

医薬品試験の効率化に関する検討

—UHPLC による省力化・低コスト化の検証及び

親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)による分離分析検討—

Studies on improving the efficiency in pharmaceutical test
-Cost reduction by Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)
and analysis by Hydrophilic Interaction Chromatography-

山本豊巖	ファーマパック株式会社	岩城有里	株式会社池田模範堂
Hougen YAMAMOTO	Pharmapack Co.,Ltd	Yuri IWAKI	Ikeda Mohando Co.,Ltd
野坂宜宏	救急薬品工業株式会社	野本有沙	株式会社廣貫堂
Nobuhiro NOSAKA	Kyukyu Pharmaceutical Co.,Ltd	Arisa NOMOTO	Kokando Co.,Ltd
高崎純一	大和薬品工業株式会社	梶川敬雄	東亜薬品株式会社
Jyunici TAKASAKI	Daiwa Pharmaceutical Co.,Ltd	Takao KAJIKAWA	TOA Pharmaceuticals Co.,Ltd
松任宏子	中央薬品株式会社	北原一治	富山小林製薬株式会社
Hiroko MATTO	Chuo Pharmaceutical Co.,Ltd	Kazuharu KITAHARA	TOYAMA KOBAYASHI Pharmaceutical Co.,Ltd
小泉テシヤワリー	株式会社富士薬品富山工場	藤野彬仁	前田薬品工業株式会社
Techawaree KOIZUMI	Fujiyakuhin Co.,Ltd	Akihito FUJINO	Maeda Pharmaceutical Industry Co.,Ltd
飯村和也	株式会社陽進堂	池崎富子	株式会社陽進堂
Kazuya IIMURA	Yoshhindo Inc.	Tomiko IKEZAKI	Yoshhindo Inc.
横田洋一	富山県薬事研究所		
Yoichi YOKOTA	Toyama Prefectural Institute For Pharmaceutical Research		

緒言

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、省力化・低コスト化は重要な要素である。今回、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) から超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) への試験法移管と移管による省力化・低コスト化の検証及び親水性相互作用クロマトグラフィーによる極性化合物とその他の成分の同時分離分析の検討を行った。

1. UHPLC による省力化・低コスト化の検討

目的

近年、HPLC 分析における分析時間の短縮や移動相溶媒の削減の一例として UHPLC を用いた超高速分析技術が注目されている。UHPLC とは、超微粒子充填カラムの利点を最大限に引き出すことができるように優れた低注入量からの注入再現性や高耐圧性等をもった液体クロマトグラフィーである。UHPLC と超微粒子充填カラムを使用することで、高い分離効率と分析時間の短縮を可能にしている。

今回、すでに確立されている HPLC 試験方法¹⁾を超微粒子充填カラムを用いた UHPLC に移行できるか確認し、その試験法の妥当性の検討及び分析時間の短縮を図った。

実験方法

市販の風邪薬に配合されているアセトアミノフェン及びエテンザミド約 56 mg、カフェイン約 17 mg に対応する量を精密に量り、薄めたリン酸(1→1000)/アセトニトリル混液(1 : 1)20 mL 及び内標準溶液 5 mL を正確に加え、10 分間激しく振り混ぜた後、遠心分離する。上澄液 2 mL に薄めたリン酸(1→1000)/アセトニトリル混液(8 : 1)を加えて、20 mL とし試料溶液とする。「アセトアミノフェン」を 105 °C で 2 時間乾燥し、その約 56 mg、「エテンザミド」をデシケーター(シリカゲル)で 3 時間乾燥し、その約 56 mg 及び「無水カフェイン」を 80 °C で 4 時間乾燥し、その約 17 mg をそれぞれ精密に量り、薄めたリン酸(1→1000)/アセトニトリル混液(1 : 1)20 mL に溶かした後、内標準溶液 5 mL を正確に加える。この液 2 mL を量り、薄めたリン酸(1→1000)/アセトニトリル混液(8 : 1)を加えて 20 mL とし、標準溶液とする。

