

バルビツール酸塩の ハイスループット HPLC分析 アプリケーション

製薬

著者

John W. Henderson, Jr., Cliff Woodward, Ronald E. Majors
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

要旨

本研究では、ラピッドレゾリューション (RR) およびラピッドレゾリューションハイスループット (RRHT) 技術により、フェノバルビタールについて確立された米国薬局方の HPLC メソッドを、ハイスループットなメソッドに迅速に改良しました。新しい RRHT カラムのテクノロジーは、HPLC 分析にかかる時間を劇的に減らすことにより、ラボの生産性を高める強力なツールです。元の分析用サイズのカラムを RR または RRHT カラムと交換することによって、従来のメソッドをハイスループットなメソッドに容易に変換できます。このように容易に変換できる理由は、5 μm の大きな粒子と比較して、1.8 μm と 3.5 μm の小さな粒子がほぼ同じ選択性を持っていることと、2 ミクロン未満の粒子の充てん剤で起こりうる極端に高いシステム圧を削減するように加工された粒子サイズによるものです。

はじめに

一般的に鎮静剤として分類されるバルビツール酸塩は、軽度 (アルコール中毒と同程度) から昏睡にいたるまで、程度の異なる鎮静状態を中枢神経系にもたらしめます。これは今日、主に鎮痙薬、麻酔薬、鎮静薬として処方されています。過去には何百種ものバルビツール酸塩が合成されましたが、現在使用されているのは、10 種程度だけです。処方するバルビツール酸塩を決める 1 つの要素として、作用時間が挙げられます。

バルビツール酸塩は、超短時間作用型、短時間作用型、中間作用型、および長時間作用型に分類されます。超短時間作用型のバルビツール酸塩は、1 分以下 (静脈内に注入) で効果が現れ、その作用は 15 分から 3 時間持続します。したがって、超短時間作用型は麻酔薬として用いられます。短時間作用型のバルビツール酸塩は、10~15 分の間に作用が現れ、2~4 時間その効果が持続します。中間型の作用までの時間は 15~30 分で、その効果は 4~6 時間持続します。短時間作用型と中間作用型のバルビツール酸塩は、乱用されることの多い薬物です。安全な代替薬物が登場するまで、睡眠薬として過去に幅広く処方されてきましたが、習慣性の高い薬物でもあります。長時間作用型のバルビツール酸塩は、効果が現れるのにかかる時間は 30~60 分で、その効果は 6~8 時間持続します [1]。長時間作用型は、発作性疾患の処置に用いられます。

効果持続時間は、化学構造によって決まり、主に、薬剤に脂溶性を与える 5 番目の炭素に結合しているアルキル基 (図 1 参照) に依存します。5 番目の炭素に結合している炭素の合計数が増えると、効果持続時間は減ります。さらに具体的には、長時間の効果は短いアルキル基やフェニル基によって実現されます。短時間の効果は、アルキル基に多数の炭素と枝分かれ鎖があるときに発生します。

血液や他の体液または体毛の迅速な分析は、中毒または意識消失の原因を特定に役立つ場合があります。これは、緊急事態には非常に有用です。図 1 は、本研究で使用されたバルビツール酸塩の化学構造の一覧です。



