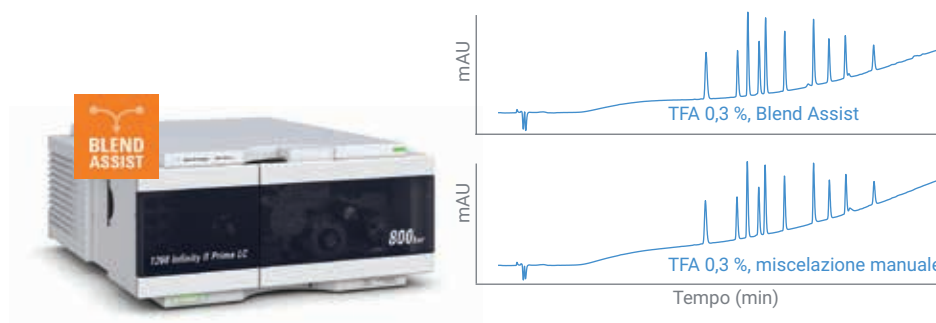


Pompa Flexible Agilent 1260 Infinity II con Blend Assist

Ottimizzazione rapida e variazione semplificata della composizione dei solventi con Blend Assist



Autori

Melanie Metzloff e
Clarissa Dickhut
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

La pompa Flexible Agilent 1260 Infinity II con Blend Assist può essere utilizzata per variare la concentrazione del tampone o del modificatore utilizzando gradienti ternari o quaternari. In questa Nota tecnica si è utilizzato Blend Assist con due approcci differenti.

- Nel primo, la funzionalità Blend Assist è stata utilizzata per testare l'effetto di differenti concentrazioni di acido trifluoroacetico (TFA) sulla separazione di uno standard di 10 peptidi. Il metodo ottimizzato è stato valutato dal punto di vista della precisione del tempo di ritenzione e confrontato con quello ottenuto con fasi mobili miscelate manualmente.
- Il secondo è stato un esperimento multimetodo. Tre differenti gruppi di composti sono stati analizzati in un'unica sequenza con concentrazioni variabili di formiato di ammonio. Per ogni gruppo, la precisione del tempo di ritenzione ha dimostrato l'eccellente precisione della pompa Flexible 1260 Infinity II in combinazione con Blend Assist.

Introduzione

Blend Assist è una funzione software implementata nel driver della pompa Flexible Agilent 1260 Infinity II che sfrutta la capacità di miscelazione quaternaria della pompa Flexible 1260 Infinity II per la diluizione in linea di una soluzione stock (tampone o modificatore).

La funzione Blend Assist può essere utilizzata durante lo sviluppo di metodi LC per ottimizzare la separazione dei composti modificando la concentrazione del tampone o del modificatore. Lo strumento software evita la necessità di effettuare lunghe e complesse miscele di varie concentrazioni di un tampone o di un modificatore. Utilizzando il sistema LC quaternario, uno o due canali contengono un'elevata concentrazione di tampone/modificatore (soluzione stock); se si definisce la concentrazione desiderata, Blend Assist diluisce i solventi¹.

Un'altra area di applicazione corrisponde a un approccio multimetodo. Per questo tipo di approccio, tre miscele di campioni e tre metodi con concentrazioni di modificatore differenti sono incluse in un'unica sequenza. Attivando Blend Assist, i differenti metodi possono essere eseguiti senza che il sistema debba essere interrotto per cambiare le fasi mobili.

