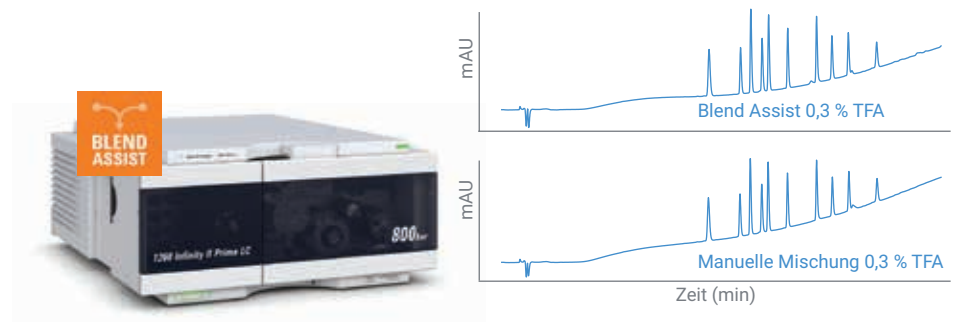


Agilent 1260 Infinity II flexible Pumpe mit Blend Assist

Schnelle Optimierung und einfache Variation der Lösemittelzusammensetzung mit Blend Assist



Autoren

Melanie Metzloff und
Clarissa Dickhut
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

Die Agilent 1260 Infinity II flexible Pumpe mit Blend Assist nutzt ternäre und quaternäre Gradienten zur Variierung der Puffer- bzw. Modifier-Konzentration. In dieser technischen Übersicht wird Blend Assist im Rahmen von zwei unterschiedlichen Ansätzen getestet:

- Erstens wurde Blend Assist verwendet, um die Wirkung von unterschiedlichen Trifluoressigsäure(TFA)-Konzentrationen auf die Trennung eines Standards mit 10 Peptiden zu testen. Die Präzision der mit der optimierten Methode erhaltenen Retentionszeiten wurde anschließend mit manuell gemischten mobilen Phasen verglichen.
- Zweitens wurde Blend Assist bei einem Experiment mit mehreren Methoden eingesetzt. Drei verschiedenartige Mischungen wurden in nur einer Sequenz mit unterschiedlichen Ammoniumformiatkonzentrationen analysiert. Die Präzision der Retentionszeiten für alle Mischungen belegt die hervorragende Präzision der Agilent 1260 Infinity II flexiblen Pumpe mit Blend Assist.

Einführung

Blend Assist ist eine in den Treiber der Agilent 1260 Infinity II flexiblen Pumpe integrierte Software-Funktion. Diese Funktion nutzt die quaternäre Mischoption der Agilent 1260 Infinity II flexiblen Pumpe zur Verdünnung einer Stammlösung (Puffer oder Modifier).

Blend Assist kann bei der Entwicklung von LC-Methoden eingesetzt werden, um die Trennung von Verbindungen durch unterschiedliche Puffer- bzw. Modifier-Konzentrationen zu optimieren. Dank dieses Software-Tools entfällt das aufwändige manuelle Mischen von verschiedenen Puffer- bzw. Modifier-Konzentrationen. Das quaternäre LC-System verfügt über einen oder zwei Kanäle, die Puffer/Modifier in hoher Konzentration (Stammlösung) enthalten: Nach Eingabe der gewünschten Konzentration verdünnt Blend Assist diese Lösungen.¹

Multimethodenansätze sind ein weiterer Applikationsbereich. Um einen solchen Multimethodenansatz zu testen, wurden drei Probenmischungen und drei Methoden mit unterschiedlichen Modifier-Konzentrationen in nur eine Sequenz eingebunden. Ist Blend Assist aktiviert, können die unterschiedlichen Methoden in nur einer Sequenz durchgeführt werden, ohne das System zum Wechsel der mobilen Phasen unterbrechen zu müssen.

