

## Kõrgefektiivne vedelik- kromatograafia

### Detektorid

2008 kevad

1

## Nõuded detektorile

- Võrdselt tundlik kõigi komponentide suhtes.  
VÕI  
Tundlik ainult meid huvitava komponendi suhtes.
- Võimalikult palju infot analüüdi kohta.
- Sõltumatu eluendi koostise muutustest (gradient) ja temperatuurist.
- Detekteerima ka väga madalaid kontsentratsioone (jälgede analüüs).
- Ei tohi põhjustada piikide laienemist (mõõteraku ruumala olgu väike).

2008 kevad

2

## Nõuded detektorile

- Kiire, et "tabada" ka väga kitsaid ja kiirelt mööduvaid piike.
- Signaali stabiilsus ja korduvus.
- Mida laiem lineaarne ala, seda parem (vähemalt 3 suurusjärku).
- Mitte-destruktiivne.
- Lihtne kasutada, robustne.
- Odav.

2008 kevad

3

## Detektorite liigid (1)

- Kontsentratsioon- ja mass-selektiivsed:
  - **Kontsentratsioonselektiivne** – signaal on võrdeline proovi kontsentratsiooniga eluaadis.  
 $S \propto c \text{ (g ml}^{-1}\text{)}$
  - **Mass-selektiivne** – signaal on võrdeline massivooga, st proovi molekulide arvuga ajaühikus.  
 $S \propto n/\Delta t \text{ (g s}^{-1}\text{)}$
- Eristamiseks tuleb pump välja lülitada piigi maksimumi kohal – kontsentratsioonselektiivne säilitab signaali, mass-selektiivse signaal kahaneb baasijoonetasele.

2008 kevad

4

## Detektorite liigid (2)

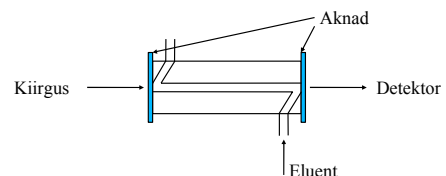
- Mõõdetava omaduse selektiivsus:
  - Mitteselektiivsed detektorid mõõdavad mingi **eluaadile kui tervikule** iseloomuliku omaduse muutust ajas.
    - Murdumisnäitaja
    - Elektrijuhtivus
  - Selektiivsed detektorid mõõdavad **analüüdile** iseloomulikke omadusi.
    - Neelduvus
    - Fluorestsents
    - Massi ja laengu suhe

2008 kevad

5

## Läbivoolurakk

- Kasutatakse 1-10  $\mu\text{l}$  ruumalaga rakke. Tavalisemad on 6-10  $\mu\text{l}$ .



2008 kevad

6

## UV-Vis neelduvuse detektor

- Kõige kasutatavam HPLC detektor.
  - Selektiivne detektor (mõõdab analüüdile iseloomulikke omadusi).
  - Kontsentratsioonselektiivne.
  - Tundlik.
  - Lai lineaarne ala (4 suurusjärku).
  - Vähetundlik temperatuurikõikumiste suhtes.
  - Sobib gradientelueerimiseks.

2008 kevad

7

## UV-Vis: kasutusala

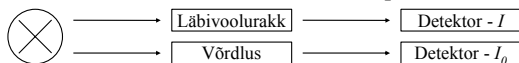
- Kasutatav väga paljude ühendite detekteerimiseks:
  - Kaksikside ja vaba elektronpaariga aatom selle naabruses  $X=Y-Z$
  - Br-, I- ja S-ühendid.
  - Karbonüül ( $C=O$ ) või nitro ( $NO_2$ ).
  - Konjugeeritud kaksiksidemed  $X=X-X=X$ .
  - Aromaatne tuum.
  - Anioonid: Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$
- **Ei sobi** küllastatud süsivesinike ja nende amino- ja nitriliderivaatide detekteerimiseks.

2008 kevad

8

## UV-Vis: tööpõhimõte

- Vahel kasutatakse kahekiirelisi süsteeme, milles võrdlusküür läbib võrdlusküveti või kompenseeriva filtri.



$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

Vastavalt Beeri reeglile  $A = \epsilon lc$  ehk  $A = abc$ , kus A – optiline neelduvus,  $\epsilon$  (a) – molaarne ekstinktsioonikoefitsient (neelduvustegur), l (b) – optiline teepikkus, c – analüüdi kontsentratsioon.

