

Sistema LC Agilent 1260 Infinity II Prime con tecnologia ISET

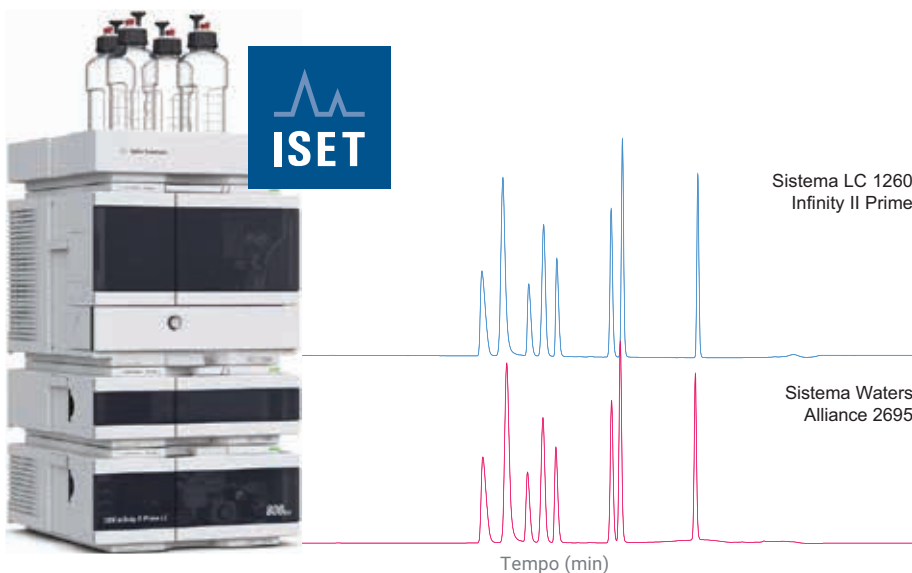
Emulazione di un sistema LC Waters Alliance per
l'analisi della metoclopramide e delle relative impurezze

Autore

Melanie Metzloff
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

Il trasferimento dei metodi da strumento a strumento rappresenta un aspetto cruciale in molti settori e in particolare nel settore farmaceutico, che è regolamentato. La tecnologia ISET (Intelligent System Emulation Technology) di Agilent semplifica il trasferimento dei metodi analitici dai sistemi LC di tipo convenzionale ai sistemi UHPLC Agilent. Questa nota applicativa illustra il semplice trasferimento di un metodo analitico dal sistema LC Waters Alliance 2695 a un sistema LC 1260 Infinity II Prime mediante la tecnologia ISET. La metoclopramide e le relative impurezze sono state analizzate con entrambi i sistemi. I valori del tempo di ritenzione e della risoluzione dei diversi esperimenti sono stati valutati e confrontati.



Introduzione

Il trasferimento di un metodo analitico da un sistema HPLC convenzionale a un sistema UHPLC, come il sistema LC 1260 Infinity II Prime, è per molti laboratori un aspetto di importanza notevole e spesso cruciale, specialmente negli ambienti altamente regolamentati. La modifica di metodi analitici consolidati può richiedere la rivalidazione, che è dispendiosa in termini di tempo e di costo. Il sistema LC 1260 Infinity II Prime, grazie alla tecnologia ISET, facilita l'emulazione di sistemi LC preesistenti, come il sistema LC Waters Alliance 2695¹.

Per la maggior parte dei metodi LC, si utilizzano gradienti lineari a crescente forza del solvente. Il sistema LC Alliance 2695 consente tuttavia l'impiego di profili di gradiente differenti, come curve di gradiente concave e convesse. Il sistema LC 1260 Infinity II Prime con tecnologia ISET è in grado di emulare queste curve di gradiente.

Questa nota applicativa descrive l'analisi della metoclopramide, un farmaco antiemetico, e di sette differenti impurezze. Per la separazione della miscela di farmaci si è applicato un gradiente concavo utilizzando il sistema LC Waters Alliance 2695. Il metodo analitico è stato quindi trasferito a un sistema LC 1260 Infinity II Prime con tecnologia ISET. I valori del tempo di ritenzione e della risoluzione ottenuti da entrambi i sistemi sono stati valutati e confrontati.

