
**Purity Screening von Substanzbibliotheken
mittels LCUVMS
Applica 16. Oktober 2012**

C. Bartelmus, pRED - F. Hoffmann-La Roche AG



Die Aufgabenstellung

Der Anlagenaufbau

Auswertung der Rohdaten

Zusammenfassung

Die Aufgabenstellung

Kontrolle der Integrität und der Reinheit der Substanzbibliothek

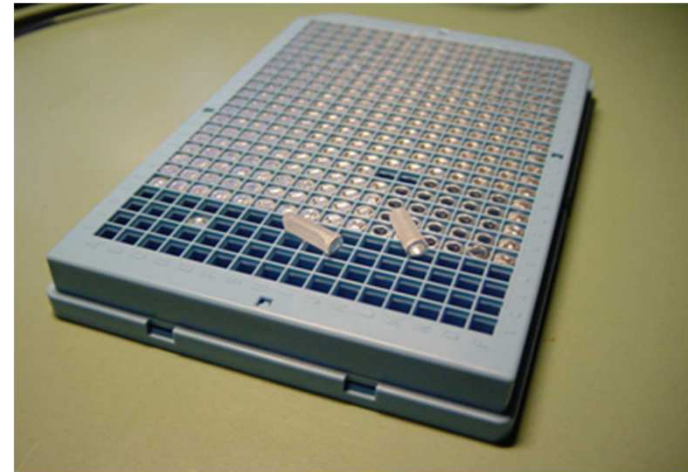
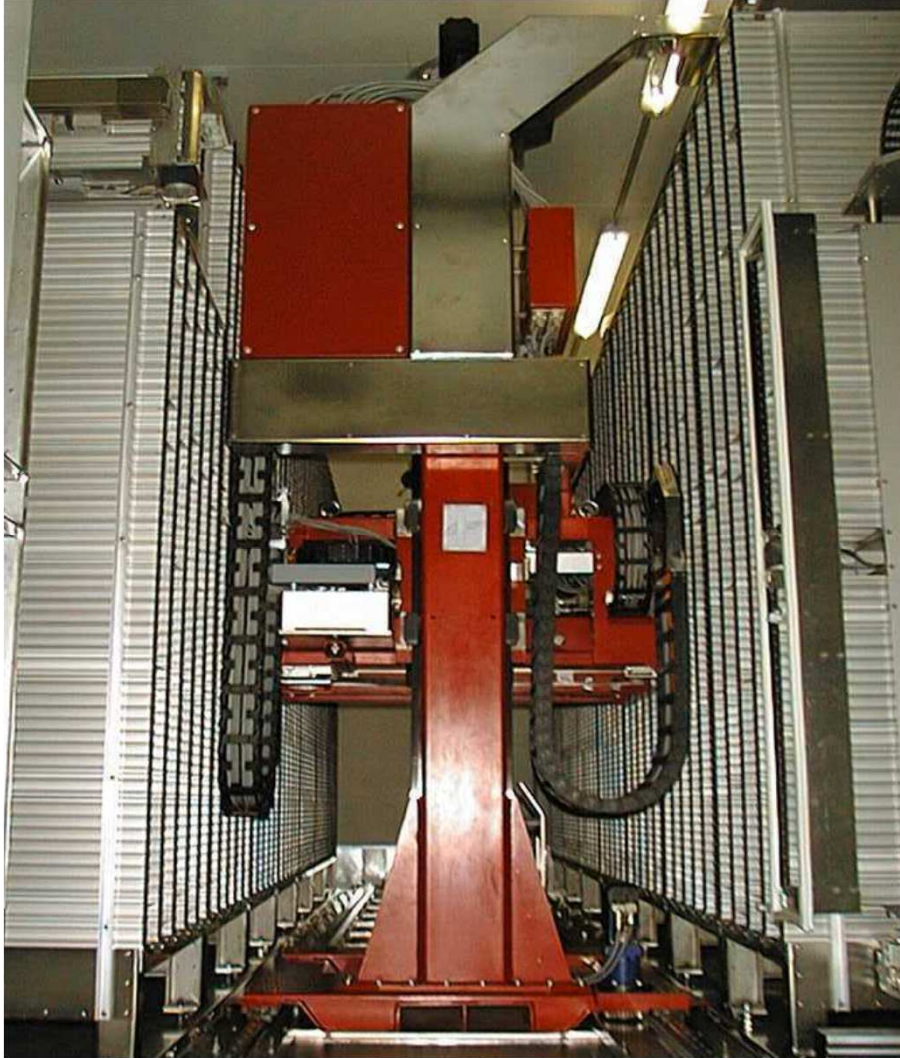
Die Substanzbibliothek umfasst mehr als 1 Mio. Verbindungen als DMSO Lösungen, die in verschiedenen Plate-Formaten bevorratet werden.

