Detekce a detektory

Ivan Mikšík
Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.
Praha

Detektory pro GC

Selektivní, citlivé, lineární dynamický rozsah

Detektor tepelně vodivostní – rozdílná tepelná vodivost plynů (porovnání tepelné vodivosti čistého nosného plynu a nosného plynu unášející z kolony separované látky (nedestruktivní detektor)

Detektor plamenově ionizační (FID) – princip ionizace chromatografované látky v mikroplameni hořící směsi vodíku a vzduchu za definovaných podmínek (destrukční detektor)

Detektor elektronového záchytu (ECD) – využívá měkkého β-zářiče (^{63}Ni). Nosný plyn je β-zářením ionizován za vzniku pomalých elektronů. Při průtoku samotného nosného plynu je konstantní ionizační proud, pokud unáší separovanou látku (obsahující např. halogen) schopnou absorbovat elektrony o nízké energii=snížení průchodu ionizačního proudu

MS

Detektory pro GC (2)

- FTIR infračervená spektroskopie (Fourierova transformace); složky separované GC postupují do světelné trubice kde absorbují infračervené záření vycházející ze zdroje; Fourierova transformace interferogramu poskytuje IR spektrum, které lze použít jak k detekci dané látky, tak k její identifikaci, příp. určení čistoty

• FID	flame ionization detection	plamenový ionizační detektor
• ECD	electron-capture	elektron zachycení
• FPD	flame photometric det.	plamenový fotometr
• NPD	nitrogen phosphorus det.	(dusík fosfor detekce)
• TCD	thermal conductivity det.	(tepelně vodivostní det.)

