

アッセイおよび関連化合物用の 最新のインスリン USP モノグラフ HPLC メソッド

Agilent InfinityLab Poroshell 120 カラムを用い、
最近改訂された USP <621> ガイドラインに従ったインスリンの
分析

著者

Rongjie Fu
Agilent Technologies
(Shanghai) Co., Ltd

概要

インスリンおよびヒトインスリンのアッセイと関連化合物分析用のオリジナルの米国薬局方（USP）モノグラフ HPLC メソッドを、Agilent InfinityLab Poroshell 120 カラムを用い、最近改訂された USP <621> ガイドラインに従って、最新のメソッドに更新しました。オリジナルのアッセイメソッドでは、4.6 × 150 mm、5 μm カラムによるイソクラティック分離が使用されており、分析には 15 分が必要です。メソッドを InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 および EC-C18 カラム（4.6 × 50 mm、2.7 μm）に移管すると、メソッドを再バリデーションしなくても、分析時間が 15 分から 6 分に短縮されました（分析時間と溶媒消費量が 60 % 削減）。関連化合物用のオリジナルのメソッドでは、4.6 × 250 mm、5 μm カラムによるグラジエント分離が使用されています。メソッドを InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 および EC-C18 カラム（4.6 × 100 mm、2.7 μm）に移管すると、メソッドを再バリデーションしなくても、インスリンの分析時間が 97 分から 39 分に短縮され（分析時間と溶媒消費量が 60 % 削減）、ヒトインスリンの分析時間が 73 分から 29 分に短縮されました（分析時間と溶媒消費量が 60 % 削減）。分析時間と溶媒消費量を大幅に削減しながらも、すべてのシステム適合性要件に適合していました。

はじめに

大部分の USP モノグラフには、原材料と製剤を試験するための HPLC メソッドが記載されています。これらのメソッドは、ジェネリック医薬品メーカー向けのルーチン分析手法です。大部分のメソッドでは、従来の 5 µm 粒子カラムが含まれている、旧式のカラム技術が採用されています。これらの種類のカラムは効率が低いため、多くの場合、長いカラム長（例えば、長さ 150 または 250 mm）が必要になり、結果的に分析時間も長くなります。USP では、以前の USP <621> ガイドラインに従って、イソクラティックメソッドでは、従来の 5 µm カラムから粒子サイズが小さいカラムへのメソッド移管のみを許容しています。2022 年 12 月に改訂された、最新の USP <621> ガイドラインでは、全多孔質粒子（TPP、小粒子サイズ）カラムと表面多孔質粒子（SPP）カラムを使用する、最新のグラジエントメソッドが許容されています。¹

SPP は最近になって HPLC カラムで利用されるようになっており、TPP カラムよりも高い効率を実現しています。アジレントは、より低い背圧でサブ 2 µm TPP カラムと同等の効率を実現している、2.7 µm InfinityLab Poroshell 120 カラムを開発しました。2.7 µm SPP カラムと短いカラムの利点は、分析時間と溶媒消費量を削減できることです。これらのカラムでは、粒子がカラムに詰まる可能性を低減できる、標準の 2 µm フリットが使用されているため、あらゆる HPLC および UHPLC システムで使用できます。この特長により、小さいフリットが使用されているサブ 2 µm カラムと比較して、カラムの寿命が延長されます。

インスリン分析に関する以前の実験では、ポアサイズが大きい (> 100 Å) カラムでは、非常に高い効率と低いテーリングファクターを実現できること、および粒子が小さいと効率が高くなることを実証しました。2.7 µm InfinityLab Poroshell 120 カラムも、きわめて高い効率を実現しました。²この結果は、中国薬局方による、インスリンとヒトインスリン分析に関する以前の実験でも実証されました。^{3, 4}

このアプリケーションノートでは、USP によるインスリンとヒトインスリン用のオリジナルのアクセスメソッドおよび関連化合物の試験メソッド^{5, 6}を、2022 年 12 月 1 日に公式に発表された最新の USP <621> ガイドラインに従って、許容調整内で SPP カラムに移管しました。最初に、5 µm Agilent Pursuit C18 および Polaris C18-A カラムでオリジナルのメソッドを実施し、InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 および EC-C18、2.7 µm カラムで最新のメソッドを確立しました。

