

Troubleshooting LC: riconoscere e risolvere i cali di prestazione

- Consigli per ripristinare la stabilità della linea di base.
- Linee guida per diagnosticare e risolvere i problemi comuni relativi al picco.
- Procedure di lavoro ottimali per gestire la contropressione del sistema.

Ogni strumento e ogni metodo prima o poi presenta un calo delle prestazioni, per cui è necessario effettuare un troubleshooting LC, la cui premessa fondamentale è capire cosa significa avere un cromatogramma “normale”. Documentando accuratamente le prove di qualifica degli strumenti, gli interventi di manutenzione e i risultati dei test di idoneità del sistema è possibile creare un elemento di confronto fondamentale per definire gli intervalli normali e scoprire l'origine dei problemi. Per esempio, ripetere un test di accuratezza della velocità di flusso e confrontarlo con i valori precedenti può aiutare a comprendere se un problema di velocità di flusso è la causa principale delle variazioni del tempo di ritenzione. In questo articolo affronteremo i problemi comuni legati alla variazione della linea di base, ai picchi cromatografici e alla pressione del sistema, suggerendo strategie concrete per risolverli. Attieniti a queste linee guida generali unitamente ai manuali delle attrezzature e alle procedure operative standard del tuo laboratorio per rimettere in funzione il tuo strumento in modo veloce ed efficace.

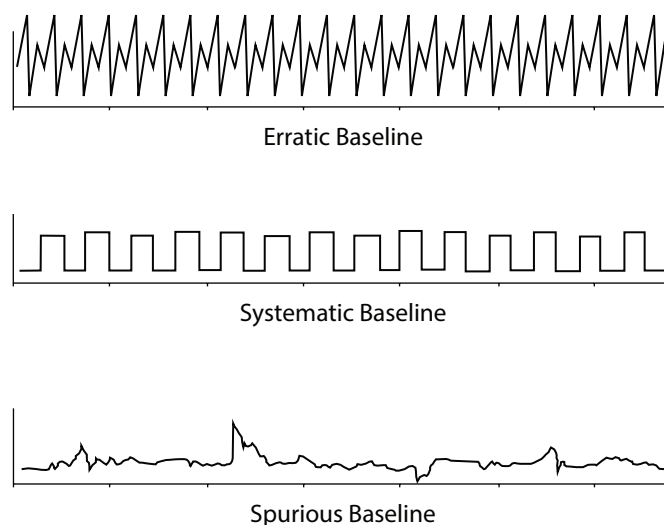
Ripristinare la stabilità della linea di base

Nei laboratori LC non è raro trovare una linea di base instabile. La variazione può essere causata da diversi fattori, e determinare se esiste uno schema può aiutare a stabilirne l'origine (Figura 1). Una linea di base irregolare è probabilmente causata da una perdita o una bolla d'aria, quindi per stabilizzarla dovrebbe essere sufficiente controllare tutti i raccordi, accertarsi del funzionamento del degasatore e spurgare il sistema con una fase mobile nuova. Se utilizzi un rivelatore UV, una linea di base rumorosa può anche indicare che è ora di cambiare la cella di flusso o la lampada del rivelatore. Se invece le variazioni della linea di base sono regolari, può essere un problema della pompa o del pistone, e la manutenzione ordinaria di queste parti dovrebbe risolvere il problema. Infine, se nel complesso la linea di base ha un cattivo aspetto, si consiglia una pulizia approfondita del sistema. Si ricorda che anche le variazioni della temperatura ambiente possono causare fluttuazioni della linea di base, quindi le prestazioni possono essere ripristinate anche utilizzando un fornetto per colonne o isolando la colonna e le linee.

Prodotti correlati

- Filtri siringa con ingresso Luer Lock
- Vial filtranti standard Thomson SINGLE StEP
- Regolatori di contropressione
- Filtro per solvente in vetro Bluestem
- Degasatore di fase mobile DEGASi PLUS
- Tubi capillari in acciaio inossidabile LC
- Tubi in PEEK

Figura 1: Linee di base anomale che si incontrano comunemente durante il troubleshooting LC.



Troubleshooting relativo al picco

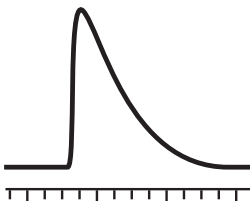
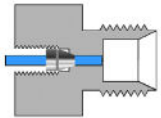
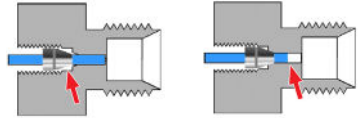
Il troubleshooting relativo al picco è necessario sia nel corso dell'analisi ordinaria che durante lo sviluppo del metodo, ma le variazioni ammesse in queste due situazioni sono diverse. I problemi legati a forme del picco di bassa qualità, ridotta sensibilità e scarsa ritenzione che si sviluppano nel tempo in un metodo consolidato, indicano che si è verificata una variazione (per esempio: perdita nell'impianto, degradazione della fase mobile, contaminazione della precolonna, ecc.), ma un'opportuna manutenzione dovrebbe consentire di ripristinare le prestazioni. Tuttavia alcuni dei suggerimenti illustrati di seguito, quali l'aggiunta di un tampone alla fase mobile o la modifica della temperatura della colonna, non dovrebbero essere messi in pratica durante l'analisi ordinaria, perché potrebbero richiedere un'ulteriore validazione prima dell'implementazione.

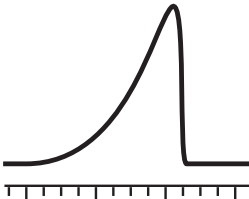
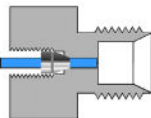
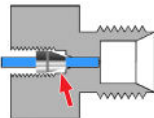
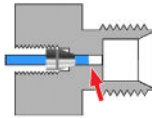
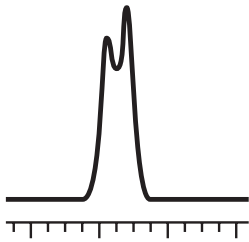
Al contrario, i problemi relativi al picco riscontrati durante lo sviluppo del metodo indicano che possono essere necessarie ulteriori variazioni dei parametri del metodo, e vi sono maggiori opportunità di miglioramento rispetto a quelle offerte da un metodo consolidato. Durante lo sviluppo del metodo, oltre a seguire le linee guida per il troubleshooting LC sotto riportate, è possibile ottimizzare il metodo di preparazione del campione, la fase stazionaria della colonna e le condizioni analitiche per le matrici e i composti da analizzare. Quando si effettuano modifiche per migliorare i picchi cromatografici, è importante innanzitutto comprendere quali fattori possono o non possono essere modificati in base alle procedure operative standard del laboratorio.

