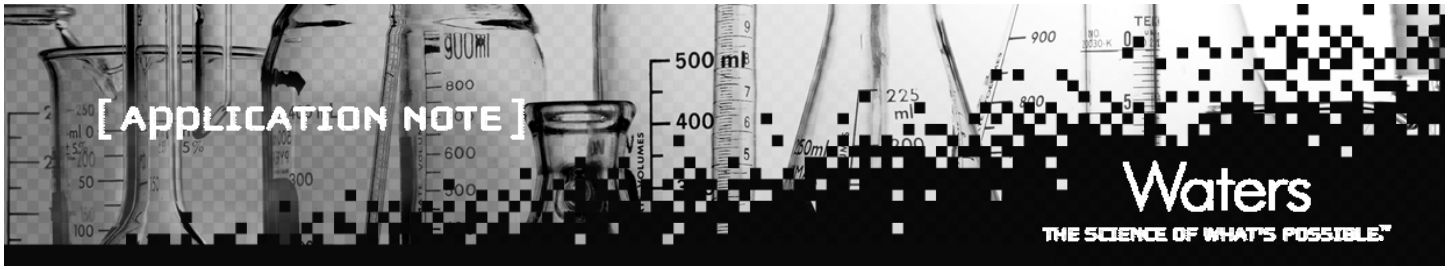


No. 720001901J

USPによるシンバスタチン分析をUPLC® 分析に移管

はじめに

シンバスタチン (図1) は*Aspergillus terreus*から合成される高脂血症治療薬です。経口摂取のあと、シンバスタチン (不活性ラクトン) は b-ヒドロキシ酸体に加水分解されます。これは 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素 A (HMG-CoA) 還元酵素の抑制剤です。この酵素は、 HMG-CoA からメバロン酸塩への変換作用の触媒効果をもち、コレステロールの生合成に対する初期の速度抑制ステップになります。

シンバスタチンは通常、経口薬として処方されます。錠剤は、通常活性成分としてシンバスタチンを 5 mg、10 mg、20 mg、40 mg、80 mg 、また賦形剤としてセルロース、ヒドロキシプロピル・セルロース、ヒドロキシプロピル・メチルセルロース、酸化鉄、乳糖、ステアリン酸マグネシウム、でんぷん、タルク、二酸化チタン等、防腐剤としてブチル化ヒドロキシアニソール等を含有します。

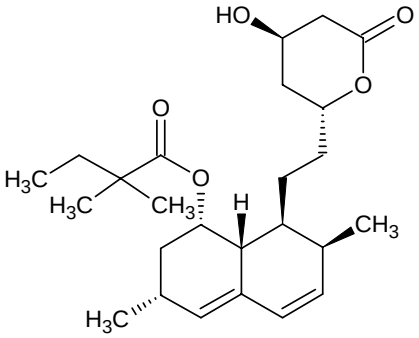


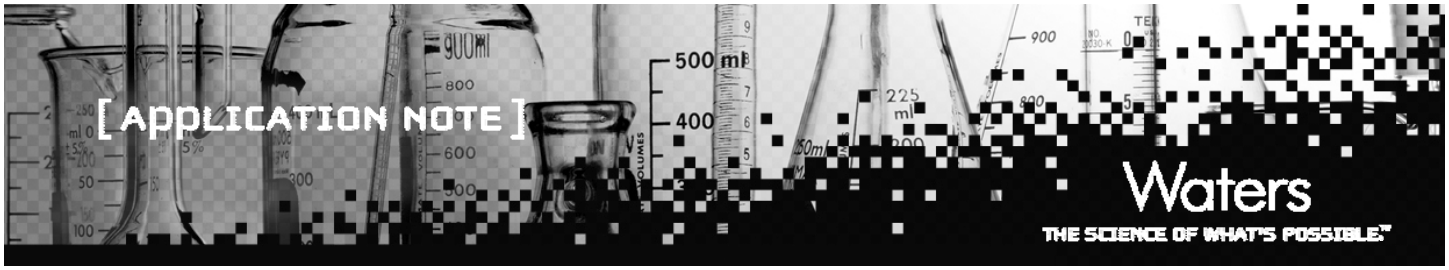
図1. シンバスタチンの化学構造

シンバスタチンの含量均一性試験は、UV検出器を装備した高性能液体クロマトグラフィ (HPLC) を使って行われます。分析時間が短縮化されればされるほど、製品の発売が早まり、収益を上げることができるのです。

