

**DERYWATYZACJA CHEMICZNA
W WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII
CIECZOWEJ**

THE CHEMICAL DERIVATIZATION IN HIGH
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

**Adrianna Kamińska*, Marta Joanna Krawczyk,
Grażyna Chwatko**

*Katedra Chemii Środowiska, Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 163, 90-236 Łódź
e-mail: adka367@interia.eu

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Techniki derywatywacji
2. Derywatywacja przedkolumnowa
 - 2.1. Derywatywacja przez grupę aminową
 - 2.2. Derywatywacja przez grupę sulfhydrylową
 - 2.3. Derywatywacja przez grupę hydroksylową
 - 2.4. Derywatywacja przez grupę karboksylową
 - 2.5. Derywatywacja przez grupę aldehydową
 - 2.6. Inne sposoby derywatywacji analitu
3. Derywatywacja pokolumnowa
 - 3.1. Derywatywacja przez grupę aminową
 - 3.2. Derywatywacja z wykorzystaniem nanocząstek
 - 3.3. Derywatywacja przez grupę sulfhydrylową
 - 3.4. Inne sposoby derywatywacji analitu
4. Derywatywacja w kolumnie

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



mgr Adrianna Kamińska ukończyła studia magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego w roku 2015. Pracę magisterską zatytułowaną „Oznaczenie siarki kwasowo labilnej techniką HPLC” obroniła w Katedrze Chemii Środowiska. Obecnie jest słuchaczką II roku studiów doktoranckich prowadzonych na Wydziale Chemii UŁ. Jednym z jej głównych zainteresowań naukowych jest opracowywanie nowatorskich metod analitycznych, umożliwiających śledzenie metabolizmu biologicznie ważnych związków siarki stosowanych w prewencji chorób cywilizacyjnych.



mgr Marta Joanna Krawczyk jest doktorantką na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Tytuł magistra chemii ze specjalizacją Chemia i nanotechnologia nowoczesnych materiałów uzyskała w roku 2013 za pracę zatytułowaną „Wykorzystanie izotachoforezy do oznaczania anionów nieorganicznych w produktach kosmetycznych”. Jej praca naukowa obejmuje badania przemian związków siarki w próbkach biologicznych.



dr hab. Grażyna Chwatko od 1996 roku jest zatrudniona na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Pracę doktorską na temat „Wyznaczanie statusu redox tioli w osoczu krwi ludzkiej metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej” obroniła w roku 2002. Roczny staż podoktorski, związany z badaniem biochemicznych aspektów aterogennego działania homocysteiny, odbyła w New Jersey Medical School, International Center for Public Health, Newark, USA. W 2014 roku uzyskała stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych po przedstawieniu rozprawy na temat: „Analiza próbek biologicznych na zawartość metabolicznie spokrewnionych związków siarki”. Jej zainteresowania naukowe obejmują opracowywanie nowych metody wykrywania i oznaczania związków siarki w próbkach biologicznych oraz zastosowanie tych metod do monitorowania przemian metabolicznych w organizmach, zarówno w stanach fizjologicznych jak i patologicznych.

ABSTRACT

High performance liquid chromatography (HPLC) is a method used to determine inorganic and organic substances in biological samples. Nevertheless, many analytes cannot be detected using HPLC method, because they do not contain a necessary chromophoric or fluorophoric groups. Derivatization is the solution of this problem. This process can be defined as a conversion of analyte to corresponding derivative which possesses in its structure a moiety compatible with suitable detector [1, 2]. Reagent responsible for conversion of analyte to a derivative needs to meet a lot of requirements. It needs to be selective e.g. to react only with analysed substances and it should not generate by-products. The derivatization reagent should react rapidly, quantitatively, at lowest possible temperature and weakly pH, and the excess of reagent should be easily removable from reaction medium [1, 3, 5]. The derivatization can be carried out in pre-column, post-column and on-column mode. In the pre-column derivatization, analytes are derivatized before injection on HPLC system, and the reaction products are separated and detected. In the post-column derivatization, the reaction is performed automatically by adding the derivatization reagent after separation but before detection. The third method is based on reaction, which simultaneously proceeds with column separation [2, 3, 5, 6].

The derivatization processes in gas and liquid chromatography are subject matter among researcher from all over the world. The Polish literature has only few review articles on derivatization process in liquid chromatography [2, 4, 55]. The present article reviews derivatization techniques used in HPLC. Derivatization techniques used in gas chromatography are classified due to the chemical nature of derivatization reagent [3, 56]. Our attention is focused on the analyte and derivatization reagent, which can be react with various functional groups such as amino, sulfhydryl, hydroxyl or carboxyl groups, occurring in the examined molecules. By chemically modification compounds into derivatives, they obtain necessary properties for chromatographic separation and accurate analysis.

Keywords: high performance liquid chromatography, derivatization, chromophoric group

Słowa kluczowe: wysokosprawna chromatografia cieczowa, derywatyizacja, grupa chromoforowa

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

2-CA	– 2-cyjanoacetamid (ang. <i>2-cyanoacetamide</i>)
2-HAP	– 2-hydroksyaceton (ang. <i>2-hydroxyacetophenone</i>)
2-ME	– 2-merkaptoetanol (ang. <i>2-mercaptoethanol</i>)
APDS	– karbaminian 3-aminopirydylo- <i>N</i> -hydroksysukcynimidylu (ang. <i>3-amino-pyridyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate</i>)
AQC	– karbaminian 6-aminochinolinylu- <i>N</i> -hydroksysukcynimidylu (ang. <i>6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate</i>)
BCPB	– bromek 1-benzyl-2-chloropirydyniowy (ang. <i>1-benzyl-2-chloropyridinium bromide</i>)
BCETS	– 2-(11 <i>H</i> -benzo[<i>a</i>]-karbazol-11-ilo)etylo-4-metylobenzenosulfonian (ang. <i>2-(11H-benzo[a]carbazol-11-yl)-ethyl-4-methylbenzenesulfonate</i>)
CMQT	– tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinowy (ang. <i>2-chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate</i>)
DNFB	– 2,4-dinitrofluorobenzen (ang. <i>2,4-dinitrofluorobenzene</i>)
DPPH	– 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (ang. <i>2,2-difenylo-1-picrylhydrazyl</i>)
DTNB	– kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy) (ang. <i>5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)</i>)
EAHC	– chlorowodorek etoksyaminy (ang. <i>ethoxyamine hydrochloride</i>)
EDC	– chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (ang. <i>1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride</i>)
ESI	– jonizacja poprzez elektrorozpylanie (ang. <i>electrospray ionization</i>)
FLC	– fluoreskamina (ang. <i>fluorescamine</i>)
FLD	– detektor fluorescencyjny (ang. <i>fluorescence detector</i>)
FMOC	– chloromrówczan 9-fluorenylometylu (ang. <i>9-fluorenylmethylchloroformate</i>)
Hcy	– homocysteina (ang. <i>homocysteine</i>)
HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>high performance liquid chromatography</i>)
LA	– kwas liponowy (ang. <i>lipoic acid</i>)
LOD	– granica wykrywalności (ang. <i>limit of detection</i>)
LOQ	– granica oznaczalności (ang. <i>limit of quantification</i>)
MASC	– chlorek 10-metyloakrydono-2-sulfonylu (ang. <i>10-methylacridone-2-sulfonyl chloride</i>)

MS/MS	– tandemowa spektrometria mas (ang. <i>tandem mass spectrometry</i>)
NAC	– <i>N</i> -acetylo- <i>L</i> -cysteina (ang. <i>N-acetyl-L-cysteine</i>)
NBD-COCl	– 4-(<i>N</i> -chlorometyloformylo- <i>N</i> -metyloamino-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol (ang. <i>4-(N-chloroformylmethyl-N-methylamino)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole</i>)
NBD-F	– 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol (ang. <i>4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole</i>)
NDA	– naftaleno-2,3-dikarboksyaldehyd (ang. <i>naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde</i>)
NQS	– 1,2-naftochinono-4-sulfonian sodu (ang. <i>sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate</i>)
N-Hcy	– homocysteina związana z białkami wiązaniem amidowym (ang. <i>homocysteine bound to protein by an amide linkage</i>)
OPA	– <i>o</i> -dialdehyd ftalowy (ang. <i>o-phthaldialdehyde</i>)
TMBB-EDAN	– 1,3,5,7-tetrametylo-8-butyretylenodiaminodifluoroboradiaza- <i>s</i> -indacen (ang. <i>1,3,5,7-tetramethyl-8-butyrethylenediaminedifluoroboradiaza-s-indacene</i>)
tHcy	– homocysteina całkowita (ang. <i>total homocysteine</i>)
UV-Vis	– spektrofotometria UV-Vis (ang. <i>ultra violet visible spectrophotometry</i>)

WPROWADZENIE

Wiele substancji będących przedmiotem zainteresowania analityków wykorzystujących technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) nie jest kompatybilnych ze stosowanymi detektorami takimi jak spektrofotometryczny czy spektrofluorymetryczny, ponieważ w swojej strukturze nie zawierają aktywnych grup chromo- lub fluoroforowych. Ponadto niektóre związki obecne w próbkach materiału biologicznego występują na poziomie porównywalnym lub wyższym od poziomu analitów przez co przeszkadzają i niekiedy uniemożliwiają przeprowadzenie analizy. W rozwiązaniu takich problemów może pomóc zastosowanie reakcji derywatywacji. Jest to proces polegający na przeprowadzeniu analitu w pochodną, która w swojej strukturze posiada ugrupowanie dobrze rozpoznawane przez określone detektory. Wprowadzenie odpowiednich grup funkcyjnych do analitu, wskutek procesu derywatywacji, może dodatkowo zmieniać właściwości fizykochemiczne związku takie jak polarność cząsteczki i jednocześnie jej rozpuszczalność. Nadanie nowych właściwości pozwala zatem na odróżnienie analitu od innych substancji obecnych w próbce i dodatkowo ułatwia a niekiedy wręcz umożliwia rozdzielenie składników w mieszaninie [1, 2].

Odczynnik derywatyzujący wykorzystywany do przekształcania analitu w pochodną winien spełniać wiele kryteriów. Przede wszystkim powinien być selektywny, tj. reagować tylko z oznaczaną substancją, a stechiometria reakcji oraz struktura powstającego w reakcji produktu powinna być dokładnie znana [3]. Reakcja pomiędzy odczynnikiem a analitem powinna zachodzić szybko, ilościowo, powtarzalnie i najlepiej przebiegać w łagodnych warunkach [1, 3]. Z analitem odczynnik powinien tworzyć tylko jedną pochodną, której maksimum absorpcji byłoby przesunięte w stosunku do maksimum odczynnika w kierunku fal dłuższych (w przypadku detekcji UV). Dzięki czemu występujące zjawisko przesunięcia batochromowego umożliwiłoby stosowanie dużych nadmiarów odczynnika derywatyzującego w stosunku do analitu, skracając jednocześnie czas reakcji derywatywacji [4]. Niezwykle istotne jest, aby powstające w czasie reakcji produkty uboczne, nie wykazywały absorpcji promieniowania UV czy fluorescencji, ewentualnie maksima absorpcji tych związków znacząco różniły się. Nadmiar odczynnika, jeśli przeszkadza w analizie, powinien być łatwo eliminowany ze środowiska reakcji [1, 3].

