Agilent 1290 Infinity II LC での Quality-by-Design（QbD）による メソッドの開発

Waters Empower 3 CDS 制御下で ISET によるメソッド移管を活用した効率的なメソッド開発ワークフロー

アプリケーションノート

医薬品開発および QA/QC

著者

Vinayak A.K and Andreas Tei
Agilent Technologies, Inc

概要

このアプリケーションノートでは、Quality-by-Design（QbD）原則に基づいて開発した、アムロジピンとその既知の EP 不純物を分離する UHPLC メソッドについて説明します。このメソッドは、HPLC システムで使用するために 2 段階で変換、移管されました。Agilent 機器コントロールフレームワーク（ICF）をインタフェースとして使用し、Waters Empower 3 クロマトグラフィーデータシステム（CDS）から Agilent 1290 Infinity II LC を制御しました。Fusion QbD（S-Matrix Corp、ユーレカ、カリフォルニア州）ソフトウェアを組み合わせることで、QbD ベースのメソッド開発プロセスを実現しました。

このメソッドは、UHPLC 条件下で粒子径 2 µm 以下のカラムを用いて開発された後、メソッドトランスレータツール（無償）を使用して、ルーチン QA/QC ワークフローで使用される HPLC システム用に変換されました。最適化および評価プロセスを促進するために、Agilent Intelligent System Emulation Technology 技術（ISET）を使用して Agilent 1290 Infinity II メソッド開発システムを、ターゲット HPLC システムの性能特性にエミュレートしました。ターゲットシステムへの移管後、すべての重要メソッド特性（CMA）が満たされていました。また、再現性を評価しました。

Agilent Technologies

はじめに

ICH Q8（R2）および ICH Q2（R2）ガイダンスに沿ったQuality-by-Design（QbD）ベースのメソッド開発およびメソッドバリデーションが、医薬品分析の R&D コミュニティで注目を集めています [2]。さまざまな固定相のカラムスクリーニングにおいて、短いサブ 2 µm カラムで UHPLC メソッドを使用することで、効率の大幅な向上が見込まれます。しかし、最終的には、LC システムの大半が従来の HPLC システムである QA/QC 部門へのメソッド移管が必要となります。重要メソッド特性（CMA）を損なうことなく、UHPLC から HPLC へメソッドを移管するプロセスは困難です [2]。UHPLC システムで開発されたメソッドは、従来型の HPLC カラムを使用して開発したとしても、HPLC システムに移管すると、システムのディレイボリュームやグラジエントミキシングの精度が異なるために、同じ性能を得られないことがあります。これらの問題を克服するために、よく使用されているターゲットシステムの特性をエミュレートする Agilent Intelligent System Emulation Technology 技術（ISET）が開発されました [3]。

このアプリケーションノートでは、頑健な QbD ベースのメソッド開発を実現する UHPLC ソリューションである Agilent 1290 Infinity II LC と、サードパーティ QbD ソフトウェア（Fusion QbD）と組み合わせた Waters Empower 3 CDS を用いて分析を行いました。最後に、QA/QC 部門で多く使用されているターゲット LCシステムの性能特性をエミュレート可能な Agilent ISET と、サードパーティソフトウェアとの組み合わせについて紹介します。

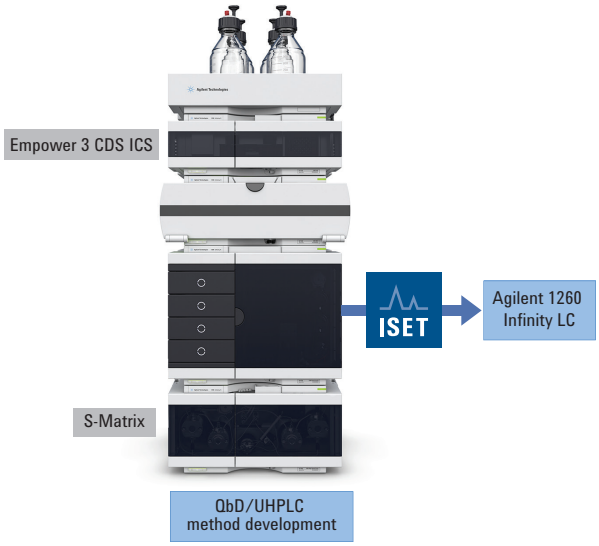

図 1. Waters Empower 3 CDS 制御下での Agilent Intelligent System Emulation技術を介したメソッド移管

実験方法

機器

メソッド開発には、Agilent 1290 Infinity II LC メソッド開発システムを使用しました。1290 Infinity II メソッド開発ソリューションの個々のモジュールおよびコンポーネントは次のとおりです。

