

プロピレンカーボネート含有移動相を用いた
環境調和型液体クロマトグラフィーにおける非ステロイド抗炎症薬の保持挙動
日大 生産工(院) 大南 樹生○ 日大 生産工 山根 庸平 中釜 達朗

1. 緒言

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は化学物質の分離分析で汎用されており、移動相溶媒としてメタノールやアセトニトリルなどの有機溶媒が使用されることが多い。しかし、これらの有機溶媒は医薬品外劇物に指定されており、実験者や環境への悪影響や保存、廃液処理などの煩雑さなどが懸念される。本研究では、アセトニトリル (AN) の代替溶媒として、より安全性の高いプロピレンカーボネート (PC) を用いることにより、環境や健康負荷の少ない環境調和型液体クロマトグラフィー

(Green HPLC) を志向した。医薬品として汎用されている非ステロイド系抗炎症薬

(Non-Steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) をモデル試料とした HPLC の分離挙動を検討したので報告する。

2. 実験

本研究で用いた装置は、移動相 (溶離液) ボトル、送液ポンプ、インジェクター (試料注入量 5 μ L)、分離カラム、カラムオープンおよび紫外可視吸光度検出器で構成した。分離カラムは、固定相としてペンタフルオロフェニル (PFP) 基を結合させたシリカゲルを充填したカラム

(COSMOSIL 5PFP、内径: 4.6 mm、長さ: 10 cm) を使用した。このカラムは NSAIDs の HPLC 分離で汎用されている。

移動相は 3 種類 (① AN: 0.2% ギ酸水溶液混合溶液 (体積比 1:1)、② PC: エタノール: 0.2% ギ酸水溶液混合溶液 (同 2:1:3)、③ PC: エタノール: 12.5 mM : 酒石酸水溶液混合溶液 (同 2:1:3) を調製した。移動相②および③については PC と水は混合しにくいとため、エタノールを添加した。

移動相③については劇物であるギ酸の代替物質として食品添加物として使用されている酒石酸を同じ pH になるように調製した。測定対象物質は、分子構造の類似性及び n-オクタノール/水間の分配係数 (log P)

を考慮し、NSAIDs としてフェルビナク (FE)、ナプロキセン (N)、ケトプロフェン (K)、イブプロフェン (I)、ジクロフェナク (D)、フルルビプロフェン (FL)、類縁物質として 4-ビフェニルカルボン酸 (4-B) を用いた。HPLC 測定の際、移動相流量は 0.30 mL/min、検出波長は 254 nm とし、ホールドアップ時間測定用試料にはウラシルを用いた。カラム温度は 35、40、45 あるいは 50 $^{\circ}$ C とした。

3. 結果および考察

3 種類の移動相において、移動相②を用いた場合に一番強い保持を示した。

溶出順序は、移動相①では、K、N、FE、4-B、D、I、FL の順であった。一方、移動相②及び③を用いた場合は、どちらも K、N、FE、4-B、FL、D、I の順であった。

カラム温度を変化させたときの保持挙動も D および FL の溶出順序が逆転した。

次に、各移動相における保持の温度依存性を比較した。ファントホッフプロットとは横軸に温度の対数、縦軸を平衡定数としてファントホッフの式を用いて導出した平衡定数をプロットしたものであり、標準エンタルピー変化を算出することができる。温度と保持における分配平衡が成り立つとき (1) 式が成立する。

$$\ln k = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \Phi \quad (1)$$

ただし、

ΔH : エンタルピー [kJ mol⁻¹]

ΔS : エントロピー [cal mol⁻¹ K⁻¹]

R: 気体定数 [J mol⁻¹ K⁻¹] T: 温度 [K]

$\ln k$: 保持係数の対数

$\ln \Phi$: 二相の体積比の対数

Fig. 2 を例としてナプロキセンのファントホッフプロットを示す。全ての移動相においてカラム温度 (T) の逆数と保持係数の自然対数

Retention behavior of Non-steroidal anti-inflammatory drugs in environment-friendly liquid chromatography using a propylene carbonate containing mobile phase

Tatsuki OMINAMI, Yohei YAMANE, and Tatsuro NAKAGAMA

($\ln k$) との間高い直線性が認められた。この結果は、温度変化によって特異的な相互作用変化が起きていないことを示している。この傾向は他のモデル試料でも同様である。

