A decorative graphic on the left side of the slide, consisting of two overlapping semi-circular shapes. The top shape is teal and the bottom shape is dark blue, both pointing towards the right.

***Entwicklung von hochauflösenden
Methoden für die Agilent UHPLC/MS
– Optimierung bezüglich
Trennleistung und Empfindlichkeit***

Detlef Wilhelm

**Agilent Anwendertreffen
Waldbronn, 13.04. 2010**

A decorative graphic on the left side of the slide, consisting of two overlapping semi-circular shapes. The top shape is teal and the bottom shape is dark blue, both pointing towards the right.

Agenda

Optimierung der UHPLC für MS

1. Dwell- und Dispersionsvolumina im System
2. Vermeidung von Dispersion und Peakverbreiterung
3. Kombination von Fast LC und Empfindlichkeit?
4. Lange oder kurze Gradienten, Einfluß auf Unterdrückung der Ionisierung

Liquid Sampling und Fast LC

1. Vorstellung des ADS 100 in Kombination mit der 1200 SL



1. Dwell- und Dispersionsvolumina im System

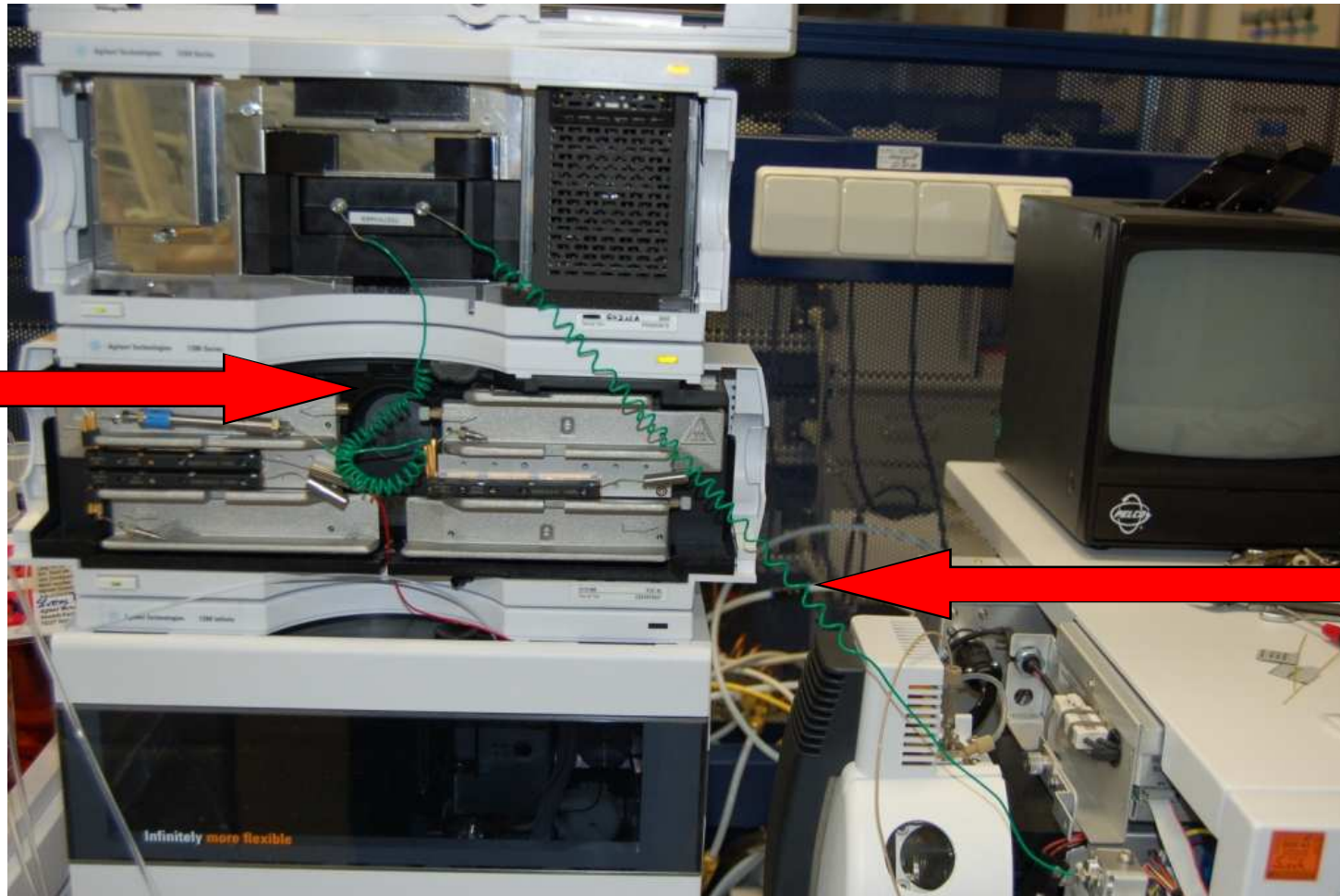
1200 SL und 1290 Infinity-System

- Pumpe
- Autosampler
- Säulenofen
- Detektor/MS

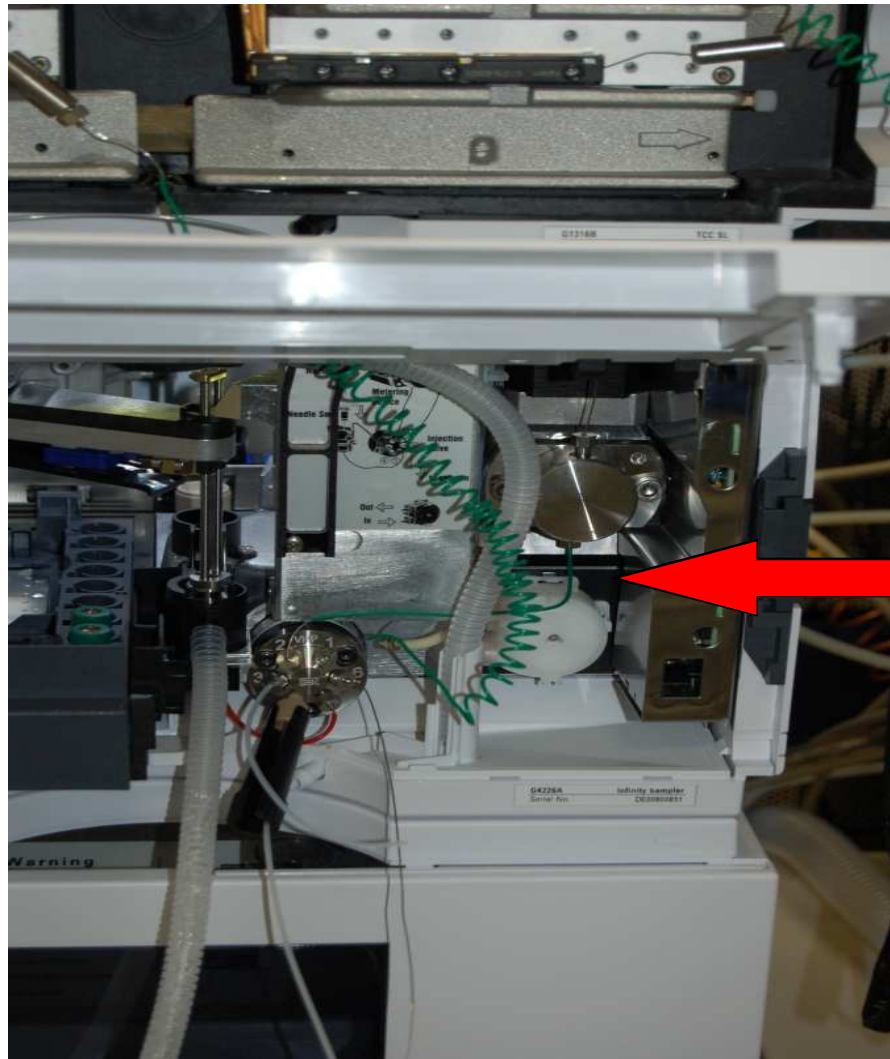
Dwell- und Dispersionsvolumina im System – 1 (letzter Detektor)



Dwell- und Dispersionsvolumina im System – 2 (Säulenausgang !!!)



Dwell- und Dispersionsvolumina im System – 3 (Autosampler)