2008 kevad

9

## UV-Vis: tüübid ja kiirgusallikad

- Fikseeritud lainepikkusega ja filtritega
  - Madalrõhu Hg-lambi puhul kasutatakse lainepikkust 254 nm.
  - Cd-lamp – 229 nm.
  - Zn-lamp – 214 nm.
    - Muud lainepikkused filtreeritakse välja. (Miks?)
    - Oluliselt tundlikum kui muudetava lainepikkusega detektorid.
  - Deuteerium-lamp – pidev UV-spekter kuni ca 340 nm.
  - Volframlamp – 340-850 nm.
- Monokromaatoriga ( $D_2$ - ja/või W-lamp)
- Diodrivi (PDA-photodiode array, DAD-diode array detector)

2008 kevad

10

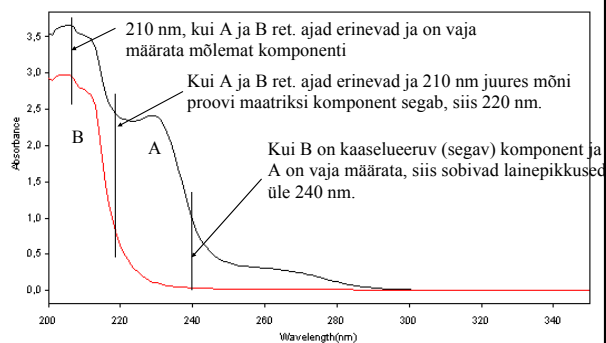
## UV-Vis: töörežiimid

- Kromatogrammi registreerimine fikseeritud lainepikkusel – kõik loetletud tüübid.
- Lainepikkuse muutmine kromatogrammi registreerimise käigus – enamasti  $D_2$ - ja W- lambiga detektoreid.
- Skaneerivad ( $D_2$  ja W) detektorid võimaldavad enamasti ka peatada eluendi voolu ja siis registreerida spektri.
- Diodrividetektor võimaldab registreerida **täieliku spektri** igast kromatogrammi punktist (eluendi liikudes).
  - Lisaks proovi lainepikkusele saab ette anda ka võrdluslainepikkuse.

2008 kevad

11

## UV-Vis: lainepikkuse valik

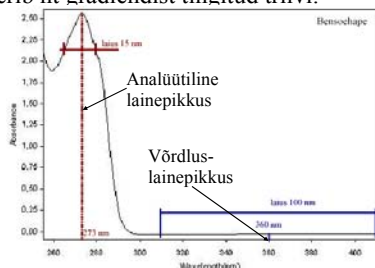


2008 kevad

12

## UV-Vis: võrdluslainepikkus

- Diodrividetektoril saab lisaks proovi lainepikkusele ette anda ka võrdluslainepikkuse (vahemiku), mis korrigeerib nt gradiendist tingitud triivi.



2008 kevad

13

## FLD – fluorestsentsdetektor

- FLD – ergastava kiirguse suund on risti detekteerimise suunaga:
  - Selektiivne detektor.
  - LOD kuni **1000 korda parem** kui UV-Vis puhul.
  - Tundlikkuse suurendamiseks on raku ruumala *ca* 20  $\mu$ l.
  - Tundlik **fluorestsentsi kustutavate** komponentide suhtes mobiilses faasis (nt lahustunud hapnik!).
  - Lineaarne ala sõltub süsteemist, aga on kitsas.

2008 kevad

14

## RI – murdumisnäitaja detektor

- RI – *refractive index*
  - Mitteselektiivne detektor (eluaadi kui terviku murdumisnäitaja).
  - LOD on ligi 1000 korda viletsam kui UV-Vis detektoril.
  - Väga tundlik temperatuuri muutuste suhtes – vajab termostateerimist.
  - Vajalik on eluendiga täidetud võrdlusraku olemasolu.
  - Ei sobi gradientelueerimise puhul.
  - Eluendis lahustunud gaasid avaldavad mõju.

2008 kevad

15

## ELSD – *evaporative light scattering detector*

- ELSD – eluent koos selles lahustunud ainetega pihustatakse uduks ja aurustatakse. Mõõdetakse laseri kiirguse hajumist aurustunud osakestel.
  - Mitteselektiivne detektor (tundlik **kõigi mittelenduvate** ainete suhtes).
  - Tundlikum kui RI.
  - Kasutatav ka gradiendi puhul, kuid eluent ei tohi sisaldada mittelenduvaid komponente.
  - Lineaarne ala on olematu.

2008 kevad

16

## Elektrokeemilised detektorid

- Kasutatakse erinevate liikide kohta:
  - Amperomeetiline.
  - Polarograafiline.
  - Kulonomeetiline.
  - Konduktomeetiline.

