

シリカ系逆相カラムにおける残存シラノール基の影響および新規エンドキャッピング

長江 徳和, 塚本 友康, 小山 隆次

1 はじめに

ロシア人植物科学者 Tswett により 1903 年にクロマトグラフィー (Chromatograph) が提唱¹⁾された。これは炭酸カルシウムの粉末を充填剤とし、石油エーテルを移動相として植物抽出液を分離したものであった。その後、固定相基材または固定相としてアルミナやシリカなどが提唱された。現在はポリマー系とシリカ系が主流であるが、逆相クロマトグラフィーにおいてはシリカ系充填剤が多用されている。また液体クロマトグラフィー (Liquid chromatography) を高速化した HPLC (High pressure liquid chromatography) は 1969 年に J. J. Kirkland²⁾ らにより開発された。発表当時に使用されていたカラムには、直径 30 μm から 40 μm のガラスビーズなどの表面に 0.5 μm 程度の厚みの多孔質層が存在する粒子が充填されていた。これは当時 Pellicular (ペリキュラー) 型充填剤²⁾³⁾と呼ばれていた。その後粒子径 10 μm 以下の全多孔性シリカ (シリカゲル) による高性能化⁴⁾が進み、現在ではサブ 2 μm の粒子まで利用可能となった。

シリカの表面に存在するシラノール基は活性が高く、このシラノール基を介して様々なシリル化試薬を結合する事ができ、逆相の C18 (ODS) など多くの固定相が開発された。しかしシリカ表面に存在するすべてのシラノール基に C18 などのシリル化試薬が反応するわけではなく、1/2 から 2/3 のシラノール基はシリカ表面に残っていた。この残存シラノール基は極性化合物の分離に寄与したり、塩基性化合物を吸着し、テーリングさせたりしたため、嵩の小さなトリメチルシリル化 (TMS) 試薬を結合させ、残存シラノール基を少なくする、いわゆるエンドキャッピングが行われるようになった。本稿ではこの残存シラノール基の分離への役割や、最新のエンドキャッピング技術について紹介する。

2 シラノール基の影響

2.1 固定相としてのシラノール基の役割

HPLC 用のシリカゲル充填剤はシリカ表面に何も修飾しないシリカゲルそのものを吸着クロマトグラフィー

として、また水やアルコールなどの極性溶媒をシリカ表面に保持させ、順相分配による分離を行う順相クロマトグラフィーとして使用される場合と、シリカ表面にシラノール基を介して極性の高いアミノプロピルシリル基などを結合し順相クロマトグラフィーとして、またオクタデシルシリル基やフェニルシリル基などを結合し逆相クロマトグラフィーとして使用される場合がある。それぞれの分離モードによりシラノール基の役割は変わるが、吸着クロマトグラフィーでは文字通り吸着点として働き、逆相モードやヒリックモードの様に移動相に水が含まれる分離モードでは、カチオンに対してイオン交換、アニオンに対してイオン排除、極性化合物に対して水素結合が働く。シリカ表面に存在するシラノール基の $\text{p}K_a$ は 2.6 前後であると言われており、シラノール基が解離し、 SiO^- の状態になる pH 3 以上の移動相条件において、イオン交換やイオン排除が起こる。

2.2 シラノール基による塩基性化合物のテーリング

一般的な C18 などの逆相カラムを用いて塩基性化合物を分離した場合にピークがテーリングする事が知られており、特に移動相有機溶媒にアセトニトリルを用いるとテーリング度合いがひどくなる。このテーリングはエンドキャッピングの効率が悪く、シリカ表面にまだ残っているシラノール基が原因であると言われている。エンドキャッピングの優れている C18 カラムほど塩基性化合物のテーリングは抑えられるため、高効率のエンドキャッピングが求められ、HPLC カラムメーカーは高効率エンドキャッピングを競ってきた。

