

マルチハートカット 2D-LC による 不純物分析のメソッド開発

Agilent 1290 Infinity 2D-LC ソリューション

アプリケーションノート

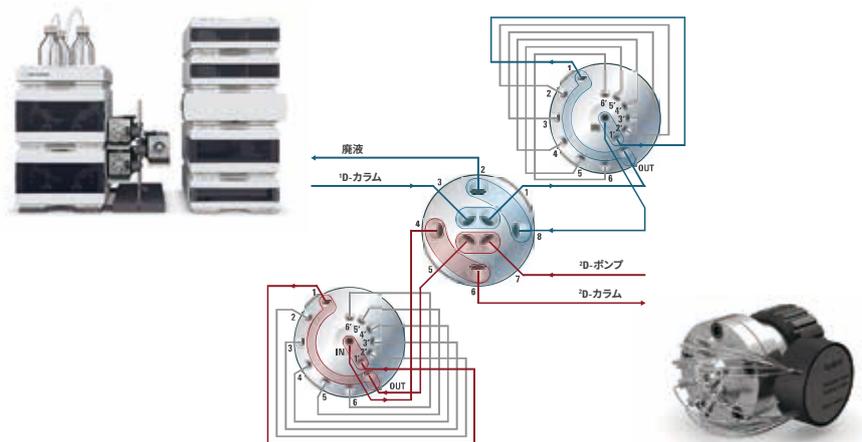
低分子医薬品およびジェネリック医薬品

著者

Sonja Krieger
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

概要

不純物の分析は、医薬品およびファインケミカル製品の開発および製造における最重要課題です。このアプリケーションノートでは、医薬品およびファインケミカル製品中の不純物を分析するためのメソッドの開発にマルチハートカット 2D-LC が最適であることを説明します。Agilent 1290 Infinity 2D-LC ソリューションを使用し、一次元目の分離で検出された各ピークをハートカットして異なる選択性を持つ二次元目に溶出液を送り分離しました。この手法により、共溶出する化合物を確実に発見することができました。さらに、サンプル溶液に疑わしい不純物をスパイクすることによって、不純物の同定を確認することができました。



Agilent Technologies

はじめに

医薬品およびケミカル製品業界において、医薬品およびファインケミカル製品に含まれる不純物の分析は最重要課題です。新しい原薬について、不純物が 0.05 % 以上含まれる場合は報告する義務があり、0.1 % 以上の場合は同定する必要があると ICH ガイドライン Q3A (R2) で定められています¹。

医薬品およびファインケミカル製品の不純物分析は、液体クロマトグラフィーにより原薬の濃縮溶液を分析することによって実現できます。医薬品およびファインケミカル製品中の不純物は、主要化合物および他の不純物との間に構造類似性を示すことがよくあります。このため、特定の選択性（カラムと溶媒の組み合わせ）を持つシステムを使用した場合、分離できないことがあります。この問題の解決策として、共溶出する成分をハートカットし、溶出液を選択性が異なる分離システムに送って分離するという方法があります。以前のアプリケーションノートで、Agilent 1290 Infinity 2D-LC ソリューションによるハートカット 2D-LC を使用して主要化合物と共溶出する不純物を分離できることを説明しました²。

不純物分析のメソッド開発では、すべての不純物を検出できること、主要化合物や他の不純物と共溶出したために隠されたままの不純物を残さないことが必要です。ハートカット 2D-LC はこの問題を確実に解決します。1290 Infinity 2D-LC ソリューションを使用すると、一次元目の分離から複数のピークをハートカットし、そのピーク分画を一時的にループに留め、次の二次元目で分析することができます。

このアプリケーションノートでは、代表的な医薬品化合物サンプルのマルチハートカット 2D-LC 分析を紹介します。一次元目の分離後に検出された各ピークをハートカットし二次元目の分離では異なる選択性で分析することによって、一次元目の分離で共溶出された可能性がある不純物を検出することができました。

