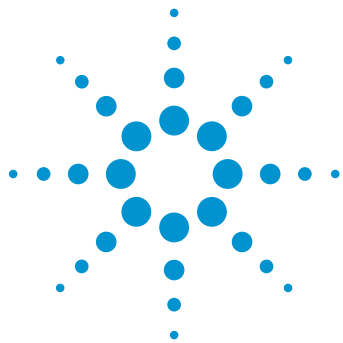




采用 ISET 的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱 — 通过 Waters Empower 软件模拟 Agilent 1100 系列液相色谱

镇痛药混合物分析

应用简报

小分子药物

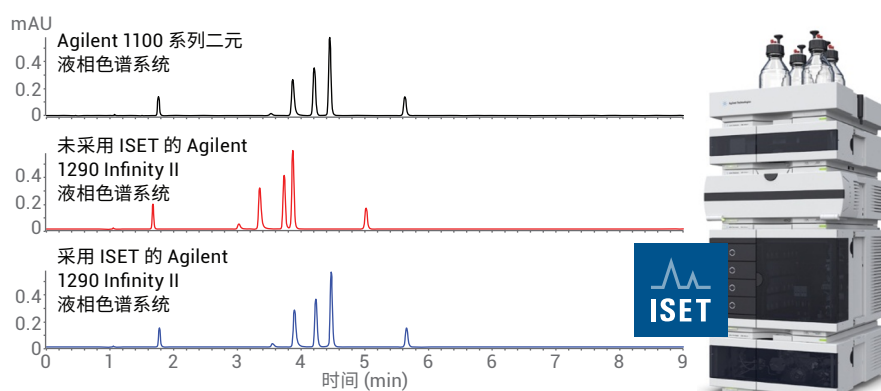
作者

Melanie Metzloff
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

安捷伦的智能系统模拟技术 (ISET) 可实现液相色谱系统方法的无缝转移，例如 Agilent 1100 系列二元液相色谱系统到 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统。借助 ISET，无需更改方法或硬件就可以获得相同的保留时间和峰分离度。

本应用简报展示了通过结合安捷伦仪器控制框架的 Waters Empower 软件使用 ISET 对五种镇痛药的分析。对混合物使用 1100 系列二元液相色谱系统和启用 ISET 的 1290 Infinity II 液相色谱系统进行分析。两种系统获得的保留时间与分离度都表现出良好的一致性。



Agilent Technologies

前言

安捷伦仪器控制框架 (ICF) 是一个软件组件，能够使第三方软件（例如 Waters Empower）全面控制安捷伦液相色谱系统。在 ICF 的协助下，任何第三方 LC 或 LC/MS 数据系统均可具备相同的液相色谱系统控制界面和操作体验，并能提供每个液相模块的完整功能¹。例如，安捷伦智能系统模拟技术 (ISET) 可借助 ICF 由 Waters Empower 软件轻松启动。ISET 与 Agilent 1290 Infinity 或 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统结合，无需更改原始方法即可实现从传统 HPLC 系统到 UHPLC 系统的无缝液相色谱方法转移²。传统方法不经更改即可运行，分析物的保留时间和分离度也将保持不变。ISET 的另一个优势是方法开发实验室可以通过使用 UHPLC 性能来提高方法开发的速度，从而实现色谱柱和溶剂的快速筛选。新开发的方法可以对目标系统进行进一步模拟，确保该方法能够按预期运行³。

在本应用简报中，使用 Agilent 1100 系列二元液相色谱系统对五种镇痛药的混合物进行分析，并将方法进一步转移到配置高速泵的 1290 Infinity II 液相色谱系统中。计算原始方法与转移后方法的保留时间与分离度的偏差。

