

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.6

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 微量分析のためのクロマトグラフィー ファクター .....	2
3 ナローボアカラムの流量と理論段相当高さ (HETP) との関係 .....	4
4 試料負荷量 .....	4
5 定量精度の検討 .....	6
6 まとめ .....	6
7 体内動態分析への応用 .....	7



信和化工株式会社

# 1. はじめに

医薬分析の進展と共に光学異性体薬物の体内動態レベルの分析が要求されています。体内動態分析は試料が微量であるため高感度分析が必要とされます。オボムコイド結合光学分割充填剤は薬物動態分析に適した水系の移動相が使用でき、試料を誘導体化することなしに直接分割が可能ですから、貴重な微量試料を損失することなく分析することができます。そのためには、カラム容積やカラム外容積を小さくして試料の拡散を極力抑えて感度向上を図ります。

今回、薬物動態分析に適した内径 2.0mm の **ULTRON ES-OVM** ナローボアカラムを開発し、微量分析のためのクロマトグラフィーファクターの検討を行いましたのでその結果をご説明致します。

## 2. 微量分析のためのクロマトグラフィーファクター

### 高感度分析のために

- 1) カラム内径を小さくしてカラム中での試料成分の拡散を防ぐ。
- 2) 配管、注入部、検出器等のカラム外容積での試料成分の拡散を防ぐ。

まず第 1 項については表 1 で示しますように長さが同じで、内径が 4.6mm と 2.0mm の 2 種類のカラムを比較してみます。充填剤が同じ場合、基本的にはカラム段数、分離能は変わりません。しかし、カラム内部容積の違い（断面積比が 5.3 : 1）によりカラム性能に差が生じます。同量の試料を注入した場合、ピーク高さは約 5.3 倍（図 1 参照）になります。

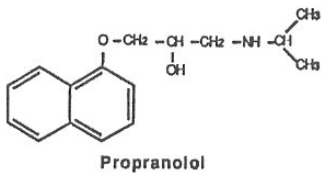
第 2 項、ここでカラム外容積とはカラムを除いた注入部（インジェクター）から検出器に至るシステム内の容積を示します（図 2 参照）。

そこでカラム外容積が実際の分離にどのような影響を与えるかについて検討しました。表 2 は通常使用されている HPLC システムで、それぞれインジェクター、配管、検出器セルを変えて比較したカラム外容積を示しています。このシステムを用いて得られたクロマトグラムを図 3 に示します。A と B ではインジェクターを 20  $\mu\text{L}$  から 5  $\mu\text{L}$ 、配管は内径 0.3mm から 0.13mm へと変えることによりカラム外容積は約 1/3 となり、配管を変えることで理論段数の向上が見られます。また、B と C ではインジェクターループ容積、配管はそのまま検出器セルを 8  $\mu\text{L}$  から 2.5  $\mu\text{L}$  に変えています。検出器セルを変えることで、この場合さらに理論段数の向上が見られました。しかし、C の検出器セルの光路長が通常の 8  $\mu\text{L}$  セルの 1/2 と短いため、検出感度が低い結果となっています。

したがって、実用上は内径 2.0mm のカラムであればインジェクター、カラム配管を極力小さくすることを考慮すれば通常の分析装置で高感度分析できることがわかります。

表 1 カラム容積と空隙容量

カラムサイズ (mm L×mmID)	カラム容積 (mL)	カラム空隙容量 (mL)
150×2.0	0.47	0.38
150×4.6	2.49	1.90



カラム	: <b>ULTRON ES-OVM</b>	<b>ULTRON ES-OVM</b>
カラムサイズ	: 150mm × 4.6mm I.D.	150mm × 2.0mm I.D.
移動相	: 20mM リン酸緩衝液 (pH=6.8) /CH <sub>3</sub> CN = 100/30	20mM リン酸緩衝液 (pH=6.8) /CH <sub>3</sub> CN = 100/30
流速	: 1.0 mL/min.	0.2 mL/min.
温度	: 25°C	25°C
検出	: UV-220nm 0.02AUFS	UV-220nm 0.02AUFS
試料	: プロプラノロール 50ng	プロプラノロール 50ng

