

Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 カラムへのベンゾカイントローチ剤の USP 分析メソッドの簡明な変換

著者

William J. Long
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、ベンゾカイントローチ剤の USP 分析メソッドの移行について取り上げます。移行前後のカラムには、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8 および Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 カラムを使用しました。5 μm の 4.6 \times 250 mm カラムを使用した最初のメソッドでは、分析に 15 分かかりました。代わりに InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 カラム (4.6 \times 150 mm、4.6 \times 100 mm、および 4.6 \times 75 mm、2.7 μm) を使用したところ、分析時間が最初のメソッドから 40 ~ 70 % 短縮されました。その際、再バリデーションや流量の変更は必要ありませんでした。分析時には背圧をモニタリングし、別機器への移管要因として考慮しました。

はじめに

製薬会社は、原材料と最終製品の試験に米国薬局方 (USP) の公定書メソッドを日常的に採用しています。ルーチン分析においては、USP メソッドを正しく実装すること、またメソッドを機器間で移管できる体制を整えることが、スループット向上に向けた重要なステップになります。メソッド移管を効果的に行えば、特定のメソッドで得られる分析結果はラボ、機器、リソースに関わらずまったく同じになります。ラボ間のメソッド移管を確実に行えば、別の場所、または受託研究機関や製造組織 (CRO や CMO) などのパートナーとの間で、メソッドの再現性が実現できます。また、生産性目標を達成するもう 1 つの手段となるのが、HPLC ベースの USP メソッドを UPLC 技術に移行することです。これにより、分析時間を短縮し、製品品質の判断基準となるクロマトグラフィー分離についても高い信頼性と品質を確保できます。UHPLC 技術は、スループット向上、品質向上、コスト削減という点で、QC と製造施設に大きな利点をもたらします。

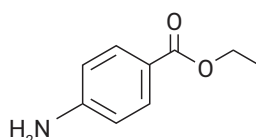
医薬品試験に伴うコストは、USP <621> の総則で認められているクロマトグラフィーの調整を行うことで削減できます。これらのコストはクロマトグラフィー溶媒と時間に関連するものですが、そのうち最も重要になるのが時間です。

このアプリケーションノートでは、サンプルスループットを高めることを目的に、表面多孔質粒子カラムを使用して、USP が公開しているベンゾカイントローチ剤の現行メソッドを許容範囲内で調整します。

医薬品試験には多額のコストが伴います。現在ラボにある LC 機器を引き続き使用しながら、溶媒消費量を削減し、生産性を向上させることでコスト削減を図ろうと模索しているラボマネージャも少なくありません。USP の公定書メソッドは、医薬品および原材料の試験で広く使用されています。これらのメソッドでは最新化する努力が払われていますが、新規技術を活用することで改善が可能です。

ベンゾカインは、*p*-アミノ安息香酸 (PABA) のエチルエステルです。局所鎮痛剤として、またはせき止めドロップの有効成分として広く使用されている局所麻酔薬であり、多くの市販薬に含まれています。トローチ剤の USP 分析メソッドでは、5 μ m の C8 または L7 カラムが使用されています。

ベンゾカインの構造を図 1 に示します。ベンゾカインの IUPAC 名は 4-アミノ安息香酸エチルエステルです。



4-アミノ安息香酸エチルエステル、*p*-アミノ安息香酸エチルエステル

図 1. ベンゾカインの構造

InfinityLab Poroshell 120 カラムは、一般的な LC 機器の性能を向上させる LC カラムです。2.7 μ m の表面多孔質粒子が充填されており、より短いカラムでより優れた分析スピードと分解能を実現し、既存の機器でより多くの

サンプルをより短時間で試験することができます。InfinityLab Poroshell 120 カラムは、L1 (C18)、L7 (C8)、L11 (フェニル)、L10 (シアノ) をはじめ、多様な固定相で提供されています。本アプリケーションノートの作業では、L7 固定相 (InfinityLab Poroshell 120 EC-C8) を使用しました。

実験方法

今回の研究では、0.17 mm チューブで構成した Agilent 1260 Infinity II LC を使用しました。表 1 に、各コンポーネントの詳細を示します。