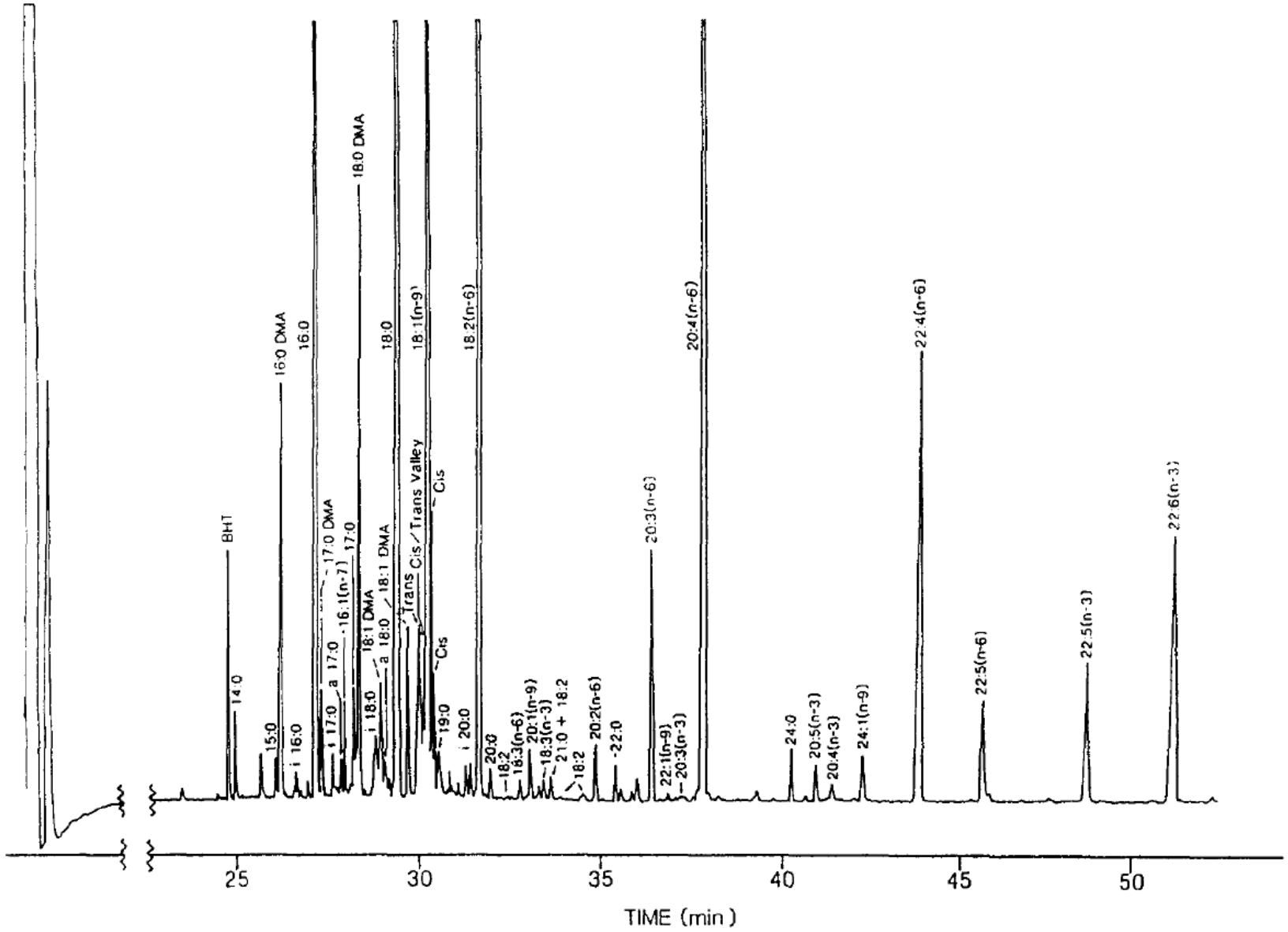
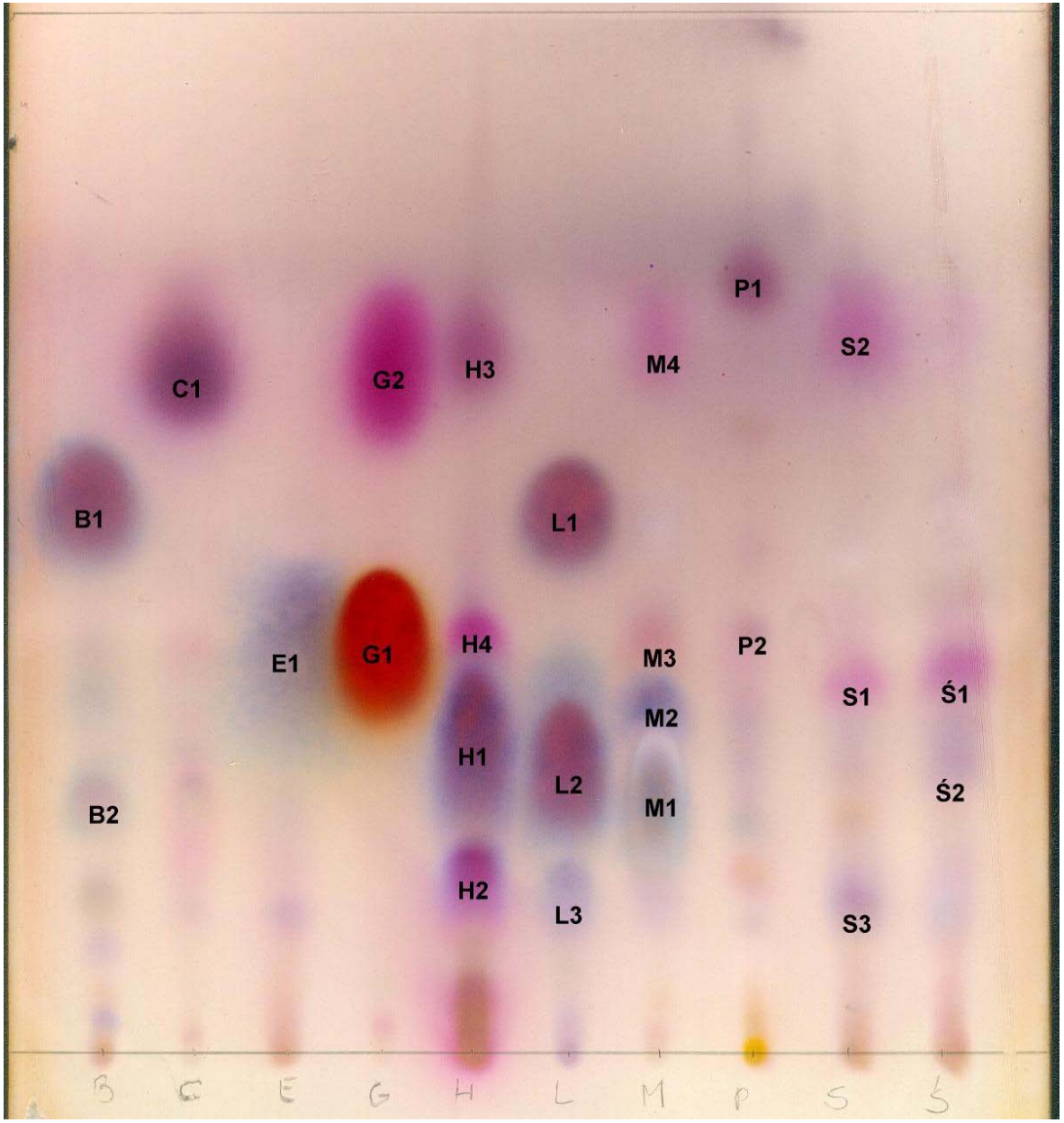
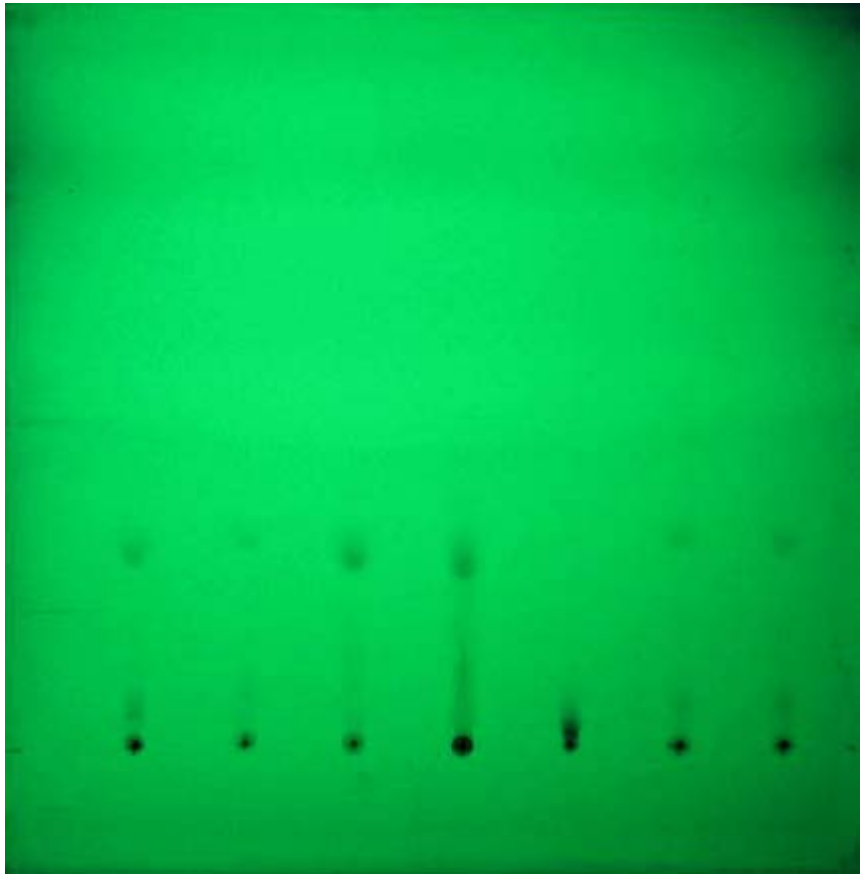
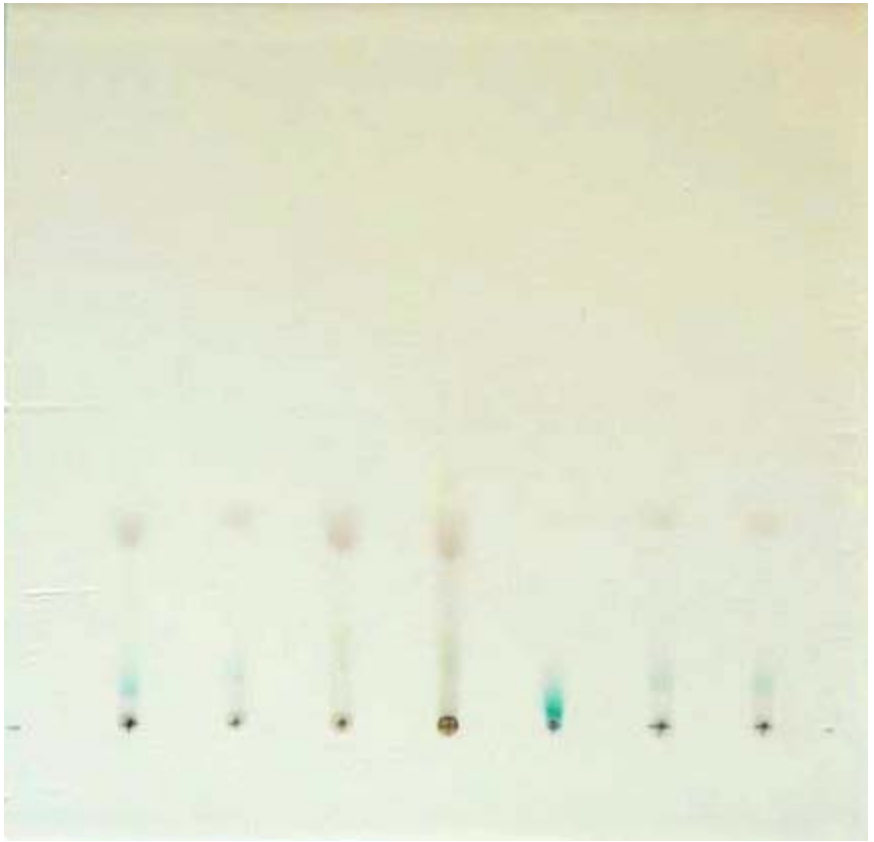


Fig. 2. Separation of human erythrocyte membrane FAMEs on a SP-2560 fused-silica capillary column (100 m × 0.25 mm I.D., 0.2 μm film thickness). Chromatographic conditions: split injection (split ratio 1:30); oven temperature program: 80°C for 2 min, 8°C/min to 220°C, 220°C for 32 min; carrier gas: helium (0.67 ml/min). DMA = dimethyl acetal derivatives of fatty aldehydes; i = iso; a = anteiso. Reproduced from Alexander et al. [25] with permission.



