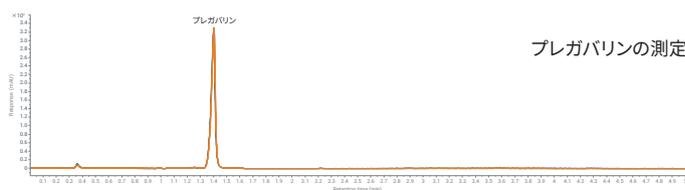
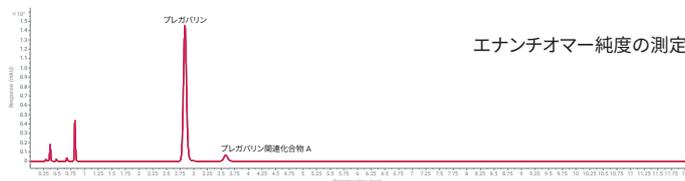


## プレガバリンに関する 2つの USP メソッドを1 台の LC で自動分析

自動カラム選択機能付き Agilent 1260 Infinity II PrimeLC を  
用いた測定およびエナンチオマー純度の測定



プレガバリンの測定



エナンチオマー純度の測定

### 著者

Sonja Schipperges  
Agilent Technologies, Inc.

### 概要

米国薬局方 (USP) のプレガバリンに関する医薬品添付文書 (製品モノグラフ) には、エナンチオマー純度の測定およびプレガバリンの測定を目的としたさまざまな高速液体クロマトグラフィー (HPLC) メソッドが記載されています。本アプリケーションノートでは、カラム選択バルブを備えた Agilent 1260 Infinity II Prime LC による、USP 準拠のプレガバリンの測定性能とエナンチオマー純度の測定について説明します。どちらの分析も、手動介入を必要とせずに 1 台の LC システムで実行できます。さらに、プレガバリンのエナンチオマー純度の測定とプレガバリンの測定を、USP ガイドラインの第 621 章に従って UHPLC 条件に移管します。これにより、時間の短縮と溶媒の削減が実現できます。

## はじめに

プレガバリン (図 1 を参照) は、リリカなどの商品名で販売されており、世界における売上は医薬品のトップ 15 に入っています。この製品の 2018 年の売上高は約 50 億ドルでした。<sup>1</sup> プレガバリンは神経因性疼痛の治療薬やてんかんの補助薬として使用されています。<sup>2,3</sup>

米国薬局方 (USP) のプレガバリンに関する医薬品添付文書 (製品モノグラフ) には、プレガバリンの測定、有機不純物の測定、およびエナンチオマー純度の測定を目的としたさまざまな高速液体クロマトグラフィー (HPLC) メソッドが掲載されています。<sup>4</sup>

本アプリケーションノートでは、カラム選択バルブを備えた Agilent 1260 Infinity II Prime LC で構成される 1 台の LC システムで、プレガバリンのエナンチオマー純度の測定とプレガバリンの測定を行う方法について説明します。Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプとカラム選択バルブを組み合わせることにより、1 台の LC で 2 つの USP メソッドを自動的に実行できます。このメソッドの組み合わせによって 2 つのメソッドを切り替えて実行する際の手動操作が不要となるため、時間の節約とエラーの回避が可能になります。

さらに、1260 Infinity II Prime LC の最大圧力範囲が 800 bar であるため、プレガバリンの測定とプレガバリンのエナンチオマー純度の測定を、USP ガイドラインの 621 章に従って UHPLC 条件に移管することができます。これにより時間と溶媒の節約が可能になり、さらなるコスト削減につながります。

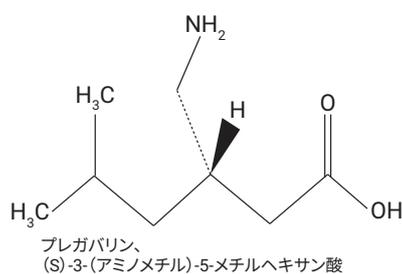


図 1. プレガバリンの構造

## 実験方法

### 装置

Agilent 1260 Infinity II Prime LC システムの構成は次のとおりです。

- Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプ (G7104C)
- Agilent 1260 Infinity II マルチサンプラー (G7167A) サンプルサーモスタット付 (オプション #101)
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116A) パルプドライブ取り付け済み (オプション #058) 4 ポジション/10 ポートカラム選択バルブ付 (G4237A)
- Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 HS (G7117C) と 10 mm の Max-Light カートリッジセル (G4212-60008)

### ソフトウェア

Agilent OpenLab CDS バージョン 2.4

### カラム

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 × 250 mm、5 μm (p/n 959990-902)

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、2.1 × 100 mm、1.8 μm (p/n 959758-902)

Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 100 mm、2.7 μm、1,000 bar (p/n 695575-902)

### 試薬

すべての溶媒は LC グレードを使用しました。アセトニトリルおよびアセトン、Merck (ダルムシュタット、ドイツ) から購入しました。超純水は、0.22 μm メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak、EMD Millipore、ピレリカ、マサチューセッツ州、米国) を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。プレガバリンおよびプレガバリン関連化合物 A (欧州薬局方参照標準) は、EDQM (ストラスブール、フランス) から購入しました。

