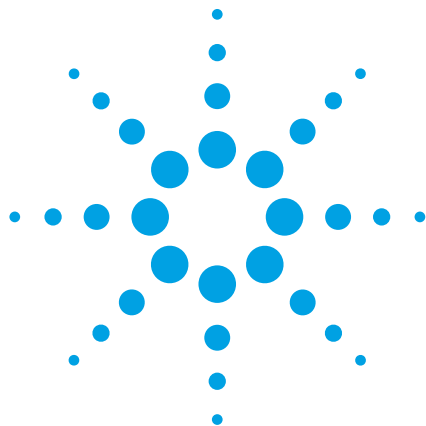




USP で規定された範囲内で高速化された HPLC 分析

Agilent 1200 シリーズ Rapid Resolution LC システムを用いたプラバスタチンナトリウムの USP 純度試験の事例研究

アプリケーション

製造 QA/QC

著者

Syed Lateef
Agilent Technologies
Bangalore, India

概要

最近改訂された米国薬局方 (USP) の General Chapter <621> では、システム適合性の要件を満たした上で、クロマトグラムの品質を向上させるためにカラムのサイズや粒径などを変更することが認められています。これらの変更では、Agilent 1200 シリーズ Rapid Resolution LC (RRLC) システムと Agilent メソッドトランスレータソフトウェアを利用して作成する高速分離メソッドを利用することができます。高速分離メソッドを作成するにはさまざまな方法がありますが、その 1 つに USP メソッドなどの確立されたメソッドから作成する方法があります。

このアプリケーションノートでは、USP メソッドから許容される変更を行ってシステム適合性の要件を満たす高速分離メソッドを作成する方法を示します。プラバスタチンの USP 純度試験では、粒径 3.5 μm のカラムと 1 mL/min の流量で 30 分のグラジエント分離が推奨されています。これらの分離条件は、粒径 1.8 μm のカラムと 1.5 mL/min の流量を適用する高速分離条件に変更することができます。粒径と流量の他に、カラム内径とカラム温度を調整して、より高速な分離メソッドを作成することもできます。Agilent メソッドトランスレータを使用することで、高速分離メソッドへの移行は速やかに効率よく行われました。USP のメソッドをベースとしたこのような高速分離メソッドは、バリデーション済みのメソッドに非常に近いメソッドとしてハイスループット分析で使用することができます。



Agilent Technologies

はじめに

ブラバスタチンナトリウムはコレステロールの生合成を抑制し、心臓や血管の疾病予防に効果があります。ブラバスタチンの USP 純度試験では、内径 4.6 mm、長さ 75 mm、粒径 3.5 µm の L1 カラム (ODSカラム) を流量 1 mL/min で使用することが推奨されています。ただし、改訂された USP の General Chapter <621> では、「システム適合性の要件を満たした上で変更によりクロマトグラムの品質が向上する場合」¹ にのみカラムのサイズや粒径などの変更を許可しています。このアプリケーションノートでは、USP で許容されている変更範囲内で、より高速な分離メソッドを作成し、システム適合性のパラメータをテストしました。適当な HPLC メソッドから開始し、より小さな内径とより小さな粒径のカラムを選択する場合に必要なパラメータを決めることで、より高速な分析が可能になります。グラジエント時間を短縮する一方で温度と流量を上げることにより、分析時間のさらなる短縮が可能になります。² より高速な HPLC 分析には、大量のサンプルを分析する際の生産性向上や溶媒消費量削減によるコスト削減という利点があります。

表 1 に、許容されているクロマトグラフィ条件の変更範囲と、ブラバスタチンの分析で適用したメソッドを示します。

改訂された General Chapter <621> によると、移動相の pH、緩衝液の塩濃度、移動相の組成比、および検出波長も変更できますが、今回の実験では行いませんでした。

