

Předcházejte problémům v HPLC s využitím příslušenství Agilent

Andrea Vernerová
Aplikační specialista (LC, LC/MS)

Vitatox 2023, Dvůr Králové nad Labem, 29.-31.5. 2023



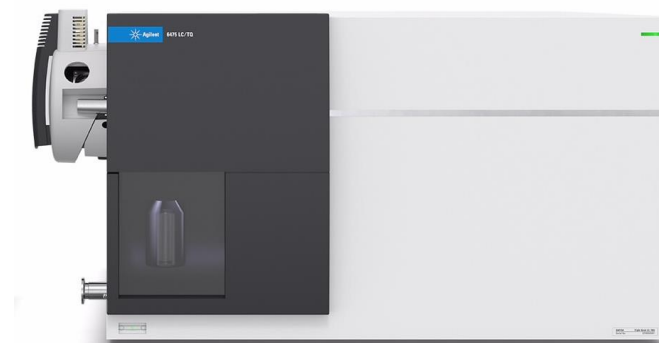
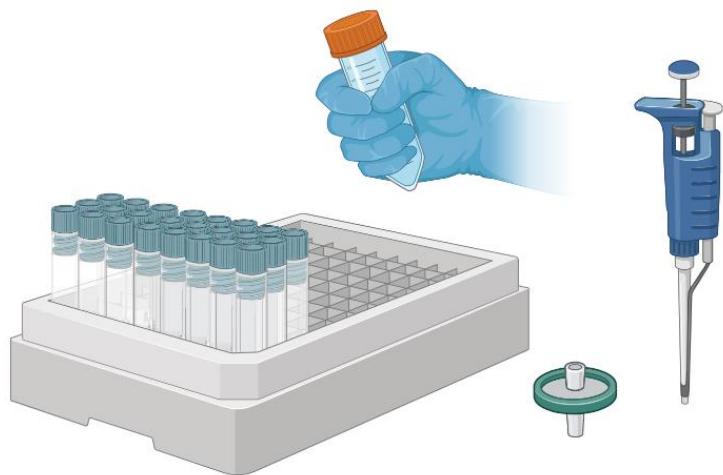
HPST
a member of Altium Group



Příprava vzorku

LC systém

Detektor (MS, DAD)



LC systém – problémy hardware

↑/↓/kolísavý tlak systému – netěsnost v systému, neprůchozí ventilký pumpy, poškozené písty nebo jejich těsnění, nefunkční degaser, nevhodný oplach pístů, zablokovaná kapilára



Neopakovatelné dávkování, přenos vzorku, změna plochy píku – netěsnost systému, ohnutá/zablokovaná jehla či sedýlko, nesprávně naplněná vialka, nevhodná oplachová kapalina



LC systém – problémy hardware

↑/↓/kolísavý retenční čas, vliv na tvar píku a tlak systému – netěsnost systému, zablokovaná kolona, zablokované/olámané systémové kapiláry, opotřebovaná ferule



Vliv na všechny části LC systému – kontaminace



LC systém - prevence - uživatel

Chemie mobilní fáze (čistota, pH, koncentrace) ←

Ochrana chromatografické kolony – prodloužení její životnosti ←

Vhodná příprava vzorku před analýzou, vhodné vialky se septy ←



LC systém - prevence - Mobilní fáze

- Kvalita a čistota mobilní fáze: HPLC grade, LC-MS grade a další
- Vodné mobilní fáze: filtrace (0,2 nebo 0,45 μm), tmavé láhve, vždy čerstvé
- Pravidelná kontrola frit v zásobních láhvích (olámané nebo znečištěné) – mikrobiální kontaminace a následná neprůchodnost



