[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

eXtended Performance (XP) カラムを用いたチオコナゾール有機不純物のUSP分析法の性能およびスループット向上

Kenneth D. Berthelette, Mia Summers, and Kenneth J. Fountain
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションの利点

- 時間のかかる USP 有機不純物分析法を USP ＜621＞ガイドライン調整範囲内で迅速化、かつ溶媒を削減するために *XP* カラムを用いて最新化
- 分析時間を最大 80%削減できスループットが向上
- 溶媒使用量を最大 90%削減でき有機溶媒のコストが大幅に削減

ウォーターズソリューション

ACQUITY UPLC® H-Class システム

Alliance® HPLC システム

XSelect™ CSH™ C_{18} カラム

Empower® 3 ソフトウェア

e*X*tended *P*erformance (*XP*) 2.5 µm カラム

TruView™ LCMS マキシマムリカバリーバイアル

キーワード

USP 分析法、チオコナゾール、ACQUITY UPLC カラムカリキュレーター、Waters 逆相カラム選択性チャート、ジェネリック医薬品

はじめに

ジェネリック医薬品中の有機不純物は世界中の製薬メーカーにおいてルーチンで分析されています。旧式の装置やカラムテクノロジーによる有機不純物分析の実施は、分析法が長時間に渡って多量の溶媒を必要とするため、時間とコストがかかる作業です。一方、大幅に改善された装置やカラムテクノロジーを用いることで、有機不純物分析をずっと効率的に行うことが可能になります。e*X*tended *P*erformace (*XP*) カラムは、HPLC、UPLC どちらの装置でも使用できるように設計された粒子径 2.5 µm のカラムで、USP ＜621＞クロマトグラフィーガイドラインの調整範囲内で小さい粒子径と低拡散システムの利点を実現できるため、USP 分析法の最新化に最適です。

チオコナゾールはイミダゾール系抗真菌薬で、イースト菌感染症の治療に使用されます。本アプリケーションでは、チオコナゾールの有機不純物分析法[2]を移管しました。有機不純物分析法はサンプル中の不純物の確認と定量に用いられます。USP 分析法を HPLC システムを使用したオリジナルのカラムサイズから、HPLC および UPLC® システム両方で *XP* カラムへ移管しました。現在の USP 分析法を HPLC システムで *XP* カラムを用いた分析法に移管することで分析時間を削減しルーチン分析ラボのサンプルスループットを向上でき、UPLC システムで *XP* カラムを用いた分析法ではさらに分析時間と溶媒消費を削減でき、結果として全体のコストを削減できます。

実験方法

Alliance 2695 HPLC 条件

移動相： 440:400:280:2 アセトニトリル / メタノール / 水 / アンモニア水（調製法は参照文献 2 準拠）

分離モード： アイソクラティック

検出： UV @ 219 nm

カラム（L1）： XSelect CSH C_{18} 4.6 × 250 mm、5 µm（製品番号 186005291）
XSelect CSH C_{18} ***XP*** 4.6 × 150 mm、2.5 µm（製品番号 186006729）
XSelect CSH C_{18} ***XP*** 4.6 × 100 mm、2.5 µm（製品番号 186006111）

カラム温度： 25 ℃

ニードル洗浄溶媒：95:5 アセトニトリル / 水

サンプルパージ溶媒：95:5 水 / アセトニトリル

シール洗浄溶媒：50:50 メタノール / 水

流速： 1.0 mL/min

注入量： 25 µL（250 mm カラム）その他は使用カラムに応じてスケーリング

ACQUITY UPLC H-Class条件

移動相： 440:400:280:2 アセトニトリル / メタノール / 水 / アンモニア水（調製法は参照文献 2 準拠）

分離モード： アイソクラティック

検出： UV @ 219 nm

カラム（L1）： XSelect CSH C_{18} ***XP*** 4.6 × 150 mm、2.5 µm（製品番号 186006729）
XSelect CSH C_{18} ***XP*** 4.6 × 100 mm、2.5 µm（製品番号 186006111）
XSelect CSH C_{18} ***XP*** 2.1 × 150 mm、2.5 µm（製品番号 186006727）

サンプル詳細

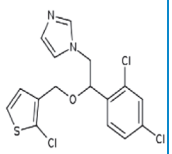
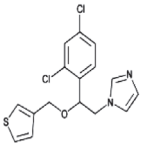
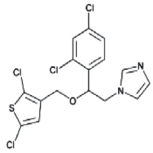
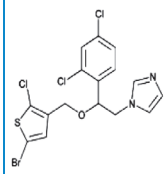
	チオコナゾール	類縁物質A	類縁物質B	類縁物質C
構造				
濃度（mg/mL）	6.6	0.2	0.2	0.2

