

[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 ～移動相～

赤松 成基* 藤田 裕代

Adjustment of Chromatographic Conditions for the Official Methods of Japanese Pharmacopoeia: Factors of Mobile Phase

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 Japanese Pharmacopoeia (JP) is an official document that defines the specifications, criteria, and standard test methods necessary to properly assure the quality of medicines in Japan. The adjustment of chromatographic conditions in the official methods of JP using dissolution test of silodosin tablets, losartan potassium and hydrochlorothiazide tablets, and pitavastatin calcium tablets as the model was discussed. The gradual variation in mobile phase was applied to evaluate parameters for the high-performance liquid chromatography (HPLC) method. The effects of mobile phase such as composition, flow rate, pH of aqueous solution, and concentration of phosphate on the retention time and the number of theoretical plates were examined. The results indicate that the pressure in HPLC column is also an important factor for adjustment.

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⁾。2022年12月に公布された第十八改正日本薬局方第一追補（以下、日局18-1）では、一般試験法の項において「2.00 クロマトグラフィー総論」が新設され、試験条件変更の際に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（最適化）することができる範囲が具体的に示された²⁾。

我々は、既報にて液体クロマトグラフィー（イソクラティック溶離）のクロマトグラフィー条件のうち、主に「カラムパラメーターと流量」及び「注入量」の調整における影響について考察した³⁾。一方、液体クロマトグラフィーにおける移動相の役割は固定相とともに分離機構において重要であり、移動相には緩衝液等の水系溶媒、有機溶媒あるいはその混合液が主に用いられている。移動相の緩衝液組成、有機溶媒比率及び流量等は分離や保持時間に大きく影響を及ぼすことが知られている⁴⁻⁷⁾。本研究では、イソクラティック溶離モデルとして3種類の試験法を用いて、新たに「移動相」の調整を日局18-1に沿って行い、得られた知見を報告する。

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

Table 1 Chromatographic conditions of each official method for dissolution

	Silodosin	Losartan potassium/ Hydrochlorothiazide	Pitavastatin calcium
Column	InertSustain C18 (GL Science), 4.6 mm i.d. ×150 mm, 5 μm	Unison UK-C8 (Imtakt), 3.0 mm i.d. ×100 mm, 3 μm	L-column3 C18 (CERI), 4.6 mm i.d. ×150 mm, 3 μm
Mobile phase	25 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 3.4) - ACN (73:27)	10 mM KH ₂ PO ₄ (pH 2.5) - ACN (60:40)	5mM NaCl in 10 mM AcOH - MeOH (35:65)
Column temperature	40°C	35°C	40°C
Flow rate	1.2 mL/min	0.5 mL/min	1.0 mL/min
Injection volumn	100 μL	3 μL	50 μL
Detection	PDA (270 nm)	PDA (230 nm)	PDA (245 nm)

II 材料と方法

1. 試薬及び標準品

シロドシン標準品、ヒドロクロロチアジド標準品及びピタバスタチンメチルベンジルアミン標準品は、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。ロサルタンカリウムは東京化成工業製の試薬を用いた。アセトニトリルは富士フィルム和光純薬製の LC/MS 用、メタノールは関東化学製の LC/MS 用を用いた。リン酸二水素ナトリウム及びその他の試薬は富士フィ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. 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。また pH メーターは、メトラートレド製 Seven2Go を用いた。試験条件は日局に規定のあるシロドシン錠溶出性、ロサルタンカリウム・ヒドロクロロチアジド錠溶出性及びピタバスタチンカルシウム溶出性の 3 製剤における各条件に従った。なおロサルタンカリウム・ヒドロクロロチアジド錠溶出性の条件はカラムの大きさ及び注入量のみを日局から変更して実施した。各種製剤の調整前の試験条件を Table 1 に示した。すべての試験は連続 6 回測定し、ピーク面積の相対標準偏差が日局の規定以下であることを確認した後、得られた測定値は平均値を用いて評価した。

また、カラム性能 (カラム効率) を示す理論段数 (N)、ピーク形状を示すシンメトリー係数 (A_s) 及び二成分のピーク間の分離度 (R_s) は、日局 18-1 に準じて以下の式で求めた²⁾。

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

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

$$R_s = 1.18 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (w_{h1} + w_{h2})$$

$t_R(t_{R1}, t_{R2})$: ピークの保持時間, ただし $t_{R2} > t_{R1}$

$w_h(w_{h1}, w_{h2})$: ピーク高さの midpoint 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

