

医薬品試験の効率化に関する検討（第5報）

ーグラジエント法を用いたかぜ薬成分の分析法の検討ー

Studies on improving the efficiency in pharmaceutical test.V.

・Study on an analytical method of cold medicine ingredients using gradient HPLC・

水越悠輔	株式会社池田模範堂	田中爾織	ジャパンメディック株式会社
Yusuke MIZUKOSHI	Ikeda Mohando Co., Ltd.	Mio TANAKA	Japan Medic Co., Ltd.
嶋田貴弘	東亜薬品株式会社	森元久美子	テイカ製薬株式会社
Takahiro SHIMADA	TOA Pharmaceutical Co., Ltd.	Kumiko MORIMOTO	Teika Pharmaceutical Co., Ltd.
亀田奈穂美	ファーマパック株式会社	中山和樹	株式会社富士薬品
Naomi KAMEDA	Pharmapack Co.,Ltd	Kazuki NAKAYAMA	Fujiyakuhin Co.,Ltd
宮下雅志	株式会社陽進堂	横田洋一	富山県薬事研究所
Masashi Miyashita	Yoshindo Inc.	Yoichi YOKOTA	Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

緒言

医薬品試験の効率化の一つとして多成分同時分析が挙げられる。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成分を溶出させる溶離法（グラジエント法）が存在する。溶出力の強い溶媒を添加していくことで、複数の成分を短時間に溶出させることが可能であるが、使用機器による保持時間の差が大きいこともあり、再現精度が良くないと考えられていた。昨年、解熱鎮痛成分において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が確認された¹⁾が、モデル試験であったため成分数が少なく、分析時間短縮の効果はあまり確認できなかった。そこで、本検討では成分数の多いかぜ薬について多成分同時分析を行い、その再現性及び定量性を検証した。

実験方法

1. 室間再現性の評価

1) 実験方法

昨年報告された¹⁾グラジエント遅れを考慮したプログラム補正を行い、以下に示す条件にて、異なる試験室（7社）に設置された各種 HPLC 機器（Table 1）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、室間再現精度の評価を行った。試験方法はカラムメーカーから公開されている市販風邪薬を分析したアプリケーション²⁾を参考にした。

(1) 試験溶液

均一に粉砕した市販風邪薬約1g[アセトアミノフェン約300mg、ジヒドロコデインリン酸塩約8mg、ノスカピン約16mg、dl-メチルエフェドリン塩酸塩約20mg、グアヤコールスルホン酸カリウム約80mg、無水カフェイン約25mg、ベンフォチアミン（ビタミンB1誘導体）約8mgに対応する量]を精密に量り、内標準溶液4mLを正確に加えた。これに70%メタノール40mLを加え、ときどき振り混ぜな

から 10～15 分間超音波抽出を行った後、遠心分離した。得られた液層をメンブランフィルター（孔径 0.45 μm ）でろ過した液を試料溶液とした。この液 3 μL につき、次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、内標準物質 1 のピーク面積に対するアセトアミノフェン、カフェインのピーク面積比及び内標準物質 2 のピーク面積に対するジヒドロコデイン、ノスカピン、dl-メチルエフェドリン、グアヤコールスルホン酸、ベンフォチアミンのピーク面積比を求めた。

内標準溶液：パラオキシ安息香酸エチル（内標準物質 1）約 0.3 g 及びピリドキシリン塩酸塩（内標準物質 2）約 0.25 g を 70%メタノールに溶解し 50 mL とした。

(2) 試験条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：開始時～アセトアミノフェン溶出まで；295 nm、dl-メチルエフェドリン溶出前～ジヒドロコデイン溶出まで；215 nm、ジヒドロコデイン溶出後以降；295 nm）

カラム：YMC-Pack Pro C18 粒径 5 μm 内径 4.6 mm 長さ 150 mm （株）ワイエムシイ

カラム温度：37°C付近の一定温度

流量：1.0 mL/min

移動相 A：リン酸二水素カリウム 1.36 g 及びリン酸水素二カリウム 1.74 g を水に溶かし 1000 mL とした液

移動相 B：メタノール

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を制御する。送液条件は、注入後、4.5 分から混合比が変化するように Table 1 に従い機器ごとに補正した。

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0 ~ 4.5	80	20
4.5 ~ 13.5	80 → 5	20 → 95
13.5 ~ 17.5	5	95

