

Application News

No. L464

高速液体クロマトグラフィー
High Performance Liquid Chromatography

新しい USP General Chapter 621 に 準拠した USP メソッドの高速化

Ultra-High Speed Analysis with Allowable Limit of the USP Methods in the New USP General Chapter 621

米 国 薬 局 方 (USP : United States Pharmacopeia) の General Chapter 621 Chromatography には HPLC や GC のパラメータの変更許容範囲が示されており、その範囲内であればシステム適合性要件を満たしている限り、再バリデーションすることなくメソッドを変更することが認められています。アプリケーションニュース No. L448 ではこの許容変更範囲でメソッドを高速化した例をご紹介します。

この度 General Chapter 621 が改定され、2014 年 8 月 1 日より施行されます。これまではカラム充填剤の粒子径は最大 50 % まで微粒子化が許容されていたのに対して、新しい General Chapter 621 によれば、カラム充填剤の粒子径は自由に選択できるようになりました。従って、粒子径 5 μm に対して、サブ 2 μm のカラム充填剤が使用できるようになったため、これまで以上の高速化が可能になりました。

ここでは超高速液体クロマトグラフ “Nexera X2” と高速分析用カラム “Shim-pack XR-ODS III” を用いて、新しい General Chapter 621 に準拠して USP メソッドを高速化した例をご紹介します。

Y. Arao K. Tanaka *

※ Shimadzu Scientific Instruments, Inc., USA

■ HPLC パラメータの変更許容範囲

Allowable Limit of Modification for HPLC Parameters

Table 1, 2 に General Chapter 621 に収載されている HPLC カラムに関連するパラメータの変更許容範囲を示します。今回の変更点はカラム長さ、粒子径および流量についてです。なおこれらの変更はアイソクラティック分析にのみ適用され、グラジエント分析には適用されません。

Table 1 現行 General Chapter 621 における HPLC パラメータ変更許容範囲 (2014 年 7 月 31 日まで有効)
Permissible Limit of HPLC Parameters in the Current General Chapter 621 (official until July 31st, 2014)

カラム内径	線速度が同一であれば変更可能
カラム長さ	± 70 % の変更が可能
粒子径	最大 50 % までの減少が可能。ただし増加は不可
流量	カラム断面積比により流量を調整する。 さらに、± 50 % の変更が可能

Table 2 新しい General Chapter 621 における HPLC パラメータ変更許容範囲 (2014 年 8 月 1 日から有効)
Permissible Limit of HPLC Parameters in the New General Chapter 621 (official after August 1st, 2014)

カラム内径	線速度が同一であれば変更可能
カラム長さおよび粒子径	L/dp (L : カラム長さ, dp : 粒子径) を -25 % ~ 50 % の範囲で変更可能
流量	カラム断面積比と粒子径逆比により流量を調整する。 * 粒子径を 3 μm 以上から 3 μm 未満に変更、あるいは 3 μm 未満から 3 μm 以上に変更する場合は、理論段数が 20 % 以上低下しない範囲で線速度の変更が可能 * さらに、± 50 % の流量変更が可能

* 本文参照

この変更点は、 L/dp を一定に保てば、同等の分離性能が得られるという理論に基づいています。例えば長さ 150 mm、粒子径 5 μm のカラム ($L/dp=150,000 \mu\text{m} / 5 \mu\text{m}=30,000$) から、長さ 50 mm、粒子径 1.6 μm のカラム ($L/dp=31,250$) へ移行すれば、 L/dp を +4.2 % に保つことができるため、同等の分離性能が得られます。また流量については以下の式が示されています。

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

F_1, F_2 はそれぞれ USP モノグラフに指定された流量、変更後の流量です。また dc, dp はそれぞれカラム内径、充填剤粒子径を示しています。本計算式には、大きく 2 つの項目が含まれています。第一は、カラム断面積に比例して流量を比較する、すなわち線速度を一定とする点です。第二に、粒子径と最適流量が反比例するため、粒子径に反比例して流量を変更する点です。例えば USP モノグラフにカラムとして $4.6 \times 150 \text{ mm}$, 5 μm が、流量として 1.0 mL/min が指定されており、これを $2.0 \times 50 \text{ mm}$, 1.6 μm のカラムに変更する場合、流量は 0.59 mL/min と求められます。また 3 μm 以上の粒子径から 3 μm 未満の粒子径に変更する場合、理論段数が 20 % 以上低下しない範囲で流量をさらに増加させることが許容されています。逆に 3 μm 未満の粒子径から 3 μm 以上の粒子径に変更する場合、理論段数が 20 % 以上低下しない様に、流量を低下させる必要があることが示されています。

