

采用 Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案为各种 HPLC 系统开发通用分析方法

应用智能系统模拟技术 (ISET) 即时模拟目标系统

应用简报

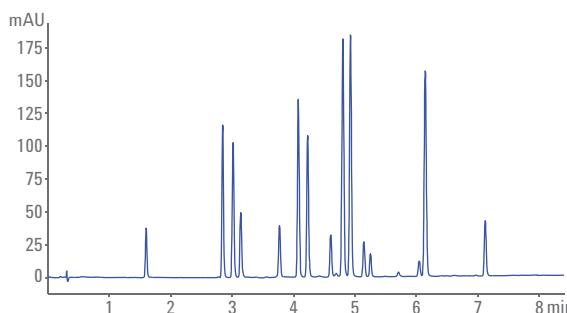
小分子药物

作者

Edgar Naegele 和 Andreas Borowiak
安捷伦科技有限公司
Waldbonn, Germany

摘要

本应用简报介绍了一种组合式的分析方法开发方案，其利用 Agilent ChemStation 方法筛选向导开发分析方法，然后采用安捷伦智能系统模拟技术 (ISET) 直接模拟目标 HPLC 系统，用以执行方法转移。本文所述的工作流程被成功应用于差异极大的目标系统（例如 Agilent 1100 系列液相色谱系统和 Waters Acquity UPLC H-Class 系统），证明该方案为只需使用一套母系统的通用分析方法开发方案。



Agilent Technologies

前言

如今，由于液相色谱系统的制造商或采用的技术各不相同，分析方法开发人员需要为不同部门甚至是同一个分析实验室开发多种液相色谱方法，这项工作极具挑战性。为了解决方法开发工作流程需要使用多种方法开发系统的问题，本应用简报介绍了一种组合式工作流程，其采用安捷伦智能系统模拟技术 (ISET) 将分析方法开发流程与即时目标系统模拟相结合。理想情况下，分析人员可将 Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案作为母系统为不同目标系统开发分析方法，无需手动进行系统更换，也无需使用只能处理有限数量目标液相色谱运行的专用分析方法开发系统。

在之前发表的工作流程中，我们通过筛选流动相和色谱柱开发了 UHPLC 方法，随后将其转移至标准 HPLC 条件，并对目标液相色谱系统进行了 ISET 模拟¹。相比之下，本应用简报介绍的工作流程应用 1290 Infinity II 方法开发解决方案和目标液相色谱系统的 ISET 模拟直接为目标系统开发分析方法。图 1 为该工作流程的概述图。首先，在 ISET 条件下筛选色谱柱、溶剂和温度，选出合适的方法。初筛之后需对方法进行精细筛选，进一步优化分离度和运行时间最优的分离方法。确定合适的分离分析方法之后，将该方法转移至目标系统，通过多次进样测试方法的稳定性。

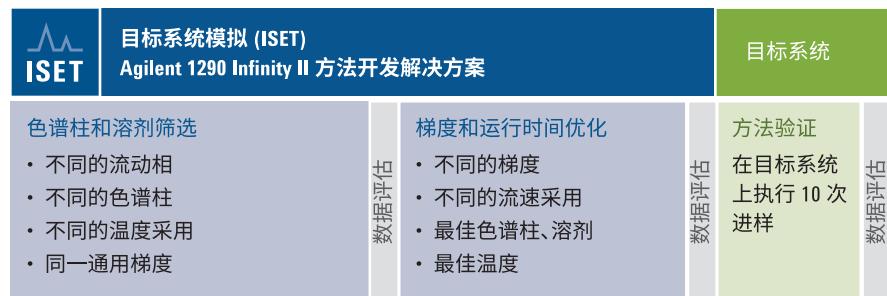


图 1. 将 Agilent ChemStation 方法筛选向导与安捷伦智能系统模拟技术 (ISET) 相结合，用于直接为特定目标系统开发色谱方法的通用工作流程

