

医薬品試験の効率化に関する検討（第3報）

—HILIC カラムを用いた点眼剤中の多成分同時定量法について—

Studies on improving the efficiency in pharmaceutical test. III

-Multicomponent simultaneous assay in the ophthalmic solutions by HILIC column-

竹村麻美	富士製薬工業株式会社	二谷智恵	救急薬品工業株式会社
Mami TAKEMURA	Fuji Pharma Co., Ltd	Chie FUTATSUYA	Kyukyu Pharmaceutical Co., Ltd.
福島美和	株式会社池田模範堂	室谷亜紀子	シミック CMO 株式会社
Miwa FUKUSHIMA	Ikedo Mohando Co.,Ltd	Akiko MUROTANI	Cmic CMO Co., Ltd.
横田洋一	富山県薬事研究所		
Yoichi YOKOTA	Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research		

緒言

近年、親水性相互作用型クロマトグラフィー（HILIC）に関する研究が進み、各メーカーから HILIC に用いる様々な固定相が開発・発売されている。HILIC は順相クロマトグラフィーの一種であり、水と有機溶媒（アセトニトリルなど）の混合溶液と、高極性の固定相を用いる分離モードである。通常の順相クロマトグラフィーでは非水溶性の有機溶媒を用いるため、親水性の化合物の中にはこの溶媒系に溶解しないため分析できないという問題があったが、HILIC では移動相が水系であり、高極性化合物も溶解、分析が可能である。HILIC は古典的な未修飾シリカゲルに加えて、アミノプロピル基、アミド基、ジオール、シアノ基、双極イオンと様々な高極性官能基が修飾されたシリカゲルを充填したカラムに適用できる。

アラントインは水に可溶性化合物ではあるが、逆相で高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分析する場合は ODS への保持がほとんど無いため、HILIC が最も有効な分析手法であると考えられる。しかし、多成分配合製剤において、アラントインと同時に親水性化合物を同時に分析しようとした場合、HILIC では固定相の種類が様々で、それぞれにおいて移動相中の塩の種類、塩濃度、pH、水含有率がピーク保持、形状に対してどのような変化をもたらすかの予測が難しく、試験法設定が困難である。

昨年度は、アラントインを含む点眼剤について、HILIC を用いてその他有効成分である水溶性ビタミンとの同時分析について検討されてきたが、『カラムの平衡化』という問題があり、ピークの保持時間が定まらず試験結果に対する評価が難しい状態であった。そこで、本年度は、固定相の違う数種類の HILIC カラムを用いて『カラム平衡化』『ピークの分離』『点眼薬の定量』の3点において順番に検討していき、分析対象とした点眼剤の分析方法について最も適した条件を見出すこととした。

実験方法

1. カラムの平衡化時間の確認

様々な固定相を使用している各種の HILIC カラム（粒子径、内径、長さが同じ物）を用いて、移動相を流した状態でのピーク保持時間の変化を確認することとした。評価方法としては点眼剤中の含有成分である、アラントイン及びピリドキシリン塩酸塩を用いて、2 時間ごとの保持時間の変化を確認し、カラム平衡化時間の比較のため、以下の計算で算出した値を『保持時間変動率』として定義し、保持時間変動の大きさを算出し比較した。

$$\text{保持時間変動率 (\%)} = (\text{2 時間後との保持時間の差}) / \text{保持時間} \times 100$$

試験方法

ピリドキシリン塩酸塩（東京化成工業株）約 50mg 及びアラントイン（和光純薬工業株）約 50mg をそれぞれ精密に量り、水 10mL に溶かし、アセトニトリルを加え正確に 50mL とし、ピリドキシリン塩酸塩標準原液及びアラントイン標準原液とした。ピリドキシリン塩酸塩標準原液 2.5mL 及びアラントイン標準原液 5mL を正確に取り、アセトニトリル／水混液（4：1）を加え正確に 50mL とし、標準溶液とした。標準溶液 10 μ L につき以下の試験を行った。

