

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15267

研究課題名（和文）シングルリファレンスHPLC法による新たなパターン認識の開発と製剤検査の応用

研究課題名（英文）Development of New Pattern Recognition and Application to Formulation Testing Using Single Reference HPLC Method

研究代表者

高橋 未来（Takahashi, Miki）

国立医薬品食品衛生研究所・食品部・任期付研究員

研究者番号：70907047

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、カンナビジオール（CBD）を中心とした5種類のカンナビノイド類をターゲット物質とし、Single Reference（SR）-HPLC定量法の開発を試みた。まず、リファレンスデザイン（DoR）によるSRの獲得を目指した。その結果、分析対象物質であるCBDをヨードメタンと反応させた結果、CBDのメチル誘導体を入手することができた。次いで、5種類のカンナビノイド類についてLC分離を検討した。一般的なODSカラムでは化学構造の類似性の高いカンナビノイド類の分離は困難であったため、立体構造の認識能が高いInertsil ODS-Pカラムを用いた結果、いずれも良好な分離が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「分析対象物質の標準品が無ければ定量できない」を解決するため、SRに対する分析対象物質の相対モル感度算出するSR-HPLC定量法をこれまで開発してきた。しかし、SR-HPLC定量法において、SRの選択基準に適合する物質を見つけることが困難であった。そこで、分析対象物質の吸収極大に関連する化学構造をターゲットとして、DoRを基盤としたSR-HPLC法を開発した。これにより、容易にSR-HPLC用のリファレンスを入手することが可能となり、より簡便かつ汎用性のある定量法の普及に貢献できる。そして、健康食品や医薬品などの品質管理に活用でき、人々の安全性を確保及び健康増進に寄与できると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop a Single Reference (SR)-HPLC quantification method focusing on five types of cannabinoids, primarily cannabidiol (CBD). Initially, we aimed to obtain SR through the Design of Reference (DoR). As a result, by reacting the target analyte CBD with iodomethane, we successfully obtained a methyl derivative of CBD. Subsequently, we examined the LC separation of the five types of cannabinoids. Using a conventional ODS column, the separation of cannabinoids, which have highly similar chemical structures, was challenging. Therefore, we utilized the Inertsil ODS-P column, which has a high recognition ability for stereostructures, resulting in satisfactory separation of all cannabinoids.

研究分野：分析化学

キーワード：液体クロマトグラフィー 定量分析 シングルリファレンス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、「定量法」に関する議論が、医薬品や生薬成分などの規格基準の成分分析において国内で活発になっている。定量法には容量分析、スペクトル解析及び分離分析などがあり、中でも高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が最も普及している。HPLC は、信頼性が高く汎用性のある分析法であるが、検量線のための標準品が必要であるという懸念点が存在する。つまり、標準品が入手困難または高額である場合、HPLC を用いた定量が難しい。これに対して、新たに光学系検出を利用した相対モル感度係数 (RMS) に基づく HPLC 定量法を考案してきた。この方法では、リファレンス標準と測定対象物質のピーク比率を利用し、検量線の傾きから RMS を算出して定量する。この技術は Single Reference (SR-)HPLC 法と呼ばれ、標準品が入手困難な物質に対しても適用可能である。しかしながら、リファレンスの選択と設定に問題があった。それは、分析対象物質と同じ検出波長を用いることができる最適なリファレンスを見つけることが困難であったことである。それゆえに、SR-HPLC 法は吸収波長を持つ化合物に幅広く応用できる可能性があるが、その応用例は未だに少ないことが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分析対象物質の吸収ピークに関連する化学構造を対象にした、新しい「リファレンスデザイン (Design of Reference, DoR)」を基盤とする SR-HPLC 法を開発することである。具体的には、測定対象物質の化学構造式から、吸収ピークに関わる化学構造をリード化合物として選定し、その吸収帯に影響を与えず、HPLC の保持時間を調整できる官能基 (メチル基、エチル基、水酸基など) を追加することで、独自のリファレンス化合物を設計する。分析化学と有機合成を組み合わせるこのアプローチにより、SR-HPLC 用のリファレンスを簡単に取得でき、簡便かつ汎用性の高い定量法の普及に寄与することができる。そこで、本研究では、カンナビノイド類に着目した (図 1)。これらはマリファナの主成分であるテトラヒドロカンナビノール (THC) と異なり麻薬成分ではなく、精神作用を持たない鎮静効果を持つ。そのため、近年、健康食品やサプリメント等で注目されている。そこで、図 1 で示したカンナビノイド類の中で、カンナビジオール (CBD)、カンナビゲロール (CBG)、カンナビノール (CBN)、カンナビジオール酸 (CBDA) 及びカンナビゲロール酸 (CBGA) を分析対象物質とした。

