

高速液体クロマトグラフィー用充填カラム

# ULTRON

技術資料 No.4 Ver.2

光学分割クロマトグラフィー用充填カラム,

## ULTRON ES-OVM (オボムコイド)

### — 目 次 —

	ページ
1 はじめに .....	2
2 リガンドの基本的な性質 .....	2
3 移動相の選択について .....	3
4 pH とキャパシティーファクターの関係 .....	3
5 塩濃度とキャパシティーファクターの関係 .....	3
6 有機溶媒類の保持におよぼす影響 .....	4
7 有機溶媒添加量の保持におよぼす影響 .....	5
8 分離度の調節例 .....	6 ~ 7
9 試料負荷量について .....	8 ~ 9
10 分析例 .....	10 ~ 14
11 カラム使用の手引き .....	15



信和化工株式会社

# 1. はじめに

ULTRON ES-OVM は光学活性物質の分離・精製・検定・血液中の光学活性物質の代謝研究などに有効であり、今後、医薬・農薬・食品・有機合成の分野での需要が増大するものと思われます。

## 1.1 特長

- (1) アミノシリカゲル(120 5 $\mu$ m)に変性に強いタンパク質(オボムコイド)をリガンドに使用(特開昭 63-307829: エーザイ株式会社)。
- (2) 光学分割のための試料の前処理が不要(直接光学分割)。
- (3) 水系の溶離液が使用できます。
- (4) 微量分析(数 ng)が可能。

## 1.2 用途

医薬品・農薬・食品・有機合成,主として芳香環を含む極性物質,たとえばアミン化合物,酸性物質。

# 2. リガンドの基本的な性質

オボムコイド(Ovomucoid)は熱抵抗性のタンパク質で、これは最初卵白中の他のタンパク質を pH3.5 でトリクロル酢酸で沈殿させて除き、それからアセトンで沈殿させて調製することができる。

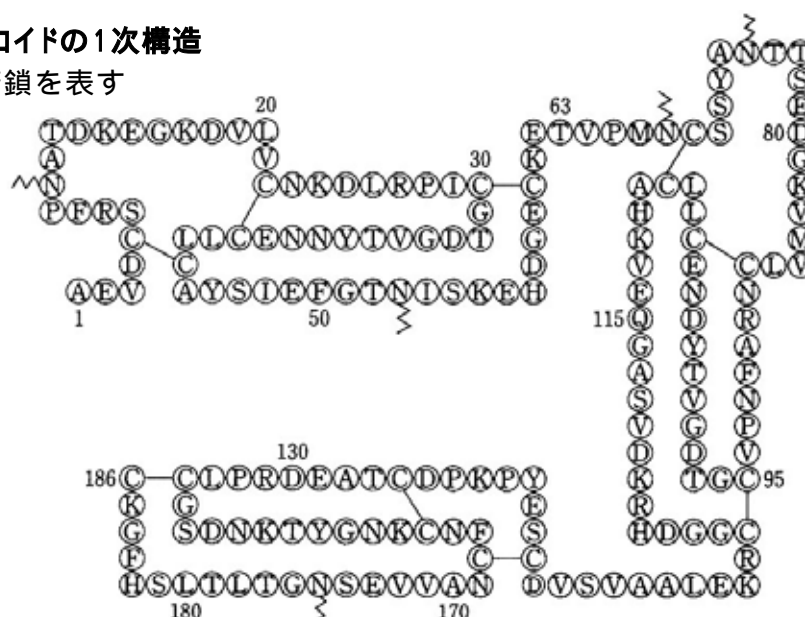
オボムコイドは溶液を硫酸アンモニウムで飽和させることによって沈殿させることができる。その分子量は約 28,000 で、等電点は 3.9~4.3 の間にある。オボムコイドはトリプシンの阻害剤として見いだされた。トリプシンの 1 分子の活性を 50%減少させるのに要するオボムコイドは 1 分子以下である。

酸性溶液中において、オボムコイドは熱変性に対して非常に抵抗するがアルカリ領域(pH9)においては、このタンパク質は 80 で急速に変性する。

	組成(%)(卵白中)	等電点	分子量	炭水化物の含量(%)	生物学的性質
オボムコイド	11	4.1	28,000	22	トリプシン阻害活性

## ニワトリオボムコイドの1次構造

Λ は糖鎖を表す



蛋白質・核酸・酵素 Vol.24, 667(1979) より引用

### 3. 移動相の選択について

光学異性体の分離は、移動相の選択が重要です。一般的に 20mM -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  水溶液あるいは 20mM -リン酸緩衝液( $\text{K}_1/\text{K}_2$ )に有機溶媒を添加した移動相を使用しますが、次の項目が分離に影響を与えます。

溶離液 pH	有機溶媒添加量
溶離液塩濃度	有機溶媒の種類

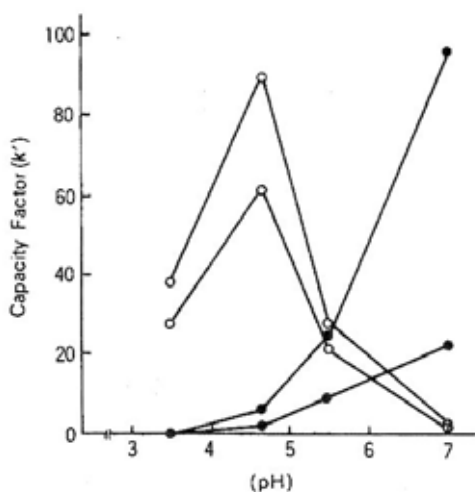
これらの項目についての検討結果をご説明します。

### 4. pH とキャパシティーファクターの関係

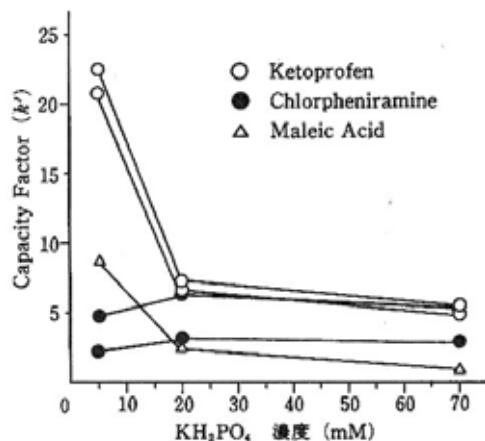
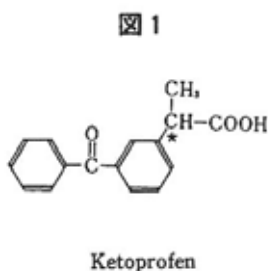
酸性化合物は、pH の増加に対してキャパシティーファクターは減少し、塩基性化合物は増加します。この現象は、試料のイオン性を減少させる方向に保持が大きくなることより、主に疎水的な相互作用が働いているものと考えられます（図 1 参照）。

### 5. 塩濃度とキャパシティーファクターの関係

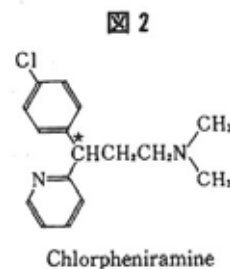
塩濃度が 20mM 以上においては、キャパシティーファクターにほとんど影響が表れませんが、5mM にしますと、酸性化合物は急激な増加がみられ、塩基性化合物はわずかに減少します。酸性化合物の急激な増加は、充填剤中の主に塩基性のイオンが影響しているものと考えられます（図 2 参照）。



カラム：ULTRON ES-OVM ( 4.6mm × 150mm )  
 移動相：20mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  /  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  = 100 / 3  
 流速：1.0 mL / min.  
 温度：25  
 検出：UV-220nm, 0.04 AUFS



カラム：ULTRON ES-OVM ( 4.6mm × 150mm )  
 移動相：~ 70mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=5.5) /  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  = 100 / 10  
 流速：1.0 mL / min.  
 温度：25  
 検出：UV-220nm, 0.04 AUFS



