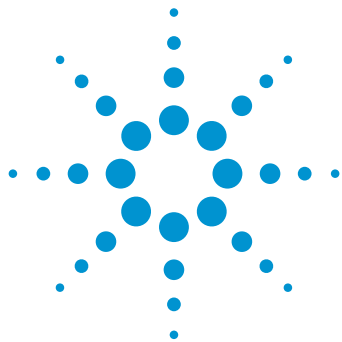




Agilent 1100 シリーズクォータナリ LC から Agilent 1260 Infinity II LC へのメソッド移管 抗ヒスタミン薬分析における同等性の証明

アプリケーションノート

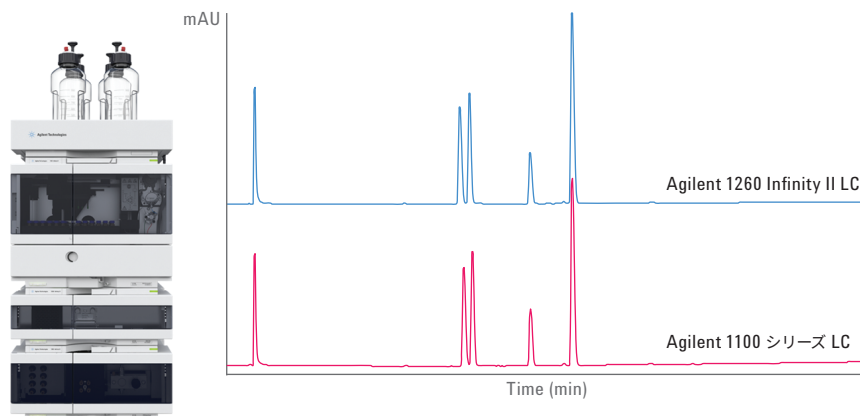
低分子医薬品

著者

Sonja Krieger
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

概要

従来の機器から新しい機器に今までの LC メソッドを移管することは、すべてのラボにとって重要なトピックです。このアプリケーションノートでは、抗ヒスタミン薬の分析に関する従来の LC メソッドを Agilent 1100 シリーズクォータナリ LC から Agilent 1260 Infinity II LC へ移管する作業について説明し、得られたリテンションタイムと分離能が同等の結果を示すことを証明します。さらに、従来の LC メソッドを、Agilent 1260 Infinity II LC によって分離能と速度が最適化された UHPLC 条件に移管します。これにより、ピーク分離能が向上する可能性があると同時に、時間と溶媒使用量も節約できます。



Agilent Technologies

はじめに

機器間のメソッド移管は、さまざまな業界におけるすべてのラボにとって重要なトピックです¹。特に医薬品業界のバリデーション済みメソッドの場合、機器間のメソッド移管は必須の作業ですが、その他の業界の QA/QC でも重要な作業になります。機器間のメソッド移管の 1 つの例として、Agilent 1100 シリーズクォータナリ LC のような旧型の機器から Agilent 1260 Infinity II LC などの新型の機器への従来の LC メソッドの移管があります。このアプリケーションノートでは、Agilent 1100 シリーズクォータナリ LC を用いた抗ヒスタミン薬の分析について説明します。また、このメソッドを Agilent 1260 Infinity II LC へ移管し、得られたリテンションタイムと分離能が同等の結果が得られることを証明します。Agilent 1260 Infinity II LC では、Agilent InfinityLab Poroshell カラムを用いて、最大圧力範囲 600 bar までの UHPLC 分析ができます。抗ヒスタミン薬に関する従来の LC 分析を、分離能と速度が最適化された UHPLC 条件に移管する作業について説明します。

ヒスタミンは内因性生物由来アミンであり、神経系では神経伝達物質として作用し、腸内、皮膚、および免疫系では局所仲介物質として作用します²。また、4 種類の受容体で発生する複雑な生理学的変化を引き起こします。1 番目のヒスタミン受容体 (H1 受容体) は体内全体に広く発現するものであり、ヒスタミンによって引き起こされる多くのアレルギー症状の原因となっています²。抗ヒスタミン薬 (H1 受容体遮断薬) は、長い間、悪心、嘔吐、およびアレルギーの治療に使用されてきました²。

