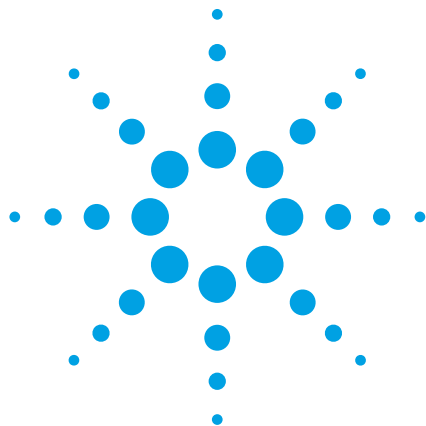




# Agilent 1290 Infinity LC システムによる 塩酸メトクロプラミド製剤中不純物分析の 生産性向上

## アプリケーション

製薬

### 著者

Gerd Vanhoenacker, Frank David,  
Pat Sandra  
Research Institute for Chromatography  
Kennedypark 26  
B-8500 Kortrijk  
Belgium

Bernd Glatz and Edgar Naegele  
Agilent Technologies  
R&D and Marketing GmbH & Co. KG  
Hewlett-Packard-Str. 8  
76337 Waldbronn  
Germany

### 概要

本アプリケーションノートでは、塩酸メトクロプラミド製剤中の不純物および関連物質の測定における Agilent 1290 Infinity LC の性能を評価しました。1200 シリーズ HPLC システムでの従来の液体クロマトグラフィ (LC) メソッドを、Agilent 1290 Infinity LC での超高压メソッドに変換する方法を説明します。メソッド変換は比較的簡単です。各種の不純物で同じ選択性を得るためには、温度の微調整がもっとも重要なパラメータとなります。メソッド開発にあたっては、1070 bar という高い圧力を適用しました。

最終的に得られた生産性の高いメソッドを、880 bar で実行しました。分析時間は 3.5 分で、従来の HPLC メソッドよりも 4 倍ほど速くなり、精度の低下はありませんでした。バリデーションを実施し、Agilent 1290 Infinity LC システムの性能を確認しました。新しいダイオードアレイ検出器 (DAD) を使用した場合の各種不純物の検出下限は、主成分の 0.001 % w/w というきわめて低いものでした。この検出下限は、必要とされる値の 1 桁を下回るものです。



**Agilent Technologies**

## はじめに

昨今の製薬分析では、ハイスループット、高い生産性、高分離能がキーワードになっています。高い生産性という点では、既存のメソッドよりも4~5倍ほど速い分析メソッドの開発が目標とされています。さらにこの場合、開発および確認されたメソッドの精度、正確性、再現性が低下しないことが必要条件となります。

液体クロマトグラフィ (LC) で分析スピードを上げる方法には、2 µm 未満の粒子の使用や、高温での操作などがあります。2 µm 未満の粒子を充填したカラムでは、対応可能速度が従来のカラムよりも大幅に高くなりますが、専用の LC 装置が必要となります。

本アプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity LC システムを用いて、塩酸メトクロプラミド製剤中の不純物を測定しました。このシステムは、最高 1200

bar に対応できる高压ポンプと、新しい高速高感度ダイオードアレイ検出器 (DAD) を搭載しています。メソッド開発にあたっては、3.5-µm 粒子充填カラムを用いた従来装置 (Agilent 1200 シリーズ LC システム) の分析条件を、1.7-µm 粒子充填カラムを用いた UHPLC システム (Agilent 1290 Infinity LC システム) に変換しました。2 つのシステムで得られたデータを比較し、精度、正確性、再現性を評価しました。

## 実験手法

### 使用機器

標準 Agilent 1200 シリーズ HPLC システムおよび Agilent 1290 Infinity LC システムを使用し、以下の構成を採用しました：

| 1200 シリーズ HPLC |             | Agilent 1290 Infinity LC システム |                                   |
|----------------|-------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| G1322A         | 真空デガッサ      | G4220A                        | 真空デガッサ内蔵<br>1290 Infinity バイナリポンプ |
| G1311A         | クォータナリポンプ   |                               |                                   |
| G1313A         | 標準オートサンブラ   | G4226A                        | 1290 Infinity オートサンブラ             |
| G1316A         | カラムコンパートメント | G1316C                        | 1290 Infinity<br>カラムコンパートメント      |
| G1315B         | ダイオードアレイ検出器 | G4212A                        | 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器         |

