Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

クラリスロマイシン錠のHPLCからUPLCへのJP分析法移管

アプリケーションの利点

- UPLC® システムによる、注入回数3000回以上のルーチン製剤分析の実現
- 分析スループットの向上と使用溶媒量の削減
- 分析効率の向上

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC® システム

Alliance® HPLCシステム

ACQUITY UPLC BEH Shield RP18カラム

XBridge™ BEH Shield RP18カラム

XBridge BEH Shield RP18 ***XP***カラム

ACQUITY UPLCカラムカリキュレーター

キーワード

分析法移管、クラリスロマイシン錠剤、
ハイスループット分析、品質管理、
分析コスト削減、ルーチン分析、製剤分析

はじめに

日本薬局方（JP）は、薬事法第41条第一項の規定に基づき医薬品の品質を適性に担保するための公的な規範書であり、多くの医薬品の分析法はJP法を基に開発されます。また、一方では最新の技術を積極的に導入することによって、分析法の質を向上すると同時に効率性の向上、コストの削減も望まれています。国際的には2010年FDAよりドラフトガイダンスである「CMC Post approval Manufacturing Changes Reportable in Annual Reports」（「年次報告書で報告可能なCMC承認後製造変更」）が発行され、今後の動向に注目が集まっています。

クラリスロマイシンはマクロライド系抗生物質のひとつで、一般感染症、非結核性抗酸菌症、ヘリコバクター・ピロリ感染症の治療に標準的に用いられています。1991年に市販され、現在では後発医薬品も販売されています。本アプリケーションノートでは、クラリスロマイシン Extended Release tablet（500 mg）のJP分析法について、従来のHPLCシステムでスループットの向上をもたらす粒子径2.5 µmのカラムと、更なる究極のスループットを実現するUPLCシステムで粒子径1.7 µmのカラムに移管を行った例をご紹介します。また、粒子径1.7 µmのカラムでは、品質管理ラボにおける分析法の実現性の点からルーチン使用（連続3000回以上の実サンプルの注入）検証もあわせて実施しました。

実験方法

Alliance 2695 HPLC 条件- その1

緩衝液： 0.067 mol/L
リン酸二水素カリウム水溶液

移動相： 13：7
緩衝液/アセトニトリル

分離モード：アイソクラティック

検出： UV 210 nm

カラム： XBridge BEH Shield RP18
4.6×150 mm、5 µm
(製品番号 186003009)

ニードル洗浄溶媒：アセトニトリル

カラム温度：50 ℃

流速： 0.75 mL/min

注入量： 10 µL

分析時間： 22 分

Alliance 2695 HPLC 条件 - その 2

緩衝液： 0.067 mol/L
リン酸二水素カリウム水溶液

移動相： 13：7
緩衝液/アセトニトリル

分離モード：アイソクラティック

検出： UV 210 nm

カラム： XBridge BEH Shield RP18 ***XP***
4.6×75 mm、2.5 µm
(製品番号 186003146)

ニードル洗浄溶媒：アセトニトリル

カラム温度：50 ℃

流速： 1.5 mL/min

注入量： 5 µL

分析時間： 6 分

結果および考察

サンプルは JP 記載クラリスロマイシン錠定量法に従って調製しました。[1] 市販のクラリスロマイシン錠500 mg 5錠を粉末とし、緩衝液（分析条件参照）を300 mLを加えて攪拌しました。次にアセトニトリルおよび内部標準溶液を加え、クラリスロマイシンが5 mg/mLになるように調製しました。時々振り混ぜながら10分間超音波処理した後、4000 rpmで15分間遠心分離し、その上清を孔径0.2 µmのメンブランフィルターでろ過しました。ろ液を移動相で10倍に希釈し試料溶液としました。サンプル溶液中のクラリスロマイシン濃度は0.5 mg/mL、内部標準物質（パラオキシ安息香酸ブチル）は0.005 mg/mLです。スタンダードも同様に JP 法に従って調製しました。クロライスロマイシン錠定量法では、内径4.6 mm、長さ15 cm、粒子径5 µmのオクタデシルシリル化シリカゲルカラムが指定されています。そこでHPLC粒子径からUPLC粒子径まで幅広くラインアップし、システムおよびカラム間でのシームレスな分析法移管が可能なXBridge BEH Shield RP18カラムを選択しました。