■ USP メソッドの高速化

Speed Enhancement of the USP Method

ここでは USP に規定されているスルファセタミドの不純物分析法を高速化した例をご紹介します。スルファセタミドはスルホンアミド系抗菌薬の一種です。USP モノグラフに指定されているカラムは $4.6 \times 150 \text{ mm}$, 5 μm, L1 (ODS), 流量は 0.8 mL/min となっています。この場合 $2.0 \times 50 \text{ mm}$, 1.6 μm, L1 のカラム “Shim-pack XR-ODS III” を使用すれば同等の L/dp 値が得られます。流量は先ほどご紹介した数式から 0.47 mL/min と求めることができます。実際の分析においては、システム適合性試験溶液、標準溶液、試料溶液の分析が必要となりますが、ここではシステム適合性試験溶液 (0.2 mg/mL USP スルファセタミド標準品, 0.05 mg/mL USP スルファニルアミド標準品) のクロマトグラムを示します。HPLC システムとして “Prominence” を、UHPLC システムとして “Nexera X2” を使用しました。Table 3 に分析条件を、Fig. 1 にクロマトグラムを、Table 4 にシステム適合性試験結果を示します。“Nexera X2” と “Shim-pack XR-ODS III” を用いることにより、システム適合性を満たしながら、大幅な分析時間の短縮ができました。今回の検討では、1 分析当たりの分析時間を約 1/10 に、溶媒消費量を約 1/15 に削減することが可能となりました。

Table 3 分析条件
Analytical Conditions

System	: ① Prominence ② Nexera X2 (Loop injection with 20 μ L loop)
Column	: ① Shim-pack VP-ODS (150 mm L. \times 4.6 mm I.D., 4.6 μ m) ② Shim-pack XR-ODS III (50 mm L. \times 2.0 mm I.D., 1.6 μ m)
Mobile Phase	: Methanol / Water / Acetic acid = 10/89/1 (v/v/v)
Column Temp.	: Ambient
Flow Rate	: ① 0.8 mL/min ② 0.47 mL/min
Injection Vol.	: ① 10 μ L ② 2 μ L
Detection	: ① SPD-20AV at 254 nm ② SPD-M30A at 254 nm
Flow Cell	: ① Conventional cell (for SPD-20A(V)) ② Standard cell (for SPD-M30A)

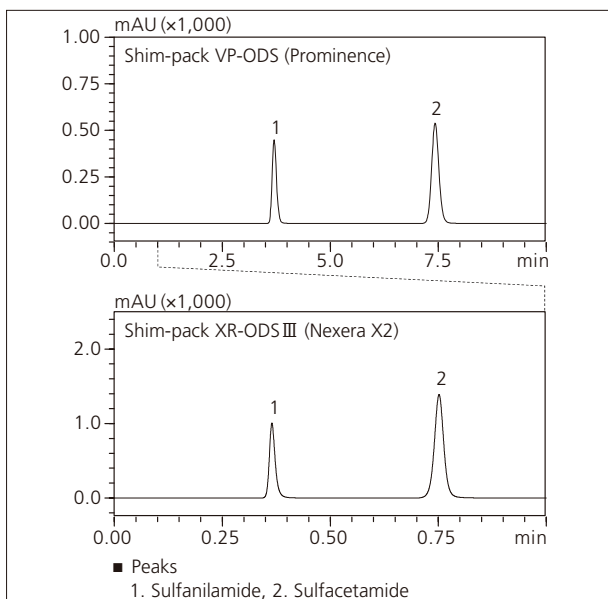


Fig. 1 システム適合性試験溶液のクロマトグラム
(上段: VP-ODS を Prominence にて, 下段: XR-ODS III を Nexera X2 にて使用)
Chromatograms of System Suitability Solution
(Upper: VP-ODS on Prominence, Lower: XR-ODS III on Nexera X2)

