

公定書メソッドを用いたイオヘキソールの分析： Agilent 1260 Infinity III LC による 緩やかなグラジエントでの高精度結果の実現



著者

Florian Rieck
Agilent Technologies, Inc.

概要

薬局方の公定書メソッドは医薬品の分析における主要なガイドラインです。これらのメソッドの中には、使用する液体クロマトグラフィー（LC）ハードウェアでは難しい緩やかなグラジエントなどの条件を必要とするものもあります。Agilent 1260 Infinity III LC はこれらの要件を考慮して設計されており、厳しい条件下でも非常に正確なリテンションタイムを実現します。このアプリケーションノートでは、イオヘキソールの公定書メソッドによる分析における性能を実証します。このメソッドは、同じシステムを使用してさらに最適化されており、分析時間を短縮して溶媒消費量を削減することで、公定書メソッドのシステム適合性要件を維持しながら、より効率的で持続可能な分析を実現しています。

はじめに

さまざまな薬局方に記載されている公定書メソッドは、多くの医薬品に対してバリデーション済みの分析手順を提供します。これらの公定書メソッドは、医薬品製造ワークフローにおける品質管理や不純物試験などに広く使用されています。新しいラボに導入する場合や、新しいハードウェアに初めて適用する場合は、各メソッドを「実際の使用条件」で検証する必要があります。¹薬局方には通常、メソッドを検証するために、2つの分析対象物間の最小分離能など、満たす必要のあるシステム適合性パラメータが記述されています。これらのパラメータを高い信頼性で測定するには、LCハードウェアが正確で再現性の高い結果を出す必要があります。

公定書メソッドの一例として、イオヘキソールとその関連物質の分析があります。²イオヘキソール（図1）はX線造影剤として使用されます。³イオヘキソールは、その分子極性により、逆相固定相を用いた分析では、主成分とその不純物の保持が低下します。このため、分離メソッドでは、高水性条件で始まる長く緩やかなグラジエントが採用されており、これはあらゆるHPLCシステムにとって厳しいものです。

このアプリケーションノートでは、欧州薬局方（Ph.Eur.）に記載されているメソッドをクォータリ LC システムに適用し、イオヘキソールと2つの既知の不純物の分析した事例について説明します。その後、この公定書メソッドをUHPLC条件に合わせて調整し、溶媒消費量と分析にかかる時間を最小限に抑えます。分離能やリテンションタイムの安定性などのシステム適合性パラメータをモニタリング/報告し、両方のメソッドの品質を評価します。

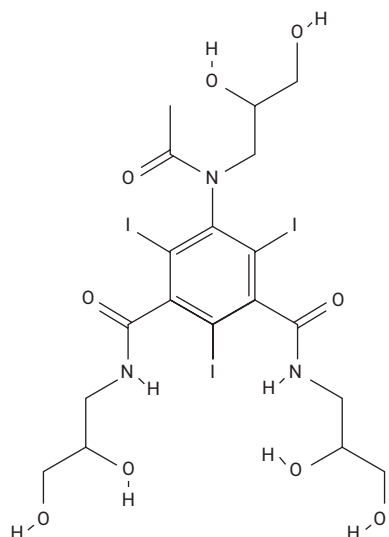


図 1. イオヘキソールの化学構造

実験方法

装置構成

1260 Infinity III LC は次のモジュールで構成しました。

- InfinityLab Assist インタフェース（G7179A）と InfinityLab Assist ハブ（G7180A）で構成される Agilent InfinityLab Assist アップグレード（G7178A）
- Agilent 1260 Infinity III クォータリポンプ（G7111B）
- 一体型カラムコンパートメント（ICC）、3 µL 熱交換器（オプション番号 #063）およびサンプルサーモスタット（オプション番号 #101）付きの Agilent 1260 Infinity III バイアルサンブラ（G7129A）
- 10 mm 標準フローセル（オプション #018）付き Agilent 1260 Infinity III 可変波長検出器（G7114A）

カラム

- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 × 250 mm、5 µm（部品番号 959990-902）
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18、3 × 150 mm、2.7 µm（部品番号 693675-742）

