

# 固体NMRによる液クロカラム充填剤の構造解析

岡 秀 行  
徳 永 裕 司  
岡 田 忠 司

## Solid State NMR Study of Silica Gel Packing Materials for High-Performance Liquid Chromatography

Hideyuki OKA  
Yuji TOKUNAGA  
Tadashi OKADA

Silica gel packing materials modified by mono-, di- and trifunctional octadecylchlorosilanes have been studied by solid state  $^{29}\text{Si}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance (NMR) using the cross polarization (CP) and magic-angle spinning (MAS) techniques. Qualitative and quantitative analyses of the NMR data obtained are utilized for the determination of the chemical modification state on silica surface as well as the amount of residual silanol groups. The silylation with trimethylchlorosilane (TMS) followed by additional treatment of the chemically modified silica surface is found to lead to the decrease in amount of the residual silanol groups. The present solid state NMR data together with the results from high-performance liquid chromatography suggest that more effectively silylated silica gel packing materials depress the adsorption of basic species.

### 1. はじめに

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は溶液中の成分分離・分析に多く用いられており、中でも逆相クロマトグラフィーは医薬品、食品を中心に広範な分野で利用されている。逆相クロマトグラフィー充填剤の ODS (オクタデシル) 化シリカゲルは、シリカゲル表面を  $\text{C}_{18}$  で修飾後、エンドキャッピングを行い分離能に影響を及ぼさず残存シラノールを封止し合成する。この充填剤は、シリカゲルの細孔径、表面積、表面処理法、ODS 基の導入形態や表面密度などにより異なる分離特性を示す。

しかしながら、逆相クロマトグラフィーのカラム性能低下の要因として、ODSゲル中のシラノールおよ

び金属不純物の存在が示唆されている<sup>1)</sup>。これらの中でも、残存シラノールは塩基性物質を吸着し、クロマトのピークテーリングを招き大きな問題である。このシラノール解析法には DRS (diffuse reflectance spectroscopy: FT-IR の拡散反射法) 等があるが<sup>2), 3)</sup>、これに対し固体核磁気共鳴法 (NMR) は、カラム充填中のシラノール基だけでなくシリカゲル表面への ODS 基結合状態や導入 ODS 基の状態分析等も可能であり、総合的な構造解析法として果たす役割は大きいと考えられる。

そこで、今回、ODSゲルの構造解析を  $^{13}\text{C}$  及び  $^{29}\text{Si}$  CP-MAS NMR 法を用いて行い、 $^{13}\text{C}$  NMR では導入 ODS 基の存在状態を、 $^{29}\text{Si}$  NMR ではシリカゲル表面の ODS 基の結合状態分析及び残存シラノールの定量

的解析を行った。さらに、NMRデータとカラム性能との関連性についても検討したので報告する。

## 2. 実験

### 〔1〕 カラム充填剤

カラム充填剤のベースシリカ粒子にはいずれも市販の5.0 $\mu$ m粒子を用いた。ベースシリカ表面への化学(ODS化)修飾は、ガラスセル中窒素雰囲気下で、オクタデシルトリクロロシラン(三官能性)、メチルオクタデシルジクロロシラン(二官能性)及びジメチルオクタデシルクロロシラン(一官能性)を反応させ合成した。エンドキャッピングは、TMS(トリメチルクロロシラン)化あるいは(TMS+特殊TMS)化処理により行った。試料は、メタノール洗浄後80 $^{\circ}$ Cで乾燥しカラム充填剤とした。今回調製した試料の一覧をTable 1に示す。

### 〔2〕 NMR装置および測定条件

NMR装置には、Varian VXR-300SにDoty製Supersonic CP-MASプローブを接続して使用した。 $^{13}$ C CP-MAS NMRの測定条件は、観測周波数75.4MHz、MAS回転数5.0kHz、接触時間2.5ms、測定待ち時間3s、積算回数3000回を用いた。 $^{29}$ Si CP-MAS NMRは、観測周波数59.6MHz、MAS回転数4.0kHz、接触時間1.6ms、測定待ち時間3s、積算回数4000回により測定を行った。