Experimentelles

Geräte

In den verschiedenen Experimenten wurden die folgenden Komponenten benutzt:

- Agilent 1260 Infinity II flexible Pumpe (G7104C) mit V380 Jet Weaver Mischer (Option 070)
- Agilent 1260 Infinity II Flüssigprobengeber (G7129C) mit integrierter Probenkühlung (Option 100)
- Agilent 1260 Infinity II Thermostat für mehrere Säulen (G7116A)
- Agilent 1260 Infinity II Diodenarray-Detektor HS (G7117C) mit Max-Light Kartuschenzelle: Schichtdicke der Zelle: 10 mm, $\sigma V = 1,0 \mu l$

Software

Agilent OpenLAB CDS (M8413A)

Chemikalien

Alle Lösemittel hatten LC-Qualität. Frisches Reinstwasser wurde einem Milli-Q Integral System entnommen,

das mit einer Entnahmeeinheit mit 0,22- μm -Membran (Millipak) ausgestattet war. Acetonitril stammte von Merck (Darmstadt, Deutschland). Trifluoressigsäure (TFA) und Ammoniumformiat stammten von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland).

Methoden

Tabelle 1: Chromatographiebedingungen für die Analyse einer 10-Peptid-Mischung.

Parameter	Wert
Verbindungen	Agilent 10-Peptid-Standard (Best.-Nr. 5190-0583)
Säule	Agilent AdvanceBio Peptide Map, 2,1 × 100 mm, 2,7 μm (Best.-Nr. 655750-902)
Lösemittel	A) Wasser B) Acetonitril C) Wasser + 1 % TFA (Zusatz zu Lösemittel A) D) Acetonitril + 1 % TFA (Zusatz zu Lösemittel B)
Gradient	0 Minuten 5 % B 4 Minuten 65 % B
Stoppzeit	5 Minuten
Nachlaufzeit	3 Minuten
Flussrate	1 ml/min
Injektion	Injektionsvolumen: 2 μl mit 3 s Nadelspülung (60 % Acetonitril in Wasser) Probentemperatur: 10 °C
Säulentemperatur	55 °C
DAD	220/4 nm, Ref. 360/80 nm, 20 Hz

Tabelle 2: Chromatographiebedingungen für die Analyse von Sulfonamid-Arzneimitteln, einer Testosteron-Mischung und dem Peptid-Standard von Sigma.

Parameter	Wert		
Säule	Agilent ZORBAX StableBond 80Å C18, 2,1 × 50 mm, 1,8 μm , 1200 bar (Best.-Nr. 857700-902)		
Lösemittel	A) Wasser B) Acetonitril C) 250 mM Ammoniumformiat (Zusatz zu Lösemittel A)		
Verbindungen	Sulfonamid-Arzneimittel: Sulfanilamid, Sulfathiazol, Sulfachlorpyridazin, Sulfamethazin (jeweils 100 ng/ μl)	Testosteron-Mischung: Testosteron c-IIIIN 50 ng/ μl und Testosteronacetat 25 ng/ μl	Sigma Peptid-Standard (Sigma H2016)
Einstellung von Blend Assist	200 mM Ammoniumformiat (Kanal A + C als Zusatz)	50 mM Ammoniumformiat (Kanal A + C als Zusatz)	25 mM Ammoniumformiat (Kanal A + C als Zusatz)
Gradient	0 Minuten 10 % B 0,5 Minuten 10 % B 4 Minuten 30 % B 4,2 Minuten 50 % B	0 Minuten 45 % B 3 Minuten 95 % B	0 Minuten 2 % B 0,5 Minuten 2 % B 6 Minuten 28 % B 7 Minuten 95 % B
Stoppzeit	5 Minuten	4 Minuten	7 Minuten
Nachlaufzeit	3 Minuten	3 Minuten	3 Minuten
Flussrate	0,5 ml/min	1 ml/min	0,5 ml/min
Injektion	Injektionsvolumen: 1 μl mit 3 s Nadelspülung (60 % Acetonitril in Wasser) Probentemperatur: 10 °C	Injektionsvolumen: 5 μl mit 3 s Nadelspülung (60 % Acetonitril in Wasser) Probentemperatur: 10 °C	Injektionsvolumen: 2 μl mit 3 s Nadelspülung (60 % Acetonitril in Wasser) Probentemperatur: 10 °C
Säulentemperatur	60 °C	30 °C	35 °C
DAD	254/8 nm, Ref. 360/100 nm, 20 Hz	254/8 nm, Ref. 360/100 nm, 20 Hz	220/8 nm, Ref. 360/100 nm, 20 Hz

Ergebnisse und Diskussion

Abwandlung der TFA-Konzentration zur Optimierung der Trennung von 10 Peptiden

Die Agilent 1260 Infinity II flexible Pumpe mit Blend Assist wurde verwendet, um die Trennung eines 10-Peptid-Standards von Agilent zu verbessern. Dazu wurde die TFA-Konzentration in der mobilen Phase variiert.