## 6. 有機溶媒類の保持におよぼす影響

メタノール<エタノール<2-プロパノール<アセトニトリルの順に、試料の溶出力は高いです。

このように分離度を調節する場合には、有機溶媒の種類を変えることも有効です。

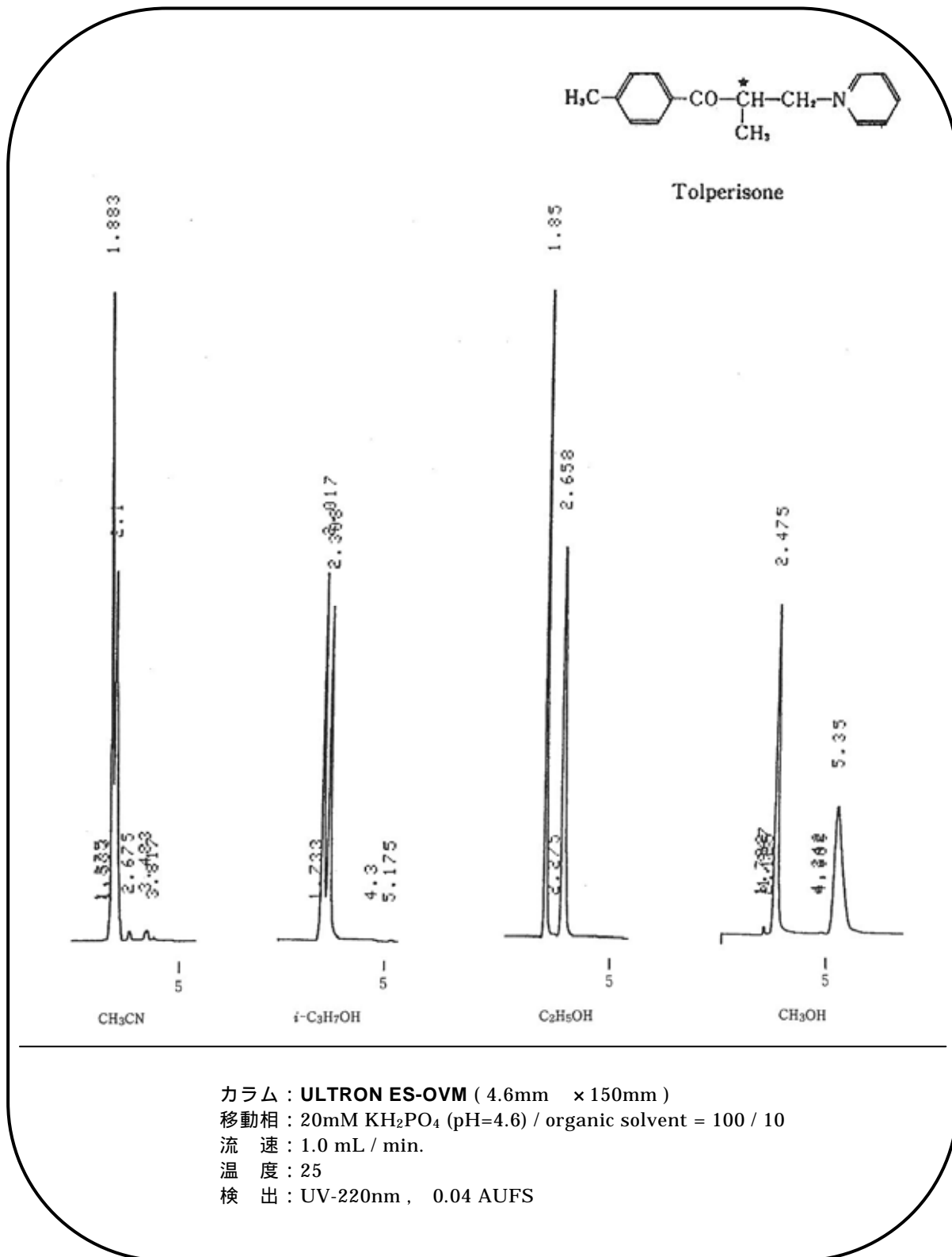


図 3

## 7. 有機溶媒添加量の保持におよぼす影響

有機溶媒の添加量は、分離に大きく影響します。

また添加量の実験では、アセトニトリルおよび 2-プロパノールの 50%水溶液を 50 時間流して耐久性の確認を行いました結果、光学分割能には異常がないことを確認しています。

充填剤への汚染物は、上記のような有機溶媒で洗浄することができます。

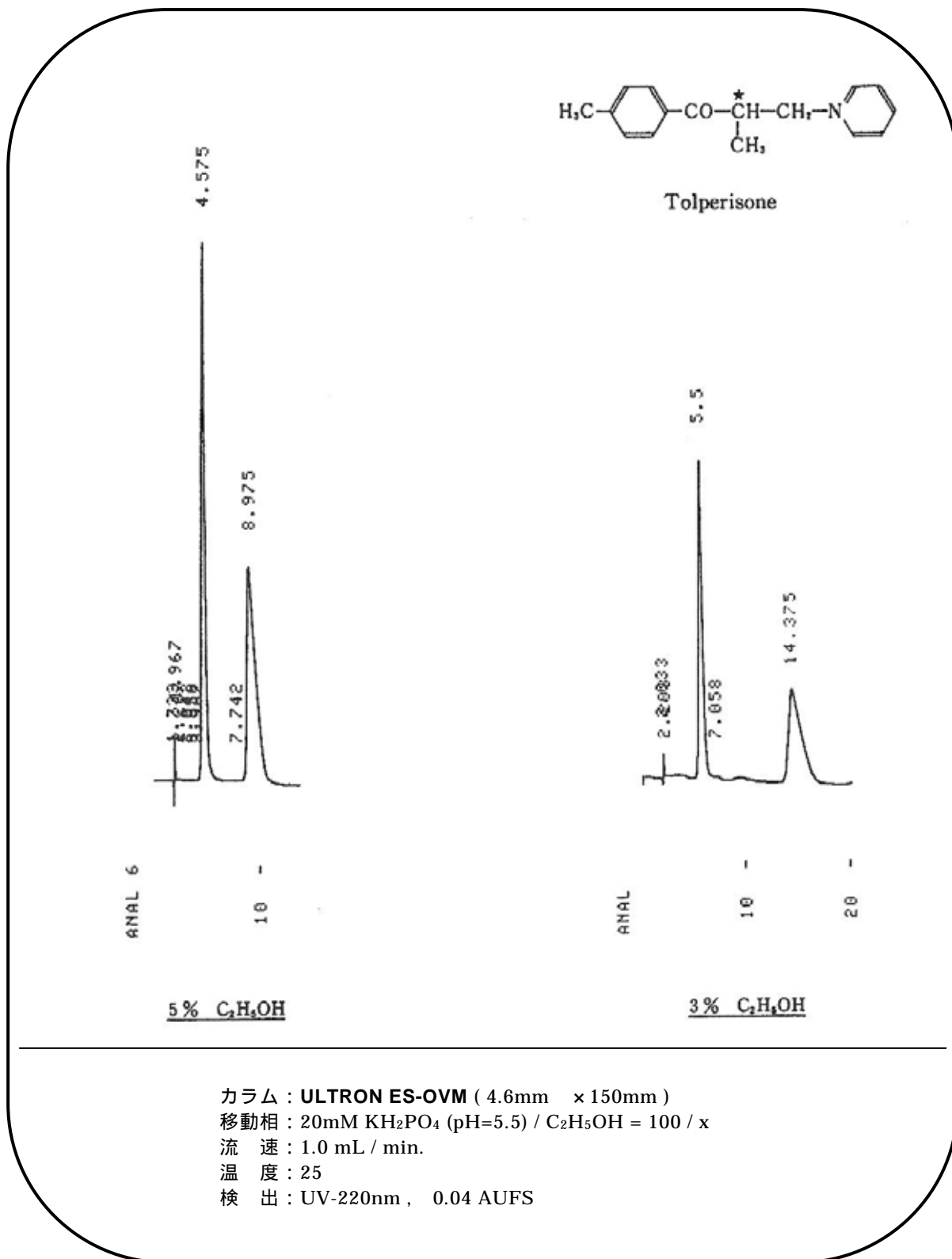


図 4

## 8. 分離度の調節例

ULTRON ES-OVM は、疎水性の強い化合物の分離に適しています。Dimethindene は、塩基性で疎水性が強い試料です。

図 5(A)の基本的な条件では、分析に約 75 分要していますが、図 6(B)のように有機溶媒を増量しますと約 1/3 に短縮されました。この二つのクロマトグラムで有機溶媒添加量が保持に大きく影響することがわかります。

