Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

# 異なるLCシステムからACQUITY Arcシステムへの類縁物質HPLC分析法移管

Margaret Maziarz and Mark Wrona
Waters Corporation, Milford, MA, USA

## アプリケーションのメリット

- Arc Multi-flow path™ テクノロジーを使用することで、様々なLCシステムのHPLCおよびUHPLC条件を、効果的で簡便にACQUITY® Arc™ システムへ移管することが可能
- ACQUITY Arcシステムでより小さな粒子径のカラムを使用することで、ラボ効率を向上し生産性を最大化
- ACQUITY QDa® を用いたMS検出による、確実な化合物同定

## ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC® H-Classシステム

ACQUITY Arcシステム

ACQUITY UPLCカラム

ACQUITY QDa検出器

Empower® 3 クロマトグラフィーデータソフトウェア(CDS)

## キーワード

分析法移管、ACQUITY Arc、ウォーターズACQUITY UPLCカラムカリキュレーター、UPLC、QDa、充填剤粒子径2 µm以下のカラム

## はじめに

原薬や最終的な製剤の試験に用いる分析法は、社内の各部署や受託分析機関で、様々なベンダーの装置を用いて行われます。そのため、製品の一貫性を確実にし、規制を遵守するために、異なる装置間での円滑な分析法移管は欠かせません。有効な分析法移管であれば、同じ分析については装置・ラボ・人に関わらず同じ結果が得られます。時間もコストもかかる再バリデーションが不要になるため、同等の結果を得ることは重要です。

異なるLCシステム、特にベンダーの異なる装置間でクロマトグラフィーの分析条件を移管することは難しい課題です。各装置によるシステム容量の相違は、分離の低下やグラジエント分析におけるピーク形状の劣化の原因となります。そのため、グラジエント分析において異なるLCシステム間で同等の分離を得るためには、システム容量の差を考慮する必要があります。

本アプリケーションノートでは、メトクロプラミド塩酸塩とその類縁物質の分析法を、異なるLCシステムからACQUITY Arcシステムへ移管しました。また充填剤粒子径がより小さいカラムを使用し、この分析法を向上させる手法[1]もご紹介しています。分析法移管の評価は、クロマトグラムにおける分離が同等であるかと、システム適合性試験結果がUSPの規格[2,3]に合致するかを検証することにより行いました。その結果、ACQUITY ArcシステムではArc Multi-flow pathテクノロジー[4]を使用することで、複数のLCシステムで確立されたHPLC分析法を、グラジエントテーブルを変更することなく効果的に再現することができました。更にACQUITY Arcシステムに ACQUITY QDa検出器を接続し、MS検出によりサンプルに含まれる化合物の迅速な同定が可能となります。

## 実験条件

### サンプル調製

表 1 に記載のメトクロプラミド塩酸塩とその類縁物質を分析しました。各標準品を 1.0 mg/mL となるようメタノールにて調製し、各ストック溶液としました。測定溶液は、メトクロプラミドのストック溶液を水で 0.5 mg/mL に希釈し、各類縁物質を 1.0 %スパイクしました。

システム適合性試験用の標準溶液は、各成分がそれぞれ 0.05 mg/mL となるよう希釈溶媒（50/50 メタノール / 水）で混合希釈しました。この溶液を 15 µg/mL に希釈溶媒（50/50　メタノール/水）を用いて希釈したものをシステム適合性試験に使用しました。

| 化合物 | 一般名 | モノアイソトピック質量 (Da) | [M + H] (Da) |
|---|---|---|---|
| API | Metoclopramide | 299.14 | 300.1 |
| Impurity A | 4-Acetamido-5-chloro-N-(2-(diethylamino)ethyl)-2-methoxybenzamide | 341.15 | 342.0 |
| Impurity B | Methyl 4-acetamido-5-chloro-2-methoxybenzoate | 257.05 | 258.1 |
| Impurity C | 4-Amino-5-chloro-2-methoxybenzoic acid | 201.02 | 202.0 |
| Impurity D | Methyl 4-acetamido-2-methoxybenzoate | 223.08 | 224.1 |
| Impurity F | 4-Amino-5-chloro-N-(2-(diethylamino)ethyl)-2-hydroxybenzamide | 285.12 | 286.0 |
| Impurity G | 2-(4-Amino-5-chloro-2-hydroxybenzamido)-N,N-diethylethanamide oxide | 315.14 | 316.0 |
| Impurity H | 4-Acetamido-2-hydroxybenzoic acid | 195.05 | 196.0 |
| Impurity 9 | Methyl 4-amino-2-methoxybenzoate | 181.07 | 182.0 |

