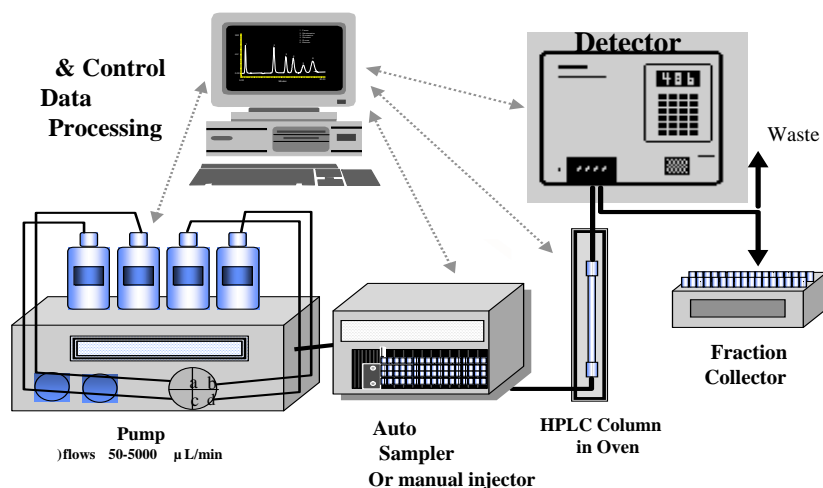


הוראות לטיפול ולשימוש נכון במכשיר HPLC

לפני שניגשים לעבודה במכשיר HPLC חייבים להתמצא בעקרונות הבסיסיים של כרומטוגרפיה נוזלית לסוגיה. הכרומטוגרף הנוזלי הנו מורכב ביותר ויש בו טכנולוגיה מתוחכמת ועדינה, בורות מוחלטת בצורת עבודתו עלולה לחבל בחלקיו שהנם יקרים ביותר. בנוסף על כך יש תהליכים כימיים של חלוקה בין שתי פאזות תוך כדי האנליזה, ויש צורך להבין מינימום מסויים של הבסיס התיאורטי להם כדי לתפעל נכון את המערכת. כמו כן רצוי שהיה גם מינימום בסיס להבנה של הצורה שבה מבצע המכשיר את עיבוד הנתונים כדי שלא יתקבלו נתונים שגויים ותוצאות מסולפות של האנליזה.



שורת הצעדים שיש לעשות לפני תחילת הרצה ב- HPLC :

- לסנן את הממסים בעזרת ממברנות בעלות cutoff של 0.22-0.45 מיקרון.
- לשים את הממסים בבקבוקים נקיים ושקופים (שניתן לראות דרכם משקעים או חלקיקים צפים), ולוודא שהם מתערבבים בקלות עם הממסים הקודמים שהיו באותו מקום (כניסות A, B, C, D). למשל אין לשים בקבוק של מתנול, מים או אצטוניטריל במקום בו היה הקסון, או לשים בקבוק ממס אורגני במקום בו היה בקבוק תמיסת בופר.
- לאוורר (degas) את הממסים ולעשות PURGE לכל הצינורות המובילים מהם למשאבה.
- לחבר את העמודה בזירות בצד של ההזרקה בכיוון הנכון, לפי סימון כיוון הזרימה שמצוין על העמודה (לא לחבר מיד לגלאי!).
- להזרים דרך העמודה את הפאזה הנעה המתאימה בקצב זרימה נמוך (0.1-0.5 ml/min) או להגיע אל הרכב הפאזה הנעה בהדרגה.
- לכונן את הגלאי לאורך הגל המתאים ולחכות להתייצבות קו-הבסיס.
- להכין את מערך שיטות העבודה במחשב: שכולל את השליטה במערכת (instrumental method), את שיטת עיבוד הנתונים (processing method), ואת שיטת הדיווח (Report).
- כאשר התייצבה המערכת והשיטות מוכנות ניתן לעשות הרצת BLANK לניסיון כדי לוודא שהיא נקייה מהפרעות.

הפרקים הבאים מפרטים את כל השלבים האלה ומדגישים נקודות חשובות לתשומת לב מפעילי המכשיר.