### 〔3〕 HPLC測定条件

カラムには、内径4.6mm、長さ15cmのものを用いた。測定試料はプロカインアミド、溶離液はアセトニトリル/磷酸緩衝液(pH6.6)(10/90v/v%)を用い

た。溶離液の流速は、1.0ml/min、測定温度は40 $^{\circ}$ Cとし、紫外可視検出器UV-8020(東ソー製)を用い、検出波長254nmにて検出した。

## 3. 結果及び考察

### 〔1〕 ODSゲルの構造解析

はじめに今回合成したODSゲルを $^{13}$ C及び $^{29}$ Si CP-MAS NMR測定し構造解析を行った。Fig. 1及びFig. 2にODS基をモノ、ジあるいはトリクロロ体を用いて導入後、TMS化によりエンドキャッピング処理し調製した試料(A, B1, D)の $^{13}$ C及び $^{29}$ Si CP-MAS NMRスペクトルを示し、図中にはそれぞれのピークの帰属を示した<sup>4)-8)</sup>。

$^{13}$ C NMRについて、モノ及びジクロロ体ODS化処理シリカゲル(A及びB1)のスペクトルは同一パターンを示し、ODS基の炭素が(a)~(f)のピークに、TMS化によるエンドキャッピングピークが(g)に、18ppmにODSのSiに結合したメチルのピーク(h)が確認された。トリクロロ体ODS化処理シリカゲル(D)のスペクトルは、他と異なるパターンを示した。ODS基及びエンドキャッピングによるピークが観測されたものの、Siに結合したメチルピークは認められなかった。また、これらの試料は合成の最終段階において試料乾燥の為メタノール洗浄しており、残存シラノールとメタノールが反応し生成したと考えられるSiOCH<sub>3</sub>構造が50ppm付近に観測された。

$^{29}$ Si NMRは、モノ、ジ及びトリクロロ体ODS化処理シリカゲルについて全く異なるスペクトルパターンを示した。ODS化にモノクロロ体を用いた試料Aは、

Table 1 Preparation method for various silica gel packing materials

Sample	Preparation method
A	base silica + monochloro ODS + end-capping[TMS(trimethylchlorosilane)]
B 1	base silica + dichloro ODS + end-capping[TMS+additional treatment]
B 2	same as B 1
C 1	base silica + dichloro ODS + end-capping[TMS]
C 2	same as C 1
D	base silica + trichloro ODS + end-capping[TMS+additional treatment]
E 1	base silica
E 2	base silica(E 1) + dichloro ODS
E 3	base silica(E 1) + dichloro ODS + end-capping[TMS+additional treatment]
F 1	base silica
F 2	base silica(F 1) + dichloro ODS
F 3	base silica(F 1) + dichloro ODS + end-capping[TMS]

