

究極のHPLC用C18カラムの開発を目指して

Aiming for the development of the ultimate C18 column for HPLC

一般財団法人化学物質評価研究機構 東京事業所 クロマト技術部技術課長 **内田 文晴**
 Takeharu Uchida (Section chief)
 Chromatography Department, CERI Tokyo, Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan (CERI)



キーワード

L-column3、シリカ系耐アルカリ性C18カラム、メタルフリーカラム

01 | はじめに

現在、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で最もよく用いられている分離モードは、試料と固定相との間に働く疎水性相互作用の原理を用いた逆相分配クロマトグラフィーであり、充填剤としてオクタデシルシリル (ODS) 化シリカゲルを充填したシリカ系逆相C18カラムが汎用的に用いられている。また、それらの充填剤の基材には、一般的にシリカゲルを用いたものが多い。その理由として、シリカゲルは機械的強度が高い、分離効率が高い、様々な修飾基を化学修飾することができ汎用性が高い、比較的安価であるなどが挙げられる。しかしながら、基材シリカは耐アルカリ性が低いいため、使用できる移動相のpH範囲に限られるという欠点を抱えている。

シリカ系逆相C18カラムは、本来疎水性相互作用のみによる比較的単純な保持機構による分離であるが、残存シラノール基や基材シリカ中の金属不純物による二次的相互作用が働き分離に悪影響を及ぼすことが広く知られている。

これらの二次的相互作用以外にも、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC/MS/MS) において、クロマトグラフィー管などの金属材料と相互作用し分離に悪影響を及ぼす場合もある。

ここでは、これらの欠点を克服すべく今まで開発に取り組んできた内容について簡単に紹介する。

02 | エンドキャッピング

分析対象物質が塩基性物質の場合、残存シラノール基に吸着し易く、ピークのテーリング及び保持時間の遅延の原因となる。そのため、一般的にトリメチルシリル化による残存シラノール基を不活性化するエンドキャッピングが施される。1980年代後半までは一般的にエンドキャッピ

ングは、トルエンなどの液相中でシリル化剤を反応させる方法がよく知られていたが、このようなエンドキャッピングでは反応効率が低く、シラノール基が残存するという問題があった。そこで、CERIでは全く新しい画期的なエンドキャッピング法である高温気相エンドキャッピング法を開発し、1990年に高温気相エンドキャッピングを施したL-column ODSを開発した。この高温気相エンドキャッピング法は、高温液相中でシリル化する方法に比べて反応効率が優れているため、より多くのシラノール基を不活性化することができる^{1,2)}。

また、2007年に高温気相エンドキャッピングの反応効率を更に向上させた高度エンドキャッピング法を開発し、それを施したL-column2 ODSを開発した(図1)。

金属不純物を多く含んだ基材シリカも残存シラノール基と同様、二次的相互作用が働き分離に悪影響を及ぼすことが知られており、特に分析対象物質が配位性化合物の場合、ピークのテーリング及び保持時間の遅延、最悪の場合ピークが全く検出されないこともある。そのため、金属不純物を含まない基材シリカを用いることも重要である³⁾。また、エンドキャッピングの表面被覆が高密度であるほど、吸着性が少なくなるといわれている。

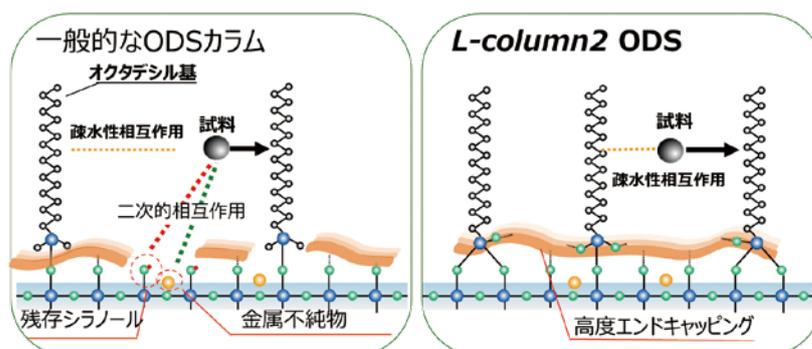
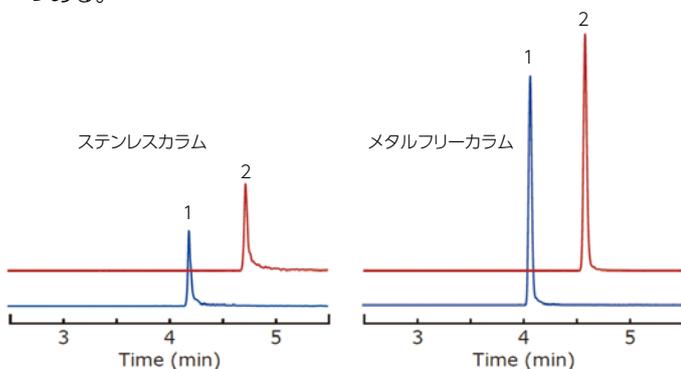


