

[資料]

日本薬局方試験法におけるクロマトグラフィー条件の調整 ～シルニジピン錠溶出性～

赤松 成基* 藤田 裕代

Adjustment of Chromatographic Conditions for the Official Methods of Japanese Pharmacopoeia: Dissolution Test of Cilnidipine Tablets

Shigeki AKAMATSU* and Yasuyo FUJITA

*Health Science Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health Science,
1819-14, Kanno, Kanno-cho, Kakogawa 675-0003, Japan*

The adjustment of chromatographic conditions in the official methods of Japanese Pharmacopoeia using dissolution test of cilnidipine tablets as the model was discussed. Twelve different columns were applied to evaluate parameters for high-performance liquid chromatography method. The effects of column size such as inner diameter, length, and particle diameter on the number of theoretical plates were examined as well as flow rate and injection volume. These results differed from expectations calculated by Japanese Pharmacopoeia, suggesting that it is necessary to investigate the optimum chromatographic conditions for each column.

I はじめに

日本薬局方（以下、日局）は、国内の医薬品の品質を適正に確保するための規格、基準及び標準的試験法等を示す公的な規範書である¹⁾。また日局は、最新の学問・技術の積極的導入による質的向上、医薬品のグローバル化に対応した国際化の一層の推進に対応するため、近年は5年ごとの全面改正が行われるほか、全面改正の間に2度の追補が公布されている。2022年12月には第十八改正日本薬局方第一追補（以下、日局18-1）が公布され、一般試験法の項では「2.00 クロマトグラフィー総論」が新設される等の改正があった²⁾。従来の日局においては、クロマトグラフィー条件の調整は許容されていたが、

変更可能な範囲が明示されていなかった。今回の改正により、日局18-1ではクロマトグラフィーの様々なパラメーターについて調整することができる範囲が具体的に示された³⁾。

本研究では、日局18-1に基づくクロマトグラフィー条件の調整の影響について評価するために、クロマトグラフィーの一つであり、日局の医薬品各条で汎用される液体クロマトグラフィーを用いた試験法の中から、イソクラティック溶離のモデルとしてシルニジピン錠の溶出性を選択した。シルニジピン錠も含め、医薬品各条で規定されている液体クロマトグラフィーカラムの多くは、粒子径が5 µm以上のものである。一方、近年高耐圧型の装置が開発されたこと等から、カラムの大きさは小型化し、食品分析や環境分析等の分野では粒子径が2 µm未満のものを使用した高速分析も数多く報告されるようになった⁴⁾。今回は、シルニジピン錠試験法の主に「カ

兵庫県立健康科学研究所 健康科学部*
〒675-0003 兵庫県加古川市神野町神野 1819-14

ラムパラメーターと流量」及び「注入量」について粒子径の小さなカラムへの変更に伴うクロマトグラフィー条件の調整を行い、得られた知見について報告する。

II 材料と方法

1. 試薬及び標準品

シルニジピン標準品は、一般社団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団から入手した。アセトニトリルは富士フイルム和光純薬製の LC/MS 用、リン酸水素二ナトリウム十二水和物及びその他の試薬は富士フイルム和光純薬製の特級を用いた。また、精製水には Merck Millipore 製 Milli-Q システムを用いた。

