

Kõrgefektiivne vedelik- kromatograafia

Detektorid

2015 kevad

1

Nõuded detektorile (1)

- 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 (mööteraku ruumala olgu väike).

2015 kevad

2

Nõuded detektorile (2)

- 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.

2015 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 välja lülitada piigi maksimumi kohal – kontsentratsioonselektiivne säilitab signaali, mass-selektiivse signaal kahaneb baasijoonetaselele.

2015 kevad

4

Detektorite liigid (2)

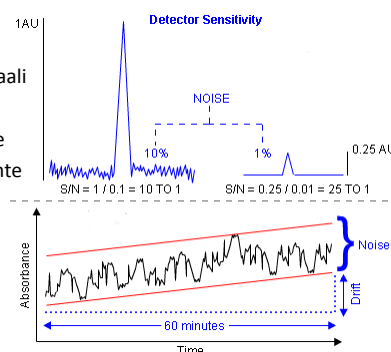
- Mõõdetava omaduse selektiivsus:
 - Mitteselektiivsed detektorid mõõdavad mingi **eluaadile kui tervikule** iseloomuliku omaduse muutust ajas
 - Murdumisnäitaja
 - Elektrijuhtivus
 - Selektiivsed detektorid mõõdavad **analüüdile** iseloomulikke omadusi
 - Neelduvus
 - Fluorestsents
 - Massi ja laengu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

2015 kevad

5

Tundlikkus

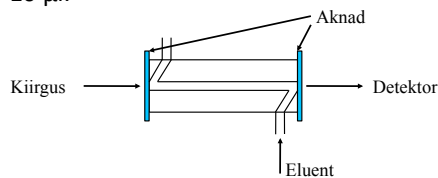
Detektoritundlikkuse hindamiseks ei piisa ainult analüüdi signaali suurusest. Tundlikkust hinnatakse signaal/müra (S/N) suhte järgi.



2015 kevad

Läbivoolurakk (1)

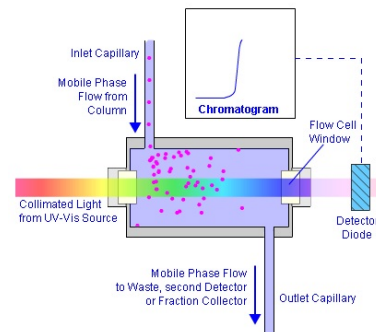
- Kasutatakse 1-10 µl ruumalaga rakke. Tavalisemad on 6-10 µl.



2015 kevad

7

Läbivoolurakk (2)



2015 kevad

8

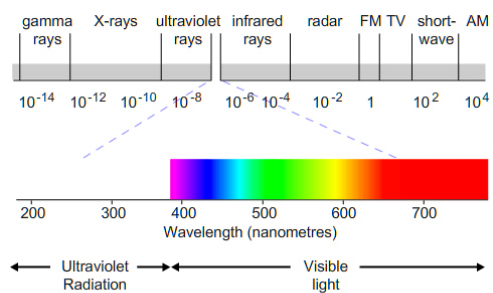
UV-Vis neelduvuse detektor

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

2015 kevad

9

Elektromagnetlainete skaala



UV Cut-off - for common organic solvents used in reverse phase HPLC:
Acetonitrile 210nm / Methanol 210nm / THF 220nm

2015

10

UV-Vis: kasutusala

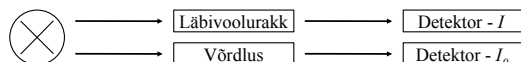
- Kasutatav väga paljude ühendite detekteerimiseks:
 - Kaksiksides ja vaba elektronpaariga aatom selle naabruses $X=Y-Z$
 - Br-, I- ja S-ühendid.
 - Karbonüül (C=O) või nitro (NO_2).
 - Konjugeeritud kaksiksided $X=X-X$.
 - Aromaatne tuum.
 - Anioonid: Br⁻, I⁻, NO_3^- , NO_2^-
- Ei sobi** küllastatud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

2015 kevad

11

UV-Vis: tööpõhimõte

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



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

- Vastavalt Beer'i reeglile $A = \epsilon lc$ ehk $A = abc$, kus A – optiline neelduvus, ϵ (a) – molaarne ekstinktsioonikoeffitsient (neelduvustegur), l (b) – optiline teepikkus, c – analüüdi kontsentratsioon.

