

医薬品試験の効率化に関する検討（第4報）

—グラジエント法を用いた解熱鎮痛薬成分の分析法の検討—

Studies on improving the efficiency in pharmaceutical test.IV.

-Study on an analytical method of analgesic antipyretic ingredients using gradient HPLC-

森元久美子	テイカ製薬株式会社	島倉征一	ジャパンメディック株式会社
Kumiko MORIMOTO	Teika Pharmaceutical Co., Ltd.	Seiichi SHIMAKURA	Japan Medic Co., Ltd.
亀田奈穂美	ファーマパック株式会社	前川知子	富士製薬工業株式会社
Naomi KAMEDA	Pharmapack Co.,Ltd	Tomoko MAEKAWA	Fuji Pharma Co., Ltd.
齊藤令奈	株式会社富士薬品	坂田康平	株式会社陽進堂
Reina SAITOU	Fujiyaku Co.,Ltd	Kohei SAKATA	Yoshindo Inc.
横田洋一	富山県薬事研究所		
Yoichi YOKOTA	Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research		

緒言

グラジエント法は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）において移動相の組成を連続的に変化させることで複数成分を短時間で溶出させる溶離法である。これを用いることで、分離の改善や複数の成分を比較的短時間で溶出させることが可能であり、多成分同時分析における試験効率化に有効である。しかしながら、品質管理における医薬品の定量試験において、単一の移動相を用いて成分を溶出させるアイソクラティック法が多く用いられており、グラジエント法を積極的に選択することはほとんどない。その理由として、グラジエント法は使用する機器により保持時間の差が大きく、再現精度が良くないためと考えられた。そこで本検討では、グラジエント法を用いた試験の再現精度及び医薬品の定量試験における実用性について検証した。

実験

1. 室間再現性の検証

1) 試験方法

グラジエント法を用いた試験の室間再現精度を評価するため、昨年度報告したアイソクラティック移動相¹⁾から、グラジエント移動相への変更を行い、以下に示す条件にて、異なる試験室（6社）に設置された各種 HPLC 機器（Table 2）を用いてグラジエント法で繰り返し6回の分析を実施した。

(1) 試験溶液

「アセトアミノフェン」を105℃で2時間乾燥し、その約56mg、「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56mg及び「無水カフェイン」を80℃で4時間乾燥し、その約17mg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）20mLに溶かした後、内標準溶液5mLを正確に加える。この液2mL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20mLとし、標準溶液とする。

内標準溶液：安息香酸 2g をアセトニトリル 50mL に溶かし、薄めたリン酸 (1→1000) を加えて 100mL とする。

(2) 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 粒径 3 μ m 内径 3mm 長さ 75mm GL-サイエンス (株)

カラム温度：40 $^{\circ}$ C 付近の一定温度

移動相 A：薄めた酢酸 (100) (1→1000) / アセトニトリル混液 (9 : 1)

移動相 B：10mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 / アセトニトリル混液 (3 : 2)

移動相の送液：移動相 A 及び移動相 B の混合比を次のように変えて濃度勾配制御した。

時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0 → 5	100 → 0	0 → 100

流量：1.0mL/min

注入量：1 μ L

2) 結果及び考察

アイソクラティック法及びグラジエント法のクロマトグラムを示したが (Fig.1~2)、分離が改善され時間短縮が可能となっていることがわかる。

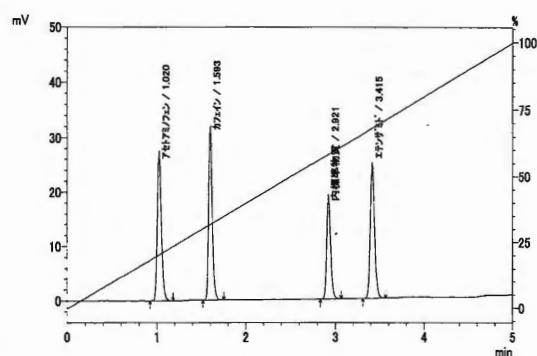
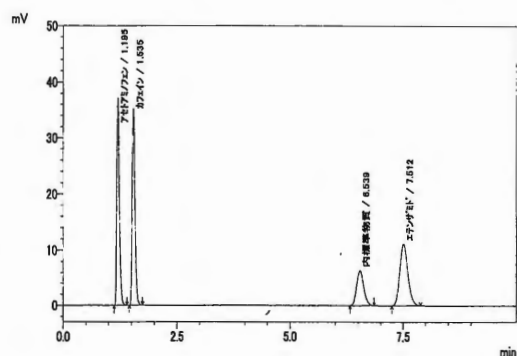