Durch Änderung der TFA-Konzentration von 0,05 % auf 0,3 % konnte die Trennung der Peptide deutlich verbessert werden (Abbildung 1). Bei 0,05 % TFA in der mobilen Phase eluierten Peak 4 (Neurotensin) und Peak 5 (Angiotensin) zusammen;

bei 0,2 % TFA konnten beide Peaks bis zur Baseline getrennt werden. Durch weitere Erhöhung der TFA-Konzentration auf 0,3 % konnte die Auflösung dieser beiden Peaks weiter verbessert werden – von 1,77 auf 2,25.

In Tabelle 3 werden die Auflösungen der verschiedenen Peptide bei den verschiedenen Modifier-Konzentrationen im Einzelnen zusammengefasst.

Bei einem TFA-Anteil von 0,3 % in der mobilen Phase konnten die Peptide der Mischung gut getrennt werden und die Auflösung lag bei allen Verbindungen über 2.

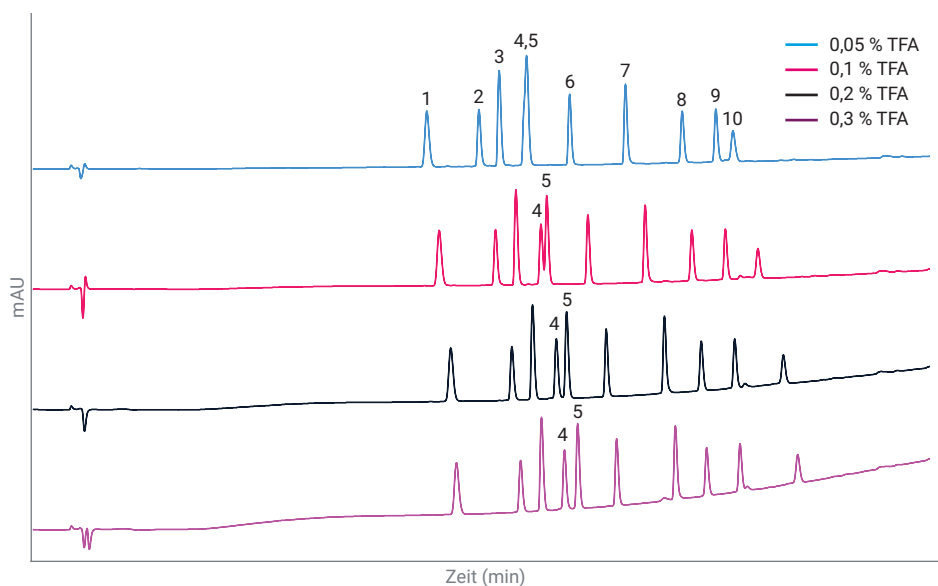


Abbildung 1: Auswirkung der Erhöhung der TFA-Konzentration auf die Trennung des 10-Peptid-Standards von Agilent. Die TFA-Konzentration wurde mit Blend Assist variiert.

Tabelle 3: Überblick über die Auflösung mit unterschiedlichen mit Blend Assist hergestellten TFA-Konzentrationen.

Verbindung	Auflösung			
	0,05 % TFA	0,1 % TFA	0,2 % TFA	0,3 % TFA
1. Bradykininfragment (1-7)	-	-	-	-
2. Bradykininacetat	7,27	7,93	8,49	8,80
3. Angiotensin II	3,34	3,39	3,42	3,43
4. Neurotensin	3,37	4,21	4,05	3,92
5. Angiotensin I		0,99	1,77	2,25
6. Renin	6,02	7,07	6,87	6,74
7. [Ace-F-3,-2 H-1] Angiotensinogen (1-14)	9,88	10,11	10,15	10,24
8. Ser/Thr-Proteinphosphatase (15-31)	9,68	8,01	6,26	5,33
9. [F14] Ser/Thr-Proteinphosphatase (15-31)	5,51	5,59	5,60	5,57
10. Melittin	2,47	5,06	7,45	8,82

