



Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD 不純物分析ソリューションを用いた合剤の不純物分析

アプリケーションノート

低分子医薬品

著者

Sonja Schneider
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

概要

Agilent 1290 Infinity II ハイダイナミックレンジダイオードアレイ検出器 (HDR-DAD) 不純物分析ソリューションは、UV 検出器の直線性範囲を拡大させるために、光路長の異なる Max-Light カートリッジセルを備えた 2 台のダイオードアレイ検出器のシグナルを組み合わせています。このソリューションは、UV 検出器の直線性範囲内で主成分と微量成分の検出および定量を 1 回の分析で可能にします。10 mm のフローセルを備えた 1 台の DAD による低用量、高用量および微量化合物の分析では、一般的に異なる注入量による 2 回の注入が必要とされます。このアプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD 不純物分析ソリューションを用いることで、合剤中の含有量の大きく異なる有効成分と微量不純物の定量が 1 回の注入で十分であることが示されています。



Agilent Technologies

はじめに

合剤は様々な疾患パターンの薬物療法で使用されています。有効成分の含有量は、目的の生理学的効果に応じて変化します。高用量や低用量の成分が組み合わされた場合、従来のダイオードアレイ検出 HPLC および UHPLC を用いた分析は、少なくとも 2 回の注入を必要とします。これは、検出器の直線性範囲内で全ての化合物を定量し、微量成分については信頼性の高い積分や定量を保証するためです。

このアプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD 不純物分析ソリューションが、高用量および低用量の有効成分ならびにそれらの不純物を、UV 検出器の直線性範囲内で高感度に一回の分析で分析できることを示しています。

実験

装置構成

Agilent 1290 Infinity II LC を使用しました。構成は以下のとおりです。

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ G7120A
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ G7167B
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット G7116B
- Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 x 2 G7117B (3.7 mm、10 mm、60 mm の Max-Light カートリッジセル)

カラム

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 × 100 mm、5 µm (p/n 959996-902)

ソフトウェア

LC、LC/MS システム用 Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition バージョン C.01.07 [27]

溶媒および試料

溶媒 A

0.1 % TFA 溶液

溶媒 B

0.09 % TFA/アセトニトリル

試料

以下の成分の合剤を用いました。1 対 80 の Paracetamol と chlorphenamine、vitamin C、caffeine と少量の未知の不純物 (図 1)

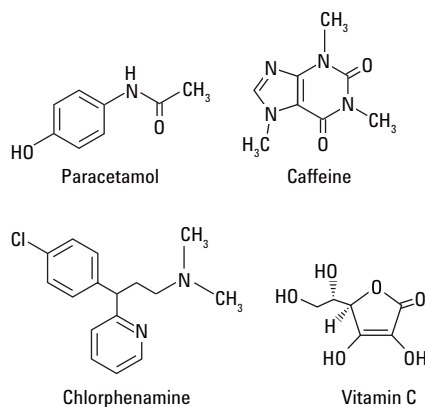


図 1. 合剤の成分: vitamin C、Paracetamol、caffeine、chlorphenamine

全ての溶媒は LC グレードを使用しました。水は 0.22 µm のフィルタ (Millipak) を付けた Milli-Q システムで処理した純水を使用しました。合剤は薬局で購入しました。

試料調製

- 2 つのカプセルの風邪薬を開け、蒸留水 20 mL に溶解。
- 5 分間、超音波抽出。
- 0.45 µm、15 mm の Agilent Premium Syringe Filter Nylon (p/n 5190-5091) でろ過。
- ろ液を 1.5 mL の LC バイアルに保存。各化合物は下記濃度で含まれます。

- 250 ng/µL chlorphenamine
- 20,000 ng/µL paracetamol
- 2,500 ng/µL caffeine
- 15,000 ng/µL vitamin C

