

Kémiai reakciók szerepe az analitikai kémiában

GÖRÖG Sándor

Richter Gedeon Rt, 1475 Budapest, Pf. 27

1. Bevezetés

Összeállításunk célja rövid áttekintést adni a kémiai reakciók szerepéről a jelenkori analitikai kémiában. Hogy ez a kérdéskör ma, a fizikai elveken alapuló modern analitikai módszerek korában is aktuális, sőt új vonásokkal, alkalmazási lehetőségekkel gazdagodott, azt az is mutatja, hogy egy legújabb kiadású analitikai enciklopédia külön fejezetet szentelt a (származék-képzési) reakciók alkalmazásának¹. A tématerület rendkívül kiterjedt irodalma és a jelen dolgozat terjedelmi korlátai természetesen csak a fontosabb irányzatok bemutatását és vázlatos tárgyalásmódot tesznek lehetővé. Ugyanezen okokból az irodalomjegyzékben az olvasó elsősorban monográfiákat ill. fontosabb összefoglaló dolgozatokat talál; kísérletes munkákra csak néhány kivételes esetben hivatkozunk.

2. Történeti áttekintés

2.1. Klasszikus analitika

Kémiai reakciók alkalmazása az analitikai kémiában egyidős magával az analitikával². A klasszikus analitika módszerei közül a *titrimetria* a meghatározandó anyag és a mérőoldat reagense közötti gyors, gyakorlatilag pillanatszerű kémiai reakción vagy egy lassúbb de teljessé tehető reakción és a reagens felesleg visszatitrálásán alapul. Így pl. acetyl-szalicilsav titrimetriás meghatározására két lehetőséget is alkalmaznak: (1) direkt titrálás nátrium-hidroxid mérőoldattal nátrium-acetyl-szalicilat állapotig; (2) reakció nátrium-hidroxid feleslegével nátrium-szalicilat és nátrium-acetat állapotig, majd a reagens felesleg visszatitrálása sósav vagy kénsav mérőoldattal. Ez utóbbi módszert használják a legújabb gyógyszerkönyvek is^{3,4}. Hasonló megállapítás tehető a titrálások valamennyi formájára (sav-bázis, redox, csapadékos, komplexometriás titrálások)⁵. A titrálások végpontjának jelezésére az analitika klasszikus korszakában általában egy-egy második (színváltozással járó) reakció szolgált: ilyenek a sav-bázis reakciónál alkalmazott indikátoroknak a végpontban végbemenő protonálódási-deprotonálódási reakciói, redox indikátorok oxidációja-redukciója. Második reakciót használunk, pl. klorid ionok Mohr f. argentometriás titrálása során a végpont jelzésére: ez a titráló ágens feleslegbe kerülő ezüst ionjainak színes csapadékot eredményező reakciója kromát ionokkal. Ezüst ionok Volhard módszerrel történő meghatározása során az ezüst és rodanid ionok közötti, csapadék-képzéshez vezető titrálás után a második reakció a feleslegbe kerülő rodanid ionok és az indikátorként használt vas(III) ionok közötti, színes komplexhez vezető reakció. Ugyancsak színes komplexek képződésén, mint második reakción alapul a különböző fémionok komplexometriás titrálása, amikor a mérőoldat reagense a leggyakrabban etiléndiamin-tetraecetsavas nátrium⁵.

Természetesen kémiai reakciók képezték az alapját a szervetlen és szerves anyagok széles körére alkalmazható, oldhatatlan csapadék leválasztására, kiszűrésére és tömegének mérésére alapozott nagy pontosságú, de ma már jórészt inkább csak történeti szempontból jelentős *gravimetriás* módszereknek⁶.

2.2. A műszeres analitika új lehetőségei. Kémiai analízis kémiai reakciók nélkül?

A fizikai ill. fizikai-kémiai alapokon álló műszeres analitikai módszerek megjelenése az analitikai kémiában a 20. század elején és tömeges elterjedésük a század közepén⁷ az analitika lehetőségeinek rendkívüli mértékű kiterjesztésén túlmenően új helyzetet teremtett a kémiai reakciók felhasználását illetően is. Az analitika számos területén szükségtelemmé vált kémiai reakciók alkalmazása. Hogy csak néhány példát említsünk, kémiai reakciók alkalmazása nélkül elvégezhető az analízis a molekula-spektroszkópiás módszerek, pl. UV-látható spektrofotometria, infravörös, az egyre inkább önálló analitikai ágazatként megjelenő közeli infravörös (NIR), magmágneses rezonancia (NMR) spektroszkópia és a fluorimetria, a vékonyréteg-kromatográfia/denzitometria, hővezetőképességi detektorral végzett gázkromatográfia (GC), UV vagy fluorimetriás detektorral végzett nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfia (HPLC) és (kapilláris) elektroforézis (CE), alkalmazásával, számos ion meghatározása ionszelektív elektródok segítségével, stb. A kémiai reakció kiküszöbölése számos előnnyel jár, mint pl. az időben elhúzódó, egyensúlyra vezető és ezért nehezen teljessé tehető reakciókból fakadó nehézségek kiesése, drága reagens felhasználásának elkerülése, stb.

