

イオヘキソール関連化合物の USP モノグラフ HPLC メソッドから 小粒子サイズの ZORBAX カラムへの グラジエントメソッドの移管

著者

Rongjie Fu
Agilent Technologies
(Shanghai) Co., Ltd

概要

新たに改訂された米国薬局方 (USP) 総則 <621> ガイドラインに従い、イオヘキソール関連化合物の分析用のオリジナル USP モノグラフ HPLC メソッドを、より小さい粒子サイズの 3.5 および 1.8 μm の Agilent ZORBAX カラムに移管しました。オリジナルメソッドは 4.6 \times 250 mm、5 μm カラムのグラジエント分離を使用し、分析に 60 分が必要です。メソッドを Agilent ZORBAX SB-C18 カラム (3.0 \times 150 mm、3.5 μm) に移管すると、分析時間は 60 分から 25 分に短縮されました (分析時間は 58 % 短縮、溶媒消費量は 75 % 削減)。さらに、メソッドを Agilent ZORBAX RRHD SB-C18 カラム (2.1 \times 100 mm、1.8 μm) に移管すると、メソッドを再バリデーションすることなく、分析時間が 60 分から 8.6 分に短縮されました (分析時間は 86 % 短縮、溶媒消費量は 92 % 削減)。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 5 μm 粒子カラムが含まれている、旧式のカラム技術が採用されています。これらのカラムは効率が低いため、多くの場合、長いカラム長（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、再バリデーションが必要となる大きな変更を行わずに、既存の USP メソッドを最新化する必要があります。以前の USP <621> では、イソクラティックメソッドのために、従来の 5 μm カラムから粒子サイズの小さいカラムへのメソッド移管のみが可能でした。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、最新のグラジエントメソッド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、現行の USP <621> ガイドラインの下で、より小さい粒子サイズのカラムに移管しました。オリジナルメソッドを、最初に 5 μm ZORBAX SB-C18 カラムで実行してから、3.5 μm または 1.8 μm ZORBAX SB-C18 カラムへ移管しました。

実験方法

機器と材料

5 μm および 3.5 μm カラムに対し、全体を通して 0.17 mm のシステム配管で構成した Agilent 1260 Infinity II LC システムを使用し、1.8 μm カラムに対し、全体を通して 0.12 mm のシステム配管で構成した Agilent 1290 Infinity II LC を使用しました。表 1 に機器の構成を示します。

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に関する USP モノグラフに従い調製しました。

使用したカラムは次のとおりです。

- Agilent ZORBAX SB-C18、4.6 x 250 mm、5 μm (p/n 880975-902)
- Agilent ZORBAX SB-C18、3.0 x 150 mm、3.5 μm (p/n 883975-302)
- Agilent ZORBAX SB-C18、2.1 x 100 mm、1.8 μm (p/n 858700-902)

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)	Agilent 4-ポジション/10-ポートバルブ、60 MPa (p/n 5067-4279)
Agilent 1260 Infinity II マルチサンプル (G7116A)	Agilent バイアル、スクリュートップ、茶色、ラベル付き、認定、2 mL (p/n 5182-0716) Agilent キャップ、スクリュー、青、PTFE/赤シリコンセプタム (p/n 5182-0717)
Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116A)	Agilent InfinityLab クイックコネク特熱交換器、標準 (G7116-60015) ヒーターとカラム：Agilent InfinityLab クイックコネク特フィッティングアセンブリ、105 mm、0.17 mm (p/n 5067-6166)
Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 WR (G7115A)	Agilent フローセル、10 mm、13 μL (p/n G1315-60022)
Agilent OpenLab CDS、バージョン C.01.07	Agilent フローセル、10 mm、13 μL (p/n G1315-60022) Agilent 長寿命重水素ランプ (p/n 2140-0820)
Agilent 1290 Infinity II LC システム	
Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)	Agilent InfinityLab クイックチェンジバルブヘッド、4 ポジション/10 ポートバルブ、130 MPa (p/n 5067-4233)
Agilent 1290 Infinity II マルチサンプル (G7167B)	Agilent バイアル、スクリュートップ、茶色、ラベル付き、認定、2 mL (p/n 5182-0716) Agilent キャップ、スクリュー、青、PTFE/赤シリコンセプタム (p/n 5182-0717)
Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)	Agilent InfinityLab クイックコネク特熱交換器、標準 (G7116-60015) ヒーターとカラム：Agilent InfinityLab クイックコネク特フィッティングアセンブリ、105 mm、0.12 mm (p/n 5067-5957)
Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7117B)	Agilent InfinityLab Max-Light カートリッジセル (p/n G4212-60008) Agilent 長寿命重水素ランプ、40 Hz (p/n 5190-0917)
Agilent OpenLab CDS、バージョン C.01.10	

