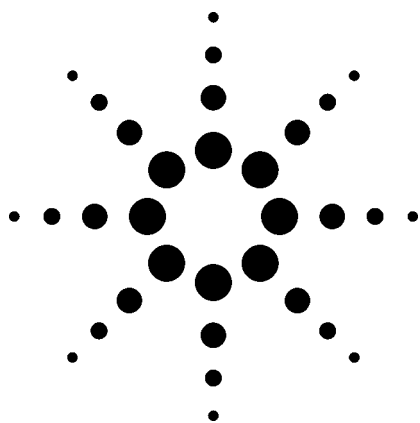




サブ 2 ミクロン粒子で充てんされた HPLC カラムを使用した USP メソッドによる ベータ遮断薬ピンドロールの迅速分析 アプリケーション

製薬

著者

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

要旨

ピンドロールは血圧を下げるのに役立つ遮断薬で、うつ症状を緩和する効果もあります。この製剤にはさらに多くの用途がある可能性があるため、迅速な分析手法を開発する必要があります。本研究では、米国薬局方 (USP) メソッドおよびサブ 2 ミクロンのサポート粒子が充てんされた短い HPLC カラム (ZORBAX SB-CN (L10) カラム) を用いて、迅速で効率高いピンドロールの HPLC 分離が得られたことを説明します。

はじめに

ベータ遮断薬は、高血圧症の治療に使用される製剤のグループの 1 つです。細胞膜で「ベータ受容体」を遮断するので、この名前が付けられています。ベータ遮断薬は、受容体と結合してアドレナリンを抑制するということが証明されています。アドレナリンは、ホルモンでも神経伝達物質でもあり、血流に分泌されると、心搏数が増え、血管が収縮し、血液凝固時間が減ります。アドレナリンを遮断すると、これらの効果が減り、心臓の働きを抑えます。したがって、ピンドロール (図 1) は血圧を下げるのに役立つベータ遮断薬として使用されます。

また、ピンドロールは、うつ病の治療にも使われます。ベータ受容体だけでなく、ピンドロールは、他の受容体を遮断し、その遮断時に脳のセロトニンの増加を引き起こします。アドレナリンに似ているセロトニンも、神経伝達物質の 1 つです。セロトニンの低下は、うつ病の症状の 1 つです。したがって、受容体を遮断すると、セロトニンのレベルが高くなり、場合によってはうつ病が緩和されます。しかし、臨床研究では、結論が一致していないため、ピンドロールと神経伝達物質受容体の関係を理解するには、さらなる研究が必要です。

薬学の現在の進歩

薬理学の知識と新テクノロジーの進歩により、ピンドロールなどの薬剤が複数の疾患を治療できることが発見される場合があります。新しく発見された効用により、薬剤がより一般的になり場合があるため、より多くの分析を行う必要性が高まっています。つまり、短い時間でより多くの結果を得ることが求められているわけです。HPLC の新しいテクノロジーは、分析「速度」の進歩させています。言い換えれば、迅速で効率の高い HPLC 分離 (ハイスループット) への期待が高まっています。小さい粒子を充てんした短いカラムと特別に設計された HPLC システムを使用すると、この新しいカラムのテクノロジーの利点が活かされ、このような分離が可能になります。

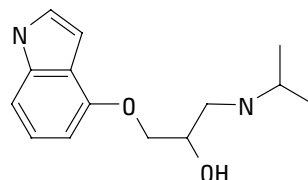


図 1 ピンドロールの構造。



Agilent Technologies

米国薬局方/国民医薬品集に記されている HPLC などの多くの分析技術が、その「補足資料」で改訂され、更新されています。たとえば、LC カラムを使用している多くの以前の USP メソッドは、もともと $10\ \mu\text{m}$ の粒子が充てんされた、 $4.6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm}$ または $3.9\ \text{mm} \times 300\ \text{mm}$ のカラムの使用が想定されていました。分析時間は通常、15~30 分でした。これらの古いメソッドの多くは、 $5\ \mu\text{m}$ または $3.0\ \mu\text{m} \sim 3.5\ \mu\text{m}$ の粒子が充てんされた、 $4.6\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}$ のカラムを使用したものに変更されました。本研究の目的は、 $1.8\ \mu\text{m}$ の粒子が充てんされた $4.6 \times 50\ \text{mm}$ カラムで分析を行い、ピンドロール用の USP メソッドを高速化することです。

カラム長の拡張性

拡張性とは、特定のメソッドについて、クロマトグラフの性能を著しく変化させないで、カラムの仕様を変更できる能力のことです。HPLC メソッドのカラム長と粒子サイズの変更は、それほど単純ではない場合があります。シリカ粒子、バッチ間のばらつき、カラム製造技術、さらに HPLC 装置そのものの違いは、クロマトグラムに影響を及ぼし、場合によっては元のメソッドの許容誤差の範囲外の結果を出す可能性があります。これらの要因はすべて、既存のメソッドの変更や改良の努力をためらわせる原因になる恐れがあります。