表 1. クロマトグラフィー条件

パラメータ	値
移動相	A) 水 + 0.1 % TFA B) アセトニトリル + 0.09 % TFA
流量	1 mL/min
グラジエント	0 分 – 5 %B 0.5 分 – 5 %B 6.1 分 – 40 %B 6.5 分 – 95 %B
ストップタイム	8 分
ポストタイム	5 分
注入量	1 µL および 5 µL、10-mm フローセル 5 µL、HDR DAD
カラム温度	40 °C
波長	254/20 nm、リファレンス 380/80 nm ピーク幅 > 0.025 分 (0.5-秒レスポンスタイム) (10 Hz)

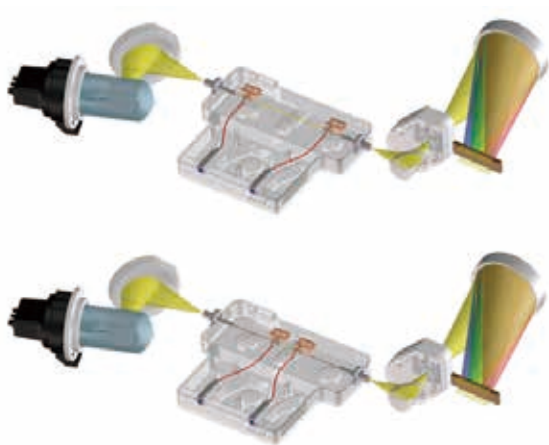
5. 水で 20 倍に希釈。
- 12.5 ng/μL chlorphenamine
 - 1,000 ng/μL paracetamol
 - 125 ng/μL caffeine
 - 750 ng/μL vitamin C
6. この溶液を試料としました。

Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD 不純物分析ソリューションの原理

Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD 不純物分析ソリューションは、10 mm の Max-Light カートリッジセルを備えた 1290 Infinity II DAD (265 nm で 2.0 AU) よりも 3 倍以上広い直線性範囲 (265 nm で 6.7 AU) を提供しています。光路長の異なる Max-Light カートリッジセルを備えた 2 つのダイオードアレイ検出器のシグナルを組み合わせることで、HDR 検出ソリューションは一回の分析で濃度が著しく異なった成分を検出し定量することができます (図 2)。一台目の 1290 Infinity II DAD は低濃度の化合物を分析するために 60 mm の光路長のセルを使用し、二台目の 1290 Infinity II DAD は高濃度の化合物を分析するために 3.7 mm のセルを使用しています。60 mm のセルは、3.7 mm のセルより先に接続する必要があります。出力シグナルは組み合わせられ、光路長 10 mm の信号に正規化されます。

ハイダイナミックレンジ (HDR) ツールは、機器構成の中で設定します。2 台の DAD はクラスター化され、検出器間を接続しているキャピラリーのディレイボリウムが入力されています。ユーザーインターフェースでは、2 台の DAD は一つの DAD として表示されています (図 3)。

