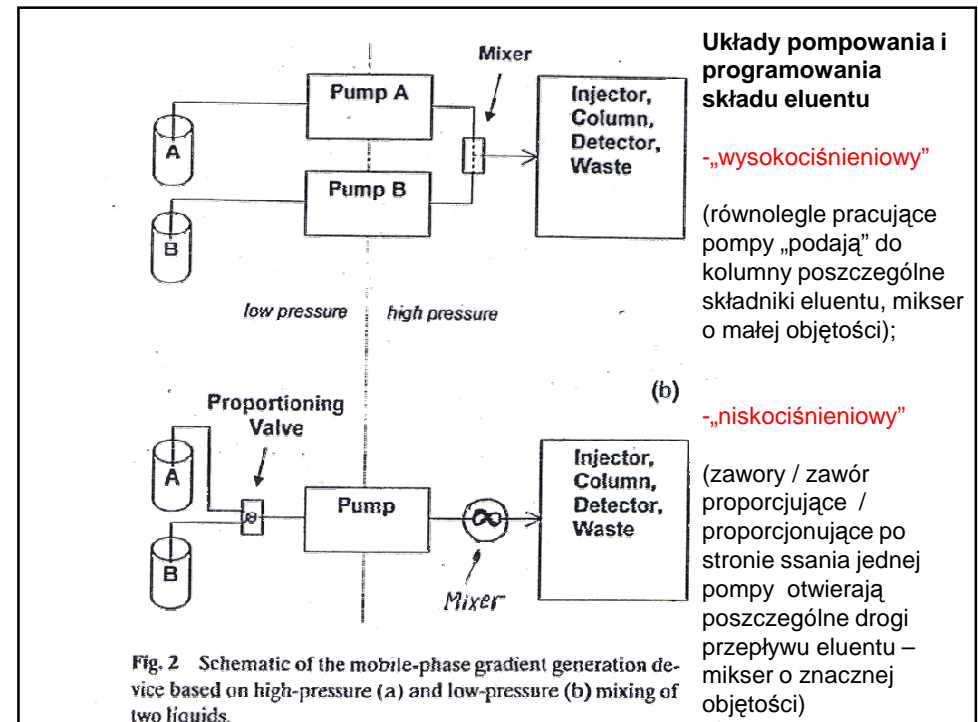


HPLC_UPLC_PLC

Aparatura / problemy z aparaturą / sposoby ich eliminacji, minimalizacji (bez detekcji)

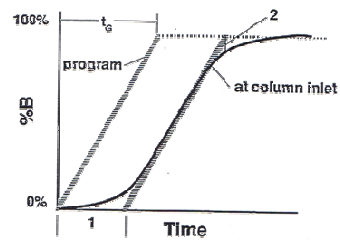
M. Kaminski

Wiedzieć jaka jest przyczyna problemu, to najczęściej -- potrafić samemu sobie poradzić – bez wzywania „serwisu” i zbędnych wydatków

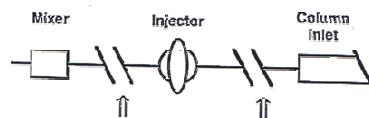


Modern HPLC Method Development

8.7 Gradient Profiles



8.8 Contributions to Dwell Volume



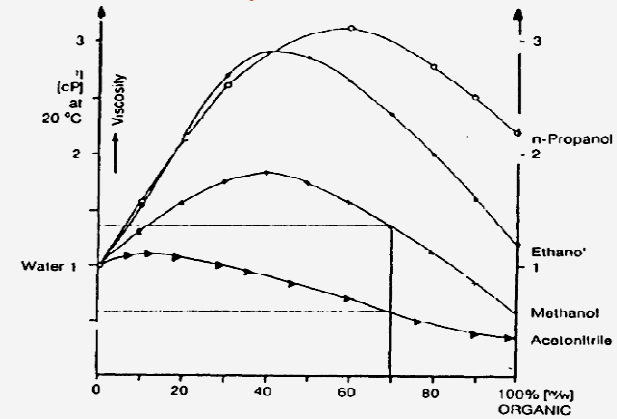
Schematic of a gradient-forming system. Flow direction is from left to right. Open spaces (indicated by arrows) can include elements such as filters and pumps.

