



从 Agilent 1100 系列四元液相色谱仪 到 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱仪 的方法转移

抗组胺药物分析的等效性证明

应用简报

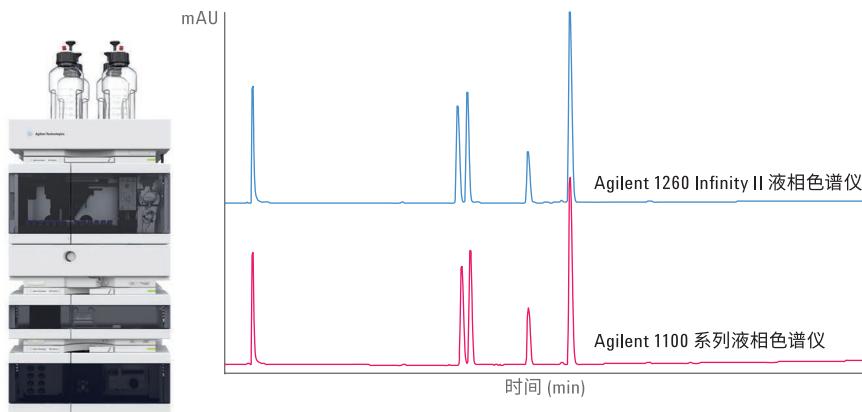
小分子药物

作者

Sonja Krieger
安捷伦科技公司
Waldbonn, Germany

摘要

对所有实验室而言，将常规液相色谱方法从原有设备转移到新仪器都是一项重要课题。本应用简报介绍了用于抗组胺药物分析的常规液相色谱方法从 Agilent 1100 系列四元液相色谱仪到 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱仪的转移，证明二者获得的保留时间和分离度等结果相当。另外，将常规液相色谱方法转移到 UHPLC 条件下，并使用 1260 Infinity II 液相色谱仪对该条件中的分离度和分析速度进行优化。这一方法转移能够提高峰分离度，同时能够节省时间和溶剂。



Agilent Technologies

前言

仪器间的方法转移对不同行业所有实验室而言都是一项重要课题¹。尤其对于制药行业中的经验证方法，仪器间的方法转移是必经过程，但对于其他行业中的 QA/QC 也同样重要。仪器间方法转移的一个示例是将常规液相色谱方法从 Agilent 1100 系列四元液相色谱仪等旧设备转移到 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱仪等新仪器。本应用简报显示了使用 1100 系列四元液相色谱仪对抗组胺药物的分析。该方法被转移到 1260 Infinity II 液相色谱仪，获得的保留时间和分离度等结果相当。在高达 600 bar 的压力范围内，1260 Infinity II 液相色谱仪能够使用 Agilent InfinityLab Poroshell 色谱柱执行 UHPLC 分析。将展示抗组胺药物的常规液相色谱分析方法向 UHPLC 条件的转移，该条件针对分离度和分析速度进行了优化。

组胺是一种内源性生物胺，可用作神经系统中的神经递质，也可用作肠道、皮肤和免疫系统中的局部介质²。它可以通过四种受体引起复杂生理变化；第一组胺受体（H1 受体）在体内广泛表达，是过敏反应中组胺引起的大多数症状的原因所在²。抗组胺药物（H1 受体拮抗剂）长期以来一直应用于治疗恶心、呕吐和过敏²。

实验部分

仪器

Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity II 四元泵 (G7111B)
- Agilent 1260 Infinity II 样品瓶进样器 (G7129A)，配有集成式柱温箱、3.0 μL 加热器（选件 #063）和样品冷却装置（选件 #100）
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 WR (G7115A)，配有 10 mm 标准流通池 (G1315-60022)

Agilent 1100 系列四元液相色谱系统包括以下模块：

- Agilent 1100 四元泵 (G1311A)
- Agilent 1100 脱气机 (G1379A)
- Agilent 1100 自动进样器 (G1313A)
- Agilent 1100 柱温箱 (G1316A)
- Agilent 1100 二极管阵列检测器 (G1315B)，配有 10 mm 标准流通池 (G1315-60022)

软件

Agilent OpenLAB CDS 2.1 版（计划于 2016 年 9 月推出）

色谱柱

- Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 × 150 mm, 5 μm
(部件号 883975-902)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 150 mm, 2.7 μm
(部件号 693975-302T)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 50 mm, 2.7 μm
(部件号 699975-302T)

