アプリケーションノート

バイオ医薬品/医薬品

低分子 GLP-1 医薬品の強制分解のためのカラムケミストリのスカウティング

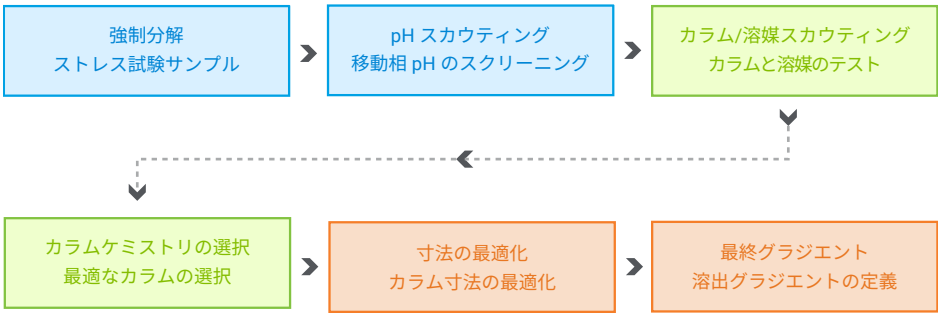
著者

Emily Parry
Agilent Technologies, Inc.

概要

オルホルグリプロンは、最近承認された経口の非ペプチド型グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）受容体作動薬であり、従来の注射によるペプチドベースの GLP-1 治療からの大きな進歩を示すものです。不純物プロファイリングとメソッド開発を支援するため、強制分解試験を実施して代表的な分解生成物を生成し、クロマトグラフィー分離条件を検証しました。6 種類の固定相ケミストリ（C18、フェニルベース、ペンタフルオロフェニル（PFP）、およびミックスモード固定相など）を使用して体系的な液体クロマトグラフィー /質量分析（LC/MS）メソッドスカウティング研究を実施し、アセトニトリルとメタノールの移動相で評価しました。カラム性能は、医薬品有効成分（API）のリテンション、不純物の分離能、検出された不純物ピークの総数に基づいて評価しました。Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムの全体的な選択性と不純物の分離能は、非常に優れていました。100 mm カラムと 1.9 µm 粒子を使用し、グラジエント時間を 26 分間に延ばしてさらに最適化したところ、分解生成物と関連不純物の分離度が大幅に向上しました。最終メソッドでは、オルホルグリプロンとその不純物を UV と MS で効果的に特性解析できました。

オルホルグリプロン強制分解生成物の分離のための体系的な LC メソッドスカウティング



概要

GLP-1 受容体作動薬は、2 型糖尿病と肥満の治療に使用される重要な治療薬の一種です。従来、ほとんどの GLP-1 治療にはペプチド医薬品が使用されてきましたが、酵素分解による経口バイオアベイラビリティの低下や、消化管での低吸収性などの問題があるため、皮下注射によって投与する必要がありました。経口セマグルチドによってペプチドベースの GLP-1 治療を経口で実施できることがわかりましたが、これらの課題を克服するには特殊な製剤が必要です。オルホルグリプロン（図 1）の承認は、この分野における大きな進歩を示すものです。オルホルグリプロンは経口投与できる非ペプチド型の低分子 GLP-1 受容体作動薬であるため、患者にとっては注射治療よりも便利で利用しやすいためです。

この新たな治療法の登場により、製品の品質と安全性を確保するために、潜在的な不純物の特性解析とモニタリングが非常に重要になっています。強制分解研究は、製造、保管、使用中に形成される可能性がある分解生成物を生成することで、医薬品有効成分（API）の安定性プロファイルに関する貴重な情報を提供します。生成された分解物混合物を使用して、クロマトグラフィーメソッドを検証し、関連不純物および分解物から API を適切に分離できます。本研究では、体系的な LC/MS メソッドスカウティング手法を使用して、オルホルグリプロンの不純物プロファイリングメソッドを開発しました。最終的なクロマトグラフィーメソッドを選択して最適化する前に、明確な選択性メカニズムを持つ 6 種類の固定相ケミストリ（逆相カラム、芳香族選択カラム、混合モードカラムなど）を評価しました。

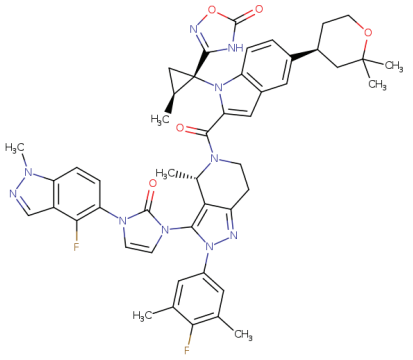


図 1. オルホルグリプロンの構造

実験方法

試薬

オルホルグリプロンは Cayman Chemical（アナーバー、ミシガン州）から調達しました。LC/MS グレードの水酸化アンモニウムとギ酸は、Sigma-Aldrich（セントルイス、ミズーリ州）から購入しました。InfinityLab LC/MS グレードの水、アセトニトリル、メタノールを、サンプル溶媒と移動相成分として使用しました。

