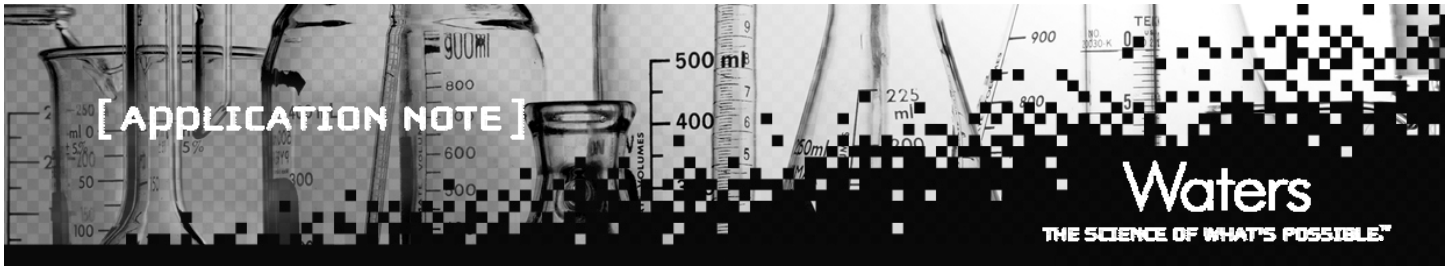


No. 720001595J

PDA-UPLC®によるOxybutynin及び類縁物質の分析：検出限界について

概要

LC検出器を用いた不純物の分析では、大きなピークの親化合物と低レベル（含量）の不純物の同時分析が求められています。従って検出器には、低レベルのノイズ、広範囲な直線性が求められるのです。分離を迅速に行いながらこれらの要求に応え、ノイズレベルを上昇させることなく再現性良くシャープなピークを得るために、素早いデータ取り込み速度が必要です。純度の確認及びライブラリとのマッチングに対して高品質のスペクトルを維持するため、狭いバンド幅でスペクトルデータをとることが求められています。

フォトダイオードアレイ（PDA）検出器を備えたWatersのUltra Performance LC® (UPLC®)は、低ノイズ、広範囲な直線性といった特徴を有しており、低レベルの不純物及び高レベルの親化合物の定量に最適で、1分析に要する時間も非常に短く、スペクトルの整合性を損なうことはありません。

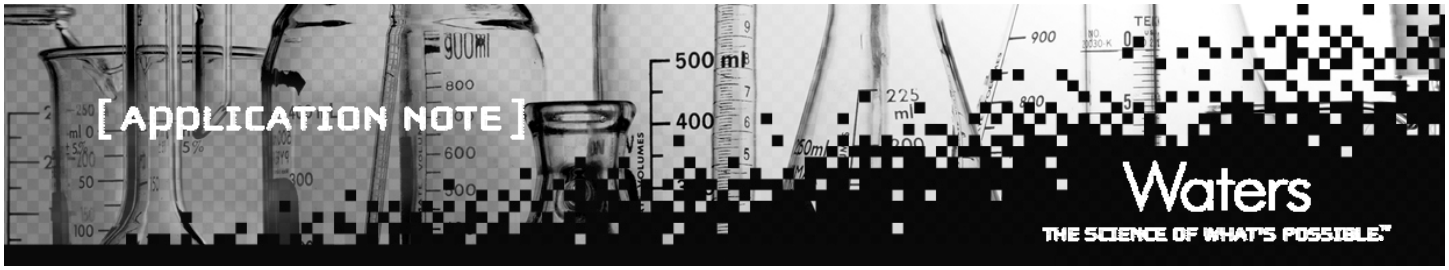
不純物分析の検出限界

低レベルの不純物の感度は、定量限界（LOQ:Limit of Quantitation）及び検出限界（LOD:Limit of Detection ）で表されます。これらのパラメータを算出するための幾つかの方法については、USPのChapter 1225[1]に記載されています。ノイズレベルを用いてLOQ及びLODを推定することもできます。通常LOQの推定には、シグナル対ノイズ（S/N）比10:1、LODの推定にはS/N比3:1が用いられます。これらの値を決定するため、低レベルの不純物ピークのシグナルがブランクと比較されます。その他、検量線の傾き及びレスポンスの標準偏差も利用されます。