試験条件

検出器：紫外吸光光度計（検出波長：210nm）

カラム：YMC-Triart Diol-HILIC 4.6 \times 250mm, 5 μ m（株ワイエムシイ）

YMC-Pack Polyamine II 4.6 \times 250mm, 5 μ m（株ワイエムシイ）

COSMOSIL HILIC 4.6 \times 250mm, 5 μ m（ナカライテクス株）

Merck Zic-HILIC 4.6 \times 250mm, 5 μ m（メルク株）

移動相：アセトニトリル／50mM NH₄H₂PO₄（H₃PO₄で pH2.8 に調製）（4：1）

カラム温度：37 $^{\circ}$ C

流量：1.0mL／min

2. 分析条件の最適化

カラム平衡化の結果が良好であった 2 種類のカラム YMC-Triart Diol-HILIC 及び Merck Zic-HILIC（以下 Diol、Zic カラム）を用いて、移動相中のアセトニトリル濃度、塩濃度及び pH を変化させ、標準溶液の各成分の保持時間の変化を調べた。

試験方法*

ピリドキシリン塩酸塩約 50mg、クロルフェニラミンマレイン酸塩（東京化成工業株）約 15mg、テトラヒドロゾリン塩酸塩（シグマーアルドリッチ）約 25mg 及びアラントイン約 50mg をそれぞれ精密に量り、水 10mL に溶かし、アセトニトリルを加えてそれぞれ正確に 50mL とし、ピリドキシリン標準原液、クロルフェニラミン標準原液、テトラヒドロゾリン標準原液及びアラントイン標準原液とした。別に、ネオスチグミンメチル硫酸塩（東京化成工業株）25mg を精密に量り、水 10mL に溶かし、アセトニトリルを加え正確に 50mL とした。この液 2mL を正確にとり、アセトニトリル／水混液（4：1）を加えて正確に 20mL とし、ネオスチグミンメチル標準原液とした。ピリドキシリン標準原液、クロルフェニラミン標準原液、テトラヒドロゾリン標準原液及びネオスチグミンメチル標準原液 1mL

ずつを正確にとり、アラントイン標準原液 2mL 及び内標準溶液 1mL を正確に加え、アセトニトリル／水混液 (4 : 1) を加えて正確に 20mL 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 を使用し HILIC により試験を行った。

内標準溶液 シチジン (東京化成工業株) のアセトニトリル／水混液 (4 : 1) 溶液 (3→5000)

試験条件

カラム : YMC-Triart Diol-HILIC 4.6×250mm, 5 μ m (株ワイエムシィ)

Merck Zic-HILIC 4.6×250mm, 5 μ m (メルク株)

移動相 : 『アセトニトリル／25mM NH₄H₂PO₄ (H₃PO₄ で pH2.8 に調製) (4 : 1)』を基本に、下線部の移動相中のアセトニトリル濃度 (80~84%)、リン酸塩濃度(0~50mol/mL)、pH (pH2.2~4.6) を変化させた。

検出器、カラム温度、流量は「1. カラム平衡化」条件と同じ。

3. 点眼剤の定量

「2. 分析条件の最適化」の結果より、各カラムで最適化した分析条件にて、点眼剤中の各成分の定量を試みた。また、検量線の作成及びシステム適合性の評価も行った。

試験方法※

市販点眼薬 1mL (ピリドキシリン塩酸塩約 1mg、ネオスチグミンメチル硫酸塩約 0.05mg、クロルフェニラミンマレイン酸塩約 0.3mg、テトラヒドロゾリン塩酸塩約 0.5mg 及びアラントイン約 2mg に対応する量) を正確に量り、内標準溶液 1mL を正確に加え、さらに移動相を加えて正確に 20mL とし、孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、ろ液を試料溶液とした。

ピリドキシリン塩酸塩約 25mg、クロルフェニラミンマレイン酸塩約 7.5mg、テトラヒドロゾリン塩酸塩約 12.5mg 及びアラントイン約 25mg をそれぞれ精密に量り、移動相に溶かし、それぞれ正確に 25mL とし、ピリドキシリン標準原液、クロルフェニラミン標準原液、テトラヒドロゾリン標準原液及びアラントイン標準原液とした。別に、ネオスチグミンメチル硫酸塩約 12.5mg を精密に量り、移動相に溶かし、正確に 25mL とした。この液 2mL を正確にとり、移動相を加えて正確に 20mL とし、ネオスチグミンメチル標準原液とした。ピリドキシリン標準原液、クロルフェニラミン標準原液、テトラヒドロゾリン標準原液及びネオスチグミンメチル標準原液 1mL ずつを正確にとり、アラントイン標準原液 2mL 及び内標準溶液 1mL を正確に加え、移動相を加えて正確に 20mL とし、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 を使用し HILIC により試験を行った。