Anschließend wurde eine mobile Phase mit einer Modifier-Konzentration von 0,3 % TFA manuell hergestellt und für die Analyse des 10-Peptid-Standards benutzt. Abbildung 2 zeigt einen direkten Vergleich der Chromatogramme von Blend Assist und der manuell gemischten mobilen Phase. Beide Chromatogramme sind ähnlich. In Tabelle 4 werden Retentionszeit (RT), RT-Präzision (RT RSD) und Auflösung genau verglichen. Die Ergebnisse für RT und Auflösung beider Analysebedingungen stimmten hervorragend überein. Die RT-Präzision war für die Analyseläufe mit den manuell gemischten Lösemitteln zwar etwas besser, RT RSD lag jedoch bei beiden Analysebedingungen deutlich unter der Spezifikation von 0,15 %.

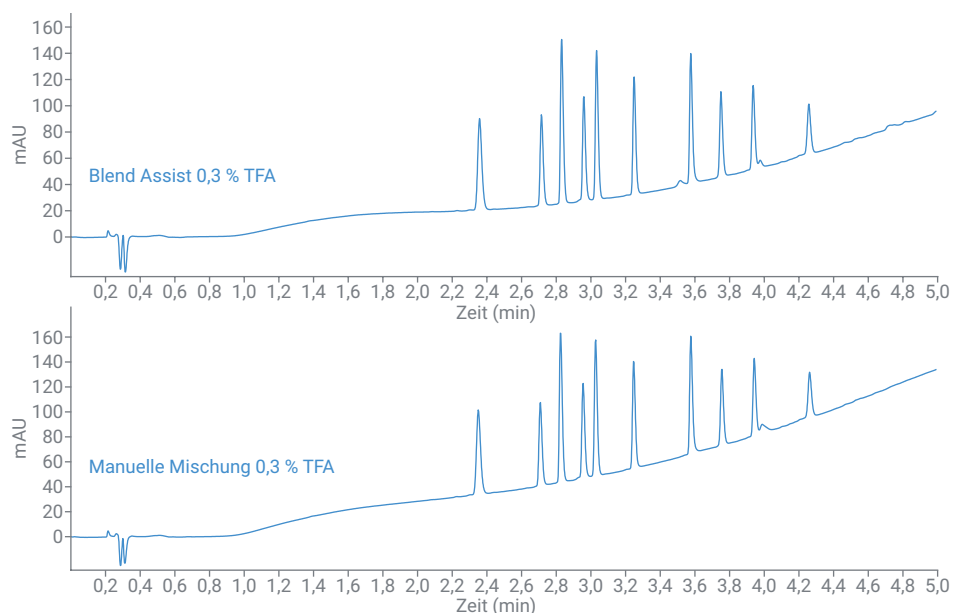


Abbildung 2: Vergleich der Chromatogramme von Analysen eines 10-Peptid-Standards mit und ohne Blend Assist.

Tabelle 4: Vergleich der Retentionszeit und RT RSD für Analysenläufe mit Blend Assist und mit manuell gemischter 0,3 % TFA. In die Berechnung gingen die Ergebnisse von sechs aufeinanderfolgenden Läufen für beide Konfigurationen ein.

Peptid	Blend Assist 0,3 % TFA			Manuell gemischt 0,3 % TFA		
	RT (min)	RT RSD (%)	Auflösung	RT (min)	RT RSD (%)	Auflösung
1. Bradykininfragment (1-7)	2,366	0,017	–	2,359	0,008	–
2. Bradykininacetat	2,725	0,020	8,80	2,717	0,007	8,73
3. Angiotensin II	2,841	0,019	3,43	2,834	0,007	3,42
4. Neurotensin	2,970	0,018	3,92	2,965	0,008	3,92
5. Angiotensin I	3,044	0,016	2,25	3,037	0,009	2,18
6. Renin	3,261	0,013	6,74	3,258	0,009	6,75
7. [Ace-F-3,-2 H-1] Angiotensinogen (1-14)	3,590	0,018	10,24	3,588	0,010	10,22
8. Ser/Thr-Proteinphosphatase (15-31)	3,764	0,019	5,33	3,768	0,005	5,42
9. [F14] Ser/Thr-Proteinphosphatase (15-31)	3,591	0,016	5,57	3,956	0,005	5,63
10. Melittin	4,272	0,011	8,82	4,275	0,015	8,82