シンバスタチン錠剤に関する、現在の USP 30–NF 25 モノグラフでは、検出波長238-nm、カテゴリー L1の4.6-mm × 25-cm カラムで、カラム温度45 ºC 、毎分 1.5 mL の流量で、液体クロマトグラフィによる分析が行われます。分析のパフォーマンスとしては 3.0 以上の保持能 k´ が要求されます。カラム効率は理論段数として4,500 以上、テーリング係数は 2.0 以下、繰り返し注入の再現性(相対標準偏差)は 2.0% 以下でなければなりません。現在の HPLC-ベースの定量法では、12 分の分析時間がかかり、活性成分のシンバスタチンの保持時間は 9.28 分です。

UltraPerformance LC®は 2 ミクロン以下の多孔性粒子を利用する、確立された液体クロマトグラフィ理論に基づいた新たな分類の分離サイエンスです。これらの粒子は高い線速度での分析を可能とし、高感度と高分離能、高速分離を実現します。したがって、UPLC®テクノロジーは、理論段数、分離能、分析対象物の保持時間といった定量で求められる条件を満たしつつ、分析時間を劇的に減少させることが可能です。このアプリケーションノートではシンバスタチンの HPLC 分析の UPLC® 分析への移管方法を示します。そして、UPLC® 分析の性能および品質を USP 分析と比較します。

Waters ACQUITY UPLC® システム



実験

USP の条件でシンバスタチンの標準溶液を用意し、その後クロマトグラフィ分析用に、100 µg/mL へと希釈致しました。

HPLC

LC システム:	**ACQUITY UPLC® システム**
カラム:	**XBridge™ C18**
	4.6 x 250 mm、5 µm
移動相:	**65% アセトニトリル/35% リン酸バッファ、**
	pH 4.5
流量:	**1.5 mL/min**
注入量:	**10 µL**
カラム温度:	**45 °C**
検出器:	**ACQUITY UPLC® PDA @ 238 nm**

UPLC®

LC システム:	**ACQUITY UPLC® システム**
カラム:	**ACQUITY UPLC® BEH C18**
	2.1 x 100 mm、1.7 µm および
	2.1 x 30 mm、1.7 µm
移動相:	**65% アセトニトリル/35% 水溶液**
	流量: 0.56 mL/min
注入量:	**0.8 µL**
カラム温度:	**45 °C**
検出器:	**ACQUITY UPLC® PDA @ 238 nm**

結果と考察

シンバスタチンの HPLC 分離を図 2 に示します。ここで分析対象物は 9.28 分の保持時間で溶出したことが分かります。HPLC 分析では k’ 値が 5.5、4σ の理論段数が 12,112、テーリング係数が 0.94 となりました。

HPLC の分析条件は、ACQUITY UPLC® のコンソールカリキュレータを使用し、UPLC® の分析条件へと移管致しました。ユーザーは、カリキュレータにカラム長さ、移動相組成、流量を含む現在の HPLC の分析条件を入力することができます。カリキュレータ により、1.)「Equal Efficiency」、2.)「Maximum Efficiency」、3.)「Shortest Analysis Time」に対して、それぞれ条件を得ることができます。シンバスタチンの HPLC 条件が入力された結果を図 3 に示します。

カリキュレータ によって計算された、3 つの UPLC® 条件に対応する 3 つの結果が示されています。カリキュレータは流量の計算には、カラム径および粒子サイズを考慮し、HPLC 条件を UPLC® 条件へと変換します。条件検討の際には、カラム geometryを考慮し、流量を $2.1^2/4.6^2$の率で調整し、粒子サイズの減少を考慮し、5/1.7 の率を掛けます。

