Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

ACQUITY UPLC I-Class システムと CORTECS T3 カラムケミストリーを用いたフルコナゾールUSP分析法移管

Jennifer Simeone, Paula Hong, and Patricia R. McConville
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

HPLCからUPLC®に分析法を移管することによるスループットの向上。CORTECS® T3カラムによる更なる選択性。

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC® I-Classシステム

Waters®カラムカリキュレーター

Empower® 3 FR2

CORTECS T3カラム

キーワード

分析法移管、HPLCからUPLCへの移管、CORTECSカラム、ソリッドコアパーティクル

はじめに

多くの既存USP分析法は、大きい粒子径(3 µm以上)のHPLCカラムと装置での使用に向けて設計されており、分析時間が長く、有害な溶媒を多く消費します。アイソクラティック分析法については、粒子径2 µm以下のカラムに移管可能で、分析時間を低減しながら同程度以上の性能を得られ、結果としてスループットを向上しながら溶媒消費量を低減できます。分析法を適切に移管するために、多くのUSPガイドラインに従う必要があります[1]。例えば、L/*dp*（ここでLはカラム長さ、*dp*はカラムに充填されたパーティクルの粒子径を示す）は、オリジナルのHPLC分析法に規定されたカラムの-25%から＋50%の範囲に維持する必要があります。HPLCからUPLCに分析法を移管する際は、これら規制要件を認識する必要があります。

分析条件とシステム適合性要件に加えて、USPモノグラフには各分析に使用されるカラム充填剤の種類についても規定されています。例えば、L1充填剤はオクタデシルシランもしくはC_{18}カラム充填剤を示しています。しかしながら、エンドキャッピングやパーティクル基材などが異なる数多くの種類のC_{18}カラムが市販されており、これらの違いは全て化合物の保持や選択性に影響します。そのため、USPの分析法を実施する際には、重要なピークペア間の規定された分離度を含むことが多いシステム適合性要件に合うカラムを見つけるために、多くのカラムをスクリーニングする必要があるかもしれません。

実験条件

サンプル詳細

フルコナゾールおよびフルコナゾール類縁物質A、B、Cは米国薬局方(USP)から入手しました。サンプルは、フルコナゾールのUSPモノグラフに従って、まずアセトニトリルに溶解した後、80:20 (v:v) 水：アセトニトリルに希釈し、十分に溶解するため、ボルテックスおよび超音波にかけました。全ての標準物質について、サンプルの最終濃度は10 µg/mLとしました。

LC条件

LLCシステム：　ACQUITY UPLC I-Class システム および CH-A

検出：　ACQUITY UPLC PDA検出器

サンプル：　フルコナゾールおよびフルコナゾール類縁物質A、B、C (それぞれUSPカタログ番号1271700、1271711、1271722、1271733)

カラム　：　CORTECS UPLC C_{18}+ 1.6 µm、2.1×75 mm (製品番号 186007115)

CORTECS UPLC T3 1.6 µm、2.1×75 mm (製品番号 186008498)

ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 µm、2.1×75 mm (製品番号 186005614)

カラム温度：　40℃

移動相A：　水

移動相B：　アセトニトリル

移動相組成：　80：20　移動相A：移動相B

CORTECS UPLC C_{18}+ 1.6 µm、2.1×75 mm &
CORTECS UPLC T3 1.6 µm、2.1×75 mm

流速：　0.228 mL/min

注入量：　1.5 µL

ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 µm、2.1×75 mm

流速：　0.203 mL/min

注入量：　2.1 µL

波長：　260 nm

取込み速度：　10 Hz

ニードル洗浄溶媒：　90/10 メタノール/水

シール洗浄溶媒：　80/20 水/メタノール

データ管理：　Empower 3 FR2

結果および考察

フルコナゾールおよびその類縁物質の分析に向けたUSP収載分析法（Organic Impurities、Procedure I[3]）は、Watersカラムカリキュレーター（図1）を用いてUPLC分析法に移管しました。3.5 µm、4.6 × 150 mmカラムから1.6 µm、2.1 × 75 mmカラムに移管した結果、L/*dp*は9.4%増加し、USPの基準（オリジナル分析法のL /*dp*の-25% ～＋50%）の範囲内に十分入っています。

注入量はオリジナル分析法の20 µLから1.5 µLに低減し、一方の流速は、粒子径を考慮してオリジナル分析法の0.500 mL/minから移管した分析法では0.228 mL/minに低減しました。カリキュレーターでは、パーティクルの空隙率に応じてカラムボリュームの違いを考慮するため、空隙率の係数（全多孔性もしくは表面多孔性）を規定できます。