Fig.1 アイソクラティック法のクロマトグラム

Fig.2 グラジエント法のクロマトグラム

6社にて分析を行い、保持時間、理論段数、分離度、シンメトリー係数、6回の注入量再現性 (ピーク面積及び内標準物質に対するピーク面積の比) を求めた結果、アセトアミノフェンの保持時間は、6社の試験結果において、いずれも保持時間は約1分であった。しかしながら、カフェインは約1.5~1.8分、内標準物質は約2.9~5.2分、エテンザミドは約3.4~5.5分と後に溶出する成分ほど保持時間に違いが認められた (Table 1 及び Fig.3~4)。原因として、グラジエントプログラムと実際の移動相の混合比との間に時間差「グラジエント遅れ」があり、これが使用した機器より異なっているためと考えられた。そのため、異なる使用機器を用いてグラジエント法により試験する場合、保持時間を一致させるためには、実際に移動相の混合比が変わる時間を合わせる必要があると考えられた。

Table 1 分析結果の各パラメータ (室間再現精度)

		A社	B社	C社	D社	E社	F社
カラム圧 (psi)		1972	1730	1900	1850	2929	2117
アセトアミン フェン	保持時間 (min)	1.070	1.090	1.040	1.110	1.049	1.009
	理論段数	2338	1518	2013	1006	2309	1751
	分離度	—	—	—	—	—	—
	シンメトリー係数	1.49	1.36	1.37	1.06	1.49	1.47
	再現性 (面積) 6回の相対標準偏差	0.354	0.275	0.367	1.419	0.288	0.388
	再現性 (面積比) 6回の相対標準偏差	0.150	0.077	0.143	0.630	0.303	0.212
カフェイン	保持時間 (min)	1.835	1.808	1.670	1.822	1.516	1.514
	理論段数	4576	3468	3936	2718	5372	4624
	分離度	7.76	6.13	6.34	5.10	5.49	5.46
	シンメトリー係数	1.33	1.26	1.23	1.05	1.43	1.45
	再現性 (面積) 6回の相対標準偏差	0.338	0.302	0.335	1.396	0.216	0.399
	再現性 (面積比) 6回の相対標準偏差	0.155	0.060	0.094	0.596	0.125	0.213
内標準物質	保持時間 (min)	5.207	3.592	3.510	3.386	2.896	2.898
	理論段数	33240	21998	34039	9806	19017	15235
	分離度	30.35	16.27	20.20	11.31	16.59	15.09
	シンメトリー係数	1.25	1.26	1.14	1.01	1.9	1.33
	再現性 (面積) 6回の相対標準偏差	0.235	0.285	0.252	1.064	0.234	0.225
	再現性 (面積比) 6回の相対標準偏差	0.127	0.037	0.091	0.265	0.125	0.149
エテンザミド	保持時間 (min)	5.524	4.114	4.025	3.917	3.391	3.391
	理論段数	44089	26242	37120	12523	21866	16939
	分離度	2.90	5.27	6.47	3.82	5.65	4.97
	シンメトリー係数	1.27	1.24	1.14	1.02	1.18	1.28
	再現性 (面積) 6回の相対標準偏差	0.280	0.295	0.326	1.205	0.212	0.323
	再現性 (面積比) 6回の相対標準偏差	0.127	0.037	0.091	0.265	0.125	0.149

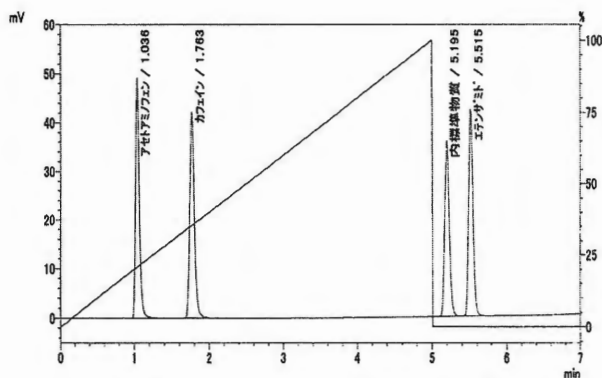


Fig.3 クロマトグラム (A社)