図1 シリカ系逆相C18 (ODS)カラムの分離機構(イメージ)

03 | メタルフリーカラム

液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC/MS/MS) による生体試料の微量分析が広く行われている。しかし、一部の化合物、特にペプチドや低分子のリン酸化合物の分析では、配管やバルブなどの金属材料と相互作用し、それらのピークが大きくテーリングする。一般的に、カラムは充填剤とステンレス製のクロマトグラフィー管、フリットと呼ばれるフィルターなどから構成されているが、これらとも相互作用し、ピークがテーリングする原因となっている。そこで、試料との相互作用が起こりにくいガラスライニングステンレス管とポリマー系のフリットを組み合わせたメタルフリーカラムを2014年に開発した⁴⁾。

このカラムは金属配位性化合物のLC/MS/MS分析において、ピーク形状や感度の改善、キャリアオーバーの低減、定量範囲の拡大⁵⁾、不確かさの低減⁶⁾など有効性が確認された(図2)。また、メタボロミクスやリポドミクスなどの分野でも使用されつつある。



分析条件

充填剤	L-column2 ODS, 3 μ m
カラムサイズ	メタルフリーカラム 2.0 mm I.D. or ステンレスカラム 2.1 mm I.D., 150 mm L.
溶離液	A:0.1% 甲酸; B:アセトニトリル A/B:95/5-50/50 (0-10 min)
流速	0.2 mL/min
カラム温度	40°C
試料	リン酸化ペプチド(1:NVPL-pY-K, 2:HLADL-pS-K)
試料濃度	500 fmol/ μ L
注入量	3 μ L
検出	ESI-MS/MS(+)

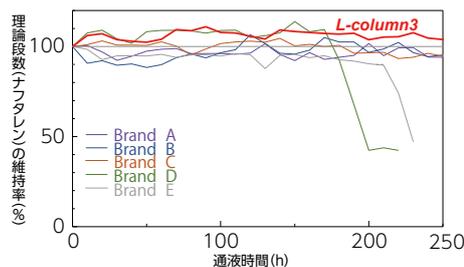
図2 カラム材質の違いによるリン酸化ペプチドの分析結果
(左)ステンレスカラム、(右)メタルフリーカラム

04 | L-column3

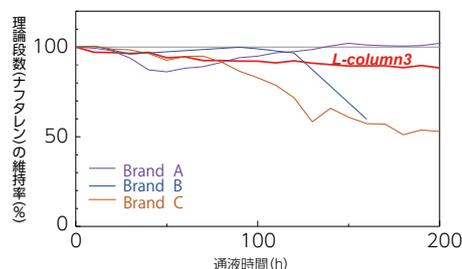
HPLC分析においてカラムは常に移動相に晒され続ける。このことはシリカ系逆相C18カラムなどの充填剤表面が常に加水分解のリスクに晒されているということを意味する。シリカ系逆相C18カラムは、シリカゲル表面をアルキル基で高密度に修飾しているため、中性移動相での耐久性は十分に維持される。しかし、アルカリ性移動相となると基材シリカは簡単に侵食されはじめ、やがてカラム先端に隙間が生じカラム性能は著しく低下する。シリカ系カラムにおけるアルカリ性の耐久性の向上について、残存シラノール基の問題と同様に各カラムメーカーも

様々なアプローチで改善を目指している。ただし、残存シラノール基についてはエンドキャッピングの反応率をいかに上げるかという比較的シンプルな方法論での対処が可能であったが、化学的耐久性については、充填剤のほとんどを占める基材自体の侵食を防ぐ必要があるため、この課題は非常に複雑で解決困難なテーマであるといえる。