USP グレードの一塩基性リン酸カリウムおよびリン酸は、Sigma-Aldrich 社から購入しました。アセトニトリル (HPLC 認定グレード) は、Honeywell 社 (Burdick and Jackson) から購入しました。水は、Millipore Milli-Q システム (0.2 μ m ろ過、18 M Ω) を使用してその場で生成しました。USP ベンゾカイン RS は、米国薬局方から購入しました。USP メソッドに従い、1.0 M 一塩基性リン酸カリウム溶液を調整してリン酸で pH 3.0 に調整し、これを緩衝液としました。移動相には、アセトニトリル、水、緩衝液 (250 mL:500 mL:50 mL) の混合液を使用しました。

表 1. 機器の構成

Agilent 1260 Infinity II LC	
Agilent 1260 Infinity II バイナリポンプ (G7117B)	
Agilent 1260 Infinity II マルチサンプル (G7167A)	- バイアル、スクリュートップ、茶色、ラベル付き、認定、2 mL、100 個 (p/n 5182-0716) - キャップ、スクリュー、青、PTFE/赤シリコンセプタム、100 個 (p/n 5182-0717)
Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット (MCT; G7116A)	- 標準フローヒーター G7116-60015 - ヒーターとカラム: Agilent InfinityLab クイックコネクタアセンブリ、105 mm、0.12 mm (p/n 5067-5961)
Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 FS (G7117A)	- 10 mm 1 μ m フローセル (G4212-60008) - 40 Hz
Agilent OpenLab CDS、バージョン C.01.07	

USP の手順に従い、所定の希釈液 A と希釈液 B を調製しました。希釈液 A は、8.3 mL の 37 % HCl を水 1 L で希釈した 0.1 N 塩酸です。希釈液 B は、アセトニトリルと水の 1:1 溶液です。標準溶液 A は、USP ベンゾカイン RS を希釈液 A に 0.01 mg/mL の濃度で溶解して調製しました。また、標準溶液 B は、USP ベンゾカイン RS を希釈液 B に 0.01 mg/mL の濃度で溶解して調製しました。これらの標準溶液は、システム適合性試験とキャリブレーションに使用しました。メソッド条件を表 2 にまとめます¹。

今回の研究で使用したカラムは次のとおりです。

- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8、4.6 × 250、5 μm (p/n 959990-906)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8、4.6 × 150 mm、2.7 μm (p/n 693975-906)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8、4.6 × 100 mm、2.7 μm (p/n 695975-906)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8、4.6 × 75 mm、2.7 μm (p/n 697975-906)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8、4.6 × 150 mm、4 μm (p/n 693970-906)

結果と考察

表 3 に、USP メソッドにおいてメソッドバリデーションなしで許容される調整範囲を示します。許可されている変更の一例として L/dp ルールがあります。カラムの長さや粒子サイズの比率を、-25 ~ +50 % の範囲内で一定に保ちます。カラムの効率をほぼ一定に保つことにより、新しいメソッドは作成されません。目的は、より効率的なメソッドを作成することではなく、より高速なメソッドを作成することです。再バリデーションなしに検出に変更を加えることはできません。移動相は変更しません。注入量は、精度および検出限界の一貫性が保たれる範囲で調整することができ、幾何学的にスケールアップされます。精度は、アッセイ法における重要な基準です。

表 2. LC メソッドの初期条件

パラメータ	設定値
カラム	L7、4.6 × 250 mm、5 μm (Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8)
緩衝液	1.0 M 一塩基性リン酸カリウム、リン酸の滴定により pH 3.0 に調整
移動相	事前混合 (アセトニトリル:水:緩衝液、200:750:50)
流量	1.5 mL/min
分析時間	約 15 分
温度 (カラム)	25 °C
注入量	20 μL (小さいカラム用に幾何学的にスケールアップ)
サンプル濃度	0.01 mg/mL の USP ベンゾカイン RS、希釈液 A または希釈液 B に溶解
検出器	UV : 280 nm
システム適合性要件	テーリングファクター : 1.5 % 以下 相対標準偏差 : 2.0 % 以下

