

# Application News

## No. L542

高速液体クロマトグラフィー

### 日米欧三薬局方国際調和案による リネゾリドの高速分析例

リネゾリドはオキサゾリジノン系骨格を有する新しいクラスの合成抗菌薬です(図1)。アメリカでは2000年に、日本では2001年に治療薬として承認を得ています。2017年に発行された米国薬局方(USP)第40版 Second Supplement にこのリネゾリドが記載されました。

一方で、検討が進められている各局方の国際調和において、国際調和案<sup>1)</sup>に試験条件の調整範囲が明記されています。各国が共通の調整範囲をもって分析条件を高速化することは、医薬品開発の効率化に重要です。

ここでは、Nexera™シリーズおよび Shim-pack Scepter™ C18 を用いて、USP に基づいてリネゾリドを分析した例と国際調和案に基づいてその分析を高速化した例をご紹介します。なお、国際調和案につきましては、2017年7月のパブリックコメントを募集する際に掲載された案に基づいており、最終的に採用される内容とは異なる可能性があります。

M. Oshiro

#### ■ Shim-pack Scepter について

分析条件の高速化を行う場合、カラムの選択は重要です。カラムの分離能はカラムの長さに比例する一方、充填剤の粒子径に反比例します。言い換えれば、分離を維持しながらカラムサイズをより短くする際は、同時に充填剤の粒子径を微粒子化する必要があります。この際、充填剤の官能基はもちろん、その修飾状態を同一にすることで分離バランスを維持したまま分析を高速化することが可能です。

Shim-pack Scepter シリーズは、1.9、3、5 μm の幅広い粒子径において共通の充填剤を使用しています。また、カラムサイズのラインナップも充実しており、高速分析から分取まで Scepter シリーズを用いて行うことが可能です。これにより、シームレスな分析法移管が可能となります。

本稿では粒子径 3 μm と 1.9 μm のカラムを用いて分析の高速化を検討しました。

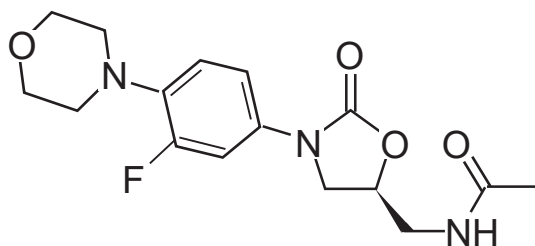


図1 リネゾリド

#### ■ 分析条件の高速化

アプリケーションニュース L524 でご紹介しましたように医薬品の試験法は日米欧三薬局方検討会議において、日本薬局方(JP)、欧州薬局方(EP)、USPの試験法と医薬品添加物各条について調和活動が行われています。クロマトグラフィーについては2017年のパブリックコメントの募集で国際調和案が示されています。この案には従来のJPにはなかった試験条件の調整範囲が明記されています。そのため、JPでも今後分析の高速化を行うことが可能になると考えられます。

表1にリネゾリドの定量法に使用されるUSPの分析条件と上記国際調和案に基づき設定した高速分析条件(UHPLC)を示します。図2に設定に用いた国際調和案のクロマトグラフィー条件の調整範囲(グラジエント溶離)について示します。なお、主な項目のみ抜粋しました。

表1 国際調和案に基づいた分析条件の高速化

|                           | USP        | UHPLC      | Note        |
|---------------------------|------------|------------|-------------|
| Column length (L) (mm)    | 75         | 50         | User choice |
| Column diameter (dc) (mm) | 4.6        | 2          | User choice |
| Particle size (dp) (μm)   | 3          | 1.9        | User choice |
| L/dp                      | 25         | 26.3       | -5.20 %     |
| Flow rate (mL/min)        | 1.5        | 0.45       |             |
| Gradient factor           |            | 0.42       |             |
| Gradient (%B)             | Time (min) | Time (min) |             |
| 20                        | 0          | 0          |             |
| 43                        | 8          | 3.4        |             |
| 100                       | 18         | 7.6        |             |
| 100                       | 25         | 10.6       |             |
| 20                        | 25.01      | 10.61      |             |
| 20                        | 30         | 12.7       |             |

カラムサイズ: 変更するカラムのカラム長さ (L) と粒子 (dp) の比 L/dp が -25~+50 % の範囲に収まること。なお表面多孔性粒子のカラムについては別規定がある。

流量: 粒子径を変更した際には流量の変更も必要となる。

変更は以下の式に従う。

$$F_2 = F_1 \times [(dc_1^2 \times dp_1) / (dc_2^2 \times dp_2)]$$

$F_1$ : 変更前の流量 (mL/min)  
 $F_2$ : 変更後の流量 (mL/min)  
 $dc_1$ : 変更前のカラムの内径 (mm)  
 $dc_2$ : 変更後のカラムの内径 (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)

また、粒子径を 3 μm 以上から 3 μm 未満へ変更する場合は、カラム効率が 20 % 以上低下しない範囲で線速度を増加させることが認められる。

グラジエント時間: グラジエント容量はカラム容量に比例して変更する。変更は以下の計算式を用いる。

$$t_{G2} = t_{G1} \times (F_1 / F_2) \times [(L_2 \times dc_2^2) / (L_1 \times dc_1^2)]$$

$t_{G1}$ : 変更前のグラジエント時間  
 $t_{G2}$ : 変更後のグラジエント時間

図2 国際調和案クロマトグラフィー条件の調整範囲 (グラジエント溶離、主要項目)