ブラバスタチンナトリウムには、USP によって報告されている 6 つの不純物があります。

- 3'-ヒドロキシブラバスタチン
- 6'-エピブラバスタチン

変更の許容範囲	ブラバスタチンの純度試験のメソッド (USP)	変更の許容範囲	高速グラジエント条件
カラム長さ (± 70%)	75 mm	22.5–127.5 mm	30 mm
カラム内径 (± 25%)	4.6 mm	3.45–5.75 mm	4.6 mm
粒径 (–50%)	3.5 µm	1.75 µm	1.8 µm
流量 (± 50%)	1.0 mL/min	0.5–1.5 mL/min	1.5 mL/min
注入量 (定量限界を満足できる範囲内で減らす)	10 µL	可変	4.0 µL*
カラム温度 (±10 °C)	規定されていない	可変	35 °C

* Agilent メソッドトランスレータにより得られた値

表 1
ブラバスタチンの USP 純度試験で許容される分析条件の変更

- 3α-ヒドロキシソコンパクチン
(関連化合物 A または RCA と呼ぶ)
- ペンタノイル不純物
- ブラバスタチンラクトン
- コンパクチン

Agilent RRLC システムでの高速不純物分析メソッドの実証には、不純物 2、3、5、および 6 のみを使用しました。

実験

サンプルの調製

- サンプル溶媒:** メタノールと水の 1:1 溶液を使用しました。メタノールは HPLC グレード (J.T. Baker)、水は Milli-Q 水 (Millipore) を使用しました。
- 相対リテンションタイム (RRT) テストサンプル:** ブラバスタチンナトリウム、およびその不純物のうち 4 つ (6'-エピブラバスタチン、RCA、ブラバスタチンラクトン、およびコンパクチン) をサンプル溶媒に溶かしました。ブラバスタチンについては 65 µg/mL、不純物についてはそれぞれ 7.5 µg/mL

とした RRT テストサンプルを調製して、USP で報告されている値と比較しました。ブラバスタチンラクトンとコンパクチンは、Varda Biotech (インド、ムンバイ) から入手しました。RCA は USP から、6'-エピブラバスタチンは European Pharmacopoeia (EP) から入手しました。

- システム適合性サンプル:** USP に従って、ブラバスタチン 1,1,3,3-テトラメチルブチルアミン (ブラバスタチン-TMBA) 0.6 mg/mL と RCA 0.001 mg/mL の混合溶液をサンプル溶媒で調製し、システム適合性サンプルとしました。システム適合性サンプルを使用して、RCA とブラバスタチンの RRT および分離度を確認しました。ブラバスタチン-TMBA と RCA は、USP から入手しました。
- 標準サンプル:** 1.25 µg/mL ブラバスタチン-TMBA 溶液をサンプル溶媒で調製し、標準サンプルとしました。標準サンプルを使用して、ピーク面積の相対標準偏差 (RSD) を確認しました。

- **直線性テストサンプル:** 0.5 mg/mL プラバスタチンナトリウムに RCA を添加して調製しました (RCAの濃度: 0.25~1.10 µg/mL の範囲で 6 点)。

装置

Agilent 1200 シリーズ Rapid Resolution システムの構成は次のとおりです。

- Agilent 1200 シリーズバイナリポンプ (デガッサ付き)
- Agilent 1200 シリーズオートサンブラ SL および Agilent 1200 シリーズオートサンブラ SL Plus (サーモスタット付き)。両方のモジュールを同じ LC システムで交互に使用しました。
- Agilent 1200 シリーズダイオードアレイ検出器
- Agilent 1200 シリーズカラムコンパートメント SL
- RRLC モード: 低ディレイボリウムコンフィグレーションのバイナリポンプ (ミキサおよびダンパなし) とオートサンブラより下流で内径 0.12mm の配管を使用しました。オートサンブラのディレイボリウム小さくしても、ピークの溶出に大きな差はありませんでした。モジュールは、ポンプとデガッサおよび他のモジュール群の 2 つに分けて設置し、ディレイボリウムが最小になるように接続しました³。
- コンベンショナル HPLC モード: バイナリポンプは通常のディレイボリウムで使用し、すべての配管は内径 0.17 mm を使用しました。モジュールの置き方は RRLC と同じとしました。
- Agilent メソッドトランスレータ、バージョン 2.0