Szczególnie w przypadku stosowania tzw. niskociśnieniowych systemów gradientowych ma miejsce poważne opóźnienie transportowe i zniekształcenie przebiegu programu elucji

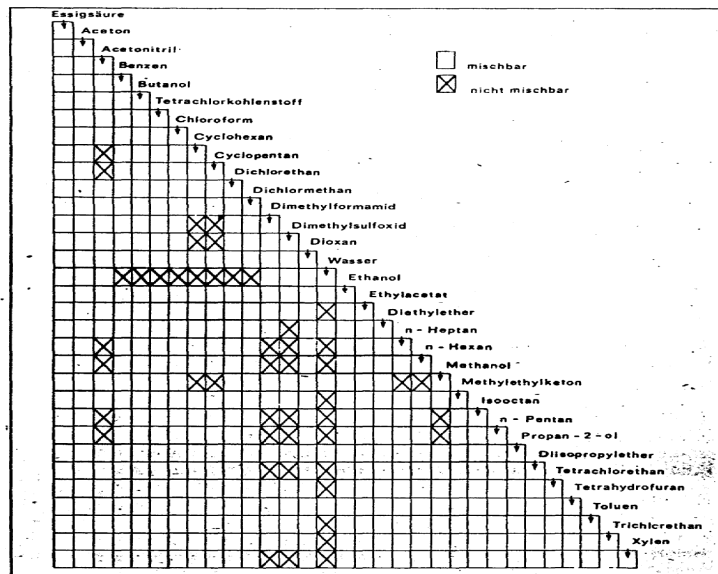
HPLC - Problemy w HPLC i sposoby ich rozwiązywania

-- lepkość woda – polarny rozpuszczalnik organiczny –

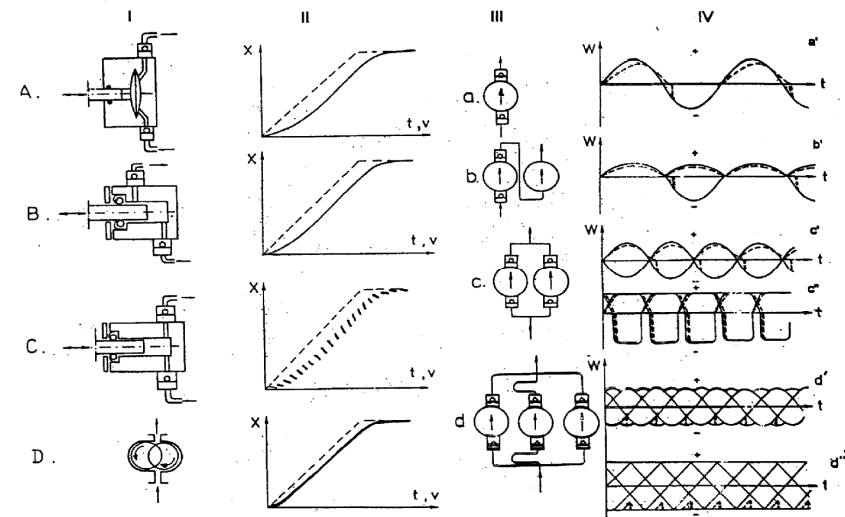
ma miejsce maksimum !!!



HPLC - Probleme i sposoby ich rozwiązywania: mieszalność cieczy



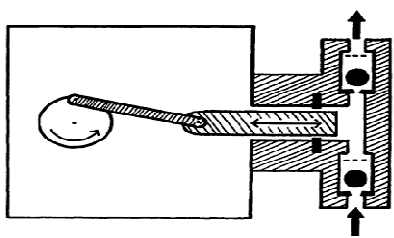
HPLC - Probleme i sposoby ich rozwiązywania – rodzaje i zasady działania pomp do HPLC / PLC, problem pulsacyjnego przepływu cieczy po stronie ssania i tłoczenia pompy



HPLC - Problemy i sposoby ich rozwiązywania – zawór ssący

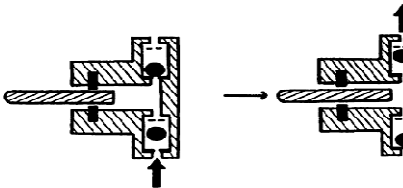
TROUBLESHOOTING HPLC SYSTEMS

PUMP



INTAKE

DELIVERY



NOTES

All commercial pumps are designed around this simple reciprocating piston pump. The rotational energy of the motor is transferred into the reciprocal movement of the piston. A pair of check valves controls the direction of flow through the pump head. A pump seal keeps mobile phase from leaking out of the pump head.

On the intake stroke, the piston is withdrawn from the pump head, creating a low pressure area. The low pressure allows the outlet check valve to settle onto its seat and the inlet check valve opens, allowing mobile phase to fill the pump head. On the delivery stroke, the piston moves into the chamber, increasing the pressure. This pressure increase seats the inlet check valve and when the pressure is sufficiently high, the outlet check valve opens and mobile phase flows to the column.

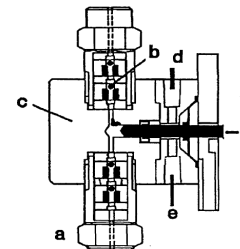
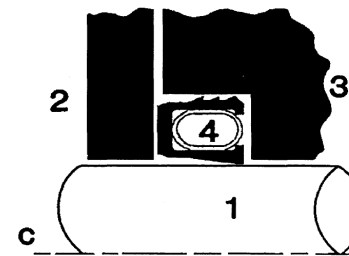
Air in the pump head causes irregularities in mobile phase delivery to the column and coincidental pressure pulses. Dirt or air in the check valves results in uneven flow and pressure.