実験手法

機器と試薬

今回のアプリケーション全体において、Agilent 1260 Infinity II LC を 0.17 mm チューブと使用しました。表 1 に機器の構成を示します。

すべての試薬と溶媒には、HPLC グレードのものを使用しました。アセトニトリル、無水硫酸ナトリウム、リン酸、エタノールアミン、およびインスリンとヒトインスリン標準は、Anpel Laboratory Technologies（上海、中国）から購入しました。水は、ELGA PURELAB Chorus システム（ハイ・ウィカム、英国）を使用して精製しました。システム適合性溶液は、インスリンとヒトインスリンの USP モノグラフに従って前処理しました。

オリジナルのメソッド条件とシステム適合性要件を表 2 に示します。関連化合物分析用の、従来のカラムを用いたグラジエント条件、および InfinityLab Poroshell 120 カラムを用いた

表 1. 機器の構成

モジュールとソフトウェア	コンポーネントの仕様
Agilent 1260 Infinity II バイナリポンプ (G7112B)	4 ポジション/10 ポートバルブ 60 MPa (p/n 5067-4287)
Agilent 1260 Infinity II マルチサンブラ (G7167A)	バイアル、スクリュートップ、茶色、ラベル付き、認定、2 mL、100 個 (p/n 5182-0716) キャップ、スクリュー、青、PTFE/赤シリコンセブタム、100 個 (p/n 5182-0717)
Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット (MCT, G7116A)	標準フローヒーター (G7116-60015) ヒーターとカラム : Agilent InfinityLab クイックコネクトアセンブリ、105 mm、0.17 mm (p/n 5067-6166)
Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 WR (G7115A)	10 mm 13 µL フローセル (p/n G1315-60022) 長寿命重水素ランプ (2.5 Hz/20 Hz)
Agilent OpenLab CDS、バージョン C.01.07	—

表 2. インスリンとヒトインスリン分析用のオリジナルの LC メソッド条件

パラメータ	アッセイメソッドの値	関連化合物分析メソッドの値
カラム	L1 : 4.6 × 150 mm	L1 : 4.6 × 250 mm
移動相	28.4 g の無水硫酸ナトリウムを 1,000 mL の水に溶解し、この溶液に 2.7 mL のリン酸をビペットで移し、必要に応じてエタノールアミンで pH 2.3 に調整。この溶液とアセトニトリルを混合し (74:26)、ろ過および脱気して前処理。	溶媒 : 0.2 mol/L の硫酸塩 (28.4g の無水硫酸ナトリウムを水に溶解して、2.7 mL のリン酸を添加し、エタノールアミンで pH 2.3 に調整して、1,000 mL の量になるまで水を添加) 溶液 A : 溶媒とアセトニトリルを混合し (82:18)、ろ過および脱気して前処理。 溶液 B : 溶媒とアセトニトリルを混合し (50:50)、ろ過および脱気して前処理。
流量	1.0 mL/min	1.0 mL/min
カラム温度	40 °C	40 °C
注入量	20 µL	20 µL
検出器	214 nm	214 nm
システム適合性要件	繰り返し注入の相対標準偏差は 1.6 % 以下、インスリンまたはヒトインスリンと A-21 デサミドインスリンとの分解能 R は 2.0 以上、インスリンまたはヒトインスリンのピークのテーリングファクターは 1.8 以下	インスリンまたはヒトインスリンと A-21 デサミドインスリンとの分解能 R は 2.0 以上、インスリンまたはヒトインスリンのピークのテーリングファクターは 1.8 以下

グラジエント条件を表 3 に示します。モノグラフに記載されているメインピークのリテンションタイム要件に従って、カラムごとに移動相の組成を最適化することにより、メインピークのリテンションタイムを調整しました。

