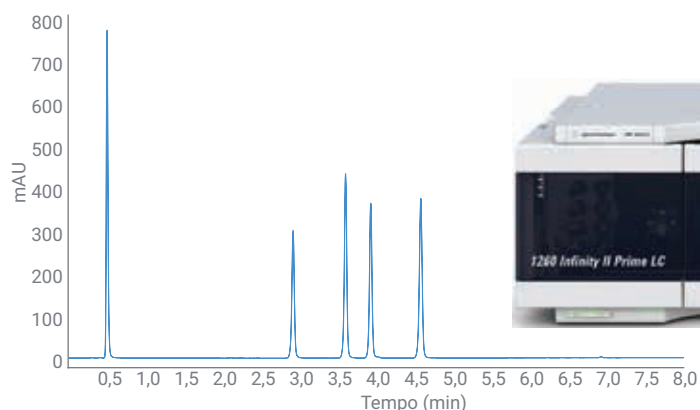


Pompa Flexible Agilent 1260 Infinity II

Il punto di riferimento per accuratezza e precisione elevate nelle pompe a gradiente per la miscelazione a bassa pressione



Autori

Melanie Metzloff e
Patric Hörth
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

La pompa Flexible Agilent 1260 Infinity II offre la massima flessibilità per applicazioni di tipo convenzionale su colonne da 4,6 mm o analisi rapide su colonne con d.i. da 2,1 e 3,0 mm, senza alcun compromesso in termini di precisione e accuratezza.

La presente nota tecnica illustra le straordinarie prestazioni della pompa Flexible 1260 Infinity II. La precisione dei tempi di ritenzione in condizioni operative complesse è stata valutata e confrontata con quella che si ottiene con la pompa binaria Agilent 1260 Infinity II. Sono inoltre state valutate la precisione della composizione, il volume di ritardo e l'accuratezza del flusso per entrambe le pompe eseguendo gradienti a step.

Introduzione

La pompa Flexible Agilent 1260 Infinity II è una pompa a gradiente per la miscelazione a bassa pressione ed è in grado di funzionare con una pressione operativa di 800 bar. La valvola multifunzione integrata offre la possibilità di utilizzare pratiche funzioni come lo spurgo automatico, l'inserimento o disinserimento di un miscelatore aggiuntivo e il backflush del filtro.

Per illustrare le eccezionali prestazioni della pompa Flexible 1260 Infinity II sono state scelte differenti applicazioni complesse. I risultati ottenuti con la pompa Flexible 1260 Infinity II sono stati confrontati con quelli ottenuti con la pompa binaria Agilent 1260 Infinity II.

Condizioni sperimentali

Strumenti

Per gli esperimenti sono stati utilizzati i seguenti moduli:

- pompa Flexible Agilent 1260 Infinity II (G7104C)
- pompa binaria Agilent 1260 Infinity II (G7112B)
- 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 1260 Infinity II WR (G7115A) Agilent, con cella di flusso standard, lunghezza del percorso 10 mm, volume 13 µL

Software

Agilent OpenLAB CDS 2.2 (M8413A)

Prodotti chimici

Tutti i solventi sono di grado LC. Acqua fresca ultra pura è stata ottenuta da un sistema Milli-Q integrato equipaggiato con una cartuccia per punto d'uso (Millipak) con membrana da 0,22 µm.

Acetonitrile ed acetone sono stati acquistati presso Merck (Darmstadt, Germania). Acido trifluoroacetico

(TFA) ed acido formico (FA) sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich (Steinheim, Germania).

Metodi

Tabella 1. Condizioni cromatografiche per i gradienti a gradini.

Parametro	Valore
Colonna	Capillare di restrizione
Solvente	A) Acetone 0,3% in acqua B) Acqua
Gradiente	Tra 20 e 45 minuti a step di 1% da 100 a 94% di A Tra 45 e 55 minuti a step di 2% da 94 a 90% di A Tra 55 e 80 minuti a step di 10% da 90 a 51% di A Tra 80 e 90 minuti a step di 1% da 51 a 49% di A Tra 90,01 e 110 minuti a step di 10% da 40 a 10% Tra 110,01 e 135 minuti a step di 2% da 6 a 0% di A
Tempo finale	140 minuti
Flusso	1 mL/min
Temperatura della colonna	30 °C
DAD	273/4 nm, rif. 360/100 nm, 10 Hz

Tabella 2. Condizioni cromatografiche per analisi con gradienti a bassa pendenza.