表 1. チオコナゾールおよび類縁物質の構造および濃度

チオコナゾールサンプルは 100% メタノールに溶解して表 1 に記載した濃度に調製し、TruView マキシマムリカバリーバイアル（製品番号 186005662CV）に入れて分析に供しました。

結果および考察

広く製造されるチオコナゾールは世界中の製薬メーカーにおいてルーチンで分析されています。本アプリケーションでは、チオコナゾールおよびチオコナゾール類縁物質 A、B、C の分離を USP モノグラフ記載の USP 有機不純物分析法を用いて異なる何種類かのカラムサイズで実施しました。チオコナゾールの不純物はすぐに入手できないため、チオコナゾール類縁物質 A、B、C は低濃度不純物スタンダードとして用いました。USP 記載の有機不純物分析法は複雑な製剤サンプルの分析に用いられます。サンプル中の複数の成分を十分に分離するには、長いカラムの使用が必要なことが多くあります。粒子径が大きく（≧ 3.5 µm）長いカラムを使用すると、分析時間が長くなり多量の溶媒を消費します。例えば、チオコナゾール有機不純物のオリジナルの USP 分析法は 4.6 × 250 mm、5 µm カラムを用いた 30 分の分離で、1 分析当り 30 mL の溶媒を消費します。一方、e***X***tended ***P***erformance（***XP***）2.5 µm カラムを使用することで、適合性要件を満たしたままで分析時間を削減することが可能です。短い分析時間により、1 分析当りの溶媒消費量を削減しながらスループットの向上が可能で、結果として全体のコストを削減できます。現在の USP ＜ 621 ＞クロマトグラフィーガイドラインでは、変更可能な分析法調整の範囲としてカラム長さ ±70%、粒子径 -50%、流速 ±50% などが規定されています [1]。本アプリケーションで示す分析法移管はこのガイドラインに従っています。この分析法が異なるカラムおよびシステム間で移管された際に類縁物質 B と C が常に分離していることを示すために、本アプリケーションでは類縁物質 B と C の USP 分離度 1.5 を合否基準としています。

カラム温度：　25 ℃

ニードル洗浄溶媒：95:5 アセトニトリル / 水

サンプルパージ溶媒：95:5 水 / アセトニトリル

シール洗浄溶媒：50:50 メタノール / 水

流速：　使用カラムに応じてスケーリング

注入量：　使用カラムに応じてスケーリング

データ管理：　Empower 3 ソフトウェア

HPLCシステムで*XP*カラムを用いた有機不純物分析

チオコナゾールの有機不純物分析法にはL1 カラムの使用が規定され、LiChrosorb RP-18 がリストに記載されています [2]。Waters 逆相カラム選択性チャートを用いて、同様の選択性を示し、より最新の XSelect CSH C_{18} カラムを選択しました。XSelect CSH C_{18} カラムは HPLC および UPLC 間で粒子径、カラムサイズを移管可能です。Alliance HPLC システムと XSelect CSH C_{18}, 4.6 × 250 mm、5 µm カラムを用いて流速 1.0 mL/min でまず USP 法で分離を行い、表 2 に示すように合否基準を満たしました。この分離ではトータルの分析時間が 30 分を要し、サンプルを継続的に分析するハイスループット環境下での時間および財務両面での管理において課題となっています。オリジナルの USP 法を用いた場合、1 日 8 時間の勤務シフトでは 480 mL の溶媒消費で 16 サンプルしか分析できません。***XP***カラムを用いることで、8 時間の勤務シフトの中で 240 mL の溶媒消費量で 80 サンプルまで分析することが可能となり、大幅にスループットを向上し経費を削減できます。

XP 2.5 µm カラムを用いて USP ＜ 621 ＞ガイドラインの調整範囲内で USP 分析法を様々なシステムに渡って移管・最新化する汎用性について図 1 に示しました。***XP*** カラムは高いカラム効率になるように充てんされ UHPLC システムの高い背圧でも使用できるようにデザインされた粒子径 2.5 µm の LC カラムで、HPLC システムでも UPLC システムでもどちらでも使用できます。

