

原位衍生化技术在液相色谱和液相色谱-质谱联用分析中的应用

杜苑琪, 肖小华*, 李攻科*

(中山大学化学学院, 广东 广州 510275)

摘要: 衍生化是将待分析物转化为更合适的物质形式以便于分析的有效手段。原位衍生化技术作为一种常用的柱前衍生化方法,可以在样品基质中同时完成分析物的萃取和衍生化,具有高效、灵敏和选择性好的优点。原位衍生化结合其他前处理技术广泛用于胺类、醛酮类、醇类、酚类、羧酸和巯基化合物的分析中,在生物、药物、食品、环境、化妆品分析等领域有广泛的应用。该文概述了原位衍生化的反应类型和代表性衍生试剂,综述了原位衍生化技术在液相色谱和液相色谱-质谱联用分析中的应用,并展望其发展趋势。

关键词: 原位衍生化;液相色谱;液相色谱-质谱;综述

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2018)07-0579-09

Applications of in situ derivatization in liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry

DU Yuanqi, XIAO Xiaohua*, LI Gongke*

(School of Chemistry, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Derivatization is an effective method to analyze substances, in which the analyte is converted into a more suitable form for analysis. As one of the most used pre-column derivatization methods, in situ derivatization can simultaneously extract and derivatize the analyte in a sample matrix, resulting in good efficiency, sensitivity, and selectivity of the analytical method. Recently, in situ derivatization combined with sample pretreatment techniques has been widely used in biological, drug, food, environmental, and cosmetic samples for the analysis of trace amines, aldehydes and ketones, alcohols, phenols, carboxylic acids, and thiols. This review summarizes the reaction types and representative derivatization reagents of in situ derivatization. The applications of in situ derivatization in liquid chromatography (LC) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis are examined. Furthermore, the long-term prospects and potential applications of in situ derivatization are discussed.

Key words: in situ derivatization; liquid chromatography (LC); liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS); review

衍生化(derivatization)技术是将待分析物转化为其他更适合物质形式以便于分析检测的一种有效手段^[1]。它可以改变分析物的理化性质或增强

离子化效率、消除基质干扰,提高物质分离度,增强检测器灵敏度和目标物选择性^[2,3],广泛应用于食品、环境、医药、生物等领域的微痕量分析物高灵敏

收稿日期: 2018-02-20

* 通讯联系人. Tel: (020) 84111664, E-mail: xiaoxhua@mail.sysu.edu.cn (肖小华); Tel: (020) 84110922, E-mail: cesgkl@mail.sysu.edu.cn (李攻科).

基金项目: 国家自然科学基金项目(21475153, 21675178, 21675179); 广东省自然科学基金项目(2015A030311020); 广东省公益研究与能力建设专项(2015A030401036); 广州市科技计划项目(201604020165).

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 21475153, 21675178, 21675179); Key Project of Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 2015A030311020); Public Welfare Research and Capacity Building of Guangdong Province (No. 2015A030401036); Guangzhou Science and Technology Project (No. 201604020165).

分析检测中。衍生化技术一般分为柱前、柱后和柱上衍生化等形式,其中柱前衍生化应用最广,又可细分为萃取前衍生化(pre-extraction derivatization)、萃取后衍生化(post-extraction derivatization)和原位衍生化(in situ derivatization)^[3]。

柱上衍生化需要对目标物进行预处理,将其转变为适合衍生化的形式后在柱上衍生,或需要先对柱子进行衍生化试剂加载等预处理,步骤繁琐、限制较多,使用频率较低。而柱后衍生化虽具有引入的物质少、影响因素小的优点,但可供选择的反应有限,同时需要额外的仪器设备,导致了峰展宽、分辨率低等问题。相比前两种衍生化方法,柱前衍生化可选择的衍生化反应和试剂较多,反应条件可控,不需要额外设备,故应用最广。但在柱前衍生化中,无论萃取前衍生化还是萃取后衍生化,均涉及对样品的大量操作以及有机试剂的消耗,增加了样品前处理时间。