- Agilent 1290 Infinity バルブドライブ（G1170A）と 12 ポジション/13 ポート溶媒選択バルブ（G4235A）
- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ（G7120A）
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンプラ（G7167B）、サンプル冷却 4 °C
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット（G7116B）、8 ポジション/18 ポートカラム選択バルブ（G4239C）搭載
- Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器（G7117B）

すべての Agilent 1290 Infinity II モジュールの最小のファームウェア要件は、B、C、D.06.70 です。

移管したメソッドの再現性は、Agilent 1260 Infinity LC を用いて検証しました。1260 Infinity LC の個々のモジュールは次のとおりです。

- Agilent 1260 Infinity バイナリポンプ（G1312B）
- Agilent 1260 Infinity オートサンプラ（G1367E）
- Agilent 1260 Infinity サーモスタット付カラムコンパートメント（G1316A）
- Agilent 1260 Infinity ダイオードアレイ検出器（G4212B）

ソフトウェア

- Fusion QbD 自動 LC メソッド開発ソフトウェア（S-Matrix Corp、ユーレカ、カリフォルニア州）（バージョン：9.7.1、ビルド 458）
- Waters Empower ソフトウェア（バージョン 3、ビルド 3471）、システム適合性パッケージ付き
- Waters Instrument Control Software（ICS）2.1 HF1、Agilent ICF およびドライバパッケージ（A.02.03 DU1 HF2）を含む
- ISET 4（ドライババージョン A.02.11）

試薬およびサンプル

すべての溶媒は HPLC グレードとしました（RCI Labscan Ltd、タイ）。アムロジピンベシル酸塩（API）標準と既知の EP 不純物 A、B、D、E、F、G は、インドの Anant Pharmaceuticals Pvt Ltd から入手しました。実験全体を通して API であるアムロジピンベシル酸塩の欧州薬局方（EP）サンプル前処理プロトコルに従い、既知の不純物をこの API にスパイクしました [4]。

ワークフロー

メソッド開発ワークフローはスクリーニングプロセスから開始し、2 種類の有機溶媒と 7 つの異なる pH レベル（水性溶媒）の液相と組み合わせた 7 本の短いサブ 2 µm カラムで、アムロジピンベシル酸塩標準および不純物を使用し、最良のクロマトグラフィー分離条件を決定しました。このカラムスクリーニング実験は、Empower 3 の制御下で 1290 Infinity II LC メソッド開発システムと Fusion QbD ソフトウェアを使用して実行しました（図 2）。最初のスクリーニング段階で特定した最良のクロマトグラフィー条件（スクリーニング段階の分析目標プロファイル（ATP）要件に適合）を多変量統計実験によってさらに最適化しました。多変量統計実験では、QbD 原則に従ってデザインスペースを作成し、頑健な UHPLC メソッド（最適化段階での ATP 要件に適合）を作成しました。

第 2 ステップでは、UHPLC メソッドを粒子サイズが異なる 2 本の HPLC カラムに移管しました。ターゲットシステムの性能特性を再現するために、ISET ツールを起動した後、Agilent 1290 Infinity II UHPLC をエミュレーションモードで動作させました。Agilent 1260 Infinity システムのグラジエントミキシングの挙動およびオートサンプラのディレイボリュームをエミュレートしました。

エミュレーションモードで得た Agilent 1290 Infinity II LC による性能結果をターゲットシステムの結果と比較しました。システム適合性テスト用不純物（不純物 B および G）と API の RT、面積、分離度の再現性を求めました。