Table 1 各社の HPLC 機器とグラジエント遅れの比較

	A 社	B 社	C 社	D 社①	D 社②	E 社	D 社③	F 社	G 社
LC 型	Prominence	Prominence	LC-2010 AHT	LC-2010C	alliance	Prominence	H-class	H-class	Prominence
ポンプ	LC-20AD	LC-20AD			e2695	LC-20AB	FTN	FTN	LC-20AD (2 台)
オート サンプラー	SIL-20AC	SIL-20AC			SIL-20AHT	QSM	QSM	SIL-20AD	
検出器	SPD-20A	SPD-M20A			e2489	SPD-M20A	eAPDA	TUV	SPD-20A
グラジエント 方式	低圧	低圧	低圧	低圧	低圧	高圧	低圧	低圧	高圧
グラジエント 遅れ(分)	3.5	2.7	2.3	1.4	1.0	0.8	0.5	0.5	0.5
移動相 A が 4.5 分後に濃 度変化し始め るように設定す る時間(分)	1.0	1.8	2.2	3.1	3.5	3.7	4.0	4.0	4.0

2. 定量性の評価

設定した試験条件を用いて、標品の入手の容易なグアヤコールスルホン酸カリウム、アセトアミノフェン、無水カフェイン、ベンフォチアミンの4成分について、まず直線性の測定を行い、次に定量性の確認を行った。また、測定を5種のHPLC機器で行うことで、その機器間差による再現性の確認も行った。

1) 検量線の測定

(1) 試験溶液

アセトアミノフェンを約3.0 g、グアヤコールスルホン酸カリウムを約0.8 g、無水カフェインを約0.25 g及びベンフォチアミン約80 mgをそれぞれ精密に量り、70%メタノールを加えて溶かし、正確に100 mLとし検量線用原液とする。その後Table 2に従い、検量線用原液及び内標準溶液を正確に量り、70%メタノールを加え44 mLとする。

Table 2 検量線の調製方法

対応濃度	検量線用原液	内標準溶液	70%メタノール
80%	8 mL	4 mL	32 mL
90%	9 mL	4 mL	31 mL
100%	10 mL	4 mL	30 mL
110%	11 mL	4 mL	29 mL
120%	12 mL	4 mL	28 mL

(2) 試験条件

1. 1) (2) で設定した試験条件を準用した。使用機器及び時間差補正についてTable 3に示す。

Table 3 使用機器及び時間差補正

機器	①	②	③	④	⑤
LC型	Prominence	LC2010C	alliance	Prominence	H-class
ポンプ	LC-20AD		e2695	LC-20AB	FTM
オートサンプラー	SIL-20AC			SIL-20AHT	QSM
検出器	SPD-20A		e2489	SPD-M20A	eλ PDA
グラジエント方式	低圧	低圧	低圧	高圧	低圧
グラジエント遅れ (分)	2.7	1.4	1.0	0.8	0.5
移動相Aが4.5分後に 濃度変化し始めるよう に設定した時間(分)	1.8	3.1	3.5	3.7	4.0

2) 定量分析

設定した試験法を用いて、本試験で使用した市販風邪薬の有効成分のうち、アセトアミノフェン、グアヤコールスルホン酸カリウム、無水カフェイン、ベンフォチアミンの4成分について定量分析を試験的に行った。

(1) 試験溶液

標準溶液については、2. 1) (1) の試験溶液(100%濃度)を用いた。

試料溶液については、1. 1) (1) の調製法に準じてn=3で調製を行った。

(2) 試験条件

1. 1) (2) の試験条件を準用した。尚、使用した機器は Table 3 記載の機器②である。

3. カラム汎用性の評価

1) 試験方法

今回設定した試験条件では、dl-メチルエフェドリン塩酸塩のピークに関してテーリングがみられ、再現性の結果においてはシンメトリー係数が 7 社平均で 2.0 を超えており、あまり良好なピーク形状ではなかった。そこで、本試験法で使用した YMC-pack C18 Pro とは異なる複数のカラム（粒径、内径、長さは本試験で使用したカラムと同じもの）を用いて分析を行い、ピーク形状や分離を確認した。

