

LC TALK

Vol. 118
January 2022



Talk 食品研究におけるSFCの可能性 …… P. 2

TEC UHPLCシステムの最適化とNexflowテクノロジー …… P. 4

Products AQbDアプローチに基づく分析法開発を効率化する
LabSolutions MD …… P. 7

Applications USPに準拠した解熱鎮痛剤のオンライン溶出試験
—内標準物質の自動添加— …… P. 10

Talk

食品研究におけるSFCの可能性



味の素株式会社 バイオ・ファイン研究所
岡本 千聖

食品のおいしさに寄与する成分は多岐にわたっており、これまでに、アミノ酸や核酸、糖、脂質、無機塩類など既知の呈味成分の分析がなされてきましたが、既存の方法ではおいしさを解明し切れておらず、まだ多くの謎が残されています。この謎を解明するため、LCを用いた水溶性成分分析や、GCを用いた香り成分分析が盛んに進められています。しかしながら、いずれの方法でも捉え切れていない成分群があることが分かっており、網羅性を上げるための新しい分析技術が求められています。

そこで我々が注目したのが、LC、GCとは異なる分離特性を有する超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）です。上記の目的を達成するために、固体から有用成分を抽出する超臨界流体抽出（SFE）、カラム分離を行うSFC、質量分析計、分取の4つの装置を組み合わせた構成で研究を行っています（図1）。



図1 弊社保有のSFC装置構成

SFCは、中極性～低極性成分の分離を得意としています。これらの成分分析で用いられているGCと比較すると、熱分解するような成分に対しては優位性を示します。また、脂肪酸などは誘導体化が不要であることや、分析と同時に分取ができる点も非常に有用です。さらに、技術進歩によりMSと直接接続できるようになり、構造情報も容易に得られるようになりました。SFEは、香り成分の抽出やカフェインの除去など工業用途で活用されていますが、現行装置は、抽出溶媒、温度などのパラメーターを再現性よく調節できるようになり、研究用途で重要となる微細な抽出条件の設定とオンライン濃縮が可能になりました。

これら2つの技術を、目的に応じて組み合わせることで、従来ではできなかった分析が可能になります。今回はその一例として、食品中の香り成分の分析事例（オンライン抽出を活用した一斉分析）と、疎水性成分の分析事例（簡易前処理と精密分離・分取）を紹介したいと思います。

1. 香り成分の一斉分析

香り成分は、GCを使ったSPME法、ヘッドスペース法などでサンプルを注入し、MSやにおい嗅ぎ法で検出することが一般的です。これらの分析法は、すぐさまにおいとして感じられる揮発しやすい成分が主なターゲットになります。人は、揮発した成分を外部から直接捉えるオルソネーザル経路と、口腔内で揮発した成分を内部から捉えるレトロネーザル経路の2つの経路で香りを感じます。既存の分析法は、オルソネーザル経路で感じられる揮発性の高い成分の分析には適していますが、レトロネーザル経路で感じられるような口腔内でゆっくりと揮発する成分や、分析中に熱分解してしまうような成分は苦手であり、網羅性は十分ではないと考えています。SFEであれば、揮発性が低い成分や、安定性の低い成分でも抽出できるため、この課題が解決できると考えました。

まず、性質の異なる代表的な香り成分を選定し、SFC-MSでの分析を試みました。順相条件では、ヘキサナールやイソ吉草酸アルデヒドなどアルデヒド基を持つ化合物でテーリングが認められたことから、逆相カラムを選択しました。逆相の固定相に極性官能基が付いたUC-RPのピーク形状が最も良く、分離も良好でした（図2）。

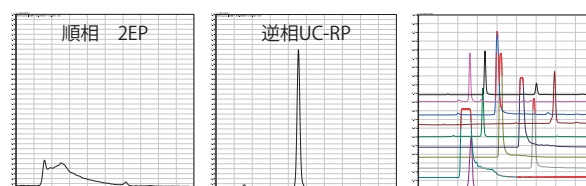


図2 ヘキサナールと10種香り成分のクロマトグラム

GC法と比較した場合、高揮発成分の感度は及ばないものの保持が弱く、低沸点のチオール化合物や、熱分解しやすいフラネオールのような化合物でもSFCでは捉えることができ、より網羅的に成分を捉えられる結果となりました。

分析方法が確立したので、次に前処理方法としてのSFEの有用性を検討しました。SFE法とSPME法で、異なる成分が捉えられるか検討したところ、SFEでしか検出できない成分群が存在することが分かりました(表1)。これらの成分が食品に寄与する成分かは、今後確認する予定ですが、香氣成分を分取する新たな手法になる可能性を見出しました。

表1 SFE、SPME法の比較結果

	SFE	SPME
ケトン類	○	○
アミン	○	○
アルデヒド	○	○
グリコール	○	○
フラン	○	○
脂肪酸	○	○
フェノール	○	○
アルコール類	○	×
炭化水素	○	×
カルボン酸	○	×
エステル	○	×

2. 疎水性成分の分析事例

疎水性成分を分析する際には、ヘキサン等の有機溶媒を用いて液液抽出を行い、その後、GCやLCで分析を行うことが一般的です。しかし、フードミックスの様な一斉分析の場合は、精製度が低いとデータ解析が困難になり、有用成分を見落とす可能性が高くなります。そこで、我々は分離能が高く、分取・精製が容易なSFCの特徴を生かし、簡易前処理・精密分離・分取装置として活用しています。

簡易前処理としては、SFCの分離特性を活かし、一定時間ごとに分画し、疎水度に応じて粗分けした後、分取液をGCで分析します。粗精製をすることで、サンプル調製の手間はかかりますが、差分析が容易になり、キー成分探索の成功に繋がります。

次に、探索により見つけた成分を、さらに精密分離・分取する技術を紹介します。精密分取は未知成分の構造解析等で必須の技術となります。今回は、肉の食感や呈味に影響を与える脂質類(グリセリド)の事例を紹介します。

グリセリドには、モノグリセリド(MG)、ジグリセリド(DG)、トリグリセリド(TG)がありますが、逆相HPLCの分離度ではそれぞれが持つ異性体を分離し切れません。そのため、分離能の高いGCで測定するのが一般的ですが、MGやDGは誘導体化が必要であること、TGは高沸点のためにカラムやMS検出に制限があるなどの弱点があります。そこで、前処理なく手軽に分析ができ、疎水性化合物の分離能が高く、分取もしやすいSFCを活用することを考えました。そこで、LCよりも分離能が高く、分取が容易なSFCを活用することを考えました。今回は、モデル化合物としてDGを選択し、構造異性体を分離、精密分取することを目指しました。種々の条件を検討し、DGの異性体分離は、モディファイヤとしてメタノール、カラムはUC-Diolを使うことで達成しました(図3)。

