

Liquid Chromatography

Průvodce řešením problémů

 **SHIMADZU**
Excellence in Science

Obsah

Úvod	04
Žádné píky	08
Zdvojené píky	09
Chvostující píky	10
Čelní chvostování	11
Široké píky	12
Píky navíc	13
Fluktuace retenčních časů	14
Ztráta rozlišení	15
Změny citlivosti	16
Drift základní linie	17
Šum základní linie	18
Tlak není zobrazen, ale průtok je správný	19
Nízký tlak	20
Fluktuace tlaku	21
Vysoký tlak	22



Úvod

Odstávka přístroje je často nákladná a časově náročná, ale problémy lze mnohdy rychle odstranit pomocí znalostí řešení problémů.

Tato příručka pro řešení potíží s kapalinovou chromatografií je navržena tak, aby pomohla uživatelům vyhodnotit běžné problémy s LC. Brožura obsahuje informace o tom, jak tyto problémy efektivně řešit a opravit, abyste mohli systém znovu spustit a pokračovat v analýzách.

Prevence je lepší než léčba - základní tipy zabraňují běžným problémům s LC

Mnohým běžným problémům lze zabránit pravidelnou výměnou spotřebních položek, např. těsnění, aby systém fungoval hladce. Projděte si níže uvedené tipy, aby vaše přístroje pracovaly správně:

- Používejte oplach těsnění a roztok pravidelně vyměňujte, aby byla zachována životnost těsnění čerpadla.
- Neuchovávejte vodné pufrы příliš dlouho, abyste zabránili růstu mikroobů.
- Zajistěte uzavření organických mobilních fází, aby se zabránilo změnám složení.
- Používejte vhodné třídy kvality rozpouštědel. V ideálním případě by se jako minimální standard měl používat stupeň HPLC, vyhněte se částicím v mobilní fázi, které mohou blokovat části LC nebo způsobit poruchy v základní linii.
- Proplachujte přístroj (a kolonu) mobilní fází bez pufru, jako je H₂O / MeCN (1: 1 v / v), abyste zabránili srážení solí nebo degradaci kolony.
- Zajistěte, aby detektor nebyl skladován v koncentrované mobilní fázi a nenechávejte lampu zapnutou, pokud ji nepoužíváte, aby nedošlo ke zkrácení životnosti lampy.
- Mějte odpovídající záruku nebo krytí údržby, které vám pomůže snížit prostoje v důsledku neočekávaných problémů.



Osvědčené postupy pro odstraňování problémů

Je problém reprodukovatelný nebo občasný?



Ved'te pečlivě záznamy



Vizuálně zkontrolujte přístroj a prověřte těsnost, vzduchové bubliny, správnou instalaci kolony, apod.



Ujistěte se, že metoda je správná, rozpouštědla jsou správně připojena, kolona je správná a ve správné pozici a nastavení průtoku a teploty je v pořádku, atd.



Proveďte test vhodnosti systému. Test by měl mít známý robustní výsledek.



Chcete-li zjistit, o jaký problém jde, měňte proměnné po jedné. Pracujte systematicky.



Zkuste nahradit podezřelý vadný element dílem, o kterém víte, že je v pořádku.
Pokud se tím problém nevyřeší, nezapomeňte změnu vrátit.

Uchovávejte záznamy

Záznamy mohou být klíčem k lokalizaci problémů a také zdrojem informací. Zaznamenávání použití přístrojů, kolon i přípravy vzorků a mobilní fáze může být zdrojem informací, když dojde k problému. I jednoduchý záznam použité mobilní fáze a kolony může odhalit, proč došlo k zablokování nebo změně tlaku.

