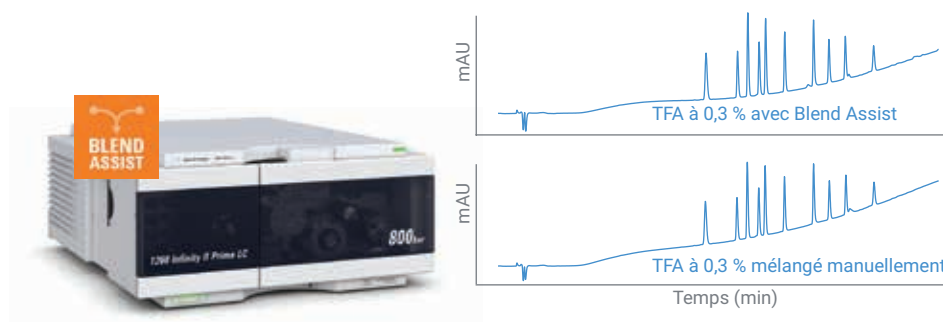


Pompe flexible Agilent 1260 Infinity II avec fonction « Blend Assist »

Optimisation rapide et changement simplifié de la composition du solvant grâce à la fonction d'assistance au mélange Blend Assist



Auteurs

Melanie Metzlaiff et
Clarissa Dickhut
Agilent Technologies, Inc.

Résumé

La pompe flexible Agilent 1260 Infinity II avec la fonction Blend Assist d'assistance au mélange permet de changer les concentrations en tampons ou en modificateurs en utilisant des gradients ternaires ou quaternaires. Cette présentation technique propose deux cas d'utilisation de la fonction Blend Assist :

- Tout d'abord, la fonction Blend Assist a permis d'analyser les effets de différentes concentrations d'acide trifluoroacétique (TFA) sur la séparation d'un étalon de 10 peptides. L'évaluation de la méthode optimisée a concerné la précision des temps de rétention, qui a été comparée à celle obtenue avec des phases mobiles mélangées manuellement.
- Quant à la deuxième approche, il s'agissait d'une expérience multiméthode. Au cours d'une séquence, trois groupes de composés ont été analysés avec différentes concentrations de formiate d'ammonium. Pour chaque groupe, la précision des temps de rétention obtenus a démontré que la précision de la pompe flexible 1260 Infinity II était excellente tout en utilisant la fonction Blend Assist.

Introduction

Blend Assist est une fonction logicielle installée dans le pilote de la pompe flexible Agilent 1260 Infinity II. Elle utilise la capacité de mélange quaternaire de la pompe flexible 1260 Infinity II pour diluer en ligne une solution mère (tampon ou modificateur).

Pour optimiser la séparation des composés en changeant la concentration du tampon ou du modificateur, la fonction Blend Assist peut être utilisée durant le développement des méthodes de LC. Cet outil logiciel évite les procédures longues et complexes de mélange des tampons ou des modificateurs à différentes concentrations. Grâce au système de LC quaternaire, un ou deux canaux peuvent contenir une concentration élevée de tampon/modificateur (solution mère) ; lorsque la concentration désirée est définie, la fonction Blend Assist dilue les solvants¹.

L'approche multiméthode est un autre domaine d'application. Dans ce cas, trois méthodes et trois mélanges d'échantillons avec différentes concentrations de modificateur sont inclus dans une même séquence. En activant la fonction Blend Assist, les différentes méthodes sont exécutées pour échanger les phases mobiles sans interruption du système.

