

# アダマンチル基を有する逆相系カラムの特長と分離性能

西山 尚 秀

## 1 はじめに

現在、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は、汎用性の高い分析方法として、様々な分野で使用されている。これまで、HPLCの分離モードは数多く存在するが、その80%以上は、逆相系と言われている。HPLC用の逆相カラムは、オクタデシル基、ODS（C18）を代表として多くの場合、シリカゲル基材の充填剤が採用されている。これは、シリカゲル系充填剤が、耐圧性、溶媒安定性に優れ、シャープな細孔径分布を有しているため、分離性能が高く、適用対象試料の範囲が広いといった特長を持つからである。

2013年から2017年当時、ODSカラムとの差別化を図るために資生堂は、化粧品開発で培った粉末表面処理技術を応用し、アダマンチル基を有する充填剤を開発した<sup>1)</sup>。

2017年12月から、医薬品精製材料分野で、世界トップレベルシェアのHPLC用シリカゲルを持つ大阪ソーダが、資生堂のクロマトグラフィー事業をすべて承継することになった。

本技術紹介では、充填剤およびカラム評価方法、そして、通常の逆相系ODS（C18）とは異なる分離特性を持つアダマンチル基を用いた弊社の特長的なカラムの紹介をする。

## 2 充填剤およびカラム評価方法

### 2.1 基本特性評価方法<sup>2)3)</sup>

逆相系カラムで最も汎用されるカラムはC18基を有するカラム、すなわちODSカラムと呼ばれるものがあるが、同じODSカラムと言ってもメーカー各社それぞれ性質が異なる。これは、シリカゲル物性（比表面積、細孔径）、シリル化試薬の種類と反応率、二次シリル化試薬と反応率などにより左右される。そのため、目的物質の分析に最も適したカラムを選択するためには、メーカー各社の充填剤の性質を知ることが必要不可欠である。そこで、弊社では標準物質を用い、ある一定の条件下において、従来からの化学結合型充填剤および弊社ポリマーコート型充填剤の性能評価を行っている。図1

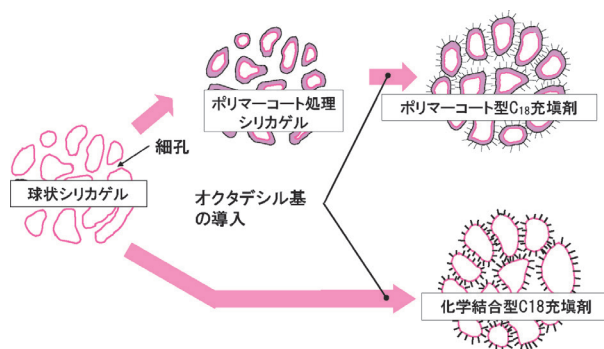


図1 化学結合型充填剤とポリマーコート型充填剤の概念図

に化学結合型充填剤とポリマーコート型充填剤の概念を示す。

充填剤の評価から、パラメーターを算出することにより、その基本特性を把握することができる。本稿で示すパラメーター算出用のHPLCの分析条件は、後述する図5の条件を用いた。

### 2.2 疎水性相互作用

疎水性相互作用は、ODSシリカゲルが有する本来の性質を示すものであり、充填剤にどのくらいの保持能力があるかを示すパラメーターである。C18基を導入する際に用いたシリル化試薬の種類、反応率等により種々の値を示す。弊社では、トルエンとベンゼンの分離係数 $\alpha$ （Toluene/Benzene）を用いてこの疎水性パラメーターを算出している。一般にハイカーボンな充填剤ほどその値は大きくなる傾向にあり、パラメーターの大きい充填剤ほど中性化合物の保持が大きくなる。すなわち、一般的に、疎水性の高い化合物を分離対象とする場合、このパラメーターが大きなカラムを選択すると保持が長くなる。

### 2.3 表面極性

表面極性は、シリカゲル表面のシラノール基（Si-OH）を含め充填剤表面の極性基が影響するパラメーターである。この値が小さい（非極性）充填剤ほど極性物質は早くシャープに溶出する傾向がある。このパラメーター