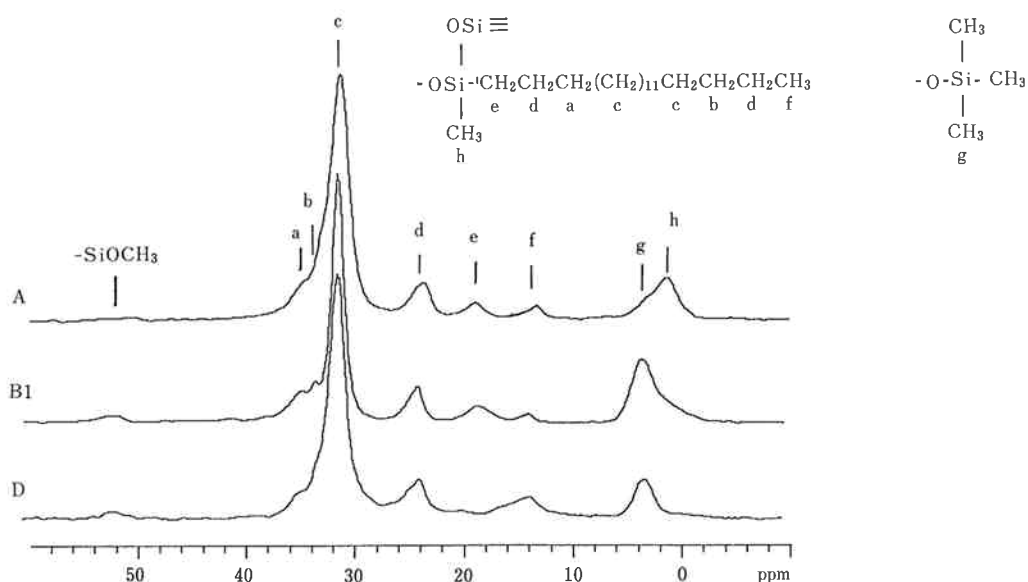


Fig. 1  $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMR spectra of the products of (mono, di, tri) functional octadecyl chlorosilane and silica gel. (A) monofunctionality silica gel, (B1) difunctionality silica gel and (D) trifunctionality silica gel.

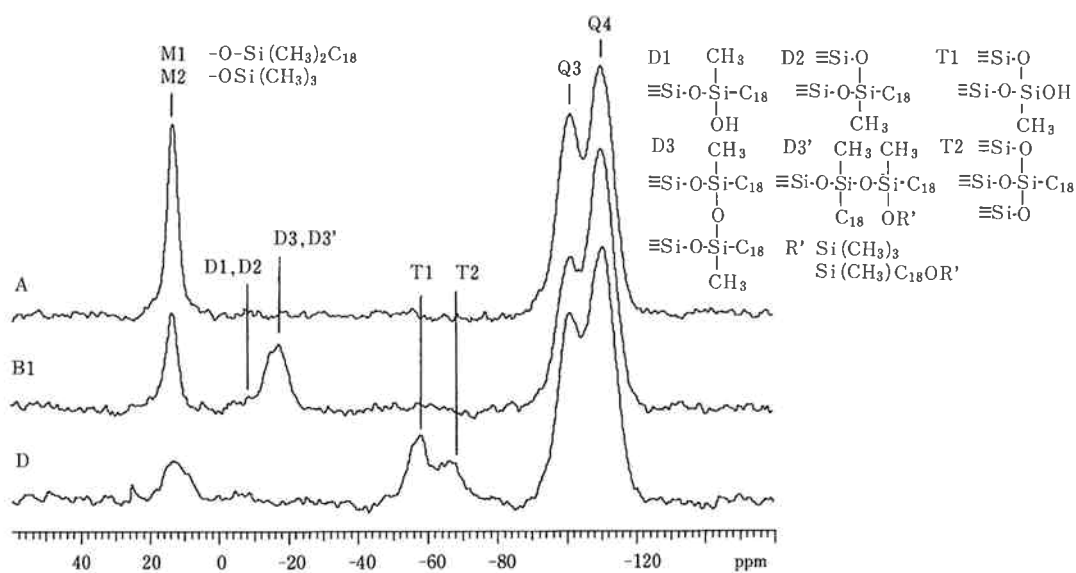


Fig. 2  $^{29}\text{Si}$  CP-MAS NMR spectra of the products of (mono, di, tri) functional octadecyl chlorosilane and silica gel. (A) monofunctionality silica gel, (B1) difunctionality silica gel and (D) trifunctionality silica gel.

骨格シリカ (Q4)、シラノール (Q3) と12ppm付近に大きなピークが観測された。 $^{13}\text{C}$  スペクトルでは、M1、M2 両構造のメチルピークが観察されており、 $^{29}\text{Si}$  スペクトルの12ppm付近のピークはODS基 (M1) とTMS基 (M2) のピークが重なった状態で観測されたと考えられる。ジクロロ体使用試料B1は、骨格シリカ、シラノール及びエンドキャッピングによるピークが検出された。ODS基のSiは-15ppm前後に検出され、D1、D2、D3、D3'のいずれかに帰属される構造であることが判明した。トリクロロ体ODS化試料Dは、骨格シリカ、シラノールに加え、T1、T2ピークが検出された。T1、T2は、ODS基のSiに帰属され、図中の構造であることが明らかになった。

