Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

錠剤レボノルゲステルとエチニルエストラジオールのHPLCからUPLCへのUSP分析法移管

Mia Summers and Kenneth J. Fountain, Waters Corporation, 34 Maple St., Milford, MA, USA

アプリケーションの利点

- USP収載のHPLC分析法を粒子径2µm以下のカラムを用いたUPLC® 分析法に更新
- 分析時間を85%削減し、ルーチンサンプル分析のスループットを向上
- 使用溶媒量およびサンプル注入量を92%削減

ウォーターズのソリューション

- ACQUITY UPLC® H-Class と Alliance® システム
- ACQUITY UPLC BEH C_8 と XBridge™ C_8 カラム
- Empower® 2 CDS ソフトウェア
- 分析法移管キット

キーワード

分析法移管、USP分析法、HPLC、UPLC、
レボノルゲステル、エチニルエストラジオール、
バースコントロール、
ACQUITY UPLCカラムカリキュレーター、
品質管理

はじめに

多くの後発医薬品のクロマトグラフィー分析はUSPに収載された分析法を基に実施されています。これらの分析法は、頻繁には更新されず、分析時間の短縮や分析の生産性を向上させる粒子径2µm以下のパーティクル技術のメリットを活用することができません。更に、薬剤のルーチン分析は製剤中の賦形剤や添加剤が幅広い化学的特性を持つため、カラムを頻繁に交換する必要が生じ、コストがかさみます。USP収載のHPLC分析法ではサンプルスループットを向上させるために再平衡化の必要がないアイソクラティック条件が数多く採用されています。しかし、サンプル中にカラムから十分に溶出しない成分を含有していた場合、カラムベッドに蓄積することによる圧力の上昇やカラム寿命の低下が懸念されます。

本アプリケーションノートでは、まず、USPに収載されているHPLC分析法で2種の異なるL7カラムを用い、レボノルゲステルとエチニルエストラジオールを分析し、結果の比較を行いました。次に、同じ固定相を採用したUPLCカラムを用いて、UPLCシステムに分析法移管を行いました。UPLCシステムと粒子径2µm以下のカラムを使用することで、USPモノグラフで規定されているシステム適合性要件に適合した迅速分析が可能となります。最後に、一般的な品質管理ラボでレボノルゲステル - エチニルエストラジオール錠剤を繰り返し分析する際に見られる圧力上昇の回避方法を御紹介します。

実験方法

Alliance® 2695 HPLC 条件

移動相： 7：3：9　アセトニトリル/メタノール/水
分析モード： アイソクラティック
検出: UV 215 nm
USPカラム： Zorbax® C_8カラム、4.6×150 mm、5 µm
(USP カテゴリー：L7)
XBridge C_8カラム、4.6×150 mm、5 µm
(USP カテゴリー：L7)
製品番号　186003017
ニードル洗浄溶媒： アセトニトリル
サンプルパージ溶媒： アセトニトリル
シール洗浄溶媒： 50：50　アセトニトリル/水
流速： 1 mL/min
注入量： 50 µL

ACQUITY UPLC H-Class 条件

移動相： 7：3：9　アセトニトリル/メタノール/水
分析モード： アイソクラティック
検出: UV 215 nm
カラム： ACQUITY UPLC BEH C_8カラム、
2.1×50 mm、1.7 µm
(USP カテゴリー： L7)
製品番号　186002877
ニードル洗浄溶媒： アセトニトリル
サンプルパージ溶媒： アセトニトリル
シール洗浄溶媒： 50：50　アセトニトリル/水
流速： 0.61 mL/min
注入量： 3.5 µL

データ管理

Empower 2 CDS

USPシステム適合性要件

USP分離度： 2.5以上
ピーク面積RSD： 2.0%以下

サンプル調製

スタンダード：
移動相中でレボノルゲステル 15 µg/mL、エチニルエストラジオール 3 µg/mLに希釈しました。

サンプル：
移動相で市販薬のレボノルゲステル - エチニルエストラジオール錠剤を溶解し、最終濃度をレボノルゲステル15 µg/mL、エチニルエストラジオール3 µg/mLになるように調製しました。5分間超音波で溶解後、20分間機械的に攪拌しました。その後4000rpmで10分間遠心分離し、更に上清を12000rpmで30分間遠心分離を行い、その上清をサンプルとしました。