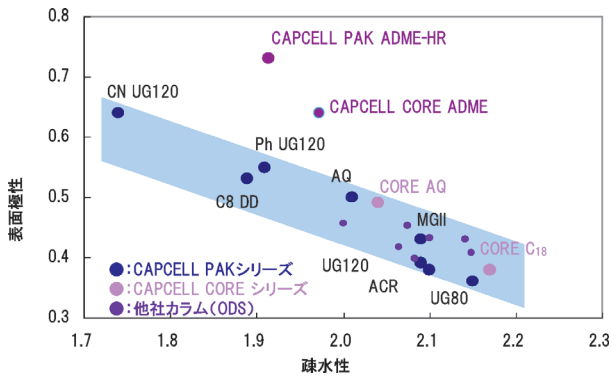


図2 パラメーターマップ：疎水性と表面極性の評価結果

は、安息香酸メチルとトルエンの分離係数  $\alpha$  (Methylbenzoate/Toluene) で評価している。例えば、弊社 CAPCELL PAK (カプセルパック) は、シリカゲルをシリコンポリマーで被膜しているため、市販のカラムの中においても相対的に小さな値となるが、C18 基の導入量を精密にコントロールすることにより、表面極性のパラメーターを自在に設計できる。通常、メーカー各社の水系 100 % 移動相下で使用可能な高極性 ODS (C18) カラムと呼ばれているものも C18 基の導入量をコントロールして調製される。

#### 2.4 パラメーターマップとカラムの開発<sup>4)</sup>

図2に弊社カラムの位置づけおよび他社カラムの性質を調査するために先のパラメーターを算出し、疎水性と表面極性の値をプロットした充填剤のパラメーターマップを示す。最適なカラム選択におけるポイントは、充填剤の疎水性と表面極性のバランスでカラムの分離特性の違いが生じるため、目的化合物の疎水性と極性を考慮することが重要である。弊社 CAPCELL PAK C18 MGII と呼ばれるカラムは、疎水性と表面極性のバランスを最適化したカラムで、弊社標準の逆相系 C18 カラムである。本カラムのパラメーター及び実際の目的化合物の分離挙動を基準とすると、他のカラムに変えたときの分離挙動が想像しやすい。これまで弊社が上市した逆相カラムは、図2のバンドから抜けるものは見られない。当時の資生堂は、新しい充填剤、カラムの開発をするにあたり、疎水性と表面極性に注目して開発を進めてきたが、疎水性と表面極性は、トレードオフの関係であり、疎水性を犠牲にしなが、表面極性を上げるよう工夫をした。

### 3 アダマンチル基を用いた特長的なカラム

#### 3.1 開発コンセプト

当時の資生堂の開発コンセプトは、通常の逆相充填剤に多く使われている直鎖官能基 (C18, C8, C4 など) を使用せず、他社製品と異なる分離性能を発現させ、差別化を図るということであった。そこで、構造が立体的

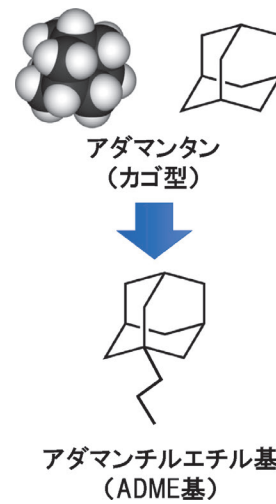


図3 アダマンチルエチル基 (ADME 基) の構造

に異なる、アダマンチル基を官能基として使用することを考えた。アダマンチル基は、10個の炭素がダイヤモンドの構造と同様に配置されているカゴ型のC10分子であり、このアダマンチル基とシリカゲル基材とをエチル基をスペーサーとして結合させた充填剤を開発した。図3にアダマンチル基、アダマンチルエチル基 (ADME 基) の構造を示す。ADME 基を狙った密度で充填剤表面に導入し、これまでの逆相カラムとは異なる特長的な分離を達成することに成功した。ADME カラムは、ある程度の疎水性を保ちながら、表面極性も高く設計され、これまでにないマッピングポジションを持った充填剤となった。