A műszeres analitika fejlődése során hamar nyilvánvalóvá vált azonban, hogy a kémiai reakciók az új helyzetben is nélkülözhetetlen eszközei a kémiai analízisnek. Itt nem elsősorban azokra az esetekre gondolunk, amikor kémiai reakció része a műszeres jelképzésnek (a vizsgált anyag elégeése a gázkromatográf lángionizációs detektorában, fragmentációja a tömegspektrometriás mérés során, csekély arányú átalakulásuk elektrokémiai műszerek elektródjának felületén, stb.). A korszerű, műszeres analitikai módszerek túlnyomó részének esetében a módszer alkalmazási lehetőségei nagymértékben kiterjeszthetők, szelektivitásuk, érzékenységük növelhető, ha a mérést kombináljuk egy, a jelképzés előtt végrehajtott kémiai reakcióval. Ez új helyzetet teremtett kémiai reakciók analitikai alkalmazása területén: a megfelelő reagens és reakciók kutatása, a reakciók optimális alkalmazási lehetőségeinek felderítése (on-line alkalmazások, automatikus, robotizált analizátorok) fontos kutatási területei a mai napig is az analitikai kémiának.

Ebben a tanulmányban a teljességre való törekvés nélkül összefoglaljuk a kémiai reakciók szerepét a

* Görög Sándor. Tel.: (1) 431-4620; Fax: (1) 431-5284; e-mail: s.gorog@richter.hu

jelenkori analitikai kémia néhány fontos ágazatában. Kémiai reakción nem csak a szó klasszikus értelmében vett reakciókat, kovalens, komplex és ionos kötés létrejöttét vagy átalakulását értjük, hanem gyengébb kölcsönhatásokkal jellemezhető adduktok létrehozását is. A modern analitikában (különösen a kromatográfiában és rokon területein) az analízis során alkalmazott reakciót általában származék-képzésnek (derivatizáció) nevezik⁸⁻¹⁵. Származék-képzésnek általában olyan reakciókat neveznek, amelyek során hozzáadunk a molekulához egy olyan molekularészt, ami a fenti követelményeknek megfelelően egy-egy módszer alkalmazási lehetőségeinek a vizsgált anyagra való kiterjesztése vagy a szelektivitás és érzékenység növelése céljából alakítja át a molekulát. Ez azt jelenti, hogy a származék-képzés során a molekula nagysága, kötési rendszerének bonyolultsága általában nő. Számos olyan, általunk korábban „retro-derivatizációs” nevezett módszer¹⁶⁻¹⁸ is létezik azonban, ahol a célt a molekula nagyságának növelése nélkül, sőt esetleg éppen csökkentése révén lehet elérni. Ilyen esetek, pl. a molekulák hidrolitikus hasítása, (jelentős) molekulatömeg változás nélkül végbemenő oxidációs vagy redukciós folyamatok, stb. Szélesebb értelemben ide sorolható a bioanalitika néhány fontos reakciótípusa, mint pl. metabolitok enzimatis vagy szolvolitikus dekonjugálása vagy biomakromolekulák enzimatis vagy hidrolitikus lebontása (szekvenálás, stb.).

3. Kémiai reakciók a jelenkori analitikai kémiában

3.1. Titrimetria

A kémiai reakciókra alapozott klasszikus analitika módszerei közül a titrimetria csekély szelektivitása ellenére mind a mai napig jelentős szerephez jut egyebek között a gyógyszer-analitika területén, ahol lehetőségei az utolsó félszázadban a nemvizes közegben végzett titrálások¹⁹ elterjedésének következtében még szélesedtek is. Ezen a területen a leglényegesebb változás az, hogy az indikátorok alkalmazását egyre inkább kiszorítja a műszeres, elsősorban a potenciometrikus végpontjelzés.

3.2. Spektroszkópiás és spektrofotometriás módszerek

3.2.1. Ultraibolya-látható spektrofotometria²⁰⁻²⁴

Ez a műszeres módszer terjedt el a legkorábban és a legnagyobb mértékben az analitikai gyakorlatban. A fejlődés azonban itt sajátos helyzetet teremtett. Bár spektrumok felvételére és kvantitatív mérésre is alkalmas spektrofotométerek már az 1910-es években rendelkezésre álltak, tömeges alkalmazásra a század közepéig csak a látható spektrumtartományban működő, szűrős fotométerek kerülhettek. Ezek használatának természetesen előfeltétele volt a meghatározandó színtelen anyagok átalakítása színes vegyületekké. A fotometria/kolorimetria aranykorának az 1920-as – 50-es évek tekinthetők. Ekkor dolgozták át a szerves és szerves anyagok széles körének kimutatására/azonosítására már korábban rendelkezésre álló és széles körben felhasznált színreakciókat kvantitatív analitikai célokra. Példaként megemlíthetjük vas(III) ionok meghatározását rodanid komplex alakjában, szalicilsav meghatározását vas(III) komplexe formájában aromás aminok ill. fenolok meghatározását diazotálás és azo-

kapcsolási reakció után, alkaloidok meghatározását pikráttá való átalakítás után. Számos új módszert is kidolgoztak ezekben az évtizedekben.

A 20. század második felében új helyzet alakult ki a kémiai reakciókra alapozott spektrofotometriás módszerek területén. A széles körben elterjedt ultraibolya spektrofotométerek igen sok esetben feleslegessé tették a meghatározandó anyag előzetes kémiai átalakítását. Megfelelő UV spektrofotometriás aktivitással rendelkező anyagok analízise során (különösen a szelektivitást nagyban növelő, széles körben elterjedt deriváló egységek alkalmazása esetén) saját fényelnyelésükön alapuló módszerrel sokkal egyszerűbben és pontosabban lehet elvégezni a meghatározást. Mindazonáltal UV-inaktív anyagok analízise esetén vagy UV-aktív anyagoknál a szelektivitás és/vagy az érzékenység növelése, automata analizátorok, főként a FIA (flow-injection analysis) technika alkalmazása esetén mind a mai napig is alkalmaznak kémiai reakciókat.