实验部分

仪器

采用以下仪器对镇痛药混合物进行分析：

Agilent 1100 系列二元液相色谱系统：

- Agilent 1100 系列二元泵 (G1312A)
- Agilent 1100 系列微型真空脱气机 (G1379A)
- Agilent 1100 系列自动进样器 (G1313A)
- Agilent 1100 系列柱温箱 (G1316A)
- Agilent 1100 系列二极管阵列检测器 (G1315B)

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统：

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7117B)，配备 10 mm 最大光强卡套式流通池

溶剂和样品

所有试剂均为液相色谱级。乙腈和甲醇购自 Merck，镇痛化合物购自 Sigma-Aldrich。新制超纯水产自配置 0.22 µm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。

实验中使用下列化合物的混合物：

- 对乙酰氨基酚 (20 µg/mL)
- 安替比林 (10 µg/mL)
- 羟基安替比林 (170 µg/mL)
- 乙酰苯胺 (10 µg/mL)
- 非那西丁 (30 µg/mL)

对于所有化合物，使用 20% 乙腈水溶液 + 0.1% 甲酸配制 1 mg/mL 的储备溶液，并用 0.1% 甲酸水溶液进一步稀释至最终浓度。

色谱柱

Agilent ZORBAX RRHD SB C18, 4.6 × 150 mm, 3.5 µm (部件号 863953-902)

软件

Waters Empower 3 (build 3471) 采用 Waters ICS 2.1 Hotfix 1 版和安捷伦 ICF A.02.03 DU1 HF2 版控制 Agilent 1100 系列二元液相色谱系统以及 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统和 ISET 4 V1.0。

方法

表 1 显示了方法参数。

结果与讨论

在 1100 系列二元液相色谱系统中使用填充 3.5 μm 颗粒的常规 $4.6 \times 150\text{ mm}$ HPLC 柱分析 5 种镇痛药的混合物。液相色谱系统通过 Waters Empower 3 软件进行控制。图 1 为经过分离的镇痛药混合物的色谱图。

表 1. 用于分析镇痛混合物的色谱条件

参数	值
流动相	A) 水 B) 乙腈
梯度	0 min - 15% B 8 min - 50% B 9 min - 80% B
停止时间	10 分钟
后运行时间	5 分钟
流速	1.5 mL/min
进样量	5 μL ，用 50% 甲醇水溶液进行标准针头清洗
柱温	30 $^{\circ}\text{C}$
检测条件	254/4 nm，参比波长 360/100 nm，20 Hz

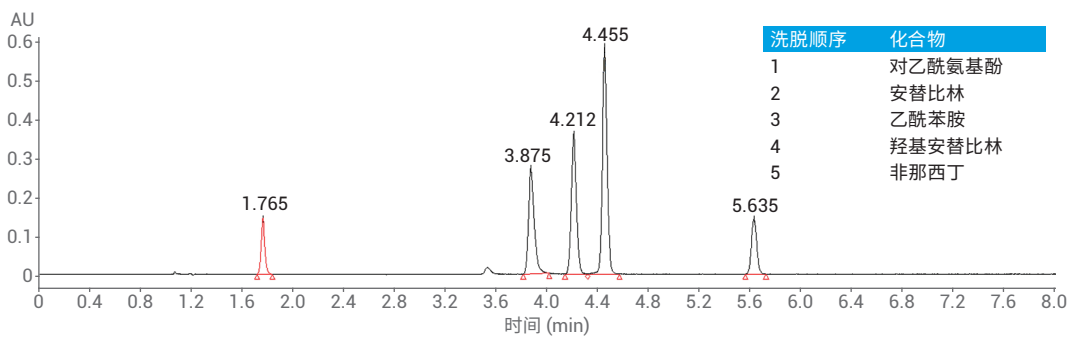


图 1. 在 Agilent 1100 系列二元液相色谱上采集的镇痛药混合物色谱图

将该方法进一步转移到 1290 Infinity II 液相色谱系统。一般来说，与常规 HPLC 系统相比，UHPLC 系统的延迟体积显著降低。这将影响分析物的保留时间和分离度。通常使用两种解决方案来补偿延迟体积的不同；可以在梯度洗脱的起始阶段编程等度洗脱步骤，也可以安装额外的毛细管以增加 UHPLC 系统的延迟体积。转移方法