化学品

所有试剂均为液相色谱级。乙腈购自 Merck 公司 (Darmstadt, Germany)。新制超纯水产自配备 0.22 μm 膜式终端过滤器的 Milli-Q Integral 系统 (Millipak, EMD Millipore, Billerica, MA, USA)。磷酸二氢钾、盐酸曲吡那敏、马来酸氯苯那敏、丁卡因和盐酸异丙嗪购自 Sigma-Aldrich 公司 (Steinheim, Germany)。

样品

用 25 mM 磷酸二氢钾水溶液 (pH 3)/乙腈 (90/10; v/v) 配制抗组胺药物曲吡那敏、氯苯那敏、丁卡因和异丙嗪的混合物，浓度为 50 μg/mL。

方法

表 1. 常规液相色谱分析的色谱条件

参数	描述
色谱柱	Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 × 150 mm, 5 µm
溶剂	A) 25 mM 磷酸二氢钾水溶液, pH 3 B) 乙腈
梯度	0 min 时 B 为 10%, 25 min 时 B 为 55%
停止时间	25 min
后运行时间	10 min
流速	1.5 mL/min
温度	40 °C
进样量	10.0 µL
检测条件	204/4 nm, 参比 360/100 nm, 数据采集速率 10 Hz

表 2. 分离度经过优化的 UHPLC 分析色谱条件

参数	描述
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 150 mm, 2.7 µm
溶剂	A) 25 mM 磷酸二氢钾水溶液, pH 3 B) 乙腈
梯度	0 min 时 B 为 10%, 13.3 min 时 B 为 55%
停止时间	13.3 min
后运行时间	6 min
流速	1.2 mL/min
温度	40 °C
进样量	4.25 µL
检测条件	204/4 nm, 参比 360/100 nm, 数据采集速率 40 Hz

表 3. 分析速度经过优化的 UHPLC 分析色谱条件

参数	描述
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 50 mm, 2.7 µm
溶剂	A) 25 mM 磷酸二氢钾水溶液, pH 3 B) 乙腈
梯度	0 min 时 B 为 10%, 2.13 min 时 B 为 55%
停止时间	2.13 min
后运行时间	1 min
流速	2.5 mL/min
温度	40 °C
进样量	4.25 µL
检测条件	204/4 nm, 参比 360/100 nm, 数据采集速率 80 Hz

结果与讨论

本应用简报显示了在 1100 系列四元液相色谱仪上使用常规液相色谱方法对抗组胺药物的分析。将该方法转移至 1260 Infinity II 液相色谱仪以获得等效性证据。另外，将用于抗组胺药物分析的常规液相色谱方法转移到 UHPLC 条件下，并使用 1260 Infinity II 液相色谱仪对该条件中的分离度和分析速度进行优化。

图 1 显示了曲吡那敏、氯苯那敏、丁卡因和异丙嗪四种抗组胺药物在 1100 系列四元液相色谱仪上的常规液相色谱分析结果，获得了优异的保留时间和峰面积精度（表 4）。

图 2 显示了抗组胺药物在 1260 Infinity II 液相色谱仪上的常规液相色谱分析结果，表 5 列出了相应的保留时间和峰面积精度。就保留时间和峰面积精度而言，1260 Infinity II 液相色谱仪的性能超过了优异的 1100 系列四元液相色谱仪。此外，观察到分离度略有提升。