Données expérimentales

Instruments

Les modules suivants ont été utilisés dans les différentes expériences :

- Pompe flexible Agilent 1260 Infinity II (G7104C) avec mélangeur Agilent Jet Weaver V380 (option n° 070)
- Échantillonneur en mode flacons Agilent 1260 Infinity II (G7129C), équipé d'un refroidisseur d'échantillons intégré (option n° 100)
- Thermostat multicolonne Agilent 1260 Infinity II (G7116A)
- Détecteur à barrette de diodes Agilent HS 1260 Infinity II (G7117C), équipé d'une cellule à cartouche Max-Light : trajet optique de la cellule de 10 mm et σV = 1,0 µL

Logiciel

Logiciel OpenLAB CDS (M8413A)

Produits chimiques

Tous les solvants utilisés étaient de qualité LC. De l'eau ultrapure a été obtenue à partir d'un système Milli-Q

Integral équipé d'une cartouche (Millipak) avec une membrane de 0,22 µm. L'acétonitrile a été acheté auprès de Merck (Darmstadt, Allemagne). L'acide trifluoroacétique (TFA) et le formiate d'ammonium ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne).

Méthodes

Tableau 1. Conditions chromatographiques pour l'analyse d'un mélange de 10 peptides.

Paramètre	Valeur
Composés	Étalon de 10 peptides Agilent (réf. 5190-0583)
Colonne	Carte peptidique Agilent AdvanceBio, 2,1 × 100 mm, 2,7 µm (réf. 655750-902)
Solvant	A) Eau B) Acétonitrile C) Eau + 1 % TFA (additif solvant A) D) Acétonitrile + 1 % TFA (additif solvant B)
Gradient	0 minute 5 % B 4 minutes 65 % B
Fin d'analyse	5 minutes
Durée post-analyse	3 minutes
Débit	1 mL/min
Injection	Volume d'injection : 2 µL avec rinçage de l'aiguille pendant 3 secondes (60 % d'acétonitrile dans l'eau) Température de l'échantillon : 10 °C
Température de colonne	55 °C
DAD	220/4 nm, réf. 360/80 nm, 20 Hz

Tableau 2. Conditions chromatographiques pour l'analyse des médicaments sulfamides, du mélange de testostérone et de l'étalon de peptides Sigma.

Paramètre	Valeur		
Colonne	Colonne Agilent ZORBAX StableBond 80 Å C18, 2,1 × 50 mm, 1,8 µm, 1 200 bars (réf. 857700-902)		
Solvant	A) Eau B) Acétonitrile C) 250 mM de formiate d'ammonium (additif solvant A)		
Composés	Médicaments sulfamides : Sulfanilamide, sulfathiazole, sulfachloropyridazine, sulfaméthazine (à 100 ng/µL chacun)	Mélange de testostérone : Testostérone c-IIIN 50 ng/µL et acétate de testostérone 25 ng/µL	Étalon de peptides Sigma (Sigma H2016)
Paramètres de Blend Assist	200 mM de formiate d'ammonium (canal A + C comme additif)	50 mM de formiate d'ammonium (canal A + C comme additif)	25 mM de formiate d'ammonium (canal A + C comme additif)
Gradient	0 minute 10 % B 0,5 minute 10 % B 4 minutes 30 % B 4,2 minutes 50 % B	0 minute 45 % B 3 minutes 95 % B	0 minute 2 % B 0,5 minute 2 % B 6 minutes 28 % B 7 minutes 95 % B
Fin d'analyse	5 minutes	4 minutes	7 minutes
Durée post-analyse	3 minutes	3 minutes	3 minutes
Débit	0,5 mL/min	1 mL/min	0,5 mL/min
Injection	Volume d'injection : 1 µL avec rinçage de l'aiguille pendant 3 secondes (60 % d'acétonitrile dans l'eau) Température de l'échantillon : 10 °C	Volume d'injection : 5 µL avec rinçage de l'aiguille pendant 3 secondes (60 % d'acétonitrile dans l'eau) Température de l'échantillon : 10 °C	Volume d'injection : 2 µL avec rinçage de l'aiguille pendant 3 secondes (60 % d'acétonitrile dans l'eau) Température de l'échantillon : 10 °C
Température de colonne	60 °C	30 °C	35 °C
DAD	254/8 nm, réf. 360/100 nm, 20 Hz	254/8 nm, réf. 360/100 nm, 20 Hz	220/8 nm, réf. 360/100 nm, 20 Hz

Résultats et discussion

Changement de la concentration de TFA pour optimiser la séparation d'un mélange composé de 10 peptides

Pour améliorer la séparation du mélange Agilent de 10 peptides, la pompe flexible 1260 Infinity II assistée de la fonction Blend Assist a été utilisée pour tester plusieurs concentrations de TFA dans les phases mobiles.

