

イソニアジド及びアシルイソニアジド誘導体の高速液体クロマトグラフィーによる最適分析条件の検討

濱口聖美^{®*}, 花井俊彦^{**}, 久保博昭, 木下俊夫^{***}

(1989年7月20日受理)

イソニアジド及びアシルイソニアジド誘導体(アセチルイソニアジド, プロピオニルイソニアジド, イソブチリルイソニアジド, ブチリルイソニアジド, ベンゾイルイソニアジド)の逆相イオン対LCによる最適分離条件を検討した。イソニアジド, アセチルイソニアジド及びプロピオニルイソニアジドの分離には, 対イオン試薬としての脂肪族スルホン酸のうちドデカンスルホン酸が最適であった。イソニアジド及びアシルイソニアジド誘導体は, 脂肪族スルホン酸とイオン対を形成することにより, 固定相のオクタデシル基に保持されると考えられるが, アシルイソニアジド誘導体のアシル基も保持に影響を与えていることが分かった。イソニアジド及びアシルイソニアジド誘導体の保持比及び分配係数を求めて, Rekkerによる疎水性基定数と比較すると良好な直線関係を示した。

1 緒 言

抗結核薬であるイソニアジド(INH)は肝臓で代謝され, アセチルイソニアジド(AINH)として尿中に排泄されることから, これらを定量することにより肝臓におけるアセチル化能を測定することができる。又, このアセチル化能を測定することによりINHによる副作用の発現を防ぐことも可能となる。従来, このINH及びAINHの定量法には, 比色分析法¹⁾, 蛍光光度法²⁾, GC³⁾などの外, HPLCによる方法が報告されている。特にHPLCによる方法には, ジオクチルスルホコハク酸⁴⁾, オクチルスルホン酸⁵⁾, ヘプタンスルホン酸⁶⁾, ドデシル硫酸⁷⁾などの対イオン試薬を使用した分析法が報告されている。しかし, これらの分析法は系統的に対イオン試薬を検討しておらず, 又, 生体液中のINH及びAINHの分析では, いずれの場合も混在物との分離が良好ではなく再現性も悪い。そこで, 各種脂肪族スルホン酸の対イオン試薬を用いてHPLCによるINH及びAINHの分離分析法を検討し, 更に, 各種アシルイソニアジド誘導体の分配係数を求め, 分配係数とHPLCの保持時間を比較すると, アシルイソニアジド誘導体の

構造をRekkerの疎水性基定数⁸⁾から推定できることが分かったので報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

INHは和光純薬工業製を用い, アシルイソニアジド誘導体であるAINH, プロピオニルイソニアジド(PINH), イソブチリルイソニアジド(*iso*-BINH), ブチリルイソニアジド(BINH), ベンゾイルイソニアジド(BzINH)は, 酸無水物又は酸クロリドを用い, 常法によりINHから合成し, 元素分析及び質量分析法により同定した。各々500 µg/ml水溶液に調製し適宜精製水で希釈して使用した。対イオン試薬のうち炭素数1~11までの脂肪族スルホン酸ナトリウムは東京化成工業製, 炭素数12のスルホン酸ナトリウム及び硫酸ナトリウムは, ガスクロ工業製を用いた。アセトニトリルはLC用, 1-オクタノールは特級を, 共に和光純薬工業製を用いた。

2.2 装 置

HPLC装置として, ポンプはModel 576, 検出器にはModel 502U紫外可視分光検出器, 各々ガスクロ工業製を, インジェクターはModel 7125レオダイン製を使用した。記録計はChromato-integrator D-2000日立製を用い, 遠心分離器はクラボウDISKBOY FB-4000を, 分光光度計はHitachi Model 200-20型を使用し

* ガスクロ工業(株): 160 東京都新宿区西新宿6-12-18

** (財)体質研究会国際解析研究所: 606 京都府京都市左京区百万遍パスツール研究所

*** 北里大学薬学部: 108 東京都港区白金5-9-1

た。

2・3 操作

2・3・1 吸収極大波長の測定 2 mM ドデカンスルホン酸ナトリウムを含む 24% アセトニトリル水溶液 (pH 3 にリン酸で調節) と INH, AINH 及び PINH の 10 µg/ml 水溶液を等量混合した溶液のスペクトルを紫外分光光度計により測定したところ, 265 nm に吸収極大波長を示したので, 以後クロマトグラフィーの検出にはこの波長を使用した。