実験方法

装置構成

Agilent 1260 Infinity II LC を、次のモジュールで構成しました。

- Agilent 1260 Infinity II クォータナリポンプ (G7111B)
- Agilent 1260 Infinity II バイアルサンプラ (G7129A)。一体型カラムコンパートメント、3.0 µL ヒーター (オプション #063)、およびサンプルクーラー (オプション #100) 搭載
- Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 WR (G7115A)。10 mm の標準フローセル (G1315-60022) 搭載

Agilent 1100 シリーズクォータナリ LC を、次のモジュールで構成しました。

- Agilent 1100 クォータナリポンプ (G1311A)
- Agilent 1100 デガッサ (G1379A)
- Agilent 1100 オートサンプラ (G1313A)
- Agilent 1100 カラムコンパートメント (G1316A)
- Agilent 1100 ダイオードアレイ検出器 (G1315B)。10 mm の標準フローセル (G1315-60022) 搭載

ソフトウェア

Agilent OpenLAB CDS バージョン 2.1
(2016 年 9 月に公開予定)

カラム

- Agilent ZORBAX SB-C18
4.6 × 150 mm、5 µm
(p/n 883975-902)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18
3.0 × 150 mm、2.7 µm
(p/n 693975-302T)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18
3.0 × 50 mm、2.7 µm
(p/n 699975-302T)

試薬

すべての溶媒は LC グレードのものでした。アセトニトリルは Merk (ダルムシュタット、ドイツ) から購入しました。超純水は、0.22 µm メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak、EMD Millipore 社、ベルリカ、マサチューセッツ州、米国) を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。リン酸二水素カリウム、塩酸トリペレナミン、マレイン酸クロルフェニラミン、テトラカイン、および塩酸プロメタジン は、Sigma-Aldrich 社 (シュタインハイム、ドイツ) から購入しました。

サンプル

抗ヒスタミン薬のトリペレナミン、クロルフェニラミン、テトラカイン、およびプロメタジンの混合物は、水に溶解させて 25 mM リン酸二水素カリウムを作製し、濃度 50 µg/mL の pH 3/アセトニトリル (90/10、v/v) として調製しました。

メソッド

表 1. 従来の LC 分析のクロマトグラフィー条件

パラメータ	説明
カラム	Agilent ZORBAX SB-C18、4.6 × 150 mm、5 µm
溶媒	A) 水に溶解させた 25 mM リン酸二水素カリウム、pH 3 B) アセトニトリル
グラジエント	0 分 – 10 %B 25 分 – 55 %B
ストップタイム	25 分
ポストタイム	10 分
流量	1.5 mL/min
温度	40 °C
注入量	10.0 µL
検出	204/4 nm、リファレンス 360/100 nm、データレート 10 Hz

表 2. 分離能が最適化された UHPLC 分析のクロマトグラフィー条件

パラメータ	説明
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、3.0 × 150 mm、2.7 µm
溶媒	A) 水に溶解させた 25 mM リン酸二水素カリウム、pH 3 B) アセトニトリル
グラジエント	0 分 – 10 %B 13.3 分 – 55 %B
ストップタイム	13.3 分
ポストタイム	6 分
流量	1.2 mL/min
温度	40 °C
注入量	4.25 µL
検出	204/4 nm、リファレンス 360/100 nm、データレート 40 Hz

表 3. 速度が最適化された UHPLC 分析のクロマトグラフィー条件

パラメータ	説明
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、3.0 × 50 mm、2.7 µm
溶媒	A) 水に溶解させた 25 mM リン酸二水素カリウム、pH 3 B) アセトニトリル
グラジエント	0 分 – 10 %B 2.13 分 – 55 %B
ストップタイム	2.13 分
ポストタイム	1 分
流量	2.5 mL/min
温度	40 °C
注入量	4.25 µL
検出	204/4 nm、リファレンス 360/100 nm、データレート 80 Hz