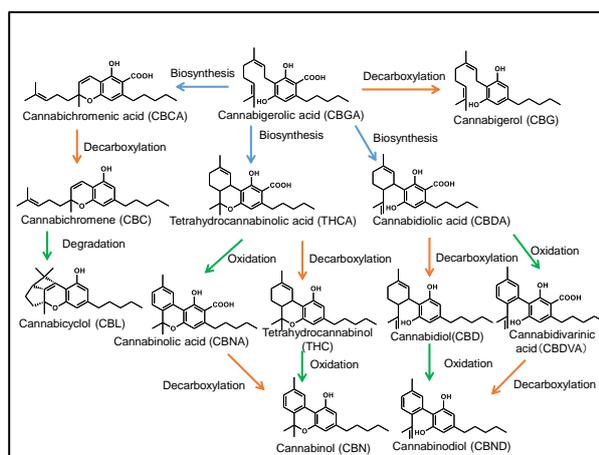


図 1 主要なカンナビノイド類

3. 研究の方法

・ 試料及び試薬

CBD (1.0 mg/mL)、CBN (1.0 mg/mL) は、Sigma-Aldrich 製を入手した。CBG (1.0 mg/mL)、CBN (1.0 mg/mL)、CBGA (1.0 mg/mL) 及び CBDA (1.0 mg/mL) は Cerilant 製を入手した。メタノールを用いて Stock solution (50 µg/mL) を調製し、-80°C に保存した。アセトニトリル (HPLC 用)、アセトン (特級)、メタノール (HPLC 用)、ギ酸 (LC/MS 用、約 99%)、ヨードメタン及び酢酸 (LC/MS 用、約 99%) は富士フイルム和光純薬製を用いた。超純水は PURELAB flex5 system (ELGA 製) を用いて得た。

・ 装置

HPLC 装置：島津製作所製 HPLC-20AD/SIL-20AC/RF-10AXL/CBM-20A/SPD-M20A/CTO-10AS
LC-MS 装置：Waters 製 Acquity H-Class/PDA e λ/Xevo TQD

・ HPLC 分析

移動相：0.1 vol%ギ酸水/0.1 vol%ギ酸含有メタノール溶液
分析カラム：Inertsil ODS-P (4.6×150 mm、5 µm、GLサイエンス製)
カラム温度：40°C
流速：1.0 mL/min
検出波長：254 nm
注入量：10 µL
希釈溶媒：メタノール/水 (50/50、V/V) 混液

なお、分析カラムの分離検討として、本カラム以外に TSKgel ODS-100Z (4.6×150 mm、5 μm、東ソー製)、InertSustain C18 (4.6×150 mm、5 μm、GL サイエンス製) 及び XBridge (4.6×150 mm、5 μm、Waters 製) を用いた。

・ LC-MS/MS 分析

移動相: 0.1 vol%ギ酸水/0.1 vol% ギ酸含有アセトニトリル溶液
 分析カラム: Inertsil ODS-HL (2.1×150 mm、3 μm、GL サイエンス製)
 カラム温度: 40°C
 流速: 0.2 mL/min
 注入量: 5 μL
 イオン化モード: ESI (+)
 モニターイオン: m/z 315→193
 キャピラリー電圧: 2.0 kV
 ソース温度: 150°C
 ディソルベーション温度: 400°C
 希釈溶媒: メタノール/水 (50/50、V/V) 混液

