

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析の効率化について

—アルカリ性移動相を用いた分析法におけるカラム耐久性調査

及び内標準物質に色素を用いた多波長同時分析—

Increase in efficiency of high performance liquid chromatography (HPLC) analysis

—Column durability investigation of an analysis method which uses an alkaline mobile phase

and multi-wavelength simultaneous analysis with a pigment as the internal standard—

佐々木 綾子 Ayako SASAKI	株式会社池田模範堂 Ikeda Mohando Co., Ltd.	野坂 宜宏 Nobuhiro NOSAKA	救急薬品工業株式会社 Kyukyu Pharmaceutical Co., Ltd.
関 友香里 Yukari SEKI	テイカ製薬株式会社 Teika Pharmaceutical Co., Ltd.	村井 拓朗 Takuro MURAI	東亜薬品株式会社 TOA Pharmaceuticals Co., Ltd.
種 絵梨子 Eriko TANE	日医工株式会社 Nichiiko Co., Ltd.	竹脇 奈々子 Nanako TAKEWAKI	株式会社パナケイア製薬第二工場 Panakeia pharm Co., Ltd.
山本 豊巖 Hougen YAMAMOTO	ファーマパック株式会社 PHARMAPACK Co., Ltd.	榎原 唯志 Tadashi SAKAKIHARA	富士製薬工業株式会社 Fuji Pharma Co., Ltd.
蛭谷 早紀子 Sakiko HIRUTANI	株式会社富士薬品 Fujiyakuhin Co., Ltd.	上野 英志 Eiji UENO	株式会社陽進堂 Yoshindo Inc.
横田 洋一 Yoichi YOKOTA	富山県薬事研究所 Toyama Prefectural Institute For Pharmaceutical Research		

諸言

品質管理業務等を代表とするルーチン分析を円滑に行うために、省力化・低コスト化は大変重要である。HPLC分析の場合、分析時間の短縮や移動相溶媒の削減などが考えられるが、今回は、アルカリ性移動相を用いた分析法におけるカラム耐久性と、内標準物質に色素を用いた多波長同時分析の2テーマについて検証した。

1. アルカリ性移動相を用いた分析法におけるカラム耐久性に関する検証

目的

イオンペア試薬を用いた分離分析(イオンペア法)は、イオン性化合物を簡便に再現性良く分析できる手法として広く利用されている。しかし、カラムの安定化及び洗浄に多くの時間を要することやカラムの専有化が推奨されていることなどから、ルーチン分析を行う上で、業務効率化の妨げとなっている。

近年、アルカリ性移動相に対して耐久性を持たせた ODS カラムが次々と登場し、塩基性物質について、アルカリ性移動相を用いたイオン抑制法による分離分析を実現させる技術として注目されている。イオン抑制法はイオンペア法に比べ、効率化の面で優れた手法である。そこで前報¹⁾では、鼻炎用医薬品の成分について、イオン抑制法による分離分析を試み、分離度及び定量性に問題がない分析法を設定することができた。しかし、分析を重ねるごとにカラムの劣化が確認され、カラムの耐久性に課題が残った。そこで、今回はアルカリ性移動相に対し

て耐久性を持たせた3社のカラムを使用し、前報¹⁾で設定した条件でのカラム耐久性を検証した。

試験方法

「リドカイン」を約50mgを精密に量り、移動相を加えて溶かし、正確に50mLとし、リドカイン標準原液とした。別に「フェニレフリン塩酸塩」約50mg及び「クロルフェニラミンマレイン酸塩」約50mgをそれぞれ精密に量り、これにリドカイン標準原液10mLを正確に加え、移動相を加えて溶かし、正確に50mLとした。この液10mLと内標準溶液5mLを正確に加え、さらに移動相を加えて100mLとし、標準溶液とした。標準溶液10 μ Lにつき、下記の条件でHPLCにより試験を行う。標準溶液を1社あたり100回ずつ注入し、計3社300回の注入後、最初に試験を行った会社で再び試験を行い、シンメトリー係数、理論段数及び分離度の変化を調査した。

内標準溶液 パラオキシ安息香酸エチルの移動相溶液 (3 \rightarrow 5000)

試験条件

検出器：紫外吸光光度計 (検出波長：230nm)

カラム：X Bridge C18 3.5 μ m 4.6mmID \times 75mm 使用可能pH：pH1 \sim pH12 (日本ウォーターズ株式会社製)

Nucleodur C18 3 μ m 4.6mmID \times 75mm 使用可能pH：pH1 \sim pH11 (株式会社ケムコプラス製)

Triart C18 3 μ m 4.6mmID \times 75mm 使用可能pH：pH1 \sim pH12 (株式会社ワイエムシイ製)

