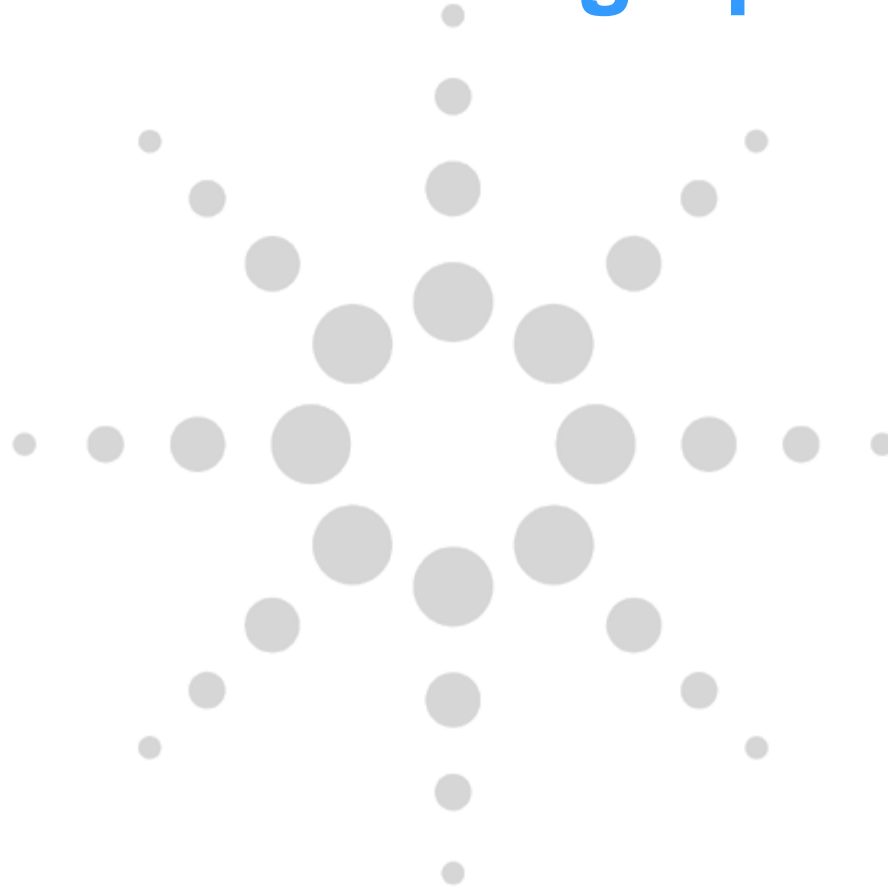
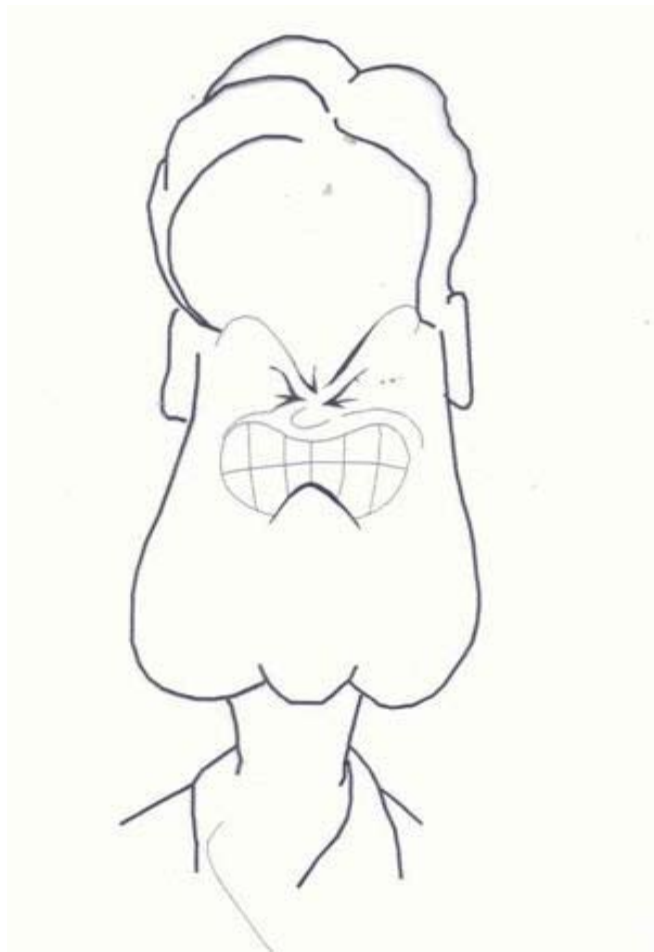


Problemlösungen und Tipps in der Flüssigkeitschromatographie



1. Fehler am Gerät tritt auf



Tipp:
- Anfall langsam abklingen lassen



Fehlererkennung

- **Was genau ist das Problem ?**
 - Alle Peaks oder einzelne ? Wie verhält sich der Druck ?
- **Was wurde geändert ?**
 - Neue Lösungsmittel, Säule, Methode, Probenvorbereitung ?
- **Tritt dieses Problem reproduzierbar auf ?**
 - Evtl. nur bei kleineren oder größeren Flußraten ?
- **Sind definierte Wartungsintervalle überschritten worden ?**
 - Dichtungen, Fritten, Filter, Kolben ...etc.

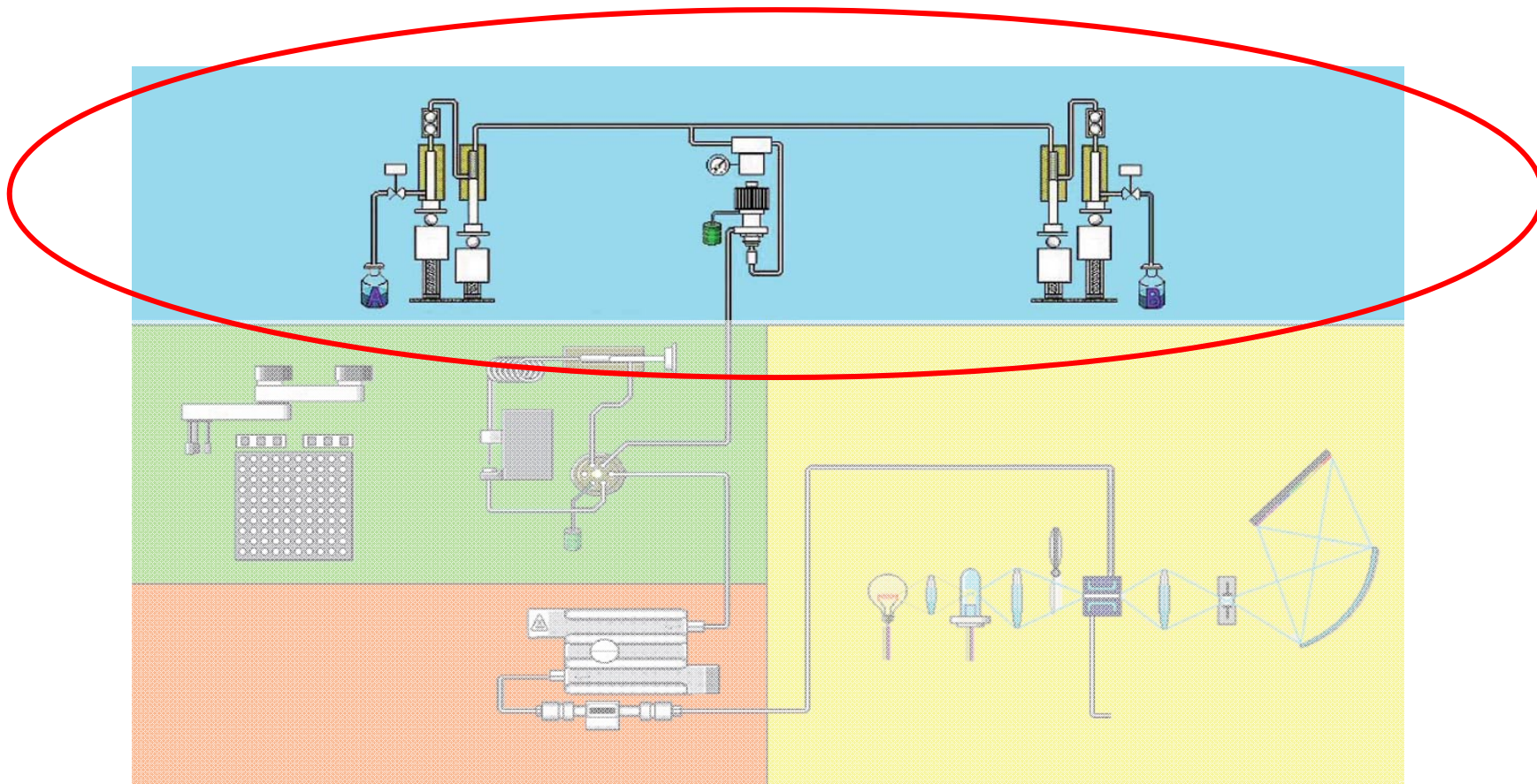


Häufigste Phänomene im Chromatogramm

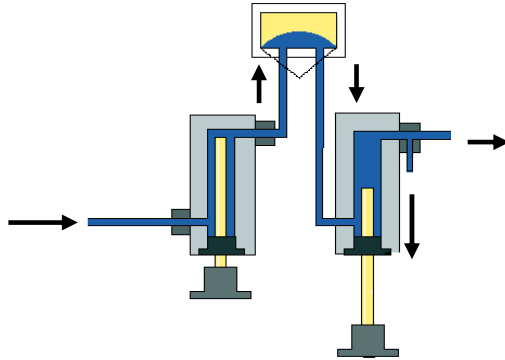
- Schwankungen der Retentionszeiten
- Mangelnde Flächenreproduzierbarkeit
- Rauschen
- Drift
- Empfindlichkeit



