

理想のHPLC用ODSカラムを求めて

Research and Development for Ideal ODS Column of HPLC

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 須藤 良久

YOSHIHISA SUDO

Chromatography Department, Chemicals Evaluation and Research Institute, Tokyo

1. 緒言

オクタデシルシリル (ODS) 化シリカゲルを代表とするシリカゲル系逆相充填剤は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) のための固定相として最も広く使われている。その理由は、機械的強度が高い、理論段数が高い、種々な修飾基が導入でき汎用性が高い、比較的値段が安い、などが挙げられる。

逆相HPLCの保持機構を説明するのにソルボホビック (疎溶媒性) 相互作用^{1, 2)}がよく用いられる。このモデルによると、溶質と非極性固定相との間の疎水性相互作用よりも、溶質と極性移動相との間の反発が、溶質と固定相との会合を引き起こすとしている。従って、中性分子であれば、その保持容量は疎水性 (例えば logPow がその指標になる) と比例し、logPow が分かれば保持容量が推定できる。しかし、水と混合する有機溶媒が異なれば溶質によって反発力が異なる。このため分離を改善するには、有機溶媒の種類を換えるのが一つの方法となる。特に、水-アセトニトリルあるいはメタノールの混合溶媒にテトラヒドロフランを少量添加すると溶出パターンが大きく変化することはよく知られている。

このように逆相HPLCの保持機構は、比較的単純である。しかし、それを複雑にしている大きな要因は残存シラノールとシリカゲル中の金属不純物である。これらを克服して、どんな物質でも誰でも容易にHPLC分析できるカラムを創ることが私どもの開発コンセプトである。

2. ODSが抱える問題

2.1 残存シラノール

シリカゲル表面のシラノールには孤立シラノール、ビシナル (会合した) シラノール、ジェミナルシラノール (図1) の3種類があるとされている³⁾。孤立シラノールの多いシリカゲルか

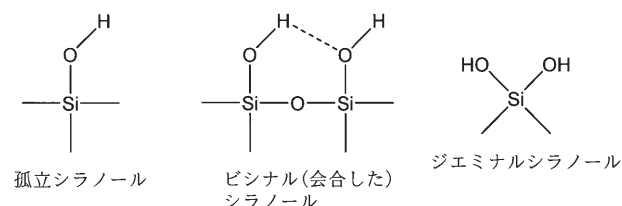


図1 シリカゲル表面のシラノール基

ら合成したトリメチルシリル化シリカゲルは、塩基性化合物との相互作用が強く、しかもトリメチルシリル基が加水分解し易い。一方、ビシナルシラノールがシリカゲル表面に均一に分布しているシリカゲルから合成した充填剤は、塩基性化合物に対する吸着性が低く、加水分解され難いと報告されている^{4, 5)}。このように基材シリカゲルの性質がシリカゲル表面を化学修飾してできた充填剤の性質に影響を与えることが明らかにされており、このことがシリカ系充填剤のメーカー間あるいはロット間のばらつきの原因の一つとなっている。

代表的逆相充填剤であるODS化シリカゲルは図2及び3に示す手順で合成されるが、シリカゲルを充分ODS化し

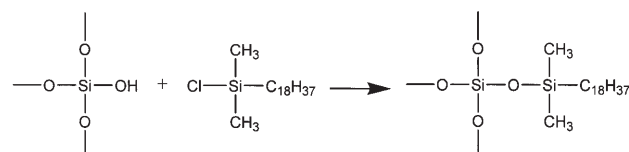


図2 ジメチルオクタデシルクロロシランを用いたODS化

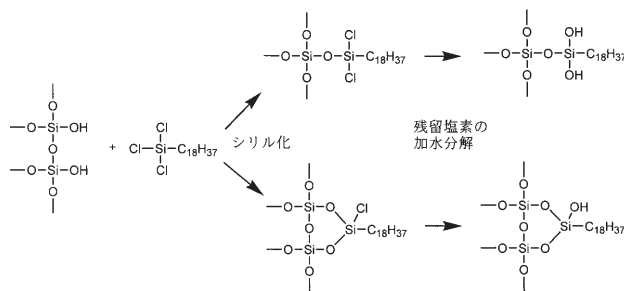


図3 オクタデシルトリクロロシランを用いたODS化

た後も、シリカゲル表面にはシラノール基が残存し⁶⁾、保持機構に影響を与える^{7, 8)}。残存シラノールは、塩基性溶質との親シラノール相互作用によって高い選択性を発揮するため、分離に寄与することが報告された⁸⁾。しかし、塩基性化合物の逆相HPLCにおいては、ピークのテーリング及び再現性の低下が生じ、予期できない長い保持時間の原因となる。この残存シラノールの影響を除くため色々な研究が行われてきた。溶質と残存シラノール基とのこの好ましくない相互作用は、移動相修飾剤の使用、あるいは固定相のエンドキャッピングによりある程度抑制できる。

移動相に各種のアミンを添加することによりピークのテーリングは改善するが⁹⁻¹²⁾、この改善はアミンがシラノール基を封鎖することによると説明された^{8, 13, 14, 15)}。酢酸アンモニウムもシラノールの抑制剤として使用できるとされた¹⁶⁾。また、塩基性溶質と移動相に添加されたアルキルスルホン酸塩とのイオンペアの形成によっても、塩基性溶質の残存シラノールへの吸着を防ぐことができる^{8, 14, 17)}。

