

Sistema LC Agilent 1260 Infinity II Prime con tecnologia ISET

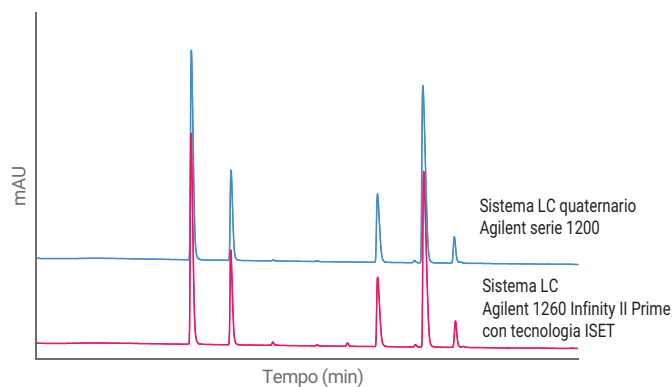
Emulazione del sistema LC quaternario Agilent serie 1200 per l'analisi dei farmaci antistaminici

Autori

Clarissa Dickhut e
Melanie Metzlaff
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

Abstract

La tecnologia ISET (Intelligent System Emulation) di Agilent consente di trasferire in modo semplice i metodi analitici dai sistemi LC di tipo convenzionale, come il sistema LC quaternario Agilent serie 1200, al sistema LC Agilent 1260 Infinity II Prime. Questa nota applicativa illustra i benefici della tecnologia ISET per l'analisi di cinque farmaci antistaminici. I tempi di ritenzione e la risoluzione dei differenti esperimenti sono stati valutati e confrontati con i dati originali ottenuti con il sistema LC quaternario serie 1200. Attivando la tecnologia ISET è stato ottenuto un eccellente accordo tra i due sistemi.



Introduzione

Il trasferimento di un metodo analitico da un sistema HPLC convenzionale a un sistema UHPLC, come il sistema LC Agilent 1260 Infinity II Prime, è per molti laboratori un aspetto di importanza notevole e spesso critica, specialmente negli ambienti regolamentati. I sistemi UHPLC hanno volumi di ritardo inferiori rispetto ai sistemi HPLC convenzionali e generalmente presentano comportamenti di miscelazione dalle pompe differenti. Queste caratteristiche possono dare come effetto tempi di ritenzione (RT) e risoluzione differenti nel trasferimento dei metodi da strumento a strumento. Per evitare la nuova validazione di metodi analitici precedenti, dispendiosa in termini di tempo e di denaro, è possibile impiegare un tempo di attesa isocratico all'inizio dell'analisi oppure installare un volume di ritardo aggiuntivo¹. Con questo tipo di approccio tuttavia si tiene conto soltanto delle differenze di volume di ritardo e non delle differenze nel comportamento di miscelazione delle due pompe analitiche.

La tecnologia ISET (Intelligent System Emulation) di Agilent offre un semplice trasferimento dei metodi e fornisce risultati cromatografici simili². Attivando la tecnologia ISET è possibile compensare le differenze dei volumi di ritardo e del comportamento di miscelazione delle pompe senza alcuna alterazione del metodo analitico o modifica del sistema LC.

Questa nota applicativa descrive la separazione di una miscela di cinque farmaci antistaminici. Per prima cosa è stata analizzata la miscela di farmaci con un sistema LC quaternario Agilent serie 1200. Quindi è stato trasferito il metodo analitico a un sistema LC Agilent 1260 Infinity II Prime e si sono effettuati gli esperimenti con e senza la funzionalità ISET. In un altro esperimento è stata utilizzata l'opzione di calibrazione fine della tecnologia ISET per mostrare in che modo sia possibile ottimizzare ulteriormente il trasferimento del metodo analitico. I tempi di ritenzione e la risoluzione sono stati valutati e confrontati con i risultati del sistema LC quaternario serie 1200.

Condizioni sperimentali

Strumenti

Per l'analisi dei farmaci antistaminici sono stati utilizzati gli strumenti sotto elencati.

Sistema LC quaternario Agilent serie 1200:

- pompa quaternaria Agilent serie 1200 (G1311A)
- autocampionatore Agilent serie 1200 (G1329A)
- comparto colonna termostata Agilent serie 1200 (G1316A)
- rivelatore a serie di diodi Agilent serie 1200 (G1315D)

Sistema LC Agilent 1260 Infinity II Prime:

- pompa Flexible Agilent 1260 Infinity II (G7104C)
- multicampionatore Agilent 1260 Infinity II (G7167A), con refrigeratore del campione integrato (opzione n.100)
- termostato multicolonna Agilent 1260 Infinity II (G7116A)
- rivelatore a serie di diodi Agilent 1260 II (G7117C)

Software

Agilent OpenLab CDS 2.2 (M8413A)

Campione

Miscela di cinque farmaci antistaminici, ognuno con una concentrazione di 150 ng/μL: triplennamina, clorfeniramina, tetracaina, prometazina e cetirizina (in ordine di eluizione).

