

אנליזה כרומטוגרפית וספקטרלית בעזרת גלאי מערך דיודות ב-

HPLC

מאת

שולמית לוין

מחלקה אנליטית

מדטכניקה

רח' אפעל 5 פתח תקוה

מבוא

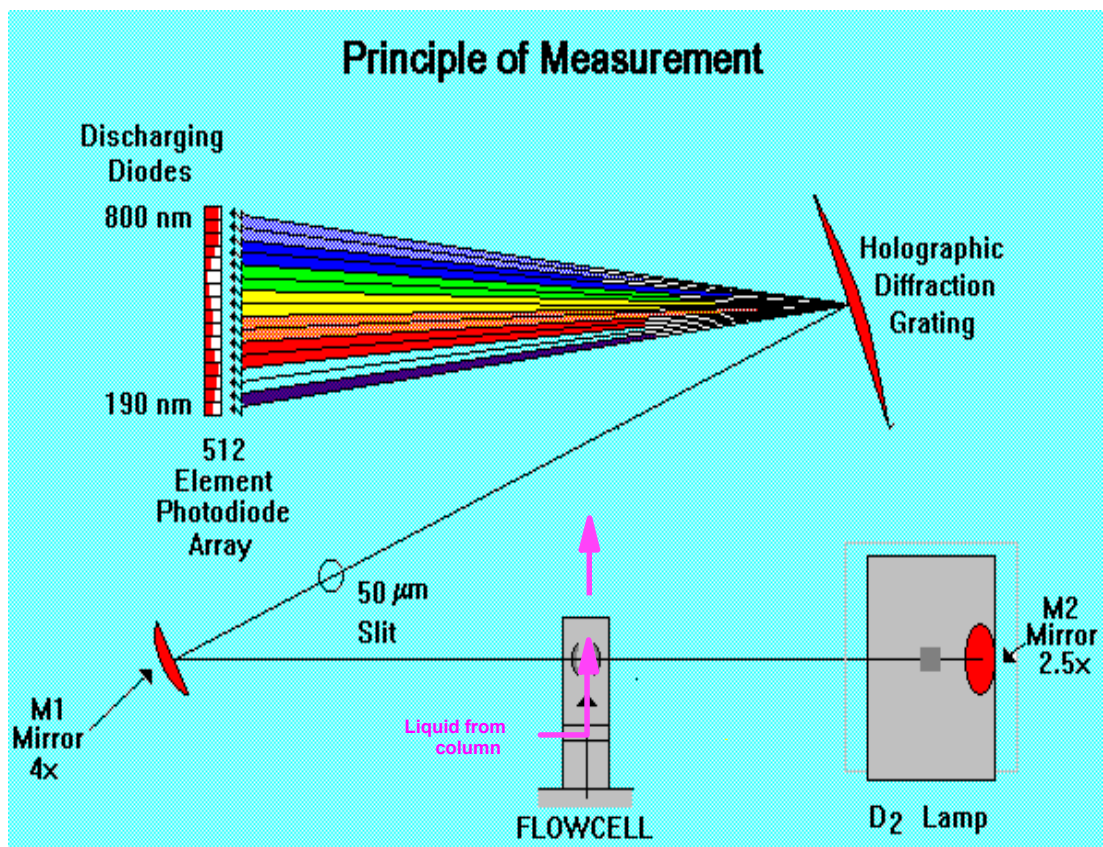
אין כיום מעבדה אנליטית המכבדת את עצמה ללא גישה חופשית למכשיר HPLC (High Performance Liquid chromatography) לשם אנליזה של חומרים שונים. מעל ל-90% מהמערכות מצוידות בגלאי בליעה בתחום האולטרא-סגול, כלומר UV, כאשר ברובן המכריע מדובר בגלאי בעל אורכי גל משתנים Variable wavelength. בגלאי זה מחליטים מראש באיזה אורך גל רוצים לעבוד, ואוספים את נתוני הכרומטוגרמה באורך גל זה במהלך ההרצה הכרומטוגרפית. בכל הגלאים הללו יש מקור אור, אלמנט שבירת אור (dispersion) שהוא שריג או פריזמה, תא זרימה בו נמצאת הדוגמא, מערכת אופטית של עדשות ומראות, וכן דיודה שקולטת את האור המגיע מהמערכת האופטית ונותנת סיגנל של עוצמת אור. בחירת אורך הגל בתוך המערכת האופטית נעשית על ידי סיבוב במרחב של השריג או הפריזמה כך שאורך הגל הרצוי יעבור דרך תא הזרימה והמערכת האופטית ויגיע לדיודה. בשנים האחרונות נעשה שימוש גובר בגלאים מתקדמים יותר, המבוססים על מערכי דיודות, ועל איסוף ספקטרום שלם בכל רגע נתון של איסוף נתונים. גלאים אלה נותנים מידע נוסף ספקטרלי על אופי החומרים המופיעים בכרומטוגרמה ומאפשרים את זיהויים.

1. עקרון פעולתו של גלאי מערך דיודות Diode-Array Detector.

