مشکلات HPLC
در یك پروسه آنالیز

(HPLC Troubleshooting)

فرحناز حدیدساز

دانشجو دکترا شیمی

در صورت داشتن هرگونه سوال لطفا با شرکت ایران ناژو با شماره تلفن ۱۴-۶۵۴۳۲۸۱۲-۰۲۱تماس حاصل فرمایید.

مشکلات HPLC در یک پروسه آنالیز :

در یک سیستم HPLC ، عوامل زیادی می توانند اشکال ایجاد کنند . در ابتدا باید مشکل را شناخت سپس به رفع آن اقدام ورزید . با استفاده از جدول شماره ۱ مشکل یا مشکلاتی را که درکروماتوگرامها ایجاد مزاحمت می کنند مشخص کنید . بنابراین با یک پروسه حذفی شما قادر خواهید بود تا بصورت صحیح مشکل را رفع نمائید .

چگونه از مزاحمت های فاز متحرک (M.ph) جلوگیری کنیم :

حساسیت پائین و بالابودن خط زمینه (Baseline) ، اغتشاش یا برآمدگی روی کروماتوگرام ، غالبا می تواند مربوط به فاز متحرک باشد . آلودگی در فاز متحرک ممکن است باعث بالارفتن baseline شود و نادرست بودن پیک می تواند بعلت افزایش ناخالصی در فاز متحرک باشد .

آب می تواند بزرگترین منبع آلودگی در فاز متحرک باشد شما باید هنگام درست کردن فاز متحرک فقط از آب مقطر کاملا خالص یا یونیزه شده استفاده کنید . برای از بین بردن این آلودگی ها باید آب یونیزه شده را از میان زغال فعال شده یا یک غشاء C18 عبور داد .

تنها از حلال ها ، نمک ها یا معرف های زوج یونی و ... که مخصوص HPLC هستند استفاده کنید. از حلال های با کیفیت پائین استفاده نکنید ، زیرا اثرات آلوده کننده ها غالبا باقی می ماند و زمانیکه شما از یک دتکتور با حساسیت بالا استفاده می کنید ، این اجزاء می توانند ایجاد مزاحمت کنند .

برای از بین بردن حباب ها در سیستم ، فاز متحرک را متناوباً گاززدائی نمائید . پس از آماده کردن فاز متحرک آنرا از فیلتر 0.45 یا 0.2 میکرون عبور دهید . این فیلتر ها علاوه بر گاززدائی باعث حذف ذراتی می شوند که عامل ایجاد اغتشاش در baseline هستند .

در ساخت فاز متحرک ، باید نسبت ها رعایت شود و باید کاملاً مطمئن شد که نسبت ها درست هستند و از حلالی استفاده کنید که حد واسط قطبیت را داشته باشد (جدول ۳صفحه ۱۵)

از آنجائیکه بسیاری از بافرهای آبی باعث رشد باکتریها می شوند با تهیه محلولهای تازه میتوان قویاً از رشد آنها جلوگیری بعمل آورد . با افزودن در حدود 100ppm از سدیم آزید (sodium azid) به محلول بافر آبی از رشد میکروارگانیسم ها جلوگیری بعمل آورید . یا می توان این بافرها را با حلال هائی مانند استونتیریل مخلوط کرد.

در هنگام استفاده از واکنشگرهای زوج یونی با دقت عمل کنید و باید بهترین غلظت و طول زنجیر این واکنشگرها برای هر آنالیز مشخص شود . معمولا افزایش غلظت یا افزایش طول زنجیر باعث افزایش زمان بازدارنده (retention time) می شود . پیشنهاد می کنیم از غلظتهای 0.2 تا 10mM استفاده کنید .

غلظتهای بالای (50%<) استونیتریل و دیگر حلال های آلی می توانند باعث رسوب و اکنشگرهای زوج یونی شوند . زمانیکه شما بخواهید از یک ترکیب برای بهبود آنالیز بعدی استفاده کنید اصلاح کننده های فراری مانند تری اتیل آمین مفید هستند . این اصلاح کننده ها هم چنین به شما کمک می کنند تا از مشکلاتی که واکنشگرهای زوج یونی ایجاد می کنند اجتناب کنید . آنها را می توان به بافرهای با غلظتهای 0.1% تا 1% اضافه کرد . افزایش غلظت آنها باعث بهبود شکل پیک درترکیبات پایه می شود اما می توانند باعث تغییر retention time شوند .

اخیرا مطالعات نشان می دهد که چرخش مداوم فاز متحرک مورد استفاده برای جداسازی باعث طولانی تر شدن عمر ستون می شود ولی باعث کاهش ارزش حلال می گردد. در این صورت شما باید کاهش تدریجی base line را که معمولا اتفاق می افتد ثبت کرده و در انتگرال گیری دخالت دهید .

بخاطر داشته باشید در یک پروسه آنالیز اجزاء فرار بخار می شوند بخصوص زمانی که بطور متناوب گاززدائی می شوند و این امر ، ترکیب M.ph را تغییر می دهد .

مشکلات پمپ ها در جداسازی :

یک پمپ باید جریان ثابتی از حلال را در شرایط مختلف از ستون عبور دهد . پمپ های جدید به گونه ای طراحی شده اند که شامل سرنگ ، دیاگرام ، پیستون یا ترکیبی از آنها است .

مشکلات پمپ ها معمولا آسان و قابل تصحیح هستند . برخی از آنها باعث بی نظمی در retention time ، اغتشاش روی base line یا شکافتگی روی کروماتوگرامها می شوند . اختلال در کار پمپ اثر ضعیفی روی کروماتوگرام دارد . یک نوع علامت نشتی این است که نمک های موجود در محل اتصالات پمپ ، خود را نشان می دهند . وجود نشتی در پمپ ممکن است احتیاج به جابجایی قطعات در دستگاه داشته باشد .

بعضی از اشکالات هم خاص دستگاه شما می باشد پس باید از دستورالعمل رفع مشکلات استفاده نمائید .

محل تزریق (Injector) و حلال های تزریق شده :

Injector بسرعت نمونه را با کمترین flow وارد سیستم می نماید . در سیستم های HPLC نوع سرنگ ، Loop و fixed Loop می تواند متفاوت باشند . این مجموعه می تواند بصورت دستی ، با هوای فشرده یا الکتریکی باشد .

مشکلات مکانیکی مربوط به injector (مانند چکه کردن ، نشتی یا ...) نسبتاً آسان و قابل تصحیح هستند . مشکلات دیگر که بر اثر افزایش تعداد تزریق ایجاد می شوند بیشتر مربوط به حلالیت است . علاوه بر اینها گاهی اوقات می توان آنها را به خود injetor نسبت داد .

تغییر درارتفاع پیک ها ، شکافتگی پیک ها و پهن تر شدن پیک ها می تواند کاملا مربوط به گرفتگی محل تزریق نمونه باشد .

بنابراین مخلوط نشدن کامل فاز متحرک با حلال و یا حلالیت کم نمونه در M.ph می تواند باعث گرفتگی محل نزریق شود . به عبارتی باید مطمئن شوید که قدرت شویندگی فاز متحرک بیشتر از حلال باشد (جدول ۳).

محافظت از ستون :

اگرچه فیلتر کردن فاز متحرک ، همسو بودن فیلتر ها ، اشباع بودن ستون و گاردستون قسمت مهمی از دستگاه نیستند اما بخش بزرگی از مشکلات همراه با جداسازی را کاهش می دهند .

فیلتر ها و محافظ ستون از ورود ذرات به ستون جلوگیری می کنند و از تجمع ذرات درستون هم قویاً جلوگیری می کنند . ذرات سیلیکا موجود در ساختار یک ستون ، درفاز متحرک حل نمی شود واز پایه سیلیکا موجود در ساختار ستون نیز محافظت می کنند .

عمر مفید این ذرات به فاکتورهای زیادی بستگی دارد که شامل ترکیب فاز متحرک ، خلوص نمونه ، PH و ..... دارد .

بنابراین مجموع این عوامل می توانند باعث گرفتگی ذرات درستون ، کاهش فشار پمپ ، پهن شدن پیک ها یا شکافتگی در پیک شوند .

بدست آوردن اطلاعات بیشتر از ستون :

ستونها در سایز ها و طرحهای مختلف طراحی شده اند . رنج وسیعی از پرکننده های ستون قابل دسترسی هستند که کاربرد همه آنها درنهایت ، جداسازی است . بیشترین وجه اشتراک مشکلات ایجاد شده در ستون مربوطه به زوال تدریجی آن است .

کاهش عمر مفید ستون باعث ضعیف شدن پیک ها ، شکافتگی پیک ها ، شانه دارشدن پیک ها ، کم شدن Resolution ، کاهش زمان بازدارنده و بالارفتن فشار برگشتی (back pressure) است . این عوامل نشان دهنده آلودگی هایی هستند که در ستون جمع شده اند و باعث تغییر در فشردگی (Packing) آن شده اند .

این آلودگی بیشترین تاثیر را در بازدهی ستونها می گذارند . بعنوان مثال بازدهی یک ستون با فشردگی 3 میکرون به 0.5 میکرون کاهش پیدا می کند و فشردگی 5 تا 10 میکرون به 2 میکرون یا بیشتر کاهش پیدا می کند .

محافظت درست از ستون و محلول سازی به روش صحیح باعث افزایش کارآیی بیشتر ستون می شود . تداخل و همپوشانی ذرات در یک ستون می تواند باعث تشکیل پیک های ضعیف و مشکلات دیگر شود . ظرفیت ستونها بستگی به عوامل بسیاری دارد اما متداولترین آنها عبارتند از :

Analyltical Column
(25cm×4.6mm)<500µg
Semi-Preparative Column
(25cm×10mm)<100mg
Preparative column
(25cm× 21.2mm)<500mg

مشکلات مربوط به دتکتورها :

بیشتر از 20 نوع دتکتور در سیستمهای HPLC وجود دارد. متداولترین آنها ، فوتومترهای UV با طول موجهای مختلف و دتکتورهای refractive index هستند . دتکتورهای الکتروشیمی و هدایت سنجی هم عموماً متداولند. پیشرفت در تکنولوژی سل دتکتورها ، استفاده از آنها را آسانتر کرده است .