Hauptverwendung ist das HTS Screening.

⇒ Analyse von allen Substanzen die neu eingelagert werden

⇒ Analyse von «Hits»

Die Aufgabenstellung



Die Aufgabenstellung

Fragestellungen:

- Ist in dem Vial die erwartete Verbindung?
- Ist die Verbindung rein?
- Ist die Konzentration o.k.?

Methoden

- MS: Mass found? , NMR
- UV Area% , NMR Kategorisierung
- NMR

Probleme

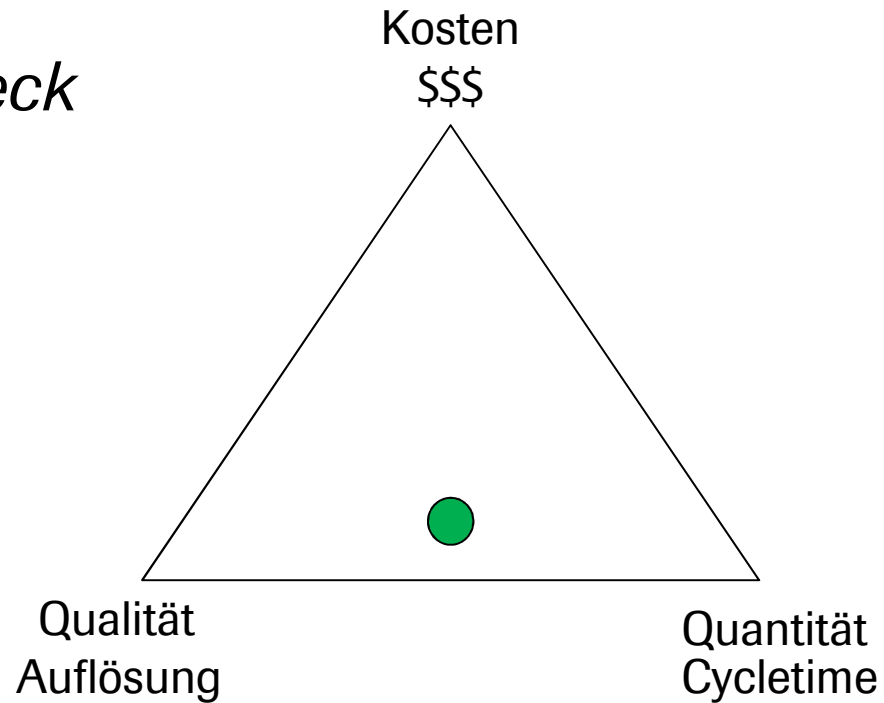
- LC / UV / MS kann nicht alle Fragestellungen beantworten
- Für das NMR gibt es keine zuverlässige automatisierte Auswertung

⇒ Zwischen 30 000 und 160 000 Analysen pro Jahr für LCUVMS

⇒ Etwa 1000 NMR Analysen pro Jahr

Die Aufgabenstellung

Das Spannungsdreieck



Jeder muss seinen Kompromiss finden

Frage: ist es wirklich nötig extrem schnell zu werden?

Wo ist der Flaschenhals? Probenvorbereitung? Datenaufnahme? Auswertung?

