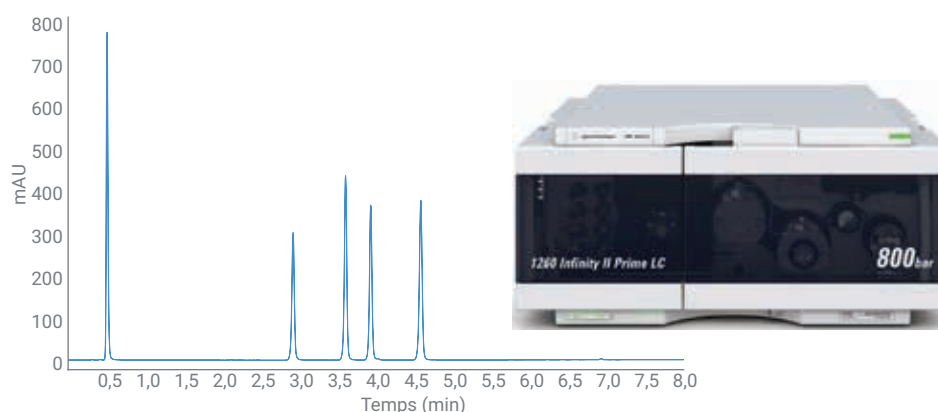


Pompe flexible Agilent 1260 Infinity II

La référence en termes d'exactitude et de précision pour les pompes à gradient basse pression



Auteurs

Melanie Metzlauff et
Patric Hörth
Agilent Technologies, Inc.

Résumé

La pompe flexible Agilent 1260 Infinity II offre une flexibilité de fonctionnement maximale pour les applications conventionnelles sur des colonnes de 4,6 mm ou pour les analyses rapides sur des colonnes de 2,1 et 3,0 mm de d. i., sans compromettre la précision ni l'exactitude.

Cette présentation technique démontre les excellentes performances de la pompe flexible 1260 Infinity II. La précision des temps de rétention dans des conditions exigeantes a été évaluée et comparée à celle de la pompe binaire 1260 Infinity II. De plus, l'évaluation de l'exactitude de la composition, le volume mort et l'exactitude du débit des deux pompes a été réalisée au moyen de sauts de gradient.

Introduction

La pompe flexible Agilent 1260 Infinity II est une pompe à gradient basse pression capable de fonctionner à une pression de 800 bars. La vanne multifonction intégrée offre des fonctionnalités telles que la purge automatique, le branchement du mélangeur additionnel et le rétrobalayage de filtre.

Différentes applications exigeantes ont été choisies afin de démontrer les performances exceptionnelles de la pompe flexible 1260 Infinity II. Les résultats obtenus avec la pompe flexible 1260 Infinity II ont été comparés à ceux obtenus avec la pompe binaire Agilent 1260 Infinity II.

Données expérimentales

Instruments

Les modules suivants ont été utilisés pour les expériences :

- Pompe flexible Agilent 1260 Infinity II (G7104C)
- Pompe binaire Agilent 1260 Infinity II (G7112B)
- Multi-échantillonneur Agilent 1260 Infinity II (G7167A), équipé d'un refroidisseur d'échantillon intégré (option n° 100)
- Thermostat multicolonne Agilent 1260 Infinity II (G7116A)
- Détecteur à barrette de diodes Agilent WR 1260 Infinity II (G7115A) équipé d'une cellule standard : trajet optique de 10 mm et volume de 13 µL

Logiciel

Logiciel de traitement des données chromatographiques OpenLAB 2.2 (M8413A)

Produits chimiques

Tous les solvants étaient de qualité LC. L'eau fraîche ultrapure a été produite par un système Milli-Q Integral équipé d'un

réservoir avec une membrane de 0,22 µm (Millipak). L'acétonitrile et l'acétone ont été achetés chez Merck (Darmstadt, Allemagne). L'acide trifluoroacétique

(TFA) et l'acide formique (AF) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne).

Méthodes

Tableau 1. Conditions chromatographiques pour les sauts de gradient.

