



TOSOH

SEPARATION REPORT

セミクロカラムを用いた逆相クロマトグラフィーによる医薬品の分離

——目 次——

	ページ
1. はじめに	1
2. 分離条件の検討	1
2-1 注入容量の影響	1
2-2 流速の影響	2
2-3 試料負荷量の影響	2
3. 応用例	3
3-1 抗てんかん薬の分析	3
3-2 喘息治療薬及び解熱鎮痛薬の分析	4
3-3 抗リウマチ薬の分析	6
4. おわりに	6

1. はじめに

セミマイクロカラムの大きな利点は、汎用カラム(内径4.6mm)に比べ、高感度な分析が行えることです。また、分析に用いる試料量が少ないため、微量試料の分離分析にも適しています。さらに最近では、環境問題の点から、溶媒消費量が大幅に削減できることも注目すべき利点といえます。一方汎用カラムに比べ、低流速で使用したり、試料注入量が少ないなど、取扱い上、注意する点もすくなくありません。本報告では、ODSシリカを用いた逆相クロマトグラフィーによる医薬品の分離について、分離に影響を及ぼす因子の検討と、応用例について述べます。

2. 分離条件の検討

分離条件の検討は、以下の測定条件を基本として行いました。またその際の分離例を図-1に示します。

[使用したカラム及び装置]

カラム; TSKgel ODS-80Ts(2mmI.D.×15cm)
TSKgel ODS-80Ts(4.6mmI.D.×15cm)
TSKgel Super-ODS(4.6mmI.D.×10cm)
溶離液; 50mM NaH₂PO₄(pH2.5)/アセトニトリル=80/20
流速; 0.15ml/min(セミマイクロカラム)
1.0ml/min(その他の方法)
温度; 40°C
検出; UV(210nm)
試料; 1. プリミドン 2. D,L-5-(4-ヒドロキシフェニル)-5-フェニルヒダントイン
3. フェノバルビタール

[HPLCシステム]

CCPM-II, AS-8020, CO-8020, UV-8020, SC-8020
UVセル; マイクロセル、検出器のレスポンス; 50msec
配管; オートサンプラ~カラム、カラム~UVセル間に、
0.1mmI.D.×40cm
(接続パイプセット・Lタイプ(品番18186))を使用
データ処理のサンプリングピッチ;
TSKgel ODS-80Ts: 200msec
TSKgel Super-ODS: 50msec

2-1. 注入容量の影響

サンプル負荷量が一定になるようにしながら注入容量だけを変えた時の、溶出ピークの理論段高さの変化を図-2に示します。図より理論段高さは1~3 μ lの範囲が最も低くなり、この範囲でカラム性能が最も高いことが示されました。また3~10 μ lの範囲では若干理論段数は落ちますが十分使用が可能と思われれます。

