



**Pienten karboksyylihapojen nestekromatografiassa
käytettävät detektorit**

Oona Ylinen
Kandidaatintutkielma
Kemian tutkinto-ohjelma
Oulun yliopisto
2022

TIIVISTELMÄ

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC) on monipuolisesti hyödynnetty analyysimenetelmä orgaanisten yhdisteiden analysoinnissa kvalitatiivisesti sekä kvantitatiivisesti. Nestekromatografiassa kriittinen osa analyysiä on detektointi. Käytetyt detektorit havaitsevat analyytin, jollain kemiallisella tai fysikaalisella ilmiöllä tai ominaisuudella, mikä on ominaista juuri kyseiselle detektorityypille. Ihanteellisesti yhdellä detektorilla pystyttäisiin analysoimaan kaikkien mahdollisten näytetyyppien kaikki analyytit, mutta tämä ei käytännössä ole mahdollista, vaan detektori tulee valita ja menetelmä tulee soveltaa tietyille analyytille sopivaksi.

Pienet suoraketjuiset karboksyylihapot ovat orgaanisia yhdisteitä, joissa funktionaalisenä ryhmänä on karboksyyli-ryhmä (-COOH). Tutkielmassa käsiteltiin spektrofotometrisen ultraviolettia absorptioon ja näkyvän valon absorptioon perustuvan detektorin, taitekerroindetektorin sekä valonsirontadetektorin toimintaa ja soveltuvuutta pienten, maksimissaan noin kuuden hiilen mittaisten, suoraketjuisten karboksyylihapojen analysointiin nestekromatografialla.

Yleisimmillä detektorityypeillä voidaan analysoida pieniä suoraketjuisia karboksyylihappoja hyvin. Parhaiten karboksyylihapoille vaikuttaisi soveltuvan valonsirontadetektori sekä spektrofotometriseen ultraviolettia absorptioon ja näkyvän valon absorptioon perustuva detektori. Taitekerroindetektorilla toteamis- ja määrittämissrajat jäävät merkittävästi korkeammiksi kuin edellä mainituilla. Taitekerroindetektorilla myös analyysiä häiritsevät ulkoiset tekijät, kuten ympäristön lämpötila, vaikuttavat menetelmän toimivuuteen. Huolellisesti kehitetyllä menetelmällä analyytit voidaan havaita luotettavasti, toistettavasti, nopeasti ja helposti.

SISÄLLYSLUETTELO

1	JOHDANTO.....	4
2	NESTEKROMATOGRAFIA	5
2.1	Toimintaperiaate	5
2.2	Laitteisto	6
3	DETEKTORITYYPIT	9
3.1	UV/VIS -detektori	9
3.2	Taitekerroindetektori.....	11
3.3	Valonsirontadetektori.....	11
4	ERI DETEKTOREIDEN SOVELTUVUUS KARBOKSYYLIIHAPPOJEN ANALYSOINTIIN	14
4.1	UV/VIS-detektori	14
4.2	Taitekerroindetektori.....	18
4.3	Valonsirontadetektori.....	19
5	YHTEENVETO.....	22
6	KIRJALLISUUSVIITTEET	24

1 JOHDANTO

Analyysitekniikat ovat kemian tutkimuksen sekä teollisuuden keskiössä. Nestekromatografia on analyysitekniikkana yksi yleisimmistä tutkimuksissa sekä teollisuuden laadunvarmistuksessa hyödynnetyistä tekniikoista. Sen kykyä määrittää orgaanisia yhdisteitä kvalitatiivisesti sekä kvantitatiivisesti hyödynnetään paljon muun muassa elintarviketeollisuudessa, lääketeollisuudessa, terveydenhuollon eri tarpeissa, biologisten materiaalien kehityksessä sekä synteesituotteiden saannon ja puhtauden määrittämisessä.

Korkean erotuskyvyn nestekromatografiassa detektointitekniikat määrittelevät analyysin onnistuvuutta merkittävästi. Useimmiten käytettyjä detektoreja ovat spektrofotometrinen ultraviolettiabsorptioon ja näkyvän valon absorptioon perustuva detektori, taitekerroindetektori sekä valonsirontadetektori yhdessä elektrokemiallisten detektorien kanssa. Useimmiten jokaisella detektointitekniikalla on omat hyötynsä sekä rajoitteensa eri analyyteille, joten käytettävä detektori on valittava käyttötarkoituksen mukaan.

Karboksyylihapot ovat orgaanisia yhdisteitä, joiden detektoinnissa voi olla haasteita, erityisesti UV/VIS-detektoinnilla. Tutkielmassa kartoitetaan yleisimpien detektoreiden soveltuvuutta pienten, korkeintaan kuuden hiilen mittaisten suoraketjuisten karboksyylihappojen, kuten muurahaishapon, levuliinihapon ja etikkahapon analysointiin korkean erotuskyvyn nestekromatografialla. Tutkielmassa perehdytään myös yleisesti nestekromatografiaan sekä detektoreiden rakenteeseen ja toimintaperiaatteeseen. Pienten suoraketjuisten karboksyylihappojen analytiikassa käytettyjä mittaolosuhteita tarkastellaan eri detektorien näkökulmasta.

2 NESTEKROMATOGRAFIA

Nestekromatografia (engl. liquid chromatography, LC) on analyysimenetelmä, jonka avulla nestemäisen näytteen analyytteja voidaan määrittää ja erottaa toisistaan sekä kvalitatiivisesti että kvantitatiivisesti. Yleisesti nestekromatografian tekniikka perustuu liikkuvan faasin eli eluentin, liikkuvassa faasissa olevan näytteen ja paikallaan pysyvän faasin eli stationaarifaasin keskinäisiin vuorovaikutuksiin. Nestekromatografian tarkkuus, helppous, nopeus ja soveltuvuus myös herkemmillekin näytteille on mahdollistanut sen suosion ja monikäyttöisyyden useilla eri tieteenaloilla.¹

Nestekromatografia voidaan jakaa useisiin spesifisempiin menetelmiin, jotka erottavat toisistaan stationaarifaasin koostumus ja erotteluperiaate. Erilaisia menetelmiä ovat muun muassa ionieksklusiokromatografia ja adsorptiokromatografia, jonka alalajeja ovat normaalifaasikromatografia sekä käänteisfaasikromatografia.^{1,2,3}

Useimmiten nestekromatografian yhteydessä käytetään nimitystä korkean erotuskyvyn nestekromatografia (engl. high performance liquid chromatography tai high pressure liquid chromatography, HPLC), sillä virtausnopeutta ja eluenttikoostumusta kontrolloimalla systeemissä voi olla hyvin korkeat paineet ja erinomainen analyyttien erotuskyky.

2.1 Toimintaperiaate

Stationaarifaasin erottelukyky adsorptiokromatografiassa perustuu analyyttien poolisuuteen ja poolittomuuteen suhteessa eluenttiliuokseen ja stationaarifaasiin. Normaalifaasinestekromatografiassa stationaarifaasi on eluenttia poolisempi, jolloin pooliset näytekomponentit sitoutuvat stationaarifaasiin ja eluoituvat viimeisenä, poolittomat ensimmäisenä. Käänteisfaasikromatografia on käänteinen normaalifaasinestekromatografiaan verrattuna, jolloin liikkuva faasi on selkeästi poolisempi kuin kiinteä stationaarifaasi. Tällöin pooliset analyytit eivät sitoudu stationaarifaasiin vaan eluoituvat ensimmäisenä. Poolittomat analyytit siirtyvät stationaarifaasin pintaan poolisen liikkuvan faasin hydrofobisen retention eli hylkimisen ansiosta.²

