



7697A HSS-7890B GC を用いた、 残留溶媒分析の汎用メソッドの開発

<要旨>

医薬品中の残留溶媒分析を行うために、ヘッドスペースサンプラを組み合わせ、GC、GC/MS が用いられます。本アプリケーションノートでは、最も汎用的に用いられる GC-FID を用いて効率的に分析を開始、運用できるメソッドを検討しました。アジレント独自のリテンションタイムロッキングを用いることで、ICH(日米 EU 医薬品規制調和国際会議)で定められた Class1,2,3 の残留溶媒に加えて、アミン類を含めた約 60 種類の溶媒を同定、定量できるようにメソッドを作成、最適化しました。

さらに、分離カラム、キャリアガスの異なる場合においても対応できるよう、各仕様におけるメソッドを検討しました。

Key Words: 7697A, 7890B GC, 残留溶媒、リテンションタイムロッキング(RTL)

* * * * *

1. はじめに

一般的に残留溶媒の分析にはヘッドスペースサンプラ(HSS)と組み合わせた、GC-FID が用いられます。この手法においては高い再現性、良好な直線性などの優れた定量的なデータが得られます。一方で、検出される溶媒の種類が多い場合や、不明なピークが検出された場合、FID での定性は困難なケースが多く見られます。

このため、本アプリケーションノートではリテンションタイムロッキング(RTL)を使用し、約 60 種類(Class1-3, アミン類、主溶媒不純物)の溶媒のリテンションタイムを確認できるメソッドを作成しました。アジレント GC 独自の RTL についての詳細は弊社 Web ページなどをご参照下さい。

(<http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=178>)

さらに異なる極性のカラムを用いて確認分析を行えるようにしました。

また、医薬品及び、その原料を溶解する溶媒は HSS 分析の感度に大きな影響を与えます。このため、水溶性、非水溶性試料の両者を対象とし、かつ、感度や測定精度を維持するための溶媒の選択を検討しました。

このため、本メソッドは汎用的に様々な試料の残留溶媒分析に適用が可能と考えられます。

ただし、溶媒の沸点や極性は非常に幅広く、HSS-GC での分析に適さないものもあります。ギ酸、酢酸、エチレングリコール、スルホラン、ホルムアミドなどが該当します。これらの分析は一般的には液体注入の方が、感度、定量性ともに優れた結果が得られます。

2. 条件

サンプル前処理

医薬品中の残留溶媒分析では、ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ジメチルアセトアミド(DMAC)、1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン(DMI)などの高沸点溶媒を使用します。水溶性試料の場合は水に溶解する場合がありますが、標準試料にはほとんどの場合、非水溶性溶媒が含まれるため、水のみで標準溶液や試料の調製を行う事は困難です。

本アプリケーションノートでは主溶媒に DMI 及び、DMI:水(1:1)の両者の使用を試み、検討を行いました。DMI は上記の溶媒の中で最も高沸点であり、クロマトグラムの後半に溶出するため、目的成分の同定が容易になります。また、水を加えることで水溶性試料への適用とともに、高感度化を図りました。

試料は 50mg を 2mL の DMI あるいは DMI:水(1:1)に溶解し、分析を行いました。

HSS-GC 分析条件

本分析では高感度化とともに、分析サイクルの短縮を図るため、内径の細い中極性カラム(0.25mm id)、高速なオープン昇温速度(40°C/min)を用いた分析条件を作成しました。さらに、キャリアガスがヘリウム、窒素の場合も考慮しました。加えて、確認分析用に極性カラムを用いたメソッドの作成を行いました。

全てのメソッドにおいてリテンションタイムロッキングを行う事で、ピークの同定を容易にします。



分析条件 A (中極性カラム)

カラム: DB-Select 624UI for <467> (30m, 0.25mm, 1.4um)

注入口温度: 200°C

ライナー: Ultra inert direct liner(P/N: 5190-4047)

注入: スプリット 30:1

キャリアガス: ヘリウム,又は窒素

オープン: 40°C(5min)-40°C/min-240°C(3min)

(分析時間 13min)

分析条件 B (極性カラム)

カラム: VF-WAXms (30m, 0.25mm, 0.5um)

注入口温度: 200°C

ライナー: Ultra inert direct liner

注入: スプリット 30:1

キャリアガス: ヘリウム,又は窒素

オープン: 35°C(5min)-20°C/min-240°C(5min)

(分析時間 20.25min)