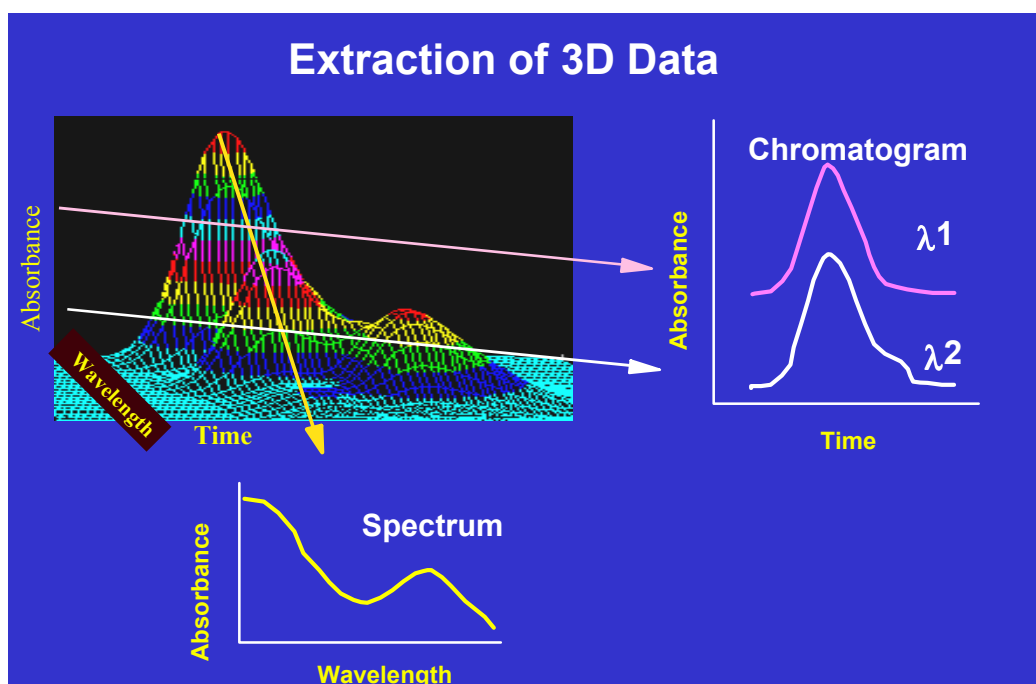
מבנה של אחד מהגלאים הנפוצים מוצג בציור מס' 1. מקור האור שולח קרן אור המכילה את כל אורכי הגל בתחום האולטרה סגול והנראה. קרן האור כמו שהיא, ללא שבירה לאורכי גל (dispersion) עוברת דרך תא הזרימה של הגלאי. קרן האור, שחלקים

ממנה נבלעים לפי תכונות בליעת החומרים הנמצאים ברגע המעבר בתוך תא הזרימה, ממשיכה דרך כל המרכיבים האופטיים אל השריג או הפריזמה, והללו מפזרים אותה במרחב למרכיביה על פי אורכי הגל השונים. במרחב זה של הגלאי נמצא מערך של דיודות, שתפקידן לקלוט את מרכיבי האור השונים ולהגיב בהתאם לעוצמתם. כל דיודה ממונה על מדידה של עוצמת אור של אורך גל מסוים. מאחר ועוצמות האור של אורכי הגל השונים נמדדות בעת ובעונה אחת תוך שברירי שניה מכל מערך הדיודות, ניתן לאסוף ספקטראות בתחום האולטרה סגול או הנראה במהלך איסוף הנתונים הכרומטוגרפיים ותרגומם למספרים בתוך המחשב.

ציור 1



הנתונים הנאגרים במחשב השולט על גלאי מערך הדיודות הנם בעצם תלת ממדיים, כלומר, אם קצב אסוף הנתונים הנו מדידה אחת לשנייה, הרי שמתקבל ספקטרום שלם בכל שנייה ושנייה. ציור 2 מראה דוגמא של נתונים בצורה תלת ממדית, המראים בציר X את זמני ההשהיה, בציר Y את אורכי הגל ובציר Z את הבליעות. אם נלקחים מתוך נתונים אלה גרפים של משטחי XZ, מתקבלות כרומטוגרמות שמראות בליעה כפונקציה של הזמן באורך גל נתון. אם נלקחים גרפים של משטחי YZ מתקבלים ספקטראות בליעת אור בתחום האולטרא-סגול והנראה, כלומר בליעה כפונקציה של אורך הגל בזמן נתון.