## ■ 高速分析条件の評価

リネゾリド溶液 (0.8 mg/L) を USP 条件、UHPLC 条件で分析した結果を図3に示します。各条件での拡大クロマトグラムを図4に示します。Compound D はリネゾリドに対する相対保持時間から同定しました。表2、表3にそれぞれの分析条件を示します。表4に今回の結果からシステム適合性試験を評価した結果を示しますが、いずれの条件もシステム適合性を満たしています。

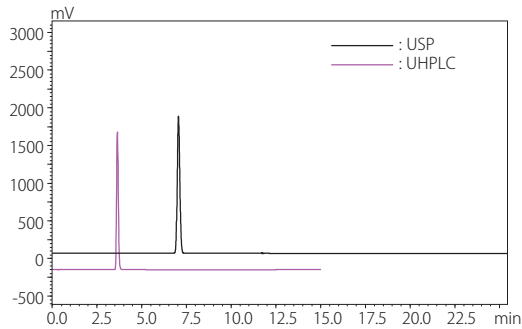


図3 リネゾリドのクロマトグラム

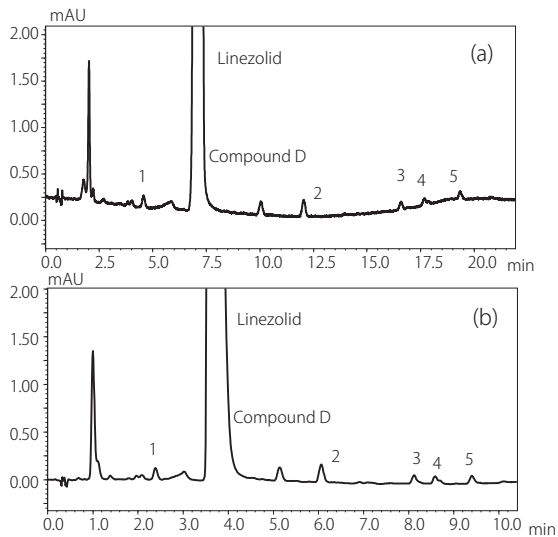


図4 リネゾリドの拡大クロマトグラム  
(a) : USP、(b) : UHPLC

表2 USP の分析条件

|                  |   |
|------------------|---|
| Column           | : Shim-pack Scepter C18<br>(75 mmL×4.6 mmI.D., 5 μm)  |
| Mobile phase     | : A) Methanol/Acetonitrile/1.4 g/L Monobasic potassium phosphate = 15/5/80 (v/v)<br>B) Methanol/1.4 g/L Monobasic potassium phosphate = 50/50 (v/v) |
| Flow rate        | : 1.5 mL/min  |
| Time program     | : B Conc.20% (0 min) → 43% (8 min) → 100% (18 min) → 100% (25 min) → 20% (25.01-30 min)   |
| Injection volume | : 10 μL   |
| Column temp.     | : 30 °C   |
| Detection        | : UV 254 nm   |

表3 USP の分析条件

|                  |   |
|------------------|---|
| Column           | : Shim-pack Scepter C18<br>(50 mmL×2.0 mmI.D., 1.9 μm)  |
| Mobile phase     | : A) Methanol/Acetonitrile/1.4 g/L Monobasic potassium phosphate = 15/5/80 (v/v)<br>B) Methanol/1.4 g/L Monobasic potassium phosphate = 50/50 (v/v) |
| Flow rate        | : 0.45 mL/min   |
| Time program     | : B Conc.20% (0 min) → 43% (3.4 min) → 100% (7.6 min) → 100% (10.6 min) → 20% (10.61-12.7 min)  |
| Injection volume | : 2 μL  |
| Column temp.     | : 30 °C   |
| Detection        | : UV 254 nm   |

表4 システム適合性試験結果

| System Suitability Requirements               | USP   | UHPLC | Judgement |        |
|---|-------|-------|-----------|--------|
| Resolution (between linezolid and compound D) | ≥3.0  | 12    | 7.7       | PASSED |
| Tailing factor                                | ≤1.5  | 1.1   | 1.2       | PASSED |
| Relative standard deviation                   | ≤1.0% | 0.1   | 0.07      | PASSED |

表5に条件ごとの本分析で用いたリネゾリドに対する類縁成分の相対保持時間を示します。Shim-pack Scepter シリーズをご使用いただくことで、より簡便に分離/バランスを保持したまま分析の高速化の検討を行うことが可能です。

表5 条件ごとの相対保持時間の比較

| Peak       | Relative retention times to linezolid |       |
|------------|---------------------------------------|-------|
|            | USP                                   | UHPLC |
| 1          | 0.6                                   | 0.7   |
| Compound D | 1.4                                   | 1.4   |
| 2          | 1.7                                   | 1.7   |
| 3          | 2.3                                   | 2.2   |
| 4          | 2.5                                   | 2.3   |
| 5          | 2.7                                   | 2.6   |

## ■ まとめ

Nexera シリーズおよび Shim-pack Scepter C18 を用いて、リネゾリドの分析を行いました。条件は USP と国際調和案に基づいた高速分析を用いましたところ、いずれもシステム適合性試験を満たしました。また、Shim-pack Scepter C18 を分析に用いることで、より簡便に分離/バランスを保持したまま分析の高速化を行うことが可能です。

### <参考文献>

- 1) 国際調和案 (Stage4)、独立行政法人 医薬品医療機器総合機構

Nexera および Shim-pack Scepter は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

**株式会社 島津製作所** 分析計測事業部  
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2019年6月

島津コールセンター ☎0120-131691  
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。  
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。