

2021年9月に公開された第十八改正日本薬局方 (JP) 第一追補のパブリックコメントにおいて、日米欧三薬局方で調和合意された内容に基づき規定された『2.00 クロマトグラフィー総論』に、クロマトグラフィー条件の調整できる範囲が明記されました。これによって許容される変更可能範囲内でカラムサイズや分析条件を最適化することで、分析の高速化が期待できます。

本報ではJP18 トラネキサム酸の定量法試験において、『2.00 クロマトグラフィー総論』に則った範囲内で条件を変更し、分析時間の短縮及び省溶媒化した分析例をご紹介します。

※分析条件の変更はJP18 第一追補分より適用される予定の内容であり、過去に公示された内容に対して行うものではありません。そのため、本テクニカルノートは参考データとなります

JPにおける変更可能な項目

『2.00 クロマトグラフィー総論』ではシステム適合性の要件を満たすことで、LCカラムや装置条件等の変更が許されています。

日本薬局方 〈令和3年9月パブコメ案〉 三薬局方国際調和		
カラム	官能基	変更不可
	粒子径	全多孔性粒子：規定された L/d_p 比が-25% ~ +50%の範囲に変更可能 表面多孔性粒子：理論段数が規定されたカラムの-25% ~ +50%の範囲であれば、 他の L と d_p の組み合わせも使用可能
	長さ	
	内径	粒子径やカラム長に変更がない場合に、カラム内径を調整する場合があるかもしれない
装置	流量	カラムの内径と粒子径の両方の変更により、以下の計算式で変更可能 $F_2 = F_1 \times [(d_{c2}^2 \times d_{p1}) / (d_{c1}^2 \times d_{p2})]$ ※3 μmをまたぐ場合は細かい規定あり。カラムの粒子径と長さの変更による調整後、±50%の変更が許容される
	注入量	カラムの粒子径と長さを変更する場合、注入量の調整は以下の計算式が利用可能 $V_{inj2} = V_{inj1} \times (L_2 \times d_{c2}^2) / (L_1 \times d_{c1}^2)$
	検出波長	変更不可
	カラム温度	±10℃
移動相	pH	±0.2
	緩衝液濃度	変更可能なpH範囲内にて±10%
	混合比	50%以下の組成の移動相は±30% (相対) ※ただし、全体に対して±10%以内

流量

F_1 : 医薬品各条の流量 (mL/min)
 F_2 : 変更後の流量 (mL/min)
 d_{p1} : 医薬品各条のカラム粒子径 (mm)
 d_{p2} : 使用するカラム粒子径 (mm)
 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)

注入量

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_c は流量と同義

JP18 トラネキサム酸 定量法の分析例

JP18 トラネキサム酸試験を分析例として、JP『2.00 クロマトグラフィー総論』に規定される変更可能範囲内でカラムサイズを変更し、高速化条件として分析を行いました。

＜JP18トラネキサム酸 定量法の試験条件＞

検出器：紫外吸光度計（測定波長：220 nm）

カラム：内径6.0 mm, 長さ25 cmのステンレス管に5 μm の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充填する。

カラム温度：25°C付近の一定温度

移動相：無水リン酸二水素ナトリウム11.0 gを水500 mLに溶かし、トリエチルアミン5 mL及びラウリル硫酸ナトリウム1.4 gを加える。リン酸又はリン酸溶液（1→10）でpH 2.5に調整した後、水を加えて600 mLとする。この液にメタノール400 mLを加える。

