

크로마토그래피의 원리와 분석법

HPLC의 검출기 및 원리

Soonchunhyang University

Department of Chemical Engineering

Prof. Jungkyun Im

순천향대

나노화학공학과

임정균 교수





HPLC 의 detector(검출기)

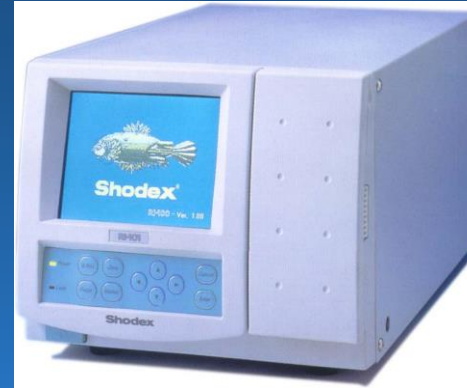




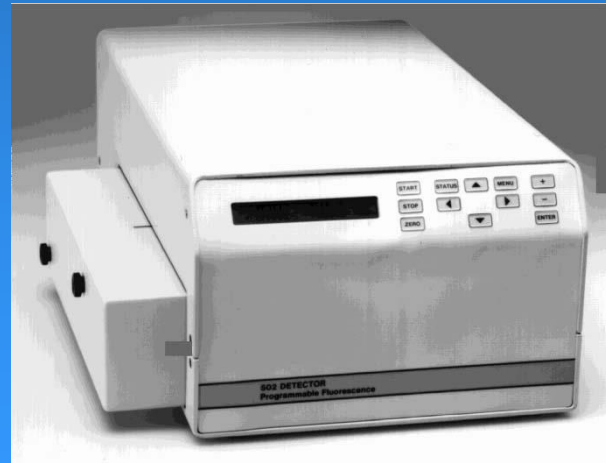
Detector(검출기)



UV/Vis 검출기



굴절을 검출기
(RI Detector)



형광 검출기





Detector(검출기)



- Column에 의해 분리된 시료의 양에 비례한 전기적 신호를 만든다.

- **구비 요건**
 1. Signal to noise ratio(S/N ratio)가 높을 것
 2. Noise, Drift가 적을 것
 3. Detection limit가 낮을 것
 4. Flow rate, temperature, pressure에 안정할 것
 5. Gradient가 가능할 것
 6. 사용 목적에 따라 선택성이 있을 것

Detector의 종류

- Optical Detector
 1. UV/Visible Detector
 2. Fluorescence Detector
 3. Refractive Index Detector
- Electrochemical Detector
 1. Conductivity Detector
 2. Electrochemical Detector

여러가지 Detector의 특징

	RI	UV/VIS	Fluorescence	Electro-chemical	Conductivity
Response	universal	selective	selective	selective	selective
Sensitivity (typical)	micro-gram	nanogram	picogram	picogram	nanogram
Flow sensitivity	YES	NO	NO	YES	YES
Temperature sensitivity	YES	NO	NO	YES	YES

Evaporative light Scattering(ELSD): uniform response, nonvolatile to semivolatile compounds, ng sensitivity



UV/Vis 검출기



❖ 사용범위

- ❖ HPLC 검출기 중 가장 많이 사용.
- ❖ 분자구조내에 Aromatic Ring , Double Bond, Triple Bond , UV 유도체를 갖고 있는 화합물.
- ❖ 사용이 간편하고, Baseline 안정화 시간이 짧다.

Functional Group	Chromophore	Wavelength (nm)	Functional Group	Chromophore	Wavelength (nm)
Ether	-O-	185	Ketone	>C=O	270-280
Olefins	-C=C-	185	Thioketone	>C=S	205
Thioether	-S-	194	Esters	-COOR	205
		215	Aldehyde	-CHO	280-300
Amine	-NH ₂	195	Carboxyl	-COOH	200-210
Thiol	-SH	195	Nitrite	-ONO	220-230
Disulfide	-S-S-	194			300-400
		255	Oxalic Acid	HOOC-COOH	250
Bromide	-Br	208	Azo	-H=N-	285-400
Iodide	-I	260	Nitroso	-N=O	302
Azide	>C=N-	190	Nitrate	-ONO ₂	270