2・3・2 INH 及びアシルイソニアジド誘導体の分配係数の測定 INH 及びアシルイソニアジド誘導体 (AINH, PINH, *iso*-BINH, BINH, BzINH) 各々をリン酸で pH 3 に調節した水溶液に溶解し, 1 mg/10 ml の濃度の試料溶液とした。試験管に各試料溶液 10 ml と等量の 1-オクタノールを添加し激しくかき混ぜた後, 遠心分離し水相及び 1-オクタノール相の吸光度を波長 265 nm で測定した。

2・3・3 移動相中のイオン対試料 10 mM のリン酸一ナトリウムを含む 10, 15 及び 20% のアセトニトリル水溶液を, リン酸で pH 3 に調節し, この溶液に 2~5 mM の各種対イオン試薬を添加したものを移動相として, INH, AINH 及び PINH の分離条件を検討した。

2・3・4 HPLC 条件 分析カラムとしては粒径 5 µm の Inertsil ODS-2 を長さ 150 mm, 内径 4.6 mm の

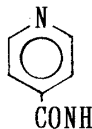
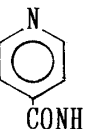
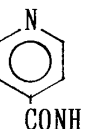
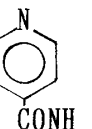
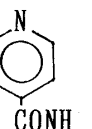
ステンレス管に充てんしたもの (ガスクロ工業製), ガードカラムは Inertsil ODS-2 を長さ 10 mm, 内径 4.0 mm のステンレス管に充てんしたものを使用した。カラム温度は室温とし, INH, AINH 及び PINH の分離には, 移動相として 2 mM ドデカンスルホン酸ナトリウム及び 10 mM リン酸一ナトリウムを含む 22.5% アセトニトリル水溶液を, リン酸で pH 3 に調節したものを使用した。流量は 1.0 ml/min とし, 検出波長 265 nm (0.032 AUFS) で測定し, 試料は 10 µl 注入した。又, INH, AINH, PINH, *iso*-BINH 及び BzINH の分離には, BzINH の溶出を速めるため, アセトニトリルの濃度を 24% にして前述の条件で分析を行った。

3 結果及び考察

3・1 内標準物質の理論的な選択法

Rekker が示す疎水性基定数¹⁾により, INH 及びアシルイソニアジド誘導体中の各々の基について疎水性基定数の合計値 ($\log P^*$) を求め, Table 1 に示した。これを理論値 $\log P$ とする。又, 実験より求めた INH とアシルイソニアジド誘導体の 1-オクタノール/水における分配係数を実測値 $\log P$ として, 両者の相関係数を求めたところ 0.984 であり理論値 $\log P^*$ の信頼性は高いものと考えられる。次に, 溶離液として pH 3 のリン酸水溶液を用いて, 検出波長 265 nm, 流量 1.0 ml/min で, INH と AINH の保持比 (K') を求めた。この K' の対数値 $\log K'$ を X 軸, 理論値 $\log P$ 及び実測値 $\log P'$ を

Table 1 Calculated $\log P$ values derived from fragment

Chemicals	INH	AINH	PINH	<i>iso</i> -BINH	BINH	BzINH
Fragment						
$\log P^*$	-0.409	-0.409	-0.409	-0.409	-0.409	-0.409
Fragment	NH ₂	NHCO	NHCO	NHCO	NHCO	NHCO
$\log P^*$	-1.428	-1.795	-1.795	-1.795	-1.795	-0.934 (ar)
Fragment	—	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₂ CH ₃	Bz
$\log P^*$	—	0.702	1.232	1.639	1.762	1.886
$\log P$	-1.837	-1.502	-0.972	-0.565	-0.442	0.543
$\log P'$	-2.052	-1.445	-0.817	-0.425	-0.318	0.317

* Rekker's hydrophobic fragmental constant¹⁾. $\log P$: calculated $\log P^*$ values of each chemical; $\log P'$: partition coefficient measured in 1-octanol/water. Abbreviations: INH, isoniazid; AINH, acetylisoniazid; PINH, propionylisoniazid; *iso*-BINH, *iso*-butyrylisoniazid; BINH, butyrylisoniazid; BzINH, benzoylisoniazid

各々 Y 軸としたグラフを Fig. 1 に示す. $\log K'$ と $\log P$ 及び $\log P'$ の相関係数は各々 0.997, 0.996 と良好な直線関係を示した.