Condizioni sperimentali

Strumentazione

Per i diversi esperimenti sono stati utilizzati i seguenti moduli:

- pompa Flexible Agilent 1260 Infinity II (G7104C) con miscelatore Jet Weaver V380 (opzione n.070)
- campionatore per vial Agilent 1260 Infinity II (G7129C), con refrigeratore del campione integrato (opzione n.100)
- termostato multicolonna Agilent 1260 Infinity II (G7116A)
- rivelatore a serie di diodi Agilent 1260 Infinity II HS (G7117C), con cella a cartuccia Max-Light (lunghezza del percorso della cella 10 mm e $\sigma V=1,0 \mu L$)

Software

Agilent OpenLAB CDS (M8413A)

Prodotti chimici

Tutti i solventi utilizzati sono di grado LC. Acqua ultra pura è stata ottenuta da un sistema Milli-Q integrato equipaggiato

con una cartuccia per punto d'uso (Millipak) con membrana da $0,22 \mu m$. L'acetonitrile è stato acquistato presso Merck (Darmstadt, Germania). Acido trifluoroacetico (TFA) e formiato di ammonio sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich (Steinheim, Germania).

Metodi

Tabella 1. Condizioni cromatografiche per l'analisi di una miscela di 10 peptidi.

Parametro	Valore
Composti	Standard Agilent di 10 peptidi (codice 5190-0583)
Colonna	Agilent AdvanceBio Peptide Map, 2,1 × 100 mm, 2,7 μm (codice 655750-902)
Solvente	A) Acqua B) Acetonitrile C) Acqua + TFA 1 % (additivo solvente A) D) Acetonitrile + TFA 1 % (additivo solvente B)
Gradiente	0 minuti: 5 % di B 4 minuti: 65 % di B
Tempo finale	5 minuti
Tempo post analisi	3 minuti
Flusso	1 mL/min
Ciclo di	Volume di iniezione: 2 μL con lavaggio dell'ago di 3 secondi (acetonitrile 60 % in acqua) Temperatura del campione: 10 °C
Temperatura della colonna	55 °C
DAD	220/4 nm, rif. 360/80 nm, 20 Hz

Tabella 2. Condizioni cromatografiche per l'analisi di farmaci sulfamidici, di una miscela di testosterone e dello standard di peptidi Sigma.

Parametro	Valore		
Colonna	Agilent ZORBAX StableBond 80Å C18, 2,1 × 50 mm, 1,8 μm , 1200 bar (codice 857700-902)		
Solvente	A) Acqua B) Acetonitrile C) 250 mM di formiato di ammonio (additivo solvente A)		
Composti	Farmaci sulfamidici: sulfanilamide, sulfatiazolo, sulfacloropiridazina, sulfametazina (100 ng/ μL ciascuno)	Miscela di testosterone: 50 ng/ μL di testosterone c-IIIN e 25 ng/ μL di acetato di testosterone	Standard di peptidi Sigma (Sigma H2016)
Impostazione di Blend Assist	200 mM di formiato di ammonio (canale A + C come additivo)	50 mM di formiato di ammonio (canale A + C come additivo)	25 mM di formiato di ammonio (canale A + C come additivo)
Gradiente	0 minuti: 10 % di B 0,5 minuti: 10 % di B 4 minuti: 30 % di B 4,2 minuti: 50 % di B	0 minuti: 45 % di B 3 minuti: 95 % di B	0 minuti: 2 % di B 0,5 minuti: 2 % di B 6 minuti: 28 % di B 7 minuti: 95 % di B
Tempo finale	5 minuti	4 minuti	7 minuti
Tempo post analisi	3 minuti	3 minuti	3 minuti
Flusso	0,5 mL/min	1 mL/min	0,5 mL/min
Ciclo di	Volume di iniezione: 1 μL con lavaggio dell'ago di 3 secondi (acetonitrile 60 % in acqua) Temperatura del campione: 10 °C	Volume di iniezione: 5 μL con lavaggio dell'ago di 3 secondi (acetonitrile 60 % in acqua) Temperatura del campione: 10 °C	Volume di iniezione: 2 μL con lavaggio dell'ago di 3 secondi (acetonitrile 60 % in acqua) Temperatura del campione: 10 °C
Temperatura della colonna	60 °C	30 °C	35 °C
DAD	254/8 nm, rif. 360/100 nm, 20 Hz	254/8 nm, rif. 360/100 nm, 20 Hz	220/8 nm, rif. 360/100 nm, 20 Hz

Risultati e discussione

Modifica della concentrazione di TFA per ottimizzare la separazione di una miscela di 10 peptidi

Per migliorare la separazione della miscela Agilent di 10 peptidi, è stata utilizzata la pompa Flexible 1260 Infinity II con Blend Assist per testare le differenti concentrazioni di TFA nelle fasi mobili.

