



Une analyse par chromatographie liquide ultra a été développée pour évaluer les performances de l'UPLC lors de la séparation de protéines.  
Différents protocoles de séparation ont été comparés sur des échantillons complexes de protéines (alimentation animale) en vue de mettre en évidence la présence de protéines ou de fragments protéiques d'une taille supérieure à 10.000 daltons.

Préparation des standards et des échantillons – Conditions UPLC®

Les standards sont dissous dans la phase mobile initiale (1 mg·mL<sup>-1</sup>).

Les standards sont dissous dans le tampon acide (2 mg·mL<sup>-1</sup>).  
Les échantillons sont mixés dans le tampon acide de façon à obtenir une concentration en protéines de 5 mg par mL de solution.

Système : ACQUITY UPLC + DAD  
Colonne : ACQUITY UPLC BEH300 C4 1.7µm, 2.1 x 150mm  
Volume d'injection : 20 µL  
Température de colonne : 65°C  
Température des échantillons : 4°C  
Solvant A : Formic acid 0.1 % dans l'eau  
Solvant B : Formic acid 0.1 % dans l'acétonitrile  
Débit : 300 µL·min<sup>-1</sup>  
Longueur d'onde : 200 to 500 nm  
Gradient :

	Temps (min.)	% A	% B
1	Initial	95.0	5.0
2	1.00	95.0	5.0
3	2.00	90.0	10.0
4	37.00	70.0	30.0
5	40.00	95.0	5.0

Système : ACQUITY UPLC + DAD  
Colonne : ACQUITY UPLC BEH300 C4 1.7µm, 2.1 x 150mm  
Volume d'injection : 20 µL  
Température de colonne : 65°C  
Température des échantillons : 4°C  
Solvant A : Trifluoroacetic acid (TFA) 0.1 % dans l'eau  
Solvant B : Trifluoroacetic acid (TFA) 0.075 % dans l'acétonitrile  
Débit : 200 µL·min<sup>-1</sup>  
Longueur d'onde : 220 nm  
Gradient :

	Temps (min.)	% A	% B
1	Initial	72.0	28.0
2	25.00	0.0	100.0
3	30.00	72.0	28.0

Système : ACQUITY UPLC H-Class Bio System + TUV  
Colonne : ACQUITY UPLC BEH200 SEC 1.7µm, 4.6 x 150mm  
Volume d'injection : 10 µL  
Température de colonne : 30°C  
Température des échantillons : 4°C  
Solvant A : 0.125M Monobasic Sodium Phosphate (Acidic Buffer)  
Solvant B : 0.125M Dibasic Sodium Phosphate (Basic Buffer)  
Solvant C : 1.0M Sodium Chloride  
Solvant D : Water  
pH de la phase mobile : Auto Blend Plus  
Débit de la phase mobile : 400 µL·min<sup>-1</sup>  
Longueur d'onde : 280nm  
Flux isocratique – Tampon Phosphate pH 6.8  
Durée d'analyse : 6 minutes



