

疎水性相互作用あるいは親水性相互作用を利用する  
コアシェル型カラムHPLC法による  
水溶性ビタミン類の分離分析

西 博 行

Separation of Water Soluble Vitamins by HPLC with Core-shell Type Columns  
Utilizing Hydrophobic Interaction and/or Hydrophilic Interaction

Hiroyuki NISHI

**Abstract**

This paper describes HPLC separation of water soluble vitamins such as ascorbic acid (vitamin C, VC) etc. employing the core-shell type column utilizing hydrophobic interaction and/or hydrophilic interaction. As for 12 water soluble vitamins, riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>, VB<sub>2</sub>), riboflavin sodium phosphate (vitamin B<sub>2</sub> phosphate), cyanocobalamin (vitamin B<sub>12</sub>), hydroxocobalamin and mecobalamin were successfully separated by the reversed-phase (RP) HPLC with an ODS column employing 15 – 20 % acetonitrile (ACN) or methanol (MeOH) as an organic modifier. Other water soluble vitamins eluted at almost  $t_0$  (column hold up time) by the RP-HPLC with an ODS column using no addition of ACN or MeOH to the mobile phase. These seven water soluble vitamins (VC, isoascorbic acid, ascorbic acid 2-glucoside, nicotinic acid, nicotinamide, vitamin B<sub>1</sub> and vitamin B<sub>6</sub>) were successfully separated by hydrophilic interaction chromatography (HILIC) with an amide type column employing around 70% ACN mobile phase. The elution order in the HILIC mode was reversed compared with that in the RP-HPLC mode. Further each sample was identified more selectively by the UV spectra obtained by the photo diode array detector. Assay of pharmaceutical preparations and soft drink containing VC was successful by the HILIC mode HPLC employing an internal substance method within a short analysis time.

**Keywords** : Water soluble vitamins, hydrophobic interaction, hydrophilic interaction, HPLC, core-shell type columns

1. は じ め に

医薬品の分離分析では、クロマトグラフィー、特にHPLC分析が汎用されており、多くの低分子合成医薬品や生薬由来の有効成分に対しては、C18カラムを用いる逆相 (reversed-phase, RP) モードでの定量法や純度試験法が設定されている<sup>1)</sup>。一方、ヒトゲノム解析後の研究の進展を経

て、近年では、ペプチド、タンパク質系医薬品（バイオ医薬品）が、その優れた臨床効果のため、多く開発・上市されている<sup>23)</sup>。また、メタボローム分析では、極性の高い化合物、例えば有機酸、アミノ酸、糖類が対象となる。これらの高極性の試料に対しては、上記の疎水性相互作用に基づく分離、いわゆる、逆相分離では、有機溶媒の割合を低くして分析条件を設定することになる。しかし、アスコルビン酸（ビタミンC）やニコチン酸アミドのような水溶性ビタミンでは、保持しにくいものが多い。

逆相分離が適さない水溶性医薬品で電荷を持つものに対しては、イオン交換HPLC分析が有効であり、抗体医薬品（バイオ医薬品）の精製工程等でも汎用されている。また、高極性化合物の分析には、順相クロマトグラフィー（normal phase-HPLC, NP-HPLC）が適用される。NP-HPLCのうち、逆相クロマトグラフィー（RP-HPLC）で用いる水と混和する有機溶媒、例えばアセトニトリル（acetonitrile, ACN）等と水との組み合わせを用いる系は、上記の有機酸、アミノ酸、糖類の分析に有効であり、特に親水性相互作用クロマトグラフィー（Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC）と呼ばれている<sup>47)</sup>。HILICの名称は、Alpertにより1990年に提案されたもので、既にアスコルビン酸（ビタミンC）の分析には、シリカゲルカラム（未修飾）やアミノプロピルカラムを用いるNP-HPLCが公定法として採用されている<sup>8)</sup>。近年、HILICモードでの分析は、メタボローム解析に多用されているが、カラム寿命や再現性等で問題が多く、改良が期待されている。

別に、HPLC分野では、従来の汎用タイプのカラム（内径4.6 mm、長さ150 mm、粒子径5  $\mu$  m）に対し、粒子径の小さな（約2  $\mu$  m）充てん剤カラムを用いるUltra-HPLC（UHPLC）法<sup>9-12)</sup>、更にカラム圧損が全多孔性の微小充てん剤に比べて低いコアシェル型カラムが登場した<sup>13)</sup>。我々のグループは、このコアシェル型カラムを用いるHPLC法に着目して、医薬品開発のスピードアップやハイスループットに対応すべく、さらに高い分離性能や分析時間の短縮を目的とした研究を行っている<sup>14-18)</sup>、近年、様々な固定相部位を持つコアシェル型HILICカラムが開発された。

本論文では、アスコルビン酸をはじめとする水溶性ビタミン類の同時分離分析について、既存のRP-HPLCによる分離について検討し、その結果を踏まえ、コアシェル型HILICカラムを用いるHPLC法での分離について検討を行った。また、日局で採用されている多波長検出器を用いて測定した各成分の紫外可視吸収スペクトルによる成分の確認法、内標準法によるアスコルビン酸を含む医薬品、清涼飲料水の定量法についても検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1 試料