*表 1. 異なる LC システムから ACQUITY Arc システムへの分析法移管に用いたメトクロプラミド塩酸塩の USP 特定類縁物質リスト*

### 分析条件

#### 分析法移管に使用したLCシステム

- Agilent 1100 シリーズ LC システム（クォータナリポンプ、ダイオードアレイ検出器）
- Agilent 1260 Infinity LC システム（クォータナリポンプ、低拡散熱交換器 3 µL、ダイオードアレイ検出器）
- Alliance HPLC システム（2998 フォトダイオードアレイ検出器）
- ACQUITY Arc システム（2998 フォトダイオードアレイ検出器、ACQUITY QDa 検出器、パッシブプレヒーター、パス 1）

メトクロプラミド塩酸塩とその類縁物質のHPLC法を、ウォーターズ ACQUITY UPLC カラムカリキュレーターを用いて、充填剤粒子径 3.5 µm、2.5 µm のカラム、更に UPLC カラムへ移管しました。流速、注入量、グラジエント時間は各カラムサイズに対応して理論計算されるため、分離性能を維持した移管が可能です。

### HPLC法（5µm）

カラム：　XSelect® CSH™ $C_{18}$ 4.6×150 mm、5 µm

流速：　2.9 mL/分

注入量：　10.0 µL

送液条件：グラジエント

| ステップ | 時間 (分) | 移動相 A (%) | 移動相 B (%) |
|---|---|---|---|
| 1 | 初期値 | 95.0 | 5.0 |
| 2 | 15.00 | 40.0 | 60.0 |
| 3 | 16.50 | 40.0 | 60.0 |
| 4 | 16.80 | 95.0 | 5.0 |
| 5 | 21.00 | 95.0 | 5.0 |

## 移管条件（3.5 µm）

カラム： XSelect CSH $C_{18}$ 3.0×100 mm、3.5 µm

流速： 1.2 mL/分

注入量： 2.8 µL

送液条件： グラジエント

| ステップ | 時間（分） | 移動相A（%） | 移動相B（%） |
|---|---|---|---|
| 1 | 初期値 | 95.0 | 5.0 |
| 2 | 10.00 | 40.0 | 60.0 |
| 3 | 11.00 | 40.0 | 60.0 |
| 4 | 11.20 | 95.0 | 5.0 |
| 5 | 14.00 | 95.0 | 5.0 |

## 移管条件（2.5 µm）

カラム： XSelect CSH $C_{18}$ 3.0×75 mm、2.5 µm

流速： 1.2 mL/分

注入量： 2.1 µL

送液条件： グラジエント

| ステップ | 時間（分） | 移動相A（%） | 移動相B（%） |
|---|---|---|---|
| 1 | 初期値 | 95.0 | 5.0 |
| 2 | 7.50 | 40.0 | 60.0 |
| 3 | 8.25 | 40.0 | 60.0 |
| 4 | 8.40 | 95.0 | 5.0 |
| 5 | 10.50 | 95.0 | 5.0 |

## 共通のLC条件

移動相A： 0.1％ギ酸水溶液

移動相B： 0.1％ギ酸含有メタノール

パージ溶媒・ニードル洗浄溶媒：50/50　水/メタノール

シール洗浄溶媒： 90/10　水/アセトニトリル

UV検出器： 波長範囲：210-400 nm、抽出波長：270 nm、サンプリングレート：20ポイント/秒

## MS条件

MS検出器： ACQUITY QDa検出器（Alliance®、ACQUITY Arc、ACQUITY UPLC H-Class）

イオン化モード： ESI＋、ESI－

フルスキャン範囲： 100 - 440 *m/z*

サンプリングレート：10ポイント/秒

キャピラリー電圧： ポジティブ：0.8 kV、ネガティブ：0.8 kV

コーン電圧： 15 V

プローブ温度： 600℃

データ： セントロイド

システム制御・データ取り込み・解析：
Empower 3 FR2 CDS ソフトウェア

## 結果と考察

### 異なるLCシステム間の分析法移管

システム間でグラジエント条件を効率的に移管するために、各LCシステムのデュエルボリュームを明確にし、最適な分析条件のために補整しました。ACQUITY Arcシステムは Multi-flow path テクノロジー（図1）が搭載され、ユーザーにより異なるLCシステムのデュエルボリュームと混合性能を再現する事が可能です。パス1またはパス2を使用することで、マニュアル操作やグラジエントテーブルの変更をすることなく、確立されたLC条件を容易に再現することができます。

