

糖ペプチドベースのキラルカラムによる 最新のキラル分離

Agilent InfinityLab Poroshell 120 キラル-T カラムを用いた
マレイン酸チモロールのキラル分離

著者

William J. Long
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、マレイン酸チモロールのキラル分離の開発と最適化について説明します。このメソッドでは Agilent InfinityLab Poroshell 120 キラル-T カラムを使用し、マレイン酸チモロールのキラル分離で用いられている現行の USP メソッドと比較します。

はじめに

医薬品業界では、エナンチオマーの高速分離がますます重要になっています。政府規制が強化されるとともに、多数の光学活性医薬品化合物が導入されているため、これらの化合物を分析するには、迅速かつ高感度で信頼性の高いメソッドを考案することが重要になります。現在使用されている薬物はその半分以上がキラル化合物であり、これらのほぼ90%が、2つのエナンチオマーの等モル混合物で構成されるラセミ化合物として販売されています。キラル薬物は化学構造は同じですが、その大部分の異性体は生物学的活性が大きく異なります。^{1,2}

ヘキサンなどの順相溶媒による、セルロースまたはアミロースベースのキラル選択相 (CSP) を用いた多数のキラル分離が実施されていますが、メタノールなどのより一般的な溶媒をベースにした分離では、他の相が要求されることが多くなっています。これらの相は、逆相メソッドを実施しているラボに簡単に組み込むことができます。

InfinityLab Poroshell 120 キラル-T (テイコプラニン) カラムは、逆相および順相 HPLC、さらに SFC でも使用できます。また結合 CSP であるため、相のブリードや損失のリスクなしに、コーティング CSP 以外のさまざまな溶媒で使用できます。

InfinityLab Poroshell 120 キラル-T およびその他のテイコプラニンベースの CSP は、極性イオンモード (メタノールおよびアンモニウム塩ベースの移動相、逆相 (メタノールまたはアセトニトリルとバッファ))、または極性有機モード (メタノール、エタノール、または別の100%有機溶媒) で作用することがわかっています。逆相モードでは、有機成分および移動相 pH の性質と濃度により、リテンションと選択性が制御されています。⁴

InfinityLab Poroshell 120 キラル-T (テイコプラニン) のような糖ペプチドベースのキラルカラムは、逆相および順相 HPLC、さらに SFC のさまざまな溶媒で使用できます。糖ペプチドは両性であり、イオン化した酸性および塩基性グループの両方が含まれています。そのため、糖ペプチドは移動相の pH に応じて、正に帯電するか、負に帯電するか、または中性になることができます。したがって、この種の CSP を用いてイオン性化合物を分離する際には、キラル認識にイオン性相互作用を関与させることができます。この種の CSP におけるキラル認識では、今述べたことが主要な役割を果たすと考えられています。キラル認識で CSP として抗生物質を使用することに関連して発生する可能性があるその他の相互作用には、水素結合、立体化、双極子-双極子、 π - π 相互作用、および疎水性相互作用があります。これらの相互作用は、使用する個別の成分と移動相モードの特性によって決定される、さまざまな組み合わせにおいて発生する場合があります。各分離モードでは、キラル認識において同時に異なる相互作用が発生します。これにより、多数のキラル分離およびこの種の CSP で適切に分離されるさまざまなタイプのキラル化合物に関する情報が得られます。

糖ペプチドテイコプラニンは、表面多孔質シリカ粒子と共有結合することにより、耐溶媒性のある安定したクロマトグラフメディアを生成します。この共有結合相は、一般的な HPLC 移動相およびメタノール、エタノール、IPA、THF、リン酸塩、ギ酸塩、酢酸塩、ギ酸、TFA、TEA、 NH_4OH などの添加物に対する耐性があります。テイコプラニン結合相の構造を図 1 に示します。

このアプリケーションノートでは、InfinityLab Poroshell 120 キラル-T でのマレイン酸チモールールの分離を開発して最適化し、現行の USP メソッドと比較します。図 2 に、この化合物の構造を示します。