一方、ODS化されたシリカゲルは、残存シラノールを除くためにトリメチルシリル化による「エンドキャッピング(二次シリル化)」が施されている。エンドキャッピング剤としては、トリメチルクロロシラン(TMCS)及びヘキサメチルジシラザン(HMDS)が一般に用いられてきた^{18, 19)}。HMDSによるエンドキャッピングは塩基性化合物の分離に効果的であり、水酸基を持った化合物にはTMCSがよいという報告もある²⁰⁾。N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamide^{21, 22)}、Trimethylsilylphosphine²³⁾あるいはTrimethylsilylimidazole²⁴⁾を用いても効果的にエンドキャッピングできるとの報告もある。また、シリカゲルのODS化の前に、全シラノールの5%をトリメチルシリル化することにより、高い効率をもつ充填剤が得られること²⁵⁾、またダブルエンドキャッピングが有効であるという報告もある²⁶⁾。しかし、これらの方法では残存シラノールを完全にはエンドキャッピングできないため、塩基性溶質のHPLCでは移動相へのアミン類などの抗テー

リング剤の添加が欠かせない。残存シラノール基の数と性質は制御することが困難であるため、塩基性化合物の吸着に関するロット間差をなくすためには残存シラノールを全てエンドキャッピングするしかない。

2.2 シリカゲル中の金属不純物

金属不純物を多く含んだシリカゲルから合成したODSは、塩基性溶質および錯体のピークのテーリングをより強く示すことから、シリカゲルに含まれる金属不純物も、ODSにおける二次的相互作用の原因となるとみなされている^{27, 28)}。また、シリカゲル表面の金属不純物が吸着活性中心を形成していると報告されている²⁹⁾。一方、シリカゲル中の金属不純物はシラノールの酸性度に影響すると考えられた³⁰⁻³³⁾。シリカーアルミナのような二成分系の金属酸化物の多くが酸性を示す³⁴⁾ことは、シリカゲル骨格中の金属不純物がシリカゲルの酸性度を高めることを示唆している。酸性のシラノールは塩基性溶質と好ましくない相互作用をする^{4, 5, 35)}。よって、塩基性溶質と金属不純物の相互作用は、直接的ではなく、残存シラノール基を通して起こると考えられる。

ODSの金属不純物と直接相互作用する配位性化合物のHPLC分析においては、移動相に金属イオン³⁶⁾あるいはキレート試薬^{37, 38)}を添加することによって、シリカゲル中の金属不純物の影響を低減できる。しかし、移動相中の添加物は、低波長でのUV検出及びLC/MS測定の影響となる。従って、シリカゲルから金属不純物を取り除く必要がある。このためにODS化前にシリカゲルを酸処理することが行われてきた³⁹⁾。

Verzele⁴⁰⁾は充填剤の金属不純物を除去するためには、シリカゲルを1Nの塩酸で煮沸することを推奨している。そのほか、シリカゲルをEDTAで処理する⁴⁾、ODSをメタノール/塩酸(60/40)で処理する²⁶⁾なども報告されている。しかし、4.4で後述するがシリカゲルの酸処理では完全に金属不純物を取り除くことはできない^{28, 40)}(表4参照)。最近では、高純度なシリカゲルの使用が、好ましくない二次的相互作用の低減に有効であるとされている^{28, 41, 42)}が、高純度シリカゲルも活性な酸性シラノールを持っているとも言われている⁴⁾。そのほか、ポリマー被覆による固定相の調製²⁸⁾、三官能性シラン化剤による固定相の合成も金属不純物の影響を低減すると報告されている⁴³⁾。しかし、これらの方法によっても、完全には目的を達成できない^{28, 43)}。

2.3 シリカゲル及び修飾基の加水分解

担体であるシリカゲル及び修飾基であるアルキルシリル基は水溶液中で加水分解し易い⁴⁴⁻⁴⁷⁾。特に、トリフルオロ酢酸を含む低いpHの移動相における修飾基の加水分解に関して多くの報告がある⁴⁸⁻⁵²⁾。修飾基の立体障害効果によりこの欠点は改善できる。すなわち、より嵩高い修飾基を用いる^{49, 50, 53)}、修飾基の導入を高密度にする⁵²⁾、十分なエンドキャッピング⁵⁴⁾、あるいは担体をポリマー被覆する^{28, 55)}などにより、加水分解に対する立体障害効果を与えることができる。また、シリカゲルの高純度化⁴¹⁾及び前処理^{5, 56)}によってもこの加水分解性を改善できる。

このようにして見て来るとODSの欠点は全て残存シラノールが関係している。従って、エンドキャッピングを完璧にすること即理想的なODSができると考えられる。

3. 新規エンドキャッピングによるODSの欠点の克服

3.1 高温シリル化のエンドキャッピングへの応用

前述のようにシリカゲルの化学修飾(ODS化など)の後のエンドキャッピングは有機溶媒中で行われてきた。一方、ガスクロマトグラフィー用キャピラリーカラムの作製においては、熔融シリカカラム内壁を不活性化するとともに固定相液体のぬれを良くするために固定相を被覆する前のカラム内壁をシリル化する。Welshら⁵⁷⁾はヘキサメチルジシラン(HMDS)を用いて、この反応を300°Cで行うことにより、極性物質に対して極めて不活性なカラムを作成できることを見出した。このシリル化は高温シリル化と呼ばれている。しかし、すでに修飾された表面に残存するシラノール基を高温シリル化する試みは行われていなかった。ODSのエンドキャッピングに高温シリル化が適応できれば、非常に不活性な充填剤が得られるはずである。そこで筆者らはこの考えを検証すべく実験を行った。

3.2 ODSの調製

ジメチルオクタデシルクロロシラン、メチルオクタデシルジクロロシランおよびオクタデシルトリクロロシランを用いて、平均粒径5 μ m、平均細孔径120nmのシリカゲルをオクタデシルシリル化して3種類のODSを調製した。これらをそれぞれODS-1、ODS-2 およびODS-3とする。調製は通常の方法³⁹⁾によった。