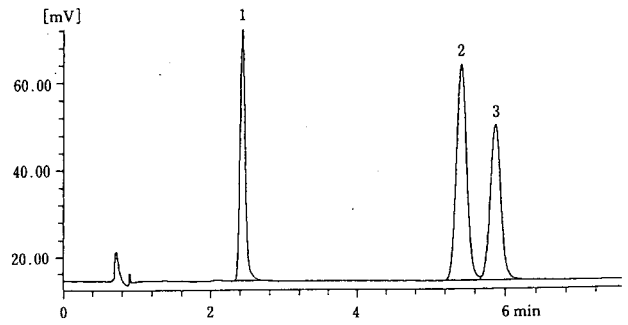


図-1. 基礎検討で行った分析例

測定条件は本文を参照

試料: 1. プリミドン 2. D,L-5-(4-ヒドロキシフェニル)-5-フェニルヒダントイン 3. フェノバルビタール

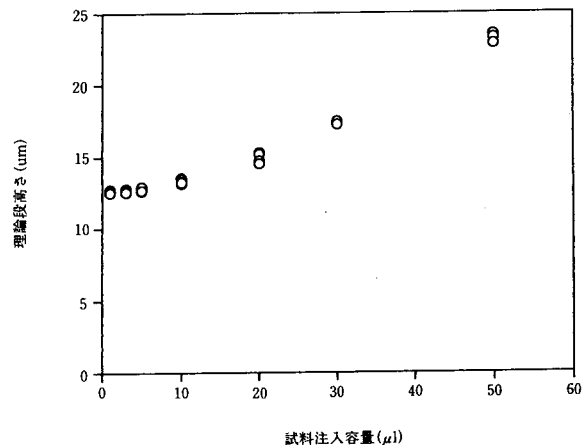


図-2. 試料注入容量の理論段高さに対する影響

カラム; TSKgel ODS-80Ts(2mmI.D.×15cm)
溶離液; 50mM NaH₂PO₄/アセトニトリル=80/20
流速; 0.15ml/min
温度; 40°C
検出; UV(210nm)
試料; D,L-5-(4-ヒドロキシフェニル)-5-フェニルヒダントイン(25 μ g/ml)
注入量; 1~50 μ l
n=3

2-2. 流速の影響

種々の流速で分析を行い、各流速でのピークの理論段高さを調べた結果を図-3に示します。図より最適な理論段数は流速が0.15ml/minの時に得られることがわかり、また0.15~0.3ml/minの範囲でカラム性能が十分に発揮できると思われます。

2-3. 試料負荷量の影響

注入容量を2 μ lに固定して試料負荷量を変えて理論段高さへの影響を調べました(図-4)。図より最適試料負荷量は5~100ngの範囲と考えられます。また試料負荷量とピーク面積との関係(図-5)では5~1000ngまでの範囲で直線的であり、定量関係にあると思われます。

以上の結果をまとめると、TSKgel ODS-80Ts(2mmI.D. \times 15cm)セミマイクロカラムの性能が十分発揮できるのは次のようになります。

	最適な範囲	十分使用できる範囲
試料注入容量	1~3 μ l	1~10 μ l
流速	0.15ml/min	0.15~0.3ml/min*
試料負荷量	5~100ng	5~1000ng