マーフィー試薬 (Na-(2,4-ジニトロ-5-フルオロフェニル)-L-アラニンアミド)、重炭酸ナトリウム、トリエチルアミンは、Sigma-Aldrich (シュタインハイム、ドイツ) から入手しました。リン酸は Merck (ダルムシュタット、ドイツ) から購入しました。

### USP によるプレガバリンの測定

**標準溶液:** プレガバリン 20 mg を水/アセトニトリル (95/5, v/v) 10 mL に溶解して 2.0 mg/mL のプレガバリン標準溶液を調製しました。

### メソッド:

表 1. プレガバリンの測定条件

パラメータ	設定値
カラム	ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 × 250 mm、5 μm
溶媒	A : 水/アセトニトリル (95/5, v/v)
グラジエント	100% A、イソクラティック ストップタイム : 25 min ポストタイム : オフ
流量	1.000 mL/min
温度	25 °C
検出	205 nm/4 nm、 リファレンス 360 nm/100 nm 10 Hz
注入	注入量 : 20 μL サンプル温度 : 10 °C ニードル洗浄 : 水/アセトニトリル (90/10) で 3 秒

表 2. プレガバリンの測定条件 — UHPLC への移管

パラメータ	設定値
カラム	ZORBAX Eclipse Plus C18、2.1 × 100 mm、1.8 μm
溶媒	A : 水/アセトニトリル (95/5, v/v)
グラジエント	100% A、イソクラティック ストップタイム : 5 min ポストタイム : オフ
流量	0.579 mL/min
温度	25 °C
検出	205 nm/4 nm、 リファレンス 360 nm/100 nm 40 Hz
注入	注入量 : 5 μL サンプル温度 : 10 °C ニードル洗浄 : 水/アセトニトリル (90/10) で 3 秒

## USP によるプレガバリンのエナンチオマー純度の測定

**感度テスト原液：**0.5 µg/mL のプレガバリン感度テスト原液は次のように調製しました。プレガバリン 5 mg を水 50 mL に溶解し、アセトンで100 mL の容量に希釈しました（最終的な濃度は 50 µg/mL）。この溶液 1 mL を水 50 mL で希釈し、さらにアセトンで100 mL の容量に希釈しました（最終的な濃度は 0.5 µg/mL）。

**標準原液：**20 mg プレガバリンと 1 mg プレガバリン関連化合物 A を 10 mL の水に溶解し、アセトンで 20 mL の容量に希釈することによって、1.0 mg/mL のプレガバリンおよび 0.05 mg/mL のプレガバリン関連化合物 A を含む標準原液を調製しました。

**感度テスト溶液：**1 mL の感度テスト原液を 10 mL 計量フラスコに移しました。0.6 mL の誘導体化試薬溶液（アセトン中の 3 mg/mL マーフィー試薬）と 1 M 重炭酸ナトリウム 100 µL を溶液に添加しました。感度テスト溶液を 55 °C の水槽内で 1 時間加熱しました。溶液を室温まで冷却し、水で容量まで希釈しました。

**標準溶液：**1 mL の標準原液を 10 mL メスフラスコに移しました。0.6 mL の誘導体化試薬溶液（アセトン中の 3 mg/mL マーフィー試薬）と 1 M 重炭酸ナトリウム 100 µL を溶液に添加しました。標準溶液を 55 °C の水槽内で 1 時間加熱しました。溶液を室温まで冷却し、水で容量まで希釈しました。

## メソッド：

表 3. プレガバリンのエナンチオマー純度の測定条件

パラメータ	設定値
カラム	ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 × 250 mm、5 µm
溶媒	B：トリエチルチルアミンと水 (7.2/1000, v/v)、50% リン酸/アセトニトリル (62/38, v/v) で pH 3.0 に調整
グラジエント	100% B、イソクラティック ストップタイム：52 min ポストタイム：オフ
流量	2.000 mL/min
温度	25 °C
検出	340 nm/4 nm、リファレンスなし 10 Hz
注入	注入量：20 µL サンプル温度：10 °C ニードル洗浄：水/アセトニトリル (90/10) で 3 秒

表 4. プレガバリンのエナンチオマー純度の測定条件  
— サブ 2 µm カラムを用いた UHPLC への移管

パラメータ	設定値
カラム	ZORBAX Eclipse Plus C18、2.1 × 100 mm、1.8 µm
溶媒	B：トリエチルチルアミンと水 (7.2/1000, v/v)、50% リン酸/アセトニトリル (62/38, v/v) で pH 3.0 に調整
グラジエント	100% B、イソクラティック ストップタイム：15 min ポストタイム：オフ
流量	0.650 mL/min
温度	25 °C
検出	340 nm/4 nm、リファレンスなし 40 Hz
注入	注入量：5 µL サンプル温度：10 °C ニードル洗浄：水/アセトニトリル (90/10) で 3 秒

表 5. プレガバリンのエナンチオマー純度の測定条件  
— 表面多孔質カラムを用いた UHPLC への移管

パラメータ	設定値
カラム	InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 100 mm、2.7 µm、1,000 bar
溶媒	B：トリエチルチルアミンと水 (7.2/1000, v/v)、50% リン酸/アセトニトリル (62/38, v/v) で pH 3.0 に調整
グラジエント	100% B、イソクラティック ストップタイム：12 min ポストタイム：オフ
流量	0.772 mL/min
温度	25 °C
検出	340 nm/4 nm、リファレンスなし 40 Hz
注入	注入量：5 µL サンプル温度：10 °C ニードル洗浄：水/アセトニトリル (90/10) で 3 秒

