

## 非ステロイド抗炎症薬及び類縁物質の Green HPLC 分離に関する研究

日大生産工 (院) ○小澤 優里

日大生産工 朝本 紘充, 齊藤 和憲, 山根 庸平, 中釜 達朗

## 1 背景

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、移動相-固定相間の相互作用によって混合物の分離分析を行う方法である。その中でも近年、環境に優しいHPLC (Green HPLC) への関心が高まっている。通常の逆相HPLCでは溶出調整溶媒としてメタノールやアセトニトリルが汎用されている。しかし、これらの有機溶媒は劇物に指定されており、保管や管理などが煩雑であるだけでなく、環境や人体に対して優しい溶媒とは言い難い。そこで、本研究では毒性が比較的 low、食品添加物や医薬品の溶解補助剤などに用いられているプロピレングリコール (PG) を溶出調整溶媒として使用する可能性を検討している。今回は、ペンタフルオロフェニル基結合シリカゲル充填カラムを用いて、分離対象物質に非ステロイド系抗炎症薬 (NSAIDs) (フェルビナク、ケトプロフェンおよびナプロキセン) とそれらの類縁物質 (1-および2-ナフチル酢酸および4-ビフェニルカルボン酸) を使用して検討した結果を報告する。<sup>1),2)</sup>

さらに、本発表では移動相溶液中のギ酸の代替物質を使用した結果についても報告する。

## 2 実験方法および測定方法

HPLC装置はHPLC用ポンプ、インジェクター (試料注入量5  $\mu$ L)、ペンタフルオロフェニル基結合シリカゲル充填カラム (内径4.6 mm, 長さ50 mm, 100 mm)、カラム恒温槽および紫外可視分光検出器で構成した。移動相には0.2%ギ酸水溶液に対し、PG、メタノールあるいはアセトニトリルを体積比1:1で混合した溶液をそれぞれ用いた。分離対象物質は水-オクタノール間の分配係数 (log P) および分子構造の類似性などを考慮して、非ステロイド系抗炎症薬 (NSAIDs) であるフェルビナク (FE)、ケトプロフェン (K) およびナプロキセン (NP) とそれらの類縁物質である1-

および2-ナフチル酢酸 (1-N) (2-N) および4-ビフェニルカルボン酸 (4-B) とした。これらの物質をそれぞれ移動相に溶解し、1 mM または飽和溶液を濃度として試料溶液とした。また、各試料溶液を等量ずつ採取して混合溶液とした。測定条件は、移動相流量0.30 mL/min、検出波長254 nmとした。また、カラムオーブンは35~50°Cに設定した。ホールドアップ時間測定用物質にはウラシル (U) を用いた。

## 3 実験結果および検討

設定温度40°Cにおける3種類の移動相 (PG含有移動相, メタノール含有移動相, アセトニトリル含有移動相) 使用時のクロマトグラムをFig. 1に示す。なお、保持強度の関係上、アセトニトリル含有移動相使用時は100 mmカラム, それ以外では50 mmカラムを使用した。

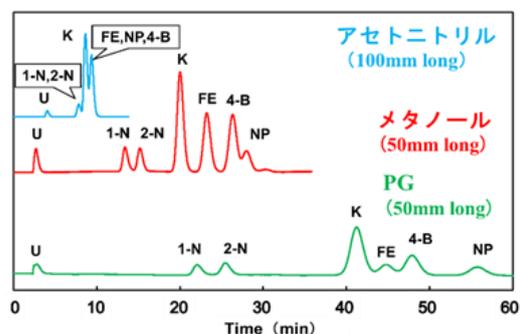


Fig. 1 分離対象物質のクロマトグラム

3種類の移動相において、同一体積比ではPG含有移動相を移動相に用いた場合に一番強い保持を示した。さらに、分離対象物質の溶出順序については、メタノール含有移動相およびPG含有移動相を用いた場合はどちらも1-N, 2-N, K, FE, 4-B, NPの順に溶出した。一方、アセトニトリル含有移動相を用いた場合は混合試料では分離が不十分であった

## A Study of Green HPLC Separation of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs and their Related Compounds

Yuuri OZAWA, Hiromichi ASAMOTO, Kazunori SAITOH, Yohei YAMANE, and Tatsuro NAKAGAMA