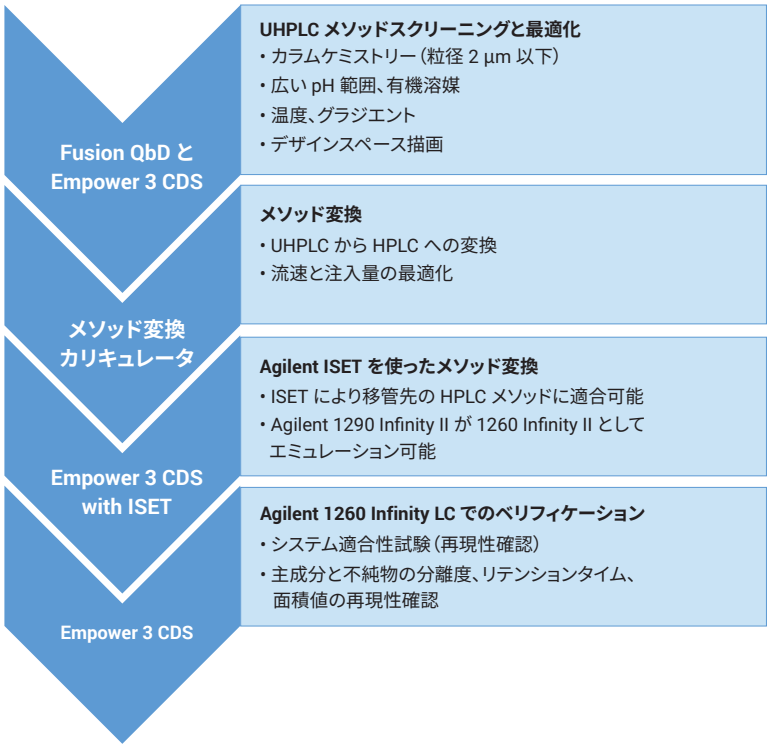

図 2. 研究に用いた全体的なワークフロー。使用したソフトウェアパッケージをフローチャートの左側に、ワークフローの詳細手順を右側に示します。

結果と考察

UHPLC のスクリーニングと最適化

スクリーニング段階の ATP で、EP メソッドのシステム適合性基準（アムロジピン不純物 B および G の間の分離度が 2.0 超）を満たす高速 UHPLC メソッドを開発しました。表 1 に、このメソッドを実現するためにスクリーニングされた、さまざまなサブ 2 µm カラム、広範囲の pH、有機溶媒（ACN および MeOH）を示しました。表 2 に、最良の全体的なクロマトグラフィー条件を得られたカラムスクリーニング実験の結果を示します。この条件でクロマトグラフィー性能が満たされることが示され、すべての ATP 基準に適合しました（図 3）。

表 1. スクリーニング実験で使用した重要メソッドパラメータ（CMP）。7 種類の pHのバッファ、7 種類のカラム、3 つの異なる流量、2 種類の強有機溶媒をスクリーニングしました。

CMP	範囲/レベル（s）
強溶媒タイプ	メタノール、アセトニトリル
ポンプの流量（mL/min）	0.8、1.0、1.2
pH	2.00 ～ 10 mM トリフルオロ酢酸 3.00 ～ 20 mM ギ酸 4.00 ～ 5 mM ギ酸 ＋ 10 mM ギ酸アンモニウム 5.00 ～ 5 mM 酢酸 ＋ 10 Mm 酢酸アンモニウム 7.00 ～ 10 mM 酢酸アンモニウム 8.00 ～ 10 mM 炭酸水素アンモニウム 9.00 ～ 10 mM 酢酸アンモニウム+ 5 mM アンモニア
カラムタイプ （3.0 × 50 mm、1.8 µm）	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8 Agilent ZORBAX SB Aq Agilent ZORBAX Eclipse Plus phenyl hexyl Agilent ZORBAX SB CN Agilent ZORBAX SB C18 Agilent ZORBAX Bonus RP*

*Bonus RP カラムで使用したカラム直径は 2.1 mm でした。

表 2. スクリーニング実験での CMP の最良条件

CMP	レベル設定
強溶媒タイプ	アセトニトリル
ポンプの流量 (mL/min)	1.200
pH	2.00
カラムタイプ	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8