مشکلات دتکتور را می توان به دو دسته الکتریکی و مکانیکی - نوری تقسیم کرد . برای رفع مشکلات مربوط به بخش الکتریکی دتکتور ، باید با دستورالعمل دستگاه آشنا بود . مشکلات نوری یا مکانیکی معمولا به جریان سل مربوط می شود . مشکلات مربوط به دتکتور شامل نشتی ها ، حباب های هوا و آلودگیهای سل است . این عوامل معمولاً باعث ایجاد اغتشاش روی خط زمینه کروماتوگرام می شوند .

بعضی از مواد سل (خصوصاً در دتکتورهای Refractive) به فشارهای بالا حساس هستند . هرگاه سرعت فاز متحرک (flow rate) یا فشار معکوس (back pressure) از میزان ذکر شده در کاتولوگ دستگاه بیشتر باشد ، پنجره سل را خواهد شکست . لامپ های کهنه، باعث افزایش زمان ، کاهش حساسیت و کاهش ارتفاع پیک می شوند . اشتباه در وصل کابل های برگشتی نیز باعث بروز مشکلاتی می شود .

گرم کننده ستون ، ثبات

این اجزاء بندرت برای سیستم ، مشکل ایجاد می کنند این موارد در جدول شماره ۱ عنوان شده است .

صحت نتایج

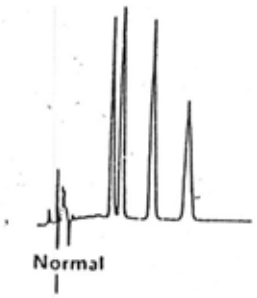
همه مشکلات یک شبه پدیدار نمی شوند اما بتدریج توسعه پیدا می کنند . پس حفظ صحت نتایج . حیاتی است و بسیاری از مشکلات را حل می کند . ارزیابی کار هر ستون با شماست . زمانیکه قادر به ارزیابی بودید می توانید بطور صحیح مشکلات را حل کنید . شما می توانید اطلاعات مربوط به تاریخچه بازدهی ستون ، فاز متحرک استفاده شده ، جریان لامپ ، کارپمپ و غیره ، را از مانیتور کامپیوتر سیستم تان دریافت کنید .

با کمک ثبات ها می توان از اشتباهات جلوگیری بعمل آورد . به عنوان مثال می توان مانع ورود آب در داخل یک ستون سیلیکا یا رسوب کردن باقر در یک سیستم شد . بسیاری از شیمیدانها سیستمهای HPLC را تغییر می دهند . ثبات ها بهترین روش برای نشان دادن تغییرات در سیستم هستند . برای مشکلات مربوط به پمپ ها ، دتکتورها ، Injector و اطلاعات سیستم ، از این راهنما استفاده کنید .

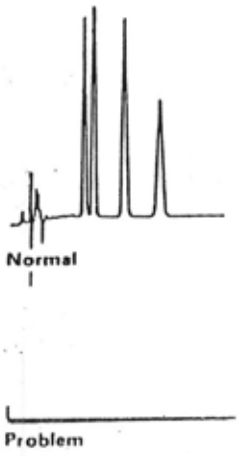
فهرست مشکلات

شماره اشکال	اشکال	شماره اشکال	اشکال	شماره اشکال	اشکال
	پیکها	19	شبه پیک ها		**Baseline**
16	تغییرات درارتفاع		**انواع پیک های دفرمه شده**	12	برآمدگی
2	گم شدن پیک	15	پهن شدن	14	غیرعادی بودن –اغتشاش
18	منفی شدن	10	کاهش تفکیک پیک (Fronting)	13	عادی بودن –اغتشاش
1	عدم مشاهده پیک	15	گردشدن		**فشار پشت ستون**
6	عدم تفکیک پیک ها	7	شکافتگی	4	بیشتر از حد معمول
5	**تغییرات زمان بازدارنده**	8,9	دنباله دارشدن	5	کمتر از حد معمول
17	**تغییرات حساسیت**				

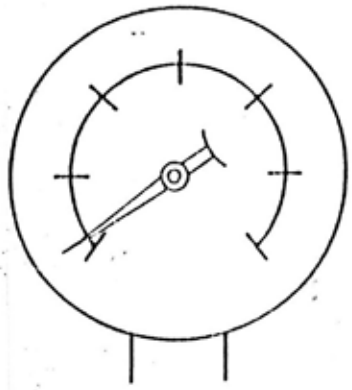
جدول ۱-مشکلات HPLC و طریقه رفع اشکال

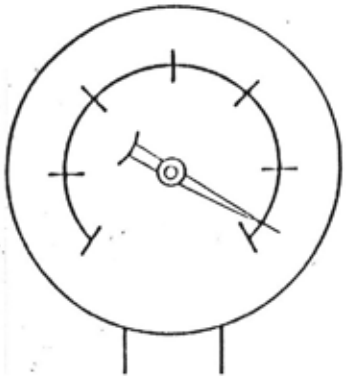
مشکل	علت اشکال	رفع اشکال
مشکل شماره ۱		
عدم مشاهده پیک / پیکهای خیلی کوچک.  	۱-لامپ دتکتور خاموش است. ۲-وجود نشتی یا شکستگی در لوله رابط بین دتکتور و محل تزریق یا دتکتور و ثبات . ۳-عدم وجود جریان فاز متحرک . ۴-نمونه ای وجود ندارد یا نمونه از بین رفته است . ۵-وجود تنظیمات خیلی بالا روی دتکتور یا ثبات .	۱-لامپ دتکتور را روشن کنید. ۲-محل اتصالات و کابلها را چک کنید . ۳-مشکل شماره ۲ را ببینید . ۴-باید مطمئن شوید که باندازه کافی، نمونه تزریق شده است . با یک محلول استاندارد تازه تهیه شده سیستم را ارزیابی کنید تا نمونه بعنوان منبع مشکل تأیید شود . ۵-تنظیمات دستگاه را به گونه ای انجام دهید که ثبات قادر به رسم کروماتوگرام باشد.

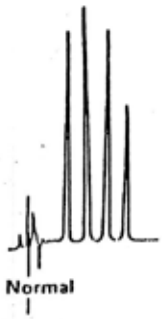
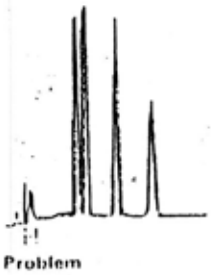
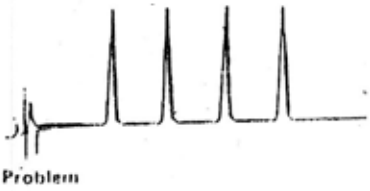
جدول ۱-مشکلات HPLC و طریقه رفع اشکال

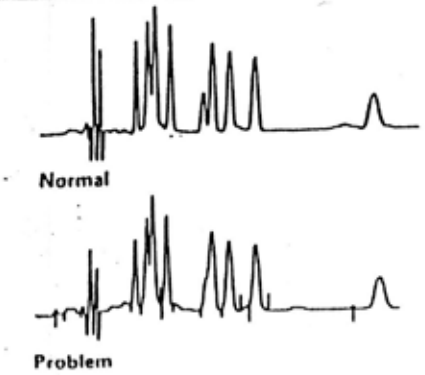
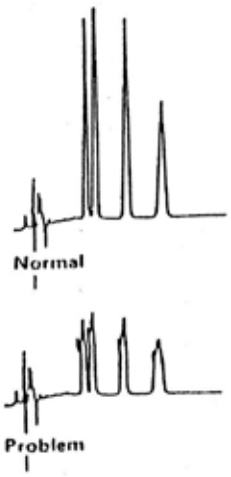
مشکل	علت اشکال	رفع اشکال
مشکل شماره ۲		
عدم وجود جریان .  	۱- خاموش بودن پمپ ۲-اختلال در جریان -انسداد یا گرفتگی . ۳-نشتی ۴-به علت نوسانات فشار ، هوا در سر پمپ به دام افتاده است .	۱-پمپ را روشن کنید . ۲-سطح فاز متحرک را در منبع کنترل کنید. جریان خروجی سیستم و محل تزریق نمونه را از نظر گرفتگی هوا کنترل کنید. اطمینان حاصل کنید که فیلتر خروجی فاز متحرک تمیز است . مطمئن شوید که اجزاء فاز متحرک کاملا گاززدائی شده است . ۳-سیستم و پمپ را برای نشتی کنترل کنید زیرا پیک های موجود در محل نشتی اغتشاش های غیر معمول ایجاد می کنند . اگر لازم بود اتصالات پمپ را عوض کنید . ۴-محل اتصال لوله به گارد ستون را اگر موجود است باز کنید . سرعت جریان فاز متحرک را کنترل کنید.پمپ را تحت Flow rote بالا حدود10ml/min ، Purge کنید.در صورت لزوم پمپ ها را یکی یکی Purge کنید . اگر پمپ ها شیرخروجی هوا دارند ،هوا را از طریق آنها خارج کنید . اگر مشکل رفع نشد و هوا خارج نشد سیستم را با متانول 100% بشوئید . اگر بازهم رفع نشد با کارخانه سازنده تماس بگیرید .

