

## Vedelikkromatograafilise meetodi optimeerimine

Näited ajakirja LC&GC Europe erinevatest numbritest

1

## Eesmärgid?

- “Arenda meetodit kuni see on piisav sinu vajadustele, siis lõpeta”
  - Iga meetodit saab teha paremaks
  - Meil ei pruugi olla selle jaoks aega ega vajadust

2

## Nõuded meetodile

- Proovide arv
- Jooksu kestvus
- Analüütide arv
- Maatriksite arv
- Tundlikkus
- Korduvus
- Korratavus
- Tõesus
- Kontsentratsioonivahemik
- Kvalitatiivne või kvantitatiivne
- Aparatuuri piirangud
- Prooviettevalmistus
- Valideerimine

3

## Parameetrid, mida jälgida

- Mahtuvusfaktor
- Asümmeetriafaktor
- Lahutuskriteerium
- Teoreetiliste taldrikute arv

4

## Kromatograafia tüüp?

- Pöördfaas
- Normaalfaas
- Ioonkromatograafia
- Ioonpaar kromatograafia
- HILIC
- Suuruseraduskromatograafia
- jne

5

## Millest lahutus sõltub?

$$R_s = \frac{1}{4} \frac{k}{k+1} (\alpha-1) \sqrt{N}$$

I    II    III osa

- Retentsioon
- Selektiivsus
- Efektiivsus (teoreetilised taldrikud)

6

## Milliseid parameetreid muuta?

Variable	Change in $\alpha$	Universal	Convenient	Low-UV/LC-MS	Robustness	Equilibration
%B	0	+	+	+	+	+
Temperature	-	+	+	+	+	+
Solvent type	++	+	+	0	+	0
Ion pair	+	-	+	0	-	-
pH	+++	-	0	0	-	+
Column type	+	+	0	+	+	+

7

## Algtingimused

- C18 või C8 kolonn
  - 150 mm × 4.6 mm 5 μm
  - 100 mm × 4.6 mm, 3 μm
  - 1–2 mL/min
- LC/MS puhul eelistatakse
  - 50 mm × 2.1 mm 3 μm
  - 0.2–0.5 mL/min

Eeldatakse, et LC/MS ei vaja nii palju lahutust. See ei kehti kaugeltki alati!!

8

## Algtingimused

- Silikageelil baseeruvad kolonnid
  - $2 < \text{pH} < 8$
  - UV jaoks fosfaatpuhver 15-25 mM pH = 2.0...3.0
  - MS nõuab lenduvat puhvrit
    - 0.1% sipelghape
  - Alused võivad vajada spetsiaalseid kolonne, mis töötavad pH > 8.0

9

## Algtingimused

- Orgaaniline solvent
  - Atsetonitril
  - Metanool
    - Ei sobi UV detektoriga <220 nm
  - THF
    - Ei sobi PEEK kapillaaridega
    - Ei sobi UV detektoriga <240 nm

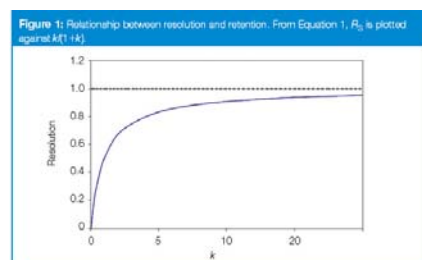
10

## 1. Retentsioon

- Hea kui  $2 < k < 10$ 
  - Aktsepteeritav  $1 < k < 20$
- $k < 2$ 
  - Lahutus on väga tundlik väikestele muutustele mobiilfaasis
  - Segav surnud aja piik

11

## 1. Retentsioon



12

## 1. Retentsioon

- $k = 0.5$  suurendamine  $k = 2$  peale?
  - Lahutus paraneb üle 3 korra
  - Surnud aja juures tavaliselt suur segav piik
- $k = 10$  suurendamine  $k = 20$  peale?
  - Lahutus paraneb ca 5%
  - Kromatograafilise jooksu aeg pikeneb kaks korda

13

## 1. Retentsioon ja analüüsi aeg

- $k$  suurendamine tähendab analüüsi aja pikenedamist
- Seda efekti saame vähendada töötades kõrgemal voolukiirusel
  - Tavasüsteemide rõhulimiit on 400 bar
  - Enamus tänapäevaseid kolonne ei anna suuremal voolukiirusel (märgatavalt) kehvat lahutust