また、図 7(C)は有機溶媒をさらに増量したもので、保持時間が早くなり、マレイン酸のピークと重なっています。

図 8(D)では、pH を少しアルカリ側にしたことにより保持時間が長くなりました。

これらの経験により、この試料の分析条件としては、図 6(B)が適しているといえます。

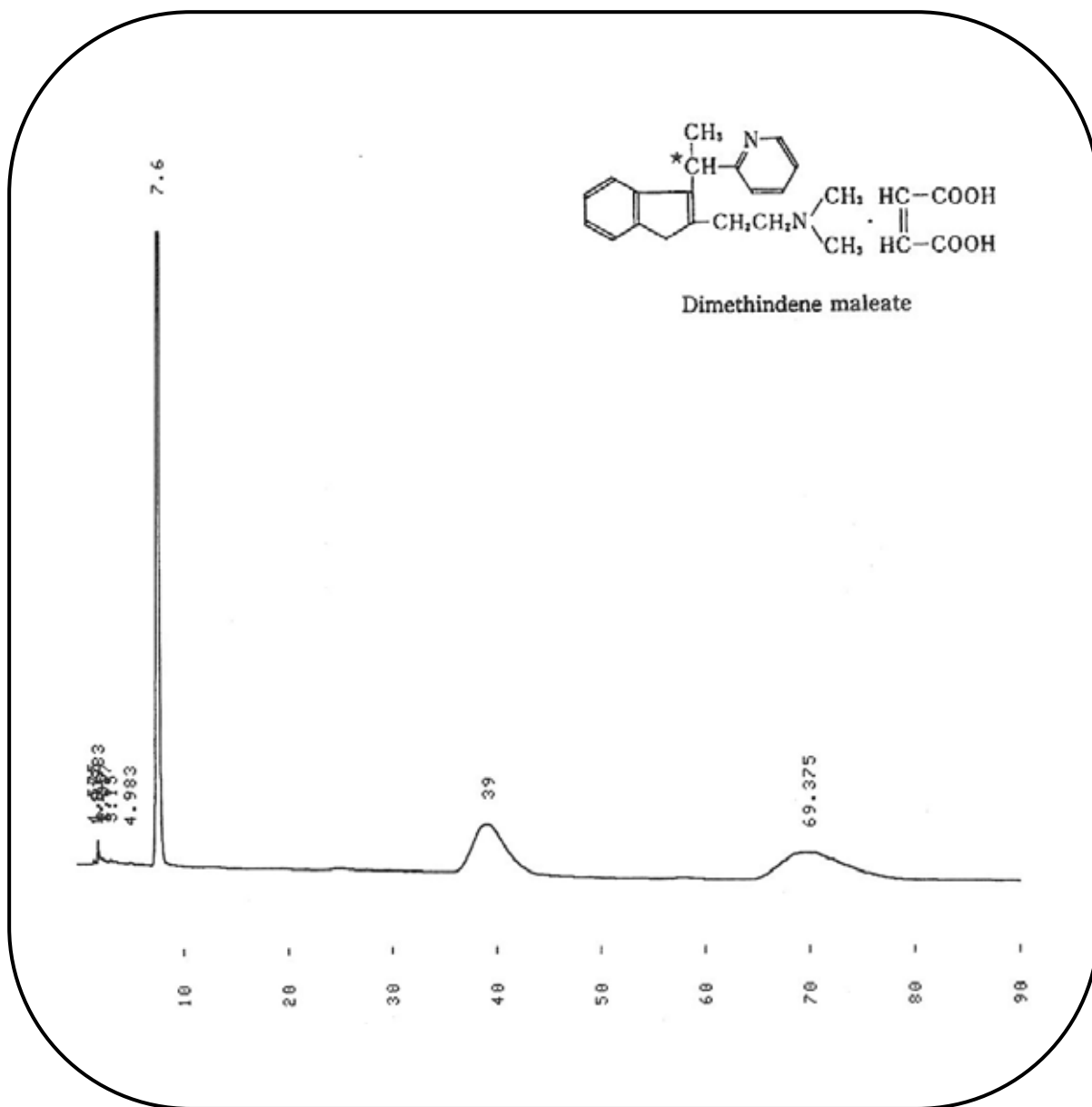


図 5 (A)

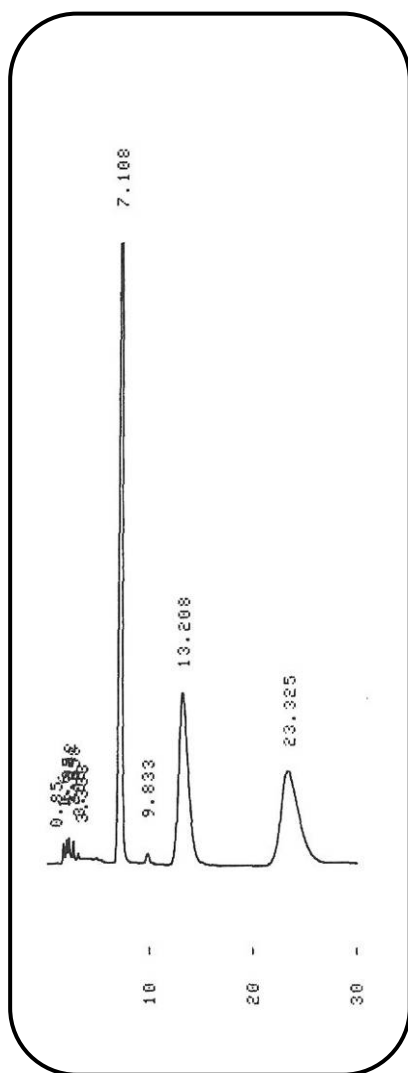


図 6 (B)

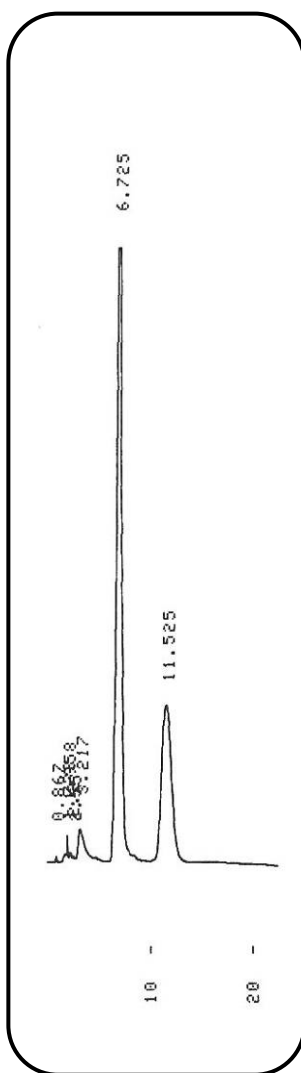


図 7 (C)

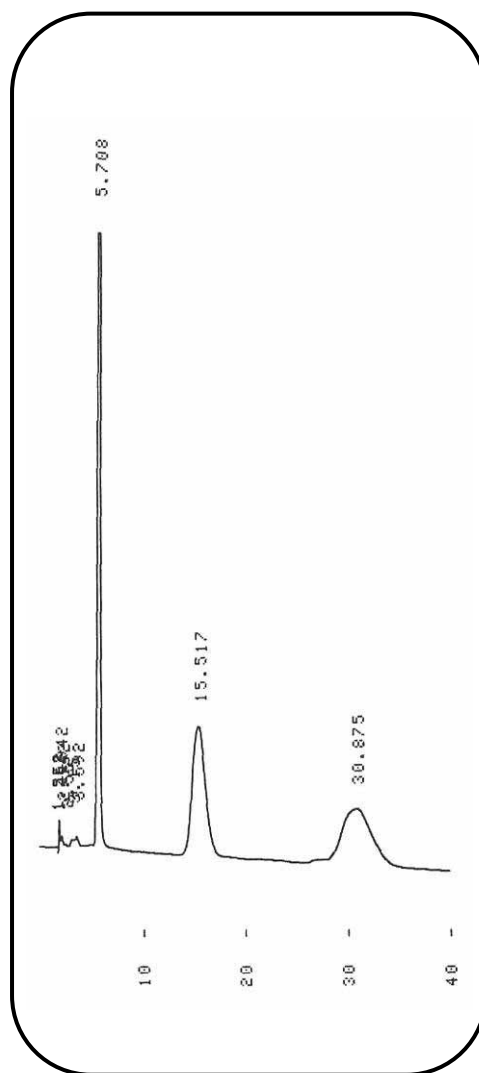


図 8 (D)

カラム : **ULTRON ES-OVM** ( 4.6mm × 150mm )

移動相 : (A) 20mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=4.6) / C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH = 100 / 10

(B) 20mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=4.6) / C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH = 100 / 15

(C) 20mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=4.6) / C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH = 100 / 20

(D) 20mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=5.0) / C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH = 100 / 20

流 速 : 1.0 mL / min.