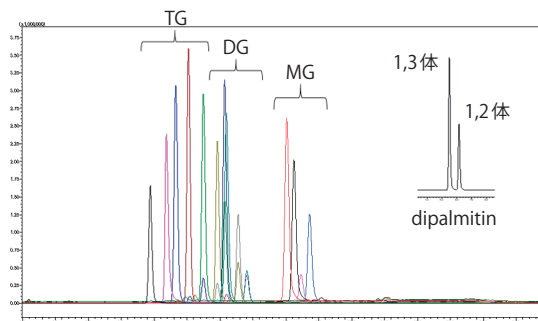


図3 グリセリド類のクロマトグラム

次に、精密分取の条件を検討しました。SFCは、カラム分離後に移動相の超臨界CO₂が気化してしまうため、その直前にグリセリドが溶解する溶媒に溶かし込む必要があります。分析に使ったメタノールでは溶解性が低く、分取時に、配管・シールへの吸着が起こってしまい、DGの異性体の精密分取が困難でした。これに対し、アセトン・ヘキサン・クロロホルムをシース液として使うことで、配管への吸着を防ぐことができ、DGを精密に分離・分取することに成功しました。分析・分取条件の詳細は、今後、テクニカルレポートに掲載予定となっておりますので、乞うご期待ください。

これまでの検討の中で、SFC、SFEの技術は、疎水性成分、香氣成分の一斉分析や、簡易・精密分取ができる点に特徴があることが分かってきました。今後も、これらの特徴を活かし、食品の呈味研究に活用していきたいと思っております。

執筆者紹介

日本女子大学理学部物質生物科学科卒業後、2011年に味の素株式会社に入社。臨床検体のアミノ酸分析や代謝物の分析業務に7年ほど従事した後、SFCやLCを使った食品中のおいしさ解明研究に従事し、現在に至る。

専門分野

クロマトグラフィー、メタボロミクス

将来の夢

ヨーロッパ巡り

趣味

映画、ボルダリング、マラソン

TEC

UHPLCシステムの最適化とNexflowテクノロジー

LCビジネスユニット
尾坂 裕輔

従来のHPLCシステムと比べ、超高速LCシステム（UHPLCシステム）は、分析時間を大幅に短縮しつつ分離も同等以上を実現します。UHPLCシステムというと、まず思い付くのはシステム耐圧がHPLCに比べて高いという点ですが、UHPLCシステムに求められる要件はそれだけではありません。高速化と高分離を実現するためには、システムの最適化が重要です。ここでは、UHPLCシステムの基本的な考え方やシステム拡散について解説するとともに、Nexeraシリーズでより一層シャープなピークを得ることができるNexflowテクノロジーについて解説します。

1. 分離を損なわずに高速化を実現するには？

UHPLC分析の基本的な考え方は、先述の通り“高速化しつつも分離は同等以上”であることです。これを実現するにはより高効率なカラム、つまりHPLCカラムよりも短く、移動相の線速度（流量）を上げて理論段数が低下しないカラムが必要です。充填剤粒子径を小さくすることで従来よりも高効率なカラムとなりますが、一方でカラムにかかる負荷圧は充填剤粒子径の二乗に反比例します。例えば、以下のようにHPLCカラムからUHPLCカラムへ変更する場合を考えてみます。

150 mm x 4.6 mm I.D., 5.0 μm
→ 75 mm x 3.0 mm I.D., 2.2 μm

充填剤粒子径を5.0 μmから2.2 μmにすることで、約5倍の圧力がかかるようになります。カラム効率（理論段数）は充填剤粒子径に反比例して高くなるため、同等の分離を維持しようとした場合はカラム長さを半分程度にすることができ、長さ方向では負荷圧が1/2になります。また、流量を維持したまま内径3.0 mmにすると圧力は約2倍程度かかります。これらの結果、約5倍の圧力がかかることとなります。UHPLCシステムで高耐圧が必要な理由はこのためです。もちろん上記は充填剤によっても異なるため目安ですが、ここで注目すべきポイントはカラム内径が小さくなっている点です。

2. UHPLCカラムの内径はなぜ小さいのか？

HPLC用カラムに比べてUHPLCカラムの内径が小さい場合が多い一つの理由は、線速度を上げて高速分析を行うためです。線速度は移動相が時間あたりに進む距離を示しており、簡易的に考えると以下の式から求められます。

$$\text{線速度 (cm/min)} = \text{移動相流量 (mL/min)} / \text{有効断面積}^* (\text{cm}^2)$$

*ここでは、充填剤を加味して約70%とします。

先の例で考えると1.0 mL/minの時、内径4.6 mmでは約8.6 cm/min、3.0 mmでは約20 cm/minとなり、同じ流量であっても2倍以上の線速度で分析することが可能ということがわかります。さらに、充填剤粒子径が小さくなるほど高い線速度域においても理論段数の低下は発生しにくくなるため、UHPLC分析では微細充填剤を内径の小さなクロマトグラフィ管に充填したカラムが用いられるのです。また、カラム内径を小さくすることでカラム内で発生する試料バンド（ピーク）の広がり、つまりカラム内拡散を抑えることも可能です。拡散にはカラム内拡散の他にも装置由来の拡散（カラム外拡散）があり、それらをまとめてシステム拡散と呼びます。

3. システム拡散について

システム拡散が小さいほどシャープなピークが得られるため、UHPLCシステムでは拡散をいかに抑えるかはとても重要です。システム拡散は図1の通り、カラム内で発生する拡散（カラム内拡散、 σ_{col} ）と、オートサンプラーや配管、検出器セルで発生する拡散（カラム外拡散、 σ_{ext} ）があります。先述の通り、ピークにはシステム拡散が含まれているため、13.5%高さでのピーク幅は4 σ で表すことができます。また、分散の加法性により σ は図1、式1で表されます。

式1に着目すると、システム全体の拡散（ σ ）は、カラム内拡散とカラム外拡散のそれぞれを2乗した合計の平方根であ

ることがわかります。カラム外拡散は同じ装置や配管を使用する限りは一定であるため、カラム内拡散とカラム外拡散のどちらが支配的かはシステムや分析条件によって変わります。

