

# 逆相分析カラム TSKgel ODS-100V, ODS-100Zの特性とその応用

科学計測事業部 ゲル製造部 セパレーションセンター 山崎 浩行  
 小熊 司  
 三苫 恵民

## 1. はじめに

シリカゲルの表面にオクタデシル基 (C18) を導入したシリカ系逆相充てん剤は、分離特性や操作性に優れていることから、医薬品などの低分子化合物の測定に最も広く使用されている。医薬品やそれらの代謝物の多くは、アミノ基などの極性基を有しており、残存シラノール基のエンドキャップ効率に優れた充てん剤が求められてきた。また、親水性化合物は、逆相充てん剤への保持が弱いため、より強い保持力を有する充てん剤が望まれている。我々は、残存シラノール基に対して非常に高いエンドキャップを施し、塩基性化合物のピーク形状を改善した、C18導入量の異なる逆相

充てん剤を開発した。本稿では、開発したODS充てん剤の特性と分離例について紹介する。

## 2. TSKgel ODS-100V, ODS-100Zの特性

### 2.1 充てん剤の特性

表1の充てん剤の物性に示すように、ODS-100V及びODS-100Zは、広い比表面積 (450m<sup>2</sup>/g) を有した、細孔径100 の高純度シリカゲルにC18を導入した粒子径5 μmの逆相充てん剤である。充てん剤の表面に導入するC18導入量をODS-100Vが15%、ODS-100Zが20%となるようにコントロールしている。図1に他社ODSカラムを含めた疎水性と表面極性のパラメータ

表1 充てん剤の物性

Column	Particle size (μm)	Pore size (Angstrom)	Specific surface area (m <sup>2</sup> /g)	Pore Volume (mL/g)	Functionality	Carbon contents* (%)	Bonding structure
TSKgel ODS-100V	5	100	450	1.10	C18	15	Monolayer
TSKgel ODS-100Z	5	100	450	1.10	C18	20	Monolayer

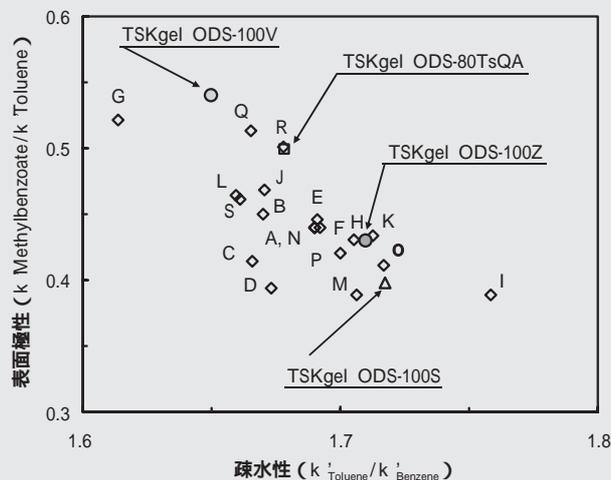


図1 ODSカラムの疎水性と表面極性パラメーター

のプロットを示す。ODS-100Vは、表面のC18濃度が低いため、疎水性が低かつ表面の極性が高くなっている。一方、ODS-100Zは、比較的疎水性が高く、中程度の表面極性を示す。これら、充てん剤表面の極性の違いは、保持力、平面認識能や各種選択性などに異なるHPLC物性値を与えている。

## 2.2 保持力

図2に示すように、各種低分子化合物の疎水度パラメーター (Log P) と保持力 (Log k') には、直線関係が得られる。一般にC18導入量が多くなるほど保持

力が強くなることが知られている。ナフタレンの保持力 (k') の他社ODSカラムとの比較を図3に示す。中性化合物であるナフタレンの保持力は、充てん剤表面へのC18導入量が20%と高いODS-100Zで、強い保持力を示し、C18導入量の低いODS-100Vでは、各社ODSカラムの中で中程度の保持力となっている。一方、図2で示されるように、アミノ基など極性基を有する親水性の低分子化合物は、C18導入量の高いODS-100Zに比べC18導入量の低いODS-100Vで若干強い保持力を与える。これは、C18導入量を低くしたことにより、充てん剤表面の表面部位と親水性化合物の相互