Agilent Technologies

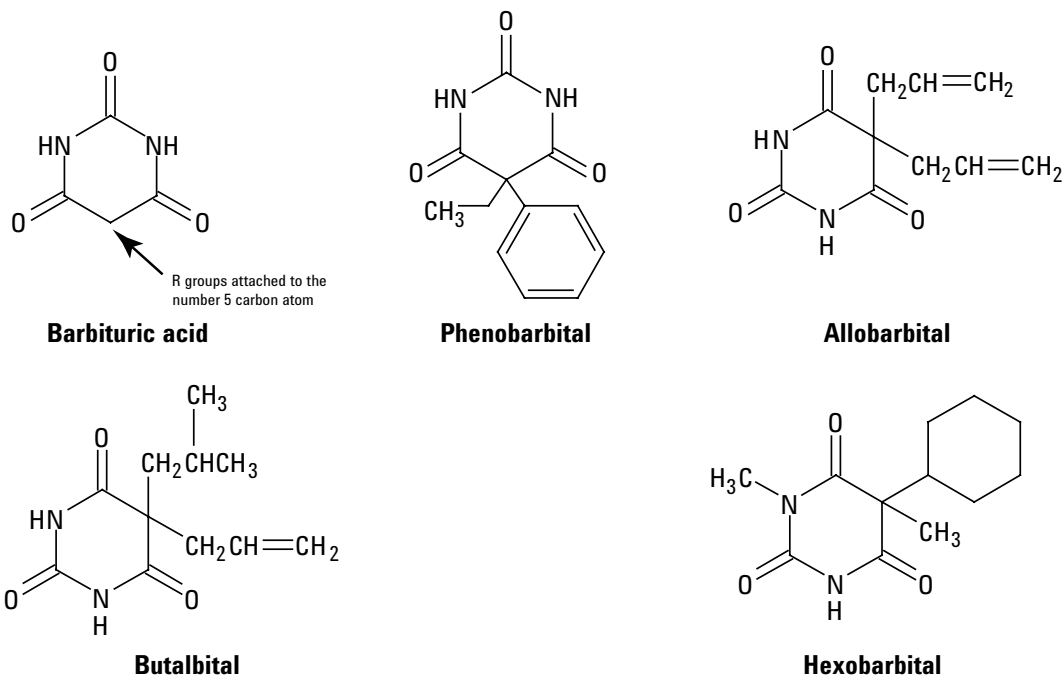


図 1 分析に使用したバルビツール酸塩とバルビツール酸の構造。

実績のある HPLC メソッドを基にして分析を開始

今回の調査の目的は、従来の低速 HPLC メソッドを基に、バルビツール酸塩の分析用に、ハイスループットな HPLC メソッドを開発することでした。ラピッドレゾリューション (RR) およびラピッドレゾリューションハイスループット (RRHT) の HPLC カラムのテクノロジーにより、既存のメソッドをハイスループットなメソッドに容易に直接的な方法で変換し、生産性を高めることができます。

医薬品として確立された薬剤の場合、HPLC メソッドは、米国薬局方 (USP) 第 27 版をまず参照します。薬局方の USP メソッドは、参考文献 3 に記載されています。長時間作用型のバルビツール酸塩、フェノバルビタールだけでなく、超短時間作用型 (ヘキソバルビタール)、短時間作用型 (アロバルビタール)、および中間作用型 (ブタルビタール) を標準として追加し、RR カラムと RRHT カラムの性能を実証しています。

バルビツール酸塩の逆相 HPLC メソッドの拡張性

拡張性とは、異なる内径や長さ、粒子サイズのカラムを使用しても、そのメソッドの分離特性を維持できる HPLC メソッドの性能を意味します。以前の研究で、小さな粒子が充填された短い ZORBAX カラムを使用して、大きい粒子が充填された長いカラムの数分の 1 の長さの時間で、ほぼ同じクロマトグラフが得られることが実証しました [4]。カラム長に比例して粒子サイズを小さくするため、カラムの効率と分解能が維持されます。バルビツール酸塩で、カラム長と粒子サイズが異なる 3 つのカラムの拡張性を例示するために、図 2 に 3 つのクロマトグラフの比較を示しています。1 番上のクロマトグラフはオ

リジナルの USP メソッドで分析したもので、内部標準 (カフェイン) だけでなく、3 つの追加のバルビツール酸塩が分離されています。USP メソッドでは、分離度 1.2 以上の分解能を持つ L1 タイプの固定相 (C18 が結合したシリカゲル) を持つ 4.6 mm×250 mm のカラムを指定しています [3]。この寸法で 5 μm の粒子を持つ ZORBAX Eclipse XDB-C18 カラムでは、分析時間は約 32 分かかりました。このカラムをカラム長の短いカラム、3.5 μm の粒子が充填された 4.6 mm×100 mm のカラムと単純に交換すると、分析時間が約 2.5 分の 1 (つまり 13 分) に減り、1.8 μm の粒子が充填された 4.6 mm×50 mm のカラムを使用すると、分析時間が約 5 分の 1 に減りました。