表 3. インスリンとヒトインスリンの関連化合物分析のグラジエント条件

カラム	流量 (mL/min)	グラジエント				注入量 (μL)	マルチカラム サーモスタット (°C)	ダイオードアレイ 検出器
		インスリン		ヒトインスリン				
Agilent Pursuit 200 Å C18、 4.6 × 250 mm、5 μm (p/n A3000250X046)	1.0	時間 (分)	%B	時間 (分)	%B	20	40	214 nm、2.5 Hz
		0	28	0	28			
		60	28	36	28			
		85	67	61	67			
		91	67	67	67			
		92	28	68	28			
97	28	73	28					
Agilent Polaris C18-A、 4.6 × 250 mm、5 μm (p/n A2000250X046)	1.0	時間 (分)	%B	時間 (分)	%B	20	40	214 nm、2.5 Hz
		0	28	0	28			
		60	28	36	28			
		85	67	61	67			
		91	67	67	67			
		92	28	68	28			
97	28	73	28					
Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18、 4.6 × 100 mm、2.7 μm (p/n 685975–902)	1.0	時間 (分)	%B	時間 (分)	%B	8	40	214 nm、40 Hz
		0	30	0	30			
		24	30	14.40	30			
		34	67	24.40	67			
		36.40	67	26.80	67			
		36.80	30	27.20	30			
38.80	30	29.20	30					
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、 4.6 × 100 mm、2.7 μm (p/n 695975-902)	1.0	時間 (分)	%B	時間 (分)	%B	8	40	214 nm、40 Hz
		0	30	0	30			
		24	30	14.40	30			
		34	67	24.40	67			
		36.40	67	26.80	67			
		36.80	30	27.20	30			
38.80	30	29.20	30					

結果と考察

アッセイメソッドおよび関連化合物の分析メソッドの両方を、InfinityLab Poroshell 120 カラムに移管しました。最近改訂された USP <621> ガイドラインに基づき、イソクラティックおよびグラジエントメソッドのルールにそれぞれ従って、クロマトグラフィー条件を調整しました。

アッセイ用のメソッドの調整 (イソクラティック溶出の調整)

オリジナルのアッセイメソッドは、1260 Infinity II LC システムと 4.6 × 150 mm、5 μm C18 (L1) カラムを使用したイソクラティックメソッドです。以前の実験を基にして、Pursuit C18 (200 Å)、Polaris C18-A (180 Å) など、ポアサイズの大きい 5 μm カラムを使用し、オリジナルのメソッドを試験しました。システム適合性のクロマトグラムを図 1 に示します。両方のカラムとも、左右対称のピーク形状、およびインスリンと A-21 デサミドインスリンとの十分な分解能を示しています。インスリンとヒトインスリンのピーク面積の相対標準偏差はすべて 0.50 % 未満であり、この試験の要件より低くなっています (1.6 %、表 5 を参照)。

以前は、USP <621> の許容調整ガイドラインにより、カラムと粒子サイズの調整はすべて L/dp ルールに従う必要がありました。この調整では、カラムの長さ (L) と粒子サイズ (dp) の比率を、-25 ~ +50 % の範囲内で一定に保ちます。L/dp ルールに従った場合、5 μm、150 mm カラムから 2.7 μm、50 mm カラムへの調整は、L/dp が許容範囲より低くなるため、許容される調整ではありません。このルールは、TPP カラム間の調整には依然として適用されています。一方、SPP カラムの調整では、N ルールに従います。

最近改訂された USP <621> では、イソクラティックメソッドの段数 (N) が -25 ~ +50 % の範囲内である限り、TTP カラムから SPP カラムへの変更が許容されています。この要件は、SPP カラムを使用する際には、オリジナルのメソッドと最終調整後のメソッドの両方で測定した化合物を用いて、N を直接比較する必要があることを意味しています。InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 および EC-C18 カラムは、インスリン分析の成功に寄与していることが実証されています。このため、InfinityLab

Poroshell 120 のカラム寸法は、インスリンを実験で測定する際の N 値に応じて選択します。50 mm、2.7 μm カラムの L/dp は、許容される調整の許容範囲よりわずかに低かったため、このカラムを用いてインスリン効率を実験で測定しました。SPP を含むカラムは、同等サイズの TPP を含むカラムと比較して、効率が高くなります。5 μm カラムおよび 2.7 μm InfinityLab Poroshell 120 カラムで得られた N 値を図 2 に示します。

