

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

PROFESOR: FEDERICO AZCÁRATE

COSAS QUE ME OLVIDÉ

- Filtrado de soluciones, solo cuando se agrega sales.



TEMARIO

- Horno de columna
- Columna
- Detectores
- Otros dispositivos
- Troubleshooting



HORNOS

Horno de columna: cumple a función de mantener estable la temperatura de la columna, posibilitando la obtención de resultados precisos.

- La temperatura influye sobre los parámetros cromatográficos. Por ejemplo, en fase reversa, genéricamente, se produce un cambio en el tiempo de retención del 2% por grado.
- El sistemas de termostaticación permiten aplicar temperaturas desde inferiores a la temperatura ambiente hasta unos 70 °C



HORNOS



PRECOLUMNAS

- La columna protectora o pre-columna (*guard column*), es una pequeña columna, que se ubica entre el inyector y la columna analítica
- Cumple la función de proteger contra la contaminación por partículas de la muestra y por especies que se retienen fuertemente y evita la disolución de la sílice o pérdidas de fase estacionaria.
- En general, está empaquetada con el mismo material que el de la columna analítica y usualmente es del mismo diámetro; es mucho más corta y de menor coste.
- Los sistemas integrados, de columna protectora+columna analítica minimizan efecto extracolumna causado por los tubos de conexión, pero contribuyen igualmente al volumen de retraso del gradiente en elución.

PRECOLUMNAS

Ventajas

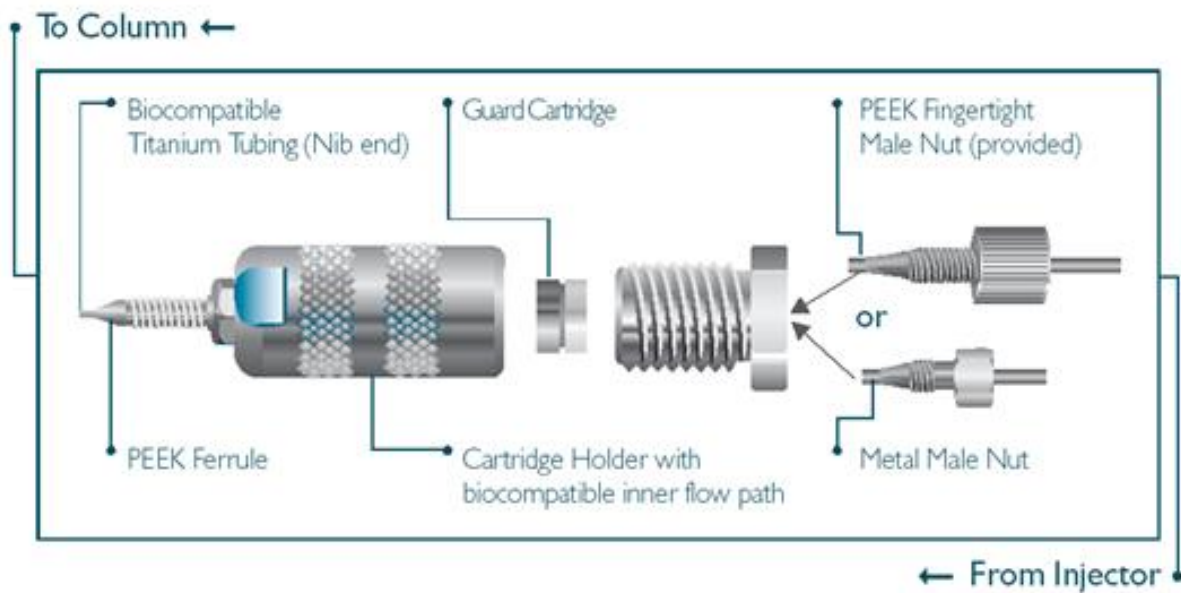
- Proporcionan una capa adicional de protección para la columna analítica, evitando la contaminación y prolongando su vida útil.
- Eliminan impurezas y partículas, ayudando a mantener una eficiencia óptima de la columna, generando una mejor resolución, forma de pico y sensibilidad.
- Las precolumnas son relativamente económicas en comparación con las columnas analíticas. Se pueden reemplazar fácilmente reduciendo el costo de cambiar la columna analítica más costosa.

PRECOLUMNAS

Selección

- La precolumna debe ser compatible con la fase estacionaria de la columna analítica para garantizar una captura eficaz de impurezas.
- El tamaño de partícula debe seleccionarse en función del nivel de protección deseado y de la matriz de la muestra. Las partículas más pequeñas ofrecen una mayor eficiencia, pero generan una mayor contrapresión.
- La longitud tiene que optimizarse para equilibrar la protección proporcionada y la caída de presión en todo el sistema.
- Las dimensiones deben coincidir con las de la columna analítica para garantizar un ajuste adecuado dentro del sistema HPLC

PRECOLUMNAS



COLUMNAS

- La columna es el corazón del sistema cromatográfico. Es donde se produce la separación de los analitos en función de sus interacciones con las fases móvil y estacionaria.
- El hardware es un tubo rígido generalmente de acero 316. En los extremos tiene un filtro fritado para evitar la pérdida de material de relleno.



COLUMNAS

Los variables que intervienen en la separación son:

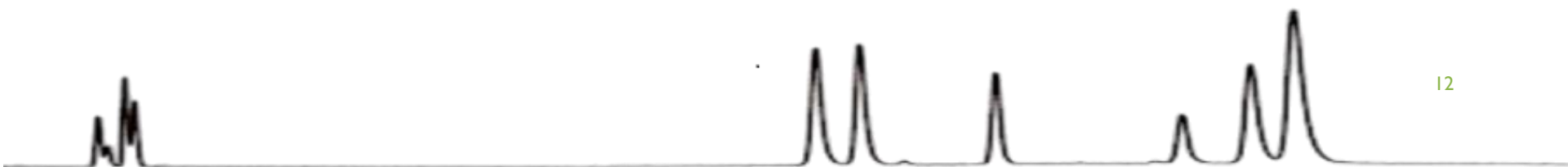
- Físicas: el diámetro de columna, el diámetro de partícula, la longitud de columna y caudal de la fase móvil
- Químicas: la afinidad del analito por la partícula a nivel molecular. Se puede distinguir afinidad química, por ejemplo puentes de hidrógeno; interacción dipolar, electrostática, hidrofóbica.



COLUMNAS

Los La fase estacionaria puede ser de muy diferente naturaleza, polar, apolar y de polaridad intermedia. Clásicamente, se han diferenciado dos modos trabajo cromatográficos, fase normal e inversa

	Fase		Comportamiento
Modo	Estacionaria	Móvil	Al aumentar de la polaridad de la fase móvil
Fase normal	Polar	Apolar	Disminuye retención
Fase inversa	Apolar	Polar	Aumenta la retención



COLUMNAS

La fase reversa es el modo más usual. La técnica resulta adecuada para analitos orgánicos neutros polares; aunque muchos de estos compuestos poseen solubilidad limitada en la fase móvil polar acuosa, en la práctica no es una limitación debido a las pequeñas cantidades de muestra inyectadas

La retención de los analitos neutros polares, no ionizados, tiene lugar mediante interacciones de dispersión; en consecuencia, esta cromatografía es muy universal ya que muchos compuestos orgánicos poseen una parte hidrofóbica en su molécula a través de la cual se produce la interacción.

COLUMNAS

Los soportes sólidos son en general de dos tipos:

- No silíceos

- Silices



COLUMNAS

No silíceos: En general, pueden admitir cualquier buffer y cualquier pH. Hay de dos tipos.

- Soportes poliméricos, típicamente de poliestireno-divinilbenceno; su porosidad y estabilidad mecánica depende de la proporción del entrecruzan te poliestireno.
- Soporte sólido de óxido de zirconio presenta excepcional estabilidad térmica y al pH comparadas con las partículas de sílice o alúmina



COLUMNAS

Siliceos: El soporte más usado es el de sílice porosa. Existen dos tipos de sílice de tipo I o A y tipo II o B.