Jeżeli ma miejsce pulsacyjna praca pompy, a pompa nie cieknie przez uszczelkę tłoka, to najczęściej problem leży w „przylepieniu się” kulki do gniazda w zaworze ssącym.

Najczęściej wystarczy wymontować cały zawór zwrotny, bez jego demontażu na części (uwaga łatwo zgubić kulkę rubinową, jeżeli spadnie na podłogę!) Wstawić zawór do łaźni ultradźwiękowej i poddać go ich działaniu przez ok. 1- - 15 min. Ponownie zamontować.

TROUBLESHOOTING HPLC SYSTEMS

NOTES

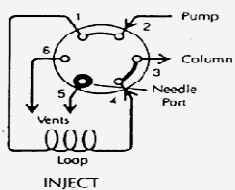
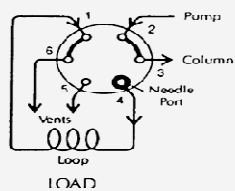


A cross-section through a pump head shows the function of the pump seal (courtesy of Bal Seal). The parts are (1) the sapphire piston, (2) the pump body, (3) the pump head, and (4) the pump seal. The lip of the seal rides on a thin film of mobile phase that lubricates the piston. It is important to flush the system after use if buffer is used to prevent this film of buffer from drying, forming an abrasive deposit.

This LKB pump head shows the use of a flushing pathway to allow washing the piston behind the seal. The parts are (a) the inlet check valve, (b) the outlet check valve, (c) the pump head, (d) the flushing inlet, (e) the flushing outlet, and (f) the piston. To use this feature, wash ca. 10 mL of warm water in (d) and out (e) to remove buffer deposits. Follow this with a similar volume of methanol or isopropanol to dry the area. This technique will greatly extend seal life, especially if buffers or salts in concentrations >100 mM are used routinely.

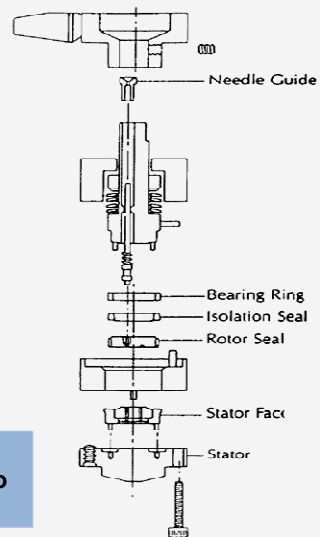
Zasada budowy i działania uszczelki tłoka. Konieczność płukania wodą gdy eluent zawiera bufor

Flow Diagram



Budowa i zasada działania najczęściej stosowanego w HPLC zaworu dozującego

Parts



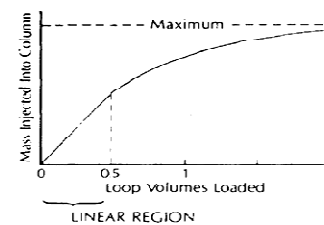
Należy wprowadzać co najmniej 2.5, albo poniżej 0.5 objętości pętli by dozowanie było powtarzalne (przyczyna – laminarny profil przepływu jest paraboloidea)

Load Volume

Fluid flows along the tube axis faster than along the tube wall. Therefore:

Partially fill loop by loading $\leq \frac{1}{2}$ loop volume. Syringe sets volume.

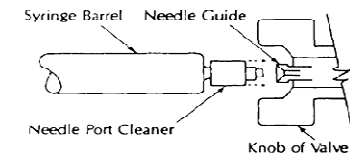
Completely fill loop by loading at least 2-3 loop volumes. This will achieve 95% of maximum. Loop sets volume.



Flushing

Flush using the Needle Port Cleaner supplied, P/N 7125 054, attached to a luer tip syringe. Don't use a needle.

Flush in INJECT position, not in LOAD. Flush liquid flows directly out vent #5, not thru loop; loop is automatically flushed with pumped mobile phase.



Przyczyny konieczności odpowietrzania eluentu / składników do wysokosprawnej chromatografii cieczowej

W warunkach elucji gradientowej, zwłaszcza, gdy do mieszania komponentów eluentu stosuje się zawory proporcjonujące („proporcjonujące” (?) – tzw. „gradient niskociśnieniowy”), bardzo ważne jest „odpowietrzanie” (głównie „odtlenianie”) składników eluentu, które podlegają mieszanii. W przeciwnym razie dochodzi do wydzielania się gazu w pompie, a następnie także na wylocie z kolumny i w naczyniu przepływowym detektora. W konsekwencji aparat niestabilnie pracuje, lub pompa zawodzi. Może też mieć miejsce nieprawidłowa i niestabilna praca detektora w postaci dryfu linii bazowej / „impulsów”, wysokiego poziomu szumów, a nawet brak sygnału pomiarowego detektora.