자외선/가시선 검출기



광원에서 특정 파장의 빛이 광이나 장치를 거쳐 cell내의 시료에 투사되면 일부는 흡수되고, 일부는 시료를 통과하게 되는데, 특정한 시료는 특정 파장의 빛에 대한 흡광도가 높아서 시료를 투과하는 빛의 강도는 상대적으로 작아지게 된다. 이때 흡수되는 빛의 양(A)은

- 용액내의 흡광 시료의 농도 (C)에 비례하고,
- 빛의 파장과, 시료의 특징적인 흡광 spectrum(Molar Absorptivity),
- 빛이 시료를 통과하는 거리 (path length, b) 와 관계가 있다. 따라서 Photodiode에 도달하는 특정파장의 빛의 양과, 시료의 농도 사이의 관계를 나타내면 다음과 같다.

$$A = \epsilon bc \text{ (Lambert- Beer's Law)}$$



1) Fixed type

- 광원 (Lamp)에 따라 정해진 몇 개의 파장만을 사용할 수 있다
- Wavelength : 214, 229, 254, 265, 280, 313, 340, 405, 436, 546 nm

2) Variable type

- 190-600 nm 사이의 모든 파장 중에서 원하는 파장을 지정하여 사용한다
- 가격은 fixed type보다 매우 비싸다

U.V. Cut-offs for some Common Solvents

Remember Solvents chosen can affect detection!!

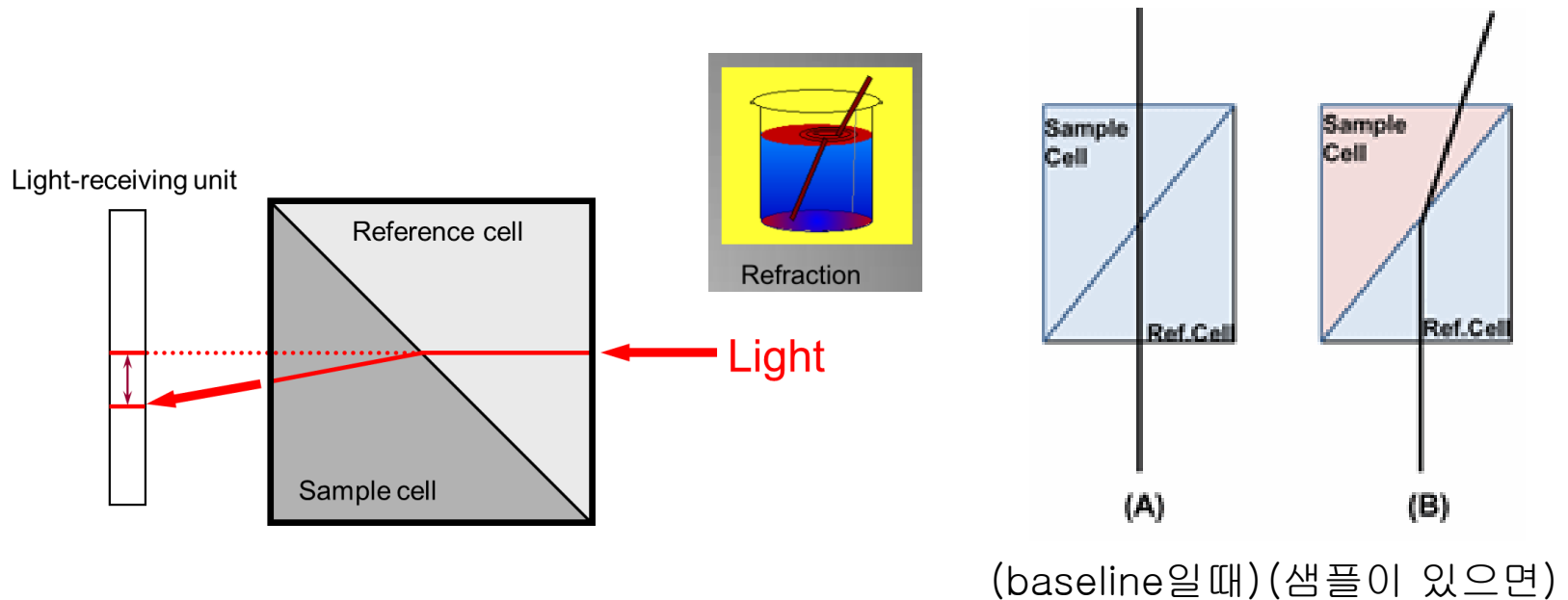
<u>Solvent</u>	<u>UV Cutoff</u>	<u>Solvent</u>	<u>UV Cutoff</u>
Water	180	N-Heptane	197
Methanol	205	Cyclohexane	200
N-Propanol	205	Carbon tetrachloride	265
Acetonitrile	190	Chloroform	245
THF	225	Benzene	280
Acetone	330	Toluene	285
Methyl acetate	260	Methylene chloride	232
Ethyl Acetate	260	Tetrachloroethylene	280
Nitromethane	380	1,2-Dichloroethane	225

