

パラオキシ安息香酸アルキルエステル（パラベン）類の
コアシェル型C18によるUHPLC分離及びキャピラリー GC-MS分析
－薬品機器分析学実習におけるパラベン試料の有用性－

西 博行・稲垣 昌宣

On the Separation of Alkylesters of Parahydroxybenzoic Acid (Parabens) by UHPLC
With Core-shell Particle C18 Columns and GC-MS With Capillary Columns:
Utility of Parabens as a Sample for the Practice of Instrumental Analysis

Hiroyuki NISHI and Masanori INAGAKI

Abstract

This paper describes separation of parabens (methyl (Me), ethyl (Et), isopropyl (iPr), propyl (nPr), and butyl (Bu) paraben) by UHPLC with core-shell particle C18 column and GC-MS with capillary column of a low polar liquid phase. High performance separation of parabens was successful within a few minutes by UHPLC. Theoretical plate height 5 μm (theoretical plate number 20000) was obtained by a 10 cm and 2.6 μm column with a low column pressure drop ($< 200 \text{ kg/cm}^2$). Retention order, $\text{Me} > \text{Et} > \text{iPr} > \text{nPr} > \text{Bu}$, was explained by the hydrophobic interaction between the column and each analyte. Complete separation of parabens was also obtained by GC-MS. Retention order in GC-MS was the same as in the UHPLC. Mass spectra by electron ionization (EI) of parabens showed an interesting result for McLaffaty rearrangement. That is, four of five parabens, which have a hydrogen atom at γ -position to $\text{C}=\text{O}$, gave a fragment ion peak at m/z 138. Me paraben having no hydrogen atom at γ -position did not give a fragment ion peak m/z 138. In conclusion, parabens were found to be useful as a sample for the practice of instrumental analysis to study both reversed-phase HPLC analysis and McLaffaty rearrangement in MS analysis with EI.

Keywords

Paraben, core-shell particle, UHPLC, GC-MS, McLaffaty rearrangement

1. はじめに

医薬、生薬、農薬、食品など、様々な物質の品質評価法として最も汎用されている分析法の一つにクロマトグラフィーがある。特に医薬品では、重要な品質評価項目である純度試験（類縁物質試験）や有効成分の定量法として、必須の分析法となっている。従来、滴定を中心とした容量

分析法により定量されていた医薬品原薬に対しても、最近では標準品を用いるクロマトグラフィーによる定量への切り替えが進んでいる。医薬品の品質評価試験法「規格及び試験方法」の例としては日本薬局方（日局）が参考になるが、日局収載の様々な医薬品の「規格及び試験方法」を見ると、最も汎用されているクロマトグラフィーは液体クロマトグラフィー（HPLC）で、ほぼ80%以上はオクタデシルシリル化シリカゲル（ODS、あるいはC18）カラムによる逆相HPLCを採用している¹⁾。

本学薬学部では、2年前期でクロマトグラフィーに関する全般的な基礎知識を講義により習得する。後期ではHPLC装置を用いて、逆相モードでの分離の基礎と医薬品（錠剤）の内標準法による定量について実習を行う。逆相HPLCの基礎では、医薬品などの保存剤として用いられるパラオキシ安息香酸アルキルエステル類（いわゆるパラベン）の混合物をテスト試料として、アルキル置換基の違いと溶出順及び分離における各種パラメーター（保持時間 t_R 、キャパシティーファクター k 、分離係数 a 、分離度 R_s 、理論段数 N 、シンメトリー係数 S ）の算出、分離での有機溶媒の割合の影響を学習する。その他のクロマトグラフィーとして、薄層クロマトグラフィー（TLC）による医薬品製剤分析、オープンカラムクロマトグラフィーによる色素の分離、さらにガスクロマトグラフィー - 質量分析法（GC-MS）の基礎など、様々なクロマトグラフィーについても薬学実習では学修する²⁾。