2015 kevad

12

UV-Vis: tüübid ja kiirgusallikad Fikseeritud lainepikkusega ja filtritega (1)

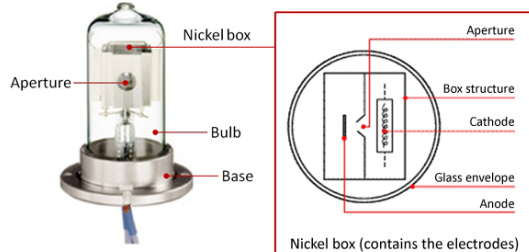
- Madalrõhu Hg-lambi puhul kasutatakse lainepikkust 254 nm.
- Cd-lamp – 229 nm.
- Zn-lamp – 214 nm.
 - Muud lainepikkused filtreeritakse välja. (Miks?)
 - Oluliselt tundlikum kui muudetava lainepikkusega detektorid.

2015 kevad

13

UV-Vis: tüübid ja kiirgusallikad Fikseeritud lainepikkusega ja filtritega (2)

- Deuterium-lamp – pidev UV-spekter 190 nm kuni ca 340 nm.



2015 kevad

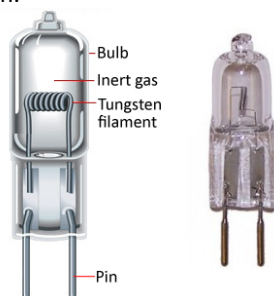
14

UV-Vis: tüübid ja kiirgusallikad Fikseeritud lainepikkusega ja filtritega (3)

- Volframlamp – 340-850 nm.

Lambi kolb on tehtud kvartsist, mis lubab teda kasutada temperatuuril kuni 900 C ja rõhul kuni 20 baari.

Et pikendada piri eluiga, täidetakse kolb mõne halogeeniaga Br, I.

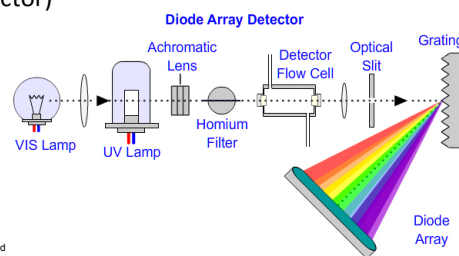


2015 kevad

15

UV-Vis: tüübid ja kiirgusallikad

- Monokromaatoriga (D₂- ja/või W-lamp)
- Diodrivi (PDA-photodiode array, DAD-diode array detector)



2015 kevad

16

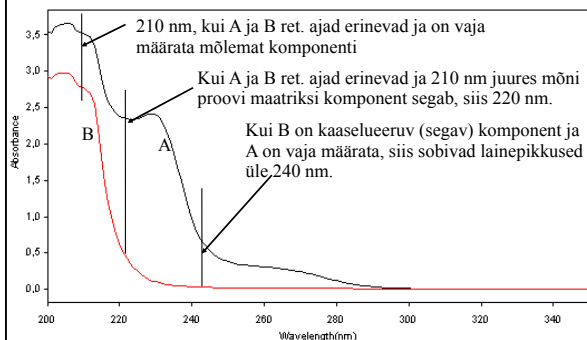
UV-Vis: töörežiimid

- Kromatogrammi registreerimine fikseeritud lainepikkusel – kõik loetletud tüübid.
- Lainepikkuse muutmine kromatogrammi registreerimise käigus – enamus D₂- ja W- lambiga detektoreid.
- Skaneerivad (D₂ 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.

