[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

CORTECS 2.7 µm カラムを用いたZidovudineのUSP分析法移管

Kenneth D. Berthelette, Thomas Swann, and Kenneth J. Fountain
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- オリジナルの USP 収載法と比較して最大 75% 分析時間を短縮
- オリジナルの USP 収載法と比較して最大 63% 溶媒消費量を削減
- 中性化合物 QCRM を用いたシステムの性能確認による信頼性の高いデータ収集

ウォーターズのソリューション

CORTECS® C_{18} カラム

Alliance® HPLC

Empower® 3 CDS

LCMS 品質証明マキシマムリカバリーバイアル

中性化合物品質管理標準（QCRM）

キーワード

Alliance HPLC、CORTECS C_{18}、
Zidovudine、中性化合物 QCRM、
USP、収載法、システム性能確認

はじめに

医薬品製造において、USP 収載の時間のかかる分析法は、サンプル分析の大きな律速となり、生産性を制限します。さらに、これらの分析法は溶媒消費量が多く 1 分析当たりのコストが非常に高くなります。通常 5 µm など粒子径の大きなカラムで実施されるこれらの分析法を CORTECS 2.7 µm ソリッドコアパーティクルカラムに移管することで、分析時間と消費溶媒量を大幅に削減することが可能です。

Zidovudine は、HIV ならびに AIDS の治療に用いられる抗レトロウイルス薬で、USP 収載の Zidovudine の分析法では、5 µm、4.0 × 250 mm の L1 カラムを使用します [1]。本アプリケーションでは、この分析法について、オリジナルのカラムから CORTECS C_{18}、2.7 µm、4.6 × 150 mm カラムと CORTECS C_{18}、2.7 µm、4.6 × 100 mm カラムへ移管し、考えられる 2 パターンの分析法移管を実証します。この 2 つの分析法の移管は、2014 年 8 月に改訂された USP General Chapter〈621〉においても許容されるものです [2]。USP General Chapter〈621〉では、カラム長と粒子径の比率（L/dp）と理論段数（N）を基準に分析法の部分的な変更を許可しています。今回は 2 種類の CORTECS 2.7 µm カラムを使用し、それぞれの分析法移管について検証します。

今回の分析法移管の検証では、中性化合物品質管理標準（QCRM）を使った装置性能適確性評価（PQ）を実施しています。システムの性能評価のための QCRM は、システムの稼働状況をモニターし、システムの潜在的な不具合をより早い段階で発見することができます。適切に稼動しているシステムによってサンプルが分析され、収集されたデータであることを保証するためにサンプル分析の前後でこの QCRM を使用しました。

実験方法

LC条件

システム： Alliance HPLC

カラム ： 全多孔性 C_{18}、5 µm、4.6 × 250 mm;
CORTECS C_{18} 2.7 µm、4.6 × 150 mm
(P/N 186007378)
CORTECS C_{18} 2.7 µm、4.6 × 100 mm
(P/N 186007377)

移動相： 80 : 20　水 : メタノール

分離モード： アイソクラティック

流速： 1.0 mL/min (4.6 × 250 mm カラム) ;
0.9 mL/min (4.6 × 150 mm カラム) ;
1.5 mL/min (4.6 × 100 mm カラム)

カラム温度： 30℃

検出 (UV)： 265 nm

注入量： 10.0 µL (4.6 × 250 mm カラム) ;
6.0 µL (4.6 × 150 mm カラム) ;
5.3 µL (4.6 × 100 mm カラム)

バイアル： LCMS 品質証明
マキシマムリカバリーバイアル
(P/N 600000749CV)

QCRM： 中性化合物 QCRM
(P/N 186006360)

データ管理： Empower 3 CDS

サンプル調製

Zidovudine とその類縁物質 B ならびに C の標準品は、USP から購入しました。サンプルは Zidovudine 1.0 mg/mL、類縁物質 B 1.0 µg/mL、類縁物質 C 2.0 µg/mL となるようメタノールで調製し、Waters® LCMS 品質保証 マキシマムリカバリーバイアルに注入しました。

