

逆相カラムTSKgel ODS-100Sの基本特性について

科学計測事業部ゲル製造部 セパレーションセンター
品質管理グループ
東ソー・テクノシステム分析センター

山崎 浩行
上間 力
小林 善美
海野 益郎

1. はじめに

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は、医薬、食品、高分子化学等様々な分野において広く用いられている分析手法です。なかでも、溶質の移動相 - 固定相間の分配平衡に基づく分離機構の分配クロマトグラフィーである逆相クロマトグラフィーは、高分子から低分子までの幅広い試料の分離分析に適用が可能なことから、最も汎用されている分離モードです。

各充填剤メーカーから種々の逆相クロマトグラフィー用充填剤が販売されていますが、シリカゲル表面にオクタデシル基（ODS）を化学修飾した充填剤が主流です。何れのメーカーも高分離、分析時間短縮・省溶媒あるいは、品質の安定等のユーザー要求を満足するべく、充填剤粒子の形状、ベースゲル基材の種類や純度の改良、官能基の種類や導入方法の改良が検討されています。特にユーザーからの要求事項で多い、安定した品質の充填カラムの供給を主眼にオクタデシル基をポリレーヤーで導入した逆相カラムTSKgel ODS - 100Sを開発、上市したのでその基本特性について紹介します。

2. 基本特性

2-1 弊社シリカ系ODSカラムとの比較

弊社は、シリカ系ODSカラムとしてポリレーヤータイプのTSKgel ODS - 120A, - 120T, Super - ODS、

モノレーヤータイプのTSKgel ODS - 80T_M, - 80Ts、バリデーション対応カラムであるTSKgel ODS - 80TsQAを有しています。ODS - 120A, - 120Tは、有機溶媒の多い溶離液で有効でペプチド等の分離に用いられます。- 120Aは、シラノールをエンドキャップしていないため、塩基性物質が吸着しますが、分離対象物質によっては有効と言えます。ODS - 80Tsは、水の多い溶離液で使用できるほか、徹底した無シラノール化や金属含有量の少ない高純度シリカを使用した充填剤です。また、Super - ODSは、極微小粒子により超高速高分離能を実現したカラムです。

今回、新規上市したTSKgel ODS - 100Sの特徴は、①ベースシリカゲルの製造からカラム充填検定までの工程を一貫して管理する事によって、ロット間差、カラム間差の低減を達成②既存のシリカ系ODSカラムでも行っている無シラノール化を更に徹底③高純度シリカを使用するとともに、原料の品質管理の徹底④ポリレーヤーODS等が挙げられます。ODSカラムの評価方法として提案されているパラメーターを用いてODS - 100Sと既存ODSカラムの比較を行った結果を表1に示します。ODS - 100Sは、疎水性のパラメータやナフタレンの保持力を比較する限り既存のODSカラムに比べ強い疎水性及び保持力を有しています。残存シラノール基との水素結合性を表すパラメータは、小さい値を示し、水素結合に寄与するシラノール基が徹底してエンドキャップされていることを示しています。表面極性パラメータが小さい

表1 既存ODSカラムとの比較

カラム	ナフタレン	疎水性 (k'_T/K'_B)	水素結合性 (k'_{CA}/k'_{Ph})	表面極性 (k'_{MB}/k'_T)	イオン交換性 (k'_{EP}/k'_B)	平面認識能 (k'_{TP}/k'_{OP})
ODS - 100S	20.11	2.11	0.25	0.38	0.31	1.55
ODS - 80TSQA	16.99	2.09	0.39	0.47	0.40	1.26
Super - ODS	9.62	2.08	0.31	0.42	0.44	1.56
ODS - 120T	14.61	2.00	0.41	0.47	0.61	1.64

T:トルエン B:ベンゼン CA:カフェイン Ph:フェノール MB:安息香酸メチル
EP: 2 - エチルピリジン TP:トリフェニレン OP:o - ターフェニレン
 $k' = (V_i - V_0) / V_0$

ことから、保持力の小さい極性物質の分離よりも疎水性の比較的強い物質の分離に適していると考えられます。充填剤のエンドキャップが不十分でシラノール基が残存する場合、塩基性物質がイオンの相互作用により充填剤に吸着するためイオン交換性パラメータは、大きい値となります。既存ODSカラムに比べODS - 100Sは、小さい値であり、水素結合性同様にシラノール基のエンドキャップが徹底されていることを示しています。また、平面認識能については、モノレーヤ-ODSに比べポリレーヤ-ODSが高い選択性を示すことが知られています。モノレーヤ-ODSであるODS - 80TsQAに比べポリレーヤ-ODSのODS - 100S、ODS - 120T及びSuper - ODSが大きい値を示しています。この他に金属と配位結合性を持つ物質は、充填剤中の金属不純物と配位するために

