

逆相液体クロマトグラフィー用カラムの選択1：酸性薬物の溶出挙動

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。次に4種の逆相液体クロマトグラフィー用に開発された充填剤の特性を酸性薬物の溶出順と相対的保持時間で比較する。この結果は一般論として逆相液体クロマトグラフィーの分離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の保持の順序は基本的には化合物の疎水性、オクタノールと水の分配定数、 $\log P$ 、に依存する。

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酸性薬物の $\log P$ と保持比の関係を図1にまとめた。

溶離液はLC-MS分析用に50%メタノールに10mMギ酸(pH 2.88)を含んでいるので、サリチル酸を除く酸性薬物は基本的に分子型として溶出しており、保持比の対数値 $\log k$ は $\log P$ と相関する。

酸性薬物の特性値はページ3表1を参照のこと

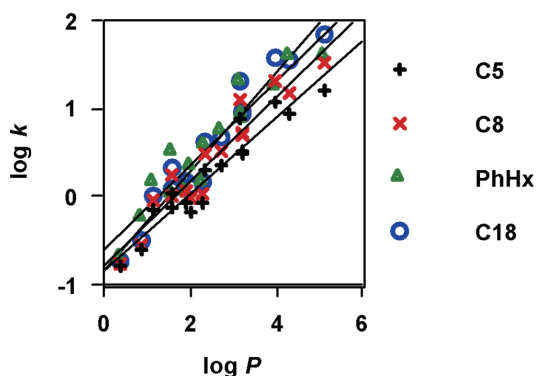


図1 カラム保持の強さの比較

カラム: 50 x 3.0 mm ID
溶離液: 50%メタノールに10mMギ酸(pH 2.88)を含む
流速: 0.40 mL/min
温度: 40°C

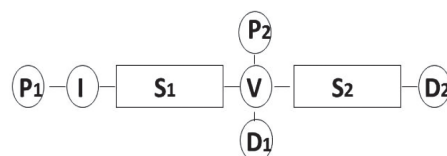
C18カラムで測定した $\log k$ とC8及びC5カラムで測定した $\log k$ との相関係数は1.00 (n=16)であり、これら3種結合基の疎水性の強さはC18 > C8 > C5の順で、これら結合基には特異的選択性はない。これら薬物の保持比を小さく、保持時間を短くするには有機溶媒濃度を上げるか短いカラムを使えばよい。これらの方法はアコーディオン効果であって分離度は低くなる。

例えばC8カラムを使った場合、最も保持の長いメフェナム酸の保持時間は50%メタノールを含む溶離液では30分であったがメタノール濃度を60及び70%にすると保持時間は9分と3分になった。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強さに依存しているため、これら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薬物を疎水性の弱いC5カラムを使って分析し、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カラムで分離する。

つまり、疎水性の弱い薬物をC18カラムで分析し、疎水性が強くて保持時間の長い薬物をC5カラムで分析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。

カラムスイッチカラムスイッチ法の模式図を次に示す



P : Pump, I : Injector, V : Valve, D : Detector,
S1 : Separation column 1/ Analytical column 1
S2 : Separation column 2/ Analytical column 2

充填剤の疎水性の違いを適用したイソクラチック溶離短時間分析

2台のポンプから同じ溶離液を送る。インジェクターから注入された試料の内、疎水性の弱い化合物は疎水性の弱いペンチル基結合シリカゲルカラム(分離カラム1)では保持が弱く分離できないので、カラムスイッチバルブを介して疎水性の強いオクタデシル基結合シリカゲルカラム(分離カラム2)に送る。カラムスイッチバルブを切り替えて、疎水性の強い化合物はペンチル基結合シリカゲルカラムで、疎水性の弱い化合物はオクタデシル基結合シリカゲルカラムで平行分析を行う。2台の検出器を用いることで同時に2つのクロマトグラムが得られる

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、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2に1例を示す。

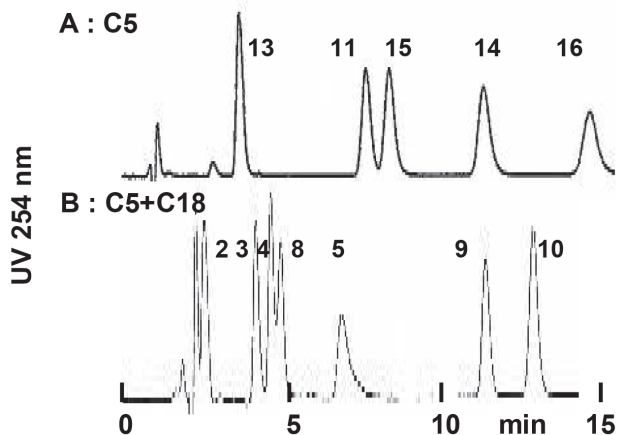


図2 カラムスイッチ法による分析時間の短縮例

カラム Paco-3-C5 50 x 3.0 mm ID, Paco-3-C18 150 x 3.0 mm ID
溶離液: 50%メタノールに10mMギ酸(pH 2.88)を含む
流速: 0.40 mL/min
温度: 40°C
ピーク番号: 表1参照