パラメータ		詳細	
DAD の波長		シグナル; 238 nm BW 4 nm、Ref; 300 nm BW 20 nm	
カラム		USP メソッド: Agilent ZORBAX SB-C18、4.6 mm × 75 mm、3.5 µm 高速分離メソッド: Agilent ZORBAX SB-C18、4.6 mm × 30 mm、1.8 µm	
サンプル溶媒		メタノール:水=50:50	
ニードル洗浄		サンプル溶媒を使用して 3 秒間洗浄ポートで洗浄	
サンプル温度		15 °C	
移動相		緩衝液: 0.08 M リン酸溶液 (トリエチルアミンで pH 7.0 に調整) A: 水:緩衝液:アセトニトリル=52:30:18 B: 水:緩衝液:アセトニトリル=10:30:60	
USP メソッド		時間	%B
流量	1.0 mL/min	0	0
ポストタイム	3.0 分	3.0	0
カラム温度	25 °C	26.5	100
注入量	10 µL	26.6	0
レスポンスタイム	2 秒	30	0
高速分離メソッド		時間	%B
流量	1.5 mL/min	0	0
ポストタイム	0.8 分	0.8	0
カラム温度	35 °C	7.07	100
注入量	4 µL	7.09	0
レスポンスタイム	1 秒	8.0	0

結果と考察

高速分析におけるプラバスタチンのリテンションタイムと不純物のリテンションタイムの関係

Agilent メソッドトランスレータを使用して、プラバスタチンの USP 純度試験のメソッドを高速分離メソッドに変換しました。Agilent メソッドトランスレータの変換結果は、そのまま使用しました。目的の流量をトランスレータへ入力する

と、その流量に対応したグラジエント条件が計算されます。Agilent 1200 シリーズ RRLC システムを使用する利点は、コンベンショナル HPLC モードと RRLC モードを 1 台のシステムで相互に交換可能なことです。このアプリケーションノートでは、USP メソッドの実行にはコンベンショナル HPLC モードを使用し、高速分離メソッドでは RRLC モードを使用しました。

4 つの不純物とブラバスタチンを含む RRT テストサンプルを コンベンショナル HPLC モードと RRLC モードの両方でテストしました。図 1 に、両方のモードでテストした RRT テストサンプルのクロマトグラムを示します。高速分離メソッドでも、USP の条件と同様に 4 つの不純物はすべて適切に分離されています。

RRT テストサンプルを使用して、RRT を計算し USP に記載されている RRT と比較しました。表 2 には、実験で得た RRT と USP に記載されている RRT を示しました。USP の値と高速分離メソッドで得られた RRT 値とほぼ同じであることが示されました。