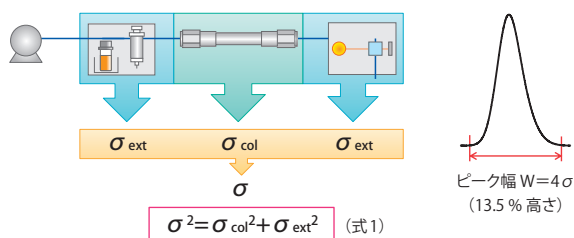
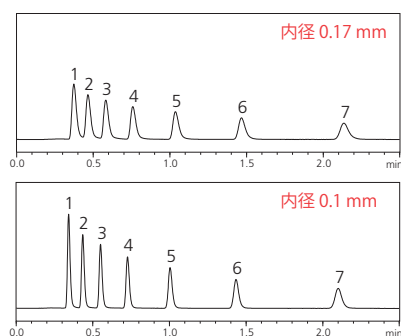


図1 システム拡散の概要

先述の通り、UHPLC分析ではカラム効率が小さくサイズが小さなカラム、つまりカラム内拡散が小さなカラムを使用するため、相対的にカラム外拡散の影響が大きくなります。そのため、UHPLCシステムはできるだけ低拡散なシステムが求められます。一方で、HPLC分析ではカラムサイズが大きく、システム拡散に占めるカラム内拡散が相対的に大きくなるため、カラム外拡散をそれほど気にする必要はありません。

4. 配管における拡散の影響

カラム外拡散は流路を構成する配管についてももちろん留意する必要があり、試料が通過する箇所の配管内径は多くのUHPLCシステムで0.1 mmが採用されています。0.1 mm内径と0.17 mm内径の配管をそれぞれ使用した時のイソクラティック溶離での分析例を図2に、理論段数比を表1に示します。ピーク1に着目すると0.17 mm内径の配管を使用した時は、0.1 mmの時と比べ理論段数が40%しか出ていません。一方でピーク番号が後ろにいくほど理論段数の差は小さくなり、ピーク7では68%にまで改善していることがわかります。このように、イソクラティック溶離でのUHPLC分析においては、配管内径が非常に大きな影響を与えるとともに、保持時間の早いピークほどカラム外拡散の影響を大きく受けるといことがわかります。なお、HPLCシステムで通常使用される配管内径は0.3 mmのため、この差はさらに大きくなります。



カラム：Shim-pack XR-ODS II (50 mm x 2.0 mm I.D., 2.2 μm)
移動相：水・アセトニトリル=35：65、流量：0.6 mL/min

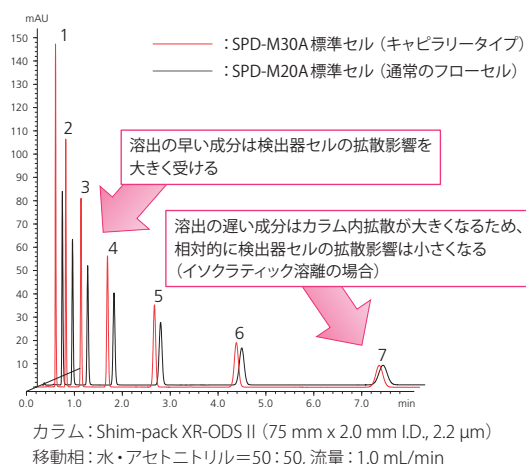
図2 配管内径の違いによる分析例

表1 0.1 mm 配管を基準とした0.17 mm 配管の理論段数比

Peak #	1	2	3	4	5	6	7
Ratio (%)	40	39	40	42	48	57	68

5. 検出器セルにおける拡散の影響

検出器セルにおける拡散もUHPLC分析では無視できません。通常のフローセルを採用した検出器 (SPD-M20A) と、低拡散のキャピラリーセルを採用した検出器 (SPD-M30A) を比較した結果を図3および表2に示します。



カラム：Shim-pack XR-ODS II (75 mm x 2.0 mm I.D., 2.2 μm)
移動相：水・アセトニトリル=50：50、流量：1.0 mL/min

図3 検出器セルの違いによる分析例

表2 キャピラリーセルを基準とした通常セルの理論段数比

Peak #	1	2	3	4	5	6	7
Ratio (%)	48	55	60	67	70	72	73

配管の場合と同様、保持時間の早い成分ほど理論段数の差が大きくなっており、UHPLC分析では検出器セルもピーク形状に大きな影響を与えることがわかります。

6. システムとしての拡散抑制と抱える課題

以上の述べた通り、UHPLC分析においてはカラム外拡散の影響が非常に大きく、低拡散なシステム設計が求められるのはこのためです。ここでは配管の内径や検出器セルについて解説しましたが、これら以外にも配管の長さやオートサンプラーの注入部など、試料が通過する箇所は全て拡散の要因となります。配管内径をさらに小さくしたりすることで、より一層の低拡散は実現できますが、同時に詰まりやすくなったり負荷圧が非常に高くなったりするため使い勝手が悪化してしまいます。近年ではUHPLC分析が広く浸透してきており、幅広い分析スキルの習熟度の方がUHPLCシステムに触れる機会が増えてきています。そのため、使い勝手を犠牲にすることなく低拡散を実現するのはメーカーとしての責務であると考えています。そこで、島津製作所では使い勝手を極力犠牲にすることなく、より一層の低拡散システムをご提供できるNexflowテクノロジーを開発しました。

7. Nexflow テクノロジーによるピーク形状のさらなる向上



Nexflow テクノロジーにより、Nexera シリーズをより一層低拡散にすることが可能です。Nexflow テクノロジーは内径0.1 mmの配管を採用しているため、配管が詰まりやすくなったり負荷圧が大幅に上昇することはなく、使い勝手は従来のUHPLCシステムと同等を維持しています。本テクノロジーはオートサンプラーの注入動作、オートサンプラーの出口配管、および検出器セルへの入口配管 (= カラム出口配管) に適用されます。

以下に、ハイエンドUHPLCシステムであるNexera X3と低拡散キャピラリーセルを採用したフォトダイオードアレイ検出器SPD-M30Aを組み合わせたシステムでの分析例を示します。Nexflow テクノロジーの適用によって、特に保持時間の早い成分において理論段数が顕著に向上しました (図4および表3)*。

* Nexflow テクノロジーの効果は分析条件によって異なります。

表3 Nexflow テクノロジーを適用した場合の理論段数向上率

成分	保持時間 (min)	理論段数比
1. Acetophenone	0.186	176 %
2. Propiophenone	0.246	163 %
3. Butyrophenone	0.320	145 %
4. Valerophenone	0.434	130 %
5. Hexanophenone	0.615	119 %
6. Heptanophenone	0.898	112 %
7. Octanophenone	1.341	108 %