温 度 : 25

検 出 : UV-220nm , 0.04 AUFS

## 9. 試料負荷量について

負荷量が増すに従い理論段数が低下します。シャープなピークを得るには、低負荷量で高感度分析が適します。

また、高負荷量領域において容量負荷量は、ピークの歪み現象がみられます。試料濃度を上げて注入量を抑える重量負荷が適しています。

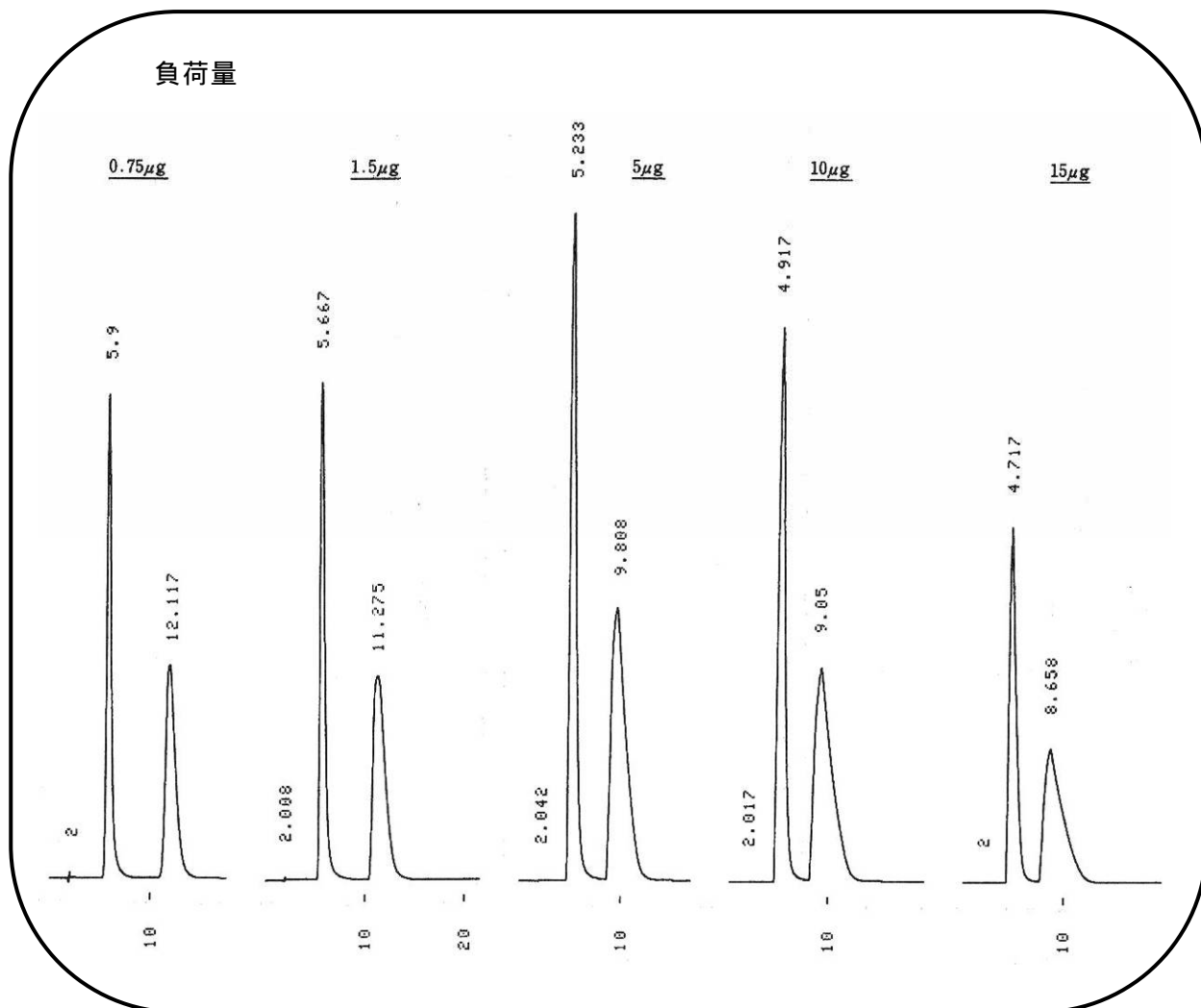


図9 重量負荷量

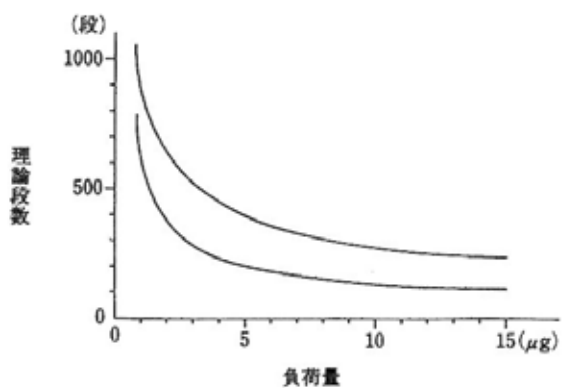


図10

カラム: ULTRON ES-OVM (4.6mm × 150mm)  
 移動相: 20mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=5.5) / C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH = 100 / 4  
 流速: 1.0 mL / min.  
 温度: 25  
 検出: UV-254nm  
 注入量: 0.5 μL 一定  
 試料: Tolperison



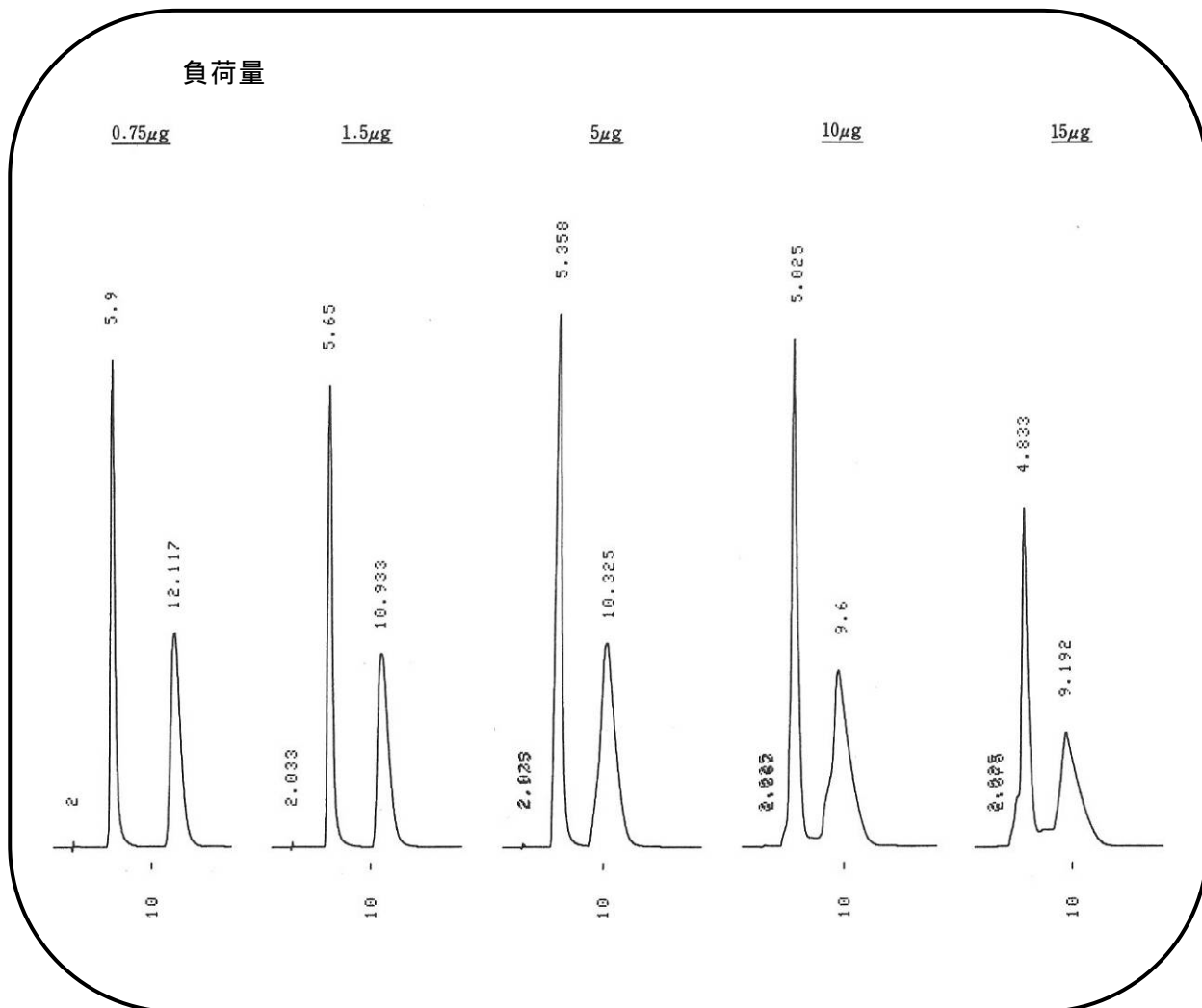
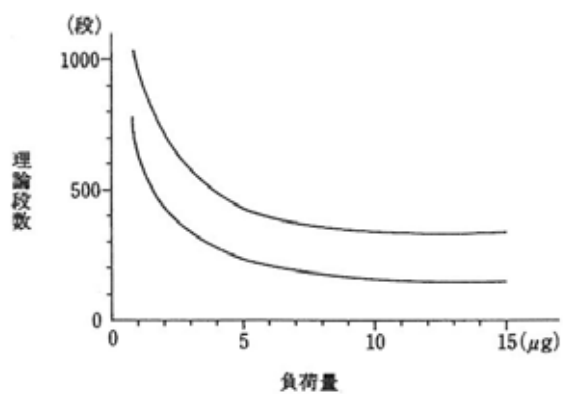