表 3. USP 総則 <621> で許容される調整範囲の要約

システム適合性のパラメータ	USP37-NF32S1	
	イソクラティック	グラジエント
粒子径	L/dp: -25 ~ +50 % または	変更不可
カラム長	N : -25 ~ +50 %	
カラム内径	柔軟な調整が可能、直線速度一定	変更不可
流量	dp にもとづく : $F_2 = F_1 \times [(dc_2^2 \times dp_1)/(dc_1^2 \times dp_2)]$ 追加調整 : ±50 %、N の減少は 20 % 以下	変更不可
注入量	精度および検出下限に矛盾が生じない範囲で調整可能	精度および検出下限に矛盾が生じない範囲で調整可能
カラム温度	±10 °C	±10 °C
移動相の pH	±0.2 単位	±0.2 単位
塩濃度	許容される pH 変動が満たされていれば、±10 %	許容される pH 変動が満たされていれば、±10 %
移動相中の成分比	微量成分 (50 % 以下) : 相対比 ±30 %、ただし絶対比 ±10 % を超えないこと、3 成分混合液中の 1 つの微量成分のみ調整可能	変更不可*
UV 検出器の波長	変更不可	変更不可

* <621> では規定されていません。変更できないものと想定しています。

このメソッドでは、最初に 250 mm (250,000 μm) の 5 μm カラムを使用しました。このカラムの L/dp の計算値は 50,000 です。表 4 は、粒子径 5 μm および 3.5 μm の全多孔質粒子 (TPP) カラムと、粒子径 4 μm および 2.7 μm の表面多孔質粒子 (SPP) カラムで満たすことのできる L (カラム長) と dp (粒子径) の組み合わせと、それぞれの L/dp 値を示しています。TPP カラムおよび SPP カラムに適用される L/dp の計算方法はまったく同じです。L/dp 値 50,000 を基準に $-25 \sim +50 \%$ という L/dp ルールに従うと、L/dp が 37,500 \sim 75,000 の範囲内であれば、その組み合わせのカラムに再バリデーションなしで調整できることになります。調整によってどの程度節約できるかは、L/dp ルールに従って変化を調査することでわかります。流量を一定とすると、このメソッドで節約できる時間と溶媒は次のようになります。4 μm の 250 mm カラムを使用した場合、時間も溶媒も節約されません。これに対し、4 μm の 150 mm カラム、3.5 μm の 150 mm カラム、または 2.7 μm の 100 mm カラムについては、L/dp ルールに従って再バリデーションなしで使用するには、カラム長および L/dp 値がわずかに足りません。一方、バリデーションなしで許容されるシナリオは、表 4 にオレンジ色のセルで示すとおりです。これらの計算値と、スループット向上という目的にもとづき、評価には、4.6 \times 150 mm の 4 μm および 2.7 μm SPP InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 カラムを選択しました。注入量を比例的に低減したところ、目的成分のリテンションタイムが 6.4 分以下に短縮されたことで、分析が高速化し、クロマトグラフィー溶媒を節約できました。InfinityLab Poroshell 2.7 μm 150 mm カラム使用時の背圧は 421 bar でした。この背圧は、実験に用いた機器ではまったく問題ありませんが、旧式の機器では対応できない可能性があります。一方、4 μm の 150 mm カラムでこのメソッドを実行したときの背圧は 264 bar でした。これらのカラムで得られたクロマトグラムを図 2 に示します。

表 4. L (カラム長)/dp (粒子径) の組み合わせの候補

L/dp (μm)	5	4	3.5	2.7
250	50,000	62,500	71,429	92,593
150	30,000	37,500	42,857	55,555
100	20,000	25,000	28,571	37,037
75	15,000	18,750	21,428	27,778
50	10,000	12,500	14,285	18,519

L/dp 値 50,000 を基準に $-25 \sim +50 \%$ という L/dp ルールに従うと、L/dp が 37,500 \sim 75,000 の範囲内であれば、許容できることになります。オレンジ色のセルは、このルールで許容される調整を示します。