カラム: Shim-pack XR-ODS II (50 mm x 2.0 mm I.D., 2.2 μm)
移動相: 水・アセトニトリル=35:65, 流量: 1.0 mL/min

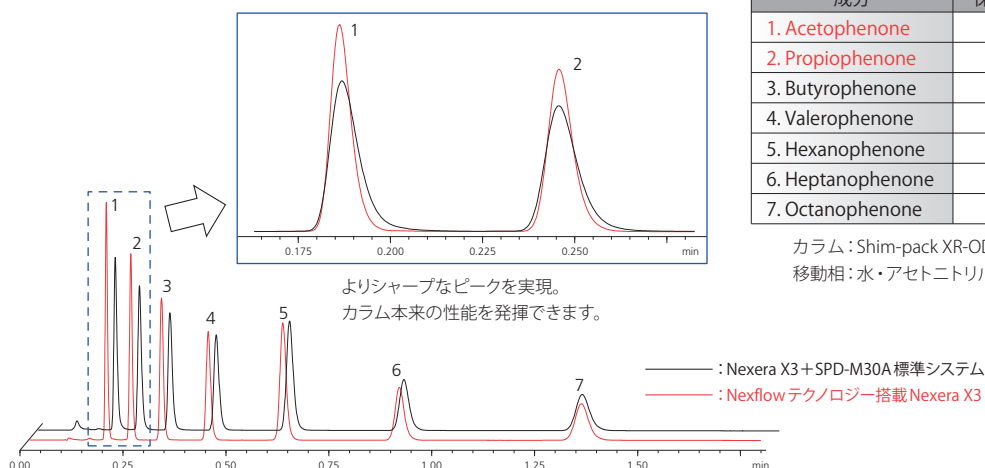


図4 Nexflow テクノロジーによるピーク形状の改善

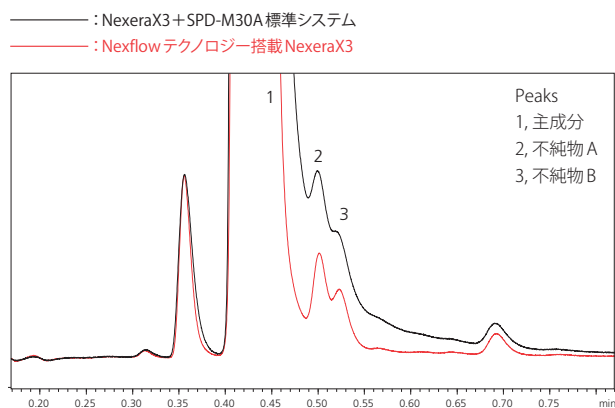


図5 医薬品中の不純物分析例

図5は、医薬品中の不純物分析例です。保持時間が非常に早い上に分離が厳しく、標準のUHPLCシステムではピーク3のピークトップを判定することも困難です。一方でNexflow テクノロジーを適用したシステムでは、ピーク2と3ともにピークトップを十分認識できる分離を達成しており、定量性も向上することが期待できます。

8. Nexflow テクノロジーの製品構成

Nexflow テクノロジーは、Nexera シリーズのUHPLCモデルが対象となっています*1。オートサンプラーの出口配管*2とフォトダイオードアレイ検出器SPD-M30A用の低拡散キャピラリーセル*3、およびワークステーションLabSolutionsなどによる低拡散注入モードを組み合わせることで実現できます。

*1: SIL-40/SIL-40Cは非対応、*2: S228-70254-47他、*3: S228-74902-41 (最新のパーツ番号や詳細については、別途お問い合わせください。)

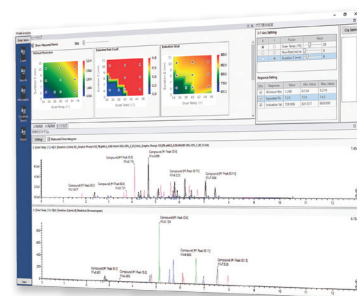
Products

AQbDアプローチに基づく分析法開発を効率化する LabSolutions MD

LCビジネスユニット
藤崎 真一

医薬品規制調和国際会議 (ICH) では、ICH-Q14において「Analytical Quality by Design (AQbD)」に基づく分析法開発への取り組みが議論されています。

「LabSolutions MD」は、科学的な根拠とリスクに基づき分析法を開発するAQbDアプローチに基づいた効率的な分析法の開発を実現します。実験計画法を用いた分析スケジュールの生成、移動相・カラム・LCパラメータの切換えによる分析の自動化、デザインスペースの構築による最適分析条件の決定及び頑健性評価といった一連のワークフローを完結できます。



1. 分析法開発のワークフロー

AQbDに基づいた分析法開発は、分析法の初期スクリーニング (Screening)、最適化 (Optimization)、頑健性評価 (Validation) というフェーズから成り立っています (図1)。LabSolutions MDは、移動相やカラムといった各種パラメータの設定を行い、実験計画を用いて分析を行う分析機能 (図2) 及び、得られたデータに対してデザインスペースや予測クロマトグラムの描画を行う解析機能により構成されます。分析機能に関しては、使用する移動相及びカラムを選択することで、自動でそれらを切換えながら分析を実施可能です。さらに、実験計画を用いた分析回数の最適化により、分析法開発の更なる効率化が可能です。

これら実験計画を用いた分析スケジュール作成は、LabSolutions MDを用い、図2の①～⑥の6つのステップだけで素早く実行できます。解析機能に関しては、ピークトラッキング機能による対象化合物の自動同定、デザインスペースによる各種パラメータの変動が分析結果に与える影響の視覚化、さらに任意のパラメータで分析した際のクロマトグラムのシミュレーションに対応しています。また、分散分析により分析結果に与える各種パラメータの影響度合いの解析も可能です。本稿では、「初期スクリーニング」、「最適化」、「頑健性評価」といった分析法開発の各フェーズに対して、LabSolutions MDを活用した効率化事例をご紹介します。