原位衍生化将萃取和衍生化过程在样品基质中同步进行,因此耗时短、效率高,有效地提高了分析方法的灵敏度和选择性^[3]。同时,原位衍生化可以与固相微萃取、液相微萃取等技术联用,减少操作和有机溶剂的消耗,使样品前处理技术向更高效、更环保的方向发展。原位衍生化反应一般在水介质中进行,可分析极性小分子或其他难以检测的极性物质;水介质下的衍生不仅有助于减少或消除有机溶剂的使用,而且衍生化产物一般不需要预提取,减少了操作步骤;与色谱等分析检测技术联用易实现自动化和在线化^[4]。目前有关原位衍生化技术的综述性文章较少。2013 年, Ferreira 等^[2]综述了原位衍生化技术在气相色谱分析中的应用。2016 年, Baghdady 等^[5]重点介绍了原位衍生技术在增强 LC-MS 生物分析灵敏度方面的应用。国内有关原位衍生化的综述尚未见报道。本文介绍了原位衍生化反应类型和代表性衍生试剂,综述了近年来原位衍生化技术在 LC 和 LC-MS 分析中的应用进展。

1 原位衍生化反应的类型

原位衍生化反应主要分为酰基化反应、硅烷化反应、烷基化反应、希夫碱反应、脎化反应和亲和反应,涉及胺类、醛酮类、醇类、酚类、羧酸和巯基化合物。表 1 列举了原位衍生化反应类型及其常用试剂。

酰基化反应一般在碱性条件下进行,温度适中、

时间较短、产量高且试剂成本低,羟基、羧基或氨基化合物的衍生化反应多属于此类反应。该衍生物具有生色基团,可以增加 LC-UV 或 LC-FLD 的检测灵敏度;或提供更多的离子化质谱信息,从而增强 LC-MS 的检测灵敏度。一般而言,酰氯类试剂的普适性较好,可以与胺类、醇类、酚类或者羧酸等多类物质反应;而酸类、酯类等衍生化试剂的专属性相对较好,仅与羟基化合物或羧酸类物质等一类物质反应。这些衍生化反应需要注意试剂的水解、衍生化产物不稳定等问题,借助液-液微萃取^[9]等方法,可以将衍生物从水溶液中分离以提高产物的稳定性。

硅烷化反应是有机物的活泼氢与硅烷化试剂的反应,因硅烷化试剂在水中稳定性差,应用较少。但结合分散液-液微萃取(dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME)等技术,可以使衍生物的提取速度比分解速度快,从而缓解稳定性差的问题,拓展其应用范围。

烷基化反应是在有机分子中的 C、N、O、P 或 S 等原子上引入烷基或取代烷基的反应,常用于醇类、酚类和巯基化合物的衍生化。以巯基化合物为例,烷基化反应增加了巯基化合物的稳定性^[45],对这些不稳定物质的分析有重要意义。

希夫碱反应主要应用于胺类物质的衍生化检测,其衍生化试剂多为醛类试剂,代表性试剂为邻苯二甲醛(OPA)^[47]和 2,3-萘二甲醛(NDA)^[50]。该类反应灵敏且迅速,可在室温进行,但反应产物不稳定,需尽快测定。结合衍生化与萃取技术可改善产物不稳定的缺点,尤其是开发自动进样器的在线自动衍生化方法,如 OPA 在线衍生化检测氨基酸^[48],将有效降低产物不稳定性对分析灵敏度的影响。

脎化反应广泛应用于醛类、酮类和部分羧酸类化合物的衍生化检测。相比其他反应,脎化反应的衍生化试剂和产物在水溶液中较为稳定,但反应需要一定的温度,时间较长。

相比其他衍生化反应,亲和反应较为少见,但它可以增加质谱检测的灵敏度,提高峰容量,有利于离子峰的确认,对酸性和两性物质的选择性检测具有优势。以酸性和两性神经化学物质的检测为例,苯甲酰化和丹酰化衍生法的阳离子模式质谱检测灵敏度较低,出现峰形畸变、保留力弱、低峰容量等问题。而 Lee 等^[58]利用甲醇进行亲和反应后产生特定的正离子,不需要检测模式的极性切换,即可对酸性和两性离子神经化学物质进行选择性的衍生化检测。