結果と考察

このアプリケーションノートでは、Agilent 1100 シリーズクォータナリ LC における、従来の LC メソッドを用いた抗ヒスタミン薬の分析について説明しています。このメソッドを Agilent 1260 Infinity II LC に移管し、同等性を証明します。さらに、抗ヒスタミン薬の分析に用いた従来の LC メソッドを、Agilent 1260 Infinity II LC によって分離能と速度が最適化された UHPLC 条件に移管します。

図 1 に、Agilent 1100 シリーズクォータナリ LC における、4 種類の抗ヒスタミン薬のトリペレナミン、クロルフェニラミン、テトラカイン、およびプロメタジンに関する従来の LC 分析の結果を示します。優れたリテンションタイムと面積精度が得られていることがわかります (表 4)。

図 2 に、Agilent 1260 Infinity II LC による抗ヒスタミン薬に関する従来の LC 分析の結果を示します。表 5 には、対応するリテンションタイムと面積精度を示します。リテンションタイムと面積精度の点から見ると、Agilent 1260 Infinity II LC は、優れた性能を示す Agilent 1100 シリーズクォータナリ LC を上回る性能を示しています。さらに、分離能もわずかに向上しています。

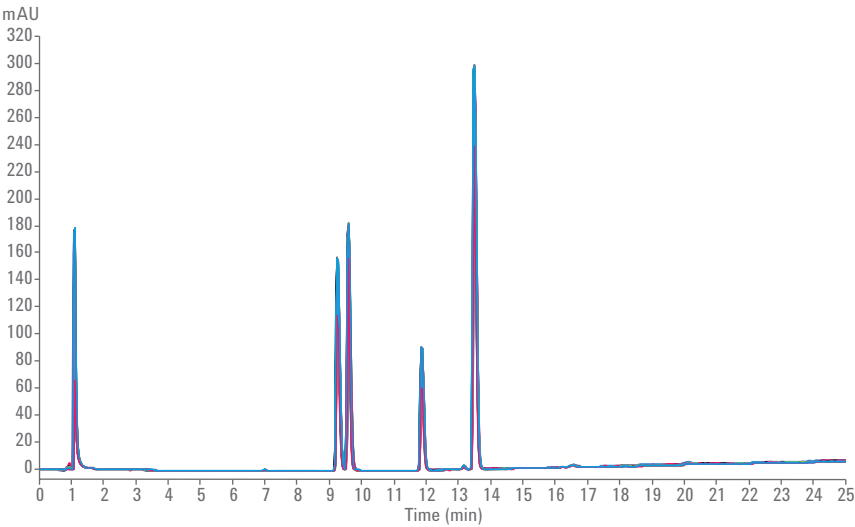


図 1. Agilent 1100 シリーズクォータナリ LC による抗ヒスタミン薬に関する従来の LC 分析。10 回の連続分析を重ね書き。

表 4. Agilent 1100 シリーズクォータナリ LC による抗ヒスタミン薬に関する従来の LC 分析。リテンションタイムと面積精度は、10 回の連続分析から決定。

化合物	RT (分)	RT RSD (%)	面積	面積の RSD (%)	分離能
トリペレナミン	9.26	0.05	1,033.5	0.26	64.6
クロルフェニラミン	9.60	0.05	1,048.3	0.28	2.0
テトラカイン	11.86	0.05	577.2	0.26	13.8
プロメタジン	13.49	0.03	2,014.5	0.25	9.1