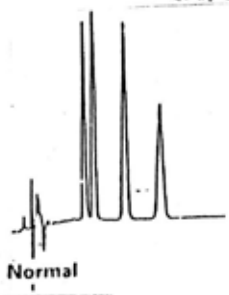
جدول ۱-مشکلات HPLC و طریقه رفع اشکال

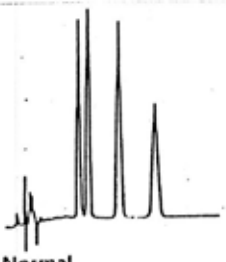
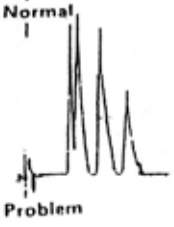
مشکل	علت اشکال	رفع اشکال
مشکل شماره ۳		
فشاری وجود ندارد یا فشار پائین تر از حد معمول است . 	۱-نشتی ۲-تداخل در جریان فاز متحرک مانند مسدود شدن ۳-بدام افتادن هوا در سرپمپ (بعلت نوسانات فشار) ۴-نشتی در انتهای اتصال ستون ۵-هوا در مکانهایی از سیستم بدام افتاده است . ۶-محل اتصالات در اطراف سرپمپ مسدود شده اند .	۱-سیستم را کنترل کنید.پمپ ها را برای نشتی ، وجود نمک و اغتشاشات غیر معمول چک کنید . اتصالات پمپ را اگر لازم بود تغییر دهید . ۲-سطح فاز متحرک را در ظرف مخصوص آن کنترل کنید که بالای سطح فیلتر ها باشد . محل تزریق نمونه را برای مسدود شدن یا گرفتگی توسط حبابهای هوا چک کنید . اطمینان حاصل کنید که فیلتر داخلی فاز متحرک تمیز است و مطمئن شوید که اجزاء فاز متحرک کاملا با هم مخلوط و بطور صحیح گاززدائی شده است . ۳-لوله محل اتصال را باز کنید و جریان فاز متحرک را کنترل کنید . اگر لازم باشد در flow rate بالا (10ml/min) پمپ را Purge کنید .اگر سیستم دارای شیرخروجی هوا است اجازه دهید هوا خارج شود . ۴-دوباره ستون را وصل کنید و flow rate حلال را روی 1-2ml/min قرار دهید . اگر فشار هنوز کم است نشتی ها را در محل اتصالات چک کنید. ۵-ستون و محافظ آن را باز کرده و سیتم را Purge کنید . اگر مشکل رفع نشد با متانل 100% ، Purge کنید . ۶-اتصالات را عوض کنید .

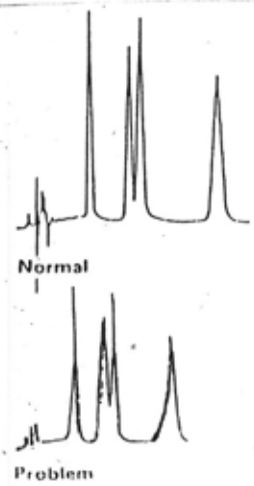
جدول ۱-مشکلات HPLC و طریقه رفع اشکال		
مشکل	علت اشکال	رفع اشکال
مشکل شماره ۴		
فشار بالاتر از حد معمول 	۱- اشکال از پمپ – محل تزریق یا از لوله ها ست . ۲-مسدود بودن گارد یا ستون	۱-گارد را باز کنید و ستون را تحت فشار 2-5ml/min قرار دهید . اگر فشار کاهش یافت علت شماره ۲ را بررسی کنید . در غیر اینصورت به صورت سیستماتیک با حذف یک به یک عوامل سیستم ، پی به علت افزایش فشار ببرید. برای کاهش فشار کار را با دتکتور شروع کنید . ۲-گارد را عوض کنید (اگر ستون گارد داشته باشد)و فشار را چک کنید . در صورت لزوم دوباره گارد را سرجایش قرار دهید. اگر ستون بواسطه آنالیتیکی مسدود شده است ، ستون را برعکس کرده تا در ستون توازن برقرار شود . اگر باز مشکل باقی ماند ستون ممکن است قویا آلوده شده باشد . بنابر این از دستورالعمل مناسب استفاده کنید. (جدول ۲ صفحه ۱۹). اگر باز مشکل رفع نشد ورودی ستون را تغییر دهید یا ستون را عوض کنید.

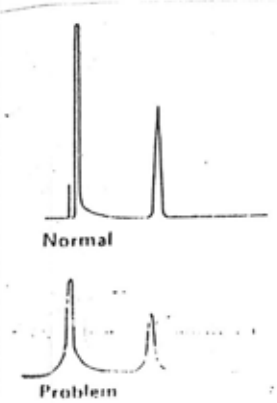
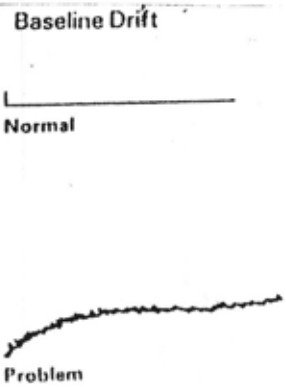
جدول ۱-مشکلات HPLC و طریقه رفع اشکال		
مشکل	علت اشکال	رفع اشکال
مشکل شماره ۵		
تغییرات در زمان های بازدارنده  Normal  Problem  Problem	۱-نشتی ها ۲-تغییر در ترکیب اجزاء فاز متحرک (کوچکترین تغییرات در ترکیب اجزاء فاز متحرک می تواند باعث تغییرات زیادی در زمان بازدارنده شود). ۳-هوا در پمپ بدام افتاده است (در نتیجه زمان بازدارنده افزایش و کاهش می یابد). ۴-نوسانات درجه حرارت ستون ، باعث ایجاد این تغییرات می شود (خصوصاً در تبادلات سیستمهای تعویض یونی). ۵-افزایش بار ستون (درصورتیکه جرم محلول تزریق شده بالاتر از ظرفیت ستون باشد زمان بازدارنده معمولاً کاهش پیدا می کند) . ۶-حلال نمونه با فاز متحرک سازگار نیستند . ۷-ستون مشکل دارد (نه بعنوان یک عامل عمده در بی نظمی زمان بازدارنده،بلکه با افزایش طول عمر ستون معمولا زمانهای بازدارنده کاهش می یابد).	۱-اتصالات سیستم را کنترل کنید. پمپ را برای نشتی ها ،گرفتگی با نمک و اغتشاشات غیر معمول کنترل کنید . ۲-فرمول ترکیب فاز متحرک را کنترل کنید. اگر فاز متحرک بصورت مکانیکی مخلوط می شود شما همان فاز متحرک را بصورت دستی مخلوط کنید . ۳-هوا را از پمپ ها Purge کنید . یا از شیرهای خروجی استفاده کنید . اگر لازم شد اتصالات پمپ را عوض کنید . از گاززدائی فاز متحرک اطمینان حاصل کنید . ۴-از ستون آون دار استفاده کنید (توجه داشته باشید که درجه حرارتهای بالاتر در ستون، بازدهی مؤثر را برای جداسازی کاهش می دهد . برای بدست آوردن بهترین نتیجه فاز متحرک را قبل از ورود به ستون می توان گرم کرد). ۵-حجمهای کوچکتری را تزریق کنید (بعنوان مثال 10 µli نسبت به 100µli) یا حجم نمونه را به نسبت 1:10 و 1:100 رقیق کنید . ۶-حلال را تنظیم کنید. اگرچه می توان از فاز متحرک هم بعنوان حلال نمونه استفاده کرد . ۷-باید ستون جدیدی جایگزین ستون قبلی شوداگر می توانید ستون قدیمی را احیاء کنید .(صفحه ۱۹را ببینید).

جدول ۱-مشکلات HPLC و طریقه رفع اشکال		
مشکل	علت اشکال	رفع اشکال
مشکل شماره ۶		
عدم تفکیک پیک ها  	۱-آلودگی فاز متحرک یا تغییر کیفیت آن به مرور زمان باعث تغییر زمان بازدارنده می شود. ۲-گارد یا ستون آنالیتیکی مسدود شده است .	۱-فرآیند ساخت فاز متحرک را کنترل کنید (صفحه ۲) . ۲-گاردستون را اگر موجود است باز کنید و دوباره عمل آنالیز را شروع کنید . در صورت لزوم گارد ستون را دوباره قرار دهید . اگر ستون مسدود است آن را برگردانید و تراز کنید . اگر مشکل رفع نشد ستون باحتمال زیاد آلوده شده است پس از دستورالعمل مناسب استفاده کنید(جدول ۲صفحه ۱۹) اگر باز هم رفع نشد ستون را عوض کنید .
مشکل شماره ۷		
شکافتگی در پیک ها  	۱-آلودگی روی گارد ستون یا حلقه ورودی ستون ۲-حلال نمونه با فاز متحرک سازگار نیست .	۱-گاردستون را اگر موجود است بردارید و دوباره عمل آنالیز را شروع کنید . در صورت لزوم گارد ستون را عوض کنید . اگر ستون مسدود است آن را برگردانید و تراز کنید . اگر مشکل رفع نشد ستون باحتمال زیاد آلوده شده است.پس از دستورالعمل مناسب استفاده کنید(جدول ۲صفحه ۱۹) اگر باز هم رفع نشد ستون را عوض کنید . ۲-حلال را تنظیم کنید . اگر چه می توان از فازمتحرک هم بعنوان حلال نمونه استفاده کرد .

جدول ۱-مشکلات HPLC و طریقه رفع اشکال		
مشکل	علت اشکال	رفع اشکال
مشکل شماره ۸		
دنباله در ابتدا یا انتهای پیکها  	۱-تداخل درنمونه ۲-اشتباه در تعیین نوع ستون ۳-اشتباه در تعیین PH فاز متحرک ۴-نمونه با سایت های فعال واکنش می دهد .	۱-نحوه عملکرد ستون را با استاندارد ها کنترل کنید . ۲-انواع دیگر ستون را امتحان کنید (بعنوان مثال ستون بی اثر یا خنثی برای ترکیبات پایه) ۳-PH را تنظیم کنید . معمولا برای ترکیبات پایه، بیشتر پیک های متقارن در PH پائین ایجاد می شوند. ۴-واکنشگرهای زوج یونی یا اصلاح کننده های فراز اضافه کنید (صفحه 3) .

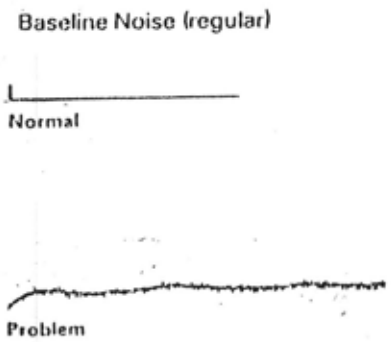
جدول ۱-مشکلات HPLC و طریقه رفع اشکال		
مشکل	علت اشکال	رفع اشکال
مشکل شماره ۹		
ایجاد دنباله در پیک هائی که قبلا متقارن بودند .   	۱-تداخل در نمونه ۲-آلودگی فاز متحرک یا تغییر کیفیت آن به مرور زمان ۳-ستون یا گارد آلوده شده است یا کهنه شده است .	۱-نحوه عملکرد ستون را با استاندارد ها کنترل کنید . ۲-ساخت فاز متحرک را کنترل کنید.(صفحه 2) ۳-گارد ستون را اگر هست عوض کنید و دوباره آزمایش کنید. درصورت لزوم دوباره گارد ستون را بگذارید و اگر ستون عامل مشکل است از دستورالعمل مناسب استفاده کنید (جدول 2- صفحه۱۹)اگر مشکل رفع نشد ستون را عوض کنید .