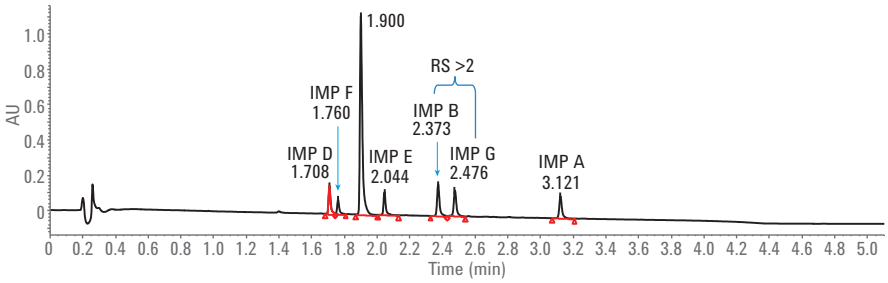

図 3. 不純物 B および G の間の分離度は 2 よりも大きく、スクリーニングでの ATP 基準に適合しました。

最適化フェーズの ATP では、EP メソッドのシステム適合性基準と API および他の不純物の分離度を損なうことなく、スクリーニング段階の最良条件の分析時間を短縮できました。ポンプの流量、グラジエント時間、オーブン温度などの重要メソッドパラメータ（CMP）を、表 3 に示すように変更しました。これらの実験のデータ解析は、確立済みの ATP 基準に適合する、頑健なデザインスペース（図 4）につながります。立証済み許容領域（PAR）を ATP のゴールに合わせて調整し、デザインスペースに示しました。5 つの異なる条件でのシステム適合性テスト用不純物の分離度の値を PAR（表 4）と各クロマトグラム（図 5）に示しました。Fusion QbD のポイント予測ツールで、重要メソッド特性（CMA）の値を予測し、実験から得られた値と比較して検証しました（表 5）。最適化後の最終 UHPLC メソッドの再現性を検証して、6 回繰り返し分析を重ね合わせてプロットしました（図 6）。

表 3. 最適化フェーズで変更した CMP

CMP	範囲/レベル (s)
ポンプの流量 (mL/min)	1.200 ～ 1.500
グラジエント時間 (分)	1.0 ≦ グラジエント時間 ≦ 4.0
最終ホールド時間 (分)	0.5 ≦ 最終ホールド時間 ≦ 1.5
オーブン温度 (°C)	25.0、30.0、35.0