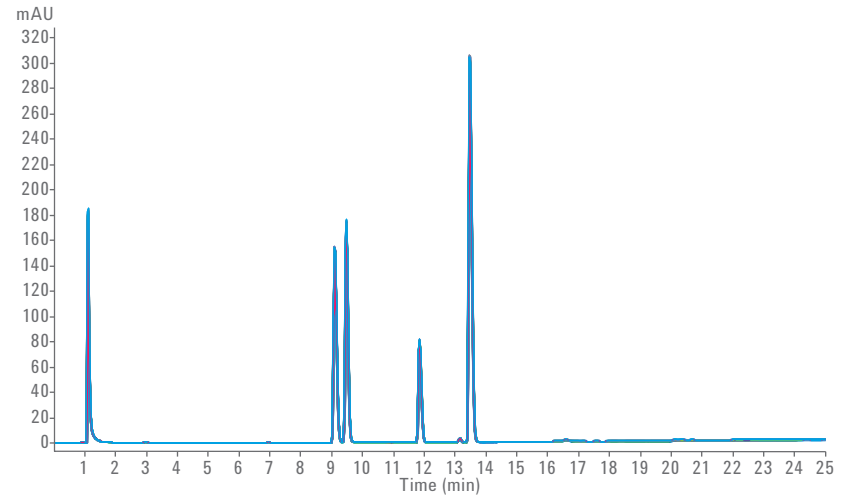


図 2. Agilent 1260 Infinity II LC における抗ヒスタミン薬に関する従来の LC 分析。10 回の連続分析を重ね書き。

図 3 と表 6 では、Agilent 1100 シリーズクォータナリ LC と Agilent 1260 Infinity II LC で分析された抗ヒスタミン薬のリテンションタイムを比較して示しています。リテンションタイムは、最大偏差 -1.7 % で良好に一致していました。このことにより、抗ヒスタミン薬の分析に関して、Agilent 1100 シリーズクォータナリ LC と比較して Agilent 1260 Infinity II LC は同等の性能を示すことが証明されました。

表 5. Agilent 1260 Infinity II LC による抗ヒスタミン薬に関する従来の LC 分析。
リテンションタイムと面積精度は、10 回の連続分析から決定。

化合物	RT (分)	RT RSD (%)	面積	面積の RSD (%)	分離能
トリベレナミン	9.10	0.01	1,018.9	0.21	63.3
クロルフェニラミン	9.48	0.02	1,007.0	0.21	2.3
テトラカイン	11.84	0.02	508.9	0.17	14.5
プロメタジン	13.48	0.01	2,017.1	0.14	9.2

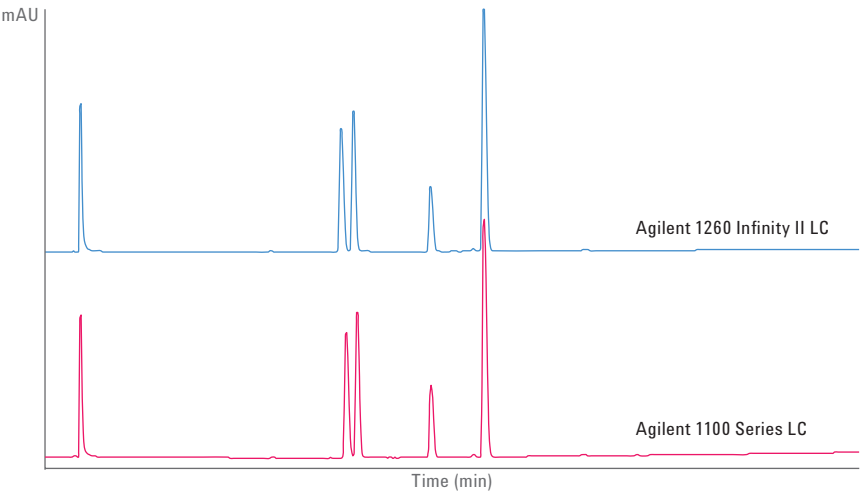


図 3. Agilent 1100 シリーズクォータナリ LC および Agilent 1260 Infinity II LC による抗ヒスタミン薬に関する従来の LC 分析。

表 6. Agilent 1100 シリーズクォータナリ LC および Agilent 1260 Infinity II LC による抗ヒスタミン薬に関する従来の LC 分析。リテンションタイムの比較。

化合物	RT 偏差 (分)	RT 偏差 (%)
トリベレナミン	-0.16	-1.7
クロルフェニラミン	-0.12	-1.3
テトラカイン	-0.02	-0.2
プロメタジン	-0.02	-0.1