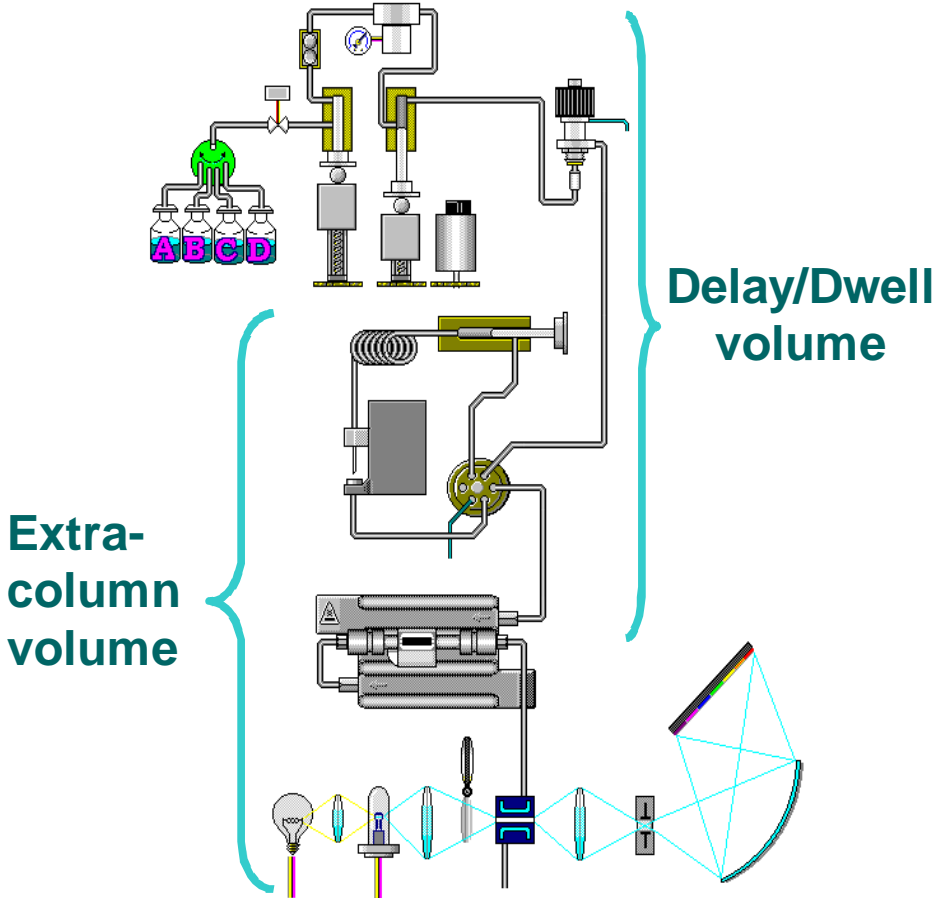


Peakverbreiterung durch Gerätekonfiguration - Großer Einfluss für 2.1 ID Säulen



Delay/dwell volume

Extra-column volume
Dispersion volume

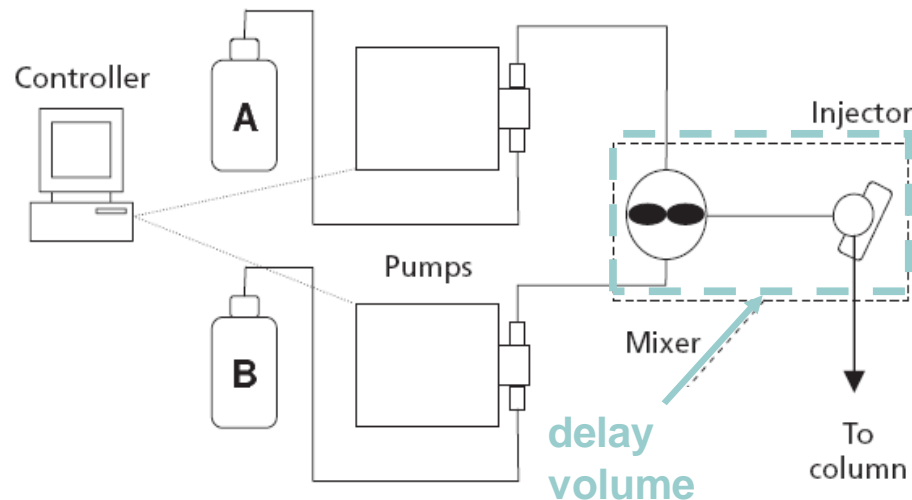


Delay Volumen

delay volume, dwell volume

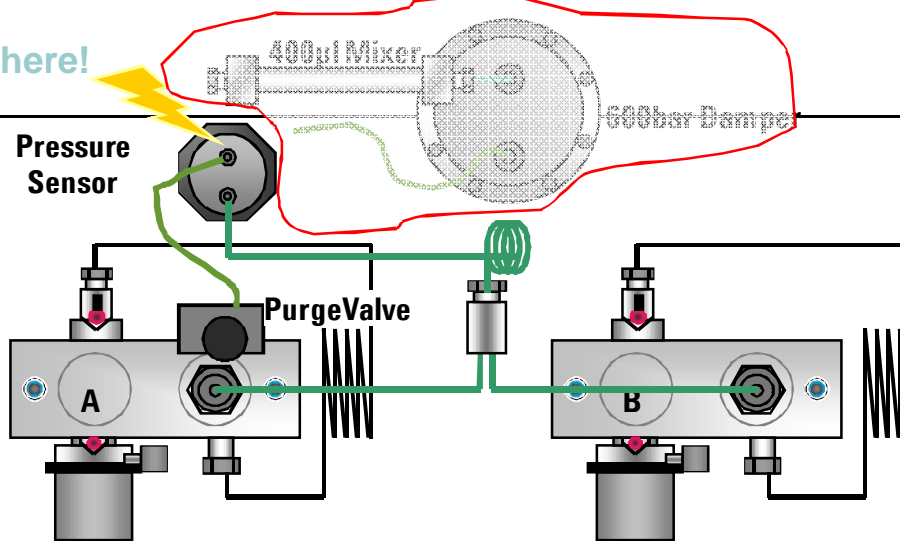
“Systemvolumen vom Punkt der Mischung der mobile Phase bis zum Säulenkopf” (W. Dolan LCGC 2006 Vol 24, No 5, 458-466)

- Reduziert Gradientenansprechzeit am Säulenkopf
- Verkürzt die Zeit, in der die Probe unter isokratischen Bedingungen am Säulenkopf verweilt
- Großer Einfluss bei niedrigen Flussraten = 2.1 mm Säulen



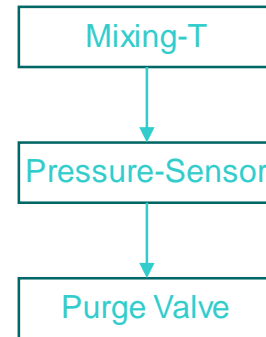
Delay-/Dwellvolume der 1200SL-Pumpe

Disconnect only here!

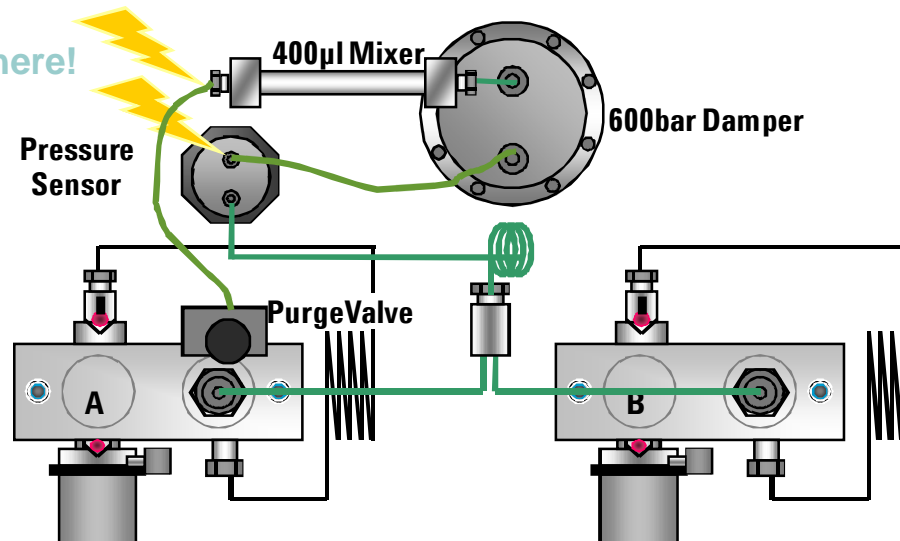


Low delay volume
120µl delay

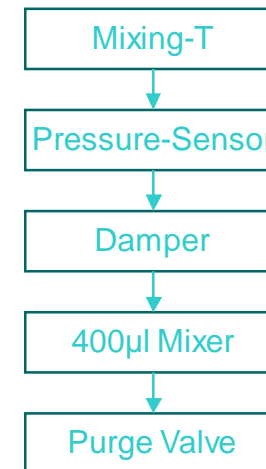
Flow Path



Disconnect only here!



Std delay volume
600-800µl





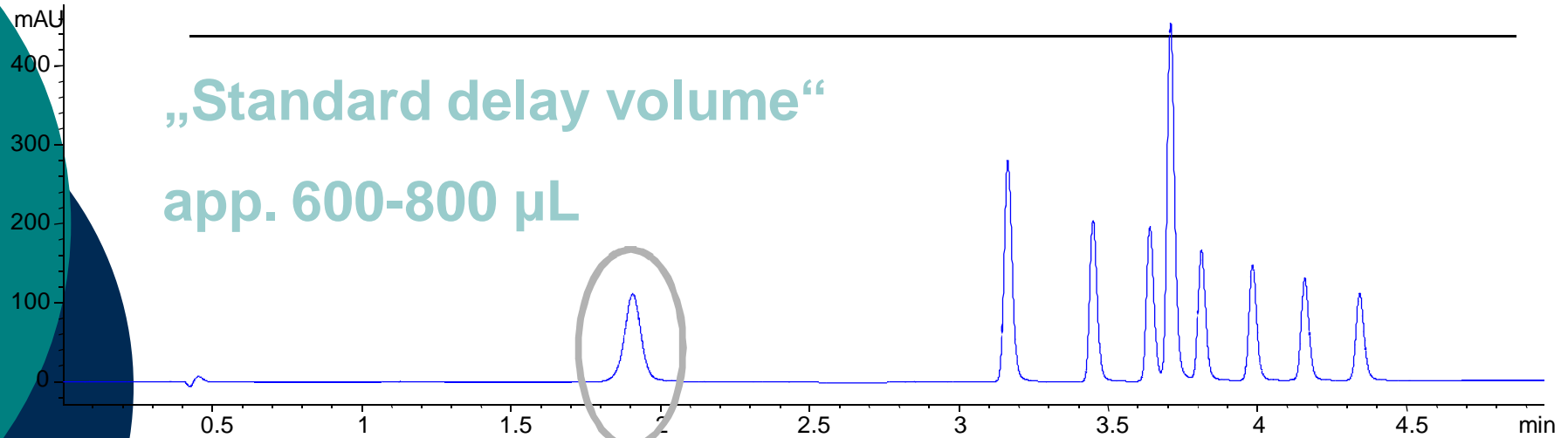
Delay-/Dwellvolume der 1200SL-Pumpe

- **Warum 2 Konfigurationen?**
- **High throughput, lowest delay volume**, Hohe Auflösung & hohe Peakkapazität für **MS** Applikationen, geeignet für 2.1 (&1)mm Säulen
- **High performance, reduced delay volume**, Hohe Auflösung & hohe Peakkapazität für **UV** and **UV/MS** Applikationen, optimiert für Gradientenpräzision/UV performance an 4.6 & 3mm Säulen, auch für 2.1mm Säulen mit flachen langen Gradienten geeignet
- → Pumpe mit unterschiedlichen Konfigurationen – **Standard** delay volume & **low** delay volume – eröffnet einen weiten Applikationsbereich insbesondere für:
 - Methodenkompatibilität