Néhány példa a fém-analitika^{24,25} területéről vas(II) ill. vas(III) ionok meghatározása 2,2'-dipiridil vagy 1,10-fenantrolin ill. rodanid komplex formájában, számos fémion, mint pl. réz(II), ezüst(I), ólom(II), Zn(II) és Hg(II) mérése ditizon komplexük alakjában. UV-VIS-aktív komplexek képzésének jelentősége van szerves ionok indirekt UV detektáláson alapuló ion-kromatográfiás analízisében is.

Néhány, még a legújabb gyógyszerkönyvekben^{3,4} is alkalmazott, kémiai reakciókra alapozott módszer²¹ egyebek között szalicilsav szennyezés meghatározása acetyl-szalicilsavban vas(III) komplexe segítségével, alkaloidok és egyéb bázisok mérése különböző savas festékekkel végrehajtott ionpár képzés után, aromás aminok ill. fenolok meghatározása diazotálás és azo-kapcsolás után, 4-én-3-oxoszteroidok meghatározása izonikotinsav-hidraziddal való kondenzáció, redukáló α -ketol oldalláncot tartalmazó kortikoszteroidok indirekt meghatározása tetrazolium reagensek segítségével. A korábbi évtizedekben kidolgozott, rendkívül nagy számban rendelkezésre álló módszer azonban egészen rendkívüli esetektől eltekintve szükségtelenné teszi új módszerek kidolgozását; az elsősorban gyengébben felszerelt laboratóriumokból származó, időről-időre még jobb folyóiratokban is feltűnő új módszerek általában korszerűtlen, felesleges módszereknek tekinthetők²⁶. Nem vonatkozik ez a nagy szelektivitású enzimatis módszerekre²⁷, amelyek bizonyos, nagyobb dózisban alkalmazott gyógyszernek biológiai mintákban való, előzetes elválasztás nélküli meghatározását is lehetővé teszik.

3.2.2 Fluorimetria^{23,28}

Azok a vegyületek, amelyek nem rendelkeznek (megfelelően intenzív) saját fluoreszcenciával, megfelelő reagensek segítségével átalakíthatók fluoreszkáló származékokká, amelyek az UV-VIS spektrofotometriánál akár nagyságrendekkel nagyobb érzékenységű meghatározásukat teszik lehetővé.

Az ehhez vezető reakcióknak két alapvető típusa van.

1. A meghatározandó szerves vegyületet szerves reagensekkel, főként oxidálószerrel alakítjuk át

fluoreszkáló származékokká. Ilyen reakció, pl. morfin oxidációja ferricianid reagenssel pszeuromorfinná, ami nagy érzékenységgű, sőt szelektivitású meghatározását teszi lehetővé, számos rokon szerkezetű vegyület, mint kodein, dihidromorfin, diacetilmorfin, apomorfin ui. nem adja a reakciót. Hasonlóan nagy szelektivitás és érzékenység érhető el ugyanezzel a reagenssel B₁ vitamin meghatározása során tiokróm származékká való oxidációja után. Ide sorolhatók a nagy koncentrációjú ásványi savakat tartalmazó reagensekkel, pl. szteroidok analitikájában elérhető fluoescencia, ami számos klasszikus módszer alapját képezte.

2. Korszerűbbek azok a módszerek, amelyek során megfelelő funkcióscsoportot tartalmazó vegyületet fluoreszkáló reagens segítségével alakítunk át fluoreszkáló származékká. Mivel az esetek többségében ezeknek a reakcióknak direkt felhasználását a feleslegben levő reagens fluoescenciája lehetetlenné teszi, ezek alkalmazására általában kromatográfias és egyéb elválasztási módszerekkel kapcsolatban kerül sor. Kivétel, pl. a széles körben alkalmazott fluoesczkamin, ami maga nem, primer aminokkal képezett származéka azonban erősen fluoreszkál. Igen korszerű módszer a nagy szelektivitású idő-felbontású fluorimetria. Ennek alapját a meghatározandó vegyületet Eu(III) ionnal képzett, erősen fluoreszkáló, hosszú lecsengésű idejű komplexei képezik, amelyek fluoescenciája megfelelő berendezés segítségével elválasztható a gyors lecsengési idejű fluoescenciával rendelkező háttér és zavaró komponensek fluoescenciájától.

3.2.3. NMR spektroszkópia²⁹

Szerves vegyületek lazán kötött hidrogénjei (–OH, –NH, –COOH, savas –CH) cseréje deutériumra D₂O, CD₃OD, CF₃COOD, stb. a fenti csoportok és környezetük NMR jeleinek aszignálására szolgáló rutinmódszerek közé tartozik. A „shift reagensekkel” mint Eu(acetilaceton)₃ ill. más európium komplexekkel való komplexképzés is fontos eszköze az NMR spektroszkópiás szerkezet-felderítésnek. Királis ligandokat tartalmazó Eu(III) komplexekkel vagy ciklodextrinnel való kölcsönhatás királis vegyületek enantiomer feleslegének mérését, akár tized százalék nagyságrendű enantiomer szennyezés mennyiségi meghatározását is lehetővé teszi³⁰.

3.2.4. Tömegspektrometria

A tömegspektrometriás analízis lehetőségeit kiterjesztő származék-képzési reakciókat a gázkromatográfiával ill. nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfiával (HPLC) kapcsolt tömegspektrometria kapcsán később tárgyaljuk.