機器コントロールとデータ解析には、Agilent OpenLAB CDS バージョン 2.1 を使用しました。図 4 に、OpenLAB CDS バージョン 2.1 のデータ解析のスクリーンショットを示します。OpenLAB CDS バージョン 2.1 では、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、および質量分析に対して 1 つのソフトウェアシステムが提供されます。ユーザーインターフェースは最新かつフラットであり、コンプライアンスレポート作成に関して高度なテクニカルサポートを実施可能です。また、ドラッグアンドドロップのテンプレート作成による、カスタマイズされたインタラクティブレポート作成機能も提供されており、関連するデータのみを確認することができます。

また、Agilent 1260 Infinity II LC と組み合わせ、Agilent InfinityLab 消耗品を使用しました。A-Line クイックコネクティフィティング (p/n 5067-6166、キャピラリー 0.17 × 105 mm) および Agilent クイックターンフィッティング (p/n 5067-5966) を使用することにより、カラムを迅速かつ簡単に工具なしで取り付けることができるため、ユーザーが関与しなくても完璧なカラム接続を実現できます。また、Agilent 1260 Infinity II LC を A-Line フレックスベンチ (p/n 5043-1252) 上で設定することにより、ラボスペースを効率的に使用して、機器に簡単にアクセスするための人間工学的アプローチが提供されます。

Agilent 1260 Infinity II LC では、Agilent InfinityLab Poroshell カラムを用いて、最大圧力範囲 600 bar までの UHPLC 分析を実行できます。お客様は、Agilent 1260 Infinity II LC をご注文される際に、複数の Agilent InfinityLab Poroshell カラムから選択して、システムとともに入手することが可能です。例えば、Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、3.0 × 150 mm、2.7 μm カラム (p/n 693975-302T) または Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、3.0 × 50 mm、2.7 μm カラム (p/n 699975-302T) から選択できます。抗ヒスタミン薬の分析では、これらのカラムを使用することにより、分離能と速度がそれぞれ最適化された UHPLC 条件メソッドを移管できます。