2. カラム

試験に用いたカラムは、オクタデシルシリル化シリカゲルを充填し、それぞれ大きさの異なる、以下の市販の 12 種類（表面多孔性粒子型 4 種類を含む）とした。

- A 社製 4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μm 全多孔性
- B 社製 2.1 mm i.d. × 50 mm, 1.7 μm 全多孔性
- C 社製 2.1 mm i.d. × 50 mm, 1.9 μm 全多孔性
- B 社製 2.1 mm i.d. × 75 mm, 2.5 μm 全多孔性
- B 社製 2.1 mm i.d. × 100 mm, 1.6 μm 表面多孔性
- B 社製 2.1 mm i.d. × 100 mm, 1.7 μm 全多孔性
- D 社製 3.0 mm i.d. × 50 mm, 2.7 μm 表面多孔性
- C 社製 3.0 mm i.d. × 100 mm, 2.7 μm 表面多孔性
- E 社製 3.0 mm i.d. × 100 mm, 3 μm 全多孔性
- B 社製 4.6 mm i.d. × 50 mm, 2.7 μm 表面多孔性
- A 社製 4.6 mm i.d. × 50 mm, 3 μm 全多孔性
- D 社製 4.6 mm i.d. × 100 mm, 3.5 μm 全多孔性

3. 装置及び試験条件

液体クロマトグラフは、Waters 製 ACQUITY Arc システムを用いた。試験条件は日局のシルニジピン錠溶出

性に規定の試験条件に従った (Table 1) ¹⁾。規定のカラムから変更する際には日局 18-1 に準じて流量及び注入量のみ適宜変更し、その他の条件は変更しなかった。換算式は以下により求めた値を参考にした ²⁾。なお、流量はシステムの耐圧制限により計算値で測定できない場合は、測定可能なレベルに低下させて測定した。すべての試験は連続 6 回測定し、得られたデータは平均値を用いて評価した。

$$\text{流量} = F_1 \times [(d_{e2}^2 \times d_{p1}) / (d_{e1}^2 \times d_{p2})]$$

$$\text{注入量} = V_{inj1} \times [(L_2 \times d_{e2}^2) / (L_1 \times d_{e1}^2)]$$

F_1 : 医薬品各条の流量 (mL/min)

d_{e1} : 医薬品各条のカラムの内径 (mm)

d_{e2} : 使用するカラムの内径 (mm)

d_{p1} : 医薬品各条のカラムの粒子径 (μm)

d_{p2} : 使用するカラムの粒子径 (μm)

V_{inj1} : 医薬品各条の注入量 (μL)

L_1 : 医薬品各条のカラムの長さ (mm)

L_2 : 使用するカラムの長さ (mm)

また、カラム性能 (カラム効率) を示す理論段数 (N) 及びピーク形状を示すシンメトリー係数 (As) は、同様に日局 18-1 に準じて以下の式で求めた ²⁾。

$$N = 5.54 \times (t_R / w_h)^2$$

$$As = w_{0.05} / 2d$$

t_R : ピークの保持時間

w_h : ピーク高さの中間点におけるピーク幅

$w_{0.05}$: ピーク高さの 1/20 の高さにおけるピーク幅

d : ピーク頂点から下ろした垂線と、ピーク高さの 1/20 の高さにおけるピーク立ち上がり側の端までの距離

Table 1 Chromatographic conditions of the JP official method for the determination of cilnidipine

Column	Octadecylsilyl column, 4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μm
Mobile phase	10 mM Na ₂ HPO ₄ (pH6.0) - ACN (4:6)
Column temperature	40°C
Flow rate	1.3 mL/min
Injection volume	20 μL
Detection	PDA (240 nm)

III 結果及び考察

1. カラムパラメーター

日局ではカラムは、「内径 4.6 mm, 長さ 15 cm のステンレス管に 5 μm の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充填」とあり ¹⁾、固定相の置換基の変更は認められないことから、複数のメーカーで販売されているオクタデシルシリル化カラム (以下, C18 カラム) から II-2 項に示した様々な大きさ (内径, 長さ

及び粒子径)のものを選択した。

最初に日局試験法によるシルニジピンのクロマトグラムを Fig.1 に示した。保持時間は約 8 min の単一ピークであり、溶媒ピークと十分に分離していることを確認した。

