

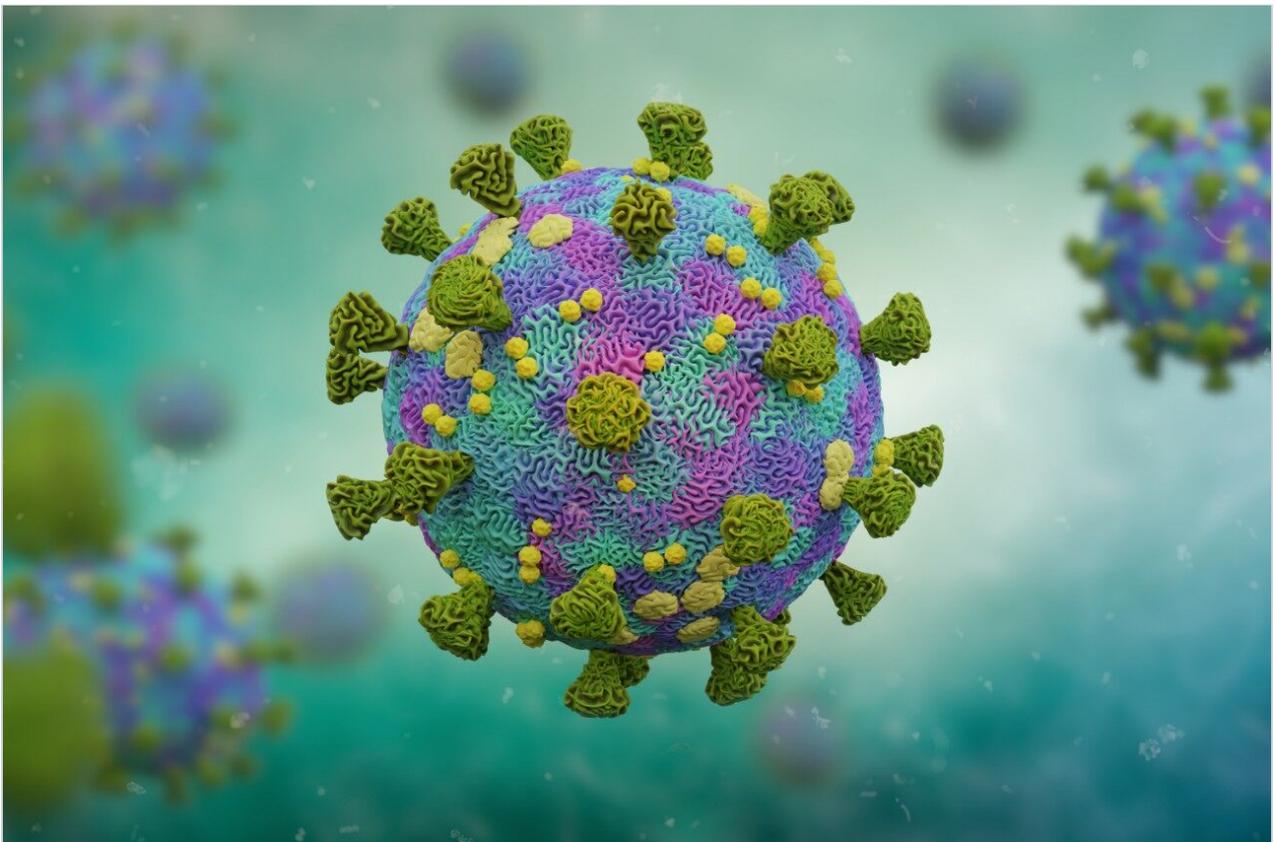
アプリケーションノート

## COVID-19 を理解する： Atlantis PREMIER BEH C<sub>18</sub> AX ミックスモードカラムを用いた Umifenovir の分析

---

Bonnie A. Alden, Matthew A. Lauber, Thomas H. Walter

日本ウォーターズ株式会社



---

要約

新型コロナウイルス感染症の世界的なパンデミックにより、SARS-CoV-2 感染症治療のための低分子薬剤の転用に焦点を当てた幅広い研究が開始されました。インフルエンザの治療や予防のために開発された抗ウイルス薬に対する、新型コロナウイルスの研究に取り組んでいる人々の関心が高まっています。商品名 Arbidol<sup>®</sup> で販売されている Umifenovir は、新型コロナウイルス感染症の臨床試験での他の薬剤との併用について、現在調査中の抗ウイルス剤の 1 つです<sup>1</sup>。新型コロナウイルス感染症の治療での臨床的結果に関わらず、ウォーターズでは、2 つの塩基性基を持つ Umifenovir の分析にミックスモードクロマトグラフィーを使用する利点を実証しています。本研究では、ミックスモードの固定相を使用することで、Umifenovir について、従来の逆相充填剤と比較してよりシャープなピークが得られることを説明しています。

