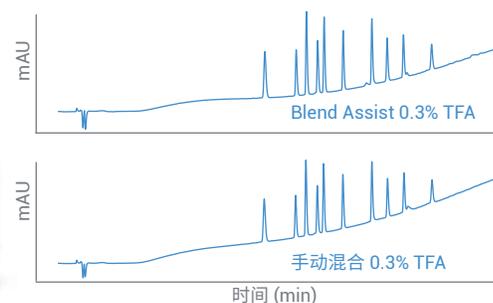


配备 Blend Assist 的 Agilent 1260 Infinity II 全能泵

使用 Blend Assist 实现快速优化并简化溶剂组成变化



作者

Melanie Metzloff 和
Clarissa Dickhut
安捷伦科技公司

摘要

配备 Blend Assist 的 Agilent 1260 Infinity II 全能泵可用于改变二元或三元梯度中的缓冲液或改性剂浓度。本技术概述以两种不同的方法使用 Blend Assist：

- 首先，使用 Blend Assist 功能测试三氟乙酸 (TFA) 浓度对十肽标准品分离的影响。根据保留时间精度对优化后的方法进行评估，并与手动混合流动相的结果进行比较
- 接下来是一个多方法实验。在一个序列中，使用不同浓度的甲酸铵对三组不同的化合物进行分析。每一组的保留时间精度都显示出配备 Blend Assist 的 1260 Infinity II 全能泵具有优异的精度

前言

Blend Assist 是一项在 Agilent 1260 Infinity II 全能泵驱动程序中的软件功能。它利用 1260 Infinity II 全能泵的四元混合能力在线稀释储备液（缓冲液或改性剂）。

Blend Assist 可以用于液相色谱方法开发阶段，通过改变缓冲液或改性剂的浓度来实现化合物分离的优化。该软件工具可以避免费时费力进行各种浓度缓冲液和改性剂混合的过程。使用四元液相色谱系统时，一或两个通道含有高浓度的缓冲液/改性剂（储备液）；确定所需浓度后，Blend Assist 对溶剂进行稀释¹。

另一应用领域是多方法分析。对于这一方法，我们在一个序列中将三种混合物和三种方法以不同的改性剂浓度进行分析。通过启用 Blend Assist，无需中断系统运行更换流动相，即可运行不同的方法。

实验部分

仪器

不同实验中使用下列模块：

- Agilent 1260 Infinity II 全能泵 (G7104C)，配备 V380 Jet Weaver 混合器（选件 #070）
- Agilent 1260 Infinity II 样品瓶进样器 (G7129C)，配备集成式样品冷却装置（选件 #100）
- Agilent 1260 Infinity II MCT (G7116A)
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 HS (G7117C)，配备最大光强卡套式流通池：光程 10 mm， $\sigma V = 1.0 \mu L$

软件

Agilent OpenLAB CDS (M8413A)

化学品

所有试剂均为液相色谱级。新制超纯水产自配置 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak)

方法

表 1. 用于分析十肽混合物的色谱条件

参数	值
化合物	安捷伦十肽标准品（部件号 5190-0583）
色谱柱	Agilent AdvanceBio 肽谱分析柱，2.1 × 100 mm, 2.7 μm （部件号 655750-902）
溶剂	A) 水 B) 乙腈 C) 水 + 1% TFA（溶剂 A 添加剂） D) 乙腈 + 1% TFA（溶剂 B 添加剂）
梯度	0 min 时 B 为 5% 4 min 时 B 为 65%
停止时间	5 min
后运行时间	3 min
流速	1 mL/min
进样	进样量：2 μL ，进样针清洗 3 s（60% 乙腈水溶液） 样品温度：10 °C
柱温	55 °C
DAD	220/4 nm，参比波长 360/80 nm，20 Hz