Paramètre	Valeur
Colonne	Capillaire restricteur
Solvant	A) 0,3 % d'acétone dans l'eau B) Eau
Gradient	Entre 20 et 45 minutes, avec des sauts de 1 % de 100 à 94 % de A Entre 45 et 55 minutes, avec des sauts de 2 % de 94 à 90 % de A Entre 55 et 80 minutes, avec des sauts de 10 % de 90 à 51 % de A Entre 80 et 90 minutes, avec des sauts de 1 % de 51 à 49 % de A Entre 90,01 et 110 minutes, avec des sauts de 10 % de 40 à 10 % Entre 110,01 et 135 minutes, avec des sauts de 2 % de 6 à 0 % de A
Fin d'analyse	140 minutes
Débit	1 mL/min
Température de colonne	30 °C
DAD	273/4 nm, réf. 360/100 nm, 10 Hz

Tableau 2. Conditions chromatographiques pour les analyses avec gradient à pente faible.

Paramètre	Valeur
Composés	Mélange polyphénolique : catéchine, acide caféique, épicatechine, épigallocatechine (tous achetés chez Sigma-Aldrich)
Colonne	Agilent ZORBAX StableBond C18, 2,1 × 50 mm, 1,8 µm (réf. 857700-902)
Solvant	A) 0,1 % AF dans l'eau B) 0,1 % AF dans l'acétonitrile
Gradient	0 minute – 6 % B 8 minutes – 12 % B
Fin d'analyse	8 minutes
Durée post-analyse	3 minutes
Débit	0,6 mL/min
Volume d'injection	2 µL avec 3 secondes de rinçage d'aiguille (60 % d'acétonitrile dans l'eau)
Température de l'échantillon	10 °C
Température de colonne	30 °C
DAD	280/4 nm, réf. 360/50 nm, 40 Hz

Tableau 3. Conditions chromatographiques pour les analyses avec faibles pourcentages de solvant organique.

Paramètre	Valeur
Composés	Médicaments sulfamides : sulfanilamide, sulfathiazole, sulfamérazine, sulfachloropyridazine, sulfaméthazine (tous achetés chez Sigma-Aldrich)
Colonne	Agilent ZORBAX StableBond C18, 2,1 × 50 mm, 1,8 µm (réf. 857700-902)
Solvant	A) 0,1 % TFA dans l'eau b) 0,1 % TFA dans l'acétonitrile
Gradient	0 minute – 1 % B 6 minutes – 25 % B
Fin d'analyse	8 minutes
Durée post-analyse	3 minutes
Débit	0,6 mL/min
Volume d'injection	2 µL avec 3 secondes de rinçage d'aiguille (60 % d'acétonitrile dans l'eau)
Température de l'échantillon	10 °C
Température de colonne	45 °C
DAD	254/4 nm, réf. 360/80 nm, 20 Hz

Résultats et discussion

Expérience 1 : saut de gradient

Des sauts de gradient, avec un traceur dans le solvant A, ont été utilisés pour déterminer le volume mort du système, l'exactitude de la composition, le bruit de mélange et l'exactitude du débit. Un débitmètre de précision (FAM) a été utilisé pour déterminer l'exactitude du débit.

La pompe flexible 1260 Infinity II, avec et sans le mélangeur Agilent Jet Weaver, et la pompe binaire 1260 Infinity II ont été soumises à des sauts de gradient dans des conditions identiques. La figure 1 montre une superposition des trois sauts de gradient allant de 100 % de A (eau + traceur) à 0 % de A pour des sauts de 1, 2 et 10 %. Les deux pompes ont présenté d'excellentes performances sur la plage complète de sauts de gradient. Les sauts de gradient ont été parfaitement résolus pour des sauts de 1 % avec un faible pourcentage de solvant B. Ces résultats montrent clairement que les performances de gradient de la pompe flexible 1260 Infinity II sont équivalentes à celles de la pompe binaire 1260 Infinity II, même pour les plages exigeantes de 1 à 5 % de B.

Tableau 4. Conditions chromatographiques pour les analyses avec forts pourcentages de solvant organique.