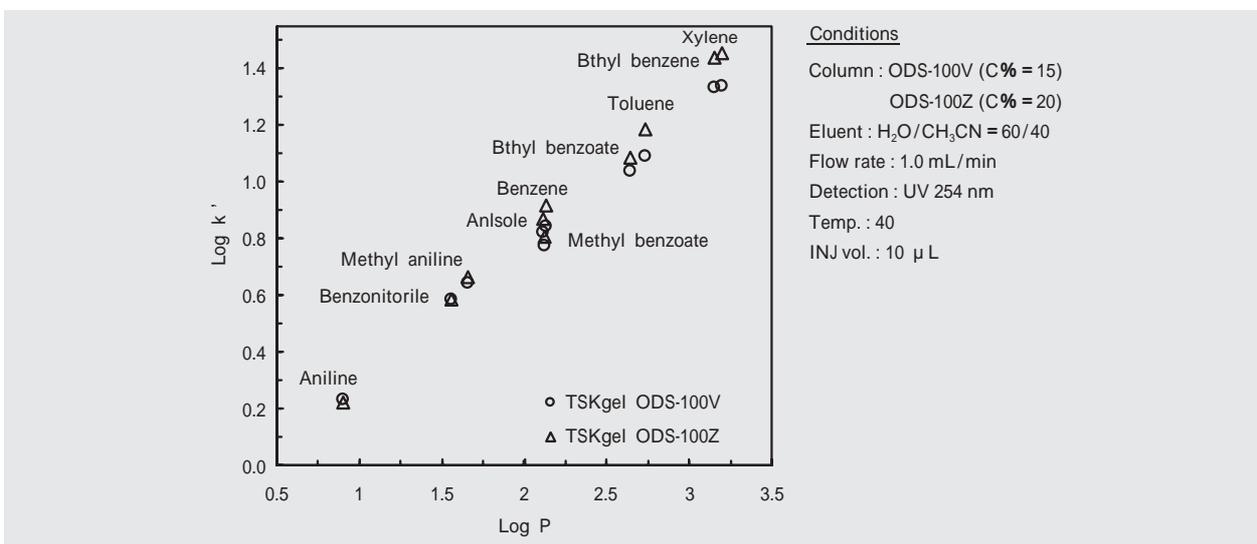


図2 疎水度パラメータ (Log P) と保持力 (Log k') の関係

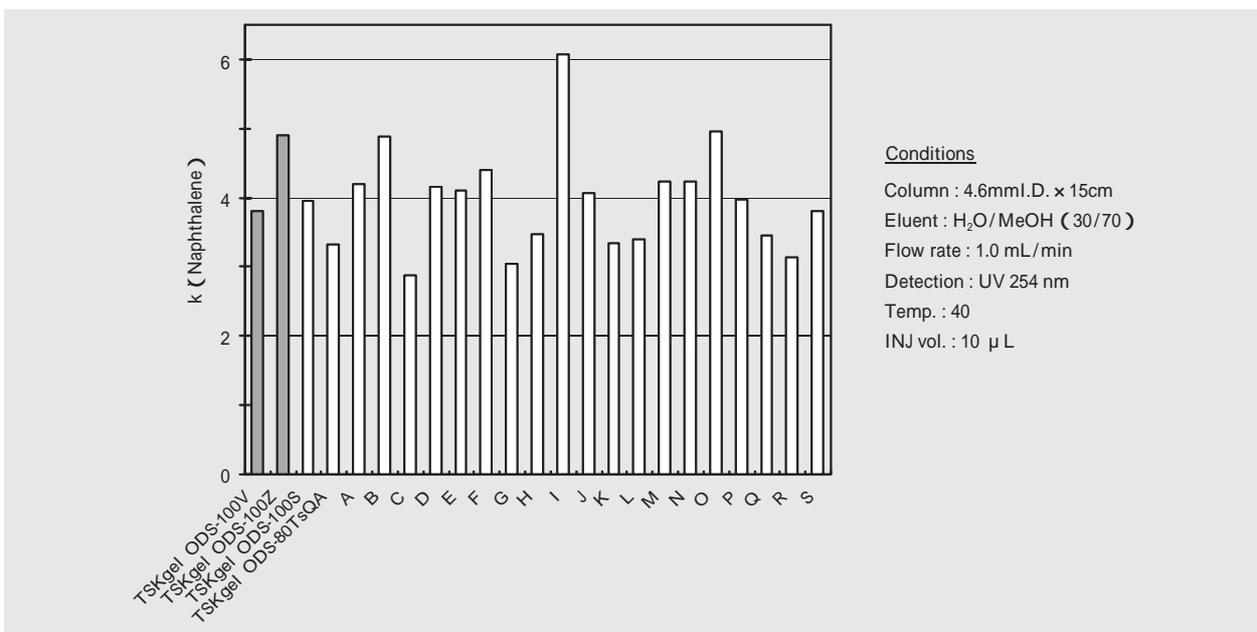


図3 保持力の比較

作用が保持力に関与していると考えられる。また、充てん剤表面の極性の高いODS-100Vは、水100%移動相においても、官能基であるC18の寝込みや細孔内からの移動相の排斥を抑えることができるため、従来のODSカラムで使用できなかった水100%移動相で保持力の低下を起こすことなく親水性化合物の測定が可能であった。図4に10mmol/Lリン酸緩衝液 (pH 7.0) を移動相に用い、核酸塩基を測定したクロマトグラムを示す。

### 2.3 イオン交換性

ODS充てん剤は、シリカゲル表面にC18アルキル鎖が化学結合しているが、C18導入後の充てん剤表面には、未反応のシラノール基が残っており、このシラノール基がイオンの相互作用により、塩基性化合物の保持やピーク形状に影響を与えることが知られている。通常、このような相互作用を防ぐためにトリメチルシ

リル基 (TMS基) などによる残存シラノール基のエンドキャップを行う。図5のエンドキャップ効率の異なるODSカラムによる移動相のpHと保持の関係に示すように、デシプラミンのような塩基性化合物は、移動相のpHを高くすることによりアミノ基の解離度が低下して疎水性が高くなるため保持力が増加する。しかしながら、残存シラノール基のエンドキャップがODS-100VやODS-100Zに比べ不十分なODS-80TsQAにおいては、移動相のpHが高くなるにしたがい、残存シラノール基とデシプラミンのアミノ基のイオンの相互作用が強くなるために、充てん剤に強く保持する。また、図6に示すようにデシプラミンのピーク形状 (非対称係数) は、エンドキャップ効率の優れたODS-100V、ODS-100Zで移動相のpHによらず良好なピーク形状が得られているのに対して、エンドキャップ効率の劣るODS-80TsQAでは、移動相のpHが高くなるにしたがって、ピークのテーリングが大きくなっている。

