

# 点眼薬の品質管理における サンプル前処理の自動化

## アプリケーションノート

### 著者

Bart Tienpont, Maria Rambla Alegre,  
Frank David, and Pat Sandra  
Research Institute for Chromatography  
Kennedypark 26  
B-8500 Kortrijk  
Belgium

### 概要

点眼薬の品質管理メソッドに、WeighStation を搭載する Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを導入しました。自動サンプル前処理は、2 つの活性成分を含む較正用の標準溶液の作成 (4 レベル) と、計量および希釈による点眼薬サンプルの前処理で構成されます。この 2 つのシーケンスを完全に自動化しました。この分析では、優れた再現性と直線性が得られています。



**Agilent Technologies**

## はじめに

WeighStation を搭載する Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いて、点眼薬に含まれる 2 つの活性成分 (デキサメタゾンとクロラムフェニコール) を測定しました。デキサメタゾンは、もっとも強力なコルチコステロイドの 1 つで、プレドニゾロンの 5~14 倍、コルチゾンおよびヒドロコルチゾンの 25~75 倍の効能があります。広域スペクトル抗生物質であるクロラムフェニコールをデキサメタゾンに加えれば、ブドウ膜前部の炎症 (虹彩炎、虹彩毛様体炎) の治療で高い効果が得られます。炎症治療用の点眼薬には、上記のいずれか、または両方の成分が含まれることがあります。通常は、粘度の高い水性溶液として処方されます。

一般的な QC 分析手順は、1) 水 (水性移動相) に活性成分を含む 4 レベル校正用標準溶液の作成、2) 水 (水性移動相) による一定量の点眼薬の希釈で構成されます。表 1A に示すように、サンプル前処理は通常、メスフラスコでおこなわれます。まず、デキサメタゾンとクロラムフェニコールをそれぞれ含む 2 つの原液を作成します。校正用標準溶液には、デキサメタゾンの場合は 16~64 µg/mL、クロラムフェニコールの場合は 80~320 µg/mL の範囲で、両方の成分が含まれています。サンプルは通常、水性移動相で 25 倍に希釈されます。サンプル前処理後、校正用標準溶液とサンプルを HPLC と UV 検出で分析します。標準溶液は安定性が低いいため、通常はサンプルを分析するたびに毎回作成します。

このアプリケーションノートでは、校正用標準溶液の作成とサンプル希釈の自動化について説明しています。一般的なメソッド設定を表 1B に示しています。正確な校正用標準溶液濃度の維持とサンプルの計量には、WeighStation を使用しました。

## 実験方法

### 化学物質

デキサメタゾンとクロラムフェニコールを Sigma-Aldrich (ペーアセ、ベルギー) から入手しました。水とアセトニトリル (AcCN) は HPLC グレードのものを使用しました (BioSolve、オランダ)。リン酸と水酸化ナトリウムを Sigma-Aldrich から入手しました。

### 構成

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチに、2 つの Agilent 7693A オートサンブラを設置しました。フロントインジェクタには、大容量シリンジキャリッジと 500 µL シリンジ (p/n G4513-60561) が含まれています。バックインジェクタには、大容量シリンジキャリッジと 50 µL シリンジ (p/n 5183-0314) が含まれています。

### ワークベンチメソッド

#### リソースレイアウト

図 1 に、ワークベンチのリソースレイアウトを示しています。移動相 A (0.3 % リン酸水、水酸化ナトリウムで pH = 3 に調整) とアセトニトリルを「ケミカルリソース」として、それぞれポジション 81~150 および 71~72 に配置しました。フロントおよびバックタワーのバイアル A1 および B1 中の溶媒は水です。希釈標準溶液を作成するすべてのバイアルは、「空のコンテナ」と定義されます。

#### ワークベンチメソッドプログラムの手順

4 つの校正用標準溶液作成のための 7696A サンプル前処理ワークベンチプログラムを、図 2 に示しています。空のバイアルを計量したのち、システムを一時停止し、固体標準試料を添加します。その後、自動プロセスを再開すると、溶媒が添加され、4 つの濃度の校正用標準溶液が作成されます。最低濃度については 6 回繰り返して作成します。

表 1A. 一般的なサンプル前処理 (USP または EP メソッド)