2008 kevad

17

## Amperomeetiline

- Amperomeetiline detektor tunneb oksüdeeruvaid ja redutseeruvaid orgaanilisi aineid:
  - Selektiivne detektor.
  - LOD erakordselt madal.
  - Lihtne ja odav.
  - Mobiilne faas peab juhtima elektrit, kuid ei pruugi olla vesilahus (mittepolaarsed eluendid ei sobi).

2008 kevad

18

## Konduktomeetriline detektor

- Klassikaline detektor ioonkromatograafias.
- Mõõdetakse eluendi elektrijuhtivust.
  - Mitteselektiivne massitundlik detektor.
  - Signaal on võrdeline ioonilise komponendi kontsentratsiooniga eluendis.
  - **Tundlikkus kahaneb**, kui eluent juhib voolu (kasutatakse supressorkolonne).
  - Temperatuuritundlik.
  - Lineaarne ala ei ole kuigi lai.

2008 kevad

19

## IR – infrapunakiirguse detektor

- Põhineb orgaaniliste ühendite võimel neelata infrapunast kiirgust.
  - Selektiivne detektor.
  - Mobiilne faas tuleb valida selliselt, et see ei neelaks prooviga samal lainepikkusel.

2008 kevad

20

## MSD – mass-spektromeetriline detektor

- MS detektorina on niivõrd võimas ja eripärane, et selle järgi lühendatakse kogu meetodit LC-MS (LC/MS).
- MS on viimastel aastatel nii tormiliselt arenenud, et raamatute/õpikute väidetesse peab ettevaatlikult suhtuma.
- MS detekteerimise jaoks peab analüüt olema ioonsel kujul, mistõttu MSD võib jagada kahte ossa:
  - Ioonallikas.
  - Massispektromeeter.

2008 kevad

21

## MSD ioonallikad

- Ioonallika põhiülesanded:
  - Analüüdi ioniseerimine.
  - Eluendi eraldamine analüüdist
  - Tagada, et ainult analüüt siseneks massispektromeetrisse.
- Atmosfäärirõhul töötavad ioonallikad (API):
  - ESI (*electrospray*) – elektropihustus
  - APCI (*AP chemical ionization*) – keemiline ionisatsioon
  - APPI (*AP photoionization*) – fotoionisatsioon
  - AP-MALDI

2008 kevad

22

## MSD: ESI

- ESI aluseks on elektropihustuse nähtus – tugevasse elektrivälja voolav vedelik pihustub peeneks uduks. Udu moodustavad tilgakesed omandavad laengu.
- ESI-sse sisenenud eluendivool pihustatakse laetud osakestega uduks gaasilise  $N_2$  ja elektrivälja abil. Analüüdi molekulid saavad laengu (nt  $H^+$  liitumisel) ja liiguvad elektrivälja toimel MS-sse.
- ESI
  - **Väga pehme** ioniseerimine, isegi biomolekulid ei lagune.
  - Kõige enamkasutatav ionisatsiooniallikas.
  - Kontsentratsioonitundlik.

2008 kevad

23

## MSD: APCI

- APCI korral pihustatakse eluendivool peeneks uduks gaasilise  $N_2$  abil. Eluent aurustatakse kuumutamisel.
- Koroonalahenduse abil ioniseeritakse  $N_2$ , mis ioniseerib eluendi molekule ja need omakorda analüüti.
- APCI
  - **Väga pehme** ioniseerimine, võimaldab uurida **vähempolaarsemaid** ühendeid kui ESI.
  - Kasutatavuselt ESI järel.
  - Võib öelda, et massitundlik.

2008 kevad

24

## MSD: mass-spektromeetrid

- Kvadrupool MS.
  - Ühekordne kvadrupool on suhteliselt tundlik ja LOD on hea, kuid ei võimalda fragmenteerida ja seetõttu ei ole nii selektiivne kui teised MS tüübid.
  - Kolmekordne kvadrupool (3Q) on ühekordsest väiksema tundlikkusega. MS<sup>2</sup> võimaldab saada [struktuurset informatsiooni](#) ja suurendab selektiivsust.
- Ioonlõks MS
  - Kõige tundlikum MS detektor; võimaldab vähemalt MS<sup>4</sup>, mis lisab oluliselt [struktuurset infot](#).
- Lennuaja (TOF) MS
  - Kõige täpsem mass.

2008 kevad

25

## Veel detektoreid

- Fotojuhtivusdetektor.
- Radioaktiivsuse detektor.
- Valguse hajumise detektor.
- Dielektrilise konstandi detektor.
- Corona CAD (Koroonalahenduse abil laetud aerosooli detektor): <http://www.coronacad.com/corona.htm>

2008 kevad

26