今回の検討では、メトクロプラミド塩酸塩とその類縁物質のHPLC法を Agilent 1100、Agilent 1260、Alliance HPLC システム、ACQUITY Arc システム（パス1）を使用して行いました。1.0 % 類縁物質を含むメトクロプラミド塩酸塩（API）サンプルの、4システムによる分析結果を図2. に示しています。ACQUITY Arc システムにて得られた分離は、Agilent や Alliance の結果と同等です。

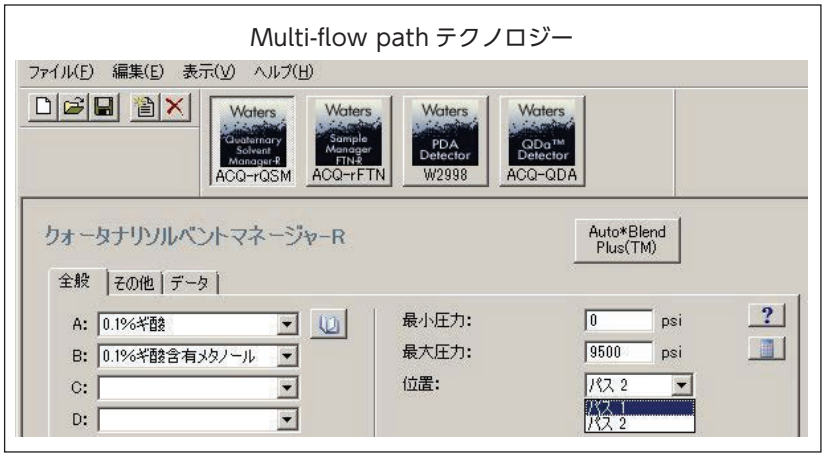


*図1. ACQUITY Arc システムの装置メソッド編集画面。Multi-flow path テクノロジーにより、ユーザーにより HPLC 条件と UHPLC 条件を選択することが可能です。*

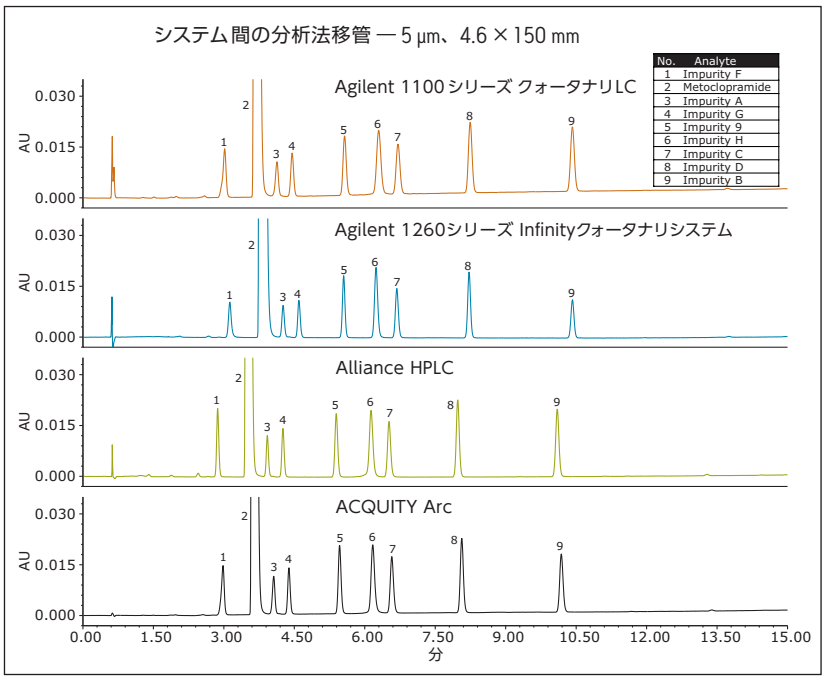


*図2. Agilent 1100 シリーズ LC システム、Agilent 1260 Infinity クォータナリ LC システム、Alliance HPLC システムから ACQUITY Arc システムへの移管結果（1.0% 類縁物質を含むメトクロプラミド塩酸塩（API）の HPLC 法）*