	コード	原液の作成	ターゲット濃度 (µg/mL)
較正用標準溶液	DEX Stck	25 mL バイアルでデキサメタゾン 10 mg を計量し、水 25 mL を添加	400
	CLO Stck	25 mL バイアルでクロラムフェニコール 10 mg を計量し、水 25 mL を添加	400
		<b>標準溶液の作成</b>	<b>ターゲット濃度 (µg/mL) デキサメタゾン/クロラムフェニコール</b>
	LVL1	移動相 25 mL 中で Dex Stck 1 mL + CLO Stck 5 mL	16/80
	LVL2	移動相 25 mL 中で Dex Stck 2 mL + CLO Stck 10 mL	32/160
	LVL3	移動相 25 mL 中で Dex Stck 3 mL + CLO Stck 15 mL	48/240
	LVL4	移動相 25 mL 中で Dex Stck 4 mL + CLO Stck 20 mL	64/320
		<b>点眼薬サンプルの前処理</b>	
サンプル	SAM	点眼薬サンプル 1 mL または 1 g + 移動相 25 mL	

表 1B. Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチによるサンプル前処理

	コード	原液の作成	ターゲット濃度 (µg/mL)
較正用標準溶液	DEX Stck-1	2 mL バイアル *でデキサメタゾン 4 mg を計量し、AcCN 1 mL を添加	4,000
	DEX Stck	DEX Stck-1 150 µL + 移動相 1,350 µL (1/10 で希釈)	400
	CLO Stck-1	2 mL バイアル *でクロラムフェニコール 4 mg を計量し、AcCN 1 mL を添加	4,000
	CLO Stck	CLO Stck-1 150 µL および移動相 1,350 µL (1/10 で希釈)	400
		<b>標準溶液の作成</b>	<b>ターゲット濃度 (µg/mL) デキサメタゾン/クロラムフェニコール</b>
	LVL1	Dex Stck 20 µL + CLO Stck 100 µL + 移動相 380 µL	16/80
	LVL2	Dex Stck 40 µL + CLO Stck 200 µL + 移動相 260 µL	32/160
	LVL3	Dex Stck 60 µL + CLO Stck 300 µL + 移動相 140 µL	48/240
	LVL4	Dex Stck 80 µL + CLO Stck 400 µL + 移動相 20 µL	64/320
		<b>最終サンプルの前処理</b>	
サンプル	SAM	点眼薬サンプル 1 滴* + 移動相 1 mL (約 35~40 mg)	

\*固体粉末または粘度の高い液体は、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを一時停止して手作業で添加します。その後、計量手順をおこないます。

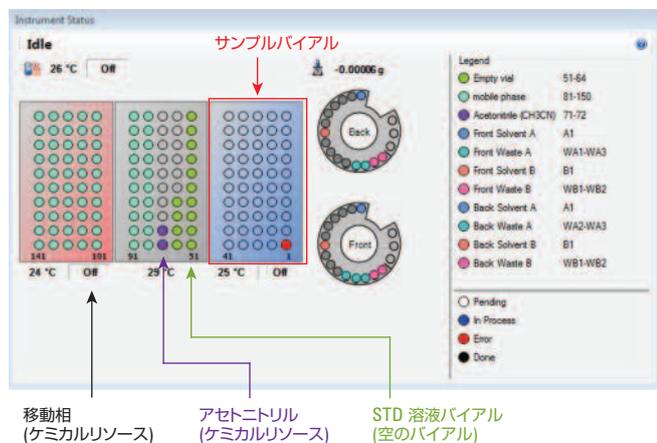


図 1. デキサメタゾンおよびクロラムフェニコールの連続希釈に対応する Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチのリソースレイアウト

DEX stck-1 および CLO stck-1 バイアルの風袋引き



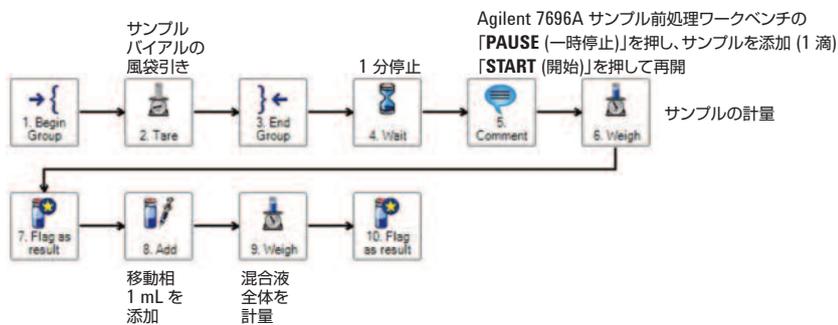
図 2. 較正用標準溶液用の Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチのメソッド設定プログラミングに用いたフローチャート図

次のシーケンスは、サンプルを希釈するためのものです。空のバイアルが風袋引きされ、システムが待機状態になります。粘性サンプル1滴を各バイアルに添加します。これは手作業でおこなう必要があります。サンプルの粘度が高いため、シリンジでは液体を移せないからです。その後、ワークベンチを再開します。バイアルがふたたび計量され(図3)、正確なサンプル重量が計算され、シーケンスレポートで報告されます。最後に、サンプル希釈用の溶媒が添加されます(図4のメソッド設定参照)。