使用機器

Agilent 1290 Infinity II バイナリポンプ（G7120B）を外部バルブドライブおよび 13 ポート溶媒スイッチングバルブ（G4235A）と組み合わせて、移動相をスカウティングしやすくしました。Agilent マルチサンプラ（G7167B）で、8 カラムスイッチングバルブ（G4239C）付きのサーモスタットカラムコンパートメント（G7116B）にサンプルを導入しました。不純物の検出には、表 1 の設定のダイオードアレイ検出器を使用しました。次に、溶出液を質量分析検出用に Agilent InfinityLab LC/MSD Pro iQ に送りました。MS 操作パラメータは表 2 のとおりです。取り込みとデータ解析には、Agilent OpenLab CDS バージョン 2.8 を使用しました。

表 1. DAD 設定

DAD	
パラメータ	**設定値**
信号	254 nm
バンド幅	4
データレート	40 Hz
スペクトル	190 ～ 400 nm
ステップ	2 nm

表 2. MS 設定

IQ Pro	
パラメータ	**設定値**
ガス温度	325 °C
ガス流量	11 L/min
ネブライザ圧力	30 psi
キャピラリ電圧	3,500 V
取り込みモード	
スキャン（+）	70 ～ 1,000 *m/z*
SIM（+）	883,4 *m/z*

サンプル調製と強制分解

10 ミリグラムのオルホルグリプロンを 60:40（v/v）のアセトニトリル:水 4 mL で溶解し、完全に溶解するまで超音波処理しました。この溶液のうち 900 µL を、強制分解研究用に 3 つの個別のバイアルに移しました。分解を誘起するために添加したのは、100 µL の 1 M 塩酸（酸性分解）、100 µL の 1 M 水酸化ナトリウム（塩基性分解）、または 100 µL の 30 % 過酸化水素（酸化分解）です。

酸性および塩基性分解サンプルは 70 °Cで 2 時間、酸化分解サンプルは 70 °Cで 1 時間加熱しました。培養後に 3 種類の分解サンプルを混合し、さらなる分解反応をクエンチしました。この混合物を、解析用に HPLC バイアルに移しました。

比較のために、溶媒ブランクと分解されていないオルホルグリプロンの標準物質サンプルも調製して解析しました。

メソッドスカウティング

OpenLab では、シーケンスパネルでの変更により、メソッドパラメータを自動変更できます。メソッドオーバーライドカラムの選択をシーケンスに追加して、特定のメソッド設定を上書きできます（図 2）。例えば、8 カラム選択バルブが取り付けられている場合、同じメソッドを使用して異なるカラムケミストリを評価できます。そのためには、サンプル解析前にワークリスト内のバルブポジションを上げて、短い平衡化メソッドを実行します。メソッドのオーバーライドに使用できるその他のパラメータとしては、カラム温度、初期のグラジエント組成、流量などがあります。

表 3 のとおり、試験用に 6 種類のカラムをすべて 2.1 × 50 mm として構成し、2.7 um の粒子を選択しました。

表 3. 評価対象の Agilent HPLC カラム

ケミストリ（2.1 × 50 mm、2.7 µm）	部品番号
InfinityLab Poroshell HPH-C18	699775-702
InfinityLab Poroshell 120 CS-C18	699775-942
InfinityLab Poroshell 120 EC-C18	699775-902
InfinityLab Poroshell 120 PFP	699775-408
InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl	699775-912
Altura Poroshell 120 PFAS	227205-007
その他の寸法	
Infinity Lab Poroshell EC-C18、2.1 × 100、2.7 µm	695775-902
Infinity lab Poroshell EC-C18、2.1 × 100、1.9 µm	695675-902