## ピーク同定の確認

質量情報を用いてメトクロプラミドと類縁物質の同定をより確実にするために、ACQUITY Arc システムに ACQUITY QDa 検出器を接続してマススペクトルのデータを取得しました。（図 3）

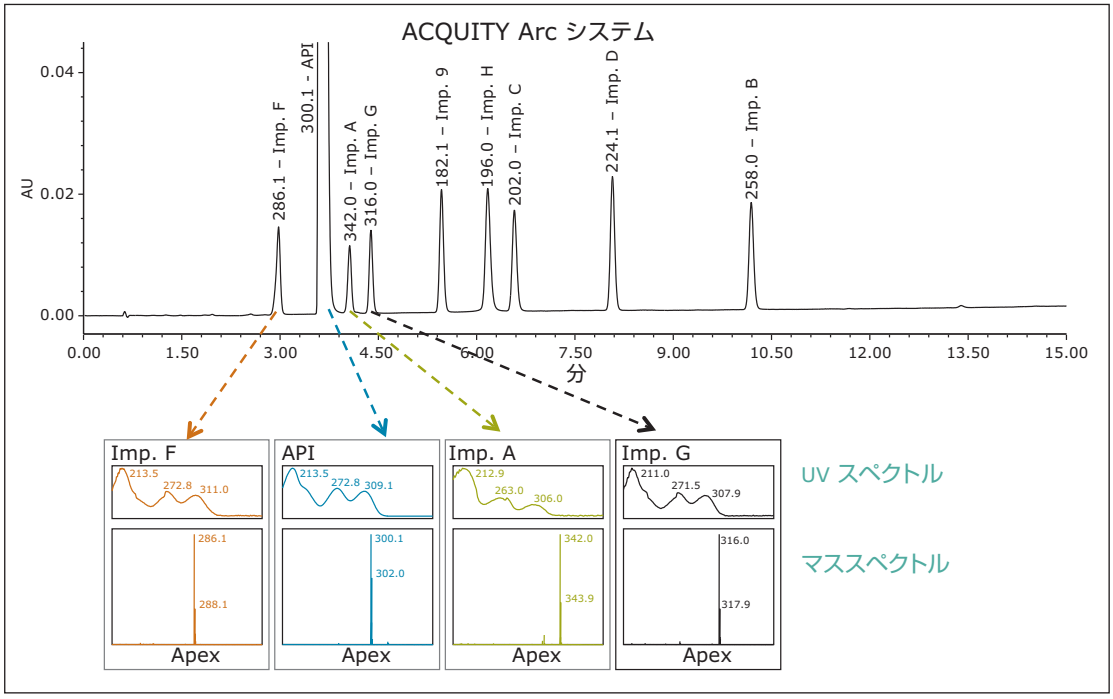


*図 3. ACQUITY QDa 検出器により取得したマススペクトルのデータを用いて、ピーク同定を確認しました。Empower 3 ソフトウェアの質量分析ウィンドウには、UV スペクトルとマススペクトルが表示されます。このデータにより、サンプル中の各化合物を迅速に同定できるようになります。*

ACQUITY Arc システムで行った HPLC 分析条件の性能を確認するために、USP モノグラフのメトクロプラミド塩酸塩の項 2 と USP General Chapter ‹621›Chromatography [3] で定められた要件に従って、5 回連続注入によるシステム適合性試験を行いました。この結果を、Agilent 1100、Agilent 1260、Alliance HPLC システムでの結果と比較しました。

近年改訂されたUSPモノグラフのメトクロプラミド塩酸塩の項[2]には、不純物の有機化合物(A, B, D)の分析条件が記載されています。モノグラフによると、メトクロプラミド塩酸塩(API)とImp. AのUSP分離度は、3.0以上であることとされています。今回の分析条件で行った結果、4システムともにUSPの規格を満たしました。さらに、ACQUITY Arcシステムでは、全てのピークにおいてUSP分離度が3.1以上となりました。USPテーリング係数は全てのシステムにおいて1.5未満となりました(表2)。ACQUITY Arcシステムによる保持時間とピーク面積の繰り返し注入再現性結果は、General Chapter ‹621› Chromatographyで定められた%RSD‹2.0よりも十分低く、他のシステムと同等となりました(表3)。

