

高速液体クロマトグラフィーと ダイオードアレイ検出器 (DAD) による Tween 80 の分析

著者

Jianxin Yu, Scott Citrowske,
Nikki Carlson, and
Jacob Strange
Abbott Laboratories,
Saint Paul, MN 55117

John Rhoads
Agilent Technologies, Inc.

概要

Tween 80 は、医薬品中の安定化賦形剤や、組織治療用の抗石灰化剤として一般的に用いられています。ただし、Tween 80 は不均一な混合物で適切な発色団が存在しないため、定量が困難です。この研究では、Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムとダイオードアレイ検出器 (DAD) によるマックスプロットを用いて、0.02 M リン酸緩衝液中の Tween 80 を分析するための、シンプルな高速液体クロマトグラフィー (HPLC) メソッドを開発しました。定量は、Tween 80 の溶出領域内のピークの合計ピーク面積に基づいて実施しています。精度、真度、直線性、および定量下限/検出下限に関する実験により、メソッドの評価において良好な結果が得られました。このメソッドは、Tween 80 を含有するさまざまな水溶液の品質管理と安定性モニタリングに適用できる可能性があります。

はじめに

Tween 80 はポリソルベート 80 とも呼ばれており、医薬品、食品、化粧品、ビタミン、ワクチン、静脈内投与製剤、ローション、および石鹸内で広く用いられている一般的な非イオン性界面活性剤、乳化剤、安定化剤、および可溶化剤です。タンパク質製剤中に存在する Tween 80 およびその他のポリソルベートは、表面への吸着を最小限に抑え、タンパク質が変性する割合を低減し、医薬品の溶解性と安定性を向上させることができます。また Tween 80 は、グルタルアルデヒド処理前後の組織 (固定) 治療で使用する場合、組織心臓弁用に調製した組織の抗石灰化剤として機能することもできます¹。Tween 80 にはこのような重要な役割があるため、製品の品質を保証するための定量を正確に実施する必要があります。

Tween 80 は脂肪酸の部分エステルの混合物であり、主にオレイン酸、さらにソルビトールとその無水物から構成されていますが、ソルビトールおよびソルビタン無水物の各モルが約 20 モルのエチレンオキシドによりエトキシ化されています。図 1 に Tween 80 の分子構造を示します。巨大分子化合物であるポリソルベートは、不均一な混合物で UV 吸収が存在しないため、定量が困難です。これまで、ポリソルベート 80 を定量するための複数のメソッドが文献で発表されました。オレイン酸への加水分解など、ポリソルベート 80 の化学的転換に基づいた間接的なメソッドが報告されています^{2,3}。これらのメソッドは煩雑で時間がかかるものであり、温度が 40 °C から 60 °C に上昇する間の消化に 6 ~ 18 時間を要します。蒸発光散乱検出器 (ELSD)⁴⁻⁶、荷電化粒子検出器 (CAD)⁷、質量分析 (MS)⁸ などの異なる検出手法と HPLC 分離を組み合わせる、Tween 80 分析用の直接的メソッドがいくつか開発されてきました。定量の際、分離せずに単一のクロマトグラフィーピークを

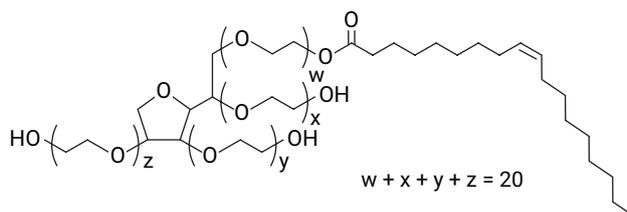


図 1. Tween 80 の分子構造

用いることを試みた研究者もいました⁴⁹。これらのメソッドは複雑な機器が必要になる場合や、Tween 80 溶液の安定性のモニタリングには使用できない場合があります。