これまで、ODS基の導入形態が異なる試料の $^{13}\text{C}$ および $^{29}\text{Si}$  NMR測定を行い、詳細な構造解析によりODS基導入形態 (モノ、ジ、トリクロロ体) の判別が可能になった。すなわち、 $^{13}\text{C}$  スペクトルは、ODSの導入形態がモノおよびジクロロ体では同一パターンだが、トリクロロ体は区別可能である。さらに、 $^{29}\text{Si}$  NMRでは、モノ、ジ、トリクロロ体各々スペクトルが異なり、明確にODS基導入形態の判別ができるよ

うになった。

## [2] 試料調製時の構造変化

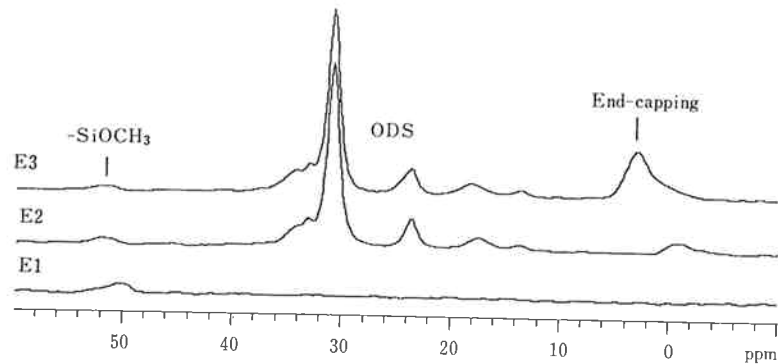
試料調製時の構造変化を定性・定量的に観察するため、ベースシリカ→ODS化後→エンドキャッピング後各々にサンプリングした試料 (E1、E2、E3) の構造解析を行った。Fig. 3に各試料を $^{13}\text{C}$ および $^{29}\text{Si}$  CP-MAS NMR測定した結果を示す。

$^{13}\text{C}$  NMRでは、ODS化後にODS基とODS基のSiに結合したメチルのピークが検出され、さらにエンドキャッピング後にTMS化によるピークが観測された。 $^{29}\text{Si}$  NMRでは、ODS化後にジクロロ体として導入されたODS基に起因するピークが検出され、エンドキャッピング後にTMS化由来のM2ピークが観測された。また、シラノールピーク (Q3) は、ODS化、TMS化に伴い減少していることが明らかになった。

## [3] NMRスペクトルデータの定量的解析

今まで得られたスペクトルデータを定量的に解析するため、残存シラノール及びシラノールを封止するエンドキャッピングに着目し検討した。シラノール量とエンドキャッピング量の定義をFig. 4に示す。シラノール量は $^{29}\text{Si}$  NMRスペクトルを波形分離しQ3/Q4

$^{13}\text{C}$  CP-MAS NMR



$^{29}\text{Si}$  CP-MAS NMR

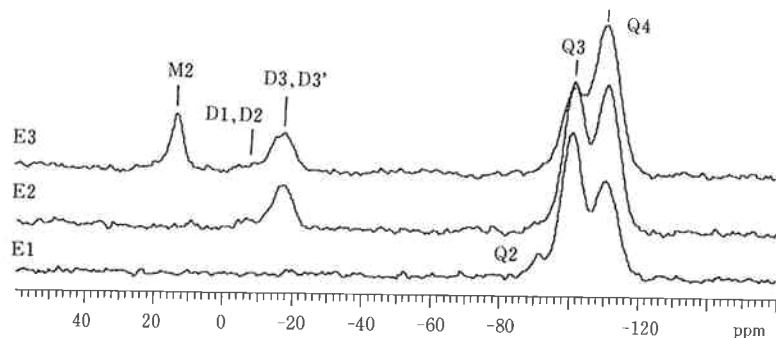


Fig. 3  $^{13}\text{C}$  and  $^{29}\text{Si}$  CP-MAS NMR spectra of difunctional octadecyl chlorosilane silica gel. (E1) base silica, (E2) after ODS silica and (E3) after end-capping silica.