Techniki odpowietrzania cieczy - składników eluentu

- Systemy membranowe *(obecnie najczęstsze, najprostsze i najbardziej skuteczne);*
- Podgrzanie do wrzenia i ochłodzenie w kontakcie z gazem nierozpuszczalnym (He, N₂) *(bardzo skuteczne, ale niewygodne);*
- Stosowanie wibracji ultradźwiękowych - łaźnia / wzbudnik ultradźwiękowy *(mało skuteczne);*
- Wykorzystanie próżni *(w pełni skuteczne tylko gdy doprowadzi się ciecze do wrzenia)*

Wyniki badań efektywności odpowietrzania różnych cieczy

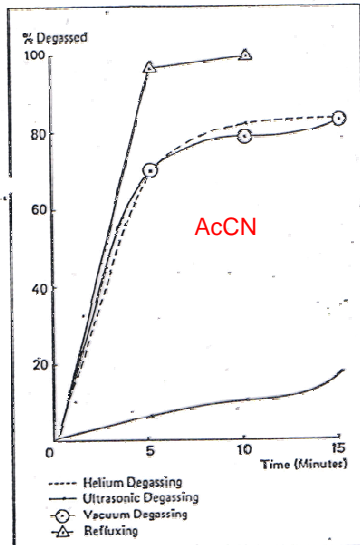


Figure 3 Comparison of Efficiency of Degassing Techniques for Solvent Acetonitrile

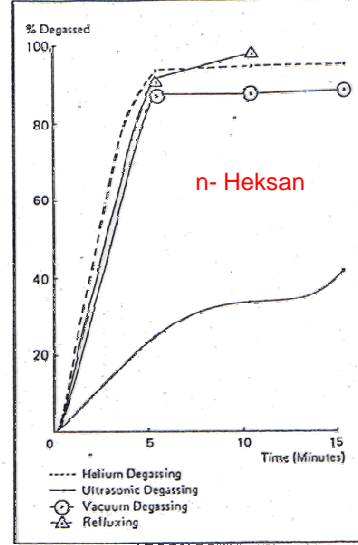


Figure 2 Comparison of Efficiency of Degassing Techniques for Solvent Hexane

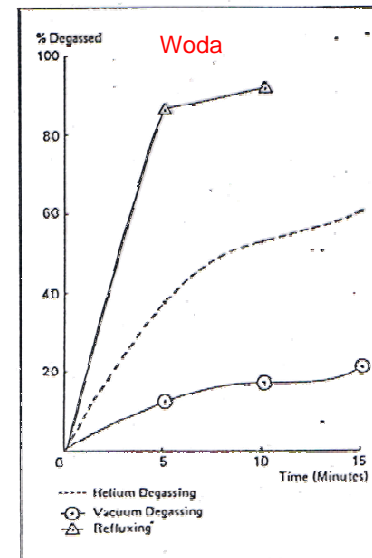


Figure 4 Comparison of Efficiency of Degassing Techniques for Solvent Water

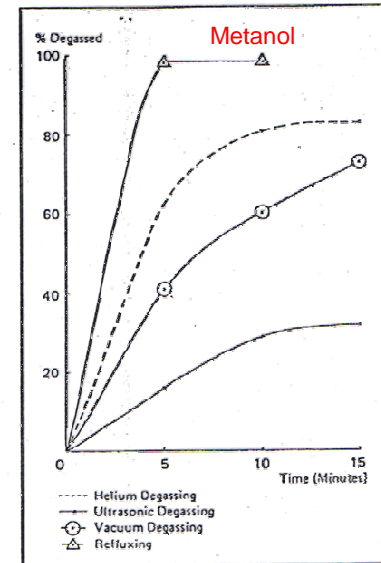
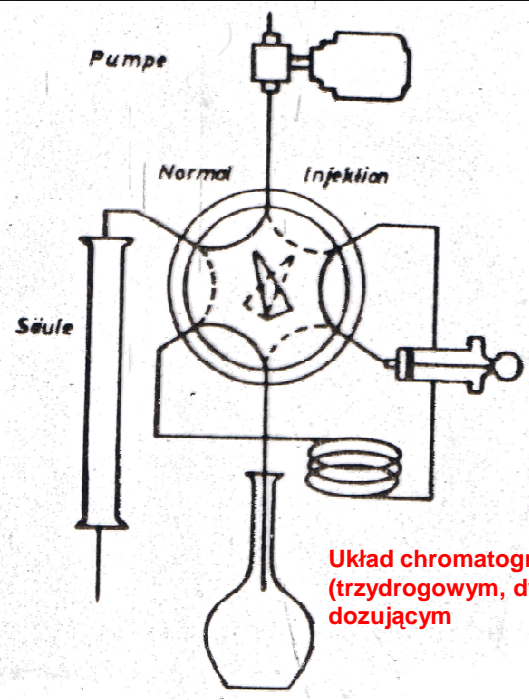