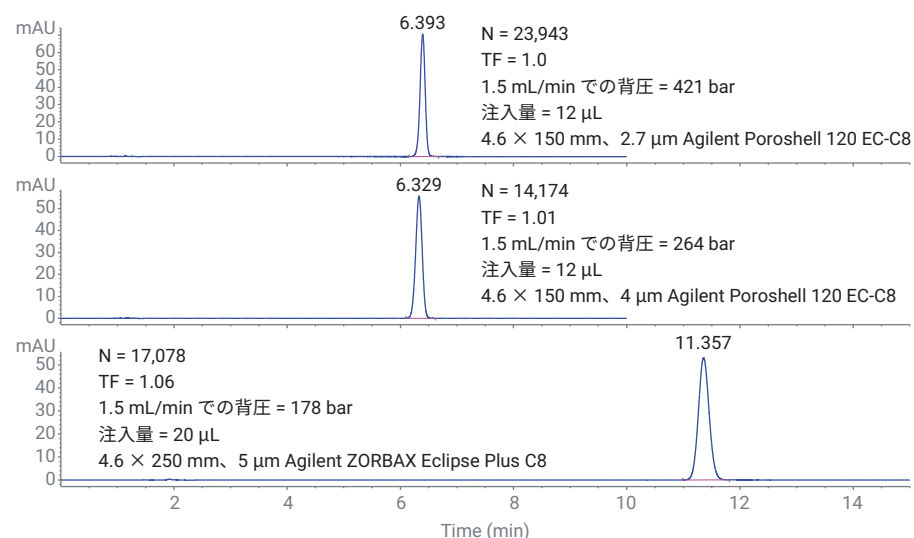


図 2. USP ベンゾカイトローチ剤：Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8 によるクロマトグラムと、L/dp ルールで許容される Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 によるクロマトグラムの比較

2.7 μm の InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 カラムで $N =$ 約 24,000 または 160,000 N/m が得られたことが報告されています。この計算値は、このメソッドにおいて、 $-25 \sim +50 \%$ という N ルールをより短い 100 mm または 75 mm カラムで満たすことができることを示唆しています。ここで、このメソッドで元のカラム (4.6 \times 250 mm、5 μm) を使用して目的成分を分析したときの N を基準とすると、 N ルールで許容される範囲は 12,808 \sim 25,617 となります。図 3 は、2.7 μm の 75mm および 100 mm カラムで得られたクロマトグラムを比較したものです。100 mm カラムは $N = 18,325$ 、背圧 315 bar で、75 mm カラムは $N = 14,065$ 、背圧 263 bar であることがわかりました。どちらのカラムも $-25 \sim +50 \%$ という N ルールを満たしています。また、短いカラムほど、時間とクロマトグラフィー溶媒の節約幅は大きくなります²。

表 3 の要約には、 L/dp 比が $-25 \sim +50 \%$ の限度内か、 N について $-25 \sim +50 \%$ という条件が満たされれば、粒子径とカラム長を調整できることが示されています。

表 5 に、実験結果と節約される時間をまとめます。これらの結果からわかるように、4.6 \times 75 mm カラムは、元のカラムと同じ機器で容易に対応でき、時間とクロマトグラフィー溶媒を 70 % 節約できるうえ、再バリデーションの必要もありません。 $-25 \sim +50 \%$ という N ルールにもとづくこの調整では、SPP カラムの真の利点が発揮されます。

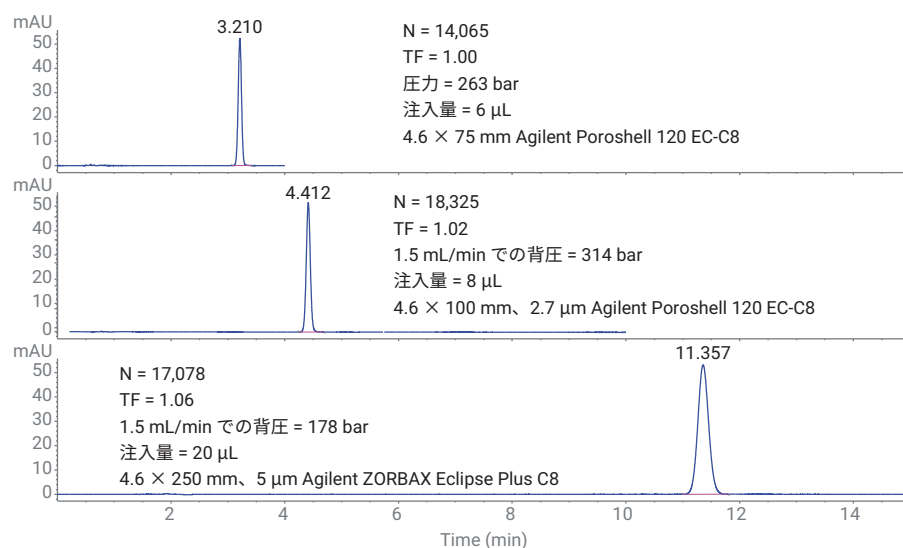


図 3. USP ベンゾカイントローチ剤：Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8 によるクロマトグラムと、 N ルールで許容される Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 4.6 \times 75 mm および 100 mm 2.7 μm によるクロマトグラムの比較