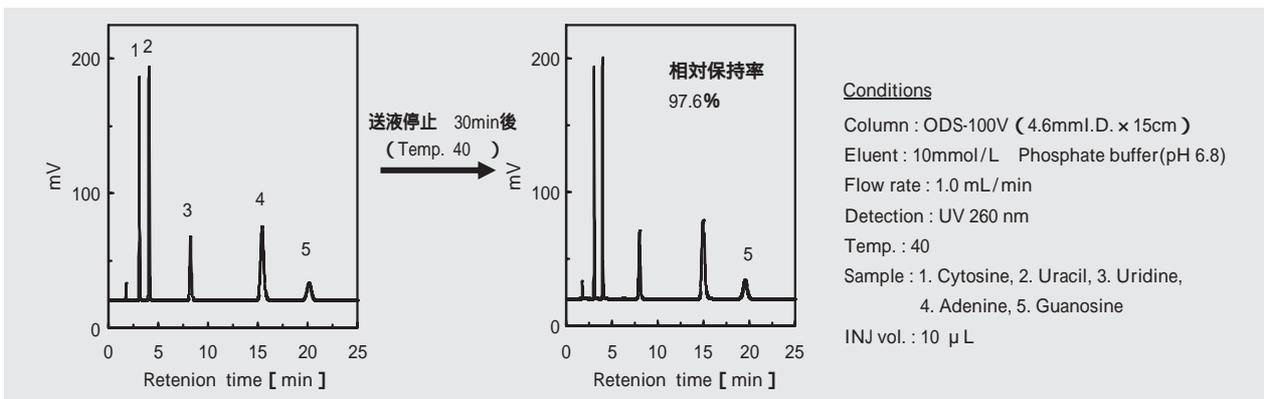


図4 有機溶媒を含まない緩衝液における核酸塩基の保持の低下

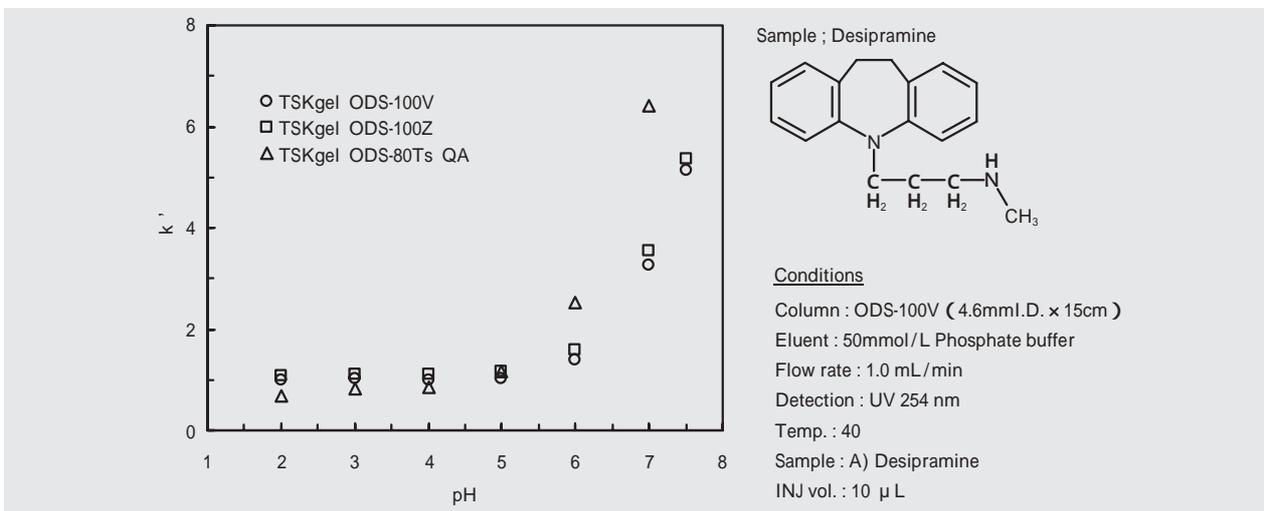


図5 移動相のpHと保持の関係

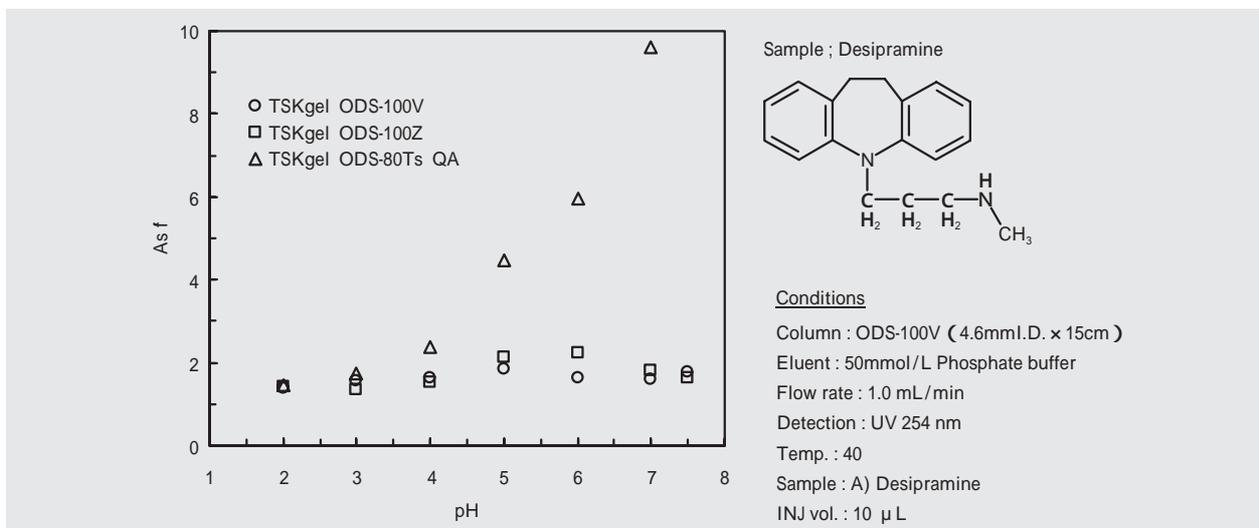


図6 移動相のpHと塩基性化合物の非対称係数の関係

このように、ODS-100V、ODS-100Zは、良好なピーク形状で塩基性化合物の保持の大きい、中性移動相での測定が可能である。図7及び図8に他社ODSカラムとの塩基性化合物（デシプラミン）及び酸性化合物