また、各成分をそれぞれ薄めたリン酸(1→1000)/アセトニトリル混液(1 : 1)に溶かし、標準原液を調製する。それらの液に薄めたリン酸(1→1000)/アセトニトリル混液(1 : 1)を加えて、試料溶液の 60%、80%、100%、120%、140%になるように適宜希釈した後、標準溶液と同様に操作し、検量線用標準溶液とする。

検量線用標準溶液、標準溶液及び試料溶液について、下記の HPLC 及び UHPLC の条件により試験を行う。

内標準溶液 安息香酸 (和光純薬工業株式会社) 1 g をアセトニトリル 50 mL に溶かし、薄めたリン酸(1→1000)を加えて 100 mL とする

試験条件 (HPLC)

検出器：紫外吸光光度計(測定波長：280 nm)

カラム：CAPCELL PAK C18 SG120 5 µm 4.6 mmID×250 mm(株式会社資生堂)

カラム温度：40 °C、移動相：薄めたリン酸(1→1000)/アセトニトリル混液(17 : 3)

注入量：20 µL、流量：エテンザミドの保持時間が約 25 分になるように調整する

試験条件 (UHPLC)

検出器、カラム温度、移動相：HPLC と同様の条件、流量：0.3 mL/min、注入量：1 µL

カラム：Shimpack XR-ODS II 2.2 µm 2.0 mmID×75 mm(株式会社島津ジーエルシー)

実験結果

3 社 (A 社、B 社、C 社) で HPLC による分析を行った結果、本試験方法は各成分において良好な分離度、注入量再現性、相関係数が得られた。また各社においてばらつきはなく、一般用医薬品の試験法に記載されている試験条件の再現ができた(Table1、Fig.1)。

次に、UHPLC による分析を 3 社 (D 社、E 社、F 社) で実施したところ、2 社 (D 社、E 社) では良好な結果が得られたが、F 社では良好な分離度を得られなかった(Fig.2、Fig3、Table2)。原因として当該機器は配管内径が他の 2 社と比較して太かったこと及び使用したカラム接続の互換性などシステムの性能差に原因があったと推測される。

次に、HPLC、UHPLC において、それぞれで成分の定量値を求め比較したところ、差はほとんど認められず (Table3)、分析時間も HPLC 試験法では 26~27 分間であったのに対して、UHPLC 試験法で

は5~8分間程度まで短縮できた。

考察

今回の検討ではUHPLCシステムの性能差などの課題も挙げられたが、本試験方法ではHPLCからUHPLCへ移行ができ、医薬品試験の効率化に寄与できると考えられる。今回のように、HPLCと同等以上の結果が得られなかったパラメータについては、今後のさらなる検討・分析法構築が必要であると考えられる。

Table1 使用機器

機器	HPLC			UPLC		
	A社	B社	C社	D社	E社	F社
ポンプ	LC-20AT	LC-10Ai	LC-20AD	H-Class	LC-30AD	LC-20AD
検出器	SPD-20A	SPD-10Avp	SPD-20A		SPD-M30A	SPD-M30A
オートサンプラ	SIL-20AC	SIL-10Ai	SIL-20ACHT		SIL-30AC	SIL-20AC HT

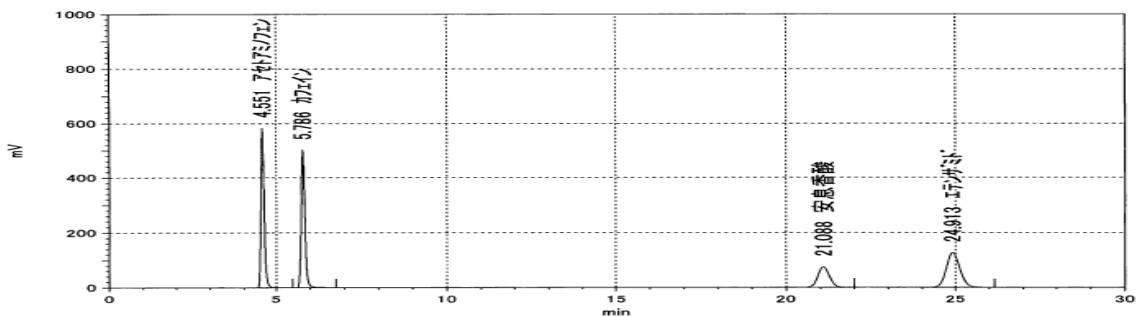


Fig.1 標準溶液のクロマトグラム(HPLC) (A社)