較正用標準溶液の作成、サンプルの前処理のいずれについても、1つのシーケンスとしてプログラムが設定されています。



図3. 風袋引き、サンプル添加、サンプル計量のイラスト



1. グループ開始
2. サンプルの風袋引き
3. グループ終了
4. 1分0秒待機
5. ワークベンチの「PAUSE (一時停止)」を押すサンプル添加後、「START (開始)」を押す
6. サンプル計量
7. サンプルを「RESULT (結果)」としてフラグging
8. フロントタワーで移動相 1,000  $\mu$ L をサンプルに添加 (洗浄、ポンプ)
9. サンプルの計量
10. サンプルを「RESULT (結果)」としてフラグging

図4. サンプル用の Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチのメソッド設定

## HPLC 分析の実験条件

分析には Agilent 1290 Infinity HPLC システムを使用しました。分離には Agilent Poroshell 120 カラム (2.1 mm × 400 mm, 2.4 μm dp (p/n 695775-902)) を使用しました。移動相 A は 0.3 % リン酸水 (水酸化ナトリウムで pH = 3 に調整)、移動相 B はアセトニトリルです。20 % B (0 分) ~ 50 % B (5 分) のグラジエントを使用しました。流量は 0.5 mL/min です。注入量は 1 μL で、UV により 254 nm で検出しました。

## 結果と考察

4 つの較正レベルに対応するクロマトグラムを図 5 で重ねて示しています。検量線を図 6 に示しています。デキサメタゾンとクロラムフェニコールのいずれについても、優れた直線性が得られています ( $R^2 > 0.999$ )。

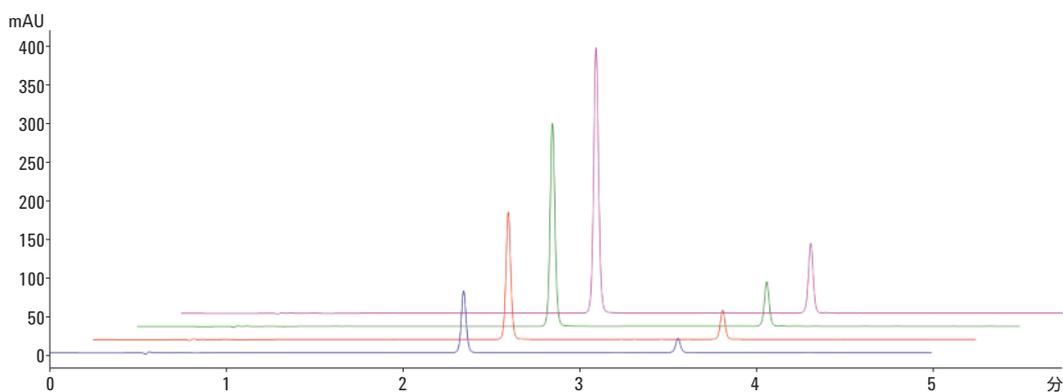


図 5. 4 つの較正レベルのクロラムフェニコール (2.35 分) およびデキサメタゾン (3.55 分) のクロマトグラム (X/Y軸オフセットで重ね表示)

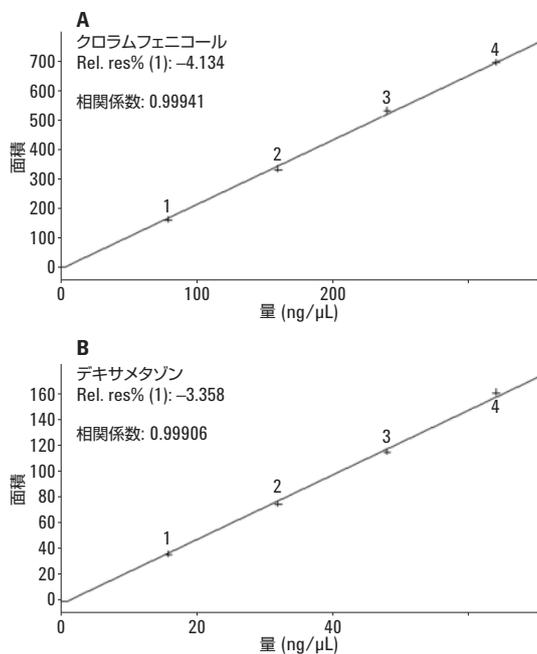


図 6. Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いた自動較正用標準溶液作成で得られたクロラムフェニコール (2.35 分) およびデキサメタゾン (3.55 分) の検量線

最低濃度のサンプルを6回繰り返して作成し、サンプル前処理の再現性を検証しました。図7に示すクロマトグラムの重ね表示は、優れた再現性を示しています。クロラムフェニコールのRSDは1.5%、デキサメタゾンのRSDは2.7%でした。