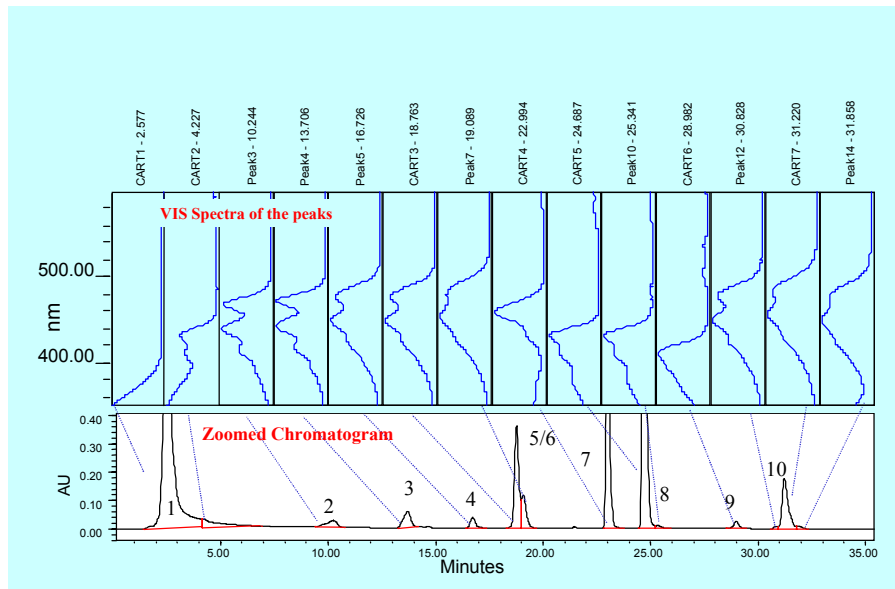
ציור 2

2. זיהוי חומרים על ידי השוואת ספקטראות עם ספריות-משתמש

בעזרת גלאי מערך דיודות ניתן, אם כן, לקבל ספקטראות UV-VIS של חומרים המופיעים בכרומטוגרמות כפיקים, כפי שניתן לראות בציור מס' 3. בחלקו התחתון של הציור נמצאת כרומטוגרמה מוגדלת באיזור קו הבסיס ובחלקו התחתון ספקטראות בתחום הנראה של הפיקים השונים שנלקחו מנקודות השיא של הפיקים. ניתן לקחת חומרים שזהותם וכמותם ידועה, סטנדרטים, להפרידם ב-HPLC ולקבל מהם ספקטראות שניתן לשמרם בספריות במחשב המעבד את נתוני הגלאי. לאחר מכן ניתן לקחת דוגמאות

המכילות חומרים אלה בתערובת עם חומרים אחרים ולזהותם על ידי השוואה לספריה שנבנתה במחשב. יש לציין שחובה להריץ את הסטנדרטים ואת הנעלמים בדיוק באותם תנאים כרומטוגרפיים, משום שספקטרום UV-VIS משתנה בהתאם להרכב הכימי של התמיסה בה נמצא החומר הנבדק.

ציון 3



ההתאמה הטובה ביותר של ספקטראות היא כאשר הספקטרום של החומר הבלתי ידוע זהה ככל האפשר לזה של החומר הידוע, אלא שקביעת דרגה של זהות בין ספקטראות אינה משימה קלה. ניתן להשוות ספקטראות בשלוש דרכים:

1. חפיפה של הגרפים כדי לראות את הדמיון באופן ויזואלי. בדיקה זו הנה סובייקטיבית למדי, ומידת ההתאמה תלויה בעיני המתבונן.
2. הערכה של ההבדלים בין הספקטראות בעזרת הפחתה בין שני הספקטראות ובחינת ההפרש ביניהם כפונקציה של אורך הגל. ככל שהעקומה המתארת את ההפרשים שונה מקו ישר אופקי השווה לאפס, ההבדלים גדולים יותר.
3. שימוש באלגוריתם מתמטי מתוחכם, כחלק מתוכנה של הגלאי שנותנת ערך מספרי למידת ההבדל בין הספקטראות. הערך הזה מגדיר באופן כמותי את מידת הדמיון בין הספקטראות. ככל שהגלאי מתקדם יותר מבחינת החומרה, והתוכנה המפעילה אותו ומעבדת נתוניו מתוחכמת יותר, כן המספר הזה משקף נאמנה את ההבדלים.

ציור מס' 4 מראה ספקטראות של ששה חומרים מונחים זה על גבי זה כדי להמחיש באופן גרפי דרגות שונות של דמיון או שוני בין ספקטראות UV. טבלה מס' (1) מראה תוצאות השוואה כמותית בין הספקטראות לבין חומר A על ידי תוכנה. הערכים של דרגת ההשוואה נעים בין 0 ל-90, כאשר ערך של 0 מציין זהות מוחלטת וככל שהוא גדול מ-0 ההבדל בין הספקטראות עולה. ניתן לראות בטבלה שכאשר משווים את החומר לעצמו ערך ההשוואה הינו 0, כלומר התאמה מושלמת. כאשר משווים בין החומר propiophenone, חומר בעל ספקטרום A, לבין acetophenone, חומר בעל ספקטרום B, שהוא חומר דומה מאוד (פחות קבוצת CH_2), ההבדל הוא משמעותי, 3.202. שני החומרים ethylparaben ו- methylparaben (ספקטראות C ו- D בהתאמה) שונים מאוד מה- propiophenone, אך נבדלים האחד מהשני רק ב- 0.25 מעלות. היכולת להבדיל בין הספקטראות של שני החומרים אלה היא אחד המבחנים הקשים ביותר של יכולת חומרה ותוכנה של גלאי מערך דיודות להבחין בין חומרים דומים. נדרשת לשם כך רזולוציה ספקטרלית טובה מאוד של 1.2 nm, רעש נמוך במיוחד במערכת הכרומוטוגרפית ואלגוריתם מתוחכם מאוד כדי לקבל את ההבחנה הזאת.