#### 3.2 ADME カラムのメカニズム

図4に ADME カラムと C18 カラムにおける充填剤表面のイメージ図を示す。C18 カラムの場合、一般的に C18 基は直立しているのではなく、絡み合い、移動相の種類によっては寝込み状態にあると考えられている。極性化合物が近づいてきた場合、C18 基がもたらす疎水場の影響で極性化合物が充填剤の表面と相互作用をしようとするが、その際に非常に大きなエネルギーを

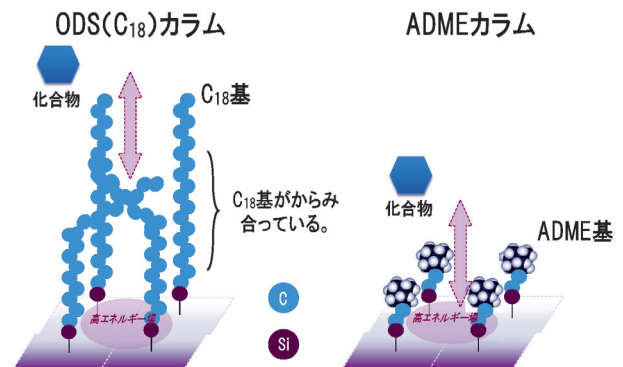


図4 ADME カラムと ODS (C18) カラムにおける充填剤表面のイメージ図

表 1 ADME カラムの物性値

粒子径 (μm)	細孔径 (nm)	比表面積 (m <sup>2</sup> /g)	密度 (μmol/m <sup>2</sup> )	C %	使用 pH 範囲	耐圧 (Mpa)
2	10	310	2.7	12	2~9	100
3	10	310	2.7	12	2~9	20
5	10	310	2.7	12	2~9	20

要する。そのため、極性化合物は、充填剤表面に近づくことができず、相互作用の影響を受けにくい。一方、ADME カラムの場合、ADME 基は、カゴ型で立体的に小さい構造を取ると考えられ、ADME 基間の相互作用が弱い。極性化合物は、C18 基と比較して充填剤表面との相互作用、すなわち表面極性の影響を受けやすく、保持が大きくなると考えられる。

### 3.3 ADME カラムの仕様および物性値<sup>5)</sup>

表 1 に ADME カラムに使用する充填剤の物性値を示す。原料シリカゲルには、弊社製品の中でも粒子径、細孔径が精密にコントロールされた高純度で金属分が少なく、アルカリに対しても耐性がある高強度シリカゲルを用いて調製した。

## 4 ADME カラムの分析例及び基本性能評価

### 4.1 ADME カラムと C18 カラムの分離比較

図 5 に一般的な C18 カラム (弊社 MG II) と ADME カラムの分離比較したクロマトグラムを示す。これは、カラム以外の分析条件を同じにして、10 種類の標準物質をプロットしたものである。C18 カラムの場合、標

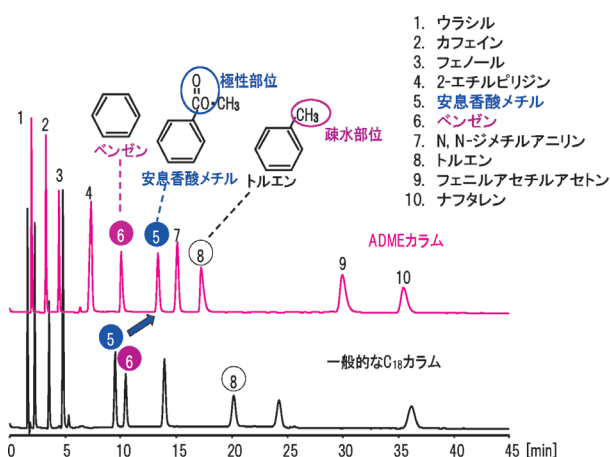


図 5 ADME カラムと C18 カラムの分離比較

HPLC 条件：カラム、固定相は図中に表示、4.6 mm i.d.×150 mm, 5 μm； 移動相、水/メタノール=50/50； 流速、1.0 mL/min； カラム温度、40 °C； 検出：UV 254 nm； ピーク、1. ウラシル、2. カフェイン、3. フェノール、4. 2-エチルピリジン、5. 安息香酸メチル、6. ベンゼン、7. N,N-ジメチルアニリン、8. トルエン、9. フェニルアセチルアセトン、10. ナフタレン

