

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が示されています。両薬局方ともに条件変更が許されてい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となりました。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 アセトアミノフェンカプセルのAssay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、分析時間を短縮した例をご紹介します。

(S. Mashiko)

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)	

F_1 変更前の流量, mL/min
 F_2 変更後の流量, mL/min
 L_1 変更前のカラム長さ, mm
 L_2 変更後のカラム長さ, mm
 dp_1 変更前のカラム粒子径, μm
 dp_2 変更後のカラム粒子径, μm
 dc_1 変更前のカラム内径, mm
 dc_2 変更後のカラム内径, mm
 V_{inj1} 変更前の注入量, μL
 V_{inj2} 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
 D_0 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 $F_2 \pm 50\%$ 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	$\pm 10^\circ\text{C}$	$\pm 5^\circ\text{C}$

<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	$\pm 10\%$	
組成	組成の低い溶液について $\pm 30\%$ (相対) または $\pm 10\%$ (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 Acetaminophen Capsules –Assay– 分析例

USP アセトアミノフェンカプセル–Assay–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で条件を変更し、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 300 mm 粒子径dp 10 μmであり、L/dpの値は30,000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。

$$22,500 \leq L/dp \leq 45,000$$

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)
150	4.6	5	30,000	4.17
150	3.0	5	30,000	1.78
100	4.6	3	33,333	6.96
100	3.0	3	33,333	2.96
100	2.1	3	33,333	1.45
75	4.6	3	25,000	6.96
75	3.0	3	25,000	2.96
75	2.1	3	25,000	1.45
75	4.6	2	37,500	10.43
75	3.0	2	37,500	4.44
75	2.1	2	37,500	2.17
50	4.6	2	25,000	10.4
50	3.0	2	25,000	4.44
50	2.1	2	25,000	2.17

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=5 μm、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)	300 mm	粒子径5 μmの場合 112.5 ~ 225 mm (L/dp=22,500~45,000)	150 mm
カラム粒子径(dp)	10 μm		5 μm
L/dp	30,000		30,000
内径(dc)	3.9 mm	内径3.0 mmの場合	3.0 mm
流量(F)	1.5 mL/min	0.89 ~ 2.66 mL/min	1.0 mL/min*

*今回は下記2点の理由から流量を1.0 mL/minと設定しました。

- ①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ある。
- ②変更可能範囲内で流量を過度に大きくすると汎用のカラム耐圧を超えてしまう恐れがある。

<クロマトグラム>

USP記載条件では移動相流量が1.5 mL/min、アセトアミノフェン溶出時間は4.0分であり、高速化条件では移動相流量が1.0 mL/min、溶出時間は1.7分と、移動相流量を2/3、分析時間を1/2以下にすることができました。

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、使用溶媒量の削減にもつながっています。

HPLC条件(USP 記載条件)

カラム : Inertsil ODS-3
 (10 μm , 300 x 3.9 mm I.D.)
Cat. No. : 5020-87016
移動相 : $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$
 =25/75, v/v
流量 : 1.5 mL/min
カラム温度* : 40 °C
検出 : UV 243 nm
注入量 : 10 μL

アセトアミノフェンの保持時間: **4.0分**

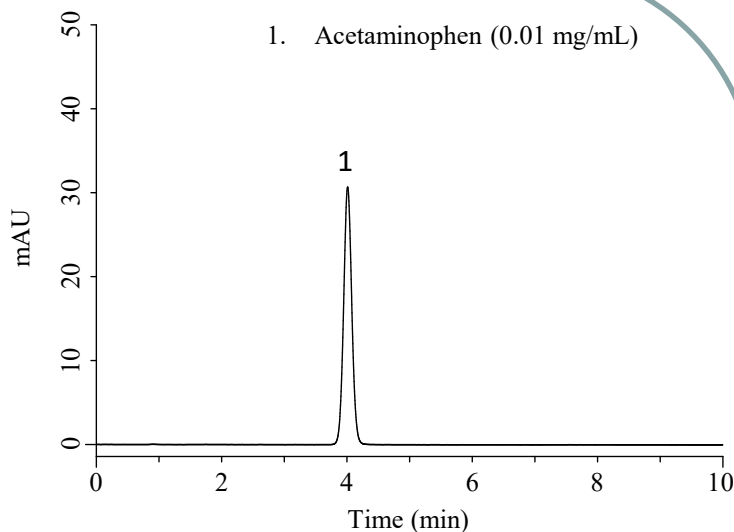


ハイスループト化!

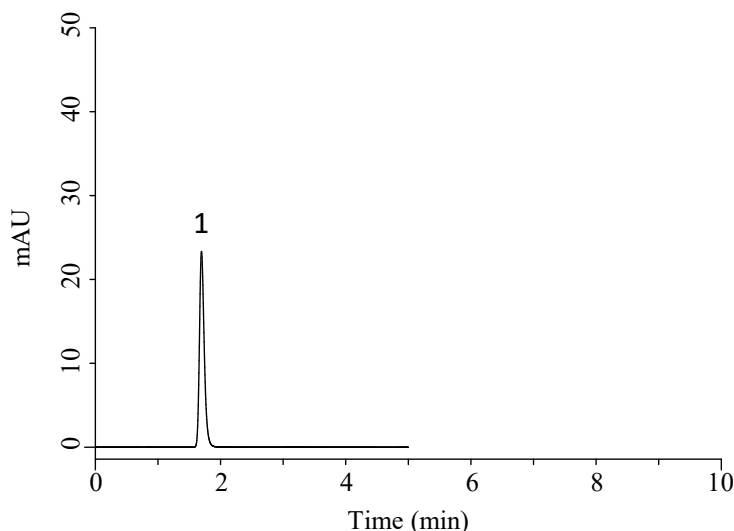
HPLC条件(高速化条件)

