

液晶構造を有する高速液体クロマトグラフィー用充填剤の開発

Development of Paking Materials with a Liquid Crystalline Functional Group for High Performance Liquid Chromatography

倉田 茂 昭、波 多 野 博 行

S.KURATA and H.HATANO*

神奈川歯科大学歯科生体工学、

*神奈川歯科大学化学教室・元教授

Kanagawa dental college, Department of biotechnology and bioengineering.

*Kanagawa dental college, Department of chemistry

緒言

液晶物質は100年も前からその存在が報告されている。この物質をクロマトグラフィーの分離用固定相として用いる試みは、ガスクロマトグラフィーにおいて高選択性固定相として、特に異性体分離などに幅広く応用されてきている¹⁻⁹⁾。その理由は、従来のガスクロマトグラフィーの分離原理が、固定相に対する試料化合物間の極性（溶解性）の差、ならびに試料化合物間の蒸気圧（沸点）の差によるのに対し、液晶化合物を固定相とした場合は、上述した分離原理の他に分子の形状を識

別し分離するという特徴を固定相に付与できると期待されるからである。例えば、Fig.1に示したようなダイオキシンやPCBなどの異性体を分離する場合、極性や沸点の差による違いだけで、高い分離を得ることは難しい。

一方、ガスクロマトグラフィーでは、分離分析する試料化合物に制約がある。試料化合物は、キャリアガスと呼ばれる移動相気体中を気体として移動し、試料化合物の極性や蒸気圧の違いにもとづく移動相と固定相との間の気液分配の差により分離されるので、試料化合物を気化させるために、沸点付近の温度まで加熱しなければならない。分子量の大きな化合物では、気化するのに非常に高い温度を必要とし、そのような化合物の多くは、高温で必ずしも安定でない。また、生物試料のように熱に不安定な化合物では、ガスクロマトグラフィーで分析することは難しい。

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は、移動相に水や各種溶剤を使用するため、気化しにくい化合物や熱に不安定な化合物試料を分離分析するのに有利である。分離の原理は固定相充填剤の種類により異なるが、一般に広く用いられている逆相クロマトグラフィーでは、固定相あるいは固定相に処理した有機官能基と移動相液体との間における試料化合物の親和性（極性あるいは溶解性）の差、すなわち、固定相である充填剤と移動相溶媒との間における試料化合物の固液もしくは液液分配により分離がなされる。しかしながら、上述

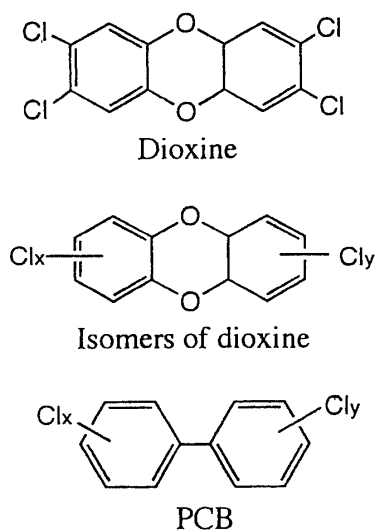


Fig.1 Chemical formulas of dioxine and PCB

したダイオキシンやPCBなどの置換基の位置異性体だけでなく、分子の極性が類似している化合物、たとえば生物試料などに多く見られるDL体や光学異性体などの化合物は、ほとんど同様の極性をもつため極性や溶解性の差だけでは高い分離を得ることは難しい。HPLCの固定相に液晶化合物を応用することは、分離原理の幅を広げ、様々な試料化合物に対し適用範囲を広げる。本研究では、高速液体クロマトグラフィー用の固定相に液晶構造をもつ充填剤を開発することである。