Die Aufgabenstellung

Der Anlagenaufbau

Auswertung der Rohdaten

Zusammenfassung

Aufbau der Anlagen und Optimierung der Module

Übersicht

Unser Kompromiss der letzten Jahre:

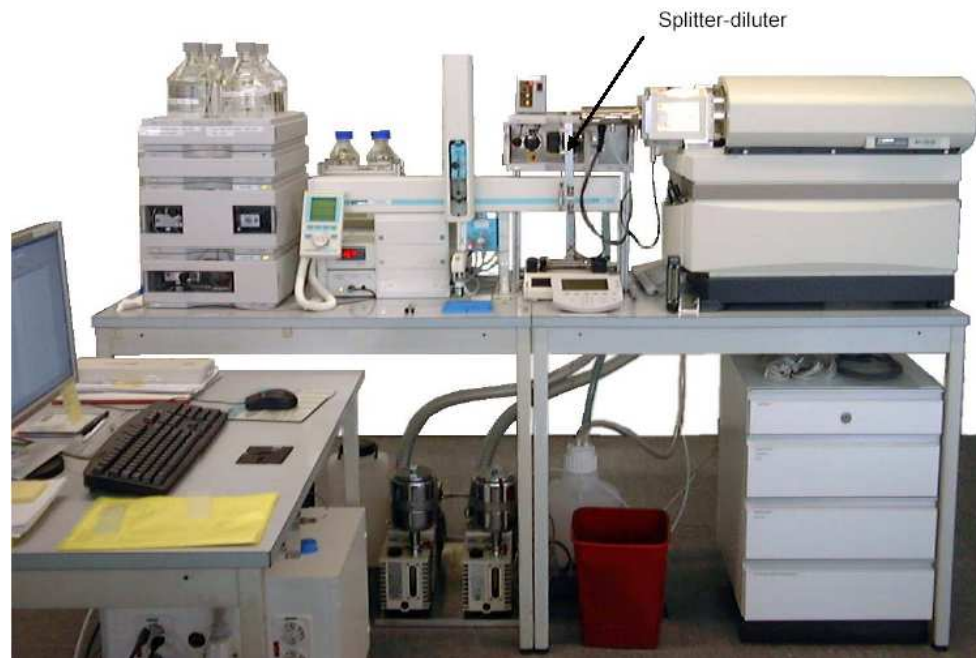
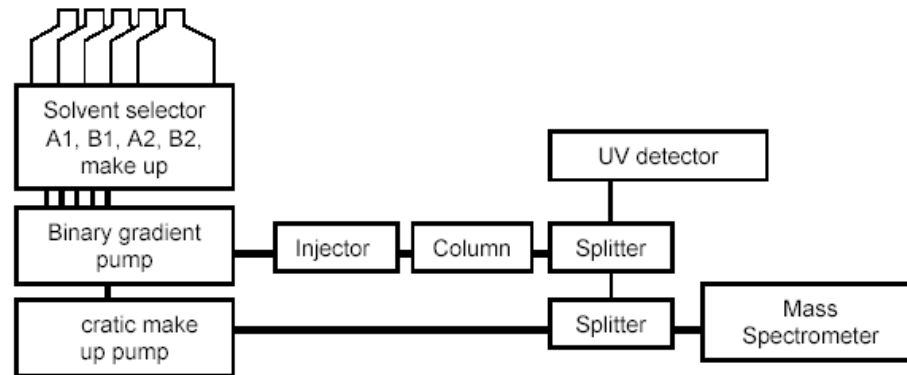
Be cheap => Sehr alte Ausrüstung:

Agilent 1100 based LC

CTC Autosampler

Sciex API150 MS

Aktuell modernisieren wir unsere Hardware.