The scan of TLC plate (silica gel G) with 10 essential oils developed with mobile phase toluene - ethyl acetate (93:7 v/v), next sprayed with vanillin in H_2SO_4 and heated. From left to right oils from: bergamot, cedar, eucalyptus, syzygium, malaleuca, lavandula, mint, orange, pine, spruce. Identified components: B1 and L1 - linalol, B2 and L2 - linalyl acetate, E1 - cinneol, G1 - eugenol, G2 - carryophyllene. Doubtfully identified components - C1 - cedrol, M3 - menthol, P1 - limonene.





Detektory a detekce pro HPLC

1. Ultrafialový/viditelný (UV/VIS)
2. Index lomu (Refractive Index)
3. Fluorescenční
4. Elektrochemický
   - Amperometrický
   - Vodivostní
5. Radioaktivní
6. Rozptyl světla (Light Scattering)
   - Mnohaúhlový rozptyl laserového světla (Multi-Angle Laser Light Scattering)
   - Odpařovací rozptyl světla (Evaporative Light Scattering)
7. Corona - Detekce nabitého aerosolu (Charged aerosol detection)
8. Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)

	Univerzálnost	Strukturální informace	Citlivost	Limity detekce (g)	Lineární oblast	Citlivost k teplotě	Kompatibilita s gradientem	Cena
UV/VIS, pevná λ	med	nízká	vysoká	10^{-10} až 10^{-11}	10^5	nízká	ano	nízká
Photodiode array	med	med	vysoká	3 ppb	> 2 AU	nízká	ano	med
Index lomu (Refractive Index)	vysoká	nízká	nízká	10^{-7}	10^4	vysoká	ne	nízká
Fluorescenceční	nízká	nízká	vysoká	10^{-12}	10^3	nízká	ano	nízká
Elektrochemický	nízká	nízká	vysoká	10^{-11}	10^6	vysoká	ne	nízká
Vodivostní	nízká	nízká	vysoká	10^{-11}	10^4	vysoká	ne	nízká
Radioaktivní	nízká	nízká	med	<100 DPM	$4x10^6$ DPM	nízká	ano	med
Mnohaúhlový rozptyl laserového světla (Multi-Angle Laser Light Scattering)	med	vysoká	nízká	10^{-7}		nízká	ano	med
Odpařovací rozptyl světla (Evaporative Light Scattering)	vysoká	nízká	med	10^{-8}	10^3	nízká	ano	med
Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)	vysoká	vysoká	med	10^{-10}		nízká	ano	vysoká

Detektory

Absorbance

molární extinkční koeficient je specifický pro každou molekulu; UV cut-off – sole a aditiva (zvýšení vlnové délky a absorbance)

- ***a) fixní vlnová délka***
- ***b) variabilní vlnová délka***
- ***c) skenující*** (rychle skenující – 10-20x /s)
- ***d) photodiode array*** (výhoda – spektrum)

výhody – vysoká citlivost, selektivita univerzálnost (200 nm), nízké pozadí umožňuje gradientovou eluci, nedestruktivní, snadné

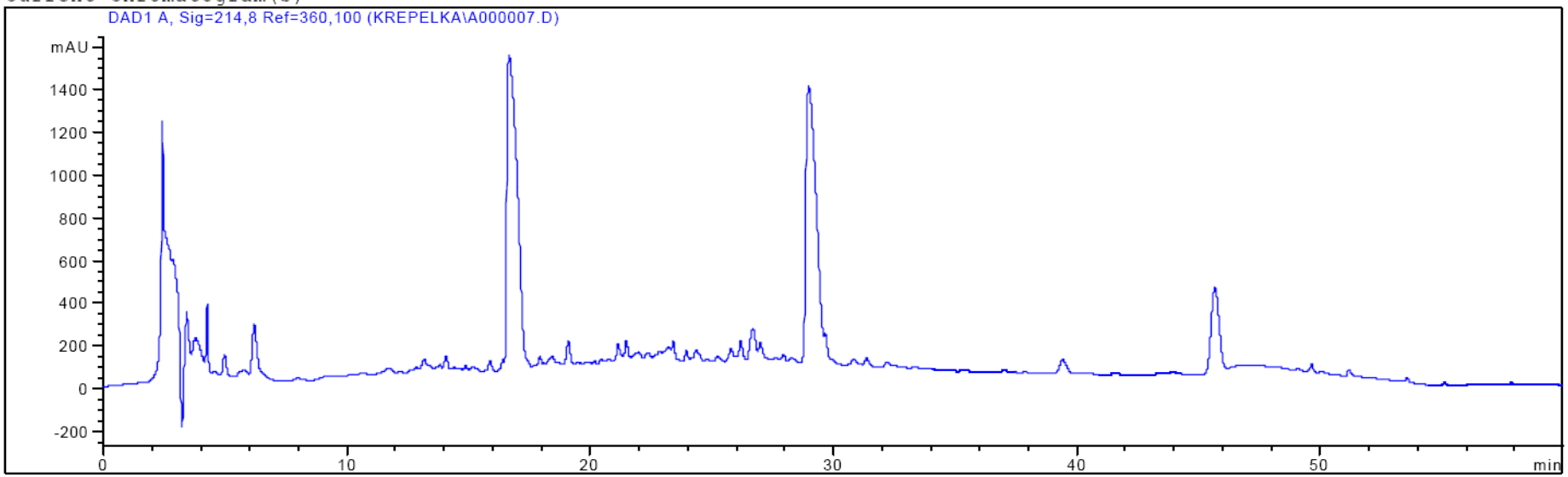
nevýhody – musí absorbovat, cut-off, rozdílná odpověď