14

## 1. Retentsiooni optimeerimine (isokraatiline elueerimine)

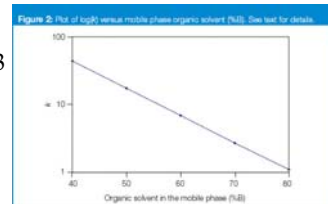
- Alustada 100% orgaanilisest eluendist
- Liikuda samm haaval vesisema eluendi poole (nt 10% kaupa)
- Sobiva retentsiooni leidmisel saab teha mobiilfaasis väikeseid muutusi

15

## 1. Retentsiooni optimeerimine

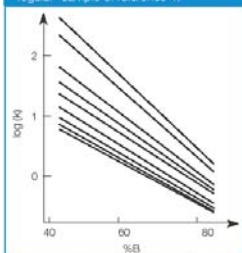
$$\log(k) = \log(k_0) - S \cdot \%B$$

- $k_0$  vastab olukorrale, kus orgaanilise solvendi %B sisaldus on 0%
- $S$  on tõus
  - enamikele  $S \approx 3$



## 2.1 Selektiivsuse optimeerimine

Figure 1: Plot of  $\log(k)$  vs. %B for the "regular" sample of reference 4.

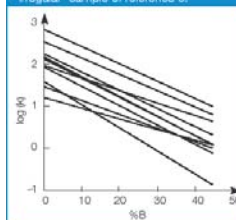


- Sarnase struktuuriga ühendid e homoloogid
- Sarnane  $\log(k)$  vs %B graafik
- %B muutes piikide suhteline asukoht (selektiivsus) ei muutu

17

## 2.1 Selektiivsuse optimeerimine

Figure 2: Plot of  $\log(k)$  vs. %B for the "irregular" sample of reference 5.



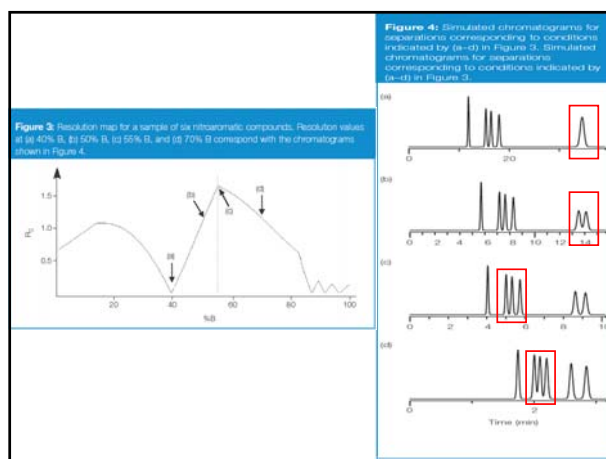
- Erinevaid funktsionaalrühmi omavate ühendite jaoks on olukord keerulisem
  - Ent võimaldab %B muutmisel selektiivsust optimeerida

18

## 2.1 Selektiivsuse optimeerimine

- Graafiku alusel saame välja arvutada  $\alpha$  ning hinnata lahutuse nõ kriitist paari  $R_S$ 
  - Võib eeldada  $N = 10\ 000$  (vt algingimused)

19



## 2.1 Selektiivsus

- Sarnaseid graafikud saab konstrueerida ka
  - Temperatuuri
  - pH
  - Solvenditüübi kohta

21

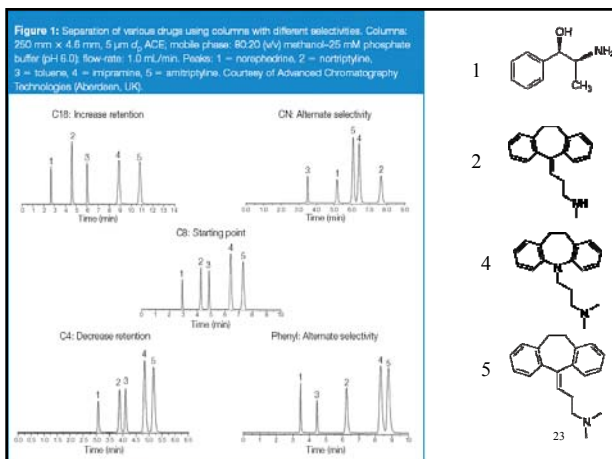
## 2.2 Kolonni selektiivsus

- Osakesed
  - Silikageel, alumiinumoksiid, polümeer
- Seotud faas
  - $C_{18}$ ,  $C_8$ , fenüül, CN

Kahe eri tootja  $C_{18}$  ei ole samade omadustega!!!