Fluss und Komposition: die Pumpe



Korrektur der Lösemittelkompressibilität



Pump 2 Auxiliary : Instrument 1

Maximum Flow Gradient
100 ml/min per minute

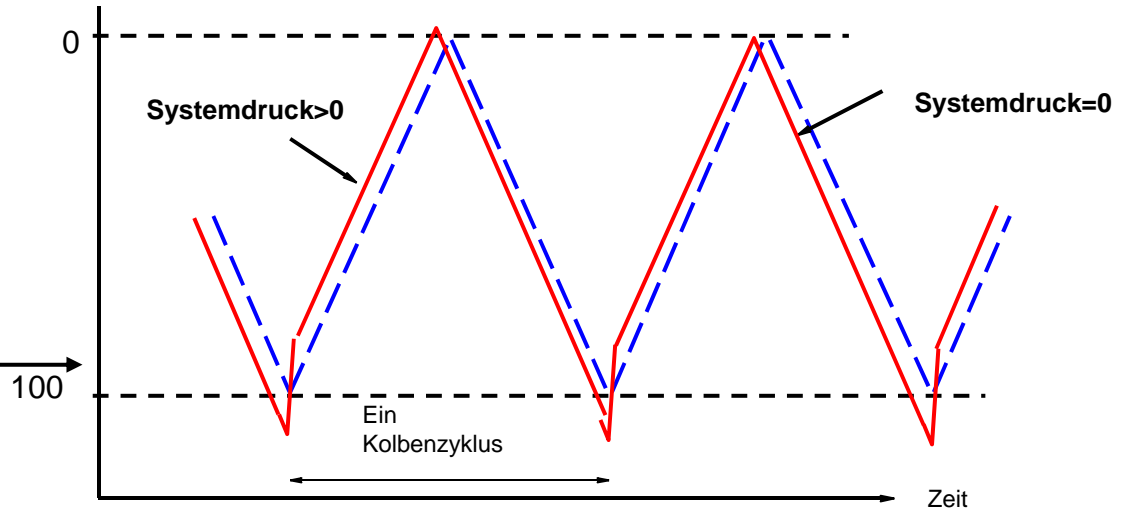
Minimum Stroke
Channel A: Auto μ l
Channel B: Auto μ l

Compressibility
 Use enhanced compressibility calibration

Channel A: 50 $\times 10^{-6}$ /bar
Channel B: 115 $\times 10^{-6}$ /bar

OK Cancel Help

Kolbenbewegung
(μ l)



Kalibrierte Kompressibilitäten (Binäre-SL-Pumpe).
Kompressibilitäten werden bei versch. Drücken bestimmt.
Lösemittel wird bei den *Setup Pump*-Parametern ausgewählt.

Traditionelle Methode für die isokratische, quaternäre
und binäre Pumpe (nicht-SL-Pumpe). Kompressibili-
täten der Lösemittel werden manuell eingetragen.



Fluss/ Komposition

- Pumpe/ Druck
 - Einlassventil
 - Auslassventil
 - Saphirkolben
- Lösemittelansaugfritte
- Degasser
- Leckage



Retentionszeitschwankungen

Ursache: Fluss/Komposition

Symptom: Druckschwankungen



Kein Druck

Druck zu hoch

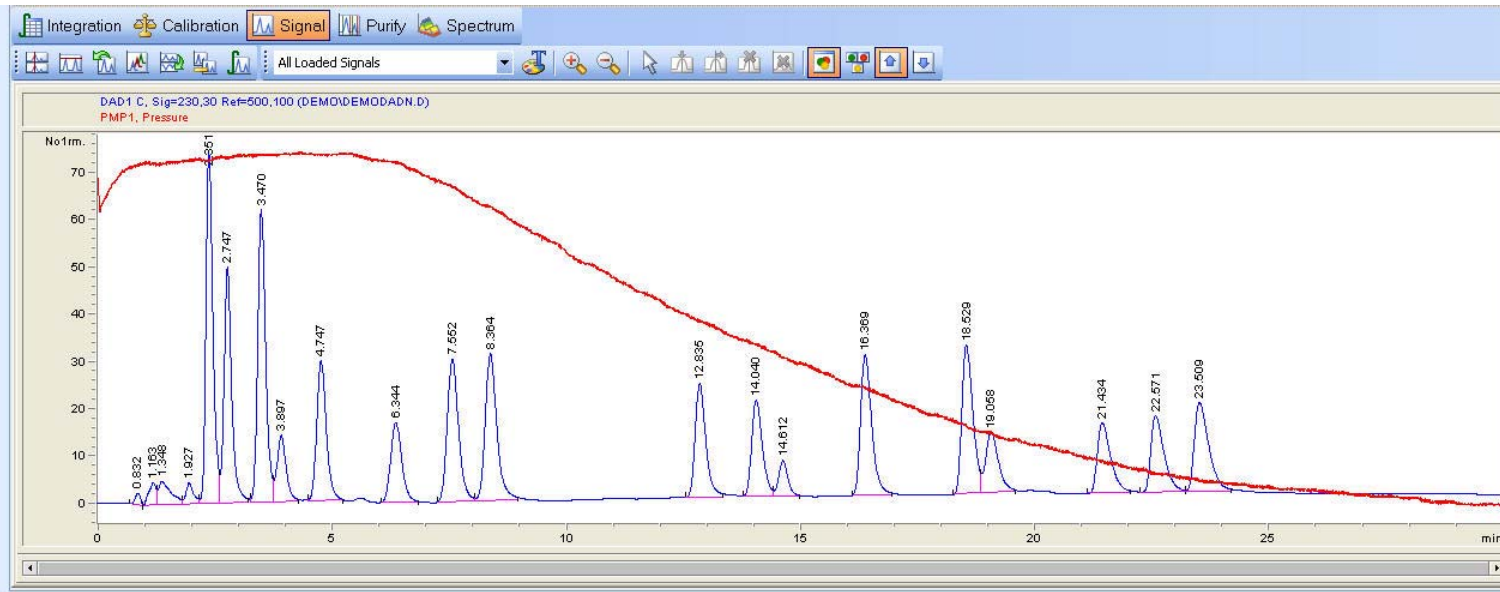
Druck zu niedrig

Druck schwankend



Agilent Technologies

Druckprobleme



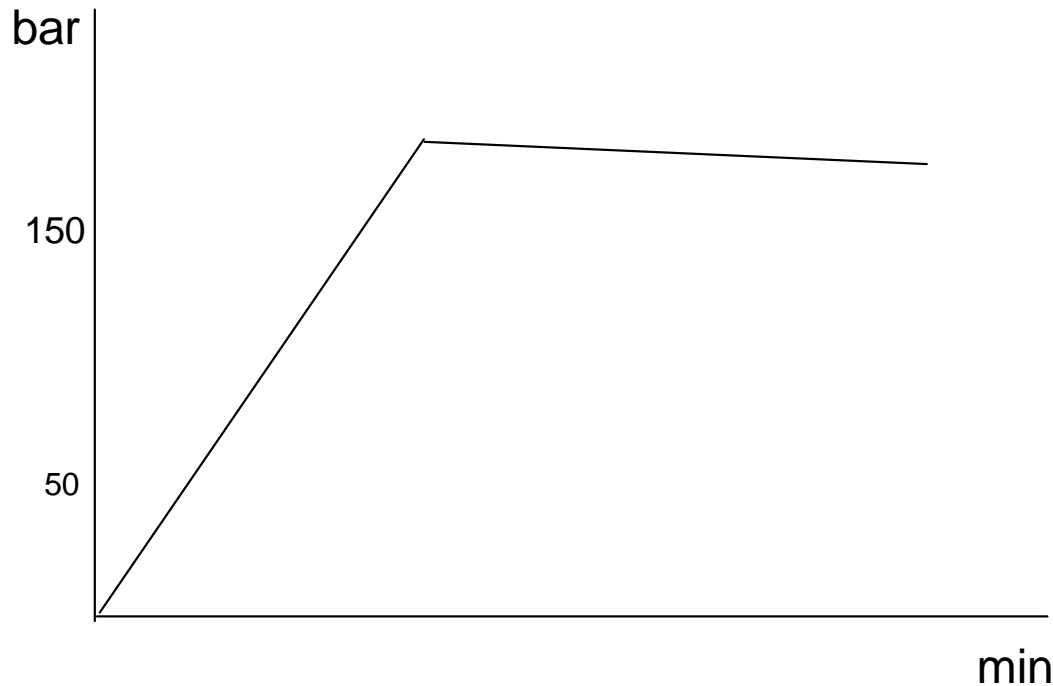
Durch Überlagerung der Druckkurve in das Chromatogramm werden Probleme während der Analyse sichtbar und helfen bei der Fehlersuche.



Pressure Ripple

The screenshot displays the 'Diagnosis' window of an Agilent instrument. The title bar reads 'Instrument 1 (offline): Diagnosis DEF_LC.M, DEF_LC.S, DEFAULT.D'. The menu bar includes 'File', 'Diagnosis', 'Maintenance', 'View', 'Abort', and 'Help'. The main toolbar contains 'Test Results/Logbooks', 'OQ/PV', 'Analytic', 'Observed Symptoms', 'Thermostat Temp...', 'Accuracy Failed', 'Possible Causes', and 'Defective Heater'. The left sidebar has 'Diagnosis' selected, with options for 'Tests...', 'System On', and 'System Off'. The central area shows a schematic of the instrument's internal components. A context menu is open over the schematic, listing 'Update Variables Display', 'Switch to Toplevel Instrument Panel', and 'Show Module Tests'. Below the schematic, a panel titled 'Binary Pump - Pressures' displays 'Pressure' at 0 bar and 'Pressure Ripple' at 0.00%. A 'Pressure Plot' button is visible next to the ripple value. At the bottom, there are buttons for 'Copy to Memo Pad', 'Send Changes', 'Cancel Changes', 'Delete Line', and 'Send'. A 'Memo Pad' is visible on the right side of the interface.