Odczynniki derywatyzujące można podzielić na cztery grupy [5]: (1) absorbujące światło w zakresie UV-Vis, które w reakcji z analitem wprowadzają do cząsteczki grupę chromoforową, np. chlorek benzoilu, tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylochinoliniowy (CMQT); (2) odczynniki fluorogeniczne, które same nie fluoryzują, ale reagując z określonymi związkami przekształcają się w emitujące światło cząsteczki, np. fluoreskamina; (3) odczynniki fluorescencyjne, które posiadają wysoce fluorescencyjną grupę aromatyczną (fluorofor) i grupę reaktywną; (4) odczynniki o właściwościach redoks, wykorzystywane w elektrochemii. Wybór odpowiedniego odczynnika derywatyzującego jest uzależniony od stosowanego detektora.

1. TECHNIKI DERYWATYZACJI

Proces derywatywacji znany jest od ponad sześćdziesięciu lat i stosowany niemal w każdym laboratorium analitycznym. Zarys historyczny i główne kierunki rozwoju tego procesu wykorzystywanego w połączeniu z techniką HPLC zostały przedstawione w Tabeli 1.

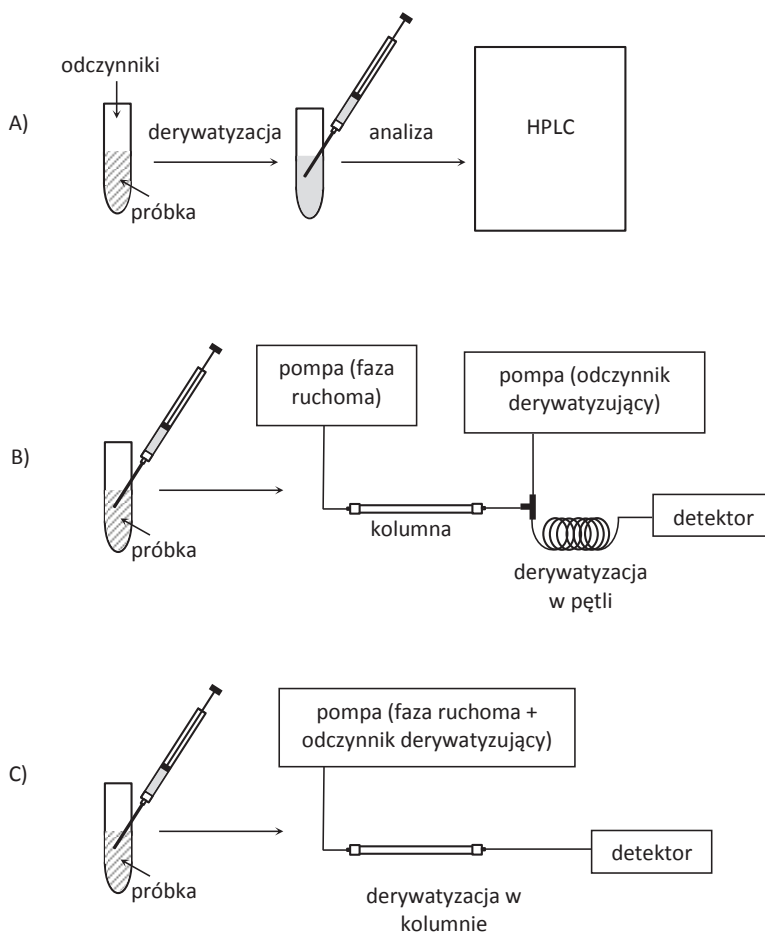
Derywatywacja w połączeniu z techniką HPLC jest bardzo przydatnym narzędziem w nowoczesnym laboratorium analitycznym, ponieważ umożliwia oznaczenie związków, które są trudno wykrywalne nawet przy pomocy zróżnicowanych detektorów. Zastosowanie derywatywacji umożliwia znaczne obniżenie wartości granicy wykrywalności (LOD) oraz oznaczalności (LOQ), a także eliminację interferencji pochodzących od składników matrycy. Derywatywacja w HPLC może być prowadzona w trybie przedkolumnowym (ang. *pre-column*), pokolumnowym (ang. *post-column*) oraz w kolumnie (ang. *on-column*). Wyżej wymienione techniki różni się w oparciu o „miejsce” prowadzenia reakcji derywatywacji (Rys. 1). W przypadku derywatywacji przedkolumnowej odczynnik dodawany jest do próbki przed jej wprowadzeniem do układu HPLC. W derywatywacji pokolumnowej odczynnik dodaje się do strumienia eluatu pomiędzy kolumnę a detektor [6]. Z kolei w przypadku derywatywacji w kolumnie do układu HPLC wprowadza się mieszaninę odczynnika derywatywującego i próbki, a reakcja pomiędzy nimi zachodzi w kolumnie chromatograficznej w trakcie rozdzielania [2]. We wszystkich trzech sposobach prowadzenia derywatywacji, reakcja może być zakłócona przez wpływ składników matrycy próbki. Na wybór sposobu przeprowadzenia derywatywacji wpływa zarówno posiadana aparatura, jak i parametry w których prowadzona jest reakcja (pH buforu, czas trwania reakcji czy temperatura) [1, 3].

Tabela 1. Kamienie milowe w rozwoju technik derywatywacyjnych łączonych z chromatografią cieczą, które znalazły zastosowanie w praktyce analitycznej.

Table 1. Milestones in development of field of application of derivatization supported liquid chromatography in analytical practice.

Rok	Opis	Lit.
1957	Derywatywacja małych ilości związków karbonylowych.	[7]
1966	Derywatywacja tioli za pomocą izocyjanianu trichloroacetylenu w celu uproszczenia interpretacji widm NMR.	[8]
1973	Zastosowanie reakcji benzoilowania do derywatywacji hydroksysterydów. Oznaczenie powstałych pochodnych za pomocą chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz.	[9]
1973	Zastosowanie 1-benzyl-3-p-tolilotriazenu do derywatywacji kwasów tłuszczowych w analizie HPLC z detekcją UV. Potwierdzenie struktur powstałych pochodnych za pomocą spektrometrii mas.	[10]
1976	Pokolumnowa derywatywacja nonapeptydów.	[11]
1977	Pierwsza opublikowana książka na temat zastosowania derywatywacji w chromatografii.	[12]

Rok	Opis	Lit.
1978	Automatyzacja procesu derywatywacji przedkolumnowej.	[13]
1995	Zastosowanie derywatywacji w kolumnie do oznaczania amin.	[14]
2002	Derywatywacja na włóknie (SPME) w połączeniu z układem HPLC.	[15]
2008	Automatyzacja procesu derywatywacji chemicznej oraz techniki mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej w postaci filmu pokrywającego wewnętrzną ściankę rurki.	[16]
2009	Jednoczesne zastosowanie derywatywacji <i>in situ</i> oraz mikroekstrakcji poprzez membranę do fazy ciekłej w celu oznaczenia amin w próbkach żywności.	[17]
2011	Zastosowanie dyspersyjnej mikroekstrakcji ciecz-ciecz wspomaganie promieniowaniem mikrofalowym z wykorzystaniem cieczy jonowych oraz procesu derywatywacji do oznaczenia sulfonamidów w wodach rzecznych, miodzie, mleku i osoczu zwierząt.	[18]



Rysunek 1. Schemat ilustrujący sposoby prowadzenia derywatywacji: A) przedkolumnowej, B) pokolumnowej, C) w kolumnie

Figure 1. The scheme of possible derivatization procedures A) pre-column, B) post-column, C) on-column

Większość odczynników derywatyzujących można stosować tylko dla jednego sposobu prowadzenia derywatywacji. Jednakże są i takie, jak na przykład *o*-dialdehyd ftalowy (OPA), który jest szeroko stosowany zarówno w derywatywacji przedkolumnowej, jak i w derywatywacji pokolumnowej i w kolumnie. W tym przypadku wybór trybu prowadzonej reakcji uzależniony jest tylko od dostępnego sprzętu, bądź efektywności rozdzielania.

Proces konwersji chemicznej analitów w ich pochodne można również prowadzić podczas pobierania próbek, w przypadku derywatywacji *in situ*. Ten rodzaj derywatywacji stosuje się, aby polepszyć właściwości fizykochemiczne analitów, a także dezaktywować ich reaktywne grupy funkcyjne, jak np. grupy tiolowe. Ze względu na to, iż grupę $-SH$ charakteryzuje duża aktywność oksydoredukcyjna, dodanie akrylanu metylu zabezpiecza tę grupę w płynach biologicznych. Należy mieć jednak na uwadze, że wydłużenie czasu reakcji derywatywacji czy też dodanie zbyt dużej ilości odczynnika derywatyzującego do matrycy, może spowodować rozcieńczenie próbki, a niekiedy nawet powstanie produktów ubocznych [19].

Ciekawym rozwiązaniem przekształcania analitu w pochodne jest połączenie techniki mikroekstakcji do fazy stałej (SPME) z procesem derywatywacji chemicznej. Konwersję chemiczną analitu na włóknie mikroekstrakcyjnym można prowadzić jednocześnie z procesem ekstrakcji poprzez umieszczenie włókna nasyczonego odczynnikami derywatyzującymi w roztworze analizowanej próbki. Przykładem takiej derywatywacji jest przeprowadzenie w pochodną metyloaminy w próbkach wody [20]. W przypadku konwersji chemicznej analitu prowadzonej po procesie ekstrakcji, anality najpierw są adsorbowane na włóknie, a następnie derywatywowane przez zanurzenie tych włókien w roztworze zawierającym odczynnik derywatyzujący. Zaletą derywatywacji chemicznej na włóknie mikroekstrakcyjnym jest wyeliminowanie dużej ilości rozpuszczalników stosowanych podczas przygotowania próbki oraz czasochłonnego i pracochłonnego etapu obróbki próbki. Wadą tej metody jest jednak niska dokładność i precyzja.

