

REAKTORY S TUHOU FÁZÍ V PRŮTOKOVÉ INJEKČNÍ ANALÝZE

DALIBOR ŠATÍNSKÝ a ROLF KARLÍČEK

*Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
e-mail: satinsky@faf.cuni.cz*

Došlo dne 6.III.2000

Klíčová slova: průtoková injekční analýza, reaktory s tuhou fází, přehled

Obsah

1. Úvod
2. Typy reaktorů s tuhou fází
 - 2.1. Enzymové reaktory
 - 2.2. Oxidačně-redukční reaktory
 - 2.3. Iontově výměnné reaktory
 - 2.4. Adsorpční reaktory
 - 2.5. Imunoafinitní reaktory
 - 2.6. Reaktory uvolňující činidlo
3. Závěr

1. Úvod

Technika průtokové injekční analýzy (FIA – Flow Injection Analysis) se stala během posledních dvou desetiletí velmi účinným a mnohostranným nástrojem zejména při zpracování většího počtu vzorků v agrochemických a biochemických laboratořích, při analýzách v oblasti životního prostředí, farmacie aj. Vzestupu využití této techniky bylo dosaženo díky jejím pozitivním analytickým vlastnostem, mezi které patří vyšší dosažitelná selektivita průtokové metody ve srovnání s jejím manuálním protějškem, která je výsledkem využití rozdílné kinetiky chemických reakcí probíhající v průtokovém systému. Velká univerzálnost techniky umožňuje modifikovat metodu způsobu, které zvyšují její citlivost (stopped flow analýza, opakovaný průchod vzorku přes detekční bod) nebo ji snižují (rozmyívání zón, ředění vzorku, změny průtokové rychlosti nebo objemu vzorku).

Přímo v průtokovém systému jsou pak kontinuálně prováděny jednotlivé analytické operace za účelem převedení vzorku do stavu vhodného k detekci např. oxidace, redukce, zakoncentrování, ředění, zahřívání aj.

Jednou z důležitých vlastností průtokových analyzátorů je možnost zapojení reaktorů s tuhou fází (SPR – Solid Phase Reactors) vhodně imobilizovaných v uzavřené koloně nebo v reakční cívce do těchto systémů.

Využitím SPR zapojených on-line do průtokového systému FIA analyzátoru se významně rozšiřuje potenciál průtokových metod zvýšením základních analytických parametrů jako jsou

citlivost a selektivita. Obecně se SPR využívají pro svou schopnost reagovat s analyzovanou látkou (enzymatické, imunologické, iontově výměnné, oxidačně-redukční reakce) na svém povrchu, nebo chovat se jako extrakční sorbenty (extrakce, mikroextrakce tuhou fází (SPE, SPME)), nebo uvolňovat reakční činidla¹.

2. Typy reaktorů s tuhou fází

Různé typy SPR, které mohou být kontinuálně začleněny do průtokového systému analyzátorů můžeme rozdělit do dvou skupin podle toho, zda se zúčastní chemické reakce či nikoliv.

Na povrchu prvního typu reaktorů probíhají chemické reakce, přičemž se nejčastěji využívají enzymatické, oxidačně-redukční, iontově-výmenné nebo imunochemické reakce. Příležitostně také reaktory slouží k vhodným oxidačně-redukčním reakcím, které daný analyt převedou na vhodnější oxidační stav analytu, který se pak snadněji účastní vlastní derivatizační reakce¹.

Pro jiné účely, než je zajištění derivatizačních reakcí slouží druhý typ reaktorů, které lze využít jako nosiče nebo extrakční fáze se sorpčními vlastnostmi. Tyto reaktory při jejichž kontaktu se vzorkem nedochází k chemické reakci, fungují jako adsorbenty buď analytu anebo matrice. Běžné typy těchto reaktorů obsahují silikagel, oxid hlinitý, chemicky vázané stacionární fáze, polyamid a další látky. Zvláštní kapitolu těchto reaktorů, u nichž nedochází k chemické reakci s analytem, tvoří materiály uvolňující činidlo.

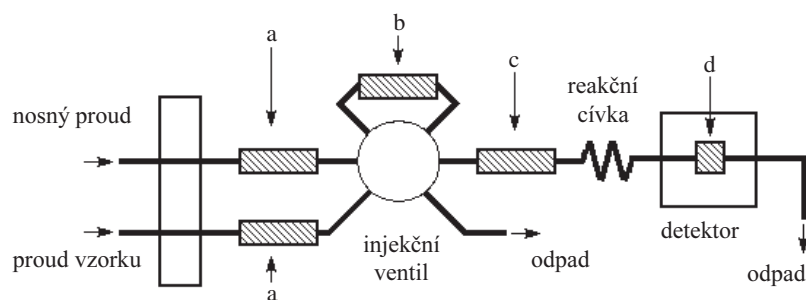
Podle vnitřního uspořádání mohou být SPR rozděleny do dvou obecných skupin:

- 1) otevřené tubulární reaktory, které mají reakční materiál imobilizovaný na stěně kolony. Jejich příprava je náročnější a s tím souvisí i jejich menší využití v analytické praxi,
- 2) plněné kolonové reaktory, které dosahují vyšší reaktivity následkem většího povrchu a tím i většího kontaktu analytu s reaktorem. Tyto reaktory vyžadují jednodušší přípravu a v praxi jsou také častěji využívány².

