

Agilent 1260 Infinity II Prime LC-System mit ISET

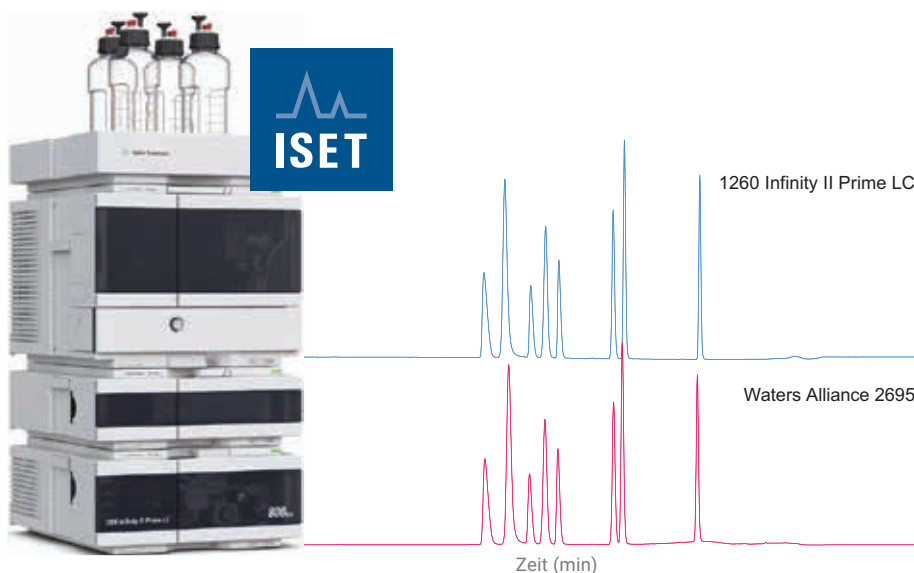
Emulation eines Waters Alliance LC-Systems
für die Analyse von Metoclopramid und seinen
Verunreinigungen

Autor

Melanie Metzloff
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

Der Gerät-zu-Gerät-Methodentransfer ist für viele verschiedene Branchen von äußerster Wichtigkeit, insbesondere für die regulierte pharmazeutische Industrie. Die Agilent Intelligent System Emulation Technology (ISET) unterstützt den nahtlosen Transfer analytischer Methoden von herkömmlichen LC-Systemen zu einem Agilent UHPLC-System. Diese Application Note demonstriert den unkomplizierten Transfer einer analytischen Methode vom Waters Alliance 2695 LC-System zum 1260 Infinity II Prime LC-System unter Verwendung von ISET. Metoclopramid und seine Verunreinigungen wurden auf beiden Systemen analysiert. Die Retentionszeiten und die Auflösung der verschiedenen Experimente wurden beurteilt und miteinander verglichen.



Einführung

Der Transfer von analytischen Methoden von einem herkömmlichen HPLC-System zu einem UHPLC-System wie dem 1260 Infinity II Prime LC-System ist für viele Labore von äußerster Wichtigkeit, insbesondere für solche in einem streng regulierten Umfeld. Der Wechsel etablierter analytischer Methoden kann eine erneute zeitaufwändige und teure Validierung erfordern. Das 1260 Infinity II Prime LC-System unterstützt die Emulation von vorhandenen LC-Systemen wie des Waters Alliance 2695 LC-Systems anhand von ISET¹.

Bei den meisten LC-Methoden werden lineare Lösemittelstärke-Gradienten verwendet. Das Alliance 2695 LC-System lässt verschiedene Gradientenprofile zu, wie z. B. konkave und konvexe Gradientenkurven. Das 1260 Infinity II Prime LC-System mit ISET kann diese Gradientenkurven emulieren.

Diese Application Note beschreibt die Analyse von Metoclopramid, ein Antiemetikum, und sieben verschiedene Verunreinigungen. Zur Trennung der Arzneimittelmischung wurde ein konkaver Gradient unter Verwendung des Waters Alliance 2695 LC-Systems angewendet. Die analytische Methode wurde dann auf ein 1260 Infinity II Prime LC-System mit ISET übertragen. Die Retentionszeiten und die Auflösung von beiden Systemen wurden beurteilt und miteinander verglichen.

Experimentelles

Geräte

Für die Analyse von Metoclopramid und seinen Verunreinigungen wurden die folgenden Geräte benutzt:

Waters Alliance 2695 HPLC-System mit dualen Absorptionsdetektor VWD 2487

Agilent 1260 Infinity II Prime LC-System:

- Agilent 1260 Infinity II flexible Pumpe (G7104C)
- Agilent 1260 Infinity II Flüssigprobengeber (G7129C), ausgestattet mit integriertem Probenkühler (Option-Nr. 100) und integriertem Säulenthmostat-Modul (6-µL-Heizung; Option-Nr. 066)
- Agilent 1260 Infinity II Diodenarray-Detektor WR (G7115A) mit 10-mm-Standarddurchflussszelle (G1315-60022)

Software

Agilent OpenLab CDS 2.2 (M8413A), zur Kontrolle des Waters Alliance 2695 LC-Systems durch OpenLab CDS 2.2, Waters DP 2017R2 war installiert.