*流速は、最大使用圧力を越えない範囲で使用する

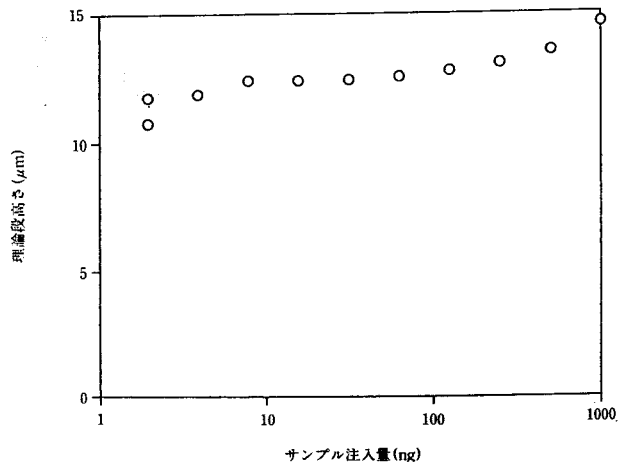


図-4. 試料注入量の理論段高さに対する影響
条件は図-3に同じ
ただし試料注入量は2 μ lとし、濃度を変えた。

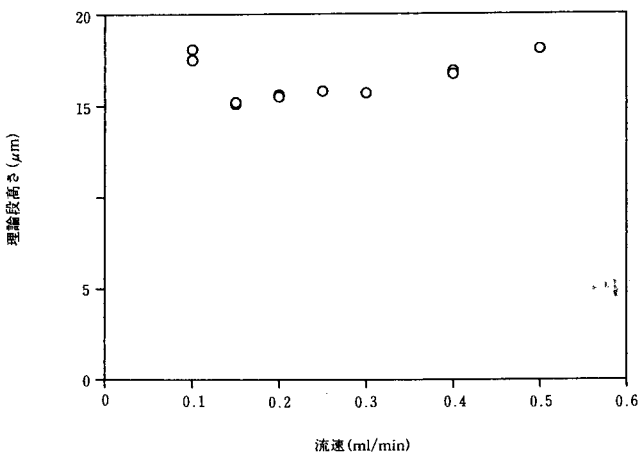


図-3. 流速の理論段高さに対する影響

カラム; TSKgel ODS-80Ts(2mmI.D. \times 15cm)
溶離液; 50mM NaH₂PO₄/アセトニトリル=80/20
流速; 0.1~0.5ml/min
温度; 40°C
検出; UV(210nm)
試料; フェノバルピタール(2 μ l, 25 μ g/ml)
n=2

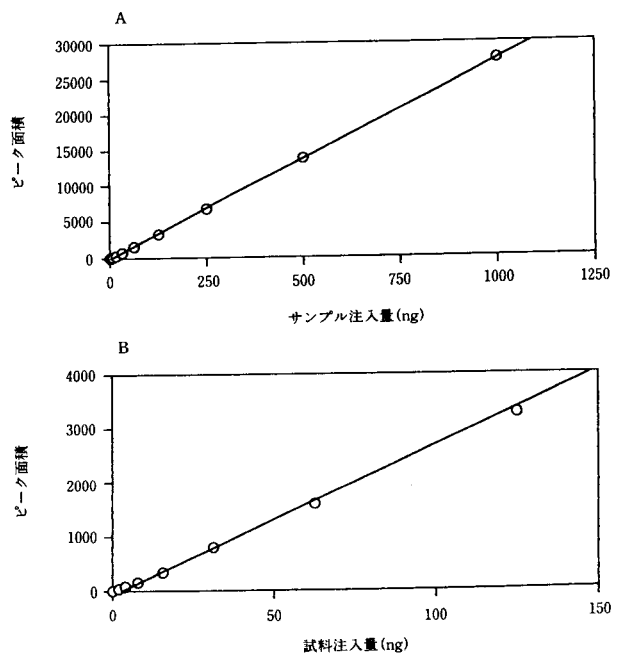


図-5. 試料注入量とピーク面積との関係
条件は図-4に同じ
図-5Bは、図-5Aの一部拡大図

3. 応用例

3-1. 抗てんかん薬の分析

11種類の抗てんかん薬の一斉分析を、TSKgel ODS-80 Tsセミマイクロカラムと汎用カラム(内径4.6mm)及びTSKgel Super-ODSで行って比較した結果を図-6に示します。

各クロマトグラムを比較すると、TSKgel ODS-80Tsセミマイクロカラムと汎用カラムとでは、使用しているミキサの違いからグラジエント曲線が微妙に異なる(また線速も若干異なる)ために各ピークの溶出時間に多少のずれが見られるものの、分離パターンはほとんど同じです。それに対してTSKgel Super-ODSと他のクロマトグラムとの比較ではピーク4と5付近の未知ピーク(試料No.1、3、9由来と思われる)の溶出順が変わっており、選択性の違いが見られました。分析時間はTSKgel ODS-80Tsセミマイクロカラムと汎用カラムの約20~25分に対して、TSKgel Super-ODSで5分程度です。

ピーク高さの比較では、TSKgel ODS-80Tsセミマイクロカラムでは汎用カラムに比べてほぼ全てのピークで4~5倍高くなっており、明らかに感度の向上が見られました。またTSKgel Super-ODSとTSKgel ODS-80Ts汎用カラムとの比較でも、2~3倍の感度の向上が見られました。