## アプリケーションのメリット

C<sub>18</sub> カラムの代わりに Atlantis PREMIER BEH C<sub>18</sub> AX カラムを使用することで、以下のようなメリットを得ることができます。

- Umifenovir のピークが、大幅にシャープになり対称性が良くなる
- Umifenovir の溶出が速くなる

---

## はじめに

ミックスモードクロマトグラフィー（MMC）は、複数の保持メカニズムがある分離法を開発するために適用できる技法です。Atlantis PREMIER BEH C<sub>18</sub> AX カラムには、架橋エチレンハイブリッド粒子ベースのミックスモード逆相/陰イオン交換固定相が含まれています<sup>2</sup>。固定相には C<sub>18</sub> 基だけでなく、第三級アルキルアミン基も含まれており、約 pH 8 未満で強い正の表面電荷が生成されます。この正の表面電荷により、従来の逆相充填剤と比較して、イオン化した酸性物質などの陰イオンの保持力が高まり、プロトン化塩基性物質などの陽イオンの保持力が低下します。Umifenovir などの塩基性の分析種では、表面チャージハイブリッド（CSH）固定相で以前実証されているように、正の表面電荷によってピーク形状とローダビリティも向上します<sup>3</sup>。このアプリケーションブリーフでは、Atlantis PREMIER BEH C<sub>18</sub> AX カラムを使用して得られる Umifenovir のピーク形状とピーク幅を、従来の C<sub>18</sub> 逆相カラム ACQUITY UPLC HSS T3 で得られたものと比較します。

---

## 実験方法

Umifenovir の分析には以下の実験条件を用いました。

### LC 条件

LC システム:	ACQUITY UPLC H-Class Bio
検出:	ACQUITY UPLC PDA 検出器
バイアル:	ポリプロピレンプラスチック、700 $\mu$ L
カラム:	Atlantis PREMIER BEH C <sub>18</sub> AX、 1.7 $\mu$ m、95 Å、2.1×50 mm  ACQUITY UPLC HSS T3、 1.8 $\mu$ m、100 Å、2.1×50 mm
カラム温度:	30 °C
サンプル:	100 $\mu$ g/mL Umifenovir および 0.1% ギ酸含有 50% アセトニトリル
サンプル温度:	12 °C
サンプル注入量:	1 $\mu$ L
流速:	0.3 mL/分
移動相	10 mM ギ酸アンモニウム 含有 30% アセトニトリル (pH 3.0)

---

## 結果および考察

ミックスモードクロマトグラフィーでは、移動相の pH とバッファー濃度を調整することで、イオン性化合物の選択性を広範囲にわたって変化させることができます。これは、MMC を使用する分析法を開発する際に考慮する必要がある最も重要なツールの 1 つです。この例では、pH 3 の移動相を使用しており、Atlantis BEH C<sub>18</sub> AX 固定相には正の表面電荷があります。この正の表面電荷は、従来の逆相充填剤と比較して、プロトン化した Umifenovir のような陽イオンの保持を低下させます。