3.3. Kromatográfias és elektroforetikus módszerek

3.3.1. Planáris kromatográfia

A csak ritkán használt, kromatografálást megelőző származék-képzési reakciónál sokkal fontosabb a kromatográfiasan elválasztott anyagoknak a rétegen való reagáltatása különböző, elsősorban permetezéssel vagy bemártással, esetleg gázfázisban alkalmazott reagensekkel^{31,32}. Ezek célja a foltok láthatóvá tétele ill. az elválasztott vegyületek átalakítása olyan színes ill.

fluoreszkáló származékokká, amelyek nagyban növelik a detektálás vagy a denzitometriás kvantitatív mérés szelektivitását és érzékenységet. Az alkalmazott számtalan reagens közül megemlíthetjük pl. nátrium-tetraiodobizmutát (Dragendorff reagens) alkalmazását alkaloidokra és kvaterner ammónium vegyületekre, 4-dimetilamino-benzaldehidet primer aminokra és aminosavakra, 2,4-dinitro-fenilhidrazint aldehidekre és ketonokra, ninhidrint aminosavakra és néhány antibiotikumra, fluoesczkamin primer és szekunder aminokra, foszformolibdénsavat lipidekre, szteroidokra és más vegyületekre, klórgázos kezelést követő kálium-jodid/keményítő bepermetezést aminokra és amidokra. Ezeknek a reakcióknak a mechanizmusa többé-kevésbe egyértelmű és jól definiált. Nem mindig mondható el ugyanez a szteroidok és más szerves vegyületek analitikájában gyakran használt, igen intenzív színekhez ill. fluoescenciához vezető, meglehetősen tömény savakat (kénsav, kénsav/vanillin, foszforsav) ill. Lewis savakat (aluminium-klorid, antimon(III)-klorid) tartalmazó reagensekről.

3.3.2. Gázkromatográfia és GC/MS^{9-11,13,16,33}

A szerves vegyületek jelentős része előzetes kémiai reakció alkalmazása nélkül is gázkromatografálható. A származék-képzésnek mégis nagy a jelentősége itt és a tömegspektrometriával kapcsolt gázkromatográfiában (GC/MS) is, mivel így a poláris csoportok blokkolása révén a vegyületek szélesebb körében válnak alkalmazhatóvá ezek a módszerek. Ilyen módon ui. növelhető az illékonyág és javítható a csúcsalak, bizonyos esetekben javítható a szelektivitás és a detektálás érzékenysége is.

Alkoholok és fenolok legáltalánosabban alkalmazott származék-képzési reakciója a szililezés (leggyakrabban trimetil-szililezés). A klasszikus reagenspár a hexametil-diszilazán/trimetil-klórszilán. Sztérikusán gátolt hidroxilcsoportok szililezésére számos reagent használják, mint pl. *N,O*-bis(trimetilszilil)acetamid ill. -trifluor-acetamid, *N*-metil-*N*-trimetilszilil-trifluoracetamid, trimetilszilil-imidazol, stb. A nagy intenzitással jelentkező (M-57)⁺ csúcs jelentkezése miatt a kvantitatív GC/MS analízisben célszerű a trimetilszilil csoport helyettesítése *t*-butil-dimetilszilil csoporttal. Fontos származék-képzési reakció az acetilezés ill. trifluor-acetilezés vagy heptafluor-butirilezés a megfelelő savanhidridekkel. Az utóbbiakkal végzett reakció lehetővé teszi a származékok nagy érzékenységgű mérését elektronbefogós detektorral.

Lényegében ugyanezeket a reagenseket használják primer és szekunder *aminok* derivatizálására is. A szililezés *karbonsavak* észterezésére is alkalmas reakció, a szilil-észterek gyenge hidrolitikus stabilitása miatt azonban ebben az esetben inkább metil-észtert képeznek vagy metanol/sósav reagenssel emelt hőmérsékleten, vagy diazometánnal. Kétszeres származék-képzést használnak, pl. *aminosavak* esetében, ahol a karboxilcsoportot észterezik, az aminocsoportot pedig acilezik, ill. az *epesavaknál*, ahol a karboxilcsoportot észterezik, a hidroxilcsoportokat pedig szililezik.

Kiseb mértékben ugyan, de szervesetlen anyagokat is gázkromatografálhatóvá tesznek kémiai reakciók segítségével. Így pl. anionokat pentafluorbenzil-p-

toluolszulfonát, számos fémiont pedig fluorozott β -diketon kelát-képző reagensek segítségével tettek illékonyá.

3.3.3. Nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfia (HPLC) és HPLC/MS^{7,9,10-14,34}

A HPLC módszer számos esetben érvényesülő előnye a korábban kifejlesztett gázkromatográfiával szemben az, hogy a módszer alkalmazhatóságának nem szab gátat a molekula nagysága és illékonyága. Ezért ilyen indokok nem teszik szükségessé a származék-képzést. Ennek azonban elsősorban az érzékenység növelése céljából és más, a következőkben tárgyalandó okokból mégis nagy a jelentősége ezen a területen is.

Lényegében valamennyi, a következőkben ismertetendő módszer esetében a származék-képzést elvégezhetjük az injektálást megelőzően ill. az oszlopról való eluálódás után is (*pre-* ill. *post-column derivatization*). Az első esetben a reakciót elvégezhetjük *off-line* módszerrel, a kromatografálást megelőzően, attól térben is elválasztva, valamint *on-line* módszerrel az injektor elé beépített reaktorban. Az utólagos származék-képzés az oszlop után elhelyezett reaktorban játszódik le. Ez utóbbira jó példa a széles körben használt aminosav-analizátor, ahol az oszlopról eluálódott aminosavakat alakítják át színes, jól mérhető származékká. A származék-képzési reakciók általában homogén folyadékfázisban játszódnak le, de számos esetben alkalmaznak a reagenst szilárd fázison immobilizált formában tartalmazó reaktorokat is.