本应用简报介绍了一套工作流程，其将 Agilent ChemStation 方法筛选向导与 ISET 相结合，用于为特定目标系统直接开发分析方法。结果表明，使用一套硬件设置可以为差异极大的目标系统（如 Agilent 1100 系列液相色谱系统和 Waters Acquity UPLC H-Class 系统）开发分析方法。为了测试该工作流程，我们使用含有 15 种化合物的复杂样品进行方法开发，并比较了使用 Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案和所选目标系统运行所得分析方法的等效性。

实验部分

仪器

Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案包括以下模块：

- 启用 ISET 的 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)
- Agilent 6140 单四极杆液质联用系统 (G6140B)

此外，如需进行自动化方法开发，需使用以下部件运行 1290 Infinity II 方案开发解决方案：

- Agilent InfinityLab Quick Change 快速更换 8 色谱柱选择阀 (G4239C)
- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A) 和 InfinityLab Quick Change 快速更换 12 位/13 通阀 (G4235A)
- 低扩散毛细管工具包，内径 0.12 mm，部件号 5067-4248

仪器设置

1290 Infinity II 全能泵与 InfinityLab Quick Change 快速更换 12 位/13 通阀集成，用于在 Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版仪器配置中进行溶剂选择。在 ChemStation 的泵设置对话框中定义溶剂。Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (MCT) 配备 InfinityLab Quick Change 快速更换 8 色谱柱选择阀，并集成在 ChemStation 仪器配置中。所有色谱柱都配有色谱柱 ID 标签（部件号 5067-5917），以便 ChemStation 自动识别色谱柱，并在 ChemStation MCT 对话框进行色谱柱分配。使用方法筛选向导自动创建色谱柱、梯度筛选方法以及仪器冲洗和色谱柱平衡方法。采用 ISET 技术模拟目标系统。

Agilent 1100 系列液相色谱系统包括以下模块：

- Agilent 1100 系列四元泵 (G1311A)
- Agilent 1100 系列脱气机 (G1379A)
- Agilent 1100 系列标准自动进样器 (G1329A)
- Agilent 1100 系列柱温箱 (G1316A)
- Agilent 1100 系列二极管阵列检测器 (G1315B)

Waters Acquity UPLC H-Class 系统包括以下模块：

- Acquity UPLC H-Class Bio 四元溶剂管理器
- Acquity UPLC Bio 样品管理器 (FTN)
- Acquity UPLC 色谱柱管理器
- Acquity UPLC TUV 检测器

软件

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation, LC 和 LC/MS 系统版, 版本 C.01.07, 附带 Agilent ChemStation 方法筛选向导 A02.06 版
- Agilent OpenLab CDS 2.1 版, 用于控制 Waters Acquity H-Class 系统

色谱柱

以 Agilent 1100 系列液相色谱系统为目标系统时：

- Agilent InfinityLab Poroshell EC-C18, 2.1 × 100 mm, 1.9 μm, 部件号 695675-902
- Agilent InfinityLab Poroshell EC-C8 USP L7, 4.6 × 150 mm, 2.7 μm, 部件号 683975-902
- Agilent InfinityLab Poroshell Bonus-RP USP L60, 4.6 × 150 mm, 2.7 μm, 部件号 693968-901
- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 150 mm, 3.5 μm, 部件号 959963-902

以 Waters Acquity UPLC H-Class 为目标系统时：

- Agilent InfinityLab Poroshell EC C18, 2.1 × 100 mm, 1.9 μm, 部件号 695675-902
- Agilent InfinityLab Poroshell EC PFP, 2.1 × 100 mm, 1.9 μm, 部件号 695675-408
- Agilent InfinityLab Poroshell EC Phenyl-Hexyl, 2.1 × 100 mm, 1.9 μm, 部件号 695675-912
- Agilent InfinityLab Poroshell EC C8, 2.1 × 100 mm, 1.9 μm, 部件号 695675-906

