

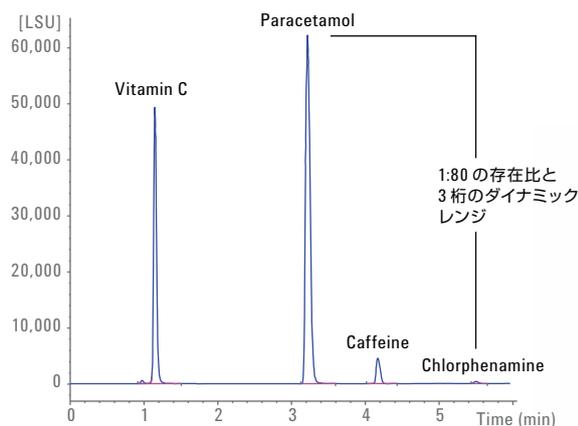
Agilent 1290 Infinity II 蒸発光散乱 検出器 (ELSD) を用いた合剤の分析

アプリケーションノート

低分子医薬品およびジェネリック医薬品

概要

蒸発光散乱 (Evaporative Light Scattering, ELS) は液体流中に存在する半揮発性と不揮発性の溶質を検出するための、ユニークで高感度な技術です。光散乱の物理的特性として、ELS 検出器は一般に非線形な応答を示し、ダイナミックレンジが比較的小さいという特徴があります。一方で、Agilent 1290 Infinity II 蒸発光散乱検出器 (ELSD) は、従来の ELSD と比べ、より直線的な応答と 10 倍広いダイナミックレンジを有します。ダイナミックレンジが広いことを検証するために、合剤中の低用量および高用量の有効成分 (250-20000 ng/ μ L) を一回の測定で定量しました。最終的に、そのデータを Agilent 1290 Infinity ELSD のピーク面積精度および感度と比較しました。



Agilent Technologies

はじめに

蒸発光散乱 (ELS) は、UV 吸収を持たない化合物の検出に適しています。光散乱の物理的特性のため、ほとんどの ELS のダイナミックレンジは 2 ~ 3 桁の広さしかなく、高濃度の化合物の分析を非常に困難にしています。この課題を克服するために、Agilent 1290 Infinity II ELS の散乱光検出部では、自動強度補正を使用しています。高濃度試料のシグナルをダイナミックレンジ内に納め、検出限界 (LOD) 付近ではシグナルノイズ比を最大にするように増幅します。このアプローチにより、シグナル範囲を最適化するためにユーザーは何も設定する必要がありません。Agilent 1290 Infinity II ELS は 4 桁のダイナミックレンジを提供できる世界初の ELS です。

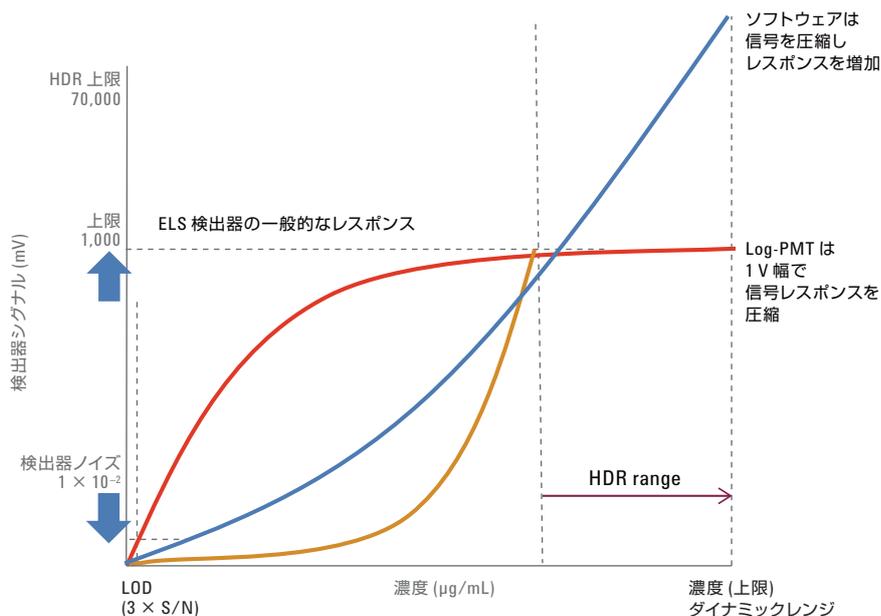
Agilent 1290 Infinity II ELS の広いダイナミックレンジを示すために、このアプリケーションノートでは、合剤中の低用量および高用量の有効成分の信頼性のある定量が一回の分析で十分に行えることを示しています。全ての化合物が、検出器の直線範囲内で信頼性の高い積分と定量を行うことができました。これらの結果を従来の ELS の結果と比較し、ピーク面積の精度および感度を評価しました。