## 結果と考察

カラム選択バルブを備えた 1260 Infinity II Prime LC を使用して、USP に従ったプレガバリンのエナンチオマー純度の測定とプレガバリンの測定を 1 台の LC システムで実行します。自動カラム切り替え機能を備えた 1 台の LC システムを利用することにより、2 つのメソッドを切り替えて実施する際の手動介入が不要になります。

図 2 に、4 ポジション/10 ポートカラム選択バルブの構成の概略図を示します。プレガバリンの測定で使用するカラムはポジション 1 に設置します。プレガバリンのエナンチオマー純度の測定に使用するカラムはポジション 2 に設置します。次に、取り込みメソッドに必要なカラムを選択します。バイパスと廃液ポジションは、メソッド間の溶媒切り替えとフラッシングに使用します。

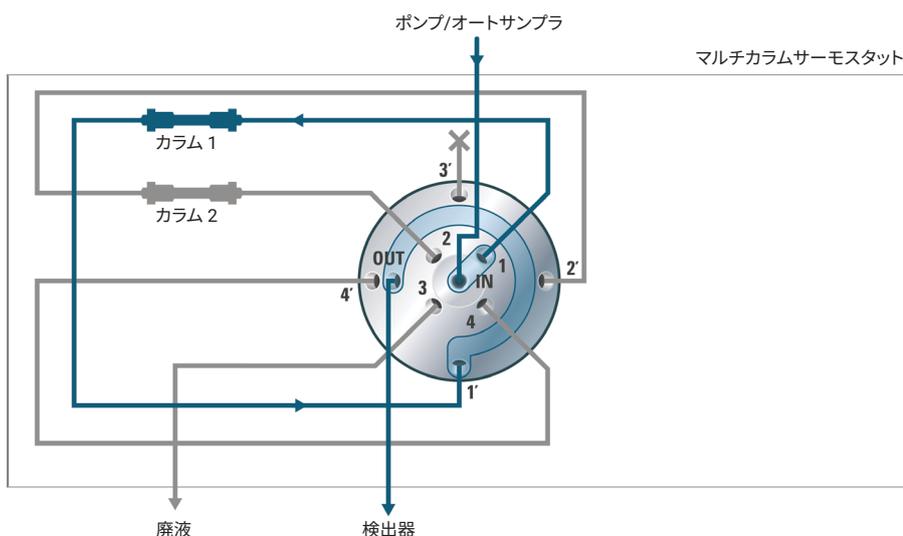


図 2. 2本のカラムが取り付けられた4ポジション/10ポートカラム選択バルブの概略図

## USP によるプレガバリンの測定

USP に準拠したプレガバリンアッセイは、Eclipse Plus C18、4.6×250 mm、5 μm カラムを使用して、流量 1.0 mL/min で実施します。図 3 は、プレガバリン標準溶液の分析結果です。優れたリテンションタイムとピーク面積の精度が得られています。USP システムの適合性要件である相対標準偏差 0.73 % 以下を十分に満たしています。プレガバリンのピークは 0.8 のテーリングファクターを示し、USP システムの適合性要件であるテーリングファクター 1.5 以下を満たしています。

1260 Infinity II Prime LC は 800 bar の圧力まで対応可能であるため、プレガバリンアッセイを UHPLC 条件に移管できます。USP ガイドラインの 621 章に従って、メソッドを Eclipse Plus C18、2.1×100 mm、1.8 μm カラムに移管できます。長さ対粒子サイズの比率が規定カラムの -25 ~ 50 % 以内であるため、この移管が実現できます。カラム径と粒子サイズが変わったので、流量を 0.579 mL/min に変更します。注入量は、カラム径に合わせて調整します。

プレガバリン標準溶液の UHPLC 分析結果を図 4 に示します。

UHPLC 条件下では、優れたリテンションタイムとピーク面積の精度が観察されています。プレガバリンのピークは 0.8 のテーリングファクターが維持されています。

UHPLC 条件への移管により、プレガバリンアッセイで 80 % の時間節約と 88 % の溶媒節約が実現します。

## USP によるプレガバリンのエナンチオマー純度の測定

USP によるプレガバリンのエナンチオマー純度の測定結果を図 5 に示します。分析は、Eclipse Plus C18、4.6 × 250 mm、5 μm カラムを使用して、流量 2.0 mL/min で実施しました。プレガバリンの前の溶出ピークは、誘導体化を行ったブランクサンプルの分析でも観察されるため、実行した誘導体化に由来するのは明らかです。

図 6 は、USP に従ってプレガバリンのエナンチオマー純度を測定するためのシステム適合性分析の結果を示しています。感度テスト溶

液の分析では、シグナル対ノイズ (S/N) 比は 19.4 でした。この値は、S/N 比が 10 以上という USP システムの適合性要件を満たしています (図 6A)。標準溶液の分析では、プレガバリンとプレガバリン関連化合物 A が分離度 6.5 で分離されています (図 6B)。USP システムの適合性要件では、プレガバリンとプレガバリン関連化合物 A の分離度は 3.0 以上が要求されます。標準溶液の分析では、プレガバリンおよびプレガバリン関連化合物 A で優れたリテンションタイムとピーク面積の精度が観察されています (図 6B)。さらに、プレガバリン関連化合物 A の相対標準偏差 5.0 % 以下という USP システムの適合性要件も満たされています。

