



采用带 ISET 功能的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统模拟 Waters Acquity H-Class 进行三元梯度分析

应用简报

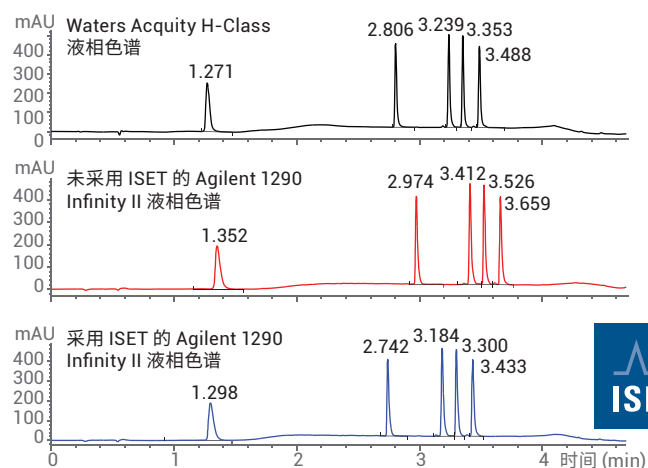
生物药物

作者

Sonja Schneider
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统内置的安捷伦智能系统模拟技术 (ISET) 可轻松地安捷伦与非安捷伦 HPLC 和 UHPLC 系统进行方法转移。本应用简报展示了 1290 Infinity II 液相色谱系统如何通过 ISET 模拟 Waters Acquity H-Class 系统的三元梯度进行多肽分析。与未采用 ISET 的系统相比，采用 ISET 的 1290 Infinity II 液相色谱系统实现了高于 97% 的一致性。



Agilent Technologies

前言

三氟乙酸 (TFA) 等改性剂常用于各种分离技术中以改善峰形和色谱分离度。改性剂浓度的细微变化会对保留时间以及分析物的分离度产生显著影响。通常, 这种色谱方法使用等度条件或使用流动相中已预先确定 TFA 含量的二元梯度条件进行。将 TFA 分配到单独的溶剂管线有助于优化方法, 无需配制多组流动相¹。

通常, 将分析方法从不同 HPLC 或 UHPLC 系统中进行转移时会出现问题, 这些问题是由混合行为差异以及延迟体积和过渡体积差异造成的。安捷伦智能系统模拟技术 (ISET) 可模拟不同的液相色谱系统, 实现不同仪器之间的无缝方法转移^{2,3}。无需更改原始方法即可进行无缝液相色谱方法转移, 得到相同的色谱分析结果。这使得用户在运行原先的方法时无需对仪器和原始方法做任何改动, 也让 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统成为真正能够运行其他 HPLC 和 UHPLC 方法的通用系统。此外, 用户还能够从 1290 Infinity II 液相色谱系统的宽分析能力范围与卓越性能中受益。

本应用简报介绍了采用配备 ISET 的 1290 Infinity II 液相色谱系统模拟 Waters Acquity H-Class 系统上的三元梯度, 使用水/乙腈流动相和改性剂 TFA 分离多肽。对色谱图进行比较, 评估采用和未采用 ISET 的 1290 Infinity II 液相色谱系统与 Waters Acquity H-Class 系统进行分析时的保留时间 (RT) 一致性。

实验部分

仪器

所有实验均在 Waters Acquity H-Class 系统和 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统中完成, 两台系统分别包括以下所列模块。

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统

- Agilent 1290 Infinity II 全能泵 (G7104A)
- 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 光程最大光强卡套式标准流通池

Waters Acquity Bio H-Class 系统

- Waters Bio 四元溶剂管理器
- Waters Bio 样品管理器 FTN

色谱条件

表 1. 色谱条件

参数	描述
流动相	A) 水 B) ACN C) 1% TFA
流速	0.5 mL/min
梯度	0 分钟 — 85% A, 5% B, 10% C 0.5 分钟 — 85% A, 5% B, 10% C 3 分钟 — 50% A, 40% B, 10% C 3.5 分钟 — 10% A, 80% B, 10% C 4 分钟 — 10% A, 80% B, 10% C 4.1 分钟 — 85% A, 5% B, 10% C 6.5 分钟 — 85% A, 5% B, 10% C
停止时间	6.5 分钟
针头清洗模式	标准清洗
进样量	0.2 µL
柱温	50 °C
二极管阵列检测器	214/4 nm, 参比波长 360/100 nm 峰宽 > 0.013 min (0.25 s 响应时间) 数据采集速率 20 Hz

- Waters 色谱柱管理器
- Waters TUV 检测器

色谱柱

Agilent Poroshell 120, EC-C18, 3.0 × 50 mm, 2.7 µm (部件号 699975-302)

软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版, 适用于 LC 和 LC/MS 系统, 修订版 C.01.07 [22, 带 ISET 4]

样品

HPLC 多肽混标

溶剂

所有溶剂均为液相色谱级。乙腈 (ACN) 购自德国 Merck 公司。新制超纯水产自配置 LC-Pak Polisher 和 0.22 µm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。三氟乙酸 (TFA) 和 HPLC 多肽混标购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, US)。