結果および考察

分析法移管時における、システムの性能評価

得られたデータの精度を保証するシステムの性能評価のために、分析法移管の一環として、サンプル分析前後で標準品を使用します。今回は、同様の実験に中性化合物 QCRM を使用しました。この中性化合物 QCRM を、得られたデータの精度とカラムを含むシステム全体が、一連の分析を通して正常に動作していることを保証するためにサンプル分析前後に使用しました。中性化合物 QCRM は、幅広い移動相とカラムケミストリーに互換性があり、全ての逆相分析に最適な 3 種類の化合物から構成されています。表 1 は、3 本のテストカラムにおいてサンプル分析の前後で注入した際のクロマトグラムを示しています。

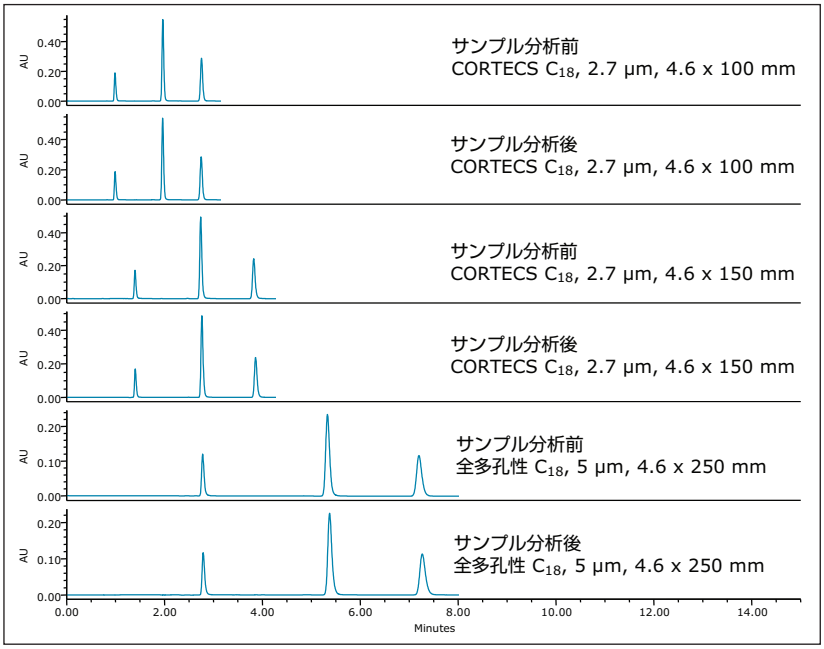

図 1. テストカラムにおいてサンプル分析の前後で中性化合物 QCRM を注入 (移動相 : アセトニトリル / 水 = 75/25)

図 1 からも分かるように、確認のために注入した中性化合物 QCRM は再現性の高い結果を示し、分析法移管の際にそれぞれのテストカラムで得られたデータが正確であるということがいえます。システム性能を確認することは、システムの問題をより早く見つけ出し、装置のダウンタイムを削減することに繋がります [3]。

カラム長と粒子径（L/dp）の比に基づくUSP収載分析法の移管

USP General Chapter〈621〉では、再バリデーションの必要無しに変更できるUSP収載分析法の調整範囲について概説しています。2014年8月に改正されたガイドラインに従って、アイソクラティック分析法に関しては、オリジナルのカラムに対してカラム長と粒子径（L/dp）の比が-25%から+50%以内であれば、カラム長や粒子径を変更できます。Zidovudineの場合、オリジナルカラムのL/dpは50,000であり、CORTECS 2.7 µm、4.6 × 150 mmカラム（L/dp = 55,555）を使用しても、この変更はガイドラインの許容範囲内です。また、CORTECSカラムはオリジナルのカラムと比較してL/dpが11%高くなります。L/dpはカラムの最大分離能力の一つの指標となります。表2は、Zidovudineとその類縁物質をオリジナルの5 µmのカラムと150 mmのCORTECS 2.7 µmカラム両方で分析した際の結果を示しています。

