

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 の 5 μm 、3.5 μm 、および 1.8 μm カラムに よるシンバスタチン分析性能の改善

アプリケーションノート

製薬

著者

William Long and Anne Brooks
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19809
USA

Yun Zou
Agilent technologies, Inc.
412 Ying Lun Road
Waigaoqiao Free Trade Zone
Shanghai 200131
China

概要

シンバスタチンは、スタチンと呼ばれるコレステロール降下剤の一種で、世界中で広く処方されている薬剤です。本アプリケーションノートでは、シンバスタチン錠剤の分析に合わせた USP メソッドの調整方法について説明します。USP メソッドは、250 mm の Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 5 μm カラムを使用し、10 分の分析時間が必要です。このメソッドは、簡単な変更で、Rapid Resolution Eclipse Plus C18、4.6 mm x 100 mm、3.5- μm カラム、または Rapid Resolution HT Eclipse Plus C18、4.6 mm x 50 mm、1.8- μm カラムの使用に適したメソッドにでき、その結果、分析時間の短縮化、時間と溶媒の大幅な節約を実現できます。どのカラムも、400 bar 未満の圧力で使用されるため、ほとんどすべての機器で使用できます。本アプリケーションノートでは、堅牢性、直線性、およびカラム寿命を示します。



Agilent Technologies

はじめに

シンバスタチンは、スタチンと呼ばれるコレステロール降下剤の一種で、世界中で広く処方されている薬剤です。シンバスタチンの構造を図 1 に示します。この薬剤は、摂取後に体内で加水分解され、肝臓内でのコレステロールの生成を阻害する物質になります。シンバスタチンは、全体的なコレステロールレベルを抑えると同時に LDL コレステロールの生成量を引き下げます。医学的な研究の結果から、高 LDL コレステロールは冠動脈疾患と関係があるとされています。米国内で市販されているスタチン剤には、この他にも、アトルバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチンなどがあります [1]。こうした薬剤の多くは配合薬の成分としても使用されています [1]。シンバスタチンは、通常、錠剤として、セルロース、ラクトース、スターチなどの不活性賦形剤と共に 5 ~ 80 mg 投与されます。現在、シンバスタチンはジェネリック薬品として世界中で生産されています。

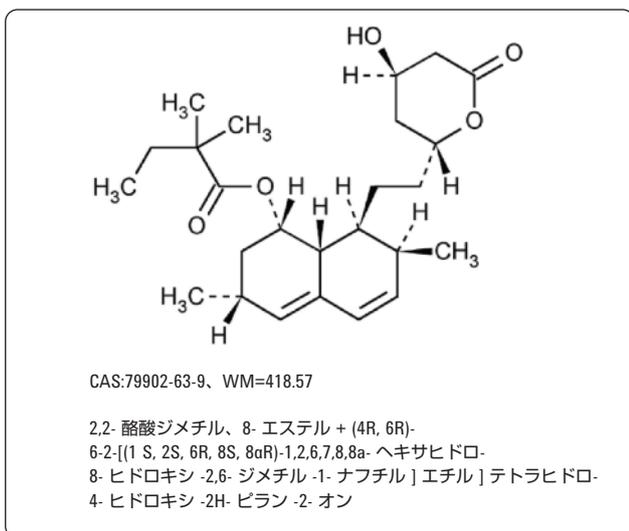


図 1. シンバスタチンの構造

高品質の製品を生産しながらコストを削減することは、医薬品およびジェネリック医薬品メーカーの目標です。USP シンバスタチン錠剤メソッド (250 mm × 4.6 mm、5- μ m カラム) と比較した場合、Eclipse Plus C18 カラムでは、分析時間を 60 ~ 80 % 短縮でき、それに伴って溶媒も節約できます。使用される溶媒がアセトニトリルであることから、メソッド調整による粒径およびカラム長の小型化は、特に魅力的な利点とははるはずです。

実験

氷酢酸、水酸化ナトリウム溶液、リン酸、第一リン酸ナトリウム、およびシンバスタチンは、Sigma-Aldrich 社から購入しまし

た。USP シンバスタチンは、米国薬局方の手順に従って調製しました。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析には、次のような条件で Agilent 1200 シリーズ Rapid Resolution LC (RRLC) システムを使用しました。

- G1312B バイナリポンプ SL、移動相チャンネル A: pH 4.5 のリン酸緩衝水溶液、チャンネル B: アセトニトリル (混合比 35:65); 流量は 1.5 mL/min (さまざまな条件を用いて堅牢性を調べました)
- G1376C ALS (オートサンブラ) SL、注入量は 10 μ L (250 mm カラムの場合)、6 μ L (150 mm カラムの場合)、4 μ L (100 mm カラムの場合)、2 μ L (50 mm カラムの場合)
- G1316B カラム恒温槽 (TCC) SL、温度は 45 °C
- G1316C ダイオードアレイ検出器 (DAD)、波長設定は 238、4 nm 360、50 mm + G1315-60024 マイクロフローセル (50 mm パス、6 μ L ボリューム)

ZORBAX カラム:

- Eclipse Plus C18、4.6 mm × 250 mm、5 μ m (部品番号 959990-902)
- Rapid Resolution Eclipse Plus C18、4.6 mm × 100 mm、3.5 μ m (部品番号 959961-902)
- Rapid Resolution HT Eclipse Plus C18、4.6 mm × 50 mm、1.8 μ m (部品番号 959941-902)

USP に基づくサンプルおよび移動相の調製
シンバスタチン錠剤の分析メソッド [2]

