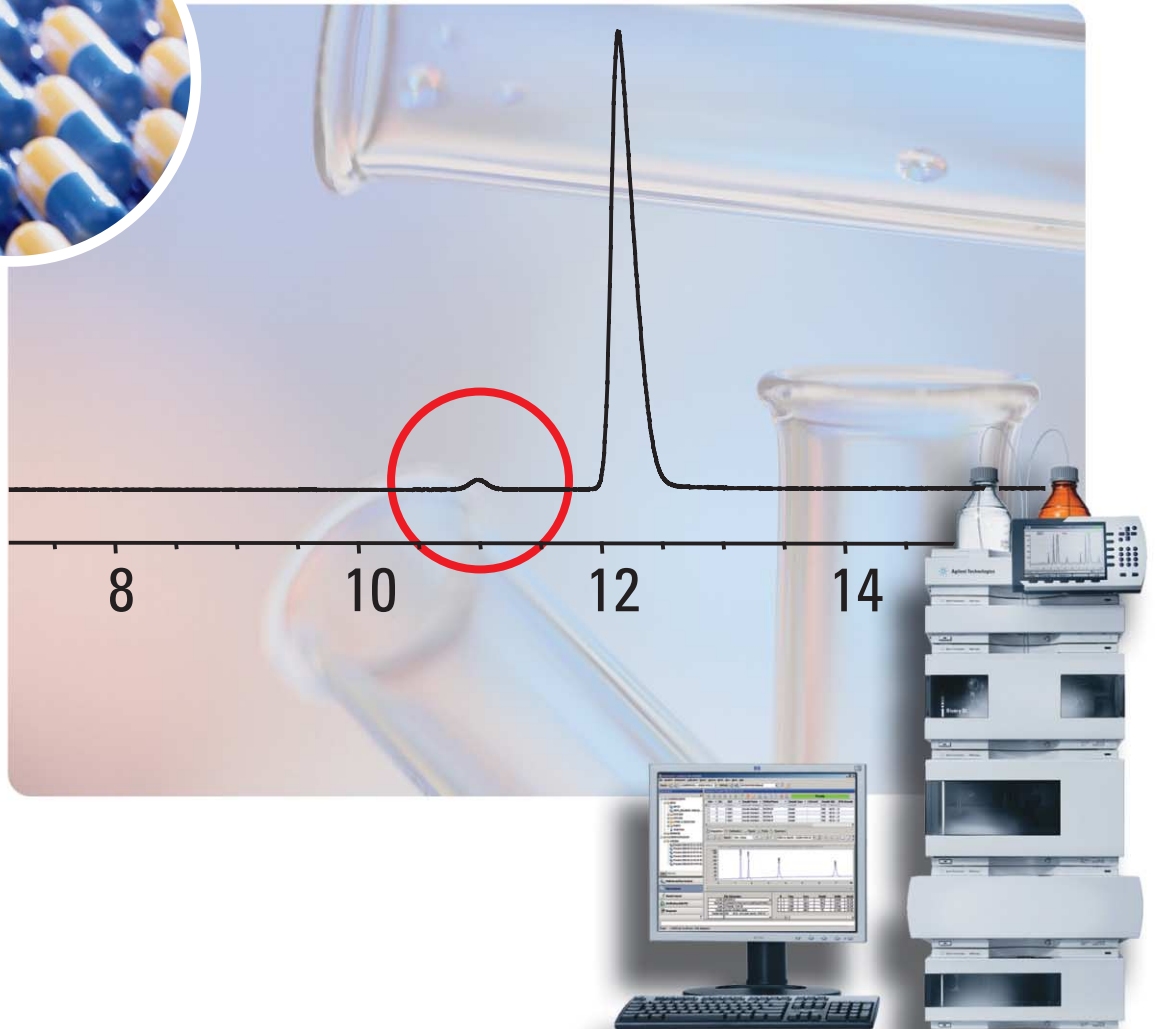


Agilent 1200シリーズLCシステムによる 不純物のプロファイリング

アプリケーション



概要

はじめに

スクリーニングから日常業務の品質管理および品質保証で検証されたメソッドの使用まで、製剤原料の不純物分析は、医薬品開発において困難な作業になりつつあります。この資料では、ラピッドレゾリューション液体クロマトグラフ(RRLC)と質量分析計を用いて、原薬の不純物の分析および同定のワークフロー全体を改善する方法について言及します。製剤原料の不純物分析については複数のアプリケーションノートが発行されています。詳しい資料は、以下からダウンロードできます。

www.agilent.com/chem/library

製剤原料中の不純物

製剤原料中の不純物は通常、2つの観点から処理されます。

- 不純物の分類や同定などの化学的な観点：実際には、レポートの生成方法、適切な仕様の設定方法、分析手順の記述方法のことです。
- 安全性の観点：新薬が市場に送り出されたときに、最終製品を使用することになる患者の安全性は非常に重要です。このため、比較研究および遺伝毒性試験はますます重要になっています。

米国FDAやEMAなどの規制機関の観点からは、製剤原料中の不純物は以下のカテゴリに分類されます。

- 有機不純物(関連する処理や薬剤)
- 無機不純物
- 残留溶媒

アプリケーションノートのシリーズ「Agilent 1200シリーズLCシステムによる不純物のプロファイリング」では、以下の有機不純物を取り上げています(英文資料)。

- パート1:LC/MSによる不純物の構造解明(5989-5617EN)
- パート2:分取用HPLCによる不純物の単離(5989-5618EN)
- パート3:メソッド開発の迅速な条件の探索(5989-5619EN)
- パート4:超高速メソッドのメソッド検証(5989-5620EN)
- パート5:完全なシーケンス処理によるQA/QCアプリケーションサンプル(5989-5621EN)

無機不純物と残留溶媒に関する詳しい資料は、15ページ目の付録にあります。

ケーススタディ

この資料で取り上げる5つのアプリケーションノートは、薬剤の開発および商品化の間、つまり、活性薬剤成分の生産関連不純物の分析と同定時における、分析メソッド開発およびQA/QCラボの典型的なワークフローを示しています。

分析には、Rapid Resolution LCシリーズを使用し、分析を高速化して、TOFと組み合わせ、研究の初期段階で正確な質量情報を得られるようにしました。各種濃度レベルの有機不純物には複数の原因があります。それらは合成中および活性薬剤原料の保管中に増加する可能性が高いですが、製造工程や最終薬剤製品の保管中にも以下より増加する可能性があります。