Parametro	Valore
Composti	Miscela polifenolica: catechina, acido caffeico, epicatechina, epigallocatechina (acquistate presso Sigma-Aldrich)
Colonna	Agilent ZORBAX StableBond C18, 2,1 × 50 mm, 1,8 µm (codice 857700-902)
Solvente	A) FA 0,1% in acqua B) FA 0,1% in acetonitrile
Gradiente	0 minuti: 6% di B 8 minuti: 12% di B
Tempo finale	8 minuti
Tempo post analisi	3 minuti
Flusso	0,6 mL/min
Volume di iniezione	2 µL con lavaggio dell'ago di 3 secondi (acetonitrile 60% in acqua)
Temperatura del campione	10 °C
Temperatura della colonna	30 °C
DAD	280/4 nm, rif. 360/50 nm, 40 Hz

Tabella 3. Condizioni cromatografiche per analisi con basse percentuali di fase organica.

Parametro	Valore
Composti	Farmaci sulfamidici: sulfanilamide, sulfatiazolo, sulfamerazina, sulfaclopiridazina, sulfametazina (acquistati presso Sigma-Aldrich)
Colonna	Agilent ZORBAX StableBond C18, 2,1 × 50 mm, 1,8 µm (codice 857700-902)
Solvente	A) TFA 0,1% in acqua B) TFA 0,1% in acetonitrile
Gradiente	0 minuti: 1% di B 6 minuti: 25% di B
Tempo finale	8 minuti
Tempo post analisi	3 minuti
Flusso	0,6 mL/min
Volume di iniezione	2 µL con lavaggio dell'ago di 3 secondi (acetonitrile 60% in acqua)
Temperatura del campione	10 °C
Temperatura della colonna	45 °C
DAD	254/4 nm, rif. 360/80 nm, 20 Hz

Risultati e discussione

Esperimento 1: gradiente a gradini

Gradienti a gradini, incluso un tracciante nel solvente A, sono stati utilizzati per determinare il volume di ritardo del sistema, l'accuratezza della composizione, il rumore di miscelazione e l'accuratezza del flusso. Per la valutazione dell'accuratezza del flusso è stato utilizzato un dispositivo per la misura dell'accuratezza del flusso (FAM, flow accuracy meter).

Gradienti a step nelle medesime condizioni sono stati applicati alla pompa Flexible 1260 Infinity II, con e senza il miscelatore Jet Weaver, e alla pompa binaria 1260 Infinity II. La figura 1 mostra la sovrapposizione di tre gradienti che vanno da 100% di A (acqua + tracciante) a 0% di A (acqua + tracciante) in step di 1, 2 e 10%. Entrambe le pompe presentano eccellenti prestazioni sull'intero intervallo del gradiente. La risoluzione degli step dei gradienti è perfetta anche per step di 1% in corrispondenza di bassa percentuale del solvente B. Questi risultati mostrano chiaramente l'equivalenza tra le prestazioni in gradiente della pompa Flexible 1260 Infinity I e della pompa binaria 1260 Infinity II, anche nel caso di intervalli problematici come tra 1 e 5% di B.

Tabella 4. Condizioni cromatografiche per analisi con alte percentuali di fase organica.

Parametro	Valore
Composti	Miscela di Sudan rosso: Sudan I, Sudan II, Sudan III, Sudan IV (acquistati presso Sigma-Aldrich)
Colonna	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3,0 × 50 mm, 1,8 µm (codice 959941-302)
Solvente	A) Acqua B) Acetonitrile 95% in acqua
Gradiente	0 minuti: 90% di B 4 minuti: 100% di B
Tempo finale	4 minuti
Tempo post analisi	2 minuti
Flusso	1 mL/min
Volume di iniezione	1 µL con lavaggio dell'ago di 3 secondi (acetonitrile)
Temperatura del campione	10 °C
Temperatura della colonna	40 °C
DAD	490/20 nm, rif. disattivato, 20 Hz

Tabella 5. Condizioni cromatografiche per analisi con gradienti rapidi.