Jednou z dalších možností jak můžeme SPR klasifikovat, je způsob jejich zapojení do systému. To vyplývá z účelu jejich využití. Pokud reaktor slouží k oxidačně-redukční nebo derivatizační reakci, pak analyt procházející přes reaktor podstupuje reakci a opouští kolonu jako produkt, který je smísen se zbytkem vzorku.

Jestliže je kolona použita pro prekoncentraci nebo k odstranění interferencí z matrice, pak je analyt zadržen chemickými, fyzikálními nebo fyzikálně-chemickými silami na určité dobu kontaktem s povrchem materiálu, dokud matrice vzorku neopustí reaktor a je odvedena do odpadu. Následnou elucí dojde k vymytí analytu z kolony a k jeho detekci; tímto způsobem se zbavíme balastních složek vzorku a vyhneme se vzniku nežádoucích signálů v detektoru.

Pro FIA analyzátorů existují tedy různé možnosti umístění SPR v systému, které vychází z materiálu a funkce reaktoru



Obr. 1. Možnosti umístění reaktorů s tuhou fází v průtokovém systému FIA analyzátoru

v celém procesu. Obr. 1 naznačuje možné umístění reaktoru v průtokovém systému:

- před injekčním ventil, v nosném proudu nebo v proudu vzorku. Takové umístění reaktoru umožňuje odstranění nečistot přítomných v čídicích nebo je využíváno k uvolnění činidla. Umístění v proudu vzorku slouží k odstranění vlivu matrice a balastních látek přítomných ve vzorku, respektive pro prekoncentraci analytu³,
- ve smyčce injekčního ventilu, pro prekoncentraci analytu, k odstranění balastních látek ve vzorku, pro multianalytické stanovení nebo simultánní stanovení vzorku a blanku^{4,5},
- mezi injekční a detekční jednotku; nejobvyklejší umístění pro SPR v průtokové injekční analýze^{6,7}, s výše uvedenými záměry (viz a) a b)), avšak nejčastěji je takto umístěný reaktor využíván pro derivatizaci stanovované sloučeniny,
- v detekčním systému za účelem sjednocení reakce (retence) a detekce, a tím využití výhod jako zvýšení citlivosti, selektivity, miniaturizace atd., v tomto případě se používá speciální reaktor⁵.

2.1. Enzymové reaktory

Tyto reaktory zapojené on-line do FIA systému pracují s enzymy zakotvenými na nosičích.

Kromě toho, že použitím kolon obsahujících reaktory s imobilizovanými enzymy (IMER – Immobilized Enzyme Reactors), se snižuje výše nákladů na rutinní analýzu, poskytují tyto biokatalyzátory ještě další množství výhod, mezi které patří:

- požadované zjednodušení průtokového systému (eliminace použití dodatečného ventilu pro simultánní dávkování enzymu/vzorku),
- zvýšení citlivosti jako výsledek menšího rozmývání zóny vzorku na rozdíl od použití enzymu jako činidla v roztoku. Tato výhoda je nejvíce patrná při stanovení, které zahrnuje několik různých enzymatických kroků a po několika biokatalytických reakcích je problematické získat detegovatelný produkt. Pro tento účel je pak nejvýhodnější seriové seřazení několika reaktorů za sebou⁸.

Jako nejčastější nosiče enzymů jsou využívány agarosa, celulosa, polyakrylamid, nylon, sklo, silikagel, a někdy též ionexové pryskyřice. Nejrozšířenějším nosičem je sklo. Kovalentně navázaným enzymům se dává přednost před sorpční imobilizací, která představuje slabší vazbu enzymu, projevující se jeho postupnou desorpční.

Nejobvyklejším způsobem zakotvení je úprava povrchu nosiče aminopropylem a následná aktivace glutaraldehydem. Na takto upravený nosič se pak enzym koordinuje jako ligand.

Imobilizace enzymu probíhá přímo v reaktoru naplněném aktivním nosičem promýváním roztokem enzymu, obvykle několik hodin a při snížené teplotě.

Analytický využitelné enzymy jsou jako látky bílkovinné povahy citlivé na změny teploty a složení okolního prostředí a jejich výroba je poměrně drahá. Zakotvení těchto látek na kolonce reaktoru ve FIA systému vede ke snížení jejich spotřeby a umožňuje také opakovanou aktivaci uvnitř systému⁹.

Na druhé straně je však použití enzymových reaktorů omezeno několika faktory, mezi které patří především postupné klesání aktivity reaktoru v závislosti na čase, použitých reakčních činidlech a teplotě, desorpce enzymu, omezené použití drastických reakčních podmínek (pH, teplota, organická činidla, ionty těžkých kovů) z důvodu poškození enzymu samotného nebo jeho vazby na nosič. Při stanovení je nutné reaktor temperovat na konstantní teplotu pro zachování stejnoměrné aktivity enzymu a tím i reprodukovatelnosti měření.

Jako příklad využití enzymových reaktorů ve FIA může sloužit stanovení glukosy s pomocí imobilizované glukosa-oxidasy¹⁰ a následné reakce peroxidu vodíku s luminolem^{11–13}. V těchto pracích se kombinuje stanovení glukosy s dalšími látkami, laktátem a penicilinem. Při analýze samotného laktátu se využívá reakce enzymového systému dependentního na NAD^+ a vzniklý NADH se deteguje spektrofotometricky^{14–16}. Podobně probíhá i stanovení ethanolu produkovaného buněčnou kulturou, imobilizovaným enzymem je zde alkoholdehydrogenasa¹⁷, stanovení L-fenylalaninu v séru¹⁸, nebo močoviny v tělních tekutinách¹⁹. Další příklady použití enzymových reaktorů ve FIA jsou uvedeny v souhrnné tabulce I.