时更方便的方式是使用 ISET，无需改变方法或更换硬件。图 2 显示了启用 ISET 与未启用 ISET 的 1100 系列二元液相色谱系统和 1290 Infinity II 液相色谱系统对镇痛药的分析色谱图。

未启用 ISET 的 UHPLC 系统中所有峰都向较低保留时间处漂移（图 2，蓝色迹线），这与预期相同。通过启用

ISET（图 2，绿色迹线），保留时间与 1100 系列二元液相色谱上采集的色谱图非常吻合。

另外，将方法转移到 UHPLC 系统会改变分离度。通过使用 ISET，这些数值能够与原始色谱图具有更好的一致性。表 2 显示了详细信息。两种系统获得的保留时间精度都非常高。

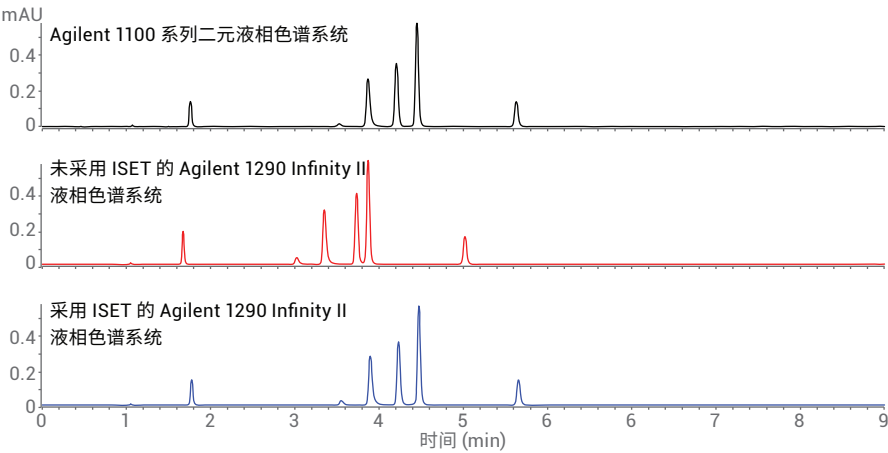


图 2. Agilent 1100 系列二元液相色谱系统和 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统在启用和未启用 ISET 时的叠加色谱图

表 2. Agilent 1100 系列二元液相色谱系统和 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统在使用和不使用 ISET 时的保留时间 (RT)、RT 精度和分离度的对比。通过 8 次连续运行计算 RT 精度

化合物	Agilent 1100 系列二元液相色谱系统			Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统			采用 ISET 的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统		
	RT (min)	RSD RT (%)	分离度	RT (min)	RSD RT (%)	分离度	RT (min)	RSD RT (%)	分离度
对乙酰氨基酚	1.765	0.041	—	1.674	0.122	—	1.772	0.062	—
安替比林	3.875	0.031	31.69	3.354	0.052	27.8	3.892	0.022	31.68
乙酰苯胺	4.212	0.024	4.50	3.736	0.037	5.25	4.230	0.028	4.41
羟基安替比林	4.456	0.028	3.46	3.873	0.043	2.03	4.471	0.035	3.45
非那西丁	5.635	0.023	16.60	5.022	0.039	16.56	5.652	0.021	16.61

启用 ISET 时，保留时间偏差远低于 1%，处于保留时间偏差 $\pm 5\%$ 的允许范围内²，如图 3A 所示。在不使用 ISET 的情况下，大多数镇痛药的保留时间偏差超出了指标范围。最大保留时间偏差为 -13% 。

