



Doğan Özdemir

Satış Mühendisi
GLSciences Ürün Sorumlusu
Sales Engineer
Product Specialist for GLSciences
Ant Teknik Cihazlar

HPLC Analizi Sırasında İyi Pik Şekilleri Elde Etmeye Yönelik İpuçları

Tips for Obtaining Good Peak Shapes During HPLC Analysis

Aynı HPLC kolon türleri için bile, ayırım performansları ve yöntemin sağlamlığı, kolon kullanımına bağlıdır. Burada, günümüzde en yaygın kullanılan kolonlar olan kimyasal olarak bağlı silika jel kolonları ile daha iyi sonuçlar elde etmek için bazı ipuçları sunuyoruz. Genel olarak, kromatografide keskin pikler tercih edilir, çünkü yayvan pikler kolayca birbiriyle çakışabilir. Ayrıca, pik alanı konsantrasyonla orantılı olduğundan, pik ne kadar dar olursa, tepe noktası da o kadar yüksek olur. Bu, hassasiyet açısından önemlidir.

1-1. Örnek Adsorpsiyonunu En Az İndirmek

Analitler dolgu maddesi üzerine adsorbe edildiğinde, pik şekilleri kötüleşir ve çoğunlukla asimetrik hale gelir. Böyle bir durum oluştuğu takdirde, end capped bir kolon kullanmak gibi önlemler almak gerekir.

Even for the same types of HPLC columns, their separation performance and the robustness of the method depend a lot on how to use them. Here, we present some tips to obtain better results with chemically bonded silica gel columns, which are the most widely used columns today. In general, sharp peaks are preferred in chromatography because broad peaks can easily overlap each other. In addition, since the peak area is proportional to the concentration, the narrower the peak is, the higher the peak height becomes. This is favored in terms of sensitivity.

1-1. Minimizing Sample Adsorption

When analytes are adsorbed onto the packing material, the peak shapes become bad and most of them are asymmetric. If such a phenomenon occurs, it is necessary to take measures such as using a well end capped column.

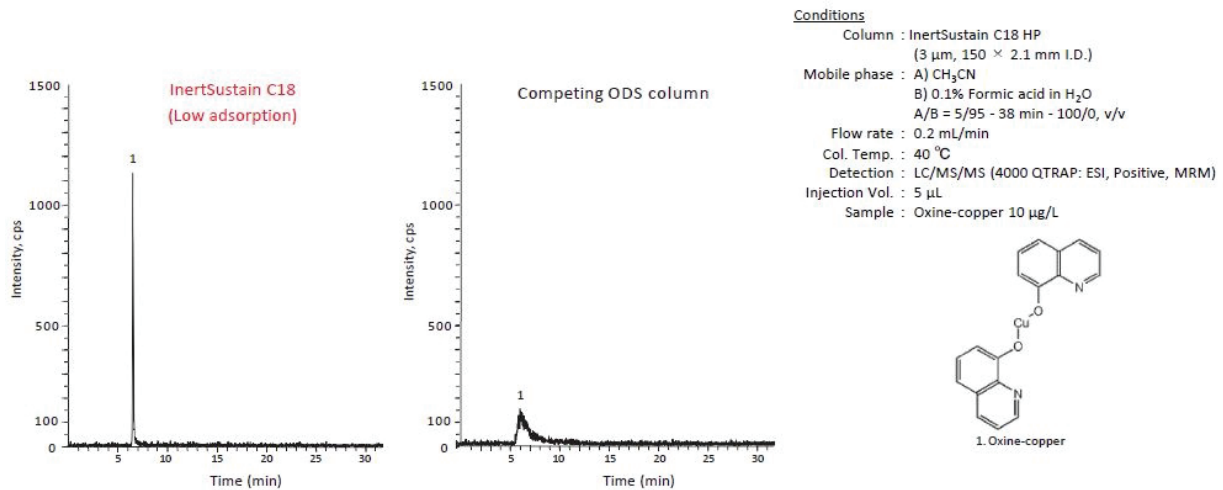


Figure 1-1. Comparison of the elution of a metal chelator.