時間と溶媒の節約を実現するために、USP に従ったプレガバリンのエナンチオマー純度の測定についても、USP ガイドラインの第 621 章に従って UHPLC 条件に移管します。メソッドは Eclipse Plus C18、2.1 × 100 mm、1.8 μm カラムに移管可能です。このカラムは、1260 Infinity II Prime LC の圧力範囲内で 0.650 mL/min の流量で操作できます。優れたリテンションタイムとピーク面積の精度が得られ、プレガバリンとプレガバリン関連化合物 A の間の分離度は 7.8 まで向上しました (図 7 を参照)。Eclipse Plus C18、2.1 × 100 mm、1.8 μm カラムを使用した UHPLC 条件下でのプレガバリンのエナンチオマー純度の測定は、USP システム適合性要件をすべて満たしています。また、UHPLC メソッドによって、HPLC メソッドと比較して 71 % の時間節約と 90 % の溶媒節約が可能です。

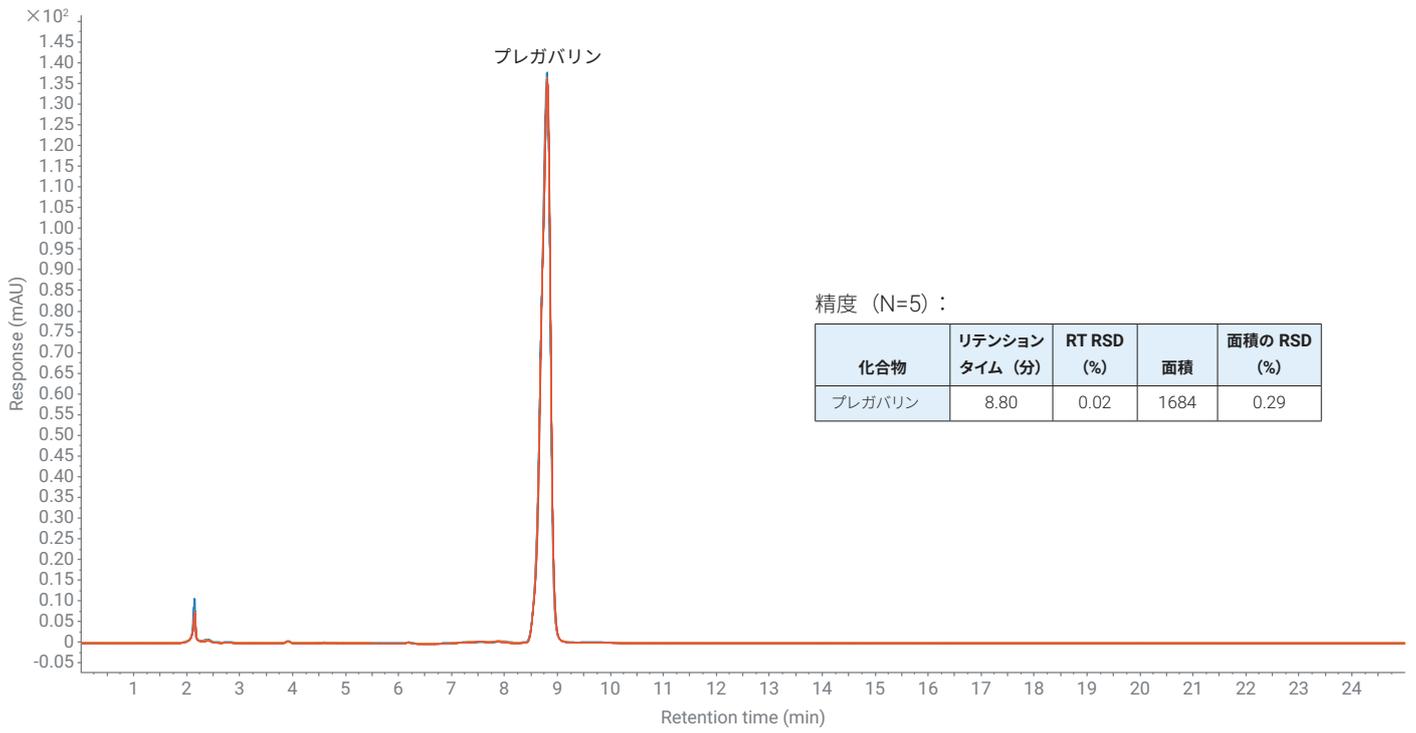


図 3. USP によるプレガバリンの測定：プレガバリン標準溶液の分析 (N=5)