流量：トラネキサム酸の保持時間が約20分になるように調整する。

※InertSustain AQ-C18を用いて1.4mL/minで保持時間を調整したアプリケーション*と比較しました。

注入量：20 μL

*：詳細は弊社テクニカルノートLT092をご参照ください。

https://www.gls.co.jp/technique/app/detail.php?data_number=LT092

JP記載のカラムサイズは、カラム長さ (L) は25 cm、粒子径 (d_p) は5 μm なので、 L/d_p の値は50,000となります。

L/d_p の値が-25% ~ +50%の範囲で変更可能であるため、変更可能な L/d_p の範囲は次のようになります。

$$37,500 \leq L/d_p \leq 75,000$$

今回は、粒子径 (d_p) を3 μm 、内径 (d_c) を3.0 mmのカラムを選択し、高速化条件を下表のように設定しました。

	JP 条件	変更可能範囲	高速化条件
カラム長さ (L , mm)	250 mm	113 ~ 225 mm	150 mm
カラム粒子径 (d_p , μm)	5 μm	-	3 μm
L/d_p	50,000	37,500 ~ 75,000	50,000
内径 (d_c , mm)	6.0 mm	-	3.0 mm
流量 (F , mL/min)	1.4 mL/min	0.35 ~ 1.06 mL/min	0.35 mL/min
注入量 (V_{inj} , μL)	20 μL	3 μL	3 μL

JP 記載条件<変更前>

HPLC条件

カラム : InertSustain AQ-C18
(5 μ m, 250 x 6.0 mmI.D.)

溶離液 A) リン酸緩衝液^{※1}
B) CH₃OH
A/B = 60/40, v/v

温度 : 25 °C

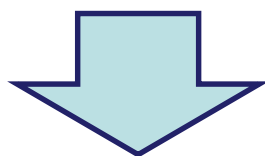
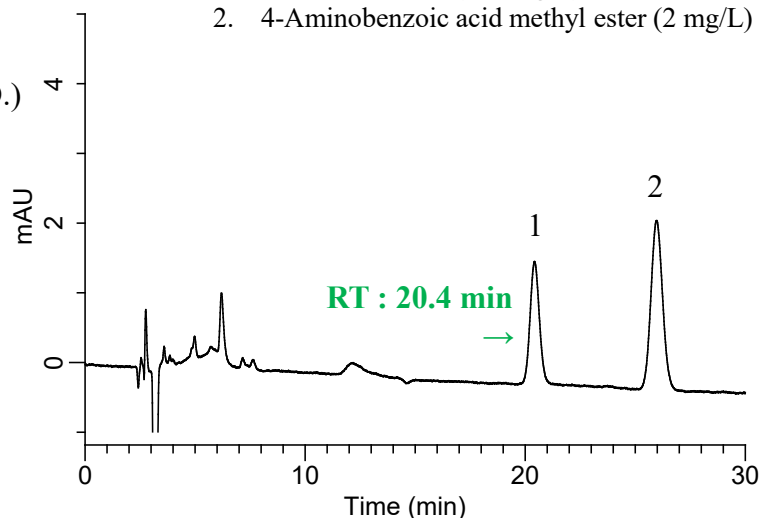
検出器 : UV 220 nm

注入量 : 20 μ L

流量 : 1.4 mL/min

分析時間 : 約30分
使用溶媒量 : 約42 mL

1. Tranexamic acid (200 mg/L)
2. 4-Aminobenzoic acid methyl ester (2 mg/L)



高速化条件<変更後>

HPLC条件

カラム : InertSustain AQ-C18 HP
(3 μ m, 150 x 3.0 mmI.D.)