Oxybutynin及び類縁物質のLOQ及びLOD

PDA検出器を装備したACQUITY UPLC®システムの検出限界を確認するため、Oxybutyninと二つの類縁物質B (methyl ester of phenylcyclohexylglycolic acid)及びC (4-(ethylmethylamino) but-2-ynyl(±)-2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-phenylacetate) のLOQ及びLODを測定しました。USPによる分析条件をUPLC®のカラム及び粒子径に合わせて調整いたしました。分析法移管によって、35分の分析が同等の分離度（Oxybutyninと主要な不純物間の分離度2.4）を保ちながら10分に短縮することができました。シグナルノイズ比を用いてLOQ及びLODを測定いたしました。4mg/mL Oxybutynin標準溶液が、2.0AUフルスケールで測定されましたが（図1）、これは検量線の直線性の範囲内でした[2]。標準溶液の濃度範囲はOxybutyninの0.001%～0.1%の間で規定いしました。

Waters ACQUITY UPLC® システム



LOQ及びLODに近い、0.005%及び0.01%標準溶液のクロマトグラムを図2に示します。図3に示される標準溶液を用いた検量線では、相関係数は0.999以上の値が得られました。LOQ及びLODを算出するための式及びOxybutininと二つの類縁物質のLOQ及びLODが、表1に示されています。

USPの不純物分析では、製品に対しては親化合物の0.1%、製剤原料に対しては0.05%の全てのピークを特定することが推奨されています。OxybutyninのLOQは、0.0105%と測定されましたが、これは要求されている下限値を大きく下回っています。化合物B、Cに対する定量限界はそれぞれ0.0049%及び0.0085%でした。これらの結果を検証するため、複数回注入して確認致しました。LOQを算出する場合の典型的なRSD%の合否基準は10%と言われていますが、Oxybutyninについては3.1%でした。また、化合物B及びCについては3.7%及び5.8%でした。同様の方法で算出された検出限界についても表1に示します。