- Tipo I: posee alta energía superficial, contiene una mayor densidad de silanoles libres distribuidos de forma no homogénea en su superficie y más impurezas. Esta sílice es más estable a pH alto
- Tipo II: es más pura, su superficie es más homogénea y menos ácida, dando lugar a picos cromatográficos mejor definidos y resultando más adecuada para compuestos básicos



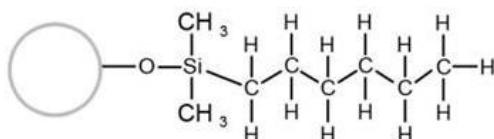
COLUMNAS

Sílice funcionalizada/Tipos de enlace

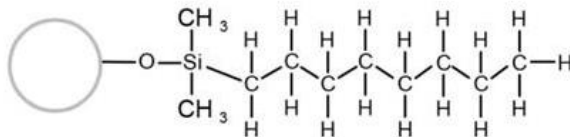
- Unión directa del grupo R a los átomos de silicio de la superficie, Si-R, este tipo de modificación no produce superficies estables,
- Enlace éster, Si-O-R, se forma fácilmente por reacción de un alcohol y los grupos silanol de la superficie
- Enlace silil-éter siloxano, Si-O-Si-R, es el más ampliamente usado y se obtiene por tratamiento de la superficie de la sílice con organosilanos, R_nSiX_{4-n} , donde X es un grupo reactivo, tal como halógeno, etoxi- o metoxi-

COLUMNAS

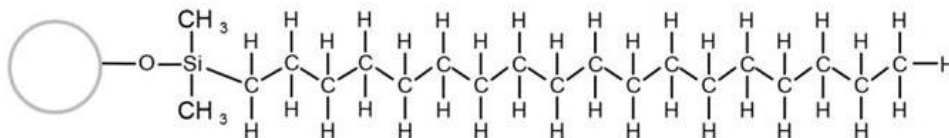
Hexilo, C6



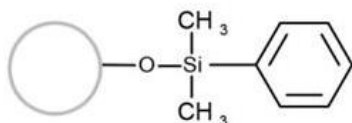
Octilo, C8



Octadecilo, C18



Fenilo



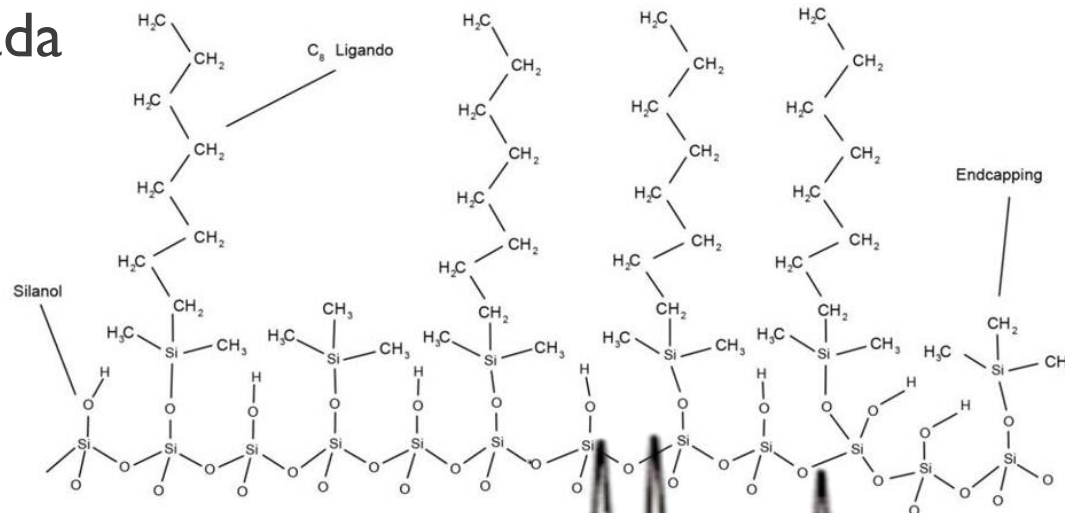
Algunas de las funcionalizaciones más usuales de la sílice usadas en fase inversa son hexilo, octilo, octadecilo y fenilo.



COLUMNAS

Protección de los grupos silanoles (*Endcapping*)

- Se usa para eliminar los grupos silanol residuales que permanecen sin reaccionar sobre la superficie de la sílice. Se emplea un agente sililante como octadecilmonoclorosilano. Como resultado de este proceso la sílice queda más desactivada



COLUMNAS

Estabilidad de las fases C18 frente al pH

- A pH inferior a 2, el enlace silil-éter entre la fase ligada y el empaquetamiento de sílice es inestable debido a la hidrólisis ácida.
- A pH superior a 8, este enlace es estable pero la sílice se disuelve. Esto conlleva obstruir los poros de la frita de salida de la columna.
- Genéricamente, estas fases son estables en el rango de pH entre 2 y 7.
- El uso de columnas con *endcapping* no es recomendable a pH bajo, inferior a 4, pero es ventajoso a pH superior a 5.

COLUMNAS

Selectividad y fase estacionaria

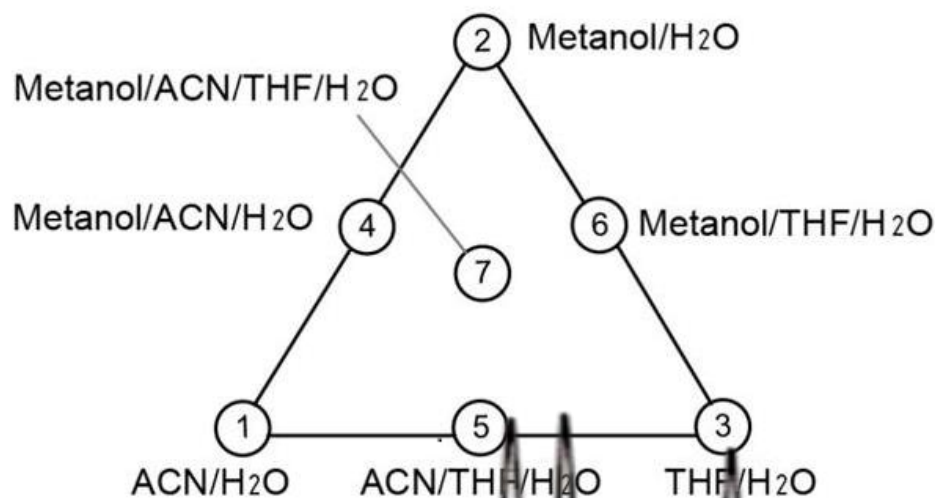
La retención depende de tres características: naturaleza y concentración de la fase ligada y área superficial.

- La retención generalmente se incrementa cuando aumenta la longitud de la cadena alquílica, o hidrofobicidad de la fase ligada. En general: columna de sílice $\ll$ ciano $< C_1 < C_3, < C_4 < \text{fenilo} < C_8 < C_{18}$.
- Un empaquetamiento típico con tamaño de poro de 80 Å presenta una superficie de unos 250 m²/g; en cambio, una de 300 Å presenta una superficie menor, 60 m²/g..

COLUMNAS

Optimización de la selectividad de la fase móvil en modo isocrático

Después de seleccionar la selectividad de la fase estacionaria, se optimiza la selectividad de la fase móvil. De forma sistemática, la optimización se realiza utilizando el triángulo de selectividad de Snyder