Şekil 1-1. Metal bir şelatöre ait elüsyonunun karşılaştırılması

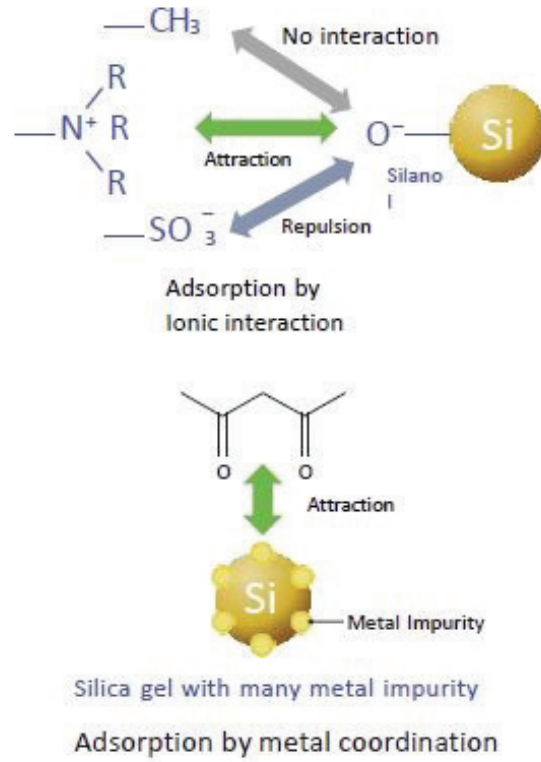


Figure 1-2. Main adsorption causes.

Şekil 2-2. Ana adsorpsiyon sebepleri.

Sebepl 1: Elektrostatik Etkileşim Yoluyla Adsorpsiyon

İyonik fonksiyonel gruplar, örneğin silanol grupları SiO₂ dolgu maddesi üzerinde kaldığında, elektrostatik etkileşim gerçekleşebilir. Bu ters faz modunda meydana gelirse, pik şeklinin bozulmasına neden olabilir.

Sebepl 2: Metal Koordinasyonu ile Adsorpsiyon

Metallerin dolgu silikasına eklenmesi, numunede bulunan metal şelatörlerin adsorpsiyonuna yol açabilir. Bu adsorpsiyon zaman zaman hedef bileşiklerin elüsyonuna engel olabilir.

1-2. Küçük Partiküllerin Seçilmesi

Daha küçük partiküller, aynı dolgu maddesi için bile, daha yüksek kolon verimliliği sağlar. Ancak, daha küçük partiküllerin daha yüksek kolon basıncı oluşturduğu unutulmamalıdır. Bu nedenle sistemin basınç direncinin kontrol altında olması önemlidir.

Representative Cause 1: Adsorption by Electrostatic Interaction

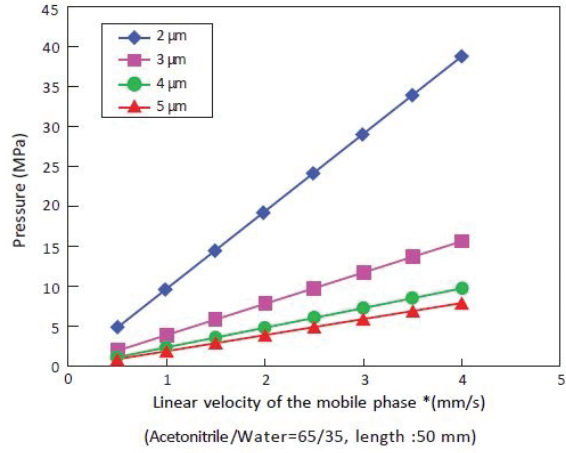
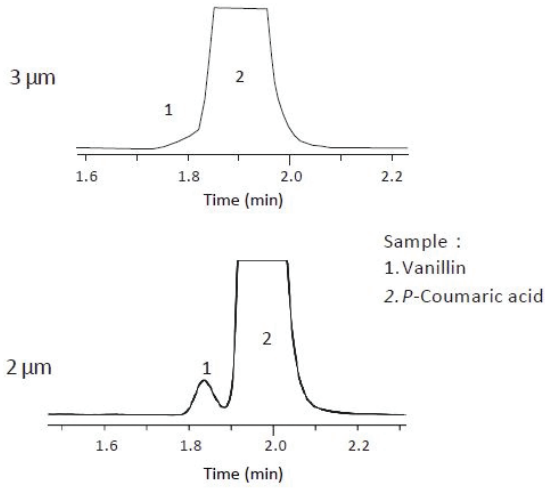
When the ionic functional groups, for example, silanol groups SiO₂ remain on the packing material, electrostatic interaction can happen. If this happens in reversed phase mode, it can cause peak distortions.