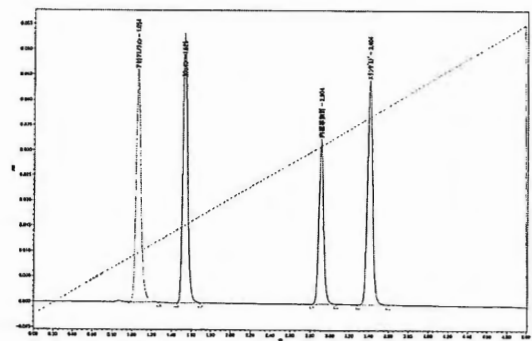


Fig.4 クロマトグラム (E社)

2. 「グラジエント遅れ」の測定

1) 試験方法

グラジエント分析において保持時間を一致させて室間再現精度を比較するためには、HPLC装置ごとにシステムボリュームによるグラジエント遅れ(プログラム上の混合比に対する実際の移動相の混合比の遅れ)が異なることを考慮して、プログラムを補正する必要がある。システムボリュームは複数の溶媒が混合される位置からカラム入口までの容量であり、グラジエント方式

(低圧混合、高圧混合)、ミキサー容量、オートサンプラ、配管の長さ及び内径に依存する。また、低圧混合方式は送液ポンプの前、高圧混合方式は送液ポンプの後ろで溶媒が混合されるため、一般的に低圧混合方式の方がシステムボリュームが大きくなり、これに伴いグラジエント遅れも大きくなる。

6社のHPLC装置それぞれにおいてグラジエント遅れがどの程度であるかを明らかにするため、移動相Bに紫外線吸収を示すアセトンを追加して移動相の吸光度の変化を測定した²⁾。

(1) 試験溶液

精製水

(2) 試験条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：280nm）

カラム：なし

カラム温度：40℃付近の一定温度

移動相A：水

移動相B：0.3%アセトン溶液

移動相の送液：移動相A及び移動相Bの混合比を次のように変えて濃度勾配制御した。

時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0 → 5	100 → 0	0 → 100

流量：1.0mL/min

2) 結果及び考察

使用機器によりグラジエント遅れが異なっており、各社の結果を比較すると、その時間は約0.5～3分であり、最大2.5分の差があることが明らかとなった (Table 2 及び Fig.5～6)。また、機器により吸光度変化の立ち上がり時間に違いは認められたが、5分間の濃度勾配はグラジエントプログラムとほぼ同程度であった。また、各社の使用機器において、A～E社は低圧混合方式、F社は高圧混合方式であったが、E社は超高速クロマトグラフィー対応の仕様のため、低圧混合方式でもグラジエント遅れが少ないこと、同型のB社及びC社でもグラジエント遅れに差があることが明らかになった。これらは配管に依存するものと考えられる。

以上より、システムボリュームの違いによるグラジエント遅れを考慮してグラジエントプログラムを補正することで、異なる機器間でも保持時間の再現性を得ることは可能であると考えた。

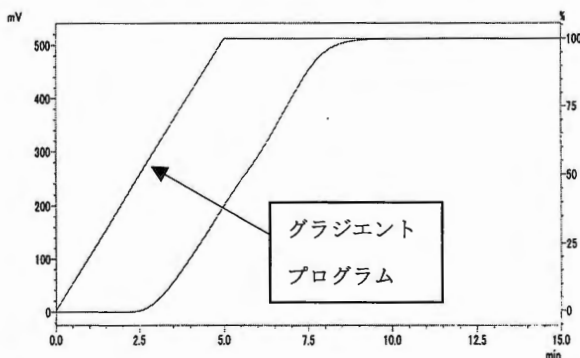


Fig.5 クロマトグラム (時間差 3.0 分、A 社)

