

Application News

No. L526

高速液体クロマトグラフィー

Prominence™ UFPLCによる イブプロフェンと類縁物質の分取精製

LC による分取精製は、医薬品の合成や天然物中の有効成分の探索、微量の未知化合物の構造解析など、医薬食品化学といった分野で広く用いられる手法です。Prominence™ UFPLC*1（以下、UFPLC）は分取に加え濃縮、精製、回収など分取に関わる工程を自動化することにより、分取精製の大幅な省力化を可能としました。本稿では UFPLC のアドバンスシステム（図 1）を用い医薬品イブプロフェンとその類縁物質の混合試料を分取精製した例を紹介します。

*1 UFPLC：Ultra Fast Preparative and Purification Liquid Chromatograph の略
N. Kosuke



図 1 Prominence UFPLC（アドバンスシステム）

UFPLC による分取精製の流れ

UFPLC は分取 LC にトラップカラムを組み合わせ、分取に関わる様々な工程を自動で実施するシステムです。以下に各工程の詳細を示します。

1. 分取 LC により混合試料中の成分を分離し目的成分をトラップカラムに導入
 2. トラップカラム内を超純水で置換
 3. 有機溶媒によりトラップカラムから目的成分を溶出
- 各工程の概略を図 2 に示します。

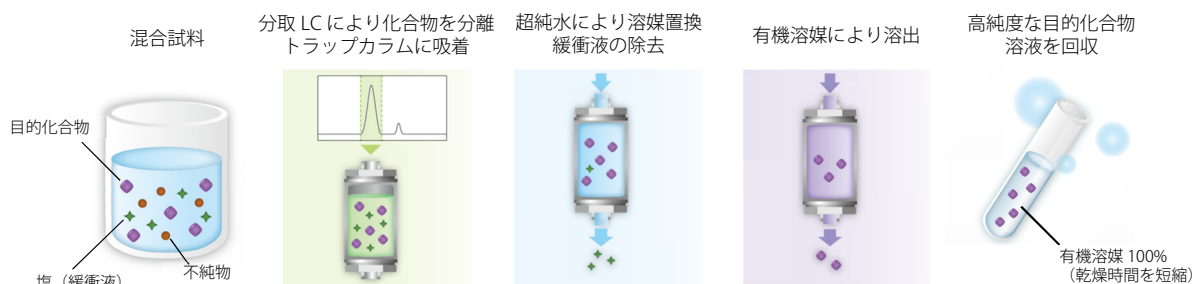


図 2 Prominence UFPLC による分取・濃縮・精製・溶出の流れ

■ イブプロフェンと類縁物質の分取精製

イブプロフェンは非ステロイド系抗炎症剤 (NSAIDs) の一種で解熱や鎮痛剤として使用されている医薬品です。USP にはイブプロフェンと類縁物質である 4-イソブチルアセトフェノン、また内部標準物質としてバレロフェノンを添加した試料の分析法が記載されています。本稿では UFPLC によりこれら 3 成分の混合溶液からそれぞれの成分を分取精製しました（図 3）。

表 1 に分取精製条件、図 4 に混合溶液の分取クロマトグラムを示します。混合溶液は対象とした 3 成分を移動相で溶解し、各成分が 5000 mg/L になるよう調製しました。

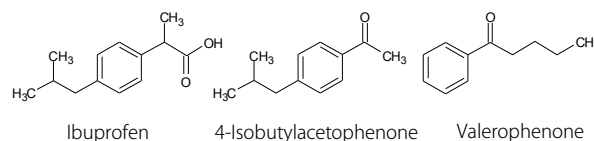


図 3 イブプロフェンと類縁物質の構造式

表 1 分取精製条件 (UFPLC)

Prep LC conditions	
Column	: Shim-pack™ VP-ODS (250 mmL × 10.0 mmI.D., 5 μm)
Mobile phase	: A: 1% (wt/v) chloroacetic acid aq. sol. (pH 3.0 adjusted with ammonium hydroxide) B: Acetonitrile A/B = 2/3 (v/v)
Flow rate	: 9.0 mL/min
Column temp.	: Ambient
Injection vol.	: 100 μL
Detection	: UV 230 nm (prep cell)
Rinse conditions	
Column	: Shim-pack™ C2P-H (30 mmL × 20 mmI.D., 25 μm)
Rinse solvent	: A: 2% (v/v) acetonitrile aq. sol., B: water
Time program	: A 15 mL/min (0-2 min) → A 8 mL/min (2.01-4 min) → B 8 mL/min (4.01-8 min)
Elution conditions	
Eluent	: acetonitrile
Flow rate	: 4.5 mL/min
Detection	: UV 230 nm (prep cell)