（ギ酸）のピーク形状の比較を示します。塩基性、酸性化合物とも他社ODSカラムと同等以上のピーク形状を示していることが分かる。

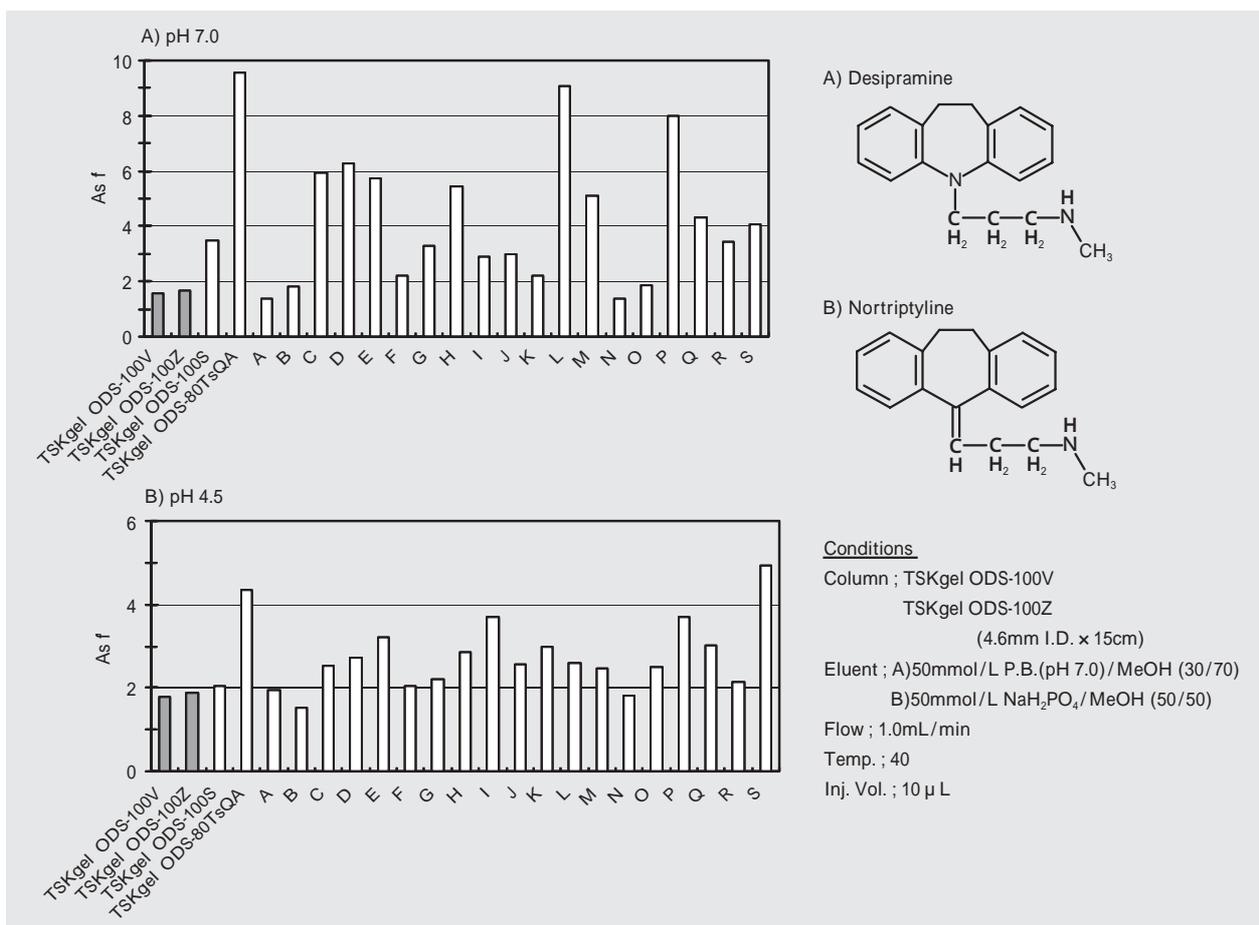


図7 塩基性化合物のピーク形状の比較

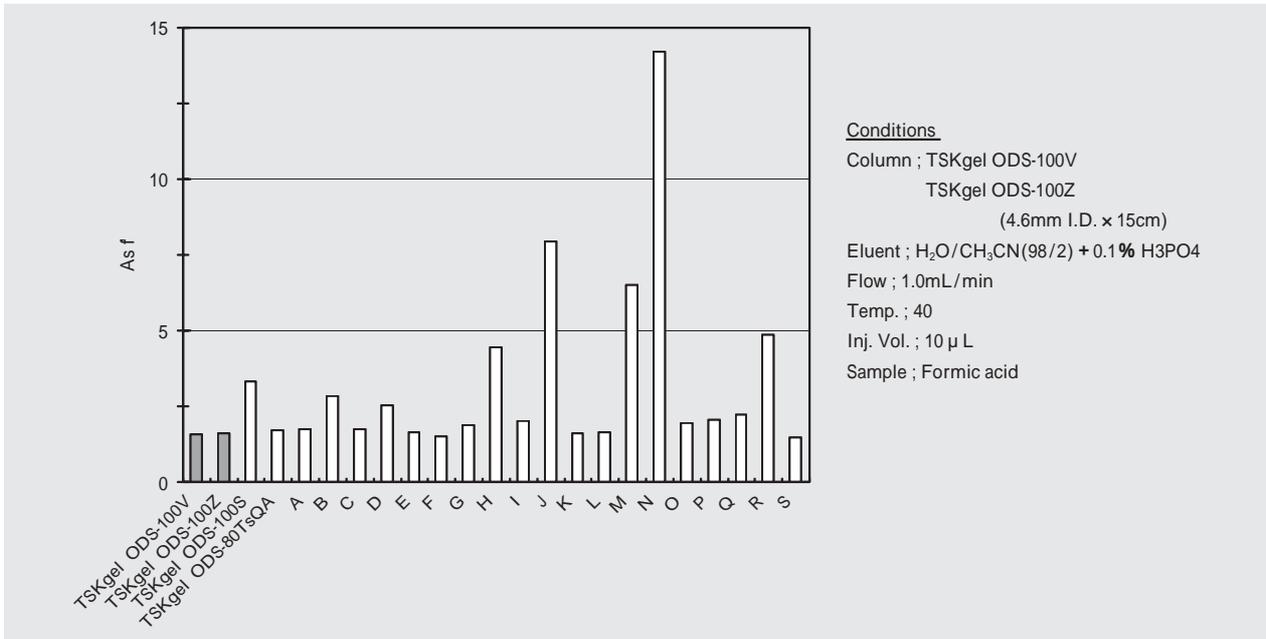


図8 酸性化合物(ギ酸)のピーク形状の比較

2.4 耐久性

シリカ系逆相充てん剤であるODSカラムを酸性移動相で使用した場合、保持力の低下などの性能低下が起こる。これは、官能基の結合部位であるシロキサン結合が、酸や水により加水分解して、官能基であるC18やエンドキャップ剤が脱離するためと考えられる。一般に充てん剤表面のC18導入量の低い充てん剤やエンドキャップ効率の悪い充てん剤ほど加水分解を受けやすいことが知られている。充てん剤表面のC18

導入量を低く抑えたODS-100Vは、この問題を解決するために、表面に導入するシリル化剤の濃度及び種類を最適化することにより、耐久性の向上を達成した。図9にODS-100V、ODS-100Zの酸性移動相での通液耐久性を示す。