標準溶液調製

1. 900 mL の水に 3 mL の氷酢酸を加えます。
2. 5 規定の水酸化ナトリウム溶液で pH を 4.0 に調節した後、水で 1L に定容します。
3. この溶液 200 mL とアセトニトリル 800 mL を混ぜ合わせて希釈液を作ります。
4. USP シンバスタチン標準品を使用して 100 mL のメスフラスコで 0.1 mg/mL 濃度の標準溶液を調製します。

試料溶液調製

1. シンバスタチン錠剤 10 錠を 250-mL のメスフラスコに移して水 (5 ~ 10 mL) を加えます。
2. 錠剤が溶けるまで攪拌します。
3. 錠剤溶液を希釈液で所定の量まで希釈します。
4. この混合溶液を遠心分離器にかけ、その上澄み液を希釈して最終濃度 0.1 mg/mL のシンバスタチン溶液を作ります。

移動相の調製

- 3.9 g のリン二水素酸ナトリウムを 900 mL の水に溶かします。
- pH が 4.5 になっていることを確認し、必要な場合には、USP の手順に従って、50 % の水酸化ナトリウム溶液または 85 % のリン酸溶液で pH を調整します。
- この溶液を水で 1000 mL まで希釈して混ぜ合わせます。移動相は、アセトニトリルと緩衝液を混合比 65:35 で混ぜ合わせたものです。

このメソッドのクロマトグラフおよび性能に関する要件は USP メソッドに規定されています。これらの要件をまとめると、次のようになります [2]。

- 238 nm の検出波長
- 4.6 mm × 250 mm カラム、L1 カラム (C18)、10 µL の注入量
- 45 °C
- 1.5 mL/min の流量
- k' は 3 以上
- $N \geq 4500$ プレート
- USP テーリングファクタ (T_f) は 2.0 以下

図 2 に示した通り、USP メソッドの効率およびその他のクロマトグラフ要件は難なく満たされています。ここに示す USP メソッドを使用して 1 日中作業を行えば、10 ~ 12 分に 1 回のペースで分析を実行できます。したがって、1 時間あたりの分

析スループットは 5 ~ 6 回になり、1 分析の所要時間を 12 分とすれば、1 日で約 120 回の注入が行えるようになります。作業を 1 週間続ければ、250 mm、5-µm のカラムで 1000 回の注入が実行できます。多くのアプリケーションでは、このスループットで十分です。スループットの増強は、メソッドの調整によって実現できます。

USP 改訂条項 <621> には、調整の範囲内とみなされるメソッド変更の推奨限度値が示されています。

- カラム長: $\pm 70\%$
- カラム内径: $\pm 25\%$
- カラム充填材の粒径: 最大 50 % までの縮小 (拡大は不可)
- 流量: $\pm 50\%$
- 注入量: システム適合性試験 (SST) の基準を満たす範囲内での変更が許可されます
- カラム温度: $\pm 10\%$
- 移動相の pH: ± 0.2
- UV 波長: メーカーの仕様から外れた変更は不可
- 緩衝液の塩分濃度: $\pm 10\%$

上記の範囲を超える修正は変更とみなされ、再検証が必要とされます。分析に短いカラム (図 3a に示した 4.6 mm × 100 mm、3.5-µm カラムなど) を使用すれば、同じ分析を 40 % の時間 (1 回の注入あたり約 4 分) で完了させることができます。さらに、溶媒の消費量も 40 % だけになります。USP のガイドラ

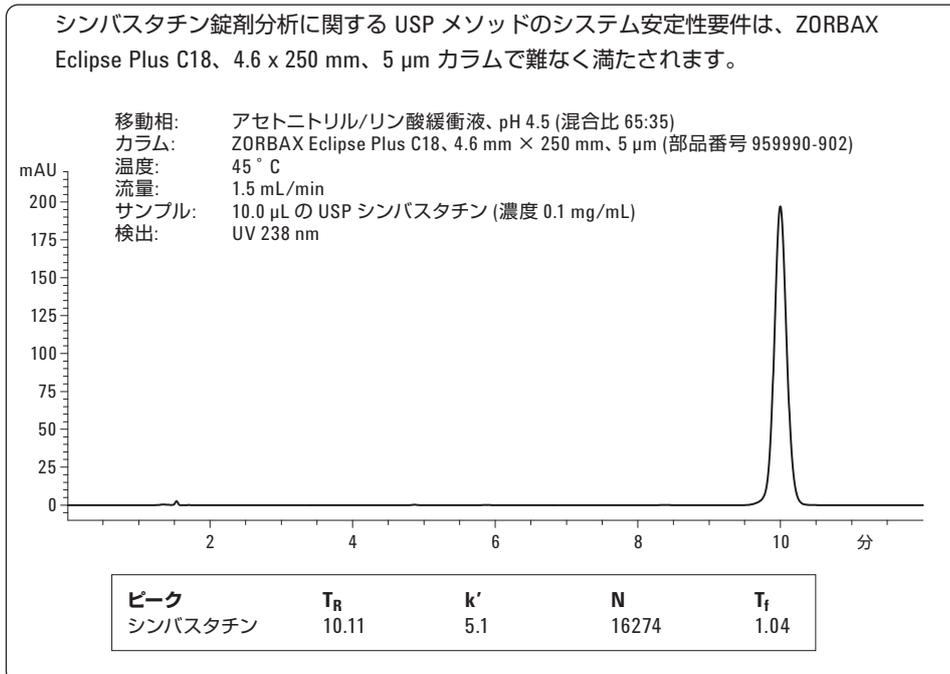


図 2. シンバスタチン錠剤に関する USP メソッド (ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 mm × 250 mm、5 µm カラムを使用)