結果と考察

サンプルはレボノルゲステル - エチニルエストラジオール錠剤のUSP収載分析法にしたがって調製しました。[1] まず始めにサンプルを4000 rpmで10分間遠心分離したところ、若干懸濁の見られる上清が得られました。次に上清を孔径 0.2 µmのPTFE製フィルターでろ過しましたが、サンプル中に含まれる超微粒子が上清に見られたため、更に12,000 rpm で30分間遠心分離を行ました。その結果、透明な上清が得られたので、これを分析サンプルとしました。

USP法では、L7カラムの使用が指定されており、推奨カラムはAgilent Zorbax C_8カラムです。分析法に従ってレボノルゲステル - エチニルエストラジオール錠剤サンプルとスタンダードをAlliance HPLCシステムとZorbax C_8カラムを用いて5回繰り返し分析を行いました。次に、Zorbax C_8カラムと類似した選択性を持ち、UPLCカラムに同じケミストリー（ACQUITY UPLC BEH C_8）を有するため分析法移管が容易なXBridge C_8カラムを用いて同様に分析しました。図1にZorbaxとXBridge C_8カラムを用いたUSP分析法のクロマトグラムを示します。両カラムは、ほぼ同様の選択性を示しますが、Zorbax C_8カラムはXBridge C_8カラムに比べ2成分共に強い保持を示しました。XBridge C_8カラムを用いることにより、若干分離度の低下が見られましたが、分析時間の大幅な短縮を図ることが可能となります。システム適合性については、両カラムとも全ての要件に適合しました（表1）。生産性向上のために後発医薬品のハイスループット分析法を検討する際、同じUSPカテゴリーに属するカラムであっても、保持能の生産性への影響について十分に考慮する必要があります。

次に、ACQUITY UPLCカラムカリキュレーターを用いてUSP法をHPLCからUPLCへ移管しました。[2] 移管の際は、同じ固定相であるXBridge C_8 HPLC カラムとACQUITY UPLC BEH C_8、1.7 µmカラムとの粒子径の違いを考慮しました。レボノルゲステル - エチニルエストラジオール錠剤サンプルとスタンダードの5回繰り返し注入を実施し、システム適合性要件である面積% RSDとレボノルゲステルとエチニルエストラジオールの分離度を確認し、UPLCとHPLCの比較を行いました。その結果を表1に示しています。UPLC に移管した分析法は、すべてのシステム適合性要件に適合していました。HPLCでは10分を要していた分析時間をUPLCでは1.5分に短縮することができ、結果として85%の分析時間の短縮と、92%の移動相およびサンプル注入量の削減となりました（図1）。

システム	USP	カラム（カテゴリー：L7）	サンプル	ピーク面積 % RSD		USP 分離度	分析時間（分）
				エチニルエストラジオール	レボノルゲステル		
HPLC	オリジナル	Zorbax C_8	スタンダード 錠剤	0.22 0.58	0.60 0.65	8.5 8.6	20
HPLC	オリジナル	XBridge C_8	スタンダード 錠剤	0.24 0.31	0.19 0.05	6.1 6.1	10
UPLC	UPLC 分析法移管	ACQUITY UPLC BEH C_8	スタンダード 錠剤	0.16 0.09	0.39 1.12	5.3 5.3	1.5

システム適合性要件

USP分離度（2ピーク間）：2.5以上

ピーク面積 RSD：2.0 %以下

表1　HPLCとUPLCのシステム適合性試験結果の比較、レボノルゲステル - エチニルエストラジオール錠剤サンプルとスタンダードの5回繰り返し分析

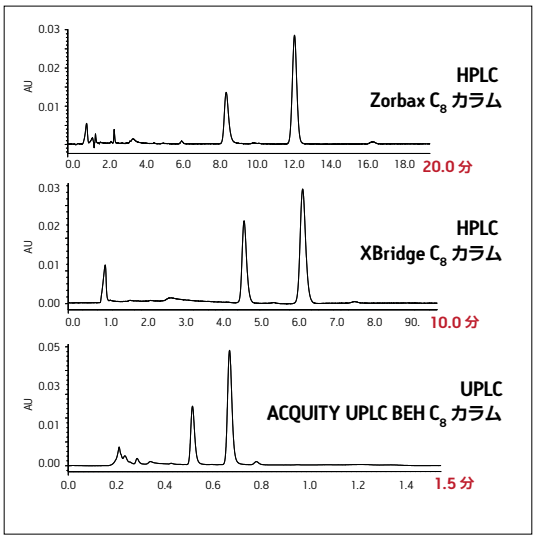

図1　レボノルゲステル-エチニルエストラジオール錠剤サンプルのHPLCとUPLCのクロマトグラム比較

ルーチン分析評価

UPLCに移管したUSP法を評価するため、ACQUITY UPLC BEH C_8、1.7 µmカラムを用いた製剤試料のハイスループット分析を行い、ルーチンで使用する際の影響について検証を行いました。