Ekskluusiokromatografian erotusmenetelmässä käytetty stationaarifaasi on kiinteä ja huokoinen. Ioniekskluusiokromatografiassa ioniset analyytit erotellaan neutraaleista tai heikosti varautuneista yhdisteistä, joko negatiivisesti tai positiivisesti varautuneella stationaarifaasilla. Stationaarifaasin pinnasta positiivisen tai negatiivisen tekee siihen sidotut varautuneet ryhmät, jotka ovat siis joko positiivisesti tai negatiivisesti varautuneita. Karboksyylihapojen analysoinnissa kolonnin stationaarifaasi on positiivisesti varautunut anioninvaihtoharts, sillä karboksyylihapot ovat mittaolosuhteissa negatiivisesti varautuneita. Analyytin eluutioon vaikuttaa merkittävästi ioniekskluusiokolonnin rakenne, jonka mm. partikkelikoko ja hartsin koostumus vaihtelevat.³

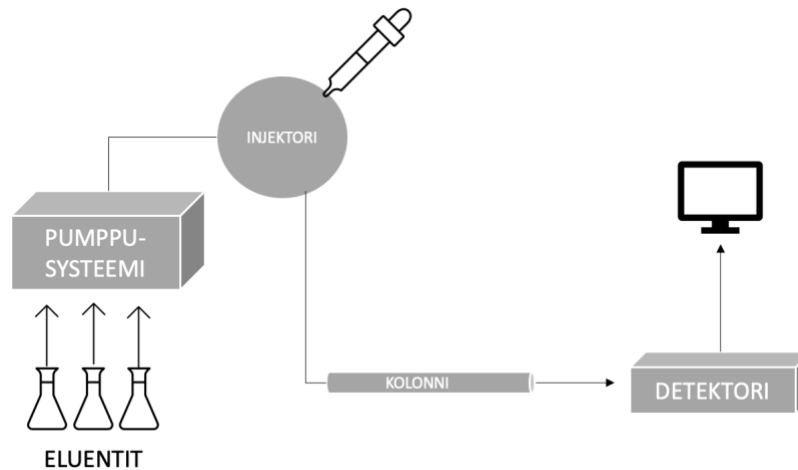
Eluotumisella tai retentiolla tarkoitetaan analyytin kulkeutumista ja erottumista muista analyyteistä kolonnissa tietyssä järjestyksessä. Näytteensyötöstä detektorille kulkeutumiseen kulunutta aikaa kutsutaan retentioajaksi (engl. retention time, r_t). Retentioaika on tärkeä tekijä yhdisteiden tunnistamisessa tunnettujen standardien avulla. Analyyttien eluotuminen havaitaan vasteena detektorilla, josta vasteen sähköinen signaali siirtyy tietokoneelle, joka muodostaa siitä graafisen kromatogrammin. Yleisimmillä detektoreilla kromatogrammissa esitetään signaalin vaste retentioajan funktiona.²

HPLC:n soveltuvuus useille erilaisille näytetyypeille on mahdollistanut sen monipuoliset käyttömahdollisuudet. Käytännössä näytteeksi soveltuu mikä tahansa ei haihtuva orgaaninen tai epäorgaaninen yhdiste, joka voidaan liuottaa sille ja valittuun menetelmään sopivaan liuottimeen. Liikkuvan faasin valintaa ohjaa analysoitavan näytteen ominaisuudet, kuten liukoisuus, hydrofobisuus tai -fiilisyyt sekä käytettävä stationaarifaasi.²

2.2 Laitteisto

Nestekromatografian laitteisto (Kuva 1) koostuu yksinkertaistetusti eluenttisäiliöistä, pumppusysteemistä, injektorista, kolonnista ja detektorista. Osat toisiinsa yhdistää inertit nesteputket, joita pitkin kulkee eluenttivirtaus. Eluenttikoostumus voi olla joko muuttumattomana koko ajan eli isokraattinen, tai vaihdella eri vaiheissa mittausta, jolloin käytössä on gradienttisysteemi. Yleensä kolonnin ja eluentin lämpötilaa voidaan kontrolloida kolonniuunilla ja siten vaikuttaa retentioaikaan.² Muita laitteiston osia ovat esimerkiksi kolonnin jälkeinen laitteisto ennen detektoria esimerkiksi derivatisointiin, sekä

detektoinnin jälkeen mahdollinen näytteen keräys ja kierrätys jätteeksi päätymisen sijaan. Useampaa detektoria on mahdollista käyttää samassa määrittäksessä peräkkäin. Näytteen tuhoava detektori ei ole usein käytännöllinen vaihtoehto, mutta sitä voidaan käyttää tarvittaessa. Tällöin hajottava detektori täytyy olla viimeisenä, jos käytössä on usea peräkkäinen detektori. Detektorin havaitsema vaste käsitellään ja analysoidaan tietokoneohjelmistossa.^{1,2,4}



Kuva 1. Nestekromatografian yleinen yksinkertaistettu laitteisto, mukailtu²

Nestekromatografiassa eluentti kulkeutuu pumpun avulla stationaarifaasin sisältämään kolonniin. Eluentin virtausnopeutta kontrolloidaan koko analyysin ajan.¹ Kolonnin tehtävänä on erottaa näytteen eri analysoitavat komponentit toisistaan niin että ne pystytään havaitsemaan detektorilla. Useimmiten titaanista, PEEK-muovista tai paksusta lasiputkesta valmistettu kolonni valitaan analysoitavan näytteen mukaisesti ja niiden pituudet, halkaisijat ja stationaarifaasin partikkelikoko vaihtelevat.⁴

Analysoitava näyte liuotetaan samankaltaiseen liuokseen kuin eluenttiliuos, joka kulkee laitteistossa kolonnin läpi injektorilta detektorille. Näyte injektoituu systeemiin injektorilla, josta se kulkeutuu kolonnin stationaarifaasille eroteltavaksi eluenttivirtauksen mukana ja edelleen detektorille signaalin detektoimista varten.²

Nestekromatografiassa kriittinen osa analyysiä on detektointi. Analysoitavat näytekomponentit kulkeutuvat eluentin mukana detektorille, jossa havaitaan kemiallinen tai fysikaalinen signaali, joka muuntuu sähköiseksi signaaliksi eli vasteeksi.

Näytekomponenttien antama vaste riippuu käytetystä detektorityypistä, joka perustuu tiettyyn kemialliseen tai fysikaaliseen ilmiöön. Näytteen analyyttien antamat vasteet muunnetaan kromatogrammiksi, josta pystytään havaitsemaan analysoitavan aineen määrää näytteessä.^{2,4}

Nestekromatografiassa käytännöllisen ja toimivan detektorin ominaisuuksia ovat mm. sopiva selektiivisyys, herkkyys sekä robustisuus, helppokäyttöisyys, stabiilisuus, toistettavuus, lyhyt vasteaika eli detektorin nopea reaktiivisuus muutokseen signaalissa ja mittausalueen laaja lineaarisuus. Selektiivisyydellä tarkoitetaan detektorin kykyä havaita analysoitavat komponentit näytematriisista, kun taas robustisuudella tarkoitetaan sitä, ettei detektori ole erityisen herkkä ulkopuolisille muuttujille. Detektorilla täytyy olla myös tilanteeseen sopiva herkkyys, jotta tarvittavat pitoisuudet saadaan havaittua, mutta tietyissä tilanteissa liiallinen herkkyys saattaa olla haitaksi.^{1,2,4}

Toteamisraja (engl. limit of detection, LOD) on signaalin voimakkuus, jossa analyytti aiheuttaa luotettavan detektointisignaalin. Se esitetään usein pitoisuutena. Toteamisrajan signaalin tulee olla vähintään kaksinkertainen verrattuna kohinaan. Kohina on detektorisignaalin pohjaviivan satunnaisvärähtelyä, kun analysoitavan komponentin vastetta ei ole havaittu. Toteamisrajaa ja lineaarista aluetta käytetään yhdessä määrittämään analyysin luotettavuutta. Lineaarisella alueella tarkoitetaan pitoisuusaluetta, jossa detektorin herkkyys on vakio. Lineaarisen alueen alaraja on pienin mahdollinen detektoitava näytekomponentin ainemäärä. Määritysraja (engl. limit of quantification, LOQ) on pienin mahdollinen detektorin antama vaste, jota voidaan käyttää kvantitatiivisesti luotettavalla tarkkuudella. Analyysimenetelmän kehityksessä määritetään prioriteetit detektorin ominaisuuksille aina analysoitavan analyytin tarpeiden mukaisesti, sillä mikään detektori ei sovellu kaikkiin tarpeisiin.^{1,25}

