

ISET 활성화 Agilent 1260 Infinity II Prime LC

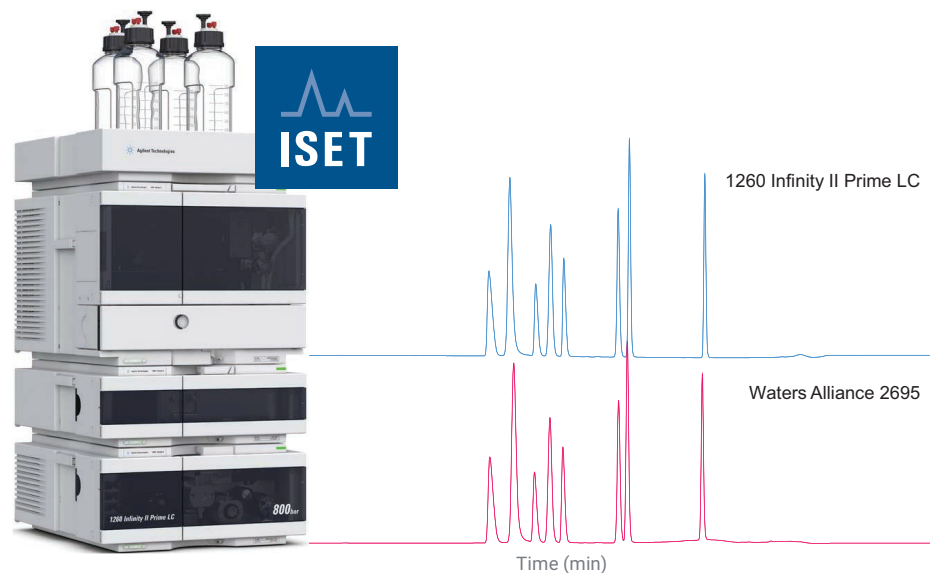
Metoclopramide 및 그 불순물 분석을 위한 Waters Alliance LC 에뮬레이션

저자

Melanie Metzloff
Agilent Technologies, Inc.

개요

기기 간 분석법 이전은 다양한 업계에서 중요한 문제로 떠오르고 있으며, 특히 규제 대상이 되는 제약 업계에서는 더욱 그러합니다. 애질런트의 ISET(Intelligent System Emulation Technology) 기술은 전통적인 LC 시스템에서 애질런트 UHPLC 시스템으로 원활하게 분석법이 이전될 수 있도록 합니다. 이 응용 자료에서는 ISET 기술을 이용해 Waters Alliance 2695 LC에서 1260 Infinity II Prime LC로 분석법을 이전하는 간단한 절차에 대해 서술합니다. 두 시스템 모두에서 Metoclopramide와 그 불순물이 분석되었으며, 다양한 실험의 머무름 시간과 분리능이 비교 및 평가되었습니다.



소개

전통적인 HPLC 시스템에서 1260 Infinity II Prime LC와 같은 UHPLC 시스템으로 분석법을 이전하는 것은 많은 실험실, 특히 엄격한 규제를 준수해야 하는 실험실에서 매우 중요한 문제입니다. 이미 수립된 분석법을 변경하려면 재검증이 필요하며 이는 많은 시간과 비용이 소모되는 일입니다. 1260 Infinity II Prime LC는 ISET을 통해 Waters Alliance 2695 LC와 같은 전통적인 LC 시스템을 에뮬레이션합니다¹.

대부분의 LC 분석법에서 선형적 용매 강도 기울기가 사용되는 반면, Alliance 2695 LC는 A자형 볼록 곡선, U자형 오목 곡선과 같은 여러 기울기 프로파일을 지원합니다. 1260 Infinity II Prime LC에서 ISET 기술을 이용하면 이와 같은 기울기 곡선을 에뮬레이션할 수 있습니다.

이 응용 자료에서는 구토 방지제인 Metoclopramide와 그의 7가지 불순물을 분석하는 방법에 대해 다루고 있습니다. 의약품 혼합물의 분리 시에는 Waters Alliance 2695 LC와 오목형 기울기가 적용되었는데, 그 후 분석법이 ISET 기술을 갖춘 1260 Infinity II Prime LC로 이전되었습니다. 두 시스템의 머무름 시간과 분리능이 비교 및 평가되었습니다.

