



spectrometrie

SPECTROSCOPISCHE DETECTIE IN DE VLOEISTOFCHROMATOGRAFIE

Theorie, Apparatuur, Interpretatie en Toepassingen: Deel IIIB

H. Lingeman; Vrije Universiteit, Vakgroep Analytische Chemie, De Boelelaan 1083, 1081 HV Amsterdam, tel.: 020 - 444 7539, fax.: 020 - 444 7543

Inleiding

In Deel IIIB komen de mogelijkheden van multi golflengte detectoren aan de orde. Met name wordt aandacht besteed aan enkele instrumentele parameters zoals gevoeligheid, dynamisch bereik en golflengte reproduceerbaarheid. Het aspect van spectrale resolutie is in Deel IIIA sectie 3.2.3 (Extract 1996 nr. 2) besproken. Tenslotte worden de toepassingsmogelijkheden (b.v. kwalitatieve multicomponent analyses, structuurbevestiging bij kwantitatieve analyses, kwantitatieve multicomponent analyses, kinetische experimenten, detectie bij grote bandbreedte, golflengte optimalisering; controle piekzuiverheid, bevestiging van piekidentiteit) van dit type absorptiedetectoren kort besproken.

3.2.3

Instrumentele parameters

1 Spectrale resolutie:

In Deel IIIA is de invloed van de spectrale bandbreedte (SB) en de bandbreedte (BB) op de resolutie besproken, waarbij met name de SB een grote invloed blijkt te hebben op de resolutie.

2 Gevoeligheid van scannende en lineaire diode-array (LDA) detectoren:

De gevoeligheid van scannende en LDA detectoren is ongeveer gelijk, maar in beide gevallen nog steeds (iets) slechter dan van vaste golflengte detectoren. Het probleem bij

scannende detectoren is de relatief korte tijd die beschikbaar is om bij iedere afzonderlijke golflengte te meten en bij LDA detectoren is de slechtere S/N verhouding het gevolg van het relatief kleine oppervlak van de gebruikte dioden. Door de signalen van verschillende golflengten bij elkaar op te tellen kan de S/N verhouding aanzienlijk worden verbeterd.

3 (Lineair) dynamisch bereik:

Zoals besproken in Deel IIIA (sectie 3.1.2) van deze serie hangt het dynamisch bereik van een absorptiedetector af van de hoeveelheid strooi-licht aan de ene kant (bij hoge absorpties) en de ruis aan de andere kant (bij lage absorpties). Het resultaat is dat het dynamisch bereik kan worden vergroot door de hoeveelheid strooi-licht te verminderen. Terugbrengen van het strooi-licht van 0,015 tot 0,001% zal het dynamisch bereik met ongeveer 45% vergroten. Voor de ruis geldt dat een vermindering met een faktor 10, eveneens een faktor 10 winst zal geven voor het dynamisch bereik.

4 Golflengte reproduceerbaarheid:

Een laatste belangrijke parameter bij LDA detectoren is de nauwkeurigheid waarmee de golflengte ingesteld kan worden en de herhaalbaarheid hiervan. Het instellen van de juiste golflengte is ondermeer belangrijk bij het overbrengen van een methode van het ene naar het andere apparaat of van het ene laboratorium naar het andere. Meestal worden de metingen echter uitgevoerd ten opzichte van een standaard waardoor deze parameter van minder belang is. De fouten die kunnen optreden door het verkeerd instellen of door een verkeerd ingestelde golflengte zijn besproken in Deel IIIA (sectie 3.1.3) van deze serie.

3.2.4

Voordelen en eigenschappen van lineaire diode-array detectoren

Het gebruik van LDA detectoren heeft een aantal voordelen boven het gebruik van vaste golflengte detectoren. De belangrijkste hiervan zijn:

- 1 (Zeer) snel opnemen van spectra;
- 2 Gelijktijdig meten bij meerdere golflengten;
- 3 Betere herhaalbaarheid golflengte instelling;
- 4 Groter dynamisch bereik;
- 5 Statistische mogelijkheden.