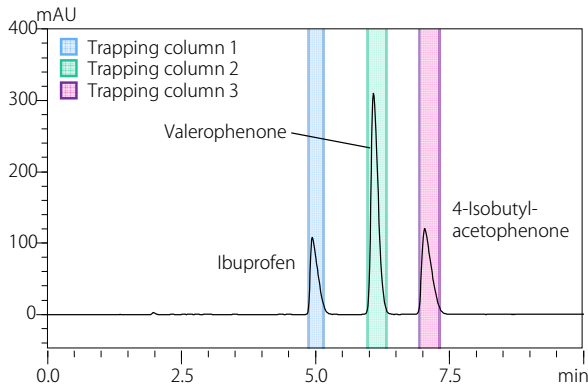


図4 イブプロフェンと類縁物質の分取クロマトグラム (UFPLC)

■ イブプロフェンと類縁物質の純度確認

UFPLCにより回収したイブプロフェン、バレロフェノン、4-イソブチルアセトフェノンの画分を“Prominence”により分析し、純度確認を行いました。表2に分析条件を示し図5にクロマトグラムを示します。また表3にそれぞれの画分に含まれる目的成分の純度を面積百分率 (UV 230 nm) で示します。

表2 純度確認の分析条件 (Prominence)

Column	: Shim-pack™ VP-ODS (250 mmL. × 4.6 mmL.D., 5 μm)
Mobile phase	: A: 1 % (wt/v) chloroacetic acid aq. sol. (pH 3.0 adjusted with ammonium hydroxide) B: acetonitrile A/B = 2/3 (v/v)
Flow rate	: 2.0 mL/min
Column temp	: 30 °C
Injection Vol.	: 10 μL
Detection	: UV 230 nm (analytical cell)

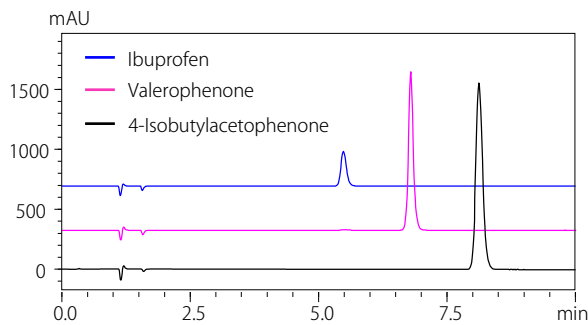


図5 UFPLCにより得られた各画分のクロマトグラム (Prominence)

表3 画分に含まれる目的成分の純度 (面積百分率 UV 230 nm)

	Area %
Ibuprofen	99.2
Valerophenone	99.6
4-Isobutylacetophenone	99.8

■ UFPLC と分取 LC の画分乾燥時間の比較

混合物を分取 LC により分離し回収した際、画分を次工程で使用するため溶媒を乾燥させることがあります。しかし、従来の逆相分取 LC では移動相に水を含んでいるため、乾燥に多大な時間を要します。また移動相に不揮発性の緩衝液を使用していた場合、乾燥後その塩が析出することがあります。UFPLC による分取精製ではトラップカラム上で脱塩を行うため分離工程で使用した不揮発性の塩を除去することが可能で、トラップカラムからのサンプル回収には有機溶媒を使用するため乾燥時間が大幅に短縮されます。

乾燥時間の短縮を確認するため、UFPLC で回収したイブプロフェンの画分を遠心濃縮機で乾燥しました。また標準的な分取 LC でイブプロフェン溶液を回収した場合の画分の乾燥時間を計測し、その長さを比較しました。標準的な分取 LC の画分は乾燥に約 180 分を要したのに対し UFPLC の画分は約 20 分で乾燥が完了しました (図6)。またそれぞれの乾燥物を確認すると、分取 LC の画分からは移動相として使用したクロロ酢酸とアンモニアの塩が析出し、そのままでは次工程で使用できない状態でした。一方、UFPLC の画分はトラップカラム上で脱塩を行っているため、乾燥後にイブプロフェン単体の結晶を確認することが出来ました (図7)。

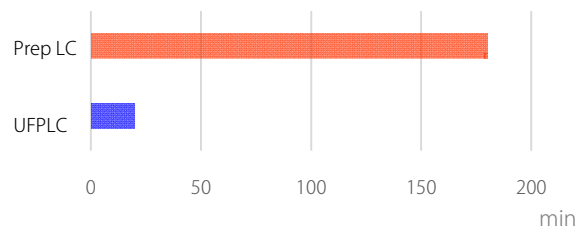


図6 溶媒乾燥時間の比較

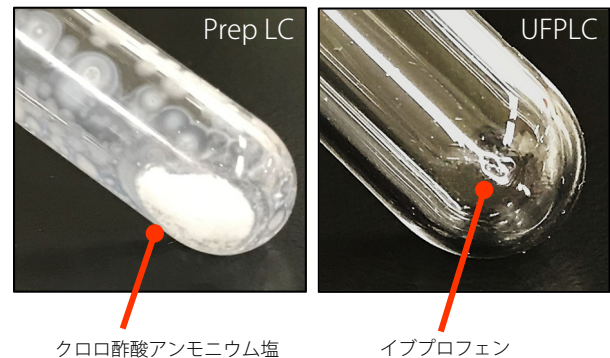


図7 イブプロフェン画分の乾燥後の状態

Prominence および Shim-pack は、株式会社 島津製作所の商標です。