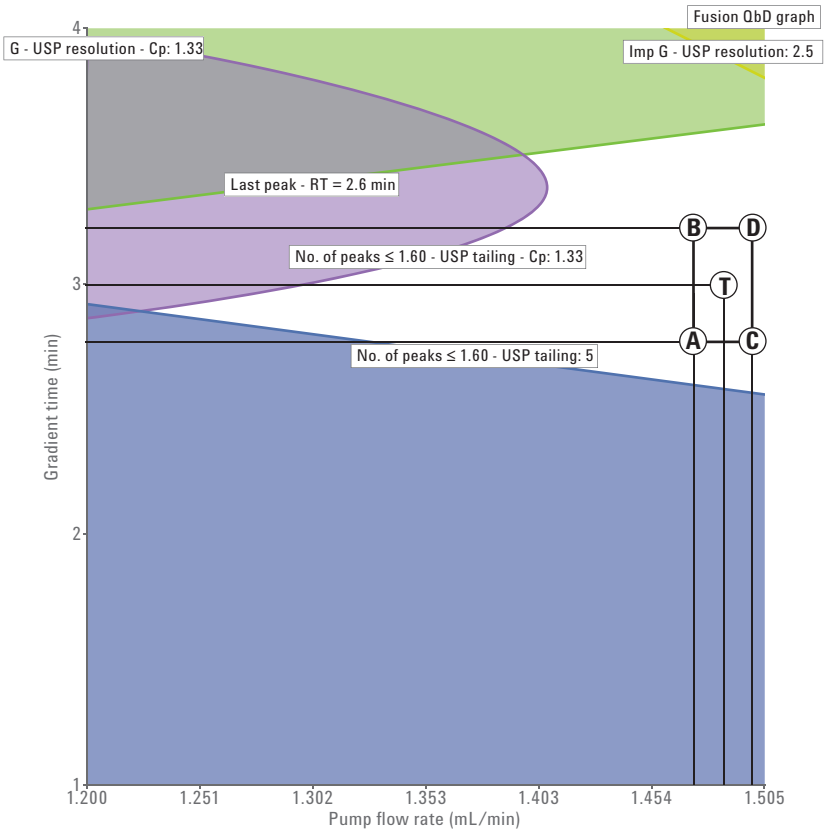

図 4. PAR を示す最終デザインスペース

表 4. PAR の 5 箇所に対応したシステム適合性テスト用不純物の CMP および分離度

条件	流量	グラジエント時間	最終ホールド時間	オーブン温度	不純物 B および G の間の分離度
A	1.47	2.76	0.5	30	3.28
B	1.47	3.08	0.5	30	3.16
T：中心点	**1.48**	**2.92**	**0.5**	**30**	**3.20**
C	1.50	3.08	0.5	30	3.22
D	1.50	2.92	0.5	30	3.10

