

Technical Review

次世代のHPLC—超高速液体クロマトグラフィーシステム—を用いた 医薬品成分の高速分離

坊之下雅夫、宮路敏彦、岩谷敬仁、東館 栄、山口高歩、斎藤宗雄

Ultra High-Speed Separation of Tuberculosis Drugs using Extreme Liquid Chromatography System

Masao Bounoshita, Toshihiko Miyaji, Keijin Iwaya, Sakae Higashidate,
Takayuki Yamaguchi and Muneo Saito

JASCO Corporation, 2967-5 Ishikawa-cho, Hachioji-shi, Tokyo, 192-8537 Japan

Abstract

Ultra high-speed separation has become increasingly important in pharmacology, food science, agrochemistry and other areas. In general, conventional HPLC separation has been performed on columns packed with 5 μm particles. However, conventional HPLC requires a long analysis time and big amounts of solvents. In case of X-LC (extreme liquid chromatography), shorter columns typically 50–100 mm in length packed with ultra micro-particles, which particle size is less than 2 μm , are used. X-LC offers higher efficiency and sensitivity, and reduction of organic solvents without sacrificing separation efficiency. We compared efficiency of X-LC with conventional HPLC in separation of medicines listed in Pharmacopeia. In case of conventional HPLC with a 5 μm column (I.D. 4.6 mm x 150 mmL) for the separation of Isoniazid, Rifampin, Pyrazinamide, the analysis time was a little over 8 minutes, whereas, X-LC with a 2 μm column (I.D. 2.1 mm x 50 mmL) gave a very short analysis time of 1.3 min, which is 6 times faster than conventional HPLC.

Keywords : X-LC, Extreme liquid chromatography, Drugs, Pharmacopeia, High-Throughput

1. 緒言

高速液体クロマトグラフィーは、医薬品、農薬、食品、化成品、そして天然物などの広い分野に渡る多種多様な物質の分離分析法として、製品開発や品質管理で使用されている。そのため、数多くの分析試料の測定が必要となり、分析時間の短縮が可能な高効率分離が求められている。しかしながら、現在、一般的に利用されている 5 μm 粒子充填カラムで

は、カラムサイズのダウンサイジングや移動相流速を速くすることによる分離効率の低下などの要因から、高速かつ高分離測定を行うことが困難である。

2 μm 以下の微小粒子充填カラムを使用した超高速液体クロマトグラフィーは、高い線速度領域の移動相流量でも、高い分離効率を維持したまま、高感度、短時間測定が実現できる手法である。このような超高速液体クロマトグラフィー

〒192-8537 東京都八王子市石川町2967-5
日本分光株式会社 LC技術部 LC応用技術課
TEL : 042-646-4109 FAX : 042-660-7513
E-mail : masao.bounoshita@jasco.co.jp

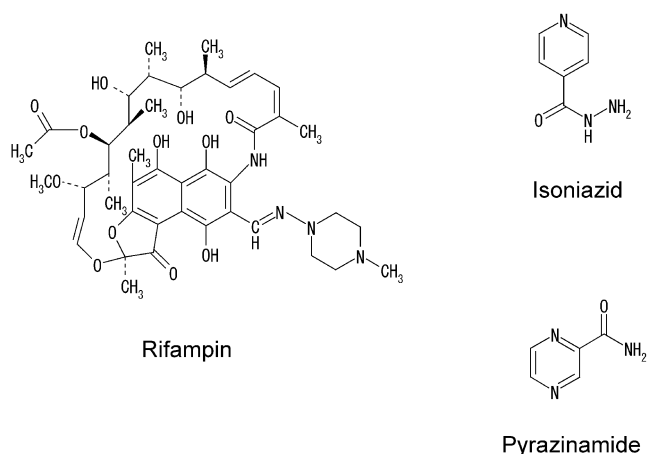


Figure 1. 結核治療薬 (Rifampin, Isoniazid, Pyrazinamide) の構造式

は、5 μm 粒子充填カラムと比較して、同じ分離度を示すクロマトグラムを約 1/5 ~ 1/10 程度の短時間で得ることができる。

このような超高速分離を実現するためには、非常にシャープなピークに対応できる設計がなされている超高速液体クロマトグラフが必要となる。今回の測定に使用した日本分光製超高速液体クロマトグラフ X-LC は、1) カラム外効果によるピークの広がりを抑えたシステム流路の設計、2) シャープなピークを適確に検出できる高速データ出力機能を備えた検出器 (UV 検出器: 100 Data points/sec) 3) 微小充填剤カラムを高い線流速で使用するための高耐圧設計 (送液ポンプ、高圧混合グラジエントミキサ、オートサンブラから、カラム入り口までの流路: 100 MPa 耐圧) に対応したシステムである。

