

USP General Chapter <621> クロマトグラフィーと Arc™ HPLC システムが提供する新しい液体クロマトグラフィーグラジエントメソッド許容範囲による分析法の最新化

Catharine E. Layton, Paul D. Rainville

Waters Corporation

本書はアプリケーションブリーフであり、詳細な実験方法のセクションは含まれていません。

要約

薬局方の分析手順を基本的に変更することなく、クロマトグラフィー試験のさまざまなパラメーターを調整できる範囲が、米国薬局方（USP） General Chapter <621> クロマトグラフィーに定義されています。このアプリケーションノートでは、この章に記載されているグラジエントメソッドの調整を Arc HPLC システムと組み合わせて、抗ウイルス薬物のアバカビル硫酸塩の USP モノグラフ分離向けにカラム寸法とシステムの最新化を行います。

アプリケーションのメリット

- Arc HPLC システムでは背圧限界が拡張されているため、さまざまな最新のカラム寸法を使用して高効率の分離が行え、分析時間、注入量、溶媒を削減可能に
- 米国薬局方（USP） General Chapter <621> クロマトグラフィーの、モノグラフのシステム適合性要件を満たすグラジエントメソッド調整により、Arc HPLC システムと組み合わせた場合に質の高いデータが得られる

はじめに

クロマトグラフィー分離は、カラムハードウェアとシステムハードウェアの両方の影響を受けます。これらのパラメーターは分析法の性能にとってきわめて重要であり、モノグラフのバリデーション後、ハードウェアの制約によりハードウェアの柔軟性が妨げられる可能性があります。例えば、最新の HPLC カラムハードウェアは通常、一連の新しい固定相の置換基のために直径 4.6 mm で提供されますが、HPLC の粒子径 5 μm を 3.5 μm 以下にすることで、より短時間で少ない溶媒消費量で同等の分離が得られます。Arc HPLC システム (図 1) などの最新の HPLC システムでは、HPLC が動作する際の背圧限界が拡張されているため、最新のカラムハードウェアの寸法に合わせてモノグラフ分析法を調整すると、信頼できる柔軟性が得られます。



図 1. Arc HPLC システム (PDA 検出器を搭載)

このアプリケーションノートでは、General Chapter <621> クロマトグラフィー (2022 年 12 月 1 日) に記載されているグラジエントメソッドの許容範囲を採用して、アバカビル硫酸塩の USP モノグラフのカラムとシステムの両方を最新化します (表 1)。

パラメーター	グラジエント溶出で許容される調整
カラム：長さ (L) 粒子径 (d_p)	各定数 L/d_p 比が -25% ~ +50% の範囲内。
カラム：内径	内径は調整できます。
注入量	カラム径を変更したときに調整します。 SST 基準に適合している場合、カラム寸法を考慮せずに変更できます。
流速	粒子径および/またはカラム寸法を変更する場合、流速を計算します。 カラム寸法の変更なしで $\pm 50\%$ 。
グラジエントプロファイル	粒子径、カラムサイズ、流速に基づくグラジエントの調整
固定相	置換基のアイデンティティーに変更がないこと、固定相の物理化学的特性、 および化学修飾の程度が同様である必要があります。
多孔性	多孔性粒子 (TPP) から表面多孔性への変更は、SST の要件が満たされ、 管理対象の指定された不純物の選択性、溶出順序が同等であることが実証される場合に許容されます。 (t_R/W_h) ² 比が -25% ~ +50% の範囲内という条件で、その他の L と d_p の組み合わせが使用できます。
カラム温度	アイソクラティックの場合 ± 10 °C、グラジエントの場合 ± 5 °C
移動相	± 0.2 pH 単位、2 液混合液および 3 液混合液の詳細を参照
検出器波長	変更は許容されない

表 1. この表には、薬局方の分析手順を基本的に変更することなく、クロマトグラフィー試験のさまざまなパラメーターを調整できる範囲が記載されています。赤色のボックスは、このアプリケーションノートで焦点を合わせているパラメーターを示しています。