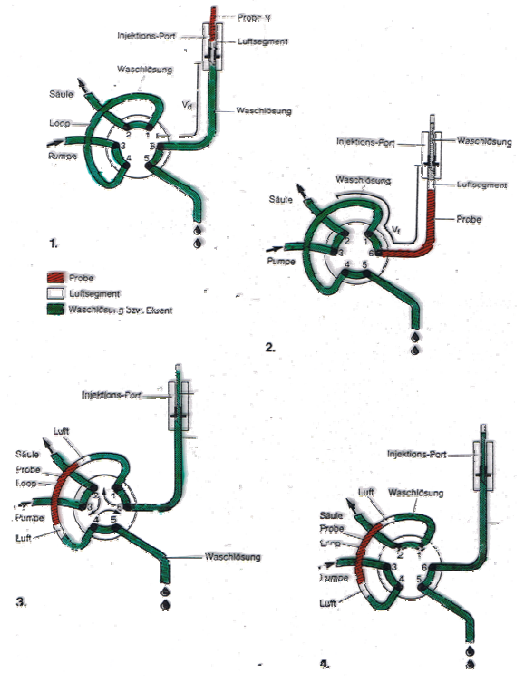
Figure 1 Comparison of Efficiency of Degassing Techniques for Solvent Methanol

DOZOWANIE

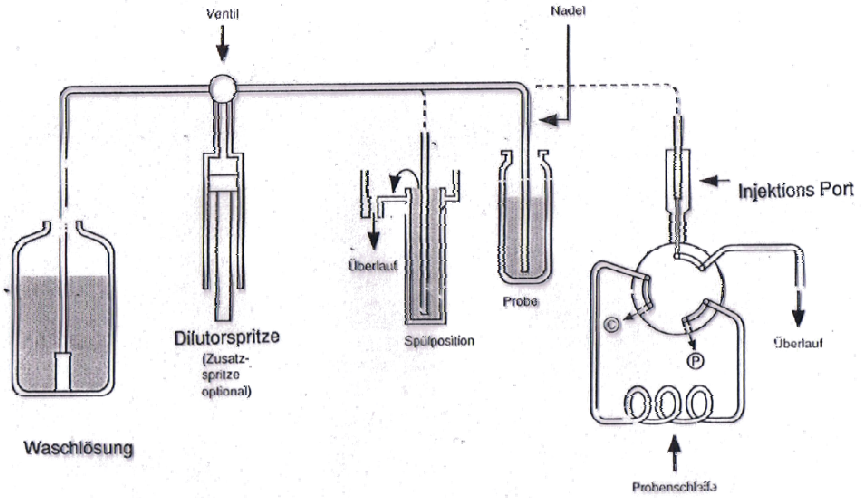


Układ chromatografu z sześciodrogowym (trzydrogowym, dwupołożeniowym) zaworem dozującym