図1に示すようにピークがテーリングしたり、全く溶出しなかったりする場合があります。ベースシリカゲルに高純度シリカゲルを使用し製造工程での金属混入を管理することで金属配位物質のテーリングを極力抑えています。

以上の結果より、ODS - 100Sは、既存のODSカラムとほぼ同等の保持力を有しており、保持力の小さい極性物質よりも疎水性の比較的強い物質の分離に適しています。また、シラノール基の更に徹底したエンドキャップを達成していることから、塩基性物質を再現性良く分析することが可能であることが示唆されます。

2-2 他社シリカ系ODSカラムとの比較

弊社カラムと同じ評価方法により他社カラム7本との比較を行った結果を表2に示します。疎水性バ

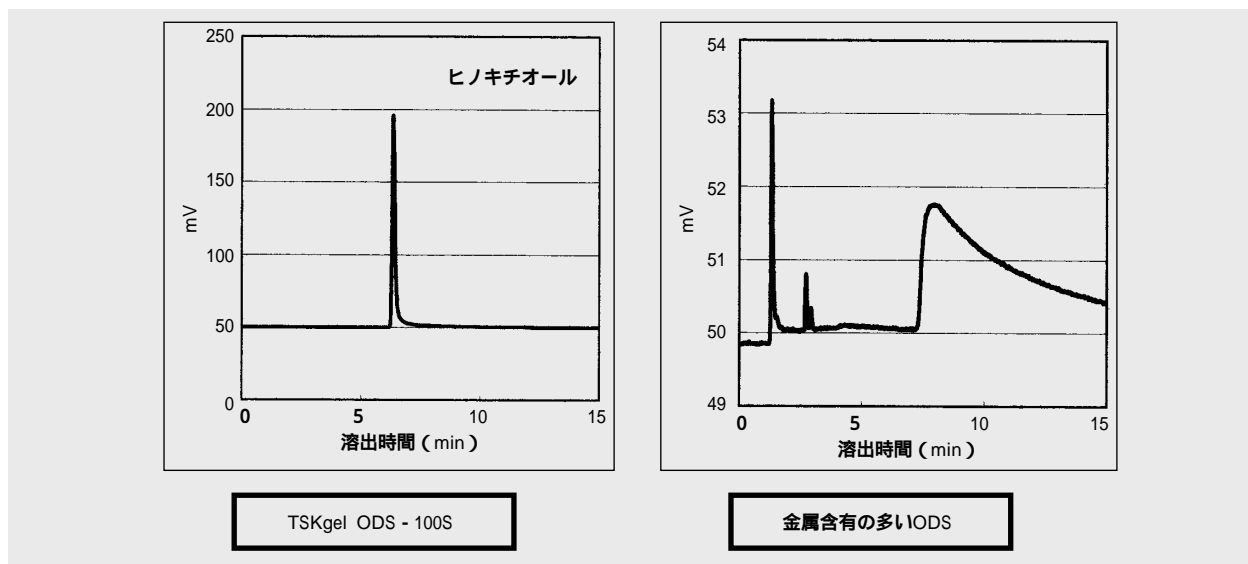


図1 金属配位結合物質の溶出比較

表2 他社ODSカラムとの比較

カラム	ナフタレン	疎水性 (k'_T/k'_B)	水素結合性 (k'_{CA}/k'_{Ph})	表面極性 (k'_{MB}/k'_T)	イオン交換性 (k'_{EP}/k'_B)	平面認識能 (k'_{TP}/k'_{OP})
ODS - 100S	20.11	2.11	0.25	0.38	0.31	1.55
Inertsil ODS - 3V	26.00	2.08	0.34	0.43	0.36	1.33
L - column	24.64	2.11	0.32	0.41	0.37	1.65
Discovery C18	9.78	2.07	0.29	0.43	0.38	1.51
YMC - Pack Pro C18	19.00	2.15	0.34	0.42	0.37	1.29
LUNA 5 μ C18(2)	19.03	2.08	0.31	0.44	0.39	1.13
CAPCELL PAK UG120	14.30	2.07	0.32	0.38	0.33	1.32
Symmetry C18	22.31	2.11	0.27	0.38	0.33	1.60

