ノート

炭素微粉の高速液体クロマトグラフィー用 カラム充填剤への応用

鳥谷部真実・横野哲朗・真田雄三

(平成2年3月28日受理)

Applications of Carbon Powder in Column Packing for High Performance Liquid Chromatography

Masami Toriyabe, Tetsuro Yokono and Yuzo Sanada

Performance of carbon packed columns for HPLC was tested. Carbons were prepared from PAN, nitrated and sulfonated coal tar pitches over the temperature range 600~900°C. D-glucose, sucrose and raffinose dissolved in distilled water were selected as moving phase. The highest performance of separation was obtained with the carbons baked at 800°C.

EKEYWORDS: Column Packing, High performance liquid chromatography, D-glucose, Sucrose, Raffinose, Carbon powder

1. 緒 言

著者らは *n*-パラフィンからの炭素小球体および炭素微粉を高速液体クロマトグラフィー用カラム充填剤に用いた場合、種々の多環芳香族、および芳香族酸性物質や塩基性物質などの分離が可能なことを報告した^{1),2)}。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の急速な進歩の要因となったのは様々な生体関連物質の分離法への可能性が高いからであるといわれている。本報告では HPLC の応用を計るうえで水溶性物質である糖類の分離について検討を行なった結果を述べたものである。市販されている糖類分離用カラムの中には、アミノ基等で修飾されたものが知られている^{3),4)}ことから、ここではポリアクリロニトリル (PAN) を主成分とする共重合体 Polymer-A を充填剤の出発原料として用いた。また、糖類、糖アルコール類の混合物に対してはスチレン-ジビニルベンゼン系共重合体にスルホン基を導入し、その対イオンを Na⁺ などの無機イオンにて交換した粒子をカラム充填剤として用いる方法も知られている⁵⁾。そこでピッチを硝酸または硫酸で処理した pitch-A, pitch-B についても出発原料とし、これら出発原料を所定温度で焼成、炭化

してえられる炭素微粉を充填剤とし、カラム性能の試験を行なった。

2. 実 験

2.1 充填剤の製作

充填剤としては、Polymer-A (PAN90%からなる高分子共重合体)、pitch-A (石炭系ピッチをニトロ化したもの)、pitch-B (石炭系ピッチをスルホン化したもの)、A 240 (石油系ピッチ) を原料として次の条件で熱処理し、微粉炭化物を得た。

1) Polymer-A

原料である Polymer-A を減圧乾燥器で充分乾燥させた後、横型赤外線イメージ炉で H. T. T. 600, 700, 750, 800, 850, 900°C (20°C/分, 30分間保持)、窒素雰囲気下で熱処理して炭化物を得た。これらを乳鉢で粉砕し、200メッシュ以下 (< 74 μm) の微粉炭化物を調製した。

2) ピッチ

石炭系ピッチ: pitch-A, pitch-B および石油系ピッチ: A 240 を 800°C で 30分間熱処理して得られたコークスを、200メッシュ以下に粉砕したものも充填剤として用いた。

これらの充填剤をステンレス製 HPLC 用カラム (4 mm φ, 250 mm) に乾式充填法で充填した。

2.2 高速液体クロマトグラフィーによる分離測定

HPLC は RI 検出器を装着したエルマ社製のものを用いた。試料水溶液の濃度は (~ 1 wt%) で使用した。この試料溶液 $15 \mu\text{l}$ をカラムに注入した。移動相は純水を用いた。

2.3 比表面積の測定

表面測定装置 湯浅アイオニクス社製オートソープ 1 型で BET 法 (77 K における窒素ガス吸着法) により求めた。

2.4 水素受容能力 (Aa) の測定

炭化物表面のキャラクタリゼーションとして水素受容能力を求めた。水素受容能の評価はガラス管中で炭化物と水素供与剤である 9, 10 dihydroanthracene (DHA) を 400°C , 5 分間, 反応させた後, CDCl_3 に溶解し, $^1\text{H-NMR}$ 測定を行い DHA より炭素表面に移動した水素量を既知の濃度のアセナフテンと比較して定量した⁶⁾。