- **Vhodné bezpečnostní uzávěry:** prevence kontaminace, úniku par rozpouštědla



Methanol

CHROMASOLV™, for HPLC, ≥99.9%

Specifications

Property	Value
Assay (GC)	Min. 99.90 %
Non-volatile matter	Max. 0.0005 %
Water (Karl Fischer)	Max. 0.03 %
Absorbance at 400 nm	Max. 0.01
Absorbance 280 nm	Max. 0.01
Absorbance at 260 nm	Max. 0.04
Absorbance at 254 nm	Max. 0.02
Absorbance at 240 nm	Max. 0.07
Absorbance at 235 nm	Max. 0.10
Absorbance at 230 nm	Max. 0.15
Absorbance at 220 nm	Max. 0.30
Absorbance at 210 nm	Max. 0.60
Absorbance at 205 nm	Max. 1.00
Absorbance (JP)(Val.Ref)	complying
Fluorescence (chinin) at 254 nm	Max. 1 ppb
Fluorescence (chinin) at 365 nm	Max. 1 ppb
APHA	Max. 10
Vapor Pressure	97.68 mmHg (20 °C)
Vapor Pressure	410 mmHg (50 °C)
Vapor Density	1.11 (vs air)

Methanol

CHROMASOLV™ LC-MS, >=99.9%

Specifications

Property	Value
Vapor Density	1.11 (vs air)
Assay (GC)	Min. 99.90 %
Non-volatile matter	max. 0.0005 %
Water (Karl Fischer)	max. 0.02 %
Non-volatile matter	Max. 0.0005 %
Water (Karl Fischer)	Max. 0.02 %
Free acid (as HCOOH)	Max. 0.001 %
Free alkali (as NH ₃)	Max. 0.0005 %
Silver (Ag)	Max. 0.1 ppm
Aluminium (Al)	Max. 0.5 ppm
Barium (Ba)	Max. 0.1 ppm
Calcium (Ca)	Max. 0.1 ppm
Cadmium (Cd)	Max. 0.05 ppm
Cobalt (Co)	Max. 0.02 ppm
Chromium (Cr)	Max. 0.02 ppm
Copper (Cu)	Max. 0.01 ppm
Iron (Fe)	Max. 0.1 ppm
Potassium (K)	Max. 0.1 ppm
Magnesium (Mg)	Max. 0.1 ppm
Manganese (Mn)	Max. 0.01 ppm
Sodium (Na)	Max. 0.1 ppm
Nickel (Ni)	Max. 0.02 ppm
Lead (Pb)	Max. 0.02 ppm
Tin (Sn)	Max. 0.1 ppm
Zinc (Zn)	Max. 0.1 ppm
Absorbance at 210 nm	Max. 0.523
Absorbance at 220 nm	Max. 0.301
Absorbance at 230 nm	Max. 0.128
Absorbance at 260 nm	Max. 0.009
Fluorescence (chinin) at 254 nm	Max. 1 ppb
Fluorescence (chinin) at 365 nm	Max. 1 ppb
HPLC Gradient at 254 nm	Max. 5 mAU
Suitability for the LC-MS	complying

Methanol

CHROMASOLV™ Plus, for HPLC

Specifications

Property	Value
Purity (GC)	Min. 99.90 %
IR spectrum	complying
Non-volatile matter	Max. 0.0001 %
Water (Karl Fischer)	Max. 0.05 %
Titration Acid	Max. 0.0003 meq/g
Titration Base	Max. 0.0002 meq/g
Absorbance at 400 nm	Max. 0.005
Absorbance at 250 nm	Max. 0.02
Absorbance at 230 nm	Max. 0.10
Absorbance at 220 nm	Max. 0.20
Absorbance at 210 nm	Max. 0.80
Absorbance at 205 nm	Max. 1.0
Fluorescence (chinin) at 254 nm	Max. 1.0 ppb
Fluorescence (chinin) at 365 nm	Max. 1.0 ppb
HPLC Gradient at 230 nm	Max. 2 mAU
HPLC Gradient at 254 nm	Max. 5 mAU
APHA	Max. 10
Carbonyl compounds (as Acetone)	Max. 0.001 %
Carbonyl Compounds (as HCHO)	Max. 0.001 %
Carbonyl compounds (as C ₂ H ₄ O)	Max. 0.001 %
Explosion Limit	36 %
Autoignition Temperature	725 °F

