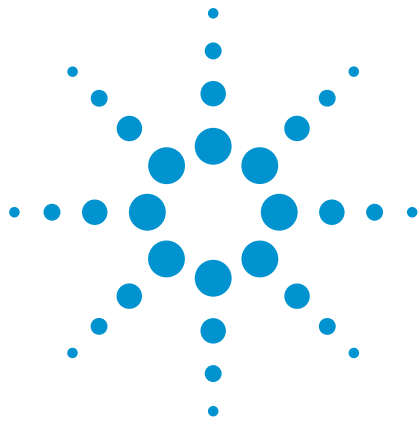
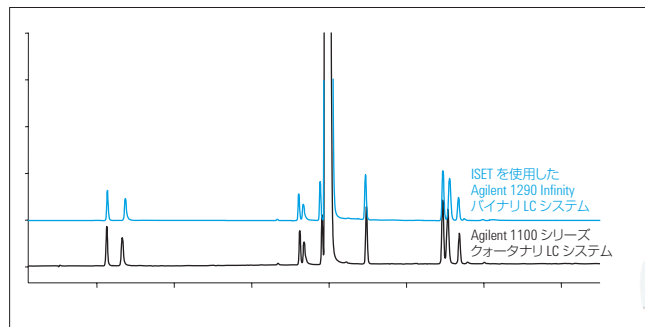




インテリジェントシステム エミュレーション技術 (ISET) を使用した Agilent 1290 Infinity LC への メソッド移管

塩酸メトクロプラミドとその不純物の分析

技術概要



著者

A.G.Huesgen
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn,
Germany

概要

アジレントインテリジェントシステムエミュレーション技術 (ISET) は Agilent 1290 Infinity LC システムの機能の 1 つで、大きいディレイボリュームと異なる混合特性を持つ Agilent 1100 シリーズクォータナリ LC システムなどの従来の LC システムから 1290 Infinity LC システムへのシームレスなメソッド移管を可能にします。1290 Infinity LC システムで ISET 機能を有効にすると、ほぼ同一のリテンションタイムと分離能が得られます。この技術概要では、1100 シリーズクォータナリ LC システムから 1290 Infinity LC システムへの従来の HPLC メソッドの移管について説明します。メトクロプラミドとその不純物を両方のシステムで分析しました。測定は、ISET を有効にした条件と有効にしない条件を使用して 1290 Infinity LC システムで行いました。リテンションタイムと分離能をさらに一致させるために、ISET の微調整オプションを使用しました。さまざまな実験のリテンションタイムと分離能を評価し、比較しました。



Agilent Technologies

はじめに

従来の LC から、Agilent 1290 Infinity LC システムなどの UHPLC システムにメソッドを移管すると、常にリテンションタイムと分析ピークの分離能に大きな違いが生じます。メソッドの再バリデーションを避けるために、多くの場合は、分析開始時にアイソクラティックホールドを追加したり、ディレイボリウムを追加したりします。これらのアプローチの欠点は、ディレイボリウムだけが調整される点です。2 つのポンプの混合特性の違いはこれらの解決策では補正できません。1290 Infinity LC で ISET を使用すると、ディレイボリウムと混合特性の違いが補正されます。その結果、リテンションタイムと分離能は、元のデータと非常に類似したものとなります。

この技術概要では、1290 Infinity LC で ISET を使用し Agilent 1100 シリーズクォータナリ LC の動作をエミュレートしました。メトクロブラミドとその不純物の分析に使用したメソッドを 1290 Infinity LC システムのメソッドに使用しました。実験は、ISET 機能を使用した場合と使用しない場合について行いました。さらに、ISET の微調整オプションを使用して、メソッド移管をさらに最適化できる方法を示しました。すべての実験のリテンションタイムと分離能を評価し、比較しました。

実験方法

機器とソフトウェア

Agilent 1290 Infinity LC システムを次のモジュールで構成しました。

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity オートサンブラ、サーモスタット付き (G4226A、G1330B)
- Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G4212A)

Agilent 1100 シリーズ LC システムを次のモジュールで構成しました。

- Agilent 1100 シリーズクォータナリポンプ (G1311A)
- Agilent 1100 シリーズオートサンブラ (G1311A)
- Agilent 1100 シリーズカラムコンパートメント (G1316C)
- Agilent 1100 シリーズダイオードアレイ検出器 (G1315B)*

