

米国薬局方 (USP) やヨーロッパ薬局方 (EP) ではシステム適合性の要件を満たすことで、LCカラムや装置条件等を変更することができます。USPの場合はGeneral Chapter <621> Chromatography、EPの場合にはGeneral Chapter 2.2.46 Chromatographic separation techniquesにカラムサイズ等の許容される範囲にて示されています。両薬局方ともに条件変更が許されておりますが変更可能範囲が異なる項目もあります。従来、USPではグラジエント条件の変更が許されていませんが、2022年12月からはグラジエント条件の変更も可能になりました。許容される変更許容範囲内で条件を作成することで分析の高速化が期待できます。

今回は、USP レボセチリジン錠剤の不純物試験についてUSP General Chapter <621> Chromatographyにて許容される範囲内で条件を変更し、分析時間を短縮することで高速化した例をご紹介します。

(K. Kanno)

USPにおける変更可能な項目

USP General Chapter <621> Chromatography ではシステム適合性の要件を満たすことで、LCカラムや装置条件等を変更が許容されています。

<カラム条件の変更許容範囲>

	イソクラティック	グラジエント
官能基	変更不可	
粒子径, dp	L/dpの比または理論段数が-25%から+50%の範囲	
カラム長さ, L		
カラム内径, dc	変更可能(変更後は流量、注入量を調整)	

F₁ 変更前の流量, mL/min
 F₂ 変更後の流量, mL/min
 L₁ 変更前のカラム長さ, mm
 L₂ 変更後のカラム長さ, mm
 dp₁ 変更前のカラム粒子径, μm
 dp₂ 変更後のカラム粒子径, μm
 dc₁ 変更前のカラム内径, mm
 dc₂ 変更後のカラム内径, mm
 Vinj₁ 変更前の注入量, μL
 Vinj₂ 変更後の注入量, μL
 t_{G1} 変更前のグラジエント時間, min
 t_{G2} 変更後のグラジエント時間, min
 t_c デュエルボリューム補正後のグラジエント時間, min
 t グラジエント時間, min
 D₀ 変更前装置のデュエルボリューム, mL
 D 変更後装置のデュエルボリューム, mL
 F 変更後の流量, mL/min

<装置条件の変更許容範囲>

	イソクラティック	グラジエント
流量	次の計算式の流量 $F_2 = F_1 \times [(dc_2^2 \times dp_1) / (dc_1^2 \times dp_2)]$ イソクラティックはF ₂ ± 50%の範囲でさらに変更可能	
注入量	次の計算式の注入量 $V_{inj2} = V_{inj1} (L_2 \times dc_2^2) / (L_1 \times dc_1^2)$	
UV波長	変更不可	
カラム温度	± 10°C	± 5°C

<移動相条件の変更許容範囲>

	イソクラティック	グラジエント
pH	± 0.2	
緩衝液濃度	± 10%	
組成	組成の低い溶液について ± 30%(相対)または ± 10%(絶対)の小さい方	特定の条件で変更可能 (詳細はUSP参照)
グラジエント時間	-	次の計算式で補正 $t_{G2} = t_{G1} \times (F_1 / F_2) \times [(L_2 \times dc_2^2) / (L_1 \times dc_1^2)]$ 必要に応じてデュエルボリュームで補正 $t_c = t - (D - D_0) / F$

※本テクニカルノートはUSP43 NF38 page6853 General Chapter <621> Chromatographyを基に該当部分を日本語で記載しています。詳細はUSP記載の英語原文をご確認ください。

USP Levocetirizine Dihydrochloride Tablets – ORGANIC IMPURITIES- 分析例

USP レボセチリジン錠剤 –不純物試験-を分析例として、USP General Chapter <621> Chromatographyに規定される変更可能範囲内で次のような手順にて条件を変更して高速化条件を設定して分析を行いました。