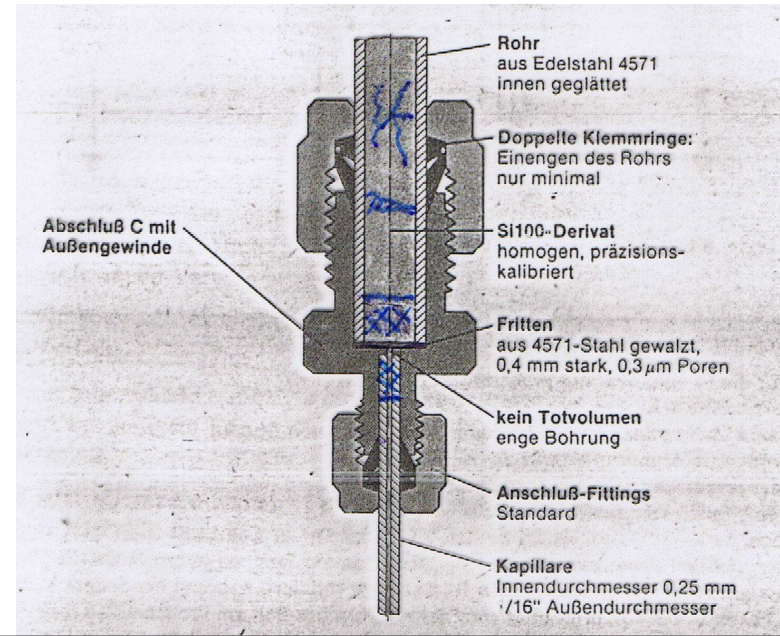
"ALL INJECT" mode AS-2000



INJEKTIONSPRINZIP



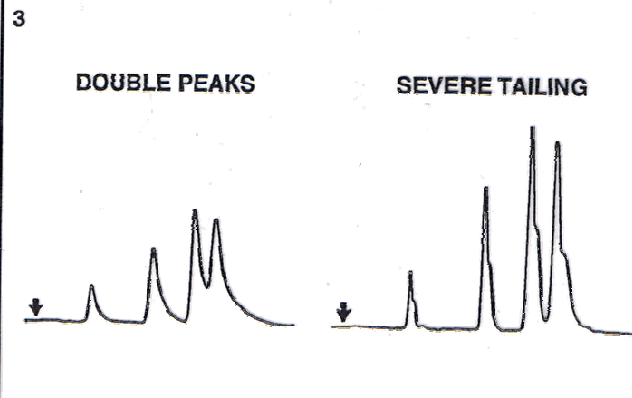
KOLUMNA



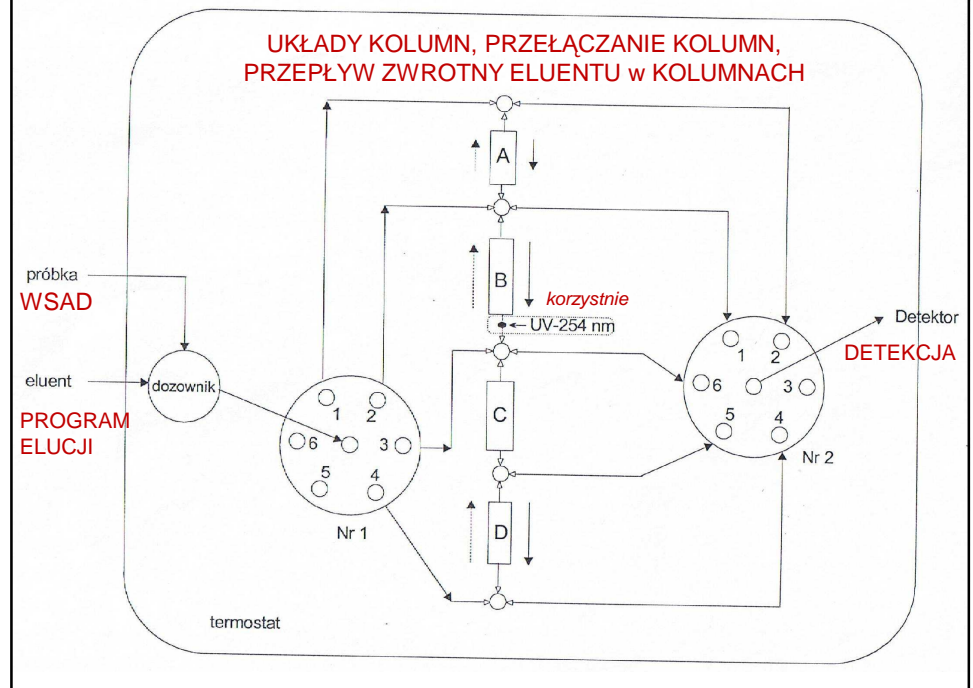
TROUBLESHOOTING HPLC SYSTEMS

NOTES

When peak doubling or severe peak tailing is observed for all peaks in a chromatogram, the most likely cause is a blocked frit or column void. When these symptoms are accompanied by high pressure, a blocked frit is the most likely cause.



UKŁADY KOLUMN, PRZEŁĄCZANIE KOLUMN, PRZEPŁYW ZWROTNY ELUENTU W KOLUMNACH



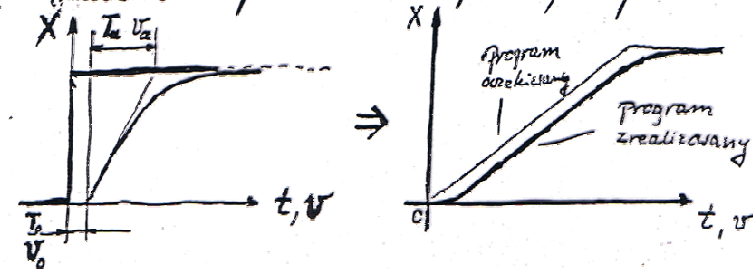
Problemy związane ze stosowaniem
elucji gradientowej – problem
poprawnego odwzorowania przebiegu
programu elucji

ELUCJA GRADIENTOWA - praktyczne problemy stosowania

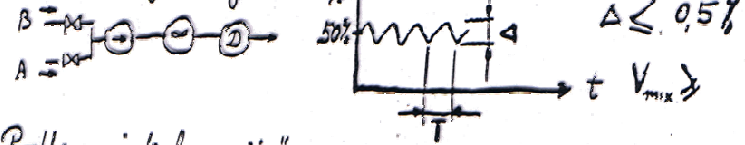
Problem „odpowietrzenia cieczy” - zapobieganie ziej pracy pompy, wysokim
szumom detektorów, utlenianiu katalitycznemu na sortencie
- metody: He, ultrawisiki, próżnia, wrzenie, permeacja gazu
przez membrany