(1) 試験溶液

1. 1) (1) の調製法に準じて調製した液を用いた。

(2) 試験条件

1. 1) (2) の試験条件を準用した。使用したカラムを Table 4 に示す。

Table 4 使用カラム

①	YMC-Pack ODS-A (ワイエムシィ)
②	COSMOSIL PACKED COLUMN 5C18-AR-II (ナカライテスク)
③	Cadenza 5CD-C18 (インタクト)
④	COSMOSIL PACKED COLUMN 5C18-MS (ナカライテスク)
⑤	Mightysil RP-18 GP (関東化学)
⑥	L-column ODS (化学物質評価研究機構)
⑦	L-column2 ODS (化学物質評価研究機構)
⑧	Sunniest C18 (クロマニックテクノロジーズ)

実験結果

1. 室間再現性の評価

7 社 9 機器によるそれぞれのピークの理論段数、分離度、シンメトリー係数、6 回注入のピーク面積及び内標準物質に対するピーク面積の比のそれぞれの相対標準偏差 (%) を求めた。結果を Table 5 に示す。また、A 社のクロマトグラムを Fig.1 に示す。

7 社 9 機器の分析によるピーク保持時間を比較したところ、分析開始直後のグアヤコールスルホン酸のピークのみならず、最も溶出の遅いノスカピンのピークも保持時間がほぼ一致し、内標準物質を含めた 9 種類全ての成分において、室間再現性が良好であることが確認された。

さらにいずれの分析対象成分においても、ピーク面積比の 6 回の相対標準偏差は、1.0%以内であり、良好な再現性が得られた。

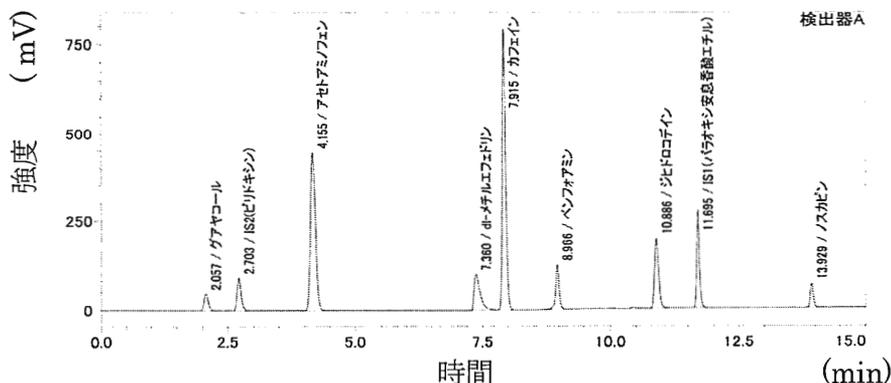


Fig.1 室間再現精度 (A 社)