1. ממשים ומשאבה - SOLVENT DELIVERY SYSTEM :**הכנת הממסים : היגינה**

לפני אנליזה ב-HPLC מכינים קודם כל את הממסים בהם עומדים להשתמש. בכל מכשיר HPLC אפשר לזהות את מערכת הממסים לפי הבקבוקים והצינורות היוצאים מהם שמובילים למשאבה. מהמשאבה יוצא צינור אחד בלבד ובו כבר זורם ההרכב הסופי בכל רגע ורגע. במכשירים יכולים להיות עד ארבעה ממסים (מסומנים ב-A, B, C, D).

- חשוב שעל כל בקבוק יצוין בבירור מהו הרכב הנוזל בתוכו !
- בכל בקבוק בקצה הצינור המוביל אל המשאבה ישנו פילטר עדין מאוד שמונע מחלקיקים כמו אצות ואבק להיכנס לקולונה. יש לשמור עליו מפני גידול אצות ולטפל בו מדי פעם (לפחות פעם בחודש כאשר עובדים עם בופרים מימיים) ע"י סוניקציה ב-10% - 20% חומצה חנקתית.
- יש לדאוג לסנן את כל סוגי הממסים (או לוודא שהם נמכרים מסוננים כבר) לפני כל שימוש בהם לכרוםטוגרפיה, מחשש לסתימת הקולונה. הסינון נעשה בעזרת מערכת סינון ממסים מיוחדת לכך שחייבת להיות בכל מעבדה בה משתמשים ב-HPLC. יש שני סוגי ממברנות המתאימות לסינון, אחת לממסים אורגניים, ובה משתמשים לסינון כל הממסים שאינם מים או שאינם מכילים מים, והשניה מתאימה למים או לתמיסות מימיות בלבד. יש להשתמש בממברנות בעלות קוטר של 0.2 או 0.45 μm .
- חשוב לשמור על ההיגינה של הממסים, יש לשטוף את כל הצינורות במערכת עד הקולונה לפני כל שינוי של ממס, בייחוד בשימוש בבופרים שונים.
- בזמן החלפת ממס בעמדה מסוימת (A, B, C, D) יש להיזהר שלא להחליף אותו בממס שאינו מתערבב עמו. נושא זה חשוב בעיקר כאשר עובדים ב-normal phase או כאשר עוברים מ-reversed phase ל-normal phase וחזרה.
- במכשירים רבים יתכן ומותקן פילטר נוסף בין המשאבה למזרק שמנקה את הממסים מזיהומים בלתי נשטפים, ניתן להוסיף עמודה זעירה ארוזה בסיליקה ג'ל נקי, כך שתרווה את הפאזה הנעה (אם היא מימית) בסיליקה, ותפחית את ההידרוליזה של המצע של עמודות ה-reversed phase, על ידי כך היא תאריך את חייהן.

2. תכנון הרכב הפאזה הנעה - ערבוב בין ממסים שונים

- לאחר הכנת התמיסות והממסים מחליטים על תוכנית העבודה, כלומר על הרכב הפאזה הנעה במשך ההרצה. לשם כך יש לעתים צורך בערבוב בין ממסים שונים.
- חובה לברר האם הממסים מתערבבים בקלות זה עם זה. ערבוב ממסים שאינם מתמוססים זה בזה בזמן בניית תוכנית הפרדה הנו אסור בתכלית כי המשאבה, העמודה ותא הגלאי יכולים להתקלקל ! לדוגמא, כלורופורם אינו מתאים לחלוטין כתוספת לפאזות נעות מימיות. הקסן אינו מתערבב עם מתנול ולא עם אצטוניטריל. איזופרופנול מתערבב גם עם מים, עם אצטוניטריל ועם מתנול (reversed phase) ומצד שני הוא מתערבב גם עם הקסן או כלורופורם (normal phase), ולכן הוא משמש כאחד מממסי הביניים בין שני אופני העבודה, ה-Reversed Phase וה-Normal Phase.
- יש לשים לב לכך שלא כל ממס מתאים לשימוש במכשיר HPLC בצורה מעשית. דוגמאות: pentane הוא ממס נדיף מאוד ומשתחררות ממנו בועות במהלך העבודה תחת לחצים גבוהים

שמשתנים מדי פעם. איזופרופנול או אתנול הם צמיגים מאוד וגורמים ללחצים גבוהים מאוד בעמודה כאשר הם באחוזים גבוהים. תערובת מתנול : מים 50 : 50 היא צמיגה ביותר וגורמת ללחצי עבודה גבוהים במיוחד וקשים לתפעול.