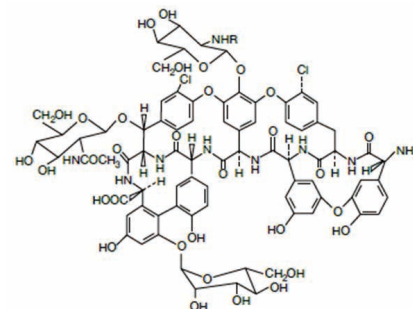


図 1. Agilent InfinityLab Poroshell 120 キラル-T カラムでのテイコプラニン結合相の構造

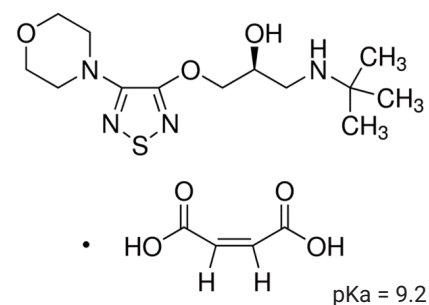


図 2. チモールールマレイン酸塩 (S) の構造

実験方法

試薬と実験方法

今回の実験では、Agilent 1260 Infinity II LC を使用しました。構成を表 1 に示します。基本的なクロマトグラフィー条件を表 2 に示します。

マレイン酸チモロール、S-(−)-1-(*t*-ブチルアミノ)-3-[[4-(4-モルホリノ-1,2,5-チアジアゾール-3-イル)オキシ]-2-プロパノールマレイン酸塩、欧州薬局方 (EP) 参照標準、および R-チモロール 欧州薬局方 (EP) 参照標準は、Sigma-Aldrich から購入しました。各エナンチオマーを 2 mg/mL でメタノールに溶解しました。等しい量の各エナンチオマー溶液で構成されるサンプルを使用して、分離能を測定しました。LC/MS グレードのギ酸アンモニウムも Sigma-Aldrich から購入しました。HPLC グレードのメタノールは Honeywell から購入しました。2 g のギ酸アンモニウムをメタノールに溶解し、0.2 % w/v で移動相を前処理しました。低濃度の溶液は、この原液を希釈して前処理しました。

結果と考察

4 本の InfinityLab Poroshell 120 キラルカラムと 6 つの移動相を用いたスクリーニングにより、チモロールキラル分離の初期分析を実施しました。^{3, 4}このテストにより、0.2 % w/v ギ酸アンモニウム移動相含有のメタノールを用いた 2 つのチモロールエナンチオマーとマレイン酸塩の分離状態が明らかになりました。この分離状態を図 3 に示します。

一般的に、極性イオン分離では、メタノールやアセトニトリルのような有機溶媒に少量の酸または塩基を加えて使用します。または、今回のケースのようにアンモニウム塩を使用できます。ギ酸アンモニウムの濃度を低くすると、後半の 2 つのピークの見分けが難しくなり、リテンションが増大することがわかりました。これらのピークは、UV スペクトルを比較することにより、2 つのチモロールエナンチオマーとして同定しました。

表 1. 機器の構成

Agilent 1260 Infinity II LC	
Agilent 1260 Infinity II バイナリポンプ (G7112B)	最大 60 MPa、0 ~ 5 mL/min
Agilent 1260 Infinity II マルチサンプル (G7167A)	<ul style="list-style-type: none"> オートサンプラとヒーター：キャピラリー、ステンレス製、0.075 × 220 mm (p/n 5067-4784) バイアル、スクリュートップ、茶色、ラベル付き、認定、2 mL、100 個 (p/n 5182-0716) キャップ、スクリュー、青、PTFE/赤シリコンセプタム、100 個 (p/n 5182-0717)
Agilent Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116A)	<ul style="list-style-type: none"> 超低分散ヒーター (G7116-60021) ヒーターとカラム：Agilent InfinityLab クイックコネクタアセンブリ、105 mm、0.075 mm (p/n5067-5961) カラムと ELSD キャピラリー、ステンレス製、0.075 × 220 mm、SV/SLV (p/n 5067-4784)
Agilent 1260 Infinity II DAD (G7115A)、10 mm 光路長搭載	<ul style="list-style-type: none"> G4212-6008、10 mm フローセル、1.0 μL V(φ) 40 Hz
Agilent OpenLab CDS、バージョン C.01.07	

