

Alliance キャリーオーバー性能評価 Part 1: システムデザイン変更によるキャリーオーバーの低減

Amanda B. Dlugasch, Jennifer Simeone, Patricia R. McConville

日本ウォーターズ株式会社



要約

本アプリケーションノートでは、Alliance HPLC システムインジェクターアセンブリ内のシールパックコンポーネントデザインの最適化による、キャリアオーバーの低減について検討します。

利点

新規デザインのインジェクターアセンブリ搭載 2018 Alliance HPLC のキャリアオーバー性能の向上

はじめに

サンプル由来のキャリアオーバーは分析ラボにおいて共通の問題であり、クロマトグラフィーの分析法に悪影響を与えます。サンプル由来のキャリアオーバーは、注入した試料が次の注入時に持ち越されることを意味します。キャリアオーバーは、バッチ間のバラつき、規格外の結果、再現性の低下などの原因となります。分析種の化学的性質、分析用カラム、HPLC システムのインジェクターアセンブリのデザインなど、複数の要因がキャリアオーバーに影響を与えます。例えば、フロースルーニードルデザインを使用した HPLC システムでは、移動相が継続的にサンプル注入ニードルの内部を洗浄するため、キャリアオーバーを低減させることができます。また、多くの LC システムは、サンプルのキャリアオーバーをさらに低減させるために、ニードルの外側を適切な溶媒で洗浄するメカニズムを搭載しています。

本アプリケーションノートでは、Alliance HPLC システムインジェクターアセンブリ内のシールパックコンポーネントデザインの最適化による、キャリアオーバーの低減について検討します。インジェクターデザインの向上を評価するために、異なる化学的性質を持つ 4 種の化合物を選択しました。

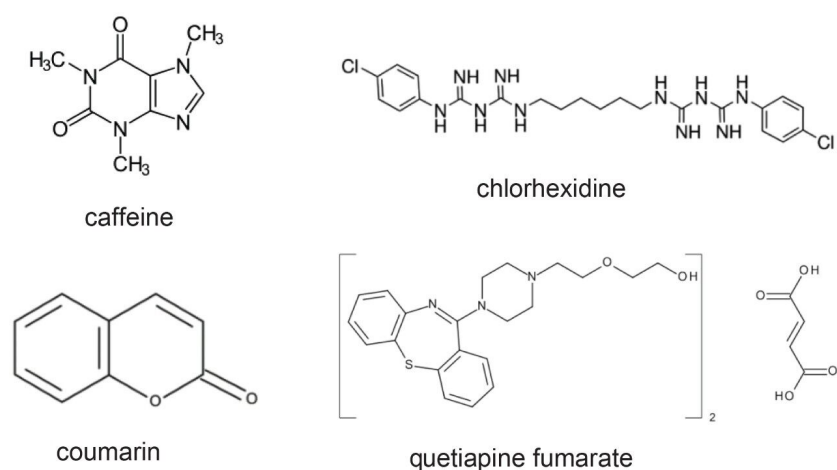


図 1. Caffeine、Chlorhexidine、Coumarin および Quetiapine fumarate の構造式

実験方法

LC 条件

LC システム

| | |
|----------------|---|
| Alliance: | Alliance e2695 セパレーションモジュール 100 μ L シリンジ、2998 PDA 検出器、CH-30 (パッシブカラムヒーター)、ファームウェア 3.03 |
| 2018 Alliance: | 2018 Alliance: Alliance e2695 セパレーションモジュール 100 μ L シリンジ、2998 PDA 検出器、CH-30 (パッシブカラムヒーター)、e2695 エンハンスメントキット、ファームウェア 3.04 |

サンプル 1

| | |
|-----------|--|
| Caffeine: | HPLC/ UV スタンダードキット (製品番号 : 700003741) チャレンジ溶液: 4.0 mg/mL Caffeine (Solution 7) 標準溶液 (0.01%) : 0.4 μ g/mL Caffeine (Solution 8) ブランク (Solution 9) |
| カラム: | XBridge BEH C ₁₈ , 3.5 μ m 4.6 mm \times 50 mm (製品番号: 186003031) |
| カラム温度: | 35 $^{\circ}$ C |
| サンプル温度: | 4 $^{\circ}$ C |
| 注入量: | 10 μ L |
| 流量: | 1.0 mL/分 |
| ニードル洗浄液: | メタノール |
| ニードル洗浄時間: | 設定のまま |