後の分析に用いたカラムは、わずかな分解能の低下だけで迅速な分離を実現し、それぞれ RR カラムと RRHT カラムと呼ばれています。これらのデータから、大きな粒子が充填されたカラムで行われた従来の方法を、分離を犠牲にすることなく、RR カラムと RRHT カラムに容易に変換できることが分かります。図 2 に示されているように、3.5 と 1.8 μm の両カラムの分解能は、USP メソッドの最小限の仕様を満たしています。

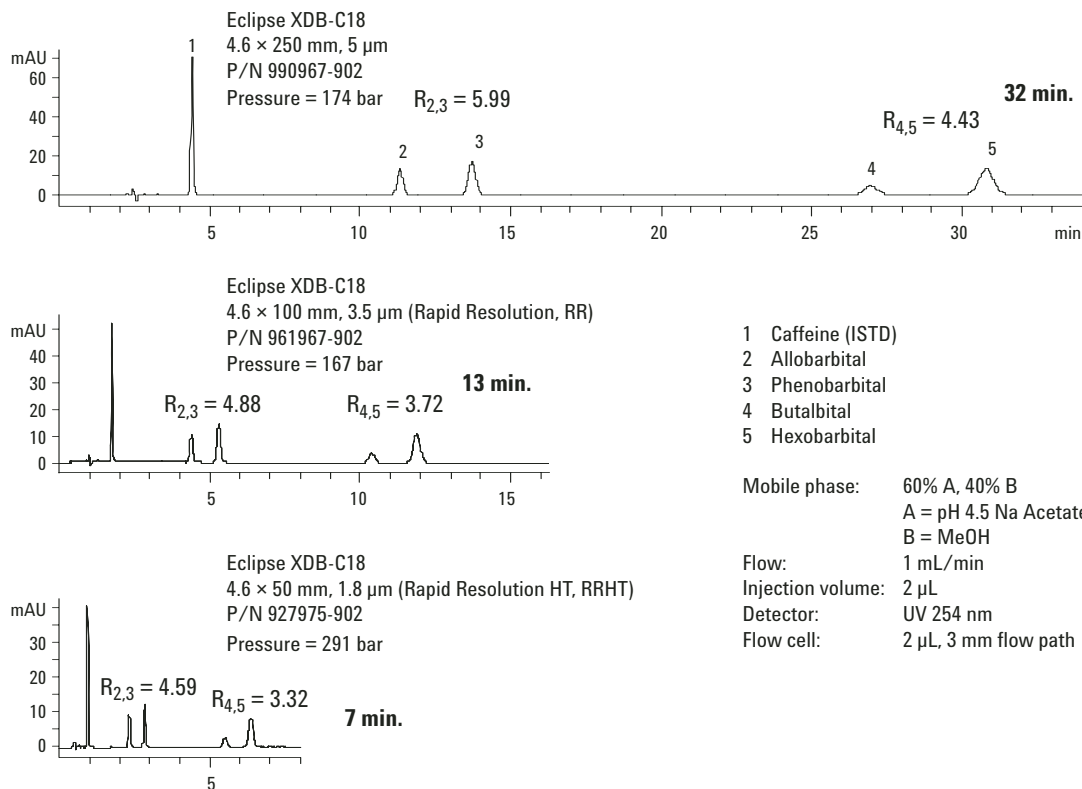
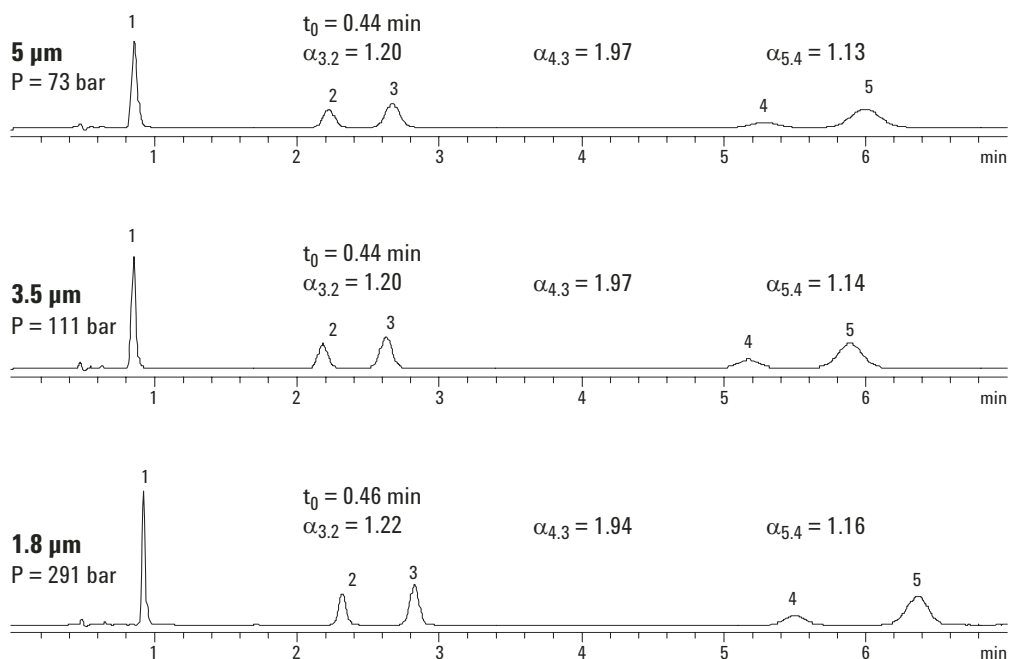