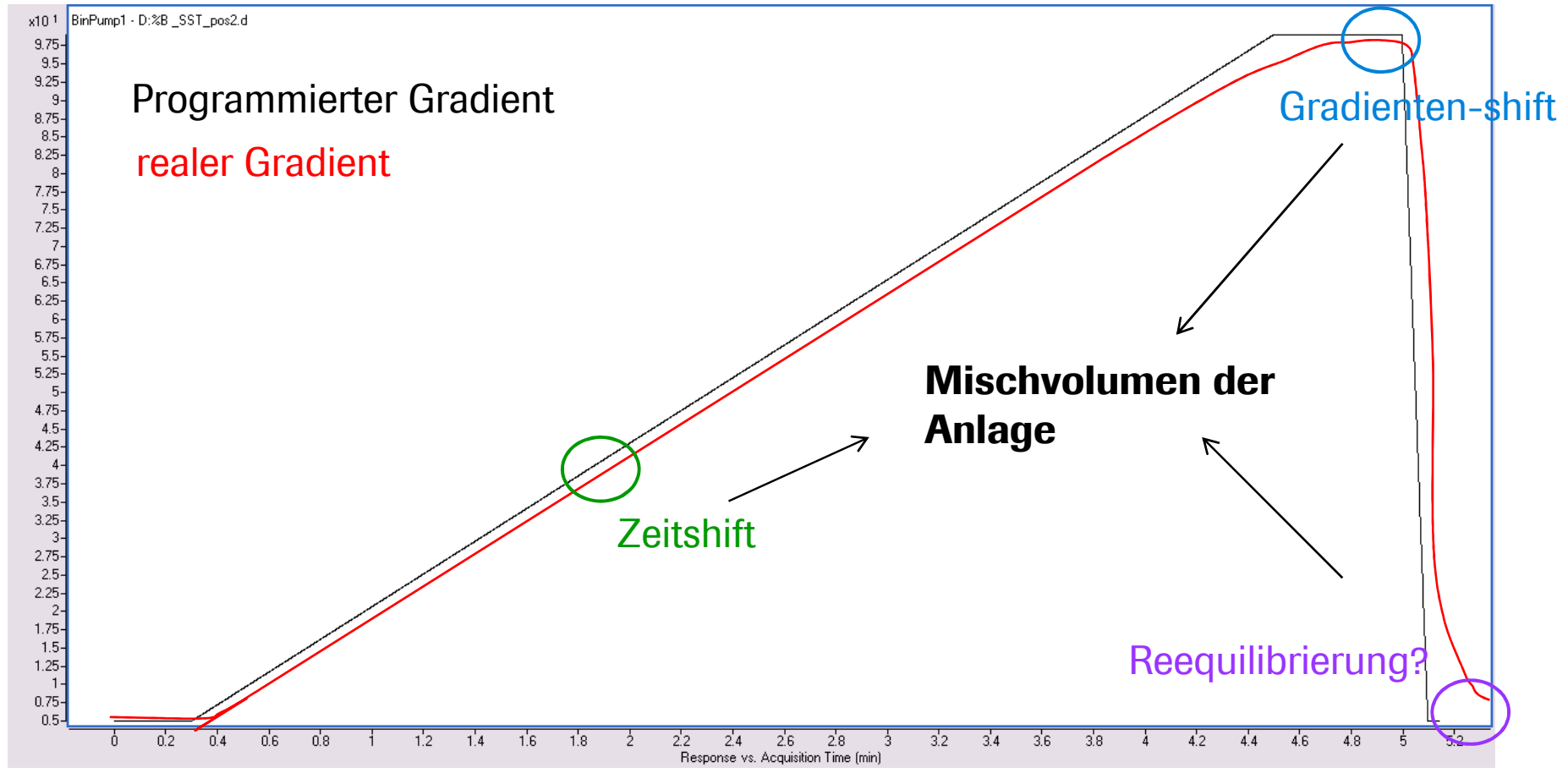
Aufbau der Anlagen und Optimierung der Module

Wo ist die zeitliche Grenze?

1. Auflösung der Peaks
Die Trennung der Substanzen darf sich nur bis auf ein Minimum verschlechtern.
Sehr unterschiedliche Ansprüche je nach Trennung
2. «Reproduzierbarkeit» und Arbeitsbereich müssen erhalten bleiben

Aufbau der Anlagen und Optimierung der Module

Wo ist die zeitliche Grenze?