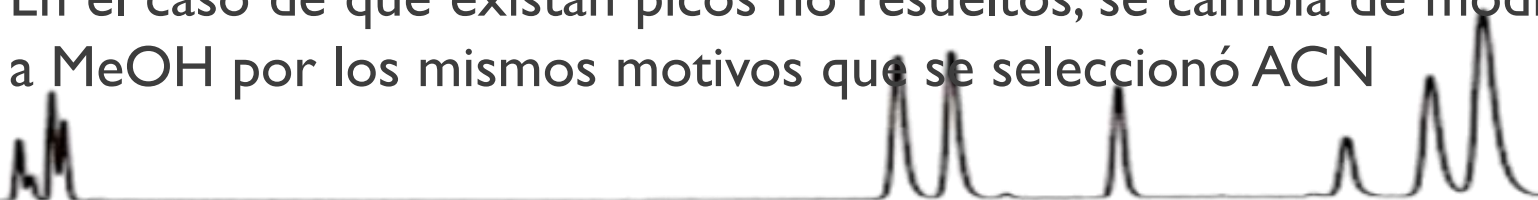
COLUMNAS

Optimización de la selectividad de la fase móvil en modo isocrático

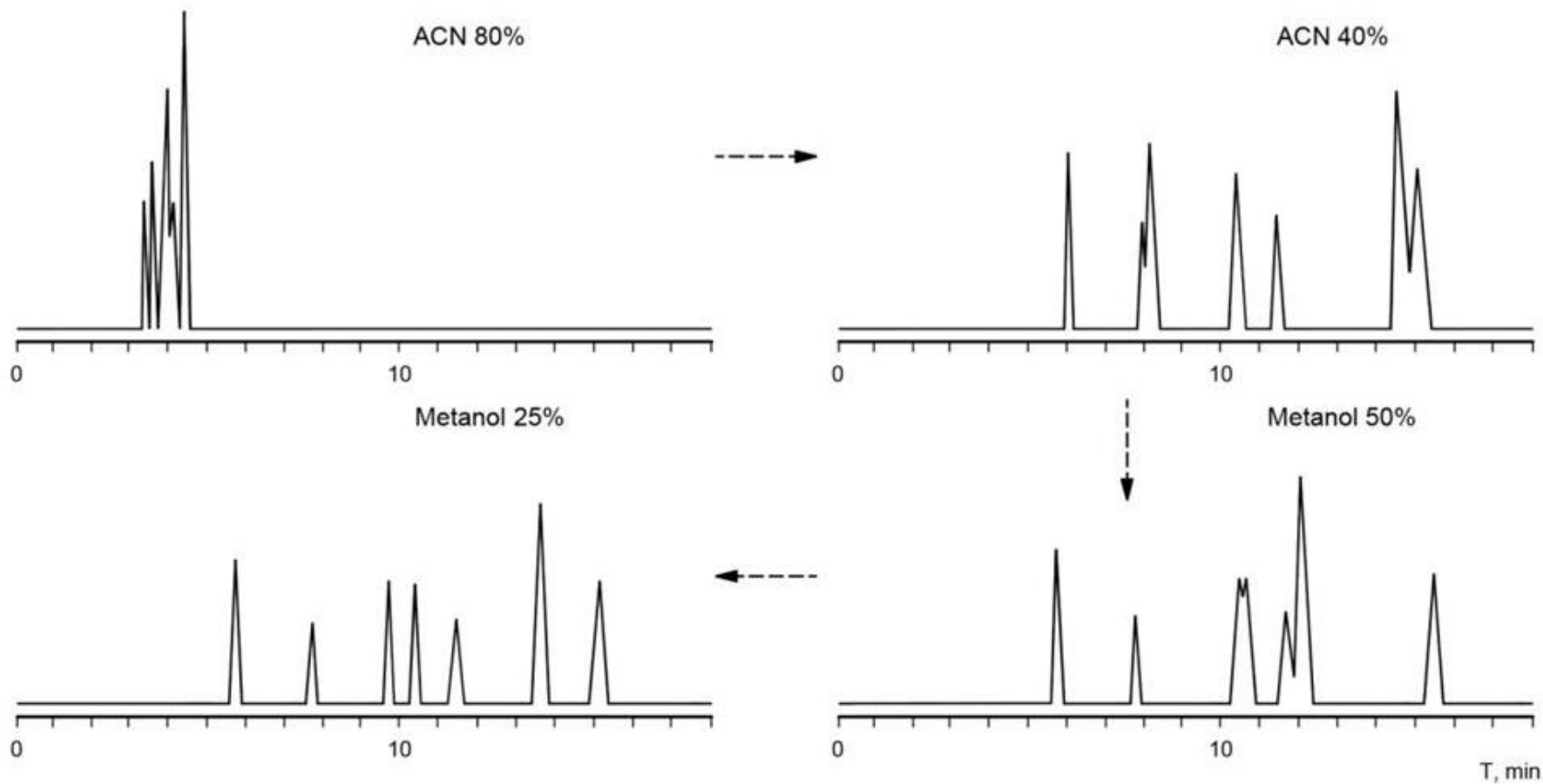
La optimización de la fase móvil comienza utilizando un único disolvente orgánico fuerte, FMB y se denomina modificador, debido a que modifica la interacción de los analitos con la fase estacionaria; se emplea en mezclas con un disolvente débil, típicamente agua, FMA.

En primer lugar se selecciona el ACN debido a que entre los tres disolventes seleccionados es el que presenta propiedades cromatográficas más favorables. El ajuste de la retención, k , se realiza cambiando la proporción de FMB.

En el caso de que existan picos no resueltos, se cambia de modificador a MeOH por los mismos motivos que se seleccionó ACN



COLUMNAS



COLUMNAS

- Seleccione un relleno de columna de poro pequeño (60-100 Å) si el peso molecular del soluto es inferior a aproximadamente 5.000. En caso contrario, utilice un relleno de columna con 300 Å de tamaño de poro.
- Selección un tamaño de partícula estándar de 5 µm, aunque está aumentando el uso de las de 3,5 µm. Si es necesario realizar análisis de alta velocidad o mayor resolución, pueden utilizarse partículas de 1,8 µm y 3,5 µm.
- Los tamaños de columna más habitualmente recomendados para el desarrollo de métodos analíticos son 4,6 x 150 mm y 4,6 x 75 mm. Si necesita más resolución, utilice una columna de mayor longitud, 4,6 x 250 mm, o una columna de la misma longitud con partículas de menor tamaño.

COLUMNAS

Moléculas pequeñas

PM < 2.000

Moléculas grandes

PM > 2.000

De 80 a 120 Å

Tamaño de poro de relleno

300 Å

La elección del tamaño del poro de relleno se basa, en primer lugar, en el tamaño de las moléculas que vayan a analizarse. Las moléculas pequeñas típicas pueden difundir fácilmente la entrada y salida de rellenos de poros de 80 a 120 Å, pero los péptidos y las proteínas no pueden. Por esta razón, se recomienda que utilice rellenos de 300 Å de tamaño de poros (300SB) para condiciones isocráticas de separaciones de gradientes de péptidos y proteínas.

Eclipse Plus C18

Fase Ligada inicial de columna

StableBond 300SB-C18

Se recomienda una C18 como fase ligada inicial de columna para la mayoría de las muestras, ya que maximiza la retención desde compuestos moderadamente polares hasta compuestos apolares. Deberían considerarse fases de cadenas más cortas si no puede optimizarse la resolución con una fase C18 o si está analizando proteínas más grandes.

4,6 mm

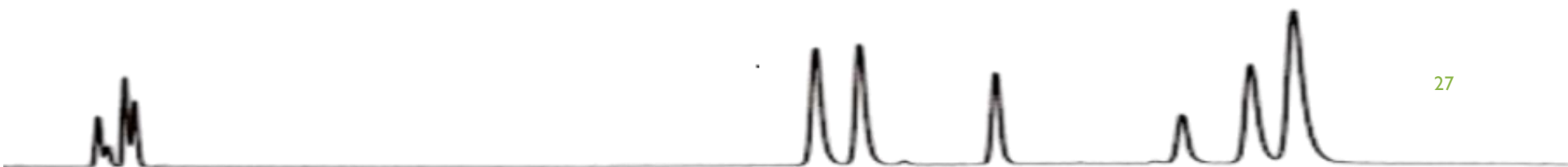
Diámetro de columna

4,6 mm

El diámetro de la columna define cuánto material (masa) se puede inyectar en una columna; cuanto menor sea el diámetro, menor será la cantidad de material que se puede inyectar manteniendo una buena forma de pico. Las columnas de menor diámetro proporcionan mayor sensibilidad y, por lo tanto, se utilizan habitualmente para LC/MS y aplicaciones con muestra limitada.

COLUMNS

Separation Mode	Description:
Reversed Phase	Used to separate hydrophobic compounds.
Normal Phase	Used to separate hydrophobic compounds and matrices that are retained too strongly by reversed phase.
HILIC	Used to polar organic compounds that are poorly retained by reversed phase.
Ion Exchange	Used to separate charged compounds.
Ion Exclusion	Used to separate organic acids, carbohydrates, sugars, starches, and oligosaccharides.
Chiral LC	Used to separate enantiomers.
Size Exclusion Chromatography (SEC)	Used to separate biomolecules and polymers.