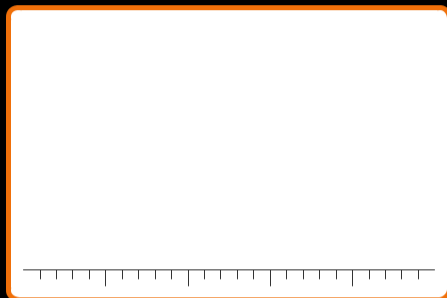
Typ záznamu	Typ zaznamenaných informací
Příprava vzorku / mobilní fáze	<ul style="list-style-type: none">- Jak se připravují mobilní fáze.- Číslo šarží rozpouštědla- Kalibrace zařízení, jako jsou pipety a váhy.- Příprava vzorku včetně objemů a ředících medií.
Přístroj	<ul style="list-style-type: none">- Moduly, velikost směšovače, sériová čísla, informace o záruce.- Protokol údržby včetně dat k náhradním dílům.- Charakteristiky LC, jako je mrtvý objem, disperze, přesnost a reprodukovatelnost autosampleru, typické tlaky.
Kolona	<ul style="list-style-type: none">- Test vhodnosti systému výrobce / chromatografické vlastnosti.- Datum pořízení a datum prvního použití.- Informace o uložení.- Shrnutí využití kolony, počet nástřiků, tlak během provozu, typ použitých mobilních fází.

Problém trvá?

Stále bojujete? Dejte nám vědět na lc@shimadzu.co.uk



Žádné píky



Příčina

Řešení

Problémy s nastavením detektoru

- Zkontrolujte, zda je zapnutá lampa detektoru.
- Zkontrolujte, zda jsou připojeny elektrické kabely.
- kontrolujte životnost lampy a v případě překročení ji vyměňte.
- Zajistěte, aby byl dle fyzikálně chemických vlastností analytu použit vhodný detektor .
- Zkontrolujte, zda metoda používá vhodné nastavení detektoru odpovídající hledaným látkám.

Eluční čas analytů delší než doba analýzy

- Zkontrolujte složení mobilní fáze.
- Zkontrolujte, zda se používá správná kolona.
- Prodlužte čas analýzy
- Zvyšte eluční schopnost mobilní fáze.

Problémy se vzorkem

- Zajistěte, aby se vzorek nezměnil. Připravte čerstvé vzorky.
- Ujistěte se, že je vzorek v autosampleru je ve správné poloze.
- Problém se adsorpcí vzorku.

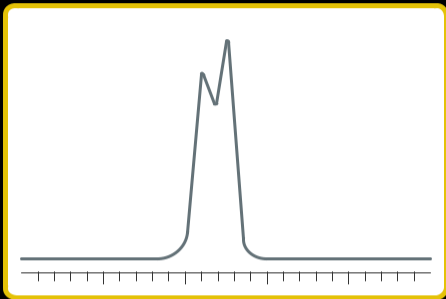
Ucpaná jehla

- Pokuste se odstranit ucpání nebo vyměnit jehlu, zjistěte, proč je jehla ucpána (např. septem nebo špatnou přípravou vzorku).

Přístroj

- Žádný průtok mobilní fáze, případně proplachovací ventil ponechán otevřený.
- Odvzdušněte systém, abyste odstranili možné vzduchové bubliny v čerpadle.
- Propláchněte vstřikovač, abyste odstranili vzduchové bubliny v dávkovacím čerpadle.

Zdvojené píky



Příčina

Znečištěný vstup kolony
nebo ochranné kolony

Řešení

- Vyměňte ochranný kryt nebo vloženou filtrační fritu; propláchněte kolonu zpětným tokem (pokud lze)

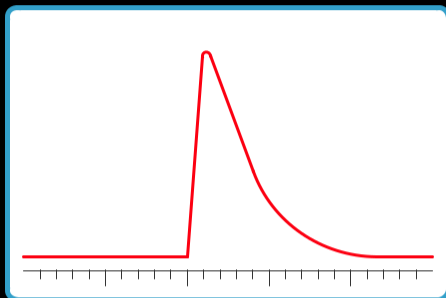
Rozpouštědlo vzorku je
nekompatibilní
s mobilní fází

Vyměňte rozpouštědlo vzorku. Použijte počáteční složení mobilní fáze (pokud lze). Použijte funkci vstřikování Co-Solvent nebo POISe.

Vlastnosti analytu

- Možnost změny izomeru nebo analytu - změňte podmínky.