Agilent 1290 Infinity II ELS の動作原理

Agilent 1290 Infinity II ELS は従来の ELS と同じレーザーを使用しているため、従来の ELS と同じ感度と LOD を有しています。主な違いは、ハイダイナミックレンジ (HDR) 光電子増倍管 (PMT) を装備していることです。HDR-PMT は、検出器のダイナミックレンジを 4 桁に拡張します。

Agilent 1290 Infinity II ELS と従来の ELS のダイナミックレンジの違いは、PMT の違いによります。従来の ELS は入力に対して線形に光電子を増加させる PMT を使用しています。結果として、ELS の非線形応答は単に散乱光の

特性に起因します。Agilent 1290 Infinity II ELS は入力に対して非線形に光電子が増加するように制御された PMT を用いることで、非線形応答の問題を解決しました。この非線形 PMT は、自然な散乱光の強度変化に対して形状がほぼ逆数の応答を示します。結果として、Agilent 1290 Infinity II ELS は 1000 mV を超えた高濃度で、ほぼ線形の応答を示します。この広いダイナミックレンジを表すために、Agilent 1290 Infinity II ELS の出力信号は LSU で表示されます。図 1 に HDR-ELS と従来の ELS の一般的なダイナミックレンジを示しました。



実験

装置構成

Agilent 1290 Infinity II LC を使用しました。構成は以下のとおりです。

- Agilent 1290 Infinity II フレキシブルポンプ G7104A
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンプラ G7167B
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット G7116B
- Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 G7117B (10 mm の Max-Light カートリッジセル)
- Agilent 1290 Infinity II 蒸発光散乱検出器 G7102A
- Agilent 1290 Infinity 蒸発光散乱検出器 G4261B

ソフトウェア

LC, LC/MSシステム用 Agilent OpenLAB CDS
ChemStation Edition バージョン C.01.07 [27]

試料

以下の成分の合剤を用いました。

- paracetamol と chlorphenamine (濃度比 80 : 1)
- vitamin C
- caffeine

クロマトグラフィー条件

サンプル	合剤風邪薬
注入量	5 µL
カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 100 mm, 5 µm (p/n 959996-902)
カラム温度	40 °C
流量	1 mL/min
移動相	A) Water + 0.1 % TFA B) Acetonitrile + 0.09 % TFA in water, 95/5
グラジエント	5 %B at 0 minutes 5 %B at 0.5 minutes 40 %B at 6.1 minutes 95 %B at 6.5 minutes 95 %B at 8 minutes
ストップタイム	10 minutes
ポストタイム	4 minutes
DAD	
波長	254 nm/20 nm, reference 380/80, 10 Hz
データレート	80 Hz
ELSD	
エバポレータ温度	55 °C
ネブライザ温度	55 °C
ガス流量	1 SLM
データレート	80 Hz
スムージング	10

試料調製

1. 風邪薬 2 カプセルを開け、蒸留水 20 mL に溶解しました。溶液には以下の成分が含まれます：
 - 250 ng/µL chlorphenamine
 - 20,000 ng/µL paracetamol
 - 2,500 ng/µL caffeine
 - 15,000 ng/µL vitamin C
2. 5 分間、超音波浴により抽出しました。
3. Agilent Premium Syringe Filter Captiva (再生セルロース、p/n 5190–5091) を用いてろ過しました。
4. ろ液を 1.5 mL の LC バイアルに入れ保存しました。
5. さらに水で希釈 (1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50) して、試料としました。

試薬

溶媒はすべて LC グレードを使用しました。アセトニトリルは Merck (Germany) から購入しました。超純水は、LC-Pak Polisher および 0.22 µm membrane point of use cartridge を装備した Milli Q Integral system (Millipak) で製造しました。トリフルオロ酢酸は、Sigma Aldrich 社 (St. Louis, USA) から購入しました。

結果と考察

従来の ELSD と 1290 Infinity II ELSD の性能の違いを評価するために、同じ構成の 1290 Infinity II LC システムを用いて以下の実験を行いました。

- 従来の ELSD を用いた 1290 Infinity II LC システムによる合剤の分析高用量と低用量の有効成分を、異なるサンプル濃度で 2 回注入して分析しました。
- 1290 Infinity II ELS 検出器を用いた 1290 Infinity II LC システムによる合剤の分析直線性範囲内の高用量と低用量の有効成分を、1 回の注入で分析しました。

