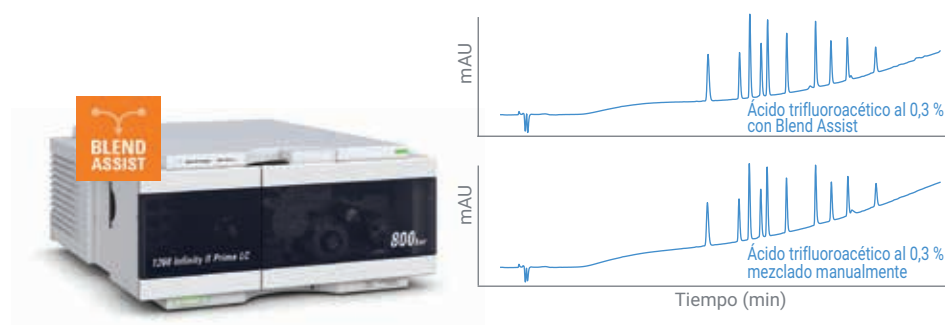


Bomba flexible 1260 Infinity II de Agilent con Blend Assist

Rápida optimización y variación simplificada de la composición del disolvente empleando Blend Assist



Autores

Melanie Metzloff y
Clarissa Dickhut
Agilent Technologies, Inc.

Resumen

La bomba flexible 1260 Infinity II de Agilent con Blend Assist puede utilizarse para variar la concentración del tampón o del modificador empleando gradientes ternarios o cuaternarios. En este resumen técnico se ha empleado Blend Assist con dos planteamientos diferentes:

- En primer lugar, la función Blend Assist se empleó para ensayar el efecto que tienen las diferentes concentraciones de ácido trifluoroacético (TFA) en la separación de un patrón con 10 péptidos. El método optimizado se evaluó teniendo en cuenta la precisión del tiempo de retención, y se comparó con las fases móviles mezcladas de forma manual.
- En segundo lugar, se realizó un experimento de método múltiple. En una secuencia se analizaron tres grupos diferentes de compuestos con concentraciones variables de formiato de amonio. Para cada grupo, la precisión del tiempo de retención demostró que la bomba flexible 1260 Infinity II logra una precisión excelente en combinación con Blend Assist.

Introducción

Blend Assist es una función de software que se incluye en el controlador de la bomba flexible 1260 Infinity II de Agilent. Esta se vale de la capacidad de mezcla cuaternaria de la bomba flexible 1260 Infinity II de Agilent para realizar la dilución on-line de una solución madre (tampón o modificador).

Para optimizar la separación de los componentes variando la concentración del tampón o del modificador, Blend Assist puede usarse durante el desarrollo del método de LC. La herramienta de software evita la laboriosa y costosa mezcla de diferentes concentraciones de un tampón o modificador. Al utilizar el sistema de LC cuaternario, uno o dos canales contienen una alta concentración de tampón/modificador (solución madre); al definir la concentración deseada, Blend Assist diluye los disolventes¹.

Otra área de aplicación es el planteamiento de método múltiple. Para este planteamiento, se incluyen tres mezclas de muestra y tres métodos con diferentes concentraciones de modificador en una secuencia. Al habilitar Blend Assist, los diferentes métodos pueden ejecutarse sin interrumpir el sistema para intercambiar las fases móviles.

Experimento

Instrumentos

Para los diferentes experimentos se emplearon los siguientes módulos:

- Bomba flexible 1260 Infinity II de Agilent (G7104C) con mezclador Agilent Jet Weaver V380 (opción n.º 070)
- Muestreador de viales 1260 Infinity II de Agilent (G7129C), equipado con un refrigerador de muestras integrado (opción n.º 100)
- Termostato multicolumna 1260 Infinity II de Agilent (G7116A)
- Detector de diodo array 1260 Infinity II HS de Agilent (G7117C), equipado con una celda de cartucho Max-Light: Longitud del camino de la celda de 10 mm y $\sigma V = 1,0 \mu l$

Software

Software OpenLAB CDS de Agilent (M8413A)

Productos químicos

Todos los disolventes utilizados fueron de calidad LC. Se obtuvo agua ultrapura

nueva a partir de un sistema integrado Milli-Q equipado con un cartucho de membrana de $0,22 \mu m$ en el punto de consumo (Millipak). El acetonitrilo se compró a Merck (Darmstadt, Alemania). El ácido trifluoroacético (TFA) y el formiato de amonio se compraron a Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

Métodos

Tabla 1. Condiciones cromatográficas para el análisis de una mezcla de 10 péptidos.