移動相 A: 水
移動相 B: メタノール
分析時間: 23 分
PDA 波長: 273 nm (解像度 1.2 nm)

グラジエント:

| 時間 (分) | 移動相 A (%) | 移動相 B (%) |
|--------|-----------|-----------|
| 0.0 | 70 | 30 |
| 2.5 | 70 | 30 |
| 3.0 | 10 | 90 |
| 9.0 | 10 | 90 |
| 9.5 | 70 | 30 |

サンプル 2

Chlorhexidine: 標準溶液: 1.0 mg/mL
Coumarin (0.1% TFA 水溶液)
ブランク: 90:10 水: アセトニトリル

カラム: CORTECS C₁₈, 2.7 μm
3 mm × 100 mm (製品番号: 186007372)

カラム温度: 50 °C

サンプル温度: 室温

| | |
|-----------|----------------------------------|
| 注入量: | 5 μ L |
| 流量: | 1.0 mL/分 |
| ニードル洗浄液: | 50:50 水:アセトニトリル |
| ニードル洗浄時間: | 設定のまま |
| 移動相 A: | 0.1% TFA 水溶液 |
| 移動相 B: | 0.1% TFA 含有アセトニトリル |
| グラジエント: | イソクラティック (67:33 移動相 A: 移動相 B) |
| 分析時間: | 10 分 |
| PDA 波長: | 257 nm (解像度 4.8 nm) |

サンプル 3

| | |
|-----------|--|
| Coumarin: | ストック溶液: 8 mg/mL Coumarin (メタノール溶液) チャレンジ溶液: 2 mg/mL Coumarin (水溶液) 標準溶液 (0.01%): 0.2 μ g/mL Coumarin (水溶液) ブランク: 水 |
| カラム: | CORTECS C ₁₈ , 2.7 μ m 3 mm \times 100 mm (製品番号: 186007372) |
| カラム温度: | 30 $^{\circ}$ C |
| サンプル温度: | 4 $^{\circ}$ C |
| 注入量: | 4 μ L |
| 流量: | 0.8 mL/分 |

| | |
|-----------|-------------------------------|
| ニードル洗浄液: | 90:10 水:アセトニトリル |
| ニードル洗浄時間: | 設定のまま |
| 移動相 A: | 水 |
| 移動相 B: | アセトニトリル |
| グラジエント: | イソクラティック (90:10 移動相 A: 移動相 B) |
| 分析時間: | 15 分 |
| PDA 波長: | 275 nm (解像度 4.8 nm) |

サンプル 4

Quetiapine fumarate Assay USP 40 NF35 S1¹

| | |
|-------------|---|
| Quetiapine: | 標準溶液: 0.16 mg/mL Quetiapine fumarate (移動相) (標準ストック溶液: USP 医薬品各条定量) ブランク: 水 |
| カラム: | XBridge BEH C ₈ , 5 μm 4.6 mm × 250 mm (製品番号: 186003018) |
| カラム温度: | 25 °C |
| サンプル温度: | 4 °C |
| 注入量: | 50 μL |
| 流量: | 1.3 mL/分 |
| ニードル洗浄液: | 90:10 水:アセトニトリル |
| ニードル洗浄時間: | 設定のまま |
| 移動相: | 54:7:39 メタノール: アセトニトリル: 緩衝液 (事前 |

Quetiapine fumarate Assay USP 40 NF35 S1¹

| | |
|---------|--------------------------------------|
| | 調製: 0.45 µm フィルターろ過) |
| 緩衝液: | 2.6 g/L 第二リン酸アンモニウム (pH 6.5 にリン酸で調整) |
| グラジエント: | イソクラティック |
| 分析時間: | 15 分 |
| PDA 波長: | 230 nm (解像度 4.8 nm) |