1290 Infinity II ELSD のダイナミックレンジの広さは、同じサンプルを従来の ELSD に注入したときの結果を比較することで示すことができます。合剤を 20 倍に希釈し、溶液を 5 μL 注入した結果を図 2 に示します。1290 Infinity II ELSD (赤色) が直線性範囲を超えることなく正確に高濃度のピークを定量できることが示されています。1290 Infinity II ELSD では全ての化合物で良好なピーク形状が得られましたが、従来の ELSD (青色) は最初の高濃度ピーク (vitamin C と paracetamol) でシグナルが飽和してしまいました。また、最後に溶出する低濃度ピーク (caffeine と chlorphenamine) ではテーリングを示しピーク形状はよくありませんでした。従来の ELSD を用いて合剤中の全ての化合物の定量を行うには、異なる希釈率のサンプルを 2 回注入する必要があります。

1290 Infinity II ELSD の広い定量範囲を示すために、クロマトグラム中の最も高いピークである paracetamol の検量線を図 3 に示しました。検出器の指数関数的な応答のため、検量線は指数関数で回帰しました。検量線は、400 から 2,000 $\text{ng}/\mu\text{L}$ で相関係数 0.9996 を示しました。

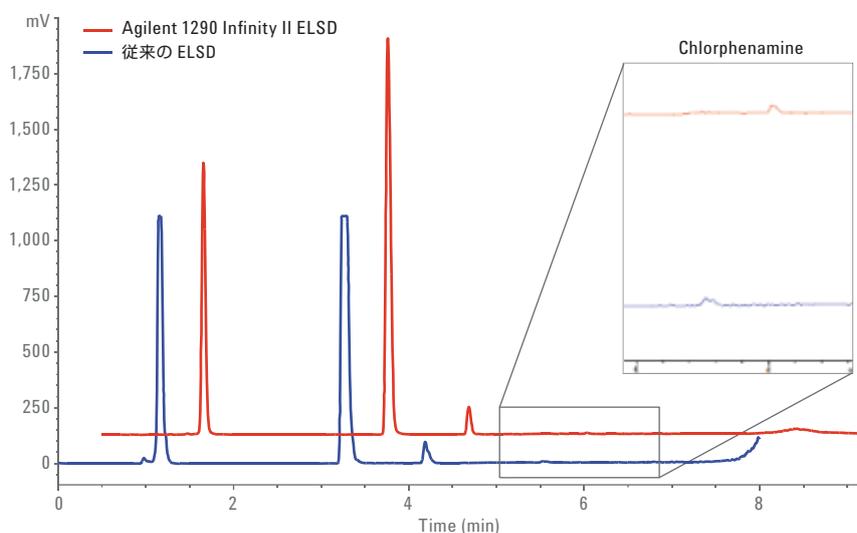


図 2 合剤の分析: Agilent 1290 Infinity II ELSD (赤線) および従来の ELS 検出器 (青線) を用いて注入しました。従来の ELSD では最初の高濃度のピークは高濃度のため飽和し、後の 2 本のピークはテーリングと悪い定量性を示しています。

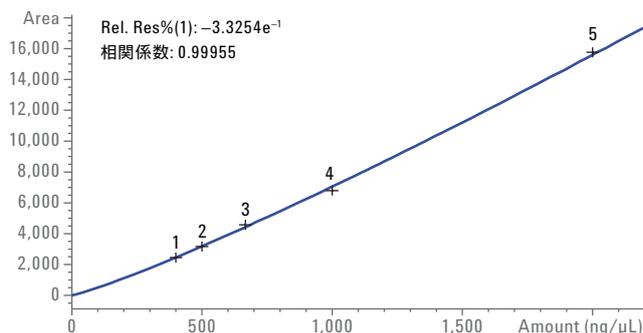


図 3 Agilent 1290 Infinity II ELSD: 広い濃度範囲 (400-2000 $\text{ng}/\mu\text{L}$) における相関係数 0.9996 の paracetamol 検量線により広いダイナミックレンジが示されています。

最も低いピークである chlorphenamine (paracetamol の 1/80) でも優れた定量性を示し、5 から 25 ng/μL で 0.9969 の良好な相関係数を示しました (図 4)。

1290 Infinity II ELSD はその広いダイナミックレンジにより、希釈していない合剤でさえも、検出器の応答が飽和することなく分析することができます。クロマトグラム中の最も高いピークと最も低いピーク間の濃度範囲は 3 桁でした (図 5)。