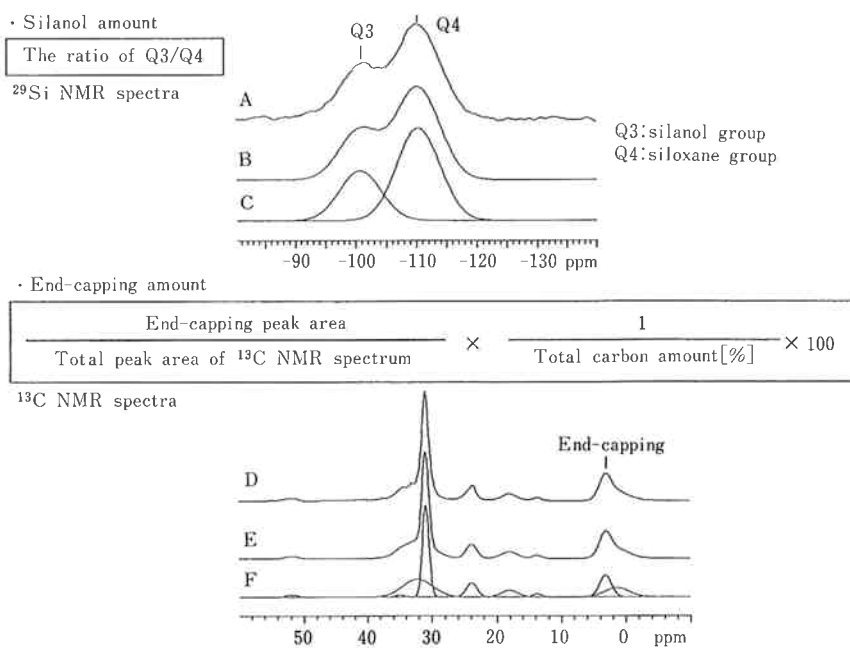


Fig. 4 The amount of silanol determined by  $^{29}\text{Si}$ , and the amount of end-capping determined by  $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMR. (A,D) observed spectra, (B,E) synthetic simulated spectra and (C,F) simulated spectra.

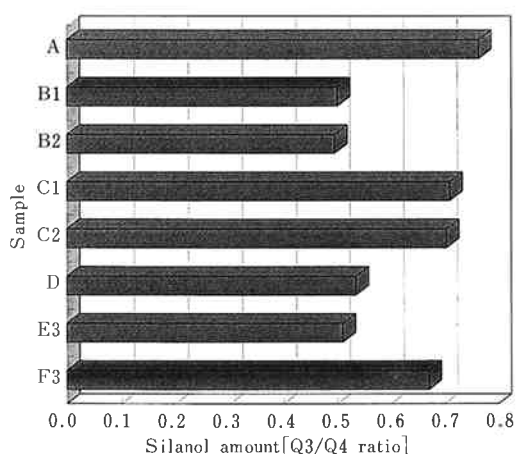


Fig. 5 The relative amounts of silanol for various silica gel packing materials.

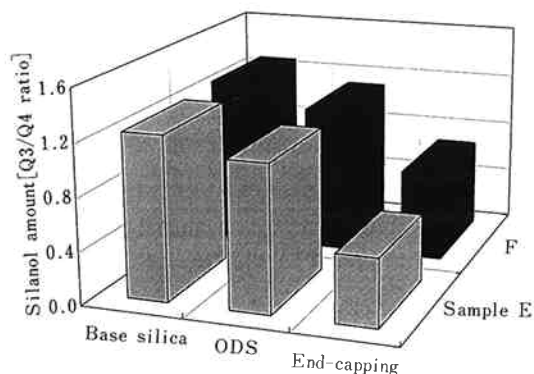


Fig. 6 Comparison with the relative silanol amount of sample E and F [base silica (E1,F1), after ODS treatment (E2,F2) and after end-capping with TMS (E3,F3)].