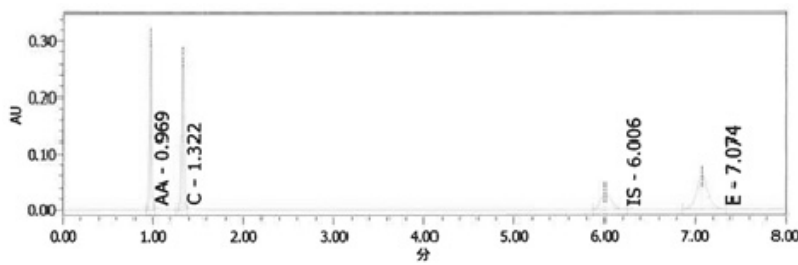


Fig.2 標準溶液のクロマトグラム(UHPLC) (D社)

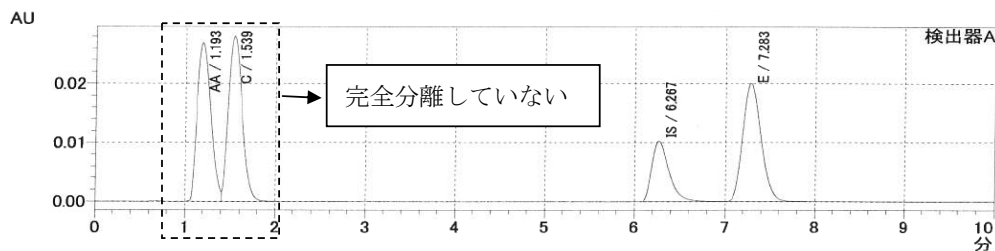


Fig.3 標準溶液のクロマトグラム(UHPLC、分離不良) (F社)

Table2 分析結果の各パラメータ

機器		HPLC			UPLC		
成分	パラメータ	A社	B社	C社	D社	E社	F社
アセトアミノフェン	保持時間(min)	4.500	4.551	4.612	0.968	0.974	1.193
	理論段数	10367	11646	9906	7522	1793	277
	分離度	-	-	-	-	-	-
	シンメトリー係数	1.30	1.24	1.21	1.11	1.25	1.32
	相関係数(面積比)	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
	再現性(面積比) (6回の相対標準偏差)	0.071	0.041	0.016	0.54	0.12	0.18
カフェイン	保持時間(min)	5.642	5.792	5.878	1.321	1.294	1.539
	理論段数	12637	13568	11930	10270	2733	471
	分離度	6.07	6.75	6.34	7.3	3.4	1.2
	シンメトリー係数	1.24	1.18	1.17	1.09	1.37	1.28
	相関係数(面積比)	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
	再現性(面積比) (6回の相対標準偏差)	0.082	0.019	0.016	0.54	0.12	0.21
内標準物質	保持時間(min)	21.105	21.094	20.952	6.004	5.807	6.267
	理論段数	20023	18351	19498	13916	11517	6025
	分離度	38.89	30.29	37.07	36.7	28.7	15.5
	シンメトリー係数	1.11	1.07	1.17	1.31	1.37	1.42
エテンザミド	保持時間(min)	24.619	24.938	24.907	7.067	6.709	7.283
	理論段数	19798	17960	19021	13285	11719	6231
	分離度	5.44	5.62	6.00	4.8	3.9	2.9
	シンメトリー係数	1.10	1.08	1.08	1.11	1.16	1.19
	相関係数(面積比)	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
	再現性(面積比) (6回の相対標準偏差)	0.051	0.071	0.011	0.61	0.09	0.15