Paramètre	Valeur
Composés	Mélange de rouges Soudan : Soudan I, Soudan II, Soudan III, Soudan IV (tous achetés chez Sigma-Aldrich)
Colonne	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3,0 × 50 mm, 1,8 µm (réf. 959941-302)
Solvant	A) Eau B) 95 % d'acétonitrile dans l'eau
Gradient	0 minute – 90 % B 4 minutes – 100 % B
Fin d'analyse	4 minutes
Durée post-analyse	2 minutes
Débit	1 mL/min
Volume d'injection	1 µL avec 3 secondes de rinçage d'aiguille (acétonitrile)
Température de l'échantillon	10 °C
Température de colonne	40 °C
DAD	490/20 nm, sans réf., 20 Hz

Tableau 5. Conditions chromatographiques pour les analyses avec gradient rapide.

Paramètre	Valeur
Composés	Échantillon de contrôle RRLC Agilent (réf. 5188-6529)
Colonne	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3,0 × 50 mm, 1,8 µm (réf. 959941-302)
Solvant	A) Eau B) Acétonitrile
Gradient	0 minute – 30 % B 1 minute – 100 % B
Fin d'analyse	2 minutes
Durée post-analyse	1 minute
Débit	2 mL/min
Volume d'injection	1 µL avec 3 secondes de rinçage d'aiguille (60 % d'acétonitrile dans l'eau)
Température de l'échantillon	10 °C
Température de colonne	60 °C
DAD	254/4 nm, réf. 360/60, 80 Hz

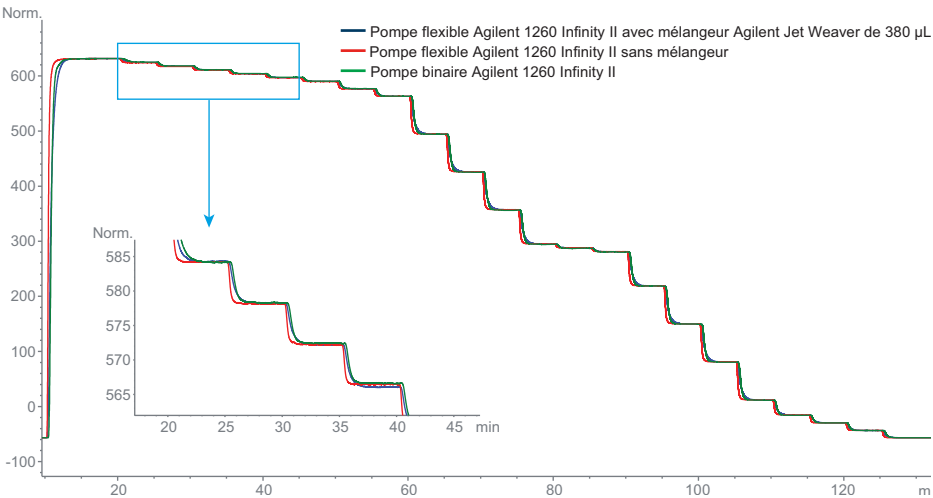


Figure 1. Sauts de gradient de 100 à 0 % de traceur sur la pompe flexible Agilent 1260 Infinity II, avec et sans mélangeur, et sur la pompe binaire Agilent 1260 Infinity II.

L'exactitude de la composition a été calculée pour les deux pompes en se basant sur les sauts de gradient. La figure 2 montre l'exactitude de la composition pour la pompe flexible 1260 Infinity II, avec et sans le mélangeur Jet Weaver de 380 µL, et la pompe binaire 1260 Infinity II. Les spécifications pour l'exactitude de la composition ont été définies à $\pm 0,35\%$ pour la pompe binaire 1260 Infinity II et à $\pm 0,4\%$ pour la pompe flexible 1260 Infinity II. L'exactitude de la composition se situe à l'intérieur de la plage spécifiée pour les deux pompes.

Le tableau 7 présente le volume mort du système, le bruit de mélange et l'exactitude du débit. Comme prévu, la pompe flexible 1260 Infinity II sans le mélangeur Jet Weaver possédait le volume mort le plus faible, environ 310 µL. Brancher le mélangeur Jet Weaver de 380 µL sur le circuit a augmenté le volume mort de seulement 460 µL. Le volume mort calculé de la pompe binaire 1260 Infinity II était de 610 µL. Les volumes morts des pompes comprennent les volumes des capillaires, du capillaire restricteur et de la cellule de détection. Dans ces mesures, le multi-échantillonneur 1260 Infinity II ne faisait pas partie du circuit.