Drucktest



Verschliessen des Pumpenausgangs mit Metallstopfen.
Flow 1.0 ml/min. Pumpe schaltet bei Erreichen des maximalen Druckes (400 bar meist) ab.
Druckabfall sollte nicht größer als 2 bar/min. sein



Leaktest

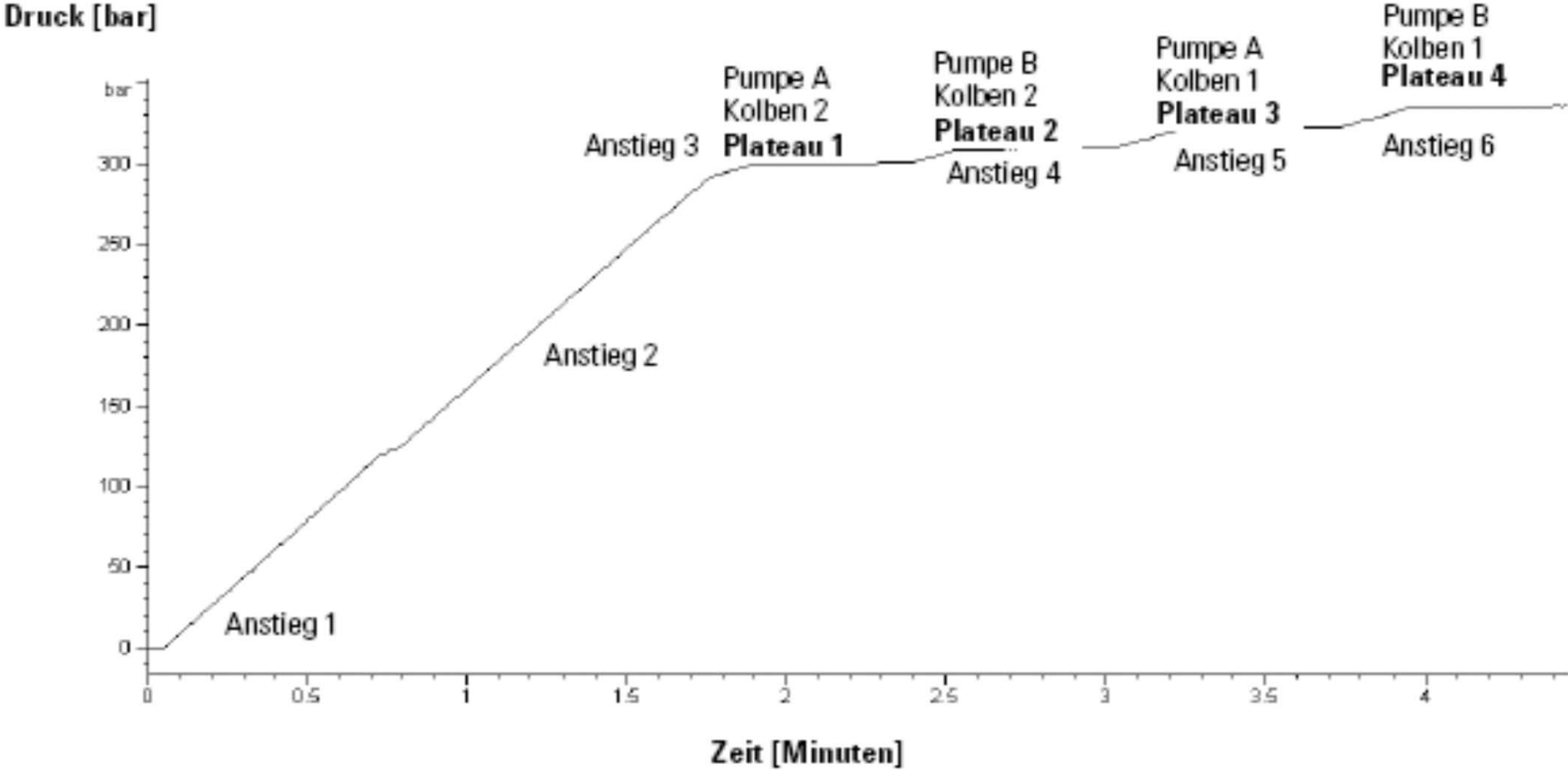
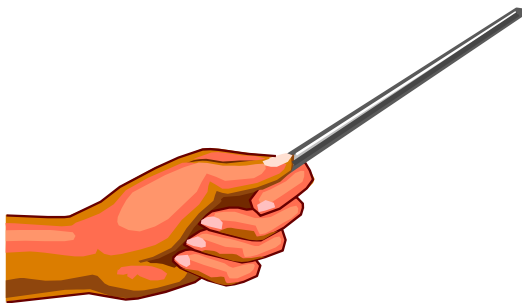


Abbildung 11 Typisches Druckprofil für den Leaktest mit Isopropanol

Retentionszeitschwankungen

Ursachen für Druckschwankungen

kein Druck:



- Saphir Kolben gebrochen
- Entgasungsprobleme
- Kugelventile
- Druckaufnehmer
- Steuerung



Retentionszeitschwankungen

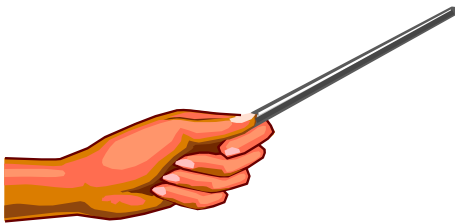
Ursachen für Druckschwankungen

Zu hoher Druck:

- Trenn-oder Vorsäule
- startende Blockade
- Gradientenmischung

Zu niedriger Druck:

- Undichtigkeit
- Flußrate/-förderung
- Luftblasen
- Gradientenmischung



Retentionszeitschwankungen

Ursachen für Druckschwankungen

Bei schwankendem Druck:

- Entgasungsprobleme, Gasblasenbildung
- Lecks, Undichtigkeiten
- Dichtungen der Kolben
- Defekte Kugelventile
- Fritten und Filter
- Pumpenantrieb fehlerhaft

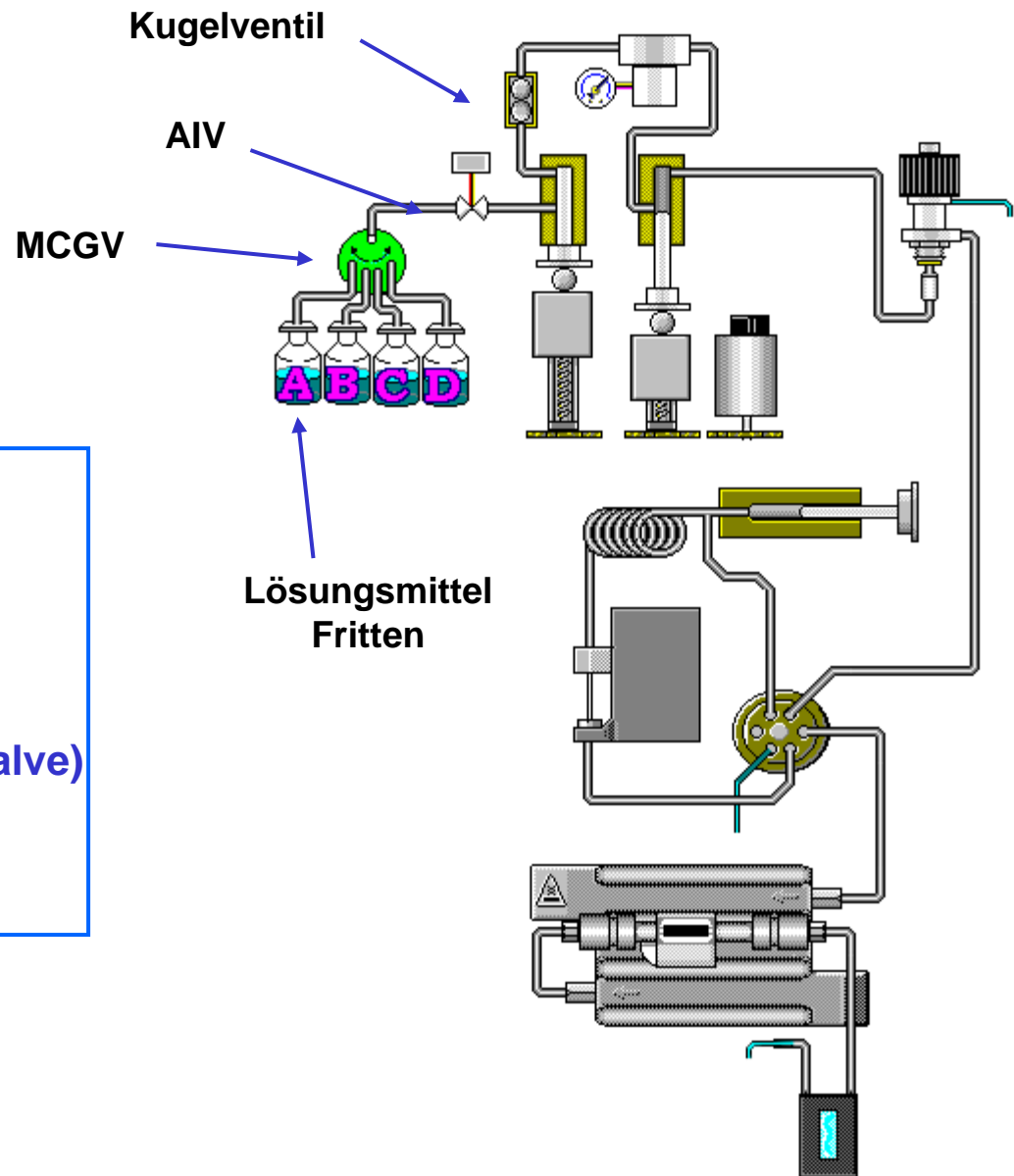


Druck Problem I

Druck zu niedrig

- Lösungsmittel Fritte verstopft (*1)
- AIV (Aktives Einlaß Ventil defekt) (*2)
- Outlet ball valve defekt (*3)
- MCGV defekt (Multi Channel Gradient valve)
- Leak in einer Kapillarverbindung