Bár az UV-aktivitást növelő származék-képzés, mint az *UV detektorral* végzett HPLC analízis érzékenységét növelő módszer egyidős magával a HPLC technikával, erre a célra ezt a módszert ma már csak ritkán alkalmazzák. Ennek oka az, hogy az UV detektálás érzékenysége még ebben a megnövelt formában sem mérhető össze a későbbiekben tárgyalandó fluorimetriás vagy főként tömegspektrometriás detektorral kapcsolt HPLC berendezés érzékenységével. A nagyszámú módszer közül a legfontosabbak hidroxil vegyületek átalakítása aroil észterekké vagy fenil-karbamát származékokká, karbonsavak fenacil-észter származékainak elkészítése, oxocsoportot tartalmazó vegyületek átalakítása különféle nitro-fenilhidrazonokká valamint primer és szekunder aminokból dinitro-fenilamin vagy fenil-tiokarbamid származékok előállítására.

A *fluoreszcenciás detektorral*^{28,34} akár több nagyságrenddel érzékenyebb detektálás is elérhető, mint az UV detektorral, ami a pg-ng/ml koncentrációtartományban való mérés lehetőségeinek megteremtésével lehetővé teszi a modern bioanalitika igényeinek kielégítését. Mivel a szerves vegyületek túlnyomó többsége nem rendelkezik az ehhez szükséges erősségű natív fluoreszcenciával, az esetek túlnyomó részében a meghatározandó vegyületeket átalakítják erősen fluoreszkáló származékokká. Megjegyzendő, hogy a direkt fluoreszcenciás meghatározást lehetővé tevő reagensek köréhez képest itt sokkal szélesebbek a lehetőségek, hiszen ez esetben természetesen nem zavar a feleslegben alkalmazott, önmagában is erősen fluoreszkáló reagens. A kereskedelmi forgalomban levő, száznál több reagens közül csak néhány fontosabbat említünk meg. *Hidroxilcsoportot* tartalmazó vegyületeket, pl. 1- vagy 9-antioil-nitrillel alakítják át antioil-észter

származékká. Ugyancsak észtercsoportot alakít ki a karboxilcsoport derivatizálására alkalmazott 4-brómmetil-7-metoxi-kumarin. *Oxocsoportot* tartalmazó vegyületeket fluoreszkáló hidrazonná lehet átalakítani danzil-hidrazin segítségével. Primer *aminocsoportot* tartalmazó vegyületeket (így pl. aminosavakat) o-ftáldaldehyd + különféle tiol reagenspárral alakítják át izoindol származékokká. Primer és szekunder aminok derivatizálására egyaránt alkalmas a danzil-klorid, fluoreszkamin és a 9-fluorenil-metil-kloroformát. Ez utóbbival karbamát származékot, míg a *tiolok* derivatizálására használt bróm-bimán reagensekkel bimán-szulfidokat alakítanak ki.

A lézer-gerjesztésű fluoreszcenciás detektorok különösen érzékeny meghatározásokat tesznek lehetővé³⁴. Itt említést érdemel a vörös vagy közeli infravörös gerjesztő fényt alkalmazó dióda-lézeres detektor. Ennek alkalmazása reaktív festék származékokkal (pl. dikarboicinok) való derivatizálást tesz szükségessé³⁵.

A *tömegspektrometriás detektálás* az elmúlt években uralkodóvá vált minden olyan esetben, amikor a nagy szelektivitás mellett nagy érzékenységre is szükség van (orvos-biológiai, környezeti analitikai, élelmiszeranalitikai stb. területek). Az ilyen esetekben általában nincs szükség a HPLC/MS analízist megelőző derivatizálásra. Bizonyos vegyületsoportok, pl. szteroidok esetén azonban az alkalmazott lágy ionizációs technikák nem biztosítják a nagy érzékenységhez szükséges mértékű ionizációt. Ilyen esetekben újabb elektromos töltéssel rendelkező vagy könnyen ionizálható csoportokat tartalmazó reagensekkel végeznek el derivatizációt. Így pl. alkoholokra 2-fluor-1-metil-piridinium-p-toluolszulfonát és ferrocenil-azid, ketonokra 2-nitro-4-trifluorometil-fenil-hidrazin vagy Girard T és P reagensek alkalmazását írták le³⁶.

Az ugyancsak nagy érzékenységet biztosító, de ritkábban alkalmazott származék-képzési módszerek közül megemlítjük az *elektrokémiai detektor* alkalmazási lehetőségeit kiszélesítő, redukálható vagy oxidálható csoportokat beépítő módszereket, valamint az izoluminol vagy lucigenin alkalmazását a *kemolumineszcenciás detektor* alkalmazásával kapcsolatban¹².

3.3.4. Kapilláris elektroforézis (CE) és rokon módszerek³⁴

A CE módszerrel természetesen csak elektromos töltéssel rendelkező vagy megfelelő pH-n ionizálható vegyületek vizsgálhatók. A módszer kiterjesztését eredményezte semleges molekulákra a micelláris elektrokinetikus kromatográfia (MEKC). Ennél kisebb, de nem elhanyagolható a jelentősége semleges molekulák (pl. szénhidrátok, szteroidok) származék-képzésének töltéssel rendelkező vagy ionizálható reagensekkel. Az előbbi vegyületsoportra példa 1-fenil-3-metil-pirazonnal³⁷, az utóbbira pedig a Girard P vagy T reagenssel való reakciójuk³⁸.