材料および方法

1. 液晶シラン化合物の合成

合成に用いた液晶としての性能を表す化合物 (R-OH) の化学式とその略号をFig. 2 に示す。こ

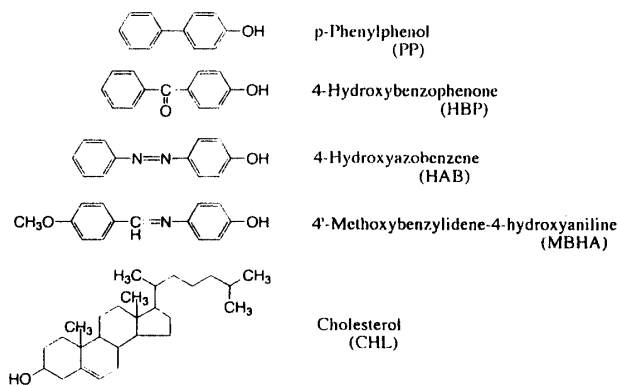
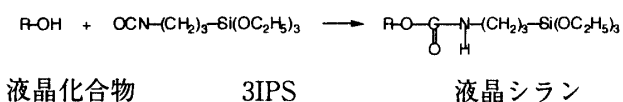


Fig. 2 Chemical formulas of liquid crystalline compounds

れら化合物に3-イソシアナトプロピルトリエトキシシラン (3IPS) を反応させ、担体であるシリカに結合させるための反応性基となるトリアルコキシ基を導入し、液晶骨格を有するシラン化合物を得た。化学式を以下に示す。



合成は液晶としての性質をもつ化合物 (R-OH) 0.03モルを100ml一口フラスコにとり、PP、HABでは溶媒としてジエチルエーテルを30ml、HBP、MBHA、CHLではトルエンを30ml、さらに3IPS0.03モルを加え、マグネツトスターラーにより攪拌しながら、室温下、24時間～4日間反応させた。なお、溶解性の低いMBHAは加温還流し反

応させた。反応後、アスピレーター減圧下で脱溶媒し、ヘキサンを加え再結晶し目的の化合物を得た。得られた各液晶化合物に相当する液晶シラン合成物を、それぞれPPSi、HBPSi、HABSi、MBHASi、そしてCHLSiと略す。なお、CHLの場合、再結晶せずメタノールで余剰の3IPSを洗い流し合成物を得た。また、用いた溶媒は、金属ナトリウムで脱水した。合成物の確認は、赤外吸収分析 (IR) ならびに核磁気共鳴吸収分析 (NMR) で行った。赤外吸収分析装置は、島津社製FTIR-4000を、核磁気共鳴吸収分析装置は日立社製R-90Hを用いた。

2. 担体の精製と処理

担体シリカの精製：シリカ担体は、洞海化学工業株式会社製DF-5/15-120A、粒径5～15 μ m、比表面積320m²/g、細孔直径125Åを用いた。玉入れ冷却器を取り付けた100ml一口フラスコにシリカおよびシリカの5倍量以上の6M-HClを加え、沸石として直径約5mmのテフロンボールを2～3個入れ、一昼夜加熱還流した。還流後、ガラス製ブフナー漏斗、ガラスフィルターを用いアスピレーター減圧下でシリカをろ過し、フィルター上のシリカにシリカの10倍量以上の蒸留水を用い酸を洗浄した。この時フィルター上のシリカ担体に空気を入れないようアスピレーターの圧を調整しながら、蒸留水を注いだ。次にアセトンを注ぎ水を除去し、シリカを漏斗より取り出し風乾した。上述と同様の方法により、酸洗浄したシリカにシリカの5倍量の蒸留水を加え、6時間加熱還流し、ろ過後、水洗、次にアセトンを流し、風乾しシリカを精製した。

シラン処理：精製シリカを150℃、24時間、乾燥器中で加熱し吸着水を除いた。乾燥した精製シリカ5gを100ml一口フラスコにとり、溶媒としてn-デカン25g、合成した液晶シラン6.44mmol、酸触媒としてp-トルエンスルホン酸をシランの10質量%加え一昼夜加熱還流し処理した。冷却後、ブフナー漏斗を用いアスピレーターで減圧ろ過し、アセトンおよびメタノールで未反応のシランを洗浄した。最後にアセトンを流した後、風乾し、アセトン臭が消えたら80℃で乾燥する。処理シリカを熱重量分析し、処理量を測定する。処理量が25質量%以下の時は、再度処理反応を行った。

