

高速液体クロマトグラフィーによる 鎮痛薬と非ステロイド系抗炎症薬の 高速スクリーニングメソッド

アプリケーションノート

低分子医薬品およびジェネリック医薬品

著者

William Long
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

医療に関する最古の記録の一部は、鎮痛薬を用いた痛みの治療に関するものです。ヤナギの樹皮を用いた [1] 炎症の緩和を初めて記録したのは、ヒポクラテスです。1763 年 4 月 25 日には、Edward Stone がヤナギの樹皮を用いた薬を投与した発熱患者について、王立協会に経過を書き送っています。ヤナギの樹皮の活性成分は、1827 年に Johann Andreas Buchner により初めて単離されました。1829 年までには、フランスの化学者 Henri Leroux が抽出プロセスを改良しました。1897 年には、ドイツの化学者 Felix Hoffmann がサリチル酸をアセチルサリチル酸、すなわちアスピリンに変換したことで、新時代の薬理学が幕を開けました。そのほかの非ステロイド系抗炎症薬 (NSAID) は、1950 年以降に開発されました [2]。

NSAID は鎮痛および解熱効果のある薬物種で、投与量を多くすると抗炎症効果も得られます。鎮痛薬としての NSAID は、非麻薬性薬であるという独自の特性を持ちます。そのため、麻薬性薬に代わる常習性のない選択肢として用いられています [3]。

もっとも広く用いられている NSAID であるアスピリン、イブプロフェン、ナプロキセンは、すべてほとんどの国の薬局で販売されています [4]。アセトアミノフェンとフェナセチンは、抗炎症活性がほとんどないため、NSAID とは見なされていません。



Agilent Technologies

選択性を用いた鎮痛薬分離の向上

クロマトグラフィー分離能を向上させる最善の方法を考える際には、分離方程式が役に立ちます。この方程式は、効率、選択性、保持係数の関係を表すものです (方程式 1)。

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{1 + k'_B}{k'_B} \right)$$

方程式 1

高い分離能を得るためには、3つの項を最大にする必要があります。カラムを長くして N (理論段数) を大きくすれば、リテンションタイムとバンドの広がりが大きくなります。これは場合によっては望ましくありません。その代わりに、固定相粒子のサイズを小さくすれば、理論段数に相当する高さを減じることができます。Agilent Poroshell 120 などの表面多孔性粒子を使えば、1.8 μm 粒子の効率の 90% を、大幅に低い圧力で得られます。

選択性 (α) を操作しても、分離能を高めることができます。どのような分離でも、選択性変数の変更がもっとも大きな影響を与えます。選択性を高めるには、移動相組成を変えるか、固定相組成を変えます。

そのため、選択性は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分離を最適化するためのもっとも強力な手段となります。このパラメータを変えるには、C18、極基内包型、フェニル、パーフルオロフェニルなどの異なる結合相を用いるか、移動相を変更します。このアプリケーションノートでは、4.6 × 50 mm、2.7 μm の Agilent Poroshell 120 カラムを用いて、ステロイド分析におけるメソッド開発の選択肢を迅速に評価しました。このカラムの短さと高い効率により、分離時間が短縮され、迅速な平衡化が可能になります。その結果、選択性の検証が迅速化します。

材料とメソッド

Agilent 1260 Infinity バイナリ LC を使用しました。構成は以下のとおりです。

- G1312B バイナリポンプ SL、最大 600 bar での送液に対応
- G1316C カラムコンパートメント (TCC)
- G1376D 高性能オートサンブラ SL Plus
- G4212A ダイオードアレイ検出器、G4212-60008 10-mm 光路長、1 μL フローセル搭載

以下のカラムを使用しました。

- Agilent Poroshell 120 PFP、4.6 × 50 mm、2.7 μm (p/n 699975-408)
- Agilent Poroshell 120 EC-C18、4.6 × 50 mm、2.7 μm (p/n 699975-902)
- Agilent Poroshell 120 Bonus-RP、4.6 × 50 mm、2.7 μm (p/n 699968-901)
- Agilent Poroshell 120 Phenyl-Hexyl、4.6 × 50 mm、2.7 μm (p/n 699975-912)

メタノールまたはアセトニトリルのいずれかを用いたギ酸アンモニウム (20 mM NH₄HCO₂、pH 3.0) で構成される汎用的なグラジエント分離により、カラムを評価しました。機器のコントロールとデータ処理には、Agilent ChemStation ソフトウェアバージョン C.1.05 を使用しました。