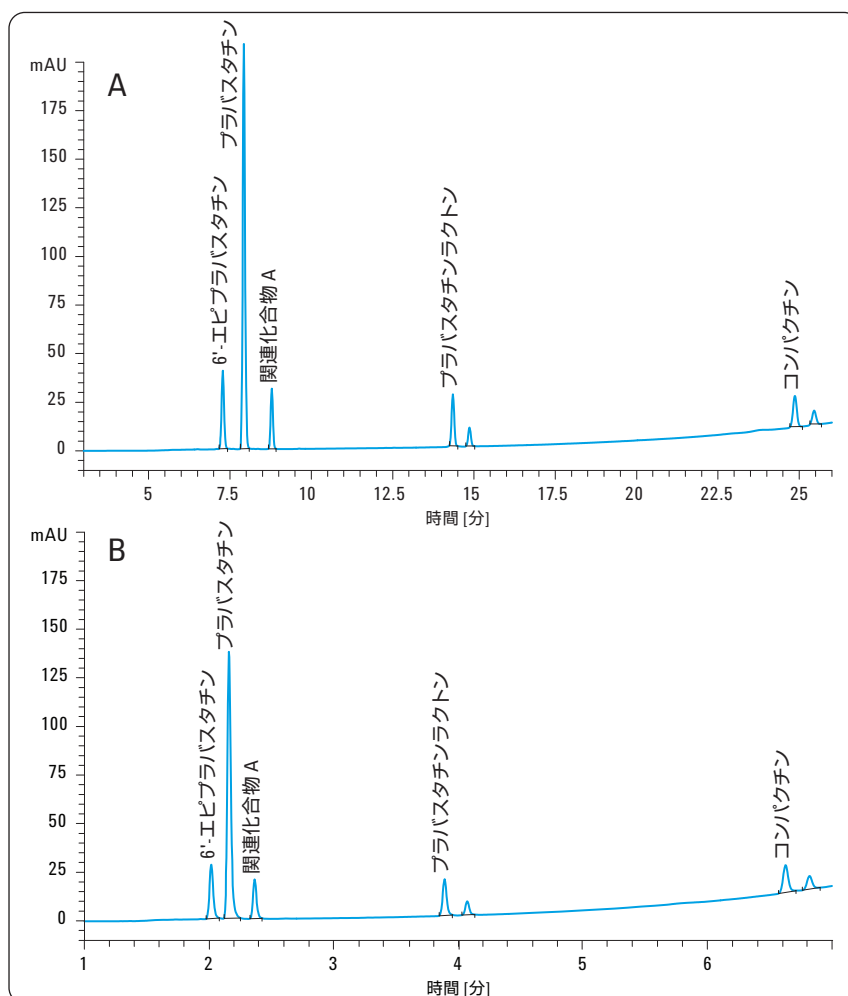


図 1
A) USP メソッドにより得られたクロマトグラム。B) Agilent メソッドトランスレータに基づく高速分離メソッドで得られたクロマトグラム

名前	USP記載の RRT	USP メソッドの 実験結果 (4.6 mm × 75 mm 3.5 µm カラム)	高速分離メソッドの 実験結果 (4.6 mm × 30 mm, 1.8 µm カラム)
3"-ヒドロキシブラバスタチン	0.33	— *	— *
6'-エピブラバスタチン	0.92	0.92	0.94
3α-ヒドロキシコンバクチン	1.1	1.1	1.1
ペンタノイル不純物	1.2	— *	— *
ブラバスタチンラクトン	1.8	1.8	1.8
コンバクチン	3.1	3.1	3.2

* 今回の実験対象には含まれない不純物

表 2
USP メソッドで報告されている 6 つの不純物のうち 4 つの不純物の RRT と、USP メソッドおよび高速分離メソッドの実験で得られた結果

オートサンブラ SL plus を使用した 高速分析のシステム適合性

USP によると、ブラバスタチン-TMBA と 1 µg/mL の濃度でスパイクした RCA を含むシステム適合性サンプルは、2.0 以上の分離度を示し、RCA は約 1.1 の RRT を持つ必要があります。図 2 に、高速分離メソッドで実行されたシステム適合性サンプルを連続注入 (n=3) したときのクロマトグラムの重ね書きを示します。RCA の RRT は約 1.1、分離度は 3.8 であり、システム適合性の要件を満たしていることが示されました。

低濃度のブラバスタチンの ピーク面積精度

1.25 µg のブラバスタチン-TMBA を含む標準サンプルを 6 回注入して、ブラバスタチンのピーク面積の RSD を確認しました。USP では、標準サンプルを 6 回連続注入したときのピーク面積の RSD は 10.0% 以下になる必要があります。この実験では、精度要件を満たす 1.0% の値が得られました。

高速分析時のスパイクされた 不純物の直線性

USP メソッドでは、ブラバスタチンの濃度が 0.5 mg/mL である場合 RCA の上限濃度は 0.2% (1 µg/mL) と指定されています。検出器のレスポンスとオートサンブラの精度を確認するために、0.5 mg/mL のブラバスタチンナトリウム溶液に RCA を 0.25~1.1 µg/mL となるようにスパイクしたサンプルを調製しました。表 3 に、各 RCA 濃度レベルで得られたシグナル/ノイズ (S/N) 比を示します。