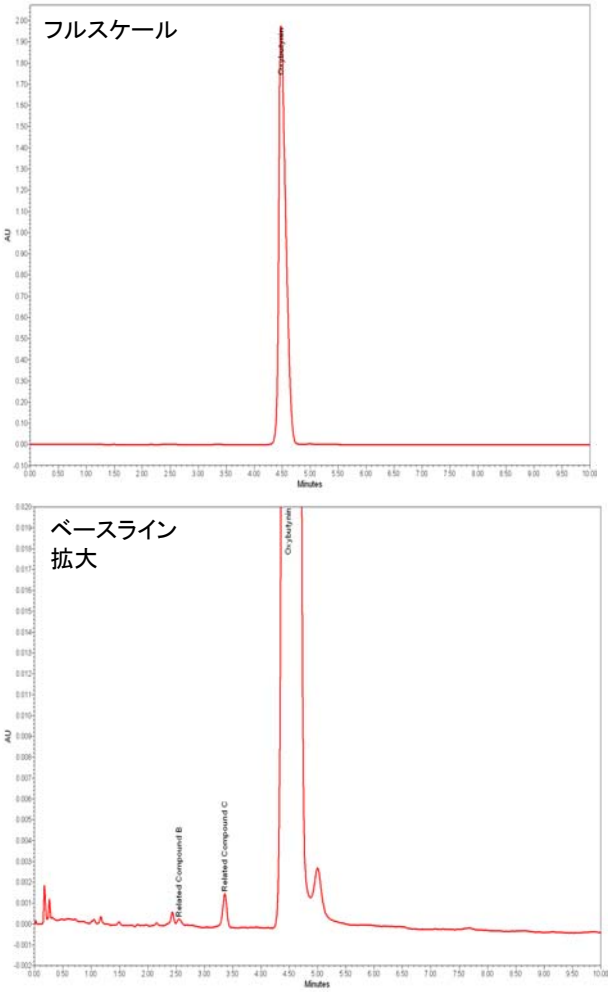


図1　Oxybutynin試料溶液のUPLC®クロマトグラム（ 4mg/mL ）

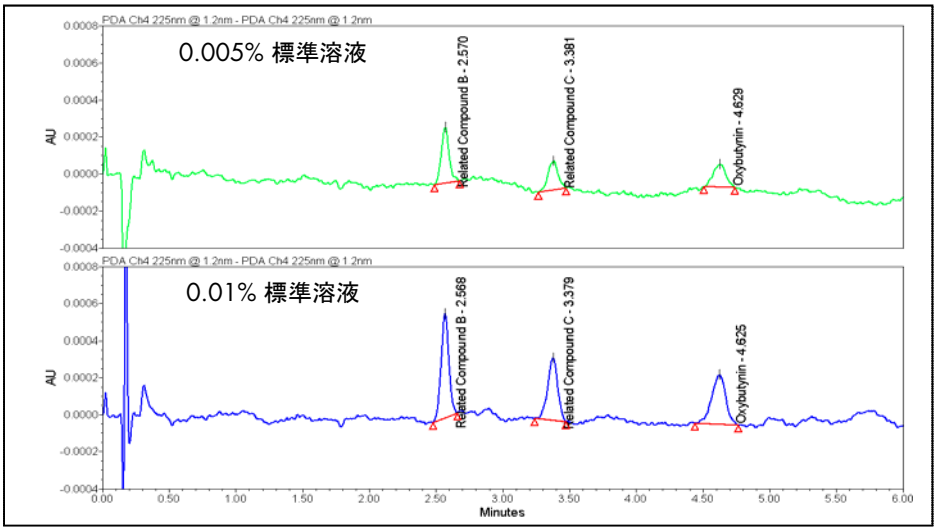
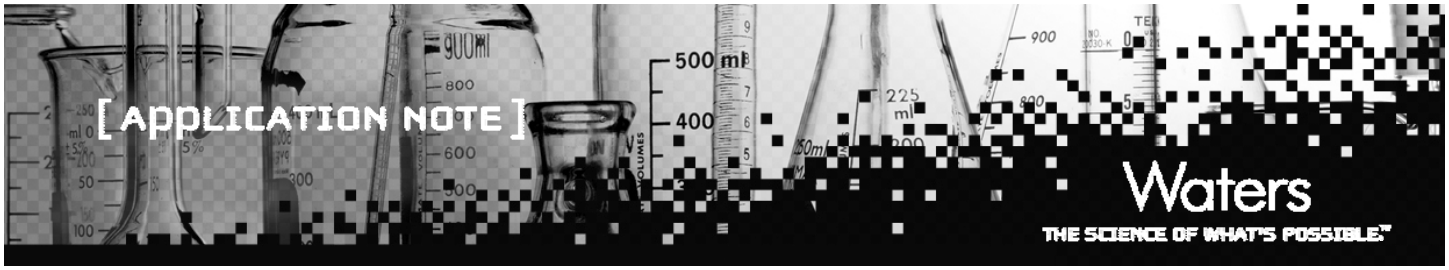