Condizioni sperimentali

Strumenti

Per l'analisi della metoclopramide e delle relative impurezze sono stati utilizzati gli strumenti elencati di seguito.

Sistema HPLC Waters Alliance 2695 con rivelatore a doppia assorbanza VWD 2487

Sistema LC Agilent 1260 Infinity II Prime:

- pompa Flexible Agilent 1260 Infinity II (G7104C)
- campionatore Agilent 1260 Infinity II (G7129C), dotato di refrigeratore campioni integrato (opzione 100) e comparto colonne integrato (riscaldatore 6 µL; opzione 066)
- rivelatore a serie di diodi Agilent 1260 Infinity II WR (G7115A), con cella di flusso standard da 10 mm (G1315-60022)

Software

Agilent OpenLAB CDS 2.2 (M8413A); per il controllo del sistema LC Waters Alliance 2695 mediante OpenLAB CDS 2.2 è stato installato il pacchetto Waters DP 2017R2.

Campione

Per gli esperimenti sono stati utilizzati i composti elencati di seguito.

- Metoclopramide cloridrato
- **Impurezza B:** 4-(acetilammino)-5-cloro-2-metossibenzoato di metile
- **Impurezza C:** Acido 4-ammino-5-cloro-2-metossibenzoico
- **Impurezza D:** 4-(acetilammino)-2-metossibenzoato di metile
- **Impurezza F:** 4-ammino-5-cloro-N-[2-(dietilammino) etil]-2-idrossibenzammide
- **Impurezza G:** N'-(4-ammino-5-cloro-2-metossibenzoil)-N, N-dietiletano-1,2-diammina N-ossido
- **Impurezza H:** Acido 4-(acetilammino)-2-idrossibenzoico
- **Impurezza 9:** 4-ammino-2-metossibenzoato di metile

Ogni composto è stato disciolto in metanolo 100% fino alla concentrazione di 2 mg/mL e ulteriormente diluito in acqua fino alla concentrazione finale di 20 ng/µL.

Prodotti chimici

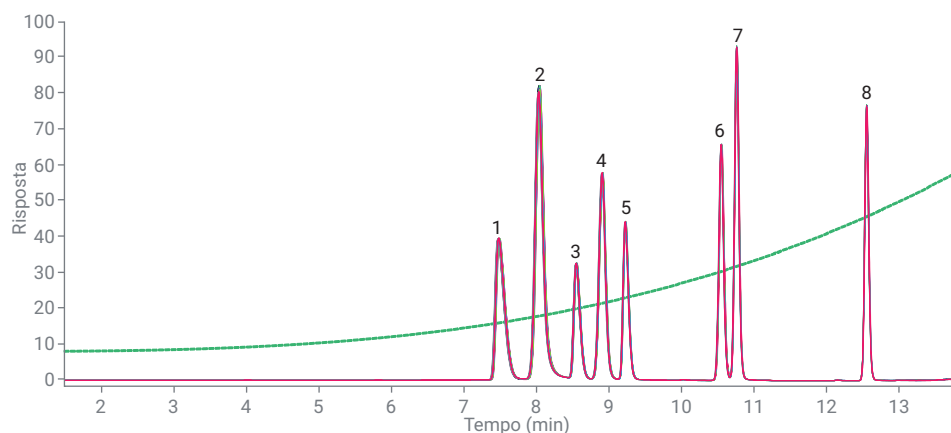
Tutti i solventi utilizzati sono di grado LC. L'acqua fresca ultrapura è stata ottenuta con un sistema Milli-Q Integral dotato di cartuccia con membrana da 0,22 µm al punto d'uso (Millipak). L'acetone nitrile è stato acquistato da Merck (Darmstadt, Germania) e l'acido formico (FA) da VWR (Darmstadt, Germania). La metoclopramide è stata reperita da Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germania) e le impurezze della metoclopramide sono state acquistate da LGC Standards (Teddington, Regno Unito).

Risultati e discussione

La metoclopramide e le relative impurezze sono state analizzate con un metodo analitico convenzionale su un sistema LC Waters Alliance 2695 applicando un gradiente concavo e utilizzando una colonna da $4,6 \times 150$ mm impaccata con particelle da $5 \mu\text{m}$. La Figura 1 mostra la sovrapposizione dei cromatogrammi ottenuti da 10 analisi consecutive e una tabella con i corrispondenti valori del tempo di ritenzione e della risoluzione.