しかし、CERIでは独自に開発した化学的耐久性の非常に高いPCSシリカ(Perfect Chemical Stable Silica)と耐久型高度エンドキャッピングにより、これらの課題の克服に成功したL-column3を2017年9月より供給を開始した。L-column3とpH 12まで使用可能な他社製カラムとの耐アルカリ性を評価するため、これらのカラムに対してトリエチルアミン(pH 12.2)及びリン酸緩衝液(pH 11.5)による通液劣化試験を行った。その結果を図3に示す。トリエチルアミンの通液において、Brand D及びBrand Eは200時間前後で理論段数の著しい低下が認められた。一方、250時間以上安定していたBrand B及びBrand Cも、リン酸緩衝液の通液では150時間以内に著しい低下が認められた。これはカラムがアルカリ性移動相の種類にも大きく影響を受けるということを示している。L-column3はいずれのアルカリ性移動相の通液条件においても安定していることから、非常に耐アルカリ性が高いことがわかる。つまり、



充填剤	C18 5 μ m
カラムサイズ	2.0 or 2.1 \times 150 mm
通液劣化試験条件	
移動相	54 mMトリエチルアミン(pH12.2)/メタノール(90/10)
流速	0.2 mL/min、カラム温度:50°C
ナフタレン測定条件	
移動相	水/アセトニトリル(40/60)
流速	0.2 mL/min、カラム温度:40°C

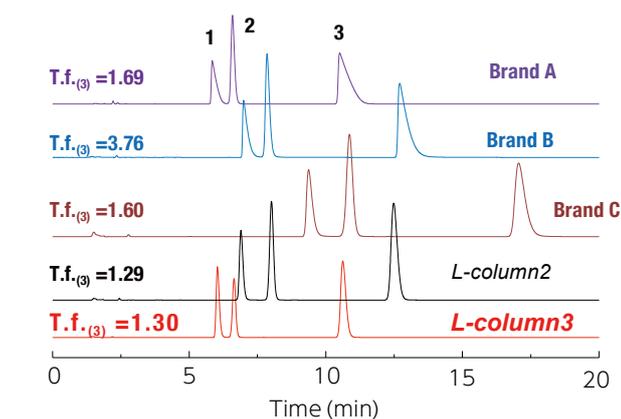


充填剤	C18 5 μ m
カラムサイズ	2.0 or 2.1 \times 150 mm
通液劣化試験条件	
移動相	10 mMリン酸緩衝液(pH11.5)/メタノール(90/10)
流速	0.2 mL/min、カラム温度:40°C
ナフタレン測定条件	
移動相	水/アセトニトリル(40/60)
流速	0.2 mL/min、カラム温度:40°C

図3 アルカリ性移動相の通液劣化試験
上)54 mMトリエチルアミン(pH12.2)/メタノール(90/10)
下)10 mMリン酸緩衝液(pH11.5)/メタノール(90/10)

L-column3 は非常に幅広いpH領域(pH 1~pH 12)でメソッド設計が可能なカラムといえる。

また、L-column3 は極限まで残存シラノール基を不活性化しており、塩基性物質、配位性化合物及び酸性物質の全てに対してシャープなピークを示す。図4に、塩基性物質である抗うつ剤の分析結果を示す。L-column3 は左右対称なシャープなピークが得られた。一方、L-column3 と同等の耐アルカリ性を示したBrand Aは、吸着性に関してはL-column3 より劣る結果であった。L-column3 は多岐の物質にわたりオールラウンドに最高レベルの低吸着性を発揮するカラムといえる。



分析条件

充填剤	C18 5 μ m
カラムサイズ	4.6 \times 150 mm
移動相	アセトニトリル/25 mMリン酸緩衝液 (pH7) (35/65)
流速	1 mL/min, カラム温度:40 $^{\circ}$ C
試料	1. パロキセチン 2. シタロプラム 3. フルオキセチン
注入量	1 μ L

図4 低吸着性(塩基性物質)