III 結果及び考察

1. 移動相の組成

日局 18-1 では、マイナーな溶媒成分の量は、相対的に ±30% まで調整でき、絶対的な 10% 以上の変更は認められていないとされている²⁾。したがって日局のシロドシン錠溶出性に規定の試験条件では、有機溶媒比率が 27% であることから、日局 18-1 で調整可能な 19% から 35% までの範囲で段階的に増減させて測定した。Table 2 に規定条件の 27% を含む、各有機溶媒比率によって得られたデータを示した。有機溶媒比率が増加すると、保持時

Table 2 Summary of parameters depending on the difference in organic solvent ratio (Silodosin)

No.	Organic solvent ratio %	Retention time (RT) /min	Area	N	A_s
1	19	>30	-	-	-
2	23	11.54	67269	9136	1.03
3	27	6.13	73276	8182	0.99
4	31	3.80	77463	7546	1.11
5	35	2.69	79853	7070	1.13

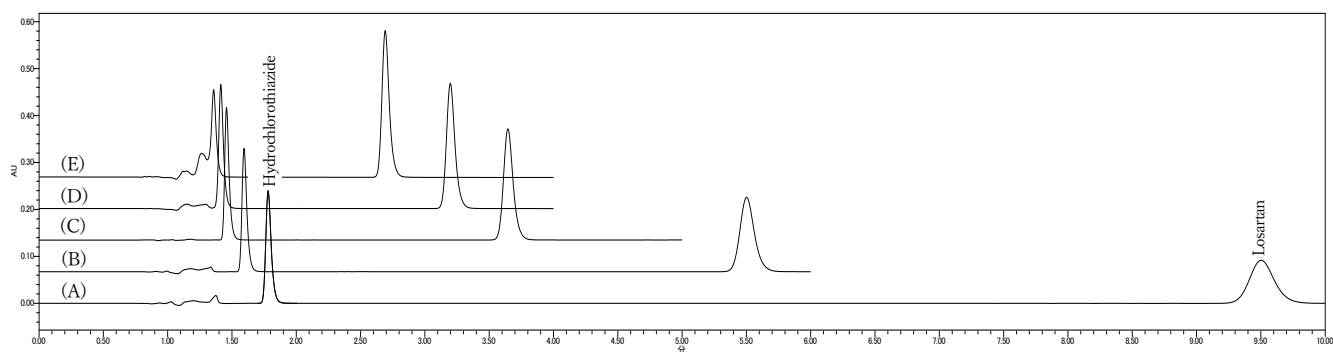


Fig.1 Representative chromatograms of losartan potassium and hydrochlorothiazide with different organic solvent ratio
(A) 30%; (B) 35%; (C) 40%; (D) 42%; (E) 45%.

間が減少するとともに、理論段数も低下したが、ピーク面積は増加した。シンメトリー係数は一定の傾向を示さなかった。一方、有機溶媒比率を調整可能な下限値である 19%とすると、30 min 以内にピークが検出できなかった。これは、対象物質が分析カラム内に強く保持されたままとなったことが原因と考えられ、調整範囲内の変更であっても適用できない事例があることがわかった。

次に、複数の有効成分が配合されている製剤において有機溶媒比率の分離度に対する影響を評価した。日局収載のロスアルタンカリウム・ヒドロクロロチアジド錠溶出性を用いて 2 成分の分離度を求めた。規定条件では有機溶媒比率が 40%であるため、日局で定める最大の±10%の範囲内で増減し、ピーク形状も含めて考察することを試みた。しかし、有機溶媒比率が 45%において、1 本目のヒドロクロロチアジドのピークが溶媒ピークと重なり、定量が困難になったことから、それ以上の高比率は実施しなかった。有機溶媒比率 30%から 45%でのクロマトグラムを Fig.1 に示した。既定の有機溶媒比率 40%では、ヒドロクロロチアジド及びロスアルタンカリウムの保持時間はそれぞれ 1.5 min, 3.6 min であり、分離度は 22.3 と定量試験において十分な値であった (Fig.1(C))。有機溶媒比率を減少させると、保持時間が増加し、2 本目であるロスアルタンカリウムのピーク形状が徐々にブロードとなったが、分離度は増加した。有機溶媒比率 30%では分離度 36.3 となった (Fig.1(A))。一方で、有機溶媒比率を 40%から増加させると、反対に保持時間及び分離度は減少した。一般的に、保持時間は分析カラム温度を高温に設定することによっても、同様に減少することが知られているが、当該製剤の試験条件でカラム温度を段階的に増加させたところ、保持時間の減少とともに、分離度の増加が見られた。このことから、必ずしも保持時間と分離度の相関は一定ではなく、有機溶媒比率の調整と分析カラム温度の調整では、異なる結果となることが明らか