さて、イオン交換クロマトグラフィーにおいて、溶質と固定相と間でイオン交換が起こり、溶質は保持される。しかし保持されたピークは基本的にテーリングする事はない。言い換えればイオン交換そのものはテーリングの原因ではない事になる。ではシリカ系逆相 C18 カラムではなぜ塩基性化合物はテーリングピークとなるのか。アセトニトリルと 20 mmol L⁻¹ 酢酸アンモニウム pH 6.8 緩衝液をある比率で混合した移動相は逆相クロマトグラフィーでの代表的な移動相である。この移動相を用いて未修飾のシリカゲルを充填したカラムと C18

またはシアノプロピル (CN) を修飾したシリカ系 C18 カラムとシリカ系 CN カラムを用い、塩基性化合物であるアミトリプチリンピークを観察すると、シリカカラムとシリカ系 CN カラムはテーリングのない対称性の良いピークとなったが、シリカ系 C18 カラムはテーリングピークを示した。シリカカラムではシリカ表面に水和層ができ、この水和層が固定相として働きヒリックモードの順相分配が起こり、溶質を保持する。ヒリックモードのシリカ固定相はシラノール基とシラノール基に水和した水分子から成り、pH 6.8 の移動相条件ではシラノール基は解離し、プロトン化した塩基性化合物とイオン交換も起こる。同様にシリカ系 C18 カラムおよびシリカ系 CN カラムの固定相は C18 または CN、エンドキャッピングを施した場合にはエンドキャッピング剤 (TMS など) と溶媒和した有機溶媒そしてシリカ表面の残存シラノール基から成っており、シラノール基は解離し、イオン交換が起こっている。図 1 にはアミトリプチリンのクロマトグラムとシラノール基の水和状態を示す。ここに示されている様に、十分に水和されているシラノール基と水和不足のシラノール基では塩基性化合物の吸着性が異なる。つまりシリカ系 C18 カラムでは C18 アルキル鎖が高疎水性であるため、C18 アルキル鎖の近くに存在するシラノール基は水和不足になり、塩基性化合物とイオン交換をした時に脱離がスムーズに起こらず、吸着した状態になりピークテーリングを起こすと考えられる。シリカ系 CN カラムのシアノプロピル基は疎水性があまり高くなく、ヘキササン/アルコール系などの

溶媒を移動相に用いれば、シリカ系 CN カラムは順相モードの分離も可能となる事からも分かる様に、逆相カラムの中では CN は非常に極性の高い固定相である。したがって固定相内のシラノール基はすべて水和十分であったと考えられ、シリカカラムと同様に十分水和したシラノール基は塩基性化合物との間で働くイオン交換が吸着状態になる事はなく、スムーズに行われたためテーリングのないピークが得られたと考えられる。1982 年に発表された論文⁵⁾ではアミトリプチリンの分析に移動相として有機溶媒と pH 7 の緩衝液が、また分析カラムとして CN カラムが用いられた。当時はほとんどの C18 カラムで、pH 7 の条件ではアミトリプチリンピークはテーリングしたが、この論文では CN カラムを用いて、テーリングのないピークが得られている。しかし CN カラムが塩基性化合物に対しテーリングを示さない理由の言及はなかった。

2・3 シラノール基を活かした C18 カラム

C18 カラムの固定相内に存在するシラノール基がすべて十分水和していれば、シラノール基と塩基性化合物のイオン交換が起こってもテーリングしないはずである。このような C18 充填剤は、熱処理を施し二つのシラノール基を脱水縮合によりシロキサン結合に変換させる事により調整可能である⁶⁾。図 2 には C18 が結合したシリカ充填剤の脱水縮合の模式図を示す。シリカゲルはアモルファスで結晶構造を有していないため、200℃以上の熱をかけるとケイ素原子が動き、二つのシラノー