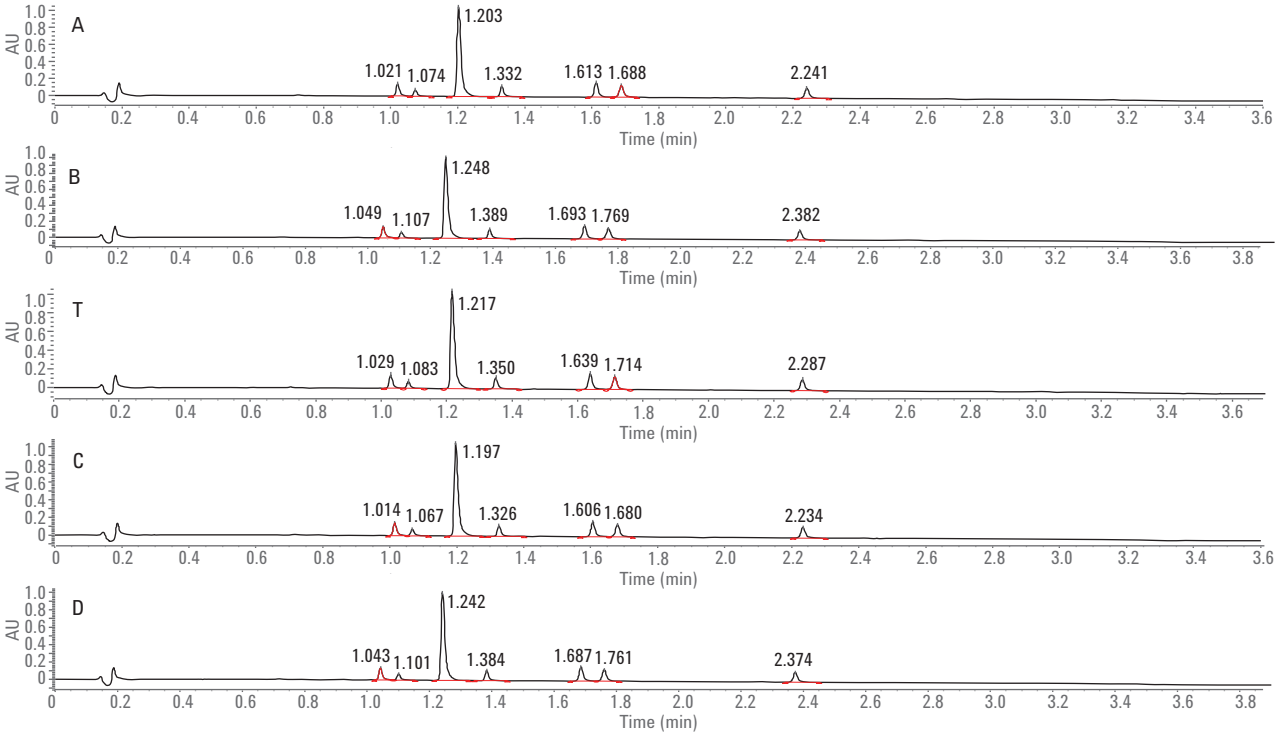

図 5. PAR 範囲の 5 つのポイント（A、B、T、C、D）の条件に対応したクロマトグラム

表 5. Fusion QbD ソフトウェアで予測された PAR の中心点（T）からのレスポンス CMA 値。実験結果を予測値と比較し、シグマ信頼限界内にあることを確認しました。

CMA	予測値	実験値	−2 シグマ信頼限界	+2 シグマ信頼限界
ピーク数 ≧ 2.00、USP 分離度	6.14	6.00	5.68	6.60
ピーク数 ≦ 1.60、USP テーリング	5.80	6.00	5.06	6.65
最終ピークのリテンションタイム	2.28	2.28	2.28	2.29
不純物 B および G の間の USP 分離度	2.97	3.20	2.90	3.20

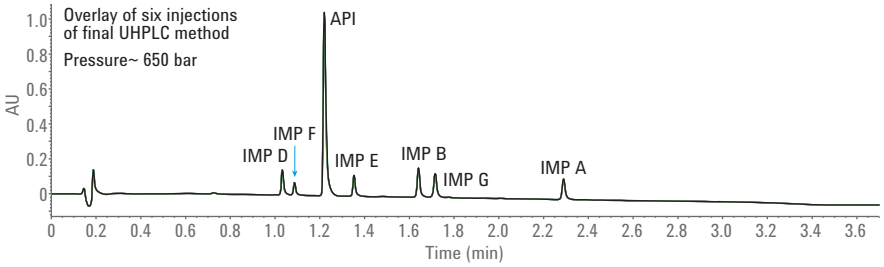

図 6. 6 回のクロマトグラム重ね表示、最終 UHPLC メソッドの再現性

メソッドの変換と移管

サブ 2 µm カラムで開発された UHPLC メソッドを、従来の粒子サイズでの 3 つの異なる HPLC メソッドに変換しました。この変換には、ジュネーブ大学が作成した Microsoft Excel ベースのメソッド変換カリキュレータを使用しました [5]。最初に、UHPLC メソッドを HPLC メソッド（カラム 1 の Agilent ZORBAX Eclipse Plus、4.6 × 150 mm、3.5 µm）に、27 分という妥当な分析時間で変換しました（表 6）。このメソッドは、ターゲットシステム（Agilent 1260 Infinity LC）の ISET エミュレーションモードを使用して 1290 Infinity II システムで評価し、その後に 1260 Infinity LC システムの分析結果を用いて検証しました（図 7）。エミュレートされた溶媒送液モジュールとオートサンプラは、G1312B v1.0 と G1367E 100 µL シリンジ v1.0 でした。ATP 基準を維持したままカラム 1（HPLC メソッド 1）へのメソッド移管を適度な分析時間で達成しましたが、圧力範囲は約 30 MPa（従来の HPLC ポンプの圧力上限の 70 %）でした。これは、圧力上限の低い従来の HPLC システムのユーザーにとっては問題となる可能性があります。結果として、より大きな粒子サイズ（カラム 2 = ZORBAX Eclipse Plus、4.6 × 150 mm、5 µm）を用いて、UHPLC メソッドを HPLC メソッド 2 に変換することで、背圧が低減されました（表 6）。メソッド変換カリキュレータによって、より低流量の 1.2 mL/min と、より長い分析時間 37 分が提案されました。HPLC メソッド 3 では、分離度を保ったまま、流量を 1.8 mL/min に上げることによって分析時間を短縮しました。HPLC メソッド 3 の結果は、1260 Infinity LC システム（図 8）での結果によっても検証され、圧力上限が低いシステムでも使用できることが示されました。表 7 と表 8 に、それぞれのメソッドについてエミュレートされたシステムと実際のシステムの RT と分離度の偏差をまとめています。HPLC メソッド 1 および 3 で 6 回繰り返し分析を実行し、各メソッドの再現性を確認して、API とシステム適合性テスト用不純物の分離度、RT、面積の RSD 値が ≦ 1.1 % となることが分かりました（表 9）。