本報では、この超高速液体クロマトグラフィーを用いて、米国薬局方 (USP) に掲載されている医薬品の結核治療薬 (3 成分混合: Rifampin, Isoniazid, Pyrazinamide, 化学構造式を Figure 1 に示す。) の混合標準液の高速分離を検討し、従来の HPLC と超高速液体クロマトグラフとの性能比較を USP 記載の測定条件に基づいて行ったので報告する。

2. 実験

実験に使用した超高速液体クロマトグラフは、X-LC 3085 PU 型移動相送液ポンプ (2 台)、X-LC 3080 DG 型デガッサ、X-LC 3080 MX 型高圧混合ミキサ (50 μL 容量を使用)、X-LC 3067 CO 型カラムオープン、X-LC 3070 UV 型紫外可視検出器、X-LC 3059 AS 型オートサンブラ、これらモジュールの制御とデータ処理を行う ChromNAV から構成される 2 ポンプ高圧グラジエントシステムを使用した。カラムは、粒子径 2 μm の逆相型シリカ ODS カラムの X-PressPak C 18 S (内径 2.1 x 長さ 50 mm) を使用した。

溶離液および、グラジエント法は、米国薬局方 (USP 27 (2004), Page 1654) に掲載されている条件を参考に、短時

Table 1. 従来の HPLC の測定条件

Flow rate :	1.5 mL/min
Column :	CrestPak C 18 S (4.6 mm ID x 150 mm L, 5 μm)
Column temp. :	25
Mobile phase :	A : 0.01 M Na_2HPO_4 / CH_3CN (96/4) (pH 6.8) B : 0.01 M Na_2HPO_4 / CH_3CN (45/55) (pH 6.8)
Wavelength :	238 nm
Sample :	0.16 mg/L Rifampin, 0.08 mg/L Isoniazid, 0.43 mg/L Pyrazinamide (in Na_2HPO_4 / CH_3OH (96/4))

Gradient Conditions

Time (min)	Solution A (%)	Solution B (%)	Elution
0	100	0	equilibration
0-5	100	0	isocratic
5-6	100 $\rightarrow$ 0	0 $\rightarrow$ 100	Linear gradient
6-15	0	100	isocratic

Table 2. X-LC の測定条件

Flow rate :	0.8 mL/min
Column :	X-PressPak C 18 S (2.1 mm ID x 50 mm L, 2 μm)
Column temp. :	25
Mobile phase :	A : 0.01 M Na_2HPO_4 / CH_3CN (96/4) (pH 6.8) B : 0.01 M Na_2HPO_4 / CH_3CN (45/55) (pH 6.8)
Wavelength :	238 nm
Sample :	0.16 mg/L Rifampin, 0.08 mg/L Isoniazid, 0.43 mg/L Pyrazinamide (in Na_2HPO_4 / CH_3OH (96/4))