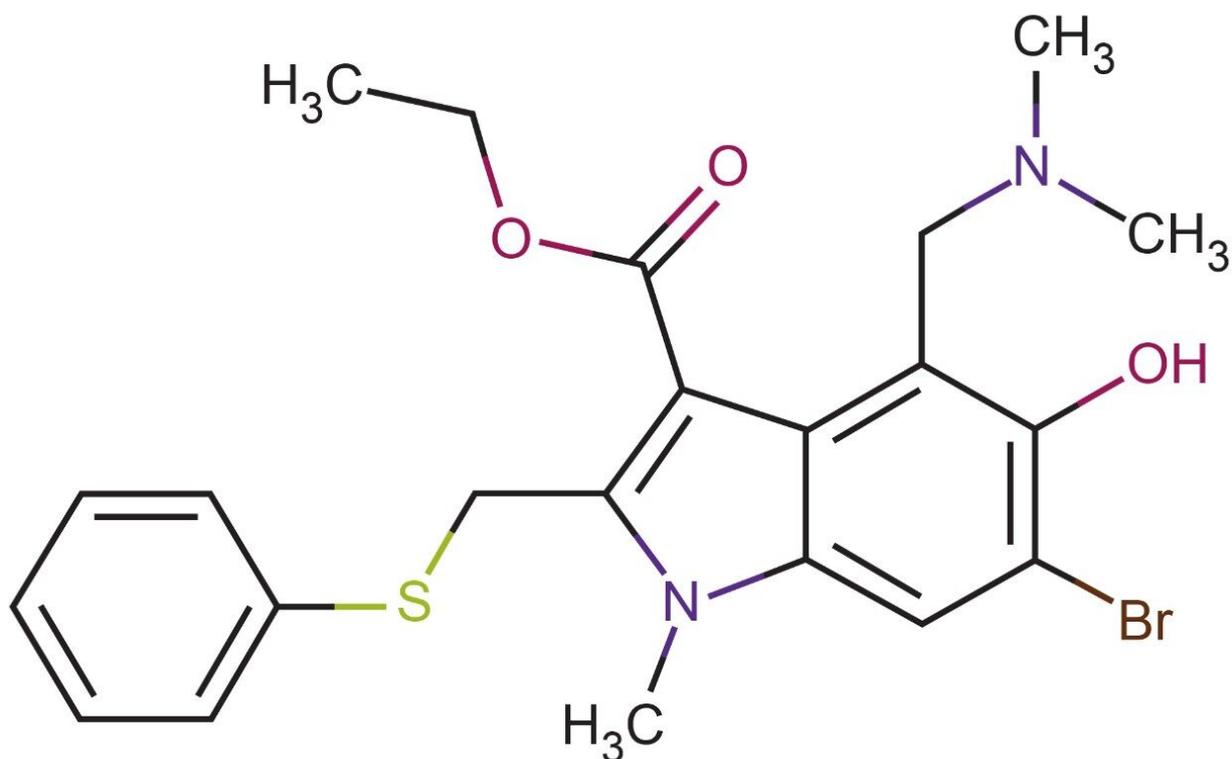


図 1. Umifenovir の構造 (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB13609>)

両方のカラムで同じアイソクラティッククロマトグラフィー条件を使用した場合、正に荷電した Umifenovir は、イオン反発の結果、Atlantis PREMIER BEH C<sub>18</sub> AX カラムにあまり保持されないことが判明しました。オンカラムで 0.1 μg をロードすると、このミックスモードカラムでは、ACQUITY UPLC HSS T3 カラムを使用した場合よりも、はるかにピークの幅が狭く、対称性が良くなりました。これらの違いは図 2 のクロマトグラムで容易に確認できます。ACQUITY UPLC HSS T3 カラムでの Umifenovir のピーク幅が 59 秒であったのに対し、Atlantis PREMIER BEH C<sub>18</sub> AX カラムでは 6.9 秒でした。