表 2. 用于分析磺胺类药物、鞣酮混合物和 Sigma 多肽标准品的色谱条件

参数	值		
色谱柱	Agilent ZORBAX StableBond 80Å C18，2.1 × 50 mm, 1.8 μm ，1200 bar（部件号 857700-902）		
溶剂	A) 水 B) 乙腈 C) 250 mM 甲酸铵（溶剂 A 添加剂）		
化合物	磺胺类药物： 磺胺、磺胺噻唑、磺胺氯哒嗪、磺胺二甲嘧啶（每种组分浓度 100 ng/ μL ）	鞣酮混合物：鞣酮 c-IIIIN (50 ng/ μL) 和醋酸鞣酮 (25 ng/ μL)	Sigma 多肽标准品 (Sigma H2016)
Blend Assist 设置	200 mM 甲酸铵（通道 A 和 C 作为添加剂）	50 mM 甲酸铵（通道 A 和 C 作为添加剂）	25 mM 甲酸铵（通道 A 和 C 作为添加剂）
梯度	0 min 10% B 0.5 min 10% B 4 min 30% B 4.2 min 50% B	0 min 45% B 3 min 95% B	0 min 2% B 0.5 min 2% B 6 min 28% B 7 min 95% B
停止时间	5 min	4 min	7 min
后运行时间	3 min	3 min	3 min
流速	0.5 mL/min	1 mL/min	0.5 mL/min
进样	进样量：1 μL ，进样针清洗 3 s（60% 乙腈水溶液） 样品温度：10 °C	进样量：5 μL ，进样针清洗 3 s（60% 乙腈水溶液） 样品温度：10 °C	进样量：2 μL ，进样针清洗 3 s（60% 乙腈水溶液） 样品温度：10 °C
柱温	60 °C	30 °C	35 °C
DAD	254/8 nm，参比波长 360/100 nm，20 Hz	254/8 nm，参比波长 360/100 nm，20 Hz	220/8 nm，参比波长 360/100 nm，20 Hz

结果与讨论

改变 TFA 浓度，以优化十肽混合物的分离

为改善安捷伦十肽混合物的分离，使用配备 Blend Assist 的 1260 Infinity II 全能泵来测试流动相中的不同 TFA 浓度。

TFA 浓度由 0.05% 增至 0.3% 的过程中，多肽的分离得到明显改善（图 1）。流动相中含 0.05% TFA 时，4 号峰（神经降压素）与 5 号峰（血管紧张素 I）发生共洗脱；到达 0.2% TFA 时，两个峰已实现基线分离。增加至 0.3% TFA 时，两个峰的分度进一步改善，由 1.77 增至 2.25。表 3 显示了不同多肽在不同改性剂浓度下分离度的详细信息。