Problem interakcji objętości podczas mieszania (wzajemna wyprężalność)

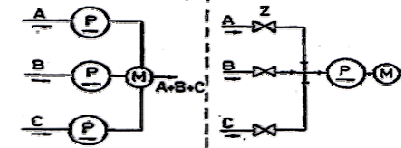
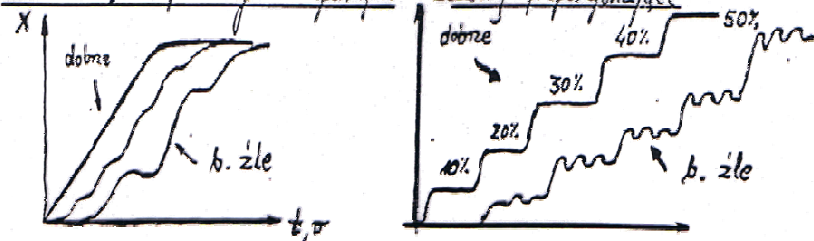
3. Zmniejszenie przebiegu programu w wyniku mieszania cieczy
w elementach aparatury (wzajemna rozciągliwość) i możliwości
precyzyjnego skutkiem; konieczność określenia zastępczej objętości
mieszania i opóźnienia transportowego aparatu.



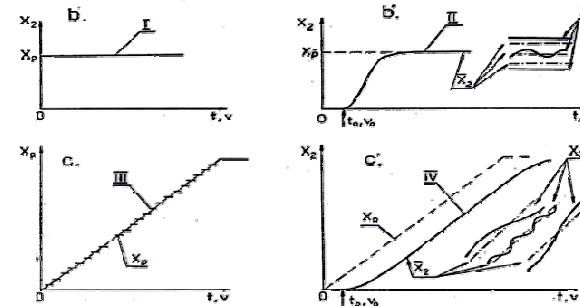
4. Kwestia optymalnej objętości mieszacza



5. Problem interferencji "pompa - zawory proporcjonujące"



Układy zasilania kolumny chromatograficznej.



Program

Realizacja

Niektóre zniekształcenia realizacji programu elucji w aparacie HPLC z zaworami proporcjonującymi

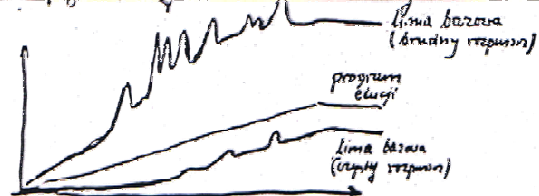
t, v – czas, objętość t_0, v_0 – opóźnienie transportowe,

X_p – zaprogramowana funkcja programu elucji,

X_z – przebieg funkcji programu elucji otrzymany na wlocie do kolumny.

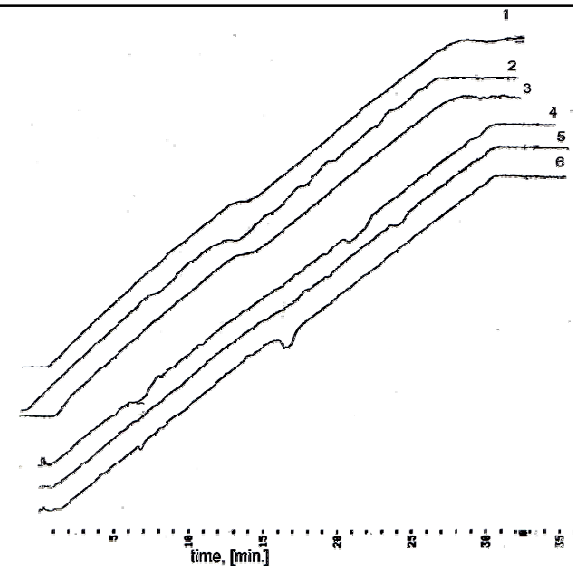
6. Zalecenia praktyczne: (po odizwazeniu kolumny)

- określić eksperymentalnie V_0, V_a (test aparatury)
 - Sprawdzić realizację w praktyce linii prostej, gradientu skokowego oraz postarzalność realizacji (w warunkach liniowej odpowiadającej detektor)
 - Zminimalizować zbędne objętości przesłania.
 - możliwość sterowania „asynchronizacją” pracy sterów pompy i zaworów proporcjonalnych.
7. Wpływ zamieszania eluenta na przebieg linii bazowej podczas „ślepej próby” i możliwości odcimowania tego przebiegu. (po przyłączeniu kolumny)