この研究では、水溶液中の Tween 80 を測定するために、Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムとダイオードアレイ検出器を組み合わせた逆相 HPLC 分離によるシンプルで高速なメソッドを採用しています。リン酸緩衝液中の Tween 80 を測定するメソッドの適合性に関しては、特異性、直線性、精度、感度、および真度を試験することにより評価されてきました。HPLC 分析の場合、ダイオードアレイ検出器は ELSD、CAD、および質量選択検出器よりも一般的に使用されているため、このメソッドは 1 つの選択肢ともいえます。

実験方法

試薬と機器

Tween 80 標準は、米国薬局方協会 (ロックビル、メリーランド州) から入手しました。Fisher Chemical (フェアローン、ニュージャージー州) から入手した Tween 80 は、Tween 80 サンプルの調製に使用しました。アセトニトリル (HPLC グレード)、リン酸ナトリウム一塩基二水和物 (認定済み結晶)、リン酸ナトリウム二塩基二水和物 (認定済み結晶)、およびリン酸 (> 85 %) は Fisher Chemical から購入しました。水は、Milli Q 純水生成装置 (Millipore、ベッドフォード、マサチューセッツ州) で調製しました。

Tween 80 サンプルは、HPLC システムをダイオードアレイ検出器 (DAD) と組み合わせることで分析しました。Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラム、3.0 × 100 mm、2.7 μm (p/n 695975-302A) (Agilent Technologies、サンタクララ、カリフォルニア州) を使用して、Tween 80 のピークを溶出しました。DAD の分離能を 1.2 nm に設定し、波長 195 ~ 400 nm をスキャンしました。定量用として、マックスプロットのデータを収集しました。サンプル量 20 μL を、イソクラティック移動相を使用して注入しました。この移動相は、移動相 A: 0.1 % リン酸水溶液、および移動相 B: 0.1 % リン酸アセトニトリル溶液を一定比率 A:B 20:80 で構成しました。分析全体を通して、カラムは 30 °C、移動相の流量は 0.4 mL/min に維持しました。

結果と考察

分析の最適化

HPLC C18 カラムのような HPLC カラムと移動相には推奨されてきた条件があり⁴、これは、水/メタノールの比率 70:30 を 4 分で水/エタノール 10:90 に変更するグラジエントを適用するものです⁴。Tween 80 では、1 つのピークも完全な溶出も観察されませんでした。上述の InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムと DAD によるマックスプロットを使用する現行の条件は、リン酸緩衝液中の Tween 80 の濃度を分析するための高速で比較的シンプルな手法となりました。

マックスプロットクロマトグラムは、各タイムポイントでの最大スペクトル吸光度測定値をプロットすることにより生成しました。マックスプロットクロマトグラムを使用すると、 λ_{max} (最大吸光度での波長) に関係なく、サンプル中のすべてのクロマトグラフィーピークを確認できます。図 2 に、0.02 M リン酸緩衝液中の USP Tween 80 標準のマックスプロットクロマトグラムを示します。

Tween 80 の UV 吸光が微弱であるため、固定単一波長による Tween 80 の分析は制限されました。M. Klein; et al.¹⁰ は Tween 80 を分析するために、ゲルろ過クロマトグラフィー (GFC) カラムと 245 nm での UV を使用しました。ただ、Klein のメソッドでは感度が低くなりました。今回は DAD データから 245 nm でのクロマトグラムを抽出することを試みましたが、驚くべきクロマトグラムが得られました。図 3 は、Tween 80 サンプルのマックスプロットとその 245 nm で抽出したクロマトグラムを比較して示しています。245 nm で抽出したクロマトグラムは、元のマックスプロットクロマトグラムよりも得られたピークが少数であり、マックスプロットクロマトグラム内のすべてのピークは 245 nm で微弱な UV 吸光を示していました。Tween 80 の分析で DAD によるマックスプロットが適切な手法であることは明らかです。

マックスプロットクロマトグラム内の 1 つのピークまたは 1 つのピークグループが、Tween 80 の定量に使用できるのかという疑問があります。USP Tween 80 標準と Fisher Tween 80 から調製した 10 mg/mL の Tween 80 溶液を比較しました。それぞれのマックスプロットクロマトグラムを図 2 と 3A に示しています。Tween 80 の濃度は、USP Tween 80 の 10.033 mg/mL と Fisher Tween 80 の 10.145 mg/mL で類似していたにもかかわらず、クロマトグラムでは同様のリテンションタイムでさまざまな強度のピークが得られています。