一般的な品質管理（QC）ラボでのルーチン分析を想定したレボノルゲステル - エチニルエストラジオールスタンダードと、レボノルゲステル - エチニルエストラジオール錠剤サンプルの繰り返し分析を行いました。スタンダードを5回注入した後、錠剤サンプルを20回注入するというサイクルをシステム適合性要件から外れるまで繰り返し実施しました。分析期間中、圧力、ピーク面積、保持時間、レボノルゲステルとエチニルエストラジオールの分離度についてモニターを行いました。

レボノルゲステルとエチニルエストラジオールのスタンダードの面積RSDは2.0%以下、分離度は2.5以上と、検証期間を通して要件に適合していました（図2）。システム圧は徐々に上昇し（図3a）、1000回注入後には7200 psiから9800 psiと約36%の上昇が見られました。このUPLCでのルーチン分析時に見られた圧力の上昇を、Alliance HPLCシステムとZorbax C_8カラムを用いたUSP法のHPLCを使用したルーチン分析時の圧力上昇（図3b）と比較を行いました。HPLCでは1000回の注入の後では1350 psiから2350 psiと約74%の上昇が見られました。HPLCを用いた分析法と移管後のUPLCでの分析法では、異なるカラム、システムを使用しているにも関わらず、双方共に同様の圧力上昇が見られています。このことから、圧力上昇の原因はサンプル中に含まれる疎水性のステロイドもしくは、有機溶媒組成が50%である移動相に対する製剤成分の溶解性の問題であると考えられます。ACQUITY UPLCシステムの圧力上昇がHPLCシステムに比べ顕著な様に見えますが、圧力上昇比としてはZorbaxカラムを用いたHPLCシステムの方が高くなっています。今回、検証中に圧力の上昇が見られましたが、両システム共にシステムの最大許容圧力を超えることはなく、またシステム適合性要件も満たしていました。

ACQUITY UPLCを用いたルーチン試験検証は2200回の注入で終了しましたが、表2に示すように2000回注入後もなお、適合性要件に適合しており、レボノルゲステル-エチニルエストラジオール分析においてACQUITY UPLC BEH C_8カラムの頑健性を示すことができました。