内標準溶液 : シチジンの移動相溶液 (3→5000)

試験条件

カラム：YMC-Triart Diol-HILIC 4.6×250mm, 5 μ m (株ワイエムシイ)

Merck Zic-HILIC 4.6×250mm, 5 μ m (メルク株)

移動相：Diol カラム

リン酸 0.05mg を水 200mL に溶かし、アセトニトリル 800mL を加えて混和する。

Zic カラム

リン酸二水素アンモニウム 0.173g 及びリン酸 0.33g を水 150mL に溶かし、アセトニトリル 850mL 加えて混和する。

検出器、カラム温度、流量は「1. カラム平衡化」「2. 分析条件の最適化」の条件と同じ。

※昨年度の試験条件¹⁾を参考に分析条件を検討した。なお、標準物質として市販試薬を用いた。

実験結果

1. カラムの平衡化時間の確認

Diol カラム及び Zic カラムの 2 種類のカラムにおいて、保持時間の安定化に要する時間が比較的少なく、1.0mL/min で 240mL (4 時間) 程度の通液で保持時間変動率が 1%以下となった。また、昨年度用いていた YMC-Pack Polyamine II については、保持時間の安定化に 360mL (6 時間) 以上の時間を要し、今回の移動相条件においてもカラムの平衡化にかなりの溶媒量が必要であった。COSMOSIL HILIC については、1080mL (18 時間) の通液後においても保持時間が安定しなかった。

(Fig.1)

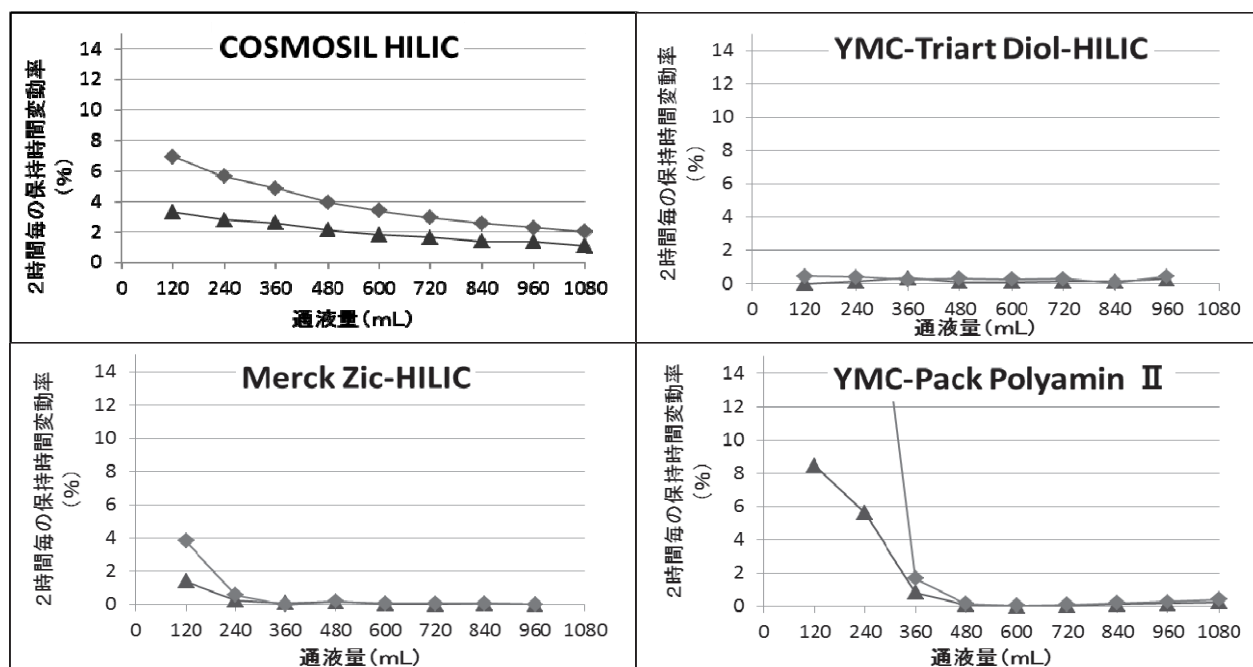


Fig.1 カラムの種類による保持時間変動率の比較(▲：アラントイン ◆：ピリドキシン)