* 1100 シリーズ DAD の検出器セルの容量は 13 μ L です。ISET (リビジョン 1.0) はカラム後の拡散ボリウムを補正しない点に注意してください。

ソフトウェア : Agilent ChemStation リビジョン C.01.03 および ISET リビジョン 1.0。すべての LC モジュールでは、ファームウェアリビジョン A.06.32、B.06.32、または B.06.41 以降と RC.Net ドライバを使用しました。

サンプル

次の化合物を混合したものを実験に使用しました。

主要化合物 :	塩酸メトクロブラミド
X :	臭素酸メトクロブラミド
不純物 1 :	4-アミノ-5-クロロ-2-メトキシ安息香酸 (EPC)
不純物 2 :	4-(アセチルアミノ)-2-ヒドロキシ安息香酸 (EPH)
不純物 3 :	4-アミノ-5-クロロ-N-2-(ジエチルアミノエチル)-2-メトキシベンズアミド N-オキシド (EPG)
不純物 4 :	4-アミノ-5-クロロ-N-2-(ジエチルアミノエチル)-2-ヒドロキシベンズアミド (EPF)
不純物 5 :	4-(アセチルアミノ)-5-クロロ-N-2-(ジエチルアミノエチル)-2-メトキシベンズアミド (EPA)
不純物 6 :	メチル 4-(アセチルアミノ)-2-メトキシベンゾエート (EPD)
不純物 7 :	メチル 4-(アセチルアミノ)-2-ヒドロキシベンゾエート
不純物 8 :	メチル 4-(アセチルアミノ)-5-クロロ-2-メトキシベンゾエート (EPB)
不純物 9 :	メチル 4-アミノ-2-メトキシベンゾエート

クロマトグラフィー条件

カラム :	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3.0 x 150 mm, 3.5 μ m (959963-302)
移動相 :	水 + NH ₄ Ac (2.5 g/L)、pH 6.99/アセトニトリル
流量 :	0.6 mL/min
グラジエント :	5 % ACN (0 分)~57.5 % ACN (15 分)
ストップタイム :	15 分
ポストタイム :	5 分
注入量 :	1 μ L (3 秒間のニードル洗浄) (Agilent 1290 Infinity オートサンブラのみ)
カラム温度 :	37 °C
検出 :	275/4 nm、リファレンス 400/60 nm、5 Hz、スリット 4 nm

結果と考察

メトクロブラミドとその不純物は、移動相の組成や温度の変化に対し、きわめて高感度に反応する化合物です。したがって、これらの化合物のメソッド移管は困難です。²

メトクロブラミドとその不純物を、3.5 μm 粒子を充てんした 3.0 x 150 mm カラムを使用し、従来のメソッドで分析しました。最初に、ISET を使用しないでこのメソッドを 1290 Infinity LC システムのメソッドに移管しました。次に、ISET を使用してこのメソッドを移管しました。図 1 の結果のクロマトグラムを参照してください。1100 シリーズ LC システムのクロマトグラムを、ISET を使用した/使用しない 1290 Infinity LC システムで測定したクロマトグラムと重ねて示します。

ISET を使用しないと、すべてのピークがリテンションタイムの早い方にシフトしました。これに対し、ISET を使用した場合は、すべてのピークのリテンションタイムが元のクロマトグラムに非常に良好に対応しました。ISET を使用して、または使用しないで 1290 Infinity LC システムで分析すると、特にピーク 2、メインピーク、およびピーク 8 について、いずれの場合にも優れた分離能が得られました。これは、主に 1290 Infinity LC システムのカラム後の拡散ボリュームが低いからです。3 つのすべてのクロマトグラムのリテンションタイムを評価し、元のクロマトグラムとの違いをパーセンテージで示しました (図 2)。

ISET なしの場合は、元のリテンションタイムと比較してリテンションタイムが 5~23 % シフトしました。ISET を使用した場合は、リテンションタイムが後方に 4 % シフトした 2 番目のピークを除き、リテンションタイムは後方に 1.5 % シフトしました。