表 2. LC メソッド条件

パラメータ	設定値
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 キラル-T、4.6 × 100 mm、2.7 μm (p/n 685775-603)
移動相	ギ酸アンモニウム含有メタノール (0 ~ 0.2 %)
流量	1 mL/min
温度 (カラム)	30 °C
UV 波長	260 nm
注入量	1 μL
サンプル濃度	2 mg/mL 水溶液

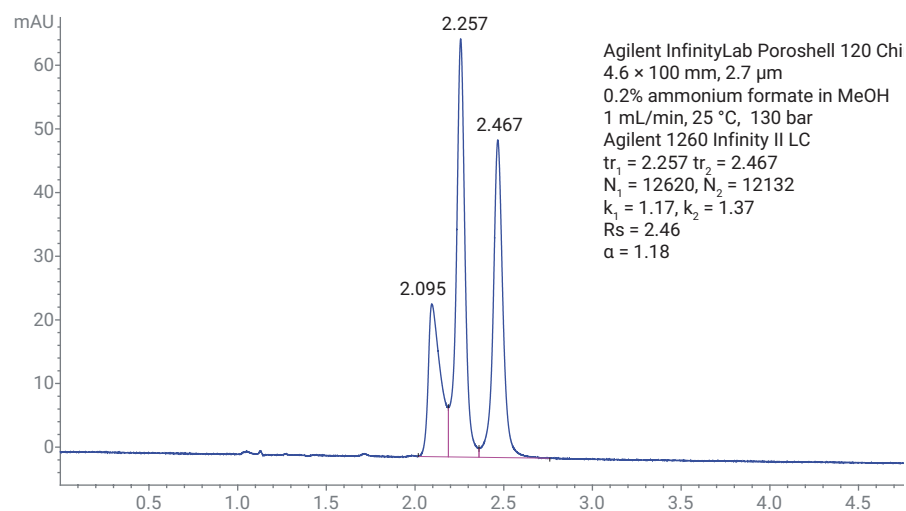


図 3. 0.2 % ギ酸アンモニウム含有メタノールを用いたマレイン酸チモロールの分離

この挙動は、極性イオン分離モードを用いた際の代表的な分離です。イオン化グループが存在しない分子のみをテコプラニンまたはバンコマイシン相に加えると、メタノール、エタノール、アセトニトリル、またはこれらの無水溶媒の組み合わせで構成される移動相での分離が高速化されます。極性有機分離の良い例として、参考文献（キラルの概要）に示されている 5-メチル-5-フェニルヒダントインまたはサリドマイドがあります。

ただし、化合物にイオン化グループが存在する際には、少量の酸と塩基または揮発性塩を加えることが必要になる場合があります。これは、大環状糖ペプチド自体の内部にイオン化グループが存在するためです。後者の移動相条件を極性イオンモードとして参照することにより、極性有機モードと区別しています。

極性イオンモードの選択性として、通常、化合物には最低 2 つの機能グループが存在しますが、そのうちの 1 つはイオン化されている必要があります。これらの機能グループには、アルコール、ハロゲン、いずれかの型の窒素（一次、二次、三次）、カルボニル、カルボキシル、酸化型の硫黄、またはリンを含めることができます。糖ペプチド相では、多数の酸と塩基、さらに揮発性塩を使用できます。酢酸アンモニウムは酸性分子の代表例であり、トリフルオロ酢酸アンモニウムおよびギ酸アンモニウムは塩基性分子で使用されます。チモロールの pKa は約 9.2 であるため、MS 対応の塩であるギ酸アンモニウムの方が適しています。