高温シリル化によるエンドキャッピングは次の手順で行った。ODS 3 gを内容積30mLのガラス製アンプルに入れ140°Cで4時間真空乾燥した。エンドキャッピング剤2.9mmolをこのアンプルに加えて、容器内を窒素置換した。アンプルの口を溶封し恒温槽に入れ350°Cで24時間加熱した。冷却後トルエンとメタノールで洗浄し140°Cで4時間真空乾燥した。

従来法である液相シリル化によるエンドキャッピングは次の手順で行った。ODS 10 gに乾燥トルエン38 mLとHMDS 4 mLを加え、16時間還流した。その後トルエンとメタノールで洗浄し140°Cで4時間真空乾燥した。

3.3 ODSの評価法

充填剤の評価のためには、クロマトグラフィーによる方法と分光学的な測定が用いられる。ピリジンは残存シラノールと強く相互作用する^{58, 59)}ため、試験物質としてよく用いられる。この相互作用が強いほどピリジンの保持時間は長くなり、またピークテーリングが大きくなる。これらの現象はピリジンと基準物質であるフェノールとの分離係数 $\alpha_{ph/py}$ およびアシンメトリー係数 As により数値で表すことができる。 $\alpha_{ph/py}$ が大きいほど、あるいは As が1に近いほど残存シラノール基の影響が小さいと評価される。 $\alpha_{ph/py}$ は次式で定義される。

$$\alpha_{ph/py} = k_{ph} / k_{py} \quad (1)$$

ここで、 k_{ph} および k_{py} は、それぞれフェノールおよびピリジンのキャパシティーファクターであり、次式で定義される。

$$k = (t_R - t_0) / t_0 \quad (2)$$

ここで、 t_R は溶質の保持時間、 t_0 はデッドタイムである。アシンメトリー係数は次式で定義される。

$$As = b/a \quad (3)$$

ここで、 a はピーク高さの10%の位置におけるピークの前半のピーク幅、 b は後半のピーク幅である。

充填剤のIRスペクトル測定には拡散反射法が用いられる^{4, 5, 60)}。ODSのIRスペクトルからは残存シラノール基の種類および濃度の情報が得られる⁶¹⁾。シリカゲルのIRスペクトルの吸収帯の帰属は文献などに要約されている⁶²⁾。また、シリカゲル表面の修飾基の定量は、拡散反射フーリエ変換FT-IRスペクトルによって得られた吸収バンドの面

積を使用することにより可能である⁶³⁾。

4. 結果と考察

4.1 高温シリル化エンドキャッピングにおける反応温度の効果

ODS-1をHMDSによりエンドキャッピングした場合の反応温度の効果を表1に示す。高温シリル化エンドキャッピングされたODS-1は、液相シリル化エンドキャッピングされたODS-1よりもピリジンの早い溶出、すなわち大きな $\alpha_{ph/py}$ を示した。また、ピリジンのピークテーリングも小さくピーク形状は良好であった。これらの結果は、高温シリル化により固定相の残存シラノールが効果的に減少したことを示している。一方、反応温度が高くなるに従って炭素含量が大幅に減少したが、ピリジンのピーク形状は反応温度の高い方が良く、ピリジンに対する吸着性は低いと判断される。これはODS基がエンドキャッピング剤のトリメチルシリル基により置換されたことを示唆している。表1に示したようにエンドキャッピング剤を用いずに同じ条件でODS-1を加熱した場合には、炭素含量の減少は極わずかであり、このことは炭素含量の減少が主にオクタデシル基とトリメチルシリル基の置換反応が原因であるという考えを支持する。

表1 高温シリル化の温度効果

充填剤番号	エンドキャッピング温度(℃)	k'		$\alpha_{ph/py}$	ピリジンのAs	炭素含量の変化 ^a (%)	窒素含量(%)
		ピリジン	フェノール				
1	250	0.83	2.89	3.48	2.47	+2.0	0.07
2	300	0.86	2.93	3.41	2.47	-8.4	0.10
3	350	0.93	2.91	3.13	2.09	-23.7	0.25
4	トルエン還流	1.40	2.97	2.12	—	+1.9	0.08
5 ^b	350	2.21	2.94	1.33	2.70	-4.3	0.01

ODS化剤：ジメチルオクタデシルクロロシラン(炭素含量17.58%)，エンドキャッピング剤：ヘキサメチルジシラザン(反応温度350℃，反応時間24時間)

a 炭素含量の変化は $(C_1-C_0)/C_0 \cdot 100$ で定義され、 C_0 と C_1 はそれぞれエンドキャッピング前と後の炭素含量である。

b 充填剤番号5はエンドキャッピング剤なしで、充填剤番号3と同じ操作を行った。

4.2 モノ、ジ、およびトリクロロオクタデシルシランから合成したODSのエンドキャッピング効果の比較

エンドキャッピング時に炭素含量が大幅に減少するのは、充填剤の性能および製造ロットの再現性において好ましくない。ところで、ODSのオクタデシルシリル基は酸性移動相中で加水分解されるが、トリクロロシランによって合成されたODS-3は、モノクロロシランによって合成されたODS-1より加水分解されにくいことが知られている⁴⁹⁾。そ