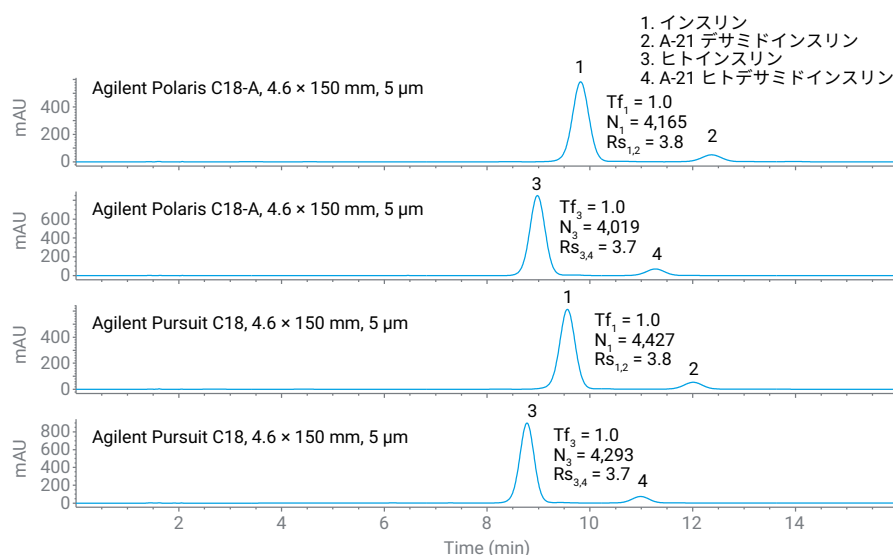


図 1. 4.6 × 150 mm、5 μm カラムを用いた、アッセイのシステム適合性試験

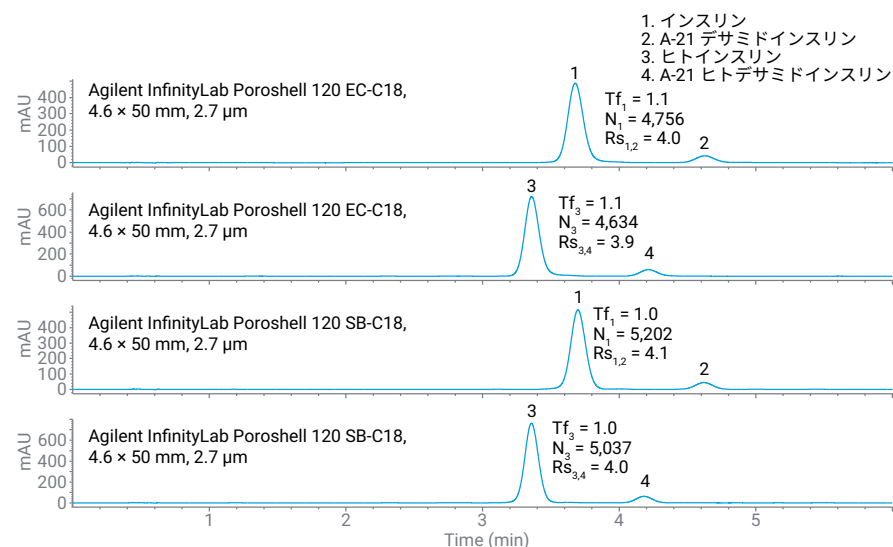


図 2. Agilent InfinityLab Poroshell 120、4.6 × 50 mm、2.7 μm カラムを用いた、アッセイのシステム適合性試験

表 4 に示すように、50 mm、2.7 μm カラムでの調整後のメソッドの N 値は、両方ともに許容範囲内です。この結果は、アッセイメソッドがシステム適合性要件に適合しているため、追加のメソッドバリデーションなしで、50 mm、2.7 μm カラムに移管できることを意味しています（表 5）。

次に、注入量の許容調整量を式 1 で計算しました。

式 1.

$$V_2 = V_1 \times (L_2 \times dc_2^2) / (L_1 \times dc_1^2)$$

ここで、V₂ は調整後のメソッドの注入量、V₁ はオリジナルのカラムの注入量、L₂ は調整後のカラム長、L₁ はオリジナルのカラム長、dc₂ は調整後のカラム内径、dc₁ はオリジナルのカラム内径です。