最终方法

系统	Agilent 1100 系列液相色谱系统	Waters Acquity UPLC H-Class
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 150 mm, 3.5 μm	Agilent InfinityLab Poroshell EC PFP, 2.1 × 100 mm, 1.9 μm
温度	40 °C	40 °C
溶剂	A) 水, 含 0.1% (v:v) 甲酸 B) 乙腈, 含 0.1% (v:v) 甲酸	A) 水, 含 0.1% (v:v) 甲酸 B) 乙腈, 含 0.1% (v:v) 甲酸
流速	1.7 mL/min	0.85 mL/min
梯度	0 min 时 10% B, 11.5 min 时 49% B, 17 min 时 55% B	0 min 时 10% B, 7.5 min 时 47% B, 7.6 min 时 10% B
停止时间	17 min	9.5 min
后运行时间	3 min	无
紫外检测	254/10 nm, 参比 360/100 nm, 数据采集速率 20 Hz	

样品

使用含 15 种农药和药物的复杂混合物作为测试样品。将各种化合物溶于乙腈 (1 mg/mL) 中，然后等量混合。表 1 列出了这些化合物及其分子式和质量。

化学品

所有溶剂均为 HPLC 级，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。所有化学品均购自德国 Sigma-Aldrich 公司。

结果与讨论

目标系统：

Agilent 1100 系列液相色谱系统

以 Agilent 1100 系列液相色谱系统为目标系统开发复杂样品分离方法的初始方法开发过程采用 Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案进行，使用方法筛选向导和 ISET 技术筛选色谱柱、溶剂和温度。此筛选方案使用四根标准 HPLC 色谱柱（参见“实验部分”），两种溶剂（甲醇和乙腈）以及三种温度（30 °C、40 °C 和 50 °C）。初始通用梯度为有机溶剂在 30 分钟内从 5% 升至 70%。图 2 所示为采用初始方法筛选向导进行筛选后，复杂测试样品的最佳分离结果。

表 1. 测试样品（每种化合物的 1 mg/mL 乙腈溶液混合物）的组成

名称	化学式	<i>m/z</i> [M+H] ⁺
脱乙基莠去津	C ₆ H ₁₀ ClN ₅	188.06
甲氧隆	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	229.07
环嗪酮	C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₂	253.16
脱乙基特丁津	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	202.08
噻唑隆	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ OS	222.06
绿麦隆	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O	213.08
莠去津	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	216.10
敌草隆	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	233.02
溴谷隆	C ₉ H ₁₁ BrN ₂ O ₂	259.00
吡唑草胺	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O	278.10
硝苯地平	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₆	347.10
另丁津	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	230.11
特丁津	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	230.11
利谷隆	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	249.02
尼莫地平	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₇	419.18

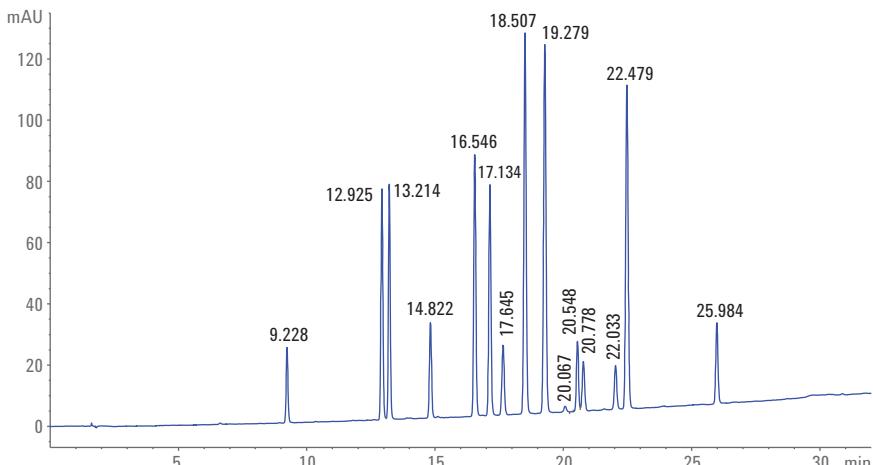


图 2. 复杂测试样品的最佳分离结果，采用 Agilent ChemStation 方法筛选向导筛选方案初筛所得的方法获得。在模拟所选目标液相色谱系统（Agilent 1100 系列液相色谱系统）的 ISET 条件下运行此筛选方案