Probe

Für die Experimente wurden die folgenden Verbindungen verwendet:

- Metoclopramidhydrochlorid
- **Verunreinigung B:** Methyl-4-(Acetylamino)-5-chloro-2-methoxybenzoat
- **Verunreinigung C:** 4-Amino-5-chloro-2-methoxybenzoesäure
- **Verunreinigung D:** Methyl-4-(Acetylamino)-2-methoxybenzoat
- **Verunreinigung F:** 4-Amino-5-chloro-N-[2-(diethylamino) ethyl]-2-hydroxybenzamid
- **Verunreinigung G:** N'-(4-Amino-5-chloro-2-methoxybenzoyl)-N, N-diethylethan-1,2-diamin-N-oxid
- **Verunreinigung H:** 4-(Acetylamino)-2-hydroxybenzoesäure
- **Verunreinigung 9:** Methyl-4-amino-2-methoxybenzoat

Jede Verbindung wurde in 100%igem Methanol auf eine Konzentration von 2 mg/ml und weiter mit Wasser auf eine Endkonzentration von 20 ng/µl verdünnt.

Chemikalien

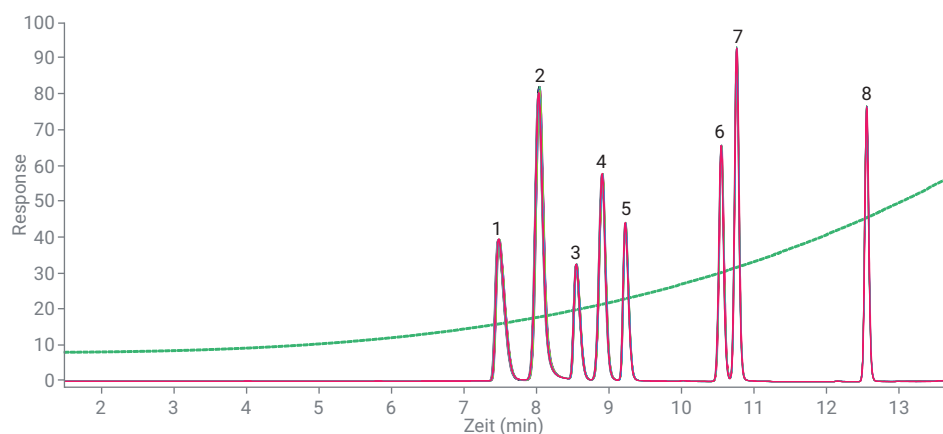
Alle Lösemittel hatten LC-Qualität. Frisches Reinstwasser wurde einem Milli-Q Integral System entnommen, das mit einer Entnahmeeinheit mit 0,22-µm-Membran (Millipak) ausgestattet war. Acetonitril wurde von Merck (Darmstadt, Deutschland) und Ameisensäure (FA) von VWR (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Metoclopramid wurde von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) und die Metoclopramidverunreinigungen von LGC Standards (Teddington, Vereinigtes Königreich) bezogen.

Ergebnisse und Diskussion

Metoclopramid und seine Verunreinigungen wurden mit einer herkömmlichen analytischen Methode auf einem Waters Alliance 2695 LC-System mit einem konkaven Gradienten und einer Säule (4,6 x 150 mm, gepackt mit 5- μ m-Partikeln) analysiert. Abbildung 1 zeigt eine Überlagerung der Chromatogramme von 10 konsekutiven Messungen und eine Tabelle mit den jeweiligen Retentionszeiten und Auflösungen.

Tabelle 1: Chromatographische Parameter für die Analyse von Metoclopramid und seinen Verunreinigungen.