3. 応用例

ODS-100V、ODS-100Zによるビタミン類を測定した

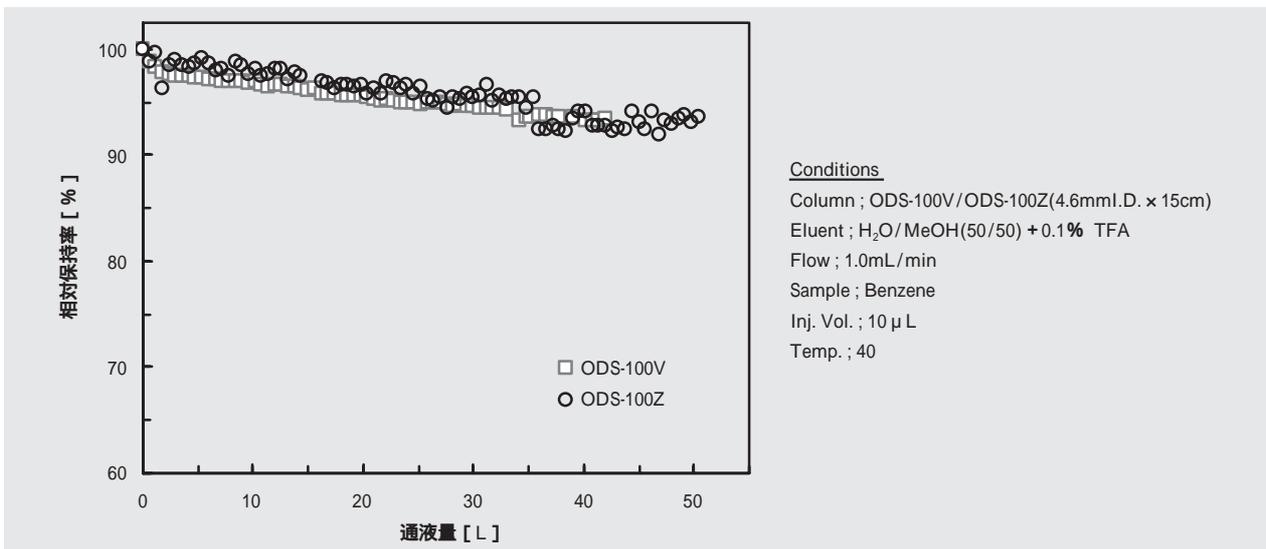


図9 酸性移動相での通液耐久性

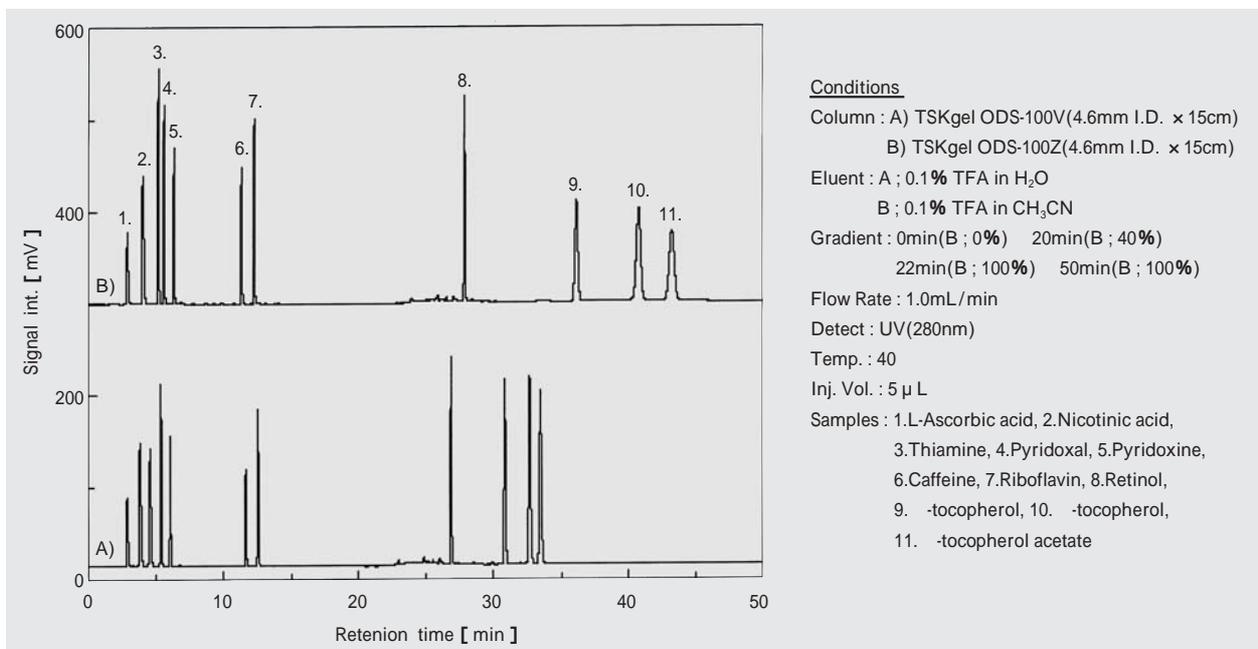


図10 ビタミン類のクロマトグラム ( ODS-100VとODS-100Zの比較 )