W myśl koncepcji „zielonej chemii analitycznej” coraz większy nacisk kładzie się na automatyzację i miniaturyzację technik analitycznych. Procesy te są kluczem w projektowaniu bardziej ekologicznych procedur derywatywacyjnych. Konstrukcja płaskich urządzeń o bardzo małych rozmiarach tzw. chipów, stanowi alternatywę dla konwencjonalnych kapilar w elektroforezie, czy też kolumn w chromatografii. Główną cechą tego typu urządzeń jest wysoki poziom automatyzacji procesów, które mogą na nim zachodzić. Dzięki czemu na jednym urządzeniu możliwe jest pobieranie próbki, derywatywacja, separacja oraz detekcja. Chipy są powszechnie stosowane w elektroforezie kapilarnej, a rzadziej w chromatografii cieczowej [21].

„Zielony” charakter derywatywacji chemicznej w laboratoriach chemicznych przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Zielona chemia analityczna w derywatywacji chemicznej.
Table 2. Green chemistry in chemical derivatization.

Idea zielonej chemii	Rozwiązanie	Lit.
redukcja czasu, pracy i energii	derywatywacja w kolumnie	[52–54]
automatyzacja czynności laboratoryjnych, równoczesne oznaczanie wielu analitów podczas pojedynczej analizy	derywatywacja w układzie on-line	[23–27]
jednoczesna derywatywacja i ekstrakcja	derywatywacja na włóknie SPME	[20]
miniaturyzacja procesów analitycznych	derywatywacja na chipie	[21]

W niniejszej pracy zostaną omówione tylko te techniki derywatywacji, które w połączeniu z techniką HPLC przyczyniły się do rozwoju chemii analitycznej. Niestety, w tak krótkim artykule nie jest możliwe szczegółowe omówienie wszystkich sposobów prowadzenia derywatywacji, dlatego naszą uwagę skupiliśmy głównie na technikach derywatywacji przedkolumnowej, pokolumnowej i w kolumnie wykorzystywanych w chromatografii cieczowej. Główne wady i zalety tych technik zostały zebrane i przedstawione w Tabeli 3.

Tabela 3. Mocne i słabe strony technik derywatywacji stosowanych w HPLC
Table 3. The advantages and drawbacks of derivatization techniques used in HPLC

Rodzaj derywatywacji	Zalety	Wady	Lit.
przedkolumnowa	<ul style="list-style-type: none"> – możliwość stosowania wszystkich rodzajów odczynników derywatywujących, nawet jeśli wymagają zastosowania wysokiej temperatury lub długiego czasu reakcji; – możliwość stosowania odczynników derywatywujących znakowanych izotopowo, jako uniwersalnego wzorca wewnętrznego, eliminuje błędy popełniane na etapie przygotowania próbki; – automatyzacja procesu pozwala zmniejszyć czasochłonność i praktyczność procedury 	<ul style="list-style-type: none"> – czasochłonność; – możliwość wystąpienia interferencji sygnału analitycznego pochodzącego od zanieczyszczeń z pikami analitów; – nieprawidłowy dobór optymalnych warunków derywatywacji wpływa na pogorszenie wydajności reakcji, wystąpienie produktów ubocznych, bądź degradację powstającej pochodnej; 	[1, 2, 22–40]

Rodzaj derywatywacji	Zalety	Wady	Lit.
pokolumnowa	<ul style="list-style-type: none"> - wyeliminowanie wieloetapowego procesu derywatywacji przedkolumnowej, który może być źródłem mniejszej powtarzalności wyników; - możliwość stosowania kilku detektorów; - tworzenie się pochodnych tuż przed ich detekcją - zniwelowanie ryzyka rozkładu pochodnej podczas prowadzonej analizy chromatograficznej; 	<ul style="list-style-type: none"> - aparat pomiarowy wyposażony jest w dużą pętlę reakcyjną, co zmniejsza efektywność separacji; - koszty związane z koniecznością zakupu dodatkowej aparatury <ul style="list-style-type: none"> - pompy dozującej odczynnik derywatywujący; - duża ilość zużywanych odczynników; 	[6, 40, 41-51]
w kolumnie	<ul style="list-style-type: none"> - możliwość prowadzenia reakcji derywatywacji podczas rozdzielania chromatograficznego; - nie wymaga zastosowania dodatkowej aparatury, tak jak w przypadku derywatywacji pokolumnowej; - znacząco upraszcza procedurę analityczną - skraca całkowity czas analizy. 	<ul style="list-style-type: none"> - nieprawidłowy dobór ilości odczynnika wpływa znacząco na pogorszenie czułości metody; - niekiedy wymaga zastosowania kolumny, której wypełnienie jest stabilne w skrajnych warunkach pH. 	[52-54]

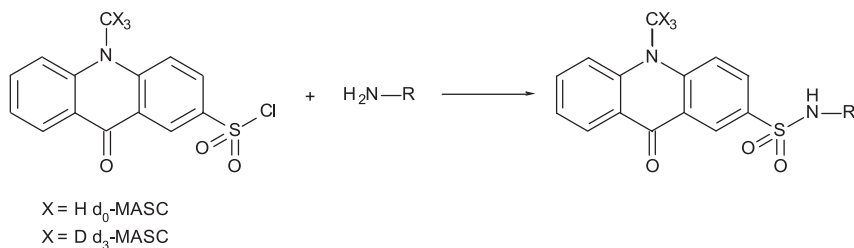
2. DERYWATYZACJA PRZEDKOLUMNOWA

Derywatywacja przedkolumnowa wymaga dodatkowych operacji podczas przygotowania próbki do analizy, w konsekwencji czego jest procesem bardziej czasochłonnym. Oznaczany związek przekształcany jest w pochodną przed wprowadzeniem go na kolumnę chromatograficzną, co może wiązać się z ryzykiem destabilizacji próbki podczas wykonywanej analizy chromatograficznej, bądź wręcz przeciwnie, zwiększyć jej stabilność [6]. Jednak, mimo ograniczeń derywatywacja przedkolumnowa znajduje szerokie zastosowanie w przypadku kiedy przebieg reakcji wymaga długiego czasu, mieszania czy użycia wysokiej temperatury [1, 3]. Reakcje derywatywacji prowadzone są poprzez przyłączenie odczynnika derywatywującego w wyniku jego reakcji z różnymi grupami funkcyjnymi: aminową, sulfhydrylową, hydroksylową czy karboksylową, występującymi w badanych cząsteczkach.

2.1. DERYWATYZACJA PRZEZ GRUPĘ AMINOWĄ

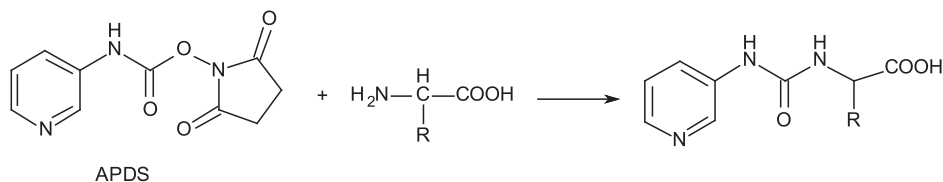
Do derywatywacji amin biogennych zawartych w winie ryżowym Cai wraz z grupą badaczy [22] wykorzystali chlorek d_0 -10-metyloakrydono-2-sulfonylu (d_0 -MASC) oraz chlorek d_3 -10-metyloakrydono-2-sulfonylu (d_3 -MASC). Zastosowanie tej pary odczynników derywatywujących znakowanych izotopowo, która

pełniła rolę uniwersalnego wzorca wewnętrznego, pozwoliło zniwelować błędy popełniane na etapie przygotowania próbki, a także pozytywnie wpłynęło na skrócenie czasu analizy chromatograficznej. Przebieg reakcji derywatywacji ilustruje Schemat 1.



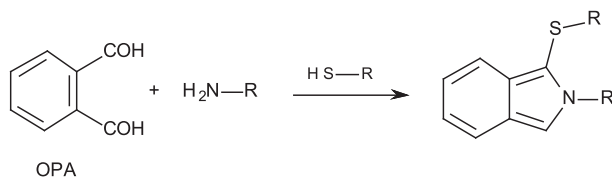
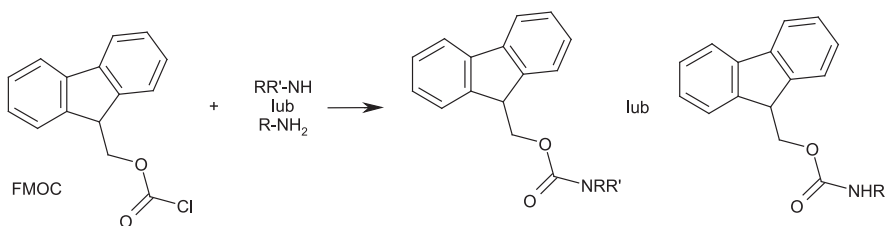
Schemat 1
Scheme 1

Do oznaczania aminokwasów w próbkach osocza człowieka procedurę derywatywacji przedkolumnowej poddano automatyzacji, co niewątpliwie pozytywnie wpłynęło na jej precyzję i powtarzalność oraz zwiększenie ilości próbek, które mogą być jednocześnie analizowane w krótszym czasie [23]. Anality przeprowadzono w pochodne, stosując 3-aminopyridylo-*N*-hydroksysukcynoimid (APDS) jako odczynnik derywatyżujący (Schemat 2).

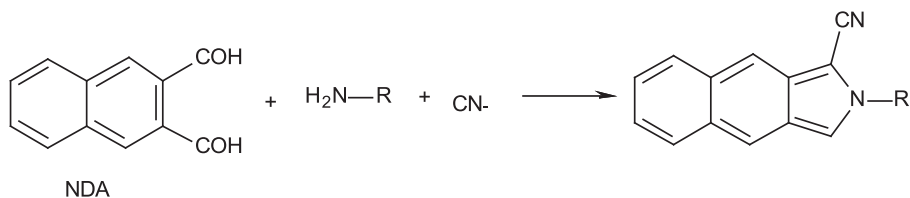


Schemat 2
Scheme 2

Automatyczną procedurę derywatywacji wykorzystano również do oznaczenia zawartości aminokwasów pierwszo- i drugorzędowych [24]. Do oznaczenia aminokwasów pierwszorzędowych jako odczynnik derywatyżujący zastosowano OPA w obecności 2-merkaptoetanolu (2-ME). Natomiast do derywatywacji przedkolumnowej aminokwasów drugorzędowych wykorzystano chloromrówczan 9-fluorenylometylu (FMOC). Równania reakcji z udziałem powyższych odczynników ilustrują odpowiednio Schematy 3 i 4. Automatyzacja procedury derywatywacji, niskie zużycie rozpuszczalników oraz krótki czas analizy (< 19 min), skutkowałą znaczącą liczbą analiz o wysokiej przepustowości. Ograniczeniem stosowania OPA i FMOC była ich niestabilność w temperaturze pokojowej. W swojej pracy Ezquer-Garin i in. wykazali, że OPA w temperaturze otoczenia jest trwały tylko przez co najmniej 4 godziny [25]. OPA i FMOC przechowywane w temperaturze około 5°C nadawały się do użytku tylko przez 7 dni.