Einfluss: Delay Volume auf Retentionszeit

„Standard delay volume“

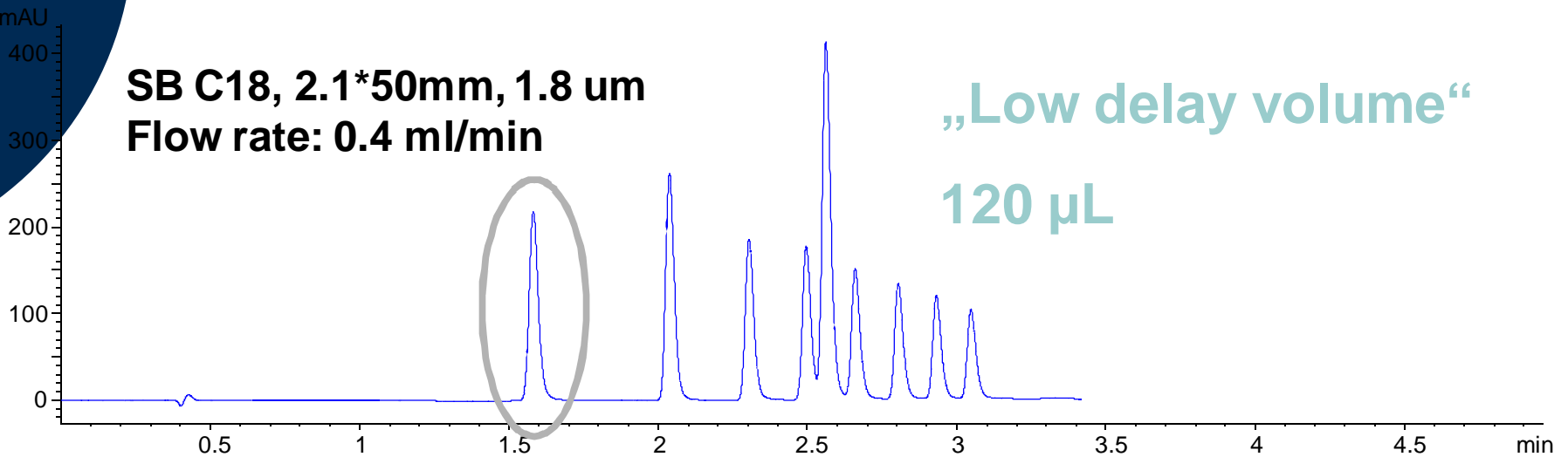
app. 600-800 μL



SB C18, 2.1*50mm, 1.8 μm
Flow rate: 0.4 ml/min

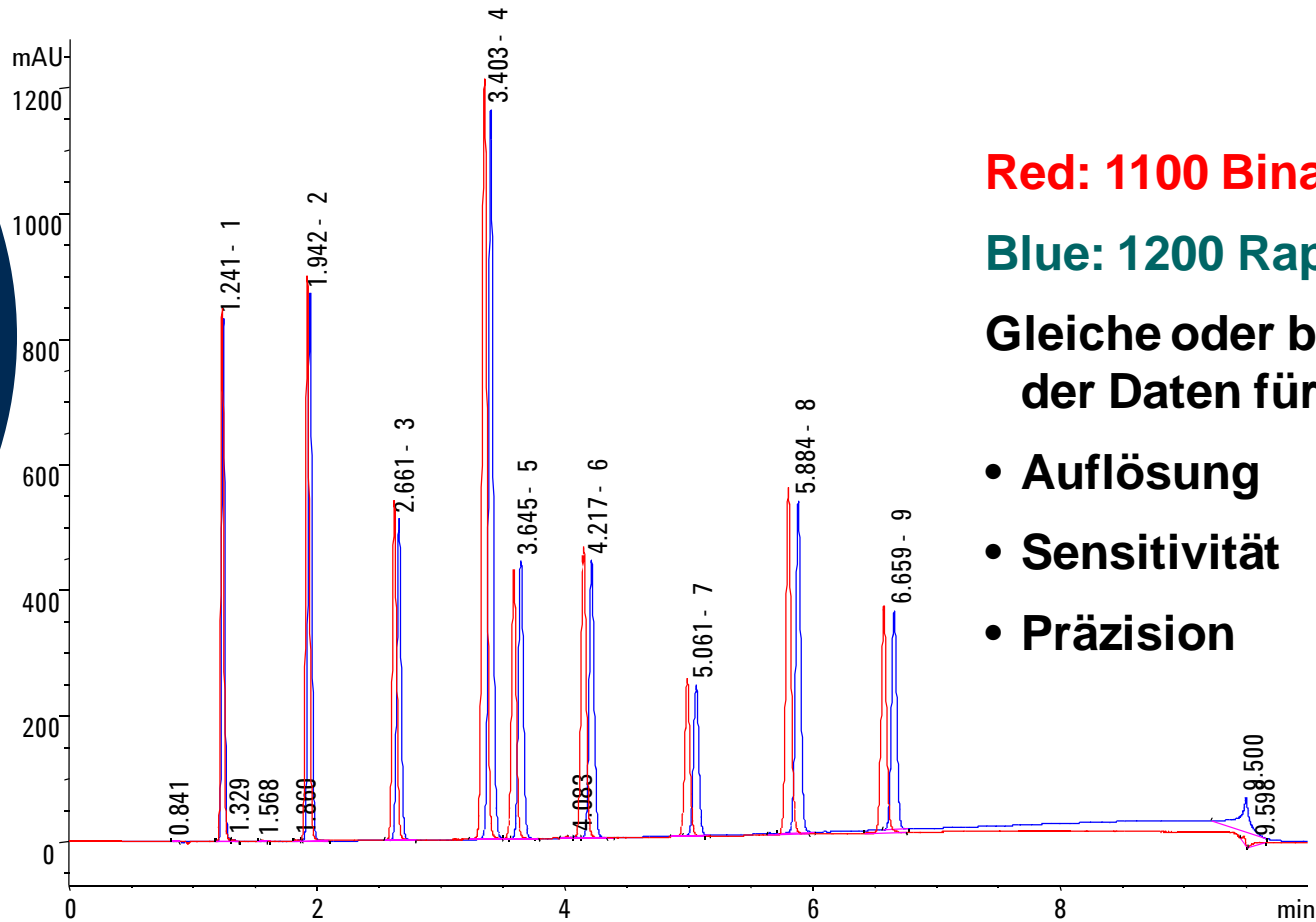
„Low delay volume“

120 μL



Methoden Transfer von 1100 Binär zu 1200 SL

Zorbax XDB C-18 4.6x150mm, 5µm



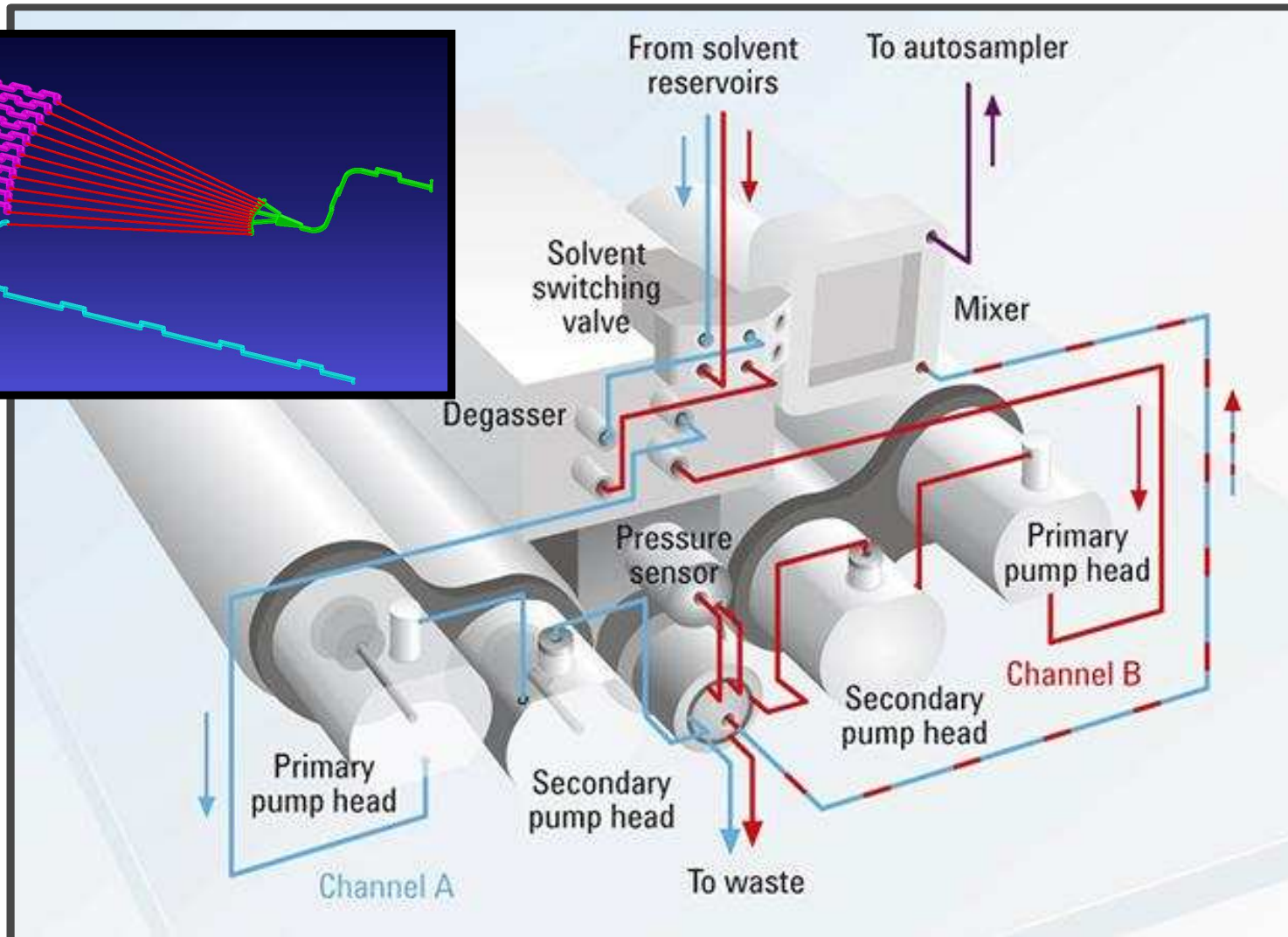
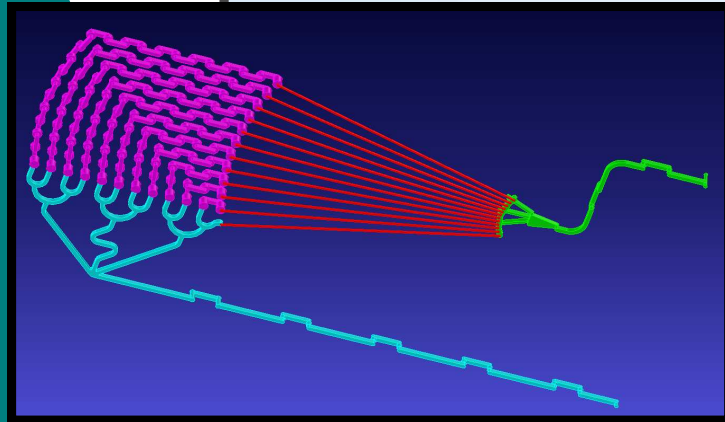
Red: 1100 Binary

Blue: 1200 Rapid Resolution

**Gleiche oder bessere Qualität
der Daten für**

- **Auflösung**
- **Sensitivität**
- **Präzision**

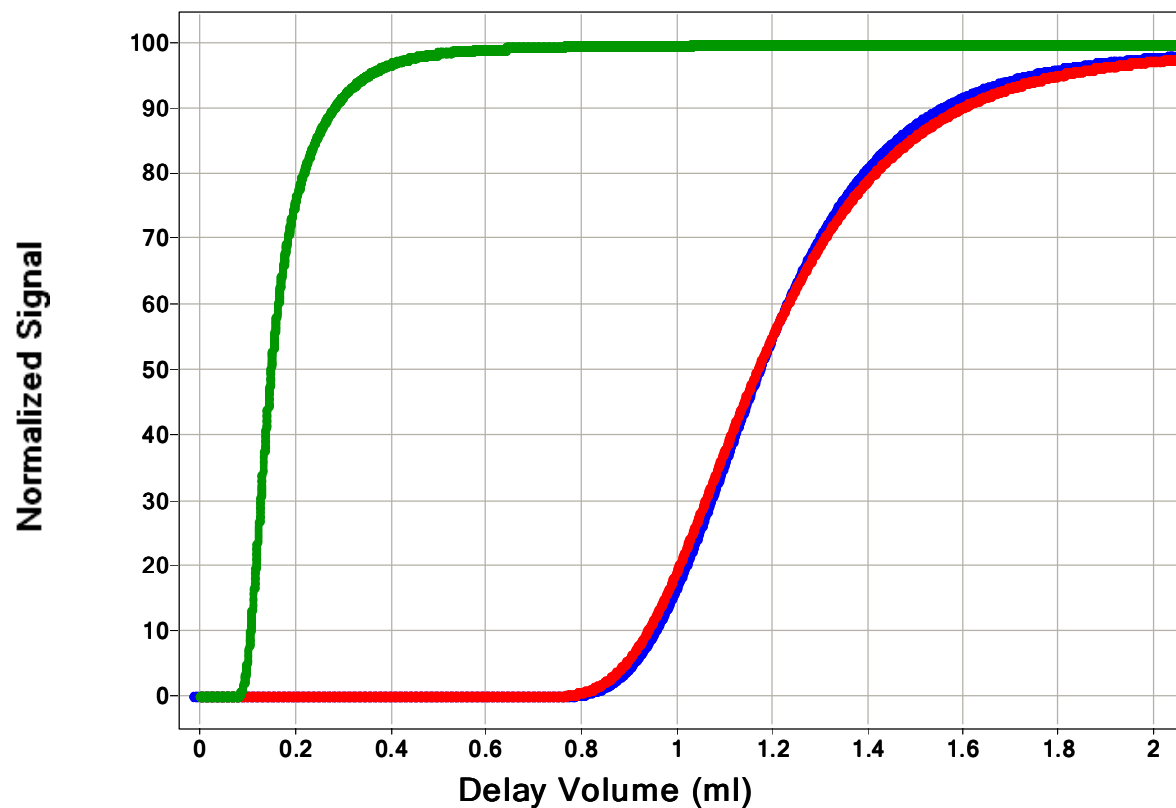
Flusswege der 1290-Pumpe (Delay-Volumen?)