Fluorescenční

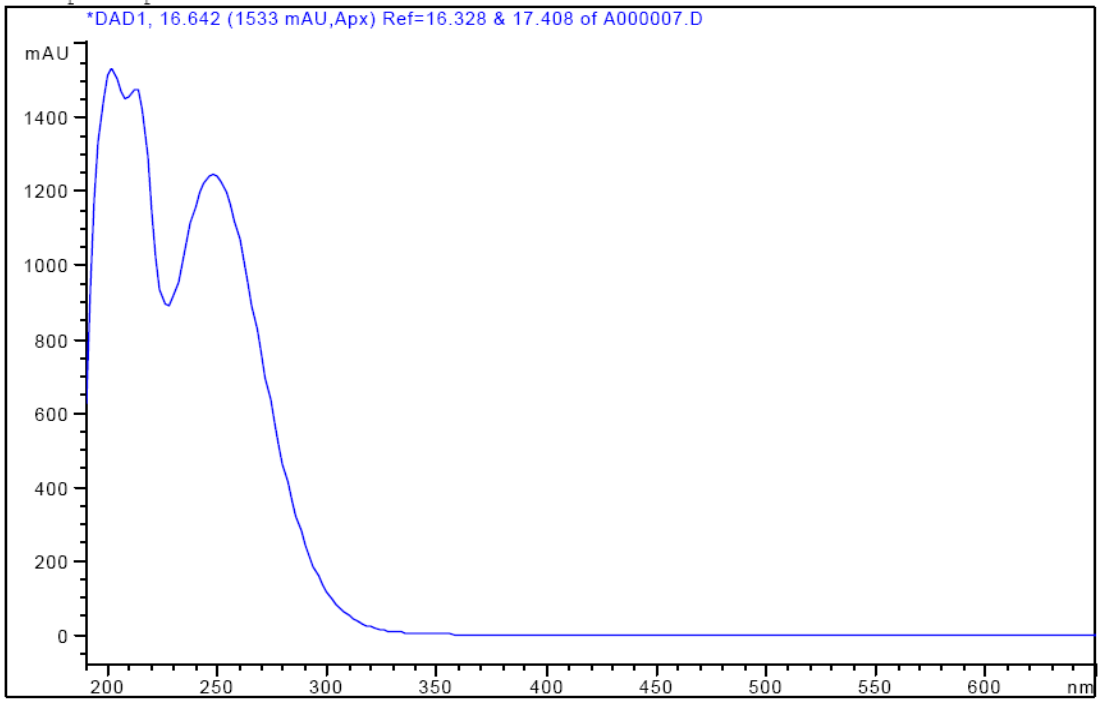
absorbuje energii ve spec. vln. délce (excitační), dosahuje excitovaný stav a pak se vrací do původního stavu emisí světla při delší vln. délce (emisní λ)

Vysoká selektivita (2 vlnové délky) a citlivost (**laser** !!!!) hlavní nevýhoda- rozdílné vln. délky pro každou látku, derivatizace

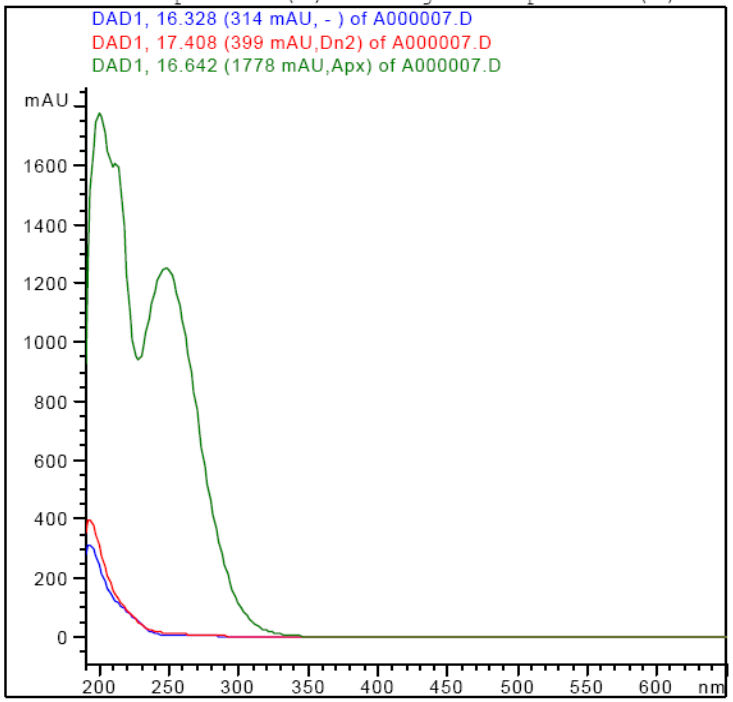
Current Chromatogram(s)

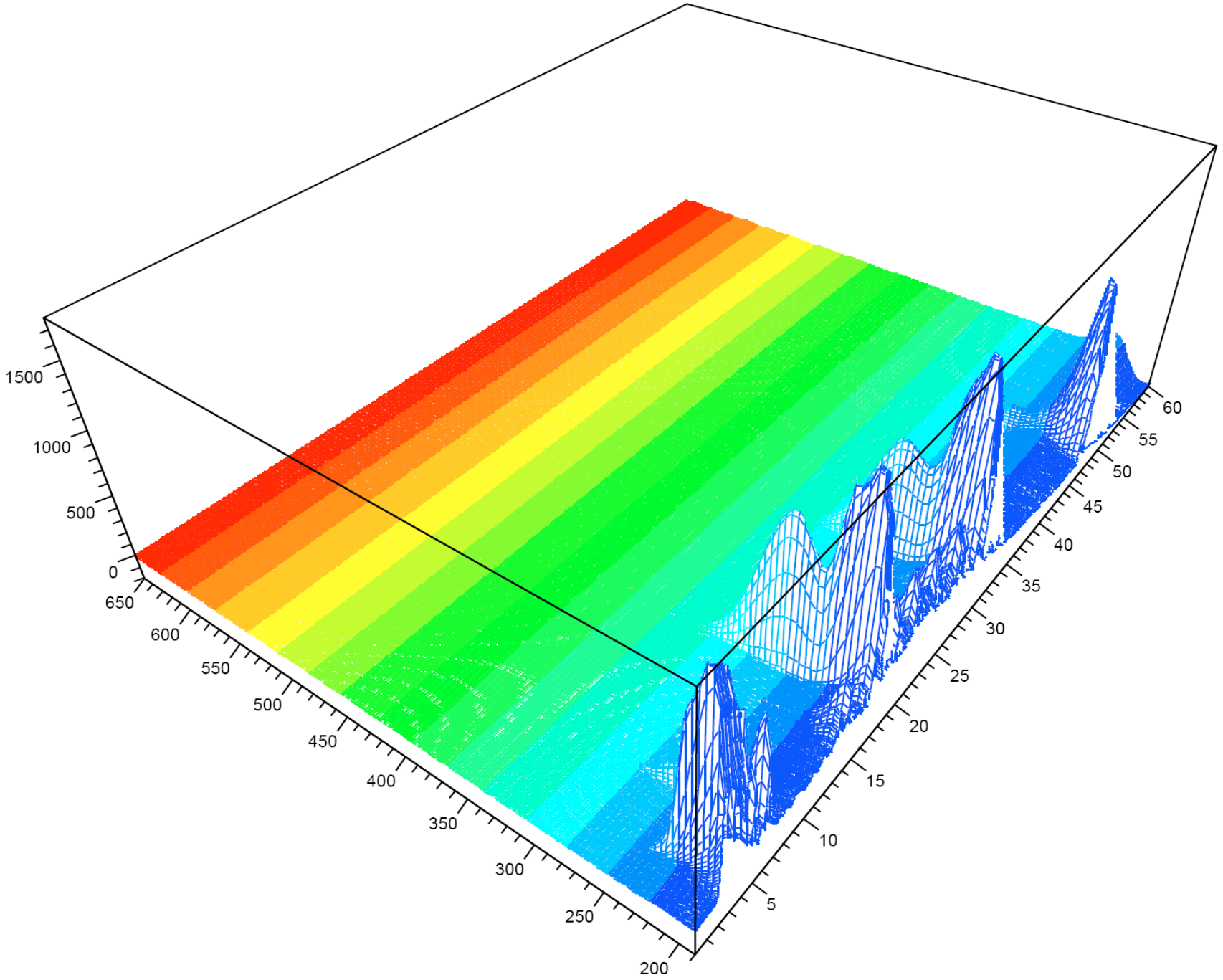


UV Apex spectrum of Peak 16.639 of A000007.D



Reference spectrum(a) + Original spectrum(a)