Table 5 分析結果の各パラメータ

		A社	B社	C社	D社①	D社②	E社	D社③	F社	G社
スルホン酸	保持時間(分)	2.056	2.065	2.029	2.100	2.049	2.049	1.946	1.858	2.006
	理論段数	2645	2953	2636	2529	2496	3627	5122	2741	3449
	分離度	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	シンメトリー係数	1.466	1.373	1.457	1.394	1.131	1.509	1.275	1.702	1.406
	再現性(面積比)	0.103	0.061	0.204	0.565	0.046	0.249	0.357	0.394	0.039
内標準物質②	保持時間(分)	2.706	2.760	2.692	2.766	2.671	2.748	2.610	2.668	2.699
	理論段数	5471	6370	5490	5003	4260	7455	11228	5689	7335
	分離度	4.256	4.805	4.384	4.128	3.807	5.321	6.425	5.687	5.290
	シンメトリー係数	1.378	1.369	1.385	1.300	1.115	1.354	1.188	1.316	1.310
アセトアニリン	保持時間(分)	4.158	4.306	4.171	4.291	4.049	4.356	4.110	4.318	4.227
	理論段数	8388	8996	8258	7936	7305	9394	12183	7837	10132
	分離度	8.879	9.685	9.019	8.750	7.824	10.504	12.158	9.809	10.41
	シンメトリー係数	1.347	1.363	1.369	1.299	1.138	1.358	1.199	1.201	1.318
	再現性(面積比)	0.071	0.048	0.642	0.417	0.160	0.671	0.562	0.627	0.124
P-メチルエチロリン	保持時間(分)	7.378	7.918	7.443	7.397	7.277	7.535	7.247	7.545	7.549
	理論段数	20614	16953	17197	17781	16099	25720	28599	17604	23901
	分離度	16.68	17.053	15.977	15.012	15.450	14.514	17.045	13.334	18.322
	シンメトリー係数	2.339	2.455	2.340	2.118	1.668	2.189	2.241	2.338	2.197
	再現性(面積比)	0.074	0.073	0.133	0.468	0.125	0.644	0.110	0.177	0.062
カンフェイン	保持時間(分)	7.915	8.369	7.872	7.836	7.735	8.070	7.794	8.029	8.059
	理論段数	69205	62645	62260	60220	39143	87770	100743	67207	81938
	分離度	3.303	2.400	2.434	2.519	2.382	3.617	4.067	2.766	3.314
	シンメトリー係数	1.314	1.251	1.323	1.232	1.041	1.286	1.078	1.258	1.212
	再現性(面積比)	0.106	0.080	0.640	0.366	0.112	0.330	0.586	0.620	0.093
ベンゾエーミン	保持時間(分)	8.953	9.399	8.792	8.763	8.785	9.021	8.723	8.836	9.005
	理論段数	91920	76058	71350	69115	46917	97413	137719	87714	99061
	分離度	8.734	7.646	7.156	7.114	6.611	8.493	9.690	6.650	8.348
	シンメトリー係数	1.080	1.048	1.081	1.014	0.929	1.039	0.902	1.124	0.981
	再現性(面積比)	0.169	0.067	0.070	0.226	0.089	0.251	0.125	0.158	0.028
シロピロリン	保持時間(分)	10.893	11.496	10.826	10.677	10.756	10.922	10.629	10.767	11.018
	理論段数	93561	84250	74465	71927	61206	101055	118216	67872	103508
	分離度	14.929	14.261	14.047	13.106	11.756	15.060	17.564	13.614	16.043
	シンメトリー係数	1.363	1.413	1.435	1.319	1.109	1.280	1.248	1.453	1.299
	再現性(面積比)	0.042	0.048	0.117	0.341	0.120	0.387	0.119	0.368	0.037
内標準物質①	保持時間(分)	11.690	12.161	11.583	11.494	11.508	11.699	11.477	11.547	11.743
	理論段数	211761	174630	161631	142855	96841	229323	342384	184400	226849
	分離度	6.545	4.856	5.546	5.827	4.690	6.560	8.379	5.924	6.166
	シンメトリー係数	1.419	1.308	1.391	1.269	1.037	1.368	1.120	1.333	1.272
ノカピリン	保持時間(分)	13.928	14.247	13.868	13.744	13.733	13.764	13.673	13.736	13.877
	理論段数	271998	234544	235275	208284	138182	327797	480724	266263	316531
	分離度	21.535	17.871	19.950	18.618	15.087	21.359	27.981	20.505	21.675
	シンメトリー係数	1.344	1.294	1.361	1.253	1.040	1.309	1.150	1.320	1.261
	再現性(面積比)	0.030	0.039	0.182	0.032	0.041	0.426	0.101	0.352	0.050

2. 定量性の評価

1) 検量線の測定

5 機器の相関係数及び回帰式を比較した結果を Table 6 及び 7 に示す。各成分の検量線において相関係数は 0.995 以上であり、直線性における濃度相関性は問題ない結果であった。また各機器の間に大きな差はなく、どの機器においても良好な結果が得られた。

Table 6 各機器の検量線測定結果（相関係数）

機器	相関係数			
	ゲアコルスルホン酸カリウム	アセトアミノフェン	カフェイン	ベンフォチアミン
①	0.99989	0.99995	0.99996	0.99991
②	0.99967	0.99996	0.99998	0.99995
③	0.99972	0.99917	0.99950	0.99998
④	0.99760	0.99823	0.99966	0.99984
⑤	0.99997	0.99924	0.99923	0.99999

Table 7 各機器の検量線測定結果（回帰式）

機器	回帰式			
	ゲアコルスルホン酸カリウム	アセトアミノフェン	カフェイン	ベンフォチアミン
①	$Y=0.0049X+0.0354$	$Y=0.0280X+0.2114$	$Y=0.0342X+0.4556$	$Y=0.0130X+0.0072$
②	$Y=0.0052X+0.0188$	$Y=0.0272X-0.1930$	$Y=0.0312X+0.3572$	$Y=0.0122X+0.0032$
③	$Y=0.0039X+0.0176$	$Y=0.0289X-0.0076$	$Y=0.0351X+0.1634$	$Y=0.0122X+0.0004$
④	$Y=0.0035X+0.0145$	$Y=0.0187X+0.4280$	$Y=0.0668X-0.0422$	$Y=0.0115X-0.0072$
⑤	$Y=0.0033X+0.0025$	$Y=0.0311X+0.0231$	$Y=0.0370X+0.3045$	$Y=0.0120X-0.0120$