表 1 原位衍生化反应类型及其常用试剂

Table 1 Classification of reaction types and reagents in in situ derivatization

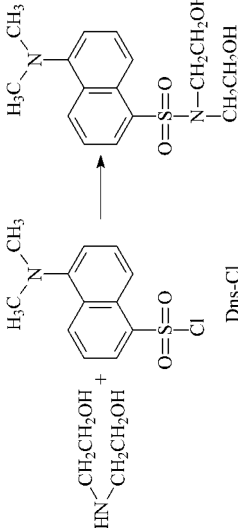
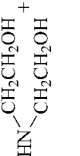
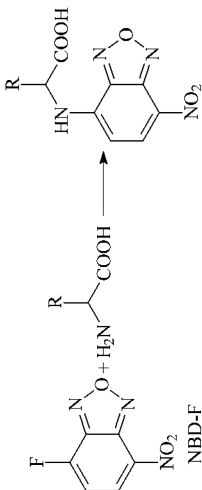
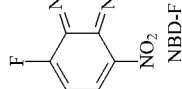
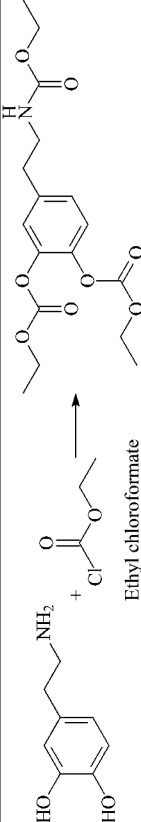
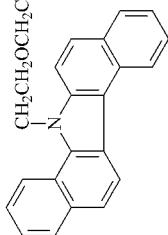
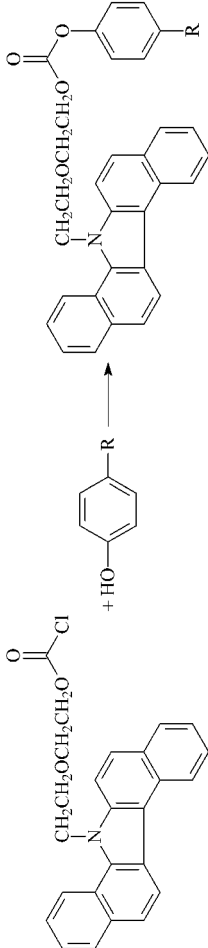
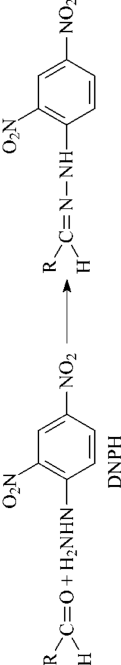
Reaction	Type of reagent	Reagent	Example	Analyte	Reference
Acylation	acyl chlorides	dansyl chloride (Dns-Cl)		amines [6-8]	[9-11]
		benzoyl chloride		amines, alcohols	
		4-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride (DABS-Cl)		amines, phenols [12,13]	[14,15]
		9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl)		amines, carboxylic acids	
		1,2-dimethylimidazole-4-sulfonyl chloride (DMISC)		phenols [16,17]	
		4-[2-(N,N-dimethylamino)ethyl-aminosulfonyl]-7-(2-aminoethyl-amino)-2,1,3-benzoxadiazole (DAABD-AE)		carboxylic acids [18,19]	
esters		2,4-dinitrofluorobenzene (FDNB)		amines [20,21]	[22]
		4-bromobenzenesulfonyl chloride		amines [22]	
		7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-F)		amines [23]	
		ethyl chloroformate		amines, phenols [24,25]	
		isobutyl chloroformate		amines [26]	
		phenylisothiocyanate (PITC)		amines [27,28]	[29]
		6-aminoquinoly-1-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC)		amino acids	
		2-[2-(7H-dibenzo[a,g]carbazole-7-yl)-ethoxy]ethyl chloroformate (DBCEC-Cl)		phenols [30]	

表 1 (续)
Table 1 (Continued)

Reaction	Type of reagent	Reagent	Example	Analyte	Reference
	acids	3-nitrophthalic anhydride		allylic	[31]
		acetic anhydride		isoprenols	
		1,2-benzo-3,4-dihydrocarbazole-9-ethyl chloroformate (BCEOC)		alcohols	[32]
		2,4,6-trinitrobenzene sulfonate (TNBS)		amines	[33, 34]
		picolinic acid		dipeptides	[35]
		2-bromopyridine-5-boronic acid (BPBA)		hydroxy-androgens	[36]
		<i>m</i> -aminophenylboronic acid (<i>m</i> -APBA)		brassinosteroids	[37]
		Marfey's reagent, such as <i>N</i> ^w -(5-fluoro-2,4-dinitrophenyl)-D-leucinamide (FDAA), <i>N</i> ^w -(5-fluoro-2,4-dinitrophenyl)-D-leucinamide (D-FDLA)		brassinosteroids	[38]
	chiral reagents			enantiomeric amines	[39-42]
Silylation	silylation reagents	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA)		alcohols, phenols	[43]
	esters	methyl acrylate (MA)		thiols	[44]
Alkylation	ketone	2-bromo-3'-methoxyacetophenone (MPB)		thiols	[45]
	amide	iodoacetamide (IAM)		thiols	[46]
Schiff base formation	aldehydes	<i>o</i> -phthalaldehyde (OPA)		amines	[47-49]
		naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA)		amines	[50]