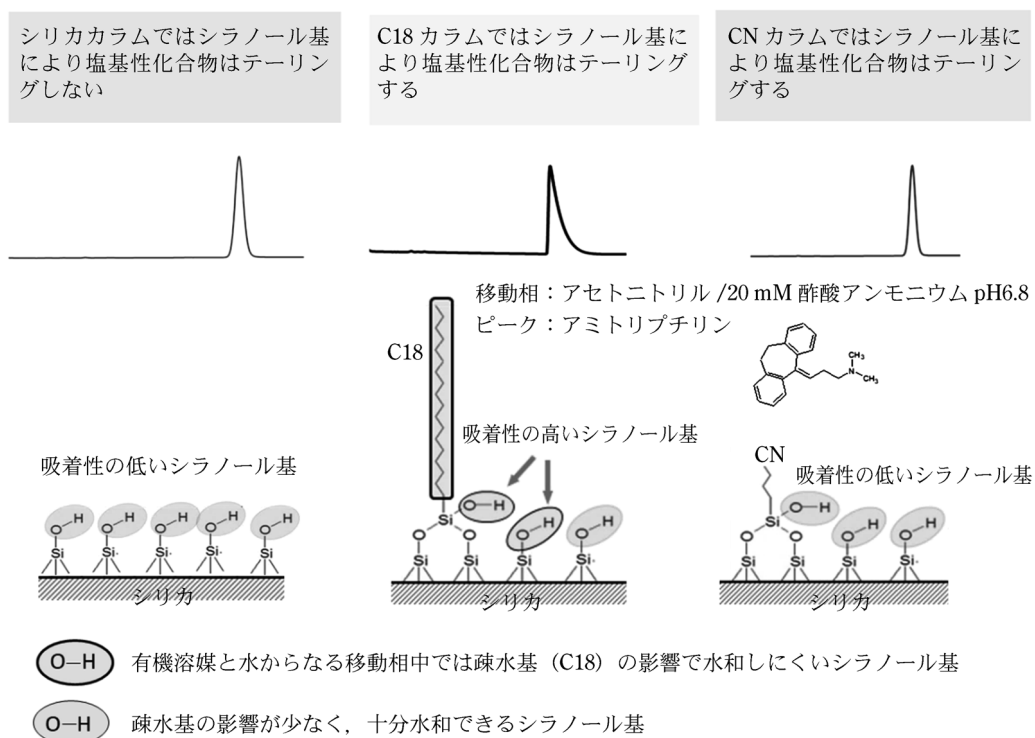


図 1 アミトリプチリンとシラノール基の水和状態

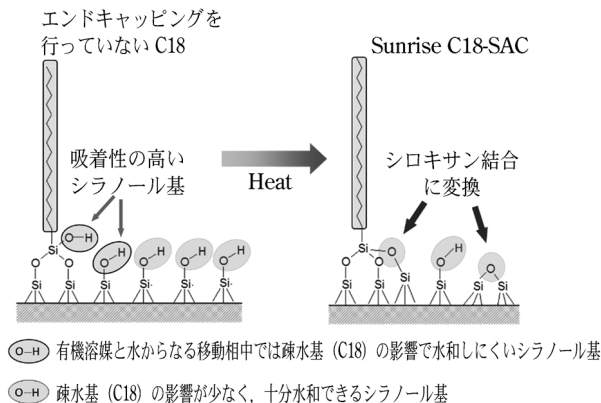


図 2 熱処理によるシロキサン結合への変換

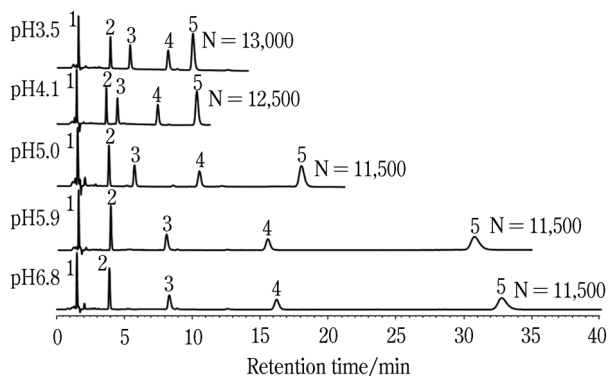


図 3 塩基性化合物の分離

測定条件：カラム, Sunrise C18-SAC 5 μm , 150 \times 4.6 mm.i.d.; 移動相, アセトニトリル/100 mmol L⁻¹ 酢酸アンモニウム (酢酸で pH 調整, pH は図中に記載) =70/30; 流量, 1.0 mL min⁻¹; カラム温度, 40 $^{\circ}\text{C}$; 検出; UV250 nm; ピーク, 1=ウラシル, 2=トルエン, 3=プロプラノロール, 4=ノルトリプチリン, 5=アミトリプチリン。

ル基が近づく事により脱水縮合が可能となり, シロキサン結合に変換される。その後水処理する事により, 疎水部分の影響を受けず水分子が接触しやすい場所のシロキサン結合のみが加水分解され, 再びシラノール基に戻る。つまり, 再生成されたシラノール基は水和が十分なもののみとなる。クロマニックテクノロジー社の Sunrise C18-SAC はこのようにして製造された C18 カラムであり, このカラムを用いて塩基性化合物を分離した結果を図 3 に示す。