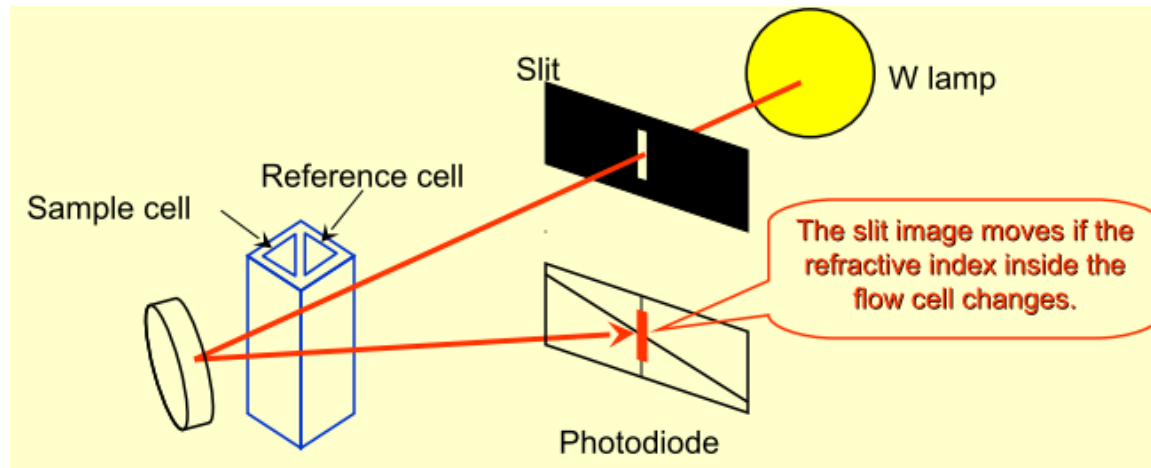
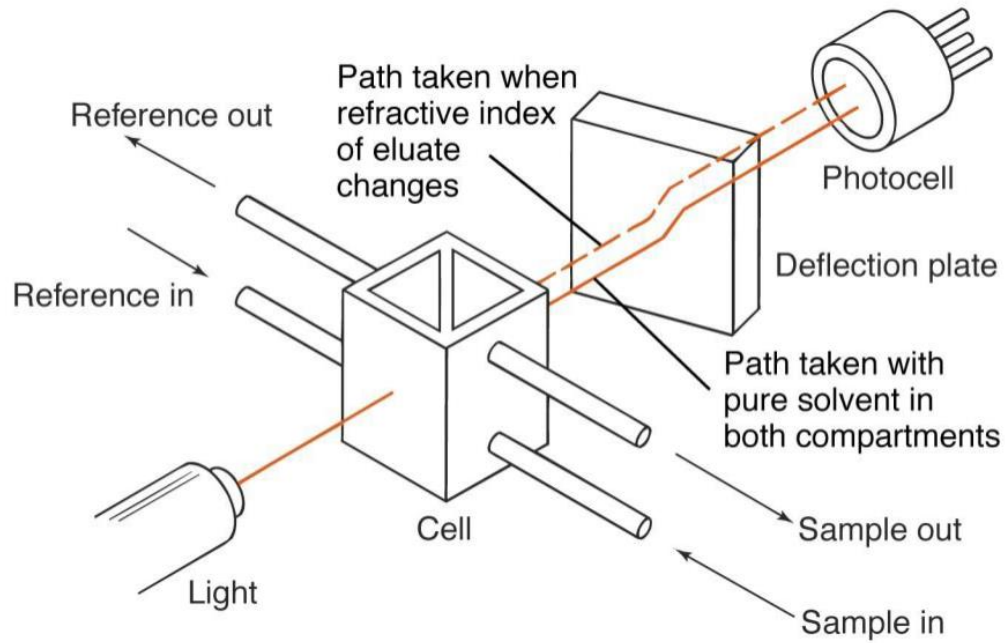
All wavelengths reported in nm.