表 1 (续)
Table 1 (Continued)

Reaction	Type of reagent	Reagent	Example	Analyte	Reference
Hydrazone formation	hydrazine	2,4-dinitro-phenyl hydrazine (DNPH)		aldehydes, ketones	[51-53]
		3-nitrophenylhydrazine (3-NPH) 2-nitrophenylhydrazine (2-NPH)		carboxylic acids	[54,55]
	amide	hydroxylamine hydrochloride (HAHC)		aldehydes	[56]
	isotope labeling reagent	4-(2-(trimethylammonio)ethoxy)-benzenaminium halide (4-APC), <i>d</i> ₄ -4-(2-(trimethylammonio)ethoxy) benzenaminium halide (4-APC- <i>d</i> ₄)		aldehydes	[57]
Neutralization	neutralization reagents	methanol (MeOH) 4-(dimethylamino)phenylboronic acid (4-DMAPBA)		neuro-chemicals	[58]
				endogenous brassino steroids	[59]

2 原位衍生化技术在液相色谱和液相色谱-质谱联用分析中的应用

原位衍生化技术在生物、食物、药物、环境和化妆品等领域有广泛应用。根据样品基体、待分析物的特点和检测需要,可以选择合适的衍生化试剂进行反应,将待分析物转化成为易于分析检测的化合物。原位衍生化技术和液液萃取、固相萃取等前处理技术结合,可以提高衍生化产物的稳定性,缩短分析时间、提高检测灵敏度。

2.1 生物样品分析

生物样品包括各种体液和组织,血浆和血清是最常见的生物样品。使用离线或在线原位衍生复杂基质中的胺类、醇类、酚类、羧酸类、醛酮类和巯基化合物,不仅减少了样品制备步骤,提高了萃取富集效率;同时增强了 LC-MS 稳定性,具有更好的色谱分离效果和选择性。

2.1.1 胺类化合物

胺类物质无紫外和荧光响应,采用液-液微萃取或固相微萃取的原位衍生化是分析胺类药物和氨基酸类化合物的有效手段。盐酸美金刚是治疗中度到重度的帕金森病和阿尔茨海默病的常用药物,Jing 等^[8]将丹磺酰氯(Dns-Cl)原位衍生化法和中空纤维液相微萃取结合,建立了人血浆中痕量盐酸美金刚含量测定的高效液相色谱-荧光检测方法。结果表明,衍生化和微萃取结合加速了萃取的传质过程,提高了分析方法的灵敏度,定量限为 0.3 ng/mL。通过将浊点萃取法和 OPA 柱前衍生法结合,Pourghobadi 等^[49]开发了人血浆样品中胺类抗癫痫药物加巴喷丁的高效液相色谱-紫外检测方法。在 3-巯基丙酸存在下,分别以 OPA 和聚乙二醇辛基苯基醚为衍生化试剂和萃取溶剂,回收率为 94.5%~98.7%。该法具有低成本、安全、富集能力高、回收率高的优点。Shamsipur 等^[26]基于氯甲酸异丁酯衍生法和分散液液微萃取技术,进行了人尿液样品中包括肌氨酸、丙氨酸、亮氨酸和脯氨酸在内的前列腺癌代谢标志物的 LC-MS 检测。萃取和衍生的过程可以在 5 min 内完成,富集因子和回收率分别为 140~155 和 93.8%~106%,方法快速简单、选择性强、富集效果好。

新型原位衍生化试剂的开发拓宽了原位衍生化的应用。1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙基氯甲酸(BCEOC)是 You 等^[33]首次合成的新型荧光衍生化