Prodotti chimici

Tutti i solventi utilizzati sono di grado LC. Acqua ultra pura fresca è stata ottenuta da un sistema Milli-Q integrato equipaggiato con una cartuccia per punto d'uso (Millipak) con membrana da 0,22-μm. I farmaci antistaminici sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA.

Tabella 1. Parametri cromatografici per l'analisi della miscela di farmaci antistaminici.

Parametro	Valore
Colonna	Agilent ZORBAX SB C18, 4,6 × 75 mm, 3,5 μm (codice 866953-902)
Fase mobile	A) TFA 0,1% in acqua B) acetonitrile
Flusso	0,8 mL/min
Gradiente	Da 10 a 55%B in 10 minuti
Tempo finale	12 minuti
Tempo post analisi	5 minuti
Volume di iniezione	5 μL con lavaggio dell'ago di 3 secondi (acetonitrile 50% in acqua)
Temperatura della colonna	25 °C
Rivelazione	232/8 nm, rif. disattivato, 20 Hz

Risultati e discussione

I cinque farmaci antistaminici sono stati analizzati con un metodo analitico convenzionale su di un sistema LC quaternario serie 1200 utilizzando una colonna da 4,6 × 75 mm impaccata con particelle da 3,5 µm. Per prima cosa il metodo analitico è stato trasferito al sistema LC 1260 Infinity II Prime senza attivare la tecnologia ISET. Come atteso, i tempi di ritenzione di tutti e cinque gli analiti hanno subito una diminuzione. Successivamente è stata attivata la funzionalità ISET. La figura 1 mostra la sovrapposizione tra il cromatogramma originale acquisito con il sistema LC quaternario serie 1200 e i due cromatogrammi ottenuti con il sistema LC 1260 Infinity II Prime con e senza tecnologia ISET.

Con l'utilizzo della tecnologia ISET, i tempi di ritenzione (RT) dei farmaci antistaminici sono risultati in accordo con quelli del cromatogramma originale, presentando una variazione del valore di RT inferiore a 3%, che rientra ampiamente nella specifica di 5% della tecnologia ISET². I valori di RT ottenuti senza utilizzare la tecnologia ISET presentano invece variazioni comprese tra 5 e 11% circa.

Per ottimizzare ulteriormente l'accordo tra i tempi di ritenzione è stata attivata la funzione di calibrazione fine della tecnologia ISET. Un offset del volume di ritardo di -50 µL ha provocato lo spostamento di tutti i picchi a tempi di ritenzione leggermente inferiori. La figura 2 mostra la sovrapposizione tra il cromatogramma originale e due cromatogrammi acquisiti con il sistema LC 1260 Infinity II Prime utilizzando la tecnologia ISET con e senza calibrazione fine.

Come conseguenza dell'impiego della funzione di calibrazione fine, i tempi di ritenzione dei cinque farmaci antistaminici risultano in accordo con quelli del cromatogramma originale, con variazioni dei valori di RT inferiori a 0,5%. La tabella 2 mostra una panoramica dei tempi di ritenzione ottenuti negli esperimenti.