جدول ۱-مشکلات HPLC و طریقه رفع اشکال		
رفع اشکال	علت اشکال	مشکل
مشکل شماره ۱۰		
۱-نحوه عملکرد ستون را با استاندارد ها کنترل کنید . ۲-کارائی ستون را افزایش دهید یا حساسیت را اینقدر تغییر دهید تا تفکیک پیک ها از هم بهبود یابد . سعی کنید از نوعهای دیگر ستون هم استفاده کنید (مانند ستون غیرقطبی C18 تا ستونی با فاز قطبی سیا نو) . ۳-حجمهای کوچکتر تزریق کنید (مانند 10µli در مقابل 100µli)یا 1:10 نسبت به 1:100 از حجم نمونه . ۴-حلال را تنظیم کنید، می توان نمونه ها را در فاز متحرک تزریق کرد . قطبیت پیوندها در فاز ساکن را با 200ml اتیل استات مخصوص HPLC تنظیم کنید (2.5ml/min) . سپس با حلالی با قطبیت حد واسط آنالیز را ادامه دهید .	۱-تداخل در نمونه ۲-شانه دار شدن یا بالا آمدن تدریجی خط زمینه قبل از پیک اصلی ممکن است مربوط به اجزای دیگر نمونه باشد . ۳-افزایش بار ستون ۴-حلال نمونه با فاز متحرک تداخل دارد .	کاهش تفکیک پیک ها 

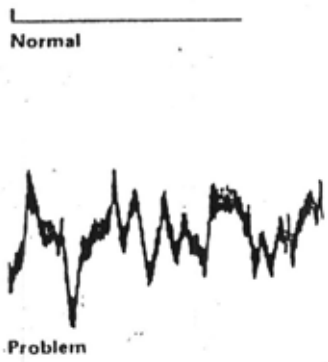
جدول ۱-مشکلات HPLC و طریقه رفع اشکال		
مشکل	علت اشکال	رفع اشکال
مشکل شماره ۱۱		
گردشدن پیکها  	۱-عملکرد دتکتورخارج از رنج خطی دینامیکی است . ۲-حساسیت ثبات خیلی پائین است ۳-بار ستون زیاد است . ۴-تداخل بین ستون و نمونه ۵-ثابت های زمانی دتکتور یا ثبات خیلی بالا است .	۱-حجم یا غلظت نمونه را کاهش دهید. ۲-حساسیت را تنظیم کنید . ۳-حجمهای کوچکتر از نمونه را تزریق کنید.(بعنوان مثال 10µli نسبت به 100µi)یا به نسبت 1:10 و 10:100 از حجم نمونه را رقیق کنید . ۴-قدرت یافر،PH یا ترکیب فاز متحرک را تغییر دهید . اگر لازم شد درجه حرارت ستون را بالا ببرید یا نوع ستون را عوض دهید (آنالیز ساختار محلول ممکن است نوع تداخلات را پیش بینی کند). ۵-ثابت ها را به گونه ای به پائینترین مقدار کاهش دهید تا در آنالیزهای بعدی مشکلی ایجاد نکنند .
مشکل شماره ۱۲		
برآمدگی baseline  	۱-ایجاد نوسانات در درجه حرارت ستون (حتی کوچکترین تغییرات در درجه حرارت ستون باعث ایجاد این نوسانات می شود.غالبا بازتابش و هدایت دتکتور ها هم عامل ایجاد این نوسانات است). ۲-یکنواخت نبودن فاز متحرک (این حالت معمولا درجذب های بالا ایجاد می شود اما برآمدگی خط زمینه ترجیحا از نوسانات درجه حرارت است).	۱-درجه حرارت ستون و فازمتحرک را کنترل کنید . از آون حرارتی قبل از دتکتور استفاده کنید . ۲-از حلال ها ، نمک های با درجه خلوص بالاو افزودنی های مخصوص HPLC استفاده کنید . فاز متحرک را قبل از استفاده گازدائی کنید .می توان از گاز هلیم هم برای گاززدائی استفاده کرد.

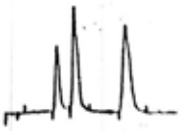
جدول ۱-مشکلات HPLC و طریقه رفع اشکال		
رفع اشکال	علت اشکال	مشکل
		مشکل شماره ۱۲
۳- سل را با متانل یا حلالهای قوی دیگر متعادل کنید . اگر لازم شد سل را با 1N HNO3 شستشو دهید . (هرگز با HCL این عمل را انجام ندهید).	۳-آلودگی یا وجود هوا در سل دتکتور .	
۴-مسیر مسدود شده را باز یا عوض کنید به دستورالعمل دتکتور برای تعویض پنجره سل مراجعه کنید .	۴-مسدود شدن مسیر خروجی بعد از دتکتور باعث ترک برداشتن پنجره سل می شود در نتیجه در baseline ایجاد اغتشاش می کند.	
۵-ترکیب فاز متحرک یا Flow rate را تصحیح کنید سعی کنید از مشکلات ساده مانند ترکیب فاز متحرک یا سرعت Flow rate اجتناب کنید .	۵-اشکالی در مخلوط کردن فازمتحرک بوجود آمده یا تغییر در Flow rate ایجاد شده است .	
۶-ستون را با یک حلال حدواسط قوی به تعادل برسانید سپس با 10 الی 20 حجم از فازمتحرک جدید ستون را قبل از شروع کار آماده آنالیز کنید .	۶-تعادل در ستون به آهستگی صورت می گیرد خصوصا زمانیکه فاز متحرک را تغییر می دهید .	
۷-مراحل ساخت فازمتحرک را کنترل کنید.(صفحه۲)	۷-فازمتحرک آلوده شده است ،یا تاریخ مصرف آن گذشته است یا برای ساخت آن از موادی با کیفیت پائین استفاده شده است .	
۸-از گاردستون استفاده کنید و اگر لازم شد ستون را با حلالهای قوی در فواصل بین شستشو متعادل کنید یا عمل آنالیز را متناوبا و دوره ای انجام دهید .	۸-اجزائی در نمونه که سرعت مهاجرت آنها در ستون کم است (k` بالا) باعث ایجاد پیکهای خیلی پهن در baseline می شود که بنظر می رسد baseline به سمت بالا کشیده می شود یا شکم داده است .	
۹-baseline را متوقف کنید . زمانی از مواد جدید استفاده کنید که رنج دینامیکی دتکتور اضافه شده باشد (صفحه ۳)	۹-جریان فاز متحرک برقرار است. اما دتکتور تنظیم نیست .	
۱۰-ماکزیمم طول موج جذب UV را تغییر دهید .	۱۰-دتکتور(UV) در ماکزیمم مقدار جذب تنظیم نیست اما در شیب منحنی قرار دارد .	

جدول ۱-مشکلات HPLC و طریقه رفع اشکال

مشکل	علت اشکال	رفع اشکال
مشکل شماره ۱۳		
اغتشاش منظم در خط زمینه 	۱-وجود هوا در فازمتحرک ، سل دتکتور یا پمپ ۲-وجود نشتی در سیستم ۳-فازمتحرک خوب مخلوط نشده است. ۴-اثر درجه حرارت (درجه حرارت ستون بالا است اما دتکتور گرم نیست). ۵-تأثیر عملکرد دیگر وسایل الکترونیکی روی baseline ۶-نوسانات پمپ	۱-فاز متحرک را گاززدائی کنید .سیستم را با خروج هوا از سل دتکتور یا پمپ به تعادل برسانید . ۲-اتصالات سیستم را کنترل کنید . پمپ را برای نشتی ها ، گرفتگی با نمک کنترل کنید،که باعث اغتشاشات غیرمعمول می شود . اتصالات پمپ را اگر لازم شد عوض کنید . ۳-فازمتحرک را با دست مخلوط کنید یا از حلال هایی با ویسکوزیته پائینتر استفاده کنید . ۴-اختلاف دما را کاهش دهید یا تبادل حرارت را افزایش دهید . ۵-در صورتیکه منبع مشکل،از خارج سیستم است LC و دتکتور و ثبات را یکی یکی جدا کنید . ۶-نوسانات پمپ را به کمترین مقدار کاهش دهید .