結果と考察

これまででは、許容可能な調整ガイドラインの下で、再バリデーションを行うことなくグラジエント条件を調整することはできませんでした。この規定では、USP メソッドからカラム寸法を変更したり、粒子サイズを若干変更したりするだけでも（2.7 μm 対 2.6 μm など）再バリデーションが必要でした。³ しかし、2022 年 12 月に発行された改訂版 USP <621> ガイドラインでは、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（即ち、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、グラジエントメソッド用の TPP カラム間の調整が可能です。L/dp の比率が一貫しているか、規定の L/dp 比の -25% ~ 50% の範囲内であれば、カラムの粒子サイズや長さは変更することができます。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、このような変更は許容可能です。

このアプリケーションノートでは、同じ化学的構造の ZORBAX SB-C18 を使用してイオヘキソール中の関連化合物を分析しました。許容可能な L/dp 比の範囲は 37,500 ~ 75,000 です。より小さい ZORBAX SB-C18、3.0 × 150 mm、3.5 μm (42,875) カラム、および ZORBAX RRHD SB-C18、2.1 × 100 mm、1.8 μm (55,555) カラムの比率はどちらもこの範囲内です。

このアプリケーションノートでは粒子サイズを変更しました。したがって、流量は調整する必要があります。粒子サイズの小さいカラムでは、同じ性能を得るために、より高い線流速が必要です、このため流速を調整しました（理論段高さを減らして測定するため）。流量は、次の式を使用して、カラム内径および粒子サイズの両方の変更に対して調整します。

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

- F_1 = モノグラフに示された流量 (mL/min)
- F_2 = 調整済み流量 (mL/min)
- dc_1 = モノグラフに示されたカラムの内径 (mm)
- dc_2 = 使用したカラムの内径 (mm)
- dp_1 = モノグラフに示された粒子サイズ (μm)
- dp_2 = 使用したカラムの粒子サイズ (μm)

変更したカラム寸法と、その結果として変化するカラム容量は、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、以下に従い、オリジナルのグラジエント時間 (t_{G1})、流量、カラム寸法から計算できます。

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

- 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

カラム寸法の変更に伴い、以下の式を使用して注入量を調整できます。

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

- V_1 = モノグラフに示された注入量 (μL)
- V_2 = 調整済み注入量 (μL)
- L_1 = モノグラフに示されたカラム長さ (cm)
- L_2 = 新しいカラム長さ (cm)
- dc_1 = モノグラフに示されたカラム内径 (mm)
- dc_2 = 新しいカラム内径 (mm)

オリジナルメソッド条件を表 2 に示します。オリジナルメソッドを ZORBAX SB-C18、4.6 × 250 mm、5 μm カラムで実行してから、ZORBAX SB-C18、3 × 150 mm、3.5 μm カラムに移管しました。どちらのメソッドもバイナリポンプ搭載 1260 Infinity II システムで実行しました。ZORBAX SB-C18、3 × 150 mm、3.5 μm カラム の粒子サイズとカラム内径はより小さいですが、バイナリポンプ搭載 1260 Infinity II LC システムはこのメソッドに適合しました。メソッドを ZORBAX RRHD SB-C18、2.1 × 100 mm、1.8 μm カラムに移管した場合、ピークの溶出液量は大幅に減少します。そのため、余分なカラム容量とディレイボリュームは最小化する必要があります。したがってディレイボリュームが小さい Agilent 1290 Infinity II LC システムを使用して、ZORBAX RRHD SB-C18、2.1 × 100 mm、1.8 μm カラムによるメソッドを実行しました。

分析時間は 3.5 μm カラムでは 58 %、1.8 μm カラムでは 86 % 短縮され、移動相消費量も 3.5 μm カラムで 75 %、1.8 μm カラムで 92 % の大幅な低減が達成されました。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。5 μm カラム、3.5 μm カラム、1.8 μm カラムに使用したグラジエント条件を表 3 に示します。表 4 に示すように、すべてのカラムのシステム適合性は要件を満たしました。

表 2. イオヘキソール中の関連化合物の分析のためのオリジナル LC メソッド条件

パラメータ	関連化合物分析メソッドの値
カラム	L1 : 4.6 × 250 mm
移動相	A : 水 B : アセトニトリル
グラジエント	時間 (分) B% 0 1 60 13
流量	1.0 mL/min
カラム温度	指定なし
注入量	10 μL
検出器	254 nm

表 3. 粒子サイズの異なる 3 種類のカラムに使用したグラジエント条件

カラム	流量 (mL/min)	グラジエント	注入量 (μL)	マルチカラムサーモスタット (°C)	ダイオードアレイ検出器
Agilent ZORBAX SB-C18、 4.6 × 250 mm、5 μm (p/n 880975-902)	1.0	時間 (分) %B 0 1 60 13	10	25	254 nm、5 Hz
Agilent ZORBAX SB-C18、 3.0 × 150 mm、3.5 μm (p/n 863954-302)	0.6	時間 (分) %B 0 1 25 13	3	25	254 nm、10 Hz
Agilent ZORBAX RRHD SB-C18、 2.1 × 100 mm、1.8 μm (p/n 858700-902)	0.58	時間 (分) %B 0 1 8.6 13	1	25	254 nm、40 Hz