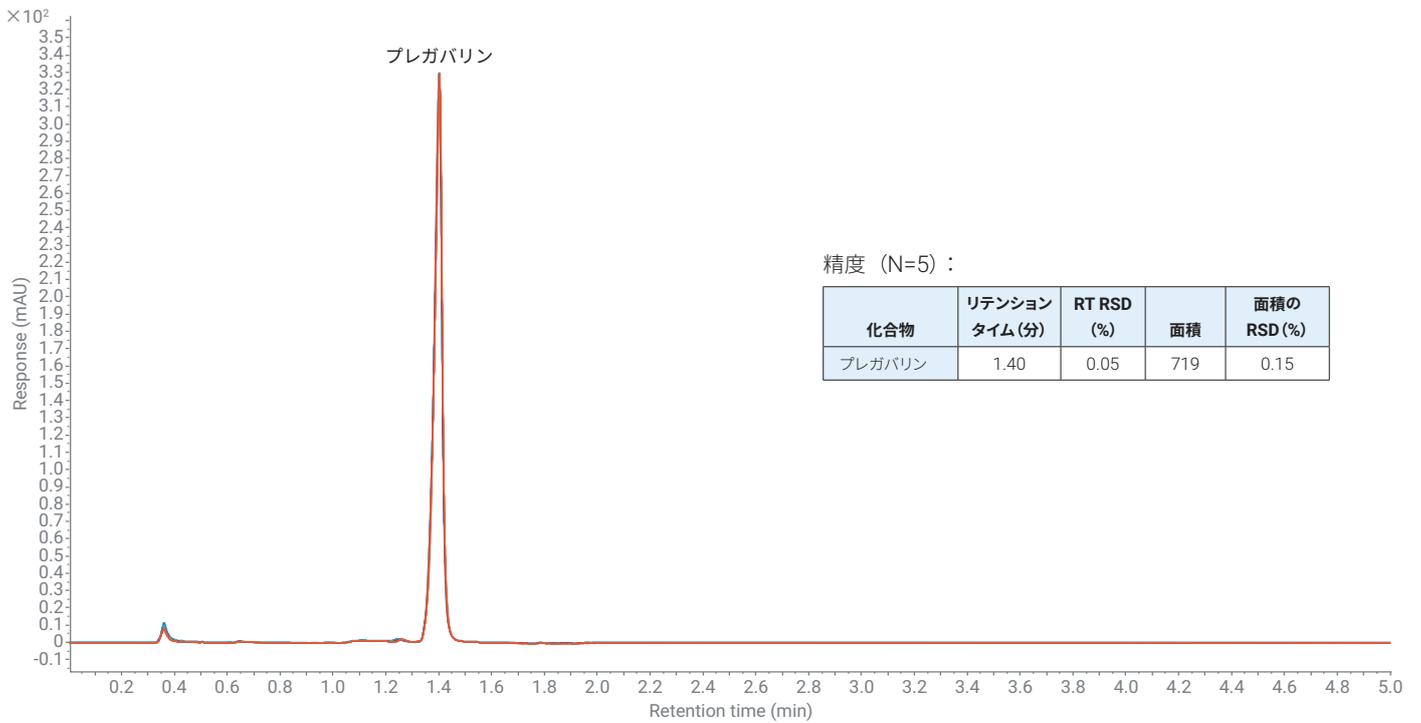


図 4. USP によるプレガバリンの測定：プレガバリン標準溶液の UHPLC 分析 (N=5)