1 (Zeer) snel opnemen van spectra:

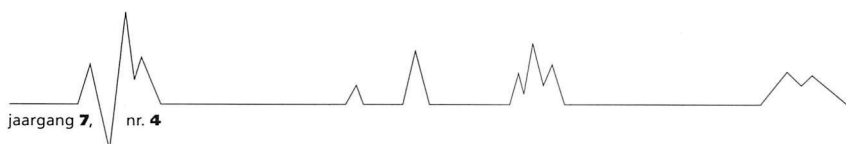
Met LDA detectoren kunnen in ongeveer 0,1 - 1 seconde(s) spectra worden opgenomen over een golflengtegebied dat 400 tot 600 nm breed is (b.v. tussen 200 - 600 nm). Dit is 1 - 2 orden sneller dan mogelijk is met conventioneel scannende systemen. Doordat LDA systemen zo snel zijn - opslag van een spectrum vergt minder dan 0,5 s-, is dit soort detectoren bij uitstek geschikt om met LC systemen te worden gekoppeld.

Attentie!

Zelfs indien er slechts bij één enkele golflengte gemeten wordt biedt een LDA een grotere betrouwbaarheid omdat bijvoorbeeld een interne referentie kan worden gebruikt en statistische technieken kunnen worden toegepast om slechte meetpunten te detecteren en te verwijderen.

2 Gelijktijdig meten bij meerdere golflengten:

Het gelijktijdig meten bij meerdere golflengten is in een aantal toepassingen van belang. Omdat bij LDA detectoren alle golflengten gelijktijdig worden gemeten, en niet één voor één, zoals bij conventionele detectoren, kunnen een aantal technieken worden toegepast om de



kwaliteit van de meetgegevens te verbeteren. Misschien wel de belangrijkste hiervan is het gebruik van de interne referentiemethode. Deze kan gebruikt worden om te compenseren voor die effecten die niet golflengte afhankelijk zijn, zoals fluctuaties in de intensiteit van de lamp. Er wordt in dat geval gebruik gemaakt van een tweede golflengte, die zo dicht mogelijk bij de analytische golflengte (golflengte waarbij gemeten wordt) gekozen wordt, maar waar de te meten verbinding geen absorptie vertoont. Golflengtemiddeling is een andere toepassing van multi golflengte detectie. In dit geval wordt de absorptie niet bij één enkele golflengte (respons van één diode) gemeten, maar worden signalen van een aantal naast elkaar liggende dioden gemiddeld. Het resultaat is een verbeterde S/N verhouding doordat de ruis wordt verminderd. In het bijzonder bij het meten van lage concentraties kunnen door het gelijktijdig gebruik van de interne referentiemethode en golflengtemiddeling aanzienlijk betere resultaten worden bereikt.

3 Betere herhaalbaarheid golflengte instelling:
In Deel IIB sectie 2.3 (Extract 1995 nr. 4) van deze serie is de mogelijkheid besproken om kwantitatieve metingen uit te voeren bij twee golflengten. Het probleem bij het gebruik van conventionele detectoren, voor dit doel, is dat er vaak bewegende delen in het apparaat aanwezig zijn waardoor er problemen met het reproduceerbaar instellen van de golflengte kunnen optreden. Door het gebruik van LDA detectoren kan dit voorkomen worden. Met name golflengtedrift over langere perioden hoort hierbij tot het verleden. Het belangrijkste gevolg van de sterk verbeterde reproduceerbaarheid van de golflengte instelling is dat de regel die zegt 'dat bij het gebruik van conventionele spectrometers altijd gemeten moet worden bij het absorptiemaximum (ondanks

het feit dat met betrekking tot de selectiviteit een andere golflengte soms de voorkeur verdient)' niet opgaat bij het gebruik van LDA detectoren. Bij gebruik van dit type scannende detectoren kan die golflengte worden gekozen waarbij het grootste dynamisch bereik en/of de beste gevoeligheid en/of selectiviteit wordt verkregen. Een ander gevolg is dat ook in dit geval golflengtemiddeling kan worden toegepast.

