Agilent Poroshell HPH C18 を使用した低 pH および高 pH でのベータブロッカーの分離

アプリケーションノート

低分子医薬品

著者

William Long

Agilent Technologies, Inc.

はじめに

ベータブロッカー、つまりベータアドレナリン遮断薬は高血圧の治療および不整脈の管理に使用される薬物種です。ベータブロッカーは、ベータアドレナリン受容体遮断薬として、神経終末のベータ受容体への結合をブロックすることにより、エピネフリン (アドレナリン) や他のストレスホルモンなどの影響を低減します。最初のベータブロッカーはイーライリリーのラボによって 1958 年に合成され、臨床的に重要なベータブロッカー、プロプラノロール、プロネタロールが 1962 年に開発され狭心症の治療に使用されました。

ベータブロッカーは、fight-or-flight 反応を媒介する交感神経系の一部、特にベータアドレナリン受容体におけるアドレナリンとノンアドレナリンの活性化を妨げます。3 種類のベータ受容体が知られており、b_1、b_2、b_3 受容体と呼ばれています。b_1-アドレナリン受容体は主に心臓と腎臓に、b_2-アドレナリン受容体は主に肺、消化管、肝臓、子宮、血管平滑筋、骨格筋に、b_3-アドレナリン受容体は脂肪細胞にあります。

ベータブロッカーの種類は多く、また、それぞれがブロックするベータ受容体の種類が異なるため、影響も異なります。プロプラノロールなどの非選択的ベータブロッカーは、b_1 および b_2 受容体をブロックし、心臓、血管、気管に影響を与えます。メトプロロールなどの選択的ベータブロッカーは主に b_1 受容体をブロックするため、主として心臓に影響を与え気管には影響を与えません。ピンドロールなどのいくつかのベータブロッカーはエピネフリンおよびノルエピネフリンの効果を模倣し、血圧や心拍数の上昇の原因となります [1、2]。

高 pH 移動相を使用した β ブロッカーなどの塩基性化合物の分析は、粒子径 2.7 µm または 4 µm の Agilent Poroshell HPH C18 を用いてルーチン化できます。これらのカラムは、広い pH 領域での表面多孔質粒子を用いたメソッド開発を可能にします。このような粒子を充填したカラムは、高効率および高速性能のためにますます採用されています。

Agilent Technologies

メソッド

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

- Agilent 1260 Infinity バイナリポンプ SL、最大 600 bar での送液に対応 (G1312B)
- Agilent 1260 Infinity サーモスタット付カラムコンパートメント (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity 高性能オートサンプラ SL Plus (G1376C)。
- Agilent 1260 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G4212A)、10 mm 光路長、1 µL フローセル (p/n G4212-60008) 付き

この実験では次のカラムを使用しました。

- Agilent Poroshell HPH C18、4.6 × 100 mm、2.7 µm (p/n 695975-702)
- Agilent Poroshell HPH C18、4.6 × 100 mm、4 µm (p/n 695970-702)

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。

分析した化合物はウラシルおよび一連のベータブロッカーが含まれています。それぞれが 1 mg/mL になるように水:アセトニトリル = 50:50 に溶解した後、同じ割合で混合して約 0.143 µg/mL のアテノロール、ピンドロール、アセブトロール、メトプロロール、オクスプレノロール、アルプレノロール、プロプラノロールの溶液を調製しました。図 1 に構造と詳細を示しています。ギ酸アンモニウムとギ酸は 10 mM に調整して pH 3 の低 pH 緩衝液を調製するために使用しました。ギ酸アンモニウムは Sigma-Aldrich Corp から購入し、再蒸留ギ酸は GFS から購入しました。Sigma-Aldrich から購入した炭酸水素アンモニウムと水酸化アンモニウムを使用して pH 10 緩衝液を調製しました。

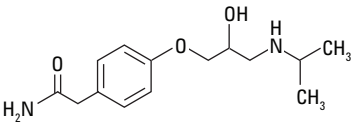
カラムは 25 °C に加熱しテスト前の 10 分間 1 mL/min で平衡化しました。

結果と考察

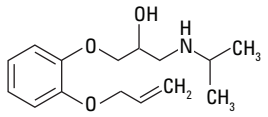
図 1 は使用したベータブロッカーの多様な構造式です。この多様性のために、体内の異なる場所にさまざまな効果を与えることができます。ベータブロッカーは、この構造内に第二アミノ基構造を含む塩基性化合物です。