Table3 UHPLCでの定量値%(HPLCでの定量値を100とした)

成分名	D社	E社	平均値
アセトアミノフェン	100.1	99.1	99.7
エテンザミド	100.2	97.6	99.3
カフェイン	99.8	97.0	98.5

2. 親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) による分離分析検討

目的

極性化合物の逆相系カラムへの保持と定量は、依然として逆相クロマトグラフィーにおける課題となっている。逆相クロマトグラフィーは、多くの化合物を保持し分離できるという汎用性から広く用いられている分析法である。しかし、実際は親水性（高極性）化合物にはあまり適していない。逆相クロマトグラフィーにおいては、そのままでは極性化合物は、カラムに保持されない、または早い時間に試料マトリックスと同時溶出し、正確な定量分析が困難になる場合が多い。

一方、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) は、高極性の固定相と高比率のアセトニトリルを含む移動相を使用し、分析種を親水性（極性）の低いものから溶出させる。保持メカニズムは液液分配、吸着、イオン交換、疎水性分配の複雑で多様な組み合わせであり、結果として逆相クロマトグラフィーと比べて異なる選択性および保持特性となる。質量分析計を使用する際には、有機溶媒比率の高い移動相を用いることによって、効率的な液滴の形成、脱溶媒効率の面で優れており、逆相クロマトグラフィーと比較して感度の向上が期待できるとされている²⁾。

本検討では、中性化合物ではあるが極性が高いため、逆相系カラムでは保持されず分析が困難であるアラントインに着目した。HILIC を用いて、その他の成分との同時分析を可能とすることによる分析の省力化を試みた。分析法を検討するに当たり、アラントインと水溶性ビタミンの同時分析を実施している HILIC カラムの分析例³⁾を参考とした。

市販点眼剤を対象に、逆相系カラムでは保持されず分析が困難であるアラントインとその他の共存する水溶性ビタミン等との成分について、2種類の HILIC カラムを用いて検討した。

実験方法

市販点眼薬のピリドキシン塩酸塩約 2.5 mg、ネオスチグミンメチル硫酸塩約 0.125 mg、クロルフェニラミンマレイン酸塩約 0.75 mg、テトラヒドロゾリン塩酸塩約 1.25 mg 及びアラントイン約 5 mg に対応する量を正確に量り、内標準溶液 2.5 mL を正確に加え、さらに移動相を加えて 50 mL とし、孔径 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し、初めのろ液を除き、次のろ液を試料溶液とした。別に各成分をそれぞれ精密に量り、それぞれに移動相を加えて標準原液とした。各標準原液を適宜希釈し、試料溶液と同様に内標準溶液及び移動相を加えて、標準溶液とした。試料溶液及び標準溶液につき、下記の条件で HPLC (HILIC モード) により試験を行い、各 HILIC カラムでの分離能について検証した。

内標準溶液 シチジン (和光純薬工業株式会社) の移動相溶液 (3³⁰⁰⁰)

試験条件^(※)

検出器：紫外吸光度計 (検出波長：210 nm)、カラム温度：37°C、流量：1.0 mL/min

カラム：YMC-Pack Polyamine II 5 μm 4.6×250 mm (株式会社ワイエムシイ)

CAPCELL PAK NH2 UG80 5 μm 4.6×250 mm (株式会社資生堂)

移動相：アセトニトリル / 25 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4$ (pH 2.8) 混液 (4 : 1)

(※) YMC-Pack Polyamine II カラムの分析例³⁾を参考とし、ピーク形状を考慮して移動相の緩衝液濃度を 50 mM から 25 mM に変更した。

実験結果

2本の HILIC カラムのいずれを用いた場合でも、クロルフェニラミンマレイン酸塩由来の2つのピークのいずれかが他の成分のピークと重なり、各成分の完全分離は達成できなかった。また試料溶