- דבר חשוב שכדאי לזכור, אצטוניטריל (גם מתנול) יכול לשמש כממס מתווך בין רוב הפאזות הנעות השונות המכילות מים (ללא בופר אי-אורגני!), לכן כדאי תמיד בסוף להשאיר את המערכת שטופה בתערובת מים - אצטוניטריל או אצטוניטריל נקי ליתר בטחון.

3. סילוק גזים במערכת - איזור - DEGASSING

- האיזור הינו שיחרור הפאזה הנעה מהאוויר שהיה מומס בה, והוא טיפול חובה ברובם המכריע על מכשירי ה-HPLC. קיימות שתי שיטות רווחות לאיזור הממסים, האחת בעזרת בעבוע הליום והשניה בעזרת ואקום בזרימה: on-line vacuum degassing. מכשיר הואקום בזרימה מכיל 4 תאי ואקום, אחד לכל עמדה (A, B, C, D), כך שכאשר הממס מגיע את התא הוא משחרר מיד את כל הגזים המומסים בו. כשמשמשים בשיטה זו יש צורך לוודא שהלחץ השלילי בתאי הואקום יהיה בהתאם להוראות היצרן, וכן יש לוודא שכאשר עושים שטיפה יסודית של המערכת (purge) דואגים לכך שתאי הואקום נשטפו בנפח מספיק (כ- 12 מ"ל ברוב המכשירים).

- כאשר משתמשים בהליום מבעבע יש לוודא שבלון ההליום תמיד פתוח כדי לשמור על לחץ חיובי בצינורות המובילים ממנו אל המכשיר. סוגרים ופותחים את ההליום בעזרת השסתום המיוחד שבמכשיר ה-HPLC עצמו. רצוי שיהיה ויסות יציאת ההליום לכל ממס וממס בנפרד בשל הבדלי הצמיגות שלהם והבדלי מסיסות הגזים בהם. הליום הוא גז אינרטי, ומסיסותו קטנה כך שהוא מרחיק את האוויר המומס ומרווה את הממסים, ואז לא נוצרות בועות בזמן ערבוב הממסים ובזמן שינויי הרכב הפאזה הנעה בזמן.

4. לאחר שמערכת הממסים מוכנה לעבודה, לפני שמתחילים את ההרצות, שוטפים את המערכת בממסים (שעברו כבר אוורור בעזרת ההליום) עד לקולונה כדי לסלק עקבות ממסים קודמים או שאריות ממסים לא מאווררים, ולמלא חללים ריקים בצינורות ובמשאבה. יש להביא בחשבון שנפח החללים בכל צינורות המערכת יכול להגיע עד ל- 5 מ"ל. שטיפה זו נקראת, PURGE והיא נעשית בקצב זרימה גבוה (כ- 10 - 5 מ"ל לדקה ומעלה) למשך 2-3 דקות לכל ממס וממס. בכל מכשירי ה-HPLC יש שסתום מיוחד לשם כך, שמוליך את הממסים החוצה במעקף אי שם בין המשאבה למזרק.

- חשוב לעשות PURGE לכל הממסים שבמערכת, ולא רק לאלה בהם עומדים להשתמש, כך שאם מכניסים בטעות אחד מהממסים האחרים בזמן הכנת תוכנית ההרצה הוא לא יכניס אויר בטעות למערכת.

- כשעוברים מממס לממס יש לשים לב לכך שהם מסוגלים להתערבב ביניהם **גם בשלב ה-PURGE**, משום שכולם עוברים דרך המשאבה, שהיא נקודה משותפת לכל הממסים. בשימוש ב-NORMAL PHASE יש לשים לב לכך במיוחד, ולעבור מממס לממס לפי יכולת הערבוב ביניהם!.