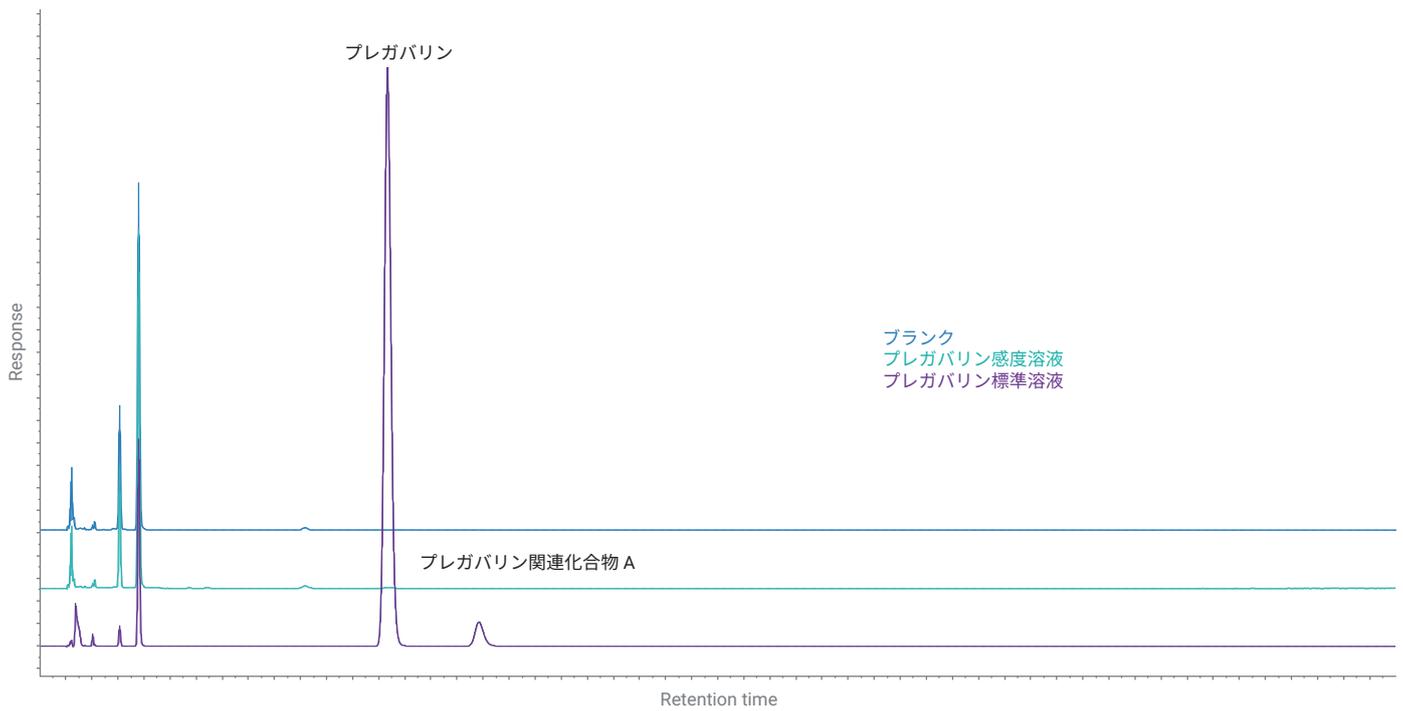


図 5. USP によるプレガバリンのエナンチオマー純度の測定：ブラン克蘭（青）、プレガバリン感度テスト溶液（水色）、プレガバリン標準溶液（紫）の重ね表示

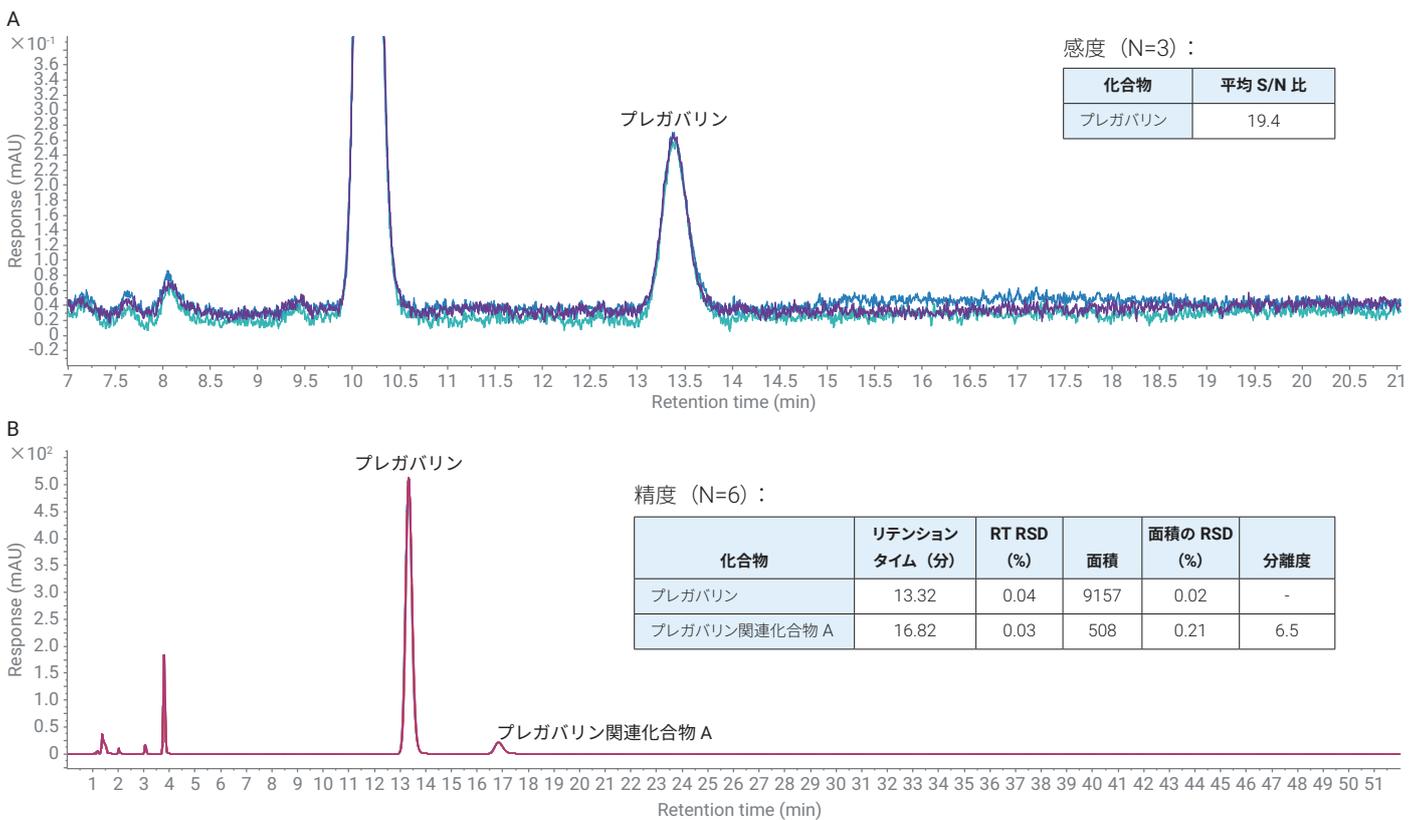


図 6. USP によるプレガバリンのエナンチオマー純度の測定：(A) 感度テスト溶液の分析 (N=3)、(B) 標準溶液の分析 (N=6)