2. 分析条件の最適化

1) アセトニトリル濃度変化 (80%~84%)

アセトニトリル濃度が84%を超えると移動相が白濁し沈殿が発生したため、80~84%での検討とした。Diol 及び Zic カラムのいずれにおいても、今回の検討の範囲内では完全分離は認めなかったが、アセトニトリル濃度を高くすることによって分離が向上する傾向があった (Fig.2)。

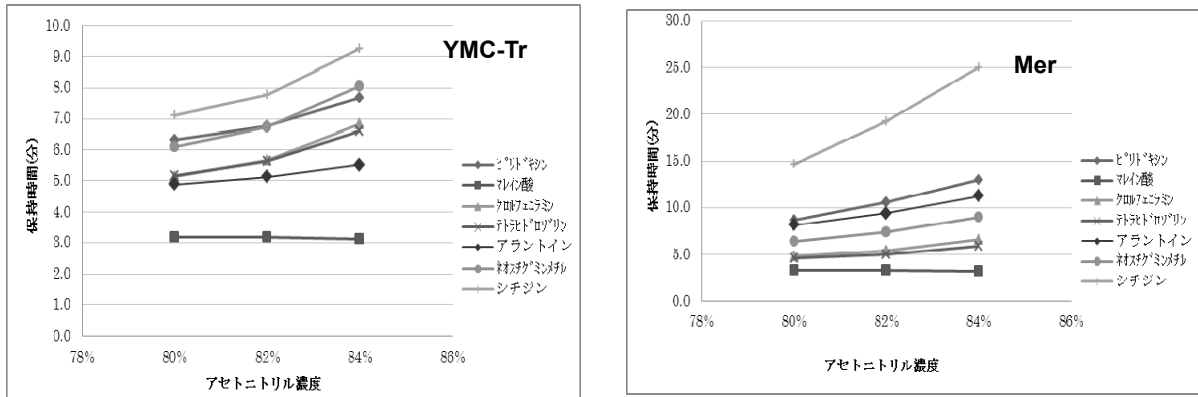


Fig.2 アセトニトリル濃度による保持時間の変化

2) 塩濃度変化(0~50mM)

塩の有無では保持の挙動が大きく異なったが、塩濃度によるピーク保持時間への影響はほとんどみられなかった。Diol カラムでは塩を添加せずに pH を 2.8 とした液を用いた場合、各成分が分離したが、ピリドキシン、シチジンのピークにてテーリングを認めた。Zic カラムでは今回の検討の範囲内では完全分離はなされなかった (Fig.3)。