실험

기기

Metoclopramide 및 그 불순물 분석을 위해 다음과 같은 기기가 사용되었습니다.

Waters Alliance 2695 HPLC 시스템, Dual Absorbance Detector VWD 2487 장착

Agilent 1260 Infinity II Prime LC:

- Agilent 1260 Infinity II Flexible Pump(G7104C)
- Agilent 1260 Infinity II Vialsampler(G7129C), 통합형 샘플 쿨러(option #100) 및 통합형 컬럼 격실(6μL heater; option #066) 장착
- Agilent 1260 Infinity II Diode Array Detector WR(G7115A), 표준형 10mm 플로우 셀(G1315-60022) 장착

소프트웨어

Agilent OpenLab CDS 2.2(M8413A), OpenLab CDS 2.2로 Waters Alliance 2695 LC를 제어하기 위해 Waters DP 2017R2가 설치되었습니다.

시료

실험에 사용된 화합물은 다음과 같습니다.

- Metoclopramide hydrochloride
- **불순물 B:** Methyl 4-(Acetylamino)-5-chloro-2-methoxybenzoate
- **불순물 C:** 4-Amino-5-chloro-2-methoxybenzoic acid
- **불순물 D:** Methyl 4-(Acetylamino)-2-methoxybenzoate
- **불순물 F:** 4-Amino-5-chloro-N-[2-(diethylamino) ethyl]-2-hydroxybenzamide
- **불순물 G:** N'-(4-Amino-5-chloro-2-methoxybenzoyl)-N, N-diethylethane-1,2-diamine N-oxide
- **불순물 H:** 4-(Acetylamino)-2-hydroxybenzoic acid
- **불순물 9:** Methyl 4-amino-2-methoxybenzoate

모든 화합물을 100% 메탄올에 2mg/ml의 농도로 용해시킨 후 물로 희석하여 최종 농도가 20ng/μL인 용액을 얻습니다.

화학품

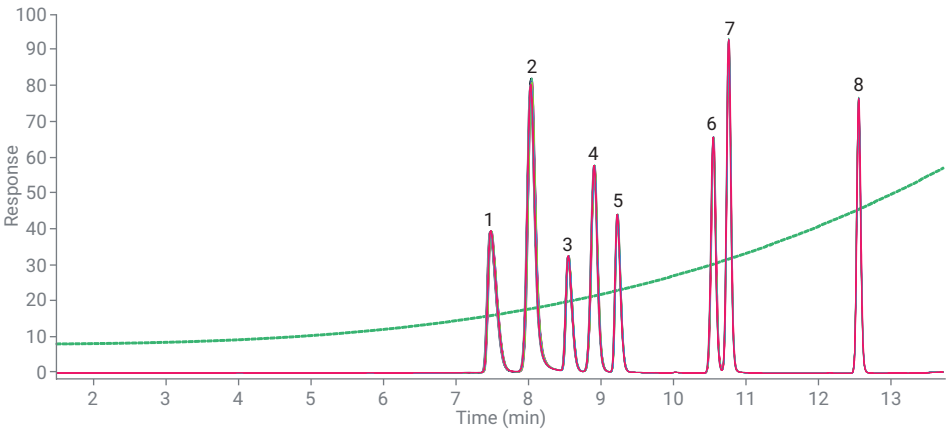
용매는 전부 LC 등급 용매를 사용했으며, 초순수는 0.22μm의 membrane point-of-use cartridge(Millipak)를 장착한 Milli-Q Integral 시스템에서 얻었습니다. 아세트니트릴은 Merck(독일 다름슈타트)에서, 포름산(FA)은 VWR(독일 다름슈타트)에서 구입했습니다. Metoclopramide는 Sigma-Aldrich(독일 타우프키르헨)에서, Metoclopramide 불순물은 LGC Standards(영국 테딩턴)에서 구입했습니다.

결과 및 토의

5µm 입자로 채워진 4.6 × 150mm 컬럼을 이용해 오목한 기울기가 적용된 Waters Alliance 2695 LC에서 전통적인 분석법으로 Metoclopramide와 그 불순물을 분석하였습니다. 그림 1은 10회 연속 실행의 크로마토그램 오버레이 및 해당 머무름 시간 및 분리능 표를 보여줍니다.