Le bruit de mélange a été calculé pour chaque saut pour la totalité du gradient. Le tableau 7 présente la comparaison des valeurs pour trois sauts différents : traceur à 95 %, 49 % et 4 %. Les pompes flexible 1260 Infinity II et binaire 1260 Infinity II ont donné des résultats similaires. Cependant, la pompe flexible 1260 Infinity II avec le mélangeur Jet Weaver de 380 µL donnait les meilleurs résultats en matière de bruit de mélange. Avec le mélangeur additionnel, le volume mort de la pompe flexible 1260 Infinity II

augmentait légèrement, mais le signal UV était plus stable en raison de meilleures performances de mélange. Ces résultats montrent clairement les performances exceptionnelles du mélangeur Jet Weaver pour l'efficacité du mélange et une conception intelligente qui permet d'avoir un volume mort aussi faible que possible. Le débit réel durant les sauts de gradient a été mesuré en ajoutant un FAM à la

configuration de l'empilage LC. Pour la pompe flexible 1260 Infinity II, le débit réel (0,998 mL/min) était légèrement inférieur au débit programmé de 1 mL/min. Le débit réel pour la pompe binaire 1260 Infinity II était légèrement supérieur à 1,003 mL/min. Cependant, les performances des deux pompes étaient excellentes et situées dans la plage de spécification de $\pm 1\%$.

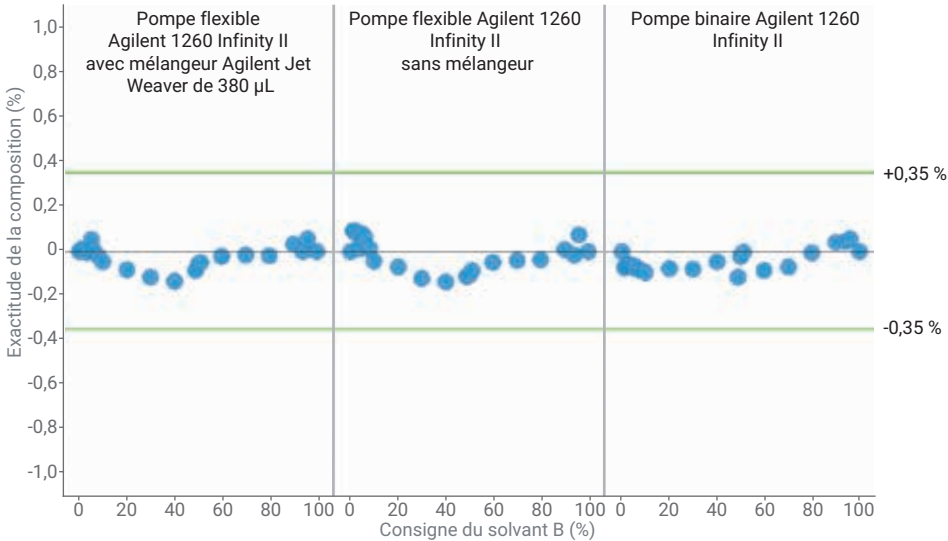


Figure 2. Exactitude de composition pour la pompe flexible Agilent 1260 Infinity II, avec et sans mélangeur, et pour la pompe binaire Agilent 1260 Infinity II.

Tableau 7. Résultats des sauts de gradient.

	Pompe flexible Agilent 1260 Infinity II avec le mélangeur Agilent Jet Weaver de 380 µL	Pompe flexible Agilent 1260 Infinity II	Pompe binaire Agilent 1260 Infinity II
Volume mort	~460 µL	~310 µL	~610 µL
Bruit de mélange à 95 % de A	0,015 %	0,048 %	0,023 %
Bruit de mélange à 49 % de A	0,024 %	0,040 %	0,045 %
Bruit de mélange à 4 % de A	0,013 %	0,034 %	0,012 %
Débit moyen (mL/min)	0,998	0,998	1,003
Δ moyenne du débit (%) :	-0,164	-0,155	0,270

Expérience 2 : Précision des temps de rétention pour les gradients à pente faible

Un mélange de quatre composés polyphénoliques a été analysé afin de déterminer la précision des temps de rétention avec un gradient à pente faible. Le gradient s'étendait de 6 à 12 % de B sur 8 minutes, ce qui représentait une variation du solvant de 0,75% par minute. La figure 3 montre une superposition des deux chromatogrammes, l'un acquis avec la pompe flexible 1260 Infinity II (sans le mélangeur additionnel) et l'autre avec la pompe binaire 1260 Infinity II. La précision des temps de rétention (tableau 8) pour les quatre composés polyphénoliques était similaire pour les deux pompes. Cette expérience prouve la haute précision de mélange de la pompe flexible 1260 Infinity II, y compris avec des gradients à pente faible, pour lesquels une pompe binaire est préférable.