大学薬学部での機器分析学実習に関しては、2011年に行われたアンケート調査結果がある³⁾。これによると多くの大学ではHPLC実習は必ず組み込まれており、ほとんどのところで逆相HPLCの基礎、あるいは逆相HPLCによる製剤定量が実施されている。また、これらHPLC実習で使用されているカラムは、内径4～4.6 mm、長さ15 cm、充てん剤粒子径5 μm のODSカラムがほとんどであった。このタイプのカラムでは流量1.0 mL/minでのカラム圧損は100 kg/cm²以下であり、過去20年以上にわたってアカデミアや産業界等の現場で主流のカラム規格で、ポンプやカラムに対しての負荷は少ない。

近年、上記の汎用タイプのカラムを用いるHPLCに対し、医薬品開発現場での開発スピードのアップやハイスループットの流れの中、さらに高い分離性能や分析時間の短縮を目的とした、粒子径の小さな（2～3 μm ）充てん剤カラムを用いるUHPLCが登場し、その有用性が明らかとなっている^{4,5)}。充てん剤の粒子径を小さなものとすることで高性能化が図れることは、以下のvan Deemterの式⁶⁾から説明される。これを模式的に図1にプロットする。

$$H = A d_p + B \frac{D_m}{u} + C \frac{d_p}{D_m} u \quad \text{----- (1)}$$

A項は多流路拡散あるいは渦巻拡散によるもので、B項はカラム軸方向への拡散（ D_m は試料の移動相中での拡散係数）、C項は物質移動の項で固定相と移動相間、充てん剤粒子内での拡散による物質移動に依存する。Hはカラムの性能を表す理論段高さ、 d_p は充てん剤の粒子径で、 u は移動相の線流速を表す。この式が示すように d_p が小さいほど、Hが小さくなり、性能が良くなることを示す。図1は、この3つの項のvan Deemter曲線への寄与を模式的にプロットしたもので、充てん剤の粒子径が大きくなるとこの曲線は全体的に上にシフトする（性能が悪くなる）。また、B項は、流速が遅くなると急激にその影響が大となる。C項は、充てん剤の粒子径に特に大きく依存し、充てん剤の粒子径を小さなものとする事で小さくなる。

著者らも実習で実施している逆相HPLCについて、通常タイプの規格のカラムを用いる方法

(HPLC) からUHPLCへの移管について比較検討を行い、結果については既に報告した⁷⁾。本研究では、パラベン類の混合物をテスト試料として、UHPLC用として注目されているコアシェル型カラムを用い、その分離について、カラム長、有機溶媒の選択性等の影響を検討した。あわせて、パラベン混合物をGC-MS実習用の試料として適応したところ、質量分析で学習するMcLafferty転位⁸⁾についての有用な試料としても活用できることが分かったので報告する。

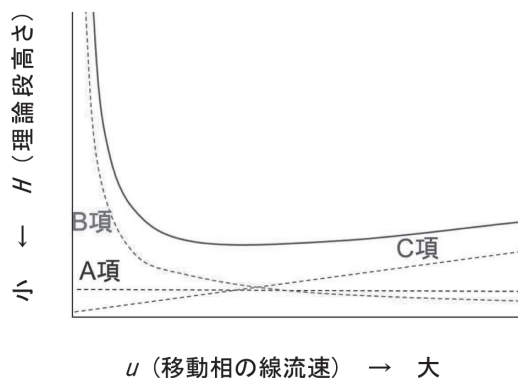


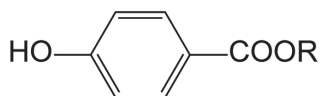
図1 van Deemter 曲線における各項の寄与の模式図

2. 実験方法

2.1 試料

パラオキシ安息香酸メチル (メチルパラベン), パラオキシ安息香酸エチル (エチルパラベン), パラオキシ安息香酸プロピル (プロピルパラベン), パラオキシ安息香酸イソプロピル (イソプロピルパラベン), パラオキシ安息香酸ブチル (ブチルパラベン), t_0 のマーカ物質としてのウラシルは、和光純薬から試薬特級あるいは分析用を購入した。移動相に用いた有機溶媒類、メタノール (MeOH), アセトニトリル (ACN) 及びテトラヒドロフラン (THF) は、同じく和光純薬からHPLC用を購入し、使用した。パラベンの構造式を図2に示す。上記のうち、日局16には、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン及びブチルパラベンが保存剤 (主に水剤の防腐剤) として収載されている。保存剤としての効果は、ブチルパラベンが最も大きく、アルキル鎖が短くなるにつれ小さくなるが、毒性に関しては、メチルパラベンが最も強く、エチル、プロピル、ブチルと弱くなる。