1500
1000
500
0
650
600
550
500
450
400
350
300
250
200
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

Detektory (2)

Index lomu (Refractive Index)

porovnává index lomu čisté mobilní fáze s fází obsahující analyt; může být positivní i negativní

Elektrochemické detektory – měří elektrická data z roztoků pomocí 2 elektrod

- *Amperometrické*

  vzorek prochází elektrolytickou reakcí, po aplikaci konstatního napětí je měřen výsledný proud v čase. Pro látky které jsou snadno oxidovatelné nebo redukovatelné (aromatické aminy a fenoly)

  extrémně selektivní – pouze molekula, která je oxidovatelná nebo redukovatelná; vysoká citlivost

  modifikace – pulzní amperometrie

- *Coulometric (voltametrický)*

  modifikace amper., totální konverze všech molekul reakcí – způsobeno velkou pórezní grafitovou pracovní elektrodou nebo pomalým průtokem mob. fáze; citliva metoda, ale produkuje mnoho šumu = limita detekce obdobná

- *Vodivostní detekce*

  Elektrochemická detekce iontů. Roztok bohatý na ionty je lepší vodič proudu než roztok málo ionty.

  Konstantní napětí v cele detektoru a měří se proud v čase.

  Hlavně pro analýzu organických a anorganických iontů eluovaných z iontově-výměnných kolon.

  Citlivé, ale neselektivní

Detektory (3)

Radioaktivní

- pevná cela průtoková cela (scintilační koktejl)

Rozptyl světla

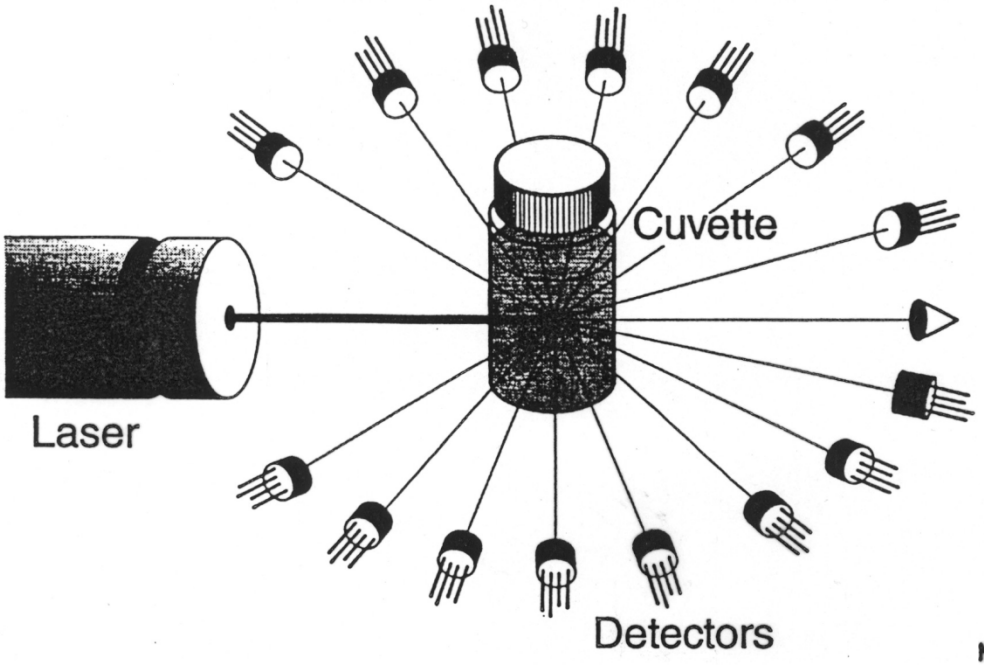
Mnohaúhlový rozptyl laserového světla (Multi-Angle Laser Light Scattering Detector)

- interakce světla a hmoty když světlo udeří do hmoty, způsobí dočasný dipól v molekule který osciluje ve frekvenci dopadajícího světla. Když se molekula vrací do původního stavu, emituje světlo v různých směrech
- Celkový rozptyl světla je přímo úměrný molekulové hmotnosti a koncentraci (software – v sérii s UV či RI k určení koncentrace)

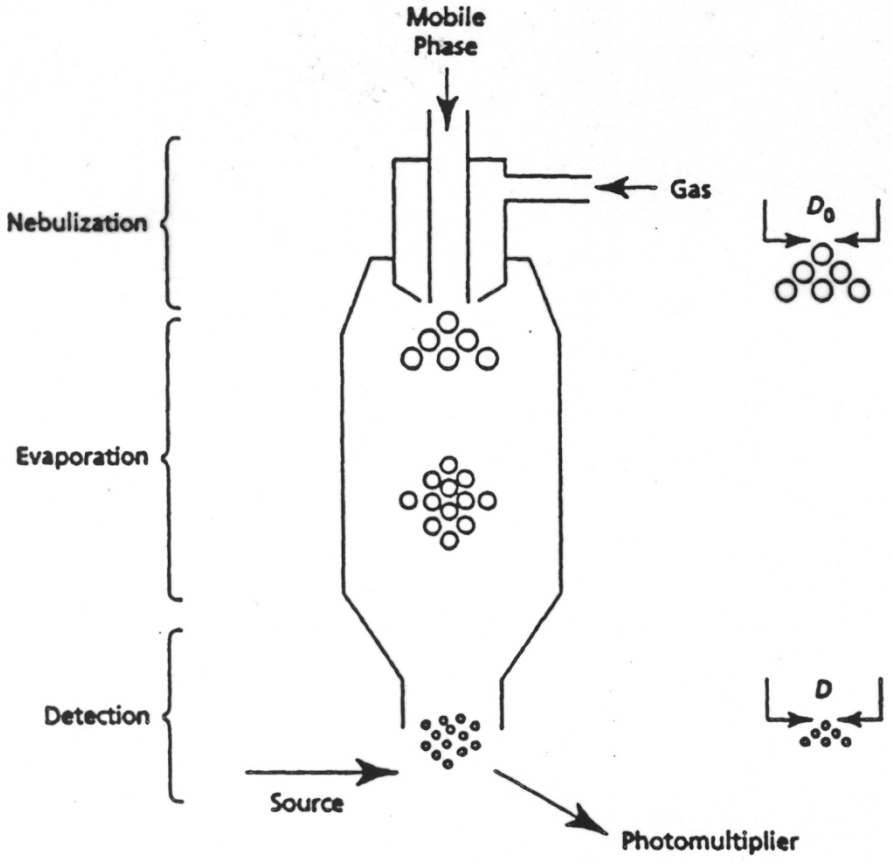
Evaporative Light Scattering (odpařovací rozptyl světla)