Table 4 システム適合性試験結果
Results of System Suitability Test

System suitability requirements	VP-ODS (Prominence)	XR-ODS III (Nexera X2)
USP resolution between sulfacetamide and sulfanilamide	≥ 5.0	14.54
USP tailing factor for sulfacetamide	≤ 1.5	1.09
Relative standard deviation for sulfacetamide	$\leq 2.0\%$	Rt 0.015 % Area 0.067 %
		Rt 0.037 % Area 0.103 %

■ Nexera X2 における USP メソッドの再現 USP Method Performed on the Nexera X2

次に USP に規定されているマレイン酸チモロール点眼液の分析法を、指定された分析条件を変更せずに“Nexera X2”にて分析を行った例を示します。マレイン酸チモロールは非選択性 β 遮断薬の一種です。Table 5 に分析条件を、Fig. 2 に標準試料 (0.136 mg/mL マレイン酸チモロール) のクロマトグラムを、Table 6 にシステム適合性試験結果を示します。UHPLC システム“Nexera X2”においても、HPLC システム“Prominence”と比較して、問題なく同等の分析ができていることがわかります。

Table 5 分析条件
Analytical Conditions

System	: ① Prominence ② Nexera X2 (Loop injection with 20 μ L loop)
Column	: Shim-pack VP-ODS (150 mm L. \times 4.6 mm I.D., 4.6 μ m)
Mobile Phase	: Sodium Phosphate Buffer <pH 2.8> / Methanol = 65/35 (v/v)
Column Temp.	: 40 $^{\circ}$ C
Flow Rate	: 1.2 mL/min
Injection Vol.	: 10 μ L
Detection	: ① SPD-20AV at 295 nm ② SPD-M30A at 295 nm
Flow Cell	: ① Conventional cell (for SPD-20A(V)) ② Standard cell (for SPD-M30A)

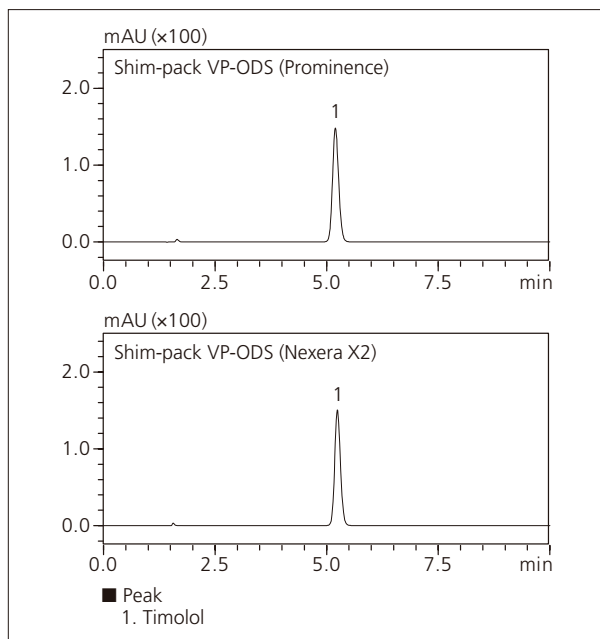


Fig. 2 標準試料のクロマトグラム
(上段: VP-ODS を Prominence にて, 下段: VP-ODS を Nexera X2 にて使用)
Chromatograms of Standard Preparation
(Upper: VP-ODS on Prominence, Lower: VP-ODS on Nexera X2)

Table 6 システム適合性試験結果
Results of System Suitability Test

System suitability requirements	VP-ODS (Prominence)	VP-ODS (Nexera X2)
USP tailing factor	≤ 2.0	1.12
USP column efficiency	≥ 3600	6354
Relative standard deviation	$\leq 2.0\%$	Rt 0.027 % Area 0.034 %
		Rt 0.082 % Area 0.062 %

■ まとめ

Conclusion

今回の検討により、新しい USP General Chapter 621 に準拠して、“Nexera X2”と“Shim-pack XR-ODS III”を用いて、これまで以上の高速分析が可能となることが示されました。また“Nexera X2”は UHPLC 分析だけでなく、HPLC 分析にも活用可能なので、現在は HPLC 分析が中心であっても、将来的に UHPLC 分析を導入したいというニーズにも応えることができるシステムとなっています。

[参考情報]

USP General Chapter 621, USP 37-NF 32, First supplement
USP Monograph, Sulfacetamide, USP 37-NF 32, First supplement
USP Monograph, Timolol maleate ophthalmic solution, USP 37-NF 32, First supplement