- Faasi optimeerimisel kasutada sama tootja sama seeria kolonne – lihtsam muutusi ennustada

22



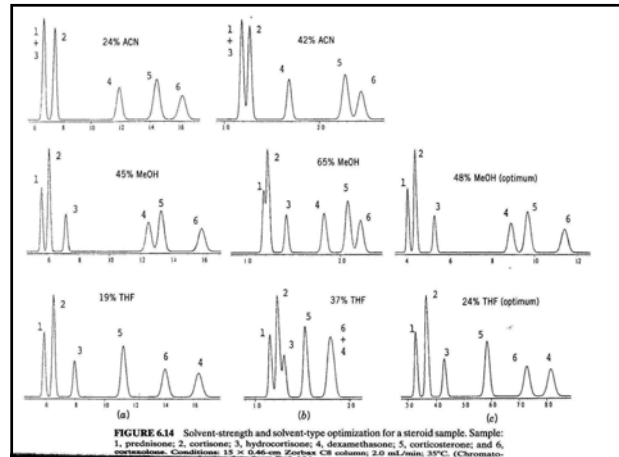
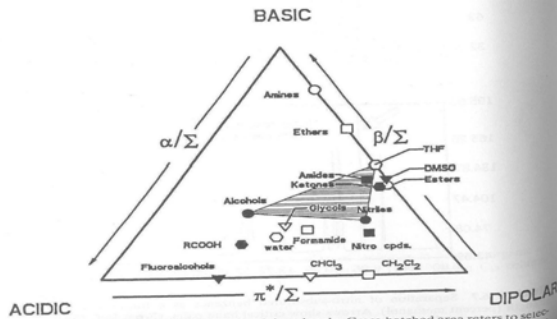
23

## 2.3 Orgaaniline solvent

- Orgaanilise solvendi muutmise võib viia piikide järjekorra ja resolutsiooni muutusele
- Selektiivsust mõjutavad solvendi happelisus, aluseliskus ja polaarsus
- Solvendi selektiivsuse kolmnurk
- Kriitilise paari jaoks piisab selektiivsuse muutusest 2-5%
- Solvendi valikul pidada silmas UV absorptsiooni, kolonni rõhku, solvendi puhtust ja stabiilsust.

24

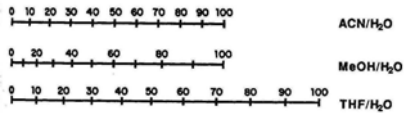
## 2.3 Solvendi selektiivsuse kolmnurk



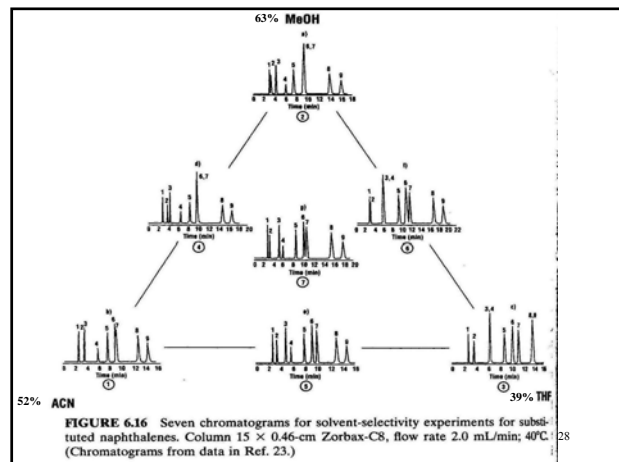
## 2.3 Orgaaniline solvent

- Praktikas käsitletakse kolme solventi: MeCN, MeOH ja THF
- Vahepealse selektiivsuse saavutamiseks võib neid omavahel segada

Solvendite elueerimisvõime võrdlus:



27



## 2.4 pH

- Ioniseeruvate ühendite puhul võib pH muutus kaasa tuua rohkem kui 10 korde *k* muutuse
- Samal ajal neutraalsete ühendite *k* ei muutu
- Muutub tugevasti ka selektiivsus  $\alpha$
- Tuleb silmas pidada ka meetodi robustsust
- pH muutudes võib muutuda analüütide UV-Vis neelduvus
- Silikageeli baasil kolonnidele 2 < pH < 8