流动相中含 0.3% TFA 时，多肽混合物即可得到完全分离，所有化合物的分离度均大于 2。

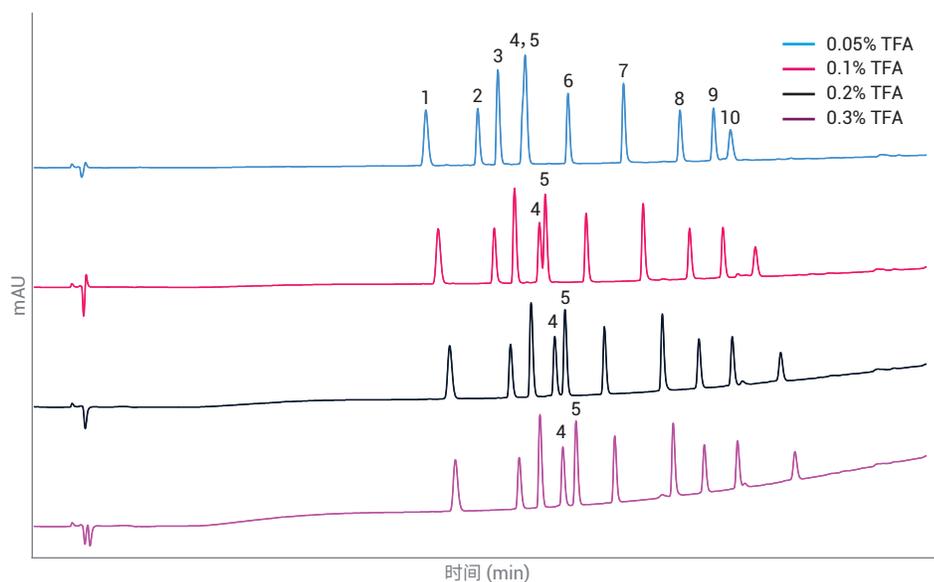


图 1. 提高 TFA 浓度对安捷伦十肽标准品分离的影响。使用 Blend Assist 改变 TFA 浓度

表 3. 使用 Blend Assist 的不同 TFA 浓度分离度信息

化合物	分离度			
	0.05% TFA	0.1% TFA	0.2% TFA	0.3% TFA
1. 缓激肽片段 (1-7)	-	-	-	-
2. 醋酸缓激肽	7.27	7.93	8.49	8.80
3. 血管紧张素 II	3.34	3.39	3.42	3.43
4. 神经降压素	3.37	4.21	4.05	3.92
5. 血管紧张素 I		0.99	1.77	2.25
6. 肾素	6.02	7.07	6.87	6.74
7. [Ace-F-3,-2 H-1] 血管紧张素 (1-14)	9.88	10.11	10.15	10.24
8. 丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 (15-31)	9.68	8.01	6.26	5.33
9. [F14] 丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 (15-31)	5.51	5.59	5.60	5.57
10. 蜂毒肽	2.47	5.06	7.45	8.82

接下来，采用手动方式将改性剂以 0.3% TFA 的浓度混合于流动相中，用于分析十肽标准品。图 2 所示为使用 Blend Assist 和使用手动方法混合流动相所获色谱图的直接比较。两幅色谱图非常相似。表 4 显示了关于保留时间 (RT)、RT 精度 (RT RSD) 和分离度的详细对比。两种运行条件在 RT 和分离度方面都获得了优异的一致性。采用手动方式混合溶剂的运行方法的 RT 精度略高，但是两种条件下 RT RSD 都明显小于 0.15% 的指标。