جدول ۱-مشکلات HPLC و طریقه رفع اشکال

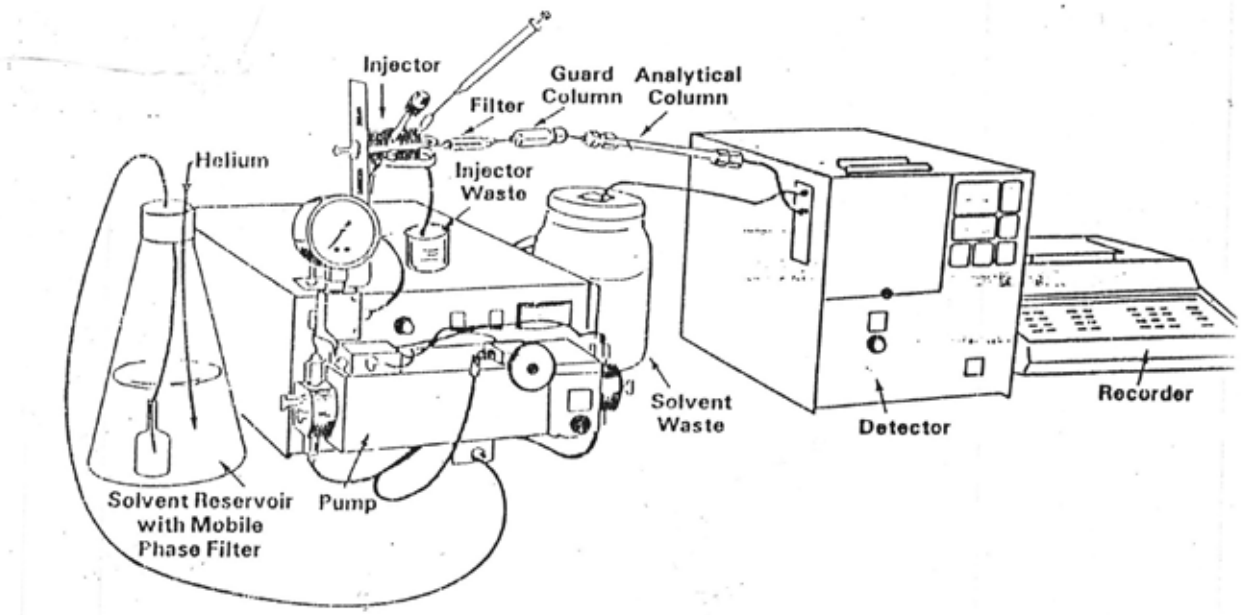
مشکل	علت اشکال	رفع اشکال
مشکل شماره ۱۴		
اغتشاش نامنظم baseline 	۱-نشتی	۱-سیستم را در قسمت اتصالات کنترل کنید .پمپ را برای نشتی ها ، گرفتگی یا نمک و اغتشاشات غیرمعمول کنترل کنید .
	۲-فازمتحرک آلوده شده است یا زمان مصرف آن گذشته است یا از موادی با کیفیت پائین ساخته شده است .	۲-ساخت فازمتحرک را کنترل کنید . (صفحه ۲) .
	۳-اشکال الکترونیکی در دتکتور یا ثبات	۳-دتکتور و ثبات را جدا کنید . برای رفع اشکال به دستورالعمل دستگاه مراجعه کنید .
	۴-هوا در سیستم بدام افتاده است .	۴-سیستم را با جلال قوی به تعادل برسانید.
	۵-وجود حبابهای هوا در دتکتور	۵-دتکتور را Purge کنید . یک وسیله برگشت فشار بعد از دتکتور نصب کنید .
	۶-سل دتکتور آلوده شده است (حتی مقادیر بسیار کم آلودگی نیز میتواند باعث ایجاد اغتشاش شود).	۶-سل را تمیز کنید .
	۷-لامپ دتکتور ضعیف شده است .	۷-لامپ را عوض کنید .
	۸-ایجاد ترک در سیلیکای ستون یا مواد فشرده شده درون ستون	۸-ستون را عوض کنید .

جدول ۱-مشکلات HPLC و طریقه رفع اشکال		
مشکل	علت اشکال	رفع اشکال
مشکل شماره ۱۵		
پهن شدگی پیک ها Normal  Problem	۱-ترکیب فازمتحرک تغییر یافته است. ۲-جریان فازمتحرک خیلی پائین است. ۳-وجود نشتی(خصوصاً بین ستون و دتکتور) ۴-نادرست بودن تنظیمات دتکتور ۵- تاثیر عوامل بیرونی بر ستون a: اضافه بار ستون b: حجم سل یا زمان (t) در دتکتور خیلی بزرگ است . c: اتصالات بین ستون و دتکتور خیلی طولانی است یا ID خیلی بزرگ است . d: زمان (t) ثبات خیلی بالاست . ۶-غلظت بافر خیلی کم است . ۷-گارد ستون آلوده یا کهنه شده است .	۱-فازمتحرک جدیدی درست کنید . ۲-Flow rate را تنظیم کنید. ۳-سیستم را در قسمت اتصالات کنترل کنید پمپ را برای نشتی ها گرفتگی با نمک و اغتشاشات غیرمعمول کنترل کنید . اگر لازم شد اتصالات پمپ را عوض کنید . ۴-تنظیمات دتکتور را تصحیح کنید . ۵- a: حجمهای کوچکتر را تزریق کنید (بعنوان مثال 10µli در مقابل 100µli)یا 1:10 و 1:100 از حجم نمونه را رقیق کنید. b: زمان (t) را کاهش دهید یا از سل کوچکتر استفاده کنید . c: از اتصالات کوتاهتر یا از یک قطعه 0.007-0.010 ID بطور تجربی استفاده کنید . d: زمان (t) را کاهش دهید . ۶-غلظت بافر را افزایش دهید . ۷-گارد ستون را عوض کنید .

جدول ۱-مشکلات HPLC و طریقه رفع اشکال		
مشکل	علت اشکال	رفع اشکال
مشکل شماره ۱۵		
	۸-ستون آلوده یا کهنه است .	۸-ستون را با نوع جدید و مشابهی از آن عوض کنید . اگر ستون جدید پیک های متقارن داد پس ستون قدیمی را احیاء کنید (جدول ۲ صفحه ۱۹) . مجدداً آنالیز را شروع کنید .
	۹-وجود فضای خالی در ورودی ستون	۹-خروجی انتهای ستون را باز کرده و فضای خالی را پر کنید .یا ستون را عوض کنید .
	۱۰- پیک بصورت دو یا چند پیک نسبتاً ضعیف نمایش داده می شود .	۱۰-نوع ستون را عوض کنید تا جداسازی بهبود یابد .
	۱۱-درجه حرارت ستون خیلی پائین است .	۱۱-درجه حرارت را افزایش دهید نباید بیشتر از 75°c شود . مگر اینکه در مونوگراف ستون درجه حرارتهای بالاتر ذکر شده باشد .

Reference

Figure A — Important Components of an HPLC System



Isolating HPLC Problems

In an HPLC system, problems can arise from many sources. First define the problem, then isolate the source.

Use Table 1 to determine which component(s) may be causing the trouble. Thereafter, a process of elimination will usually enable you to pinpoint the specific cause and correct the problem.

How to Prevent Mobile Phase Problems

Low sensitivity and rising baselines, noise, or spikes on the chromatogram can often be attributed to the mobile phase. Contaminants in the mobile phase are especially troublesome in gradient elution. The baseline may rise, and spurious peaks can appear as the level of the contaminated component increases.

Water is the most common source of contamination in reversed phase analyses. You should use only high purity distilled or deionized water when formulating mobile phases. However, several common deionizers introduce organic contaminants into the water. To remove these contaminants, pass the deionized water through activated charcoal or a C18 cartridge.

Use only HPLC grade solvents, salts, ion pair reagents, and basic modifiers. Cleaning lower quality solvents is time consuming, and trace levels of contaminants often remain. These trace contaminants can cause problems when you use a high sensitivity ultraviolet or fluorescence detector.

To help prevent bubbles in the system, degas the mobile phase prior to use. Sparge it with helium (3-5psi) during use. Filtering the mobile phase through a 0.2 or 0.45 micron filter eliminates gas. This will also remove particles that could produce noisy baselines or plug the column.

Avoid mixing dissimilar or immiscible solvents and remember to flush the system when going from one mobile phase to another. To ensure complete flushing, always use a solvent of intermediate polarity (Table 3, page 15).

Because many aqueous buffers promote the growth of algae or bacteria, you should discard cloudy buffers and make them up fresh. Prevent microorganism growth by adding about 100ppm of sodium azide to aqueous buffers. Or you can mix these buffers with an organic solvent such as acetonitrile.

Use ion pair reagents carefully. The optimum chain length and concentration of the reagent must be determined for each analysis. In general, increasing the concentration or chain length increases retention times. We recommend using concentrations of 0.2 to 10mM. High concentrations (>50%) of acetonitrile and some other organic solvents can precipitate ion pair reagents.

Volatile basic modifiers, such as triethylamine, are useful when you wish to recover a compound for further analysis. These modifiers also let you avoid problems associated with ion pair reagents. They can be added to the buffer at concentrations of 0.1 to 1.0%. Increasing the concentration improves peak shape for basic compounds, but can alter retention times.

Recent studies suggest that recycling mobile phase used for isocratic separations prolongs column life and reduces solvent costs. However, you must adjust the recorder or integrator to compensate for the gradual baseline increase that usually follows. Remember . . . volatile components can evaporate, especially when the mobile phase is recycled or continuously degassed, and this will change mobile phase composition.

Isolating Pump Problems

The pump must deliver a constant flow of solvent to the column over a wide range of conditions. Modern HPLC pump designs include syringe, diaphragm, piston, or combinations.

Pumping system problems are usually easy to spot and correct. Some of the more common symptoms are erratic retention times and a noisy baseline, or spikes on the chromatogram. Leaks at pump fittings or seals will result in poor chromatography. A sure sign of a leak is a buildup of salts at a pump connection.

To isolate and repair specific problems related to your apparatus, use the troubleshooting and maintenance sec-

tions of the operation manual. Pump seals may require periodic replacement. You should perform regular maintenance rather than waiting to deal with a problem.

Injector and Injection Solvents

The injector rapidly introduces the sample into the system with minimal disruption of the solvent flow. HPLC systems currently use variable loop, fixed loop, and syringe-type injectors. These are activated manually, pneumatically, or electrically.

Mechanical problems involving the injector (e.g., leaks, plugged capillary tubing, worn seals) are easy to spot and correct. Other problems, such as irreproducible injections, are more difficult to solve. But these, too, can sometimes be traced to the injector.

Variable peak heights, split peaks, and broad peaks can be caused by incompletely filled sample loops, incompatibility of the injection solvent with the mobile phase, or poor sample solubility. Whenever possible, dissolve and inject samples in mobile phase. Otherwise, be sure the injection solvent is of lower eluting strength than the mobile phase (Table 3).

Column Protection

Although not an integral part of most equipment, mobile phase filters, in-line filters, saturator columns, and guard columns greatly reduce problems associated with complex separations.

Filters and guard columns prevent particles and strongly retained compounds from accumulating on the analytical column. Silica particles in a saturator column dissolve in basic mobile phases, protecting the silica based packing in the analytical column.

The useful life of these disposable products depends on many factors, including mobile phase composition, sample purity, pH, etc. As these devices become contaminated or plugged with particles, pressure increases and peaks broaden or split. For more about column protection, see the products pages of this guide and request Bulletin 781.

Getting the Most from Your Analytical Column

Columns are available in many different sizes and designs. A wide variety of packings are also available, but all have the same purpose — to perform the separation. The most common problem associated with analytical columns is deterioration. This is true regardless of whether the column contains a bonded reversed or normal phase, ion exchange, size exclusion, or resin based packing.

Symptoms of deterioration are poor peak shape, split peaks, shoulders, loss of resolution, decreased retention times, and high back pressure. These symptoms indicate contaminants have accumulated on the frit or column inlet, or there are voids, channels, or a depression in the packing bed.