図2 RR および RRHT カラムの構成により、速度が高くなり、十分な分解能が維持されます。

粒子サイズの間数としての液相の感度

カラム寸法と粒子サイズの変更による生産性の向上は、球状シリカ粒子と結合相の再現性によって、実現されます。ZORBAX ベースのシリカ、オルガノシリカの結合プロセス、およびカラムの標準化されたテストの非常に均一な製造工程により、最終的に分解能に影響を与える選択性の変更されることがなく、ユーザーが自由にカラムを交換できるようになります。この均一性の測定は、異なる粒子サイズ間で選択性の要因を比較する 1 つの方法です。選択性 (α) は次の保持係数の比です。 $\alpha_{2,1} = k_2/k_1$ 。ここで、 k_1 は成分 1 の調整された保持係数で、 k_2 は成分 2 の調整された保持係数です。

図3では、同じ異なるサイズの粒子で充填された 4.6 mm × 50 mm の Eclipse XDB-C18 カラムによる、ハイスループットなバルビツール塩の分離を比較したものです。選択性 (α) が、粒子サイズとは無関係に、3 つのすべてのカラムで同じであることに注目してください。選択性が同じであることは、3 つの異なるサイズの粒子が科学的によく似ていることを示しています。異なるサイズの粒子は、同じクロマトグラフ特性を示すため、予測可能で拡張可能な結果を持つ異なる寸法のカラムに充てられます。また、図3は、粒子サイズが小さくなるにつれて、効率が高まることを示しています。粒子サイズが 5、3.5、1.8 μm と小さくなるにつれて、感度が向上し (ピークが高くなり)、ピーク幅が狭くなることに注目してください。



Columns: Eclipse XDB-C18, 4.6 x 50 mm
Mobile phase: 60% A, 40% B
A = pH 4.5 Na Acetate
B = MeOH
Flow rate: 1 mL/min
Injection volume: 2 µL
Detector: UV 254 nm
Flow cell: 2 µL, 3 mm flow path

Peak Widths (min)

	5 µm	3.5 µm	1.8 µm
1 Caffeine (ISTD)	0.043	0.033	0.028
2 Allobarbitol	0.097	0.073	0.058
3 Phenobarbital	0.116	0.089	0.072
4 Butalbital	0.213	0.165	0.138
5 Hexobarbital	0.237	0.187	0.167

図 3 粒子サイズは選択性とピーク幅に影響を与えます。

RRHT テクノロジを使用した分解能の最適化

van Deemter のプロットは、カラム効率の変化を描写するために使用されます。これは通常、線速度の関数 (流量に比例) として、 H (つまり、理論段高さ、HETP) で表されます。典型的な van Deemter プロットは、図 4a に示されています。