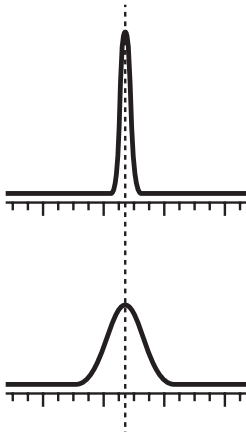
Migliorare le forme del picco di bassa qualità

Picchi alti e simmetrici migliorano l'accuratezza e la sensibilità, ma numerosi fattori possono causare lo scodamento (tailing), il fronting, lo sdoppiamento e l'allargamento dei picchi. Questi tipi di distorsioni del picco comportano spesso altri problemi, quali la variazione dei tempi di ritenzione o la coeluizione. Se si osservano forme del picco distorte durante l'analisi ordinaria o lo sviluppo del metodo, i consigli per il troubleshooting LC riportati nella Tabella I aiutano a diagnosticare il problema sulla base dei segnali visibili nel cromatogramma.

Tabella I: Consigli per il troubleshooting LC per migliorare la forma del picco.

Segno	Causa	Soluzione								
<div>Scodamento dei picchi</div> <div></div>	Sovraccarico della colonna	<div>Iniettare una quantità inferiore di massa (diluire il campione o ridurre il volume di iniezione). Si ricorda che il volume di iniezione è limitato dalle dimensioni della colonna. Le linee guida generali per intervalli accettabili sono indicate di seguito:</div> <table><tr><th>ID colonna</th><th>Volume (µL)</th></tr><tr><td>2,1 mm (lunghezza 30-100 mm)</td><td>1-3</td></tr><tr><td>3,0-3,2 mm (lunghezza 50-150 mm)</td><td>2-12</td></tr><tr><td>4,6 mm (lunghezza 50-250 mm)</td><td>8-40</td></tr></table>	ID colonna	Volume (µL)	2,1 mm (lunghezza 30-100 mm)	1-3	3,0-3,2 mm (lunghezza 50-150 mm)	2-12	4,6 mm (lunghezza 50-250 mm)	8-40
ID colonna	Volume (µL)									
2,1 mm (lunghezza 30-100 mm)	1-3									
3,0-3,2 mm (lunghezza 50-150 mm)	2-12									
4,6 mm (lunghezza 50-250 mm)	8-40									
	Colonna usurata o degradata	Sebbene opportuni accorgimenti consentano di massimizzare la durata della colonna LC, le colonne sono consumabili che prima o poi devono essere sostituiti. Prestazioni cromatografiche di scarsa qualità possono essere il segnale che è giunto il momento di sostituire la colonna. Ma prima di procedere in tal senso è opportuno cercare di rigenerarla seguendo la procedura descritta nella Tabella II.								
	Contaminazione	<ul style="list-style-type: none">Preparare nuove soluzioni per escludere il rischio di soluzioni degradate o preparate in modo errato.Sciacquare la colonna analitica seguendo la procedura di pulizia raccomandata dal produttore.Sostituire regolarmente le precolonne, accertandosi che corrispondano alla fase della colonna analitica.In caso di utilizzo di analizzatori MS, assicurarsi di utilizzare solventi e additivi di grado LC-MS.								
	Interazioni con il silanolo sulla superficie della silice	<div>Aggiungere un tampone alla fase mobile (ripartendo equamente la componente acquosa e quella organica) per bloccare i siti attivi sulla superficie della silice.</div> <div>La soluzione tampone può essere preparata mescolando un acido debole con il sale della sua base coniugata. Quando si utilizza l'acido formico, usare il formiato di ammonio per tamponare la soluzione, mentre quando si utilizza l'acido acetico, usare l'acetato di ammonio.</div>								
	Componenti della matrice interferenti/coeluenti	<ul style="list-style-type: none">Analizzare uno standard preparato in solvente per confronto.Filtrare gli estratti del campione.Valutare l'aggiunta o la modifica della procedura di preparazione del campione per produrre estratti più puliti.								
	Eccessivo volume del sistema	Ridurre il volume del sistema utilizzando sezioni di tubo più corte o tubi con diametro interno inferiore per minimizzare la dispersione del picco. Quando si sostituisce il tubo, è importante realizzare connessioni corrette assicurandosi che il tubo e la ferrula siano completamente inseriti nell'entrata della colonna.								
	Connessioni instabili	<div>Assicurarsi che il tubo e la ferrula siano completamente inseriti nell'entrata della colonna.</div> <div><div><div>Corretto</div><div></div><div>Tubo e ferrula inseriti correttamente</div></div><div><div>Scorretto</div><div></div><div>Ferrula non inserita, con conseguente perdita</div><div>Tubo non inserito, con conseguente volume morto</div></div></div>								