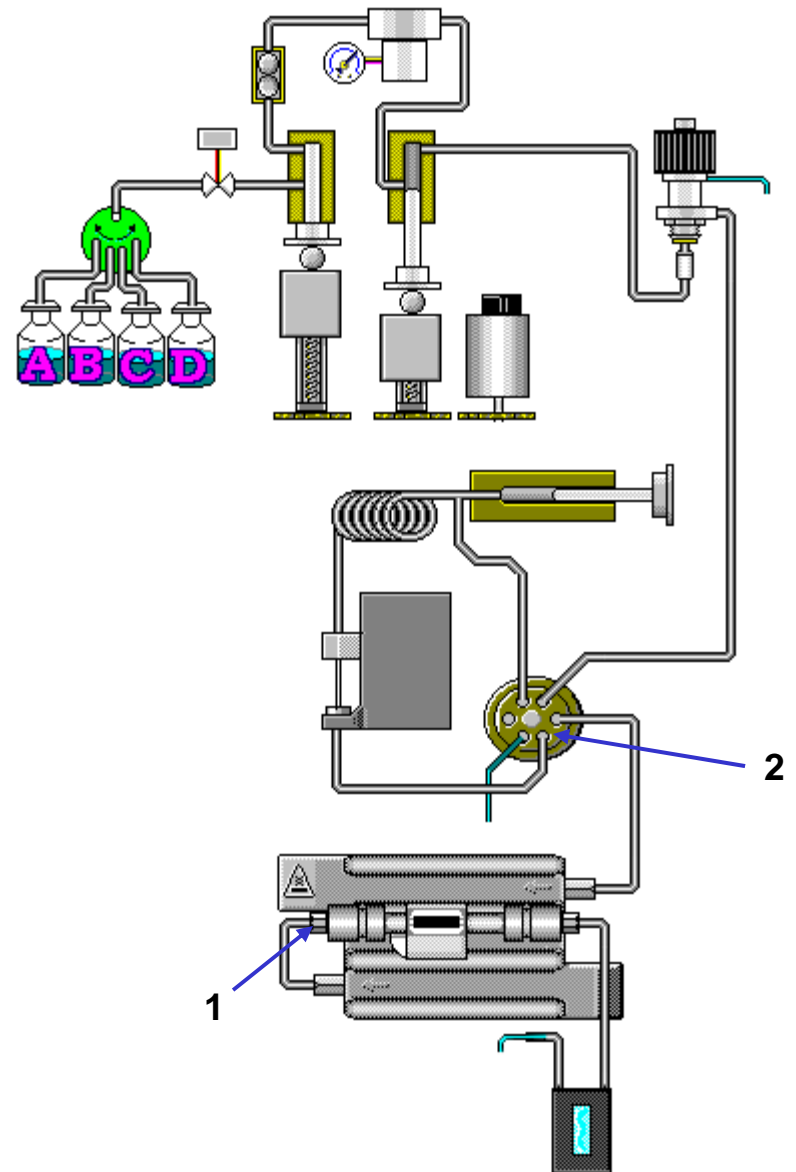
- *1: „Pressure Ripple“ kontrollieren
- *2: Test mit der „Luftblase“ machen
- *3: Leakttest



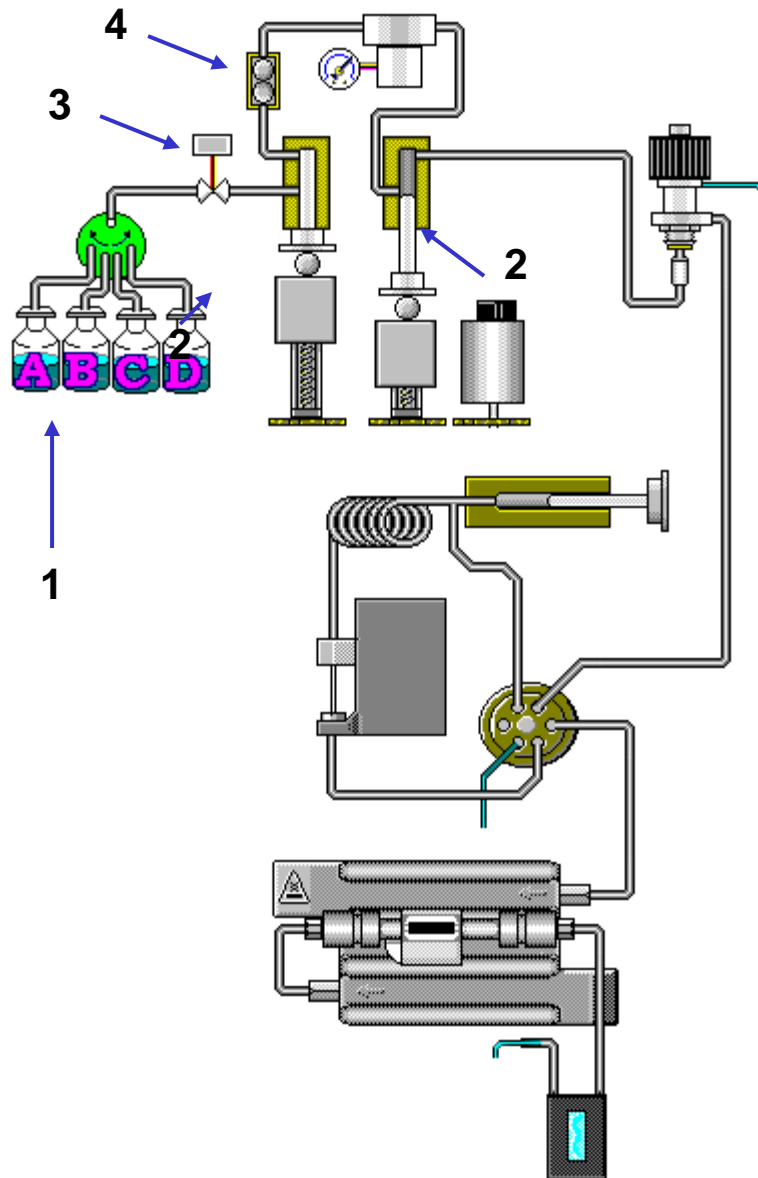
Druck Problem II

Druck zu hoch

- Fritte im Purgeventil verschmutzt
- Säuleneingangsfritte ist verschmutzt (1)
- Säule ist verschmutzt
- Blockade in einer der Kapillaren
- Rotor im Injektionsteil verstopft (2)
- Injektionsnadel oder Nadelsitz ist verstopft
- Pufferablagerungen