準物質中の安息香酸メチルが先に溶出し、続いてベンゼンが溶出する。一方、ADME カラムの場合、ベンゼン、安息香酸メチルの順に物質が溶出し、溶出順序が逆転する。安息香酸メチルが極性部位を持つため ADME カラムでの保持が大きくなり、その結果、ベンゼンと安息香酸メチルの分離が、大きく改善される。また、ADME カラムの疎水性が C18 カラムより低いため、トルエンの保持が短くなる。これらの物質の保持時間から算出される ADME カラムの疎水性パラメーターは 1.91、表面極性 0.73 と算出される (図 2 参照)。

### 4.2 ADME カラムの基本特性と分離比較

図 6 に同条件で一般的なコアシェル型 C18 カラム (弊社 CAPCELL CORE C18)、高極性逆相カラム (弊社 CAPCELL CORE AQ)、ADME カラム (弊社 CAPCELL CORE ADME) の分離比較したクロマトグラムを示す。分析試料は、ホルモン薬であるエチニルエストラジオール (ピーク 3) とその代謝物である 17β-エストラジオール (エストロゲン) (ピーク 1) とエストロン (ピーク 2) を用いた。2, 3 は、化学的構造が類似しているため一般的な C18 カラムでは分離が困難であった。高極

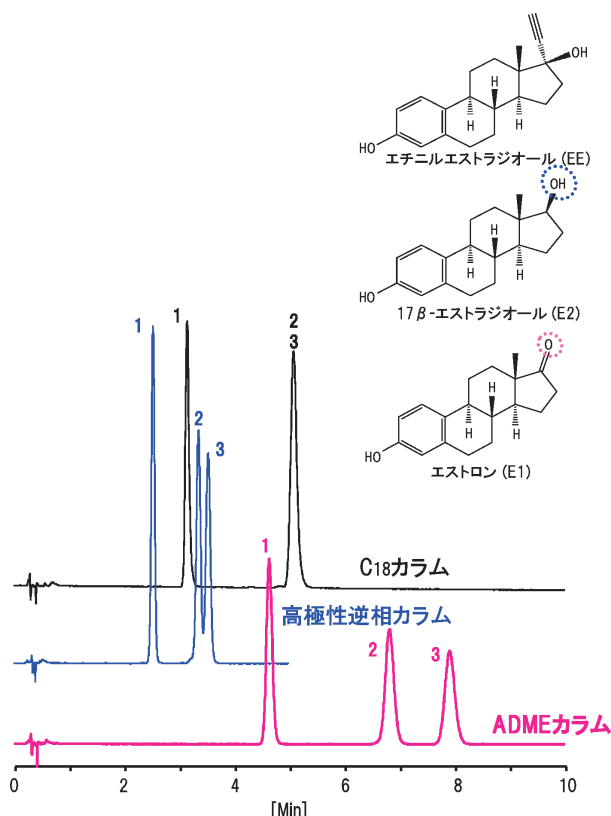


図 6 ADME カラムの基本特性と分離比較

HPLC 条件：カラム、コアシェル型カラム固定相は図中に表示、2.1 mm i.d.×50 mm； 移動相、水/アセトニトリル=70/30； 流速、0.4 mL/min； カラム温度、40 °C； 検出器、PDA, 220 nm； ピーク、1. 17β-エストラジオール (エストロゲン) (E2)、2. エストロン (E1)、3. エチニルエストラジオール (EE)。

性逆相カラムは、炭素含有率 (C %) を一般的な C18 充填剤よりも小さくし、水系 100 % の移動相で使用可能と最適化したカラムである。この高極性逆相カラムを使用した場合、全体的に他のカラムと比較して保持が短くなるが、2, 3 のピークの分離が、改善の傾向を示した。ADME カラムを用いた場合、全体的に他のカラムと比較して保持も大きくなり、2 と 3 の完全分離の達成を可能にした。この分離例から ADME カラムは、極性基に対して認識能が高いと言える。

