



Agilent 1290 Infinity II LC と ISET – Waters Empower ソフトウェアによる Waters Alliance 2695 LC のエミュレーション パラセタモールとその不純物の分析

アプリケーションノート

低分子医薬品

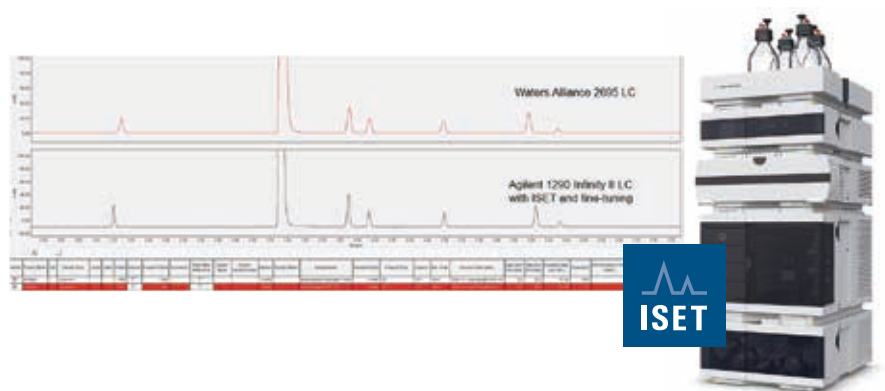
著者

Melanie Metzloff
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

概要

多くの業界で、機器間のメソッド移管は多くのラボにとって課題の多い問題です。個々の機器の性能を考慮しつつ、リテンションタイムを維持し、しかも機器の移管によって分析対象物の分離能が低下しないようにしなければならないからです。アジレントのインテリジェントシステムエミュレーション技術 (ISET) を使用すれば、ディレイボリュームがより大きく、ミキシング挙動の異なる LC システムから Agilent 1290 Infinity や Agilent 1290 Infinity II LC へメソッドをシームレスに移管できます。

このアプリケーションノートでは、Waters Alliance 2695 LC から Agilent 1290 Infinity II LC へ、LC メソッドを容易に移管できることを示します。これを実証するために、機器を Waters Empower ソフトウェアでコントロールし、移管時に ISET を有効にしたときと無効にしたときの結果について考察しました。メソッドの評価には、分析対象物としてパラセタモールとその不純物を用い、両システムで得られたリテンションタイムと分離能の値を比較しました。



Agilent Technologies

はじめに

機器間のメソッド移管は、重要であるにも関わらず、多くの業界にとっては頭の痛い作業です。特に、規制の厳しい環境では、すでに確立されている検証済みのメソッドを移管するのは容易でなく、多大なコストを伴うこともあります。分析対象物のリテンションタイムやクロマトグラフィー分離能が移管の前後で変わってしまう可能性があるからです¹。それでも、古い機器を新しい機器に交換しなければならない時期は繰り返しやってきます。

アジレントのインテリジェントシステムエミュレーション技術 (ISET) を搭載した Agilent 1290 Infinity LC または Agilent 1290 Infinity II LC では、Waters Alliance 2695 LC など旧式の他社製機器のエミュレーションが可能です。ISET により、より大きいディレイボリュームやグラジエントミキシング挙動の違いが考慮されるため、両方の LC で同等のリテンションタイムを実現できます。

このアプリケーションノートでは、パラセタモールとその不純物を Waters Alliance 2695 LC で分析した後、Agilent 1290 Infinity II フレキシブルポンプを装着した Agilent 1290 Infinity II LC にメソッドを移管しました。ISET を有効にした場合と無効にした場合での UHPLC システムへのメソッド移管を評価し、Waters Alliance 2695 LC で得られたデータと比較しました。その結果、ISET を有効にすると、リテンションタイムでの高い相関性と優れた分離能値が得られました。

実験方法

使用機器

パラセタモールとその不純物の分析には、次の機器を使用しました。

Agilent 1290 Infinity II LC システム:

- Agilent 1290 Infinity II フレキシブルポンプ (G7104A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ (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)、光路長 10 mm の Max-Light カートリッジセル搭載

Waters Alliance 2695 と Dual Absorbance Detector VWD 2487

溶媒およびサンプル

すべての溶媒は LC グレードのものでした。超純水は、0.22 µm メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak) を備えた Milli-Q Integral システムで生成しました。