Representative Cause 2: Adsorption by Metal Coordination

The inclusion of metals in packing silica can lead to adsorption of metal chelators contained in a sample. This adsorption sometimes causes no elution of the target compounds.

1-2. Choosing Small Particles

Even for the same packing material, smaller particles yield better column efficiency. However, note that smaller particles generate higher column pressure. Please check the pressure resistance of your system.



*: Linear velocity means a value flow volume divided by column surface area.

Figure 1-3. Relationship between the linear velocity and the column pressure.

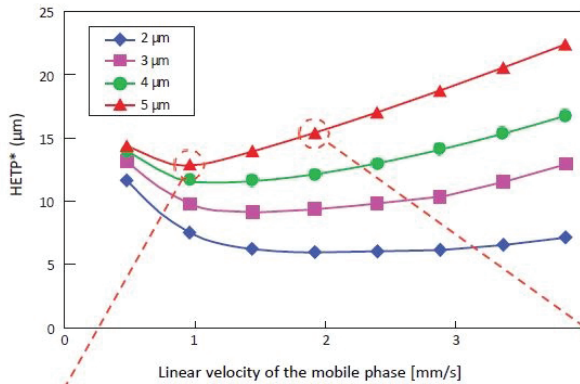
Şekil 1-3. Doğrusal hız ve kolon basıncı arasındaki ilişki.

1-3. Akış Hızının Etkisi

Pik genişlikleri, hareketli fazın doğrusal hızına bağlıdır ve her bir kolon için bir optimal hız bulunur. Keskin pikler elde etmek için optimuma yakın bir doğrusal hız sağlayan bir akış hızının uygulanması istenir.

1-3. Effect of the Flow Rate

Peak widths depend on the linear velocity of the mobile phase, and each column has its optimal. In order to obtain sharp peaks, it is desirable to apply a flow rate which delivers a linear velocity close to the optimal.



: HETP (Height equivalent to a theoretical plate) is the column length required to obtain one theoretical plate. Lower values indicate better separation performance.

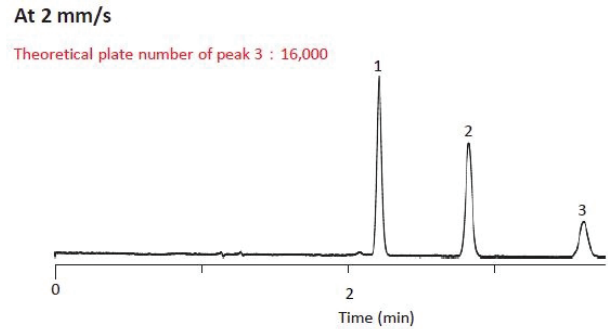
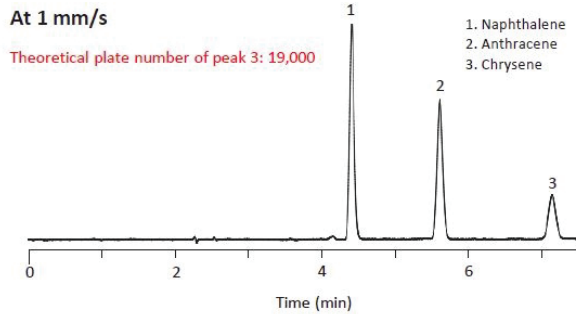


Figure 1-4. Van Deemter's plots on ODS columns.

Şekil 1-4. ODS kolonların Van Deemter eğrileri

1-4. Ölü Hacmi En Aza İndirmek

Tubing ve kolon arasında bir ölü hacim varsa, pikler bozulur. Bu aynı zamanda tubingün kolona olan bağıl hacmi büyük olduğunda da olur. Küçük iç çapa sahip kolonlar (ID) veya kısa kolonlar kolayca etkilenir. Ölü hacmin etkisini azaltmak için, uzun kolonların kullanılması bir çözümdür. Şekil 1-7, 2 µm partikül boyutlu 50 mm uzunluğunda bir kolon ile 3 µm partikül boyutlu 75 mm uzunluğunda bir kolon arasındaki bir karşılaştırmayı gösterir. Daha uzun kolon uzunluğu, daha büyük partiküllü kolonlarla bile daha iyi pikler elde edilmesinin nedeni ölü hacmin etkisinin azalmış olmasıdır.