- Kvalita rozpouštědel – vliv na šum a drift základní linie (práce v oblasti blízké UV cut-off hodnotě mobilní fáze)

Absorbance při 260/250 nm:

- HPLC: max. 0,04
- LC-MS: max. 0,009
- HPLC Plus: max. 0,02

InfinityLab Stay Safe promývací láhev

- K umístění nepoužívaných hadiček pro přívod mobilní fáze
- Prevence křížové kontaminace rozpouštědel a vodné fáze



Vyhňte se škodlivým výparům



Snadná manipulace



Zabraňte nechtěnému nasávání vzduchu

- Uzavření láhve pomocí bezpečnostních víček → minimalizace kontaminace ultračistých rozpouštědel z prostředí laboratoře
- Jednotlivé hadičky bez rizika samovolného překroucení nebo vyklouznutí
- Hadičky jsou pevně přichyceny k víčkům (šroubení) → zabránění nežádoucímu nasávání vzduchu do LC systému



InfinityLab Stay Safe bezpečnostní víčka

- rozdílný počet výstupů dle požadavků uživatele

Mobilní fáze



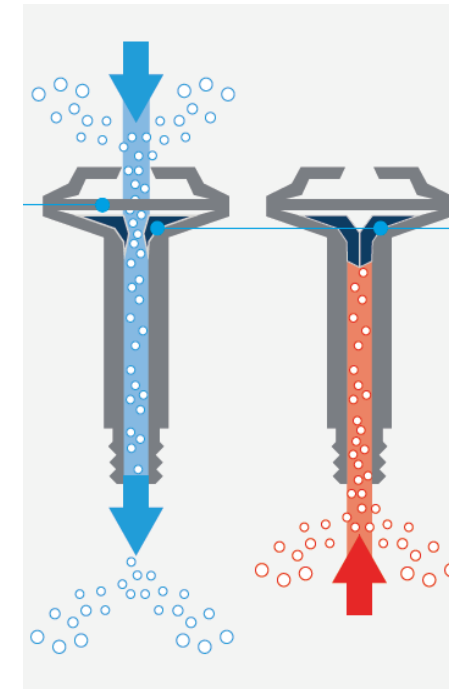
Odpad



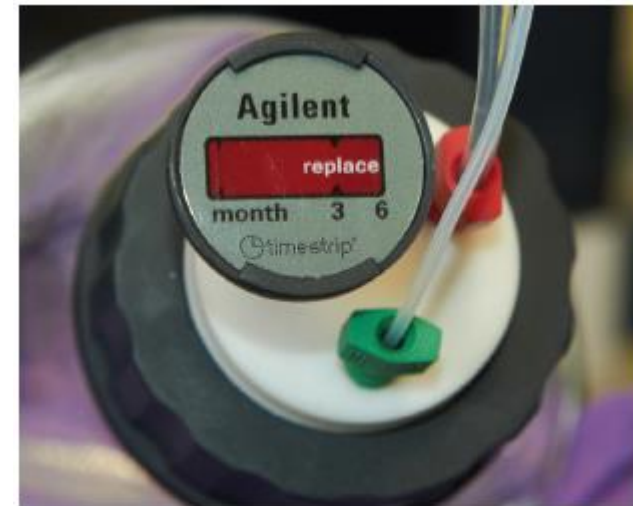
Filtrační membrána

Ochrana solventů před prachem a dalšími možnými kontaminacemi z prostředí.

PTFE filtr



Jednocestný ventil
Prevence úniku nebezpečných výparů z láhve.