Analyse von drei unterschiedlichen Mischungen durch Variierung der Pufferkonzentration in einem Multimethoden-Lauf

Für diesen Ansatz wurden drei unterschiedliche Probenmischungen analysiert: Sulfonamid-Arzneimittel, eine Testosteron-Mischung und ein Peptid-Standard von Sigma. Zur optimalen Trennung dieser unterschiedlichen Analyttypen werden unterschiedliche Ammoniumformiatkonzentrationen in der wässrigen Phase benötigt. Diese Analysen können entweder in separaten Sequenzen durchgeführt werden, bei denen die Lösemittel für jede Methode ausgetauscht werden. Oder aber die Analysen werden in nur einer Sequenz wie in dieser technischen Übersicht zusammengefasst. Mit Blend Assist kann das System die Pufferkonzentration in der wässrigen Phase für jede Methode online ändern. Dies ermöglicht die Durchführung von drei Applikationen in einer Sequenz.

In Abbildung 3 wird die Analyse von vier Sulfonamid-Arzneimitteln dargestellt: Sulfanilamid, Sulfathiazol, Sulfachlorpyridazin und Sulfamethazin. Zur Trennung der Sulfonamid-Arzneimittel wurde 200 mM Ammoniumformiat als Modifier verwendet. Die Präzision der Retentionszeiten war für alle Peaks ausgezeichnet.

Abbildung 4 zeigt die Analyse von Testosteron CIII und Testosteronacetat in sechs aufeinanderfolgenden Läufen. Blend Assist war aktiviert und mischte 50 mM Ammoniumformiat in die wässrige Phase. Die Präzision der Retentionszeiten war für beide Peaks ausgezeichnet.

Abbildung 5 zeigt die Analyse des Peptidstandards von Sigma. Die Analyse erfolgte mit 25 mM Ammoniumformiat in der wässrigen Phase. Die erzielte Präzision der Retentionszeit war ausgezeichnet und lag deutlich unterhalb der Spezifikation von 0,15 %.

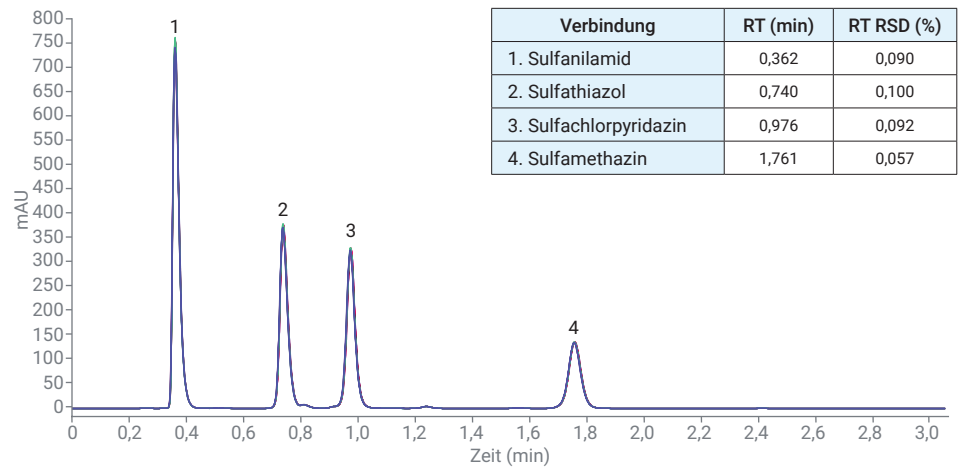


Abbildung 3: Trennung von Sulfonamid-Arzneimitteln: überlagerte Darstellung von sechs aufeinanderfolgenden Analyseläufen.