Segno	Causa	Soluzione								
Fronting dei picchi 	Incompatibilità tra i solventi (probabile soprattutto in caso di fronting dei picchi a eluizione rapida)	Diluire il campione in una composizione del solvente uguale (o più debole) rispetto alla composizione della fase mobile iniziale. Cercare di far corrispondere sia il rapporto tra la componente acquosa e quella organica sia la forza del tampone.								
	Colonna usurata o degradata	Sebbene opportuni accorgimenti consentano di massimizzare la durata della colonna LC, le colonne sono consumabili che prima o poi devono essere sostituiti. Prestazioni cromatografiche di scarsa qualità possono essere il segnale che è giunto il momento di sostituire la colonna. Ma prima di procedere in tal senso è opportuno cercare di rigenerarla seguendo la procedura descritta nella Tabella II.								
	Contaminazione	<ul style="list-style-type: none">Preparare nuove soluzioni per escludere il rischio di soluzioni degradate o preparate in modo errato.Sciacquare la colonna analitica seguendo la procedura di pulizia raccomandata dal produttore.Sostituire regolarmente le precolonne, accertandosi che corrispondano alla fase della colonna analitica.In caso di utilizzo di analizzatori MS, assicurarsi di utilizzare solventi e additivi di grado LC-MS.								
	Sovraccarico della colonna	<p>Iniettare una quantità inferiore di massa (diluire il campione o ridurre il volume di iniezione). Si ricorda che il volume di iniezione è limitato dalle dimensioni della colonna. Le linee guida generali per intervalli accettabili sono indicate di seguito:</p> <table><tr><th>ID colonna</th><th>Volume (µL)</th></tr><tr><td>2,1 mm (lunghezza 30-100 mm)</td><td>1-3</td></tr><tr><td>3,0-3,2 mm (lunghezza 50-150 mm)</td><td>2-12</td></tr><tr><td>4,6 mm (lunghezza 50-250 mm)</td><td>8-40</td></tr></table>	ID colonna	Volume (µL)	2,1 mm (lunghezza 30-100 mm)	1-3	3,0-3,2 mm (lunghezza 50-150 mm)	2-12	4,6 mm (lunghezza 50-250 mm)	8-40
	ID colonna	Volume (µL)								
2,1 mm (lunghezza 30-100 mm)	1-3									
3,0-3,2 mm (lunghezza 50-150 mm)	2-12									
4,6 mm (lunghezza 50-250 mm)	8-40									
Componenti della matrice interferenti/coeluenti	<ul style="list-style-type: none">Analizzare uno standard preparato in solvente per confronto.Filtrare gli estratti del campione.Valutare l'aggiunta o la modifica della procedura di preparazione del campione per produrre estratti più puliti.									
Connessioni instabili	<p>Assicurarsi che il tubo e la ferrula siano completamente inseriti nell'entrata della colonna.</p> <div><div><p>Corretto</p><p>Tubo e ferrula inseriti correttamente</p></div><div><p>Scorretto</p><p>Ferrula non inserita, con conseguente perdita</p></div><div><p>Scorretto</p><p>Tubo non inserito, con conseguente volume morto</p></div></div>									
Sdoppiamento dei picchi 	Incompatibilità tra i solventi	Diluire il campione in una composizione del solvente uguale (o più debole) rispetto alla composizione della fase mobile iniziale.								
	Problema di solubilità	Assicurarsi che il campione sia completamente solubile sia nel solvente del campione che nella fase mobile per impedire la precipitazione.								
	Contaminazione	<ul style="list-style-type: none">Preparare nuove soluzioni per escludere il rischio di soluzioni degradate o preparate in modo errato.Sciacquare la colonna analitica seguendo la procedura di pulizia raccomandata dal produttore.Sostituire regolarmente le precolonne, accertandosi che corrispondano alla fase della colonna analitica.In caso di utilizzo di analizzatori MS, assicurarsi di utilizzare solventi e additivi di grado LC-MS.								

Segno	Causa	Soluzione								
<p>Picchi ampi</p> 	Sovraccarico della colonna	<p>Iniettare una quantità inferiore di massa (diluire il campione o ridurre il volume di iniezione). Si ricorda che il volume di iniezione è limitato dalle dimensioni della colonna. Le linee guida generali per intervalli accettabili sono indicate di seguito:</p> <table><tr><th>ID colonna</th><th>Volume (µL)</th></tr><tr><td>2,1 mm (lunghezza 30-100 mm)</td><td>1-3</td></tr><tr><td>3,0-3,2 mm (lunghezza 50-150 mm)</td><td>2-12</td></tr><tr><td>4,6 mm (lunghezza 50-250 mm)</td><td>8-40</td></tr></table>	ID colonna	Volume (µL)	2,1 mm (lunghezza 30-100 mm)	1-3	3,0-3,2 mm (lunghezza 50-150 mm)	2-12	4,6 mm (lunghezza 50-250 mm)	8-40
	ID colonna	Volume (µL)								
	2,1 mm (lunghezza 30-100 mm)	1-3								
	3,0-3,2 mm (lunghezza 50-150 mm)	2-12								
	4,6 mm (lunghezza 50-250 mm)	8-40								
	Variazione della concentrazione della fase mobile	Realizzare una nuova fase mobile e mantenerla tappata per impedirne l'evaporazione o la contaminazione.								
	Velocità di flusso troppo bassa	Aumentare la velocità di flusso della fase mobile.								
	Dispersione del picco nell'iniettore	Utilizzare un loop di campionamento più piccolo.								
	Ritenzione troppo elevata	<ul style="list-style-type: none">Utilizzare una fase stazionaria meno ritentiva.Provare a eseguire un'eluizione a gradienteSe si utilizza un metodo isocratico, aumentare la forza della fase mobile.Modificare la composizione del tampone.								
	Volume della cella del rivelatore troppo grande o tempo di risposta troppo lungo	Utilizzare una cella più piccola e/o ridurre il tempo di risposta.								
Il volume dell'extra-colonna è troppo elevato	<ul style="list-style-type: none">Utilizzare un tubo più corto con diametro interno inferiore.Utilizzare raccordi ZDV.									
Bassa temperatura della colonna	Aumentare la temperatura.									
Fine della durata della precolonna o della colonna analitica	Sostituire la precolonna e/o la colonna.									
Efficienza della colonna insufficiente	Provare a utilizzare una colonna con particelle più piccole.									
Coeluizione	<ul style="list-style-type: none">La perdita di risoluzione può essere causata dalla degradazione della fase mobile o dalla contaminazione delle precolonne. Preparare una nuova fase mobile e sostituire la precolonna. Se non si riesce a separare il picco coeluente, ripristinare o sostituire la colonna analitica.L'assenza di risoluzione iniziale durante lo sviluppo del metodo indica l'inadeguatezza della selettività della colonna o dei parametri cromatografici. Regolare la fase mobile e la temperatura della colonna o provare una colonna con una diversa selettività della fase stazionaria.									
Perdita	<ul style="list-style-type: none">Verificare l'eventuale presenza di raccordi allentati e, nel caso, effettuarne il serraggio o la sostituzione.Se si riscontrano perdite o precipitati nella pompa, potrebbe essere necessario sostituire le guarnizioni.									