Gyakrabban használják a vizsgálandó vegyület kémiai átalakítását kromoforok ill. még inkább fluoroforok bevitelével a detektálás érzékenységének növelése céljából. E tekintetben az előző fejezetben leírtak általában vonatkoznak a CE technikára valamint a kapilláris elektrokinetikus kromatográfiára (CEC) és a micelláris elektrokinetikus kromatográfiára

(MEKC) is; ugyanazokat a reakciókat alkalmazzák, mint a HPLC derivatizáció esetében. Jól megválasztott reakciók alkalmazása esetén különösen lézergyesztésű fluorimetriás detektorral lehet rendkívüli érzékenységet elérni. Argon ion vagy hélium-kadmium lézer és tetrametil-rodamin-5-izocianát reagens segítségével pl. peptidek kimutatási határa 10^{-18} M/injektálásra volt csökkenthető³⁹. A már említett o-ftálaldehid/2-merkaptó-etanol reagenspárral izoindol származékokká való átalakítás után biogén aminok kapilláris elektrokromatográfiás vizsgálatát végezték el UV detektálással⁴⁰.

3.4. Immun-analitikai módszerek⁴¹

A bioanalitikában nagy jelentőségű immun-analitikai módszerekben is nagy a kémiai reakciók szerepe. A meghatározandó kis, önmagukban nem immunogén molekulákat (haptének) kovalens kötéssel fehérjékhez kötik szelektív és érzékeny meghatározásuk alapját képező antitestek termeltetése céljából. Egy újabb kémiai reakcióval előállítják a meghatározandó anyag jelzett származékát (radioaktív jelzés a radioimmunoassay ill. megfelelő egyéb jelzés az enzim-, fluoreszcenciás-, lumineszcenciás immunoassay, stb. számára). A mérés alapját a jelzett és a meghatározandó jelzetlen anyag között az antitesten való megkötődés során bekövetkező kompetíció képezi. A leírtakból következik, hogy a kémiai reakciókat ma (eltérően az immun-analitika hőskorától) már általában a kereskedelemben kapható „kit”-eket előállító cégeknél végzik el. Az enzim immunoassay módszerek esetében azonban a mérést az enzim aktivitásának spektrofotometriás vagy fluorimetriás mérésére alapozzák. Ilyen reakciók, pl. hidrogén-peroxid és 2-fenilén-diamin között lejátszódó, peroxidáz enzimmel katalizált és kinon-diimin kromoforhoz vezető reakció. Sokkal nagyobb érzékenység és szelektivitás érhető el, ha a hidrogén-peroxid reakciópartnerül a fenilecetsavat választjuk, a reakcióterméket glicinnel reagáltatjuk és a keletkező fluorofort a már említett időfelbontású fluorimetriával mérjük.

Itt jegyezzük meg, hogy a radioaktív izotópokkal jelzett vegyületek szintézise, ami természetesen már nem tekinthető analitikai tevékenységnek, számos, a bio-analitikában nagy fontosságú mérést tesz lehetővé.

3.5. Királis analitika

A jelenkori orvos-biológiai-gyógyszerészeti analitika egyik legfontosabb feladata *enantiomerek egymás melletti meghatározása* bonyolult biológiai közegben, de kényes feladat tiszta enantiomer formában forgalomba hozott gyógyszerek enantiomer tisztaságának meghatározása is.

Bár nagy számban állnak rendelkezésre kereskedelmi forgalomban levő *királis kromatográfiás állófázisok*, amelyek lehetővé teszik enantiomerek közvetlen elválasztását gázkromatográfián, vékonyréteg-kromatográfián, szuperkritikus fluid-kromatográfián, főként pedig a HPLC technikával, máig is nagy a jelentősége annak az általános módszernek, amire az jellemző, hogy az enantiomereket *homokirális reagens* segítségével átalakítják *diasztereomer* párrá, amelyek már akirális kromatográfiával is elválaszthatók^{42,43}.

Ennek a módszernek klasszikus, de mindmáig széles körben használt válfaja *kovalens kötés* létrehozása az enantiomerek és a homokirális reagens között. Ennek, a ma leginkább a HPLC elválasztást megelőző derivatizációnak reakciótípusai megegyeznek a HPLC/UV és fluorimetriás derivatizációnál leírtakkal. A kereskedelmi forgalomban kapható közel száz reagens közül különösen elterjedt *aminok/aminosavak* derivatizálására a Marfey reagens (1-fluor-2,4-dinitrofenil-L-alanin-amid), a (+)-1-(9-fluorenil)etil-kloroformát és az o-ftálaldehid/*N*-acetyl(vagy izobutiril)-L(vagy-D)-cisztein reagenspár. A *hidroxilcsoport* derivatizálására bevezetett reagensok közül megemlítjük az (*R,R*)-*O,O*-diacetyl(vagy di-*p*-toluyl)-borkősav-anhidridet, a *karboxilcsoport* homokirális reagensi közül pedig az (*S*)-(-)- α -metilbenzilamint és számos származékát.

A homokirális reagensekkel szemben támasztott fontos követelmény a nagy (legalább 99,9%-os) enantiomer tisztaság, nagyfokú enantiomer stabilitás és a kinetikus rezolválás kizárhatósága. Előny, ha a reagens mind a két enantiomer formájában rendelkezésre áll; így ui. a megfelelő forma megválasztásával elérhető, hogy enantiomer tisztaság ellenőrzése esetén a kisebbik komponens a főcsúcs előtt eluálódjék. A detektálás érzékenysége szempontjából fontos, hogy a reagens megfelelő UV ill. fluoreszcenciás tulajdonságokkal rendelkezzen.