29

**TABLE 7.1** Buffers for Use in HPLC Separation

Buffer	pK <sub>a</sub>	Buffer Range <sup>a</sup>	UV Cutoff <sup>b</sup>
Trifluoroacetic acid	>>2	1.5–2.5	210 nm (0.1%)
Phosphoric acid/mono- or di-K phosphate	2.1 7.2	< 3.1 6.2–8.2	< 200 nm (0.1%)
Citric acid/tri-K citrate	12.3 3.1 4.7 5.4	11.3–13.3 2.1–6.4	< 200 nm (10 mM) 230 nm (10 mM)
Formic acid/K-formate	3.8	2.8–4.8	210 (10 mM)
Acetic acid/K-acetate	4.8	3.8–5.8	210 nm (10 mM)
Mono-/di-K carbonate	6.4	5.4–7.4 <sup>c</sup>	< 200 nm (10 mM)
	10.3	9.3–11.3	< 200 nm (10 mM)
Bis-tris propane <sup>d</sup> · HCl/Bis-tris propane	6.8 9.0	5.8–7.8 8.0–10.0	215 nm (10 mM) 225 nm (10 mM)
Tris <sup>e</sup> · HCl/tris	8.3	7.3–9.3	205 nm (10 mM)
Ammonium chloride/ammonia	9.2	8.2–10.2	200 nm (10 mM)
1-Methylpiperidine · HCl/1-Methylpiperidine	10.1	9.1–11.1	215 nm (10 mM)
Triethylamine · HCl/triethylamine	11.0	10.0–12.0	< 200 nm (10 mM)

<sup>a</sup> pH range allowed with this buffer (conservative estimate).

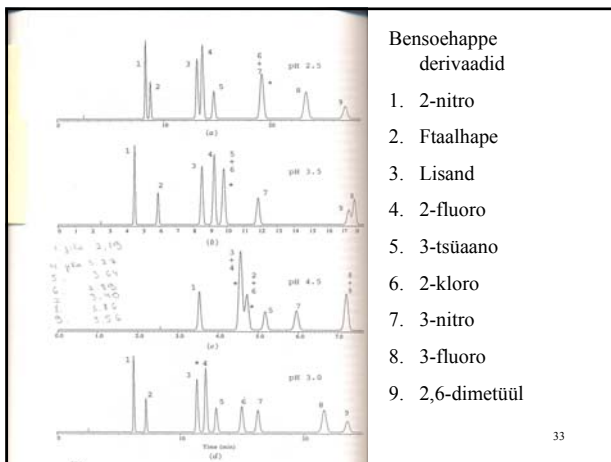
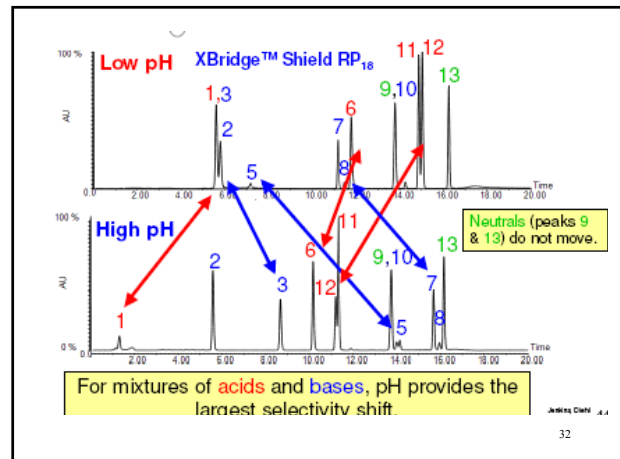
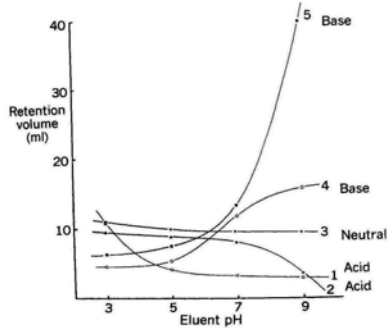
<sup>b</sup> Absorbance < 0.5 A; from Ref. 7.

<sup>c</sup> Requires addition of an acid (e.g., acetic or phosphoric).

<sup>d</sup> Tris(hydroxymethyl)aminomethane.

<sup>e</sup> 1,3-bis [Tris(hydroxymethyl)methylamino] propane.