エンドキャッピング：シラン処理した処理層中には、未反応のシラノール基が存在するため、シラノール基をトリメチルクロロシランでキャッピングした。すなわち、100ml一口フラスコに処理シリカを5g採取し、80℃、1時間乾燥する。次にn-デカンを25g、処理シリカに対しトリメチルシリル化剤であるN,O-ビス（トリメチルシリル）アセトアミドを33vol%（1.65ml）、N-トリメチルシリルイミダゾールを50vol%（2.5ml）、そしてトリメチルクロロシランを50vol%（2.5ml）を加え、一昼夜加熱還流する。冷却後、上述と同様の操作を行い、ろ過、洗浄、乾燥しエンドキャッピングし処理シリカを得た。

3. カラム充填

充填に用いた装置をFig. 3に示した。パッカーはGLサイエンス社製を用いた。調製した充填剤を80℃、1時間乾燥する。充填剤1gをビーカーに秤量し、ジクロロメタン/ヘキサノール=1/2のスラリー溶媒10mlを加え、超音波洗浄機で15分間処理する。スラリー溶媒に分散させた充填剤をパッカーに入れる。ビーカーに付着した充填剤はジクロロメタンで洗いパッカーに入れ、パッカーの空

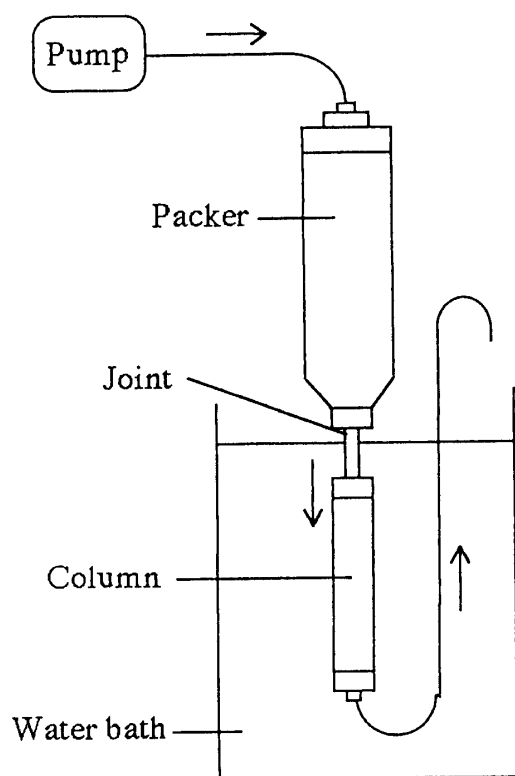


Fig.3 Apparatus for packing

隙部をさらにジクロロメタンで満たしパッカーを閉じた。液体クロマト用ポンプの流速を10ml/min、限界圧力を420kgf/cm²に設定し、溶離液としてジクロロメタンを流し、素早く充填剤をカラムに加圧充填する。パッカーの内容量に対し約2倍量のジクロロメタンを流し、次にメタノールを50ml流す。充填の再現性を良くするためにカラムを60℃の水浴槽に入れて、さらにメタノールを100ml、次に水100mlを流す。カラムをパッカーより外し、カラム上端まで充填剤が満たされていることを確認しカラムを閉じる。なお、充填に際しては空気を入れないよう操作することに留意した。

4. HPLC装置および条件

装置は日立社製ポンプL6000、検出器L4200UV-VIS（波長254nm）、記録計D-2500クロマトインテグレーターを用いた。カラムは内径2.6mm、長さ150mmを用い、カラム温度は室温、溶離液流速1ml/minで測定した。また、調製したカラムの性能を市販カラムと比較するために、市販カラムGLサイエンス社製イナートシルC8（4.6φ×150mm）、メルク社製リクロソープRP-8（4.0φ×250mm）、旭化成社製アサヒパックODP-50（6.0φ×150mm）を用いた。それぞれINET、RP8、そしてODP50と略す。調製した充填剤を評価するための分析試料としては、グループ1として、ピリジン、アニリン、フェノール、そして、ナフタリン、グループ2として、アントラセン、2-および3-メチルアントラセンを用い、約0.001質量%MeCN溶液として調製した。