为了优化该方法，将有机相的初始比例设为 10%，停止时间和比例设为最后一个组分洗脱后 30 秒。采用第二个方案对该方法进行优化，其中梯度斜率和流速均以 10% 的固定比率增加，分别用于优化流速和梯度时间。为了优化最终色谱图中 12.037 和 12.156 分钟处洗脱的关键化合物对的分离度，我们降低了第 11.5 分钟至第 17 分钟（运行结束时间）之间的梯度斜率。在最终方法中，采用分离速度和关键化合物对之间的分离度取得平衡的最适条件（图 3）。

为了在方法开发和优化过程中鉴定化合物，采用单四极杆质谱仪追踪化合物质量。经过最终优化的方法被直接转移至目标系统（1100 系列液相色谱系统），并进行了 10 次重复进样（图 4）。

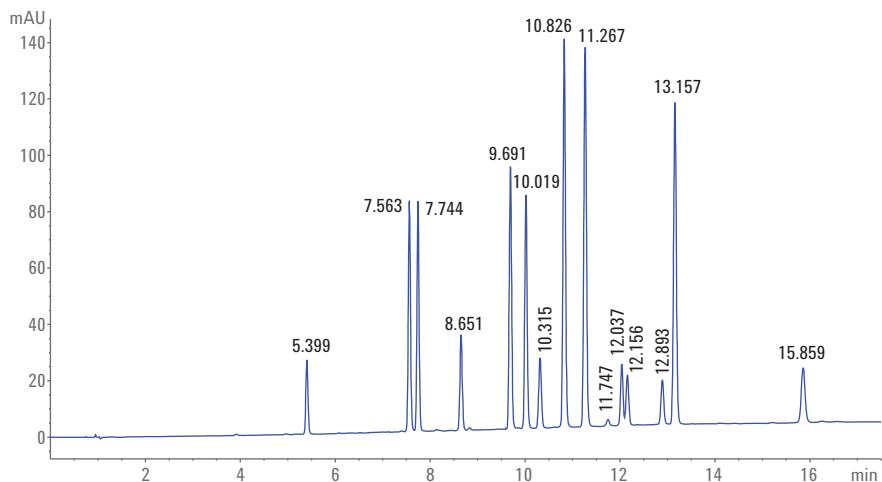


图 3. 复杂测试样品的最佳分离结果，采用经 Agilent ChemStation 方法筛选向导精细筛选方案优化的方法获得。在模拟所选目标液相色谱系统（Agilent 1100 系列液相色谱系统）的 ISET 条件下运行此筛选方案