インで認められている特定の項目については、一定範囲内の「調整」であればメソッドを再検証する必要はありません。こうした項目には、長さ(±70%)、直径(±25%)、粒子サイズ(粒子サイズの50%の縮小のみ可。拡大は不可)などがあります。図3aから分かる通り、長さ、直径、および粒子サイズの許容範囲内の調整で性能要件が満たされています。とはいえ、ほとんどのラボでは、新規メソッドを実施する場合、一定の検証を行っています。

図3bに示すように、4.6 mm × 50 mm、1.8- μ mのEclipse Plus C18カラムを使用して分析を実行することもできます。USPメソッドの性能要件は難なく満たされていますが、USPの条項621に規定されているメソッド調整の限度値を超える変更を加えているため、メソッドの再検証を行う必要があります。長さは80%縮小され、粒子サイズは62%縮小されています。要求される検証手順には、直線性の実証や、温度、pH、および有機含有率に対する堅牢性試験などが含まれます。

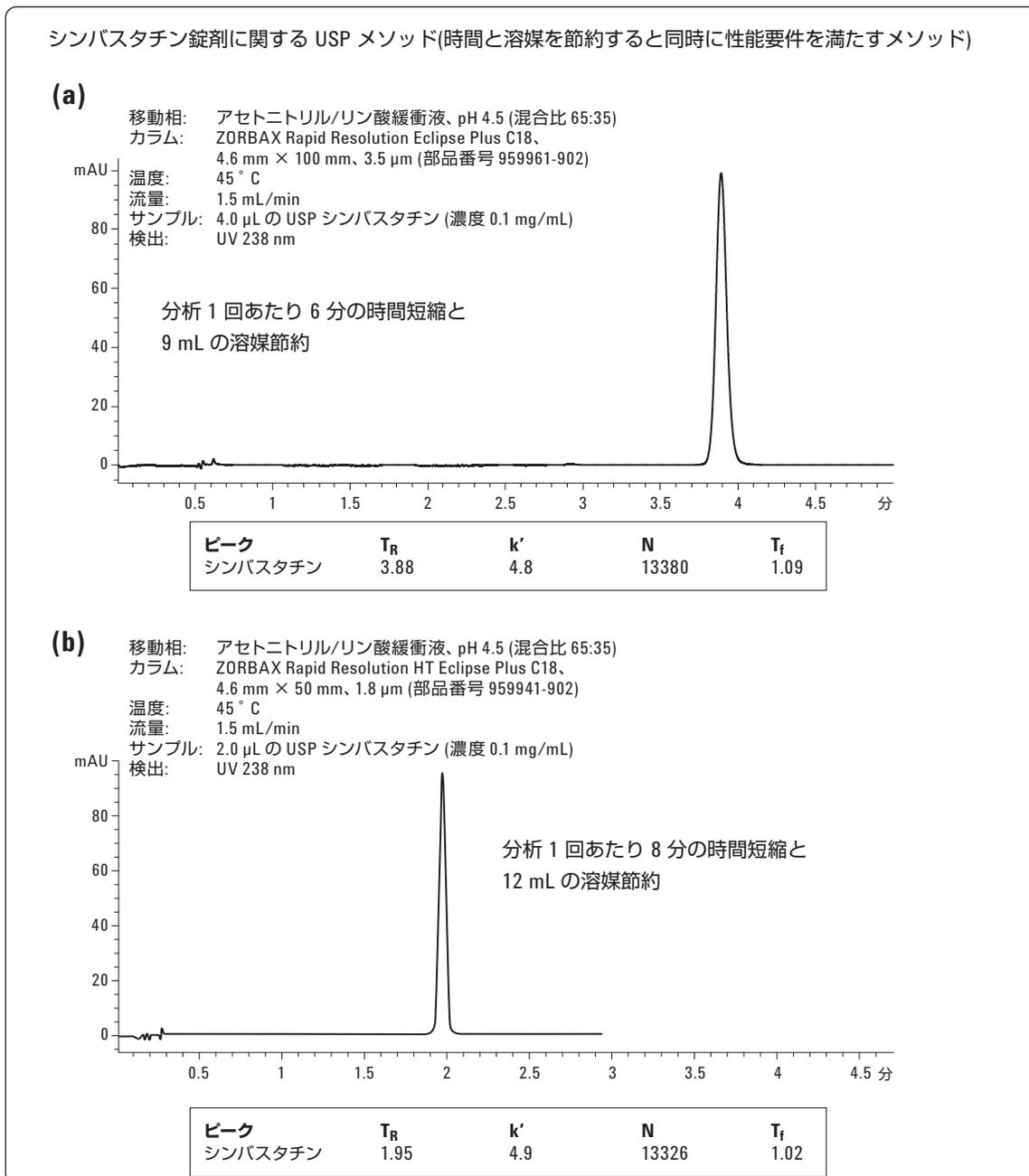


図 3. カラム長および粒子サイズの小型化による USP シンバスタチン錠剤メソッドの分析性能の変化

充てん剤のロット間での分析再現性の実証は、重要でありながらしばしば無視されるステップです。この検証ステップでは、異なるロットの充てん剤を使用しても同じ分離結果が得られることを検証します。このステップの目的は、メソッドの実施を成功させるために製造ロット間でカラム充てん剤の選択性に差異が生じないことを確認することです。特定のメソッドを使用する間、購入することになるカラム製品について、分離能にどの程度の差異が生じるかを把握しておくことは重要です。