Gradientenansprechzeit der Pumpe



Scatter Plot



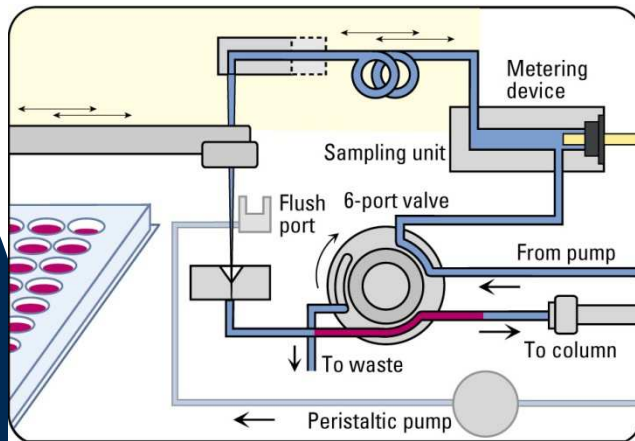
- 1290 Infinity Pumpe+ Jet Weaver+ 1290 Infinity Autosampler
- 1200 RRLC Pump + Mixer + Damper + 1200 RRLC Autosampler
- 1290 Infinity Pumpe+ Jet Weaver + 1290 Infinity Autosampler + 1200 SL Mixer, Damper, 250mm capillary

Dispersionsvolumen

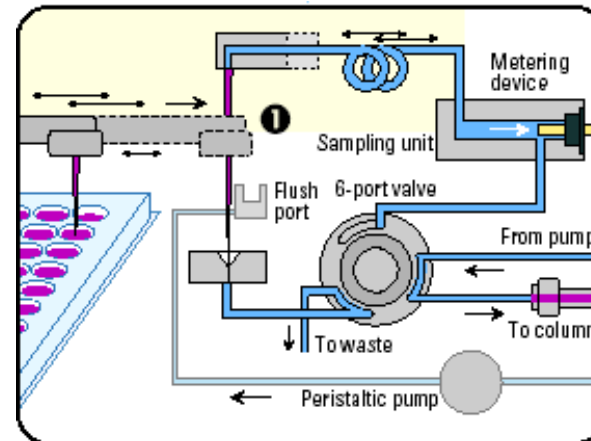
Dispersionvolumen (system dispersion)

- *“Dispersion ist die Bandenverbreiterung oder Verdünnung, die durch Verbindungskapillaren, Ventile, Flusszellen und Säulen entsteht. Es beginnt am Injektor und endet mit dem letzten Detektor im System. Dispersion reduziert die messbare Säuleneffizienz und verschlechtert die Auflösung.”*
- Auto sampler (needle, needle seat, valve)
- Kapillaren (internal diameter, length)
- Verbindungen (Unions, Fittings)
- Zusätzliche Ventile (z.B. Alternating column regeneration)
- Detektor (Wärmeaustauscher, Volumen und Geometrie der Detektorzelle)

1200 Series High Performance Autosampler SL: Delay Volume Reduction



Main Pass



Bypass

<p>High Throughput</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Automatic Delay Volume Reduction</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Enable Overlapped Injection</p> <p> <input checked="" type="radio"/> when Sample is flushed out</p> <p> <input type="radio"/> after <input type="text" value="2.0"/> min</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Minimized Carry Over</p>	<p>Needle Wash</p> <p>in: <input type="text" value="Flushport"/></p> <p>Time: <input type="text" value="6.0"/> sec</p> <p>Location: <input type="text" value="Vial 1"/> repeat: <input type="text" value="1"/> times</p>
<p>Auxiliary</p> <p>Draw Speed: <input type="text" value="200"/> µl/min</p> <p>Eject Speed: <input type="text" value="200"/> µl/min</p>	<p>Equilibration Time: <input type="text" value="2.0"/> sec</p> <p>Sample Flush-Out Factor: <input type="text" value="20"/> times Injection Vol.</p>

Reduktion des Totvolumens um

- Schleifenvolumen
- Volumen des Metering device („Hochdruckspritze“ bleibt während der Analyse im aufgezogenen Zustand), kann mehr als 100µ betragen
- Volumen der Nadel und der Nadelsitzkapillare

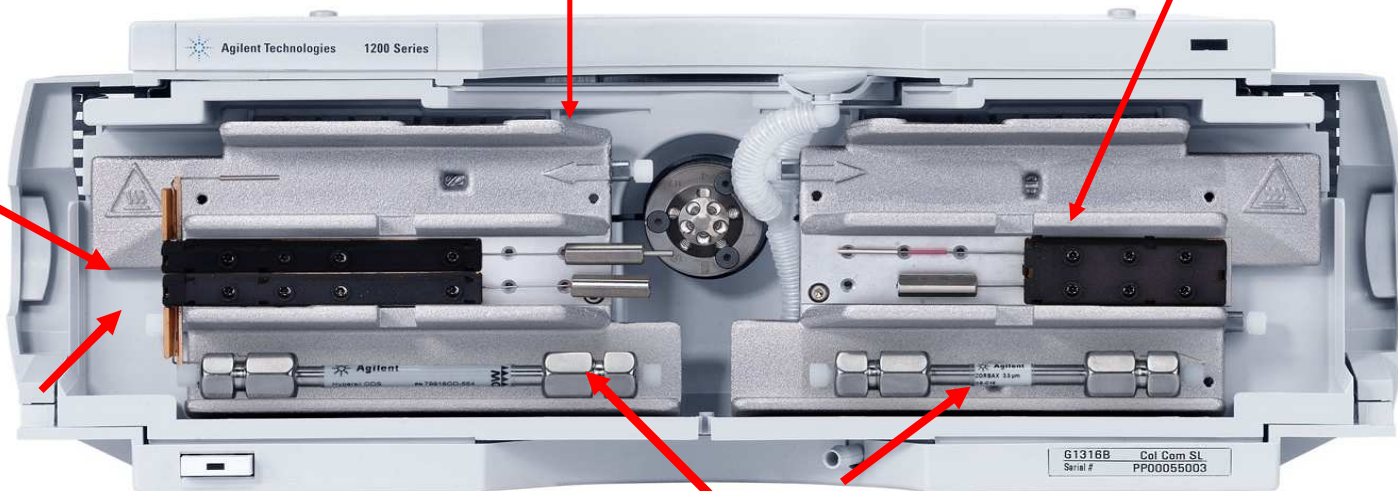
TCC SL Heaters/Cooler

2-position/10-port
micro-valve SL
(G1316B # 057)

U-shaped
post-column
cooler 1.5 ul

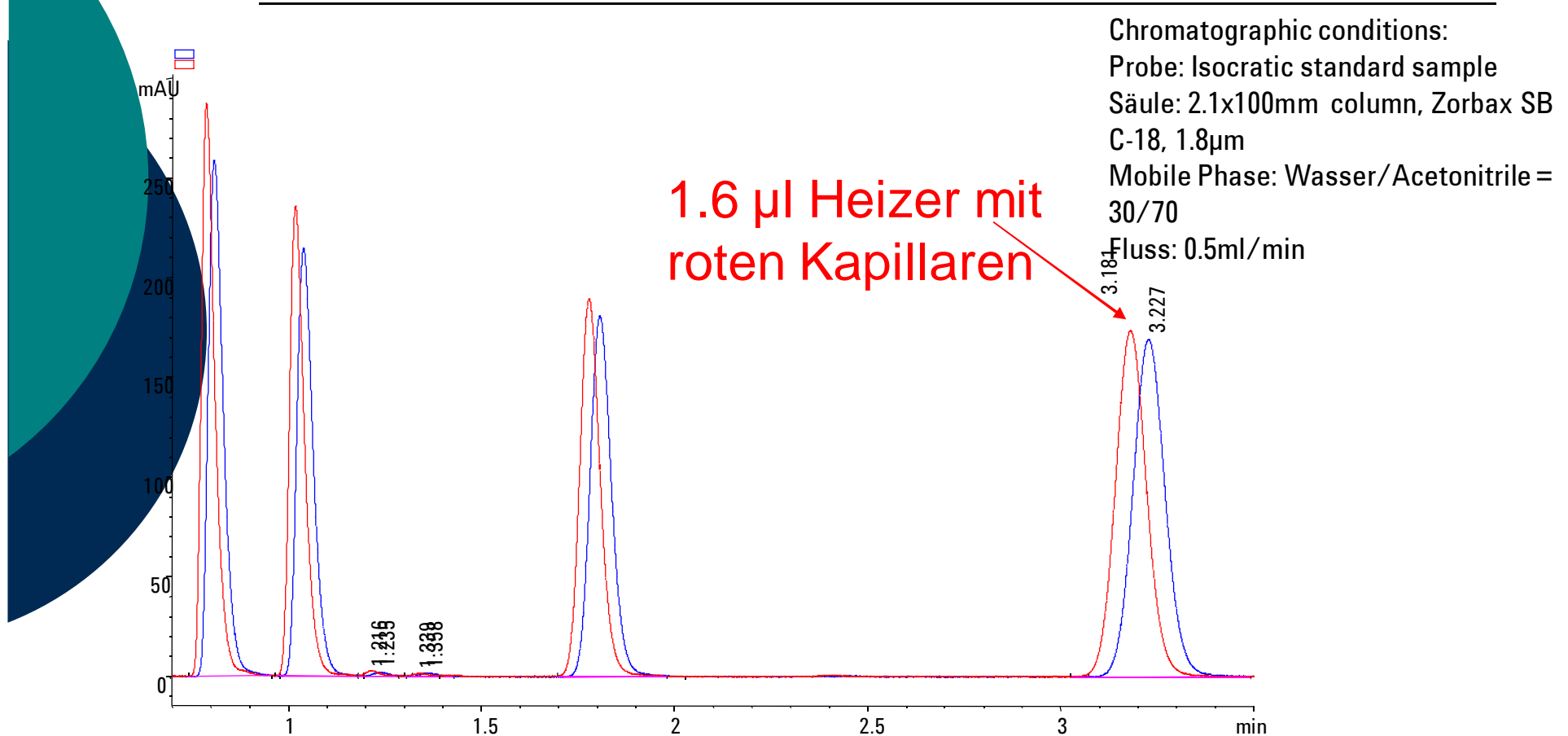
Heizer für
Säule 2

Heizer für
Säule 2



Zwei Säulen alternierend genutzt

Reduzierung der Peakbreite mit dem neuen 1.6µl- vs. Standard 3µl- Wärmeaustauscher



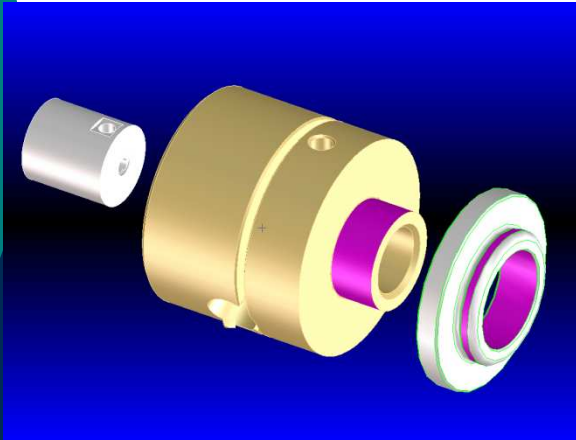
Schmalere und früher eluierende peaks mit low Dispersion Wärmeaustauschern!