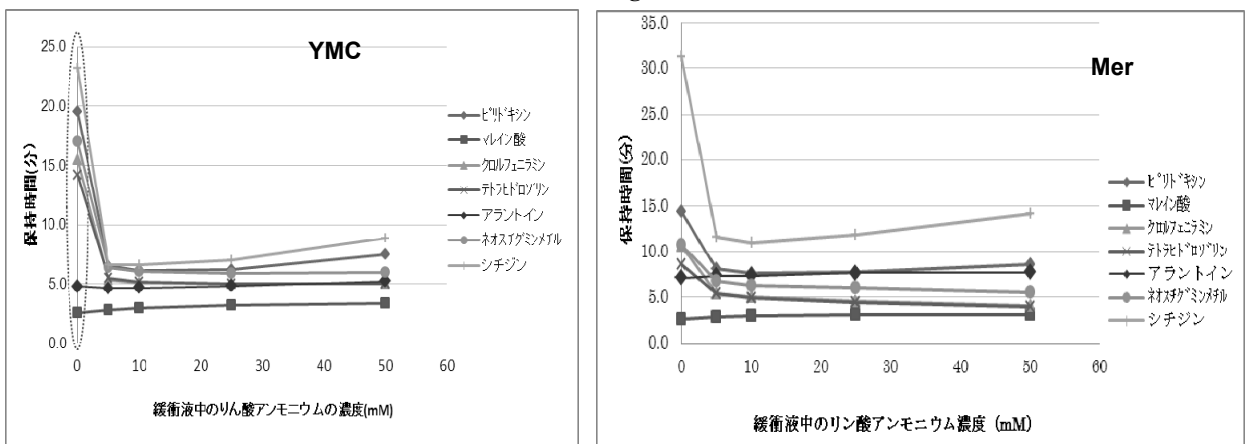


Fig.3 リン酸アンモニウム濃度による保持時間の変化

3) pH 変化 (pH2.2~4.6)

pH を変動させることによりピリドキシン及びシチジン (内標準物質) のみ、保持が大きく変化した。Diol カラムでは今回の検討の範囲内では完全分離はなされなかった。Zic カラムでは pH2.2 にて完全分離が認められた (Fig.4)。

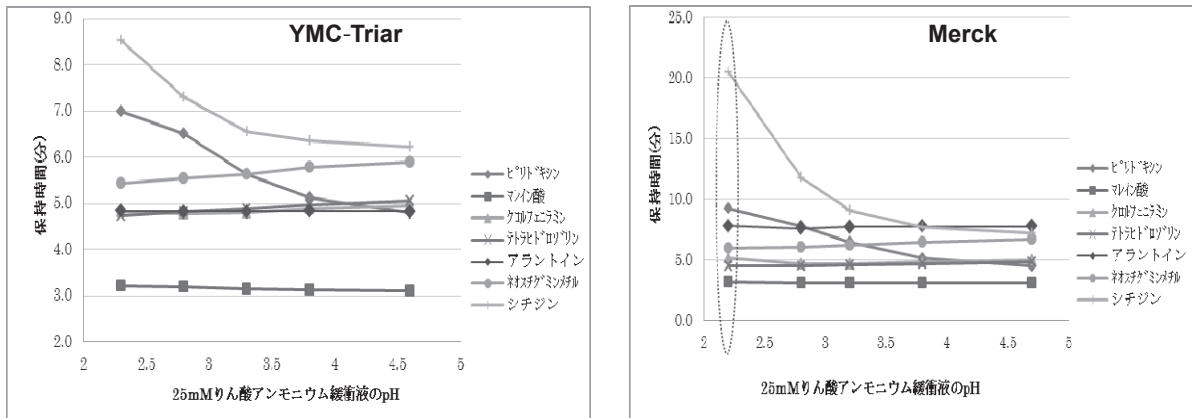


Fig.4 リン酸アンモニウム緩衝液の pH による保持時間の変化

以上の結果より、Diol カラムにおいては塩なしで pH2.8 とすると分離の可能性があり、Zic カラムにおいては pH2.2 で塩濃度を 25mM より減らし移動相中のアセトニトリル濃度を上げると分離の可能性があることがわかった。それぞれ以下の移動相条件を最適条件とした。

Diol カラム：リン酸 0.05g を水 200mL に溶かし、アセトニトリル 800mL を加えて混和する。

Zic カラム：リン酸二水素アンモニウム 0.173g 及びリン酸 0.33g を水 150mL に溶かし、アセトニトリル 850mL 加えて混和する。

3. 点眼剤の定量

Diol カラムに関しては標準溶液における各成分の分離は可能であったが、試料溶液を測定した際に試料中に含まれる塩と思われる影響によりピーク形状の乱れが確認されたことから、定量値の測定を断念した (Fig.5)。