4. 研究成果

(1) まず、分析対象化合物に最適な SR を入手するため、DoR を中心に研究を遂行した。DoR では、分析対象化合物について吸収極大に参与する化学構造に着目し、その吸収帯に影響を及ぼさない、かつクロマトグラフィーの保持時間を調節可能な官能基 (アルキル基) を導入することを検討した。CBD の化学構造式の 2 か所のヒドロキシ基に注目し、これらを有機合成によりメトキシ化することを試みた。具体的には、CBD とヨードメタン (CH₃I) を反応させ、生成物を単離精製した^①。そして、NMR 及び MS により構造決定し、HPLC のクロマトグラム上 (検出波長 254 nm) で生成物の純度を確認した。その結果、生成物は高純度なメトキシ化した CBD (純度 95%以上) であることを同定した。入手した生成物を CBD の SR として採用したかったが、当該の化合物は単離精製が難しく、収率がかなり低かった (約 30%)。そのため、CBD の部分的な構造に着目し、類似した化合物かつ高収率で得られる SR を模索していく必要がある。

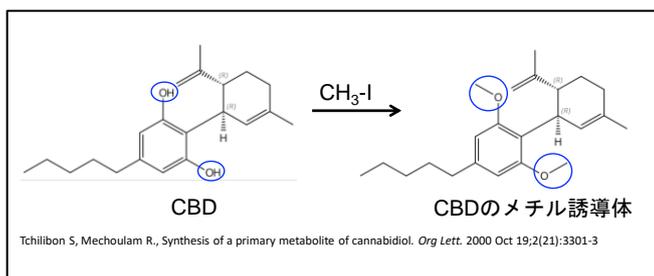


図 2 CBD をターゲットとした DoR

(2) 次に、分析対象物質であるカンナビノイド類について、最適な分析カラム及び移動相を検討した。まず、ODS カラム (カラムサイズは全て内径 4.6 mm、長さ 150 mm 及び粒子径 5 μm) を中心にカンナビノイド類の分離検討を実施した。その結果、いずれの ODS カラムにおいても CBDA、CBG 及び CBD の分離が困難であった (図 3)。これらは図 1 より、化学構造が類似しており、一般的な ODS カラムでは全ての対象物質を分離することは困難だと考えられた。そこで、化合物の立体構造の差を認識しやすい Inertsil ODS-P カラムを用いて分離を試みた。その結果、いずれのカンナビノイド類も分離度 1.5 以上であり良好な分離を示した。さらに、Inertsil ODS-P と同様に立体構造の認識能のある Inertsil ODS-HL も検討してみたが、こちらの分析カラムでは分離困難であった。以上より、本研究における分析カラムとして Inertsil ODS-P を採用することとした。

次に、移動相の有機溶媒系について、InertSil ODS-P カラムを用いてアセトニトリル又はメタノールの比較検証を実施した。その結果、アセトニトリルを用いた方が、シグナルノイズ比 (S/N) が高く、ピーク形状も良好であった。さらに、CBD と CBG の分離について、メタノールでは分離不可であったが、アセトニトリルでは分離度 1.5 以上の良好な分離が確認された。以上より、移動相の有機溶媒系として、アセトニトリルを用いることとした。

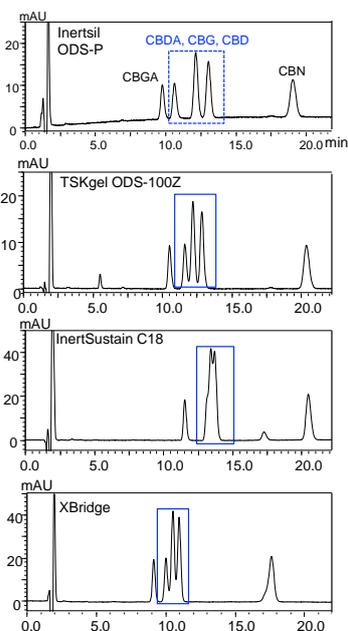


図 3 ODS カラムの分離検討

<引用文献>

^① Susanna Tchilibon and Raphael Mechoulam, Synthesis of a Primary Metabolite of Cannabidiol, *Org Lett.*, Vol. 2, No. 21, 2000, 3301-3303

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------