Schemat 3
Scheme 3Schemat 4
Scheme 4

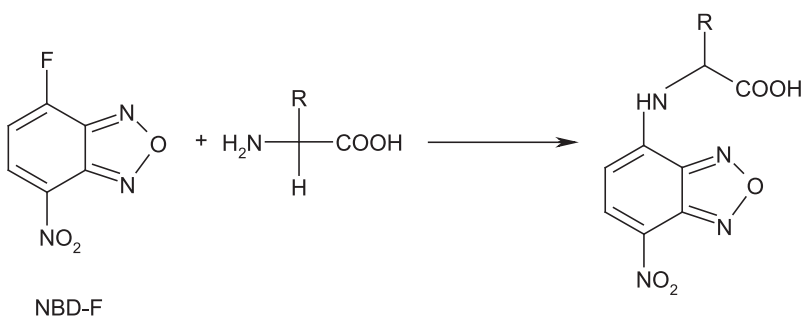
OPA zastosowano również do oznaczenia amikacyny – antybiotyku należącego do grupy aminoglikozydów. W odróżnieniu od metody opisanej przez Buha i in. [24] odczynnikiem sprzęgającym w reakcji derywatywacji z OPA była *N*-acetylo-*L*-cysteina (NAC) (Schemat 3) [25]. Wyniki badań wykazały, że wzrost stężenia NAC zwiększał stabilność powstającej pochodnej fluorescencyjnej, hamując kinetykę reakcji jej rozpadu i jednocześnie spowalniając kinetykę reakcji tworzenia. Konsekwencją tego było wydłużenie czasu potrzebnego do uzyskania maksymalnej wydajności reakcji.

Schemat 5
Scheme 5

W roku 2016, aby oznaczyć śladowe ilości amin alifatycznych reakcję derywatywacji prowadzono z naftaleno-2,3-dikarboksyaldehydem (NDA) w obecności jonu cyjankowego (Schemat 5) [26]. Podczas opracowania procedury derywatywacji bardzo ważny był dobór odpowiedniej ilości NDA, ponieważ jego zbyt wysokie stężenie sprzyjało powstawaniu produktów ubocznych. Stosowany odczynnik derywatywujący charakteryzował się wysoką trwałością. Mógł być przechowywany w lodówce przez kilka tygodni w postaci roztworu w brązowej butelce, owiniętej folią aluminiową. Jedynym ograniczeniem stosowania NDA jest jego cena, ponie-

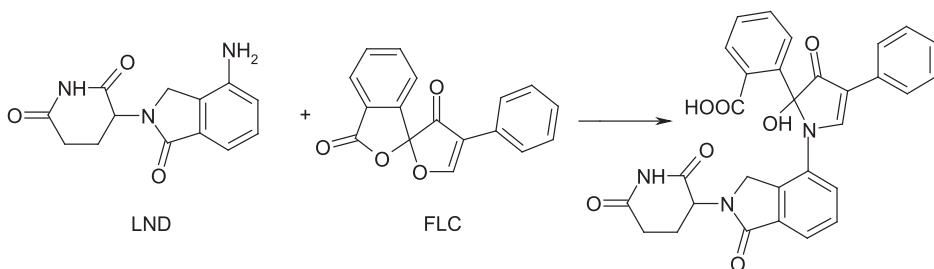
waż jest to jeden z droższych odczynników wykorzystywanych w derywatywacji przedkolumnowej.

Innym odczynnikiem derywatyżującym wykorzystywanym do przekształcenia związków, zawierających grupy aminowe pierwszorzędowe i drugorzędowe w pochodną fluoryzującą był wysoce reaktywny 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol (NBD-F) (Schemat 6). NBD-F został zastosowany do oznaczenia proliny w miodzie [27]. W wyniku reakcji derywatywacji tworzące się pochodne były stabilne przez co najmniej 24 godziny w temperaturze pokojowej. Ograniczeniem procesu derywatywacji był dobór odpowiedniej masy próbek miodu. Ponieważ w przypadku cięższych naważek, NBD-F nie mógł w pełni reagować z oznaczanym analitem, co było prawdopodobnie spowodowane faktem, iż podobnie jak prolina, również inne związki mogły reagować z NBD-F.



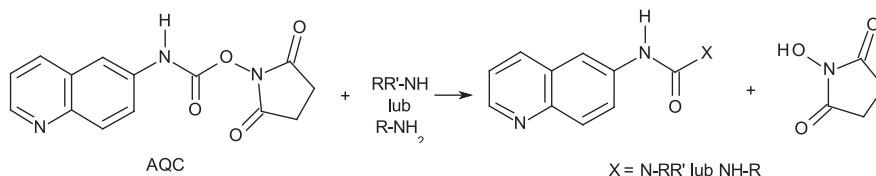
Schemat 6
Scheme 6

Derywatyzację przedkolumnową zastosowano również do oznaczenia lenalidomidu (LND), którego stężenie monitorowano w osoczu człowieka [28]. Konwersję analitu (Schemat 7) z utworzeniem wysoce fluorescencyjnej pochodnej prowadzono z fluoreskaminą (FLC). FLC po rozpuszczeniu w acetonitrylu mogła być przechowywana w temperaturze -20°C w ciągu 7 dni bez dostępu światła.



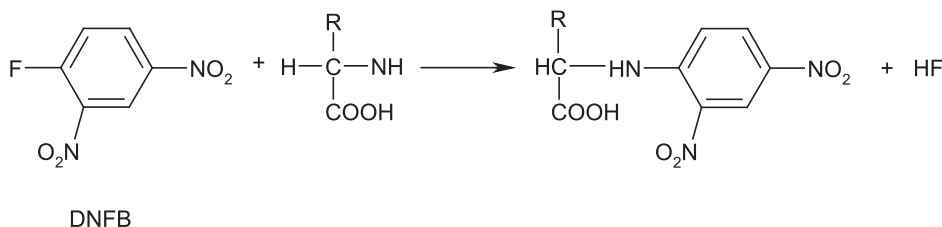
Schemat 7
Scheme 7

Odczynnikiem derywatyżującym, który zastosowano do oznaczania aminokwasów w osoczu krwi pacjentów będących w ostrych stanach chorobowych był karbaminian 6-aminochinolinylo-*N*-hydroksysukcynoimidylu (AQC) (Schemat 8) [29]. Zaletą tego odczynnika był fakt, że tworzące się pochodne mogły być oznaczane z wykorzystaniem detektora UV-Vis oraz detektora FLD. Wybór podwójnej detekcji podyktowany był ograniczeniami opracowanej metody. Znaczną ilość oznaczeń wykonano za pomocą detektora UV-Vis. Ponieważ niektóre zderywatywowane aminokwasy, z uwagi na ich zbyt niskie stężenie, były słabo widoczne na chromatogramie detektora FLD.



Schemat 8
Scheme 8

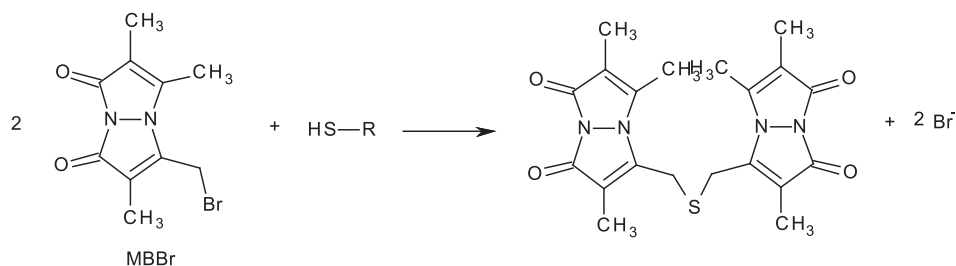
Uniwersalnym i niedrogim odczynnikiem wykorzystywanym w derywatyżacji przedkolumnowej aminokwasów pierwszo- i drugorzędowych jest także 2,4-dinitrofluorobenzen (DNFB) (Schemat 9) [30]. Zaletą tego odczynnika derywatyżującego była wysoka stabilność tworzących się pochodnych aminokwasów w temperaturze pokojowej. Natomiast ograniczeniem procedury derywatyżacji był dobór odpowiedniej ilości DNFB, ponieważ nadmiar tego odczynnika derywatyżującego powodował sygnał analityczny, który interferował z sygnałem analitu.



Schemat 9
Scheme 9

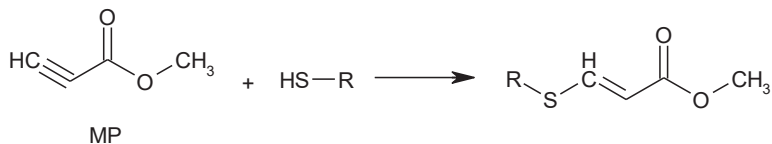
2.2. DERYWATYZACJA PRZEZ GRUPĘ SULFHYDRYLOWĄ

W 2014 roku do derywatyżacji kwasu 3-merkaptopropionowego zastosowano monobromobiman (MBBr) (Schemat 10) [31]. Wybór tego odczynnika derywatyżującego podyktowany był wysoką wydajnością i stabilnością tworzącej się pochodnej fluorescencyjnej. Dzięki temu próbki mogły być przechowywane w temperaturze 4°C, przez co najmniej jeden rok przy zaledwie około 3–5% straty analitu.



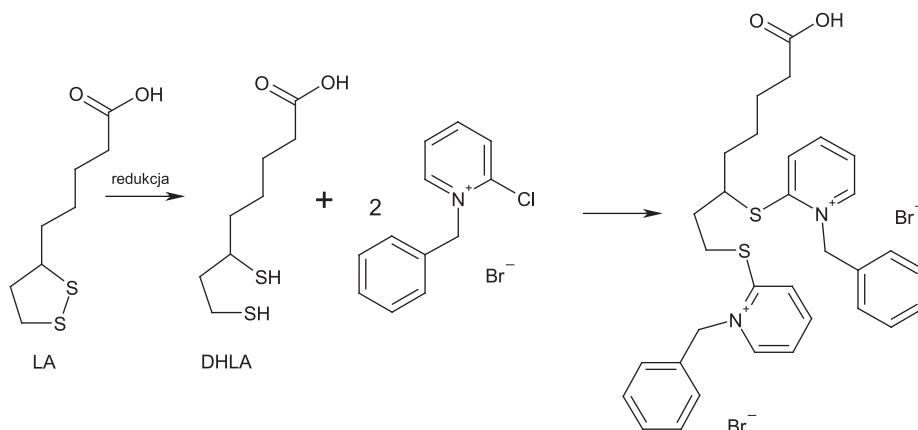
Schemat 10
Scheme 10

Samara wraz z grupą badaczy derywatyzację endogennych tioli (Schemat 11) prowadzili z użyciem propiolanu metylu (MP) [32]. Jak podkreślają autorzy dobór optymalnych warunków do reakcji derywatywacji zapewnił odpowiednią czułość metody oraz wyeliminował powstanie produktów ubocznych.