分析した化合物は、アセトアミノフェン、フェナセチン、ピロキシカム、トルメチン、ケトプロフェン、ナプロキセン、スリンダク、ジクロフェナク、ジフルニサルです。いずれも Sigma-Aldrich から購入しました。いずれの鎮痛薬物質も、フッ素 (スリンダクおよびジフルニサル) や塩素 (ジクロフェナク) などの幅広い官能基を有しています。分析した化合物の構造と詳細を図 1 および表 1 に示しています。すべてのサンプルは、アセトニトリル中で 10 mg/mL になるように調製し、水で希釈して最終濃度を 0.1 mg/mL としました。ギ酸アンモニウムおよびギ酸も Sigma-Aldrich から購入しました。メタノールとアセトニトリルは Honeywell (Burdick and Jackson) から購入しました。この分析に用いた水は、Milli Q システム (Millipore) の 0.2 μm ろ過 18 MΩ です。

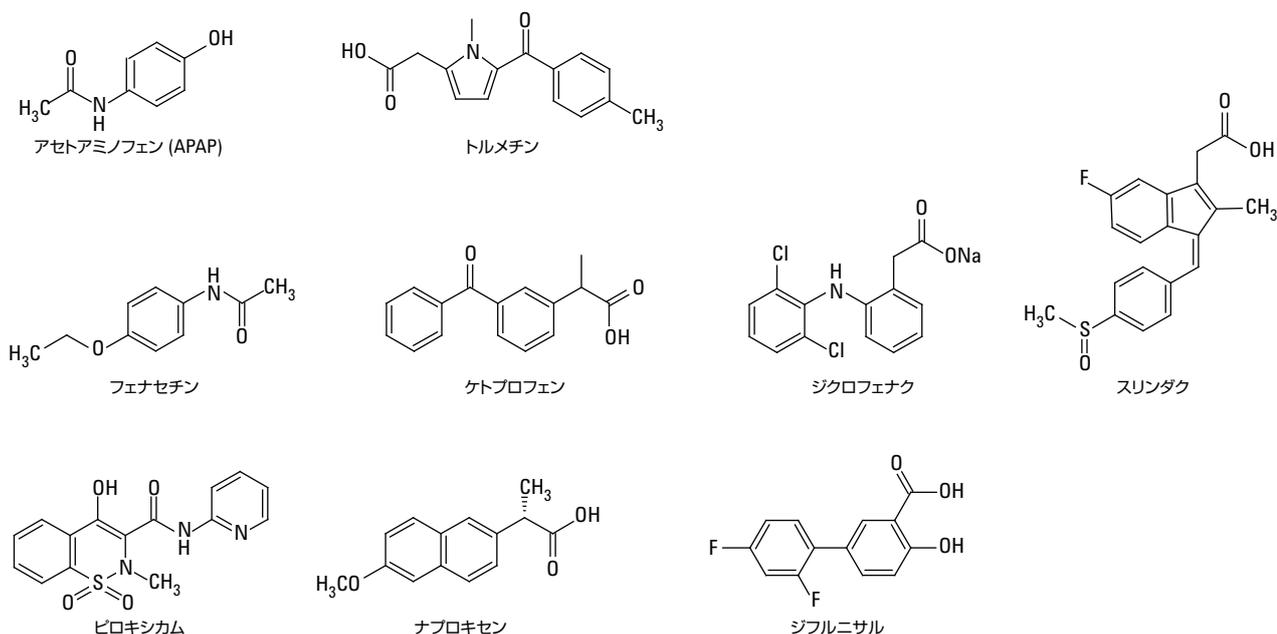


図 1. 各鎮痛薬の構造

表 1. 各鎮痛薬のリテンションタイム、Log P、pKa データ

化合物	Log P	pKa	tr PFP MeCN	tr PFP MeOH	tr C18 MeCN	tr C18 MeOH	tr BrP MeCN	tr BrP MeOH	tr PH MeCN	tr PH MeOH
アセトアミノフェン	0.46	9.38	0.863	1.252	0.803	1.123	0.99	1.235	0.781	1.039
フェナセチン	1.58	2.2	1.966	2.912	2.147	2.943	2.176	2.774	2.059	2.959
ピロキシカム	3.06	6.3	2.536	3.876	2.849	3.688	2.744	3.415	2.732	4.027
トルメチン	2.79	3.5	2.868	4.137	2.928	4.265	3.173	4.073	2.893	4.395
ケトプロフェン	3.12	4.45	3.008	4.258	3.109	4.308	3.342	4.146	3.137	4.468
ナプロキセン	3.18	4.15	3.112	4.505	3.249	4.436	3.342	4.218	3.167	4.468
スリンダク	3.42	4.7	2.934	4.656	3.249	4.308	3.173	4.288	2.995	4.594
ジクロフェナク	4.51	4.15	3.53	4.795	3.9	5.046	4.043	4.87	3.711	5.106
ジフルニサル	4.41	2.69	3.659	5.094	3.249	4.567	3.867	4.919	3.091	4.559