Parametro	Valore
Composti	Campione di controllo RRLC Agilent (codice 5188-6529)
Colonna	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3,0 × 50 mm, 1,8 µm (codice 959941-302)
Solvente	A) Acqua B) Acetonitrile
Gradiente	0 minuti: 30% di B 1 minuto: 100% di B
Tempo finale	2 minuti
Tempo post analisi	1 minuti
Flusso	2 mL/min
Volume di iniezione	1 µL con lavaggio dell'ago di 3 secondi (acetonitrile 60% in acqua)
Temperatura del campione	10 °C
Temperatura della colonna	60 °C
DAD	254/4 nm, rif. 360/60, 80 Hz

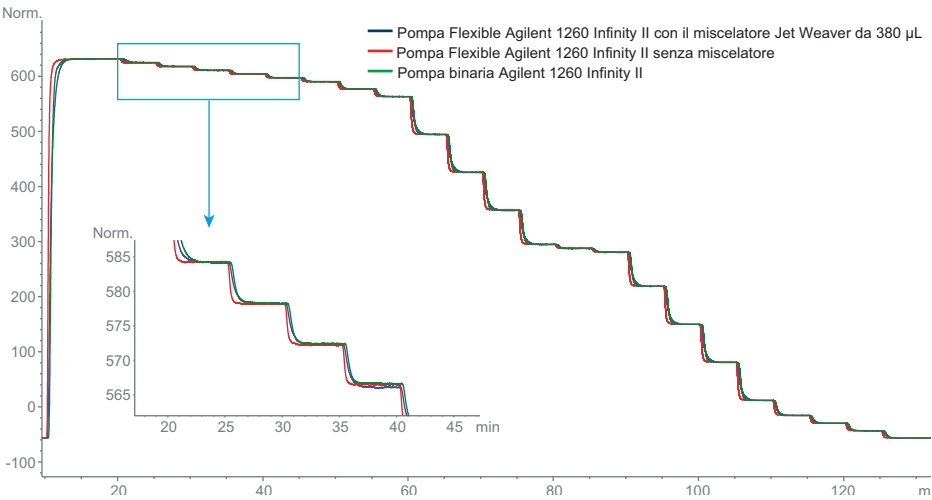


Figura 1. Gradienti a gradini da 100 a 0% di tracciante su pompa Flexible Agilent 1260 Infinity II, con e senza miscelatore, e su pompa binaria Agilent 1260 Infinity II.

L'accuratezza della composizione è stata calcolata per entrambe le pompe sulla base degli step dei gradienti. La figura 2 mostra l'accuratezza della composizione per la pompa Flexible 1260 Infinity II (con e senza il miscelatore Jet Weaver da 380 µL) e per la pompa binaria 1260 Infinity II. Le specifiche per l'accuratezza della composizione sono state definite come $\pm 0,35\%$ per la pompa binaria 1260 Infinity II e $\pm 0,4\%$ per la pompa Flexible 1260 Infinity II. L'accuratezza della composizione per entrambe le pompe è risultata essere entro l'intervallo specificato.

La Tabella 7 riassume i valori di volume di ritardo del sistema, rumore di miscelazione e accuratezza del flusso. Come atteso, la pompa Flexible 1260 Infinity II senza il miscelatore Jet Weaver presenta il più basso volume di ritardo, pari a circa 310 µL. Inserendo il miscelatore Jet Weaver da 380 µL nel percorso del flusso, il volume di ritardo è aumentato soltanto fino a 460 µL. Per la pompa binaria 1260 Infinity II è stato calcolato un volume di ritardo di 610 µL. I volumi di ritardo per tutte le pompe includono il volume dei capillari, il capillare di restrizione e la cella del rivelatore. In queste misurazioni il multicampionatore 1260 Infinity II non faceva parte del percorso del flusso.

Il rumore di miscelazione è stato calcolato per ogni step sull'intero gradiente. La Tabella 7 confronta i valori in corrispondenza di tre step differenti: 95%, 49% e 4% del tracciante. La pompa Flexible 1260 Infinity II e la pompa binaria 1260 Infinity II hanno prodotto risultati simili. La pompa Flexible 1260 Infinity II con il miscelatore Jet Weaver da 380 µL ha prodotto tuttavia i migliori risultati per quanto riguarda il rumore di miscelazione. Con il miscelatore aggiuntivo il volume

di ritardo della pompa Flexible 1260 Infinity II è aumentato leggermente, ma questo favorisce un segnale UV più stabile grazie alle migliori prestazioni di miscelazione. Questi risultati illustrano chiaramente le straordinarie prestazioni del miscelatore Jet Weaver, con l'efficienza di miscelazione e l'intelligenza del design che mantengono il volume di ritardo al valore più basso possibile.

Il flusso effettivo nelle analisi in gradiente è stato monitorato aggiungendo un

dispositivo FAM alla configurazione dello stack LC. Per la pompa Flexible 1260 Infinity II è risultato un flusso reale (0,998 mL/min) leggermente inferiore rispetto al flusso programmato di 1 mL/min. Il flusso reale della pompa binaria 1260 Infinity II è risultato avere valori leggermente superiori, con 1,003 mL/min. Le prestazioni di entrambe le pompe sono state tuttavia eccellenti, con valori che rientrano nell'intervallo di specifica di $\pm 1\%$.

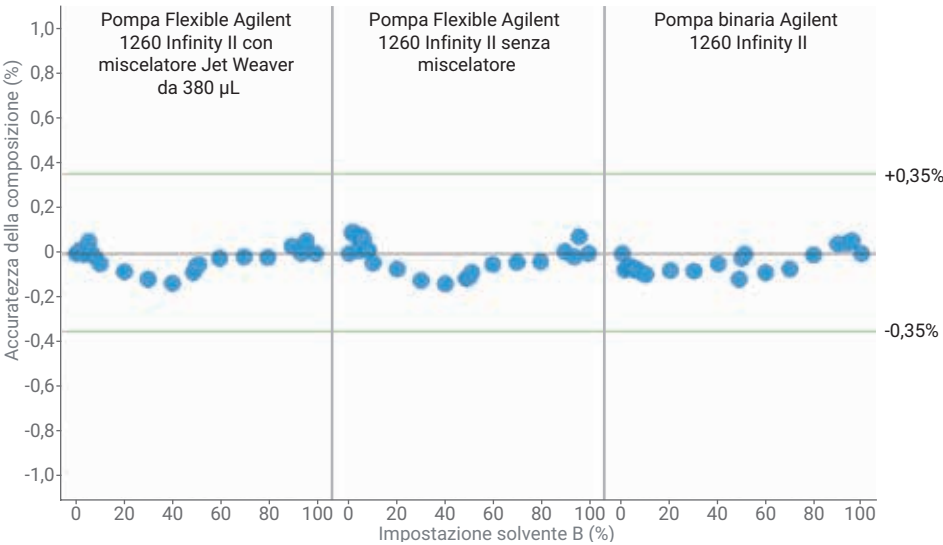


Figura 2. Accuratezza della composizione per la pompa Flexible Agilent 1260 Infinity II, con e senza miscelatore, e per la pompa binaria Agilent 1260 Infinity II.

Tabella 7. Risultati per i gradienti a step.

	Pompa Flexible Agilent 1260 Infinity II con il miscelatore Jet Weaver da 380 µL	Pompa Flexible Agilent 1260 Infinity II	Pompa binaria Agilent 1260 Infinity II
Volume di ritardo	~460 µL	~310 µL	~610 µL
Rumore di miscelazione a 95% di A	0,015%	0,048%	0,023%
Rumore di miscelazione a 49% di A	0,024%	0,040%	0,045%
Rumore di miscelazione a 4% di A	0,013%	0,034%	0,012%
Flusso medio (mL/min)	0,998	0,998	1,003
Δ flusso medio (%)	-0,164	-0,155	0,270

Esperimento 2: precisione del tempo di ritenzione per gradienti con bassa pendenza

Per determinare la precisione del tempo di ritenzione in condizioni di gradienti con bassa pendenza , è stata analizzata una miscela di quattro composti polifenolici. Il gradiente utilizzato passava da 6% di B a 12% di B in otto minuti, il che corrisponde a una variazione del solvente B di 0,75% al minuto. La Figura 3 mostra la sovrapposizione di due cromatogrammi, uno acquisito con la pompa Flexible 1260 Infinity II (senza il miscelatore aggiuntivo) e l'altro con la pompa binaria 1260 Infinity II. I valori di precisione del tempo di ritenzione (Tabella 8) per i quattro composti polifenolici ottenuti con le due pompe sono simili. Questo esperimento mostra l'elevata precisione di miscelazione della pompa Flexible 1260 Infinity II anche in condizioni di gradiente con bassa pendenza, in cui si preferisce una pompa binaria.