図 2 は最初のメソッド開発スキャンの結果得られたクロマトグラムを示しています。図に示されているように、適切に分離されていますが、遅い溶出ピークではピーク形状があまり良くありません。移動相での緩衝液濃度が低下するにつれて、ベースラインが低下し、

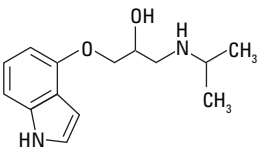
アテノロール pKa 9.6



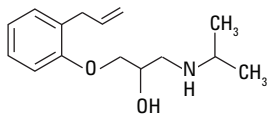
オクスプレノロール pKa 9.5



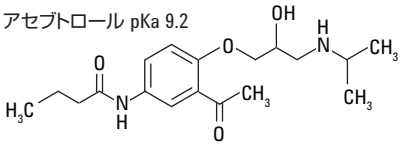
ピンドロール pKa 8.8



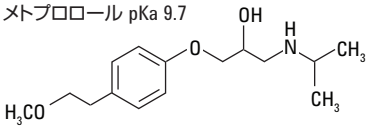
アルプレノロール pKa 9.5



アセブトロール pKa 9.2



メトプロロール pKa 9.7



プロプラノロール pKa 9.5

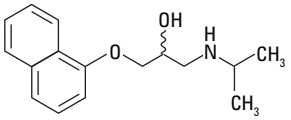


図 1. ベータブロッカーの構造。

ピークはわずかに広がり短くなります。このために、定量がより困難になります。これはアセトニトリルへの緩衝液の配合量を変えることや移動相調整剤を使用することで改善できます。2.7 µm Poroshell HPH C18 (A) と 4 µm Poroshell HPH C18 (B) の両方で同一のクロマトグラフィー挙動が示され、クロマトグラフィーを移管できることが示されました。

図 3 に pH 10.5 での混合物のクロマトグラフィーを示しています。アルカリ性移動相では、完全にプロトン化された塩基性化合物の分離は、図 2 の酸性移動相を使用して得られたクロマトグラフィーの分離よりも良好です。どのピークについても、図 2 よりもピーク形状が優れ、テーリングが低減し、ピークは高く、リテンションタイムも良好です。ピーク 6 と 7 のペアは、この条件では完全に分離しています。クロマトグラフィーの向上により、低レベルでも定量できます。2.7 µm Poroshell HPH C18 (A) と 4 µm Poroshell HPH C18 (B) の両方で同一のクロマトグラフィー挙動が示され、クロマトグラフィーを移管できることが分かります。