Modificando la concentrazione di TFA da 0,05 a 0,3 %, la separazione dei peptidi è stata chiaramente migliorata (Figura 1). Con 0,05 % di TFA nelle fasi mobili, il picco 4 (neurotensina) e il picco 5 (angiotensina I) sono coeluiti; con 0,2 % di TFA, entrambi i picchi sono stati separati alla base. Aumentando fino a 0,3 % di TFA, la risoluzione tra questi picchi può essere ulteriormente migliorata, passando da 1,77 a 2,25. La Tabella 3 mostra una panoramica dettagliata della risoluzione per i differenti peptidi con differenti concentrazioni del modificatore.

Utilizzando 0,3 % di TFA nelle fasi mobili si è ottenuta una buona separazione dei peptidi della miscela, con una risoluzione superiore a 2 per tutti i composti.

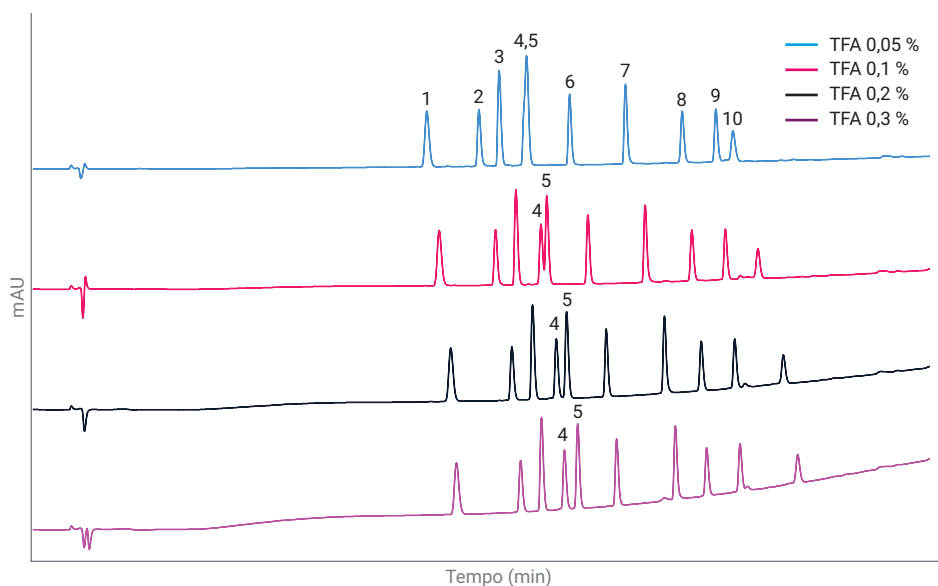


Figura 1. Effetto dell'aumento della concentrazione di TFA sulla separazione dello standard Agilent di 10 peptidi. La concentrazione di TFA è stata modificata utilizzando Blend Assist.

Tabella 3. Panoramica della risoluzione per differenti concentrazioni di TFA ottenute utilizzando Blend Assist.

Composto	Risoluzione			
	TFA 0,05 %	TFA 0,1 %	TFA 0,2 %	TFA 0,3 %
1. Bradichinina, framm. (1-7)	-	-	-	-
2. Acetato di bradichinina	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] Angiotensinogeno (1-14)	9,88	10,11	10,15	10,24
8. Serina/treonina protein fosfatasi (15-31)	9,68	8,01	6,26	5,33
9. [F14] Serina/treonina protein fosfatasi (15-31)	5,51	5,59	5,60	5,57
10. Melittina	2,47	5,06	7,45	8,82