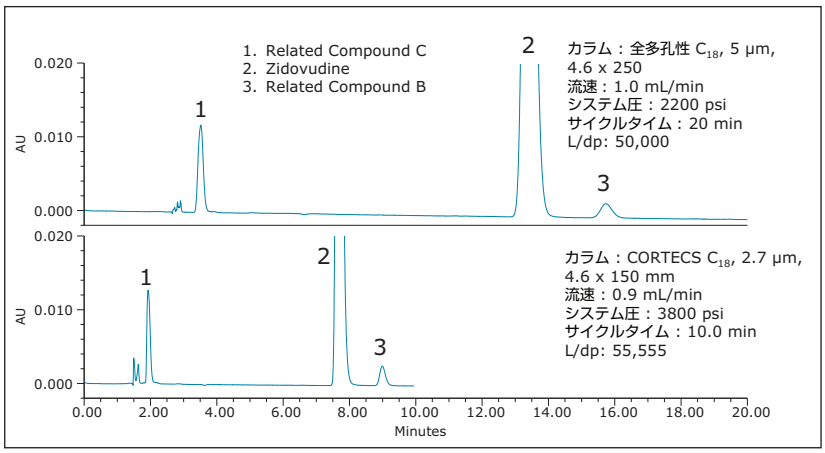

図2. オリジナルの5µm、4.6 × 250 mmカラムとCORTECS C_{18} 2.7 µm、4.6 × 150 mmカラムによるZidovudineと類縁物質の分析

図2で示されているように、CORTECS C_{18} 2.7 µm、4.6 × 150 mmカラムを使用することで、サイクルタイムと溶媒消費量が50%削減できます。L/dpを維持したカラムを選択すれば、モノグラフの基準を満たす分離を予測することが可能です。Zidovudine分析の場合は、分析に合格するための3つのシステム適合性基準が記載されています。表1はそれぞれのカラムに5回繰り返し注入した場合に得られた結果と、USPの適合要件とその結果を示しています。このデータが示すように、CORTECS 4.6 × 150 mmカラムは全ての必要なシステム適合性要件を満たしています。このカラムを使用することで、分析法再バリデーションの必要性無しに、サイクルタイムと溶媒消費量を削減し、コストを削減しながらラボの生産性を向上できます。

	USPモノグラフ適合性要件	全多孔性C_{18} 5 µm、4.6×250 mm	CORTECS C_{18} 2.7 µm, 4.6 x 150 mm	CORTECS C_{18} 2.7 µm, 4.6 x 100 mm
分離度 [2,3]	1.4以下	3.9	4.4	3.5
USPテーリング[2]	1.5以上	1.12	1.20	1.16
%RSD保持時間[2]	2.0以上	0.03	0.51	0.23

表1. USPモノグラフで示されている適合性基準と注入再現性結果（n＝5）

理論段数（N）に基づくUSP収載分析法の移管

USP General Chapter〈621〉では、アイソクラティック分析法の移管についてさらなる手段が示されています。2014 年 8 月の改正から、理論段数（N）がオリジナルのカラムに対して -25% から +50% 以内のカラムであれば移管できるとされています。理論段数はカラム効率の指標であり、分離パラメーターによって影響を受けます。理論段数を算出するためには、ベースラインでのピーク幅とピークの保持時間を記録しておく必要があります。式 1 は N を計算する際に用いられ、tR はピークの保持時間、W はベースラインにおけるピーク幅を示しています

$$N = 16\left(\frac{{}^{t}R}{W}\right)^2$$

式 1. アイソクラティック分離における理論段数の算出方法：
${}^{t}R$ は保持時間、W はベースラインにおけるピーク幅

分析を行っているカラムについて N を算出し、移管先のカラムの理論段数が General Chapter〈621〉のガイドラインの許容範囲内であれば、新しいカラムへ移管することが可能です。本アプリケーションにおいては、オリジナルの 5 µm、4.6 × 250 mm カラムについて最後に溶出するピークの平均 N 値は 2957 でした。USP ガイドラインに従えば、移管するカラムの、最後に溶出するピークの理論段数が 2217-4475 の間であれば使用することができます。CORTECS C_{18}、2.7 µm、4.6 × 100 mmカラムへの移管を実施し、図 3 に 2 つのカラムによる分析結果を示しました。