En changeant la concentration de TFA de 0,05 à 0,3 %, la séparation des peptides a été grandement améliorée (figure 1). Les pics 4 (neurotensine) et 5 (angiotensine I) qui coéluaiient avec 0,05 % de TFA dans les phases mobiles, étaient séparés à la ligne de base avec 0,2 % de TFA. En augmentant la concentration de TFA jusqu'à 0,3 %, la résolution entre ces pics a pu être encore améliorée, de 1,77 à 2,25. Le tableau 3 présente de manière détaillée la résolution des différents peptides selon les concentrations du modificateur.

Avec 0,3 % de TFA dans les phases mobiles, les peptides du mélange ont été bien séparés, la résolution étant supérieure à 2 pour tous les composés.

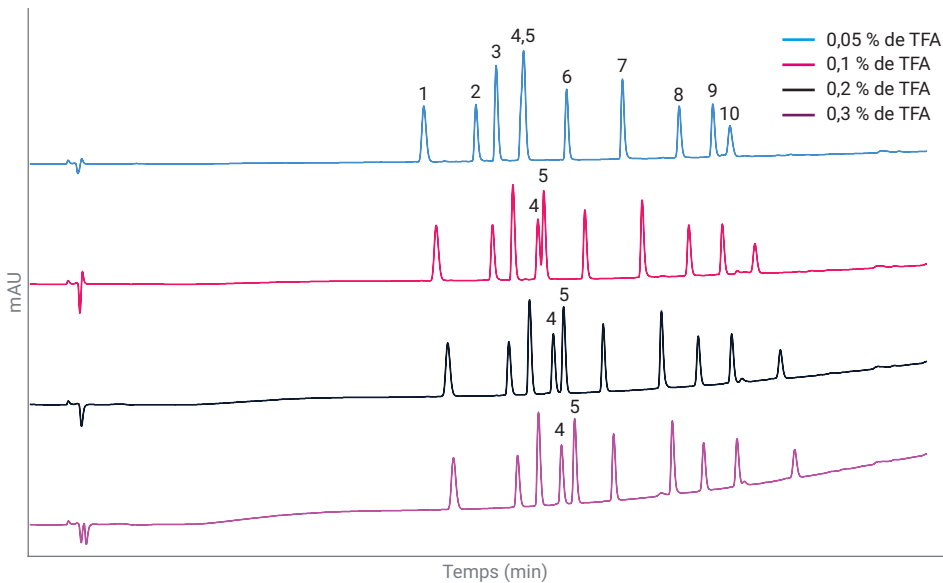


Figure 1. Effet de l'augmentation de la concentration de TFA sur la séparation de l'étalon de 10 peptides Agilent. La concentration de TFA a été changée en utilisant la fonction Blend Assist.

Tableau 3. Présentation des valeurs de résolution obtenues en fonction des concentrations de TFA en utilisant la fonction Blend Assist.

Composé	Résolution			
	0,05 % de TFA	0,1 % de TFA	0,2 % de TFA	0,3 % de TFA
1. Fragment de bradykinine 1-7	–	–	–	–
2. Acétate de bradykinine	7,27	7,93	8,49	8,80
3. Angiotensine II	3,34	3,39	3,42	3,43
4. Neurotensine	3,37	4,21	4,05	3,92
5. Angiotensine I		0,99	1,77	2,25
6. Rénine	6,02	7,07	6,87	6,74
7. [Ace-F-3,-2 H-1] angiotensinogène (1-14)	9,88	10,11	10,15	10,24
8. Ser/Thr protéine phosphatase (15-31)	9,68	8,01	6,26	5,33
9. [F14] Ser/Thr protéine phosphatase (15-31)	5,51	5,59	5,60	5,57
10. Méliittine	2,47	5,06	7,45	8,82