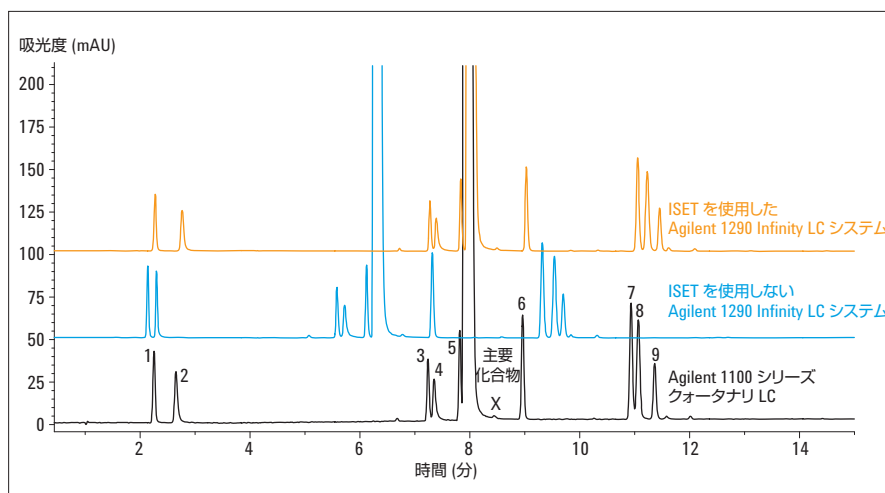


図 1
Agilent 1100 シリーズ LC システムのクロマトグラムと、ISET を使用した場合/使用しない場合の Agilent 1290 Infinity LC システムのクロマトグラムの重ねがき

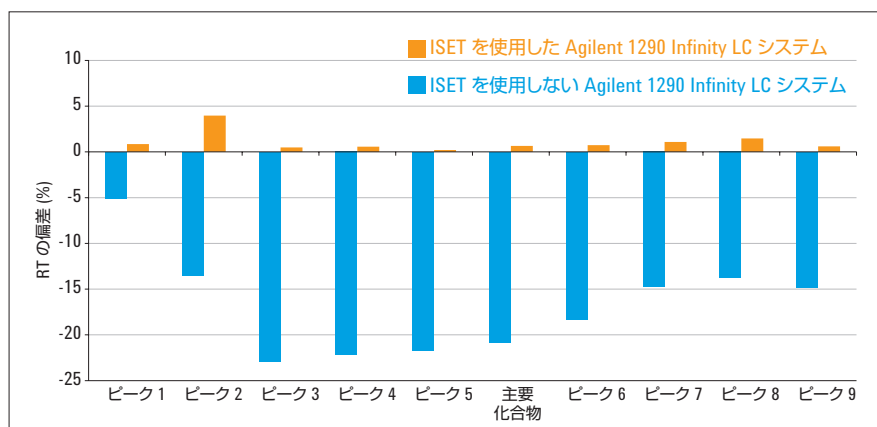


図 2
ISET を使用した場合/使用しない場合に Agilent 1290 Infinity LC システムで得られたリテンションタイムと、Agilent 1100 シリーズ LC システムのリテンションタイムの偏差

さらにリテンションタイムを一致させるために、ISET の Enable Manual Fine Tuning (手動による微調整の有効化) オプションをアクティブにしました (図 3)。20 μL のディレイボリュームオフセットを加えると、リテンションタイムは前方にわずかにシフトしました。Agilent 1100 シリーズクォータナリ LC の最大背圧は、メトクロプラミドの分析で約 120 bar でした。この値をソフトウェアの Typical Operating Pressure (代表的な動作圧力) フィールドに入力しました。グラジエント分析ではシステム圧力が変化し、1100 シリーズ LC のダンパーボリュームが変化します。Typical Operating Pressure 機能を使用して、ダンパーのボリュームを補正することができます。

これらの新しい条件を適用するにより、1100 シリーズのデータと、ISET と微調整オプションを使用した 1290 Infinity のクロマトグラムがさらに一致するようになりました (図 4)。