相対比として算出し、エンドキャッピング量は、 $^{13}\text{C}$  NMRスペクトルを波形分離し全検出炭素ピークに対するエンドキャッピングピークの相対比を導入炭素量で補正した値を用いた。

(1) 残存シラノール量比較

Fig. 5 に、各ODSゲルの残存シラノール量を比較した結果を示す。ODSゲルの残存シラノール量は、エンドキャッピングに特殊TMS処理を施した試料B1、B2、E3およびDが同レベルで、次いでC1、

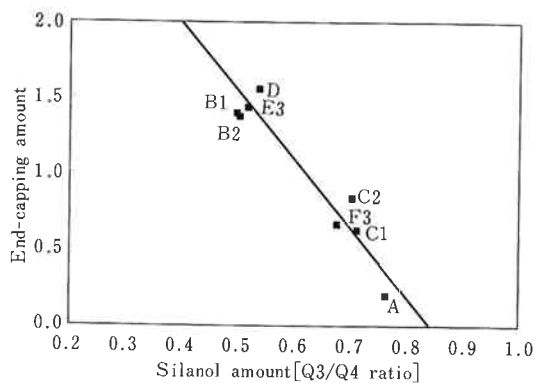
C2、F3、Aが最も多い結果が得られた。さらに、試料合成工程間のシラノール量を比較した結果をFig. 6に示す。合成工程ごとの残存シラノール量は、ベースシリカ→ODS化→エンドキャッピング (E1→E2→E3、F1→F2→F3) に従いかなり減少していることが確認された。

(2) エンドキャッピング量とシラノール量の関係

今回検討したODSゲルのうち、残存シラノール量は特殊TMS化によりエンドキャッピングした試料B1、

**Table 2** The relative amounts of silanol and end-capping determined by  $^{29}\text{Si}$  and  $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMR, and the ratio of theoretical plate number of procainamide for each silica gel

Sample	Silanol amount [Q3/Q4 ratio]	End-capping amount	The ratio of theoretical plate number of procainamide
A	0.76	0.20	0.432
B1	0.50	1.38	0.515
B2	0.49	1.40	0.549
C1	0.71	0.63	0.022
C2	0.70	0.84	0.026
D	0.53	1.56	0.858
E3	0.51	1.44	0.588
F3	0.67	0.67	0.020



**Fig. 7** The effect of end-capping of the residual silanol in silica gel.

B2、E3およびDが同レベルで最も少ない。TMS化等によるエンドキャッピング効率が大きいとゲル表面のシラノール量は当然減少すると考えられる。そこで、シラノール量の低減に何が最も寄与しているのか検討するため、シラノール量とエンドキャッピング量との関係を調べた。

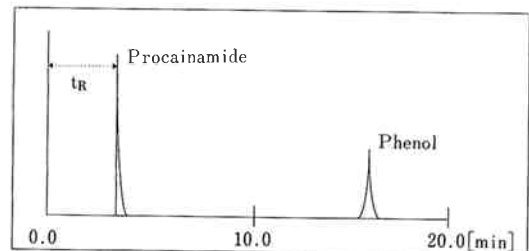
Table 2にODSゲルの残存シラノール量とエンドキャッピング量を、Fig. 7に得られた相関図を示す。B1、B2、E3およびDは、エンドキャッピング量が多くシラノール量が最も少ない結果が得られ、次いで、C2、F3、C1、Aの順にエンドキャッピング量は減少しそれに反比例してシラノール量の増加が確認された。すなわち、これらの試料について、エンドキャッピングによりシラノール量が直線的に減少することが明らかになり、シラノール封止のためにはエンドキャッピングが重要であることがあらためて認識された。

### (3) NMRデータとカラム物性値との相関

次に、NMRデータとカラム物性値との相関を検討

- Theoretical plate number  

$$N = 5.54 (t_R / W_{h/2})^2 \dots (1)$$
 $t_R$  : Retention time  
 $W_{h/2}$  : Full width of half maximum intensity
- The ratio of theoretical plate number  
 $N_{\text{procainamide}} / N_{\text{phenol}}$



**Fig. 8** The calculation method of theoretical plate number (N) and the ratio of theoretical plate number from the chromatogram obtained by the ionicity test.