4 Groter dynamisch bereik:
Zoals eerder besproken is strooilicht vaak de belangrijkste factor die het dynamisch bereik beperkt. Doordat bij het gebruik van LDA detectoren niet bij het absorptiemaximum gemeten hoeft te worden, kan bij sterk absorberende monsters naast het absorptiemaximum (lagere absorptie) worden gemeten waardoor het dynamisch bereik vergroot wordt. Verder worden in LDA detectoren minder optische elementen gebruikt waardoor er meer licht doorkomt en het ruisniveau lager is. Tenslotte kan bij LDA systemen tijden golflengtemiddeling worden gebruikt, hetgeen ook weer een gunstige invloed heeft op het dynamisch bereik. Tijdmiddeling is bij een aantal LDA systemen mogelijk. Een voorbeeld voor Hewlett-Packard detectoren is gegeven in tabel XIII. Om een spectrum van 190 tot 820 nm op te nemen, met intervallen van 2 nm, zijn 316 metingen nodig. Met een conventionele detector (1 meetpunt per s) zijn hiervoor 316 s nodig. Met een LDA detector kunnen echter in 1

s 10 volledige spectra worden opgenomen en vervolgens worden gemiddeld. Het resultaat is dat de ruis met de wortel uit het aantal metingen afneemt. Het zal duidelijk zijn dat tijdmiddeling bij conventionele detectoren niet praktisch is. Een andere mogelijkheid om de gevoeligheid te verbeteren is de al eerder genoemde golflengtemiddeling. Bij verbindingen met een relatief breed absorptiespectrum wordt nu niet alleen bij het maximum gemeten maar ook bij een aantal punten (met 2 nm intervallen) aan weerszijde van dit maximum. Ook in dit geval neemt de ruis af met de wortel uit het aantal metingen, maar afhankelijk van de verhouding van de instrumentele bandbreedte (SB) en de bandbreedte van de verbinding (BB) zal ook het signaal afnemen indien te veel meetpunten worden gebruikt. Het is daarom belangrijk om het juiste optimum te vinden.

5 Statistische mogelijkheden:
Gekoppeld aan het gebruik van LDA detectoren is het gebruik van computers waardoor de hoeveelheid informatie die uit spectra is af te leiden sterk is toegenomen. Eén van de mogelijkheden die de tegenwoordig beschikbare software biedt is het middelen van gegevens; dit omdat volledige spectra binnen 1 s kunnen worden opgenomen. Behalve de gemiddelde waarde van een meetpunt kan nu ook de standaarddeviatie worden uitgerekend, hetgeen de betrouwbaarheid van de metingen zeker ten goede komt.

Tabel XIII: Vergelijking scantijden en gevoeligheid van conventionele en LDA detectoren

Scantijd Conventionele detector	Scantijd / Integratietijd LDA detector	Relatieve gevoeligheid
31,6 s	0,1 s	1
8 min 25,6 s	1,6 s	4
2 h 14 min 18,0 s	25,6 s	16

A.J. Owen, The Diode-Array Advantage in UV/Visible Spectroscopy, Hewlett-Packard, No. 12-5954-8912, 1988, p. 27.

Een totaal andere mogelijkheid is het registreren van slechte meetpunten. Een voorbeeld is een luchtbel die de doorstroomcel passeert. Omdat een luchtbel de cel meestal zeer snel passeert, wordt op dat moment een te hoge standaarddeviatie gemeten.

De software kan ook worden gebruikt om de beste detectiegolflengte te kiezen, zijnde die golflengte waarbij de laagste standaarddeviatie wordt verkregen. In het algemeen kan gezegd worden dat veranderingen in de standaarddeviatie gebruikt kunnen worden om problemen met de monsters en/of de apparatuur te signaleren.