굴절율 검출기 (Refractive Index Detector)

❖ 원리

- ❖ Reference Cell 과 Sample Cell 에 포함된 시료와 용매의 굴절율 차이에 의하여 검출
- ❖ 가장 덜 민감하다.(가장 싸다.)
- ❖ 온도, 밀도, 유속, 이동상의 비율, 청결 상태 등에 영향을 받는다.
- ❖ 이동상의 RI의 변화를 감지한다.
- ❖ UV-Vis을 잘 흡수하지 않는 샘플의 검출에 용이하다. (예: 탄수화물)







형광검출기 (Fluorescence Detector)



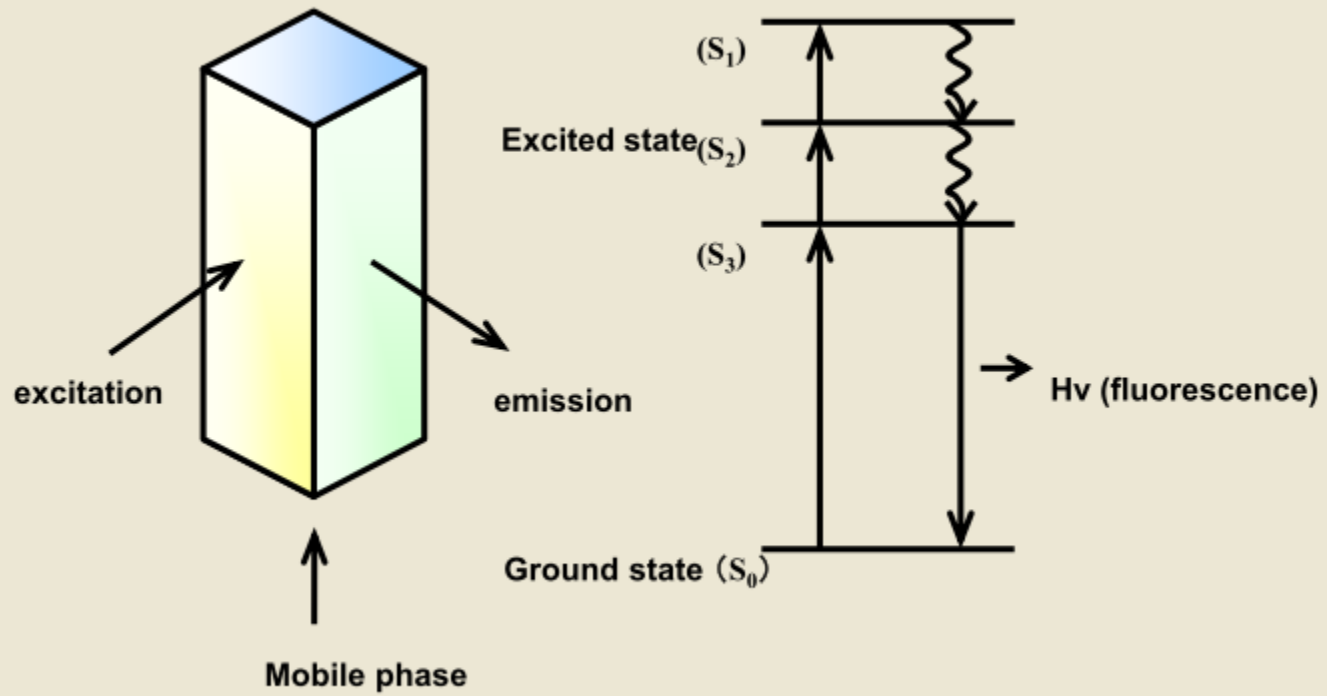
❖ 원리

- ❖ 시료의 분자 구조가 형광성을 띠거나, 형광 유도체를 만들었을 때 이용된다.
- ❖ 시료는 분자구조가 형광성을 띠거나 형광 유도체를 만들었을 때 이용하며, 시료에서 발광하는 빛의 양은 시료의 농도에 비례하며 발광량에 따른 전기적 신호의 크기가 정량의 척도가 된다.
- ❖ UV lamp가 excitation radiation을 담당한다.

