

Introduction

Une analyse par chromatographie liquide ultra a été développée pour évaluer les performances de la SEC sur une chaîne UPLC H-Classe Bio.

L'évaluation envisage l'utilisation d'une méthode spécifique SEC dédiée à l'analyse d'aliments pour animaux afin de détecter la présence de protéines ou de fragments protéiques d'une taille supérieure à 10.000 daltons.

Préparation des échantillons et conditions UPLC®

Préparation des échantillons et conditions UPLC®

Les échantillons d'aliments pour animaux sont préparés par simple dilution dans le solvant WW. L'analyse est réalisée selon le protocole UPLC décrit ci-dessous.

Le calibrage a permis de définir un cutt-off à 4.1 minute (ou 1.6 mL de volume d'élution).

L'analyse qualitative se fait sur les extraits obtenus injectés directement en UPLC®.

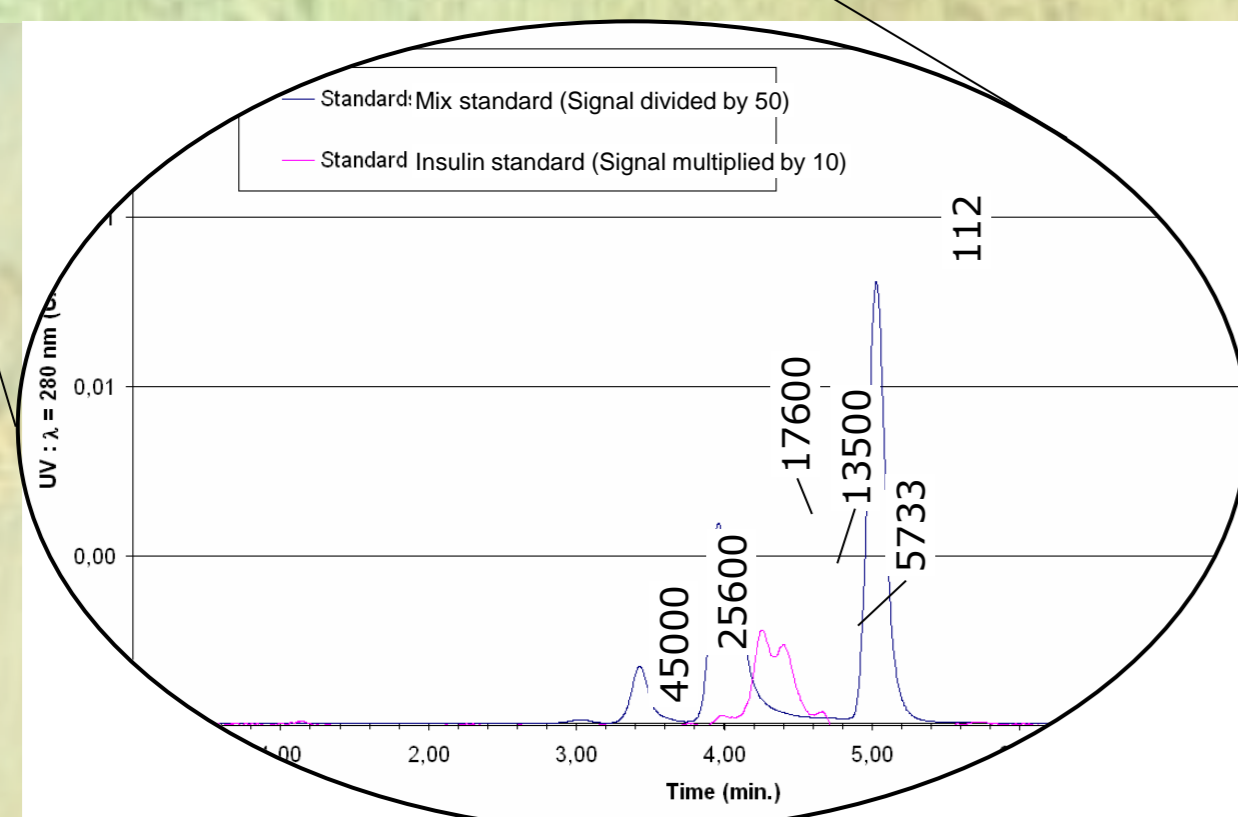
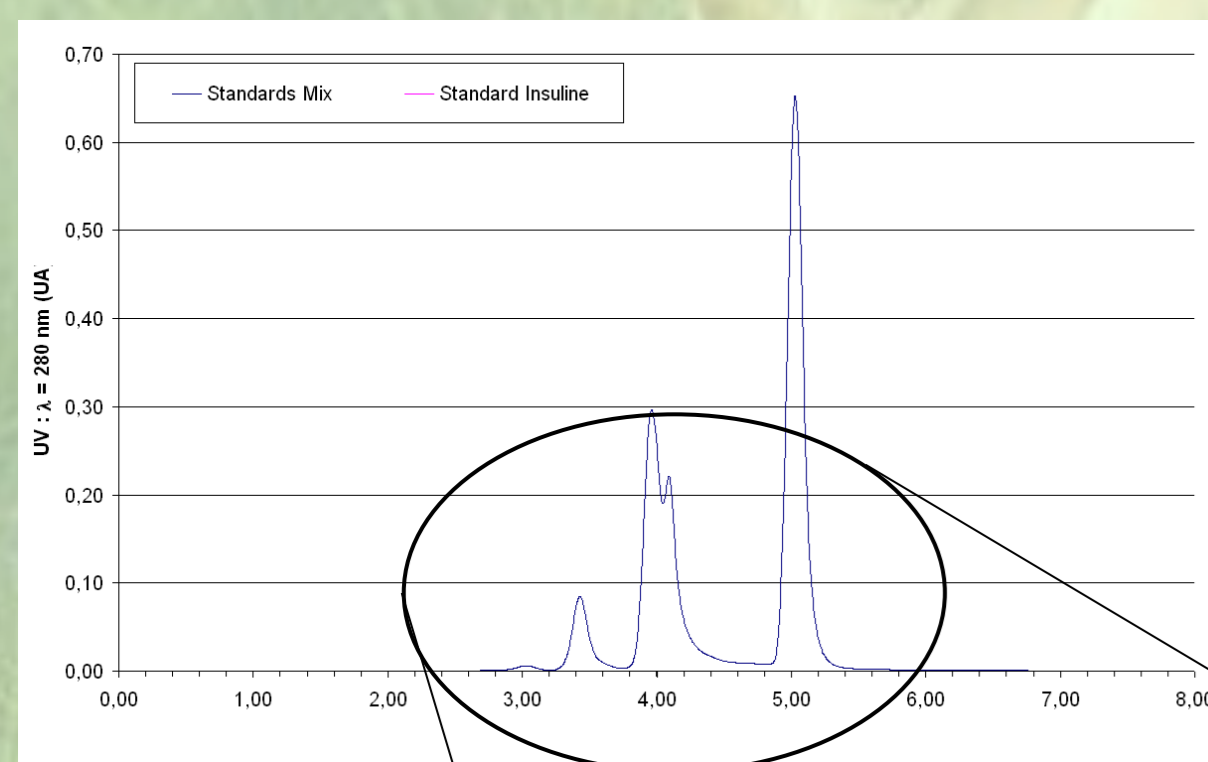