## 溶液

不純物および関連物質の原液をメタノールで調製しました。各化合物の構造と EP コードを表 1 に示しています。本アプリケーションノート全体を通じて、表に記載された化合物、ピーク番号を使用しています。原液を混合し、水で適切な濃度に希釈しました。製剤の水溶液を用いて、塩酸メトクロプラミド (5 mg/mL) と他の物質 (組成社外秘) を注入しました。

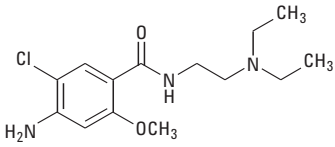
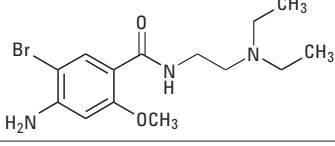
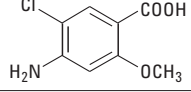
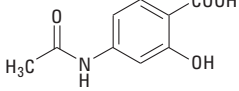
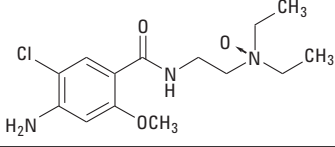
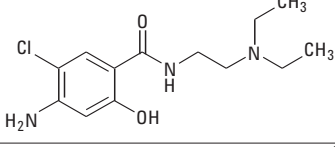
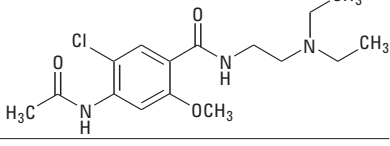
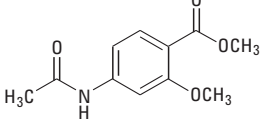
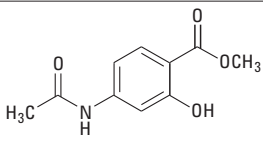
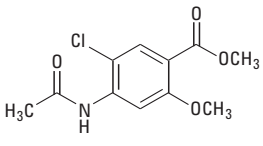
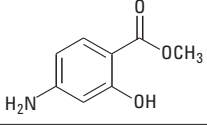
| ピーク    | 化合物名 (ヨーロッパ薬局方コード、EP)                                   | 構造                                                                                    |
|--------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| メイン化合物 | メトクロプラミド                                                |    |
| X      | 臭素化メトクロプラミド                                             |    |
| 1      | 4-アミノ-5-クロロ-2-メトキシ安息香酸 (EP C)                           |    |
| 2      | 4-(アセチルアミノ)-2-ヒドロキシ安息香酸 (EP H)                          |    |
| 3      | 4-アミノ-5-クロロ-N-2-(ジエチルアミノエチル)-2-メトキシベンズアミド N-オキシド (EP G) |   |
| 4      | 4-アミノ-5-クロロ-N-2-(ジエチルアミノエチル)-2-ヒドロキシベンズアミド (EP F)       |  |
| 5      | 4-(アセチルアミノ)-5-クロロ-N-2-(ジエチルアミノエチル)-2-メトキシベンズアミド (EP A)  |  |
| 6      | メチル 4-(アセチルアミノ)-2-メトキシベンゾエート (EP D)                     |  |
| 7      | メチル 4-(アセチルアミノ)-2-ヒドロキシベンゾエート                           |  |
| 8      | メチル 4-(アセチルアミノ)-5-クロロ-2-メトキシベンゾエート (EP B)               |  |
| 9      | メチル 4-アミノ-2-メトキシベンゾエート                                  |  |