今回の分析では、ZORBAX StableBond SB-CN (USP LC カラムタイプ L10) と Agilent 1100 (Rapid Resolution Modification Kit、部品番号 5188-5324 で再構成された)、または Agilent 1200 Rapid Resolution System を使用して、ピンドロールの USP メソッドのカラムサイズを変更した場合に、前述の問題が軽減されたことが分かりました。ZORBAX SB-CN カラムシリーズは容易にカラムサイズを変更できるので、十分な分離能を維持しながらも、分析時間と溶媒の使用量を削減し、メソッドを迅速に改良することができます。これらの節約により、ラボの生産性が向上します。

図 2 では、元の USP メソッド [1] において、 $3.5\ \mu\text{m}$ の粒子が充てんされた $4.6\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}$ のカラムと、 $1.8\ \mu\text{m}$ 粒子が充てんされた同じ内径の $50\ \text{mm}$ カラムでのピンドロールの分析結果を比較しました。内部標準 (ISTD) としてインドールを使用しました。両カラムの結合相は、ZORBAX Stable-Bond SB-CN (USP LC カラムタイプ L10) です。短いカラムで、分離能が維持されつつ分析時間が短くなっていること、感度が向上していることに注目してください。大きな粒子の古い技術からサブ 2 ミクロンの新しい技術にメソッドを変えることで、これらの利点が実現されます。

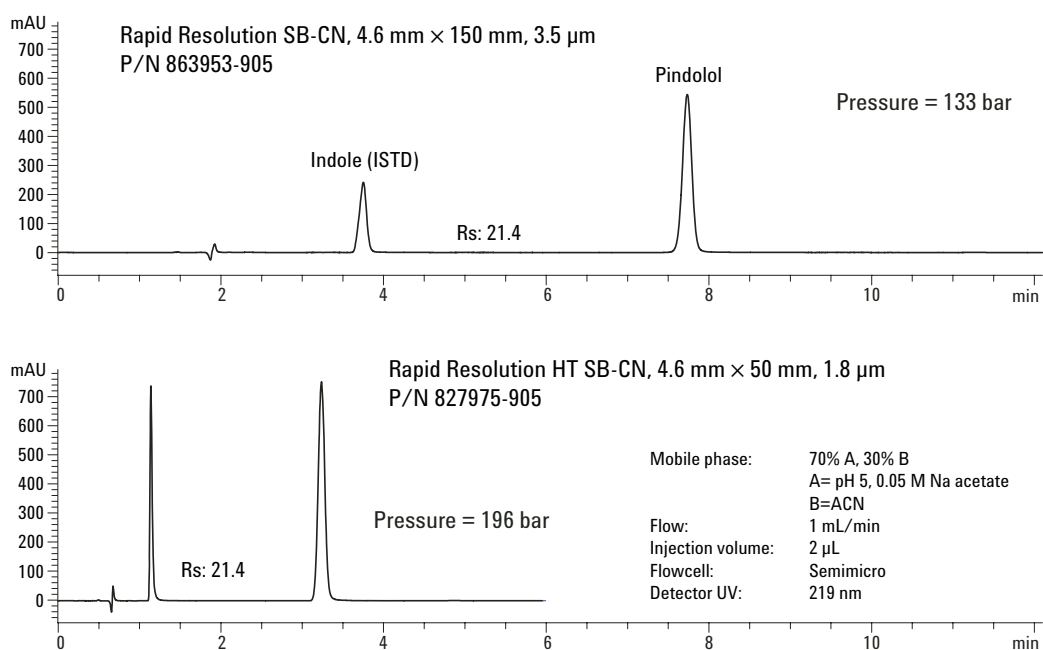


図 2 拡張性。カラム構成を変更し、分離能を維持したままで、高速化します。

さらなる利点として、#トルメソッドの微調整は不要でした。本来ならば、 $1.8\ \mu\text{m}$ の粒子に変えると、粒子が小さい ($\Delta P \sim 1/d_p^2$ 、ここでは d_p は平均粒子内径) ため、システムの背圧 ΔP が増加すると思われます。しかし、他のサブ 2 ミクロンのカラムより低い圧力をもたらす短いカラム長と、独自の粒度分布管理技術により、圧力増加の可能性は相殺されます。この実験では、粒子サイズが $3.5\ \mu\text{m}$ で長さが $150\ \text{mm}$ カラムを使用すると、元の圧力は 133bar で、粒子サイズが $1.8\ \mu\text{m}$ で長さが $50\ \text{mm}$ カラムを使用すると、圧力は 196bar になりました。