次に、3種類のサンプルを分析しました。クロマトグラムを図8に示しています。サンプルAにはデキサメタゾン、サンプルBにはクロラムフェニコール、サンプルCには両方が含まれています。

3種類いずれのサンプルについても、正確な量の活性成分が検出されました(検出値はいずれも表示濃度の90%~105%)。同じシーケンスで前処理した、種類の異なるサンプルの分析では、クロス汚染が生じないことも明らかになりました(デキサメタゾンのみを含むサンプルではクロラムフェニコールは検出されず、逆も同様)。

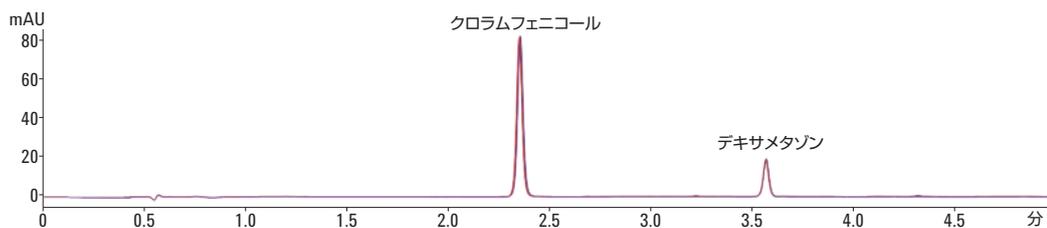


図7. Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いた自動較正用標準溶液作成で得られたクロラムフェニコール(2.35分)およびデキサメタゾン(3.55分)の6つの較正用標準溶液のクロマトグラムの重ね表示。クロラムフェニコールとデキサメタゾンの相対標準偏差は、それぞれ1.5%および2.7%です。

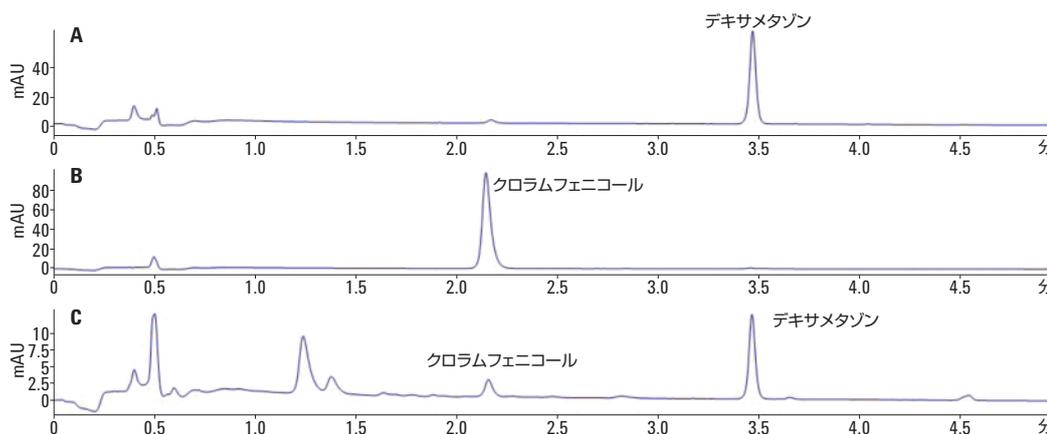


図8. 3種類の点眼薬で得られたクロマトグラム

サンプル前処理の再現性を表 2 に示しています。サンプルタイプ B のクロラムフェニコールの測定濃度、サンプル重量、最終濃度を記載しています。このサンプルは 6 回繰り返して作成しました。測定濃度の相対標準偏差は 1 % 未満でした。

これらの定量的データが得られることに加えて、全体的な溶媒消費量も大幅に少なくなります。計量用のガラス器具を使用しないため、溶液が無駄になることはほとんどありません。

## 結論

WeighStation を搭載する Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを、自動校正用サンプル作成およびサンプル希釈に問題なく適用することができました。サンプルの粘度が高いため、シリンジを用いた容積測定による希釈は不可能でしたが、WeighStation の使用により、正確なサンプル重量が測定されました。希釈後は、活性成分を正確に測定することができました。

## 詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト ([www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)) をご覧ください。

表 2. 点眼薬タイプ B のサンプル前処理の再現性

	測定濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	サンプル重量 (mg)	正確な濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
SAM-rep01	124	27.72	4.59
SAM-rep02	121	26.95	4.61
SAM-rep03	114	25.41	4.61
SAM-rep04	103	23.07	4.57
SAM-rep05	143	32.58	4.53
SAM-rep06	138	31.27	4.53
		<b>RSD (%)</b>	<b>0.74</b>

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2014

February 6, 2014

5991-3591JAJP



**Agilent Technologies**