

Agilent InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18 を 用いた最新のグラジエント USP メソッド

新たに改訂された USP <621> ガイドラインに従って
イオヘキソール関連化合物の USP モノグラフ HPLC メソッドを
表面多孔質粒子 2.7 μm に移管

Rongjie Fu
Agilent Technologies
(Shanghai) Co., Ltd

概要

イオヘキソールの関連化合物分析用のオリジナル USP モノグラフ HPLC メソッドを、新しく改訂された USP <621> ガイドラインに従って、表面多孔質粒子 (SPP) 2.7 μm カラムに移管し、最新化しました。オリジナルメソッドは、Agilent ZORBAX SB-C18、4.6 \times 250 mm、5 μm カラムによるグラジエント分離を使用しており、分析に 60 分を必要とします。このメソッドを Agilent InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18、4.6 \times 100 mm、2.7 μm カラムに移管すると、再バリデーションすることなく、分析時間が 60 分から 13 分に短縮され、分析時間と溶媒消費量が 78 % 削減されました。すべてのシステム適合性の要件を満たしつつ、分析時間と溶媒消費量の両方で大幅な削減を達成しました。

概要

大部分の USP モノグラフには、原材料と製剤を試験するための HPLC メソッドが記載されています。これらのメソッドは、ジェネリック医薬品メーカー向けのルーチン分析手法です。大部分のメソッドでは、従来の粒子径サイズ 5 μm の旧式のカラム技術が採用されています。このような種類のカラムは効率が低いため、分析種の保持・分離に長いカラム（例えば、長さ 150 または 250 mm）が必要になり、結果的に分析時間も長くなります。分析者の主な仕事は USP のメソッドを再現することであり、多くの場合は異なる機器やラボにおいてメソッドを移管することです。また、分析者は大幅な変更を加えずに既存の USP メソッドを最新化し、再バリデーションを不要にしました。以前の USP <621> ガイドラインは、イソクラティックメソッドを従来の粒子径サイズ 5 μm カラムから粒子径サイズが小さいカラムを利用したメソッドに移管する内容でした。2022 年 12 月に改訂された、最新の USP <621> ガイドラインでは、全多孔質粒子 (TPP、小粒子サイズ) カラムと表面多孔質粒子 (SPP) カラムを使用する、グラジエントメソッドの最新化が許容されています。¹

このアプリケーションノートでは、イオヘキソールのための、4.6 \times 250 mm、5 μm カラムを使用する USP のオリジナルの関連化合物試験メソッド² を、最新の USP <621> ガイドラインに従って、粒子径サイズが小さい SPP カラムに移管しました。最初に、5 μm Agilent ZORBAX SB-C18 カラムを用いてオリジナルメソッドを実行した後³、新しく開発した InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18、2.7 μm カラムを用いたメソッドに移管しました。

実験手法

機器と材料

Agilent 1260 Infinity II LC システムにおいて、4.6 \times 250 mm および 4.6 \times 100 mm の両方のカラムに 0.17 mm の HPLC システム配管を使用しました。

すべての試薬と溶媒には、HPLC グレードのものを使用しました。アセトニトリル、イオヘキソール、関連化合物は Anpel Laboratory Technologies (上海、中国) から購入しました。水は、ELGA PURELAB Chorus システム (ハイ・ウィカム、英国) を使用して精製しました。システム適合性溶液は、イオヘキソールの USP モノグラフに従い調製しました。

カラム

- Agilent ZORBAX SB-C18、4.6 \times 250 mm、5 μm (部品番号 880975-902)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18、4.6 \times 100 mm、2.7 μm (部品番号 695975-742)

表 1. 機器の構成

Agilent 1260 Infinity II LC システム	
Agilent 1260 Infinity II バイナリポンプ (G7112B)	4 ポジション/10 ポートバルブ 60 MPa (部品番号 5067-4287)
Agilent 1260 Infinity II マルチサンブラ (G7167A)	バイアル、スクリュートップ、茶色、ラベル付き、認定、2 mL、100 個 (部品番号 5182-0716) キャップ、スクリュ、青、PTFE/赤シリコンセパタム、100 個 (部品番号 5182-0717)
Agilent Infinity II マルチカラムサーモスタット (MCT)	標準フローヒーター (G7116-60015) ヒーターとカラム: InfinityLab クイックコネクタセンプリ、105 mm、0.17 mm (部品番号 5067-6166)
Agilent 1260 ダイオードアレイ検出器 WR (G7115A)	フローセル: 10 mm 13 μL フローセル (部品番号 G1315-60022) 長寿命重水素ランプ (部品番号 2140-0820)
Agilent OpenLab CDS、バージョン C.01.07 ソフトウェア	