4. הכנת העמודה - COLUMN

בשלב זה הגיע הזמן לחבר את העמודה, או הקולונה, אל המערכת. יש לזכור שבזמן כל פתיחה וסגירה של חיבור כלשהו במכשיר HPLC יש לדאוג שלא להשתמש בכוח מופרז !!! מחברים בעדינות ומקפידים שההברגה תתאים קודם כל בצורה ידנית ללא כל כלי עזר, מהדקים בכוח היד תוך כדי זרימת נוזלים, ורק אז מהדקים בעזרת מפתח מיוחד כרבע סיבוב, **לא יותר!** החיבורים אמורים לעמוד בלחצי נוזלים גבוהים: בקצה כל צינור במקום החיבור שלו נמצאת FERRULE, שהיא חרוט (קונוס) מתכתי גמיש, שאמור להדק את החיבור באופן הרמטי, כאשר החרוט נלחץ

לעומת חלל פנימי בצורת חרוט. כל הידוק בכוח גורם לכך שבפעם הבאה יהי צורך בכוח מוגבר יותר להידוק עד שהחיבור נהרס.

יש לזכור שהעמודה הינה החלק הרגיש ביותר לבעיות, היא לב ליבה של המערכת. שם מתרחשת ההפרדה, ויש לדעת היטב באיזו מערכת ממסים לבחור ובאיזה תוכנית עבודה לעבוד כדי שתהיה הפרדה טובה. יש לשמור עליה מפני זיהומים שמקורם בממסים או בדוגמאות, מפני חלקיקים שיסתמו את חלליה, ומפני בועות אוויר שיקלקלו את פעילותה.

- לפני כל שימוש בשיטה כרומטוגרפית חדשה קודם כל יש לברר מה מגבלותיה של הקולונה עמה עומדים לעבוד מבחינת תחום לחצים, תחום pH, סוג ממסים וסוג הבופרים שמותר להעביר דרכה.

כדאי תמיד להכין תערובת-מבחן סטנדרטית של מומסים ושיטה קבועה להפרדתם, בעזרתה אפשר לבחון את כושר פעילותה של העמודה והאם חל שינוי ביעילותה. כך אפשר מדי פעם בפעם לבדוק באופן אובייקטיבי האם העמודה עדיין במצב תקין.

- כאשר מחברים לראשונה קולונה שהייתה מאופסנת, או קולונה אחרת מזו שהייתה במכשיר, מפרקים את זו המחוברת, מגיעים להרכב התמיסה הממלאת את הקולונה שאופסנה, ומחברים את הקולונה החדשה כאשר הפאזה הנעה זורמת בקצב הזרימה הנמוך והעמודה אינה מחוברת עדיין לגלאי. אין לחבר אותה מיד אל הגלאי, אלא יש לתת לממסים לזרום החוצה חופשי למשך כ- 5 דקות לפני החיבור. הדבר בא להגן על תא הגלאי מפני חלקיקי אבק או סיליקה ג'ל, שמשתחררים מהקצה של הקולונה אם יש בה בעיית אריזה כלשהי. לאחר שמס האופסון של הקולונה עבר אותה בשלום, יש לעבור בהדרגה ובזהירות את הרכב הפאזה הנעה החדשה הנדרשת לעבודה. לשים לב לא לעבור ישירות מבופרים לממסים אורגניים, אלא רק דרך מים טהורים.

- מומלץ לדאוג לכך שתהיה guard column צמודה בראש הקולונה להגן עליה מפני השפעת זיהומי הדוגמאות, אלא אם עובדים עם חומרי גלם כימיים פשוטים או בדוגמאות פשוטות ומסוננות (לא ביולוגיות, סביבתיות או מרקחות, או אפילו ישירות מתוך תערובות ריאקציה כימית). יש להקפיד על כך שה- guard column תהיה מאותו סוג בדיוק של הקולונה הראשית, ושתהיה מחוברת היטב כדי למנוע הרחבת פיקים מיותרת. דוגמאות מורכבות (ביולוגיות או סביבתיות) עלולות לזהמה מאוד ואז יש להחליפה לעתים מזומנות.

- במעבר מהרכב ממסים אחד לשני יש לשים לב שהם מתערבבים היטב על כל התוספים שבתוכם, ושעושים זאת בהדרגה ולא בבת אחת כדי לא לגרום ל"הלם כימי" לאריזת העמודה. במעבר בין בופרים לממסים אורגניים יש לבדוק ולוודא שהם מתערבבים ללא שקיעה של מלחי הבופר על פני העמודה או בחיבורי המכשיר או במשאבה.