パラベン及びウラシルは、それぞれ 100 mgを100 mLのメスフラスコにとり、メタノールを加えて溶かし、100 mLとして各原液とした。UHPLC用のパラベン混合液は、それぞれのパラベン及びウラシル原液、各々 10 mLを100 mLのメスフラスコに正確にとり、水を加えて100 mLとし、試料溶液とした。GC-MS用はウラシルを除き、各パラベン原液 10 mLを100 mLのメスフラスコに正確にとり、メタノールを加えて100 mLとし、試料溶液とした。



R : アルキル基

図2 パラヒドロキシ安息香酸アルキルエステル類 (パラベン) の構造

2.2 装置

HPLC装置として、(株)島津製作所(京都)のProminence装置一式(UHPLC対応)を使用した。ポンプはLC-20AB(耐圧上限 40 MPa, 約 400 kg/cm²), オートインジェクターとしてはSIL-20ACを, 検出器はSPD-M20A多波長検出器(photo diode array detector, PDA), システムコントローラはCBM-20A, カラムオープンはCTO-20Aを, また, デガッサーDGU-20A3を使用した。なお, カラムから検出器までの配管は内径 0.1 mm のステンレス管を用いたが, 検出器のセルは通常の容量 10 μ Lのものを使用し, スリット幅は 8 nm (他に 1.2 nm選択可能)とした。PDA検出器の時定数(レスポンス)及びサンプリングタイムは, 640 ms (初期設定値)から 80 ms に変更して用いた。カラムは, コアシェル型のUHPLCカラムとして, Kinetex 2.6 μ m C18 (2.6 μ m, 4.6 mm i.d. \times 50 mm, 100 mm) 及び Kinetex 5 μ m C18 (5 μ m, 4.6 mm i.d. \times 150 mm)を使用した。ピークの理論段数 N , 理論段高さ H 及び分離度 R_s は, Prominence装置に搭載されているデータ解析ソフトを用いて計算した。検出モニターはUV 210 nmあるいは 254 nm, カラム温度は 40 $^{\circ}$ Cの一定温度とし, 流量は 1 mL/minとした。なお, 移動相は, 有機溶媒/水混液とした。

GC-MS装置としては、(株)島津製作所(京都)のGCMS-QP2010 Plusを用い、分離カラムは、ジエールサイエンス社製のInertCap 5MS/Sil (0.25 mm \times 30 m, 膜厚 0.5 μ m)を用いた。以下に操作条件を示す。試料はマイクロシリンジにより、1 μ L注入した。

<GC-MS操作条件>

カラム : InertCap 5MS/Sil (0.25 mm \times 30 m, 膜厚 0.5 μ m)
カラム温度 : 150 $^{\circ}$ C (5 min) \rightarrow (8 $^{\circ}$ C /min) \rightarrow 300 $^{\circ}$ C (10 min)
注入口温度 : 250 $^{\circ}$ C
キャリアガス : He (1.07 mL/min)
イオン源温度 : 220 $^{\circ}$ C
インターフェース温度 : 250 $^{\circ}$ C
イオン化電圧 : 70 eV
イオン化モード : EI

3. 結果及び考察

3.1 UHPLC分析

前報で、カラムとして、UHPLC用に開発された全多孔性の粒子径の小さな充てん剤(約 2 μ m), カラム長 5 cm を用いることで、従来パラベン類の一斉分離に要した分析時間 7.5 分が、ほぼ三分之一である 2.5 分で達成されることを報告した⁷⁾。ただし、5 cm といったショートカラムであるにもかかわらず、カラムの圧損は 300 kg/cm²となった。UHPLC用の粒子径の小さい充てん剤では、上記の図1におけるC項の寄与が大きく、内径 4.6 mm で 5 cm のC18カラムを用いて、ACN 60%でナフタレンを分析した場合、全多孔性の 5 μ m 充てん剤で約 9 μ m, 全多孔性の 3.5 μ m の充てん剤で約 7 μ m の、全多孔性の 1.8 μ m 充てん剤で約 4 μ m の理論段高さ (H) が得られている⁹⁾。また、移動相の線流速の依存性、すなわちvan Deemter曲線の右肩あがりも粒子径が小さくなるに従って緩やかになっている。