まず、JP法を用いてAlliance HPLCシステムでクラリスロマイシンのスタンダードおよびクラリスロマイシン錠サンプルを6回連続注入しました。クロマトグラムを図1に、システム適合性結果を表1に示します。JP法記載の定量法システム適合性に両サンプルとも適合しました。

次にスループットの向上と使用溶媒/廃棄溶媒の削減を目的として、ACQUITY UPLCカラムカリキュレーターを用いて粒子径5 µmのカラムから2.5 µmおよび1.7 µmのカラムに分析法を移管しました。[2] このカリキュレーターは、カラムの粒子径、カラム長さと内径を基に分析条件が自動で算出されます（図2）。その結果を用い、Alliance HPLCシステム、XBridge BEH Shield RP18 ***XP*** 2.1×75 mmカラムとACQUITY UPLC H-Classシステム、ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 2.1×50 mm（1.7 µm）カラムを用いてクラリスロマイシンスタンダードとサンプルを同様に分析し、両カラムにおいて保持時間以外のシステム適合性に適合していることを確認しました（表1）。各クロマトグラムを図1に示します。 XBridge BEH Shield RP18 2.1×75 mm 2.5 µm ***XP*** カラムを用いることにより、従来のHPLCシステムを用いた、分析のハイスループット化と効率化を実現することが可能です。更に、ACQUITY UPLC システムと粒子径1.7 µmの専用カラムを用いた場合には、更なる分析のハイスループット化と効率化が実現します。粒子径を5 µmより小さい粒子径に変更した結果、システム性能と再現性を維持したまま、2.5 µmのカラムでは73%の分析時間短縮と45%の溶媒使用量の削減を、1.7 µmのカラムでは88%の分析時間短縮と93%の溶媒使用量の削減を実現しました。

クラリスロマイシンスタンダード

		HPLC		UPLC
JP要件		5 µm	***XP***（2.5 µm）	UPLC（1.7 µm）
保持時間（分）	約8分	8.41	2.29	1.12
分離度	≧3	21.8	18.1	14.8
相対標準偏差（面積）	≦2.0%	0.53	0.78	0.76

表1　HPLC および UPLC のシステム適合性結果（スタンダードの6回繰り返し測定）

ACQUITY UPLC H-Class 条件-その1

緩衝液： 0.067 mol/L
リン酸二水素カリウム水溶液

移動相： 13：7
緩衝液/アセトニトリル

分離モード：アイソクラティック

検出： UV 210 nm

カラム： XBridge BEH Shield RP18
2.1 ×50 mm、1.7 µm
(製品番号 186002853)

ニードル洗浄溶媒：アセトニトリル

カラム温度：50 ℃

流速： 0.46 mL/min

注入量： 0.7 µL

分析時間： 2.5 分

ACQUITY UPLC H-Class 条件 - その 2
ルーチン分析検証時

緩衝液： 0.067 mol/L
リン酸二水素カリウム水溶液

移動相： 13：7
緩衝液/アセトニトリル

分離モード：アイソクラティック

検出： UV 210 nm

カラム： ACQUITY UPLC BEH Shield
2.1×50 mm、1.7 µm
(製品番号186002853)