Ensuite, une phase mobile de concentration en modificateur TFA à 0,3 % a été préparée manuellement et utilisée pour l'analyse de l'étalon de 10 peptides. La figure 2 présente une comparaison directe des chromatogrammes acquis avec des phases mobiles mélangées manuellement ou à l'aide de la fonction Blend Assist. Les deux chromatogrammes sont similaires. Le tableau 4 présente une comparaison détaillée des valeurs de temps de rétention (TR), de précision des TR (RSD TR) et de résolution. Les deux conditions d'analyse ont permis d'obtenir un alignement excellent des TR et des résolutions. La précision des TR était légèrement meilleure pour les analyses avec des solvants mélangés manuellement. Cependant, dans les deux conditions, la RSD TR était bien en dessous de la spécification de 0,15 %.

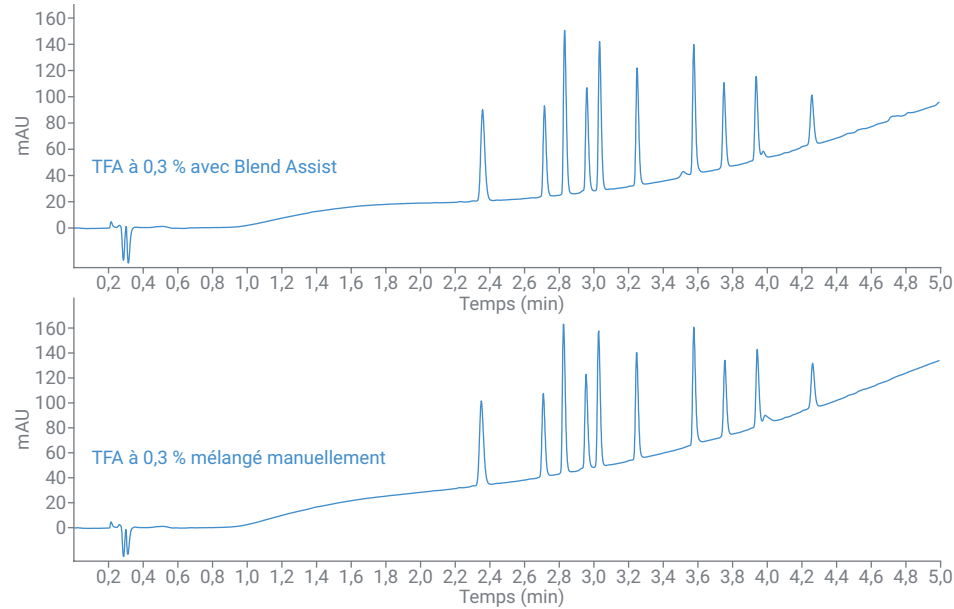


Figure 2. Comparaison des chromatogrammes pour l'analyse d'un étalon de 10 peptides, avec et sans la fonction Blend Assist.

Tableau 4. Comparaison des temps de rétention (TR) et des RSD TR obtenus dans les analyses utilisant la fonction Blend Assist et celles utilisant du TFA à 0,3 % mélangé manuellement. Dans les deux configurations, le calcul est basé sur six analyses consécutives.

Peptide	TFA à 0,3 % avec Blend Assist			TFA à 0,3 % mélangé manuellement		
	TR (min)	RSD TR (%)	Résolution	TR (min)	RSD TR (%)	Résolution
1. Fragment de bradykinine 1-7	2,366	0,017	–	2,359	0,008	–
2. Acétate de bradykinine	2,725	0,020	8,80	2,717	0,007	8,73
3. Angiotensine II	2,841	0,019	3,43	2,834	0,007	3,42
4. Neurotensine	2,970	0,018	3,92	2,965	0,008	3,92
5. Angiotensine I	3,044	0,016	2,25	3,037	0,009	2,18
6. Rénine	3,261	0,013	6,74	3,258	0,009	6,75
7. [Ace-F-3;-2 H-1] angiotensinogène (1-14)	3,590	0,018	10,24	3,588	0,010	10,22
8. Ser/Thr protéine phosphatase (15-31)	3,764	0,019	5,33	3,768	0,005	5,42
9. [F14] Ser/Thr protéine phosphatase (15-31)	3,591	0,016	5,57	3,956	0,005	5,63
10. Méliittine	4,272	0,011	8,82	4,275	0,015	8,82