結果的に、注入量は 20 から 6.7 μL へと比例的に減少しています。

最後に、流量の許容調整量を式 2 で計算しました。

式 2.

$$F_2 = F_1 \times [(dp_1 \times dc_2^2) / (dp_2 \times dc_1^2)]$$

ここで、F₂ は調整後のメソッドの流量、F₁ はオリジナルのメソッドの流量、dp₂ は調整後のカラム粒子サイズ、dp₁ はオリジナルのカラム粒子サイズ、dc₂ は調整後のカラム内径、dc₁ はオリジナルのカラム内径です。

表 4. アッセイでのカラム寸法の変更

カラム	インスリンの N	許容範囲 (-25 ~ +50 %)	ヒトインスリンの N	許容範囲 (-25 ~ +50 %)
Agilent Polaris C18-A、4.6 × 150 mm、5 μm	4,165	3,124 ~ 6,048	4,019	3,014 ~ 6,029
Agilent Pursuit C18、4.6 × 150 mm、5 μm	4,427	3,320 ~ 6,641	4,293	3,220 ~ 6,440
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4.6 × 50 mm、2.7 μm	4,756	範囲内	4,634	範囲内
Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 4.6 × 50 mm、2.7 μm	5,205	範囲内	5,037	範囲内

表 5. アッセイのシステム適合性の概要

カラム	テーリングファクター		分解能		5 回注入の面積の RSD (%)	
	インスリン	ヒトインスリン	インスリン	ヒトインスリン	インスリン	ヒトインスリン
Agilent Polaris C18-A、4.6 × 150 mm、5 μm	1.0	1.0	3.8	3.7	0.4	0.07
Agilent Pursuit C18、4.6 × 150 mm、5 μm	1.0	1.0	3.8	3.7	0.08	0.3
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4.6 × 50 mm、2.7 μm	1.1	1.1	4.0	3.9	0.2	0.05
Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 4.6 × 50 mm、2.7 μm	1.0	1.0	4.1	4.0	0.1	0.09
USP システム適合性要件	≤ 1.8		≥ 2.0		≤ 1.6 %	

この場合、計算された流量は 1.85 mL/min です。改訂された <621> ガイドラインに基づき、カラム寸法の変更による調整後には、± 50 % の流量を追加で変更することが許容されています。システム適合性要件に適合している限り、流量は 0.9 ~ 2.8 mL/min の範囲内で調整できます。インスリンなどの分子量が大きい化合物の場合、流量を増大させても、それに比例してピークの溶出時間は短縮されなかったため、調整後のメソッドは流量 1 mL/min が使用されています。

インスリンとヒトインスリン用の USP アッセイメソッドを、追加のメソッドバリデーションなしで、従来の 4.6 × 150 mm、5 μm TPP カラムから 4.6 × 50 mm、2.7 μm SPP カラムに移管しました。分析時間は 15 分から 6 分に短縮され、分析時間と溶媒消費量が 60 % 削減されました。システム適合性基準を、両方のメソッドで評価して達成しました。ここで説明したアプローチにより、ラボの生産性とサンプルスループットを向上できることは明らかです。

関連化合物分析用のメソッドの調整 (グラジエント溶出の調整)

最初に、1260 Infinity II LC システム、4.6 × 250 mm、5 µm Pursuit C18 (L1) および Polaris C18-A (L1) カラムを用いて、グラジエントメソッドによるオリジナルの関連化合物分析を試験しました。システム適合性のクロマトグラムを図 3 と 4 に示します。システム適合性要件には問題なく適合しています (表 6 を参照)。Pursuit C18 カラムでは、インスリンのメインピークとその前に溶出する不純物との分解能が向上しましたが、これはインスリンのシステム適合性溶液でのみ観察されました。