Deterioration is more evident in higher efficiency columns. For example, a 3 micron packing retained by 0.5 micron frits is more susceptible to plugging than a 5 or 10 micron packing retained by 2 micron or larger frits. Proper column protection and sample preparation are essential to getting the most from each column.

Overloading a column can cause poor peak shapes and other problems. Column capacity depends on many factors, but typical values are:

Analytical column (25cm x 4.6mm)	<500μg
Semi-preparative column (25cm x 10mm)	<100mg
Preparative column (25cm x 21.2mm)	<500mg

Solving Detector Problems

More than 20 types of detectors are available for HPLC systems. The most common are fixed and variable wavelength ultraviolet photometers and refractive index detectors. Electrochemical and conductivity detectors are currently popular. Improvements in detector cell technology have made them more durable and easier to use.

Detector problems fall into two categories — electrical and mechanical/optical. For electrical problems, you should deal with the instrument manufacturer. Mechanical or optical problems can usually be traced to the flow cell. Detector-related problems include leaks, air bubbles, and cell contamination. These usually produce spikes or baseline noise on the chromatograms.

Some cell materials — especially those used in refractive index detectors — are sensitive to high pressure. Flow rates or back pressures that exceed the manufacturer's recommendation will break the cell window. Old or defective lamps and incorrectly set detector rise time, gain, or attenuation will reduce sensitivity and peak height. Faulty or reversed cable connections can also cause problems.

Column Heater, Recorder

These components seldom cause problems with the system. They will be discussed in the troubleshooting table (Table 1).

Keep Accurate Records

Most problems don't occur overnight, but develop gradually. Accurate record keeping, then, is vital to detecting and solving many problems.

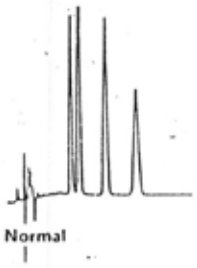
Evaluate every column you receive, when you receive it and at regular intervals thereafter. By keeping a written history of column efficiency, mobile phases used, lamp current, pump performance, etc., you can monitor your system's performance.

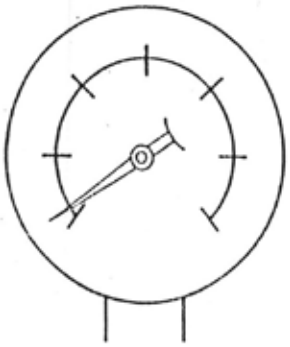
Records also help prevent mistakes, such as introducing water into a silica column or precipitating buffer in the system. Many analysts modify their HPLC systems in some way. Reliable records are the best way to ensure that a modification does not introduce problems. For problems relating to pumps, detectors, automatic samplers, and data systems, consult your instrument manual's troubleshooting guide.

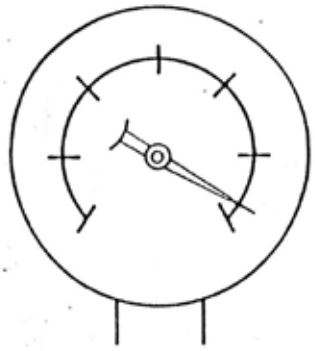
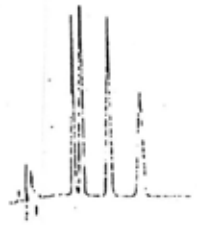
PROBLEM INDEX

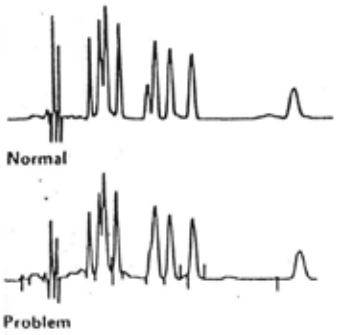
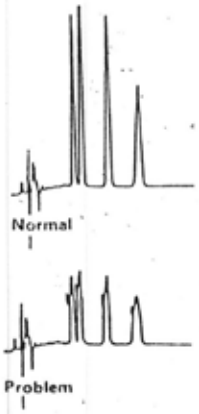
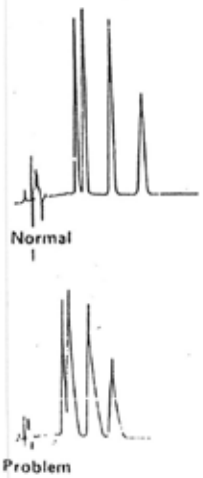
Problem	Problem No.	Problem	Problem No.	Problem	Problem
Baseline —		Ghost peaks	19	**Peaks —**	
drift	12	**Peak shapes, incorrect —**		height change	16
noise, irregular	14	broad	15	missing	2
noise, regular	13	fronting	10	negative	18
Column back pressure —		rounded	11	no peaks	1
higher than usual	4	split	7	unresolved	6
lower than usual	3	tailing	8, 9	**Retention times, variable**	5
				Selectivity change	17

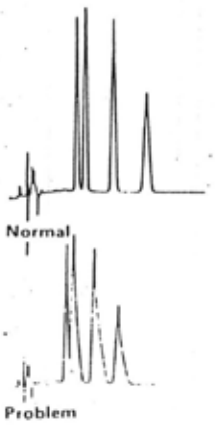
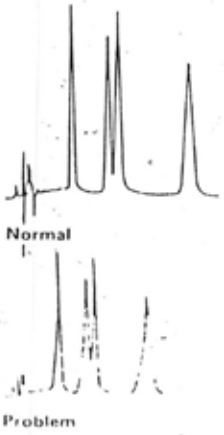
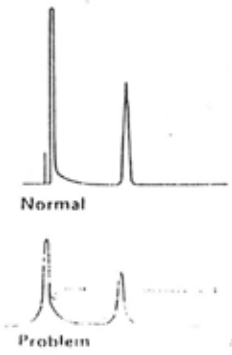
Table 1 — HPLC Problems, Probable Causes, and Remedies

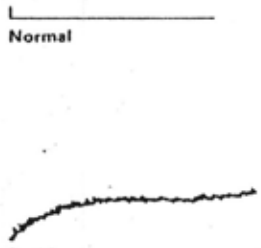
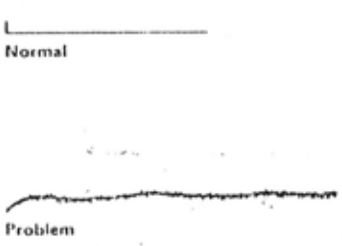
Problem	Probable Cause	Remedy/Comments
Problem No. 1		
No Peaks/Very Small Peaks  Normal Problem Problem	1. Detector lamp off. 2. Loose/broken wire between detector and integrator or recorder. 3. No mobile phase flow. 4. No sample/deteriorated sample. 5. Settings too high on detector or recorder.	1. Turn lamp on. 2. Check electrical connections and cables. 3. See "No Flow" (Problem No. 2). 4. Be sure automatic sampler vials have sufficient liquid. Evaluate system performance with fresh standard to confirm sample as source of problem. 5. Check attenuation or gain settings.

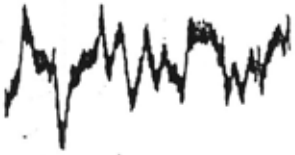
Problem	Probable Cause	Remedy/Comments
Problem No. 2		
No Flow 	1. Pump off. 2. Flow interrupted/obstructed. 3. Leak. 4. Air trapped in pump head. (Revealed by pressure fluctuations.)	1. Start pump. 2. Check mobile phase level in reservoir(s). Check flow throughout system. Examine sample loop for obstruction or air lock. Make sure mobile phase inlet filter is clean. Make sure mobile phase components are miscible and mobile phase is properly degassed. 3. Check system for loose fittings. Check pump for leaks, salt build-up, unusual noises. Change pump seals if necessary. 4. Disconnect tubing at guard column (if present) or analytical column inlet. Check for flow. Purge pump at high flow rate (10ml/min.), prime system if necessary. (Prime each pump head separately.) If system has check valve, loosen valve to allow air to escape. If problem persists, flush system with 100% methanol. If problem still persists, contact system manufacturer.
Problem No. 3		
No Pressure/Pressure Lower than Usual 	1. Leak. 2. Mobile phase flow interrupted/obstructed. 3. Air trapped in pump head. (Revealed by pressure fluctuations.) 4. Leak at column inlet end fitting. 5. Air trapped elsewhere in system. 6. Worn pump seal causing leaks around pump head.	1. Check system for loose fittings. Check pump for leaks, salt build-up, unusual noises. Change pump seals if necessary. 2. Check mobile phase level in reservoir(s). Check flow throughout system. Examine sample loop for obstruction or air lock. Make sure mobile phase inlet filter is clean. Make sure mobile phase components are miscible and mobile phase is properly degassed. 3. Disconnect tubing at guard column (if present) or analytical column inlet. Check for flow. Purge pump at high flow rate (10ml/min.), prime system if necessary. (Prime each pump head separately.) If system has check valve, loosen valve to allow air to escape. 4. Reconnect column and pump solvent at 1-2ml/min. If pressure is still low, check for leaks at inlet fitting or column end fitting. 5. Disconnect guard and analytical column and purge system. Reconnect column(s). If problem persists, flush system with 100% methanol. 6. Replace seal.