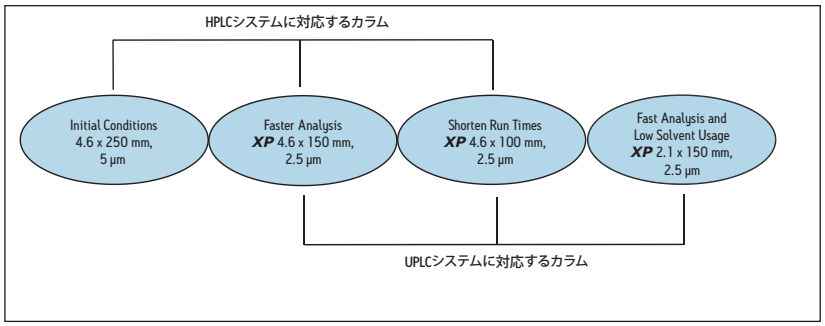


*図 1. USP ＜ 621 ＞ガイドラインの調整範囲内で HPLC および UPLC 両方のシステムに渡る **XP** 2.5 µm カラムの汎用性*

USP 分析法をまずオリジナルの 4.6 × 250 mm、5 µm カラムから ***XP*** 4.6 × 150 mm、2.5 µm カラムに移管して、小さい粒子径を用いることで短い分析時間を達成できることを実証しました。小さい粒子径を用いることで、粒子径に対するカラム長さの比（L/dp）で評価される分離効率が向上します。この場合には、***XP*** 4.6 × 150 mm カラムに移管することで L/dp が 50,000（オリジナル条件）から 60,000 に上昇しました。ACQUITY UPLC カラムカリキュレーターに従うと、このカラムの適切に移管した流速は 2.0 mL/min になります[3] が、この流速は USP ＜ 621 ＞ガイドラインの調整の範囲外です。USP ガイドラインの調整範囲内かつ HPLC システムの耐圧範囲内に適合するように流速 1.0 mL/min を用いました。オリジナルカラムでのチオコナゾールとその類縁物質との分離を ***XP*** 4.6 × 150 mm カラムの結果と比較しました（図 2A-B）。***XP*** 4.6 × 150 mm カラムでは分離度を 5% 向上しながら分析時間を 43% 削減できました（表 2）。

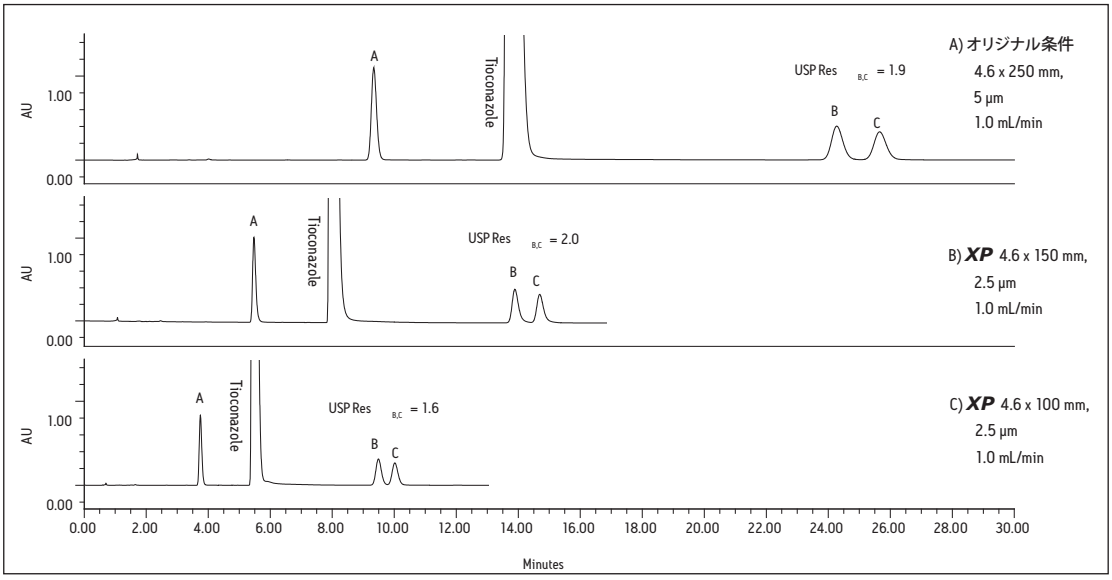


図 2. 様々なサイズの XSelect CSH C_{18} カラムを HPLC システムで用いたチオコナゾールとその類縁物質 A, B, C の分離比較。同等の分離で分析時間を低減。