溶離液 A) リン酸緩衝液^{※1}
B) CH₃OH
A/B = 60/40, v/v

温度 : 25 °C

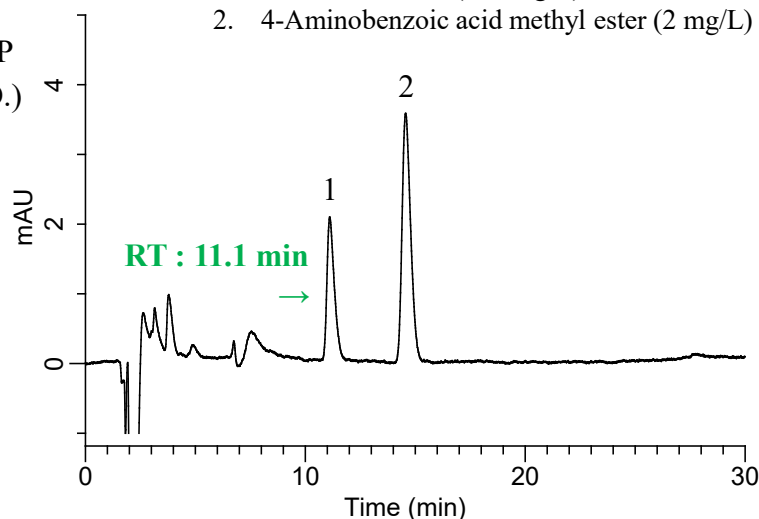
検出器 : UV 220 nm

注入量 : 3 μ L

流量 : 0.35 mL/min

分析時間 : 約15分
使用溶媒量 : 約5.25 mL

1. Tranexamic acid (200 mg/L)
2. 4-Aminobenzoic acid methyl ester (2 mg/L)



<システム適合性試験結果>

	基準	JP記載条件		高速化条件	
分離度 (1,2)	5 以上	6.4	PASS	5.3	PASS
RSD% (1) (n = 6)	0.6 % 以下	0.02%	PASS	0.55%	PASS

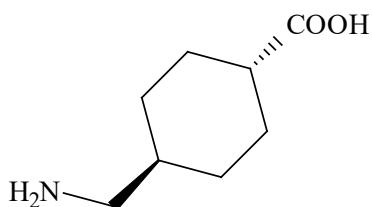
『分析時間は約1/2に短縮』
『使用溶媒量は約1/8に省溶媒化』
を達成できました。

カラムのサイズダウンによって、
移動相の平衡化時間の短縮も
期待できます。

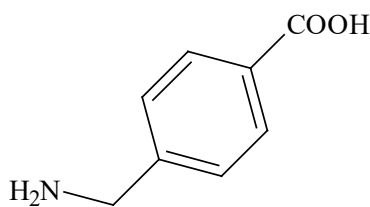
※1 リン酸緩衝液
前ページの試験条件参照。

JP記載条件及び高速化条件の結果は上表の通りとなり、
両条件ともにシステム適合性の規定を満たすことができ、
良好な結果が得られました。

構造式



トラネキサム酸



4-アミノメチル安息香酸

Structures are created using Chemistry 4-D Draw which is provided by ChemInnovation Software, Inc.

※本データは、薬局方分析を検討するお客様のカラム選択のための参考資料です。
お客様装置におけるシステム適合性を保証するものではありません。

使用製品

●分析カラム

InertSustain AQ-C18 HP
3 μm, 150 x 3.0 mm I.D.
Cat.No. 5020-89930



●バイアル関連製品

・スクリーバイアル
1.5 mL 褐色(ラベル付) 入数100本
Cat.No.1030-51003



・セプタム付スクリーキャップ
PTFE_赤/シリコン_白 厚さ1.0 mm
Cat.No.1030-51222

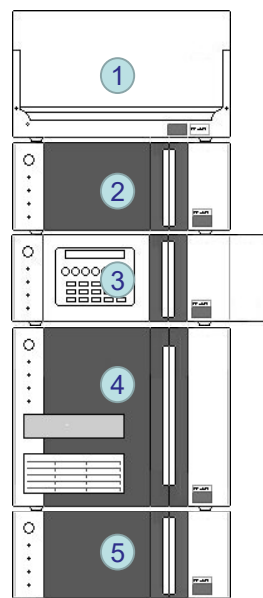


使用装置

●HPLC装置

日立HPLCシステム Chromaster

No.	品名	型番
1	オーガナイザー	
2	検出器	5430
3	カラムオープン	5310
4	オートサンプラー	5280
5	ポンプ	5160



ジールサイエンス株式会社

〒163-1130 東京都新宿区西新宿 6-22-1 新宿スクエアタワー 30F
TEL.03-5323-6611 FAX.03-5323-6622

※各試験法は、変更される場合がありますので、分析の前に確認されることをお薦めします。

データに起因し、直接的または間接的に生じたいかなる損害に対しても、当社が責任をおうものではありません。また、記載事項につきましては、予告無しに改訂する場合がありますので、あらかじめご了承ください。

カスタマーサポートセンターでは、ノウハウのご提供と分析に関するフォローを行っております。お困りの際には、カスタマーサポートセンターまでお気軽にお問い合わせください。

カスタマーサポートセンター (土・日・祝除く 9:00-17:00)

☎ 04-2934-1100 ✉ info@glsc.co.jp



【アプリケーションの検索はこちら】

https://www.glsc.co.jp/technique/app/app_search.html