- 6ti měsíční časový pás
- Signalizace výměny

LC systém - prevence - Autosampler

- Správně nastavit needle offset (bottom sensing) – vialsampler x multisampler
- Správná volba oplachové kapaliny (10-15% IPA nebo 100% MetOH, flush port x vialky)
- Používat kvalitní septa – při opakovaném nástřiku kontaminace vzorku
- Vhodná úprava vzorku



Optimalizace „needle offset“

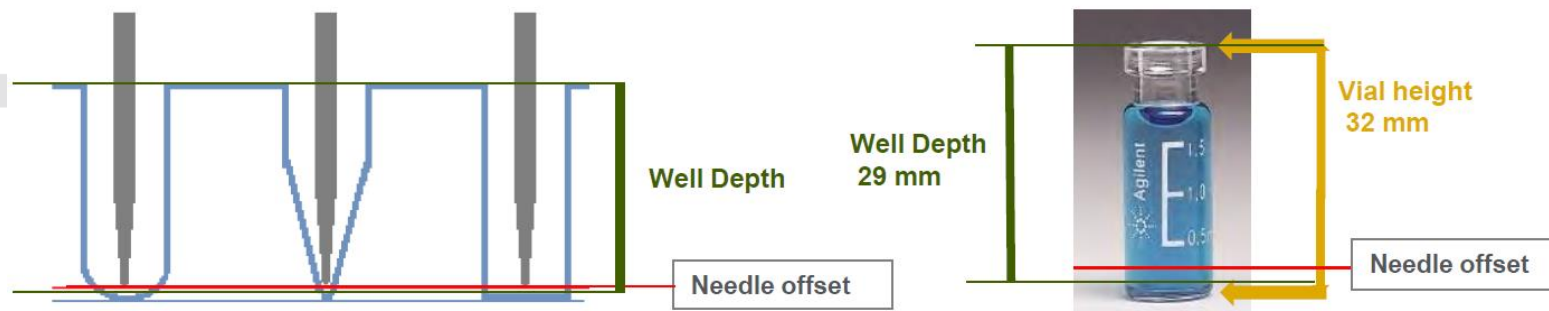
Needle Height Position Offset = 0	Vial Sampler G1329B/G7129A/B	Multisampler G7167A/B
	2 ml vialky (sampe tray)	2 ml vialky (54 vial tray)
Bez funkce „Bottom Sensing“	2 mm	5 mm
S funkcí „Bottom Sensing“	x	2 mm

Nikdy nenastavujte maximální offset jehly (-2 mm/-5 mm)!

Needle Height Position

Offset: mm

Use Vial/Well Bottom Sensing



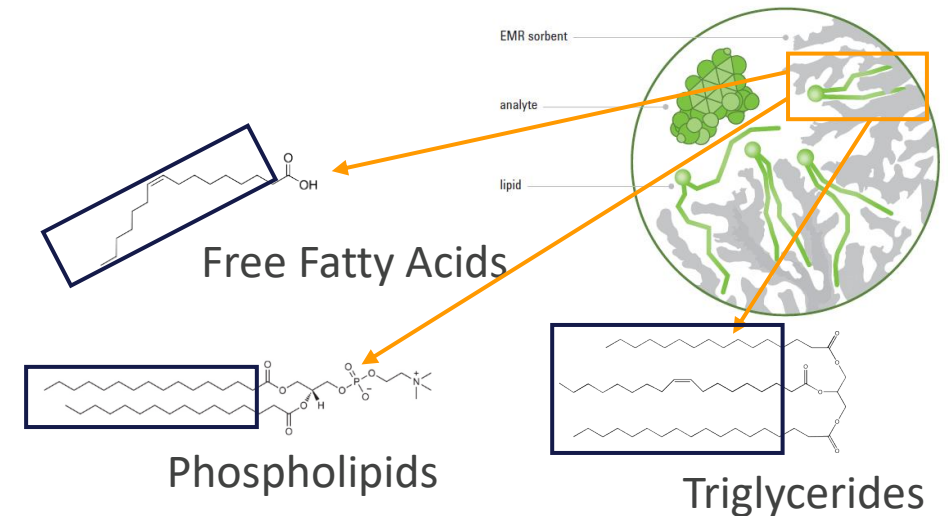
Captiva EMR-Lipid

Vylepšené odstranění matrice před analýzou (Enhanced Matrix Removal, EMR)