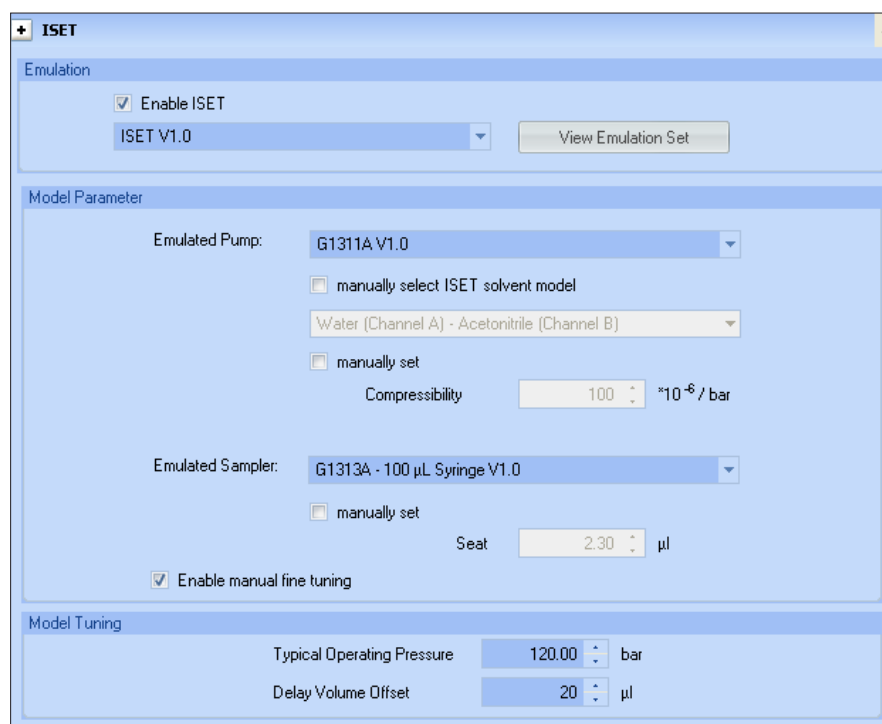


図 3
手動による微調整オプションを有効にするための ISET ソフトウェアのメニュー

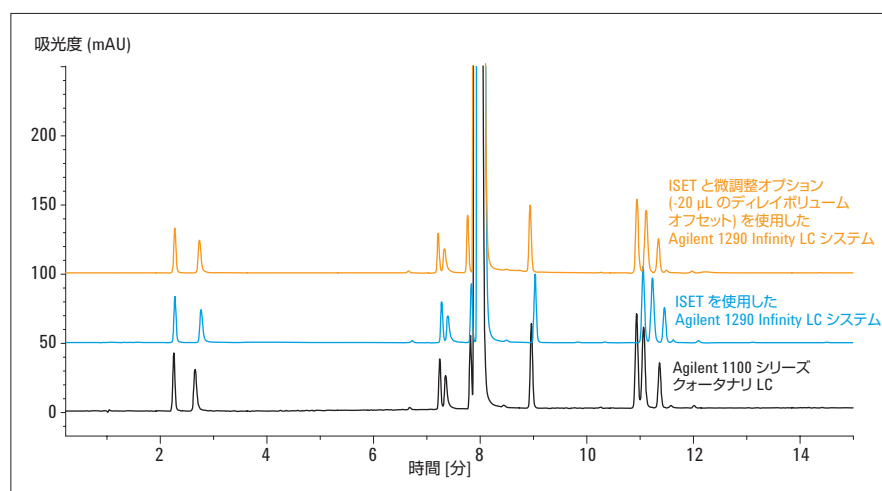


図 4
Agilent 1100 シリーズ LC システムのクロマトグラム、ISET を使用した Agilent 1290 Infinity LC システムのクロマトグラム、ISET と微調整オプションを使用した場合の 1290 Infinity LC システムのクロマトグラムの重ねがき

元のクロマトグラムと、微調整オプションを使用したクロマトグラムのリテンションタイムには 100 % に近い一致が見られました。リテンションタイムの偏差についての 3 つのクロマトグラムの結果を図 5 にまとめました。

ISET と微調整オプションを使用すると、リテンションタイムの偏差は 2 番目のピークで 3 % 未満に、残りのピークで 0.8 % 未満になりました。1290 Infinity LC システムでは、分離能は一般に良好なものとなりました。分離能の絶対値を組み合わせ図 6 に示しました。すべてのピークは非常に良好に一致しました。差は、カラム後の拡散ボリュームによるものです。

結論

アジレントインテリジェントシステムエミュレーション技術 (ISET) によって、従来のメソッドから 1290 Infinity LC システムのメソッドへのシームレスな移管が容易になり、その結果、リテンションタイムと分離能の優れた一致が実現します。メトクロプラミドとその不純物の従来の分析メソッドを、1100 シリーズクォータナリ LC システムから 1290 Infinity LC システムに移管しました。1290 Infinity LC の ISET 機能を有効にすることで、リテンションタイムの偏差が、1 つを除きすべてのピークで 1.5 % 未満になりました。ISET の微調整オプションを使用すると、リテンションタイムの偏差を 0.8 % 未満まで下げることができました。1290 Infinity LC システムへのメソッド移管後の分離能は、一般に 1100 シリーズ LC の場合よりもわずかに向上しました。

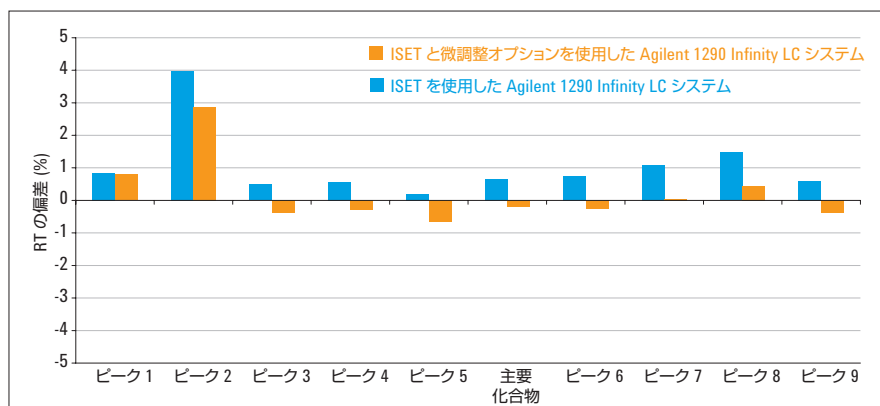


図 5 ISET を使用した Agilent 1290 Infinity LC システム、ISET と微調整オプションを使用した Agilent 1290 Infinity LC システムで得られたリテンションタイムと、Agilent 1100 シリーズ LC システムのリテンションタイムの偏差

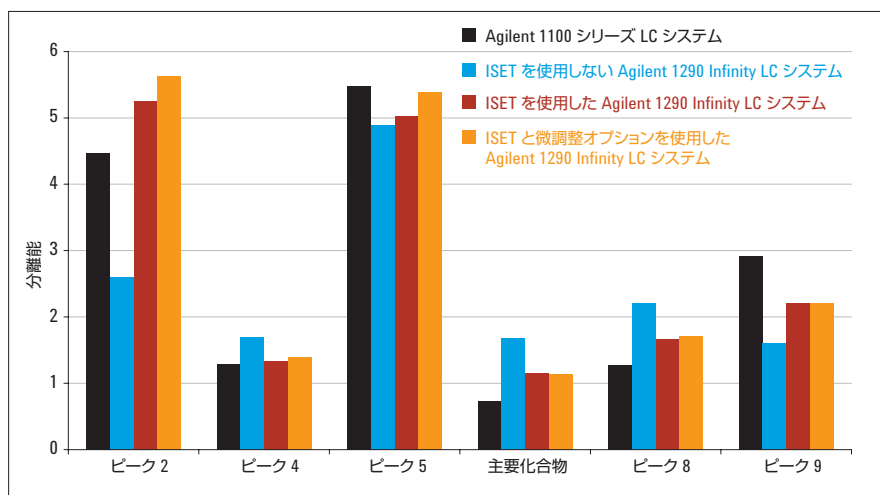


図 6 Agilent 1100 シリーズ LC システム、ISET を使用した/使用しない Agilent 1290 Infinity LC システム、および ISET と微調整オプションを使用した Agilent 1290 Infinity LC システムで得られた分離能の差

参考文献

1.
「インテリジェントシステムエミュレーション
技術 ISET 搭載 Agilent 1290 Infinity LC」、
アジレント資料番号 5990-8670JAJP, **2011**
2.
Gerd Vanhoenacker, Frank David, Pat Sandra,
Bernd Glatz, Edgar Naegele, 「Agilent 1290
Infinity LC システムによる塩酸メトクロプラ
ミド製剤中不純物分析の生産性向上」、
アジレント資料番号 5990-3981JAJP, May **2009**

www.agilent.com/chem/lc:jp

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2012
Published in Japan, January 1, 2012
5990-9692JAJP



Agilent Technologies