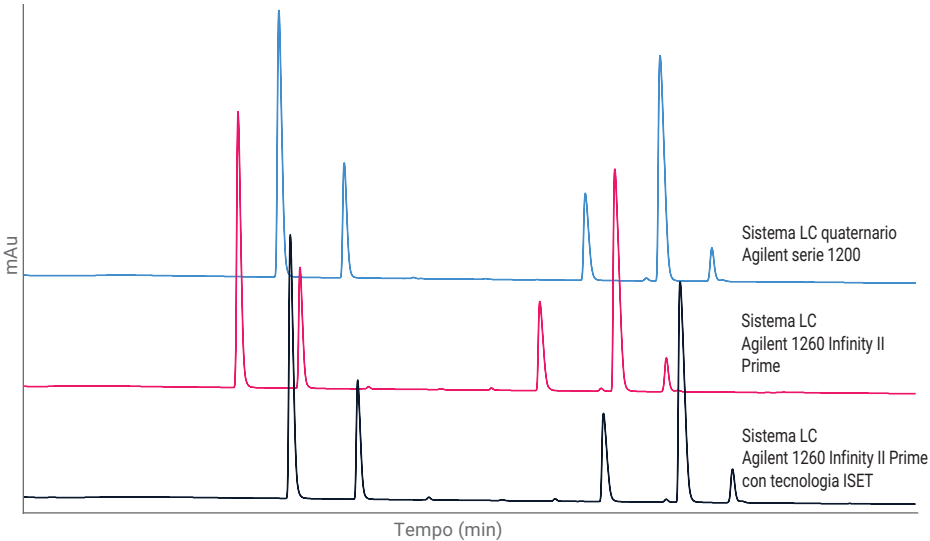


Figura 1. Analisi di farmaci antistaminici con il sistema LC quaternario Agilent serie 1200 (blu), seguita dal trasferimento del metodo analitico al sistema LC Agilent 1260 Infinity II senza tecnologia ISET (rosso) e con tecnologia ISET (nero).

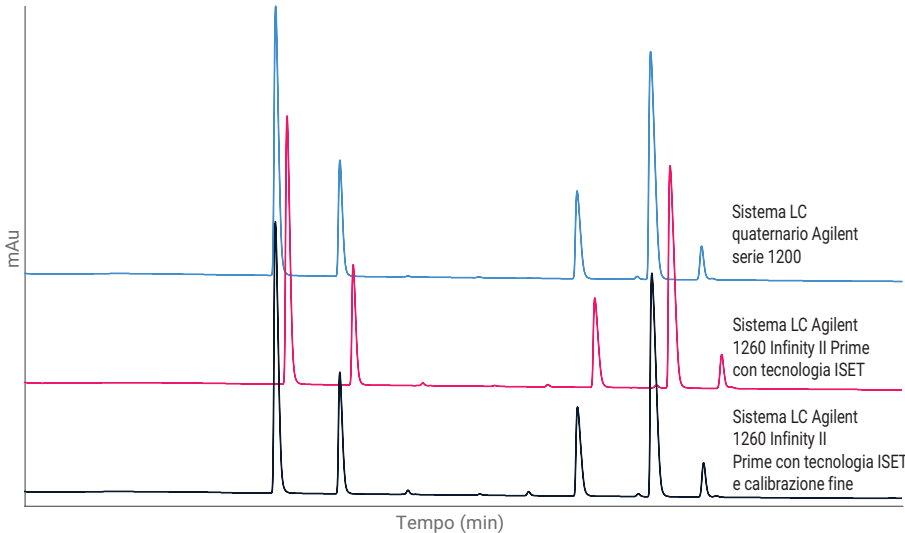


Figura 2. Sovrapposizione dei cromatogrammi ottenuti dall'analisi di farmaci antistaminici utilizzando un sistema LC quaternario Agilent serie 1200 (blu), un sistema LC Agilent 1260 Infinity II Prime con tecnologia ISET (rosso) e un sistema LC Agilent 1260 Infinity II Prime con tecnologia ISET e calibrazione fine (nero).

Tabella 2. Tempi di ritenzione (RT) dei differenti farmaci antistaminici analizzati utilizzando un sistema LC quaternario Agilent serie 1200 e un sistema Agilent 1260 Infinity II Prime senza tecnologia ISET, con tecnologia ISET e con tecnologia ISET e calibrazione fine.

Sistema LC quaternario Agilent serie 1200	Sistema LC Agilent 1260 Infinity II Prime		
	RT (min)	RT con ISET (min)	RT con ISET e calibrazione fine (min)
4,51	4,02	4,64	4,50
5,28	4,75	5,43	5,27
8,11	7,58	8,33	8,13
8,99	8,46	9,23	9,02
9,60	9,06	9,84	9,64

La figura 3 mostra le variazioni dei valori di RT stimati.

La precisione dei tempi di ritenzione e delle aree e la risoluzione del sistema LC quaternario serie 1200 sono stati confrontati con quelli del sistema LC 1260 Infinity II Prime con tecnologia ISET e calibrazione fine. Per valutare tali valori sono state effettuate 10 analisi consecutive su entrambi i sistemi LC (Tabella 3). Entrambi i sistemi hanno mostrato eccellenti valori di precisione, mentre le prestazioni relative alla precisione dell'area e al tempo di ritenzione del sistema LC 1260 Infinity II sono state leggermente migliori.