USP記載のカラムサイズは、カラム長さL 250 mm 粒子径dp 5 μmであり、L/dpの値は50,000となります。L/dpの値が-25%～+50%の範囲で変更可能であるため、変更可能なL/dp範囲は次のようになります。

$$37,500 \leq L/dp \leq 75,000$$

下表はこの範囲に入るカラムサイズ例です。

長さ (L, mm)	内径 (dc, mm)	粒子径 (dp, μm)	Relative Values	
			L/dp	流量 (F, mL/min)
250	4.6	5	50,000	1.0
150	4.6	3	50,000	1.7
150	3.0	3	50,000	0.7
150	2.1	3	50,000	0.3
125	3.0	3	41,700	0.7
100	4.6	2	50,000	2.5
100	3.0	2	50,000	1.1
100	2.1	2	50,000	0.5
75	3.0	2	37,500	1.1

上表の通り、高速化条件は複数のカラムサイズから選択可能ですが、分析環境(例:分析装置の最適流量や耐圧、カラムサイズのラインアップ)等によって最適なカラムを選択します。

今回は、粒子径dp=3 μmと内径dc=3.0 mmのカラムを選択し、高速化条件を下表のように設定しました。

	USP記載条件	変更可能範囲	高速化条件
カラム長さ(L, mm)	250 mm	粒子径3 μmの場合	150 mm
カラム粒子径(dp, μm)	5 μm	113～225 mm	3 μm
L/dp	50,000	(L/dp=37500～75000)	50,000
内径(dc, mm)	4.6 mm	内径3.0 mmの場合	3.0 mm
流量(F, mL/min)	1.0 mL/min	0.35～1.06 mL/min	1.0 mL/min*

*今回はアセトニトリル/水系移動相を使用するHILICモードでカラム圧力が高くなりにくい条件であり、かつ、システム適合性の要件に流量によって変化する理論段数についての規定がないため、流量は変更可能範囲で最大に近い1.0 mL/minとしました。

<クロマトグラム>

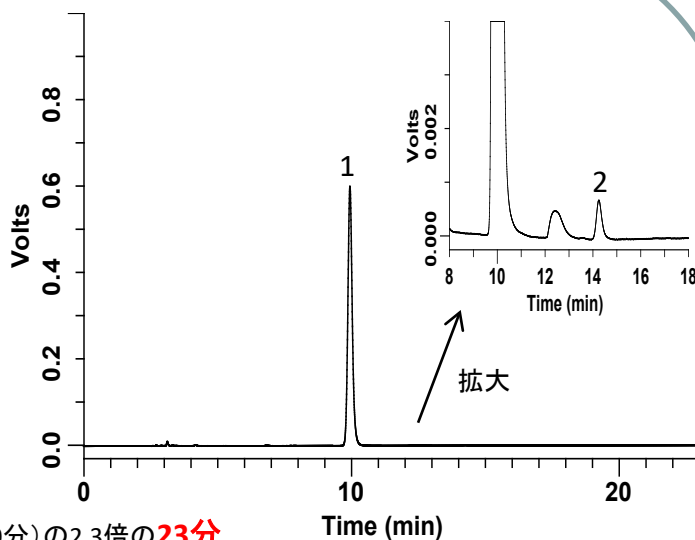
USP記載条件の分析時間は23分であり、高速化条件では分析時間は5.75分と、分析時間は約1/4にすることができました。USP レボセチリジン錠剤の不純物試験ではレボセチリジンピークの保持時間の2.3倍の時間まで分析すると規定されており、分析時間が長くなります。また、この分析は未修飾シリカを使用したHILICモードであるためカラムの平衡化には移動相を未充填カラム容量の30倍以上通液することが推奨され、カラムを安定させるまでも長い時間を要します。

許容される範囲で条件を変更し高速化することで、分析時間の短縮の他に、未充填カラム容量の小さいカラムを使用することになるため平衡化に要する時間の短縮にもつながっています。

1. Levocetirizine (0.2 mg/mL)
2. Chlorobenzhydryl Piperazine (0.2 mg/mL)

HPLC条件(USP 記載条件)

カラム : Inertsil SIL-100A
(5 μm, 250 x 4.6 mm I.D.)
Cat. No. : 5020-01712
移動相 : CH₃CN/H₂O/1 M H₂SO₄ in H₂O
=93/6.6/0.4, v/v/v
流量 : 1.0 mL/min
カラム温度 : 30 °C
検出 : UV 230 nm
注入量 : 20 μL