Parameter	Wert
Säule	Agilent ZORBAX StableBond-Säule C18; 4,6 x 150 mm, 5 μ m (Best.-Nr. 883975-902)
Lösemittel	A) 0,1 % FA in Wasser B) 0,1 % FA in Acetonitril
Gradient	0 Minuten – 8 % B 14 Minuten – 66 % B; Kurve 8 14,1 Minuten – 8 % B; Kurve 6
Stoppzeit	18 Minuten
Flussrate	2 ml/min
Injektion	Injektionsvolumen: 10 μ l, Nadelspülung von 3 Sekunden (60 % Acetonitril in Wasser)
Probentemperatur	8 °C
Säulentemperatur	25 °C
DAD	270/4 nm, Ref. = aus, 5 Hz



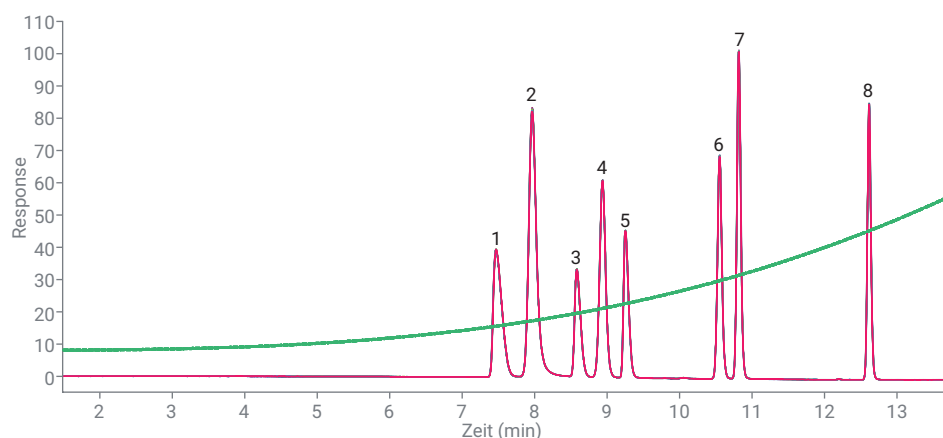
Nein.	Verbindung	RT (min)	RSD der RT (%)	Auflösung
1	Verunreinigung F	7,50	0,12	–
2	Verunreinigung H	8,05	0,12	2,58
3	Metoclopramid	8,57	0,07	2,84
4	Verunreinigung 9	8,93	0,07	2,16
5	Verunreinigung G	9,24	0,05	2,08
6	Verunreinigung C	10,57	0,04	9,93
7	Verunreinigung D	10,78	0,03	1,75
8	Verunreinigung B	12,57	0,01	16,46

Abbildung 1: Analyse von Metoclopramid und seinen Verunreinigungen Erstellt auf einem Waters Alliance 2695 LC-System, Überlagerung von 10 konsekutiven Messungen. Die grüne Kurve im Chromatogramm zeigt den Anteil an Lösemittel B.

Die analytische Methode für die Trennung von Metoclopramid und seinen Verunreinigungen wurde dann auf das 1260 Infinity II Prime LC-System mit aktivierter ISET-Funktion übertragen. Abbildung 2 zeigt die resultierende Überlagerung der Chromatogramme zusammen mit der jeweiligen Retentionszeit und Auflösung.

Die Verwendung der ISET-Funktion auf dem 1260 Infinity II Prime LC-System ermöglicht die Bildung von konkaven und konvexen Gradientenprofilen. In Agilent OpenLab CDS und der Agilent ChemStation Analytical Workstation Software ist die Nummerierung der verwendeten 11 verschiedenen Gradientenprofile mit der des Waters Alliance Systems identisch. Für diese Experimente wurden Kurve 8 (konkav) und Kurve 6 (linear) verwendet.

Bei Übertragung der analytischen Methode auf ein 1260 Infinity II Prime LC-System mit ISET wurden Chromatogramme erzielt, die den auf dem Alliance 2695 LC-System erzeugten Chromatogrammen sehr ähneln. Abbildung 3 zeigt einen Vergleich der Chromatogramme, die mit dem 1260 Infinity II Prime LC-System und dem Alliance 2695-System erstellt wurden.



Nein.	Verbindung	RT (min)	RSD der RT (%)	Auflösung
1	Verunreinigung F	7,48	0,02	–
2	Verunreinigung H	7,98	0,05	2,38
3	Metoclopramid	8,59	0,01	3,58
4	Verunreinigung 9	8,95	0,01	2,29
5	Verunreinigung G	9,26	0,03	2,19
6	Verunreinigung C	10,56	0,03	10,51
7	Verunreinigung D	10,83	0,01	2,46
8	Verunreinigung B	12,63	0,01	18,93

Abbildung 2: Analyse von Metoclopramid und seinen Verunreinigungen. Erstellt auf einem 1260 Infinity II Prime LC-System, Überlagerung von 10 konsekutiven Messungen. Die grüne Kurve im Chromatogramm zeigt den Anteil an Lösemittel B.