表 1  
分析対象化合物

## 結果と考察

### 1. 1200シリーズ LC から 1290 LC Infinity システムへのメソッド変換

クォータナリポンプを用いた直線グラジエントにより、1200 シリーズ HPLC でオリジナルメソッドを開発しました。0.5 % w/w で不純物を添加した製剤のクロマトグラムを図 1A に示しています。カラムには、3.5- $\mu$ m 粒子を充填した XBridge C-18 カラムを使用しました。初期圧力は 140 bar です。一部の装置における違いを考慮すれば、簡単にメソッドを 1290 Infinity LC に変換することができます。メソッドパラメータを 1290 Infinity LC システムに移す際に、リテンションタイムが大幅に短くなりました。選択性にも変化が見られました。これは、2 つのシステムでディレイボリュームが異なるためです。クォータナリポンプのディレイボリュームは 950  $\mu$ L ですが、1290 Infinity バイナルポンプのディレイボリュームは、10  $\mu$ L に低減されています。この差異を補正するために、1290 Infinity LC メソッドでは、初期アイソクラティックホールド時間を設定しました。この簡単な補正により、リテンションタイムと選択性は両システムでほぼ同じとなりました。効率については、1290 Infinity LC が 1200 シリーズを上回りました (クロマトグラムは示さず)。

その後、1.7- $\mu$ m 粒子を充填した 2.1 mm id BEH C18 カラムにメソッドを合わせました。両カラムで同じ線速度を保つために、流量を 0.22 mL/min に下げる一方で、注入量を 2  $\mu$ L から 0.8  $\mu$ L に減らしました。圧力は 380 bar です。ディレイボリュームの違いを補正するために、0.5 分の初期ホールド時間をグラジエントに設定しました。この条件を用いた分析では、3.5- $\mu$ m 粒子充填カラムの結果 (図 1A) と比べて、分析結果はほぼ同じでしたが (図 1B)、分析時間はやや短くなりました。

1290 Infinity 構成では、効率と分離能が大きく向上しました。理論上の効率は、カラム長と粒子直径の 2 倍の比率として、おおよその値を計算することができます。したがって、1.7- $\mu$ m 粒子カラムの効率は、3.5- $\mu$ m カラムの効率の約 2 倍になると考えられます。分離能は効率の平方根と関連するため、同システムの分離

能は 1.4 倍になると考えられます。このケースでは、分離能は理論値よりも大幅に向上します (たとえば、ピーク 1 とピーク 2 で 2.6 から 5.9)。これは、Agilent 1290 Infinity LC システムのデッドボリュームが小さく、ポンプドライブが優れているためです。