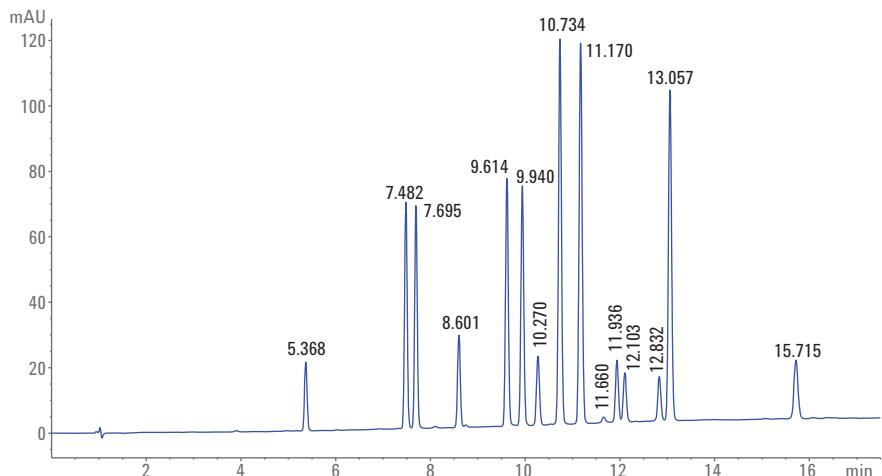


图 4. 在目标系统（Agilent 1100 系列液相色谱系统）上获得的最终分离结果

评估目标系统重复运行的结果显示，保留时间的典型标准偏差小于等于 0.003 分钟。相应的 RSD 值普遍低于 0.03 °C。方法开发系统和目标系统之间的保留时间差异普遍低于 1%（表 2）。

和图 5）。第一步大规模筛选方案用时约 35 小时，优化步骤用时约 8 小时，在目标系统上进行的评估用时约 5 小时，因此完整的方法开发总共耗时约 48 小时。

表 2. Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案和目标系统（Agilent 1100 系列液相色谱系统）所得的保留时间、标准偏差和 RSD 值比较（ \bar{t} = 保留时间， \bar{x} = 平均值， σ = 标准偏差，RSD = 相对标准偏差）

编号	化合物	Agilent 1100 系列 液相色谱系统	Agilent 1100 系 列液相色谱系统	Agilent 1100 系 列液相色谱系统	Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方 案	Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方 案	Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方 案	Δt (%)
		\bar{x} (tr) (min)	σ (tr) (min)	RSD (%)	\bar{x} (tr) (min)	σ (tr) (min)	RSD (%)	Δt (%)
1	脱乙基莠去津	5.365	0.002	0.035	5.401	0.002	0.037	0.7
2	甲氧隆	7.479	0.003	0.037	7.565	0.002	0.027	1.1
3	环嗪酮	7.692	0.003	0.037	7.745	0.001	0.016	0.7
4	脱乙基特丁津	8.599	0.002	0.027	8.653	0.002	0.022	0.6
5	噻唑隆	9.613	0.002	0.023	9.692	0.002	0.020	0.8
6	绿麦隆	9.939	0.002	0.023	10.021	0.002	0.019	0.8
7	莠去津	10.269	0.002	0.020	10.316	0.002	0.016	0.5
8	敌草隆	10.734	0.002	0.017	10.827	0.002	0.023	0.9
9	溴谷隆	11.170	0.002	0.020	11.269	0.003	0.024	0.9
10	吡唑草胺	11.658	0.003	0.023	11.748	0.002	0.016	0.8
11	硝苯地平	11.935	0.003	0.025	12.039	0.002	0.017	0.9
12	另丁津	12.103	0.002	0.019	12.158	0.002	0.016	0.5
13	特丁津	12.833	0.002	0.019	12.895	0.002	0.016	0.5
14	利谷隆	13.058	0.003	0.020	13.159	0.003	0.020	0.8
15	尼莫地平	15.718	0.004	0.027	15.861	0.003	0.019	0.9

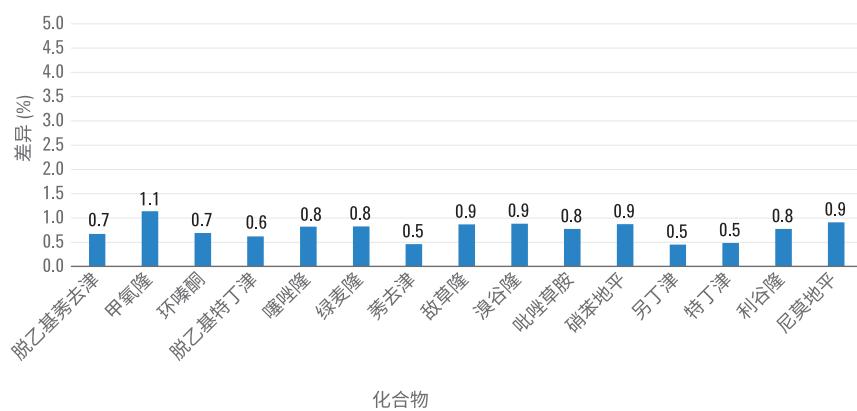


图 5. 采用目标系统（Agilent 1100 系列液相色谱系统）和 Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案分离各化合物的保留时间差异