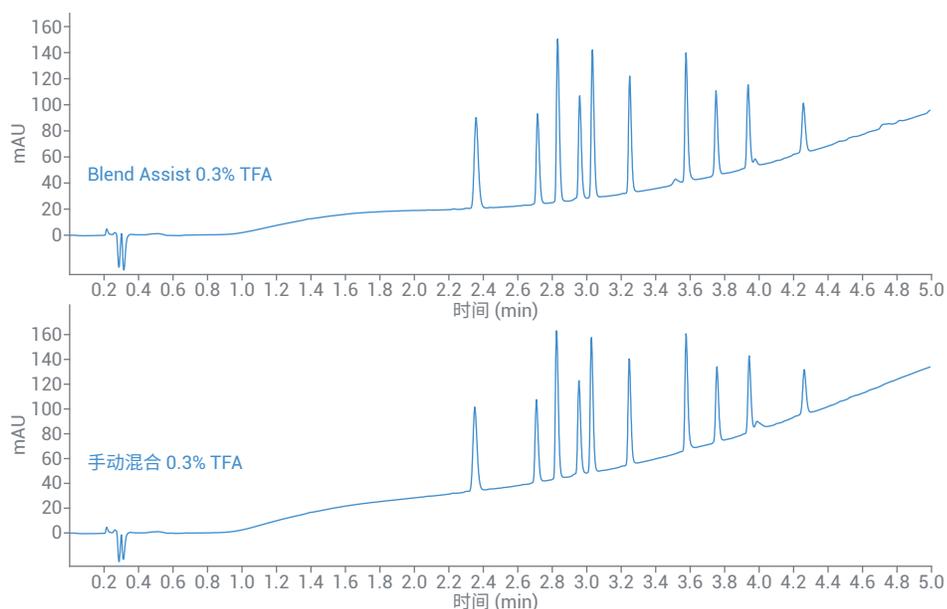


图 2. 启用与不启用 Blend Assist 分析十肽标准品色谱图的比较

表 4. 使用 Blend Assist 和手动方法混合 0.3% TFA 的保留时间与 RT RSD 的比较。两种设置均进行六次连续进样，用于计算

肽	Blend Assist 0.3% TFA			手动混合 0.3% TFA		
	RT (min)	RT RSD (%)	分离度	RT (min)	RT RSD (%)	分离度
1. 缓激肽片段 (1-7)	2.366	0.017	-	2.359	0.008	-
2. 醋酸缓激肽	2.725	0.020	8.80	2.717	0.007	8.73
3. 血管紧张素 II	2.841	0.019	3.43	2.834	0.007	3.42
4. 神经降压素	2.970	0.018	3.92	2.965	0.008	3.92
5. 血管紧张素 I	3.044	0.016	2.25	3.037	0.009	2.18
6. 肾素	3.261	0.013	6.74	3.258	0.009	6.75
7. [Ace-F-3,-2 H-1] 血管紧张素 (1-14)	3.590	0.018	10.24	3.588	0.010	10.22
8. 丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 (15-31)	3.764	0.019	5.33	3.768	0.005	5.42
9. [F14] 丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 (15-31)	3.591	0.016	5.57	3.956	0.005	5.63
10. 蜂毒肽	4.272	0.011	8.82	4.275	0.015	8.82

在多方法运行中通过改变缓冲液浓度分析三种不同的化合物混合物

在这一方法中，对以下三种不同的样品混合物进行分析：磺胺类药物、睾酮混合物和 Sigma 多肽标准品。三种类型的分析物都需要在水相中加入不同浓度的甲酸铵来实现最佳分离。三种分析物可以在一个序列中运行，如本技术概述中介绍的方法，在同一序列中根据每个方法或分析物的不同更换溶剂。使用 Blend Assist 可以为每种方法在线改变水相中的缓冲液浓度；因此可以在一个序列中运行三种应用方法。

图 3 所示为以下 4 种磺胺类药物的分析结果：磺胺、磺胺噻唑、磺胺氯吡啶和磺胺二甲嘧啶。分离磺胺类药物时，使用 200 mM 的甲酸铵溶液作为改性剂。所有峰都获得了优异的保留时间精度。

图 4 所示为睾酮 CIII 和醋酸睾酮六次连续运行的分析结果。启用 Blend Assist 将 50 mM 甲酸铵混合至水相。两个峰都获得了优异的保留时间精度。

图 5 所示为 Sigma 多肽标准品的分析结果。分析过程中，在水相中加入了 25 mM 的甲酸铵。这一操作同样获得优异的保留时间精度，明显小于 0.15% 的指标。