今回コアシェル型のカラムとして Kinetex 2.6 μm C18 (4.6 mm i.d. \times 50 mm, 100 mm) 及び Kinetex 5 μm C18 (4.6 mm i.d. \times 150 mm) を使用して、パラベン類の分離について検討した。MeOH 60%で 2.6 μm の 5 cm及び 10 cmカラム、流量 1.0 mL/min, 40°Cの条件で分離を行った結果を図3に示す。溶出順は、疎水性の低い順であり、最初に溶出する t_0 のマーカ物質であるウラシルの後に、メチルパラベン、エチルパラベン、イソプロピルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベンとなった。このうち、構造異性体であるイソプロピルパラベンとプロピルパラベンのピークが一番近接して溶出するが、それぞれ R_s は 2.0 及び 1.5 であった。逆相モードでは、これら構造異性体の分離では直鎖の化合物のほうが、枝分かれした異性体より一般的に保持時間が大きい。これは直鎖化合物のほうが、固定相C18との相互作用に寄与する表面積が大である、また、水和構造の破壊から考えられるエントロピー効果が大きいと考えられる。Nは、イソプロピルパラベン、プロピルパラベントともに 5 cmカラムでは 5000, 10 cmカラムでは11800であった。5 cmカラムでは、Nはほぼ 10 cmカラムの1/2となったが R_s は1.5で、ほぼ完全分離された。

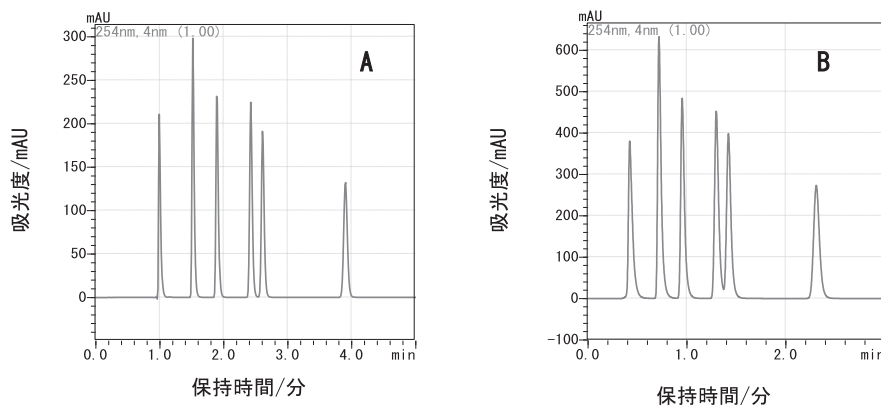


図3 コアシェル型C18カラム (2.6 μm), MeOH60%によるパラベンの分離
A : 10 cmカラム, B : 5 cmカラム

次に有機溶媒をACN40%として、Kinetex 2.6 μm C18の 10 cmカラム及び Kinetex 5 μm C18 (4.6 mm i.d. \times 150 mm) を使用して、流量 1.0 mL/min, 40°Cの条件でパラベン類の分離について検討した。結果を図4に示す。Nは、図4Aでイソプロピルパラベン、プロピルパラベントともに 19900であった。別に報告したNSAIDsでも、10 cmカラムで20000段 (H は 5 μm) が得られている¹⁰⁾。以上のように分析の系が最適化されていない (例えばマイクロセルを用いていない) にもかかわらず、きわめて大きなNが得られた。しかもカラム圧損は図3AのMeOH60%で約 200 kg/cm², 図4AのACN40%で 140 kg/cm²と全多孔性の微小充てん剤を用いた場合と比較して低い値であった。すなわち、低い圧損で高いNが得られるという、コアシェル型カラムの有用性を示した¹¹⁾。これは、固定相と移動相間、充てん剤粒子内での拡散による物質移動に依存するC項が、コアシェル型充てん剤で小さいことに加え、充てん剤の粒子径分布が従来の充てん剤粒子よりも狭いことから⁹⁾, カラムへの充てん剤の充てんが密に行われ、A項が小さくなったことの両者が大きく寄与していると考えられた。