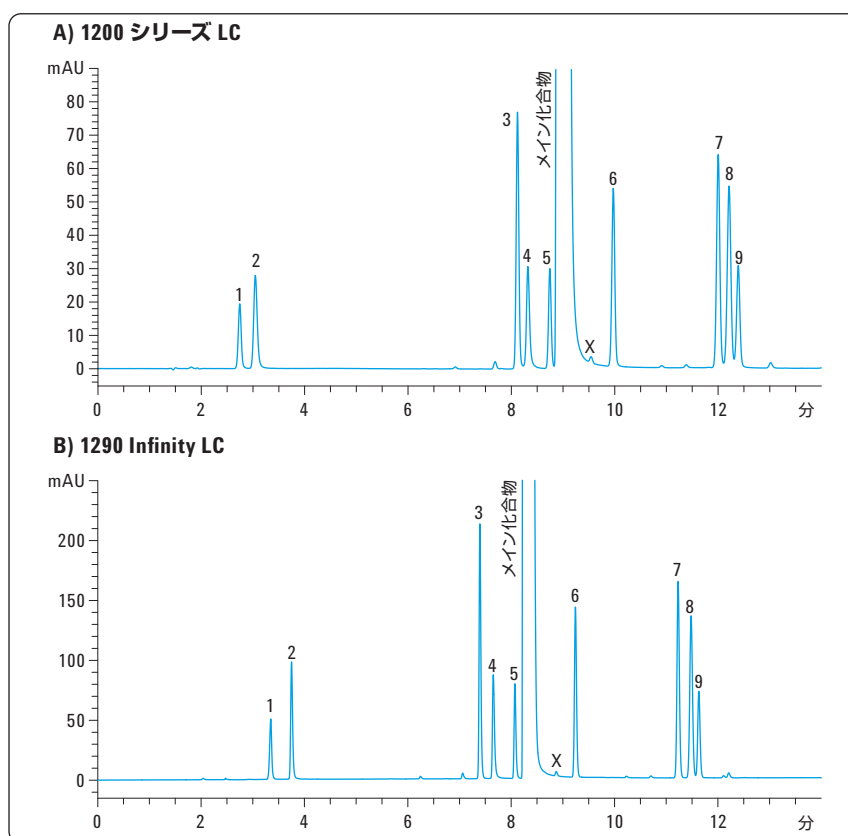


図 1. Agilent 1200 シリーズ LC システムから Agilent 1290 Infinity システムへのメソッド変換。  
サンプル：不純物 1~9 を 0.5 % w/w で添加した製剤。

| 条件 図 1 | A                                            | B                                                |
|--------|----------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| カラム    | XBridge C-18、<br>150 mm × 3.0 mm、3.5 $\mu$ m | BEH C18、150 mm × 2.1 mm、1.7 $\mu$ m              |
| 移動相    | A = 0.25 % w/w 酢酸アンモニウム水溶液<br>B = アセトニトリル    |                                                  |
| 流量     | 0.45 mL/min                                  | 0.22 mL/min                                      |
| グラジエント | 0-15 分：5-57.5 % B                            | 0-0.5 分：5 % B アイソクラティック<br>0.5-15.5 分：5-57.5 % B |
| 温度     | 37 °C                                        | 37 °C                                            |
| 注入量    | 2 $\mu$ L                                    | 0.8 $\mu$ L                                      |
| 検出     | DAD、シグナル 275/4 nm、リファレンス 400/60 nm           |                                                  |
| 最大圧力   | 140 bar                                      | 380 bar                                          |

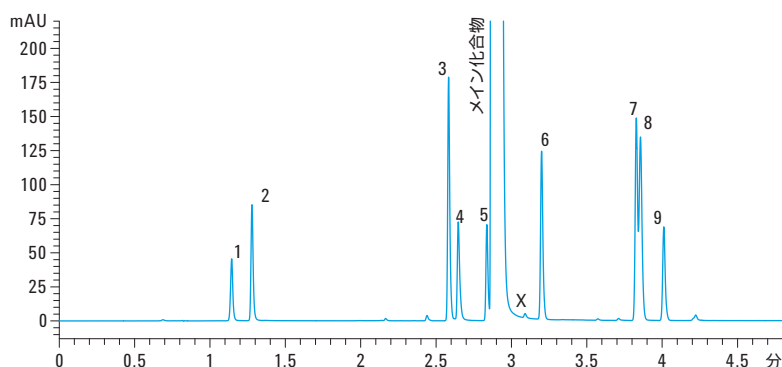
## 2. Agilent 1290 Infinity LC システムによるスピード向上

1.7- $\mu$ m 粒子カラムを用いた分析を、380 bar の圧力で実施しました。この圧力は、1290 Infinity LC システムポンプの圧力条件である 1200 bar よりも大幅に低いものです。そのため、流量を上げて分析時間を短縮することが可能です。この場合、同じ溶出プロファイルを維持するために、流量の増加に比例してグラジエント時間を短縮させる必要があります。

流量を 0.22 mL/min から 0.66 mL/min に変更したところ、動作圧力が 380 bar から 1020 bar に上昇しました。予想されていたとおり、高圧（カラムの移動相速度が高い）の場合、摩擦熱が生じます [1,2]。一部の化合物の保持力は温度により変化するため、高流量では選択性的変化が見られました。化合物 5 とメイン化合物、および化合物 7 と 8 の分離能は、この温度変化による影響を特に強く受けました (図 2A)。