Agilent ZORBAX カラムのバッチ番号は、ボックスの外側にもボックス内側のデータシートにも記載されています。図 4 は、ロット番号の異なる 3 つのカラムを示したものです。図に示した通り、Eclipse Plus C18、4.6 mm x 50 mm、1.8- μ m カラムの分離能の一貫性 (およそ $N = 13,000$ 、 $T_f \geq 1.0$ 、 $k' \geq 4.9$) は、この分析に要求されるレベルを十分に上回っています。

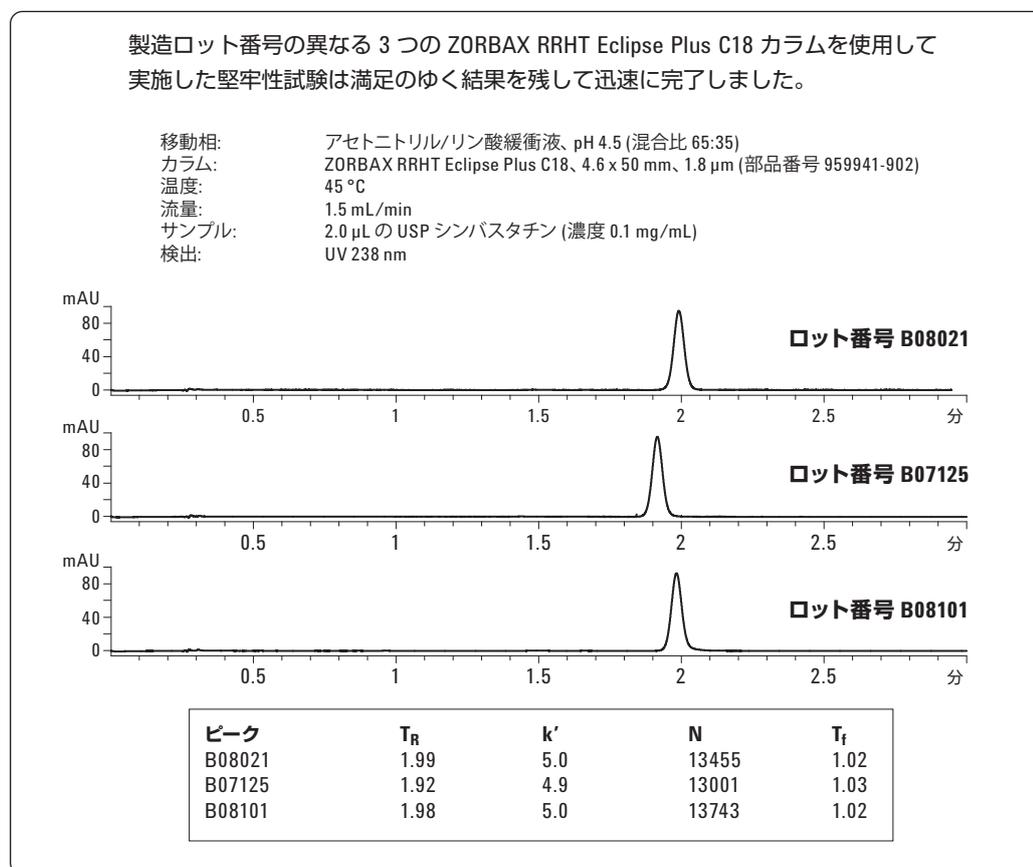


図 4. 製造ロットの異なる 3 つのカラムを使用した USP シンバスタチン錠剤メソッドの分析性能の比較

図 5 は、有機含有率の差異による分析結果の変化を示したものです。USP は、移動相の溶媒混合比の調整を認めています。相対比で $\pm 30\%$ または絶対比で $\pm 2\%$ のどちらか大きな方の変更に認められますが、(50% 以下の移動相成分について) 10% を超える変更を行うことや、いずれかの成分の最終濃度をゼロまで引き下げることは認められません。この実験で使用した移動相には有機溶媒の方が多く含有されているため (アセトニトリルの含有率 65%)、量の少ない方の成分 (緩衝液) を変化させるという形で調整を行いました。緩衝液含有率 (65%) の 30%

は 10.5% に相当します。調整の許容最大値は $\pm 10\%$ です。緩衝液の比率を 31.5 ~ 38.5% の範囲で調整すること、もしくは、アセトニトリルの比率を 68.5% ~ 61.6% の範囲で調整することが認められます。リテンションタイムは、予想通り、有機溶媒濃度が増加するに伴って減少します。有機溶媒濃度の変化による分離性能の変動は、カラムの製造ロットの違いによる変動よりも大きなものですが、このメソッドに要求される水準をクリアしていることに変わりはありません。