| 化合物 | USP分離度 | | | | | USPテーリング係数 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Agilent 1100 | Agilent 1260 | Alliance | ACQUITY Arc | USPの基準* | Agilent 1100 | Agilent 1260 | Alliance | ACQUITY Arc | USPの基準 |
| Imp. F | n/a | n/a | n/a | n/a | n/a | 0.8 | 1.2 | 1.1 | 0.9 | 1.5 |
| API | 6.1 | 7.0 | 7.8 | 6.5 | 3.0 | 1.0 | 1.2 | 1.2 | 1.1 | |
| Imp. A | 3.3 | 3.7 | 4.0 | 3.6 | | 0.9 | 1.1 | 1.1 | 1.0 | |
| Imp. G | 2.8 | 3.4 | 3.7 | 3.3 | n/a | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | |
| Imp. 9 | 9.1 | 9.4 | 11.1 | 10.3 | | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | |
| Imp. H | 4.8 | 6.0 | 5.9 | 5.6 | | 1.1 | 1.1 | 1.0 | 1.1 | |
| Imp. C | 2.5 | 3.6 | 2.9 | 3.1 | | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | |
| Imp. D | 10.1 | 13.2 | 11.8 | 11.8 | | 1.1 | 1.0 | 1.1 | 1.1 | |
| Imp. B | 14.3 | 18.4 | 16.8 | 16.5 | | 1.1 | 1.0 | 1.1 | 1.1 | |

*表2. システム適合性試験結果。Agilent 1100、Agilent 1260、Allianceシステムから ACQUITY Arcシステムへの分析法移管において、USP分離度とUSPテーリング係数の値は同等となりました。*
*＊USPモノグラフでは、メトクロプラミド塩酸塩(API)のシステム適合性試験について、APIとImp. Aの分離度が3.0以上であることを要求しています。*

| 化合物 | 保持時間の%RSD | | | | | ピーク面積の%RSD | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Agilent 1100 | Agilent 1260 | Alliance | ACQUITY Arc | USPの基準 | Agilent 1100 | Agilent 1260 | Alliance | ACQUITY Arc | USPの基準 |
| Imp. F | 0.02 | 0.05 | 0.24 | 0.09 | 2.0 | 0.26 | 0.26 | 0.17 | 0.04 | 2.0 |
| API | 0.01 | 0.04 | 0.24 | 0.05 | | 0.28 | 0.11 | 0.17 | 0.10 | |
| Imp. A | 0.02 | 0.03 | 0.25 | 0.04 | | 0.32 | 0.11 | 0.19 | 0.02 | |
| Imp. G | 0.02 | 0.03 | 0.22 | 0.03 | | 0.35 | 0.12 | 0.18 | 0.13 | |
| Imp. 9 | 0.01 | 0.00 | 0.14 | 0.03 | | 0.45 | 0.08 | 0.16 | 0.18 | |
| Imp. H | 0.01 | 0.02 | 0.13 | 0.03 | | 0.31 | 0.21 | 0.29 | 0.20 | |
| Imp. C | 0.01 | 0.01 | 0.11 | 0.02 | | 0.34 | 0.18 | 0.17 | 0.36 | |
| Imp. D | 0.01 | 0.01 | 0.10 | 0.04 | | 0.31 | 0.10 | 0.15 | 0.16 | |
| Imp. B | 0.01 | 0.02 | 0.09 | 0.03 | | 0.66 | 0.14 | 0.22 | 0.22 | |

*表3. システム適合性試験結果。Agilent 1100、Agilent 1260、Allianceシステムから ACQUITY Arcシステムへの分析法移管において、保持時間とピーク面積の再現性は同等となりました。*

## 生産性向上のための分析法移管

充填剤粒子径のより小さいカラムを使用した分析法移管は、分析時間の短縮と高い線速度により、スループットと生産性の向上が可能です。充填剤粒子径の小さいカラムで適切に分析法を移管するためには、現行の分離性能を保つ必要があります。そのため、カラム長（L）と充填剤粒子径（dp）の比を現行法と一致させたカラムを使用します。流量、注入量、グラジエント時間はウォーターズ ACQUITY UPLC カラムカリキュレーターを使用することで、同等の分離を保ちながら移管することができます。

