



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

Έλεγχος και Διασφάλιση Ποιότητας

Ενότητα 6: Έλεγχος επίδοσης συστήματος HPLC

Κουμπάρης Μιχαήλ

Τμήμα Χημείας

Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας

ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΔΟΣΗΣ / ΔΙΑΚΡΙΒΩΣΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΗPLC (1)

- Περιλαμβάνει έλεγχο:
 - Συστήματος παροχής διαλυτών
 - Ακρίβειας ταχύτητας ροής
 - Ακρίβειας και σταθερότητας σύστασης κινητής φάσης σε βαθμιδωτή έκλουση
 - Έλεγχο επαναληψιμότητας εισαγόμενου όγκου και επιμόλυνσης συστήματος έγχυσης
 - Έλεγχο θερμοκρασίας αυτόματου δειγματολήπτη
 - Έλεγχο ρύθμισης θερμοκρασίας φούρνου στηλών
 - Έλεγχος ανιχνευτή (UV / PDA (διάταξης φωτοδιόδων))
 - Γραμμικότητα
 - Ακρίβεια μήκους κύματος



Έλεγχος Συστήματος Παροχής Διαλυτών

- Έλεγχος Ακρίβειας Ταχύτητας Ροής:

Μετρείται με διακριβωμένο χρονόμετρο, ο απαιτούμενος χρόνος (sec) για την πλήρωση διακριβωμένης ογκομετρικής φιάλης όγκου 5 – 20 mL (V).

Η ταχύτητα ροής κινητής φάσης (νερό) ρυθμίζεται μεταξύ 0,5 – 3 mL/min (F), ενώ το σύστημα ελέγχεται με στήλη (προτείνεται τριχοειδής ανοξειδωτος σωλήνας ή στήλη, π.χ. 5 μ m μήκους 15 cm για τη δημιουργία πίεσης <5000 psi ή 345 bar.



Έλεγχος Συστήματος Παροχής Διαλυτών

Εάν χρησιμοποιείται Σύστημα Βαθμιδωτής Έκλουσης, επαναλαμβάνεται ο έλεγχος για όλα τα κανάλια.

$$f = [V \times 60] / t$$

$$\text{Απόκλιση \%D} = [(f-F)/F] \times 100$$

$$\text{Όριο ανοχής \%D} \leq \pm 5$$



Έλεγχος Συστήματος Παροχής Διαλυτών

Έλεγχος ακρίβειας και σταθερότητας σύστασης κινητής φάσης
σε βαθμιδωτή έκλυση

Χρησιμοποιείται τριχοειδής ανοξειδωτος σωλήνας (π.χ. 2000 x 0,12 mm) στη θέση της στήλης ή στήλη μικρού μήκους (οπότε είναι αποδεκτή μικρή χρονική καθυστέρηση στην υλοποίηση του προγράμματος έκλυσης).

Ρυθμίζεται ο ανιχνευτής στα 265 nm και η ταχύτητα ροής στο 1,0 mL/min.

Εφαρμόζεται το ακόλουθο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης.



Πρόγραμμα Βαθμιδωτής Έκλουσης

Χρόνος (min)	%κινητή φάση A	% κινητή φάση B
0,0	100	0
0,1	90	10
10	90	10
10,1	50	50
20	50	50
20,1	10	90
30	10	90
30,1	0	100
40	0	100
40,1	100	0



Έλεγχος ακρίβειας και σταθερότητας σύστασης κινητής φάσης σε βαθμιδωτή έκλυση

- Κινητή φάση A: Νερό
- Κινητή φάση B: 0,5% ακετόνη σε νερό
- Το σύστημα εξισορροπείται αρχικά με νερό για 10 min
- Υπολογίζεται το σφάλμα σύστασης κινητής φάσης (D):

$$D = \%H - G$$

G : θεωρητική (ρύθμιση) σύσταση κινητής φάσης ως προς κινητή φάση B, %

$$\%H = (h/H) \times 100$$

%H: πραγματική (μέτρηση) σύσταση κινητής φάσης ως προς κινητή φάση B, %

h: ύψος μετρούμενης χρωματογραφικής γραμμής (λόγω ακετόνης)