結果および考察

1. 合成物の確認

反応に用いた3IPSの赤外吸収スペクトルをFig. 4に、また液晶としての性質を示す化合物(R-

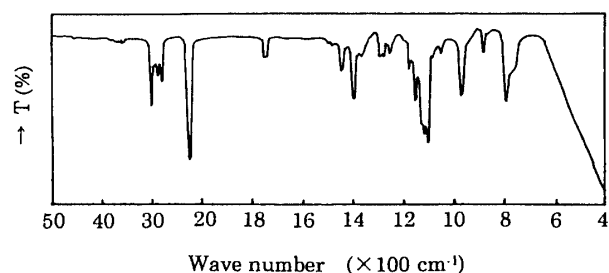


Fig.4 FTIR spectrum of 3IPS

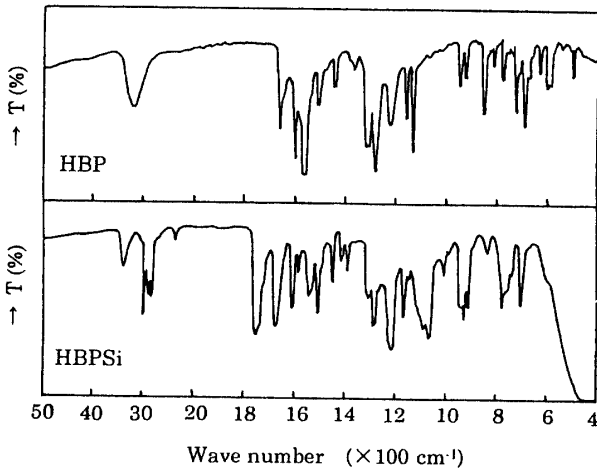


Fig.5 FTIR spectra of HBP and HBPSi

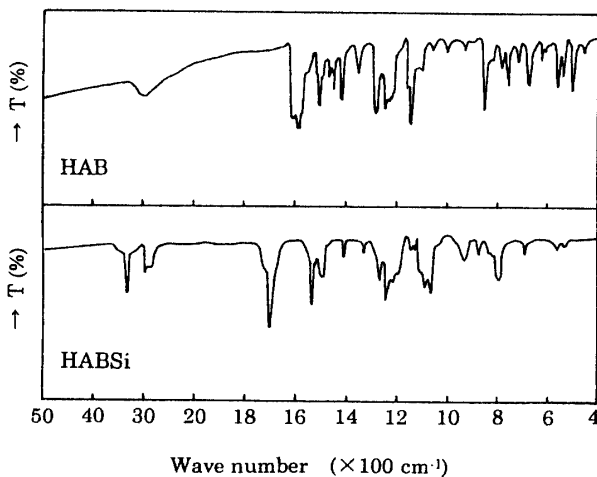


Fig.6 FTIR spectra of HAB and HABSi

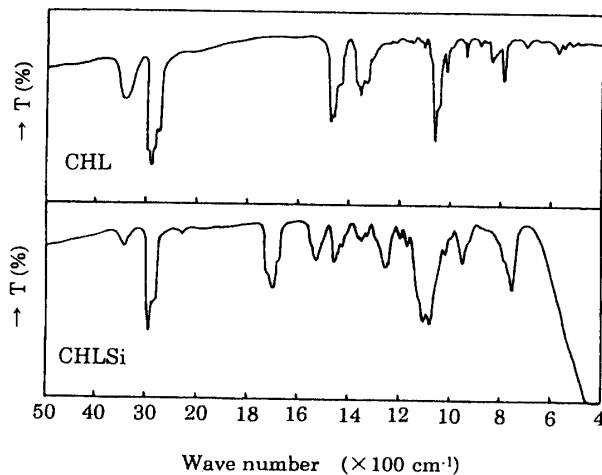


Fig.7 FTIR spectra of CHL and CHLSi

OH : HBP、HAB、CHL) ならびにそれら化合物と3IPSとの反応物の赤外吸収スペクトルをFig.5～7に示した。Fig.4では、3IPSのイソシアナト基(-NCO)の吸収が 2200cm^{-1} 付近に認められる。合成した各液晶シラン化合物には、反応前のR-OH

に基づく水酸基の吸収が減少し、 $1600\sim 1700\text{cm}^{-1}$ に反応により生成したウレタン結合のカルボニル基の吸収が認められる。また、生成した化合物中には3IPSのイソシアナト基の吸収は消失し、 $1000\sim 1200\text{cm}^{-1}$ に反応によって導入されたトリアルコキシシリル基(-Si(OC₂H₅)₃)の吸収が認められる。これらのことから反応に用いたすべての液晶化合物(R-OH)は、3IPSと定量的に反応し、合成目的である液晶構造をもつシランを与えたことが分かった。PPおよびMBHAについても同様の結果を得た。