今回は、メトクロプラミド塩酸塩とその類縁物質の HPLC 法を、ACQUITY Arc システムで 3.5 µm と 2.5 µm のカラムへ移管しました。充填剤粒子径がより小さいカラムへ移管する事で、分離を維持したまま分析時間の短縮と溶媒使用量の削減を達成することができます（図 4）。粒子径 3.5 µm のカラムでは分析時間を 33 % 短縮、溶媒使用量は 72 % 削減しました。粒子径 2.5 µm のカラムでは分析時間を 50 % 短縮、溶媒使用量は 79 % 削減しました。

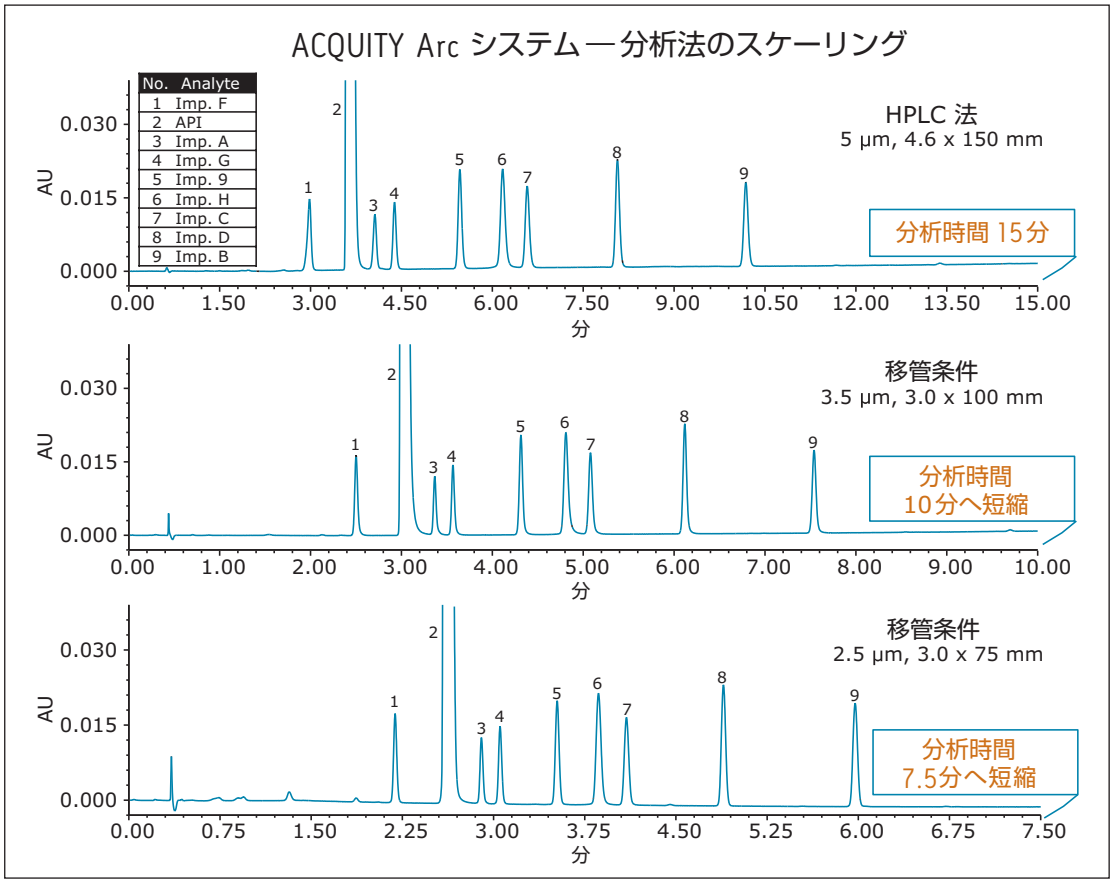


*図 4. ACQUITY Arc システムに分離効率（L/dp）の等しい 3 種類のカラムを接続した際の、メトクロプラミド塩酸塩とその類縁物質のクロマトグラム*

ACQUITY Arc システムを用いて、HPLC 法と移管条件にてシステム適合性試験用の標準品を 5 回繰り返し注入した際の結果を図 4 に掲載しています。移管条件での保持時間とピーク面積の再現性は 2.0%未満となり、USP の基準と比較して有意に低くなりました。USP 分離度、USP テーリング係数も同等となりました。