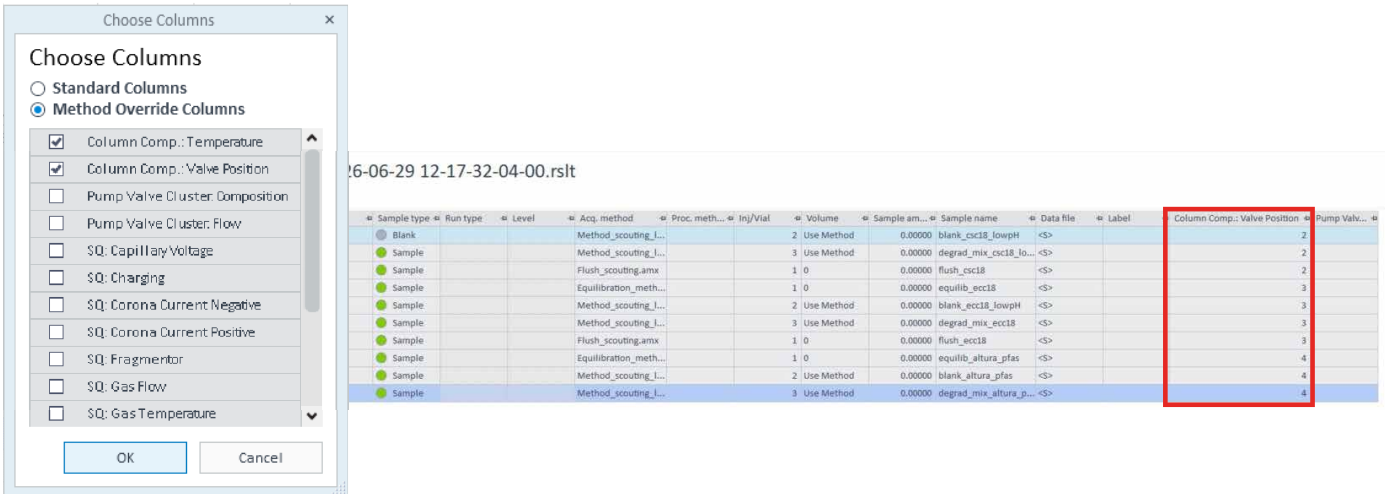


図 2. シーケンスパネルで使用できる OpenLab メソッドオーバーライドカラム

結果と考察

メソッドスカウティングの結果

初期の pH スカウティングは、Poroshell HPH-C18 カラムを使用して実行しました。このカラムが幅広い pH 範囲に対応しているためです。水性移動相の成分は水と 0.1 % ギ酸、または 10 mM 水酸化アンモニウムで、これをアセトニトリル有機相内で対応する調整剤と組み合わせました。リテンションを上げる低 pH 条件（図 3）を見つけた後に、0.1 % ギ酸を含むメタノールベースの有機移動相を調製し、12 ポート溶媒選択バルブを切り替えて自動試験ワークフローに組み込みました。

初期のスカウティンググラジエントでは、高有機溶媒組成で、API とすべての不純物が 1 分以内に溶出しました。ピーク下のベースラインの上昇は、顕著な共溶出が発生していることを示します。各種カラムケミストリをより効果的に評価できるようにするため、高比率の有機溶媒で始まる緩やかなグラジエント（図 4）を開発し、追加のカラムの試験に使用しました。

Poroshell EC-C18 を含めたのは、表面と結合相の特性が Poroshell HPH-C18 と異なるため、オルホルグリプロンやその分解生成物のリテンションと選択性を補完できるためです。Poroshell CS-C18 カラムを含めたのは、C18 選択性が異なるため、不純物の分離度が向上する可能性があるからです。また Poroshell PFP 相を評価したのは、オルホルグリプロンなどの芳香族化合物に対する独自の選択性があるためです。スクリーニングには Poroshell Altura PFAS カラムも含めました。

このカラムは混合モードリテンションメカニズムを備えているため、従来の逆相相互作用より選択性が高く、従来の C18 相では適切に分離されない不純物を分離できるというメリットがあるためです。