イソプロピルパラベンとプロピルパラベンの分離度を見ると、図4AのACN40%では1.9と図3AのMeOH60%とほぼ同じ値であった。ACNの場合は、MeOHと比較して10 cmカラムでNが1.6

倍にもなるがRsがほぼ同じ値であったことは、この構造異性体の分離に対してはMeOHのほうが選択性に優れていることを示す。更に多環化合物類の分離選択性にきわめて有効であることが明らかとなっているTHFを用いて検討した^{12,13)}。THF40%で分離を検討したところ、ACN40%とほぼ同じ保持時間でパラベン類は分離溶出されたが、イソプロピルパラベンとプロピルパラベンのRsは1.4と低く、ベンゼン環を母骨格とした化合物の異性体には選択性が劣ることが分かった。

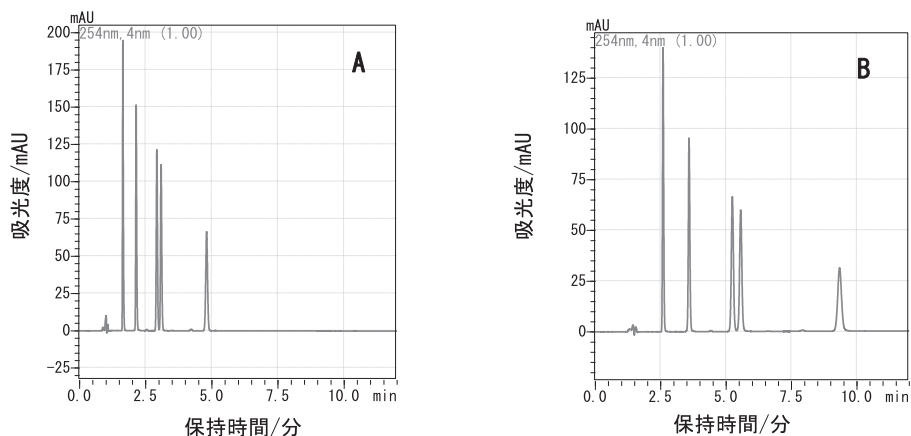


図4 コアシェル型C18カラム (2.6 μm 及び5 μm), ACN40%によるパラベンの分離
A : 2.6 μm , 10 cmカラム, B : 5 μm , 15 cmカラム (既存サイズ)

一方のKinetex 5 μm C18 (4.6 mm i.d.×150 mm) タイプのカラムは、汎用カラムとして広く使用されているカラム規格で、様々な公定書に試験法として採用されている。粒子径の小さな充てん剤を用いることは分析法の変更となるため、既存タイプのサイズ及び粒子径5 μm でコアシェル型のメリットを生かすカラムとして市販されたものと考えられる。図4Bでは、イソプロピルパラベンとプロピルパラベンのNは19200、両者のRsは2.1、また、圧損は66 kg/cm²と、既存タイプのカラム (全多孔性5 μm 粒子径) と比較して性能が良い (Nが高い) 結果を与えた。図5は、カラムにおけるC項の影響を模式的に示したものである。C項は物質移動の項で固定相と移動相間、充てん剤粒子内での拡散による物質移動に関する項で、コアシェル型では、シェル (多孔質シリカゲル) の部分が物質移動に関与する部分で、2.7 μm の充てん剤では0.5 μm と狭いため、C項の寄与が小さくなる。一方、カラムの圧損は、充てん剤の粒子径に依存するため、コアシェル型カラムでは、同じ粒子径の充てん剤と同じカラム圧損であるにもかかわらず、性能がよいことになる。