選択性を高めるカラムの選択

分離の選択性を高められるカラムを選択しました。選択したカラムは、Poroshell 120 EC-C18 カラムです。これは高度にエンドキャップされた C18 カラムで、メソッド開発の最初の選択肢として推奨されています。

Poroshell 120 Bonus-RP カラムは C18 カラムと同じ多くの分離に使用でき、水性度の高い移動相における湿潤性の低さといった C18 カラムの欠点のいくつかを回避することができます。また、疎水性相互作用やアミノ基との H 結合の影響を受ける分子の保持力が高くなります。アルキルのみの相と比べて、Bonus-RP では、極性基 (H 結合受容体) とフェノールや酸などの H 結合供与体の強力な H 結合により、フェノール、有機酸などの極性物質

の保持力と選択性が高くなります。Bonus-RP の保持力は C18 に比べてわずかに小さいだけなので、移動相条件を変更せずに、容易にカラムを比較することができます。Bonus-RP 相では、極性化合物の選択性が C18 相と異なります。また、100 % の水に対応できます。

Poroshell 120 Phenyl-Hexyl カラムでは、芳香族基を持つ化合物について独自の選択性が得られるため、そうしたサンプルの分離能が向上します。また、一般的なアルキル相 (C18 および C8) では適切に分離できない中程度の極性を持つ化合物についても、最適な分離が得られます。アセトニトリルは、芳香族化合物や極性化合物と Phenyl-Hexyl 固定相の π - π 相互作用を低下させる傾向がありますが、メタノールにはそれと同じ相互作用を高める働

きがあり、保持力と選択性の変化の両方が増大します。フェニル結合相で必ずしもアセトニトリルを使ってはいけないうか、許容範囲内の分離が得られないというわけではありませんが、メタノールを使用するほうが、フェニル相に求められる選択性の違いを得られる可能性が高くなります。

Poroshell 120 PFP カラムは、ペンタフルオロフェニルリガンドを有しています。そのため、従来の逆相カラムに対してオーソゴナルな分離メカニズムが得られます。多くの極性保持メカニズムを特異的にターゲットとする PFP 相では、構造、置換基、極性部への立体アクセスの小さな違いをもとに化合物を分離することができます。それにより得られる位置異性体、ハロゲン化合物、極性化合物の選択性は、複雑な混合物や低分子医薬品の分析にきわめて役立ちます。

結果と考察

図 2 に示すように、すべてのカラムを用いて、9 種類すべての化合物の分離を試みました。Poroshell 120 PFP カラムと Poroshell 120 Bonus-RP カラムでは、すべての化合物が同じ順序で完全に分離されました。分離時間は 5 分で、有機修飾剤にはメタノールを使用しました。PFP カラムでは、Poroshell 120 Bonus-RP カラムに比べて、すべてのピークの配置が均一に近くなりました。Poroshell 120 Phenyl-Hexyl カラムでは、Poroshell 120 PFP カラムとは溶出順序が変化しました。これは、PFP カラムがより強いフェニルカラムだというだけでなく、 π - π および疎水性相互作用以外の相互作用が働いたためです。4 つのカラムのすべてで、アセトアミノフェン (APAP) とフェナセチンが最初に溶出しました。Poroshell 120 EC-C18 カラムでは、3 つの化合物 (トルメチン、ケトプロフェン、スリンダク) を完全に分離できませんでした。