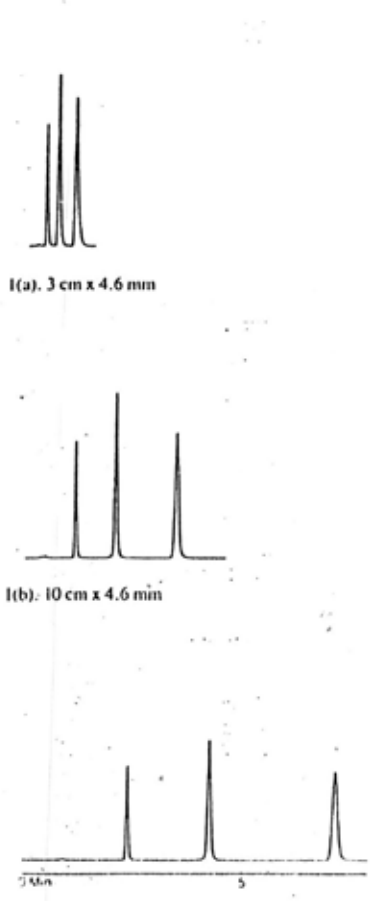
Problem	Probable Cause	Remedy/Comments
Problem No. 4		
Pressure Higher than Usual 	1. Problem in pump, injector, or tubing.	1. Disconnect guard and analytical column, run pump at 2-5ml/ min. If pressure is minimal, see Cause 2. If not, isolate cause by systematically eliminating system components, starting with detector and working back to pump.
	2. Obstructed guard or analytical column.	2. Remove guard column (if present) and check pressure. Replace guard column if necessary. If analytical column is obstructed, reverse and flush (page 13). If problem persists, column may be clogged with strongly retained contaminants. Use appropriate restoration procedure (Table 2, page 14). If problem still persists, change inlet frit (page 13) or replace column.
Problem No. 5		
Variable Retention Times Normal  Problem Problem	1. Leak.	1. Check system for loose fittings. Check pump for leaks, salt build-up, unusual noises. Change pump seals if necessary.
	2. Change in mobile phase composition. (Small changes can lead to large changes in retention times.)	2. Check make-up of mobile phase. If mobile phase is machine mixed, hand mix and supply from one reservoir.
	3. Air trapped in pump. (Retention times increase and decrease at random times.)	3. Purge air from pump head or check valves. Change pump seals if necessary. Be sure mobile phase is degassed.
	4. Column temperature fluctuations (especially evident in ion exchange systems).	4. Use reliable column oven or insulate column. (**Note:** higher column temperatures increase column efficiency. For optimum results, heat eluant before introducing it onto column.)
	5. Column overloading. (Retention times usually decrease as mass of solute injected on column exceeds column capacity.)	5. Inject smaller volume (e.g., 10µl vs. 100µl) or 1:10 and 1:100 dilutions of sample.
	6. Sample solvent incompatible with mobile phase.	6. Adjust solvent. Whenever possible, inject samples in mobile phase.
	7. Column problem. (Not a common cause of erratic retention. As a column ages, retention times gradually decrease.)	7. Substitute new column of same type to confirm column as cause. Discard old column if restoration procedures fail (see page 14).

Problem	Probable Cause	Remedy/Comments
Problem No. 6		
Loss of Resolution 	1. Mobile phase contaminated/deteriorated (causing retention times to change). 2. Obstructed guard or analytical column.	1. Check make-up of mobile phase. (page 2). 2. Remove guard column (if present) and attempt analysis. Replace guard column if necessary. If analytical column is obstructed, reverse and flush (page 13). If problem persists, column may be clogged with strongly retained contaminants. Use appropriate restoration procedure (Table 2, page 14). If problem still persists, change inlet frit (page 13) or replace column.
Problem No. 7		
Split Peaks 	1. Contamination on guard or analytical column inlet. 2. Sample solvent incompatible with mobile phase.	1. Remove guard column (if present) and attempt analysis. Replace guard column if necessary. If analytical column is obstructed, reverse and flush (page 13). If problem persists, column may be clogged with strongly retained contaminants. Use appropriate restoration procedure (Table 2, page 14). If problem still persists, inlet frit is probably plugged. Change frit (page 13) or replace column. 2. Adjust solvent. Whenever possible, inject samples in mobile phase.
roblem No. 8		
Peaks Tail on Initial and Later Injections 	1. Interference in sample. 2. Wrong column type. 3. Wrong mobile phase pH. 4. Sample reacting with active sites.	1. Check column performance with standards. 2. Try another column type (e.g., deactivated column for basic compounds). 3. Adjust pH. For basic compounds, lower pH usually provides more symmetric peaks. 4. Add ion pair reagent or volatile basic modifier (page 3).

Problem	Probable Cause	Remedy/Comments
Problem No. 9		
Peaks Formerly Symmetric, Now Tailing 	1. Interference in sample. 2. Mobile phase contaminated/deteriorated. 3. Guard or analytical column contaminated/worn out.	1. Check column performance with standards. 2. Check make-up of mobile phase (page 2). 3. Remove guard column (if present) and attempt analysis. Replace guard column if necessary. If analytical column is source of problem, use appropriate restoration procedure (Table 2, page 14). If problem persists, replace column.
Problem No. 10		
Fronting Peaks 	1. Interference in sample. 2. Shoulder or gradual baseline rise before a main peak may be another sample component. 3. Column overloaded. 4. Sample solvent incompatible with mobile phase.	1. Check column performance with standards. 2. Increase efficiency or change selectivity of system to improve resolution. Try another column type if necessary (e.g., switch from nonpolar C18 to polar cyano phase). 3. Inject smaller volume (e.g., 10µl vs. 100µl) or 1:10 and 1:100 dilutions of sample. 4. Adjust solvent. Whenever possible, inject samples in mobile phase. Flush polar bonded phase column with 200ml HPLC grade ethyl acetate (2.5ml/min.), then with intermediate polarity solvent prior to analysis.
Problem No. 11		
Rounded Peaks 	1. Detector operating outside linear dynamic range. 2. Recorder gain set too low. 3. Column overloaded. 4. Sample-column interaction. 5. Detector and/or recorder time constants are set too high.	1. Reduce sample volume and/or concentration. 2. Adjust gain. 3. Inject smaller volume (e.g., 10µl vs. 100µl) or 1:10 and 1:100 dilutions of sample. 4. Change buffer strength, pH, or mobile phase composition. If necessary, raise column temperature or change column type. (Analysis of solute structure may help predict interaction.) 5. Reduce settings to lowest values or values at which no further improvements are seen.

Problem	Probable Cause	Remedy/Comments
Problem No. 12		
Baseline Drift  	1. Column temperature fluctuation. (Even small changes cause cyclic baseline rise and fall. Most often affects refractive index and conductivity detectors, UV detectors at high sensitivity or in indirect photometric mode.) 2. Nonhomogeneous mobile phase. (Drift usually to higher absorbance, rather than cyclic pattern from temperature fluctuation.) 3. Contaminant or air buildup in detector cell. 4. Plugged outlet line after detector. (High pressure cracks cell window, producing noisy baseline.) 5. Mobile phase mixing problem or change in flow rate. 6. Slow column equilibration, especially when changing mobile phase. 7. Mobile phase contaminated, deteriorated, or prepared from low quality materials. 8. Strongly retained materials in sample (high k') can elute as very broad peaks and appear to be a rising baseline. (Gradient analyses can aggravate problem.) 9. Mobile phase recycled but detector not adjusted. 10. Detector (UV) not set at absorbance maximum but at slope of curve.	1. Control column and mobile phase temperature, use heat exchanger before detector. 2. Use HPLC grade solvents, high purity salts, and additives. Degas mobile phase before use, sparge with helium during use. 3. Flush cell with methanol or other strong solvent. If necessary, clean cell with 1N HNO_3 (*never* with HCl). 4. Unplug or replace line. Refer to detector manual to replace window. 5. Correct composition/flow rate. To avoid problem, routinely monitor composition and flow rate. 6. Flush column with intermediate strength solvent, run 10-20 column volumes of new mobile phase through column before analysis. 7. Check make-up of mobile phase (page 2). 8. Use guard column. If necessary, flush column with strong solvent between injections or periodically during analysis. 9. Reset baseline. Use new materials when dynamic range of detector is exceeded (page 3). 10. Change wavelength to UV absorbance maximum.
Problem No. 13		
Baseline Noise (regular)  	1. Air in mobile phase, detector cell, or pump. 2. Leak. 3. Incomplete mobile phase mixing. 4. Temperature effect (column at high temperature, detector unheated). 5. Other electronic equipment on same line. 6. Pump pulsations.	1. Degas mobile phase. Flush system to remove air from detector cell or pump. 2. Check system for loose fittings. Check pump for leaks, salt buildup, unusual noises. Change pump seals if necessary. 3. Mix mobile phase by hand or use less viscous solvent. 4. Reduce differential or add heat exchanger. 5. Isolate LC, detector, recorder to determine if source of problem is external. Correct as necessary. 6. Incorporate pulse dampener into system.

Problem	Probable Cause	Remedy/Comments
Problem No. 14		
Baseline Noise (irregular) Normal  Problem	1. Leak. 2. Mobile phase contaminated, deteriorated, or prepared from low quality materials. 3. Detector/recorder electronics. 4. Air trapped in system. 5. Air bubbles in detector. 6. Detector cell contaminated. (Even small amounts of contaminants can cause noise.) 7. Weak detector lamp. 8. Column leaking silica or packing material.	1. Check system for loose fittings. Check pump for leaks, salt build-up, unusual noises. Change pump seals if necessary. 2. Check make-up of mobile phase. (page 2). 3. Isolate detector and recorder electronically. Refer to instruction manual to correct problem. 4. Flush system with strong solvent. 5. Purge detector. Install back pressure device after detector. 6. Clean cell. 7. Replace lamp. 8. Replace column.
Problem No. 15		
Broad Peaks Normal Problem	1. Mobile phase composition changed. 2. Mobile phase flow rate too low. 3. Leak (especially between column and detector). 4. Detector settings incorrect. 5. Extra-column effects: a. Column overloaded. b. Detector response time or cell volume too large. c. Tubing between column and detector too long or ID too large. d. Recorder response time too high. 6. Buffer concentration too low. 7. Guard column contaminated/worn out. 8. Column contaminated/worn out. 9. Void at column inlet. 10. Peak represents two or more poorly resolved compounds. 11. Column temperature too low.	1. Prepare new mobile phase. 2. Adjust flow rate. 3. Check system for loose fittings. Check pump for leaks, salt build-up, and unusual noises. Change pump seals if necessary. 4. Adjust settings. 5. a. Inject smaller volume (e.g., 10μl vs. 100μl) or 1:10 and 1:100 dilutions of sample. b. Reduce response time or use smaller cell. c. Use as short a piece of 0.007-0.010" ID tubing as practical. d. Reduce response time. 6. Increase concentration. 7. Replace guard column. 8. Replace column with new one of same type. If new column provides symmetrical peaks, flush old column (Table 2, page 14), then retest. 9. Open inlet end and fill void (page 13) or replace column. 10. Change column type to improve separation. 11. Increase temperature. Do not exceed 75°C unless higher temperatures are acceptable to column manufacturer.