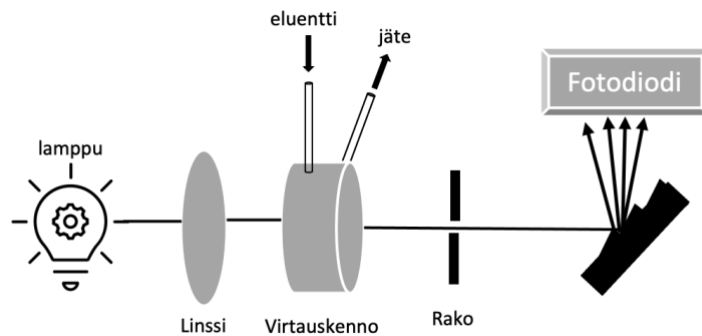
3 DETEKTORITYYPIT

Detektorit luokitellaan usein yleis-, selektiivisiin ja spesifisiin detektoreihin. Yleisdetektori havaitsee laajasti kaikki eluentista poikkeavat analyytit. Selektiivinen detektori havaitsee jonkin tietyn yhdisteryhmän analyytit, jotka reagoivat tiettyyn ilmiöön samankaltaisten ominaisuuksiensa vuoksi. Spesifinen detektori havaitsee vain kemiallisesti täysin samanlaiset analyytit eluentista tai jopa vain yhden ainoan komponentin. Useimmiten analyysikehityksessä tavoitellaan yleisdetektorin käyttöä, mutta jokaisella yleisdetektorilla on omat puutteensa.^{2,6}

Lisää detektoreiden ominaisuuksia voidaan avata luokittelulla konsentraatio- ja massasensitiivisiin detektoreihin. Konsentraatiosensitiivinen detektori antaa vasteen analyytin konsentraatiosta eluentissa. Massasensitiivinen detektori havaitsee analyytin kokonaismäärän tai määrän tietyssä ajassa massana. Esimerkiksi ultraviolettiabsorptioon perustuva detektori on konsentraatiosensitiivinen ja massaspektrometri on massasensitiivinen.⁷

3.1 UV/VIS -detektori

Spektrofotometrinen ultraviolettiabsorptioon ja näkyvän valon absorptioon perustuva - detektori (engl. ultraviolet/visible detection, UV/VIS) on yksi yleisimmin käytetyistä nestekromatografian detektoreista. Detektointi perustuu analysoitavan aineen kykyyn absorboida ultravioletin (100-400 nm) ja näkyvän valon aallonpituuksia (400-700 nm). Virtauskenossa eluenttiliuoksen läpi lähetetään analysoitavalle aineelle tunnettu sopiva aallonpituus tai -pituusalue. Detektorille saapuva säteilyn määrä havaitaan ja muunnetaan signaaliksi, jonka avulla määritetään absorboituneen säteilyn määrä, joka on verrannollinen analyytin pitoisuuteen (Kuva 2). Näytteeseen absorboitunut säteily ja siten analyytin määrä määritetään Beer-Lambertin lain mukaan.^{2,4}



Kuva 2. UV/VIS-detektorin yksinkertaistettu rakenne, mukailtu⁸

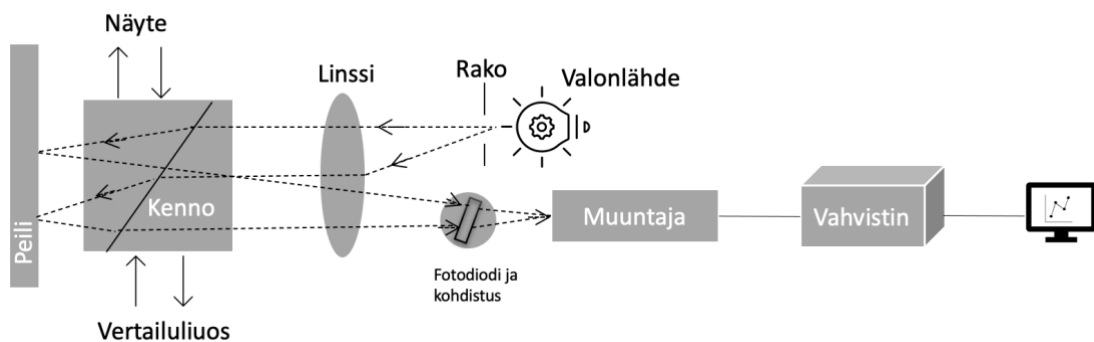
Analyytti voidaan detektoida UV- ja näkyvän valon absorptiolla, jos se sisältää σ -orbitaalin, π -orbitaalin tai n-atomiorbitaalin (sisältää heteroatomeja). Molekyylin korkeinta miehittyä molekyyliorbitaalia kutsutaan HOMO-orbitaaliksi (engl. highest occupied molecular orbital) ja matalinta miehittämätöntä molekyyliorbitaalia LUMO-orbitaaliksi (engl. lowest unoccupied molecular orbital). Absorboidun elektromagneettisen säteilyn määrä tietyllä aallonpituudella sisältää juuri oikean määrän energiaa, jotta tietyn molekyylin elektronit virittyvät perustilastaan matalamman energian HOMO-orbitaalilta korkeamman energian LUMO-orbitaalille. Molekyylin rakennetta, joka absorboi UV-valon ja näkyvän valon aallonpituutta kutsutaan kromoforiksi. Molekyylin π -elektronit vaativat vähemmän energiaa elektronien virittymiseen kuin σ -elektronit ja ne voivat olla eristettyjä tai konjugoituneita. Konjugoidussa systeemissä elektronit delokalisoituvat ja HOMO- ja LUMO-orbitaalien energiatasojen ero on pienempi. Konjugoitu systeemi absorboi pidemmällä aallonpituudella kuin eristetty systeemi. Yksittäinen eristetty π -sidoksen ei alenna energiatasojen eroa merkittävästi, sillä sen elektronit eivät pysty delokalisoitumaan σ -sidosten kanssa. Analyysissä käytettävä liuotin ei saa absorboida voimakkaasti analyytin kanssa samalla aallonpituudella, jotta se ei häiritse analyytin antamaa vastetta detektoinnissa^{2,9,10}

UV/VIS-detektoreita on yleisesti kolme eri tyyppiä: yhtä aallonpituutta käyttävä, vaihtelevaa aallonpituutta käyttävä sekä diodirividetektorit (engl. diode array detection, DAD tai photo diode array detection PDA). Diodirividetektorit ovat monipuoliset ja hyödylliset, sillä niiden avulla voidaan mitata sekä yksi että usea aallonpituus tai -alue

samanaikaisesti. UV/VIS-detektoreiden toteamisrajat voivat olla analyytistä riippuen, jopa 0,01 ng.^{1,2,4}

3.2 Taitekerroindetektor

Taitekerroindetektorin (engl. refractive index detection, RID) toiminta perustuu eluentin taitekertoimen muutosten havaitsemiseen. Detektorin vertaava puhtaan eluentin ja näytteen sisältävän eluentin taitekertoimia lähettämällä valonsäteen kennoon (Kuva 3). Taitekertoimen arvon muutos aiheuttaa detektoriin vasteen, joka vahvistetaan mittausdataksi. RI-detektoria sanotaan yleisdetektoriksi, koska käytännössä kaikki yhdisteet, joiden taitekertoimet poikkeavat liikkuvasta faasista, aiheuttavat jonkinlaisen muutoksen taitekertoimessa. Analyysin vasteen voimakkuudet vaihtelevat voimakkaasti ulkoisista tekijöistä johtuen, eikä taitekerroindetektorit sovellu laajasti eri yhdisteille sen heikon herkkyyden vuoksi. Taitekerroindetektorin toteamisrajat saattavat olla korkeita, alhaisimmillaan pitoisuudet karboksyylihapoille voivat olla milligrammoja litrassa. RI-detektorin ei yleensä sovellu gradienttisysteemeihin ja se on erittäin lämpötilariippuvainen. Taitekerroindetektorin kyky tunnistaa melkein kaikki mahdolliset yhdisteet, ylläpitää sen suosiota.^{1,2,8}