適切に移管した分析法について、ACQUITY UPLC I-ClassシステムでCORTECS UPLC C_{18}+およびCORTECS UPLC T3ケミストリーの両方を用いて分析を実施しました。CORTECSカラムはソリッドコア（表面多孔性とも呼ばれる）パーティクルを採用しており、全多孔性パーティクルと比べてクロマトグラフィー性能とスピードが向上します。CORTECS C_{18}+カラムは、表面チャージにより卓越したピーク形状と独自の選択性を提供します。CORTECS T3カラムは、極性化合物の保持向上のためにデザインされています。どちらのケミストリーもL1の充填剤として分類されるため、どちらもこのUSPモノグラフの条件を満たしています。各カラムで得られた分離のクロマトグラムの例は図に示しました。

CORTECS UPLC C_{18}+カラムでは、移管したUSP条件においては、フルコナゾールと類縁物質Cのベースライン分離が得られませんでした。一方、CORTECS T3ではフルコナゾールと全ての類縁物質についてベースライン分離が達成できました。

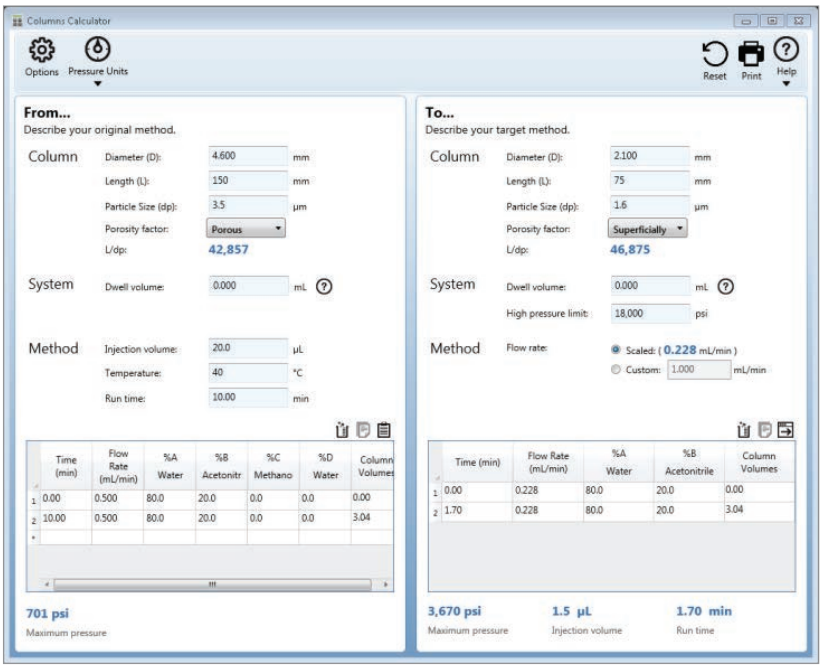

図 1. Waters カラムカリキュレーター：オリジナルの USP モノグラフ収載 HPLC 分析法から CORTECS ULC 1.6 µm、2.1 × 75 mmカラムを用いた UPLC への分析法移管

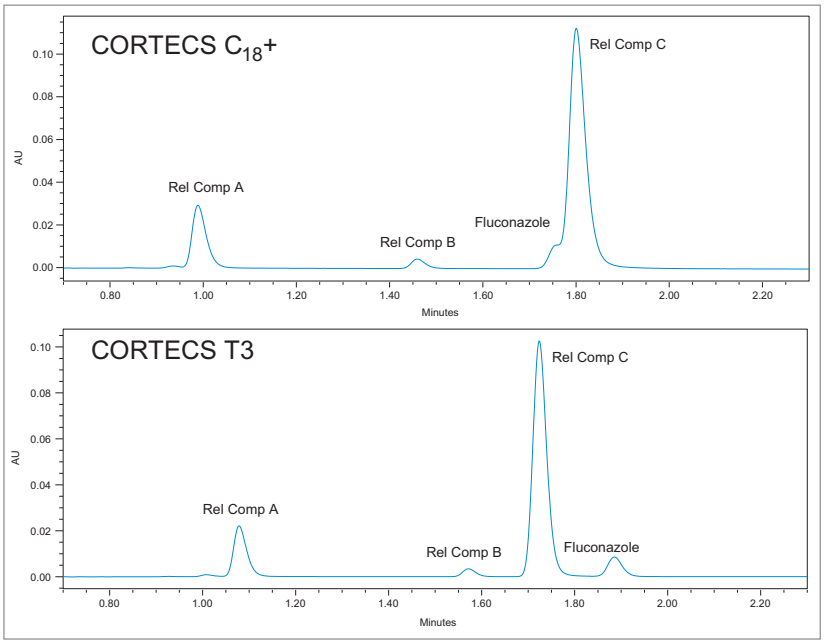

図 2. フルコナゾール USP 分析法：CORTECS UPLC C_{18}+ カラム（製品番号 186007115）（上）と CORTECS UPLC T3 カラム（製品番号 186008498）（下）で分析実施した比較