在未启用 ISET 的状态下比较 HPLC 和 UHPLC 之间的分离度，某些镇痛药的分离度超出了指标限值，如图 3B 所示。分离度的最大允许偏差为 -5% 。通过 ISET 改善结果，使结果接近使用 1100 系列二元液相色谱得到的原始数据。

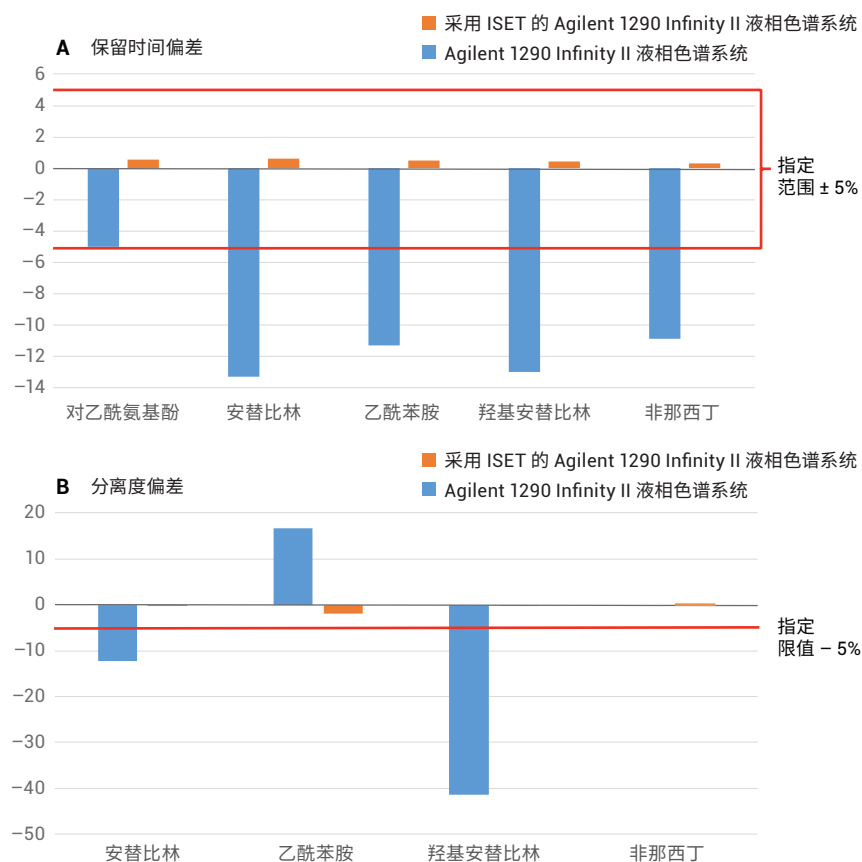


图 3. A) 保留时间偏差；B) 与 Agilent 1100 系列二元液相色谱系统相比，启用和不启用 ISET 时 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统的分离度偏差

1100 系列二元液相色谱和 1290 Infinity II 液相色谱系统均通过 Waters Empower 软件控制。图 4 显示了采用 ISET 设置的 Agilent 1290 Infinity II 高速泵的方法界面。通过 Waters Empower 进行操作时，启用 ISET 与使用 Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版同样简单且具有相同功能。

结论

安捷伦智能系统模拟技术 (ISET) 与 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统结合，可轻松地将方法从 HPLC 直接转移到 UHPLC 系统。在本研究中，使用 Agilent 1100 系列二元液相色谱系统对五种镇痛药的混合物进行分析，并将方法进一步转移到 1290 Infinity II 液相色谱系统。通过启用 ISET，分析

物的保留时间和分离度与原始 HPLC 方法表现出优异的一致性。两个液相色谱系统均通过 Waters Empower 3 软件进行控制，并在软件中启用了泵功能 ISET。得到的色谱图在保留时间方面的一致性达到 99% 以上。本应用指南通过模拟其他液相色谱系统并采用 Waters Empower 等第三方软件进行控制，清晰地展示了 1290 Infinity II 液相色谱系统的通用特性。