Système : ACQUITY UPLC H-Class Bio System + TUV
Colonne : ACQUITY UPLC BEH200 SEC 1.75m, 4.6 x 150mm
Volume d'injection : 10 µL
Température de colonne : 30°C
Température de stockage des échantillons : 4°C
Solvant A : 0.125M Monobasic Sodium Phosphate (Acidic Buffer)
Solvant B : 0.125M Dibasic Sodium Phosphate (Basic Buffer)
Solvant C : 1.0M Sodium Chloride
Solvant D : Eau
Débit : 400 µL·min⁻¹
Longueur d'onde : 280nm

Standards utilisés pour le calibrage

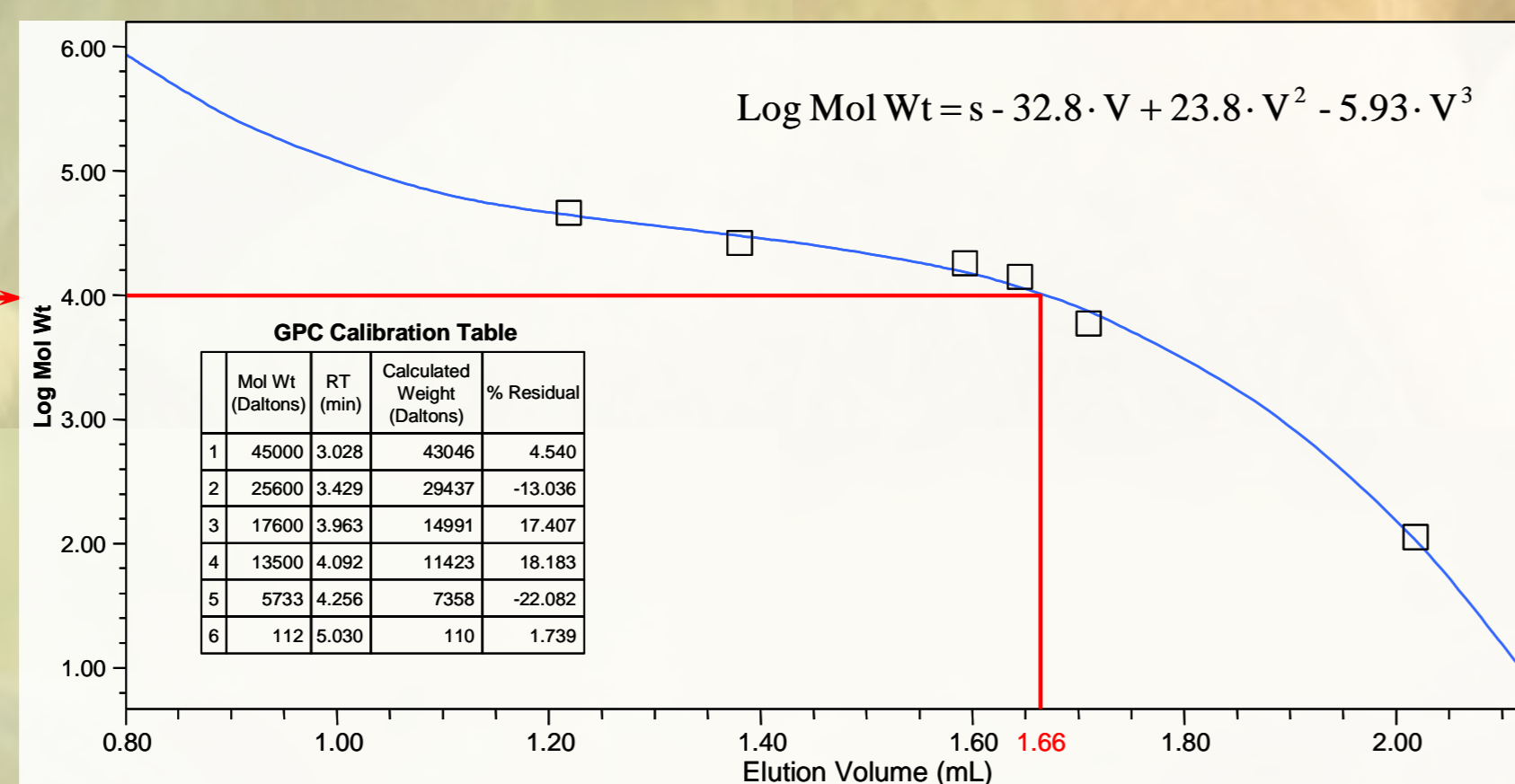
PROTEINES (2 mg·mL ⁻¹)	MW
Uracile	112
Insuline	5577
Cytochrome C Cheval	12500
Ribonucléase	13700
Myoglobine	17600
Chymotripsinogène A	25600
Ovalbumine	45000