最初のピークを、共通塩であるマレイン酸塩として同定しました。図 4 に、ギ酸アンモニウムの 3 種類の濃度 0.2、0.15、0.1 % での分離を示します。最初のチモロールのピークは、欧

州薬局方標準を注入することにより、「S」体エナンチオマーとして同定しました。表 3 に、6 種類のギ酸アンモニウムの濃度、各濃度での 2 つのチモロールエナンチオマーのリテンション、およびチモロールエナンチオマーの分離能を示します。これらのデータをプロットし

表 3. Agilent InfinityLab Poroshell 120 キラル-T でのさまざまなギ酸アンモニウム濃度におけるマレイン酸チモロールの分離

% ギ酸アンモニウム	Rs	t1	t2
0.0	-	-	-
0.025	4.12	8.585	9.917
0.05	3.71	5.073	5.798
0.1	3.17	3.204	3.597
0.15	2.78	2.577	2.848
0.20	2.46	2.257	2.467

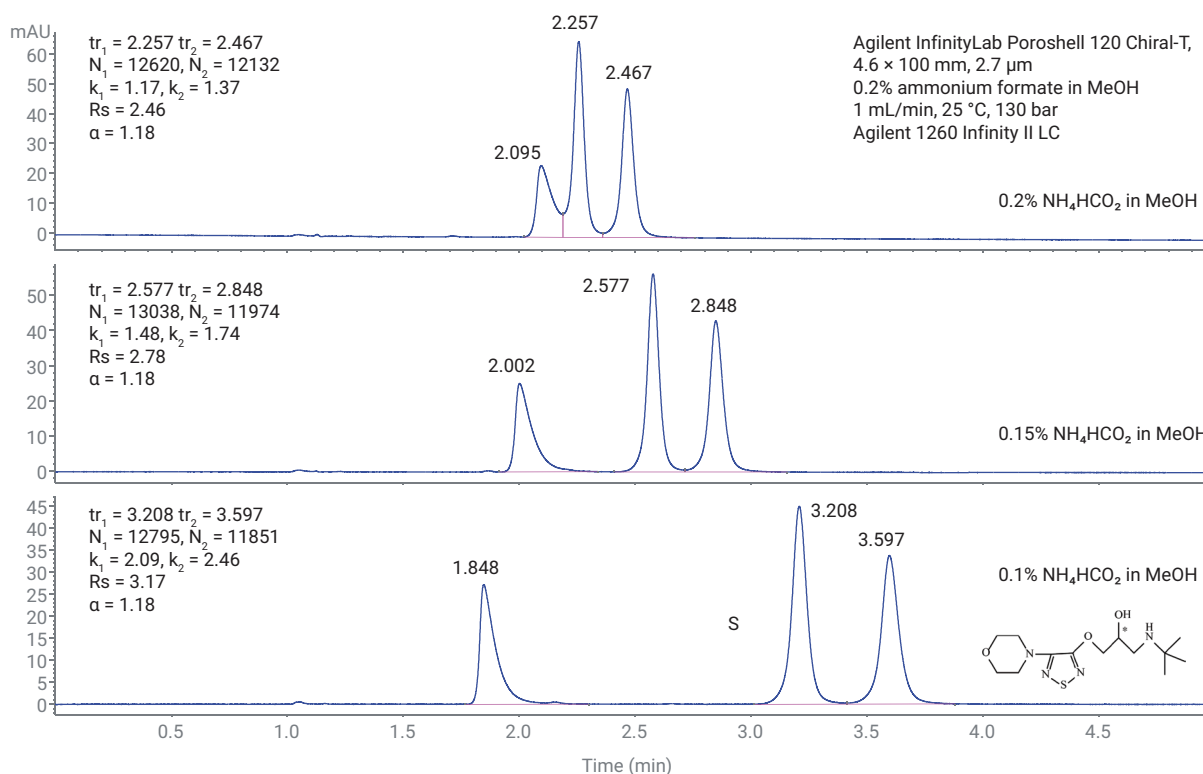


図 4. 0.2、0.15、0.1 % ギ酸アンモニウム含有メタノールを用いたマレイン酸チモロールの分離

たものが図 5A と 5B です。図 6 に、このデータセットのクロマトグラフの重ね表示を示します。このデータは、ギ酸アンモニウムの濃度が低くなると、チモロールエナンチオマーの分離能が高くなることを示しています。一方、ピークのリテンションは増大しています。ギ酸アンモニウムの濃度を低くすることにより、分離能が高くなりました。ギ酸アンモニウムの濃度 0.025 % w/v では、分離能は 4.12 です。ギ酸アンモニウムの濃度 0 % では、カラムにより、チモロールのピークが識別できない場所にピークが保持されています。