H: ύψος χρωματογραφικής γραμμής σε 100% κινητή φάση B

Ανεκτό όριο ανοχής: $(D/G) \times 100 \leq \pm 2\%$



Έλεγχος σταθερότητας σύστασης κινητής φάσης σε βαθμιδωτή έκλυση

$$\%R = (N/h_{50}) \times 100$$

%R: σταθερότητα σύστασης κινητής φάσης

h_{50} : ύψος χρωματογραφικής γραμμής σε 50% κινητή φάση B

N: θόρυβος (μετρείται για 1 min) στη γραμμική περιοχή

Ανεκτό όριο: $\%R \leq 0,2\%$

Με τη διαδικασία αυτή ελέγχεται η σταθερότητα σύστασης κινητής φάσης σε συνδυασμό με θόρυβο ανιχνευτή.

Μπορεί να ελεγχθεί και η κλίση της χρωματογραφικής γραμμής (detector drift) αν ληφθεί η γραμμή 50% κινητή φάση B για 60 min



Έλεγχος Επαναληψιμότητας Εισαγόμενου Όγκου και Έλεγχος Επιμόλυνσης Συστήματος Έγχυσης (1)

- Παρασκευάζονται τα διαλύματα:
 - Διαλύτης A: MeOH:Νερό 60:40
 - Διάλυμα A: 15,0 mg methyl-, ethyl-, propyl-paraben / 100 mL διαλύτη A (150 µg/mL)
 - Διάλυμα B: 1,0 mL δ/μα A / 10,0 mL διαλύτη A (15 µg/mL)
 - Διάλυμα Γ: 1,0 mL δ/μα B / 100,0 mL διαλύτη A (0,15 µg/mL)



Έλεγχος Επαναληψιμότητας Εισαγόμενου Όγκου και Έλεγχος Επιμόλυνσης Συστήματος Έγχυσης (2)

- Χρησιμοποιείται:
 - Στήλη Lichrospher 100 RP8, 5 μm , 125 x 4 mm (ή αντίστοιχη)
 - Κινητή φάση ο διαλύτης A με ροή 1,0 mL/min
 - Μήκος κύματος 254 nm
 - Όγκος ένεσης 20 μL
- Εκτελείται το ακόλουθο πρόγραμμα:
 - 6 x $\Delta/\mu\text{A B}$
 - 1 x $\Delta/\mu\text{A A}$
 - 1 x Διαλύτη A (λευκό 1)
 - 1 x $\Delta/\mu\text{A B}$
 - 1 x Διαλύτη A (λευκό 2)
 - 1 x $\Delta/\mu\text{A } \Gamma$



Έλεγχος Επαναληψιμότητας Εισαγόμενου Όγκου και Έλεγχος Επιμόλυνσης Συστήματος Έγχυσης (3)

- Ανεκτό όριο επαναληψιμότητας εισαγόμενου όγκου.
 - $\%RSD_6$ εμβαδών κορυφών ($\Delta/\mu\alpha$ Β) $\leq 1,0\%$
- Ανεκτό όριο επιμόλυνσης συστήματος εισαγωγής:
 - Εμβαδόν κορυφής propyl-paraben στο λευκό 1 $\leq 0,5\%$ (10 x εμβαδόν κορυφής propyl-paraben στο $\Delta/\mu\alpha$ Β που ενίεται αμέσως μετά το εν λόγω λευκό (0,5% $\Delta/\mu\alpha$ Α)).
 - Εμβαδόν κορυφής propyl-paraben στο $\Delta/\mu\alpha$ Γ 0,9-1,1 % εμβαδού κορυφής propyl-paraben στο $\Delta/\mu\alpha$ Β που ενίεται αμέσως μετά το λευκό 1.



