

## 逆相液体クロマトグラフィー用カラムの選択2:塩基性薬物の溶出挙動

逆相液体クロマトグラフィーでは充填剤の疎水性の程度と構造によって保持時間と溶出順序が決まる。このニュースでは逆相液体クロマトグラフィー用に開発された4種の充填剤の特性を塩基性薬物の溶出順序と相対的保持時間で比較した。この結果は ChemcoPlus nNews 2 の酸性薬物の溶出挙動と同じように逆相液体クロマトグラフィーに於ける効率の良い分離分析条件の検討に応用できる。

### 1. 充填剤の疎水性に依存する溶出順序

逆相液体クロマトグラフィーに於ける保持の順序は基本的に化合物の疎水性、オクタノールと水との分配定数 ( $\log P$ ) に依存する。 $\log k_{\text{mol}} = \alpha \log P$  ( $k_{\text{mol}}$ : 分子型化合物の保持比;  $\alpha$ : constant)。この1例としてペンチル (C5)、オクチル (C8)、フェニルヘキシル (PhHx)、オクタデシル (C18) 結合シリカゲルカラムを使って、同一条件で測定した塩基性薬物の保持比  $k$  と  $\log P$  との関係を図6に纏めた。溶離液はLC-MS用として、50%メタノールにpH10.2のギ酸アンモニウムを含む。但し、この条件ではこれら塩基性薬物は分子型として溶出しているとは限らず、部分的にイオン化している薬物もある。塩基性薬物の特性値はページ5表2を参照のこと。

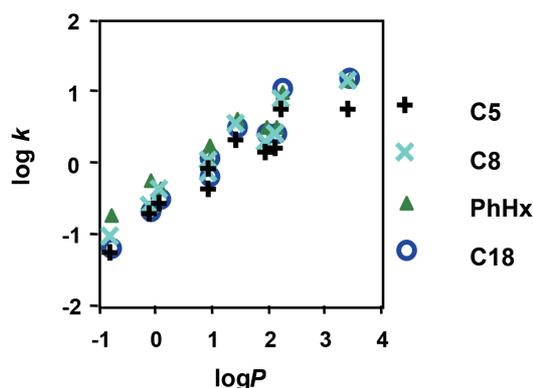


図5 各種カラムに於ける保持比と  $\log P$  との関係

これら4種の結合基の疎水性の強さは  $\text{PhHx} \geq \text{C18} \geq \text{C8} > \text{C5}$  の順で、これら薬物の保持比は基本的にこれら結合基の疎水性の順序に依存している。 $\log P$  とこれらの充填剤カラムで測定した  $\log k$  との相関係数は0.97 (PhHx)、0.97 (C18)、0.97 (C8) 及び0.95 (C5) ( $n=10$ ) であった。これらの相関係数が ChemcoPlus nNews2 に纏めた酸性薬物の結果に比べて低いのはこれら塩基性薬物のクロマトグラフィー挙動がページ5表2に纏めた塩基性薬物の解離定数から解るようにこれら塩基性薬物は必ずしもLC-MSに適した塩基性の溶離液中では分子型として存在していないことによる。

更に、C8とC18カラムで測定した保持比に大きな違いがなかったのは、化学結合型シリカゲル充填剤を逆相液体クロマトグラフィーで使った場合、結合基の直鎖の長さが12以上では保持比が大きくなると報告されていることから推察できる。しかし、カロチノイドのように長くて大きな分子の分離にはC22(ドコシル)がC18より適していること

から、結合基の鎖長は化合物の構造によって必要な最大長さがあり、これら塩基性薬物の場合には10以上のアルキル差を必要としないことが判る。

### 2. 充填剤の特性による溶出

C18、C8及びC5結合シリカゲルカラムで測定したこれら塩基性薬物の  $\log k$  値を比較する為に、C18を基準にして  $\log k$  値間の相関係数を求めると、1.00 (C8) 及び1.00 (C5) ( $n=10$ ) であって、これらカラムの間には特異的選択性はなく、疎水性の保持力に違いがあるだけである。ChemcoPlus nNews2 に纏めた酸性薬物の結果と比較すると、PhHxとの相関係数は低くても酸性薬物トルブタミドとトラザミドの挙動に見られたような顕著な選択性はなかった。