- יש להשגיח על הלחצים שלא יהיו גבוהים מדי (לדוגמא: לחץ גבוה יחסית הוא למשל 200 אטמ' או 3000 psi, בקולונה של 25 סמ' בקצב זרימה של 1 מ"ל לדקה), יש לזכור שלחץ גבוה משמש כאינדיקציה לבעיה בקולונה, ויכול לגרום לנזקים בלתי הפיכים לאריזה עצמה. אי הקפדה על כל ההנחיות הקשורות לעמודה או לממסים עלולה לגרום לנזקים לאריזה של הקולונה, שהנפוץ שבהם הוא היווצרות חלל בתחילתה, דבר שמוציא אותה מכלל שימוש לגמרי.

- נזקים אחרים שיכולים להיגרם לאריזת הקולונה הם הידרוליזה של הסיליקה אליה קשור הפחמימן (C-18) וכן ספיחה בלתי הפיכה של זיהומים.

5. הגלאי DETECTOR

לאחר שחברה העמודה לגלאי מכינים גם את הגלאי לאנליזה. חשוב לזכור כי הגלאי הוא בעצם ה"העיניים" של המערכת. קו הבסיס או ה- base line הוא תגובת הגלאי לפאזה הנעה שיוצאת מהקולונה כל הזמן, גם לפני ההזרקה וגם לאחריה, והוא יכול לשמש כאינדיקציה למצב הקולונה או הממסים. אם העמודה מזוהמת או שהממסים אינה מתאימים ל- HPLC מתקבל קו-בסיס שאינו יציב. יש לזכור שאם הממסים אינם מתאימים ל- HPLC הם יכולים להכיל זיהומים מתהליך ייצורם, כך שאין אפשרות לעבוד איתם בגרדיינט בשל ספיחה ושחרור של הזיהומים כל הזמן, תוך כדי שינוי הרכב הפאזה הנעה. גלאים נפוצים הם גלאי UV בעל אורך גל משתנה שניתן לבחור אותו מראש ולעבוד כל הזמן על אורך גל זה.

- אורך הגל שנבחר צריך להתאים למומסים, לדוגמא, תחום אורכי הגל שנבחר לחומרים בעלי מערכות ארומטיות עם מתמירים פולריים יהיה 240 - 260 nm.
- אם לחומר אין בליעה בתחום ה-UV יש אפשרות להרכיב לו נגזרת בולעת ב-UV.
- נסיון לעבוד בתחום אורכי גל של 210 - 220 nm עלול להיות מתסכל ביותר בשל בעיות עם הממסים עצמם שמתחילים לבלוע באיזור זה.
- בגלאים רבים ניתן לעבוד בשני אורכי גל במקביל, דבר שיכול לעזור מאוד בזמן פיתוח שיטה חדשה או התאמת שיטה קיימת לחומרים חדשים. אפשר לנסות לעבוד בתחום של 210 - 220 nm ושל 240 - 260 nm במקביל כדי לגלות כמה שיותר חומרים בדוגמא. בגלאי מערך דיודות photo-diode array ניתן לקבל מספר גדול של כרומוטוגרמות מהרצה אחת וכן ניתן לחפש את אורך הגל האופטימלי לעבודה כמותית בתוך הספקטראות של הפיקים.

6. הכנסת הדוגמאות: הזרקה INJECTION

אם המערכת יציבה: הלחץ יציב (+/- 2%) במשאבה, הטמפרטורות יציבות בתנור, ובדוגם האוטומטי, קו הבסיס ישר בגלאי, והכל מוכן לאנליזה, הגיע הזמן להזריק את הדוגמאות לעמודה. ישנן מערכות בהן יש שסתום הזרקה ידני וכאלה בהן יש דוגם אוטומטי (autosampler).

שסתום הזרקה ידני (Rheodyne or Valco):

הכנסת הדוגמאות למערכת הזרימה נעשית כאן דרך שסתום הזרקה מיוחד, שמבנהו מורכב ועדין. תמיסת הדוגמא מועמסת על לולאה בת נפח ידוע מדויק, כך שתמיד יוזרק נפח קבוע אל הקולונה. מילוי הלולאה נעשה כאשר מתג ההזרקה נמצא על מצב load, בו הלולאה אינה מחוברת אל צירי הזרימה (הלחץ בה אטמוספרי). אם מעבירים בעזרת המזרק דרך הלולאה נפח גדול מנפחה, זורם הנפח העודף אל ה- waste. מומלץ להשתמש במזרק המכיל נפח גדול לפחות פי 2 מנפח הלולאה של שסתום ההזרקה בזמן עבודה כמותית מדויקת. מילוי הלולאה נעשה בעזרת מזרק מיוחד שהמחט בו קטומה והוא מתאים במיוחד ל- HPLC.