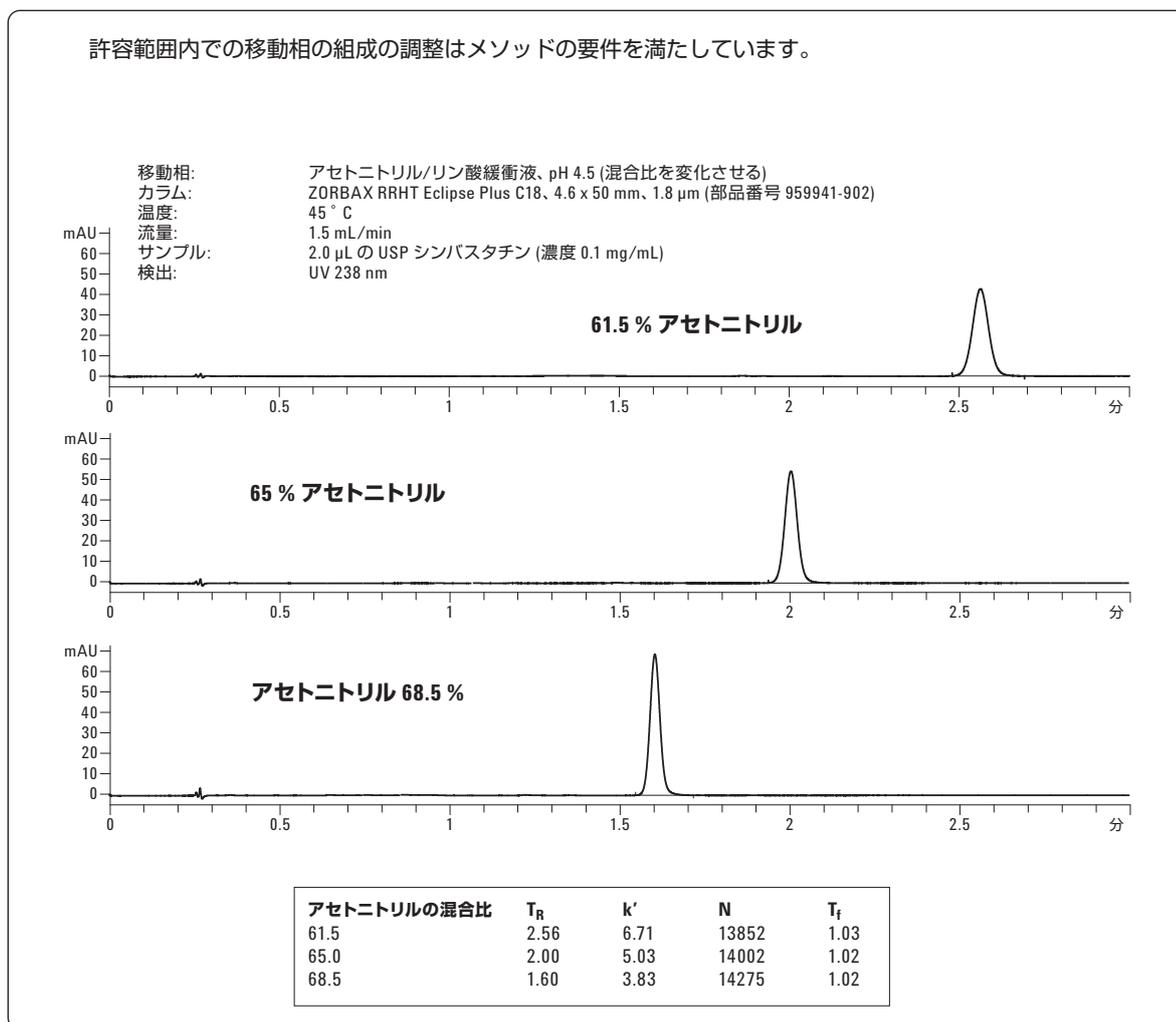


図 5. 二成分移動相の混合比調整による USP シンバスタチン錠剤メソッドの分析性能の比較

図 6 は、シンバスタチン分析に対する pH の影響を示したものです。試験範囲全体にわたって、pH の変化はほとんど検出されません。他の多くの極性化合物の場合、pH の変化が分析性能に与える影響は遙かに大きくなります。