- 原料
- 副生成物
- 中間体
- 分解生成物
- 反応物および配位子

充填材料が原因になることもあります。

FDAガイドライン「製剤原料中の不純物」に従って、見掛けレベル0.1%未満の不純物同定は通常、重要視されません。しかし、強い影響があったり、有毒物質を生成したり、0.1%未満の薬理効果であると見込まれたりする不純物の可能性があるため、同定を試みる必要があります。すべてのケースで、不純物を認定する必要があります。このガイダンスのため、0.05%と0.09%の間の分析結果を最も近い数に(たとえば、0.1%)に切り上げる方法が一般的ですが、この値は不純物を同定するかどうかを決める際、0.1%に切り上

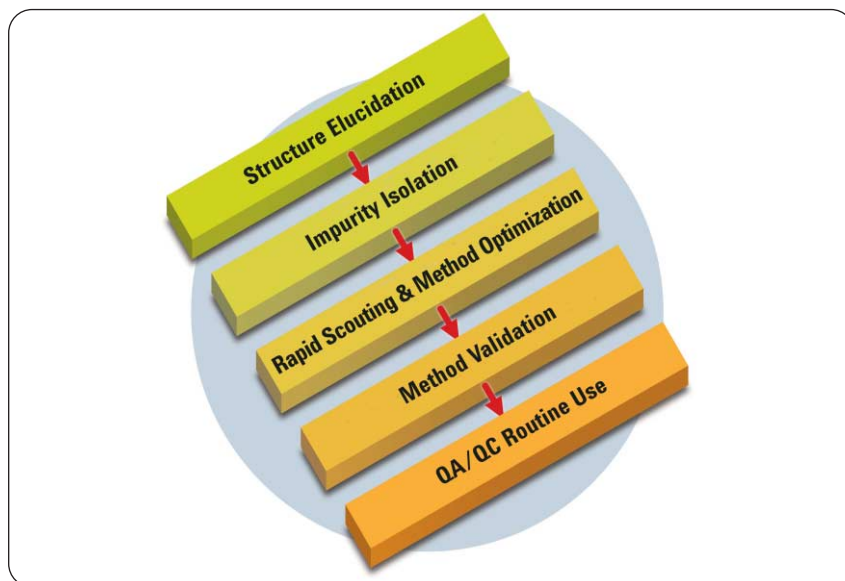


図1
開発およびQA/QCラボの通常のワークフロー分析メソッド

げてはいけません。つまり、不純物の感度測定は逆反応のリスクを減らすのに必要です。飛行時間型(TOF)質量分析は、微量レベルの不純物を特定する高感度かつ高質量精度を得るためのメソッドになります。

副生成物の分析

このドキュメントに記載されている分析手順では、原料、副生成物、中間体、および同定プロセスでもっとも効率よく迅速に特定される方法について取り上げています。充填剤および有機揮発性不純物(OVI)の分析に関する詳細情報については、付録に記載しています。不純物分析は、通常のメソッド開発のワークフロー、メソッドの最適化/転送、およびGMP条件下での一連の日常業務使用に従います。

Agilent Technologiesは、分析を常

に高速化し、薬剤分析で高感度を達成するのに適切なツールを製薬分析分野に提供するという目標に向かって懸命に努力してきました。この概論が安全性の確保に有用であることを願っています。

1. LC/MSによる不純物の構造説明

はじめに

薬剤の発見、開発、および製造では、人体にとって有毒である可能性がある微量な不純物や副生成物を同定することは極めて重要です。薬剤の研究開発のさまざまな場面で不純物をプロファイリングすることは非常に重要であり、これは工程全体のネックになります。一例として、このアプリケーションノートでは、高速分離LC/イオントラップおよびESI oaTOF質量分析によって薬剤の合成で生じる合成副生成物の同定について議論します。

実験

装置

Agilent 1200シリーズRapid Resolution LCシステム(RRLC)、
Agilent 6210 TOF、
Agilent 6330 Ion Trap

メソッド

- カラム: ZORBAX SB C18
2.1 x 150mm
1.8 μm 粒子サイズ
- 溶媒: A:水
B:AcN, 0.1%
TFA
- 流量: 0.5mL/分
グラジエント: 0分 - 5% B,
30分 95% B,
32分 95% B
- 停止時間: 32分
ポストタイム:10分
- DAD: 2 μLセル、10mmパス、
270nm ± 4nm
リファレンス 360 ± 8nm
幅 0.1分
- インジェクタ: 1 μLの注入量、
ニードル洗浄5秒、
MeOH/水が1/1
- カラムオープン:60℃

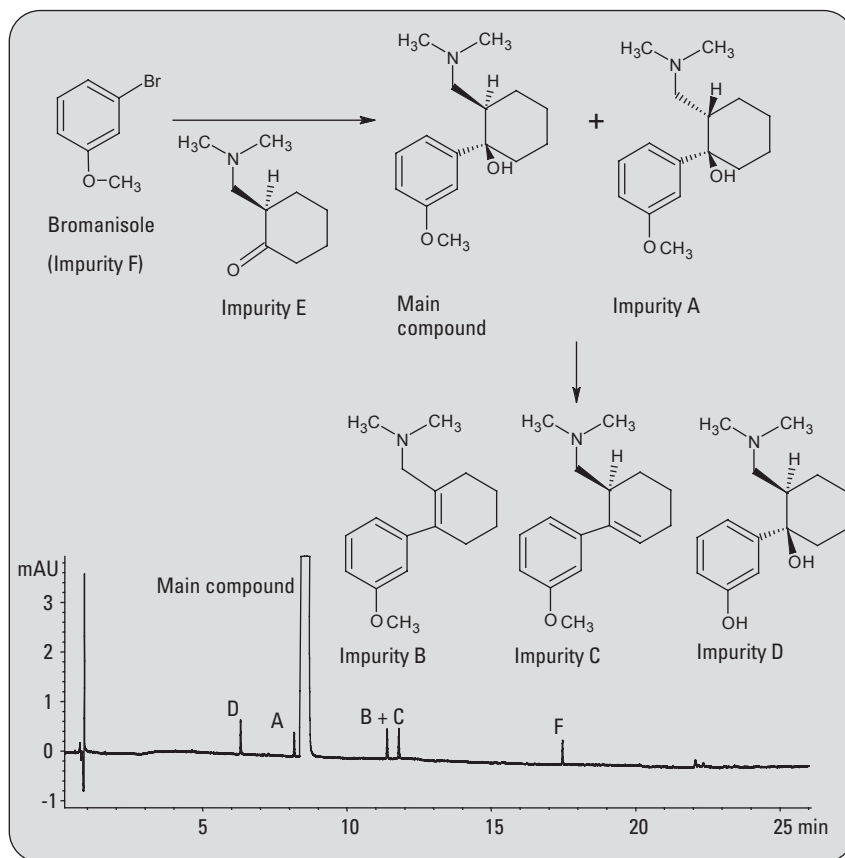


図1
不純物と反応スキームからの薬剤の高分解能LC分離

- MSトラップ: ESIソース:200℃、
正極性、
乾燥ガス:10L/分、
ネブライザ:40psi、
ICC:125000、
自動MS/MS
およびMS³
- MS-TOF: ESIソース:200℃、
正極性、
乾燥ガス:12L/分、
ネブライザ:40psi、
スキマー:40V、
スキャンm/z 100~1000、
レファレンス質量溶液
のスイッチがオン