調整を行う際の受け入れ基準は、システム適合性要件です。ベンゾカイントローチ剤の分析では、このメソッドで InfinityLab Poroshell 120 EC-C8、4.6 \times 75 mm、2.7 μm カラムを使用することで、元のメソッドで 15 分かかっていた分析時間を 4.5 分に短縮することができました。このように効率が向上したことに加え、溶媒消費量も 70 % 削減されました。一般に、メソッドを 75 mm の InfinityLab Poroshell 120 2.7 μm カラムに適応させることにより、同様の節約効果が得られます。ベンゾカイントローチ剤の分析メソッドに対するシステム適合性要件の評価を、希釈液 A (0.1 N 塩酸) と希釈液 B (アセトニトリルと水 (1:1))

でそれぞれ調製した 0.01 mg/mL の USP ベンゾカイン RS 溶液を使用して行いました。具体的には、テーリングファクターが 1.5 以下、RSD が 2.0 % 以下という要件を満たす必要があります。その評価結果を表 6 にまとめます。RSD が 2 以下の場合のシステム適合性データは、通常、5 つのクロマトグラムを使用して求められます。つまり、分析時間が 15 分であれば、実際のサンプルを注入する前に 75 分以上の時間が費やされることになります。一方、75 mm の 2.7 μm SPP カラムを用いたより高速なメソッドを使用すれば、所要時間は 27 分で済みます。

表 5. USP のベンゾカイン分析メソッドを Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 カラムで調整した結果のまとめ

カラム	カラム長 (L, mm)	粒子径 (dp, μm)	L/dp 比	許容 L/dp 範囲 (-25 \sim +50 %)	N ベンゾカイン標準	許容 N 範囲 (-25 \sim +50 %)	短縮された時間の割合	圧力 (Bar)
ZORBAX Eclipse Plus C8	250	5	50,000	37,500 \sim 75,000	17,078	12,808 \sim 25,617		176
Poroshell 120 EC-C8	150	4	37,500	仕様を満たす	23,943	確認不要	40 %	264
Poroshell 120 EC-C8	150	2.7	55,555	仕様を満たす	14,174	確認不要	40 %	421
Poroshell 120 EC-C8	100	2.7	37,037	仕様を満たさない	18,325	仕様を満たす (+7 %)	60 %	314
Poroshell 120 EC-C8	75	2.7	27,778	仕様を満たさない	14,128	仕様を満たす (-17 %)	70 %	287

結論

公定分析に 5 μm の全多孔質カラムを使用しているラボでは、2.7 μm の Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 表面多孔質カラムに移行することで、分析の高速化と溶媒の節約という利点が得られます。既存の機器を置き換える必要もありません。さらに重要なのは、移行後のメソッドを使用して、ラボにある任意の機器に作業を柔軟に割り当てられるようになることでしょう。分析時間の短縮およびスループットの向上により、ラボの生産性を向上させることができます。これらの短いカラムへの調整を許容される範囲で行えば、追加のバリデーションは不要です。この場合、表面多孔性カラムでは 5 μm カラムよりも短時間で結果を得ることできるため、システムの適合性要件を容易に満たしつつ、ラボの生産性を向上させることができます。

参考文献

1. USP Benzocaine Lozenge Method, *United States Pharmacopeia* **2020**, 42(4), Rockville, MD.
2. USP General Chapter 621, USP 37-NF32, First supplement.

ホームページ

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

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. 2021
Printed in Japan, April 5, 2021
5994-3221JAJP
DE44279.0580439815

表 6. システム適合性試験の結果

	システム適合性要件	Agilent Poroshell 120 EC-C8 4.6 × 75 mm, 2.7 μm , 1.5 mL/min, 標準溶液 A		Agilent Poroshell 120 EC-C8 4.6 × 75 mm, 2.7 μm , 1.5 mL/min, 標準溶液 B	
USP テーリングファクター	2.0 % 以下	1.0		1.0	
相対標準偏差	2.0 % 以下	面積	0.3 %	面積	0.3 %
		リテンションタイム	0.3 %	リテンションタイム	0.2 %