### 4・3 生体アミン類の溶出挙動の比較

図 7 に水系 100 % 移動相での生体アミン 6 種の溶出挙動を示す。用いた試料は、カテコール骨格を有する神経伝達物質ノルエピネフリン (ピーク 2)、エピネフリン

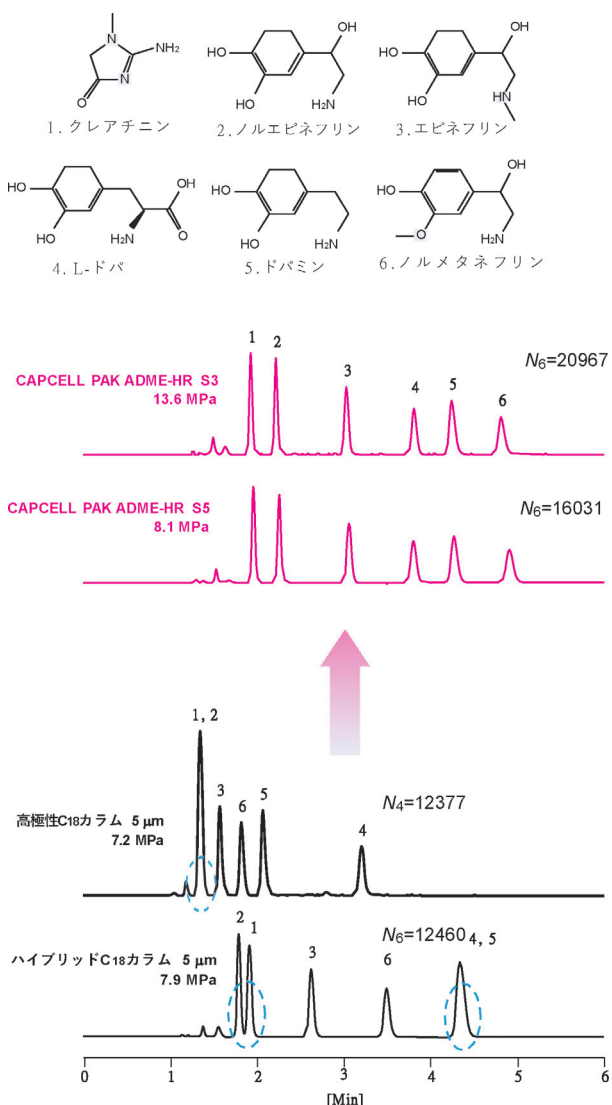


図 7 生体アミン類の溶出挙動比較

HPLC 条件：カラム、固定相は図中に表示、4.6 mm i.d.×150 mm； 移動相、0.1 % ギ酸水溶液； 流速、1.0 mL/min； カラム温度、40 °C； 検出器、NQAD (Evaporation 60 °C, Nebulizer 30 °C)； 注入量、3 μL ピーク、1. クレアチニン、2. ノルエピネフリン、3. エピネフリン、4. L-ドパ、5. ドパミン、6. ノルメタネフリン。

ン (ピーク 3) 及びドパミン (ピーク 5)、その前駆体である L-ドパ (ピーク 4)、ノルエピネフリンの代謝物であるノルメタネフリン (ピーク 6) 及び極性の高い生体アミンのクレアチニン (ピーク 1) である。分析に使用したカラムは、図 7 中に示した。検出器として、ユニバーサルなエアロゾルベース検出器である NQAD (Nano Quantity Analyte Detector) (大阪ソーダ製) を用いた。高極性 C18 カラムでは、1 及び 2 のピークが重なり、水系 100 % 移動相が使用可能なハイブリッド C18 カラムでは、4 と 5 のピークが重なり分離不良な傾向を示した。一方、ADME カラムを用いた場合、各々 5 μm、3 μm の粒子径とも良好なピーク形状と十分な分離能が得られた。これは、ADME が極性化合物に対して大きな保持力を発現でき、そのため、良好な分離を達成し、高理論段数を示したと考えられる。