Expérience 3 : Précision des temps de rétention avec un faible pourcentage de solvant organique

Un mélange de cinq médicaments sulfamides a été analysé, avec un gradient allant de 1 à 25 % de solvant organique (figure 4). Pour cette plage de pourcentage faible en solvant organique, une pompe binaire présente des avantages. La pompe flexible 1260 Infinity II est conçue pour une plage de composition de 0 à 100 %. La précision des temps de rétention a été calculée pour huit analyses consécutives (tableau 9) afin d'évaluer les performances des deux pompes pour ces faibles teneurs en solvant organique. Les deux pompes ont montré d'excellentes performances en termes de précision des temps de rétention. Pour les composés sulfanilamide et sulfathiazole élués en premier, la pompe flexible 1260 Infinity II a même surpassé la pompe binaire 1260 Infinity II.

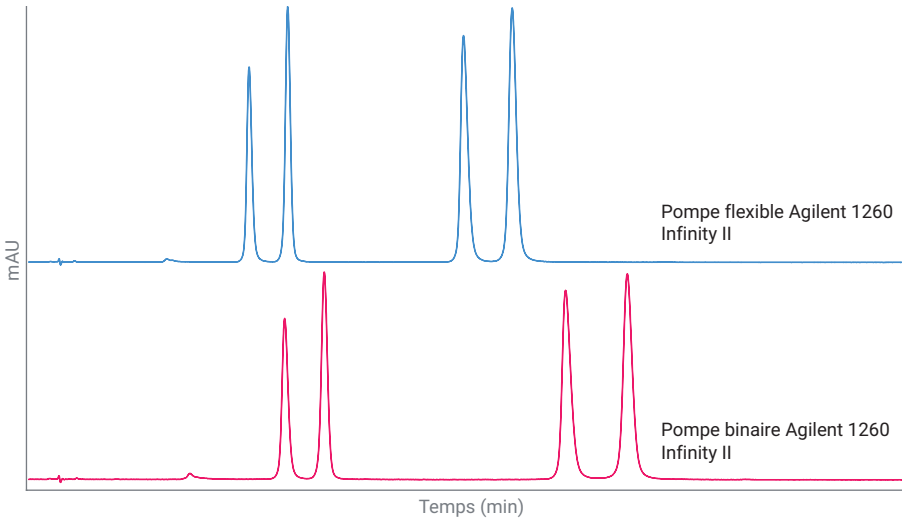


Figure 3. Analyse des composés polyphénoliques avec un gradient à faible pente. Ordre d'élution : catéchine, acide caféique, épicatechine, puis épigallocatechine.

Tableau 8. Précision des temps de rétention pour l'analyse des composés polyphénoliques. Huit analyses consécutives ont été utilisées pour le calcul.

Pompe flexible Agilent 1260 Infinity				
	Catéchine	Acide caféique	Épicatechine	Épigallocatechine
TR moyen (min)	2,019	2,372	3,979	4,426
Écart-type TR	0,0018	0,0015	0,0042	0,0036
RSD TR	0,087	0,061	0,106	0,081
Pompe binaire Agilent 1260 Infinity II				
TR moyen (min)	2,348	2,710	4,927	5,491
Écart-type TR	0,0035	0,0023	0,0032	0,0033
RSD TR	0,151	0,085	0,066	0,060