Chvostující píky

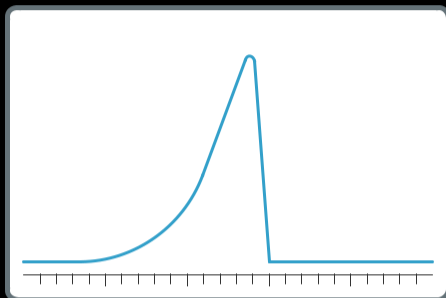


Příčina

Řešení

Sekundární interakce	- U zásad zvýšte pH (jak lze); u kyselin snižte pH; zvýšte iontovou sílu pufru (jak lze); změňte kolonu.
Mrtvý objem	- Znovu připojte kolonu s fitinky pro redukci mrtvého objemu.
Degradace kolony	- Vyměňte kolonu.
Vakance v koloně	- Vyplňte trhlínu (pravděpodobně ale vlastnosti kolony už nebudou dobré).
Interferující pík	- Použijte delší kolonu; další vývoj metody.
Nevhodné pH mobilní fáze	- Upravte pH (doporučují se 2 jednotky pH od pKa).
Chelatace vzorku na aktivních místech	- Omezte interakci pomocí ion párového činidla, modifikátoru nebo sekvestračního činidla, změňte kolonu nebo průtokovou cestu za injektorem.
Nedostatečná pufrace	- Použijte koncentraci pufru 50-100 mM (UV metody).
Nástřík vzorku	- Snižte koncentraci vzorku.

Čelní chvostování



Příčina

Řešení

Degradace kolony

- Vyměňte kolonu.

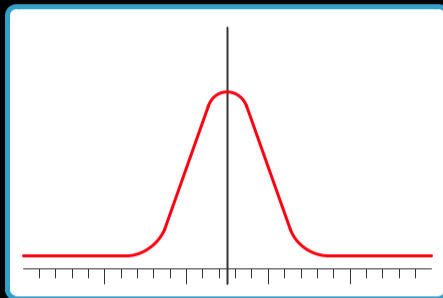
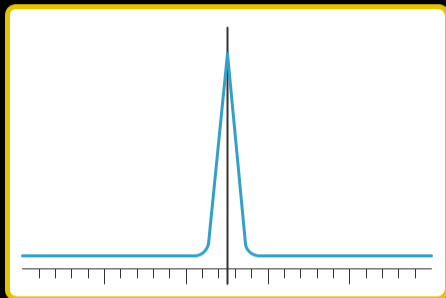
Mobilní fáze/
rozpouštědlo vzorku
nejsou kompatibilní

- Upravte složení mobilní fáze. Použijte počáteční složení mobilní fáze (pokud lze).

Přetížení vzorkem

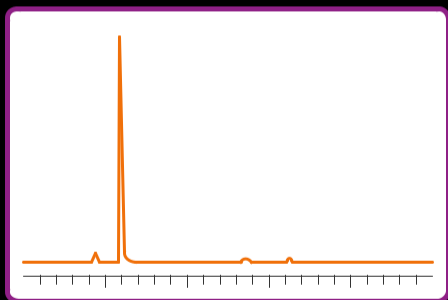
- Snižte koncentraci vzorku.

Široké píky

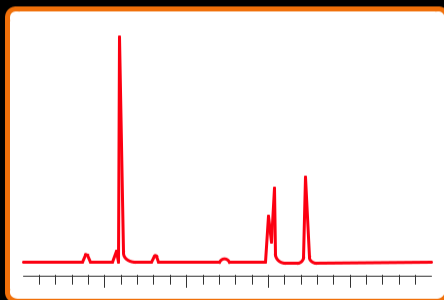


Příčina	Řešení
Nástřík vzorku	- Snižte koncentraci vzorku nebo nástřík.
Problém s kolonou	- Degradace kolony, kolona by měla být vyměněna.
Problém s nastavením termostatu kolony	- Zkontrolujte správnou teplotu termostatu. Vyšší teplota kolony obvykle vede k rychlejší eluci látek (pozor na teplotní limit kolony doporučený výrobcem).
Mobilní fáze	- Ověřte, že používáte správnou mobilní fázi.
Nastavení přístroje	- Zvyšte vzorkovací frekvenci detektoru pro zjištění, zda se zlepší tvar píků. - Dlouhé kapiláry a další faktory zvyšující vnitřní objem systému rozmývají píky, zkontrolujte možnosti omezení. - Zkontrolujte, zda je nastaven správný průtok MF (mobilní fáze) a je dodržován.