図 11 容量負荷量

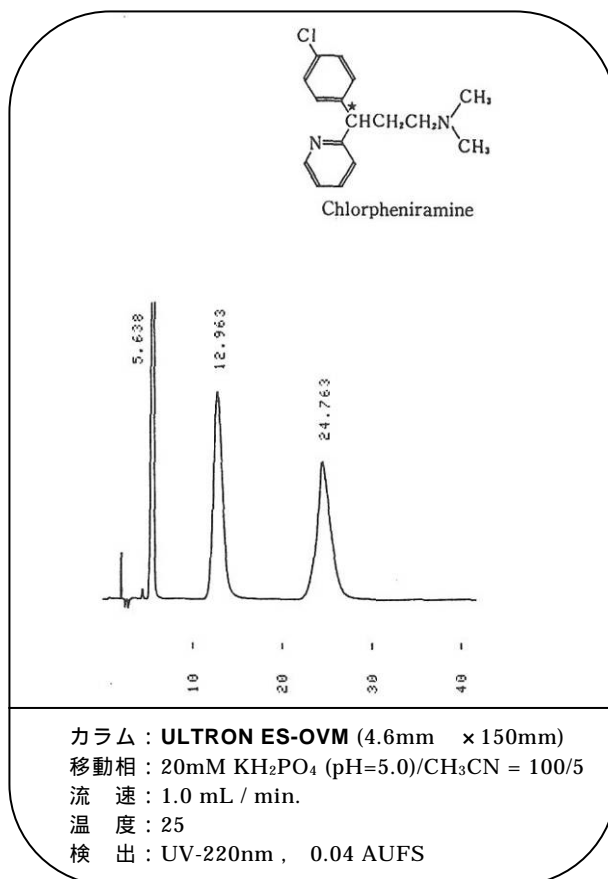


分析条件は、図 10 に同じ  
 注入量 順に 0.5, 1.0, 3.3, 6.7, 10 μL

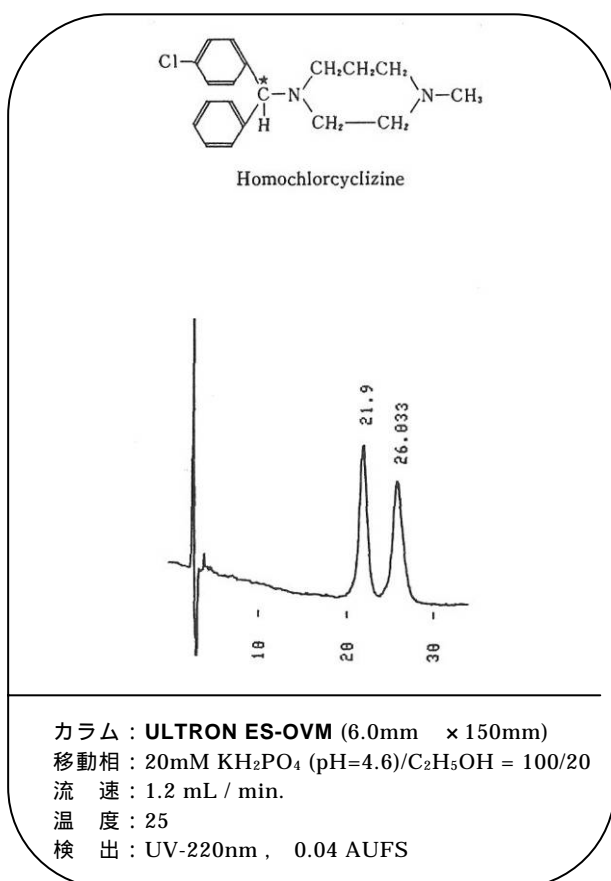
図 12

# 10. 分析例

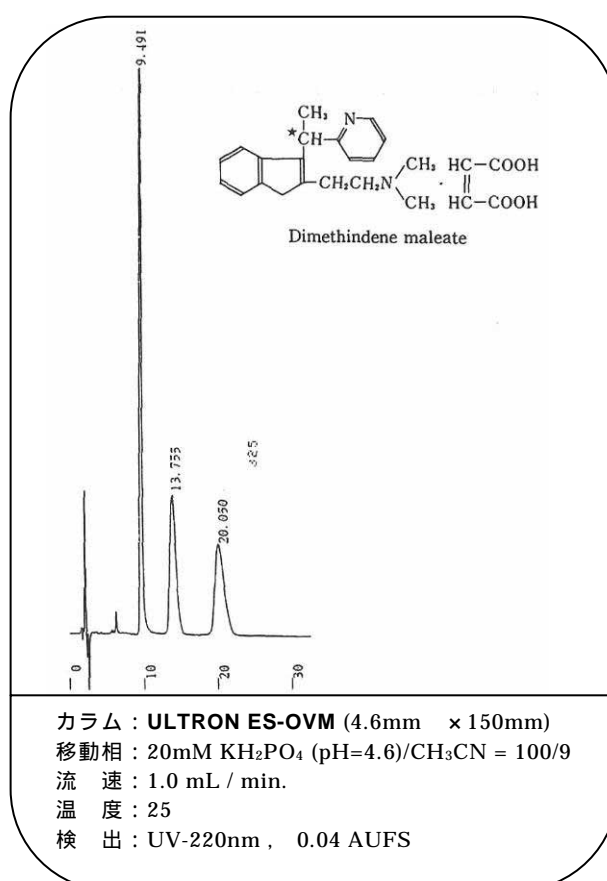
## 10.1 抗ヒスタミン薬



クロルフェニラミン

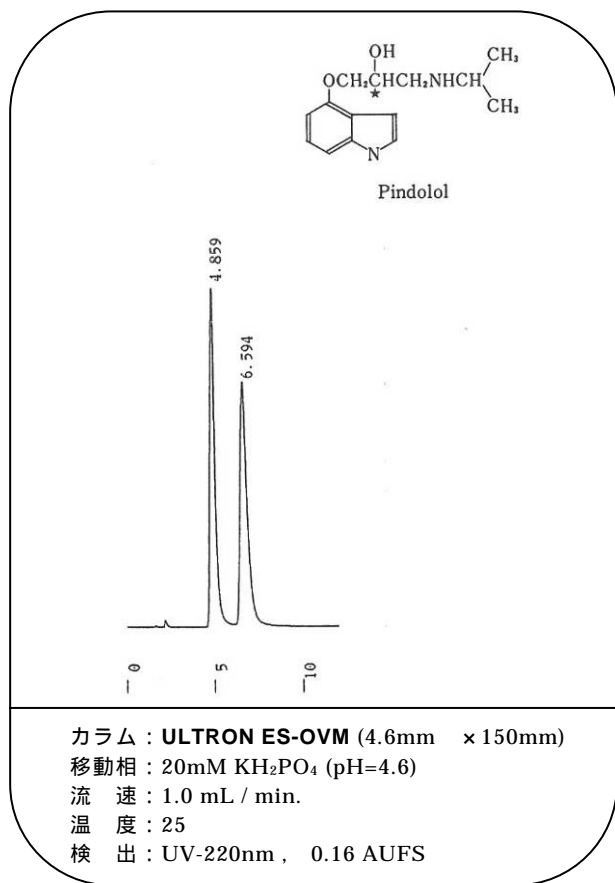


ホモクロルシクリジン

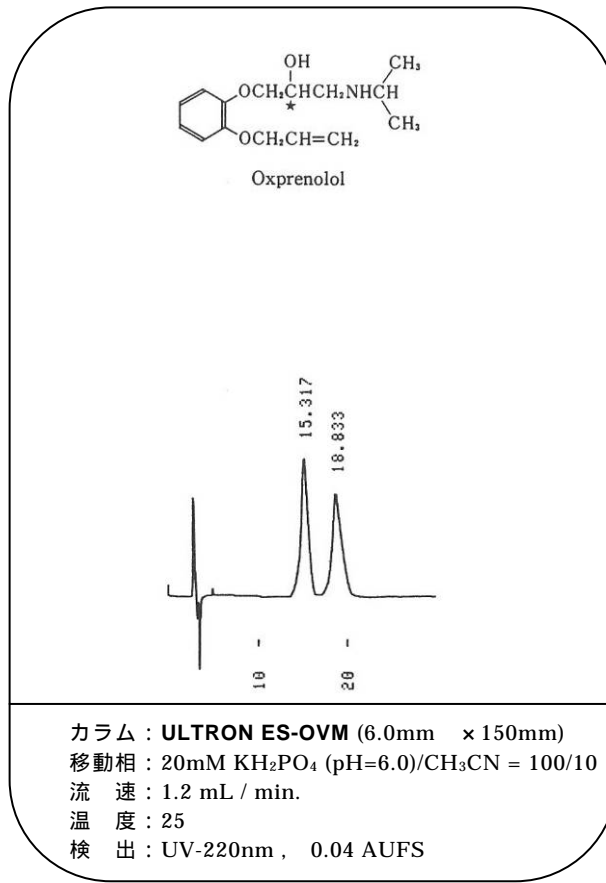


ジメチンデン

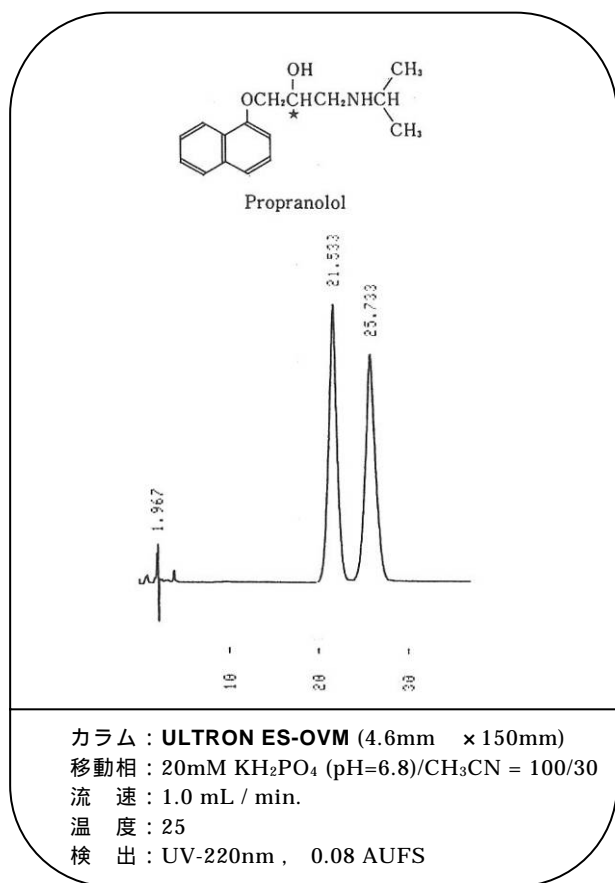
10.2 - 遮断薬



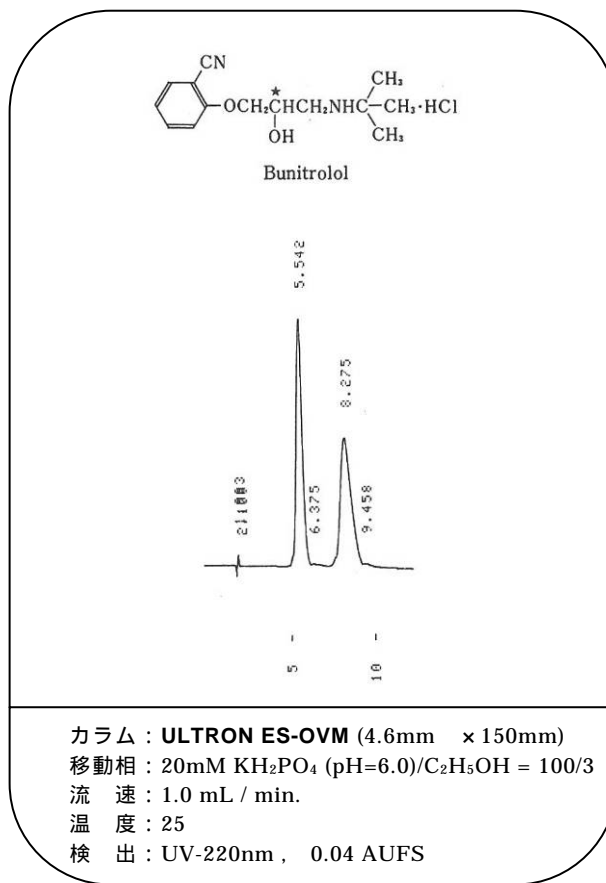
ピンドロール



オクスプレノロール

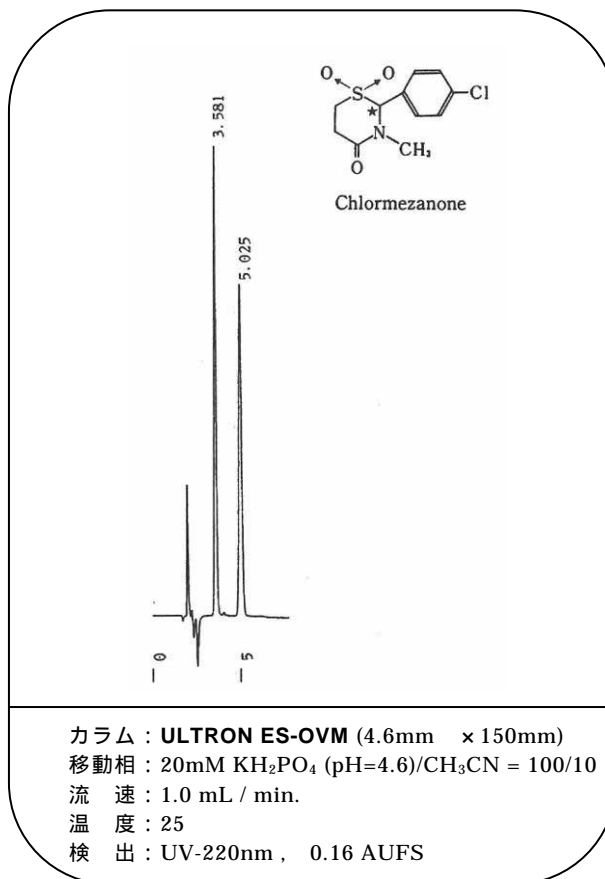


プロプラノロール

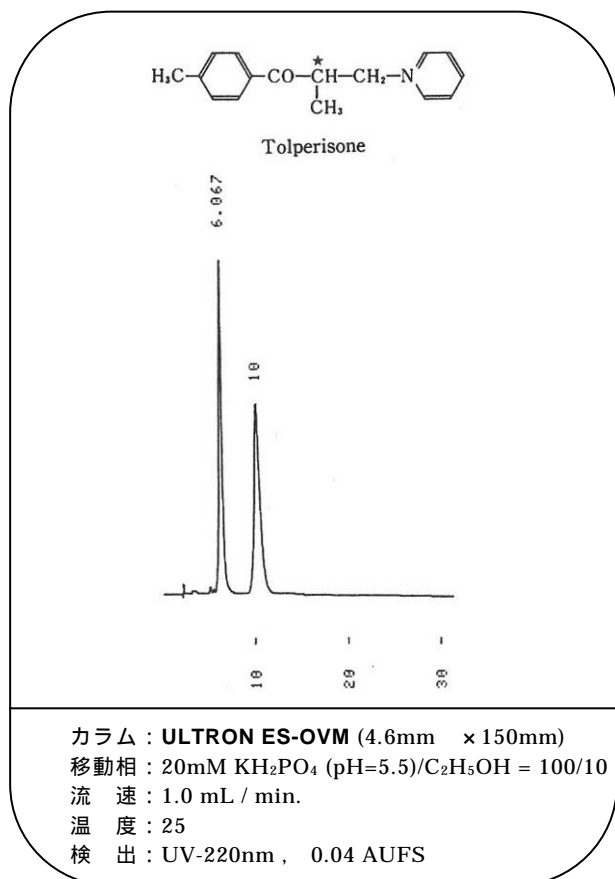


ブニトロロール

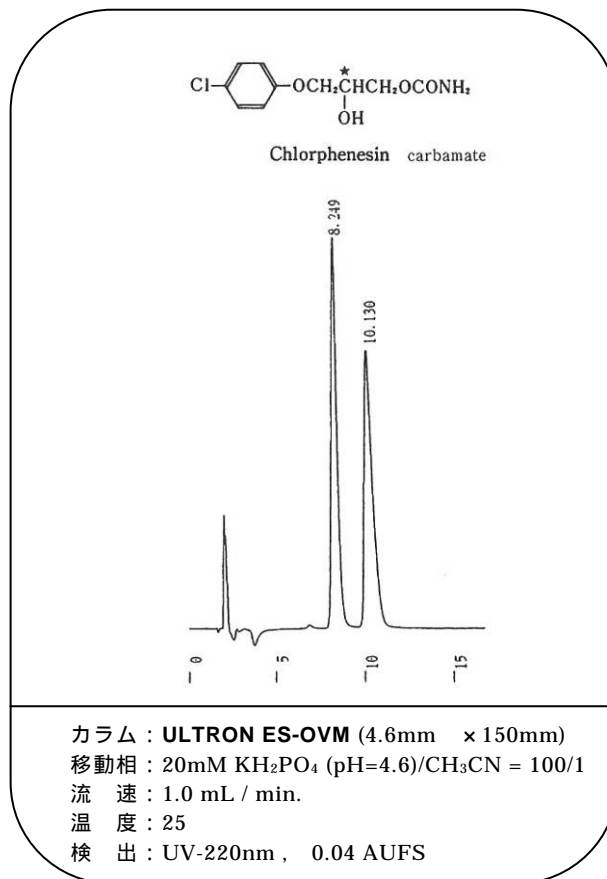
### 10.3 筋弛緩薬



**クロルメザノン**

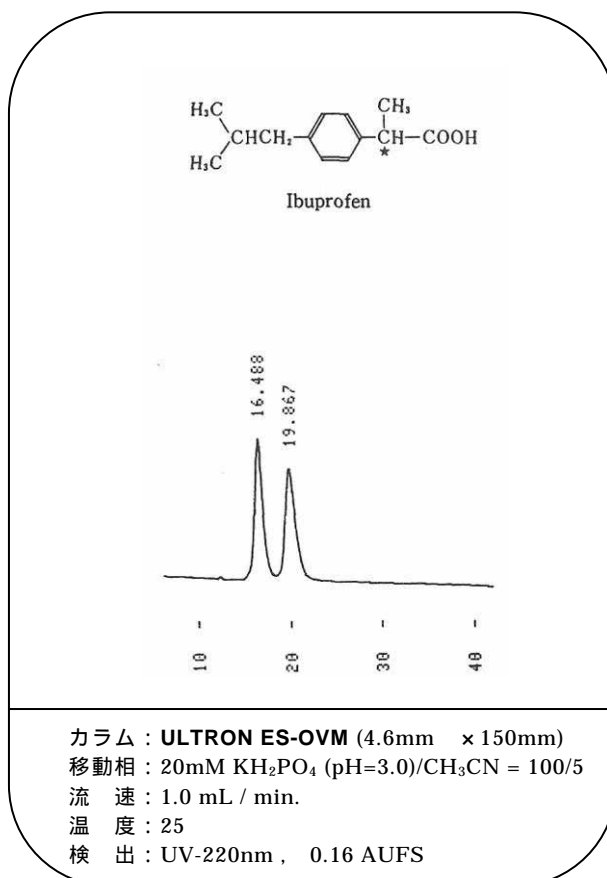


**トルペリゾン**

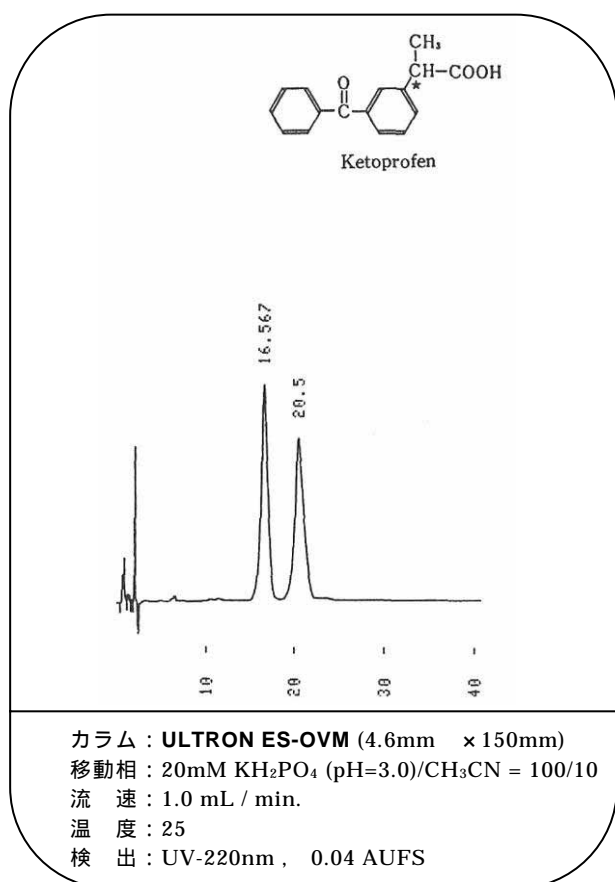


**クロルフェネシン**

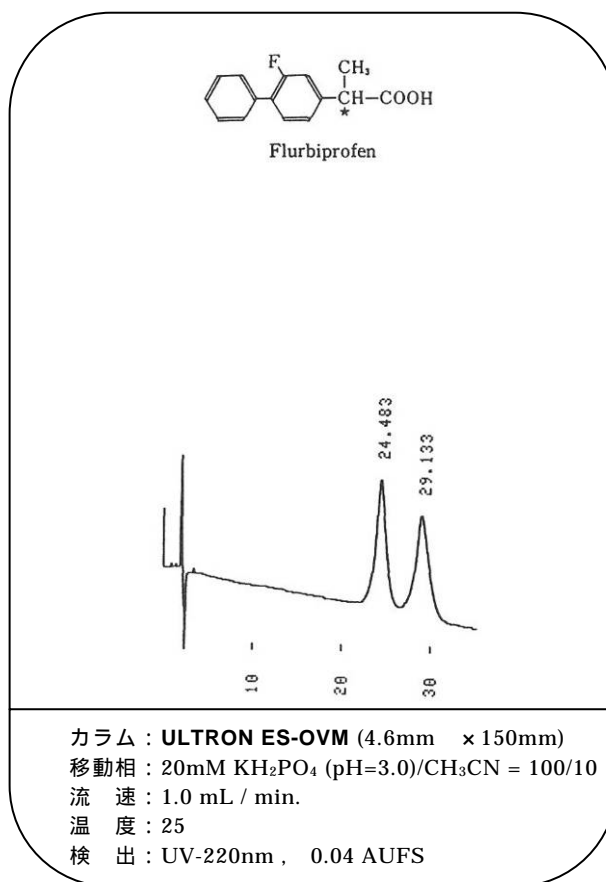
## 10.4 抗炎症薬



**イブプロフェン**

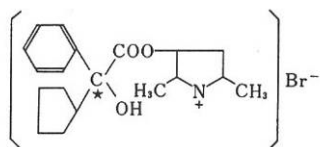


**ケトプロフェン**

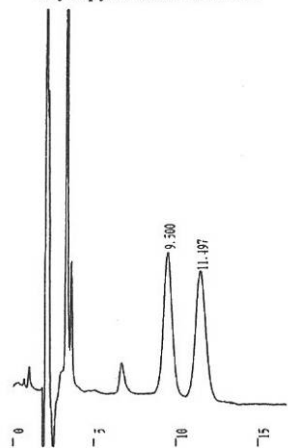