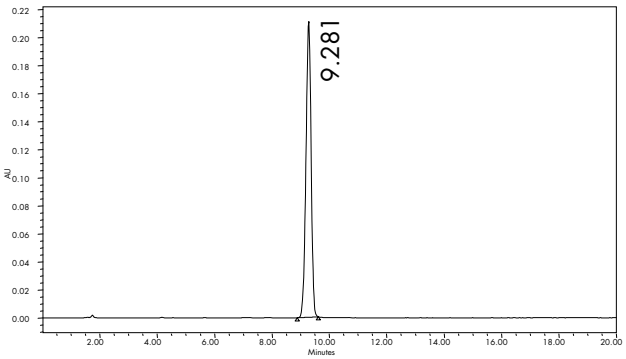


図2. シンバスタチンの HPLC 分離

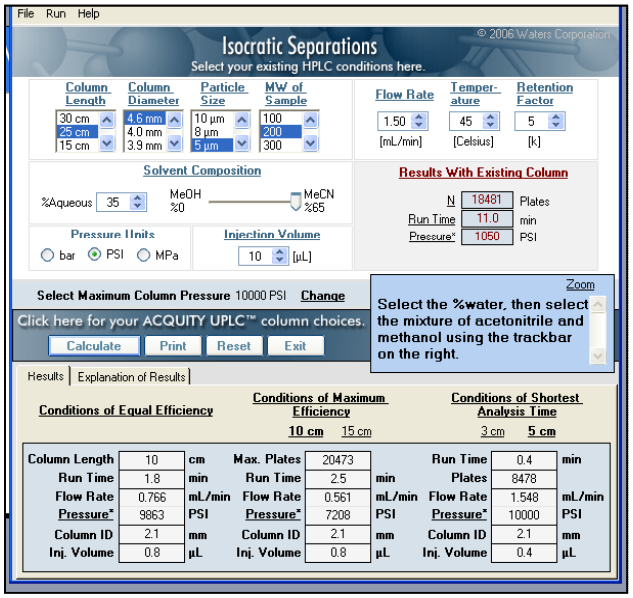
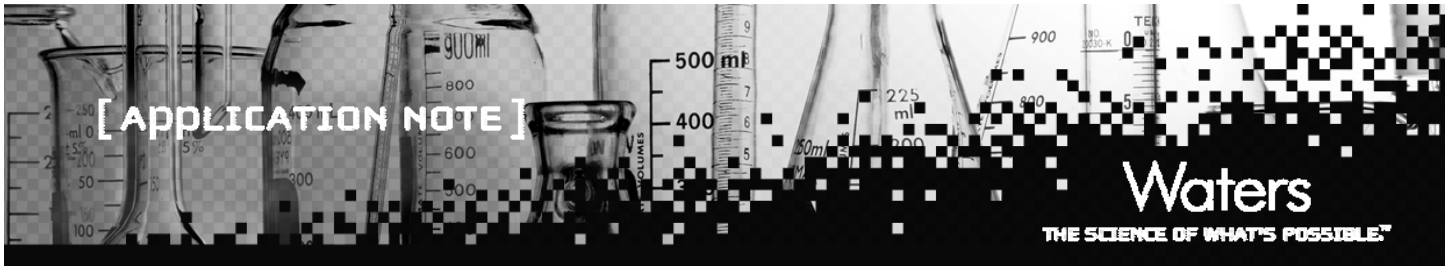


図 3. ACQUITY UPLC® コンソールカリキュレータ



UPLC® 分析

注入量は、カラム全体の容量を考慮し調整します。
同等の効率を維持する場合の（UPLC®への分析法）移管では、2.1 x 100 mm、1.7 µm C_{18}のカラムを流量 766 µL/min 及び注入量 0.8 µL で使用することが推奨されています。推奨の注入量は非常に低いので、2 µL のサンプルループをオートサンプラーに装備致しました。これら条件を使用した結果を図 4a に示します。

結果は分析時間が 1.41 分であったことを示しています。ACQUITY UPLC® システムによる分析では、12,874 の理論段数、k´値は 4.88、USP テーリング係数は 1.10 でした。これらの値は元の HPLC の理論段数 12,112、k’ 値として 5.5、テーリング係数 0.94 に相当するものでした。