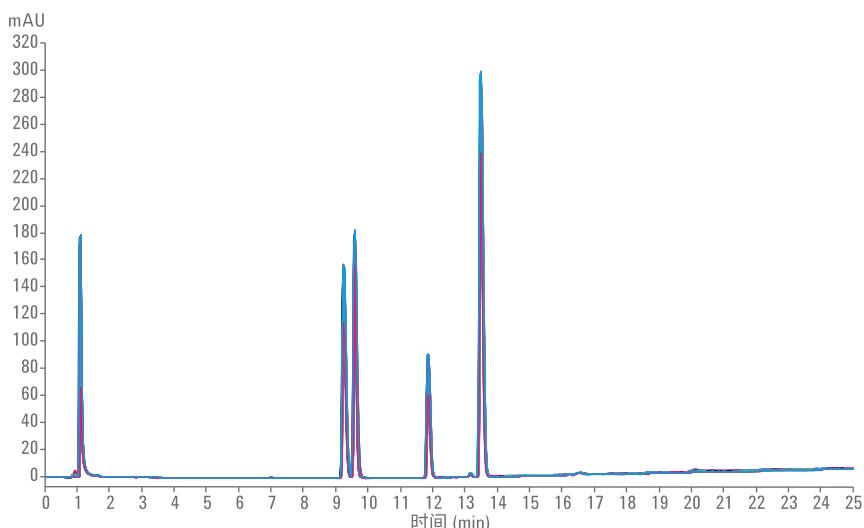


图 1. 抗组胺药物在 Agilent 1100 系列四元液相色谱仪上的常规液相色谱分析；10 次连续运行的叠加

表 4. 抗组胺药物在 Agilent 1100 系列四元液相色谱仪上的常规液相色谱分析；根据 10 次连续运行结果测定保留时间和峰面积精度

化合物	RT (min)	RT RSD (%)	峰面积	峰面积 RSD (%)	分离度
曲吡那敏	9.26	0.05	1,033.5	0.26	64.6
氯苯那敏	9.60	0.05	1,048.3	0.28	2.0
丁卡因	11.86	0.05	577.2	0.26	13.8
异丙嗪	13.49	0.03	2,014.5	0.25	9.1

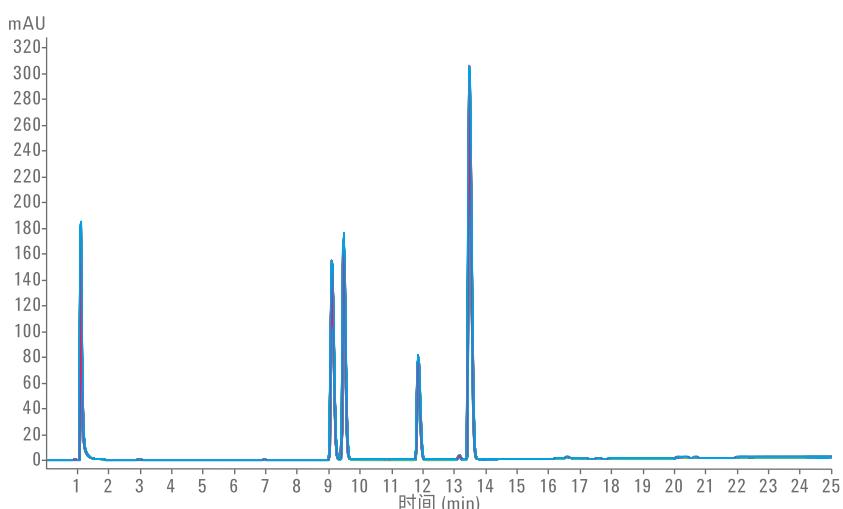


图 2. 抗组胺药物在 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱仪上的常规液相色谱分析；10 次连续运行的叠加

图 3 和表 6 比较了抗组胺药物在 1100 系列四元液相色谱仪和 1260 Infinity II 液相色谱仪上分析得到的保留时间，两幅色谱图表现出优异的保留时间一致性，最大偏差为 -1.7%。这一结果证明了 1260 Infinity II 液相色谱仪与 1100 系列四元液相色谱仪在抗组胺药物分析中的等效性。

表 5. 抗组胺药物在 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱仪上的常规液相色谱分析；根据 10 次连续运行结果测定保留时间和峰面积精度

化合物	RT (min)	RT RSD (%)	峰面积	峰面积 RSD (%)	分离度
曲吡那敏	9.10	0.01	1,018.9	0.21	63.3
氯苯那敏	9.48	0.02	1,007.0	0.21	2.3
丁卡因	11.84	0.02	508.9	0.17	14.5
异丙嗪	13.48	0.01	2,017.1	0.14	9.2