この実験では、アバカビル硫酸塩の不純物の分離を選択しました。その理由は、このバリデーション済みグラジエントメソッドでは、クロマトグラフィーシステムの適合性基準の基礎になっている、課題となる部分的に分離したピークのクリティカルペアが生じるためです。USP <621> に規定されているハードウェアに依存するグラジエントメソッドを調整した後、得られたクロマトグラムについて、元のモノグラフのシステム適合性要件を維持する性能について検討しました。

実験方法

試料および分析法

USP モノグラフ:

アバカビル硫酸塩、有機不純物

LC システム:

Arc HPLC システム、2998 フォトダイオードアレイ検出器 (PDA) 搭載

カラム:	Symmetry™ C ₁₈ カラム、3.9 × 150 mm、5 μm、製品番号: WAT046980
	Symmetry C ₁₈ カラム、4.6 × 150 mm、5 μm、製品番号: WAT045905
	Symmetry C ₁₈ カラム、4.6 × 100 mm、3.5 μm、製品番号: WAT066220
	Waters XBridge™ C ₁₈ カラム、4.6 × 100 mm、3.5 μm、製品番号: 186003033
	Waters XSelect™ HSS™ T3 カラム、4.6 × 150 mm、3.5 μm、製品番号: 186004786
ソフトウェア:	Empower™ 3 クロマトグラフィーデータシステム (CDS)
サンプル:	アバカビル硫酸塩システム適合性混合液、USP 製品番号: 1000500

結果および考察

体系的アプローチを用いてアバカビル硫酸塩の USP モノグラフ分離を最新化しました。まず、モノグラフカラムを粒子径 5 μm の L1 固定相置換基および 3.9 × 150 mm カラムハードウェアとして特定しました。L1 固定相置換基を備えた最新のカラムハードウェア（直径 4.6 mm、長さ (L) 100 mm および 150 mm）を選択して、分析法を最新化しました。カラムの固定相置換基の粒子径 (dp) は 5 μm または 3.5 μm でした。すべての例で、モノグラフの比は -25% ~ +50% で、USP <621> ガイダンスの L/dp 比の許容範囲を満たしていました。

流速、注入量、グラジエントの開始時間は、USP <621> ガイダンスに記載されている式を用いて、最新のターゲットカラムに対して数学的に調整しました。まず、式 1 により、流速を調整することで、モノグラフ分離の線速度が維持されました。第 2 に、式 2 に従って注入量を調整して、カラム容量に対する分析種の比が維持されました。最後に、計算したターゲットカラムの流速、長さ、粒子径に応じて、式 3、表 2 でグラジエント開始時間を調整しました。開始時間の調整により、モノグラフ分離で報告されているグラジエント勾配とカラム容量の比が維持されました。USP <621> ガイダンスには、モノグラフのバリデーション時に指定された場合にシステムのデュエルボリュームを調整できる式 4 が記載されています。アバカビル硫酸塩のモノグラフでは、システムのデュエルボリュームが報告されておらず、分離

に初期のアイソクラティックホールド時間が含まれていません。結果として、分析法の最新化においては、計算されたグラジエントの開始時間に対するデュエルボリュームの調整は行いませんでした。

$$F_2 = F_1 \times \left[\frac{(dc_2^2 \times dp_1)}{(dc_1^2 \times dp_2)} \right] = \frac{1.00 \text{ mL}}{\text{分}} \times \left[\frac{(4.6 \text{ mm}^2 \times 5 \text{ } \mu\text{m})}{(3.9 \text{ mm}^2 \times 3.5 \text{ } \mu\text{m})} \right] = 1.987 \text{ mL/分}$$

F_1 = モノグラフの流速 (mL/分)

F_2 = 調整後の流速 (mL/分)

dc_1 = モノグラフカラムの内径 (mm)

dc_2 = ターゲットカラムの内径 (mm)

dp_1 = モノグラフカラムの粒子径 (μm)

dp_2 = ターゲットカラムの粒子径 (μm)

式 1. モノグラフカラムおよび $4.6 \times 100 \text{ mm}$ 、 $3.5 \text{ } \mu\text{m}$ カラムでの流速の調整

$$V_{inj2} = V_{inj1} \times \left[\frac{(L_2 dc_2^2)}{(L_1 dc_1^2)} \right] = 20 \text{ } \mu\text{L} \times \left[\frac{(100 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}^2)}{(150 \text{ mm} \times 3.9 \text{ } \mu\text{m}^2)} \right] = 18 \text{ } \mu\text{L}$$