3・2 対イオン試薬の検討

移動相中の対イオン試薬と INH, AINH 及び PINH の各保持時間との関係を Fig. 2 に示す. 一般にスルホン酸基を有する対イオン試薬は, 塩基性の試料物質とイオン対を形成し, 保持は対イオン試薬の脂肪鎖と固定相であるオクタデシル基との分子間相互作用により行われると考えられている. pH 3 の水溶液中では, ピリジン環の窒素及びヒドラジンのアミノ基はプロトン付加して

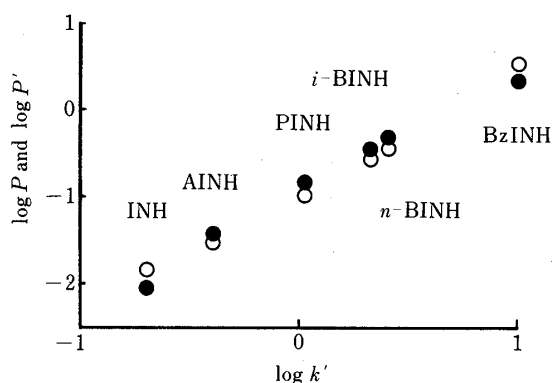


Fig. 1 Relationship between partition coefficients and capacity ratios

$\log P$ (○-; calculated by Rekker's hydrophobic fragmental constants) and $\log P'$ (●-; measured by 1-octanol/water partition) values are given in Table 1. Abbreviation (INH, AINH, PINH, iso-BINH, BINH, BzINH): see Table 1.

いると考えられる. INH はピリジニウムとヒドラジニウムイオンの 2 か所でイオン対形成が考えられ, アシルイソニアジドはピリジニウムイオンのみがイオン対を形成していると考えられる (Fig. 3). Fig. 2 に示すように, 対イオン試薬として使用した脂肪族スルホン酸の炭素鎖が長くなるほど, INH, AINH 及び PINH のイオン対の保持は長くなった. INH の保持時間は炭素数 4 までは AINH や PINH より短く, 炭素数 5~7 では AINH と PINH の間にあり, 炭素数 8 以上では AINH や PINH より長くなった. INH の溶出挙動を調べるた

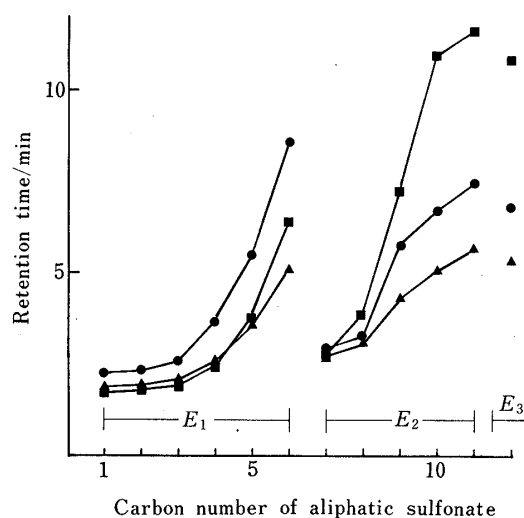


Fig. 2 Relationship between ion-pair reagent and retention time

Eluent E_1 ; 10% acetonitrile solution (pH 3); E_2 ; 15% acetonitrile solution (pH 3); E_3 ; 20% acetonitrile solution (pH 3). ■: INH; ▲: AINH; ●: PINH

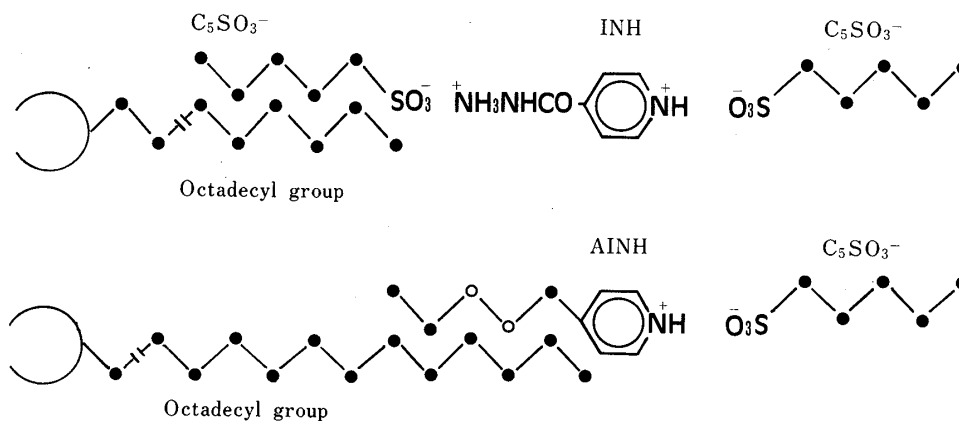


Fig. 3 Model of interaction between octadecyl group and isoniazid (INH) or acetylisoniazid (AINH)