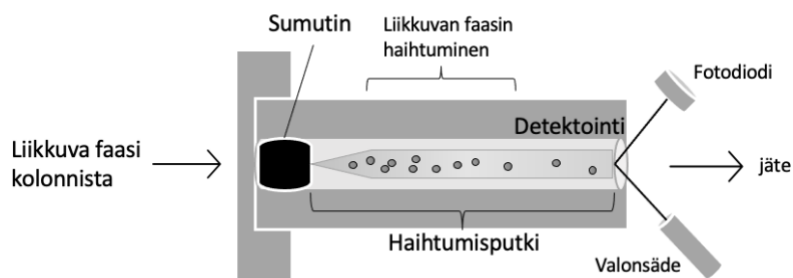


Kuva 3. Taitekerroindetektorin esimerkkirakenne, mukailtu¹

3.3 Valonsirontadetektor

Valonsirontadetektorin (engl. evaporative light scattering detection, ELSD) perustuu näytepartikkeleista elastisesti siroavan valonsäteen havaitsemiseen. Haihtuva liikkuva faasi ja sen sisältämä haihtumaton näyte sumutetaan kolonnin jälkeen sumuttimella inertin kaasun avulla (Kuva 4). Sumutuksen jälkeen liikkuva faasi haihtuu pois haihtumisputkessa ja jäljelle jäävät vain näytepartikkelit, joihin kohdistetaan valonlähteestä säde. Partikkelit

sirottavat valonsäteen elastisesti, joka havaitaan fotodiodilla. Elastisessa sironnassa molekyylit indusoituvat valonsäteestä hetkelliseksi dipoliksi, jonka purkautuessa molekyyli emittoi alkuperäisen valonsäteen taajuudella. Emittoitu valonsäde havaitaan fotodiodilla, josta muuntuu vasteeksi. Valonsirontadetektori on sensitiivinen, sillä sen määrittäysraja voi olla jopa nanogrammoissa, analyytin luonteesta riippuen. Useimmiten toteamisrajat liikkuvat 0,001-0,1 µg/l alueella. ELSD soveltuu myös gradienttisysteemiajoihin. Valonsirontadetektioinnilla voidaan määrittää haihtumattomia näytteitä ja detektorin ehdottomana hyötynä on, että niille saadaan samanlainen vaste.^{2,8,11}



Kuva 4. Valonsirontadetektorin esimerkkirakenne, mukailtu^{2,12}

Valonsirontadetektoria kuvaillaan usein hyväksi halvemmaksi vaihtoehdoksi massaspektrometrille niiden samankaltaisuuden vuoksi, vaikkei ELSD anna tietoa yhdisteen rakenteesta. Valonsirontadetektorin suurin hyöty on sen kyky tunnistaa käytännössä mikä tahansa analyytti, joka ei haihdu liikkuvan faasin mukana. ELSD ei vaadi erityistä näytteenkäsittelyä, minkä ansiosta analyysi on yksinkertainen ja helppo suorittaa. Valonsirontadetektorin ollessa destruktiivinen, sen sijainti on sarjassa detektioinnissa viimeisenä. Valonsirontadetektori on erinomainen vaihtoehto yhdisteiden, joiden UV-absorptio on heikkoa (noin 200 nm tai alle sen) analysointiin. Detektori on riippumaton ulkoisista tekijöistä ja analyysi on robusti, minkä ansiosta tulokset ovat usein hyvin toistettavia.^{13,14}

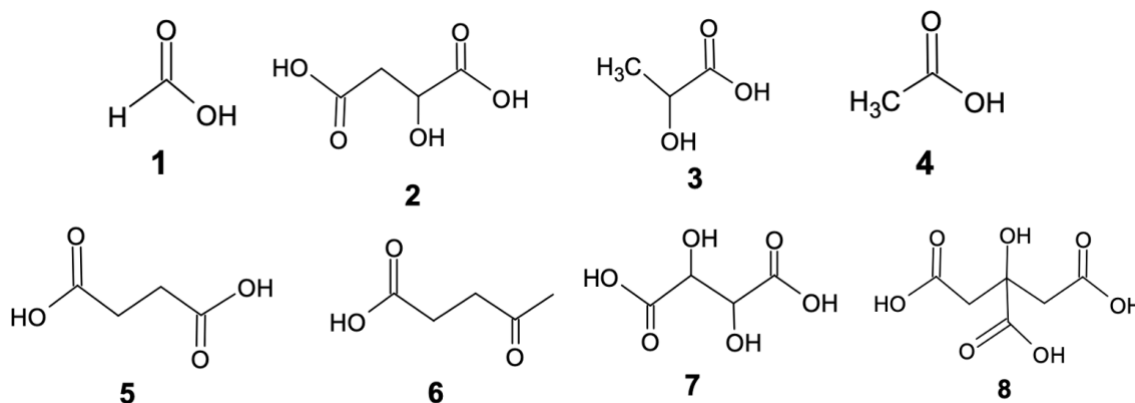
Valonsirontadetektorilla suoritettavissa nestekromatografia-analyyseissä on useita rajoitteita, jotka tulee ottaa huomioon, ja niistä saattaa aiheutua haasteita menetelmänkehityksessä. Koska detekointi perustuu kuivien partikkeleiden kykyyn heijastaa valonsädettä, on liikkuva faasi haihdutettava erilleen näytekomponenteista. Voi olla haastavaa löytää sopiva eluentti, joka haihtuu näytteelle sopivassa lämpötilassa, koska

analyytit eivät saa haihtua samalla. Eluentin haihtumista kontrolloidaan haihtumisputken lämpötilan avulla. Lämpötilan valinta onkin kriittisimpiä vaiheita detektoinnin onnistumisen kannalta. Lämpötila tulee valita niin, että analyysi pysyy tarpeeksi herkkänä, sillä sekä liian matala että korkea lämpötila häiritsee herkkyttä. Liian matala lämpötila ei välttämättä haihduta kaikkea eluenttia, mikä esiintyy liiallisena taustan kohinana. Liian korkea lämpötila taas haihduttaa myös analysoitavat analyytit, jolloin ne eivät ole detektoitavissa, eikä menetelmä ole toimiva.¹⁴⁻¹⁶

4 ERI DETEKTOREIDEN SOVELTUVUUS KARBOKSYYLIHAPPOJEN ANALYSOINTIIN

Karboksyylihapot ovat orgaanisia yhdisteitä, joissa funktionaalisenä ryhmänä on karboksyyliryhmä (-COOH). Karboksyylihapot muodostavat sidoksia karboksyyliryhmästään, joten ne ovat hiiliketjun pituudesta ja muista funktionaalisista ryhmistään riippuen poolisia tai vähemmän poolisia. Mitä pidempi hiiliketju on kyseessä, sitä poolittomampi yhdiste on. Karboksyylihapon poolisuudella on suuri merkitys kromatografian erotusmenetelmän valinnassa. Hapot pystyvät muodostamaan karboksylaattisuoloja luovuttamalla karboksyyliryhmästään protonin ja ovat happamia vesiliuoksessa.¹⁰

Käsiteltävät karboksyylihapot ovat muurahaishappo **1** eli metaanihappo, omenahappo **2** eli hydroksibutaanidihappo, maitohappo **3** eli 2-hydroksipropaanidihappo, etikkahappo **4** eli etaanihappo, meripihkahappo **5** eli butaanidihappo, levuliinihappo **6** eli 4-okso-pentaanidihappo, viinihappo **7** eli 2,3-dihydroksibutaanidihappo ja sitruunahappo **8** eli 2-hydroksi-1,2,3-propaanitrikarboksyylihappo.