ציור 4

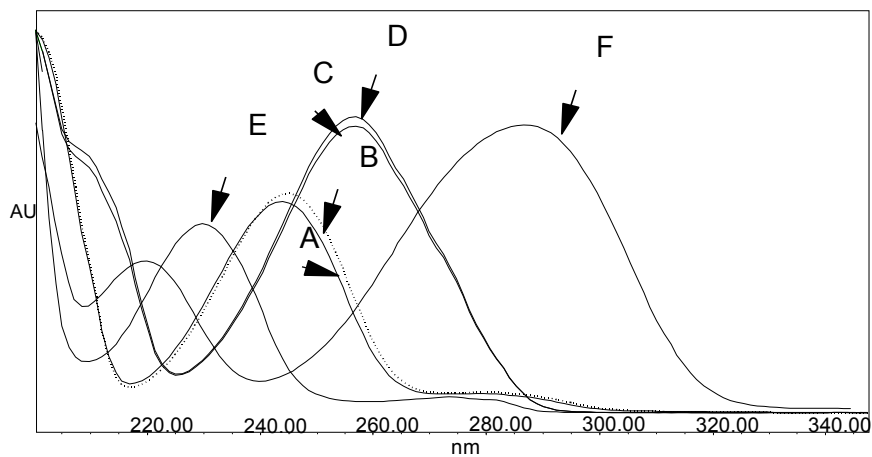


Table 1

Spectrum	Match Spectrum Name	Match Angle
A	Propiophenone	0.000
B	Acetophenone	3.202
C	Ethylparaben	37.906
D	Methylparaben	38.151
E	Benzoic acid	44.472
F	Ethyl-p-aminobenzoate	67.583

3. קביעת נקיון הפיק: Peak Purity

שימוש נרחב במיוחד בגלאי מערך הדיודות נעשה בתעשייה הפרמצבטית, בה נדרשת אנליזה כמותית ברמת מהימנות גבוהה מאוד. חייבים לוודא בזמן פיתוח שיטות כרומטוגרפיות חדשות שהפיקים המייצגים את החומרים הנבדקים בכרומטוגרמה הנם חד מרכיביים. לשם כך מבצעים קביעת ניקיון הפיק - Peak Purity. אנליזת Peak Purity נועדה לגלות נוכחות של אי-ניקיון שנוכח בתוך הפיק של החומר העיקרי עליו מבצעים את האנליזה הכמותית. אנליזת Peak Purity משמשת בעיקר בשיטות המשמשות לקביעת זיהומים או חומרי פירוק (Related compounds) בתוך פיקים של חומרים פעילים בחומרי גלם ו/או בפורמולציות רוקחיות. גלאי מערך הדיודות מעיד על נוכחות של חומרים נוספים בתוך הפיק של החומר הפעיל, תוך שימוש בספקטראות אותם אסף מנקודות נתונים על פני הפיק, וקביעת ההומוגניות הספקטרלית שלו (Peak homogeneity).

כדי לגלות זיהומים בעזרת גלאי UV-VIS רגיל באורך גל קבוע חייבים לראות 'כתף', או 'גבנון' או עיוות גדול של צורת הפיק (tailing) כדי לחשוך בקיומו של מזהם בפיק הנבדק. זיהומים המופיעים יחד עם הפיק אינן ניתנים לגילוי כאשר הרזולוציה הכרומטוגרפית ביניהם לבין הפיק הראשי היא נמוכה מדי, כלומר $R_s < 0.3$.

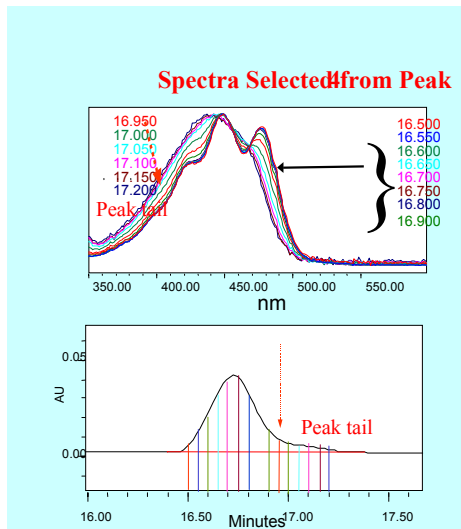
העובדה שלכל חומר יש ספקטרום UV-VIS אופייני לו, כפי שראינו בציור 4, מאפשרת השוואת הספקטראות המתקבלים מנקודות שונות על פני הפיק, מפיקים שונים בכרומטוגרמה אחת או בין כרומטוגרמה אחת לשניה. התוכנה המעבדת את נתוני הגלאי משווה את הספקטראות הללו, וקובעת את מידת הדמיון ביניהם. ברגע שקיימים הבדלים משמעותיים בין הספקטראות המתקבלים, מתקבלת התראה לכך שחומרים זרים נוכחים בפיק הנבדק.

נשאלת השאלה מהו הבדל משמעותי, וזאת השאלה המרכזית בכל מהלך הקביעה של ניקיון פיקים. השוואת ספקטראות דומים ככל שניתן, שנאספו בהרצה כרומטוגרפית, לעולם לא תיתן זהות מוחלטת. גם כאשר הפיק ייצג חומר נקי ב-100%, יהיה תמיד הבדל מסוים בין הספקטראות שנאספו מנקודות שונות על פניו, שגודלו מבוסס על מידת הרעש במערכת. רעש המערכת ב-HPLC נובע מפעולת המשאבות, מהאופטיקה והאלקטרוניקה של הגלאי, מהבליעה של מרכיבי הפאזה הנעה וכדומה. רעש זה קובע את מידת ההבדל המינימלי בין שני ספקטראות UV זהים שנאספו בגלאי מערך דיודות במערכת HPLC.