Come gestire una perdita di sensibilità

Una perdita di sensibilità può essere indice di problemi legati alla preparazione del campione o al sistema analitico. Innanzitutto bisogna accertarsi che la procedura di preparazione del campione sia stata eseguita correttamente, anche relativamente al tempo e alla temperatura di stoccaggio, come pure verificare che i parametri del sistema siano impostati correttamente e funzionino nel modo giusto. Prima di ricercare cause più complesse, verificare sempre se vi sono problemi evidenti (per esempio: errori di calcolo/diluizione, ago dell'autocampionatore non inserito nel campione, volume di iniezione sbagliato, impostazioni del rilevatore errate, assenza di flusso della fase mobile, rilevatore o lampada spenti, integrità dello standard di riferimento, ecc.). Un ulteriore controllo del lavoro da parte di un collega può rappresentare un aiuto preziosissimo, perché spesso è più facile per una persona esterna individuare i problemi rispetto a chi è coinvolto nell'attività.

Una volta esclusi i problemi più banali, l'analisi di uno standard noto è uno strumento diagnostico utile per la risoluzione dei problemi LC. Se i risultati rientrano nell'intervallo previsto significa che il sistema funziona correttamente e che il problema risiede nella preparazione o manipolazione del campione. Se invece si registra una bassa risposta anche relativamente allo standard, è probabile che l'origine del problema sia lo strumento. È inoltre possibile che gli analiti siano semplicemente al di fuori dell'intervallo di sensibilità dello strumento. In tal caso è possibile farli rientrare nell'intervallo regolando la concentrazione del campione, ma occorre fare attenzione a non provocare la perdita degli analiti più volatili.

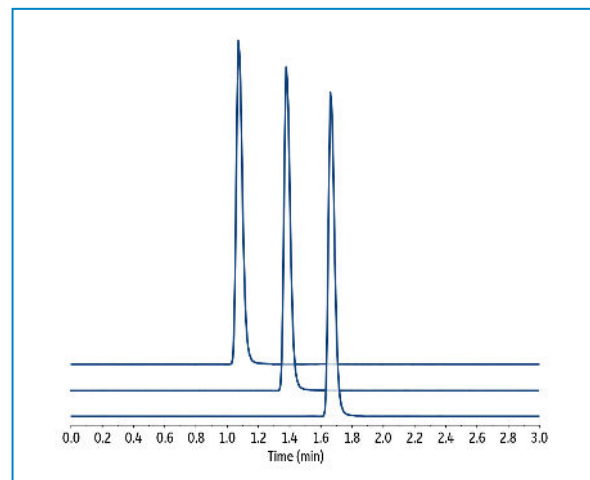
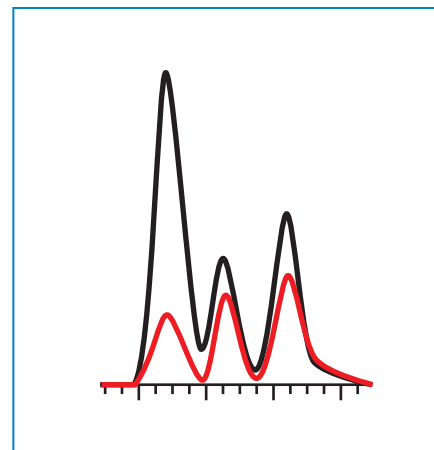
Se una bassa risposta si verifica solo con le prime iniezioni, è possibile che il campione sia adsorbente nei siti attivi del loop di campionamento o della colonna. L'utilizzo di una soluzione passivante o l'effettuazione di alcune iniezioni di campione preliminari per condizionare il sistema e ridurre l'adsorbimento prima dell'analisi effettiva del campione può contribuire a ripristinare la risposta degli analiti. L'eventuale diminuzione della risposta in tutti i picchi è probabilmente causata da errori di calcolo, diluizioni sbagliate o da una riduzione del volume di iniezione dovuta a perdite, malfunzionamenti del sistema, errori di programmazione o utilizzo di un loop di campionamento di dimensioni sbagliate. Se si osserva una perdita di ritenzione molto ingente è possibile che si sia verificata la disidratazione della fase e che si debba rigenerare o sostituire la colonna; tuttavia è un evento relativamente raro rispetto ad altre cause.

Nel caso dell'analisi LC-MS, la perdita di sensibilità potrebbe essere causata da altri fattori, come problemi relativi all'analizzatore MS, quindi è fondamentale verificarne il perfetto funzionamento. L'iniezione diretta della soluzione di tuning nel MS (bypassando il sistema LC) rappresenta una procedura semplice che fornisce informazioni utili per la risoluzione dei problemi. Dato che la perdita di sensibilità del MS può dipendere da diverse cause (per esempio: pulizia dell'ottica, tampone precipitato nell'entrata del MS, necessità di cambiare un moltiplicatore di elettroni, prestazione della sorgente di ionizzazione, tuning dei composti, ecc.), consigliamo di contattare il produttore per avere informazioni specifiche sulla risoluzione dei problemi. La soppressione ionica dovuta alle interferenze della matrice può inoltre causare una scarsa risposta nei sistemi LC-MS, ma per tale problematica sono solitamente necessarie modifiche di metodo rilevanti che possono richiedere una nuova validazione, quali migliori procedure di preparazione del campione, utilizzo di standard interni o accoppiati alla matrice, come pure variazioni della composizione della fase mobile.

Stabilizzazione dei tempi di ritenzione variabili

Per un'accurata identificazione e quantificazione è fondamentale che gli analiti eluiscano sempre nello stesso tempo di ritenzione. Tuttavia non è insolito osservare variazioni dei tempi di ritenzione durante le analisi ordinarie, e le cause possono essere molteplici. Come primo passo nel troubleshooting LC occorre verificare che tutte le impostazioni del metodo siano corrette e che la fase mobile sia stata preparata correttamente (soprattutto se si nota un cambiamento rilevante anziché una leggera variazione). La preparazione di una nuova fase mobile rappresenta una soluzione semplice per eliminare i problemi dovuti a una modifica della composizione in seguito a evaporazione, reazioni, contaminazione o miscelazione incompleta. Inoltre, se si trasferisce un metodo esistente in un nuovo strumento non bisogna trascurare le possibili differenze di volume morto tra gli strumenti, in quanto possono influenzare significativamente il tempo di ritenzione. Altre possibili cause sono le seguenti:

1. Velocità di flusso sbagliata o variabile: confermare manualmente la correttezza della velocità di flusso e verificare l'assenza di perdite nel sistema.
2. Fluttuazioni di temperatura: utilizzare sempre un comparto colonne termostato.
3. Mancata corrispondenza tra solventi: assicurarsi che il solvente del campione sia compatibile con la fase mobile iniziale (cercare di far corrispondere sia il rapporto tra la componente acquosa e quella organica sia la forza del tampone.).
4. Sovraccarico di campione: non iniettare una quantità di campione superiore alla capacità della colonna.