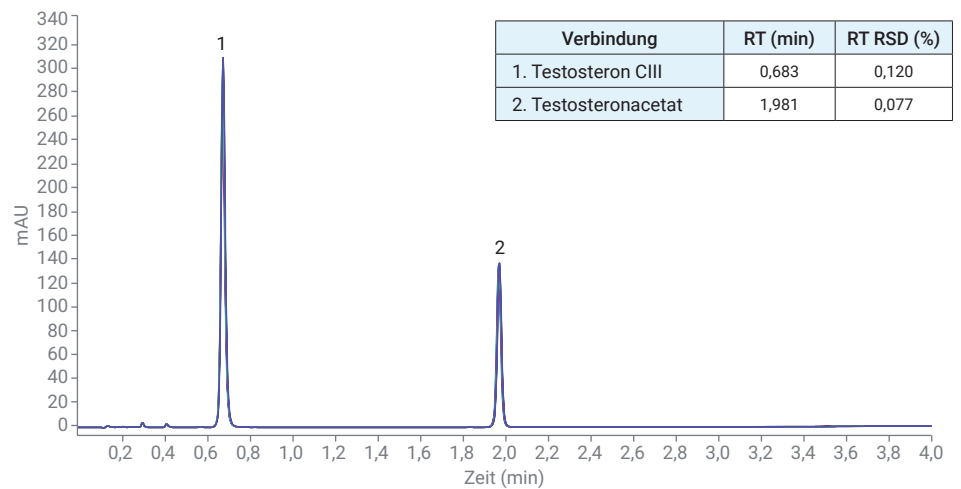


Abbildung 4: Trennung von Testosteron CIII und Testosteronacetat: überlagerte Darstellung von sechs aufeinanderfolgenden Analyseläufen.

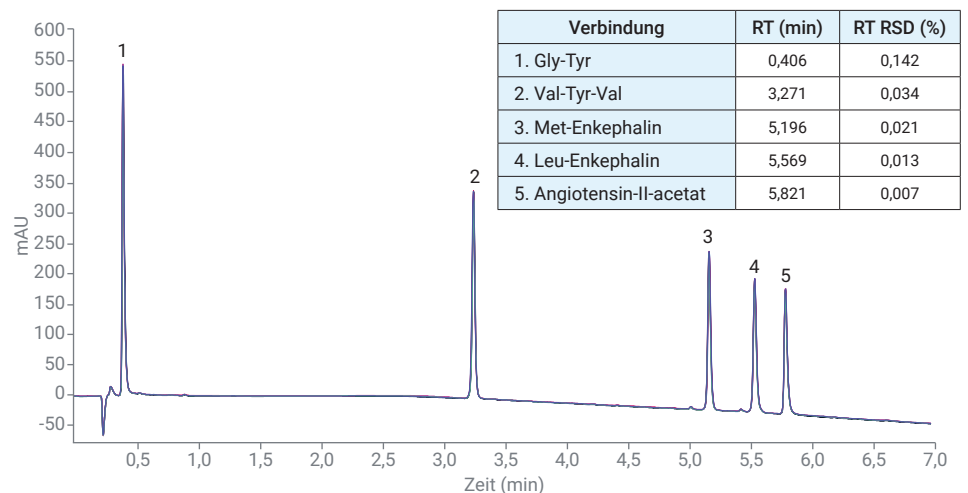


Abbildung 5: Trennung des Peptid-Standards von Sigma: überlagerte Darstellung von sechs aufeinanderfolgenden Analyseläufen.

Abschließende Bemerkungen

Die Agilent 1260 Infinity II flexible Pumpe mit Blend Assist erlaubt eine unkomplizierte Änderung der Modifier-/Pufferkonzentration und kann die manuelle Mischung unterschiedlicher Konzentrationen ersetzen. In dieser technischen Übersicht werden zwei Anwendungsfälle für Blend Assist dargestellt. Im ersten Beispiel wurde die TFA-Konzentration in der mobilen Phase geändert, um die Trennung eines 10-Peptid-Standards zu optimieren. Der Vergleich der mit Blend Assist optimierten Methode mit manuell gemischten Lösemitteln ergab eine hervorragende Übereinstimmung von Retention und Auflösung.

Im zweiten Beispiel wurde die Konzentration des Modifiers Ammoniumformiat für drei unterschiedliche Methoden geändert, um Sulfonamid-Arzneimittel, eine Testosteronmischung und eine Peptidmischung in nur einer Sequenz zu analysieren. Die Präzision der Retentionszeiten war für alle drei Applikationen ausgezeichnet.

Literatur

1. Huesgen A.G. Fast and Flexible Optimization of Modifier Concentrations Using an Agilent 1290 Infinity LC System with Blend Assist, *Agilent Technologies Technical Overview*, Publikationsnummer 5991-2169EN, **2013**.

www.agilent.com/chem

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
Gedruckt in den USA, 1. März 2018
5991-9088DEE