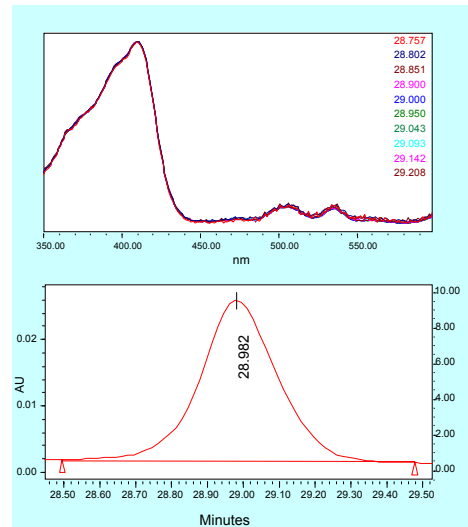
אם כן, כל תוכנה המעבדת נתוני גלאי מערך דיודות חייבת להיות מצוידת בסף כמותי מסוים, שמשמש כקריטריון כמותי למידת הדמיון בין ספקטראות זהים והוא מבוסס בעצם על הרעש במערכת. הסף הזה מבוסס בדרך כלל על איזור שקט וחסר פיקים שנבחר בכרומטוגרמה לשם קביעת הרעש הבסיסי במערכת. הסף הכמותי הזה יכול להשתנות משיטה כרומטוגרפית אחת לשניה, ולעתים אפילו בין איזור לאיזור בכרומטוגרמה. קביעה נכונה של סף זה בתוכנה היא קריטית לתשובה האם הפיק הנבדק הוא נקי אולא. סף סלחני מדי לא יהיה רגיש להבדלים אמיתיים בין חומרים דומים, ואז פיק מזוהם בו יש הבדלים אמיתיים בין ספקטראות, ידווח כאילו הוא נקי, ואילו סף מחמיר מדי עלול לגרום לכך שהבדלים שנובעים מרעש במערכת יובחנו כאילו הם אמיתיים, וחומרים נקיים ידווחו כאילו נוכחים בהם זיהומים.

קביעת סף כמותי להבדלים בין ספקטראות נעשית על ידי הרצת סטנדרטים אותנטיים ונקיים והשוואת הספקטראות על פני הפיק שלהם. ההבדלים בין הספקטראות האלה הם בסדר גודל של רעש המערכת הכרומטוגרפית, ועל כן יספקו סף כמותי לניקיון הפיק. ציורים 5 ו-6 מראים השוואה גרפית של ספקטראות שנגזרו מנקודות שונות על פני פיקים בכרומטוגרמה. ציור 5 מדגים זהות בין ספקטראות על פני פיק נקי מזיהומים, ואילו בציור 6 מודגם פיק שאינו נקי, והספקטראות משתנים בהדרגה כאשר מגיעים לאיזור ה'זנב' שלו, שהוא בעצם זיהום הנמצא בצמידות רבה אל החומר. ניתן לראות בציור 6 שכל הספקטראות שנאספו עד 16.9 דקות חופפים בצורה מושלמת זה על זה, ואילו אלה שנאספו לאחר מכן משתנים בהדרגה עד לקבלת הספקטרום של החומר המזהם.

ציור 6



ציור 5



4. גורמים המשפיעים על תוצאת המדידה של ניקיון הפיק

ישנם גורמים רבים המשפיעים על דיוק הקביעה של ניקיון הפיק בעזרת גלאי מערך דיודות.

מספר הנקודות על הפיק

אחד הגורמים הקריטיים היא בחירת הנקודות מהן נלקחים הספקטראות להשוואה. המהימנות הגבוהה ביותר מתקבלת כאשר משווים את הספקטראות המתקבלים מכל הנקודות המרכיבות את הפיק. לדוגמא, אם רוחב הפיק הוא 20 שניות וזמן הדיגום (sampling time) הוא ספקטרום אחד לשניה, הרי שמתקבלים 20 ספקטראות מהפיק. תוכנה מתוחכמת תהיה מסוגלת להשוות את כל הספקטראות הללו לספקטרום ייחוס (לעתים קרובות זהו ספקטרום החומר במקסימום הפיק, או ספקטרום ייחוס אחר שנקבע מראש). אם לא תילקחנה כל נקודות הפיק קיים חשש להחמיץ נוכחות של זיהום באיזור מסויים שלו.

