薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
112 (6) 409-413 (1992)

フェニル処理高速液体クロマトグラフィー用充てん剤の調製：
カルバマゼピン，ジフェニルヒダントインの
保持挙動による評価

岡本光美*

岐阜県立多治見病院

Preparation of Phenyl Treated Packing Materials for High-
Performance Liquid Chromatography: Evaluation by
Retention Behaviour of Carbamazepine
and Diphenylhydantoin

Mitsuyoshi OKAMOTO*

Gifu Prefectural Tajimi Hospital, 5-161,
Maehata cho, Tajimi, 507, Japan

(Received January 8, 1992)

The retention behavior and selectivity of 30 kinds of phenyl-modified porous glasses and silicas, prepared from solutions of phenyldimethylchlorosilane, diphenylmethylchlorosilane or triphenylchlorosilane in xylene, were studied by high-performance liquid chromatography using carbamazepine and diphenylhydantoin as model compounds. From the elemental data for carbon, the maximum number of bonded phenyl groups per gram (mean pore diameter, 15 nm, specific surface area, 217 m²/g, pore volume, 0.85 ml/g) on the diphenyl-bonded glass surface was calculated to be 0.159×10^{21} . Using various acetonitrile-0.01 M potassium dihydrogen phosphate mixtures as eluents, carbamazepine and diphenylhydantoin were separated on all the gels studied, but the degrees of resolution of the two compounds were different. With an increase in specific surface area on the glasses or silicas, the k' values of the solute increased.

Keywords—phenyl treated glass; phenyl treated silica; monophenyl-treated column gel; diphenyl-treated column gel; triphenyl-treated column gel; high-performance liquid chromatography; carbamazepine; diphenylhydantoin

緒 言

効果的な血中薬物濃度測定を行うには，クロマトグラフ的な分離分析方法が有効な手段と考えられる．とりわけ高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は，物質をそのままの形で測定可能であるので有効な一方法である．HPLC 上で分離効果を高めるためには，一般的に溶離液組成を変化させることが行われている．しかし生体成分の分離分析測定は溶離液の調製のみでは目的成分の測定困難な場合がある．そこで著者は，HPLC 充てん剤原料の表面を化学修飾により変化させ分離効果を高める方法に着目した．すなわち先に，対象物質に効果的な保持挙動を示す HPLC 用充てん剤の基礎的研究として，固定相に付着する $100 \text{ \AA}^2$ (1 nm^2) もしくは 1 g 当りのアルキル基数，アルキルア

ミノ基数, フェニル基数に関する重要なパラメータは比表面積と同様, 細孔直径などとも関係すると報告した.¹⁾ このように, 新しい固定相設計のためには基礎的な研究が必要であると考え,²⁾ 今回ポーラスガラス (PG), ポーラスシリカ (PS) のフェニル処理³⁾を試みた. ついで, これらカラムの評価を, その構造が各々非平面, 平面であり, 血中濃度測定が重要視されている⁴⁾ジフェニルヒダントイン (フェニトイン, DPHT), カルバマゼピン (CBZ) をモデル化合物として行った.

実 験 方 法

1. 試料及び試薬 CBZ, DPHT は吉富製薬株式会社より恵与されたものを使用した. フェニルジメチルクロロシラン (P), ジフェニルメチルクロロシラン (D), トリフェニルクロロシラン (T) は Petrarch System (PA, U.S.A.) 社製を使用した. PS, PG は富士デヴィソン社より恵与され Table I に示した計 10 種を用いた. その他の試薬及び試液は市販の特級品をそのまま使用した.

2. フェニル処理 HPLC 充てん剤 乾燥 PS-1~PS-6, PG-1~PG-4 のそれぞれ 3.5 g にトリエチルアミン 1.5 ml, P の 3.4% 乾燥キシレン溶液 35 ml を添加し前報³⁾に従い P 処理 PS-1-P~PS-6-P, PG-1-P~PG-4-P シリーズをそれぞれ作製した. 同様に乾燥 PS-1~PS-6, PG-1~PG-4 のそれぞれを P シリーズと同様に処理し D 処理 PS-1-D~PS-6-D, PG-1-D~PG-4-D, T 処理 PS-1-T~PS-6-T, PG-1-T~PG-4-T を作製した. このようにして作製した P, D, T 処理 PS 及び PG の炭素含有量 (C%) 比表面積 (m^2/g) を測定し Table II 中に示した.

3. 装置及び器具 HPLC 測定は Jasco Uvidec 100 IV 型検出器を装備した Jasco Twinkle を用いて行った. 元素分析, 平均細孔直径, 比表面積の測定は各々 Yanagimoto MT-3 CHN 元素分析計, Carlo Erba MOD-220 型 Porosimeter, 柴田 SA-1000 型表面積測定装置を用いて行った.