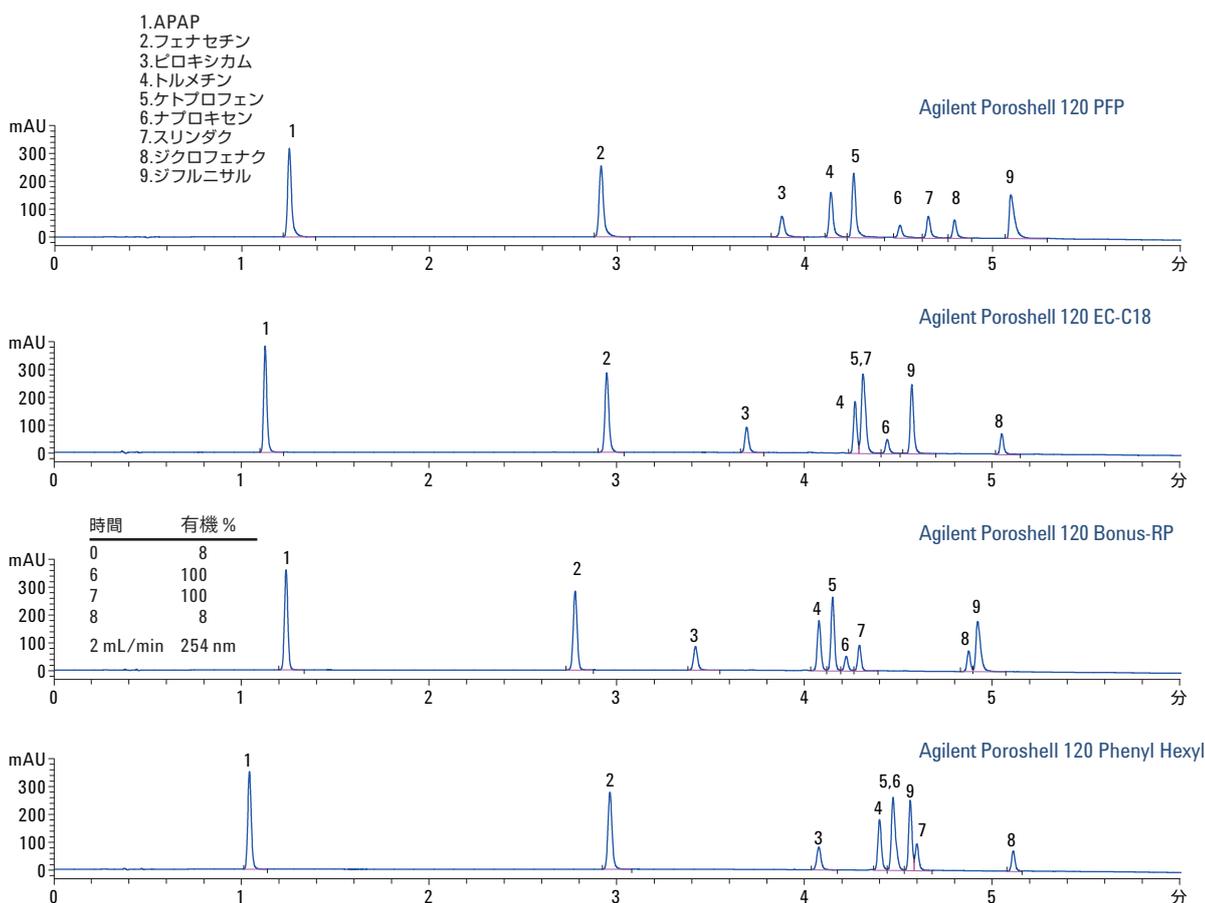


図 2. Agilent Poroshell 120 カラムとメタノールを用いた鎮痛薬の分離。A) 20 mM NH_4HCO_2 、pH 3.0、B) メタノール、40 °C、Agilent 1260 Infinity バイナリ LC とパルスダンパー、標準ミキシングカラム

図 3 に、アセトニトリルを用いた 4 つのカラムの分離結果を示しています。このケースでは、すべての化合物を分離できたのは Poroshell 120 PFP だけでした。Poroshell 120 EC-C18 カラムと Poroshell Phenyl-Hexyl カラムでは、すべての化合物が同じ順序で溶出しました。一般的に、アセトニトリル中では、Phenyl-Hexyl カラムの π - π 相互作用が抑制されます。このケースでも、PFP カラムと Bonus-RP カラムでは、溶出順序がほとんど同じになりました (最後の 2 ピークを除く)。

Poroshell 120 PFP 相で 9 種類すべての化合物をほとんど分離できたことから、メタノールとアセトニトリルのいずれを使用する場合でも、このカラムがさらなるメソッド開発に最適な選択肢といえます。