これら塩基性薬物を短時間で分離分析するには、溶出時間の長い疎水性な薬物は疎水性の弱いC5を使って分析を行えばよい。疎水性が弱くて保持比が小さく、分離不十分な薬物は疎水性の強いC18で分離する。つまり、疎水性の弱い薬物をC18で分離し、疎水性が強く保持時間の長い薬物はC5で分離するカラムスイッチング法で分離分析するのが望ましい。

カラムスイッチ法の模式図はページ2の図を参照のこと。この同じ溶離液を使うイソクラチック溶出法はグラディエント溶出法に比べて、ベースラインの変動がないのでピーク面積および高さの読み取り誤差が少なく、定量分析に相応しい分析法である。図6に1例を示した。

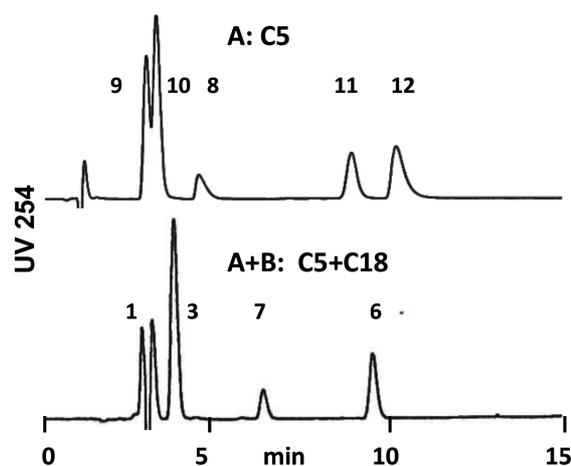


図6 カラムスイッチ法による分析時間の短縮例

カラム A: Pacic-3-C5 50×3.0mm ID, B: Pacic-3-C18 150×3.0mm ID  
溶離液: 45%メタノールにpH10.2のギ酸アンモニウム含  
流速: 0.40mL/min  
温度: 40°C  
ピーク番号: 表2参照

表2 塩基性薬物の特性値

	Chemicals	Log P	pKa
1	Theobromine	-0.78	9.9
2	Allopurinol	-0.55	9.4
3	Caffeine	-0.07	14.0
4	Theophylline	-0.02	8.6
5	Isoproterenol	0.08	7.9
6	Scopolamine	0.98	7.75
7	Triamterene	0.98	6.2
8	Homatropine	1.45	9.9
9	Carbamazepine	1.98	13.9
10	Procain	2.14	8.11
11	Lidocaine	2.26	7.9
12	Quinine	3.44	4.1

### 3. 溶離液の pH 変化による溶出挙動

これら薬物のように解離定数が異なる化合物の溶出挙動は溶離液のpHに影響を受けるので、溶離液のpHを変えて分離の改善や溶出順序を変えて定量性を向上できる。化合物の任意のpH溶離液中の保持比  $k$  は図7中の式で求めることができる。