❖ 사용범위

- ❖ Polycyclic Aromatic , Aflatoxin 류 , Amino Acid
- ❖ 생화학 , 의학 , 공중보건 , 약리학 , 석유화학분야
- ❖ UV 검출기 보다 100배 ~ 1000배 선택성이 있다. (감도좋다.)





Evaporative Light Scattering Detector (ELSD)

- ❖ Traditional HPLC detectors such as UV and RI have limited capabilities
- ❖ UV and RI are not compatible with a wide range of solvents
- ❖ RI detection is not gradient compatible
- ❖ Different analytes produce different UV responses depending on their extinction co-efficient
- ❖ ELSDs can detect anything that is less volatile than the mobile phase
- ❖ ELSD is universal and compatible with a wide range of solvents
- ❖ Destructive

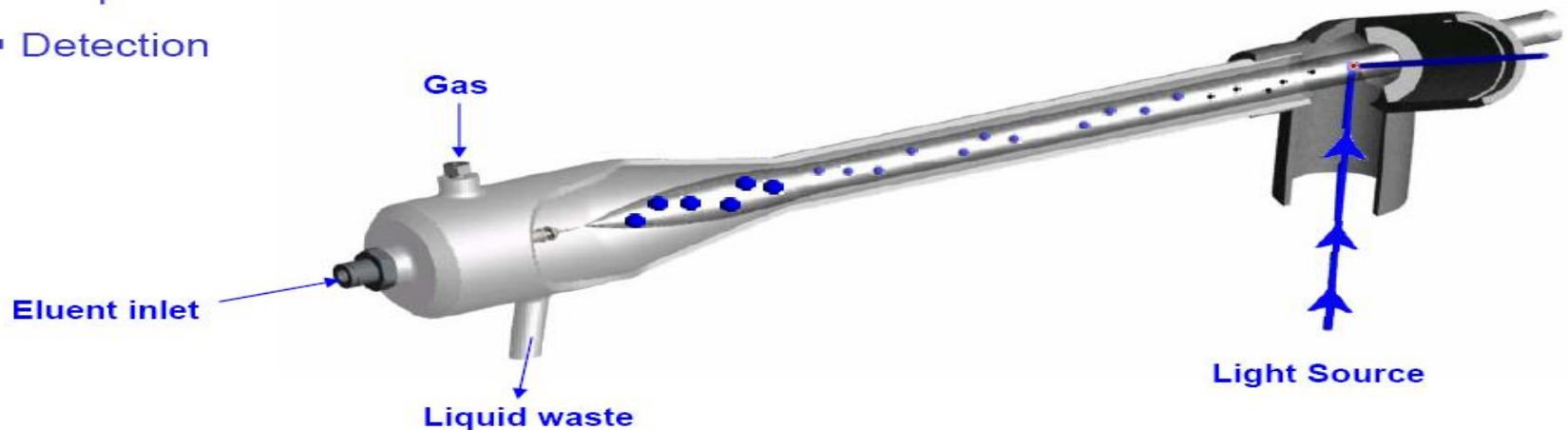
Unique Method of Detection

Three steps:

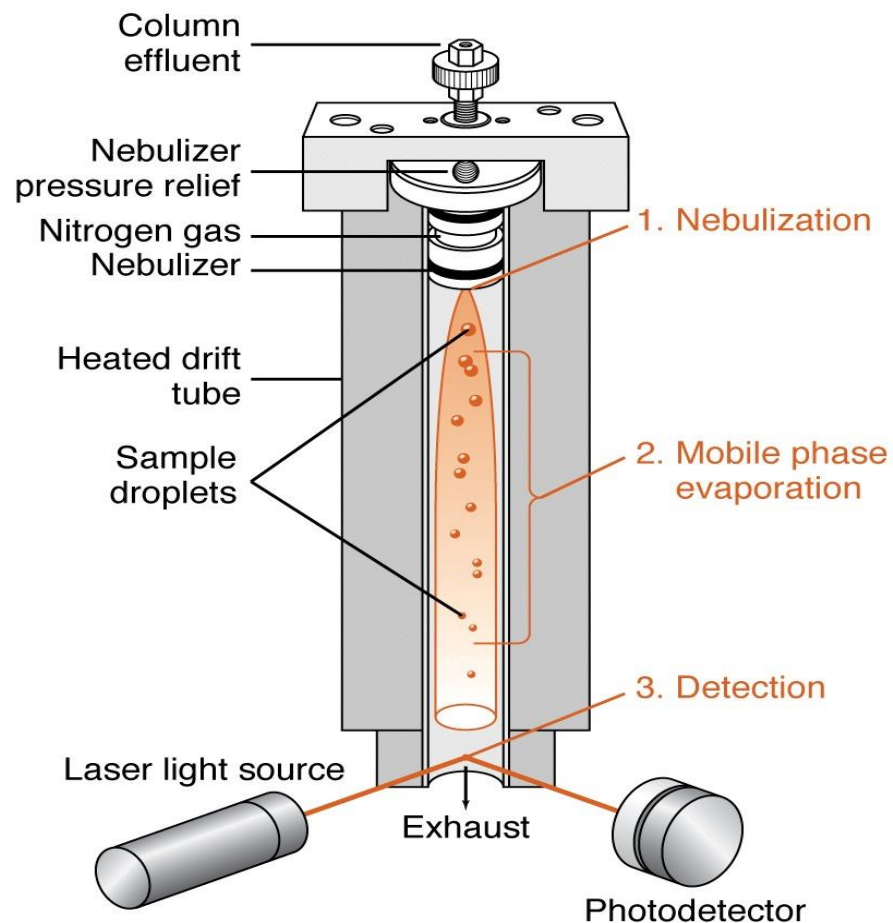
- Nebulization
- Mobile Phase Evaporation
- Detection

The ELSD principle of operation employs three distinct stages:

- Nebulisation
- Evaporation
- Detection



Schematic representation of ELS

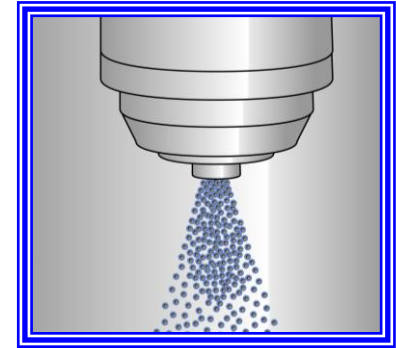


Analytes are de-solvated in the detector.

The reduction in light intensity detected (due to scattering by the analytes) is measured.

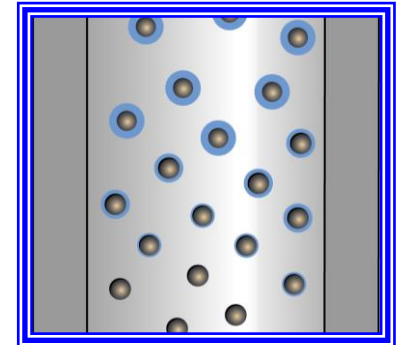
Step 1: Nebulization

- Column effluent passes through nebulizer needle
- Mixes with nitrogen gas
- Forms dispersion of droplet



