

Application News

No. L518

高速液体クロマトグラフィー

Nexera-i MT による欧州薬局方に準拠した医薬品不純物分析の高速化

近年、分析業務の効率化や生産性の向上を目的とした短時間分析法の開発が進んできており、製薬分野の研究開発部門では UHPLC や充てん剤を微粒子化したカラムを用いた超高速分析技術の導入が進められています。この風潮は薬局方にも適用されており、例えば、欧州薬局方 (EP) 第 8 版に記載されている Adjustment of chromatographic condition¹⁾ によると、システム適合性基準を満たした場合のみ、TLC、LC、GC、SFC で各種パラメーターの変更が許容されています。この場合、再バリデーションは不要です。

ここでは、一体型高速液体クロマトグラフ “Nexera-i MT” を用いた医薬品の類縁物質の分析を EP に準拠して高速化した例をご紹介します。

N. Iwata

■ HPLC の変更許容範囲

Adjustment of chromatographic condition の LC 項は、アイソクラティック溶離とグラジエント溶離に大別されています。

グラジエント溶離では移動相の濃度勾配によるピークシフトが原因で、誤同定、複数ピークの重複などの可能性があるため、アイソクラティック溶離とはメソッドの変更許容範囲が異なります。例えば、カラム粒子径について、アイソクラティック溶離では最大 50% の減少が可能ですが、グラジエント溶離では変更不可となります。さらに、グラジエント溶離の場合、主成分の溶出位置は、試験法に提示されている保持時間の前後 15% 以内になることと記載されています。したがって、グラジエント溶離では変更を制限される項目が多く、分析の高速化は実質不可能となり、アイソクラティック溶離のみ高速化が可能となります。

■ Ivermectin 類縁物質の高速化

イベルメクチンはマクロライド類に属する腸管糞線虫症治療薬、疥癬治療薬として知られており、抗寄生虫薬の動物用医薬品としても使用されています。また、イベルメクチンは、H₂B_{1a} (分子量: 875) と H₂B_{1b} (分子量: 861) の 2 種類の主成分があり、組成の 90% 以上は H₂B_{1a} で構成されています。

表 1 分析条件

System	: Nexera-i MT
Column 1 (Conventional)	: Shim-pack GIST C18 (250 mm L, 4.6 mm I.D., 5 μm)
Flow rate 1	: 1.0 mL/min
Column 2 (High speed)	: Shim-pack GIST C18 (150 mm L, 4.6 mm I.D., 3 μm)
Flow rate 2	: 1.5 mL/min
Mobile phase	: A) Water B) Methanol C) Acetonitrile A/B/C=15/34/51 (v/v/v)
Column temp.	: 25 °C
Injection volume	: 20 μL
Detection	: UV254 nm

ここでは、EP の変更許容範囲を満たす条件で、分析時間の短縮を検討しました。表 1 に EP 収載のイベルメクチン類縁物質試験項²⁾ と変更許容範囲に準拠した分析条件を示します。分析に使用した Nexera-i MT は HPLC と UHPLC の両流路を持つため、1 台のシステムで汎用および高速分析の移行を容易に行うことが可能です。分析カラムは Shim-pack GIST C18 シリーズを使用しました。分析カラムと流量以外の分析条件は EP 収載条件と同じです。

図 1 にイベルメクチン標準溶液 (0.8 mg/mL) を測定した結果を示します。高速化することで分離を保ったまま分析時間を約 2/5 に、移動相消費量を約 3/5 に抑えることができました。表 2 にシステム適合性試験結果を示します。汎用、高速分析のいずれもシステム適合性試験に合格しました。

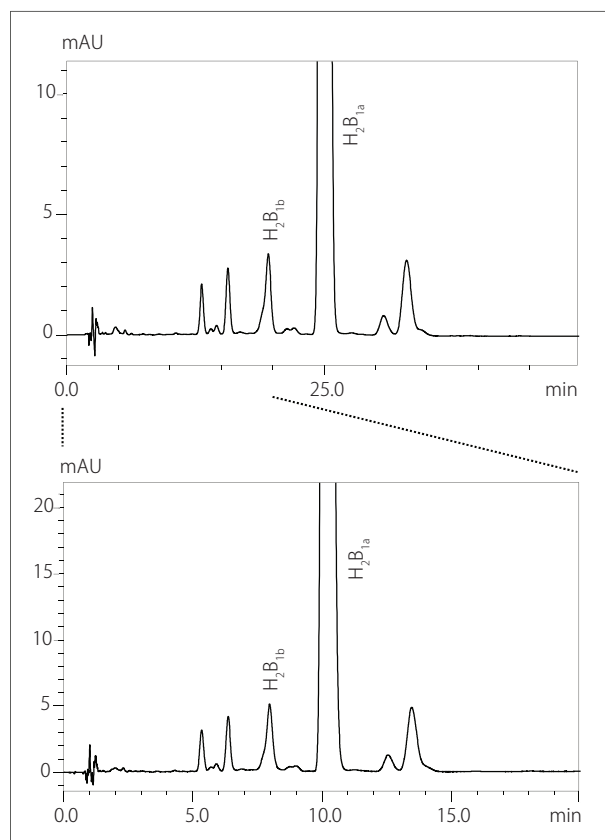


図 1 Ivermectin 標準溶液の分析
上段: HPLC 流路による汎用分析 (カラム 1 使用)
下段: UHPLC 流路による高速分析 (カラム 2 使用)

