

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	移動相成分の等温過剰吸着の精密評価と液体クロマトグラフィーの分離機構における吸着層の役割の解明
Title(English)	
著者(和文)	大橋潤二
Author(English)	Ohashi Junji
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10930号, 授与年月日:2018年9月20日, 学位の種別:課程博士, 審査員:岡田 哲男,小松 隆之,河野 正規,西野 智昭,福原 学,渋川 雅美
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10930号, Conferred date:2018/9/20, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

論文要約

移動相成分の等温過剰吸着の精密評価と液体クロマトグラフィーの分離機構における吸着層の役割の解明

大橋 潤二 (指導教官: 岡田哲男 教授)

【序論】

日米欧医薬品規制調和国際会議 (ICH) の品質に関するガイドラインである「新薬効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン(ICH Q3A)」並びに「新薬効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドライン(ICH Q3B)」において医薬品中の有機不純物の管理方法を規定している。液体クロマトグラフィーは不純物を分析する手法として広く用いられており、分析対象の構造や特性に応じて、逆相クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーなどの固定相の種類を使い分ける必要がある。すなわち、液体クロマトグラフィーの分離機構を理解した上で、これらのクロマトグラフィー手法を適切に選択し、分析法開発することが、不純物を適切に管理し、品質の高い医薬品を供給する上で重要である。なかでも、逆相液体クロマトグラフィーは広く医薬品の分析に適用されている。逆相液体クロマトグラフィーの固定相表面は疎水性であるため、有機溶媒が優先的に吸着する。この固定相表面に吸着した移動相成分は試料の保持をコントロールする要因の一つとして注目されているが、詳細は不明である。

液体クロマトグラフィーでは再現性の高い保持を得るために移動相に緩衝溶液や塩が添加される。しかし、塩を添加した溶液からの等温過剰吸着の測定は極めて困難であり、ほとんど検討されていない。本研究では、固定相に吸着した移動相成分の溶質保持への役割の解明を目的として、1) 新規の等温過剰吸着の測定法の開発、2) 逆相固定相への過剰吸着の塩添加の影響の解明、3) 陰イオン交換樹脂への水の過剰吸着に対する対イオンの影響の検証、について検討を行った。

【実験】

等温過剰吸着の測定は4液混合タイプの低圧グラジエント HPLC システムを用いた。また、有機溶媒としてはアセトニトリル (ACN) とメタノール (MeOH) を用いた。

【結果と考察】

1) Frontal analysis による精密な新規の等温過剰吸着の測定法の構築

Staircase mode で frontal analysis を行うとき、ACN では 190 nm、MeOH では 190 nm および 200 nm において階段状の破過曲線が検出されるが、共存物の影響が大きく適用性は限定される。一方、長波長 (e.g. 589 nm) では破過曲線の位置にピークが検出されることを見出した (図1)。このピークは破過曲線の溶出位置における屈折率の変化によるものである。このピークを破過曲線の溶出容量とすることにより算出した逆相固定相への有機溶媒の等温過剰吸着は既報の結果と良く一致していた。この方法は多様な固定相と移動相の組み合わせに適用可能であり、吸着有機溶媒層の保持における役割の解明に資すると考え、

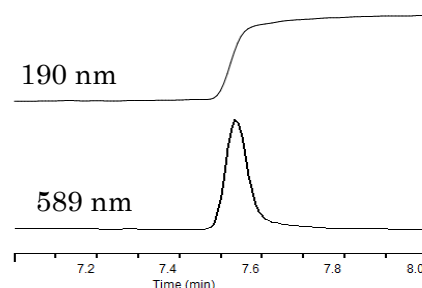


図1. Frontal analysis のクロマトグラム (ACN/水混液)