最近改訂された USP <621> ガイドラインに従って、このグラジエントメソッドを適切な UHPLC カラムに移管することにより、分析時間と溶媒消費量を削減できます。改訂された USP <621> ガイドラインでは、比率 $(t_R/W_h)^2$ が -25 ~ +50 % の範囲内である限り、グラジエントメソッドを TTP カラムから SPP カラムに変更することが許容されています (ここで、 t_R はリテンションタイム、 W_h はピーク半値幅です)。関連化合物分析用のオリジナルのメソッドを、InfinityLab Poroshell 120、4.6 × 100 mm、2.7 µm カラムに移管しましたが、両方の InfinityLab Poroshell 120 カラムでの比率 $(t_R/W_h)^2$ (表 7 参照) はともに、許容範囲内に十分に収まっていました。この結果は、オリジナルのメソッドをここで説明した InfinityLab Poroshell 120 カラムに移管する際に、メソッドの再バリデーションは不要であることを意味しています。

InfinityLab Poroshell 120 カラムで得られた、関連化合物分析のクロマトグラムを図 5 と 6 に示します。システム適合性の結果を表 6 に示します。テーリングファクター、分解能、ピーク面積の相対標準偏差の測定結果など、システム適合性に関する値はすべて、要件に適合していました。InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムと SB-C18 カラムは両方ともに左右対称のピークを示しましたが、InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 カラムは InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラ

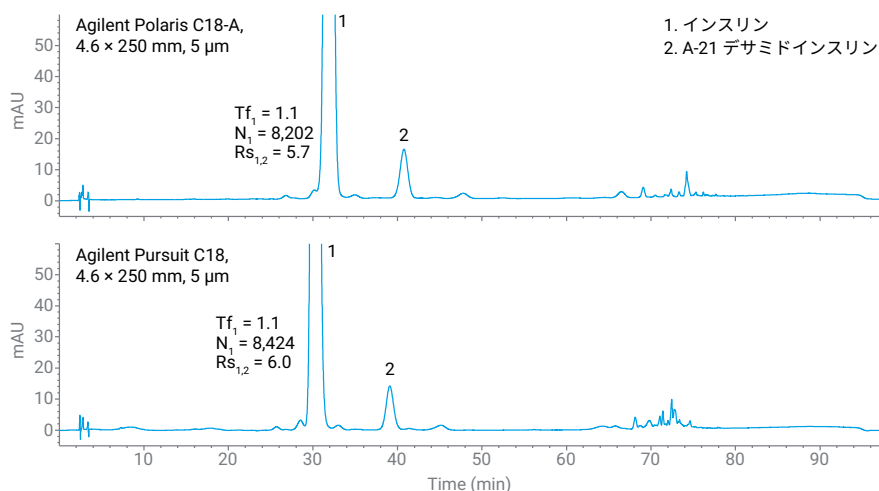


図 3. 4.6 × 250 mm、5 µm カラムを用いた、インスリンの関連化合物分析のシステム適合性試験

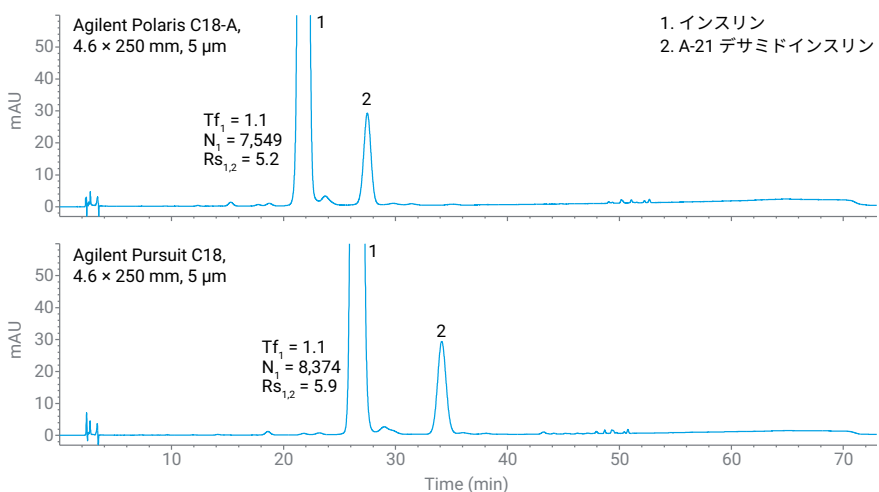


図 4. 4.6 × 250 mm、5 µm カラムを用いた、ヒトインスリンの関連化合物分析のシステム適合性試験

表 6. 関連化合物分析のシステム適合性の概要

カラム	テーリングファクター		分解能	
	インスリン	ヒトインスリン	インスリン	ヒトインスリン
Agilent Polaris C18-A, 4.6 × 250 mm, 5 µm	1.1	1.1	5.7	5.2
Agilent Pursuit C18, 4.6 × 250 mm, 5 µm	1.1	1.1	6.0	5.9
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 µm	1.0	1.0	6.0	5.6
Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 µm	1.1	1.1	6.4	5.8
USP システム適合性要件	≤ 1.8		≥ 2.0	

表 7. 関連化合物分析でのカラム寸法の変更

カラム	t_R (分)		W_h (分)		$(t_R/W_h)^2$		許容範囲	
	インスリン	ヒトインスリン	インスリン	ヒトインスリン	インスリン	ヒトインスリン	インスリン	ヒトインスリン
Agilent Polaris C18-A, 4.6 × 250 mm, 5 μm	31.819	21.748	0.8369	0.5892	1,445.5	1,362.4	1,084 ~ 2,168	1,022 ~ 2,044
Agilent Pursuit C18, 4.6 × 250 mm, 5 μm	30.220	26.520	0.7751	0.6821	1,520.1	1,511.6	1,140 ~ 2,280	1,134 ~ 2,267
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4.6 × 100 mm, 2.7 μm	13.440	9.248	0.3500	0.2428	1,474.6	1,450.8	範囲内	範囲内
Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 4.6 × 100 mm, 2.7 μm	13.951	9.251	0.3431	0.2639	1,653.4	1,228.8	範囲内	範囲内

ムと比較して、インスリンピーク前の不純物をより効果的に分離しました。SB-C18 はエンドキャップ処理されていない C18 相であり、エンドキャップ処理された EC-C18 相とは異なる選択性を示しており、メソッド開発の柔軟性が高まります。

式 1 と 2 を用いると、注入量と流量も調整できます。同様に、4.6 × 100 mm、2.7 μm カラムの流量も 1 mL/min のままです。

グラジエント時間を式 3 で調整しました。

式 3.

$$t_{G2} = t_{G1} \times (F_1 / F_2) [(L_2 \times dc_2^2) / (L_1 \times dc_1^2)]$$

ここで、 t_{G2} は調整後のメソッドのグラジエントセグメント時間、 t_{G1} はオリジナルのメソッドのグラジエントセグメント時間、 F_2 は調整後のメソッドの流量、 F_1 はオリジナルのメソッドの流量、 L_2 は調整後のメソッドのカラム長、 L_1 はオリジナルのメソッドのカラム長、 dc_2 は調整後のカラム内径、 dc_1 はオリジナルのカラム内径です。

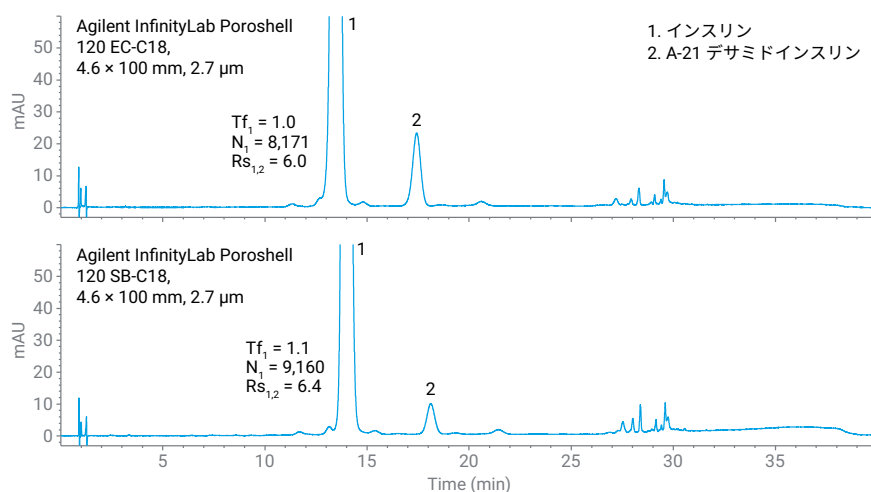


図 5. Agilent InfinityLab Poroshell 120、4.6 × 100 mm、2.7 μm カラムを用いた、インスリンの関連化合物分析のシステム適合性試験