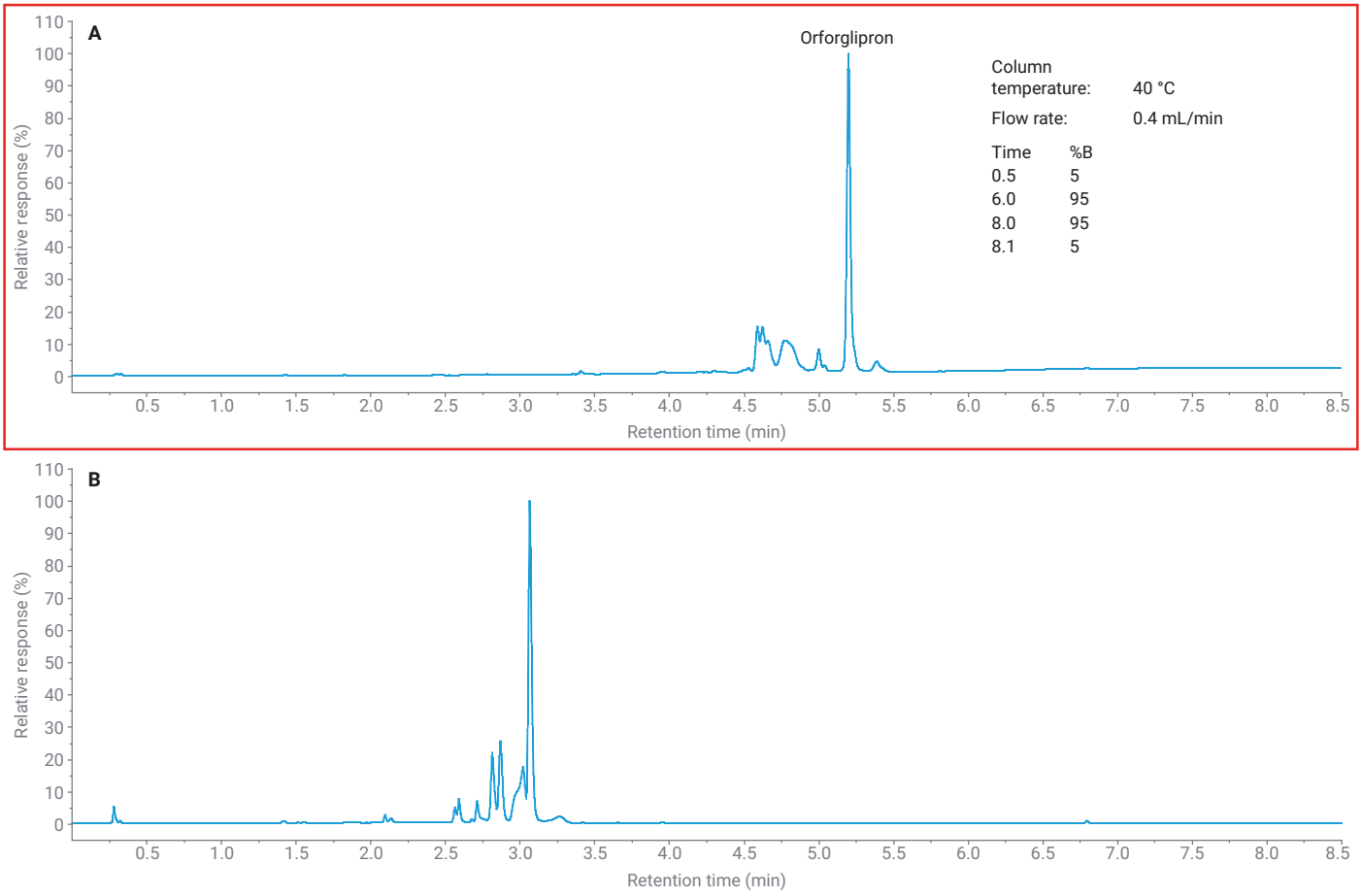


図 3. Agilent Poroshell HPH-C18 カラムによる分解物混合物のクロマトグラム。(A) はギ酸グラジエント、(B) は水酸化アンモニウムグラジエントを使用

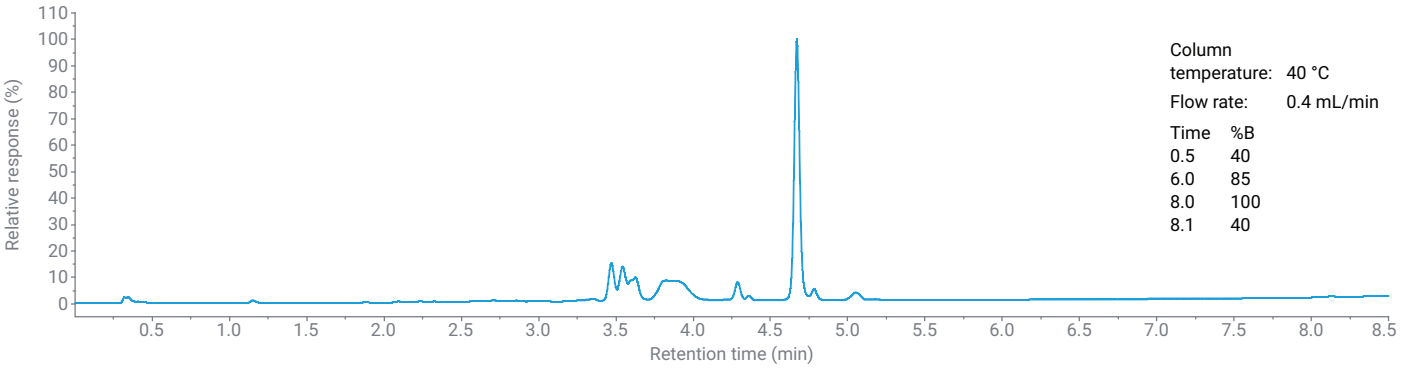


図 4. Agilent Poroshell HPH-C18 カラムと低 pH のフォーカススカウティンググラジエントによる分解物混合物のクロマトグラム

図 5 は、選択した固定相からのクロマトグラムを示しています。カラム性能の評価には、3 つの主要指標を使用しました。すなわち、API からの不純物の分離、API のリテンション、検出される不純物ピークの総数です。これらの条件に基づき、Poroshell EC-C18 カラムは全体的に非常に高い性能を発揮しました。