以下の系に適用した。

2) 逆相固定相への有機溶媒の吸着に対する塩添加の影響とアルキルベンゼンの保持機構

開発した *frontal analysis* を用いて、逆相固定相への有機溶媒の過剰吸着に対する塩添加の影響を評価した。塩添加による妨害ピークは認められず、本法の有用性は明らかであった。水和エネルギーの大きい H_2PO_4^- を添加すると、ACN の過剰吸着は $8.06 \pm 0.04 \mu\text{mol m}^{-2}$ から $8.58 \pm 0.10 \mu\text{mol m}^{-2}$ に増加し、水和エネルギーの小さい Br^- を添加すると $8.06 \pm 0.04 \mu\text{mol m}^{-2}$ から $7.93 \pm 0.09 \mu\text{mol m}^{-2}$ に減少した (図 2)。逆相固定相への有機溶媒の過剰吸着は $\text{NaCl} \approx \text{NaHSO}_4 \approx \text{NaH}_2\text{PO}_4 > \text{NaOAc} > \text{NaBr} \approx \text{NaClO}_4$ の順に小さくなり、*Hofmeister* 効果に類似した傾向が認められた。この効果は、水和エネルギーの大きいイオンが ACN 水混液中のミクロな不均一化を促進するために起こると考えた。また、塩の添加により有機溶媒の過剰吸着量を変化させ、静電的相互作用のないアルキルベンゼンの保持と ACN の過剰吸着の関係を検証したところ、負の相関が認められた (図 3)。たとえば、ACN の過剰吸着が $7.40 \mu\text{mol/m}^2$ から $8.79 \mu\text{mol/m}^2$ 増加するとき、プロピルベンゼンの保持係数は 16.0 から 14.7 に減少した。この結果は固定相に吸着した ACN 分子がアルキルベンゼンの保持と競争的であることを示している。

peak parking moment analysis により、逆相固定相に保持しないウラシルのカラム内の総軸方向拡散係数を測定した。その結果、ウラシルのカラム内の総軸方向拡散係数は MeOH 水混液では分子拡散係数に比例し、ACN 水混液では分子拡散係数に比例しなかった (図 4)。MeOH 水混液では、過剰吸着が小さいため、多孔性シリカのポア内の溶液組成とバルク移動相の差が小さく、バルク移動相中の値で分子拡散係数を近似できる。一方、ACN 水混液では、過剰吸着が大きいため、ポア内の溶液組成と移動相組成の差が大きく、移動相中の値でポア内の分子拡散係数を近似できない。以上、逆相固定相に吸着した有機溶媒は試料の保持に寄与しているだけでなく、試料の拡散へも影響しており、カラムの特性や性能を決定する重要な因子であることを明らかにした。

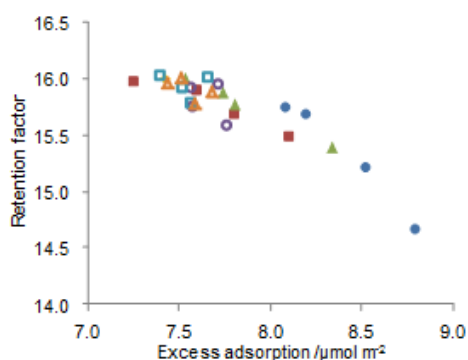


図 3. プロピルベンゼンの保持の ACN の等温過剰吸着の影響

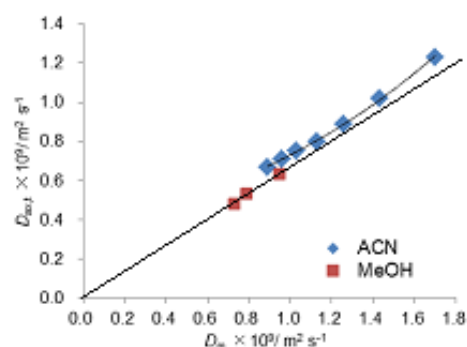


図 4. ウラシルのカラム内の総軸方向拡散係数と分子拡散係数の関係

3) 陰イオン交換固定相表面の水和層形成への対イオンの影響

陰イオン交換担体への ACN 水混液からの水の等温過剰吸着の結果を図 5 に示すが、対イオンの効果の序列は $\text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{SCN}^- > \text{ClO}_4^- > \text{PF}_6^-$ であり、*Hofmeister* 効果と一致していた。30 % (v/v) ACN 水溶液からの *Inertsil AX* への水の過剰吸着は対イ