低濃度化合物分析用の光路長 60 mm の検出器 1



高濃度化合物分析用の光路長 3.7 mm の検出器 2

図 2. 異なるセルの Agilent 1290 Infinity II DAD

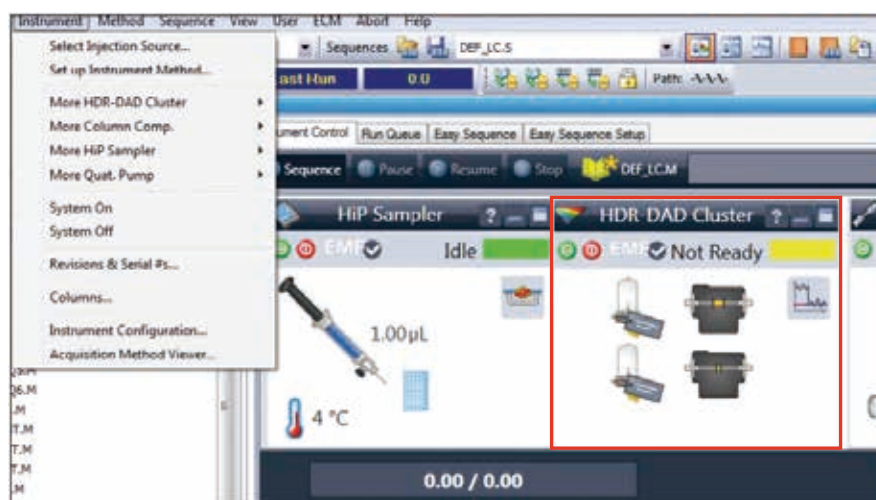


図 3. Agilent ChemStation ソフトウェアでの HDR ツール設定画面

結果と考察

1290 Infinity II DAD と 1290 Infinity II HDR-DAD 不純物分析ソリューションのパフォーマンスの違いを評価するために、以下の実験を行いました。

- 1290 Infinity II DAD と 10 mm の Max-Light カートリッジセルを用いた合剤の分析。高用量と低用量の有効成分と微量成分を分析するために、1 μL と 5 μL の 2 回注入を行いました。
- 1290 Infinity II HDR-DAD 不純物分析ソリューションを用いた合剤の分析。6.7 AU の直線性範囲以内で定量値可能な高用量と低用量の有効成分と微量成分を分析するために、5 μL の一回注入を行いました。

最初の実験では、1290 Infinity II DAD と 10 mm の Max-Light カートリッジセルを用いました。2 回注入が直線性範囲以内で全ての化合物と微量な不純物を分析するためには、2 回の注入が必要でした (図 4、5)。vitamin C、paracetamol、caffeine は、1 μL 注入によって分析しました。

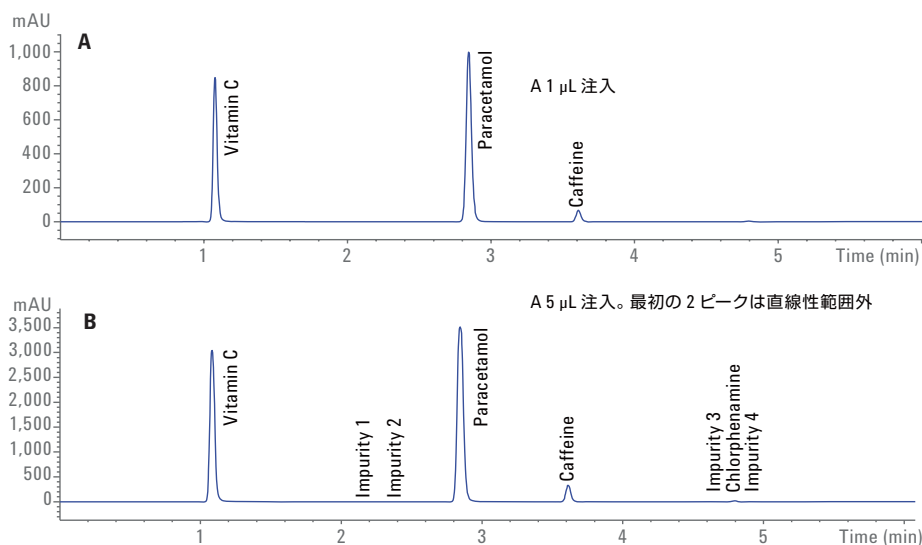


図 4. 1290 Infinity II DAD と 10 mm の Max-Light カートリッジセルを用いた、異なる注入量による合剤のクロマトグラム

最大のピークの高さは約 1000 mAU であり、これは 1290 Infinity II DAD の直線性範囲内でした。他の化合物は 5 μL の注入によって分析しましたが、vitamin C と paracetamol は 3000 および 3500 mAU のピークの高さになるため、直線性範囲外になりました。

図 5 は 1290 Infinity II DAD を使用した 1 μL (赤) と 5 μL (青) の注入の拡大図です。5 μL 注入では、chlorphenamine と微量成分を確実に同定し分析することが可能でした。Chlorphenamine は 1 μL の注入ではピークの高さは 3.8 mAU でしたが、5 μL の注入では約 19 mAU でした。