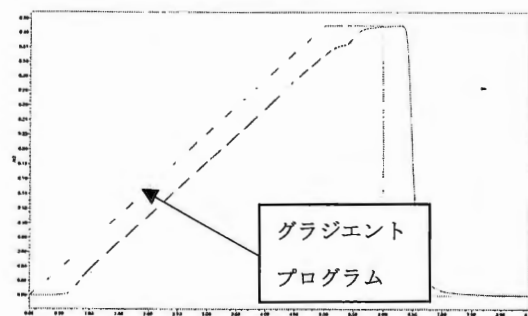


Fig.6 クロマトグラム (時間差 0.5 分、E 社)

3. グラジエント開始時間補正後の室間再現性の検証

1) 試験方法

グラジエント遅れの最も大きかった A 社の保持時間に合わせるため、移動相 A を 100% の比率で流す時間を使用機器ごとに設定することで、注入の 3 分後から移動相の組成変化が始まるようにグラジエントの開始時間を補正した (Table 2)。すなわち、2. で測定したグラジエント遅れを補正するため、Table2 に示すとおり、移動相 A を 100% で流す時間を機器ごとに設定した。その後は、1. に示した条件と同様に 5 分間で移動相 B が 100% となるようグラジエントプログラムを設定した。

Table 2 各社の機器構成及びグラジエントプログラムの補正

	A 社	B 社	C 社	D 社	E 社	F 社
ポンプ	LC-20AD	LC2010	LC2010	e 2695	H-Class	LC-20AD 2 台
オートサンプラ	SIL20AC					SIL-20AC
検出器	SPD-20A			e 2489	TUV	SPD-20A
グラジエント方式	低圧	低圧	低圧	低圧	低圧	高圧
グラジエント遅れの時間 (分)	3.0	1.4	1.0	1.0	0.5	0.5
移動相 A を 100% で流すように設定した時間 (分)	0	1.6	2.0	2.0	2.5	2.5

2) 結果及び考察

6 社それぞれ、理論段数、分離度、シンメトリー係数、6 回の再現性 (ピーク面積及び内標準物質に対するピーク面積の比) を求めた (Table 3 及び Fig.7~8)。

アセトアミノフェンの保持時間は、6 社の試験結果において、いずれも保持時間は約 1 分であった。また、カフェインは約 1.7~1.8 分、内標準物質は約 4.9~5.2 分、エテンザミドは約 5.5~5.7 分であり、A 社に合わせたため溶出時間は遅くなったが、内標準物質とエテンザミドの相対標準偏差が小さくなり再現性が大きく向上した (Table 4)。また、いずれの分析対象成分においても、ピーク面積の比の 6 回の相対標準偏差は、0.3% 以内であり、良好な再現性が得られた。D 社において、面積の 6 回の相対標準偏差が 1.5% 以上となったが、グラジエントプログラム補正前後の全成分とも 1.0% 以上であること、注入量が 1 μ L と少量であることから、使用機器による注入量ばらつきであると考えられる。

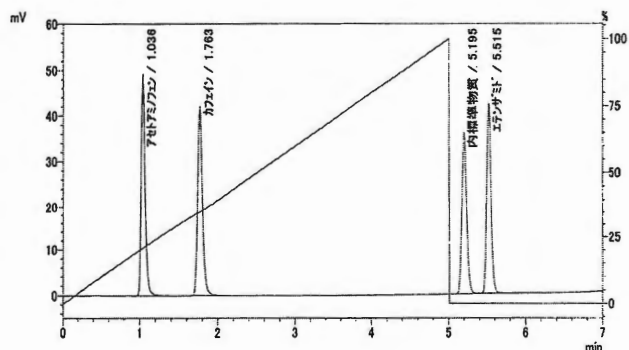


Fig.7 クロマトグラム (A 社)

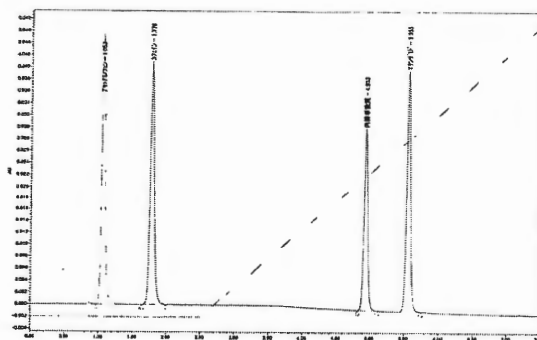


Fig.8 クロマトグラム (E 社)