図2.　Oxybutynin、並びに4mg/mLのOxybutyninに対し0.005%及び0.01%のレベルで添加された二つの類縁物質



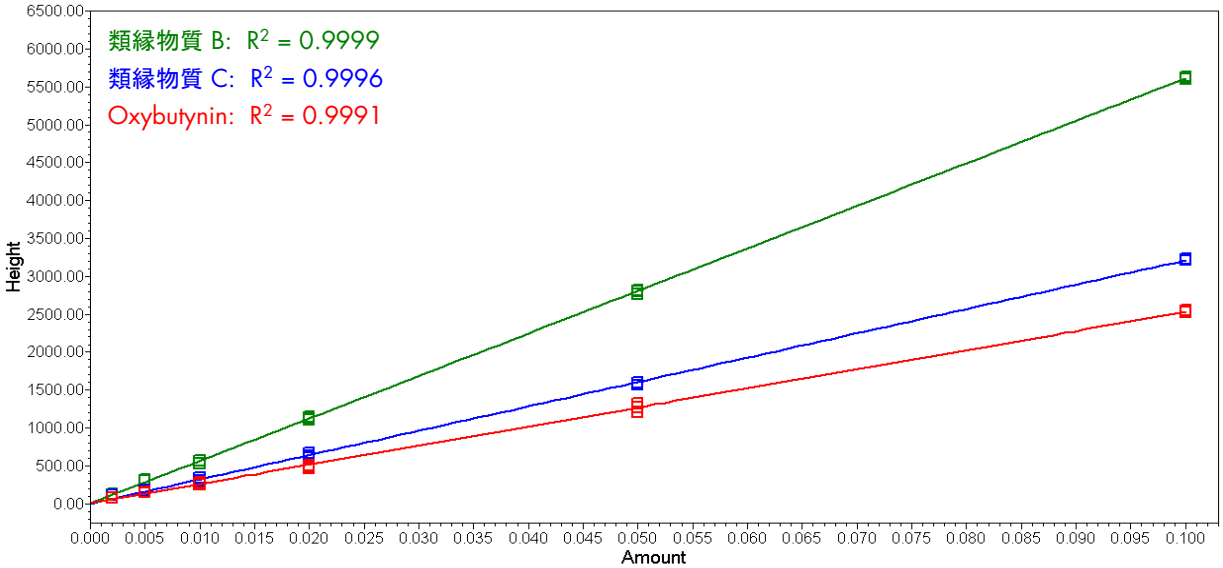


図3. 定量･検出限界付近でのOxybutynin及び二つの類縁物質に関する検量線

化合物	Equation of Calibration Curve	Average Peak-to Peak Noise (μAU)	Peak Height at LOD	LOD	Peak Height at LOQ	LOQ
Oxybutynin	Y = 2.52 e+4 X + 10.3	27.5	82.5	0.0029%	275.0	0.0105%
類縁物質 B	Y = 5.61 e+4 X – 0.8	27.5	82.5	0.0015%	275.0	0.0049%
類縁物質 C	Y = 3.21 e+4 X + 3.4	27.5	82.5	0.0025%	275.0	0.0085%

表1 Oxybutynin及び二つの類縁物質に関する定量･検出限界

Oxybutynin分析条件

LCシステム: ACQUITY UPLC® システム
ACQUITY UPLC® PDA検出器
Empower™ ソフトウエア

カラム: ACQUITY UPLC® BEH C8
2.1 x 50 mm, 1.7μm

検出: 分析用フローセル
225 nm
ノーマルタイムコンスタント
10 pts/sec
1.2 nm バンド幅

移動相: 65/35 10mM リン酸緩衝液
(pH7.0) / アセトニトリル

流速: 0.800 mL/min

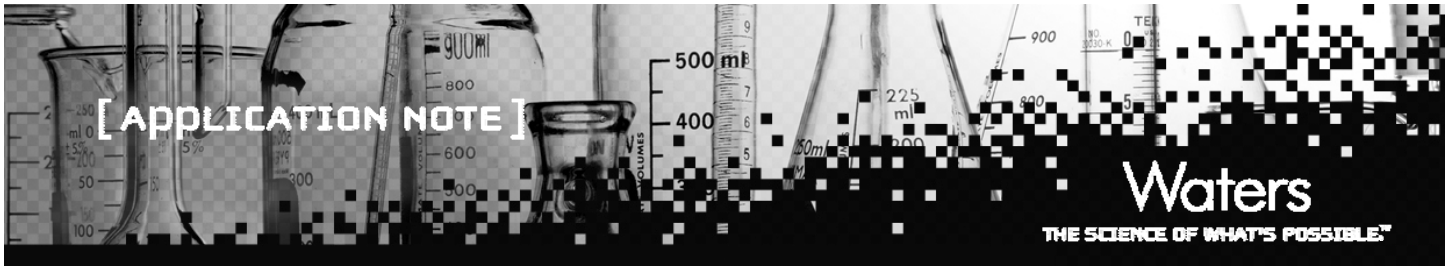
カラム温度: 45℃

試料: Oxybutynin及び類縁物質B及びCの50/50 水/アセトニトリル溶液
4.0 mg/mL 標準溶液 0.001%～0.1%

注入量: 4.8μL (full loop)