- univerzální detektor, k detekci všech látek méně těkavých než mob. fáze
- výtok z kolony – zmlžen (nebulizován), vytvořena jednotná mlha která je zahřáta k odstranění těkavého rozpouštědla; netěkavý analyt prochází skrz celu, kde rozptýlí paprsek ze zdroje světla
- *Aplikace:* cukry, lipidy (x jiné metody); kompatibilita s gradientem
- univerzálnost, gradient, nezávislý na teplotě; nelineární kalibrační křivka

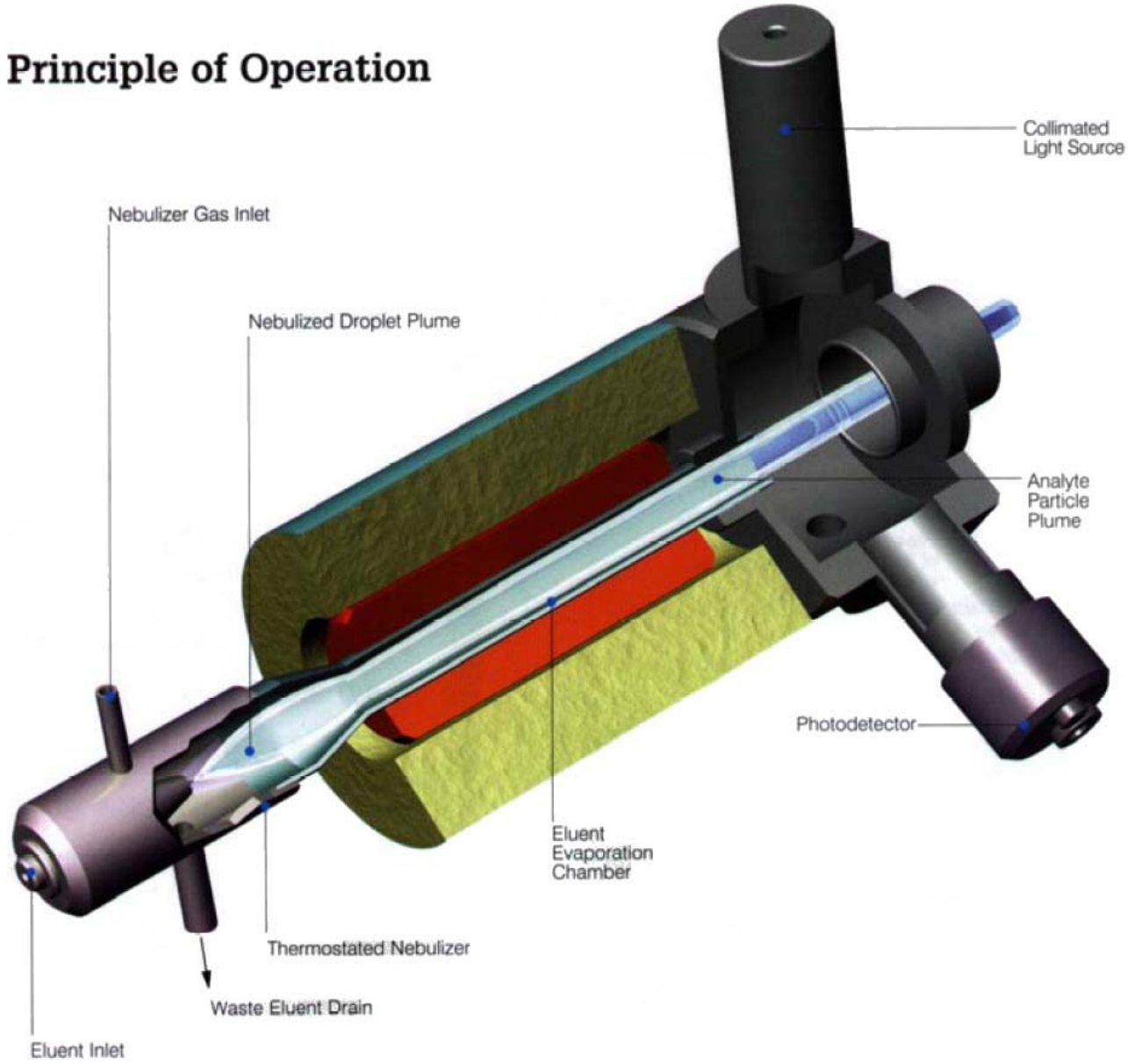
Multi-Angle Laser Light Scattering Detector



Evaporative Light Scattering Detector



Evaporative Light Scattering (odpařovací rozptyl světla)



Detektory (4)

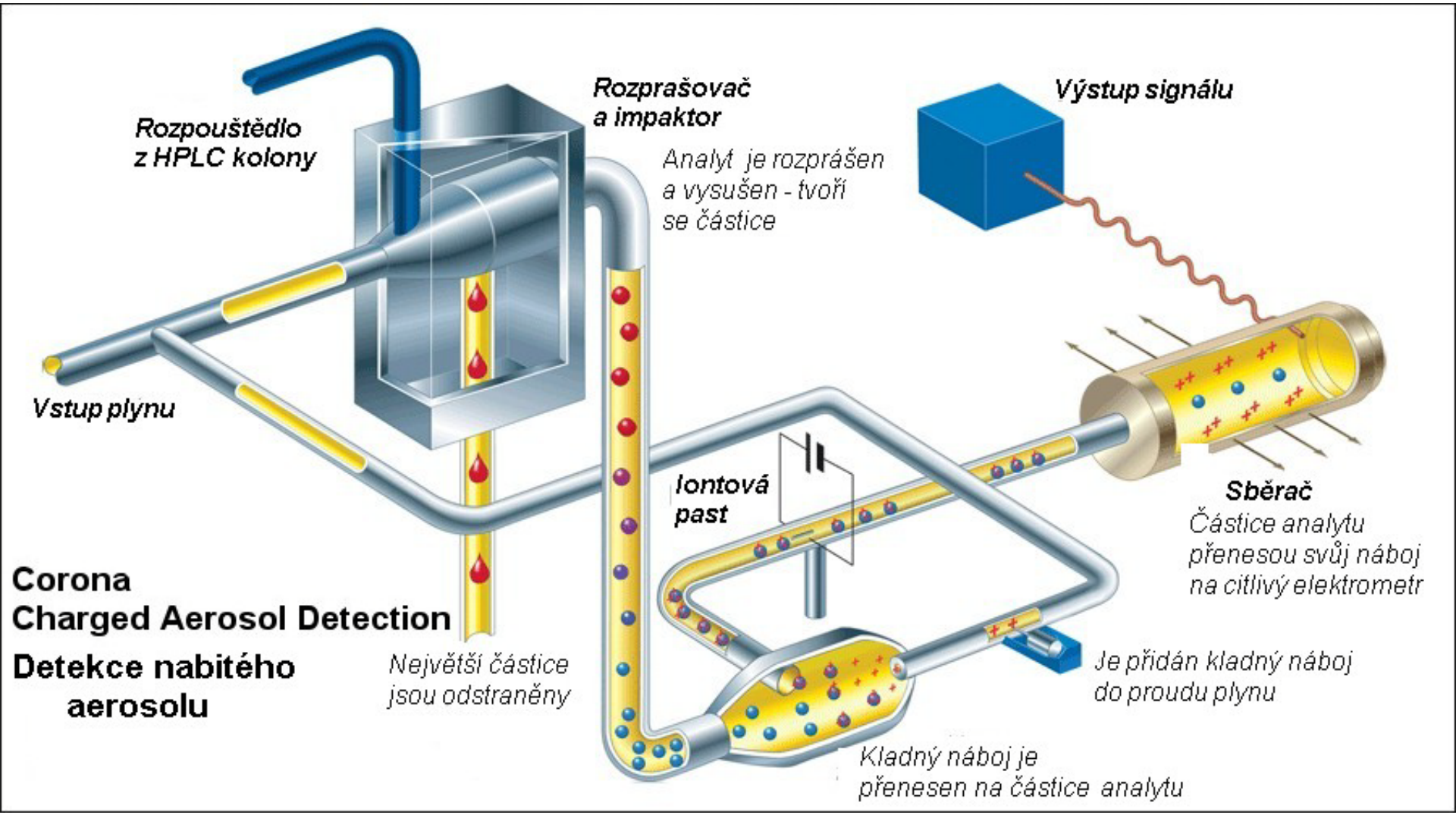
Corona – Detekce nabitého aerosolu *(Charged Aerosol Detector)*