カラム性能の確認のために用いたパラベン類：パラオキシ安息香酸メチル（メチルパラベン）、パラオキシ安息香酸エチル（エチルパラベン）、パラオキシ安息香酸プロピル（プロピルパラベン）、パラオキシ安息香酸イソプロピル（イソプロピルパラベン）、パラオキシ安息香酸ブチル（ブチルパラベン）、 $t_0$ （カラムのホールドアップタイム）のマーカー物質としてのウラシルは、和光純薬から試薬特級あるいは分析用を購入した。移動相に用いた有機溶媒類、メタノール（MeOH）及びACNは、同じく和光純薬からHPLC用を購入し、使用した。

用いた水溶性ビタミン類は、以下の通りですべて市販品を用いた。チアミン塩化物塩酸塩（vitamin B<sub>1</sub>、VB<sub>1</sub>）、リボフラビン（vitamin B<sub>2</sub>、VB<sub>2</sub>）、リボフラビンリン酸エステルナトリウ

ム (vitamin B<sub>2</sub> phosphate, VB<sub>2</sub>-P)、ピリドシキン塩酸塩 (vitamin B<sub>6</sub>, VB<sub>6</sub>)、シアノコバラミン (vitamin B<sub>12</sub>, VB<sub>12</sub>)、メコバラミン (mecobalamin, MeVB<sub>12</sub>)、ヒドロキシコバラミン (hydroxocobalamin, OHVB<sub>12</sub>)、ニコチン酸 (nicotinic acid, NA)、ニコチン酸アミド (nicotinamide, NAA)、アスコルビン酸 (vitamin C, VC)、イソアスコルビン酸 (isoascorbic acid, isoVC)、グルコシドアスコルビン酸 (ascorbic acid 2-glucoside, VC-Glc)。これらの構造式を図1に示す。これらは、各々水溶液 (0.1%) とし、適宜混合、あるいは希釈した溶液を分離検討用の試料溶液とした。また、製剤として、アスコルビン酸錠 (シナール配合錠、シオノギ) を、また、アスコルビン酸 (VC) 配合の市販清涼飲料水 (アクエリアスビタミン、日本コカコーラ) も用いた。メコバラミン錠としては、日本薬局方メコバラミン錠500 μg (エーザイ、トワ) を用いた。

パラベン及びウラシルは、それぞれ100 mgを100 mLのメスフラスコにとり、メタノールを加えて溶かし、100 mLとして各原液とした。分離検討用のパラベン混合液は、それぞれのパラベン及びウラシル原液、各々 10 mLを100 mLのメスフラスコに正確にとり、水を加えて100 mLとしたものを用いた。

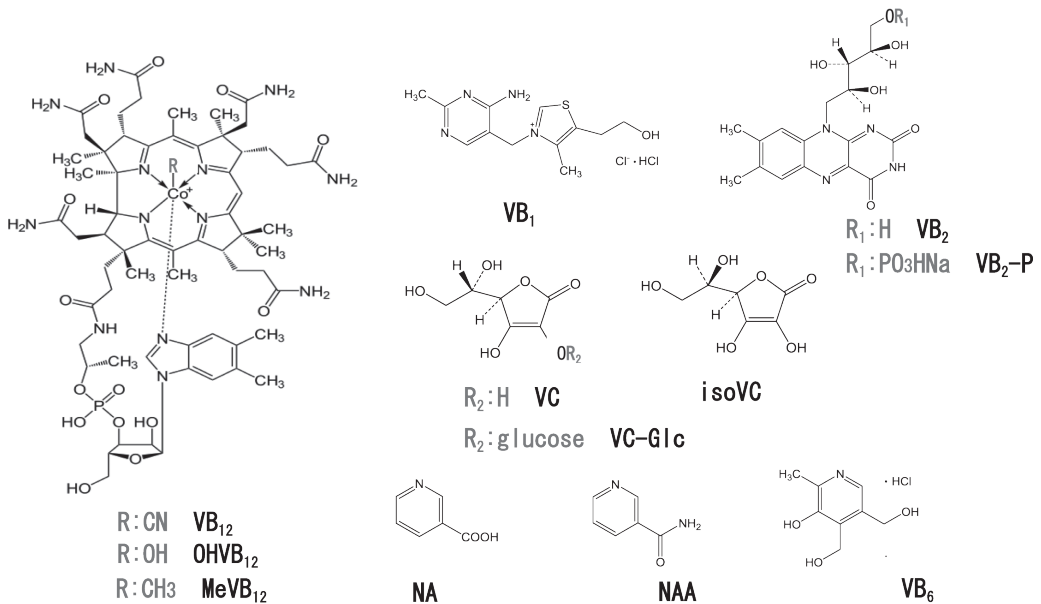


図1 検討に用いた水溶性ビタミンの構造式

## 2.2 装置

HPLC装置は、(株)島津製作所 (京都) 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/cm<sup>2</sup>)、オートインジェクターとしてはSIL-20ACを、検出器はSPD-M20A多波長検出器 (photo diode array detector, PDA)、システムコントローラはCBM-20A、カラムオーブンはCTO-20Aを、また、デガッサー DGU-20A3を使用した。なお、カラムから検出器までの配管は内径 0.1 mmのステンレス管を用いたが、検出器のセルは通