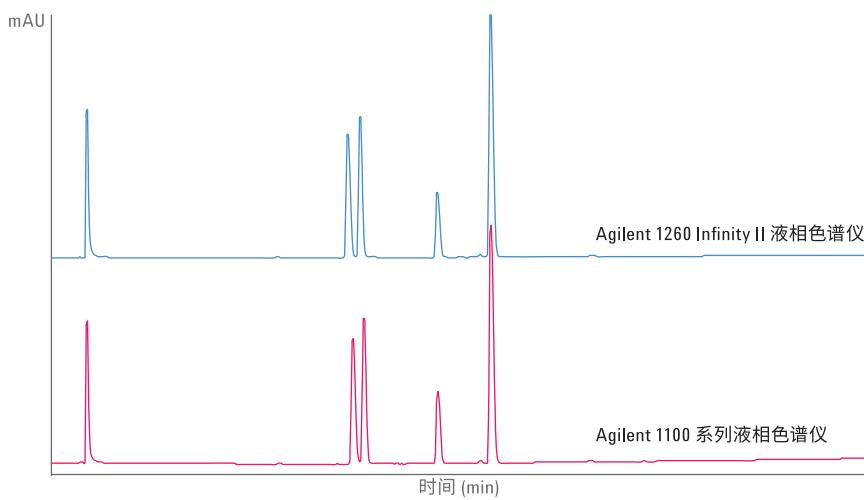


图 3. 抗组胺药物在 Agilent 1100 系列四元液相色谱仪和 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱仪上的常规液相色谱分析

表 6. 抗组胺药物在 Agilent 1100 系列四元液相色谱仪和 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱仪上的常规液相色谱分析；保留时间比较

化合物	保留时间偏差 (min)	保留时间偏差 (%)
曲吡那敏	-0.16	-1.7
氯苯那敏	-0.12	-1.3
丁卡因	-0.02	-0.2
异丙嗪	-0.02	-0.1

使用 Agilent OpenLAB CDS 2.1 版软件进行仪器控制和数据分析。图 4 展示了在 OpenLAB CDS 2.1 版软件中进行数据分析的视图。OpenLAB CDS 2.1 版软件提供了用于液相色谱、气相色谱和质谱的单个软件系统。它提供了全新的直观用户界面，能够为法规认证报告提供先进的技术支持。它还具有拖放式模板创建功能，可提供定制的交互式报告，并能仅对相关数据进行审核。

结合 1260 Infinity II 液相色谱仪使用了 Agilent InfinityLab 备件。Agilent InfinityLab Quick Connect 快速连接接头（部件号 5067-6166，带有 0.17×105 mm 毛细管）和 Agilent Quick Turn 接头（部件号 5067-5966）能够实现免工具、快速且简单的色谱柱安装，确保每位用户均可实现完美色谱柱连接。将 1260 Infinity II 液相色谱仪安装到 Agilent InfinityLab Flex Bench 移动式仪器载架（部件号 5043-1252）上有利于高效利用实验室空间，并通过人体工程学方法轻松操作仪器。

压力范围高达 600 bar 的 1260 Infinity II 液相色谱仪能够使用 InfinityLab Poroshell 色谱柱进行 UHPLC 分析。订购 1260 Infinity II 液相色谱仪时，客户可选择随系统提供的不同 InfinityLab Poroshell 色谱柱，如 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0×150 mm, $2.7 \mu\text{m}$ 色谱柱（部件号 693975-302T）或 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0×50 mm, $2.7 \mu\text{m}$ 色谱柱（部件号 699975-302T）。对于分析抗组胺药物，这些色谱柱允许将方法转移到分离度和分析速度分别经过优化的 UHPLC 条件下。