Résultats

Temps d'analyse : 40.0 minutes

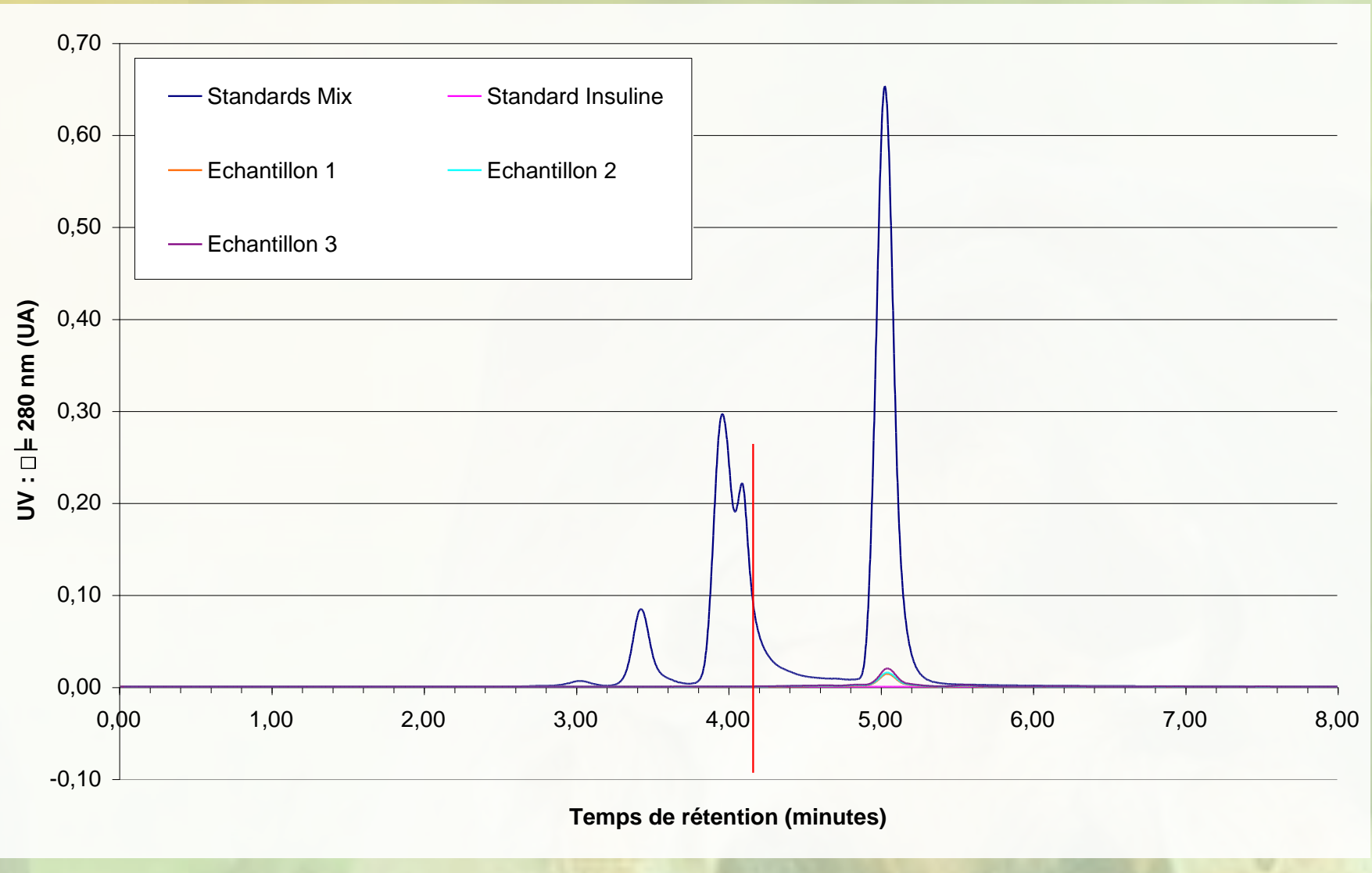
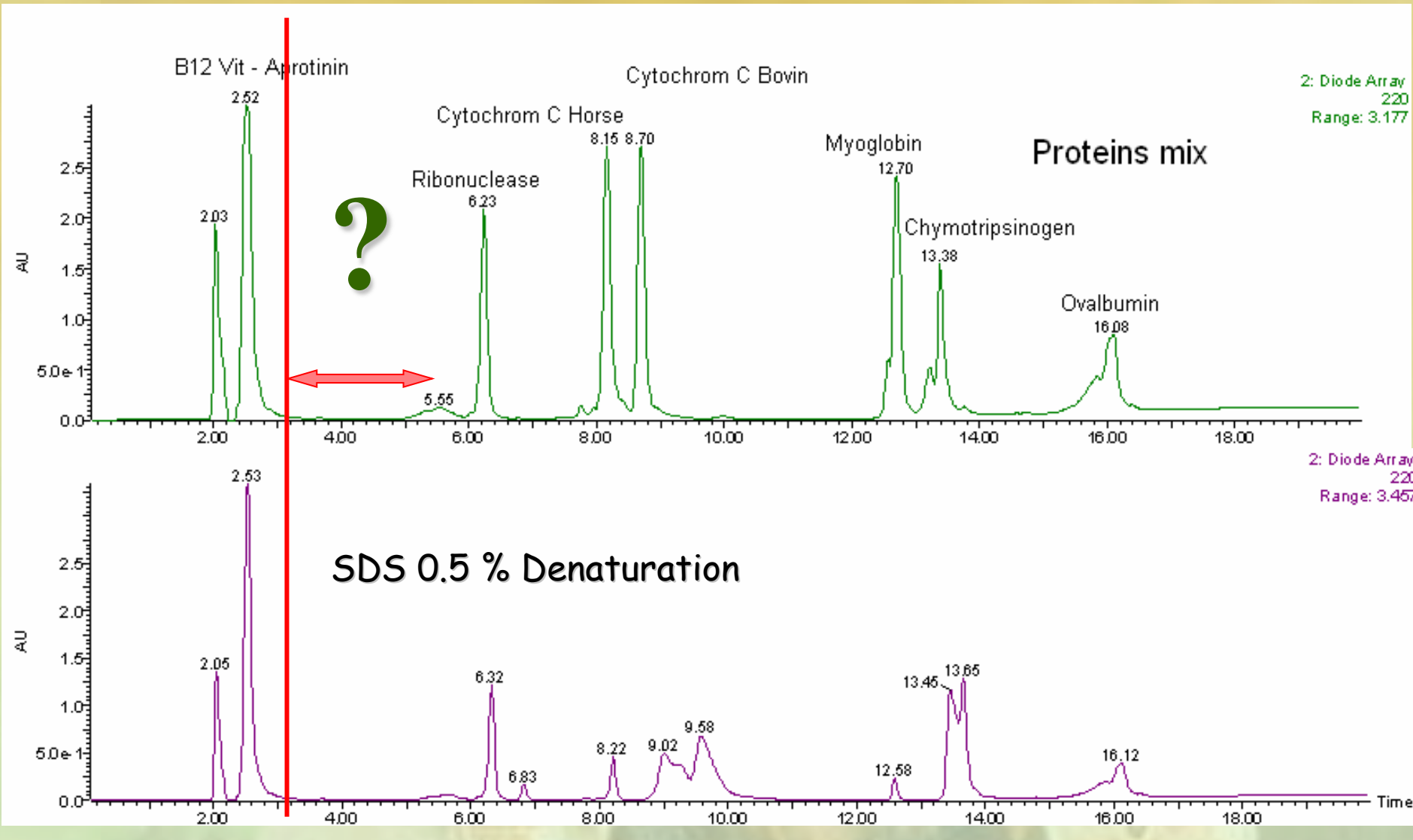
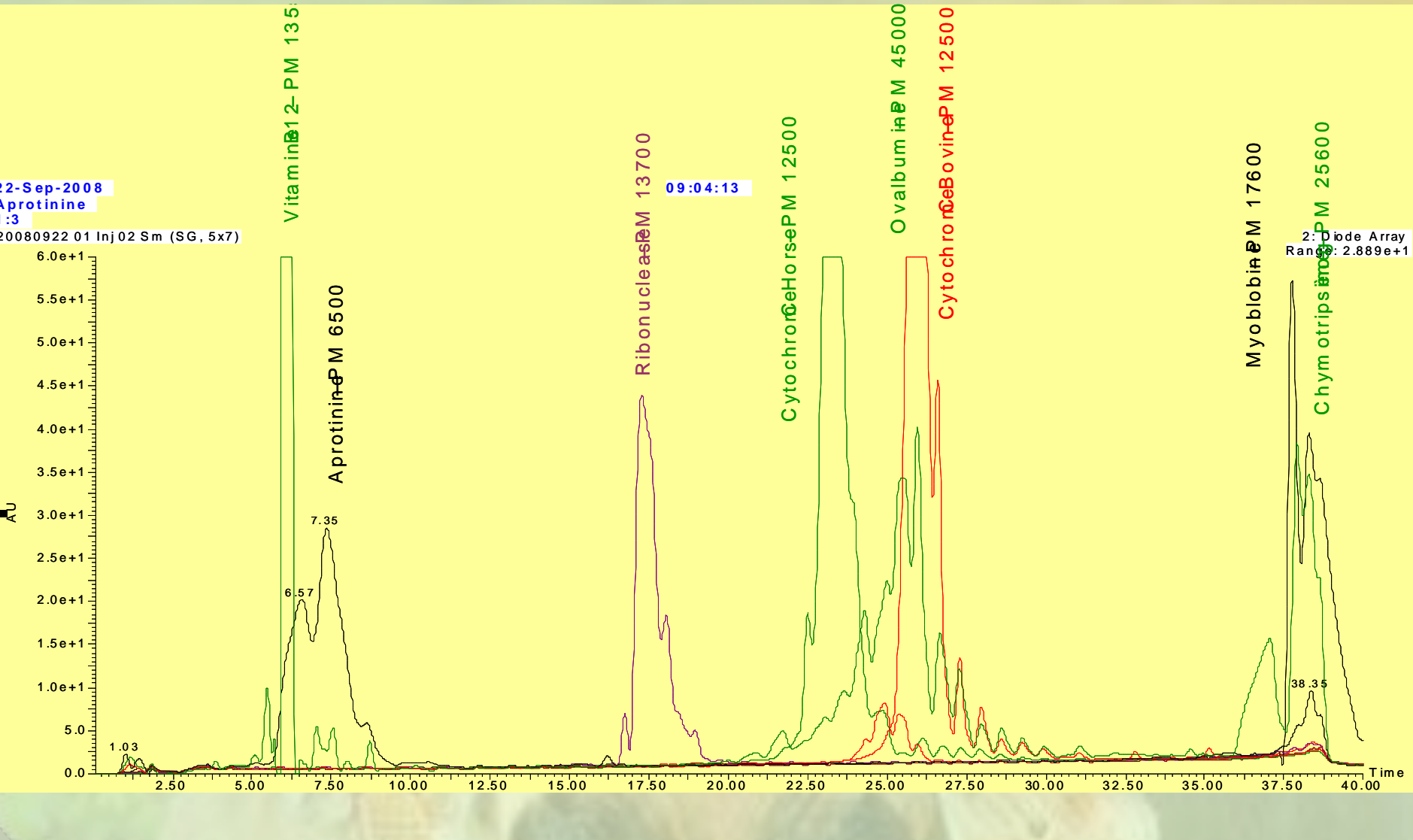
	Protéine	MW (Da)	Temps de rétention
1	Vitamine B12	1355	6.00
2	Aprotinine	6500	7.35
3	Ribonucléase	13700	17.50
4	Cytochrome C Horse	12500	23.25
5	Ovalbumine	45000	25.75
6	Cytochrome C Bovine	12500	26.00
7	Myoglobine	17600	37.50
8	Chymotripsinogène A	25600	38.00