5. Contaminazione/ostruzione della colonna: sciacquare la colonna per rimuovere l'eventuale particolato, soprattutto in caso di sovrappressione elevata. Se questa procedura non funziona, forse è il momento di sostituire la colonna. Si raccomanda di utilizzare una precolonna per minimizzare la contaminazione e massimizzare la durata della colonna.
6. Interferenze della matrice: analizzare uno standard di solvente e confrontarlo con il campione per vedere se i picchi non costanti sono effettivamente componenti della matrice.
7. Equilibratura della colonna insufficiente: aumentare l'intervallo di tempo tra le corse; si raccomanda un tempo sufficiente per il passaggio di 10 volumi di colonna. Nota: L'equilibratura della colonna potrebbe richiedere più tempo nelle analisi HILIC.
8. Bolle d'aria: spurgare l'aria dalla pompa e accertarsi che la fase mobile sia degassata. Controllare le guarnizioni della pompa e sostituirle in caso di perdite evidenti.

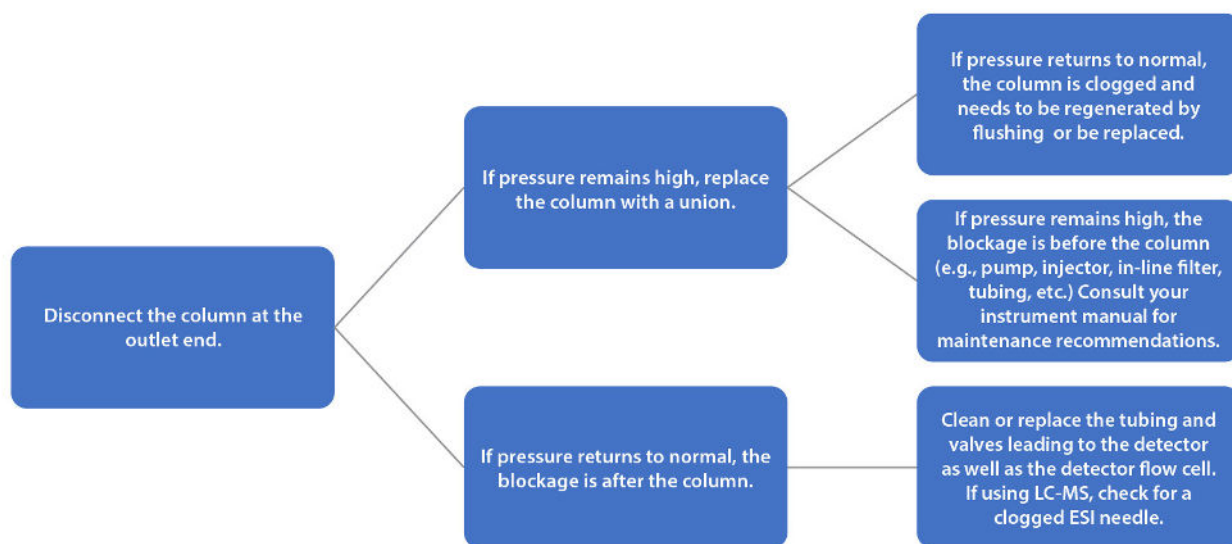
Ogni tanto, durante l'analisi possono apparire improvvisamente picchi fantasma. Questo fenomeno può essere verificato effettuando un'iniezione di solvente dopo un'iniezione di campione. Se compare un picco, si tratterà probabilmente di un picco a eluizione tardiva derivante dalla precedente iniezione di campione. In questo caso, il problema del carryover potrebbe essere eliminato aumentando la velocità di flusso, prolungando il tempo della corsa o aggiungendo una fase con gradiente. È possibile ridurre il rischio di carryover anche minimizzando il volume extra-sistema realizzando il collegamento idraulico dell'LC con tubi più corti e di diametro inferiore e connessioni ZDV in modo da ridurre i punti in cui il campione può accumularsi. Inoltre, per ridurre il carryover è importante tenere conto dei solventi e dei parametri di lavaggio dell'ago. I picchi fantasma possono essere causati anche dalla contaminazione della fase mobile, della precolonna o della colonna analitica. Questo problema può essere risolto preparando una fase mobile nuova e degassata, e sostituendo la precolonna e la colonna analitica (dopo averla risciacquata secondo la procedura di pulizia raccomandata dal produttore).

Ripristino della normale pressione di sistema

Diagnosticare la causa dell'aumento della contropressione

L'aumento della contropressione è uno dei problemi più comuni nel troubleshooting LC, ma è importante ricordare che non tutti i cambiamenti di pressione indicano che qualcosa non va. Per esempio, durante le analisi di gradiente la pressione cambia con l'aumentare della viscosità della fase mobile (viscosità massima: ~50:50 per metanolo:acqua e ~20:80 per acetone:acqua). Pertanto per diagnosticare un problema è importante conoscere le condizioni di impostazione normali. È inoltre fondamentale operare entro i limiti di pressione dell'LC (per esempio, non utilizzare colonne <2,7 µm in strumenti con un limite di 400 bar). La presenza di una contropressione eccessivamente alta è indice di un'ostruzione nel sistema, e per risolvere il problema bisogna innanzitutto identificarne la posizione isolando le fonti potenziali una alla volta secondo la procedura indicata nella Figura 2.

Figura 2: Fasi del troubleshooting LC per localizzare le ostruzioni del sistema che provocano un aumento della contropressione.



Rimozione di ostruzioni e contaminanti della colonna

Un aumento della contropressione e una riduzione delle prestazioni cromatografiche possono indicare una contaminazione o un'ostruzione della colonna. Il risciacquo della colonna e la prevenzione di possibili ostruzioni future seguendo le linee guida indicate di seguito può risolvere il problema ed estendere la durata della colonna analitica.

