



Hydroxychloroquine逆相分析のメソッド最適化例

—揮発性移動相条件での高速分析—

株式会社ワイエムシー

(F140925J)

はじめに

ヒドロキシクロロキンは1955年に米国で承認され、現在、全世界70か国以上でマラリアや全身性エリテマトーデス、皮膚エリテマトーデスをはじめとして、様々な病態に用いられています。日本国内では未承認ですが、2014年8月8日に製造販売承認申請が行われたことが発表されています¹⁾。

ヒドロキシクロロキンの分析方法としては、USP（The United States Pharmacopeia；米国薬局方）の「Hydroxychloroquine Sulfate Tablets」 Assayの項でHPLC法が規定されています。このUSP分析条件では移動相に不揮発性のイオンペア試薬が使用されているため、LC-MS(MS)に適応できません。

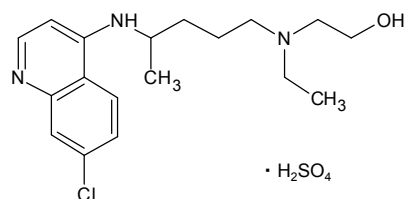
そこで今回、有機シリカハイブリッドカラムTriart C18とLC-MS(MS)に適応可能な揮発性移動相を用いて、ヒドロキシクロロキンおよびクロロキン混合物の分離メソッド最適化、および高速化を検討しましたのでご紹介します。

¹⁾ サノフィ株式会社 2014年8月8日付 プレスリリース

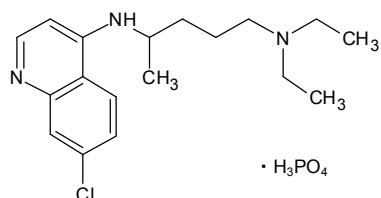
Triart C18カラムによる分析メソッドスクリーニング

HPLC条件

Column : **Triart C18 1.9 μ m** (50 X 2.0 mmI.D)
Eluent : A) 20 mM formate buffer
B) acetonitrile or methanol
5-95%B (0-10 min), 5%B (10-20 min)
Flow rate : 0.2 mL/min
Temperature : 25°C
Detection : UV at 254 nm
Injection : 4 μ L (50 μ g/mL)
Sample : 1. Hydroxychloroquine sulfate
2. Chloroquine phosphate



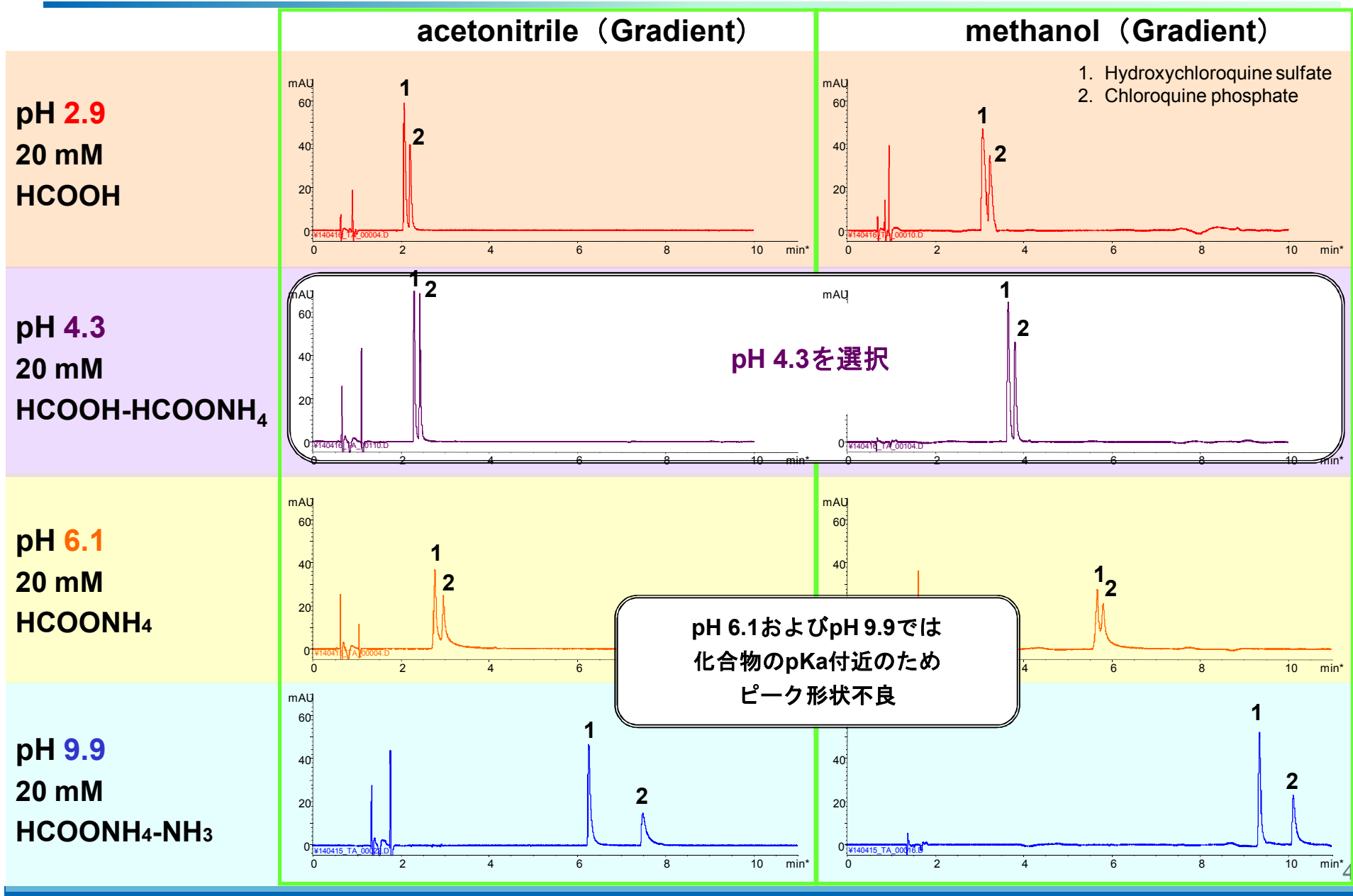
Hydroxychloroquine sulfate
(pKa1 = 7.28)
(pKa2 = 9.76)