次に Table 2 に日局試験法を含む、各 C18 カラムによって得られたデータを示した。カラムの大きさは、全多孔性粒子の場合、長さ (L) と粒子径 (d_p) の比率 (L/d_p) の -25% から +50% の範囲に変更することが可能であるが、比較のため範囲外になるものも同様に示した (No.6 及び No.11)。日局試験法の No.1 では、保持時間が 7.65 min 付近であったが、他の 11 種類のカラムで保持時間がその 1/2 以下に減少し、高速分析が可能となった。シンメトリー係数及び再現性の指標であるピーク面積の相対標準偏差は 12 種類すべてで日局試験法に規定の 2.0 以下及び 2.0% 以下 ($n=6$) であり、顕著な差は見られなかった。

続いて理論段数について評価した。日局試験法の No.1 と比較して、No.2, No.3 及び No.11 の 3 種類は 25% 以上低下した。これらはいずれも長さが 50 mm と短く、理論段数が保持時間の 2 乗に比例することから、保持時

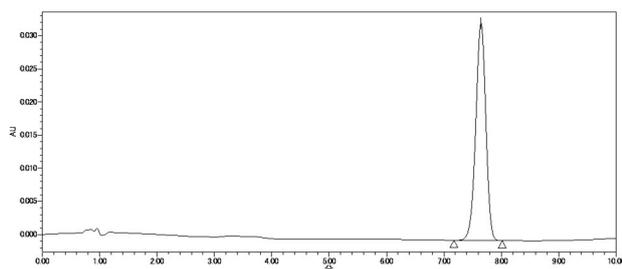


Fig.1 Representative chromatogram of cilnidipine with the JP official method

間の減少が影響を与えているものと考えられた。No.11 は L/d_p の範囲外であるが、No.2 及び No.3 では日局 18-1 の規定を満たすことから、実試料の定量時に理論段数の低下には注意を要することが示唆された。一方、長さが 100 mm のものはすべて理論段数が増加した。特に、No.12 は粒子径の大きさが $3.5 \mu\text{m}$ であり、調査したカラムの中では No.1 の次に大きな粒子径であるにも関わらず、理論段数は増加しており、長さが重要なファクターであることがわかった。

一方、表面多孔性粒子カラムに変更する際には、 L/d_p に関わらず理論段数が規定カラムの -25% から +50% の範囲にある必要があるため、No.5 及び No.8 は上限を超えていることから、日局 18-1 によればこの条件では変更の対象外となった。

次に、全多孔性粒子カラムと表面多孔性粒子カラムを比較した。ほぼ同じカラムの大きさである (No.5 及び No.6), (No.8 及び No.9), (No.10 及び No.11) の 3 組すべてにおいて表面多孔性粒子の方が理論段数は大きくなった。これは、表面多孔性粒子カラムが、無孔性の中心核 (コア) を持つことから、カラム充填剤内での拡散が抑えられたことが要因と考えられた⁵⁾。なお、期待された表面多孔性粒子カラム使用に伴うシステム圧力の低下は今回の比較からは認められなかった。

またグリーンケミストリーの観点から、有機溶媒を含む移動相の消費量について調査した。移動相消費量を「流量と保持時間の積」と定義し、日局試験法の No.1 との比率を求めた。No.1 の移動相消費量を 1 とすると、No.2 が最小値の 0.06 であり、最大は 0.60 の No.12 であった。いずれのカラムでも日局試験法に比べると移動相消費量が少なかったが、内径及び長さの小さいものはより消費量が少ないことがわかった。