Píky navíc



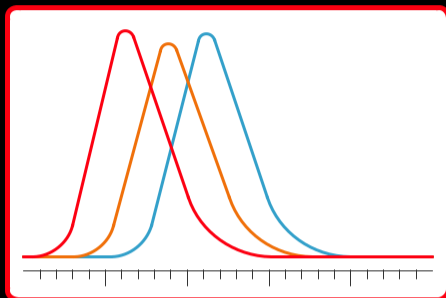
Nástřík 1



Nástřík 2

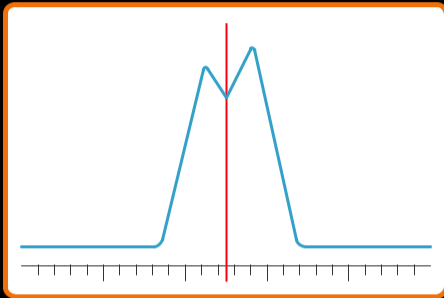
Příčina	Řešení
Další látky ve vzorku	- Pokud jsou ve vzorku další látky, není to chyba.
Píky s dlouhým RT z předchozí analýzy	- Prodlužte RT (retenční čas), nebo zvýšte eluční sílu MF; zvýšte průtok MF.
Ghost píky	- Zkontrolujte čistotu MF; použijte zachycovač ghost píků (je-li možno).

Fluktuace retenčních časů



Příčina	Řešení
Průtok	- Zkontrolujte, zda metoda používá správný průtok. Průtokoměrem zjistíte skutečný průtok.
Nedostatečná stabilizace	- Kolona s reverzní fází by měla být ekvilibrována nejméně deseti-násobným objemem MF. Pokud je i toto nedostatečné, zvýšte čas ekvilibrace. Platí i pro další techniky, jako je iontová výměna a HILIC.
Špatná regulace teploty	- Zkontrolujte, zda metoda používá správnou teplotu. Zajistěte, aby teplota v kolonové peci byla přesná.
Změna rozměrů kolony	- Ujistěte se, že je použita správná kolona včetně rozměrů.
Změna stacionární fáze kolony	- Pro paměťové efekty nepoužívejte kolonu s ion párovým činidlem pro jinou mobilní fázi. - Vysušená stacionární fáze (historicky nesprávně „kolaps fáze“)
Nesprávná mobilní fáze	- Zajistěte, aby byla mobilní fáze připravena správně. - Pokud používáte čerpadlo k směšování mobilní fáze, ověřte, že dávkování je přesné. - Zajistěte, aby byla použita správná mobilní fáze a správné trasy dle zvolené metody.
Netěsnosti	- Zkontrolujte, zda v systému nejsou uvolněné spoje.
Vzduchová bublina v čerpadle	- Odvzdušněte čerpadlo pomocí odvzdušňovacího ventilu.

Ztráta rozlišení



Příčina

Změna šířky píků

Řešení

- Změny vlastností kolony a nástřiku vzorku/účinnosti kolony může mít za následek rozšíření píků. Zajistěte, aby kolona nebyla přetížena nebo vyměňte kolonu aby zatížení snesla.

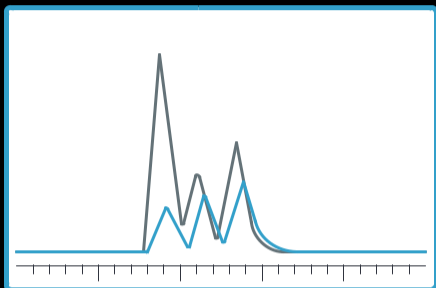
Změny retenčního času

- Viz popis v části retenční čas.

Změna mobilní fáze nebo odpaření

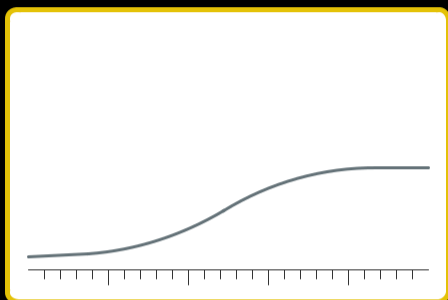
- Připravte nové mobilní fáze.