05 | L-column3で広がる アプリケーション

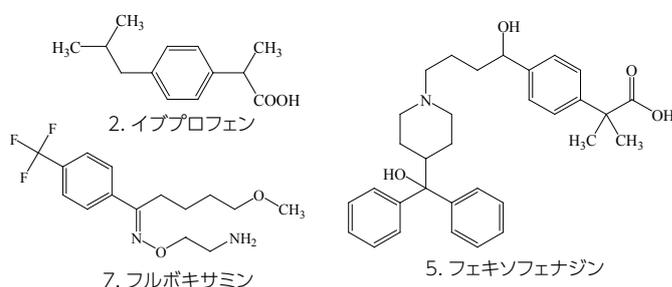
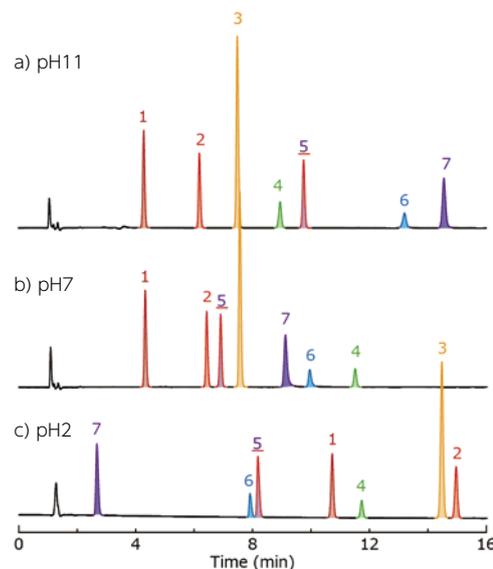
L-column3は非常に幅広いpH領域(pH 1~12)でメソッド設計が可能なことから、イオン性化合物の分析に対してその性能を十分に発揮することができる。それは、イオン性化合物の解離状態が移動相のpHによって変化し、保持が大きく変化するからである。そのため、移動相のpH変化が分離改善に大きく寄与する。図5に、L-column3を用いてイオン性化合物を分析したものを示す。移動相のpHを2、7、11に変更することで、イオン性化合物の保持時間を変化させることができる。

酸性物質であるイブプロフェンのpKaは4.5であることから、pH 2の移動相では解離が抑えられた状態となるので、保持時間は最も長くなる。一方、pH 7及びpH 11の移動相ではほとんど解離しているため、保持時間は短くなる。

塩基性物質では、酸性物質と逆の傾向となる。塩基性物質であるフルボキサミンのpKaは9.2であることから、pH 2及びpH 7の移動相ではほとんど解離しているため保持時間が短くなるが、pH 11の移動相では解離が抑えられた状態になることから、保持時間が最も長くなる。この挙動は他の塩基性物質及び酸性物質でも同様の傾向が見られた。

一方、両性物質であるフェキソフェナジンのpKaは4.3及び

9.5である。pH 2の移動相では構造中のピペリジノ基のほとんどが解離し、カルボキシル基は解離が抑えられた状態となり、pH 11の移動相では逆に構造中のピペリジノ基は解離が抑えられた状態で、カルボキシル基がほとんど解離している。また、pH 7の移動相では、構造中のピペリジノ基及びカルボキシル基の両方がほとんど解離しているため、保持時間が最も小さくなる。このような両性物質に対しても、L-column3を用いれば、広範囲な移動相条件から移動相のpHに制約されることなく、目的に応じた分析条件を選択することができる。



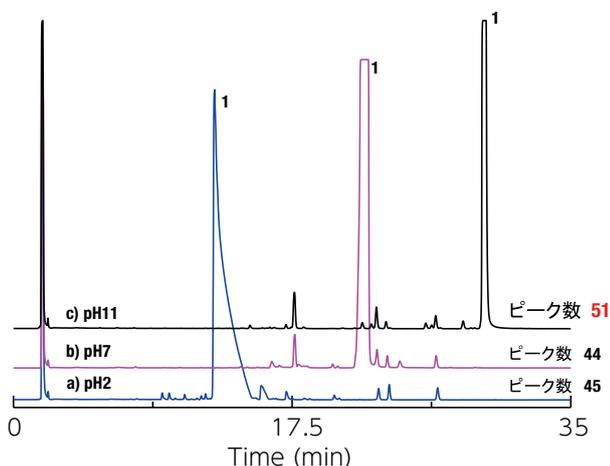
分析条件

カラム	L-column3 C18 5 μ m, 2.1 \times 150 mm
移動相	A: アセトニトリル; B: 25 mMリン酸緩衝液 (pH2,7,11) A/B: 20/80-70/30 (0-20 min)
流速	0.3 mL/min, カラム温度:40 $^{\circ}$ C
試料	1. ケトプロフェン(酸性) 2. イブプロフェン(酸性) 3. インドメタシン(酸性) 4. イソプロピルパラベン(弱酸性) 5. フェキソフェナジン(両性) 6. トリプロリジン(アルカリ性) 7. フルボキサミン(アルカリ性)
注入量	1 μ L