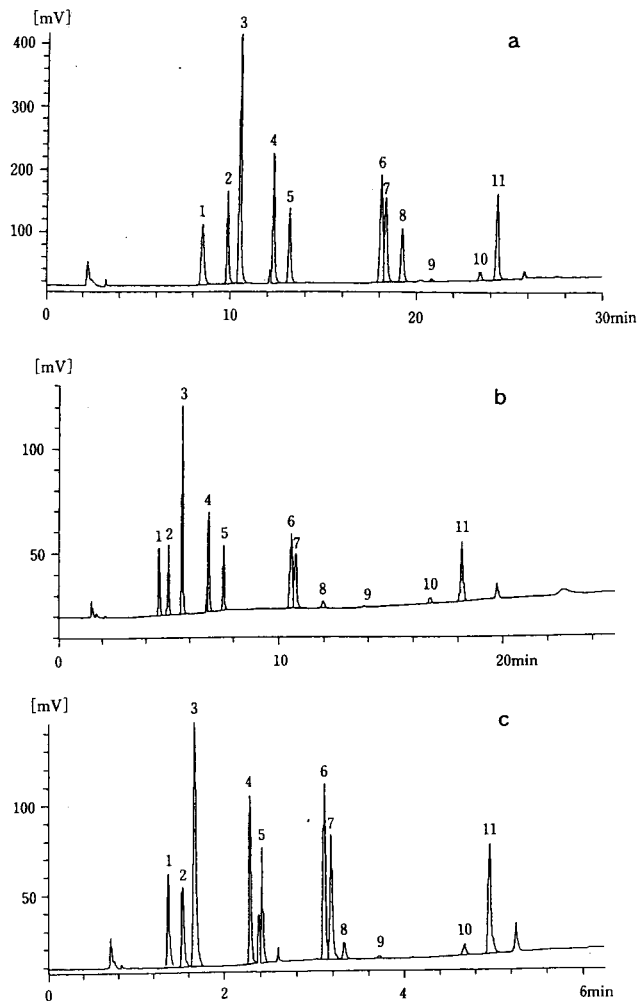


図-6. 抗てんかん薬の分析

カラム; 図-6 a; TSKgel ODS-80Ts(2mmI.D.×15cm)
 図-6 b; TSKgel ODS-80Ts(4.6mmI.D.×15cm)
 図-6 c; TSKgel Super-ODS(4.6mmI.D.×10cm)
 溶離液; A; 50mM NaH₂PO₄(pH2.5)/アセトニトリル=80/20
 B; 50mM NaH₂PO₄(pH2.5)/アセトニトリル=30/70
 TSKgel ODS-80Ts(2mmI.D., 4.6mmI.D.)
 B: 0%(0min)→30%(5min)→30%(10min)
 →100%(25min) リニアグラジエント
 TSKgel Super-ODS
 B: 0%(0min)→30%(1.25min)→30%(2.5min)
 →100%(6.25min) リニアグラジエント
 流速; TSKgel ODS-80Ts(2mmI.D.); 0.15ml/min
 TSKgel ODS-80Ts(4.6mmI.D.); 1.0ml/min
 TSKgel Super-ODS; 1.5ml/min
 温度; 40°C 検出; UV(210nm)
 試料; 1. エトサクシミド(375ng) 2. プリミドン(50ng)
 3. スルチアム(250ng) 4. D,L-5-(4-ヒドロキシフェニル)-5-フェニルヒダントイン(50ng) 5. フェノバルビタール(50ng) 6. カルバマゼピン(50ng) 7. フェニトイン(50ng) 8. ニトラゼパム(50ng) 9. クロナゼパム(2ng) 10. バルプロ酸(1μg) 11. ジアゼパム(50ng)
 注入量; 10μl

3-2. 喘息治療薬及び解熱鎮痛薬の分析

喘息治療薬及び解熱鎮痛薬6種のTSKgel ODS-80Tsセミマイクロカラムと汎用カラム、及びTSKgel Super-ODSで一斉分析を行った結果を図-7に示します。セミマイクロカラムを使った分析では、ステップグラジエントにより18分以内に6種類の薬物が分離できました。TSKgel ODS-80Ts汎用カラムでは16分、TSKgel Super-ODSでは4分で分析が終了しました。