の理由は次のように考えられる。ODS-3のオクタデシルシロキシ基($C_{18}H_{37}Si-O-$)のケイ素原子に結合している2個の置換基は電気的に陰性なオキシ基なので、ODS-3のオクタデシルシロキシ基のケイ素が最も親電子的な攻撃を受け難い。これに対して、ODS-1のオクタデシルシロキシ基のケイ素原子に結合している2個の置換基は、電子供与基であるメチル基なので、ODS-1のオクタデシルシロキシ基のケイ素が最も親電子的な攻撃を受け易い。このことは高温シリル化でも同様であると考えられるので以下の方法で検証した。

モノ、ジ、およびトリクロロオクタデシルシランから合成したODS-1、ODS-2およびODS-3をHMDSにより反応温度350℃、反応時間24時間によりエンドキャッピングした結果を表2に示す。トリクロロオクタデシルシランから得られたオ

表2 3種類のODS化剤で合成したODSの高温シリル化効果

充填剤番号	ODSの種類	k'		$\alpha_{ph/py}$	ピリジンのAs	原料ODSの炭素含量(%)	炭素含量の変化(%)	窒素含量(%)
		ピリジン	フェノール					
3	ODS-1	0.93	2.91	3.13	2.09	17.58	-23.7	0.25
6	ODS-2	0.87	2.82	3.24	2.05	17.79	-11.1	0.20
7	ODS-3	1.05	2.79	2.66	1.93	17.47	+1.6	0.14

エンドキャッピング剤：ヘキサメチルジシラザン(反応温度350℃，反応時間24時間)
各ODSに使用したODS化剤：ODS-1=ジメチルオクタデシルクロロシラン，ODS-2=メチルオクタデシルジクロロシラン，ODS-3=オクタデシルトリクロロシラン

クタデシルシリル基は、高温シリル化においても安定であることが確かめられた。なお、 $\alpha_{ph/py}$ はODS-3が最も小さかった。しかし、HMDSは反応性が高く試薬自身が不安定なためか、反応の再現性があまり良くない。また、充填剤の窒素含量が比較的高く含窒素化合物が生成し残留していることを示している。このため $\alpha_{ph/py}$ の値を底上げしている可能性がある。しかも、この含窒素化合物が充填剤の寿命を短くする可能性もある。

以上のことから、高温シリル化によるエンドキャッピングを行うためには、ODSは三官能性シリル化剤を用いて合成することが望ましく、エンドキャッピング剤としてHMDSはあまり好ましくないと結論付けられた。

4.3 高温シリル化エンドキャップ剤としてのシクロシロキサン

シクロシロキサン及びポリシロキサンもGC用キャピラリーカラムの不活性化によく用いられる。通常は反応性が低く比較的安定な化合物であるが、キャピラリーカラムの高温シリル化では高い反応率を示す。そこで、シクロシロキサンを用いてODS-3を高温シリル化エンドキャッピングし

た。その結果を表3に示す。HMDSの方がシクロシロキサ

表3 オクタデシルトリクロシランで合成したODS-3の高温シリル化での反応温度効果

充填剤番号	エンドキャッピング 温度(°C)	k'		$\alpha_{ph/py}$	ピリジンのAs	炭素含量の 変化(%)	窒素含量(%)
		ピリジン	フェノール				
8	250	1.75	2.79	1.59	4.53	+4.4	0.03
9	300	1.33	2.51	1.89	1.45	+6.9	0.02
10	350	1.15	2.83	2.46	1.24	+1.0	0.04

エンドキャッピング剤：シクロシロキサン（反応時間24時間）

ンより大きな $\alpha_{ph/py}$ を示した。しかし、アシンメトリー係数Asはシクロシロキサンの方が小さく、また反応の再現性も高かった。さらに、窒素含量はODS-1と比べて大幅に少なく(表1参照)、それが $\alpha_{ph/py}$ に影響した可能性が高い。ODS-3をシクロシロキサンで高温シリル化した充填剤とトルエン還流下でトリメチルシリル化エンドキャッピングした充填剤を充填したカラムのピリジンとフェノールのクロマトグラムを図4に示す。高温シリル化エンドキャッピングした方がピ

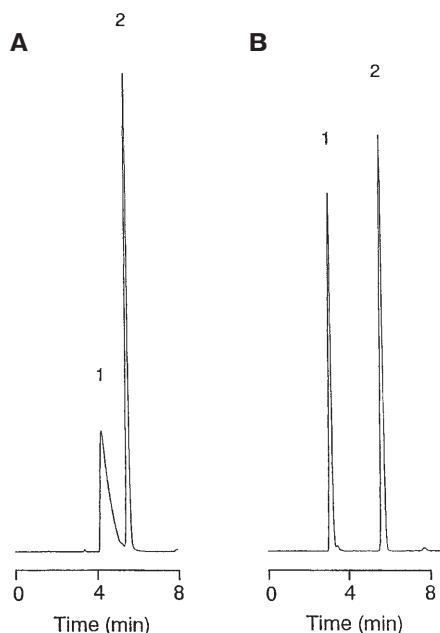


図4 液相シリル化によりエンドキャッピングされたODS-Cl₃ (A) 及び高温シリル化によりエンドキャッピングされたODS-Cl₃ (B) におけるピリジンおよびフェノールのクロマトグラム

HPLC条件 移動相：アセトニトリル/水=30/70, 流速：1mL/min, 検出：UV254 nm. ピーク1：ピリジン, ピーク2：フェノール

リジンのピークが非常に先鋭である。また、両充填剤の残存シラノール基の拡散反射FT-IRスペクトルを図5示す。スペクトルにおけるOHの吸収も高温シリル化エンドキャップ充填剤は非常に小さく、残存シラノールが非常に少ないことを示している。