Aufbau der Anlagen und Optimierung der Module

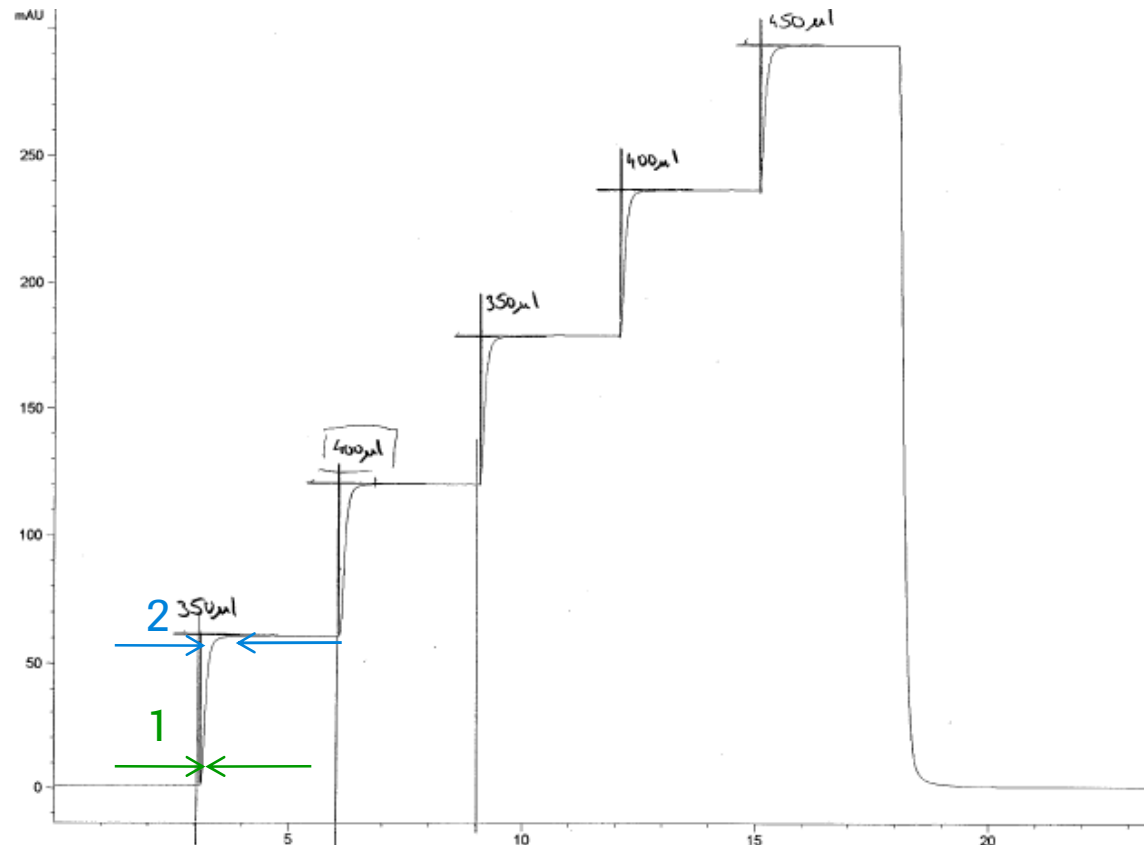
Gradienten Pumpe

Kennen Sie das Mischvolumen Ihrer Anlagen ?

Vorschlag: Stufengradienten eignen sich nicht nur zur Ermittlung der Richtigkeit der Gradientenmischung:

1. **Verzögerungsvolumen:** Volumen von Soll zu Beginn des Sprunges
2. **Mischvolumen:** Volumen von Soll zu Ende des Sprungs.

Von den Herstellern wird oft nur der theoretische Wert der Pumpe mitgeteilt. In der Praxis oft viel grösser!



Aufbau der Anlagen und Optimierung der Module

Gradienten Pumpe

- Schnelle LC nur wenn das Mischvolumen der Anlage minimiert ist
- Mischvolumen der gesamten Anlage – inkl. Säule limitiert den Cycletime
- Generell: Low-pressure-gradienten haben grosse Mischvolumen
- Ältere LC Systeme enthalten, grossvolumige Mischkammern und Pulsationsdämpfer, diese können teils ausgebaut oder verkleinert werden
- Problem: UV Basislinie wird evtl. unruhiger!

Aufbau der Anlagen und Optimierung der Module

Injektor

- Je nach Konstruktion versteckt sich im Autosampler eine grosse Kapillare.
- Diese führt je nach Schaltung zu grossen Totvolumina oder Verschleppung
- Bei Rheodyne / Valco Ventilen mit Loop: Auch die Loop zählt mit, daher: Loop-Grösse dem Injektionsvolumen anpassen

- Bei sehr schnellen Zyklen: Overlap aktivieren, damit nicht der AS die cycle-time bestimmt

- Weitere Herausforderung: Injektion aus 2,3 μL Restvolumina in 384 er Wellplate
=> Kontrolle der Injektion mittels Injektionspeak

Aufbau der Anlagen und Optimierung der Module

Säule

- Ist das grösste Totvolumen!!!
- Je länger die Säule desto grösser die Totzeit!
- Im Extremfall auf kürzerer Säule bessere Trennung
- Totzeit kann wichtige Hinweise auf minimale Zeiten geben (isokratisches Plateau, Reequilibrium)
- Je kleiner der Partikel Durchmesser
desto besser die Trennung
desto höher der Druck
- Sub 2µm Material ist inzwischen Standard
- Alternative: CoreShell-Technologie - aber geringere Substanzkapazität
- Für LCMS: nicht mehr als ID 3 mm !!!