アルキル鎖のC18、C8及びC5基は疎水性以外の特性はないがフェニルヘキシル基(PhHx)はフェニル基のπ電子によるいわゆるπ-π相互作用があり、これによって単に疎水性による保持だけでなくフェニル基による選択的保持がある。

PhHxカラムでのlog Pとlog kとの相関係数は0.95(n=15)でありC8カラムでの相関係数より低く、C8カラムで測定したlog kとPhHxカラムで測定したlog kとの相関係数は0.98(n=16)であった。このPhHxカラムの特性を利用して分離を改善できる。

例えばC8カラムで保持比が同じぐらいのトルブタミドとトラザミドの保持比をPhHxカラムで測定すると、C8カラムではこれらの分離度(Rs)は測定できなかったがPhHxカラムでは3.0になった。このように特性の異なるカラムを使うことによって分離を改善することができる。

表1 酸性薬物の特性値

		Log P	pKa
1	Nicotinic acid	0.36	4.75
2	Sulfamethoxazole	0.86	6.16*
3	Chloramphenicol	1.14	7.49*
4	p-Hydroxybenzoic acid	1.58	4.54#
5	Nalidixic acid	1.59	8.6
6	Benzoic acid	1.87	4.19
7	Furosemide	2.03	4.25*
8	Salicylic acid	2.26#	2.97#
9	Tolbutamide	2.34	5.16
10	Tolazamide	2.69	4.07*
11	Phenylbutazone	3.16	4.5
12	Naproxen	3.18	4.15
13	Probenecid	3.21	3.4
14	Ibuprofen	3.97	4.91
15	Indomethacin	4.27	4.5
16	Mefenamic acid	5.12	4.2

参考文献: DrugBank, *predicted; #PubChem

2. 充填剤の特性による溶出順序

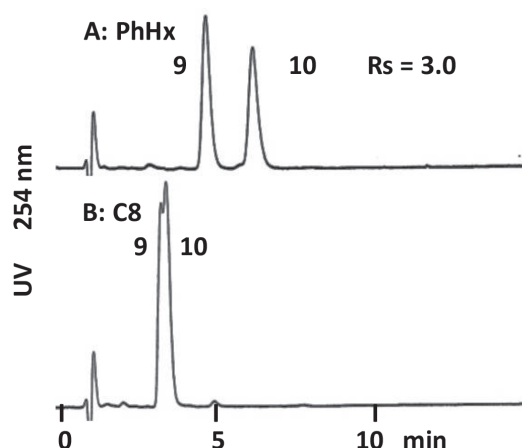


図3 フェニルヘキシル(PhHx)基結合シリカゲルの選択性 1

カラムA: Paci-3-PhHx 50x3.0 mm ID, B: Paci-3-C8 50x3.0 mm ID
 溶離液: 50%メタノールに10mMギ酸(pH 2.88)を含む
 流速: 0.40 mL/min, 温度: 40°C, ピーク番号: 表1参照

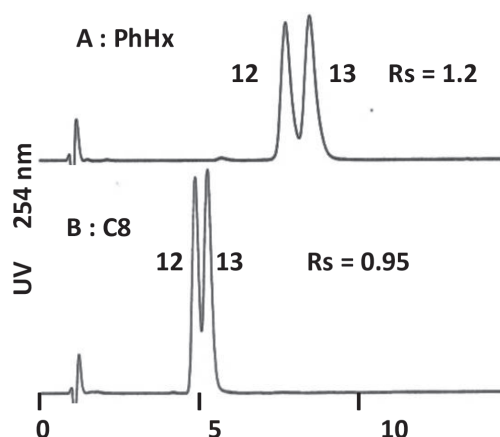


図4 フェニルヘキシル(PhHx)基結合シリカゲルの選択性 2

カラムA: Paci-3-PhHx 50x3.0 mm OD, B: Paci-3-C8 50x3.0 mm ID
 溶離液: 50%メタノールに10mMギ酸(pH 2.88)を含む
 流速: 0.40 mL/min, 温度: 40°C, ピーク番号: 表1参照

相対的にこれらの化合物はPhHxカラムに強く保持され溶出時間が長い、C18カラムを使っても分離できるが保持時間は長い。これら薬物の解離定数が異なるので溶離液のpHを変えることによって分離の改善や溶出順序を変えられる。

■ 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 3 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
 ChemcoPlus nNews 4 イソクラティックとグラジ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