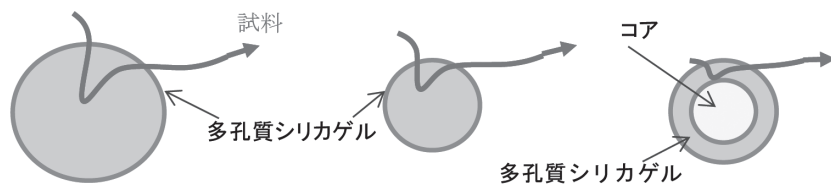


図5 コアシェル型カラムのC項の影響の模式図

3.2 キャピラリー GC - MS分析

パラベン類につき、5% diphenyl(equive.)-dimethylpolysilphenylene siloxaneを固定相する低極性タイプのキャピラリーカラム InertCap 5MS/Sil (0.25 mm×30 m, 膜厚0.5 μm) を用いて分析を行った。TICモードでモニターした分離クロマトグラムを図6に、それぞれのピークの電子イオン化 (EI) 法によるMSスペクトルを図7に示す。溶出順はアルキル置換基の炭素数の増える順となるが、パラベンの場合、上記逆相HPLCでの溶出順と一致し、①メチルパラベン、②エチルパラベン、③イソプロピルパラベン、④プロピルパラベン、⑤ブチルパラベンとなった。クロマトグラムでは、カラム温度をイニシャル150℃ (5 分間) から 8℃ /minで 300℃まで昇温して分析を行っているため、後から溶出する成分のピークがシャープとなっている。また、逆相HPLCで近接して溶出したイソプロピルパラベンとプロピルパラベンが良好に分離されている。

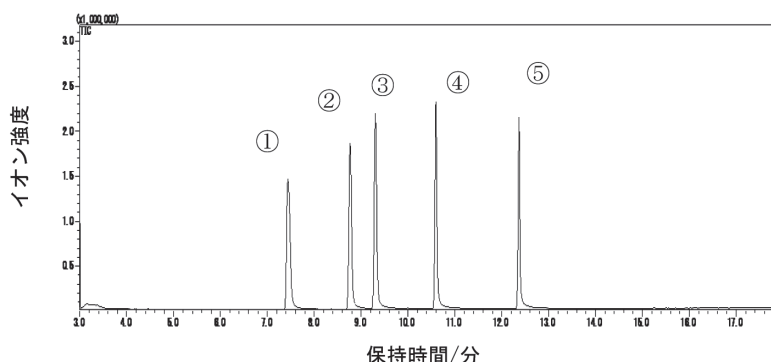


図6 パラベン類のGC-MS分析

①メチルパラベン、②エチルパラベン、③イソプロピルパラベン、④プロピルパラベン、⑤ブチルパラベン

図7のMSスペクトルで、(M)⁺と表示しているm/z 152, 166, 180, 180, 194 のイオンピークは、それぞれのパラベンの分子イオンピークで分子量を示す。m/z 121 はすべてのパラベンで最も強いイオンピークで、基準ピークである。また、m/z 93 のイオンピークも共通して検出されている。その他として、メチルパラベンを除く4種のパラベンで特徴的なイオンピークとしてm/z 138 が、小さいながらもイソプロピルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベンで、m/z 139 のイオンピークも検出された。これらのフラグメントイオンピークの推定構造を図8に示す。

EI法では、カルボニル基のα位で開裂 (フラグメンテーション) が生じやすいため、パラベンのカルボニル基の隣で開裂したフラグメントイオンm/z 121 が最も生成しやすく、さらにCOが脱離してm/z 93 が共通で検出されている。メチルパラベンを除くパラベンで検出されたm/z 138のイオンピークは図9に示した通りで、カルボニル基に対してγ位に引き抜きやすい水素原子がある化合物で起こる転位反応による。これは、McLafferty転位と呼ばれ、質量分析法で学習する重要な転位反応のひとつである。カルボニル基に対してγ位に引き抜きやすい水素原子が存在しないメチルパラベンでは観測されず、その他のパラベンでは観測されており、明確な違いを示した。エチルパラベンではM-28、イソプロピル及びプロピルパラベンではM-42、ブチルパラベンではM-56となっている。また、このm/z138のピーク強度がブチルパラベンで大きく、パラベンのアルキル基が大きくなるほど転位反応が起こりやすいことが示されている。なお、m/z 139については、McLafferty転位反応により酸素が露出するため、ここに水素の転位反応が