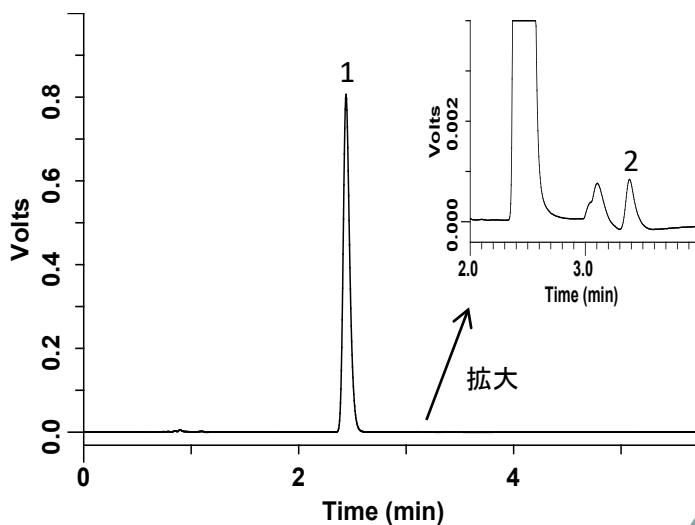
分析時間はレボセチリジンの保持時間(約10分)の2.3倍の**23分**



ハイスループット化!

HPLC条件(高速化条件)

カラム : Inertsil SIL-100A
(3 μm, 150 x 3.0 mm I.D.)
Cat. No. : 5020-04225
移動相 : CH₃CN/H₂O/1 M H₂SO₄ in H₂O
=93/6.6/0.4, v/v/v
流量 : **1.0 mL/min**
カラム温度 : 30 °C
検出 : UV 230 nm
注入量 : **10 μL***



分析時間はレボセチリジンの保持時間(約2.5分)の2.3倍の**5.75分**

<システム適合性結果>

USP記載条件、高速化条件の結果は下表のとおりになり、両条件ともにシステム適合性の要件を満たし良好な結果が得られました。

		基準	USP記載条件		高速化条件	
分離度 (ピーク1とピーク2)		3以上	11.7	PASS	7.31	PASS
テーリングファクター (ピーク1)		2未満	1.21	PASS	1.28	PASS
RSD%	ピーク1	1.0%未満	0.18%	PASS	0.05%	PASS
	ピーク2	5.0%未満	2.11%	PASS	0.89%	PASS