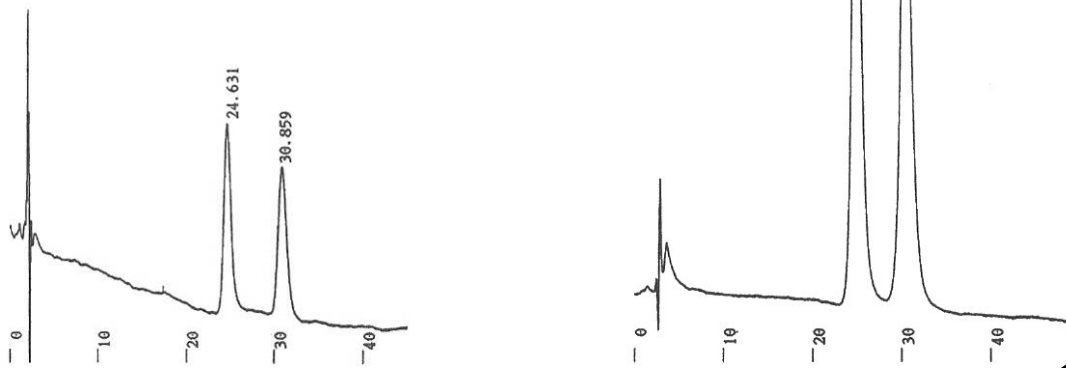


図1 標準カラムとナローボアカラムの比較クロマトグラム

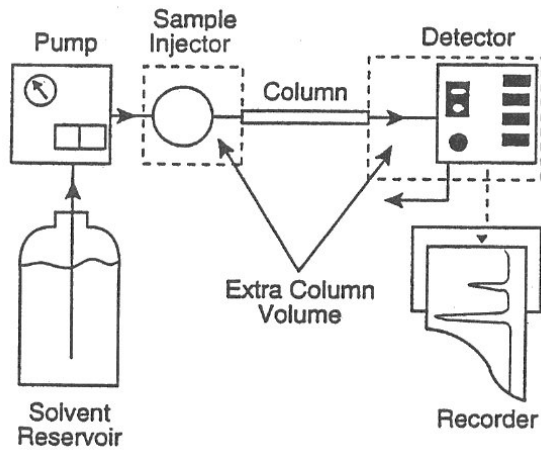


図2 カラム外容積

表2 各システムのカラム外容積の比較

	A	B	C
インジェクター ループ容積	20 μL	5 μL	5 μL
接続チューブ	内径 0.3mm 容積 71μL	内径 0.13mm 容積 18μL	内径 0.13mm 容積 6.7μL
検出器セル容量	8μL	8μL	2.5μL
カラム外総容積	99μL	31μL	14.2μL