Parámetro	Valor
Compuestos	Patrón de 10 péptidos Agilent (ref. 5190-0583)
Columna	Mapa de péptidos AdvanceBio de Agilent $2,1 \times 100$ mm, $2,7 \mu m$ (ref. 655750-902)
Disolvente	A) Agua B) Acetonitrilo C) Agua + ácido trifluoroacético al 1 % (aditivo del disolvente A) D) Acetonitrilo + ácido trifluoroacético al 1 % (aditivo del disolvente B)
Gradiente	0 minutos 5 %B 4 minutos 65 %B
Tiempo de parada	5 minutos
Tiempo posterior	3 minutos
Flujo	1 ml/min
Inyección	Volumen de inyección: $2 \mu l$ con lavado de la aguja de 3 segundos (acetonitrilo al 60 % en agua) Temperatura de la muestra: $10^\circ C$
Temperatura de la columna	$55^\circ C$
Detector DAD	220/4 nm, ref. 360/80 nm, 20 Hz

Tabla 2. Condiciones cromatográficas para el análisis de sulfamidas, una mezcla de testosterona y el patrón de péptido Sigma.

Parámetro	Valor		
Columna	Columna Agilent ZORBAX StableBond $80\text{\AA}$ C18, $2,1 \times 50$ mm, $1,8 \mu m$, 1200 bar (ref: 857700-902)		
Disolvente	A) Agua B) Acetonitrilo C) 250 mM formiato de amonio (aditivo del disolvente A)		
Compuestos	Sulfamidas: Sulfanilamida, sulfatiazol, sulfaclopiridazina y sulfametacina (100 ng/ μl cada una)	Mezcla de testosterona: Testosterona c-IIIN 50 ng/ μl y acetato de testosterona 25 ng/ μl	Patrón del péptido Sigma (Sigma H2016)
Configuración de Blend Assist	200 mM formiato de amonio (canal A + C como aditivo)	50 mM formiato de amonio (canal A + C como aditivo)	25 mM formiato de amonio (canal A + C como aditivo)
Gradiente	0 minutos 10 % B 0,5 minutos 10 % B 4 minutos 30 % B 4,2 minutos 50 % B	0 minutos 45 % B 3 minutos 95 % B	0 minutos 2 % B 0,5 minutos 2 % B 6 minutos 28 % B 7 minutos 95 % B
Tiempo de parada	5 minutos	4 minutos	7 minutos
Tiempo posterior	3 minutos	3 minutos	3 minutos
Flujo	0,5 ml/min	1 ml/min	0,5 ml/min
Inyección	Volumen de inyección: $1 \mu l$ con lavado de la aguja de 3 segundos (acetonitrilo al 60 % en agua) Temperatura de la muestra: $10^\circ C$	Volumen de inyección: $5 \mu l$ con lavado de la aguja de 3 segundos (acetonitrilo al 60 % en agua) Temperatura de la muestra: $10^\circ C$	Volumen de inyección: $2 \mu l$ con lavado de la aguja de 3 segundos (acetonitrilo al 60 % en agua) Temperatura de la muestra: $10^\circ C$
Temperatura de la columna	$60^\circ C$	$30^\circ C$	$35^\circ C$
Detector 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

Resultados y comentarios

Cambio de la concentración de ácido trifluoroacético para la optimización de la separación de una mezcla con 10 péptidos

Para mejorar la separación de la mezcla de 10 péptidos de Agilent, se utilizó la bomba flexible 1260 Infinity II con Blend Assist para ensayar con diferentes concentraciones de ácido trifluoroacético en las fases móviles.