Gradient Conditions

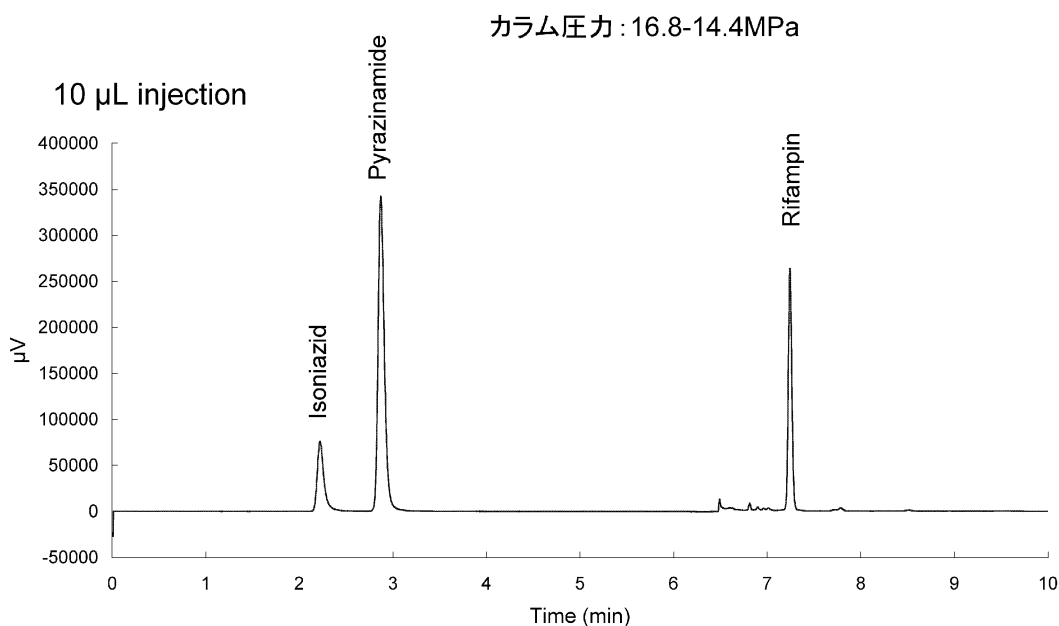
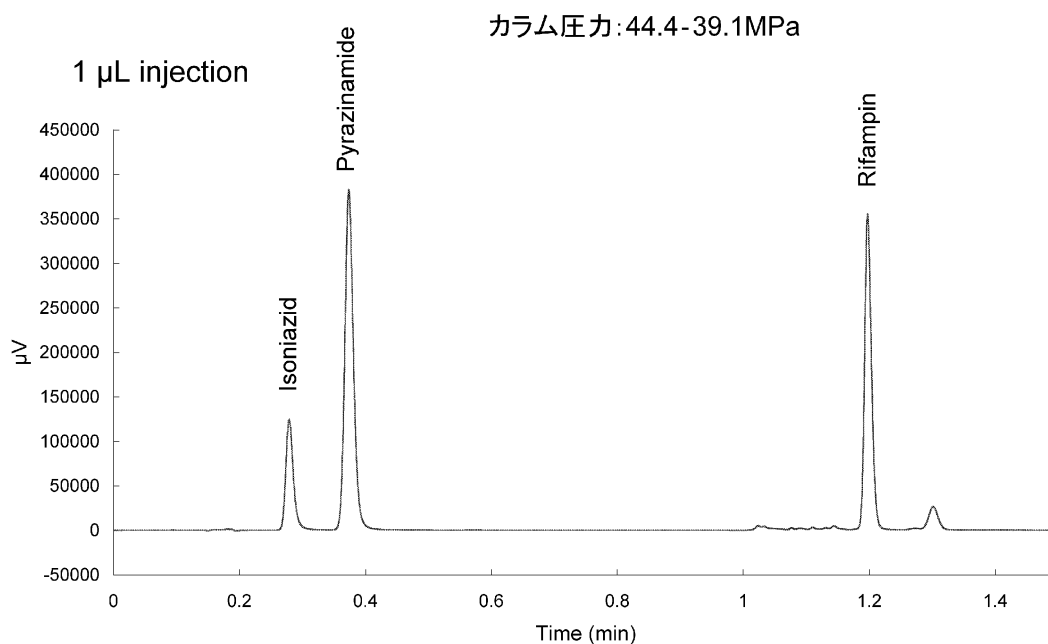
Time (min)	Solution A (%)	Solution B (%)	Elution
0	100	0	equilibration
0-0.7	100	0	isocratic
0.7-0.9	100 $\rightarrow$ 0	0 $\rightarrow$ 100	Linear gradient
0.9-1.5	0	100	isocratic

間化し測定を行った。従来の HPLC で測定した条件を Table 1、超高速液体クロマトグラフィーで採用した条件を Table 2 に示す。溶離液は、リン酸緩衝液 (pH 6.8 に調製) とアセトニトリルの 96/4 の混合溶媒を A 溶媒、45/55 の混合溶液を B 溶媒として使用した。A 溶媒を用いて Isoniazid と Pyrazinamide を溶出させた後、B 溶媒に切換えて Rifampin を溶出させている条件である。

超高速液体クロマトグラフィーのグラジエント溶出条件は、2 μm カラムの約 10 分の 1 に短縮した時間に設定した。測定に使用した 3 種類の標準試料は、SIGMA-ALDRICH 社 (USA) から購入した。

3. 結果と考察

従来の HPLC を用い、10 μL の混合標準液 (1 ; Isoniazid, 2 ; Pyrazinamide, 3 ; Rifampin) を注入して得られたクロマトグラムを Figure 2 に示す。分離カラムは、粒径 5 μm の充填剤を充填した CrestPak C 18 S (内径 4.6 mm、長さ 150 mm)

Figure 2. 従来のHPLC (5 μ m充填剤カラム) によるクロマトグラムFigure 3. X-LC (2 μ m充填剤カラム) によるクロマトグラム

を使用し、溶離液の流量は1.5 mL/minとした。分析時間は約8分で終了した。測定時のカラム圧力はグラジエント溶出法であるため14.4～16.8 MPaを示した。

X-LCシステムを用い、1 μ Lの混合標準液を注入して得られたクロマトグラムをFigure 3に示す。溶離液の流量は、0.8 mL/minに設定し測定した。この流量は、5 μ mの充填剤カラム使用時の約半分である。カラム圧力は、39.1～44.4 MPaと高い圧力を示し、この圧力では、通常のHPLCシステムは利用することが難しい。分析時間は約1.3分であり、従

