

UHPLC 法によるパラベンの分離とジルチアゼム製剤の定量

—薬品分析化学実習の HPLC 法から UHPLC 法への移管—

永松 久実・西村 基弘・西 博行

Separation of Parabens and Assay of Diltiazem HCl in Formulations by UHPLC

Kumi NAGAMATSU, Motohiro NISHIMURA and Hiroyuki NISHI

1. はじめに

医薬品の類縁物質試験や定量法等の品質評価法として、現在最も汎用されている手法は、HPLC 法、特に逆相モードの HPLC 法である。本学薬学部の専門実習では、2 年次に実施の薬品分析化学実習 II ではじめて HPLC 法について修得することになっているが、その内容は①逆相 HPLC 法の理論と基礎、②逆相 HPLC 法による医薬品製剤の定量、の 2 項目である¹⁾。なお、本学薬学部での HPLC 法を用いる実習としては、この他に 3 年次衛生薬学実習でのビタミン C の定量²⁾、天然物化学実習 I でのオウバク中のベルベリンの定量があり³⁾、HPLC 法が如何に医薬品分析で汎用されている有用な手法であるかが分かる。

薬品分析化学実習 II の逆相 HPLC 法の基礎では、医薬品の保存剤として用いられるパラヒドロキシ安息香酸アルキルエステル類（いわゆるパラベン）をテスト試料として用い、アルキル置換基の違いと溶出順、分離における各パラメータ（保持時間 t_R 、キャパシティーファクター k 、分離係数 α 、分離度 R_s 、理論段数 N 、シンメトリー係数 S ）の算出、加えて分離での有機溶媒の割合の影響を検討する。一方、製剤の定量については、実製剤ジルチアゼム錠 60 mg を用い、内標準（IS）法による定量を行っている。

なお、薬学部における HPLC 実習に関しては、アンケート調査結果がある⁴⁾。これによると多くの大学では分析実習は縮小されているものの（10コマ程度）、HPLC 法は必ず組み込まれており、ほとんどの大学で上記のような逆相 HPLC の基礎、あるいは製剤定量が実施されている。このような HPLC 法の実習で用いられているカラムとしては、内径 4~4.6 mm、長さ 15 cm で、充てん剤粒子径 5 μm の ODS カラムが最も汎用されている。このタイプのカラムでは、流量 1.0 mL/min でのカラム背圧は約 100 kg/cm² であり、通常使用でポンプやカラムに対しての負荷は少なく、特に問題は起こらない。

近年、上記の通常タイプのカラムを用いる方法（HPLC 法）に加え、さらに高い分離性能や分析時間の短縮を目的として粒子径の小さな（2~3 μm ）充てん剤カラムを用いる UHPLC 法が盛んに検討されている。本検討では、薬品分析化学実習 2 の逆相 HPLC 法の 2 つ、すなわち、パラベンの分離及びジルチアゼム製剤の IS 法による定量について、上記の通常タイプのカラムを用いる方法（HPLC 法）から UHPLC 法への移管について、比較検討を行った。また、定量法では、現在用いている IS：ジルチアゼム関連物質（ジルチアゼムの 8-クロロ誘導体）に代

わるものを検討し、新たな試験法を設定したのであわせて報告する。

2. 実験方法

2.1 試料

p-ヒドロキシ安息香酸メチル（メチルパラベン）、*p*-ヒドロキシ安息香酸エチル（エチルパラベン）、*p*-ヒドロキシ安息香酸プロピル（プロピルパラベン）、*p*-ヒドロキシ安息香酸イソプロピル（イソプロピルパラベン）、*p*-ヒドロキシ安息香酸ブチル（ブチルパラベン）、*t*₀のマーカ物質としてウラシル、また、緩衝液調製用に用いたリン酸（85%）及びリン酸二水素カリウム、また、塩酸は、すべて和光純薬工業株式会社（大阪）の試薬特級を購入し、使用した。メタノール（MeOH）はHPLC用を和光純薬から購入し、使用した。