Al variar la concentración del ácido trifluoroacético de 0,05 a 0,3 %, la separación de los péptidos mejoró ostensiblemente (Figura 1). Con un 0,05 % de ácido trifluoroacético en las fases móviles, los picos 4 (neurotensina) y 5 (angiotensina I) coeluyeron; con un 0,2 % de ácido trifluoroacético, ambos picos se separaron en la línea de base. Al aumentar a un 0,3 % de ácido trifluoroacético, la resolución entre estos picos mejoró más aún, de 1,77 a 2,25. La Tabla 3 muestra un resumen detallado de la resolución para los diferentes péptidos con diferentes concentraciones del modificador.

Al emplear un 0,3 % de ácido trifluoroacético en las fases móviles, los péptidos de la mezcla se pudieron separar bien, con una resolución por encima de 2 en todos los compuestos.

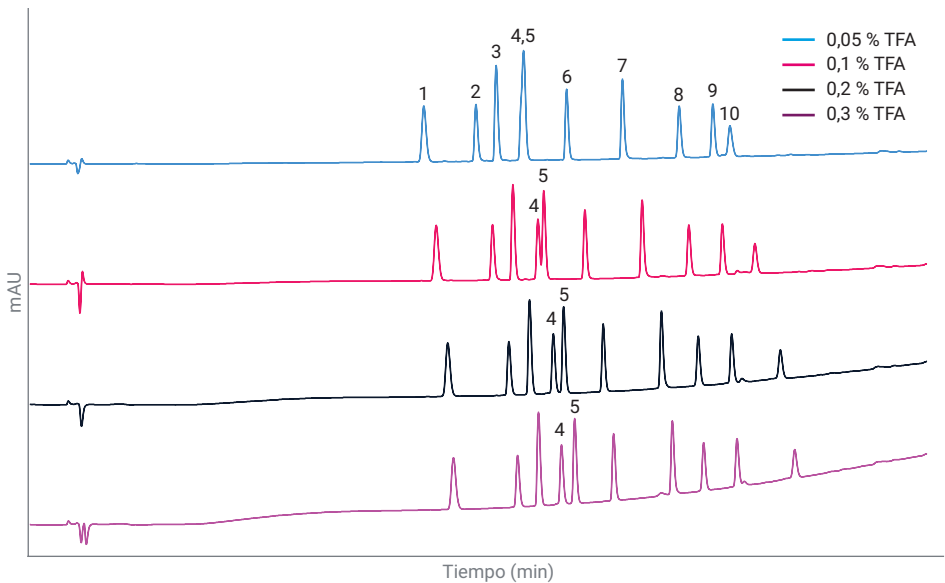


Figura 1. Impacto de la concentración creciente de ácido trifluoroacético en la separación del patrón de 10 péptidos Agilent. Se varió la concentración de ácido trifluoroacético empleando Blend Assist.

Tabla 3. Visión general de la resolución para diferentes concentraciones de ácido trifluoroacético utilizando Blend Assist.

Compuesto	Resolución			
	0,05 % TFA	0,1 % TFA	0,2 % TFA	0,3 % TFA
1. Fragmento de bradiquinina (1-7)	–	–	–	–
2. Acetato de bradiquinina	7,27	7,93	8,49	8,80
3. Angiotensina II	3,34	3,39	3,42	3,43
4. Neurotensina	3,37	4,21	4,05	3,92
5. Angiotensina I		0,99	1,77	2,25
6. Renina	6,02	7,07	6,87	6,74
7. [Ace-F-3,-2 H-1] Angiotensinógeno (1-14)	9,88	10,11	10,15	10,24
8. Proteína fosfatasa Ser/Tre (15-31)	9,68	8,01	6,26	5,33
9. [F14] Proteína fosfatasa Ser/Tre (15-31)	5,51	5,59	5,60	5,57
10. Melitina	2,47	5,06	7,45	8,82