Successivamente, una concentrazione del modificatore di 0,3% di TFA nelle fasi mobili è stata ottenuta mediante miscelazione manuale e utilizzata per l'analisi dello standard di 10 peptidi. La figura 2 mostra un confronto diretto tra il cromatogramma acquisito utilizzando Blend Assist e quello acquisito utilizzando fasi mobili miscelate manualmente. I due cromatogrammi sono simili. La Tabella 4 mostra un confronto dettagliato relativo al tempo di ritenzione (RT), precisione del RT (RSD del RT) e risoluzione. Un eccellente accordo è stato ottenuto nelle due condizioni di analisi per l'RT e per la risoluzione. La precisione del RT è stata leggermente migliore per le analisi in cui si sono utilizzati solventi miscelati manualmente, tuttavia il valore di RSD del RT è risultato chiaramente inferiore alla specifica di 0,15 % in entrambe le condizioni.

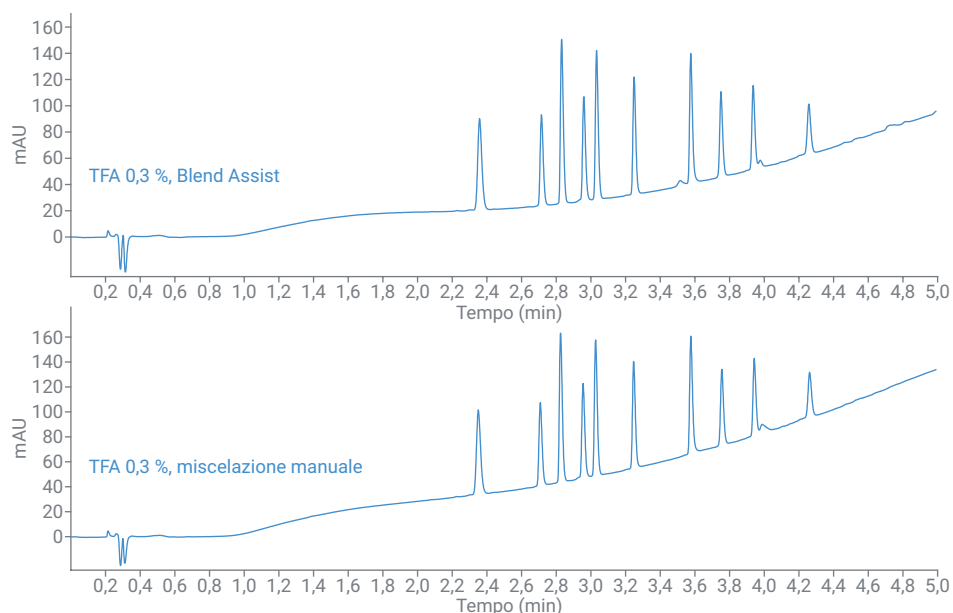


Figura 2. Confronto tra i cromatogrammi per l'analisi di uno standard di 10 peptidi ottenuti con e senza Blend Assist.

Tabella 4. Confronto tra il tempo di ritenzione e il valore della RSD per l'RT per analisi effettuate con Blend Assist e analisi effettuate utilizzando miscele di TFA 0,3 % ottenute manualmente. In entrambe le configurazioni, per il calcolo sono state utilizzate sei analisi consecutive.

Peptide	TFA 0,3 %, Blend Assist			TFA 0,3 %, miscelazione manuale		
	RT (min)	RSD di RT (%)	Risoluzione	RT (min)	RSD di RT (%)	Risoluzione
1. Bradichinina, framm. (1-7)	2,366	0,017	–	2,359	0,008	–
2. Acetato di bradichinina	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] Angiotensinogeno (1-14)	3,590	0,018	10,24	3,588	0,010	10,22
8. Serina/treonina protein fosfatasi (15-31)	3,764	0,019	5,33	3,768	0,005	5,42
9. [F14] Serina/treonina protein fosfatasi (15-31)	3,591	0,016	5,57	3,956	0,005	5,63
10. Melittina	4,272	0,011	8,82	4,275	0,015	8,82