カラム温度を 37 °C から 32 °C に低下させれば、熱による影響を緩和することができます (図 2B)。この条件下では、4.5 ~ 5 分で良好な分離能が得られました。この分析時間は、オリジナルの LC メソッドに比べて、約 3 分の 1 に短縮されています。ただし、圧力を 1070 bar に上昇させたのに対し、カラムの耐圧は 1000 bar です。耐圧を上回る圧力で長時間使用すると、カラムの寿命が短くなり、メソッドの堅牢性も低下します。

A) 37 °C



B) 32 °C

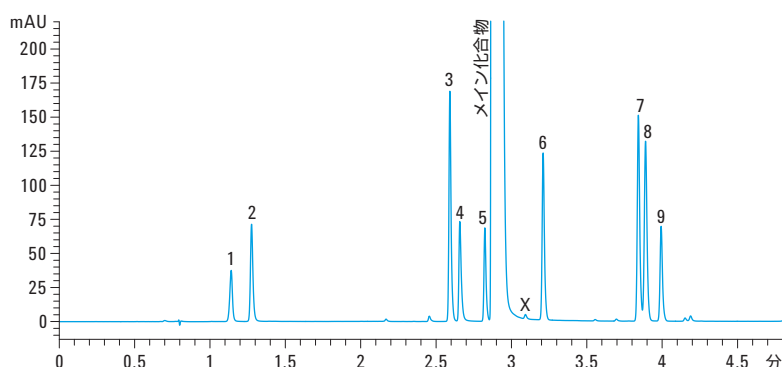
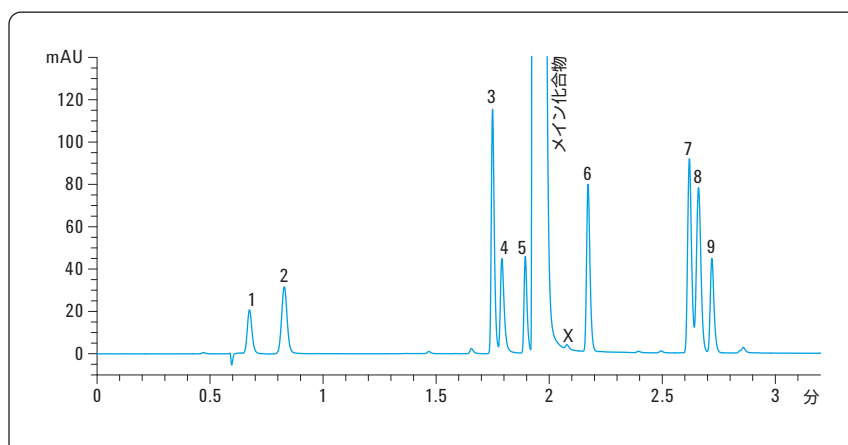


図 2.  
選択性における摩擦熱の影響と、カラム温度低下による効果。  
サンプル：不純物1~9 を 0.5 % w/w で添加した製剤。

| 条件 図 2 | A                                              | B        |
|--------|------------------------------------------------|----------|
| カラム    | BEH C18、150 mm × 2.1 mm、1.7 $\mu$ m            |          |
| 移動相    | A = 0.25 % w/w 酢酸アンモニウム水溶液<br>B = アセトニトリル      |          |
| 流量     | 0.66 mL/min                                    |          |
| グラジエント | 0-16 分：5 % B アイソクラティック<br>16-5.16 分：5-57.5 % B |          |
| 温度     | 37 °C                                          | 32 °C    |
| 注入量    | 0.8 $\mu$ L                                    |          |
| 検出     | DAD、シグナル 275/4 nm、リファレンス 400/60 nm             |          |
| 最大圧力   | 1020 bar                                       | 1070 bar |