Změny citlivosti



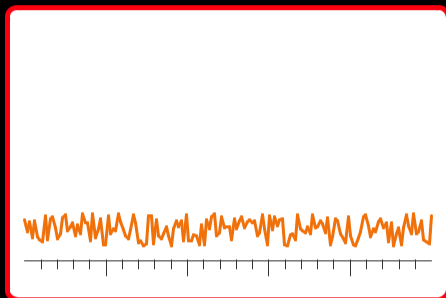
Příčina	Řešení
Problém s injektorem	<ul style="list-style-type: none">- Změny dávkovacího objemu injektoru, k identifikaci změn použijte QC kontrolní vzorek.- Zkontrolujte metodu a podrobnosti k nástříku.- Zvyšte proplach jehly a smyčky k potlačení přenosu vzorku mezi nástříky.- Odvzdušněte dávkovací čerpadlo vstříkovače.
Vzorek	<ul style="list-style-type: none">- Degradace vzorku může snížit píky analytů a zvýšit píky nečistot. Připravte nový vzorek.- Zkontrolujte přípravu vzorku aby bylo zajištěno, že koncentrace se nezměnila.
Detektor	<ul style="list-style-type: none">- Pokud se změnila citlivost u všech píků, zkontrolujte nastavení a citlivost detektoru.- Zkontrolujte životnost lampy a vyměňte ji, pokud je za limitem.- Možná bude nutné vyměnit okénka průtokových kyvet.
Změna vlastností kolony	<ul style="list-style-type: none">- Zkontrolujte šířky píku a rozlišení. Otestujte výkon kolony pomocí standardního QC testu.
Netěsnosti přístroje	<ul style="list-style-type: none">- Zkontrolujte, zda v systému nejsou uvolněné spoje.

Drift základní linie



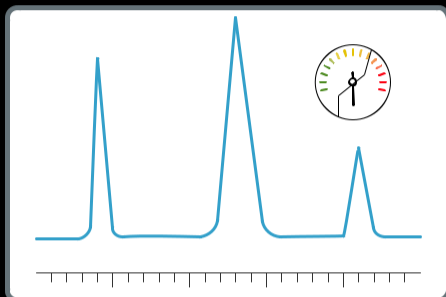
Příčina	Řešení
Fluktuace teploty kolony	- Kontrolujte teplotu kolony.
Nízká kvalita mobilní fáze	- Použijte HPLC rozpouštědla, vysoce čisté soli a přísady. Zajištěte, aby byly mobilní fáze dostatečně odplyněny.
Kontaminant nebo vzduchová bublina v kyvetě detektoru	- Propláchněte průtokovou kyvetu isopropanolem. Je-li nutno, Propláchněte kyvetu 1M kys.dusičnou.
Prasklé okénko kyvety	- Vyměňte okénka kyvety.
Problém s mícháním mobilní fáze	- Použijte větší nebo efektivnější mixér.
Pomalá ekvilibrace kolony	- Vypláchněte kolonu mobilní fází (minimálně 10–20 objemy kolony).
Analyty s dlouhým RT eluující v dalším nástřiku	- Použijte proplach mezi nástřiky, nebo, pokud je možno, použijte zpětný proplach kolony k vymytí kontaminantů s dlouhým retenčním časem.
Recyklovaná mobilní fáze, ale detektor není správně vynulován	- Provedte autozero detektoru.
Detektor (UV) není nastaven na maximum absorbance	- Změňte vlnovou délku na maximum UV absorbance.

Šum základní linie



Příčina	Řešení
Bublina v detektoru nebo čerpadle	- Dostatečně odplyňte mobilní fázi a propláchněte cestu MF
Netěsnost	- Zkontrolujte cesty MF (mobilní fáze) a spojky.
Nedokonalá míchání mobilní fáze	- Předmíchejte mobilní fázi nebo použijte větší mixér.
Teplotní změny detektoru	- Použijte teplotně stabilizovanou průtokovou celu detektoru.
Kontaminovaná nebo vadná mobilní fáze	- Zkontrolujte mobilní fázi.
Nemisitelné složky mobilní fáze (pozorujeme i tlakové pulzy)	- Použijte mísitelné složky MF
Bublina zachycená v systému	- Propláchněte a vyčistěte průtokovou cestu.
Slabá lampa detektoru	- Vyměňte lampu.
Únik náplně kolony	- Vyměňte kolonu.

Tlak není zobrazen, ale průtok je správný



Příčina

Řešení

Porucha snímače

- Opravte nebo vyměňte snímač tlaku.

