

Agilent 1290 Infinity LC System

Systemhandbuch und
Kurzanleitung



Agilent Technologies

Hinweise

© Agilent Technologies, Inc. 2009-2011, 2012

Die Vervielfältigung, elektronische Speicherung, Anpassung oder Übersetzung dieses Handbuchs ist gemäß den Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes ohne vorherige schriftliche Genehmigung durch Agilent Technologies verboten.

Microsoft[®] Microsoft is a U.S. registered trademark of Microsoft Corporation.

Handbuch-Teilenummer

G4220-92301

Ausgabe

05/2012

Gedruckt in Deutschland

Agilent Technologies
Hewlett-Packard-Strasse 8
76337 Waldbronn, Germany

Dieses Produkt kann als Komponente eines In-vitro-Diagnosesystem eingesetzt werden, sofern das System bei den zuständigen Behörden registriert ist und den einschlägigen Vorschriften entspricht. Andernfalls ist es nur für den allgemeinen Laborgebrauch vorgesehen.

Gewährleistung

Agilent Technologies behält sich vor, die in diesem Handbuch enthaltenen Informationen jederzeit ohne Vorankündigung zu ändern. Agilent Technologies übernimmt keinerlei Gewährleistung für die in diesem Handbuch enthaltenen Informationen, insbesondere nicht für deren Eignung oder Tauglichkeit für einen bestimmten Zweck. Agilent Technologies übernimmt keine Haftung für Fehler, die in diesem Handbuch enthalten sind, und für zufällige Schäden oder Folgeschäden im Zusammenhang mit der Lieferung, Ingebrauchnahme oder Benutzung dieses Handbuchs. Falls zwischen Agilent und dem Benutzer eine schriftliche Vereinbarung mit abweichenden Gewährleistungsbedingungen hinsichtlich der in diesem Dokument enthaltenen Informationen existiert, so gelten diese schriftlich vereinbarten Bedingungen.

Technolizenzlizenzen

Die in diesem Dokument beschriebene Hardware und/oder Software wird/werden unter einer Lizenz geliefert und dürfen nur entsprechend den Lizenzbedingungen genutzt oder kopiert werden.

Sicherheitshinweise

VORSICHT

Ein **VORSICHT**-Hinweis macht auf Arbeitsweisen, Anwendungen o.ä.aufmerksam, die bei falscher Ausführung zur Beschädigung des Produkts oder zum Verlust wichtiger Daten führen können. Wenn eine Prozedur mit dem Hinweis **VORSICHT** gekennzeichnet ist, dürfen Sie erst fortfahren, wenn Sie alle angeführten Bedingungen verstanden haben und diese erfüllt sind.

WARNUNG

Ein **WARNUNG**-Hinweis macht auf Arbeitsweisen, Anwendungen o. ä. aufmerksam, die bei falscher Ausführung zu Personenschäden, u. U. mit Todesfolge, führen können. Wenn eine Prozedur mit dem Hinweis **WARNUNG** gekennzeichnet ist, dürfen Sie erst fortfahren, wenn Sie alle angeführten Bedingungen verstanden haben und diese erfüllt sind.

Inhalt dieses Handbuchs...

Dieses Handbuch gilt für das Agilent 1290 Infinity LC System.

1 Einführung in die Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Dieses Kapitel enthält eine Einführung zum Agilent 1290 Infinity LC System und die zugrunde liegenden Konzepte.

2 Das Agilent 1290 Infinity LC System - Gerätebeschreibung

In diesem Kapitel werden die Funktionen des 1290 Infinity LC Systems beschrieben.

3 Optimieren des Agilent 1290 Infinity LC Systems

In diesem Kapitel wird beschrieben, wie die Theorie anzuwenden ist und wie die Funktionen des LC-Systems zur Entwicklung optimierter Trennmethode genutzt werden können.

4 Einrichtung und Installation

Dieses Kapitel enthält Informationen zur Softwareinstallation, zur Gerätekonfiguration und zur Vorbereitung des Systems für den Betrieb.

5 Schnellstart-Anleitung

Dieses Kapitel enthält Informationen zur Datenerfassung und Datenanalyse mit dem 1290 Infinity LC System.

6 Anhang

Dieses Kapitel enthält ergänzende Informationen zur Sicherheit, zum Internet, zur Einrichtung einer Methode sowie rechtliche Hinweise.

Inhalt

1 Einführung in die Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie	7
Theorie der Verwendung kleinerer Partikel bei der Flüssigkeitschromatographie	8
Vorteile von Säulen mit Partikelgrößen unter 2 µm	15
Reibungserwärmung	19
2 Das Agilent 1290 Infinity LC System - Gerätebeschreibung	21
Neue Eigenschaften und Funktionen des Agilent 1290 Infinity LC Systems	22
Systemkomponenten	25
3 Optimieren des Agilent 1290 Infinity LC Systems	39
Verzögerungsvolumen und Extrasäulenvolumen	40
Konfiguration des optimalen Verzögerungsvolumens	42
Erzielen höherer Injektionsvolumina	51
Erzielen eines höheren Durchsatzes	53
Erzielen einer höheren Auflösung	56
Erzielen einer höheren Empfindlichkeit	59
Erzielen der geringstmöglichen Verschleppung	68
Verstopfung von Säulen vermeiden	71
4 Einrichtung und Installation	73
Installation der Software	74
Installation des Moduls	75
5 Schnellstart-Anleitung	93
Über die Schnellstart-Anleitung	94
Vorbereitung des Systems	95
Datenerfassung in der Ansicht Methoden- und Analysenkontrolle	100
Datenanalyse	109

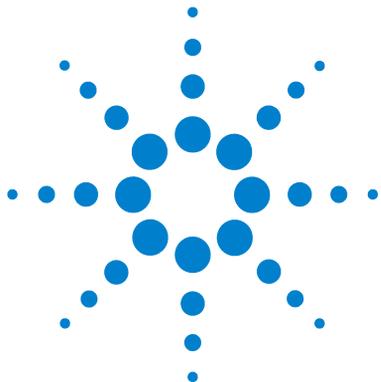
6 Anhang 115

Sicherheitsinformationen 116

Informationen zu Lösungsmitteln 119

Agilent Technologies im Internet 120

Einrichtung einer Methode mithilfe von Edit Entire Method 121



1 Einführung in die Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Theorie der Verwendung kleinerer Partikel bei der Flüssigkeitschromatographie 8

Vorteile von Säulen mit Partikelgrößen unter 2 μm 15

Reibungserwärmung 19

Dieses Kapitel enthält eine Einführung zum Agilent 1290 Infinity LC System und die zugrunde liegenden Konzepte.



Theorie der Verwendung kleinerer Partikel bei der Flüssigkeitschromatographie

Einführung

Im Jahr 2003 führte Agilent die ersten kommerziell erhältlichen porösen Kieselgelsäulen mit 1,8 µm-Partikeln ein. Dies waren die ersten Vertreter einer Klasse von Säulen, die inzwischen als "Sub-2-Mikron"- oder STM-Säulen bekannt sind. Zur Anwendung mit dem Agilent 1200 Serie Rapid Resolution LC System, das im Jahr 2006 auf den Markt kam, wurden diese Packungsmaterialien in ZORBAX RRHT Säulen gefüllt, die einem Druck von 600 bar standhalten können. 2009 wurde die Produktreihe um RRHD-Säulen erweitert, die routinemäßig bei einem Druck von 1200 bar verwendet werden können, um das Agilent 1290 Infinity LC System mit seinem umfangreichen Leistungsbe- reich, der Drücke von bis zu 1200 bar und eine Flussrate von 5 ml/min bietet, zu ergänzen.

Diese Säulen mit Partikeln von weniger als 2 µm Größe (1,8 µm) können im Hinblick auf zwei wesentliche Ziele verwendet werden:

1 Schnellere Chromatographie

Kurze Säulen mit Partikel unter 2 µm bieten die Möglichkeit, die Analysezeit durch Erhöhung der Flussrate drastisch zu verkürzen, ohne dabei Trennleistung einzubüßen.

2 Höhere Auflösung

Lange Säulen mit Partikel unter 2 µm bieten höhere Effizienz und somit höhere Auflösung, wie sie zur Trennung komplexer Proben erforderlich ist. Geringere Dispersion bringt auch eine geringere Verdünnung der Analyt-Peaks mit sich und infolge dessen einen Gewinn an Empfindlichkeit, insbesondere bei der LC/MS.

Der Druck, der erforderlich ist, um das Lösungsmittel durch eine Säule mit STM-Partikeln zu treiben, steigt rasch mit der Erhöhung der Flussrate, die zum Erreichen einer schnelleren Trennung erforderlich ist, und sehr rasch mit zunehmender Länge der Säule, die eine Voraussetzung für eine bessere Auflösung ist. Daher erfolgte die Einführung von STM-Säulen gleichzeitig mit der Entwicklung von UHPLC-Systemen, also HPLC-Systemen, die höhere Drücke bieten als 400 bar, die Norm, die seit den frühen Tagen der HPLC gültig war.

Ultrahochleistungs- oder Ultrahochdruck-LC-Systeme bieten außerdem geringe Verzögerungsvolumina und die rasche Datenerfassung, die für die schmalen Peaks bei der schnellen oder hochauflösenden Chromatographie erforderlich sind. Das Agilent 1290 Infinity LC System ist ein Meilenstein in der UHPLC, da es das erste System ist, das alle auf dem Markt verfügbaren unterschiedlichen Leistungsbereiche bei der UHPLC komplett abdeckt und erweitern kann.

Die Theorie

Die Effizienz der Trennung bei der HPLC kann durch die Van-Deemter-Gleichung ([Abbildung 1](#) auf Seite 10) beschrieben werden. Diese leitet sich ab aus dem "Bodenhöhen"-Modell, das zur Bestimmung der Dispersion von Analyten auf ihrem Weg durch die Säule verwendet wird. H ist das Höhenäquivalent eines theoretischen Bodens (manchmal auch als HETP, height equivalent to a theoretical plate, bezeichnet), d_p ist die Partikelgröße des Packungsmaterials der Säule, u_0 ist die lineare Geschwindigkeit der mobilen Phase und A , B , und C sind Konstanten, die für die verschiedenen dispersiven Kräfte stehen. Der Term A bezieht sich auf die Eddy-Diffusion oder die unterschiedlichen Flusswege durch die Säule; B bezieht sich auf die Diffusion von Molekülen entlang der Säulenachse (longitudinale Diffusion); C bezieht sich auf den Massenübergang des Analyten zwischen der mobilen und der stationären Phase. Die Trennung ist umso effizienter, je kleiner H ist. Der Effekt jedes einzelnen Terms und die kombinierte Gleichung sind in [Abbildung 1](#) auf Seite 10 dargestellt, in der die Bodenhöhe gegen die lineare Flussrate durch die Säule aufgetragen ist. Diese Art der Auftragung ist als Van-Deemter-Kurve bekannt und sie wird verwendet, um die optimale Flussrate (Minimum der Kurve) und damit die optimale Trennleistung einer Säule zu bestimmen.

1 Einführung in die Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Theorie der Verwendung kleinerer Partikel bei der Flüssigkeitschromatographie

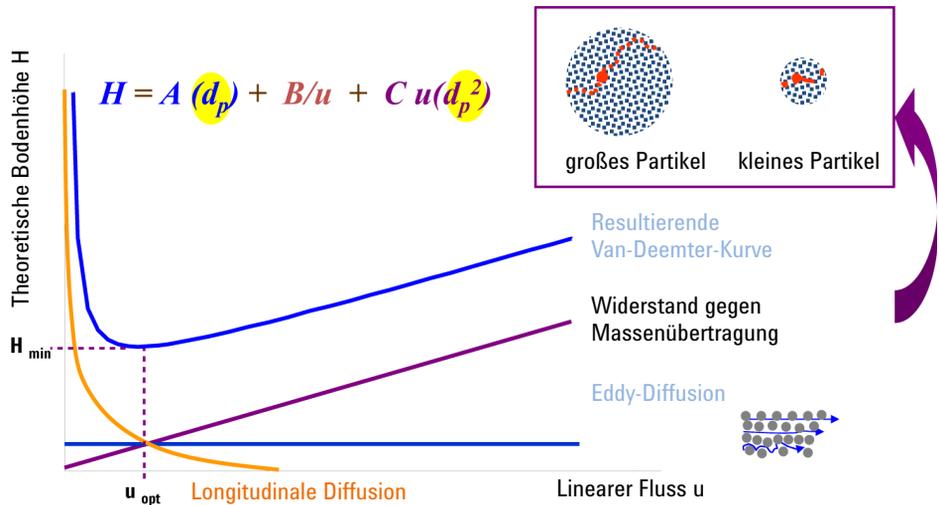


Abbildung 1 Hypothetische Van-Deemter-Kurve

Die Van-Deemter-Diagramme in [Abbildung 2](#) auf Seite 11 zeigen, dass eine Verringerung der Partikelgröße zu höherer Effizienz führt. Die Umstellung von den häufig verwendeten Partikelgrößen 3,5 μm und 5,0 μm auf eine Partikelgröße von 1,8 μm ermöglicht eine deutliche Verbesserung der Leistung. Die 1,8 μm -Partikel führen zu zwei- bis dreimal geringeren Werten für die Bodenhöhe und entsprechend höherer Effizienz. So kann eine kürzere Säule verwendet werden, ohne dass die Auflösung leidet. Außerdem verringert sich die Analysezeit um den Faktor zwei bis drei. Die Erhöhung der Effizienz ergibt sich vor allem aus der Verringerung der unterschiedlichen Flusswege infolge der kleineren Partikel. Dies führt zu einem kleineren A-Term (Eddy-Diffusion). Außerdem führen kleinere Partikel zu kürzeren Massenübergangszeiten, wodurch sich der C-Term verkleinert; die Folge ist ein deutlich geringerer Effizienzverlust mit steigender Flussrate (die Steigung der Kurve verringert sich). Das bedeutet, dass die Trennung an kleineren Partikeln durch Erhöhung der Flussrate weiter beschleunigt werden kann, ohne dass ein nennenswerter Effizienzverlust eintritt.

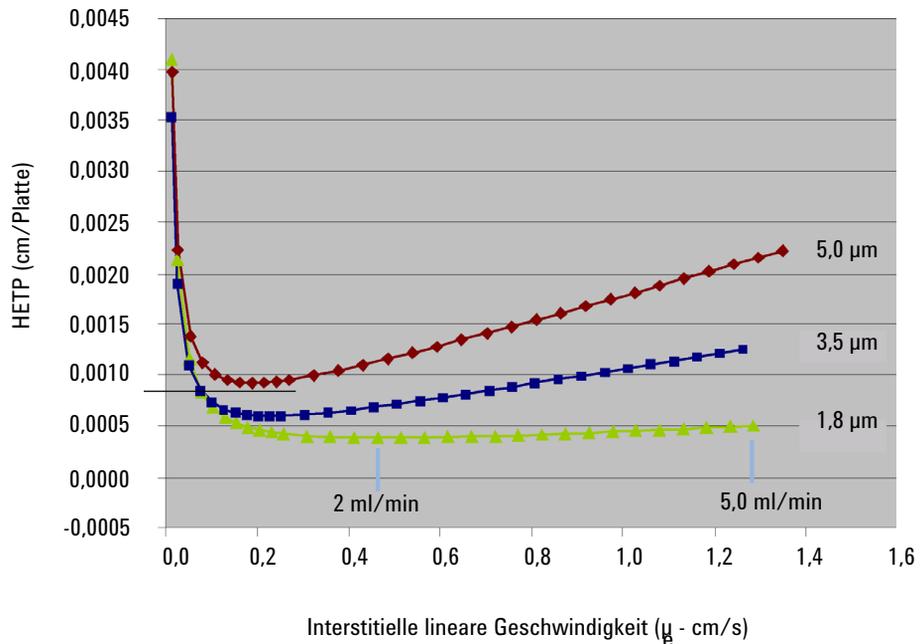


Abbildung 2 Van-Deemter-Kurve für unterschiedliche Partikelgrößen

Eine chromatographische Trennung kann auf der Grundlage der physikalischen Parameter der HPLC-Säule optimiert werden, wie beispielsweise Partikelgröße, Porengröße, Partikelmorphologie, Länge und Durchmesser der Säule, Lösungsmittelgeschwindigkeit und Temperatur. Darüber hinaus kann die Thermodynamik einer Trennung berücksichtigt werden, und die Eigenschaften des gelösten Stoffs sowie der stationären und mobilen Phase (Prozentsatz des organischen Lösungsmittels, Ionenstärke und pH-Wert) können manipuliert werden, um eine möglichst kurze Retention und höchste Selektivität zu erreichen.

1 Einführung in die Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Theorie der Verwendung kleinerer Partikel bei der Flüssigkeitschromatographie

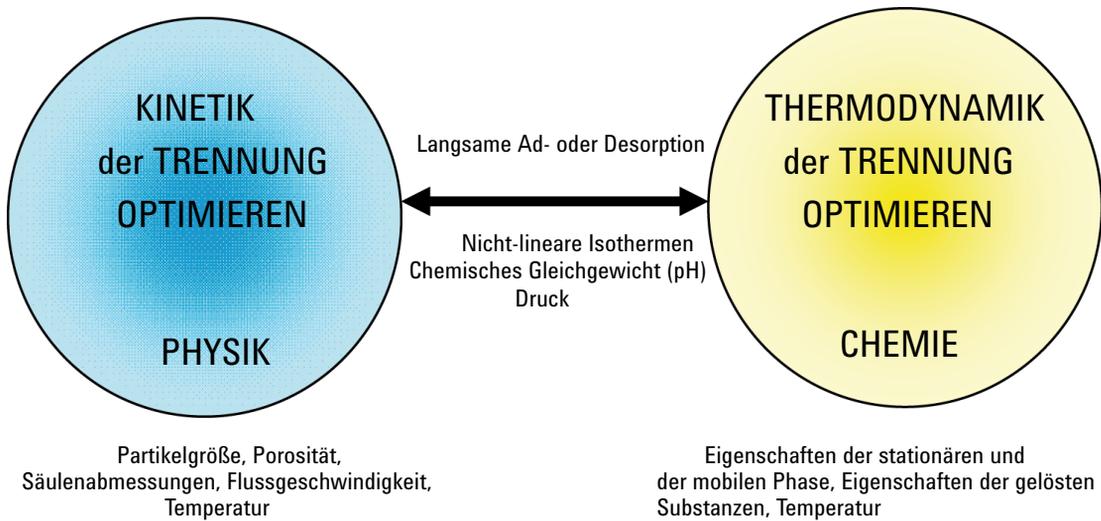


Abbildung 3 Ermittlung optimaler Bedingungen bei der HPLC

Die Auflösung kann als Funktion von drei Parametern beschrieben werden:

- Säuleneffizienz oder theoretische Böden (N),
- Selektivität (α),
- Retentionsfaktor (k).

Gemäß der Auflösungsgleichung (Abbildung 4 auf Seite 13) hat die Selektivität den stärksten Einfluss auf die Auflösung (Abbildung 5 auf Seite 13). Dies bedeutet, dass die Auswahl geeigneter Eigenschaften der mobilen und stationären Phase sowie der richtigen Temperatur für eine erfolgreiche Trennung entscheidend ist.

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \cdot \left[\frac{k_2'}{k_2' + 1} \right]$$

Abbildung 4 Auflösungsgleichung

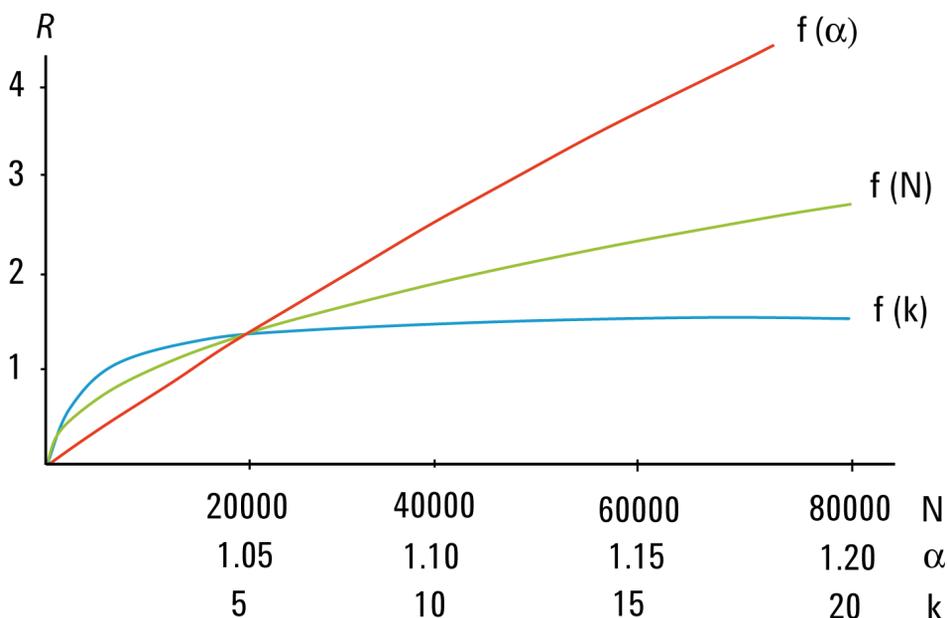


Abbildung 5 Einfluss der Anzahl an Böden, des Trennfaktors und des Retentionsfaktors auf R

Gleichgültig ob die Rapid Resolution-Trennmethode neu entwickelt oder eine vorhandene konventionelle Methode einfach transferiert wird - es ist sicherlich von Vorteil, eine große Auswahl an stationären Phasen mit unterschiedlicher Zusammensetzung und in unterschiedlichen Säulenformaten zur Verfügung zu haben.

1 Einführung in die Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Theorie der Verwendung kleinerer Partikel bei der Flüssigkeitschromatographie

Agilent bietet bereits mehr als 140 ZORBAX 1,8 µm Rapid Resolution High Throughput (RRHT) Säulen an (14 unterschiedliche Selektivitäten; 15 bis 150 mm lang; Innendurchmesser 2,1, 3,0 und 4,6 mm), und mit der Markteinführung des Agilent 1290 Infinity LC wird die STM-Reihe um die Rapid Resolution High Definition (RRHD) 1200 bar Säulen erweitert. So kann die optimale stationäre Phase ausgewählt werden, die zur Maximierung der Selektivität erforderlich ist. Auflösung, Flussrate und Analysezeit können durch Auswahl geeigneter Säulenlänge bzw. des geeigneten Säulendurchmessers optimiert werden, und der Einsatz längerer STM-Säulen ist mittlerweile so einfach wie nie zuvor.

Viele Labors ermitteln die beste Kombination aus stationärer Phase, mobiler Phase und Temperatur für ihre Trennungen in einer längeren Screening-Phase. Agilent bietet Lösungen für die Methodenentwicklung sowohl für die 1200er Serie als auch für 1290 Infinity LC Systeme an. Diese ermöglichen die vollständige Automatisierung dieses zeitaufwändigen Auswahlprozesses und machen so die Entwicklung wie den Transfer von Methoden einfacher und zuverlässiger.

ZORBAX 1,8 µm RRHD und RRHT Säulen haben dieselbe Zusammensetzung wie ZORBAX Säulen mit 3,5 und 5 µm Partikeln. Infolge dessen bieten Partikel der Größen 5,0, 3,5 und 1,8 µm bei jeder beliebigen ZORBAX-Phase dieselbe Selektivität. Dies erlaubt einen einfachen, schnellen und sicheren bidirektionalen Methodentransfer zwischen konventioneller LC, UHPLC und präparativer LC.

Vorteile von Säulen mit Partikelgrößen unter 2 µm

Schnellere Chromatographie

Kürzere Laufzeiten haben eine Reihe von Vorteilen. Labors mit hohem Durchsatz verfügen über eine höhere Kapazität und können mehr Proben in kürzerer Zeit analysieren. Die Analyse von mehr Proben in kürzerer Zeit verringert zudem die Kosten. Beispielsweise senkt eine Verkürzung der Analysezeit von 20 min pro Probe auf 5 min die Kosten für 700 Proben um 79 % (Tabelle 1 auf Seite 15).

Tabelle 1 Zeit- und Kosteneinsparungen bei 700 Analysen

Zykluszeit	Zykluszeit 20 min	Zykluszeit 5 min
Läufe	700	700
Ungef. Kosten/Analyse ¹	10,58 \$	2,24 \$
Ungef. Kosten/700 Analysen ¹	7400 \$	1570 \$
Kosteneinsparungen	-	5830 \$
Zeit ²	10 Tage	2,5 Tage

¹ Lösungsmittel: 27 \$/l, Entsorgung: 2 \$/l, Labor: 30 \$/h

² 24 Stunden/Tag

Mit dem Agilent Kosteneinsparungsrechner können die Einsparungen bei der Umstellung von der konventionellen HPLC auf die UHPLC unter Verwendung von Säulen mit einer Partikelgröße von 1,8 µm auf einfache Weise berechnet werden. Diesen Rechner finden Sie auf der Website von Agilent Technologies zusammen mit einem Methodentransferrechner: www.chem.agilent.com. Die Ergebnisse werden grafisch und in einer Tabelle dargestellt.

Kürzere Laufzeiten führen auch schneller zu Ergebnissen. Dies ist wichtig bei der Prozesskontrolle und für schnelle Freigabetests. Statt Stunden auf die Freigabe einer einzelnen Medikamentencharge warten zu müssen, können nun die Anpassung und Kalibrierung des Systems sowie die Probenanalyse in weniger als einer Stunde durchgeführt werden. Schnelle Ergebnisse sind

1 Einführung in die Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Vorteile von Säulen mit Partikelgrößen unter 2 µm

darüber hinaus wichtig für Synthesechemiker, die offene LC/MS-Systeme zur Überprüfung von Verbindungen und zur Reaktionskontrolle verwenden. Schließlich können kürzere Laufzeiten die Methodenentwicklung erheblich beschleunigen.

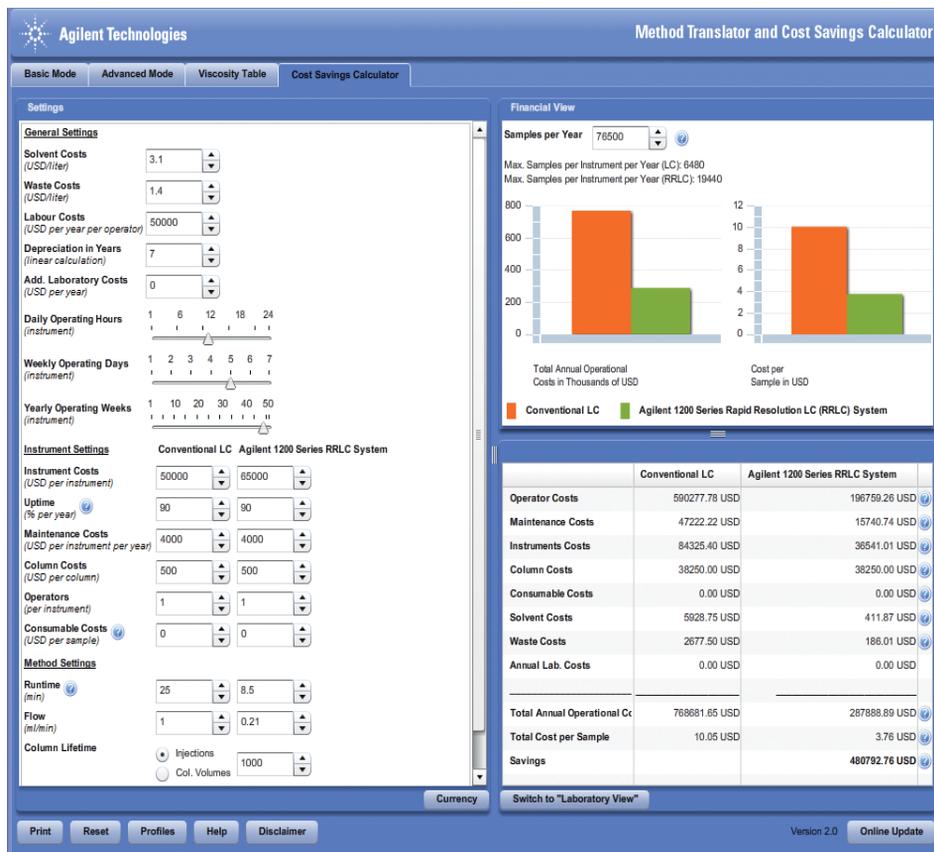


Abbildung 6 Kosteneinsparungsrechner

Einführung in die Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Vorteile von Säulen mit Partikelgrößen unter 2 µm

1

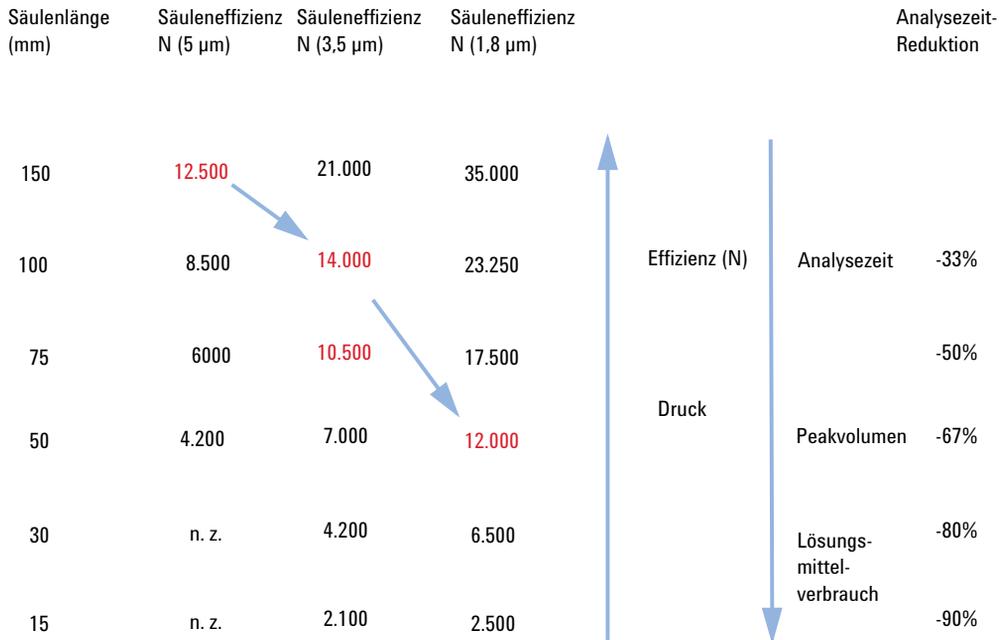


Abbildung 7 Zusammenhang zwischen Partikelgröße, Effizienz und Analysezeit

Höhere Auflösung

Längere Säulen, die mit kleineren Partikeln gepackt sind, führen zu höherer Effizienz und besserer Auflösung. Dies ist wichtig bei der Analyse komplexer Proben aus Metabolom- oder Proteom-Studien. Auch Anwendungen wie die Erstellung von Verunreinigungsprofilen können von einer höheren Trennleistung profitieren. Sogar für die LC/MS-Analyse von Medikamenten oder Drogen in biologischen Flüssigkeiten ist eine höhere Peak-Kapazität aufgrund der reduzierten Interferenz durch Ionenunterdrückung von Vorteil. Generell führt eine höhere Trennleistung zu verlässlicheren Analyseergebnissen.

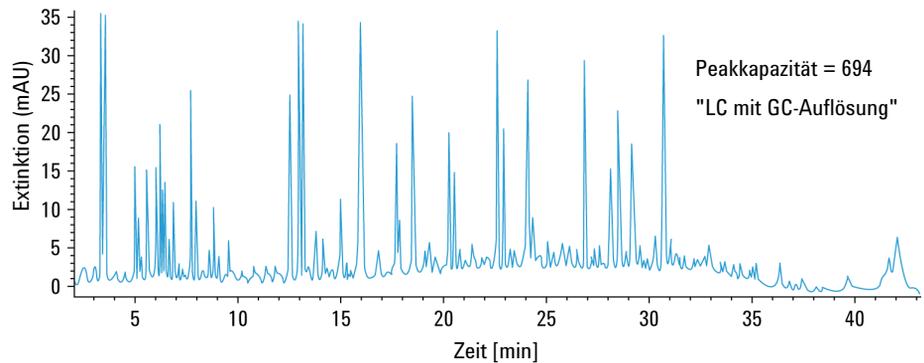


Abbildung 8 Bei Verwendung einer ZORBAX RRHT SB-C18 Säule (2,1 x 150 mm, 1,8 µm) zur Analyse eines tryptischen Verdaus von BSA können Peakkapazitäten von mehr als 700 erreicht werden.

Reibungserwärmung

Das Durchleiten der mobilen Phase durch die Säule unter höherem Druck und höheren Flussraten erzeugt Wärme. Die entstehenden Temperaturgradienten (radial und longitudinal) können sich auf die Säuleneffizienz auswirken.

$$Power = F * p$$

wobei F für die Flussrate und p für den Druck steht.

Eine intensive Thermostatisierung der Säule (beispielsweise mit einem Wasserbad) führt zu einem starken radialen Temperaturgradienten, der wiederum einen deutlichen Verlust an Säuleneffizienz verursacht. Thermostatisierung durch stehende Luft reduziert den radialen Temperaturgradienten und verringert so den Effizienzverlust, es muss jedoch eine höhere Säulenauslasstemperatur in Kauf genommen werden. Die höhere Temperatur kann die Selektivität beeinflussen. Bei geringerem Rückdruck können Leistungsverluste durch Reibungswärme auf ein Minimum begrenzt werden, so dass Säulen mit Partikel unter 2 µm und mit einem Innendurchmesser von 4,6 oder 3 mm immer noch höhere Effizienzen bieten als vergleichbare Säulen mit einem Innendurchmesser von 2,1 mm.

Ein Beispiel für den Transfer einer Gradientenmethode auf eine STM-Säule mit Innendurchmesser 2,1 mm, bei der die Trennung beschleunigt wurde, ist in [Abbildung 9](#) auf Seite 20 gezeigt. Die ursprüngliche Analyse auf der Säule mit Innendurchmesser 2,1 mm wurde bei einer Flussrate von 0,22 ml/min, einem sich daraus ergebenden Druck von 380 bar und einer Temperatureinstellung von 37 °C durchgeführt, wobei sich alle Peaks in 12,5 min trennen ließen (Chromatogramm nicht gezeigt). Der Fluss wurde auf 0,66 ml/min erhöht und die Gradientenzeiten wurden um den Faktor drei nach unten korrigiert, wobei sich ein Druck von 1020 bar ergab und alle Peaks in 4,2 min eluiert werden konnten ([Abbildung 9](#) auf Seite 20 oben). Dies sollte zu derselben Trennung führen, jedoch lässt sich ein Verlust an Auflösung zwischen den Peaks 7 und 8 und zwischen Peak 5 und dem Hauptpeak erkennen. Der Grund hierfür ist die Wärmeentwicklung in der Säule, die die Selektivität für diese Substanz ändert. Es stellte sich heraus, dass eine Einstellung des Säulenthmostats auf eine um 5 °C niedrigere Temperatur ausreichte, um den Wärmeeffekt in der Säule auszugleichen und die Trennung wiederherzustellen ([Abbildung 9](#) auf Seite 20 unten). Der Druck erhöhte sich auf 1070 bar, was ebenfalls ein Hinweis darauf ist, dass die Temperatur in der Säule niedriger war.

1 Einführung in die Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Reibungserwärmung

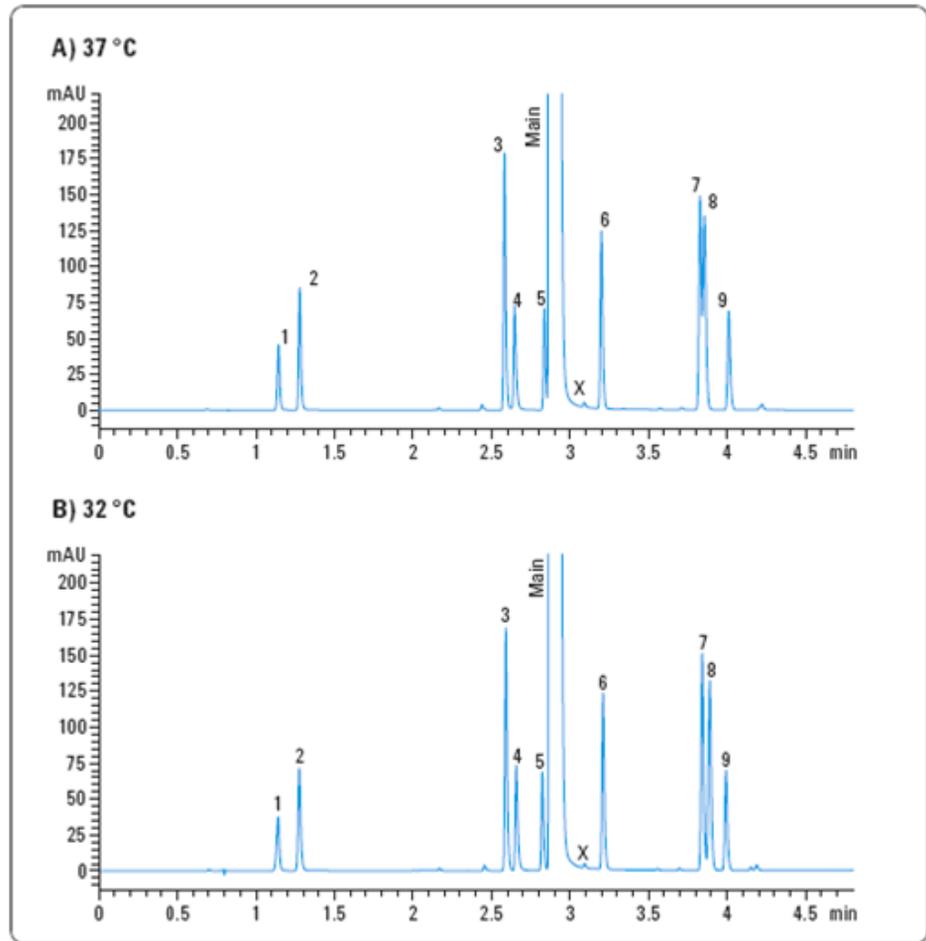
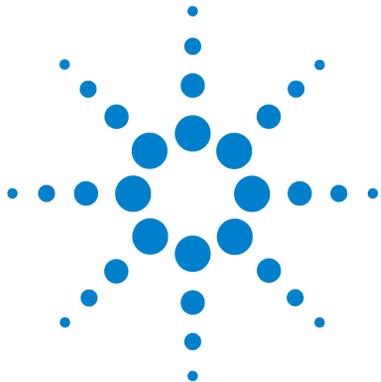


Abbildung 9 Einfluss der erzeugten Reibungswärme auf die Selektivität und Effekt der niedrigeren Säulentemperatur

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Verwendung von Packungsmaterial aus Partikeln unter 2 μm die Vorteile höherer Effizienz, höherer Auflösung und schnellerer Trennung bietet. Das Agilent 1290 Infinity LC System mit RRHD Säulen bietet einen größeren verfügbaren Trennraum und ermöglicht eine intensivere Nutzung all dieser Vorteile. Die Funktionen des 1290 Infinity LC werden in [“Das Agilent 1290 Infinity LC System - Gerätebeschreibung”](#) auf Seite 21 diskutiert und in [“Optimieren des Agilent 1290 Infinity LC Systems”](#) auf Seite 39 ist dargestellt, wie die Theorie umzusetzen ist, um diese Funktionen bei Entwicklung optimierter Trennmethode einzusetzen.



2 Das Agilent 1290 Infinity LC System - Gerätebeschreibung

Neue Eigenschaften und Funktionen des Agilent 1290 Infinity LC
Systems [22](#)

Systemkomponenten [25](#)

In diesem Kapitel werden die Funktionen des 1290 Infinity LC Systems beschrieben.



Neue Eigenschaften und Funktionen des Agilent 1290 Infinity LC Systems

Das Agilent 1290 Infinity LC System ist für höchste Flexibilität bei der analytischen Flüssigkeitschromatographie unter Verwendung aller aktuellen und künftigen Säulentchnologien konzipiert. Der 1290 Infinity LC bietet den umfangreichsten Bereich von Betriebsparametern, so dass mit diesem System Methodeneinstellungen wiederholt werden können, die von jedem beliebigen anderen analytischen HPLC- oder UHPLC-System jedes beliebigen Anbieters transferiert wurden. Um diese Flexibilität zu ermöglichen, wurden beim Agilent 1290 Infinity LC System einige radikal neue Konstruktionskonzepte umgesetzt – auf der Grundlage ausgereifter und zuverlässiger Technik, die Agilent HPLC-Systeme zur erfolgreichsten HPLC-Produktreihe gemacht hat, die derzeit verfügbar ist.

Dieses System bietet:

- Flussraten von 0,05 ml/min bis 5 ml/min für konventionelle oder schnelle Chromatographie mit allen analytischen Säulen von 1 bis 5 mm Innendurchmesser und allen Arten von Packungsmaterial
- Drücke im Bereich bis 1200 bar (> 17400 psi) für schnelle Chromatographie mit kurzen Säulen, hohe Auflösung mit langen Säulen bei Verwendung von Packungsmaterial unter 2 µm und eine breitere Auswahl an Viskositäten der mobilen Phase
- Ultra-kleine Verzögerungsvolumina für schnellste Gradienten in Kombination mit massenspektrometrischer oder UV/VIS-Detektion
- Möglichkeit der Anwendung sämtlicher von einem anderen analytischen HPLC- oder UHPLC-System transferierter Methoden
- Ausgefeilte Pumpensteuerung für geringes chromatographisches Rauschen und geräuscharmen Betrieb und damit bessere Ergebnisse und ein angenehmeres Arbeitsumfeld
- Entgaser und automatisches Spülventil im Pumpenmodul integriert
- Automatischer Probengeber für variable Probenvolumina mit verringertem Verzögerungsvolumen, verringerter Verschleppung und der Option für einen Betrieb als automatischer Probengeber mit fester Schleife
- Neues Flexible Cube-Modul für zusätzliche Probengeber-Funktionen wie Rückspülen des Nadelsitzes und Betrieb mit fester Schleife

- Säulenthermostat mit erweiterten Einsatzmöglichkeiten und integrierte Ventile für einen Druckbereich bis 1200 bar (17400 psi)
- Diodenarray-Detektor mit deutlich höherer Empfindlichkeit und Basislinienstabilität bei Verwendung eines Kartuschenzellensystems mit Optofluid-Wellenleitern.
- Datenerfassungsraten von bis zu 160 Hz mit vollständigen Spektreninformationen
- Eine neue Reihe von ZORBAX RRHD-Säulen mit Partikel unter 2 µm zum Betrieb bei Drücken bis 1200 bar
- Mischassistent für automatische Pufferung und Zumischung von Zusätzen in der 1290 Infinity Quaternären Pumpe

Die wichtigste Neuerung ist der erweiterte Bereich von Drücken und Flussraten, die mit dem System genutzt werden können. Dieser Betriebsbereich gibt den Leistungsbereich (Fluss x Druck) des Geräts an und ist in grafischer Darstellung am leichtesten zu verstehen (**Abbildung 10** auf Seite 23). Wie aus dem Diagramm ersichtlich erlaubt der Leistungsbereich der 1290 Infinity Pumpe den Betrieb bei 1200 bar bei einem Fluss von bis zu 2 ml/min, wobei sich der Druck auf 800 bar verringert, wenn der Fluss auf 5 ml/min steigt. Dies schließt die Betriebsbereiche aller auf dem Markt verfügbaren UHPLC-Systeme ein und erlaubt den direkten Transfer von Methoden von jedem beliebigen dieser Systeme auf das 1290 Infinity System.

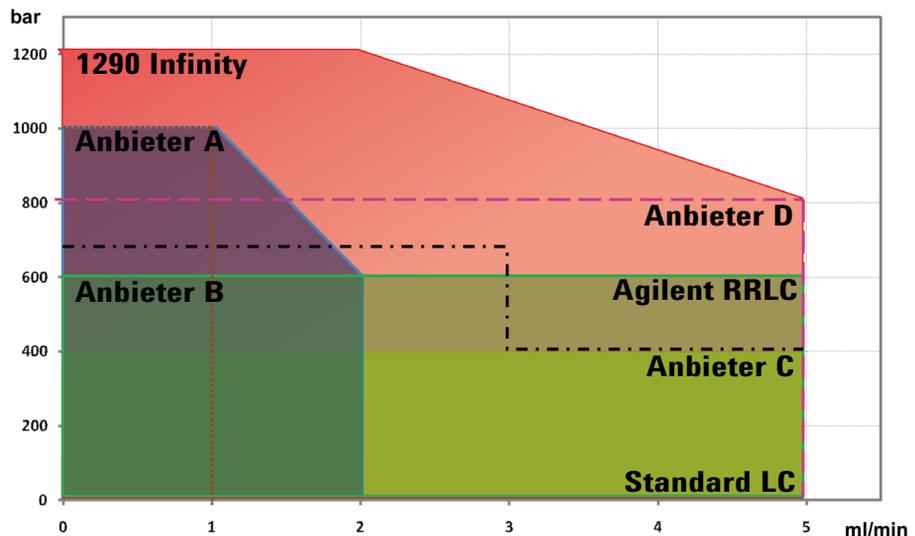


Abbildung 10 Leistungsbereich von UHPLC-Systemen (Betriebsbereich: Druck x Flussrate)

Der Druckbereich bietet die Möglichkeit mit langen Säulen und den modernen Partikeln unter 2 µm zu arbeiten, um eine hohe Auflösung zu erzielen, und mit kurzen Säulen bei erhöhten Flussraten, um eine schnelle Trennung zu erreichen. Der Flussratenbereich erlaubt nicht nur die Anwendung herkömmlicher Methoden, es können darüber hinaus auch oberflächlich poröse (oder membranartige) Packungsmaterialien (zum Beispiel Poroshell) bei hohen Flussraten eingesetzt werden. Diese Arten der Packung stoßen seit Kurzem auf neues Interesse als Alternative zu STM-Materialien, wenn es um hocheffiziente Trennung geht. Dank des umfangreichen Flussratenbereichs kann für eine bestimmte Trennung jeweils die Säule mit dem am besten geeigneten Durchmesser gewählt werden: mit 2 mm Innendurchmesser für Anwendungen mit niedriger Flussrate, wie sie einige MS-Systeme voraussetzen, oder mit bis zu 5 mm Innendurchmesser (üblicherweise 4,6 mm) für eher konventionelle LC oder höhere Belastbarkeit. Der Flussratenbereich steht auch im Einklang mit den neuesten Forschungsergebnissen, die die Vorteile der Anwendung hoher Flussraten zur Erhöhung der Effizienz von Gradiententrennungen aufzeigen. (Siehe *Petersson et al., J.Sep.Sci, 31, 2346-2357, 2008, Maximieren der Peakkapazität und Trennungsgeschwindigkeit bei Flüssigkeitschromatographie*).

Der neue Diodenarray-Detektor bietet einen beispiellosen Grad an Empfindlichkeit, in Kombination mit hervorragenden Basislinieneigenschaften und hohem Bedienkomfort dank des innovativen Zellendesigns.

Der automatische Probengeber basiert auf dem bewährten Agilent Durchflussdesign für die Injektion variabler Volumina mit geringer Verschleppung, aktualisiert für Anwendungen unter höheren Drücken und mit geringeren Volumina. Ein völlig neues Modul, der Flexible Cube, kann dem Probengeber hinzugefügt werden und bietet Injektion mit fester Probenschleife für minimale Verzögerungsvolumina sowie weitere Leistungsverbesserungen wie das Rückspülen des Nadelsitzes.

Systemkomponenten

Agilent 1290 Infinity Binäre Pumpe

Die Agilent 1290 Infinity Binäre Pumpe stützt sich auf technische Neuerungen, mit denen sich die Probleme, die beim Pumpen von LC-Lösungsmitteln unter ultra-hohem Druck und mit hohen Flussraten auftreten, lösen lassen: Schwerlast-Antriebsmotoren an den Kolben; neue Materialien für die Kolben selbst, die nicht nur der Belastung widerstehen sondern aktiv Wärme von den Dichtungen abtransportieren; Wärmeaustauscher mit Mikrofluidiktechnik und der Jet Weaver, eine Mischvorrichtung, ebenfalls auf Mikrofluidiktechnik basiert. Die Pumpe kann Flussraten im Bereich von 0,05 – 5 mL/min erzeugen bei Drücken von bis zu 1200 bar.

Das Agilent 1290 Binäre Pumpenmodul umfasst zwei identische Hochdruckpumpen (1200 bar), einen Lösungsmittelentgaser mit zwei Kanälen plus Lösungsmittelauswahl-Einlassventil mit vier Kanälen, ein automatisches Spülventil und eine Mischvorrichtung für kleine Volumina, den Jet Weaver, in einem einzigen Gehäuse. Der Entgaser erhöht die Flussstabilität, insbesondere bei niedrigen Flussraten, sowie die Empfindlichkeit des Detektors.

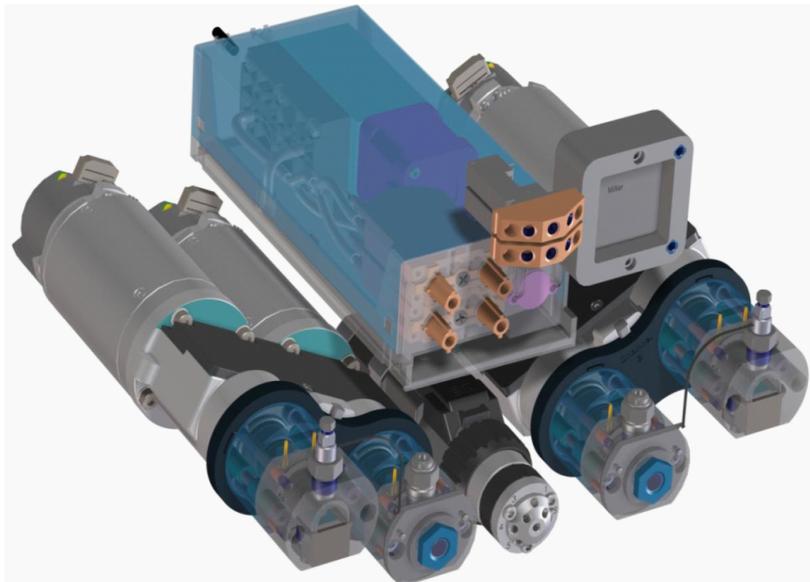


Abbildung 11 Agilent 1290 Infinity Binäre Pumpe

2 Das Agilent 1290 Infinity LC System - Gerätebeschreibung

Systemkomponenten

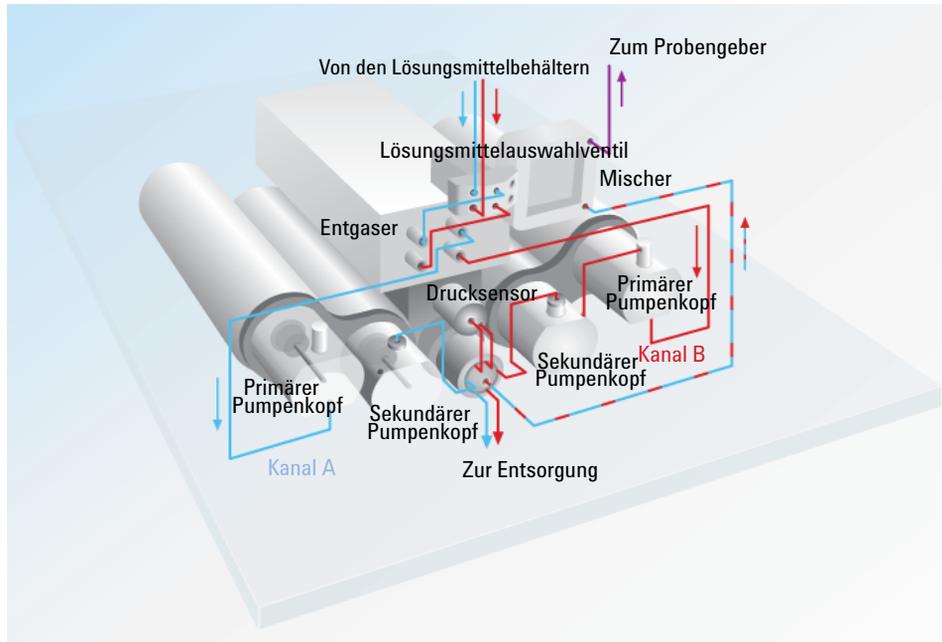


Abbildung 12 Teilebezeichnung und schematische Darstellung der Agilent 1290 Infinity Binären Pumpe

Jeder Pumpenkopf enthält zwei in Serie geschaltete Kolben, die durch eine innovative Firmware gesteuert werden und aus einem neuartigen Kolbenmaterial hergestellt sind, Siliciumcarbid, das wirksam Wärme aus der Pumpe abführt. Die Kapillare, die den primären Kolben mit dem sekundären verbindet, ist mit einem integrierten Wärmetauscher ausgestattet, der die Wärme abführt, die bei hohen Drücken und Flussraten erzeugt wird. Jeder Pumpenkopf verfügt über ein passives Einlassventil und ein passives Auslassventil an der Kammer des primären Kolbens. Jeder Kolben wird unabhängig und präzise von einem Motor mit 65000 Schritten angetrieben, wobei pro Schritt eine Verdrängung von 300 Picolitern erfolgt.

Die Bewegung der Kolben wird über eine Feedback-Schleife intelligent gesteuert, um sicherzustellen, dass diese aktive Dämpfung von Druckschwankungen zu einem gleichmäßigen Fluss führt. Der Kolbenantrieb passt sich automatisch an die Kompressibilitätseigenschaften des Lösungsmittels und die hydraulischen Charakteristika des Systems an, um den gleichmäßigen Fluss aufrecht zu erhalten. Dies, in Kombination mit der fein abgestimmten Bewegungssteuerung, die durch die Kolbenbewegung verursachte Druckschwankungen redu-

ziert, und der effizienten Niedervolumen-Mischvorrichtung, stellt sicher, dass das Pumpenrauschen in UV-Spuren auf ein Minimum beschränkt wird. Ein speziell dafür vorgesehener Mikroprozessor in der Pumpe sorgt für die fein abgestimmte Bewegungssteuerung und die Optimierung der Kolbenbewegung, was eine Echtzeit-Optimierung auf der Grundlage der statischen und dynamischen Parameter ermöglicht. Diese Funktionen führen nicht nur zu hervorragender Leistung bei der Chromatographie, sondern auch zu einem äußerst geräuscharmen Betrieb.

Werden konzentrierte Pufferlösungen als mobile Phase eingesetzt, kann mithilfe der Option aktive Kolbenhinterspülung die Lebensdauer der Pumpendichtungen verlängert werden.

Ein Lösungsmittelauswahlventil erlaubt die Bildung von binären Mischungen (isokratisch oder Gradient) aus je einem von zwei Lösungsmitteln pro Kanal. Binäre Gradienten werden durch Hochdruckmischung der Lösungsmittel aus Pumpe A und Pumpe B am Spülventil gebildet. Mit dem Spülventil kann der Fluss unter Steuerung durch die Software zum Abfallbehälter umgelenkt werden, um den Pumpenkopf mit neuen Lösungsmitteln zu spülen. An das Spülventil ist ein Sensor angeschlossen, mit dem der Systemdruck überwacht wird.

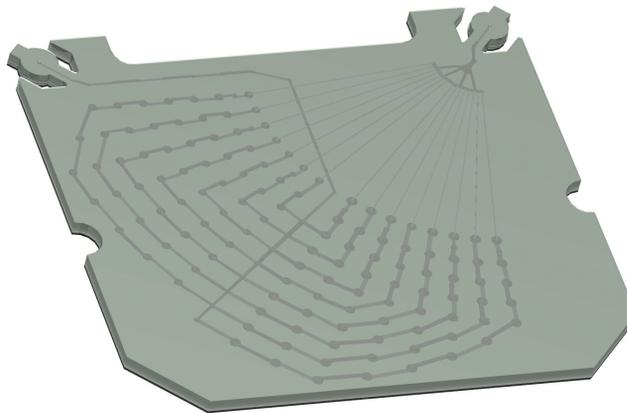


Abbildung 13 Der Jet Weaver-Mischer

Der Flussweg der Pumpe ist im Hinblick auf minimale Verzögerung der Gradienten optimiert und mit einem innovativen Mischsystem ausgerüstet, das auf Mikrofluidtechnik basiert. Die Mischvorrichtung, der sogenannte Jet Weaver, umfasst ein Netzwerk von mehrschichtigen Mikrofluid-Kanälen ($120\ \mu\text{m} \times 120\ \mu\text{m}$), die eine gründliche Mischung gewährleisten. Der Jet Weaver hat zwei Standardvolumina: $35\ \mu\text{l}$ für Anwendungen mit normaler UV-Detektion und $100\ \mu\text{l}$ für höchste Anforderungen wie den Einsatz von TFA bei der UV-Detektion. Für kompromisslos niedriges Basislinienrauschen bei diesen anspruchsvollen Anwendungen steht außerdem ein $380\ \mu\text{L}$ -Jet Weaver zur Verfügung. Bei der MS-Detektion ist es häufig möglich, ohne Jet Weaver zu arbeiten und allein mit dem $10\ \mu\text{l}$ -Basisvolumen des Pumpenflusswegs eine ausreichende Mischung zu erreichen. Zu den typischen Anwendungen gehören Methoden mit hohem Durchsatz und schnellen Gradienten in $2,1\ \text{mm}$ -Säulen mit hoher Auflösung.

Die 1290 Infinity Binäre Pumpe bietet die Möglichkeit, auf der rechten oder der linken Seite der Pumpe zusätzliche Ventilschienen zu montieren. An diesen Ventilschienen können bis zu zwei zusätzliche 12-fache Lösungsmittelauswahlventile angebracht werden. Dies erlaubt die Verwendung von bis zu 26 Lösungsmitteln für binäre Gradienten zur Entwicklung analytischer Methoden. Mit einem speziellen "Cluster-Treiber" können die externen Lösungsmittelauswahlventile in die Benutzeroberfläche integriert werden, was eine anwenderfreundliche und einfache Auswahl der Lösungsmittel anhand ihrer Bezeichnungen erlaubt.

1290 Infinity Quaternäre Pumpe

Im Gegensatz zur binären Pumpe ist die 1290 Infinity Quaternäre Pumpe mit nur einem Pumpenkopf und einem zusätzlichen Mehrkanalgradientenventil (MCGV) ausgestattet, mit dem die Lösungsmittel dem programmierten Gradienten entsprechend dosiert werden können. Bei diesem Niederdruck-Mischverfahren treffen die Lösungsmittel im Inlet Weaver aufeinander und werden bereits vor sowie im Pumpenkopf gemischt.

Der Pumpenkopf ist derselbe wie in der 1290 Infinity Binären Pumpe und weist daher dieselben Leistungsparameter und technischen Daten auf. Er kann außerdem mit einer aktiven Kolbenhinterspülung ausgestattet werden, um bei Verwendung konzentrierter Pufferlösungen die Lebensdauer der Pumpendichtungen zu erhöhen.

Ein Drucksensor überwacht während der Analyse den Druck, bevor die Lösungsmittel in das Mehrzweckventil, ein 4-Kanalumschaltventil, gelangen, was die in den nachstehenden Abbildungen dargestellten Funktionen ermöglicht. Das Mehrzweckventil ist mit einem Inlinefilter versehen, der bei einer Analyse grundsätzlich verwendet wird, mit einem optionalen 380 µL Jet Weaver-Mischer, der die bestmögliche Mischung der Lösungsmittel gewährleistet und leicht installiert werden kann, einer optionalen Restriktionskapillare und einer Verbindung zum Abfallsystem.

2 Das Agilent 1290 Infinity LC System - Gerätebeschreibung

Systemkomponenten

Tabelle 2 Ventulfunktionen

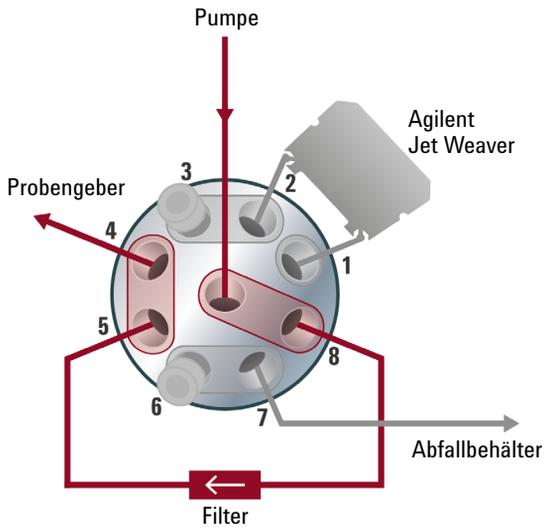


Abbildung 14 Standardanwendung

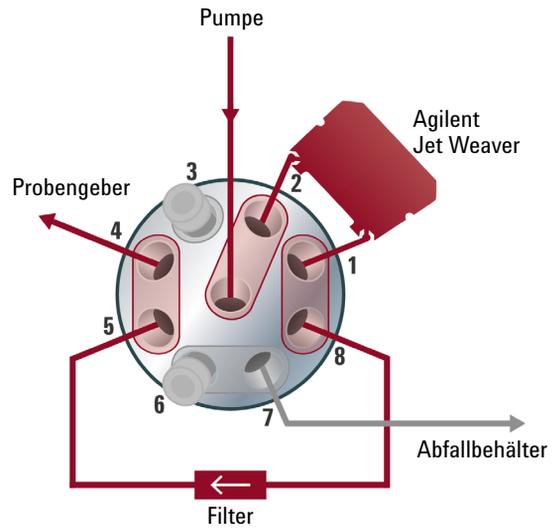


Abbildung 15 Konfiguration mit zusätzlichem Mischvolumen

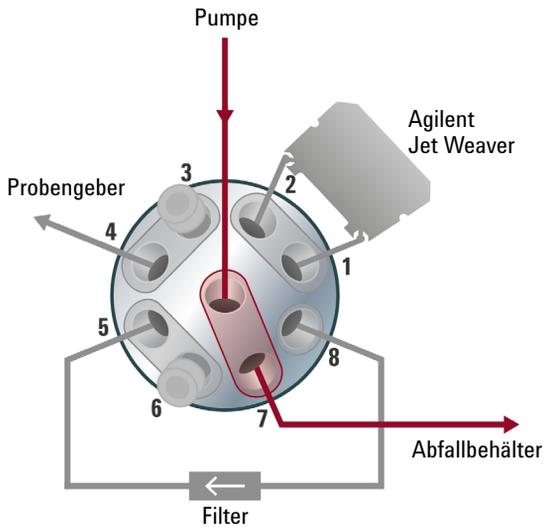


Abbildung 16 Automatische Spülfunktion

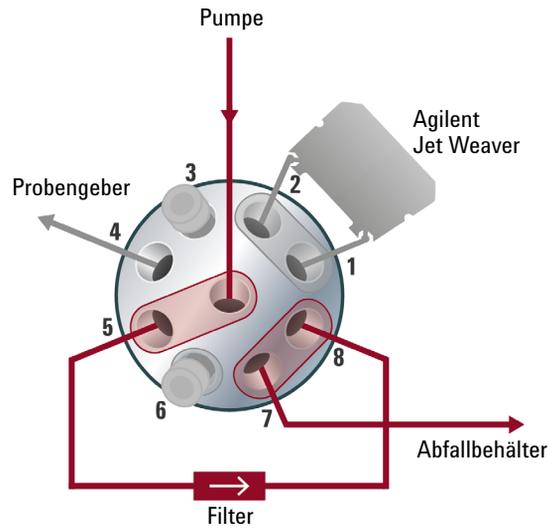


Abbildung 17 Rückspülen des Inlinefilters

Die Standardanwendung (1) wird bei der Mehrzahl der Analysen eingesetzt, während die Konfiguration mit dem zusätzlichen Mischvolumen (2) für alle Arten von Anwendungen benutzt wird, bei denen die Basislinie beeinträchtigt wird. Dabei können die Mischleistung und die davon abhängige UV-Basislinie mithilfe des Agilent Jet Weaver-Mischers deutlich verbessert werden. Eine automatische Spülfunktion (3) ist installiert, ebenso besteht die Möglichkeit, den Inlinefilter rückzuspülen (4). So kann der Filter gereinigt werden, was seine Lebensdauer verlängert.

Agilent 1290 Infinity Automatischer Probengeber

Der Agilent 1290 Infinity Automatische Probengeber basiert auf dem bewährten Agilent Durchflussdesign für die Injektion variabler Volumina, setzt jedoch neue Maßstäbe in puncto Leistung. Neue inerte Materialien in der Dichtung der Dosiereinheit und des Nadelsitzes führen zu einem äußerst geringen Grad an Verschleppung. Das verringerte hydraulische Volumen des Flussweges ist für schnellere Gradienten geeignet, die Möglichkeit, überlappende Injektionen und die "Automatische Reduktion des Verzögerungsvolumens" (ADVR) zu nutzen, tragen zu kürzeren Zykluszeiten und einer noch schnelleren Zuführung des Gradienten zur Säule bei. Das System zieht, bei hoher Reproduzierbarkeit im gesamten Bereich von Sub-Mikrolitervolumina bis zum maximalen Injektionsvolumen (40 µl) und ohne Vergeudung von Probenmaterial, exakt das eingestellte Volumen an Probenlösung auf. Die installierte Standard-Injektionskapillare erlaubt Injektionen bis zu einem Volumen von 20 µl.

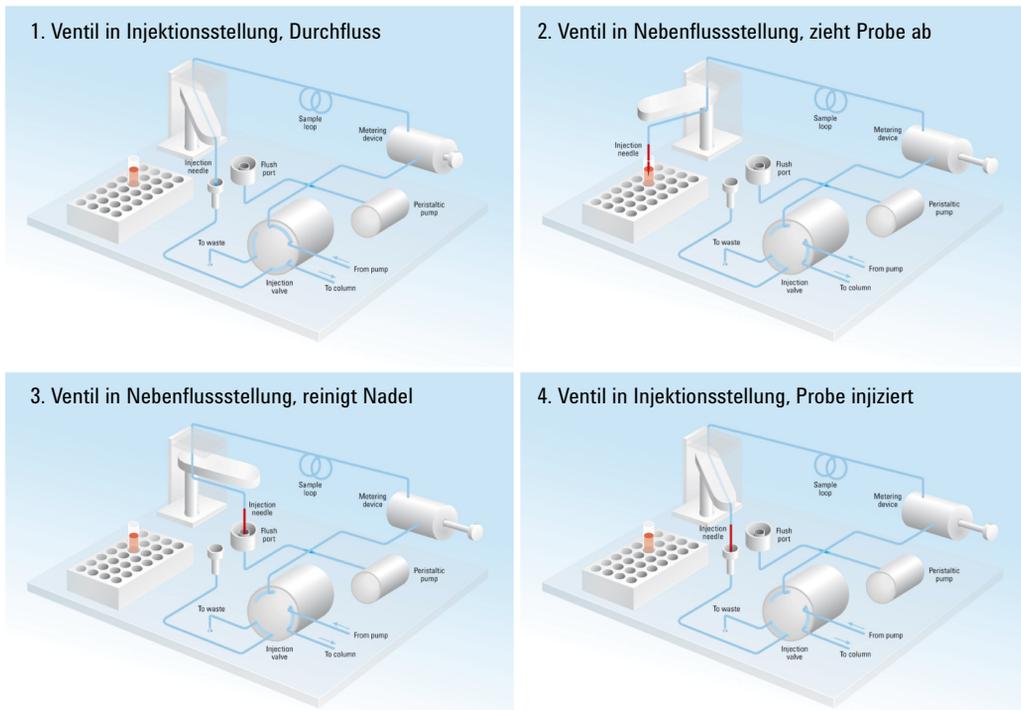


Abbildung 18 Diagramm der Injektionsschritte beim 1290 Infinity Automatischen Probengeber

Ein völlig neues Zusatzmodul, der Flexible Cube, lässt sich nahtlos mit dem Probengeber verbinden und bietet zusätzliche Funktionen. Durch das Hinzufügen des neuen Flexible Cube-Moduls, das eine 500 µl-Spritzenpumpe, ein Niederdruckventil und zwei Hochdruck-Säulenschaltventile umfasst, werden weitere Optionen verfügbar. Zum Beispiel kann das Durchfluss-Injektionssystem durch eine feste Injektionsschleife ersetzt werden, in der die Spritzenpumpe und die Ventile des Flexible Cube zum Füllen der Probenschleife genutzt werden. Der Vorteil dieser Konfiguration liegt darin, dass das Verzögerungsvolumen des Probengebers eliminiert wird, was insbesondere bei Anwendungen mit schnellen Gradienten und hohem Durchsatz interessant ist. Der Nachteil dabei ist, dass auf die Flexibilität, die die Injektion variabler Volumina bietet, verzichtet werden muss, und dass beim Spülen der Schleife ein Teil der Probe verloren geht. Andere Funktionen, wie beispielsweise das automatische Rückspülen des Injektionsnadelsitzes nach der Injektion, sind mit dem Flexible Cube möglich, wodurch die Verschleppung problematischer Verbindungen oder die Verstopfung der Säule durch verunreinigte Proben routinemäßig und zuverlässig vermieden werden kann.

Das Probengestell des Probengebers umfasst 10 feste Positionen für 2 ml-Probeflaschen und zwei entfernbare Teller, die identisch oder verschieden sein können, wobei unter folgenden Möglichkeiten gewählt werden kann:

- Teller für 2 ml-Probeflaschen mit 54 Positionen
- Mikrotiterplatte mit 96 Well-Positionen (verschiedene Höhen konfigurierbar)
- Mikrotiterplatte mit 384 Well-Positionen (verschiedene Höhen konfigurierbar)

Falls erforderlich kann der automatische Probengeber mithilfe des Probengeber-Temperatursteuerungsmoduls von 4 °C bis 40 °C thermostatisiert werden.

Agilent 1290 Infinity Säulenthermostat

Der Agilent 1290 Infinity Säulenthermostat (Thermostatted Column Compartment, TCC) reguliert die Temperatur zwischen 10 °C unter Umgebungstemperatur und bis zu 100 °C bei 2,5 ml/min bzw. 80 °C bei 5 ml/min. Die Spezifikation für die Temperaturstabilität beträgt $\pm 0,05$ °C, die Spezifikation für die Genauigkeit $\pm 0,5$ °C (kalibriert)¹. Dies wird ermöglicht durch eine Kombination aus Wärmeleitung durch Kontakt mit den Ventilatorflügeln des Thermostats, der Temperatur der stehenden Luft in der Säulumgebung und vor allem durch Vorheizen (oder -kühlen) der mobilen Phase, die durch einen Wärmetauscher fließt, bevor sie die Säule erreicht. Im Säulenthermostaten gibt es zwei unterschiedliche Temperaturzonen, die im Fall von langen Säulen (bis zu 300 mm) gekoppelt oder im Fall von kurzen Säulen (100 mm oder kürzer) bei unterschiedlichen Temperaturen betrieben werden können.

Das Modul wird mit einem 1,6 µl-Wärmetauscher für geringe Dispersion geliefert und die verschiedenen Ventilkits enthalten zusätzliche Wärmetauscher für geringe Dispersion für jede Säule. Bis zu 4 Wärmetauscher für geringe Dispersion können flexibel im Innern des Säulenthermostaten montiert werden. Für den konventionellen HPLC-Betrieb sind außerdem integrierte 3 µl- und 6 µl-Wärmetauscher verfügbar.

Alle Säulenthermostaten können einen internen Ventiltrieb aufnehmen, der Umschaltanwendungen vom einfachen Umschalten zwischen zwei Säulen bis zur automatischen Regeneration von Säulen, Probenvorbereitung oder Säulerrückspülung ermöglicht. Alle Ventilköpfe werden als komplettes Kit mit allen erforderlichen Kapillaren, zusätzlichen Wärmetauschern für geringe Dispersion und sonstigen Zubehörteilen geliefert.

Die Säulenschaltventile sind beim Herstellen von Verbindungen zum Ventil außergewöhnlich flexibel und bedienungsfreundlich: Auf Druck schiebt sich die Antriebseinheit des Schnellwechselventils nach vorne und erlaubt so einen einfachen Zugang (siehe [Abbildung 19](#) auf Seite 35 links). Alternative Ventilköpfe für unterschiedliche Anwendungen können vom Anwender am Antriebsmechanismus ausgetauscht werden (siehe [Abbildung 19](#) auf Seite 35 rechts). Beachten Sie das RFID-Tag am Ventilkopf.

¹ Alle Spezifikationen gelten für destilliertes Wasser bei einer Umgebungstemperatur von 25 °C, einem Sollwert von 40 °C und einen Flussbereich von 0,2 bis 5 ml/min.

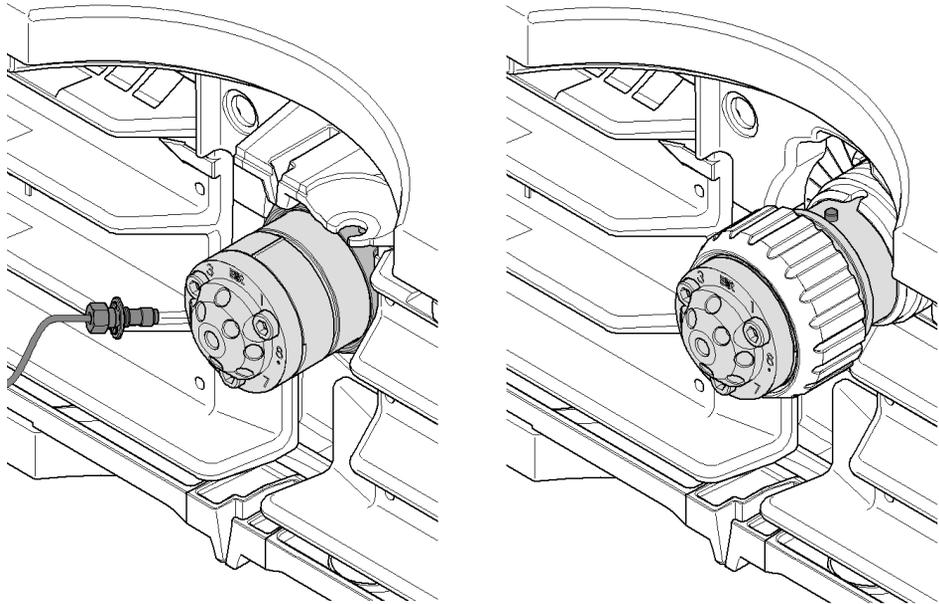


Abbildung 19 Schnellwechselventil im Säulenthmostaten

Bis zu drei Säulenthmostaten können "geclustert" werden, was erweiterte Anwendungen wie das Umschalten zwischen acht Säulen bei der automatisierten Methodenentwicklung oder das Anschließen von zusätzlichen Säulen für unterschiedliche Anwendungen ermöglicht. So wird die zu verwendende Säule einfach zu einem Methodenparameter. Dies erfordert zwei 8-Positionen-/9-Anschlüsse-Ventilköpfe, jeweils einen in zwei Säulenthmostaten. Geclusterte Säulenthmostaten werden zur leichteren Bedienung von der Software als eine Einheit mit einer Schnittstelle behandelt.

Weitere Verbesserungen im Vergleich zu früheren Konstruktionen betreffen die thermische Isolierung, die Kapillarführungen und ein "Tür-offen"-Sensor, so dass in Methoden festgelegt werden kann, dass die Tür geschlossen werden muss, was insbesondere bei Hochtemperaturmethoden nützlich ist.

Agilent 1290 Infinity Diodenarray-Detektor

Der 1290 Infinity Diodenarray-Detektor basiert auf einem neuen optischen Design und enthält eine Kartuschenzelle mit Optofluid-Wellenleitern, die hohe Empfindlichkeit bei geringer Dispersion, einen breiten linearen Bereich und eine stabile Basislinie für ultraschnelle LC-Anwendungen bietet. Die Agilent Max-Light-Kartuschenzelle erhöht die Lichttransmission drastisch. Dazu nutzt sie das Prinzip der inneren Totalreflexion entlang einer nicht beschichteten Kieselgelkapillare, was zu einem völlig neuen Grad an Empfindlichkeit führt, ohne dass wegen Dispersionseffekten aufgrund des Zellenvolumens auf Auflösung verzichtet werden muss. Durch dieses Design werden Störungen der Basislinie, die durch Brechung oder thermische Effekte verursacht werden, auf ein Minimum begrenzt, was zu einer verlässlicheren Integration der Peakflächen führt.

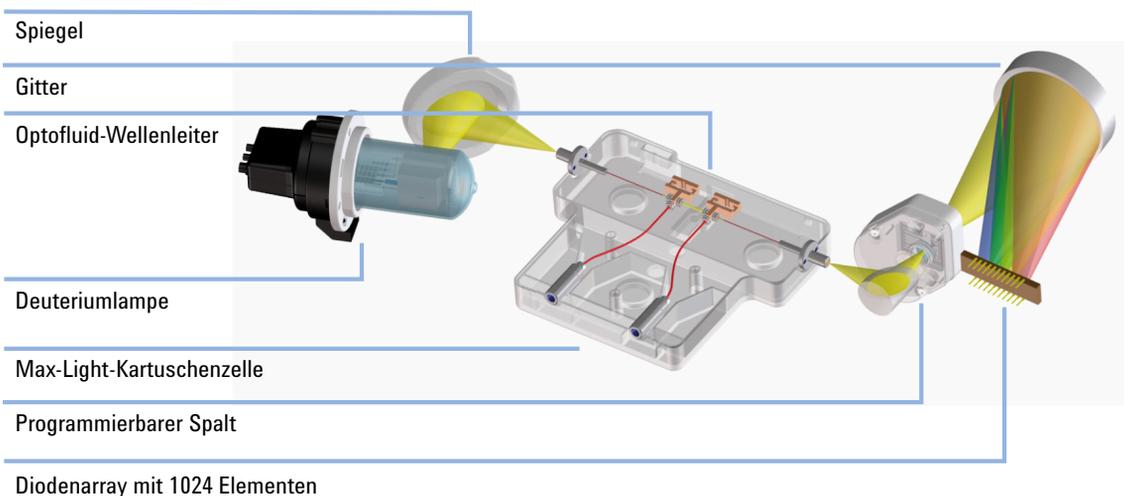


Abbildung 20 Der Lichtweg im Agilent 1290 Infinity Diodenarray-Detektor

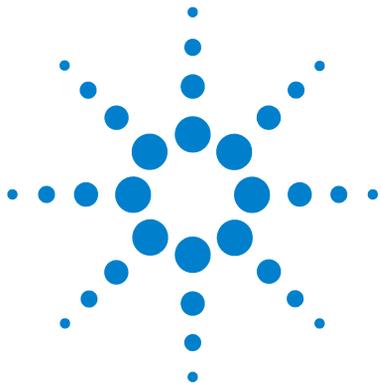
Das Modul umfasst außerdem eine elektronischen Temperatursteuerung, die Effekte durch die Umgebungstemperatur weiter reduziert. Obwohl das hydraulische Volumen der Max-Light-Kartuschenzelle sehr klein ist, hat sie die Standard-Streckenlänge von 10 mm. Als Alternative mit noch höherer Empfindlichkeit ist die Agilent Max-Light-Hochempfindlichkeitszelle mit einer Streckenlänge von 60 mm verfügbar. Die Zellen können bequem ausgetauscht werden, da sie sich leicht in den Zellenhalter hinein oder aus ihm heraus schieben lassen und an der optischen Bank automatisch ausgerichtet werden. Die Lichtquelle des DAD ist eine Deuteriumlampe mit einem Betriebswellenlängenbereich von 190 bis 640 nm. Das Licht wird von einem Diodenarray-Detektor mit 1024 Dioden detektiert. Den Eingang in den Spektrographen bildet ein programmierbarer optischer Spalt, der eine spektrale Auflösung von 1 bis 8 nm liefert. Meist wird der mittlere Bereich genutzt, zur Optimierung kann der Spalt zum Erzielen einer hohen spektralen Auflösung jedoch bis auf 1 nm geschlossen (selten erforderlich bei Flüssigphasen-UV-Spektren) oder, um maximale Transmission und minimales Signalrauschen zu erreichen, bis auf 8 nm geöffnet werden.

Die chromatographischen Signale werden aus den Diodenarray-Daten in der Firmware des Moduls extrahiert. Bis zu 8 einzelne Signale können definiert werden, jedes mit einer Signalwellenlänge, einer Diode-Bunching-Bandbreite und gegebenenfalls einer Referenzwellenlänge und -bandbreite. Signale können mit bis zu 160 Hz (160 Datenpunkte/Sekunde) ausgegeben werden, was die genaue Aufzeichnung auch der schnellsten (schmalsten) chromatographischen Peaks gewährleistet. Gleichzeitig kann das Modul mit derselben Geschwindigkeit von 160 Hz auch vollständige Spektren an das Datensystem ausgeben.

In regulierten Laboren ist es wichtig, dass alle Methodenparameter aufgezeichnet werden. Mit dem 1290 DAD können nicht nur die Gerätesollwerte aufgezeichnet werden, es sind darüber hinaus RFID-Tags (radio-frequency identification tags) in die Lampe und die Flusszellenkartusche integriert, so dass die Identität und die Variablen dieser wichtigen Komponenten ebenfalls vom System aufgezeichnet werden können.

2 Das Agilent 1290 Infinity LC System - Gerätebeschreibung

Systemkomponenten



3 Optimieren des Agilent 1290 Infinity LC Systems

Verzögerungsvolumen und Extrasäulenvolumen	40
Verzögerungsvolumen	40
Extrasäulenvolumen	41
Konfiguration des optimalen Verzögerungsvolumens	42
Erzielen höherer Injektionsvolumina	51
Erzielen eines höheren Durchsatzes	53
Erzielen einer höheren Auflösung	56
Erzielen einer höheren Empfindlichkeit	59
Erzielen der geringstmöglichen Verschleppung	68
Verstopfung von Säulen vermeiden	71

In diesem Kapitel wird beschrieben, wie die Theorie anzuwenden ist und wie die Funktionen des LC-Systems zur Entwicklung optimierter Trennmethode genutzt werden können.



Verzögerungsvolumen und Extrasäulenvolumen

Das *Totvolumen*, oder Verzögerungsvolumen, ist definiert als das Systemvolumen zwischen dem Mischpunkt in der Pumpe und dem Säulenkopf.

Das *Extrasäulenvolumen* ist definiert als das Volumen zwischen dem Injektiionspunkt und dem Nachweispunkt, abzüglich des Volumens in der Säule.

Verzögerungsvolumen

Bei Gradiententrennungen verursacht dieses Volumen eine Verzögerung zwischen der Änderung der Mischung in der Pumpe und dem Zeitpunkt, zu dem diese Änderung die Säule erreicht. Die Verzögerung hängt von der Durchflussrate und dem Totvolumen des Systems ab. Dies bedeutet, dass sich in jedem HPLC-System zu Beginn jedes Analysenlaufs ein zusätzliches isokratisches Segment im Gradientenprofil befindet. In der Regel wird das Gradientenprofil in Form der Mischungseinstellungen an der Pumpe angegeben und das Totvolumen wird nicht spezifiziert, obwohl sich dies auf die Chromatographie auswirkt. Diese Auswirkungen machen sich bei niedrigen Flussraten und kleinen Säulenvolumina stärker bemerkbar und können die Übertragbarkeit von Gradientenmethoden stark beeinflussen. Es ist daher wichtig, bei schnellen Gradiententrennungen kleine Totvolumina zu haben, insbesondere bei Narrow-Bore-Säulen (z. B. mit einem ID von 2,1 mm), die häufig in der Massenspektrometrie verwendet werden.

Das Totvolumen in einem System umfasst das Volumen in der Pumpe ab dem Zeitpunkt des Mischens, die Verbindungen zwischen Pumpe und automatischem Probengeber, das Volumen im Flussweg durch den Probengeber und die Verbindungen zwischen Probengeber und Säule.

Beispiel: Bei HPLC-Methoden mit 5 µm Packungsmaterial werden in der Regel Durchflussraten von 1 ml/min in Säulen mit einem ID von 4,6 mm und etwa 0,2 ml/min in Säulen mit einem ID von 2,1 mm (dieselbe lineare Geschwindigkeit in der Säule) verwendet. Bei einem System mit einem typischen Totvolumen von 1000 µl und einer 2,1 mm-Säule gäbe es ein anfängliches „verborgenes“ isokratisches Segment von 5 min, während die Verzögerung bei einem System mit 600 µl Totvolumen 3 min betragen würde. Diese Totvolu-

mina wären für eine Analysendauer von ein oder zwei Minuten zu hoch. Bei Packungen unter zwei μm ist die optimale Durchflussrate (gemäß der Van Deemter-Kurve) etwas höher, sodass bei der schnellen Chromatographie das Drei- bis Fünffache dieser Durchflussraten verwendet werden kann und damit Verzögerungszeiten von etwa einer Minute erzielt werden. Das Totvolumen muss jedoch noch weiter reduziert werden, um Verzögerungszeiten zu erzielen, die nur einen Bruchteil der geplanten Analysendauer ausmachen. Dies wird beim Agilent 1290 Infinity LC-System aufgrund des niedrigen Totvolumens des Pumpenflusswegs, dem geringen Volumen des Jet Weaver-Mischers und dem geringen Volumen des Flusswegs durch den automatischen Probengeber erzielt.

Extrasäulenvolumen

Das Extrasäulenvolumen ist eine Quelle für Peakdispersion, die zu einer Verringerung der Auflösung bei der Trennung führt. Es sollte daher minimiert werden. Säulen mit kleinerem Durchmesser erfordern ein proportional kleineres Extrasäulenvolumen, um die Peakdispersion auf ein Minimum zu reduzieren.

In einem Flüssigchromatographen hängt das Extrasäulenvolumen von den Verbindungsschläuchen zwischen automatischem Probengeber, Säule und Detektor sowie vom Volumen der Durchflusszelle im Detektor ab. Das Extrasäulenvolumen wird beim Agilent 1290 Infinity LC-System durch die Narrow-Bore-Leitung (ID 0,12 mm), die Niedervolumen-Wärmetauscher im Säulentermostat und die Max-Light-Kartuschenzelle im Detektor minimiert.

Konfiguration des optimalen Verzögerungsvolumens

In [Tabelle 3](#) auf Seite 42 und [Tabelle 4](#) auf Seite 43 sind die Komponentenvolumina dargestellt, die zum System-Verzögerungsvolumen im Agilent 1290 Infinity LC System beitragen. In der Standardkonfiguration mit der Agilent 1290 Infinity Binären Pumpe, dem Jet Weaver-Mischer, dem 1290 Infinity Automatischen Probengeber und dem Säulentermostat beträgt das Verzögerungsvolumen des Systems etwa 125 µl. Dieses Standard-Verzögerungsvolumen ist für die meisten Applikationen angemessen. Beispielsweise führt eine schnelle Trennung in einer 50 mm x 2,1 mm-Säule mit Partikeln unter 2 µm bei einer moderaten Flussrate von 0,6 ml/min zu einer typischen Gradienten-Verzögerungszeit von etwa 0,2 min. Dies ist bei Gradientenzeiten von zwei bis drei Minuten in der Regel akzeptabel (siehe [Tabelle 6](#) auf Seite 43). Es ist häufig hilfreich, die Flussrate in Bezug auf die Säulenvolumina zu berücksichtigen. Wie aus [Tabelle 7](#) auf Seite 44 ersichtlich wird, fließen bei dieser Säule bei einer Rate von 0,6 ml/min etwa 6 Säulenvolumina pro Minute durch das System und das Verzögerungsvolumen beträgt das 1,2-fache des Säulenvolumens.

Bei einer Konfiguration mit der Agilent Infinity 1290 Quaternären Pumpe, dem Agilent 1290 Automatischen Probengeber und dem Säulentermostat beträgt das Verzögerungsvolumen 430 µL, woraus sich eine Verzögerungszeit von 0,7 min ergibt. Dies ist bei Gradientenzeiten von 3 min die Grenze des Akzeptablen.

Tabelle 3 Verzögerungsvolumina der 1290 Infinity LC Module

Komponenten	Verzögerungsvolumen (µl)
Binäre Pumpe	10
Jet Weaver-Mischer (Standard)	35
Binäre Pumpe + Jet Weaver	45
Quaternäre Pumpe	350
Quaternäre Pumpe + V380 Jet Weaver	500
Automatischer Probengeber (feste Schleife mit 5 µl)	5
Automatischer Probengeber (Standard, variables Volumen)	80
Säulentermostat mit Wärmetauscher für geringe Dispersion	1,6
Verbindungsschlauch, 0,12 mm Innendurchmesser, pro 100 mm	1,1

Tabelle 4 Verzögerungsvolumina der Konfigurationen des 1290 Infinity Binären LC-Systems

Systemkonfigurationen ¹	Verzögerungsvolumen (µl)
Binäre Pumpe + Probengeber mit fester Schleife (nur MS)	20
Binäre Pumpe + Jet Weaver + feste Schleife	55
Binäre Pumpe + Standard-Probengeber (nur MS)	90
Binäre Pumpe + Jet Weaver + Probengeber	125

¹ 5 µl hinzugefügt, um Verbindungen in Systemkonfigurationen zu ermöglichen

Tabelle 5 Verzögerungsvolumina der Konfigurationen des 1290 Infinity Quaternären LC-Systems

Systemkonfigurationen ¹	Verzögerungsvolumen (µl)
Quaternäre Pumpe + Probengeber mit fester Schleife (nur MS)	360
Quaternäre Pumpe + Standard-Probengeber (nur MS)	430
Quaternäre Pumpe + V380 Jet Weaver + feste Schleife	510
Quaternäre Pumpe + V380 Jet Weaver + Probengeber	580

¹ 5 µl hinzugefügt, um Verbindungen in Systemkonfigurationen zu ermöglichen

Tabelle 6 System-Verzögerungszeiten, mit denen der Gradient den Säulenkopf erreicht

Durchflussrate (ml/min)	System-Verzögerungsvolumen (Mikroliter)							
	20	55	90	125	360	395	430	465
	Verzögerungszeiten (Minuten)							
0,2	0,10	0,28	0,43	0,60	1,80	2,15	2,55	2,90
0,4	0,05	0,14	0,21	0,30	0,90	1,08	1,28	1,45
0,6	0,03	0,09	0,14	0,20	0,60	0,72	0,85	0,97

3 Optimieren des Agilent 1290 Infinity LC Systems Konfiguration des optimalen Verzögerungsvolumens

Tabelle 6 System-Verzögerungszeiten, mit denen der Gradient den Säulenkopf erreicht

Durchflussrate (ml/min)	System-Verzögerungsvolumen (Mikroliter)							
	0,03	0,07	0,11	0,15	0,45	0,54	0,64	0,73
0,8	0,03	0,07	0,11	0,15	0,45	0,54	0,64	0,73
1,0	0,02	0,06	0,09	0,12	0,36	0,43	0,51	0,58
1,5	0,01	0,04	0,06	0,08	0,24	0,29	0,34	0,39
2,0	0,01	0,03	0,04	0,06	0,18	0,22	0,26	0,29
3,0	0,01	0,02	0,03	0,04	0,12	0,14	0,17	0,19
4,0	0,01	0,01	0,02	0,03	0,09	0,11	0,13	0,15
5,0	0,00	0,01	0,02	0,02	0,07	0,09	0,10	0,12

Tabelle 7 Ungefähres Flüssigkeitsvolumen bei typischen Säulenlängen und einer angenommenen Porosität von 0,6

Säulendurchmesser (mm)	Säulenlänge (mm)				
	30	50	100	150	250
	Säulenvolumen – flüssige Phase (Mikroliter)				
2.1	62	104	208	312	520
3.0	127	212	424	636	1060
4.0	226	377	754	1131	1885
4.6	299	499	997	1496	2493

Bei sehr schnellen Gradienten, die innerhalb von 0,5 min beendet sind und nur mit dem Agilent 1290 Infinity Binären LC System ausgeführt werden können, kann das Verzögerungsvolumen des Systems problemlos reduziert werden, ohne die physische Konfiguration des Systems verändern zu müssen. Diese Änderung wird durch das Ändern des Probengeberverhaltens erreicht.

Das Verzögerungsvolumen von 80 µl des Agilent 1290 Infinity Automatischen Probengebers ist bedingt durch den Flussweg vom Injektionsventil durch

Dosiereinheit, Nadel, Nadelsitz und Verbindungskapillaren zurück zum Injektionsventil (siehe [Abbildung 18](#) auf Seite 32). Für eine Injektion schaltet das Ventil von der Injektionsstellung in die Nebenflussstellung, sodass die Dosiereinheit die Probe in die Nadelkapillare ziehen kann. Die Injektion erfolgt, wenn das Ventil zurück in die Injektionsstellung wechselt und die Probe in die Säule gespült wird. Das Ventil verbleibt während der Analyse in dieser Position, sodass der Probengeber kontinuierlich gespült wird. Daher muss der Gradient durch dieses Verzögerungsvolumen fließen, um die Säule zu erreichen. Dies kann verhindert werden, indem das Injektionsventil von der Injektionsstellung in die Nebenflussstellung geschaltet wird, nachdem die Injektion erfolgt ist und die injizierte Probe in die Säule gespült wurde. In der Praxis kann dies einige Sekunden nach der Injektion erfolgen. Diese Option wird durch Auswahl der Funktion "Automatische Reduktion des Verzögerungsvolumens" (ADVR) im Setup-Menü des Probengebers aktiviert. Der Ausspülfaktor (üblicherweise das 5-fache Injektionsvolumen) stellt sicher, dass genügend Zeit zum Spülen der Probe aus dem Injektor bleibt, bevor das Ventil in die Nebenflussstellung schaltet. Damit wird das Verzögerungsvolumen des Systems wirksam von 125 µl auf 50 µl reduziert.

Bei Verwendung der ADVR-Funktion sollte beachtet werden, dass der Gradient an der Pumpe bereits zum Zeitpunkt der Injektion gestartet wurde. Es sollte geprüft werden, ob der Gradient den Probengeber schon erreicht hat. In diesem Fall kommt es zu einer kleinen Stufe im Gradienten. Dies passiert, wenn das Verzögerungsvolumen kleiner als das Ausspülvolumen ist. Dies stellt nicht zwangsläufig ein Problem dar, sollte bei einem Methodentransfer aber berücksichtigt werden. Bei einem Ausspülfaktor von 5 und einem Injektionsvolumen von 10 µl lässt der Probengeber 50 µl durchfließen, bevor das Ventil in die Nebenflussstellung wechselt. Dies bedeutet bei einem Verzögerungsvolumen von 50 µl, dass der Gradient gerade das Injektionsventil erreicht hat. Bei kleineren Injektionsvolumina hat dies keine Auswirkungen, bei größeren Volumina führt dies jedoch zu einer kleinen Stufe im Gradienten. Die verwendete Flussrate hat ebenfalls Auswirkungen auf die Entscheidung, ob ADVR verwendet werden soll oder nicht. Bei 0,2 ml/min beträgt die gesparte Verzögerungszeit 21 Sekunden, bei 1,0 ml/min beträgt sie 4 Sekunden.

Die ADVR-Funktion ist vermutlich nicht für Applikationen mit Substanzen geeignet, die für Verschleppungsprobleme bekannt sind.

Zur Minimierung der Peakdispersion und des Verzögerungsvolumens im Säulenthmostat muss der Wärmetauscher für geringe Dispersion installiert werden. Der Wärmetauscher für geringe Dispersion ist in den Kapillarenkits für Applikationen geringer Dispersion enthalten. Das allgemeine Kapillarenkit

3 Optimieren des Agilent 1290 Infinity LC Systems Konfiguration des optimalen Verzögerungsvolumens

enthält darüber hinaus Narrow-Bore-Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 0,12 mm. Die integrierten 3 µl- und 6 µl-Wärmetauscher sind für Rückwärtskompatibilität vorgesehen und sollten nur verwendet werden, wenn eine herkömmliche Methode auf dem System durchgeführt werden muss, obwohl in diesem Fall auch der Wärmetauscher für geringe Dispersion verwendet werden kann.

Um die Auflösung im Diodenarray-Detektor Agilent 1290 Infinity aufrechtzuerhalten, hat die Max-Light-Kartuschenzelle ein Volumen geringer Dispersion (σ -Volumen 1,0 µl), so dass keine weitere Volumenoptimierung erforderlich ist. In Situationen, in denen die alternative Agilent Max-Light-Hochempfindlichkeitszelle verwendet wird, um eine höhere Empfindlichkeit zu erzielen, wird das Zellenvolumen für die Verwendung von Säulen mit Innendurchmessern von 3 mm und 4,6 mm optimiert.

Für den Pumpenbetrieb wird empfohlen, das richtige Lösungsmittel im Bildschirm zur Pumpeneinrichtung einzustellen. Obwohl die intelligente Steuerung die Druckschwankungen automatisch auf ein Minimum reduziert, kann die Lösungsmittelkompressibilität Auswirkungen auf die Aufrechterhaltung der absolut korrekten Flussrate bei hohem Druck haben. Dies stellt sicher, dass immer die korrekten Kompressibilitätswerte für die verwendeten mobilen Phasen angewendet werden. Für die Agilent 1290 Infinity Binäre und Quaternäre Pumpe sind Kalibrierungsfunktionen verfügbar.

Das physische Verzögerungsvolumen der 1290 Infinity Binären Pumpe hängt in erster Linie von der Verwendung des Jet Weaver-Mischers ab. Bei UV-Detektion sollte immer der Jet Weaver verwendet werden, bei der Massenspektrometrie kann der Anwender den Jet Weaver jedoch umgehen, womit er 35 µl vom Verzögerungsvolumen entfernt. Dies ist nur im ultraschnellen Gradientenbetrieb (weniger als 0,5 min) oder bei Verwendung von Säulen mit sehr geringen Volumina sinnvoll. Unter [Tabelle 6](#) auf Seite 43 finden Sie Informationen zu den Auswirkungen auf die Verzögerungszeit im System. Bei Umgehen des Jet Weavers wird der Verbindungsschlauch direkt vom Spülventil zum automatischen Probengeber geführt. Stellen Sie sicher, dass der Jet Weaver mit einem Lösungsmittel gespült wurde, das keine Pufferlösung oder andere Zusätze enthält, bevor Sie ihn vom System trennen.

Gelegentlich kann es sinnvoll sein, das Verzögerungsvolumen in der Pumpe zu erhöhen. Dies ist insbesondere der Fall, wenn UV-Detektion verwendet wird und eine Substanz zur mobilen Phase hinzugefügt wurde, die stark UV-Licht absorbiert. Dabei kann es zu einer Verstärkung des Pumpenrauschens kommen. Das häufigste Beispiel hierfür ist die Verwendung von Trifluoressigsäure (TFA) bei der Analyse von Proteinen und Peptiden. Der Effekt kann durch

Erhöhen des Mischervolumens abgeschwächt werden. Der Jet Weaver-Mischer bietet zwei alternative Volumina in derselben Einheit. Sie wechseln vom geringeren Volumen (35 µl) zum höheren Volumen (100 µl), indem Sie den Mischer herausnehmen, einmal umdrehen (von vorne nach hinten) und dann wieder einsetzen. Das Mischvolumen (und somit das Verzögerungsvolumen) wird um 65 µl erhöht und die Basislinienleistung bei Verwendung von Zusätzen wie TFA wird verbessert. Die Konfiguration des Jet Weaver-Mischers wird automatisch von einem RFID-Tag protokolliert. Für anspruchsvolle Anwendungen mit geringstmöglichem UV-Basislinienrauschen ist ein Jet Weaver-Mischer mit 380 µL Volumen lieferbar, der analog zum Jet Weaver-Standardmischer installiert wird.

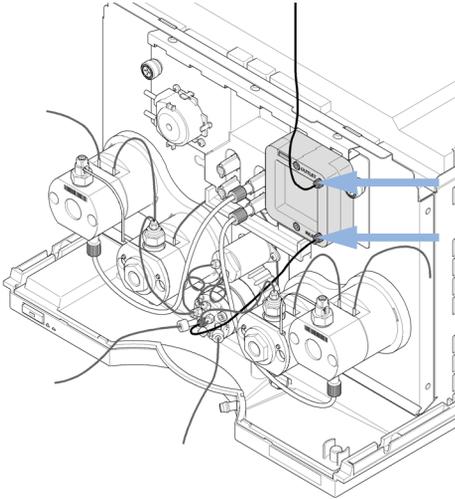
Die Vorgehensweise beim Ersetzen eines Jet Weavers in der 1290 Infinity Binären Pumpe ist in [“Ersetzen des Jet Weaver in der 1290 Infinity Binären Pumpe”](#) auf Seite 48 dargestellt.

Wegen des unterschiedlichen Einrichtungs- und Mischprinzips bei der Agilent Infinity 1290 Quaternären Pumpe ist das physische Verzögerungsvolumen wesentlich größer, so dass bei Standardanwendungen kein zusätzlicher Jet Weaver-Mischer erforderlich ist. Es ist jedoch trotzdem möglich, für Anwendungen, die die Basislinie beeinträchtigen könnten, beispielsweise bei Einsatz von TFA, einen optionalen 380 µL Jet Weaver-Mischer zu installieren. Der optionale Jet Weaver-Mischer hat ein anderes Gehäuse, das an das Design der 1290 Infinity Quaternären Pumpe angepasst ist.

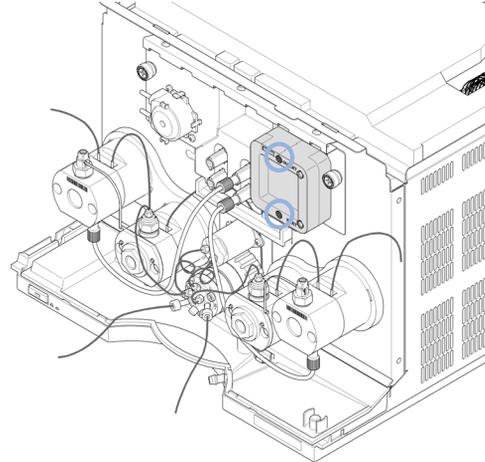
Die Vorgehensweise beim Ersetzen eines Jet Weavers in der 1290 Infinity Quaternären Pumpe ist in [“Installieren des V380 Jet Weaver in der 1290 Infinity Quaternären Pumpe”](#) auf Seite 49 dargestellt.

Ersetzen des Jet Weaver in der 1290 Infinity Binären Pumpe

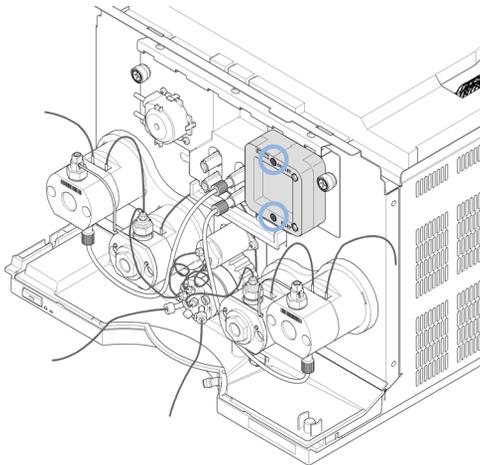
1 Entfernen Sie die Kapillarverbindungen vom Jet Weaver.



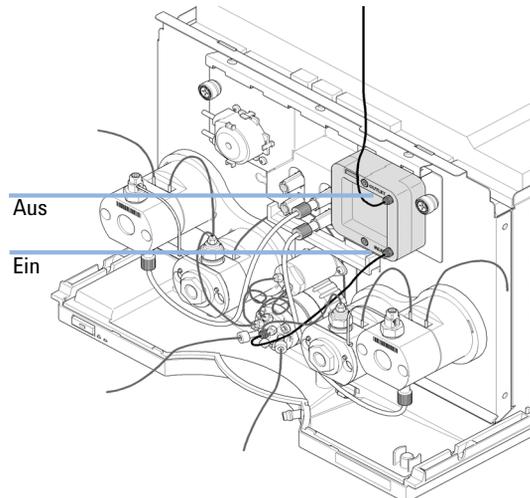
2 Lösen Sie die Sechskantschrauben, mit denen der Jet Weaver am Pumpengehäuse befestigt ist.



3 Installieren Sie den neuen Jet Weaver.



4 Befestigen Sie die Kapillarverbindungen wieder.

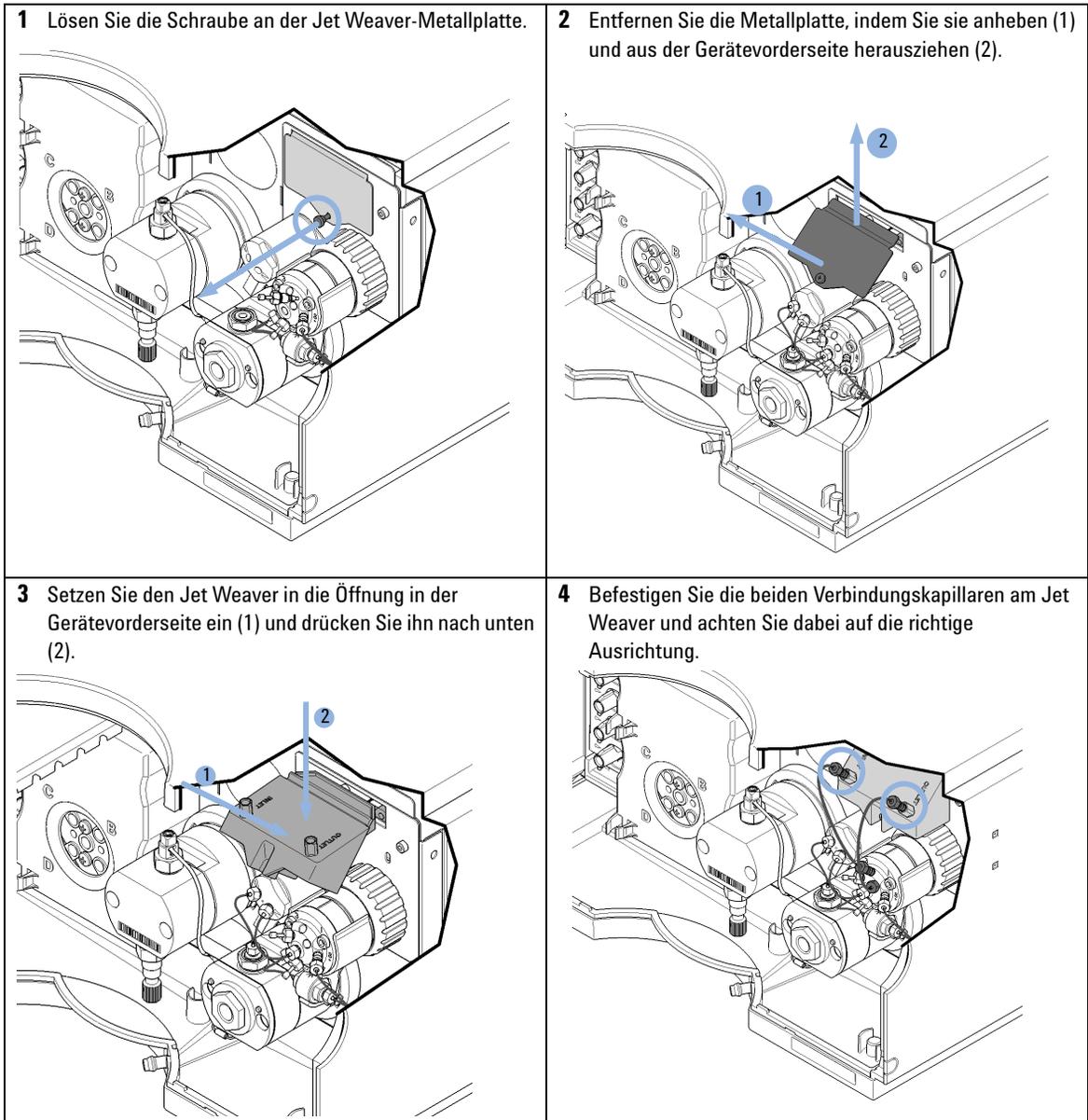


HINWEIS

Der Jet Weaver hat eine Vorder- und eine Rückseite mit unterschiedlichen internen Volumina (35 und 100 μ l), die im Hinblick auf ein geringes Verzögerungsvolumen bzw. beste Mischleistung optimiert sind.

Der Einlass an der Unterseite des Jet Weaver wird durch eine Kapillare (Länge 300 mm, 0,17 mm Innendurchmesser) mit dem Mittelanschluss des Pumpenventils verbunden. Der Auslass an der Oberseite wird mit dem Probengeber verbunden.

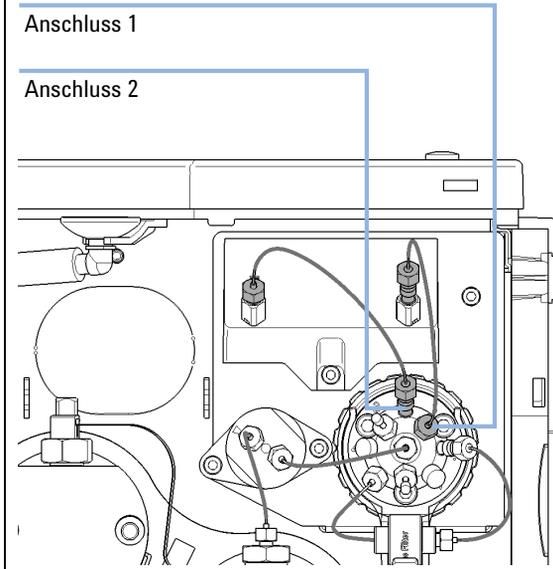
Installieren des V380 Jet Weaver in der 1290 Infinity Quaternären Pumpe



3 Optimieren des Agilent 1290 Infinity LC Systems

Konfiguration des optimalen Verzögerungsvolumens

- 5 Verbinden Sie die Einlasskapillare aus dem Jet Weaver mit Anschluss 2 des Mehrzweckventils. Verbinden Sie die Auslasskapillare mit Anschluss 1.



Erzielen höherer Injektionsvolumina

Die Standardkonfiguration des Agilent 1290 Infinity Probengebers umfasst eine Probenschleife mit variablem Volumen für bis zu 20 µl Injektionen. Die Dosiereinheit kann ein maximales Volumen von 40 µl injizieren und die Proben-Schleifenkartusche kann ausgetauscht werden, um dies zu ermöglichen (weitere Hinweise finden Sie im *1290 Infinity Probengeber-Handbuch*). Das Systemtotvolumen aufgrund des Probengebers wird entsprechend erhöht.

Wenn eine Methode von einer größeren Säule auf eine kleinere Säule herabgesetzt wird, ist es wichtig, dass die Methodenübersetzung Toleranzen für die Reduktion des Injektionsvolumens der Säule vorsieht, damit das Leistungs-niveau der Methode erhalten bleibt. Dadurch soll das Volumen der Injektion auf demselben Prozentsatz des Volumens in Bezug auf die Säule gehalten werden. Dies ist besonders dann wichtig, wenn das Injektionslösungsmittel stärker (mit höherer Elutropie) als die startende mobile Phase ist und jede Erhöhung Auswirkungen auf die Trennung haben würde, insbesondere für frühe Peaks (niedrigerer Retentionsfaktor). In einigen Fällen ist dies die Ursache der Peakverzerrung und als allgemeine Regel sollte gelten, dass das Injektionslösungsmittel gleich oder schwächer ist als die Ausgangs-Gradientenkomposition. Dies wirkt sich darauf aus, ob und um wie viel das Injektionsvolumen erhöht werden kann. Der Anwender sollte daher auf Anzeichen erhöhter Dispersion (breitere oder schrägere Peaks und reduzierte Peak-Auflösung) achten, wenn versucht wird, die Injektionsgröße zu erhöhen. Wenn eine Injektion in einem schwachen Lösungsmittel erfolgt, kann das Volumen wahrscheinlich weiter erhöht werden, weil die Auswirkungen darin bestehen, dass die Analysesubstanz im Kopf der Säule beim Start des Gradienten konzentriert wird. Wenn andererseits die Injektion in einem stärkeren Lösungsmittel erfolgt als die startende mobile Phase, verteilt sich erhöhtes Injektionsvolumen über das Analytenband über die Säule abwärts vor dem Gradienten. Und das führt zur Peakdispersion und geringerer Auflösung.

Die wichtigste Überlegung bei der Festlegung des Injektionsvolumens ist aber wahrscheinlich der Durchmesser der Säule, da dieser die Peakdispersion wesentlich mitbestimmt. Peakhöhen können in einer schmalen Säule höher sein als bei einer größeren Injektion in einer breiteren Säule, weil weniger Peakdispersion vorliegt. Bei Säulen mit 2,1 mm Innendurchmesser betragen die normalen Injektionsvolumina zwischen 5 und 10 µl, aber dies hängt stark von der chemischen Zusammensetzung des Analyten und der mobilen Phase

3 Optimieren des Agilent 1290 Infinity LC Systems Erzielen höherer Injektionsvolumina

ab, wie oben erläutert. Eine allgemeine Richtlinie für die Festlegung des maximalen Injektionsvolumens lässt sich aus dem Volumen der Säule ableiten (siehe): In einer Gradiententrennung können Injektionsvolumina von etwa 5 % des Säulenvolumens bei guter Auflösung und Peakdispersion erreicht werden.

Eine Möglichkeit, größere Injektionen zu erreichen, besteht im Einsatz einer Abfangsäule. Sie wird über ein Umschaltventil ausgewählt und konzentriert die Injektion vor dem Umschalten (also dem Injizieren) in eine Analysensäule. Hinweise dazu finden Sie unter . Das Ventil kann problemlos im thermostatisierten Säulenofen angeordnet werden.

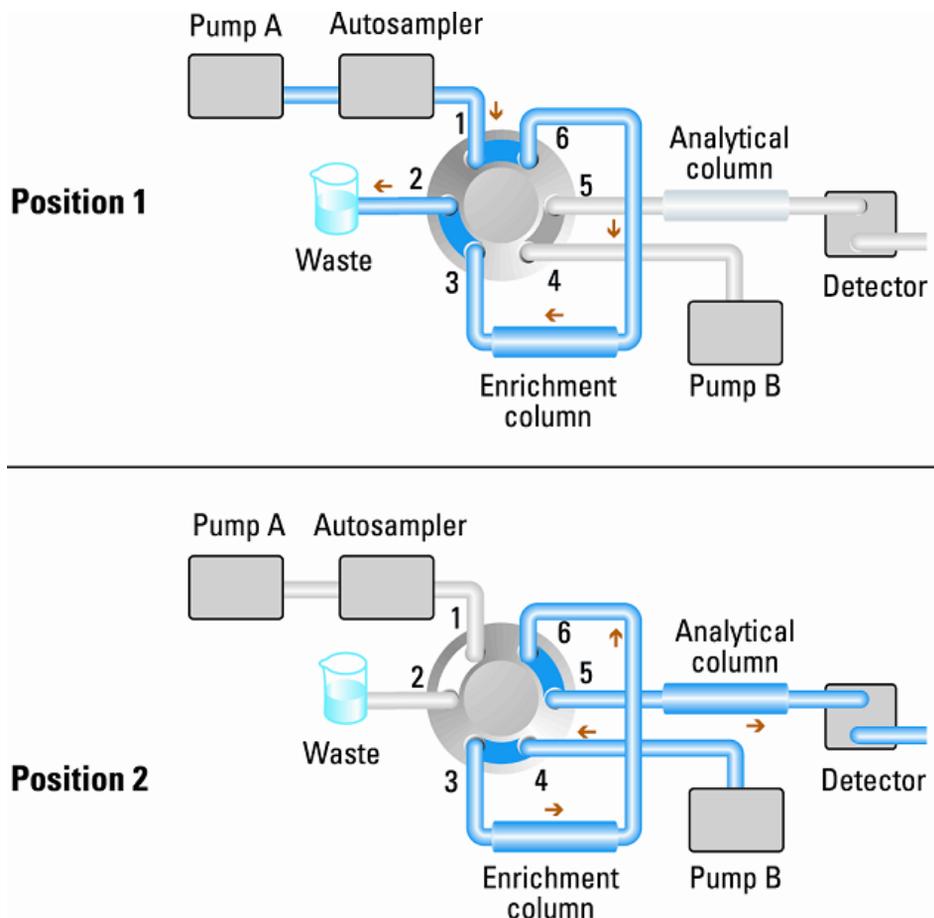


Abbildung 21 Probenanreicherung

Erzielen eines höheren Durchsatzes

Einige Labors arbeiten in einer Umgebung mit einem hohen Durchsatz, in der mehrere hundert oder sogar tausend Injektionen zur Durchführung eines Gesamtauftrags erforderlich sind. In diesen Situationen ist es besonders wünschenswert, die Zykluszeiten zu minimieren, da selbst wenige Sekunden, die pro Injektion gespart werden, die für den Auftrag erforderliche Gesamtdauer deutlich reduzieren können. Die wichtigsten Schritte zur Erzielung einer schnelleren Zyklusdauer und eines höheren Durchsatzes sind folgende:

- Verwendung schneller Trennungen
- Überlappende Injektionen
- Minimieren der Äquilibrierungszeit
- Alternierende Säulenregeneration

Der erste Schritt zur Erzielung eines hohen Durchsatzes besteht darin, sicherzustellen, dass die verwendeten Methoden kurze Zykluszeiten haben, d. h. schnelle Chromatographiemethoden sind. Kurze Säulen mit einer Packungspartikelgröße von 1,8 µm eignen sich aufgrund ihrer hohen Effizienz hervorragend für diesen Zweck. Wenn die Methoden eine isokratische Trennung beinhalten, ermöglicht dies besonders schnelle Zykluszeiten, da zwischen den Analysenläufen keine Säulenäquilibration erforderlich ist. Am häufigsten werden jedoch Gradientenmethoden verwendet, was mit dem Umfang bzw. der Komplexität der Proben zusammenhängt. Beim Entwickeln der Methode sollte der Gradientenbereich so klein wie möglich gehalten werden, um die Trennung zu erzielen. In vielen offenen Systemen werden Gradienten zwischen 5 % und 95 % organischem Lösungsmittel verwendet, um die größtmögliche Flexibilität für eine große Bandbreite an unbekanntem Substanzen zu erhalten. In einer Situation, in der ein hoher Durchsatz erforderlich ist, sollte jedoch überlegt werden, ob ein kürzerer Bereich ausreicht, wenn der erwartete Bereich an Substanzen für die Analyse verringert wird. Dies würde nicht nur eine Verkürzung der Analysenzeit, sondern auch der Äquilibrierungszeit zwischen den Analysenläufen ermöglichen.

Die Zyklusdauer setzt sich aus mehreren Phasen zusammen: Zyklusdauer = Injektion + Trennung + Äquilibration + Datenverarbeitung.

Wenn eine große Zahl an Proben zu verarbeiten ist, kann selbst eine kleine Reduzierung der Zyklusdauer zu einer großen Reduzierung der Gesamtdauer

eines Auftrags führen. Aus diesem Grund kann die Datenverarbeitung offline erfolgen, damit das System den Schwerpunkt auf die Analyse der Proben und das Erfassen der Daten legen kann.

Die Injektion kann bezogen auf die Geschwindigkeit optimiert werden, wobei zu beachten ist, dass ein zu schnelles Ansaugen der Probe die Reproduzierbarkeit vermindern kann. Hier kann nur eine geringfügige Optimierung erzielt werden, da die verwendeten Probenvolumina in jedem Fall zum schmalen Ende des Bereichs tendieren. Einen deutlichen Teil der Injektionszeit beanspruchen die Nadelbewegungen zu und von der Probenflasche und in den Spülkanal. Diese Bewegungen können jedoch durchgeführt werden, während eine Trennung läuft. Hierbei handelt es sich um die so genannte „Überlappungsinjektion“, die problemlos vom Einrichtungsbildschirm des automatischen Probengebers in der ChemStation Software aktiviert werden kann. Der automatische Probengeber kann so konfiguriert werden, dass er den Fluss durch den Probengeber in die Nebenfluss-Stellung schaltet, wenn die Injektion erfolgt ist, und dann nach beispielsweise 3 Minuten in einen 4-Minuten-Lauf schaltet, um den Vorgang des Ansaugens der nächsten Probe und die Vorbereitung für die Injektion zu starten. Dies kann in der Regel zwischen 0,5 und 1 Minute pro Injektion sparen. Bei klebrigen Substanzen wird empfohlen, dies während der Säulenäquilibrierung zu tun, wenn der Probengeber die Startbedingungen des nächsten Gradientenlaufs ermittelt hat.

Der Schritt der Säulenäquilibrierung kann ein bedeutender Teil der Zyklusdauer sein. Für gewöhnlich muss die Säule zur Stabilisierung für die nächste Injektion mit dem Drei- bis Fünffachen des Säulenvolumens gespült werden. Dies kann in einigen Applikationen 50 % oder mehr der Trennungszeit ausmachen. Es ist ein wesentlicher Vorgang, kann jedoch aus der Zyklusdauer herausgenommen werden, indem eine automatisierte alternierende Säulenregeneration verwendet wird. Hierfür ist ein 2-Positionen-/10-Anschlüsse-Ventilkopf mit 1200 bar im Säulenthmostat erforderlich. Außerdem werden eine zweite Trennsäule, die mit der ersten identisch ist, sowie eine zweite Pumpe benötigt. Während eine Säule für die Analyse verwendet wird, wird die andere Säule mit der anfänglichen Gradientenzusammensetzung der mobilen Phase gespült. Zum Starten der nächsten Injektion wird dann die neu äquilibrierte Säule in den analytischen Flussweg geschaltet. Die beiden Säulen wechseln auf diese Weise, bis alle Injektionen der Sequenz erfolgt sind. Die zweite Pumpe wird nur zum Spülen einer isokratischen Mischung durch die Säule benötigt. Es kann daher ein einfacheres Modell als die 1290 Infinity Pumpe verwendet werden. Beispielsweise wäre eine isokratische Pumpe der Serie 1200 für diese Aufgabe ausreichend. Der Aufbau ist in [Abbildung 22](#) auf Seite 55 dargestellt.

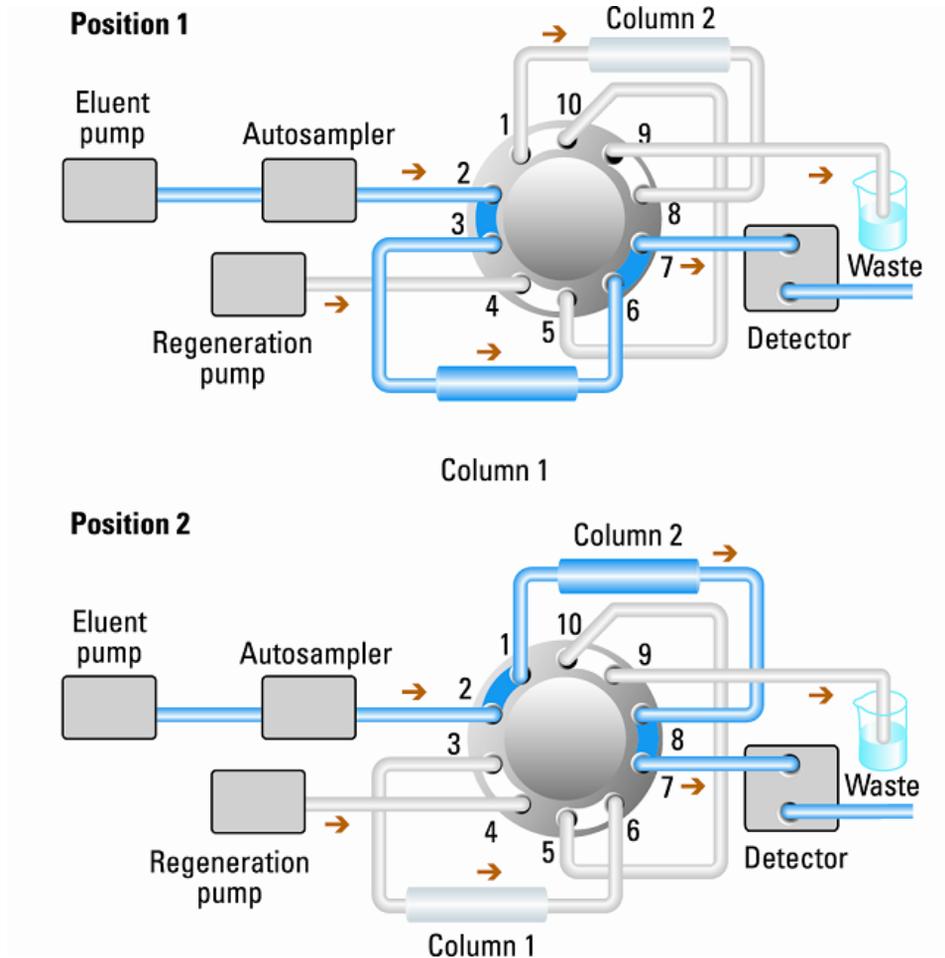


Abbildung 22 Alternierende Säulenregeneration

Erzielen einer höheren Auflösung

Höhere Auflösung bei einer Trennung verbessert die qualitative und quantitative Datenanalyse, steigert die Peakauflösung oder schafft größeren Spielraum für eine Beschleunigung der Trennung. Dieser Abschnitt bringt Überlegungen zur Steigerung der Auflösung durch folgende Punkte:

- Optimieren der Selektivität
- Packungen mit kleinerer Partikelgröße
- Längere Säulen
- Flachere Gradienten, schnellerer Fluss
- Kleinstmögliches Extrasäulenvolumen
- Injektionslösungsmittel und -volumen optimieren
- Ausreichend schnelle Datenerfassung

Die Auflösung zwischen zwei Peaks wird durch die Auflösungsgleichung beschrieben:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \frac{(k_2 + 1)}{k_2}$$

Dabei gilt:

- R_s = Auflösung,
- N = Plattenzahl (Maß der Säuleneffizienz),
- α = Selektivität (zwischen zwei Peaks),
- k_2 = Retentionsfaktor des zweiten Peaks (der frühere Kapazitätsfaktor).

Der Term mit der größten Auswirkung auf die Auflösung ist die Selektivität, α , eine Änderung dieses Terms bedeutet auch eine Änderung der stationären Phase (C18, C8, Phenyl, Nitril usw.), der mobilen Phase und der Temperatur zur Steigerung der Selektivitätsdifferenzen zwischen den zu trennenden gelösten Substanzen. Das ist ein wesentlicher Arbeitsschritt. Er wird am besten durch ein automatisiertes Methodenentwicklungssystem erledigt, das eine breite Auswahl an Bedingungen für verschiedene Säulen und mobile Phasen geordnet protokollieren kann. Dieser Abschnitt zeigt, wie sich mit jeder beliebigen stationären und mobilen Phase eine höhere Auflösung erzielen lässt.

Würde ein automatisiertes Methodenentwicklungssystem für die Entscheidung über Phasen verwendet, wäre der Einsatz kurzer Säulen für rasche Analyse zu jedem Schritt des Scoutings wahrscheinlich.

Die Auflösungsgleichung zeigt, dass der nächstwichtigste Term die Plattenzahl oder Effizienz ist; und diese kann auf viele Arten optimiert werden. N ist umgekehrt proportional zur Partikelgröße und direkt proportional zur Säulenlänge: Also ergeben eine geringere Partikelgröße und eine größere Säulenlänge eine höhere Plattenzahl. Der Druck steigt umgekehrt proportional zum Quadrat der Partikelgröße und proportional zur Säulenlänge. Daher wurde das LC-System 1290 Infinity für einen Druck von bis zu 1200 bar ausgelegt, sodass es mit Sub-2 μm -Partikeln arbeiten kann, und für eine Säulenlänge von bis zu 100 mm bzw. 150 mm. Fallweise wurden sogar 100 mm und 150 mm Säulen zu einer Gesamtlänge von 250 mm miteinander kombiniert. Die Auflösung steigt mit der Quadratwurzel von N , also bewirkt eine Verdopplung der Säulenlänge eine Steigerung der Auflösung um den Faktor 1,4. Das Ergebnis hängt von der Viskosität der mobilen Phase ab, da diese in direktem Zusammenhang mit dem Druck steht. Methanolgemische erzeugen mehr Rückdruck als Acetonitrilgemische. Acetonitril wird oft bevorzugt, da es geringere Viskosität aufweist, und die Peakformen besser und enger sind, Methanol jedoch führt zu besserer Selektivität (jedenfalls für Moleküle unter etwa 500 Da). Die Viskosität lässt sich durch Temperaturerhöhung reduzieren, man darf jedoch nicht vergessen, dass das die Selektivität der Trennung verändern kann. Es ist experimentell zu klären, ob das zu größerer oder geringerer Selektivität führt. Bei der Verstärkung von Fluss und Druck darf man nicht vergessen, dass dabei die Reibungswärme in der Säule steigt. Das kann zu einer etwas größeren Verbreiterung und möglicherweise zu einer leichten Selektivitätsänderung führen, was beides eine Auflösungsreduktion bedeuten kann. Letzteres könnte sich durch Reduktion der Thermostattemperatur um ein paar Grade ausgleichen lassen. Auch hier muss das Experiment entscheiden.

Die Van Deemter-Kurve zeigt, dass die optimale Flussrate durch eine STM-Säule bei größeren Partikeln höher liegt und bei Zuwachs der Flussrate ziemlich flach ansteigt. Normalerweise liegen die folgenden Flussraten für STM-Säulen in der Nähe des Optimums: 2 ml/min für Säulen mit 4,6 mm Innendurchmesser) und 0,4 ml/min für Säulen mit 2,1 mm Innendurchmesser.

Bei isokratischen Trennungen führt eine Steigerung des Retentionsfaktors k zu besserer Auflösung, da die Substanz länger zurückgehalten wird. Bei Gradiententrennung wird die Retention durch k^* in der folgenden Gleichung beschrieben:

3 Optimieren des Agilent 1290 Infinity LC Systems Erzielen einer höheren Auflösung

$$k^* = \frac{t_G}{\Delta\%B} \cdot \frac{F}{V_m} \cdot \frac{100}{S}$$

Dabei gilt:

- k^* = mittlerer k-Wert,
- t_G = Gradientendauer (oder Dauer des Gradientensegments) (min),
- F = Fluss (ml/min),
- V_m = Verzögerungsvolumen der Säule,
- $\Delta\%B$ = Änderung des Anteils von Lösungsmittel B während des Gradienten,
- S = konstant (ca. 4-5 bei kleinen Molekülen).

Daraus ergibt sich, dass k und damit die Auflösung durch einen flacheren Gradienten (2 bis 5 %/min Änderung als Richtwert), eine höhere Flussrate und kleineres Säulenvolumen gesteigert werden kann. Die Gleichung zeigt auch, wie man einen bestehenden Gradienten beschleunigen kann: Wird der Fluss verdoppelt und die Gradientendauer halbiert, ändert sich nichts an k^* und der Trennung, diese erfolgt jedoch in der halben Zeit. Neue Forschungsergebnisse zeigen, dass eine kürzere STM-Säule (bei Temperaturen über 40 °C) eine höhere Peakleistung erzeugen kann als eine längere STM-Säule, wenn man den Analysenlauf beschleunigt. (Vgl. *Petersson et al., J.Sep.Sci, 31, 2346-2357, 2008, Maximizing peak capacity and separation speed in liquid chromatography*).

Jede Reduktion des Extrasäulenvolumens reduziert die Verbreiterung und ergibt eine bessere Auflösung. Das wurde beim LC-System 1290 Infinity mit engen (0,12 mm i.d.) Kapillaren (kontrollieren Sie, dass die kleinste Länge zwischen Säule und Detektor verwendet wird) und bei der Max-Light Durchflusszelle bereits optimiert

Ein Auflösungsgewinn schließlich lässt sich nur nutzen, wenn die Datenerfassung schnell genug ist, um genaue Profile der schmalen Peaks zu erstellen.

Erzielen einer höheren Empfindlichkeit

Erreichen einer höheren Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit einer Trennmethode ist eine Folge der Wahl der stationären und mobilen Phase, da eine gute Trennung mit schmalen Peaks und eine stabile Basislinie mit minimalem Rauschen gewünscht werden. Die Wahl der Gerätekonfiguration ist wichtig und die Einrichtung des Detektors wirkt sich besonders stark aus. In diesem Abschnitt wird erörtert, wie die Empfindlichkeit durch folgende Faktoren beeinflusst wird:

- Pumpenmischervolumen
- Schmalere Säulen
- Detektor-Durchflusszelle
- Detektorparameter

Bei der Besprechung der Detektorparameter werden auch die damit verwandten Themen der Selektivität und der Linearität behandelt.

Pumpenmischervolumen

Um eine möglichst geringes Basislinienrauschen bei UV-Detektoren zu erreichen, wird eine Konfiguration des Standard-Totvolumen für den 35 µl Jet Weaver beim 1290 Infinity Pumpenmodul empfohlen. Dies gilt für fast alle Anwendungen, aber wenn in der mobilen Phase TFA eingesetzt wird oder die Zusammensetzung längere Mischzeiten erfordern, muss die größere Volumenseite des Jet Weaver Mischers verwendet werden, um das Rauschen zu minimieren.

Spalten

Die Empfindlichkeit ist das Signal/Rausch-Verhältnis (S/N). Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, die Peakhöhe zu maximieren und das Basislinienrauschen zu minimieren. Jede Verringerung der Peakdispersion unterstützt die Bewahrung der Peakhöhe. Daher sollte ein zusätzliches Säulenvolumen durch Einsatz von kurzen Verbindungskapillaren mit geringem Durchmesser und korrekt installierte Verschraubungen minimiert werden. Der Einsatz von Säulen mit geringerem Innendurchmesser steigert die Peak-Höhe und ist daher für

3 Optimieren des Agilent 1290 Infinity LC Systems

Erzielen einer höheren Empfindlichkeit

Applikationen mit begrenzten Probenmengen besonders gut geeignet. Wenn die Probenmenge in eine Säule mit einem kleinen Innendurchmesser injiziert werden kann, wird die durch den Säulendurchmesser bedingte Verwässerung geringer ausfallen und daher steigt die Empfindlichkeit. Wenn beispielsweise der Innendurchmesser einer Säule von 4,6 mm auf 2,1 mm reduziert wird, lässt sich eine theoretische Verbesserung der Peak-Höhe von 4,7 times erzielen, weil in der Säule eine geringere Verwässerung auftritt. Bei einem Massenspektrometer-Detektor können die geringeren Flussraten schmalere Säulen einen höheren Wirkungsgrad der Ionisierung und damit eine höhere Empfindlichkeit bewirken.

Erzielen einer höheren Empfindlichkeit des Detektors

Die Leistungsfähigkeit des Detektors kann durch verschiedene Parameter optimiert werden. In den folgenden Abschnitten wird beschrieben, wie sich die Detektorparameter auf die Leistung auswirken:

- Flusszellen wirken sich auf die Empfindlichkeit aus.
- Wellenlängen und Bandbreiten wirken sich auf die Empfindlichkeit, Selektivität und Linearität aus.
- Spaltbreiten wirken sich auf die Empfindlichkeit, spektrale Auflösung und Linearität aus.
- Peakbreiten wirken sich auf die Empfindlichkeit und Auflösung aus.

Flusszelle

Die Max-Light-Kartuschenzelle hat eine Standardschichtdicke von 10 mm und ist für minimales Volumen und minimale Dispersion optimiert (σ Volumen 1,0 μL). Sie bietet eine hohe Lichtübertragung zur Reduzierung von Rauschen aufgrund des Optofluid-Wellenleiters. Sie ist für eine große Bandbreite an analytischen Säulen geeignet - von kurzen Narrow-Bore-Säulen bis hin zu langen Säulen mit Standarddurchmessern (4,6 mm). Im Allgemeinen sollte bei dieser Zelle das Peakdispersionsvolumen (berechnet aus Peakbreite x Flussrate) größer als etwa 2 μL sein (zum Beispiel 0,02 min x 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ = 4 μL).

Die Max-Light-Hochempfindlichkeitszelle hat eine Schichtdicke von 60 mm, was je nach den Applikationsbedingungen zu drei- bis fünfmal höheren Werten beim Signal/Rausch-Verhältnis führt. Das Dispersionsvolumen ist im Vergleich zur Standardzelle geringfügig erhöht.

Wellenlänge und Bandbreite

Der Detektor misst die Extinktion mittels Diodenarray-Detektion simultan bei Wellenlängen von 190 nm bis 640 nm. Eine UV-Lampe liefert gute Empfindlichkeit über den gesamten Wellenlängenbereich. Der Diodenarray-Detektor (DAD) kann zu jedem Zeitpunkt simultan bis zu acht chromatographische Signale und Spektren des kompletten Spektrenbereichs berechnen und an das Datensystem senden.

Ein UV-Chromatogramm oder Signal stellt Extinktionsdaten im Vergleich zur Zeit dar und wird durch seine Wellenlänge und Bandbreite definiert.

- Die Wellenlänge gibt die Mitte der Detektionsbande an.

3 Optimieren des Agilent 1290 Infinity LC Systems

Erzielen einer höheren Empfindlichkeit

- Die Bandbreite definiert den Wellenlängenbereich, über den der Durchschnitt der Extinktionswerte berechnet wird, um das Ergebnis für jeden Zeitpunkt zu ermitteln.

Beispielsweise hat ein Signal bei einer Wellenlänge von 250 nm und mit einer Bandbreite von 16 nm durchschnittliche Extinktionsdaten von 242 nm bis 258 nm. Darüber hinaus können eine Referenzwellenlänge und eine Referenzbandbreite für jedes Signal definiert werden. Die durchschnittliche Extinktion von der auf die Referenzwellenlänge zentrierten Referenzbandbreite wird von ihrem äquivalenten Wert an der Signalwellenlänge subtrahiert, um das Ausgabechromatogramm zu erzeugen.

Die Signalwellenlänge und -bandbreite können so gewählt werden, dass sie für folgende Faktoren optimiert sind:

- Universelle Breitbanddetektion
- Selektive Schmalbanddetektion
- Empfindlichkeit für eine spezifische Substanz

Breitband- oder universelle Detektion arbeitet mit einer großen Bandbreite, um beliebige in diesem Bereich absorbierende Substanzen nachzuweisen. Wenn Sie beispielsweise alle absorbierenden Moleküle zwischen 200 nm und 300 nm nachweisen möchten, legen Sie ein Signal bei 250 nm mit einer Bandbreite von 100 nm fest. Der Nachteil hierbei ist, dass die Empfindlichkeit für keines dieser Moleküle optimal ist. Am häufigsten wird die Schmalband- oder selektive Detektion verwendet. Das UV-Spektrum eines bestimmten Moleküls wird untersucht und es wird ein entsprechendes Extinktionsmaximum ausgewählt. Falls möglich, sollte der Bereich, in dem Lösungsmittel stark absorbieren, vermieden werden (bei Methanol unter 220 nm, bei Acetonitril unter 210 nm). In **Abbildung 23** auf Seite 64 beispielsweise liegt das geeignete Extinktionsmaximum von Anissäure bei 252 nm. Eine enge Bandbreite von 4 nm bis 12 nm erzielt in der Regel eine gute Empfindlichkeit und ist spezifisch für die Extinktion in einem schmalen Bereich.

Die schmale Bande kann hinsichtlich der Empfindlichkeit für ein bestimmtes Molekül optimiert werden. Mit zunehmender Bandbreite wird das Signal aber auch das Rauschen reduziert und das Signal/Rausch-Verhältnis wird optimal sein. Als ungefähre Richtlinie gilt, dass dieses Optimum häufig nahe der natürlichen Bandbreite auf halber Höhe der Extinktionsbande im UV-Spektrum liegt. Im Beispiel der Anissäure liegt dieses bei 30 nm.

Die analytische Wellenlänge wird in der Regel bei einem Wellenlängenmaximum festgelegt, um die Empfindlichkeit für dieses Molekül zu erhöhen. Der

Detektor ist bei vielen Applikationen linear bis zu 2 AU und darüber hinaus. Dies bietet einen großen linearen Bereich für die Konzentration. Bei einer Analyse mit hohen Konzentrationen kann der lineare Konzentrationsbereich erweitert werden, indem die Wellenlänge auf einen Wert mit einer geringeren Extinktion festgelegt wird, z. B. auf das Wellenlängenminimum, oder indem eine größere Bandbreite verwendet wird, die in der Regel geringere Extinktionswerte umfasst. Die Verwendung von Wellenlängenmaxima und -minima zur Quantifizierung geht auf herkömmliche UV-Detektoren zurück, die aufgrund mechanischer Toleranzen beim Verschieben von Gittern steil ansteigende und abfallende Flanken des Spektrums vermeiden mussten. Bei Diodenarray-Detektoren gibt es diese Einschränkungen nicht, aber aus konventionellen Gründen werden Maxima und Minima gegenüber anderen Bereichen des Spektrums bevorzugt verwendet.

Die Referenzbandbreite wird normalerweise in einem Bereich des UV-Spektrums festgelegt, in dem die Substanz keine Extinktion aufweist. Dies wird anhand des Spektrums für Anissäure in [Abbildung 23](#) auf Seite 64 dargestellt. Dieses Spektrum ist typisch für viele kleine Moleküle, die ein UV-Chromophor enthalten. Zur Erzielung optimaler Ergebnisse wurde die Referenz als breite Bande so nah wie möglich an der Signalwellenlänge, jedoch in einem Bereich mit keiner Extinktion festgelegt. Referenzbandbreiten von 60 nm bis 100 nm werden häufig verwendet. Die Standardreferenz beträgt 360 nm mit einer Bandbreite von 100 nm. Es wird eine große Bandbreite verwendet, da dies das Rauschen im Referenzsignal reduziert (in der statistischen Theorie wird der Fehler, in diesem Fall also das Rauschen, um die Quadratwurzel aus der Anzahl der Determinationen reduziert). Es ist wichtig, dass die Referenzbandbreite nicht in einen Bereich des Spektrums hineinreicht, der eine gewisse Extinktion aufweist, da dies das Ergebnissignal und die Empfindlichkeit reduzieren würde. Die Verwendung einer Referenzwellenlänge kann dabei helfen, die Drift oder Versetzung im Chromatogramm zu reduzieren, die durch Brechungsindexänderungen infolge von Raumtemperaturschwankungen oder Gradientenbetrieb entsteht. Der Effekt eines Referenzsignals kann einfach getestet werden, indem zwei identische Signale festgelegt werden, eines mit und eines ohne Referenzsignal. Wenn es keinen Bereich des Spektrums ohne Extinktion gibt, ist es besser, kein Referenzsignal zu verwenden.

3 Optimieren des Agilent 1290 Infinity LC Systems Erzielen einer höheren Empfindlichkeit

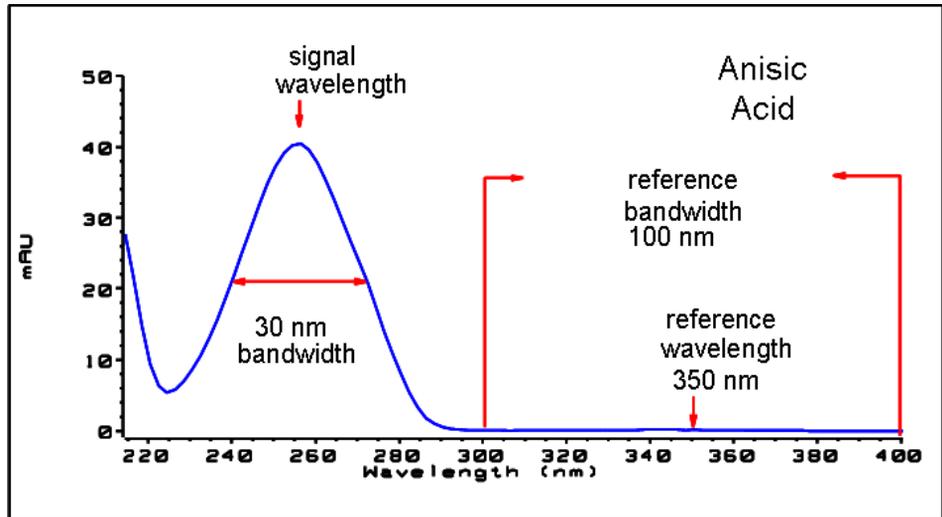


Abbildung 23 Spektrum von Anissäure

Spaltbreite (nur G4212A)

Die Lichtübertragung in den Spektrographen und die optische Bandbreite werden vom variablen Spalt der Aperturöffnung gesteuert. Die Standardeinstellung der Spaltbreite beträgt 4 nm, was für die meisten Applikationen angemessen ist, da sie eine gute Gesamtleistung erzielt. Die hiervon betroffenen Leistungsmerkmale sind Empfindlichkeit, spektrale Auflösung und Linearität. Wenn eine bestimmte Wellenlänge in den Spektrographen eintritt, fällt ihr Licht effektiv auf eine kleine Diodenbande, deren Breite proportional zur Breite des Eintrittsspalts ist. Die Angabe 4 nm für den Spalt beschreibt dieses Verhalten: das Licht fällt auf eine bestimmte Anzahl an Dioden, die eine Bandbreite von 4 nm detektieren. Daraus ergibt sich, dass die optische Mindestauflösung 4 nm beträgt und daher die Diodenarray-Bandbreite (bzw. die digitale Bandbreite) auf mindestens 4 nm eingestellt werden muss. Für eine optimale Empfindlichkeit empfiehlt sich die Einstellung 8 nm, die das meiste Licht einfallen lässt und das Rauschen minimiert, jedoch die geringste spektrale Auflösung erzielt. Dies ist in der Regel kein Problem bei UV-Spektren, da deren natürliche Bandbreiten für gewöhnlich größer als 25 nm ohne Feinstrukturen sind. Die optische Bandbreite bei 8 nm verringert im Vergleich zur Spaltbreite von 4 nm den Linearitätsbereich, sodass es wichtig ist, dass eine validierte Methode immer die Spaltbreite verwendet, die für die Validierung verwendet wurde. Für eine optimale spektrale Auflösung ist die Einstellung 1 nm am besten geeignet. Sie ermöglicht das Auflösen einer Feinstruktur z. B. im Ben-

zol-Spektrum (siehe [Abbildung 24](#) auf Seite 65). Nur sehr wenige Substanzen zeigen solche feinen Details im Auflösungsspektrum an. Die Lichtstärke ist geringer, sodass das Signal mehr Rauschen aufweist – der Rauschpegel hängt von der verwendeten Wellenlänge und den Lösungsmitteln der mobilen Phase ab.

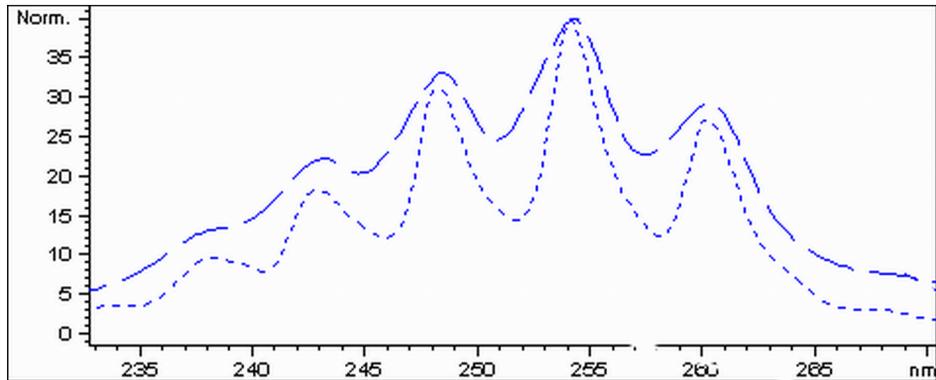


Abbildung 24 Benzol bei Spaltbreiten von 1 und 4 nm (Prinzip)

Das Injektionsvolumen und das Lösungsmittel zur Probenauflösung sind wichtig für die Steuerung der Dispersion. Es muss sorgfältig darauf geachtet werden, dass die Substanzen an der Oberseite der Säule fokussiert werden, um eine Peakdispersion aufgrund der Injektion zu vermeiden, da dies zu einer geringeren Peakhöhe führen würde. Hierzu muss die Probe in einer Lösungsmittelzusammensetzung aufgelöst werden, die eine geringere Elutionsstärke als die mobile Phase aufweist. Es ist möglich, das Injektionsvolumen zu erhöhen, um eine größere Analytenkonzentration in der Säule und damit eine größere Peakhöhe zu erzielen.

Lesen Sie hierzu die Anmerkungen unter [“Erzielen höherer Injektionsvolumina”](#) auf Seite 51.

Peakbreite, Ansprechzeit und Datenerfassungsrate

Peakbreiteneinstellung, Ansprechzeit und Datenrate im Detektor sind miteinander verknüpft. Die verfügbaren Einstellungen sind in [Tabelle 8](#) auf Seite 66 aufgeführt. Es ist wichtig, diese korrekt festzulegen, um eine optimale Empfindlichkeit zu erhalten und die bei der Trennung erzielte Auflösung beizubehalten.

Der Detektor erfasst Datenpunkte intern schneller, als es für ein Chromatogramm erforderlich ist, und verarbeitet sie, um das vom Datensystem erkannte Signal zu erzeugen. Ein Teil des Verarbeitungsvorgangs reduziert die Daten auf eine angemessene Datenrate, wodurch eine akkurate Zeichnung der chromatographischen Peaks ermöglicht wird. Wie bei den meisten analytischen Bestimmungen werden Gruppen von Werten effektiv gemittelt, um Fehler im Ergebnis zu verringern. Der Detektor bündelt Rohdatenpunkte und erzeugt die Ausgabesignalraten mit der erforderlichen Datenerfassungsrate mittels eines elektronischen Filterprozesses. Wenn die resultierende Datenrate zu langsam ist (Überfilterung), werden die Peakhöhen verringert und die Auflösung zwischen ihnen reduziert. Ist die Datenrate zu schnell, weisen die Daten ein stärkeres Rauschen auf, als für die genaue Zeichnung schmaler Peaks zulässig ist.

Die Einstellung der *Peakbreite* im Detektor ermöglicht es dem Benutzer, diese Parameter korrekt festzulegen, ohne mehr wissen zu müssen, als wie die Ergebnisse im Chromatogramm integriert werden, um die Breite der Peaks sehen zu können. Die Peakbreiteneinstellung sollte auf die schmalste Peakbreite eingestellt werden, die im Chromatogramm dargestellt werden kann. Wenn sie zu breit eingestellt wird, werden die Peaks niedriger und breiter (und potenziell weniger aufgelöst) dargestellt. Wenn sie zu schmal eingestellt wird, führt dies zu einer unnötigen Verstärkung des Basislinienrauschens. Die Software verwendet diesen Wert vor allem, um die *Datenerfassungsrate* so einzustellen, dass genügend Datenpunkte bei den schmalsten Peaks erfasst werden. Angestrebt werden 15 bis 25 Punkte bei einem Peak. Der 1290 Infinity DAD kann bei Bedarf mit einer maximalen Rate von 160 Hz Daten erfassen. Dies ermöglicht die Erfassung von genügend Datenpunkten bei einem Peak, der nur 0,1 s breit ist. Die Einstellung der *Ansprechzeit* ist eine weitere Möglichkeit, diese Filterung festzulegen. Sie wird in Sekunden gemessen und entspricht etwa einem Drittel des Peakbreitenwerts (der in Minuten gemessen wird). Sie zeigt effektiv, wie schnell das dargestellte Signal auf eine Stufenänderung im Eingangssignal reagiert.

Tabelle 8 Peakbreite – Ansprechzeit – Datenrate

Peakbreite bei halber Peakhöhe [min] ¹	Ansprechzeit [s]	Signalratenrate [Hz]
< 0,0015625	0,015625	160
> 0,0015625	0,03125	160
> 0,003125	0,0625	80
> 0,00625	0,125	40
> 0,0125	0,25	20
> 0,025	0,5	10
> 0,05	1,0	5
> 0,10	2,0	2,5
> 0,20	4,0	1,25
> 0,40	8,0	0,625
> 0,85	16,0	0,3125

¹ Werte in der Benutzeroberfläche können gerundet werden.

Erzielen der geringstmöglichen Verschleppung

Die Verschleppung wird gemessen, wenn Rest-Peaks einer vorherigen Injektion mit aktiver Substanz in einer nachfolgenden Injektion mit Blindlösung erscheinen. In diesem Fall liegt eine Verschleppung zwischen den Injektionen mit aktiven Substanzen vor, die zu fehlerhaften Ergebnissen führen kann. Der Grad der Verschleppung wird als Bereich des Peaks in der Blindlösung als Prozentsatz des Bereichs in der vorherigen aktiven Injektion angegeben. Der Agilent 1290 Infinity Probengeber wurde so ausgelegt, dass eine möglichst geringe Verschleppung auftritt, indem besondere Sorgfalt auf den Flüssigkeitsweg und die Verwendung von Materialien gelegt wurde, die sich durch eine möglichst geringe Probenadsorption auszeichnen. Ein Verschleppungsgrad von 0,002 % sollte erzielt werden können, auch wenn ein Dreifach-Quadrupol-Massenspektrometer als Detektor eingesetzt wird. Über die Betriebseinstellungen des Probengebers kann der Anwender geeignete Parametereinstellungen vornehmen, um die Verschleppung in allen Applikationen mit Substanzen zu minimieren, die beim Durchfluss durch das System eine hohe Haftungsneigung aufweisen.

Die folgenden Funktionen des Probengebers können verwendet werden, um die Verschleppung zu minimieren:

- Interne Nadelreinigung
- Externe Nadelreinigung
- Rückspülung des Nadelsitzes
- Reinigung des Injektionsventils

Der Flüssigkeitsweg, einschließlich des Inneren der Nadel, wird im Normalbetrieb laufend gespült und verhindert damit bei den meisten Applikationen die Verschleppung. Die automatische Minimierung des Totvolumens (ADVR) reduziert das Totvolumen, aber auch die Spülung des Probengebers und sollte bei Analyten nicht eingesetzt werden, bei denen die Verschleppung nicht vorkommen darf.

Das Äußere der Nadel kann mit einer Waschflasche an einer speziellen Position gereinigt werden. Die Reinigung der Nadel ist auch über den Spülschluss möglich. Wenn eine Waschflasche an einer bestimmten, vom Anwender festgelegten Position auf dem Probensteller verwendet wird, darf diese Flasche kein Septum enthalten und muss mit einem Lösungsmittel

gefüllt sein, das die Nadel von Probenrückständen befreien kann. Das Septum wird nicht verwendet, weil beim Abwischen von kontaminierenden Substanzen bei der Abwärtsbewegung diese bei der Aufwärtsbewegung der Nadel wieder haften bleiben können. Die Nadel kann mehrere Male in die Flasche getaucht werden. Dies ist für das Entfernen eines geringen Verschleppungsgrades ausreichend, aber eine wirksamere Reinigung des Nadeläußeren sollte der Spülanschluss verwendet werden.

Der Spülanschluss befindet sich über und hinter dem Nadelsitz. Eine peristaltische Pumpe liefert die Waschlösung. Der Anschluss hat ein Volumen von 0,68 ml und die peristaltische Pumpe liefert 6 ml/min. daher erfolgt die Füllung des Spülanschlusses mit frischer Lösung in 7 s. Wenn der Spülanschluss ausgewählt ist, kann der Anwender festlegen, wie lange das Äußere der Nadel mit frischem Lösungsmittel gewaschen werden soll. Dies kann bei Routineapplikationen zwei bis drei Sekunden dauern, wenn der Verschleppungsgrad weniger schwerwiegend ist, und 10 bis 20 s bei kompletteren Reinigungsvorgängen. Es wird empfohlen, dass die äußerliche Reinigung der Nadel im Spülanschluss als Standardprozedur festgelegt wird, um eine Kontaminierung des Nadelsitzes zu verhindern. Wenn der Nadelsitz kontaminiert wird, muss er durch eine Rückspülung gereinigt werden, indem die Durchflussverbindungen manuell ausgetauscht werden. Dies ist eine der Aufgaben, die mit dem Flexible Cube-Modul automatisiert werden können.

Der Spülanschluss und die dazugehörige Pumpe für die Heranführung des Lösungsmittels müssen regelmäßig gespült werden, um den Verschleppungsgrad möglichst gering zu halten. So sollten Sie beispielsweise vor Inbetriebnahme des Systems täglich die Pumpe täglich drei Minuten mit einer geeigneten Lösung spülen.

Wenn die Verschleppung durch andere Maßnahmen nicht beseitigt werden konnte, kann es sein, dass Rückstände der Analysesubstanz innerhalb des Injektorventils haften geblieben sind. Das Injektorventil kann so eingerichtet werden, dass es zusätzliche Umschaltbewegungen durchführt, damit der Flüssigkeitsweg im Ventil gereinigt wird, wenn hier Probleme mit der Verschleppung auftreten. Wenn die problematischen Substanzen einen hohen Prozentsatz organischer Phase für die Elution benötigen, wird empfohlen, das Injektionsventil auf einen hohen Prozentsatz der organischen Phase zu schalten, nachdem der letzte Peak eluiert hat. Es wird ebenfalls empfohlen, das Injektionsventil erneut umzuschalten, nachdem sich die anfänglichen Bedingungen für die mobile Phase stabilisiert haben. Damit wird sichergestellt, dass die Bypass-Rille in der Rotordichtung des Ventils die Gradientenstartbedingungen erfüllt. Dies ist besonders wichtig bei Flussraten unter 0,5 ml/min.

3 Optimieren des Agilent 1290 Infinity LC Systems Erzielen der geringstmöglichen Verschleppung

Für Proben, bei denen die Nadel-Außenseite mit Wasser oder Alkohol aus der Spülpumpe nicht ausreichend gereinigt werden kann, sind Waschflaschen mit einem geeigneten Lösungsmittel zu verwenden. Mit einem Injektorprogramm können mehrere Waschflaschen zur Spülung eingesetzt werden.

Verstopfung von Säulen vermeiden

Wie bei jedem HPLC-System muss dafür gesorgt werden, dass eine teilweise oder völlige Verstopfung der Säule oder der Schläuche des Systems durch Unachtsamkeit vermieden wird. Probleme durch in das System eingebrachtes Material können im Allgemeinen mithilfe der folgenden Maßnahmen vermieden werden:

- Lösungsmittel filtern
- Proben filtern
- Mobile Phasen regelmäßig erneuern
- Puffersalze aus dem System spülen

Eine unvermeidbare Quelle von Partikeln ist das System selbst. Wie bei allen HPLC-Systemen verschleifen Dichtungen und geben Material ab, das sich in Fritten im System sammelt. Dies macht den routinemäßigen Austausch dieser Fritten erforderlich. Für Säulen, die mit Partikeln unter 2 µm gepackt sind, sind Fritten mit kleiner Porengröße erforderlich, um zu verhindern, dass Packungsmaterial aus der Säule gespült wird. Dadurch erhöht sich das Risiko einer Verstopfung dieser Fritten mit Partikeln aus der Probe, der mobilen Phase und dem Gerät selbst.

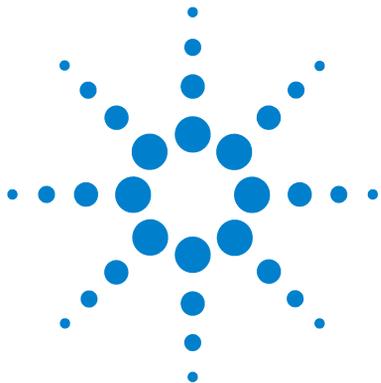
Diese einfachen Gebrauchsregeln helfen, Verstopfungen zu vermeiden:

- 1** Installieren und betreiben Sie Säulen nur in der auf der Säule vermerkten Flussrichtung.
- 2** Verwenden Sie ausschließlich Lösungsmittel von chromatographischem Reinheitsgrad und hoher Qualität.
- 3** Filtern Sie alle wässrigen Puffer und alle Proben vor der Verwendung durch einen geeigneten 0,2 µm-Filter.
- 4** Ersetzen Sie Flaschen mit Pufferlösungen für die mobile Phase alle ein bis zwei Tage. Geben Sie keine mobile Phase in die Flasche hinein; verwenden Sie immer eine neue Flasche.
- 5** Verwenden Sie keine mit hochkonzentrierten Salzlösungen gepufferten mobilen Phasen (> 50 mM) in Kombination mit Acetonitril, um Ausfällung zu vermeiden.
- 6** Nutzen Sie bei mit mobilen Phasen mit hochkonzentrierten Puffern die Option Kolbenhinterspülung.

3 Optimieren des Agilent 1290 Infinity LC Systems

Verstopfung von Säulen vermeiden

- 7 Ein Inlinefilter (1290 Infinity Inlinefilter, Durchmesser 2 mm, Bestellnummer: 5067-4638) ist empfehlenswert, um Partikel abzufangen und die Lebensdauer der Säule zu verlängern.
- 8 Wechseln Sie den Filter, wenn der Druck um 10 % ansteigt.
- 9 Spülen Sie sämtliche pufferhaltigen mobilen Phasen aus den Pumpen (und den Verbindungen bis zur Säule) und leiten Sie 5 ml Lösungsmittel durch die Säule, bevor Sie sie an das Gerät anschließen.
- 10 Spülen Sie die Säule mit kompatibler mobiler Phase, wobei Sie mit 0,1 ml/min bei einer Säule mit 2,1 mm Innendurchmesser, 0,2 ml/min bei 3,0 mm Innendurchmesser und 0,4 ml/min bei 4,6 mm Innendurchmesser langsam beginnen. Steigern Sie die Flussrate innerhalb von 5 Minuten bis auf den gewünschten Durchfluss.
- 11 Wenn sich der Druck stabilisiert hat, schließen Sie die Säule am Detektor an.
- 12 Äquilibrieren Sie die Säule und den Detektor vor Gebrauch mit 10 Säulenvolumina der mobilen Phase (siehe [Tabelle 7](#) auf Seite 44 zum Thema Säulenvolumen).
- 13 Vermeiden Sie Überdruck. Überprüfen Sie den Druckbereich Ihres Gradienten, bevor Sie eine Sequenz beginnen.
- 14 Wenn die Probenlösung eine hohe Konzentration eines organischen Lösungsmittels aufweist, können Sie ein Injektionsprogramm verwenden, um ein kleines Volumen eines schwächeren Lösungsmittels vor und nach dem Probenaliquot hinzuzufügen und so das Risiko einer Ausfällung in einer mobilen Phase mit hochkonzentriertem Puffer zu verringern.



4 Einrichtung und Installation

Installation der Software	74
Installation des Moduls	75
Optimieren der Gerätekonfiguration (Binäres LC System)	75
Optimieren der Gerätekonfiguration (Quaternäres LC System)	80
Initialisierung der Pumpe	85
Spülen der Pumpe	87
Flüssigkeitsanschlüsse zwischen Modulen	91
Integration in ein Netzwerk	91

Dieses Kapitel enthält Informationen zur Softwareinstallation, zur Gerätekonfiguration und zur Vorbereitung des Systems für den Betrieb.



Installation der Software

Installation der Software-Steuerung und des Datensystems

Einzelheiten zur Installation der Software finden Sie im *Handbuch für den 1290 Infinity Diodenarray-Detektor* und in den Software-Handbüchern.

Installation der Agilent Lab Advisor-Software

Einzelheiten zur Installation der Agilent Lab Advisor-Software finden Sie in der Software-Dokumentation auf der Lab Advisor-DVD.

Die Agilent Lab Advisor-Software ersetzt und erweitert die diagnostischen Funktionen, die bisher nur mit der ChemStation-Software verfügbar waren.

Agilent Lab Advisor ist eine Windows®-basierte Anwendung, die Geräte im Labor kontinuierlich und in Echtzeit überwacht und durch automatische Meldungen über den Wartungs- und Servicebedarf mithilfe von leistungsfähigen Zählern die Produktivität deutlich erhöht. Auf diese Weise werden Probleme behoben, bevor sie die Ergebnisse beeinträchtigen. Die Software schließt umfassendes Informations- und Dokumentationsmaterial, eine Sammlung von Rechnern und anderen Werkzeugen, die Sie bei der Einrichtung, Kalibrierung und Instandhaltung Ihres Geräts unterstützen, sowie Tests und Diagnosefunktionen zur Leistungsüberprüfung ein. Agilent Lab Advisor gibt außerdem Rückmeldung bei auftretenden Gerätefehlern und schlägt Lösungen vor. Die Software arbeitet sowohl mit als auch ohne Agilent Datensysteme.

Die Software überwacht:

- Status des LC-Moduls
- Frühwarnsystem für fällige Wartungen (meldet die Notwendigkeit einer Aktualisierung oder eines Austauschs)

Außerdem führt die Software Folgendes aus:

- Sie automatisiert nützliche Tests,
- versucht, unterstützte LAN-basierte Geräte zu identifizieren, die eingeschaltet und mit dem Labornetzwerk des PCs verbunden sind,
- schlägt automatisch Ersatzteile und Fehlerbehebungsmaßnahmen für einige häufige Geräteprobleme vor.

Installation des Moduls

Einzelheiten zur Installation der Module finden Sie in den Handbüchern für die einzelnen Module. Diese Handbücher enthalten außerdem Informationen zu den Spezifikationen, zur Wartung und zu den Geräteteilen.

Optimieren der Gerätekonfiguration (Binäres LC System)

Gerätekonfiguration mit einem Turm

Sie erzielen eine optimale Leistung, wenn Sie die Module des Agilent 1290 Infinity Binären LC-Systems in folgender Konfiguration installieren (siehe [Abbildung 25](#) auf Seite 76 und [Abbildung 26](#) auf Seite 77). Diese Konfiguration optimiert den Flussweg hinsichtlich eines minimalen Verzögerungsvolumens und minimiert den Platzbedarf.

Die Agilent 1290 Infinity Binäre Pumpe sollte sich stets ganz unten im Turm befinden.

4 Einrichtung und Installation

Installation des Moduls

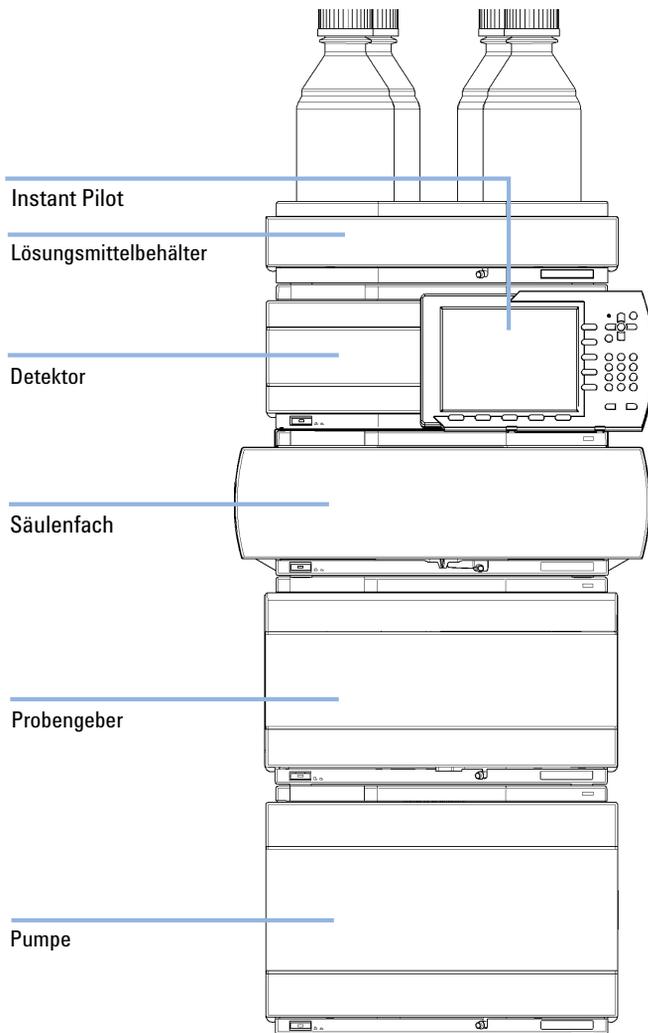


Abbildung 25 Empfohlene Gerätekonfiguration für 1290 Infinity mit binärer Pumpe (Vorderansicht)

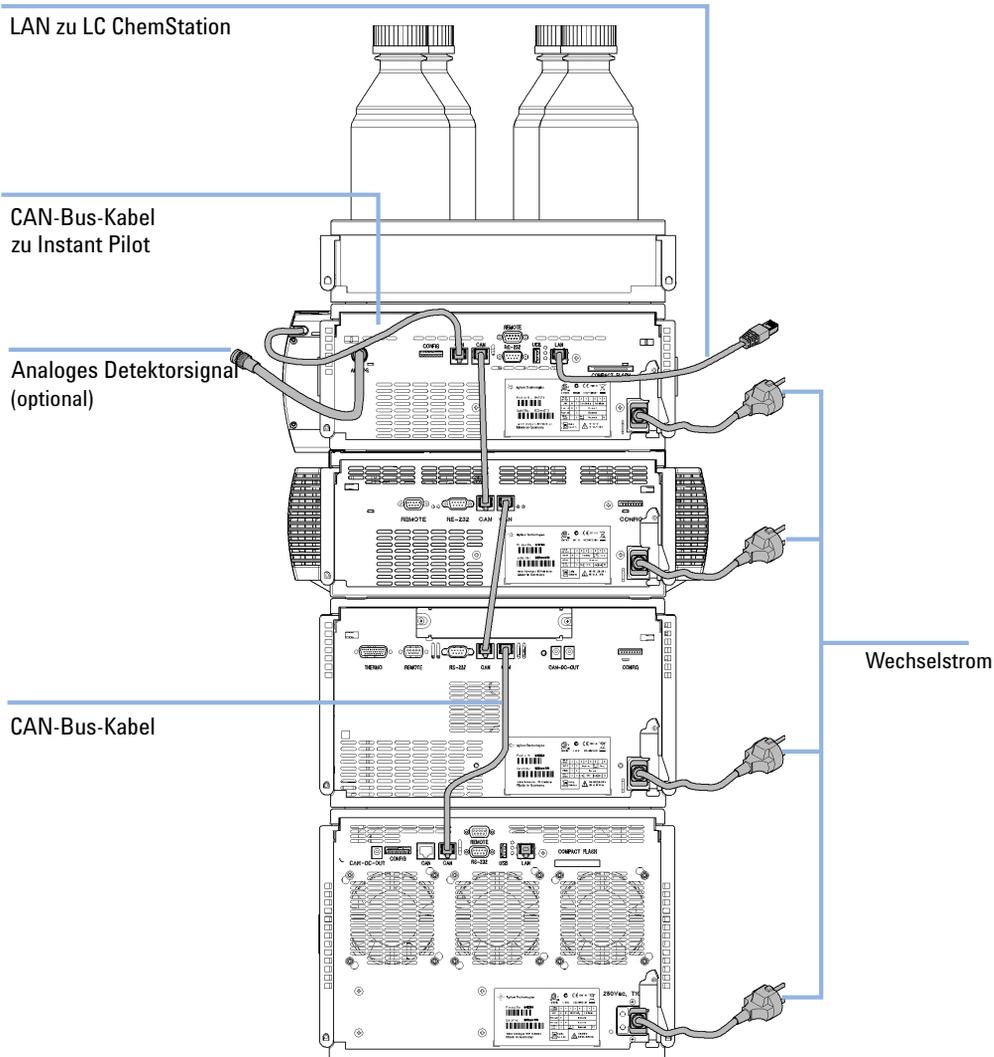


Abbildung 26 Empfohlene Gerätekonfiguration für 1290 Infinity mit binärer Pumpe (Rückansicht)

Konfiguration mit zwei Türmen

Wenn die Thermostateinheit des automatischen Probengebers Bestandteil des Systems ist, wird eine Zwei-Turm-Konfiguration empfohlen. Hier befindet sich unten in jedem Turm jeweils ein schweres Modul (Pumpe 1290 Infinity oder Thermostat) und die Türme werden nicht zu hoch. Einige Benutzer bevorzugen die niedrigere Höhe dieser Anordnung auch ohne Thermostateinheit des automatischen Probengebers. Es wird eine etwas längere Kapillare zwischen der Pumpe und dem automatischen Probengeber benötigt. (Siehe [Abbildung 27](#) auf Seite 78 und [Abbildung 28](#) auf Seite 79).

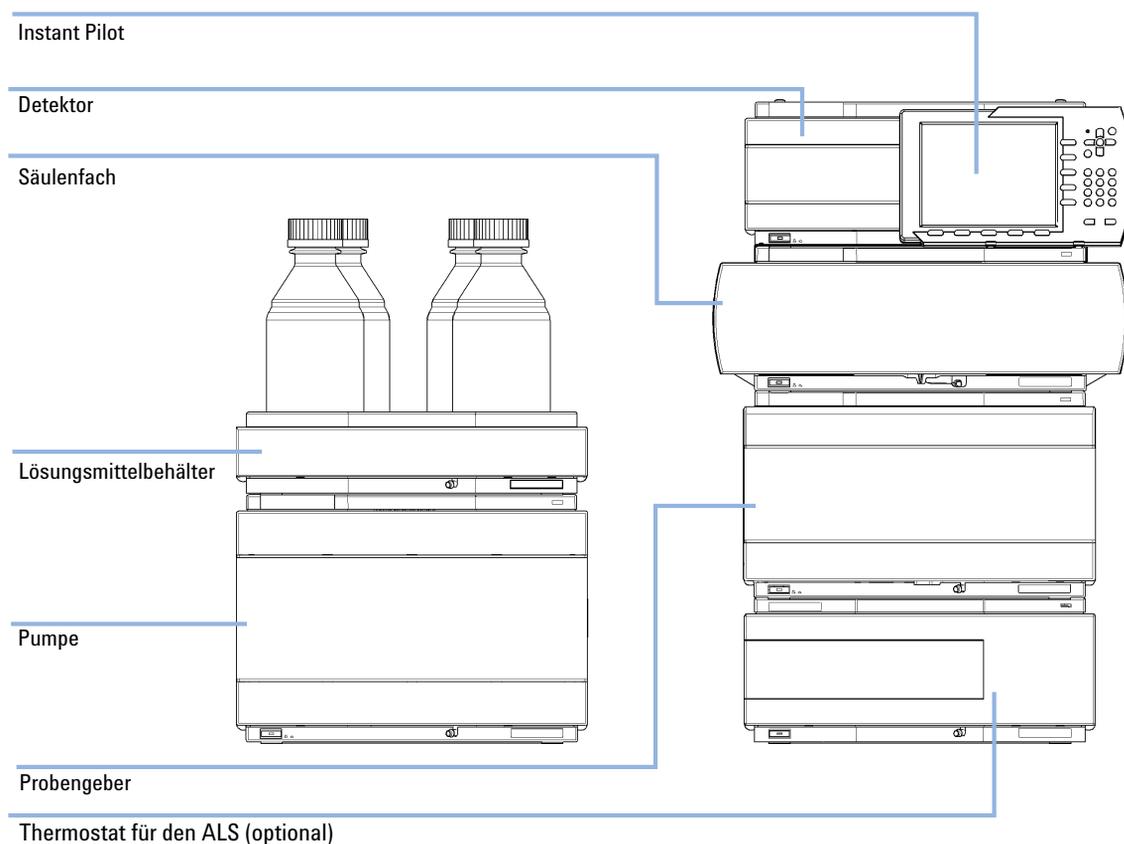


Abbildung 27 Empfohlene Zwei-Turm-Konfiguration für 1290 Infinity mit binärer Pumpe (Vorderansicht)

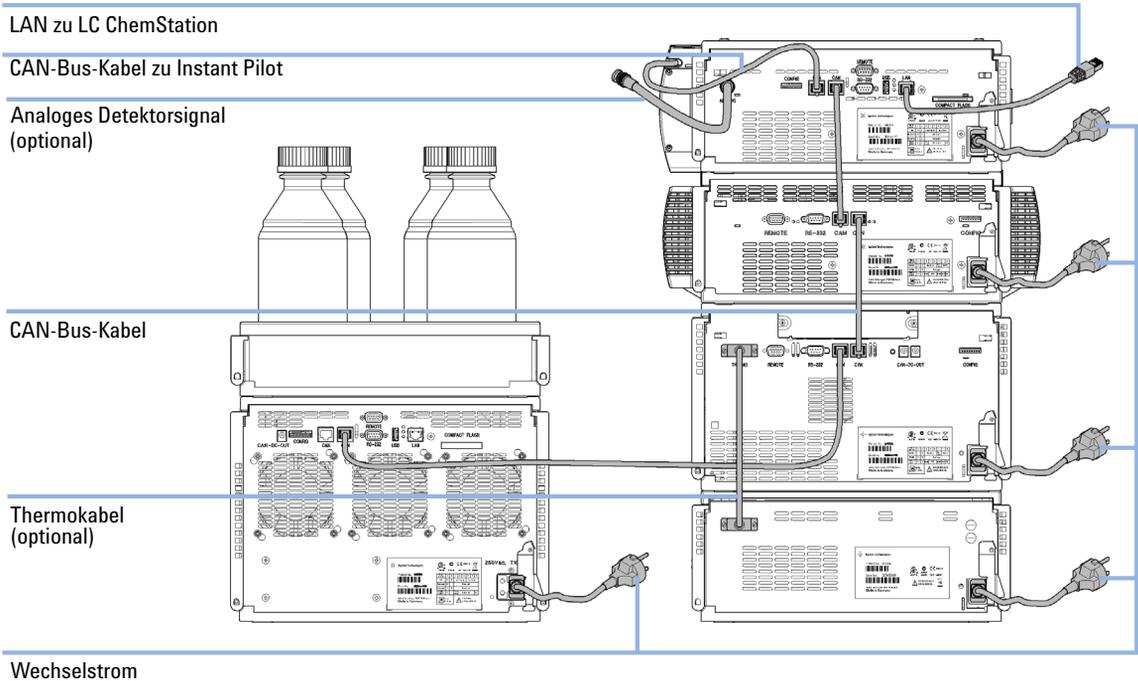


Abbildung 28 Empfohlene Zwei-Turm-Konfiguration für 1290 Infinity mit binärer Pumpe (Rückansicht)

Optimieren der Gerätekonfiguration (Quaternäres LC System)

Anordnung in einem Turm

Sie erzielen eine optimale Leistung, wenn Sie die Module des quaternären LC-Systems Agilent 1290 Infinity in folgender Konfiguration installieren (siehe [Abbildung 29](#) auf Seite 81 und [Abbildung 30](#) auf Seite 82). Diese Konfiguration sorgt für einen optimalen Flussweg mit minimalem Verzögerungsvolumen und minimiert den Platzbedarf.

Die quaternäre Pumpe Agilent 1290 Infinity sollte sich stets ganz unten im Turm befinden.

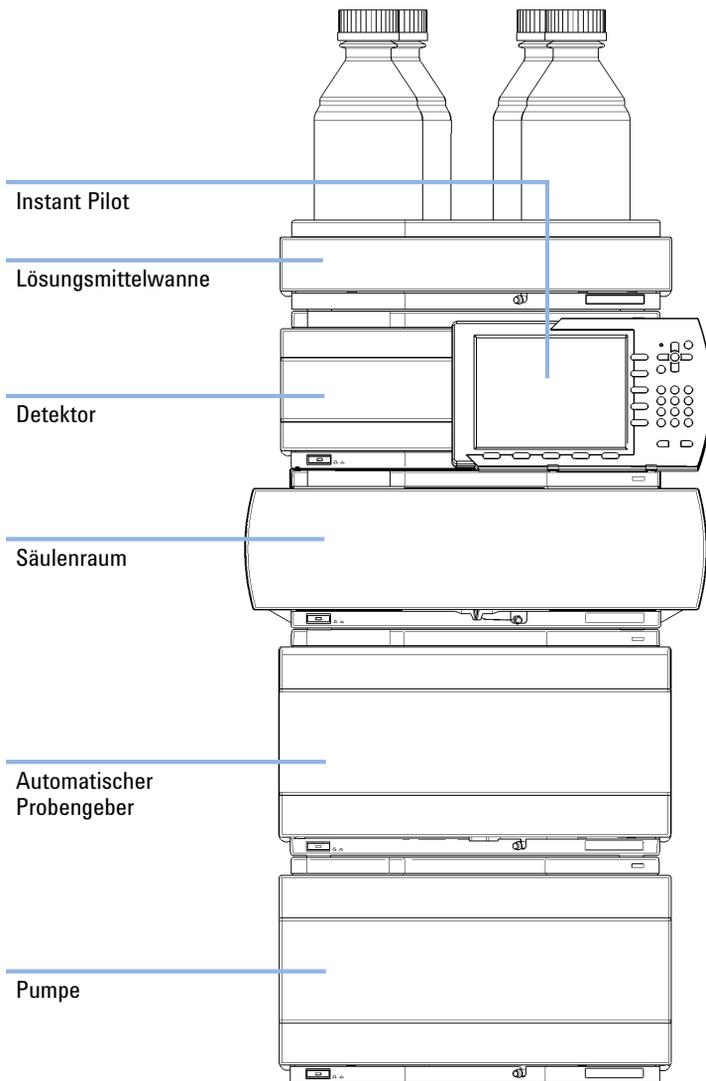


Abbildung 29 Empfohlene Geräteanordnung für 1290 Infinity mit quaternärer Pumpe (Vorderansicht)

4 Einrichtung und Installation

Installation des Moduls

LAN zu Steuerungssoftware

CAN-Bus-Kabel zum Instant Pilot

Analoges Detektorsignal
(optional)

CAN-Bus-Kabel

Wechselstrom

Abbildung 30 Empfohlene Geräteanordnung für 1290 Infinity mit quaternärer Pumpe (Rückansicht)

Anordnung in zwei Türmen

Falls die Thermostateinheit des automatischen Probengebers Bestandteil des Systems ist, wird eine Zwei-Turm-Konfiguration empfohlen. Hier befindet sich unten in jedem Turm jeweils ein schweres Modul (Pumpe 1290 Infinity oder Thermostat) und die Türme werden nicht zu hoch. Einige Benutzer bevorzugen diese Anordnung wegen ihrer niedrigeren Höhe auch dann, wenn keine Thermostateinheit des automatischen Probengebers vorhanden ist. Es wird eine etwas längere Kapillare zwischen der Pumpe und dem automatischen Probengeber benötigt. (Siehe [Abbildung 31](#) auf Seite 83 und [Abbildung 32](#) auf Seite 84).

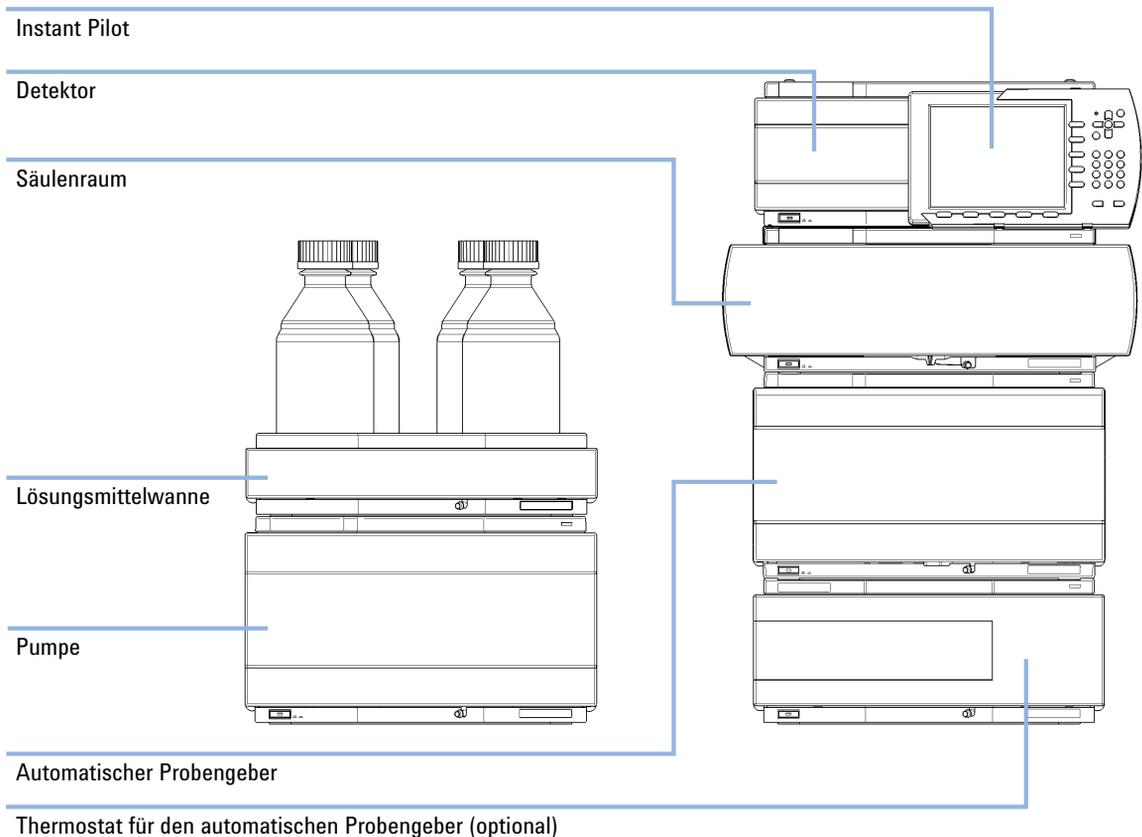


Abbildung 31 Empfohlene Zwei-Turm-Konfiguration für 1290 Infinity mit quaternärer Pumpe (Vorderansicht)

4 Einrichtung und Installation

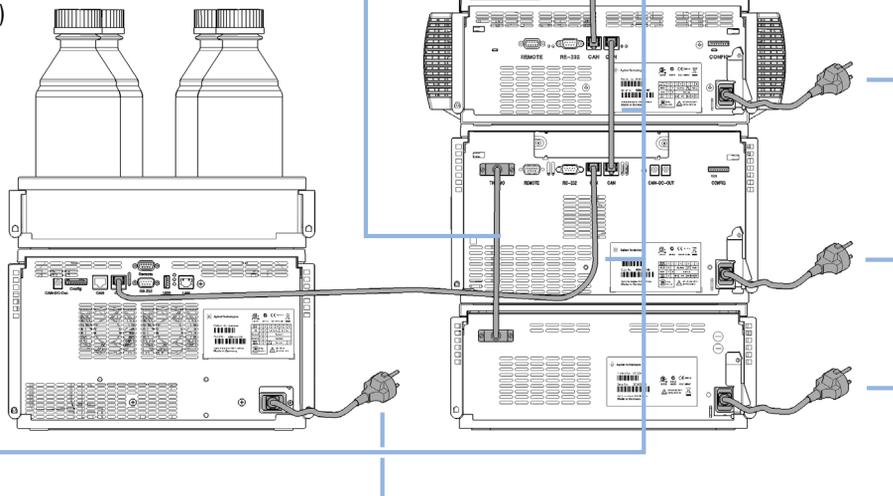
Installation des Moduls

LAN zu Steuerungssoftware

CAN-Bus-Kabel zum Instant Pilot

Analoges Detektorsignal (optional)

Thermo-Kabel (optional)



CAN-Bus-Kabel

Wechselstrom

Abbildung 32 Empfohlene Zwei-Turm-Konfiguration für 1290 Infinity mit quaternärer Pumpe (Rückansicht)

Initialisierung der Pumpe

Dieser Vorgang ist erforderlich, wenn ...

- die Pumpe zum ersten Mal verwendet wird,
- wenn einer oder mehrere der Einlassschläuche Luftblasen enthalten oder aus anderen Gründen trocken sind.

Der Zweck der Initialisierung ist es, alle Luftblasen aus der Pumpe und den Einlassschläuchen zu entfernen.

Propan-2-ol (alternative Bezeichnungen: Isopropanol, Isopropylalkohol, IPA) ist das zur Initialisierung der Pumpe im trockenen Zustand am besten geeignete Lösungsmittel und hat den Vorteil, dass es mit den meisten Lösungsmitteln für die Normalphasen- oder Umkehrphasen-LC mischbar ist (Ziehen Sie eine Löslichkeitstabelle zu Rate, wenn Sie sich nicht sicher sind).

WARNUNG

Giftige, entzündliche und gesundheitsgefährliche Lösungsmittel, Proben und Reagenzien

Der Umgang mit Lösungsmitteln, Proben und Reagenzien kann Gesundheits- und Sicherheitsrisiken bergen.

- Beachten Sie bei der Handhabung dieser Substanzen die geltenden Sicherheitsvorschriften (z. B. durch Tragen von Schutzbrille, Handschuhen und Schutzkleidung), die in den Sicherheitsdatenblättern des Herstellers beschrieben sind, und befolgen Sie eine gute Laborpraxis.
- Das Volumen an Substanzen sollte auf das für die Analyse erforderliche Minimum reduziert werden.
- Das Gerät darf nicht in einer explosionsgefährdeten Umgebung betrieben werden.

HINWEIS

Achten Sie darauf, dass die Lösungsmittelbehälter nicht leer laufen; verwenden Sie hierzu den Flaschenfüllstandsanzeiger. Füllen Sie die Lösungsmittelschläuche mithilfe einer Spritze, die Pumpe pumpt keine Luft.

HINWEIS

Bevor Sie mit dem Verfahren beginnen, stellen Sie sicher, dass alle Lösungsmittleitungen an die Pumpe angeschlossen sind, wie im Installationshandbuch für die Pumpe beschrieben, und dass die Abfallschläuche sicher in einen geeigneten Lösungsmittelabfallbehälter geführt sind. Stellen Sie außerdem sicher, dass die Pumpe von der Computer-Software oder der Instant Pilot Steuereinheit gesteuert wird und dass die Flussrate auf null eingestellt ist.

- 1 Bereiten Sie Kanal A und Pumpenkopf A für die Initialisierung vor:
 - a Füllen Sie zur Initialisierung der Pumpe alle Lösungsmittelbehälter teilweise mit etwa 150 ml HPLC-reinem Propan-2-ol und platzieren Sie die Enden der Lösungsmittelschläuche mit den Sinterglasfiltern in die Lösungsmittelbehälter.
 - b Ziehen Sie den Schlauch, der zum Einlass-Rückschlagventil von Pumpenkopf A hinführt, ab. Dies ist der Auslassschlauch des Vakuumentgasers von Kanal A.
 - c Befestigen Sie die Initialisierungsspritze mit dem Gewindeadapter am Schlauch.
 - d Ziehen Sie langsam Lösungsmittel durch den Schlauch, bis alle Blasen daraus entfernt sind.
 - e Nehmen Sie schnell die Spritze und den Adapter vom Schlauch ab und befestigen Sie den Schlauch am Einlass-Rückschlagventil von Pumpenkopf A.
- 2 Wiederholen Sie den vorigen Schritt für Lösungsmittelkanal B und Pumpenkopf B.
- 3 Wenn ein Lösungsmittelauswahlventil (SSV) in der Pumpe installiert ist, führen Sie für jeden der verbliebenen leeren Lösungsmittelschläuche die folgenden Schritte aus:
 - a Ziehen Sie den leeren Schlauch am Lösungsmittelauswahlventil ab. Befestigen Sie die Initialisierungsspritze mit dem Gewindeadapter am Schlauch.
 - b Ziehen Sie langsam Lösungsmittel durch den Schlauch, bis alle Blasen daraus entfernt sind.
 - c Nehmen Sie schnell die Spritze und den Adapter vom Schlauch ab und befestigen Sie den Schlauch wieder am Lösungsmittelauswahlventil.

- 4 Wenn Sie die ChemStation-Software verwenden, klicken Sie mit der rechten Maustaste auf den Pumpenabschnitt im Systemdiagramm und wählen Sie dann **Prime On** im Kontextmenü (nicht verwechseln mit dem Befehl **Purge On**). Andere Steuereinheiten haben eine ähnliche Funktion.

Das Spülventil schaltet die Flusswege A und B in die Abfallposition und initialisiert gleichzeitig beide Kanäle. Das Modul saugt mit hoher Geschwindigkeit und mit allen vier Pumpenantrieben gleichzeitig Lösungsmittel an und gibt es an die Abfallposition des automatischen Spülventils ab. Dies wird 20-mal wiederholt; anschließend endet die Initialisierung. Das Spülventil schaltet den Flussweg zurück in Richtung System.

Es ist empfehlenswert, die beiden Kanäle nun mit 30 ml Propan-2-ol zu spülen. Gehen Sie vor wie in [“Spülen der Pumpe”](#) auf Seite 87 beschrieben.

Spülen der Pumpe

Das Spülverfahren wird für die 1290 Infinity Binäre Pumpe beschrieben. Es kann auf die gleiche Weise auch für die 1290 Infinity Quaternäre Pumpe ausgeführt werden.

- Wenn die Pumpe zum ersten Mal initialisiert wurde.
- Wenn die Pumpe vor Verwendung des Systems mit frischem Lösungsmittel gespült werden soll oder wenn das Lösungsmittel gegen ein anderes ausgetauscht werden soll.
- Wenn die Pumpe einige Stunden oder länger nicht in Betrieb war (möglicherweise ist Luft in die Lösungsmittelleitungen hineindiffundiert, so dass Spülen empfehlenswert ist).
- Wenn die Lösungsmittelbehälter neu gefüllt werden und die Pumpe gespült werden muss, damit das System mit dem frischen Lösungsmittel gefüllt werden kann. Wenn unterschiedliche Lösungsmittel verwendet werden sollen, stellen Sie sicher, dass das neue Lösungsmittel mit dem alten mischbar ist und fügen Sie nötigenfalls einen Zwischenschritt mit einem mischbaren Lösungsmittel ein (Isopropanol ist meist eine gute Wahl; ziehen Sie eine Löslichkeitstabelle zu Rate).

Die Einlassschläuche zur Pumpe sollten bereits mit Lösungsmittel gefüllt sein. Wenn die Einlassschläuche teilweise oder völlig trocken sind, führen Sie die vollständige Initialisierung aus (siehe [“Initialisierung der Pumpe”](#) auf Seite 85).

4 Einrichtung und Installation

Installation des Moduls

Über das Spülventil lassen sich beide Pumpenköpfe gleichzeitig an den Abfallbehälter anschließen und bei ihrer jeweiligen maximalen Flussrate von 5 ml/min spülen, was insgesamt einen Spülfluss von 10 ml/min mit einer Zusammensetzung von 50/50 ergibt.

WARNUNG

Giftige, entzündliche und gesundheitsgefährliche Lösungsmittel, Proben und Reagenzien

Der Umgang mit Lösungsmitteln, Proben und Reagenzien kann Gesundheits- und Sicherheitsrisiken bergen.

- Beachten Sie bei der Handhabung dieser Substanzen die geltenden Sicherheitsvorschriften (z. B. durch Tragen von Schutzbrille, Handschuhen und Schutzkleidung), die in den Sicherheitsdatenblättern des Herstellers beschrieben sind, und befolgen Sie eine gute Laborpraxis.
 - Das Volumen an Substanzen sollte auf das für die Analyse erforderliche Minimum reduziert werden.
 - Das Gerät darf nicht in einer explosionsgefährdeten Umgebung betrieben werden.
-

- 1 Zum Aufrufen der Einrichtungsseite für die Steuerung des Spülventils klicken Sie mit der rechten Maustaste auf den Abschnitt Pumpe und wählen Sie **Control** aus dem Kontextmenü.

Alternativ dazu können Sie **Gerät > Mehr 1290 Infinity BinPump > Steuerung** wählen.

- 2 Stellen Sie im Abschnitt **Purge** die folgenden Parameter ein:

- **Duration:** 6 min
- **Flow:** 10 ml/min
- **Composition B:** 50 %

Composition A wird automatisch auf 50 % gesetzt. Lassen Sie die Schaltfläche Ein/Aus auf **Off**. Klicken Sie zum Beenden auf **OK**.

4 Einrichtung und Installation

Installation des Moduls

- 3 Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf den Pumpenabschnitt und wählen Sie **Purge On** aus dem Kontextmenü.

HINWEIS

Verwechseln Sie **Purge On** nicht mit dem nächsten Befehl **Prime On**.

Das Spülventil schaltet nun den Flussweg in die Spülposition und spült mit 5 ml/min jeweils für 6 Minuten beide Kanäle gleichzeitig in Richtung Abfallbehälter. Nach dem festgelegten Zeitraum wird der Spülfluss ausgeschaltet, das Ventil schaltet den Flussweg wieder zurück in Richtung System und die Flussrate sowie die Zusammensetzung, die bei der Methode aktuell eingestellt sind, werden wiederaufgenommen. Bei diesem Beispiel ist der Fluss immer noch auf null eingestellt. Die auf der Seite **Control** in den Schritten 1 und 2 vorgenommenen Einstellungen für die Spülung bleiben erhalten. So kann das Spülverfahren, wenn es wieder nötig ist, bei Schritt 3 begonnen werden.

Wenn die Pumpe initialisiert und mit Propan-2-ol gespült wurde, können die Lösungsmittel gegen die Lösungsmittel der mobilen Phase wie beispielsweise Wasser und Methanol ausgetauscht werden. Das Spülverfahren wird wiederholt, wann immer ein Lösungsmittel ausgetauscht wird. Unmittelbar nach dem Spülen ist das Lösungsmittel in der Pumpe nicht entgast. Das System sollte daher für mindestens 10 min betrieben werden, so dass das Lösungsmittel entgast werden kann.

Flüssigkeitsanschlüsse zwischen Modulen

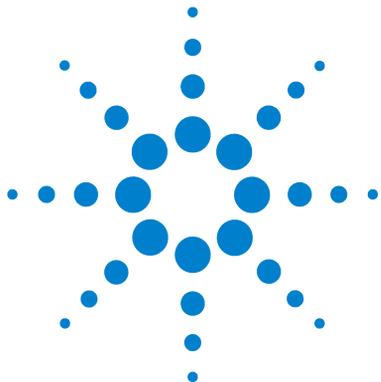
Spülen Sie beim Verbinden der Module stets jede einzelne Kapillare und die Säule mit Lösungsmittel, bevor Sie die nächste Komponente des Flusswegs anschließen.

- 1** Schließen Sie den Auslass des Jet Weaver-Mischers mit einer flexiblen Edelstahlkapillare mit 0,12 mm Innendurchmesser am automatischen Probengeber an (die Farbmarkierung ist rot). Die Verbindung sollte über Anschluss Nr. 1 am Injektionsventil des Probengebers erfolgen.
- 2** Verbinden Sie mit einer flexiblen Edelstahlkapillare mit Innendurchmesser 0,12 mm den Anschluss Nr. 6 am Injektionsventil des Probengebers mit dem Säulenthermostaten. Schließen Sie, um ein geringes Verzögerungsvolumen zu erhalten, die Kapillare direkt am Wärmeaustauscher für geringe Dispersion oder, falls installiert, am Schaltventil an.
- 3** Verbinden Sie den Auslass der Säule mit dem Einlass (markiert mit CELL-IN, linker Anschluss) der Max-Light-Kartuschenzelle im 1290 Infinity Detektor.
- 4** Schließen Sie den Abfallschlauch am Auslass (markiert mit CELL-OUT, rechter Anschluss) der Max-Light-Kartuschenzelle im 1290 Infinity Detektor an und platzieren Sie den Schlauch in einen geeigneten Abfallsammelbehälter.

Integration in ein Netzwerk

Informationen zur Integration Ihres Systems in ein Netzwerk finden Sie in den Benutzerhandbüchern der einzelnen Module (Kapitel *LAN-Konfiguration*).

4 **Einrichtung und Installation** Installation des Moduls



5 Schnellstart-Anleitung

Über die Schnellstart-Anleitung	94
Vorbereitung des Systems	95
EIN-Schalten des Systems	95
Laden der Standardmethode	96
Konfigurieren des Online-Plot	97
Spülen der Pumpe	99
Datenerfassung in der Ansicht Methoden- und Analysenkontrolle	100
Methodenparameter für die Testmischung und die ZORBAX RRHD Säule	100
Einrichtung der Methode	102
Ausführen der Methode mit einer einzelnen Injektion	105
Schnelleres Ausführen der Methode	107
Datenanalyse	109
Ansicht Datenanalyse	110
Integrieren eines Signals	111
Spezifizieren des Berichts	113

Dieses Kapitel enthält Informationen zur Datenerfassung und Datenanalyse mit dem 1290 Infinity LC System.



Über die Schnellstart-Anleitung

Dieses Kapitel enthält Informationen zum Betrieb des Agilent 1290 Infinity LC Systems. Sie kann als Anleitung für die schnelle Durchführung einer ersten Analyse nach der Installation verwendet werden und gleichermaßen zur Übung wie auch zur ersten Übersicht über die Funktion des Systems insgesamt dienen. Sie enthält außerdem ausführlichere Informationen über die Methodenparameter.

An diesem Beispiel wird die Einrichtung einer Methode und die Durchführung einer Analyse mit der Säule und der Testprobe demonstriert, die mit dem 1290 Infinity LC System mitgeliefert wird. Das Beispiel bezieht sich auf Menüs und Befehle in der OpenLAB CDS ChemStation Edition, jedoch sind identische Funktionen auch bei den alternativen Steuerungsoptionen wie der OpenLAB CDS EZChrom Edition, der Instant Pilot Steuereinheit und der MassHunter-Software verfügbar.

HINWEIS

Damit begonnen werden kann, sollte das System installiert, eingeschaltet und initialisiert sein (siehe ["Initialisierung der Pumpe"](#) auf Seite 85). Die UV-Lampe sollte mindestens 30 Minuten vor Beginn der quantitativen Analyse eingeschaltet worden sein.

Vorbereitung des Systems

EIN-Schalten des Systems

Wenn das System nicht bereits eingeschaltet und die Software im Betriebszustand Ready ist, führen Sie diese Schritte durch:

- 1 Schalten Sie das Computer-System ein und warten Sie, bis der Windows Desktop angezeigt wird.
- 2 Schalten Sie die Stromversorgung der LC-Module mit dem Schalter links unten an den einzelnen Modulen ein.

In der Mitte des Schalters leuchtet ein grünes Kontrolllicht auf.

- 3 Starten Sie die Steuerungssoftware auf dem Computer durch Klicken auf das entsprechende Symbol (wenn konfiguriert). Alternativ können Sie **Start > Alle Programme > Agilent Technologies > OpenLAB > OpenLAB Teilfenster** wählen. Wählen Sie im Navigationsfenster unter **Instruments** das entsprechende Gerät und klicken Sie auf **Launch online**.

Die ChemStation-Software wird in der Ansicht **Method and Run Control** gestartet. Die Module befinden sich anfangs im Modus Standby und Not Ready, ausgenommen der automatische Probengeber, der sofort initialisiert wird und in den Modus Ready übergeht.

- 4 Um jedes Modul einzeln einzuschalten, klicken Sie mit der rechten Maustaste auf das entsprechende Symbol und wählen Sie **Switch [module name] on** aus dem Kontextmenü.

Alternativ dazu können Sie alle Module gleichzeitig einschalten, indem Sie auf die Schaltfläche **System On/Off** links unten im Systemdiagramm klicken. Der Systemstatus ändert sich, nach einer kurzen Wartezeit für das Erreichen der Gerätesollwerte, von *Not Ready* (gelbes Licht) nach *Ready* (grünes Licht).

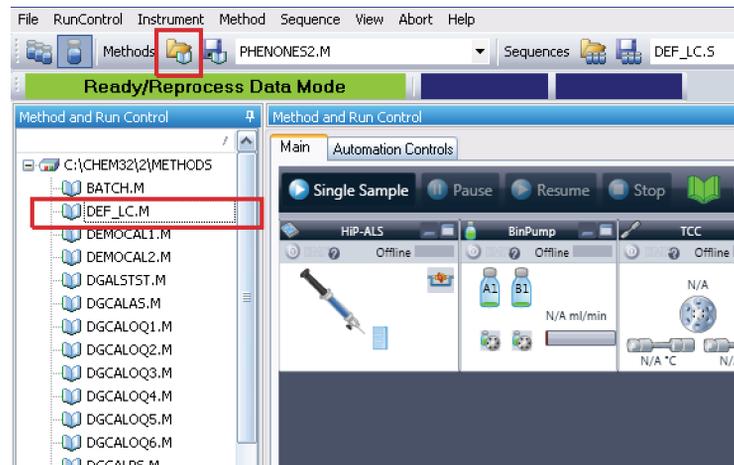
Laden der Standardmethode

Die ChemStation bietet eine Standardmethode mit der Bezeichnung **DEF_LC.M**, die beim ersten Einschalten, oder wann immer eine neue leere Methodenvorlage erforderlich ist, geöffnet wird. Sie enthält Standardeinstellungen für alle Module.

Mit diesem Verfahren laden Sie die Methode **DEF_LC.M**. Sie können sie zum Einstellen sämtlicher Parameter auf die Standardwerte benutzen oder als Methodenvorlage für die Einrichtung einer neuen Methode.

- 1 Rufen Sie die Ansicht **Method and Run Control** der ChemStation auf.
- 2 Wählen Sie in der Menüleiste **Methode > Neue Methode ...** und wählen Sie anschließend **DEF_LC.M** aus dem Kontextmenü.

Alternativ dazu können Sie das Symbol **Load Method**  unter der Menüleiste verwenden oder Sie können auf den Methodennamen **DEF_LC.M** auf der Registerkarte **Methoden** im Navigationsfenster doppelklicken.



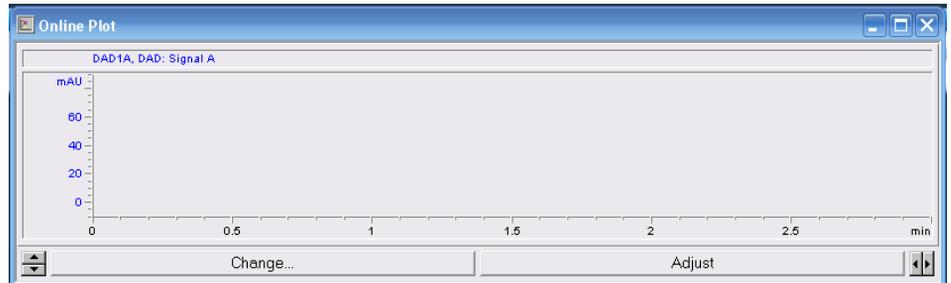
Die Standardmethode (**DEF_LC.M**) bietet einen Satz Standardparameter, die zur Einrichtung einer neuen Methode modifiziert werden können. Beispielsweise ist die Flussrate auf null gesetzt und die **Method Information** und die **Method History** sind leer.

HINWEIS

Beachten Sie, dass diese Methode nicht mit neuen Parametern überschrieben werden kann. Klicken auf **Save** führt daher direkt zur Funktion **Save As...**, so dass Sie einen neuen Methodennamen eingeben müssen.

Konfigurieren des Online-Plot

- 1 Wenn das Fenster **Online Plot** nicht sichtbar ist: Klicken Sie auf **Ansicht > Online-Signale > Signalfenster 1**, um das Fenster einzublenden.



- 2 Zum Konfigurieren der gewünschten Signale im Fenster **Online Plot** klicken Sie auf **Change....**

Die Einrichtungsseite **Edit Signal Plot** wird geöffnet.

5 Schnellstart-Anleitung

Vorbereitung des Systems

- 3 Markieren Sie im Feld **Available Signals** die gewünschten Signale und klicken Sie auf **Add**, um sie in das Feld **Selected Signals** zu transferieren.
- 4 Zum Konfigurieren der einzelnen Einstellung für jedes Signal markieren Sie das Signal im Feld **Selected Signal** und geben Sie die erforderlichen Werte in der unteren Hälfte der Seite ein.

HINWEIS

Zusätzlich zu den Detektorsignalen können auch Parameter wie die Temperatur und der Druck geplottet werden. Mit der Schaltfläche **Apply to Method** können die Einstellungen auf dieser Seite in der Methode gespeichert werden.

Das Fenster **Online Plot** verhält sich wie eine elektronische Flip-Chart und gibt kontinuierlich die vom Detektor/von den Detektoren ausgegebenen Werte und andere Ausgabeparameter wieder. Die Signale werden rechts im Fenster gezeichnet und bewegen sich nach links. Bis zu 90 min zurückliegender Daten sind zugänglich. Dies ist nützlich für die Überprüfung der Basislinie und für Vergleiche mit vorangegangenen Injektionen. Die X- und die Y-Achse können mit den Auf/Ab-Schaltflächen an jeder Achse direkt angepasst werden.

Mit der Schaltfläche **Adjust** im **Online Plot**-Fenster lässt sich der aktuelle Punkt des ausgewählten Signals zur Nulllinie bewegen. Das ausgewählte Signal wird durch die Farbe der Y-Achsenbeschriftung angezeigt. Ein spezielles Signal kann durch Klicken auf das Signal oder durch Klicken auf die entsprechende Signalbeschreibung oben im Plot ausgewählt werden.

Durch Drücken der Schaltfläche **Balance** werden alle Detektoren auf null gesetzt.

HINWEIS

Auf der Seite **Online Plot** vorgenommene Änderungen wirken sich nicht auf die in den einzelnen Datendateien gespeicherten Daten aus.

Spülen der Pumpe

Spülen Sie die Pumpe, wenn ...

- die Pumpe zum ersten Mal initialisiert wurde,
- die Pumpe vor Verwendung des Systems mit frischem Lösungsmittel gespült werden soll oder wenn das Lösungsmittel gegen ein anderes ausgetauscht werden soll;
- die Pumpe einige Stunden oder länger nicht in Betrieb war (möglicherweise ist Luft in die Lösungsmittelleitungen hineindiffundiert, so dass Spülen empfehlenswert ist).
- die Lösungsmittelbehälter neu gefüllt werden und die Pumpe gespült werden muss, damit das System mit dem frischen Lösungsmittel gefüllt werden kann; Wenn unterschiedliche Lösungsmittel verwendet werden sollen, stellen Sie sicher, dass das neue Lösungsmittel mit dem alten mischbar ist und fügen Sie nötigenfalls einen Zwischenschritt mit einem mischbaren Lösungsmittel ein (Isopropanol ist meist eine gute Wahl; ziehen Sie eine Löslichkeitstabelle zu Rate).

Weitere Einzelheiten zum Spülverfahren finden Sie unter [“Spülen der Pumpe”](#) auf Seite 87.

Datenerfassung in der Ansicht Methoden- und Analysenkontrolle

In diesem Abschnitt werden alle Methodenverfahren und -einstellungen für die 1290 Infinity Binäre Pumpe beschrieben. Sie können auf die gleiche Weise auch für die 1290 Infinity Quaternäre Pumpe ausgeführt werden.

Methodenparameter für die Testmischung und die ZORBAX RRHD Säule

Das 1290 Infinity LC System wird geliefert mit einer Säule ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 1,8 µm, 2,1 mm x 50 mm und einer Testmischung, die Phenone enthält und bei dieser Beispielanalyse verwendet werden kann.

Die Phenon-Testmischung (Bestellnummer 5188-6529) enthält neun Komponenten, jeweils mit einer Konzentration von 100 ng/µl, in Wasser/Acetonitril (65/35). Die neun Komponenten sind:

- Acetanilid
- Acetophenon
- Propiophenon
- Butyrophenon
- Benzophenon
- Valerophenon
- Hexanophenon
- Heptanophenon
- Octanophenon

Die Methodenparameter für die Trennung dieser Testmischung sind in [Tabelle 9](#) auf Seite 101 zusammengefasst.

Tabelle 9 Methodenparameter für die erste Trennung

Modul	Parameter	Einstellung
Pumpe	Lösungsmittel A	Wasser
	Lösungsmittel B	Acetonitril
	Flussrate	0,4 ml/min
	Anfängliche Zusammensetzung	60 % A, 40 % B
	Gradientenzeitplan	Nach 4 Minuten 20 % A, 80 % B
	Stopzeit	5 Minuten
Automatischer Probengeber	Injektion	1 µl
	Nadelreinigung	Spülanschluss, 6 s
Säulenthermostat	Säule	ZORBAX Eclipse Plus C18 1,8 µm, 2,1 mm x 50 mm Innendurchmesser
	Temperatur	40 °C
Detektor	Signal A	250 nm, BW 100 nm, Ref. 360 nm, BW 100 nm
	Peakbreite	0,025 min (10 Hz)
	Spektren speichern	Alle

Einrichtung der Methode

In diesem Abschnitt wird, unter Verwendung der Bedingungen für die Testmischung, beschrieben, wie die Methodenbedingungen für eine Analyse rasch eingestellt werden können. Eine ausführlichere Darstellung der verfügbaren Parameter finden Sie im Anhang, [“Einrichtung einer Methode mithilfe von Edit Entire Method”](#) auf Seite 121.

Die Standardmethode **DEF_LC.M** wurde geladen und ist bereit für die Vorbereitung der neuen Methode. Nun können zum Erstellen der neuen Methode die Schlüsselparameter bearbeitet werden. Stellen Sie für die hier beschriebene Beispielanalyse die in [Tabelle 9](#) auf Seite 101 aufgelisteten Bedingungen ein.

- 1 Um rasch auf die Seite **Method** für die einzelnen Module zuzugreifen, klicken Sie mit der rechten Maustaste auf das Diagramm für das Modul und wählen Sie **Method...** aus dem Kontextmenü.

Auf diese Weise werden alle Module eingerichtet.

- 2 Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf den Pumpenbereich und wählen Sie **Method...** aus dem Kontextmenü.

- a Geben Sie auf der Seite **Method** für die **1290 Infinity Binary Pump** die folgenden Parameter ein:
 - Flussrate: 0,4 ml/min
 - Lösungsmittel A: Wählen Sie **Water** aus der Dropdown-Liste Kompressibilität.
 - Lösungsmittel B: Klicken Sie das Kontrollkästchen an, um Lösungsmittel B zu aktivieren.
 - % B: Anfangswert 40 %
 - Stoppzeit: 5 min
 - Oberer Druckgrenzwert: 1200 bar
- b Klicken Sie auf das **+**-Zeichen, um den **Timetable** zu öffnen.
- c Fügen Sie eine Zeile hinzu, wählen Sie **Change Solvent Composition** und setzen Sie % B auf 80 %
- d Für die anderen Parameter können die Standardeinstellungen beibehalten werden. Klicken Sie zum Schließen des Fensters auf **OK**.
Die Änderungen werden an das Pumpenmodul gesendet.

- 3 Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf den Probengeberbereich und wählen Sie **Method...** aus dem Kontextmenü.
 - a Geben Sie auf der Seite **Method** für den **1290 Infinity Autosampler** die folgenden Parameter ein:
 - Injektionsvolumen: 1,0 µl
 - Injektion mit Nadelreinigung
 - Modus Spülanschluss, Zeit: 6 s
 - b Für die anderen Parameter können die Standardeinstellungen beibehalten werden. Klicken Sie zum Schließen des Fensters auf **OK**.

Die Änderungen werden an das Probengebermodul gesendet.
- 4 Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf den Säulenthmostatbereich und wählen Sie **Method...** aus dem Kontextmenü.
 - a Geben Sie auf der Seite **Method** für den **1290 Infinity TCC** die folgenden Parameter ein:
 - Temperatursollwert links 40 °C
 - Temperatur rechts Kombiniert
 - b Für die anderen Parameter können die Standardeinstellungen beibehalten werden. Klicken Sie zum Schließen des Fensters auf **OK**.

Die Änderungen werden an das TCC-Modul gesendet.
- 5 Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf den Diodenarray-Detektor-Bereich und wählen Sie **Method...** aus dem Kontextmenü.
 - a Geben Sie auf der Seite **Method** für den **1290 Infinity DAD** die folgenden Parameter ein:
 - **Use Signal:** Schalten Sie außer **Signal A** alle Signale aus, indem Sie die Häkchen in den entsprechenden Kontrollkästchen entfernen.
 - Signal A: 250 nm, BW 100 nm, Ref. 360 nm, BW 100 nm
 - Peakbreite: 0,012 min (0,25 s Ansprechen, 20 Hz)
 - b Im Abschnitt **Advanced** setzen Sie **Spectrum Store** auf **All**.
 - c Für die anderen Parameter können die Standardeinstellungen beibehalten werden. Klicken Sie zum Schließen des Fensters auf **OK**.

Die Änderungen werden an das DAD-Modul gesendet.
- 6 Nun sind alle erforderlichen Methodenparameter eingegeben. Wählen Sie **Methode > Methode speichern unter ...**, um die Methode unter einem neuen Namen zu speichern.

5 Schnellstart-Anleitung

Datenerfassung in der Ansicht Methoden- und Analysenkontrolle

Die ChemStation lässt nicht zu, dass die Methode als **DEF_LC.M** gespeichert wird, damit die Standardmethodenvorlage nicht verändert wird.

- 7 Lassen Sie das System sich für mindestens 10 min äquilibrieren und prüfen Sie im **Online Plot**, ob die Basislinie stabil ist, bevor Sie die Analyse beginnen.

Ausführen der Methode mit einer einzelnen Injektion

In diesem Abschnitt wird beschrieben, wie eine einzelne Injektion der Testmischung unter Verwendung der im vorigen Abschnitt eingegebenen Bedingungen analysiert wird.

Analysen mit der ChemStation können in zwei Modi ausgeführt werden:

- **Run Method:** einzelne Injektionen, zum Beispiel bei der interaktiven Methodenentwicklung unter Verwendung der aktuellen Einstellungen;
- **Run Sequence:** automatische Serie von Injektionen aus mehreren Flaschen, evtl. mit mehreren Methoden. Weitere Einzelheiten finden Sie in den ChemStation-Handbüchern.

- 1 Klicken Sie auf das Symbol **Select Run Method Task** .
- 2 Wenn die erforderlichen Methodenbedingungen aktuell nicht geladen sind, wählen Sie **Methode > Methode laden** oder das Symbol  unter der Menüleiste, um sie zu laden.

HINWEIS

Wenn Änderungen vorgenommen wurden, die noch nicht gespeichert sind, wird dies durch ein gelbes Sternchen am Symbol Methodenstatus angezeigt. Die Injektion kann ohne vorheriges Speichern der Parameteränderungen vorgenommen werden. Die ChemStation speichert stets eine Kopie der Aufnahmeparameter in der Datendatei als ACQ.TXT, um sicherzustellen, dass die ursprünglichen Methodenparameter erhalten bleiben.

- 3 Setzen Sie die Probenflasche in Position 1. Dies ist die vordere von den 10 Positionen für 2 ml-Flaschen auf der rechten Seite des Probentellers.
- 4 Wählen Sie **Analyststeuerung > Probeninfo** geben Sie den Namen für ein **Subdirectory** (optional), den **Filename**, die Proben**Location** (**Flasche 1**), den **Sample Name** und gegebenenfalls einen **Comment**.
- 5 Wenn das System bereits äquilibriert und die Basislinie stabil ist, klicken Sie auf **Run Method** auf der Seite **Sample Info**, um die Injektion zu starten. Alternativ dazu klicken Sie auf **OK** und wenn Sie bereit sind, klicken Sie auf die Schaltfläche **Start Single Sample** über dem Systemdiagramm.
- 6 Die Injektion wird durchgeführt und das Chromatogramm wird im **Online Plot** angezeigt. Die Datenerfassung wird beendet, wenn die **Stop Time** erreicht ist.

Das Chromatogramm sollte ähnlich wie das in [Abbildung 33](#) auf Seite 107 aussehen, allerdings mit längerer Zeitachse, da das Chromatogramm in der

5 Schnellstart-Anleitung

Datenerfassung in der Ansicht Methoden- und Analysenkontrolle

Abbildung unter den im nächsten Abschnitt beschriebenen Bedingungen in einem Viertel der Zeit aufgenommen wurde.

Schnelleres Ausführen der Methode

Der erste Versuch wurde bei einem Druck durchgeführt, wie er in einem Standardsystem erreichbar ist. Nun wird die Flussrate erhöht und der Gradient für eine schnellere Trennung angepasst.

- 1 Bearbeiten Sie die Methodenbedingungen wie im vorigen Abschnitt beschrieben und nehmen Sie die folgenden Änderungen vor:
 - Flussrate: 1,6 ml/min
 - Gradient: Ändern Sie den Gradienten so, dass die Steigung des Gradienten im Hinblick auf das Volumen im Vergleich zur ersten Analyse gleich bleibt. Der Fluss wurde um den Faktor 4 erhöht, verringern Sie daher die Gradientenzeit um den Faktor 4. Setzen Sie die Gradientenzeit auf 1 min.
 - Stoppzeit: 1,25 min
- 2 Speichern Sie die Methode unter einem neuen Namen.
- 3 Stellen Sie sicher, dass in **Sample Info** ein neuer Dateiname verwendet wird.
- 4 Wenn die Basislinie stabil und das System äquilibriert ist, starten Sie die Analyse mit der Schaltfläche **Start Single Sample**.

Das Chromatogramm sollte ähnlich aussehen wie das unten gezeigte mit einer Laufzeit von etwa 1 min.

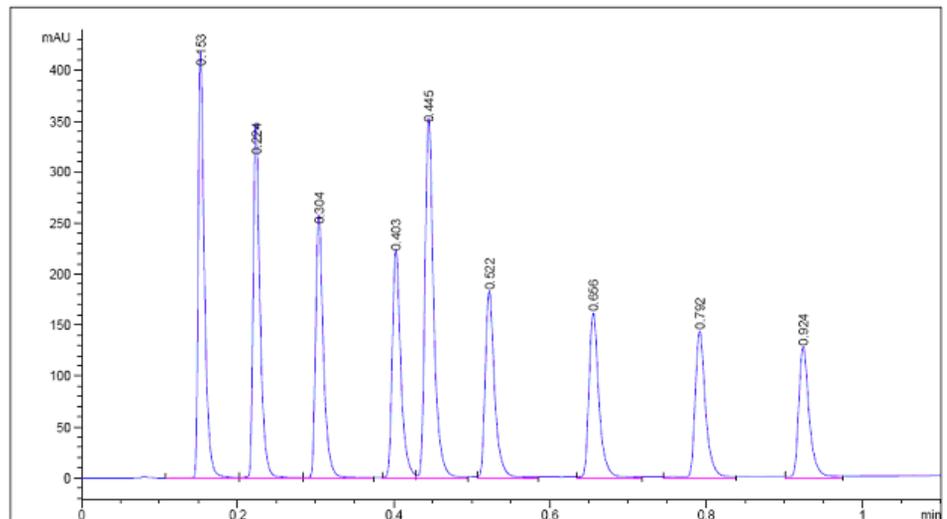


Abbildung 33 Beispielchromatogramm der Phenon-Testmischung, erstellt mit den Quick Start-Bedingungen

5 Schnellstart-Anleitung

Datenerfassung in der Ansicht Methoden- und Analysenkontrolle

Diese Trennung ist mit den aktuellen Bedingungen noch nicht optimiert und möglicherweise möchte der Anwender mehr Erfahrungen mit dem System sammeln, indem er versucht, die Methode weiter zu verbessern. Folgende Änderungen können dazu beitragen:

- Reduzieren Sie die Konzentration der Probe durch Verdünnen um den Faktor 10.
- Erweitern Sie den Bereich des Gradienten.
- Erhöhen Sie die Temperatur.
- Untersuchen Sie die Spektren der Peaks und wählen Sie eine geeignete schmalere Bandbreite.

Weitere Einzelheiten zur Optimierung finden Sie unter [“Optimieren des Agilent 1290 Infinity LC Systems”](#) auf Seite 39.

Datenanalyse

Eine Methode in der ChemStation enthält alle Parameter für die Datenerfassung (Steuerung des Systems) und die Datenanalyse (Verarbeitung der Daten, um quantitative und qualitative Ergebnisse zu erhalten). In diesem Abschnitt wird kurz auf Integration und Berichte eingegangen, so dass die zuvor erstellten Chromatogramme integriert und gedruckt werden können. Ausführlichere Informationen zur Datenanalyse, einschließlich der Verwendung der Kalibrierung zur Quantifizierung, finden Sie im ChemStation-Handbuch.

Methodenquelle

Navigationstabelle

Aufgabe Integration

Aufgabe Spektrum

Navigationsfenster

Date Time	Operator	Vial	Data File	Sample Name	Method Name	Manu...	Sample Info	Sample Amo...	ISTD Amount	Multiple
08/07/2009 18:40:53	Rob	Vial 1	PHENONE-MI...	Phenones Test Mix	PHENONES2.M			0	0	1
08/07/2009 18:45:06	Rob	Vial 1	PHENONE-MI...	Phenones Test Mix	PHENONES2.M			0	0	1

#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
1	0.122	291.7	238.1	0.0208	10.633	1.519
2	0.192	292.2	228.5	0.0189	11.030	0.958
3	0.275	257.5	238.1	0.0166	9.720	0.545
4	0.349	24.6	16.9	0.0201	0.929	2.05
5	0.377	232.4	261	0.0144	9.771	0.262
6	0.422	239	296	0.0124	9.623	0.661
7	0.487	257.6	295.9	0.0132	9.730	0.749
8	0.601	337.3	337.4	0.0147	12.731	1.421

Abbildung 34 Ansicht Datenanalyse

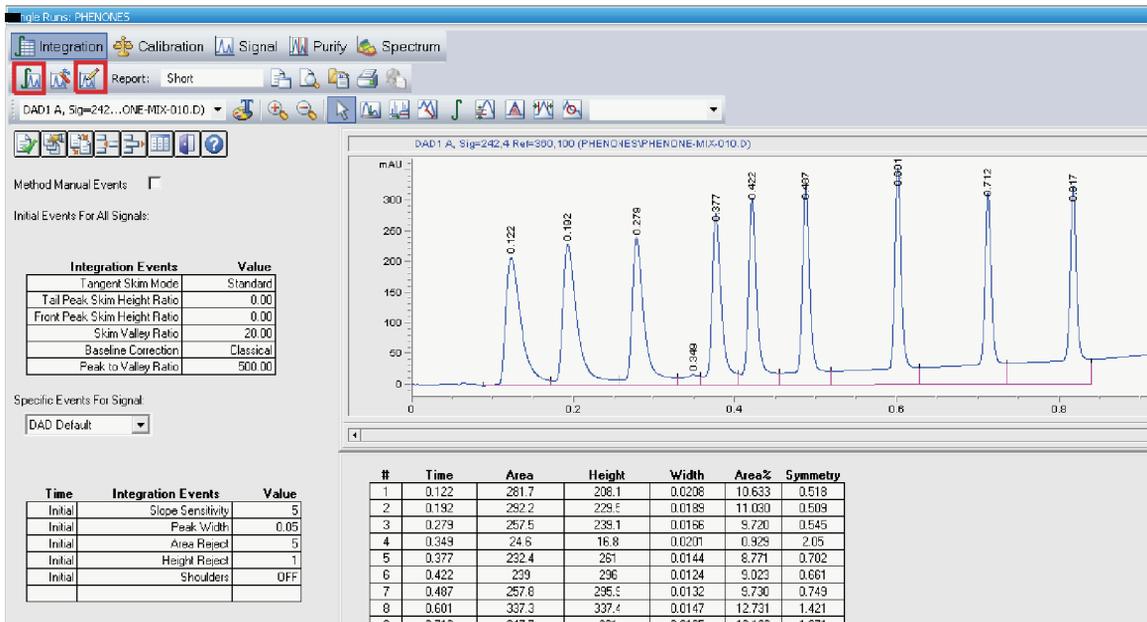
Ansicht Datenanalyse

So wird ein Chromatogramm in der Ansicht Data Analysis geöffnet:

- 1** Starten Sie eine offline befindliche ChemStation.
- 2** Klicken Sie auf Datenanalyse unten links auf dem Bildschirm (siehe [Abbildung 34](#) auf Seite 109).
- 3** Suchen Sie im Navigationsfenster das Datenverzeichnis mit den Datendateien. Alle Daten zu einzelnen Injektionen sind als Untergruppe unter **Single Runs** repräsentiert. Doppelklicken Sie auf **Single Runs**, um diese Datendateien in die Navigationstabelle zu laden.
- 4** Wählen Sie eine Datei in der Navigationstabelle und doppelklicken Sie darauf, um das Chromatogramm in die Ansicht zu laden.

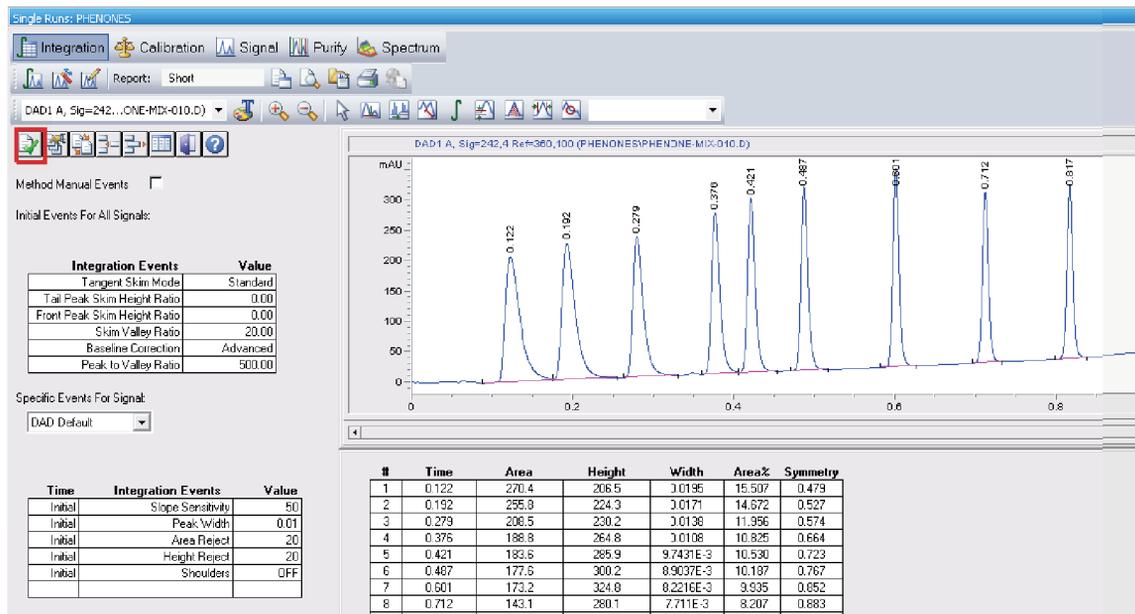
Integrieren eines Signals

- 1 Wählen Sie das Aufgabenwerkzeug Integration (siehe nachstehende Abbildung). Die Symbole **Integrate** und **Set Integration Events Table** sind in der nachstehenden Abbildung markiert.



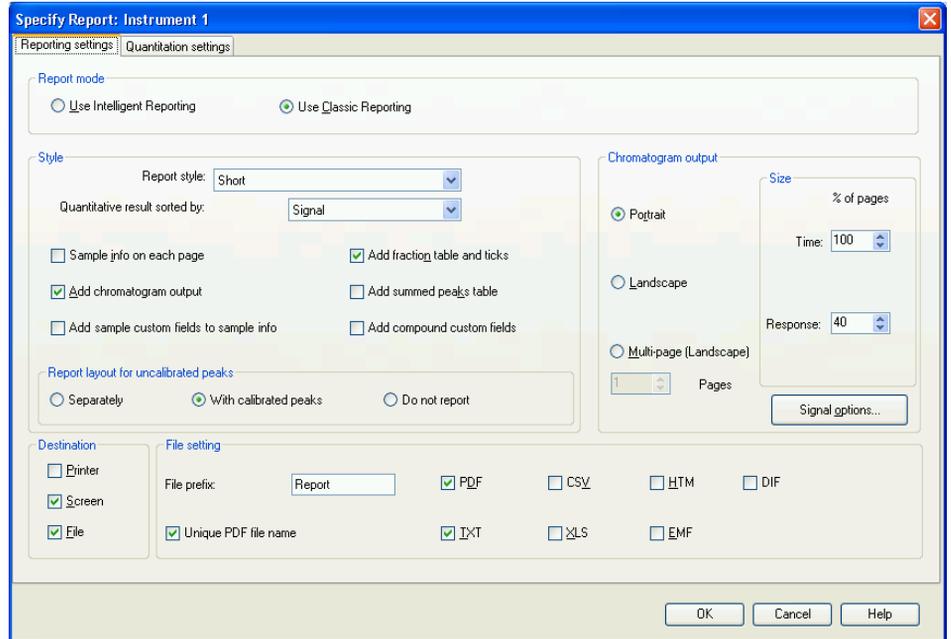
- 2 Klicken Sie auf das Symbol **Set Integration Events Table**, um die Tabelle wie gezeigt zu öffnen.
- 3 Setzen Sie die **Baseline Correction** für Analysen auf **Advanced**.
- 4 Setzen Sie die **Slope Sensitivity** auf 50. Bei höheren Werten werden steilere Peaks integriert und weniger steile ignoriert.
- 5 Setzen Sie den Wert für die **Peak Width** auf die Breite des schmalsten interessierenden Peak, in diesem Fall etwa 0,01.
- 6 **Area Reject** und **Height Reject** können so eingestellt werden, dass die kleinsten Peaks zurückgewiesen werden.
- 7 Klicken Sie auf das Symbol **Integrate**, um die Ergebnisse mit diesen neuen Einstellungen zu aktualisieren.

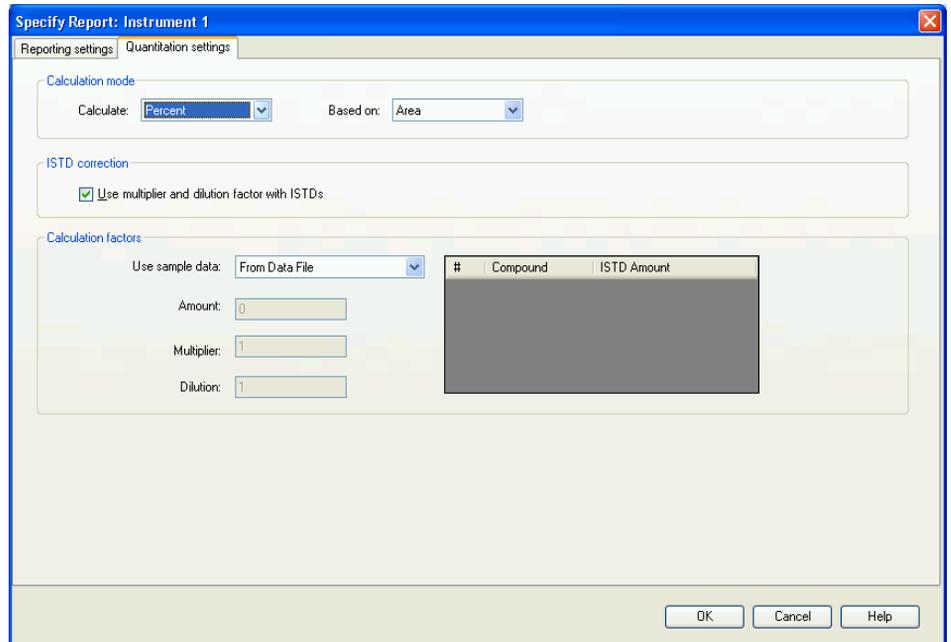
- 8 Schließen Sie die Tabelle Integrationsereignisse mit dem grünen Häkchen-Symbol (siehe nachstehende Abbildung).



Spezifizieren des Berichts

- 1 Klicken Sie in der Menüleiste auf **Bericht > Bericht spezifizieren**, um das in der nachstehenden Abbildung gezeigte Fenster zu öffnen.

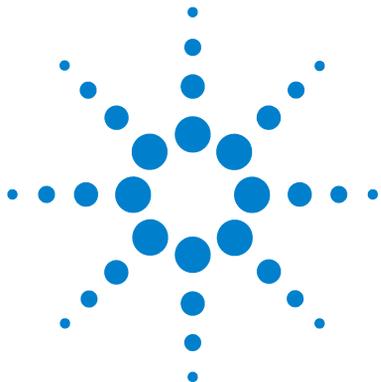




- 2 Mit den in den Abbildungen weiter oben gezeigten Beispieleinstellungen können Sie einen Flächenprozentbericht der Peaks erstellen.
- 3 Im Abschnitt **Destination** wählen Sie **Printer** um einen Papierausdruck zu erhalten bzw. **File** und **PDF**, um eine nützliche PDF-Berichtsdatei in der Datendatei zu speichern (die Datendatei mit der Dateinamenerweiterung ist eigentlich ein .D Verzeichnis. Die Berichtsdatei kann direkt auf den ChemStation angezeigt werden oder sie kann im Verzeichnis mit dem Windows Explorer gefunden werden).
- 4 Speichern Sie die Methode noch einmal, um sicherzustellen, dass die Berichtseinstellung für die zukünftigen Verwendung durch die Methode zur Verfügung stehen.

Wenn die Methode wieder verwendet wird, werden diese Integrationsereignisse und Berichtseinstellungen zum Erstellen des Berichts verwendet.

Dieser Abschnitt schließt die kurze Übersicht über den Datenanalyse-Teil der ChemStation-Software ab. Weitere Informationen zu den vielfältigen Funktionen der ChemStation finden Sie in den ChemStation-Handbüchern und in der Online-Hilfe.



6 Anhang

Sicherheitsinformationen	116
Informationen zu Lösungsmitteln	119
Agilent Technologies im Internet	120
Einrichtung einer Methode mithilfe von Edit Entire Method	121
Methodeninformationen	123
Gerät/Aufnahme	124
Datenanalyse	139
Laufzeit-Checkliste	146

Dieses Kapitel enthält ergänzende Informationen zur Sicherheit, zum Internet, zur Einrichtung einer Methode sowie rechtliche Hinweise.



Sicherheitsinformationen

Allgemeine Sicherheitsinformationen

Die folgenden allgemeinen Sicherheitshinweise müssen in allen Betriebsphasen sowie bei der Wartung und Reparatur des Geräts beachtet werden. Die Nichtbeachtung dieser Vorsichtsmaßnahmen bzw. der speziellen Warnungen innerhalb dieses Handbuchs verletzt die Sicherheitsstandards der Entwicklung, Herstellung und vorgesehenen Nutzung des Geräts. Agilent Technologies übernimmt keine Haftung, wenn der Kunde diese Vorschriften nicht beachtet.

WARNUNG

Stellen Sie die ordnungsgemäße Verwendung der Geräte sicher.

Der vom Gerät bereitgestellte Schutz kann beeinträchtigt sein.

→ Der Bediener sollte dieses Gerät so verwenden, wie in diesem Handbuch beschrieben.

Sicherheitsstandards

Dies ist ein Gerät der Sicherheitsklasse I (mit Erdungsanschluss). Es wurde entsprechend internationaler Sicherheitsstandards gefertigt und getestet.

Betrieb

Beachten Sie vor dem Anlegen der Netzspannung die Installationsanweisungen. Darüber hinaus sind folgende Punkte zu beachten:

Während des Betriebs darf das Gehäuse des Geräts nicht geöffnet werden. Vor dem Einschalten des Gerätes müssen sämtliche Massekontakte, Verlängerungskabel, Spartransformatoren und angeschlossenen Geräte über eine geerdete Netzsteckdose angeschlossen werden. Bei einer Unterbrechung des Erdungsanschlusses besteht die Gefahr eines Stromschlags, der zu ernsthaften Personenschäden führen kann. Das Gerät muss außer Betrieb genommen und

gegen jede Nutzung gesichert werden, sofern der Verdacht besteht, dass die Erdung beschädigt ist.

Stellen Sie sicher, dass nur Sicherungen für entsprechenden Stromfluss und des angegebenen Typs (normal, träge usw.) als Ersatz verwendet werden. Die Verwendung reparierter Sicherungen und das Kurzschließen von Sicherungshaltern sind nicht zulässig.

Einige in diesem Handbuch beschriebenen Einstellarbeiten werden bei an das Stromnetz angeschlossenem Gerät und abgenommener Gehäuseabdeckung durchgeführt. Dabei liegen im Gerät an vielen Punkten hohe Spannungen an, die im Falle eines Kontaktschlusses zu Personenschäden führen können.

Sämtliche Einstellungs-, Wartungs- und Reparaturarbeiten am geöffneten Gerät sollten nach Möglichkeit nur durchgeführt werden, wenn das Gerät von der Netzspannung getrennt ist. Solche Arbeiten dürfen nur von erfahrenem Personal durchgeführt werden, das über die Gefahren ausreichend informiert ist. Wartungs- und Einstellarbeiten an internen Gerätekomponenten sollten nur im Beisein einer zweiten Person durchgeführt werden, die im Notfall Erste Hilfe leisten kann. Tauschen Sie keine Komponenten aus, solange das Netzkabel am Gerät angeschlossen ist.

Das Gerät darf nicht in Gegenwart von brennbaren Gasen oder Dämpfen betrieben werden. Ein Betrieb von elektrischen Geräten unter diesen Bedingungen stellt immer eine eindeutige Gefährdung der Sicherheit dar.

Bauen Sie keine Austauschteile ein und nehmen Sie keine nicht autorisierten Veränderungen am Gerät vor.

Kondensatoren in diesem Gerät können noch geladen sein, obwohl das Gerät von der Netzversorgung getrennt worden ist. In diesem Gerät treten gefährliche Spannungen auf, die zu ernsthaften Personenschäden führen können. Die Handhabung, Überprüfung und Einstellung des Gerätes ist mit äußerster Vorsicht auszuführen.

Beachten Sie bei der Handhabung von Lösungsmitteln die geltenden Sicherheitsvorschriften (z. B. das Tragen von Schutzbrille, Handschuhen und Schutzkleidung), die in den Sicherheitsdatenblättern des Herstellers beschrieben sind, speziell beim Einsatz von giftigen oder gesundheitsgefährlichen Lösungsmitteln.

Sicherheitssymbole

Tabelle 10 Sicherheitssymbole

Symbol	Beschreibung
	Ist ein Bauteil mit diesem Symbol gekennzeichnet, so sollte der Benutzer zur Vorbeugung von Verletzungen und Beschädigungen die Bedienungsanleitung genau beachten.
	Weist auf gefährliche Spannungen hin.
	Weist auf einen Schutzkontakt (Erdung) hin.
	Das Licht der Deuterium-Lampe in diesem Produkt kann bei direktem Blickkontakt zu Augenverletzungen führen.
	Das Gerät ist mit diesem Symbol versehen, wenn heiße Oberflächen vorhanden sind, mit denen der Benutzer nicht in Berührung kommen sollte.

WARNUNG

Eine WARNUNG

weist Sie auf Situationen hin, die Personenschäden oder tödliche Verletzungen verursachen können.

→ Übergehen Sie nicht diesen Hinweis, bevor Sie die Warnung nicht vollständig verstanden haben und entsprechende Maßnahmen getroffen haben.

VORSICHT

Der Sicherheitshinweis VORSICHT

weist Sie auf Situationen hin, die zu einem möglichen Datenverlust oder zu einer Beschädigung des Geräts führen können.

→ Fahren Sie bei einem Vorsicht-Hinweis erst dann fort, wenn Sie ihn vollständig verstanden und entsprechende Maßnahmen getroffen haben.

Informationen zu Lösungsmitteln

Flusszelle

So bewahren Sie die optimale Funktionsfähigkeit der Flusszelle:

- Vermeiden Sie den Gebrauch alkalischer Lösungen (pH > 9,5), welche Quarz angreifen und damit die optischen Eigenschaften der Flusszelle verändern können.

Umgang mit Lösungsmitteln

Beachten Sie die folgenden Empfehlungen bei der Wahl der Lösungsmittel.

- Braune Glasware kann Algenwachstum verhindern.
- Vermeiden Sie den Gebrauch der folgenden Stahl korrodierenden Lösungsmittel:
 - Lösungen von Alkalihalogeniden und ihren entsprechenden Säuren (z. B. Lithiumjodid, Kaliumchlorid),
 - hohe Konzentrationen anorganischer Säuren wie Schwefelsäure und Salpetersäure speziell bei höheren Temperaturen (falls es Ihre chromatographische Methode zulässt, sollten stattdessen Phosphorsäure- oder Phosphatpufferlösungen eingesetzt werden, die weniger korrosiv auf Edelstahl wirken),
 - halogenierte Lösungsmittel oder Gemische, die Radikale und/oder Säuren bilden, wie beispielsweise:
$$2 \text{CHCl}_3 + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{COCl}_2 + 2 \text{HCl}$$

(Diese Reaktion, die wahrscheinlich durch Edelstahl katalysiert wird, läuft in getrocknetem Chloroform schnell ab, wenn durch den Trocknungsprozess der als Stabilisator fungierende Alkohol entfernt wurde.),
 - chromatographiereine Ether, die Peroxide enthalten können (z. B. THF, Dioxan, Di-Isopropylether) und daher über trockenem Aluminiumoxid, an dem die Peroxide adsorbiert werden, filtriert werden sollten,
 - Lösungsmittel, die stark komplexbildende Verbindungen enthalten (z. B. EDTA),
 - Mischungen von Tetrachlorkohlenstoff mit 2-Propanol oder THF.

Agilent Technologies im Internet

Die neuesten Informationen über Produkte und Dienstleistungen von Agilent Technologies erhalten Sie im Internet unter

<http://www.agilent.com>

Wählen Sie Products/Chemical Analysis

Auf diesem Wege können Sie auch die aktuellste Firmware der Agilent 1200 Modulserie herunterladen.

Einrichtung einer Methode mithilfe von Edit Entire Method

In diesem Abschnitt werden alle Methodenverfahren und -einstellungen für die 1290 Infinity Binäre Pumpe beschrieben. Sie können auf die gleiche Weise auch für die 1290 Infinity Quaternäre Pumpe ausgeführt werden.

Eine Methode in der ChemStation enthält alle Parameter für die Datenerfassung (Steuerung des Systems) und die Datenanalyse (Verarbeitung der Daten, um quantitative und qualitative Ergebnisse zu erhalten). Auf die Parameter kann über eine Reihe von Bildschirmen zugegriffen werden, die sich jeweils auf ein bestimmtes Modul oder eine bestimmte Funktion konzentrieren. Diese Bildschirme werden durch Klicken auf ein Symbol auf der graphischen Benutzeroberfläche (GUI) oder über die Menüleiste mit ihren Dropdown-Menüs aufgerufen. Eine neue Methode kann erstellt werden, indem entweder eine vorliegende Methode bearbeitet oder indem die leere Methodenvorlage **DEF_LC.M** geladen und bearbeitet wird.

Wenn nur einige wenige Parameter geändert werden sollen, können Sie direkt die entsprechenden Seiten für die Einrichtung der zu ändernden Parameter aufrufen. Für weniger erfahrene Anwender ist es möglicherweise leichter, die Funktion **Ganze Methode bearbeiten** zu verwenden, bei der der Anwender Schritt für Schritt durch die Seiten geführt wird. Der Zugriff auf diese Funktion erfolgt über das Menü **Methode > Ganze Methode bearbeiten**, woraufhin das Dialogfeld **Check Method Sections to Edit** geöffnet wird.

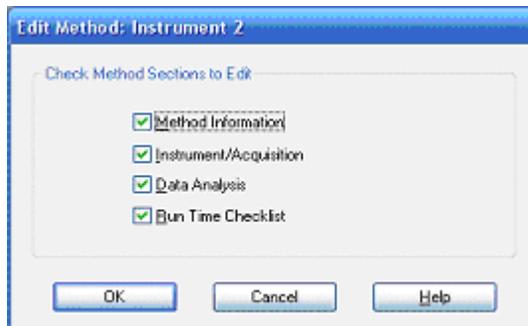


Abbildung 35 Zu bearbeitende Methodenabschnitte prüfen

In diesem Dialogfeld sind die Abschnitte zusammengefasst, die geprüft werden sollen. Es bietet auch die Möglichkeit, einzelne Teile zu überspringen, indem diese abgewählt werden.

Je nach den ausgewählten Teilen werden nacheinander verschiedene Bildschirme angezeigt:

- **Method Information** enthält eine Textbeschreibung der Methode.
- **Instrument/Acquisition** umfasst:
 - Injektorparameter,
 - Pumpenparameter,
 - Ofenparameter,
 - Detektorparameter und
 - Gerätekurven.
- **Data Analysis** umfasst:
 - Signaldetails,
 - Integrationsparameter und
 - Berichtparameter.
- **Run Time Checklist** umfasst die Teile der Methode, die ausgeführt werden.

HINWEIS

Beim Bearbeiten von Methoden unter **Edit Entire Method** wird durch Klicken auf **OK** der aktuelle Eingabebildschirm geschlossen und der nächste Bildschirm aufgerufen. Dies ist ein Einbahn-Verfahren.

Wenn Sie unabsichtlich **OK** anklicken, bevor Sie Ihre Eingaben abgeschlossen haben, klicken Sie auf **Cancel** und starten Sie **Edit Entire Method** von Neuem. Alternativ können Sie auch fortfahren und am Ende zum Bildschirm mit den unvollständigen Eingaben zurückkehren. Nach Klicken auf **Cancel** wird eine Schaltfläche angezeigt, die das **Skip** der restlichen Bildschirme ermöglicht.

Methodeninformationen

Der Bildschirm **Method Information** kann über das Menü **Methode > Methodeninformationen** oder durch Klicken mit der rechten Maustaste auf die graphische Benutzeroberfläche auch direkt aufgerufen werden.

In dieses Feld können Informationen über die Methode eingegeben werden. Diese Informationen werden oberhalb des Systemdiagramms im Bildschirm **Method and Run Control** eingeblendet, sobald die Methode geladen und im Speicher resident ist.

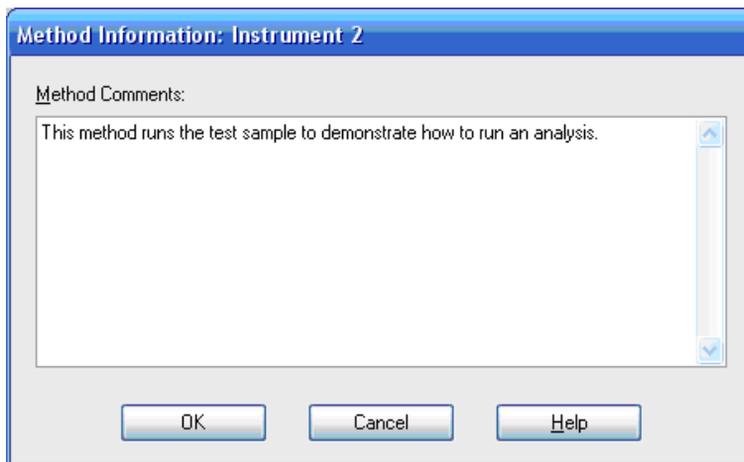


Abbildung 36 Methodeninformationen

Gerät/Aufnahme

Einrichtung einer Gerätemethode

Der Bildschirm **Setup Method** kann über das Menü **Gerät > Gerätemethode einrichten ...** oder durch Klicken mit der rechten Maustaste auf ein beliebiges Modulsymbol auf der graphischen Benutzeroberfläche und Auswahl von **Method...** im Kontextmenü direkt aufgerufen werden. Diese nächste Phase bei **Edit Entire Method** ist der Bildschirm **Setup Method** mit sechs Registerkarten für verschiedene Module oder Funktionen.

Folgende Registerkarten stehen zur Verfügung:

- Automatischer Hochleistungsprobengeber (**HiP-ALS**)
- **HiP-ALS Injector Program**
- Binäre Pumpe (**BinPump**)
- Säulentermostat (**TCC**)
- Diodenarray-Detektor (**DAD**)
- **Instrument Curves**

Zum Navigieren zwischen den Registerkarten klicken Sie auf den Namen der Registerkarte oben im Bildschirm. Sind die geänderten Parameter eingegeben, können sie durch Klicken auf **Apply** sofort an das Gerät gesendet werden. Oder: Wenn alle Registerkarten ausgefüllt worden sind, werden die Parameter durch Klicken auf **OK** an die Module gesendet, der Bildschirm wird geschlossen und die Einrichtung der Methode wird der nächsten Phase fortgesetzt.

Die Registerkarten für die Eingabe der Parameter sehen wegen des Konzepts von Agilent, für die Gerätemodule gemeinsame RC-Net-Treiber zu verwenden, in allen Steuerungsprogrammen ähnlich aus (ChemStation, EZChrom, MassHunter usw.).

Zum Ausführen der Beispielanalyse ist es, wie bei den meisten Methoden, nicht erforderlich, alle verfügbaren Parameter zu ändern, der Vollständigkeit halber werden sie jedoch in den nächsten Abschnitten beschrieben.

Registerkarte Automatischer Probengeber (HiP-ALS)

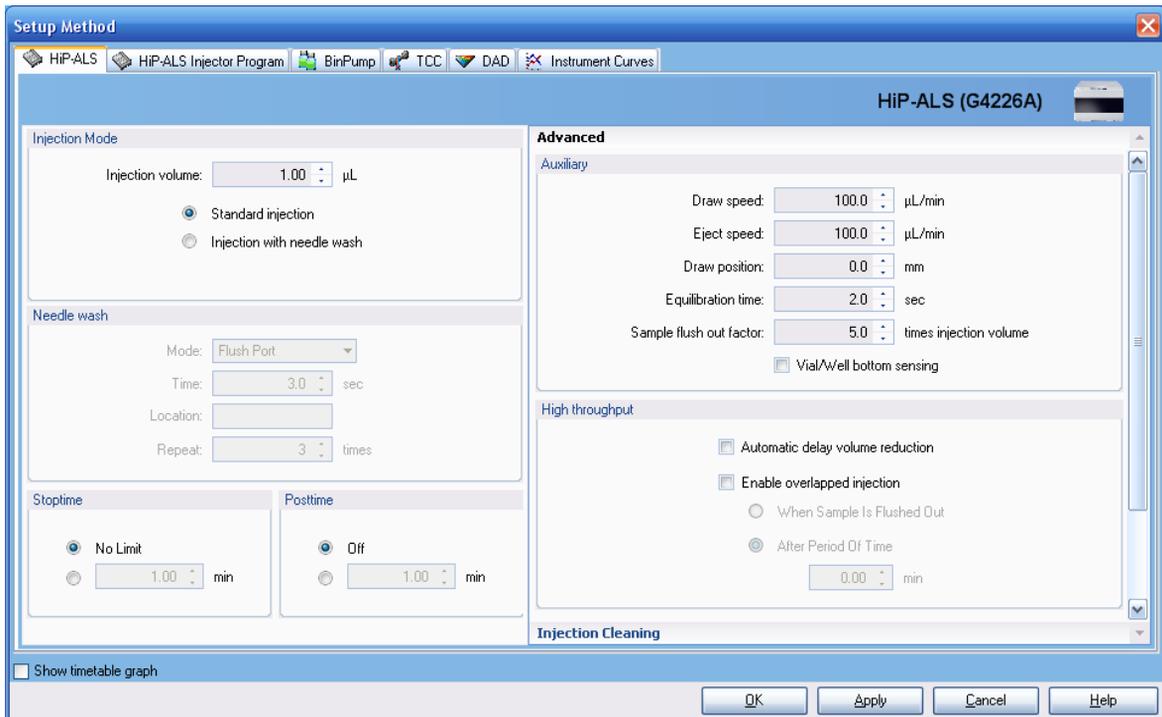


Abbildung 37 Bildschirm Methode einrichten - Registerkarte Automatischer Hochleistungsprobengeber

- **Injection Mode**
 - **Injection volume** wird zum Einstellen des zu injizierenden Volumens verwendet (example 3 µl),
 - **Standard injection** zeigt an, dass kein externes Reinigen der Nadel erfolgt,
 - **Injection with needle wash** wird verwendet, um mögliche Verschleppung zu verringern. Dies ist die empfohlene Option, die im nächsten Eintrag konfiguriert wird.
- **Needle Wash**, wenn zuvor ausgewählt
 - **Mode** bestimmt, wie das Äußere der Nadel gespült wird: entweder aktiv am **Flush Port** oder durch Eintauchen in eine angegebene **Wash Vial**.

- **Time** gibt an (in Sekunden), wie lange von der peristaltischen Pumpe, die an den Spülanschluss angeschlossen ist, Spülflüssigkeit gepumpt wird. Anschließend pumpt sie noch weitere 15 s, um den Spülanschluss zu reinigen.
- **Location** gibt an, welche Flasche oder Mikrotiterplatte verwendet wird, wenn **Wash Vial** ausgewählt wurde.

HINWEIS

Flaschen dürfen kein Septum haben, d. h. sie sollten offen sein, um eine Verschleppung von Material auf dem Septum zu Vermeiden.

- **Repeat** bestimmt, wenn Waschflasche ausgewählt wurde, wie oft die Nadel in die Flasche eingetaucht wird (Voreinstellung 3, Maximum 5).
- **Stop Time / Post Time** werden auf **No Limit / Off** gestellt; diese Werte werden auf der Registerkarte Pumpe eingegeben.
- **Advanced - Auxiliary**
 - **Draw speed** ist die Geschwindigkeit, mit der die Probe in die Nadel gesaugt wird. Der Standardwert ist 100 µl/min. Bei viskosen Proben oder um bei kleinen Proben die Präzision zu erhöhen sollte er herabgesetzt werden (< 2 µL).
 - **Eject speed** ist die Geschwindigkeit, mit der die Nadel die Probe abgibt.
 - **Draw position** ist die vertikale Versetzung gegenüber der nominalen Injektionsposition 10 mm über dem Boden einer Flasche. Diese befindet sich etwa auf halber Höhe einer 2 ml-Flasche. Es sollte also eine negative Versetzung eingestellt werden, um die Probe nahe beim Flaschenboden zu entnehmen. Beispielsweise würde bei einem Wert von -7 mm die Nadelspitze 3 mm über dem Flaschenboden platziert.
 - **Equilibration time** ist die Zeitverzögerung zwischen dem Aufziehen der Probe und dem Bewegen der Nadel.
 - **Sample flush out factor** bestimmt, wie lange der Probengeber nach der Injektion wartet, bis das Ventil auf die Nebenflussstellung umgestellt wird. Dadurch wird sichergestellt, dass die Probenzone die Nadel, den Nadelsitz und das Injektionsventil verlassen hat. Der Standardwert ist 5.
 - **Vial/Well bottom sensing** ist eine Alternative zur Versetzung der Aufziehposition. Die Nadel wird langsam nach unten bewegt, bis sie den Boden der Flasche oder der Mikrotiterplatte berührt, und dann wieder 1 mm angehoben. Dies ist eine vielseitig anwendbare Art sicherzustellen, dass die Nadel sich in der Nähe des Flaschenbodens befindet, jedoch dauert die

Injektion auf diese Weise etwas länger. Außerdem ist dieses Verfahren nicht geeignet, wenn sich Partikel am Flaschenboden befinden, die die Nadel verstopfen könnten.

- **Advanced - High Throughput**
 - **Automatic delay volume reduction (ADVR)** dient zum Umschalten des Injektionsventils von Injektion auf Nebenfluss, nachdem die Injektion erfolgt ist und ein durch den Probenausspülfaktor festgelegtes Volumen den Injektor durchflossen hat. Dadurch wird das Verzögerungsvolumen des Systems um etwa 70 µl reduziert und die Konzentrationsänderungen im Gradienten erreichen die Säule früher.
 - **Enable overlapped injection** dient ebenfalls zum Umschalten des Injektionsventils von Injektion auf Nebenfluss, nachdem die Injektion erfolgt ist, entweder nachdem die Probe aus dem Injektor gespült wurde oder zu einem festgelegten späteren Zeitpunkt während der Analyse. Anschließend zieht der Injektor zur Vorbereitung auf die nächste Injektion die nächste Probe auf, wodurch die Zykluszeit insgesamt reduziert und der Probendurchsatz gesteigert wird.
- **Injection Valve Cleaning**
 - **Injector Cleaning** ermöglicht das Spülen des Injektionssystems mit Lösungsmittel.
 - **Injection Valve Cleaning** ermöglicht das Umschalten des Ventils zu festgelegten Zeitpunkten während der Analyse, um bei der Injektion problematischer Verbindungen die Verschleppung auf ein Minimum zu begrenzen.

Registerkarte Automatischer Hochleistungsprobengeber (Hip_ALS Injector Program)

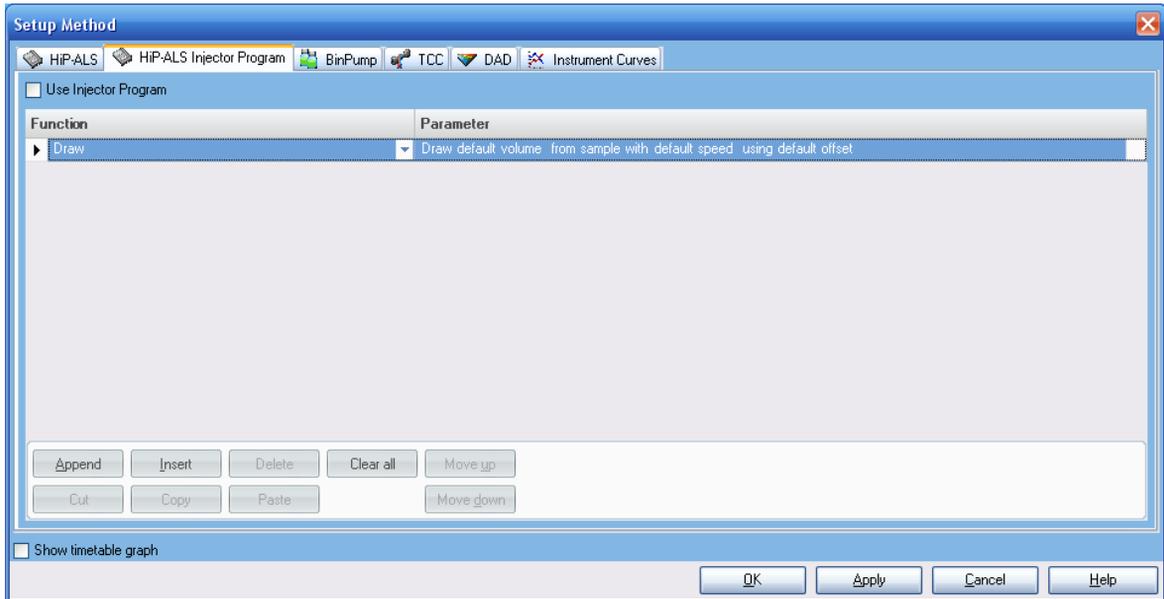


Abbildung 38 Bildschirm Methode einrichten - Registerkarte Automatischer HiP-Proben-
geber Injektorprogramm

Auf dieser Registerkarte können spezielle Injektionsverfahren erstellt werden, die die Verarbeitung von Aliquots aus mehreren Flaschen erlauben, wie beispielsweise bei einer Vorsäulenderivatisierung. Die Reagenzien werden automatisch mit der Probe gemischt, um die Nachweisbarkeit oder Empfindlichkeit zu erhöhen. Ein häufig angeführtes Beispiel ist die Derivatisierung von Aminosäuren mit OPA- und FMOC-Reagenzien. Weitere Einzelheiten sind im *Handbuch für den Agilent 1290 Infinity Automatischen Probengeber* beschrieben.

Registerkarte Binäre Pumpe (BinPump)

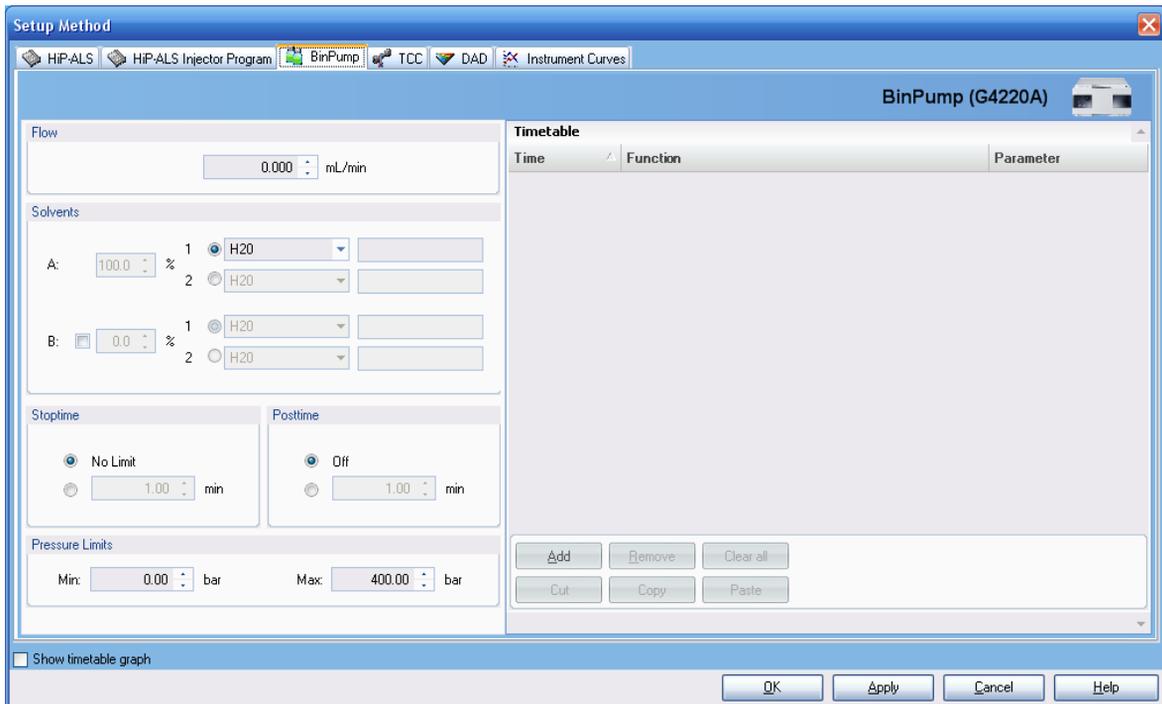


Abbildung 39 Bildschirm Methode einrichten - Registerkarte Binäre Pumpe

- **Flow** dient zum Einstellen der Flussrate auf bis zu 5 ml/min. Für die Beispielanalyse sollen 0,4 ml/min verwendet werden. Wenn der Rückdruck kurz den eingestellten Maximaldruck erreicht, wird der Fluss einige Sekunden lang verringert, um den Druck zu senken. Bleibt der Druck jedoch auf diese Weise begrenzt, ergibt sich eine Störung und der Fluss wird gestoppt.
- **Solvents** gibt an, welche mobilen Phasen zur Verfügung stehen und welche prozentualen Anteile durch die zwei Kanäle A und B gepumpt werden. Mithilfe je eines Dropdown-Feldes für die Kanäle kann ein Lösungsmittel aus einer List ausgewählt werden, so dass über die Pumpensteuerung die optimalen Einstellungen für die Kompressibilität verwendet werden. Dadurch werden die Flusseigenschaften optimiert wie in ["Konfiguration des optimalen Verzögerungsvolumens"](#) auf Seite 42 beschrieben. In ein zweites Textfeld kann eine Beschreibung der mobilen Phase eingegeben werden. Wenn das Lösungsmittelauswahlventil an der Pumpe installiert wird, gibt es für jeden der beiden Kanäle zwei Lösungsmitteloptionen, wobei die rich-

tige Option für die Methode mit der Optionsschaltfläche links von der Beschreibung des Lösungsmittels ausgewählt wird. Die Pumpe stellt binäre Mischungen aus den für Kanal A und B ausgewählten Lösungsmitteln her, z. B. A2 und B1. Es ist nicht möglich, A1 mit A2 oder B1 mit B2 zu mischen. Der eingegebene Wert für den jeweiligen Anteil von A und B bestimmt die Zusammensetzung für eine isokratische Methode oder aber die Anfangsbedingungen bei einer Gradientenmethode sowie die Äquilibrierungsbedingungen zwischen den Analysen. Es wird nur der Wert für B eingegeben, A wird automatisch angepasst, so dass sich 100 % minus B ergeben, wenn der Cursor bewegt wird. Stellen Sie zur Durchführung der Beispielanalyse für A Wasser und für B 50 % Methanol ein. A wird automatisch auf 50 % gesetzt.

- **Timetable** dient zur Eingabe der Änderungen hinsichtlich der prozentualen Zusammensetzung der mobilen Phase aus A und B oder, gegebenenfalls, hinsichtlich der Flussrate und des zulässigen Maximaldrucks, die während der Analyse stattfinden sollen. Im Zeitplan können lineare Änderungen an den Parametern zwischen angegebenen Zeitpunkten festgelegt werden. Die an anderer Stelle erfolgten Einstellungen fungieren auf diesem Bildschirm als Anfangsbedingungen und ändern sich nur dann, wenn im Zeitplan eine Eingabe vorgenommen wird. Wenn z. B. der Fluss während der Analyse konstant bleibt, muss im Zeitplan keine Eingabe bezüglich des Flusses vorgenommen werden. Um eine Eingabe im Zeitplan vorzunehmen, klicken Sie auf die Schaltfläche **Add**, um dem Zeitplan eine Zeile hinzuzufügen. Geben Sie den entsprechenden Zeitpunkt ein, wählen Sie die Art des Eintrags aus der Dropdown-Liste aus (Zusammensetzung, Fluss, Druck) und klicken Sie auf das Feld **parameter**, um das Eingabefeld für den Wert einzublenden. Wenn im Zeitplan Eingaben außerhalb der logischen Reihenfolge vorgenommen werden, werden die Einträge automatisch in der richtigen zeitlichen Reihenfolge geordnet. Zeilen im Zeitplan können direkt bearbeitet werden. Zum Hinzufügen und Entfernen von Zeilen können die Schaltflächen **Cut**, **Paste** und **Remove** verwendet werden. Es können mehrere Zeilen hinzugefügt werden, um zur Erstellung von beliebigen Gradientenprofilen eine Serie linearer Gradientensegmente zu definieren. Zum Erstellen eines einfachen Gradienten für die Beispielanalyse löschen Sie, falls er nicht bereits leer ist, zunächst alle Einträge im Zeitplan mithilfe der Schaltfläche **Clear all**. Fügen Sie eine Zeile für 4,00 min hinzu und ändern Sie die Zusammensetzung in 90 %. Das Diagramm zeigt einen linearen Gradienten von 50 % B bis 90 % B über 4 min. Wenn ein Stufengradient erforderlich ist, kann er mithilfe von zwei Eingaben unter "vor dem Schritt" und "nach dem Schritt", getrennt durch 0,01 min gebildet werden. Ein Stufengradient wird häufig angewendet, um stark retinierte Peaks gegen Ende einer Analyse rasch von der Säule zu eluieren. Dazu wird das stärkere Lösungsmittel und/oder die Flussrate

bei einem Stufengradienten erhöht; beispielsweise kann der Prozentsatz von B von 75 % auf 95 % erhöht werden. Es ist nicht nötig, die Einstellungen für den Zeitpunkt 0,00 min in den Zeitplan einzugeben, diese Werte werden von anderen festgelegten Zeitpunkten auf diesem Bildschirm übernommen. Manche Anwender möchten allerdings eine "vollständige" Liste im Zeitplan sehen und nehmen Eingaben für 0,00 min vor. Das ist prinzipiell kein Problem, wenn jedoch die Anfangsbedingungen einmal geändert werden, müssen die neuen Einstellungen sowohl im Zeitplan als auch für die festgelegten Zeitpunkte im Abschnitt Lösungsmittel des Bildschirms geändert werden.

- **Show timetable graph:** wenn dieses Kästchen angeklickt ist, werden die Änderungen im Zeitplan graphisch dargestellt.
- **Stop Time** gibt den gesamten für die Trennung oder Analyse erforderlichen Zeitraum an und wird von manchen Anwendern auch als "Laufzeit" bezeichnet. Dabei handelt es sich um den Zeitraum in Minuten zwischen dem Zeitpunkt der Injektion und dem Zeitpunkt, an dem die Analyse abgeschlossen ist, an dem also die Datenerfassung beendet wird, der Fluss, die Zusammensetzung und andere Systemeinstellungen auf die Anfangswerte für die Methode zurückgestellt werden und das System für die nächste Injektion verfügbar wird. Er sollte immer mindestens so lang sein wie der letzte Eintrag im Zeitplan, andernfalls endet die Analyse und die Anfangswerte werden wiederhergestellt, bevor die im Zeitplan angegebenen Schritte ausgeführt wurden. **Stop Time** kann auf **No Limit** gesetzt werden. In diesem Fall muss der Anwender die Analyse manuell beenden. Zwar werden Stoppzeitparameter für alle Systemmodule eingestellt, die Stoppzeit der Pumpe hat jedoch Vorrang und die Stoppzeit der anderen Module richtet sich normalerweise nach diesem Wert.
- **Post Time** gibt einen Zeitraum nach dem Ende einer Analyse an, in dem eine neue Injektion unterbunden wird. In diesem Zeitraum kann sich das System nach einer Gradientenanalyse re-äquilibrieren. Im Fall einer isokratischen Methode kann die Nachlaufzeit auf **Off** gestellt werden. Für eine Gradientenmethode kann der Wert durch Beobachten des Verhaltens der Basislinie experimentell ermittelt werden. Üblicherweise muss das Verzögerungsvolumen des Systems berücksichtigt werden sowie ein Zeitraum, in dem drei bis fünf Säulenvolumen durch das System gespült werden können.
- **Pressure Limits** dient zur Steuerung der Pumpe im Hinblick auf den Druck. Der Maximaldruck der 1290 Infinity Pumpe beträgt 1200 bar, manche Säulen sind jedoch für einen niedrigeren Druck ausgelegt. Dieser kann hier eingestellt werden, um die Säule vor Beschädigung zu schützen. Wenn dieser Druck erreicht wird, tritt eine Störung bei der Pumpe auf. Falls gerade eine

Analyse durchgeführt wird, wird sie gestoppt und die Pumpe schaltet in den Standby-Modus ohne Fluss. Informationen zum Maximaldruck bei einer bestimmten Säule werden mit der Säule geliefert. Agilent ZORBAX RRHD Säulen sind für den Betrieb bei 1200 bar geeignet. Der Grenzwert für niedrigen Druck ist "Aus"-geschaltet, wenn der Wert 0 eingestellt ist, bei jedem anderen Wert wird jedoch ein Pumpenfehler gemeldet, sobald der Druck während des Betriebs unter diesen Wert sinkt. Dies kann als alternative Sicherheitsmaßnahme genutzt werden, wenn sich die Säule nicht in einem Modul mit Lecksensor befindet oder wenn das System trocken läuft. Üblicherweise wird ein Wert von 10 bis 20 bar eingestellt.

Registerkarte Säulentermostat (TCC)

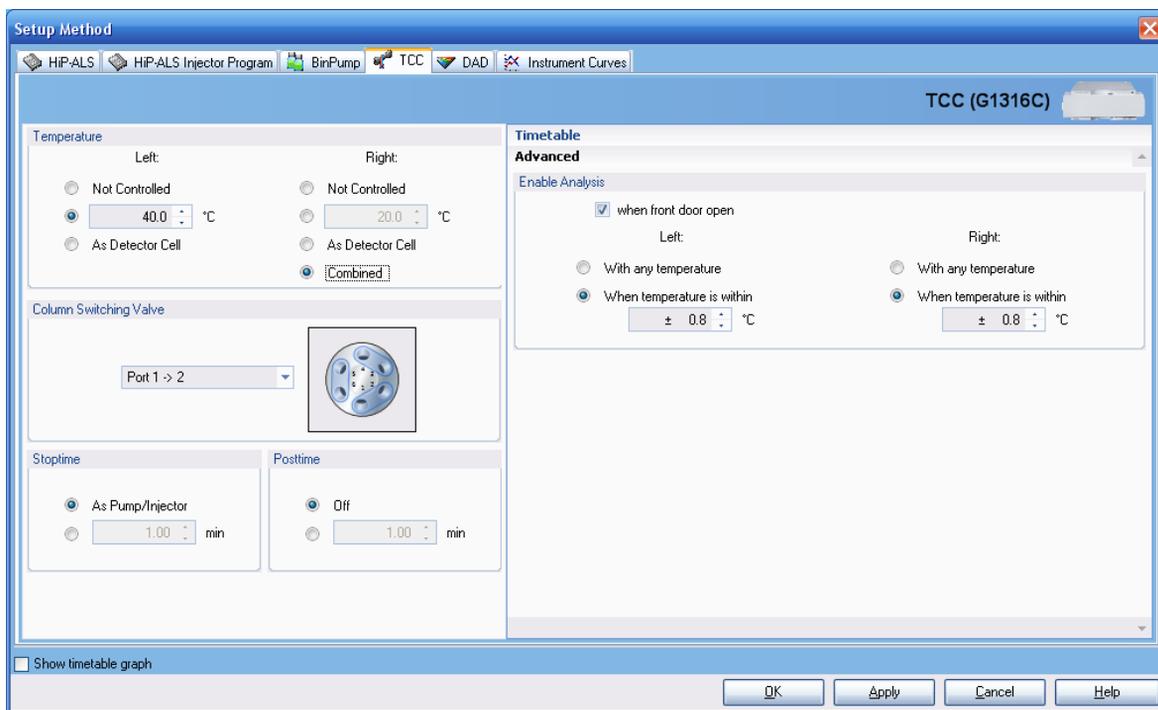


Abbildung 40 Bildschirm Methode einrichten - Registerkarte Säulentermostat

- **Temperature** dient zur Definition der Temperatur des linken und rechten Säulenhalters, die unabhängig voneinander gesteuert oder durch Anklicken der Optionsschaltfläche **Combined** gekoppelt werden können. Bei Kombination der Säulenhalter werden beide Abschnitte durch die Einstellungen für

die linke Seite gesteuert. Dies ist nötig, wenn die Säule länger als 15 cm ist und durch beide Abschnitte gehalten werden muss. Die beiden Seiten können unabhängig voneinander genutzt werden, wenn zwei Säulen erforderlich sind, die bei verschiedenen Temperaturen betrieben werden müssen. Solch eine Anordnung kann verwendet werden, wenn außerdem ein Säulenschaltventil installiert wird, mit dem zwischen den beiden Säulen umgeschaltet werden kann. Separate Temperaturzonen sind auch dann nützlich, wenn die Säule auf der einen Seite bei hoher Temperatur betrieben (z. B. über 60 °C) und der Wärmetauscher auf der anderen Seite zum Kühlen des Elutionsmittels verwendet wird, bevor es in den Detektor gelangt. Auf diese Weise wird durch thermische Effekte in der Flusszelle hervorgerufenen Rauschen reduziert. Bei Auswahl der Option **As Detector Cell** wird automatisch die Temperatur der Zelle im 1290 Infinity Detektor bestimmt.

Die Temperatur kann in beiden Zonen jeweils auf Werte zwischen -5 °C und 100 °C eingestellt werden, und der Anwender sollte prüfen, ob eine bestimmte Säule für den Betrieb bei der gewählten Temperatur geeignet ist. (Agilent ZORBAX RRHD und RRHT StableBond Phasen können am oberen Ende des Temperaturbereichs verwendet werden). Die Temperatur wird auf $\pm 0,15$ °C genau bis auf 10 °C unter der Umgebungstemperatur reguliert, jedoch ist zu beachten, dass es nur sehr wenige Anwendungen gibt, die bei Temperaturen unter 12-15 °C ausgeführt werden. Der TCC sollte nicht bei Temperaturen verwendet werden, die so niedrig sind, dass Wasser aus feuchter Luft kondensiert, da dies den Lecksensor auslöst.

- **Column Switching Valve:** Diese Option ist nur dann aktiv, wenn zwischen den Säulenhaltern ein Ventil eingebaut ist. Es stehen drei Arten von Ventilen zur Verfügung:
 - 2-Positionen/6-Anschlüsse: zum Umschalten zwischen 2 Säulen
 - 2-Positionen/10-Anschlüsse: zur abwechselnden Regeneration von Säulen
 - 8-Positionen/9-Anschlüsse: zur Auswahl zwischen mehreren Säulen bei MDS

Registerkarte Diodenarray-Detektor (DAD)

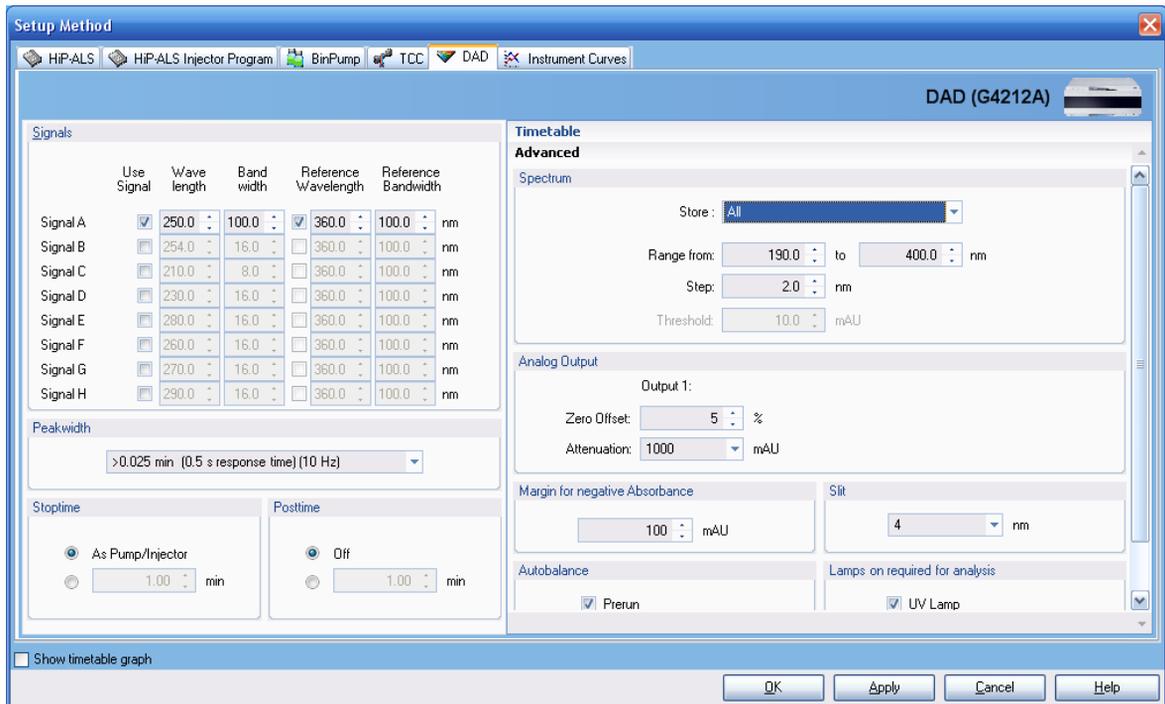


Abbildung 41 Bildschirm Methode einrichten - Registerkarte Diodenarray-Detektor

- **Signals:** Es können bis zu acht separate Signale (Chromatogramme) aufzeichnet werden. Ein Signal wird zur Erfassung gekennzeichnet, indem das Kontrollkästchen **Use Signal** für dieses Signal angeklickt und die Wellenlänge und die Bandbreite definiert werden. Wenn ein Referenzsignal erforderlich ist, wird hierfür ebenfalls das Kontrollkästchen angekreuzt und die entsprechenden Parameter werden definiert.
 - **Wavelength** dient zum Einstellen der zentralen Wellenlänge (nm) des Signals,
 - **Bandwidth** dient zum Einstellen der Bandbreite (nm) des Signals,
 - **Reference Wavelength** dient zum Einstellen der zentralen Wellenlänge (nm) des Referenzwellenlängebands, der vom Analysesignal subtrahiert wird,
 - **Reference Bandwidth** dient zum Einstellen der Bandbreite (nm) des Referenzsignals.

- **Peakwidth** dient zum Einstellen der Datenerfassungsrate und der Signalfilterung.
- **Stop Time/Post Time** werden auf **No Limit / Off** gestellt; diese Werte werden normalerweise auf der Registerkarte **Pump** eingestellt. Jedoch unterscheidet sich die Stoppzeit des Detektormoduls manchmal von der Stoppzeit der Pumpe, wenn nämlich die Datenanalyse vor der für die Pumpe definierten Stoppzeit enden soll. Dies kann der Fall sein, wenn ein Konzentrationsanstieg zur Äquilibration am Ende des Gradienten programmiert wurde. Wenn beispielsweise % B nach 10 min auf 95 % gestiegen ist und erwartet werden kann, dass alle Peaks von der Säule eluiert wurden und die Analyse im Grunde beendet ist, dann kann ein zusätzliches Segment eingefügt werden, bei dem % B innerhalb von zwei Minuten auf den Anfangswert zurückgeführt wird, um die Re-Äquilibration der Säule sanft zu starten. Während dieses Zeitraums sind keine brauchbaren Signale zu erwarten, also wird die Detektor-Stoppzeit auf 10 min gesetzt und die Datenerfassung wird beendet, während die Pumpenstoppzeit 12 min beträgt, damit die Verringerung von % B durchgeführt werden kann. Diese Einstellung kann der Anwender seinen Wünschen entsprechend vornehmen. Manche Anwender nehmen es hin, dass das Chromatogramm in den letzten Minuten keine brauchbaren Daten enthält und zeichnen es trotzdem auf, wodurch sie sich den Umstand einer unterschiedlichen Stoppzeit für den Detektor ersparen. Die Stoppzeit des Detektors hat keinen Vorrang vor der Pumpe und beendet nicht den Lauf, wie das auch bei früheren Stoppzeiten für jedes andere Modul der Fall ist. Daher ist es am bequemsten, Stoppzeiten als **As Pump** anzugeben.
- **Timetable** funktioniert auf dieselbe Weise wie bei anderen Modulen: eine Zeile hinzufügen, den zu ändernden Parameter auswählen und die neuen Werte für den Parameter eingeben. Die Änderungen für den Detektor treten sofort zum angegebenen Zeitpunkt in Kraft. Die folgenden Parameter können während der Analyse geändert werden:
 - Abgleich
 - Änderung des Signals
 - Änderung des Schwellenwerts
 - Änderung des Peaks bzw. der Detektorpeakbreite
 - Änderung des Spektrenaufnahmemodus
 - Ändern der Kontakte
- **Advanced - Spectrum**

Spektren können während der Analyse auf kontinuierliche oder peakgesteuerte Weise gespeichert werden (Dies gilt für die ChemStation-Software.

Einige Software-Pakete, z. B. EZChrom, erlauben ausschließlich die kontinuierliche Aufnahme aller Spektren und die peakgesteuerte Option ist nicht vorgesehen). Die Erfassung von Spektren und Signalen sind unabhängige Vorgänge, die von der Firmware des Detektors ausgeführt werden und es müssen hierfür durch die Computer-Software keine Daten aus der 3D-Matrix extrahiert werden. Die Geschwindigkeit, mit der Spektren aufgenommen werden, wird durch die Einstellung der **Peakwidth** bestimmt. In dem unter **Peakwidth** angegebenen Zeitraum werden acht Spektren aufgenommen. Die Peakdetektion bei Signal A wird von der Firmware nur ausgeführt, um zu bestimmen, welche peakgesteuerten Spektren gespeichert werden sollen. Bei mehreren Signalen kann es erforderlich sein, Signal A zur Breitbanddetektion zu verwenden, um sicherzustellen, dass für alle Signale unterschiedlicher Wellenlänge Spektren verfügbar sind.

- **Store** dient zur Steuerung des Spektrenaufnahmemodus und bietet die folgenden Optionen:
 - Keine:** keine Speicherung von Spektren;
 - Maximum + Basislinien:** Aufnahme von 3 Spektren, d. h. am Beginn, am Maximum und am Ende des Peaks;
 - Maximum + Flanken + Basislinien:** Aufnahme von 5 Spektren, d. h. am Beginn, an der Aufwärtsflanke, am Maximum, an der Abwärtsflanke und am Ende des Peaks;
 - Alle im Peak:** Speichern aller in einem Peak verfügbaren Spektren;
 - Alle:** Speichern aller Spektren während des gesamten Verlaufs der Analyse;
 - Jedes 2. Spektrum:** Speichern jedes zweiten Spektrums während des gesamten Verlaufs der Analyse.
- **Range:** Spektren können über den gesamten Bereich des Detektors hinweg gespeichert werden, von 190 nm bis 640 nm, oder in jedem beliebigen, vom Anwender angegebenen begrenzten Bereich. (Dadurch verringert sich auch die zu speichernde Datenmenge).
- **Step:** dient zur Festlegung des Intervalls (nm) der für ein Spektrum gespeicherten Daten und beeinflusst daher die spektrale Auflösung. Die Standardeinstellung 2 nm ist für die meisten Anwendungen gut geeignet.
- **Threshold:** Von Peaks mit einer Höhe unterhalb dieses vom Anwender bestimmten Wertes (mAU) werden keine Spektren gespeichert.
- **Advanced - Analog Output**

Der Detektor 1290 Infinity ist mit einem Analogausgangsanschluss für Datensysteme ausgestattet, der keinen digitalen Dateninput akzeptiert. Folgendes kann eingestellt werden:

- **Zero Offset** dient zur Einstellung des Nullpunkts auf einen festgelegten Prozentsatz des Ausgangssignals, um so etwas Spielraum für negative Drift zu erlauben.
- **Attenuation** setzt die eingestellte Extinktion mit dem vollen Ausgangssignal gleich.
- **Advanced - Margin for Negative Absorbance**
Die Standardeinstellung ist 100 mAU, was bedeutet, dass der Detektor, unter Berücksichtigung der Einstellung für den Nullpunkt, über einen ausreichenden dynamischen Bereich verfügt, der eine Messung bis hinunter zu diesem Wert erlaubt. Zur Messung größerer negativer Peaks oder zum Verfolgen einer Basislinie mit einer starken negativen Drift muss der Wert nach unten korrigiert werden, um ein "Aufsetzen" des Signals an der unteren Grenze des Bereichs zu verhindern. Diese Korrektur sollte jedoch nicht ohne guten Grund vorgenommen werden, denn eine stärker negative Einstellung bewirkt eine Erhöhung des Basislinienrauschens und schränkt den Bereich ein, der für die Erfassung positiver Peaks zur Verfügung steht.
- **Advanced - Slit**
Der Eingangsspalt zum Spektrographen steuert die spektrale Auflösung und beeinflusst das Basislinienrauschen und die Empfindlichkeit. Die Standardeinstellung 4 nm ist für die meisten Anwendungen gut geeignet. ["Erreichen einer höheren Empfindlichkeit"](#) auf Seite 59 enthält weitere Informationen zu diesem Parameter.
- **Advanced - Autobalance** dient dazu, die Extinktion bei allen Wellenlängen auf null zu setzen (also alle Punkte des Spektrum mit null abzugleichen), bewirkt also auch einen Nullpunktgleich der Basislinie. **Prerun** wird ausgewählt, um einen Abgleich unmittelbar vor Beginn der Analyse vorzunehmen; dies ist die normale Vorgehensweise. Manchmal wird alternativ **Postrun** gewählt, so dass der Abgleich am Ende der Analyse nach Ablauf der Nachlaufzeit erfolgt. Wenn zum Beispiel das Signal immer eine negative Drift zeigt und der Anwender es vorzieht, dass die Analyse bei einem Extinktionswert von null endet, kann so der korrekte Nullwert für die nächste Analyse eingestellt werden. Die vorhergegangene Analyse, an deren Ende der Abgleich vorgenommen wurde, wird dadurch jedoch nicht verändert.

6 Anhang

Einrichtung einer Methode mithilfe von Edit Entire Method

- **Advanced - Lamps on required for analysis:** Der DAD oder MWD des 1290 Infinity verfügt über eine Deuteriumlampe, die für eine bestimmte Analyse eingeschaltet sein muss. In diesem Fall muss dieses Kontrollkästchen angeklickt werden.

Registerkarte Instrument Curves

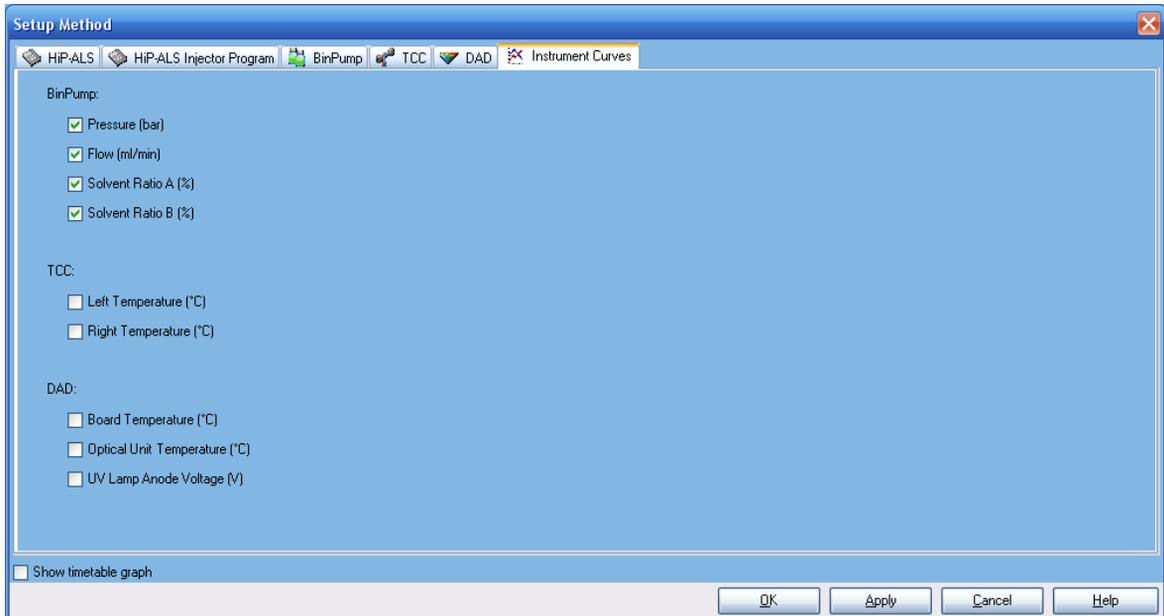


Abbildung 42 Bildschirm Methode einrichten - Registerkarte Gerätekurven

Durch Anklicken des entsprechenden Kontrollkästchens auf der Registerkarte Gerätekurven wird die Speicherung von weiteren erfassten Datenströmen über die Detektordaten hinaus zusammen mit den Daten ermöglicht. Diese werden hauptsächlich zu diagnostischen Zwecken verwendet. Dabei handelt es sich um:

- Pumpe:
 - Druck
 - Fluss
 - A/B-Zusammensetzung; nützlich für eine Überlagerung des Chromatogramms mit dem Gradientenprofil
- Säulentermostat:

- Temperatur links/rechts
- Detektor:
 - Temperatur der Platine
 - Temperatur der Optikeinheit
 - Anodenspannung der UV-Lampe

Datenanalyse

Signaldetails

Auf den Bildschirm **Signal Details** kann in der Ansicht **Method and Run Control** auch direkt zugegriffen werden: Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf das Symbol **Calibration** auf der graphischen Benutzeroberfläche und wählen Sie dann **Signal Details** im Kontextmenü. In der Ansicht Datenanalyse kann über das Menü **Kalibrierung > Signaldetails** auf den Bildschirm zugegriffen werden.

Der Bildschirm **Signal Details** ist die nächste Phase bei **Edit Entire Method**. Hier wird eingegeben, welche der erfassten Signale bei der Datenanalyse zu verarbeiten sind. Im Dropdown-Feld sind die verfügbaren Signale aufgelistet, darunter die Analysesignale, die in den Detektoreinstellungen festgelegt wurden, und aufgezeichnete Parameter wie Temperatur, Fluss, Zusammensetzung Druck und Diagnosetraces. Wählen Sie ein Signal aus und klicken Sie auf **Add to Method**, um es in die Tabelle **Signal Details** im unteren Bereich des Bildschirms zu überführen. Sie können einzelne oder alle erfassten Detektorsignale zur Verarbeitung auswählen. Wenn keine Signale ausgewählt wurden, ist die Tabelle leer. In diesem Fall verarbeitet ChemStation standardmäßig alle erfassten Detektorsignale.

Es kann vorkommen, dass ein Anwender eine vorhandene Methode bearbeitet, um eine neue zu erstellen, und beim Versuch, die Methode auszuführen, tritt eine **Parameter Mismatch** auf. Der Grund dafür ist, dass die **Signal Details** der ursprünglichen Methode ein spezielles Signal enthielten, beispielsweise 250 nm mit 8 nm Bandbreite, und dies in der neu erstellten Methode beispielsweise in 254 nm/12 nm geändert wurde. Die Tabelle **Signal Details** enthält immer noch die ursprünglichen Angaben, was bedeutet, dass ein Signal verarbeitet werden soll, das gar nicht mehr erfasst wird. Zur Korrektur des Problems markieren Sie das ursprüngliche Signal in der Tabelle und entfernen Sie es durch Anklicken der Schaltfläche **Delete Row**.

6 Anhang

Einrichtung einer Methode mithilfe von Edit Entire Method

Bei einem System mit mehreren Detektoren, beispielsweise einem Diodenarray-Detektor und einem Massenspektrometer, erlauben die Zeilen **Signal Description** die Eingabe von Verzögerungszeiten für den stromabwärts gelegenen Detektor, so dass die Software die von den verschiedenen Detektoren erfassten Peaks zur Deckung bringen kann.

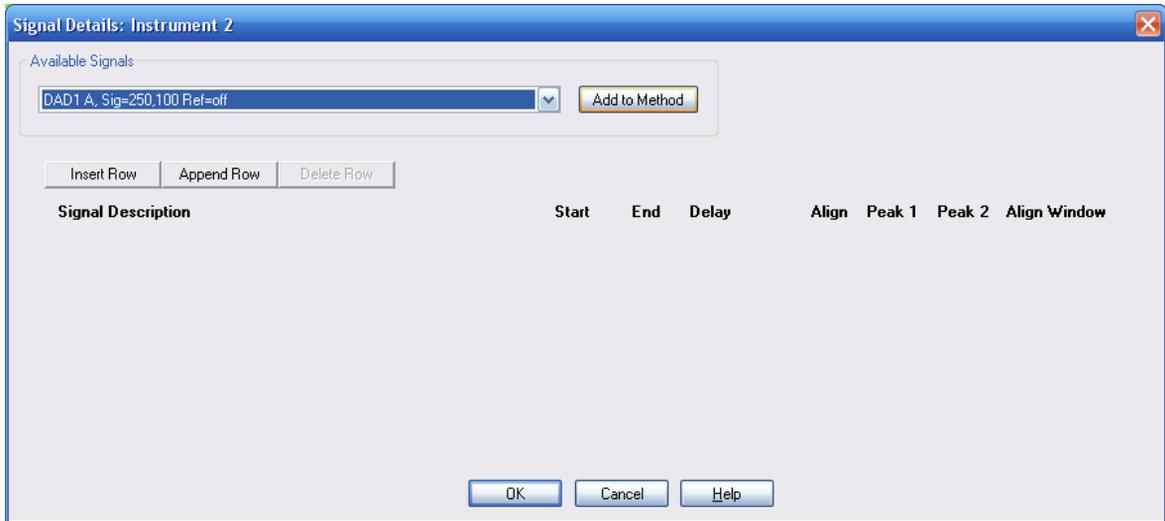


Abbildung 43 Signaldetails

Integrationsereignisse bearbeiten

Der Bildschirm **Edit Integration Events** kann in der Ansicht **Method and Run Control** durch Rechtsklicken auf das Symbol Integrationsereignisse auf der graphischen Benutzeroberfläche und anschließendes Klicken auf **Edit Integration Events** im Kontextmenü auch direkt aufgerufen werden. In der Ansicht **Data Analysis** kann er über das Menü **Integration > Integrationsereignisse ...** oder das Aufgabensymbol **Edit Integration Events** aufgerufen werden.

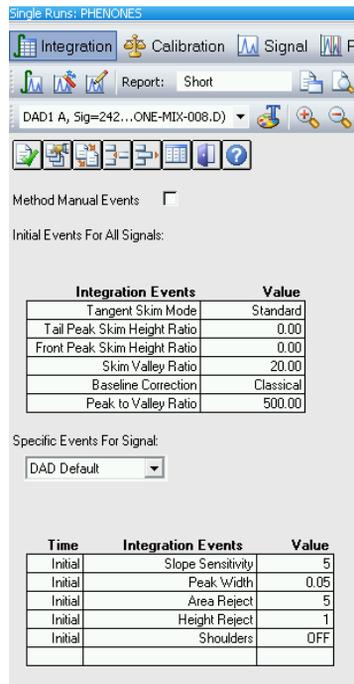


Abbildung 44 Bildschirm Bearbeiten von Integrationsereignissen

Integration, Kalibrierung und Berichte bilden den Datenanalyse-Teil der Methode. Die Integrationsparameter und die Kalibrierungstabelle sind einfacher einzurichten, sobald Daten erfasst worden sind und die Daten in der Ansicht Datenanalyse überprüft werden. Die Integrationsereignisse können zu diesem Zeitpunkt optimiert werden und für die anfänglichen Läufe zur Datenerfassung werden oft die Standardeinstellungen verwendet.

Der Bildschirm **Edit Integration Events** umfasst zwei Tabellen:

- **Initial Events For All Signals** enthält Ereignisse (Integrationsparameter), die auf alle mit der Methode erfassten Signale zutreffen,
- **Specific Events For Signal** enthält Ereignisse, die für einen Typ Detektor oder für verschiedene Signale desselben Detektors spezifisch sind.

Schlüsselparameter in dieser Tabelle sind:

- **Slope Sensitivity** gibt die Steigung und die Krümmung der Basislinie an, die erforderlich ist, um Anfang und Ende eines Peaks zu kennzeichnen.
- **Peak Width** Hier wird die Breite eingegeben, die der schmalste Peak in halber Höhe aufweist. So kann vom Integrator besser zwischen Rauschen und sehr kleinen Peaks unterschieden werden.
- **Area Reject / Height Reject** dient zur Eingabe von Werten für die Fläche oder Höhe von Peaks, unterhalb derer die Ergebnisse der entsprechenden Peaks zurückgewiesen werden.
- **Integration OFF/ON** ermöglicht das Unterdrücken der Integration zwischen den angegebenen Grenzen. Wird fast immer verwendet, um die Integration im Bereich zwischen der Injektion und der Lösungsmittelfront oder dem Marker für einen nicht retinierten Peak zu verhindern.

Zeilen wie **Integration OFF/ON** werden der Tabelle mithilfe der Symbole oben im Fenster hinzugefügt.

Klicken Sie zum Beenden auf **OK** und der nächste Bildschirm für das Verfahren Ganze Methode bearbeiten wird geöffnet.

Bericht spezifizieren

Der Bildschirm **Specify Report** kann in der Ansicht **Method and Run Control** durch Rechtsklicken auf das Symbol Bericht auf der graphischen Benutzeroberfläche und anschließendes Klicken auf **Specify Report** im Kontextmenü auch direkt aufgerufen werden. In der Ansicht **Data Analysis** kann er über das Menü **Bericht > Bericht spezifizieren** oder das Aufgabensymbol Bericht spezifizieren aufgerufen werden.

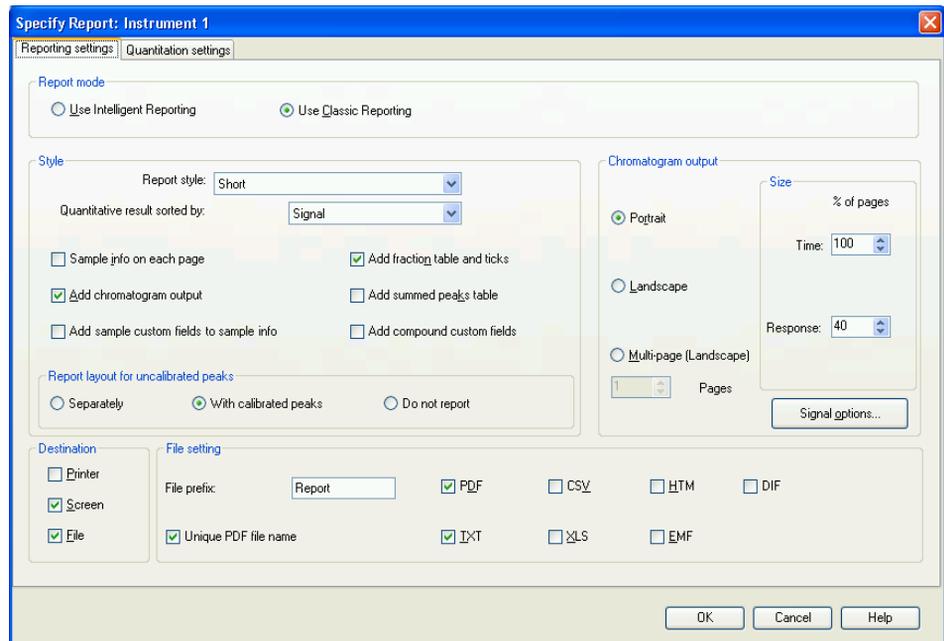


Abbildung 45 Bildschirm Bericht spezifizieren

Um einen einfachen Bericht über Fläche% mit der klassischen Berichtsfunktion einzurichten, der an den Drucker übertragen und als pdf-Datei ausgedruckt wird, geben Sie die folgenden Einstellungen in die entsprechenden Abschnitte im Bildschirm Bericht spezifizieren ein:

Auf der Registerkarte **Reporting settings**:

- **Report mode:** Verwenden Sie Klassischen Bericht erstellen
- **Style**
 - **Report Style:** Kurz
 - **Quantitative results sorted by:** Signal

6 Anhang

Einrichtung einer Methode mithilfe von Edit Entire Method

- **Add Chromatogram Output:** Aktiviert
- **Chromatogram Output:** Hochformat
- **Size:**
 - **Timeachse** 100 % der Seite
 - **Responseachse** 40 % der Seite
- **Destination**
 - **Printer:** Aktiviert
 - **Screen:** Nicht aktiviert
 - **File:** Aktiviert
- **File Setting:**
 - **PDF:** Aktiviert
 - **Unique PDF file name:** Aktiviert

Auf der Registerkarte **Quantitation settings:**

- **Calculation mode**
 - **Calculate:** Prozent
 - **Based on:** Fläche

Klicken Sie zum Beenden auf **OK** und der nächste Bildschirm für das Verfahren Ganze Methode bearbeiten wird geöffnet.

Gerätekurven

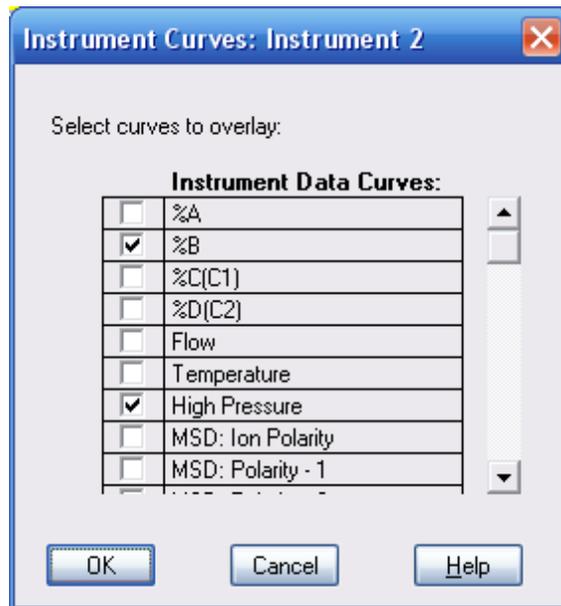


Abbildung 46 Bildschirm Gerätekurven

Sind die Kontrollkästchen **Instrument Curves** aktiviert, werden die entsprechenden aufgezeichneten Parameter dem Chromatogramm als Graph überlagert.

Laufzeit-Checkliste

Die **Run Time Checklist** kann über das Menü **Methode > Laufzeit-Checkliste ...** oder durch Klicken auf das Symbol **Run Time Checklist** rechts oben im Bildschirm auch direkt aufgerufen werden.

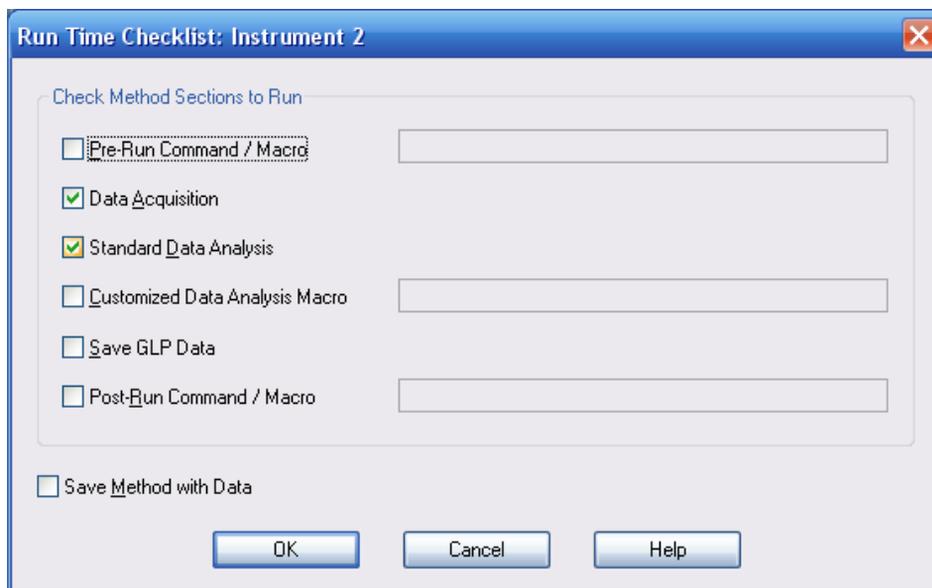


Abbildung 47 Bildschirm Laufzeit-Checkliste

In der **Run Time Checklist** wird festgelegt, ob die Methode sowohl Datenerfassung als auch Datenanalyse umfassen soll. Außerdem bietet sie die Möglichkeit, an verschiedenen Zugriffspunkten Makrobefehle oder -programme mit dem Arbeitsablauf zu verlinken. In den meisten Fällen werden die Kontrollkästchen **Data Acquisition** und **Standard Data Analysis** aktiviert. Wenn keine Datenanalyse erforderlich ist, beispielsweise bei einer Reihe von Läufen zur Methodenentwicklung, kann **Standard Data Analysis** deaktiviert werden, so dass kein Bericht erstellt wird. Die Daten können dann später in der Ansicht **Data Analysis** visuell überprüft werden.

Um ein Makroprogramm an einem der Zugriffspunkte mit der Methode zu verlinken, wird das entsprechende Kontrollkästchen aktiviert und der Name des Makros wird in das Textfeld rechts eingegeben. Die Software sucht im Verzeichnis C:\Chem32\Core nach dem Makro; wenn es an einem anderen Ort gespeichert ist, muss der Pfad ebenfalls eingegeben werden.

Dies sind die Zugriffspunkte im Arbeitsablauf der Methode:

- **Pre-Run Command / Macro**
- **Customized Data Analysis Macro**
- **Post-Run Command / Macro**

Save Method with Data dient zum Speichern einer Kopie der Methode in der Datendatei, die den Namen RUN.M erhält. Dies ist nicht erforderlich, wenn die ChemStation in der üblichen Konfiguration betrieben wird, da die Methode von der Software grundsätzlich in der Datendatei gespeichert wird (alle Versionen ab B.02.01). Nur wenn die ChemStation so konfiguriert wurde, dass **Unique Sequence Folder Creation** ausgeschaltet ist und somit die Methode nicht routinemäßig in der Datendatei gespeichert wird, ist diese Option relevant.

Da dies der letzte Bildschirm im Verfahren ist, werden durch Klicken auf **OK** die **Run Time Checklist** und das Verfahren **Edit Entire Method** beendet. Die Methode sollte nun im Methoden-Masterverzeichnis gespeichert werden, standardmäßig C:\Chem32\1\Methods, und zwar über **Datei > Speichern unter > Methode** oder **Methodenmenü > Methode speichern unter**.

Software-Vokabular

1

- 1290 Infinity Autosampler
 - 1290 Infinity Automatischen Proben-
geber
- 1290 Infinity Binary Pump
 - 1290 Infinity Binäre Pumpe
- 1290 Infinity TCC
 - 1290 Infinity Säulenthmostaten

A

- Add
 - Hinzufügen
- Add Chromatogram Output
 - Chromatogrammausgabe hinzufügen
- Add to Method
 - Zur Methode hinzufügen
- Adjust
 - Anpassen
- Advanced
 - Erweiterte Einstellungen
- Advanced - Analog Output
 - Erweiterte Einstellungen - Analogaus-
gang
- Advanced - Autobalance
 - Erweiterte Einstellungen - Automa-
tischer Abgleich
- Advanced - Auxiliary
 - Erweiterte Einstellungen - zusätzliche
Einstellungen
- Advanced - High Throughput
 - Erweiterte Einstellungen - Hoher
Durchsatz

- Advanced - Lamps on required for analysis
 - Erweiterte Einstellungen - Einschalten
der Lampen für die Analyse erforder-
lich
- Advanced - Margin for Negative Absor-
bance
 - Erweiterte Einstellungen - Toleranz für
negative Extinktion
- Advanced - Slit
 - Erweiterte Einstellungen - Spalt
- Advanced - Spectrum
 - Erweiterte Einstellungen - Spektrum
- All
 - Alle
- Apply
 - Übernehmen
- Apply to Method
 - Auf Methode anwenden
- Area Reject
 - Fläche zurückweisen
- Area Reject / Height Reject
 - Fläche zurückweisen/minimale Höhe
- As Detector Cell
 - Wie Detektorzelle
- As Pump
 - Wie Pumpe
- Attenuation
 - Dämpfung
- Automatic delay volume reduction
 - Automatische Reduktion des Verzöge-
rungsvolumens
- Available Signals
 - Verfügbare Signale

B

- Balance
 - Abgleich
- Bandwidth
 - Bandbreite
- Based on
 - Grundlage
- Baseline Correction
 - Basislinienkorrektur

C

- Calculate
 - Berechnen
- Calculation mode
 - Berechnungsmodus
- Calibration
 - Kalibrierung
- Cancel
 - Abbrechen
- Change Solvent Composition
 - Lösungsmittelzusammensetzung
ändern
- Change...
 - Ändern ...
- Check Method Sections to Edit
 - Zu bearbeitende Methodenabschnit-
te prüfen
- Chromatogram Output
 - Chromatogrammausgabe
- Clear all
 - Alle löschen
- Column Switching Valve
 - Säulenschaltventil

Combined
Kombiniert

Comment
Kommentar

Composition A
Zusammensetzung A

Composition B
Zusammensetzung B

Control
Steuerung

Customized Data Analysis Macro
Anwenderdefinierte Datenanalyse
Makro

Cut
Ausschneiden

D

Data Acquisition
Datenerfassung

Data Analysis
Datenanalyse

Delete Row
Zeile löschen

Destination
Ausgabe

Draw position
Aufziehposition

Draw speed
Aufziehggeschwindigkeit

Duration
Dauer

E

Edit Entire Method
Ganze Methode bearbeiten

Edit Integration Events
Integrationsereignisse bearbeiten

Edit Signal Plot
Signal-Plot bearbeiten

Eject speed
Ausstoßgeschwindigkeit

Enable overlapped injection
Überlappenden Injektionsmodus aktivieren

Equilibration time
Äquilibrierungszeit

F

File
Datei

File Setting
Dateieinstellung

Filename
Dateinamen

Flow
Fluss

Flush Port
Spülanschluss

H

Height Reject
minimale Höhe

Hip_ALS Injector Program
HiP_ALS Injektorprogramm

HiP-ALS Injector Program
HiP-ALS Injektorprogramm

I

Initial Events For All Signals
Anfängliche Ereignisse für alle Signale

Injection Mode
Injektionsmodus

Injection Valve Cleaning
Injektionsventil reinigen

Injection volume
Injektionsvolumen

Injection with needle wash
Injektion mit Nadelreinigung

Injector Cleaning
Injektor reinigen

Instrument Curves
Gerätekurven

Instrument/Acquisition
Gerät/Aufnahme

Instruments
Geräte

Integrate
Integrieren

Integration OFF/ON
Integration EIN/AUS

L

Launch online
Online starten

Load Method
Methode laden

Location
position

M

Method
Methode

Method and Run Control
Methoden- und Analysenkontrolle

Method History
Methodenhistorie

Method Information
Methodeninformationen

Method...
Methode ...

Mode
Modus

N

Needle Wash
Nadelreinigung

Software-Vokabular

No Limit
Unbegrenzt
No Limit / Off
Unbegrenzt/Aus

O

Off
Aus
Online Plot
Online-Plot

P

Parameter Mismatch
Parameter-Nichtübereinstimmung
Paste
Einfügen
Peak Width
Peakbreite
Peakwidth
Peakbreite
Post Time
Nachlaufzeit
Postrun
Nachlaufphase
Post-Run Command / Macro
Nachanalyse Befehl/Makro
Prerun
Vorlaufphase
Pre-Run Command / Macro
Vorlaufphase Befehl/Makro
Pressure Limits
Druckgrenzwerte
Prime On
Initialisierung Ein
Printer
Drucker
Pump
Pumpe

Purge
Spülen
Purge On
Spülen Ein

Q

Quantitation settings
Quantifizierungseinstellungen
Quantitative results sorted by
Quantitative Ergebnisse sortiert nach

R

Range
Bereich
Reference Bandwidth
Referenzbandbreite
Reference Wavelength
Referenzwellenlänge
Remove
Entfernen
Repeat
Wiederholen
Report mode
Berichtmodus
Report Style
Berichtstil
Reporting settings
Berichteinstellungen
Response
Extinktions
Run Method
Methode ausführen
Run Sequence
Sequenz ausführen
Run Time Checklist
Laufzeit-Checkliste

S

Sample flush out factor
Probenausspülfaktor
Sample Info
Probeninfo
Sample Name
Probennamen
Save
Speichern
Save As...
Speichern unter ...
Save Method with Data
Methode mit Daten speichern
Screen
Bildschirm
Select Run Method Task
Aufgabe Analysenmethodenauswahl
Selected Signal
Ausgewählte Signale
Selected Signals
Ausgewählte Signale
Set Integration Events Table
Tabelle Integrationsereignisse einrichten
Setup Method
Methode einrichten
Show timetable graph
Graph für Zeitplan anzeigen
Signal Description
Signalbeschreibung
Signal Details
Signaldetails
Signals
Signale
Single Runs
Einzelne Analysen
Size
Größe

Skip
Überspringen

Slope Sensitivity
Steigungsempfindlichkeit

Solvents
Lösungsmittel

Specific Events For Signal
Spezielle Ereignisse für einzelne Signale

Specify Report
Bericht spezifizieren

Spectrum Store
Speichern von Spektren

Standard Data Analysis
Standarddatenanalyse

Standard injection
Standardinjektion

Start Single Sample
Einzelne Probe starten

Step
Schritt

Stop Time
Stoppzeit

Stop Time / Post Time
Stoppzeit/Nachlaufzeit

Store
Speichern

Style
Stil

Subdirectory
Unterverzeichnis

Switch [module name] on
[Modulname] einschalten

System On/Off
System Ein/Aus

T

Temperature
Temperatur

Threshold
Schwellenwert

Time
Zeit

Timetable
Zeitplan

U

Unique PDF file name
Eindeutiger PDF-Dateiname

Unique Sequence Folder Creation
Erstellen eines eindeutigen Sequenzordners

Use Signal
Signal verwenden

V

Vial/Well bottom sensing
Flaschen-/Plattenboden detektieren

W

Wash Vial
Waschflasche

Water
Wasser

Wavelength
Wellenlänge

Z

Zero Offset
Nullpunktverschiebung

Index

A

Agilent 1290 Infinity LC System
 Leistungsbereich 22
 neue Eigenschaften und
 Funktionen 22
 Systemkomponenten 25

Agilent
 im Internet 120

Algen 119

Analyse
 Daten 109

Ansprechzeit 66

Auflösung 13, 18
 Optimierung 56

Automatische Minimierung des
 Totvolumens 68

B

Bandbreite 63

Bericht
 Spezifikation 113

Binäre Pumpe
 Beschreibung 25

D

Datenanalyse 122

Daten
 Analyse 109

Datenerfassungsrate 66

DEF_LC.M 121

Detektor
 Erzielen höherer Empfindlichkeit 61

Diodenarray-Detektor
 Beschreibung 36

E

Einrichtung einer Gerätemethode 124

Empfindlichkeit
 Optimierung 59

Extrasäulenvolumen
 Beschreibung 41

F

Flüssigkeitschromatographie
 Verwendung kleinerer Partikel 8

Flusszelle 119
 Informationen zu
 Lösungsmitteln 119
 Max-Light-Hochempfindlichkeitszelle
 61

Max-Light-Kartuschenzelle 61

G

Gerät/Aufnahme 122

H

Hoher Durchsatz
 Optimierung 53

I

Infinity Automatischer Probengeber
 Beschreibung 32

Informationen zu Lösungsmitteln 119

Injektionsvolumen
 Erreichen höherer Volumina 51

Integration 111

Integrieren
 Signal 111

Internet 120

J

Jet Weaver
 Kapillarverbindungen entfernen 48

K

Konfiguration
 ein Turm 75, 80
 zwei Türme, Rückansicht 79, 84
 zwei Türme, Vorderansicht 78, 83
 zwei Türme 78, 83

L

Laden
 Standard 96

Laufzeit-Checkliste 122

Lösungsmittel 119

M

Methode
 Einrichtung 102
 einzelne Injektion 105
 Ganze Methode bearbeiten 121
 schnelleres Ausführen 107
 Standard 121

Methodeninformationen 122, 123

Methodenparameter 100

N

Netzwerkintegration 91

O

- Online-Plot
 - Konfigurieren 97, 97
- Optimierung
 - Bedingungen bei der HPLC 11
 - chromatographische Trennung 11
 - Detektorempfindlichkeit 61
 - Erreichen höherer Empfindlichkeit 59
 - Erreichen niedrigster Verschleppung 68
 - Erzielung höherer Auflösung 56
 - höheren Durchsatz erzielen 53
 - Injektionsvolumina 51
 - Pumpenmischervolumen 59
 - Säuleneinsatz 59
 - Spaltbreite 64
 - Verstopfung von Säulen vermeiden 71
 - Wellenlänge und Bandbreite 61

P

- Partikel unter 2 μm 15
- Peakbreite 66
- Pumpe spülen ... 87
- Pumpenmischervolumen 59

R

- Rechner
 - Kosten 15
- Reibungserwärmung 19
- Retentionsfaktor 13

S

- Säulen
 - Partikel unter 2 μm 15
- Säulenthermostat
 - Beschreibung 34
- Säule

- Temperatur 19
- Thermostatisierung 19

- Schnellstart-Anleitung
 - Einführung 94

- Sicherheit
 - Allgemeine Informationen 116
 - Symbole 118

- Sicherheitsklasse I 116

- Signal
 - Integrieren 111

- Signalwellenlänge 63

- Spaltbreite 64

- Systemeinrichtung und Installation
 - Netzwerkintegration 91

- Systemkomponenten
 - automatischer Probengeber 32
 - binäre Pumpe 25
 - Diodenarray-Detektor 36
 - Säulenthermostat 34

- System
 - Einschalten 95

T

- Tabelle Integrationsereignisse 111
- theoretische Böden 13
- Totvolumen
 - Beispiel 40
 - Beschreibung 40

V

- Van-Deemter-Gleichung 9
- Verschleppung 68
- Verstopfung von Säulen
 - Gebrauchsregeln 71

W

- Wellenlänge und Bandbreite
 - Optimierung 61

www.agilent.com

Inhalt dieses Buchs

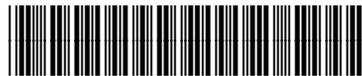
Dieses Handbuch enthält technische Referenzinformationen zum Agilent 1290 Infinity LC System.

Das Handbuch behandelt folgende Themen:

- Einführung,
- Gerätebeschreibung,
- Systemoptimierung,
- Einrichtung und Installation,
- Schnellstart-Anleitung.

© Agilent Technologies 2009-2011, 2012

Printed in Germany
05/2012



G4220-92301



Agilent Technologies