移動相：メタノール/0.05%トリエチルアミン溶液にリン酸を加えてpH10.0に調整した混液(3:2)

カラム温度：30 $^{\circ}$ C付近の一定温度

流量：リドカインの保持時間が約7分になるように調整する (約1.0mL/min)

結果と考察

3社のカラムを用いて分析した結果、X Bridge C18やNucleodur C18においては、分析対象の分離が不十分であるものが認められ、一部の成分が評価不能であった(図1、2)。これに対し、Triart C18は全ての成分が分離できており(図3)、本試験条件においては、3社の中ではTriart C18による分析が最適であると考えられる。

カラム耐久性を調査した結果、Nucleodur C18は、連続分析において徐々にシンメトリー係数の増加や理論段数の低下など、パラメーターに大きな変動が認められた(図5)。さらに、ピーク形状も変化しており、カラムとしての耐久性は低いと考えられる。Triart C18は、パラメーターに変動が認められたが(図6)1回目と301回目を比較したとき、ピーク形状の著しい低下は認められなかったことから、カラムとしての耐久性はほとんど問題ないと思われる。一方、X Bridge C18ではTriart C18で認められたカラムの劣化は確認されず、ほとんどパラメーターの変動は認められなかった(図4)。従って、分離条件に課題はあるが、連続使用における耐久性はX Bridge C18がより適切であり、溶出条件を最適化すれば使用可能と推察された。なお、前報¹⁾において、Triart C18による分析ではカラム耐久性に課題があり、ルーチン分析に用いる場合には、問題がある可能性が示された。しかし、今回の検証においては、若干のカラム劣化は認められたが、分析に支障を来すほどの問題はなかった。これは、前回は、同一のカラムで分析法の開発・検討から始めたため、