Chloroquine phosphate
(pKa1 = 7.29)
(pKa2 = 10.32)

移動相条件のスクリーニング

Triart C18 X 移動相 (pH, 有機溶媒の種類)



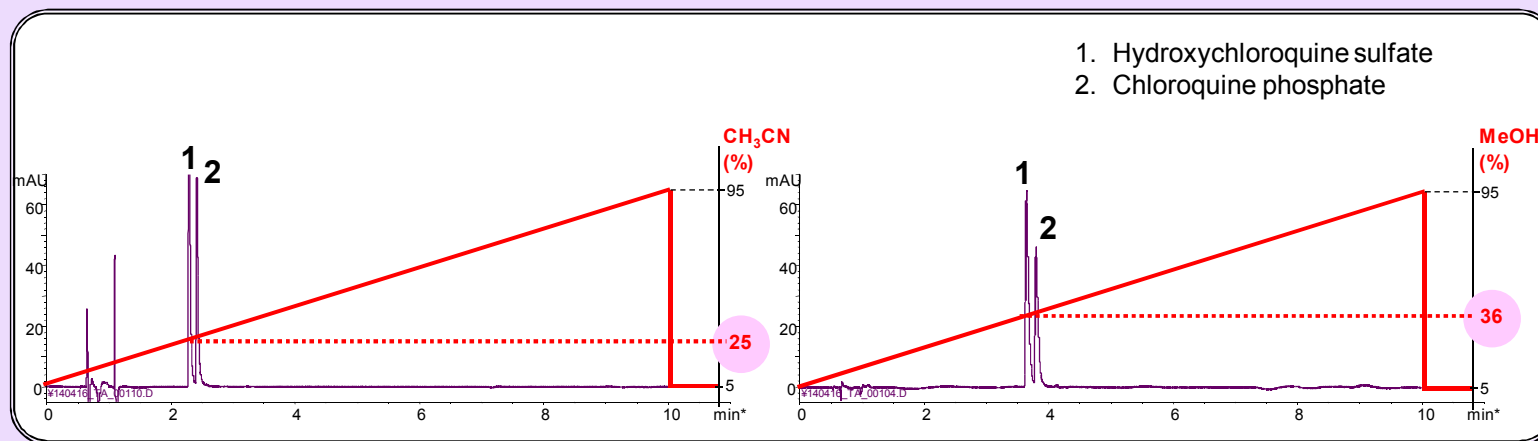
移動相条件の最適化 有機溶媒の選定と濃度の調整

スクリーニング結果

acetonitrile (Gradient)

methanol (Gradient)