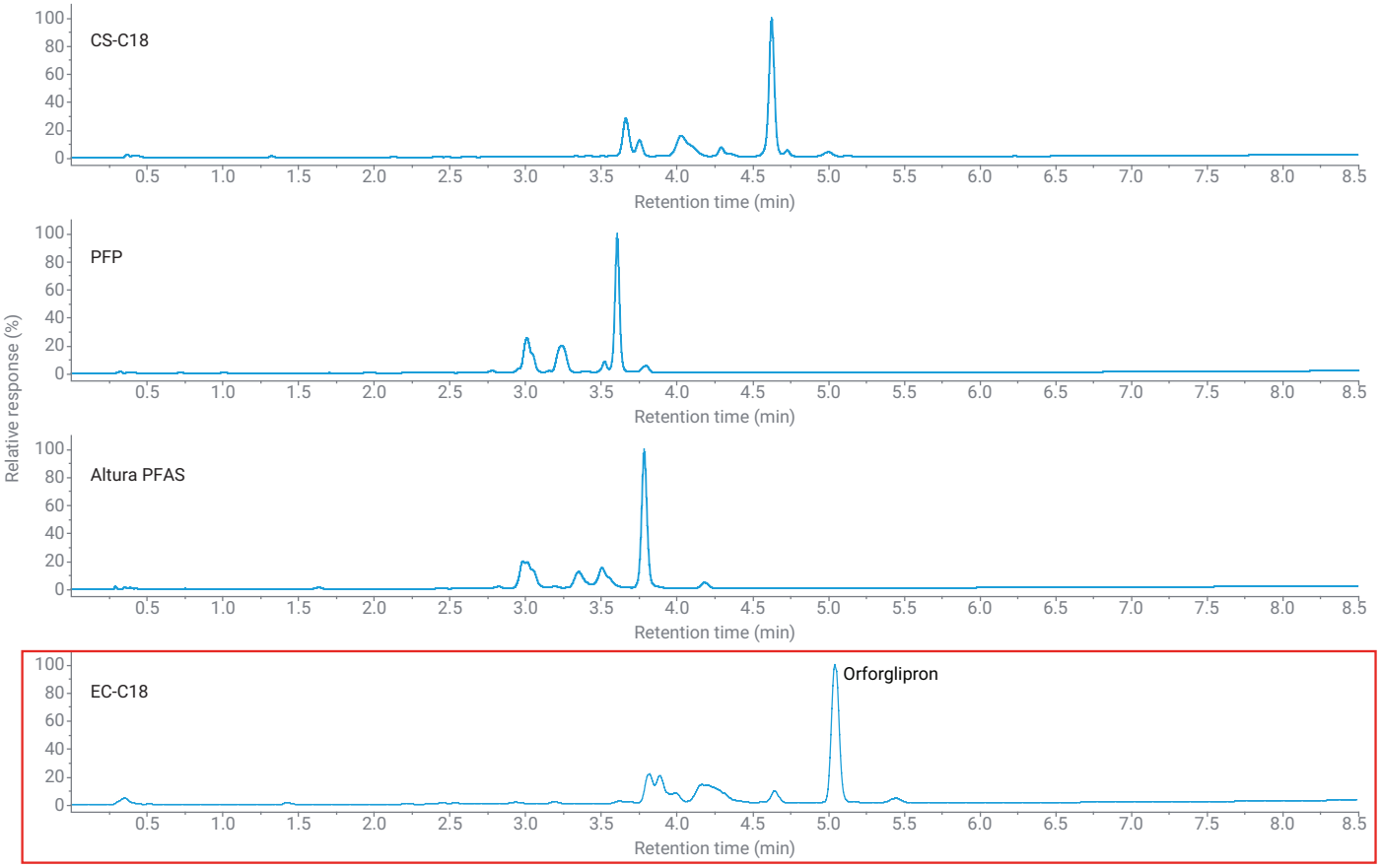


図 5. 分解物混合物のクロマトグラム

すべてのカラムの評価には、アセトニトリルとメタノールを有機溶媒として使用しました。ほとんどの場合、アセトニトリルは性能が高く、API と不純物のピークを明確に分離できました。唯一の例外は PhenylHexyl カラムでした。図 6 は、PhenylHexyl カラムで（A）アセトニトリル、(B) メタノールを使用した場合の分離を比較したものです。この固定相を含めたのは、オルホルグリプロンなどの芳香族化合物との π-π 相互作用による、独自の選択性があるためです。メタノールは、アセトニトリルに対する PhenylHexyl 相の選択性を変えることが知られています。このケースでは、メタノールを使用することで不純物の分離度の向上が見られました。ただし、API からの不純物の分離や検出された不純物ピークの総数について、PhenylHexyl 条件が Poroshell EC-C18 カラムを上回ることはありませんでした。