表 6. UHPLC および他のすべての変換済み HPLC メソッドのメソッドパラメータ

パラメータ	UHPLC メソッド	HPLC メソッド 1	HPLC メソッド 2	HPLC メソッド 3
カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus 3.0 × 50 mm、1.8 µm	Agilent ZORBAX Eclipse Plus 4.6 × 150 mm、3.5 µm	Agilent ZORBAX Eclipse Plus 4.6 × 150 mm、5 µm	Agilent ZORBAX Eclipse Plus 4.6 × 150 mm、5 µm
流量（mL/min）	1.5	1.8	1.2	1.8
注入量（µL）	2	14	14	14
グラジエント	時間 % B 0.00 25 0.30 25 3.20 95 3.70 95 3.80 25 4.30 25	時間 % B 0.00 25 2.87 25 19.79 95 22.71 95 23.29 25 26.21 25	時間 % B 0.00 25 4.10 25 28.27 95 32.44 95 33.27 25 37.44 25	時間 % B 0.00 25 2.87 25 19.78 95 22.70 95 23.28 25 26.20 25
圧力（MPa）	～ 65	～ 30	～ 13	～ 18

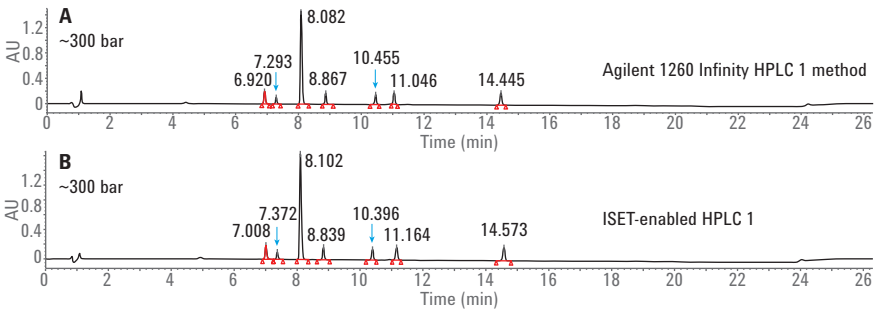

図 7. Agilent 1290 Infinity II システムで ISET を用いたエミュレーションメソッドと Agilent 1260 Infinity システムでの HPLC メソッド 1 との類似性を示すクロマトグラムの重ね表示

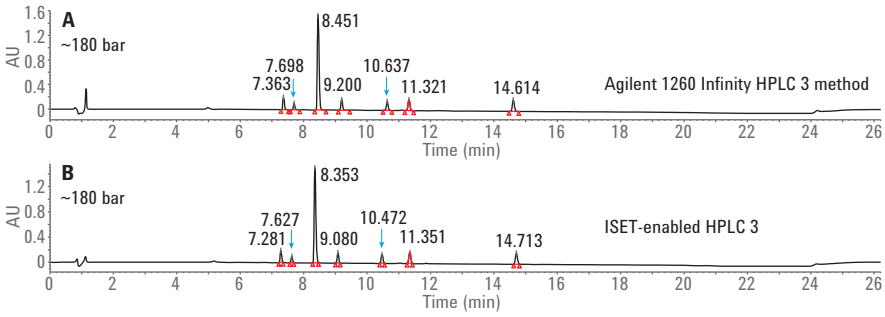

図 8. ISET を用いたエミュレーションメソッドと Agilent 1260 Infinity LC システムでの HPLC メソッド 3 との類似性を示すクロマトグラムの重ね表示

表 7. HPLC メソッド 1 について計算して求めたパーセント偏差。すべての偏差が許容基準の許容限界内（分離度－5 % およびリテンションタイム ±5 %）にありました。

	API 分離度	API RT（分）	不純物 B RT（分）	不純物 G RT（分）	不純物 G の分離度
Agilent 1260 Infinity HPLC 1	8.01	8.08	10.45	11.05	5.63
ISET による HPLC 1	8.46	8.06	10.38	11.07	6.52
パーセント偏差（%）	+4.3	−0.24	−0.6	+0.1	+13.6