### 4・4 有機酸の溶出挙動の比較

図 8 にカルボキシル基を有する 10 種類の有機酸を分

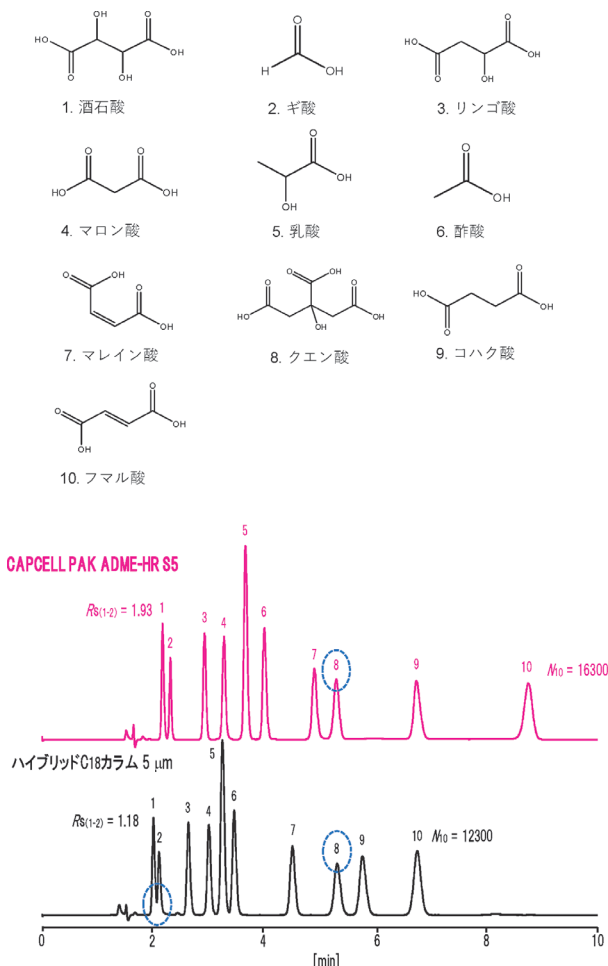


図 8 有機酸の溶出挙動の比較

HPLC 条件：カラム、固定相は図中に表示、4.6 mm i.d.×150 mm； 移動相：0.2 % リン酸溶液、流速：1.0 mL/min； カラム温度、35 °C； 検出：UV 215 nm； 注入量：20 μL； ピーク、1. 酒石酸、2. ギ酸、3. リンゴ酸、4. マロン酸、5. 乳酸、6. 酢酸、7. マレイン酸、8. クエン酸、9. コハク酸、10. フマル酸。

析した例を示す。水系 100 % 移動相を使用可能なハイブリッド C18 カラムでは、酒石酸（ピーク 1）とギ酸（ピーク 2）の分離度は  $RS_{(1-2)C18}=1.18$  でベースライン分離を達成させることは困難であった。一方、同条件で ADME カラムを用いた場合、 $RS_{(1-2)ADME}=1.93$  の完全分離を達成させることができた。カラム長を伸ばすことで C18 カラムでも分離改善が可能と考えられたが、分析時間が長くなることが示唆された。一方、クエン酸（ピーク 8）は、測定に用いた試料の中で最も分子量が大きく、炭素数も最も多い 6 個であることから、アダマンチルエチル基（アルキル基）の作用による表面極性よりも C18 基（アルキル鎖）の疎水性による保持力が優位に働き、保持時間が同等であったと推察される。また、マレイン酸（ピーク 7）とフマル酸（ピーク 10）のクロマトグラムの比較から、ADME カラムはシーストランス異性体に対する高い分離能が示唆された。