**フルルビプロフェン**

### 10.5 抗コリン薬



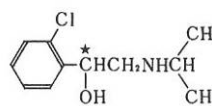
Glycopyrronium bromide



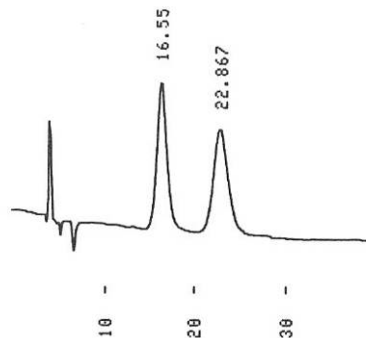
カラム : ULTRON ES-OVM (4.6mm × 150mm)  
 移動相 : 20mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=5.5)/C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH = 100/2  
 流速 : 1.0 mL / min.  
 温度 : 25  
 検出 : UV-210nm , 0.005 AUFS

臭化グリコピロニウム

### 10.6 気管支拡張薬



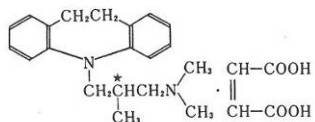
Clorprenaline



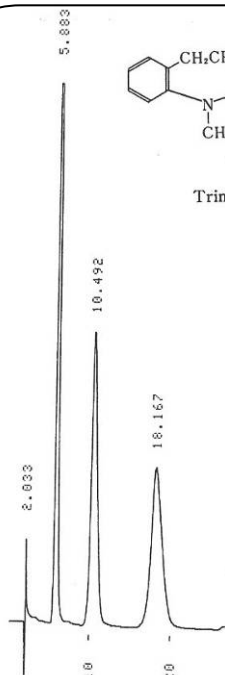
カラム : ULTRON ES-OVM (4.6mm × 150mm)  
 移動相 : 20mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=5.5)/CH<sub>3</sub>CN = 100/3  
 流速 : 1.0 mL / min.  
 温度 : 25  
 検出 : UV-220nm , 0.04 AUFS

クロルプレナリン

### 10.7 抗うつ剤



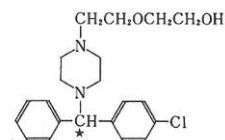
Trimipramine maleate



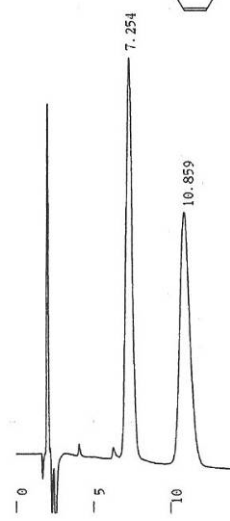
カラム : ULTRON ES-OVM (4.6mm × 150mm)  
