

医薬品試験の効率化に関する検討(第2報)

- 超高速液体クロマトグラフ(UHPLC)の汎用性及び優位性について -

Studies on improving the efficiency in pharmaceutical test. II.

-General versatility and superiority of Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)-

飯村和也	株式会社陽進堂	池崎富子	株式会社陽進堂
Kazuya IIMURA	Yoshindo Inc.	Tomiko IKEZAKI	Yoshindo Inc.
松任宏子	中央薬品株式会社	森元久美子	テイカ製薬株式会社
Hiroko MATTO	Chuo Pharmaceutical Co.,Ltd	Kumiko MORIMOTO	Teika Pharmaceutical Co., Ltd.
田中雄大	東亜薬品株式会社	馬渡暢子	株式会社パナケイア製薬
Yudai TANAKA	TOA Pharmaceuticals Co.,Ltd	Yoko MAWATARI	Panakeia Pharmaceutical Co., Ltd.
山本豊巖	ファーマパック株式会社	新海邦孟	富士製薬工業株式会社
Hougen YAMAMOTO	Pharmapack Co.,Ltd	Kunio SHINKAI	Fuji Pharma Co., Ltd.
小林夏絵	株式会社富士薬品	前田渚	株式会社富士薬品
Natsue KOBAYASHI	Fujiyakuin Co.,Ltd	Nagisa MAEDA	Fujiyakuin 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、高速液体クロマトグラフ(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超高速液体クロマトグラフ(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である。粒径 2 μm 以下の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。

UHPLCを使用することが効率化につながると言われている一方で、HPLCに比べると、まだ普及台数も少ない。そこで、今回、UHPLCを所有する複数の会社で、昨年度確立した同一試験条件¹⁾で試験を行うことで室間再現性を検証することとした。さらに、HPLCとUHPLC間で、カラムなど同一条件で試験を行い、室間再現性を比較することとした。これらの実験を通じてUHPLCの汎用性及び優位性が認められれば、今後UHPLCのさらなる普及につながると考えた。

1. UHPLCの室間再現性の検証

実験方法

「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 を正確に加えた。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、標準溶液とした。

また、標準溶液と同様に、標準溶液に対して 60%、80%、100%、120%、140%となるように適宜調製を行い、検量線用標準溶液を調製した。

標準溶液及び検量線用標準溶液について、Table1 の 4 社(A、B、C、D)の UHPLC を用いて、下記の条件で試験を行った。分析時間の短縮についても検証するため 2 流量で実施した。

内標準溶液 安息香酸 (和光純薬工業製試薬) 1.0 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 とした。

試験条件

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：280nm)

カラム：Inert Sustain C18 2.2 μ m 2.0 mmID×75 mm (ジーエルサイエンス社製)
(デッドボリューム削減のため、カラム入口にジーエルサイエンス社製高耐圧性フィッティング使用)

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)

流量：0.3 mL/min 及び 0.6 mL/min

注入量：1 μ L

実験結果及び考察

理論段数、分離度、シンメトリー係数、相関係数及び注入量再現性(面積及び内標準物質に対する面積比)の各分析パラメータを各会社間で求めた結果、早く溶出するアセトアミノフェンとカフェインの理論段数、分離度及びシンメトリー係数が若干ばらついた他は、ばらつきもなく良好な結果が得られた。(Fig.1~2 及び Table2)。

流量を 0.3 mL/min から 0.6 mL/min に上げることでアセトアミノフェンとカフェインの理論段数及び分離度は多少減少したが、A 社、D 社のシンメトリー係数は、少し改善されることが確認された。

以上より流量を 2 倍にしても分析パラメータに問題はなく、分析時間を約半分の数分に短縮できることが確認された。

2. UHPLC 及び HPLC の室間再現性の比較

実験方法

UHPLC の汎用性を検証するため、HPLC でも使用される粒径 3 μ m、内径 3.0mm のカラムを用いて、UHPLC 所有の 4 社(A 社、B 社、C 社、D 社)と HPLC 所有の 4 社(E 社、F 社、G 社、H 社)で比較を行った (Table1)。カラム、カラムフィッティング及び試験条件を統一し、流量は 0.6 mL/min で行った。

試験条件

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：280nm)

カラム：Inert Sustain C18 3 μ m 3.0 mmID×75 mm (ジーエルサイエンス社製)
(デッドボリューム削減のため、カラム入口にジーエルサイエンス社製高耐圧性フィッティング使用)

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)