次に、より短い ***XP*** 4.6 × 100 mm、2.5 µm カラムを用いて許容範囲の分離度を維持しつつより迅速な分離が行えること示しました。分離が非常に複雑な有機不純物分析法は、一般に他の分析法よりも分析時間が長いため、分析時間の低減により特に利益がもたらされます。分離効率の低い（L/dp 40,000）短いカラムへの移管は必ずしも選択肢とならない可能性があることに注意することが重要です。例えば、近接して溶出する賦形剤や不純物の場合には、オリジナルの分離と同等の分離効率が必要になるかもしれません。図 2C は ***XP*** 4.6 × 100 mm、2.5 µm カラムを用いた分離で、表 2 に示すように全ての合否基準を満たし、オリジナルの条件に比べて分析時間を 57% 削減できました。このケースでは、L/dp が 50,000（オリジナル条件）から 40,000 に低減した結果、類縁物質 B と C の分離度が 15% 低減しましたが、オリジナルの分離の複雑性によりますが、この分離度は十分な値でした。

	合否基準	4.6 x 250 mm, 5 µm [オリジナル条件]	*XP* 4.6 x 150 mm, 2.5 µm (1.0 mL/min)	*XP* 4.6 x 100 mm, 2.5 µm (1.0 mL/min)
USP分離度	BとCの分離度が1.5以上	1.9	2.0	1.6
L/dp	N/A	50,000	60,000	40,000
分析時間(分)	N/A	30	17	13

*表 2. Alliance HPLC システムで **XP** 2.5 µm カラムを含む様々なカラムサイズの XSelect CSH C_{18} 固定相を用いてチオコナゾールサンプルを 5 回繰り返し注入した適合性結果。L/dp は粒子径に対するカラム長さの比。*

UPLCシステムで*XP*カラムを用いた有機不純物分析

図 1 に概要を示したように、***XP*** カラムと ACQUITY UPLC カラムカリキュレーターを用いて分析法を Alliance HPLC システムから ACQUITY UPLC H-Class システムに移管できます。ACQUITY UPLC H-Class システムのようなより新しい装置では、耐圧性、注入間でのより迅速な平衡化、顕著なシステムボリュームおよび拡散の低減によって、より迅速で効率的な分離が得られます。HPLC システムと UPLC システムの分離性能を比較するために、図 2B に示した ***XP*** 4.6 × 150 mm, 2.5 µm カラムを用いた有機不純物分析法を ACQUITY UPLC H-Class システムでも実施しました(図 3A)。HPLC から UPLC への装置の違いだけで、ピーク B と C の分離度は 5%向上し分析時間は 12%低減しました(表 2、表 3)。UPLC の低システムボリュームおよび低拡散によりピーク形状が向上し、分離度が向上しました。

UPLC システムの利点をさらに実証するため、UPLC システムで ***XP*** 4.6 × 100 mm カラムを用いて分離を行いました(図 3B)。この分離では、ピーク B と C の分離度が HPLC システムを用いた場合の 1.6 (表 2) から UPLC システムを用いた場合は 1.8 (表 3) に向上しました。UPLC システムと ***XP*** 4.6 × 100 mm カラムを用いることで、HPLC でオリジナルの分析条件で分析した場合と同じ分離度で 57%分析時間を低減できました。

	合否基準	*XP* 4.6 x 150 mm, 2.5 µm (1.0 mL/min)	*XP* 4.6 x 100 mm, 2.5 µm (1.0 mL/min)	*XP* 2.1 x 150 mm, 2.5 µm (0.5 mL/min)
USP分離度	BとCの分離度が1.5以上	2.1	1.8	1.8
L/dp	N/A	60,000	40,000	60,000
分析時間(分)	N/A	15	13	6

*表 3. ACQUITY UPLC システムで **XP** 2.5 µm カラムを含む様々なカラムサイズの XSelect CSH C_{18} 固定相を用いてチオコナゾールサンプルを 5 回繰り返し注入した適合性結果。L/dp は粒子径に対するカラム長さの比。*