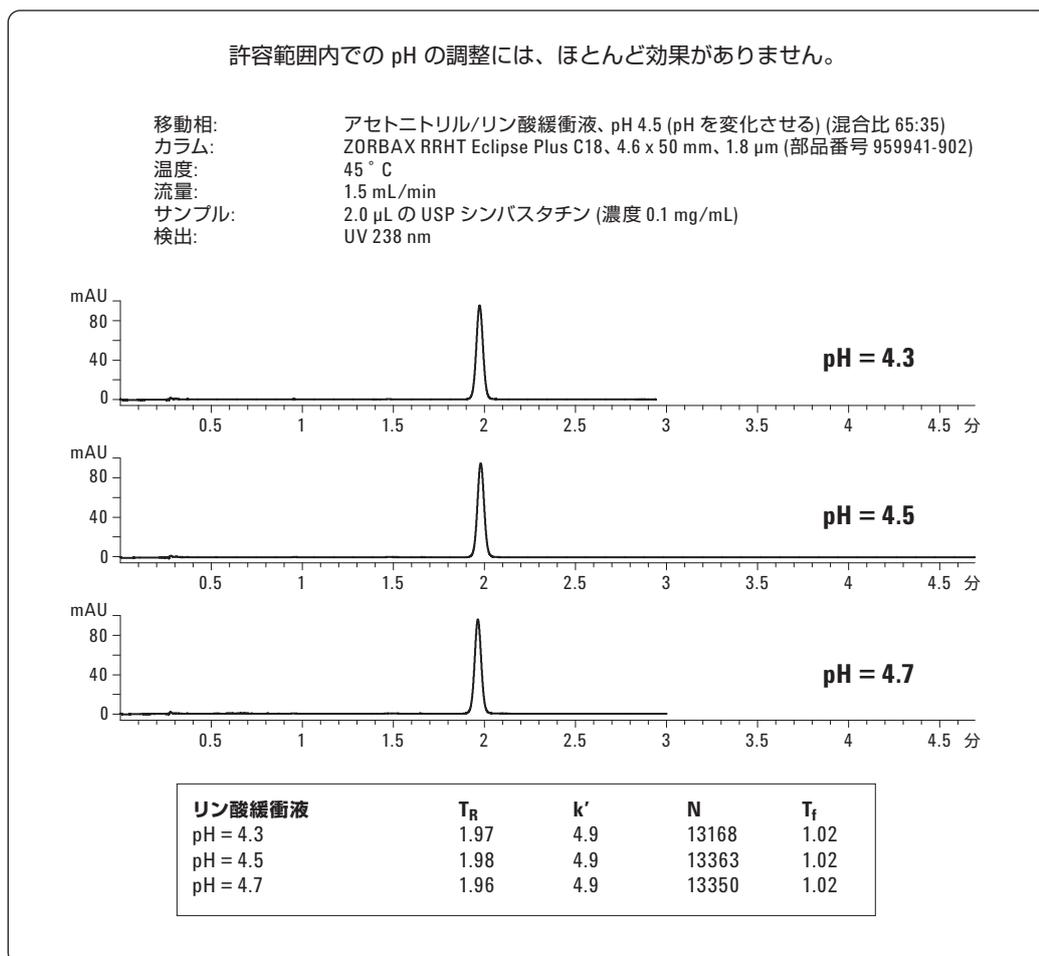


図 6. pH 調整による USP シンバスタチン錠剤メソッドの分析性能の比較

最後に、このメソッドの分析性能に対する温度変化の影響を図7に示します。± 10 % の温度変化について調べました。10 °C の変化幅について、性能要件は満たされています。

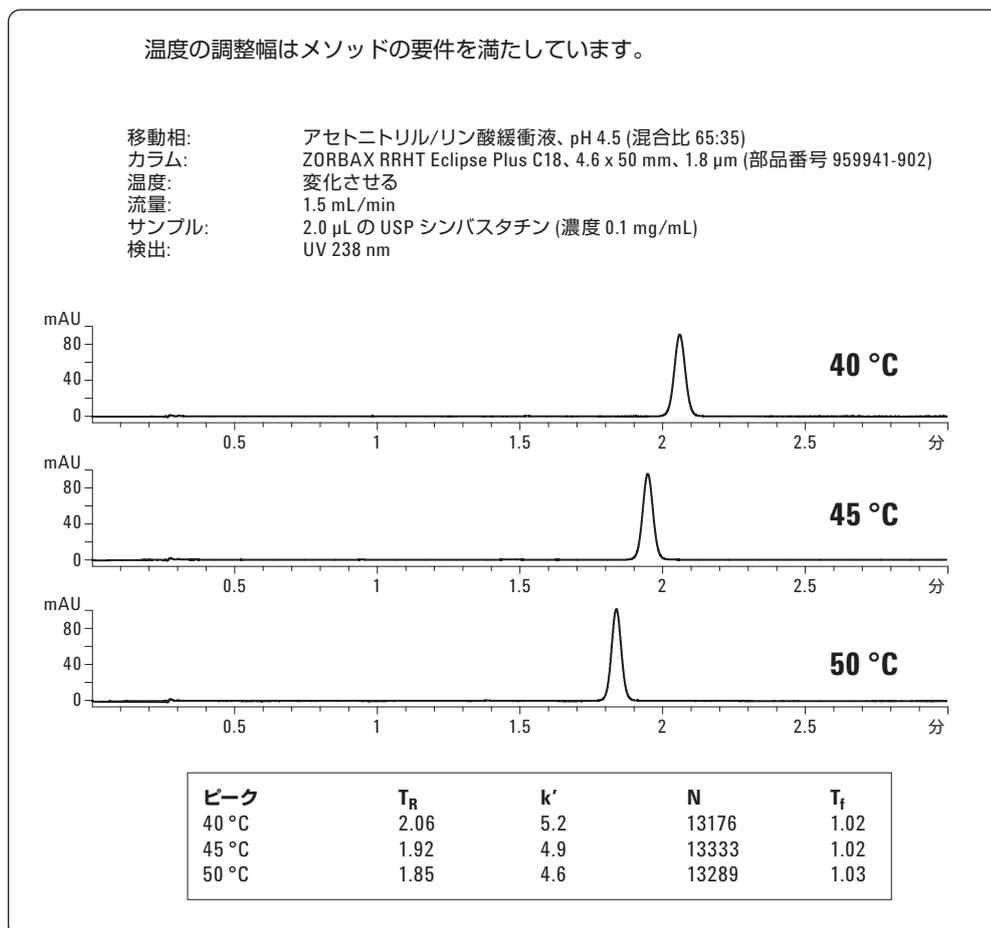


図7. 温度調整による USP シンバスタチン錠剤メソッドの分析性能の比較

図 8a は、シンバスタチン分析の直線性と回収率を示したものです。調製サンプル (0.1 mg/mL) の予想レンジの 80 ~ 120 % という要件は、50 ~ 150 % のキャリブレーションの使用によってクリアされています。精度は、サンプルとして追加した既知のシンバスタチン量の回収率を計算することによって決定されます。3 つのレベル (予想レンジの上、下、および予想レンジ内) で精度を計算し、それぞれの精度を比較します。USP にはサンプルの数が指定されていないため、医薬品規制ハーモナイゼーション国際会議 (ICH) の勧告に従って、レベルごとに 1 回ず