常の容量 10  $\mu\text{L}$  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。PDA の時定数 (レスポンス) 及びサンプリングタイムは、640 ms (初期設定値) から 80 ms に変更して用いた。

カラムは、コアシェル型の逆相カラムとして、Sunshell C18 (2.6  $\mu\text{m}$ 、4.6 mm i.d.  $\times$  100 mm)、Capcell Core C18 (2.7  $\mu\text{m}$ 、4.6 mm i.d.  $\times$  100 mm)、Kinetex 2.6  $\mu\text{m}$  C18 (2.6  $\mu\text{m}$ 、4.6 mm i.d.  $\times$  100 mm) を使用した。さらに、C18 カラムより疎水性部位が大である C30 カラムとして、Develosil XG-C30M-3 (3  $\mu\text{m}$ 、4.6 mm i.d.  $\times$  150 mm) も用いた。一方、コアシェル型の HILIC カラムとしては、Kinetex HILIC 100A (2.6  $\mu\text{m}$ 、4.6 mm i.d.  $\times$  100 mm)、Sunshell HILIC-Amide (2.6  $\mu\text{m}$ 、4.6 mm i.d.  $\times$  100 mm) を、固定相部位の選択性の検討のため、全多孔性の HILIC カラムとして、Inertsil HPLC COLUMN Amide (3  $\mu\text{m}$ 、4.6 mm i.d.  $\times$  150 mm)、Inertsil HPLC COLUMN HILIC (3  $\mu\text{m}$ 、4.6 mm i.d.  $\times$  150 mm) も用いた。HILIC カラムの固定相部位を図 2 に示す。ピークの理論段数  $N$ 、理論段高さ  $H$  及び分離度  $R_s$  は、Prominence 装置に搭載されているデータ解析ソフトを用いて計算した。検出モニターは UV 210 nm あるいは 254 nm、カラム温度は 40°C の一定温度とし、流量は 1 mL/min とした。

移動相は、RP-HPLC の場合は、薄めたリン酸 (1  $\rightarrow$  1000)、トリフルオロ酢酸 (TFA) (1  $\rightarrow$  1000)、あるいは 0.05 mol/L リン酸二水素カリウム水溶液に薄めたリン酸 (1  $\rightarrow$  10) あるいは 1 mol/L 水酸化ナトリウム液を加えて pH を調整した液 (pH 2.5  $\sim$  5.2) を緩衝液とし、これに対し、有機溶媒 ACN あるいは MeOH を適宜混合し、メンブランフィルター (0.45  $\mu\text{m}$ ) でろ過して使用した。HILIC の場合は、0.05 mol/L 酢酸アンモニウム、あるいは 0.05 mol/L ギ酸アンモニウムに、ACN あるいは MeOH を適宜混合し、メンブランフィルター (0.45  $\mu\text{m}$ ) でろ過して使用した。

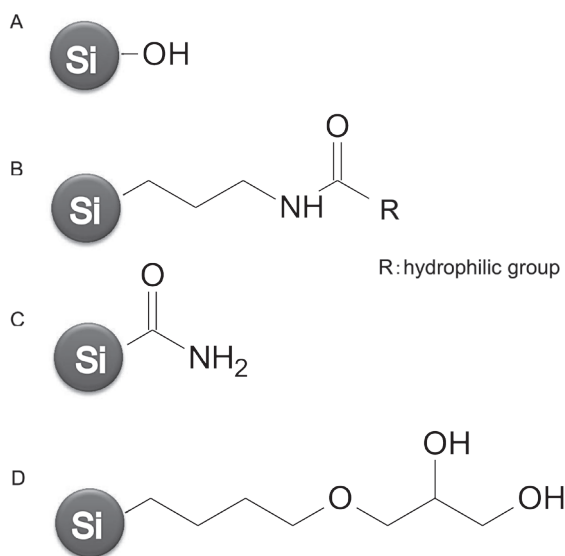


図 2 検討に用いた HILIC カラムの固定相部位

A: Kinetex HILIC 100A, B: Sunshell HILIC-Amide (R: 未開示), C: Inertsil HPLC COLUMN Amide, D: Inertsil HPLC COLUMN HILIC

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 疎水性相互作用を利用したHPLC（逆相カラム）による分析

2種類のVC類（isoVC及びVC-Glc）を除く10種類の水溶性ビタミン類に対して、コアシェル型のC18カラム（2.6  $\mu\text{m}$ 、100 mm）を用いる逆相モードでの分離について、リン酸塩緩衝液のpHを2.5から5.2まで変化させ、有機溶媒としてMeOHあるいはACNを適宜混合して検討した。その結果、検討したpH領域で有機溶媒の種類（ACNとMeOH）及びpHの違いが分離選択性に与える影響は少なく、溶出順、ピークの変換パターンはほぼ同じであった。

10種類の中で、比較的、疎水性の高いVB<sub>2</sub>群とVB<sub>12</sub>群については、ACNとMeOHの添加濃度が15～20%で良好な保持・分離が得られた。図3AにACN15%でのVB<sub>2</sub>群2種類とVB<sub>12</sub>の、図3BにACN18%でのVB<sub>12</sub>群3種類の分離例を示す。有機溶媒の数%の違いで大きく保持が影響され、図3B（18%）で2.8分に溶出したMeVB<sub>12</sub>は、図3A（15%）の条件では、19分に溶出した。図3Aで対象としたビタミン類は、輸液や点眼剤等の医薬品製剤の処方としてよく用いられる組み合わせ