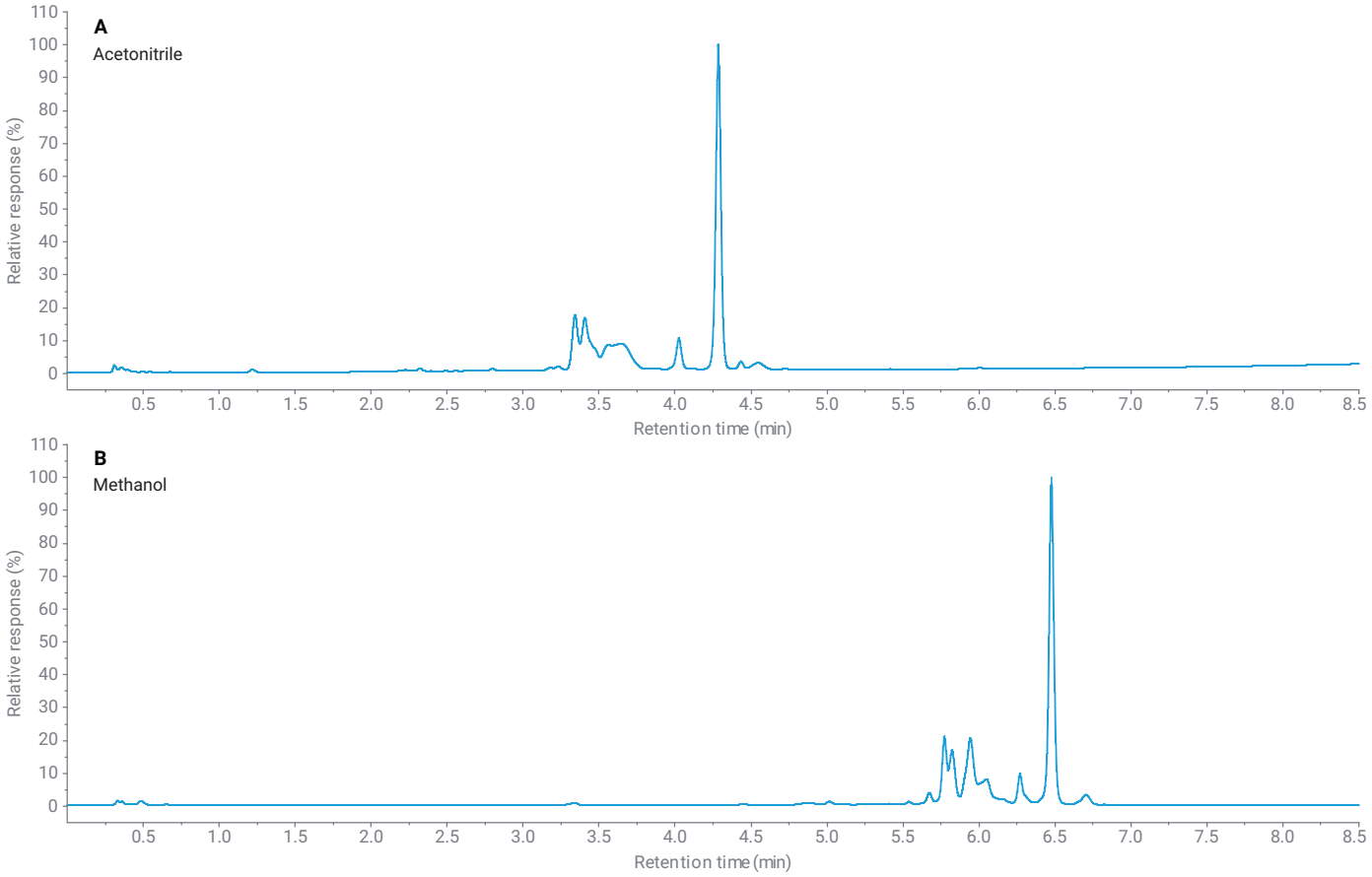


図 6. Agilent Poroshell PhenylHexyl カラムによる分解物混合物のクロマトグラム。(A) はアセトニトリル、(B) はメタノールを有機移動相として使用