Έλεγχος Αυτόματου Δειγματολήπτη (1)

Ακρίβεια Θερμοκρασίας Θερμοστάτη

- Ρυθμίζεται η θερμοκρασία αυτόματου δειγματολήπτη στη συνήθως χρησιμοποιούμενη τιμή (π.χ. 8 °C) και αφήνεται το σύστημα να ισορροπήσει.
- Μετρείται με διακριβωμένο θερμόμετρο η πραγματική θερμοκρασία του δειγματολήπτη.
- Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για άλλες συνήθως χρησιμοποιούμενες θερμοκρασίες.

$$\text{Ανεκτό όριο: } T_{\text{πραγμ}} - T_{\text{ρυθμ}} \leq \pm 3 \text{ } ^\circ\text{C}$$



Έλεγχος Αυτόματου Δειγματολήπτη (2)

Επαναληψιμότητα Θερμοκρασίας Θερμοστάτη

- Ρυθμίζεται η θερμοκρασία αυτόματου δειγματολήπτη στη συνήθη (π.χ. 8 °C) και αφήνεται το σύστημα να ισορροπήσει.
- Μετρείται η θερμοκρασία με διακριβωμένο θερμόμετρο ανά 15 min.

Όριο ανοχής: για όλες τις μετρήσεις

$$T_{\text{πραγμ}} - T_{\text{ρυθμ}} \leq \pm 3 \text{ } ^\circ\text{C}$$



Έλεγχος Ακρίβειας Θερμοκρασίας Φούρνου Στηλών

- Ρυθμίζεται η θερμοκρασία του φούρνου στηλών στους 40, 45, 50, 55 °C και αφήνεται να ισορροπήσει το σύστημα για 30 min.
- Μετρείται με διακριβωμένο θερμόμετρο η πραγματική θερμοκρασία του φούρνου.

Όριο ανοχής:

$$T_{\text{πραγμ}} - T_{\text{ρυθμ}} \leq \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$$



Ανιχνευτής UV / PDA

Έλεγχος Γραμμικότητας (1)

- Παρασκευάζονται τα διαλύματα:
 - Δ5: 9,0 -11,0 mg καφεΐνης / 200 μ L MeOH (50,0 μ g/mL)
 - Δ4: 50 mL Δ5/100 mL MeOH (25,0 μ g/mL)
 - Δ3: 10 mL Δ5/100 mL MeOH (5,0 μ g/mL)
 - Δ2: 2,0 mL Δ3/100 mL MeOH (1,0 μ g/mL)
 - Δ1: 10 mL Δ3/100 mL MeOH (0,5 μ g/mL)
 - Δ6: MeOH (λευκό)



Ανιχνευτής UV / DAD

Έλεγχος Γραμμικότητας (2)

- Χρησιμοποιείται:
 - Στήλη RP-18, 5 μm , 30-50 x 2,1-4,6 mm
 - Κινητή φάση: MeOH
 - Ροή: 1,0 mL/min
 - Θερμοκρασία στήλης: 40 °C
 - Μήκος κύματος: 273 nm
 - Όγκος ένεσης: 20 μL



Ανιχνευτής UV / DAD

Έλεγχος Γραμμικότητας (3)

- Εκτελείται το ακόλουθο πρόγραμμα:
 - 2 x Δ6
 - 1x Δ1
 - 1x Δ2
 - 1x Δ3
 - 1x Δ4
 - 1x Δ5

Όριο: Συντελεστής συσχέτισης Εμβαδού κορυφής-Συγκέντρωσης
 $r^2 \geq 0,999$



Ανιχνευτής UV / DAD

Ακρίβεια Μήκους Κύματος (1)