2.2. Oxidačně-redukční reaktory

Mikrokolony obsahující oxidační nebo redukční materiál jsou využívány v průtokových systémech z důvodu převedení analytu na vhodný oxidační stav pro následnou derivatizační reakci nebo oxidace či redukce analytu na požadovanou sloučeninu.

Oxidačně-redukční materiály jsou umístěny v kolonkách, do kterých jsou plněny samostatně ve formě prášku nebo granulátu o různé velikosti zrn, nebo jsou navázány na inertní nosič, kterým je pak kolona naplněna. Jako nosiče se běžně používají granulované sintrované sklo o velikosti částic několik desetin milimetru ošetřené epoxidovým lepidlem, které slouží k zachycení reakčního materiálu, nebo amberlitové pryskyřice různé zrnitosti (dowex, porovina aj.).

Tyto kolonky nejsou obvykle komerčně vyráběny, ale jsou připravovány přímo na pracovišti pro daný druh analýzy.

Jedná se většinou o pevné plastické hadičky o vnitřním průměru v rozmezí 0,5 mm až 2 mm, které jsou na obou koncích opatřené vatovou zátkou k zamezení vymývání materiálu z kolony. Materiál je do kolony plněn sypáním za sucha, častěji však nasáváním z vodné suspenze pomocí vakua.

Délka kolony pro daný typ stanovení se volí podle velikosti „oxidační“ resp. „redukční“ síly v ní obsaženého materiálu, přitom mezi veličinami platí nepřímá úměra. Účinnost reakční kolony závisí také na aktivním povrchu reaktoru tedy na velikosti částic. Délku reakční kolony je proto nutné optimalizovat vzhledem k její účinnosti a k velikosti částic, jelikož s rostoucí délkou a se snižující se zrnitostí stoupá i účinnost kolony, ale zároveň dochází k většímu rozmývání zóny vzorku a tím i snížení odezvy detektoru. Délka většiny reakčních kolon se pohybuje v rozmezí 0,5–20 cm.

Pro reprodukovatelnost měření je také důležitá rovnoměrnost plnění kolony. Při nerovnoměrném naplnění kolona obsahuje volné prostory, kterými analyt prochází, aniž by zregoval. Při náhodném vniknutí vzduchové bubliny do systému se vzduch zachytí ve volném prostoru a jeho následné uvolnění pak znehodnotí další měření.

Jednou z častých prací zabývajících se redukčními reaktory je stanovení dusičnanů založené na jejich redukci kadmíem na dusitany, které s Griessovým činidlem dávají měřitelnou barevnou reakci^{20–24}. Za pomoci redukčních reaktorů byly také přímo stanoveny i směsi dusitanů a dusičnanů. Princip stanovení spočívá v použití dvojitého injektoru, kterým je vzorek jediným nástřikem dávkován současně do dvou větví průtokového systému. V jedné větvi je zařazen průtokový reaktor s houbovým kadmíem, v němž probíhá redukce dusičnanů na dusitany. Dusitany původně přítomné ve vzorku i vzniklé redukci dusičnanů jsou převáděny na azobarvivo. První odezva detektoru odpovídá obsahu dusitanů a druhá odezva součtu obsahu dusitanů a dusičnanů ve vzorku²⁰.

Jako postkolonový reaktor ve spojení s HPLC byl použit např. oxidační MnO₂ reaktor ke stanovení paralytických toxinů mořských korýšů²⁵. K FIA stanovení oxidovatelných organických sloučenin ve vodných vzorcích byl použit PbO₂ oxidační reaktor vázaný na SiO₂ (cit.²⁶).

Mezi dalšími byly pomocí FIA s využitím oxidačních resp. redukčních reaktorů stanoveny např. obsahy léčiv, vitamínů

nebo iontů kovů převážně ve farmaceutických přípravcích^{7,27–45} (viz tab. I).

2.3. Iontově výměnné reaktory

Mikrokolony s iontově-výměnným materiálem zapojené on-line do průtokového systému se řadí k reaktorům, jejichž povrch se účastní chemické reakce s analytem, avšak svou funkcí patří k extrakčním reaktorům. Ve FIA systémech jsou využívány z důvodu:

- prekoncentrace analytu,
- odstranění interferencí z matrice vzorku použitím vhodného nosiče (anex nebo katex různé iontové síly, inertní nosič s imobilizovaným činidlem – obvykle chelátové skupiny). Toho lze dosáhnout použitím postupně seřazených reaktorů naplněných vhodným materiálem.

Nedostatkem tohoto typu mikroreaktoru je:

- nárůst kompaktnosti materiálu v koloně způsobené kontinuální cirkulací proudu stejným směrem,
- výskyt parazitických signálů v detektoru, po té co matrice vzorku prochází přes detektor během prekoncentračního procesu.

Oba nedostatky mohou být odstraněny jednoduchou změnou v průtokovém systému – umístěním reaktoru ve smyčce dávkovacího ventilu tak, aby retence probíhala v opačném směru než eluce.

Další nedostatek, který prodlužuje dobu analýzy a jež je způsoben časem určeným k prekoncentraci analytu, je možno odstranit použitím dvou mikrokolon na nichž střídavě probíhá prekoncentrace a eluce, takže se navzájem doplňují¹.