A continuación, se mezclaron manualmente las concentraciones de modificador del 0,3 % en ácido trifluoroacético en las fases móviles, y se utilizaron para el análisis del patrón de 10 péptidos. La Figura 2 muestra una comparación directa entre los cromatogramas obtenidos utilizando Blend Assist y utilizando fases móviles mezcladas manualmente. Ambos cromatogramas son similares. La Tabla 4 muestra una comparación detallada de los tiempos de retención (TR), la precisión del tiempo de retención (RSD TR) y la resolución. Ambas condiciones de análisis mostraron una gran concordancia en el TR y la resolución. La precisión del TR fue ligeramente mejor en los análisis que emplearon disolventes mezclados manualmente; sin embargo, bajo esas condiciones, el RSD TR estuvo claramente por debajo de la especificación del 0,15 %.

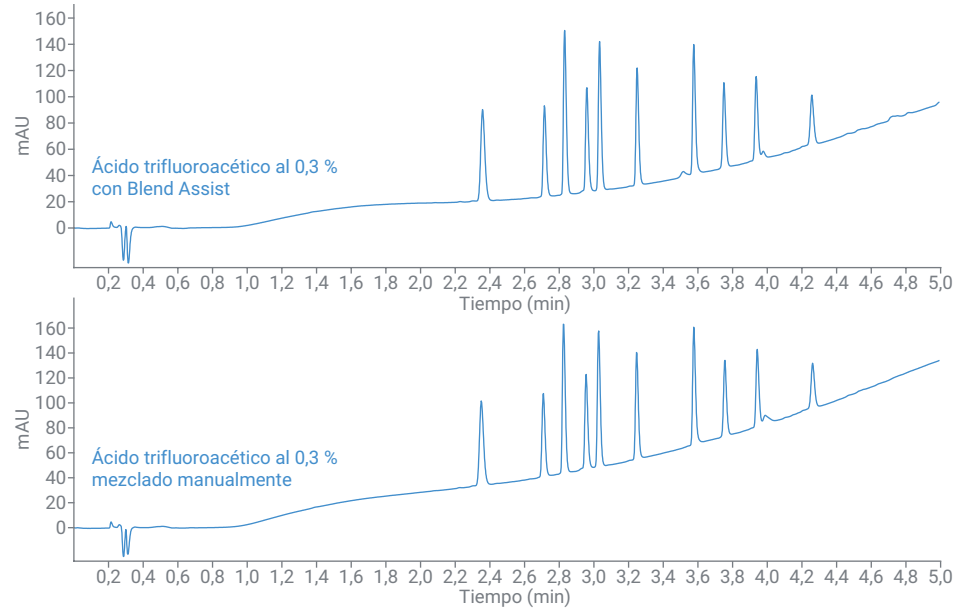


Figura 2. Comparación de los cromatogramas para el análisis de un patrón de 10 péptidos con y sin Blend Assist.

Tabla 4. Comparación del tiempo de retención y el RSD TR en análisis en los que se utilizó Blend Assist, y ensayos en los que se mezcló manualmente ácido trifluoroacético al 0,3 %. Se usaron seis análisis consecutivos con ambas configuraciones para el cálculo.

Péptido	Ácido trifluoroacético al 0,3 % con Blend Assist			Ácido trifluoroacético al 0,3 % mezclado manualmente		
	TR (min)	RSD TR (%)	Resolución	TR (min)	RSD TR (%)	Resolución
1. Fragmento de bradiquinina (1-7)	2,366	0,017	–	2,359	0,008	–
2. Acetato de bradiquinina	2,725	0,020	8,80	2,717	0,007	8,73
3. Angiotensina II	2,841	0,019	3,43	2,834	0,007	3,42
4. Neurotensina	2,970	0,018	3,92	2,965	0,008	3,92
5. Angiotensina I	3,044	0,016	2,25	3,037	0,009	2,18
6. Renina	3,261	0,013	6,74	3,258	0,009	6,75
7. [Ace-F-3,-2 H-1] Angiotensinógeno (1-14)	3,590	0,018	10,24	3,588	0,010	10,22
8. Proteína fosfatasa Ser/Tre (15-31)	3,764	0,019	5,33	3,768	0,005	5,42
9. [F14] Proteína fosfatasa Ser/Tre (15-31)	3,591	0,016	5,57	3,956	0,005	5,63
10. Melitina	4,272	0,011	8,82	4,275	0,015	8,82