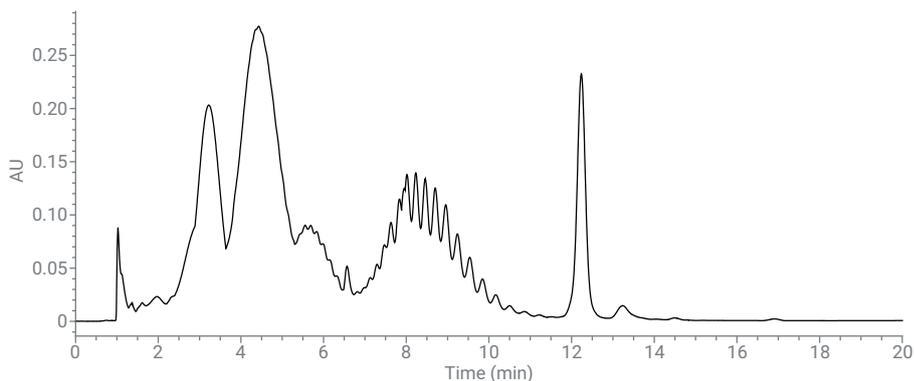


図 2. 195 ~ 400 nm のマックスプロットで得られた 0.02 M リン酸緩衝液中の 10 mg/mL の USP Tween 80 標準のクロマトグラム

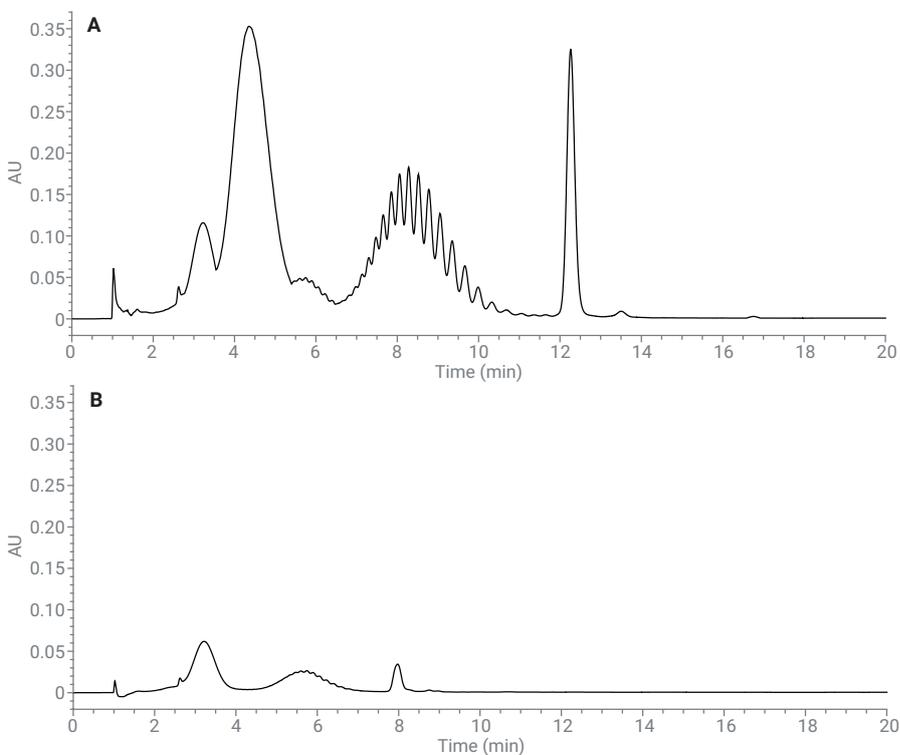


図 3. 0.02 M リン酸緩衝液中の 10 mg/mL (スケールは同じ) の Tween 80 サンプルに対するマックスプロット (A) とその 245 nm で抽出したクロマトグラム (B) の比較