Schemat 11
Scheme 11

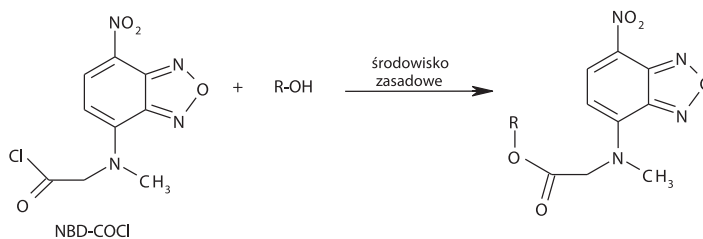
Proces konwersji chemicznej analitu wykorzystano także do oznaczenia kwasu liponowego (LA) w moczu oraz suplementach diety [33]. Reakcję derywatywacji poprzedzono etapem redukcji wiązania disiarczkowego, w celu przekształcenia LA do kwasu dihydroliponowego (DHLA). Zredukowana forma LA była następnie przeprowadzana w pochodną za pomocą bromku 1-benzyl-2-chloropirydyniowego (BCPB) (Schemat 12). W odróżnieniu do innych odczynników derywatywujących, BCPB z DHLA reagował bardzo szybko w temperaturze pokojowej i z dobrą wydajnością.



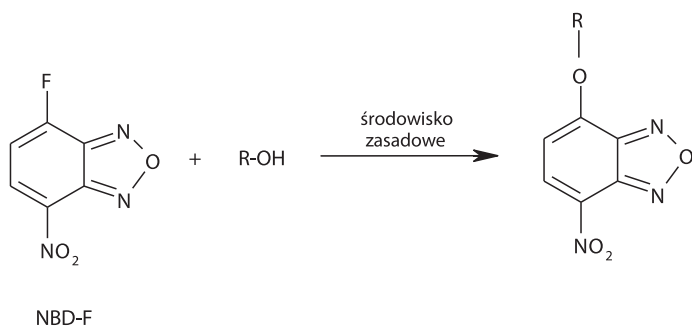
Schemat 12
Scheme 12

2.3. DERYWATYZACJA PRZEZ GRUPĘ HYDROKSYLOWĄ

Przykładem analitu zawierającego w swojej cząsteczce grupę -OH jest eugenol. Do derywatywacji tego związku zastosowano dwa odczynniki derywatyżujące. Jak wynika z danych literaturowych, metoda analityczna oznaczania eugenolu z wykorzystaniem 4-(N-chlorometyloformylometylo-N-amino-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazolu) (NBD-COCl) (Schemat 13) [34] charakteryzowała się 6,7-krotnie wyższą czułością w porównaniu do tej, w której derywatyzację prowadzono z 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazolu (NBD-F) (Schemat 14) [35]. Reakcja derywatywacji eugenolu z NBD-COCl zachodziła w bardzo krótkim czasie w temperaturze pokojowej. Dzięki temu etap przygotowania próbek do analizy nie był czasochłonny, a opracowana metoda oznaczania eugenolu w oleju goździkowym może być z powodzeniem stosowana do rutynowych analiz.



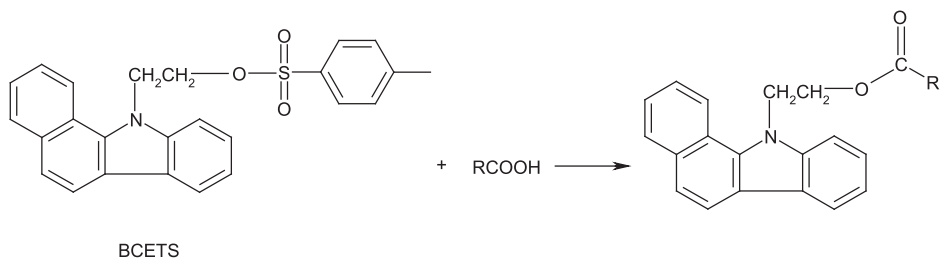
Schemat 13
Scheme 13



Schemat 14
Scheme 14

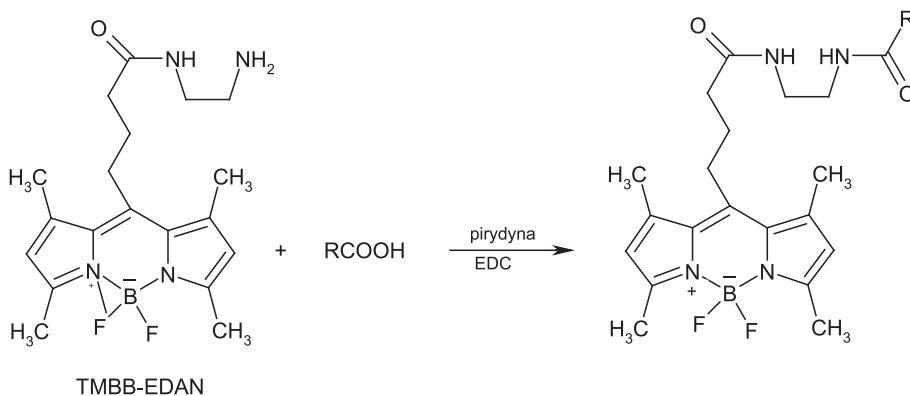
2.4. DERYWATYZACJA PRZEZ GRUPĘ KARBOKSYLOWĄ

Derywatywacja przedkolumnowa zastosowana została również do oznaczania fitohormonów – związków zawierających w swojej strukturze grupę karboksylową [36]. Odczynnikiem, który wykorzystywano do przekształcenia analitów w pochodne fluoryzujące był 2-(11H-benzo[*a*]-karbazol-11-ilo)etylo-4-metylobenzenosulfonian (BCETS). Reakcję (Schemat 15) prowadzono w obecności współrozpuszczalnika *N,N*-dimetyloformamidu i katalizatora K_2CO_3 , aby zwiększyć jej wydajność i selektywność, poprawić czułość detekcji oraz zapobiec wytrącaniu się produktów ubocznych.



Schemat 15
Scheme 15

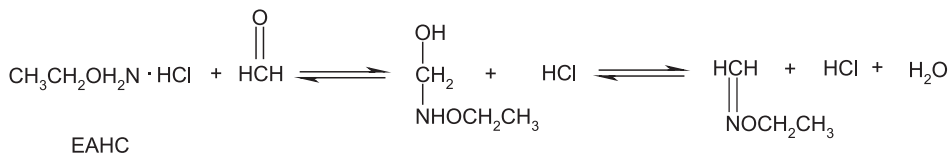
Grupę innych fitohormonów, którą stanowiło 8 giberelin oznaczono również w pomidorach i gruszkach [37]. W tym celu derywatyzację przedkolumnową prowadzono z 1,3,5,7-tetrametylo-8-butyretylenodiaminodifluoroboradiaza-*s*-indacenem (TMBB-EDAN) w obecności chlorowodoru 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimidu (EDC) i pirydyny (Schemat 16). Autorzy w swojej pracy podkreślili, że TMBB-EDAN reagował selektywnie z grupą karboksylową tylko w łagodnych warunkach, co wpłynęło na wydłużenie czasu reakcji derywatywacji.



Schemat 16
Scheme 16

2.5. DERYWATYZACJA PRZEZ GRUPĘ ALDEHYDOWĄ

W roku 2015 opracowano metodę oznaczania formaldehydu w próbkach piwa [38]. Do reakcji derywatywacji zastosowano chlorowodorek etoksyaminy (EAHC), którego pochodne były stabilne tylko przez 2 dni. Procedura przekształcenia analitu w pochodną była relatywnie szybka i przebiegała w łagodnych warunkach.

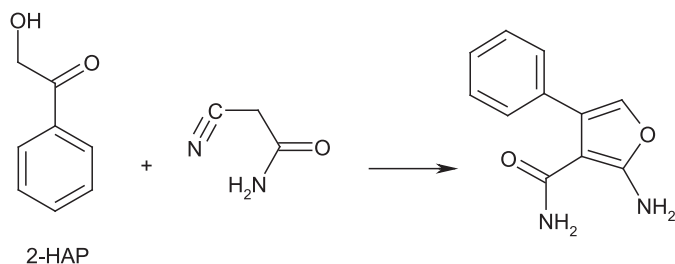


Schemat 17
Scheme 17

2.6. INNE SPOSOBY DERYWATYZACJI ANALITU

W celu określenia zawartości 2-cyanoacetamidu (2-CA) w próbkach farmaceutycznych, optymalizacji poddano dwie procedury przeprowadzania analitu w pochodną fluoryzującą – derywatyzację przed- i pokolumnową [39]. Reakcje wykonywano stosując jako odczynnik derywatyzujący 2-hydroksyacetoftenon (2-HAP) (Schemat 18). Douša i in. wykazali, że metoda oznaczania 2-cyanoacetamidu oparta na derywatywacji przedkolumnowej charakteryzowała się wyższą czułością w porównaniu do metody z zastosowaniem derywatywacji pokolumnowej, ale nieco mniejszą precyzją i dokładnością. Autorzy podkreślali, że ograniczeniem procedury derywatywacji przedkolumnowej była bardzo wysoka temperatura, która nie mogła być przekroczona, ponieważ dochodziło wówczas do degradacji powstającej pochodnej. Z kolei duży nadmiar odczynnika derywatyzującego powodował spadek

intensywności fluorescencji, dlatego też bardzo ważne było dobranie odpowiedniej objętości 2-HAP do reakcji derywatywacji, w wyniku której tworzące się pochodne były stabilne przez około 24 godziny.

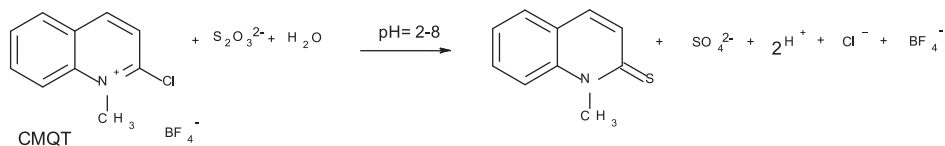


2-HAP

Schemat 18

Scheme 18

W ostatnich latach opracowano metodę oznaczania tiosiarczanów w moczu człowieka z wykorzystaniem tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinolowego (CMQT). Odczynnik ten był również szeroko stosowany do oznaczania egzogennej i endogennej tioli w próbkach biologicznych [4]. Ze względu na to, iż reakcje CMQT z tiosiarczanami towarzyszy silne przesunięcie batochromowe, możliwe było zastosowanie dużych nadmiarów odczynnika derywatyzującego względem analitu, co również wpłynęło na skrócenie czasu reakcji derywatywacji [40].