Trattamento

Sciacquare con una serie di solventi le colonne HPLC e UHPLC nella direzione indicata sulla colonna può essere un metodo efficace per rimuovere il particolato e i contaminanti chimici che hanno provocato le ostruzioni. Utilizzare un minimo di 20 volumi di colonna di ciascun solvente e sciacquare nell'ordine indicato nella Tabella II riportata di seguito. Dopo la rigenerazione, conservare sempre la colonna nel solvente consigliato dal produttore.

Tabella II: Sequenza di solventi per il risciacquo della colonna

Colonne a fase inversa	Colonne a fase normale
1. Water:methanol (95:5 v/v)	1. Isopropyl alcohol
2. Methanol	2. <i>n</i> -Hexane
3. Isopropyl alcohol	3. Ethanol
4. <i>n</i> -Hexane	4. Original mobile phase
5. Isopropyl alcohol	
6. Methanol	
7. Water:methanol (95:5 v/v)	
8. Original mobile phase	

Prevenzione

- Usare sempre fasi mobili nuove e filtrate per rimuovere il particolato e impedire una proliferazione batterica. Tenere chiusi i flaconi della fase mobile per evitare contaminazioni. In caso di utilizzo di analizzatori MS, assicurarsi di utilizzare solventi e additivi di grado LC-MS.
- Filtrare i campioni per rimuovere il particolato della matrice; l'uso di filtri siringa e vial filtranti facilita la procedura.
- Assicurarsi che il solvente del campione e le fasi mobili siano compatibili. La mancata corrispondenza tra i solventi può causare la precipitazione di componenti del campione o di sali tampone con conseguenti ostruzioni.
- Utilizzare una precolonna o un filtro precolonna per proteggere la colonna analitica. Scegliere sempre un sistema di precolonne e una fase corrispondenti alla colonna analitica.
- Ispezionare regolarmente le guarnizioni della pompa, i rotori dell'iniettore automatico, i filtri in linea e i supporti dell'ago, e sostituirli prima che la normale usura ne causi la rottura con conseguente dispersione di particelle nel flusso.

Sebbene meno frequentemente, talvolta può accadere di rilevare pressioni troppo basse, che solitamente sono causate da perdite, quindi è necessario controllare accuratamente i raccordi e la pompa per individuare eventuali segni di umidità o precipitati. Se nonostante il serraggio o la sostituzione dei raccordi non è possibile risolvere il problema, potrebbe essere giunto il momento di sostituire le guarnizioni della pompa. Il calo di pressione può essere provocato anche dall'intrappolamento di bolle d'aria o dal blocco di una valvola di ritegno, ma è generalmente possibile risolvere entrambi gli inconvenienti risciacquando il sistema con una fase mobile degassata o un solvente idoneo, come l'alcol isopropilico. Se questa procedura non risolve il problema, forse è il momento di sostituire le valvole di ritegno. Alcune perdite potrebbero essere dovute a graffi sulla guarnizione del rotore nelle valvole a sei porte. La perdita potrebbe non essere visibile, ma causerà una riduzione della pressione e del flusso. Quando si ricercano perdite o si misura la precisione della velocità di flusso, assicurarsi di utilizzare una colonna vecchia o un restrittore di flusso. Oltre a cali di pressione, le perdite possono causare anche altri problemi cromatografici, quali una maggiore ritenzione, una riduzione del segnale o addirittura un blocco dello strumento automatico. Per prevenire questi problemi, controllare quotidianamente i raccordi per accertare l'assenza di residui e pulire i tubi con una velina da laboratorio per eliminare qualsiasi traccia di umidità. Riserrare delicatamente i raccordi e sostituire regolarmente tubi, raccordi e guarnizioni nell'ambito di un programma di manutenzione ordinaria rappresenta una buona prassi per prevenire perdite ingenti e conseguenti tempi di inattività. La guida alla manutenzione ordinaria LC di Restek è un utile punto di partenza per lo sviluppo o il perfezionamento di un programma di manutenzione.

Riepilogo

Il troubleshooting LC è fondamentale per la produzione di dati accurati e affidabili. Sebbene le cause potenziali di scarse prestazioni siano molteplici, osservando attentamente i segnali cromatografici, analizzando singolarmente tutte le possibili cause e facendo un confronto con le condizioni "normali" è possibile individuare velocemente ed efficacemente la causa principale. Infine, trasferendo tutto quanto appreso in un programma di manutenzione ordinaria è possibile prevenire problemi futuri e garantire una maggiore efficienza dello strumento.

Filtri siringa con ingresso Luer Lock

- L'ingresso Luer Lock offre una connessione a tenuta con la siringa.
- Vari tipi di filtri, porosità e diametri.
- Codifica di colori per una facile identificazione.
- Alloggiamento robusto in polipropilene.
- Autoclavabile a 121 °C per 15 minuti.
- Sconto quantità per un maggiore risparmio.

Nota: Filtri siringa per uso esclusivo di laboratorio.