Table 2 Summary of parameters for the analytical columns

Column No.	Inner diameter /mm	Length (L) /mm	Particle diameter (d_p) / μm	L/d_p	Flow rate / (mL/min)	Injection volume / μL	Retention time (RT) /min	Area	N	As	Flow rate *RT		Notes ^{a)}
											Ratio	Ratio	
1	4.6	150	5	30.0	1.3	20	7.65	401078	9139	0.952	9.94	1	JP official method
2	2.1	50	1.7	29.4	0.8	2	0.74	30108	3210	1.199	0.59	0.06	
3	2.1	50	1.9	26.3	0.7	2	1.16	32659	6654	1.096	0.81	0.08	
4	2.1	75	2.5	30.0	0.5	2	1.63	45714	7448	1.126	0.82	0.08	
5	2.1	100	1.6	62.5	0.5	3	2.33	117715	21034	1.118	1.17	0.12	SPP
6	2.1	100	1.7	58.8	0.5	3	2.34	108669	15032	1.146	1.17	0.12	
7	3.0	50	2.7	18.5	1.0	3	1.13	51258	8155	1.012	1.13	0.11	SPP
8	3.0	100	2.7	37.0	1.0	5	1.89	106558	17134	1.008	1.89	0.19	SPP
9	3.0	100	3	33.3	1.0	5	3.14	106075	11081	1.117	3.14	0.32	
10	4.6	50	2.7	18.5	2.4	5	0.73	44229	8184	1.059	1.76	0.18	SPP
11	4.6	50	3	16.7	2.4	5	1.38	44074	4845	1.004	3.31	0.33	
12	4.6	100	3.5	28.6	1.8	15	3.34	211495	12859	1.104	6.00	0.60	

a) SPP: superficially porous particle

2. 流量

流量についてカラム性能への影響を評価した。注入量等その他の条件を一定にし、流量のみを増減させて各種カラムで測定した。流量を増加させると、保持時間が減少して高速分析が可能となったが、理論段数が大きく低下したカラムもあった。反対に、流量を減少させると、ピーク幅が大きくなるが、保持時間が増加するために理論段数が大きくなったものもあった。また、移動相消費量（流量と保持時間の積）は流量に関わらずほぼ一定の値を示し、カラムの種類にのみ依存する結果となった。Fig.2にTable2の5種類のカラム（No.2, 7, 10, 11及び12）のVan Deemterプロットを示した。このプロットの縦軸は長さ（ L ）と理論段数（ N ）の比である理論段高さ（ L/N ）であり、値が小さいほど理論段数が大きいことを示している。また、横軸は流量をカラム断面積で除した線速度とした。一般的には粒子径の小さいカラムほど理論段高さは小さくなり、カラム長さを短くしても高い理論段数を維持することができることとなる。また、流量が増加しても理論段高さの増加は緩やかになることが特徴である⁶⁾。しかしながら、No.2では粒子径が2 μm 未満であったが、理論段高さは高値であり、流

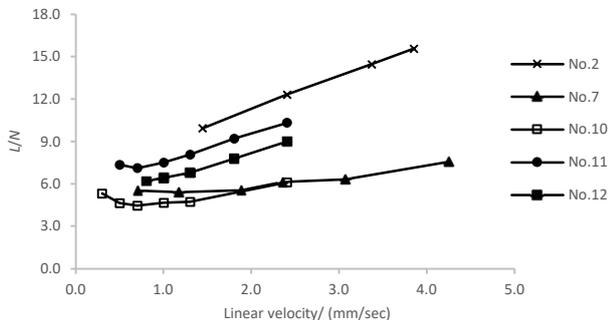


Fig.2 Van Deemter plot for 5 different columns

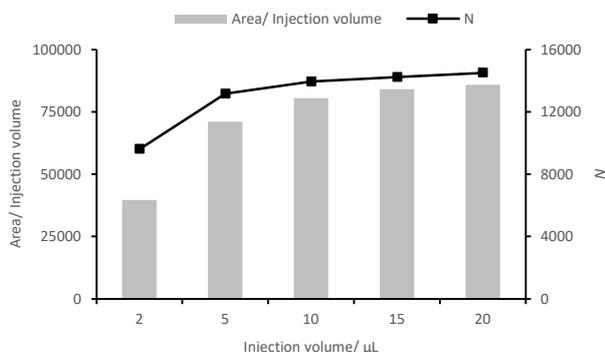


Fig.3 Effect of injection volume on peak area and number of theoretical plates for No.4 column