一方、製剤の定量で用いるジルチアゼム塩酸塩（DIL）原薬、ジルチアゼム製剤（ヘルベッサ錠60）、ISとして用いたクロロジルチアゼムマレイン酸塩（CIL）及びDILの主不純物かつ分解物である脱アセチル体（DIL-OH）については、田辺三菱製薬株式会社から供与されたものをそのまま用いた。Caチャンネルブロッカーであるジルチアゼム塩酸塩の化学構造式を図1に示す。本品は、血圧降圧剤として現在世界100ヶ国以上で臨床に供されている。

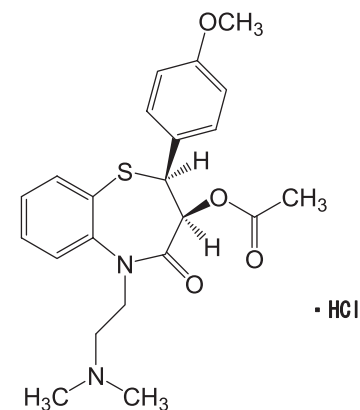


図1 ジルチアゼム塩酸塩の化学構造

2.2 装置

装置は株式会社島津製作所（京都）のProminence装置一式（UHPLC対応）を使用した。ポンプはLC-20AB（耐圧上限40 MPa、約400 kg/cm²）、オートインジェクターとしてはSIL-20ACを、多波長検出器としてSPD-M20A（システムコントローラはCBM-20A、カラムオープンにはCTO-20Aを、また、デガッサーDGU-20A3を使用した。

なお、カラム直後の配管は内径0.1 mmのものを用いたが、検出器のセルは通常の10 μLのものを使用し、スリット幅は8 nm（他に1.2 nm選択可能）とした。検出器の時定数（レスポンス）及びサンプリングタイムは、コンベンショナルなHPLCカラム及びそれと比較のUHPLCの測定の際は、それぞれ640 ms（初期設定値）としたが、その他のUHPLC測定では、最適化を行った。

カラムは、UHPLC 用カラムとして(株)島津製作所の Shim-pack XR-ODS (2.2 μm , 3.0 mm i.d. \times 50 mm), また, コアシェル型の UHPLC カラムとして, Phenomenex Kinetex 2.6u C18 (2.6 μm , 4.6 mm i.d. \times 100 mm) を, コンベンショナルな HPLC 用カラムとしては, Phenomenex Gemini NX5u C18 (5 μm , 4.6 mm i.d. \times 150 mm) を使用した。

ピークの理論段数 N , 理論段高さ H 及び分離度 R_s は, Prominence 装置一式に搭載されているデータ解析ソフトを用いて計算した。

2.3 パラベンの分離

パラベンの分離は, MeOH と水の混液 (MeOH 50%, 60% 及び 70%) の, 単純逆相条件とした。各パラベン及びびウラシル 100 mg をとり, MeOH に溶かし 100 mL とし, パラベンの原液とした。この各原液 5 mL をとり, 水を加えて 50 mL としてパラベン混合液 (ウラシルを含む) を調製した。

2.4 ジルチアゼム誘導体を内標準としたジルチアゼム製剤の定量 (既存 IS 法)

本品10錠の重量を精密に量り, 粉末とする。表示量に従ってジルチアゼム塩酸塩約30 mgに
対応する量を精密に量り, 0.01 mol/L 塩酸試液60 mLを加え, 5分間加温した後, 10分間振り混
ぜ, 冷後, 0.01 mol/L 塩酸試液 20 mLを加えて, 更に10分間振り混ぜる。これに内標準溶液とし
て, クロロジルチアゼムのメタノール溶液 (1 \rightarrow 300) 10 mLを正確に加え, 0.01 mol/L 塩酸試
液を加えて100 mLとし, ろ過する。はじめのろ液20 mLを除き, 次のろ液を試料溶液とする。別
に定量用ジルチアゼム塩酸塩 (乾燥済み) 約30 mgを精密に量り, 0.01 mol/L 塩酸試液 60 mLを
加えて溶かし, 内標準溶液 10 mLを正確に加え, 0.01 mol/L 塩酸試液を加えて 100 mLとし, 標
準溶液とする。試料溶液および標準溶液の 10 μL につき, 次の条件で液体クロマトグラフィー<
2.01 >により試験を行い, 内標準物質のピーク面積に対するジルチアゼムのピーク面積の比を
求め, IS法により含量を求める。