移動相の pH を 3.5 から 6.8 まで変化させているが, pH が高いほど保持時間は長くなった。また 5 番ピークのアミトリプチリンの理論段数を図中に示しているが, すべてのクロマトグラムで 11000 段以上の高い段数でテーリングの少ないピークが得られた。さらに図 4 では塩濃度を 10 mmol L⁻¹ から 200 mmol L⁻¹ に増加させた時の分離を示す。ホールドアップ時間測定用のウラシルと中性化合物のトルエンは塩濃度に依存せず, 一定の溶出時間であった。しかし塩基性化合物であるプロプラノロール, ノルトリプチリンおよ

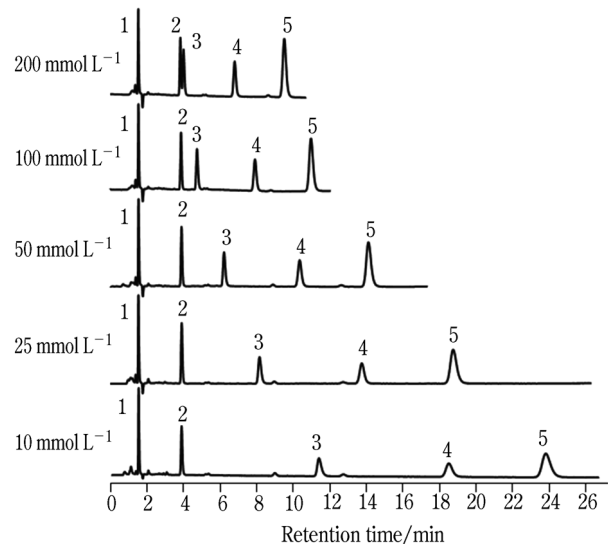


図 4 異なる緩衝液濃度でのクロマトグラム

測定条件：移動相, アセトニトリル/酢酸アンモニウム pH 4.1 (緩衝液濃度は図中に記載) =70/30; 流量, 1.0 mL min⁻¹; 他は図 3 と同じ。

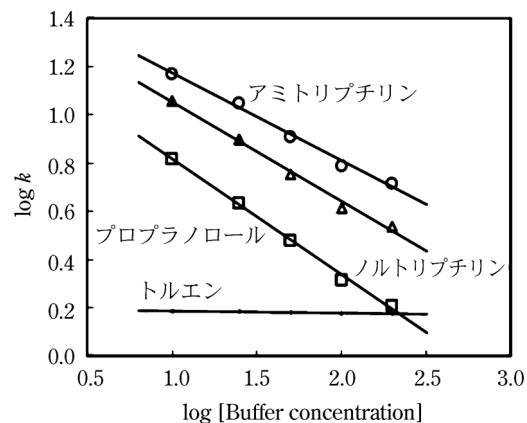


図 5 移動相のイオン濃度と保持の関係

$$\log k = -\frac{Z_B}{Z_A} \log[A] + \frac{Z_B}{Z_A} \log[\bar{A}] + \log \frac{V_r}{V_m} + \frac{1}{Z_A} \log K_A^B$$