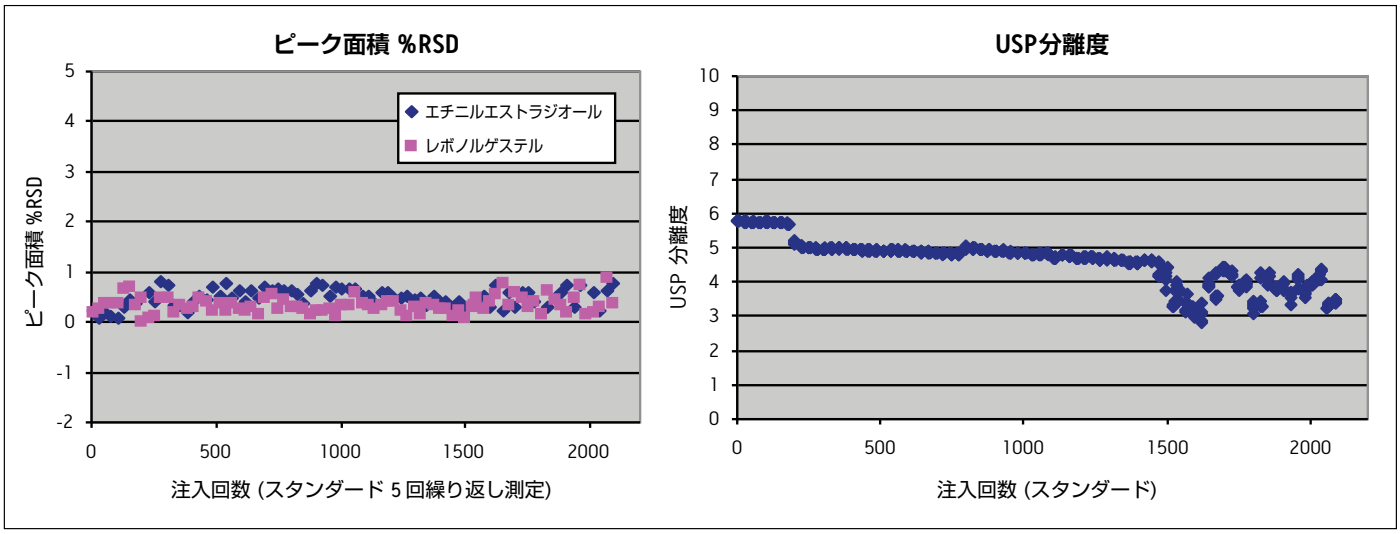

図2　移管したUPLC分析法を用いたレボノルゲステルとエチニルエストラジオールのルーチン分析時のシステム適合性試験結果

レボノルゲステルとエチニルエストラジオールスタンダード			
	% RSD ピーク面積* (2.0% 以下)		USP 分離度 (2.5 以上)
	エチニルエストラジオール	レボノルゲステル	
ルーチン分析検証:開始	0.21	0.20	5.7
ルーチン分析検証:2200 回注入後	0.57	0.22	3.3

*5回繰り返し分析

表2　移管したUPLC分析法を用いたルーチン使用評価の注入開始時と2200回注入後のUSP適合性試験結果

2000回以上の注入後でもUPLC分析法はシステム適合性結果に適合していましたが、カラムベッドへのサンプルの蓄積が要因とみられるシステム圧の上昇を回避するため分析法の改良を試みました。2回目のルーチン分析検証では、新しいACQUITY UPLC BEH C_8カラムを使用し、各分析の最後にグラジエント洗浄を実施しました。1.5分のアイソクラティック分析の後に、0.3分間でアセトニトリルの比率を100%まで上げ、1分間アセトニトリルで洗浄後、100%の移動相で再平衡化を行いました。洗浄工程を加えることで、分析時間は4分（再平衡化時間を含む）になりましたが、サンプル中の疎水性成分をカラムから溶出させカラムへの蓄積を防ぐことで、ルーチン使用における繰り返し注入の際も安定したシステム圧での運用が可能となります。(図3c)