ACQUITY Arc システムは、効率と生産性を向上する分析法移管を容易に実行可能であり、幅広い LC システムの分析法もサポートできる柔軟性があります。

| 化合物 | 保持時間の%RSD | | | ピーク面積の%RSD | | | USP分離度 | | | USPテーリング係数 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 5 µm | 3.5 µm | 2.5 µm | 5 µm | 3.5 µm | 2.5 µm | 5 µm | 3.5 µm | 2.5 µm | 5 µm | 3.5 µm | 2.5 µm |
| Imp. F | 0.09 | 0.10 | 0.05 | 0.04 | 0.20 | 0.12 | n/a | n/a | n/a | 0.9 | 1.2 | 1.1 |
| API | 0.05 | 0.08 | 0.05 | 0.10 | 0.05 | 0.20 | 6.5 | 9.4 | 9.4 | 1.1 | 1.3 | 1.2 |
| Imp. A | 0.04 | 0.06 | 0.05 | 0.02 | 0.10 | 0.12 | 3.6 | 5.3 | 5.0 | 1.0 | 1.3 | 1.2 |
| Imp. G | 0.03 | 0.07 | 0.05 | 0.13 | 0.10 | 0.08 | 3.3 | 3.6 | 3.2 | 1.1 | 1.2 | 1.1 |
| Imp. 9 | 0.03 | 0.06 | 0.04 | 0.18 | 0.12 | 0.16 | 10.3 | 11.9 | 8.6 | 1.1 | 1.1 | 1.1 |
| Imp. H | 0.03 | 0.10 | 0.04 | 0.20 | 0.07 | 0.21 | 5.6 | 6.4 | 5.1 | 1.1 | 1.3 | 1.1 |
| Imp. C | 0.02 | 0.07 | 0.04 | 0.36 | 0.07 | 0.15 | 3.1 | 3.3 | 3.2 | 1.1 | 1.2 | 1.1 |
| Imp. D | 0.04 | 0.05 | 0.03 | 0.16 | 0.12 | 0.11 | 11.8 | 13.7 | 11.7 | 1.1 | 1.1 | 1.1 |
| Imp. B | 0.03 | 0.04 | 0.04 | 0.22 | 0.05 | 0.13 | 16.5 | 18.7 | 15.7 | 1.1 | 1.1 | 1.0 |

*図 4. ACQUITY Arc システムに分離効率（L/dp）の等しい 3 種類のカラムを接続した際の、メトクロプラミド塩酸塩とその類縁物質のクロマトグラム*

## 結論

Agilent 1100、Agilent 1260、Alliance HPLC システムで行ったメトクロプラミド塩酸塩とその類縁物質の分析を、ACQUITY Arc システムは問題なく再現しました。ACQUITY QDa 検出器を ACQUITY Arc システムと接続する事により、マススペクトルを使用して迅速なピーク同定が可能です。カラムの充填剤粒子径を 5.0 µm から 3.5、2.5 と小さくする事で、分析時間の短縮と溶媒使用量の削減が可能となりました。

ACQUITY Arc システムの特徴である Multi-flow path テクノロジーにより、分析法の整合性を損なわずに異なるシステムから分析法を容易に再現することが可能です。ACQUITY Arc システムは、LC システムとしての強力なパフォーマンスを発揮し、新しい技術である ACQUITY QDa 検出器や Empower クロマトグラフィーデータソフトウェア（CDS）と統合しているため、ラボの有益な資産となります。ACQUITY Arc システムは、いずれの LC システムでの分析法も十分に再現し柔軟に最適化をすることが可能です。

## 参考文献


1. Jones MD, Alden P, Fountain KJ, Aubin A. Implementation of Methods Translation between Liquid Chromatography Instrumentation. Waters Corp. 2010: 720003721en.
2. USP Monograph, Metoclopramide Hydrochloride, USP38-NF33, The United States Pharmacopeia Convention, official August 2015.
3. USP Monograph, Metoclopramide Tablets, USP38-NF33, The United Pharmacopeia Convention, official August 2015.
4. ACQUITY Arc System, http://www.waters.com/waters/ja_JP/ACQUITY-Arc-System/nav.htm?locale=ja_JP&cid=134844390


Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®


**日本ウォーターズ株式会社** www.waters.com

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 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734

ショールーム 東京 大阪

サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡



Waters、ACQUITY UPLC、ACQUITY、Alliance、QDa、Empower、XSelect および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
CSH および Arc Multi-flow は Waters Corporation の商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2016 Waters Corporation. Produced in Japan. 2016年5月 720005558JA PDF