Peakbreiten Reduzierung und Verbesserung der Auflösung

Fluss	Evaluated Peak	Neuer Heizer mit 1.6µl 50° grad	3µl Heizer 50°C
1.5ml/min	Rs of peak 2	3.19	2.73
„	PW 5sigma of peak 4 in min	0.031	0.033
1ml/min	Rs of peak 2	3.96 (+26%)	3.15
„	PW 5sigma of peak 4 in min	0.067 (-13 %)	0.076
0.5ml/min	Rs of peak 2	3.29	2.86
„	PW 5sigma of peak 4 in min	0.042	0.044
0.2ml/min	PW 5sigma of peak 1 in min	0.087	0.096
„	Rs of peak 2	3.51	3.14
„	PW 5sigma of peak 4 in min	0.192	0.197

13ul, 5ul and 2ul Flusszellen

Neues Design für erhöhte (praktische) Sensitivität *

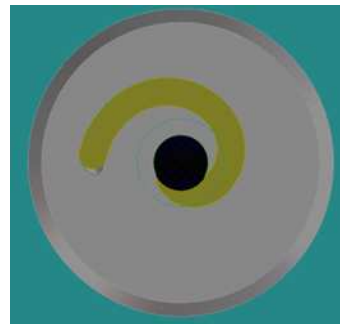


Ceramic Ring for thermal de-coupling *

- Insert
- Body
- Ring

Vorteile

- ✓ Reduzierte RI-sensitivity
- ✓ Verbesserte Peakdispersion
- ✓ Minimiertes Rauschen bei high-flow, high-temperature applications

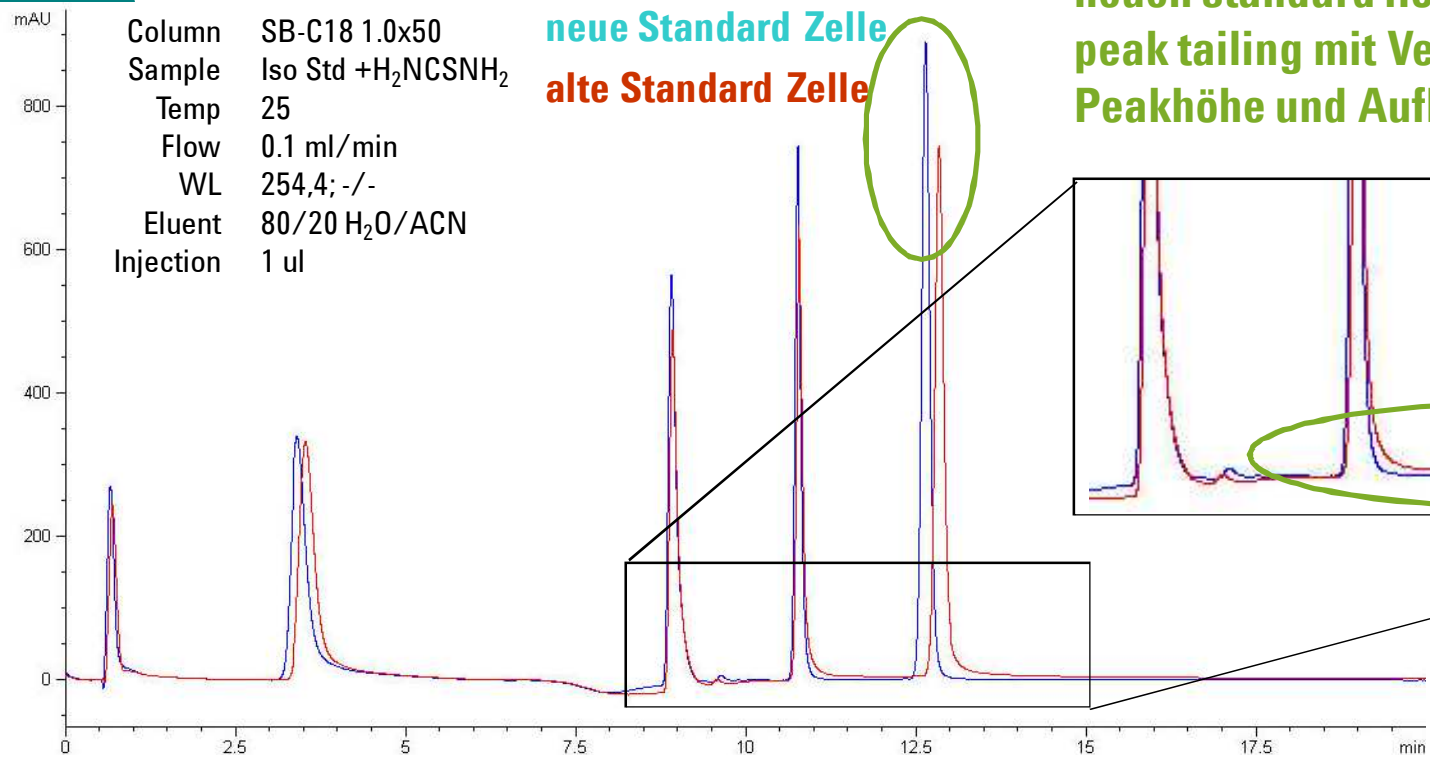


“Drill” Design of Inlet and Outlet for faster flush-out *

*Patent Filed

AN/TOX


13ul, 5ul and 2ul Flusszellen Neues Design für erhöhte Sensitivity *



Verbessertes flush-out Verhalten der neuen standard flow cell minimiert peak tailing mit Verbesserung der Peakhöhe und Auflösung.

*Patent Filed

Einfluss des Dispersionsvolumen auf Effizienz



Dimension	Theoretical N (red. plate ht. 2.3)
4.6 x 150 mm, 5 μm	13000
4.6 x 50mm, 1.8 μm	12100
3 x 50mm, 1.8 μm	12100
2.1 x 50mm, 1.8 μm	12100

*20 μL Dispersion volume, isocratic $k' = 2.5$, red. Plate height = 2.3

Einfluss des Dispersionsvolumen auf Effizienz

Dimension	Theoretical N (red. plate ht. 2.3)	* N with Dispersion volume of 20 μL
4.6 x 150 mm, 5 μm	13000	
4.6 x 50mm, 1.8 μm	12100	
3 x 50mm, 1.8 μm	12100	
2.1 x 50mm, 1.8 μm	12100	

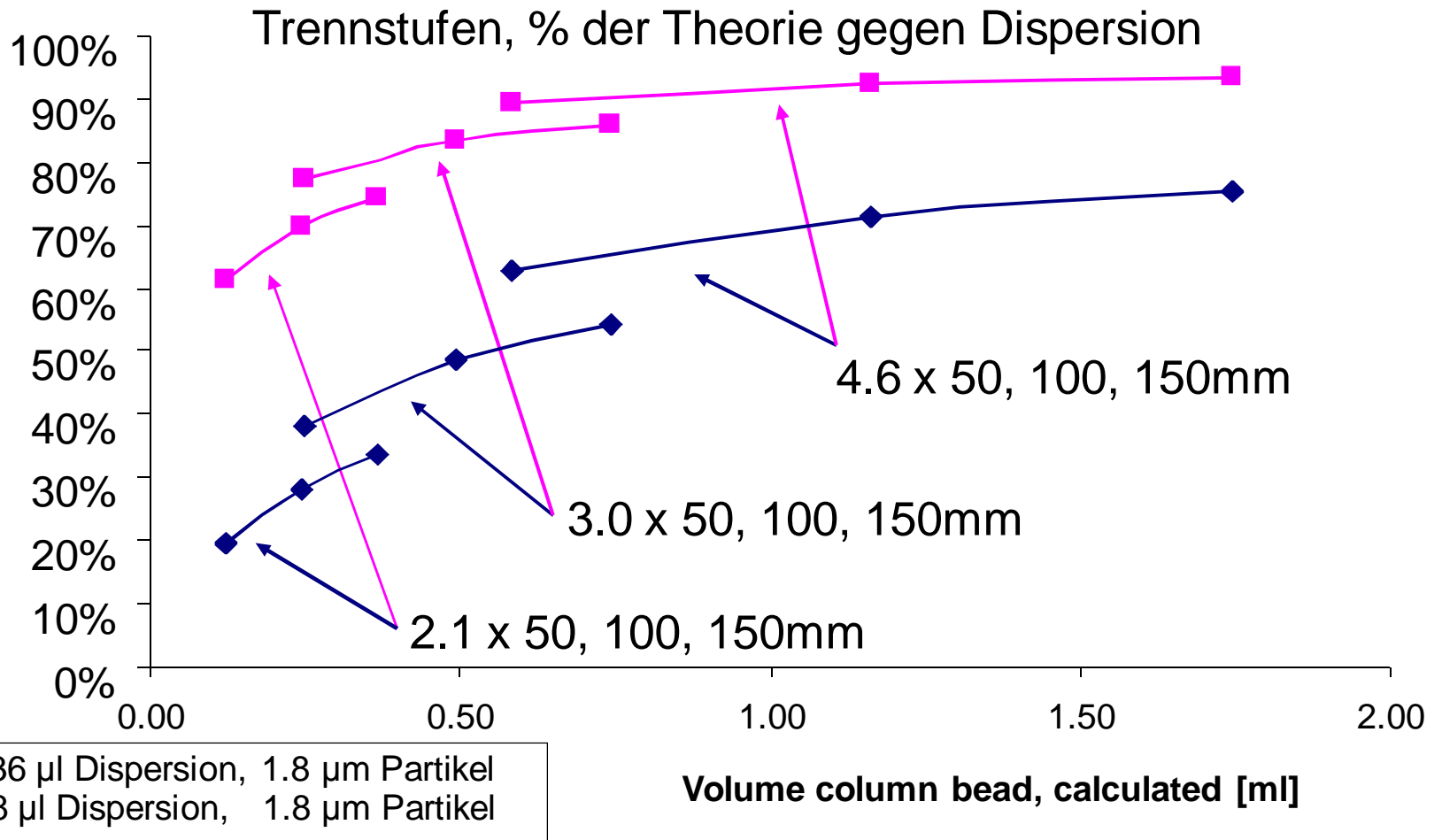
AN/TOX *20 μL Dispersion volume, isocratic $k' = 2.5$, red. Plate height = 2.3

Einfluss des Dispersionsvolumen auf Effizienz

Dimension	Theoretical N (red. plate ht. 2.3)	* N with Dispersion volume of 20 μL
4.6 x 150 mm, 5 μm	13000	11000 (85%)
4.6 x 50mm, 1.8 μm	12100	7700 (64%)
3 x 50mm, 1.8 μm	12100	4800 (40%)
2.1 x 50mm, 1.8 μm	12100	2500 (20%)

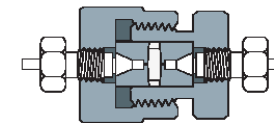
AN/TOX *20 μL Dispersion volume, isocratic $k' = 2.5$, red. Plate height = 2.3

Relative Trenneffizienz (Theor. = 100 %)



Volumen von Verbindungskapillaren

ID (mm)	Length (cm)	Color Code	Volume (µl)	Part No.	Price (\$)
0.12	10.5	Red	1.2	5021-1820	28
0.12	15	Red	1.7	5021-1821	28
0.12	20	Red	2.3	5065-9935	28
0.12	28	Red	3.2	5021-1822	28
0.12	40	Red	4.5	5021-1823	28
0.12	50	Red	5.6	5065-9964	28
0.17	10.5	Green	2.4	5021-1816	28
0.17	15	Green	3.4	5021-1817	28
0.17	20	Green	4.6	5065-9931	28
0.17	28	Green	6.4	5021-1818	28
0.17	40	Green	9.1	5021-1819	28
0.17	60	Green	13.6	5065-9933	32
0.17	70	Green	15.9	5065-9932	32
0.17	90	Green	20.5	5065-9963	32
0.25	28	Blue	13.8	5022-6508	28
0.25	80	Blue	39.3	5065-9930	32
0.50	10.5	None	20.6	5065-9927	28
0.50	15	None	29.5	5022-6509	28
0.50	28	None	55	5022-6510	28
0.50	80	None	157	5065-9926	66



Je schmaler die Peakvolumen bei Fast-Analytik um so wichtiger die sog. Extra Column Volumes wie der der Kapillaren!

Ref: Agilent pub 5988-2662ENUS, HPLC Maintenance Guide, page 55

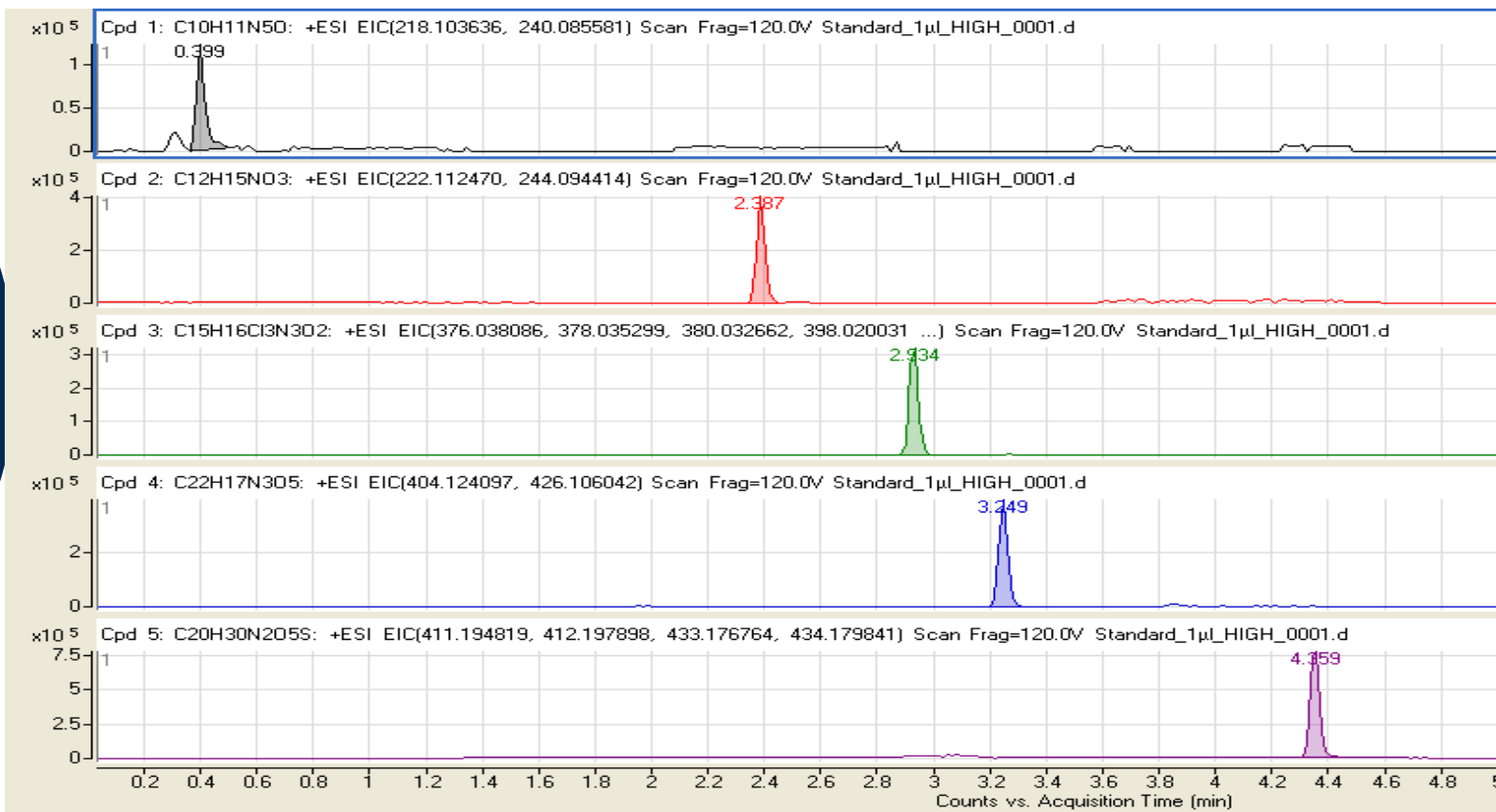
Delayvolumen der 1290 Infinity und 1200SL je nach Konfiguration

Konfiguration	DV* / μ l
1290 pump	10
1290 pump (für MS) + Fixed Loop Autosampler¹	20
1290 pump (für UV) + Fixed Loop Autosampler	55
1290 pump (für MS) + Variable Loop Autosampler	75
1290 pump (für UV) + Variable Loop Autosampler	110
1200 RRLC pump (für MS/low Delay) + Variable Loop Autosampler	260
1200 RRLC Pumpe (für UV) + Variable Loop Autosampler	740-940

* Delay volume: „10 % step gradient Definition“,

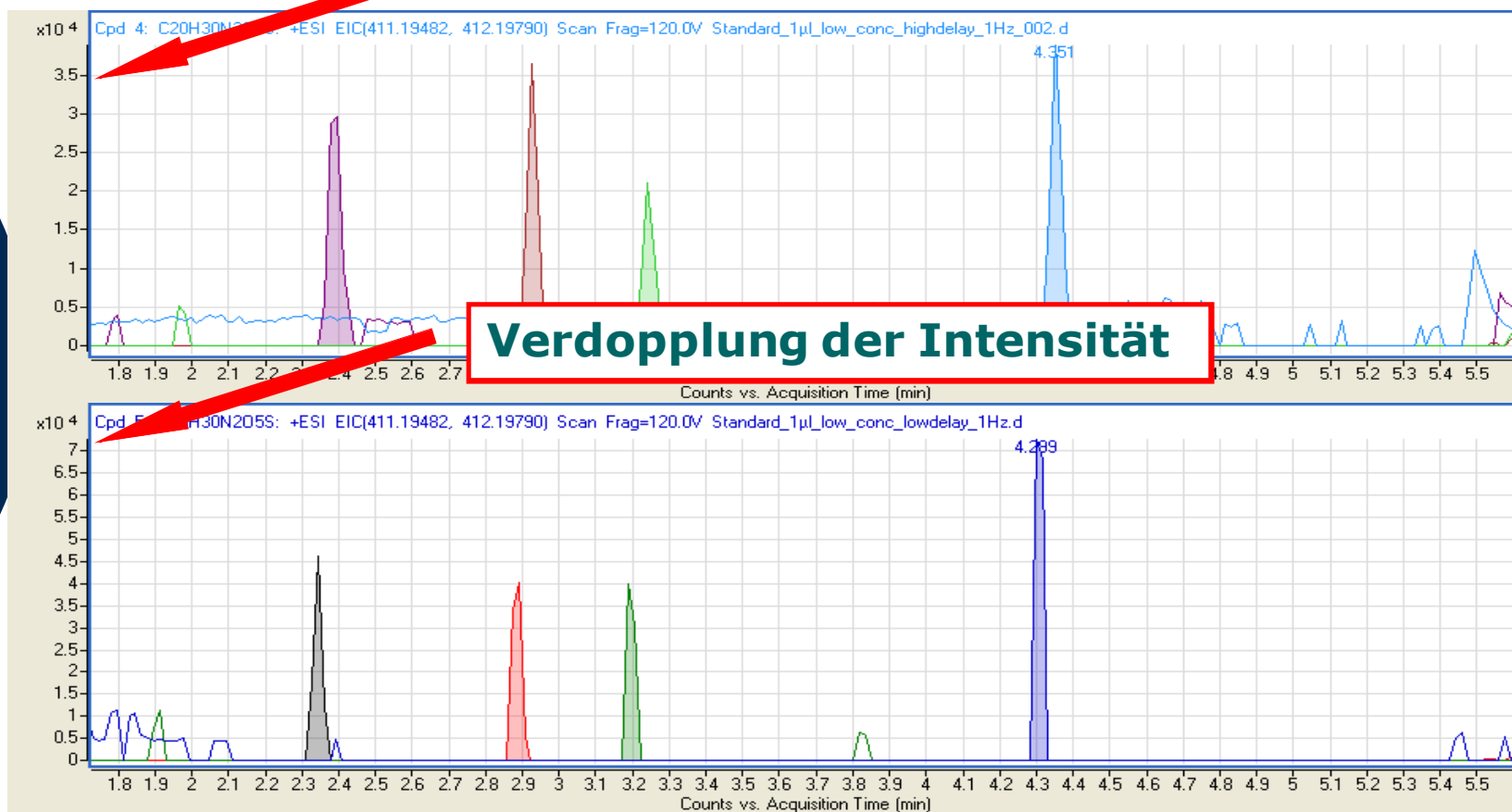
¹ 5 μ l Schleife

HPLC-MS Optimierung



50mm*2,1mm Eclipse Plus C18, Standard of pesticides, 0,5ml/min, long delay behind column, 1Hz Data rate

HPLC-MS Optimierung (Dispersionsvolumen)

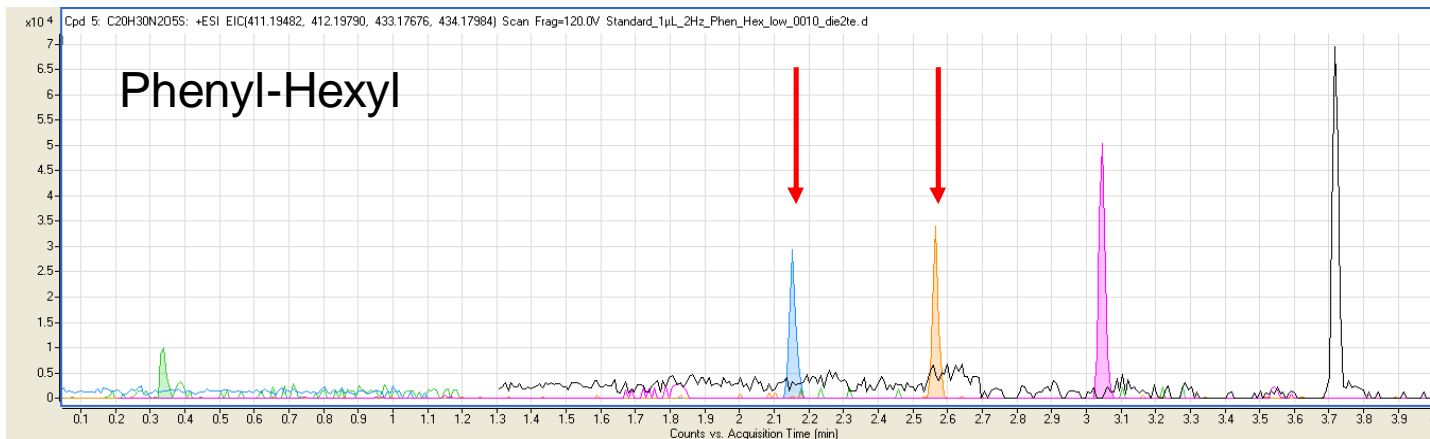
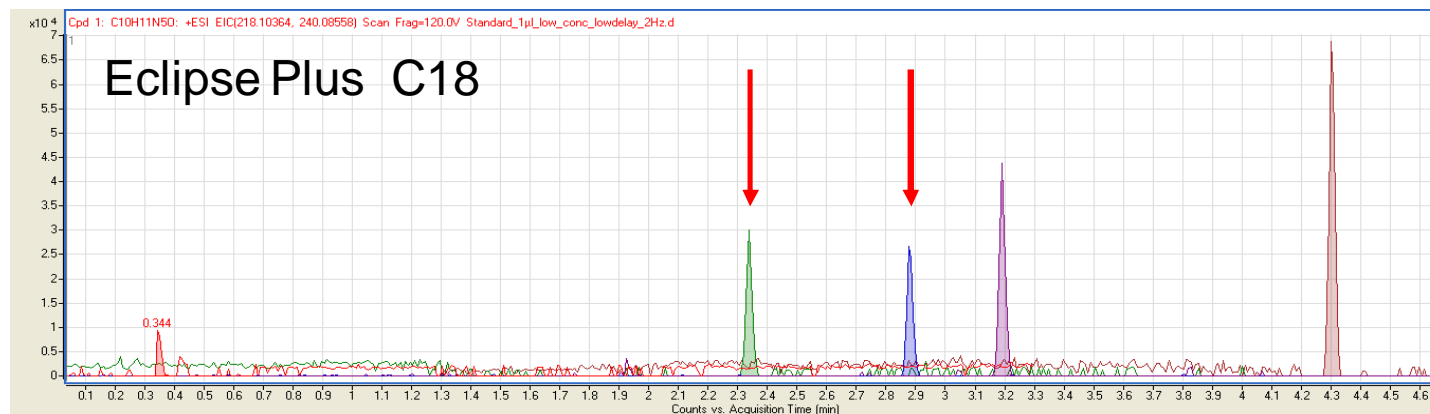


50mm*2,1mm Eclipse Plus C18, Standard of pesticides, 0,5ml/min, **high** (grüne Kap.) and **low** (rote Kap.) dispersion volume hinter der Säule, 1Hz



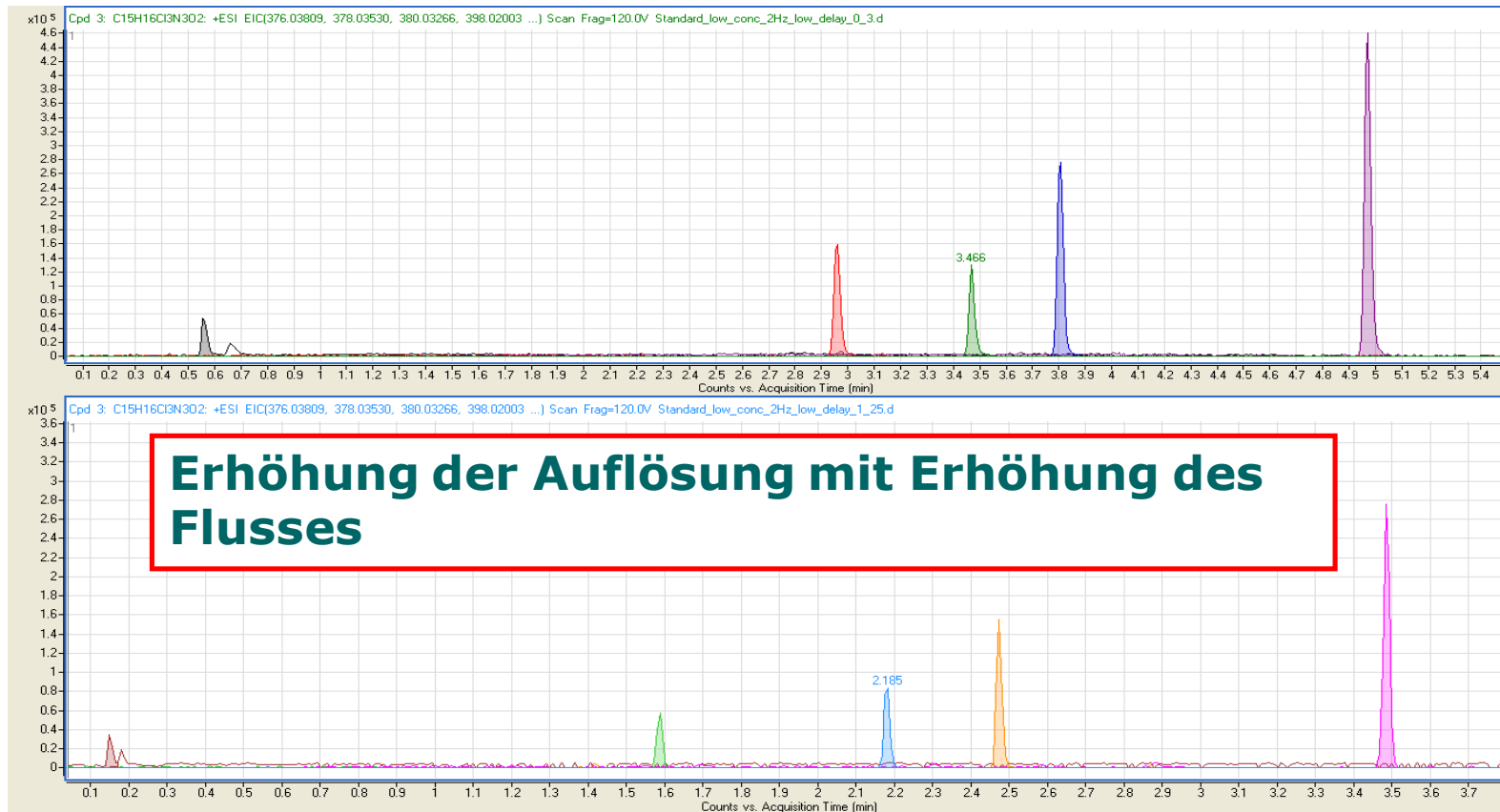
Data rate

HPLC-MS Optimierung (Selektivität)



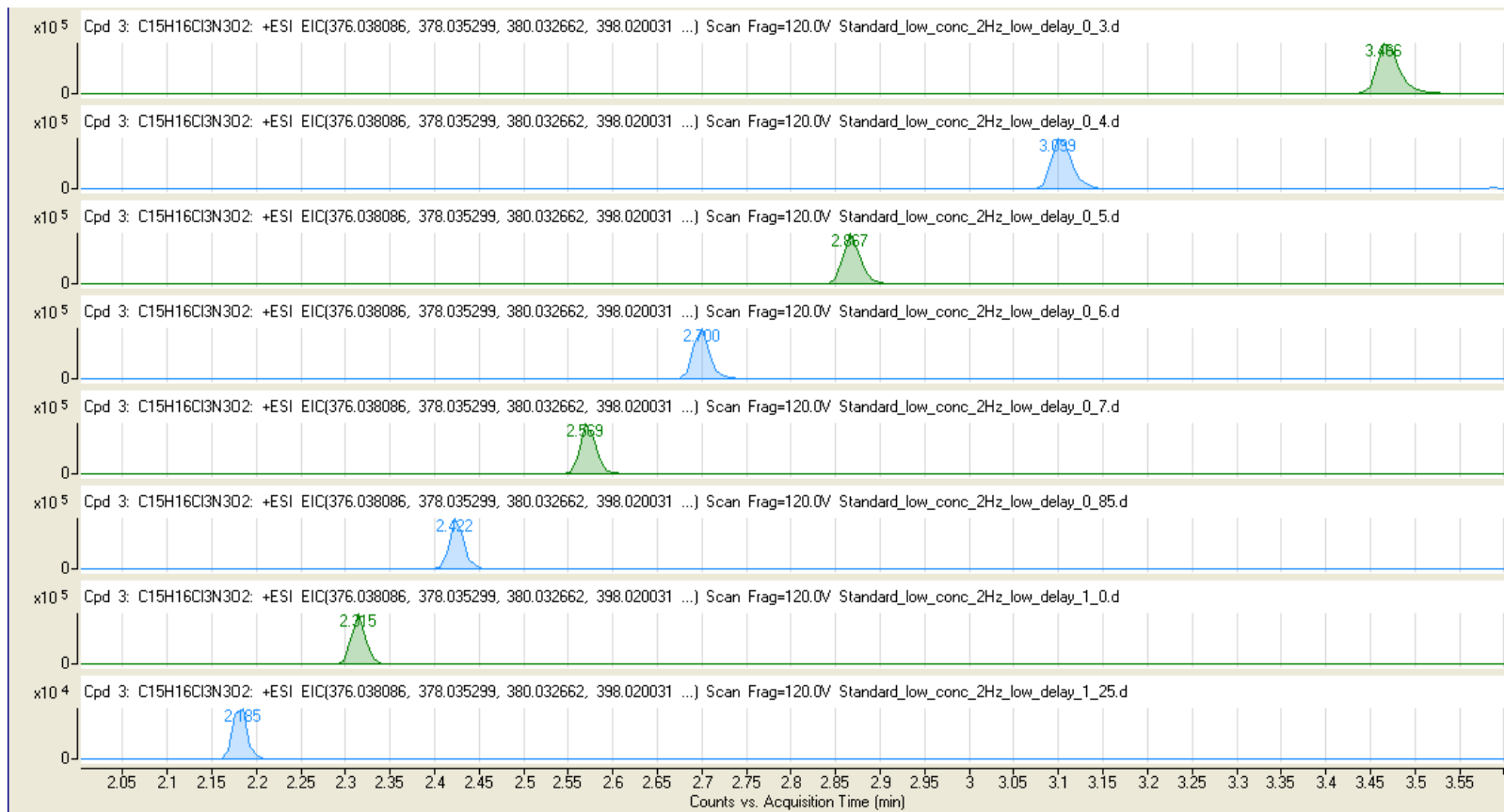
50mm*2,1mm Eclipse Plus C18, Standard of pesticides, 0,5ml/min,
Retentionsumkehr für Peak 2 und 3, 2Hz Data rate

HPLC-MS Optimierung (hoher Fluß und Auflösung)



50mm*2,1mm Eclipse Plus C18, Pestizidstandard, 0,3-1,25ml/min, 2Hz
Data rate

HPLC-MS Optimierung (hoher Fluß und Empfindlichkeit)



50mm*2,1mm Eclipse Plus C18, Pestizidstandard, 0,3-1,25ml/min, 2Hz
Data rate

HPLC-MS Optimierung (hoher Fluß und Empfindlichkeit)

Compound List

File	RT	Mass	Diff (Tgt)	Score (Tgt)	Formula (Tgt)	Mass (Tgt)	RT Diff (Tgt)	Height	Area	Width
Standard_low_conc_2Hz_low_delay_0_3.d	3.466	375.03123	1.11	97.17	C15H16Cl3N3O2	375.03081	0.616	130744	230441	0.157
Standard_low_conc_2Hz_low_delay_0_4.d	3.099	375.03142	1.64	87.29	C15H16Cl3N3O2	375.03081	0.249	122160	197186	0.108
Standard_low_conc_2Hz_low_delay_0_5.d	2.867	375.0308	-0.02	94.47	C15H16Cl3N3O2	375.03081	0.017	135220	178394	0.083
Standard_low_conc_2Hz_low_delay_0_6.d	2.7	375.03144	1.68	98.58	C15H16Cl3N3O2	375.03081	-0.15	126664	164983	0.141
Standard_low_conc_2Hz_low_delay_0_7.d	2.569	375.03107	0.69	97.79	C15H16Cl3N3O2	375.03081	-0.281	122511	150336	0.108
Standard_low_conc_2Hz_low_delay_0_85.d	2.422	375.0306	-0.56	98.93	C15H16Cl3N3O2	375.03081	-0.428	120765	136955	0.083
Standard_low_conc_2Hz_low_delay_1_0.d	2.315	375.03093	0.32	94.09	C15H16Cl3N3O2	375.03081	-0.535	110772	118873	0.083
Standard_low_conc_2Hz_low_delay_1_25.d	2.185	375.03062	-0.52	93.15	C15H16Cl3N3O2	375.03081	-0.665	83897	98889	0.083

50mm*2,1mm Eclipse Plus C18, Pestizidstandard, 0,3-1,25ml/min, 2Hz
Data rate

HPLC-MS Optimierung (hoher Fluß und Empfindlichkeit)

Compound List										
File	RT	Mass	Diff (Tgt)	Score (Tgt)	Formula (Tgt)	Mass (Tgt)	RT Diff (Tgt)	Height	Area	Width
Standard_low_conc_2Hz_low_delay_0_3.d	3.805	403.1175	1.68	98.75	C22H17N3O5	403.11682	0.605	276993	486359	0.132
Standard_low_conc_2Hz_low_delay_0_4.d	3.43	403.11741	1.47	97.38	C22H17N3O5	403.11682	0.23	296332	494830	0.124
Standard_low_conc_2Hz_low_delay_0_5.d	3.19	403.11644	-0.94	99.28	C22H17N3O5	403.11682	-0.011	304104	452692	0.099
Standard_low_conc_2Hz_low_delay_0_6.d	3.023	403.11753	1.76	99.04	C22H17N3O5	403.11682	-0.177	306475	394875	0.116
Standard_low_conc_2Hz_low_delay_0_7.d	2.892	403.11741	1.45	98.78	C22H17N3O5	403.11682	-0.309	299628	363800	0.108
Standard_low_conc_2Hz_low_delay_0_85.d	2.737	403.11688	0.14	98.81	C22H17N3O5	403.11682	-0.463	264225	300817	0.116
Standard_low_conc_2Hz_low_delay_1_0.d	2.621	403.117	0.44	99.24	C22H17N3O5	403.11682	-0.579	217215	239685	0.099
Standard_low_conc_2Hz_low_delay_1_25.d	2.475	403.1168	-0.05	98.28	C22H17N3O5	403.11682	-0.725	155236	162800	0.083

50mm*2,1mm Eclipse Plus C18, Pestizidstandard, 0,3-1,25ml/min, 2Hz
Data rate

HPLC-MS Optimierung

(Peakunterdrückung und Gradientenlänge)

Compound List										
File	RT	Mass	Diff (Tgt, ppm)	Score (Tgt)	Formula (Tgt)	Mass (Tgt)	RT Diff (Tgt)	Area	Height	
Kamille_high_long.d	54.749	403.11727	1.12	98.66	C22H17N3O5	403.11682	0.049	14611576	1346071	
Kamille_high_middle.d	39.967	403.11722	0.99	99.51	C22H17N3O5	403.11682	0.017	14619347	1920466	
Kamille_high_short.d	23.434	403.11729	1.17	99.29	C22H17N3O5	403.11682	0.012	11847886	2560961	

File	Formula (Tgt)	RT	Height	Score (Tgt)	Mass (Tgt)	Diff (Tgt, ppm)	Diff (Tgt, mDa)
Standard_low_long.d	C20H30N2O5S	83.439	437240	87.43	410.187543	0.79	0.32
Standard_low_middle.d	C20H30N2O5S	59.795	604661	87.51	410.187543	0.85	0.35
Standard_low_short.d	C20H30N2O5S	31.675	4791680	90.77	410.187543	-2.27	-0.93

50mm*2,1mm Eclipse Plus C18, Standard und Kamillenextrakt von Pestiziden, verschiedene Gradienten (30, 60, 90 min), 2Hz Data rate

ADS 100 – AnaTox Dissolution Sampler



Dissolution Dissolution
Dissolution Dissolution
Dissolution Dissolution
Sampling
Dissolution
Dissolution Dissolution

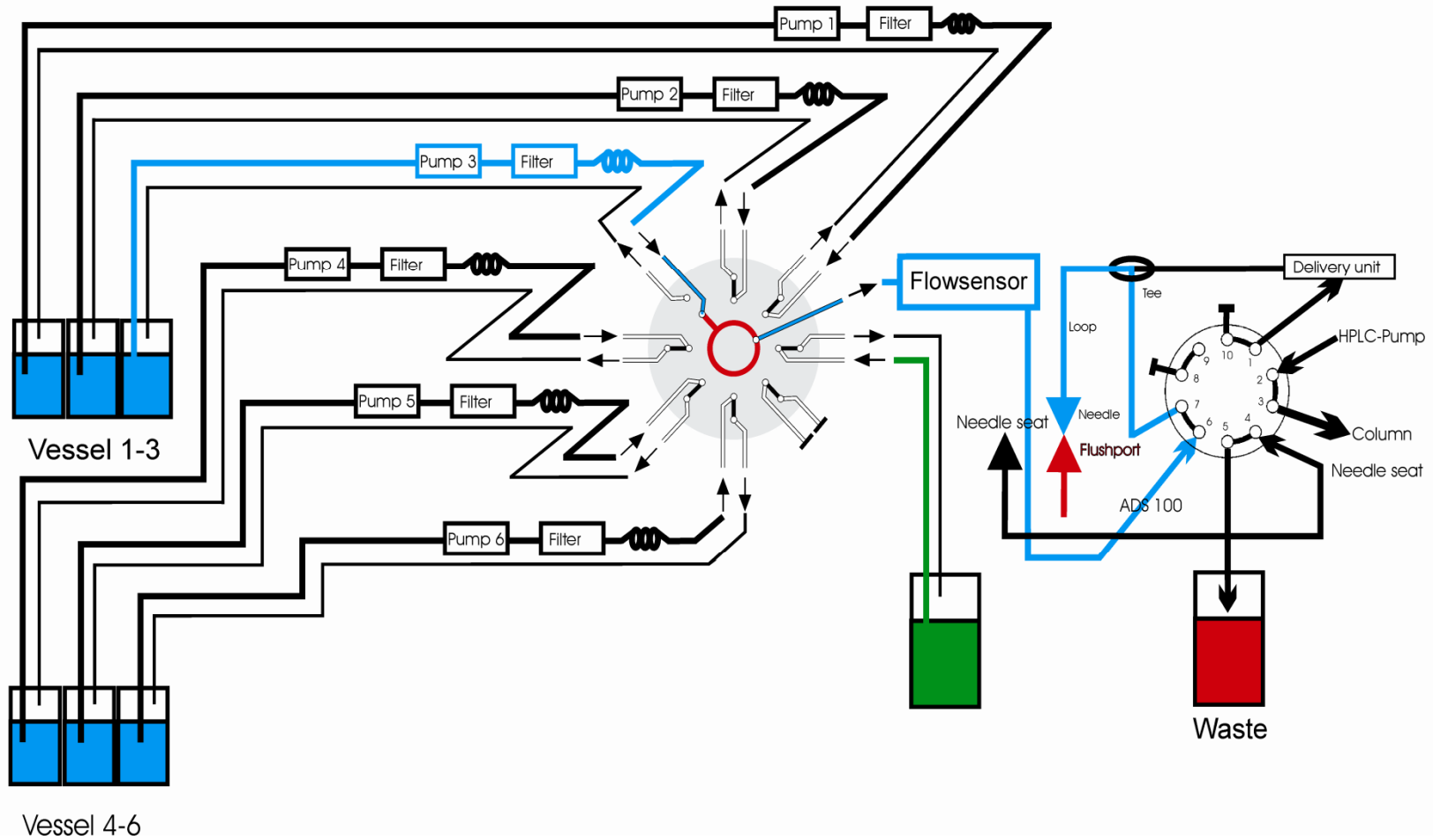


ADS 100 – AnaTox Dissolution Sampler

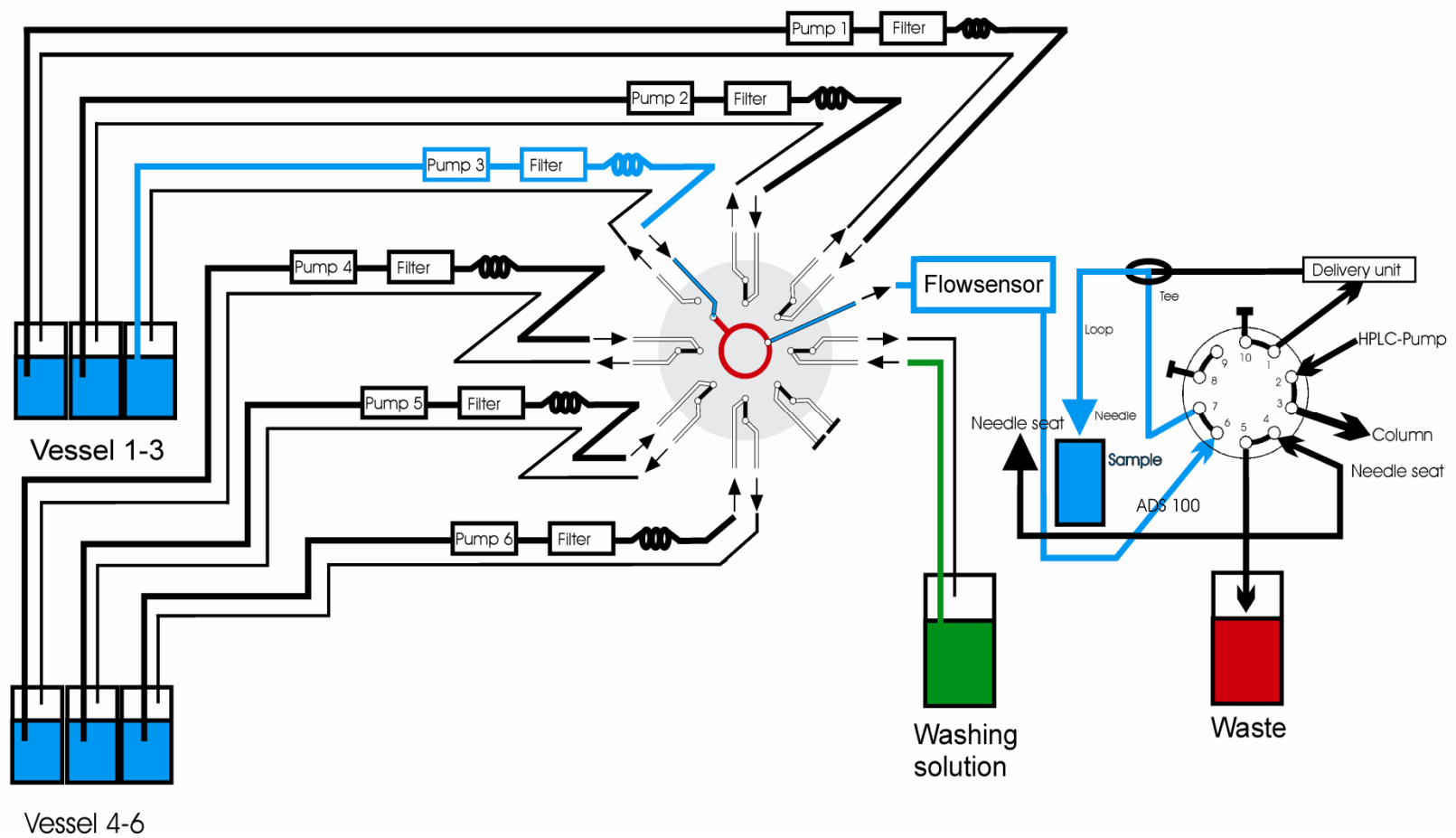
Functions

- Simultaneous sampling of up to 8 vessels
- Filtration der Proben bis zu 100bar und bis zu 1µm
- Sequentieller Transfer der Proben zum ALS
- Automatisches Waschen und Spülen aller Kapillaren und Ventile
- Automatische Generierung von Sequenztabelle
- Zeit-optimierte Probenahme und Injection von Proben
- Audit trail
- Dokumentation aller Prozesse

Liquid Sampling – Flushing HPLC-ALS with sample



Liquid Sampling – Transferring sample to ALS-Rack



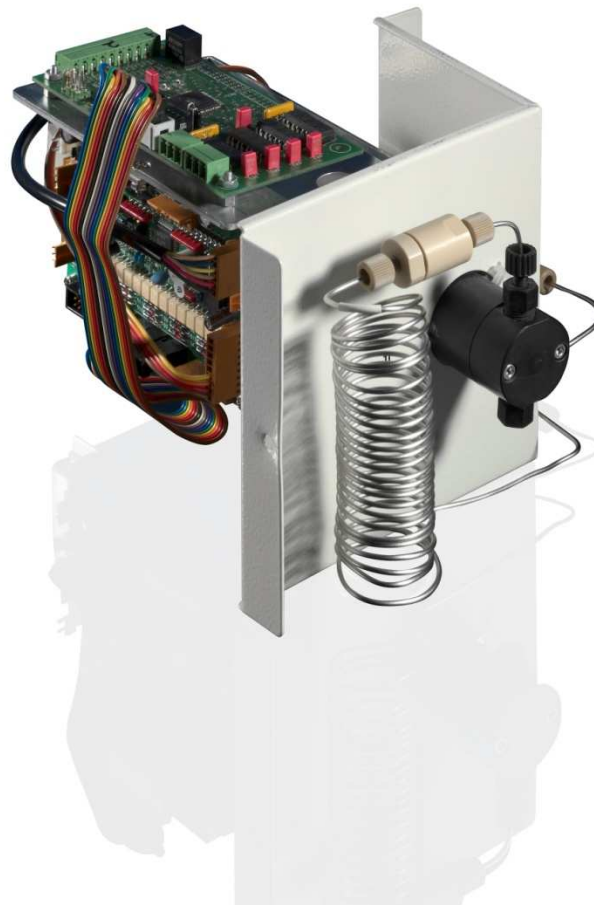


Dissolution and Liquid Sampling

Hardware: Features

- Filtration (unter Druck), Untersuchung von Suspensionen möglich
- Probemenge: variable (abhängig vom Schleifenvolumen)
- Überwachung der Probenahme durch Flowsensor
- Kreislauffahrweise der Proben (minimiert Probenahmezeit)
- Unabhängig vom Dissolutionbad (-hersteller)
- Compactsystem (all in one), eine Schnittstelle zum PC
- Upgrade von manuellen zu automatischen Systemen
- Probensammler: Wellplatesammler, Fractionssammler
- Detection: HPLC-System, UV-Spektrometer, UV-Detector

Modulares Design



- Einfacher Zugriff auf komplette Pumpenmodule
- Einfache Wartung der Pumpenköpfe
- Einfacher Zugriff auf die Filter



Spezifikation

- Minimal cycle time: 10min for 6 samples
- Maximum pressure: 100bar
- Maximum Flow rate: 5ml/min
- Carry over: <0,1%
- Sampling precision:
 - <250µl: < 10%
 - <1000µl: < 5%
 - <2000µl: < 3%



Fragen?