が、単体試料の溶出順序は 1-N, 2-N, K, FE, NP, 4-B であった。

まず、疎水性の指標である  $\log P$  値と保持係数の対数 ( $\log k$ ) との相関を検討した。設定温度 40 °C における 3 種類の移動相 (PG 含有移動相, メタノール含有移動相, アセトニトリル含有移動相) におけるステロイドの  $\log P$ - $\log k$  プロットを Fig. 2 に示す。

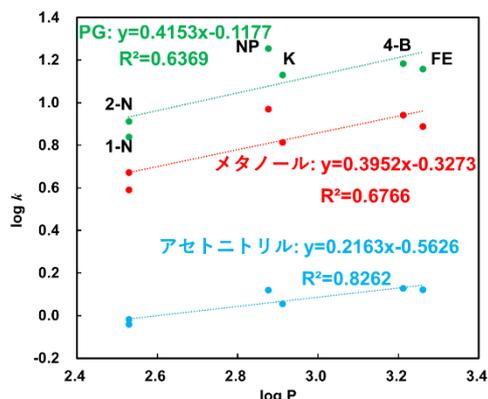


Fig. 2 各有機溶媒含有移動相における  $\log P$  -  $\log k$  プロット

本研究で使用したモデル試料においては、 $\log P$  -  $\log k$  プロットは概ね正の相関関係が見られた。さらに、PG 含有移動相とメタノール含有移動相ではプロットの形状が類似していた。

温度による保持の変化については、それぞれの移動相ごとにファントホッフプロットを作成して検討した。一例として、PG 含有移動相におけるファントホッフプロットを Fig. 3 に示す。

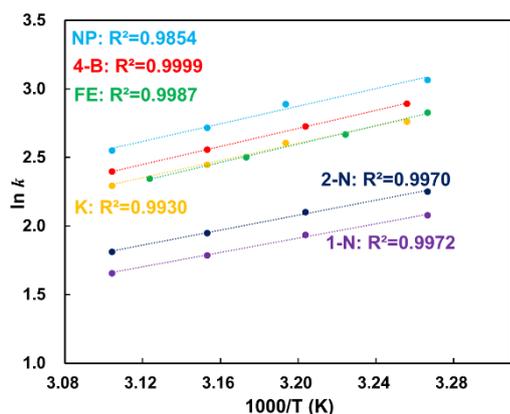


Fig. 3 PG 含有移動相におけるファントホッフプロット

検討の結果、すべての移動相についてファントホッフプロットに直線性が見られた。PG 含有移動相を用いた場合の傾きや切片はメタノール含有移動相を用いた場合と類似していたのに対し、アセトニトリル含有移動相を用いた場合ではカラム温度変化に対して保持の変化がほとんど見られなかった。したがって、PG 含有移動相は溶出順序や保持の温度応答性についてもメタノール含有移動相と類似した特性を示すことがわかった。アセトニトリル含有移動相との違いの要因は、移動相と溶質の水素結合性に起因していると考えられる。

さらに、本研究では分離対象物質と固定相との相互作用に及ぼす移動相の影響を考察するために、分離対象物質の相互作用パラメータと保持係数との重回帰分析を行った。カラム温度の変化に対する相互作用寄与の変化を検討した結果、PG 含有移動相とメタノール含有移動相では類似性が見られたが、アセトニトリル含有移動相は大きく異なっていた。さらに、本研究ではギ酸の代替物質として酒石酸の使用の検討についても報告する。

#### 4 結論

PG 含有移動相はメタノール含有移動相と類似した分離挙動と相互作用を発現することが推察され、NSAIDs とその類縁物質においてメタノールの代替溶媒として使用出来る可能性が示唆された。他の HPLC 分離にも適用が期待できることから、実験者にとって安全で環境に優しい HPLC 分析が実現できると考える。

#### 5 参考文献

- 1) 小澤優里, 会田早希, 武田佳太, 朝本紘充, 齊藤和憲, 中釜達朗, Retention behaviors of non-steroidal anti-inflammatory drugs on green HPLC using an aqueous propylene glycol solution as the mobile phase, 日本化学会第 99 春季年会講演要旨集, (2019) 1PB-123
- 2) 小澤優里, 朝本紘充, 齊藤和憲, 中釜達朗, プロピレングリコール含有移動相を用いた非ステロイド抗炎症薬の Green HPLC, 日本分析化学会第 68 年会講演要旨集, (2019) J3003