2. 充填剤としての評価

液晶骨格をもつ基を化学修飾した充填剤を評価するために、分析試料として二つのグループの化合物を用いた(Fig.8)。グループ1は、ピリジン、アニリン、フェノール、そして、ナフタリンである。ナフタリンは無極性であり、逆相系の充填剤には吸着力が高く、その保持時間から分析時間を評価できる。他の三つの化合物はいずれも極性があり、比較的短時間で溶出するために、化合物間の分離の様子から充填剤としての分離の善し悪しを評価できる。グループ2は、アントラセンの同族化合物であり、メチル基の置換による立体構造の違いによる分離の状態を評価した。

市販の逆相系充填剤(ODP50、INETそしてRP8)ならびに本研究で調製した充填剤(HABSi)を用い、グループ1の化合物をHPLC分析した。

Group1:



Pyridine



Aniline

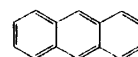


Phenol

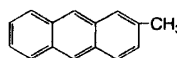


Naphthalene

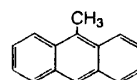
Group 2:



Anthracene



2-Methylantracene



9-Methylantracene

Fig.8 Samples for evaluation of packing materials by HPLC

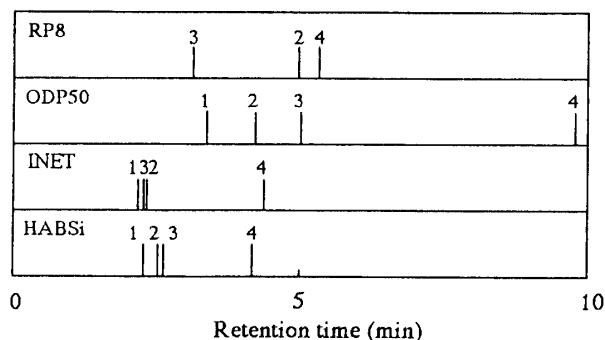


Fig.9 Retention time of those compounds separated by commercial column (RP8, ODP50 and INET) and prepared column (HABSİ)
Sample; 1:Pyridine, 2:Aniline, 3:Phenol, 4:Naphtalene

得られたクロマトグラムの各分子のピーク位置をまとめたものをFig. 9 に示す。市販カラムRP8ではピリジンが吸着し、本実験の分析時間内では溶出しない。ODP50では分離の状態は良好であるが、分析時間が長い。INETではナフタリンを除く、三つの化合物の分離がやや悪い。調製した本液晶充填剤を用いたカラムでは分析時間も短く、各分子の分離状態も良好であった。

グループ2の化合物を分析した結果をFig.10に示す。比較のために用いた市販カラムINETでは、溶離液のMeCN/H₂Oの組成が7/3で良好な分離が得られ、MeCN/H₂Oの比が3/7の水の割合が高い系ではカラムに吸着し溶出しない。一方、調製した液晶カラムHABSİでは、溶離液MeCN/H₂Oの組成が3/7で良好に分離する。分析時間だけを評価すれば、INETカラムを用いる方が優位となる。しかし、生物系試料のような親水性の化合物の分析を考えた場合、溶離液中の水の割合が高い方が有利である。水の割合が高くないと、親水性の試料は溶離液に溶解せず、HPLC分析することはできない。

以上、本論文では、液晶構造をもつシラン処理剤を合成し、担体であるシリカと反応させ高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用充填剤を調製し、その分離性能や特長について基礎的検討を行った。その結果、従来の逆相系の充填剤とは異なる性質をもつ充填剤を得ることができた。さらにカラム温度を上げ、充填剤上の液晶をスメッチ