表 1 には、メタノールおよびアセトニトリルを用いた 4 つのカラムにおける 9 種類すべての化合物のリテンションタイムを示しています。Log P および pKa のデータも示しています。Log P は、境界で分離される 2 つの溶媒相における単一物質の平衡分布を示す値です。

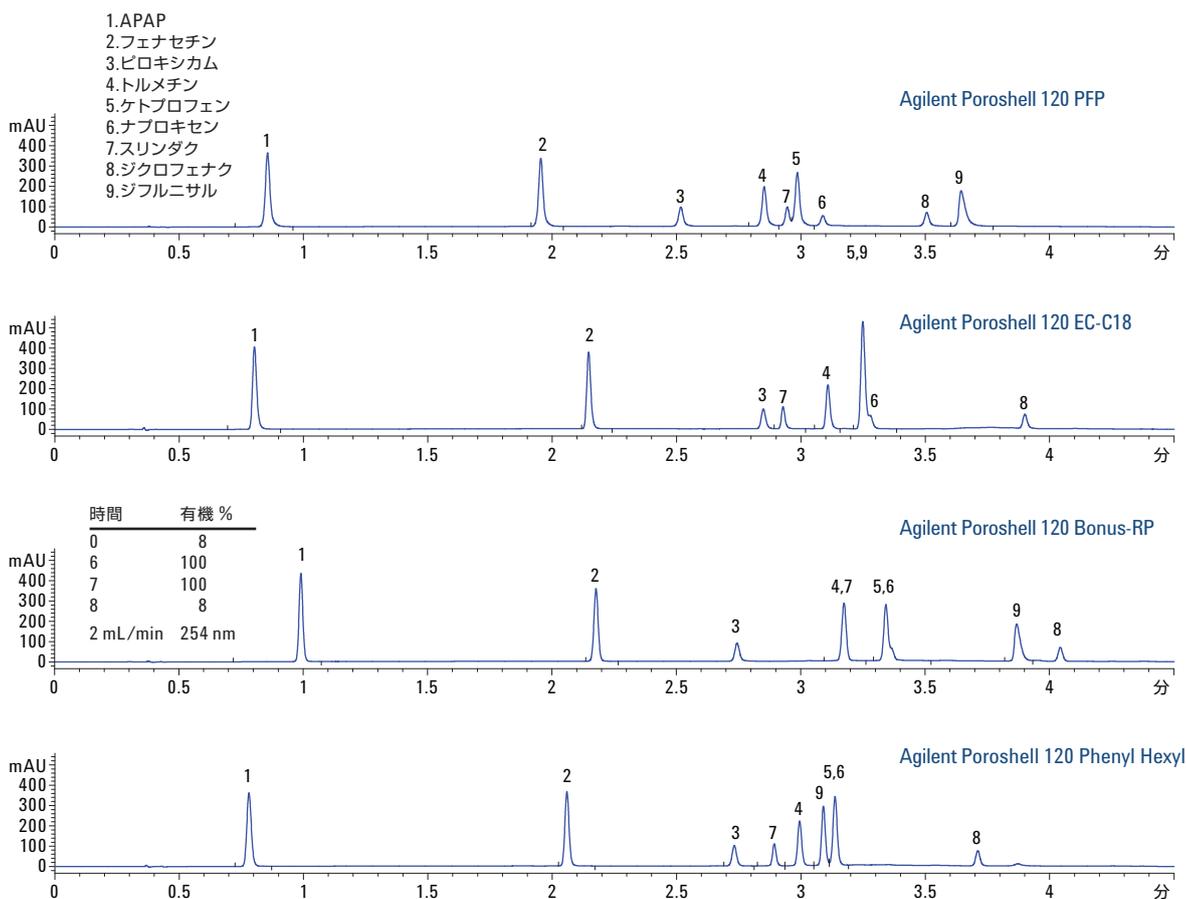


図 3. Agilent Poroshell 120 カラムとアセトニトリルを用いた鎮痛薬の分離

多くの単純な有機溶質の麻酔作用は、油水分配係数と密接な関係があることがわかっています。「油水」の油については、のちにオクタノールに置き換えられました [5]。図 4 に示すように、Log P 値は、メタノールまたはアセトニトリルを用いた場合の Poroshell 120 EC-C18 カラムのリテンションタイムと関連しています。図 5 では、最後に溶出する 7 つの鎮痛薬について、メタノールおよびアセトニトリルにおける Poroshell EC-C18 および PFP のリテンションタイムデータの相関性を示しています。最初に溶出するアセトアミノフェンとフェナセチンについては、すべての溶媒とカラムの組み合わせで同じ溶出順序が保たれました。この 2 つの化合物を除くと、メタノール (図 5a) およびアセトニトリル (図 5b) における EC-C18 と PFP のリテンションタイムの相関性はきわめて小さくなりました。このことは、両カラムがきわめてオーソゴナルであることを示しています。