Descrizione	Colore	Diametro	Porosità	qtà.	cat.#
Acetato di cellulosa					
Filtro siringa	Verde	4 mm	0,22 µm	100 pz.	23972
	Blu	4 mm	0,45 µm	100 pz.	23973
	Rosso	30 mm	0,22 µm	100 pz.	23982
	Rosso	30 mm	0,45 µm	100 pz.	23983
	Rosso	13 mm	0,45 µm	100 pz.	26155
	Rosso	13 mm	0,22 µm	100 pz.	26156
	Rosso	25 mm	0,45 µm	100 pz.	26157
	Rosso	25 mm	0,22 µm	100 pz.	26158
Nylon					
Filtro siringa	Giallo	4 mm	0,22 µm	100 pz.	23970
	Rosa	4 mm	0,45 µm	100 pz.	23971
	Rosa	30 mm	0,22 µm	100 pz.	23980
	Rosa	30 mm	0,45 µm	100 pz.	23981
	Rosa	13 mm	0,22 µm	100 pz.	26146
	Rosa	13 mm	0,45 µm	100 pz.	26147
	Rosa	25 mm	0,22 µm	100 pz.	26148
	Rosa	25 mm	0,45 µm	100 pz.	26149
PES (polietersulfone)					
Filtro siringa	Verde	13 mm	0,22 µm	100 pz.	23966
	Verde	13 mm	0,45 µm	100 pz.	23967
	Verde	25 mm	0,22 µm	100 pz.	23968
	Verde	25 mm	0,45 µm	100 pz.	23969
	Bianco	4 mm	0,22 µm	100 pz.	23978
	Blu	4 mm	0,45 µm	100 pz.	23979
	Verde	30 mm	0,22 µm	100 pz.	23988
	Verde	30 mm	0,45 µm	100 pz.	23989
PP (polipropilene)					
Filtro siringa	Blu	25 mm	0,22 µm	100 pz.	28935 NEW!
	Nero	25 mm	0,45 µm	100 pz.	28936 NEW!
PTFE (politetrafluoroetilene)					
Filtro siringa	Viola	4 mm	0,22 µm	100 pz.	23974
	Arancione	4 mm	0,45 µm	100 pz.	23975
	Bianco	30 mm	0,22 µm	100 pz.	23984
	Bianco	30 mm	0,45 µm	100 pz.	23985
	Bianco	13 mm	0,22 µm	100 pz.	26142
	Bianco	13 mm	0,45 µm	100 pz.	26143
	Bianco	25 mm	0,22 µm	100 pz.	26144
	Bianco	25 mm	0,45 µm	100 pz.	26145
PVDF (polivinilidenefluoruro)					
Filtro siringa	Marrone	4 mm	0,22 µm	100 pz.	23976
	Rosso	4 mm	0,45 µm	100 pz.	23977
	Blu	30 mm	0,22 µm	100 pz.	23986
	Blu	30 mm	0,45 µm	100 pz.	23987
	Blu	13 mm	0,22 µm	100 pz.	26150
	Blu	13 mm	0,45 µm	100 pz.	26151
	Blu	25 mm	0,22 µm	100 pz.	26152
	Blu	25 mm	0,45 µm	100 pz.	26153

Acetato di cellulosa, Nylon, PES, applicazioni del PVDF idrofobico

PP (polipropilene), applicazioni del PTFE idrofobico

Filtri siringa per uso esclusivo di laboratorio.



Riduzione dei costi, non della qualità!

Note sugli ordini

Prezzo per conf. da 100. Possibili sconti di prezzo per confezioni da 5 e 10.
Il prezzo preciso sarà indicato in fattura.

Confezioni di campioni GRATUITI disponibili. Utilizza queste pratiche confezioni per lo sviluppo del metodo o per un confronto con la marca che utilizzi abitualmente. Richiedile oggi aggiungendo -248 al codice del componente. Gli ordini di confezioni di campioni non possono essere trasmessi online: telefonaci! Max. 1 confezione di campioni a cliente.



Elimina facilmente il particolato e i contaminanti dal campione!

Vial filtranti standard Thomson SINGLE StEP

- Consigliati per i campioni che contengono meno del 10% di particolato solido.
- Vial di facile utilizzo per una filtrazione del campione veloce con una semplice pressione delle dita.
- Minimizzano la perdita di campione eliminando i trasferimenti multipli.
- I tappi codificati per colore consentono di identificare facilmente le membrane da 0,2 µm o 0,45 µm in PVDF, PTFE, PES o nylon.
- I tappi in silicone/PTFE pretagliati consentono di eliminare gli aghi dell'autocampionatore rotti e i setti bucati.
- Il robusto vial in polipropilene contiene un inserto con capacità di carico di 450 µL e basso volume morto (120 µL).
- Adatti per la maggior parte degli autocampionatori standard di 12 x 32 mm, inclusi gli strumenti UHPLC.

Descrizione	Colore	Porosità	qtà.	cat.#
Nylon				
Vial filtrante standard Thomson SINGLE StEP	tappo pretagliato nero	0,2 µm	100 pz.	25891
	tappo pretagliato rosa	0,45 µm	100 pz.	25892
PES (polietersolfone)				
Vial filtrante standard Thomson SINGLE StEP	tappo pretagliato grigio	0,2 µm	100 pz.	25897
PTFE (politetrafluoroetilene)				
Vial filtrante standard Thomson SINGLE StEP	tappo pretagliato verde	0,2 µm	100 pz.	25893
	tappo pretagliato blu	0,45 µm	100 pz.	25894
PVDF (polivinilidenefluoruro)				
Vial filtrante standard Thomson SINGLE StEP	tappo pretagliato rosso	0,2 µm	100 pz.	25895
	tappo pretagliato giallo	0,45 µm	100 pz.	25896

Brevetto n° 7.790.117



Regolatori di contropressione

I regolatori di contropressione possono migliorare le prestazioni del rilevatore impedendo la formazione di bolle nella cella di flusso. Inoltre sono utili nelle linee di reazione post-colonna e tra i rilevatori e i collettori di frazioni durante l'attività preparatoria. I regolatori rappresentano una soluzione migliore rispetto ad alternative più specifiche, come i tubi di piccolo diametro, in cui la pressione varia con la velocità di flusso.

Descrizione	qtà.	cat.#
Regolatore di contropressione: fine linea, tubo OD 1/16", flangiato	cad.	25017
Regolatore di contropressione: fine linea, tenuta ad alta pressione	cad.	25018
Regolatore di contropressione: flusso continuo, volume interno di 5 µL	cad.	25020

Filtro per solvente in vetro Bluestem

- Il filtro per solvente in vetro Bluestem di Restek assicura una fase mobile pulita per una maggiore durata delle colonne e delle guarnizioni della pompa.
- Il frit da 15 µm in vetro borosilicato si trova più in basso dei tradizionali filtri in vetro per trascinare più fase mobile da ogni bottiglia.
- Lo stelo del filtro di colore blu consente la conferma visiva istantanea dell'orientamento verticale del filtro.
- Si collega al tubo in PTFE standard 1/8" OD (3,2 mm) utilizzando l'adattatore frit esistente. Per ottenere le migliori prestazioni, raccomandiamo di utilizzare l'adattatore frit di Restek (venduto separatamente come cat.# 26392).



26431

Descrizione	qtà.	Simile al componente n°	cat.#
Adattatore Frit in PTFE	4 pz.	Agilent 5062-8517	26392
Filtro per solvente in vetro, frit da 15 µm	cad.	Agilent 5041-2168	26431

Degasatore di fase mobile DEGASi PLUS

Efficienza di degasificazione estremamente elevata in un'unità robusta e di piccole dimensioni.