かになった。

最後に、日局のピタバスタチンカルシウム錠溶出性の条件においても調整した。日局では、移動相にメタノールを用いて有機溶媒比率が約 65%となるように混合し、ピタバスタチンの保持時間が約 5 min になるように流量を調整することとなっている²⁾。このため流量を増加させて保持時間の調整を試み、流量 1.0 mL/min では、保持時間は 8.2 min であったが、システム圧力が約 3500 psi となった (Fig.2)。しかし、これ以上の流量の増加は、使用したカラムの推奨最大圧力である 25 MPa (約 3700 psi) をシステム圧力が超えるため、保持時間の短縮は困難であることがわかった。他メーカーのカラムにおいても 20~25 MPa が推奨最大圧力となっているものも多く、同様の問題が起こり得ることが推察された。一般にカラムにかかる圧力は、有機溶媒の種類や混合の比率によって異なり、メタノールと水の混合においては約 50%で圧力が最も高くなる³⁾。そこで、マイナーな溶媒成分である水系溶媒を 35%から規定最大の 10%減少させた 25% (有機溶媒比率 75%) とすることで、システム圧力を低下させて保持時間が約 5 min になるよう調整可能か検討した。その結果、流量が 0.8 mL/min で保持時間が 5.1 min と調整が可能で、システム圧力は約 2300 psi であった。一方、水系溶媒を 45% (有機溶媒比率 55%) とした際には、規定条件よりもさらに圧力が上昇し、流

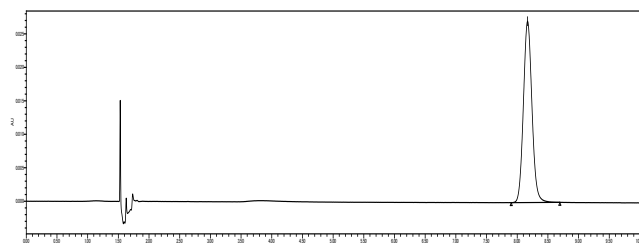


Fig.2 Representative chromatogram of pitavastatin calcium
Chromatographic conditions follow in Table 1.

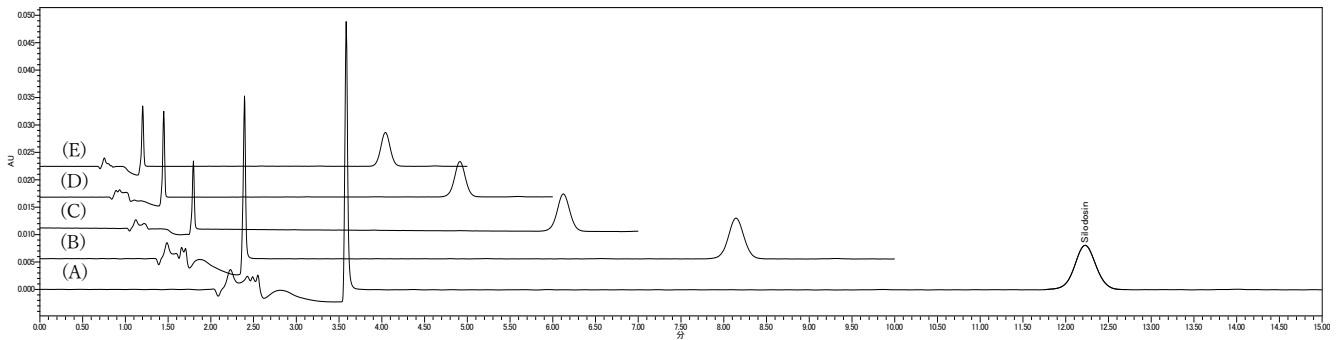


Fig.3 Representative chromatograms of silodosin with different flow rate

(A) 0.6 mL/min; (B) 0.9 mL/min; (C) 1.2 mL/min; (D) 1.5 mL/min; (E) 1.8 mL/min.