ソフトウェア

Agilent OpenLab CDS リビジョン 2.7 以降

試薬

実験全体を通じて、Agilent LC 用 InfinityLab グラジエントグレードアセトニトリル（ACN）（部品番号 5191-5100*）を使用しました。超純水は、0.22 µm メンブレンカートリッジ（Millipak）を装着した Milli-Q Integral システムで製造しました。分析グレードの水酸化ナトリウムは、VWR（ダルムシュタット、ドイツ）から購入しました。

*特定の国でのみ入手可能です。

サンプル

イオヘキソール欧州薬局方参照化合物、イオヘキソール不純物 A 欧州薬局方化合物、およびイオヘキソール不純物 J 欧州薬局方化合物は、Merck（ダルムシュタット、ドイツ）から購入しました。すべての化合物の混合溶液は、最終濃度 75 µg/mL で 1 mM 水酸化ナトリウム水溶液中に調製しました。

メソッドの設定

クロマトグラフィー条件は、イオヘキソール欧州薬局方モノグラフ²に規定されています（表 1 を参照）。

分析時間と溶媒消費量に関して分離を最適化するために、メソッドを調整し、UHPLC 条件に移行しました。実施した変更はすべて、米国薬局方（USP）⁴ の621 章および欧州薬局方⁵ の 2.2.46 に規定された許容範囲内です。メソッドの移行に必要な許容範囲と計算式の詳細については、別のアプリケーションノートを参照してください。⁶最適化されたメソッド（表 1）は、欧州薬局方モノグラフで要求されているものと同じ充填剤を使用し、高水性条件に最適化された表面多孔質粒子を用いて化合物を保持するカラムを適用しました。

表 1. 欧州薬局方メソッドと最適化されたメソッドのクロマトグラフィー条件

パラメータ	設定値	
	欧州薬局方メソッド	最適化されたメソッド
移動相	A：水 B：アセトニトリル	A：水 B：アセトニトリル
流量	1 mL/min	0.788 mL/min
グラジエント	時間（分） %B	時間（分） %B
	0 1	0 1
	60.00 13 60.01 99	19.44 13 19.45 99
ストップタイム	67 分	23 分
ポストタイム	8 分	4 分
注入量	10 µL	2.55 µL
温度	25 °C	25 °C
UV 検出	254 nm データレート 5 Hz	254 nm データレート 10 Hz

結果と考察

イオヘキソールとその不純物 A および J を含む標準溶液を、欧州薬局方公定書メソッドを使用して分離しました。すべての化合物はクロマトグラムの前半に溶出しました（図 2 を参照）。2 つの不純物が主成分から十分に分離されました。イオヘキソールは、エンド体とエキソ体の 2 つの異性体が存在するため、公定書メソッドの条件下では分離不能だと考えられる 2 つのピークを示します。²不純物 A とイオヘキソールの分離能は 5.5 で、欧州薬局方² で定義されているシステム適合性要件（5.0 以上）を満たしました。不純物 J もイオヘキソールからベースライン分離されました。この公定書メソッドでは、60 分間にわたり 0.2 %/min のグラジエント勾配が指定されています。これはあらゆるグラジエントポンプにとって課題となります。この分析条件にもかかわらず、8 回の連続注入におけるリテンションタイム（RT）の相対標準偏差（RSD）は、すべての化合物で 0.083 % 以下でした（表 2 を参照）。これらの数値は、1260 Infinity III クォータリポンプの高い混合精度を実証するものです。

表 2. 公定書メソッドを使用してサンプルを 8 回繰り返し注入したときのピーク特性

化合物	RT (分)	相対 RT	分離能 (EP)	RT RSD (%)
不純物 A	15.865	0.83	—	0.069
イオヘキソール エンド	18.096	0.95	5.5	0.083
イオヘキソール エキソ	19.041	1.00	2.2	0.078
不純物 J	20.685	1.09	3.8	0.059