Resultats



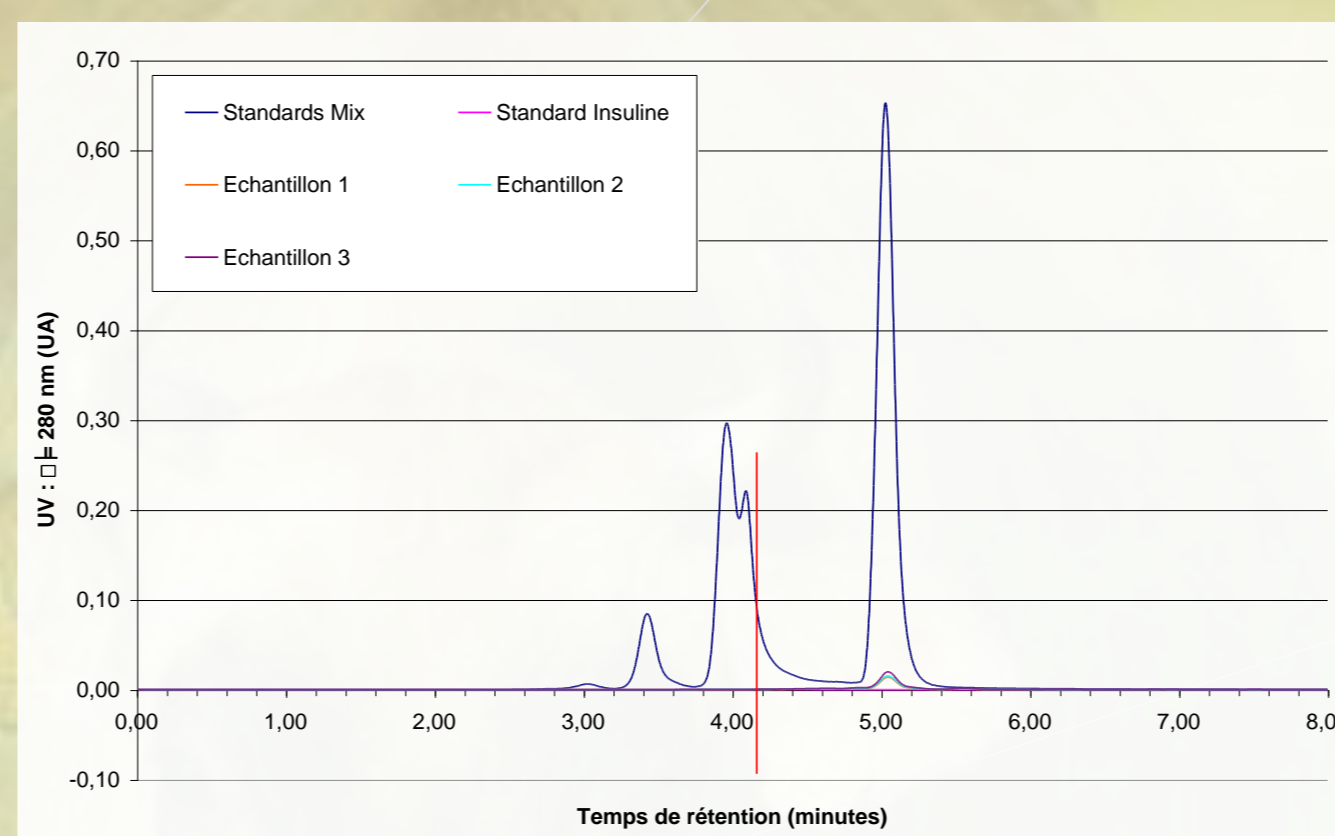
Une courbe de calibrage, constituée de protéines de référence de poids moléculaire connu, a été injectée sur un système BioACQUITY HClass System équipé d'une colonne SEC200.

A partir de cette courbe de calibrage, le temps de rétention limite (ou le volume d'élution limite) a été calculé au moyen du module GPC de Empower :



Un seuil à 10.000 Da peut être calculé.

Les extraits sont ensuite injectés sur le système Acquity UPLC H-Classe Bio. Sur base du temps de rétention, la présence de composés d'une taille supérieure à 10.000 daltons peut être détectée à partir de la droite de calibrage.



Pour les échantillons analysés, aucun pic n'a été mis en évidence avant le temps de rétention limite. Les échantillons ne contiennent donc pas de composés de plus de 10.000 Da (concentration > LOD).

Conclusions

Développement d'une application sur le système Acquity UPLC H-Class Bio utilisant une colonne BEH200 SEC :

Analyse SEC d'échantillons d'aliments pour animaux cherchant à détecter la présence de composés de MW > 10.000 Da

Courbe de calibrage utilisant des standards de poids moléculaire connu

Définition aisée du Cut-Off (Temps de rétention ou volume d'élution)

Analyse permettant de visualiser directement la présence ou l'absence des composés indésirables

Deux remarques pour cette application :

- Aucune linéarité ne peut être garantie sous les 10.000 Da
- Les standards doivent être choisis pour obtenir un maximum d'information et de précision au seuil de coupure