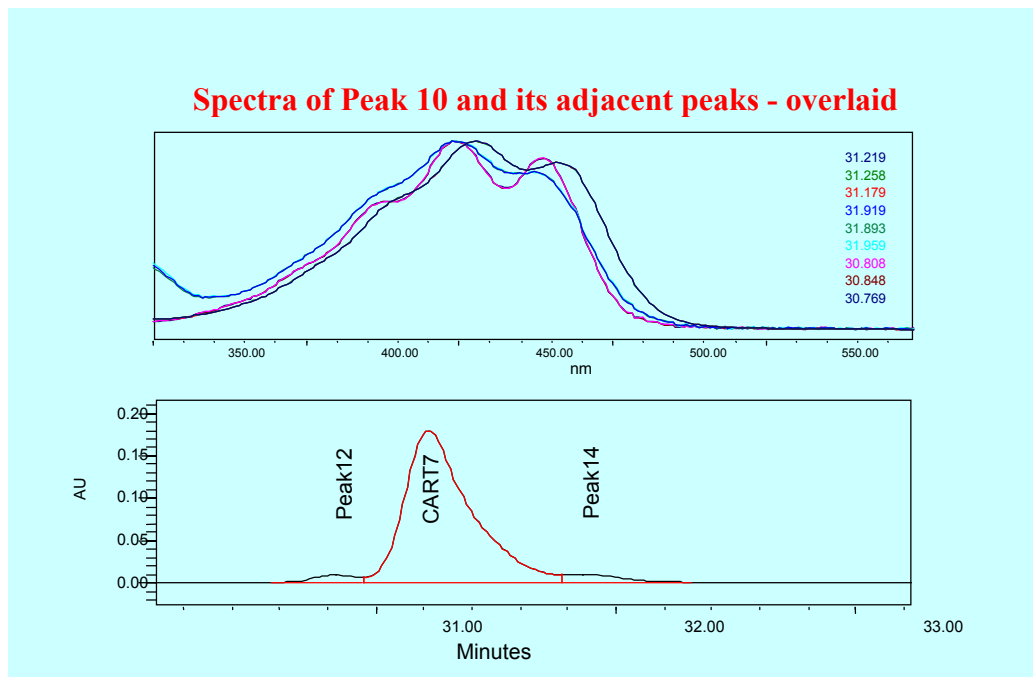
רזולוציה ספקטרלית או רוחב הפס הספקטרלי ורגישות גבוהה

גורם חשוב מאוד בהשוואת ספקטראות UV הנו הרזולוציה הספקטרלית, כלומר רוחב הפס הספקטרלי בו נלקחו הספקטראות. ציור מס' 7 מראה שלושה קרוטנואידים הדומים מאוד בספקטראות שלהם בתחום הנראה. בחלק התחתון רואים את הכרומטוגרמה, ובה פיק אחד עיקרי ושניים קטנים משני צדדיו. זמני ההשהיה שלהם מאוד קרובים, משום שהם חומרים דומים מאוד. בחלק העליון של הציור רואים את הספקטראות של הפיקים הללו מנורמלים, בניסיון לחפוף ביניהם. מכל פיק נלקחו שלושה

ספקטראות כדי להדגים חפיפה מלאה לעומת הבדלים בספקטראות בצורה גרפית. רואים שכל שלושה ספקטראות מאותו פיק חופפים לחלוטין וקשה להבחין שיש שלושה ספקטראות מתחת לעקומה ואילו ההבדלים בין הספקטראות בולטים לעין למרות שהם עדינים מאוד. להבחנה ודאית בין ספקטראות אלה נדרש פס ספקטרלי צר ככל האפשר. ואולם, יש לזכור שיש בעיה בשימוש ברוחב פס ספקטרלי צר בשל רמת האנרגיה הנמוכה שעלולה להגיע אל כל דיודה ודיודה, דבר שגורם לרעש ניכר. לכן חשוב שלגלאי מערך דיודות תהיה אופטיקה מתוחכמת כך שניתן יהיה לבצע מדידות בפס ספקטרלי צר גם לחומרים בריכוזים נמוכים בהם נדרשת רגישות גבוהה

שלושת הפיקים בציר 7, מדגימים בבירור את חשיבות היכולת לעבוד ברוחב פס ספקטרלי צר וברגישות גבוהה בעת ובעונה אחת. ניתן לראות בכרומטוגרמה שלמרות שהפיקים משני צדי הפיק הגבוה הם קטנים בסדר גודל לפחות ממנו אפשר בקלות להשוות בין הספקטראות שלהם ללא הפרעות ניכרות של רעש.

ציר 7

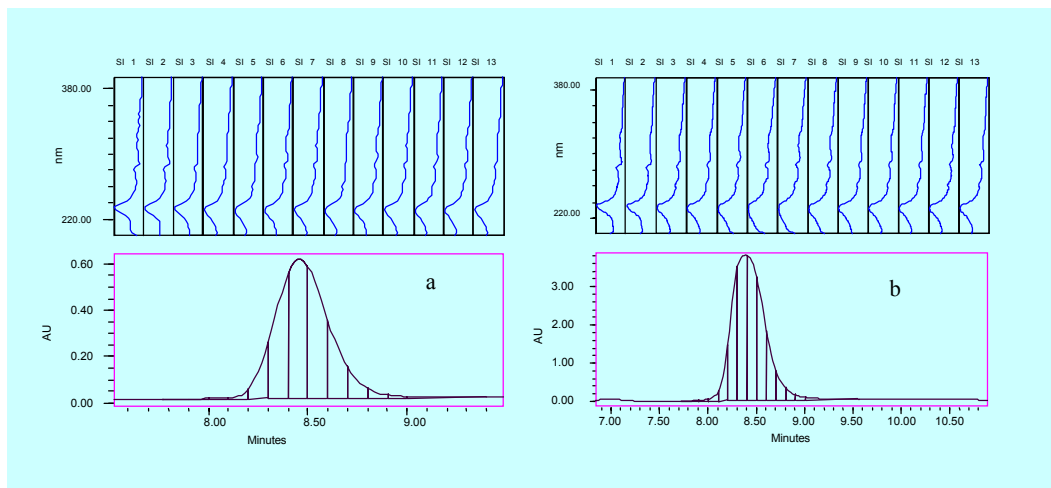


לינאריות הספקטרום עם הריכוזים

כשם שבודקים את תחום הלינאריות של בליעת גלאי ה-UV באורך גל מסוים לשם קביעה כמותית של חומרים על סמך חוק בר-למברט, חשוב עוד יותר לדעת את תחום הלינאריות של הגלאי בתנאים הכרומטוגרפיים בהם עובדים לגבי הספקטרום כולו. כאשר

עולים ריכוזי החומרים מעל לגובה מסוים מתחילות להופיע הפרעות בצורת הספקטרום בשל אפקטים של אי-לינאריות. ציור 8 מראה פיק בשתי הרצות שונות של אותו החומר, כאשר כרומטוגרמה a נלקחה בריכוזים סבירים יחסית לעבודה ב-HPLC, (בסביבות 0.1 מ"ג למ"ל, ולכן גובה הפיק לא עלה על 0.6 יחידות בליעה). ההתנהגות של הספקטראות שנלקחו מהרצה זו היתה לינארית, כלומר הם היו זהים לחלוטין על פני כל נקודות הפיק והתוכנה דיווחה על פיק נקי. לעומת זאת, כרומטוגרמה b נלקחה בריכוזים גבוהים מאוד (גובה הפיק היה מעל ל-3 יחידות בליעה) והספקטראות שנאספו מנקודות שונות על פניו, כפי שרואים בציור מעל לכרומטוגרמה זו, השתנו בהדרגה עם העלייה בריכוז. התוכנה דיווחה במקרה זה שהפיק איננו נקי, למרות שהיה זה אותו החומר בדיוק אך בריכוז גבוה יותר!

ציור 8



בחירת ספקטרום קו-הבסיס (baseline spectrum).

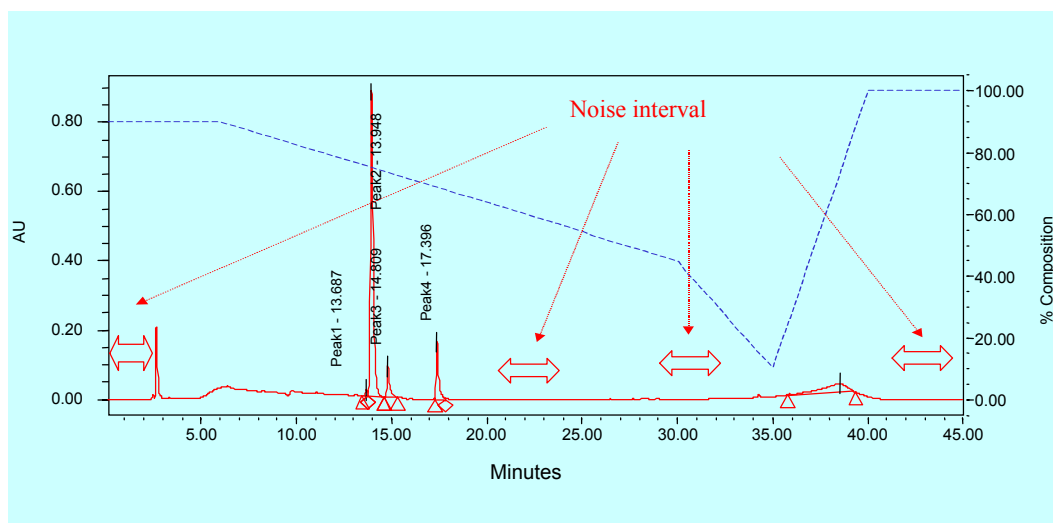
כשם שמודדים ספקטרום UV בספקטרופוטומטר ומשווים לממס של הדוגמא כך גם ב-HPLC, יש צורך להפחית את ספקטרום הפאזה הנעה, שבה נשאת הדוגמא אל תא הזרימה בגלאי ובה נערכת המדידה, מכל ספקטרום שנבדק. הדבר נעשה באופן אוטומטי על ידי התוכנות המעבדות את הנתונים. לשם כך בוחרים תחום זמנים בכרומטוגרמה שהוא שקט לחלוטין מכל פיקים בכל אורכי הגל שנמדדו בניסוי, ומציינים בתוכנה שזהו התחום על פיו ייקבע הרעש במערכת וכל ספקטרום שיימדד יש להפחית ממנו את הספקטרום הממוצע של איזור זה. בחירת תחום הזמנים הזאת היא חשובה ביותר לקבלת ערכים נכונים של ניקיון הפיק משום שגם הסף הכמותי המשמש להשוואה בין ספקטראות נבנה ממנו, וגם תיקון כל ספקטרום וספקטרום מבוסס עליו. אם האיזור הזה אינו נקי לחלוטין

מפיקים או מרעשים אחרים, יתקבל סף כמותי גבוה מדי להבדלים בין הספקטראות, ובמקרים מסוימים הדיווח על ניקיון הפיק עלול ל'העלים' פיקים מזוהמים.