pH 4.3
20 mM
HCOOH-HCOONH₄



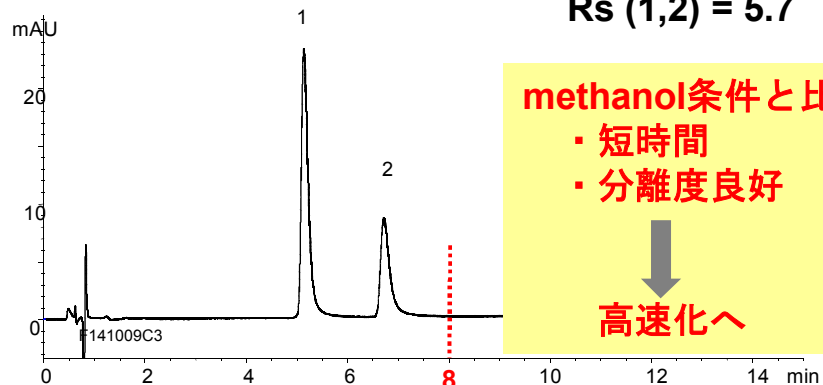
GradientからIsocratic条件に移行



Gradient条件で溶出する有機溶媒濃度(%)よりも
15~20%低い濃度から検討

20 mM HCOOH-HCOONH₄ (pH 4.3)/acetonitrile (90/10)

Rs (1,2) = 5.7



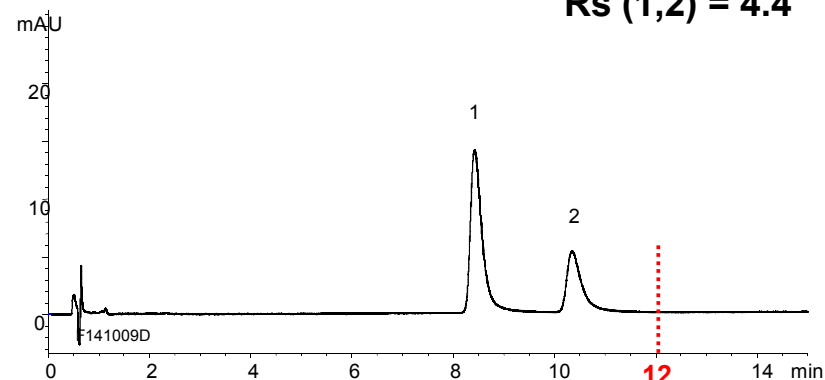
methanol条件と比較して

- ・ 短時間
- ・ 分離度良好

高速化へ

20 mM HCOOH-HCOONH₄ (pH 4.3)/methanol (85/15)

Rs (1,2) = 4.4



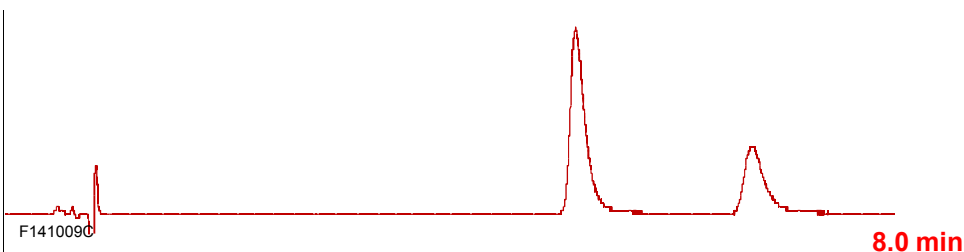
分析の高速化

Column : Triart C18 1.9 μ m, 50 X 2.0 mm I.D.

Eluent : 20 mM HCOOH-HCOONH₄ (pH 4.3)/acetonitrile (90/10)