メソッド

表 1. パラセタモールとその不純物の分析に用いたクロマトグラフィー条件

パラメータ	値
移動相	A) 0.1 % TFA 水溶液 B) 0.09 % TFA アセトニトリル溶液
グラジエント	0 分 – B 5 % 0.5 分 – B 5 % 8 分 – B 70 % 8.5 分 – B 5 % 16 分 – B 5 %
流量	1.2 mL/min
注入量	3 µL、標準的なニードル洗浄を使用
カラム温度	30 °C
検出	270/4 nm、参照波長オフ、10 Hz

実験に用いた混合化合物は次のとおりです。

主成分

パラセタモール (5 mg/mL)

不純物 A

2-アセトアミドフェノール (10 µg/mL)

不純物 B

N-(4-ヒドロキシフェニル) プロパミド (10 µg/mL)

不純物 F

ニトロフェノール (10 µg/mL)

不純物 H

4-(アセチルアミノ) 酢酸フェニル (N,O-ジアセチル-4-アミノフェノール) (10 µg/mL)

不純物 J

4-クロロアセトアニリド (10 µg/mL)

不純物 K

4-アミノフェノール (10 µg/mL)

カラム

Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、4.6 × 100 mm、3.5 µm (p/n 959961-902)

ソフトウェア

- Waters Empower 3 (ビルド 3471): Waters Alliance 2695 のコントロール用
- Waters Empower 3 (ビルド 3471) と Waters ICS 2.1 Hotfix 1 バージョンおよび Agilent ICF A.02.03 DU1 HF2 バージョン: Agilent 1290 Infinity II LC のコントロール用

結果と考察

Waters Alliance 2695 LC から 1290 Infinity II LC へのメソッド移管を簡単かつシームレスに行えることを実証するために、両システムでパラセタモールとその不純物を分析し、リテンションタイムと分離能の値を評価しました。

まず、メソッドを Waters Alliance 2695 LC で使用した後、ISET を無効にして 1290 Infinity II LC に移管しました。図 1 は、そのときに両システムで得られたクロマトグラムです。2 つのクロマトグラムを比較すると、1290 Infinity II LC シス

テムでは、すべてのピークが早く溶出しています。これは、このシステムのディレイボリュームが大幅に小さいためです。

次に、両システムのディレイボリュームとグラジエントミキシング挙動の違いを補正するために、ISET を有効にしました。ISET は、ポンプのメソッドタブをクリック操作するだけで有効化できます。ISET を有効にすると、図 2 に示すように、ポンプのステータスダッシュボードにオレンジ色のアイコンが表示されます。

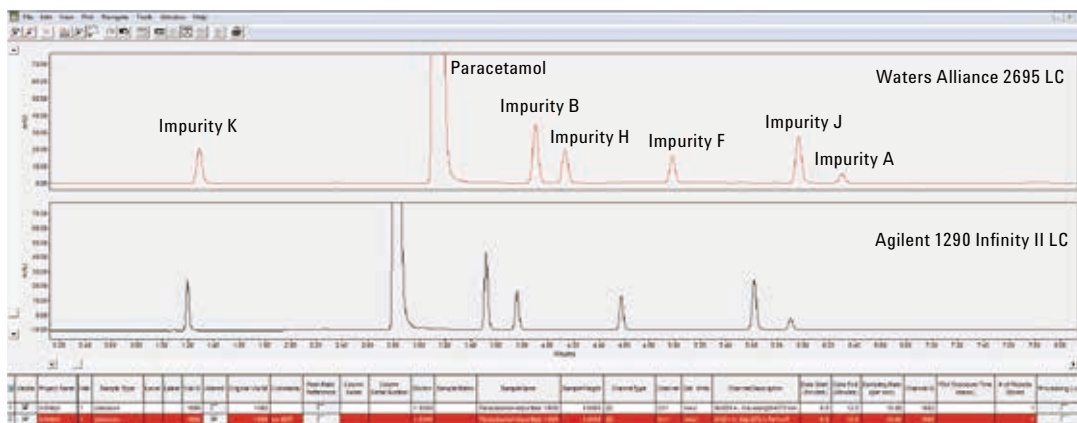


図 1. パラセタモールとその不純物の分析における、Waters Alliance 2695 と、ISET を無効にした Agilent 1290 Infinity II LC のクロマトグラムの比較