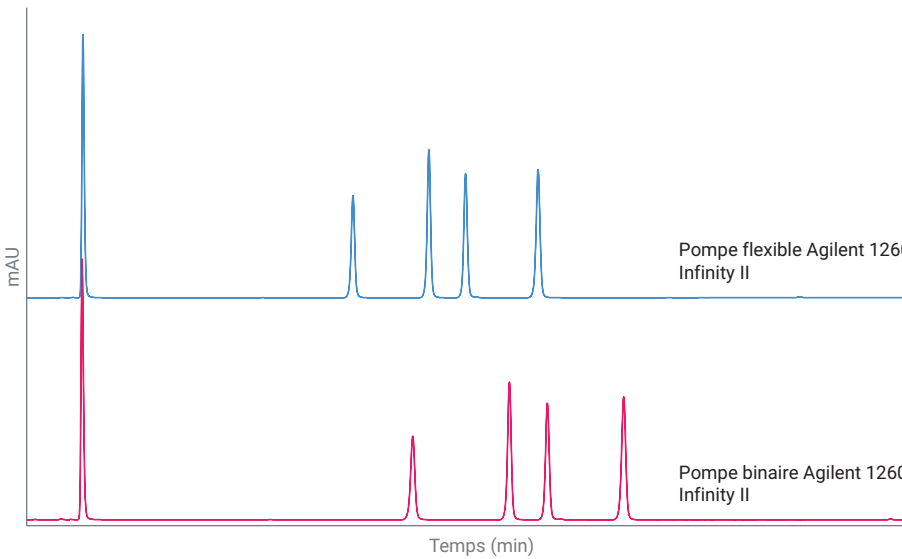


Figure 4. Analyse des médicaments sulfamides pour un pourcentage de solvant organique faible. Ordre d'élution : sulfanilamide, sulfathiazole, sulfamérazine, sulfachloropyridazine, puis sulfaméthazine.

Expérience 4 : Précision des temps de rétention avec un pourcentage de solvant organique élevé

Pour cette expérience, les rouges Soudan 1, 2, 3 et 4 ont été analysés en utilisant un gradient de 90 à 100 % de solvant organique (figure 5 et tableau 10). Les résultats montrent que la pompe flexible 1260 Infinity II convient bien à cette application et donne de meilleurs résultats que la pompe binaire 1260 Infinity II.

Tableau 9. Précision des temps de rétention pour l'analyse des médicaments sulfamides.

Pompe flexible Agilent 1260 Infinity					
	Sulfanilamide	Sulfathiazole	Sulfamérazine	Sulfachloropyridazine	Sulfaméthazine
TR moyen (min)	0,505	2,926	3,607	3,935	4,586
Écart-type TR	0,0005	0,0009	0,0012	0,0013	0,0005
RSD TR	0,092	0,032	0,033	0,033	0,010
Pompe binaire Agilent 1260 Infinity II					
TR moyen (min)	0,499	3,468	4,331	4,671	5,355
Écart-type TR	0,0009	0,0044	0,0022	0,0022	0,0024
RSD TR	0,174	0,127	0,050	0,047	0,045

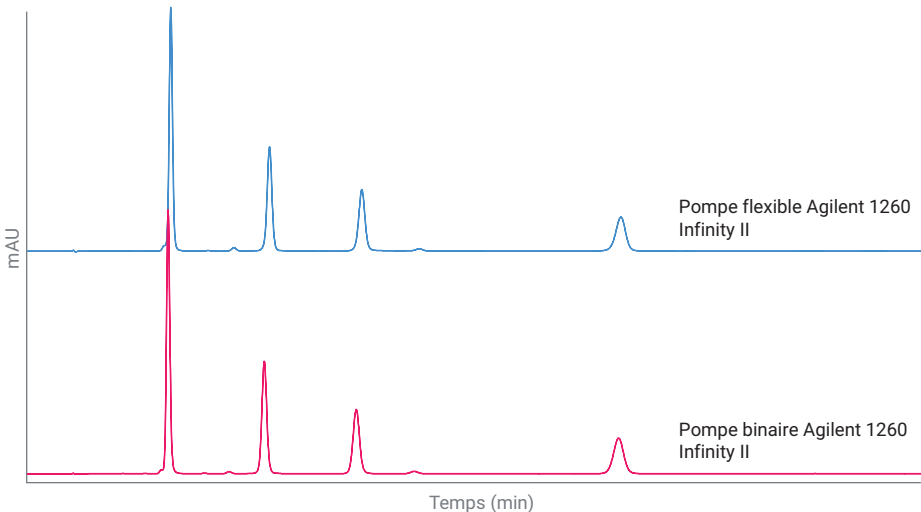


Figure 5. Analyse d'un mélange de rouges Soudan avec un fort pourcentage de solvant organique. Ordre d'élution : rouge Soudan 1, rouge Soudan 2, Rouge Soudan 3, puis rouge Soudan 4.