目标系统：

Waters Acquity UPLC H-Class

使用粒径较小的 (1.9 μm) Agilent InfinityLab Poroshell 色谱柱开发以 Waters H-Class 系统为目标系统的分离方法。选用 C8、C18、phenyl-hexyl 和 pentafluorophenyl (PFP) 固定相色谱柱进行初筛。这些色谱柱具有适用于 UHPLC 仪器的典型尺寸 ($2.1 \times 100 \text{ mm}$)。以甲醇和乙腈为有机溶剂运行初始方案，并测试三种不同的温度。初始通用梯度时长为 20 分钟，有机溶剂比例从 5% 升至 70%。与预期结果相同，C8 和 C18 填料色谱柱的分离效果与传统液相色谱方法相当（数据未显示）。出人意料的是，相较于 C8 和 C18 固定相色谱柱，PFP 固定相色谱柱的化合物洗脱时间明显提前，而且选择性也略有不同（图 6）。

由于所有化合物都已实现分离，最后一个峰在保留时间 12 分钟处即洗脱，我们选择了该分离方法进行优化。在第二步优化过程中，通过测试不同的流速和梯度，让 PFP 色谱柱以更短的运行时间和最佳分离度分离农药样品。最后，经过优化的方法以 0.85 mL/min 的流速和 10% 到 47% 乙腈梯度在 7.4 分钟即可实现化合物分离（图 7）。

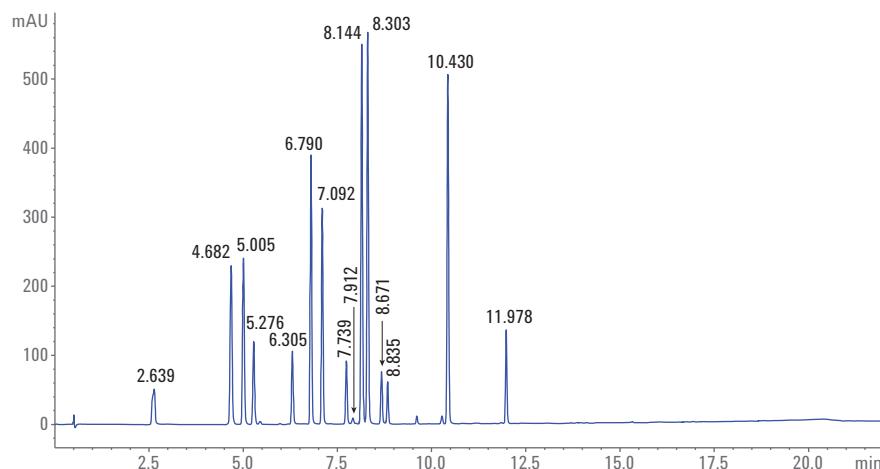


图 6. 采用 20 分钟内乙腈从 5% 升至 70% 的梯度和 40 °C 的柱温，在 PFP 色谱柱上分离农药样品所得的结果。在模拟所选目标液相色谱系统 (Waters H-Class) 的 ISET 条件下运行此筛选方案