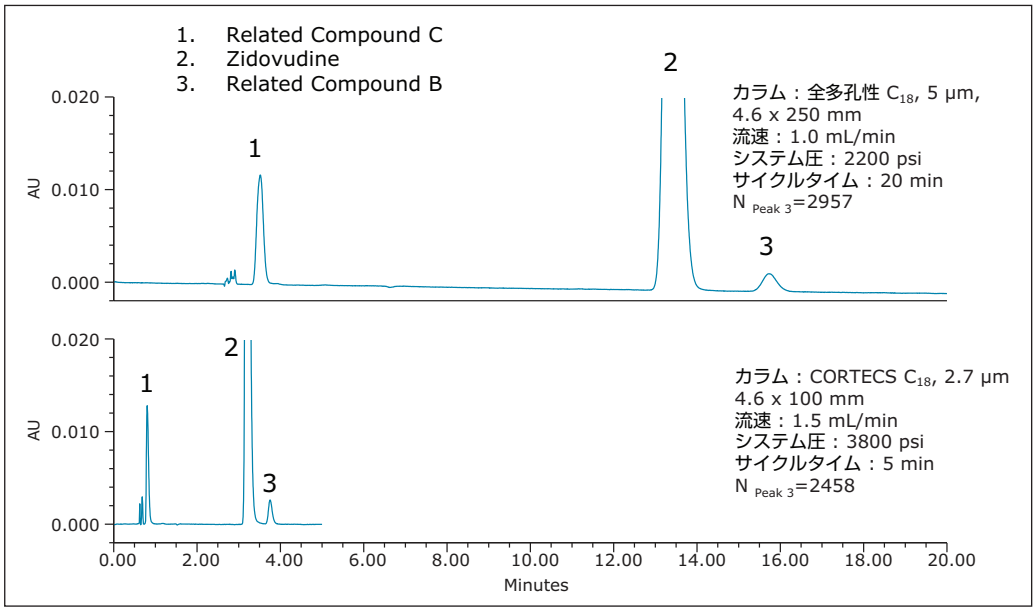

図 3. オリジナルの 5 µm、4.6 × 250 mm カラムと CORTECS 2.7 µm カラムによる Zidovudine とその類縁物質の分離

図 3 で示されているように、最後に溶出したピークの N 値は 2458 であり、この場合オリジナルの分析法に対して -25% の範囲内であるため、CORTECS 4.6 × 100 mm カラムによる分離は USP ガイドラインの条件を満たしています。CORTECS カラムへ移管することで、サイクルタイムは 75% 短縮し、大きく生産性が向上します。さらに、1 分析当たりの溶媒量を 63%削減することで全体として大幅に溶媒使用量を削減できます。表 1 では、実験において CORTECS 4.6 × 100 mm カラムが適合したシステム適合性基準も示しています。

結論

USP 収載法は従来 5 µm カラムにより実施され、1 分析当たり多くの時間と溶媒を使用します。2014 年 8 月に改正された USP General Chapter〈621〉ではアイソクラティックの分析法を粒子径の小さいカラムに移管するための 2 種類の方法が示されています。1 つは、カラム長と粒子径の比（L/dp）を維持して移管する方法、もう 1 つは理論段数（N）を維持して移管する方法です。新規ソリッドコアカラムの汎用性を示すために、Zidovudine のアイソクラティック分析法を、2 種類の移管方法を用いてサイズの異なる 2 本の CORTECS 2.7 µm カラムに移管しました。CORTECS 2.7 µm カラムを使用することで、溶媒使用量を削減しながら、分析時間を最大 1/4 まで短縮することが可能です。加えて、USP General Chapter〈621〉に従って、再バリデーションの必要がないため、カラム間の移管を迅速に行えます。これらの利点はラボ全体の生産性を向上し、1 分析当たりのコストを削減することに繋がります。

参考文献

1. *USP Monograph: Zidovudine*. USP-NF.
2. General Chapters:<621> *Chromatography* USP-NF.
3. Berthelette, K.; Summers, M.; Fountain, K.; Troubleshooting Common System Problems Using Waters Neutrals Quality Control Reference Material, Waters Application Note 720004635EN, 2013.

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 富山

Waters、CORTECS、Alliance、Empower および The Science of What's Possible は Waters Corporation 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。

©2015 Waters Corporation. Produced in Japan.

2015年2月 720005157JA PDF