様々な移動相条件(pHや溶媒の種類、組成比)の変化により、カラムへの負担が大きくなったためと推察された。

図1 X Bridge C18 のクロマトグラム

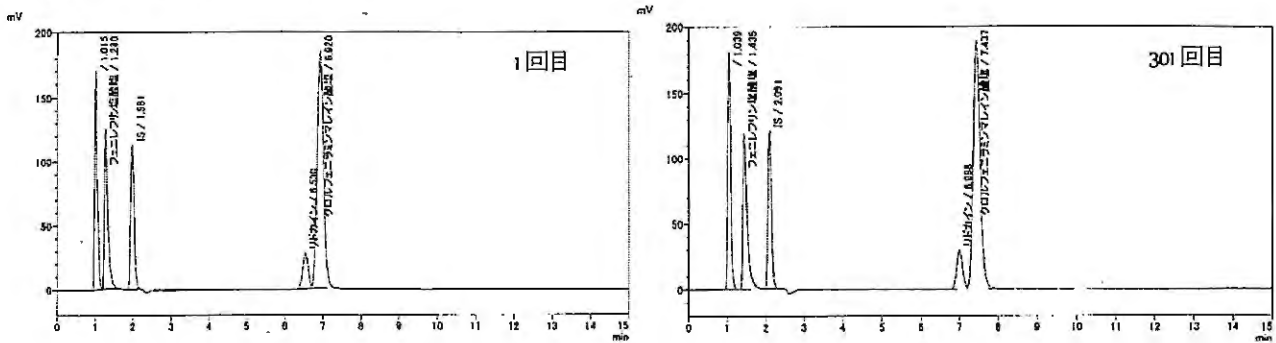


図2 Nucleodur C18 のクロマトグラム

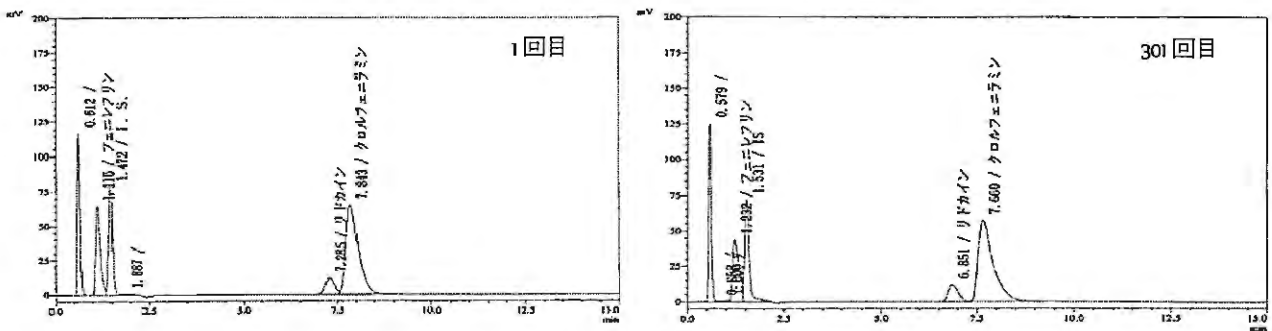


図3 Triart C18 のクロマトグラム

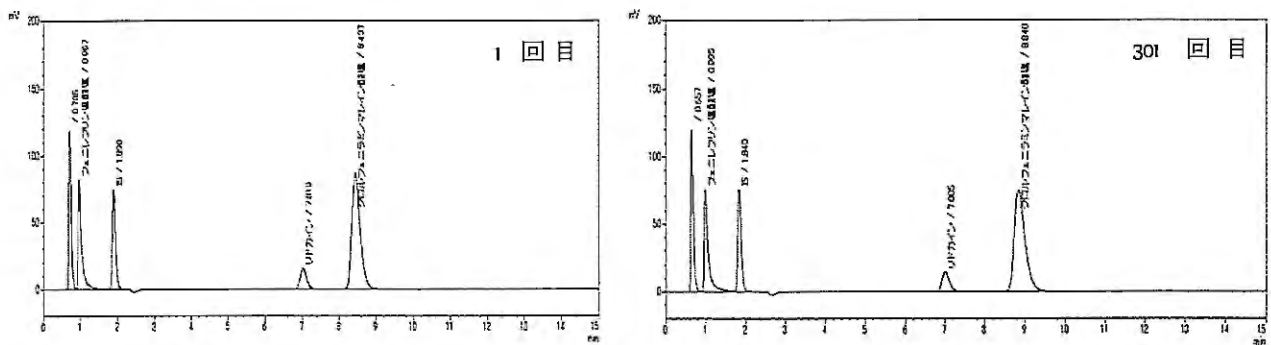


図4 X Bridge C18 の理論段数とシンメトリー係数

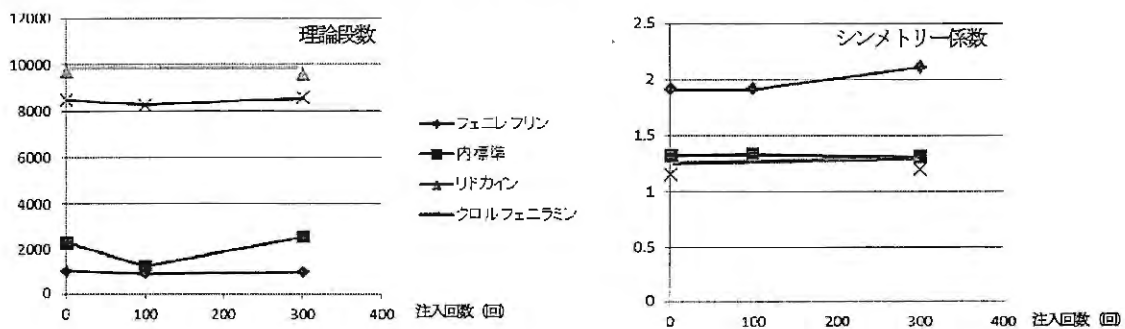


図5 Nucleodur C18の理論段数とシンメトリー係数

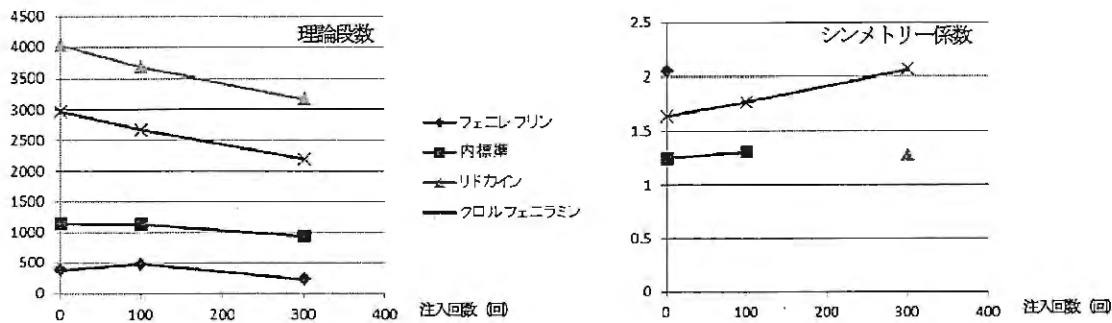
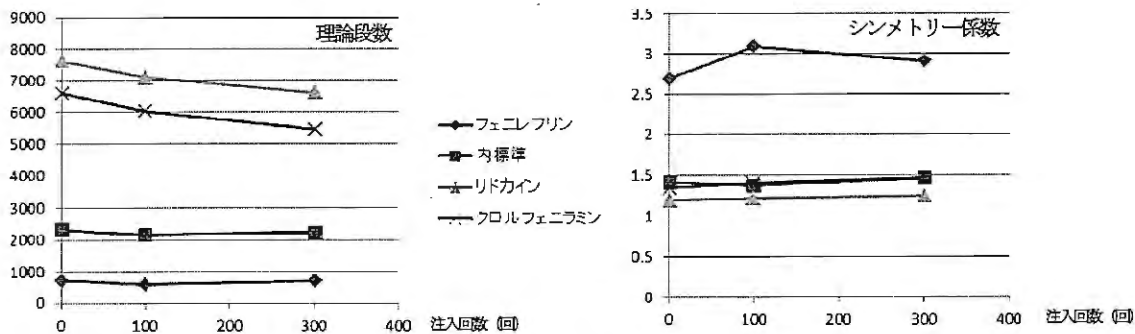