Aufbau der Anlagen und Optimierung der Module

Temperatur

Je höher die Temperatur

desto geringer die Viskosität

desto schneller sind die Diffusionsprozesse

⇒ Druck sinkt, Fluss kann gesteigert werden

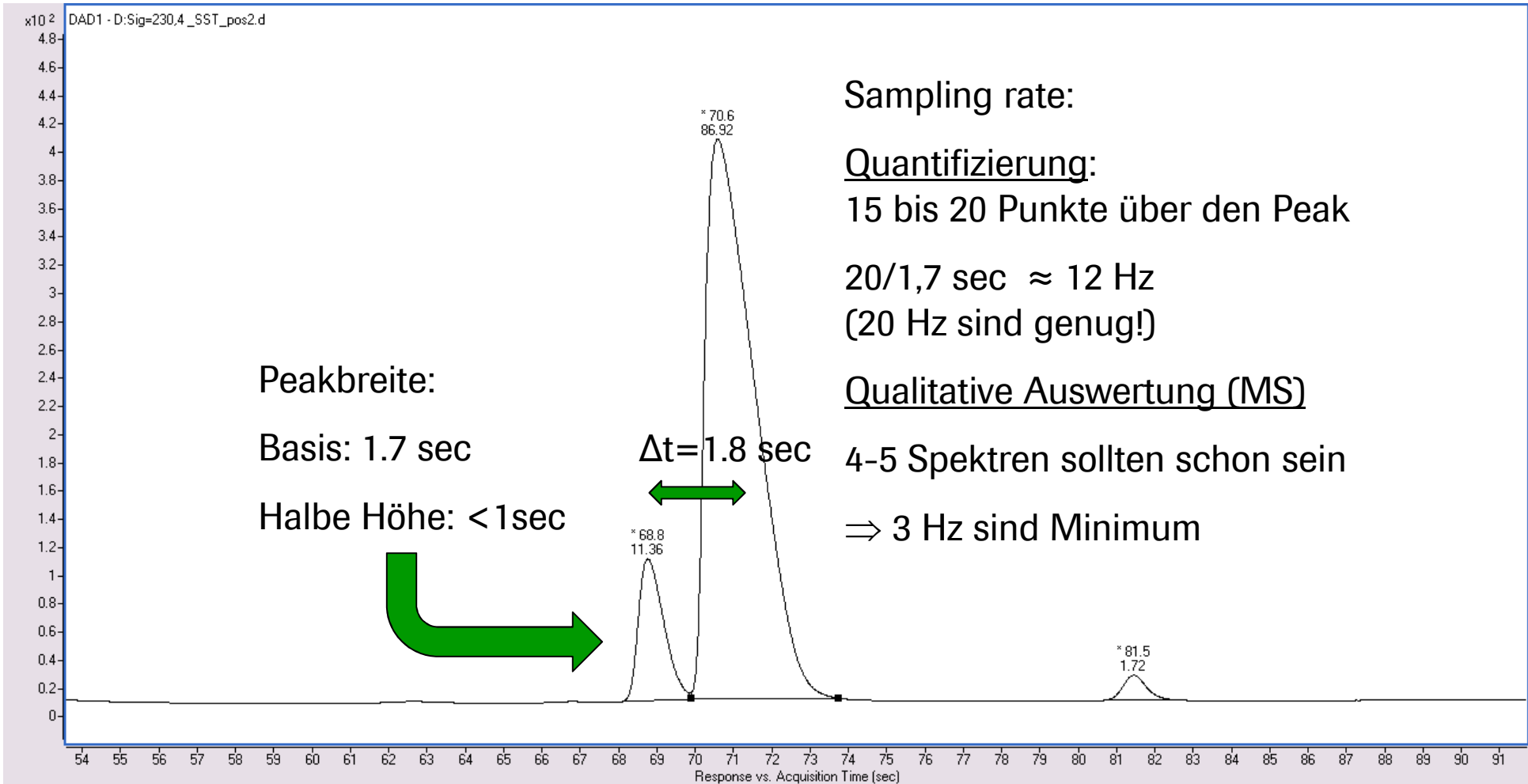
⇒ Massentransport auf der Säule verbessert,