20μL ループ : レオダイン 7125

検出器 : SHIMADZU SPD-6A

5μL ループ : レオダイン 8125

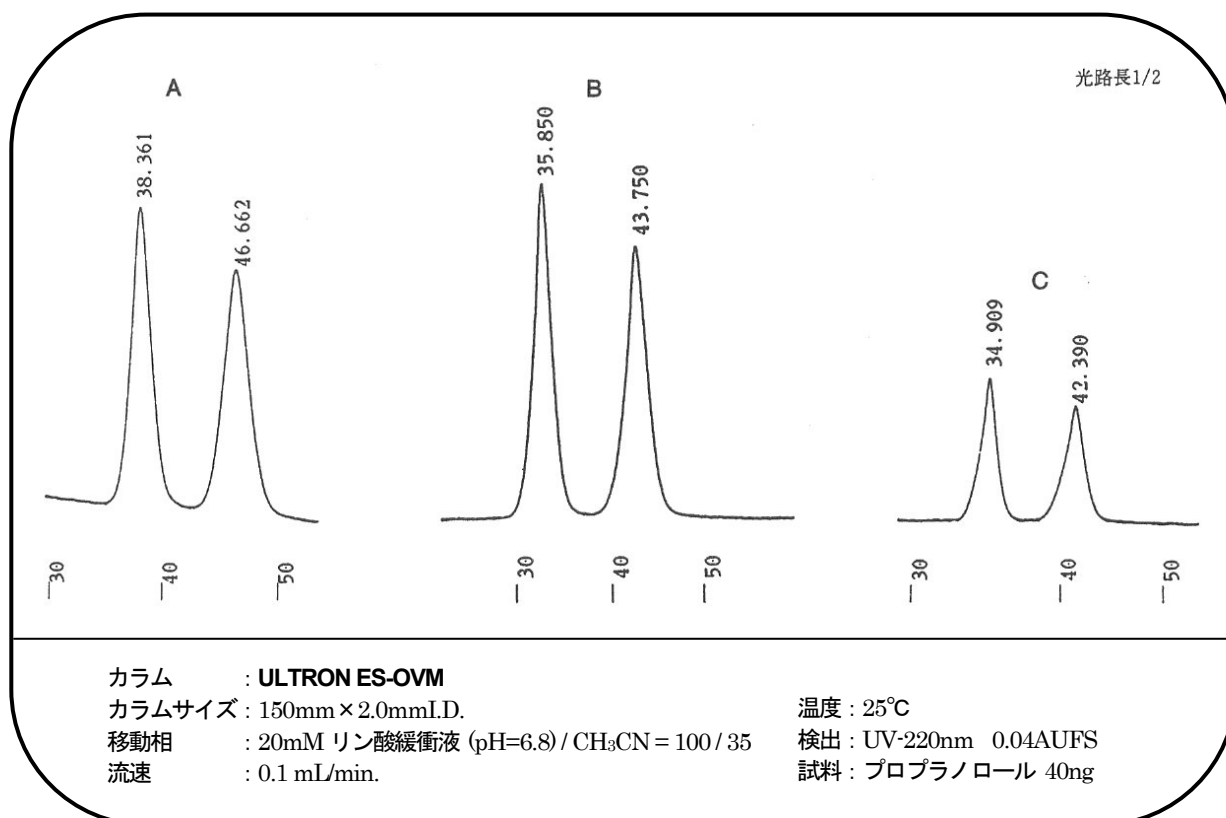


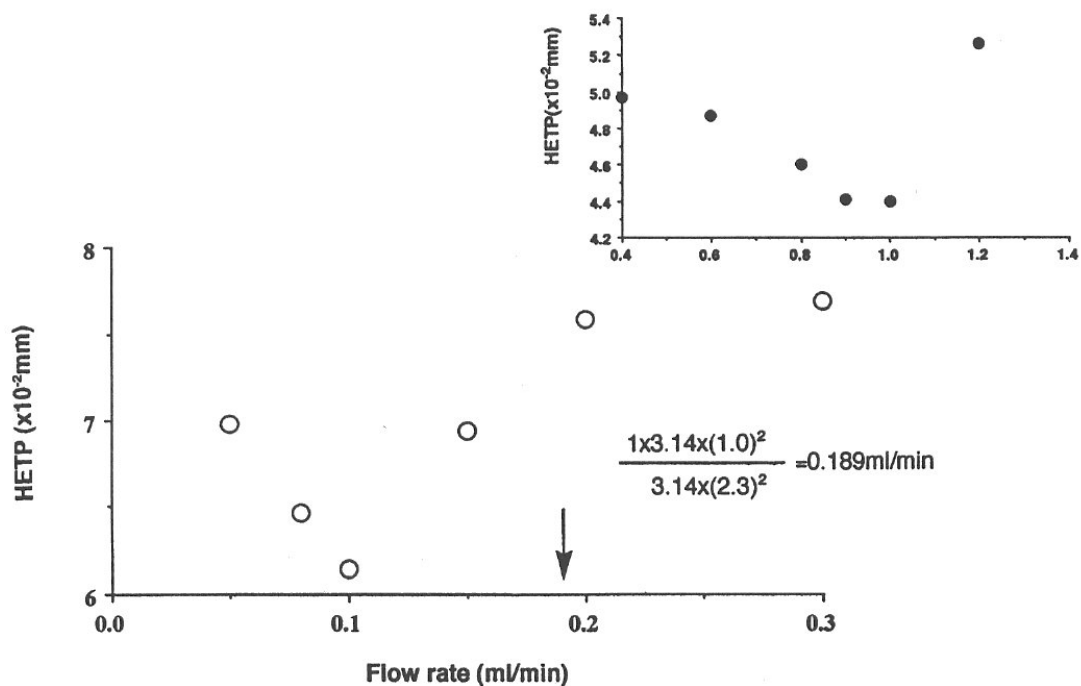
図3 カラム外容積の分析に与える影響

### 3. ナローボアカラムの流量と理論段相当高さ(HETP)との関係

内径 2.0mm のナローボアカラムにおいて、通常のアナリカラムと同じ線流速を得るためには、断面積から計算して、約 5.3 分の 1 の 0.2mL/min になります。図 4 は内径 2.0mm と内径 4.6mm カラムを用いて各流速におけるプロプラノロール ( $\beta$ -遮断薬) の HETP をプロットしたものです。図に示しますように **ULTRON ES-OVM** ナローボアカラムの最適流量値は、0.1mL/min 付近で得られています。

### 4. 試料負荷量

**ULTRON ES-OVM** ナローボアカラムにおけるプロプラノロールの負荷量が、保持比 ( $K'$ )、光学認識能 ( $\alpha$ )、分離度 ( $R_s$ ) および理論段数 ( $N$ ) に及ぼす影響について調べた結果を表 3 に示します。保持比、光学認識能、分離度、理論段数について 0.5ng から 100ng の負荷量の範囲でほぼ一定の値を示しました。**ULTRON ES-OVM** ナローボアカラムでは絶対試料量として 0.5ng から 100ng の注入であれば最適の分離が得られます。



カラム : **ULTRON ES-OVM**  