试剂,可快速标记肽和氨基酸,时间短并且衍生物稳定。Zhao 等^[34]将 BCEOC 应用于同时衍生化大鼠脑浆中的谷氨酸、 γ -氨基丁酸、多巴胺、5-羟色胺和 5-羟基吲哚乙酸,建立了高效灵敏的 HPLC-FLD 方法。该方法灵敏度高,检出限为 0.398 ~ 1.258 nmol。

2.1.2 羟基化合物

羟基化合物的衍生化反应时间短,产量高且试剂成本低,应用于血液中激素和药物含量的检测。Maas 等^[16]采用 1,2-二甲基咪唑-4-磺酰氯(DMISC)衍生化人血清中的麻醉剂异丙酚,将其转化为 DMISC 衍生物后进行 LC-MS/MS 分析,实现电离和断裂的改善,提高了检测灵敏度,检出限为 0.95 ng/mL。Xu 等^[17]结合了酶水解、固相萃取和 DMISC 衍生化技术,在 10 min 内完成衍生化,并利用 LC-MS/MS 进行生物标志物 1-羟基萘的监测分析。基于吡啶甲酸衍生化,Zang 等^[36]开发了同时检测九个羟基雄激素及其在人血清中的缀合物的 LC-MS/MS 方法。衍生物吡啶甲酸酯的生成改善质子亲和力,减少基质干扰,改善了电离效率,检出限为 1.0~2.5 ng/dL。该方法被应用于研究雄激素二酯在雄激素生物合成中的作用和前列腺癌的诊断和治疗效果追踪。

2.1.3 羧酸类化合物

酸类物质的衍生化检测较为少见。4-[2-(*N,N*-二乙基氨基)乙基氨基磺酰基]-7-(2-氨基乙基氨基)-2,1,3-苯并恶二唑(DAABD-AE)是 Santa 等^[18]开发的新型衍生化试剂,其衍生物具有高质子亲和力,可提供特征性离子质谱信息。该课题组将 DAABD-AE 试剂成功应用于血浆中降植烷酸、植烷酸和二十六酸等长链脂肪酸^[19]的 LC-MS/MS 分析,利用 DAABD-AE 对血浆的分析物进行水解、提取和衍生化,以诊断戊二酸血症和过氧化物酶体紊乱。

2.1.4 醛酮类化合物

醛类和酮类的衍生化反应属于腙化反应,其检测常与固相萃取结合。目前已开发研制出各类新型固相萃取材料,被应用于癌症标记物的检测上。Liu 等^[51]合成了 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ /聚(甲基丙烯酸-co-乙二醇二甲基丙烯酸酯)磁固相萃取材料,建立了人尿中的内源性己醛和庚醛的磁固相萃取-原位衍生-HPLC-UV 测定方法。衍生化试剂 DNPH 吸附在材料表面后,在 9 min 内完成己醛和庚醛的萃取和衍

生,检出限分别为 1.7 nmol/L 和 2.5 nmol/L。该方法已成功应用于测定健康人和肺癌患者尿液中内源性的己醛和庚醛。Wu 等^[52]合成了天然无毒的聚多巴胺/双醛淀粉/壳聚糖(PD/DAS/CHI)材料,并固定在聚四氟乙烯管的内壁上。结合 DNPH 衍生化和管内固相微萃取,开发了检测人体血液中的两种肝癌生物标志物己醛和 2-丁酮的高效液相色谱方法。该方法在 11 min 内完成衍生和富集,具有简单、快速和灵敏的优点,可应用于肝癌的筛查。

2.1.5 巯基化合物

巯基化合物不稳定,易氧化,紫外、荧光或质谱信号较差。衍生化可固定巯基,提高检测灵敏度,改善分析方法的选择性^[60]。原位衍生化技术已广泛应用于巯基生物样品的分析检测。Takahashi 等^[45]开发了检测人血浆中氯吡格雷(一种血小板聚集抑制剂)代谢物的 LC-MS/MS 方法,固相萃取和衍生化的结合稳定了血液中巯基代谢产物,防止了样品基质对检测的干扰。检测的范围为 0.5 ~ 250 ng/mL,线性良好。Mompelat 等^[46]建立分析家禽肌肉、肾脏和血浆中头孢噻唑的 LC-MS 方法,在碘乙酰胺衍生化后采用固相萃取进行富集,方法选择性和特异性高,检出限为 30.3 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.2 食品分析