同時に起こったこと（オニウム反応）によるものと推定される。GC-MS分析によるパラベン類の分離には既に多くの報告があるが、いずれも環境における微量測定を目的としており¹⁴⁻¹⁷，転位反応について論じたものはない。

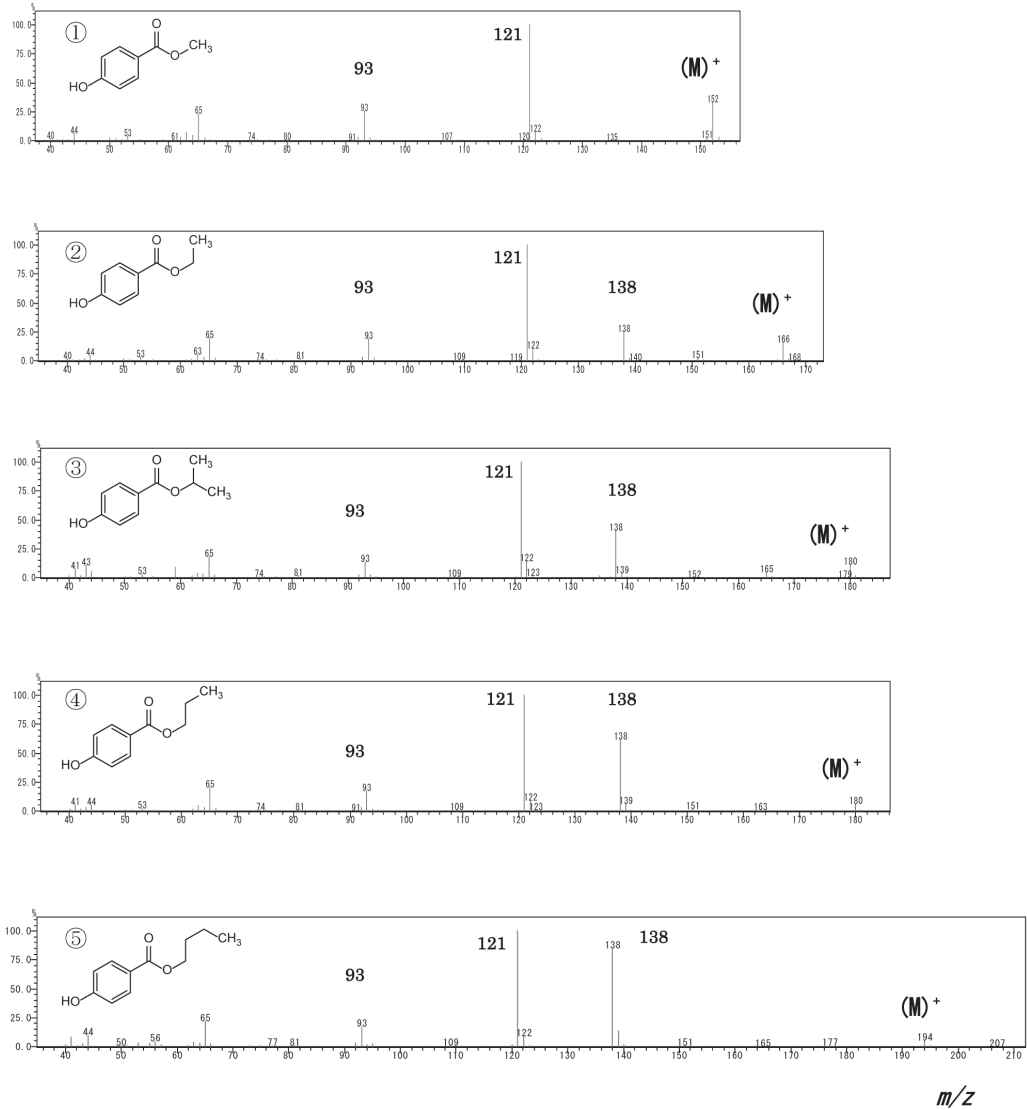


図7 各パラベンのMSスペクトル (EI法)
番号は図6のクロマトグラム参照

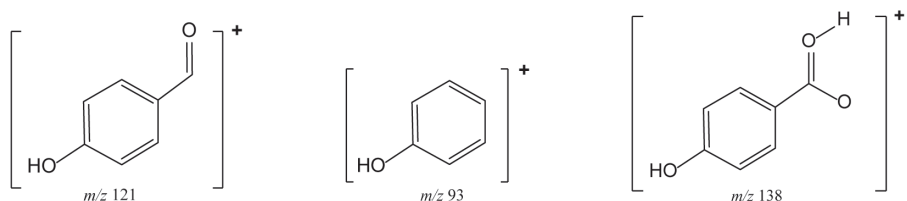


図8 フラグメントイオンピークの推定構造

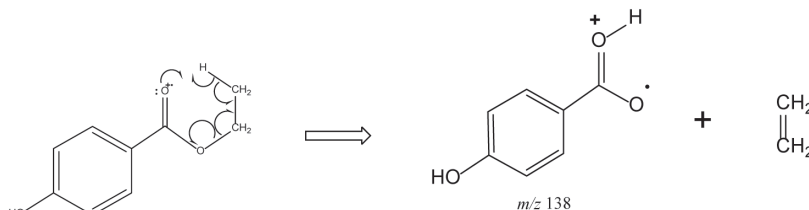


図9 McLafferty転位反応 (エチルパラベン)

4. ま と め

以上、試料として用いたパラベン類 (メチルパラベン, エチルパラベン, イソプロピルパラベン, プロピルパラベン, プチルパラベン) は, それ自身が医薬品添加物として日局に記載されているのみならず, HPLC分析では最も汎用されている逆相モードでその溶出順と疎水性相互作用の理解のための試料として適しており, また, 逆相HPLC分析での構造異性体の分離についての考察用としても役立つ。今回, GC-MS分析に適用したところ, McLafferty転位の説明にも活用できることが分かり, 機器分析実習用の試料としてきわめて有用であることが分かった。

引 用 文 献

- 1) 日本薬局方第十六改正, じほう社, (2011).
- 2) 薬品分析化学実習Ⅱ 実習書 (2013年度版), 安田女子大学薬学部 (2013).
- 3) 浜瀬健司, 「薬学教育の観点からの薬局方改正とクロマトグラフィー」, 第18回クロマトグラフィーシンポジウム (福岡), プロシーディングpp.33-34, (2011).
- 4) C. Sanchez and T. Farkas, *Am. Lab.*, 44, 11-14 (2012).