実験方法

2D-LC メソッド

一次元目ポンプ	
溶媒 A	水 + 0.1 % ギ酸
溶媒 B	アセトニトリル + 0.1 % ギ酸
流量	0.2 mL/min
グラジエント	0 分 - B 5 % 20 分 - B 95 % 25 分 - B 95 %
ポストタイム	10 分
二次元目ポンプ	
溶媒 A	水 + 0.1 % ギ酸
溶媒 B	メタノール + 0.1 % ギ酸
流量	2.0 mL/min
グラジエントおよび グラジエントモジュレーション	B 10 % (0.00 分) - B 50 % (22.00 分) B 70 % (1.50 分) - B 95 % (22.00 分)
² D グラジエントストップタイム	1.50 分
² D サイクル時間	2.00 分
オートサンブラ	
注入量	2 µL
サンプル温度	6 °C
ニードル洗浄	メタノール/水 (50/50, v/v) で 10 秒
カラムコンパートメント	
一次元目カラム	30 °C (右側)
二次元目カラム	30 °C (左側)
マルチハートカット	
動作モード	<ul style="list-style-type: none">一次元目のリテンションタイムにもとづくハートカット (2D タイムセグメント) 設定により時間ベースのマルチハートカットを実行。不純物のハートカットをサンプリング時間 0.40 分で実行 (ループ充填の 200 %)。主要化合物のピークを含む領域で間隔を空けずに連続的に 3 回ハートカットを、0.10 分のサンプリング時間で実行 (ループ充填の 50 %)。
ダイオードアレイ検出器	
一次元目	波長 254 nm/4 nm、リファレンス波長 360 nm/100 nm 20 Hz データレート
二次元目	波長 254 nm/4 nm、リファレンス波長 360 nm/100 nm 80 Hz データレート

装置構成

マルチハートカット用の Agilent 1290 Infinity 2D-LC ソリューションを次のモジュールで構成しました。

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A、2 台)
- Agilent 1290 Infinity オートサンブラ (G4226A)、1290 Infinity サーモスタット (G1330B) 付き
- Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント (G1316C)
- Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A)、2 ポジション/4 ポート デュオバルブ (2D-LC バルブヘッド、G4236A) を搭載
- Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A、2 台)、40 μ L ループ付き マルチハートカットバルブ (G4242-64000、2 台) を搭載
- Agilent 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G4212、2 台)、光路長 10 mm の Max-Light カートリッジセル (G4212-60008) を搭載

ソフトウェア

Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition
ソフトウェア、バージョン C.01.07 [27]
Agilent 1290 Infinity 2D-LC Acquisition
ソフトウェア、バージョン A.01.02 [24]

カラム

- 一次元目: Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、2.1 \times 150 mm、1.8 μ m (部品番号 959759-902)
- 二次元目: Agilent Poroshell 120 Bonus-RP、4.6 \times 50 mm、2.7 μ m (部品番号 699968-901)

試薬

すべての溶媒は LC グレードを使用しました。アセトニトリルおよびメタノールは、Merck 社 (ドイツ、ダルムシュタット) から購入しました。超純水は、0.22 μ m メンブレンカートリッジを備えた Milli-Q Integral システム (Millipak、EMD Millipore 社、ベルリカ、マサチューセッツ州、米国) で精製しました。ギ酸 (FA) は Agilent から入手しました (部品番号 G2453-86060)。

サンプル

不純物を含む医薬品物質サンプルとして、N,N-ジエチル-*m*-トルアミド (DEET) のメタノール/水 (50/50、v/v) 溶液にいくつかの不純物を添加して作製しました。

結果と考察

医薬品およびファインケミカル製品の不純物分析のメソッド開発中、そのメソッドですべての不純物が主要化合物から分離されているか、相互間でも分離できているか、また、共溶出が起きていないかが重要な問題となります。図 1 は、C18-カラムを使用し、それぞれに 0.1 % のギ酸を含む水/アセトニトリルのグラジエントを適用した場合の一次元目の不純物の分析を示しています。拡大されたクロマトグラムでは、主要化合物と 2 つの不純物について部分的な共溶出を観察できます。部分的な共溶出の問題を解決し共溶出の可能性について各ピークを検査するために、各ピークをハートカットして溶出液を二次元目へ送り、異なる選択性で分離することができます。