操作条件

検出波長: UV 254 nm

カラム: Phenomenex Gemini NX5u C18 (5 μm , 4.6 mm i.d. \times 150 mm)

カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$

移動相: MeOH/0.05 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 3.0) 混液 (3 : 2)

流量: 1 mL/min

2.5 エチルパラベンを内標準としたジルチアゼム製剤の定量 (新 IS 法)

本品10錠の重量を精密に量り, 粉末とする。表示量に従ってジルチアゼム塩酸塩約30 mgに
対応する量を精密に量り, 0.01 mol/L 塩酸試液60 mLを加え, 5分間加温した後, 10分間振り混
ぜ, 冷後, 0.01 mol/L 塩酸試液20 mLを加えて, 更に10分間振り混ぜる。これに内標準溶液とし
て, *p*-ヒドロキシ安息香酸エチルのメタノール溶液 (3 \rightarrow 5000) 10 mLを正確に加え, 0.01 mol/L
塩酸試液を加えて100 mLとし, ろ過する。はじめのろ液20 mLを除き, 次のろ液を試料溶液と
する。別に定量用ジルチアゼム塩酸塩 (乾燥済み) 約30 mgを精密に量り, 0.01 mol/L 塩酸試液
60 mLを加えて溶かし, 内標準溶液10 mLを正確に加え, 0.01 mol/L 塩酸試液を加えて 100 mLと
し, 標準溶液とする。試料溶液および標準溶液の10 μL につき, 以下2.3と同様に試験を行う。

3. 結果及び考察

3.1 HPLC 法によるパラベン分離及びジルチアゼム製剤の定量 (既存 HPLC 法)

UHPLC法による分離と比較するに当たり、コンベンショナルなHPLC用カラムである、Phenomenex Gemini NX5u C18 (5 μ m, 4.6 mm i.d. \times 150 mm) を用いてパラベンの分離を行った。検出器の時定数及びサンプリングタイムは640 ms (使用機器の設定可能値のほぼ中間値) とした。60%及び70% MeOHでの結果を図2に示す。約1.5分のところに溶出している最初のピークがウラシルで、 t_0 である。その後は、パラベンのアルキル置換基の疎水性の違いに従って、メチル、エチル、イソプロピル (iPr)、プロピル (Pr)、最後にブチルパラベンが溶出している。60% MeOH (図2A) で5分あたりにベースライン分離されているイソプロピルパラベンとプロピルパラベンは、70% MeOH (図2B) では溶出が3分付近と速くなり、一部ピークが重複して溶出した。逆相モードでは使用する有機溶媒の濃度により保持時間を調整することを実習では学習させる。なお、図2AのiPrパラベンとPrパラベンのピークの理論段数Nは、保持時間約5分でほぼ10000段であり、両ピークの分離度 R_s は1.97と完全分離 ($R_s > 1.5$) であった。