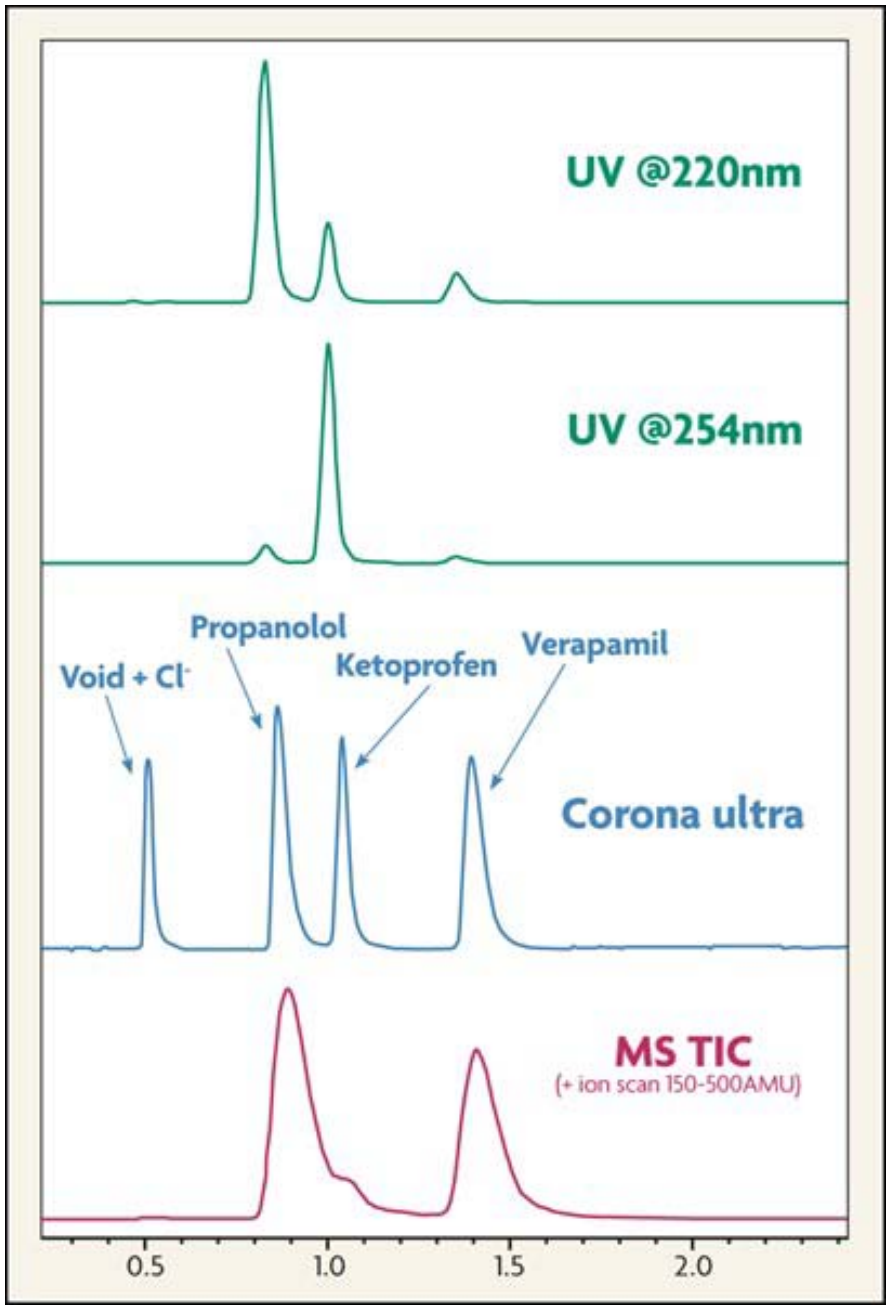
- Měření náboje spojeného s částicí analytu. Náboj je v přímém poměru k množství analytu ve vzorku. Detekce netěkavých analytů včetně těch bez chromoforu. Odpověď detektoru nezávisí na optických vlastnostech analytu (jako u UV/VIS detekce) nebo ionizovatelnosti (jako u MS – hmotnostní spektrometrie)

Postup:

- 1) Přeměna analytu na částice (rozprášení, odpaření rozpouštědla)
- 2) Proud kladně nabitého plynu se srazí s částicemi analytu – náboj je přenesen na částice (větší částice, větší náboj); náboj získá plyn (N^2) průchodem skrz vysokonapěťový platinový korónový nabíječ (corona charger)
- 3) Částice jsou převedeny do kolektoru kde je změřen vysoce citlivým elektrometrem.

- Alternativa k ostatním detektorům (hlavně netěkavé analyty: od lipidů po proteiny, DNA, oligosaccharidy, aminokyseliny, cukry, léčiva, ba i ionty),
- Univerzální detektor, citlivost až pikogramy.