ニードル洗浄溶媒：アセトニトリル

カラム温度：50 ℃

流速： 0.92 mL/min

注入量： 0.7 µL

分析時間： 1.4 分

データ管理

Empower® 3

JP システム適合性要件

システムの性能：
クラリスロマイシン、内部標準物質の順に溶出
分離度3以上

システムの再現性：
内部標準物質のピーク面積に対するクラリスロマイシンのピーク面積の比の相対標準偏差が2.0%以下

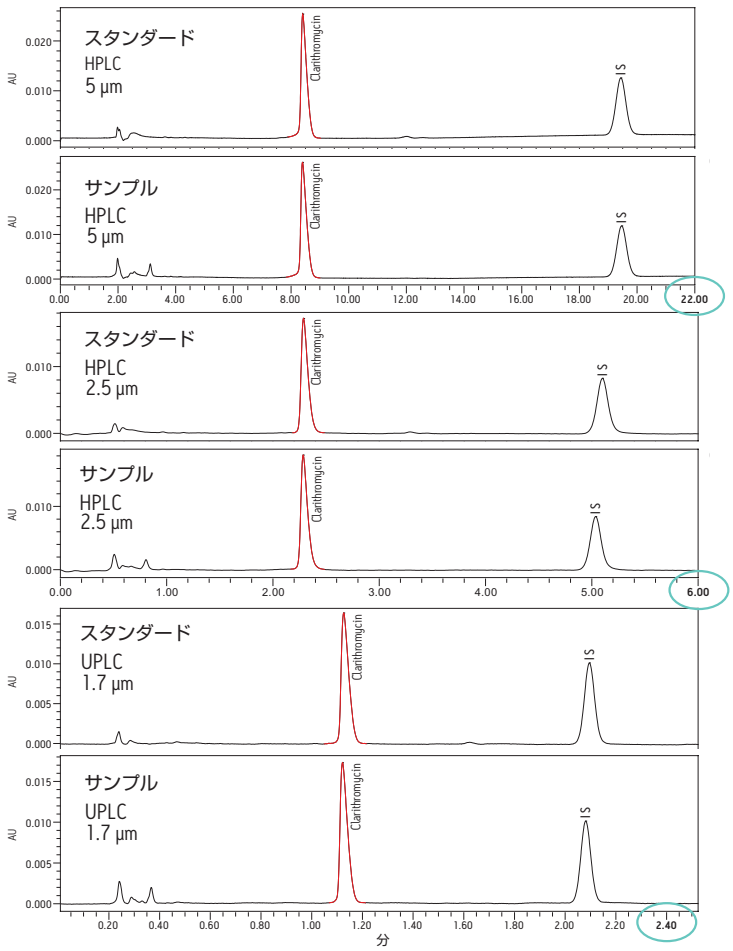

図1　クラリスロマイシンスタンダードおよびサンプルのクロマトグラム

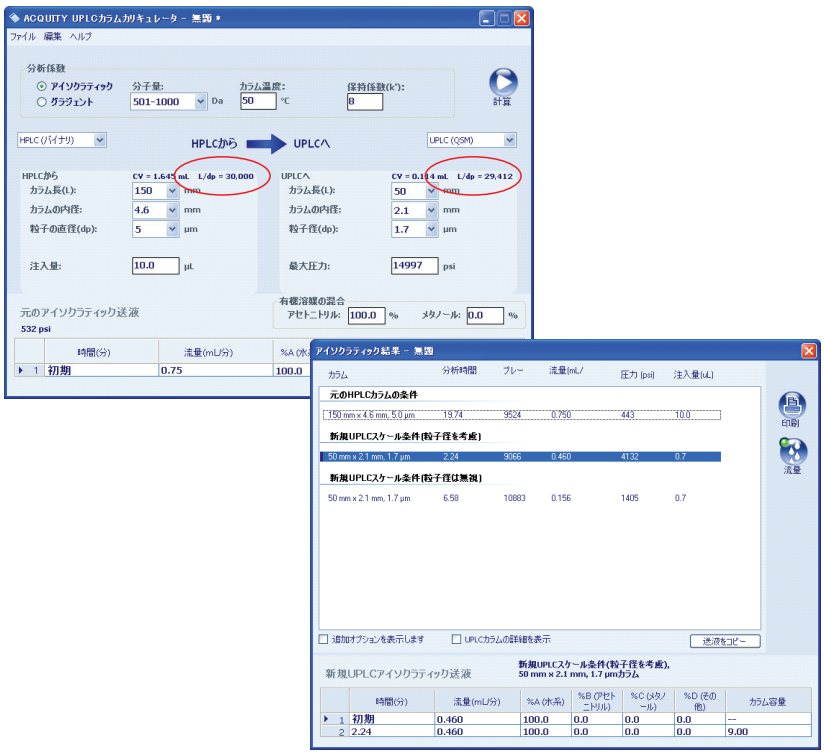

図2　ACQUITY UPLCカラムカリキュレーターを用いたHPLCからUPLCへの分析法移管

ルーチン使用検証

品質管理ラボで分析法を適用するためには、分離能、分析効率だけではなくカラムの耐久性、装置の連続稼動も考慮に入れ検討する必要があります。そこで、UPLCシステムとUPLCカラムを用いた分析法の頑健性を確認するため、ルーチン使用検証を実施しました。今回のルーチン試験ではUPLCカラムの特性を生かして、システム圧を考慮に入れながらカラムカリキュレーターから算出された分析条件と同様の分離能を維持し、更にハイスループット分析に対応できるように流速を調整しました（ACQUITY UPLC H-Class条件 - その2参照）。その結果、分析時間は1.4分と更に短縮され従来のHPLC分析と比較して94%の分析時間短縮と、92%の溶媒使用量の削減を実現しました。 ルーチン分析検証時は、ブランク（移動相溶媒）1回 - スタンダード3回 - サンプル20回注入を1つのサンプルセットとしました。このサンプルセットを繰り返し分析し、3000回注入を実施しました。またシステム適合性を確認するためルーチン分析の間に定期的にスタンダードの6回注入を実施し、あわせてシステム圧のモニターも実施しました。その結果3000回注入後でも保持時間以外のJPのシステム適合性要件に適合しており（表2）、システム圧も若干の上昇は見られましたが分析を通して安定していました（図3）。

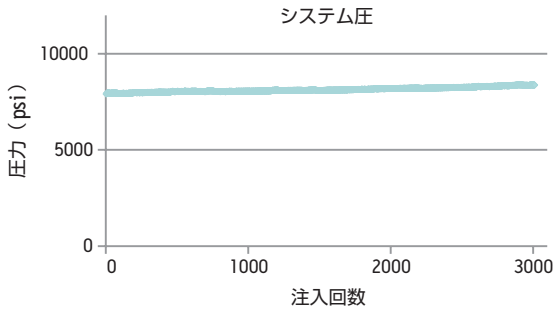

図3　ルーチン分析時のシステム圧モニター

		ルーチン使用検証	
JP要件		注入開始	3000回注入時
保持時間（分）	約8分	0.56	0.55
分離度	≧3	15.5	15.3
相対標準偏差（面積）	≦2.0%	0.70	0.52

表2　クラリスロマイシンルーチン分析検証時のシステム適合性試験結果（スタンダード6回繰り返し測定）

結論