結 果 及 び 考 察

1. PS 及び PG 1 g, 1 nm^2 当たりの付着 P, D, T 基数

1 g 又は 1 nm^2 当たりの付着 P, D, T 基の数は PS, PG 上で monofunctionally として置換しているものと仮定し, それぞれの元素分析値から前報¹⁾に従い計算して求めた (Table II). PS, PG の比表面積 (m^2/g) が増加するに従って 1 g 当たりの付着 P, D, T 基数も増加した. 一方, 1 nm^2 当たりの付着基数にそれほど大きな変化はみられなかった.

TABLE I. Characteristics of Parent Porous Silicas and Glasses

Sample	Serial number	Mean particle size (μm)	Mean pore diameter (nm)	Specific surface area (sq.m/g)	Pore volume (ml/g)
Silica	PS-1	5.8	9.5	363	0.94
	PS-2	10.0	12.5	272	0.85
	PS-3	9.0	15.0	224	0.84
	PS-4	5.8	17.3	197	0.85
	PS-5	9.0	18.7	180	0.84
	PS-6	8.0	22.0	126	0.70
Glass	PG-1	8.9	15.0	217	0.85
	PG-2	8.2	33.5	69	0.57
	PG-3	8.5	57.7	57	0.84
	PG-4	8.7	73.1	47	0.81

The names and serial numbers were assigned by the author for convenience and not commercial names.

TABLE II. Surface Treatments and Elemental Analyses and Number of Accessible Surface Groups per Gram (or per 1 nm²) for Different Silicas (or Glasses) Treated with P, D, or T

Column gel	Specific surface area (sq.m/g)	C found (%)	No. of accessible surface groups per gram ($\times 10^{21}$)	No. of accessible surface groups per 1 nm ²
PS-1-P	233	7.91	0.496	2.13
PS-2-P	211	7.29	0.457	2.17
PS-3-P	168	5.79	0.363	2.16
PS-4-P	147	5.17	0.324	2.20
PS-5-P	143	4.45	0.282	1.97
PS-6-P	116	3.92	0.246	2.11
PS-1-D	196	9.67	0.373	1.90
PS-2-D	187	9.05	0.349	1.87
PS-3-D	123	8.43	0.325	2.24
PS-4-D	107	6.32	0.244	2.28
PS-5-D	104	5.92	0.288	2.20
PS-6-D	87	4.89	0.189	2.17
PS-1-T	244	8.62	0.240	0.99
PS-2-T	236	7.73	0.215	0.91
PS-3-T	178	6.37	0.177	1.00
PS-4-T	167	5.57	0.155	0.93
PS-5-T	160	5.18	0.144	0.90
PS-6-T	124	4.61	0.128	1.04
PG-1-P	131	4.99	0.313	2.39
PG-2-P	51	1.93	0.121	2.38
PG-3-P	47	1.71	0.107	2.31
PG-4-P	38	1.27	0.080	2.10
PG-1-D	138	4.13	0.159	1.25
PG-2-D	59	2.43	0.094	1.58
PG-3-D	54	2.23	0.086	1.58
PG-4-D	41	1.47	0.057	1.39
PG-1-T	135	4.11	0.112	1.21
PG-2-T	58	1.57	0.044	0.76
PG-3-T	52	1.35	0.038	0.72
PG-4-T	42	1.10	0.031	0.74

P, phenyldimethylchlorosilane; D, diphenylmethylchlorosilane; T, triphenylchlorosilane.

2. P, D, T 処理 PS, PG における CBZ, DPHT の溶離挙動

P, D, T 処理 PS, PG と CBZ, DPHT の k' 値の関係を Fig. 1 に示した. それぞれの CBZ, DPHT の k' の値が異なるのは bulky effect に基づくと考えられた. Table II に示したように付着 P, D, T 基数が増加するに従って P, D, T 処理 PS, PG 上の CBZ, DPHT の k' 値は増加した. さらにフェニル処理 PG がフェニル処理 PS と同様に CBZ, DPHT の分離能を示したことは, PG の HPLC 充填剤としての応用が可能であることを示唆している (Fig. 1).