表 8. HPLC メソッド 3 について計算して求めたパーセント偏差。すべての偏差が許容基準の許容限界内（分離度 −5 % およびリテンションタイム ±5 %）にありました。

	API 分離度	API RT（分）	不純物 B RT（分）	不純物 G RT（分）	不純物 G の分離度
Agilent 1260 Infinity HPLC 3	7.63	8.45	10.63	11.35	5.9
ISET による HPLC 3	7.32	8.35	10.47	11.32	7.3
パーセント偏差（%）	−4.2	−0.24	−0.6	+0.1	+13.6

表 9. HPLC メソッド 1 および 3 の再現性を示す RSD 値。

	不純物 G の Rs	不純物 G の RT	API の RT	API の Rs	不純物 G の面積	API の面積
HPLC メソッド 1						
平均（分）	5.46	11.03	8.07	8.05	748,439	5,778,226
SD	0.05	0.008	0.008	0.01	2,951.619	5,852.5
RSD	0.96	0.07	0.10	0.14	0.39	0.10
HPLC メソッド 3						
平均（分）	5.52	11.04	8.07	8.07	752,041.8	5,784,162
SD	0.06	0.005	0.004	0.01	3,421.39	4,937.24
RSD	1.13	0.04	0.05	0.16	0.45	0.08

結論

Agilent 機器コントロールフレームワーク（ICF）ソフトウェアを、Waters Empower 3 クロマトグラフィーデータシステム、Waters ICS、Fusion QbD ソフトウェアから Agilent 1290 Infinity II LC を制御するためのインタフェースとして使用して、高速かつ頑健な UHPLC メソッドを開発しました。QbD の原則に従って、最適化の後にデザインスペースを生成しました。デザインスペースの 5 つのポイントを許容基準によって確認し、すべての基準が満たされていることを確認しました。CMA の予想値が実験値と適合することが分かりました。システム適合性要件（不純物 B および G の分離度 ＞ 2）が満たされ、すべてのピークは 3.7 分のグラジエント時間内にベースライン分離しました。最終 UHPLC メソッドは再現性に優れ（API と不純物 G の面積 RSD ＜ 0.5）、頑健性の高いものでした。

Agilent ISET 技術を用いて、Agilent 1290 Infinity II UHPLC システムから Agilent 1260 Infinity システムへのシームレスなメソッド移管を実現できました。メソッドをターゲットシステムの圧力上限に適合させました。エミュレーションモードの結果とターゲットシステムの結果を比較しました。このように、Agilent 1290 Infinity II LC、ISET、ICF、サードパーティ製 CDS および Fusion QbD ソフトウェアを組み合わせて、メソッド開発、QbD の原則、メソッド移管をシームレスに実行できました。

参考文献

1. Metzlaff, M. Agilent 1290 Infinity II LC with ISET– Emulation of the Agilent 1100 Series LC Through Waters Empower Software. *Agilent Technologies, Application Note*, publication number 5991-6541EN, **2016**.

2. Vinayak, A. K. QbD Based Method Development on an Agilent 1290 Infinity UHPLC System Combined with a Seamless Method Transfer to HPLC Using Intelligent System Emulation Technology.*Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-5701EN, **2015**.

3. Huesgen, A. G. Fast screening of mobile and stationary phases with the Agilent 1290 Infinity LC and seamless method transfer to an Agilent 1200 Series LC using ISET. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-0989EN, **2012**.

4. European pharmacopeia 8.7, 04/2016:1491, pg: 5703.

5. HPLC calculator: software for chromatographic performance evaluation and HPLC method transfer http://www.unige.ch/sciences/pharm/fanal/lcap/telechargement-en.htm

ホームページ
www.agilent.com/chem/jp

カストマコンタクトセンタ
0120-477-111
email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。
本文書に記載の情報、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. 2016, 2017
Printed in Japan, Macrh 1, 2017
5991-7505JAJP

Agilent Technologies