2015 kevad

17

UV-Vis: lainepikkuse valik

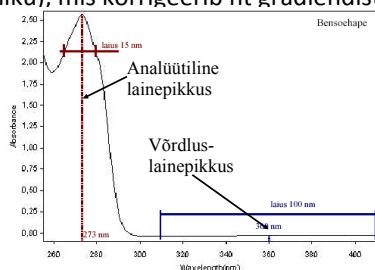


2015 kevad

18

UV-Vis: võrdluslainepikkus

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

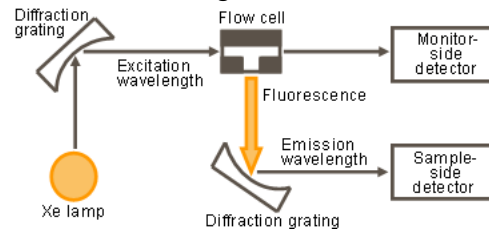


2015 kevad

19

FLD – fluorestsentsdetektor (1)

- FLD – ergastava kiirguse suund on risti detekteerimise suunaga:



2015 kevad

Hitachi High-Tech

FLD – fluorestsentsdetektor (2)

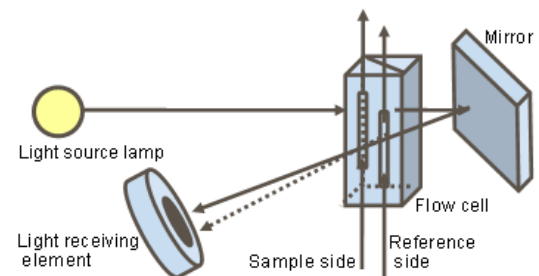
- Omadused
 - Selektiivne detektor.
 - LOD kuni **1000 korda parem** kui UV-Vis puhul.
 - Tundlikkuse suurendamiseks on raku ruumala *ca* 20 μ l.
 - Tundlik **fluorestsentsi kustutavate** komponentide suhtes mobiilses faasis (nt lahustunud hapnik!).
 - Lineaarne ala sõltub süsteemist, aga on kitsas.

2015 kevad

21

RI – murdumisnäitaja detektor (1)

- RI – *refractive index*



2015 kevad

Hitachi High-Tech

RI – murdumisnäitaja detektor (2)

- Omadused
 - 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.

2015 kevad

23

ELSD – evaporative light scattering detector

- ELSD – eluent koos selles lahustunud ainetega pihustatakse uduks ja aurustatakse. Mõõdetakse laseri kiirguse hajumist aurustunud osakestelt.
 - 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.

2015 kevad

24

Elektrokeemilised detektorid

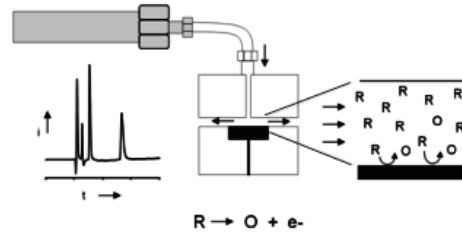
- Kasutatakse erinevate liikide kohta:
 - Amperomeetiline
 - Polarograafiline
 - Kulonomeetiline
 - Konduktomeetiline

2015 kevad

25

Amperomeetiline (1)

- Amperomeetiline detektor tunneb oksüdeeruvaid ja redutseeruvaid orgaanilisi aineid



2015 kevad



Amperomeetiline (2)

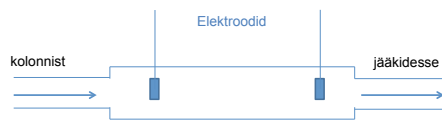
- Omadused
 - Selektiivne detektor.
 - LOD erakordselt madal.
 - Lihtne ja odav.
 - Mobiilne faas peab juhtima elektrit, kuid ei pruugi olla vesilahus (mittepolarsed eluendid ei sobi).

2015 kevad

27

Konduktomeetiline detektor (1)

- Klassikaline detektor ionkromatograafias.
- Mõõdetakse eluendi elektrijuhtivust.



2015 kevad

28

Konduktomeetiline detektor (2)

- Omadused
 - 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.