結果と議論

合成による主生成物は薬剤原料およびそのジアステレオマーのカウンターパートである微量な不純物A(図1)です。可能性のある他の不純物は、分解生成物(不純物B、C、およびD)および合成の抽出物(不純物EおよびF)です。薬剤成分中の予測されるすべての不純物を発見するには、液体クロマトグラフィ、ガスクロマトグラフィ、薄層クロマトグラフィなどの直交型分離の手法を使用する必要があります。リテンションタイムの

ある合成で使用される抽出物の比較では、LC/UVのみによって不純物Fが3-プロモニソールであることが明らかになりました(図1)。抽出不純物EはUVでも、ESI-MSでも検出できませんでした。そのため、サンプルをGC-FIDで分析し、リテンションタイムの比較によって化合物を検出して確認することができました(データは記載していません)。すべての不純物について示された化学式を確認するために、LC/MS-TOF分析を実行し、正確な質量を測定し、実験式を計算しました。この実験で1桁のppmレンジ(表1)の十分な質量精度により、提示された化学式をすべて確認することができました。不純物についてより詳しい構造情報を作成するために、イオントラップマスマスペクトロメトリ分析を実行しました(図2)。ジアステレオマー不純物(A)は、 m/z 比が264.1、8.20分のリテンションタイムで検出されました。この成分の分子イオンも、MS/MSフラグメンテーションで脱水し、 m/z 比が246.1でフラグメントイオンになります。 m/z 比が246.1、MS³レベルのイオンのフラグメンテーションでは、メトキシ基の損失のため m/z 比が215.1で主要なイオン、ジメチルアミノ基の損失のため m/z 比が202.1でイオン、ベンジル型カチオンに関連して m/z 比が121.1でフラグメントが生成されました。

不純物	化学式	計算された質量	測定された質量	質量精度 [mDa]	質量精度 [ppm]
A	C ₁₆ H ₂₆ NO ₂	264.1964	264.1957	-0.7	2.5
B	C ₁₆ H ₂₄ NO	246.1858	246.1850	-0.8	3.2
C	C ₁₆ H ₂₄ NO	246.1858	246.1851	-0.7	2.9
D	C ₁₅ H ₂₄ NO ₂	250.1807	250.1804	-0.3	1.2

表1 不純物のLC/TOF分析による正確な質量測定、および相対質量誤差の計算による実験式の組み合わせ

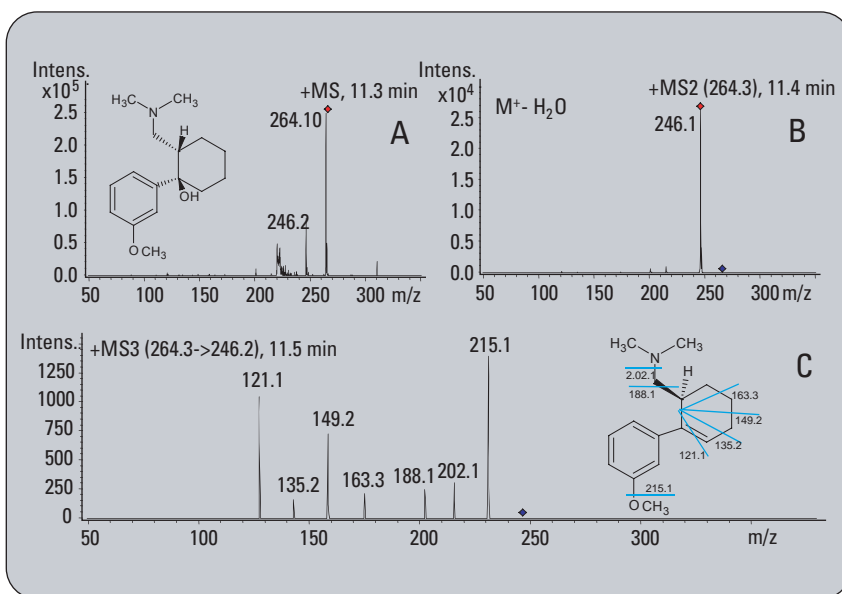


図2
 A) m/z 比が264.1の分子イオンによる不純物AのイオントラップMS
 B) m/z 比が264.1の不純物AのMS/MSフラグメントイオン
 C) m/z 比が264.1のイオンのMS³フラグメンテーション

結論

薬剤原料中の微量な不純物の検出および構造解明のため、1.8 μ mのRRHTカラム付きのAgilent 1200シリーズRapid Resolution LCシステムを、Agilent 6330 Ion TrapおよびAgilent 6210 ESI TOFと併用して実証しました。1200シリーズRRLCシステムを使用する場合、すべての不純物を検出するのに必要な分解能は1.8 μ mのカ

ラムで達成されました。MS/MSおよびMSⁿ機能を持つイオントラップは構造解析に使用し、ESI-TOFは正確な質量測定によって示された化学式の確認に使用しました。

2. 分取用HPLCによる不純物の分離

はじめに

不純物のプロファイリングでは、薬剤¹の有機および無機不純物の検出、同定、構造解明、および定量を目的とした分析作業について説明しています。このプロセスで最初に行うのは、すべての不純物の検出です。

ガスクロマトグラフィ、キャピラリ電気泳動、MS技術(イオントラップ装置や時間飛行型(TOF)装置など)を含む高圧液体クロマトグラフィなどの各種直交型分析メソッドは、この目的で使用されます。

ただし、最も高性能なMS装置を用いても、すべての成分について完全に構造解明することは不可能な場合があります。これらの成分は、分離と精製を行う必要があります。さらに¹H-および¹³C-NMRによって特性が決定されます。MSによって同定できなかった一組の不純物の分離と精製については、ここに記載しています。

結果と議論

Agilentアプリケーションノート²に示されているように、2つの不純物(AおよびD)はイオントラップとTOF装置を使用したMSによって同定できます。しかし、他の2つの不純物(BおよびC)は、完全に特性を決定できませんでした。したがって、さらなる構造解明のため、分取用HPLCによって分離しました。分析メソッド²は、不純物BおよびCの分解能および分析時間の短縮のため、最適化されました。実験の読み込みは、メソッドのスケールアップを行う前に分析スケールカラムで実行しました。不純物BおよびCのベースライン分離は、ZORBAX SB-C18カラムに注入され