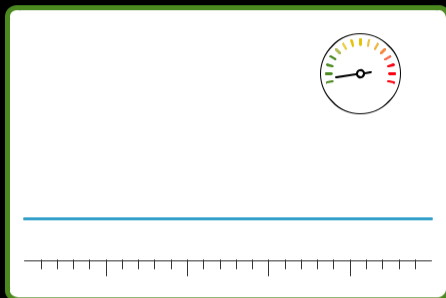
Nekompatibilita softwaru

- Použijte alternativní software, který umožňuje záznam tlaku.

Proplachovací ventil
ponechán otevřený

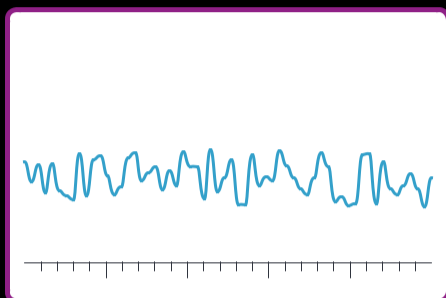
- Zavřete ventil.

Nízký tlak



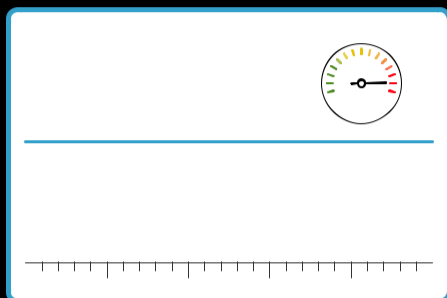
Příčina	Řešení
Částečná netěsnost v systému	- Zkontrolujte všechna připojení a utáhněte všechna netěsná místa.
Průtok	- Zkontrolujte, zda je v metodě nastaven správný průtok. - Vyzkoušejte přesnost průtoku pomocí kalibrovaného průtokoměru, nebo změřte čas naplnění definovaného objemu.
Metoda	- Ověřte, zda metoda používá správnou teplotu a správná rozpouštědla.
Špatná kolona	- Použijte kolonu se správnými rozměry a geometrií částic.
Příliš vysoká teplota kolony	- Nastavte odpovídající teplotu kolony a zkontrolujte, zda nedošlo k jejímu poškození, pokud dojde k překročení limitu teploty kolony.
Porucha snímače	- Opravte nebo vyměňte snímač tlaku.

Fluktuace tlaku



Příčina	Řešení
Vzduchové bubliny	- Propláchněte cestu MF pro odstranění vzduchových bublin.
Opotřebení těsnění pumpy	- Vyměňte těsnění.
Zkontrolujte ventily	- Ultrazvukujte zpětné ventily v isopropanolu. - Pokud problém přetrvává, vyměňte zpětné ventily.
Netěsnosti	- Poškození těsnění čerpadla může způsobit malé netěsnosti. Vyměňte těsnění. Zkontrolujte spojky.
Nedostatečné odplynění	- Odplyňte rozpouštědlo, vyměňte frity mobilní fáze; je-li nutno opravte degasser.
Použití gradientové eluce	- Cyklus tlaků způsobený změnami viskozity je normální, ale použijte přiměřeně velký objem mixéru.

Vysoký tlak



Příčina	Řešení
Nastaven vysoký průtok	- Snižte nastavení průtoku
Ucpaná kolona	- Propláchněte kolonu zpětným tokem (pokud lze), nebo ji vyměňte.
Nekompatibilní MF (sraženina pufru nebo nemísitelné složky)	- Použijte správnou MF; propláchněte kolonu a znovu ekvilibrujte
Nesprávná kolona	- Použijte kolonu správného rozměru a geometrie částic
Zablokovaný injektor	- Odstraňte překážku (zkontrolujte jehlu, smyčku, ventil s HPV výstup).
Zablokovaná ochranná kolona/kartridž	- Vyměňte nebo odstraňte guard kolonu
Zablokovaný in-line filtr	- Vyměňte nebo odstraňte filtr.
Příliš nízká teplota kolony	- Nastavte správnou teplotu.
Vadný senzor	- Opravte nebo vyměňte snímač tlaku.
In-line filtr pumpy je zablokován	- Vyměňte filtr



www.shimadzu.co.uk
info@shimadzu.co.uk | 01908 55 22 09
Technical Support: lc@shimadzu.co.uk