T:トルエン B:ベンゼン CA:カフェイン Ph:フェノール MB:安息香酸メチル
EP: 2 - エチルピリジン TP:トリフェニレン OP:o - ターフェニレン

ラメータやナフタレンの保持力は、評価に用いた7本のほぼ平均的な数値を示しています。表面極性パラメータは小さく、極性物質の保持力が弱いグループに属しています。水素結合性やイオン交換性パラメータは、比較したカラムが何れもシラノール基のエンドキャップを行っていることから小さい値を示しています。図2のクロマトグラムに示すように、ODS-100Sでは、塩基性物質のピリジンについて良好なピーク形状が得られていますが、エンドキャップの不十分なカラムでは、ピリジンのピーク形状にテーリングが認められます。

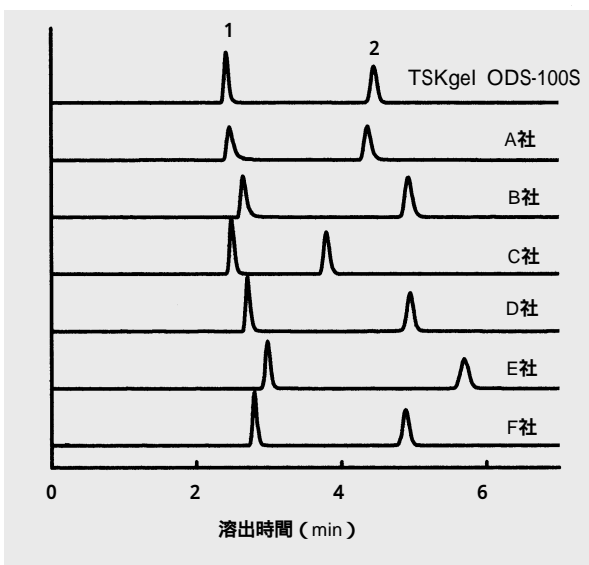


図2 塩基性物質を用いた他社カラムとの比較
 カラム：4.6mmIDx150mmL
 溶離液：30% アセトニトリル
 試料：1.ピリジン 2.フェノール
 流速：1.0ml/min、温度：40℃
 検出：紫外吸光度計(254nm)

3. 品質安定化

ODS充填剤の品質の安定化は、ベースとなるシリカゲルの物性のバラツキが重要な要因となります。表3にODSの品質に及ぼすゲルの物性の一覧を示します。ベースシリカゲルの製造、ODSの導入、エンドキャップ処理及びカラムの充填・検定の各製造工程毎に品質や製造条件の管理を行い、安定した品質のODSカラムを供給しています。表4に6ロットのベースシリカゲル及びODSゲルの物性平均値と製造再現性及びバリデーション対応逆相充填カラムODS-80TsQAの製造再現性を示します。何れの物性値も極めて小さい変動幅で製造されていることが分かります。また、ODS-100Sは、バリデーション対応したカラムに近い変動幅の製造再現性が得られています。

ODSの導入及びエンドキャップ処理後、保持力、選択性(平面認識能)及びイオン交換性がクロマト評価により管理されています。表5に11ロットのクロマト評価結果を示します。エンドキャップ処理のバラツキに由来すると考えられるピリジンのピーク形状の変動が若干大きいものの、何れも極めて小さいC.V.値を示しています。図3に6ロットの保持力、選択性を比較したクロマトグラム、図4に塩基性物質

表3 ODS品質に及ぼすゲル物性

1. 細孔容積(Vp) [ml/g]
2. 細孔径(pd) [(nm)] [平均細孔径、極大細孔径]
3. 比表面積(SA) [m²/g]
4. 粒子径(dp) [μm] [平均粒子径、dp₉₀/dp₁₀]
5. ODS表面濃度(C¹⁸) [μmol/m²]
6. 炭素含有量(C%)

表4 シリカゲル及びODSゲル物性のCV値

	ODS - 100S		ODS - 80TsQA
	平均値	CV値(%, n=6)	CV値(%, n=6)
平均細孔径()	102	1.1	0.5
極大細孔径()	103	1.6	
細孔容積(cc/g)	0.86	1.6	0.7
比表面積(m ² /g)	339	1.7	0.5
粒子径 ^{*)} (μm)	6.89	0.5	0.6
dp ₉₀ /dp ₁₀ ^{*)}	1.58	0.9	1.8
ODS表面濃度(μmol/m ²)	3.20	2.3	1.3
炭素導入量(%)	18.0	1.7	0.8