2.5 pH の測定

試料 1 g を蒸留水 100 ml 中に加えて 15 分間煮沸し, 48 時間放置した後, 炭素懸濁液の水素イオン濃度を pH メーターで測定した。

2.6 比重の測定

比重の測定はピクノメーターを用いて測定した。

3. 結果および考察

3.1 Polymer-A より生成した微粉炭化物を充填剤とした場合の分離性能

Fig. 1 に Polymer-A を $600\sim 900^\circ\text{C}$ で熱処理して作成したカラムを用いた場合の糖類の分離結果を示す。Polymer-A 600, 700, 750 を用いた時の, 3 種類の糖 (D-glucose: 単糖類, sucrose: 二糖類, raffinose: 三糖

類) の分離は, Polymer-A 700, 750 に raffinose による肩が若干見える程度で全体的には保持時間がほぼ一致しこれらの試料を分離することは出来なかった。Polymer-A 800 を用いた場合は明確に 3 本のピークに分離できた。Polymer-A 850, 900 の場合, 前者は D-glucose と sucrose のピークが重なり, 後者は sucrose と raffinose が重なったピークとして検出され, 結局, 三種類に分離できなかった。

Polymer-A では, 800°C で熱処理した炭化物を用いた場合, 分離能が最も優れていることが明らかとなった。

3.2 各種ピッチより生成した微粉炭化物を充填剤とした場合の分離性能

pitch-A, pitch-B, A 240 の熱処理は Polymer-A で良好な分離能を示した焼成温度と同様に 800°C で行なった。Fig. 2 に pitch-A 800, pitch-B 800, A 240 800 炭化物を用いた場合の D-glucose, sucrose, ならびに raffinose の分離結果を示す。Fig. 2 より pitch-A 800 を用いた場合には 3 番目の raffinose のピークが裾広がりなピークとなったが満足できる分離能を示した。pitch-B 800 の場合には raffinose を検出することはできなかったが, D-glucose と sucrose の差が大きく, この 2 種類に関しては明確に分類された。

一方, A 240 800 では 3 種類の糖類の保持時間が等しく分離不可能であった。

3.3 各充填剤の特性

Table 1 に各種炭化物の水素受容能力 (Aa), pH, 比重の値を示す。ここで示した充填剤は液相炭化を経てきているので, いずれも 77 K において BET 法にて測定した比表面積は $1 \text{ m}^2/\text{g}$ 以下と小さい。また, 他の特性値 (Aa, pH, 比重) は熱処理温度 800°C で生成した炭化物

Fig. 1 Separation of sugars by HPLC using carbon powder from polymer A at various temperatures of heat treatment.

Fig. 2 A comparison of column performance in HPLC of various carbon powders.

Table 1 Properties of carbon column.

Sample	H.T.T. hydrogen acceptor ability (Aa) (°C)	(mg-H ₂ /g-coke)	pH	density (g/cm ³)
Polymer-A	600	2.55	6.84	1.407
	700	2.31	6.44	1.509
	800	2.06	6.64	1.593
	900	1.99	6.65	1.607
pitch-A	800	—	—	1.404
A240	800	—	—	—

が特異的とはなっていない。さらに3種類の糖の溶出順序が分子サイズの小さい順に検出され、平均細孔半径が約12 Å*で市販品のそれと比較するとかなり小さいことから、サイズ排除を分離機構とするカラム充填剤とは異なることが考えられる。また、移動相の極性をメタノールを加え、変化させることにより、糖類に対する保持時間が短くなることが別のシリーズの実験から明らかとなった⁷⁾。つまり、充填剤と糖類の相互作用がメタノールの存在によって大きく影響を受けたためと考えられるので、炭素表面と糖質の親和性の相違が分離能に関係していると推定される。

以上述べたことより考えられる分離機構をFig.3に示した。このモデルでは糖類は水に介して、充填剤と水素結合等の相互作用をしており、その相互作用の強弱によって分離が行なわれる機構である。しかし、詳細は明らかでない。また、糖類の分離には炭化物の光学的異方性組織とは直接関係は認められなかった。

3.4 カラムの分離能の評価

カラムの分離効率を表わすのに理論段数という概念が

*市販されている分子ふるいクロマトグラフィー用充填剤の場合、平均細孔半径は約100~300 Åである。

Fig. 3 Suggested model of separation mechanism.