 移動相 : 20mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=4.6)/C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH = 100/30  
 流速 : 1.0 mL / min.  
 温度 : 25  
 検出 : UV-220nm , 0.04 AUFS

マレイン酸トリミプラミン

### 10.8 抗アレルギー性緩和剤



Hydroxyzine



カラム : ULTRON ES-OVM (4.6mm × 150mm)  
 移動相 : 20mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=4.6)/C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH = 100/10  
 流速 : 1.0 mL / min.  
 温度 : 25  
 検出 : UV-220nm , 0.04 AUFS

ヒドロキシジン

# 11. ULTRON ES-OVM の使用の手引

封入液 33% 2-プロパノール  
 保管 室温（冷所）  
 移動相条件  
     BUFFER 0.02 ~ 0.05M の各種緩衝溶液  
             （緩衝溶液の種類による Rs の影響参照）  
     pH 3.0 ~ 7.5  
     有機溶媒 methanol, ethano1, acetonitrile, 1-propanol, 2-propano1  
             最大 50%まで使用可能です。

## カラムの洗浄

まず使用移動相と同じ割合の水/有機溶媒にし、0.2 mL/min で一晩洗浄して下さい。さらにカラムが汚れているときは、pH3.5 リン酸 / 2-プロパノール = 100 / 20 で 0.2mL / min、2 時間程度洗浄して下さい。

## 移動相条件の最適化

移動相条件の最適化フローシートを参照して下さい。  
 (技術資料 No.7 参照)

