

薬局方（分析条件の変更）

Pharmacopeia (Change of analytical conditions)

日米欧三局方検討会議(PDG)において、日本薬局方(JP)、米国薬局方及び欧州薬局方と国際調和が行われています。第十八改正日本薬局方第一追補では2.00 クロマトグラフィー総論において、カラムパラメータや流量等の変更が可能となりました(参照: [第十八改正日本薬局方第一追補令和4年12月12日厚生労働省告示第355号](#))。今回はパラオキシ安息香酸エチル(エチルパラベン)について第十八改正日本薬局方に収載の条件から分析条件を変更し、システムの適合性を確認しました。

Key words : パラベン、薬局方、国際調和
Column : USP category: L1

[Analytical conditions]
Column : L-column2 ODS
System : Agilent 1260 Infinity II

項目	パラメータ	変更の範囲 (第十八改正日本薬局方第一追補)	JP:4.6×150 5 µm	変更例①:3.0×100 3 µm	変更例②:2.1×75 2 µm	変更例③:2.1×75 2 µm
溶離液	pH	±0.2	指定なし	変更なし	変更なし	変更なし
	緩衝液の塩濃度	±10%	A : KH ₂ PO ₄ 17→2500	変更なし	変更なし	変更なし
	組成比	マイナーな溶媒成分の量を相対的に±30%まで変更できる	A/B 35/65 B : MeOH	変更なし	変更なし	変更なし
カラム	官能基	変更は認められない	C18	変更なし	変更なし	変更なし
	長さ (L)	L / dpの比率の-25%から+50%の間の範囲に変更することができる	150 mm 5 µm	100 mm 3 µm	75 mm 2 µm	75 mm 2 µm
	粒子径 (dp)		L / dp 30.0	L / dp 33.3	L / dp 37.5	L / dp 37.5
測定条件	流量*	$F_2 = F_1 \times [(d_{c2}^2 \times d_{p1}) / (d_{c1}^2 \times d_{p2})]$ F ₁ : 医薬品各条の流量(mL/分) F ₂ : 変更後の流量(mL/分) d _{c1} : 医薬品各条のカラムの内径(mm) d _{c2} : 使用するカラムの内径(mm) d _{p1} : 医薬品各条のカラム粒子径(µm) d _{p2} : 使用するカラム粒子径(µm)	1.3 mL/min	0.92 mL/min	0.68 mL/min	0.35 mL/min* (-48%)
	温度	±10℃	35 ℃	変更なし	変更なし	25 ℃(±10 ℃)
	検出波長	変更することはできない。	272 nm	変更なし	変更なし	変更なし
	注入量	$V_{inj2} = V_{inj1} \times [(L_2 \times d_{c2}^2) / (L_1 \times d_{c1}^2)]$ V _{inj1} : 医薬品各条の注入量(µL) V _{inj2} : 調整した注入量(µL) L ₁ : 医薬品各条のカラムの長さ(cm) L ₂ : 新たなカラムの長さ(cm) d _{c1} : 医薬品各条のカラムの内径(mm) d _{c2} : 新たなカラムの内径(mm)	10 µL	3 µL	1 µL	1 µL

※(変更案③)イソクラティック分離において、カラム変更による調整後、更に流量の±50%の変更が許容されるため、0.35 mL/minに減少させた

■ イソクラティック分離における、カラムパラメータと流量(参照元: 日本薬局方第十八改正第一追補)

粒子径3 µm以上から3 µm未満へ変更	20%以上カラム効率が低下しない範囲で、溶離液の流量を増加することが認められる。
粒子径3 µm未満から3 µm以上へ変更	20%以上カラム効率が低下しないよう、溶離液の流量を減少させる必要がある。
カラムの大きさ(内径)の変更	調整後、更に流量の±50%の変更が許容される。

カラム効率を示す数値は理論段数を用います。

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2 \quad \begin{array}{l} t_R: \text{被検成分のピークの保持時間} \\ W_h: \text{ピーク高さの中心におけるピーク幅}(h/2) \end{array}$$