- יש להשתמש אך ורק במזרק המתאים ל- HPLC - משום שהמחט שלו קטומה ונכנסת בדיוק לתוך מוליך מיוחד בגוף השסתום בצורה הרמטית, כך שהקצה הקטום מגיע בדיוק לנקודה קבועה על פני משטח גרפיט, הרגיש לשריטות בתוך גוף השסתום בפנים. אם משתמשים במזרק רגיל בעל מחט חדה בקצה, שורטים את המשטח וגורמים מיידית להרס השסתום. האינדיקציה לכך שנעשתה טעות כזו היא נזילה מתוך שסתום ההזרקה, שבעקבותיה יש צורך להחליף את החלק הפנימי בו נגעה מחט המזרק.
- בזמן מילוי המזרק חשוב לשטוף אותו היטב בתמיסה של הדוגמא ולהקפיד שלא יכיל בוועות. בוועות גורמות לשינוי בנפח המוזרק ומפריעות בתהליך ההפרדה והגילוי.

• כדי להתחיל בהרצה יש להזרים את הדוגמא שבתוך הלולאה אל הקולונה. לשם כך מעבירים בבת אחת את מתג ההזרקה למצב inject. במצב זה הלולאה נכנסת אל תוך ציר הזרימה, הנוזל הבא מהמשאבה עובר דרכה ואוסף אותה בדרכו אל העמודה.

• המעבר ממצב load למצב inject חייב להיעשות בבת אחת ובמהירות, כי בין שני המצבים האלה של מתג ההזרקה נחסמת דרך הזרימה להרף עין. אם המעבר לא נעשה במהירות, הנוזלים מוסטים לכיוון אלטרנטיבי ונגרמת הפרעה גדולה מדי לזרימה התקינה. אפשר אפילו לגרום להתפתחות לחץ גבוה פתאומי שגורם להפסקה אוטומטית של הזרימה על ידי המשאבה עצמה כאמצעי בטחון. מהתיאור הנ"ל אפשר להבין ששסתום ההזרקה גם הוא עמיד בלחצים גבוהים ויש לשמור גם עליו מפני דוגמאות עם חלקיקים שלא ייסתם.

במכשירי ה-HPLC בהם נעשית הזרקה ידנית, העברת מתג ההזרקה למצב inject גורמת אוטומטית לתחילתה של ההרצה במשאבה ומפעילה את כל תוכנית הפעולה, כולל גרדיינט אם ישנו, האינטגרטור או מערכת עיבוד הנתונים.

דוגם אוטומטי:

ברוב המכשירים כיום נהוג להזריק את הדוגמאות בעזרת דוגם אוטומטי, Autosampler, בו כל תהליך מילוי לולאת ההזרקה והכנסת הדוגמא למערכת נעשה באופן אוטומטי ונשלט על ידי המחשב.

- יש לזכור כי בתחילתה ובסופה של העבודה יש לדאוג לכך שהצינורות בדוגם האוטומטי שטופים ונקיים ממלחים.
- לפני כל התחלת שיטה חדשה חשוב לשטוף גם את הדוגם האוטומטי בפאזה הנעה החדשה בה עומדים לעבוד, ויש להביא בחשבון את הממסים שהיו בצנרת שלו לפני ששוטפים אותו (לדוגמא, אסור לשטוף אותו בממסים אורגניים אם הוא היה מלא בבופר אי-אורגני).
- יש לדאוג שנוזל שטיפת המחט מלא ונקי למניעת carry-over בין ההזרקות.
- בזמן בניית מערך הדוגמאות אותו עומדים להזריק יש לשים לב להתאמה בין מספרי ה-vials שנרשמו במערך זה לבין אלה שסודרו בדוגם (טעות נפוצה...).
- אפשר לתכנן את רשימת הדוגמאות כך שהשורה האחרונה תהיה הזרקת סרק בשיטה הסוגרת את המשאבה, ה-vacuum degasser ומנורות הגלאים.