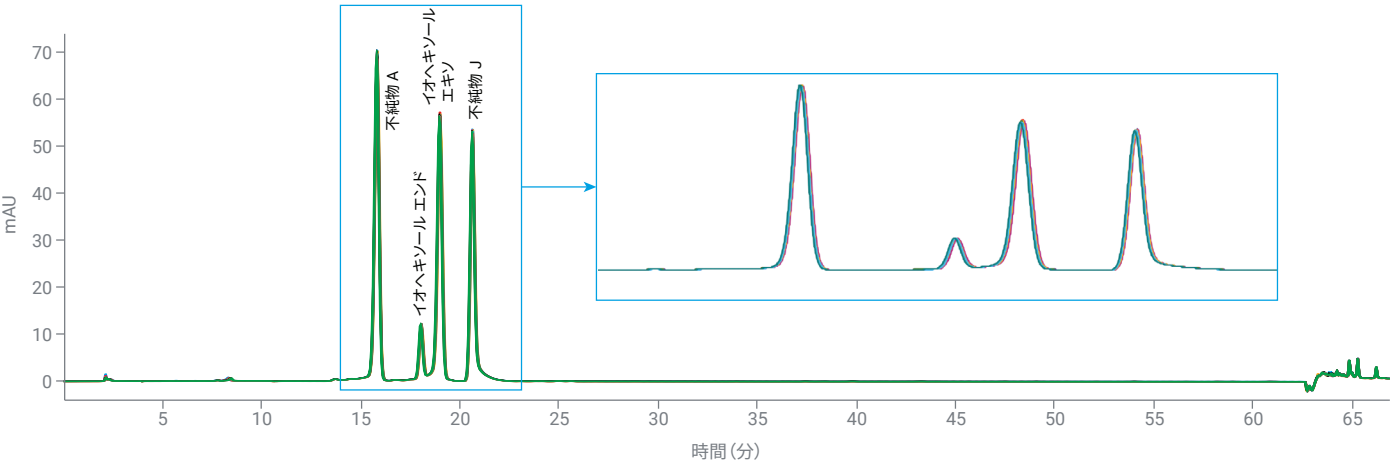


図 2. 公定書メソッドを使用した分離のクロマトグラムの重ね書き表示（N = 8）

溶媒の消費量を削減し分析時間を短縮するために、メソッドを最適化し、より小さな粒子の、長さが短いナローボアカラムに移行しました。流量・グラジエント・注入量は、新しい寸法に合わせて調整しました。すべての計算と調整は、欧州薬局方⁵のチャプター 2.2.46 に記載されている LC グラジエント溶出の許容限度内で行いました。カラムは、全多孔性の C18 粒子から表面多孔質の 100 % 水適合性 C18 粒子に変更しました。この Poroshell 120 Aq-C18 粒子は、独自のエンドキャッピングによる C18 修飾を特徴としており、従来の C18 固定相よりも固定相のデウェッティングに対する耐性が高くなります。⁷非極性固定相 (C18 など) が高水性条件下で操作されると、相のデウェッティングが発生します。これが起こると、リテンションタイムのシフトやピークの歪みが発生する可能性があります。

表 3. 最適化されたメソッドを使用してサンプルを 8 回繰り返し注入したときのピーク特性

化合物	RT (分)	相対 RT	分離能 (EP)	RT RSD (%)
不純物 A	5.793	0.82	—	0.044
イオヘキソール エンド	6.763	0.96	6.8	0.033
イオヘキソール エキシ	7.068	1.00	2.1	0.032
不純物 J	7.380	1.04	2.2	0.026

最適化されたメソッドにより、分析時間が 75 分 (カラムフラッシュと再平衡を含む) から 27 分に短縮されました (64 % の削減)。調整した条件下でサンプルを 8 回分析しました。図 3 にすべての分析結果のクロマトグラムの重ね表示を示します。今回も 4 つの化合物はうまく分離され、グラジエントの前半で溶出されました。不純物 A とイオヘキソールの分離能は 6.8 に向上しました。不純物 J は、以前よりも分離能は低いものの、イオヘキソールのエキソ異性体からベースライン分離されました。RT の再現性は再び非常に高く、RSD は元のメソッドよりもさらに良好になりました (表 3 を参照)。最小分離能に関する公定書メソッドのシステム適合性要件が満たされており、調整されたメソッドが分析に適していることがわかります。

調整されたパラメータでは、システム適合性要件と RT 精度を高いレベルで維持しながら、元のメソッドの 29 % 未満の溶媒を使用して、36 % の時間で分析が実施できました。