- 5) H. Nishi and K. Nagamatsu, *Anal. Sci.*, vol.30, 205-211 (2014).
- 6) J. J. Van Deemter, F. J. Zuyderweg, and A. Klinkenberg, *Chem. Eng. Sci.*, 5, 271 (1956).
- 7) 永松久実, 西村基弘, 西 博行, 安田女子大学紀要, 第40巻, 403-411 (2011).
- 8) 日本薬学会編, スタンダード薬学シリーズ2, 物理系薬学Ⅲ, pp.185-186 (2006).
- 9) N.Nagase and T.Tsukamoto, *Chromatography*, 34 (1), 41-47 (2013).
- 10) 向山修世, 宮脇温子, 西 博行, 日本分析化学会第62年会 (大阪), 予稿集p.259 (2013).
- 11) 永松久実, 西 博行, 安田女子大学紀要, 41巻, 477-486 (2013).

- 12) 武田朋子, 河野早苗, 西 博行, 日本薬学会第134年会 (熊本), 要旨集No.2, p.277 (2014).
- 13) 河野早苗, 武田朋子, 西 博行, 日本分析化学会第63年会 (広島), 予稿集Y1142 (2014).
- 14) G. A.-Rivera, M.Vila, M.Lores, C.G.-Jares, and M.Llompart, *J.Chromatogr.A*, 1339, 13-25 (2014).
- 15) N.Ramirez, R.M.Marce and F.Borrull, *J.Chromatogr.A*, 1218, 6226-6231 (2011).
- 16) R.A.Peter, B.Albero, E.Miguel, and C.S.-Brunete, *Anal.Bioanal.Chem.*, 402, 2347-2357 (2012).

[2014. 9. 25 受理]