Conclusione

La tecnologia ISET (Intelligent System Emulation) di Agilent consente di trasferire in modo semplice i metodi analitici da un sistema HPLC convenzionale al sistema LC Agilent 1260 Infinity II Prime. La funzionalità ISET è semplice da utilizzare e consente di ottenere cromatogrammi quasi identici senza effettuare alcuna modifica dello strumento o alterazione del metodo analitico. Un metodo analitico convenzionale per l'analisi dei farmaci antistaminici è stato trasferito dal sistema LC quaternario Agilent serie 1200 al sistema LC 1260 Infinity II Prime. Attivando la funzionalità ISET e utilizzando l'opzione di calibrazione fine per il sistema LC 1260 Infinity II Prime, è stato ottenuto un eccellente accordo tra i tempi di ritenzione, con una variazione inferiore a 0,5%. Inoltre, con il trasferimento del metodo analitico, la precisione dei tempi di ritenzione e delle aree è migliorata e il sistema LC 1260 Infinity Prime ha dimostrato prestazioni di eccellenza.

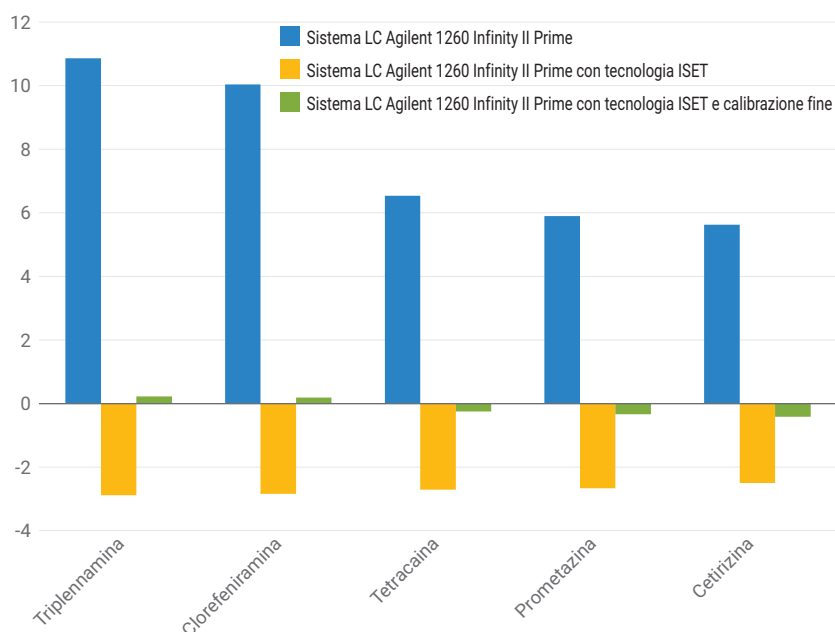


Figura 3. Variazione del tempo di ritenzione tra un sistema LC Agilent serie 1200 e un sistema LC Agilent 1260 Infinity II Prime, con e senza tecnologia ISET e calibrazione fine aggiuntiva.

Tabella 3. Confronto tra la precisione di tempo di ritenzione e area e tra la risoluzione di un sistema LC quaternario Agilent serie 1200 e quella di un sistema LC Agilent 1260 Infinity II Prime.

	RSD RT (%)		RSD Area (%)		Risoluzione	
	Sistema LC quaternario Agilent serie 1200	Sistema LC Agilent 1260 Infinity II Prime	Sistema LC quaternario Agilent serie 1200	Sistema LC Agilent 1260 Infinity II Prime	Sistema LC quaternario Agilent serie 1200	Sistema LC Agilent 1260 Infinity II Prime
Triplennamina	0,06	0,03	0,091	0,052	–	–
Clorefeniramina	0,05	0,03	0,111	0,052	8,06	8,34
Tetracaina	0,02	0,03	0,139	0,052	27,78	28,56
Prometazina	0,02	0,02	0,095	0,074	7,05	7,24
Cetirizina	0,02	0,01	0,135	0,072	5,47	5,59

Bibliografia

1. Gratzfeld-Huesgen, A. Transferring methods to the Agilent 1290 Infinity LC using Intelligent System Emulation Technology (ISET) – Analysis of metoclopramide hydrochloride and its impurities, *nota applicativa di Agilent Technologies*, codice pubblicazione 5990-9692EN, **2014**.
2. Agilent 1290 Infinity II with ISET, *Agilent Technologies User Manual*, codice G4220-90313, **2015**.

www.agilent.com/chem

Solo per scopi di ricerca. Non utilizzabili per procedure diagnostiche.

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.