- Vysoce selektivní a účinné odstranění tuků a lipidů/matrice bez ztráty analytu

Mechanismy EMR:

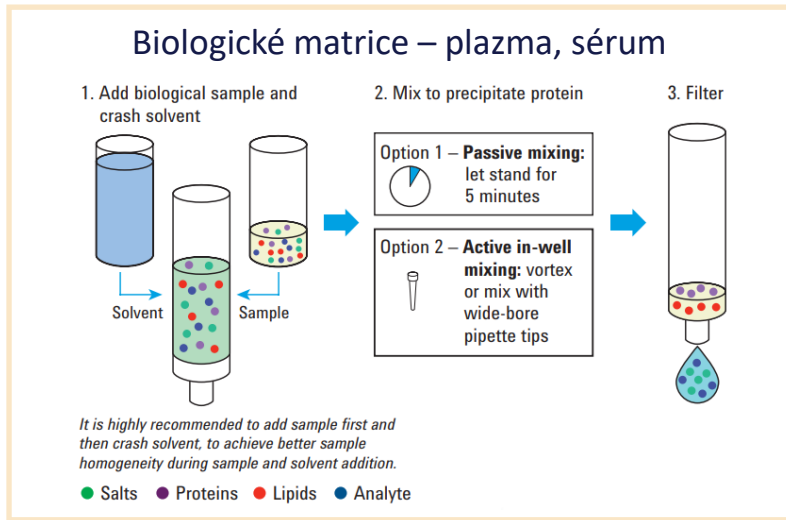
- **Vylučovací selekce**
- **Chemie sorbentu** (hydrofobní interakce)
- Minimální potlačení iontů cílových analytů → vyšší spolehlivost a robustnost metody
- ↑ citlivost analytů, zlepšení tvaru píku a prodloužení životnosti kolony
- 3 v 1: precipitace proteinů, filtrace a selektivní odstranění lipidů