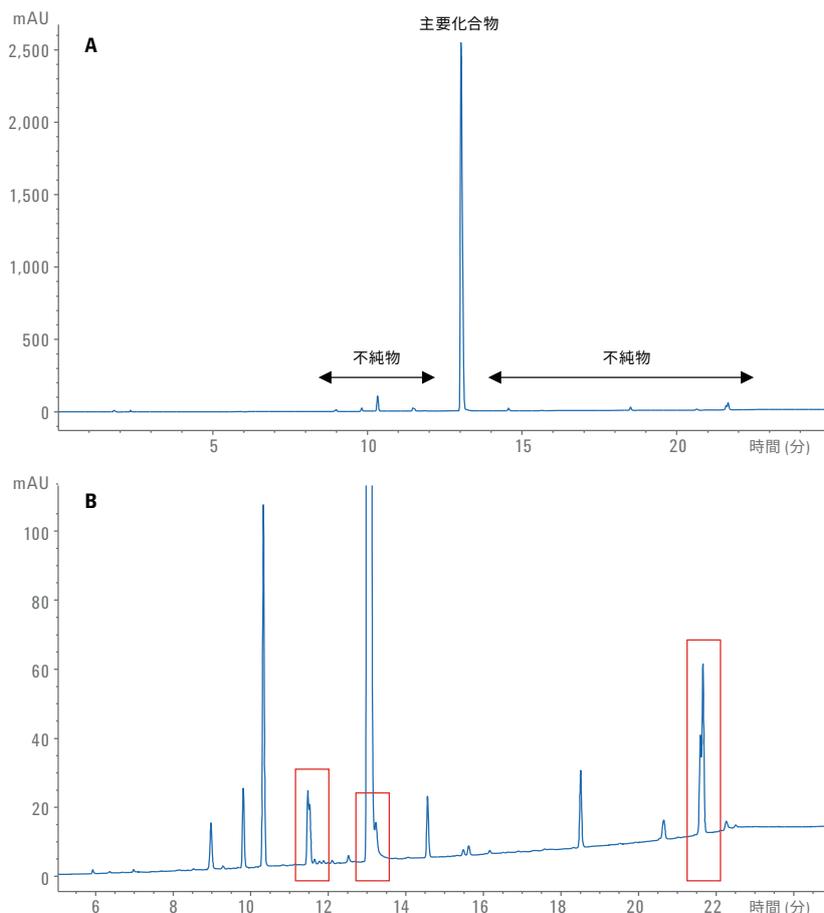


図 1. 2D-LC メソッドで一次元目の条件で実施した不純物分析。マークは部分的な共溶出部分。
(A) フルスケール、(B) 拡大図

図2のパネルAは、並流構成のセントラル 2D-LC バルブと2台のマルチハートカットバルブによるマルチハートカットの配管図を示しています。図2のパネルBは圧力テスト済みの40 μ L ループが取り付けられたマルチハートカットバルブを示しています。

マルチハートカットのアルゴリズムにより確実に、バルブ切り替えを最小限に抑え、一次元目の溶出液から採取されたハートカット分画を二次元目で可能な限り高速に分析できます。すべてのマルチハートカット 2D-LC 分析で、最初のハートカット分画が採取されてデッキ A (図2のAの右側のマルチハートカットバルブ) のループ1に留められます。次にセントラル 2D-LC バルブが切り替わり、最初のハートカット分画が二次元目で分析されます。最初のハートカット分画の二次元目での分析中、最大5個のハートカット分画が採取されデッキ B (図2のAの左側のマルチハートカットバルブ) のループ1から5に留められ、二次元目の分析まで保管されます。各デッキ (マルチハートカットバルブ) では、一次元目の溶出液と二次元目の溶媒のフロールーそれぞれに1本のループが常に必要です。最初のハートカット分画の二次元目での分析が終了し、セントラル 2D-LC バルブが再び切り替わると、最大5個のハートカット分画はデッキ A のループ1から5に保存され、デッキ B に保存されたハートカット分画は二次元目で分析されます。ハートカット分画のデッキでの保存中、フラッシュグラジエントの実行後、デッキに保存されたハートカット分画の分析が行われます。二次元目では保存の順とは逆の順序で分析されます。

マルチハートカットのアルゴリズムでは、一次元目の分析の実行中に、二次元目でハートカット分画の分析を開始できます。つまり、この手法では同一の分析中にハートカット用にループが再利用され、取り付けられているループの数よりも多くのハートカット溶出液を採取できます。マルチハートカットのアルゴリズム、動作ルーチン、ソフトウェアの機能の詳細については、技術概要に記載されています³。