流量：0.6 mL/min

注入量：1 μ L

実験結果及び考察

本試験方法では、UHPLC 及び HPLC においても各成分における良好な分離度、シンメトリー係数、相関係数、注入量再現性(内標準物質に対する面積比)が得られ、各社においてばらつきはなかった (Fig.3~4 及び Table3)。しかし、アセトアミノフェン、カフェインの理論段数と分離度において、HPLC に対して UHPLC が約 2 倍以上であった。更に、UHPLC 所有の 4 社及び HPLC 所有の E 社、G 社において良好な注入量再現性(面積)が得られた。しかし、HPLC 所有の F 社、H 社は相対標準偏差が 1.0%を大きく上回った。これは、注入量を UHPLC に合わせ 1 μ L としたためと思われる。

まとめ

本試験条件において UHPLC は異なる環境下(企業間、UHPLC メーカー間)でもほぼ同等な結果が得られるということが確認できた。更に流量を上げ、分析時間を短縮しても良好な結果が得られた。また、UHPLC で HPLC 用カラムを使用し分析を行っても、HPLC 用カラムは問題なく使用することができ、更に溶出の早い成分(アセトアミノフェン、カフェイン)に関しては、理論段数、分離度、注入量再現性(面積)の点で優位性が確認できた。UHPLC は面積と面積比の相関係数及び注入量再現性のいずれも良好な結果が示されたことから、絶対検量線法及び内標準法のどちらの分析方法を選択しても問題ないと考えられる。

以上のことから、UHPLC は汎用性・優位性のある機器として医薬品試験の効率化に寄与できると考えられる。

Table1 使用機器

機器	UHPLC		HPLC			
会社	A,B,C 社	D 社	E 社	F 社	G 社	H 社
ポンプ	H-Class	LC-30AD	LC-20ADX	LC-20AT	LC-20AD	alliance
検出器		SPD-M20A	SPD-20A	SPD-20A	SPD-20A	Dual λ
オートサンプラ		SIL-30AC	SIL-20ACXR	SIL-20AC	SIL-20ACHT	alliance

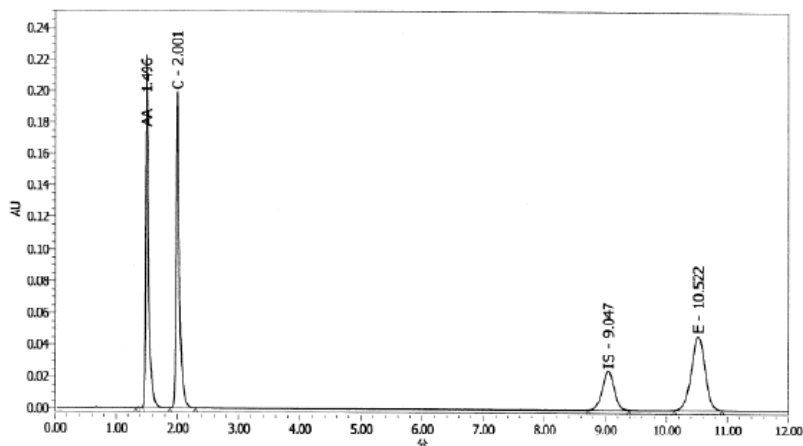


Fig.1 標準溶液のクロマトグラム(A 社、0.3 mL/min)

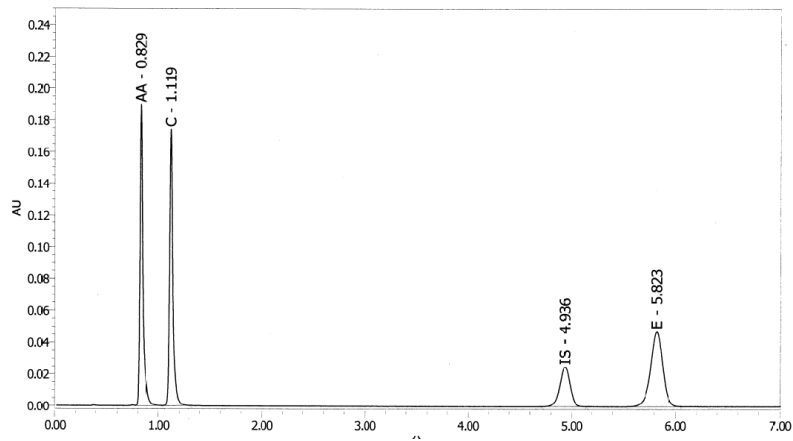


Fig.2 標準溶液のクロマトグラム(A社、0.6 mL/min)