CMQT

Schemat 19

Scheme 19

W Tabeli 4 zebrano informacje dotyczące prezentowanych w pracy związków, które oznaczane są z zastosowaniem derywatywacji przedkolumnowej.

Tabela 4. Wybrane przykłady metod wykorzystujących derywatazację przedkolumnową
Table 4. The selected methods using pre-column derivatization

Analityt	Odczynnik derywatazujący	Matryca	Charakterystyka procedury derywatazacji	Detekcja	λ [nm]	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ [nm]	LOD	LOQ	Lit.
aminy biogenne	d ₀ -MASC, d ₃ -MASC	wino ryżowe	Derywatazację prowadzono w ciągu 15 minut w podwyższonej temperaturze 55°C w środowisku buforu boranowego o pH 9,4.	MS/MS ESI	-	-	0,15-0,23 ^a μ mol/l	0,50-0,77 ^a μ mol/l	[22]
aminokwasy I ^o i II ^o	APDS	osocze	Reakcję derywatazacji prowadzono w środowisku buforu boranowego w zakresie pH 8,7-8,9 w temperaturze 50°C w ciągu 5 minut.	MS/ESI	-	-	0,12-2,27 ^a μ mol/l	0,39-7,55 ^a μ mol/l	[23]
aminokwasy I ^o	OPA/2-ME	układy biologiczne	Derywatazację prowadzono w środowisku buforu boranowego o pH 9,5 w temperaturze pokojowej.	FLD	-	340/450	34,17-196,05 ^a ng/ml	94,27-594,08 ^a ng/ml	[24]
aminokwasy II ^o	FMOc								
amikacyna	OPA/NAC	osocze	Reakcja przebiegała w ciągu 5 minut w temperaturze 80°C.	FLD	-	337/439	b.d.	1 μ g/ml	[25]
aminy alifatyczne	NDA	wody pitne i z jeziora	Reakcja derywatazacji zachodziła w obecności jonu cyjankowego. Czas reakcji był krótki i w środowisku alkalicznym (pH = 9), w temperaturze pokojowej wynosił 5 minut.	FLD	-	440/480	0,01-0,04 ^a nmol/l	0,04-0,1 ^a nmol/l	[26]
prolina	NBD-F	miód	Derywatazacja przebiegała w ciągu 12 minut w temperaturze 60°C, a tworzące się pochodne były stabilne przez co najmniej 24 godziny w temperaturze pokojowej.	FLD	-	470/530	3 ^a mg/kg	10 ^a mg/kg	[27]
lenalidomid	FLC	osocze	Derywatazacja poprzedzona była deproteinizacją białek przez acetonitryl i związaniem aminokwasów w stabilny kompleks, wskutek dodania octanu miedzi. Supernatant poddawano reakcji derywatazacji, której czas w temperaturze pokojowej wynosił 5 minut.	FLD	-	495/382	0,8 ^a ng/ml	2,3 ^a ng/ml	[28]

Tabela 4.
Table 4.

Ciąg dalszy
Continuation

Analit	Odczynnik derywatyzujący	Matryca	Charakterystyka procedury derywatyzacji	Detekcja		λ [nm]	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ [nm]	LOD	LOQ	Lit.
				FLD	UV-Vis					
aminokwasy I° i II°	AQC	osocze	Reakcja derywatyzacji trwała zaledwie 10 sekund i prowadzona była w obecności buforu boranowego o pH 8,8 w temperaturze pokojowej.	FLD	UV-Vis	250	250/395	0,17–8,06 ^a $\mu\text{mol/ml}$	0,52–24,42 ^a $\mu\text{mol/ml}$	[29]
	DNFB	herbata	Derywatyzację przedkolumnową prowadzono w buforze węglanowym o pH = 9 w temperaturze 60°C w ciągu 60 minut bez dostępu światła. Derywatyzację prowadzono w buforze kwasu 2-(cykloheksyloamino)etanosulfonowego (pH 9,3), bądź Tris-HCl (pH 7,5). Reakcja derywatyzacji w temperaturze pokojowej przebiegała w czasie 15 min.	UV-Vis	UV-Vis	360	–	0,11–4,05 ^a $\mu\text{g/ml}$	0,34–12,26 ^a $\mu\text{g/ml}$	[30]
tirole	MBBr	osady rzeczne	Reakcja przebiegała w temperaturze pokojowej w buforze boranowym o pH=8 z dodatkiem kwasu etylenodiaminotetraoctowego.	FLD	FLD	–	380/480	4,3 ^a nmol/l	14,5 ^a nmol/l	[31]
tirole endogenne	MP	owoce	Reakcję derywatyzacji prowadzono w buforze Tris-HCl o pH 9, której czas w temperaturze pokojowej wynosił 5 minut.	UV-Vis	UV-Vis	285	–	0,1–0,5 ^a $\mu\text{mol/l}$	0,4–1,5 ^a $\mu\text{mol/l}$	[32]
LA	BCPB	mocz, suplementy diety	Reakcja w temperaturze pokojowej w środowisku buforu boranowego o pH 9 przebiegała w ciągu 1 min.	UV-Vis	UV-Vis	321	–	0,1 ^a $\mu\text{mol/l}$	0,2 ^a $\mu\text{mol/l}$	[33]
eugenol	NBD-COCl	olejek goździkowy	Czas reakcji derywatyzacji w temperaturze 40°C oraz w środowisku buforu boranowego o pH 8,5 wynosił 4 min.	FLD	FLD	–	470/540	0,006 ^a $\mu\text{g/ml}$	0,02 ^a $\mu\text{g/ml}$	[34]
	NBD-F	olejki eteryczne		UV-Vis	UV-Vis	380	–	0,04 ^a $\mu\text{g/ml}$	0,13 ^a $\mu\text{g/ml}$	[35]

Tabela 4.
Table 4.
Ciąg dalszy
Continuation

Analityt	Odczynnik derywatyzujący	Materia	Charakterystyka procedury derywatywacji	Detekcja	λ [nm]	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ [nm]	LOD	LOQ	Lit.
fitohormony	BCETS	owoce i warzywa	Reakcję prowadzono w obecności współrozpuszczalnika <i>N,N</i> -dimetyloformamid i katalizatora K_2CO_3 w temperaturze 90°C. Czas reakcji derywatywacji był stosunkowo krótki i wynosił 20 minut.	MS/APCI	-	279/380	1,7–2,6 ^a nmol/l	b.d.	[36]
				FLD					
formaldehyd	EAHC	gruszki i pomidory	Odczynnik derywatyzujący efektywnie reagował z giberelinami w temperaturze 25°C w ciągu 75 minut, w obecności EDC i pirydyny. Reakcja derywatywacji prowadzona była w buforze fosforanowym o pH = 6 w temperaturze 25°C w czasie 20 minut.	FLD	205	-	0,081–0,22 ^a nmol/l	b.d.	[37]
				UV-Vis					
2-CA	2-HAP	farmaceutyki	Reakcja derywatywacji w środowisku buforu boranowego o pH 11 w temperaturze około 100°C przebiegała w ciągu 8 minut.	MS/APCI	-	315/383	0,4 ^a µg/l	1,1 ^a µg/l	[39]
				FLD					
tiotiazyny	CMQT	mocz	Reakcję prowadzono w środowisku kwaśnym w zakresie pH 2–8. Czas derywatywacji był krótki i w temperaturze pokojowej przy 10-krotnym nadmiarze odczynnika wynosił zaledwie 2 minuty.	UV-Vis	375	-	0,3 ^a µmol/l	0,5 ^a µmol/l	[40]

^a Obliczone dla roztworów standardowych.

b.d. - brak danych.

3. DERYWATYZACJA POKOLUMNOWA

Derywatywacja pokolumnowa posiada wiele zalet oraz wad (Tab. 3). Do jej niewątpliwych atutów można zaliczyć skrócenie czasu przygotowania próbki, ponieważ odczynnik derywatyzujący wprowadzany jest do układu. Zostaje zatem wyeliminowany wieloetapowy proces derywatywacji przedkolumnowej, który może być źródłem zmniejszonej powtarzalności uzyskiwanych wyników. Kolejną zaletą jest tworzenie się pochodnych tuż przed ich detekcją, co ułatwia pracę z analitami, które tworzą mało stabilne pochodne. Mocną stroną tej metody jest także możliwość stosowania kilku detektorów, które wykorzystywane są do oznaczania zarówno powstałych po reakcji pochodnych, jak i związków przed derywatyzacją. Niestety, jak każda procedura analityczna, również derywatywacja pokolumnowa posiada swoje wady. Największym minusem jest konieczność częstego stosowania długich pętli reakcyjnych, co wpływa niekorzystnie na efektywność rozdzielania. Dodatkowo ten rodzaj derywatywacji wiąże się z większymi kosztami zakupu sprzętu, ponieważ konieczne jest wyposażenie chromatografu w dodatkową pompę dozującą odczynnik derywatyzujący. Zastosowanie derywatywacji pokolumnowej wiąże się również z zużyciem większych ilości odczynnika derywatyzującego. Odczynnik ten, z uwagi na szybkość przepływu analitu z kolumny do detektora, musi charakteryzować się wysoką reaktywnością [6].

3.1. DERYWATYZACJA PRZEZ GRUPĘ AMINOWĄ

Do oznaczania amin biogennych techniką HPLC najczęściej stosuje się jako odczynnik derywatyzujący OPA, który reaguje z grupą aminową analitu w obecności grup sulfhydrylowych (Schemat 3) [41–45]. W świetle derywatywacji pokolumnowej odczynnik ten charakteryzuje się szybką kinetyką reakcji w temperaturze pokojowej, a także tworzeniem wysoce fluorescencyjnej pochodnej. Co jest ważne, odpowiedni dobór czynnika nukleofilowego np. 2-ME, jak również ograniczony dostęp światła zapobiegają degradacji odczynnika derywatyzującego. Natomiast dodanie środka powierzchniowo czynnego (np. Brij 35) znacznie poprawia stabilność tworzących się pochodnych. Innym odczynnikiem derywatyzującym, który reaguje ze związkami zawierającymi grupę aminową jest 1,2-naftochinono-4-sulfonian sodu (NQS) [46]. W przeciwieństwie do OPA jest jednym z rzadziej stosowanych odczynników, mimo, iż cechuje się niskimi kosztami. NQS reaguje z grupami aminowymi w roztworze alkalicznym tworząc pochodną fluorescencyjną. Ze względu na ten fakt odczynnik derywatyzujący rozpuszczano w fazie ruchomej, a dopiero eluat mieszał się z NaOH w pętli reakcyjnej. NQS został zastosowany do derywatywacji pokolumnowej streptomycyny występującej w ogórku i kapuście pekińskiej.