結果と考察

以前の調整ガイドラインでは、再バリデーションせずにグラジエント条件を調整することは許容されていませんでした。この規定では、USP メソッドからカラムサイズを変更したり、粒子サイズを若干変更したりするだけでも (2.7 μm と 2.6 μm など) 再バリデーションが必要でした。⁴2022 年 12 月に新しく改訂された USP <621> ガイドラインには、次のように記載されています。「TPP カラムから SPP カラムへの変更は、置換基の同一性が変更されず、固定相の他の物理化学的特性、つまり、クロマトグラフィー担体、表面修飾、化学修飾の程度が類似している場合、許容されています。カラムの粒子径サイズや長さは、 $(t_r/W_h)^2$ 比が一定であるか、または所定の $(t_r/W_h)^2$ 比の -25 ~ +50 % の範囲内であれば変更可能です。このような変更は、システム適合性基準が満たされ、管理対象の指定不純物の選択性と溶出順序が同等であると示される場合、再バリデーションを行うことなく、許容可能です。」オリジナル USP メソッドで Agilent ZORBAX SB-C18、4.6 \times 250 mm、5 μm カラムを用い、システム適合性パラメータを決定するために使用するイオヘキソール関連化合物 A とイオヘキソール関連化合物 C について、 $(t_r/W_h)^2$ 比と許容範囲を計算しています。値を表 2 に示します。

表 2. この実験で使用した HPLC メソッドと UHPLC メソッドの比較

パラメータ	USP のオリジナル	UHPLC の使用
カラム	Agilent ZORBAX SB-C18、 4.6 × 250 mm、5 μm (部品番号 880975-902)	Agilent InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18、4.6 × 100 mm、 2.7 μm (部品番号 695975-742)
(t_R/W_R) ² 比	3,890 (-25 ~ 50 %) 20,217 (-25 ~ 50 %)	3,023 (-22.3 %) 25,290 (25.1 %)
移動相	A : 水 B : アセトニトリル	A : 水 B : アセトニトリル
グラジエント	時間 (分) B % 0 1 60 13	時間 (分) B % 0 1 13 13
流量	1 mL/min	1.85 mL/min
温度	25 °C	25 °C
注入量	10 μL	4 μL
検出	DAD 信号 254 nm、 Ref オフ 2.5 Hz	DAD 信号 254 nm、 Ref オフ 40 Hz

この実験では、最新のメソッドにおいて、新しい InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18 カラムを使用しました。このカラムは、高極性の移動相条件で優れた保持・分離を示すカラムであり、C18 の結合密度が低くポアサイズがより大きい 120 Å の 2.7 μm SPP をベースにして開発されています。また、USP L1 カラムであるため、InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18 カラムを最新のメソッドで使用することが許容されていました。カラムサイズ 4.6 × 100 mm の 2.7 μm カラムを使用した理由は、長さ 100 mm において 2 μm 未満のカラムと同等の効率を実現しているためであり、これは 250 mm、5 μm カラムに匹敵します。両方の InfinityLab カラムでシステム適合性溶液を分析し、イオヘキソール関連化合物 A とイオヘキソール関連化合物 C の (t_R/W_R)² 比も計算しました。両方のカラムの比はすべて、許容範囲内です。値を表 2 にまとめて示します。

このアプリケーションノートでは、粒子径サイズを変更して、流量を調整する必要がありました。これは、粒子径サイズの小さいカラムでは、同じ性能を得るために、より高い線速度が必要になるためです（理論段高さを減らして測定するため）。流量は、カラム径と粒子径サイズの変更に對して式 1 を用いて調整しました。

式 1.