る1.0444mgの未精製サンプルによって行われました。

スケールアップ計算

濃縮されたサンプル中の不純物BおよびCの濃度は、主要化合物の約3~5%になり、約0.03~0.05mgの不純物だけを分析カラムの単一注入から分離できたことが示されます。したがって、分離は内径が21.2mmの分取用カラムにスケールアップされました。約22mgの未精製サンプルの場合、約0.66~1.1mgの各不純物が注入ごとに分離できました。そのため、追加のNMR分析では、10回未満の注入で十分でした。

精製パラメータ

ケミステーションのフラクションプレビューはフラクションのコレクションパラメータの最適化に使用されました。分取用分析のクロマトグラムが読み込まれた後、しきい値、アップスロープ、ダウンスロープ、上限のしきい値3などのフラクションコレクションパラメータが調整され、必要なフラクションコレクション性能が実現されました。この場合、タイムウィンドウ(9~14分)内のサンプルのしきい値ベースのコレクションから最良の結果が得られました。フラクションプレビューを用いて最適化されたパラメータによる実際のフラクションコレクション分析の結果は、図1に示されています。10回の連続精製分析から組み合わせられた

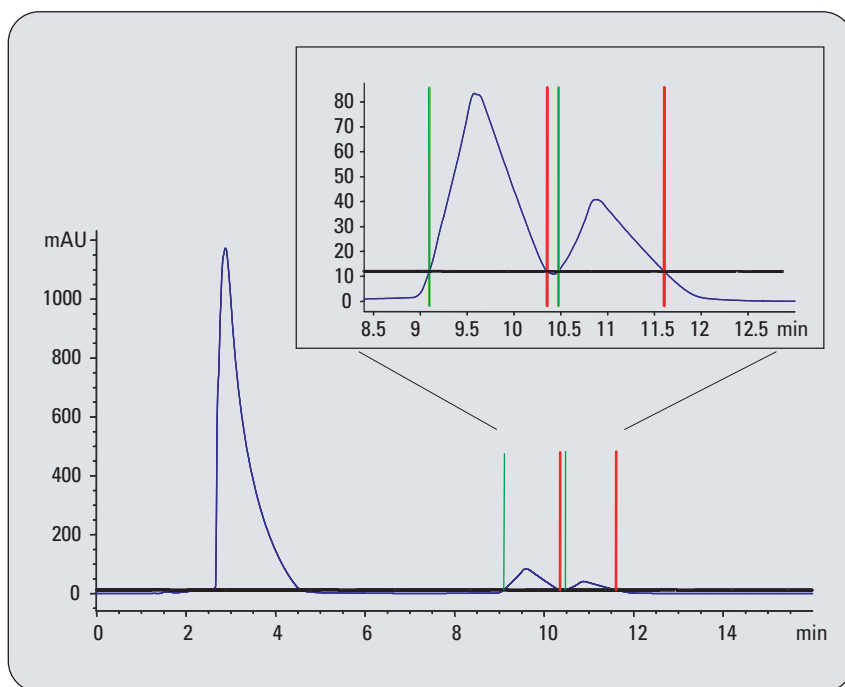


図1
フラクションコレクションの結果

フラクションの分析では、不純物C(純度98.7%)および不純物B(純度98.2%)について、NMR分析の構造解明にとって十分な量が得られました(図2)。

結論

Agilent 1200シリーズRRLCシステムで開発された高分解能分析メソッドによる2つの不純物の分離と精製について説明しました。標準的なAgilent 1200シリーズLCシステムとAgilent 1200シリーズの分取用システムへの変換は、固定相が分析カラムサイズのサブ2 μm の粒子および分取用カラムサイズの標準的な5 μm の粒子で使用可能だったため、シームレスで行われました。したがって、メソッドの最適化および実験の読み込み後のスケールアップは直接的に、分取用カラムで追加メソッドの最適化を行うことなく、実行できました。フラクションプレビューなどのケミステーションの機能およびフラクションの自動ポーリングにより、短時間に最適な精製結果が容易に得られました。収集されたフラクションの精製および復元により、不純物の構造解明は容易な作業になりました。

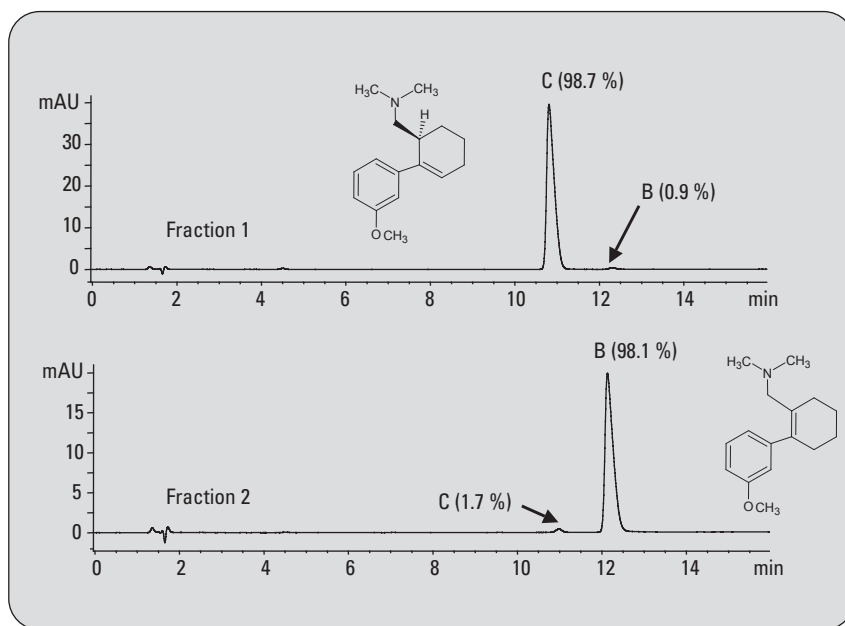


図2
主要化合物の医薬品の合成で同定された不純物

参考文献 (英文)

1. Sándor Görög, 「安全な新しい医薬品を迅速に:分析化学の役割」 *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 22, Nos.7, および8, 2003年。
2. Edgar Naegele 「Impurity Profiling with the Agilent 1200シリーズRRLC-MSシステムによる不純物のプロファイリング:不純物の構造解明」 *Agilent Technologiesアプリケーションノート*, 発行番号5989-5617EN, 2006年。
3. Udo Huber 「高度なピークベースのフラクションコレクション-アップスロープとダウンスロープでの作業」, *Agilent Technologiesアプリケーションノート*, 発行番号5989-0511EN, 2004年。