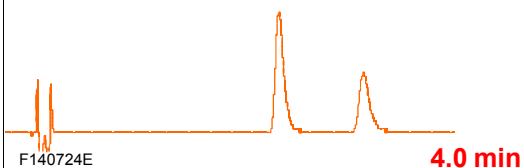
0.2 mL/min

16.6 MPa
(2,410 psi)



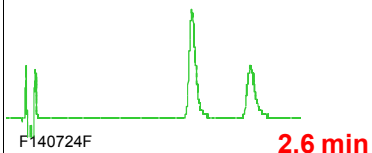
0.4 mL/min

31.0 MPa
(4,500 psi)



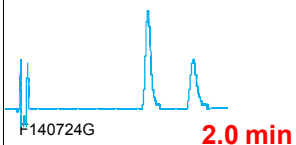
0.6 mL/min

44.3 MPa
(6,430 psi)



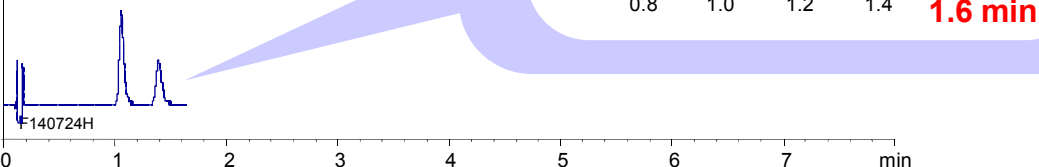
0.8 mL/min

57.2 MPa
(8,300 psi)



1.0 mL/min

69.0 MPa
(10,000 psi)



1. Hydroxychloroquine sulfate
2. Chloroquine phosphate

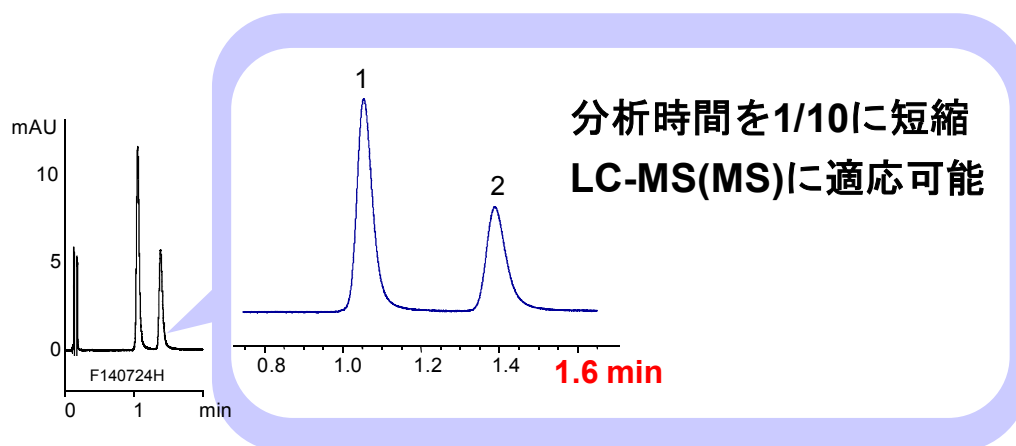
Temperature : 25°C
Detection : UV at 254 nm
Injection : 2 μ L (10 μ g/mL)

USPメソッドとの比較

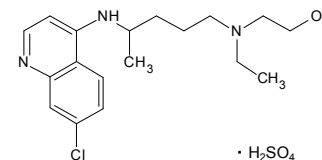
YMCメソッド

: 揮発性の移動相, UHPLC用カラム

Triart C18 1.9 μm , 50 X 2.0 mmI.D.

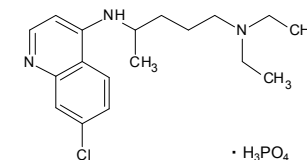


1



Hydroxychloroquine sulfate

2



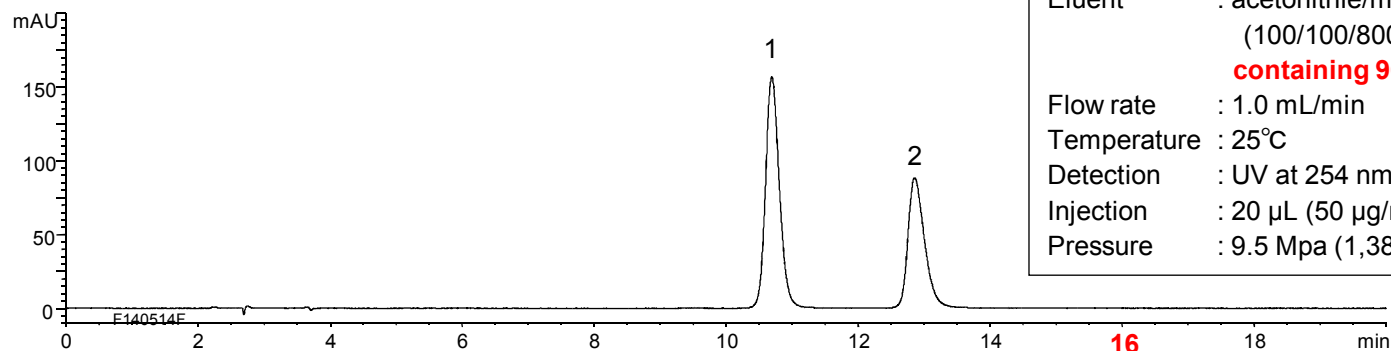
Chloroquine phosphate

Eluent : 20 mM HCOOH-HCOONH_4 (pH 4.3)/acetonitrile (90/10)
Flow rate : 1.0 mL/min
Temperature : 25°C
Detection : UV at 254 nm
Injection : 2 μL (10 $\mu\text{g/mL}$)
Pressure : 69.0 MPa (10,000 psi)

USPメソッド

: 不揮発性の移動相, コンベンショナルカラム

Triart C18 5 μm , 250 X 4.6 mmI.D.



Eluent : acetonitrile/methanol/water/phosphoric acid (100/100/800/2)
containing 96 mg of sodium 1-pentanesulfonate
Flow rate : 1.0 mL/min
Temperature : 25°C
Detection : UV at 254 nm
Injection : 20 μL (50 $\mu\text{g/mL}$)
Pressure : 9.5 Mpa (1,380 psi)