V_{inj1} = モノグラフの注入量 (μL)

V_{inj2} = 調整後の注入量 (μL)

L_1 = モノグラフカラムの長さ (mm)

L_2 = モノグラフカラムの長さ (mm)

dc_1 = モノグラフカラムの内径 (mm)

dc_2 = 調整後のカラムの内径 (mm)

式 2. モノグラフカラムおよび $4.6 \times 100 \text{ mm}$ 、 $3.5 \text{ } \mu\text{m}$ カラムでの注入量の調整

$$t_{G2} = t_{G1} \times \left(\frac{F_1}{F_2} \right) \left[\frac{(L_2 \times dc_2^2)}{(L_1 \times dc_1^2)} \right] = t_{G1} \times \left(\frac{1.000 \text{ mL/分}}{1.987 \text{ mL/分}} \right) \left[\frac{(100 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}^2)}{(150 \text{ mm} \times 3.9 \text{ mm}^2)} \right] = 0.467$$

(モノグラフのグラジエント時間に適用した乗数)

t_{G1} = モノグラフのグラジエント時間 (分)

t_{G2} = 調整後のグラジエント時間 (分)

F_1 = モノグラフの流速 (mL/分)

F_2 = 調整後の流速 (mL/分)

dc_1 = モノグラフカラムの直径 (mm)

dc_2 = ターゲットカラムの直径 (mm)

式 3. モノグラフカラムおよび 4.6 × 100 mm、3.5 μm カラムでのグラジエントの調整

モノグラフの時間 (分)	% B	ターゲットカラムの調整済み時間	% B
0 分	5	0 分	5
20 分	30	0 分 + (20 分 × 0.467) = 9.3 分	30
35 分	90	9.3 分 + (15 分 × 0.467) = 16.3 分	90
35.1 分	5	16.3 分 + (0.1 分 × 0.467) = 16.4 分	5
50 分	5	16.4 分 + (14.9 分 × 0.467) = 23.4 分	5

表 2. 4.6 × 100 mm、3.5 μm カラムマルチプライヤーによるグラジエントの調整

$$t_c = t - \left[\frac{(D - D_0)}{F} \right]$$

t = モノグラフのグラジエントテーブルに示されている時間設定 (分) (該当する場合)

t_c = 補正済みグラジエント時間 (分)

D = ターゲット装置のデュエルボリューム (mL)

D_0 = モノグラフに記載されているデュエルボリューム (mL)

F = 流速 (mL/分)

式 4. モノグラフ装置のデュエルボリュームの調整 (可能な場合)

ウォーターズの分取 OBD カラムカリキュレーターとカラムカリキュレーター 2.0 の両方を使用して、ターゲットカラムのための手動でのグラジエント計算を確認しました (図 2)。オンラインカリキュレーターにより、調整後のグラジエントの最大グラジエント背圧の推定値が得られるため、これは特に重要でした。この推定は、モノグラフで使用される 85% 有機移動相組成ではなく、100% 有機移動相組成について計算されたものですが、調整後の分析法では Arc HPLC システムの背圧限界 9,500 psi を超えないという確信が得られました。



図 2. ウォーターズの分取 OBD カラムカリキュレーターおよびカラムカリキュレーター 2.0 オンライン調整カリキュレーター (www.waters.com)

モノグラフのシステム適合性不純物混合液 (SST) を、調整後のグラジエントと最新化したクロマトグラフィーハードウェアを使用して分析しました。最新のカラム寸法すべてで、未分離アバカビルのクリティカルペアのモノグラフシステム適合性分離度 1.5 以上という要件が正常に満たされました (図 3)。SST の相対保持時間 (RRT) を、初期のモノグラフ分離に利用した固定相で得られた RRT と比較したところ、L1 固定相置換基が同じカラムで RRT が最も類似しており、L1 固定相置換基が異なるカラムでは RRT が異なっていました (図 4)。USP <621> に記載されているように、さまざまな置換基を使用した場合、ピークの欠落や逆転が観察されることがあります。そのため、分析法の調整後、クロマトグラフィーピークのアイデンティティーを、PDA スペクトル分析によって確認しました。