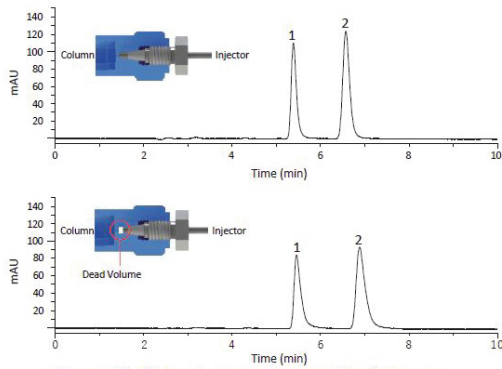


Figure 1-5. Effect of dead volume on peak shapes.

Conditions

Column : Inertsil ODS-3 (5 µm, 150 X 4.6 mm I.D.)
 Mobile phase : CH₃CN/H₂O = 5/95, v/v
 Flow rate : 1.0 mL/min
 Col. Temp. : 40 °C
 Detection : UV 215 nm
 Sample : Methamidophos
 Acephate

Şekil 1-5. Ölü hacmin pik şekilleri üzerine etkisi.

1-4. Minimizing the Dead Volume

If there is a dead volume between the tubing and the column, peaks are distorted. This also happens when the relative volume of the tubing to the column is large. Columns with a small internal diameter (ID) or a short length are easily affected. To reduce the effect of the dead volume, using long columns is one solution. Figure 1-7 shows a comparison between a 50 mm long column packed with 2 µm particles and a 75 mm long column packed with 3 µm particles. With the longer column length, even larger particles provide better peaks because the effect of the dead volume is less significant.

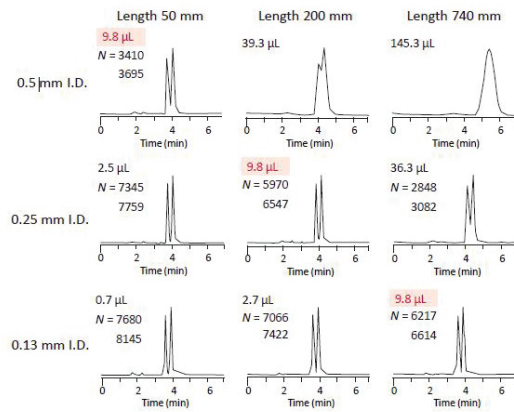


Figure 1-6. Effect of I.D. and length of connection tubing.

Conditions

Column : Inertsil ODS-3 (5 µm, 150 X 1.5 mm I.D.)
 Mobile phase : A) CH₃CN
 B) H₂O
 A/B = 60/40, v/v
 Flow rate : 0.1 mL/min
 Col. Temp. : 40 °C
 Detection : UV 254 nm (Cell length 5 mm, Cell volume 1.5 µL)
 Sample : 2,3-Dimethylphenol (1 mg/mL in 60% CH₃CN)
 2,6-Dimethylphenol (1 mg/mL in 60% CH₃CN)

Şekil 1-6. I.D. ve bağlantı tubingünün uzunluğunun etkisi.

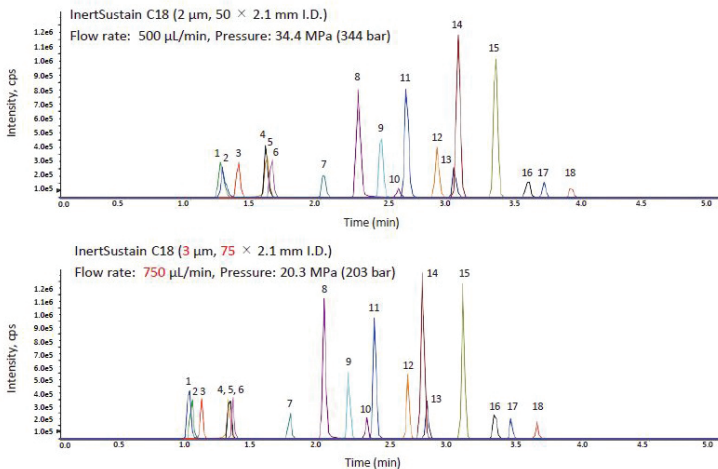


Figure 1-7. Comparison between 2 µm- and 3 µm-particles.

Şekil 1-7. 2µm ve 3µm'lik partüküller arasında karşılaştırma.