3.2. DERYWATYZACJA Z WYKORZYSTANIEM NANOCZĄSTEK

Proces derywatywacji pokolumnowej można również prowadzić z zastosowaniem nanocząstek tlenku terbu (Tb_4O_7 NPs) jako odczynnika derywatyżującego do oznaczania pozostałości antybiotyków chinolonowych w próbkach mleka [47]. Etap derywatywacji opierał się na tworzeniu luminescencyjnych chelatów chinolonów z Tb_4O_7 NPs. Derywatyzację pokolumnową prowadzono również z wykorzystaniem nanocząstek złota (AuNPs) pokrytych niejonowym surfaktantem - Zonylem. Indukowana przez analit agregacja AuNPs mierzona była kolorymetrycznie. Zaletą takiej reakcji jest niezwykle szybka kinetyka agregacji nanocząstek oraz wysoka selektywność wiązania się z homocysteiną [48].

3.3. DERYWATYZACJA PRZEZ GRUPĘ SULFHYDRYLOWĄ

Derywatyzację związków zawierających w swojej cząsteczce nukleofilową grupę -SH w obecności odpowiedniej aminy pierwszorzędowej w środowisku zasadowym prowadzono z użyciem OPA [49]. Jony amonowe niezbędne do utworzenia wysoce fluorescencyjnej pochodnej rozpuszczone były w fazie ruchomej. Innym odczynnikiem derywatyżującym, który zastosowano do derywatywacji związków tiolowych był odczynnik Ellmana (kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy)) (DTNB) [50]. Reakcję derywatywacji biotiole z DTNB prowadzono w obecności metylo- β -cyklodekstryny. Dodanie tego związku cyklicznego do odczynnika derywatyżującego ułatwiało jego reakcję z tiolami. Özyürek wraz z współ. zaobserwowali również, że DTNB uprzednio rozpuszczony w roztworze metylo- β -cyklodekstryny zwiększał stabilność tworzących się pochodnych.

3.4. INNE SPOSOBY DERYWATYZACJI ANALITU

Jak opisano wcześniej w podrozdziale 2.6, odczynnik derywatyżujący 2-HAP może być stosowany do derywatywacji 2-cyjanoacetamidu zarówno w reakcji prowadzonej przedkolumnowo, jak i pokolumnowo (Schemat 18) [40]. Autorzy wykazali, że w przeciwieństwie do metody opartej na derywatywacji przedkolumnowej, metoda wykorzystująca derywatyzację pokolumnową charakteryzowała się wyższą precyzją i dokładnością. W 2015 r. opublikowano pracę, w której derywatyzację pokolumnową z 2,2-difenylo-1-pikrylhydrazylem (DPPH) wykorzystano do oznaczania szeregu homologicznego skondensowanych polifenoli w niepalonych ziarnach kakaowca [51]. Niewątpliwie zaletą tego odczynnika derywatyżującego jest fakt, iż umożliwia oznaczanie polifenoli, a także określenie zdolności przeciwutleniającej wydzielonych skondensowanych polifenoli.

Zestawienie omawianych metod oznaczania wybranych związków z zastosowaniem derywatywacji pokolumnowej przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Wybrane przykłady metod wykorzystujących derywatyzację pokolumnową
Table 5. The selected methods using post-column derivatization

Analityt	Odczynnik derywaty- zujący	Matryca	Charakterystyka procedury derywatywacji	Detekcja	λ [nm]	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ [nm]	LOD	LOQ	Lit.
aminy biogenne		owoce tropikalne	Mieszanka niezbędna do przeprowadzenia badanych analizów w pochodną fluorydującą składała się z OPA, 2-ME oraz dostępnego handlowo roztworu Brij-35. Całość rozpuszczano w buforze boranowym, aby pH otrzymanego roztworu było równe 10,5. Reakcję derywatywacji prowadzono w warunkach temperatury pokojowej.	FLD	-	340/450	b.d.	0,01–0,08 ^a mg/100g	[41]
histamina		świeże ryby oraz z puszki		FLD	-	340/450	0,03 ^a mg/kg	0,09 ^a mg/kg	[42]
aminy biogenne	OPA	mięso i produkty jego pochodzenia kukurydza i produkty jej pochodzenia		FLD	-	330/465	0,2 mg/kg	0,5 mg/kg	[43]
			Odczynnik derywatywujący z dodatkiem 2-ME rozpuszczano w roztworze tetraboranu sodu, a końcowa wartość pH wyniosła 10. Temperatura układu reakcyjnego nie przekraczała 25°C. Reakcja derywatywacji prowadzona była w reaktorze pokolumnowym PCRS-100 o objętości 250 μ l, którego pętla kapilarna miała średnicę 0,42 mm.	FLD	-	345/450	0,001–0,0004 ^b %	0,004– 0,011 ^a %	[45]
aminoalkohole	OPA	L-walinal		FLD	-				
streptomycyna	NQS	ogórek i kapusta pekińska	Reakcja derywatywacji zachodziła w środowisku alkalicznym w pętli kapilarnej o wymiarach 0,3 mm \times 10 m. Temperatura układu reakcyjnego utrzymywana była na poziomie 50°C.	FLD	-	263/435	10 ng/g	30 ng/g	[46]
chinolony	Tb ₄ O ₇ NPs	mleko o różnej zawartości tłuszczu	Mieszanka derywatywująca składała się z Tb ₄ O ₇ NPs, tlenku trioktylofosfiny, dodocylotioarzanu sodu oraz buforu Tris i heksaminy. Reakcję derywatywacji prowadzono w zakresie pH 7–7,5.	FLD	-	340/545	2–35 ^a ng/ml	5–65 ^a ng/ml	[47]

Tabela 5. Ciąg dalszy
Table 5. Continuation

Analityt	Odczynnik derywaty-zujący	Matryca	Charakterystyka procedury derywaty-zacji	Detekcja	λ [nm]	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ [nm]	LOD	LOQ	Lit.
Hcy	AuNPs	mocz i osocze	Reakcja derywaty-zacji prowadzona była w reaktorze pokolumnowym RXN 1000 o objętości 1 ml, o średnicy pięci kapilarnej 0,45 mm. Proces agregacji mejonowych nanocząsteczek fluorosurfaktanta zachodził w środowisku buforu fosforanowego o pH = 6 w temperaturze 70 °C w ciągu 30 sekund.	UV	680	-	80 ^a pmol	b.d.	[48]
glutation	OPA	wino	Pętla reakcyjna miała wymiary 0,5 mm x 120 cm. Reakcja prowadzona była w buforze boranowym o pH 10, w którym rozpuszczony był OPA, natomiast jony amonowe biorące udział w tworzeniu pochodnej znajdowały się w fazie ruchomej płynącej przez kolumnę.	FLD	-	340/455	19 ^a nmol/l	62 ^a nmol/l	[49]
biotiole	DTNB	flony biologiczne i farmaceutyki	Reakcję derywaty-zacji prowadzono w pięci reakcyjnej o wymiarach 0,5 mm x 5 m. Reakcja zachodziła w środowisku buforu fosforanowego o pH 2,85.	UV	410	-	0,04–0,58 μ mol/l	b.d.	[50]
2-CA	2-HAP	farmaceutyki	Reakcję derywaty-zacji prowadzono w środowisku buforu boranowego o pH 11. Temperatura układu reakcyjnego utrzymywana była na poziomie 100°C. Reaktor wyposażony był w kapilarną pięć długości 127 cm. Czas reakcji derywaty-zacji wynosił 8 min.	MS/APCI	-	356/445	3,8 ^a μ g/l	12,5 ^a μ g/l	[40]

Tabela 5. Ciąg dalszy
Table 5. Continuation

Analityt	Odczynnik derywaty-zujący	Matryca	Charakterystyka procedury derywaty-zacji	Detekcja	λ [nm]	$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ [nm]	LOD	LOQ	Lit.
aktywność antyoksyda-cyjna	DPPH	niepalone ziarna kakaowca	Reakcja derywaty-zacji zachodziła w pętli kapilarnej o wymiarach 0,38 mm × 4,5 m. Czas reakcji był krótki i odpowiadał 1 minucie. Wyposażony w kapilarną pętlę reaktor termostatowany był w temperaturze 60°C.	UV-Vis	515	-	6-27 ^a µg/ml	19-83 ^a µg/ml	[51]

^a Obliczone dla roztworów standardowych.
b.d. - brak danych.

4. DERYWATYZACJA W KOLUMNIE

Spośród trzech rodzajów prowadzenia reakcji derywatywacji ta w kolumnie jest najrzadziej stosowana. W połączeniu z techniką HPLC umożliwia prowadzenie szybkich i prostych analiz z uzyskaniem wąskich i ostrych pików w porównaniu do analiz z wykorzystaniem derywatywacji pokolumnowej [1].

Na przestrzeni lat 2010–2016 zostały opublikowane 3 artykuły, dotyczące zastosowania derywatywacji chemicznej biegnącej w kolumnie chromatograficznej (Tab. 6).

Tabela 6. Wybrane przykłady metod wykorzystujących derywatywację w kolumnie

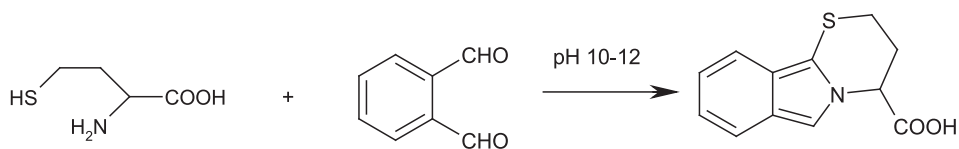
Table 6. The selected methods using on-column derivatization

Analit	Odczynnik derywatyzujący	Matryca	Detekcja	$\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ [nm]	LOD [$\mu\text{mol/l}$]	LOQ [$\mu\text{mol/l}$]	Lit.
zred. Hcy	OPA	mocz	FLD	370/480	b.d.	0,025 ^a	[52]
tHcy					b.d.	0,025 ^a	
tiolakton Hcy		mocz			b.d.	0,02 ^a	[53]
tHcy					b.d.	0,25 ^a	
tHcy		osocze			b.d.	0,25 ^a	
N-Hcy					b.d.	0,25 ^a	
tHcy		wino			0,05 ^a	0,1 ^a	[54]

^a Obliczone dla roztworów standardowych.

b.d. – brak danych.