オンが H_2PO_4^- のときに $20.2 \pm 0.5 \mu\text{mol m}^{-2}$ 、 PF_6^- のときに $4.9 \pm 0.2 \mu\text{mol m}^{-2}$ であった。この過剰吸着量の差は、水和エネルギーの大きい対イオンほど水素結合を強くすることにより、陰イオン交換担体への水の過剰吸着を増加させていることに起因していると推察した。40% (v/v) ACN 以上の濃度では水和エネルギーの小さい PF_6^- を対イオンとすることにより水の過剰吸着が負の値を示し、ACN 分子がイオン交換樹脂に吸着することを示唆する結果が得られた。対イオンを変えることにより陰イオン交換樹脂の水の過剰吸着を変化させ、中性化合物の保持との関係を検討したところ、中性化合物の保持と水の過剰吸着の間に負の相関が認められた (図 6)。この結果は、水への溶解度が低い中性化合物は水の吸着層によりイオン交換体への接触を妨害されており、水の吸着層の成長により保持が小さくなることを示している。

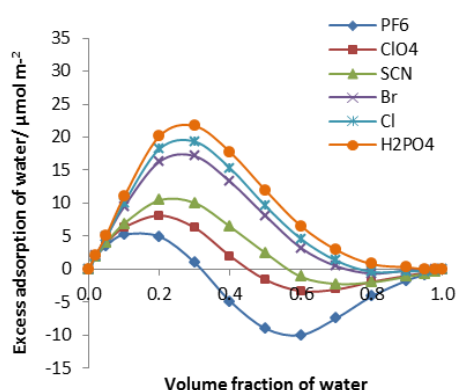


図 5. Inertsil AX の水の等温過剰吸着の塩添加の影響

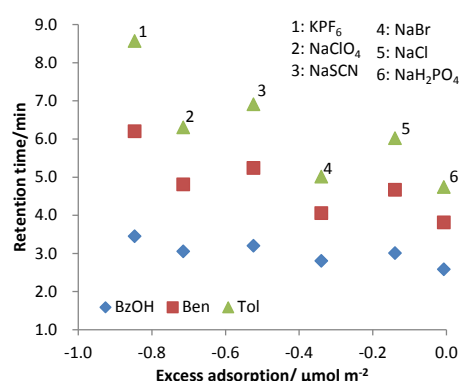


図 6. Inertsil AX の中性化合物の保持に対する水の等温過剰吸着の影響

【結論】

種々の溶液からの固定相への等温過剰吸着の測定に適用可能な staircase mode による frontal analysis の新規測定法を開発した。本分析法を逆相および陰イオン交換クロマトグラフィーへの等温過剰吸着の塩添加の影響に適用し、水和エネルギーと等温過剰吸着の相関を明らかにした。また、吸着層の試料の保持機構における役割を明らかにし、試料保持と競合的であることを示した。以上のように、これまで固定相の一部として寄与すると考えられることもあった液体クロマトグラフィー固定相表面の吸着層に関する議論を決着させる知見を得た。

【報文目録】

1. Junji Ohashi, Makoto Harada, Tetsuo Okada, A simple method for measuring excess adsorption isotherms of organic eluent components on reversed-phase packing materials, J Sep Sci 40 (2017) 842-848
2. Junji Ohashi, Makoto Harada, Tetsuo Okada, Excess adsorption of organic eluent components from mobile phases containing electrolytes, Chromatographia 81 (2018) 1127-1133.
3. Junji Ohashi, Makoto Harada, Tetsuo Okada, Effect of anions in the anion-exchange resin on the aqueous layer formation based on the evaluation of the excess adsorption of water on a stationary phase, in preparation.