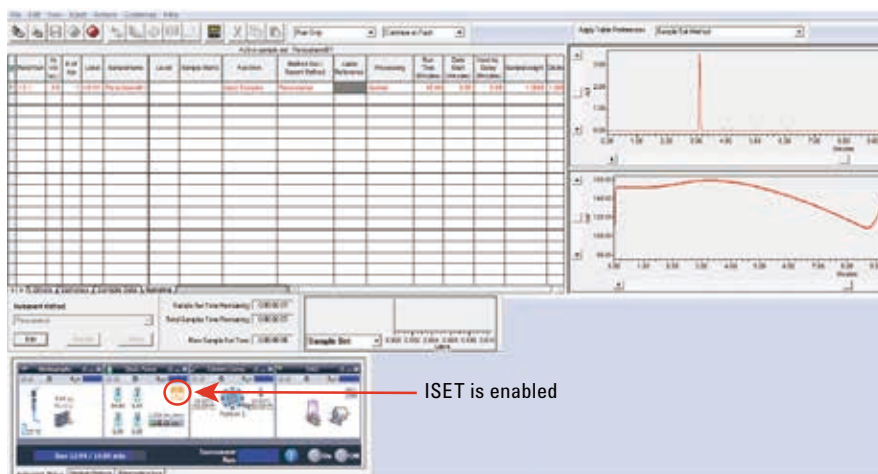


図 2. Empower 3 と ICF で ISET を有効にしたときのアジレントの機器ステータス画面の例

ISET を有効にすることにより、1290 Infinity II LC のリテンションタイムが明らかに遅くなり、Waters Alliance 2695 LC の結果との整合性が格段に高まりました (図 3 の青線)。さらに、ISET に加えて微調整オプションを使用すると、元のクロマトグラムとの相関性がきわめて高いクロマトグラムが得られました (図 3 の黒線)。

微調整オプションでは、デッドボリュームを調整し、エミュレーションをさらに改善することができます²。このアプリケーションノートでは、ISET パラメータ画面でデッドボリュームを 100 μL 追加しました (図 4)。

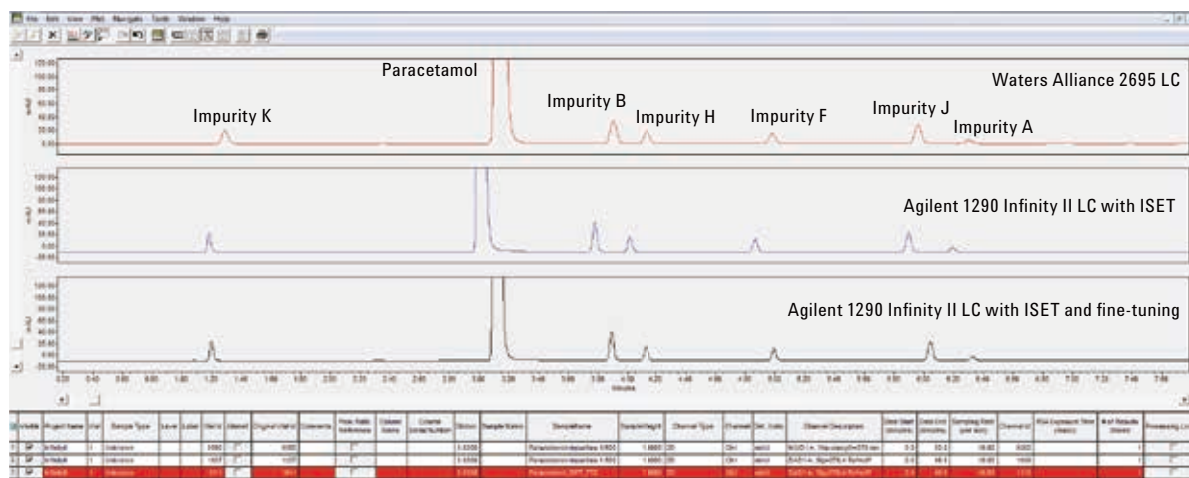


図 3. パラセタモールとその不純物の分析における、Waters Alliance 2695 LC、ISET を有効にした Agilent 1290 Infinity II LC、および ISET と微調整を有効にした Agilent 1290 Infinity II LC のクロマトグラムの比較