カラム : Inertsil ODS-3
(5 μm , 150 x 3.0 mm I.D.)
Cat. No. : 5020-01751
移動相 : $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$
 =25/75, v/v
流量 : **1.0 mL/min**
カラム温度 : 40 °C
検出 : UV 243 nm
注入量 : **3 μL**

アセトアミノフェンの保持時間: **1.7分**



*カラム温度についてはUSPに条件の記載がないため、今回は40 °Cに設定しました。

**<システム適合性結果>**

USP記載条件、高速化条件での分析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	
理論段数	1,000以上	4,436	PASS	2,498	PASS
テーリングファクター	2未満	1.0	PASS	1.3	PASS
RSD% (n=6)	2.0%未満	0.06%	PASS	0.05%	PASS

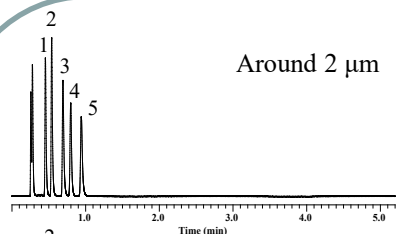
カラム選択のポイント

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。

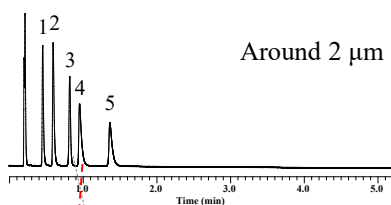
そのため、異なる粒子径間でも分離パターンが変わらない充填剤を使用して条件検討することが重要なポイントになります。

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。

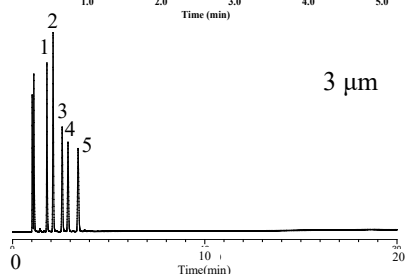
ジーエルサイエンスのLCカラムInertsil/InertSustainシリーズは自社でシリカゲルから合成しているため、異なる粒子径間で分析条件を移行する分析の場合でもおすすめできます。



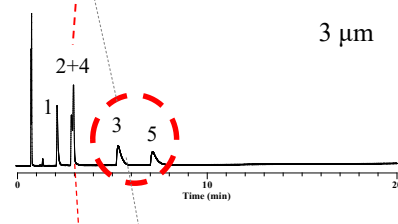
Around 2 μm



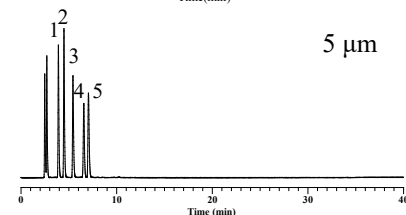
Around 2 μm



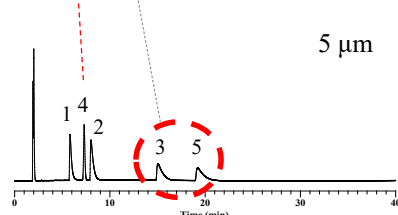
3 μm



3 μm



5 μm



5 μm

Conditions

Eluent : A) CH₃CN
 B) 25 mM K₂HPO₄ in H₂O
 (pH 7.0, 25 mM KH₂PO₄ in H₂O)
 A/B = 60/40, v/v
 Flow Rate : ※1
 Col. Temp. : 40 °C
 Detection : UV 220 nm
 Injection Vol. : ※2

1. Chlorpheniramine
2. Triprolidine
3. Homochlorcyclizine
4. Hydroxyzine
5. Clemastine

Sub 2 μm (2.1 × 50 mm)
 ※1 : 0.4 mL/min ※2 : 0.5 μL
 3 μm (2.1 × 150 mm)
 ※1 : 0.3 mL/min ※2 : 1 μL
 5 μm (4.6 × 250)
 ※1 : 1.0 mL/min ※2 : 2 μL

InertSustainSwift C18

市販C18カラム例

分析カラム

Inertsil ODS-3 10 μm, 300 × 3.9 mm I.D. Cat.No. 5020-87016

Inertsil ODS-3 5 μm, 150 × 3.0 mm I.D. Cat.No. 5020-01751



製品・技術に関するご相談

カスタマーサポートセンター
 TEL.04-2934-1100
 受付時間：9:00～12:00 13:00～17:00
 (土・日・祝日・弊社休日を除く)

お問い合わせフォーム



- 各試験法は、変更される場合がありますので、分析をご検討される前に確認されることをお勧めいたします。
- 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、当社が責任を負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。
- 本資料に掲載している製品をご使用する際には、必ず「取扱説明書」をよくお読みください。のうえ、正しくお使いください。

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

https://www.gls.co.jp