8. עבודה איזוקרטית (הרכב קבוע) או בגרדיינט

במידת האפשר עדיף לעבוד בהרכב קבוע של הפאזה הנעה, גם מבחינת נוחיות העבודה, גם מבחינת יציבות המערכת (שיווי משקל קבוע) וגם מבחינת העמודה שאינה סובלת שינויים תכופים בהרכב ובלחצים. אולם, כאשר יש קבוצת מומסים שונה מאוד באופייה מבחינת פולריות ומבנה כימי, יש לשקול עבודה בגרדיינט של ממסים.

בגרדיינט ממסים עולה חוזק הממס עם הזמן תוך כדי ההרצה הכרומוטוגרפית. לדוגמא, ב-reversed phase מתחילים בפאזות בעלות % גבוה של מים ומעלים בהדרגה את % המתנול או האצטוניטריל עם הזמן ואילו ב-phase normal מתחילים בפאזות בעלות % גבוה של הקסן, או הפטן ומוסיפים בהדרגה כלורופורם או THF או איזופרופנול עד לאתנול ואצטוניטריל. יש לזכור כי מתנול ואצטוניטריל אינם מתערבבים עם הקסן !

בניית הגרדיינט נעשית בטבלה שמראה את אחוז כל ממס כפונקציה של הזמן, כאשר סכום כל אחוזי הממסים תמיד מסתכם ב-100% לדוגמא :

TIME (min.)	A%	B%	C%	D%
0	100	0	0	0
1	100	0	0	0
10	70	20	10	0
15	70	20	10	0
20	100	0	0	0
30	100	0	0	0

בטבלה זו מתחילים ב- A 100%, נשארים לדקה, ומוסיפים עד עשר דקות את B ואת C עד להרכב המצוין בשורה השניה. D נשאר סגור כל הזמן.

המכשיר בונה את הגרדיינט באופן אוטומטי כך שבדקה העשירית יהיה הרכב הפאזה הנעה כדלקמן:

70% של ממס, 20% של ממס B ו-10% של ממס C, כל זאת ללא ממס D. למשך חמש דקות הבאות נשאר ההרכב הזה, כפי שאפשר לראות בטבלה, ואז חוזר בהדרגה הרכב הפאזה הנעה, במשך חמש הדקות הבאות, אל ההרכב ההתחלתי ונשאר בו 10 דקות כדי שאפשר יהיה להתחיל בגרדיינט חדש לקראת ההרצה הבאה. יש וריאציות שונות בין המכשירים לגבי צורת בניית הטבלה הזאת, אבל היא תמיד קיימת בצורת % הממס כפונקציה של הזמן.

- יש לזכור שעבודה בגרדיינט דורשת ניקיון גבוה במיוחד של הממסים, כי אם אינם טהורים מספיק חלים שיבושים בקו-הבסיס בשל שינויי שווי משקל תכופים תוך כדי ההרצה.

- הממסים עצמם בולעים בתחום הנמוך של אורכי הגל, לכן לא בכל מכשיר HPLC אפשר לעבוד בגרדיינט בתחום נמוך מ- 230 nm אפילו אם הגלוי יכול לתפקד באורכי גל קצרים. הדבר נובע מכך שעלייה ההדרגתית ב- % הממס הנוסף גורמת לעלייה כללית בבליעת הפאזה הנעה עצמה. כאשר המשאבה אינה מדויקת ביותר בערבוב או כאשר הממס הנוסף בולע מאוד ב- 220 nm - 210 נוצרות תנודות חזקות בקו- הבסיס שנובעות מהתנודות בבליעתה של הפאזה הנעה עצמה.