マレイン酸チモロール用の USP メソッドでは、5 μ m、4.6 \times 250 mm 順相メソッドを利用しており、USP 分類 L40 (セルローストリス-3,5-ジメチルフェニルカーバメートコーティング多孔質シリカ) カラムとヘキサノール/イソプロパノール/ジメチルアミン、960:40:2 移動相が用いられています。このメソッドは、欧州薬局方にも記載されています。この移動相にはジメチルアミンが存在するため、MS には対応していません。^{5, 6, 7} USP/EP メソッドに関するもう 1 つの問題は、コーティングキラルカラムが使用されていることです。コーティングカラムは、固定化キラルカラムと比較して寿命がかなり制限されており、注入回数が 200 回程度の場合もあります。アセトン、クロロホルム、DMF、ジメチルスルホキシド、酢酸エチル、塩化メチレン、THF など HPLC 溶出液で一般的に使用されている多数の溶媒は、システム内の残留物中に存在する場合でも、キラル固定相を破壊することがあります。一般に、この順相溶媒を使用しているシステムは、順相アプリケーション専用です。⁸ InfinityLab Poroshell 120 キラル-T は完全に結合されたカラムであり、一般的に使用されているクロマトグラフィー溶媒に対する耐性があります。

4.6 \times 250 mm カラムで欧州薬局方メソッドを用いた分離について説明している参考文献には、2 つのチモロールエナンチオマーのリテンションタイムが 9 ~ 14 分の間であることが示されています。同じカラムで SFC を用いることにより、このメソッドを新しいメソッドと比較しています。新しいメソッドは非常に高速である一方、分離能が低下していることが報告されています。⁹