3. メソッド開発の迅速な条件の探索

はじめに

「新しい分析メソッドの開発と検証にはお金と時間がかかります。」¹ したがって、各分析の分析時間を減らす方法は工程全体にとって有益ですが、分解能、感度、とりわけ堅牢性について妥協してはいけません。サブ2 μm の粒子で充填されたカラムは、1000を超えるメソッドに適用される品質の高さにより、メソッド開発を大幅に加速することができます。最初に、液相、移動相パラメータ(% B、緩衝液、pH、溶媒)、およびグラジエントスロープや温度などのようなパラメータについての分離条件を広く検討し、最適な条件を慎重に決定します。このアプリケーションノートでは、Agilent 1200シリーズRapid Resolution (RRLC)システムと各種のAgilent ZORBAX RRHTカラムを用いて、1回の分析につき4分未満の分析時間の分離条件、さらにジアステレオマー(成分と分離された位置異性体)を取得する効率を可能にしました。

実験

すべての実験は、バイナリポンプSL、サーモスタット付き高性能オートサンプルSL、サーモスタット付きカラムコンパートメントSL、およびダイオードアレイ検出器SLが備え付けられたAgilent 1200シリーズRRLCシステムで行いました。条件の探索中に、16の異なる条件がテストされました。Agilent ZORBAXカラムであるStableBond CN、StableBond C18、Extend C18、Eclipse XDB C8、およびEclipse XDB C18を使用しました。HPLCグレードの水が、別の修飾子を持つメタノールまたはアセトニトリルとともに移動相として使用

しました。酸性条件はpH値が1.92になる0.2%のTFA(強溶媒の場合は0.16%)で、弱酸性条件はpH=6.02のリン酸緩衝液で、最終の基本条件は0.2%のアンモニア(pH=11.0)です。カラム、移動相、およびpH値の可能なすべての組み合わせの合理的なサブセットだけが実現しました。最初の探索は、低ディレイボリュウムコンフィグレーションのポンプ、DADの5 $\mu\text{L}/6\text{mm}$ セルが付属した3.0mm ID x 50mmカラムで行われました。内径が4.6-mmのカラムはメソッドの微調整のために選択され、ポンプセットは標準ディレイボリュウムコンフィグレーションに設定され、検出器では13 $\mu\text{L}/10\text{mm}$ フローセルが使用されました。すべての分析の探索では、40°Cの5~95% Bグラジエントを適用しました。詳細については、10ページのリファレンス2を参照してください。

結果と議論

このメソッド開発の目的は、薬剤成分の生成不純物の定量化のため、量子化迅速で堅牢なメソッドを提供することです。この成分は、pKa値が9.4の塩基性塩であり、水によく溶けます。前の実験から、反応物はHPLC以外の手段(GCやTLCなど)で容易に検出できることが分かっていました。ジアステロマー不純物A、位置異性体の脱ヒドロキシル生成物のBとC、脱メチル化生成物Dの分離に注目しました(図2の化学式)。

初期条件の探索中には、不純物が豊富なサンプルが使用され、5~95% Bの広範なグラジエントが液相と移動相の異なるセットにより適用されました。予測されるように、液相や移動相の変更による選択性の変化は、クロマトグラフの結果に著しい影響を与えました。誤った条件セットを選択すると、かなり単純な混合液が存在しているという誤解を与える可能性があります。他の条件では4つのピークが示され、最終的に5つのす

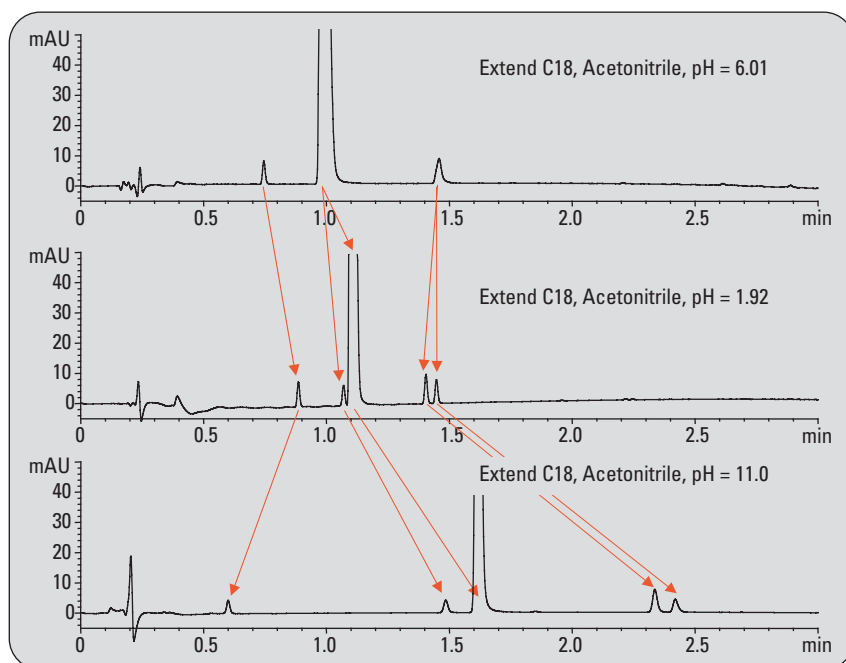


図1
pH値の変更による影響を、アセトニトリルが充填されたZORBAX Extend C18カラムを用いて図示しています。

すべての成分を検出することができました。図1には、選択性の変更の影響を示すために、いくつかの例を挙げています。微調整の最適な開始ポイントの検索では、2未満の分解能を持つ主要なペアが複数存在しない条件のみを考慮しました。最終的に、StableBond C18カラムが高度な最適化用を選択されました。微調整は、製造QA/QC環境の好ましいカラム内径である内径4.6mmのカラムに条件を転送することによって開始されました。さらに、グラジエントレンジが狭くなり、異なる温度の影響もメソッドの微調整のために検討しました。最終的なメソッドでは、すべての成分について、3を超える分解能を達成することができました(図2)。表1には、低いレポートレベル(主要化合物の0.05%)の不純物を含むサンプル分離に関する示性値が示されています。参考文献3および4に示されているように、開発されたメソッドは、標準バリデーション手順および薬剤QA/QC条件化のアプリケーションのすべての要件を満たしていました。