## 2.4 Hapete ja aluste retentsioon sõltuvalt pH-st



## 3. Efektiivsus

- Kui lahutus on ebapiisav tuleb optimeerida efektiivsust – teoreetilisi taldrikuid
- Kui lahutus on parem kui vajalik, siis saame teha meetodit kiirmaks
- 150 mm × 4,6 mm kolonn, osakesesuurus 5 µm – ca 10 000 teoreetilist taldrikut

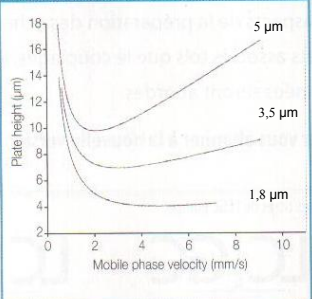
## 3. Efektiivsust mõjutavad

- Eluendi voolukiirus
- Kolonni pikkus
- Statsionnarse faasi osakeste suurus

## 3.1 Eluendi voolukiirus

- Van Deemteri graafik
- Erinevate kolonni osakesesuuruste jaoks on graafik erinev
  - 5 µm osakestega optimum 1-1.2 ml/min
    - Suurem voolukiirus -> efektiivsus väheneb
  - Väiksemate osakeste puhul saab kasutada suuremaid voolukiiruseid

**Figure 1:** Influence of particle size on column efficiency for 5  $\mu\text{m}$  (top), 3.5  $\mu\text{m}$  (middle) and 1.8  $\mu\text{m}$  (bottom) particles. 2 mm/s velocity  $\approx$  1.2 mL/min. See text for details.



37

### 3.2 Kolonni pikkus

- Asendades 150 mm kolonni 100 mm
  - Analüüsi aeg lüheneb 33%
  - Lahutus väheneb 6%
- Kui lahutus on piisav saab meetodit lühema kolonni kasutamisega kiiremaks teha

38

### 3.3 Osakese suurus

- Sama pikkusega kolonn osakestega 1.7–1.8  $\mu\text{m}$ 
  - 3 x suurem N
  - 1.7 x suurem lahutus
  - Võimalus suurmateks voolukiirusteks
  - Võimalus kiiremaks analüüsiks
- Sama pikkusega kolonn osakestega 5  $\mu\text{m}$ 
  - Madalam kolonni rõhk

39

**Table 1:** Influence of particle size on resolution, plate number, and pressure\*

Parameter:	$R_s$	N	Pressure (psi)
Proportional to:	$1/d_p^{1/2}$	$1/d_p$	$1/d_p^2$
10 $\mu\text{m}$	1.08	6950	105
5 $\mu\text{m}$	1.62	3,850	425
3.5 $\mu\text{m}$	1.92	19,500	865
3.0 $\mu\text{m}$	2.04	22,200	1180
1.7 $\mu\text{m}$	2.46	32,250	3660

\* Calculated values, 150 mm  $\times$  4.6 mm column, 65% acetonitrile-water, 35  $^\circ\text{C}$ , 1.0 mL/min

**Table 2:** Examples of column parameter changes

L (mm)	$d_p$ ( $\mu\text{m}$ )	N	$R_s$	Pressure (psi)	$t_R$ (min)
150	5	12000	2.0	2000	15
100	3	13300	2.1	3700	10
50	1.7	11750	2.0	5750	5
150	5	12000	1.7	2000	15
150	3	20000	2.2	5550	15
75	1.7	17650	2.1	8650	7.5

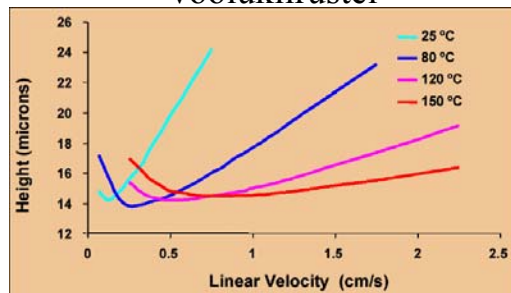
40

### 3.4 N kasvab ...

- ....kui....
  - Kolonn on hästi pakitud
  - Kolonn on pikk
  - Voolukiirus on optimaalne
  - Täidiseosakesed on väikesed
  - Mobiilfaasi viskoossus on madal ja temperatuur kõrge
  - Analüüdimolekulid on väikesed
  - Kolonniväline surnud ruumala on minimaalne

41

### 3.4 Teoreetilise taldriku kõrgus erinevatel temperatuuridel ja voolukiirustel



42