7697A HSS (分析条件 A、B 共通)

オープン: 80°C

ループ/バルブ: 80°C

トランスファライン: 180°C

バイアル平衡化時間: 15min

バイアル攪拌: 5

バイアル加圧: 15 psi

ループ最終圧力: 10 psi

ループサイズ: 1mL

バイアル加圧ガス: 窒素

バイアルサイズ: 20mL

3. 分析結果

クロマトグラムの比較

図 1には Class2 の溶媒を分析条件 A, B で分析したクロマトグラムを示します。

2 種類の異なる液相のカラムで分離すると、各溶媒の溶出順序が前後していることが分かります。メタノールは一般的に広く分析される溶媒の一つですが、中極性の DB-Select 624UI カラムではほとんど保持しません。一方で極性カラムの VF-WAXms では比較的保持が強いため、良好なピーク形状が得られやすい傾向があります。このように 2 つのカラムのピークが同定されており、各カラムの特性を理解しておくことで、各分析に最適なクロマトグラム、感度を得ることが可能となります。

また、溶媒が検出された際に、他のピークが重なっていないかの確認分析も容易に行う事が可能です。

再現性

表 1 には、Class2 の溶媒、100mg/L の繰り返し再現性 (%RSD, n=6) を示しました。分析条件は DB-Select 624UI カラムで窒素キャリアを用いたものです。

ほとんどの化合物で 3%以内の良好な結果が得られました。一方で、DMF, DMAC, NMP といった非プロトン性極性溶媒は、感度が低く再現性も他に比べて悪い結果となりました。これらの溶媒は、溶解させる溶媒(主溶媒)に水を加えない方が、感度、再現性ともに良好な結果が得られる事が分かっています。

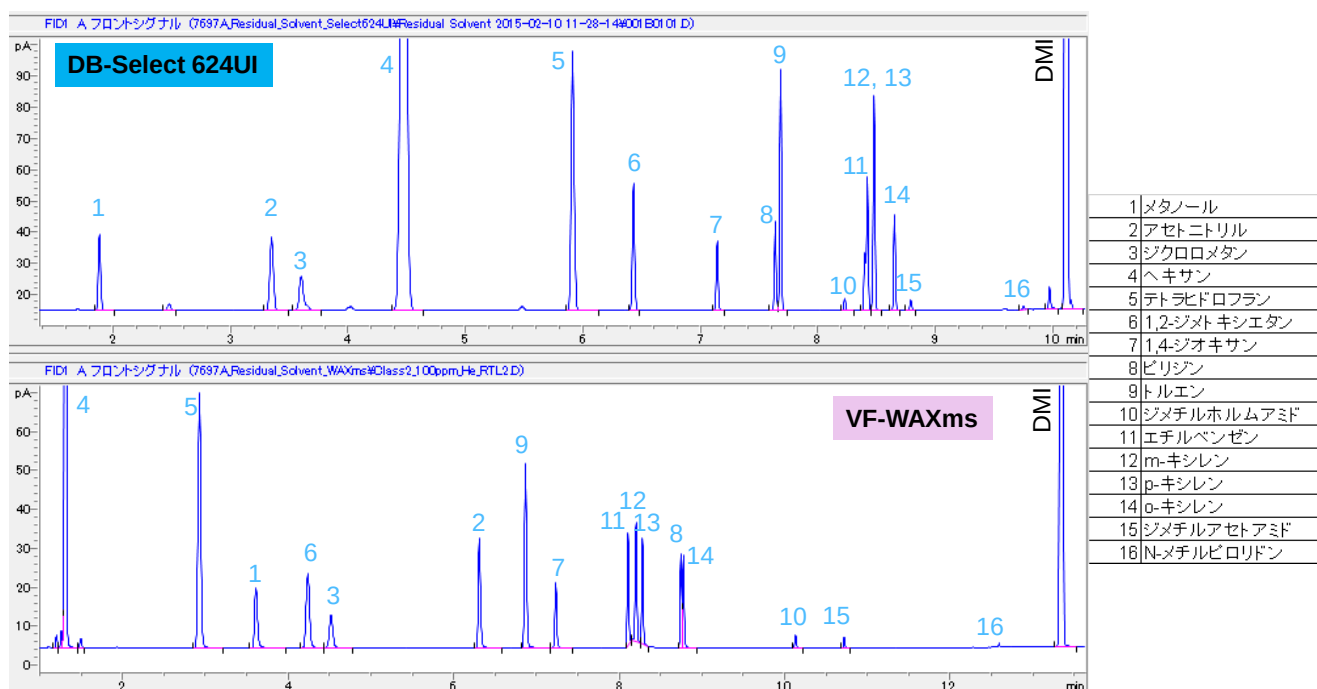


図 1. Class2 溶媒、各 100mg/L のクロマトグラム。上図は DB-Select 624UI、下図は VF-WAXms で、ともにキャリアガスに窒素を使用した際のデータ。