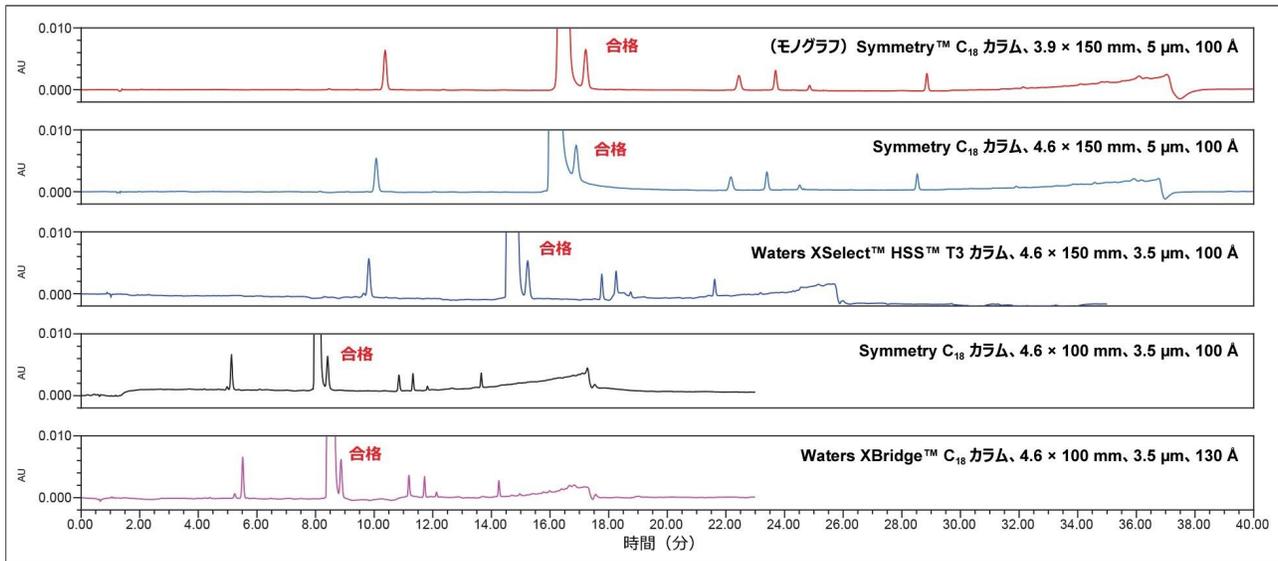


図 3. モノグラフおよび調整後のカラムで得られたクロマトグラムを重ね描き。すべてが、クリティカルペアの SST 分離度要件に適合しています。

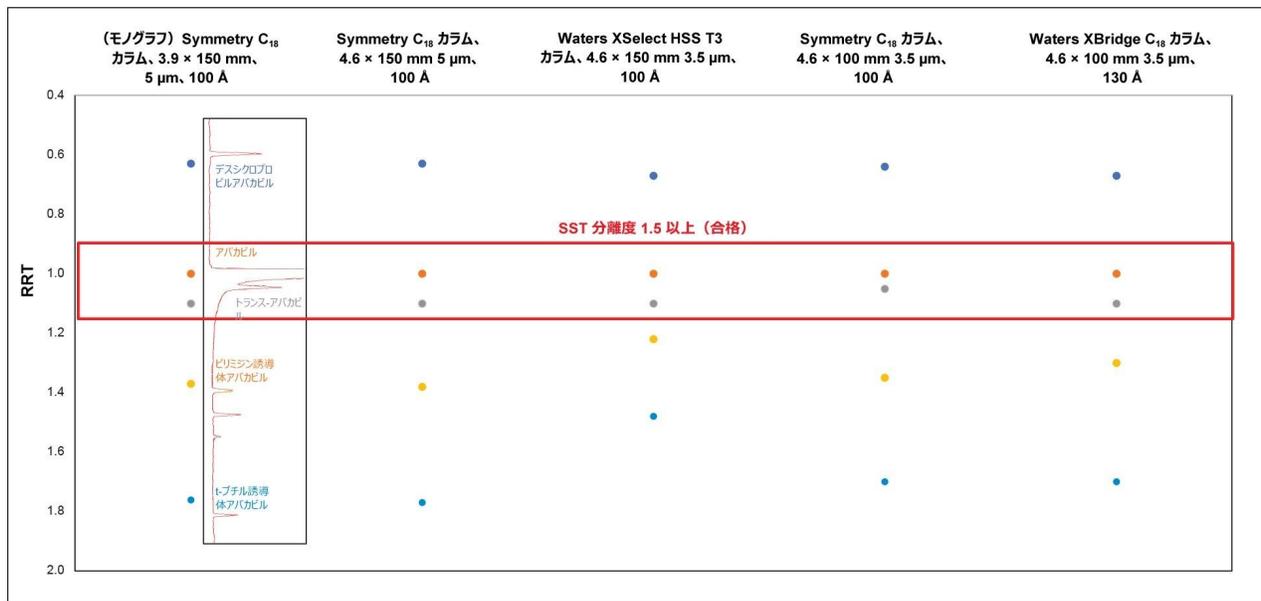


図 4. システム適合性混合液における不純物の相対保持時間 (RRT) の比較

Arc HPLC システムを、最新のカラムハードウェアの寸法と組み合わせることにより、バリデーション済みモノグラフ分離に独自のメリットをもたらすことができました。この LC システムの最新のチューブ径により、従来の HPLC システムの背圧上限がわずか 5,000 psi であったのに対し、最大 9,500 psi の分離時背圧が発生するカラムハードウェアを使用できます。さらに、モノグラフ分析法の粒子径 5 μm を、USP <621> ガイダンスの L/d_p 比の要件を維持しつつ、3.5 μm に下げることになりました。これらのハードウェアの組み合わせにより、バリデーション済みのモノグラフ分離で、分析時間、注入量、溶媒消費量が大幅に削減できました（表 3）。

Arc HPLC システム				
	(モノグラフ) 3.9 × 150 mm、 5 μm 、100 Å	4.6 × 150 mm、5 μm 、 100 Å	4.6 × 150 mm、3.5 μm 、 100 Å	4.6 × 100 mm、3.5 μm 、 100 Å、130 Å
L/ d_p	30,000	30,000	42,900	28,600
分析時間	50 分	50 分	35 分	23 分
1 時間あたりの 分析数	1.2	1.2	1.7	2.6
合計移動相 消費量	50 mL	71 mL	71 mL	47 mL
注入量	20 μL	27.8 μL	27.8 μL	18.5 μL
潜在的なメリット	—	最新の直径	最新の直径 分析時間の短縮 注入量の減少	最新の直径 分析時間の短縮 1 時間あたりの分析数増加 注入量の減少 移動相使用量の削減

表 3. Arc HPLC システムと組み合わせた場合の、最新のカラムハードウェアクロマトグラフィーのメリット

結論