Jedním z aspektů použití těchto reaktorů ve FIA je ovlivnění citlivosti stanovení jejich tvarem. Vyšší citlivost stanovení byla dosažena použitím kónických kolon na rozdíl od kolon cylindrických. Kolona musí být vložena do systému tak, aby proud vzorku procházel dříve užším a pak širším koncem kolony a zadržený analyt musí být eluován v opačném směru k dosažení minimální disperze v koloně⁴⁶. Výše uvedené zásaditosti platí také pro adsorpční reaktory.

Iontoměničové reaktory pro účely FIA jsou připravovány přímo na pracovišti z komerčně dodávaných měničů iontů pro HPLC, jejich plněním do plastických hadiček na konci opa-

Tabulka I

Příklady použití reaktorů s tuhou fází v průtokové injekční analýze

Typ reaktoru	Stanovovaná látka
Enzymový	glukosa ^{10–13} , laktát ^{14–16} , ethanol ¹⁷ , L-fenylalanin ¹⁸ , močovina ¹⁹ , chloramin ⁶⁵ , formaldehyd ⁶⁶ , galaktosa a glycerol ⁶⁷ , neostigmin a galantamin ⁶⁸ , hypoxantin ⁶⁹ , glycerol ^{70,71} , L-lysin ⁷² , fosfáty ⁷³ , kyselina octová ⁷⁴ , glutamát ⁷⁵
Oxidačně-redukční	fenothiazin ⁷ , dusičnany s dusitany ^{20–24} , adrenalin ^{27,28} , sulfadiazin ²⁹ , N-substituované fenothiaziny ³⁰ , noradrenalin ³¹ , vitamin C ³² , vitamin K ₃ ³³ , sulfidy ³⁴ , aspartam ³⁵ , thioridazin ^{36,43} , chlorpromazin ^{36,44} , iproniazid a isoniazid ³⁷ , mangan ³⁸ , kodein ³⁹ , ondansetron ⁴⁰ , kyselina acetylsalicylová ⁴¹ , cystein ⁴² , promethazin ⁴⁵
Iontově výměnný Adsorpční	kaptopril ⁵¹ , Fe ⁶³ , ethanol ⁶⁴ , Cd ⁷⁶ , kyselina monochloroctová ⁷⁷ , Zn, Cd, Pb ⁷⁸ , Cd, Pb, Cu ⁴⁷ , Mo ⁴⁸ , Cd ⁴⁹ , Cd, Co, Cu, Mn, Pb ⁵⁰ , kaptopril ⁵¹ , kyselina salicylová ⁵² , pesticidy ⁵³ , Zn ⁵⁴ , kyanidy ⁵⁵ , směsi aminů ⁵⁶ , Cr ⁷⁹ , pseudoefedrin ⁸⁰ , pesticid naptalam ⁸¹ , polyfenoly ⁸²
Imunoafinitní	L-fenylalanin ¹⁸ , albumin ⁵⁷ , insulin ⁵⁸
Uvolňující činidlo	peroxyd ⁶²

třených vatovou zátkou. Plnění probíhá za pomoci vakuové vývěvy nasáváním pevné fáze iontoměniče v suspenzi s kapalinou (doporučuje se nechat měnič bobtnat v této kapalině přes noc).

Délky reaktorů se liší podle typu stanovení a typu měniče. Rozhodující pro délku reaktoru je především výměnná kapacita měniče (množství iontů, které může měnič poutat svými výměnnými skupinami). K dosažení co nejmenší disperze zóny vzorku je pak délka reaktoru pro většinu stanovení nepřímo úměrná kapacitě iontoměniče. Největší kapacitou se vyznačují pórovité pryskyřice s organickou maticí, menší kapacitu mají měniče chemicky vázané na pórovitém silikagelu.

Výhodou silných měničů je úplná disociace funkčních skupin v širokém rozsahu hodnot pH (1 až 14 pro měniče kationtů a 0 až 12 pro měniče aniontů na bázi organických pryskyřic a 2 až 8 pro měniče na bázi silikagelu), která umožňuje použití silných kyselin a bazí jako nosného proudu nebo elučního činidla. Je možná i jejich aktivace přímo v průtokovém systému nebo v průběhu stanovení.

Iontoměničové fáze se využívají také k detekci vložení těchto reaktorů do průtokové cely konvenčních nedestruktivních molekulárních optických detektorů. Nejčastěji měřeními veličinami jsou absorbance, fluorescence a reflektance. Způsob provedení detekce s využitím iontoměniče využívají:

1. reakce činidla a analytu v roztoku a retence produktu na iontoměniči, který je vhodný u velmi selektivní reakce,
2. selektivní adsorpce analytu na pryskyřici s následující reakcí s vhodným činidlem,
3. ireverzibilní adsorpce činidla na iontoměniči a pozdější reakce s analytem, který je použitelný, jestliže reakční produkt nemůže být přímo adsorbován na iontoměnič⁵.