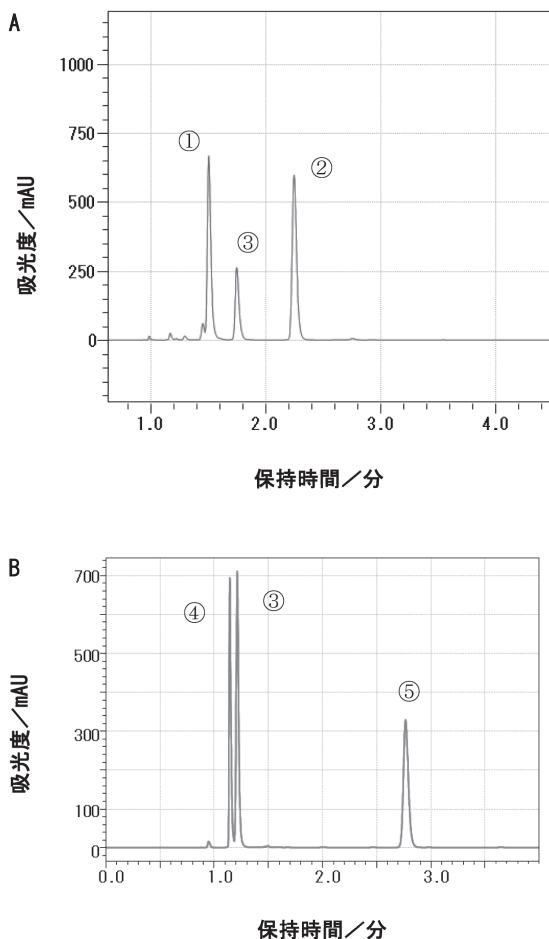


図3 RP-HPLCによる水溶性ビタミンの分離 (1) VB<sub>2</sub>群とVB<sub>12</sub>群の分離

移動相A: リン酸塩緩衝液 (pH 5.2) ACN15%, B: リン酸塩緩衝液 (pH 5.2) ACN18%  
 カラム: Kinetex C18 (2.6  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm  $\times$  10 cm), 254 nm, 40  $^{\circ}\text{C}$ , 1.0 mL/min  
 ピーク: ①VB<sub>2</sub>P, ②VB<sub>2</sub>, ③VB<sub>12</sub>, ④OHVB<sub>12</sub>, ⑤MeVB<sub>12</sub>

せパターンであり、これらの分離定量が3分以内で可能となった。一方、末梢神経血流改善等として汎用されるMeVB<sub>12</sub>は、VB<sub>12</sub>の金属Coに配位しているCN（シアノ基）が、CH<sub>3</sub>（メチル基）となっているビタミンであるが、3種類のなかでは最も疎水性が大きく最後に溶出した。そのためMeVB<sub>12</sub>を3分以内で溶出させる分析条件では、他の2種類は、カラムのt<sub>0</sub>直後にOHVB<sub>12</sub>、VB<sub>12</sub>の順に溶出した。なお、MeVB<sub>12</sub>には、錠剤と注射剤とがあるが、光に対して不安定であるため、遮光包装となっている。固体状態（原末及びメコバラミン錠）では比較的安定であったが溶液状態では速やかに分解する。図3Bの条件で溶液状態の安定性について検討した結果については既に報告したが<sup>15)</sup>、3000 Lux照射下に保存した場合で、溶解後10分でおおよそ30%がOHVB<sub>12</sub>に変換した。なお、図3の条件では、VCをはじめとするその他のビタミンは保持されなかった。

次に、VB<sub>2</sub>とVB<sub>12</sub>の条件（図3）では保持が弱かった残りのVC、NA、NAA、VB<sub>1</sub>、VB<sub>6</sub>について、有機溶媒の添加量をさらに低くして分離の検討を行った。その結果、ACNでは1%、MeOHでは5%添加条件で4分以内に分離されたがVCは保持されず、カラムのt<sub>0</sub>に溶出した。図4AにKinetex 2.6 μm C18 によるACN 1%での分離例を示す。なお、有機溶媒による分離選択