表1は、1つのクロマトグラムを5つのピークグループに分割した場合の各グループにおける合計ピーク面積の比率を示しています。

- **グループ1:** 1.8～3.7分
- **グループ2:** 3.7～5.3分
- **グループ3:** 5.3～6.8分
- **グループ4:** 6.8～11.6分
- **グループ5:** 11.6～14.2分

同様のリテンションタイムグループにおける2つのTween 80物質間の比率は0.99 (10.033/10.145)とは異なっていますが、これは個別グループのピークではTween 80の全混合物を表せないことを示しています。1.8～14.2分の合計ピーク面積も比較したところ、得られた比率は0.98～0.99であり、これは2つの溶液のTween 80の濃度の比率に非常に近い値です。つまり、このメソッドでTween 80を定量する場合は、1.8～14.2分のピークの合計ピーク面積を使用する必要があります。

リン酸緩衝液中の Tween 80 の分析

組織治療に使用される0.02 M リン酸緩衝液中の Tween 80 の測定について、提案した分析メソッドを評価しました。評価したパラメータは、直線性、特異性、真度、精度、および定量下限 (LOQ) です。

直線性: 応答の直線性は、0.02 M リン酸緩衝液で調製した Tween 80 標準溶液を注入することにより評価しました。分析した Tween 80 の濃度は、理論上のターゲット Tween 80 含有量の 10～200 % でした (ターゲット = 10 mg/mL であるため、範囲 = 1～20 mg/mL)。Tween 80 の濃度 (1.0、2.5、5.0、10、15、および 20 mg/mL) に対する各標準溶液のすべてのピーク面積の合計を、直線回帰によりプロットしました。線形方程式は $y = (4.57 \times 10^6)x + (6.06 \times 10^5)$ で、相関

係数は $R^2 = 0.999951$ でした (詳細については、図4を参照)。低濃度から高濃度までの個別の濃度における偏差 (%) は、～3.8、～1.0、0.2、0.4、0.8、および～0.5 % でした。この直線性に関する結果より、0.02 M リン酸緩衝液中の範囲 1～20 mg/mL の Tween 80 に対して、このメソッドが優れた直線性を示していることがわかります。

表1. 各ピークグループの合計ピーク面積の比率

ピークグループ	USP/Fisher Tween 80 のピーク面積の比率					% RSD
	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	
グループ1 (1.8～3.7分)	1.94	1.95	1.98	1.97	1.97	0.9%
グループ2 (3.7～5.3分)	0.79	0.80	0.79	0.79	0.80	0.7%
グループ3 (5.3～6.8分)	2.23	2.19	2.21	2.19	2.19	0.9%
グループ4 (6.8～11.6分)	0.81	0.82	0.82	0.80	0.82	1.1%
グループ5 (11.6～14.2分)	0.77	0.78	0.77	0.75	0.77	1.1%
ピーク面積の合計 (1.8～14.2分)	0.98	0.99	0.99	0.98	0.99	0.6%

10.033 mg/mL の USP Tween 80 と 10.145 mg/mL の Fisher Tween 80 のそれぞれを含有する2つの溶液。濃度の比率は0.99