2.4. Adsorpční reaktory

Volba náplně reaktoru pro FIA stanovení požadovaného analytu se řídí základními charakteristikami jako jsou:

funkčnost – tj. vztah afinity sorbentu k různým organickým sloučeninám, která je určena mírou polaritativy sorbentu resp. analytu;

velikost a tvar částic – ovlivňující hydrodynamické podmínky v koloně (turbulentní a molekulová difúze v nosném proudu);

velikost povrchu – související s počtem aktivních míst. Sorbenty mající vysokou povrchovou velikost na jednotku hmoty mají vysoký počet aktivních míst a dosahují vyššího stupně kumulace látek z roztoku;

velikost pórů – ovlivňující prostup molekul do sorbentu. Bylo by možné soudit, že malé póry jsou vhodné pro účinnou kumulaci. Při realizaci tohoto přístupu, kdy velikost pórů je porovnatelná s rozměry molekul, je prostup látky velice obtížný. Při použití sorbentu s větší velikostí pórů, schopnost sorpce roste;

chemická inertnost – charakterizující změnu kvality povrchu a tím i reprodukovatelnost v sorpčním procesu.

Nejznámějším a nejužívanějším materiálem pro adsorpční reaktory ve FIA je chemicky modifikovaný silikagel, oxid hlinitý, oxid křemičitý, dále polymerní sorbenty – akrylátové polymery, styren-divinylnbenzenové kopolymery, polypropyleny, polytetrafluoroethyleny, nebo chelatační sorbenty obsahující kovové ionty a jiné další.

Tyto reaktory jsou připravovány přímo na pracovišti z te-

flonových hadiček a komerčně dostupných sorbentů podobně jako iontové výměnné reaktory. Plnění probíhá za vlhka ze suspenze organického rozpouštědla a sorbentu. Délka těchto adsorpčních reaktorů zapojených do FIA systému se pohybuje v rozmezí 5 až 70 mm. Použití reaktorů kratších pozitivně ovlivňuje disperzi zóny vzorku, ale na druhé straně snižuje sorpční kapacitu reaktoru. V případě nižší afinity analytu k sorbentu (např. použití chemicky vázané nepolární stacionární fáze) dochází pak k předčasnému vymývání analytu z kolonky již během prekoncentračního kroku. Tomuto jevu můžeme zabránit změnou sorbentu nebo nosného proudu, popř. jeho průtokové rychlosti, nebo množstvím sorbentu v kolonce (prodloužení reaktoru). Použití adsorpčních reaktorů delších než 70 mm je ve FIA systémech zcela vyjíméčné. Dochází tím ke značnému rozmývání zóny vzorku, nežádoucímu prodloužení doby analýzy a eluce analytu z reaktoru není dostatečně náhlá pro cílené dosažení maximální odezvy.

Pravděpodobně největší nevýhoda v uplatnění těchto reaktorů ve FIA systémech spočívá v nemožnosti použití koncentrovaných organických rozpouštědel jako elučních činidel. Toto omezení je způsobeno přítomností pryžových hadiček na peristaltickém čerpadle, které zajišťují kontinuální aspiraci činidel do celého FIA systému. Při použití organických činidel ve vyšší než 50% koncentraci dochází k porušení těchto hadiček a tím i k nerovnoměrnému průtoku činidla, vzniku falešných signálů nebo zvyšování nulové linie při použití spektrofotometrického detektoru v důsledku změn v indexu lomu, a také často ke znehodnocení adsorpčního reaktoru.

Adsorpční reaktory slouží především pro prekoncentraci, zvláště kovových iontů pro jejich stanovení AAS detekcí⁴⁷⁻⁵⁰, nebo jsou využívány pro zakoncentrování organických sloučenin z vodných roztoků.

Značná výhoda těchto reaktorů spočívá v jejich použití při analýze vzorků se složitou maticí, jako jsou odpadní vody, biologické materiály (krev, sérum, mozkomíšni mok, moč) apod., kdy je požadována prekoncentrace analytu a odstranění balastních látek. Při zařazení ochranné předkolonky do proudu vzorku ve FIA systému je pak možné analyzovat vzorek bez předchozích úprav. Technika FIA-SPE se uplatnila při stanovení např. captoprilu⁵¹, kyseliny salicylové⁵², pesticidů⁵³ aj.

Jedním z méně známých sorbentů je polyurethanová pěna, která byla použita ve FIA poprvé k prekoncentraci zinečnatých iontů jako thiokyanátových komplexů z biologického materiálu⁵⁴.

Méně obvyklé je použití adsorpčních reaktorů jako fázových separátorů při extrakci z kapaliny do kapaliny¹. Tyto kolony se schopností selektivně adsorbovat vodní fázi mohou nahradit použití obvyklých jednotek pro kontinuální separační procesy.

Adsorpčních materiálů je také možno použít ke tvorbě průtokových senzorů umístěných v průtokových celách, dovolujících individuální a multianalytické stanovení. Tak je tomu v případě fluorimetrického stanovení kyanidů, které je založeno na retenci kyanidových komplexů s beryliem na chemicky modifikovaném silikagelu a jeho simultánním monitorování. Citlivost této metody je pak zvýšena o 2 řády ve srovnání s konvenční FIA metodou⁵⁵.

Tyto reaktory umístěné v detekčních celách také umožňují multianalytické stanovení s využitím spektrofotometrie s diodovým polem, jako je tomu například u analýzy ternárních směsí aminů⁵⁶.

2.5. Imunoafinitní reaktory

Tyto typy reaktorů se uplatňují zejména při stanovení antigenních materiálů makromolekulárního charakteru při klinicko-biochemických či imunologických vyšetřeních^{18,57,58}. Patří mezi separační reaktory, které využívají afinitní ligandy (protilátky) imobilizované na stěnu reaktoru nebo na inertní nosič k vytvoření selektivní stacionární fáze pro analýzu vzorku.