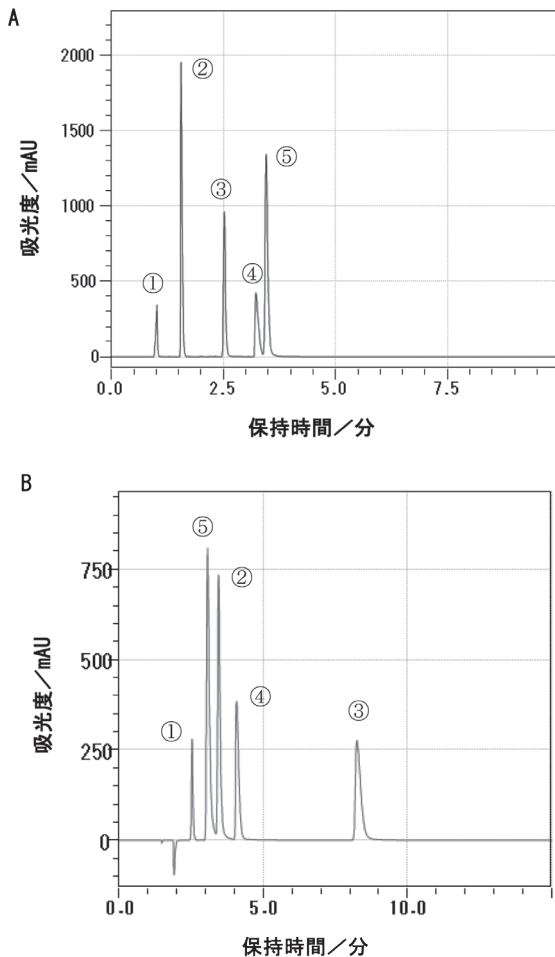


図4 RP-HPLCによる水溶性ビタミンの分離 (2) VCを含む5種類の分離

A: Kinetex C18 (2.6 μm, 4.6 mm × 100 mm), リン酸塩緩衝液 (pH5.2) ACN1%  
 B: Develosil XG-C30M-3 (5 μm, 4.6 mm × 150 mm), TFA (1 → 1000) 210 nm, 40°C, 1.0 mL/min, ピーク: ①VC, ②NA, ③VB<sub>6</sub>, ④VB<sub>1</sub>, ⑤NAA

性に差は認められず、他のコアシェル型C18カラムであるSunshell C18とCapcell Core C18でも同様の分離であった。

そこでカラムとしてC18よりも疎水性相互作用が強く働くと考えられるC30カラム（3  $\mu\text{m}$ 、150 mm）を用いて検討した。移動相として、有機溶媒添加なしの薄めたリン酸（1  $\rightarrow$ 1000）、TFA（1  $\rightarrow$ 1000）溶液を移動相として分析を行った。前者では、溶出は5分以内で $\text{VB}_1$  ( $t_0$ ) > VC > NAA > NA >  $\text{VB}_6$ 、後者では9分以内で $t_0$  > VC > NAA > NA >  $\text{VB}_1$  >  $\text{VB}_6$ となった。緩衝液の違いにより選択性が異なったが、リン酸塩緩衝液の系では保持されなかったVCが、わずかであるがTFA系で保持 ( $k = 0.2$ ) された。TFA（1  $\rightarrow$ 1000）での分離例を図4Bに示す。一方、これらの条件では、図3で検討した $\text{VB}_2$ 群と $\text{VB}_{12}$ 群は溶出せず、検討に用いた10種類の水溶性ビタミン類をRP-HPLCで一斉分離するためには、グラジエント溶出法が必要であることが分かった。

### 3.2 親水性相互作用を利用したHPLC（HILICカラム）による分析

次にRP-HPLCで保持の弱かった図4で検討に用いた5種類の水溶性ビタミンにisoVCあるいはVC-Gluを加えた混合液につき、HILICカラムによる分離を検討した。最初にHILIC分析で最も典型的な移動相組成である酢酸アンモニウム（0.05 mol/L）・ACN混液を用いて、図2に示した4種類のカラムで分離を行った。その結果、シリカベースであるKinetex HILICでは、ピークがテーリングし、また、ジオール型のInertsil HPLC COLUMN HILICにおいても同様であった。一方、アミド型のSunshell HILIC-AmideとInertsil HPLC COLUMN Amideでは、分離選択性が大きく異なったものの、良好なピーク形状が得られ、特に前者では約5分で7種類の分離が達成された。図5にACN 70%での分離例を示す。逆相モードでの分離のときのようにカラム種により $\text{VB}_1$ の選択性が大きく異なったが、保持の弱かったVCが保持されることが分かった。特にSunshell HILIC-Amideでは、VCとその異性体isoVC、またVC-Glcとも良好に分離された<sup>17)</sup>。なお、図5BでのNAA、 $\text{VB}_1$ 、 $\text{VB}_6$ 、NA、VCの溶出順は、C18カラムによるRP-HPLCでの分離（図4A）と全く逆となり、試料と固定相間で作用している相互作用が逆であることを示した。

図5よりカラムとしてSunshell HILIC-Amideを選択し、VCの定量のための移動相条件の検討を行った。まず、有機溶媒としてACNに変えてMeOHを用いて検討を行ったところ、溶出順に差はなくMeOH 70%では、ACN 70%分析とほぼ同じ保持を示した。しかし、isoVCとVCとの分離度はACNでは3.6であったのに対し、MeOHでは2.0であり、この両者の分離ではACNが優れていることが分かった。そこで有機溶媒をACNとしてその添加濃度と保持の関係を検討した。結果を図6に示す。有機溶媒の濃度が高くなるにつれ、保持時間は大きくなり、RP-HPLCとは逆の関係を示し、親水性相互作用が働いていることを示した。有機溶媒%変化に対する保持時間の変化については、図から変化の小さい試料（NAA及び $\text{VB}_6$ ）と大きく影響される試料（NA、 $\text{VB}_1$ 、VC、isoVC）とがあることが分かった。ACN 70%では $\text{VB}_6$ より早く溶質した $\text{VB}_1$ は、ACN 75%以降では溶出が逆転している。これら影響の大きい試料を見ると解離基を有するか、電荷を持つ化合物であり、保持に親水性相互作用が大きく働いているものと判断された。次にACN添加濃度を70%とし、緩衝液の塩濃度について25 ~ 100 mmol/Lの範囲で検討した。結果、塩濃度は保持時間とピーク形状に大きな差を与えなかった。なお、図5Bと図6とで同じ有機溶媒濃度（70%）でありながら、保持時間の違いが認められる。これについては後述するが、HILICカラムを用いて移動相の条件検討を行っている間での固定相の変化（劣化）と思われる。