⇒ schmaler Peaks, bessere Trennung

Thermische Zersetzung auf der Säule extrem selten

Aufbau der Anlagen und Optimierung der Module

Detection



Aufbau der Anlagen und Optimierung der Module

UV Detektion

- Flusszellen sollten ein möglichst kleines Volumen haben
0.05 sec (20Hz) bei Flow 0.5 mL/min entsprechen 0.4 μ L!
- 10 bis 20 Hz sind im Normalfall genug,
Höhere Datenraten machen nur das File grösser.
- Auf Verschraubungen achten! Hier oft Totvolumen die zu Mischeffekten führen.

Aufbau der Anlagen und Optimierung der Module

Massenspektrometer

- MRM / SIM kann sehr leicht genug Datenpunkte liefern
- Scanspeed essentiell um chromatographische Auflösung zu behalten
3-4 Hz sind sehr empfehlenswert
Geräte haben teils sehr unterschiedliche Performance
Insbesondere bei Polarityswitching schwer erreichbar
Wichtig spektrale Auflösung und Massenlage dürfen nur wenig leiden!
- ESI ist konzentrations-, nicht massen-abhängig
daher kann ein Splitting die Robustheit erhöhen (weniger Dreck in der Quelle)
- Wenn die Intensität im MS zu hoch ist, hilft eine isokratische Pumpe als Verdünnung
- Ein Make-up minimiert auch die Delay-time

Die Aufgabenstellung

Der Anlagenaufbau

Auswertung der Rohdaten

Zusammenfassung

Auswertung

Umfang

- Bei 50 000 Analysen pro Jahr müssen bei 200 Arbeitstagen pro Tag etwa 250 Samples ausgewertet werden.
Neben Probenvorbereitung und Laborarbeit bleiben etwa 5 bis 6 Stunden zum Auswerten. Das heisst etwa 50 Proben pro Stunde – non stop
 - Utopisch, dass dies in hoher Qualität möglich ist
- ⇒ Software muss die Arbeit automatisieren
- ⇒ Die Ergebnisse sollten in einer Datenbank suchbar abgelegt werden.

Auswertung

Identität

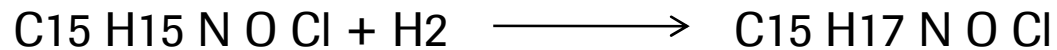
- ESI/APCI Spektren können sehr gut vorhergesagt werden
- Vergleich der Simulation mit der Realität
- Viele Softwarepakete auf dem Markt, aber wenige funktioniert gut!

Problem: oft nur ungenügende Auswertung der Isotopenpattern

Auswertung

Identität

Beispiel: Hydrierung einer chlorhaltigen Verbindung



Angenommen die Reaktion scheitert...