データ管理

Empower 3 クロマトグラフィーデータソフトウェアFR 3、Hot Fix 1

結果および考察

試験の手順とキャリーオーバーの算出

最適化したインジェクターデザインがサンプルキャリーオーバーに与える影響を調べるため、様々な化学的性質を持った複数の化合物を、Alliance HPLC システムおよび e2695 エンハンスメントキットを搭載した 2018 Alliance HPLC システムで分析しました。Caffeine、Chlorhexidine、Coumarin、および Quetiapine fumarate の 4 種の化合物を選択しました。各化合物は個別に調製し、それぞれ 6 回の繰り返し注入を実施しました。

本試験では、キャリーオーバーを評価するために 2 種の分析法を用いています。1 つ目の分析法では、検出器が飽和する濃度であるチャレンジ溶液を使用しました。検出器の飽和により正確なピーク面積が測定できないため、チャレンジ溶液の濃度の 0.01% に調製した標準溶液も分析しました。注入の順序は、プレブランク溶液、標準溶液、チャレンジ溶液、ポストブランク溶液です。

キャリーオーバーは次のように計算しました。

$$\text{キャリーオーバー(\%)} = (\text{ポストブランクのピーク面積}) / (\text{標準溶液のピーク面積}) * 0.01$$

この分析法は、Caffeine と Coumarin のキャリーオーバーの評価に使用しました。

2 つ目の分析法では、チャレンジ溶液の濃度を検出器の直線範囲内まで下げて、標準溶液によるキャリーオーバーを定量します。この分析法では、キャリーオーバーは次のように計算します。

キャリアオーバー(%) = (ポストブランクのピーク面積) / (標準溶液のピーク面積) * 100

この方法は、Chlorhexidine と Quetiapine fumarate に使用しました。

インジェクターデザインの検討事項とキャリアオーバーへの影響

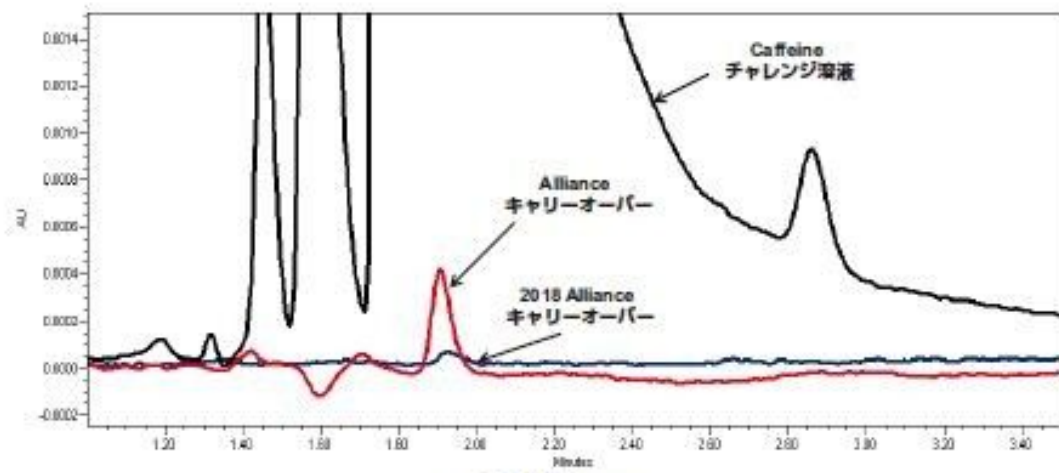
Alliance HPLC システムのインジェクターは、分析メソッドの実行中（分析中）にニードルの内部を移動相で洗浄するフロースルーニードルを採用しています。ニードルは、インジェクターアセンブリーのシールパック内にあり、その外部表面がニードル洗浄溶媒で指定した時間で洗浄されます²。2018 Alliance HPLC システムではシールパックを再設計し、インジェクターニードル外部表面のニードル洗浄フローを改良および最適化しています。既存の Alliance システムでも e2695 エンハンスメントキットを使用することで、インジェクターコンポーネントを新しいシールパックデザインに変更できます。

シールパックデザイン改良の影響を実証するために、4種の分析化合物のキャリアオーバーを、Alliance HPLC システムおよび 2018 Alliance HPLC システムで評価しました（表 1 および図 2）。Caffeine と Chlorhexidine は HPLC システムにおけるキャリアオーバーの評価に一般的に使用される化合物であり、Coumarin と Quetiapine fumarate は、HPLC システムでキャリアオーバーが起こりやすい化合物です^{3,4}。