セミマイクロカラムでの感度は汎用カラムと比較すると約2倍高く、TSKgel Super-ODSとはほぼ同等でした。

各薬物の検出限界と定量限界は以下の通りで、血中薬物の分析にも十分使用可能であると思われます。

薬物	検出限界 (S/N=3)	定量限界	血中治療濃度範囲
テオプロミン	0.031	0.2	
アセトアミノフェン	0.16	0.59	1-10
テオフィリン	0.043	0.4	10-20(小人5-15)
カフェイン	0.068	0.23	
エテンザミド	0.29	1.0	
フェナセチン	0.24	0.87	

単位は $\mu\text{g/ml}$ (注入量 $2\mu\text{l}$)

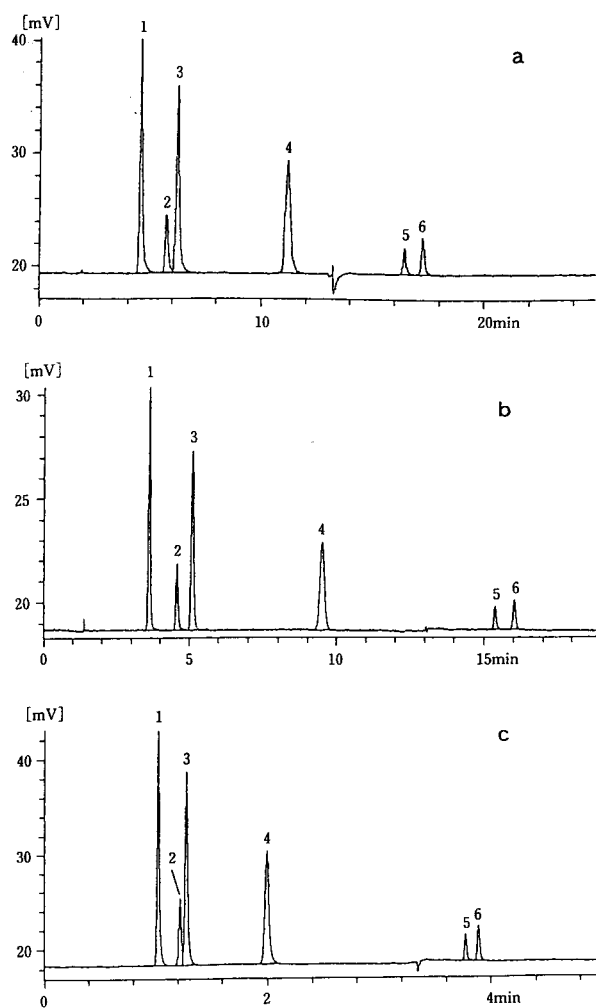


図-7. 喘息治療薬及び解熱鎮痛薬の分析

カラム； \square -7 a；TSKgel ODS-80Ts(2mm I.D. \times 15cm)

\square -7 b；TSKgel ODS-80Ts(4.6mm I.D. \times 15cm)

\square -7 c；TSKgel Super-ODS(4.6mm I.D. \times 10cm)

溶離液；A；水/アセトニトリル=91/9

B；水/アセトニトリル=70/30 ステップグラジエント

TSKgel ODS-80Ts(2mm I.D.)；

B：0% (0min) \rightarrow 100% (10min)

TSKgel ODS-80Ts(4.6mm I.D.)；

B：0% (0min) \rightarrow 100% (11min)

TSKgel Super-ODS(4.6mm I.D.)；

B：0% (0min) \rightarrow 100% (2.5min)