Table 3 分析結果の各パラメータ（補正後の室間再現精度）

		A社	B社	C社	D社	E社	F社
カラム圧 (psi)		1972	1730	1900	1850	2910	2132
アセトアミノフェン	保持時間 (min)	1.070	1.084	1.041	1.083	1.053	1.026
	理論段数	2338	1480	2022	1020	2268	1799
	分離度	—	—	—	—	—	—
	シンメトリー係数	1.49	1.36	1.37	1.03	1.48	1.47
	再現性（面積）6回の相対標準偏差	0.354	0.367	0.245	1.759	0.128	0.115
	再現性（面積比）6回の相対標準偏差	0.150	0.052	0.227	0.087	0.099	0.035
カフェイン	保持時間 (min)	1.835	1.802	1.673	1.805	1.776	1.779
	理論段数	4576	3184	3841	2379	4428	3524
	分離度	7.76	5.98	6.33	5.10	7.42	6.97
	シンメトリー係数	1.33	1.27	1.24	1.05	1.21	1.24
	再現性（面積）6回の相対標準偏差	0.338	0.356	0.176	1.760	0.073	0.136
	再現性（面積比）6回の相対標準偏差	0.155	0.032	0.051	0.074	0.081	0.073
内標準物質	保持時間 (min)	5.207	4.879	5.054	4.970	4.933	4.939
	理論段数	33240	33383	45502	19569	41054	31007
	分離度	30.35	26.29	33.44	21.85	31.01	27.21
	シンメトリー係数	1.25	1.22	1.10	1.03	1.10	1.21
	再現性（面積）6回の相対標準偏差	0.235	0.336	0.157	1.732	0.073	0.122
	再現性（面積比）6回の相対標準偏差	0.127	0.036	0.102	0.048	0.154	0.098
エテンザミド	保持時間 (min)	5.524	5.489	5.699	5.603	5.555	5.564
	理論段数	44089	42091	59609	24948	48751	39237
	分離度	2.90	5.72	6.88	4.46	6.30	5.55
	シンメトリー係数	1.27	1.22	1.12	1.03	1.12	1.22
	再現性（面積）6回の相対標準偏差	0.280	0.338	0.152	1.746	0.162	0.146
	再現性（面積比）6回の相対標準偏差	0.127	0.036	0.102	0.048	0.154	0.098

Table 4 グラジエントプログラム補正前後の保持時間の比較

成分名	グラジエントプログラム補正前		グラジエントプログラム補正後	
	平均 (分)	相対標準偏差 (%)	平均 (分)	相対標準偏差 (%)
アセトアミノフェン	1.061	0.03	1.060	0.02
カフェイン	1.694	0.09	1.778	0.03
内標準物質	3.582	0.24	4.997	0.02
エテンザミド	4.060	0.19	5.572	0.01

4. 医薬品の定量分析

1) 試験方法

今回設定した試験方法を用いて、有効成分としてアセトアミノフェン、カフェイン及びエテンザミドを含有する医薬品の定量分析を行った。比較のために昨年度報告した¹⁾アイソクラティック法での分析も行った。

2) 結果及び考察

今回設定した試験方法で分析した結果、グラジエント法を用いた場合、アイソクラティック法に比べ3成分全ての定量値が2%低くなった。アイソクラティック分析時に見られる、保持時間約4.5分の不純物ピークがグラジエント分析では見られなかったこと、3成分全ての定量値が低

かったことから、内標準物質のピークに不純物ピークが重なった結果、内標準ピークで補正した定量値が低くなったと推察された。そこで、分析に使用するカラムを Inert Sustain C18 から CAPCELL PAK C18 UG120 に変更したところ、内標ピークと不純物ピークが分離し、その結果アイソクラティック法とグラジエント法の間で定量値に大きな差は見られなかった (Table 5 及び Fig.9~12)。

Table 5 医薬品の定量結果

成分名	Inert Sustain C18			CAPCELL PAK C18 UG120		
	定量値 (%)		定量値の差 (%)	定量値 (%)		定量値の差 (%)
	アイソクラティック	グラジエント	グラジエント-アイソクラティック	アイソクラティック	グラジエント	グラジエント-アイソクラティック
アセトアミノフェン	100.6	98.6	-2.0	100.3	100.0	-0.3
カフェイン	98.4	96.4	-2.0	98.2	97.8	-0.4
エテンザミド	99.8	97.5	-2.3	99.6	99.3	-0.3

