

医薬品試験の効率化に関する検討

—グラジエント法を用いたイオヘキソールの純度試験の分析時間の短縮の検討—

竹林 憲司, 薬事研究会分析部会

緒 言

医薬品の生産量が増大する中、製薬企業には医薬品試験の効率化及び低コスト化が求められている。効率化の手段の一つとして「グラジエント溶出法」がある。グラジエント溶出法での分析は定量及び純度試験（類縁物質）にて適用されているが、どちらの試験においても一般的に分析時間が長いため、分析の効率化が課題となっている。そこで、本年はイオヘキソールの純度試験について、カラム種類及び長さの選定、これに伴うグラジエント時間の調整を行い、分析時間の短縮を検証した。

方法及び結果

まず、純度試験でグラジエント溶出法が規定されている原薬について、安全性や移動相組成、不純物の有無等を調査した。その結果、移動相が水とアセトニトリルで調製が容易なこと、欧州薬局方に類縁体である不純物 A と不純物 J が規定されていることから、イオヘキソールという医薬品を選定した。次に日本薬局方に規定されている試験条件を参考にして分析した結果を基本モデルとし、分析時間の短縮化を試みた。

1. サンプルの調製

1 mL 中の含有量がイオヘキソール 1.5 mg、不純物 A 3 µg、不純物 J 3 µg になるように混合溶液を調製した。

イオヘキソールの濃度は日本薬局方の純度試験に規定される試料濃度である。不純物 A、J の濃度は、それぞれの不純物の濃度がイオヘキソールの濃度に対して 0.2% になるように計算した場合の濃度である。

2. 基本モデルでの分析

日本薬局方に記載されている試験条件を参考にして以下の条件を基本モデルとした。「1. サンプルの調製」で調製した溶液について基本モデルの条件で測定し、保持時間及び分離度を確認した。

〔試験条件〕

検出器：紫外吸光光度計（測定波長 254 nm）

カラム：InertSustain C18 4.6 × 250 mm 5 µm

カラム温度：25℃

移動相：移動相 A：アセトニトリル

移動相 B：水

流量：1.0 mL/min

注入量：10 µL

グラジエント条件

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0 ~ 1	1	99
1 ~ 46	1 → 10	99 → 90

結 果

不純物 A、イオヘキソール、イオヘキソール（エキソ体）、不純物 J の順に溶出した。各ピークの保持時間と分離度を表 1 に示す。不純物 A とイオヘキソールの間に未知ピークが存在し、不純物 A とイオヘキソールとの分離度が測定できなかった。

表 1 基本モデルでの保持時間と分離度

化合物名	保持時間(分)	分離度
不純物 A	18.123	-
未知ピーク	18.667	-
イオヘキソール	20.016	-
イオヘキソール（エキソ体）	21.439	2.965
不純物 J	23.254	3.665

上記の結果から、今後の検討の判断基準を下記のように設定した。

イオヘキソールとエキソ体との分離度	1.5 以上
エキソ体と不純物 J との分離度	1.5 以上

イオヘキソールと不純物 A との分離については、「基本モデルの分析結果と同様に不純物 A とイオヘキソールの間に未知ピークを認める」とした。

3. カラム長さ、カラム粒子径、グラジエント条件の検討

長さを短く、粒子径を細かくしたカラムを用いて、適切な圧力の範囲内で分析時間を短縮するためには、分析条件（流量、グラジエント条件等）を最適化する必要が

あると考えられた。

そこで、カラムをショート化する際の分析条件について、以下のような計算式で注入量、流量、グラジエントタイムを求めた。（参考文献(1)参照）

最適化条件を作成するための方法を以下に示す。

カラムサイズ：4.6 × 250 mm、5 μm

グラジエントタイム：46 分

以下の通りに流量と注入量は断面積比により算出し、グラジエントタイムはカラム長さ比で算出した。

カラムサイズ	4.6 × 250 mm, 5 μm (基本モデル)		3.0 × 100, 3 μm の場合	
断面積	(2.3) ² × 3.14 ÷ 16.6 注入量：10 μL 流量：1.0 mL/min	断面積比 × 1/2.3	(1.5) ² × 3.14 ÷ 7.1 注入量：約 4 μL 流量：0.4 mL/min	
カラム長さ	250 mm グラジエントタイム (分) 0 → 1 1 → 46	長さ比 × 1/2.5	100 mm グラジエントタイム (分) 0 → 1* 1 → 19	

※カラムの比較を行うため、全て 1 分からグラジエントがかかるよう統一した

上記の計算式に従い、ショート化したカラムの断面積及びカラム長さから、各カラムに最適な注入量、流量、グラジエント時間を算出した (表 2)。

カラム温度については温度を上げることで、分析時間

を短縮できる可能性が考えられたため、25℃及び 40℃で分析した。サンプルは「1. サンプルの調製」で調製した溶液を使用した。

表 2 各カラムの分析条件

カラム名 カラムサイズ (mm)	粒子径 (μm)	カラム温度 (℃)	流量 (mL/min)	注入後の 時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)	注入量 (μL)
InertSustain 4.6 × 250	5	25	1.0	0 → 1	1	99	10
		40	1.0	1 → 46	1 → 10	99 → 90	
InertSustain 3.0 × 100	3	25	0.4	0 → 1	1	99	4
		40	0.4	1 → 19	1 → 10	99 → 90	
InertSustain 3.0 × 75	2	25	0.4	0 → 1	1	99	4
		40	0.4	1 → 14.5	1 → 10	99 → 90	
InertSustain 3.0 × 50	2	25	0.4	0 → 1	1	99	4
		40	0.4	1 → 10	1 → 10	99 → 90	
InertSustain 3.0 × 30	2	25	0.4	0 → 1	1	99	4
		40	0.4	1 → 6.4	1 → 10	99 → 90	