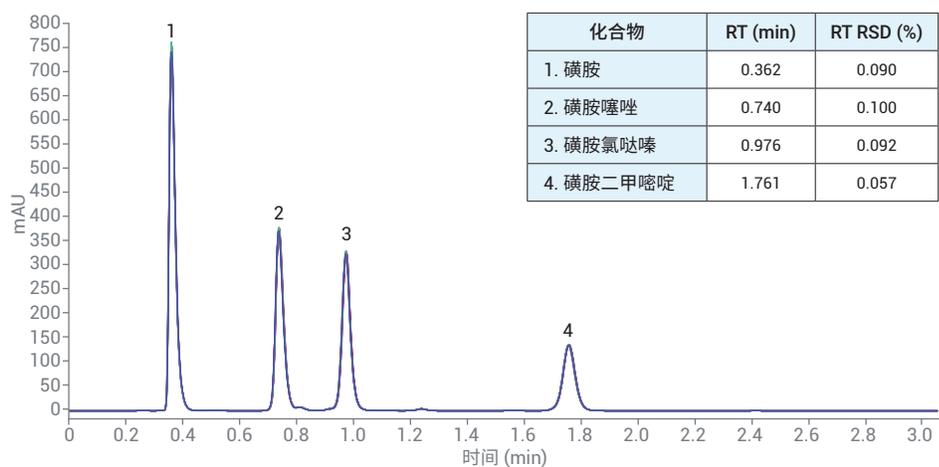


图 3. 磺胺类药物分离：六次连续运行的叠加色谱图

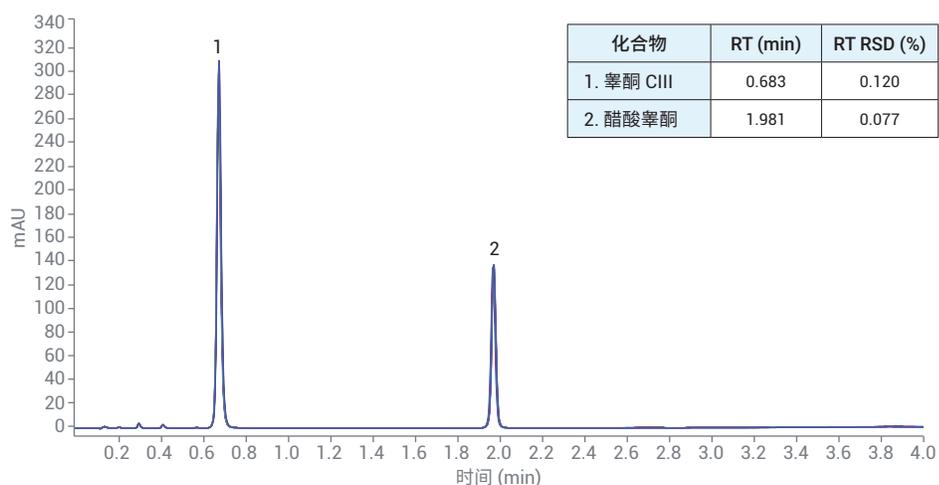


图 4. 睾酮 CIII 和醋酸睾酮的分离：六次连续运行的叠加色谱图

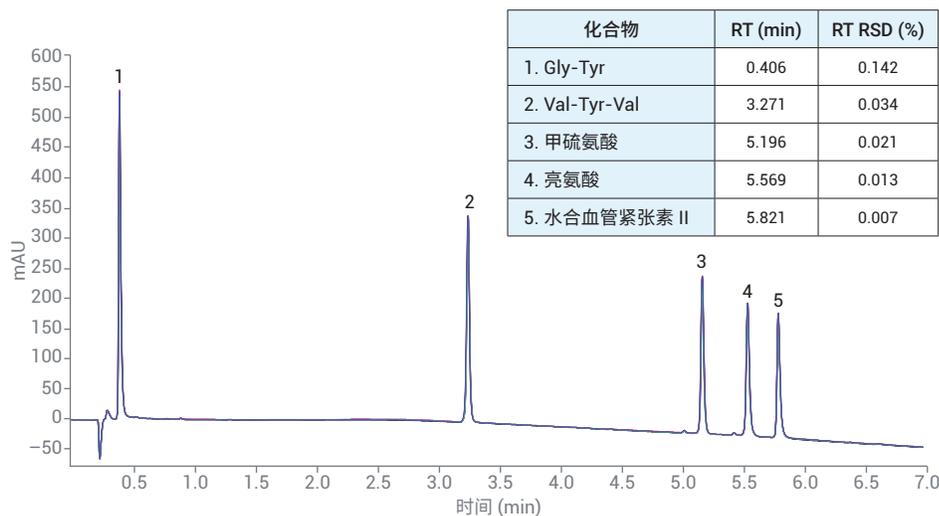


图 5. Sigma 多肽标准品分离：六次连续运行的叠加色谱图

结论

配备 Blend Assist 的 Agilent 1260 Infinity II 全能泵能够直接改变改性剂/缓冲液浓度，避免手动混合各种浓度的需要。本技术概述中展示了 Blend Assist 的两个用例。第一个例子中，通过改变流动相中的 TFA 浓度来优化十肽标准品的分离。比较 Blend Assist 方法与手动混合溶剂运行的方法，保留时间和分离度均获得优异的一致性。

第二个例子中，在同一序列中根据三种不同的方法和各种分析物（磺胺类药物、鞣酮混合物和多肽混合物）改变改性剂甲酸铵的浓度。三个应用示例都获得了优异的保留时间精度。

参考文献

1. Huesgen A.G. Fast and Flexible Optimization of Modifier Concentrations Using an Agilent 1290 Infinity LC System with Blend Assist (使用配备 Blend Assist 的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统快速、灵活地优化改性剂浓度)，安捷伦科技公司技术概述，出版号 5991-2169EN，**2013**

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2018
2018年3月1日，中国出版
5991-9088ZHCN