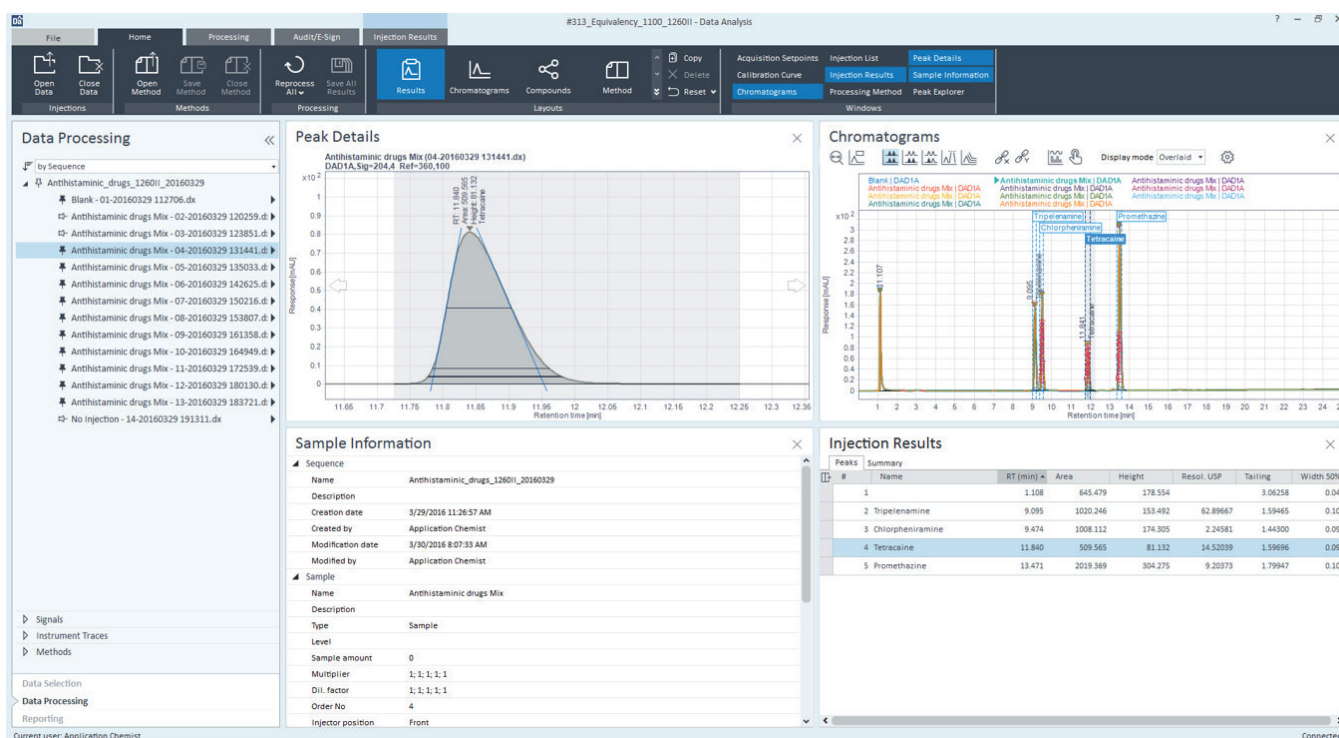


図 4. Agilent OpenLAB CDS バージョン 2.1 によるデータ解析のスクリーンショット。

図 5 と表 7 に、分離能が最適化された UHPLC 条件下で、抗ヒスタミン薬を分析した結果を示します。Agilent 1260 Infinity II LC の全圧力範囲を使用するために、Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、3.0 × 150 mm、2.7 μm カラムを 1.2 mL/min という比較的高流量で動作させています。これらの条件下では、トリベレナミンおよびクロルフェニラミンの分離能が、従来の LC メソッドを使用した場合には 2.3 ですが、分離能が最適化された UHPLC メソッドを使用した場合には 5.4 まで向上しています。さらに、分析時間が 47 % 短縮され、溶媒使用量が 57 % 減少しています。

Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、3.0 × 50 mm、2.7 μm カラムを導入することにより、抗ヒスタミン薬の分析を、速度が最適化された UHPLC 条件に移管できます。この結果を、図 6 と表 8 に示します。この場合も、トリベレナミンおよびクロルフェニラミンの分離能が、従来の LC メソッドの場合と比較して、2.3 から 2.9 に向上しています。同時に、分析時間と溶媒使用量がそれぞれ、91 % および 86 % と大幅に低減されています。

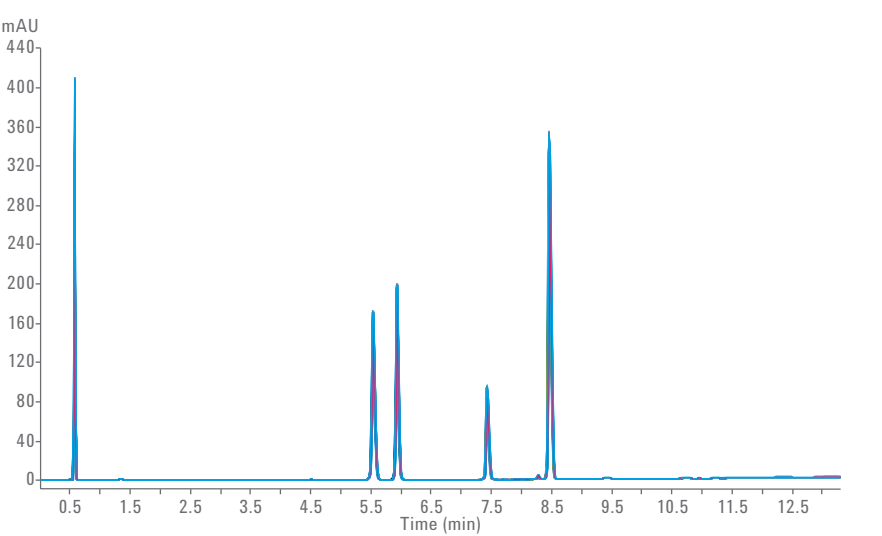


図 5. Agilent 1260 Infinity II LC による抗ヒスタミン薬に関する分離能が最適化された UHPLC 分析。10 回の連続分析を重ね書き。

表 7. Agilent 1260 Infinity II LC による抗ヒスタミン薬に関する分離能が最適化された UHPLC 分析。リテンションタイムと面積精度は、10 回の連続分析から決定。