表2 システム適合性試験結果

System suitability requirements		Results		Judgements
		Conventional	High speed	
Resolution (H ₂ B _{1b} and H ₂ B _{1a})	≥3.0	5.1	4.7	PASS
Signal-to-noise ratio (0.4 μg/mL)	≥10	40	38	PASS
Symmetry factor	≤2.5	1.1	1.2	PASS

■ Diclofenac sodium 類縁物質の高速化

ジクロフェナクは解熱剤や鎮痛剤として多く利用されています。ここでは、EP に基づきジクロフェナクナトリウムの類縁物質分析を高速化した例をご紹介します。

図2にジクロフェナク標準溶液 (1.0 mg/mL) を測定した結果を示します。EP 記載のジクロフェナクナトリウム類縁物質試験項³⁾と変更許容範囲に準拠した分析条件を表3に示します。汎用、高速分析ともに分析カラムはイベルメクチン分析と同じカラムを使用しました。標準品はシステム適合性試験用に市販されている試薬を使用しました。

EP 記載の移動相流量は 1.0 mL/min です。本稿ではカラム耐圧の関係上、変更許容範囲を満たす 0.8 mL/min へ変更しましたが、システム適合性を満たしていました (表4)。また、高速分析についてもシステム適合性試験に合格しました。今回の高速化検討で分離を保ったまま分析時間を約 1/3 に、移動相消費量を約 5/8 に抑えることができました。

以上より、Nexera-i MT は汎用分析から高速分析への移行を容易に行えただけでなく、同等の結果が得られました。

表3 分析条件

System	: Nexera-i MT
Column 1 (Conventional)	: Shim-pack GIST C18 (250 mm L, 4.6 mm I.D., 5 μm)
Flow rate 1	: 0.8 mL/min
Column 2 (High speed)	: Shim-pack GIST C18 (150 mm L, 4.6 mm I.D., 3 μm)
Flow rate 2	: 1.4 mL/min
Mobile phase	: A) Sodium phosphate buffer (pH 2.5) B) Methanol A/B=34/66 (v/v)
Column temp.	: 25 °C
Injection volume	: 20 μL
Detection	: UV 254 nm

表4 システム適合性試験結果

System suitability requirement		Results		Judgement
		Conventional	High speed	
Resolution (impurity F and Diclofenac)	≥4.0	6.8	5.1	PASS

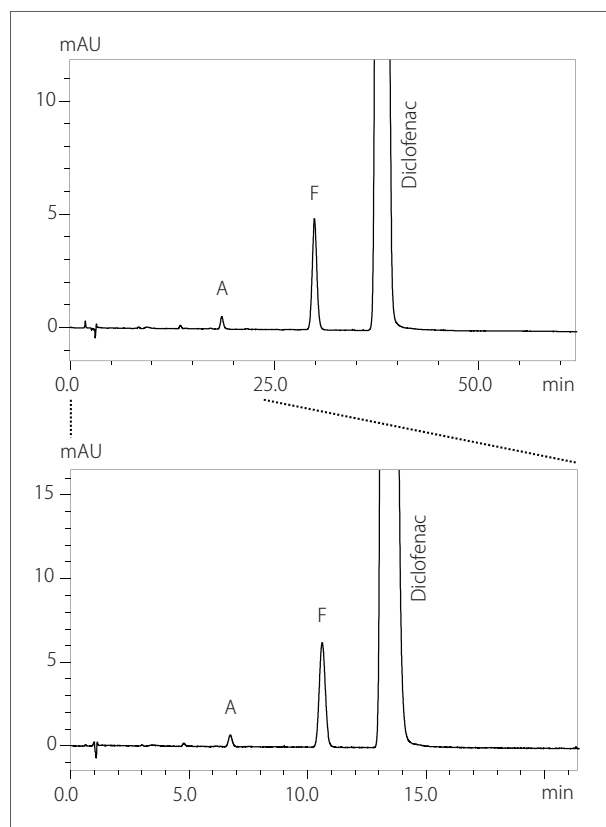


図2 Diclofenac 標準溶液の分析
上段: HPLC 流路による汎用分析 (カラム 1 使用)
下段: UHPLC 流路による高速分析 (カラム 2 使用)

[参考文献]

- 1) European Pharmacopoeia 8.0, 04/2009:20246
2.2.46. Chromatographic separation techniques
- 2) European Pharmacopoeia 8.8, 04/2016:1336 "Ivermectin"
- 3) European Pharmacopoeia 8.8, 07/2014:1002 "Diclofenac sodium"