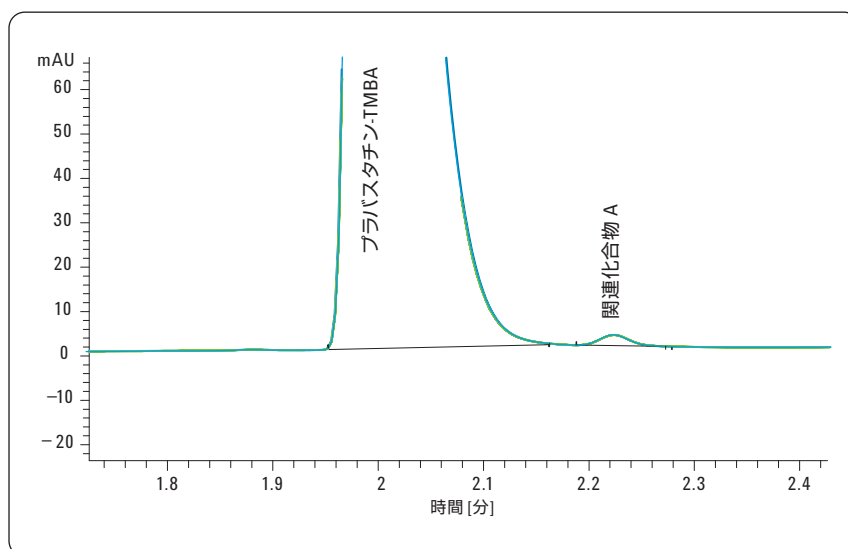


図 2
システム適合性サンプルの 3 回連続注入時のクロマトグラムの重ね書き

レベル	RCA µg/mL (不純物率)	S/N 比
1	0.25 (0.05)	11.8
2	0.5 (0.10)	25.0
3	0.7 (0.14)	32.3
4	0.9 (0.18)	34.9
5	1.0 (0.20)	38.6
6	1.1 (0.22)	43.3

表 3
1.0 µg/mL の限界濃度を下回るレベルと上回るレベルでスパイクした RCA

0.05% に相当する 0.25 $\mu\text{g/mL}$ は、高速分離メソッドの定量限界 (LOQ) です。図 3 に、各注入濃度でのクロマトグラムの重ね書きを示します。スパイクされた濃度の上昇と共に、レスポンスの様な上昇が見られます。RCA の直線性プロットを図 4 に示します。回帰直線の相関係数 (R^2) は 0.998 でした。