Conditions

Column : InertSustain C18 or InertSustain C18 HP
 Mobile phase : A) CH₃CN
 B) 0.05% HCOOH in H₂O
 A/B = 5/95 - 5 min - 95/5, v/v
 Col. Temp. : 40 °C
 Detection : LC/MS/MS
 (4000 QTRAP: ESI, Positive, MRM)
 Injection Vol. : 10 µL

Sample

- | | |
|---------------------|-------------------------|
| 1. Acetaminophen | 11. Doxepin |
| 2. Ranitidine | 12. Amitriptyline |
| 3. Theophylline | 13. Reserpine |
| 4. Scopolamine | 14. Isopropylantipyrine |
| 5. Naltrexone | 15. Ketoprofen |
| 6. Caffeine | 16. Warfarin |
| 7. Metoprolol | 17. Capsaicin |
| 8. Chlorpheniramine | 18. Dihydrocapsaicin |
| 9. Propranolol | |
| 10. Diphenhydramine | |

1-5. Silika Partiküllerin Gözenek Büyüklüğü

5000'den daha büyük bir moleküler ağırlığa sahip bileşikler için, bazen iyi pik şekilleri elde etmek için geniş gözeneklere sahip partiküllerin kullanılması gerekir. Örneğin, Inertsil WP 300 C 18 bu bileşikler için iyi bir seçenektir.

1-6. Hızlı Elüsyon

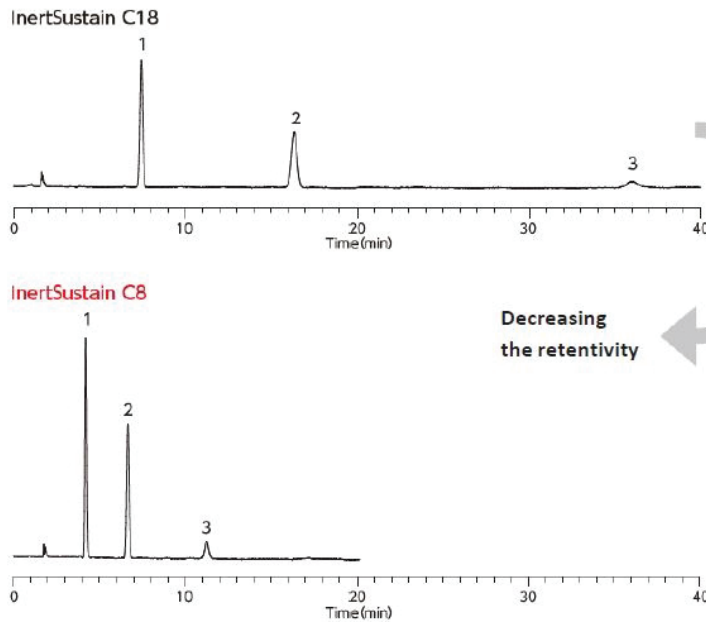
Genel olarak, enjeksiyondan dedektöre kadar geçen süre daha uzun sürdükçe analitler daha fazla yayılırlar ve bu daha yayvan pik şekillerine neden olur. Bu nedenle, hassasiyet, kısa analizi mümkün kılan analitik koşullar benimsenerek iyileştirilebilir. Kolon kalıcılığını artırmak, kolon uzunluğunu kısaltmak ve mobil faz kompozisyonunu değiştirmek bu yöntemler arasındadır. Bununla birlikte, bu yöntemlerin ayrımı kötüleşebileceği unutulmamalıdır.

1-5. Pore Size of Silica Particles

For compounds which have a molecular weight larger than 5000 it is sometimes necessary to use particles having wide pores to obtain good peak shapes. For example, Inertsil WP 300 C 18 is a good option for these compounds.

1-6. Fast Elution

In general analytes spread more as it takes longer from injection to detection, and this results in broader peaks. Therefore, sensitivity can be improved by adopting analytical conditions which enable short analysis: 1 increasing the column retentivity, 2 shorten the column length, and 3 changing the mobile phase composition. However, note that these methods might worsen your separation.

**Conditions**

Column size : 5 μ m, 150 X 4.6 mm I.D.
Mobile phase : CH₃CN
Flow rate : 1.0 mL/min
Col. Temp. : 40 °C
Detection : UV 270 nm

Sample

1. Vitamin K2(MK-4) (5 mg/L)
2. Vitamin K1 (5 mg/L)
3. Vitamin K2(MK-7) (5 mg/L)

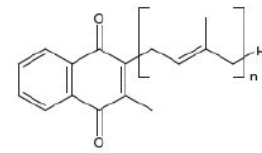
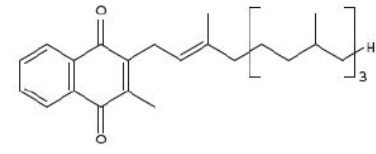


Figure 1-8. Shorter analysis by decreasing the column retentivity.