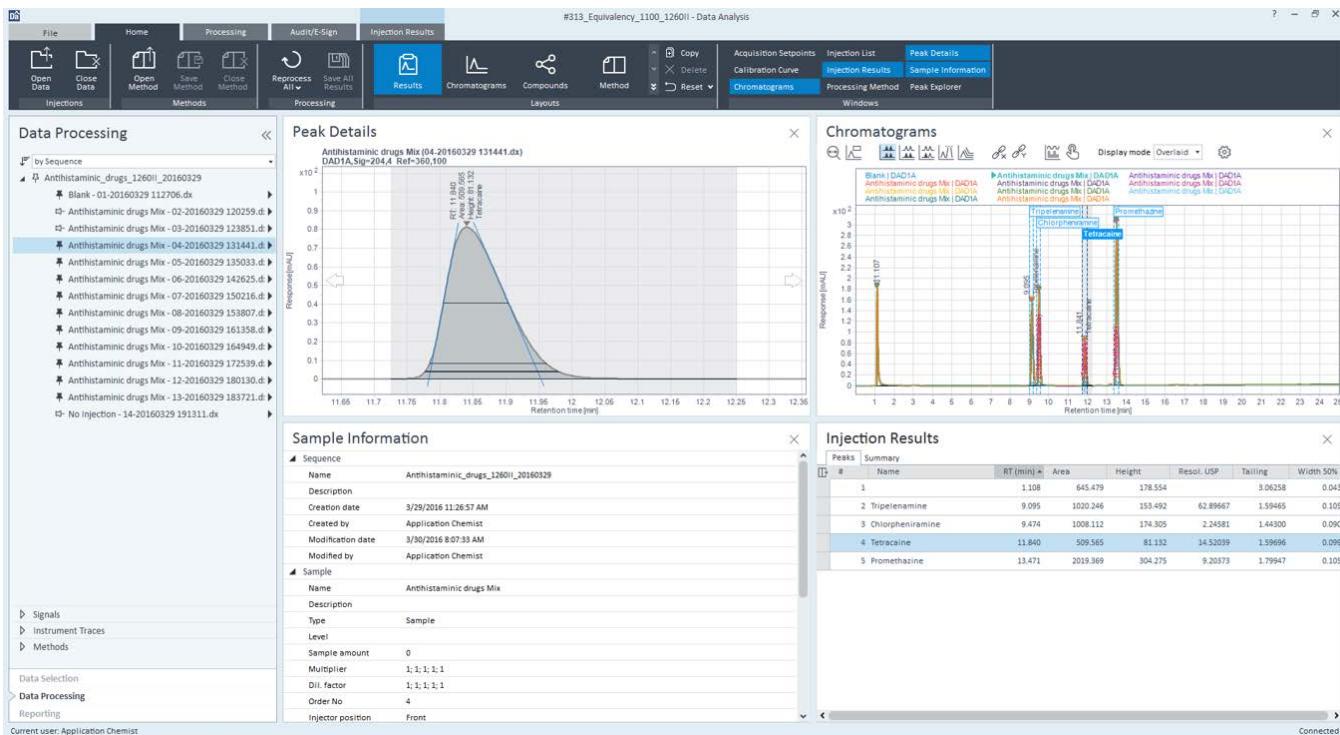


图 4. 在 Agilent OpenLAB CDS 2.1 版软件中进行数据分析的视图

图 5 和表 7 显示了抗组胺药物在分离度经过优化的 UHPLC 条件下的分析结果。InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 150 mm, 2.7 μm 色谱柱充分利用了 1260 Infinity II 液相色谱仪的压力范围，能够在相对较高的流速下 (1.2 mL/min) 进行操作。在这些条件下，曲吡那敏和氯苯那敏的分离度从常规液相色谱方法下的 2.3 提高到了分离度经过优化的 UHPLC 方法下的 5.4。另外，分析时间可缩短 47%，溶剂用量可减少 57%。

采用 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 50 mm, 2.7 μm 色谱柱时，抗组胺药物的分析方法可转移到分析速度经过优化的 UHPLC 条件下，如图 6 和表 8 所示。与常规液相色谱方法相比，曲吡那敏和氯苯那敏的分离度也从 2.3 提高至 2.9。同时，分析时间和溶剂用量分别可大幅减少 91% 和 86%。

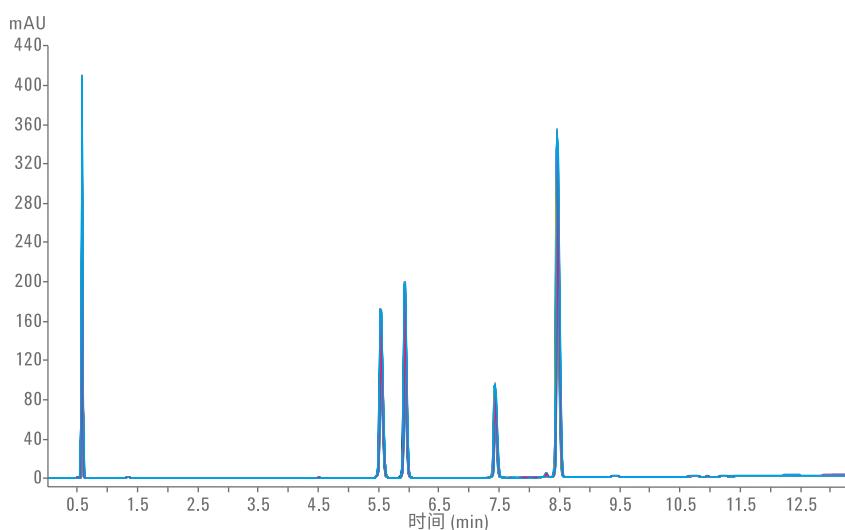


图 5. 抗组胺药物在 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱仪上分离度经过优化的 UHPLC 分析；10 次连续运行的叠加