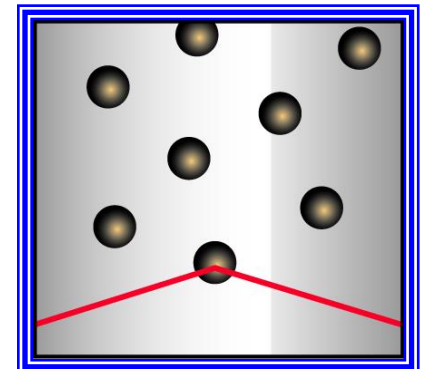
Step 2: Mobile Phase Evaporation

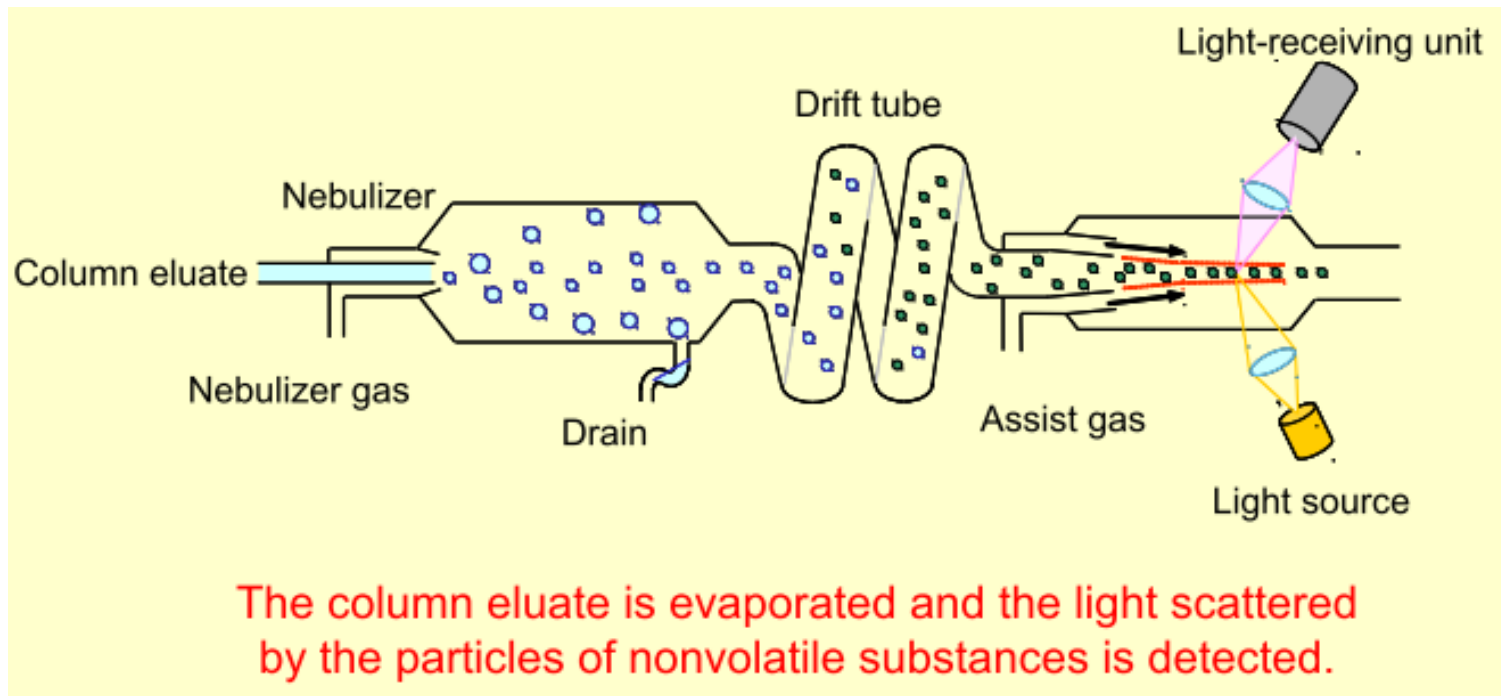
- Droplets pass through a heated zone (Drift tube)
- Mobile phase evaporates from the sample particle
- Dried sample particles remain



Step 3: Detection

- Sample particles pass through an optical cell
- Sample particles interrupt laser beam and scatter light
- Photodiode detects the scattered light





ELSD 또는 MS와 같은 장비로 분석할 경우 용매와 additive가 모두 쉽게 evaporation되는 용매인지 미리 체크할 필요가 있다.

ELSD – A Powerful Detector for HPLC

1. Better sensitivity
2. Gradient compatible
3. Stable baselines
4. No solvent front peaks

AN ELSD IS AN EFFECTIVE REPLACEMENT OR A PERFECT COMPLEMENT TO EXISTING LC DETECTORS

- RI
- UV
- Fluorescence

The End.