Analyse multiméthode de trois mélanges de composés différents en faisant varier la concentration du tampon

Dans cette approche, trois différents mélanges ont été analysés : des médicaments de la famille des sulfamides, un mélange de testostérone et un étalon de peptides Sigma. Les trois types de composés exigent chacun une concentration de formiate d'ammonium différente dans la phase aqueuse pour que la séparation soit optimale. Ces analyses peuvent se faire en plusieurs séquences simples, en remplaçant les solvants pour chaque méthode, ou bien en une séquence unique comme c'est le cas dans cette présentation technique. À l'aide de la fonction Blend Assist, la concentration du tampon dans la phase aqueuse peut être modifiée en ligne pour chaque méthode ; ainsi, il est possible d'analyser les trois mélanges en une seule séquence.

La figure 3 présente l'analyse de quatre médicaments de type sulfamides : le sulfanilamide, le sulfathiazole, la sulfachloropyridazine et la sulfaméthazine. Le modificateur utilisé pour la séparation des médicaments sulfamides était le formiate d'ammonium à 200 mM. La précision des temps de rétention obtenue était excellente pour tous les pics.

La figure 4 montre l'analyse de la testostérone CIII et de l'acétate de testostérone pendant six analyses consécutives. La fonction Blend Assist a été activée pour mélanger 50 mM de formiate d'ammonium à la phase aqueuse. La précision des temps de rétention obtenue était excellente pour les deux pics.

La figure 5 montre l'analyse de l'étalon de peptides Sigma. L'analyse a été effectuée avec 25 mM de formiate d'ammonium dans la phase aqueuse. La précision des temps de rétention était excellente, bien en dessous de la spécification de 0,15 %.

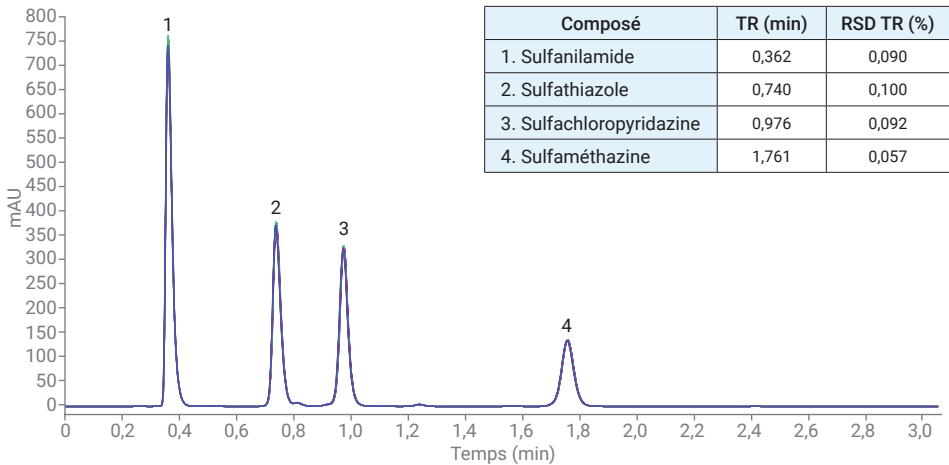


Figure 3. Séparation des médicaments sulfamides : superposition de six analyses consécutives.