流速；TSKgel ODS-80Ts(2mm I.D.)；0.15ml/min

TSKgel ODS-80Ts(4.6mm I.D.)；1.0ml/min

TSKgel Super-ODS；1.5ml/min

温度；50 $^{\circ}\text{C}$

検出；UV(273nm)

試料；1. テオプロミン 2. アセトアミノフェン 3. テオフィリン 4. カフェイン 5. エテンザミド 6. フェナセチン
(各10 $\mu\text{g/ml}$ 、 $2\mu\text{l}$)

次に市販の薬剤を試料としてセミマイクロカラムで各成分の分析を行いました。用いた試料は解熱鎮痛剤(OTC薬)で、一錠(430mg)あたりに含まれる成分の含有量は下表の通りです。

解熱鎮痛剤(OTC薬)の各成分の含有量(mg/錠)

アセトアミノフェン	150
エテンザミド	130
カフェイン	30
アリルイソプロピルアセチル尿素	50
賦型剤	70

図-8に解熱鎮痛剤(錠剤)のクロマトグラムを示します。ピーク面積からの各成分の定量値は含有量と良く一致しました(表-1)。また表-2より、サンプル間差のC.V.値は2~3%、検量線(テオブロミン)の傾きの日差再現性はC.V.値4.06%が得られ、十分な再現性があることが示されました。

表-1. 解熱鎮痛剤の分析における試料間差

試料No.	アセトアミノフェン	エテンザミド	カフェイン
1	142	125	27.8
2	153	127	28.6
3	145	131	28.2
4	145	125	28.2
5	153	123	29.4
平均	148	126	28.4
C.V.(%)	3.36	2.40	2.13

単位はmg/錠

解熱鎮痛剤一錠を粉砕してメタノール100mlに溶解しマイシヨリディスでろ過して試料とした。

各成分はテオブロミンを内部標準としてクロマトグラムのピーク面積比により定量した。

表-2. 喘息治療薬の分析における検量線(テオブロミン)の日差再現性

Day	検量線の傾き
1	101
2	95.6
3	101
4	94.4
5	92.4
平均	96.9
C.V.(%)	4.06

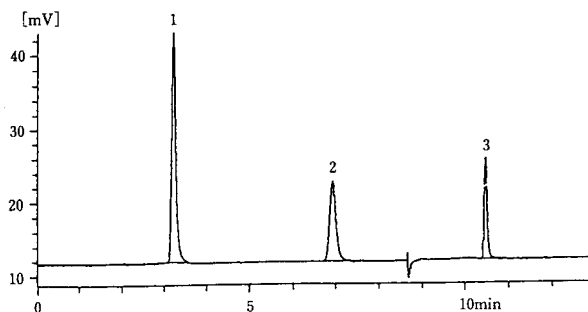


図-8. 市販の解熱鎮痛剤(錠剤)の分析

カラム; TSKgel ODS-80Ts (2 mmI.D.×15cm)

溶離液; 水/アセトニトリル=91/9

流速; 0.3ml/min

温度; 50°C

検出; UV (273nm)

試料; 錠剤抽出液(10 μl)

1. アセトアミノフェン
2. エテンザミド
3. カフェイン

3-3. 抗リウマチ薬の分析

抗リウマチ薬の一斉分析を、TSKgel ODS-80Tsセミマイクロカラムと汎用カラム、及びTSKgel Super-ODSで行った結果を図-9に示します。

分析時間はTSKgel ODS-80Tsセミマイクロカラムで12分、汎用カラムで9分、TSKgel Super-ODSでは4分でした。各ピークの高さを比較すると、セミマイクロカラムでは汎用カラムに比べて約3倍感度が高く、またTSKgel Super-ODSとは同等以上でした。

サリチル酸の注入量とピーク面積の関係は20~500 μ g/mlの間で直線性を示しました。検出限界(S/N=3)と定量限界(S/N=10)は、それぞれ0.071 μ g/ml(140pg)と0.31 μ g/ml(620pg)でした。血中治療濃度範囲は150~300 μ g/mlであり、十分血中薬物の測定に対応できるものと考えられます。