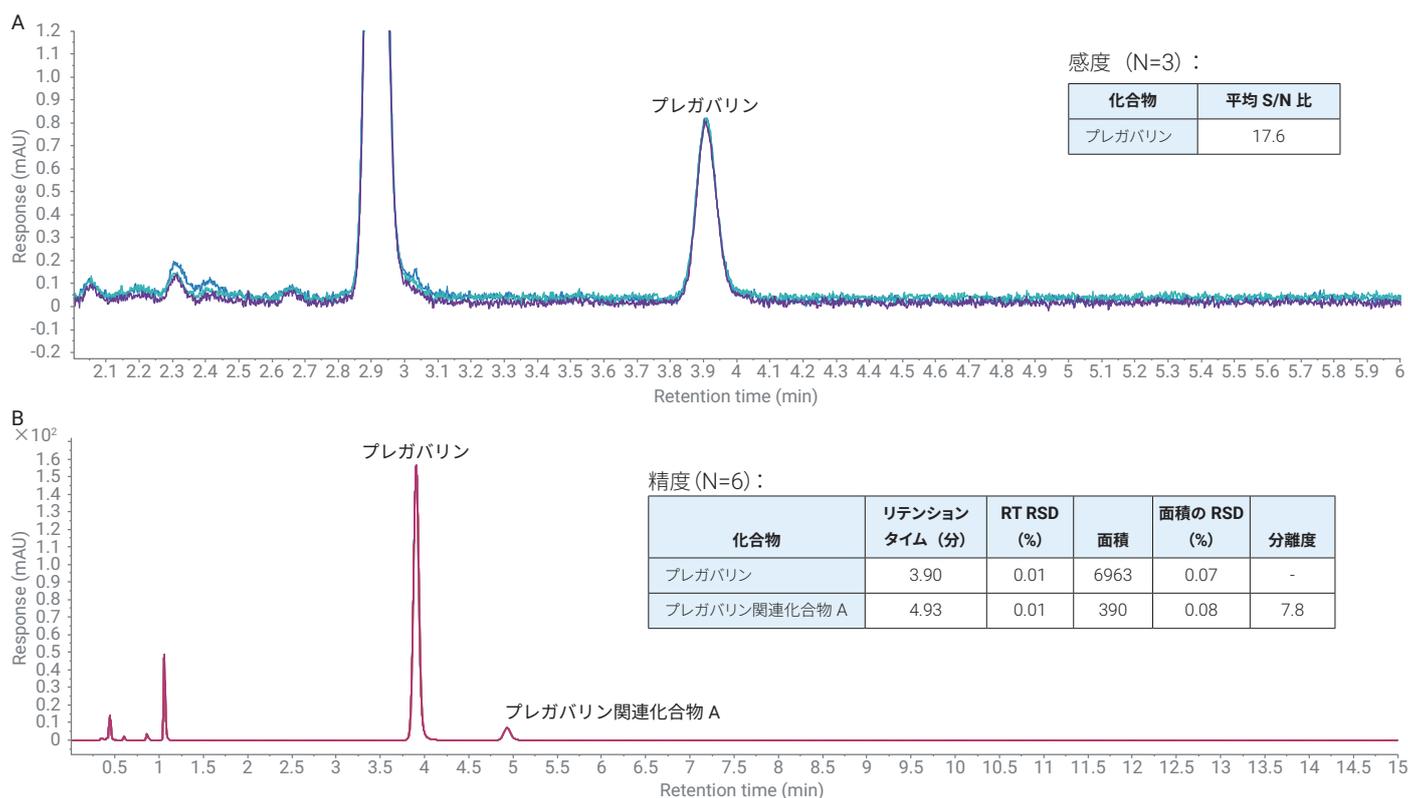


図 7. Eclipse Plus C18、2.1 x 100 mm、1.8  $\mu$ m カラムを使用した USP によるプレガバリンのエナンチオマー純度の UHPLC 測定：(A) 感度テスト溶液の分析 (N=3)、(B) 標準溶液の分析 (N=6)

USP ガイドラインの第 621 章に従ってプレガバリンのエナンチオマー純度の測定を UHPLC 条件に移管するには、もう一つのオプションがあります。そのオプションとは、流量 0.772 mL/min で実施される InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 x 100 mm、2.7  $\mu$ m、1,000 bar カラムへの移管です。所定の対して理論段数 (N) が -25 ~ 50% 以内であるため、この移管は可能です。図 8 は、InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 x 100 mm、2.7  $\mu$ m、1,000 bar カラムを使用し、USP に従ってプレガバリンのエナンチオマー純度を UHPLC により測定した結果を示しています。優れたリテンションタイムとピーク面積の精度が得られています。USP システムの適合性要件もすべて満たされています。HPLC メソッドと比較して、InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 x 100 mm、2.7  $\mu$ m、1,000 bar カラムを使用したプレガバリンのエナンチオマー純度の UHPLC 測定では、77% の時間節約と 91% の溶媒節約が可能となりました。

## 結論

カラム選択バルブを備えた Agilent 1260 Infinity II Prime LC により、1 台の LC システムで手動介入を必要とせずに USP に従ったプレガバリンのエナンチオマー純度の測定とプレガバリンの測定が自動化できます。どちらのメソッドでも優れたリテンションタイムとピーク面積精度が得られ、すべての USP システム適合性要件が満たされます。さらに、プレガバリンのエナンチオマー純度の測定とプレガバリンの測定は、USP ガイドラインの 621 章に従って UHPLC 条件に移管できます。1260 Infinity II Prime LC が対応する最大 800 bar の圧力範囲によって、メソッドの移管が容易になります。両メソッドを UHPLC 条件に移管すると、実行時間が 77 分から 17 分に短縮され、溶媒を 90% 節約できます。