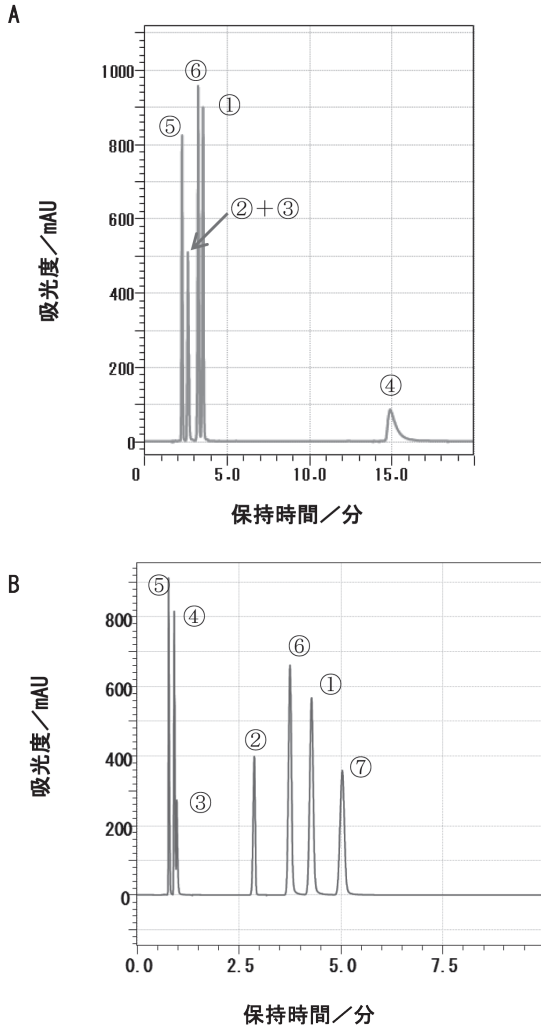


図5 アミド型HILICカラムによる水溶性ビタミン7種類の分離

カラム：A: Inertsil HPLC COLUMN Amide (3  $\mu$ m, 4.6 mm $\times$ 150 mm), B: Sunshell HILIC-Amide (2.6  $\mu$ m, 4.6 mm $\times$ 100 mm)  
 移動相: 0.05 mol/L酢酸アンモニウム・ACN = 30:70, 254 nm, A: 1.0 mL/min B: 1.5 mL/min  
 ピーク：①VC, ②NA, ③VB<sub>6</sub>, ④VB<sub>1</sub>, ⑤NAA, ⑥isoVC, ⑦VC-Glc

### 3.3 多波長検出器 (PDA) による確認

医薬品の「規格及び試験方法」には、その品質および特性を評価するための試験項目が採用される。この「規格及び試験方法」の典型的な例としては、日局収載医薬品の各条がある。原薬では、性状、確認試験、純度試験、定量法などが、製剤では、これらに加えて溶出試験や含量均一性試験が設定される<sup>1,19)</sup>。原薬及び製剤両者において、確認試験は必ず設定しなければならない試験項目であり、製剤では一般的に紫外可視吸光度 (UV/VIS) 法がよく用いられている。医薬品の純度試験や定量法には、ほとんどの場合、HPLC法による試験法が設定されているが、検出器としてPDAを用いると分離成分のUV/VIS吸収スペクトルを得ることができる。17局より、PDAによるUV/VISスペクトルを用いた成分確認が使用可能となっている<sup>1)</sup>。図4のクロマトグラムにつき、PDAで得られた各ピークのUV吸収スペクトルを図7に示す。それぞれを区別でき、これら成分のより特異性の高い確認が可能であった。



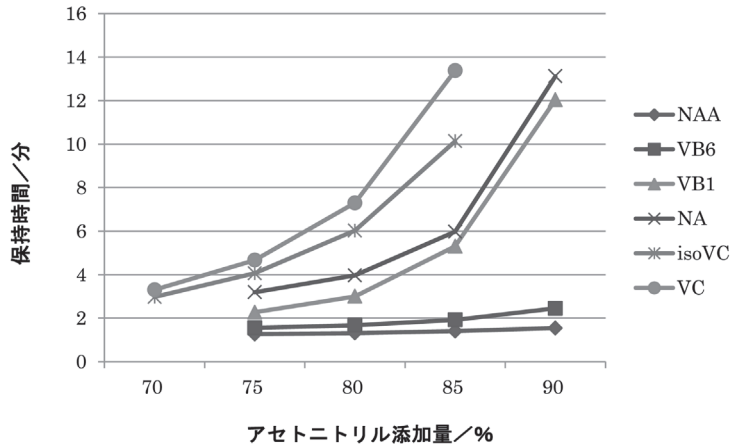


図6 アミド型HILICカラムでの有機溶媒濃度と保持の関係

カラム：Sunshell HILIC-Amide, 40℃, 移動相：0.05 mol/L酢酸アンモニウム緩衝液とACN

### 3.4 定量法への応用

図5Bの条件で、VCを含む製剤（シナール錠、ラベル表示 200 mg/ 1 錠）と清涼飲料水（ラベル表示VC 200 mg/100 mL）につき、内標準物質をisoVCとした定量法を検討した。以下に定量法を記す。