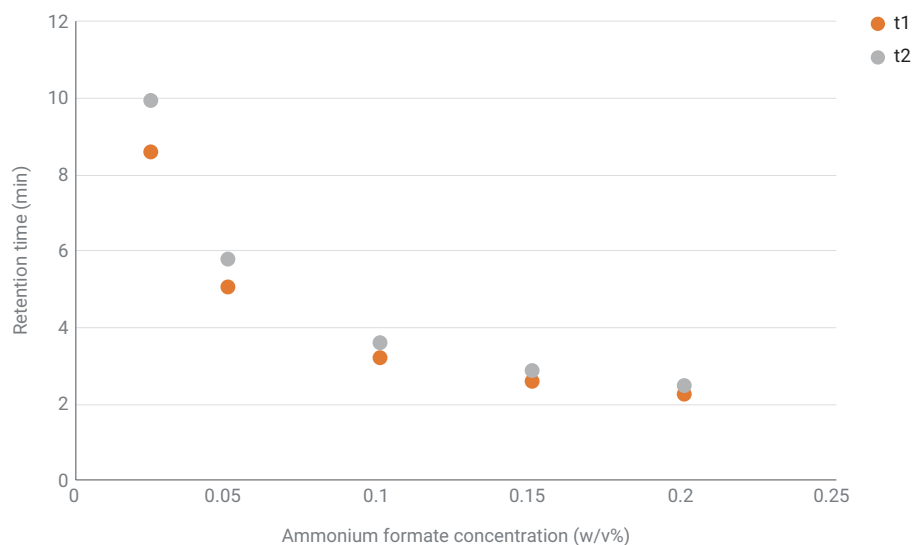


図 5A. ギ酸アンモニウム濃度の関数としてのチモロールエナンチオマーのリテンションタイム

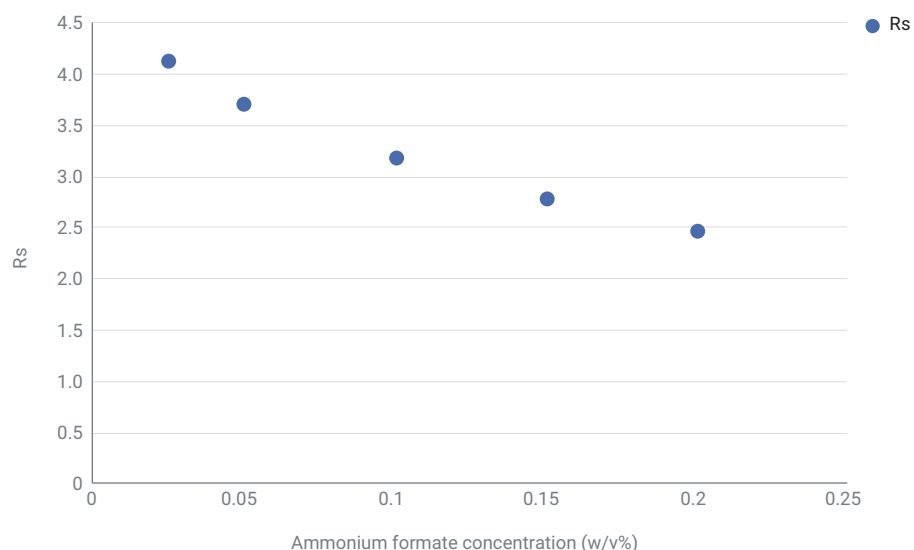


図 5B. ギ酸アンモニウム濃度の関数としてのチモロールエナンチオマーの分離能

結論

ここでは、極性イオン移動相（ギ酸アンモニウム含有メタノール）と InfinityLab Poroshell 120 キラル-T カラムを用いた、チモロールエナンチオマーの分離について説明しました。今回のメソッドでは 220 nm UV 検出を用いていますが、移動相は MS 検出と完全に互換

性があります。したがって、トラブルシューティングプロセスメソッドまたは法医学分析に簡単に適できます。このメソッドは、いずれの HPLC システムでも区別なく実施できます。

