



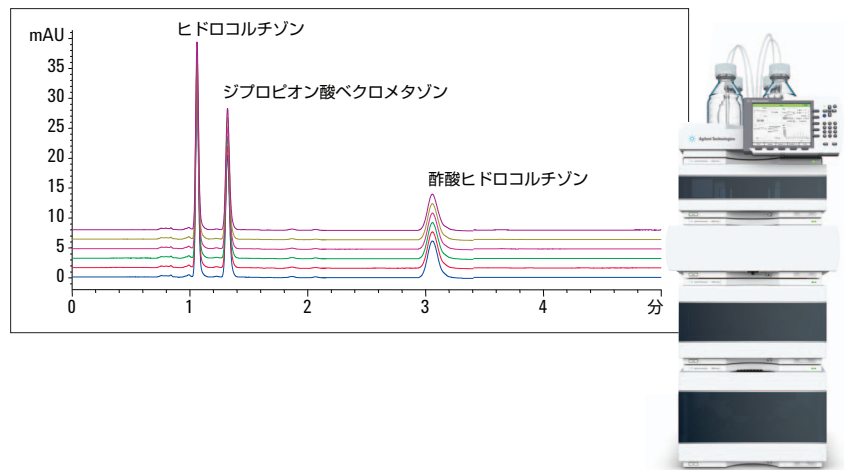
# Agilent 1290 Infinity クォータナリポンプ： アイソクラティック条件の移動相を 分析者が事前調製した場合と ポンプが調製した場合の比較

糖質コルチコイド薬の分析

## 技術概要

### 著者

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



### 概要

超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) において、リテンションタイムの精度は最も重要なパラメータの1つです。特に、リテンションタイムによって化合物を同定し、正確に定量するためには、リテンションタイムの精度を最高までに高める必要があります。そのため多くのアプリケーションでは、アイソクラティック分析で使用する移動相溶媒を事前に調製し、LCのポンプへ送液します。この技術概要では、Agilent 1290 Infinity クォータナリポンプの特徴であるブレンドアシスト機能を用いて、ポンプに移動相を調製させる方法と従来の方法との違いを調べました。



Agilent Technologies

## はじめに

近年、医薬品の品質管理分析ではアイソクラティック条件で UHPLC を用いた超高速分析が頻りに適用されるようになってきました。リテンションタイムの精度を高めるために、移動相を事前に調製する手法が採用されますが、常に同じ組成になるようにするためには、移動相を調製する手順の再現性を極めて高くする必要があります。しかし、調製手順や調製者によって、組成がわずかに変化する可能性があります。化合物によっては、このわずかな変化がリテンションタイムを大きくずらす結果になり、リテンションタイムの精度低下につながります。

今回の検討では、Agilent 1290 Infinity クォータナリポンプのブレンドアシスト機能を用いることにより、リテンションタイムの精度が最高レベルにまで高まることが判明しました。分析対象物としては、3種類の糖質コルチコイドを選択しました。その理由として、これらの化合物は移動相組成がわずかでも変化するると、リテンションタイムが大きく変動するからです (図 1 参照)。

## 実験手法

### 機器とソフトウェア

以下のモジュールで構成される Agilent 1290 Infinity LC を使用しました。

- Agilent 1290 Infinity クォータナリポンプ (G4204A)
- Agilent 1290 Infinity オートサンブラ、サーモスタット搭載 (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)