Naast deze relatief eenvoudige toepassingen van statistische methoden kunnen ook chemometrische procedures worden toegepast. Eén van de mogelijkheden is om spectra, waarin weinig structuur is te herkennen, toch interpreteerbaar te maken. Dit kan gedaan worden door de afgeleide van de extinctie naar de golflengte ($dE/d\lambda$) te gebruiken. Behalve deze eerste afgeleide, kan zelfs de tweede afgeleide gebruikt worden om onbekende verbindingen in complexe monsters te identificeren. Een andere mogelijkheid is het gebruik van spectrale deconvolutie technieken.

De informatie van LDA detectoren kan ook worden weergegeven in de vorm van 3-D of contour plots. 3-D representaties, de bekende berglandschappen, hebben het nadeel dat ze vaak geroteerd moeten worden om de gewenste informatie te verkrijgen. In contour representaties worden de gegevens in concentrische isoabsorptie contouren (λ, t) weergegeven. Een belangrijke toepassing van 3-D en contour representaties is het detecteren van onzuiverheden of kleine hoeveelheden van één verbinding naast een grote overmaat van een andere verbinding.

Een andere toepassing van 3-D representaties is het vinden van de optimale detectiegolflengte. Dit kan gebeuren door het 3-D plaatje van een blanco matrix monster te verge-

lijken met het 3-D figuur van een monster. Bij biologische monsters blijkt regelmatig dat de beste S/N verhouding wordt verkregen bij een andere golflengte dan het absorptie-maximum.

Een voorbeeld is de bepaling van een bepaald geneesmiddel in plasma. Deze verbinding heeft twee absorptiemaxima: 251 nm ($\epsilon = 14.400$) en 293 nm ($\epsilon = 10.600$). Uit het 3-D plaatje van een blanco plasmonster blijkt dat de achtergrondabsorptie bij deze twee golflengten relatief hoog is. De beste detectiegolflengte blijkt 307 nm te zijn. Ofschoon het signaal bij deze golflengte 25% lager is dan bij 293 nm, is de S/N verhouding optimaal bij deze relatief lange golflengte. Samenvattend kan gezegd worden dat met name bij het ontwikkelen van nieuwe methoden het gebruik van LDA detectoren grote voordelen heeft.

Literatuur: gegevens over de voordelen en toepassingen van LDA detectoren kan gevonden worden in: A.J. Owen, The Diode-Array Advantage in UV/Visible Spectroscopy, Hewlett-Packard, No. 12-5954-8912, 1988. L. Huber, Applications of Diode-Array Detection in HPLC, Hewlett-Packard, No. 12-5953-2330, 1989.

3.2.5

Toepassingen van lineaire diode-array detectoren

De hierboven beschreven eigenschappen van LDA detectoren resulteren in een groot aantal toepassingen, die in een aantal gevallen niet kunnen worden uitgevoerd met conventionele detectoren en in andere gevallen minder goed of minder snel met de bestaande systemen. De belangrijkste hiervan zijn:

- 1 Kwalitatieve multi component analyses;
- 2 Structuurbevestiging bij kwantitatieve analyses;
- 3 Kwantitatieve multi component analyses;
- 4 Kinetische experimenten;
- 5 Detectie bij grote bandbreedten;
- 6 Golflengte optimalisering;
- 7 Controle piekzuiverheid;
- 8 Bevestiging piekidentiteit.

Met name in de biomedische, klinische en farmaceutische analyse kan het gebruik van LDA detectoren onverwachte resultaten opleveren. Voorbeelden zijn het zoeken naar onbekende metabolieten in biologische vloeistoffen, het identificeren van farmaceutisch actieve verbindingen in plant extracten, het identificeren van metabolieten door vergelijking van de overeenkomstige UV-spectra met het spectrum van de moederverbinding en de identificatie van aminozuren in peptiden en eiwitten met behulp van afgeleide spectroscopie. Om deze toepassingen te kunnen uitvoeren worden één of meer van de hierboven genoemde technieken gebruikt.

