

Derivatiseerimine

HPLC kontekstis

Sissejuhatus

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

Eesmärgid

- Selektiivsuse (lahutuse) parandamine
 - Nt ioniliste 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

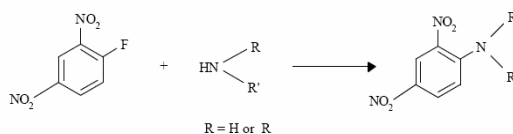
Režiimid

- Kolonnieelne
 - 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.

Reaktsioonid

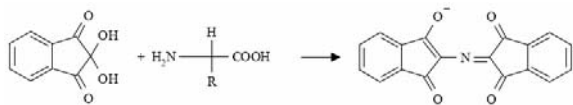
- Oksüdeerimine ja redutseerimine on kasutamiseks enamasti liialt mittespetsiifilised
- Põhiliselt kasutatakse liitumisreaktsioone
 - Elektrofiilne reagent ei sobi hästi bioloogiliste proovide otseseks derivatiseerimiseks, kuna bioloogilised proovid sisaldavad hulgaliselt nukleofiile (nt vesi).
 - Nukleofiilseid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

1-fluoro-2,4-dinitrobenseen, FDNB



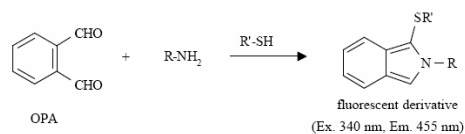
- Primaarsed ja sekundaarsed amiinid (alifaatne hüdrosüül)
- Reaktsioon aluselises keskkonnas
- UV-Vis detekteerimine
- Nt antibiootikumid gentamütsiin, tobramütsiin

Ninhüdriin



- Kolonnijärgne; UV-Vis (sini-violetne)
- Primaarsed amiinid, eriti α -aminohapped (va tsüsteiin)
- Suhteliselt väike tundlikkus, kuid on kujunenud klassikaliseks meetodiks automatiseeritavuse ja täpsuse tõttu.

o-ftaalaldehüd, OPA



- Fluorestsents, elektrokeemiline; kolonnieelne ja -järgne
- Aluselises keskkonnas, 2 minutit
- Reageerib primaarsete amiinidega, tavaline aminohapete korral
- Derivaadid vähepüsivad

Viiteid

- Sigma-Aldrich
 - http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/22084/H_PCL_Derivatization_Literature.pdf
- Pickering Laboratories
 - Kolonnijärgsele derivatiseerimise seadmetele ja meetodikatele spetsialiseerunud firma
 - <http://www.pickeringlabs.com>