表 2 には主溶媒を DMI に変更した際の各化合物の再現性を示しました。この結果、すべての化合物で 3% 以内の良好な再現性が得られました。

この結果より、非プロトン性極性溶媒を主なターゲットにする場合、主溶媒を DMI のみにする事が推奨されます。

表 1. Class2 溶媒(主溶媒 DMI:水=1:1)、各 100mg/L のピーク面積の繰り返し再現性 (%RSD, n=6)。

RT (min)	化合物	1	2	3	4	5	6	平均値	標準偏差	%RSD
1.933	メタノール	47.7	47.7	47.4	47.3	48.0	46.9	47.5	0.4	0.9
3.530	アセトニトリル	109.7	108.3	107.3	106.7	108.6	108.0	108.1	1.0	1.0
3.786	ジクロロメタン	276.0	267.3	265.9	264.5	267.7	272.6	269.0	4.4	1.6
4.673	ヘキサン	4606.4	4462.8	4439.9	4427.3	4491.8	4550.7	4496.5	89.5	1.5
5.956	テトラヒドロフラン	395.8	386.3	382.4	379.7	387.0	390.7	387.0	5.7	1.5
6.532	1,2-ジメトキシエタン	104.9	103.5	102.0	101.4	103.8	103.3	103.2	1.2	1.2
7.233	1,4-ジオキサン	42.7	42.5	42.0	41.9	42.9	41.8	42.3	0.4	1.0
7.736	ピリジン	44.1	43.9	43.3	43.2	45.0	43.7	43.9	0.7	1.5
7.763	トルエン	1368.9	1327.4	1312.5	1303.5	1326.5	1352.5	1331.9	24.6	1.8
8.318	N,N-ジメチルホルムアミド	1.9	1.6	1.7	1.7	1.5	1.7	1.7	0.1	6.8
8.557	m,p-キシレン	1898.5	1840.6	1816.6	1802.7	1839.8	1878.4	1846.1	36.4	2.0
8.731	o-キシレン	710.5	689.3	679.9	674.3	688.8	702.8	690.9	13.6	2.0
8.875	N,N-ジメチルアセトアミド	3.5	3.2	3.2	3.2	3.1	3.5	3.3	0.2	5.5
9.841	N-メチルピロリドン	0.21	0.14	0.14	0.13	0.11	0.22	0.16	0.0	28.8

表 2. Class2 溶媒(主溶媒 DMI)、各 100mg/L のピーク面積の繰り返し再現性 (%RSD, n=6)。

RT (min)	化合物	1	2	3	4	5	6	平均値	標準偏差	%RSD
1.933	メタノール	40.3	39.4	40.5	40.1	40.0	40.2	40.1	0.4	0.9
3.530	アセトニトリル	55.1	53.7	55.5	54.7	54.6	55.1	54.8	0.6	1.1
3.786	ジクロロメタン	35.2	34.1	35.4	34.8	34.8	35.1	34.9	0.5	1.3
4.673	ヘキサン	1142.5	1107.8	1154.3	1134.5	1138.4	1150.7	1138.0	16.6	1.5
5.956	テトラヒドロフラン	172.1	166.9	173.7	170.7	170.8	172.3	171.1	2.3	1.4
6.532	1,2-ジメトキシエタン	62.2	60.2	63.0	61.7	61.9	62.4	61.9	1.0	1.5
7.233	1,4-ジオキサン	29.5	28.5	29.8	29.3	29.2	29.6	29.3	0.5	1.6
7.736	ピリジン	32.8	31.7	33.2	32.7	32.7	33.1	32.7	0.5	1.6
7.763	トルエン	94.0	90.5	94.8	93.1	93.2	94.3	93.3	1.5	1.6
8.318	N,N-ジメチルホルムアミド	4.3	4.1	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3	0.1	2.0
8.557	m,p-キシレン	87.4	84.0	88.5	86.7	86.8	88.3	87.0	1.6	1.8
8.731	o-キシレン	33.2	31.8	33.6	32.9	32.9	33.6	33.0	0.6	1.9
8.875	N,N-ジメチルアセトアミド	3.5	3.4	3.6	3.5	3.5	3.7	3.5	0.1	2.4
9.841	N-メチルピロリドン	1.3	1.2	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	0.0	2.6