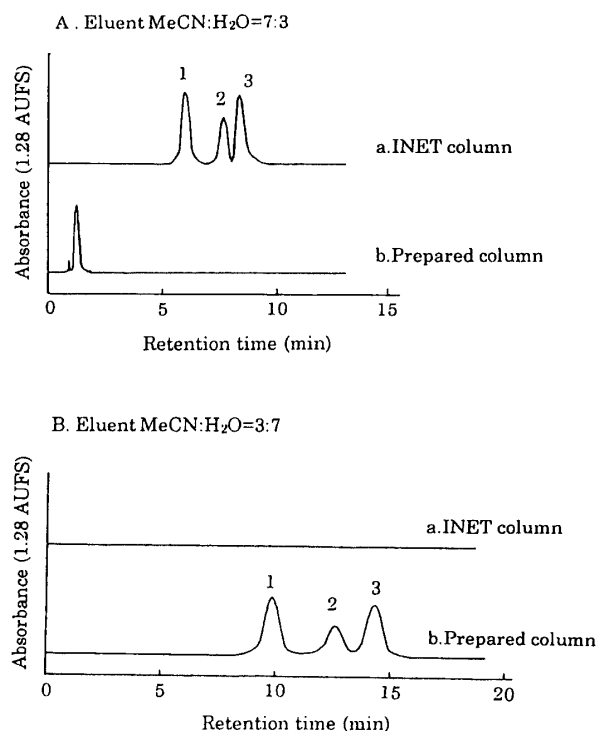


Fig.10 Chromatograms of anthracene and its congeners separated by commercial column (INET) and prepared column (HABSİ)
1: Anthracene, 2: 2-Anthracene, 3: 9-Anthracene

ク相からネマチック相へ相転移させた場合の分離の差を検討する必要がある。ここで合成した化合物に限ることなく、様々な官能基を充填剤に付与

することにより、新たな分離性能を有する充填剤を得ることができるであろう¹⁰⁾。

謝 辞

本研究の内容は、本学化学教室元教授・波多野博行先生（故）のもと、1989年6月～1991年7月にかけて行った研究をまとめたものである。ご存命中にまとめられなかったことのお詫びとこの研究を通じ様々な勉強の機会を与えて下さった先生に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Z.Witkiewicz, : Liquid-crystalline stationary phases for gas chromatography, *J.Chromatogr.*, **251**, 311-337 (1982)
- 2) 齊郷和秀, 中村豊一 : 側鎖型高分子液晶膜の分子配列制御および応用, *高分子*, **38**(4), 270-273 (1989)
- 3) J.C.Dubois, G.Decobert, P.Barny et al., : Liquid crystalline side chain polymers derived from poly-acrylate, poly-methacrylate and poly- α -chloroacrylate, *Mol.Cryst. Liq. Cryst.*, **137**, 349-364 (1986)
- 4) G.Decobert, F.Soyer, and J.C.Dubois : Liquid crystal -Chiral liquid crystalline side chain polymers-, *Polymer bulletin* **14**,179-186 (1985)
- 5) J.S.Bradshaw, C.Schregenberger, K.H.C.Chang et al., : Synthesis and chromatographic properties of polysiloxane stationary phases containing biphenylcarboxylate ester liquid-crystalline side groups, *J.Chromatogr.*, **358**, 95-106 (1986)
- 6) K.P.Naikwadi, A.L.Jadhav, S.Rokushika, and H.Hatano : Liquid crystalline polyacrylates and their use in capillary gas chromatography, *Makromol.Chem.*, **187**, 1407-1414 (1986)
- 7) S.Rokushika, K.P.Naikwadi, A.L.Jadhav, and H.Hatano : Polyacrylate liquid crystalline stationary phases in supercritical fluid chromatography with carbon dioxide mobile phase, *Chromatographia*, **22**(1), 209-212 (1986)
- 8) S.A.Wise, L.C.Sander, H.C.K.Chang et al : Shape selectivity in liquid and gas chromatography: Polymeric octadecylsilane (C18) and liquid crystalline stationary phases, *Chromatographia*, **25**(6), 473-479 (1986)
- 9) K.P.Naikwadi, S.Rokushika, and H.Hatano : New liquid crystalline stationary phases for gas chromatography of positional and geometrical isomers having similar volatilities, *J.Chromatogr.*, **331**, 69-76 (1985)
- 10) 小中原猛雄, 岡田真一郎, 門出孝志, 中山伸之ら, : 炭化フッ素系化学結合型逆相HPLC用充填剤の合成とその分離特性, *日本化学会誌*, **1991**(12), 1638-1645 (1991)

(本学講師・本学元教授)