Tabella 1. Parametri cromatografici per l'analisi di metoclopramide e impurezze

Parametro	Valore
Colonna	Agilent ZORBAX StableBond C18; $4,6 \times 150$ mm, $5 \mu\text{m}$ (codice 883975-902)
Solvente	A) FA 0,1% in acqua B) FA 0,1% in acetonitrile
Gradiente	0 minuti – 8%B 14 minuti – 66%B; curva 8 14,1 minuti – 8%B; curva 6
Tempo finale	18 minuti
Flusso	2 mL/min
Iniezione	Volume di iniezione: 10 μL , lavaggio dell'ago 3 secondi (acetonitrile 60% in acqua)
Temperatura del campione	8 °C
Temperatura della colonna	25 °C
DAD	270/4 nm, Ref. off, 5 Hz



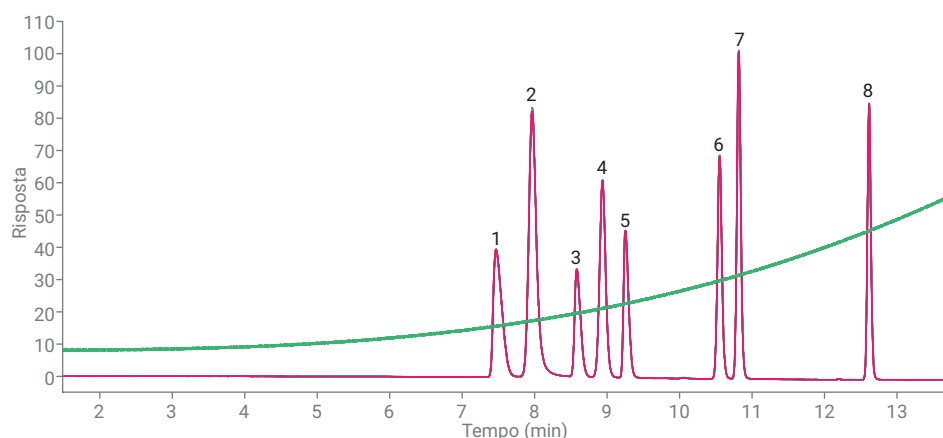
N.	Composto	RT (min)	RSD RT (%)	Risoluzione
1	Impurezza F	7,50	0,12	–
2	Impurezza H	8,05	0,12	2,58
3	Metoclopramide	8,57	0,07	2,84
4	Impurezza 9	8,93	0,07	2,16
5	Impurezza G	9,24	0,05	2,08
6	Impurezza C	10,57	0,04	9,93
7	Impurezza D	10,78	0,03	1,75
8	Impurezza B	12,57	0,01	16,46

Figura 1. Analisi di metoclopramide e impurezze. Acquisizione su sistema LC Waters Alliance 2695, sovrapposizione di 10 analisi consecutive. La curva verde del cromatogramma mostra la frazione B del solvente.

Il metodo analitico per la separazione della metoclopramide e delle relative impurezze è stato successivamente trasferito al sistema LC 1260 Infinity II Prime con tecnologia ISET attivata. La Figura 2 mostra la sovrapposizione risultante dei cromatogrammi insieme ai corrispondenti valori del tempo di ritenzione e della risoluzione.

Utilizzando la tecnologia ISET sul sistema LC 1260 Infinity II Prime è possibile formare profili di gradiente concavi e convessi. In OpenLAB CDS e in ChemStation, la numerazione degli 11 differenti profili di gradiente utilizzati è identica alla numerazione del sistema Waters. Per questi esperimenti sono state utilizzate la curva 8 (concava) e la curva 6 (lineare).

Quando il metodo analitico è stato trasferito a un sistema LC 1260 Infinity II Prime con tecnologia ISET sono stati ottenuti cromatogrammi molto simili a quelli prodotti con il sistema LC Alliance 2695. La Figura 3 mostra il confronto tra i cromatogrammi acquisiti con il sistema LC 1260 Infinity II Prime e con il sistema LC Alliance 2695.



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

Figura 2. Analisi di metoclopramide e relative impurezze. Acquisizione mediante un sistema LC 1260 Infinity II Prime, sovrapposizione di 10 analisi consecutive. La curva verde del cromatogramma mostra la frazione B del solvente.