Fig. 4 Height equivalent of a theoretical plate vs. flow rate of eluent.

導入されている。カラム内の分離帯を微小なプレートの集まりであると想定し、この理論段数を分離に必要な平衡の繰返しとして考えると、その繰返される平衡の理論段数が多いほど分離は良くなる。すなわち、段が多いほど効率がよいと考える。インジェクト開始時からピークの最大の点までの保持時間を t_R 、ピークのパンド幅を t_w とすると、理論段数 N は

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{t_w} \right)^2 \quad (1)$$

で表わされる⁸⁾。

理論段数 N はカラムの長さ L に比例する。この比例定数 $1/H$ の逆数 H を一理論段相当高さ (HETP, カラム効率) といい、カラムの単位長さあたりの効率を表わす。

$$H = \frac{L}{N} \quad (2)$$

したがって、 H の小さいカラムは効率の良いカラムであり、 N の小さいカラムは効率の悪いカラムを意味する。

ここでは著者らが作成した熱処理温度 800°C の Polymer-A 800, pitch-A 800 を対象に理論段数 N とカラム効率 H を求めてみた。測定は、まず各カラムで試料成分

D-glucose のみインジェクトし、流速を $0.2 \sim 0.7 \text{ ml/min}$ まで変化させたクロマトグラフを得る。そのクロマトグラフから保持時間 t_R 、ピーク幅 t_w を読み取る。それらの値とカラムの長さ 250 mm とから式 (1, 2) より理論段数 N とカラム効率 H を求める。

Fig. 4 にその結果を示す。Polymer-A 800 は流速 $0.5 \sim 0.6 \text{ ml/min}$ に極小値をもっている。これは著者らが主として行なっていた実験条件に一致している。pitch-A 800 は 0.4 ml/min に極小値をもっており、その時のカラム効率は他の流速の場合より小さくなった。すなわち最も効率の良い流速は 0.4 ml/min であった。両カラムともカラム効率は市販されているカラムの $1/50$ ぐらいであり、今後改良をしていく必要がある。

今後は 800°C 付近の炭素の物理化学構造の解明と分離能の相関および分離機構に関する研究が課題であろう。

炭素化合物は特有の耐熱性、耐薬品性を備えているので種々の移動相のもとで膨張も収縮も少ないクロマトグラフィー用充填剤として発展する可能性があらう。

文 献

- 1) T. Yokono, M. Nakahara, K. Makino and Y. Sanada, *J. Material Sci. Lett.* **7**, 894 (1988)
- 2) 横野哲朗, 中原昌彦, 真田雄三, 炭素 **1988** [No. 134] 188
- 3) F.M. Rabel, A.G. Caputo and E.T. Butts, *J. Chromatogr* **73**, 126 (1976)
- 4) N.Y. Kim and L.S. Wolfe, *Anal. Biochem.* **102**, 213 (1980)
- 5) 日本分析化学会関東支部編 “高速液体クロマトグラフィーハンドブック” p. 99 丸善 (1985)
- 6) S. Iyama, T. Yokono and Y. Sanada, *Carbon* **24**, 423 (1986)
- 7) 鳥谷部真実, 横野哲朗, 真田雄三, 未発表
- 8) L.R. Snyder and J.J. Kirkland 著, 小島次雄, 春木達郎訳 東京化学同人 高速液体クロマトグラフィー p. 22