- Παρασκευάζεται το διάλυμα:
 - Ανιχνευτής PDA: Δ/μα 5 από έλεγχο γραμμικότητας.
 - Ανιχνευτής UV: Δ/μα 1 μg ανθρακενίου /mL νερού (δυσδιάλυτο) ή δ/μα υπερχλωρικού ολμίου.
- Χρησιμοποιείται:
 - Στήλη RP-18, 5 μm, 30-50 x 2,1-4,6 mm
 - Κινητή φάση: ACN 15% σε νερό
 - Ροή: 1,0 mL/min
 - Θερμοκρασία στήλης: 40 °C
 - Μήκος κύματος: 230-290 PDA
 - Όγκος ένεσης: 20 μL



Ανιχνευτής UV / DAD

Ακρίβεια Μήκους Κύματος (2)

- Ανιχνευτής PDA:
 - Ενίενται 20 μL διαλύματος καφεΐνης και λαμβάνεται το φάσμα.
 - Το μέγιστο εμφανίζεται στα 272 nm και το ελάχιστο στα 244 nm.
- Ανιχνευτής UV:
 - Γεμίζεται η κυψελίδα με $\delta/\mu\text{α}$ ανθρακενίου και μεταβάλλεται το μήκος κύματος από 248 – 254 με βήμα 1 nm.
 - Η μέγιστη απορρόφηση λαμβάνεται στα 251 nm.



Ανιχνευτής UV / DAD

Ακρίβεια Μήκους Κύματος (3)

- Εναλλακτικά χρησιμοποιείται:
 - Δ/μα υπερχλωρικού ολμίου, όπως στον έλεγχο φασματοφωτομέτρων.
 - Τη γραμμή της λυχνίας υδρογόνου (εσωτερικός έλεγχος οργάνου) στα $656,279 \pm 2$ nm.
- Όριο ανοχής: ± 3 nm



Τέλος

Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στο πλαίσιο του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Πανεπιστήμιο Αθηνών**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο την αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.



Σημειώματα

Σημείωμα Ιστορικού Εκδόσεων Έργου

Το παρόν έργο αποτελεί την έκδοση 1.0.

Έχουν προηγηθεί οι κάτωθι εκδόσεις:

- Έκδοση διαθέσιμη [εδώ](#).



Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Εθνικών και Καποδιστριακών Πανεπιστημίων Αθηνών, Κουμπάρης Μιχαήλ 2015. Κουμπάρης Μιχαήλ. «Έλεγχος και Διασφάλιση Ποιότητας». Έκδοση: 1.0. Αθήνα 2015.

Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση:

<http://opencourses.uoa.gr/courses/CHEM103/>



Σημείωμα Αδειοδότησης

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά, Μη Εμπορική Χρήση Παρόμοια Διανομή 4.0 [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Ως **Μη Εμπορική** ορίζεται η χρήση:

- που δεν περιλαμβάνει άμεσο ή έμμεσο οικονομικό όφελος από την χρήση του έργου, για το διανομέα του έργου και αδειοδόχο
- που δεν περιλαμβάνει οικονομική συναλλαγή ως προϋπόθεση για τη χρήση ή πρόσβαση στο έργο
- που δεν προσπορίζει στο διανομέα του έργου και αδειοδόχο έμμεσο οικονομικό όφελος (π.χ. διαφημίσεις) από την προβολή του έργου σε διαδικτυακό τόπο

Ο δικαιούχος μπορεί να παρέχει στον αδειοδόχο ξεχωριστή άδεια να χρησιμοποιεί το έργο για εμπορική χρήση, εφόσον αυτό του ζητηθεί.



Διατήρηση Σημειωμάτων

Οποιαδήποτε αναπαραγωγή ή διασκευή του υλικού θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει:

- το Σημείωμα Αναφοράς
- το Σημείωμα Αδειοδότησης
- τη δήλωση Διατήρησης Σημειωμάτων
- το Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (εφόσον υπάρχει)

μαζί με τους συνοδευόμενους υπερσυνδέσμους.