したがって、ルーチンアプリケーションでは、カラム長を 150 mm から 100 mm に変更し、0.66 mL/min で最大背圧が 880 bar となるようにしました。さらに、オリジナルメソッドの選択性を維持するために、グラジエントホールド時間とグラジエント時間を短縮しました。分析時間は、3.5- $\mu$ m 粒子カラムを用いたオリジナルメソッドが 15.5 分だったのに対し、3.5 分にまで短縮されました (図3)。初期ピークの分離度は 3.8 で、1200 シリーズ LC よりも高い値を維持しています。



**図 3.**  
最終的な Agilent 1290 Infinity LC システムメソッドで得られた結果。  
サンプル：不純物 1～9 を 0.5 % w/w で添加した製剤。

| 条件 図 3 | 最終的な Agilent 1290 Infinity LC システムメソッド          |
|--------|-------------------------------------------------|
| カラム    | BEH C18、100 mm × 2.1 mm、1.7 $\mu$ m             |
| 移動相    | A = 0.25 % w/w 酢酸アンモニウム水溶液<br>B = アセトニトリル       |
| 流量     | 0.66 mL/min                                     |
| グラジエント | 0–0.1 分：5 % Bアイソクラティック<br>0.1–3.45 分：5–57.5 % B |
| 温度     | 32 °C                                           |
| 注入量    | 1 $\mu$ L                                       |
| 検出     | DAD、シグナル 275/4 nm、リファレンス 400/60 nm              |
| 最大圧力   | 880 bar                                         |

### 3. メソッドバリデーション

図 3 の条件を用いて、直線性、注入再現性、検出下限のパラメータに関する分析を実施しました (表 2)。良好な直線性 (すべての化合物で  $>0.999$ ) と注入精度が得られました。一部の化合物の検出下限 (LOD) に近い 0.005 % レベルにおける RSD は、すべての化合物で 8 % を下回り、ほとんどの化合物で 3.5 % も下回りました。この値は、このレベルのものとしては良好といえます。LOD における分析のクロマトグラムを図 4 に示しています。LOD は化合物により異なり、メイン化合物に対して 0.001 % w/w から 0.005 % w/w の範囲です (オンカラムで 50–250 pg)。このことは、必要とされる濃度の 10 分の 1 から 50 分の 1 のレベルで不純物が検出されていることを示しています。

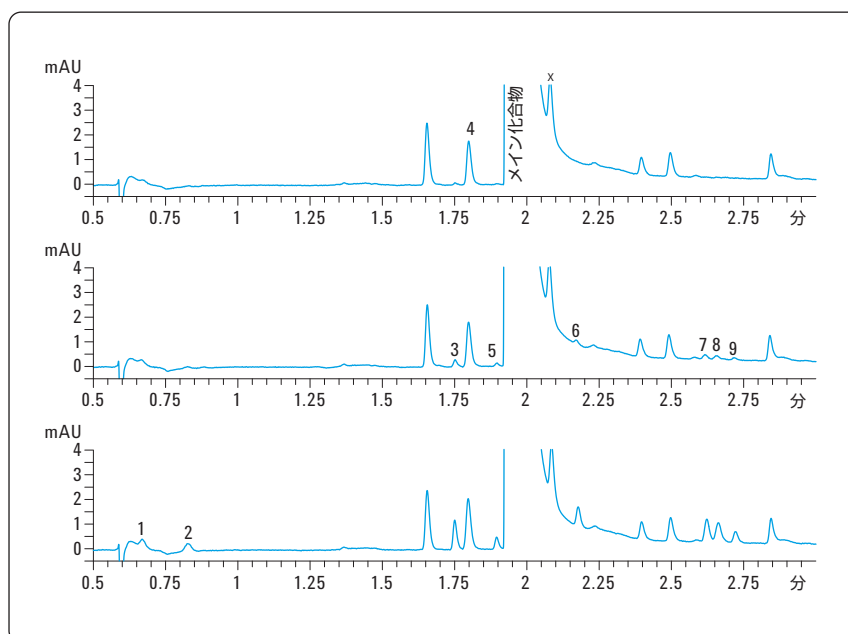


図 4.  
製剤 (上段のクロマトグラム) および不純物 1~9 を LOD レベルで添加した製剤 (中段のクロマトグラム: 0.001 % w/w、下段のクロマトグラム: 0.005 % w/w) の分析。  
条件: 図 3 参照。