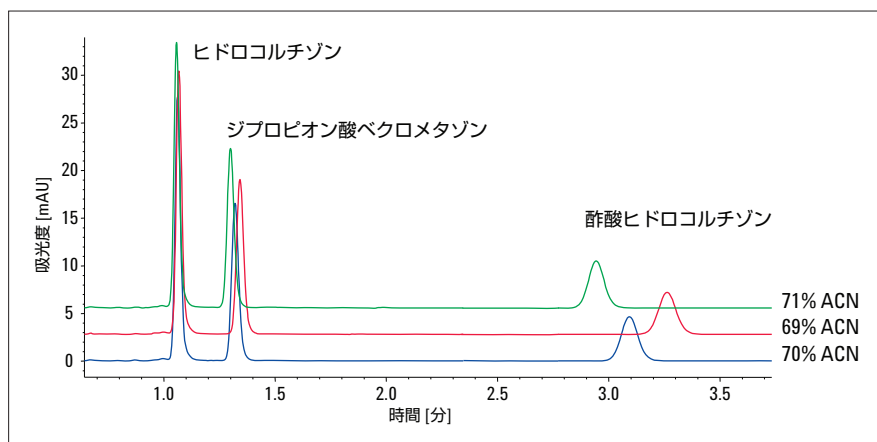


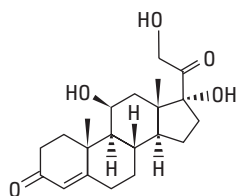
図 1  
アセトニトリル濃度のわずかな変化によるリテンションタイムの変動

### ソフトウェア

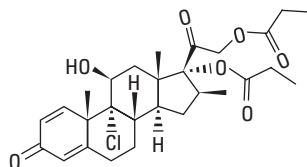
使用したソフトウェアは Agilent Chem-Station C.01.03 です。すべての Agilent LC モジュールは RC.Net ドライバと適切なリビジョンのファームウェアを搭載しています。

### 分析対象化合物

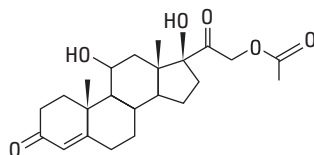
ヒドロコルチゾン



ジプロピオン酸ベクロメタゾン



酢酸ヒドロコルチゾン



### クロマトグラフィー条件

カラム: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、100 x 4.6 mm、5 μm  
移動相: 水:アセトニトリル / 30:70  
流速: 1 mL/min  
分析時間: 5分  
注入量: 3 μL、ニードル洗浄 6秒  
カラム温度: 30 °C  
検出器: 254/10 nm、Ref 400/80、20 Hz、スリット 4 nm

## 結果と考察

すべての実験には、1290 Infinity クォータナリポンプを使用しました。事前に調製した移動相を用いた実験には、移動相溶媒はポンプのチャンネル C を使用しました。ブレンドアシスト機能によってポンプに移動相を調製させる実験には、チャンネル A と B を使用しました。図 2 に、ポンプに移動相を調製させた時の 6 つのクロマトグラムを示します。

以下の実験を実施し、リテンションタイム (RT) の相対標準偏差 (RSD) を評価しました。

1. ブレンドアシスト機能で調製した移動相を用いた、連続 6 回の分析における RT の RSD。
2. 事前に調製した移動相を用いた、連続 6 回の分析における RT の RSD。
3. 10 回の測定で 1 セットの分析を数日にわたって 6 セット行い、ブレンドアシスト機能で調製した移動相を用いた各セットの 10 回目の分析における RT の RSD。
4. 10 回の測定で 1 セットの分析を数日にわたって 6 セット行い、1 人の分析者が事前に調製した移動相を用いた各セットの 10 回目の分析における RT の RSD。
5. 3 人の分析者が事前に調整した移動相を用いた 3 回の分析における RT の RSD。

図 3 に、実験 1 および 2 の結果を示します。実験前に予測したとおり、事前に調製した移動相を用いた実験のリテンションタイム精度は、全体として、ブレンドアシスト機能によってポンプで調製した移動相を用いた実験をわずかに上回りました。ただし、事前に調製した移動相を用いた場合のリテンションタイムの精度は、約 2 倍程度の向上にとどまっていますが、それでも全体としてはきわめて良好といえます。

実験 3 および 4 では、ブレンドアシスト機能によってポンプで調製した移動相については、単純に溶媒を補充するだけでした。各セットの 10 回目の分析について、ブレンドアシスト機能で調製および事前に調製した移動相を用いた場合における 6 つのリテンションタイムの RSD を評価しました。図 4 に、6 つのそれぞれのクロマトグラムを重ねて表示しています。ブレンドアシスト機能で調製した移動相を用いたリテンションタイムの精度は、同一人物が事前に調製した移動相を用いた場合の精度を大幅に上回りました。

