

Derivatiseerimine

HPLC kontekstis

Sissejuhatus

- Derivatiseerimine on proovide ettevalmistuse või kromatograafilise analüüsi etapp, mille käigus viiakse analüüdiga läbi reaktsioon, mis muudab analüüdi analüüsiks sobivamaks.

2

Eesmärgid

- Selektiivsuse (lahutuse) parandamine
 - Nt iooniliste ainete lahutamiseks pöördfaaskromatograafiliselt
- Detekteeritavuse (tundlikkuse) parandamine
 - Nt kromofoori või fluorestseeruva rühma lisamine analüüti
- Optiliste isomeeride lahutamine
 - vt vastavad loengumaterjalid
- GC puhul – lenduvuse parandamine
 - vt GC derivatiseerimise loengu materjalid

3

Eesmärgid



- Retentsiooni suurendamine
- Analüüdi viimine vormi, kus saab kasutada eraldamiseks pöördfaaskromatograafiat
- Analüütide lahutuse parandamine
- UV-Vis
- Fluorestsents
- ESI/MS

4

Režiimid

- Kolonneelne
 - reagent lisatakse tavaliselt käsitsi viaali. Reaktsioonitingimusi (solvent, temperatuur, aeg) on lihtsam kontrollida. Derivaat peab olema küllalt stabiilne.
- Kolonnijärgne
 - derivatiseeriv reagent lisatakse pärast analüütilist kolonni teise HPLC pumba abil. Automaatne, reaktsioon peab olema kiire ja eluendiga sobiv.

5

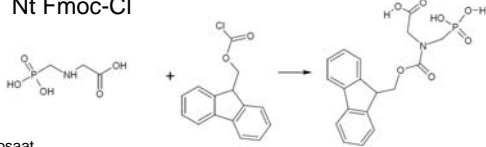
Reaktsioonid

- Oksüdeerimine ja redutseerimine on kasutamiseks enamasti liialt mittespetsiifilised
- Põhiliselt kasutatakse liitumisreaktsioone
 - Elektrofiilne reagent ei sobi hästi bioloogiliste proovide otseseks derivatiseerimiseks, kuna bioloogilised proovid sisaldavad hulgaliselt nukleofiile (nt vesi).
 - Nukleofiilseid reagente kasutatakse rohkem, kuna on spetsiifilisemad ja stabiilsemad vees

6

Kromatograafia muutmine

- Ioonsed/ioniseeruvad ühendid
 - Nt aminohapped
- Nt Fmoc-Cl



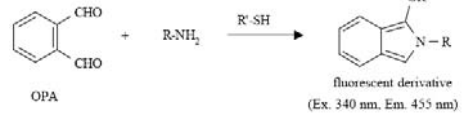
Glüfosaat
Enim kasutatav pestitsiid
Väga polaarne, elueerub
pöörfaaskolonnist surnud
ajal

Fmoc-Cl

Saadus on märksa
suurema hüdrofoobse
osaga ning määramiseks
saab kasutada
pöörfaaskromatograafiat 7

Detekteeritavus

- UV-Vis
 - Molekuli tuleb sisse viia kromfoor
- Fluorestsents
 - Molekuli tuleb sisse viia fluorofoor
 - Fluorestsentsreagendid sobivad ka UV-Vis-ga määramiseks



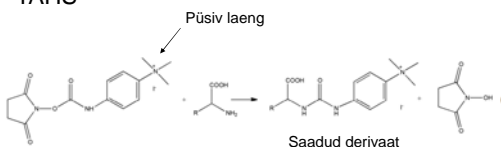
OPA

fluorescent derivative
(Ex. 340 nm. Em. 455 nm)

8

Detekteeritavus

- ESI/MS
 - Laeng
 - Hüdrofoobsus
- TAHS



TAHS

Aminohape
Võib olla ka amiin

9

Derivatiseerimise optimeerimine

- Reagendi kontsentratsioon
- Reagendi hulk
- Reaktsiooni keskkond
 - Solevent
 - pH
- Reaktsiooni aeg
- Produktide stabiilsus

10