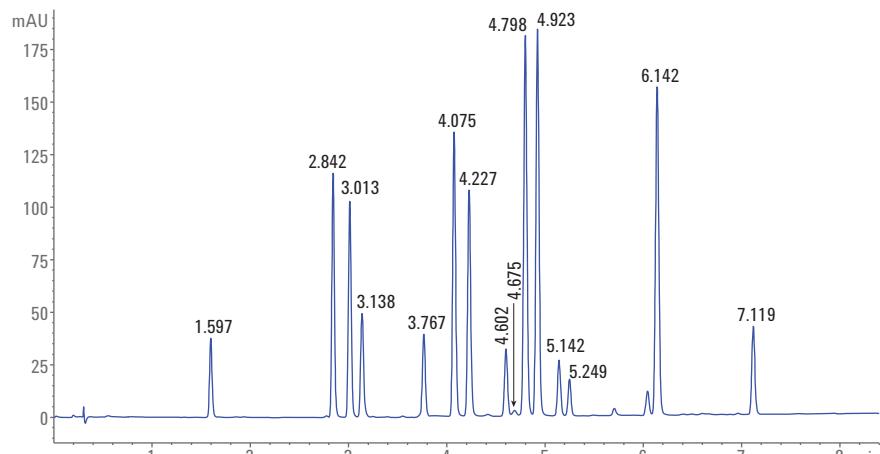


图 7. 采用 7.4 分钟内乙腈从 10% 升至 47% 的梯度和 40 °C 的柱温，在 PFP 色谱柱上对农药样品进行最终优化分离的结果。在模拟所选目标液相色谱系统 (Waters H-Class) 的 ISET 条件下运行此筛选方案

将该方法直接转移至目标系统（Waters H-Class 系统）进行评估。对比 1290 Infinity II 方法开发系统（图 7）和 Waters H-Class 系统（图 8）获得的色谱图可确定保留时间。

通过 10 次重复运行进行统计评估。评估结果表明，保留时间的典型标准偏差低于 0.01 分钟。由于保留时间较短，相应的 RSD 值普遍低于 0.2%。开发系统与目标系统之间的保留时间差异普遍低于 2%（表 3 和图 9）。完整的方法开发大约需要 37 小时。

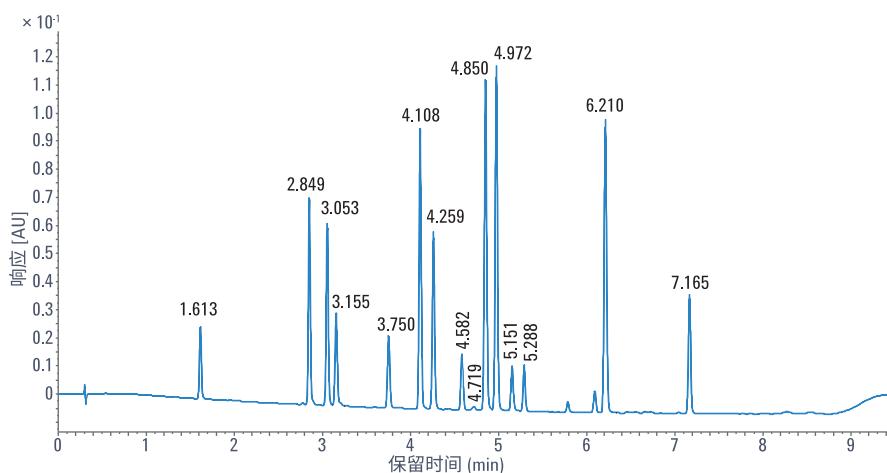


图 8. 农药样品在 Waters H-Class 系统上的最终优化分离结果，方法条件如下：使用 PFP 色谱柱，梯度为 7.4 分钟内乙腈从 10% 升至 47%，流速为 0.85 mL/min，柱温 40 °C

表 3. Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案和目标系统（Waters H-Class 液相色谱系统）所得的保留时间、标准偏差和 RSD 值比较（ \bar{t}_r = 保留时间， \bar{x} = 平均值， σ = 标准偏差，RSD = 相对标准偏差）