■ L-column シリーズの場合の最適流量の目安

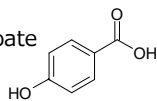
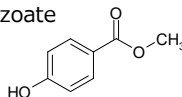
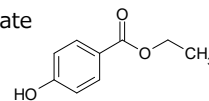
粒子径	最適線速度	内径2.1 mmの最適流量目安	内径3.0 mmの最適流量目安
5 µm	1~2 mm/sec	0.2 mL/min	0.4 mL/min
3 µm	1.5~3 mm/sec	0.2 mL/min	0.6 mL/min
2 µm	2 mm/sec~	0.4 mL/min~	0.8 mL/min~

最適流量は内径の断面積に比例します。

内径4.6 mmを「1」とした場合、内径3.0 mmは約2/5、内径2.1 mmは約1/5になります。

■ JPとの分析結果の比較

Sample:

1. Parahydroxybenzoate
(5 mg/L)
パラオキシ安息香酸2. Methyl Parahydroxybenzoate
(5 mg/L)
パラオキシ安息香酸メチル3. Ethyl Parahydroxybenzoate
(5 mg/L)
パラオキシ安息香酸エチル

規格				
相対標準偏	RSD	相対保持時間 t_1/t_3	相対保持時間 t_2/t_3	分離度 $R_{2,3}$
<0.85%		約0.5	約0.8	> 2

	JP 内径 4.6 mm 長さ 150 mm 粒子径 5 μm	<table><tr><td>RSD(%)</td><td>0.17</td></tr><tr><td>t₁/t₃</td><td>0.53</td></tr><tr><td>t₂/t₃</td><td>0.79</td></tr><tr><td>R_{2,3}</td><td>4.70</td></tr></table> Passed	RSD(%)	0.17	t ₁ /t ₃	0.53	t ₂ /t ₃	0.79	R _{2,3}	4.70
RSD(%)	0.17									
t ₁ /t ₃	0.53									
t ₂ /t ₃	0.79									
R _{2,3}	4.70									
	変更例① 内径 3.0 mm 長さ 100 mm 粒子径 3 μm	<table><tr><td>RSD(%)</td><td>0.46</td></tr><tr><td>t₁/t₃</td><td>0.55</td></tr><tr><td>t₂/t₃</td><td>0.80</td></tr><tr><td>R_{2,3}</td><td>3.20</td></tr></table> Passed	RSD(%)	0.46	t ₁ /t ₃	0.55	t ₂ /t ₃	0.80	R _{2,3}	3.20
RSD(%)	0.46									
t ₁ /t ₃	0.55									
t ₂ /t ₃	0.80									
R _{2,3}	3.20									
	変更例② 内径 2.1 mm 長さ 75 mm 粒子径 2 μm	<table><tr><td>RSD(%)</td><td>0.65</td></tr><tr><td>t₁/t₃</td><td>0.59</td></tr><tr><td>t₂/t₃</td><td>0.81</td></tr><tr><td>R_{2,3}</td><td>1.43</td></tr></table> Failed	RSD(%)	0.65	t ₁ /t ₃	0.59	t ₂ /t ₃	0.81	R _{2,3}	1.43
RSD(%)	0.65									
t ₁ /t ₃	0.59									
t ₂ /t ₃	0.81									
R _{2,3}	1.43									
	変更例③ 内径 2.1 mm 長さ 75 mm 粒子径 2 μm 流量 0.35 mL/min 温度 25 °C	<table><tr><td>RSD(%)</td><td>0.14</td></tr><tr><td>t₁/t₃</td><td>0.55</td></tr><tr><td>t₂/t₃</td><td>0.79</td></tr><tr><td>R_{2,3}</td><td>2.03</td></tr></table> Passed	RSD(%)	0.14	t ₁ /t ₃	0.55	t ₂ /t ₃	0.79	R _{2,3}	2.03
RSD(%)	0.14									
t ₁ /t ₃	0.55									
t ₂ /t ₃	0.79									
R _{2,3}	2.03									

変更例①ではシステム適合性の要求事項を満たすことができました。変更例②では分離度の要求事項を満たすことができませんでした。そこで流量を0.35 mL/min、カラム温度を25 °Cで実施することで、分離度> 2を満たしました(変更例③)。

保持時間が短くなると要求事項を満たすために、更なる検討が必要になるケースがあります。また、カラムサイズや粒子径を小さくすることで、検査時間の短縮や使用溶媒量の削減が可能です。

変更例①では分析時間が半減し、溶媒は約60%削減できます。変更例③では分析時間が半減し、溶媒は85%削減できます。

2023.02 OGT