בהרצות כרומטוגרפיות בתנאי גרדיינט נעשה שינוי הדרגתי של הרכב הפאזה הנעה עם הזמן. שינוי זה גורם לכך שמידת הרעש באיזורים השונים בכרומטוגרמה תהיה שונה. ייתכן מצב כזה שאיזור מסוים בכרומטוגרמה (למשל תנאים איזוקרטיים זמניים) יהיה שקט יותר מזה של האיזור בו מופיע הפיק הנבדק. במקרה שאיזור כזה ייבחר כאיזור השקט של הכרומטוגרמה, ייקבע סף כמותי שהוא נמוך מדי להבדלים בין הספקטראות הנובעים מהרעש או משינויי הפאזה הנעה. התוצאה תהיה דיווח על נוכחות זיהומים בפיקים שבעצם הם נקיים.

ציור מס' 9 מתאר ניסיון לקביעת ניקיון פיק 3 בכרומטוגרמה תוך שימוש בארבעה איזורים חסרי פיקים במקומות שונים בכרומטוגרמה. הגרדיינט של הממסים מצוייר על פני הכרומטוגרמה בקו מקווקו. בשום מקרה הרכב התמיסה ממנה נלקחו ספקטראות הפאזה הנעה לא היה זהה להרכב שבו הופיע הפיק הנבדק. במקרים שהסף הכמותי להבדלים היה גבוה מדי התוכנה דיווחה על פיק נקי, ובמקרים שהוא היה נמוך מדי היא דיווחה שהוא מזוהם. בדרך כלל יש לזכור שכאשר הפיק נקי מאוד והמערכת הכרומטוגרפית שקטה מאוד אין כזו השפעה דרמטית על תוצאת מדידת ניקיונו והתשובה היא מובהקת. רק במקרים גבוליים בהם לא ברור אם הפיק חד מרכיבי או לא, כמו שמודגם בציור 9, חשוב ביותר להקפיד על תחום זמנים בכרומטוגרמה בהם הרכב הפאזה הנעה קרוב ככל האפשר לפיק עצמו.

ציור 9



מאפיינים מיוחדים בספקטרום

יש לזכור שספקטראות הבליעה בתחום האולטרא-סגול או הנראה אינם מתברכים במאפיינים של 'טביעת אצבע' כמו בספקטרוסקופיות אינפרא-אדום, מסות, או תהודה גרעינית. ברוב המקרים מדובר בזיהוי של קבוצות חומרים מצומדים או ארומטיים מותמרים במידה זו או אחרת שיש בהם אלמנטים מובהקים יותר מאשר חומרים בודדים. אך גם בתוך קבוצות חומרים ניתן להבחין בין חברי הקבוצה ברמת ודאות גבוהה יחסית, כמו שניתן לראות בציר 4. ואולם, קימות קבוצות חומרים חסרות כרומופורים (קבוצות בולעות קרינת אולטרא סגול או בתחום הנראה), כמו חומצות אמיניות אלקיליות לא-ארומטיות ללא נגזרות, או פפטידים שלהן. חומרים אלה הם בעלי ספקטרום חסר מאפיינים לחלוטין וקשה מאוד להחליט באופן ודאי על קיום מזהמים בפיקים שמייצגים אותם בכרומוטוגרמה. לכן בדרך כלל בחומרים חסרי כרומופורים בתחום האולטרא-סגול והנראה משתמשים גם בגלאי ספקטרומטר מסות לשם קביעה ודאית יותר של ניקיון הפיקים. אך מילת אזהרה: גם בשימוש של ספקטרומטר מסות קיימת אפשרות שלא להבחין בקיומו של מזהם בפיק כאשר הוא איזומר או קונפורמר של החומר הנבדק (חומר בהרכב כימי זהה אך במבנה מרחבי שונה). בכל מקרה, גם גלאי מערך דיודות וגם גלאי ספקטרומטר מסות לא יראה זיהום של אנטיומרים (איזומרים אופטיים) אחד בתוך השני במערכת הפרדה כיראלית משום שהספקטראות של אנטיומרים הם זהים לחלוטין.

לסיום

צריך לזכור כי גם כאשר מתקבלת תשובה כאילו הפיק הוא הומוגני מבחינה ספקטרלית זו אינה הוכחה חותכת וסופית לכך שהחומר המיוצג בפיק זה הוא נקי מבחינה כימית. הומוגניות ספקטרלית מוכיחה אך ורק את ניקיון הפיק לשם ביצוע קביעה כמותית מדויקת, וזאת במגבלות הבאות:

1. הספקטרום של החומר המזהם שונה במידה משמעותית מזה של החומר הנבדק, אחרת קשה להבחין ביניהם.
2. יש רזולוציה כרומוטוגרפית מינימלית בין המזהם לבין החומר הנבדק, כאמור, מעל 0.3, אחרת יש חפיפה גדולה מדי, וצריך אז לבצע השוואה לספקטרום של סטנדרט שנמצא בספריית המשתמש.

ולסיום, מלת אזהרה כללית. כאשר מתקבל רק פיק אחד בהרצה והוא מדווח בתוכנה כנקי, לא הוכח מעל לכל ספק ניקיונו הכימי של החומר בדוגמא. לשם כך חייבים לבצע אנליזה בשיטות אחרות נוספות בלתי כמו אלקטרופורזה קפילרית, כרומטוגרפיה נוזלית עם גלאי מס ספקטרומטרי: LC-MS, ספקטרוסקופית אינפרא-אדום: IR, תהודה מגנטית גרעינית: NMR, כימיה רטובה, כרומטוגרפיה ברובד דק: TLC וכו'.