直線性

Class2 溶媒、各 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000mg/L を DMI 溶媒で調製し、検量線を作成しました。(DMAC、NMP は 1mg/L は検出できずデータなし)

各成分の決定係数(r^2)を表 3 に、メタノールとヘキサンの検量線を図 2 に示しました。すべての成分において、0.999 以上の良好な直線性が得られました。

一方で、ヘキサン、トルエンといった感度を得られやすい化合物は高濃度(1000mg/L)でバイアル内での分配平衡のくずれにより、検量線の直線性が低下する傾向が見られました。(図 2 検量線上の矢印)このような現象を防ぐため、各化合物の濃度、混合溶液にした場合の化合物数を多くしすぎないといった注意が必要です。この他、Class1, 3, アミン類においても同様に良好な直線性が得られました。

表 3. Class2 溶媒(主溶媒 DMI)の検量線の決定係数

RT	Compounds	R^2
1.93	メタノール	0.9999
3.53	アセトニトリル	1.0000
3.79	ジクロロメタン	0.9997
4.67	ヘキサン	0.9998
5.96	テトラヒドロフラン	0.9996
6.53	1,2-ジメトキシエタン	1.0000
7.23	1,4-ジオキサン	1.0000
7.74	ピリジン	0.9999
7.76	トルエン	0.9996
8.32	N,N-ジメチルホルムアミド	0.9991
8.52	エチルベンゼン	0.9992
8.56	m,p-キシレン	0.9999
8.73	o-キシレン	1.0000
8.88	N,N-ジメチルアセトアミド	0.9990
9.84	N-メチルピロリドン	1.0000



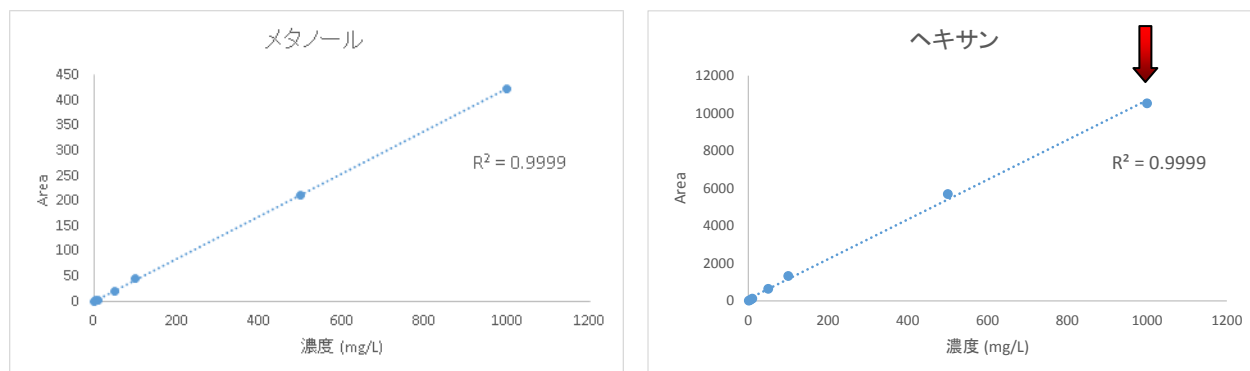


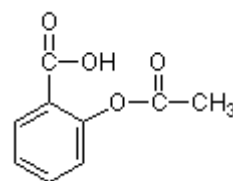
図 2. メタノールとヘキサンの検量線（DMI 溶媒）

添加回収試験

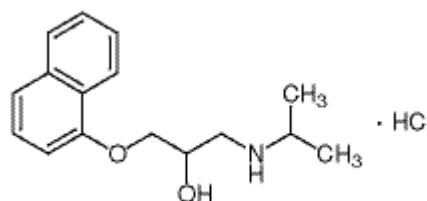
アセチルサリチル酸、プロプラノロール塩酸塩、ガバペンチンを用意し、25mg/mL となるよう、DMI:水(1:1)に溶解しました。この DMI:水はあらかじめ 100mg/L となるように Class2 の標準溶液を添加しています。標準溶液 100mg/mL の面積値と比較し、添加回収試験を行いました。この結果を表 4 に示しました。