Temps d'analyse : 30.0 minutes

	Protéine	MW (Da)	Temps de rétention
1	Vitamine B12	1355	2.52
1'	Aprotinine	6500	2.52
2	Ribonucléase	13700	6.23
3	Cytochrome C Horse	12500	8.15
4	Cytochrome C Bovine	12500	8.70
5	Myoglobine	17600	12.70
6	Chymotripsinogène A	25600	13.38
7	Ovalbumine	45000	16.08

Temps d'analyse : 6.0 minutes

	Protéine	MW (Da)	Temps de rétention
1	Uracile	112	6.00
2	Insuline	5577	7.35
3	Cytochrome C Horse	12500	17.50
4	Ribonucléase	13700	23.25
5	Myoglobine	17600	25.75
6	Chymotripsinogène A	25600	26.00
7	Ovalbumine	45000	37.50



Conclusions

Les premières conditions chromatographiques ont permis de séparer les protéines, sans pour autant permettre la mise en évidence de fragments de taille supérieure à 10.000 daltons.  
L'utilisation de TFA à la place d'acide formique comme modifiant de phase a amélioré la séparation. Dans ces conditions, le temps d'analyse a pu être réduit. Pour optimiser encore la séparation UPLC, la pente du gradient peut être modifiée pour réduire le temps d'analyse après le cut off.  
La méthode d'exclusion sérique, développée sur le système Acquity UPLC H-Class Bio, est applicable pour la mise en évidence de fragments protéiques d'une taille supérieure à 10.000 daltons. La définition du cut off (volume d'élution ou temps de rétention) repose sur une courbe de calibrage calculée en analysant des composés de poids moléculaire connu. Avant une application en routine, les standards seront choisis pour obtenir un maximum d'information et de précision dans la réponse obtenue : la courbe peut dans ce cas être basée sur un polymère (PEG) et validée au moyen de protéines de référence.