液にテーリングの傾向が見られ、原因としては、試料溶液に含まれる添加物の影響が考えられる (Fig4、Fig5)。

さらに今回、カラムの平衡化にかなりの時間を要し、その間ピーク形状及び保持時間が変化するという問題が発生した (Fig6、Fig7)。イオン交換で安定した分析をするためには、移動相と固定相のイオン対の形成が平衡に達する必要があるが、高濃度のリン酸-アンモニウム水溶液を通液し、積極的に固定相とイオン対を形成させることが必要とされるが、今回の試験では、このような処理は実施せず、分析用の移動相を通液したのみであったためイオン対形成が不十分となり、保持時間の安定に時間を要したものと思われる。

考察

一般的に、ピリドキシン塩酸塩等の塩基性化合物の分析には、イオンペア試薬を用いて ODS カラムに保持させる方法があるが、この方法では、アラントイン等の非イオン性の親水性物質は保持されず、同時分析は困難であった。今回の報告により、HILIC カラムを使用することで、全ての成分については困難なもの、塩基性化合物と非イオン性の親水性物質の同時分析が可能であることが分かった。カラムの安定化に時間を要するという問題点が挙げられたことから、使用する溶媒量の削減については課題が残るが、効率良くカラムを平衡化させることが可能となれば、分析時間の短縮化とともに、イオンペア試薬等を用いる必要もなくなり、コスト削減にも大きく貢献できることが期待される。今後、今回の問題点については、他の HILIC カラムの使用も含め、更に検討する必要があると考えられた。

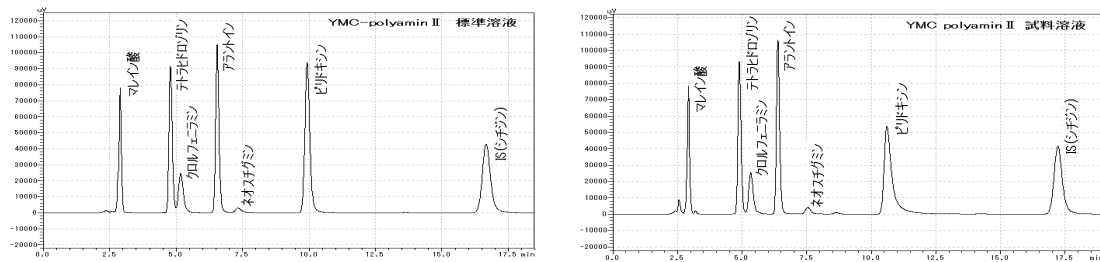


Fig.4 YMC-Pack Polyamine IIでのクロマトグラム (左：標準溶液、右：試料溶液)

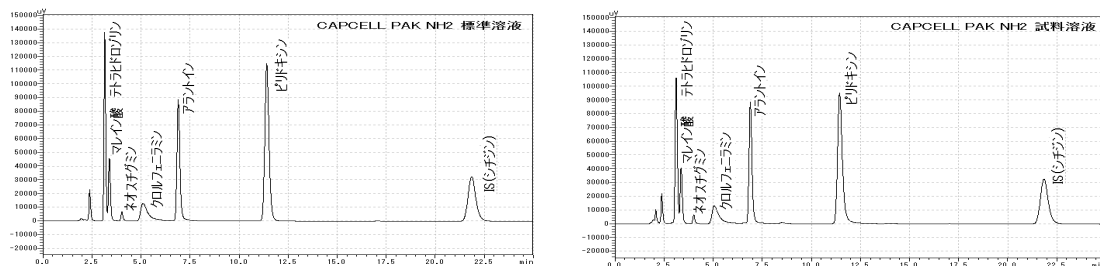


Fig.5 CAPCELL PAK NH₂でのクロマトグラム (左：標準溶液、右：試料溶液)

Table3 分析結果パラメータ (YMC-Pack Polyamine II)