1 Kwalitatieve multi component analyses:

Indien in een mengsel meerdere verbindingen, met ongeveer identieke spectra, voorkomen dan is het met conventionele spectrometers moeilijk om kleine spectrale verschillen betrouwbaar vast te stellen. Door LDA systemen te gebruiken gaat dit eenvoudiger en kunnen, in een aantal gevallen, spectrale verschuivingen van 1 nm worden bepaald.

2 Structuurbevestiging bij kwantitatieve analyses:

Bij de kwantitatieve bepaling van één enkele verbinding kan de reproduceerbaarheid en de gevoeligheid worden verbeterd door absorptie-, golflengte- en/of tijdmiddeling toe te passen. Omdat bij LDA detectoren behalve bij het absorptiemaximum ook gelijktijdig bij één of meerdere andere golflengten kan worden gemeten, kan uit de verhouding van deze signalen worden bepaald of de chromatografische piek zuiver is of dat er een verontreiniging aanwezig is.

3 Kwantitatieve multi component analyses:

Ofschoon het met conventionele detectoren mogelijk is om een mengsel van twee verbindingen die, chromatografisch niet volledig zijn gescheiden, kwantitatief te bepalen

door bij meerdere golflengten te meten (zie ook Deel IIB, sectie 2.3 van deze serie) zijn de mogelijkheden bij het toepassen van een LDA detector aanzienlijk groter. Door gebruik te maken van geschikte algoritmen voor multi component analyses, kunnen mengsels waarin een vijftal overlappende spectra voorkomen ontrafeld worden. Een ander probleem doet zich voor als de te bepalen verbindingen wel chromatografisch zijn te scheiden, maar gedetecteerd moeten worden bij verschillende golflengten. Ook nu brengt de LDA detector uitkomst. Dit omdat er meerdere detectiegolflengten gelijktijdig kunnen worden geselecteerd.

4 Kinetische experimenten:

De grote snelheid waarmee gegevens verzameld en verwerkt kunnen worden maken LDA detectoren bij uitstek geschikt voor het uitvoeren van kinetische experimenten. Voorbeelden zijn het volgen van de hydrolyse-reactie van geneesmiddelen onder verschillende omstandigheden, het volgen van cis-trans overgangen en enzymatische reacties en het meten van de fotolytische stabiliteit van een verbinding. Het voordeel ten opzichte van conventionele systemen is dat de monsters slechts gedurende een zeer korte tijd bestraald hoeven te worden om een volledig spectrum op te kunnen nemen, waardoor neveneffecten (b.v. thermische en fotochemische ontleding) kunnen worden vermeden.

5 Detectie bij grote bandbreedten:

Bij het ontwikkelen van een nieuwe LC methode is niet altijd bekend wat precies de detectiecondities moeten zijn. Door nu een LDA detector te gebruiken kan het hele golflengtegebied (b.v. van 190 - 600 nm) worden geselecteerd. Dit betekent dat in één enkele run alle pieken kunnen worden gedetecteerd. Bij het gebruik van een vaste golflengte detector kan dit alleen door een (groot) aantal experimenten uit te voeren bij verschillende golflengten.