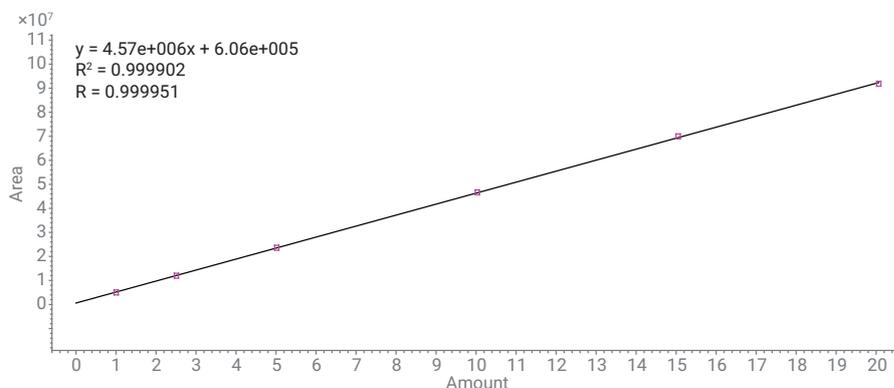


図4. 線形プロットと方程式

真度: 真度は、0.02 M リン酸緩衝液中の Tween 80 ターゲット濃度 10 mg/mL に対して、約 10 % (低)、100 % (中)、および 160 % (高) で調製した Tween 80 試験溶液を分析することにより評価しました。表 2 は、各濃度の繰り返し測定における測定量と調製量、回収率 (%)、平均回収率、および %RSD を示しています。この結果は、低、中、および高濃度での %RSD (n = 3) がそれぞれ 11、1、および 1 %であることを示しています。

特異性: 特異性は、0.02 M リン酸緩衝液 (マトリックス) のサンプル溶液、および 0.02 M リン酸緩衝液中で 1 mg/mL の Tween 80 標準溶液を注入することにより評価しました。サンプルマトリックスの注入で得られたピークは微弱で幅が広がったため、ソフトウェアでは積分できませんでした。手で積分した合計ピーク面積は、最低濃度の標準溶液 Tween 80 (1 mg/mL) の合計ピーク面積の 5 % 未満でした。これは、Tween 80 の貼りつきによるキャリアオーバーが原因で引き起こされた可能性があります。カラム内での物質の蓄積を低減するためには、各シーケンスの後にアセトニトリルを注入してカラムをフラッシュする (100 % 移動相 B) が有効です。サンプル溶液の濃度が 10 mg/mL に近くなると、キャリアオーバーの影響は無視できます。

メソッドの精度

メソッドの精度は、1 回の分析時に同じ均一なサンプル溶液に対して調製と分析を 6 回繰り返して実行することにより評価しました。6 回の結果の %RSD は 0.3 % と算出されましたが、これは標準的な HPLC メソッドの精度要件 2 ~ 5 % よりもかなり低い値です。

定量下限 (LOQ) と検出下限 (LOD)

Tween 80 には複数のピークが存在するため、ピークの S/N 比に基づいてメソッドの LOD と LOQ を推定することは不可能です。Tween 80 標準溶液を 0.02 M リン酸緩衝液中で 0.1 mg/mL に希釈し、3 回の繰り返し分析を実施して得られた回収率は 96、111、

および 143 % で %RSD は 20 でした。%RSD が少し高い値のため、LOD は 0.1 mg/mL と推定されます。LOQ に関しては、直線性と真度の結果より、メソッドの LOQ は緩衝液中の Tween 80 において約 1 mg/mL であることがわかっています。

安定性

このメソッドは、Tween 80 サンプルと標準溶液の安定性のモニタリングに使用できる可能性があります。図 5 では、10 mg/mL の Tween 80 標準溶液を、室温で穴のあいたキャップを付けて 5 日間置いた後に再注入された溶液と比較しています。6.5、8、および 12 分のピークが増大している一方、2 ~ 5 分のピークは減少しています。溶液が変化した過程および変化した内容物については、この研究の対象外です。

表 2. 真度の結果

物質レベル	ピーク面積	濃度測定値 (mg/mL)	濃度理論値 (mg/mL)	回収率 (%)	平均回収率 (%)	RSD
低 1 回目	5,007,741	1.1272	1.0145	111.1 %	106.9 %	11 %
低 2 回目	5,318,193	1.1971	1.0284	116.4 %		
低 3 回目	4,167,663	0.9381	1.0073	93.1 %		
中 1 回目	44,297,696	9.9714	10.1450	98.3 %	99.4 %	1 %
中 2 回目	45,302,502	10.1976	10.2840	99.2 %		
中 3 回目	45,041,302	10.1388	10.0730	100.7 %		
高 1 回目	72,116,909	16.2335	16.4400	98.7 %	98.8 %	1 %
高 2 回目	71,863,773	16.1765	16.4630	98.3 %		
高 3 回目	74,398,919	16.7471	16.8730	99.3 %		