## 仕様および価格

品名	平均粒子径(μm)	カラムサイズ(mm)	用途	定価(円)
ULTRON ES-OVM ナローポアカラム	5	150×2.0 I.D.	血中薬物分析	180,000
ULTRON ES-OVM	5	150×4.6 I.D.	一般分析用	180,000
"	5	150×6.0 I.D.	高分離用	250,000
ULTRON ES-OVM・G	5	10×4.0 I.D.	ガードカラム	32,000
ULTRON ES-OVM	10	250×4.6 I.D.	セミ分取検査用	165,000
ULTRON ES-OVM Prep	10	250×20.0 I.D.	セミ分取用	1,650,000
ULTRON ES-OVM Prep・G	10	15×8.0 I.D.	セミ分取ガードカラム	66,000

お問い合わせ下さい

カラムフィッティングはウォーターズ型と互換性があります。  
 カラム封入液は水 / 2-プロパノール = 2 / 1 水溶液です。  
 他のカラムサイズはお問合せ下さい。

**仕様は改良のため、予告なく変更することがありますのでご了承下さい。**

## 12. 掲載文献、学会発表リスト

- Direct Liquid Chromatographic Resolution of Racemic Compounds. Use of Ovomuroid as a Column Ligand  
TOSHINOBU MIWA\* MASAKI ICHIKAWA, MASANORI TSUNO, TEIICHI HATTORI, TAKESHI MIYAKAWA, MASANORI KAYANO and YASUO MIYAKE, *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 682 (1987)
- Propranolol プロドラッグにおける立体選択的、臓器特異的加水分解  
(武庫川女大、薬) 高橋, 玉川, 萩中, 古山, 佐藤, 安田, 加多木, 薬物動態, Vol.4, No.3 (1989)
- Chiral Separation of Propranolol and Its Ester Derivatives on an Ovomuroid-Bonded Silica : Influence of pH, Ionic Strength and Organic Modifier on Retention, Enantioselectivity and Enantiomeric Elution Order  
Jun Haginaka\*/ Junko Wakai / Kouichi Takahashi / Hiroyuki Yasuda / Toyoshi Katagi, *Chromatographia*, 29, 58 (1990)
- Direct liquid chromatographic resolution of (R- and (S) - abscisic acid using a chiral ovomuroid column  
Masahiko Okamoto\* and Hiroshi Nakazawa, *J. Chromatogr.*, 504, 445 (1990)
- Optical resolution of abscisic acid metabolites using an ovomuroid-conjugated high-performance liquid chromatographic column  
Masahiko Okamoto / Hiroshi Nakazawa, *J. Chromatogr.*, 508, 217 (1990)
- Chiral Separation and Determination of Propranolol Enantiomers in Rat or Mouse Blood and Tissue by Column Switching High Performance Liquid Chromatography with Ovomuroid Bonded Stationary Phase  
Gen Tamai\* Masami Edani, and Hideo Imai, *BOIMEDICAL CHROMATOGRAPHY*, 4 (1990)
- Stereoselective hydrolysis of O-acetyl propranolol as prodrug in human serum  
KOICHI TAKAHASHI, JUN HAGINAKA, SATOKO TAMAGAWA, TOSHIKI NISHIHATA\*, HIROYUKI YASUDA, TOYOSHI KATAGI, *J. Pharm.Pharmacol.*, 42, 356 (1990)
- The Effects of pH and Alcoholic Organic Modifiers on the Direct Separation of Some Acidic, Basic and Neutral Compounds on a Commercially Available Ovomuroid Column  
J.Iredale / A.-F. Aubry / I. Wainer\*, *Chromatographia*, 31, 329 (1991)
- On-line determination and resolution of verapamil enantiomers by high-performance liquid chromatography with column switching  
YOSHIYA ODA\*, NAOKI ASAKAWA, TAKASHI KAJIMA, YUTAKA YOSHIDA and TADASHI SATO, *J. Chromatogr.*, 541, 411 (1991)
- Retention and enantioselectivity of racemic solutes on a modified ovomuroid-bonded column  
Jun Haginaka\*, Chikako Seyam, Hiroyuki Yasuda, Hiroya Fujima and Hiroo Wada, *J. Chromatogr.*, 592, 301 (1992)
- オボムコイド結合光学分割カラムの特性  
(信和化工) 藤間宏也, 北川浩史, 北村裕子, 和田啓男, クロマトグラフィー, Vol.13, 385 (1992)
- High-performance liquid chromatographic method for the enantiomeric separation of the chiral metabolites of midazolam  
J.Drewe and E.Kusters, *J. Chromatogr.*, 609, 395 (1992)
- Optimized HPLC Separations of Racemic Drugs Using an Ovomuroid Protein-Based Chiral Column  
K. M. Kirkland, K. L. Neilson, D. A. McCombs and J. J. DeStefano, *LC-GC*, 10, 322 (1992)
- Enantioselective pharmacokinetics of homochlorcyclizine . Simultaneous determination of (+) - and (-) - homochlorcyclizine in human urine by high-performance liquid chromatography  
Mayumi Nishikata, Aki Nakai, Hitomi Fushida, Keishirou Miyake, Takaichi Arita, Ken Iseki, Katsumi Miyazaki and Akikazu Nomura, *J. Chromatogr.*, 612, 239 (1993)



Direct high-performance liquid chromatographic separation of the enantiomers of diltiazem hydrochloride and its 8-chloro derivative on a chiral ovomucoid column

Hiroyuki Nishi\*, Norio Fujimura, Hiroshi Yamaguchi and Tsukasa Fukuyam, *J. Chromatogr.*, **633**, 89 (1993)

Chiral separation of lorazepam on ovomucoid-bonded columns : Peak coalescence due to racemization

H. Fujima, H. Wada, T. Miwa and J. Haginaka, *Journal of liquid chromatography*, **16**, 879 (1993)

タンパク質をリガンドとした光学分割クロマトグラフィー

(信和化工, エーザイ) 倉橋, 坂根, 和田, 三輪, 第6回液体クロマトグラフィー春季討論会 (1989)

HPLCによるマウス組織中プロプラノロールの光学分割定量

(福山大, 薬) 玉井, 恵谷, 永田, 今井, 第10回液体クロマトグラフィー国際大会 (1989)

オボムコイド結合カラムのアブシジン酸及びその誘導体の光学分割への応用

(住友化学工業) 岡本, 中澤, 第10回液体クロマトグラフィー国際大会 (1989)

A comparison of a new ovomucoid (ULTRON) and acid glycoprotein (CHIRAL-AGP) based chiral stationary phases for the direct resolution of drug enantiomers

K. M. Kirkland *et al.*, 14th International Symposium on Column Liquid Chromatography (1990)

リグナン系抗腫瘍化合物の設計・合成と不斉反応の開発

(東京大, 薬) 富岡, 有機合成セミナー (1990)

カラムスイッチングHPLCによる生体試料中薬物の光学分割定量 - 酸性薬物ケトプロフェンの分析

(福山大, 薬) 玉井 元, 恵谷政美, 今井日出夫, 日本薬学会 第110年会 (1990)

キラル固定相を用いたカラムスイッチングLCECによるイヌ血漿中S-312光学異性体分離定量法

(塩野義, 研) 梅田常二, 藤友博行, 西野以久子, 上野恭嗣, 日本薬学会 第110年会 (1990)

カラムスイッチングによる定量・光学分割のオンライン化

(エーザイ) 小田吉哉, 浅川直樹, 吉田 豊, 里 忠, 日本薬学会 第110年会 (1990)

クロルフェニラミンの光学異性体の液体クロマトグラフィーによる定量

(武庫川女大, 薬) 伏田仁美, 中井亜紀, 三宅司郎, 日本薬学会 第110年会 (1990)

蛋白質 (オボムコイド) をリガンドとした光学分割カラムによる保持挙動および分離の最適化

(信和化工) 藤間宏也, 第21回液体クロマトグラフ研究会 (1990)

タンパク質をリガンドとする固定相を用いる光学分割 (1); オボムコイド結合カラムによるプロプラノロール及びそのエステル誘導体の光学分割

(武庫川女大, 薬) 萩中 淳, 若居純子, 高橋幸一, 安田博幸, 加多木豊史, 日本分析化学会第39年会 (1990)

## ULTRON 技術資料

- No.1 ポリマー系有機酸専用カラム ULTRON PS-80H
- No.2 ポリマー系糖,糖アルコール専用カラム  
ULTRON PS-80N,PS-80C,PS-80P
- No.3 非水系 ULTRON GPC カラム
- No.4 光学分割カラム ULTRON ES-OVM カラム  
Ver.2
- No.5 光学分割カラム ULTRON ES-OVM カラム
- No.6 光学分割カラム ULTRON ES-OVM  
(ナローポアカラム)
- No.7 光学分割カラム ULTRON ES-OVM カラム



信和化工株式会社

〒612-8307 京都市伏見区景勝町50番地2

TEL 075-621-2360 FAX 075-602-2660

e-mail: info@shinwa-cpc.co.jp

U R L : <http://shinwa-cpc.co.jp/>

LN1004B