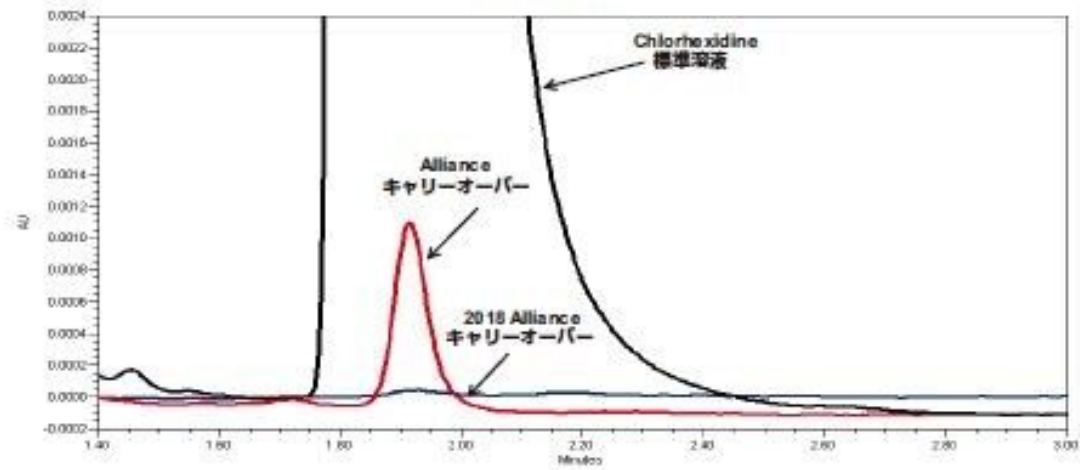
特定の条件下で評価した結果、全ての化合物において両 Alliance HPLC システムとも低レベルのキャリアオーバーを示しました。一方、2018 Alliance HPLC システムではシールパックデザインの改良によってキャリアオーバー性能を大幅に向上することができました。具体的には、キャリアオーバーの低減は、Caffeine で 7 倍、Chlorhexidine で 20 倍、Coumarin で 3 倍、Quetiapine で 1.5 倍となりました。

| 化合物 | Alliance HPLC システム | 2018 Alliance HPLC システム | キャリアオーバーの低減 |
|---------------------|--------------------|-------------------------|-------------|
| Caffeine | 0.0011% | 0.00016% | 6.9× |
| Chlorhexidine | 0.010% | 0.0005% | 20× |
| Coumarin | 0.0002% | 0.00006% | 3.3× |
| Quetiapine fumarate | 0.028% | 0.019% | 1.5× |
| システム仕様* | ≤ 0.01% | ≤ 0.0025% | NA |

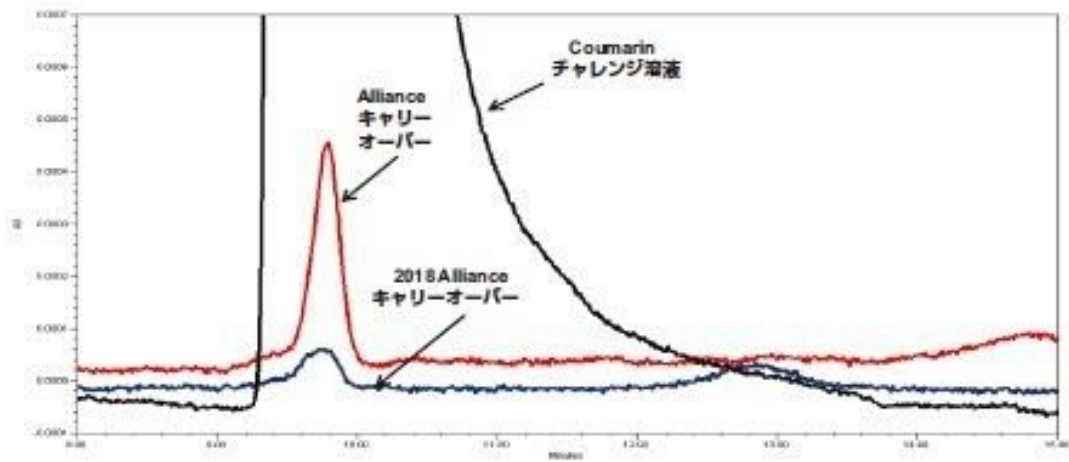
表 1. デフォルトの「設定のまま」洗浄モードを使用した、Alliance HPLC システムおよび 2018 Alliance HPLC システムにおける Caffeine、Chlorhexidine、Coumarin、および Quetiapine fumarate のキャリアオーバー。* Alliance HPLC システム⁵ および 2018 Alliance HPLC システム⁶ のキャリアオーバー装置仕様は、特定の条件下における Caffeine の分析に基づいています。