A: 溶離剤イオン, B: 測定イオン, k: B の保持指数, K: 選択係数, Z_A, Z_B: 各イオンの電荷, V_r, V_m: カラム内の樹脂体積と移動相体積

びアミトリプチリンは塩濃度が高いほど保持時間は短くなった。図 5 ではウラシル以外のピークについて緩衝液の塩濃度の対数を横軸, 保持係数の対数を縦軸としてプロットした。また図 5 にはイオン交換クロマトグラフィーにおける溶離液イオン濃度と保持の関係式も示している。プロプラノロール, ノルトリプチリンおよびアミトリプチリンはこの図から分かるように保持係数の対数と塩濃度の対数はマイナスの傾きの直線となり, イオン交換クロマトグラフィーにおける溶離液イオン濃度と保持の関係式に当てはまる分離挙動であった。これはまさにイオン交換が作用する事により保持時間が変化している事を示している。シラノール基の影響がほぼないエ

ンドキャッピングの優れたシリカ系 C18 カラムに比べ、水和十分なシラノール基を残した Sunrise C18-SAC カラムは塩基性化合物の保持が 10 倍以上大きく、逆相分配とイオン交換の両相互作用が働いた分離が達成されている。

3 新規エンドキャッピング

3.1 従来のエンドキャッピングとの差

従来のエンドキャッピングは C18 などのアルキル基をシリカ表面に結合後、残ったシラノール基に嵩の小さなシリル化試薬例えば TMS などを結合させ、シラノール基を少なくしてた。シリカ表面にはシラノール基が 8 ~ 9 $\mu\text{mol m}^{-2}$ 存在すると言われているが、1980 年に発表された論文⁷⁾ではシリカゲルに C18 アルキル基を結合後、TMS によるエンドキャッピング処理を行った後でも、シリカ表面には 50 % 程度のシラノール基が残っていると結論付けられた。その後エンドキャッピング手法は改善されたが、残存シラノール基の影響が最も少ないシリカ系 C18 充填剤でも 30 % 以上のシラノール基が残っていると推察される。熱処理によりシラノール基はシロキサン結合に変換されるため、エンドキャッピング処理を高温で行う事により、シリル化試薬の結合でシラノール基が減少するとともにシラノール基のシロキサン結合への変換が起こり、さらにシラノール基は減少する。また高温でのエンドキャッピング処理でも、前述のようにケイ素原子は動いていると考えられ、ケイ素原子の移動によりエンドキャッピングでのシリル化試薬の結合密度は高くなると考えられる。したがって、高温エンドキャッピング処理により、シリカ表面上のシラノール基は 10 % から 20 % 程度まで減少していると推察される。

3.2 高温エンドキャッピング

様々なエンドキャッピング方法が HPLC カラム各社で試みられているが、近年の傾向として、ほとんどの HPLC カラムメーカーはシリル化試薬や反応条件を開示しておらず、シリカ系逆相カラムのユーザーにとってはエンドキャッピングについてはブラックボックス化している。ここではクロマニックテクノロジーズ社で行っているエンドキャッピング方法⁸⁾について簡単に記述する。逆相固定相としてのアルキル基やフェニル基は三官能性シリル化試薬を用い、トルエン中で還流する事によりシリカゲルに結合させる。エンドキャッピング処理は 2 回行い、エンドキャッピング試薬として 1 回目は 1,5-ジクロロヘキサメチルトリシロキサンを、2 回目はトリメチルクロロシランを用い、トルエン中で還流した後、窒素封入した密閉容器内で 12 時間 200 °C 以上の温度を維持した。表 1 にはコアシェルシリカを用い、C18 アルキル基を結合後、200 °C 以上である X °C と (X-40) °C

表 1 異なる温度でのエンドキャッピングの差

エンドキャッピングの反応温度	X °C	(X-40) °C
C18 結合後の炭素含有量	7.0 %	7.0 %
エンドキャッピング後の炭素含有量	7.3 % (熱により C18 が一部切断)	7.7 % (熱による C18 の切断はない)
シロキサン結合への変換	Yes	No
アミトリプチリンのピーク形状	良好	良好 (X °C と同じ)
Retention factor (k)	10.4	9.5

* 基材シリカ：コアシェルシリカ (比表面積 150 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)
 * Retention factor の測定条件：移動相、メタノール/水 = 7/3；カラム温度、40 °C、試料、アミルベンゼン。

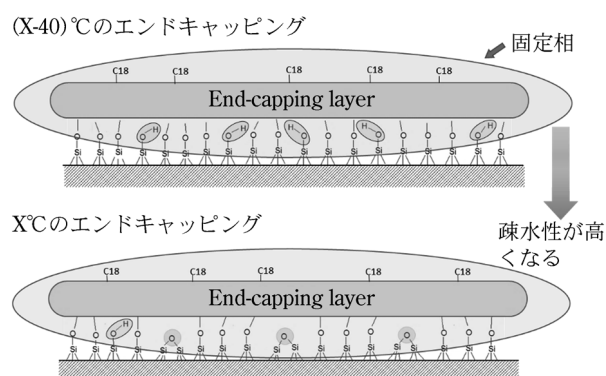


図 6 エンドキャッピング後のシリカ表面のシラノール基の存在状態の模式図

°C でエンドキャッピングを行った時の炭素含有量、アミルベンゼンの保持係数などを示す。エンドキャッピング後の炭素含有量は X °C の反応温度の方が (X-40) °C よりも低くなった。これは X °C の反応温度では一部の C18 アルキル基が切断する事が原因であると推察される。また塩基性化合物であるアミトリプチリンのピーク形状は両反応温度でも同程度に良好であり、残存シラノール基の影響はほぼ認められなかった。一般的に同じシリカ基剤を用いた場合、炭素含有量の高い充填剤の方が保持は大きくなるが、アミルベンゼンの保持係数は炭素含有量の低い X °C の方が逆に 10 % 程度大きくなった。図 6 にはエンドキャッピング後のシリカ表面のシラノール基の存在状態の模式図を示す。X °C の反応ではシラノール基はシロキサン結合に変換されるのに対し、(X-40) °C の反応ではシラノール基はシロキサンに変換されず、残っていると推察される。固定相の疎水性はシリカ表面に残っているシラノール基を含め C18 アルキル基およびエンドキャッピング剤全体が関与していると考えられ、シラノール基の存在が疎水性を低減し、保持を小さくしていると考えられる。炭素含有量が低いにもかかわらず保持が大きい事はシリカ表面に残るシラ

ノール基が少ない事を肯定している。アルカリ性条件でのシリカ系逆相カラムの劣化はアルカリによるシリカの加水分解により促進される。エンドキャッピングの高効率化でシリカ表面近くの疎水性が上がり、水分子のシリカ基剤への接触頻度も少なくなるためシリカの加水分解も遅くなる。また、シリカのアルカリによる加水分解⁹⁾はシリカ表面に存在するシラノール基のケイ素原子に対する求核反応が起点となり起こるため、シリカ表面に存在するシラノール基が少ないほど劣化は遅くなる。シラノール基の存在量を少なくする高温エンドキャッピングは、塩基性化合物のテーリングを抑えるだけでなく、耐久性、特にアルカリ性条件での耐久性を向上させる。

3.3 塩基性化合物のピーク形状

前述の高温エンドキャッピング処理を施した全多孔性シリカ C18 である Sunniest C18 カラムを用いた塩基性化合物の分離を図 7 に示す。比較として通常の TMS によるエンドキャッピングの A 社 C18 の分離も示す。A 条件のメタノールとリン酸緩衝液 (pH 7.5) を移動相に用い、カラム温度 40 °C での 4 番のアミトリプチリンピークは A 社 C18 カラムでも、シャープなピーク形状であったが、B 条件の様にカラム温度を 22 °C に下げたり、C 条件の様に移動相有機溶媒をメタノールからアセトニトリルに変更した場合には、A 社 C18 カラムではアミトリプチリンピークはひどくテーリングした。一方 Sunniest C18 カラムでは LC/MS 用の揮発性緩衝液を移動相に用いた条件 D も含め、すべての移動相条件でテーリングの少ないシャープなピークが得られた。

4 まとめ

本稿ではシラノール基の分離への影響を考察した。多くのクロマトグラファーはシリカ系逆相カラムでの塩基性化合物のテーリングは残存シラノール基が原因であると認識していると思われるが、実際にはシラノール基の水和状態により塩基性化合物のテーリング度合いは変わり、十分水和したシラノール基は塩基性化合物のテーリングの原因ではない事を解説した。またシラノール基のイオン交換および C18 固定相の逆相分配が塩基性化合物に同時に作用して分離が達成される事を明らかにした。さらにシリカゲルはアモルファスであり、ガラスと同じように高温では原子が動き、結合状態が変化する事や、高温によるシラノール基のシロキサン結合への変換もエンドキャッピングの手法の一つである事も紹介した。現在でも新しい知見を見いだしたり、新たな技術開発が進んでおり、クロマトグラフィーの分野でもさらなる発展が期待される。

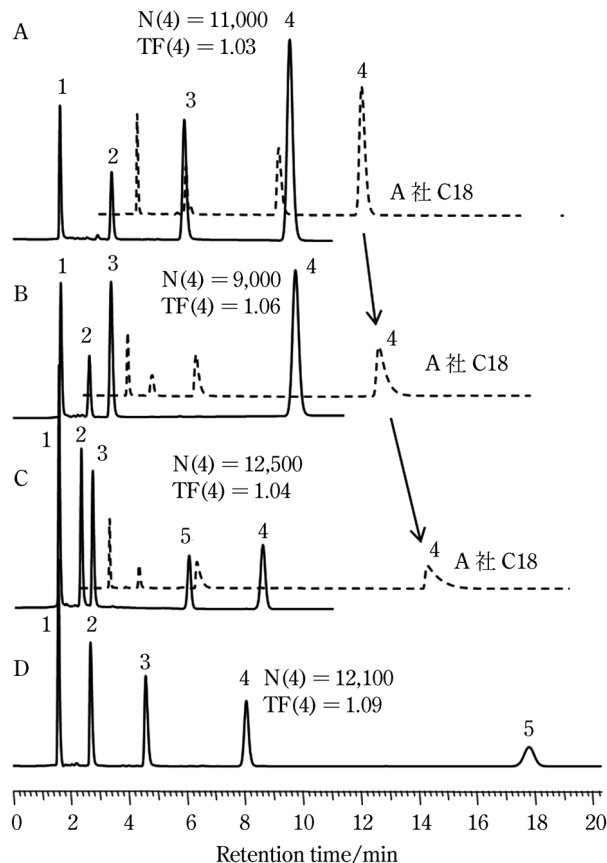


図 7 塩基性化合物の分離

測定条件：カラム, Sunniest C18 5 μm , 150 \times 4.6 mm.i.d. (実線), A 社 C18 5 μm , 150 \times 4.6 mm.i.d. (破線); 移動相, A) メタノール/20 mmol L⁻¹ リン酸ナトリウム pH 7.5=80/20, B) メタノール/20 mmol L⁻¹ リン酸ナトリウム pH 6.0=80/20, C) アセトニトリル/20 mmol L⁻¹ リン酸ナトリウム pH 7.0=60/40, D) アセトニトリル/10 mmol L⁻¹ 酢酸アンモニウム pH 6.8=40/60; 流量, 1.0 mL min⁻¹; カラム温度, A), C), D), 40°C, B), 22°C; 検出; UV250 nm; ピーク, 1=ウラシル, 2=プロプラノロール, 3=ノルトリプチリン, 4=アミトリプチリン, 5=トルエン。