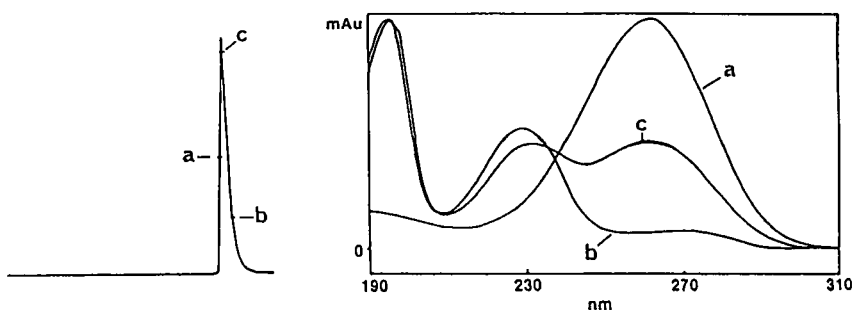
6 Golflengte optimalisering:

Als eenmaal alle pieken gedetecteerd zijn, is vaak de volgende stap het vaststellen van de beste detectiegolflengte. Met LDA detectoren kan van iedere piek afzonderlijk een spectrum worden verkregen en meestal kan de software het absorptiemaximum berekenen wat dan weer samen met de retentietijd naast de piek in de 2-D of 3-D representatie kan worden geprint. Zoals eerder besproken kunnen de gegevens behalve in een 2-D plaatje (retentietijd vs. absorptie) ook in een 3-D figuur (retentietijd vs. golflengte vs. absorptie) worden weergegeven. 3-D representaties kunnen op verschillende manieren worden

vinden.

7 Controle piekzuiverheid:

Eén van de meest gebruikte toepassingen van de LDA detector is het controleren van de piekzuiverheid tijdens LC scheidingen. Dit kan gebeuren aan de hand van verschillende methoden. Een populaire methode is het opnemen van een spectrum juist voor de top van de piek (upslope), op de top van de piek (apex) en net na de top van de piek (downslope). Door vervolgens deze spectra te normaliseren en met elkaar te vergelijken kan zowel handmatig als automatisch een waarde voor de zuiverheid van de piek worden verkregen. Een aardig voor-



Figuur 25: UV-spectra opgenomen tijdens de elutie van een tweetal slecht gescheiden componenten. A, spectrum voor de top; C, spectrum op de top; B, spectrum na de top.

gemaakt. Uit een zogenaamd iso-absorptie plot (contourplot) kan relatief eenvoudig de noodzakelijke informatie worden gehaald om een methode te optimaliseren. Deze iso-absorptie plots kunnen worden gebruikt indien een mengsel van verbindingen met verschillende absorptiemaxima moet worden bepaald. De gegevens in een iso-absorptie plot worden gegeven in een 2-D vlak. Op de x-as staat de tijd en op de y-as de golflengte. De derde dimensie is weergegeven met een kleurenpatroon. De hoogste absorptie is, bijvoorbeeld, weergegeven in rood en dit verloopt dan via oranje en geel naar blauw. Door nu evenwijdig aan de x-as lijnen te trekken kunnen één of meerdere golflengten worden geselecteerd waarbij een optimale detectie kan plaats-

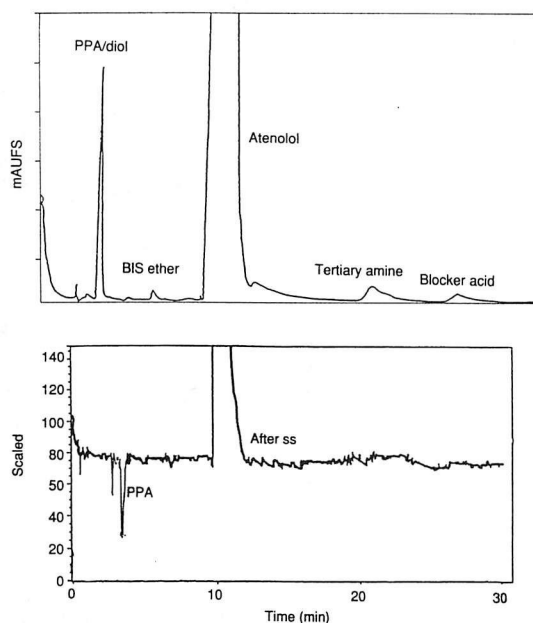
beeld is weergegeven in figuur 25. In het chromatogram (links) is te zien dat sorbinezuur en benzoëzuur chromatografisch niet gescheiden zijn, maar door nu drie spectra (A, voor de top; C, op de top; B, na de top) op te nemen, is duidelijk te zien dat de piek inderdaad niet uit één enkele component bestaat. Het spectrum bij C is een duidelijke mengvorm van de beide afzonderlijke spectra. Een veel gebruikte methode is de spectrale suppressie methode. Deze is gebaseerd op het meten van de absorptieverhouding bij twee geschikte golflengten voor de twee probleem componenten. Hiervoor worden de volgende vergelijkingen gebruikt:

$$\epsilon(\lambda_1) = K(1,2) \cdot \epsilon(\lambda_2) \quad (16)$$

Vergelijking 16 zegt dat de molaire extinctie (ϵ) bij golflengte λ_1 evenredig is met de molaire extinctie bij een andere golflengte (λ_2). $K(1,2)$ is voor een zuivere verbinding een constante bij een bepaalde combinatie van golflengten. Dit betekent dat:

$$A_1 / A_2 = K(1,2) \text{ bij de golflengten } \lambda(1) \text{ en } \lambda(2) \quad (17)$$

Pharmacopoeia voor een RP-LC bepaling van atenolol en twee verontreinigingen die chromatografisch niet zijn te scheiden (figuur 26). In figuur 26A is het chromatogram te zien van atenolol en de twee onzuiverheden (PPA en het diol) die elkaar overlappen. In figuur 26B is spectrale suppressie toegepast met behulp van:



Figuur 26: Bepaling van de piekzuiverheid van een tweetal co-eluerende verontreinigingen in atenolol.

In deze vergelijking is A de absorptie bij golflengte λ_1 of golflengte λ_2 . Na spectrale suppressie geldt voor een zuivere verbinding:

$$\Delta\epsilon(\lambda_1,2) = \epsilon(\lambda_1) - K(1,2) \cdot \epsilon(\lambda_2) = 0 \quad (18)$$

of in andere woorden:

$$\Delta A(1,2) = A(\lambda_1) - K(1,2) \cdot A(\lambda_2) = 0 \quad (19)$$

het resultaat is dat een interfererende verbinding, met andere spectrale eigenschappen, een positieve of negatieve respons zal geven.

De grootte van deze respons is afhankelijk van de concentratie. Een voorbeeld waarbij bovengenoemde methode wordt toegepast is te vinden in de British

$$\Delta A(\text{PPA}) = A(226) - 5,12 A(280)$$

Hierdoor wordt de diol piek onderdrukt en verschijnt PPA als een negatieve piek, waarvan de hoogte evenredig is met de concentratie. Door nu:

$$\Delta A(\text{diol}) = A(226) - 8,11 A(289)$$

te gebruiken kan de hoeveelheid diol worden bepaald. Met behulp van deze methode kan ongeveer 0,5% van een verontreiniging naast de hoofdverbinding worden bepaald.

Literatuur: gegevens over piekzuiverheid bepalingen kunnen worden gevonden in: B.J. Clark, T. Frost and M.A. Russell, UV Spectroscopy: Techniques, Instrumentation, Data handling, Chapman & Hall, London 1993.

B.J. Clark, A.F. Fell en D. Westerlund, J. Chromatogr., 286 (1984) 261.
V.G. Kostenko, J. Chromatogr., 355 (1986) 296.

Indien echter weinig informatie voorhanden is over de co-eluerende verbindingen kan deze techniek niet worden gebruikt en moeten chemometrische procedures worden gevolgd. De bedoeling bij het gebruik van deze technieken is om een schatting te maken van het aantal verbindingen in een chromatografische piek. Eén van de krachtigste methoden op dit gebied is 'Iterative Target Transformation Factor Analysis' (ITTTFA). Informatie omtrent deze en soortgelijke technieken is te vinden in: A.A. Fasamade, A.F. Fell en H.P. Scott, Anal. Chim. Acta, 187 (1986) 233.