試料 200 mgを含む試料、シナール錠では1 錠をとり、200 mLのメスフラスコに入れ、水を加えてよく振り混ぜる。必要であれば超音波処理を行う。この液につき、メンブランフィルター（0.45 μm）でろ過する。ろ液 2 mLを正確に量り、20 mLのメスフラスコに入れ、内標準溶液 2 mLを正確に加え、水を加えて 20 mLとし試料溶液とする。上記清涼飲料水の場合は、1 mLを正確に量り、20 mLのメスフラスコに入れ、内標準溶液 2 mLを正確に加え、水を加えて20 mLとし試料溶液とする。別にVC原末約 100 mgを精密に量り、100 mLのメスフラスコに入れ、水を加えて溶かし、正確に100 mLとする。この液 2 mLを正確に量り、20 mLのメスフラスコに入れ、内標準溶液 2 mLを正確に加え、水を加えて 20 mLとし標準溶液とする。試料溶液および標準溶液のそれぞれ10 μLにつき、図5Bの条件でHPLC分析を行い、それぞれの液の内標準物質のピーク面積に対するVCのピーク面積の比AtおよびAsを求め、以下の式によりVCの量を求める。

$$\begin{aligned} & \text{シナール 1 錠あるいは飲料 1 mLに含まれるVC (mg)} \\ & = \text{VC原末の採取量 (mg)} \times (\text{At} / \text{As}) \times 2 \end{aligned}$$

内標準溶液：isoVCのメタノール溶液（1 →1000）

繰り返し3回定量した結果を表1に示す。正確にはプラセボを用いたバリデーション（添加回収実験ほか）が必要であるが、結果を見るとほぼ定量的に測定できているものと思われる。なお、安定性に劣るVCに対しては、含量範囲の上限は表示量の120%まで許容されている<sup>19)</sup>。清涼飲料水での測定結果108%は、妥当な値と判断される。同様にビタミンB群に対しては、上限は

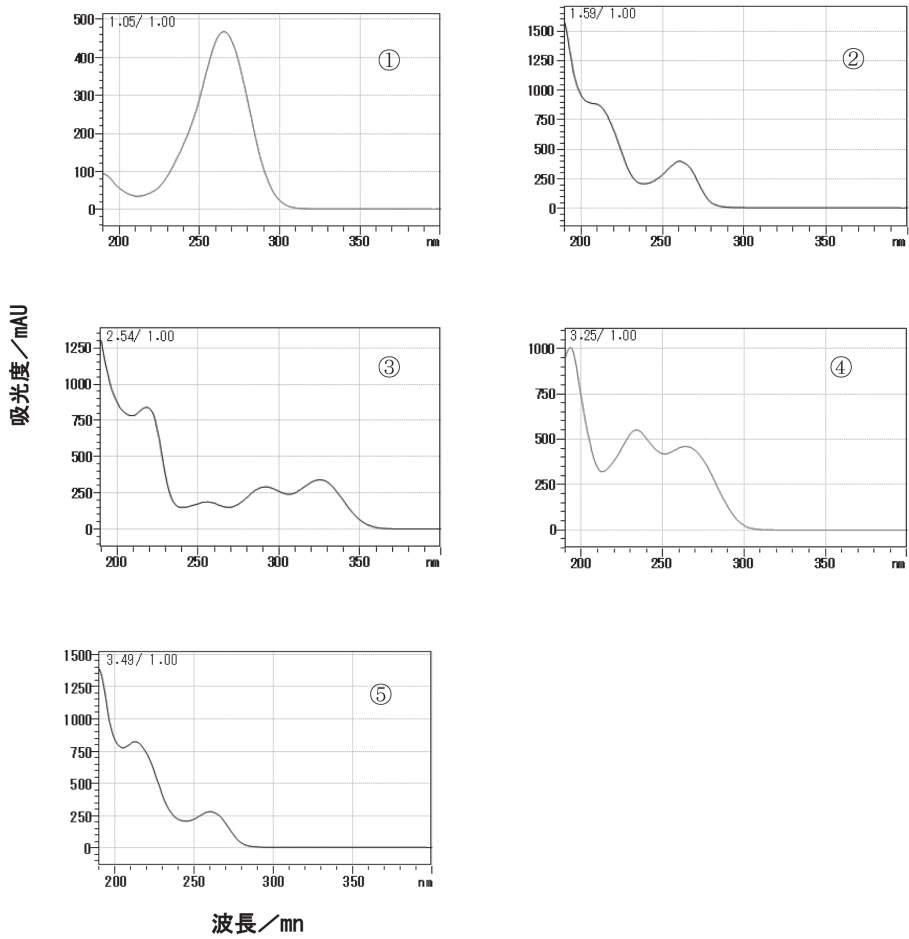


図7 PDA検出によるピークのUV吸収スペクトル

番号は図4Aのピーク番号と同じ (①VC, ②NA, ③VB<sub>6</sub>, ④VB<sub>1</sub>, ⑤NAA)