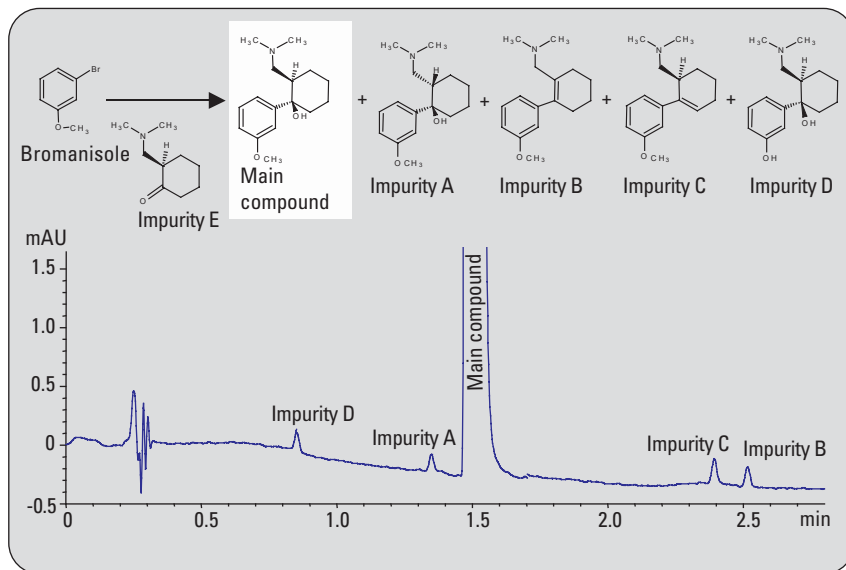


図2 低いレポートレベル(主要化合物の0.05%)で不純物を含むサンプルへの最終メソッド条件の適用

最終メソッド:	
溶媒:	A = 水(0.2ボリュウム-% TFA)、B = アセトニトリル(0.16ボリュウム-% TFA)
温度:	30°C
流量:	2.2mL/分
グラジエント:	0.00分 17%B 2.80分 45%B 3.00分 45%B
停止時間:	3.00分
ポストタイム:	1.00分
DAD:	スペクトル 190~500nm(バンド幅1nm)、全スペクトル シグナルA: 270nm(8nm)、レファレンス500nm(100nm) ピーク幅: >0.03分(0.2秒のレスポンスタイム) スリット: 8nm バランス: フレラン
注入量:	5µL
インジェクタ:	自動ディレイボリュウム低減なし、 ニードル洗浄10秒(メタノール)

化合物	時間[分]	分離度	面積[mAU · s]	高さ[mAU]	幅[s]	面積[%]	質量[ng]
不純物D	0.853	---	0.25	0.180	1.30	0.050%	1.76
不純物A	1.349	15.96	0.23	0.150	1.38	0.046%	1.62
主要化合物	1.489	3.21	497.10	222.200	2.11	99.791%	3492.69
不純物C	2.393	19.83	0.33	0.220	1.36	0.066%	2.32
不純物B	2.516	3.58	0.23	0.170	1.27	0.046%	1.62

表1 低いレポートレベルで主要化合物の不純物を含むサンプルの分離に関する示性値

結論

活性薬剤成分のジアステレオマーおよび位置異性体不純物に関するメソッド開発時間は、Agilent 1200シリーズRRLCシステムとサブ2 μ m粒子のカラムを用いることにより、大幅に削減することができます。サイクル時間が4.5分だったため、一日の間に多くの条件について検討することができました。追加の微調整はさらに半日かかったので、ちょうど1日半後の検証にメソッドを提供できました。メソッド検証の時間も、最終メソッドでは1回の分析時間が4分であるため、大幅に短縮されました。

参考文献 (英文)

1. Michael W. Dong, 「活動している科学者のための現代のHPLC」、Wiley Interscience、ISBN0-471-72789-X、2006年。
2. Michael Frank 「Agilent 1200シリーズLC/MSシステムによる不純物のプロファイリング - パート3:メソッド開発の迅速な条件の探索」、Agilentアプリケーションノート、発行番号5989-5619EN、2006年。
3. Angelika Gratzfeld-Huesgen 「Agilent 1200シリーズLCシステムによる不純物のプロファイリング - パート4:高速LCメソッドのメソッド検証」 Agilentアプリケーションノート、発行番号 5989-5620 EN、2006年。
4. Angelika Gratzfeld-Huesgen 「Agilent 1200シリーズLCシステムによる不純物のプロファイリング - パート5:完全なシーケンス処理によるQA/QCアプリケーションサンプル」 Agilentアプリケーションノート、発行番号 5989-5621EN、2006年。

詳細なアプリケーションノート「1200シリーズLCシステムによる不純物のプロファイリング-パート3:高速LCメソッドのメソッド検証」(発行番号5989-5619EN: 英文)については、[Bwww.agilent.com/chem/library](http://www.agilent.com/chem/library)を参照してください。

4. 高速LCメソッドのメソッドバリデーション

はじめに

規制された環境で稼働している分析ラボでは、分析結果がすべての規制基準を満たすように、メソッドを検証する必要があります。さらに、異なるラボの異なるユーザーの結果は、異なる装置が使用されたとしても、同等でなければなりません。そのため、別のユーザーが同じ分析を同じまたは別の装置で実行した場合に発生するばらつきを補償するため、メソッドは可能な限り堅牢でなければなりません。ここで導入された検証手順は、米国薬局方(USP)の勧告、ICHガイドラインQ2B^{1,2}、FDAガイドライン^{4,5}を基にしました。これらのガイドラインは世界中で知られており、製薬、食品、環境、および化学産業の分析ラボで使用されています。以下では、1つの主要化合物および4つの不純物に対する1つの高速LCメソッドが検証され、図1にクロマトグラムの例を示しました。

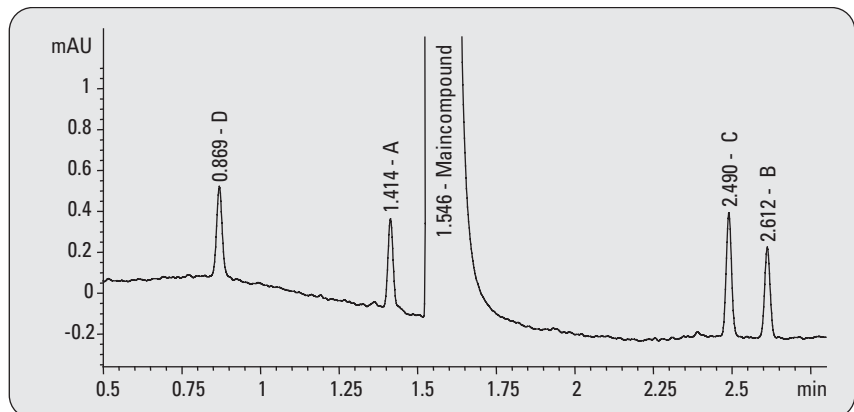


図1 主要化合物と4つの不純物の分析。主要化合物1.15mg/mL、不純物は主要化合物の0.072%。

検証プロトコル:

1. 主要化合物の面積とリテンションタイムの精度	6濃度、6分析
2. 主要化合物の精度	6濃度、6分析
3. 主要化合物の直線性	6濃度、6分析
4. 主要化合物のキャリーオーバー	原液の3回の注入
5. 主要化合物のレンジ	
6. 不純物の面積とリテンションタイムの精度	7濃度、6分析
7. 不純物の精度	7濃度、6分析
8. 不純物の直線性	7濃度、6分析
9. 不純物のレンジ	
10. 検出の限界とLOQ	
11. 主要化合物と不純物の堅牢性	異なるカラム温度、流量、注入量、TFA濃度、グラジエントの勾配の傾き、波長、ユーザーと装置、堅牢性のテストなし

検証手順

事前の検証実験の後に、次の検証プロトコルがセットアップされました(表1)。特異性のテスト結果を示します³。追加のサンプル準備手順は行われませんでした。サンプル成分は水に溶解しました。主要化合物については限界が設定され、合格または不合格の実際の結果と比較しました(表2)。不純物の結果は表3にまとめられています。

表1 検証テスト手順

テストされたパラメータ	限界条件	検出された値	合格/不合格
1 面積とリテンションタイムの精度	面積 <2% rsd RT < 0.1% rsd	面積 <0.5% rsd RT < 0.1% rsd	合格
2 精度	±2 %	±1.5 %	合格
3 直線性	>0.99990 レスポンスファクタ 5%内のレンジ	>0.99999 レスポンスファクタ 5%レンジ内	合格
4 キャリーオーバー	~0.01 %	~0.01 %	合格
5 レンジ	2~0.08mg/mL	2.3~0.073 mg/mL	合格
11 堅牢性	<2% rsd、面積、	<2% rsd、面積、	合格

表2 主要化合物のテスト結果

テストされたパラメータ	限界条件	検出された値	合格/不合格
6 面積とリテンションタイムの精度	面積<5 % rsd、 0.05% レベル RT < 0.5% rsd	面積<3% rsd、 0.05% レベル RT < 0.15% rsd	合格
7 精度	±5 %、0.05% レベル	±3 %	合格
8 直線性	>0.9990 レスポンスファクタ 5%レンジ内	>0.9998 レスポンスファクタ 5%レンジ内	合格
9 レンジ	0.03~0.3 μg/mL	0.0287~0.306 μg/mL	合格
10 LODおよびLOQ	LOD 0.01%レベル LOQ 0.03%レベル	LOD 0.007%レベル LOQ 0.027%レベル	合格
11 堅牢性	<10% rsd、面積、 0.07%レベル	<10% rsd、面積、 0.07%レベル	合格

表3 不純物のテスト結果

結論

高速LCメソッドは主要化合物および4つの不純物の分析用に開発されました。このメソッドの検証は成功しました。精度、直線性、および堅牢性に関するすべての要件が満たされました。これにより、高速LCメソッドはQA/QCラボで使用でき、USP/ICHの勧告に準拠していることが分かります。高速LCメソッドは、同一のデータ品質だけでなく、さらなる利点として、高いサンプルのスループットを提供しています。

参考文献

1. International Conference on Harmonization (ICH) Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology; Nov. 1996, published in the “Federal Register”, Vol 62, No. 96, pages 27463-27467, May 19, 1997.
2. Internet
Resources:<http://fda.gov/cder/guidance/index.htm>および
<http://www.labcompliance.com>
(Huber博士のホームページ)
3. Michael Frank, “Impurity Profiling with the Agilent 1200 LC System- Part 3::Rapid Condition Scouting for Method Development”, J, Agilentアプリケーションノート、資料番号5989-5619EN、2006年
4. Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration, 1994.
5. Guideline for Submitting Samples and Analytical Data for Methods Validation, Food and Drug Administration, 1987.

詳細なアプリケーションノート「1200シリーズLCシステムによる不純物のプロファイリング-パート4: Method Validation of a Fast LC Method」(資料番号5989-5620EN : 英文)については、www.agilent.com/chem/libraryを参照してください。

5. 高いサンプルスループットの高速LCメソッドを使用したQA/QCアプリケーションの例

はじめに

高速分析LCメソッドの開発、検証に続くステップは、このメソッドをQA/QCラボに転送することです。通常、詳細な標準操作手順書(SOP)は、失敗や誤解のリスクをできる限り小さくするために使用します。以下は、システムの適合性確認、順序付け、および得られた結果の合格基準を含む標準操作手順書の一例です。Agilentシリーズ1200 Rapid Resolution LC (RRLC)システムは、システムの適合性確認およびサンプルとキャリブレーション混合液の分析の順序付けとレポート作成を実行するために使用しました。クロマトグラフィ条件は、以前に発行した資料で開発され、検証された高速LCメソッドを基にしています。参考文献1と2を参照してください。約5分のサイクル時間により、サンプルのスループットの大幅な増加とそれによるコスト削減も可能になります。以下では、SOPの一例が簡略化されたバージョンで示されており、結果の例が提供されています。

パフォーマンステスト

テストでは、サンプルが合格であるか、不合格であるかを判定する必要があります。キャリブレーション混合物とコントロールサンプルは、サンプル希釈にも使用される溶媒を含むブランクサンプルと同様に、使用する必要があります。表1は、サンプルの精度、感度、分解能、およびその他のメソッドパフォーマンスパラメータを決定する要件をまとめたものです。この表で定義されている要件を基にして、シーケンステーブルがAgilentケミステーションソフトウェアでセットアップされました(表2)。このシーケンスには、最初の適合性テスト、3つのサンプルの

サンプル	目的	注入数
ブランク溶液 (純粋なサンプル溶媒)	ベースライン適合性の確認と 人工生成物の同定	2~3
コントロールサンプル	感度と分離度の確認	1
キャリブレーション混合物1	レスポンスの安定性の確認	3
キャリブレーション混合物2	レスポンスの安定性の確認と キャリブレーション混合物1の正確さ	3
システム適合性のサンプル	面積とリテンションタイム、分解能、ピーク幅、 k' 、およびシグナル対ノイズの比の精度	6
サンプル	不純物と主要化合物の 定量化、 面積とリテンションタイムの精度について	3

表1 サンプルが合格であるか、不合格であるかを判定するのに必要なテスト

分析前後のキャリブレーション分析、およびコントロールサンプルが含まれています。これらの分析間には、次の分析に悪影響を及ぼす可能性のあるキャリーオーバーやゴーストピークが現れないように、純水が注入されました。

- リテンションタイムの精度は $< 0.5\% \text{ rsd}$
- すべてのピークの見分度度は > 2
- 最大ピーク半値幅 < 0.08 分
- k' は $5 < k' < 25$
- すべてのピークのシグナル対ノイズの比は > 50