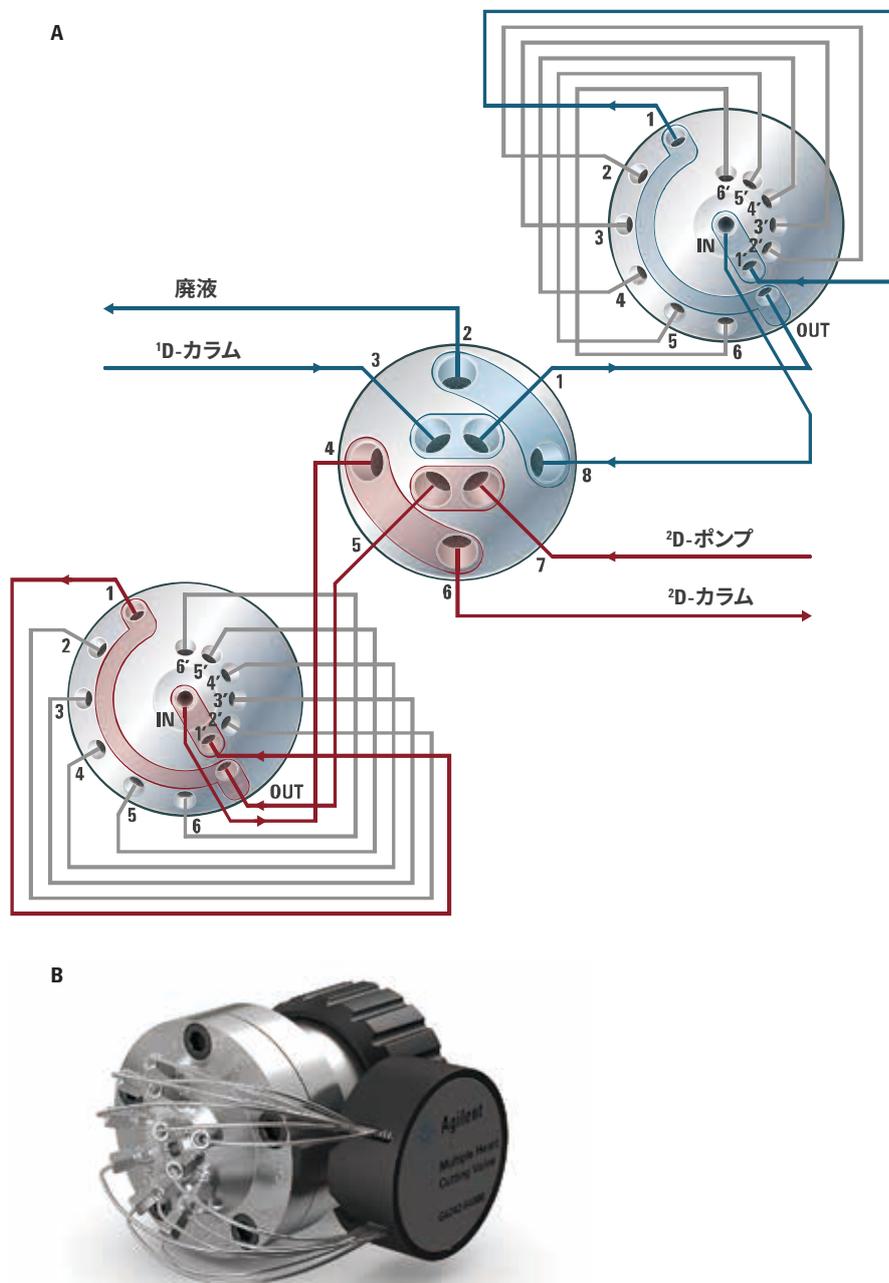


図2.A) 並流構成のセントラル 2D-LC バルブと2台のマルチハートカットバルブによるマルチハートカットの配管図。B) マルチハートカットバルブと取り付け済みループキャピラリー

マルチハートカットは、時間ベース (既知の一次元目の分離用などの特定のハートカット時間による) またはピークベース (既知のサンプル用などのために一次元目のピークの検出でトリガされたハートカットによる) で実行されます。図 1 に示す不純物分析では時間ベースのマルチハートカットを使用しました。共溶出されるサンプル成分が見つかるように、ハートカットして二次元目で分析する不純物を選択しました。さらに、主要化合物に由来するピーク部分では間隔を空けずに 3 つの連続したハートカットを行いました。

図 3 は、マルチハートカットのメソッドセットアップを示しています。グラジエントプレビューセクションでは、一次元目のリファレンスクロマトグラムをロードしてハートカットのタイムセグメントを自動生成できます。生成したタイムセグメントは 2D タイムセグメントテーブルで編集できます。また、ハートカットを手動で追加して関心領域をより詳細に調査することが可能です。不純物のハートカットについては、200 % のループ充填に相当する 0.40 分のサンプリング時間を選択しました (ループサイズ 40 μ L、一次元目の流量 0.20 mL/min)。過剰なループ充填のため、ループは一次元目の溶出液で完全に充填されました。グラジエントプレビューセクションの拡大部分は、最初の 4 つの不純物のハートカットのタイムセグメントを示しています。オレンジの領域はサンプリング時間を示し、特に濃いオレンジ色の領域は二次元目に送られた一次元目の溶出液の部分を予測して示しています。主要化合物のピークを含む領域では間隔を空けずに 3 つの連続したハートカットを実行するため、0.10 分のサンプリング時間 (ループ充填の 50 %) を選択しました。この方法で主要化合物のピークを含む一次元目の溶出液は消失されることなくサンプリングされました。