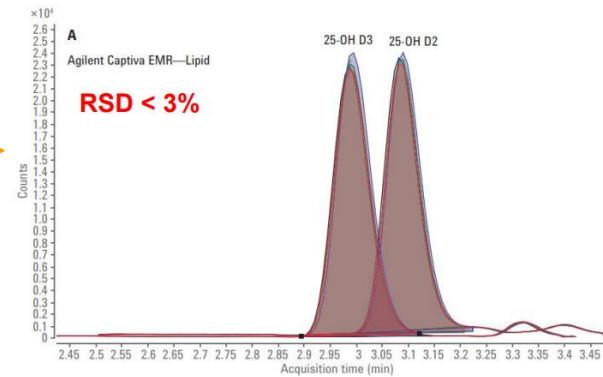
Captiva EMR-Lipid

2 formáty

- 1 ml kolony a 96ti jamkové mikrotitrační destičky



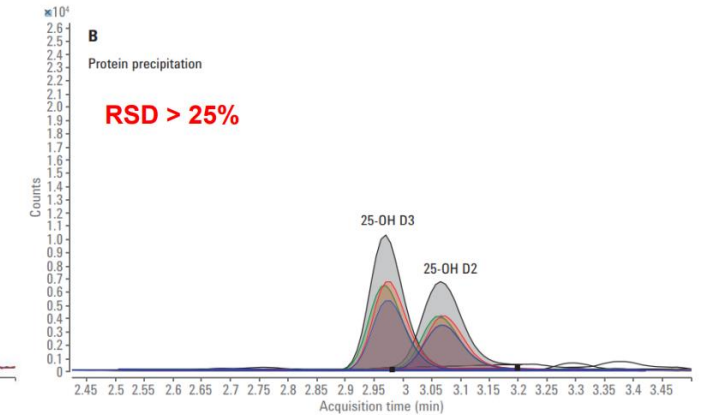
Captiva EMR-Lipid



Vzorek po správné úpravě

↑ odezva, ↓ RSD

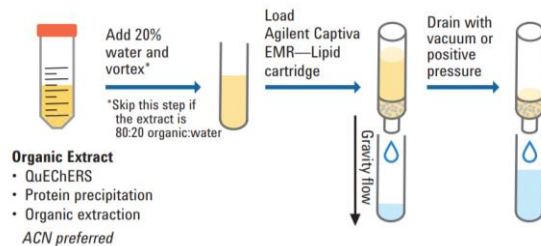
Protein precipitation



Vzorek bez dostatečného prečistění

- 3 a 6 ml kolony

Potravinové matrice – ↑ obsah rostlinného/živočišného tuku



Agilent Carbon S

- Analýza potravin a životního prostředí
- **Graphitized Carbon Black (GCB)** = grafitizovaný uhlík, kokosové uhlí nebo aktivní uhlí
- Carbon S = náhrada za GCB, optimalizovaný obsah uhlíku a struktura pórů
- Odstranění pigmentů z matrice
- Zlepšená výtěžnost pro aromatické planární pesticidy (hexachlorbenzen a thiabendazol) bez přídavku toluenu

Přínos:

- Kvalita dat: ↑ výtěžnost, reprodukovatelnost
- Dosažení ↓ LOD
- ↑ propustnost dat pro multireziduální analýzu pesticidů



Carbon S sorbent

Barva	Pigmenty
Zelená	Chlorofyl, lutein
Červená, modrá, fialová, černá	Antokyanidiny, antokyany
Oranžová, žlutá	Karotenoidy, xantofyly

Agilent Carbon S

- Přečištění vzorku před LC i GC analýzou (stanovení pesticidů a PFAS)

Dostupnost ve 4 formátech:

- Sorbent („Bulk“)
- dSPE kity (pro QuEChERS)
- SPE (pouze uhlíkové nebo v kombinaci s PSA nebo NH₂) – Bond Elut Carbon produkty
- Captiva **Enhanced Matrix Removal (EMR)** Carbon S produkty pro přečištění vzorku



15mL and 2mL dSPE



Bond Elut Carbon



Captiva EMR-

LC systém - prevence - Kolona

- Použití správného fittingu (InfinityLab Quick Connect/Turn) –
↓ mrtvý objem, carry-over
- Pravidelná výměna kapilár, ferule, šroubů z materiálu PEEK (spotřební materiál)
- Předkolony/prefiltry – prodloužení životnosti kolony
- In-line filtry



do 1300 bar

InfinityLab Quick Connect fitting



do 400 bar

InfinityLab Quick Turn fitting

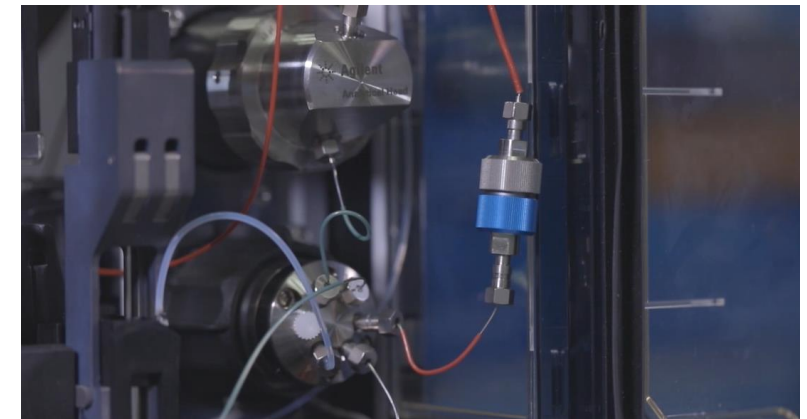
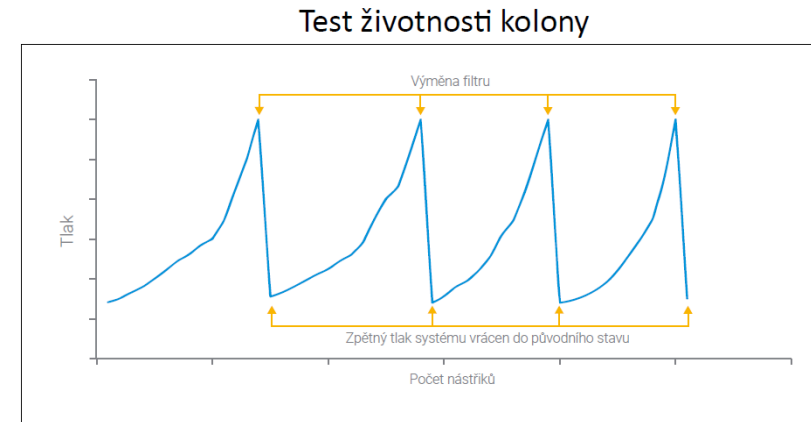
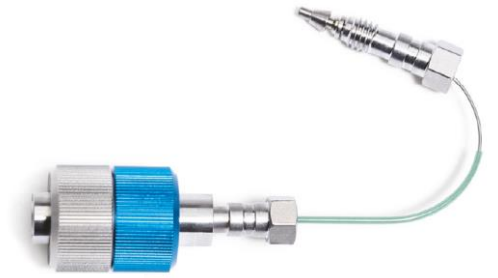
do 800 bar