Análisis de tres mezclas de compuestos diferentes variando la concentración del tampón con un análisis de método múltiple

Para este planteamiento, se analizaron tres mezclas de muestra diferentes: sulfamidas, una mezcla con testosterona y un patrón de péptidos Sigma. Los tres tipos de analitos requieren una concentración diferente de formiato de amonio en la fase acuosa para lograr una separación óptima. Estos análisis pueden realizarse en secuencias individuales, intercambiando los disolventes para cada método, o bien se pueden realizar en una secuencia, como se indica en este resumen técnico. Con la función Blend Assist, la concentración del tampón en la fase acuosa puede modificarse on-line para cada método; por tanto, es posible ejecutar las tres aplicaciones en una secuencia.

La Figura 3 muestra el análisis de cuatro sulfamidas: sulfanilamida, sulfatiazol, sulfacloropiridazina y sulfametacina. Para la separación de las sulfamidas, se empleó formiato de amonio 200 mM como modificador. Se obtuvo una precisión del tiempo de retención excelente para todos los picos.

La Figura 4 muestra el análisis de la testosterona CIII y el acetato de testosterona en seis análisis consecutivos. Se habilitó la función Blend Assist para mezclar el formiato de amonio 50 mM en la fase acuosa. Se obtuvo una precisión del tiempo de retención excelente para todos los picos.

La Figura 5 muestra el análisis del patrón de péptido Sigma. El análisis se realizó con formiato de amonio 25 mM en la fase acuosa. Excelente precisión del tiempo de retención, con un valor muy por debajo de la especificación del 0,15 %.

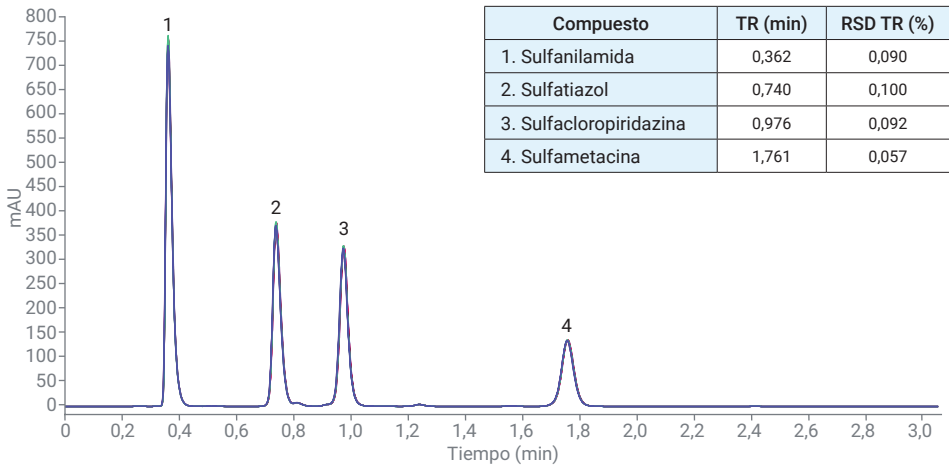


Figura 3. Separación de sulfamidas: superposición de seis análisis consecutivos.