量 0.9 mL/min で、システム圧力が約 3300 psi となったが、20 min 以内にピークが出現しなかった。続いて、日局に記載はないが、メタノールをアセトニトリルへ変更した場合に、保持時間が約 5 min に調整可能か確認した。アセトニトリルは、メタノールと比べて圧力が低いため、有機溶媒比率は規定と同じ 65%として流量を調整した。流量 1.0 mL/min では、システム圧力が約 1640 psi とメタノールと比べて大幅に減少し、保持時間は 2.9 min と減少した。保持時間を約 5 min になるように流量を減少させたところ、0.6 mL/min で、システム圧力が約 880 psi、保持時間が 5.3 min となり、理論段数等のパラメーターも規定を十分に満たした。

2. 移動相の流量

規定の試験条件を用いて流量のみを調整し、その他のパラメーターは固定して評価を行った。流量は、保持時間に与える影響が大きく、連続分析においてトータルの移動相消費量や分析時間にも直結するが、ピーク形状や分離への影響も無視できない。日局 18-1 によると、カラムの大きさに変更がない場合には、流量の調整は±50%まで認められており²⁾、シロドシン錠溶出性の条件では 1.2 mL/min とした流量を、0.6 mL/min から 1.8 mL/min までの範囲で調整した。得られたクロマトグラムを Fig.3 に示した。流量の増加に伴い、保持時間は減少し、ピーク面積及び理論段数も減少した。流量最小値の 0.6 mL/min では、保持時間 12.2 min、ピーク面積 140459、理論段数 11688 であった。一方、最大値の 1.8 mL/min では、保持時間 4.1 min、ピーク面積 48082、理論段数 6319 となったが、特に定量において問題となることはなかった。なお、流量の調整によって、シンメトリー係数は特に変化はなかった。また、システム圧力は、流量が増加すると上昇したが、1.8 mL/min においてもカラムの推奨圧力を下回っており、この流量の範囲内では変更が可能と思われた。

続いて、ロスアルタンカリウム・ヒドロクロロチアジド

錠溶出性の条件でも、同様に流量のみを調整し、各種パラメーターを確認した。流量の増加に伴い、保持時間、ピーク面積及び理論段数が減少する傾向は、シロドシン錠溶出性と同じであった。また、分離度については、流量の増加に伴い、減少することがわかった。

3. 移動相の水系組成の pH

日局のロスアルタンカリウム・ヒドロクロロチアジド錠溶出性の条件で評価した。規定では、「リン酸二水素カリウム 1.36 g を水 900 mL に溶かし、リン酸を加えて pH 2.5 に調整した後、水を加えて 1000 mL とする。」とある²⁾。pH 調整後に、水を加えるため、最終的な pH は 0.02 上昇したが、今回の検討ではこのわずかな変動は無視して実施した。つまり最終の水溶液にリン酸を添加し、pH を 2.5±0.4 の範囲で調整した。Table 3 に得られたパラメーターの一部を示した。

pH の増加に伴い、1 本目のヒドロクロロチアジドは保持時間の変化が見られなかったが、2 本目のロスアルタンカリウムの保持時間は増加し、分離度も増加した。

Table 3 Summary of parameters depending on the difference in pH of aqueous solution (Losartan potassium and hydrochlorothiazide)

No	pH	RT ^{a)} /min		Rs ^{b)}
1	2.1	1.46	3.15	18.8
2	2.3	1.46	3.44	20.8
3	2.4	1.46	3.55	21.6
4	2.5	1.46	3.65	22.1
5	2.6	1.46	3.74	22.6
6	2.7	1.46	3.80	23.3
7	2.9	1.46	3.90	24.4

a) Retention time. The former peak is hydrochlorothiazide; the latter peak is losartan potassium.

b) Resolution between hydrochlorothiazide and losartan potassium.

Table 4 Summary of parameters depending on the difference in concentration of phosphate (Losartan potassium and hydrochlorothiazide)

No.	Concentration /mM	RT ^{a)} /min	Rs ^{b)}
1	0	1.45 3.31	19.9
2	8	1.46 3.59	22.2
3	9	1.46 3.58	22.1
4	10	1.46 3.62	22.4
5	11	1.46 3.65	22.6
6	12	1.46 3.66	22.6
7	20	1.46 3.69	22.8

a) Retention time. The former peak is hydrochlorothiazide; the latter peak is losartan potassium.

b) Resolution between hydrochlorothiazide and losartan potassium.