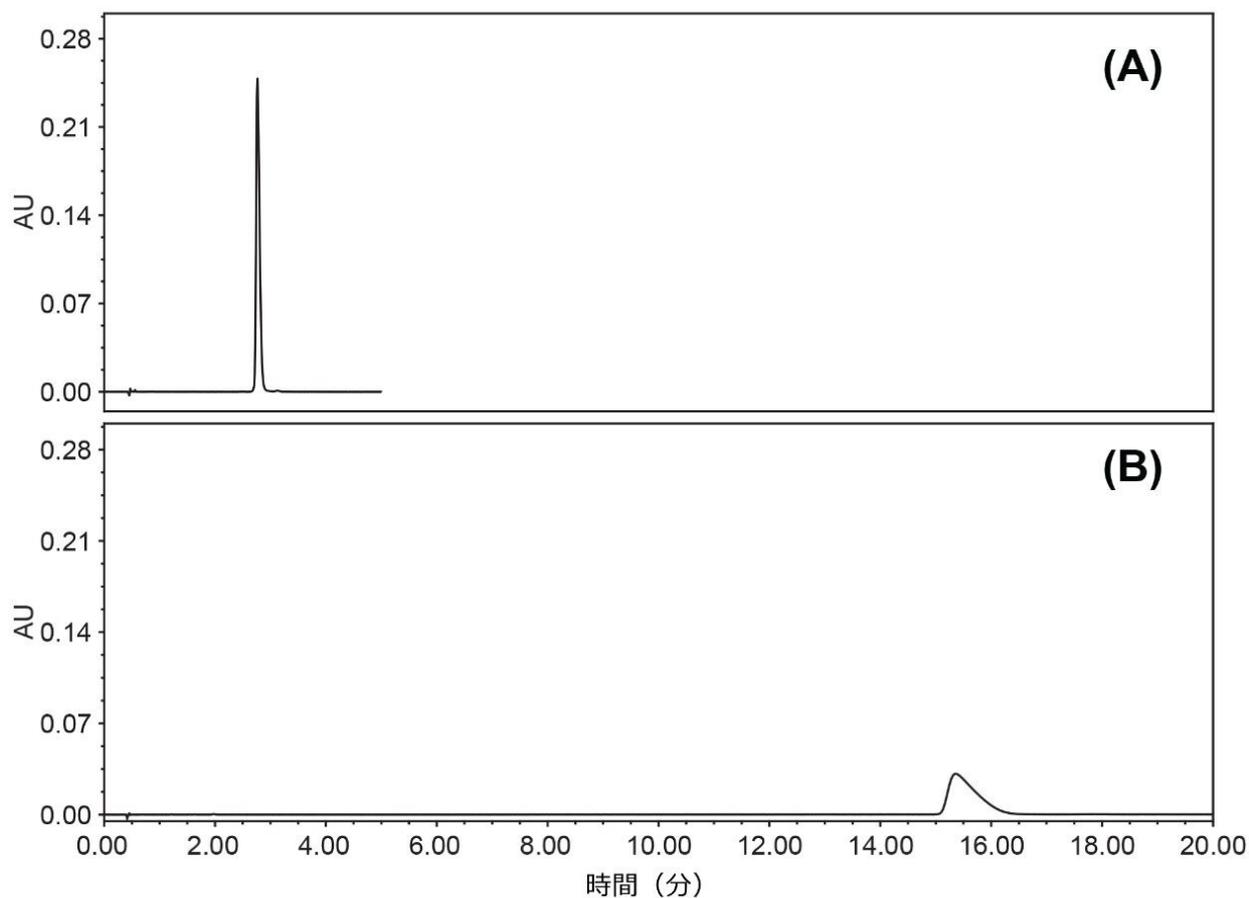


図 2. (A) Atlantis PREMIER BEH  $C_{18}$  AX カラム、および (B) ACQUITY UPLC HSS T3 カラムで、10 mM ギ酸アンモニウム含有 30% アセトニトリル溶液 ( $pH$  3.0) の同等のクロマトグラフィー条件を使用した場合の、Umifenovir のピーク形状の比較

この試験条件では、ACQUITY UPLC HSS T3 カラムの方でより高い保持係数 (約 39) が得られました。保持係数を Atlantis PREMIER BEH  $C_{18}$  AX カラムで得られた値と対比できるようにするため、(バッファー強度と pH はそのままにして) 移動相のアセトニトリル含有量を 40% に増加しました。得られたクロマトグラムを図 3B に示します。Umifenovir のピーク幅が大幅に減少しましたが、それでも Atlantis PREMIER BEH  $C_{18}$  AX カラムで得られたピークよりも約 50% 広がっています。