フルコナゾールおよびフルコナゾールの類縁物質A-Cのシステム適合性要件には、類縁物質Bと類縁物質Cの分離度が1.5以上であることが規定されています。さらに、保持時間および面積両方の相対標準偏差は5.0%以下である必要があります。CORTECS T3で得られた結果を表1に示しました。

	保持時間(分)	保持時間 RSD	面積 RSD	分離度
システム適合性要件	N/A	≤5.0	≤5.0	≥1.5 類縁物質B&C
類縁物質A	1.08	0.08	0.18	–
類縁物質B	1.57	0.05	0.53	9.38
類縁物質C	1.72	0.07	0.17	2.80
フルコナゾール	1.88	0.05	0.27	2.83

表1. CORTECS UPLC T3 カラムを用いて ACQUITY ULC I-Class システムで得られたフルコナゾールおよび類縁物質についてのクロマトグラフィー性能結果

CORTECS UPLC T3カラムを用いてシステム適合性要件を満たせることに加え、分析時間について、オリジナルのHPLC分析法の10分から移管したUPLC分析法では約2分に短縮できました。

さらに、ソリッドコアパーティクルを用いることでカラム効率とスループットを向上できることを示すために、全多孔性のACQUITY UPLC HSS T3 1.8 µm、2.1×75 mmカラム(製品番号 186005614)(粒子径を考慮して分析条件を移管)でも分析を実施した結果との比較を図3に示しました。

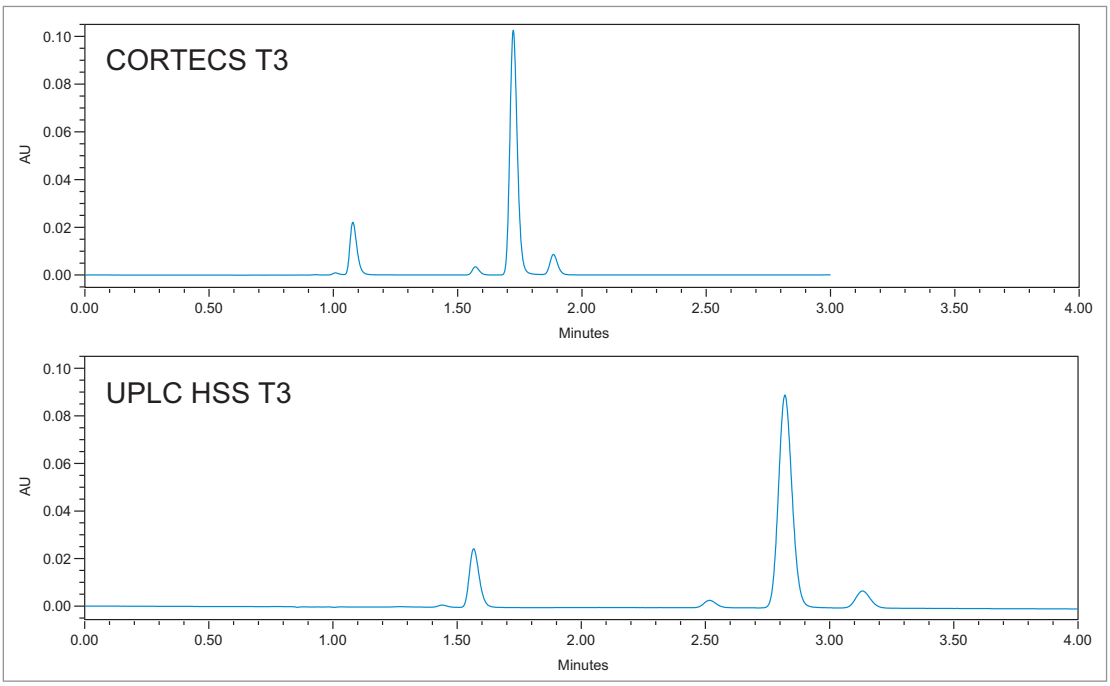

図3. ソリッドコアパーティクル(CORTECS T3 カラム - 上)と全多孔性パーティクル(ACQUITY UPLC HSS T3 カラム - 下)の比較。ACQUITY UPLC HSS T3 カラムでは流速 0.203 mL/min、注入量 2.1 µL。