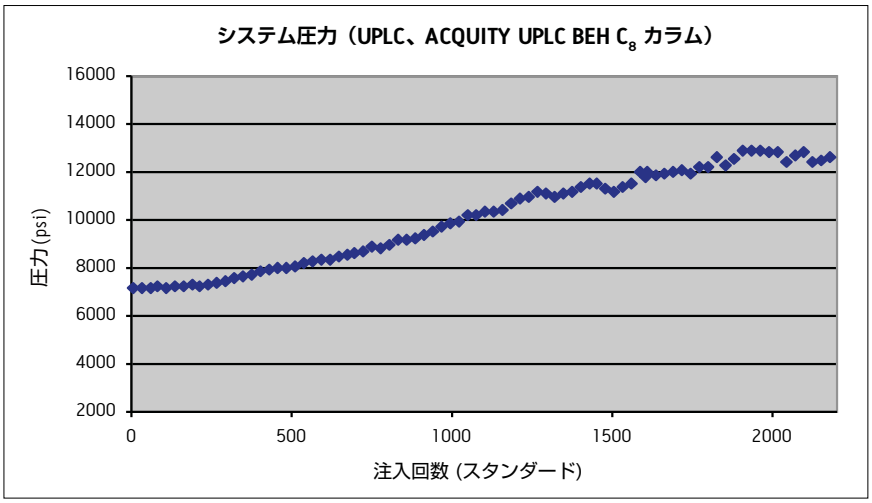

図3a　ACQUITY UPLC BEH C_8 カラム、UPLCシステムを用いたルーチン分析検証時の圧力モニター（USP法を移管）

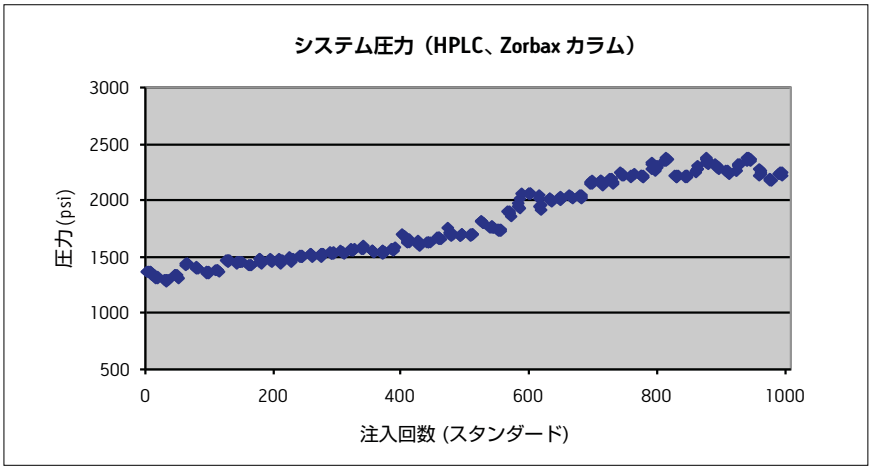

図3b　Zorbax カラム、HPLCシステムを用いたルーチン分析検証時の圧力モニター（USP法）

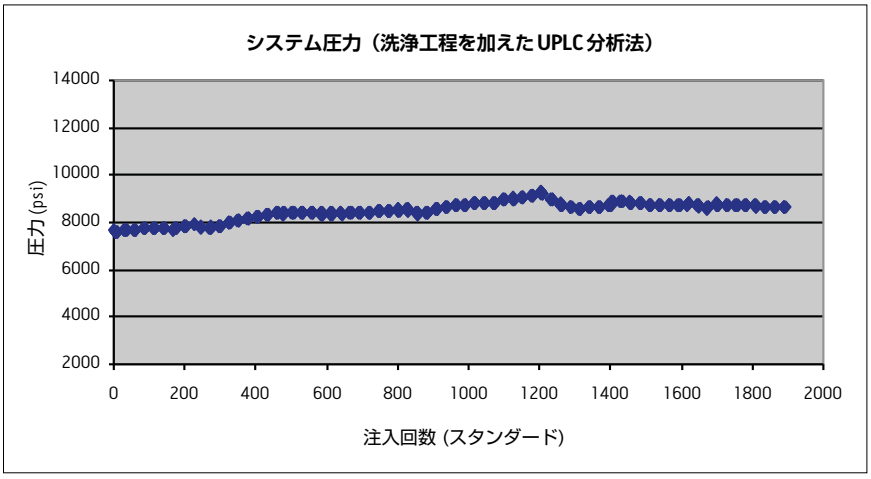

図3c　ACQUITY UPLC BEH C_8 カラム、UPLCシステムを用いたルーチン分析検証時の圧力モニター（USP法を移管し、洗浄工程を追加）

結論

汎用性の高いカラムケミストリーとACQUITY UPLCカラムカリキュレーターにより、USP に収載されているレボノルゲステルとエチニルエストラジオール錠剤サンプルのHPLC分析法をUPLC分析法へ移管することに成功しました。UPLC分析法は従来のHPLC 分析法と比べ、約85%の分析時間の短縮と、92%のサンプル注入量および溶媒量の削減を実現しました。錠剤サンプルの調製に遠心分離を追加するとことは、サンプルの精製工程として非常に有効ですが、今回はHPLCおよびUPLC両システムのルーチン分析において、システム圧の上昇を完全に抑えることはできませんでした。しかし、アイソクラティック分析にカラム洗浄工程を追加し、カラムへのサンプル蓄積を防ぐことで、ルーチン使用の際でも圧力を安定させることができました。UPLCへの分析法移管とそのルーチン使用検証では、2200回注入後もUPLC BEH C_8カラムはレボノルゲステルとエチニルエストラジオール錠剤のUSPシステム適合性要件に全て適合しており、アイソクラティックUSP法が用いられている後発医薬品のハイスループット分析において、優れたカラム性能を実証することができました。

参考文献

1. USP Monograph. *Levonorgestrel and Ethinyl Estradiol Tablets*, USP34-NF29, 3299. The United States Pharmacopeial Convention, official from August 1, 2011.
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 および Alliance は Waters Corporationの登録商標です。

XBridge、Empower および The Science of What's Possible は Waters Corporationの商標です。

Zorbax は Agilent Technologies の登録商標です。

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。

©2012 Waters Corporation. Printed in Japan.

2012年12月 720004156JA PDF