- Il sistema di controllo brevettato ZHCR (RPM variabile) mantiene il vuoto costante per eliminare le fluttuazioni della linea di base.
- La membrana Systec AF è altamente permeabile ai gas, consentendo un volume di camera ridotto pari a 480 µL per un rapido avvio ed equilibratura.
- La linea di flusso è biocompatibile e offre un'ampia compatibilità chimica.
- Monitoraggio continuo del sistema di vuoto per garantire sempre condizioni operative ottimali.
- Funzioni avanzate di controllo delle perdite e degli errori (vedere manuale di istruzioni).
- Adatto per l'utilizzo con qualsiasi sistema HPLC.
- Conforme alle direttive RoHS e CE.

Descrizione	Tensione	qtà.	cat.#
Degasatore di fase mobile DEGASi PLUS	110 – 240 V	cad.	25839



25839

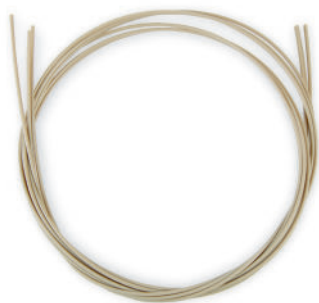
Tubi capillari in acciaio inox LC

- acciaio inox di grado 316.
- Lunghezze precise pretagliate.
- Finitura superficiale pulita e liscia.
- Codifica di colori per una facile identificazione.
- Tolleranza ristretta: OD e ID +/-0,001".

Per sostituire i tubi di sistema nell'ambito del troubleshooting o ridurre il volume morto del sistema nel passaggio a colonne più strette, Restek offre tubi di qualità in tutte le lunghezze e ID richiesti. Ogni ID è codificato per colore per facilitarne la corretta identificazione e sostituzione. Grazie al taglio di precisione, il tubo presenta estremità pulite, squadrate e prive di ovalità.



Colore	ID	OD	Lunghezza	Materiale	Pressione massima	qtà.	cat.#
Rosso	0,005" (0,127 mm)	1/16"	5 cm	Acciaio inox di grado 316	27.850 psi	3 pz.	25813
Rosso	0,005" (0,127 mm)	1/16"	10 cm	Acciaio inox di grado 316	27.850 psi	3 pz.	25814
Rosso	0,005" (0,127 mm)	1/16"	20 cm	Acciaio inox di grado 316	27.850 psi	3 pz.	25815
Rosso	0,005" (0,127 mm)	1/16"	30 cm	Acciaio inox di grado 316	27.850 psi	3 pz.	25816
Giallo	0,007" (0,178 mm)	1/16"	5 cm	Acciaio inox di grado 316	26.610 psi	3 pz.	25817
Giallo	0,007" (0,178 mm)	1/16"	10 cm	Acciaio inox di grado 316	26.610 psi	3 pz.	25818
Giallo	0,007" (0,178 mm)	1/16"	20 cm	Acciaio inox di grado 316	26.610 psi	3 pz.	25819
Giallo	0,007" (0,178 mm)	1/16"	30 cm	Acciaio inox di grado 316	26.610 psi	3 pz.	25820
Blu	0,010" (0,254 mm)	1/16"	5 cm	Acciaio inox di grado 316	25.160 psi	3 pz.	25821
Blu	0,010" (0,254 mm)	1/16"	10 cm	Acciaio inox di grado 316	25.160 psi	3 pz.	25822
Blu	0,010" (0,254 mm)	1/16"	20 cm	Acciaio inox di grado 316	25.160 psi	3 pz.	25823
Blu	0,010" (0,254 mm)	1/16"	30 cm	Acciaio inox di grado 316	25.160 psi	3 pz.	25824
Arancione	0,020" (0,508 mm)	1/16"	5 cm	Acciaio inox di grado 316	20.230 psi	3 pz.	25825
Arancione	0,020" (0,508 mm)	1/16"	10 cm	Acciaio inox di grado 316	20.230 psi	3 pz.	25826
Arancione	0,020" (0,508 mm)	1/16"	20 cm	Acciaio inox di grado 316	20.230 psi	3 pz.	25827
Arancione	0,020" (0,508 mm)	1/16"	30 cm	Acciaio inox di grado 316	20.230 psi	3 pz.	25828



27746

Tubi in PEEK

- Ideali per essere collegati o inseriti in sistemi HPLC.
- OD 1/16" in lunghezze di 3 e 10 metri.
- Meno permeabili all'ossigeno e più resistenti alle temperature rispetto ai tubi in PTFE o Tefzel.
- Facili da tagliare a lunghezza con la tagliatubi clean-cut (cat.# 25069).
- Adatti per l'utilizzo con raccordi in PEEK da serrare a mano o senza flangia.
- Utilizzare tubi $\leq 0,007"$ fino a 7000 psi e tubi ID $\geq 0,010"$ fino a 5000 psi

Colore	ID	OD	Lunghezza	Pressione massima	qtà.	Simile al componente n°	cat.#
Naturale	0,0025"	1/16"	1 m	7000 psi	3 pz.	VICI JR-T-5764-M1	27746
Striscia rossa	0,005"	1/16"	3 m	7000 psi	cad.	Agilent 5042-6461; Grace 5131751, AL35720; VICI JR-T-5999-M3	27747
Striscia rossa	0,005"	1/16"	10 m	7000 psi	cad.	VICI JT-T-5999-M10	27748
Striscia gialla	0,007"	1/16"	3 m	7000 psi	cad.	Agilent 0890-1763; Grace 5131753, AL35722; VICI JR-T-6000-M3	27749
Striscia gialla	0,007"	1/16"	10 m	7000 psi	cad.	VICI JR-T-6000-M10	27750
Striscia blu	0,010"	1/16"	3 m	5000 psi	cad.	Grace 5131759, AL35728; VICI JR-T-6001-M3	27751
Striscia blu	0,010"	1/16"	10 m	5000 psi	cad.	VICI JR-T-6001-M10	27752
Striscia arancione	0,020"	1/16"	3 m	5000 psi	cad.	Grace 5131757, AL35726; VICI JR-T-6002-M3	27753
Striscia arancione	0,020"	1/16"	10 m	5000 psi	cad.	VICI JR-T-6002-M10	27754
Striscia verde	0,030"	1/16"	3 m	5000 psi	cad.	VICI JR-T-6003-M3	27755
Striscia verde	0,030"	1/16"	10 m	5000 psi	cad.	VICI JR-T-6003-M10	27756