do 1300 bar



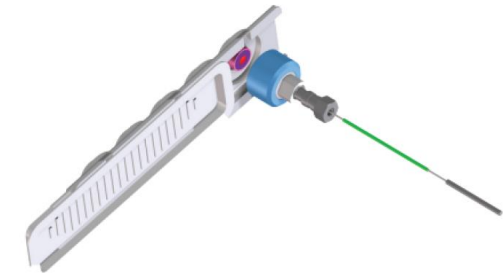
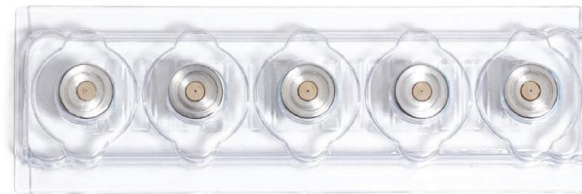
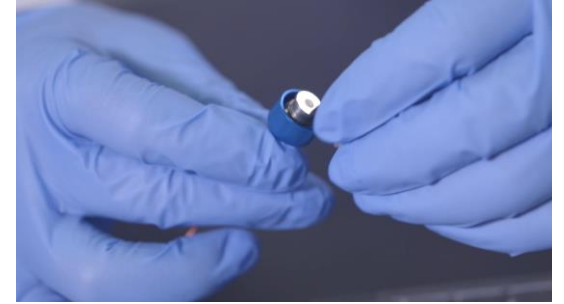
Agilent InfinityLab Quick Change in-line filtr

- Vychytává drobné nečistoty před vstupem do kolony
- Významné prodloužení životnosti kolony nebo předkolony
- Snadné manuální dotažení - Oproti běžným filtrům můžete provést až 100 výměn filtru bez netěsností
- Umístění: do pozice 6 nástřikového ventilu




Agilent InfinityLab Quick Change in-line filtr

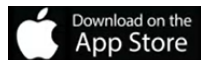
- Bezdotyková výměna filtračních disků pro minimalizaci kontaminace
- Široký výběr rozměrů a velikosti porozity filtračních disků pro každý HPLC systém
- Tlaková odolnost 1300 bar