Das Edukt ist in der Sample enthalten

Führt bei vielen Software Versionen zu

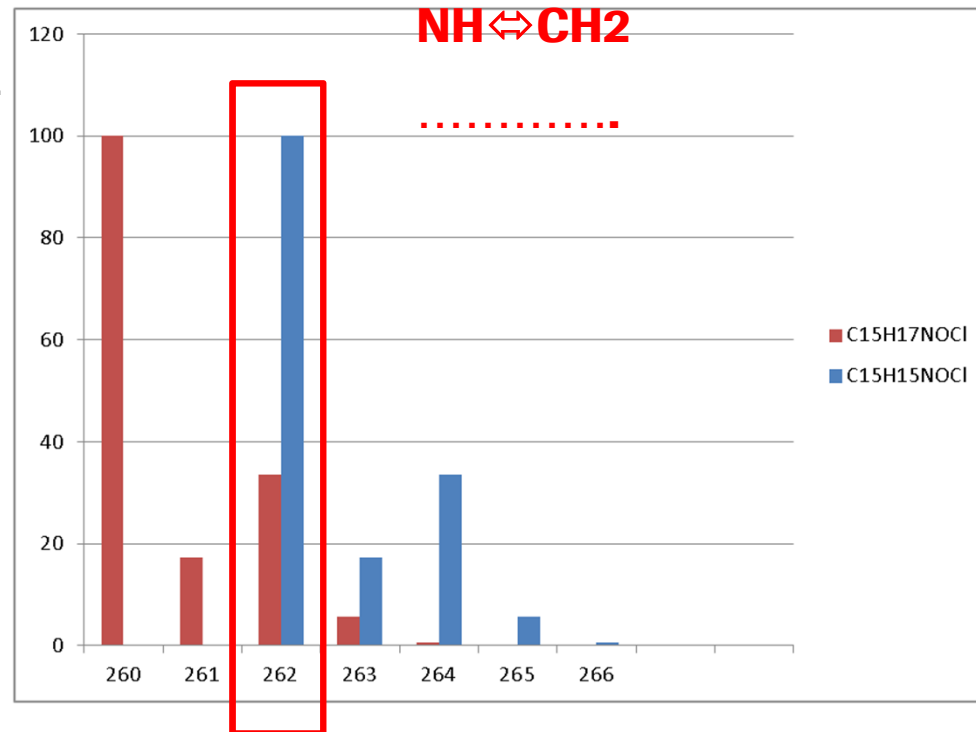
Falsch positiver Beurteilung

Ähnliche Ergebnisse bei allen Reaktionen, die einen Massenshift von -2 bis +4 ergeben!

OH ↔ F

OH ↔ NH₂

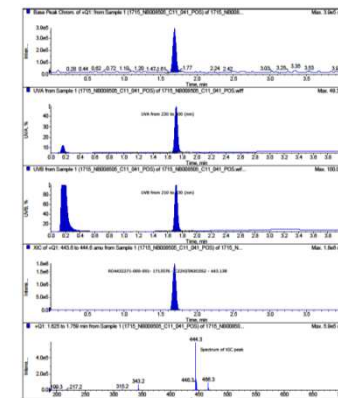
NH ↔ CH₂



Auswertung

UV Reinheit

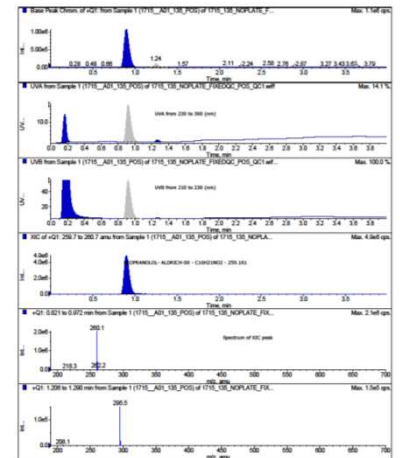
- Area% Auswertung ist inzwischen in fast allen Softwarepaketen Standard
- Korrelation mit den Peaks des MS nicht immer ganz einfach vor allem, wenn der gewünschte Peak dicht neben einem anderen erscheint
- Auswertung des Injektionspeaks als Qualitätskontrolle nicht immer einfach



Qualitätskontrolle



- In jeder Injektion vollautomatisch ist der DMSO Peak von Höhe und Breite i.O.
- Vor Sequenz Start
Ist der Gradientengang in Ordnung ?
- Verschiedene QC-Samples verteilt über die Sequenz:
Area% - Peakform und Höhe
Massenlage
Delaytime zwischen UV und MS



Die Aufgabenstellung

Der Anlagenaufbau

Auswertung der Rohdaten

Zusammenfassung

Zusammenfassung

- Eigene Ziele definieren
- Möglichkeiten ermitteln:
 - Welche Hardware ist verfügbar?
 - Sind Anschaffungen möglich?
 - Welchen menschlichen Aufwand kann ich leisten?
- Methodenentwicklung
 - Hardware Parameter ermitteln
 - Technische Grenzen klar machen
- Auswertung automatisieren
- QC-Konzept aufbauen
- Ergebnisse sichern

Zusammenfassung

Die Herausforderungen:

Logistik der Daten

zuverlässige Auswertung der Daten

Ablage der Ergebnisse



Acknowledgements

Analytik

Dr. S. Müller

Dr. J. Schneider

Christian Albrecht

Compound depository

Dr. E. Gutknecht

Dr. M. Brunner

Dr. A. Grenz



Innovation für die Gesundheit