Tableau 10. Précision des temps de rétention pour l'analyse des rouges Soudan. Huit analyses consécutives ont été utilisées pour le calcul.

Pompe flexible Agilent 1260 Infinity				
	Soudan I	Soudan II	Soudan III	Soudan IV
TR moyen (min)	0,643	1,085	1,497	2,656
Écart-type TR	0,0004	0,0008	0,0007	0,0014
RSD TR	0,055	0,070	0,047	0,053
Pompe binaire Agilent 1260 Infinity II				
TR moyen (min)	0,630	1,058	1,468	2,640
Écart-type TR	0,0009	0,0018	0,0027	0,0044
RSD TR	0,147	0,173	0,187	0,166

Expérience 5 : Précision des temps de rétention pour des analyses rapides

Un débit élevé de 2 mL/min a été utilisé afin de permettre des analyses plus rapides. La durée du gradient était établie à une minute, avec 30 à 100 % de solvant organique (figure 6). Les configurations standard et à faible volume mort ont été testées pour la pompe binaire 1260 Infinity II. Pour la configuration à faible volume mort, le mélangeur et l'amortisseur étaient contournés. La pompe flexible 1260 Infinity II a été utilisée avec et sans le mélangeur. La pression pour l'ensemble des configurations du système était de 540 bars environ.

Le temps d'analyse le plus rapide a été obtenu avec la pompe binaire 1260 Infinity II en configuration à faible volume mort, suivie de la pompe flexible 1260 Infinity II en configuration standard.

Trois pics représentatifs ont été choisis afin de démontrer la précision des temps de rétention pour ces analyses chromatographiques rapides (tableau 11). Même dans ces conditions exigeantes, la précision des temps de rétention pour les deux pompes et leurs configurations correspondantes était excellente, avec une RSD < 0,09 %.

Dans une expérience supplémentaire, le débit était augmenté de 2 mL/min à 2,6 mL/min, avec une pression du système d'environ 750 bars. Pour cette expérience, seule la pompe flexible 1260 Infinity II en configuration standard a été utilisée, étant donné que cette pompe fonctionne dans des plages de pression allant jusqu'à 800 bars, alors que la pompe binaire 1260 Infinity II est limitée à 600 bars.

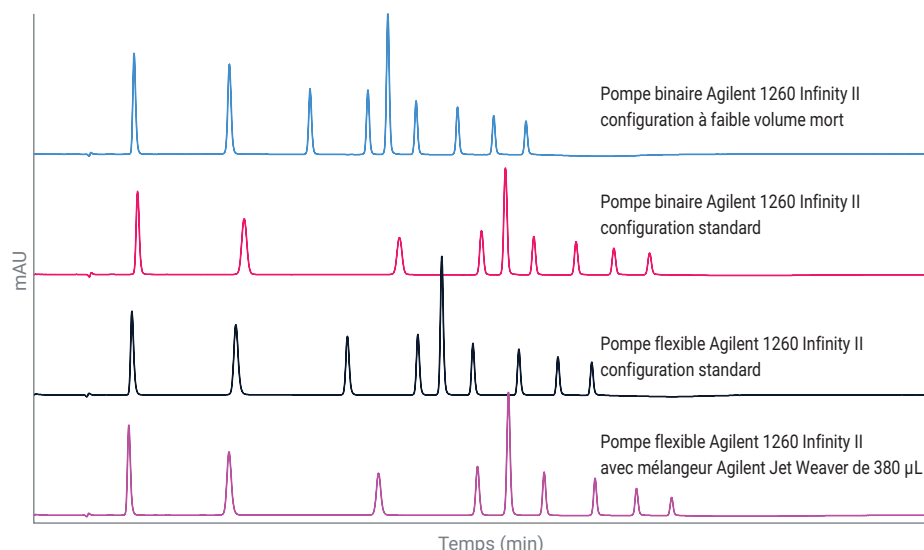


Figure 6. Analyse de l'échantillon de contrôle RRLC en utilisant un débit élevé.