つ、計 3 回のテストを実施しました。テスト結果を図 8b に示します。この図から、精度が 100 % に近く、このメソッドには予想される用途に十分な精度であることが分かります。最後に、耐久性の測定結果を図 8c に示します。この測定は、3 名の化学者が別個の機器を使用して行ったものです。

この再検証を行うために必要とされる試験は最小限のものです。実際、この高速メソッドを使用して約 1000 件のサンプル分析を行えば、その節約費用で検証コストを全額補填できます。

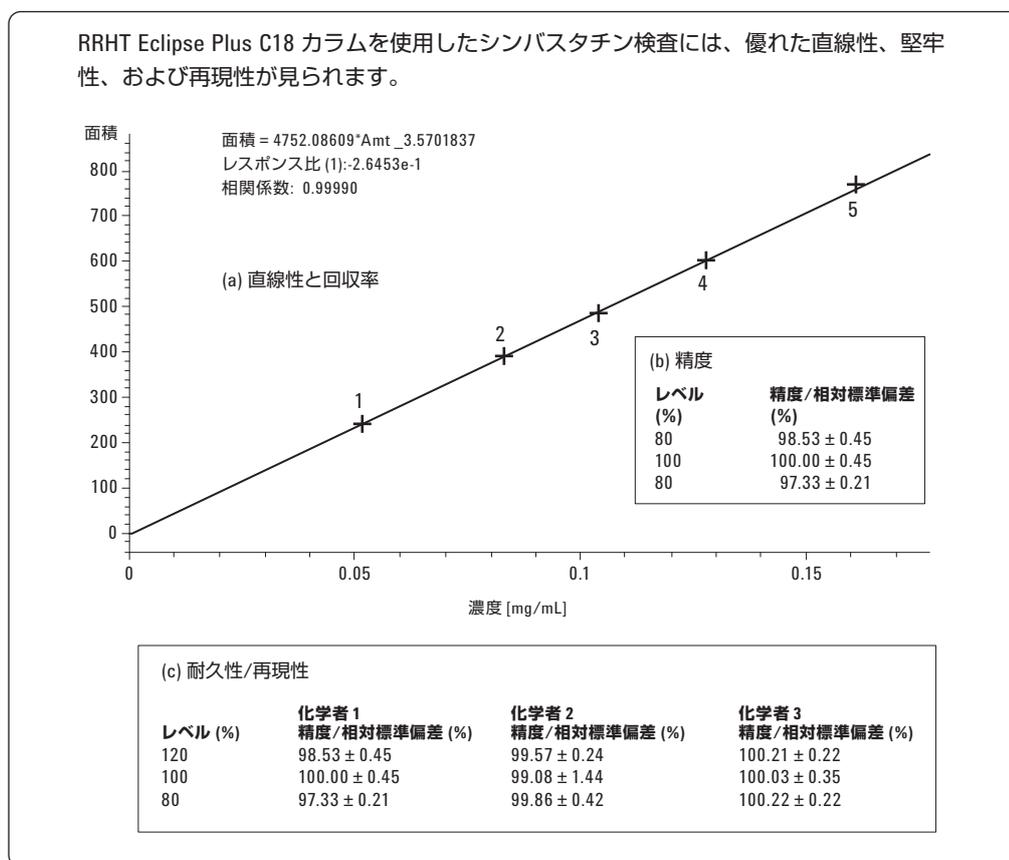


図 8. USP シンバスタチン錠剤メソッドの直線性と回収率。a) 直線性、b) 精度、c) 回収率

ほとんどのラボマネージャが懸念するのは、実物サンプルの分析に使用した場合のカラムの耐用寿命です。この新規メソッドの効果および安定性を検証するために、実物サンプルを 4.6 mm × 50 mm Eclipse Plus C18 カラムに 1100 回注入します。参考資料 1 に示されている通り、40 mg のシンバスタチン錠剤 (Teva Pharmaceuticals 社製) を 10 錠水に溶かし、希釈液で希釈します。この溶液を複数のアリコートに分け、USP の手順に従って 2 本の遠心管で円心分離します。シンバスタチンの濃度が 0.1 mg/mL になるまで各溶液の上澄み液を希釈し、オートサンプル用バイアルに移します。4 リットルのリン酸緩衝液と 4 リットルのアセトニトリルを Agilent 1200 シリーズ SL システムの各溶媒ポトルに入れました。図 9 から分かる通り、このメ

ソッドで注入を 1100 回実行しても、カラム効率の低下や圧力の上昇は見られません。このメソッドで生じる圧力は 400 bar を超えないため、このメソッドは、ほとんどすべての最新 HPLC システムで使用できます。注入の実行回数は、4 リットルというアセトニトリルの量に制約されたものです。この分析を 250 mm、5- μ m カラムで行っていたとすれば、20 リットルのアセトニトリルが必要になっていたという計算になります。さらに、1000 回の注入の分析には約 33 時間の時間がかかりました。この分析を 250 mm カラムで USP メソッドの指定通りに実行したとすると、一連のテストが完了するまでには 165 時間、つまり 6.85 日の時間がかかることになります。