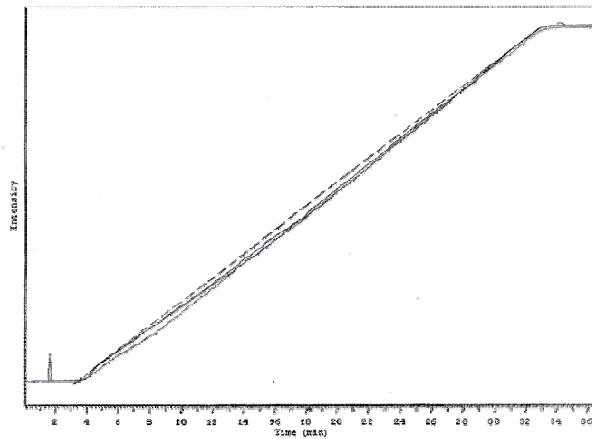


8. Metody oczyszczania

rozpuszczalników:
 H_2O , CH_3OH , THF, Hexan



Przykłady zniekształceń linii programu elucji otrzymanych z zastosowaniem aparatu: Lichrograph (Merck-Hitachi)
 Warunki: $X=3.33[\%/min.]^*t$, ciecz A - 0.05% acetonu w wodzie, ciecz B - 0.1% acetonu w wodzie;
 krzywe 1, 2, 3: $w=1.5 \text{ cm}^3/min$, z kolumną chromatograficzną ($\Delta P=30 \text{ MPa}$),
 krzywe 4, 5, 6: $w=1 \text{ cm}^3/min$, bez kolumny ($\Delta P \approx 0 \text{ MPa}$)

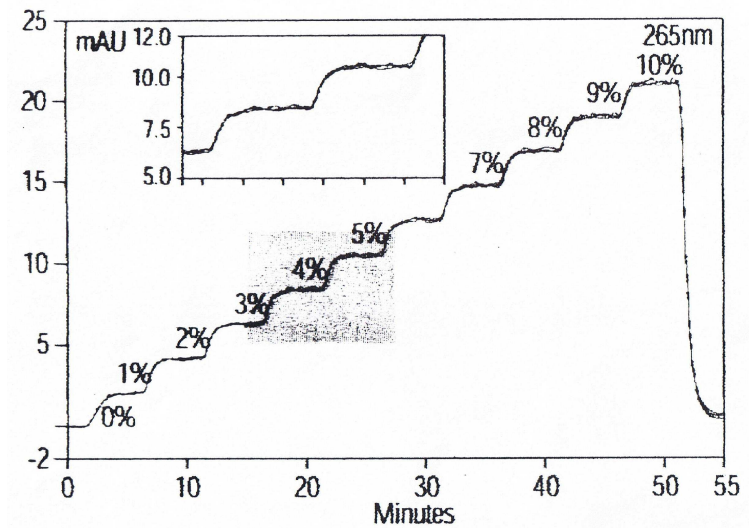


Przykłady zniekształceń linii programu elucji

Aparat: LaChrom (Merck-Hitachi)

Warunki: $X=3,33[\%/min.] * t + 4[\%]$, zastępcza objętość mieszania $V_z = 0,35 \text{ cm}^3$, ciecz A - 25% metanolu + 0,05% acetonu w wodzie, ciecz B - 75% metanolu + 0,1% acetonu w wodzie, $w = 1,5 \text{ cm}^3/min$, z kolumną chromatograficzną Lichrospher 250x4 RP18 $5\mu\text{m}$ ($\Delta P = 31-32 \text{ MPa}$).

Linia kreskowa zaznaczono pożądany przebieg programu elucji przesunięty o wartość opóźnienia transportowego.



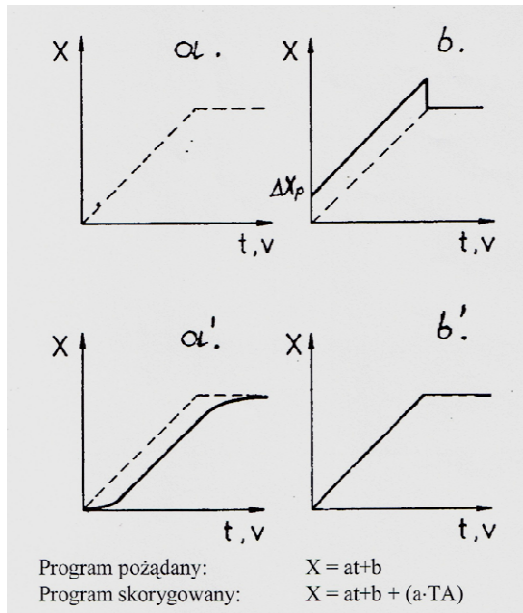
Flow:

Solvent A:

Solvent B:

Gradient:

Detection:



Efektywna korekta przebiegu programu elucji w celu zapewnienia żądanego „profilu” na wlocie do kolumny HPLC –

- Szczególnie ważne i wykorzystywane w UPC – tylko korekta opóźnienia transportowego - najważniejsza !!!