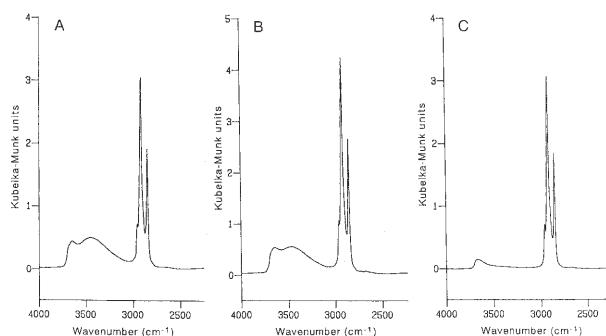


図5 ODSの拡散反射FT-IRスペクトル

(A) エンドキャッピング前のODS-Cl₃
(B) HMDSを用いて液相エンドキャッピングしたODS-Cl₃
(C) 350°Cで高温シリル化エンドキャッピングしたODS-Cl₃

4.4 シリカゲル純度の影響と塩酸処理効果

高純度シリカゲルと低純度シリカゲルを塩酸処理したものとし、4種類のシリカゲル(表4)を使って、高温エンドキャッピングしたODS中の金属不純物が塩基性化合物(ピリジン)と配位性化合物(ヒノキチオール)に及ぼす影響を検討した。

表4 高純度シリカゲルと非高純度シリカゲルの塩酸処理結果

シリカ番号	シリカゲル	塩酸処理	シリカゲル中金属含量(μg/g)					
			Na	Mg	Ca	Al	Ti	Fe
11	低純度	なし	54	188	1050	442	132	34
12	低純度	あり	<3	90	440	183	69	5.4
13	高純度	なし	<3	0.33	2.6	<3	0.13	6.4
14	高純度	あり	<3	0.08	0.4	<3	0.07	0.8

シリカ番号11と12は原料シリカゲルが同じものであり13と14が同じものである。

シリカゲルを塩酸処理し高温シリル化エンドキャッピングした場合、ピリジンの吸着に関し原料シリカの純度の影響はわずかであった。これに対して、塩酸処理なしで液相シリル化エンドキャッピングした場合は、低純度原料シリカゲルではピリジンが明確に吸着した(表5)。

表5 高純度シリカゲルと低純度シリカゲルの塩酸処理結果

充填剤番号	シリカゲル ^a	塩酸処理	$\alpha_{ph/py}$			
			ベンゼン/ヒノキチオール ^b トルエン/TMS ^d 高温シリル化 ^e	フェノール/ピリジン ^c トルエン/TMS ^d 高温シリル化 ^e		
18	低純度	なし	— ^f	— ^f	— ^f	1.59
19	低純度	あり	— ^f	— ^f	1.81	3.02
20	高純度	なし	— ^f	1.75	1.18	3.02
21	高純度	あり	1.44	1.76	2.44	3.10

a 表4参照

b HPLC条件 移動相：アセトニトリル/20 mmol/L リン酸 (4/6, v/v), 温度：40°C. 検出：UV 254 nm

c HPLC条件 移動相：アセトニトリル/水 (3/7, v/v), 温度：25°C, 検出：UV 254 nm

d エンドキャッピング トルエン還流下でのトリメチルシリル化

e エンドキャッピング シクロシロキサンを用いた高温シリル化

f 分析時間内に試験物質は溶出しなかった。

Snyderら⁶⁴⁾は、エンドキャッピングによって酸性で活性なシリカの不利な点を完全にカバーすることはできないと述べている。しかし、低純度シリカゲルは金属不純物の影響による酸性のシラノールが含まれていると考えられるが、塩酸処理した低純度シリカゲルより合成されたODSでも、高温シリル化を用いればほぼ完全にエンドキャッピングできることを表5は示している。ODSの性質は、特に塩基性溶質のHPLC分析において、メーカー間だけでなくロット間で異なり、これは主に基材シリカの性質の違いによるということはずでに述べた。しかし、塩酸処理した低純度シリカゲルによるODSを高温シリル化エンドキャッピングしたものと、高純度シリカゲルによるODSを高温シリル化エンドキャッピングしたものの $\alpha_{ph/py}$ 値はほとんど同じである。これは、高温シリル化エンドキャッピングはODSのロット間および製造者間の品質のばらつきの低減に寄与することを示唆している。

配位性化合物のヒノキチオールの結果を表5及び図6に示す。対照物質のベンゼンの保持時間がヒノキチオールよ

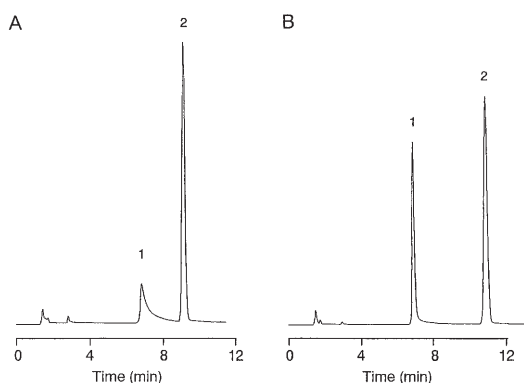


図6 液相エンドキャッピングされたODS(A)及び高温シリル化エンドキャッピングされたODS(B)を用いたヒノキチオールのクロマトグラム

HPLC条件: 移動相, アセトニトリル/20 mmol/L リン酸 (4/6, v/v); 流量, 1 mL/min; 温度, 40 °C; 検出, UV254 nm. ピーク1, ヒノキチオール200 mg/L; 2, ベンゼン2% (v/v).