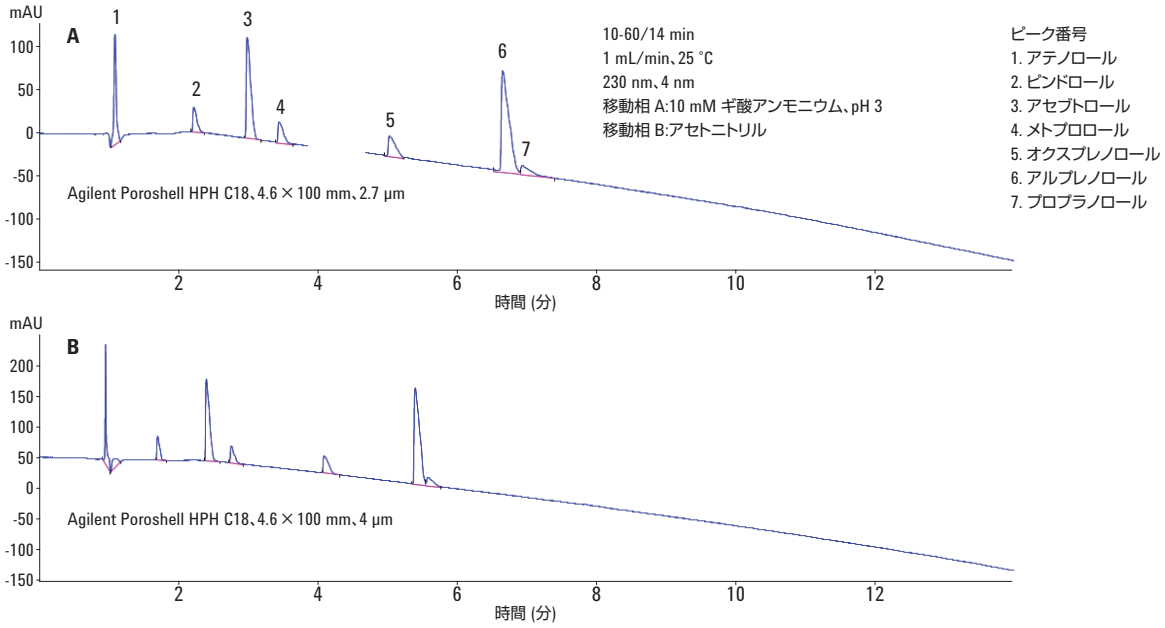


図 2. Agilent Poroshell HPH C18 カラムでのベータブロッカーの混合物の低 pH 分離

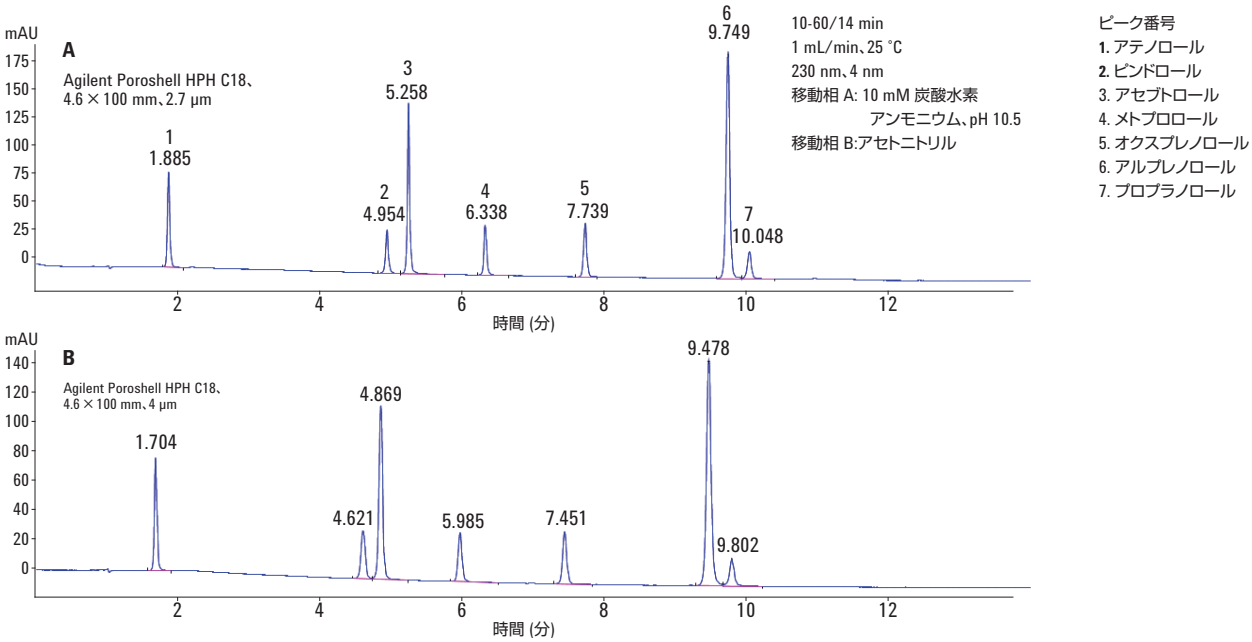


図 3. Agilent Poroshell HPH C18 カラムでのベータブロッカーの混合物の高 pH 分離

結論

高 pH 移動相を使用した塩基性化合物の分析は、粒子径 2.7 µm または 4 µm の Agilent Poroshell HPH C18 を用いてルーチン化できます。どちらのサイズでも、高 pH でよりシャープで良好に保持されたピーク形状を実現します。場合によってはより良好な分離能も達成されます。Poroshell HPH C18 などの高 pH にて安定な新しいカラムを使用すると、カラムの耐久性に大きな影響を与えずに、pH のコントロールを利用して選択性を調整できます。また、類似した選択性により、背圧条件によって、2.7 µm カラムと 4 µm カラム間でメソッドを移管できます。

分析者は、高効率および高速性能のために採用が広まっている表面多孔性粒子技術を用いたこれらのカラムを使用することで、メソッド開発にて広い pH 領域が調査できます[3]。

参考文献

1. http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/high-blood-pressure/in-depth/beta-blockers/art-20044522
2. http://www.webmd.com/heart-disease/guide/beta-blocker-therapy
3. Long, W. J.; Mack, A. E.; Wang, X.; Barber, W. E. Selectivity and Sensitivity Improvements for Ionizable Analytes Using High-pH-Stable Superficially Porous Particles. *LCGC* **2015**, *33* (4).

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、アジレントのウェブサイト (www.aglient.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. 2015

Printed in Japan December 7, 2015
5991-6519JAJP

Agilent Technologies