4.1 UV/VIS-detektorin

Ultravioletti- ja näkyvän valon absorptioon perustuva detektointi on hyvin suosittu karboksyylihappojen analysoinnissa, mutta hapot aiheuttavat analyysiin useita haasteita. Karboksyylihapot absorboivat UV-säteilyä useimmiten aallonpituuksilla 210-220 nm. Pieni aallonpituus on suoraketjuisille karboksyylihapoille ominaista, koska ne sisältävät vain yhden π -sidoksen yhtä happoryhmää kohden, eivätkä sisällä yleensä konjugaattiorakenteita. Koska hapot absorboivat rakenteidensa takia melko huonosti UV-

aallonpituuksia, sensitiivisyys UV-detektorilla ei ole paras mahdollinen monimutkaisissa näytematriiseissa. Hyvin voimakkaasti karboksyylihappojen aallonpituudella absorboivat yhdisteet, kuten fenolit saattavat näytematriisissa häiritä happojen analyysiä.^{15,17}

Karboksyylihappojen detektointialueen ollessa hyvin lyhyillä aallonpituuksilla (< 220 nm), detektoinnista tulee melko haastavaa. Mitä lyhyempiin aallonpituuksiin siirrytään, sitä enemmän analyysin välineistöltä, tekniikalta ja menetelmältä vaaditaan. Tärkeiksi tekijöiksi nousevat detektorin erinomainen toimivuus, korkealaatuiset liuottimet ja reagenssit sekä analyysin suorittamisen huolellisuus. Eluenttien ominaisuus absorboida sähkömagneettista säteilyä alkaa häiritsemään analyysijä lyhyillä aallonpituusalueilla ja tämä on erityisesti läsnä alle 200 nm mittauksissa. Ilmiö esiintyy kromatogrammissa liuotinpiikkeinä, jotka häiritsevät karboksyylihappojen havaitsemista ja tunnistusta spektristä.¹⁷ UV/VIS-detektorilla toteamisraja on melko alhainen ja hyvällä menetelmällä pieniäkin määriä karboksyylihappoja voidaan detektoida luotettavasti.

Taulukkoon 1 on koottu eri tutkimuksissa pienille suoraketjuisille karboksyylihapoille käytettyjä mittausolosuhteita HPLC:lla, johon on kytkettynä ultraviolettidetektor. Tutkimuksissa on käytetty käänteisfaasikolonnia 1 ml/min virtausnopeudella ja detektointi on tehty 210 nm aallonpituudella. Käänteisfaasikolonnin ansiosta analyyttien retentioajat ovat lyhyitä, sillä ne pysyvät noin alle kymmenessä minuutissa, mikä on hyödyllistä analyysin nopeuden kannalta.

Taulukko 1. Karboksyylihappojen retentioajat sekä toteamis- ja määrittämissrajat HPLC-UV laitteistolla 1,0 ml/min virtausnopeudella ja 210 nm aallonpituudella erilaisissa olosuhteissa määritettyinä

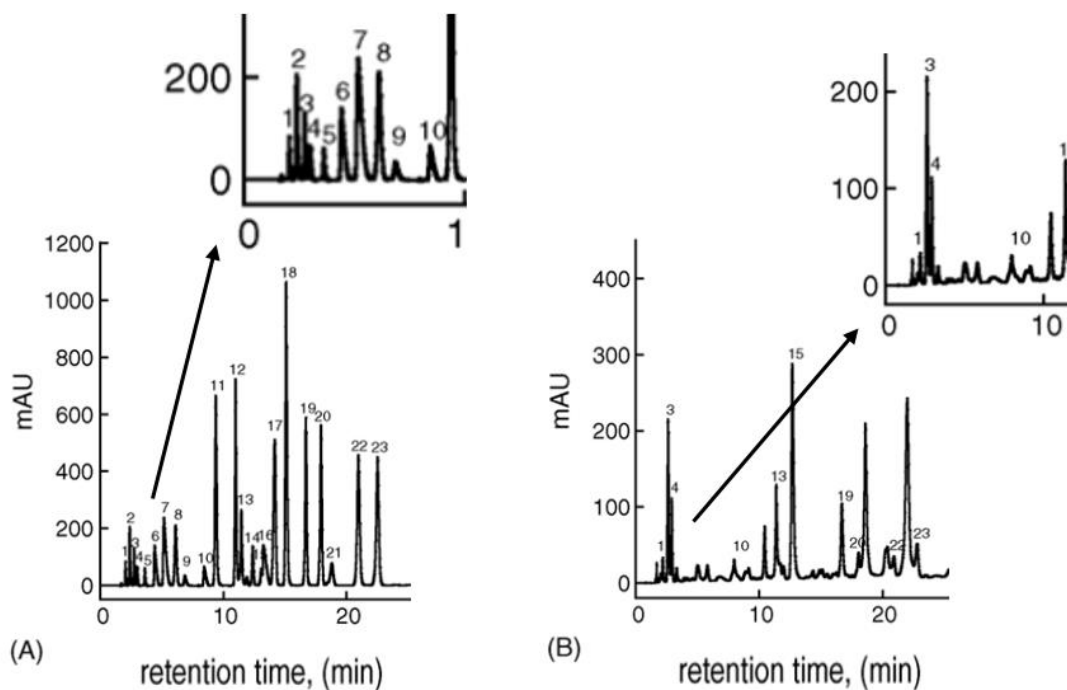
Analyytti	R _t (min)	LOD (g/l)	LOQ (g/l)	Kolonne	Eluentti
muurahaishappo	2,1	0,002	Ei mainittu	Waters, YMC Carotenoid S-3 (150 x 4,6 mm, C30, 30°C)	Gradientti: A: 0,01 M fosforihappo (pH 2,2-2,3) B: Vesi: asetonitrili (10:90)
omenahappo	2,4	-			
maitohappo	2,8	0,005			
etikahappo	3,0	0,002			
meripihkahappo	4,6	0,003			
levuliinihappo ¹⁸	8,7	0,020			
viinihappo	3,5	0,010	0,031	Atlantis dC18 (250 x 4,6 mm id; 5 µm, 30°C)	Isokraattinen, 10 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O (pH 2,70; säädetty rikkihapolla)
muurahaishappo	3,7	0,021	0,064		
omenahappo	4,3	0,017	0,052		
maitohappo	5,1	0,046	0,138		
etikahappo	5,4	0,042	0,127		
sitruunahappo	7,0	0,012	0,037		
meripihkahappo ¹⁹	8,6	0,008	0,024		

Eluenttien pH on säädetty tarpeeksi happamaksi, noin 2,2–2,7, jotta karboksyylihapot ovat protonoidussa muodossa. Matalan pH-arvon on havaittu parantavan pienten suoraketjuisten karboksyylihappojen detektoinnin resoluutiota.¹⁸ Eluutiota on säädelty isokraattisesti¹⁹ tai gradienttisysteemillä¹⁸. Gradientteluutiossa eluentti koostui 0,05 % fosforihapposta (liuos A) ja 10:90 vesi:asetonitrilistä (H₂O:ACN, liuos B). Eluentin koostumus oli aikavälillä 0-2 min 100 % liuos A, minkä jälkeen 2-15 min aikana muuttui koostumukseen 90 % A, 10 % B. 24-43 min aikana muutos koostumukseen 65 % A, 35 % B, josta edelleen 43-89 min aikana muutos koostumukseen 0 % A, 100 % B. Lopuksi 114-120 min aikana muutos koostumukseen 100 % A. Retentioaikojen perusteella voidaan havaita, että karboksyylihapot eluovutvat pääosin laimean fosforihappopitoisen eluentin aikana, kuten myös taulukon 1 isokraattisessa mittauksessa.

Taulukossa 1 esitetyt karboksyylihappojen toteamisrajat eroavat toisistaan merkittävästikin samalla analytyillä eri menetelmillä. Esimerkiksi muurahaishapon toteamisrajoja ovat eri tutkimuksissa 0,002 g/l¹⁸ ja 0,021 g/l¹⁹ sekä etikahapon 0,002 g/l¹⁸

ja 0,042 g/l¹⁹. Kyseisillä mittausrakenteilla ja menetelmillä päästään kuitenkin kohtuu pieniin lukemiin, kun määritettävät pitoisuudet ovat milligrammoja litrassa.