最後に、USP 分析法を ***XP*** 2.1 × 150 mm、2.5 µm カラムに移管しました。カラム内径を低減することで、同等の分離度を維持して大幅に溶媒消費量を削減しながら分析時間をさらに低減できることを示すために、このカラムを試験しました。ACQUITY UPLC カラムカリキュレーターに従うと、このカラムでの分析法に適切な流速は 0.42 mL/min です。しかしながら、この流速は USP ＜ 621 ＞ガイドラインの調整の範囲外となるため、ガイドラインを遵守する流速 0.5 mL/min にしました。得られたクロマトグラム（図 3C）は、表 3 に示すように合否基準を十分に満たしながらオリジナルの条件と比較して分析時間を 80% 削減できました。***XP*** 2.1 × 150 mm カラムを用いることでオリジナルの USP 分析法と比べて溶媒消費量を最大 90% 削減でき、結果として大幅にコストを削減できます。流速を USP ＜ 621 ＞ガイドライン調整範囲内で調整したため、ピーク B と C の分離度は 1.9 から 1.8 に下がりましたが、基準の範囲内でした。

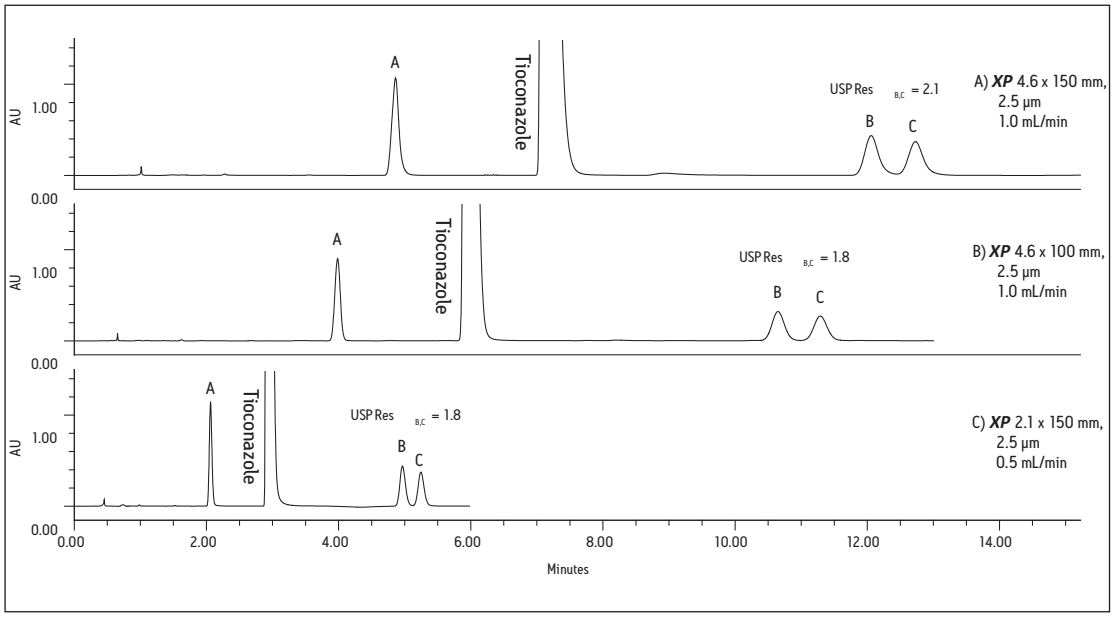


*図 3. UPLC システムで **XP** カラムを用いたチオコナゾールと類縁物質の分離比較。カラムサイズ変更により分析時間削減。*

結論

時間が長くコストのかかる有機不純物分析を頻繁に行っている場合、既存 HPLC システムで e***X***tended ***P***erformance [***XP***] 2.5 µm カラムを用いることで、オリジナルの USP 分析法に比べて大幅に分析時間を削減し、最大 57% 溶媒使用量を削減できます。***XP*** カラムと UPLC システムを組み合わせることで、分析時間を最大 80%、溶媒使用量を最大 90%削減できます。***XP*** カラムは HPLC システムと UPLC システムどちらでも使用できるため、現在の USP ＜ 621 ＞ガイドラインに準拠しながら USP 分析法を最新化できます。ルーチン分析を行うラボでは、粒子径の小さいカラムを用いた USP 分析法の最新化により大幅な時間と経費の削減が実現します。

参考文献

1. USP General Chapter ‹621›, USP35-NF30, 258. The United States Pharmacopeial Convention, official from August 1, 2012.
2. USP Monograph. Tioconazole, USP35-NF30, 4875. The United States Pharmacopeial Convention, official from August 1, 2012.
3. Jones MD, Alden P, Fountain KJ, Aubin A. Implementation of Methods Translation between Liquid Chromatography Instrumentation. Waters Application Note 720003721en. 2010 Sept.

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、ACQUITY UPLC、Alliance および Empower は Waters Corporation の登録商標です。
XSelect、CSH、Truview 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5月 720004474 JA PDF