ACQUITY UPLCカラムカリキュレーターを用い、クラリスロマイシン錠のJP定量法を粒子径5 μmの分析法から、2.5 μm、1.7 μmの分析法へと問題なく移管することができました。 2.5 μmカラムでは73%の分析時間短縮と45%の溶媒使用量の削減を実現し、従来のHPLCシステムを有効活用したシステムの効率化と、1分析当たりのコストの削減が可能です。また新技術であるUPLCシステムと粒子径1.7 μmの専用カラムを用いることで、88%分析時間の短縮と93%使用溶媒量削減が可能であり、究極のシステム効率化とコスト削減を実現することができます。 さらに、Empower 3 を用いてシステム適合性要件およびシステム圧を経時的にモニターし、各データの管理、解析することで製剤試験の効率化とシステムの稼動状況の視覚化を図ることができます。UPLCカラムを用いたルーチン分析では、3000回以上の注入後もJPクラリスロマイシン錠定量法に規定されている保持時間以外のシステム適合性要件に適合しており、ルーチンQC分析における分析法の頑健性も実証することができました。ウォーターズのトータルソリューションである最新技術を用いた分析システム、幅広いカラムケミストリーラインアップ、データ管理ソフトウェア、そして分析法移管ツールを活用することで、簡便且つシームレスにJP法記載の分析法をラボの状況に合わせて 2.5 μmもしくは 1.7 μmに移管し、システムの効率化、コスト削減を図ることが可能です。

参考文献

1. 第十六改正日本薬局方　クラリスロマイシン錠（平成23年3月24日　厚生労働省告示第65号）
2. Jones M.D., Alden P., Fountain K.J., Aubin A. Implementation of Methods Translation between Liquid Chromatography Instrumentation, Waters Application Note [2010], Part Number 720003721EN.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社　www.waters.com
東京本社 〒140-0001　東京都品川区北品川1-3-12第5小池ビル　TEL 03-3471-7191　FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011　大阪市淀川区西中島5-14-10サムティ新大阪フロントビル11F　TEL 06-6304-8888　FAX 06-6300-1734
ショールーム　東京　大阪
テクニカルセンター　東京　大阪　名古屋　福岡　札幌

Waters、UPLC、ACQUITY UPLC、Alliance および Empower は Waters Corporation の登録商標です。
BEH Technology、XBridge および The Science of What's Possible は Waters Corporation の商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2013 Waters Corporation. Printed in Japan.　2013年1月 MKT12178　PDF