Poroshell EC-C18 での分離の最適化

不純物の分離度を上げるもう一つの方法は、カラムを長くすることです。このため、初期スクリーニング中に特定された Poroshell EC-C18 カラムケミストリを、100 mm の長さ、2.7 µm と 1.9 µm の粒子サイズ、8.5 分間のグラジエントという条件で評価しました。100 mm × 1.9 µm のカラムは全体的な分離能が非常に優れていたため、これをその後のメソッド開発用として選択しました。また API 質量スペクトルには、*m/z* 883.4 にプロトン化されたクリーンな分子イオン、*m/z* 797.3 にニュートラルロスによるインソースフラグメントイオンが表示されています（図 7）。

8.5 分間のグラジエントにより API から主な不純物を分離できましたが、多くの不純物ピークは一部しか分離されませんでした。分離能をさらに上げるため、より長く完全に最適化されたグラジエントを開発しました。

最終メソッドでは 26 分間のグラジエントを採用しました。これにより不純物の分離度が大幅に向上し、不純物プロファイルをより完全に特性解析できました（表 4）。初期の緩やかなグラジエントは、不純物を完全に分離するために必要でした。最適化したメソッドで取得した代表的な UV と MS のクロマトグラムを、図 8 に示します。グラジエント時間を延ばすことで分離能が向上したため、良好な API ピーク形状とリテンションを維持しながら、個々の不純物ピークの検出と特性解析を改善できました。

表 4. オルホルグリプロンの不純物のプロファイリング用に最適化された最終的な LC メソッド

パラメータ	最終条件
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18
寸法	2.1 × 100 mm、1.9 µm
移動相 A	水と 0.1 % ギ酸
移動相 B	アセトニトリルと 0.1 % ギ酸
流量	0.5 mL/min
カラム温度	40 °C
注入量	1 µL
グラジエントプログラム	時間（分） %B 0.5 40 16 52 18.4 70 24 100