図6 Triart C18の理論段数とシンメトリー係数



※図に記載されていないデータは、測定できなかったことを示す

2. 内標準物質に色素を用いた多波長同時分析の検証

目的

多成分の同時分析においては、被検成分の溶出時間が接近している場合やその他の成分が存在する場合には、全成分の溶出後に溶出する内標準物質を設定せざるを得ないことが多々あり、分析時間が長時間になりやすい。

今回は新しい試みとして、内標準物質に色素を用いた多波長同時分析を試みた。一般用医薬品の有効成分は、紫外域の低波長にしか吸収がないものが多く、低波長で測定を行うのが一般的である。そこで、内標準物質として紫外域の低波長以外の可視域に大きな吸収を持つ色素を用いた。色素を内標準物質にすることで、被検成分の紫外域の測定波長による分析では内標準物質が使用できない溶出位置においても、可視域では内標準物質としての設定が可能となり、分析時間の短縮に寄与できると考えた。本検討では、「一般用医薬品の試験法 (上巻)」の鼻炎用点鼻薬の項に記載されている方法を参考に、フェニレフリン塩酸塩、クロルフェニラミンマレイン酸塩及びリドカインについてフォトダイオードアレイ検出器を用いた多波長同時分析を行い、各成分の直線性と回収率の確認をすることで、本分析法の実用性を検証した。

試験方法

市販鼻炎用点鼻薬のフェニレフリン塩酸塩約10mg、クロルフェニラミンマレイン酸塩約10mg及びリドカイン約2mgに対応する量を正確に量り、内標準溶液5mLを正確に加え、さらに移動相を加えて100mLとし、孔径0.45 μmのメンブランフィルターでろ過し、初めのろ液3mLを除き、次のろ液を試料溶液とした。「リドカイン」約

50mg、「フェニレフリン塩酸塩」約250mg及び「クロルフェニラミンマレイン酸塩」約250mgをそれぞれ精密に量り、移動相を加えて溶かし、正確に50mLとした。この液1mLと内標準溶液5mLを正確に加え、さらに移動相を加えて50mLとし、孔径0.45 μ mのメンブランフィルターでろ過し、初めのろ液3mLを除き、次のろ液を標準溶液とした。

試料溶液及び標準溶液10 μ Lにつき、下記の条件でHPLCにより試験を行う。試料溶液及び標準溶液の内標準物質のピーク面積に対する有効成分のピーク面積の比を求めた。

内標準溶液 青色1号の移動相溶液 (1 \rightarrow 20000)

試験条件

検出器：フォトダイオードアレイ検出器 (表1)

検出波長：230nm (フェニレフリン、クロルフェニラミン、リドカイン)、600nm (青色1号)

カラム：① L-column ODS 5 μ m 4.6mmID \times 150mm (財団法人化学物質評価研究機構製)

② Inertsil ODS-3 5 μ m 4.6mmID \times 150mm (ジーエルサイエンス)

移動相：1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム1.4gを水770mLに溶かし、リン酸でpH2.2に調整する。この液とアセトニトリルを(3:1)の割合で混合する。

カラム温度：40 $^{\circ}$ C付近の一定温度

流量：1.0mL/min

結果と考察

カラム①、②を用いて上記試験を実施した結果、成分の測定波長である230nmでの測定において、カラム①では内標準物質とフェニレフリンのピークは重ならなかった(図7、8)。よって、使用するカラムは①とした。また、内標準物質を検出する波長として、600nmを選択した(図9)。