表 7. 抗组胺药物在 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱仪上分离度经过优化的 UHPLC 分析；根据 10 次连续运行结果测定保留时间和峰面积精度

化合物	RT (min)	RT RSD (%)	峰面积	峰面积 RSD (%)	分离度
曲吡那敏	5.53	0.05	523.7	0.05	97.2
氯苯那敏	5.93	0.03	515.5	0.10	5.4
丁卡因	7.43	0.04	260.6	0.09	21.0
异丙嗪	8.46	0.03	1,028.2	0.04	13.6

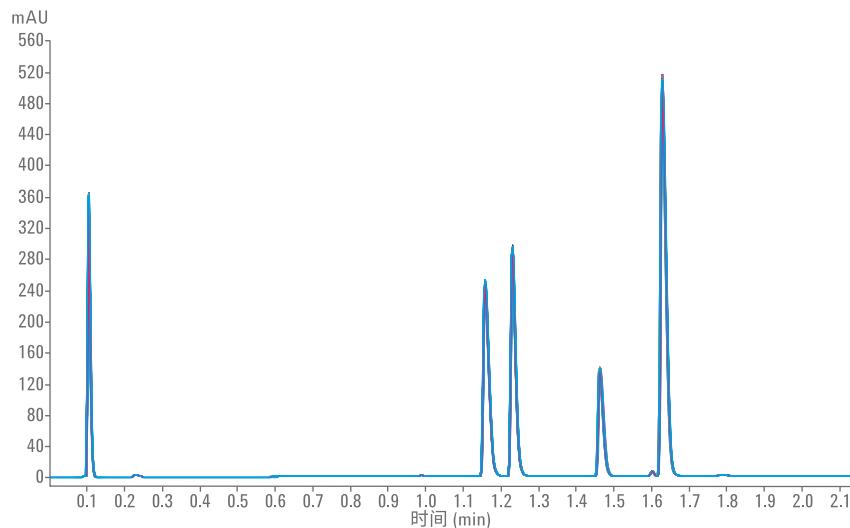


图 6. 抗组胺药物在 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱仪上分析速度经过优化的 UHPLC 分析；10 次连续运行的叠加

结论

将用于分析抗组胺药物的常规液相色谱方法从 Agilent 1100 系列四元液相色谱仪转移到 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱仪，最大保留时间偏差为 -1.7%，且分离度略有提升，因此证明了 1260 Infinity II 液相色谱仪与 1100 系列四元液相色谱仪在抗组胺药物分析中的等效性。在高达 600 bar 的压力范围内，1260 Infinity II 液相色谱仪能够使用 Agilent InfinityLab Poroshell 色谱柱进行 UHPLC 分析。将常规液相色谱方法转移到分离度和分析速度经过优化的 UHPLC 条件下，峰分离度得以提高，同时分析时间和溶剂用量有所减少。

参考文献

1. Agilent 1290 Infinity II with ISET (采用 ISET 功能的 Agilent 1290 Infinity II)，安捷伦科技公司用户产品样本，部件号 G4220-90314, 2015
2. Panula, *et al.*, International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors, *Pharmacological Reviews* 2015, 67, 601–655

表 8. 抗组胺药物在 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱仪上分析速度经过优化的 UHPLC 分析；根据 10 次连续运行结果测定保留时间和峰面积精度

化合物	RT (min)	RT RSD (%)	峰面积	峰面积 RSD (%)	分离度
曲吡那敏	1.16	0.00	254.4	0.19	53.0
氯苯那敏	1.23	0.00	252.1	0.23	2.9
丁卡因	1.46	0.05	126.7	0.25	9.8
异丙嗪	1.63	0.04	500.0	0.19	6.4

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2016
2016 年 6 月 1 日, 中国出版
5991-6914CHCN



Agilent Technologies