図 2 で示すように、従来の ELSD のダイナミックレンジでは、合剤を 20 倍希釈したサンプルの分析では狭すぎるため、50 倍希釈が必要になります。

50 倍希釈のサンプルを用いて 2 つの検出器の性能を比較しました (表 1)。50 倍に希釈したため、従来の ELSD でもダイナミックレンジを超えることなく paracetamol と vitamin C を定量することができましたが、引き換えに、クロマトグラム中の最も低いピークである chlorphenamine は検出することができませんでした。また、caffeine のピーク面積の RSD は 15.25 % と大きい値を示しました。

一方、ハイダイナミックレンジの 1290 Infinity II ELSD では、chlorphenamine を除く他の成分のピーク面積の RSD は 2 % 未満と良好でした。Chlorphenamine のピーク面積の RSD は 17.81 %、S/N 比は 16 でした。

これらの結果から、従来の ELSD による一回の測定では、有効成分の濃度範囲が広範囲にわたる合剤は一回のサンプル注入では分析できないことが示されました。一方、ハイダイナミックレンジの 1290 Infinity II ELSD は全ての化合物で素晴らしい結果を示しました。10 倍も広いダイナミックレンジによって、一回の注入で合剤中の高用量および低用量の有効成分を定量することができました。

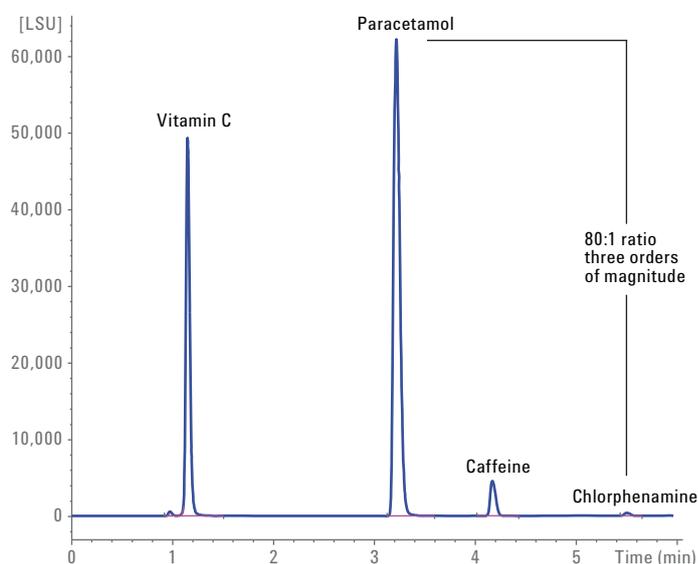
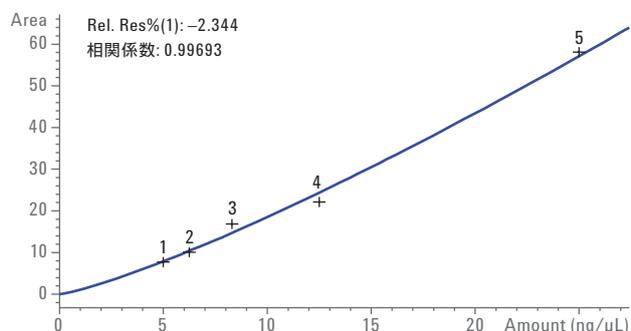


図 5 希釈していない合剤の測定においても Agilent 1290 Infinity II ELSD は飽和点に達することなく注入することができます。1:80 の存在比の最も高いピークと最も低いピークの間に 3 桁のダイナミックレンジがあります。

表 1. Agilent 1290 Infinity II ELSD と従来の ELSD の比較 (n=5)

成分名	Agilent 1290 Infinity II ELSD 面積 RSD (%)	従来の ELSD 面積 RSD (%)
Vitamin C	2.73	4.23
Paracetamol	1.38	1.33
Caffeine	2.06	15.27
Chlorphenamine	17.81	—

結論

このアプリケーションノートは、Agilent 1290 Infinity II LC システムに接続した Agilent 1290 Infinity II 蒸発光散乱検出器 (ELSD) のサンプルスループットにおける性能と効率の向上について示しています。従来比 10 倍の広いダイナミックレンジは、低用量と高用量の有効成分を含む合剤をたった一回の注入によって分析、定量することを可能にしました。ダイナミックレンジと面積 RSD を従来の ELSD と比較したところ、従来の ELSD では一回の注入によって最も低いピークと高いピークを同時に検出することができませんでしたが、1290 Infinity II ELSD ではクロマトグラム中の最も低いピークでも優れた結果が得られました。拡張された 1290 Infinity II ELSD のダイナミックレンジは、合剤中の濃度比 80:1 以上の化合物でも検出と定量が可能です。

www.agilent.com/chem/jp

本資料に記載の情報は、予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2015

Published in Japan, March 1, 2015

5991-5601JAJP



Agilent Technologies