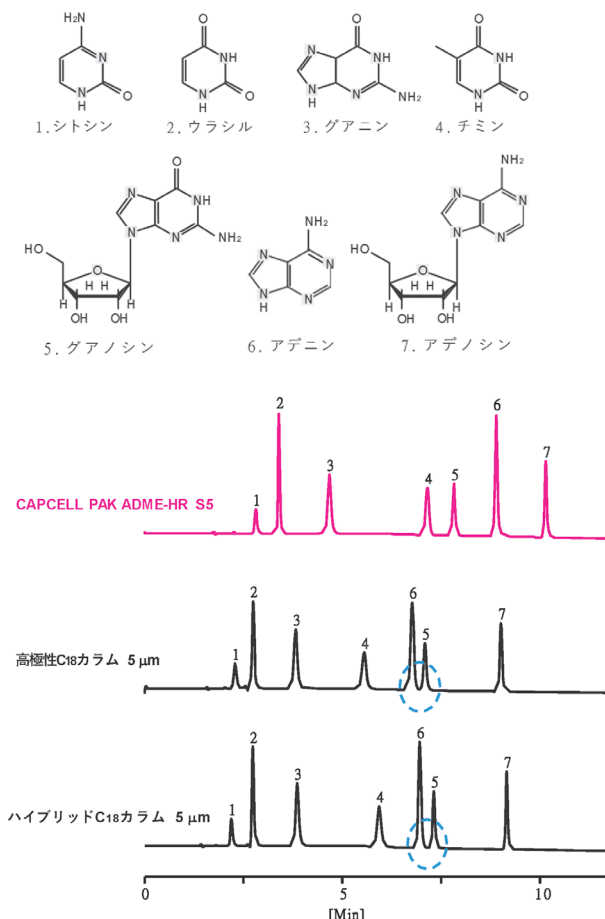


図 9 核酸塩基及びヌクレオシドのグラジエント溶出を用いた分析

HPLC 条件：カラム、固定相は図中に表示、2.0 or 2.1 mm i.d.×150 mm； 移動相：A) 10 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液、B) アセトニトリル、B のグラジエント： 1 % (0 min) → 1 % (1 min) → 40 % (15 min) → 1 % (15.1 min)； 流速：0.2 mL/min；カラム温度：40 °C； 検出：UV 254 nm； 注入量：2 μL； ピーク、1. シトシン、2. ウラシル、3. グアニン、4. チミン、5. グアノシン、6. アデニン、7. アデノシン。

## 5 ADME カラムの核酸分析例及び評価

### 5・1 核酸塩基とオリゴ核酸の分析の意義

近年、新型コロナウイルス感染症対策としてコロナワクチンが開発され、核酸医薬が注目されるようになってきた。核酸医薬は、オリゴ核酸を基本骨格とした医薬品である。核酸塩基、ヌクレオシド及びヌクレオチドは、極性の高い化合物であり、ADME カラムを分析に用いることで、特徴的な分離が可能であることが示唆された。そこで、ADME カラムを使用した分析例及び他の官能基の溶出挙動を示す。

### 5・2 核酸塩基及びヌクレオシドのグラジエント溶出を用いた分析

図 9 に 7 種類の核酸塩基及びヌクレオシドの分析した例を示す。高極性 C18 カラムや水系 100 % 移動相を使用可能なハイブリッド C18 カラムは、1 から 7 までのピークの溶出パターンが類似し、グアノシン（ピーク 5）及びアデニン（ピーク 6）の保持時間も近い関係性を示した。それに対して、ADME カラムは異なる選択性を示し、特にチミン（ピーク 4）、ピーク 5、6、ア

塩基長	塩基配列
14 mer	rCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU
17 mer	rUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU
20 mer	rUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU
21 mer	rGrUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU

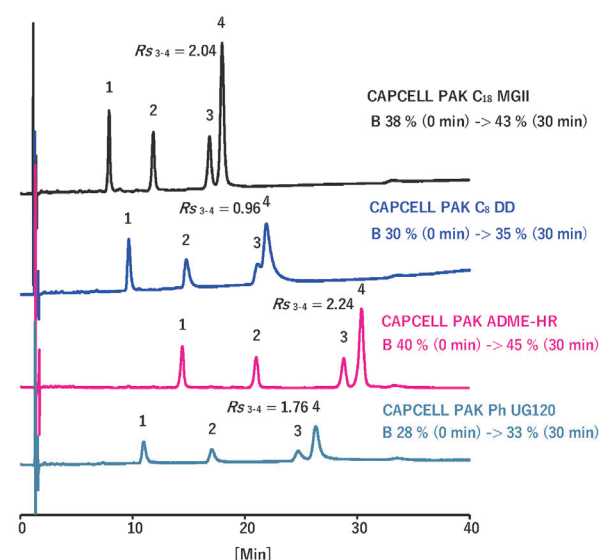


図 10 オリゴ核酸のグラジエント溶出を用いた分析

HPLC 条件：固定相は図中に表示、カラム、C18 MGII S3, C8 DD S3, Ph UG120 S5； 2.0 mm i.d.×150 mm, ADME-HR S3； 2.1 mm i.d.×150 mm, 移動相：A) 100 mmol/L トリエチルアミン-酢酸緩衝液 (TEAA), B) 100 mmol/L TEAA, アセトニトリル (CH<sub>3</sub>CN), 流速：300 μL/min, カラム温度：50 °C, 検出：UV 260 nm, 注入量：2 μL, ピーク、1. 14 mer, 2. 17 mer, 3. 20 mer, 4. 21 mer。

デノシン（ピーク 7）の保持も大きくなり、良好な分離を達成した。

### 5・3 オリゴ核酸の官能基の相違による溶出挙動の比較

図 10 にオリゴ核酸の分離検討をした結果を示す。グラジエント時間は 30 分間に固定した。この条件下での官能基ごとに有機溶媒であるアセトニトリルの初期比率及び最終比率が異なるが、20 mer（ピーク 3）及び 21 mer（ピーク 4）の適度な保持と分離を両立する有機溶媒の勾配は、C8 カラムを除いて、約 5 % であった。この条件下で C8 は、ピーク 3、4 のベースライン分離を達成することはできなかった。また、有機溶媒比率は、 $Ph < C8 < C18 < ADME$  の順番となった。本条件下において、オリゴ核酸の保持は、ADME カラムが最も大きく、ピーク 3、4 の分離度も  $RS_{(3-4)ADME} = 2.24$  と有機溶媒比率を大きくしても良好な分離結果が得られた。オリゴ核酸分析においても ADME カラムは、有効に使用可能であることを示した。

## 6 ま と め

充填剤評価方法、そして、特長的な官能基であるアダマンチルエチル基を修飾したカラムについて紹介した。

ADME カラムは、ODS (C18) カラムで保持が小さい、分離ができない場合には、条件はそのままカラムを交換することで分離改善の可能性を示した。ODS カラムと比較して優れた保持力、異なる選択性及び良好なピーク形状を示すため、医薬品業界など、あらゆる分野の核酸関連化合物の分析、分取への適用が期待される。

## 文 献

- 1) 株式会社 資生堂：廣江宜久，特許 6199140 号，“充填剤の製造方法、充填剤及びカラム”（2017. 9. 20）。
- 2) 神田武利：分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **59**, 175 (2010)。
- 3) Taketoshi Kanda : *Chromatography*, **32**, 95 (2011)。
- 4) 株式会社 大阪ソーダ：“高速液体クロマトグラフ用カラム総合カタログ”，(2018 年 2 月発行)。
- 5) 株式会社大阪ソーダ：“HPLC 用カラム主要グレードカタログ”，(2021 年 4 月発行)。



西山 尚秀 (Takahide NISHIYAMA)  
株式会社大阪ソーダ (〒551-0011 大阪府大阪市西区阿波座 1-12-18)。東京都立大学大学院工学研究科応用化学専攻博士課程修了。博士 (工学)。《現在の研究テーマ》新規 HPLC 用充填剤開発。《趣味》音楽鑑賞、スノーボード、水泳。  
E-mail : tnishiya@osaka-soda.co.jp

会社ホームページ URL :

<http://www.osaka-soda.co.jp>

関連製品ページ URL :

<https://sub.osaka-soda.co.jp/HPLC/>

URL :

<https://sub.osaka-soda.co.jp/HPLC/column/cpadme.html>