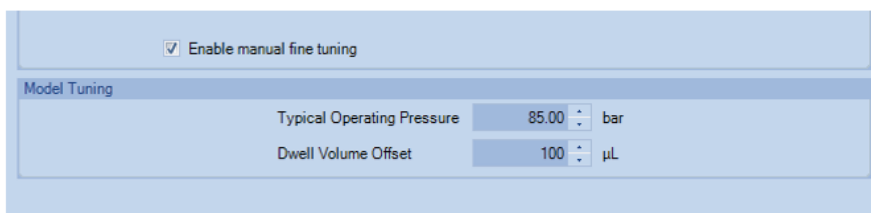
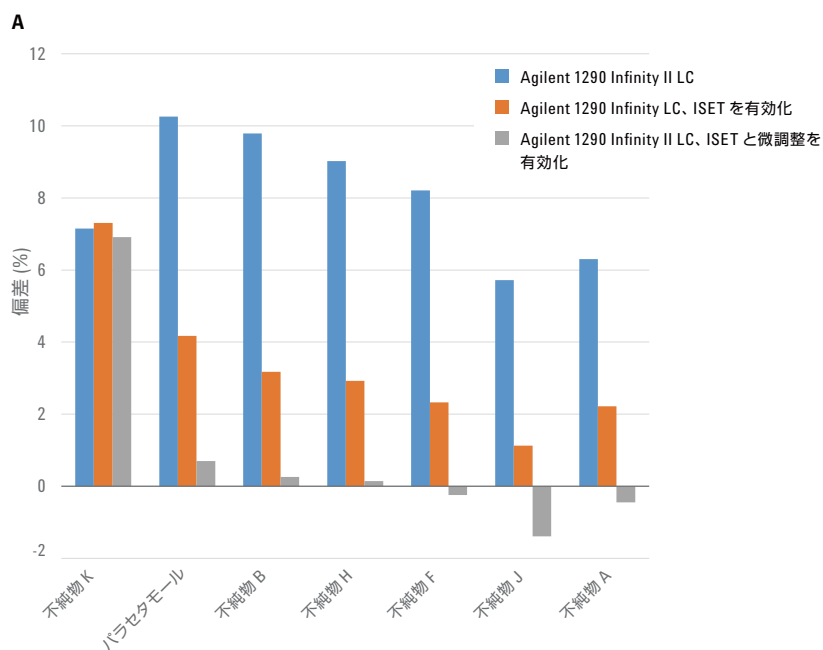


図 4. ISET 画面の微調整パラメータ

Waters Alliance 2695 LC で最初に採取したデータに対して、1290 Infinity II LC で各種設定を用いたときのリテンションタイムの偏差を図 5 に詳しく示します。ISET の仕様では、リテンションタイムの偏差が $\pm 5\%$ (リテンションタイムが 6 分を超える場合) または ± 0.3 分 (リテンションタイムが 6 分以下の場合) の範囲にしなければなりません²。UHPLC システムへのメソッド移管時に ISET を使用しなかった場合、ほとんどのピークについてこの仕様が満たされませんでした。一方、ISET を有効にすると、すべてのピークが ± 0.3 分または $\pm 5\%$ の仕様内に収まりました。また、ISET に加えて微調整オプションを用いたところ、リテンションタイムの偏差がさらに最適化され、すべてのピークの偏差が 0.1 分または 2% を下回りました。



B

	Agilent 1290 Infinity II LC	Agilent 1290 Infinity II LC、ISET を有効化	Agilent 1290 Infinity II LC ISET と微調整を有効化
不純物 K	0.092	0.094	0.089
パラセタモール	0.322	0.131	0.022
不純物 B	0.382	0.124	0.010
不純物 H	0.373	0.121	0.006
不純物 F	0.409	0.116	-0.012
不純物 J	0.341	0.067	-0.083
不純物 A	0.397	0.140	-0.028