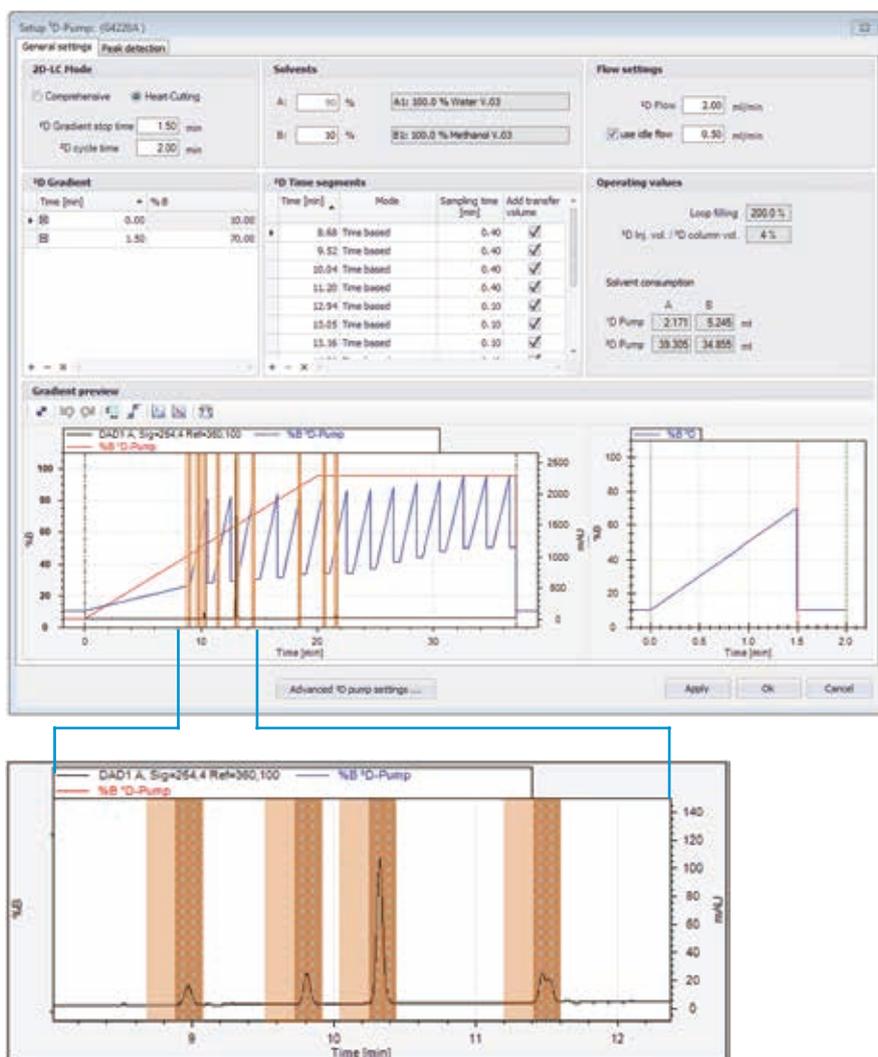


図 3. マルチハートカットのメソッドセットアップ

図 4 は、2D-LC ハートカットビューワに表示されたマルチハートカット 2D-LC による分析結果を示しています。上部 2 つのパネルには、ハートカットのマーク付きの一次元目のクロマトグラム (左) とハートカットテーブル (右) が示されています。下部の左側には、二次元目の検出器で記録されたままのクロマトグラムが示されています。ハートカットの二次元目の分析では保存された順とは逆の順序でハートカットの分析およびフラッシュグラジエント (F)

がリトレースされます。右側には、1 つの二次元目のクロマトグラムが重ね表示で表示されています。

図 5 は、不純物のハートカット分画の二次元目の分析から得られた結果を示しています。ハートカット 4 と 11 は、一次元目に一部が共溶出された化合物が二次元目に分離された可能性があります。