Po nadávkování vzorku do kolony se analyt specificky váže na imobilizovanou protilátku a ostatní komponenty vzorku jsou bez zadržení eluovány. Tvorba těchto biospecifických komplexů mezi analytem a afinitním ligandem je velice citlivá na prostředí a je podmíněna nejen vhodným pH, iontovou silou, teplotou, ale i koncentrací kovových iontů, případně kofaktorů nebo jiných důležitých látek. Při změně reakčních podmínek v koloně (složení pufru, rozpouštědla, pH, gradientu iontové síly, teploty nebo pomocí konkurenčních ligandů, alosterických efektů, koenzymů, disociačních činidel aj.) můžeme analyt následně eluovat a detegovat^{59,60}.

Jako afinitní ligand pro izolace biologicky aktivních látek je vhodná každá sloučenina, která s nimi tvoří biospecifické, pevné a reverzibilní komplexy.

Nevýhodou těchto reaktorů je jejich náročná příprava, která spočívá ve složité imobilizaci afinitních ligandů na nosič⁶¹.

Afinitní ligand musí splňovat dvě základní podmínky: musí obsahovat funkční skupinu použitelnou pro kovalentní vazbu na tuhý nosič, aniž se tím naruší komplementární vazebné místo nutné pro tvorbu specifického komplexu a po imobilizaci mít dostatečnou afinitu pro izolovanou látku. Mnoho požadavků je také kladeno na nosič afinitního ligandu umístěného v reaktoru: nerozpustnost, nulová adsorpční kapacita, dostatečná permeabilita a velký specifický povrch, vysoká pevnost, chemická reaktivita dovolující vazbu afinitního ligandu, chemická stabilita za podmínek vyžadovaných pro vazbu, adsorpci, desorpci i regeneraci, hydrofilní charakter aj.

Z biopolymerních nosičů je nejčastěji používána agarosa, dále celulóza, dextran, polyakrylamid aj. Pro imobilizaci glykoproteinů je v současné době nejvíce užívána vazba přes cukernou složku do níž je oxidací zavedena aldehydová skupina, která se váže na hydrazinové deriváty tuhých nosičů.

Nevýhodou imunoafinitních reaktorů je také velká závislost tvorby komplexů biologicky aktivních látek s afinitními ligandy na mikrookolí. To je často příčinou časové náročnosti vypracování podmínek přípravy optimálních bioadsorbentů i podmínek pro sorpci a desorpci izolovaných látek. Optimální sorpční a desorpční podmínky reaktoru zjistíme ze stanovení adsorpce izolované látky na imobilizovaný afinitní ligand v závislosti na pH, iontové síle, povaze pufrů, teplotě, případně i dalších faktorech^{59,60}.

Pracovní podmínky těchto reaktorů jsou odlišné podle jednotlivých typů stanovení, tak jako u výše uvedených reaktorů. Je zde ale kladen důraz na omezené reakční podmínky (silné kyseliny a zásady, koncentrovaná organická činidla). Při použití drastických podmínek pro uvolnění stanovované látky dochází k narušení vazby nosič–afinitní ligand a tím ke znehodnocení celého reaktoru. Většina imunoafinitních reaktorů pracuje v rozmezí pH 5–11. Délka většiny těchto reaktorů se pohybuje v rozmezí 0,5–5 cm, (podobně jako u adsorpčních reaktorů) a volí se podle množství navázaného a aktivního afinitního ligandu.

2.6. Reaktory uvolňující činidlo

Využití těchto reaktorů ve FIA systémech nedosáhlo zatím většího rozšíření. Jejich zapojení do systému umožňuje eliminovat použití čerpadla pro přidávání reagensů, použití směšovací T-kusů a odstranění problémů vznikajících z nedokonalého mísení zóny vzorku s přidávanými činidly. Další výhodou těchto reaktorů je minimální příspěvek k rozšíření separovaných zón, a tím zvýšení citlivosti stanovení díky sníženému ředění vzorku. Jejich celková výhoda vyplývá ze zjednodušení celého systému, který pak pracuje bez nadbytečných kanálů dávkujících činidlo.

Tyto reaktory jsou uzavřeny v minikolonách tzv. cartridge (např. peroxyoxalát pro chemiluminiscenční stanovení peroxidů⁶²) nebo jsou vázány na nosiči. Imobilizovaných činidel se také ve FIA využívá k detekci, pokud jsou činidla vhodně imobilizována na stěnu průtokové cely.

Další modifikací tohoto typu reaktorů jsou reaktory z dutých vláken. Reaktory využívají několika dutých vláken např. ze sulfonovaného polyethylenu která jsou ponořena do roztoku činidla a zavedena do FIA systému.

3. Závěr

Jednoduchost, rychlost, flexibilita a plná automatizace jsou hlavní charakteristiky metody FIA a umožnily uplatnění této techniky v agrochemických a biochemických laboratořích, při analýzách v oblasti životního prostředí, ve farmacii v kontrole kvality a účinnosti léčiv, při disolučních testech, stabilitních studiích apod. Se zvyšujícími se požadavky na citlivost a selektivitu analytických metod, na snížení spotřeby činidel a na zjednodušení přípravy vzorku před stanovením je i v technice FIA nutné udržení tempa s moderními analytickými postupy. Řešení těchto požadavků spočívá v zapojení různých typů reaktorů s tuhou fází přímo do průtokového systému FIA analyzátoru.