8 Bevestiging piekidentiteit:

Doordat LDA detectoren zijn uitgerust met een computer en automatisch op verschillende tijdstippen in een piek spectra kunnen verzamelen, kan de identiteit van een verbinding in een piek bevestigd worden door het spectrum van de piek te vergelijken met in een bibliotheek aanwezige spectra. Om dit echter betrouwbaar te kunnen doen is het belangrijk dat de referentiespectra onder dezelfde condities (b.v. pH, ion-sterkte, eluensamenstelling, temperatuur) zijn opgenomen als het monster. Om de betrouwbaarheid te vergroten kan ook een combinatie van retentietijd en spectrum worden gebruikt om de identiteit van een verbinding te bevestigen.

Attentie!

Het vergelijken van de overeenkomst tussen een referentiespectrum en het gemeten spectrum gebeurt met behulp van zogenaamde 'match' factoren. Een beschrijving van deze factoren en de parameters (b.v. retentietijd, absorptie drempelwaarde, spectrale ruis, matrix absorptie) wordt gegeven in L. Huber, Applications of Diode-Array Detection in HPLC, Hewlett-Packard, 1989.

De identificering en kwantificering van onbekenden, bijvoorbeeld voor

Sample			Match		Library		
Peak#	Time	Purity			Time	Entry#	Name
1	8.62	986		0			
2	9.36	932					
	9.27		up	969	9.34	1	* Metronidazol
	9.43		down	993	9.34	1	* <u>Metronidazol</u>
3	10.53						
	10.46		up	1	10.45	2	?? Meticlorpindol
	10.69		down	986	10.45	2	<u>Meticlorpindol</u>
	10.69						
4	12.18	999		1000	12.16	3	<u>Sulfapyridine</u>
5	13.94	441		0			
6	16.10	990		981	16.03	4	<u>Furazolidon</u>
7	18.40	754		0			
	18.48		down	43	19.00	5	?? Pyrazon
8	19.02	999		1000	19.00	5	<u>Pyrazon</u>
9	22.13	161					
	22.05		up	799	22.22	7	?? Chloramphenicol
	22.25		down	974	22.02	6	<u>Ipronidazol</u>

Figuur 27: Resultaat van een piekidentificatie met behulp van een spectrale bibliotheek.

een toxicologische screening, kan op routine basis volledig automatisch gebeuren indien behalve retentie en spectrale gegevens ook calibratie data worden opgeslagen in het computergeheugen. Bij iedere piek in het chromatogram wordt dan automatisch de naam geprint, een factor die aangeeft hoe goed de spectra overeenkomen, een factor

voor de piekzuiverheid alsmede de concentratie van de verbinding. Een voorbeeld van hoe dit eruit kan zien na het automatisch zoeken in een bibliotheek is in figuur 27 te vinden. In dit overzicht is te zien dat voor de match factoren waarden tussen de 0 en 1000 worden gebruikt. De onderstreepte verbinding is steeds de component die het

beste overeenkomt met de opgeslagen gegevens in de bibliotheek, terwijl de andere componenten een duidelijk mindere overeenkomst vertonen.

Attentie!

In tegenstelling tot massaspectrometrische bibliotheken voor GC-MS systemen, moeten bibliotheken voor LC-DAD systemen door de gebruiker zelf worden aangemaakt omdat de condities waaronder de spectra worden opgenomen, van grote invloed

De uiteindelijke conclusie is dat de beschikbaarheid van een gevoelige lineaire diode-array detector een belangrijke voorwaarde is om op een snelle en betrouwbare manier, vloeistofchromatografische methoden met absorptiedetectie te ontwikkelen en te optimaliseren en te voorkomen dat matrix effecten of stabiliteitsproblemen de resultaten negatief beïnvloeden.