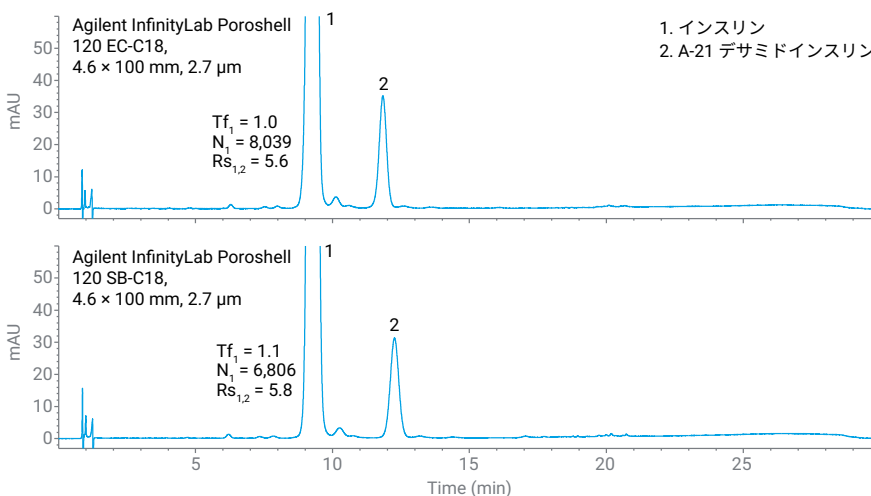


図 6. Agilent InfinityLab Poroshell 120、4.6 × 100 mm、2.7 μm カラムを用いた、ヒトインスリンの関連化合物分析のシステム適合性試験

要約すると、InfinityLab Poroshell 120 カラムで最新の USP メソッドを使用することにより、関連化合物分析の全分析時間および溶媒使用量が大幅に削減されました。具体的には、InfinityLab Poroshell 120 カラムを使用することで、分析時間と溶媒消費量が合計で 60 % 削減されました。システム適合性基準を、オリジナルと最新の USP メソッドで評価して達成しました。ここで説明したアプローチにより、ラボの生産性とサンプルスループットを向上できることは明らかです。

結論

従来の 5 μ m TPP カラムによる旧式のカラム技術を用いた、インスリンとヒトインスリンのアッセイおよび関連化合物分析用の USP メソッドでは、SPP カラムのようなより新しい技術を有効に活用できます。これらのメソッドを最新の Agilent InfinityLab Poroshell 120 カラムに移管することにより、同等かまたはそれ以上の結果が得られると同時に、分析時間と移動相の使用量を大幅に削減することができます。またこれらのメソッドは、最近改訂された USP <621> ガイドラインに従って、追加のメソッドバリデーションなしで調整できます。

参考文献

1. USP Harmonized Standards Home Page. *Supplement USP Stage 4 Harmonization*, Official, 1 December **2022**.
2. Fu, R.; Joseph, M. The Influence of Silica Pore Size and Particle Size on Insulin—a Small Protein Molecule Separation. *Agilent Technologies application note*, 5990-9028EN, **2011**.
3. Fu, R. Converting a CHP Method of Insulin to Agilent Poroshell 120 columns. *Agilent Technologies application note*, 5990-9029EN, **2011**.
4. Fu, R. Converting a CHP Method of Related Compounds Analysis in Human Insulin to Agilent InfinityLab Poroshell 120 Columns. *Agilent Technologies application note*, 5994-4756EN, **2022**.
5. USP NF Monographs. USP Insulin, *United States Pharmacopeia* 3503.
6. USP NF Monographs. USP Insulin Human, *United States Pharmacopeia* 3506.

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。

DE08622455

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, July 12, 2023

5994-6533JAJP