2) 定量分析

定量分析を行った結果（n=3）を Table 8 に示す。各成分の含量については特に問題のない結果が得られた。再現性や検量線の結果についても良好な結果が得られていることから、今回設定した分析条件で概ね問題なく定量することが可能であると考えられる。

Table 8 定量結果

	成分含有率 (%)			
	ゲアコルスルホン酸カリウム	アセトアミノフェン	カフェイン	ベンフォチアミン
1	102.8	97.3	98.6	101.8
2	102.6	96.9	98.4	102.1
3	99.7	95.8	97.6	99.4
平均値	101.7	96.7	98.2	101.1
相対標準偏差 (%)	1.706	0.804	0.539	1.464

3. カラム汎用性の評価

L-column ODS、L-column2 ODS、Sunniest C18 のカラムを使用した場合、特に dl-メチルエフェドリンのピーク形状及び分離度の改善がみられた。

良好な分離ができた L-column ODS、Sunniest C18 のクロマトグラム及び分析結果パラメータを Fig.2~3、Table 9~10 に示す。

本試験条件において dl-メチルエフェドリンのような塩基性物質のピークテーリングは、カラムを変更することによって改善された。その理由の一つとして、テーリングの原因となる残存シラノール基が、本試験で使用していたカラム (YMC-pack C18 Pro) よりも、Sunniest C18、L-column 及び L-column2 の方が少ないからであると推測される。そのような残存シラノール基が少ない理由としては、Sunniest C18、L-column 及び L-column2 のシリカゲルの処理方法が本試験で使用していたカラムの処理方法とは異なっていたためと推察される。

以上のことから、本試験条件においては、残存シラノール基がより少ないカラムを用いることでピークの形状が改善されることが示唆された。

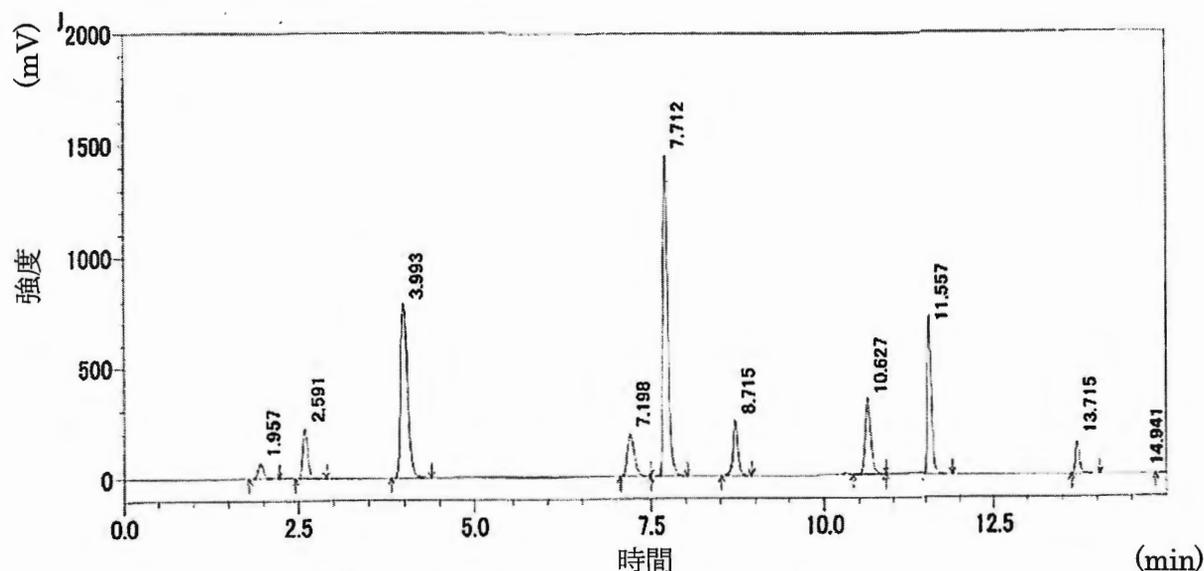


Fig.2 カラム⑥ (L-column ODS、E社)