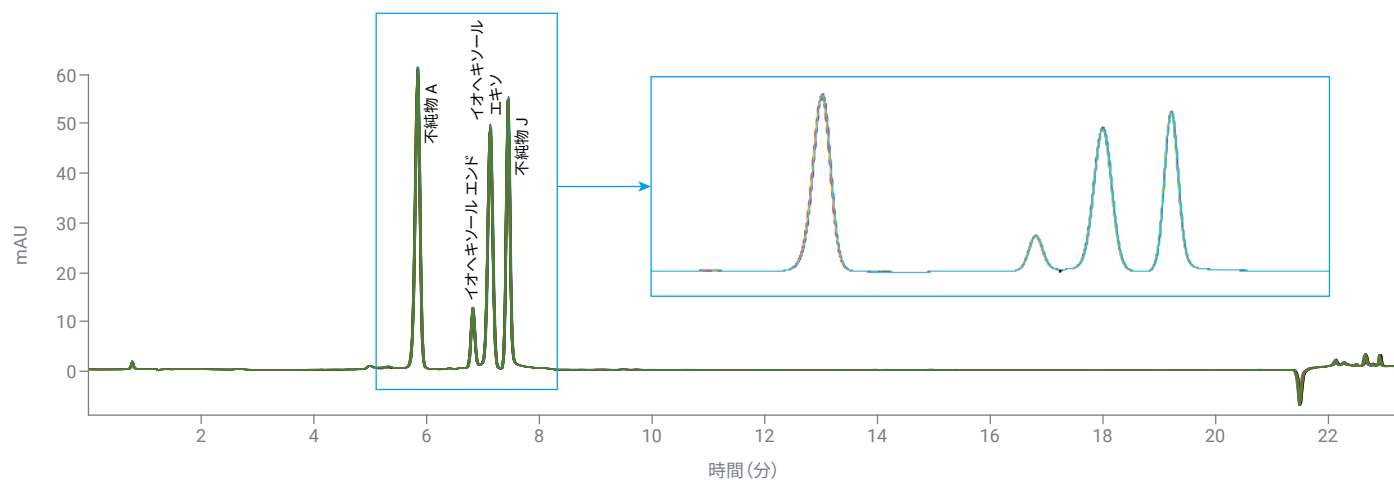


図 3. 最適化された条件下での分離のクロマトグラムの重ね表示 (N = 8)

結論

緩やかな 2 液グラジエントを使用する公定書メソッドを適用して、イオヘキソールと 2 つの不純物を分離しました。欧州薬局方のシステム適合性パラメータは、リテンションタイムの $RSD \leq 0.083\%$ ($N = 8$) で合格しました。元の 75 分間のメソッドを、USP⁴ の— 621 章と欧州薬局方⁵ の 2.2.46 で規定された範囲内で最適化し、UHPLC 条件に移行しました。最適化を行ったメソッドでは、元のメソッドで達成されていた分離能が維持され、RT RSD が $\leq 0.044\%$ に改善され、分析時間と溶媒消費量がそれぞれ 64 %、71 % 削減されました。これらの数値は、Agilent 1260 Infinity III LC が、公定書メソッドにおける難しい緩やかなグラジエント条件下でも非常に再現性の高い結果を実現し、同時にこれらのメソッドを最適化して時間を節約し、より持続可能な運用を行う柔軟性も持ち合わせていることを示しています。

参考文献

1. The United States Pharmacopoeia. General chapter <1226> Verification of Compendial Procedures, **2019**. https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M870_03_01.html (accessed 2024-06-17).
2. The European Pharmacopoeia 11.0, Iohexol. 01/2017:1114.
3. National Drug Code Directory, United States Food and Drug Administration.
4. The United States Pharmacopoeia. General chapter <621> Chromatography, **2023**. https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-6C3DF8B8-D12E-4253-A0E7-6855670CDB7B_8_en-US (accessed 2024-06-17).
5. The European Pharmacopoeia 11.0, Chapter 2.2.46, Chromatographic Separation Techniques.
6. Schipperges, S.; Naegel, E. Reduce the Cost per Injection for Your USP Compendial Method. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-5897EN, **2023**.
7. Fu, R.; Wei, T. Analysis of Polar Compounds Using an Agilent InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18 Column with Improved and Reliable Performance. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-5555EN, **2022**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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。

DE21315027

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, October 28, 2024

5994-7571JAJP