食品基体复杂,待分析物的种类繁多,基质干扰严重。食品样品的制备、高效提取与净化是主要的技术难点^[61]。原位衍生化技术与前处理技术的结合,能简化样品制备和分析步骤,增加萃取效果,增强物质的检测信号,降低基质对分析的干扰。

生物胺是一类具有生物活性、含氨基的低分子质量化合物。大多数食品中都含有生物胺,主要由微生物氨基酸脱羧酶作用于氨基酸脱羧而生成^[62],其过量摄入会使人体产生不良反应。结合 Dns-Cl 原位衍生化和中空纤维液相微萃取,Saaïd 等^[6]利用 HPLC-UV 检测虾酱和番茄酱样品中的色胺、腐胺、尸胺、组胺、酪胺和亚精胺 6 种生物胺。该方法简单,萃取使用的有机溶剂少,富集因子为 47~456。Fu 等^[10]结合快速提取和苯甲酰氯衍生化,建立了检测鱼肉中生物胺的超高效液相色谱-三重四极杆质谱方法。该方法 10 min 即可获得稳定的生物胺衍生物,检出限达到 pg/mL 水平。结合液相微萃取和苯甲酰氯衍生化,Jia 等^[11]开发了测定白葡萄酒、红酒、米酒和啤酒 4 种酒精饮品中生物胺的 HPLC-UV 方法。该方法绿色环保、成本低,检出限为

0.005~0.01 $\mu\text{g/mL}$ 。

食品中氨基酸含量分析也是热点之一。Kwanyuen 等^[27]使用苯异硫氰酸酯(PITC)衍生化氨基酸,开发了测定大豆氨基酸含量的 HPLC-UV 方法。与其他方法相比,具有简便成本低、自动分析,大批量处理的优点。芮鸿飞等^[28]采用 PITC 衍生化测定黄酒中 17 种氨基酸和 7 种生物胺的含量,氨基酸和生物胺的线性范围分别为 2.0~500 mg/L 和 0.5~125 mg/L。该方法线性范围广、准确性高、稳定性好。

高氨基酸含量对其他胺类物质的检测造成一定干扰,原位衍生化技术与液-液微萃取的结合可解决此问题。Chang 等^[47]将 OPA 原位衍生化和微萃取技术结合,用于测定高氨基酸含量的牛奶、啤酒等样品中 C1~C8 直链脂肪族伯胺的含量,并采用涡旋辅助液-液微萃取(vortex-assisted liquid-liquid microextraction, VALLME)富集衍生物,检出限为 0.09~0.31 nmol。

2.3 药物分析

药物分析涉及药物研发、药物代谢、药品质量控制和药物制剂分析等领域^[63]。药物的分子结构较为复杂,衍生化后增加分析物的质子亲和力,提高目标物的离子化效率,产生特征离子产物,可以提高检测灵敏度。Jalalizadeh 等^[21]采用 2,4-二硝基氟苯(FDNB)衍生化测定粉末状片剂样品中盐酸美金刚,方法检测限为 0.2 $\mu\text{g/mL}$,比 9-氯甲酸苄基酯(FMOC-Cl)法更低,灵敏度更高。Lacroix 等^[12]采用 4-二甲氨基偶氮苯-4'-磺酰氯(DABS-Cl)衍生化大麻素,其衍生物在正电喷雾模式下易质子化,使信号强度增强,显著改善了检测灵敏度,定量限为 0.25~0.80 ng/mL。Michail 等^[54]将可溶性碳二亚胺耦合剂和 2-硝基苯肼衍生化应用于定量在药物中的甲氨蝶呤和吡哆美辛,检出限分为 0.08 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.03 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4 环境分析

原位衍生化技术与液相微萃取方法或者固相萃取结合,提高对水体等环境样品中目标物的富集萃取效果,增强检测的灵敏度,对水体污染物的监测有重要意义。Wang 等^[50]开发了测定瓶装水、自来水和湖泊样品中的痕量直链脂肪族伯胺的 HPLC-FLD 方法。在氰化物存在下,NDA 衍生化脂肪族伯胺,同时采用 VALLME 方法富集衍生化产物。王晓燕等^[30]采用 DLLME 衍生化与 HPLC-FLD 结合,实现