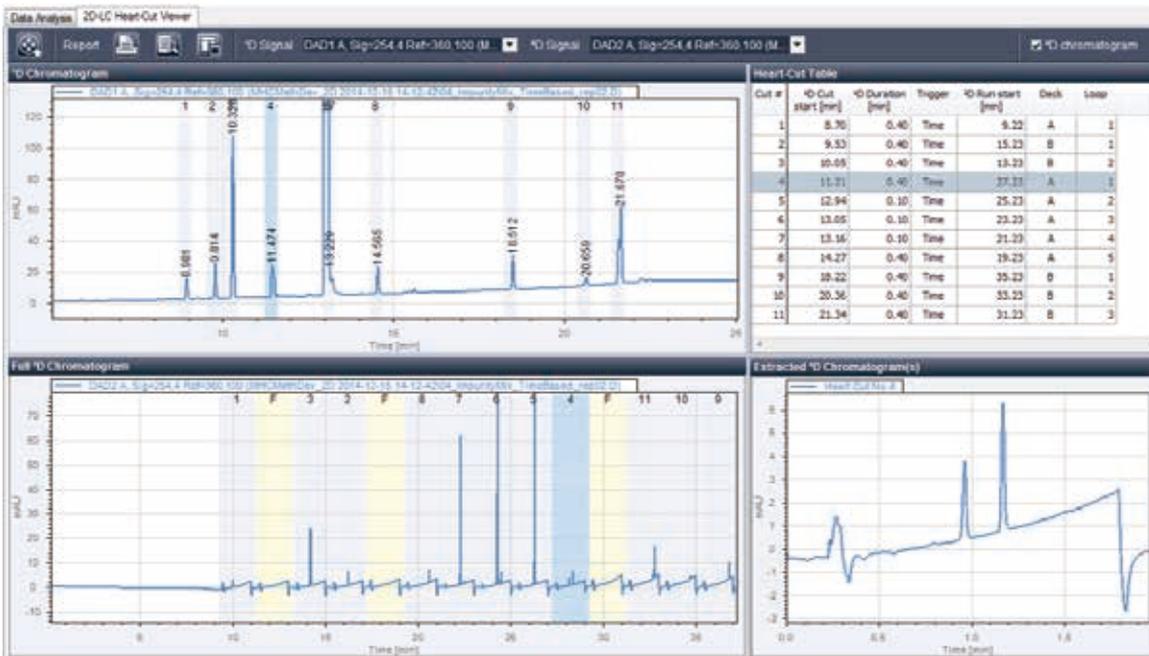


図 4. 2D-LC ハートカットビューワに表示されたマルチハートカット 2D-LC による分析結果

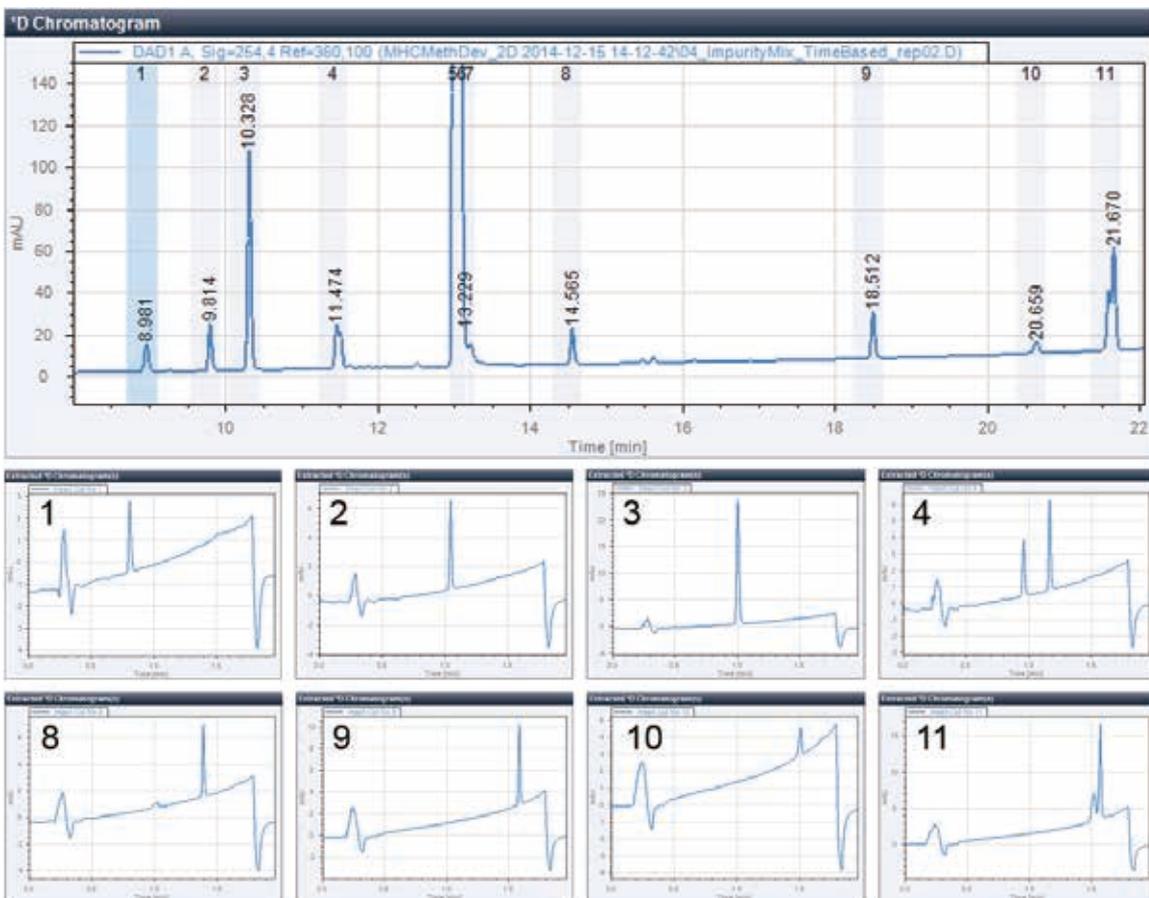


図 5. 不純物の二次元目の分析結果。上のパネル: 一次元目のクロマトグラムとハートカットマーク。下のパネル: 二次元目のクロマトグラム

図6は、主要化合物のピーク領域で間隔を空けずに連続的にハートカットした3分画の二次元目の分析結果を示しています。全体として、二次元目の分析から、主要化合物と3種類の不純物の共溶出が明らかになりました。1つ目の不純物は、主要化合物のピーク全体を含む領域から検出することができます(ハートカット5から7)。2つ目の不純物は、ハートカット6と7に現れ、3つ目の不純物は一次元目の主要化合物の一部で共溶出し、ハートカット7で分離されています。

不純物の同定を確認するために、不純物の分析中に疑わしい化合物を合成してサンプルにスパイクすることができます。例証するために、主要化合物と一次元目に共溶出される不純物とともにサンプル溶液をスパイクして、二次元目で主要化合物から分離しました。図7は、不純物の量を増やしながらかスパイクしたサンプル溶液の分析結果を示しています。ハートカット後、二次元目の分析で徐々に増えた不純物の量を検出することができました。マルチハートカット 2D-LC は、技術概要に記載されているように、信頼できる定量に必要な直線性と再現性を提供します³。