Esperimento 3: precisione del tempo di ritenzione per bassa percentuale di contenuto organico

È stata analizzata una miscela di cinque farmaci sulfamidici, utilizzando un gradiente da 1 a 25% di fase organica (Figura 4). Per questo intervallo di bassa percentuale di fase organica è vantaggioso utilizzare una pompa binaria. La pompa Flexible 1260 Infinity II è indicata per un intervallo di composizione da 0 a 100%. Per valutare le prestazioni in questo intervallo a bassa percentuale di organico per entrambe le pompe, la precisione del tempo di ritenzione è stata calcolata a partire da otto analisi consecutive (Tabella 9).

Entrambe le pompe hanno dimostrato eccellenti prestazioni in termini di precisione del tempo di ritenzione. Per i primi due composti eluiti, sulfanilamide e sulfatiazolo, le prestazioni della pompa Flexible 1260 Infinity II sono state addirittura superiori rispetto a quelle della pompa binaria 1260 Infinity II.

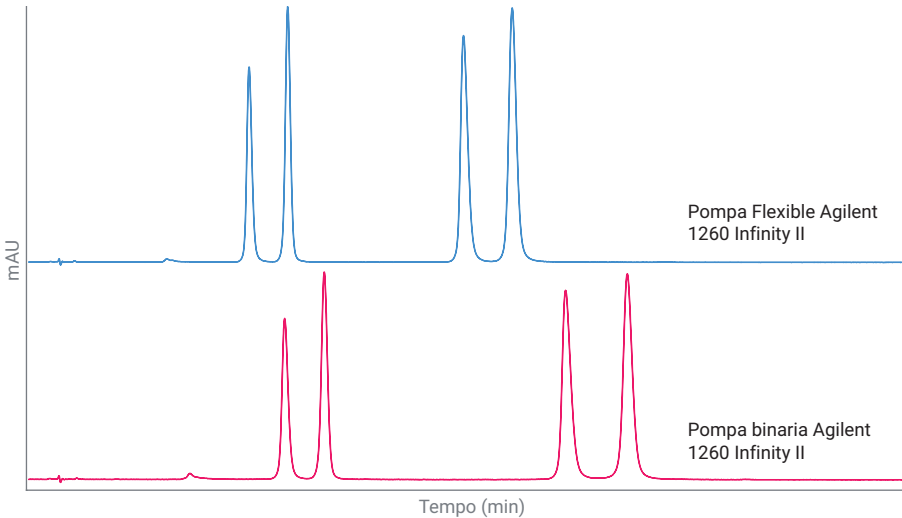


Figura 3. Analisi di composti polifenolici con gradiente a bassa pendenza. Ordine di eluizione: catechina, acido caffeico, epicatechina, quindi epigallocatechina.

Tabella 8. Precisione del tempo di ritenzione per l'analisi di composti polifenolici. Per il calcolo sono state utilizzate otto analisi consecutive.

Pompa Flexible Agilent 1260 Infinity				
	Catechina	Acido caffeico	Epicatechina	Epigallocatechina
RT medio (min)	2,019	2,372	3,979	4,426
Variazione standard RT	0,0018	0,0015	0,0042	0,0036
RSD RT	0,087	0,061	0,106	0,081
Pompa binaria Agilent 1260 Infinity II				
RT medio (min)	2,348	2,710	4,927	5,491
Variazione standard RT	0,0035	0,0023	0,0032	0,0033
RSD RT	0,151	0,085	0,066	0,060