カラム効率が最大の条件では流量が 560 µL/min、分析時間は 1.92 分となりました。これらの条件を使って得られたデータを図 4b に示します。ここでは、ピーク保持時間はカラム効率が同等の場合より、僅かに大きくなっていることが分かります。クロマトグラフィの性能としては、理論段数は 17,685 に増加し、k’ 値は 5、テーリング係数は 1.10 でした。

最短の分析時間の条件が、2.1 x 30 mm,1.7 µm C_{18} カラム、流量 1.5 mL/min で実施されました。得られたデータを図 4c に示します。これらの条件では、分析時間は0.23 分という短いものでしたが、理論段数は、USP の基準を下回りました。

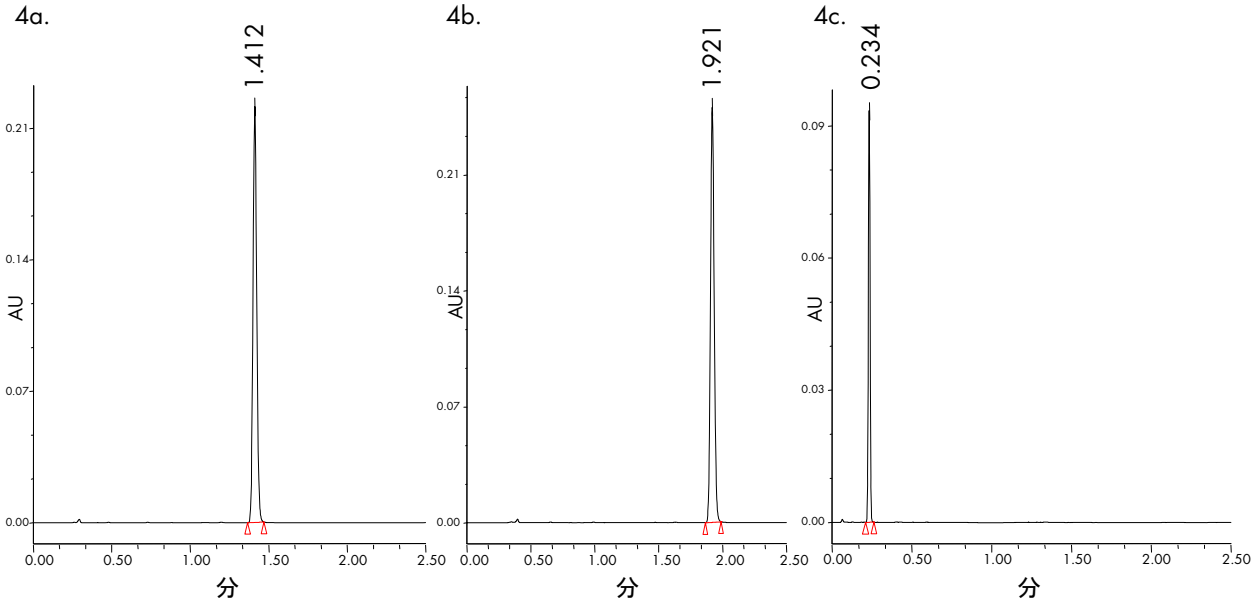


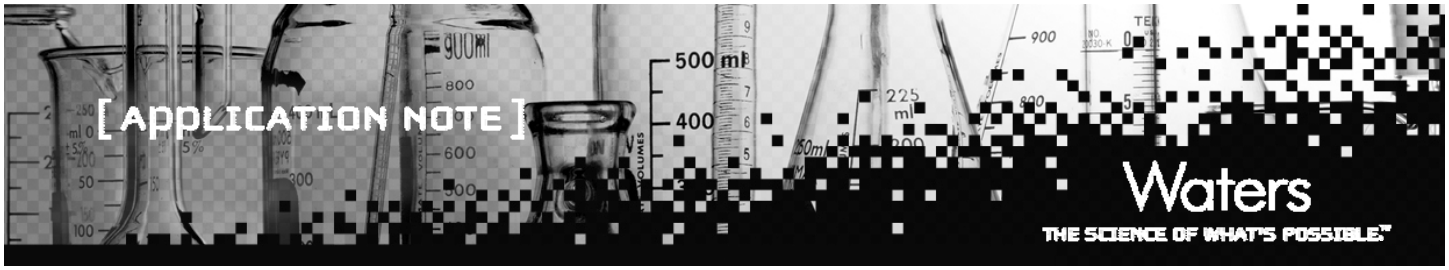
図4. シンバスタチンの UPLC® クロマトグラム。使用条件は ACQUITY UPLC® コンソールカリキュレータが推奨する、4a.) カラム効率が同等の場合、4b.) カラム効率を最大にした場合、4c.) 分析時間が最短の場合