ピーク面積，理論段数及びシンメトリー係数は両者に特に大きな変化はみられなかった。医療用医薬品最新品質情報集（通称：ブルーブック）によれば，ロスアルタンカリウムの pKa は 4.3，ヒドロクロロチアジドの pKa は 7.9 及び 9.2 であることから⁹⁾，今回の酸性域での pH 調整においてロスアルタンカリウムのピークへの影響が顕著となった。また，日局 18-1 では pH±0.2 までの調整が認められているが，その範囲を超えた pH 2.1 及び 2.9 においても，2 本のピーク定量に関して問題はなかった。

4. 移動相の緩衝液組成の塩濃度

移動相中の塩が物質の分離に与える影響については，一般に solvophobic 理論が用いられ，塩の添加により，溶質分子間での静電的反発が減少し，移動相の表面張力が増加することから，塩濃度の増加に従って，保持時間が増加することが知られている¹⁰⁾。

前項と同様に，日局のロスアルタンカリウム・ヒドロクロロチアジド錠溶出性の条件で評価した。つまり，水に溶解するリン酸二水素カリウム量を調整し，得られたクロマトグラムから得られたパラメーターを比較した (Table 4)。日局 18-1 では，塩濃度の変更は±10%以内とされているが²⁾，この範囲内である 9 mM から 11 mM において塩濃度の変化が保持時間，ピーク面積，理論段数及び分離度に与える影響はほとんどなかった。さらに，範囲を超えて極端に変化させた例として，塩濃度を-20%としたものや2倍にしたものを測定したところ，塩濃度の上昇に伴い，2 本目のピークの保持時間が延長する傾向は確認できたが，影響は限定的であることがわかった。また，塩を完全に除いたものでは保持時間の減少が見られたが，この条件でも両ピークの定量に影響はなかった。なお，高濃度の塩において有機溶媒との混合時に塩が析出する可能性があるが，今回の実験では確認されなかった。

IV 結論

日局 18-1 に従って，3 種類の日局試験法を用いてクロマトグラフィー条件のうち移動相の各種パラメーターを調整し，その影響について考察した。

組成では，有機溶媒比率の増減により，保持時間だけでなく，分離度への影響も明らかとなった。二成分が配合されているロスアルタンカリウム・ヒドロクロロチアジド錠の試験法では，有機溶媒比率の減少によって保持時間の増加及び分離度の増加がみられ，分析カラム温度の増減による挙動とは異なるものであった。

ピタバスタチンカルシウム錠の試験法において，我々の使用した一般的な分析カラムでは有機溶媒比率の変更に伴うシステム圧力の低下が保持時間の調整に必須であり，分析カラムの耐圧も重要なファクターであることがわかった。さらに，有機溶媒の種類の変更も圧力低下に有効であった。

流量については，流量の増加による保持時間，理論段数及び分離度の減少が確認された。このほか水系組成の pH 及び緩衝液組成の塩濃度は規定の範囲内で調整したところ，保持時間及び理論段数等に変化が見られたが，定量において特に大きな影響は見られなかった。

本研究が他製剤の試験法においても移動相パラメーターの調整における有益な資料となるものと考えられる。

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) 赤松成基，藤田裕代：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～シルニジピン錠の溶出性～。兵庫県立健康科学研究所研究報告，6，22-26 (2024)
- 4) Mehta, D.K., Kumar, M.A., Sonali, K.: HPLC method development and validation: A Review. World J. Pharm. Med. Res., 10, 233-241 (2024)
- 5) Heering, A., Lahe, M., Vilbaste, M., Saame, J., Samin, J.P., Leito, I.: Improved pH measurement of mobile phases in reversed-phase liquid chromatography. Analyst, 149, 1481-1488 (2024)
- 6) Lippert, J. A., Johnson, T. M., Lloyd, J. B., Smith, J. P., Johnson, B. T., Furlow, J., Proctor, A., Marin, S. J.: Effects of elevated temperature and mobile

- phase composition on a novel C18 silica column. *J. Sep. Sci.*, **30**, 1141-1149 (2007)
- 7) 長江徳和：水 100%移動相を用いた高速液体クロマトグラフィー逆相固定相の保持挙動. *分析化学*, **59**, 193-205 (2010)
 - 8) Aburjai, T., Alzweiri, M., Al-Hiari, Y. M.: Temperature and pressure behaviours of methanol, acetonitrile/water mixtures on chromatographic systems. *Am. J. Anal. Chem.*, **2**, 934-937 (2011)
 - 9) 医療用医薬品最新品質情報集（ブルーブック）：
https://www.nihs.go.jp/drug/ecqaged/bluebook/r/o_Losartan-Hydrochlorothiazide_Tab_01.pdf
 - 10) 中村洋：液クロの巻，p. 43-44，筑波出版会，茨城（2003）

(令和 8 年 3 月 17 日受理)