| 化合物 | 直線性、 $R^2$ <sup>(1)</sup> | 注入の再現性、% RSD <sup>(2)</sup> |          |                   | LOD               |                    |
|-----|---------------------------|-----------------------------|----------|-------------------|-------------------|--------------------|
|     |                           | 面積、0.005%                   | 面積、0.05% | % w/w             | オンカラム (pg)        | S/N <sup>(3)</sup> |
| 1   | 1.0000                    | 4.50                        | 2.65     | 0.005             | 250               | 7.3                |
| 2   | 0.9999                    | 7.54                        | 1.72     | 0.005             | 250               | 8.6                |
| 3   | 1.0000                    | 1.35                        | 0.95     | 0.001             | 50                | 7.9                |
| 4   | 0.9994                    | 1.77                        | 1.74     | NA <sup>(4)</sup> | NA <sup>(4)</sup> | NA <sup>(4)</sup>  |
| 5   | 1.0000                    | 2.35                        | 2.24     | 0.001             | 50                | 3.6                |
| 6   | 0.9997                    | 3.32                        | 0.93     | 0.001             | 50                | 4.3                |
| 7   | 1.0000                    | 2.42                        | 0.49     | 0.001             | 50                | 5.3                |
| 8   | 1.0000                    | 1.92                        | 0.81     | 0.001             | 50                | 4.5                |
| 9   | 1.0000                    | 3.61                        | 1.42     | 0.001             | 50                | 3.0                |

<sup>(1)</sup> 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5%、1 注入/レベル

<sup>(2)</sup> 6 連続注入/レベル

<sup>(3)</sup> シグナル/ノイズ比、ノイズは約 1–1.25 分から採取

<sup>(4)</sup> データなし、不純物が製剤中にすでに存在

## 結論

本アプリケーションノートでは、既存の HPLC メソッドから高速 Agilent 1290 Infinity LC システムメソッドへの変換の実行可能性を評価しました。

最初に、1200 シリーズ LC で開発した HPLC 分析を、1290 Infinity LC システムに単純に移しました。一部の装置特性を考慮すれば、比較的簡単にメソッド変換を実施できます。その後、オリジナルメソッドのカラム (150 mm × 3.0 mm、粒子径 3.5- $\mu$ m) を、より小粒径の 1.7- $\mu$ m 粒子を充填したナローボア 2.1-mm カラムに変更しました。これにより、化合物間の分離能が大幅に向上しました。

2  $\mu$ m 未満の粒子を使用したことで、移動相の速度を上げ、分離能を低下させずに分析時間を短縮することができました。圧力と移動相の速度が高くなったことで、摩擦熱の影響により、メソッドの選択性が変化しました。オリジナルメソッドの選択性を維持するために、カラム温度を低くしました。

最終的に得られた Agilent 1290 Infinity LC システムメソッドを、880 bar の圧力を用いて 100-mm カラムで実施したところ、オリジナルの HPLC メソッドに比べて分析スピードが 4 倍に向上しました。この Agilent 1290 Infinity LC システムメソッドのバリデーション結果も良好でした。検出下限は、メイン化合物に対して 0.001 % w/w から 0.005 % w/w の範囲でした。これはオンカラムで 50–250 pg に相当し、必要とされる濃度の 10 分の 1 から 50 分の 1 にあたります。

## 参考文献

1. de Villiers A., Lauer H., Szucs R., Goodall S., Sandra P., J. Chromatogr. A, 1113 84–91. **2006**
2. Gritti F., Guiochon G., J. Chromatogr. A, 1187 165–179. **2008**

本文書掲載の機器類は薬事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。

[www.agilent.com/chem/1290:jp](http://www.agilent.com/chem/1290:jp)

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc.,  
2009 May 15, 2009  
Publication Number 5990-3981JAJP



**Agilent Technologies**