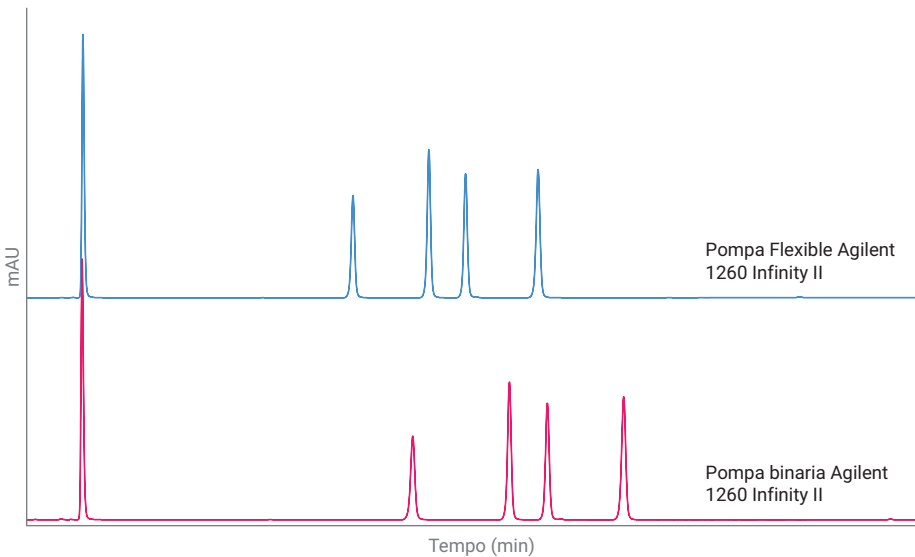


Figura 4. Analisi di farmaci sulfamidici a bassa percentuale di fase organica. Ordine di eluizione: sulfanilamide, sulfatiazolo, sulfamerazina, sulfachloropiridazina, quindi sulfametazina.

Esperimento 4: precisione del tempo di ritenzione per alta percentuale di fase organica

Per questo esperimento sono stati analizzati i composti Sudan rosso 1, 2, 3 e 4 utilizzando un gradiente da 90 a 100% di fase organica (Figura 5 e Tabella 10). I risultati mostrano che la pompa Flexible 1260 Infinity II è molto indicata per questo tipo di applicazione e offre prestazioni migliori rispetto alla pompa binaria 1260 Infinity II.

Tabella 9. Precisione del tempo di ritenzione per l'analisi di farmaci sulfamidici.

Pompa Flexible Agilent 1260 Infinity					
	Sulfanilamide	Sulfatiazolo	Sulfamerazina	Sulfacolorpiridazina	Sulfametazina
RT medio (min)	0,505	2,926	3,607	3,935	4,586
Variazione standard RT	0,0005	0,0009	0,0012	0,0013	0,0005
RSD RT	0,092	0,032	0,033	0,033	0,010
Pompa binaria Agilent 1260 Infinity II					
RT medio (min)	0,499	3,468	4,331	4,671	5,355
Variazione standard RT	0,0009	0,0044	0,0022	0,0022	0,0024
RSD RT	0,174	0,127	0,050	0,047	0,045

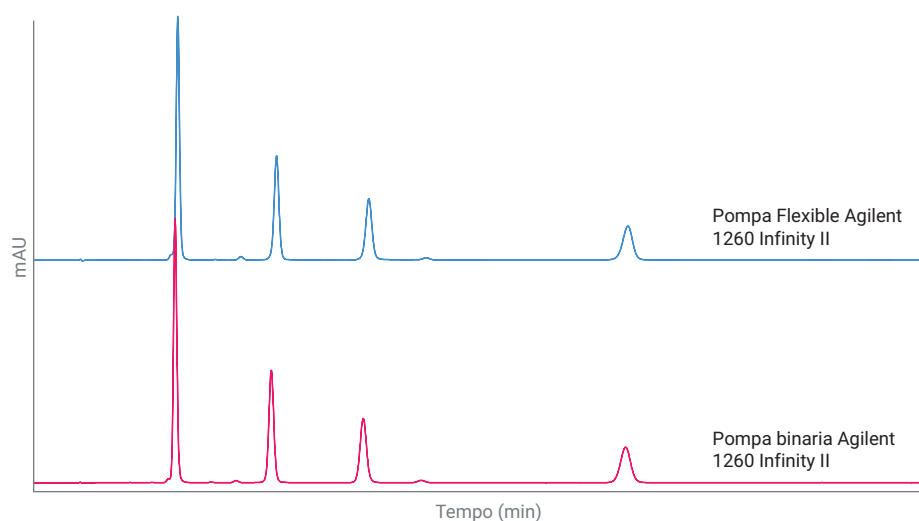


Figura 5. Analisi di una miscela di composti Sudan rosso ad alta percentuale di fase organica. Ordine di eluizione: Sudan rosso 1, Sudan rosso 2, Sudan rosso 3, quindi Sudan rosso 4.