Analisi di tre differenti miscele di composti con variazione della concentrazione del tampone in un'analisi multimetodo

Per questo approccio sono state analizzate tre differenti miscele di campioni: farmaci sulfamidici, una miscela di testosterone e uno standard di peptidi Sigma. Per una separazione ottimale, ognuno dei tre tipi di analiti richiede una concentrazione di formiato di ammonio differente nella fase acquosa. Queste analisi possono essere eseguite in singole sequenze, cambiando i solventi per ogni metodo, oppure in un'unica sequenza, come avviene nella presente nota tecnica. Utilizzando Blend Assist è possibile modificare la concentrazione del tampone nella fase acquosa per ogni metodo in linea ; di conseguenza, è possibile eseguire le tre applicazioni in un'unica sequenza.

La figura 3 illustra l'analisi di quattro farmaci sulfamidici: sulfanilamide, sulfatazolo, sulfacloropiridazina e sulfametazina. Per la separazione dei farmaci sulfamidici, si sono utilizzate 200 mM di formiato di ammonio come modificatore. Un'eccellente precisione del tempo di ritenzione è stata ottenuta per tutti i picchi.

La figura 4 illustra l'analisi di testosterone CIII e acetato di testosterone per sei analisi consecutive. Blend Assist è stato attivato per miscelare 50 mM di formiato di ammonio nella fase acquosa. Un'eccellente precisione del tempo di ritenzione è stata ottenuta per entrambi i picchi.

La figura 5 illustra l'analisi dello standard di peptidi Sigma. L'analisi è stata eseguita con 25 mM di formiato di ammonio nella fase acquosa. E' stata ottenuta un'eccellente precisione del tempo di ritenzione, nettamente inferiore rispetto alla specifica di 0,15 %

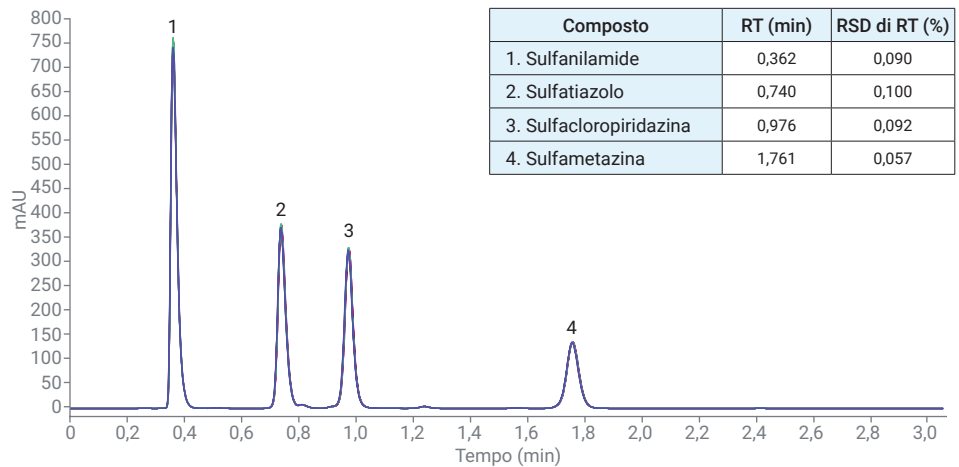


Figura 3. Separazione di farmaci sulfamidici: sovrapposizione di sei analisi consecutive.