図5 L-column3を用いた移動相のpHによるイオン性化合物の分離パターン変化

現在、医薬品の開発において原薬中の不純物に関するガイドラインが発行されており、新規医薬品の申請時に、不純物や医薬品の保存中に生成する分解生成物等についての分析法、構造決定及び安全性評価をしたものを添付する必要がある。図6に、塩基性医薬品であるホモクロルシクリジンの分解生成物を分析した例を示す。それぞれのクロマトグラムを比較すると、pH 11の移動相が一番多くピークを検出することができた。また、移動相のpHによりピーク数が異なることから、pHを

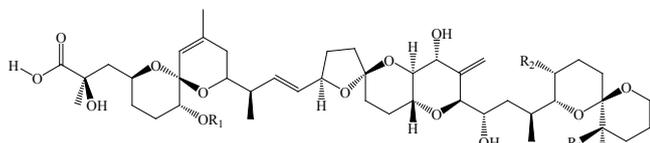
高くすることで今までは分離することができなかった不純物のピークを分離する可能性が示唆され、pH 11でも分析可能なL-column3が、医薬品の不純物分析に有効であることが示された。また、移動相のpHが高くなるほど負荷量によるピーク形状の変化が小さくなり、pH 11の移動相では高負荷量の試料を注入してもシャープなピークとして検出することができた。このことから、塩基性物質を大量に負荷させる分取精製において、L-column3が有効であることが示された。



分析条件

カラム	L-column3 C18 5 μm , 2.1 \times 150 mm
移動相	A: アセトニトリル; B: 25 mM リン酸緩衝液 (pH2,7,11) A/B: 5/95-75/25-75/25 (0-30-40 min)
流速	0.2 mL/min, カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$
試料	10 g/L ホモクルシクリジンの分解生成物
注入量	5 μL

図6 ホモクルシクリジンの分解生成物の分析



No.	化学物質	R1	R2	R3	R4
1	オカダ酸 (OA)	-H	-CH ₃	-H	-H
2	ディノフィシトキシシン-2 (DTX-2)	-H	-H	-H	-CH ₃
3	ディノフィシトキシシン-1 (DTX-1)	-H	-CH ₃	-CH ₃	-H

オカダ酸: 関東化学株式会社製 (製品番号49915-09, CAS.No 78111-17-8)
 ディノフィシトキシシン-1: 関東化学株式会社製 (製品番号49915-06, CAS.No 81720-10-7)
 ディノフィシトキシシン-2: 関東化学株式会社製 (製品番号49915-07, CAS.No 139933-46-3)

図7 オカダ酸群の化学構造

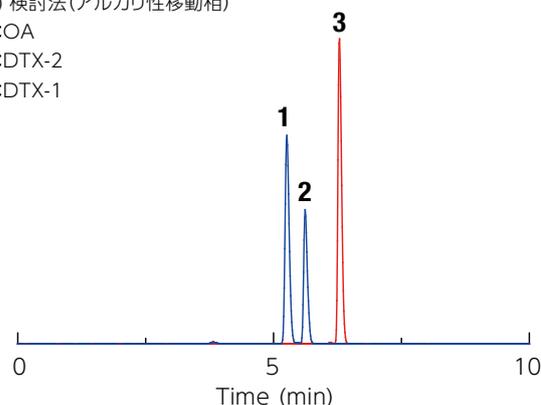
次に、L-column3を用いて下痢性貝毒であるオカダ酸群を分析した例を紹介する。オカダ酸 (OA) や異性体であるディノフィシトキシシン (DTX) は、構造中にカルボキシル基を有する毒素である (図7)。公定法では、移動相にギ酸アンモニウムやギ酸を加えて酸性にすることで、カルボキシル基の解離が抑制された状態で分析をしている。しかし、マトリックス効果により感度が不安定であるという問題がある。