量の増加による理論段高さの顕著な増加も見られた。これは用いた汎用システムの配管や検出器セル等でのカラム外拡散が原因と考えられ、微細粒子径カラム本来のカラム性能を十分に生かしきれなかったものと推測された。一方、No.7及びNo.10の表面多孔性粒子カラムでは、粒子径は2-3 μm であるものの、高流量においても低い理論段高さを維持していた。本結果からも表面多孔性粒子カラムの有用性が認められた。また、No.10及びNo.11に見られるように、一定レベルを超えて流量を減少させると、逆に理論段高さが増加するものもあり、カラムごとに最適な流量を見極める必要があることが確認された。

3. 注入量

注入量は液体クロマトグラフィーにおいて検出ピークに直結するパラメーターであり、注入量の増減は理論段数にも影響を与える。しかし、内径の小さいカラムで測定する際には、過大な注入量によりカラム内での試料のバンド幅が広がり、ピーク形状の悪化及び理論段数の低下の原因となることがあり、注意が必要である。

複数のカラムにおいて流量を固定して注入量を増減したところ、注入量の増加に伴い、ピーク面積が増大し、理論段数も大きくなった。一例として、全多孔性粒子であるNo.4カラム（Table 2）における注入量のピーク面積及び理論段数に与える影響についてFig.3に示した。III-3項に示した注入量の換算式ではNo.4カラムは2 μL となるが、今回実施した日局試験法の注入量（20 μL ）以下の範囲では、注入量の増加に伴うバンド幅の広がりや理論段数の低下は見られず、理論段数は大きくなった。一方で、10 μL 以下では注入量あたりのピーク面積が減少しており、再現性は良好であったものの小容量では試料をロスしている可能性が考えられた。そのため、カラム変更時には理論上の変換値よりも大きい注入量も検討する必要があることが明らかとなった。

IV 結論

日局の医薬品各条で規定されている試験法（シルジニピン錠の溶出性）のクロマトグラフィー条件の調整について、日局18-1の規定と照らし合わせながら実施した。主に分析カラムの大きさ（内径、長さ及び粒子径）、流量及び注入量の違いによる保持時間及び理論段数等への影響を調査し、考察した。

今回調査した比較対象の粒子径の小さい11種類すべてのC18カラムで保持時間は1/2以下に減少し、高速化が図れた。また使用する移動相消費量も4割以上の削減

が可能となった。しかし、カラムの大きさが日局 18-1 の規定を満たすものであっても、流量及び注入量を換算式で得られた値を利用するだけでは十分な理論段数を示さないものもあり、実試料測定にはその都度これらパラメーターの詳細な調整が有用であることがわかった。また、表面多孔性粒子カラムは同サイズの全多孔性粒子カラムと比べ、高い理論段数を示した。なお、本研究では汎用の液体クロマトグラフィーを用いたが、配管の内径や耐圧性能等のシステムが与える影響も大きいことから、システムに応じたクロマトグラフィー条件の調整が重要であることもわかった。

文 献

- 1) 厚生労働省：第十八改正日本薬局方。令和 3 年 6 月 7 日，厚生労働省告示第 220 号 (2021)
- 2) 厚生労働省：第十八改正日本薬局方第一追補。令和 4 年 12 月 12 日，厚生労働省告示第 355 号 (2022)
- 3) 奥田晴宏：日本薬局方の医薬品各条試験法との関連課題。医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス，**54**, 30-35 (2023)
- 4) 望月直樹：食の安全確保にかかわる LC-MS/MS の基本的な分析技術。食衛誌，**54**, 251-258 (2013)
- 5) Guillaume, D., Ruta, J., Rudaz, S., Veuthey, J. L. : New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches. *Anal. Bioanal. Chem.*, **397**, 1069-1082 (2010)
- 6) 国広沖之，早川禎宏，丸山秀三：超高速液体クロマトグラフと高速高分離分析用カラムの開発。 *Chromatography*, **28**, 95-99 (2007)

(令和 6 年 3 月 19 日受理)