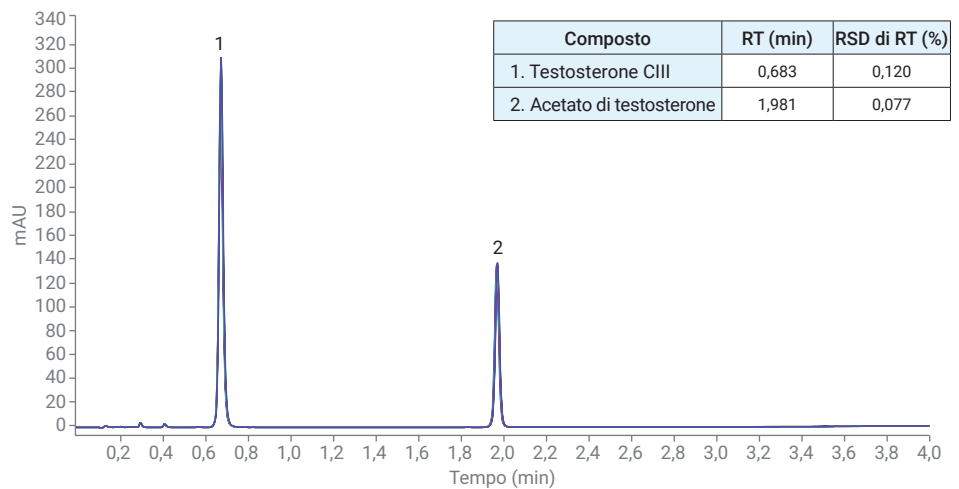


Figura 4. Separazione di testosterone CIII e acetato di testosterone: sovrapposizione di sei analisi consecutive.

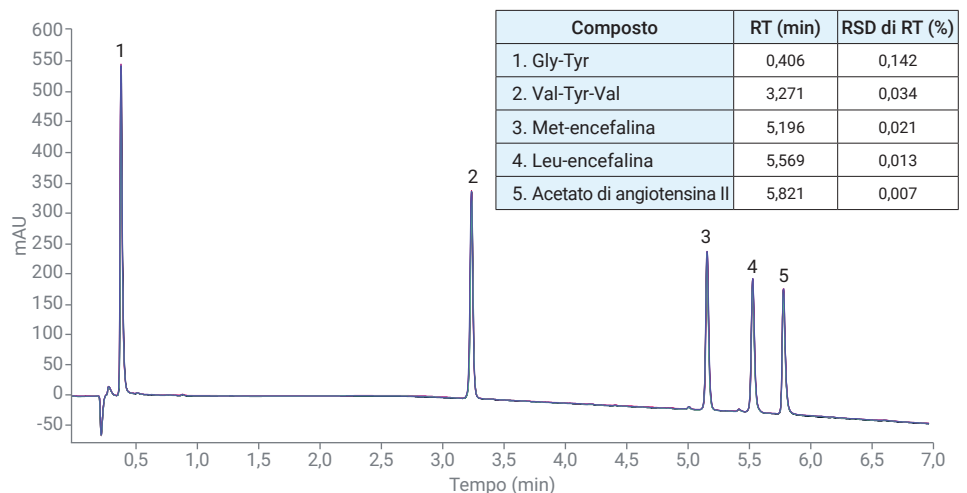


Figura 5. Separazione di uno standard di peptidi Sigma: sovrapposizione di sei analisi consecutive.

Conclusione

La pompa Flexible Agilent 1260 Infinity II con Blend Assist consente di variare in modo semplice la concentrazione del modificatore/tampone ed evita la necessità di effettuare miscele manuali per ottenere le differenti concentrazioni. La presente nota tecnica illustra due differenti esempi di impiego di Blend Assist. Nel primo esempio, la concentrazione di TFA nelle fasi mobili è stata modificata per ottimizzare la separazione di uno standard di 10 peptidi. Il confronto tra il metodo che utilizza Blend Assist e le analisi effettuate utilizzando solventi miscelati manualmente ha evidenziato un eccellente accordo per quanto riguarda ritenzione e risoluzione.

Nel secondo esempio, la concentrazione del modificatore formiato di ammonio è stata modificata in tre differenti metodi per analizzare in un'unica sequenza farmaci sulfamidici, una miscela di testosterone e una miscela di peptidi. Un'eccellente precisione del tempo di ritenzione è stata ottenuta per tutti e tre gli esempi di applicazione.

Bibliografia

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

www.agilent.com/chem

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
Stampato negli Stati Uniti, 1 marzo 2018
5991-9088ITE