표 1. Metoclopramide와 그 불순물 분석을 위한 크로마토그래피 파라미터

파라미터	값
컬럼	Agilent ZORBAX StableBond C18; 4.6 × 150mm, 5µm(p/n 883975-902)
용매	A) 0.1% FA in water B) 0.1% FA in acetonitrile
Gradient	0min – 8 %B 14min – 66 %B; curve 8 14.1min – 8 %B; curve 6
정지 시간	18min
유속	2L/min
주입	주입량: 10µL, 3초간 니들 세척(60% 아세토니트릴 수용액)
시료 온도	8°C
컬럼 온도	25°C
DAD	270/4nm, Ref. off, 5Hz



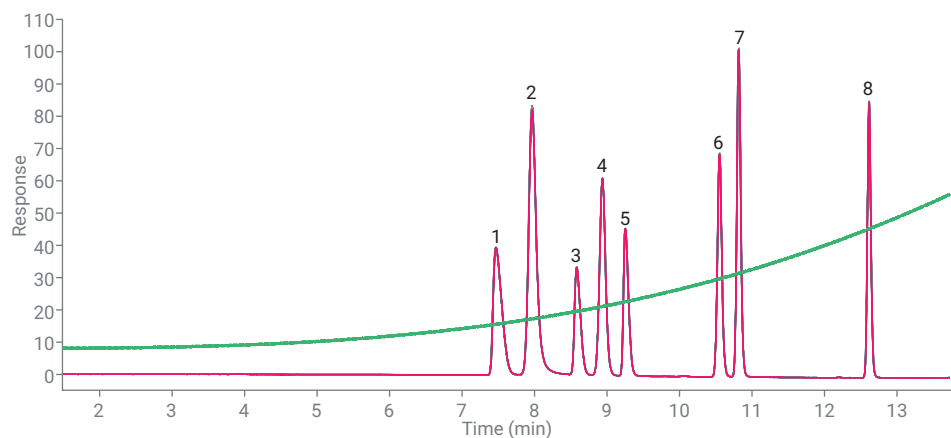
번호	화합물	RT(min)	RSD RT(%)	분리능
1	불순물 F	7.50	0.12	–
2	불순물 H	8.05	0.12	2.58
3	Metoclopramide	8.57	0.07	2.84
4	불순물 9	8.93	0.07	2.16
5	불순물 G	9.24	0.05	2.08
6	불순물 C	10.57	0.04	9.93
7	불순물 D	10.78	0.03	1.75
8	불순물 B	12.57	0.01	16.46

그림 1. Metoclopramide 및 그 불순물 분석 Waters Alliance 2695 LC 시스템에서 10회 연속 분석의 크로마토그램 오버레이. 크로마토그램 디스플레이의 녹색 곡선은 용매 비율 B를 나타냅니다.

그 후 Metoclopramide와 그 불순물의 분리를 위한 분석법을 ISET 기술이 활성화된 1260 Infinity II Prime LC로 이전하였습니다. 그림 2는 그 결과로 나타난 크로마토그램 오버레이와 해당 머무름 시간 및 분리능을 보여줍니다.

1260 Infinity II Prime LC에서 ISET 기술을 활용함으로써 오목형 및 볼록형 기울기 프로파일 생성이 가능해졌습니다. OpenLab CDS와 ChemStation에서 사용된 11개의 상이한 기울기 프로파일은 Waters의 번호 매기기와 동일합니다. 이 실험에서 곡선 8(볼록형)과 곡선 6(선형적)이 사용되었습니다.

ISET 기술을 이용해 1260 Infinity II Prime LC로 분석법을 이전했을 경우, Alliance 2695 LC의 결과와 매우 유사한 크로마토그램이 얻어졌습니다. 그림 3은 1260 Infinity II Prime LC와 Alliance 2695 LC의 크로마토그램 비교 결과를 보여줍니다.



번호	화합물	RT(min)	RSD RT(%)	분리능
1	불순물 F	7.48	0.02	—
2	불순물 H	7.98	0.05	2.38
3	Metoclopramide	8.59	0.01	3.58
4	불순물 9	8.95	0.01	2.29
5	불순물 G	9.26	0.03	2.19
6	불순물 C	10.56	0.03	10.51
7	불순물 D	10.83	0.01	2.46
8	불순물 B	12.63	0.01	18.93

그림 2. Metoclopramide 및 그 불순물 분석. 1260 Infinity II Prime LC에서 10회 연속 분석을 통해 얻어진 크로마토그램 오버레이. 크로마토그램 디스플레이의 녹색 곡선은 용매 비율 B를 나타냅니다.