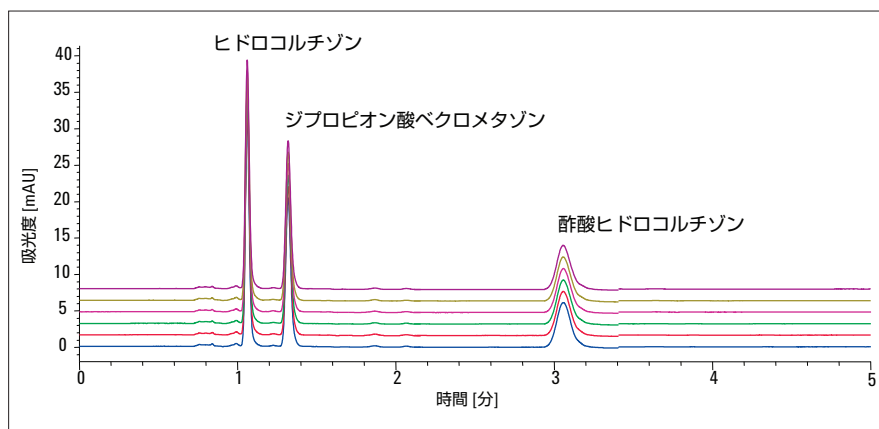


図 2  
ブレンドアシスト機能で調製した移動相を用いた糖質コルチコイドの分析

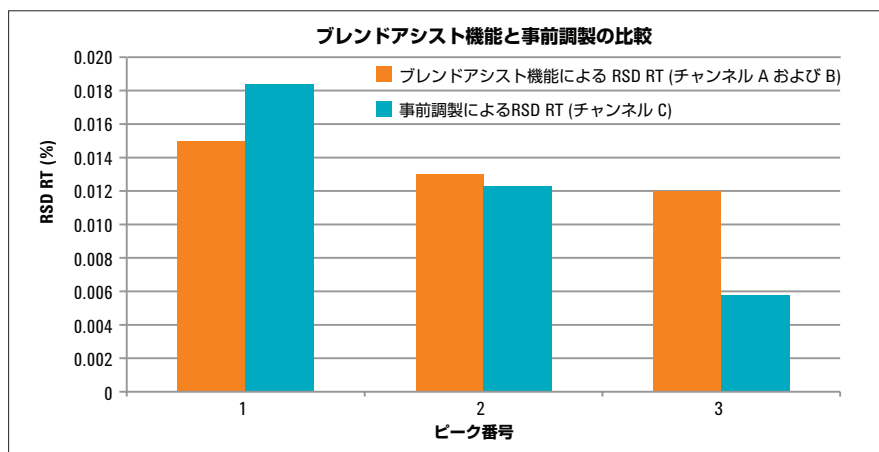


図 3  
ブレンドアシスト機能で調製および事前に調製した移動相を用いた場合のリテンションタイムの RSD

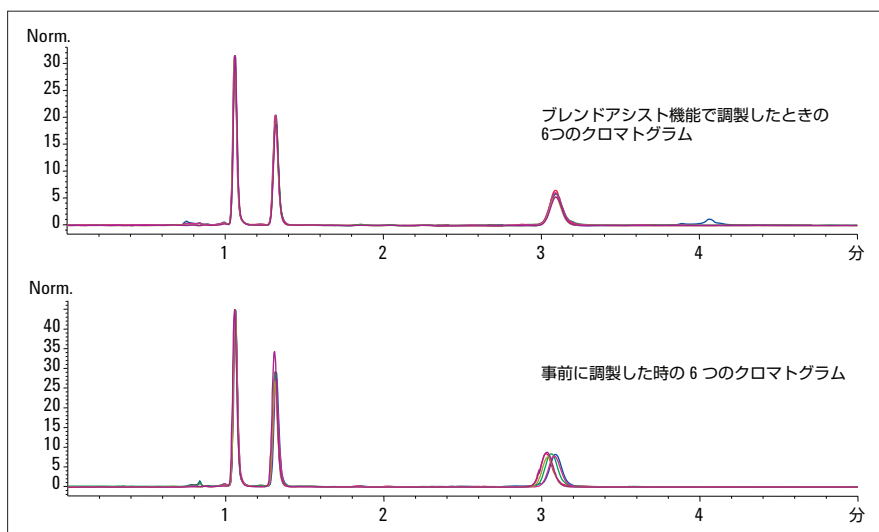


図 4  
ブレンドアシスト機能で調製および事前に調製した 6 つのクロマトグラムの比較

ブレンドアシスト機能で調製した移動相を用いたときの相対標準偏差は、3番目のピークで0.16%でした。

1人の分析者が事前に調製した移動相を用いたときの相対標準偏差は、3番目のピークで0.83% RSDでした。予想どおり、ブレンドアシスト機能で調製した移動相を用いた場合には日間誤差を最小限に抑え、さらに1人の分析者が調製し続けた移動相よりも精度が高いことがわかりました。