COLUMNAS/FASE REVERSA

Tipo de columna	Diámetro interior (mm)	Carga de muestra (aprox.)	Flujo normal	Mayor sensibilidad	Aplicaciones
Analítica	4.6	0,1-1,5 mg	0,5-3 ml/min		Separaciones estándar
Ahorro de disolvente	3.0	150-500 ug	0,3-1,5 ml/min	+	Economiza disolvente, usa instrumentos HPLC estándar
NarrowBore (de diámetro estrecho)	2.1	50-120 ug	0,1-0,5 ml/min	++	Alta sensibilidad, muestra limitada, LC/MS, economizar disolvente
Microbore	1.0	10-50 ug	10-100 µl/min	++++	Alta sensibilidad, muestra limitada, LC/MS
Capilar	0.5, 0.3	1-10 ug	1-15 µl/min	+++++	Muy alta sensibilidad, LC/MS, péptidos y proteínas
Nanocolumna	0.1, 0.075	100-200 ng	200-500 nl/min	+++++	Muy alta sensibilidad, LC/MS, péptidos y proteínas
Semiprep.	9.4	1-10 mg	5-10 ml/min		mg separaciones preparativas
Preparativa	21.2	20-250 mg	20-60 ml/min		Cientos de miligramos hasta 1 gramo



COLUMNAS

Columna para HPLC

Fase estacionaria

Tipo de
superficie

Tamaño de
poro

Tamaño de
partícula

Propiedades químicas

Estabilidad química/Sensibilidad

Factor de retención

Dimensiones de columna

Longitud

Diámetro
interno

Propiedades físicas

Eficiencia

Velocidad

COLUMNAS

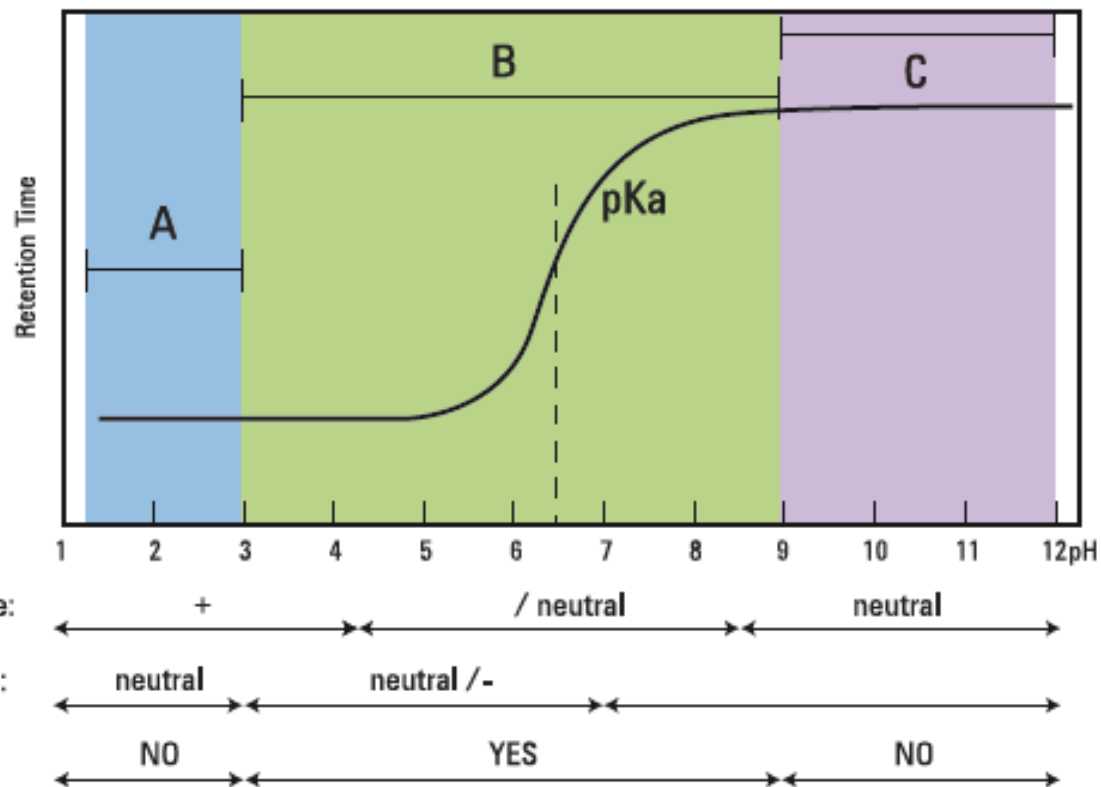
Los compuestos ionizables, bases y ácidos, modifican su factores cromatográficos (eficiencia de la columna, selectividad y tiempo de retención) con el pH.

- Los cambios en el pH de la fase móvil mejoran la eficiencia de la columna ya que puede modificarse la ionización del analito y la de los silanoles residuales
- Se minimizan las interacciones secundarias entre los analitos y la superficie de sílice que provocan una degradación de la forma del pico
- El tiempo de retención puede mejorar cambiando el pH de separación de forma que se separen los analitos en su forma no ionizada.



COLUMNAS

Desarrollo de métodos en el rango de pH 1-12



COLUMNAS

Bajo pH < 3 – Región A

- Comience el desarrollo del método a un pH bajo, en el que los silanoles de la columna RP-HPLC están protonados. Así se minimizan las colas de pico al eliminar las interacciones silanol/base.
- A pH bajo, los compuestos básicos están cargados positivamente y puede reducirse su retención.
- Los compuestos ácidos pueden estar protonados y presentar mayor retención.
- Los tiempos de retención son normalmente estables frente a pequeños cambios en el pH, generando un método robusto.
- Los aditivos de fase móvil volátiles, como el ácido fórmico o el trifluoroacético (TFA), se utilizan a menudo a bajo pH con LC/MS.

pH medio 7 – Región B

- Desarrolle métodos a pH como mínimo 1 unidad por encima o por debajo del pKa para minimizar los cambios en la retención con pequeños cambios del pH.
- Algunos grupos SiOH de la superficie de sílice se convierten en SiO⁻ por encima de pH 4 a 5; pueden producirse interacciones que den lugar a colas.
- Minimice las interacciones seleccionando una columna bien diseñada y desactivada con aditivos como TEA (triethylamina), (menos aconsejable) o utilizando fases "ligadas polares".
- La ruptura de la sílice se evita mediante una química de enlace innovadora, una fuerte desactivación y el uso de Rx-SIL.

pH alto > 9 – Región C

- En esta región, los compuestos básicos pueden encontrarse en su forma de base libre.
- Es probable que se dé una mayor retención y resolución de los compuestos básicos.
- La retención cambia poco en esta región, por lo que pueden desarrollarse métodos robustos.
- La ruptura de la sílice se evita mediante una innovadora química de columna bidentada, una desactivación fuerte, el uso de Rx-SIL y una fase móvil óptima.
- El hidróxido amónico es un excelente modificador de fase móvil volátil a pH alto.



DETECTORES

El detector mide alguna propiedad físico química de la fase móvil o del analito cuando eluye desde la columna.