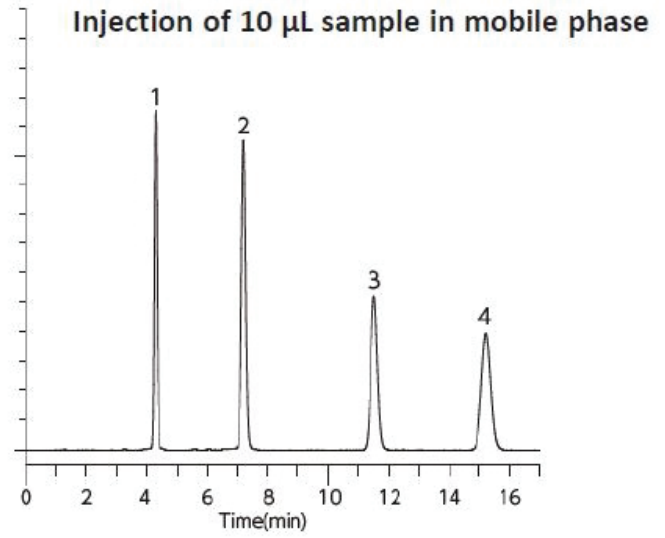
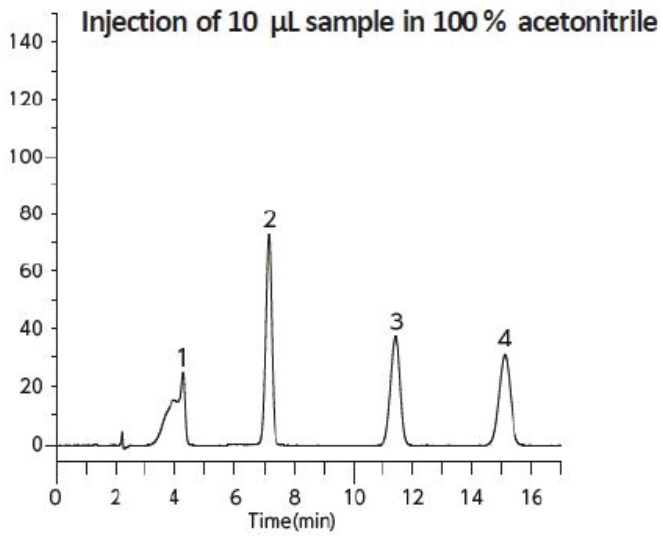
Şekil 1-8. Kolon kalıcılığını azaltarak daha kısa analiz sonuçları.

1-7. Numune Solventinin Bileşimi

Numune solventin ile mobil faz arasında bir uyumsuzluk varsa, pik şekilleri bozulabilir. Çünkü numune solventi enjeksiyondan hemen sonra mobil faz olarak çalışır. Bu, numune solventi daha yüksek elüsyon gücüne sahip olduğunda pik şekilleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olmaktadır. Bu durumda, numune solventinin bileşiminin veya enjeksiyon hacminin değiştirilmesi pik şekillerini geliştirebilir.

1-7. Composition of the Sample Solvent

If there is a mismatch between the sample solvent and the mobile phase, peak shapes can be distorted because the sample solvent works as the mobile phase soon after the injection. This has significant influence on the peak shapes when the sample solvent has higher elution strength. In this case, changing the composition of the sample solvent or the injection volume can improve the peak shapes.

**Conditions**

Column : InertSustain AQ-C18 (5 µm, 150 X 4.6 mm I.D.)
Mobile phase : H₂O/CH₃CN = 90/10, v/v
Flow rate : 1.0 mL/min
Col. Temp. : 40 °C
Detection : UV 280 nm
Injection : 10 µL

Sample

1. 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde
2. 2-Furfural
3. 2-Acetylfuran
4. 5-Methyl-2-furfural

Figure 1-9. Peak shape improvement by changing the composition of the sample solvent.

Şekil 1-9. Numune solventinin bileşiminde yapılan değişikliklerle pik şekillerinin iyileştirilmesi.

Referans \ Reference:

https://www.glsclences.com/technique/technique_data/lc/usage_of_hplc_1/column1.html