Kuvassa 5A nähdään esimerkki pienten suoraketjuisten karboksyylihappojen seoksesta DAD-detektorilla muodostetusta kromatogrammista. Kromatogrammista nähdään, että pienet suoraketjuiset karboksyylihapot eluotuvat melko lähellä toisiaan, ja retentioaikojen sekä signaalien päällekkäisyys on siten mahdollista. Kuvan 5B kromatogrammin näytematriisi on maissin sadonkorjuujätteestä esikäsitelty biomassahydrolysaatti, joka sisältää luonnollisia biomassan hajoamisessa syntyviä yhdisteitä. Karboksyylihapoanalyytit ovat erottuneet hyvin toisistaan näytematriisin aiheuttamasta vähäisestä pohjaviivan noususta huolimatta. DAD-detektorilla voidaan siis oikein suunnitellulla elutiolla, mitata myös hyvin monimutkaisia näytematriiseja.¹⁸



Kuva 5. A) Standardeista ja B) maissin sadonkorjuujätteestä DAD-detektorilla mitatut kromatogrammit, joissa 1 = muurahaishappo, 2 = omenahappo, 3 = maitohappo, 4 = etikkahappo, 6 = meripihkahappo, 10 = levuliinihappo, mukailtu¹⁸

4.2 Taitekerroindetektori

Taitekerroindetektorin käyttö on haastavaa karboksyylihapoille sen yleisdetektoriluonteen takia. Taulukkoon 2 on koottu tutkimuksia ja mittausolosuhteita, joissa taitekerroindetektoria on käytetty pienten suoraketjuisten karboksyylihappojen analysointiin nestekromatografialla. Taitekerroindetektorin toteamisrajat ovat yleisesti huomattavasti suuremmat verrattuna esimerkiksi UV/VIS-detektoreihin. UV/VIS-detektorilla etikkahapon toteamisrajaksi on saatu esimerkiksi 0,002 g/l¹⁸ (Taulukko 1) ja taitekerroindetektorilla toteamisrajaksi on saatu esimerkiksi 0,01 g/l²⁰ (Taulukko 2). Kehitetyt menetelmät ovat toki hyvin yksilöllisiä, ja eroavaisuuksia eri tutkimusten toteamisrajoissa on suuntaan tai toiseen. Taitekerroindetektorilla antaa vasteen kaikista analyyteistä, jotka muuttavat eluentin taitekerrointa, minkä takia näytematriisilla saattaa olla vaikutusta analyttien detektointiin näytteestä.²⁰ Taitekerroindetektorilla soveltuu kuitenkin hyvin analyysiin, jossa näytteen odotettava karboksyylihappomäärä on kohtuullisen suuri ja siten helposti havaittavissa.

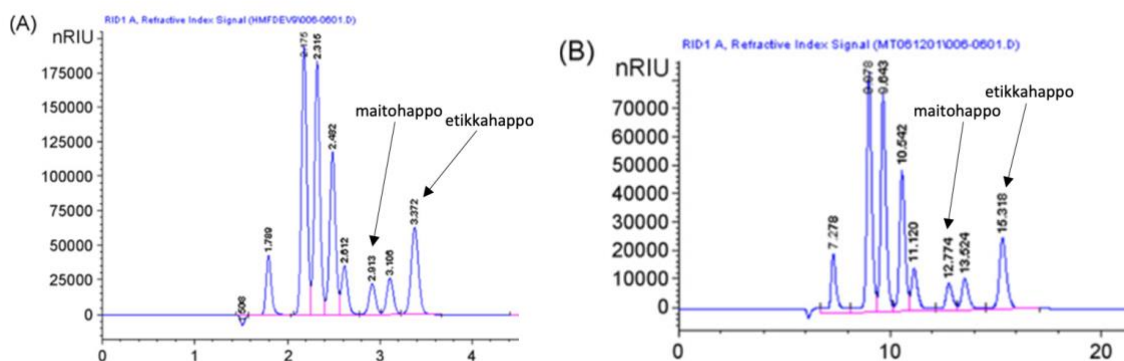
Taulukko 2. Karboksyylihappojen retentioajat sekä toteamis- ja määrittämissrajat HPLC-RID-laitteistolla 0,005 M rikkihapon isokraattisella eluutiolla erilaisissa olosuhteissa määritettyinä

Analyytti	R _t (min)	LOD & LOQ (g/l)	Kolonne	Virtausnopeus (ml/min)
levuliinihappo ²¹	16,8	Ei mainittu	Aminex HPX-87H, 60°C Detektorin lämpötila 40°C	0,55
maitohappo etikkahappo ²⁰	12,8 15,3	Ei mainittu	Aminex HPX-87H, 65°C	0,6
maitohappo etikkahappo ²⁰	2,9 3,4	LOD = 0,005 LOQ = 0,1 LOD = 0,01 LOQ = 0,04	Rezex RFQ (100 x 7,8 mm, 8 mm), 85°C	1,0
etikkahappo levuliinihappo ²²	≈ 18,0 ≈ 19,0	Ei mainittu	Aminex HPX-87H, 45°C	0,6

Taitekerroindetektorin yhteydessä karboksyylihappojen analytiikkaan käytetty kolonne on tyypillisesti ionieksluusiokolonne kuten Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, 9 µm) ja käytössä on ollut isokraattinen eluutio eluenttina 0,005 M rikkihappo. Levuliinihapolle on käytetty kahdessa eri tutkimuksessa Aminex HPX-87H-kolonna samalla eluentilla, virtausnopeuksilla 0,55 ml/min²¹; 0,6 ml/min²² sekä kolonnen lämpötiloilla 60°C; 45°C.

Suurin vaikutus eluotumiseen on ollut virtausnopeudella sekä lämpötilalla, josta retentioaikojen 16,8 min; 19,0 min ero aiheutuu (taulukko 2). Myös etikkahapon analysointia on tutkittu Aminex HPX-87H-kolonnilla melkein identtisisissä olosuhteissa. Ainut eroavaisuus oli kolonnille käytetyt lämpötilat 65°C²⁰; 45°C²², joilla on siten selkeä yhteys retentioaikoihin 15,3 min; 18,0 min. Etikkahappoa ja levuliinihappoa käsitellyssä tutkimuksessa²² tavoitteena oli parantaa etikkahapon ja levuliinihapon erotusta optimoimalla kolonnin lämpötilaa, rikkihappoeluentin konsentraatiota sekä virtausnopeutta. Taulukossa 2 on nähtävissä kehityksessä optimoidut mittausolosuhteet.

Maitohapolle ja etikkahapolle vertailtiin kahdelle eri kolonnille kehitettyä menetelmää, tavoitteena osoittaa Rezex RFQ -kolonnin vaihtoehtoinen ja nopeampi menetelmä toimivaksi.²⁰ Rezex RFQ -kolonni on Aminex HPX-87H-kolonnin verrattuna lyhyempi, se kestää korkeampia lämpötiloja (85°C) sekä suurempaa virtausnopeutta (1,0 ml/min), minkä takia retentioajat lyhenevät jopa viiteosaan verrattuna Aminex-kolonnin (etikkahappo 3,4 min vs 15,3 min). Kuvassa 6 on vertailuna Aminex-HPX-87H ja Rezex RFQ kolonniin analyysimenetelmien kromatogrammit, joista nähdään erottumisen olevan hyvä myös nopeamman retentioajan mahdollistaneissa mittausolosuhteissa.