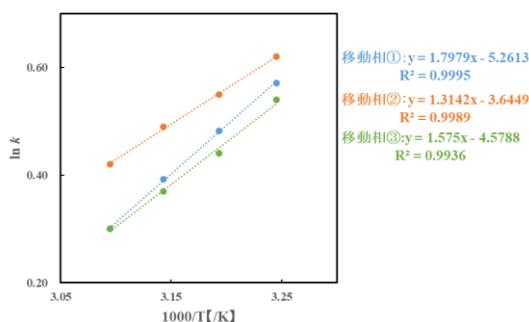


Fig. 2 各移動相におけるナプロキセンのファントホッフプロット

さらに、移動相-固定相間の相互作用を考察するために溶質の相互作用パラメータを用いた重回帰分析を行った。重回帰分析とは、目的変数に対して複数の説明変数がどの程度寄与しているかを分析する手法である。HPLC 分析の保持に関して重回帰分析による検討が行われた例¹⁾があるため、本研究でも固定相-移動相間の相互作用をより深く検討することを目的として重回帰分析を行った。

(2) 式に溶質パラメータ (E, S, A, B および V) の値を代入し、測定対象物質である非ステロイド抗炎症薬 6 種類の保持係数から固定相パラメータ (e, s, a, b, および v) を推算した。また、推算した固定相パラメータによって保持に関する相互作用を考察した。溶質パラメータは文献値²⁾⁻⁴⁾を用いた。

$$\log k = eE + sS + aA + bB + vV + c \quad (2)$$

ただし、

- E: 溶質の過剰モル屈折率
- S: 溶質の双極子性、極性
- A: 溶質の水素結合供与性 (酸性)
- B: 溶質の水素結合受容性 (塩基性)
- V: 溶質の McGoman 体積 (分子体積)
- e: 固定相の電子対に対する相互作用
- s: 固定相の双極子性、極性 (双極子、誘起双極子、分極による相互作用)
- a: 固定相の水素結合供与性 (酸性)
- b: 固定相の水素結合受容性 (塩基性)
- v: 固定相のメチレン基に対する相互作用

その結果、全ての移動相において、v (固定相のメチレン基に対する相互作用) のパラメータが最も大きい値を得た。したがって、固

定相のメチレン基と試料分子との疎水性相互作用が保持に強く影響を与えていることが示唆された。また、すべての移動相において e (固定相の電子対に対する相互作用) と移動相間で大きな差異は認められなかったが、s (分子双極子性) と b (水素結合受容性) に差が認められた。使用した分離カラムは双極子相互作用性に特徴のある固定相を使用しており、芳香環にハロゲンが結合した D と FL は双極子相互作用性の違いによって溶出順序が逆転したと考えられる。

以上のことから、一部の試料において AN の代替溶媒として PC の利用の可能性が示唆される。これにより、AN などの毒性の高い有機溶媒の使用量を減らすことができ、環境への負荷を軽減させることができる。

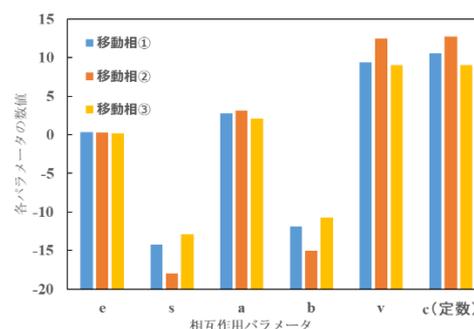


Fig. 3 各移動相における相互作用パラメータ (温度 35 °C)

参考文献

- 1) S. Studzinska and B. Buszewski, *Chromatographia*, 75, 1235 (2012)
- 2) Y.H. Zhao, J. LE, MH. Abraham, A. Hersey, P.J. Eddershaw, C.N. Luscombe, D. Butina, G. Beck, B. Sherborne, I. Cooper, J.A. Platts, *J. Pharm. Sci.*, 90(6), 749 (2001)
- 3) C. Westa, Y. Zhangb, L. Morin-Allorya, *J. Chromatogr. A*, 1218, 2019 (2011)
- 4) Clifford R. Mitchell, Nancy J. Benz, S. Zhang, *J. Chromatogr. B*, 875, 65 (2008)