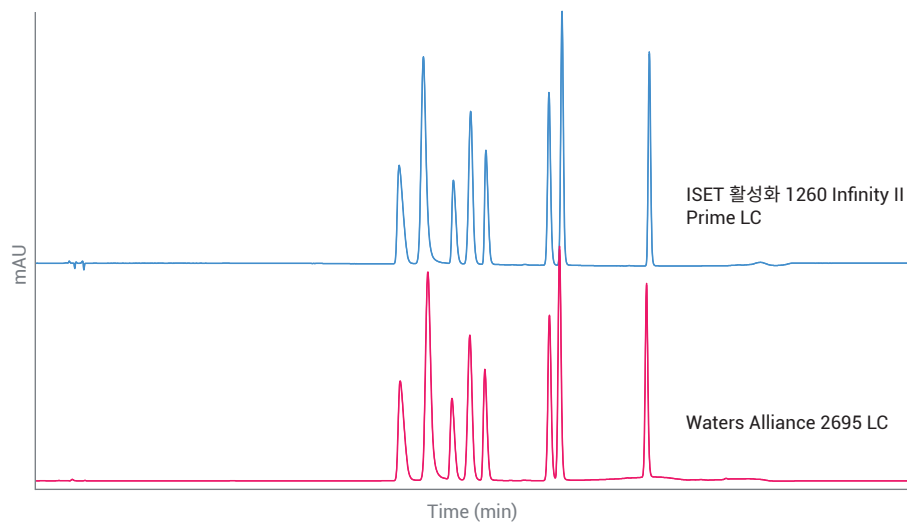


그림 3. ISET 기술이 활성화된 1260 Infinity II Prime LC와 Waters Alliance 2695 LC로 Metoclopramide 및 불순물을 분석해 얻은 크로마토그램의 오버레이

두 시스템 모두의 머무름 시간은 최대 편차 $\approx 0.9\%$ 로 지정된 머무름 시간 편차 수치인 $\pm 5\%$ 보다 훨씬 적어 뛰어난 성능을 자랑합니다. 또한 분리능 편차도 측정되었습니다. 대부분의 피크 분리능이 불순물 H만 제외하고는 1260 Infinity II Prime LC를 이용한 실험에서 더 우수하게 나타났습니다. 표 2는 머무름 시간과 분리능 편차를 상세히 나열하였습니다.

결론

iset 기술은 기존의 분석법을 전통적인 HPLC에서 1260 Infinity II Prime LC로 원활하게 이전합니다. iset을 활성화함으로써 Waters Alliance LC의 에뮬레이션이 가능해지며, 블록형 및 오목형 기울기도 실행 가능해집니다.

이 응용 자료에서는 Metoclopramide와 그 불순물의 분석법을 Waters Alliance 2695 LC에서 1260 Infinity II Prime LC로 이전하였습니다. 그 결과 뛰어난 머무름 시간과 분리능 상관계수가 얻어졌습니다. 또한 대부분의 피크에서 분리능도 향상되었습니다. 이 응용 자료는 iset의 사용상 용이성을 명확하게 보여주고 있습니다. 1260 Infinity II Prime LC에서 Metoclopramide와 그 불순물을 분석하는 과정에서 분석법이나 기기의 변경은 필요하지 않습니다.

표 2. Waters Alliance 2695 LC와 1260 Infinity II Prime LC의 머무름 시간 및 분리능 비교

화합물	편차 RT(분)	편차 RT(%)	편차 분리능	편차 분리능(%)
불순물 F	-0.02	-0.27	-	-
불순물 H	-0.07	-0.90	-0.20	-8.28
Metoclopramide	0.02	0.23	0.73	20.48
불순물 9	0.02	0.22	0.13	5.58
불순물 G	0.02	0.23	0.12	5.25
불순물 C	-0.01	-0.09	0.58	5.51
불순물 D	0.05	0.46	0.71	28.76
불순물 B	0.06	0.48	2.47	13.06

참조

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*, publication number 5991-1603EN, **2014**
2. Agilent InfinityLab LC with ISET, *Agilent Technologies User Manual*, part number G7120-90310, **2017**

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
2018년 6월 1일, 한국에서 인쇄
5991-9394KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국에질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr