



Agilent HPLC Day

1200 Infinity Series

“Cromatografía Multidimensional LCxLC:
La solución para mejorar la resolución y
eficiencia analítica”

13:00-13:30

Agilent InfinityLab LCs



**EFFICIENCY
INSTRUMENTAL**

2D-LC

Facultat de Farmàcia
Universitat València
Burjassot, 7 Juliol 2016

Isidre Masana
Agilent Technologies
Especialista Productos UHPLC/MS

 Agilent Technologies



1200 Infinity Series

“Cromatografía Multidimensional LCxLC:
La solución para mejorar la resolución y
eficiencia analítica”

Agilent InfinityLab LCs



1290 Infinity II

1260 Infinity II

1220 Infinity

Agenda 2D-LC

1. Introducción
2. Configuraciones Típicas y Ejemplos de Aplicación.
3. Resumen

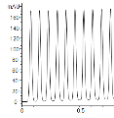
Página: 2

 Agilent Technologies

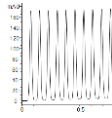
¿Porqué 2D-LC?

1200 Infinity Series

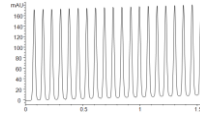
LC + LC (Cromatografía **Monodimensional**)



Peak capacity = 10

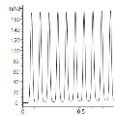


Peak capacity = 10

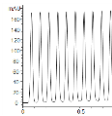


Peak capacity = 20
Doblando longitud columna

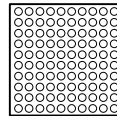
LC x LC (Cromatografía **Bidimensional: 2D-LC**)



Peak capacity = 10



Peak capacity = 10



Peak capacity = 100 !
Condiciones de separación ORTOGONALES:

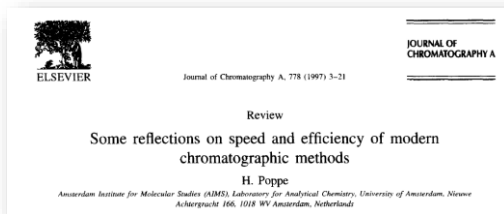
2D-LC Reduce muy considerablemente el solapamiento de picos.

- Cambio tipo de fase /mecanismo separación
- Cambio pH, modificadores,....

¿Porqué 2D-LC?



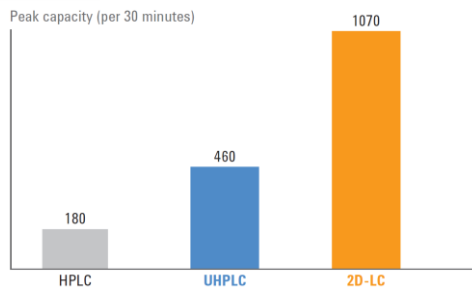
1200 Infinity Series



2D LC mejora la capacidad de separar picos :

- **x 2 Capacidad de UHPLC**
- **x 5 Capacidad de HPLC**
- Permite llegar a **separaciones** de picos **imposibles de resolver con 1D-LC.**

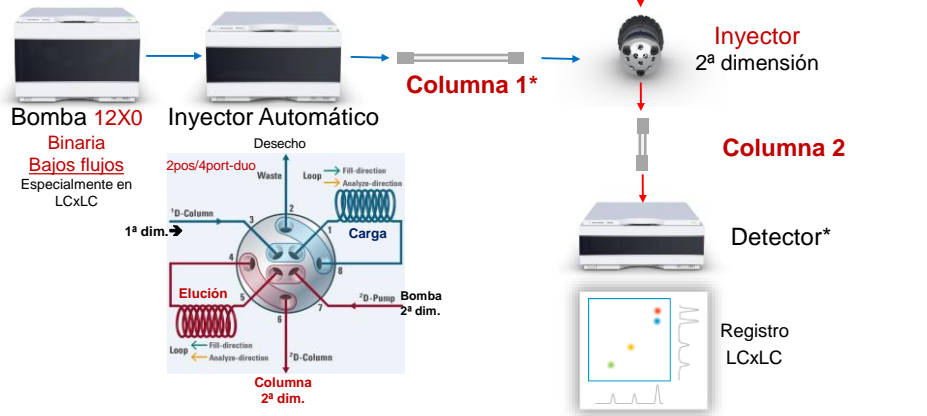
“Resolving power is what it is all about in analytical separation science.”



Solución 1290 Infinity 2D-LC

¿En Qué Consiste?

Separación por LC en 2 dimensiones :



*Para monitorizar la 1ª dimensión, se puede situar otro detector entre la columna 1 y la válvula de inyección en la 2ª dimensión.



“Cromatografía Multidimensional LCxLC: La solución para mejorar la resolución y eficiencia analítica”



Agenda 2D-LC

1. Introducción 2D-LC
2. Configuraciones Típicas y Ejemplos de Aplicación.
3. Resumen

Agilent InfinityLab LCs



1290 Infinity II

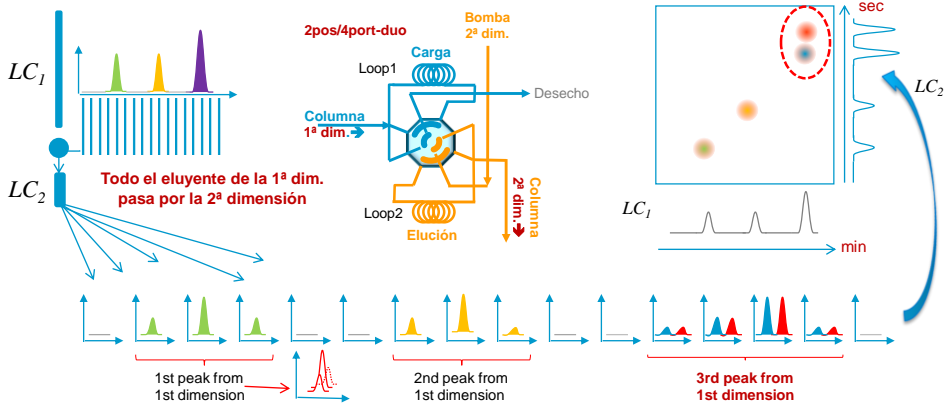
1260 Infinity II

1220 Infinity

2D-LC: “Comprehensive” 2D-LC (LCxLC)

1200 Infinity Series

- El **efluente completo** de la primera columna se inyecta a la segunda columna y se analiza con **gradientes muy rápidos**.
- Un pico de la primera dimensión debe ser muestreado por lo menos 3 a 4 veces. No se pierden picos
- El **tiempo de ejecución del método de la segunda dimensión coincide con el tiempo de recogida de efluente de la primera dimensión**. Finalmente, los picos se reconstruyen.
- Aplicación típica: **muestras complejas** que requieran la máxima capacidad posible de separación.



Página: 7

Agilent Technologies

Muy Fácil Puesta en Marcha de Complejos Métodos 2D-LC – Parámetros específicos de la bomba 2D

1200 Infinity Series

Selección modo 2D-LC mode: comprehensive / heart-cutting

Control Bomba 2D

Ajustes de Eluyentes y Flujos 2D

Define repetición del gradiente 2ª dimensión (Modulation time)

Define el gradiente base 2ª dimensión

Muestra despliegue gradiente 2ª dimensión sobre tiempo ejecución de la primera.

Edición gráfica de la deriva del gradiente

Define la ventana/s de activación del modo 2DLC

Flujo de "espera"

Alertas de valores operativos

Cálculo del consumo de disolvente

Primer plano del gradiente base - 2D

Acceso a la UI estándar de la bomba.

El conjunto de gradientes de la 2ª dimensión se puede editar y modificar gráficamente mediante sencillos arrastres de sus límites con el ratón.

Alternativa: "Peak controlled"

Página: 8

Agilent Technologies

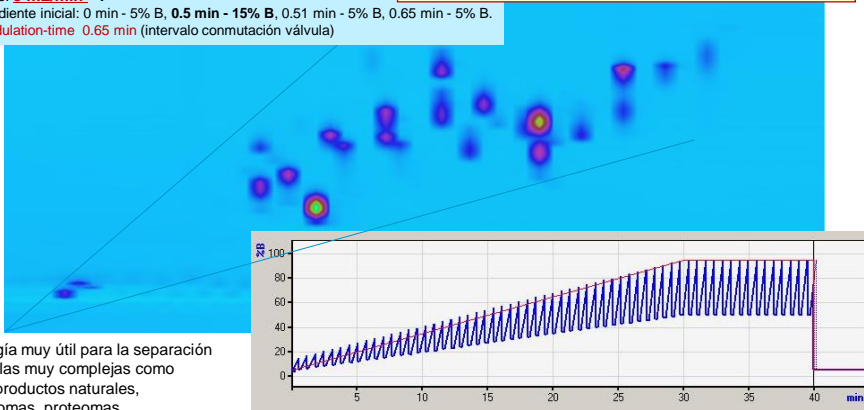
Ejemplo de Perfil Gradientes 2D Optimizado

1200 Infinity Series

- 1ª Dimensión: Análisis lento a flujos bajos**
- Eclipse Plus RRHD, **C18, 150 x 2.1 mm, 1.8 µm.**
 - Flujo: **0.1 mL/min.**
 - Gradiente: 0 min 5% B – 30 min 95% B, 40min stop-time.

- 2ª Dimensión: Análisis ultra-rápido a flujos MUY altos**
- Eclipse Plus RRHD, **Phenyl Hexyl, 50 x 3.0 mm, 1.8 µm**
 - Flujo: **3 mL/min.****
 - Gradiente inicial: 0 min - 5% B, **0.5 min - 15% B**, 0.51 min - 5% B, 0.65 min - 5% B.
 - Modulation-time **0.65 min** (intervalo conmutación válvula)

****La capacidad de separación en gradiente es DIRECTAMENTE proporcional al FLUJO de trabajo (y al tiempo del gradiente).**



Tecnología muy útil para la separación de mezclas muy complejas como lípidos, productos naturales, metabolomas, proteomas,....

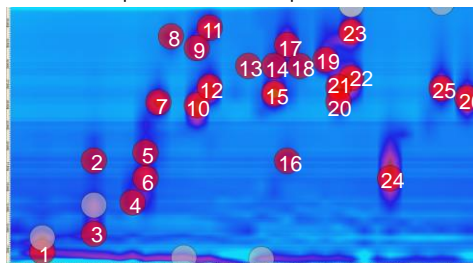
Ejemplo Aplicación: Repetibilidad Cuantitativa Polifenoles en matriz Alimentaria

1200 Infinity Series

Compound		RT 1st dim (min)	RT 2nd dim (sec)	Peak Volume
Esculin	mean	9.75	18.58	177,383
	s.d.	nd	0.11	4,713
	RSD (%)	nd	0.57	2.7
Rutin	mean	13.65	33.68	72,375
	s.d.	nd	0.07	853
	RSD (%)	nd	0.22	1.2
Coumaric acid	mean	13.00	25.57	660,541
	s.d.	nd	0.13	13,037
	RSD (%)	nd	0.52	2.1
Reservatrol	mean	18.85	26.65	1,122,219
	s.d.	nd	0.10	16,089
	RSD (%)	nd	0.37	1.4
Salicylic acid	mean	19.50	18.53	211,092
	s.d.	nd	0.10	6,895
	RSD (%)	nd	0.51	3.3
Luteolin	mean	19.50	32.70	695,601
	s.d.	nd	0.11	17,592
	RSD (%)	nd	0.33	2.5
7-Hydroxy-Flavone	mean	22.75	34.26	1,388,226
	s.d.	nd	0.10	17,195
	RSD (%)	nd	0.30	1.3
Pinoslyvin	mean	24.70	18.85	1,588,654
	s.d.	nd	0.23	57,580
	RSD (%)	nd	1.24	3.6
Chrysin	mean	27.30	27.42	808,916
	s.d.	nd	0.11	14,768
	RSD (%)	nd	0.39	1.8
Flavone	mean	28.60	26.38	1,008,012
	s.d.	nd	0.13	20,911
	RSD (%)	nd	0.48	2.1

RSD% Volumen picos:
Todos los compuestos <3.6% RSD
 (1.2-3.6%)

Amplia cobertura del espacio 2D



GC Image LCxLC Edition Software
 from GC Image LLC



1200 Infinity Series

“Cromatografía **Multidimensional LCxLC**:
La solución para mejorar la resolución y
eficiencia analítica”

Agenda 2D-LC

Agilent **InfinityLab** LCs



1290 Infinity II

1260 Infinity II

1220 Infinity

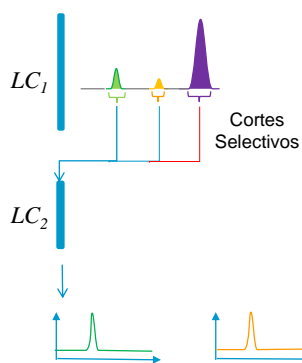
1. Introducción 2D-LC
2. Configuraciones Típicas y Ejemplos de Aplicación.
 - LCxLC: “Comprehensive”.
 - LC-LC: “Heart-Cutting”.
 - mLC-LC: “Multiple Heart-Cutting”.
3. Resumen

Página: 11

10-20m

2D-LC: “Heart-cutting” 2D-LC (LC-LC)

Heart-cutting 2D-LC (LC-LC):



- **Sólo algunas partes** del efluente de la primera columna (picos seleccionados de la primera dimensión) se inyectarán en la segunda columna. “Requiere” 2 detectores (uno para cada columna).
- Normalmente, un pico de la primera dimensión se muestra en su conjunto y en la segunda dimensión se utiliza un **gradiente con un mayor tiempo de ejecución que el tiempo de recogida**. En la segunda dimensión se suelen utilizar columnas más largas (que en LCxLC) para una mayor capacidad de separación y con distinta selectividad.
- Aplicación típica en farma: corroborar la **pureza del principio activo**.
- **OJO!!**: Los picos de la primera dimensión que eluyen cuando está aún ejecutándose el gradiente en la segunda dimensión - **se perderán!!!**.
 - Solución: **Multiple Heart-cutting** 2D-LC

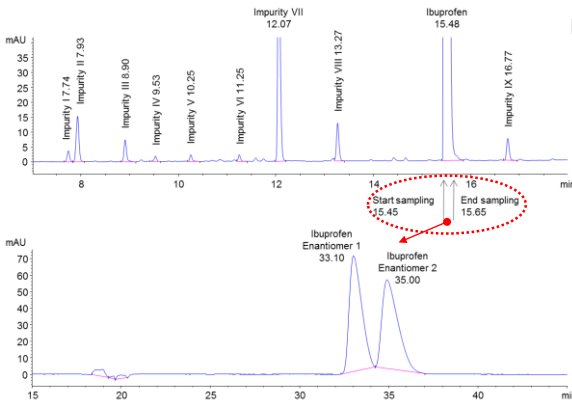


Página: 12

Análisis 2D-LC NO Quiral de Impurezas y Quiral del Principio Activo con 1 sola Inyección.

Ejemplo Ibuprofeno (racémico) con modalidad “Heart Cutting“

1200 Infinity Series



Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus **C18**,
2.1 × 150 mm, 1.8 μm
 Flujo: **0.25 mL/min** - Gradiente: **25min**

1ª Dim:
C18
Impurezas

2ª Dim:
 Columna **Quiral**
Enantiómeros
principio activo

Columna **Quiral**, **4.6 × 250 mm, 5 μm**
 Flujo: **1 mL/min** – Isocrático **40min**

Datos Nota Aplicación Agilent: **5991-4664EN**

Página: 13



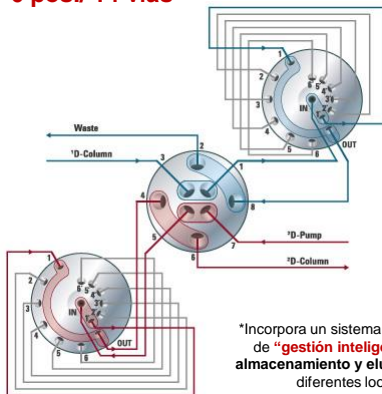
Nueva Solución 1290 Infinity II 2D-LC

Multiple heart-cutting

1200 Infinity Series

Elegante solución* mediante un sistema de válvulas **con 12 loops**:
 → válvula **2D-LC + 2** válvulas de **6 pos./ 14 vías**

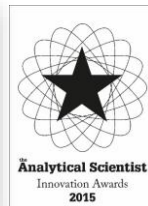
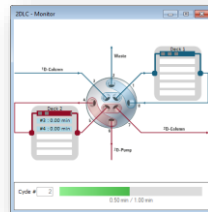
Kits de loops de válvulas **pre-alineados y calibrados**, sólo tiene que añadirlos al sistema 2D-LC existente.



*Incorpora un sistema automático de “gestión inteligente” del almacenamiento y elución de los diferentes loops



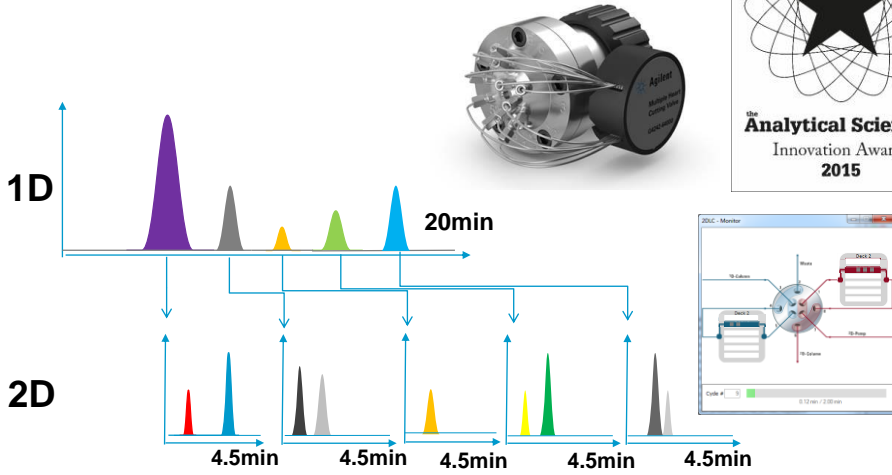
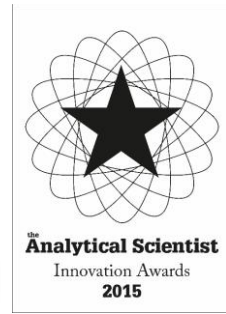
Monitorización “Online” estado.



Página: 14



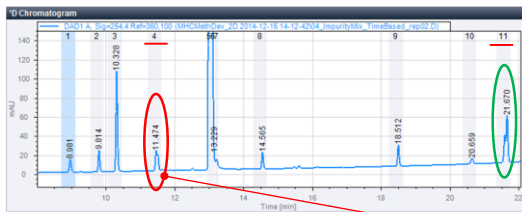
Nueva Solución 2D-LC 1290 Infinity II Multiple heart-cutting



Permite **retener en distintos loops distintas fracciones de la 1ª dimensión** para analizarlas cuando se pueda en la 2ª dimensión

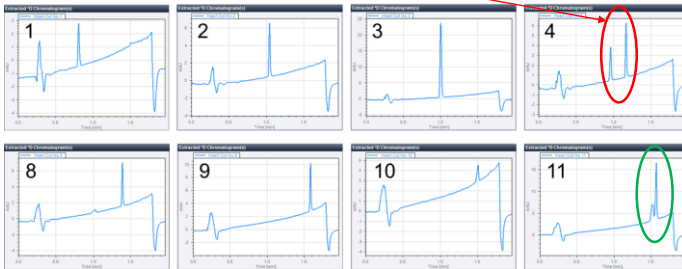
Desarrollo de Métodos para Análisis de Impurezas **Multiple Heart-cutting 2D-LC** Revela la Coelución de Impurezas

1200 Infinity Series



Flujo **0.2 mL/min**; grad. 25min
Eclipse Plus C18, **2.1 x 150 mm, 1.8 µm**;
Detección: DAD at 254 nm

- ¿Hay impurezas ocultas debajo del pico principal compuesto?
- ¿Hay coeluciones de impurezas?



Flujo **2.0 mL/min**
Poroshell 120 Bonus-RP,
4.6 x 50 mm, 2.7 µm

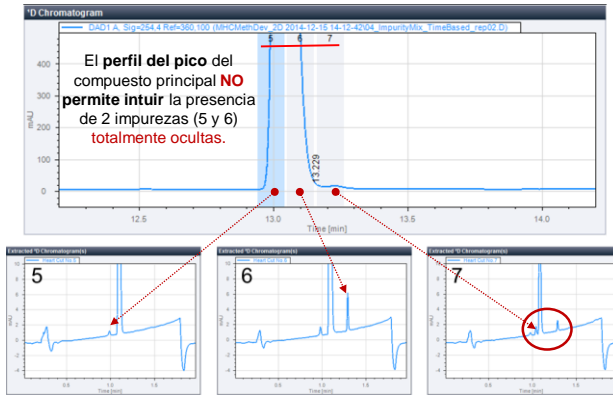
**2D grad. stop time 1.50 min
cycle time 2.00 min.**

Datos Nota Aplicación Agilent: 5991-5643EN

Desarrollo de Métodos para Análisis de Impurezas

Multiples Cortes del pico del Compuesto Principal

1200 Infinity Series



- Debajo de los anchos picos del principio activo suele ser donde se producen el mayor nº de solapamientos y donde es más difícil detectarlos con 1D-LC.
- Dos impurezas (5 y 6) completamente ocultas bajo el pico del compuesto principal
- Coelución parcial de una tercera impureza (7) con el compuesto principal.

Página: 17

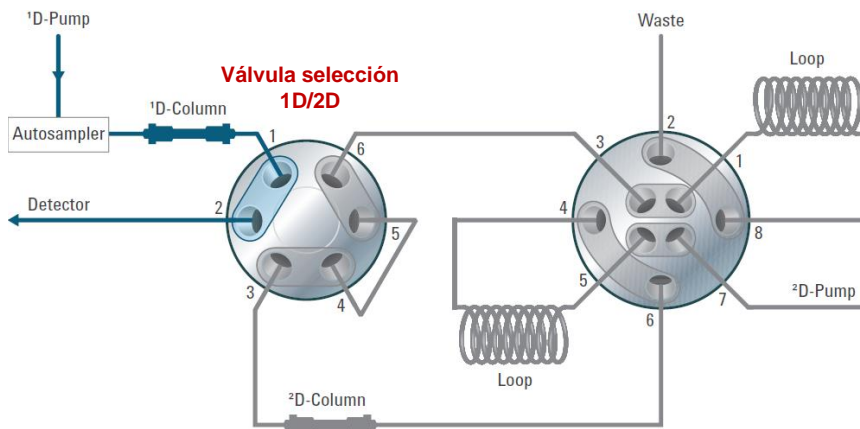
17

Cambio entre U/HPLC y 2D-LC SIN interacción manual:

Configuración Sistema Conmutación 1D ↔ 2D

1200 Infinity Series

Configuración de la válvula: **modo U/HPLC**

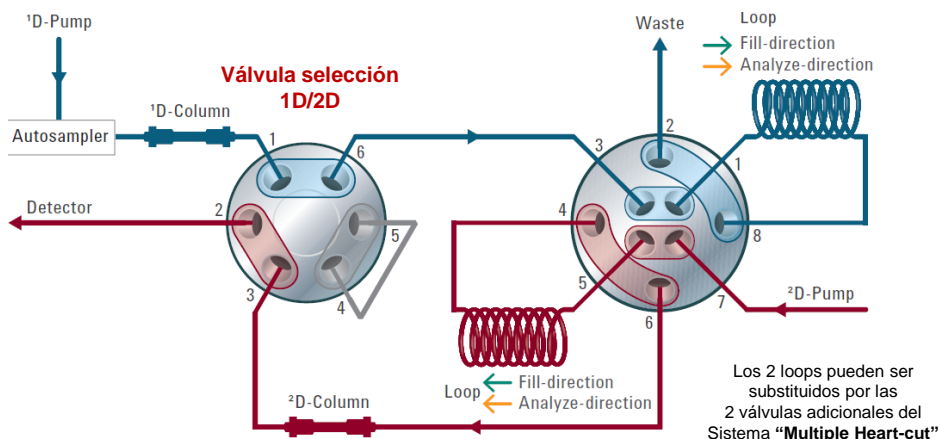


Página: 18

Cambio entre U/HPLC y 2D-LC SIN interacción manual: Configuración Sistema Conmutación 1D↔2D

1200 Infinity Series

Configuración de la válvula: modo 2D-LC



Página: 19

Agilent Technologies

Sectores y Aplicaciones Típicas de 2D-LC

1200 Infinity Series

SECTORES TÍPICOS:

- Farma y Biofarma.
- Química Fina.
- Petroquímica.
- Polímeros.
- Alimentación.
- Medio ambiente.
- Proteómica
- Metabolómica
- Universidades y Centros de Investigación:
 - Dptos. Química Analítica.
 - Dptos. Investigación en Cromatografía.
- ...

APLICACIONES TÍPICAS:

- Separación de **muestras complejas**:
 - Productos naturales.
 - Muestras biológicas.
 - Alimentos.
 - Muestras medio ambientales.
 -
- Determinación de **impurezas**.
- **Impurezas + Quirales** en 1 inyección.
- **Validar la idoneidad** de nuevos **métodos de separación** de impurezas (/revisión de antiguos).
- Separación de **metabolitos, lípidos, péptidos, proteínas, ...**
- Separación de **polímeros**.
- ...

Página: 20

Agilent Technologies



1200 Infinity Series

“Cromatografía **Multidimensional LCxLC**:
La solución para mejorar la resolución y
eficiencia analítica”

Agenda 2D-LC

Agilent **InfinityLab** LCs



1290 Infinity II

1260 Infinity II

1220 Infinity

1. Introducción
2. Configuraciones Típicas y Ejemplos de Aplicación.
3. Resumen

Página: 21



1200 Infinity Series

Cromatografía Multidimensional
LCxLC y LC-LC: la solución para mejorar
la resolución y eficiencia de sus análisis

Resumen

1290
Infinity II

- 1.- **2D-LC** mejora la capacidad de separar picos :
 - x 2 Capacidad de UHPLC
 - x 5 Capacidad de HPLC
- 2.- En la **1ª dimensión** se utilizarán **columnas largas** (de pequeño d.i.) a **flujos bajos** y con **gradientes lentos**.
- 3.- En **LCxLC** en la **2ª dimensión** se utilizarán **columnas cortas a flujos altos** y con **gradientes muy rápidos**. En **LC-LC** suelen realizar **separaciones algo más lentas**.
- 4.- La modalidad **LCxLC** (“Comprehensive”) es ideal para separar **muestras complejas**.
- 5.- La modalidad **mLC-LC** (“Multiple Heart-cutting”) es ideal para:
 - Análisis de **impurezas**.
 - **Validar** el desarrollo de **nuevos métodos** de separación.



Estamos a su disposición en
tel.: 901.11.6890
customer care_spain@agilent.com

Muchas Gracias...

...por su Atención

Información Adicional 2D-LC:

- **Poster: 2D-LC/MS:** Cromatografía multidimensional de anticuerpos monoclonales (2D-LC/QTOF), perfiles de impurezas y enantiómeros, utilizando una única plataforma.

Agilent 2D-LC Primer: 5991-2359EN

isidre_masana@agilent.com
www.agilent.com/chem