编号	化合物	Waters	Waters	Waters	Agilent 1290 Infinity II	Agilent 1290 Infinity II	Agilent 1290 Infinity II	Δt_r (%)
		H-Class \bar{x} (t_r) (min)	H-Class σ (t_r) (min)	H-Class RSD (%)	方法开发解决方案 \bar{x} (t_r) (min)	方法开发解决方案 σ (t_r) (min)	方法开发解决方案 RSD (%)	
1	脱乙基莠去津	1.616	0.004	0.220	1.587	0.003	0.164	-1.8
2	环嗪酮	2.852	0.003	0.105	2.833	0.004	0.159	-0.6
3	甲氧隆	3.056	0.003	0.112	2.997	0.005	0.161	-1.9
4	脱乙基特丁津	3.157	0.003	0.101	3.126	0.005	0.168	-1.0
5	莠去津	3.753	0.003	0.070	3.764	0.005	0.132	0.3
6	噻唑隆	4.110	0.003	0.062	4.062	0.005	0.113	-1.2
7	绿麦隆	4.261	0.002	0.055	4.213	0.005	0.114	-1.1
8	另丁津	4.585	0.002	0.046	4.601	0.005	0.104	0.3
9	吡唑草胺	4.734	0.041	0.871	4.676	0.005	0.104	-1.2
10	溴谷隆	4.864	0.038	0.788	4.781	0.006	0.122	-1.7
11	敌草隆	5.992	0.055	1.101	4.908	0.005	0.097	-1.7
12	特丁津	5.166	0.043	0.824	5.137	0.005	0.100	-0.6
13	硝苯地平	5.340	0.150	2.806	5.240	0.005	0.089	-1.9
14	利谷隆	6.212	0.001	0.024	6.121	0.006	0.105	-1.5
15	尼莫地平	7.167	0.001	0.016	7.108	0.005	0.066	-0.8

结论

本应用简报介绍了采用 Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案和 Agilent ChemStation 方法筛选向导，并借助 ISET 控制为特定目标系统直接开发分析分离方法的方案。使用该方案成功开发了以 Agilent 1100 系列液相色谱系统和 Waters Acquity UPLC H-Class 系统为目标系统的复杂样品分离方法。对于这两套系统，采用 Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案开发的方法在开发系统和目标系统上的运行结果均表现出优异的相关性。保留时间偏差普遍低于 2%。采用 1290 Infinity II 方法开发解决方案进行方法开发并在目标系统上进行评估所需的时间通常为两天或更短。

参考文献

1. Huesgen, A. G. Fast screening of mobile and stationary phases with the Agilent 1290 Infinity LC and seamless method transfer to an Agilent 1200 Series LC using ISET (通过 Agilent 1290 Infinity LC 对流动相与固定相进行快速筛选并利用 ISET 实现到 Agilent 1200 系列液相色谱的无缝方法转移)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-0989EN, 2012

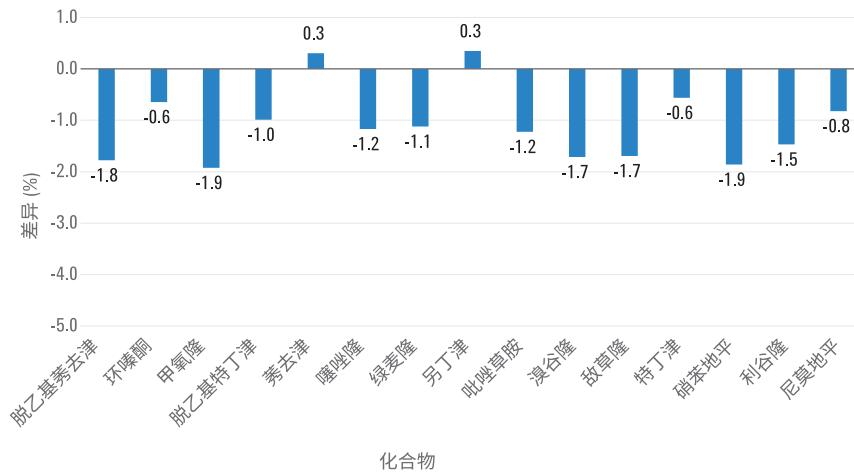


图 9. 采用目标系统（Waters H-Class 系统）和 Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案分离各化合物的保留时间差异

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, 2017
2017年3月1日, 中国出版
5991-7794CHCN



Agilent Technologies