$$F_2 = F_1 \times [(dp_1 \times dc_2^2)/(dp_2 \times dc_1^2)]$$

- F_1 = モノグラフに示されている流量 (mL/min)
- F_2 = 調整後の流量 (mL/min)
- dc_1 = モノグラフに示されているカラム内径 (mm)
- dc_2 = 使用したカラム内径 (mm)
- dp_1 = モノグラフに示されている粒子径サイズ (μm)
- dp_2 = 使用したカラムの粒子径サイズ (μm)

カラムサイズの変更とこれによるカラム容量の変化は、選択性を制御するグラジエントボリュームに影響を及ぼします。カラム容量に比例してグラジエントボリュームを変更することにより、グラジエントをカラム容量に対して調整します。新しいグラジエント時間 t_{G2} は、式 2 に示すように、オリジナルのグラジエント時間 t_{G1} 、流量、カラムサイズから計算できます。

式 2.

$$t_{G2} = t_{G1} \times (F_1/F_2)[(L_2 \times dc_2^2)/(L_1 \times dc_1^2)]$$

- t_{G1} = グラジエントボリュームまたはグラジエント時間 (初期)
- t_{G2} = 新しいグラジエント時間
- F = 流量
- $L \times dc^2$ = カラム容量に対するグラジエントボリュームの比率を一定に保つために、各グラジエントのセグメントのグラジエント時間を調整する必要があります

式 3 は、カラムサイズを変更した場合の注入量の調整に使用できます。

式 3.

$$V_2 = V_1 \times [(L_2 \times dc_2^2)/(L_1 \times dc_1^2)]$$

- V_1 = モノグラフに示されている注入量 (μL)
- V_2 = 調整後の注入量 (μL)
- L_1 = モノグラフに示されているカラム長 (cm)
- L_2 = 新しいカラム長 (cm)
- dc_1 = モノグラフに示されているカラム内径 (mm)
- dc_2 = 新しいカラム内径 (mm)

オリジナルのメソッドと新しいメソッドの条件を表 2 に示します。内径 4.6 mm のカラムを用いたメソッドを、バイナリポンプを搭載した 1260 Infinity II LC システムで実行しました。内径 4.6 mm の Poroshell 120 カラムは、同じ最大圧力 60 MPa の 1260 Infinity II LC システムによく適合していました。表 3 に示されているように、両カラムのシステム適合性はすべて要件を満たしていました。InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18、4.6 × 100 mm、2.7 μm カラムを使用した最新のメソッドでは、分析時間が 60 分から 13 分に短縮 (78 % の時間短縮) され、溶媒消費量も大幅に削減 (78 % の削減) されました。このような手法により、明らかにラボ生産性とサンプルスループットを向上させることが可能です。クロマトグラムを図 1 に示します。

表 3. システム適合性の概要

USP システム適合性の要件	0-アルキル化合物のリテンションタイムは、イオヘキソールのエキソ異性体の 1.0 に対して 1.1 ~ 1.4 である	イオヘキソール関連化合物 A とイオヘキソール関連化合物 C の分離能 R は 20.0 以上である	イオヘキソール関連化合物 C のピーク面積は、クロマトグラムの全ピークの総面積と比較して 0.5 ± 0.1 % である
Agilent ZORBAX SB-C18、 4.6 × 250 mm、5 μm	20.25 ~ 25.78 分	51.1	0.55 %
Agilent InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18、 4.6 × 100 mm、2.7 μm (部品番号 695975-742)	5.03 ~ 6.40 分	45.9	0.55 %