●: carbon atom; ○: nitrogen atom; C_5SO_3 : pentanesulfonate ion

めに, Fig. 2 の同じ溶離液で求めた対イオンの炭素数 6 までの $\log K'$ と炭素数の関係を求めた. この結果, INH は炭素数 5 で AINH より遅く溶出しており, この $\log K'$ と炭素数の関係を延長すると, 炭素数 8 のところで INH は PINH より遅く溶出されることが推察された. この予測は異なる溶離液で求めた結果, つまり, Fig. 2 の炭素数 7 以上での溶出順序を説明できた. アミノ基の対イオンとのイオン対形成による保持時間の増加は, $\log K'$ 値で 1.3 倍であった. この結果と Fig. 1 の結果を考慮すると, 対イオンの鎖長を変えたときの INH の溶出順序を予測することができ, 必要な内標準物質の選択も可能と思われる. 又, 炭素数 1~12 までの脂肪酸スルホン酸を用いて, INH, AINH の分離条件を検討したところ, 炭素数が多いほど INH, AINH の分離が良かった. そこで, 炭素数 12 のドデカンスルホン酸ナトリウムとドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用いて, これらの 1.0~2.5 mM の濃度範囲における INH と AINH の分離度及び分離係数を測定した. Fig. 4 に示すように, SDS の濃度が 2.0 mM 以上になると分離度, 分離係数も急激に大きくなり, わずかな濃度変化により保持時間の再現性が低下した. 又, SDS は界面活性効果による泡立ちのため調製しにくいことから, 適切な対イオン試薬として 2.0 mM のドデカンスルホン酸ナトリウムを用いた. Fig. 5(a, b) に INH, AINH, PINH, *iso*-BINH 及び BzINH の最適分離条件下における HPLC のクロマトグラムを示す. BINH は *iso*-BINH とピークが重なってしまうため示さなかった. Fig. 5(a) 及び Fig. 1 より INH と AINH 分離定量に

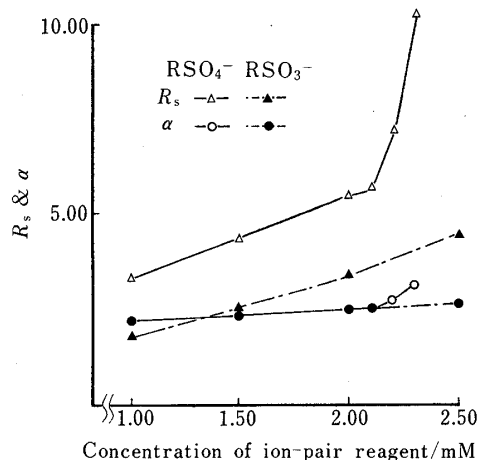


Fig. 4 Resolution (R_s) and separation factor (α) of isoniazid and acetylisoniazid for dodecane-sulfonate (RSO_3^-) and dodecylsulfate (RSO_4^-)

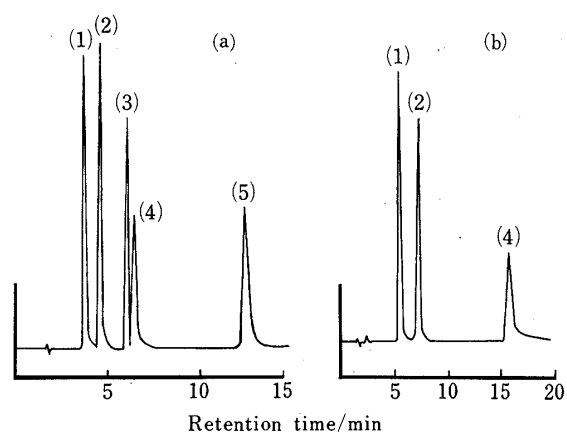


Fig. 5 Chromatograms of a mixture of AINH (1), PINH (2), *iso*-BINH (3), INH (4) and BzINH (5)

Abbreviation: see Table 1. (a): column, 150 mm $\times$ 4.6 mm i.d. packed Inertsill ODS-2 (5 μm); eluent, 24% acetonitrile solution containing 2.0 mM dodecane-sulfonate (pH 3); flow rate, 1.0 ml/min; column temp., ambient. (b): chromatographic condition is the same as in Fig. 5 (a) except for acetonitrile concentration (22.5%~24%).