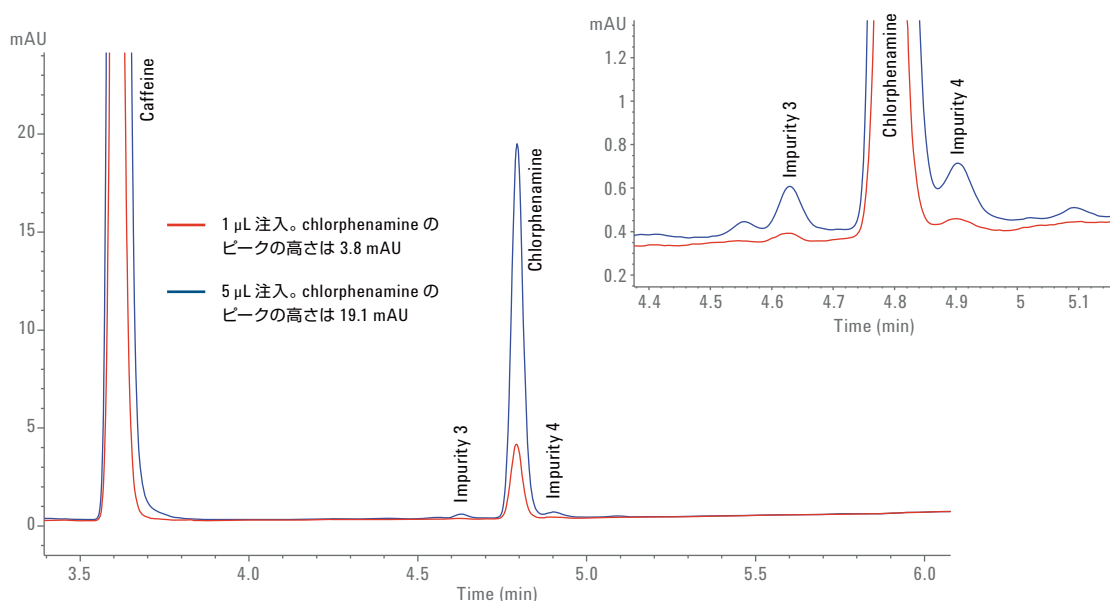


図 5. 1290 Infinity II DAD と 10 mm の Max-Light カートリッジセルを用いた、1 μL 注入 (赤) と 5 μL 注入 (青) による合剤の分析結果

このやり方は、積分が容易であり、結果としてより信頼できる定量が保証されます。不純物 3 と 4 は 5 μ L の注入のみで分析でき、不純物 1 と 2 はクロマトグラムの早い時間に溶出しています。

二つ目の実験では、1290 Infinity II HDR-DAD 不純物分析ソリューションを用いて合剤の試料 5 μ L を注入しました。図 6 は 5 μ L 注入の 1290 Infinity II DAD のシグナル (赤) と 1290 Infinity II HDR-DAD のシグナル (青) の重ね合わせです。1290 Infinity II HDR-DAD では、全てのピークが直線範囲に入っているため正確に定量することができます。一方、10 mm の Max-Light カートリッジセルを用いた vitamin C、paracetamol のシグナルは飽和しています。1290 Infinity II HDR-DAD のシグナルは 4350 mAU に達していますが、直線性範囲内 (約 6700 mAU) です。結果として、vitamin C、paracetamol、caffeine のシグナルは飽和しないため、問題なく定量することができました。

図 7 は、従来の方法と 1290 Infinity II HDR-DAD の 5 μ L 注入のクロマトグラムの拡大図です。予想通り、1290 Infinity II HDR-DAD のシグナルは高用量の化合物の分析と同時に chlorphenamine と不純物 1 ~ 4 の検出が可能でした。

1290 Infinity II DAD と 1290 Infinity II HDR-DAD ソリューションによる化合物のシグナルノイズ比 (S/N)=3 の検出下限値 (LOD) を評価しました (表 2)。1290 Infinity II HDR-DAD の検出下限値は 1290 Infinity II DAD よりも約 30 % ~ 50 % 低くなりました。