粒子径の違いに関わらず、ソリッドコアパーティクルを使用することで化合物が早く溶出し、分析時間が約50%短縮されました。さらに、ソリッドコアカラムでは、全てのピークについてピーク幅が狭くなっていました。カラム効率(N)の計算に用いた式は以下で示されます：

$$N = 5.54\,[t_R/W_{1/2}]^2$$

ここで t_R はピークの保持時間、$W_{1/2}$ は半値幅です[2]。この式から、カラム効率はピーク幅だけでなくピークの保持時間にも依存することが分かります。最初に溶出するピーク（フルコナゾール類縁物質A）では、CORTECS UPLC T3カラムとACQUITY UPLC HSS T3カラムでカラム効率は大きく変わりませんでした。これは、保持時間が短くなると、ピーク幅低減によるカラム効率の増加を効率的に打ち消してしまうからです。他のピークについては、CORTECSカラムのソリッドコアパーティクルによりカラム効率が向上しました。分析時間の短縮、より幅の狭いピーク、カラム効率の向上は、ソリッドコアパーティクルを用いる利点です（図4）。

	50%でのピーク幅		カラム効率	
	CORTECS T3	UPLC HSS T3	CORTECS T3	UPLC HSS T3
類縁物質A	1.80	2.57	7049	7216
類縁物質B	1.81	3.27	14753	11603
類縁物質C	1.92	3.55	15769	12303
フルコナゾール	2.02	3.87	17180	12812

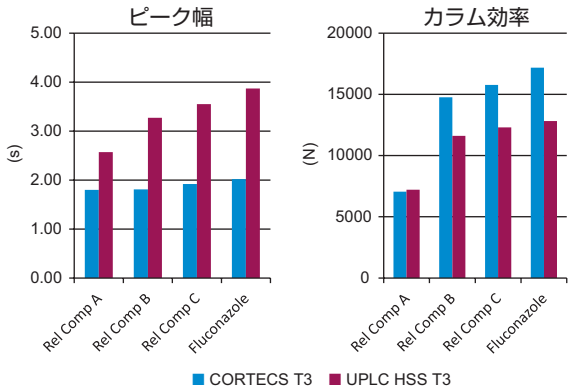

図4. ソリッドコアパーティクル（CORTECS T3）と全多孔性パーティクル（ACQUITY UPLC HSS T3）で得られたフルコナゾールおよび類縁物質についての結果比較

結論

従来のHPLC分析法を最新のUPLC分析法に移管できることで、分析時間と溶媒消費量を削減しながら、同等もしくはより向上した性能を得ることができます。Watersカラムカリキュレーターは、分析法を移管する際に役立つツールで、パーティクルの空隙率を考慮しながら、移管した流速、注入量、グラジエントテーブルを計算できます。さらに、規定された”L1”カラム充填剤の中でも、選択性や保持が異なる数多くのC_{18}カラムがあります。CORTECS T3カラムケミストリーは、USPモノグラフのシステム適合性を全て満たして、フルコナゾールおよび類縁物質の分離に適したカラムであることが実証されました。CORTECSカラムのソリッドコアパーティクルにより、トータルの分析時間を一般的なUPLCカラムと比べて約半分に、またオリジナルのHPLC分析法と比べて80%以上短縮しながら、幅の狭いピークと向上したカラム効率が得られます。

参考文献

1. Chapter <621> CHROMATOGRAPHY. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 37-NF 32 S2) Baltimore, MD: United Book Press, Inc.; 2014. p. 6376–85.
2. Snyder, Lloyd R., Kirkland, Joseph J., Dolan, John W., *Introduction to Liquid Chromatography, 3rd Edition.* Hoboken: Wiley & Sons, 2010. Print.
3. Official Monographs, USP 37 NF32 S2. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 37-NF 32 S2) Baltimore, MD: United Book Press, Inc.; 2014. p. 4968.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118

大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734

ショールーム 東京 大阪

サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、ACQUITY、ACQUITY UPLC、UPLC、Empower、CORTECS および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2016 Waters Corporation. Produced in Japan. 2016年9月 72005791JA PDF