Opisane analizy prowadzono techniką HPLC z detekcją FLD [52–54]. Odczynnikiem, który wykorzystywano do przekształcania badanych analitów w pochodną fluoryzującą był OPA (Schemat 20). Opracowane metody pozwoliły na oznaczanie: formy zredukowanej (Hcy) i całkowitej homocysteiny (tHcy) w moczu człowieka [52]; tiolaktonu homocysteiny, homocysteiny związanej z proteinami wiązaniem amidowym (N-Hcy) oraz tHcy w osoczu i moczu człowieka [53]; jak również tHcy w winie [54]. Do fazy ruchomej dodawano OPA oraz 0,1 M NaOH, w konsekwencji czego pH fazy było silnie zasadowe. Wykonanie analizy o wysokiej wydajności w drastycznych warunkach umożliwiło zastosowanie kolumny PRP-1 Hamilton C18. Z uwagi na jej stabilność w zakresie pH 1–13, reakcja derywatywacji mogła być prowadzona przy wysokich wartościach pH (8–13). Dzięki temu nie dochodziło do degradacji wypełnienia kolumny i utraty jej sprawności.



Schemat 20
Scheme 20

Derywatywacja w kolumnie uprościła procedurę, umożliwiając tym samym bezpośrednio oznaczenie hydrolizatów białek osocza [54], co znacząco przyspieszyło również oznaczenie formy *N*-Hcy. Dodatkowo pozwoliła ona obniżyć wartości LOD tHcy w moczu, w porównaniu do wcześniej opisanej metody [53]. Przedstawione powyżej metody oparte na derywatywacji w kolumnie z OPA, przede wszystkim eliminują ograniczenia derywatywacji pokolumnowej. Skracają całkowity czas analizy oraz pozwalają uzyskać wąskie piki chromatograficzne.

PODSUMOWANIE

Koncepcja zielonej chemii propaguje działania zmierzające do wyeliminowania, bądź ograniczenia stosowania procesu derywatywacji. Dostępne są procedury analityczne stosowane do rozdzielania analitów bez ich uprzedniego przeprowadzenia w pochodne. Jednakże często są one bardzo pracochłonne, bądź wymagają specjalistycznej aparatury. Dlatego też alternatywą wobec tych ograniczeń staje się proces derywatywacji, który przede wszystkim zwiększa selektywność i czułość oznaczeń. Poprzez wprowadzenie odpowiednich grup funkcyjnych, poprawia właściwości separacyjne analizowanych związków oraz umożliwia ich detekcję. Przeprowadzenie analitu w pochodną z wykorzystaniem powszechnie dostępnych odczynników derywatywujących można łatwo zautomatyzować, zmniejszając ilość etapów przygotowania próbki i tym samym poprawić powtarzalność uzyskiwanych wyników. Liczne zalety oraz szeroka gama odczynników derywatywujących warunkują nieustanny rozwój technik derywatywacji i opracowywanie nowych procedur oznaczania.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R.L. Grob, M.A. Kaiser, *Environmental problem solving using gas and liquid chromatography*, Elsevier, Amsterdam, New York 1982.
- [2] J. Kalembkiewicz, T. Ruman, *Wiad. Chem.*, 2004, **58**, 113.
- [3] J. Namieśnik, W. Chrzanowski, P. Szpinek, *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym*, CEEAM, Gdańsk 2003.
- [4] P. Furmaniak, M. Wyszczelska-Rokiel, P. Kubalczyk, R. Głowacki, *Wiad. Chem.*, 2014, **68**, 211.

- [5] L. Coppex, Derivatives for HPLC Analysis. Diploma thesis, [online], University of Genf, 2000, [dostęp: 2016-07-12]. Dostępny w Internecie: <https://pl.scribd.com/doc/189706760/Derivatives-for-HPLC-Analysis>.
- [6] A. Jones, S. Pravadali-Cekic, G.R. Dennis, R.A. Shalliker, *Anal. Chim. Acta*, 2015, **889**, 58.
- [7] N.D. Cheronis, H. Stein, V.M. Levey, *Microchem. J.*, 1957, **1**, 39.
- [8] P.E. Butler, W.H. Mueller, *Anal. Chem.*, 1966, **38**, 1407.
- [9] F.A. Fitzpatrick, S. Siggia, *Anal. Chem.*, 1973, **45**, 2310.
- [10] I.R. Politzer, G.W. Griffin, B.J. Dowty, J.L. Laseter, *Anal. Lett.*, 1973, **6**, 539.
- [11] R.W. Frei, L. Michel, W. Santi, *J. Chromatogr.*, 1976, **126**, 665.
- [12] K. Blau, G.S. King, *Handbook of Derivatives for Chromatography*, Heyden & Son Ltd.: London 1977.
- [13] J.C. Gfeller, J.M. Huen, J.P. Thevenin, *J. Chromatogr.*, 1978, **166**, 133.
- [14] K. Saito, M. Horie, H. Nakazawa, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, 1995, **36**, 639.
- [15] A. Namera, A. So, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A*, 2002, **963**, 295.
- [16] M.C. Prieto-Blanco, C. Ch'áfer-Peric'as, P. L'opez-Mah'ia, P. Camp'ins-Falc', *J. Chromatogr. A*, 2008, **1188**, 118.
- [17] M. Saaid M, B. Saad, A.S.M. Ali, M.I. Saleh, C. Basheer, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 5165.
- [18] X. Xu, R. Su, X. Zhao, Z. Liu, Y. Zhang, D. Li, X. Li, H. Zhang, Z. Wang, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **707**, 92.
- [19] Y.Z. Baghdady, K.A. Schug, *J. Sep. Sci.*, 2016, **39**, 102.
- [20] R. Herráez-Hernández, C. Cháfer-Pericás, P. Campins-Falcó, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **513**, 425.
- [21] E. Kłodzińska, W.A. Filipiak, M. Szumski, B. Buszewski, *Chemia i Inżynieria Ekologiczna*, 2004, **11**, 423.
- [22] Y. Cai, Z. Sun, G. Chen, X. Liu, J. You, C. Zhang, *Food Chem.*, 2016, **192**, 388.
- [23] H. Yoshida, K. Kondo, H. Yamamoto, N. Kageyama, S.I. Ozawaa, K. Shimboa, T. Muramatsu, A. Imaizumi, T. Mizukoshi, J. Masuda, D. Nakayama, Y. Hayakawa, K. Watanabe, K. Mukaiabatake, H. Miyano, *J. Chromatogr. B*, 2015, **88**, 998.
- [24] S.M. Buha, A. Panchal, H. Panchal, R. Chambhare, S. Kumar, M. Jain, P.R. Patel, *J. Chromatogr. Sci.*, 2011, **49**, 118.
- [25] C. Ezquer-Garin, L. Escuder-Gilabert, Y. Martín-Biosca, R.F. Lisart, S. Sagrado, M.J. Medina-Hernández, *Talanta*, 2016, **150**, 510.
- [26] C.Y. Wang, S.Y. Tung, Y.S. Lo, H.L. Huang, C.H. Ko, Ch.H. Wu, *Talanta*, 2016, **152**, 475.
- [27] Y. Li, J. Zhou, X. Xue, L. Wu, L. Chen, J. Zhang, S. Yang, *Anal. Methods*, 2015, **7**, 7625.
- [28] N.Y. Khalil, I.A. Darwish, T.A. Wani, A.R. Al-Majed, *Chem. Cent. J.*, 2013, **1**, 52.
- [29] H. Wang, Y.R. McNeil, T.W. Yeo, N.M. Anstey, *J. Chromatogr. B*, 2013, **940**, 53.
- [30] N. Li, Y. Liu, Y. Zhao, X. Zheng, J. Lu, Y. Liang, *Food Anal. Methods*, 2016, **9**, 1307.
- [31] P. Salgado, T. Visnevschi-Necrasov, R.P. Kieneb, I. Azevedo, A.C.S. Rochaa, C.M.R. Almeida, C. Magalhães, *J. Chromatogr. B*, 2015, **992**, 103.
- [32] A. Samara, A. Zotou, P. Tzanavaras, *Food Anal. Methods*, 2016, **9**, 680.
- [33] G. Chwatko, P. Kubalczyk, E. Bald, *Curr. Anal. Chem.*, 2014, **10**, 320.
- [34] Y. Higashi, *J. Anal. Chem.*, 2015, **70**, 1401.
- [35] Y. Higashi, Y. Fujii, *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, 2011, **34**, 18.
- [36] G. Li, S. Liu, Z. Sun, L. Xia, G. Chen, J. You, *Food Chem.*, 2015, **170**, 123.
- [37] Y.H. Lu, Y.M. Cao, X.F. Guo, H. Wang, H.S. Zhang, *Anal. Methods*, 2016, **8**, 1520.
- [38] J. Zhao, G. Wang, T. Cao, Z. Guo, *Food Anal. Methods*, 2016, **9**, 156.
- [39] M. Douša, J. Břicháč, M. Tkadlecová, S. Man, J. Zezula, J. Hájiček, T. Pekárek, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 2016, **128**, 391.

- [40] G. Chwatko, E. Bald, *Talanta*, 2009, **79**, 229.
- [41] P. Santiago-Silva, R.A. Labanca, M. Beatriz, A. Gloria, *Food Res Int.*, 2011, **44**, 1264.
- [42] W.P. Evangelista, T.M. Silva, L.R. Guidi, P.A.S. Tette, R.M.D. Byrro, P. Santiago-Silva, Ch. Fernandes, M.B.A. Gloria, *Food Chem.*, 2016, **211**, 100.
- [43] D. Rosinska, J. Lehotay, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 2014, **37**, 609.
- [44] C.M. Bandeira, W.P. Evangelista, M.B.A. Gloria, *Food Chem.*, 2012, **131**, 1355.
- [45] M. Douša, J. Stach, P. Gibala, K. Lemr, *J. Sep. Sci.*, 2016, **39**, 851.
- [46] B. Chen, H. Zhang, B. Lin, J. Ge, L. Qiu, *J. AOAC Int.*, 2012, **95**, 523.
- [47] G.S. Yáñez-Jácome, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, *J. Chromatogr. A*, 2015, **1405**, 126.
- [48] C. Lu, Yanbing Zu, V.W-W. Yam, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 666.
- [49] C.K. Zacharis, P.D. Tzanavaras, T.D. Karakosta, D.G. Themelis, *Anal. Chim. Acta*, 2013, **795**, 75.
- [50] M. Özyürek, S. Baki, N. Güngör, S.E. Çelik, K. Güçlü, R. Apak, *Anal. Chim. Acta*, 2012, **750**, 173.
- [51] V. Pedan, N. Fischer, S. Rohn, *Food Res. Int.*, 2015, **89**, 890.
- [52] R. Głowacki, K. Borowczyk, E. Bald, H. Jakubowski, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **396**, 2363.
- [53] R. Głowacki, E. Bald, H. Jakubowski, *Amino Acids*, 2011, **41**, 187.
- [54] R. Głowacki, K. Borowczyk, E. Bald, *Amino Acids*, 2012, **42**, 247.
- [55] R. Głowacki, *Wiad. Chem.*, 2009, **63**, 11.
- [56] J.M. Płotka-Wasyłka, C. Morrison, M. Biziuk, J. Namieśnik, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 4693.

Praca wpłynęła do Redakcji 28 grudnia 2016