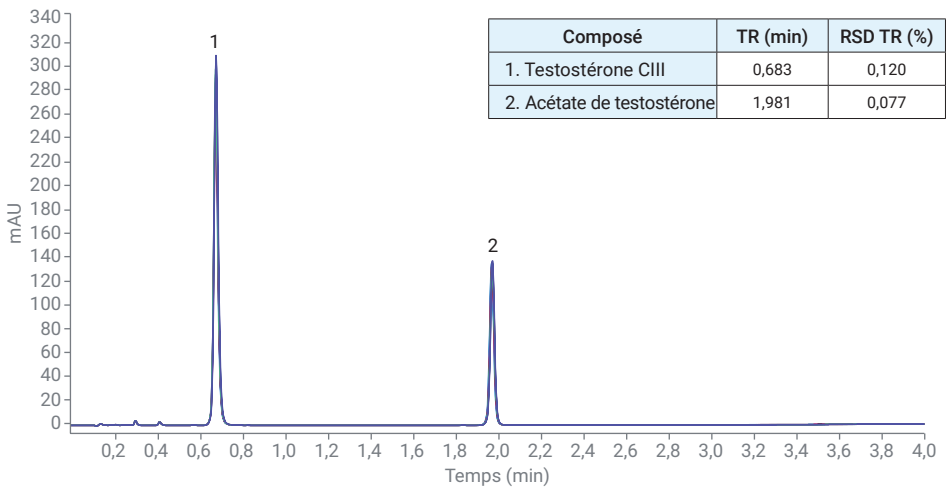


Figure 4. Séparation de la testostérone CIII et de l'acétate de testostérone : superposition de six analyses consécutives.

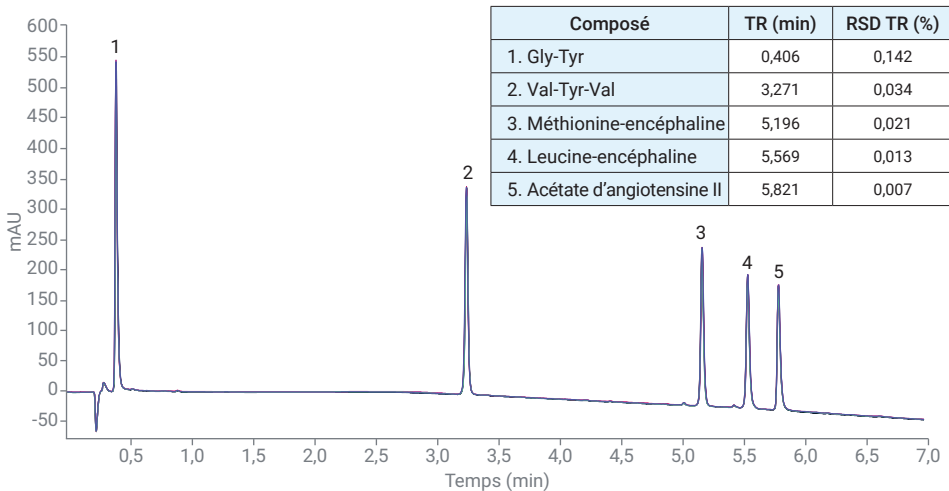


Figure 5. Séparation d'un étalon de peptides Sigma : superposition de six analyses consécutives.

Conclusion

La pompe flexible Agilent 1260 Infinity II associée à la fonction d'assistance au mélange Blend Assist permet de modifier simplement la concentration du tampon/modificateur et d'éviter d'avoir à mélanger manuellement des solutions de concentration différente. Cette présentation technique décrit deux utilisations différentes de la fonction Blend Assist. Dans le premier cas, la concentration de TFA dans les phases mobiles a été changée pour optimiser la séparation d'un étalon de 10 peptides. En comparant les analyses faites avec la fonction Blend Assist à celles utilisant des solvants mélangés manuellement, l'alignement des valeurs de rétention et résolution obtenues a été excellent.

Dans le deuxième cas, la concentration en modificateur (formiate d'ammonium) a été changée dans trois méthodes différentes pour l'analyse de médicaments sulfamides, d'un mélange de testostérone et d'un mélange de peptides au cours de la même séquence. La précision des temps de rétention obtenue était excellente pour les trois exemples d'application.

Référence

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*, publication number 5991-2169EN, **2013**.

www.agilent.com/chem

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
Imprimé aux États-Unis, le 1^{er} mars 2018
5991-9088FR