Hlavní aspekty současného trendu v technice FIA-SPR můžeme rozdělit do 4 skupin:

1. miniaturizace jako prostředek snížení spotřeby činidel a vzorků; změny systému z makroskopického na mikroskopický,
2. úprava vzorku přímo v průtokovém systému (prekoncentrace, derivatizace, odstranění vlivu matrice) a tím zvýšení selektivity a citlivosti,
3. sjednocení reakce (retence) a detekce za účelem využití všech výhod tohoto zapojení (zvýšená citlivost, selektivita, frekvence dávkování),
4. požadavek na multianalytické stanovení díky jednoduchému konvenčnímu detektoru, vhodnému reaktoru s tuhou fází a FIA systému.

Spojení FIA-SPR předurčují tuto techniku jako velmi vhodný prostředek všude tam, kde je nutno analyzovat velké série vzorků (rutinní analýzy vod, potravin, krve, moči), sledovat změny koncentrace analytů v průběhu různých procesů (řízení a optimalizace biotechnologických výroby, monitorování hladin léčiv nebo jejich metabolitů v tělních tekutinách pacientů) a zejména tam, kde je stanovovaný analyt součástí složité matrice. Ve všech těchto rozmanitých oblastech se technika FIA-SPR uplatňuje také z důvodu snížení objemu vzorků i spotřeby činidel a tím i nižšího zatížení životního prostředí díky menšímu množství odpadu.

Z uvedených skutečností vyplývá, že potenciál využití FIA s on-line zapojením reaktorů s tuhou fází je v analytické praxi značný a bude se zřejmě dále rozšiřovat.

Autoři děkují Ministerstvu školství a mládeže za finanční podporu této práce (projekt MSM 111600001).

LITERATURA

- Luque de Castro M. D.: Trends Anal. Chem. 11, 149 (1992).
- Ortiz S. L., Calatayud J. M.: Anal. Lett. 28, 971 (1995).
- Faria L. C., Pasquini C., Oliviera G.: Analyst (London) 116, 118 (1991).
- Karlsson M., Person J. A., Möller J.: Anal. Chim. Acta 244, 109 (1991).
- Kojlo A.: J. Pharm. Biomed. Anal. 10, 785 (1992).
- Koljo A.: J. Pharm. Biomed. Anal. 8, 663 (1990).
- Polášek M., Dolejšová J., Karlíček R.: Pharmazie 53, 168 (1998).
- Zaitsu K., Jamagishi K., Ohkura Y.: Chem. Pharm. Bull. 36, 4488 (1988).
- Paseková H., Polášek M., Solich P.: Chem. Listy 93, 354 (1999).
- Solich P., Polášek M., Karlíček R.: Potravinářské Vědy 9, 81 (1991).
- Liu X., Hansen E. H.: Anal. Chim. Acta 326, 1 (1996).
- Min R. W., Nielsen J., Willadsen J.: Anal. Chim. Acta 320, 199 (1996).
- Min R. W., Willadsen J.: Anal. Chim. Acta 312, 149 (1995).
- Shu H., Hakanson H., Mattiasson B.: Anal. Chim. Acta 283, 727 (1993).
- Shu H., Hakanson H., Mattiasson B.: Anal. Chim. Acta 300, 277 (1995).
- Mori H.: Anal. Lett. 32, 1301 (1999).
- Hedenfalk M., Mattiasson B.: Anal. Lett. 29, 1109 (1996).
- Kiba N., Itagaki A., Furusawa M.: Talanta 44, 131 (1997).
- Solich P., Polášek M., Karlíček R.: Anal. Chim. Acta 218, 151 (1989).
- Karlíček R., Dolejšová J., Polášek M.: Agrochémia 28, 119 (1988).
- Beljaars P. R., Dijk R., Horst G. M.: J. AOAC Int. 77, 1522 (1994).
- Maimo J., Cladera A., Mas F.: Int. J. Environ. Anal. Chem. 35, 161 (1989).
- Ensafi A. A., Kazemzadeh A.: Anal. Chim. Acta 382, 15 (1999).
- Gabriel D., Baeza J., Valero F.: Anal. Chim. Acta 359, 173 (1998).
- Lawrence J. F., Wong B.: J. Chromatogr. 755A, 227 (1996).
- Ruchti B., Schramm C., Kubitschko S.: Fresenius' J. Anal. Chem. 342, 822 (1992).
- Kojlo A., Calatayud J. M.: Anal. Lett. 28, 239 (1995).
- Kojlo A., Calatayud J. M.: Anal. Chim. Acta 308, 334 (1995).
- Romero A. M., Benito C. G., Calatayud J. M.: Anal. Chim. Acta 308, 451 (1995).
- Kojlo A., Calatayud J. M.: Talanta 42, 909 (1995).
- Ortiz S. L., Rivas G. A., Calatayud J. M.: Microchim. Acta 126, 69 (1997).
- Pereira A. V., Filho O. F.: Anal. Chim. Acta 366, 55 (1998).
- Torró I. G., Mateo J. V. G., Calatayud J. M.: Analyst 122, 139 (1997).
- Staden J. F., Kleuver L. G.: Anal. Chim. Acta 369, 157 (1998).
- Fatibello F. O., Marcolino J. L. H., Pereira A. V.: Anal. Chim. Acta 384, 167 (1999).
- Catala I. M., Lauherta Z. L., Calatayud J. M.: Lab. Rob. Autom. 10, 33 (1998).
- Bautista G. J. A., Mateo G. J. V., Calatayud M. J.: Anal. Lett. 31, 1209 (1998).
- Staden J. F., Kleuver L. G.: Anal. Chim. Acta 350, 15 (1997).
- Barnett N. V., Bowser T. A., Gerardi R. D., Smith B.: Anal. Chim. Acta 318, 309 (1996).
- Zamora L. L., Calatayud J. M.: Anal. Chim. Acta 300, 143 (1995).
- Rivas G. A., Calatayud J. M.: Talanta 42, 1285 (1995).
- Icardo C. M., Zamora L. L., Calatayud J. M.: Analyst 123, 1685 (1998).
- Paz L. J. L., Mateo G. J. V., Calatayud J. M.: J. Flow Injection Anal. 14, 15 (1997).
- Kojlo A.: Anal. Lett. 30, 2353 (1997).
- Calatayud J. M., Mateo G. J. V.: Anal. Chim. Acta 264, 283 (1992).
- Fang Z., Welz B.: J. Anal. At. Spectrom. 4, 543 (1989).
- Fang Z., Guo T., Welz B.: Talanta 38, 613 (1991).
- Futura N., Brushwyler K. R., Hieftje G. M.: Spectrochim. Acta 44B, 349 (1989).
- Domínguez M. F. E., Biurrun M. C. Y., Barrera M. P. B.: Analyst 123, 105 (1998).
- Nickson R. A., Hill S. J., Worsfold P. J.: Anal. Chim. Acta 351, 311 (1997).
- Karlíček R., Solich P.: Pharmazie 53, 549 (1998).
- Karlíček R., Gargoš M., Solich P.: J. Flow Injection. Anal. 13, 45 (1996).
- Diaz G. T., Valenzuela A. M. I., Salinas F.: Anal. Chim. Acta 384, 185 (1999).
- Jesus D. S., Cassella R. J., Ferreira S. L. C.: Anal. Chim. Acta 366, 263 (1998).
- Chen D., Luque de Castro M. D., Valcárcel M.: Microchem. J. 44, 215 (1991).
- Band B. F., Lázaro F., Luque de Castro M. D.: Anal. Chim. Acta 229, 177 (1990).
- Ruhn P. F., Taylor J. D., Hage D. S.: Anal. Chem. 66, 4265 (1994).
- Khokhar M. Y., Miller J. N., Seare N. J.: Anal. Chim. Acta 290, 154 (1994).
- Hermanson G. T., Mallia A. K., Smith P. K.: Immobilized Affinity Ligand Techniques. Academic Press, New York 1992.
- Turková J.: Bioaffinity Chromatography. Elsevier, Amsterdam 1993.
- Ruhn P. F., Garver S., Hage D. S.: J. Chromatogr. 669, 9 (1994).
- Zoonen P., Kamminga D. A., Gooijer C.: Anal. Chim. Acta 167, 249 (1985).