来のHPLCによる分析時間に比べて約1/6の短時間測定ができた。さらに、注入量が10分の1でもほぼ同じ高さのピークを得ることができ、約10倍の感度の向上となった。Table 3に分析時間および1分析当たりの溶媒消費量を示した。溶媒消費量は、5 μ m充填剤カラムの約5.3%となり、約20分の1に削減することができた。超高速液体クロマトグラフィーにより得られたピーク面積と保持時間の再現性を比較した結果をTable 4に示した。保持時間の再現性は、相対標準偏差値 (RSD%) で、0.25～0.29%と良好な再現性を得ることが

Table 3. X-LC (2 μ m)とHPLC (5 μ m)の比較

Pyrazinamide (Peak #2)	HPLC(5 μ m)	X-LC(2 μ m)	X-LC/HPLC
分析時間(min)*	8	1.3	0.163
溶媒消費量 (mL/1 分析)**	30	1.6	0.053
ピーク高さ(mAU)	337	378	1.122
注入量(μ L)	10	1	0.1

* 分析時間については、初期条件に戻す時間を除く。

** 溶媒消費量は、1 分析サイクル(再生時間含む)で計算。

Table 4. ピーク面積と保持時間の再現性

ピーク面積の再現性 (n = 10)

Peak	Area Average	Standard deviation(min)	%RSD
Isoniazid	107712	579.80	0.54
Pyrazinamide	373309	1075.32	0.29
Rifampin	271506	3942.24	1.45

保持時間の再現性 (n = 10)

Peak	Rt Average(min)	Standard deviation(min)	%RSD
Isoniazid	0.279	0.0007589	0.27
Pyrazinamide	0.373	0.0009395	0.25
Rifampin	1.199	0.0035274	0.29

Table 5. X-LCによる測定結果とUSPの規定ピークパラメータ値との比較

Rifampin (Peak #3)	Resolution, R (Between isoniazid and pyrazinamide)	NTP	Tailing factor	Replicate injections (RSD%)
X-LC	4.19	65014	1.253	<1.45
USP規定値	>4	>50000	<2	<2.0

できた。

USPに定められている規定値(分離度、理論段数、テーリングファクタ、注入再現性)と比較した値をTable 5に示す。分離度は、 $R > 4$ (Not less than 4)に対して、IsoniazidとPyrazinamide間で $R = 4.19$ 、PyrazinamideとRifampin間で $R = 37.2$ を得られ、注入再現性は、2.0%未満(RSD%)に対して、0.29~1.45%と規定値内であることが確認できた。

4. 結論

以上のように、超高速液体クロマトグラフX-LCを用いることにより、従来のHPLCに比べて大幅なスピードアップが可能であり、検出限界の向上と同時に溶媒の消費量の低減も実現することができた。さらに、本報告で示したようにX-LCは従来のHPLCで設定した測定条件とほとんど同じ条件を踏襲することができるため、すでに測定条件を確立した試料の分析に対して、比較的容易に適用することができる。

以上の結果から、本システムは、医薬品をはじめとする各種成分の高速分離分析に有効に利用することが期待できる。

5. おわりに

高速液体クロマトグラフィーの測定時間の短縮は、微小粒子充填カラムを使用した短いカラムで測定する方法が、20年以上も前から検討されていた。この間、充填剤は、10 μ mから5 μ m、3 μ mへと微小な粒子径の利用が可能になり、短いカラムによる分析時間の高速化が検討され、徐々に実現されてきていた。しかしながら、通常のHPLCシステムでは、数秒の幅で溶出する非常にシャープなピークに対応した検出器、ピークの広がりに対する適切な流路設計、さらに、微小充填剤を使用することによる高いカラム圧力下での安定な使用が困難であった。そのため、2 μ m以下の充填剤カラムを使用できるシステムとして作動させることは難しかった。

現在、XLCシステムのように、非常にシャープなピークへの対応、高い耐圧性能を有する超高速液体クロマトグラフが登場し、さらに、市販されている2 μ m前後の各種充填剤カラムも増え、容易に入手することができるようになってきた。すなわち、身近に超高速液体クロマトグラフを利用できる状況が整ってきたといえる。

本Technical Reviewの実験に使用した超高速液体クロマトグラフX-LCは、蛍光検出器をラインアップに加え、蛍光物質やプレカラム蛍光誘導体化物質など、多くの測定対象試料に通用することができるシステムとなっている。また、3ポンプ高圧混合グラジエントシステムや1ポンプ定組成送液システムなど分析目的に適したシステムを構築することができ、もちろん3 μ m充填剤のカラムや従来から使用している5 μ m充填剤のカラムも利用することができる。今後も多くのアプリケーションの紹介を行い、次世代のHPLCシステムとして、利用していただけるよう発展させていきたい。

References

- [1] U. S. Pharmacopeia 27 (2004), pp. 1653-1654