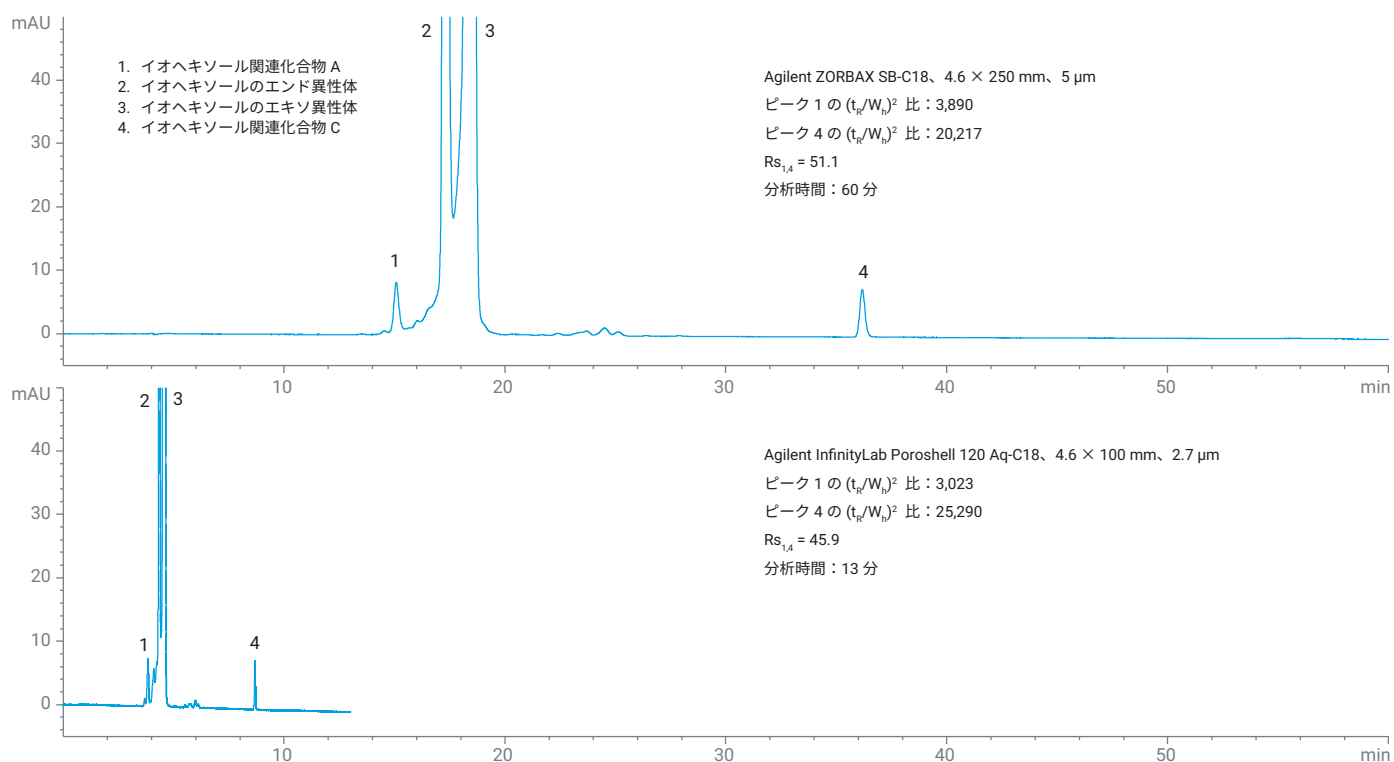


図 1. 粒子径サイズの異なる両カラムを用いた、イオヘキソール中の関連化合物分析用のシステム適性溶液のクロマトグラム

結論

従来の全多孔質 5 µm カラムを使用した、イオヘキソールの関連化合物分析用の USP メソッドを、Agilent InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18 カラムを使用して適切に最新化しました。最新のメソッドでは、分析時間と溶媒使用を大幅に削減しながら、同等の結果が得られています。このメソッドを使用することにより、ラボの生産性とサンプルスループットを向上することが可能です。またこのメソッドは、新しく改訂された USP <621> ガイドラインに従って、追加のメソッド再バリデーションなしで調整できます。

参考文献

1. USP Harmonized Standards Home Page. Supplement USP Stage 4 Harmonization, Official, December 1, **2022**.
2. USP 35 Monographs. Iohexol, United States Pharmacopeia: 3534-3536.
3. Fu, R. Gradient Method Transfer of the Iohexol USP Monograph HPLC Method for Related Compounds to Smaller Particle Size ZORBAX Columns. *Agilent Technologies application note*, 5994-6544EN, **2023**.
4. Long, W. J. A Simple Conversion of the USP Assay Method for Diphenhydramine HCl to the Agilent InfinityLab Poroshell 120 Column EC-C8. *Agilent Technologies application note*, 5994-5400EN, **2022**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE49474901

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, September 28, 2023

5994-6756JAJP