ピンドロール内の不純物の定量

ピンドロールの 2 つのクロマトグラム (図 3) の拡大表示では、ピンドロールから分離された不純物がハイライトされています。USP モノグラフ [1] には、ピンドロールのピーク面積に対する不純物のピーク面積の割合はそれぞれ 0.5% を超えてはいけないこと、不純物の合計は 2.0% を超えられないことが記載されています。SB-CN を使用すると、ピンドロールのピークの後に未知の不純物のピークが溶出しました。2 つのクロマトグラムの不純物のピーク面積は同じですが (等量の注入)、サブ 2 ミクロンのカラムで分析される不純物のピーク高さが高くなり (感度の向上)、不純物の検出や定量が容易になります。不純物のレベルは約 0.2% で、USP メソッド [1] に記載されている単一成分の不純物の最高レベル 0.5% を下回ると推定されました。

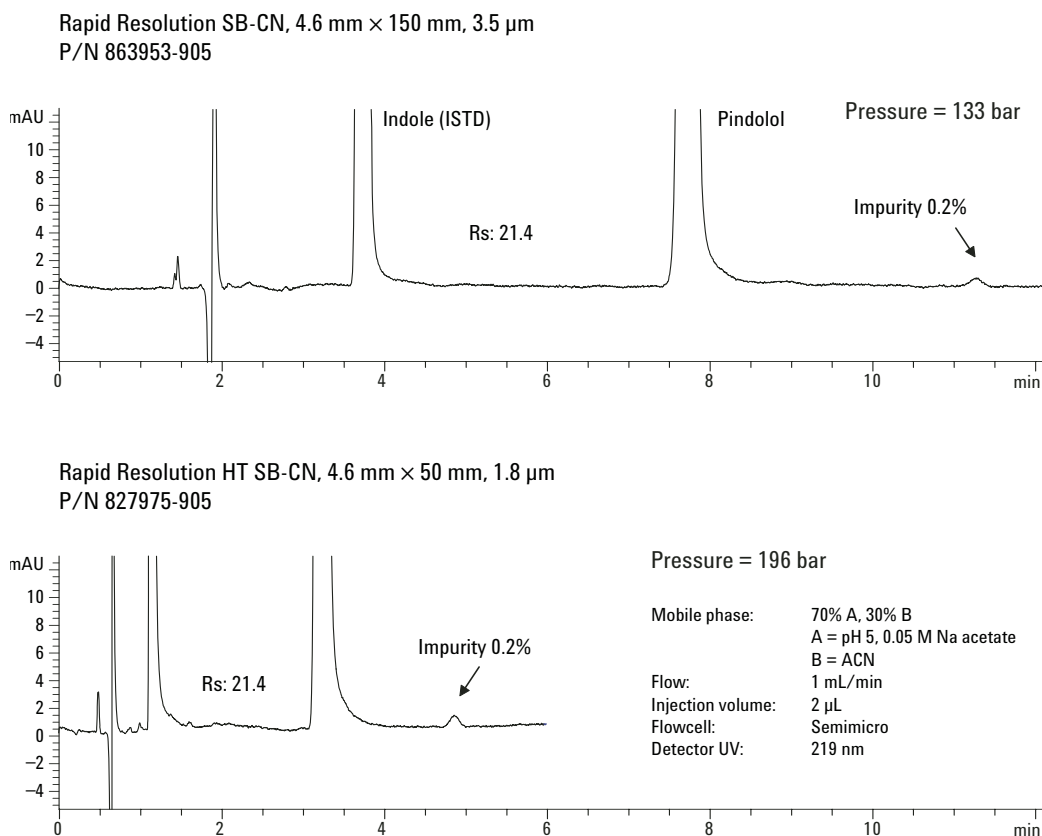


図 3 拡張性。カラム構成を変更し、分離能を維持したままで高速化し、感度を高めます。

結論

長いカラムに充てんされた 3.5 μm または 5 μm の粒子で開発された実績のある HPLC メソッドは、カラム長の短い 1.8 μm の粒子が充てんされたカラムを使用することにより、スケールダウンが可能でした。その結果、分析時間の短縮、感度の向上、溶媒コストの削減、元のクロマトグラムの分解能の維持という利点が得られました。今回の分析では、ZORBAX SB-CN カラムに拡張性があることが実証されました。Agilent 1100/1200 HPLC システムを使用している場合、メソッドのスケールダウンに伴う改良に必要なものは、長いカラムに替えて小さい粒子を充てんした短いカラムを使用することだけででした。1.8 μm の ZORBAX 粒子では、多くの一般的な結合相を使用できます。StableBond-CNは、L10 タイプのカラム、特に USP ピンドロールのメソッドに適したカラムです。

このアプリケーションノートで使用した製品は以下のとおりです。

1. Agilent 1100 シリーズバイナリシステム用 Rapid Resolution Modification Kit、部品番号 5188-5324 (DAD 用)。
2. Zorbax Rapid Resolution StableBond CN、3.5 μm 、4.6mm $\times$ 150mm、部品番号 863953-905。
3. Zorbax Rapid Resolution HT StableBond CN、1.8 μm 、4.6mm $\times$ 50mm、部品番号 827975-905。

参考文献

1. 米国薬局方 (USP) 27-NF22、p. 1493

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 27, 2006
5989-5098.JAJP



Agilent Technologies