文 献

- 1) M. S. Twett : *Tr. Protok. Varshav. Obshch. Estestvoispyt. Otd. Biol* 14 (1903).
- 2) J. J. Kirkland : *J. Chromatogr. Sci.*, **7**, 7 (1969).
- 3) C. Horvath, B. A. Preiss, S. R. Lipsky : *Anal. Chem.*, **39**, 1422 (1967).
- 4) J. J. Kirkland : *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 593 (1972).
- 5) P. Koteel, R. E. Mullines, R. H. Gadsden : *Clinical Chemistry*, **28/3**, 466 (1982).
- 6) N. Nagae : Pittcon2008, 830-6P (2008). (<http://chromanik.co.jp/technical/pdf/pittcon08.pdf>) (2021年5月17日, 最終確認).
- 7) G. E. Berendsen, L. D. Galan : *J. Chromatogr. A*, **196**, 21 (1980).
- 8) N. Nagae, E. Shearer, T. Tsukamoto ; *HPLC2019*, P 391 (2019). (http://chromanik.co.jp/info/wp-content/uploads/2019/12/HPLC2019_2.pdf) (2021年5月17日, 最終確認).
- 9) 長江徳和 : LC と LC/MS の知恵, 第 2 号, in press.



長江徳和 (Norikazu NAGAE)
株式会社クロマニックテクノロジーズ (〒552-0001 大阪府大阪市港区波除 6-3-1)。名古屋大学工学部応用化学卒。博士(工学)。
《主な著書》“LC/MS, LC/MS/MS のメンテナンスとトラブル解決”(分担執筆)(オーム社)。
E-mail: nagae@chromanik.co.jp



塚本友康 (Tomoyasu TSUKAMOTO)
株式会社クロマニックテクノロジーズ (〒552-0001 大阪府大阪市港区波除 6-3-1)。中部大学応用生物学研究科応用生物学専攻博士課程修了。博士(応用生物学)。
《現在の研究テーマ》液体クロマトグラフィー用充填剤の開発。
E-mail: tsukamoto@chromanik.co.jp



小山隆次 (Ryuji KOYAMA)
株式会社クロマニックテクノロジーズ (〒552-0001 大阪府大阪市港区波除 6-3-1)。立命館大学理工学部生物工学科卒。
《趣味》クロマトグラフィー。
E-mail: koyama@chromanik.co.jp

会社のホームページURL :

<http://chromanik.co.jp/>

関連製品ページURL:

http://chromanik.co.jp/pdf/Sunrise_catalog.pdf

http://chromanik.co.jp/pdf/Sunniest_catalog.pdf

<http://chromanik.co.jp/product/SunShell.html>

原稿募集

「技術紹介」の原稿を募集しています

対象：以下のような分析機器、分析手法に関する紹介・解説記事

- 1) 分析機器の特徴や性能および機器開発に関わる技術、
- 2) 分析手法の特徴および手法開発に関わる技術、
- 3) 分析機器および分析手法の応用例、
- 4) 分析に必要な試薬や水および雰囲気などに関する情報・解説、
- 5) 前処理や試料の取扱い等に関する情報・解説・注意事項、
- 6) その他、分析機器の性能を十分に引き出すために有用な

情報など

新規性：本記事の内容に関しては、新規性は一切問いません。新規の装置や技術である必要はなく、既存の装置や技術に関わるもので構いません。また、社会的要求が高いテーマや関連技術については、データや知見の追加などにより繰り返し紹介していただいても構いません。

お問い合わせ先：

日本分析化学会『ぶんせき』編集委員会

[E-mail: bunseki@jsac.or.jp]