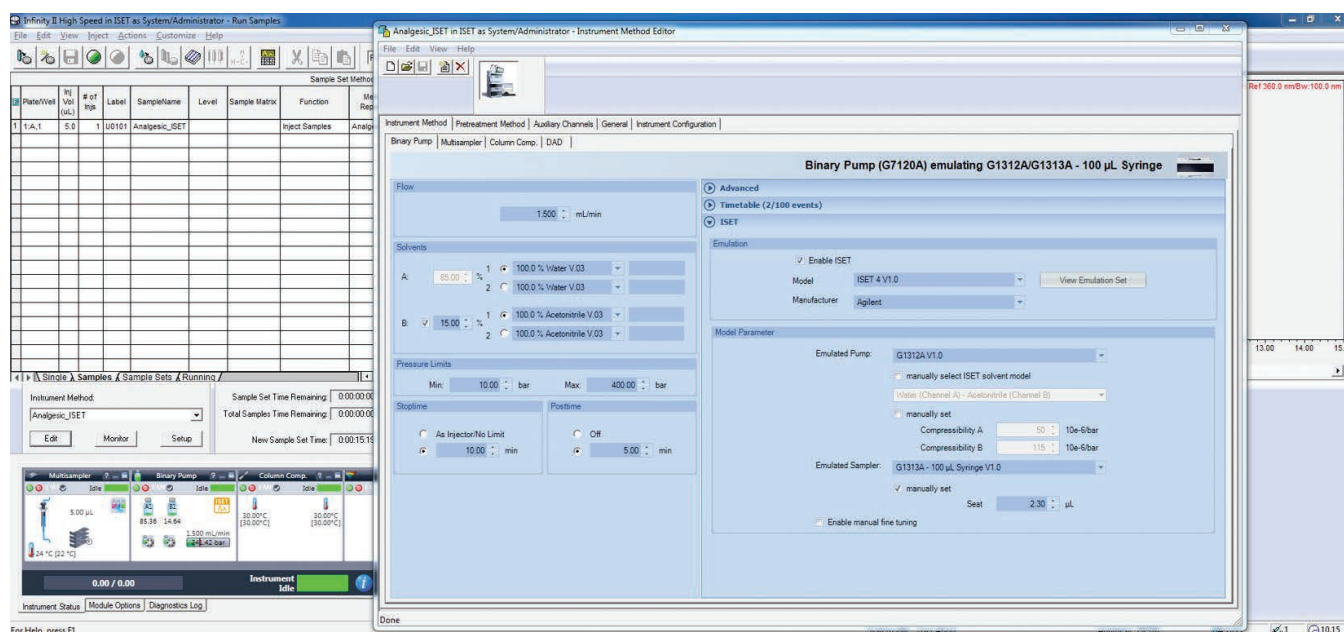


图 4. Empower 3 和 ICF 中启用 ISET 和泵方法界面的安捷伦仪器状态界面示例

参考文献

1. The Agilent Instrument Control Framework (ICF) (安捷伦仪器控制框架 (ICF))，安捷伦科技公司客户信函，出版号 5990-5756EN，**2010**
2. Agilent 1290 Infinity with ISET (采用 ISET 的 Agilent 1290 Infinity)，安捷伦科技公司用户使用手册，部件号 G4220-90313，**2014**
3. Huesgen, A. G. Seamless instrument-to-instrument method transfer from an Agilent 1100/1200 Series LC to an Agilent 1290 Infinity LC using Intelligent System Emulation Technology (ISET) (采用智能系统模拟技术 (ISET) 实现从 Agilent 1100/1200 系列液相色谱到 Agilent 1290 Infinity 液相色谱的无缝仪器间方法转移)，安捷伦科技公司技术概述，出版号 5990-9113EN，**2011**

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

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 3 月 1 日，中国出版
5991-6541ZHCN



Agilent Technologies