4. おわりに

TSKgel ODS-80Tsセミマイクロカラムに関して基礎検討を行った結果、最適注入量は1~3 μ l、最適流速は0.15 ml/min、最適試料負荷量は5~100ngでした。

次にセミマイクロカラムでの各種の薬物の分析を行った結果、汎用カラムに比べて4倍以上の感度が得られました。極微小充填剤であるTSKgel Super-ODSとの比較では、分析時間は4倍程長いものの感度的には2倍以上でした。試料として市販の薬剤の分析を行ったところ、高感度で再現性のよい分析結果が得られました。これらの薬物の分析における検出限界及び定量限界は血中治療濃度を十分にカバーしており、血中薬物のモニタリングへの応用が可能であることが示されました。

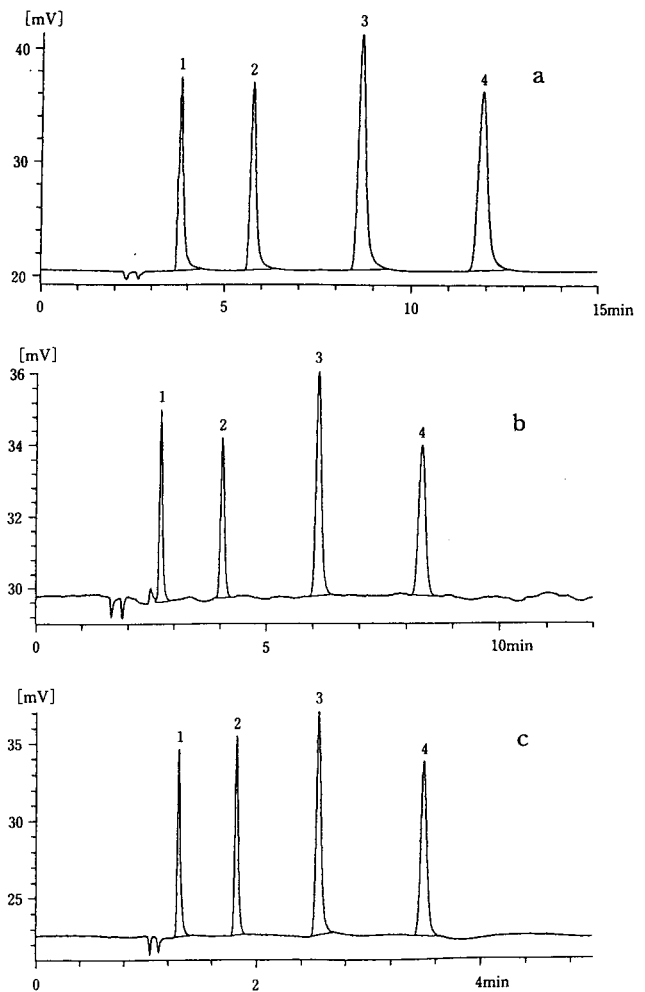


図-9. 抗リウマチ薬の分析

カラム；図-9 a；TSKgel ODS-80Ts(2 mmI.D.×15cm)
図-9 b；TSKgel ODS-80Ts(4.6mmI.D.×15cm)
図-9 c；TSKgel Super-ODS(4.6mmI.D.×10cm)

溶離液；水/メタノール/氷酢酸=54/45/1

流速；TSKgel ODS-80Ts(2mmI.D.)；0.15ml/min
TSKgel ODS-80Ts(4.6mmI.D.)；1.0ml/min
TSKgel Super-ODS；1.0ml/min

温度；40℃

検出；UV(283nm)

試料；1.ゲンチシン酸 2.アスピリン 3.サリチル酸
4. O-トリル酸(内部標準)
(各10 μ g/ml、2 μ l)