最近では、LC/MS/MS分析にアルカリ性移動相を用いている例も報告されている⁷⁾。これは、移動相をアルカリ性にすることでカルボキシル基が解離状態となるため、イオン化効率が改善されて感度を向上することができるからである。我々も、移動相にアンモニア水を用いたアルカリ性移動相でおカダ酸群を分析した。分析に用いたオカダ酸群は、関東化学株式会社か

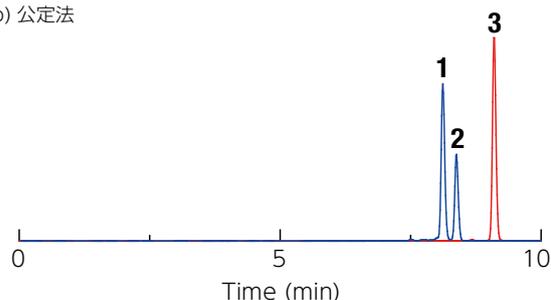
ら購入したものをを用いた。その結果を図8に示す。上側のクロマトグラムが移動相にアンモニア水を使用して分析したものの、下側のクロマトグラムが移動相にギ酸アンモニウム及びギ酸を使用した公定法で分析したものである。これらを比較すると、アンモニア水を使用することで、公定法と比較して三成分とも感度を向上し、OAとDTX-2間の分離も改善することができた。このことから、アルカリ性移動相を用いたオカダ酸群の分析にL-column3が有効であることが確認された。

a) 検討法 (アルカリ性移動相)

- 1: OA
2: DTX-2
3: DTX-1



b) 公定法



分析条件

カラム	L-column3 C18 3 μm , 2.1 \times 150 mm
溶離液	a) A: 5 mM アンモニア水 (pH10.5); B: アセトニトリル/5 mM アンモニア水 (pH10.5) (95/5) b) A: 2 mM ギ酸アンモニウム及び50 mM ギ酸; B: アセトニトリル/2 mM ギ酸アンモニウム及び50 mM ギ酸 (95/5) A/B: 60/40-60/40-100/0-100/0 (0-2.5-7.5-12.5 min)
流速	0.2 mL/min, カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$
試料濃度	380 $\mu\text{g/L}$ (OA), 840 $\mu\text{g/L}$ (DTX-2), 850 $\mu\text{g/L}$ (DTX-1), 注入量: 5 μL
検出	ESI-MS/MS(-)

図8 L-column3を用いたオカダ酸群の分析 a) 検討法, b) 公定法

06 | おわりに

本稿では、これまでCERIで開発したシリカ系逆相C18カラムについて紹介してきた。いずれのカラムも様々な試行錯誤の中で開発できたものである。しかし、その中でも耐アルカリ性カラムの開発は、基材シリカ自体が持つ化学的特徴に関わることであるため、最もハードルの高いものであった。そのような中、近年の耐アルカリ性カラムの登場は、先に紹介したように今後のHPLC分析、LC/MS/MS分析等において広がりを持たせることができる重要なツールの一つとして期待できる。しかしながら、シリカ系逆相C18カラムが登場して以来、耐アルカリ性が低いということが周知の事実として広く認知されていたため、アルカリ性移動相を使用したアプリケーションデータは酸性及び中性移動相と比べて遥かに少ないのが実情であり今後の課題である。

参考文献

- 1) Y. Sudo, *J. Chromatogr. A* **737**(2), 139-147 (1996).
- 2) Y. Sudo, *J. Chromatogr. A* **757**(1-2), 21-28 (1997).
- 3) Y. Sudo, T. Wada, *J. Chromatogr. A* **813**(2), 239-246 (1998).
- 4) H. Sakamaki, T. Uchida, L. W. Lim, T. Takeuchi, *J. Chromatogr. A* **1381**, 125-131 (2015).
- 5) H. Sakamaki, T. Uchida, L. W. Lim, T. Takeuchi, *Anal. Sci.* **31**(2), 91-97 (2015).
- 6) S. Shibayama, H. Sakamaki, T. Yamazaki, A. Takatsu, *J. Chromatogr. A* **1406**, 210-214 (2015).
- 7) A. Gerssen, P. P. J. Mulder, M. A. McElhinney, J. de Boer, *J. Chromatogr. A* **1216**(9), 1421-1430 (2009).