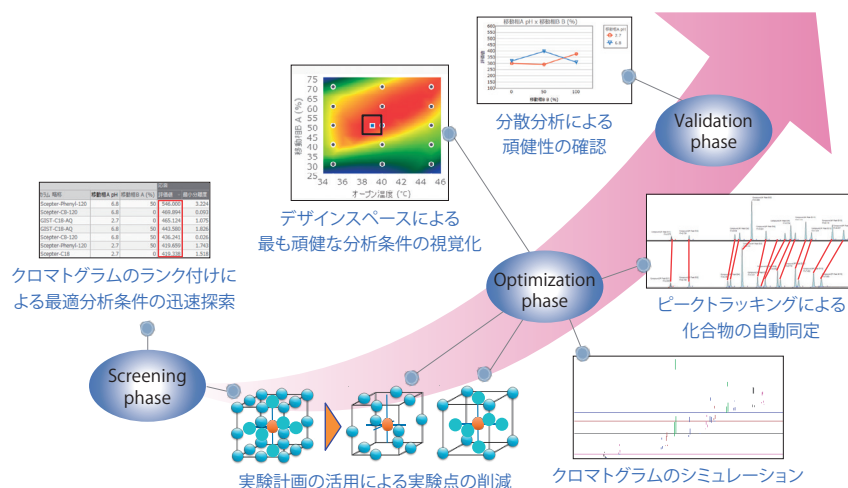


図1 LabSolutions MDによる分析法開発の効率化

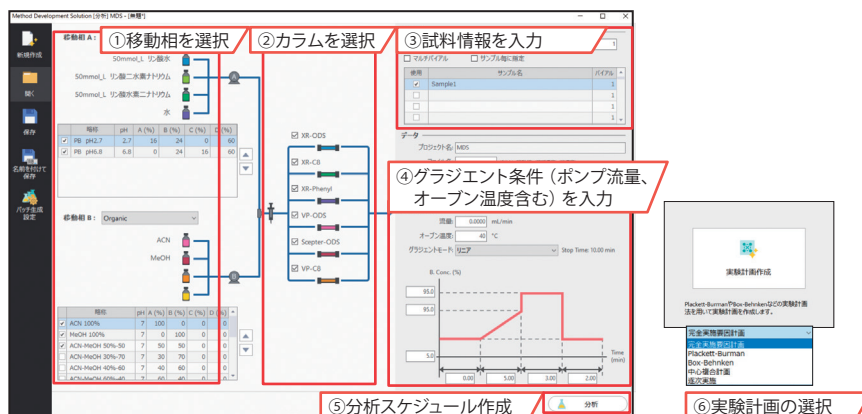


図2 分析画面

2. スクリーニングフェーズ

2.1 最適分析条件の迅速探索

スクリーニングでは条件の数だけクロマトグラムが得られますが、この中からどの条件が最適かを評価する必要があります。クロマトグラムを全て人が目視確認すると多くの手間が発生します。LabSolutions MDでは、各分析条件での分離の状態を以下の式 (1) を用いて定量的に評価を行うことで、素早く簡単に最適な分析条件を探し出すことができます (図3、図4)。

$$E = P \times (Rs1 + Rs2 + \dots + RsP) \dots (1)$$

評価値 (E) はピーク検出数 (P) と分離度 (Rs) の和を用いて算出されます。

カラム 略称	移動相 A pH	移動相 B A (%)	応答	評価値	最小分離度
Scepter-Phenyl-120	6.8	50	546.000	3.224	*1
Scepter-C8-120	6.8	0	469.894	0.093	
GIST-C18-AQ	2.7	0	465.124	1.075	
GIST-C18-AQ	6.8	50	443.580	1.826	
Scepter-C8-120	6.8	50	436.241	0.026	
Scepter-Phenyl-120	2.7	50	419.659	1.743	
Scepter-C18	2.7	0	419.338	1.518	
Scepter-C18	6.8	50	396.000	4.326	
Scepter-C4-300	2.7	0	394.239	0.402	
Scepter-C18	6.8	100	384.553	2.046	*2

図3 評価値による各分析条件の順位付け (評価値が高い順に表示)

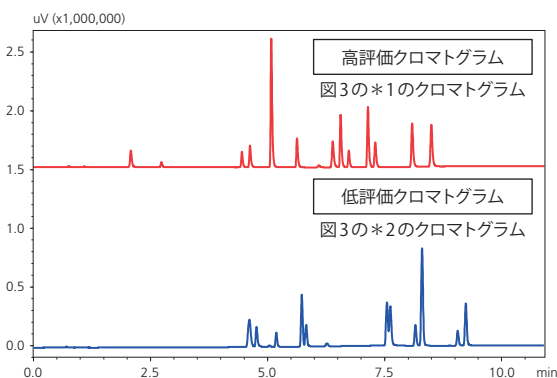


図4 評価値が高いクロマトグラムと低いクロマトグラムの比較

2.2 分散分析による分離に大きな影響を与えるパラメーターの特定

スクリーニングに用いたパラメーターに対して分散分析を実施し、分離に与えるパラメーターの影響の大きさを確認可能です (図5)。p値が0.05以下である要因は、各水準の平均値が水準間で有意に異なると判断できるため、「水準毎に異なる結果が得られている」=「分離に与える影響が大きい」と判断できます。

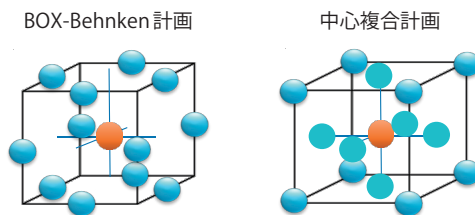
要因効果	要因	平方和	自由度	平均平方	F値	p値
移動相 A pH x 移動相 B B (%)		44817.9	2	22408.9	6.72	0.0141
カラム 略称		66312.0	5	13262.4	3.98	0.0302
カラム 略称 x 移動相 A pH		35853.2	5	7170.6	2.15	0.142
カラム 略称 x 移動相 B B (%)		50149.0	10	5014.9	1.50	0.265
移動相 B B (%)		9123.7	2	4561.9	1.37	0.298
移動相 A pH		3243.6	1	3243.6	0.973	0.347
誤差		33336.5	10	3333.7		
合計		242835.8	35			

図5 分散分析によるパラメーターが分離に与える影響度合いの解析

3. 最適化フェーズ

3.1 実験計画を用いた実験点数の削減

BOX-Behnken (ボックスベーンケン) 計画や中心複合計画は、完全実施要因計画に比べて実験点が少ないため、分析時間の短縮が可能です (図6)。例えば、有機溶媒移動相の混合比率、ポンプのグラジエント条件、カラムオープン温度の最適化を3水準にて検討する場合、完全実施要因計画では27点 (3×3×3) 必要ですが、BOX-Behnken計画では13点、中心複合計画では15点のみで最適化の検討が可能です。



	必要な実験点
完全実施要因計画	27点
BOX-Behnken計画	13点 (分析時間を約52%削減)
中心複合計画	15点 (分析時間を約44%削減)

図6 各実験計画法における必要な実験点の数の比較 (3パラメーター、3水準の場合)

3.2 ピークトラッキングによる化合物の自動同定

分析条件の変更による各化合物の保持時間の変動に対して、類似度や面積値といった任意のパラメータを用いることで自動追跡（ピークトラッキング）が可能です（図7）。分析条件により、ピークの溶出位置が変わった際もすべてのデータに対して素早く、自動でピークを認識するため、同定の手間がかかりません。

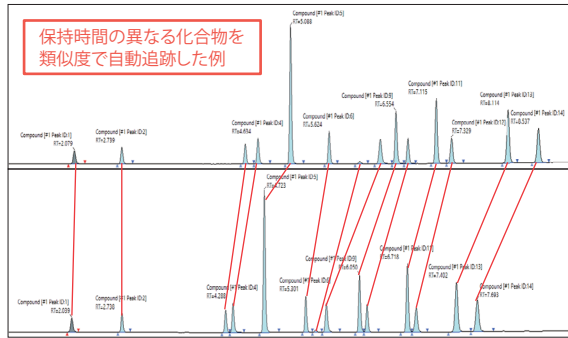


図7 ピークトラッキング機能による化合物の自動同定

3.3 デザインスペースによる最適な分析条件の視覚化

有機溶媒移動相の混合比率を5点（30%、40%、50%、60%、70%）、カラムオープン温度を3点（35℃、40℃、45℃）、グラジエント最終濃度を3点（75%、80%、85%）設定し、最適化を実施した結果に対するデザインスペースを図6に示します。パラメータの変動が分離に与える影響を、縦軸を有機溶媒移動相の混合比率、横軸にカラムオープン温度をとり、視覚的に確認可能です。これにより、最も頑健な分析条件は有機溶媒混合比率が50%、カラムオープン温度が39℃、グラジエント終濃度が80%であることが一目でわかり、勘と経験に頼らない頑健な分析条件の設定を実現します。ここで、デザインスペース内の任意の点（図8内の点A）をクリックすると、各種パラメータを変更した際のクロマトグラムの予測にも対応（図9）しており、分析前に条件を任意に変更した際の分離挙動の確認等に活用できます。

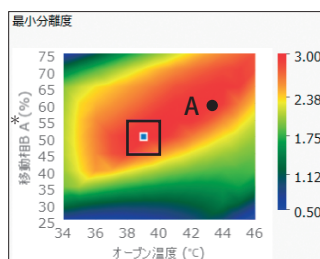


図8 最小分離度に関するデザインスペース
(グラジエント終濃度：80%時)

* 移動相B A：有機溶媒移動相

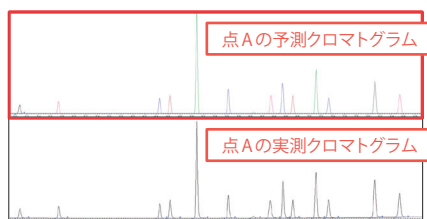


図9 点A（図8）における予測クロマトグラム及び実測クロマトグラム

4. 頑健性評価フェーズ

頑健性の評価は、各種パラメータが変動した際に、測定値へ与える影響を理解し、分析法の信頼性を確保するために重要です。LabSolutions MDでは、逐次実験計画を用いることで、最適化で決定された条件に対して、各種パラメータを小さい範囲で変動させた際の分析スケジュールを自動生成し、分離に与える影響を評価可能です。例えば、最適化フェーズにて得られた分析条件に対して有機溶媒移動相組成を1%刻み（49%、50%、51%）で、カラムオープン温度を1℃刻み（38℃、39℃、40℃）で変動させる（図10の白丸）ことで、各種パラメータの変動が保持時間及び分離度に与える影響を確認できます。図11に、頑健性評価において得られたクロマトグラムを示します。最適化で決定された条件に対して各種パラメータを変動させた際の分離度及び保持時間の変動が極めて小さいことが確認でき、デザインスペースにより導かれた分析法の頑健性の高さを示せます。

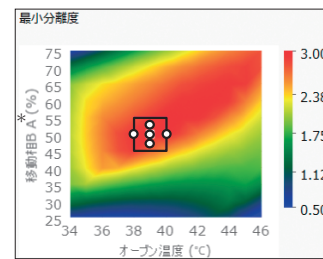


図10 頑健性評価の際の実験点

* 移動相B A：有機溶媒移動相

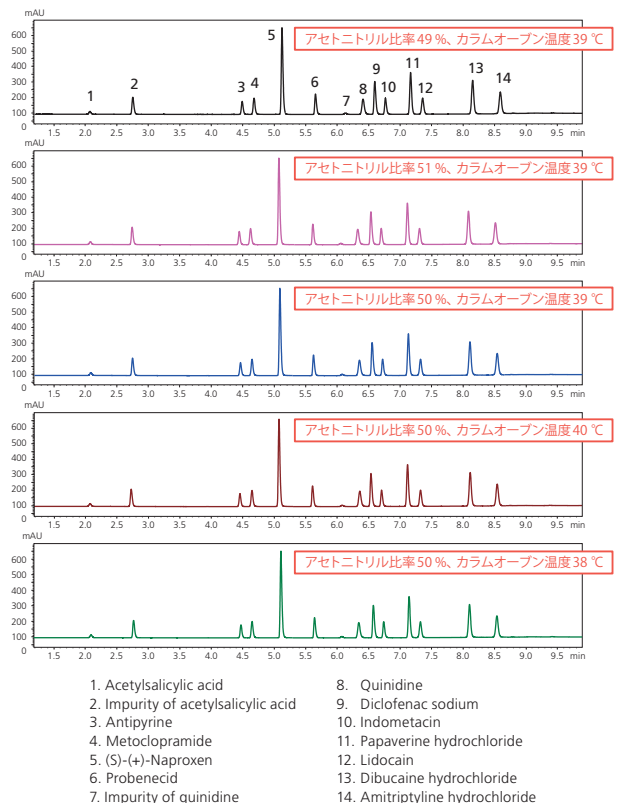


図11 頑健性評価の各実験点（図10の白丸）でのクロマトグラム

Applications

USPに準拠した解熱鎮痛剤のオンライン溶出試験 —内標準物質の自動添加—

グローバルアプリケーション開発センター
松岡 佳那、田邊 彩乃

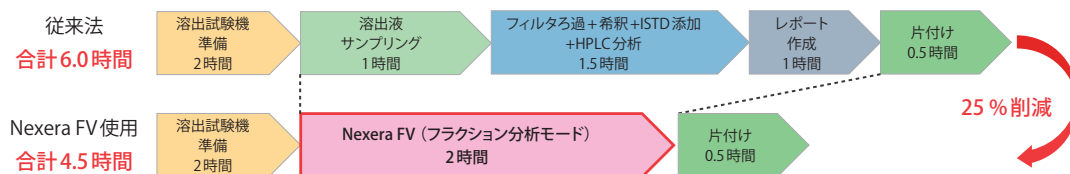
経口の固形製剤（錠剤やカプセルなど）は、体内（消化管など）でまず薬物が溶解され、その後吸収されることで効果を発揮するためバイオアベイラビリティに大きく関わり、主薬の溶出性を確認する溶出試験は非常に重要です。実際に、製剤の開発、品質管理やジェネリック医薬品の生物学的同等性試験などで、広く溶出試験が実施されています。溶出試験は一般的に一定時間、一定条件下での医薬品の溶出性を確認するため、時間ごとに複数のベッセルから溶出液を採取し、分析を行う必要があります。これらの作業を人の手で行うと、作業量が多く、時間もかかります。また、手作業で行うサンプリングや希釈、内標準物質（ISTD）の添加などの前処理過程においてはヒューマンエラーが起きる可能性もあります。

Nexera FVは、溶出試験器とオートサンプラーをオンラインで接続したLCシステムです。溶出試験器からの溶出液分注、HPLC分析、レポート出力までの工程を自動化することが可能です。従来、オペレーターが手作業で行っていた業務の自動化、省力化とスループット向上が実現できます^{1),2)}。

ここでは、Nexera FVを用いて、ISTDを自動で溶出液に添加し、USPに準拠した解熱鎮痛剤のオンライン溶出試験を行った例をご紹介します。

1. Nexera FVを用いたオンライン溶出試験

図1にオンライン溶出試験における従来法とNexera FVを用いた方法、それぞれのワークフローと実際にかかった時間



*記載時間は、溶出試験1時間、HPLC分析0.5時間（1回6分の分析を6回実施）の解熱鎮痛剤の例です。

図1 オンライン溶出試験のワークフロー比較例

の比較例を示します。

従来、手作業で行っていた指定時間での溶出液サンプリング、フィルターろ過、希釈、ISTDの添加、HPLC分析、レポート作成の工程を自動化することができます。また、専用ソフトウェアDT-Solutionを用いてHPLC分析の設定が手軽に行え（図2参照）、分析終了と同時に溶出率など複数のデータをまとめたレポート（図3）が作成されます。



図2 DT-Solutionの設定画面

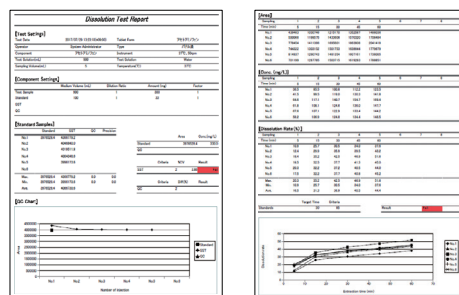


図3 マルチデータレポート画面*

*マルチデータレポートはLabSolutions DB/CSに対応したレポートの自動作成機能（オプション）です。

2. 前処理機能を用いた内標準物質の添加

内標準法を用いて、解熱鎮痛剤中のアセトアミノフェン、アスピリン、カフェインの定量を行いました。標準試料および分注後の溶出液へのISTDの添加は、オートサンプラーSIL-30ACFVの前処理機能を用いて行いました。図4にオートサンプラーを用いたISTD添加の流れを、図5にオートサンプラー内のバイアル配置例を示します。試験開始前に、ISTDバイアル(1)をコントロールバイアルラックに、溶出試験器から溶出液が送液されてくるフローバイアルをフローバイアルラックにセットしておきます。また、溶出液分画用バイアル(2)および希釈・ISTD添加用バイアル(3)として空のバイアルを図5の位置にセットしておきます。試験を開始し、指定時間になると、(1)溶出試験器から溶出液が各フローバイアルに送液され、(2)オートサンプラーによって溶出液分画用バイアル(2)に分画されます。(3)その後、ISTDバイアル(1)中のISTDと溶出液分画用バイアル(2)に分画された溶出液をそれぞれニードルで指定量吸引して、希釈・ISTD添加用バイアル(3)に希釈液とともに吐出、混合しました。(4)最後に(3)で調製したISTDを希釈添加した溶出液10 μLを希釈・ISTD添加用バイアル(3)からインジェクションポート(4)に注入しました。ISTDには安息香酸のメタノール溶液(添加前3600 mg/L)を、希釈液にはメタノール/氷酢酸=95.5を用いました。

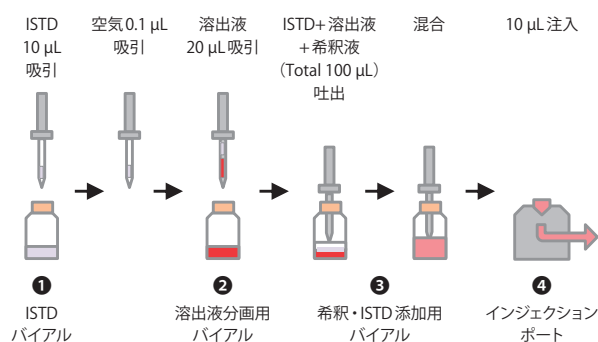


図4 オートサンプラーによる内標準物質 (ISTD) 添加のフロー

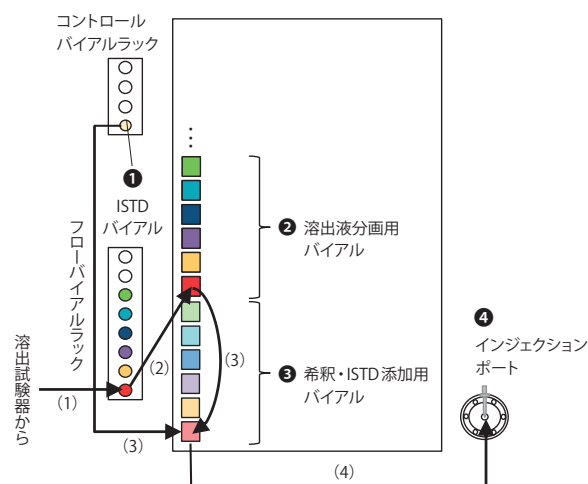


図5 オートサンプラー内のバイアル配置例

3. システム適合性試験

表1に分析条件を、図6にアセトアミノフェン、アセチルサリチル酸、カフェイン混合標準品のクロマトグラムを示します。アセチルサリチル酸の加水分解によって生成したサリチル酸もわずかながら含有されており、ピークとして出現していると考えられます。また、表2にシステム適合性試験の結果を示します。分析条件は、米国薬局方 USP43-NF38 Acetaminophen, Aspirin and Caffeine Tablets³⁾のモノグラフに記載の溶出試験条件を用いました。表3に、同USPモノグラフで要求されるシステム適合性試験の合格基準を示します。システム適合性は、各標準品100 mg/Lの溶液について表1の条件で、繰り返し6回の分析を行い確認しました。システムの性能、システムの再現性ともにUSPモノグラフの基準を満たしていました。