Tabella 10. Precisione del tempo di ritenzione per l'analisi di composti Sudan rosso. Per il calcolo sono state utilizzate otto analisi consecutive.

Pompa Flexible Agilent 1260 Infinity				
	Sudan I	Sudan II	Sudan III	Sudan IV
RT medio (min)	0,643	1,085	1,497	2,656
Variazione standard RT	0,0004	0,0008	0,0007	0,0014
RSD RT	0,055	0,070	0,047	0,053
Pompa binaria Agilent 1260 Infinity II				
RT medio (min)	0,630	1,058	1,468	2,640
Variazione standard RT	0,0009	0,0018	0,0027	0,0044
RSD RT	0,147	0,173	0,187	0,166

Esperimento 5: precisione del tempo di ritenzione per analisi rapide

Per consentire analisi rapide è stato applicato un flusso elevato pari a 2 mL/min. La durata dell'analisi in gradiente è stata impostata su un minuto, con una variazione da 30 a 100% di fase organica (Figura 6). Per la pompa binaria 1260 Infinity II sono state testate la configurazione standard e la configurazione a basso ritardo. Per la configurazione a basso ritardo, il regolatore e il miscelatore sono stati esclusi. La pompa Flexible 1260 Infinity II è stata utilizzata con e senza il miscelatore. La pressione era di 540 bar circa per tutte le configurazioni del sistema.

La pompa binaria 1260 Infinity II con la configurazione a basso ritardo ha dato il minore tempo di analisi, seguita dalla pompa Flexible 1260 Infinity II con la configurazione standard.

Per illustrare la precisione del tempo di ritenzione per queste analisi cromatografiche rapide (Tabella 11), sono stati scelti tre picchi rappresentativi. Anche in queste condizioni complesse, i valori di precisione del tempo di ritenzione per entrambe le pompe nelle rispettive configurazioni sono stati eccellenti, con un valore di RSD <0,09%.

In un ulteriore esperimento il flusso è stato aumentato da 2 mL/min a 2,6 mL/min e la pressione del sistema risultante era di 750 bar. Per questo esperimento è stata utilizzata soltanto la pompa Flexible 1260 Infinity II nella configurazione standard, in quanto questa pompa ha un intervallo di pressione operativa fino a 800 bar, mentre la pompa binaria 1260 Infinity II è limitata a 600 bar.

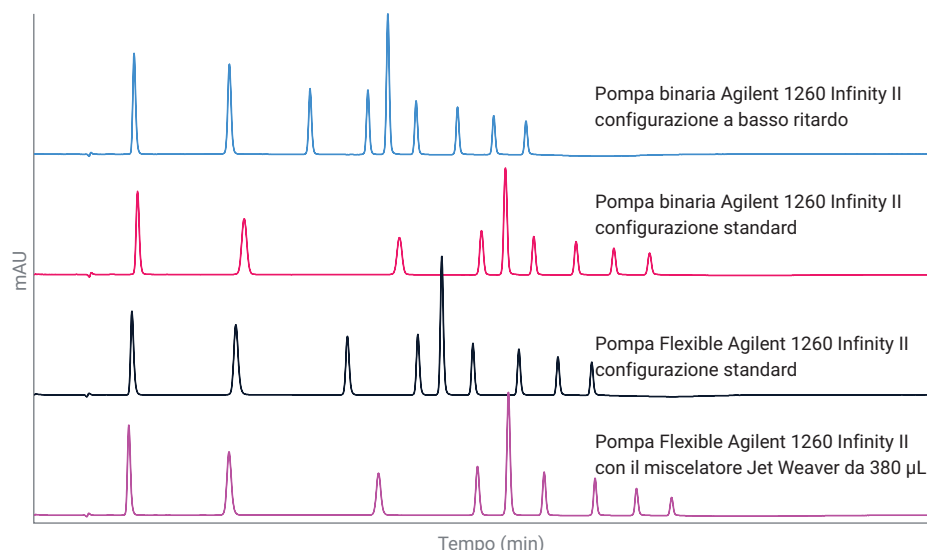


Figura 6. Analisi del campione di controllo RRLC utilizzando un flusso elevato.

Tabella 11. Precisione del tempo di ritenzione per l'analisi del campione di controllo RRLC. Sono stati scelti tre picchi rappresentativi. Per il calcolo sono state utilizzate otto analisi consecutive.