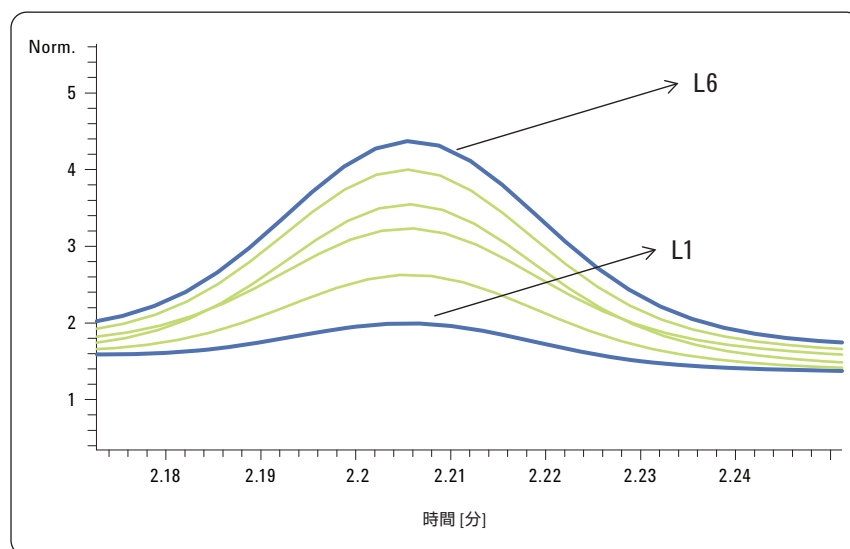


図 3
0.25 $\mu\text{g/mL}$ (L1) から 1.1 $\mu\text{g/mL}$ (L6) でスパイクした RCA のレスポンス

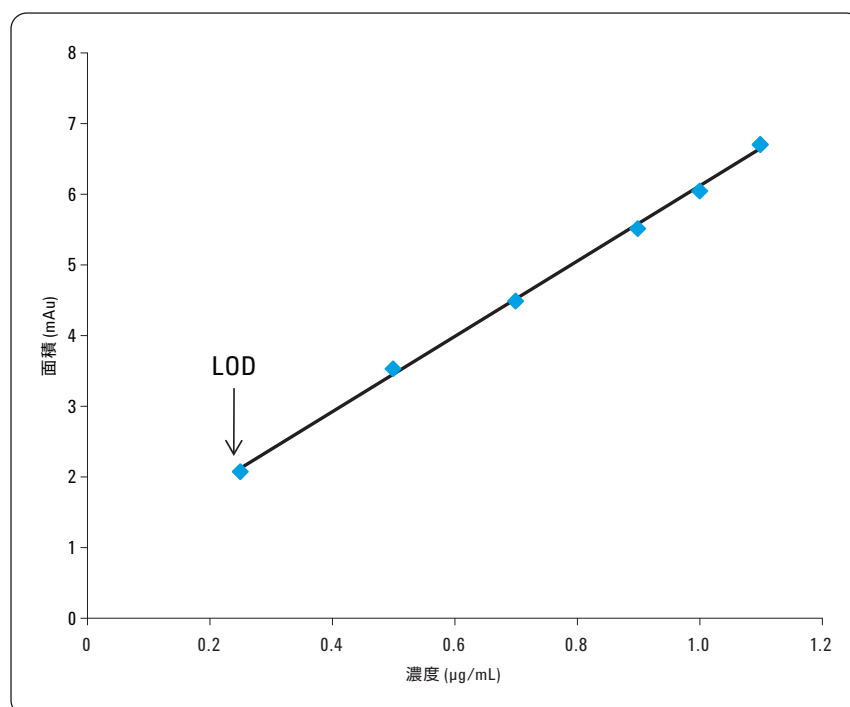


図 4
0.25 $\mu\text{g/mL}$ (L1) から 1.1 $\mu\text{g/mL}$ (L6) でスパイクした RCA の直線性

結論

クロマトグラフィーの特性を失うことなく分析時間を短縮すれば、分析メソッドのバリデーションにかかる時間を短縮できます。高速分析は、日常的な品質保証/品質管理のコスト削減に貢献します。より高速な分析時間 8 分のプラバスタチンの純度試験メソッドは、分析時間が 30 分の USP メソッドを基に、最新の USP で変更が許可されているクロマトグラフィーのパラメータのみを変更することで作成されました。新しいグラジエント条件は、Agilent メソッドトランスレータで得られたものを変更せずに使用しました。この新しい高速分離メソッドは、すべてのシステム適合性の要件を満たします。RCA とプラバスタチンの分離度は 3.8 で、これは USP の限界値 2.0 をはるかに上回っています。また、標準溶液による精度確認テストでは、10% の許容限界を下回る 1.0% の RSD が得られました。高速分離メソッドの直線性テストでは、回帰直線の相関係数 0.998 の直線性が得られました。USP で許容されている範囲内でのみ変更することで得られた高速分離メソッドでは、サンプルあたりのコストが 1/3 以下に削減されます。

参考文献

1. *U.S. Pharmacopeia 31-NF 26*, second supplement, **2008**
2. M. Frank, "Achieving Faster Analysis with the Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC System and 2.1 mm ID Columns," Agilent Application Note, Publication number 5989-4502EN, **2006**
3. M. Woodman, "Improving the Effectiveness of Method Translation for Fast and High Resolution Separations," Agilent Application Note, Publication number 5989-5177EN, **2006**

www.agilent.com/chem/jp

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2009
Published February 1, 2009
Publication Number 5990-3528JAJP



Agilent Technologies