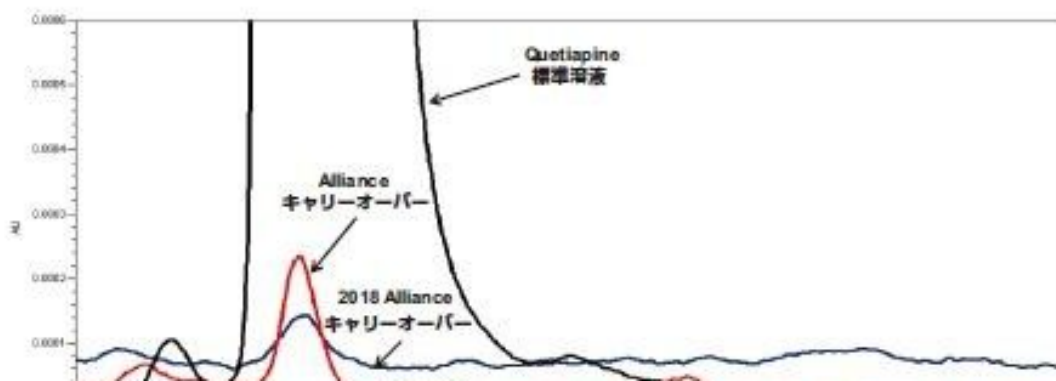
Caffeine



Chlorhexidine



Coumarin



および 2018 Alliance HPLC システム（青）によるポストブランクのクロマトグラフィー結果。クロマトグラム（黒）は、Caffeine と Coumarin では高濃度のチャレンジ溶液を表しており、Chlorhexidine と Quetiapine fumarate では標準溶液を表しています。

結論

2018 Alliance HPLC システムは、インジェクターニードル外部のニードル洗浄フローを改善する新しいシールパックデザインを搭載しています。新デザインのシールパックは、幅広い化合物においてキャリーオーバーを大幅に低減させることが可能です。今回扱った化合物のキャリーオーバー評価において、2018 Alliance HPLC システムが分析する化合物種に関わらずキャリーオーバーを低減できることが示唆されました。

参考文献

1. Official Monographs, Quetiapine Fumarate USP 40 NF35 S1, United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 40-NF35 S1) Baltimore, MD. United Book Press, Inc., 2017. p. 5939.
2. Jenkins, T.; Waite, M. Low Sample Carryover with Key Performance Indicators on the Alliance HPLC System. Waters Technology Brief 720004534EN.
3. Jenkins, T.; Waite, M. Screening of Commercial Vanilla Extracts for Authenticity using the Breeze 2 Modular HPLC System. Waters Application Note 720002877EN.
4. Thurmond, M.; Hodgins, J.C. A Carryover-Elimination Method for a Broad Range of Analytical Samples. The Application Notebook. 2003 Sept. http://alfresco.ubm-us.net/alfresco_images/pharma/2014/08/22/bb2580d3-0346-4a14-838b-1bfecbbba32b/article-159538.pdf
5. Waters e2695 Separations Module Instrument Specifications 720002552EN. September 2008.
6. Waters e2695 Separations Module Instrument Specifications. 720004547EN. April, 2018.

ソリューション提供製品

Alliance HPLC システム <<https://www.waters.com/534293>>

Empower 3 クロマトグラフィーデータソフトウェア <<https://www.waters.com/513188>>

2998 フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器 <<https://www.waters.com/1001362>>

720006386JA、2018 年 10 月

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.