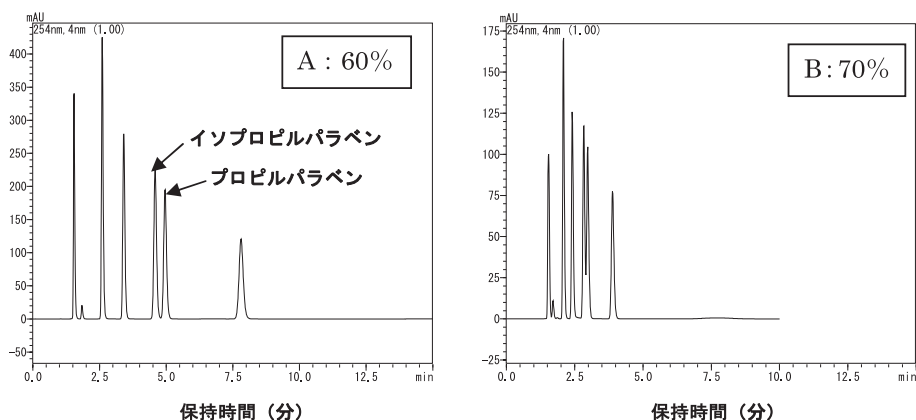


図2 HPLC法 (15 cm カラム) によるパラベンの分離

Phenomenex Gemini NX5u C18 (5 μ m, 4.6 mm i.d. \times 150 mm) による、CILをISとしたジルチアゼム製剤の定量における試料溶液のクロマトグラムを図3に示す。60% MeOH (図3A) では、DILが2.5分に、ISのCILが4分付近に溶出する。この条件でDILとISとのピーク高さがほぼ等しくなるようにIS試料濃度を調整してあるので、70% MeOH (図3B) では溶出が早まることでピークがシャープになり、ISのピーク高さが高くなっている。なお、60% MeOH (図3A) で3.5分のところに小さなピークが観測されているが、これはCILの不純物 (かつ分解物) である脱アセチル体 (CIL-OH) である。よく見るとDILのピークの直前の2分のところにも極めて小さなピークが検出されているが、これがジルチアゼムの分解物 (かつ不純物) であるDIL-OHである。60% MeOHではこれらが全て分離されており、分析法バリデーションにおける特異性を満足している。しかし、70% MeOH (図3B) では、CIL-OHはDILとCILの間に分離されて検出されているものの溶出が早まることでDIL-OHはDILのピークに重複した。なお、図3では1.5分にピークが観測されているが、これはCILの対塩であるマレイン酸のピークで、この

条件では保持されないためフロントに溶出し、 t_0 のマーカースとして用いることができる。

DIL 及び IS である CIL のピークの理論段数 N は、図 3 A ではそれぞれ 3100 段、4300 段とパラベン分離 (図 A) の 2 分の 1 と低いものであったが類縁物質である DIL-OH と分離はされており、また、両ピークの R_s は 7.88、分析は 5 分以内で終了と定量法としては十分であることが確認された。

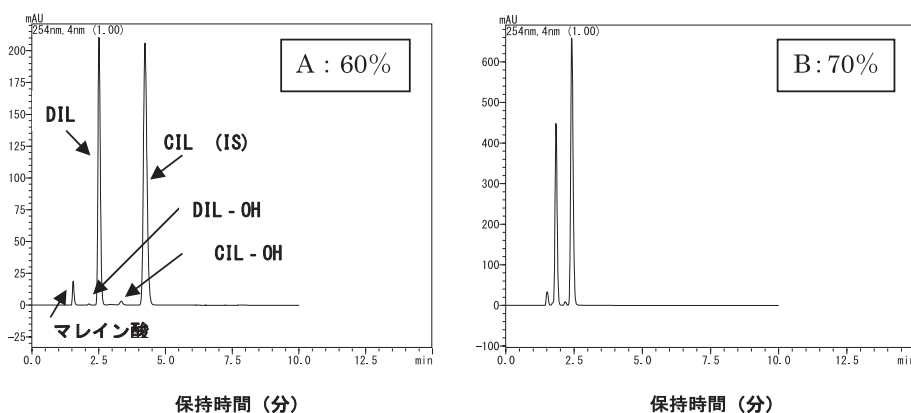


図 3 HPLC 法 (15 cm カラム) による DIL の定量 (IS : CIL)

3.2 HPLC 法による新 IS によるジルチアゼム製剤の定量 (新 IS 法による HPLC 定量)

医薬品製剤の HPLC 定量で用いる IS としては、対象医薬品の類縁物質の溶出位置付近に重複して溶出せず、かつ構造がよく似ている (HPLC での挙動が同じ) 物質が好ましい。加えて、安価で安定であり、安定供給される化合物であることも必要である。CIL はこれらの条件にほぼ該当するが市販されていないことから、今回、IS の変更について検討を行った。図 2 A 及び図 3 A を参考にして、DIL の溶出位置近くでしかも後に溶出するものとしてエチルパラベンを選定し、添加するエチルパラベンの濃度を検討した。その結果、設定した定量法を 2.5 に、その時のクロマトグラム 図 4 A を示す。なお、このクロマトグラムでは、DIL の前にピークが検出されているが、これは特異性の確認のために添加した DIL-OH 体である。MeOH 70% (図 4 B) では、DIL と DIL-OH との分離が不十分で、重複して溶出した。図 4 A における DIL と IS であるエチルパラベンとの分離度 R_s は 4.38 で、ピークの理論段数 N は、それぞれ 3300 段、6200 段であった。

3.3 UHPLC 法による検討 (1) カラムの効果

カラムの性能 (H : 理論段高さ) と移動相の流速 (u : 線流速) との関係については、van Deemter の式 (1) が知られている⁵⁾。この式で A 項は渦流拡散といわれ、 $A = 2\lambda dp$ (λ : 曲りくねり係数、 dp : 充てん剤の粒子径)、 B 項はカラム軸 (縦軸) 方向への拡散で、 $B = 2Dm$ (Dm : 移動相中での拡散係数)、 C 項は移動相と固定相間での物質移動における分配平衡の遅れの寄与を示す。 $C = Csm \cdot dp^2 / Dm + Cs \cdot df^2 / Ds$ (Csm , Cs : 係数、 Ds : 固定相中での拡散係数、 df : 固定相 (液体) の厚さ) である。

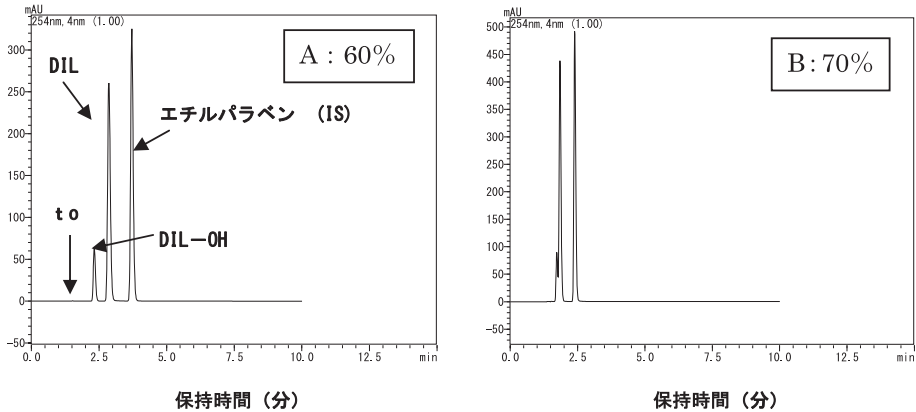


図4 HPLC法 (15 cm カラム) による DIL の定量 (IS : エチルパラベン)

$$H = A + B/u + C u \text{ ----- (1)}$$

A 項では、形のそろった粒子径 dp が小さい充てん剤が細密充てんされるほどその H への寄与が小さくなり、B 項は流速 u が大きいほど、小さい理論段高さ H (高い理論段数 N) が得られることがわかる。また、C 項については、粒子径 dp と固定相厚さ df 及び流速 u が小さいほど有利であることが分かる。流速を最適条件下で用いることは実際的でないので、従来より充てん剤の粒子径を小さくすることで高性能のカラムを目指すことが行われており、 $2\mu\text{m}$ 程度の充てん剤が開発され市販されていた。しかし、粒子径が小さいほどカラム背圧が大きくなり、この影響で急激にカラムが劣化することがよく経験され、実用分析では汎用性がなかった。

近年、 $2\sim 3\mu\text{m}$ の充填剤で 300 kg/cm^2 の使用でもカラム寿命の優れたものが開発され、市販されるようになり、メーカーにより UPLC (Ultra high pressure LC)⁶⁾、あるいは UFLC (Ultra fast LC)⁷⁾ と称されるものが利用できるようになった。なお、名称は現在では一般的に UHPLC にほぼ統一されている。HPLC の開発当初 (1980年代前後) よりポンプは耐圧性のものが利用できたが、上記のように耐圧性のカラムがなかったため、高圧化による HPLC、すなわち UHPLC が発展しなかったが、近年はその応用研究が多く報告されるようになってきている^{8~10)}。

UHPLC では、高い理論段数が得られるため、同じカラムサイズであれば従来カラムのときよりも高速分離が可能となる。すなわち、分離時間の短縮による省力化が、また、カラムサイズが小さいミニカラムの適用も可能となる。ただし、カラムの性能を最大限に発揮させるためには、流路系の内径や検出器のセル容量も最適化 (スケールダウン) しなければならない。

今回、まず UHPLC カラムとして、粒子径 $2.2\mu\text{m}$ の Shim-pack XR-ODS ($3.0\text{ mm i.d.} \times 50\text{ mm}$) を UHPLC 対応装置に装着して検討を行った。UHPLC カラムでは MeOH を用いるとカラム背圧が高くなるため、アセトニトリルを採用するケースが多いが、カラム長 5 cm のものを用いることとし、有機溶媒には MeOH を用いて性能を比較した。パラベンの分離結果を図 5 A に、CIL を IS とした DIL の定量でのクロマトグラムを図 5 B に示す。なお、図 5 の UHPLC データは、HPLC との比較 (σ_{COL}^2 のみの評価) のため、時定数 640 ms 、サンプリングタイム 640 ms の、HPLC 測定での標準的数値 (下記 3. 2 参照) で求めたものである。図 5 A と図 2 B を比較すると保持時間が前者のほうが速いにもかかわらず、iPr パラベンと Pr パラベンの分離が良い

ことが分かる。図 2 B 及び図 5 A における理論段数 N 、理論段高さ H 及び R_s の値を比較して表 1 に示す。CIL を IS とした DIL の定量におけるクロマトグラム (図 5 B) においても、図 3 B よりも溶出時間は速くなっているにもかかわらず、それぞれの脱アセチル体との分離が達成されている。なお、流速は 0.7 mL/min としたが、カラムの背圧は、 $\text{MeOH } 70\%$ 移動相で 198 kg/cm^2 であった。

HPLC で用いたカラムと UHPLC で用いたカラムは、充てん剤の粒子径以外も異なるため厳密な比較はできないが、カラムの長さが短くなった (3分の1) にも関わらず、分離は同等以上であることが分かった。カラムの長さ L と粒子径 dp の両者を変更した場合の分離の目安として、カラム長 L を粒子径 dp で除した $F = L/dp$ があるが、HPLC では $F = 15/5 = 3.0$ 、UHPLC では $F = 5/2.2 = 2.3$ で、ほぼ同じと判断された。

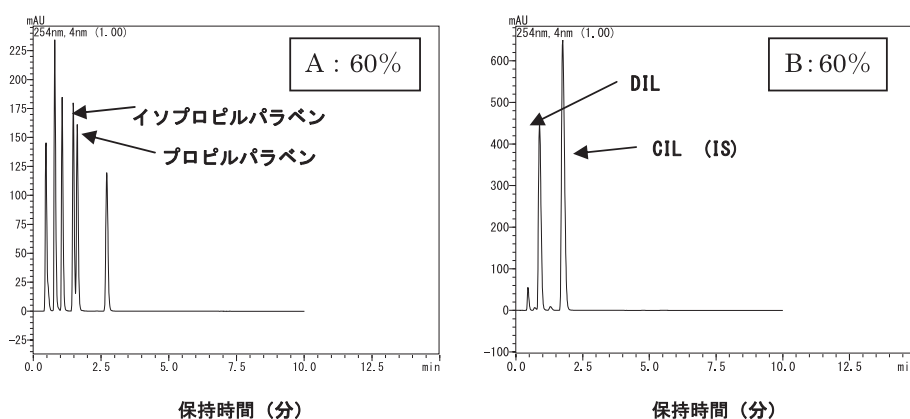


図 5 UHPLC 法 (5 cm カラム) によるパラベンの分離及び DIL の定量 (IS : CIL) (時定数 640 ms)

表 1 HPLC と UHPLC における iPr パラベンと Pr パラベンの分離での各種パラメータ

分析条件	t_0 (min)	保持時間 (min)	理論段数 N	理論段高さ H (μm)	分離係数 R_s
HPLC (15 cm, $5 \mu\text{m}$) (MeOH 70%) 640 ms	1.50	2.83 2.97	5130 5420	29.2 27.7	0.89
UHPLC (5 cm, $2.2 \mu\text{m}$) (MeOH 60%) 640 ms	0.42	1.47 1.62	2010 2240	24.9 22.3	1.10
UHPLC (5 cm, $2.2 \mu\text{m}$) (MeOH 60%) 80ms	0.42	1.30 1.42	4610 5000	10.8 10.0	1.57
UHPLC (10 cm, $2.6 \mu\text{m}$) (MeOH 70%) 80 ms	0.98	1.57 1.64	15400 15400	6.49 6.49	1.30