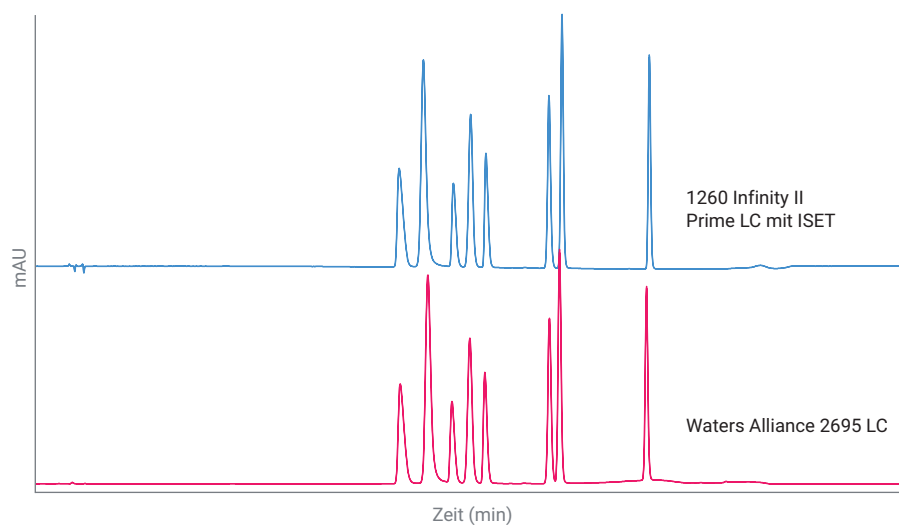


Abbildung 3: Überlagerung eines Chromatogramms, das mit dem 1260 Infinity II Prime LC-System mit aktivierter ISET-Funktion erstellt wurde, und eines Chromatogramms, das mit dem Waters Alliance 2695 LC-System erstellt wurde, jeweils zur Analyse von Metoclopramid und seinen Verunreinigungen.

Die Retentionszeiten auf beiden Systemen stimmen mit einer maximalen Abweichung von ca. 0,9 % ausgezeichnet überein und liegen eindeutig unter der festgelegten Abweichung der Retentionszeit von $< \pm 5 \%$. Darüber hinaus wurde die Abweichung der Auflösung bestimmt. Die Auflösung der meisten Peaks war bei den Messungen besser, die mit dem 1260 Infinity II Prime LC-System durchgeführt wurden, mit Ausnahme der Verunreinigung H. Tabelle 2 zeigt einen detaillierten Überblick über die Abweichung bei der Retentionszeit und der Auflösung.

Tabelle 2: Vergleich der Retentionszeiten und der Auflösung von einem Waters Alliance 2695 LC-System mit einem Agilent 1260 Infinity II Prime LC-System.

Verbindung	Abweichung RT (min)	Abweichung RT (%)	Abweichung Auflösung	Abweichung Auflösung (%)
Verunreinigung F	-0,02	-0,27	–	–
Verunreinigung H	-0,07	-0,90	-0,20	-8,28
Metoclopramid	0,02	0,23	0,73	20,48
Verunreinigung 9	0,02	0,22	0,13	5,58
Verunreinigung G	0,02	0,23	0,12	5,25
Verunreinigung C	-0,01	-0,09	0,58	5,51
Verunreinigung D	0,05	0,46	0,71	28,76
Verunreinigung B	0,06	0,48	2,47	13,06

Abschließende Bemerkungen

ISET ermöglicht den nahtlosen Transfer von vorhandenen Methoden von herkömmlichen HPLC-Systemen zum 1260 Infinity II Prime LC-System. Durch Aktivierung der ISET-Funktion ist die Emulation eines Waters Alliance LC-Systems möglich – sogar bei Verwendung von konkaven und konvexen Gradienten.

In dieser Application Note wurde eine Methode für die Analyse von Metoclopramid und seinen Verunreinigungen von einem Waters Alliance 2695 LC-System zu einem 1260 Infinity II Prime LC-System übertragen. Es wurde eine hervorragende Korrelation der Retentionszeit und der Auflösung erzielt. Zudem wurde die Auflösung für die meisten Peaks erhöht. Diese Application Note zeigt eindeutig die benutzerfreundliche Anwendung der ISET-Funktion. Es waren keine Modifikationen oder Veränderungen der analytischen Methode für die Analyse von Metoclopramid und seinen Verunreinigungen auf dem 1260 Infinity II Prime LC-System erforderlich.

Literatur

1. Gratzfeld-Huesgen, A. Agilent 1290 Infinity Binary LC System with ISET – Emulation of the Waters Alliance 2695 LC system analyzing β – blockers, *Agilent Technologies Application Note*, Publikationsnummer 5991-1603EN, **2014**.
2. Agilent InfinityLab LC with ISET, *Agilent Technologies User Manual*, Bestellnummer G7120-90310, **2017**.

www.agilent.com/chem

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
Gedruckt in den USA, 1. Juni 2018
5991-9394DEE