^{*)} コールター測定

表5 ODSカラムのクロマト評価結果

	平均値	CV値(%, n=11)
k' (ナフタレン保持力)	1.81	1.2
k' (フェノール保持力)	2.04	0.8
(立体選択性)	1.51	0.3
k' (塩基性物質保持)	0.64	1.0
TP/TP (ピリジン段数/フェノール段数)	0.68	4.4

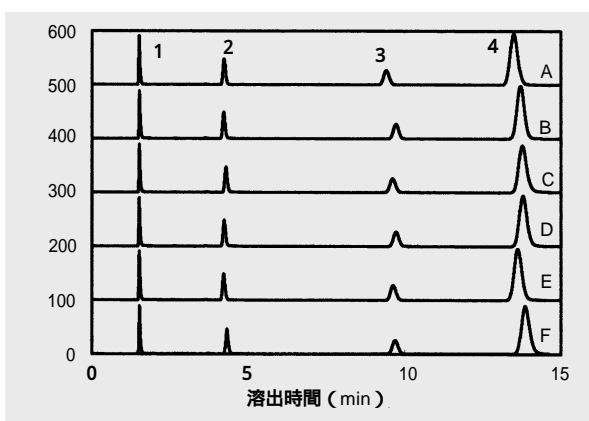


図3 TSKgel ODS - 100Sロット別溶出比較
 カラム: TSKgel ODS - 100S (4.6mmIDx150mmL)
 溶離液: 80%メタノール
 試料: 1.ウラシル、2.ナフタレン、3.o-ターフェニル、
 4.トリフェニレン
 流速: 1.0ml/min、温度: 40℃
 検出: 紫外吸光度計(254nm)

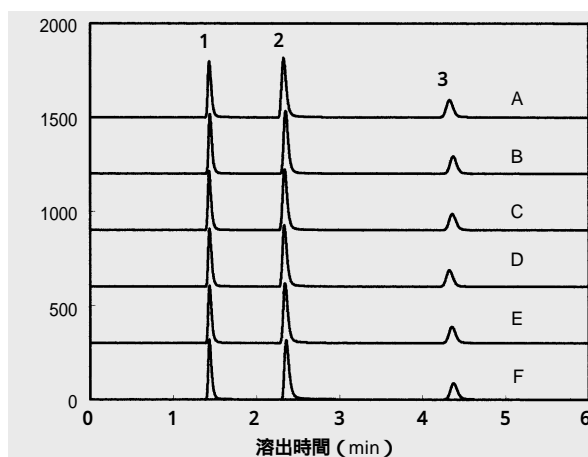


図4 TSKgel ODS - 100S ロット別溶出比較
 カラム: TSKgel ODS - 100S (4.6mmIDx150mmL)
 溶離液: 30%アセトニトリル
 試料: 1.ウラシル、2.ピリジン、3.フェノール
 流速: 1.0ml/min、温度: 40℃
 検出: 紫外吸光度計(254nm)

表6 TSKgel ODS - 100S商品系列

品番	粒子径	カラムサイズ	理論段数(カラム)	ガードカラム
19534	5 μm	4.6mmI.D. × 15cm	11000	} 3.2mmI.D. × 1.5cm 専用ホルダー
19535	5 μm	4.6mmI.D. × 25cm	18000	
19536	5 μm	3mmI.D. × 15cm	11000	
19537	5 μm	3mmI.D. × 25cm	18000	
19538	5 μm	2mmI.D. × 15cm	10000	} 2mmI.D. × 1cm 専用ホルダー
19539	5 μm	2mmI.D. × 25cm	16500	

のクロマトグラムを示します。

4. おわりに

逆相クロマトグラフィー用充填カラムの安定した品質の提供を主眼に開発・商品化したODS - 100Sは、各製造工程において厳密に品質管理され製造されており、バリデーション対応充填カラムODS - 80TsQA

同様に、極めて狭い範囲の変動幅で製造されており、ロット間差やカラム間差の小さい逆相充填カラムと言えます。また、表6の商品系列に示しますように、コンベンショナルカラムからセミマイクロカラムまで幅広く用意されており、今後、様々な分野の広範囲な試料への適用が期待されます。