り大きいと、 α (ベンゼン/ヒノキチオール) が大きいほど吸着が少なくと評価される。低純度シリカゲルでは全ての条件でヒノキチオールは溶出しなかった。高純度シリカゲルを塩酸処理し、高温シリル化エンドキャッピングしたODSが最も吸着の少ないクロマトグラムが得られた。

4.5 耐久性ODSの加水分解に対する安定性

エンドキャッピング修飾基の加水分解に対する安定性について、高温シリル化エンドキャッピングと液相シリル化エンドキャッピングの効果を比較した。酸性の移動相をカラムに通液して、定期的にカラムの $\alpha_{ph/py}$ を測定した。エンドキャッ

ピング修飾基の加水分解に対する安定性を評価した。

高温シリル化エンドキャッピングされたODSの $\alpha_{ph/py}$ 値は液相シリル化エンドキャッピングされたODSより変動が非常に小さく、安定性が高いことが示された。 $\alpha_{ph/py}$ の変動を図7に示す。

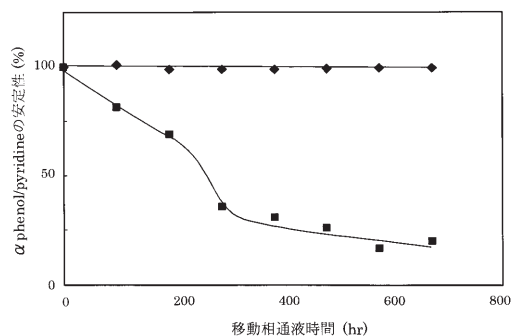


図7 高温シリル化エンドキャッピングされたODS(●)及び液相エンドキャッピングされたODS(■)の酸性移動相中での α phenol/pyridineの安定性

試験条件 移動相: メタノール/20mmol/Lリン酸pH 2.1 (1/1, v/v)
HPLC条件 移動相: アセトニトリル/水 (3/7, v/v), 流量: 1 mL/min, 温度: 25°C, 検出: UV 254 nm, 試験物質: ピリジン及びフェノール

Glajchら⁶⁵⁾は、エンドキャッピングにより導入されたトリメチルシリル基は酸性移動相中で加水分解するので、エンドキャッピングは長期使用には効果がないとしている。しかし、高温シリル化エンドキャッピングによって導入されたエンドキャッピング基は非常に安定であることが確かめられ従来の常識が覆された。高温シリル化によって達成された非常に高い表面被覆率が、ODS表面での加水分解を効果的に阻害すると結論づけられる。また、2%TFA/(アセトニトリル-水 10:90)、温度80°Cでの加速試験でのナフタレンのkの変化を図8に示した。高温シリル化エンドキャッピングしたODSは修飾基(C18)も加水分解し難いことが示されている。

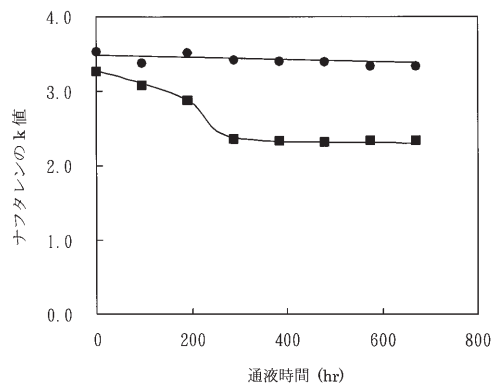


図8 高温シリル化エンドキャッピングされたODS(●)及び液相エンドキャッピングされたODS(■)の酸性移動相中でのナフタレンの保持係数kの安定性

試験条件 移動相: メタノール/20mmol/Lリン酸pH 2.1 (1/1, v/v).
HPLC条件 移動相: メタノール/20mmol/Lリン酸pH 2.1 (1/1, v/v), 流量: 1 mL/min, 温度: 25°C, 検出: UV 254 nm, 試験物質: ナフタレン

5. 新たな挑戦

高温シリル化エンドキャッピングを開発して17年も経つと色々問題点も見えてきた。そこで我々はより効果的な新規エンドキャッピング法を再度開発し、新製品L-column2 ODSを最近上市した。更にエンドキャッピングを徹底したこのODSの特徴は、これまでアセトニトリル／中性緩衝液の移動相では、塩基性化合物はピークがテーリングしたが、この条件でのテーリングがなくなった(メタノール系では他のカラムでもテーリングしない)。一例としてヒスタミン剤類のL-column2 ODSとL-column ODSのクロマトグラムを図9に示す。