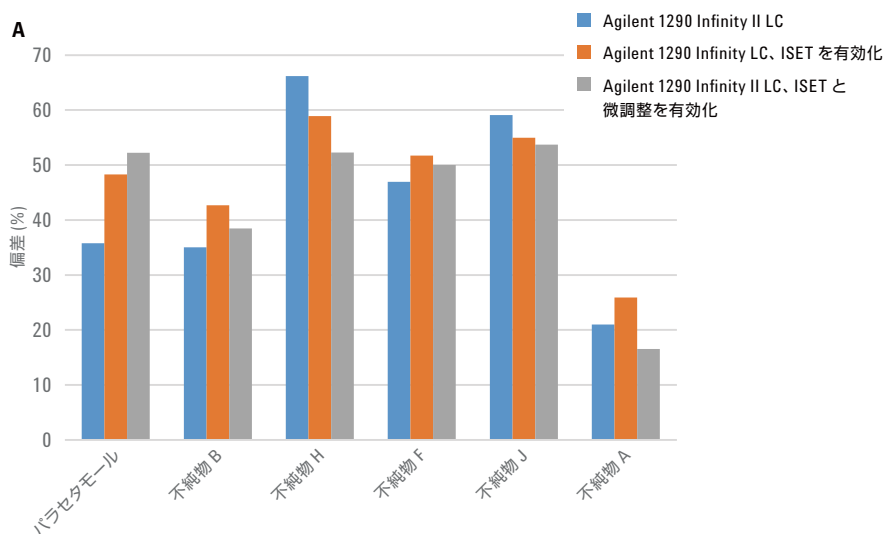
図 5. Agilent 1290 Infinity II LC で各種設定を用いたときのリテンションタイムの偏差。
A) リテンションタイムの偏差 (%)。B) リテンションタイムの偏差 (分)。

メソッドの移管を評価する際に考慮しなければならないもう一つのクロマトグラフィーパラメータが、ピーク分離能です。分離能の最大許容損失は5%です³。図6に、1290 Infinity II LCで各種設定を用いたときの分離能の偏差をまとめます。すべてのピークが、メソッドをUHPLCシステムに移管することにより大幅に高まりました。

結論

アジレントのインテリジェントシステムエミュレーション技術 (ISET) を使用すると、すでに確立されているメソッドを従来のHPLCからAgilent 1290 Infinity II LCなどのUHPLCシステムへシームレスに移管できます。ISETにより、メソッド移管元のHPLCシステムが1290 Infinity II LCでエミュレートされ、元のデータセットに近いリテンションタイムが再現されます。ISETは数回のクリック操作で簡単に有効化できます。LCのハードウェアやメソッドを変更する必要はありません。

このアプリケーションノートでは、パラセタモールとその不純物の分析メソッドをWaters Alliance 2695 LCからAgilent 1290 Infinity II LCへ移管しました。ISETと微調整オプションを併せて有効にすることで、すべてのピークのリテンションタイムについて優れた相関性が得られました。また、すべてのピークが分離能が向上しました。



B

	Waters Alliance 2695 LC	Agilent 1290 Infinity II LC	Agilent 1290 Infinity LC, ISETを有効化	Agilent 1290 Infinity II LC, ISETと微調整を有効化
不純物 K	-	-	-	-
パラセタモール	23.24	31.56	34.46	35.38
不純物 B	9.51	12.84	13.57	13.17
不純物 H	2.87	4.77	4.56	4.37
不純物 F	10.5	15.43	15.93	15.75
不純物 J	11.86	18.87	18.38	18.23
不純物 A	4.05	4.9	5.1	4.72

図 6. A) 分離能の偏差 (%). B) Waters Alliance 2695 LC の分離能の値と、Agilent 1290 Infinity II LC で各種設定を用いたときの分離能の値。

参考文献

1. Huesgen, A. G., Agilent 1290 Infinity Binary LC with ISET, emulation of the Waters Alliance 2695 LC system analyzing aromatic acids, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-2019EN, **2013**.
2. Agilent 1290 Infinity with ISET, *Agilent User Manual*, part number G4220-90313, **2014**.
3. Huesgen, A. G., Agilent 1290 Infinity Binary LC with ISET - Emulation of the Waters Alliance 2695 LC System Analyzing Analgesics, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-2792EN, **2013**.

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, November 1, 2015

5991-6408JAJP



Agilent Technologies