化合物	RT (分)	RT RSD (%)	面積	面積の RSD (%)	分離能
トリベレナミン	5.53	0.05	523.7	0.05	97.2
クロルフェニラミン	5.93	0.03	515.5	0.10	5.4
テトラカイン	7.43	0.04	260.6	0.09	21.0
プロメタジン	8.46	0.03	1,028.2	0.04	13.6

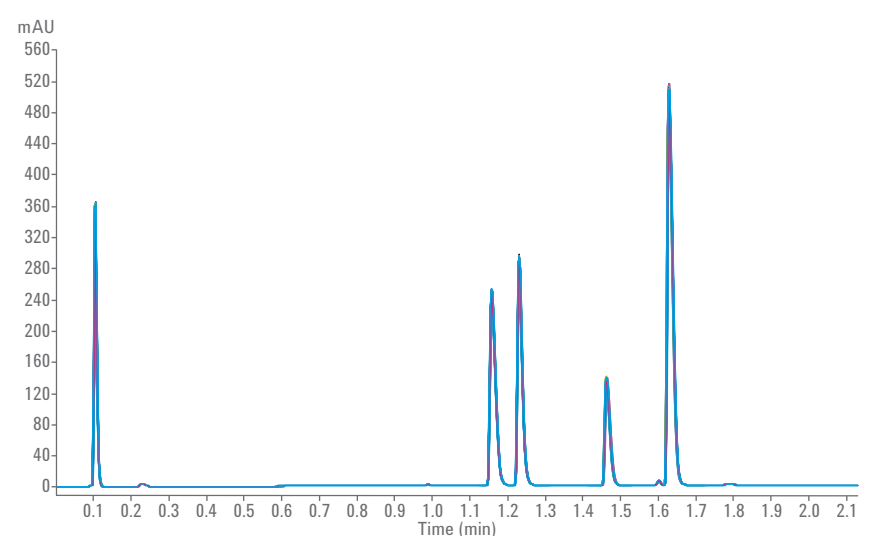


図 6. Agilent 1260 Infinity II LC による抗ヒスタミン薬に関する速度が最適化された UHPLC 分析。10 回の連続分析を重ね書き。

結論

抗ヒスタミン薬の分析において、Agilent 1100 シリーズクォータリ LC から Agilent 1260 Infinity II LC に従来の LC メソッドを移管することにより、リテンションタイムの最大偏差が -1.7 %、さらにより高い分離能が認められました。これにより、抗ヒスタミン薬の分析において、Agilent 1100 シリーズクォータリ LC と比較して Agilent 1260 Infinity II LC は同等の性能を示すことが証明されました。Agilent 1260 Infinity II LC では、Agilent InfinityLab Poroshell カラムを用いて、最大圧力範囲 600 bar までの UHPLC 分析を実行できます。従来の LC メソッドから、分離能と速度が最適化された UHPLC 条件に移管することにより、ピーク分離能が向上すると同時に、分析時間と溶媒使用量が低減されました。

参考文献

1. Agilent 1290 Infinity with ISET, *Agilent Technologies User Manual*, part number G4220-90314, **2015**.
2. Panula, *et al.*, International Union of Basic and Clinical Pharmacology.XCVIII.Histamine Receptors, *Pharmacological Reviews* **2015**, 67, 601–655.

表 8. Agilent 1260 Infinity II LC による抗ヒスタミン薬に関する速度が最適化された UHPLC 分析。
リテンションタイムと面積精度は、10 回の連続分析から決定。

化合物	RT (分)	RT RSD (%)	面積	面積の RSD (%)	分離能
トリベレナミン	1.16	0.00	254.4	0.19	53.0
クロルフェニラミン	1.23	0.00	252.1	0.23	2.9
テトラカイン	1.46	0.05	126.7	0.25	9.8
プロメタジン	1.63	0.04	500.0	0.19	6.4

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本資料掲載の製品は、すべて研究用です。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。アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2016

Printed in Japan, June 1, 2016

5991-6914JAJP



Agilent Technologies