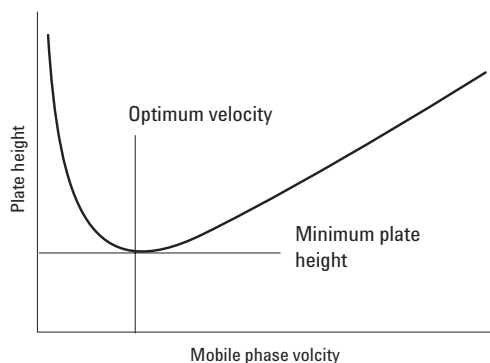
プロットの形状は、式 1 によって記述することができます。

$$H = A + B/u + Cu \quad (\text{式 1})$$

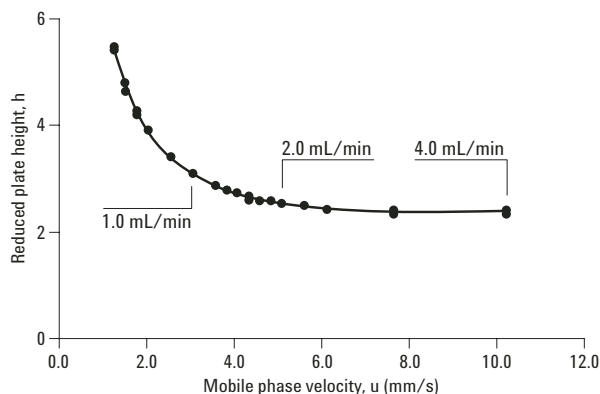
クロマトグラフィでは、大きい値の理論段数 (N) を意味する小さい値の H が得られるよう努力が行われています。渦拡散を表す van Deemter 式の「A」の項は、粒子サイズに依存するため、小さい粒子の場合にもっとも小さくなります。「B」の項は、流量に依存しており、縦方向 (軸方向) の拡散によって決まります。低流速では、軸方向の拡散から H の値への寄与が非常に大きく、分析

時間が非常に長い場合があります。「C」の項は、移動相から固定相、および固定相から移動相への溶質の物質移動に関連しています。流量と粒子サイズの両方には関係しています。大きな粒子、つまり 5 または 10 µm で充てんされた典型的なカラムの場合、そのカラムは図 4a の van Deemter プロットのような特性を示します。しかし、1.8 µm の充填剤のように小さな粒子の場合、高線流速での van Deemter プロットは図 4b に示されているようにずっと平らになります。この平らさは、高流量であっても、小さな粒子の物質移動が優れている (早い) ためです。つまり、小さな粒子のカラムは、分離速度が劇的に高まって、効率を維持して高線流速で分析できます。

a) A hypothetical Van Deemter Plot



b) A typical 1.8 μm Van Deemter Plot



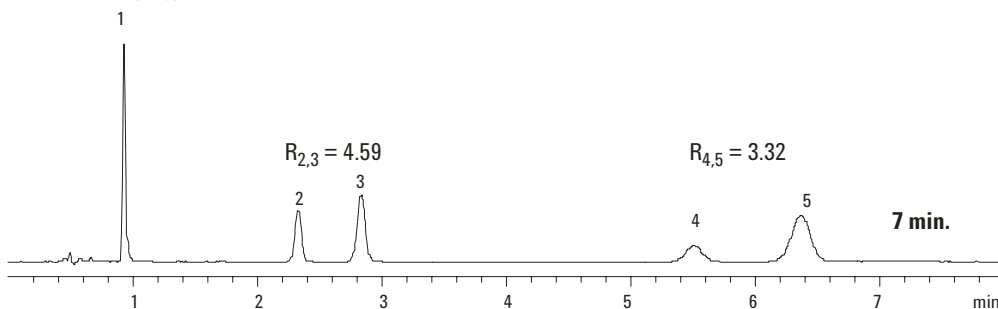
Columns: ZORBAX SB-C18, 4.6 $\times$ 50 mm, 1.8 μm
 Eluent: 60% ACN:Water (60% ACN)
 Flow rate: 0.5-4.0 mL/min at 25 $^{\circ}\text{C}$
 Detector: UV 254 nm
 Sample: 0.2 μL Octanophenone (5 mg/mL eluent)