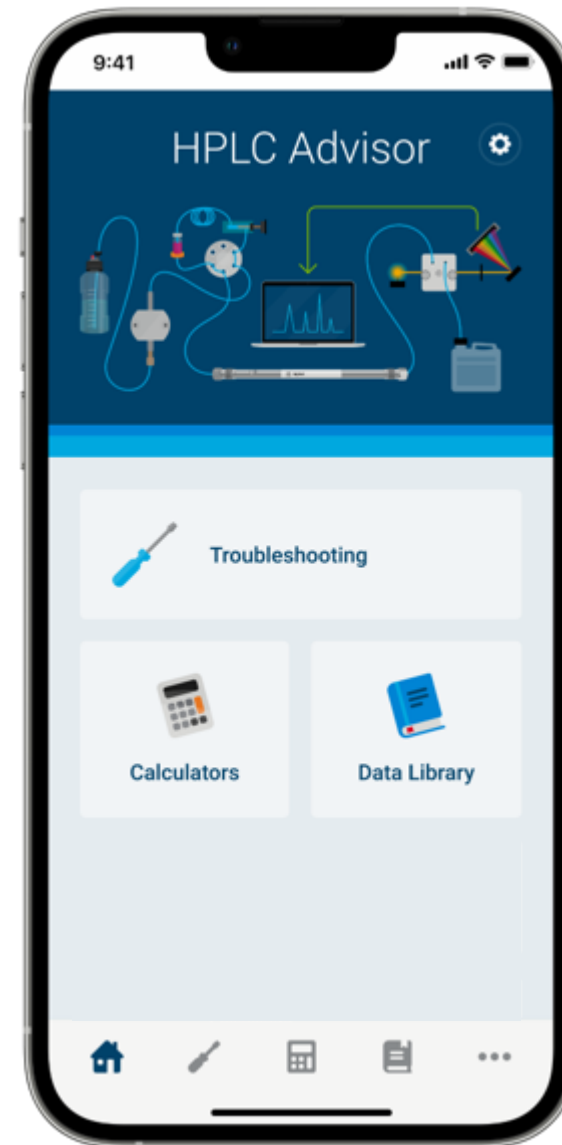
HPLC Advisor

Aplikace Agilent InfinityLab HPLC Advisor

- Snadnější a rychlejší řešení problémů s LC
- Stažení přímo do Vašich chytrých zařízení umožní pomoc kdykoli a kdekoli (také offline) 
- Nezávisle na modelu LC
- Pomoc při vývoji metod



Jak funguje HPLC Advisor



Užitečné vyhledávače od Agilent

„Agilent eSelector Tools“ nabízejí pomoc při výběru:



Analytických kolon

Vialek včetně víček a sept

Stříkačkových filtrů

SPE kolon

LC kapilár



Shrnutí

Řešení problémů v HPLC – Troubleshooting:

1. PREVENCE
2. DIAGNOSTIKA
3. ŘEŠENÍ



Agilent

Trusted Answers

Nabídka řešení od Agilent

- InfinityLab Stay Safe promývací láhev
- InfinityLab Stay Safe bezpečnostní víčka
- Captiva EMR-Lipid a Agilent Carbon S filtry
- Agilent InfinityLab Quick Change inline filtr

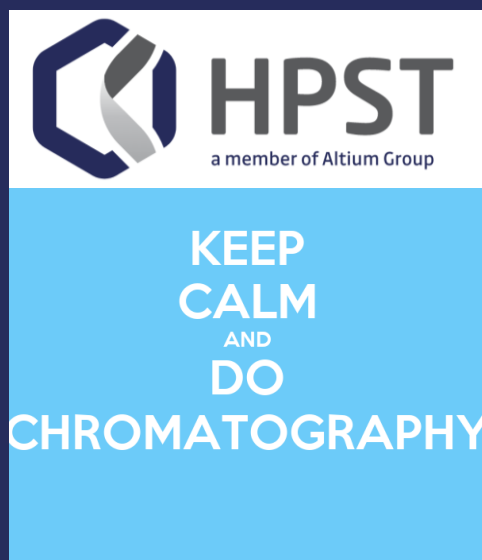
- Aplikace Agilent InfinityLab HPLC Advisor
- Agilent eSelector Tools



Autorizovaný distributor
Agilent Technologies



Děkuji za pozornost



Andrea Vernerová
Aplikační specialista (LC, LC/MS)
andrea.vernerova@hpst.cz

www.hpst.cz