した。両者の間に関連性を見出すことは、カラム製品の品質向上に寄与する因子を把握し今後の製品改良への指針を得るためにも重要と考えられる。ODSゲル製品の品質管理には様々な方法があるが、中でも、残存シラノールは試料（塩基性物質）の吸着を招きカラム性能を低下させることから、シラノールの影響を観察するためのイオン性テストは重要である。イオン性テストは、プロカインアミドの溶出によりシラノールの影響を判断する方法で行った。シラノールによる吸着がなければ溶出ピークはシャープで半値幅は小さくなり、理論段数は大きくなる。

そこで、NMRデータとしてシラノール量を、カラム物性値としてイオン性テストから求められた理論段数比をそれぞれ選択し検討した。Fig. 8にイオン性テストから理論段数および理論段数比を算出する方法を

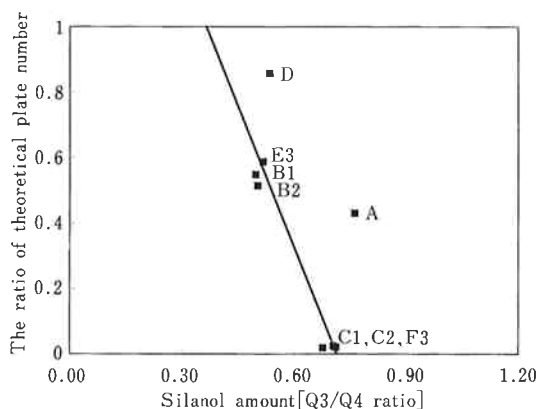


Fig. 9 The correlation between silanol amount and the ratio of theoretical plate number.

示す。また、カラム充填による影響をノーマライズするため、中性のフェノールを内部標準に用い理論段数比を算出した。理論段数比が大きいとカラム性能は高いと判断される。Table 2 に各ODSゲルのカラム物性値（プロカインアミド理論段数比）を、Fig. 9 に残存シラノール量とプロカインアミド理論段数比の関係を示す。その結果、シラノール量とプロカインアミド理論段数比の間には相関が認められ、塩基性物質の溶出試験において、残存シラノール量が少ないと理論段数比は大きい、つまりカラム性能が高いことが明らかになった。

4. 結 論

1) ODS化シリカゲルのODS基の導入形態の判別が

可能になるなど、試料の明確な履歴解析が<sup>13</sup>C及び<sup>29</sup>Si CP-MAS NMRを用いてできるようになった。  
 2) 今回検討した試料について、エンドキャッピング量が多いと残存シラノール量が少ないことが明らかになった。  
 3) クロマトから得られたカラム物性値（理論段数比）と<sup>29</sup>Si NMR算出シラノール量との間に相関が確認された。

5. 参考文献

- 1) 日本化学会編, “クロマトグラフィーの新展開”, 化学総説 9, 学会出版センター (1990)
- 2) J.Köhler, D.B.Chase, R.D.Farlee, A.J.Vega and J.J.Kirkland, *J.Chromatogr.*, 352, 275 (1986)
- 3) J.Köhler and J.J.Kirkland, *J.Chromatogr.*, 385, 125 (1987)
- 4) B.Buszewski, *Chromatographia.*, 29, 233 (1990)
- 5) K.Albert, R.Brindle, J.Schmid, B.Buszewski and E.Bayer, *Chromatographia*, 38, 283 (1994)
- 6) S.O.Akapo and C.F.Simpson, *J.Chromatogr. Sci.*, 32, 86 (1994).
- 7) K.Albert, J.Schmid, B.Pfleiderer and E. Bayer, *Chemically modified surfaces*, 105 (1992)
- 8) W.E.Rudzinski and T.L.Montgomery, *J. Catal*, 98, 444 (1986)



著 者  
 氏名 岡 秀 行  
 Hideyuki OKA  
 入社 平成3年4月1日  
 所属 南陽研究所  
 解析研究室  
 副主任研究員



著 者  
 氏名 徳 永 裕 司  
 Yuji TOKUNAGA  
 入社 昭和59年4月2日  
 所属 南陽研究所  
 解析研究室  
 主任研究員



著 者  
 氏名 岡 田 忠 司  
 Tadashi OKADA  
 入社 昭和46年4月16日  
 所属 南陽研究所  
 解析研究室  
 室長