 カラムサイズ : 150mm × 2.0mm I.D.  
 移動相 : 20mM リン酸緩衝液 (pH=6.8) / CH<sub>3</sub>CN = 100/35  
 温度 : 25°C  
 検出 : UV-220nm 0.04AUFS  
 試料 : プロプラノロール

図 4 流速と HETP の関係

表 3 試料負荷量と分離度、理論段数の関係

Dependence of the capacity factor ( $k$ ), enantioselectivity ( $\alpha$ ), resolution ( $R_s$ ) and theoretical plate number ( $N$ ) of propranolol enantiomers on the amount loaded on the **ULTRON ES-OVM** narrow-bore column

Loaded amount (ng)	$k_1$	$k_2$	$\alpha$	$R_s$	$N_1$
0.5	7.84	9.86	1.25	2.17	2600
1	8.15	10.00	1.24	2.14	2120
5	7.61	9.55	1.25	2.17	2350
10	7.60	9.50	1.25	2.28	2530
20	7.53	9.41	1.25	2.39	2780
40	7.42	9.27	1.25	2.42	2920
60	7.09	8.87	1.25	2.26	2580
80	6.96	8.73	1.25	2.13	2290
100	6.89	8.65	1.26	2.12	2180
200	6.53	8.19	1.25	1.74	1440
300	6.38	8.03	1.26	1.57	1170