3.2 UHPLC 法による検討 (2) 検出器での影響

UHPLC の性能を最大限で得るためには、カラムを UHPLC 対応とする以外に、検出器におけるセル用量、時定数 (レスポンス) 及びサンプリングタイム、また、流路系の最適化を行う必要がある。式 (2) にピークのパンド広がりに関与する拡散要因を示す。ピークのパンド広がりには、以下の式 (2) に示したようにカラムに起因するもの σ_{COL}^2 、注入に関連するもの σ_{INJ}^2 、流路系 σ_{CON}^2 、連結 σ_{FIT}^2 、検出に起因する拡散要因 σ_{DET}^2 が考えられ、全体の σ_{TOTAL}^2 は、

それらの総和で表される。

$$\sigma_{\text{TOTAL}}^2 = \sigma_{\text{COL}}^2 + \sigma_{\text{INJ}}^2 + \sigma_{\text{CON}}^2 + \sigma_{\text{FIT}}^2 + \sigma_{\text{DET}}^2 \text{-----} \quad (2)$$

今回の検討では、カラムから検出器までの流路は0.1 mmのステンレス管とし、カラムもUHPLC対応として、 σ_{COL}^2 と σ_{CON}^2 （及び σ_{FIT}^2 ）は最適化を行った。一方、試料の注入に関しては、SIL-20ACを用い、セルの容量は超高速対応のセミマイクロセル（容量2.5 μL ）ではなく、通常の10 μL とした。これは、セルの光路長が2の1となることで検出感度が半分以下になることのデメリットを避けたいためである。また、スリット幅も1.2 nmでなく、通常の8 nmとした。図5のUHPLCデータは、HPLCとの比較（ σ_{COL}^2 のみの評価）のため、上述のようにHPLC測定での標準的数値（時定数、サンプリングタイムともに640 ms）で求めたものである。時定数80 ms、サンプリング80 msとして、パラベンを分離を行った。結果を図6及び表1に示す。図6AでのMeOH 60%におけるiPrパラベンとPrパラベンは保持時間約1.4分で、両者の分離度 R_s は1.57（完全分離）、理論段数 N は640 ms測定時に比べて倍以上の約5000段となり、理論段高さ H は10 μm が得られた。また、MeOH 70%（図6B）においても時定数640 msでは重複したiPrパラベンとPrパラベンのピークが時定数80 msでは分離（ $R_s = 0.55$ ）された。

C項に関しては固定相が担体表面に薄く均一に分布していると影響が小さくなる。このタイプは、1969年にカーランドによりHPLCに用いられたペリキュラー型シリカと呼ばれた表面多孔性シリカの時代に、既に開発されている。試料の負荷量が少ないため、その後、現在主流の全多孔性シリカに充てん剤の座を奪われていたが、UHPLCの登場とともに改めて見直されている。このタイプの充てん剤はコアシェル型^{11, 12)}と呼ばれており、背圧が比較的低い。今回、Phenomenex Kinetex 2.6u C18 (2.6 μm) 10 cmカラムを用い、MeOH 70%でパラベンの分離を行ったところ、流速1.0 mL/minで187 kg/cm²と、上記UHPLCカラム（5 cm）の2倍の長さであるにもかかわらず、低いカラム背圧であった。iPrパラベンとPrパラベンのピークの分離の結果を、表1にあわせて記載する。今後は、このコアシェル型のUHPLCカラムによる高速分析について検討を進めてゆく予定である。