A kovalens derivatizálásnál nagyobb a jelentősége annak a megoldásnak, amikor a homokirális reagenst feloldják az eluensben és ott *dinamikus addukt-képzési* reakció valósul meg az eluens áramba injektált enantiomerek és a reagens között. Az így kialakuló diasztereomerekben természetesen nem kovalens kötések alakulnak ki, hanem elektrosztatikus, hidrofób kölcsönhatások, hidrogénhidak, stb. kapcsolják össze az elválasztandó enantiomereket a homokirális reagensszel. Az akirális kromatográfiás elválasztást elsősorban a kialakuló diasztereomerek stabilitási állandói közti különbségre alapozzák. A diasztereomer ionpár képzésen alapuló módszer gyakran használt reagensi, pl. a 10-kámfor-szulfonsav mindkét enantiomerje valamint a kinin. A számos semleges addukt-képző reagens közül a legnagyobb a jelentősége az α -, β - és γ -ciklodextrinnek (CD) és félszintetikus származékaiknak. Ezeket a reagenset elsősorban a HPLC módszerrel kapcsolatban használják, de nő jelentőségük a CEC és MEKC módszerek vonatkozásában is^{44,45}.

Ugyancsak elsősorban a ciklodextrineknek és származékainak köszönhető, hogy maga a kapilláris elektroforézis (CE) egyre inkább az enantiomer elválasztások legfontosabb módszerévé válik^{46,47}. Különösen kiterjesztette a lehetőségeket a ciklodextrinek elektromos töltést hordozó, anionos (pl. szulfobutil- β -CD, a korábban használt észterkeverékek helyett tiszta CD-kénsav-észterek⁴⁸) és kationos (pl. 2-hidroxi-propil-trimetilammónium- β -CD és 6-monamino-6-deoxi- β -CD) származékainak bevezetése és kereskedelmi forgalomba kerülése.

4. Összefoglalás

Áttekintjük a kémiai reakciók szerepének változásait az analitikai kémiában az azokra alapozott klasszikus korszaktól (titrimetria és gravimetria) napjainkig, amikor

a műszeres módszerek sok esetben lehetővé teszik a kémiai reakciók nélküli analíziseket. Rámutatunk arra, hogy a kémiai reakciók szerepe napjainkban a spektroszkópiás, kromatográfias, elektroforetikus és kapcsolt módszerek alkalmazási területének kiszélesítése, valamint érzékenységük és szelektivitásuk növelése. Rövid áttekintést adunk kémiai reakciók alkalmazásáról az ultraibolya-látható spektrofotometriában, fluorimetriában, NMR spektroszkópiában, immun-analitikában, planáris, gáz- és nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfias, kapilláris elektroforézisben és rokon módszereiben, különös tekintettel az elválasztási és spektroszkópiás módszerek összekapcsolására és a királis analitikai vonatkozásokra.