Druck Problem III

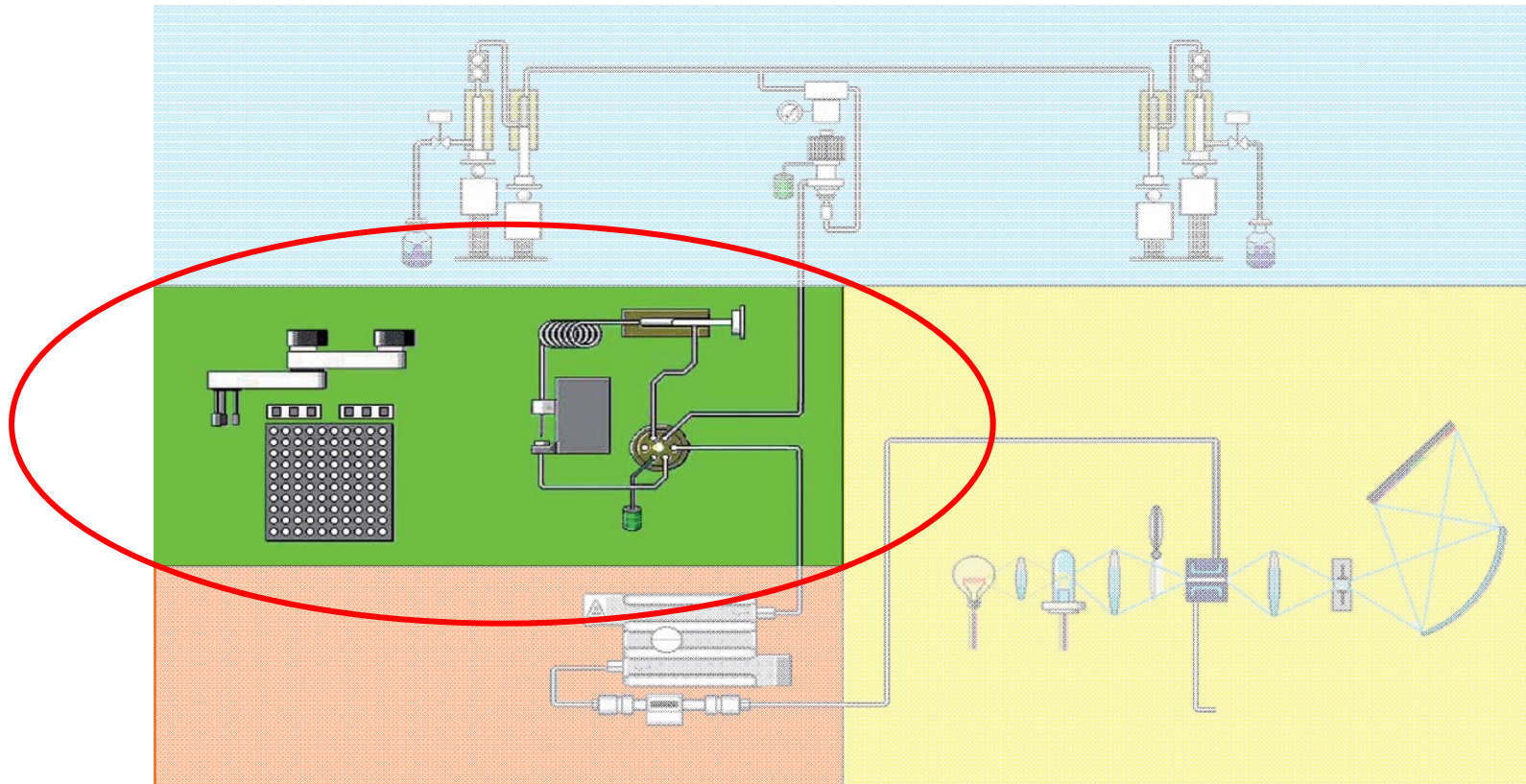


Druckschwankungen

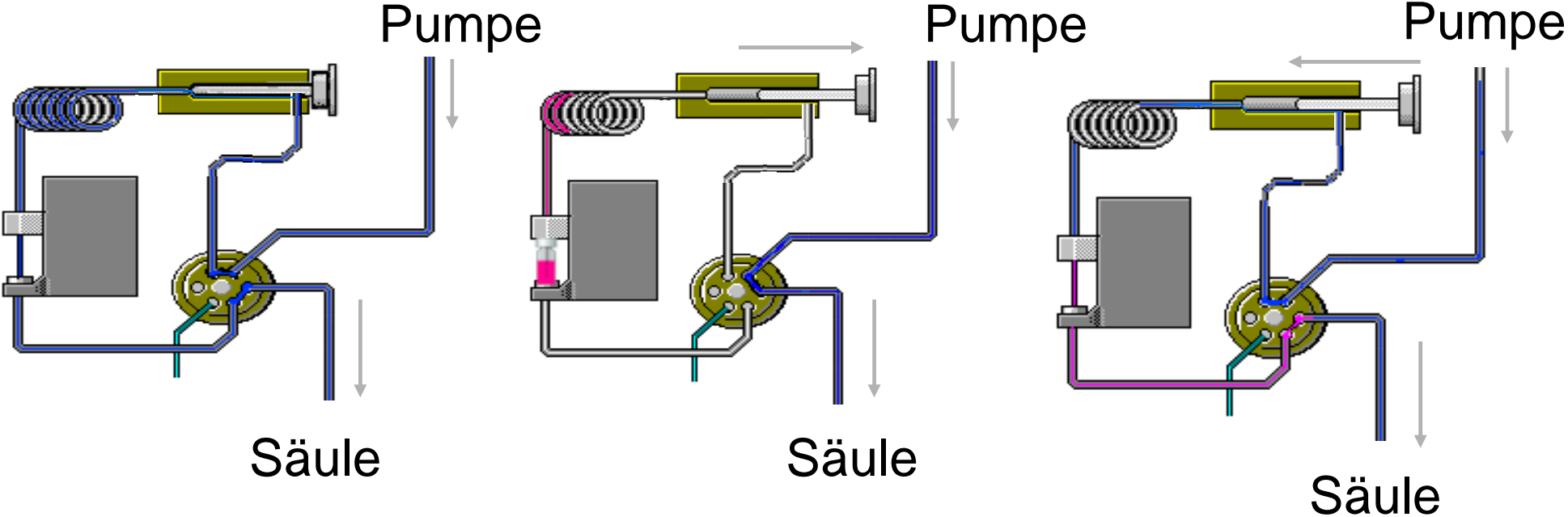
- Lösungsmittelfritten verstopft (1)
- Lösungsmittel nicht entgast
- Dichtungen der Pumpe defekt (2)
- Outlet ball valve defekt (4)
- AIV defekt (3)
- Luft im System



Der Injektor



Prinzip des Autosamplers



Vor der Injektion

Probe aufziehen

Injektion

Ventil in „Mainpass“-Position

Ventil in „Bypass“-Position

Ventil in "Mainpass"-Position

Injektionsvolumen

→ Probenvorbereitung

→ Nadel

→ Nadelsitz

→ Rotorseal



Probleme mit Peakflächen

Reproduzierbarkeit

Peakflächen sind
nicht reproduzierbar

Mit Peakhöhe

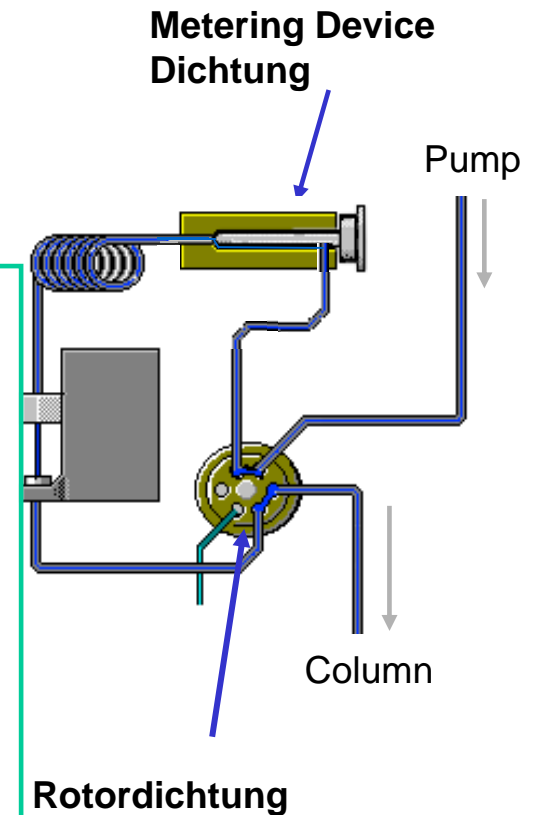
- Rotordichtung defekt oder Injektionsventil undicht
- Metering Device Dichtung undicht
- Nadel verstopft

Mit Retentionszeit

- Flußrate der Pumpe(n) nicht konstant

Andere Gründe

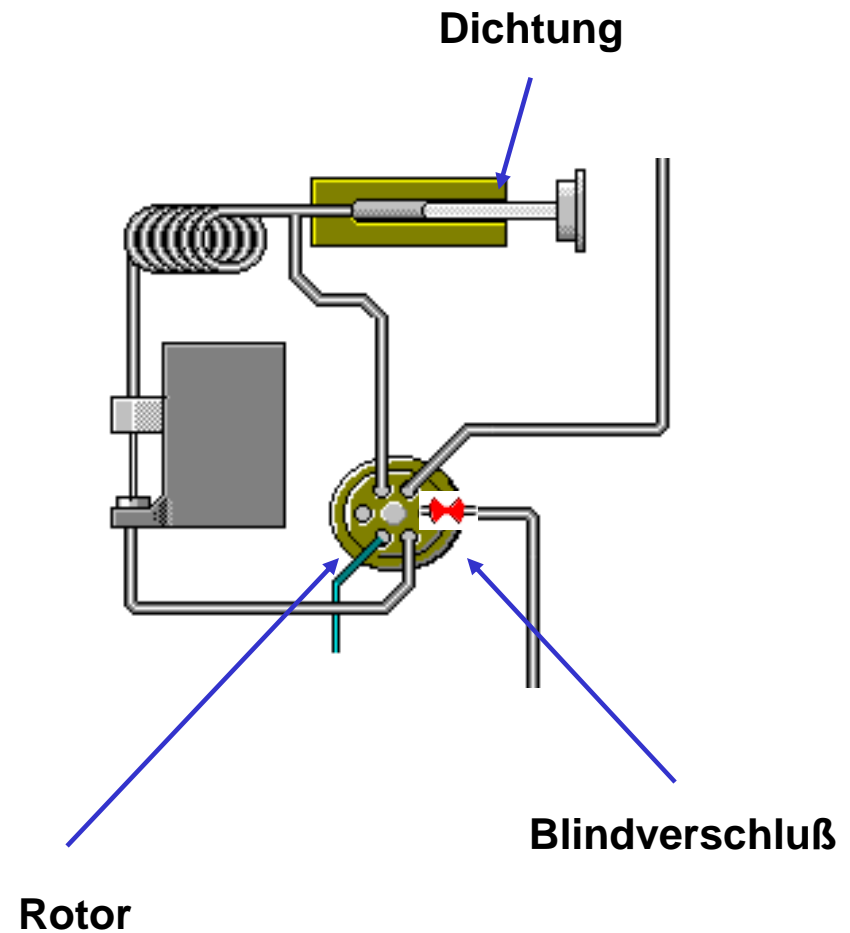
- Kapillare vom Injektor zum Detektor undicht
- Detektor oder Säule nicht equilibriert



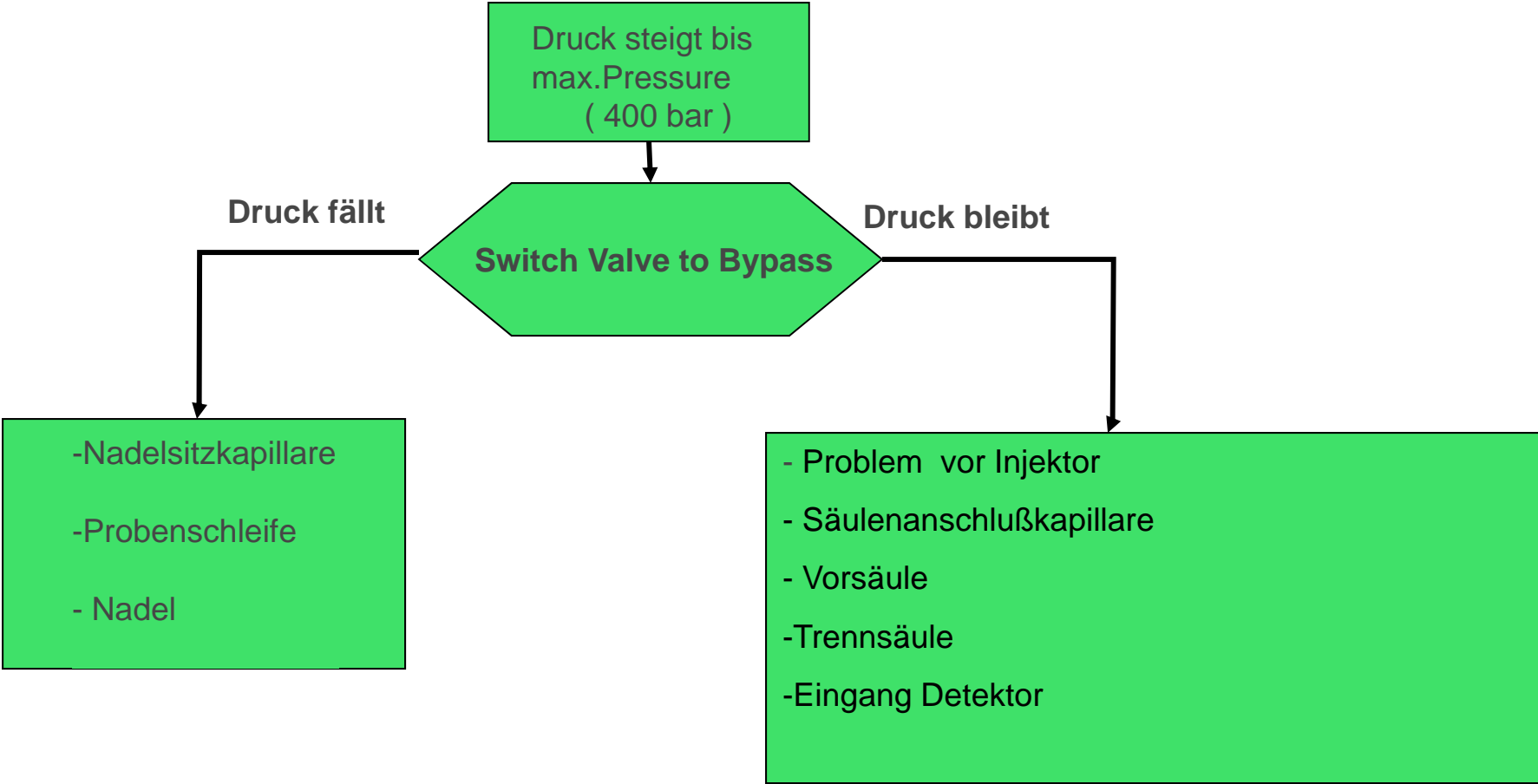
Mangelnde Reproduzierbarkeit der Peakflächen