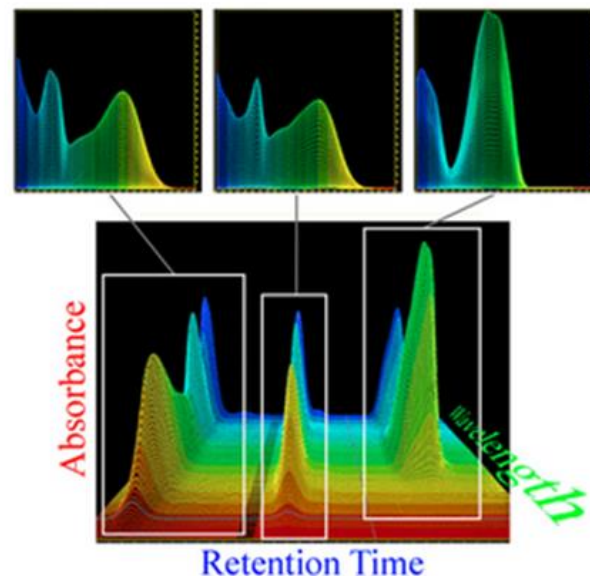
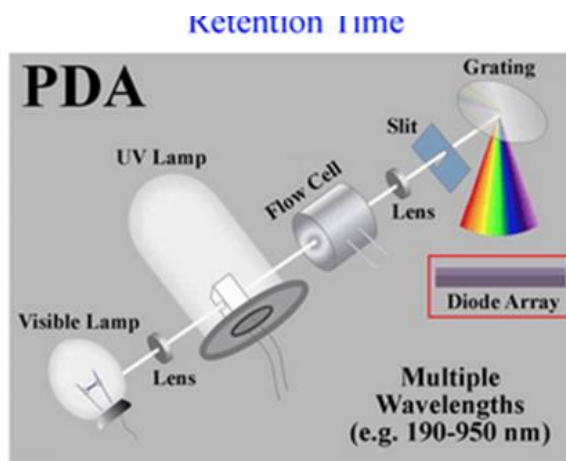
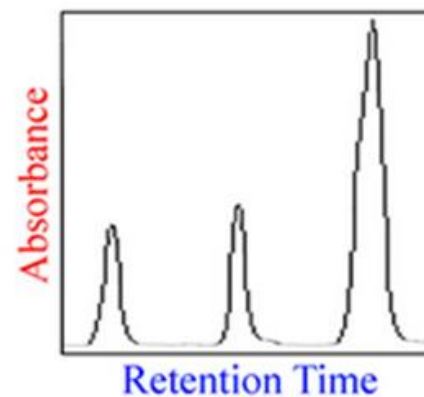
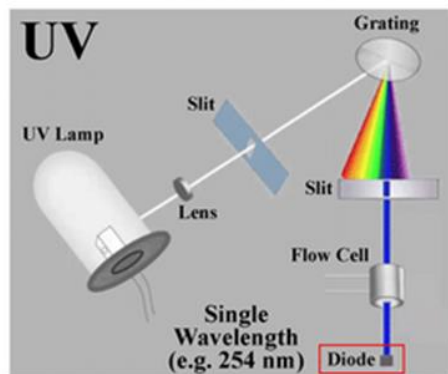
- Espectrofotométrico UV-vis (DAD)
- Fluorimétrico (FLD)
- Índice de refracción (IRD)
- Electroquímico(ECD)
- De dispersión de radiación tras evaporación (ELSD)
- Aerosol cargado (CAD)
- Masas



DETECTORES/ESPECTROFOTOMÉTRICOS

- Posee buena sensibilidad y rango lineal.
- Permite detectar analitos en el orden de los nanogramos.
- No es destructivo.
- Permite hacer gradientes con la única restricción de que los solventes sean transparentes.
- El detector UV opera en el rango de 190 – 350 nm mientras que el UV-Vis 190 – 900 nm
- La concentración del analito responde a la ley de Beer
- Existen de dos tipos, de onda fija y de onda variable

DETECTORES /ESPECTROFOTOMÉTRICOS



DETECTORES/FLUOROMÉTRICOS

- Se puede emplear para compuestos con fluorescencia natural o adquirida por una reacción de derivatización
- Muy sensible y selectivo lo cual lo hace adecuado para el análisis de trazas (hasta UV x 1000)
- No es destructivo*
- Existen dos tipos de reflectores, de onda fija y de onda variable



DETECTORES/FLUOROMÉTRICOS

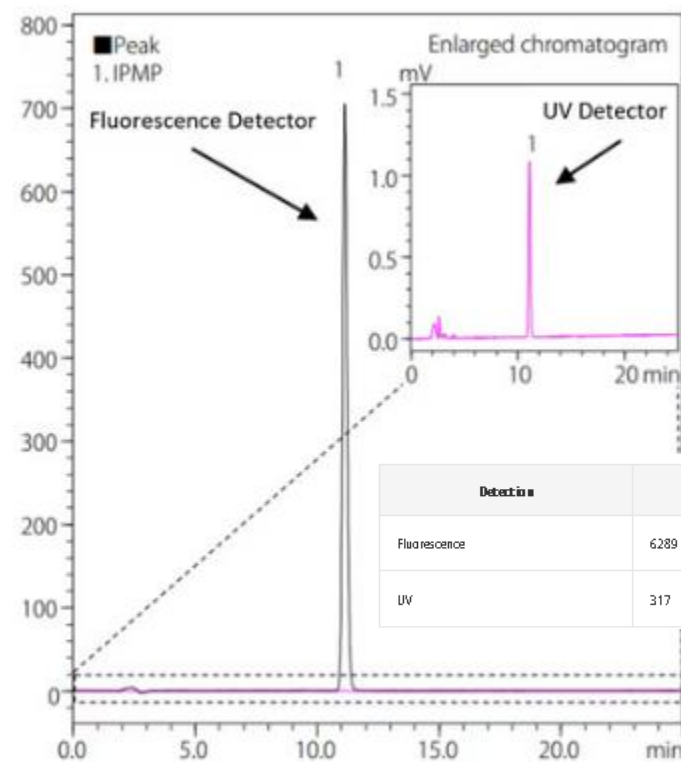
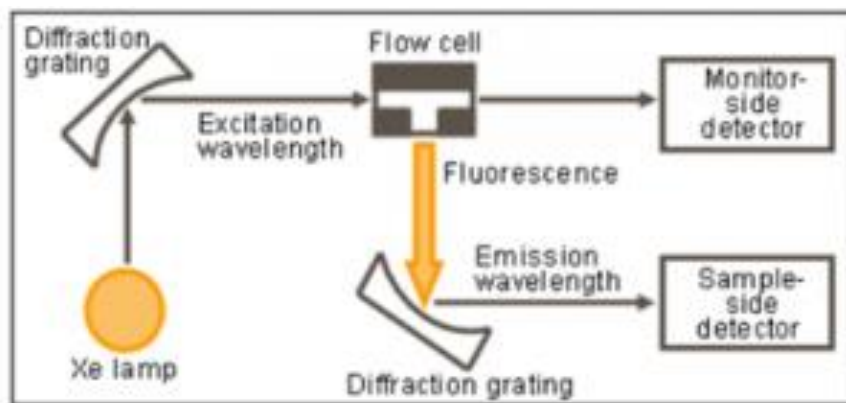


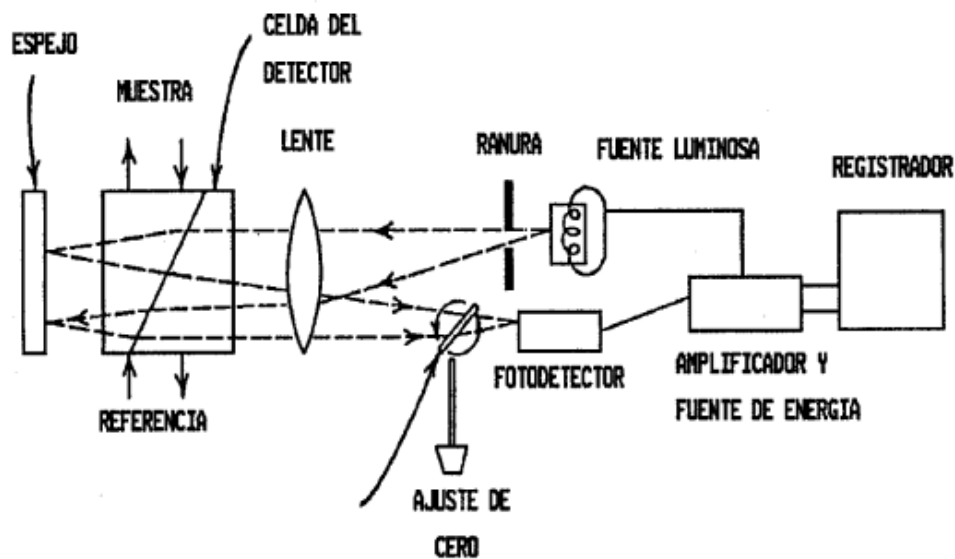
Fig. 3 Comparison of Chromatograms of IPMP
Standard Solution (2 mg/L)