了对环境水样中 4 种酚类内分泌干扰物的测定。方法快速高效、条件温和、灵敏度高,约 5 min 能完成整个富集与衍生过程,检出限低至 0.01~0.04 nmol/L。相比 OPA 法,该方法荧光衍生物更稳定、信号更强,且富集能力更强,富集因子为 2~70。Yu 等^[43]开发了测定河水中除草剂苯噻草胺及其 3 种代谢产物的 LC-MS 方法。该方法将 *N*-甲基-*N*-三甲基硅烷三氟乙酰胺(MSTFA)衍生化和固相萃取结合,回收率为 78.6%~101.2%,精密度好、选择性强,有效监测环境水体中苯噻草胺代谢产物残留。

2.5 化妆品分析

化妆品是现代生活的必需品之一,因其与人体皮肤直接接触,化妆品的安全性问题被关注。化妆品添加的重金属、防腐剂、防晒剂、染色剂和激素等对人体健康具有潜在危害^[64]。原位衍生化技术在化妆品分析检测上,具有提高萃取效果和维持衍生化产物的稳定性的作用,已应用于化妆品中的禁用、禁用物质的检测。基于胶束提取和 Dsn-Cl 原位衍生化方法,Li 等^[7]开发了检测化妆品中的痕量二乙醇胺的 HPLC-UV 方法。衍生化、萃取和浓缩可在 10 min 内完成,方法快速、简单有效、环保。Miralles 等^[9]采用苯甲酰氯衍生化苯乙醇、甲基丙二醇、苯丙醇、辛酰二醇和乙基己基甘油等 5 种化妆品防腐剂,并结合涡旋辅助液-液半微萃取(vortex-assisted liquid-liquid semimicroextraction, VALLsME),开发了检测 5 种防腐剂的 HPLC-UV 方法。采用 VALLsME 提高了衍生化产物的稳定性,对控制化妆品质量有重要意义。吕春华等^[53]建立了化妆品中游离甲醛的柱前衍生化-萃取阻断反应-HPLC 测定方法。采用 2,4-二硝基苯肼(DNPH)乙醇溶液-磷酸盐缓冲液作为化妆品的提取溶液,快速衍生 2 min 后立即加入二氯甲烷萃取,阻断衍生反应,有效避免甲醛缓释剂类防腐剂分解释放甲醛造成的干扰。该方法快速、简便、重现性好,定量限为 50 $\mu\text{g/g}$ 。

2.6 其他分析

对映异构体的手性鉴别已经成为分析化学领域,特别是药品、食品分析以及临床、法医分析的热点。手性衍生化法不需专门的手性色谱分离,衍生化时间可短至 10 min,且相对安全。手性原位衍生化多使用 Marfey 试剂与胺类化合物上发生反应。Marfey 试剂已被用于测定尿、口服液等样品中苯丙胺类化合物的对映体组成^[39]。Shu 等^[40]利用

Marfey 衍生化技术,建立了测定头发样品中甲基苯丙胺的对映体组成的非手性的 LC-MS/MS 方法。该方法不需要定量每种对映异构体,线性范围为 80 ~ 18 000 pg/mg,相关性好,可应用于甲基苯丙胺阳性病例的确认。Nakanishi 等^[41]开发了测定尿液中药物 3,4-亚甲二氧基甲基安非他明及其代谢产物对映异构体的 LC-MS/MS 方法。该方法简单温和、无需萃取,衍生化反应 30 min 后可直接进样分析。刘浩等^[42]利用非手性 HPLC 系统实现达托霉素中 8 种手性氨基酸的 D, L-构型的分离测定,各氨基酸衍生物、FDAA 以及反应副产物之间均可得到有效分离。

3 结论与展望

本文总结了原位衍生化反应类型和代表性衍生试剂,综述了原位衍生化技术在液相色谱和液相色谱-质谱联用分析中的应用进展。作为一种常用的柱前衍生化方法,原位衍生化可在样品基质中同时完成分析物的萃取和衍生化,具有高效、灵敏和选择性好的优点。近年来,原位衍生化结合前处理技术广泛用于胺类、醛酮类、醇类、酚类、羧酸和巯基化合物分析中,在生物、药物、食品、环境、化妆品分析等领域有广泛应用。