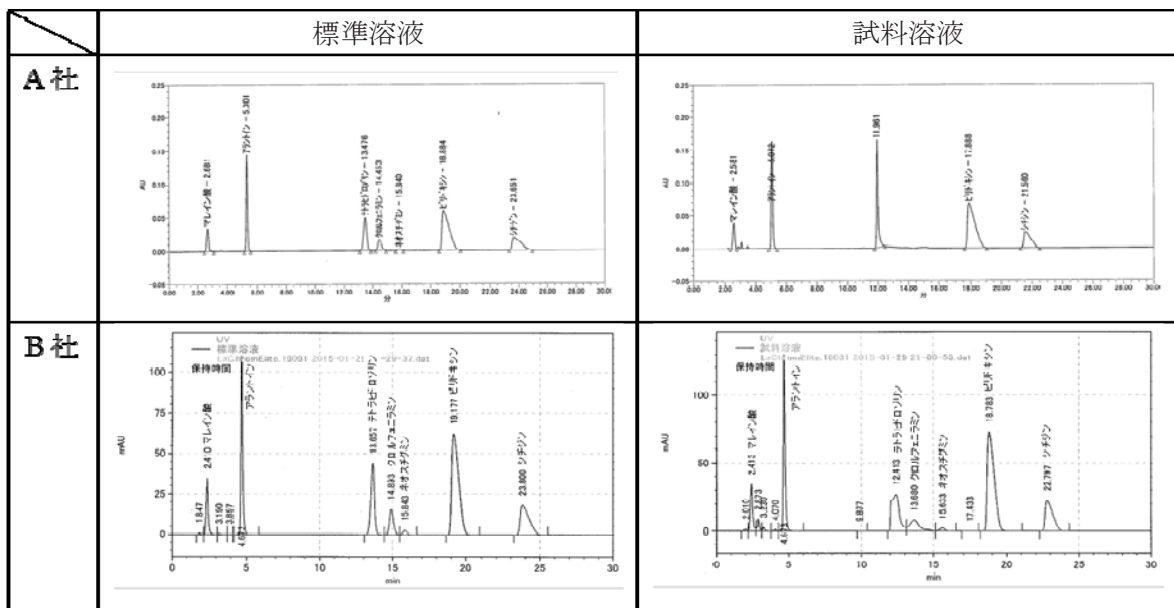


Fig.5 Diol カラムにおける標準溶液と試料溶液のクロマトグラム

Zic カラムにおいては、試料溶液のピーク形状についても問題は認めなかった (Fig.6)。

以上の結果を踏まえ、Zic カラムを用いて、検量線、システムの再現性、システムの性能及び 3 社による定量値再現性の確認を行った。検量線についてはピーク面積が最も小さいネオスチグミンにおいて相関係数が 0.994 ではあったが、全体としては 0.999 前後であり、直線性における濃度相関性はほぼ問題は無い結果であった (Table1)。システム再現性では、一部ばらつきが認められる結果となったが、測定機器の違いやネオスチグミンのピークが比較的小さいためにバラツキが生じやすかった事が原因であると考えられる (Table2)。システムの性能については各々のピークが完全に分離しており、良好な結果であった (Table3)。更に 3 社による分析においても、各成分の定量値は相対標準偏差が 1.5%以内とほぼ同様の値であったため、定量値の再現性についても問題がないことが確認できた (Table4)。