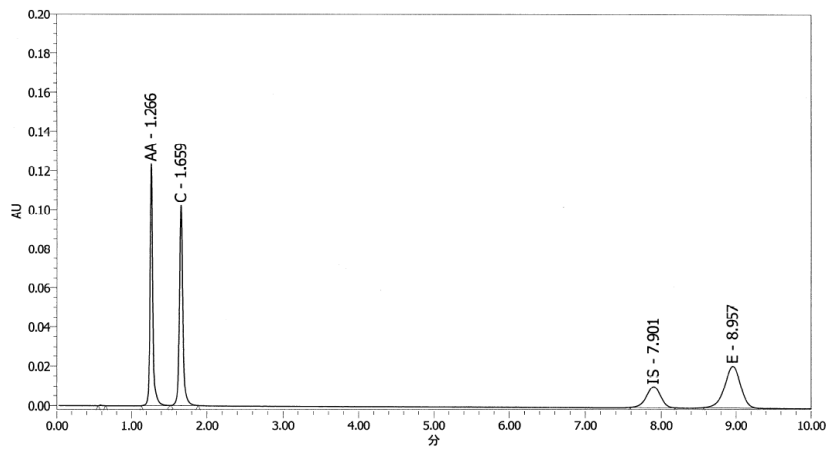


Fig.3 標準溶液のクロマトグラム(A社、UHPLC)

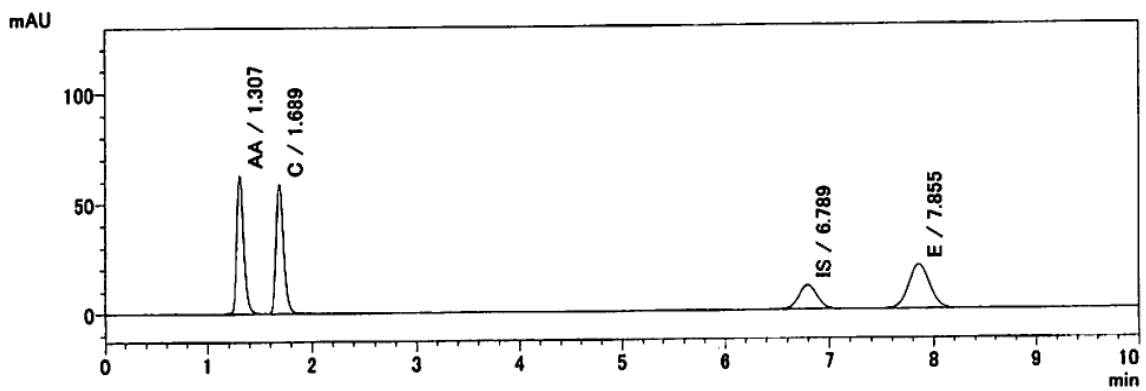


Fig.4 標準溶液のクロマトグラム(E社、HPLC)

AA : アセトアミノフェン、C : カフェイン、IS : 内標準物質、E : エテンザミド

Table2 UHPLCによる分析パラメータ

パターン (上:流量,下:会社)		0.3 mL/min				0.6 mL/min			
		A社	B社	C社	D社	A社	B社	C社	D社
カラム圧(psi)		3700	4445	4566	4133	6800	8535	8603	8004
アセト アミノ フェン	保持時間(min)	1.496	1.294	1.248	1.226	0.829	0.655	0.632	0.637
	理論段数	7688	10699	6976	3468	5673	7203	5832	1642
	分離度	-	-	-	-	-	-	-	-
	シンメトリー係数	1.97	0.98	1.05	1.70	1.78	1.01	1.03	1.61
	相関係数(面積)	0.999	0.999	0.999	0.999	0.998	0.999	0.999	0.999
	注入量再現性(面積) (6回の相対標準偏差)	0.317	0.162	0.120	0.378	0.461	0.098	0.205	0.286
	相関係数(面積比)	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
	注入量再現性(面積比) (6回の相対標準偏差)	0.348	0.232	0.209	0.163	0.459	0.146	0.236	0.117
カフ フェン	保持時間(min)	2.001	1.885	1.682	1.645	1.119	0.964	0.865	0.862
	理論段数	9673	13089	9259	5141	7779	9674	7863	2851
	分離度	6.77	10.23	6.72	4.80	6.13	8.84	6.47	3.54
	シンメトリー係数	1.66	0.92	0.98	1.57	1.52	0.95	0.96	1.52
	相関係数(面積)	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
	注入量再現性(面積) (6回の相対標準偏差)	0.298	0.071	0.109	0.360	0.516	0.093	0.205	0.249
	相関係数(面積比)	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	1.000
	注入量再現性(面積比) (6回の相対標準偏差)	0.344	0.159	0.193	0.149	0.488	0.144	0.254	0.069
内標 準物質	保持時間(min)	9.047	7.962	7.004	6.810	4.936	3.792	3.334	3.389
	理論段数	10512	11436	11340	10557	12560	12754	12133	8217
	分離度	32.54	33.50	32.04	29.02	33.74	32.69	30.93	23.67
	シンメトリー係数	0.99	0.94	0.93	1.04	0.96	0.92	0.91	1.07
	注入量再現性(面積) (6回の相対標準偏差)	0.325	0.168	0.264	0.399	0.337	0.092	0.305	0.265
エテ ンザ ミド	保持時間(min)	10.522	9.905	8.269	8.012	5.823	4.817	4.045	4.064
	理論段数	10683	11197	11315	10855	12571	12578	12132	9150
	分離度	3.89	5.80	4.42	4.21	4.63	6.72	5.32	4.24
	シンメトリー係数	0.97	0.94	0.92	1.01	0.93	0.91	0.90	1.04
	相関係数(面積)	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
	注入量再現性(面積) (6回の相対標準偏差)	0.490	0.102	0.144	0.371	0.296	0.207	0.343	0.275
	相関係数(面積比)	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
	注入量再現性(面積比) (6回の相対標準偏差)	0.337	0.114	0.201	0.148	0.316	0.211	0.116	0.123