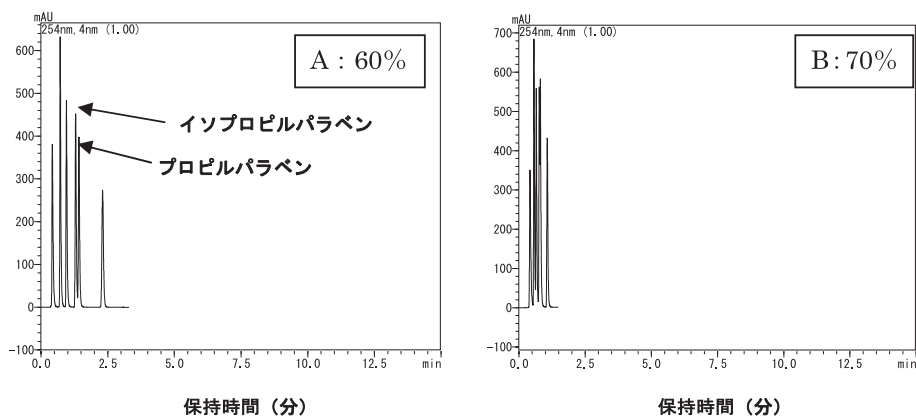


図6 UHPLC法（5 cmカラム）によるパラベンの分離（時定数80 ms）

以上、今回、5 μm 、15 cmカラムによるHPLC法を、2.2 μm 、5 cmカラムのUHPLC法で検

討したところ、7.5分のパラベン混合物の分離が、2.5分以内で同じ性能で達成され、高速分析できることが分かった。

謝 辞

本実験を実施するにあたり、UHPLC カラム Shim-pack XR-ODS を供与頂きました(株)島津製作所(三上博久氏)に感謝いたします。また、本研究の一部は平成23年度科学研究費補助金基盤研究(C)「CE法を中心としたマイクロ分析系による医薬品の品質物性の高速精密評価」(研究代表:西博行, 課題番号 23550110)の助成を受けたものである。

引用文献

- 1) 薬品分析化学実習Ⅱ 実習書(2010年度版), 安田女子大学薬学部(2010).
- 2) 衛生薬学実習 実習書(2010年度版), 安田女子大学薬学部(2010).
- 3) 天然物化学実習 実習書Ⅰ(2010年度版) 安田女子大学薬学部(2010).
- 4) 浜瀬健司, 「薬学教育の観点からの薬局方改正とクロマトグラフィー」, 第18回クロマトグラフィーシンポジウム(福岡), プロシーディング pp.33-34, (2011).
- 5) 例えば, 津田孝雄, 「クロマトグラフィー——分離のしくみと応用——」, 丸善(株), pp.51-67, (1989).
- 6) Waters 社商標。
- 7) (株)島津製作所商標。
- 8) H. Kawanishi, T. Toyooka, K. Ito, M. Maeda, T. Hamada, T. Fukushima, M. Kato, S. Inagaki: Hair analysis of histamine and several metabolites in C3H/HeNCrj mice by ultra-performance liquid chromatography with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry (UPLC-ESI-TOF-MS), *Clinica Chimica Acta*, 378, 122-127 (2007).
- 9) J. Z. Min, Y. Shimizu, T. Toyooka, S. Inagaki, R. K-Hanajiri, Y. Goda: Simultaneous determination of eleven designated hallucinogenic phenethylamines by ultra-fast liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. B*, 873, 187-194 (2008).
- 10) Z. Zhan, Y. Lin, J. Xing, Y. Jomono, N. Hamada: Rapid method development of HPLC by using ultra fast LC system, *Shimadzu Hyoron*, 65(1,2), 117-123 (2008).
- 11) J. J. Kirkland, F. A. Truszkowski, C. H. Dilks, G. S. Engel: *J. Chromatogr. A*, 890, 3-13 (2000).
- 12) J. J. Kirkland, T. J. Langlois, J. J. DeStefano: *Am. Lab.*, 39, 18-21 (2007).

Summary

Recently UHPLC, where smaller particle (2~3 μm) packing materials are employing, is progressing rapidly, in addition to the conventional HPLC with the usual size packing materials (5 μm). Higher performance and fast analysis can be obtained through UHPLC. Separation of paraben mixtures and assay of diltiazem hydrochloride in formulations, those two reversed phase HPLC analysis performed in the pharmaceutical analysis practice II, are investigated by the UHPLC with an ODS column (2.2 μm , 5 cm length). The same or higher performance was obtained by the UHPLC, compared with the conventional HPLC with an ODS column (5 μm , 15 cm length), showing the usefulness of UHPLC. Further the novel assay method of diltiazem hydrochloride in formulations, where ethyl paraben is used as an IS instead of diltiazem derivative (8-chlorodiltiazem) IS, is developed as an alternative because of fear of shortness of 8-chlorodiltiazem.

[2011. 9. 29 受理]