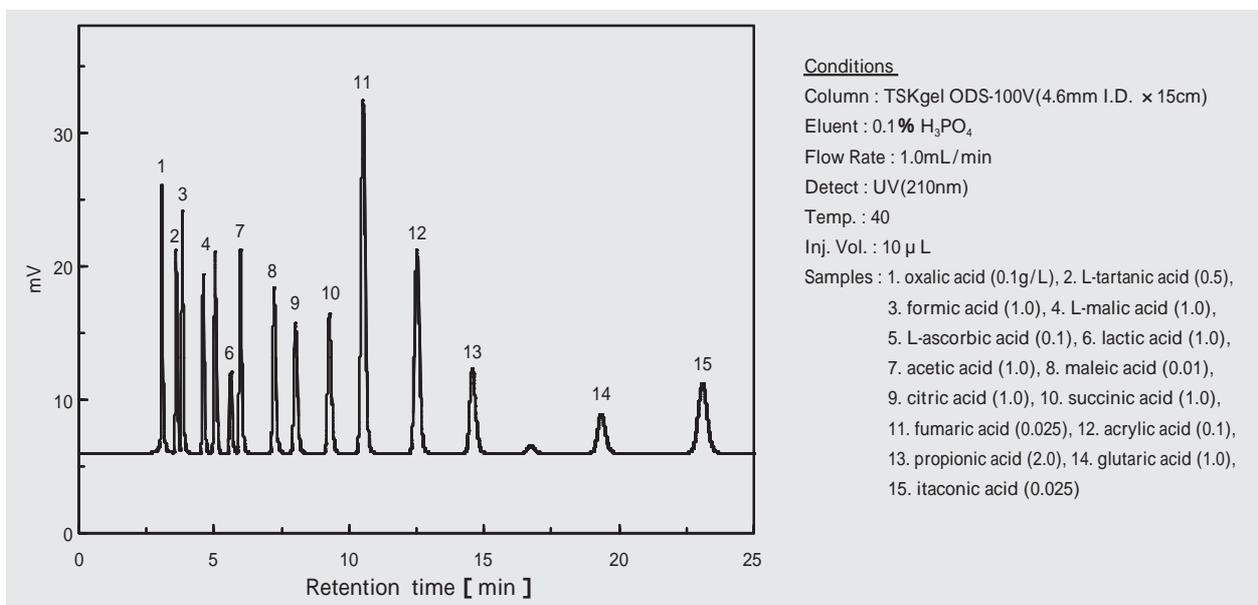


図11 有機酸のクロマトグラム

クロマトグラムを図10に示した。前述したように、C18導入量が低く、表面極性の高いODS-100Vは、トコフェロールなどの脂溶性ビタミンの保持が弱くなっている。アスコルビン酸などの水溶性ビタミンの保持がODS-100Zと同等或いは、若干強くなっている。一方、C18導入量の高いODS-100Zは、疎水性の高い脂溶性ビタミンの保持が強くなっている。図11にODS-100Vによる有機酸の測定例を示した。有機溶媒を含まない移動相において、良好なクロマトグラムが得ら

れた。

#### 4. おわりに

ODS-100V、ODS-100Zは、同じベースシリカ表面に異なる濃度のC18を導入することにより、異なる選択性を有したODSカラムとなっている。両者は共に十分なエンドキャップを行っていることから、塩基性化合物で良好なピーク形状を得ることができる。また、

高純度のシリカゲルを使用し、不純金属が混入しないように合成されており、有機酸などの酸性化合物に対しても良好なピーク形状を得ることが可能である。極性基を有する親水性化合物の測定には、表面極性の高いODS-100Vが優れ、脂質など疎水性の高い化合物の保持や分離には、ODS-100Zが優れている。このように、選択性の異なる2種類のODSを使い分けることにより、各種低分子化合物で最適な分離を達成することができる。