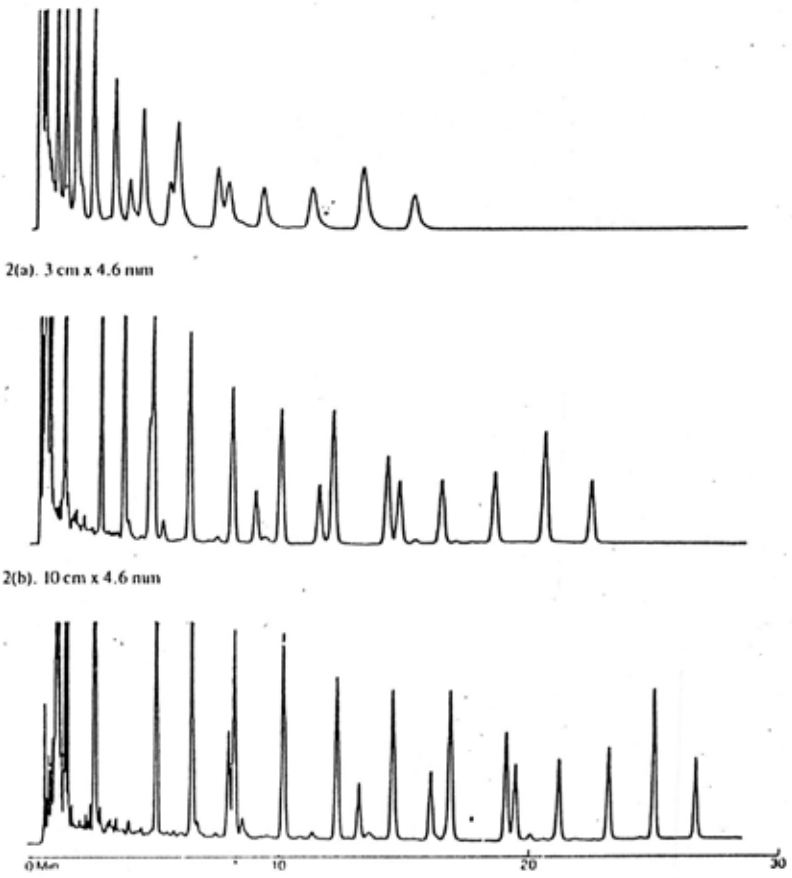


1(a). 3 cm x 4.6 mm

1(b). 10 cm x 4.6 mm

1(c). 22 cm x 4.6 mm

Figure 1(a-c); Effect of cartridge length in isocratic elution under identical conditions.



2(a). 3 cm x 4.6 mm

2(b). 10 cm x 4.6 mm

2(c). 22 cm x 4.6 mm

Figure 2(a-c); Effect of cartridge length in gradient elution under identical conditions.

To Minimize Column Cost

The selection of the shortest cartridge that gives satisfactory resolution offers multiple advantages.

As shown in Figure 1, shorter cartridges reduce analysis time and increase sample detectability. Shorter cartridges are low in cost and also reduce solvent consumption. If you can resolve your sample on a short cartridge, you can save both time and money by replacing a long cartridge that has more resolution than is required.

The effect of cartridge length on resolution is less in gradient elution than in isocratic separations, because solvent composition (not cartridge length) is the dominant force in gradient elution. Figure 2 shows that short cartridge columns produce resolutions nearly as good as long columns.

Low cost, easily interchanged, short Pierce cartridge columns (especially the 3 cm length) are ideal for methods development. You can afford to have a wide variety of column packing materials on hand for convenient, time-saving evaluations. And when the sorbent has been selected and higher resolution is required, simply choose a longer cartridge with the same packing.

Restoring Your Column's Performance

These procedures should rejuvenate a column whose performance has deteriorated.

Disconnect and reverse the column. Connect it to the pump, but not the detector. Follow the appropriate flushing procedure in this table, using a flow rate that results in column back pressure of 1500-4000psi. If you have a SUPELCOSIL® column, analyze the test mix provided using the conditions on the quality control test sheet. Efficiency, symmetry, and capacity should be within 10-15% of the test sheet values. If not, repack the column inlet (page 13) or replace the column.

Table 2 — Column Restoration Procedures

Nonbonded Silica Column

Flush with 50ml hexane
Flush with 50ml methylene chloride
Flush with 50ml isopropanol
Flush with 50ml methanol
Flush with 25ml methylene chloride
Flush with 25ml mobile phase
Evaluate column performance

Nonpolar Column
(C1, C4, C6, C8, C18, phenyl, or diphenyl column, SUPELCOSIL® LC-PAH or DB column)

Water Soluble Samples

Flush with 50ml hot (40-60°C) distilled water
Flush with 50ml methanol
Flush with 50ml acetonitrile
Flush with 30ml tetrahydrofuran
Flush with 25ml methanol
Flush with 25ml mobile phase
Evaluate column performance according to conditions specified by the manufacturer

Water Insoluble Samples

Flush with 50ml isopropanol
Flush with 50ml tetrahydrofuran
Flush with 50ml methylene chloride
Flush with 50ml hexane
Flush with 25ml isopropanol
Flush with 25ml mobile phase
Evaluate column performance

Polar Column
(amino, cyano, or diol column, SUPELCOSIL® LC-PCN, or LC-(R)-Urea column)

For a column used in the reversed phase mode (e.g., drug analyses using an organic solvent/aqueous buffer mobile phase), follow the same cleanup procedure as for nonpolar columns. For a column with nonaqueous mobile phases, use the following scheme:

Flush with 50ml chloroform
Flush with 50ml methylene chloride
Flush with 50ml 2-propanol
Flush with 25ml methylene chloride
Flush with 25ml mobile phase
Evaluate column performance

Ion Exchange Column
(strong or weak anion or cation exchange, amino column)

Most analyses involving ion exchange systems use ionic mobile phases. Compounds that may affect column performance are usually insoluble or only slightly soluble in water. The following procedure should be sufficient to remove these compounds.

Flush with 50ml hot (40-60°C) distilled water
Flush with 50ml methanol
Flush with 50ml acetonitrile
Flush with 25ml methylene chloride
Flush with 25ml methanol
Flush with 25ml mobile phase
Evaluate column performance

Columns Used for Protein/Biopolymer Analyses
(C4, C8, C18, other RP column used for proteins, diphenyl column)

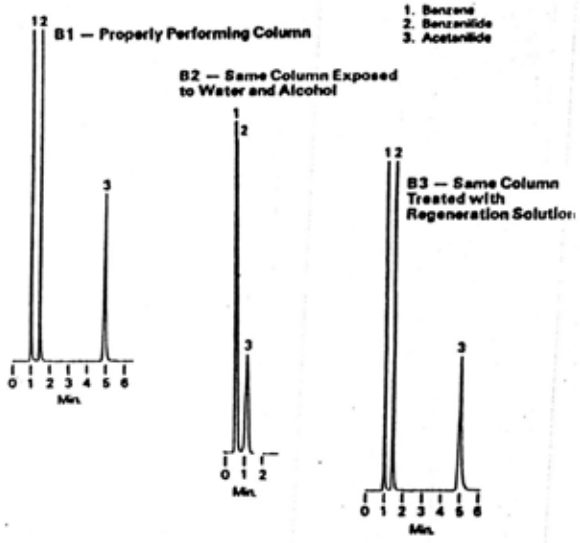
Flush with 100ml distilled water
Flush with 50ml 0.1% trifluoroacetic acid
Flush with 50ml isopropanol
Flush with 50ml acetonitrile
Flush with 50ml distilled water
Flush with 50ml mobile phase
Evaluate column performance

Nonbonded Silica Column Exposed to Polar Solvent

Samples and mobile phases containing very strongly polar solvents, such as water or alcohols, can deactivate uncoated silica HPLC columns. This can drastically affect column performance (Figure B2). Even prolonged column flushing with a nonpolar solvent only partially restores column performance, while wasting chemicals.

A *silica regeneration solution* quickly and inexpensively restores silica column performance by removing trapped polar material. Pump the solution through the affected column for 10 minutes at a rate of 4ml/minute, then flush with mobile phase for 10 minutes at a rate of 2ml/minute. Evaluate column performance by using the test mixture supplied with SUPELCOSIL® LC-Si columns. Performance should be virtually the same as before the polar liquid was introduced (Figure B3).

Figure B — Regeneration Solution Restores Silica Column Performance



SUPELCOSIL® LC-Si column, 15cm x 4.6mm (3μm packing), Mobile Phase: methylene chloride:methanol:water, 99.4:0.5:0.1 (Fig. B1), 2-propanol:water, 50:50 (Fig. B2), or Silica Column Regeneration Solution, 4ml/min. for 10 min., then methylene chloride:methanol:water, 99.4:0.5:0.1, 2ml/min. for 10 min (Fig. B3), Temp.: amb., Flow Rate (Figs. B1 & B2): 2ml/min., Det.: 254nm UV, 0.1 AUFS, Sample: 10μl SUPELCOSIL® LC-Si column test mix injected after methylene chloride:methanol:water equilibration for Fig. B3).

Table 3 — Properties of Organic Solvents Commonly Used in HPLC

Solvent	Polarity	Miscible with Water?	UV Cut Off	Refractive Index at 20°C	Solvent Strength, ε° Silica	Viscosity at 20°C, cP
Hexane	nonpolar	no	190	1.375	0.00	0.31
Isooctane		no	190	1.391	0.01	0.50
Carbon tetrachloride		no	263	1.460	0.11	0.97
Chloroform		no	245	1.446	0.26	0.57
Methylene chloride		no	233	1.424	0.32	0.44
Tetrahydrofuran		yes	212	1.408	0.35	0.55
Diethyl ether		no	218	1.352	0.38	0.23
Ethyl acetate		poorly	256	1.372	0.38	0.45
Acetone		yes	330	1.356	0.45	0.30
Dioxane		yes	215	1.422	0.49	1.32
Acetonitrile		yes	190	1.344	0.50	0.37
2-Propanol		yes	190	1.378	0.63	2.30
Methanol		yes	190	1.329	0.73	0.60
Water		yes	190	1.333	>0.73	1.00
Acetic acid	polar	yes	—	1.372	>0.73	1.22

Summary

Use a systematic approach to isolate and correct your HPLC problems. Table 1 will help solve most of the comm problems encountered in HPLC. You should also refer to the maintenance and troubleshooting sections of your instrun manual.

Several newer HPLC systems hav elf-diagnostic capabilities that help to isolate the problem area. For persis problems relating to the column or analysis, contact our Technical Service Department.