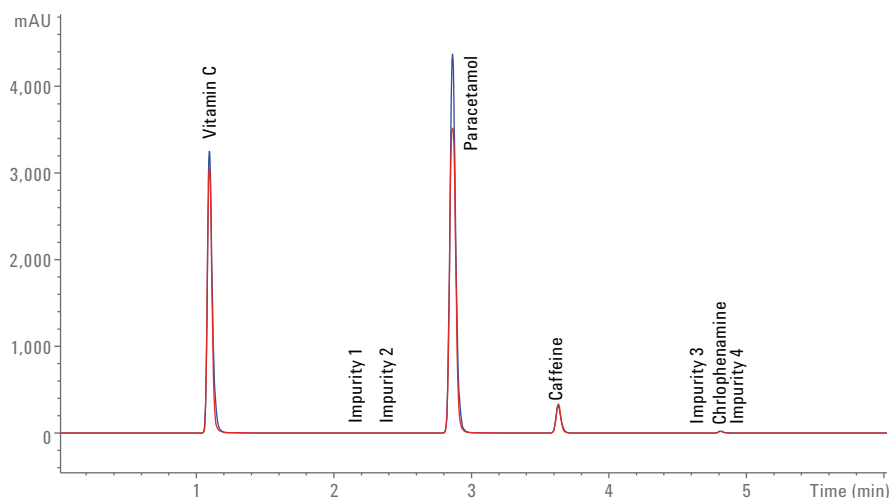


図 6. 5 μ L 注入の 1290 Infinity II DAD のシグナル (赤) と 1290 Infinity II HDR-DAD のシグナル (青) の重ね合わせ

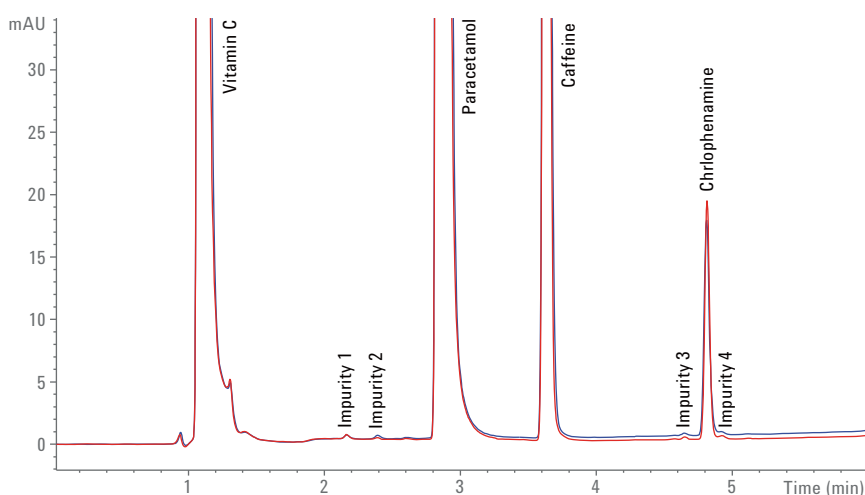


図 7. 5 μ L 注入の 1290 Infinity II DAD のシグナル (赤) と 1290 Infinity II HDR-DAD のシグナル (青) の拡大図

表 2. 検出下限値

	Agilent 1290 Infinity II DAD LOD (pg オンカラム)	Agilent 1290 Infinity II HDR DAD LOD (pg オンカラム)	改善度 %
Vitamin C	44.8	26.6	40
Paracetamol	51.5	26.4	49
Caffeine	67.5	47.2	30
Chlorphenamine	118.5	84.4	29

結論

Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD 不純物分析ソリューションでは、一回の測定で合剤中に存在している低用量と高用量の有効成分と微量の不純物の分析が可能です。1290 Infinity II DAD と 10 mm の Max-Light カートリッジセルを用いて全ての化合物を完全に分析するため、高用量の有効成分のシグナルが飽和することを避けるために、異なる注入量で二回分析しなければなりません。

加えて、1290 Infinity II DAD と比較して 1290 Infinity II HDR-DAD ではより低い検出下限値が得られました。1290 Infinity II HDR-DAD を用いると chlorphenamine の検出下限値は 30 % も低くなりました。

www.agilent.com/chem

This information is subject to change without notice.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
Published in Japan, May 1, 2015
5991-5743JAJP



Agilent Technologies