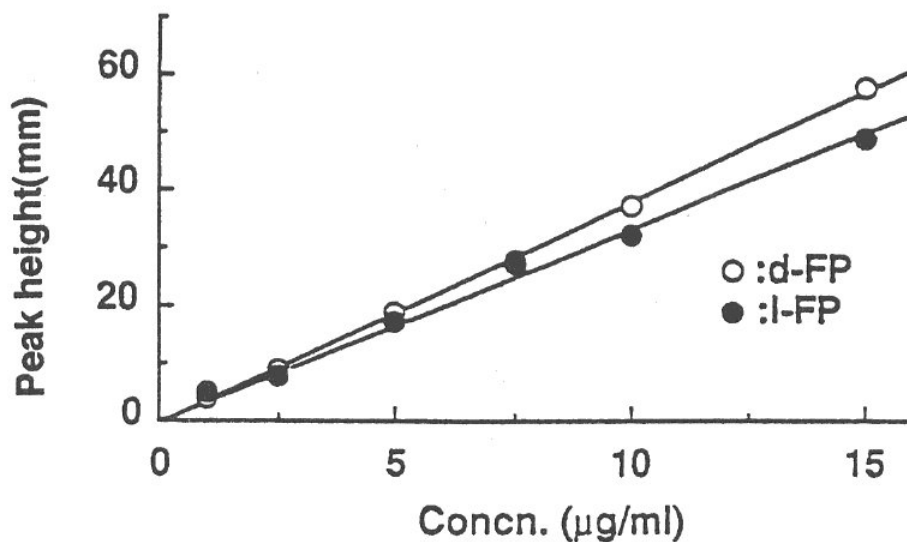
\*Eluent used was a mixture of 20mM phosphate buffer (pH6.8) and acetonitrile (100/35, V/V).

\*\*The values of  $k_1$  and  $k_2$  correspond to the capacity factors of the first and second eluted peaks, respectively, ( $R$ )-propranolol and ( $S$ )-propranolol.

カラム : **ULTRON ES-OVM**  
 カラムサイズ : 150mm × 2.0mm I.D.  
 移動相 : 20mM リン酸緩衝液 (pH=6.8) / CH<sub>3</sub>CN = 100/35  
 流速 : 0.1mL  
 温度 : 25°C  
 検出 : UV-220nm

## 5. 定量精度の検討

上述結果をもとに酸性試料であるフルルビプロフェン（抗炎症剤）の HPLC 条件を設定し、定量精度の検討を行いました。試料はラット血清にフルルビプロフェンを添加し、塩酸酸性下ベンゼンで抽出後、減圧乾固して移動相溶媒で調製しました。図 5 には横軸に各光学異性体試料の濃度、縦軸にクロマトグラフィーを行った時のピーク高さをプロットして得られた校正曲線を示します。図より 2ng から 30ng の範囲で直線性が得られることがわかります。



カラム : ULTRON ES-OVM  
カラムサイズ : 150mm×2.0mmI.D.  
移動相 : 20mM リン酸緩衝液 (pH=3.0) / CH<sub>3</sub>CN = 100/15  
温度 : 25°C  
検出 : UV-247nm, 0.05AUFS  
試料 : フルルビプロフェン

図 5 フルルビプロフェンの *d, l* 異性体の校正曲線

## 6. まとめ

- 1) カラム内径を小さくして試料の拡散を小さくする。
- 2) カラム外容積をできるだけ小さくする。
  - (1) インジェクター：通常の分析システムで使用のものの約 1/5 にする。  
(一例：レオダイン 8125etc)
  - (2) 接続チューブ：内径 0.13mm で、できる限り短くする。
  - (3) デッドボリュームの少ない接続部品を使用する。
  - (4) 検出器セルはセル容積と光路長を考慮する。
- 3) 最適流速は 0.1mL/min 付近で、試料により実測して設定する。
- 4) 試料負荷量は 100ng 以下が望ましい。

次に実際の応用例を示します。

## 7. 体内動態分析への応用 (資料ご提供:熊本大学薬学部小田切先生)

ラットにフルルビプロフェンのラセミ体を経口投与し、各所定時間における血漿試料をHPLCで分析、クロマトグラムのピーク高さより血漿中の未変化体 (*d*体、*l*体) の濃度推移を測定し、その変化を図6に、また表4には薬物速度論的パラメーターを示しています。未変化体の血中濃度は *d*体が高い値を示したことから、ラットの血中動態ではフルルビプロフェンの立体選択性があることがわかります。