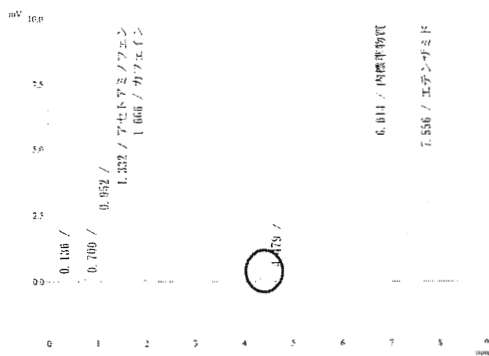


Fig.9 クロマトグラム (Inert Sustain C18 アイソクラティック法)

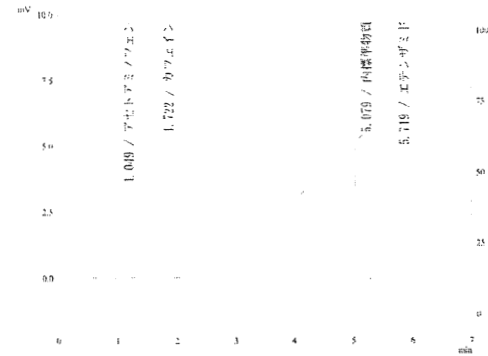


Fig.10 クロマトグラム (Inert Sustain C18 グラジエント法)

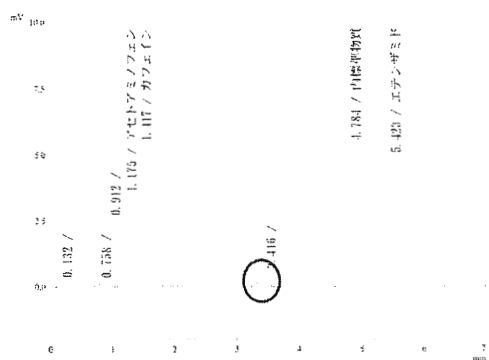


Fig.11 クロマトグラム (CAPCELL PAK C18 UG120 アイソクラティック法)

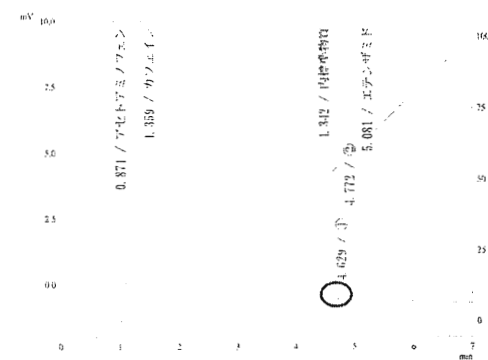


Fig.12 クロマトグラム (CAPCELL PAK C18 UG120 グラジエント法)

総括

アセトアミノフェン、エテンザミド及びカフェインの同時分析のモデル試験として、医薬品の定量試験におけるグラジエント法を作成し、その実用性を6社で検討した。

その結果、各社の機器では、ピークの保持時間はばらついたが、各機器のグラジエント遅れを測定し、その値を使用してグラジエントの開始時間を補正することで、異なる機器を使用した場合においても、保持時間を一致させることが可能であり、ピーク面積の比の再現性も良好であることが明らかになった。

また、市販製剤を用いたの定量試験においても、カラムの変更によりアイソクラティック法と同様の結果を得ることができた。医薬品の品質管理での定量試験においては、アイソクラティック法が多用されてきたが、本研究により、グラジエント法の実用性が示唆された。グラジエント法を用いることで、保持の異なる複数の成分を順に分離よく、短時間で溶出させることが可能であり、多成分同時分析における試験効率化に有効であると考えられる。

今後グラジエント法を用いることで、さらに成分数の多い製剤の同時分析における試験効率化を検討することが課題である。

文 献

- 1) 飯村和也ら、医薬品試験の効率化に関する検討（第2報）、家庭薬研究、No.35、57-62 (2016)
- 2) Wako Analytical Circle No.14(1999)