

Kõrgefektiivne vedelik- kromatograafia

Meetodi väljatöötamise alused

2005/2006 kevad

1

Meetodi väljatöötamine

- Meetodi väljatöötamine proovivõtust kuni valideerimise ja rutiinkasutuseni on raskesti formaliseeritav.
- Siinkohal vaatleme vaid üldiseid etappe.

2005/2006 kevad

2

1. Info kogumine

- **Tullio Ilomets: “Päev raamatukogus võib vältida kuudepikkuse töö laboris.”**

- Selgitada välja eesmärgid.
 - Kvalitatiivne või kvantitatiivne määramine?
 - Põhiaine või lisandid?
 - Milline on maatriks (looduslik või sünteetiline)?
 - Kui palju proove on vaja analüüsida?
 - ...

2005/2006 kevad

3

1. Info kogumine (2)

- Analüütide kohta
 - Mitu analüüti?
 - Keemilised struktuurid, olemus (alus, hape, proteiin ...)
 - pK_a väärtused
 - Lahustuvus
 - UV-Vis spektrid
- Proovi kohta
 - Lahusena? Lahustub mobiilses faasis?
 - Vajab eeltötlust?
 - ...

2005/2006 kevad

4

2. Detekteerimine

- Kõige lihtsam ja laiemalt on levinud UV-Vis detektor. Kogutud info (analüüdi struktuur, spekter, kontsentratsioon, lisandid) peaks võimaldama otsustada, kas UV-Vis detektor on kasutatav.
 - Fluorestsents
 - Elektrokeemiline
 - Murdumisnäitaja
 - Derivatiseerimine
 - Mass-spektromeeter

2005/2006 kevad

5

3. HPLC meetodi valik

- Pöördfaas-kromatograafiat tasub proovida neutraalsete või ioniseerumata ühendite jaoks, mis lahustuvad vesi/orgaanika segudes.
- Alustada võiks järgmisest:
 - kolonn: C18, 4.6 x 250 mm, 5 μ m
 - mobiilne faas: vesi/MeCN, MeCN sisaldust varieerida
 - puhver: 25 mM fosfaatpuhver pH 3.5
 - voolukiirus: 1 – 2 ml/min
 - temperatuur: 40°C
 - proov: < 50 μ g (1 – 2 mg/ml)

2005/2006 kevad

6

4. Lahutuse optimeerimine

- Eluendi koostise, pH, temperatuuri jm. optimeerimisest tuleb juttu edaspidi.

2005/2006 kevad

7

5. Valideerimine

- Selektiivsus (*selectivity*)
- Kordustäpsus (*precision*)
- Täpsus (*accuracy*)
- Avastamiskiir (*limit of detection*)
- Määramiskiir (*limit of quantitation*)
- Lineaarsus (*linearity*)
- Kasutuskiir (*range*)
- Mittekapriissus (*robustness*)

2005/2006 kevad

8