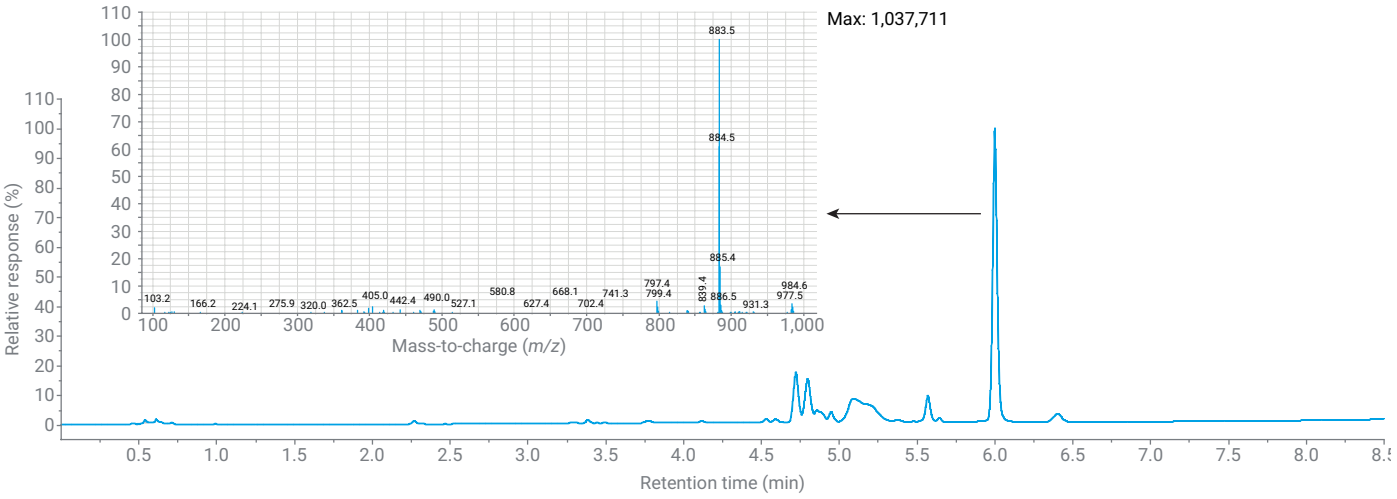
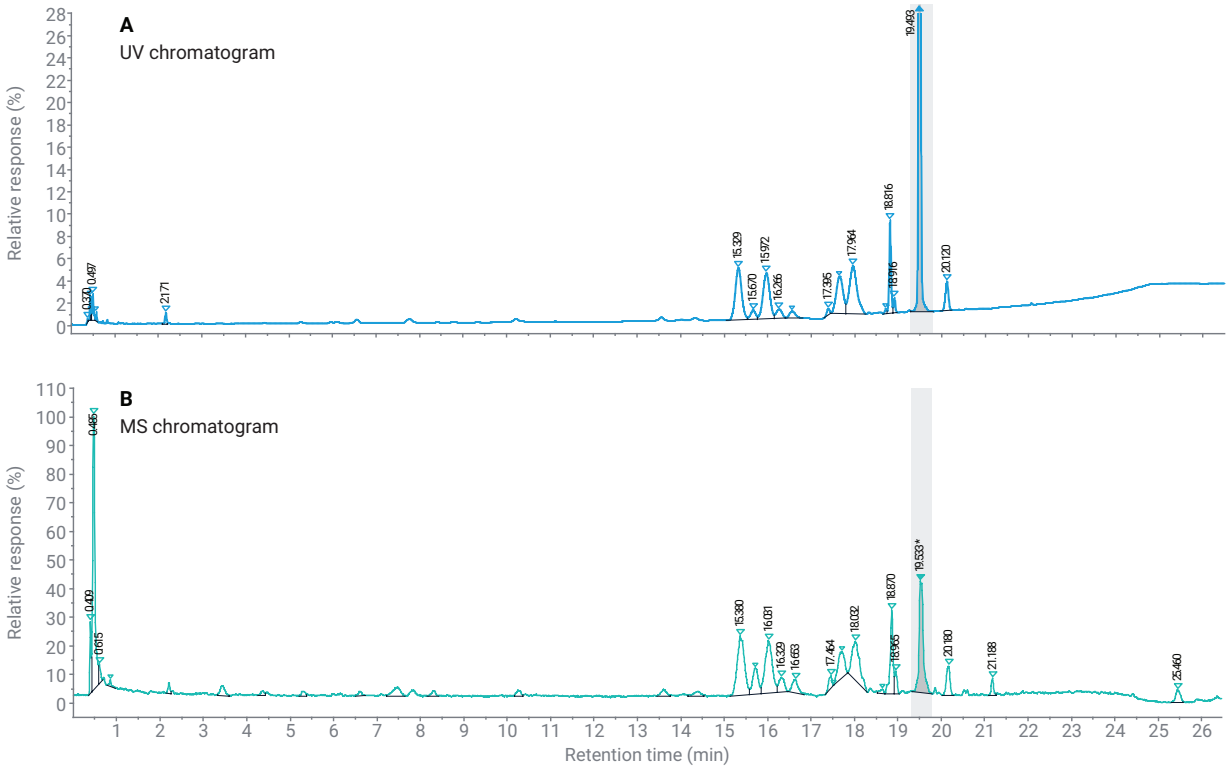


図 7. Agilent EC-C18 2.1 × 100 mm、1.9 µm カラムと 8.5 分間のグラジエントを用いた分解物混合物の UV クロマトグラムと、API ピークの MS スペクトル



RT	*m/z*
0.496	130.1
15.329	917.4
15.670	696.3
15.972	917.4
16.266	917.4
16.568	917.4
17.395	859.5
17.657	951.4
17.964	951.4
18.816	887.4
18.916	887.4
19.493	883.4
20.120	917.5

図 8. Agilent Poroshell EC-C18 カラムの最終グラジエントを用いた分解物混合物の（A）UV クロマトグラムと（B）MS クロマトグラム、および全ピークの *m/z* の MS 表

結論

カラムスクリーニングの結果、オルホルグリプロンの不純物プロファイリング用に評価した固定相の中で、Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 相が全体的に最適な選択肢であることがわかりました。この固定相は、API リテンション、不純物分離、不純物のピーク検出の性能が優れていました。Agilent InfinityLab Poroshell 120 PhenylHexyl カラムではメタノールにより選択性が向上しましたが、全般的にアセトニトリルのほうがメタノールより分離能が優れていました。

さらに最適化を進めた結果、カラムを長くして粒子サイズを小さくすると分離能が向上することがわかり、100 mm の Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムと 1.9 µm 粒子の組み合わせが、最も高い性能を発揮しました。8.5 分間のグラジエントで主な不純物を API から分離できましたが、グラジエント時間を 26 分間に延ばすと、不純物プロファイルの分離能がさらに向上しました。最終メソッドでは、オルホルグリプロンとその不純物を UV と MS で効果的に解析できたため（*m/z* 883.4 でのプロトン化された分子イオンの検出など）、これを不純物解析用の方法として選択しました。

ホームページ
www.agilent.com/chem/jp

カスタマー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。

DE-017712

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2026
Printed in Japan, October 8, 2026
5994-9501JAJP

Agilent
Trusted Answers