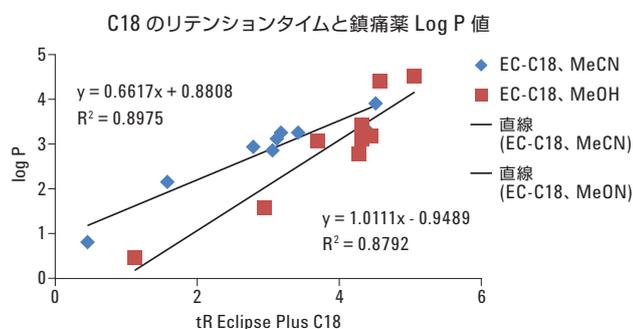


図 4. Agilent Poroshell 120 EC-C18 のリテンションタイムと Log P 値の相関性

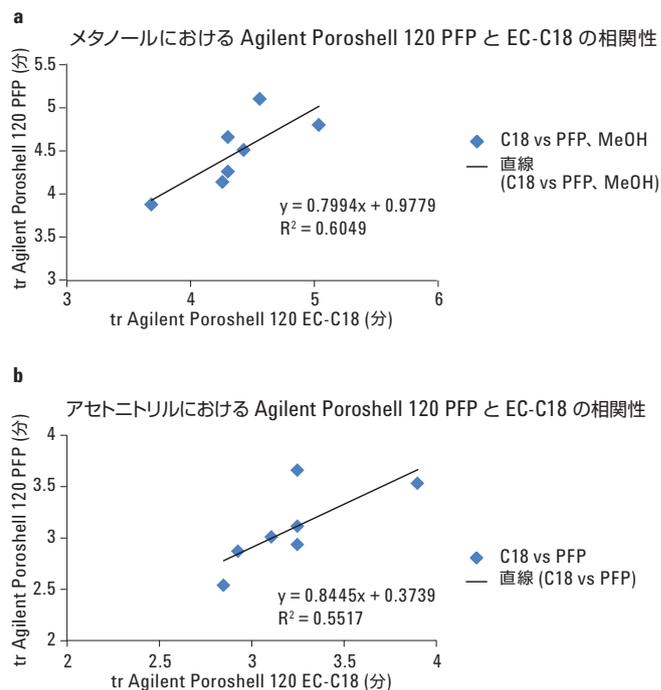


図 5. メタノール (5a) およびアセトニトリル (5b) における Agilent Poroshell 120 EC-C18 と Agilent Poroshell 120 PFP のリテンションタイムの相関性

結論

メソッド開発スキームの一環として、汎用的なグラジエントを用いてメソッドを検証すれば、分析上の問題を迅速に解決することができます。このアプリケーションノートでは、鎮痛薬を例に、各カラム相とアセトニトリルやメタノールといった有機修飾剤の組み合わせにより異なる選択性を開発し、分離を最適化できることを説明しました。このケースでは、Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムの例が示しているように、広く用いられている C18 相では適切な分離は得られませんでした。Agilent Poroshell 120 PFP カラムなどの選択性が異なるカラムを使うことで、分離結果が向上しました。フッ素化相は、ハロゲンや共役化合物との相互作用が向上するため、有効な選択肢となります。

参考文献

1. N.G.Bisset.*Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*, p. 534.Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, Germany (2004).
2. G. Guerriero.*Ann.NY Acad.Sci.***1163**, 154 (2009).
3. P. Mackowiak.*Clin.Ther.Dis.***31**, 154 (2000).
4. A. Streitwieser, K. Heathcock.*Introduction to Organic Chemistry*.MacMillan, NY, USA (1981).
5. http://en.wikipedia.org/wiki/Non-steroidal_anti-inflammatory_drug.
6. J. Sangster.*Logkow: a database of evaluated octanol/water partition coefficients (Log P)*.Sangster Research Laboratories, Montréal, Canada.
<http://logkow.cisti.nrc.ca/logkow/index.jsp>.

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2014

Printed in Japan

April 4, 2014

5991-4291JAJP



Agilent Technologies