結 果

表2に示した条件で実際に分析を行い、分析時間の短縮化が可能かどうか検討した結果を表3に示す。

その結果、判断基準に適合したのは、「4.6 × 250 mm,

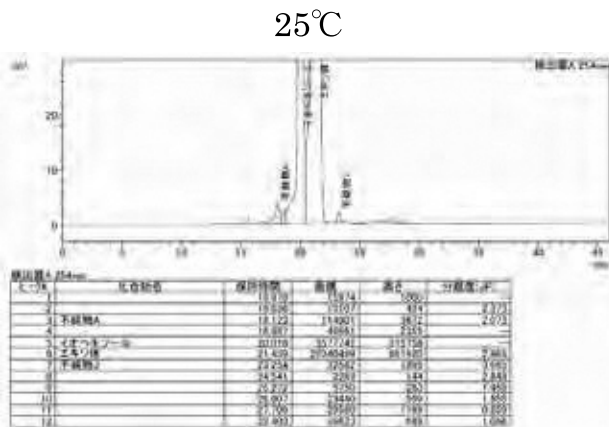
5 μm」(25℃, 基本モデル), 「3.0 × 100 mm, 3 μm」(25℃), 「3.0 × 75 mm, 2 μm」(25℃)であり、基本モデルと比較して保持時間が短縮されていた。

表 3 各カラムの分析結果

カラム名 カラムサイズ (mm)	粒子径 (μm)	カラム温度 (℃)	イオヘキソールの保持時間 (分)	エキソ体との 分離度	直前のピークと 不純物の分離度	
					不純物 A	不純物 J
InertSustain 4.6 × 250	5	25	20.010	2.965	○	3.665
		40	17.194	2.500	×	4.130
InertSustain 3.0 × 100	3	25	9.354	2.415	○	2.843
		40	7.947	2.229	×	3.471
InertSustain 3.0 × 75	2	25	6.985	2.569	○	3.293
		40	6.003	2.644	×	- *
InertSustain 3.0 × 50	2	25	7.700	1.530	○	- *
		40	6.197	1.030	×	2.000
InertSustain 3.0 × 30	2	25	5.310	1.187	○	- *
		40	3.743	- *	×	- *

○…不純物 A とイオヘキソールの間に未知ピークを認めた
 ×…不純物 A とイオヘキソールの間に未知ピークを認めなかった
 ※分離できなかった。

InertSustain C18 4.6 × 250 mm 5μm, 25℃



InertSustain C18 3.0 × 75 mm 2μm, 25℃

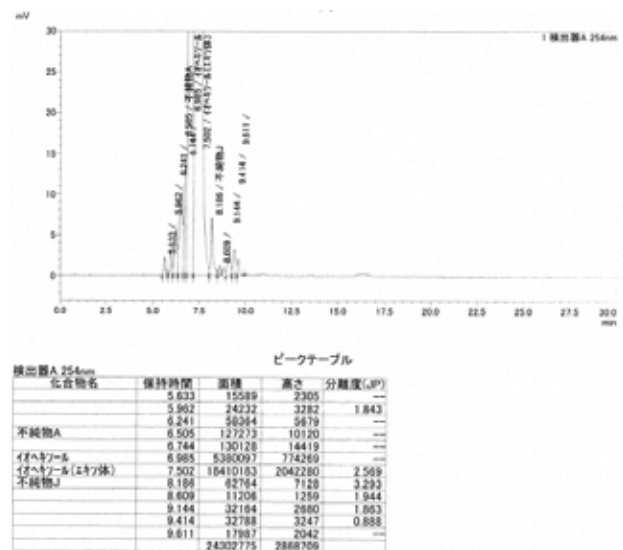


図 1 分析結果 (混合溶液のクロマトグラム)

考 察

今回、分析時間の短縮のために、内径、カラム長さ、粒子径、カラム温度を検討したところ、「3.0 × 75 mm, 2 μ m」のカラム（25℃条件）であればイオヘキソールとエキソ体、不純物 J の分離が得られ、かつ不純物 A とイオヘキソール間の未知ピークも認められた。この結果から、本試験条件において、「3.0 × 75 mm, 2 μ m」カラムを使用し、カラム温度 25℃で、グラジエントタイムを最適化した条件で分析することで、「2. 基本モデルでの分析」の条件から、分析時間を約 3 分の 1 に短縮することが可能となった。

	流量 (mL/min)	分析時間 (分)
基本モデル条件	1.0 (エキソ体の保持時間が約 21 分)	46
短縮化条件	0.4 (エキソ体の保持時間が約 7.5 分)	14.5

参考文献

- 1) 「株式会社ワイエムシイ 2008 分析展 新技術説明会」
<http://www.ymc.co.jp/data/tech/15.pdf>