複数の分析者が事前に調製した移動相を用いた場合にも、同様のRSD値となりました(図5参照)。

3回の分析の相対標準偏差は0.982% RSDでした、実験3~5の結果を図6に示しています。

## 結論

分析回数が少なく連続している場合、事前に調製した移動相のほうがブレンドアシスト機能で調製した移動相よりもわずかに精度が高くなりました。しかし、数日にわたる分析で比較すると、ブレンドアシスト機能で調製した場合のほうが精度が高くなりました。これは主に、分析者が毎日新たに移動相を調製する際に生じる誤差が原因だと考えられます。

ブレンドアシスト機能で調製した移動相におけるリテンションタイムの日間精度は、およそ0.16% RSDでした。一方、事前に調製した場合のリテンションタイムの日間精度は、およそ0.89% RSDでした。異なる分析者が事前に調製した移動相を用いた場合にも、同様の結果が得られました。Agilent Infinity 1290 クォータナリポンプのブレンドアシスト機能は、ポンプに移動相を自動で調製させる機能です。特に、リテンションタイムの日間精度を高めるためには、移動相を事前に調製するよりも、この機能を用いたほうがより効果的になります。

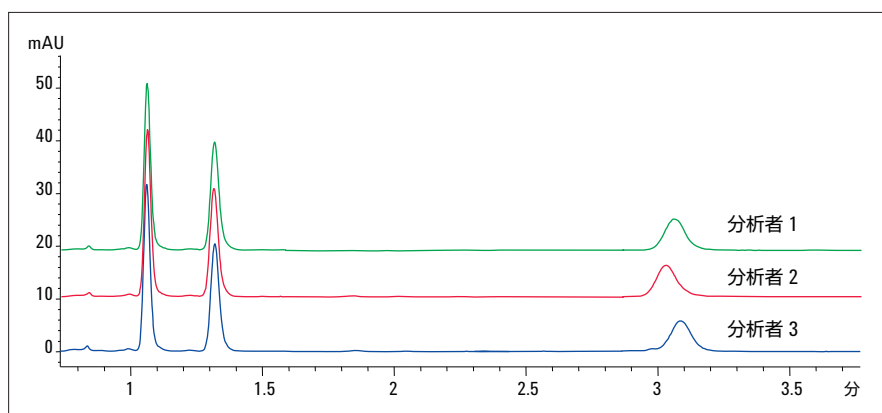


図5  
3人の分析者が事前に調製した移動相を用いて得られたクロマトグラムの比較

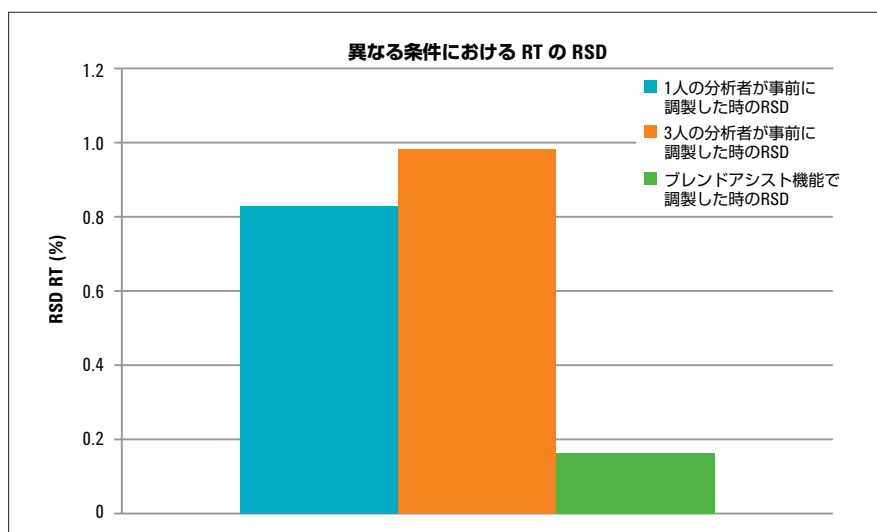


図6  
異なる条件で調製した移動相におけるリテンションタイムの精度

[www.agilent.com/chem/jp:lc](http://www.agilent.com/chem/jp:lc)

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc., 2012  
Published in Japan, April 25, 2012  
5991-0098JAJP



Agilent Technologies