図 4 Van Deemter プロット-プレートの高さで移動相の速度。

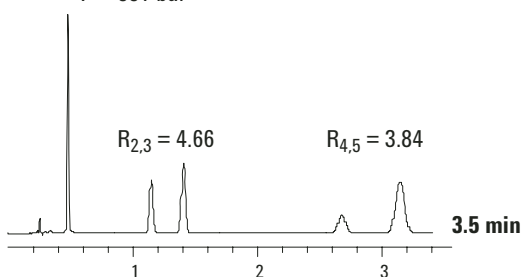
図 4b の van Deemter プロットの形状を基にして、最善の全体的な効率を得るために、1.8 μm のカラムは高流量で分析する必要があります (2 mL/分を上回る)。流量が 1 mL/分から 2 mL/分に増加した結果、線速度が最適なものに近づき、カラム効率が向上したため、迅速な分離とよりよい分解能が得られている図 5 の比較のクロマトグラムに注目してください。もちろん、カラム圧力が粒子内径の 2 乗の逆数に比例するため、高線速度では、とりわけ室温におけるカラム長の長いカラムでは、圧力降下は増大します。カラムの背圧は 1 mL/分では 291bar、2 mL/分では 550bar でした。つまり、Agilent 1200

Rapid Resolution システムで得られるような HPLC 装置の高圧特性が役に立ちます。さらに、Agilent 独自設計の粒子サイズの分布によって、RRHT カラムは 1.8 μm 粒子の充てんカラムに想定されるよりもシステム圧が低くなります。

Flow: 1 mL/min
 P = 291 bar



Flow: 2 mL/min
 P = 551 bar



1 Caffeine (ISTD) Columns: Eclipse XDB-C18, 4.6 $\times$ 50 mm, 1.8 μm
 2 Allobarbitol Mobile phase: 60% A, 40% B
 3 Phenobarbitol A = pH 4.5 Na Acetate
 4 Butalbital B = MeOH
 5 Hexobarbitol Injection volume: 2 μL
 Detector: UV 254 nm
 Flow cell: 2 μL , 3 mm flow path

図 5 流量の増加によって、高い分解能が得られます。

結論

本研究では、RR および RRHT 技術により、米国薬局方のフェノバルビタールに対して確立された HPLC メソッドが、ハイスループットなメソッドに迅速に改良されました。新しい RRHT カラムのテクノロジーは、HPLC 分析にかかる時間を劇的に減らすことによりラボの生産性を高める強力なツールです。元の分析用サイズのカラムを RR または RRHT カラムと交換することによって、実績のある堅牢なメソッドからハイスループットなメソッドに容易に変換できます。このように容易に変換できる理由は、5 μm の大きな粒子と比較して、1.8 μm と 3.5 μm の小さな粒子がほぼ同じ選択性を持っていることと、2 ミクロン未満の粒子の充てん剤で起こりうる極端に高いシステム圧を低減できる、独自の粒度分布管理技術によるものです。より高い流量、高温、異なる結合相の使用も、検討する価値のあるメソッド開発といえます。新しい Agilent 1200 シリーズの HPLC システムは、高流量と高温の利点を生かすため、ZORBAX RRHT カラムで最高の性能が発揮できるように設計されています。

参考文献

1. <http://www.dea.gov/concern/barbiturates.html>
2. <http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/6673barbit.html>
3. USP27-NF22 1461 ページ、米国薬局方/国民医薬品集、29(6)、2004 年。
4. J. W. Henderson, Jr, "Plug & Play" Fast and Ultra-Fast Separations Using 3.5- μm Rapid Resolution and 1.8- μm Rapid Resolution High Throughput Columns, Agilent Technologies、刊行物 5989-2908EN、www.agilent.com/chem

詳細情報

製品とサービスに関する詳細情報については、弊社のホームページ、www.agilent.com/chem/jpをご覧ください。

Agilent は、本資料に誤りが発見された場合、また、本資料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。
また、本資料掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

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。
著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本資料を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2006

Printed in Japan
June 15, 2006
5989-5092JAJP



Agilent Technologies