DETECTORES/ÍNDICE DE REFRACCIÓN

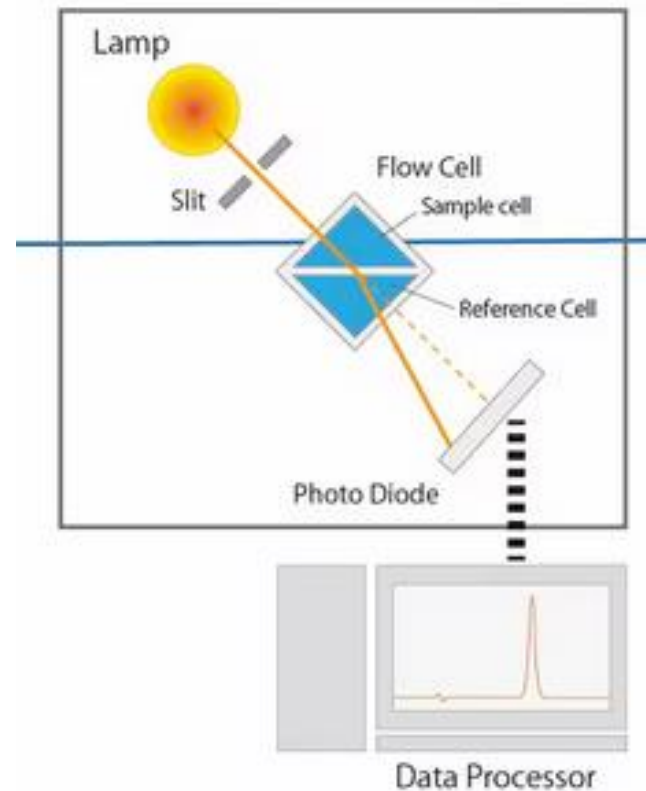
- Mide la diferencia de índice de refracción entre el solvente puro y solvente que contiene al muestra.
- Es un detector universal*
- No es destructivo
- Es poco sensible
- No permite la aplicación de gradiente de elución
- Sensible a las variaciones de temperatura



DETECTORES /ÍNDICE DE REFRACCIÓN



Refractive Index Detector

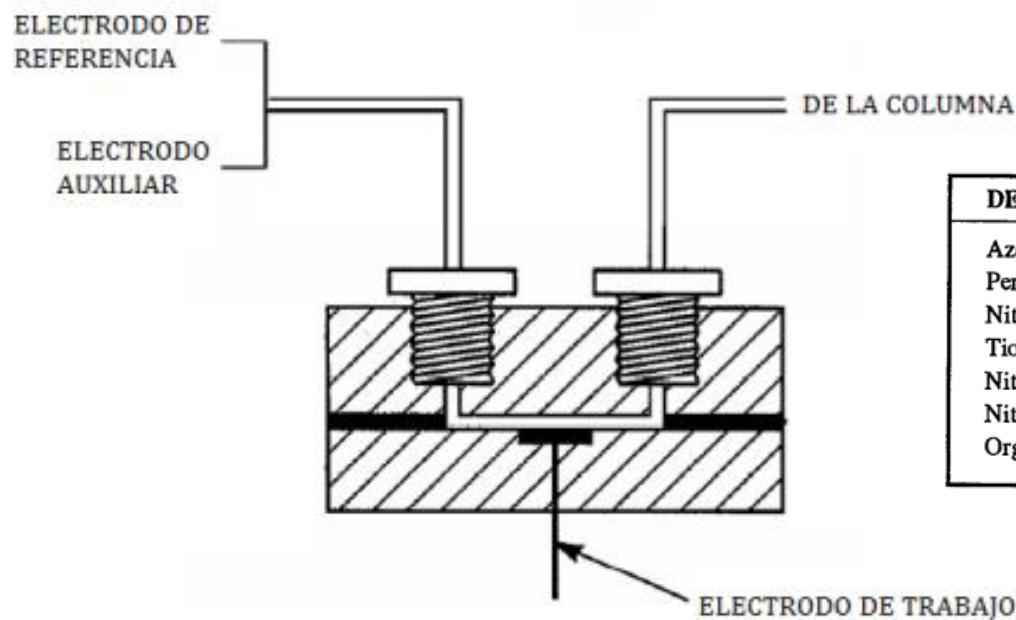


DETECTORES/ELECTROQUÍMICO

- Muy sensible (hasta $1000 \times$ UV)
- Selectivo para analitos oxidables o reducibles
- Apto para trazas en matrices complejas
- La fase móvil debe ser conductiva, lo cual limita su aplicación a fase reversa e intercambio iónico
- La corriente es proporcional a la concentración de analito
- Destructivo



DETECTORES /ELECTROQUÍMICO



DE REDUCCION	DE OXIDACION
Azocompuestos Peróxidos Nitrosaminas Tioamidas Nitrocompuestos aromáticos Nitrocompuestos alifáticos Organometálicos	Peróxidos Aminas aromáticas Purinas

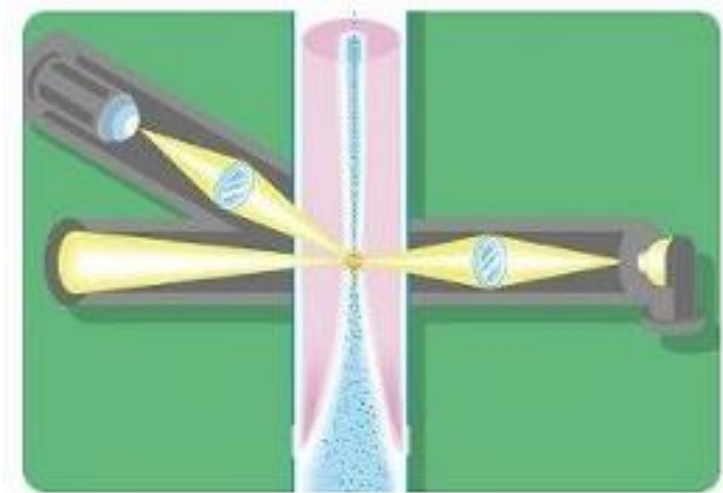
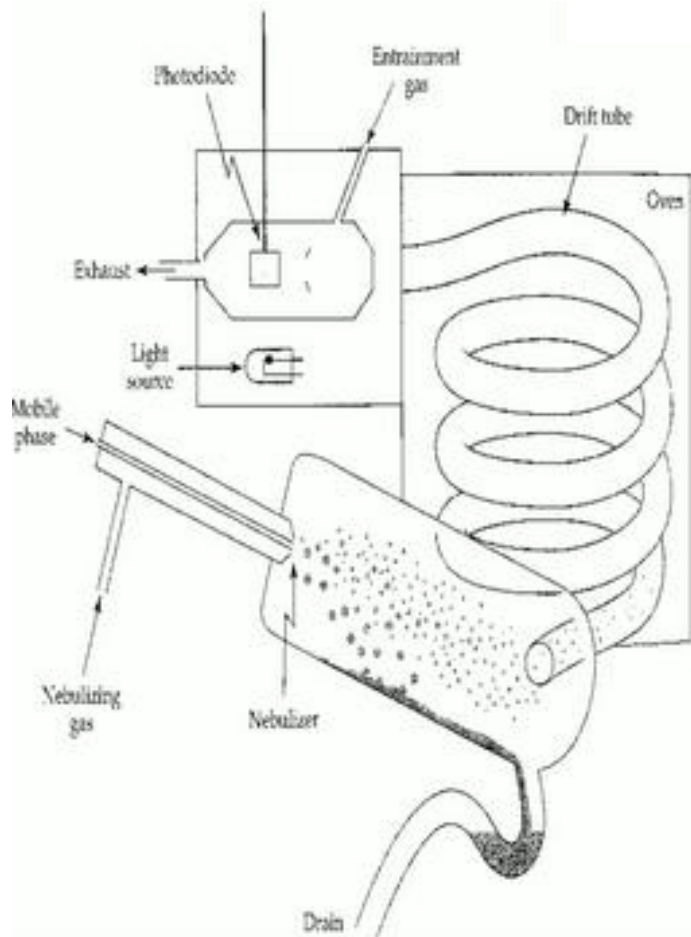