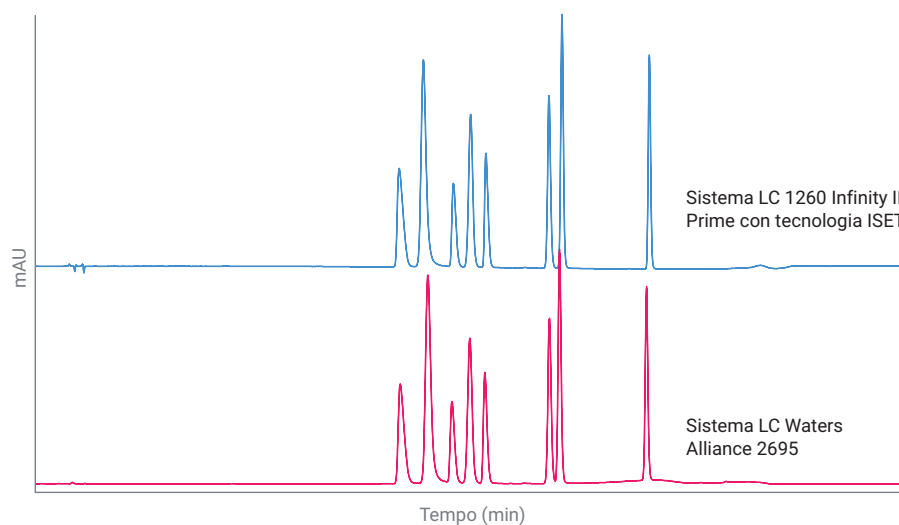


Figura 3. Sovrapposizione di un cromatogramma acquisito con il sistema LC 1260 Infinity II Prime con tecnologia ISET attivata e di un cromatogramma acquisito con il sistema LC Waters Alliance 2695 per l'analisi di metoclopramide e impurezze.

I tempi di ritenzione dei due sistemi, con una deviazione massima di $\approx 0,9\%$, sono in eccellente accordo e la deviazione del tempo di ritenzione è nettamente inferiore al valore specificato ($< \pm 5\%$)². È stata inoltre determinata la deviazione della risoluzione. La risoluzione, per la maggior parte dei picchi, è risultata essere migliore per le analisi in cui si è utilizzato il sistema LC 1260 Infinity II Prime, ad eccezione dell'impurezza H. La Tabella 2 mostra una panoramica dettagliata sulla deviazione del tempo di ritenzione e della risoluzione.

Tabella 2. Confronto tra i valori del tempo di ritenzione e della risoluzione per un sistema LC Waters Alliance 2695 e per un sistema LC Agilent 1260 Infinity II Prime

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

Conclusione

La tecnologia ISET consente di trasferire in modo semplice i metodi preesistenti da sistemi HPLC convenzionali al sistema LC 1260 Infinity II Prime. Attivando la tecnologia ISET, è possibile emulare il sistema LC Waters Alliance, utilizzando anche gradienti concavi e convessi.

In questa nota applicativa, il metodo per l'analisi della metoclopramide e delle relative impurezze è stato trasferito da un sistema LC Waters Alliance 2695 a un sistema LC 1260 Infinity II Prime. Si è ottenuta un'eccellente correlazione dei valori del tempo di ritenzione e della risoluzione. Inoltre, la risoluzione è stata migliorata per la maggior parte dei picchi. Questa nota applicativa mostra chiaramente la facilità d'uso della tecnologia ISET. L'analisi della metoclopramide e delle relative impurezze sul sistema LC 1260 Infinity II Prime non ha richiesto alcuna modifica dello strumento o del metodo analitico.

Bibliografia

1. Gratzfeld-Huesgen, A. Agilent 1290 Infinity Binary LC System with ISET – Emulation of the Waters Alliance 2695 LC system analyzing β – blockers, *Nota applicativa Agilent*, numero di pubblicazione 5991-1603EN, **2014**.
2. Agilent InfinityLab LC with ISET, Manuale utente di *Agilent Technologies*, codice G7120-90310, **2017**.

www.agilent.com/chem

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
Stampato negli Stati Uniti, 1 giugno 2018
5991-9394ITE