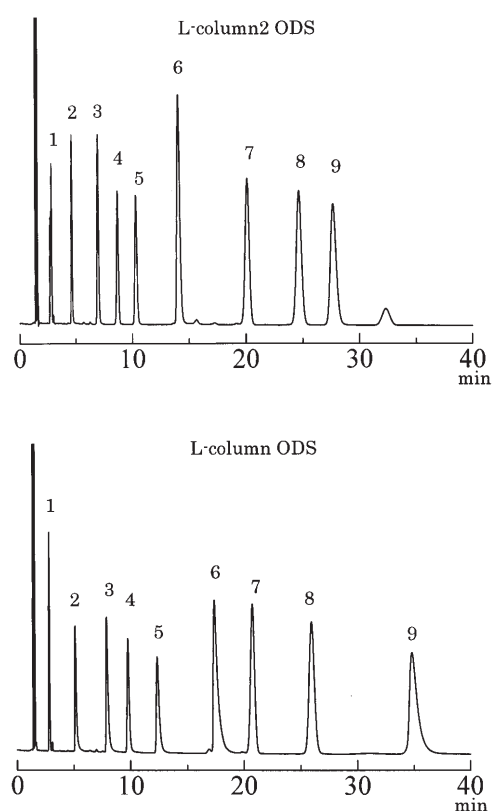


図9 L-column2 ODSとL-column ODSのヒスタミンの分析比較

HPLC条件 カラム：L-column2 ODS 4.6×150 mm(5 μ m,12 nm) and L-column ODS 4.6×150 mm(5 μ m,12 nm), 移動相：アセトニトリル / 25 mM リン酸緩衝液 pH 7.0(40/60), 温度：40℃, 流量：1 mL/min, 検出：UV 220 nm, Inj.vol.: 1 μ L, 試料：1)フェノキシフェナジン(50 mg/L), 2)クロルフェニラミン(50 mg/L), 3)トリプロリジン(50 mg/L), 4) ジフェンヒドラジン(50 mg/L), 5)ジフェニルピラリン(100 mg/L), 6)ホモクロルシクリジン(200 mg/L), 7)ヒドロキシジン(200 mg/L), 8)アミステミゾール(50 mg/L), 9)プロメタジン(200 mg/L)

6. おわりに

高温シリル化によるODSのエンドキャッピングの非常に高い表面被覆効果は、クロマトグラフィーおよび赤外分光法によって明らかにされた。この方法は、塩基性化合物

だけでなく錯体とODSとの好ましくない2次的相互作用の除去にも非常に効果的であった。また、酸性およびアルカリ性移動相中での加水分解に対するODSの安定性を向上させた。特に酸性移動相中では長期間、エンドキャッピング効果は劣化しなかった。さらに充填剤の製造者間およびロット間の品質のばらつきを改善することが示唆された。

残存シラノール基の影響を除去するため、前述のような移動相の工夫がされてきたが、適切な移動相を選択するためには、ある程度の知識と経験が必要である。高温シリル化エンドキャッピングしたODSでは移動相が単純化できるため、初心者でも簡単に逆相HPLCが行えるようになった。また最近、急速に普及しているLC/MSにおいては、不揮発性の移動相添加剤が使用できず、また揮発性の添加剤であってもその添加量は制限される。この分野においても移動相にシラノールマスキング剤を添加する必要のないことは大きな利点である。さらに充填剤の加水分解に対する安定性が向上し、カラムの寿命が延びたため、経済的にも有利である。

従来、残存シラノール基は充填剤の選択性を向上させるために有用であるという意見があり、また近年、充填剤の不活性化は古い問題としてあまり注目されていなかった。しかし、エンドキャッピングの既定の限界が破られ、高度にエンドキャッピングされたODSの優位性が明らかになったことにより、この分野での研究が見直されると思われる。

なお、高温シリル化エンドキャッピングしたカラムはL-columnとしてのみ販売されている。商品化に当たっては反応条件を最適化し、ここで示した性能を更に向上させている。

参考文献

- 1) C. Horvath, W. Melander and I. Molnar, *J. Chromatogr.*, **125** (1976) 129.
- 2) C. Horvath, W. Melander and I. Molnar, *Anal. Chem.*, **49** (1977) 142.
- 3) K. K. Unger, Porous Silica, *Elsevier, Amsterdam* (1979) p.7.
- 4) J. Kohler, D. B. Chase, R. D. Farlee, A. J. Vega and J. J. Kirkland, *J. Chromatogr.*, **352** (1986) 275.
- 5) J. Kohler and J. J. Kirkland, *J. Chromatogr.*, **385** (1987) 125.