Hivatkozások

- Görög, S., Derivatization of analytes, in *Encyclopedia of Analytical Science* 2nd Ed., Worsfold, P., Townshend, A., Poole, C.F. Eds.; Elsevier: Amsterdam, **2004**.
- Szabadváry, F., *Az analitikai kémia módszereinek kialakulása*, Akadémiai Kiadó: Budapest, **1960**; *The history of analytical chemistry*, Pergamon Press: Oxford, **1966**.
- European Pharmacopoeia 4*, Council of Europe: Strassbourg, **2003**.
- United States Pharmacopoeia 27*, The USP Convention Inc., Rockville, **2004**.
- Wilson, C.L., Wilson, D.W. (Eds.), *Comprehensive analytical chemistry* Vol. 1B, *Classical Analysis*, Elsevier: Amsterdam, **1960**.
- Erdey, L., *A kémiai analízis súlyszerinti módszerei I-III.*, Akadémiai Kiadó: Budapest, **1960**; *Theorie und Praxis der gravimetrischen Analyse I-III.*, Akadémiai Kiadó: Budapest, **1964**; *Gravimetric Analysis I-III.* Pergamon Press: Oxford, **1965**.
- Ewing, G.W., *Analytical Instrumentation Handbook*, 2nd Ed., Marcel Dekker: New York, **1997**.
- Knapp, D.R., *Handbook of analytical derivatization reactions*, Wiley: New York, **1979**.
- Drozd, J., *Chemical derivatization in gas chromatography*, Elsevier: Amsterdam, **1981**.
- Frei, W., Lawrence, F., *Chemical derivatization in analytical chemistry*. Vol. 1,2 Plenum Press: New York, **1982**.
- Lingeman, H., Underberg, W.J.M. (Eds.), *Detection-oriented derivatization techniques in liquid chromatography*, Marcel Dekker: New York, **1990**.
- Blau, K., Halket, J.M., *Handbook of derivatives for chromatography*, Wiley: Chichester, **1993**.
- Krull, I.S., Deyl, Z. Lingeman, H., *General strategies and selection of derivatization reactions for LC*, *J. Chromatogr. B, Biomedical Applications*, Vol. 659. Elsevier: Amsterdam, **1994**.
- Lunn, G., Hellwig, L.C., *Handbook of derivatization reactions for HPLC*, Wiley: New York, **1998**.
- Toyo'oka, T., *Modern derivatization methods for separation sciences*, Wiley: New York, **1999**.
- Görög, S., Laukó, A., *Magy. Kém. Folyóirat*, **1986**, 92, 338.
- Görög, S., Rényi, M., Laukó, A., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1983**, 1, 39.
- Görög, S., Laukó, A., Rényi, M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1983**, 1, 497.
- Gyenes, I., *Titrationen in nichtwässrigen Medien*, Akadémiai Kiadó: Budapest, Enke Verlag: Stuttgart, **1970**.
- Knowles, A., Burgess, C. (Eds.), *Practical absorption spectrometry*, Chapman and Hall: London, **1984**.
- Sommer, L., *Analytical absorption spectrometry in the visible and ultraviolet*, Elsevier: Amsterdam, **1989**.
- Görög, S., *Spektrofotometriás gyógyszeranalízis*, Akadémiai Kiadó: Budapest, **1993**; *Ultraviolet-visible spectrophotometry in pharmaceutical analysis*, CRC Press, Boca Raton, **1995**.
- Gore, M.G., *Spectrophotometry and spectrofluorimetry: a practical approach*, 2nd Ed., Oxford University Press: Oxford, **2000**.
- Burger, K., *Organic reagents in metal analysis*, Akadémiai Kiadó: Budapest, Pergamon Press: Oxford, **1973**.
- Lobinski, R., Marczenko, Z., *Spectrochemical Trace Analysis of Metals and Metalloids*, Elsevier: Amsterdam, **1996**.
- Görög, S., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1998**, 4, 362.
- Bergmeyer, H.U., Gawehn, K. (Eds.), *Grundlagen der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie: Weinheim, **1977**.
- Ichinose, N., Schwedt, G., Schnepel, F.M., Adachi, K., *Fluorometric analysis in biomedical chemistry. Trends and techniques including HPLC applications*, Wiley: Chichester, **1991**.
- Sohár, P., *Mágneses magrezonancia spektroszkópia I-II*, Akadémiai Kiadó: Budapest, **1976**; *Nuclear magnetic resonance spectroscopy I-III*, CRC Press: Boca Raton, **1983**.
- Tárkányi, G., *J. Chromatogr. A*, **2002**, 961, 257.
- Stahl, E., Ashworth, M.R.F., *Thin-layer chromatography. A laboratory handbook* 2nd Ed., Springer: New York, **1990**.
- Cimpan, G.: Pre- and Post-Chromatographic Derivatization, in *Planar Chromatography*, Nyiredy, Sz. Ed., pp. 410-445. Springer: Budapest, **2001**.
- Berjozkin, V.G., *A gázkromatográfia kémiai módszerei*, Műszaki Könyvkiadó: Budapest, **1984**.
- Fukushima, T., Usui, N., Santa, T., Imai, K., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2003**, 30, 1655.
- Mank, A.J.G., van der Laan, H.T.C., Lingeman, H., Goojier, C., Brinkmann, U.A.T., Velthorst, N. H., *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 1742.
- Higashi, T., Shimada, K., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2004**, 378, 875.
- Honda, S., Suzuki, S., Taga, A., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2003**, 30, 1689.
- Görög, S., Gazdag, M., Kemenes-Bakos, P., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1996**, 14, 1115.
- Chen, C., Jeffery, D., Jorgenson, J.W., Moseley, M.A., Pollack, G.M., *J. Chromatogr. B., Biomed. Appl.*, **1997**, 697, 149.
- Oguri, S., Yoneya, Y., Mizunuma, M., Fujiki, Y., Otsuka, K., *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 3463.
- Gosling, J.P. (Ed.): *Immunoassays: a practical approach*, Oxford University Press: Oxford, **2000**.
- Görög, S., Gazdag, M., *J. Chromatogr. B.*, **1994**, 659, 51.
- Görög, S., Chiral Derivatization, in *Encyclopedia of Separation Science*, Wilson, I.D., Adlard, T.R., Poole, C.F., Cook, M., Eds.: pp. 2310-2321. Academic Press, London, **2000**.
- Chankvetadze, B., Kartoziya, I., Yamamoto, C., Okamoto, Y., Blaschke, G., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2003**, 30, 1897.
- Gazdag, M., Takács, T., Szöllösi, É., *Acta Pharm. Hung.*, **2003**, 73, 23.
- Chankvetadze, B., *Capillary electrophoresis in chiral analysis*, Wiley: Chichester, **1997**.
- Chankvetadze, B.: Separation of chiral compounds by CE and MEKC with cyclodextrins, in: *Encyclopedia of chromatography*, J. Cazes Ed., Marcel Dekker: New York, pp. 756-760, **2001**.
- Vigh, Gy., Sokolowski, A.D., *Electrophoresis*, **1997**, 18, 2331.

The role of chemical reactions in analytical chemistry

The changes of the role of chemical reactions in analytical chemistry are summarized from the classical period when titrimetry, gravimetry were associated with chemical reactions up to the present time when instrumental methods often enable analyses to be carried out without the application of chemical reactions. It is demonstrated that the role of chemical reactions in contemporary analytical chemistry is to enhance the application field of spectroscopic, chromatographic, electrophoretic and hyphenated methods and to increase their selectivity and sensitivity. The application of chemical reactions in UV-VIS spectrophotometry, fluorimetry, NMR spectroscopy, immunoassays, planar, gas and high-performance liquid chromatography, capillary electrophoresis and related techniques is briefly summarized with special respect to the hyphenation of spectroscopic and separation methods and chiral analysis.

Béérkezett: 2003. IX. 12.