Pompa Flexible Agilent 1260 Infinity II, configurazione standard			
	Picco 3	Picco 6	Picco 8
Media	0,697	0,977	1,166
Variazione standard	0,0004	0,0005	0,0005
RSD	0,051	0,047	0,040
Pompa Flexible Agilent 1260 Infinity II con miscelatore Jet Weaver da 380 µL			
Media	0,766	1,135	1,341
Variazione standard	0,0005	0,0004	0,0000
RSD	0,060	0,031	0,003
Pompa binaria Agilent 1260 Infinity II, configurazione standard			
Media	0,813	1,112	1,290
Variazione standard	0,0005	0,0005	0,0006
RSD	0,066	0,048	0,050
Pompa binaria Agilent 1260 Infinity II, configurazione a basso ritardo			
Media	0,614	0,850	1,023
Variazione standard	0,0005	0,0006	0,0005
RSD	0,084	0,074	0,047

Aumentando il flusso fino a 2,6 mL/min, la durata del gradiente è stata ridotta da 1 a 0,77 minuti (Figura 7). Tutti i picchi sono stati eluiti in meno di un minuto, con una straordinaria precisione dei tempi di ritenzione, inferiore alla specifica di RSD 0,15%. L'ultimo composto è stato eluito più rapidamente (0,967 minuti) con la pompa Flexible 1260 Infinity II che con la pompa binaria 1260 Infinity II (1,095 minuti) con un flusso di 2 mL/min in configurazione a basso ritardo.

Conclusione

La pompa Flexible Agilent 1260 Infinity II ha fornito prestazioni eccellenti in termini di precisione del tempo di ritenzione per diverse applicazioni LC complesse. I gradienti applicati hanno dimostrato un'accuratezza della composizione e un rumore di miscelazione eccellenti per la pompa Flexible 1260 Infinity II e la pompa binaria Agilent 1260 Infinity II. I flussi effettivi sono stati misurati e monitorati per entrambe le pompe, dimostrando per l'accuratezza del flusso valori sempre inferiori a 0,3%.

Il volume di ritardo del sistema per la pompa Flexible 1260 Infinity II è di 310 µL circa e di 460 µL con il miscelatore Jet Weaver da 380 µL. Per la pompa binaria 1260 Infinity II, il volume di ritardo del sistema arriva a 610 µL.

Questa nota tecnica mostra che entrambe le pompe hanno dimostrato eccellenti prestazioni. Inoltre, la pompa Flexible 1260 Infinity II ha prodotto eccellenti risultati per applicazioni complesse in cui una pompa binaria risulta normalmente vantaggiosa.

Composto	RT medio (min)	RSD RT (%)
1. Acetanilide	0,171	0,103
2. Acetofenone	0,351	0,071
3. Propiofenone	0,546	0,037
4. Butirrofenone	0,668	0,021
5. Valerofenone	0,710	0,019
6. Esanofenone	0,763	0,025
7. Eptanofenone	0,842	0,025
8. Ottanofenone	0,909	0,024
9. Benzofenone	0,967	0,024

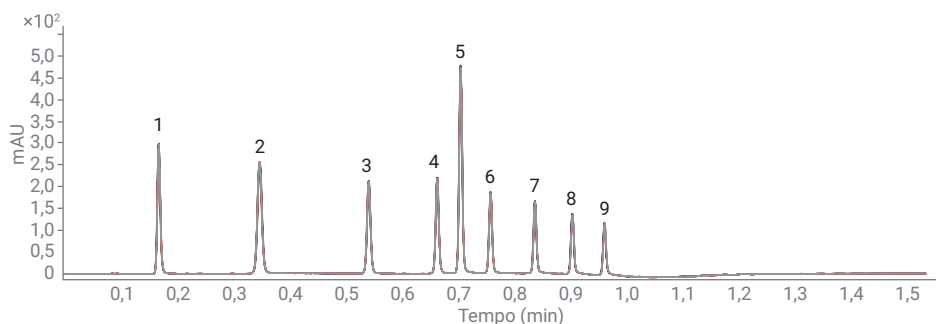


Figura 7. Sovrapposizione di otto cromatogrammi con flusso di 2,6 mL/min alla contropressione di 750 bar.

www.agilent.com/chem

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
Stampato negli Stati Uniti, 1 marzo 2018
5991-90311TE