DETECTORES/ DE DISPERSIÓN DE RADIACIÓN TRAS EVAPORACIÓN

- En principio, todos los compuestos menos volátiles que la fase móvil pueden ser detectados
- La respuesta del detector está directamente relacionada con la masa del compuesto eluyente. Mide la dispersión de radiación láser producida por estas partículas
- Los solventes HPLC se pueden emplear. Los aditivos no volátiles como sales de fosfato no están permitidos
- Requiere Nitrógeno para la nebulización
- No destructivo

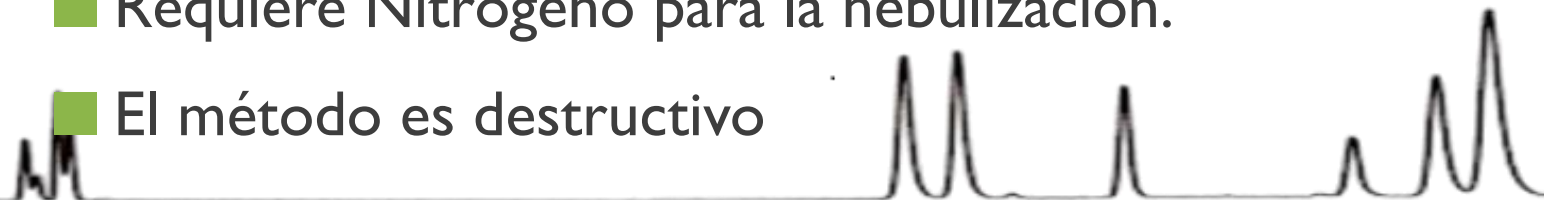


DETECTORES / DE DISPERSIÓN DE RADIACIÓN TRAS EVAPORACIÓN

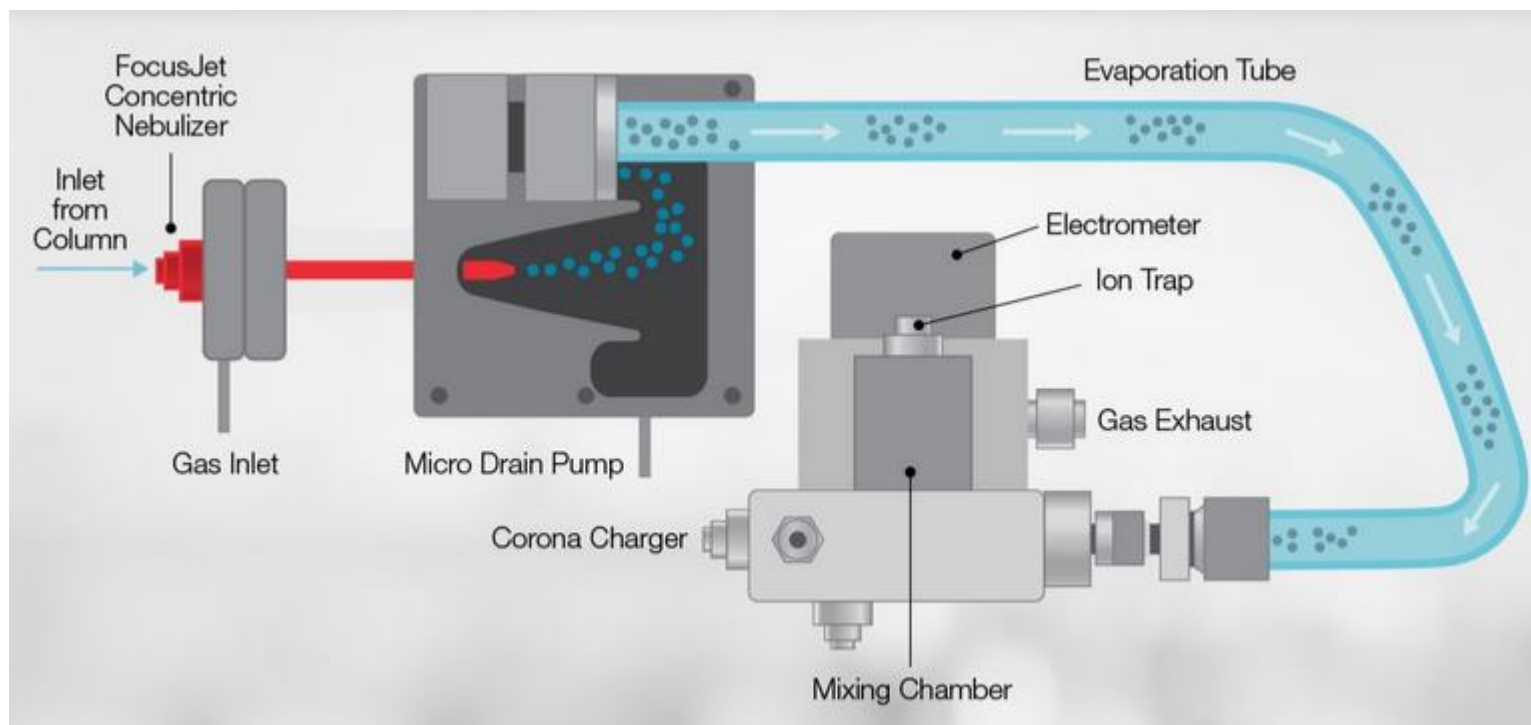


DETECTORES/ AEROSOL CARGADO

- En principio, todos los compuestos menos volátiles que la fase móvil pueden ser detectados
- La partículas del analito se cargan por transferencia de carga desde una corriente de gas cargado. Estas cargas dan una señal que se recoge por un electrodo colector. La señal es proporcional a la cantidad de analito presente
- Los solventes HPLC se pueden emplear. Los aditivos no volátiles como sales de fosfato no están permitidos
- Requiere Nitrógeno para la nebulización.
- El método es destructivo



