Derivatizace

Většina derivatizačních reakcí – v kapalném fázi (homogenní prostředí) často v tzv. reaktoru (standardizované) např. Pico-Tag
čistě chemické reakce (viz předchozí), také der. postupy zprostředkované enzymatickou reakci

před- a **post**-kolonová reakce

je-li derivatizační reaktor stabilní součástí chromatografu, označuje se spojení „on-line“ x „off-line“ alespoň výhledově se bude použití on-line metod stále více rozšiřovat, i když samozřejmě jejich použití není univerzální. Asi největší překážkou k jejich většímu využití je přístrojová náročnost a samozřejmě cena. Z hlediska přípravy vzorku vyžadují mnohem menší objemy vzorků, na druhou stranu však nejsou všechny v současnosti používané techniky vhodné k těmto účelům (např. extrakce kapalina-kapalina). Materiály pro on-line kombinaci bývají dražší, na druhou stranu jsou nižší náklady na chemikálie, např. rozpouštědla a výhodnější je menší časová náročnost.

Předkolonová derivatizace

off-line umožňuje drastické podmínky; není časové omezení; nemusí být 100%, ale reprodukovatelná; derivatizační činidlo mísitelné s mob. fází nebo odstranit = rozpustný pouze analyzovaný produkt; off-line lze použít ke zvýšení hydrofobicity a tím z hydrofilní matrice izolovat analyty, jež jsou předmětem zájmu, snadněji než bez derivatizace

on-line podmínky
a) der. činidla v mob. fázi netěkavá a chemicky stálá
b) vznikající produkty rozpustné v mob. fázi
c) musí probíhat v malém objemu
d) relativně rychlé

výhody: menší množství vzorku

nevýhoda: všechny složky systému, tj. derivatizační reagencie, rozpouštědla a všechny produkty rozpustné v dané mobilní fázi a eluovatelné daným analytickým systémem

Postkolonová derivatizce

off-line zřídka používané – jímání frakcí, obtížná automatizace (stanovení fosfátu ve fosfolipidech). Bohužel k tomuto systému off-line jsme velmi často tlačeni přístrojovou dostupností (např. MALDI, ale i NMR atd.)

on-line v současnosti nejběžnější spřažení metod (viz dále); tyto kombinace zachovávají separační účinnost použité analytické metody, kterou jinak velmi potlačíme systémem off-line (sběrem frakcí)

Derivatizace biol. vzorků v homogenním prostředí – problematická (tvorba sraženin) = úprava před analýzou (viz předchozí přednáška) nebo derivatizace na pevné fázi (zakotvena na nosiči)

Postkolonové reaktory

Výhody:
1. použít publikované separační postupy
2. vznik vedlejších produktů není tak závažný jako u předkolonové derivatizace
3. reakce nemusí probíhat kvantitativně a reakční produkty nemusí být stálé. Reakce ale musí být reprodukovatelná, potřebujeme 2. čerpadlo

A) Otevřený tubulární reaktor
Nejjednodušší – trubička (skleněná, křemenná, nerez. ocel, polytetrafluoroethylen – PTFE) stočená do kruhu nebo podobně, ještě lepší spirálně stočený. Rychlé reakce (do 1 min), při použití „spletených“ reaktorů (spletená vlákna) až několik minut

B) Náplňové reaktory
trubice z nerez. oceli plněná nosičem (většinou skleněné perličky 10-15 µm), reakční doba 0,5-4 min). Dnes: spíše aktivní nosič než inertní materiál – ionexy, redoxní činidla, nosiče obohacené katalyzátorem nebo nosiče s imobilizovanými enzymy = označ. reaktory s tuhou fází

C) Reaktory se segmentovaným tokem
v analyzátorech s kontinuálním průtokem (1969 - AA) Přerušení, segmentace, sloupce protékající kapaliny vzduchem nebo inertním plynem brání difůzi separované zóny. K segmentaci lze také použít nemísitelné kapaliny (voda-organika).

2 nejdůl. faktory ovlivňující účinnost reaktoru jsou smáčivost stěny a segmentační frekvence. Lze využít reakce probíhající až desítky minut

použití v praxi zejména tam, kde fungují jako extrakční soustava

velkou pozornost výběru rozpouštědel – smáčivost trubice má velký význam na účinnost zařízení před vstupem do detektoru je třeba odstranit segmenty plynu (org. kapaliny) – T separátory – využívají rozdílné povrchové smáčivosti různých materiálů (PTFE-sklo; vatička PTFE)

membránové separátory – nejdřív PTFE membrána, nyní sendvič (střední část z PTFE, obě sousední z oceli)

D) Reaktory z porézních a dutých vláken
odstraňují problém vznikající z nedokonalého mísení efluentu s reagenciemi, minimální příspěvek k rozšíření separovaných zón

vlákna (trubičky) ze spletených PTFE vláken v nádobce plněné vhodným činidlem (např. alkalizace NaOH — konverze na UV absorbující produkty)

E) Fotochemické reaktory
nefluoreskující na fluoreskující nebo elektroaktivní produkty

kapilára – křemenná, temperovaná (teplotní fluktuace – reakční kinetika)

F) Zdvojené reaktory
každý reaktor na jiném principu
1 – ohřátím k hydrolýze
2 – ozářením na fluoreskující produkty

G) Enzymové reaktory
zakotvená fáze na nosičích (agarosa, celulóza, polyakrylamid, sklo, silikagel) nejobvyklejší – úprava povrchu nosiče aminopropylem a následná aktivace glutaraldehydem, pak se koordinuje enzym jako ligand

Aplikace
zásadně rychlé reakce

Redoxní reakce – pro elekrochemickou detekci (amperometrie, coulometrie, potenciometrie) nebo pro přímé převedení analytu na fluoreskující sloučeninu
vitamin K — redukcí vyniká hydrochinon (flourimetricky)
postkolonová generace jodu nebo bromu – I nebo Br reagují se separovanými látkami a přebytek halogenu je detekován amperometricky
často používána je postkolonová oxidace vedoucí ke vzniku fluoreskujících produktů
aminocukry – redukční vlastnosti, např. redukují měďnatou sůl bis(1,10-fenanthrolinu), vzniklý bis(1,10-fenanthrolin) měďný se amperometricky reooxiduje na Ag/AgCl elektrodě

Hydrolytické reakce
např. kortisol na fluoreskující produkty účinkem HCl

Chemiluminiscenční reakce
citlivé a selektivní stanovení řady látek vázaných (hydrofobně) na bílkoviny nebo fosfolipidy
3 systémy využívající: 1) deriváty kys. šťavelové (peroxyoxalátová), 2) lucigenin, 3) luminol

Termálně iniciované reakce
AA – ninhydrin

Komplexotvorné reakce
pomalé = málo rozšířené nepřímá fluormetrie iontů kovů (viz následující přednáška o stanovení kovů

Postkolonové on-line derivatizační reakce
viz tab.

Enzymové reakce
Imobilizované enzymy (předkolonové úpravy), např. β-glukoronidáza k analýze estriolových glukuronidů → produkt estriol