Peak Flächen
unreproduzierbar

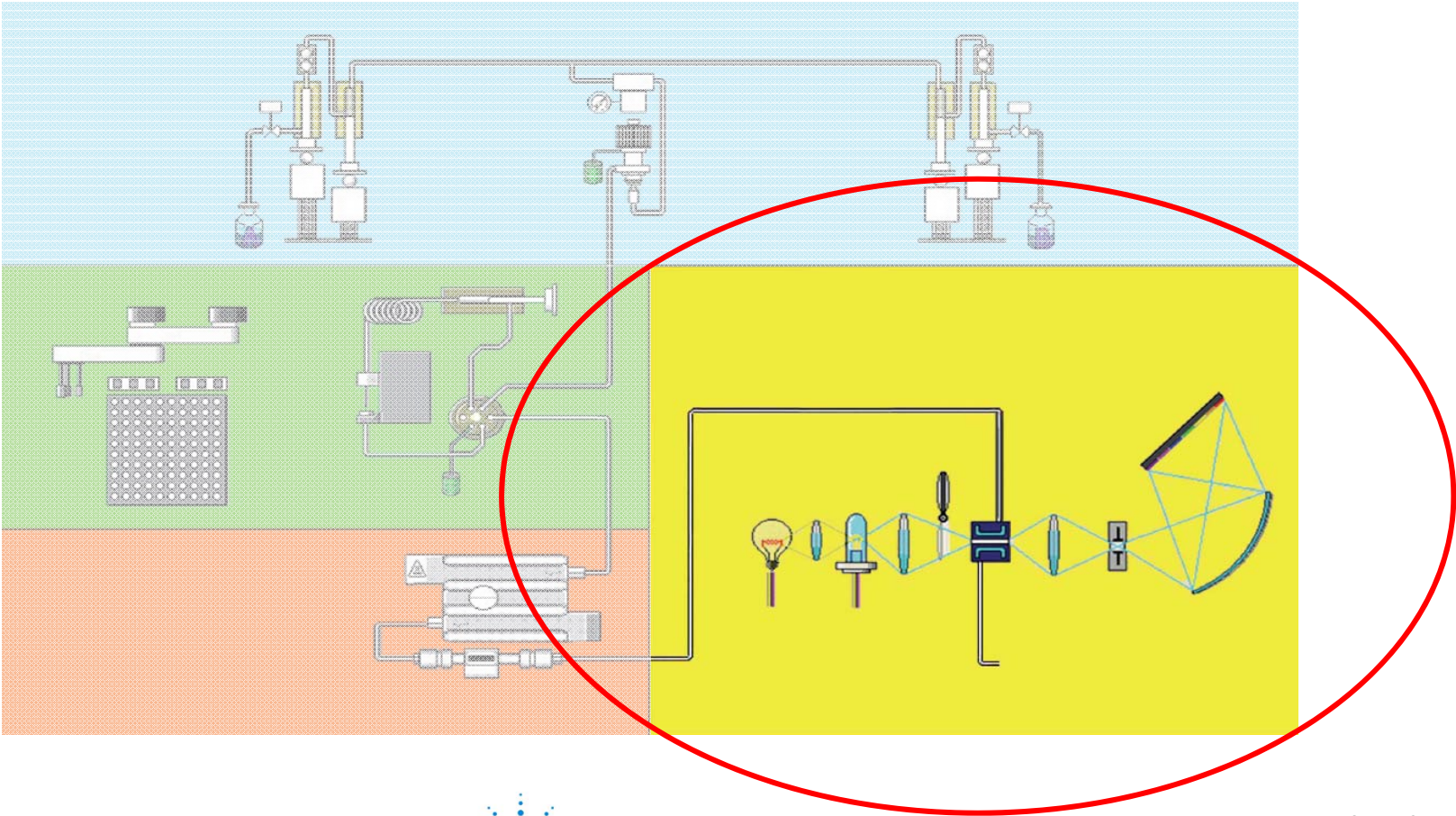
- Rotor des Injektionsventils undicht
- Kolbendichtung der Spritzeneinheit undicht
- Nadel teilweise blockiert
- Nadelsitzkapillare verstopft
- Kapillare vom Injektor zum Detektor undicht
- Defekte Säule



Fehlersuche Injektor



Der Detektor



Detektion

→ Lampe

→ Zelle

→ Detektor-Parameter

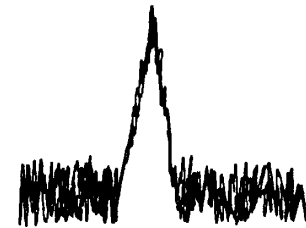
→ Spalt, Linearität, Bandbreite



Detektionsprobleme

Rauschen/ Drift/ Empfindlichkeit

- Temperaturschwankungen
- Lösungsmittelkontamination
- Undichtigkeiten der Pumpe (Lufteintritt)
- Photodioden / PDA defekt
- Zellfenster absorbieren
- Alterung der Deuteriumlampe/ Wolframlampe



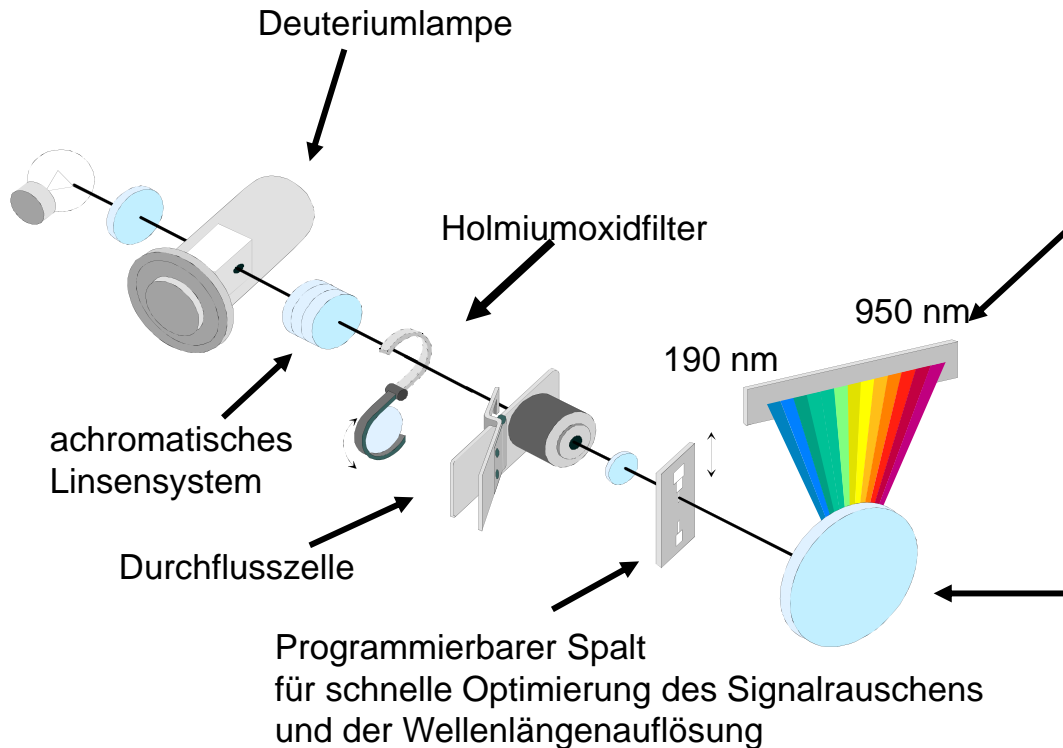
Detektionsprobleme

Abhilfen, Optimierung

- Temperatur: - Verwendung eines Säulenofens, Wärmetauscher
- Lösungsmittel: - nur frische Lösungsm. für die HPLC verwenden, Filter benutzen, Vorratsflaschen (auch Leere) verschließen.
- Probenmatrix: - Probenaufarbeitung optimieren, HPLC-Filter einsetzen.
- Zellfenster : - Signal ohne Detektorzelle (oder wenn nicht möglich ohne Zellfenster und Eluent) testen. OK?
Zellfenster austauschen.
- Photodioden: - Detektortest durchführen, Response OK?
- Pumpe : - Dichtungen OK?



Mögliche Fehlerquellen im UV - Detektor

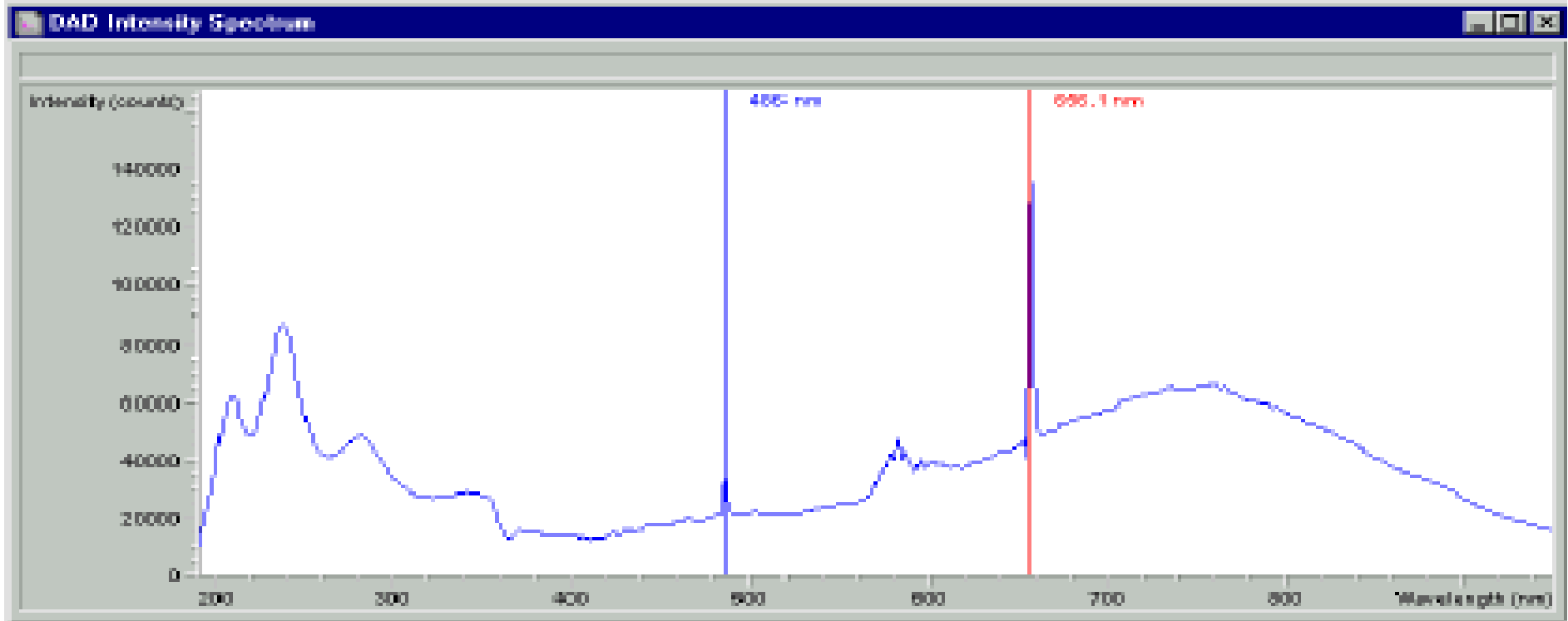


- keine konstante Intensität
- Plasmasprünge
- Photodegradation der Probe (instabil, UV-empfindlich)
- Reflektion durch Partikel in der Probe bzw. Kratzer auf dem Zellfenster
- Kontamination der Quartzfenster
- Zu großer Slit (Blende) für die gewählte Methode (geringe Spektrenauflösung)
- Zu kleiner Slit (Blende), geringe Empfindlichkeit