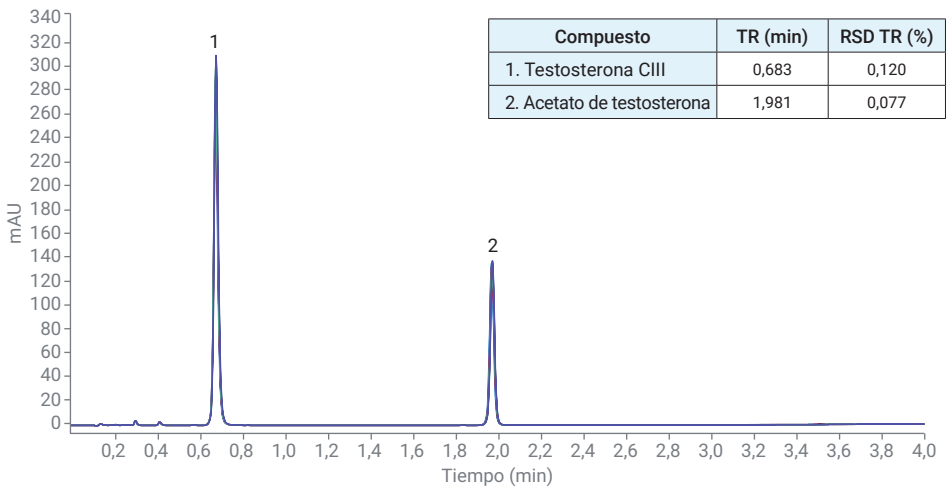


Figura 4. Separación de testosterona CIII y acetato de testosterona: superposición de seis análisis consecutivos.

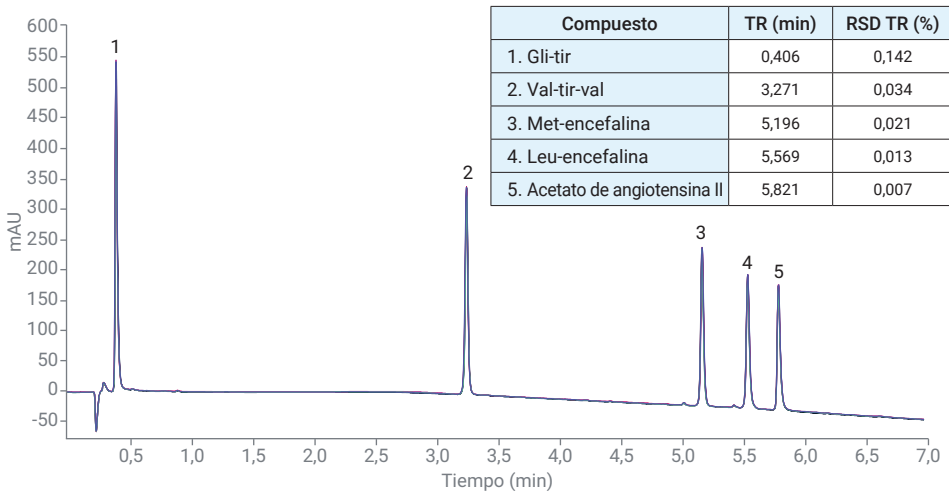


Figura 5. Separación de un patrón de péptido Sigma: superposición de seis análisis consecutivos.

Conclusión

La bomba flexible 1260 Infinity II de Agilent con Blend Assist permite una variación directa de la concentración del modificador/tampón, y evita la necesidad del mezclado manual de diferentes concentraciones. Este resumen técnico presenta dos escenarios de uso de Blend Assist. En el primer ejemplo, se varió la concentración de ácido trifluoroacético en las fases móviles para optimizar la separación de un patrón con 10 péptidos. Se obtuvo una concordancia excelente en la retención y la resolución al comparar el método Blend Assist con los análisis que utilizan disolventes mezclados manualmente.

En el segundo ejemplo, se varió la concentración del formiato de amonio modificador en tres métodos diferentes para el análisis de sulfamidas, una mezcla de testosterona y una mezcla de péptidos en una secuencia. Se obtuvo una precisión del tiempo de retención excelente para los tres ejemplos de aplicación.

Referencia

1. Huesgen A.G. Optimización rápida y flexible de las concentraciones de los modificadores empleando un sistema LC 1290 Infinity de Agilent con Blend Assist, *Resumen técnico Agilent Technologies* número de publicación 5991-2169ES, **2013**.

www.agilent.com/chem

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
Impreso en EE. UU., 1 de marzo de 2018
5991-9088ES