Kuva 6. A) Rezex –kolonnilla mitatun standardiseoksen kromatogrammi ja B) Aminex – kolonnilla mitatun standardiseoksen kromatogrammi, mukailtu ²⁰

4.3 Valonsirontadetektor

Haihtuvien karboksyylihappojen analysoinnissa valonsirontadetektorilla kriittisin vaihe on haihtumisputken lämpötilan sekä eluentin valinta, jotta eluentin haihtuminen onnistuu niin, että analyyyti on detektoitavissa. Muurahaishapon analysointi saattaa olla haastavaa,

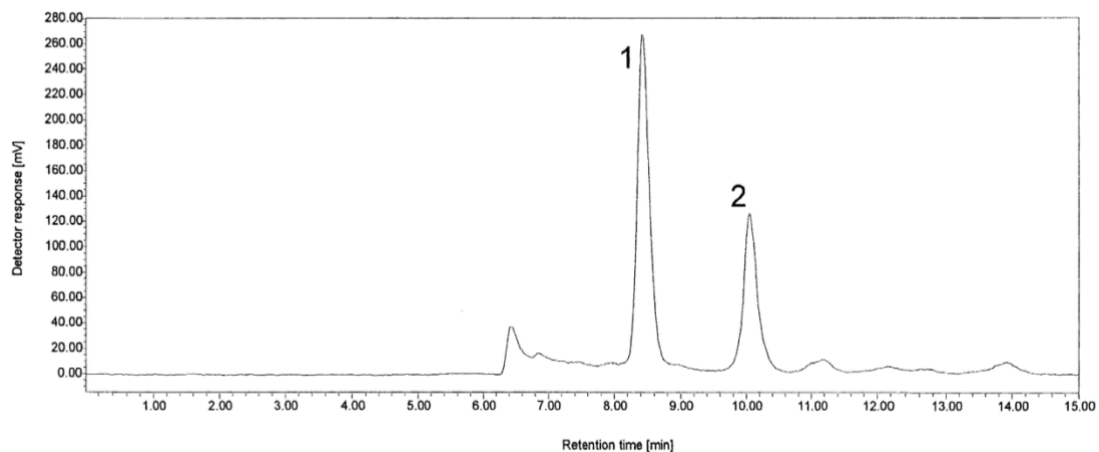
sillä sen kiehumispiste (101°C^{23}) on hyvin lähellä yleisen eluentin eli veden kiehumispistettä (100°C^{23}), jolloin analyytti saattaa haihtua eluentin mukana. Eräissä tutkimuksissa omenahapon on arveltu hajoavan kalibrointimittausten aikana tietyissä olosuhteissa ja olevan siten herkemmin hajoava karboksyylihappo kuin sitruunahappo ja viinihappo. Sen havaittiin antavan kalibroitikäyrien kulmakertoimeksi sitruunahapon ja viinihapon kulmakertoimista poikkeavan arvon, vaikka teoriassa kulmakertoimien tulisi olla lähes identtiset.¹⁶ Karboksyylihappojen analysoinnissa pH:n säätämiseen käytetyt yhdisteet, kuten kaliumfosfaatti, aiheuttavat virhettä haihtumisessa, optisessa kennossa sekä lisäävät taustakohinaa liikaa. Taulukkoon 3 on koottu eri tutkimuksissa käytettyjä karboksyylihappojen analyysiolosuhteita HPLC-ELSD-laitteistolla, ja esitetyissä tutkimuksissa on käytetty trifluoretikkahappoa (TFA) pH:n kontrollointiin, eikä kaliumfosfaatin kaltaisia suoloja.

Taulukko 3. Karboksyylihappojen retentioajat sekä toteamis- ja määrittämissuoritukset HPLC-ELSD-laitteistolla erilaisissa olosuhteissa isokraattisella eluutiolla määritettyinä

Analyytti	R _t (min)	LOD (g/l)	LOQ (g/l)	Kolonne	Eluentti	Haihtumis- putki (°C)	Virtaus- nopeus (ml/min)
levuliinihappo muurahaishappo ²⁴	15,0 13,0	Ei mainittu	Ei mainittu	Aminex HPX-87H, 50°C	0,1%TFA; 2% ACN; 97,9% vesi	30	0,6
viinihappo omenahappo sitruunahappo meripihkahappo ¹⁵	– ≈ 20,0 ≈ 25,0 ≈ 26,0	0,00389 0,0074 0,015 0,0028	0,010 0,010 0,022 0,0045	Primesep 200	0,2% TFA	40	0,2
sitruunahappo omenahappo ¹⁶	≈ 8,5 ≈ 10,1	Ei mainittu	0,020 0,060	Aminex HPX-87H	0,02 M TFA	60	0,6

Verrattuna UV/VIS-detektointiin, herkkyys on huonompi ja toteamisrajat ovat keskimäärin samoja tai hieman korkeampia valonsirontadetektorilla, mutta päinvastoin taitekerroindetektoriin verrattaessa. Esimerkiksi etikkahapon toteamisrajaksi UV/VIS-detektorilla on saatu 0,002 g/l¹⁸ (Taulukko 1), taitekerroindetektorilla 0,01 g/l²⁰ (Taulukko 2) ja valonsirontadetektorilla eri happojen toteamisrajat liikkuvat välillä 0,0028–0,015 g/l (Taulukko 3).^{14–16}

Valonsirontadetektorilla on analysoitu laajasti useita yleisimpiä pieniä suoraketjuisia karboksyylihappoja (taulukko 3). Kolonnina on useimmiten käytetty Aminex HPX-87H, jota on käytetty monesti myös taitekerroindetektorin kanssa (taulukko 2). Kuvassa 7 nähdään, kuinka *Eschscholtzia californica:n* kuivapuristeen sitruunahappo sekä omenahappo ovat erottuneet lyhyillä retentioajoilla, kun käytössä on Aminex HPX-87H –kolonni sekä 0,6 ml/min virtausnopeus. Kyseisessä tutkimuksessa¹⁶ haihtumisputken lämpötila (60°C) on onnistuttu pitämään kohtuu matalana verrattuna eluentin kiehumispisteeseen (vesi = 100°C ja TFA = 72°C²³). Haihtumisputken lieriömäinen rakenne tehostaa eluentin haihtumista matalissakin lämpötiloissa. Kuvasta 7 nähdään myös, että eluentti on haihdutettu pois typpikaasun avulla niin, että korkean sulamispisteen omaavat analyytit sitruunahappo (153°C²³) sekä omenahappo (132°C²³) eivät ole haihtuneet mukana, sillä niiden antama vaste erottuu selkeästi taustan kohinasta ja tausta on vain vähän kohonnut. Myös analysoidessa levuliinihappoa sekä muurahaishappoa, haihtumisputken lämpötila on saatu hyvin matalaksi (30°C). Analyytit eivät ole haihtuneet niiden korkeiden kiehumispisteiden ansiosta (levuliinihappo = 245°C ja muurahaishappo = 101°C²³). Haihtumisputken lämpötilat vaihtelevat noin 30-60°C välillä pienten suoraketjuisten karboksyylihappojen analysoinnissa.



Kuva 7. Aminex HPX-87H kolonnilla eroteltu ja valonsirontadetektorilla detektoitu *Eschscholtzia californica:n* kuivapuristeen analyyttien kromatogrammi, jossa 1 = sitruunahappo ja 2 = omenahappo. Eluenttina 0,02 M TFA, virtausnopeutena 0,6 ml/min ja haihtumisputken lämpötilana 60°C¹⁶

5 YHTEENVETO

Pienten suoraketjuisten karboksyylihappojen analysointi nestekromatografialla voi olla haastavaa, mutta oikean menetelmän löytyessä niitä voi analysoida tarkasti, luotettavasti sekä toistettavasti. Tutkielmassa kartoitettiin UV/VIS-, RI- sekä ELS-detektointitekniikoiden soveltuvuutta karboksyylihappojen analysointiin HPLC:llä. Vertailtiin myös tutkittujen menetelmien mittausolosuhteiden eroavaisuuksia sekä niiden vaikutuksia tuloksiin.

Eluutiona taitekerroin- ja valonsirontadetektorimittauksissa on käytetty isokraattista eluutiota ja vesipohjaisia eluenteja, joissa on pieniä määriä rikkihappoa, TFA:ta tai asetonitriiliä. UV/VIS-detektorilla eluuttina on käytetty vesipohjaisia eluenteja, joissa on fosforiyhdisteitä isokraattisessa mittauksessa. Lisäksi UV/VIS-gradienttimittauksessa oli käytetty asetonitriili-vesi liuosta. UV/VIS-detektorilla käytetyt kolonnit olivat käänteisfaasikolonneja, taitekerroindetektorilla ionieksklusiokolonneja ja valonsirontadetektorilla sekä ionieksklusio- että käänteisfaasikolonneja. Käytetyillä kolonneilla ja mittausolosuhteilla päästiin tarkastelluilla karboksyylihapoilla lyhyisiin retentioaikoihin (noin 2-26 min), joten analyysit ovat myös nopeita toteuttaa.