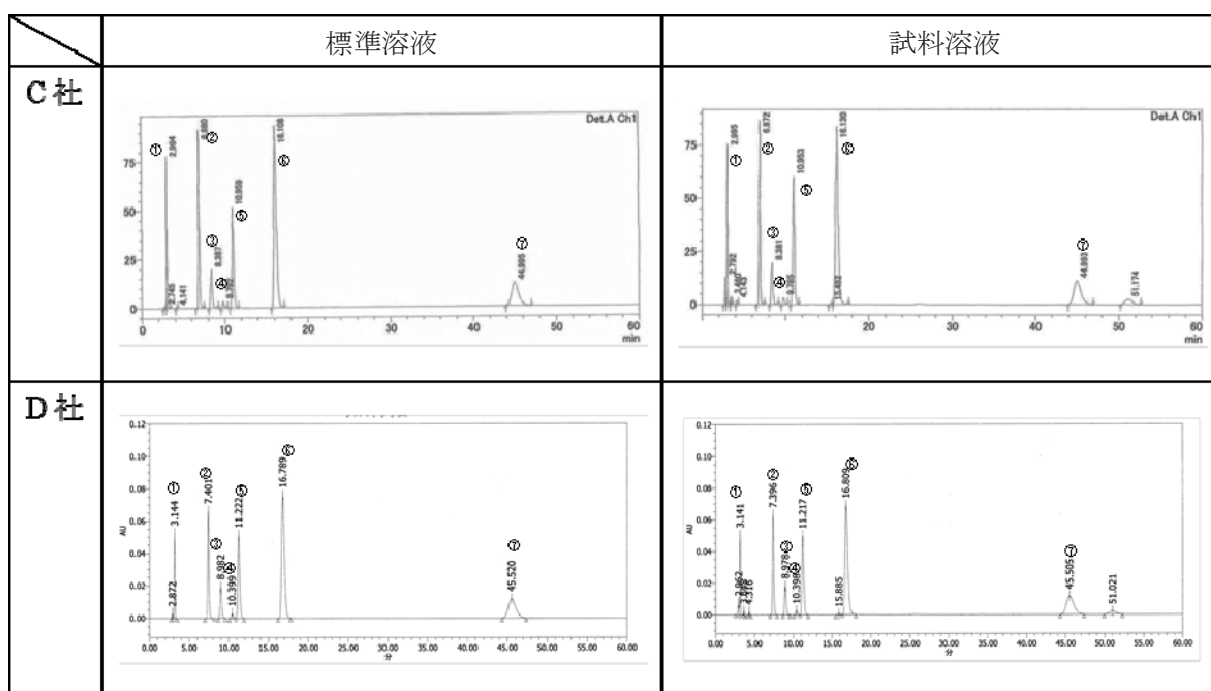


Fig.6 Zic カラムにおける標準溶液と試料溶液のクロマトグラム

- ①マレイン酸 ②テトラヒドロゾリン ③クロルフェニラミン ④ネオスチグミン ⑤アラントイン
⑥ピリドキシシン ⑦内標準物質 (シチジン)

Table1 Zic カラムにおける各成分の回帰式と相関係数

	テトラヒドロゾリン	クロルフェニラミン	ネオスチグミン	アラントイン	ピリドキシシン
回帰式	$Y=0.995X+0.010$	$Y=0.381-0.009$	$Y=0.060X-0.010$	$Y=1.210X-0.016$	$Y=2.652X-0.123$
相関係数	R=0.999	R=1.000	R=0.994	R=1.000	R=0.998

Table2 Zic カラムにおけるシステム再現性確認

	システム再現性における相対標準偏差(%) (n=6)				
	テトラヒドロゾリン	クロルフェニラミン	ネオスチグミン	アラントイン	ピリドキシン
A社	0.09	0.03	0.36	0.07	0.32
C社	0.54	0.79	1.05	0.60	0.79
D社	0.42	0.60	0.72	0.42	0.46

Table3 Zic カラムにおけるシステムの性能確認

	分離度 (前に溶出するピークとの分離度)					
	テトラヒドロゾリン	クロルフェニラミン	ネオスチグミン	アラントイン	ピリドキシン	シチジン
A社	25.3	6.7	5.5	3.7	11.6	29.3
C社	6.1	4.3	3.6	3.3	11.7	28.8
D社	18.4	4.8	3.6	2.0	10.4	25.0

Table4 Zic カラムにおける定量値の再現性確認

	成分含有率 (%)				
	テトラヒドロゾリン	クロルフェニラミン	ネオスチグミン	アラントイン	ピリドキシン
A社	99.9	99.5	98.3	99.3	97.4
C社	98.1	99.1	96.9	99.0	95.9
D社	97.2	97.3	98.1	98.1	95.6
平均値	98.4	98.7	97.8	98.8	96.3
標準偏差	1.329	1.147	0.765	0.650	0.933
相対標準偏差	1.35	1.16	0.78	0.66	0.97

考 察

今回の検討の結果、アラントインを含む点眼剤中の多成分同時分析が可能となり、分析時間の短縮化に寄与できる結果が得られた。

HILIC カラムは種類により平衡化に必要な時間、ピークの保持時間や形状が大きく違ってくることから、測定対象に適した HILIC カラムを選択することが重要であると考えられる。

なお、今回の検討で得られた各カラムでの平衡化にかかる時間の傾向及び Diol カラム及び Zic カラムにおける移動相中のアセトニトリル濃度、塩濃度及び pH による各成分のピーク保持時間変動等の基礎的データは、今後、他の製剤において HILIC カラムを用いて分析方法を検討する上でも参考となる貴重なデータであると言える。

文 献

- 1) 山本豊巖ら、家庭薬研究 No34、65-72(2015)