成分	保持時間 (min)	理論段数	分離度	シンメトリー係数
マレイン酸	2.900	6156	—	—
塩酸テトラヒドロズリン	4.808	7240	10.2	1.22
クロルフェニラミン	5.209	3913	1.4	—
アラントイン	6.490	12995	4.6	1.22
ネオスチグミンメチル硫酸塩	7.379	5370	2.8	—
ピリドキシン塩酸塩	10.104	13999	7.3	1.21
シチジン	16.853	14275	14.9	1.22

備考：分離が不十分でパラメータの算出が困難なものは（－）で記載した

Table4 分析結果パラメータ (CAPCELL PAK NH₂)

成分	保持時間 (min)	理論段数	分離度	シンメトリー係数
塩酸テトラヒドロズリン	3.137	7040	—	1.38
マレイン酸	3.374	5720	1.4	—
ネオスチグミンメチル硫酸塩	4.010	8397	3.6	1.38
クロルフェニラミン	5.180	1074	2.9	2.16
アラントイン	6.882	10921	3.8	1.34
ピリドキシン塩酸塩	11.374	13909	13.9	1.20
シチジン	21.813	14802	19.0	1.21

備考：分離が不十分でパラメータの算出が困難なものは（－）で記載した

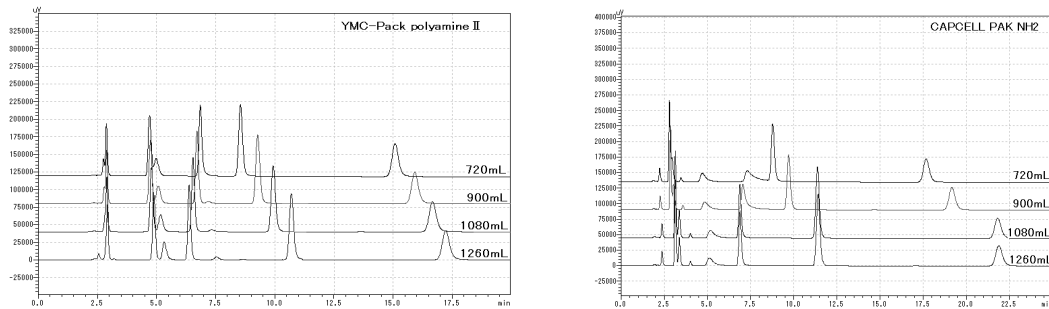


Fig.6 クロマトグラムの累積通液量による変化
(左：YMC-Pack Polyamine II 右：CAPCELL PAK NH₂)

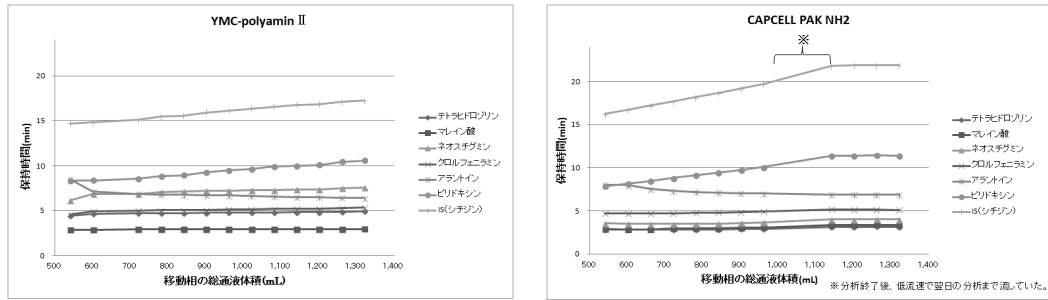


Fig.7 通液時間による保持時間の変化
(左：YMC-Pack Polyamine II 右：CAPCELL PAK NH₂)

参考文献

- 1) 真弓忠範編、一般用医薬品の試験法・上巻-5 薬効群収録、真弓忠範編、株式会社薬業時報社、日本、1997、57-59
- 2) 日本ウォーターズ株式会社 HILIC 親水性相互作用クロマトグラフィー総論 第一刷発行(2011年1月)
- 3) 株式会社ワイエムシイ HPLC アプリケーションデータ J030624B