- 6) K. K. Unger, *Porous Silica*, Elsevier, Amsterdam, 1979, p102.
- 7) A. Nahum and Cs. Horath, *J. Chromatogr.* **203** (1981) 53.
- 8) K. E. Bij, Cs. Horath, W. R. Melander and A. Nanum, *J. Chromatogr.*, **203** (1981) 65.
- 9) F. P. B. van der Maedcn, P. T. van Rens, F. A. Buytenhuys and E. Buurman, *J. Chromatogr.*, **142** (1977) 715.
- 10) J. C. Kraak and P. Bijster, *J. Chromatogr.*, **143** (1977) 499.
- 11) K.-G. Wahlund and A. Sokolowski, *J. Chromatogr.*, **151** (1978) 299.
- 12) D. Weserlund and E. Erixson, *J. Chromatogr.*, **185** (1979) 593.
- 13) A. Sokolowski and K.-G. Wahlund, *J. Chromatogr.*, **189** (1980) 299.
- 14) W. A. Moats, *J. Chromatogr.*, **366** (1986) 69.
- 15) E. Bayer and A. Paulus, *J. Chromatogr.*, **400** (1987) 1.
- 16) C. K. Lim and T. J. Peters, *J. Chromatogr.*, **316** (1984) 397.
- 17) J. F. Lawrence and R. Leduc, *Anal. Chm.*, **50** (1978) 1161.
- 18) A. Pryde, *J. Chromatogr. Sci.*, **12** (1974) 486.
- 19) R. E. Majors and M. J. Hoppcer, *J. Chromatogr. Sci.*, **12** (1974) 767.
- 20) C. H. Lochmuller and D. B. Marshall, *Anal. Chim. Acta.*, **142** (1982) 63.
- 21) K. Karch, I. Sebestian and I. Halasz, *J. Chromatogr.*, **122** (1976) 3.
- 22) H. Engelhardt and H. Muller, *Chromatographia*, **19** (1984) 77.
- 23) D. B. Marshall, C. L. Cole and A. D. Norman, *J. Chromatogr. Sci.*, **25** (1987) 262.
- 24) K. D. MC Murtrey, *J. Liq. Chromatogr.*, **11** (1988) 3375.
- 25) D. B. Marshall, K. A. Stutler and C. H. Lochmuller, *J. Chromatogr. Sci.*, **22** (1984) 217.
- 26) J. J. Kirkland, J. W. Henderson, J. J. DeStefano, M. A. van Straten, H. A. Claessens., *J. Chromatogr. A*, **762** (1997) 97.
- 27) M. Verzele and C. Dewaele, *J. Chromatogr.*, **217** (1981) 399.
- 28) Y. Ohtsu, Y. Shiojima, T. Okumura, J. Koyama, K. Nakamura, O. Nakata, K. Kimata and N. Tanaka, *J. Chromatogr.*, **481** (1989) 147.
- 29) B. Buszewski, *Chromatographia*, **34** (1992) 573.
- 30) P. C. Sadek, C. J. Koester and L. D. Bowers, *J. Chromatogr. Sci.*, **25** (1987) 489.
- 31) J. Nawrocki, D. L. Moir and W. Szczepaniak, *J. Chromatogr.*, **467** (1989) 31.
- 32) J. Nawrocki, D. L. Moir and W. Szczepaniak, *Chromatographia*, **28** (1989) 143.
- 33) J. J. Kirkland, C. H. Dilks Jr. and J. J. DeStefano, *J. Chromatogr.*, **635** (1993) 19.
- 34) K. Tanabe, T. Sumiyoshi, K. Shibata, T. Kiyoura and J. Kitagawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn* **47** (1974) 1064.
- 35) M. Muss and H. Engelhardt, *J. Chromatogr.*, **371** (1986) 371.
- 36) P. J. M. Bergers and A. C. De Groot, *Water Res.*, **28** (1994) 639.
- 37) S. M. Cramer, B. Nathanael and Cs. Horvjth, *J. Chromatogr.*, **295** (1984) 405.
- 38) W. N. Bames, A. Ray and L. J. Bathes, *J. Chromatogr.*, **347** (1985) 173.
- 39) D. J. I. Kingston and B. B. Gerhart, *J. Chromatogr.*, **116** (1976) 182.
- 40) M. Verzele, M. De Potter and J. Ghysels, *High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **2** (1979) 151.
- 41) M. Ohhira, F. Ohmura and T. Hanai, *J. Liq. Chromatogr.*, **12** (1989) 1065.
- 42) D. V. McCalley, *J. Chromatogr.*, **636** (1993) 213.
- 43) K. Kimata, N. Tanaka and T. Araki, *J. Chromatogr.*, **594** (1992) 87.
- 44) K. K. Unger, *Porous Silica*, Elsevier, Amsterdam, 1979, p14.
- 45) W. Noll, *Chemistry and Technology of Silicones*, Academic Press, Orlando, 1968.
- 46) H. A. Claessens, C. A. Cramers, J. W. de Haan, F. A. H. den Otter, L. J. M. van de Ven, P. J. Andree, G. J. de Jong, N. Lammers, J. Wijma and J. Zeeman, *Chromatographia*, **20** (1985) 582.
- 47) H. A. Claessens, J. W. de Haan, L. J. M. van de Ven, P. E. de Bruyn and E. A. Eramers, *J. Chromatogr.*, **436** (1988) 345.
- 48) J. L. Glajeh, J. J. Kirkland and J. Kohler, *J. Chromatogr.*, **384** (1987) 81.
- 49) N. Sagliano, Jr., T. R. Floyd, R. A. Hartwick, J. M. Dibussolo and N. T. Miller, *J. Chromatogr.*, **443** (1988) 155.
- 50) J. J. Kirkland, J. L. Glajeh and R. D. Farlee, *Anal. Chem.*, **61** (1989) 2.
- 51) N. Tanaka, K. Kimata, Y. Mikawa, K. Hosoya, T. Araki, Y. Ohtsu, Y. Shiojima, R. Tsuboi and H. Tsuchiya, *J. Chromatogr.*, **535** (1990) 12.
- 52) M. J. Wirth and H. O. Fatunmbi, *Anal. Chem.*, **65** (1993) 822.
- 53) M. J. J. Hetem, J. W. de Haan, L. J. M. van de Ven, C. A. Cramers, J. N. Kinkel, *Anal. Chem.*, **62** (1990) 2288.
- 54) J. J. Kirkland, J. W. Henderson, J. J. DeStefano, M. A. van Straten, and H. A. Claessens, *J. Chromatogr.*, **762** (1997) 97.
- 55) M. J. J. Hetem, J. W. de Haan, H. A. Claessens, C. A. Cramers, A. Deege and G. Schomburg, *J. Chromatogr.*, **540** (1991) 53.
- 56) N. T. Miller and J. M. Dibussolo, *J. Chromatogr.*, **499** (1990) 317.
- 57) T. Welsch, W. Engewald, C. Klaucke, *J. Chromatographia*, **10** (1977) 22.
- 58) P. J. van den Driest and H. J. Ritchie, *Chromatographia*, **24** (1987) 324.
- 59) L. Nondek, B. Buszewski and D. Berek, *J. Chromatogr.*, **360** (1986) 241.
- 60) M. Mauss, H. Engelhardt, *J. Chromatogr.*, **371** (1986) 235.
- 61) S. Kondo, H. Yamauchi, Y. Kajiyama, T. Ishikawa, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **80** (1984) 2033.
- 62) K. K. Unger, *Porous Silica*, Elsevier, Amsterdam (1979) p.10.
- 63) R. S. S. Murthy, D. E. Leyden, *Anal. Chem.*, **58** (1986) 1228.
- 64) L. R. Snyder, J. L. Glajch, J. J. Kirkland, *Practical HPLC Method Development*, John Wiley & Sons, Inc. New York, (1988) p.64.
- 65) J. L. Glajch, J. J. Kirkland, J. Kohler, *J. Chromatogr.*, **384** (1987) 81.