Detektionsprobleme

Wellenlängengenauigkeit (Agilent 1100/1200)



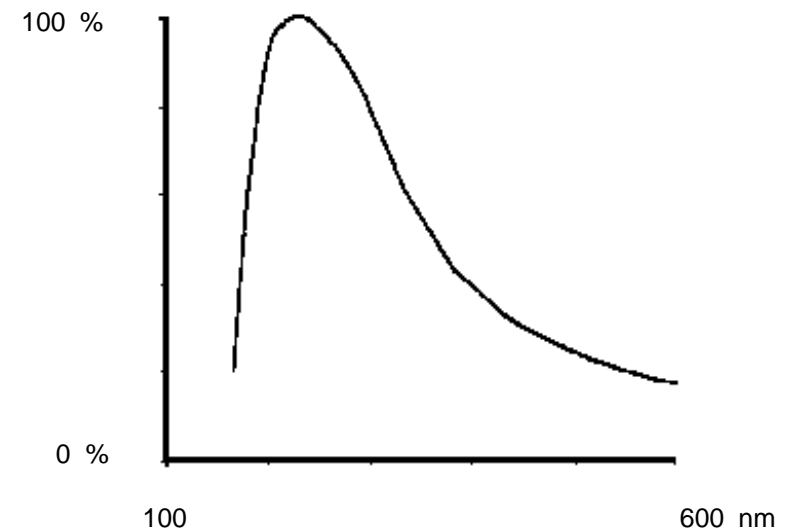
Kalibrierung der Wellenlänge mit den Alpha- und Beta-Emissionslinien 656,1 und 486,0nm



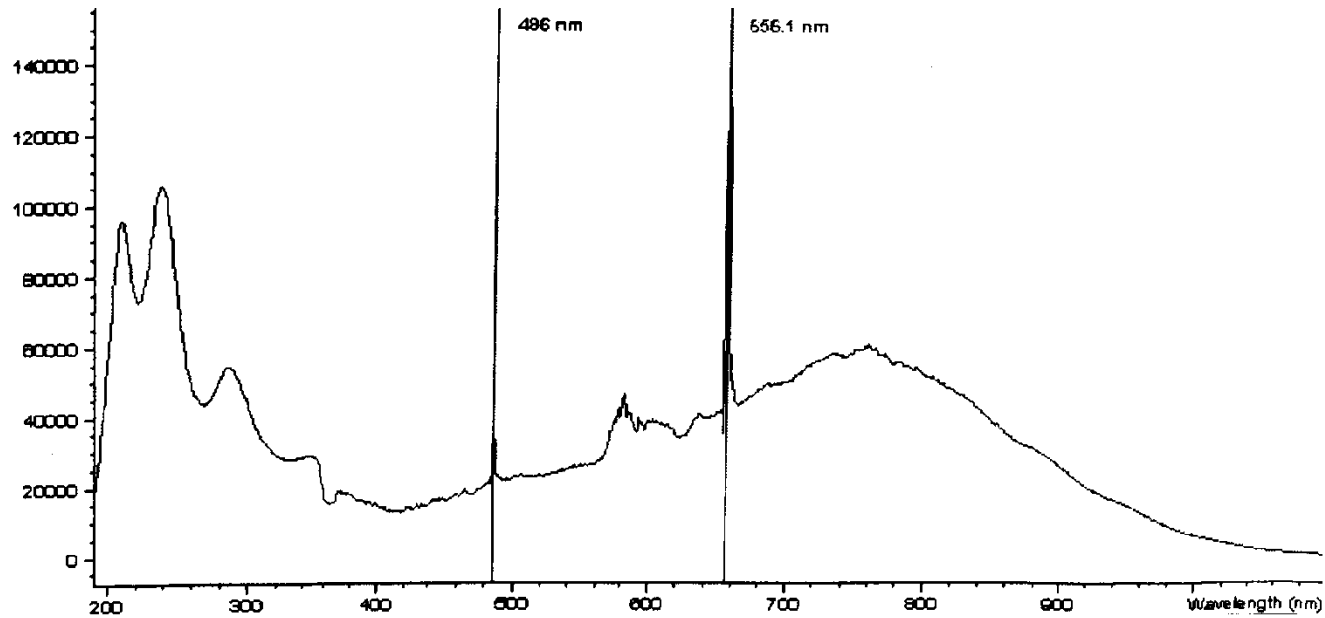
Detektionsprobleme

Lampenlebensdauer

- 700 bis 900 Betriebsstunden (Std. Lampe
ca. 2000 Betriebsstunden (Longlifelamp)
- 30 bis 45 min. Einbrennzeit
- kein linearer Abfall der Lampen-
intensität bezogen auf die Wellenlänge
- nicht mit den Fingern berühren



Intensitätstest



Mögliche Fehlerquellen:

- Absorbierendes Lösemittel oder Luftblasen in der Zelle
- Schmutzige oder kontaminierte Flusszelle
- Kontaminierte optische Komponenten
- Alte oder Non-Agilent Lampe

Limits:

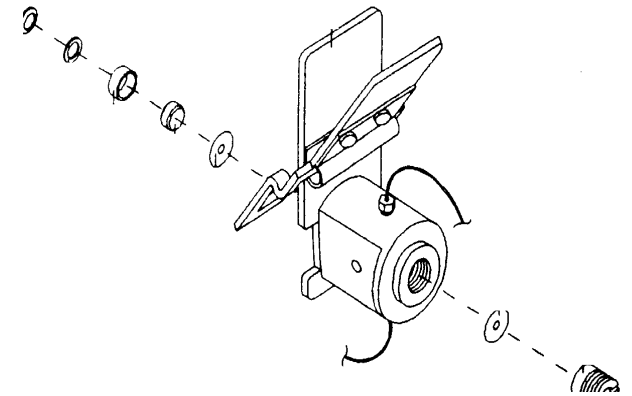
- 190-220nm > 2000
- 221-350nm > 5000
- 351-500nm > 2000
- 501-950nm > 4000



Detektionsprobleme

alle Detektoren

- Detektorsignal ohne Zelle überprüfen
- Detektorsignal mit Wasser prüfen
- Evtl. Zellfenster austauschen
- Lösungsmittel entgasen
- evtl. "Backpressure Regulator" nach Detektor installieren oder Abfallbehälter hochstellen
(hydrostatischen Gegendruck nutzen!)
- Methode auf systematischen Fehler überprüfen
(MeOH/Wasser z.B)



Detektionsprobleme

Fluoreszenzdetektoren

- Kalibration der Spiegelsysteme regelmäßig überprüfen.
- Photomultiplier vor Streulicht schützen.
- "Cut-Off-Filter" nicht berühren.
- Lebensdauer der Xenon-Lampen: ca. 1500-2000h beim 1046 und ca. 4000h beim G1321A.
- Ozonbildung im Detektorraum kann zu Problemen führen



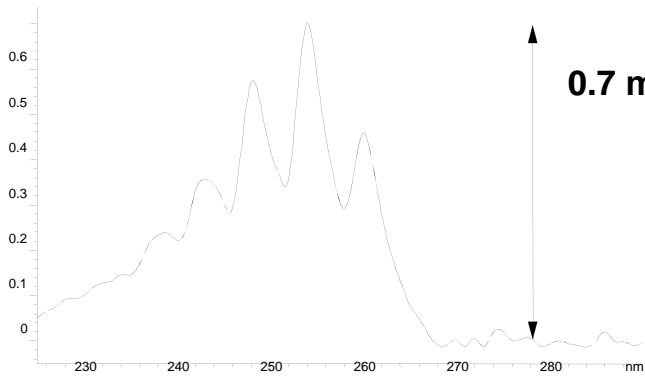
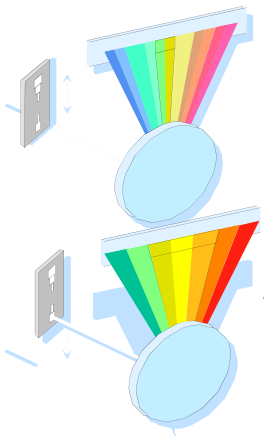
Detektionsprobleme

Brechungsindexdetektoren

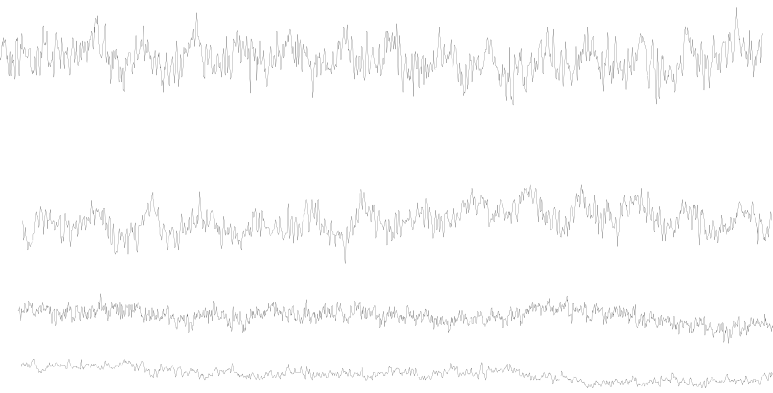
- frische mobile Phasen verwenden
- Gradientenbetrieb nicht möglich, vormischen!
- Installationsort überprüfen ("Zug", Sonne, Klimaanlage)
- alle Zuleitungen thermisch isolieren.
- unbedingt sorgfältig entgasen