- כאשר מתכוונים לעבוד בגרדיינט יש להריץ בפעם הראשונה את הגרדיינט "על ריק" ללא מומסים כדי לבחון את הרצת ה-blank ורק כאשר מקבלים קו-בסיס חלק ויציב למשך כל זמן ההרצה אפשר להתחיל לעבוד.** ככלל בעבודה בכרומטוגרפיה יש לעשות הרצת מבחן קודם כל. לשם כך יש להזריק את הממס בו הוכנו הדוגמאות לפני שמתחילים להזריק את הדוגמאות עצמן, זאת כדי לבחון את המערכת. לפעמים מתקבלים פיקים השייכים למערכת עצמה עקב הזרקת ממס נקי בלבד, עוד לפני שהוכנס מומס כלשהו למערכת, ואפשר לטעות בהם ולהחשיבם כמומסים. פיקים כאלה נקראים system peaks, והם יכולים להיות חלק בלתי נפרד מהמערכת (לא בהכרח לכלוך!). פיקים אלה נובעים מהפרת שיווי משקל של תוספי הפאזה הנעה עקב הזרקת דוגמא שהרכבה שונה במשהו מהפאזה הנעה עצמה. למשל, בשימוש בבופרים אורגניים כמו אצטט ואמוניה תמיד יופיע פיק נוסף בכרומטוגרמה אם מזריקים מים בלבד ומכוונים לאורכי גל נמוכים. הפיק הזה שייך לחומצה האצטית שבבופר או האמוניה. ברגע שמזהים אותם כ-system peaks, צריך למצוא דרך לחיות עמם או לסלק אותם על ידי תוספת מרכיבי פאזה נעה לדוגמא.

10. עיבוד נתונים Data Processing

באופן עקרוני בכל מכשיר HPLC מתקדם יש מערכת עיבוד נתונים כלשהי המבצעת אינטגרציה של הפיקים שמתקבלים ונותנת דיווח של זמן ההשהייה של כל פיק ושטחו. לכל מערכת יש את

המאפיינים שלה לעיבוד הנתונים, אותם חייבים ללמוד היטב כדי לבצע אינטגרציה מהימנה של הפיקים.

כך שהמערכת תגדיר נכון את (integration events) יש לשים לב לשימוש נכון באירועי אינטגרציה הפיקים. בכל המערכות המתקדמות עיבוד הכרומטוגרמה לדו"ח נותן ציור שלה עם סימון הגדרות הפיקים על ידי האינטגרטור, היכן התחלת הפיק והיכן סופו. יש להקפיד לשים לב בציור זה שכל הפיק נכנס בהגדרה זו, או לחילופין, שלא נכנס שטח עודף.

- בכל אינטגרטור מודרני יש אפשרות להגדיר רוחב מינימלי של פיק אותו יזהה האינטגרטור כרוחב הפיק peak width. אם נותנים לו מספר הקטן מרוחב הפיקים האמיתי בכרומטוגרמה, הוא לא יגדיר את כל הפיק, ואילו אם נותנים לו מספר גדול יותר יגדיר שטח עודף.

- בכל אינטגרטור ניתן להגדיר את הגובה המינימלי שמעליו הוא יחליט שהפיק אינו רעש רקע (threshold). אם מגדירים גובה נמוך מדי, האינטגרטור מודד רעש רקע כפיקים ומדווח על פיקים רבים מדי. אם מגדירים גובה גבוה מדי האינטגרטור עלול להחמיץ את הפיק הרצוי למדידה, או לחילופין להגדיר אותו חלקית.

- בכל שיטת עיבוד נתונים קיימת אפשרות להגדיר את מרכיבי הדוגמא אותם מודדים (component table), על ידי מתן שם למרכיב הדוגמא המסויים, וכן ציון זמן שהשייה שלו, בתוספת טווח זמנים שמשמש כחלון שינויים.

- בתוכנות המתקדמות יש שיטות מוכנות להצגת התוצאות בדו"ח: Report' templates. ניתן גם לשנותן ולבנותן לפי צרכי המשתמש, ככל שהתוכנה מתקדמת יותר, כך ניתן יותר לשלוט בדפוסי הדיווח שלה, ולהעביר מהדו"ח חלקים לתוכנות אחרות במחשב (טבלאות, כרומטוגרמות וגרפים).

וכן חישובים נוספים על system suitability בתוכנות של היום ניתן לבצע מדידות כמותיות, חישובי שטחי הפיקים כך שהתשובה הרצויה תינתן באופן אוטומטי על ידי התוכנה ללא צורך בשימוש לשם קבלת התשובה הסופית של זיהוי החומר וכמותו. Excel בתוכנות חיזוניות כמו

לסיכום:

אחזקה נכונה של כל חלקי המכשיר תאריך את חייו ותקטין את תכיפות התיקונים. שימוש נכון במכשיר ה-HPLC על כל מרכיביו יאפשר עבודה שוטפת ללא נזקים למכשור, וקבלת האינפורמציה הנכונה על הדוגמאות שנבדקות.