63. Staden J. F., Kleuver L. G.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 362, 319 (1998).
64. Chen Z., Yu J. J., Hibbert D. B.: *Electroanalysis* 9, 541 (1997).
65. Buck S., Stein K., Schwedt G.: *Anal. Chim. Acta* 390, 141 (1999).
66. Kiba N., Sun L. M., Yokose S.: *Anal. Chim. Acta* 378, 169 (1999).
67. Vega F. A., Nunez C. G., Weigel B.: *Anal. Chim. Acta* 373, 57 (1998).
68. Ghous T., Townshend A.: *Anal. Chim. Acta* 372, 379 (1998).
69. Numata M., Funazaki N., Ito S.: *Talanta* 43, 2053 (1996).
70. Kiba N., Azuma N., Furusawa M.: *Talanta* 43, 1761 (1996).
71. Prodromidis M. I., Stalikas C. D., Tzouwara-Karayanni S. M.: *Talanta* 43, 27 (1996).
72. Chen R. L. C., Lee M. H., Matsumoto K.: *Anal. Sci.* 12, 87 (1996).
73. Noguchi A., Aoki T., Oshima T.: *J. Flow Injection Anal.* 12, 209 (1995).
74. Tservistas M., Weigel B., Schuegerl K.: *Anal. Chim. Acta* 316, 117 (1995).
75. Stalikas C. D., Karayannis M. I., Tzouwara-Karayanni S. M.: *Talanta* 41, 1561 (1994).
76. Couto C. M., Lima J. L., Conceicao M., Montegreno B. S. M.: *Anal. Chim. Acta* 366, 155 (1998).
77. Puig-Lleixa C., Bartroli J., Del-Valle M.: *Anal. Chim. Acta* 359, 311 (1998).
78. Elsholz O., Schulze G.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 353, 119 (1995).
79. Ma W. H., Cai R. X., Chen D. H.: *Lab. Rob. Autom.* 11, 141 (1999).
80. Chen H. W., Fang Z. L.: *Anal. Chim. Acta* 394, 13 (1999).
81. Galeano D. T., Acedo V. M. I., Salinas F.: *Anal. Chim. Acta* 384, 185 (1999).
82. Arce L., Tena M. T., Rios A.: *Anal. Chim. Acta* 359, 27 (1998).

D. Šatínský and R. Karlíček (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové*): **Solid Phase Reactors in Flow Injection Analysis**

The review deals with the principles and practical applications of the use of the solid phase reactors in FIA (flow injection analysis) techniques. The article is confined to the advances in the development of the analysis of samples in the flow systems, mainly on-line preparation (derivatization, separation and preconcentration) of samples inside the flow injection manifold. The article involves 82 references covering the period from 1985 to 1999.