Detektoren - Optimierung des Spalts

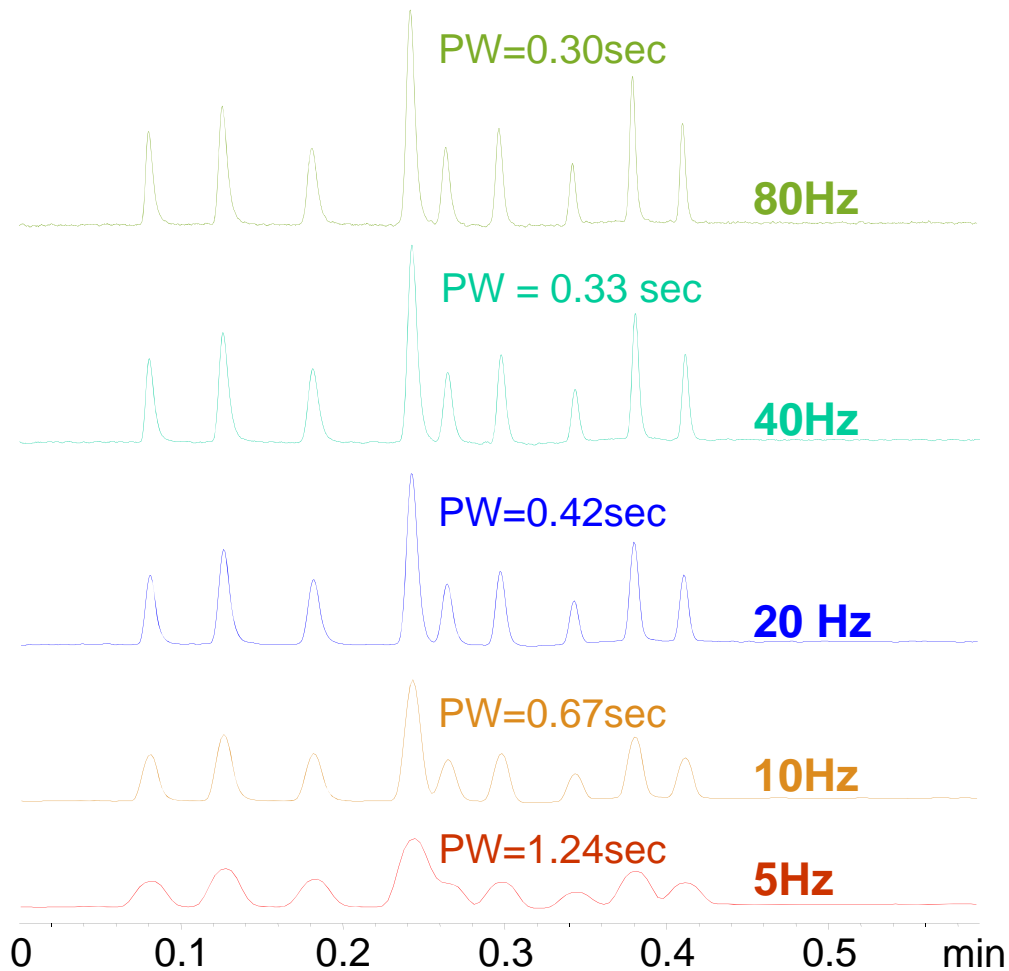


1 nm Spalt
2 nm Wellenlängen bunching (Step = 2)



1 nm
2 nm
4 nm
8 nm **< 1x10⁻⁵AU**

Was ist der **Vorteil** einer Datenakquisitionsrate von 80Hz? Einfluß der Peakbreite auf die Auflösung



- Probe: Phenone Test Mix
- Säule: Zorbax SB-C18, 4.6x30, 1.8 μ m
- Gradient: 50 -100% ACN in 0.3min
- Temperatur: 50°, Fluß: 5ml/min
- Flußzelle: 5 μ l
- Slit: 8 nm
- Signal: 245nm, Bandbreite: 10nm
- Referenz: 360nm, Bandbreite: 80nm



Peakbreite – Reaktionszeit – Datenrate

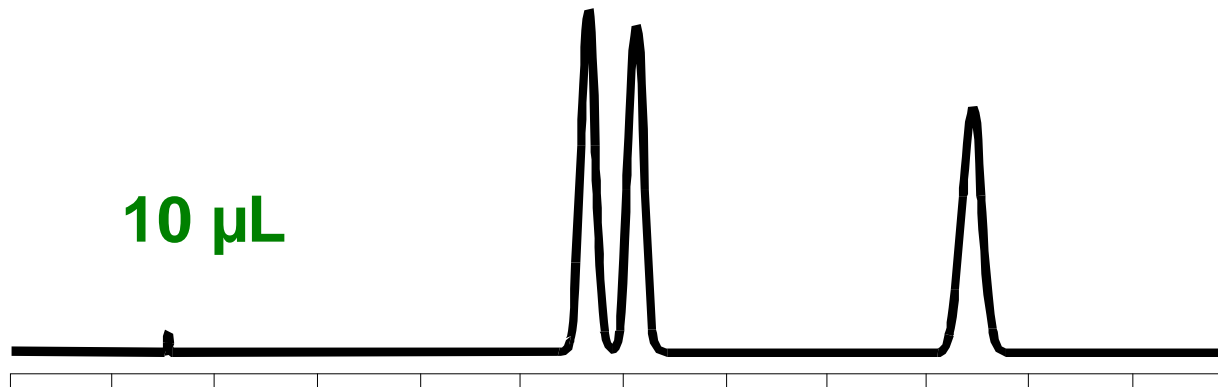
Peakbreite = Breite des Peaks bei 50% der Höhe

Peak Width (min)	Response Time (sec)	Data Rate (Hz)
<0.0025	0.025	80
>0.0025	0.05	80
>0.005	0.1	40
>0.01	0.2	20
>0.03	0.5	10
>0.05	1.0	5
>0.10	2.0	2.5
>0.20	4.0	1.25
>0.40	8.0	0.62
>0.85	16.0	0.31

80Hz: Bitte nicht bei einer Peakbreite > 0.15 sek. benutzen, da das Rauschen dann stark zunimmt.

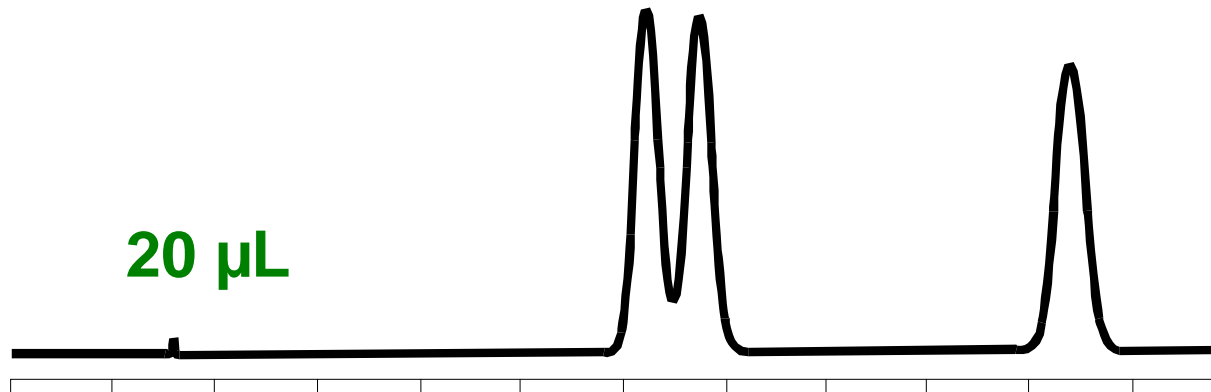


Auswirkung von säulenexternen Volumina



a.

Peakhöhe
a. 200mAU
b. 100mAU



b.

2,1 x 150 mm
F = 0,2 ml/min

Zeit, min.



Agilent Technologies

Wartungsintervalle

Vorbeugung v. Problemen

- Erstellen von definierten Zyklen für eine Geräteüberprüfung (OQPV)
- Ersetzen von Teilen *vor* deren Ausfall (→ Early Maintenance Feedback, EMF)
- Erstellen von Testmethoden zur Überprüfung der Funktion
- Qualität der zu verwendeten Lösungsmittel definieren
- Einbau bzw. Austausch mit Originalteilen des Herstellers



Instant Pilot Maintenance

Welcome

Control
Details

Bin Pmp SL		G1312B - LP00000016
h ALS SL		G1367C - DE64755101
DAD SL		G1315C - DE64755104

Method | Sequence | Status | Log

- 1 Configure
- 2 Maintenance
- 3 Diagnosis**

Diagnosis

Binary Pump SL : LP00000016

Pressure test

High Perf. Autosampler SL : DE64755101

Injector Steps

Diode Array Detector SL : DE64755104

Lamp intensity test

Holmium spectrum test

Dark current test

Cell test - No Pass / Fail result

Exec.

Exit

11:09

Test
s

Maintenance - DAD SL

Message	Date	Time
EMF Events		
[Empty]		
Error Events		
Module shutdown	02/01/06	
Module shutdown	02/06/06	
Module gone during analysis	02/08/06	
UV ignition failed	02/13/06	13:27
Lamp Tag Not Present	02/14/06	08:01
Lamp Tag Not Present	02/15/06	08:23
Maintenance Entries		
[Empty]		

1 Calibrate
2 Lamp Info
3 Cell Info

Setup
Maint.
Entry
Ident.
Exit

System | Controller | Bin Pmp SL | h ALS SL | DAD SL

11:46

Maintenance Functions

For hALS:

- 1 Change Needle / Seat**
- 2 Change Loop
- 3 Change Piston
- 4 Change Needle Carrier
- 5 Align Transport

Logbooks

Kundenschulung in Waldbronn

Die Materialien dieser Einführung sind aus einem Agilent Kundenschulungs-Kurs entliehen.

Wir bieten Ihnen vielfältige Kurse zu folgenden Themen an:

- GC
- LC und CE
- GS-MS
- LC-MS
- UV
- Software



Agilent Technologies