3. P, D, T 基の効果について

Fig. 1 に見られるように, 3 種類の付着フェニル基, 即ち P, D, T 基の保持挙動は, 固定相の特性に深く依存していることを示唆するものである. D シリーズが P, T シリーズと比較して大きな k' 値を与え, このうち PS-1-D 上 DPHT, CBZ の分離度 (R_s) は 2.68 であった. このような現象は, 先に報告した多環芳香族化合物の溶出挙動に関する研究でも観察されている.⁶⁾ D シリーズが他の P, T シリーズと比較して大きな保持を与えたことを説明するために CBZ, DPHT の立

Fig. 1. Correlations between the Capacity Factors (k') of Carbamazepine (and Diphenylhydantoin) and the Bulky Effect of Bonded Phenyl Groups (in Table II)

Column, 4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm. Mobile phase, CH_3CN -0.01 M KH_2PO_4 (pH 3.0) (25 : 75). UV, 254 nm. Flow-rate, 1.0 ml/min. Sample: 1, carbamazepine (CBZ); 2, diphenylhydantoin (DPHT).

Fig. 2. Computer Graphical Conformational Structures of Carbamazepine and Diphenylhydantoin

CBZ, carbamazepine; DPHT, diphenylhydantoin.

体構造をコンピュータグラフィック表示した.⁷⁾

Fig. 2 から明らかなように DPHT が有する 2 個のフェニル環は CBZ が有するフェニル環と比較し、より自由度を有している。CBZ が有する 2 個のフェニル環は自由度が小さく、フェニル系固定相への保持が困難と考えられる。このことは、D シリーズが 2 個のフェニル基を有するので、P シリーズの有する 1 個のフェニル基と比較して、DPHT, CBZ をより強く保持し、一方 T シリーズの有する 3 個のフェニル基は、DPHT, CBZ との bulky effect で D シリーズより弱く保持する結果となったと考えられる。それゆえに、DPHT, CBZ と各フェニル基との保持挙動は溶質とフェニル系固定相との π - π interaction 現象として説明することが可能である。この説明は、Tanaka らが報告した pyrenylethyl 基を有する固定相と多環芳香族化合物との相互作用の報告と符号するものである。⁸⁾

以上のように、P, D, T 処理 PS, 及び PG 上の、CBZ, DPHT のクロマトグラフ挙動を比較しながらフェニル処理 PG の有用性を併せて検討した。その結果、HPLC による DPHT, CBZ 分析には D 処理充てん剤が有効と考えられた。さらに DPHT, CBZ の保持挙動は P, D, T 処理 PS, PG 上それぞれ異なっていたので、これらを相互に組み合わせて使用すれば DPHT, CBZ の同定、定量に信頼性をいっそう向上させることが期待できると考えられた。一方、PG は HPLC 用充てん剤として応用可能なことが示唆された。PG 充てん剤については、その報告例が少ないので、さらに固定相の効果について基礎的な研究^{5,9)}が進み、新しい固定相設計がなされるものと期待される。

引用文献及び注

- 1) M. Okamoto, *J. Chromatogr.*, **202**, 55 (1980); M. Okamoto, H. Kishimoto, *ibid.*, **212**, 251 (1981); M. Okamoto, F. Yamada, *ibid.*, **247**, 167 (1982); *idem*, *ibid.*, **283**, 61 (1984).
- 2) M. Okamoto, K. Nobuhara, K. Jinno, *J. Chromatogr.*, **556**, 407 (1991).
- 3) K. Jinno, M. Okamoto, *Chromatographia*, **18**, 494 (1984); *idem*, *ibid.*, **18**, 677 (1984); *idem*, *ibid.*, **20**, 242 (1985); C. J. Little, A. D. Dale, M. B. Evans, *J. Chromatogr.*, **153**, 381 (1978); K. K. Unger, B. Becker, P. Roumeliotis, *ibid.*, **125**, 115 (1976).
- 4) Method for Relief of Cancer Pain, WHO, 1986.
- 5) M. Okamoto, K. Jinno, *Chromatographia*, **21**, 467 (1986).
- 6) K. Jinno, T. Nagoshi, N. Tanaka, M. Okamoto, J. C. Fetzer, W. R. Biggs, *J. Chromatogr.*, **386**, 123 (1987); *idem*, *ibid.*, **392**, 75 (1987).
- 7) A. J. Hopfinger, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 7196 (1980); S. Hirono, H. Umeyama, I. Moriguchi, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3061 (1984).
- 8) N. Tanaka, Y. Tokuda, K. Iwaguchi, M. Araki, *J. Chromatogr.*, **239**, 761 (1982).
- 9) J. Rayss, A. Dawidowicz, Z. Suprynowicz, B. Buszewski, *Chromatographia*, **17**, 437 (1983); Z. Suprynowicz, J. Rayss, A. L. Dawidowicz, R. Lodkowski, *ibid.*, **20**, 677 (1985); M. Okamoto, K. Jinno, *J. Chromatogr.*, **395**, 171 (1987); S. Mori, M. Kato, *ibid.*, **363**, 217 (1986).