表1 HPLC条件

カラム	: Shim-pack Scepter C18-120*1 (100 mm×4.6 mm I.D., 5 μm)
移動相	: メタノール/氷酢酸/水 = 28 : 3 : 69
流量	: 2 mL/min
温度	: 45 °C
注入量	: 10 μL
試料バイアル	: Shimadzu Vial, LC, 1.1 mL, Glass*2 Shimadzu Vial, LC*3
検出	: 吸光光度検出器 275 nm

*1 P/N: 227-31020-04, *2 P/N: 228-21283-91, *3 P/N: 228-31600-91

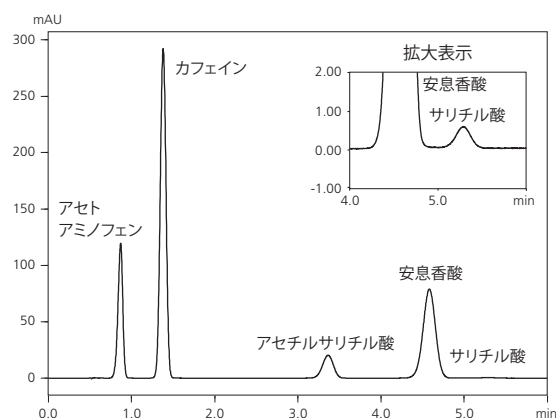


図6 アセトアミノフェン・アセチルサリチル酸・カフェイン混合標準品 (100 mg/L) のクロマトグラム

表2 システム適合性試験の結果 (各 100 mg/L)

システム適合性要件		目的成分			ISTD	判定
		アセトアミノフェン	カフェイン	アセチルサリチル酸	安息香酸	
分離度 (n=6)	≥1.4	19.32	15.73	4.66		合格
テーリング係数 (n=6)	≤1.2	0.87	0.98	0.94	0.97	合格
保持時間 (%RSD)	≤2.0	0.08	0.07	0.28	0.17	合格
ピーク面積 (%RSD)	≤2.0	0.36	0.38	0.35	0.44	合格

表3 システム適合性試験合格基準

分離度	いずれの目的成分ピークにおいても ISTDピークとの分離度 ≥1.4
テーリング係数	いずれのピークにおいても ≤1.2
相対標準偏差 (%RSD)	≤2.0 %

表4 溶出条件

システム	: NTR-6600AST (富山産業株式会社)
溶出方法	: バドル法
溶出液	: 水
溶出液量	: 900 mL
回転速度	: 100 rpm
溶出液温度	: 37 °C
試験時間	: 60 min
サンプリング時間	: 60 min

4. 溶出試験

表4に市販の解熱鎮痛剤の溶出条件を、図7に市販の解熱鎮痛剤の溶出液のクロマトグラムを示します。HPLC分析条件は表1と同様です。溶出液を指定時間に自動でサンプリング、ろ過、Nexera FVを用いて内標準物質を自動添加し、分析しました。

表5に、溶出時間60分での各成分の溶出率を示します。USPモノグラフでは、溶出試験許容範囲は、溶出時間60分以内にアセトアミノフェン、アセチルサリチル酸、カフェインの3成分について表示量の75%が溶出していることとされています。本試験では、いずれの成分、いずれのベッセルについても、溶出時間60分での溶出率が75%以上であり、許容範囲内でした。

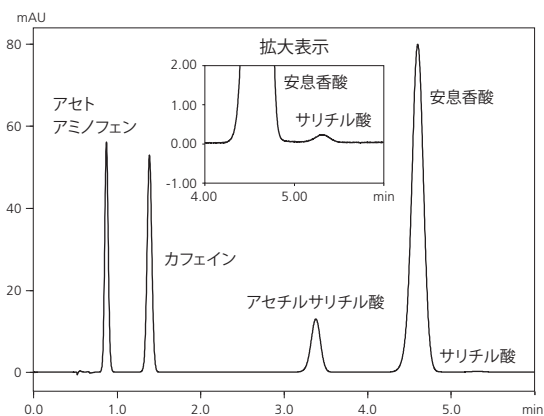


図7 解熱鎮痛剤のクロマトグラム (溶出時間60分)

表5 解熱鎮痛剤溶出試験の溶出率* (溶出時間60分、%)

ベッセル No.	目的成分 アセトアミノフェン	目的成分 カフェイン	目的成分 アセチルサリチル酸
1	109.3	123.1	104.6
2	106.4	121.5	109.7
3	107.7	122.9	105.6
4	108.9	119.3	103.7
5	113.2	131.8	102.8
6	110.7	121.2	103.2
判定	合格	合格	合格

* 溶出率 (%) = 濃度 (mg/L) × 試験液量 0.9 (L) / 表示量 (mg) × 100

5. まとめ

アセトアミノフェン、アセチルサリチル酸、カフェインを含有する解熱鎮痛剤について USPモノグラフに準拠したオンライン溶出試験を行いました。Nexera FVを用いて内標準物質の希釈添加を自動で行うことで、従来法と比べて大幅に作業時間を削減し、業務を効率化することができました。その結果、全行程にかかる約25%の時間を削減できることを確認しました。

参考文献

- 1) 島津アプリケーションニュース 01-00029-JP
ロキサチジン酢酸エステル塩徐放カプセルのオンライン溶出試験
- 2) 島津アプリケーションニュース 01-00031-JP
サプリメントを用いたオンライン溶出試験
- 3) USP43-NF38 "Acetaminophen, Aspirin and Caffeine Tablets"

本文に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。
なお、本文中では「TM」、「®」を明記していません。