结果与讨论

使用三元梯度分析五种多肽的混合物，使用 1% TFA 作为改性剂并通过单独的溶剂管线 C 连续输送 10%，得到整个梯度中的 TFA 总浓度为 0.1%。将该方法分别用于 Waters Acquity H-Class 系统、未采用 ISET 的 1290 Infinity II 液相色谱系统以及采用 ISET 的 1290 Infinity II 液相色谱系统。图 1 显示了所有三幅色谱图以及在 1290 Infinity II 液相色谱系统上进行分离得到的保留时间精密度值（六次连续运行）。表 2 列出了所有五个峰的保留时间和保留时间偏差。

不采用 ISET 时，1290 Infinity II 液相色谱系统观察到明显的保留时间偏移，与 Waters Acquity H-Class 系统的保留时间相比，五个峰中有四个峰的偏差超过 5%。启用 ISET 后，保留时间与原色谱图具有良好的一致性。与未启用 ISET 的 1290 Infinity II 液相色谱系统相比，启用 ISET 后，所分析的所有化合物的保留时间偏差均小于 2.3%（表 2 右侧列）。ISET 规定的允许偏差为 5% 以下⁴。

结论

在模拟其他 HPLC 或 UHPLC 仪器时，Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统的 ISET 功能使用户无需调整仪器或修改方法即可运行现有方法，并能够获得高度一致的色谱图。使用单独的溶剂通道输送 1% 的 TFA 对五种多肽进行三元梯度分析所得到的结果证明了上述结论。将该方法从 Waters Acquity H-Class 系统转移到 1290 Infinity II 液相色谱系统。启用 ISET 时，保留时间一致性高达 97%，这使得 1290 Infinity II 液相色谱系统内置的 ISET 成为模拟非安捷伦液相色谱的三元梯度分析的理想解决方案。

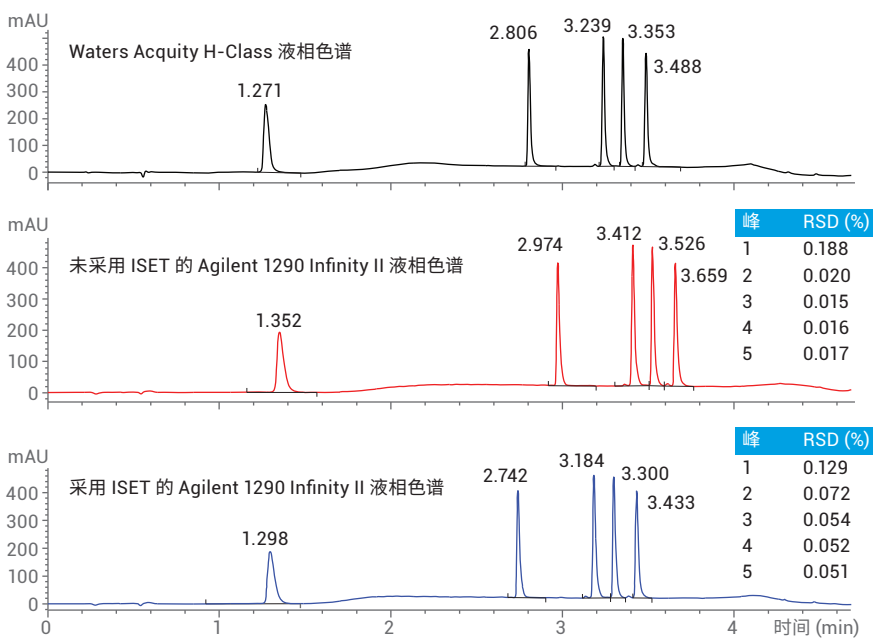


图 1. 将采用单独的 C 溶剂通道输送 1% TFA 的三元梯度方法从 Waters Acquity H-Class 系统转移至采用和未采用 ISET 的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统

表 2. 各个系统的保留时间以及将方法从 Waters Acquity H-Class 转移至采用和未采用 ISET 的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统后出现的偏差 (Dev.)

峰	Waters Acquity H-Class RT	Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统			
		未采用 ISET 时的 RT	采用 ISET 时的 RT	未采用 ISET 时的偏差	采用 ISET 时的偏差
1	1.271	1.352	1.298	-6.37	-2.12
2	2.806	2.974	2.742	-5.99	2.28
3	3.239	3.412	3.184	-5.34	1.70
4	3.353	3.526	3.3	-5.16	1.58
5	3.488	3.659	3.433	-4.90	1.58

参考文献

1. Gratzfeld-Huesgen, A., Fast and flexible optimization of buffer/modifier concentrations using ternary gradients with the Agilent 1260 Infinity LC Quaternary System (使用 Agilent 1260 Infinity 四元液相色谱系统通过四元梯度快速、灵活地优化缓冲液/改性剂浓度)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5990-6864EN，**2010**
2. Gratzfeld-Huesgen, A., Agilent 1290 Infinity Binary LC with ISET – Emulation of the Waters Alliance 2695 LC System Analyzing Analgesics (采用带 ISET 功能的 Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱系统模拟 Waters Alliance 2695 液相色谱系统分析镇痛药)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-2792EN，**2013**
3. Gratzfeld-Huesgen, A., 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 LC 的无缝仪器间方法转移)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5990-9113EN，**2011**
4. Agilent 1290 Infinity with ISET (带 ISET 功能的 Agilent 1290 Infinity)，用户手册，部件号 G4220-90314，**2015**

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 4 月 1 日，中国出版
5991-6715ZHCN



Agilent Technologies