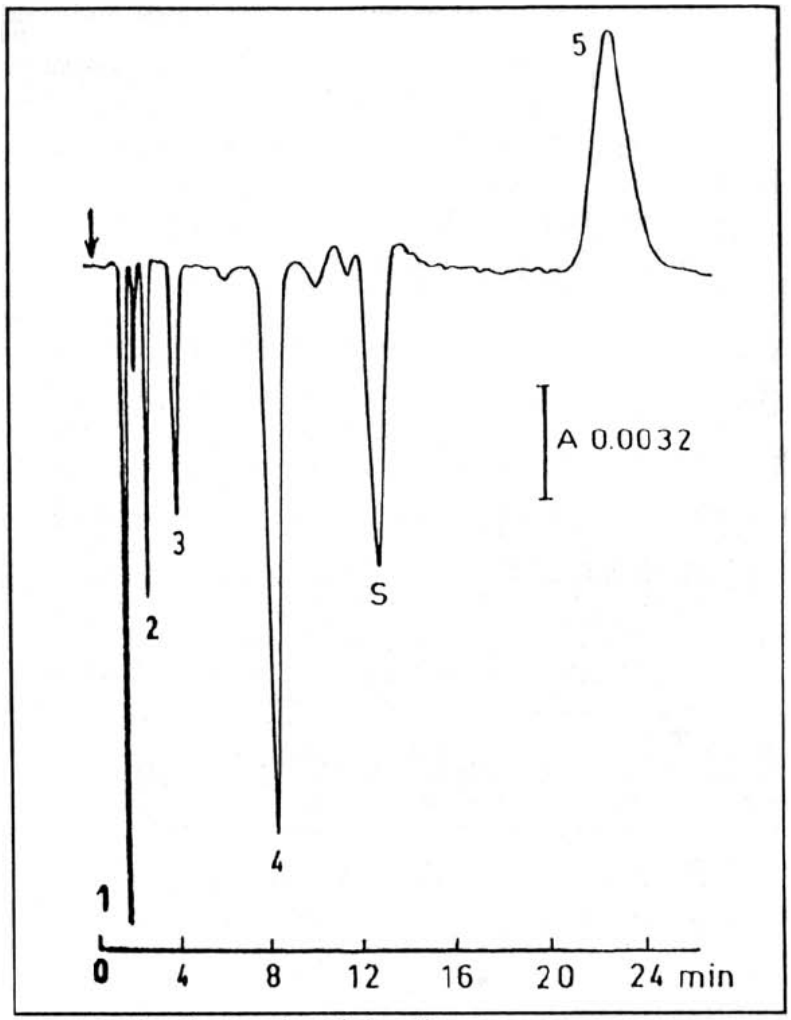

Rozpouštědlo
z HPLC kolony
Rozprašovač
a impaktor
Analyt je rozprášen
a vysušen - tvoří
se částice
Výstup signálu
Vstup plynu
Iontová
past
Sběrač
Částice analytu
přenesou svůj náboj
na citlivý elektrometr
Corona
Charged Aerosol Detection
Detekce nabitého
aerosolu
Největší částice
jsou odstraněny
Je přidán kladný náboj
do proudu plynu
Kladný náboj je
přenesen na částice analytu


UV @220nm
UV @254nm
Propanolol
Void + Cl-
Ketoprofen
Verapamil
Corona ultra
MS TIC
(+ ion scan 150-500AMU)
0.5
1.0
1.5
2.0

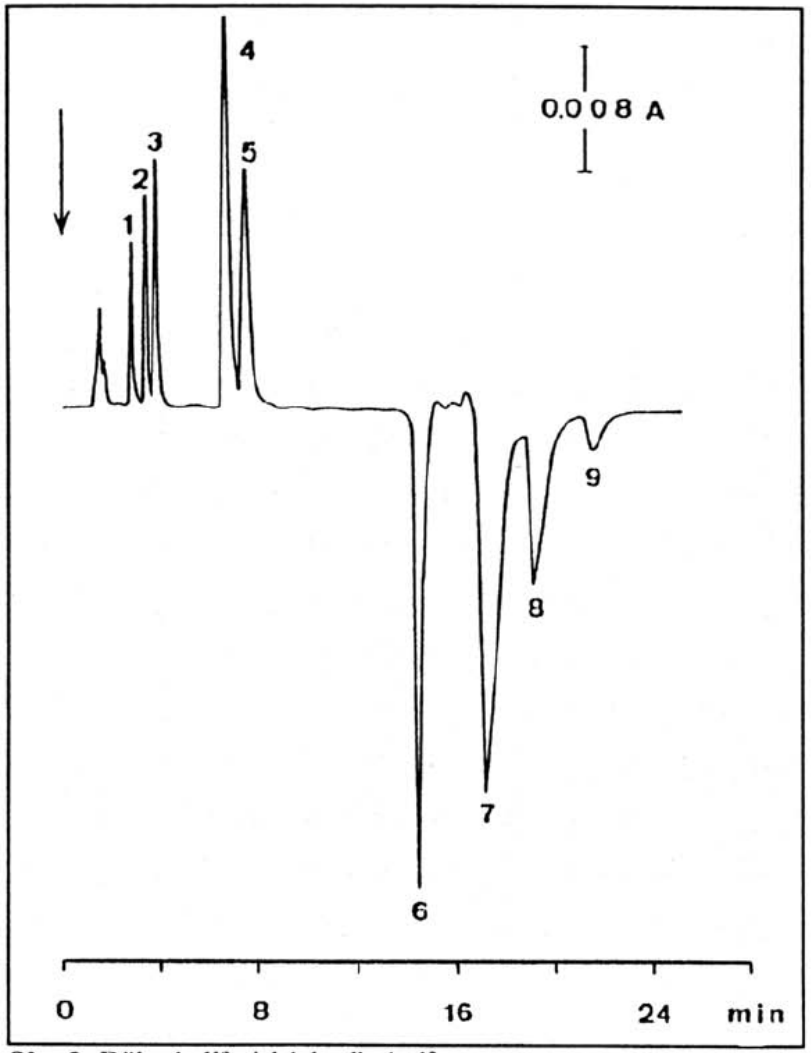
Nepřímá detekce

- princip – fyzikální náhrada přidávané, dobře detekovatelné složky (chromoforu, fluoroforu nebo iontu) sledovaným analytem.
- Nejjednodušším mechanismem je zředění mobilní fáze vstupujícím analytem
- **Univerzálnost**
- nepřímá UV – nejběžnější; do mobilní fáze se přidává UV-aktivní látka - **proba**
- smysl zobrazení píků je určován druhem anal. vzorku. Analyty, které nenesou žádný náboj a nebo mají stejný náboj jako proba – negativní píky, nenabité analyty – poskytují positivní píky, pokud jsou tak polární, že se eluují před systémovým píkem
- Smysl píku závisí na náboji solutu a jeho retenci relativně k použité probě a je nezávislý na množství dávkované látky
- **Volba složek** – aby sledovaný analyt byl eluován v těsné blízkosti proby (docílíme jak změnou koncentrace použité proby, tak změna hydrofobních vlastností tuhé fáze (čím vyšší obsah alkylů v solutu, tím hydrofobnější musí být proba a tím méně hydrofobní musí být adsorbent)

Nepřímá detekce



Obr. 1: Dělení karboxylových kyselin
Mobilní fáze 3.10^{-4} M 1-fenethyl-2-pikolin v octanovém pufru pH 4,6;
μBondapak Phenyl, detekce při 254 nm
Identifikace píků:
1 - kyselina octová, 2 - kyselina propionová, 3 - kyselina máselná, 4 - kyselina valerová, 5 - kyselina kapronová, S - systémový pík



Obr. 2: Dělení alifatických alkoholů
Mobilní fáze 4.10^{-4} M nikotinamid ve vodě, stacionární fáze Ultrasphere ODS, detekce při 268 nm
Identifikace:
1 - methanol, 2 - propylen glykol, 3 - ethanol, 4 - 2-propanol, 5 - 1-propanol, 6 - systémový pík, 7 - 2-butanol, 8 - 2-methyl-1-propanol, 9 - 1-butanol