Table 9 カラム⑥ (L-column ODS、E社) の分析結果パラメータ

成分	保持時間 (分)	理論段数 (段)	分離度	シンメトリー係数
グアヤコールスルホン酸カリウム	1.957	2853	—	1.361
内標準物質 2	2.591	6828	4.676	1.406
アセトアミノフェン	3.993	8264	9.336	1.407
dl-メチルエフェドリン	7.198	24818	14.971	1.518
カフェイン	7.712	64965	3.390	1.378
ベンフォチアミン	8.715	84585	8.353	1.062
ジヒドロコデイン	10.627	86226	14.487	1.272
内標準物質 1	11.557	211968	7.685	1.372
ノスカピン	13.715	281604	21.238	1.402

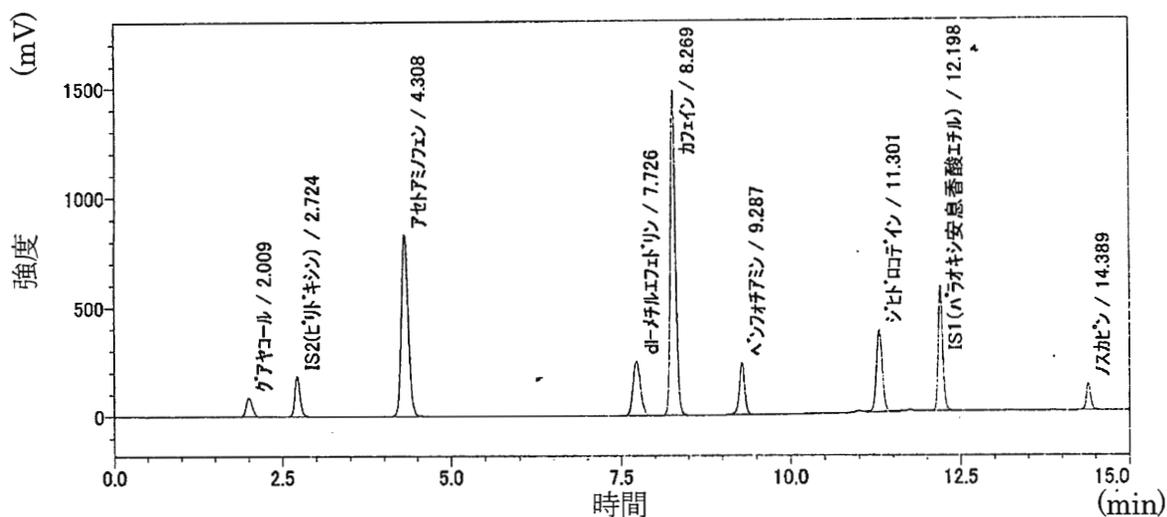


Fig.3 カラム⑧ (Sunniest C18、B社)

Table 10 カラム⑧ (Sunniest C18、B社) の分析結果パラメータ

成分	保持時間 (分)	理論段数 (段)	分離度	シンメトリー係数
グアヤコールスルホン 酸カリウム	2.009	2323	—	1.189
内標準物質 2	2.724	6107	4.684	1.221
アセトアミノフェン	4.308	7977	9.558	1.189
dl-メチルエフェドリン	7.726	24038	17.475	1.175
カフェイン	8.269	54423	3.198	1.150
ベンフォチアミン	9.287	70259	7.237	1.007
ジヒドロコデイン	11.301	80868	13.500	1.094
内標準物質 1	12.198	167357	6.471	1.225
ノスカピン	14.389	217727	18.108	1.213

考 察

本検討では、市販かぜ薬を用いたグラジエント法による多成分同時分析の有用性を検証した。その結果、内標準物質を含む 9 成分の同時分析を可能とし、検討した成分では室間再現性及び定量性に問題のないことが確認された。

医薬品の品質管理試験において、これまで溶媒組成が一定のアイソクラティック法が多用されてきたが、本検討により、グラジエント法を用いることで、多成分同時分析における試験効率化が可能であると考えられた。

文 献

- 1) 森元久美子ら、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成分の分析法の検討—、家庭薬研究 No.36、p26-33(2017)
- 2) 株式会社ワイエムシィ アプリケーションデータ No.F040706B