DETECTORES / AEROSOL CARGADO

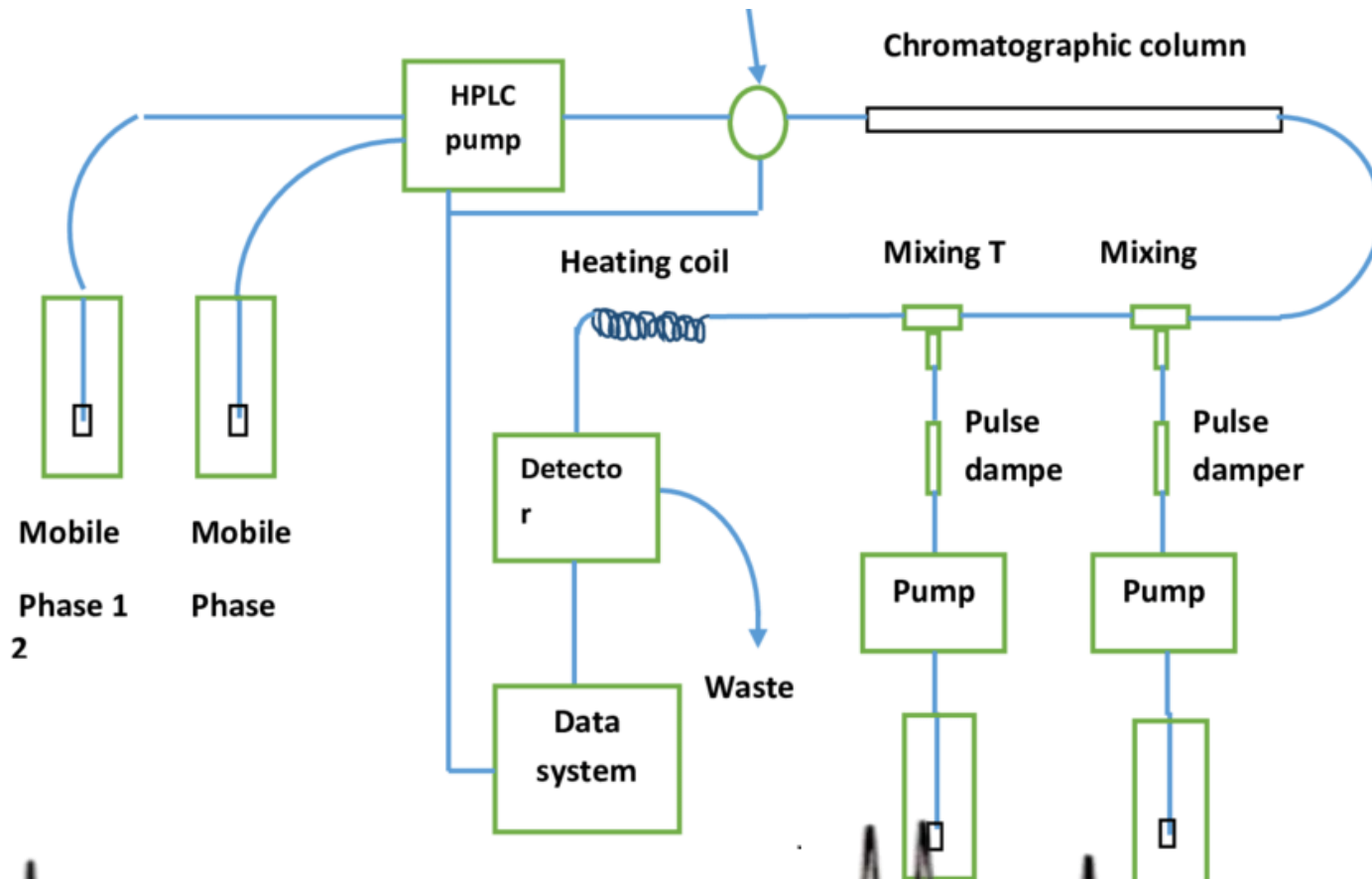


OTROS EQUIPOS/DERIVATIZADORES POST COLUMNA

- Se utilizan para aumentar la sensibilidad o mejorar el método analítico para muestras como aminoácidos, proteínas y azúcares.
- Los eluatos de la columna se mezclan con reactivos de derivatización antes de ingresar al detector mejorando la sensibilidad de detección o utilizando las propiedades del nuevo compuesto para seleccionar un detector más selectivo



OTROS EQUIPOS/DERIVATIZADORES POST COLUMNA



OTROS EQUIPOS/DERIVATIZADORES POST COLUMNA

- La derivatización fotoquímica es un método que utiliza luz con ciertas propiedades para irradiar un objetivo y provocar un cambio químico o alterar sus propiedades químicas.
- La derivatización electroquímica es un método en el que se aplica un voltaje específico a un objetivo de alguna manera para que se oxide a una sustancia con una fuerte fluorescencia.

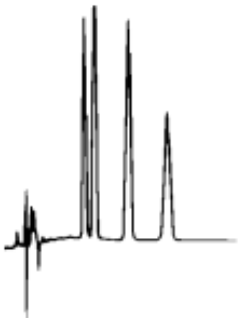


OTROS EQUIPOS/COLECTORES DE FRACCIONES



TROUBLESHOOTING

Table 1. HPLC Problems, Probable Causes, and Remedies

Problem	Probable Cause	Remedy/Comments
Problem No. 1: No Peaks/Very Small Peaks		
Normal  794-0747	1. Detector lamp off. 2. Loose/broken wire between detector and integrator or recorder. 3. No mobile phase flow. 4. No sample/deteriorated sample/ wrong sample.	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 and no air bubbles in the sample. Evaluate system performance with fresh standard to confirm sample as source of problem. 5. Check attenuation or gain settings. Check lamp status. Auto-zero if necessary.
Problem  794-0748		
Problem  794-0749		

TROUBLESHOOTING

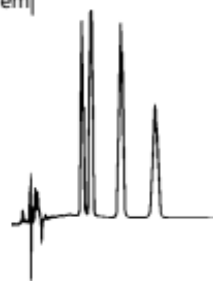
Problem	Probable Cause	Remedy/Comments
Problem No. 5: Variable Retention Times		

Normal



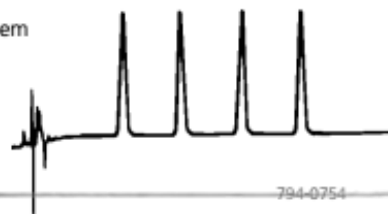
794-0753

Problem



794-0747

Problem



794-0754

1. Leak.
2. Change in mobile phase composition. (Small changes can lead to large changes in retention times.)
3. Air trapped in pump. (Retention times increase and decrease at random times.)
4. Column temperature fluctuations (especially evident in ion exchange systems).
5. Column overloading. (Retention times usually decrease as mass of solute injected on column exceeds column capacity.)
6. Sample solvent incompatible with mobile phase.
7. Column problem. (Not a common cause of erratic retention. As a column ages, retention times *gradually* decrease.)

1. Check system for loose fittings. Check pump for leaks, salt buildup, unusual noises. Change pump seals if necessary.
2. Check make-up of mobile phase. If mobile phase is machine mixed using proportioning values, hand mix and supply from one reservoir.
3. Purge air from pump head or check valves. Change pump seals if necessary. Be sure mobile phase is degassed.
4. Use reliable column oven. (Note: higher column temperatures increase column efficiency. For optimum results, heat eluant before introducing it onto column.)
5. Inject smaller volume (e.g., 10 μL vs. 100 μL) or inject the same volume after 1:10 or 1:100 dilutions of sample.
6. Adjust solvent. Whenever possible, inject samples in mobile phase.
7. Substitute new column of same type to confirm column as cause. Discard old column if restoration procedures fail (see page 14).

TROUBLESHOOTING

Problem	Probable Cause	Remedy/Comments
---------	----------------	-----------------

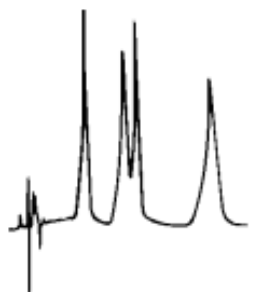
Problem No. 10: Fronting Peaks

Normal



794-0760

Problem

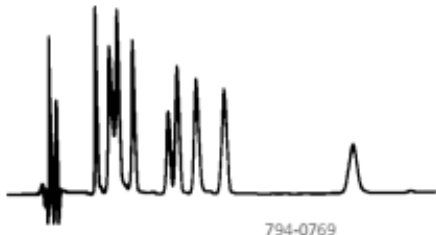
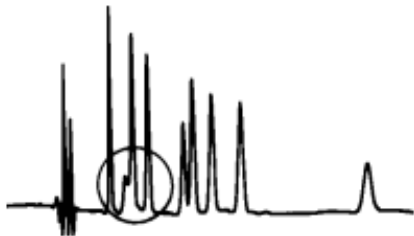


794-0761

1. Column overloaded.
2. Sample solvent incompatible with mobile phase.
3. Shoulder or gradual baseline rise before a main peak may be another sample component.

1. Inject smaller volume (e.g., 10 μL vs. 100 μL). Dilute the sample 1:10 or 1:100 fold in case of mass overload.
2. Adjust solvent. Whenever possible, inject samples in mobile phase. Flush polar bonded phase column with 50 column volumes HPLC grade ethyl acetate at 2-3 times the standard flow rate, then with intermediate polarity solvent prior to analysis.
3. 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).

TROUBLESHOOTING

Problem	Probable Cause	Remedy/Comments
Problem No. 16: Change in Peak Height (one or more peaks)		
Normal  794-0769	1. One or more sample components deteriorated or column activity changed. 2. Leak, especially between injection port and column inlet. (Retention also would change.) 3. Inconsistent sample volume.	1. Use fresh sample or standard to confirm sample as source of problem. If some or all peaks are still smaller than expected, replace column. If new column improves analysis, try to restore the old column, following appropriate procedure (Table 2, page 14). If performance does not improve, discard old column. 2. Check system for loose fittings. Check pump for leaks, salt buildup, unusual noises. Change pump seals if necessary. 3. Be sure samples are consistent. For fixed volume sample loop, use 2-3 times loop volume to ensure loop is completely filled. Be sure automatic sampler vials contain sufficient sample and no air bubbles. Check syringe-type injectors for air. In systems with wash or flushing step, be sure wash solution does not precipitate sample components.
Problem  794-0770	4. Detector or recorder setting changed. 5. Weak detector lamp. 6. Contamination in detector cell.	4. Check settings. 5. Replace lamp. 6. Clean cell.