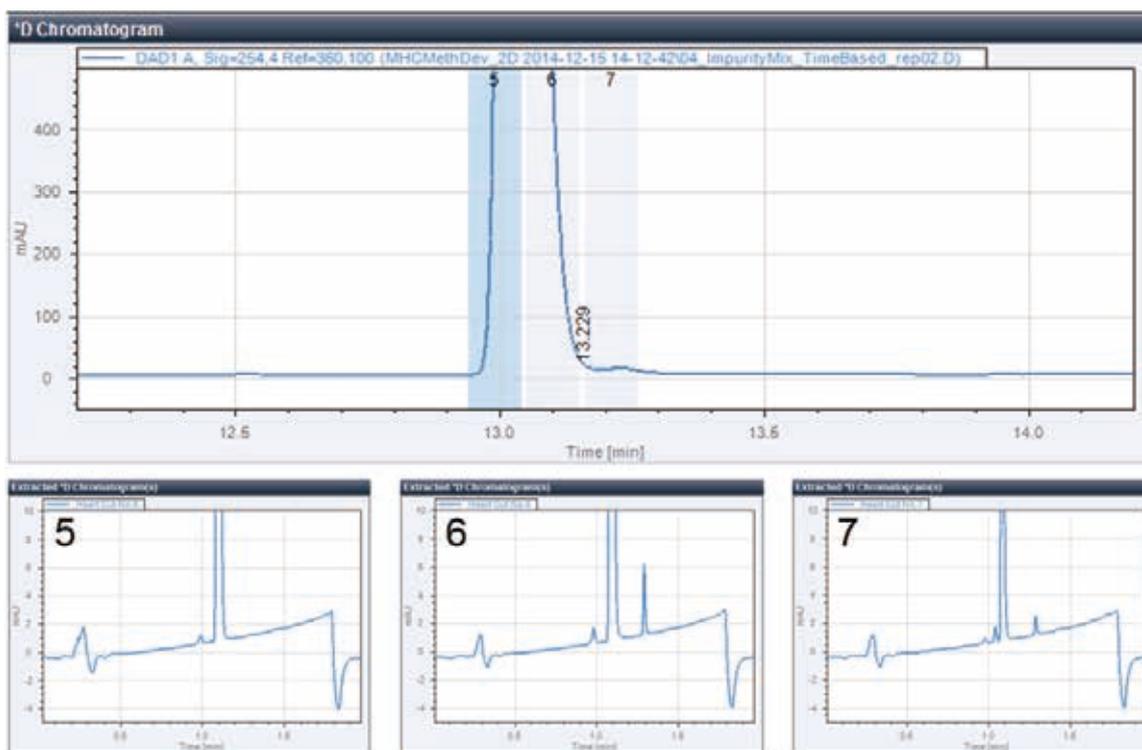


図6. 主要化合物の二次元目の分析結果。上のパネル: 一次元目のクロマトグラムとハートカットマーク。下のパネル: 二次元目のクロマトグラム

結論

マルチハートカット Agilent 1290 Infinity 2D-LC は、一次元目の分離で得られた複数のピークをハートカットして、選択性が異なる二次元目の分離にハートカット分画を送ることができます。このアプリケーションノートでは、マルチハートカット 2D-LC が医薬品やファインケミカル製品および医薬製剤や化学製剤の不純物分析のメソッド開発に最適なソリューションであることが実証されました。一次元目の分離後に検出されたピークを二次元目の分離に移すことにより、隠れている可能性のある化合物の共溶出を明らかにできます。

参考文献

1. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH harmonized tripartite guideline, Impurities in new drug substances (Q3A(R2)), October 25, **2006**.
2. Naegele, E., Detection of Impurities by Heart-Cutting using the Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-0834EN, **2012**.
3. Buckenmaier, S., Multiple Heart-Cutting with the Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution, *Agilent Technologies Technical Overview*, publication number 5991-5615EN, **2015**.

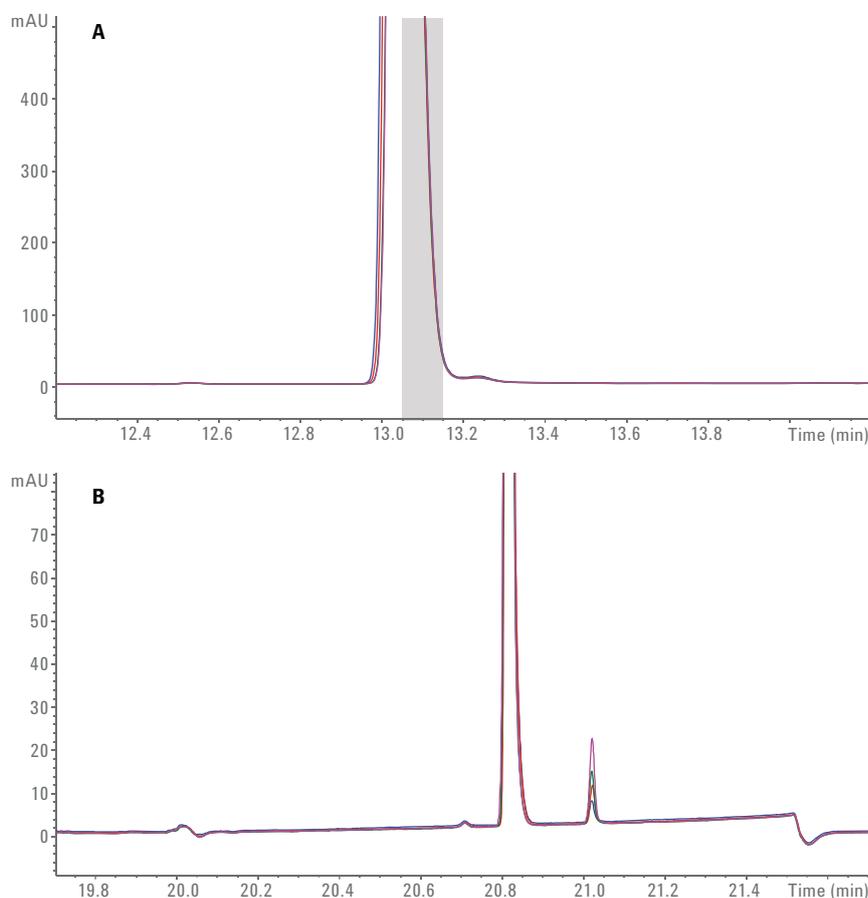


図 7. 不純物の量を徐々に増やした (最初の量の 2 倍、3 倍、4 倍) 場合のサンプルの分析結果。

A) 一次元目のクロマトグラムの重ね表示とハートカットマーク。B) 二次元目のクロマトグラムの重ね表示

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2015

Printed in Japan, June 1, 2015

5991-5643JAJP



Agilent Technologies