## 参考文献

1. Statista, <https://www.statista.com/statistics/258022/top-10-pharmaceutical-products-by-global-sales-2011/> (2020 年 5 月 5 日アクセス)
2. Stahl, S. M., et al. The Diverse Therapeutic Actions of Pregabalin: is a Single Mechanism Responsible for Several Pharmacological Activities? *Trends in Pharmacological Sciences*, Vol. 34 No. 6, 332–339, **2013**.
3. Taylor, C. P., et al. Pharmacology and Mechanism of Action of Pregabalin: the Calcium Channel  $\alpha_2\text{-}\delta$  ( $\alpha_2\text{-}\delta$ ) Subunit as a Target for Antiepileptic Drug Discovery *Epilepsy Research*, 73, 137–150, **2007**.
4. USP monograph on pregabalin, 2020 年 11 月 1 日に公式化予定、<https://online.uspnf.com/uspnf/section/monographs-usp> (2020 年 5 月 13 日アクセス)

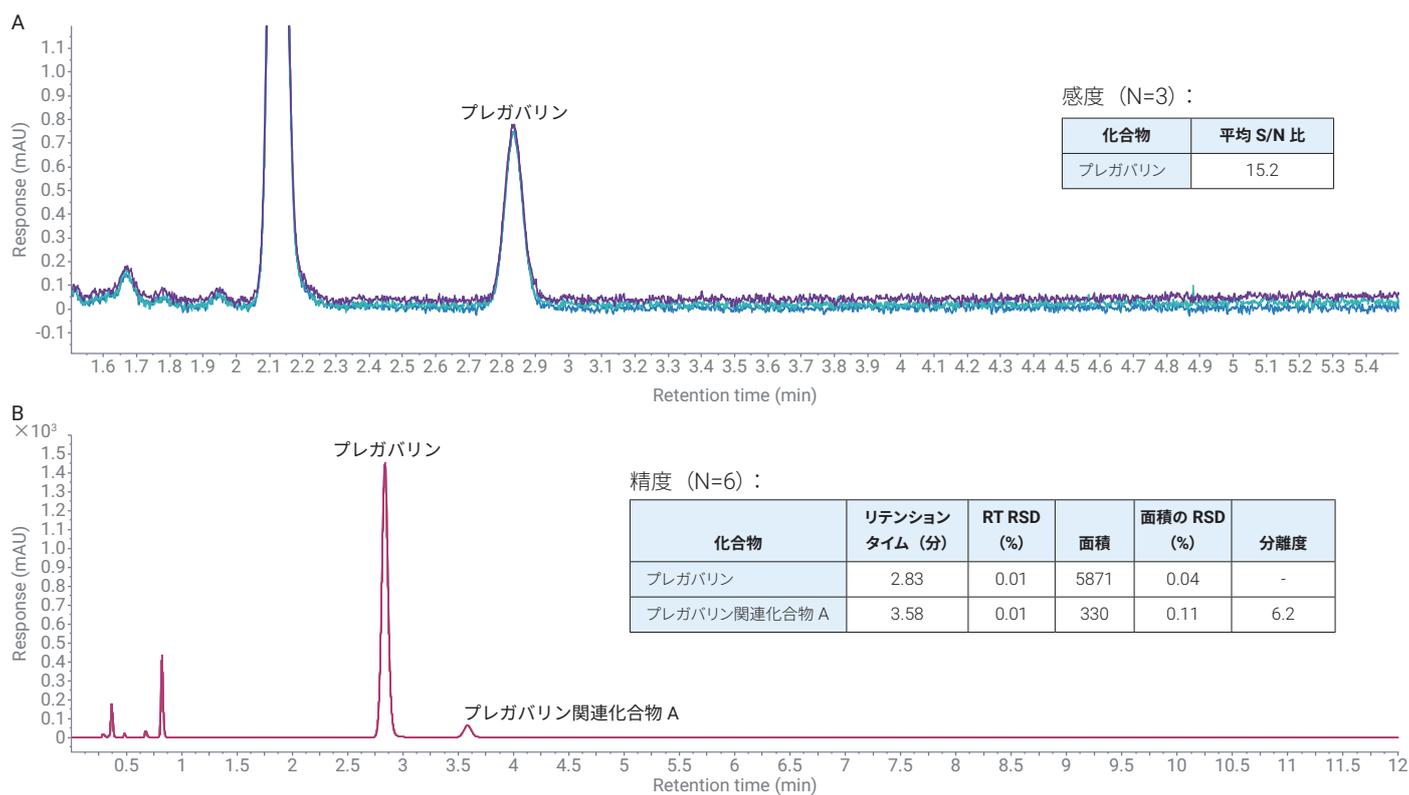


図 8. InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 x 100 mm、2.7  $\mu$ m、1,000 bar カラムを使用した USP によるプレガバリンのエナンチオマー純度の UHPLC 測定 : (A) 感度テスト溶液の分析 (N=3)、(B) 標準溶液の分析 (N=6)

ホームページ

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

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

[email\\_japan@agilent.com](mailto: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. 2020  
Printed in Japan, July 2, 2020  
5994-2173JAJP  
DE.7066898148