Kaikki kolme käsiteltyä detektoria soveltuivat pienten suoraketjuisten karboksyylihappojen analysointiin hyvin. Taitekerroindetektorilla oli odotetusti suurimmat toteamis- ja määrittämissrajat, jonka jälkeen valonsirontadetektorilla oli seuraavaksi pienimmät. Keskimäärin pienimpiin pitoisuuksiin päästiin UV/VIS-detektorilla, jonka toteamis- ja määrittämissrajat olivat melkein samaa luokkaa kuin valonsirontadetektorilla. Tarkastelluissa tutkimuksissa oli löydetty hyvin toimivat menetelmät ja toteamisrajoissa päästiin jopa muutamia milligrammoihin litrassa, niin UV/VIS- kuin valonsirontadetektorilla.

Jokainen käsitelty detektori antaa oikein kehitetyllä menetelmällä luotettavia tuloksia, mutta analyysiin tarvittava määrittämissarkkuus rajaa käytettäviä vaihtoehtoja. Valonsirontadetektori vaikuttaisi olevan hyvä vaihtoehto UV/VIS:in rinnalle, koska määrittämissarkkuus on yhtä hyvä ja karboksyylihappojen UV/VIS-detektointiaallonpituudella esiintyvät häiriöt eivät vaikuta tuloksiin. Valonsirontadetektori vaatii kuitenkin hyvän menetelmänkehityksen, mutta on toimiessaan nopea, luotettava, helppo ja toistettava, olleen siten mainio vaihtoehto. Valonsirontadetektoria verrataan toimivuudeltaan

erinomaiseen, mutta kalliiseen massaspektrometriin, molempien ollessa desktruktiivisiä detektoreita. Massaspektrometrin käytön parhaat puolet happojen analysoinnissa voisi yhdistää käytännöllisempään ja halvempaan valonsirontadetektoriin. Parhaimman detektointituloksen voisi saada, kun valonsirontadetektorin asetettaisiin peräkkäin jonkin muun detektorin kanssa.

6 KIRJALLISUUSVIITTEET

1. Holler, J.; Skoog, D.; Crouch, S. *Principles of Instrumental Analysis*, 6. painos.; Thomson Brooks/Cole, **2007**.
2. Riekkola, M.; Hyötyläinen, T. *Kolonnikromatografia Ja Kapillaarielektromigraatiotekniikat*, 2. painos.; Helsingin Yliopisto, **2002**.
3. Haddad, P. Ion Chromatography: principles and applications, Chapter 7 Ion-Exclusion Chromatography. *Journal of Chromatography Library* **1990**, 46 (C), 195–222. [https://doi.org/10.1016/S0301-4770\(08\)61139-2](https://doi.org/10.1016/S0301-4770(08)61139-2)
4. LaCourse, M. E.; LaCourse, W. R. *General Instrumentation in HPLC*; **2017**; 1. painos. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805393-5.00017-8>
5. Snyder, L. R.; Glajch, J. L.; Kirkland, J. J. *Practical HPLC Method Development*, 2. painos.; Wiley: Hoboken, NJ, USA, **1997**.
6. Zhang, K.; Kurita, K. L.; Venkatramani, C.; Russell, D. Seeking Universal Detectors for Analytical Characterizations. *J Pharm Biomed Anal* **2019**, 162, 192–204. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.09.029>
7. Urban, P. L. Clarifying Misconceptions about Mass and Concentration Sensitivity. **2016**. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.5b00986>
8. Fanali, S.; Haddad, P. R.; Poole, C. F.; Schoenmakers, P.; Lloyd, D. *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*; **2013**. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-68614-7>
9. Harwood, L. M.; Claridge, T. D. W. Introduction to Organic Spectroscopy. **1997**, 91.
10. Clayden, J., Greeves, N. Warren, S. *Organic chemistry* (2. tarkistettu painos). Oxford University Press. **2012**.
11. Magnusson, L. E.; Risley, D. S.; Koropchak, J. A. Aerosol-Based Detectors for Liquid Chromatography. *J Chromatogr A* **2015**, 1421, 68–81. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.045>
12. Harris, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*, 7. painos.; Freeman, **2007**.
13. Lucena, R.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. Evaporative Light Scattering Detection: Trends in Its Analytical Uses. *Anal Bioanal Chem* **2007**, 388 (8), 1663–1672. <https://doi.org/10.1007/S00216-007-1344-6/TABLES/3>
14. Megoulas, N. C.; Koupparis, M. A. Twenty Years of Evaporative Light Scattering Detection. <http://dx.doi.org/10.1080/10408340500431306> **2007**, 35 (4), 301–316. <https://doi.org/10.1080/10408340500431306>
15. Restuccia, D.; Spizzirri, U. G.; Puoci, F.; Clodoveo, M. L.; Picci, N. LC with Evaporative Light-Scattering Detection for Quantitative Analysis of Organic Acids in Juices. *Food Anal Methods* **2017**, 10 (3), 704–712. <https://doi.org/10.1007/S12161-016-0628-X/TABLES/3>
16. Schiller, M.; von der Heydt, H.; März, F.; Schmidt, P. C. Quantification of Sugars and Organic Acids in Hygroscopic Pharmaceutical Herbal Dry Extracts. *J Chromatogr A* **2002**, 968 (1–2), 101–111. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00949-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00949-4)

17. Lendi, B. E.; Meyer, V. R. The UV Detector for HPLC - An Ongoing Success Story. *LC-GC Europe* **2005**, *18* (3), 156–163.
18. Chen, S. F.; Mowery, R. A.; Castleberry, V. A.; Walsum, G. P. van; Chambliss, C. K. High-Performance Liquid Chromatography Method for Simultaneous Determination of Aliphatic Acid, Aromatic Acid and Neutral Degradation Products in Biomass Pretreatment Hydrolysates. *J Chromatogr A* **2006**, *1104* (1–2), 54–61. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2005.11.136>
19. Pereira, V.; Câmara, J. S.; Cacho, J.; Marques, J. C. HPLC-DAD Methodology for the Quantification of Organic Acids, Furans and Polyphenols by Direct Injection of Wine Samples. *J Sep Sci* **2010**, *33* (9), 1204–1215. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900784>
20. Scarlata, C. J.; Hyman, D. A. Development and Validation of a Fast High Pressure Liquid Chromatography Method for the Analysis of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation Products. *J Chromatogr A* **2010**, *1217* (14), 2082–2087. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2010.01.061>
21. Rahayu, D. U. C.; Nurani, D. A.; Rochmah, L. N. H.; Antra, N. F.; Krisnandi, Y. K. A Hierarchical MnOx/ZSM-5 Heterogeneous Catalyst for the Conversion of Cellulose from Mahogany Wood to Levulinic Acid. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng* **2019**, *496* (1), 012055. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/496/1/012055>
22. Xie, R.; Tu, M.; Wu, Y.; Adhikari, S. Improvement in HPLC Separation of Acetic Acid and Levulinic Acid in the Profiling of Biomass Hydrolysate. *Bioresour Technol* **2011**, *102* (7), 4938–4942. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2011.01.050>
23. Rumble, J. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, electronic version, 102. painos, **2021**, [Viitattu 14.10.2022]. <https://tinyurl.com/mupxz888>
24. Thapa, I.; Mullen, B.; Saleem, A.; Leibig, C.; Baker, R. T.; Giorgi, J. B. Efficient Green Catalysis for the Conversion of Fructose to Levulinic Acid. *Appl Catal A Gen* **2017**, *539*, 70–79. <https://doi.org/10.1016/J.APCATA.2017.03.016>