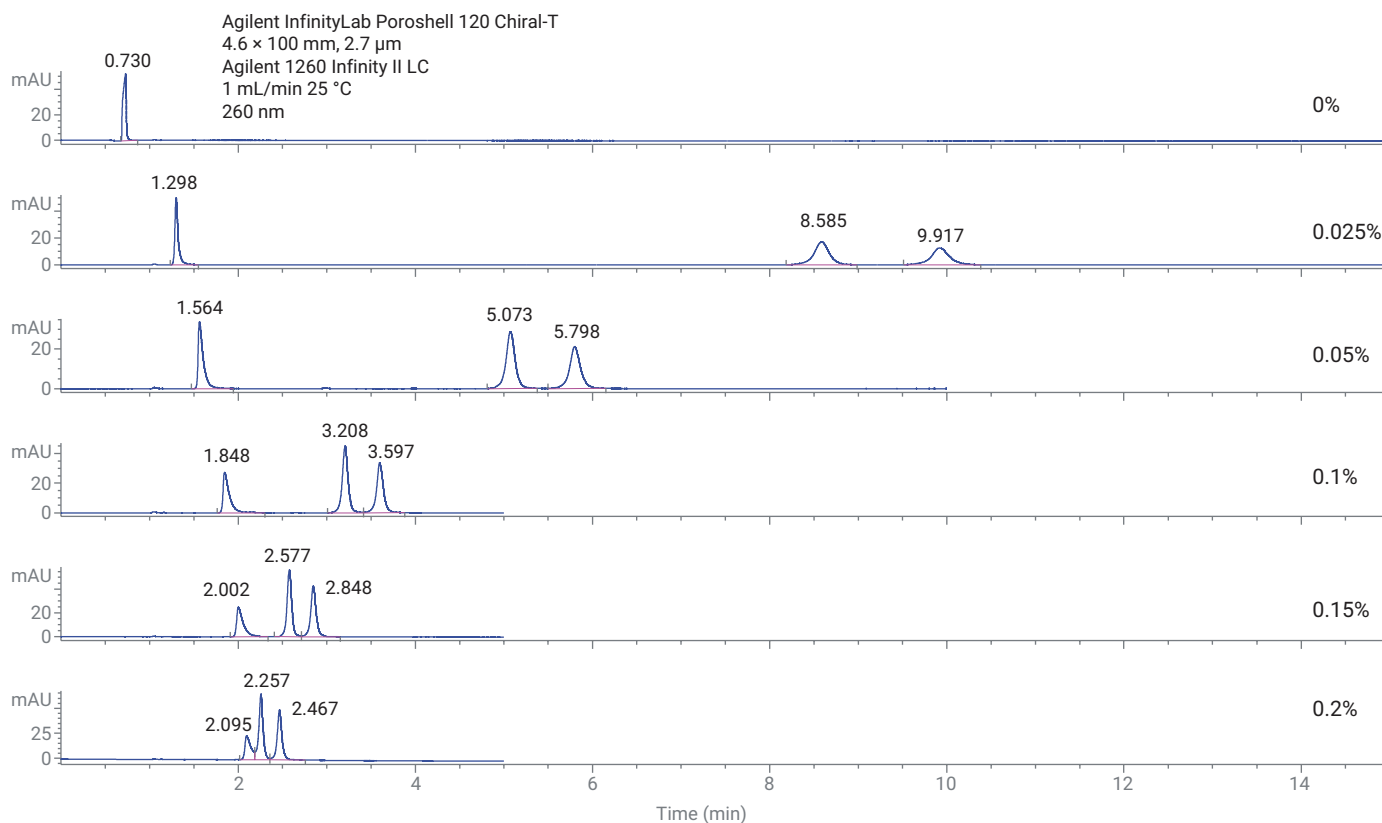


図 6. ギ酸アンモニウム濃度の関数としてのマレイン酸チモロールの分離

参考文献

- Bonner, W. A. Parity Violation and the Evolution of Biomolecular Homochirality. *Chirality* **2000**, 12, 114–126.
- Food and Drug Administration, FDA's Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs. **1992**, 57 Fed. Reg. 22249.
- Long, W. J.; Mack, A. E. Screening Chiral Compounds Using Superficially Porous Based Chiral Columns and a Method Development Solution. *Pittcon* **2018**, CO-1479.
- Put Agilent InfinityLab Poroshell 102 Chiral Innovations to Work on Your Challenging Separations. Agilent InfinityLab Poroshell 120 Chiral application compendium, publication number 5991-8450EN, **2017**.
- United States Pharmacopeia USP 40 Timolol Maleate Monograph.
- European Pharmacopoeia, 4th edition, Addendum 2002, Council of Europe, Strasbourg.
- European Pharmacopoeia (Version 7.5): Timolol Maleate Monograph.
- Instruction Manual for Chiralcel OD-H and OJ-H Chiral Technologies 07/2013.
- Marley, A.; Connolly, D. Determination of (R)-Timolol in (S)-Timolol Maleate Active Pharmaceutical Ingredient: Validation of a New Supercritical Fluid Chromatography Method with an Established Normal Phase Liquid Chromatography Method. *J. Chromatogr. A* **2014**, 1325, 213–220.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。本文書に記載の情報、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. 2020
Printed in Japan, June 23, 2020
5994-2143JAJP
DE.0087615741