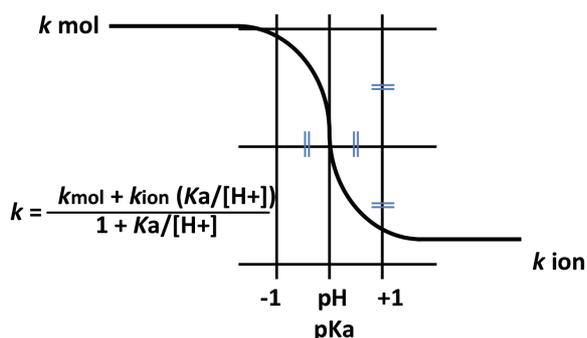


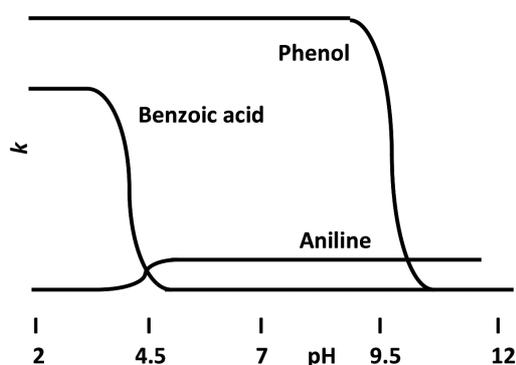
図7 保持に及ぼすpHの影響

この計算に必要な化合物特性は解離定数  $pK_a$  と  $\log P$  である。この式を用いて簡便に任意のpHでの  $k$  を求めるときの問題点はイオン状態化合物の  $\log P$  値を予測できない。つまり、 $k_{ion}$  を予測できないので0として計算する。この為にイオン化しても疎水性が強い化合物の予測  $k$  値に誤差が生じるがおおよそのクロマトグラフィー条件を求めるのにこ

の式は使われており、コンピュータソフトも市販されている。この図から解るように化合物が分子型の時に最大の保持比  $k_{mol}$  を取り、イオン化すると最小の保持比  $k_{ion}$  となる。これらの平均値は化合物の解離定数  $pK_a$  と同じpHの溶離液中で得られる。

単純な例としてフェノール、安息香酸とアニリンの溶出挙動をまとめたのが図8で、 $k_{mol}$  はそれぞれの  $\log P$  の大きさに比例し、pH が  $pK_a$  値と  $\pm 1$  の所を変曲点として  $k$  が変化することを表している。これら3種の化合物特性を次にまとめた。

Compounds	Log P	pKa
Phenol	1.98	10.02
Benzoic acid	1.87	4.19
Aniline	0.91	4.63

図8 保持比  $k$  と溶離液pHの関係

これら3種の化合物を短時間で分離する場合には疎水性の強い充填剤と有機溶媒濃度の薄い、pH9.5以上の溶離液を用いて分離分析すれば良いことが解る。酸性化合物だけを分析対象とする場合には、低いpHの溶離液を用いて塩基性化合物を先端溶出させてから酸性化合物を分離分析する。塩基性化合物を分析対象とする場合には高いpHの溶離液を用いて、酸性化合物を先端溶出させた後に塩基性化合物を分離分析する。フェノール性化合物を分析対象とする場合には、酸性溶離液で塩基性化合物を先端溶出した後に溶離液のpHを中性付近に変えて、強酸及びカルボン酸を溶出させた後にフェノール化合物を分離分析する。このように溶離液のpHを変えることで選択的分離分析が可能となる。

#### ■ 価格表 Paci-3-C18, Paci-3-PhHx, Paci-3-C8, Paci-3-C5

カラムサイズ	価格	カラムサイズ	価格	カラムサイズ	価格
50 x 4.6 mm ID	¥ 40,000	50 x 3.0 mm ID	¥ 40,000	50 x 2.1 mm ID	¥ 40,000
150 x 4.6 mm ID	¥ 48,000	150 x 3.0 mm ID	¥ 48,000	100 x 2.1 mm ID	¥ 48,000
250 x 4.6 mm ID	¥ 56,000	250 x 3.0 mm ID	¥ 56,000		

#### 次回予告

ChemcoPlus nNews 4 イソクラテックとグラディエント溶出法に於ける定量精度の違い



株式会社 ケムコプラス

http://www.chemcoplus.co.jp/

大阪本社

〒577-0065 大阪府東大阪市高井田中3-10-7  
TEL (06) 6787-5551 (代)  
FAX (06) 6787-6688

東京営業所

〒108-0074 東京都港区高輪2-19-17-701  
TEL (03) 3444-4201 (代)  
FAX (03) 3444-4238