テスト結果の例

システム適合性テストの手順を例示しました。主要化合物と不純物A、B、C、およびDについて4~10 $\mu\text{g/mL}$ の溶液が準備されます。この溶液は毎日、最初の分析を行う前に注入します。テストされたパラメータと限界値の設定は以下のとおりです。

- 面積の精度は $< 2\% \text{ rsd}$

システム適合性の例の結果は表2にまとめられています。すべての限界基準が満たされています。同じ方法で、キャリブレーション標準およびコントロールサンプルの適切なパラメータと限界を評価しました。すべてのテストが限界基準を満たしていました。3つの全サンプルの不純物の量は0.5%の限界を超えていません。

化合物	量	RSD RT	RSD面積	分離度	PW	k'	S/N
A	4.9 $\mu\text{g/mL}$	0.142	0.155	9.48	0.018分	11.43	75.3
B	4.5 $\mu\text{g/mL}$	0.062	0.483	3.88	0.019分	21.95	79.3
C	5.1 $\mu\text{g/mL}$	0.069	0.399	6.76	0.019分	20.88	109.7
D	4.4 $\mu\text{g/mL}$	0.246	0.201	-	0.019分	6.61	79.8
主要 化合物	9.99 $\mu\text{g/mL}$	0.107	0.160	6.13	0.018分	13.09	109.7

表2 システム適合性テストの結果

結論

分析QA/QC部門は、増加するサンプル量とデータ品質と信頼性に関する要求の高まりに直面しています。通常、1回のサンプル分析には10～15回の補助的な分析を実行して、定性的かつ定量的なデータの正しさを保証する必要があります。徹底的に検証された高速LCメソッドは、データ品質について妥協することなく、サンプルスループットの大幅な向上に役立てることができます。

使用されたシーケンスには47回の分析が含まれており、システム適合性テストの30分を含む約3.9時間かかりました。20分のサイクルタイムの従来のメソッドを使用したシーケンスでは、約15.7時間かかることでしょうか。これは、高速LCメソッドの場合にサンプルスループットが大幅に向上したことを示しています。

溶媒も大幅に節約されます。20分のサイクル時間内に、47回の分析と流量2.2mL/分、溶媒2068mLが必要でしたが、この高速メソッドを使用すると、5分のサイクル時間には47回の分析のために517mLの溶媒使用量ですみます。

したがって、1回の分析のコストが約1/3～1/4倍ほどに大幅に削減されます。例については、表3を参照してください。

メソッドの再検証には、2週間と約4,000ドルのコストがかかります。当社の例では、約500回の分析の実行後に、メソッドを高速分析にアップデートするとコスト効率が高くなります。

サイクルタイム	20分のサイクルタイム	5分のサイクルタイム
1年間の分析数*	26208	104832
1回の分析でのおおよそのコスト	\$11.35	\$2.85
1000回の分析でのおおよそのコスト**	\$11,350	\$2,850
1000回の分析で節約されるおおよそのコスト	-	\$8,500
スループットの増加	-	4倍

表3

高速LCメソッドを用いたサンプルのスループットの増加とコストの削減

*24時間/日、7日/週、52週/年

**溶媒および廃棄 = \$31/l、労力/時 = \$30。

参考文献

1. Michael Frank 「Impurity Profiling with the Agilent 1200 Series LC System Part 3:Rapid Condition Scouting for Method Development」、Agilentアプリケーションノート、資料番号5989-5619EN、2006年。
2. Angelika Gratzfeld-Huesgen 「Agilent 1200シリーズLCシステムによる不純物のプロファイリング - パート4: Method Validation of a Fast LC Method」、Agilentアプリケーションノート、資料番号5989-5620EN、2006年。

詳細なアプリケーションノート「1200シリーズLCシステムによる不純物のプロファイリング-パート5:高いサンプルスループットを目的とした高速LCメソッドを使用したQA/QCアプリケーション例」(資料番号5989-5621EN: 英文)については、www.agilent.com/chem/libraryを参照してください。

付録

不純物のプロファイリング

「Agilent 1200シリーズLCシステムによる不純物のプロファイリング - パート 1:LC/MSによる不純物の構造解明」Agilentアプリケーションノート、資料行番号5989-5617EN、2006年。

「Agilent 1200 LCシステムによる不純物のプロファイリング - パート2:分取用HPLCによる不純物の分離」Agilentアプリケーションノート、資料番号5989-5618EN、2006年。

「Agilent 1200 LCシステムによる不純物のプロファイリング - パート3:メソッド開発の迅速な条件の探索」、Agilentアプリケーションノート、資料番号5989-5619EN、2006年。

「Agilent 1200 LCシステムによる不純物のプロファイリング、パート4:超高速LCメソッドのメソッド検証」Agilentアプリケーションノート、資料番号5989-5620EN、2006年。

「Agilent 1200 LCシステムによる不純物のプロファイリング パート5:完全なシーケンス処理によるV.QA/QCアプリケーションサンプル」Agilentアプリケーションノート、資料番号5989-5621EN、2006年。

Guidance for industry

「Guidance for industry NDA:製剤原料中の不純物」、米国保健社会福祉省および食品医薬品局医薬品評価センター(CDER)CMC、2000年2月。

「Guidance for Industry Q3B(R2)新薬中の不純物」、米国保健社会福祉省および食品医薬品局医薬品評価センター(CDER)生物製剤評価研究センター(CBER) ICH リビジョン2、2006年7月。

残留溶媒

「Agilent G1888 Network Headspace Samplerによる薬剤中の残留溶媒の同定」、Agilentアプリケーションノート、資料番号5989-1263EN、2004年。

「Agilent G1888 Headspace/6890N GC/5975 Inert MSDシステムによる薬剤中の残留溶媒の同定」、Agilentアプリケーションノート、資料番号5989-3196EN、2005年。

「GC/MSによる薬剤の充填剤中の抽出物とろ過物の同定」、Agilentアプリケーションノート、資料番号5989-5494EN、2006年。

無機不純物

「伝統的な漢方薬に関する従来型のICP-MSおよびORS-ICP-MSの評価」、Agilentアプリケーションノート、資料番号5989-2570EN、2005年。

「誘導結合プラズマ質量分析法を用いた伝統的な漢方薬中の有毒成分の同定」、アプリケーションノート、発行番号、2006年。

「定期的な薬剤分析:実績のあるアプリケーションと最良の事例にとって不可欠なソリューションガイド」CD、Agilent資料番号5989-5366EN、2006年。

www.agilent.com/chem/1200rr

Agilent は、本資料に誤りが発見された場合、また、本資料の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。
また、本資料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。

本資料に記載の情報、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。
著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本資料を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

© 2006 Agilent Technologies, Inc.

November 1, 2006
5989-5841JAJP



Agilent Technologies