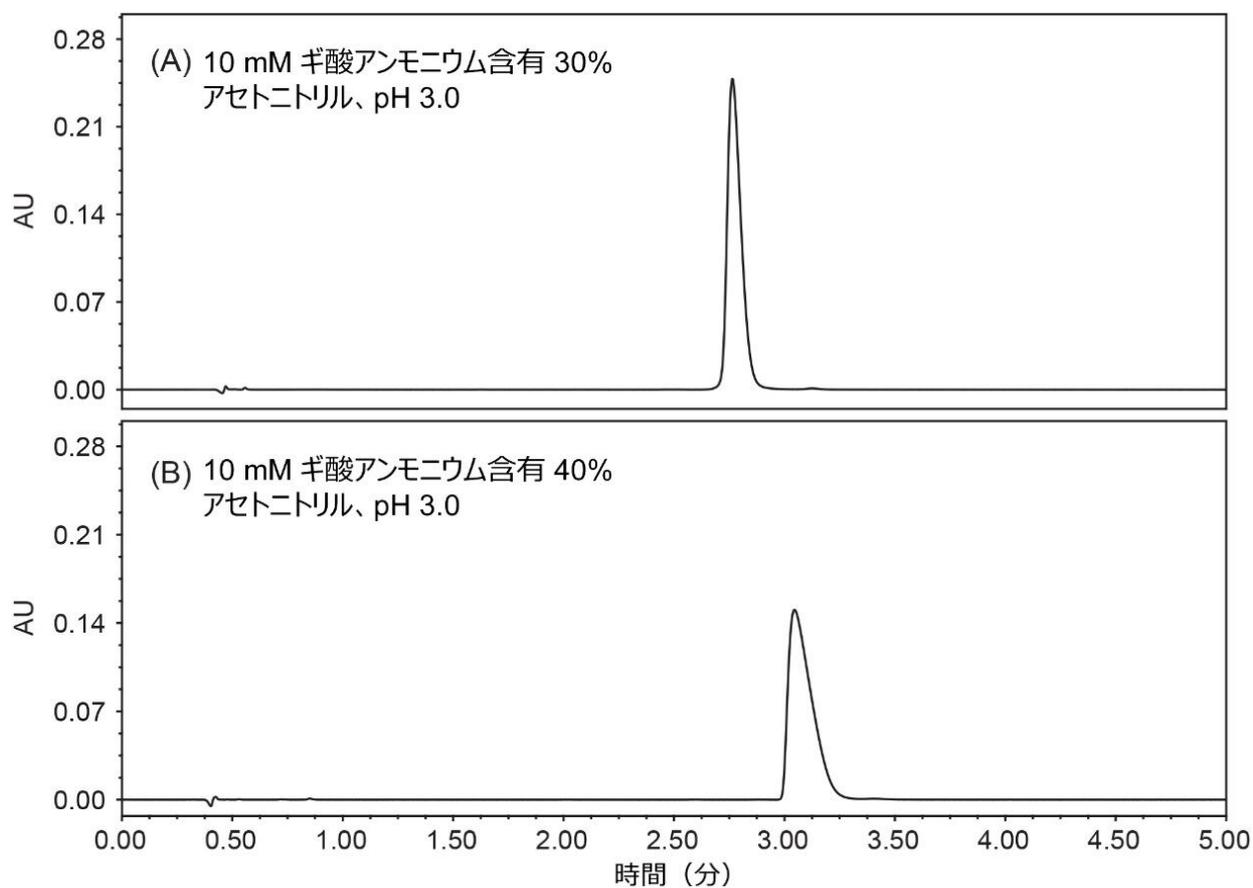


図 3. (A) Atlantis PREMIER BEH C<sub>18</sub> AX カラムと (B) ACQUITY UPLC HSS T3 カラムを使用した場合の、同等の保持係数での *Umifenovir* のピーク形状の比較

Atlantis PREMIER BEH C<sub>18</sub> AX カラムにより、幅が狭く、対称の *Umifenovir* ピークが得られました。この場合の USP テーリング係数は 1.5 と測定されましたが、ACQUITY UPLC HSS T3 カラムを使用したときは必ず、移動相組成に関係なく、USP テーリング係数は 2 を超えていました。

## 結論

Atlantis BEH C<sub>18</sub> AX などのミックスモード固定相により、独特の選択性が得られて既存の RP 固定相が補完され、分析法開発時のカラムのスクリーニングに有用です。Atlantis PREMIER BEH C<sub>18</sub> AX カラムは、イオン性酸性物質を保持する能力に加え、プロトン化塩基についてもシャープで対称的なピークを生成することができるため、さまざまな種類の化合物のクロマトグラフィー分離法を開発する際には、対象が極性の酸性物質か *Umifenovir* のような疎水性塩基性物質かに関わらず、このカラムを検討する価値があります。

---

## 参考文献

1. Liu, C. *et al.* *Research and Development on Therapeutic Agents and Vaccines for COVID-19 and Related Human Coronavirus Diseases.* *ACS Central Science* 2020, 6 (3), 315-331.
2. Walter, T.H. *et al.* *A New Mixed-Mode Reversed-Phase/Anion-Exchange Stationary Phase Based on Hybrid Particles* Waters Application Note 720006742EN <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/a-new-mixed-mode-reversed-phase-anion-exchange-stationary-phase-based-on-hybrid-particles.html>>
3. Iraneta, P. C.; Wyndham, K. D.; McCabe, D. R.; Walter, T. H. *A Review of Waters Hybrid Particle Technology. Part 3. Charged Surface Hybrid (CSH) Technology and its Use in Liquid Chromatography.* Waters White Paper 720003929EN <[https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=10167251&locale=en\\_US](https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=10167251&locale=en_US)> , 2011.

---

## ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio システム <<https://www.waters.com/10166246>>

ACQUITY UPLC PDA 検出器 <<https://www.waters.com/514225>>

720006980JA、2020年8月