における内標準物質として, INH のピークとも重ならない PINH が, 保持時間からも適当であった [Fig. 5 (b)].

(1988 年 10 月, 日本分析化学会)
第 37 年会において一部発表

文 献

- 1) H. G. Boxenbaum, S. Rigelman: *J. Pharm. Sci.*, **63**, 1191 (1974).
- 2) W. A. Olson, P. G. Dayton, Z. H. Israili, A. W. Pruiiff: *Clin. Chem.*, **23**, 745 (1977).
- 3) J. A. Timbrell, J. M. Wright, C. M. Smith: *J. Chromatogr.*, **138**, 165 (1977).
- 4) S. J. Saxena, J. T. Stewart, I. L. Honigberg, J. G. Washington, G. R. Keene: *J. Pharm. Sci.*, **66**, 813 (1977).
- 5) M. R. Holdiness: *J. Liq. Chromatogr.*, **5**, 707 (1982).
- 6) J.-O. Svenson, A. Muchtar, O. Ericsson: *J. Chromatogr.*, **341**, 193 (1985).
- 7) M. Guillaumont, M. Leclercq, Y. Frobert, B. Guise: *J. Chromatogr.*, **232**, 369 (1982).
- 8) R. F. Rekker: "The Hydrophobic Fragmental Constant", (1977), Elsevier (Amsterdam).

☆

Optimization of HPLC analysis of isoniazide and acylisoniazide derivatives. Kiyomi HAMAGUCHI*,

Toshihiko HANAI^{**}, Hiroaki KUBO and Toshio KINOSHITA^{***}, (*Gasukuro Kogyo Inc., 6-12-18, Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160; ^{**}International Institute of Technological Analysis, Health Research Foundation, Institute Pasteur de Kyoto, Hyakumanben, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606; ^{***}School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, 5-9-1, Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108)

Optimal conditions of separation for isoniazid and acylisoniazid derivatives (acetylisoniazid, propionylisoniazid, isobutyrylisoniazid, butyrylisoniazid, benzoylisoniazid) were determined in reversed-phase ion-pair LC. Sodium dodecanesulfonate was the best ion-pair reagent among alkylsulfonates. When the carbon number of alkylsulfonate was below 4, the elution order was isoniazid, acetylisoniazid and propionylisoniazid. When the carbon number of alkylsulfonate was 5, the elution order of isoniazid and acetylisoniazid was changed. Further when its number was 8, the elution order of isoniazid and propionylisoniazid was reversed. The acyl group of acylisoniazid also affected their retention. The conditions of HPLC were as follows: Column, Inertsil ODS-2 (5 μ m, 150 $\times$ 4.6 mm i.d.); eluent, 24% aqueous acetonitrile solution containing 2.0 mM sodium dode-

canesulfonate (pH 3); flow rate, 1.0 ml/min; column temperature, ambient. Retention time was 6.30 min for isoniazid, 3.69 min for acetylisoniazid, 4.49 min for propionylisoniazid, 6.06 min for isobutyrylisoniazid, 6.25 min for butyrylisoniazid and 12.58 min for benzoylisoniazid. The capacity ratios ($\log k'$) of isoniazid and acylisoniazid derivatives and the partition coefficients measured in 1-octanol/water ($\log P'$) were in good linear relation with those calculated by Rekker's hydrophobic fragmental constants ($\log P$). Coefficient of correlation for first-order regression lines of $\log P$ - $\log P'$, $\log k'$ - $\log P$ and $\log k'$ - $\log P'$ plots were 0.984, 0.997 and 0.996 ($n=6$), respectively. This calculation method could generally be used to find an appropriate internal standard compound for reversed-phase LC.

(Received July 20, 1989)

Keyword phrases

analysis of isoniazid and acylisoniazid derivatives, alkylsulfonate as ion-pair reagent, reversed-phase ion-pair LC, relation between $\log k'$ and $\log P$.