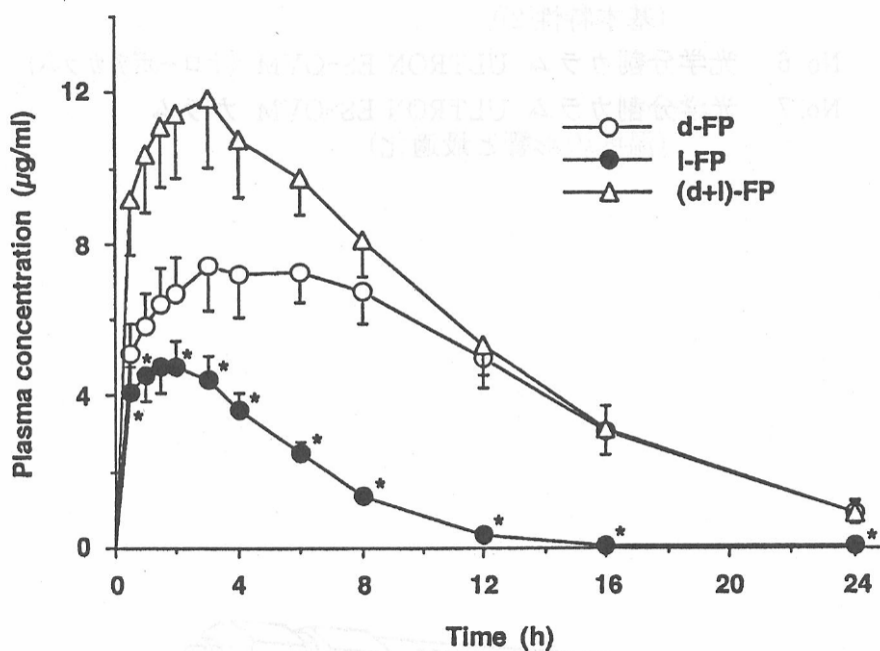


図6 Plasma Concentration of *d*- and *l*-Flurbiprofen after Oral Administration of 3mg/kg Racemic Drug to 7 Rats.

\* :  $p < 0.05$  vs. *d*-FP

表4 Pharmacokinetic Parameters of *d*- and *l*-Flurbiprofen after Oral Administration of 3mg/kg Racemic Drug to 7 Rats.

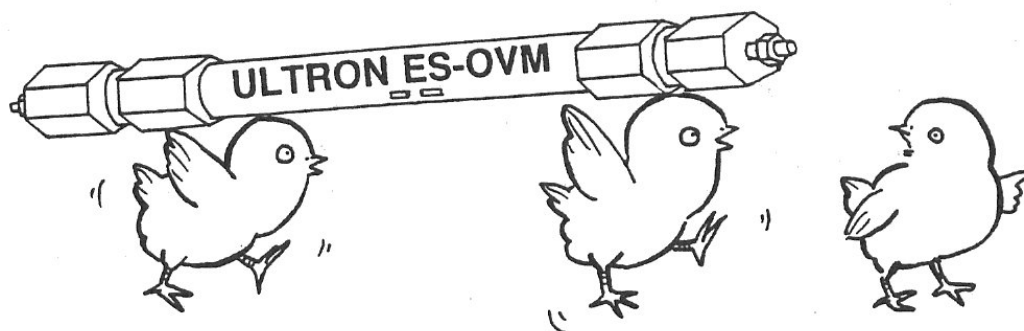
	<i>d</i> -Flurbiprofen	<i>l</i> -Flurbiprofen
AUC <sub>0</sub> <sup>24</sup> (µg/mL·h)	108.6 ± 15.0	31.0 ± 3.0 *
$k_a$ (h <sup>-1</sup> )	0.87 ± 0.29	0.95 ± 0.25
$k_e$ (h <sup>-1</sup> )	0.12 ± 0.02	0.60 ± 0.30

Values represent the mean ± S.E..

\* :  $p < 0.05$  vs. *d*- Flurbiprofen

## 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  
(ナローボアカラム)
- 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/>

LN1006B