USP モノグラフのグラジエント分離は、General Chapter <621> クロマトグラフィー（2022 年 12 月 1 日）に従って、Arc HPLC システムでシステム適合性要件が正常に維持されるように調整できます。Arc HPLC システムを使用することで、バリデーション済みのモノグラフのシステム適合性を損なうことなく、カラムの最新化を行うことができます。このシステムにより、さまざまな最新の HPLC カラムの寸法に対応する動作時背圧上限が提供されます。そのため、分析時間、注入量、溶媒消費量の削減などのクロマトグラフィー上のメリットが実現できました。

参考文献

1. USP General Chapter <621> Chromatography, Official Date: 01-Dec-2022, www.USP.org <<https://www.usp.org/>> , referenced 1/06/2023.
2. Abacavir Sulfate Monograph official 01-May-2020, www.uspnf.com <<https://www.uspnf.com/>> , referenced 1/15/2023.
3. Preparative OBD Column Calculator, www.waters.com <<https://www.waters.com/nextgen/global.html>> , accessed 1/15/2023.
4. Columns Calculator 2.0, www.waters.com <<https://www.waters.com/nextgen/global.html>> , accessed 1/15/2023.

ソリューション提供製品

Arc HPLC システム <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135068659>>

2998 フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器 <<https://www.waters.com/1001362>>

Empower クロマトグラフィーデータシステム <<https://www.waters.com/10190669>>

720007877JA、2023 年 3 月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)