表1 HILICモードでの医薬品及び清涼飲料水中のVCの定量 (%)

測定回数	シナール錠 200	清涼飲料水
1	103.4	107.3
2	99.0	107.6
3	98.6	108.1
平均	100.3	107.7

115%まで許容されている<sup>19)</sup>。

#### 4. ま と め

以上、水溶性ビタミン類のHPLC分析では、比較的、疎水性の高いVB<sub>2</sub>群とVB<sub>12</sub>群 5種類については、コアシェル型C18カラムを用いるRP-HPLCにより、ACNとMeOHが15～20%で良好な保持・分離が短時間で得られた。一方、RP-HPLCで保持の弱かったVCを含む残り7種類については、Sunshell HILIC-Amideカラムを用いるHILICモードにより、ACN 70%で良好に保持されることが分かった。また、PDAによるUV吸収スペクトルを用いることでこれら成分のより特異性の高い確認、さらにVCについては内標準法による定量法が5分以内で可能であった。NP-HPLCでは再現性が劣るアミノプロピルカラム等と比べるとSunshell HILIC-Amideカラムでは、比較的再現性の良い保持時間を与えたものの、やはり使用時間の経過（試料注入回数や量）とともに保持時間の変動が認められ、カラムの洗浄法等の検討、あるいはプレカラムの使用が必要と思われた。

#### 5. 謝 辞

本論文をまとめるにあたり、薬学科創薬学講座薬品分析化学分野配属の多谷本祥子さん（2期生）、篠原 舞さん（4期生）及び梅田雅美さん（5期生）の卒業研究におけるデータの一部を盛り込みました。実験及びデータの取得に感謝いたします。

#### 引 用 文 献

1. 第十七改正日本薬局方解説書, 廣川書店, (2016).
2. 日本製薬工業協会 産業ビジョン2025「世界に届ける創薬イノベーション-ビジョン①-」  
[http://www.jpma.or.jp/about/jpma\\_info/pdf/reference.pdf](http://www.jpma.or.jp/about/jpma_info/pdf/reference.pdf)
3. EvaluatePharma."World Preview 2014, Outlook to 2020" (2014).
4. Alpert, A. J., *J. Chromatogr.*, 499, pp.177-196 (1990).
5. Strege, M. A., *Anal. Chem.*, 70, pp.2439-2445 (1998).
6. Alpert, A. J., *Anal. Chem.*, 80, pp.62-76 (2008).
7. McCalley, D.V., Neue, U. D., *J. Chromatogr. A*, 1192, pp.225-229 (2008).
8. 日本薬学会編「衛生試験法 注解2010」p.247 (2010).
9. C. Sanchez, T. Farkas, *Am. Lab.*, 44, pp.11-14 (2012).
10. N. Nagase and T. Tsukamoto, *Chromatography*, 34 (1), pp.41-47 (2013).
11. E.L.Regalado, P. Zhuang, Y. Chen, A. A. Makorov, W. A. Schafer, N. McGachy, C. Welch, *Anal. Chem.*, 86 (1), pp.805-813 (2014).
12. S. Fekete, J. Schappler, J-L. Veuthey, D. Guillaume, *Trends in Anal. Chem.*, 63, pp.2-13 (2014).
13. Hayer, R., Ahmed, A., Edge T., Zhang H., *J. Chromatogr. A*, 1357, pp.36-52 (2014).
14. 多谷本祥子, 宮脇温子, 西 博行, "コアシェル型充てん剤を用いたUHPLC法による水溶性ビタミン類の一斉迅速分析", 日本分析化学会第62年会 (東大阪), 要旨集Y1072 (2013).
15. H. Nishi and K. Nagamatsu, *Anal. Sci.*, vol.30, pp.205-211 (2014).
16. 篠原 舞, 森田志保美, 永田智沙, 河野早苗, 武田朋子, 西 博行, "コアシェル型HILIC-Amideカラムによるアスコルビン酸類の分離及び定量法の開発", 第22回クロマトグラフィーシンポジウム (東大阪), 要旨集P-06, p.27 (2015).

17. 梅田雅美, 篠原 舞, 内田佳那, 寄江智美, 西博行, “Dual mode (逆相+イオン交換) カラムによる水溶性薬物の分析法の開発-アスコルビン酸類の一斉分離法の開発と定量応用-”, 第23回クロマトグラフィーシンポジウム (甲府), 要旨集P-01, p.21 (2016).
18. 泉田莉菜, 荒木菜子, 砂山博文, 稲垣昌宣, 西 博行, “コアシェル型カラムによる生薬成分分析 (4) センナの品質評価法の開発”, 第24回クロマトグラフィーシンポジウム (仙台), 要旨集P-03, p.28 (2017).
19. 監修 レギュラトリーサイエンス学会, 医薬品製造販売指針2015, じほう社, (2015).

[2017. 9. 28 受理]

コントリビューター：大山 義彦 教授 (薬学科)