表 4. システム適合性の概要

パラメータ	リテンションタイム	分離能	ピーク面積
USP システム適合性の要件	O-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に対し、1.0と比較し 1.1 ~ 1.4 の間です。	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 との間の分離能、R は 20.0 以上です。	イオヘキソール関連化合物 C のピーク面積は、クロマトグラムのすべてのピークの総面積と比較し 0.5 ± 0.1 % です。
Agilent ZORBAX SB-C18、 4.6 × 250 mm、5 μm	20.25 ~ 25.78 分	51.1	0.55 %
Agilent ZORBAX SB-C18、 3.0 × 150 mm、3.5 μm	9.91 ~ 12.61 分	44.0	0.55 %
Agilent ZORBAX RRHD SB-C18、 2.1 × 100 mm、1.8 μm	3.34 ~ 4.25 分	40.7	0.56 %

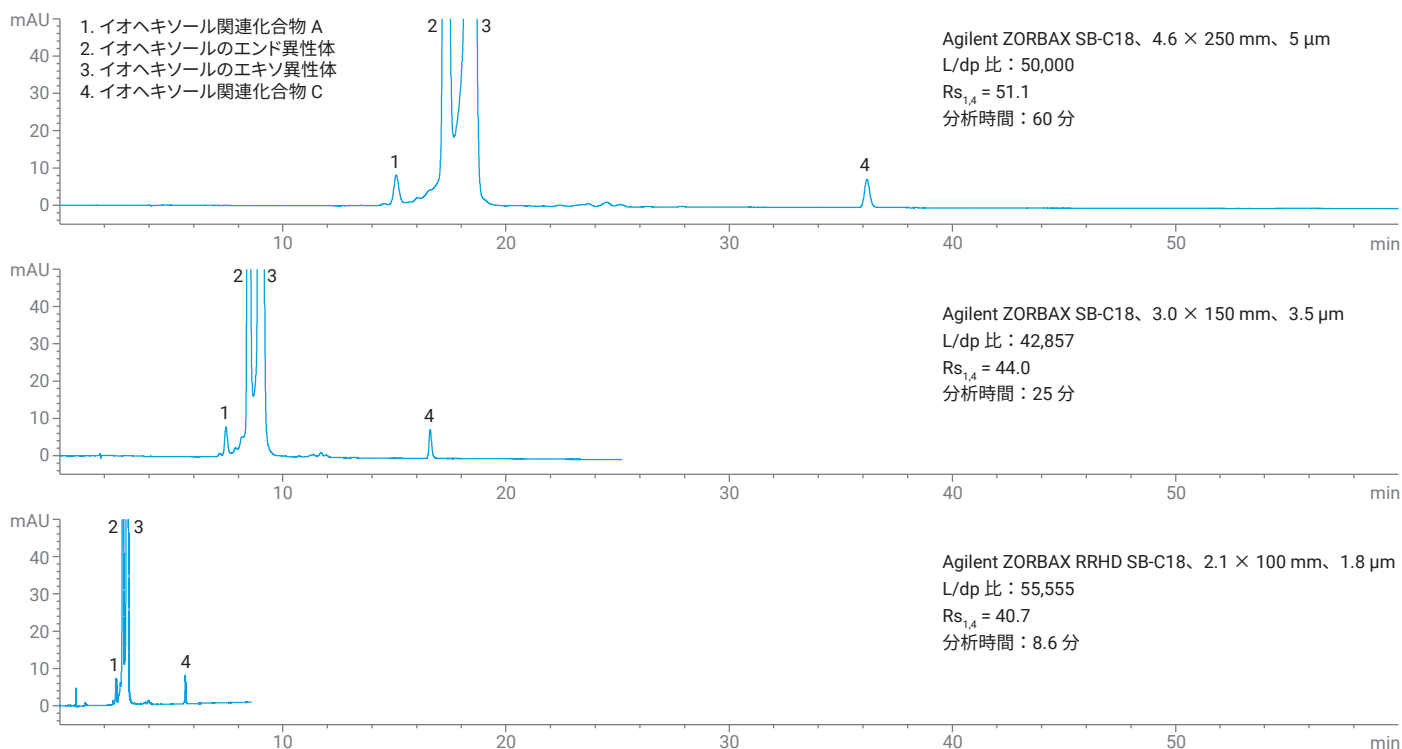


図 1. 粒子サイズの異なる 3 種類のカラムに使用した、イオヘキソール中の関連化合物の分析のためのシステム適合性溶液のクロマトグラム

結論

従来の 5 µm TPP カラムを使用したイオヘキソールの関連化合物分析の USP メソッドは、-25 % ~ 50 % の範囲の L/dp 比で、より小さい粒子サイズのカラムに移管できました。小さい粒子サイズの短いカラムを使用したメソッドでは、分析時間と移動相消費量を大幅に低減しつつ、同等以上の優れた結果を提供しました。このようなメソッドの調整は、メソッドの再バリデーションは不要で、新しく改訂された USP <621> ガイドラインに基づき許容可能です。

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. 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, publication number 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。

DE12524595

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, September 27, 2023

5994-6544JAJP