2015 kevad

29

IR – infrapunakiirguse detektor

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

2015 kevad

30

MSD – mass-spektromeetriline detektor

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

2015 kevad

31

MSD omadused

- **Selektiivsus** – Koos elueeruvaid piike saab lahutada/isoleerida massi järgi, isegi kui nad ei ole kromatograafiliselt lahus.
- **Piikide määramine** – Keemilistele ühenditele isikupärane spekter
- **Molekulmassi informatsioon** – Teadaolevate ja tundmatute ühendite identifitseerimine
- **Informatsioon ühendi struktuuri kohta** – Fragmenteerimine võimaldab anda täiendavat informatsiooni
- **Kiirem meetodika väljatöötamine** – Kiire ja lihtne analüütide detekteerimine ilma retentsioonaja valideerimiseta
- **Proovimatriksi eristamine analüüdist** – võib vähendada prooviettevalmistusele kuluvat aega
- **Kvantifitseerimine** – Nii kvalitatiivne kui kvantitatiivne analüüs

2015 kevad

32

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 (*AP matrix-assisted laser desorption/ionization*)

2015 kevad

33

MSD: ESI

- ESI aluseks on elektropihustuse nähtus – tugevasse elektrivälja voolav vedelik pihustub peeneks uduks. Udu moodustavad tilgakased omandavad laengu.
- ESI-sse sisenenud eluendivool pihustatakse laetud osakestega uduks gaasilise N₂ 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.

2015 kevad

34

MSD: APCI

- APCI korral pihustatakse eluendivool peeneks uduks gaasilise N₂ abil. Eluent aurustatakse kuumutamisel.
- Koroonalahenduse abil ioniseeritakse N₂, 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.

2015 kevad

35

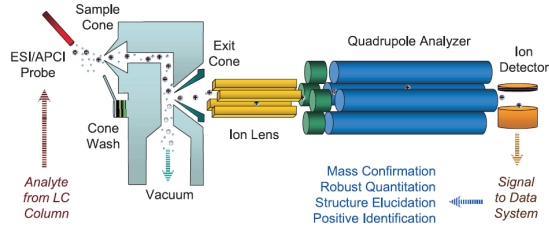
MSD: mass-spektromeetrid

- 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. MS² võimaldab saada **struktuurset informatsiooni** ja suurendab selektiivsust.
- Ioonlõks MS
 - Väga tundlik MS detektor; võimaldab vähemalt MS⁴, mis lisab oluliselt **struktuurset infot**.
- Lennuaja (TOF) MS
 - Väga täpne mass.
- Orbitrap MS
 - Kõige tundlikum MS detektor, äärmiselt täpne nii väikeste kui suurte molekulide detekteerimisel, kiire detekteerimine, lai lineaarne ala, võimaldab MSⁿ, andes oluliselt **struktuurset infot**.

2015 kevad

36

Kvadrupool MS



2015 kevad

Thermo
SCIENTIFIC

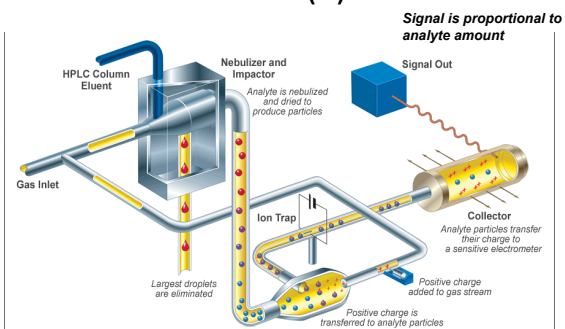
Veel detektoreid

- Fotojuhtivusdetektor
- Radioaktiivsuse detektor
- Valguse hajumise detektor
- Dielektrilise konstandi detektor
- Corona CAD (Koroonalahenduse abil laetud aerosooli detektor): http://www.esainc.com/products/type/hplc_systems/detectors/coronacad

2015 kevad

38

CCAD (1)



fall 2014

39

CCAD (2)

- Väga hea tundlikusega (nanogrammides)
- Lai dünaamiline ala
- Hea korduva signaaliga
- Detekteerib väga erinevate omadustega ühendeid (ka neid millel puudub kromofoor)
- Robustne ja lihtne kasutada

fall 2014

40