Table3 UHPLC 及び HPLC 間の分析パラメータ

パターン (上:使用機器,下:会社)		UHPLC				HPLC			
		A社	B社	C社	D社	E社	F社	G社	H社
カラム圧(psi)		1800	2012	1867	1595	1305	1195	1218	1400
アセトアミノフェン	保持時間(min)	1.266	1.282	1.197	1.173	1.307	1.363	1.385	1.288
	理論段数	7315	6640	4972	3764	1896	1592	768	1681
	分離度	-	-	-	-	-	-	-	-
	シンメトリー係数	1.29	1.14	1.30	1.35	1.39	1.32	1.50	1.26
	相関係数(面積)	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
	注入量再現性(面積) (6回の相対標準偏差)	0.439	0.404	0.452	0.224	0.579	1.224	0.447	2.916
	相関係数(面積比)	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
	注入量再現性(面積比) (6回の相対標準偏差)	0.722	0.423	0.370	0.275	0.100	0.370	0.175	1.028
カフェイン	保持時間(min)	1.659	1.838	1.591	1.550	1.689	1.772	1.769	1.622
	理論段数	7913	7189	5538	4738	2744	2418	1237	2335
	分離度	5.88	7.45	5.16	4.54	3.07	2.92	1.92	2.58
	シンメトリー係数	1.18	1.08	1.22	1.26	1.33	1.26	1.46	1.26
	相関係数(面積)	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
	注入量再現性(面積) (6回の相対標準偏差)	0.377	0.540	0.205	0.179	0.606	1.230	0.533	2.933
	相関係数(面積比)	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
	注入量再現性(面積比) (6回の相対標準偏差)	0.693	0.546	0.254	0.371	0.217	0.317	0.100	0.876
内標準物質	保持時間(min)	7.901	7.834	6.672	6.499	6.789	7.171	6.914	6.229
	理論段数	8721	7893	6977	8543	7075	7318	6192	5975
	分離度	30.31	27.37	25.15	25.28	22.64	22.58	18.67	20.09
	シンメトリー係数	0.95	1.01	1.05	1.04	1.06	1.02	1.04	1.09
	注入量再現性(面積) (6回の相対標準偏差)	0.573	0.266	0.305	0.224	0.502	1.273	0.505	3.483
	相関係数(面積比)	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
エテンザミド	保持時間(min)	8.957	9.617	7.788	7.540	7.855	8.383	8.026	7.123
	理論段数	8582	7776	6977	7422	7145	7484	6459	6083
	分離度	2.92	4.53	3.22	3.20	3.08	3.36	2.97	2.58
	シンメトリー係数	0.95	1.01	1.05	1.04	1.05	1.01	1.02	1.09
	相関係数(面積)	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
	注入量再現性(面積) (6回の相対標準偏差)	0.379	0.265	0.116	0.108	0.385	1.302	0.538	3.374
	相関係数(面積比)	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
	注入量再現性(面積比) (6回の相対標準偏差)	0.362	0.230	0.205	0.229	0.160	0.398	0.051	0.264

参考文献

- 1) 山本豊巖ら、家庭薬研究 No34、65-72(2015)