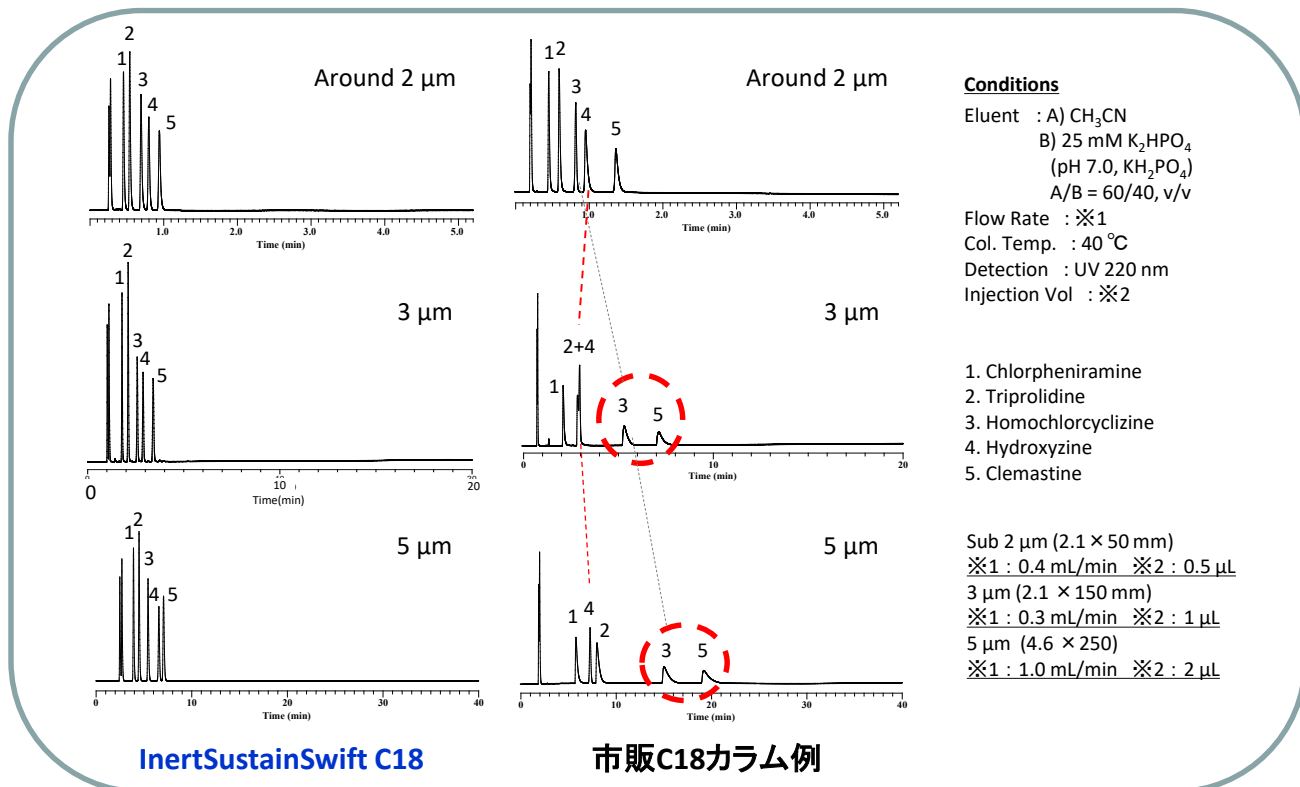
カラム選択のポイント

高速化のために条件を変更する場合は、多くの場合で小さい粒子径の充填剤を使用します。

そのため、異なる粒子径間でも分離パターンが変わらない充填剤を使用して条件検討することが重要なポイントになります。

市販カラムでは、同じカラム名(充填剤)であっても粒子径が異なると、シリカゲル母体の製造方法が異なる等の影響により粒子径間で分離パターンが変わるケースがあります。

ジーエルサイエンスのLCカラムInertsil/InertSustainシリーズは自社でシリカゲルから合成しているため、異なる粒子径間で分析条件を移行する分析の場合でもおすすめできます。



分析カラム

Inertsil SIL-100A 5 μm, 250 × 4.6 mm I.D.

Cat.No. 5020-01712

Inertsil SIL-100A 3 μm, 150 × 3.0 mm I.D.

Cat.No. 5020-04225

Inertsil SIL-100の出荷時封入溶媒はヘキサン/エタノールです。レボセチリジンの分析では水を含むHILICモードで使用するため、使用開始前にエタノールで十分にカラムを置換してから移動相を流すようにしてください。また、エタノール置換後の移動相によるカラム平衡化の際には、未充填カラム容量の30倍以上の通液を推奨いたします。

<未充填カラム容量> 250 × 4.6 mm I.D. :約4.2 mL

150 × 3.0 mm I.D. :約1.1 mL



ジーエルサイエンス株式会社

〒163-1130 東京都新宿区西新宿 6-22-1 新宿スクエアタワー 30F
 TEL.03-5323-6611 FAX.03-5323-6622

※各試験法は、変更される場合がありますので、分析の前に確認されることをお薦めします。

データに起因し、直接的または間接的に生じたいかなる損害に対しても、当社が責任をおうものではありません。また、記載事項につきましては、予告無しに改訂する場合がありますので、あらかじめご了承ください。

カスタマーサポートセンターでは、ノウハウのご提供と分析に関するフォローを行っております。お困りの際には、カスタマーサポートセンターまでお気軽にお問い合わせください。

カスタマーサポートセンター (土・日・祝除く9:00-17:00)

☎ 04-2934-1100 ✉ info@gl.s.co.jp



【アプリケーションの検索はこちら】

https://www.gl.s.co.jp/technique/app/app_search.html