L/dp 分析法移管

分析法移管は L/dp を一定とし、初期条件を 250 mm カラムおよび 5 µm 粒子、L/dp 値を 50 (250/5) として達成しました。2.1 x 100 mm, 1.7 µm C_{18} カラムに移管する際、L/dp 値は 59 に増加され、より効率的なクロマトグラフィシステムが実現されました。しかし、2.1 x 30 mm、1.7 µm C_{18} カラムが使用されたときは、L/dp 値は 29 に減少し、理論段数が USPの基準に到達しない原因となりました。

定量時の性能

同等の効率の条件を用いて、UPLC® 分析を評価致しました。最大のスループットを実現しながら、基準を満たしたことがその理由です。コンソールカリキュレータによって示された条件を使って、分析の再現性を評価致しました。その結果を表 1 に示します。ここで、シンバスタチン標準溶液（ 0.8 µL ）の 6 回の 繰り返し注入による%RSD は 0.883 でした。その結果、この手法は USP の基準を十分満たすことが確認されました。



Peak Name: Simvastatin

	Injection	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	1	Simvastatin	1.374	388681	100.00	234823
2	2	Simvastatin	1.374	389533	100.00	235199
3	3	Simvastatin	1.374	383973	100.00	231690
4	4	Simvastatin	1.375	380276	100.00	229737
5	5	Simvastatin	1.375	386983	100.00	233379
6	6	Simvastatin	1.375	386800	100.00	233178
Mean			1.375	386041		
Std. Dev.			0.000	3410		
% RSD			0.03	0.883		

表 1. カラム効率が同等の場合の UPLC® シンバスタチン分析の再現性

結論

コレステロール低下剤、シンバスタチンの分析における USP HPLC-UV 分析法の ACQUITY UPLC® 分析法への移管が成功裏に行われました。最終的な分析法では分析時間が減少し、対象物の保持時間は HPLC の 9.28 分から、UPLC の 1.41 分まで短縮されました (スループットとして実に 7 倍)。2 ミクロン以下の粒子の ACQUITY UPLC への簡単な分析法移管のため、ACQUITY UPLC® コンソールカリキュレータが使われました。カリキュレータにより、3 つの UPLC 分析法オプションを得ることができました。カラム効率が同等の場合、カラム効率が最大の場合、分析時間が最短の場合に対する条件です。カラム効率が同等の場合、元の HPLC 条件に比べ、ほとんど同等のクロマトグラフィ性能での移管を実現しました。同等および最大の UPLC 条件では、USP 基準の k’ 値とテーリング係数が合致したか、または基準を超えました。同等の効率の場合、分析の再現性が確認され、6 回の繰り返し注入によって 1% 未満の RSD があることが分かりました。最後にこの分析は ACQUITY UPLC® システムにて最短の分析時間条件に移管され、分析時間は 0.3 分、試料の保持時間は 0.23 分となり、スループットの増加は 40 倍に上りました。

ここに HPLC から UPLC® 分析法への移管が容易であること、並びに時間、リソース、売り上げに意識が高いどんなラボ環境でも、UPLC® が高い品質の結果を、極めて高いスループットで実現できることを実証しました。更に、豊富に取り揃えられた ACQUITY UPLC® BEH カラムにより、科学者は今必要な UPLC® 分離について柔軟に対応することができます。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™
日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp
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 カトキチ新大阪ビル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 静岡