Tableau 11. Précision des temps de rétention pour l'analyse de l'échantillon de contrôle RRLC. Trois pics représentatifs ont été choisis. Huit analyses consécutives ont été utilisées pour le calcul.

Pompe flexible Agilent 1260 Infinity II : configuration standard			
	Pic 3	Pic 6	Pic 8
Moyenne	0,697	0,977	1,166
Écart-type	0,0004	0,0005	0,0005
RSD	0,051	0,047	0,040
Pompe flexible Agilent 1260 Infinity II avec mélangeur Jet Weaver de 380 µL			
Moyenne	0,766	1,135	1,341
Écart-type	0,0005	0,0004	0,0000
RSD	0,060	0,031	0,003
Pompe binaire Agilent 1260 Infinity II : configuration standard			
Moyenne	0,813	1,112	1,290
Écart-type	0,0005	0,0005	0,0006
RSD	0,066	0,048	0,050
Pompe binaire Agilent 1260 Infinity II en configuration à faible volume mort			
Moyenne	0,614	0,850	1,023
Écart-type	0,0005	0,0006	0,0005
RSD	0,084	0,074	0,047

En augmentant le débit à 2,6 mL/min, le temps d'analyse avec gradient était réduit de 1 à 0,77 minute (figure 7). Tous les pics étaient élués en moins d'une minute, avec une excellente précision des temps de rétention, en dessous de la spécification de 0,15 % de RSD. Le dernier composé était élué plus tôt (0,967 minute) avec la pompe flexible 1260 Infinity II qu'avec la pompe binaire 1260 Infinity II (1,095 minute) avec un débit de 2 mL/min en configuration à faible volume mort.

Conclusion

La pompe flexible Agilent 1260 Infinity II fournit d'excellentes performances quant à la précision des temps de rétention pour diverses applications LC exigeantes. L'exactitude de la composition et le bruit de mélange étaient excellents pour la pompe flexible Agilent 1260 Infinity II et la pompe binaire Agilent 1260 Infinity II. Les débits qui ont été mesurés et suivis en temps réel pour les deux pompes ont montré que l'exactitude du débit était toujours inférieure à 0,3 %.

Le volume mort du système pour la pompe flexible 1260 Infinity II est d'environ 310 µL et de 460 µL avec le mélangeur Agilent Jet Weaver de 380 µL. Pour la pompe binaire 1260 Infinity II, le volume mort du système est de 610 µL au total.

Cette présentation technique montre que les deux pompes présentent d'excellentes performances. De plus, la pompe flexible 1260 Infinity II a montré d'excellents résultats pour des applications exigeantes pour lesquelles une pompe binaire est normalement préférable.

Composé	TR moyen (min)	RSD TR (%)
1. Acétanilide	0,171	0,103
2. Acétophénone	0,351	0,071
3. Propiophénone	0,546	0,037
4. Butyrophénone	0,668	0,021
5. Valérophénone	0,710	0,019
6. Hexanophénone	0,763	0,025
7. Heptanophénone	0,842	0,025
8. Octanophénone	0,909	0,024
9. Benzophénone	0,967	0,024

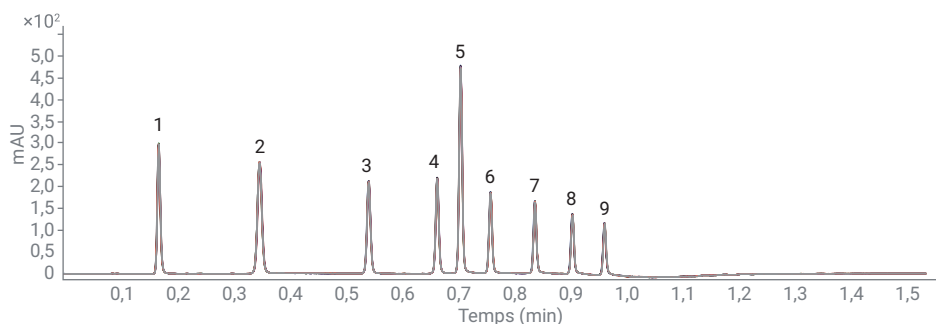


Figure 7. Superposition de huit chromatogrammes avec un débit de 2,6 mL/min et une contre-pression de 750 bars.