強洗浄溶媒: 200 μL 25/75 水/アセトニトリル

弱洗浄溶媒: 800 μL 75/25 水/アセトニトリル



LOQ及びLOD付近でのスペクトル整合性

通常、PDA検出器は未知物質の同定、ライブラリ検索、ピーク純度分析に対して、スペクトル情報を得るのに利用されます。したがって、これらの機能を達成するために高度なスペクトル分解能を維持することが重要です。ノイズレベルを最小にし、低レベルの不純物ピークの検出限界を改善するために、バンド幅及びスリット幅を広げる必要がある場合があります。しかしながら、これらのパラメータを大きくすることは、スペクトルの品質を落とすだけでなく、検出の際の直線性に影響を与えます。高品質なスペクトルデータには、狭いバンド幅（通常1-2 nm）が必要です。1.2 nmという狭いバンド幅を用いて、Oxybutyninとその類縁化合物に対する高品質なスペクトルを得ることができました（図4）。より高い分離能は、特に構造が似ている化合物に対しては、ライブラリ検索においてより高いマッチ度及びピーク純度を与えます（図5）。

結論

低ノイズで広い範囲での直線性を有するACQUITY UPLC® PDA検出器を装備し、高い分離能とスピードを兼ね備えたACQUITY UPLC®システムによって、理想的な不純物の定量分析を達成することができました。スペクトル情報を犠牲にすることなく、定量限界0.005%以下、 検出限界0.0015%以下を達成することが可能です。

参考文献

1. General Chapter <1225>: Validation of compendial methods. United States Pharmacopeia (USP) XXIII, National Formulary, XVIII. 1995: 1710-1612
2. Jenkins T. Demonstrating superior Linearity: The ACQUITY UPLC® Photodiode Array Detector. 2006 Mar; Waters Application Note 720001593EN.
3. Monographs: Oxybutynin Chloride. USP XXIII, NF XVIII. 1995.
4. General Chapter <621>: Chromatography – system suitability. USP XXIII, NF XV III. 1995.

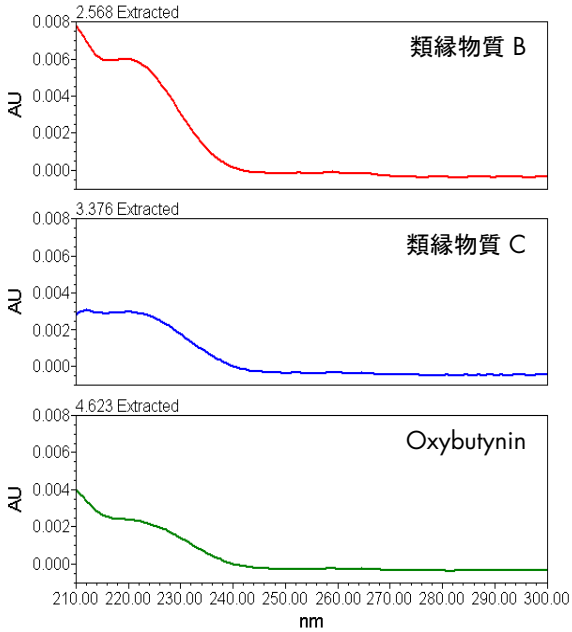


図4 Oxybutynin及び類縁物質B・Cのスペクトル（0.1%）

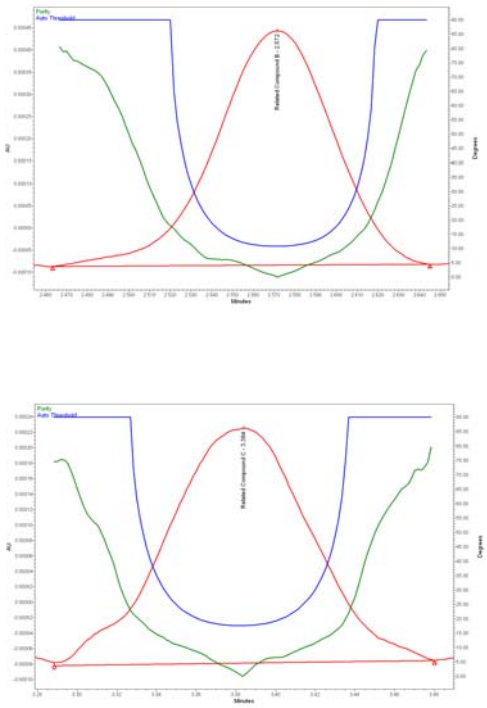


図5 Oxybutynin及び類縁物質B・CのEmpower 2ソフトウェアを利用したピーク純度分析（0.01%）

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™
日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 カトキチ新大阪ビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 静岡