ほぼすべての化合物で、80-120%以内の良好な値が得られました。N-メチルピロリドンに関しては、他の化合物と比較し、著しく感度が低いため、ばらつきの大きい結果となりました。

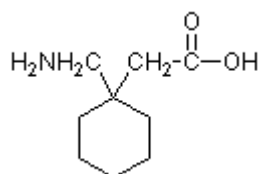
この他、Class3 及びアミン類に関しても添加回収試験を行いました。同様に良好な結果が得られています。アミン類に関しては、溶液の pH を調整する事で良好な回収率が得られました。



アセチルサリチル酸



プロプラノロール塩酸塩



ガバペンチン

表 4. Class2 溶媒の添加回収率

化合物	回収率(%)		
	アセチルサリチル酸	プロプラノロール塩酸塩	ガバペンチン
メタノール	99	100	105
アセトニトリル	98	99	98
ジクロロメタン	94	96	90
ヘキサン	92	95	84
テトラヒドロフラン	95	98	96
1,2-ジメトキシエタン	95	100	99
1,4-ジオキサン	97	100	100
ピリジン	58	98	101
トルエン	94	96	92
N,N-ジメチルホルムアミド	94	98	100
エチルベンゼン	91	96	92
m,p-キシレン	92	96	92
o-キシレン	92	96	92
N,N-ジメチルアセトアミド	89	93	90
N-メチルピロリドン	81	84	68



4. まとめ

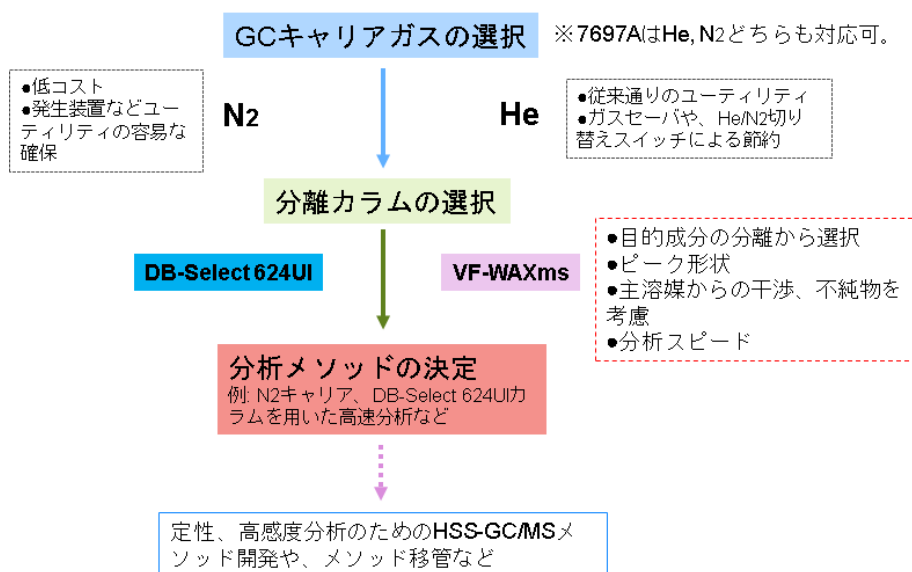
本アプリケーションノートでは Class1,2,3 の溶媒に加え、アミン類のリテンションタイムロッキングテーブルを作成し、すぐに分析を開始できるだけでなく、液相の異なるカラムでのデータも確保する事で従来の分析法に比べ、定性の能力も向上します。

分析時間も DB-Select 624UI カラムを使用したメソッドでは 20 分のサイクルタイムを実現し、多検体への対応が可能です。

また、キャリアガスは、ヘリウム、窒素に対応する事で、コスト削減や、メソッドの移管も容易に行う事ができると考えられます。

事前に下記の項目を選択する事で、分析前に最善のメソッドを選択する事が可能となります。

1. キャリアガスの選択
2. 分離に応じたカラムの選択 (624 あるいは WAX)
3. 試料の溶解性を考慮した溶媒の選択 (DMI あるいは DMI:水)
4. 感度を考慮した溶媒の選択 (非プロトン性極性溶媒など)



【GC-MS-201508AZ-001】

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる障害について一切免責とさせていただきます。
また、本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1
www.agilent.com/chem/jp



Agilent Technologies