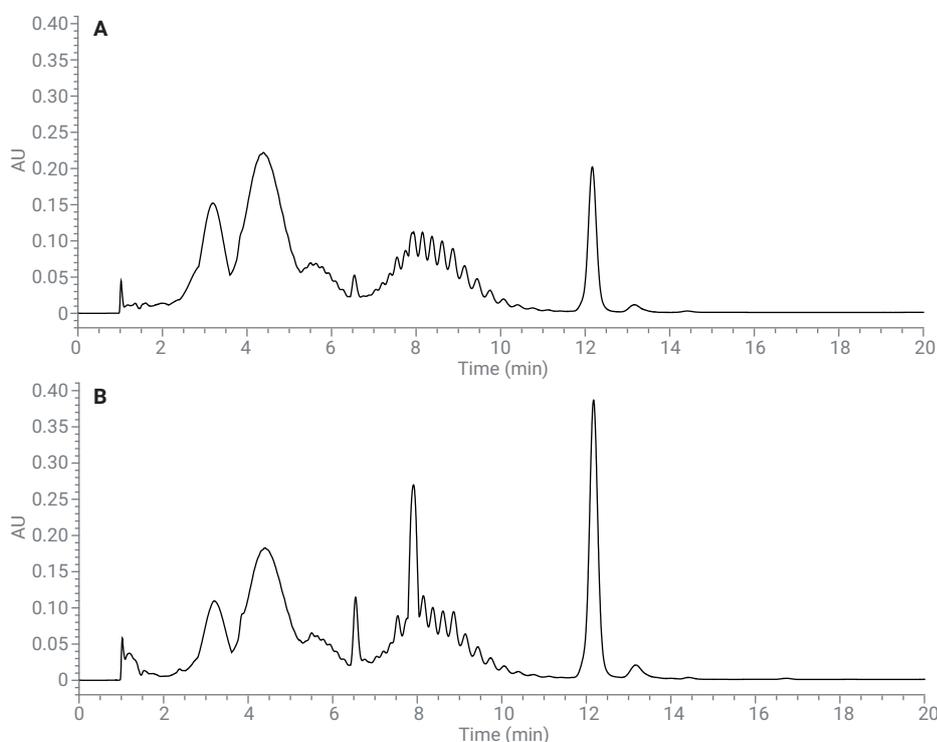


図 5. 10 mg/mL の Tween 80 標準溶液 (A) と、室温で穴のあいたキャップを付けて 5 日間置いた後に再注入された溶液 (B) との比較

結論

0.02 M リン酸緩衝液中の Tween 80 を分析するために、Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムとダイオードアレイ検出器 (DAD) によるマックスプロットを用いた高速でシンプルな HPLC メソッドを開発しました。このメソッドは正確、精密で高感度です。適切なサンプル前処理をした場合、幅広いキャリブレーション範囲において、治療用タンパク質製剤などのさまざまな水溶液に対してこのメソッドを適用できる可能性があります。また、このメソッドを使用して Tween 80 溶液の安定性を調査することもできます。

参考文献

1. Yperman, J. Cell Repopulation of Bioprosthetic Heart Valves, (Leuven University Press, Belgium, **2006**), 77.
2. Hu, M.; et al. J. Chromatogr. A **2003**, 984, 233-236.
3. Adamo, M.; et al. Chromatogr. B **2010**, 878, 1865-1870.
4. Nair, L. M.; et al. J. Chromatogr. A **2003**, 1012, 81-86.
5. Nayak, V. S.; et al. Chromatogr. Sci. **2012**, 50, 21-25.
6. Wu, Y.; et al. AOAC International **2010**, 93, 917-921.
7. Shi, S.; et al. Anal. Bioanal. Tech. **2015**, 6, 245-252.
8. Zhang, R.; et al. Chromatogr. Sci. **2012**, 50, 598-607.
9. McCarthy, S. M. Waters Application Note, 720005323EN, Mar **2015**.
10. Klein, M.; Preston, J. Phenomenex Application Note, App ID 23389.

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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2018
Printed in Japan, March 29, 2018
5991-9188JAJP