この試験方法で、共同研究者の2社が直線性と添加回収試験を行い、実用性について検討した。この分析方法が実用性のあるものかを判断する基準として、直線性に関しては各濃度の試料溶液(60、80、100、120、140%)から算出された回帰直線の相関係数が0.999以上、添加回収については空試験液 \sim 各濃度の試料溶液(80、100、120%)を添加したときの回収率が100.00 \pm 5.00%であることと定めた。その結果、3成分共に直線性、回収率に問題がなく、基準を満たしており、2社間の結果に大きな差は認められなかった(表2、3)。これらの結果より、この分析方法が製剤の定量に実用可能であることが示唆された。

今回、内標準物質として入手が容易で、比較的広く用いられている青色1号を用いたが、色素には可視光で極大吸収を持つものが多いことから、より内標準物質として適したものがあると考えられる。分析時間を短縮し業務効率化を実現する方法として、今後さらなる検討・分析法構築が期待される。

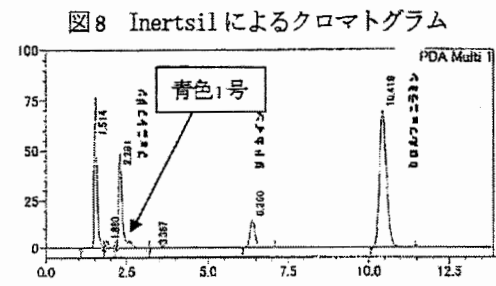
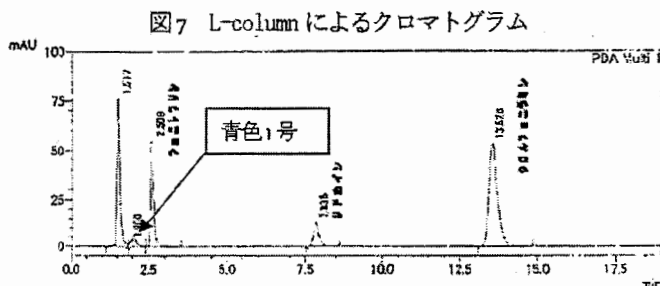


図9 L-columnによる各波長でのクロマトグラム

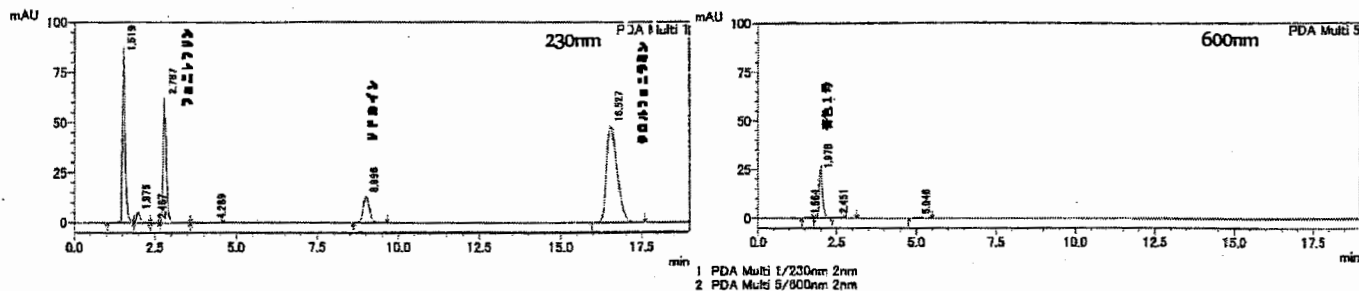


表1 使用機器

会社	A社	B社
メーカー	島津	島津
ポンプ	LC-20AB	LC-20AD
検出器	SPD-M20A	SPD-M20A
オートサンプラー	SIL-20AD	SIL-20AC
システムコントローラー	CEM-20A	-
オープン	CTO-20A	CTO-20AC

表2 直線性の相関係数

成分	相関係数	
	A社	B社
フェニレフリン	0.9996	0.9999
リドカイン	0.9998	0.9999
クロルフェニラミン	0.9999	1.0000

表3 回収率

成分	試料溶液	回収率(%)	
		A社	B社
フェニレフリン	80 %	102.9	100.0
	100 %	101.5	98.8
	120 %	100.8	98.8
リドカイン	80 %	102.5	99.9
	100 %	101.5	98.8
	120 %	101.8	99.3
クロルフェニラミン	80 %	101.8	99.6
	100 %	100.7	99.0
	120 %	101.0	99.4

参考文献

- 1) 上野英志他, HPLC法の新規充填剤及びアセトニトリル代替溶媒を用いた省力化・低コスト化の検討, 家庭薬研究 No.32, 28-36(2013)