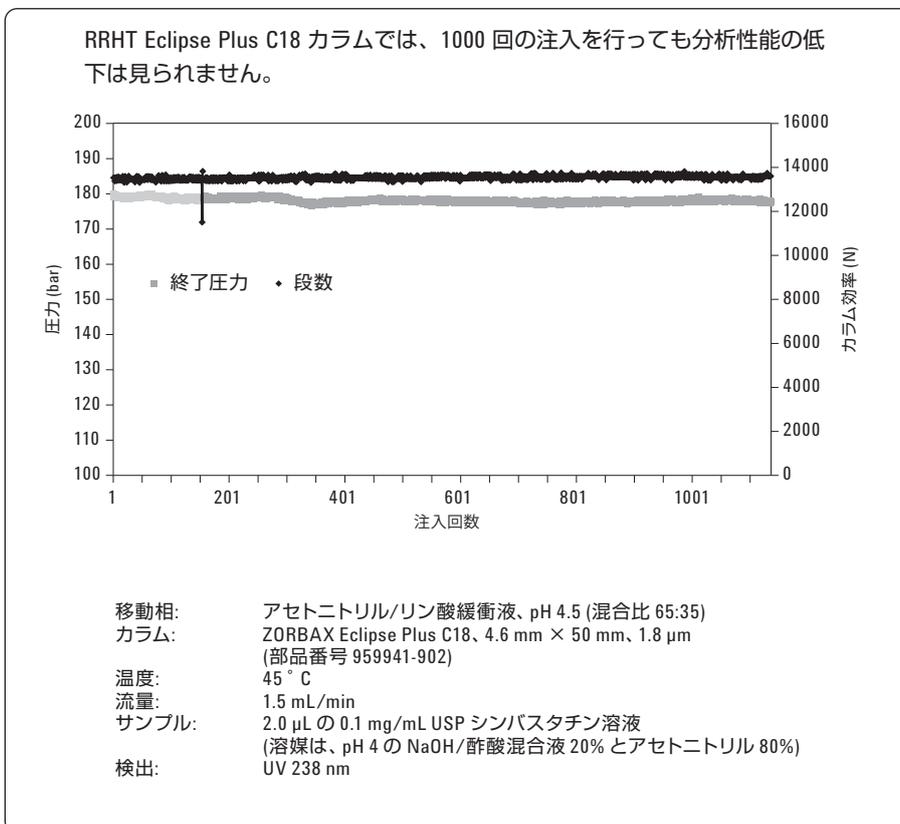


図 9. USP シンバスタチン錠剤メソッドで使用されるカラムの寿命調査 (1100 回の注入を行ってもカラム効率の低下や圧力の上昇は見られません)

結論

現行の FDA および USP 勧告で認められているカラム径の調整は ± 25 パーセントの範囲内ですが、USP の改定案では、線速度が一定であれば、カラムの内径 (ID) を必要なだけ調整できるようになります [2]。この改定案は、USP 30 第二補足改正の PF34 ナンバー 5 に記載され、2009 年の年末近くに最終合意案として採択されるものと見られます。それ以降に最終合意されたメソッドには新しいガイドラインが適用されることとなります [4]。

さらに、上記の改定案には、粒子サイズ調整の許容範囲の変更も盛り込まれています。現在、メソッド調整では、粒子サイズの縮小が最大 50 パーセントまで認められています。つまり、粒子サイズを $5\ \mu\text{m}$ から $3.5\ \mu\text{m}$ に、もしくは $3.5\ \mu\text{m}$ から $1.8\ \mu\text{m}$ に変更できるようになっています。 $5\ \mu\text{m}$ から $1.8\ \mu\text{m}$ への粒子サイズの変更は許容限度を超えた変更であるため、こうした変更を行った場合にはメソッドの再検証が必要になります。2009 年 12 月以降に最終合意される今後のメソッドについては、(カラムの性能メトリックスを維持している限り) $3.5\ \mu\text{m}$ の粒子サイズを拡大または縮小することができ、そうした変更を加えても推奨ガイドラインを守りつづけることができます [4]。

本アプリケーションノートで取り上げた Agilent 1200 SL システムは、シンバスタチンの USP 錠剤メソッドから、 $4.6\ \text{mm} \times 100\ \text{mm}$ 、 $3.5\text{-}\mu\text{m}$ カラムまたは $4.6\ \text{mm} \times 50\ \text{mm}$ 、 $1.8\text{-}\mu\text{m}$ カラムを使用した調整メソッドに簡単に移行しました。すべてのケースにおいて、カラム効率要件を 100 % 以上上回る効率が達成されました。注入量は、カラムの容量に従ってスケールアップしました。Eclipse Plus C18 RRHT カラムを使用すると、400 bar 未満のシステム圧力で時間および溶媒使用量を 80 % 削減できました。最後に、このカラムが効率の低下や圧力の上昇を伴わずに 1000 回を超える注入の分析に耐えられたという事実は、 $4.6\ \text{mm} \times 50\ \text{mm}$ 、 $1.8\text{-}\mu\text{m}$ の Eclipse Plus C18 カラムがシンバスタチンの分析に優れたカラムであることを証明するものです。

参考資料

1. <http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=163> American Heart Association (cholesterol lowering drugs).
2. USP Simvastatin Tablet Method. "United States Pharmacopeia 31 NF 26" Rockville, MD. 2008.
3. USP Method Validation Guidance. "United States Pharmacopeia XXX Supplement 2: System Suitability Testing, Rockville, MD. 2007, Chapter <621>
4. USP 30 Second Supplement Revisions, PF34 (5), in process and expected to be final Dec 2009.

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

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。

著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Published in Japan
June 17, 2009
5990-3883JAJP



Agilent Technologies