然而在原位衍生化过程中,为了使衍生化产率最大化,需大量或过量使用衍生化试剂,样品中的反应性基质也干扰了衍生化过程,降低衍生化反应的产率。故原位衍生化要求衍生化试剂能以高浓度加入而不引起显著性的离子抑制,并且对目标分析物有高选择性、选择性和抗基质干扰力。此外,部分衍生化试剂能与水反应或分解,导致在分析过程出现较大的干扰峰;部分衍生化试剂的衍生化产物不稳定,也增加了分析难度,带来了分析误差。故原位衍生化要求衍生化试剂能在水溶液中稳定存在,可通过与液液微萃取等技术的结合,改善或增强衍生化产物的稳定性,缩短了前处理的时间。但原位衍生化与萃取结合的相关技术仍涉及有机溶剂的使用,将有机溶剂用量最小化,甚至不使用有机溶剂显得尤为重要。现阶段已有在线原位衍生化技术的报道^[59],实现了在线自动化分析,但对衍生萃取富集过程的设计提出了较高要求,仍未能广泛推广。因此选择性和灵敏度高的新型衍生化试剂的研制、与更有效快速、环保的前处理技术的结合和在线衍生化方法与仪器的研究是重要的发展方向。

参考文献:

- [1] Zacharis C K, Tzanavaras P D. *Anal Chim Acta*, 2013, 798: 1
- [2] Ferreira A M C, Laespada M E F, Pavón J L P, et al. *J Chromatogr A*, 2013, 1296: 70
- [3] Qi B, Liu P, Wang Q, et al. *TrAC-Trends Anal Chem*, 2014, 59: 121
- [4] Lin H, Wang J, Zeng L, et al. *J Chromatogr A*, 2013, 1296: 235
- [5] Baghdady Y Z, Schug K A. *J Sep Sci*, 2016, 39(1): 102
- [6] Saaid M, Saad B, Ali A S, et al. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(27): 5165
- [7] Li X, Shi J, Chen L, et al. *Anal Methods*, 2016, 8(14): 2915
- [8] Jing S J, Li Q L, Jiang Y. *J Chromatogr B*, 2015, 1008: 26
- [9] Miralles P, Vrouvaki I, Chisvert A, et al. *Talanta*, 2016, 154: 1
- [10] Fu Y, Zhou Z, Li Y, et al. *J Chromatogr A*, 2016, 1465: 30
- [11] Jia S, Ryu Y, Kwon S W, et al. *J Chromatogr A*, 2013, 1282: 1
- [12] Lacroix C, Saussereau E. *J Chromatogr B*, 2012, 905: 85
- [13] Akhlaghi Y, Ghaffari S, Attar H, et al. *Amino Acids*, 2015, 47(11): 2255
- [14] Wang S, Liu B, Yuan D, et al. *Talanta*, 2016, 161: 700
- [15] Boonchiangma S, Ratchakrut P, Chanthai S, et al. *Chromatographia*, 2015, 78(13/14): 923
- [16] Maas A, Maier C, Michel-Lauter B, et al. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(6): 1547
- [17] Xu L, Spink D C. *J Chromatogr B*, 2007, 855(2): 159
- [18] Tsukamoto Y, Santa T, Saimaru H, et al. *Biomed Chromatogr*, 2005, 19(10): 802
- [19] Aldirbashi O Y, Santa T, Rashed M S, et al. *J Lipid Res*, 2008, 49(8): 1855
- [20] Zhao Y L, Mou D H, Li Y. *Food Science*, 2015, 36(6): 178
赵英莲, 牟德华, 李艳. *食品科学*, 2015, 36(6): 178
- [21] Jalalizadeh H, Raei M, Tafti R F, et al. *Sci Pharm*, 2014, 82(2): 265
- [22] Croyal M, Dauvilliers Y, Labeeuw O, et al. *Anal Biochem*, 2011, 409(1): 28
- [23] Li Y, Zhou J, Xue X F, et al. *Anal Methods*, 2015, 7(18): 7625
- [24] Park J Y, Myung S W, Kim I S, et al. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36(2): 252
- [25] Leung E M, Chan W. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(6): 1807
- [26] Shamsipur M, Naseri M T, Babri M. *J Pharmaceut Biomed*, 2013, 81/82: 65
- [27] Kwanyuen P, Burton J W. *J Am Oil Chem Soc*, 2010, 87(2): 127
- [28] Rui H F, Zhang X Y, Liu X Q, et al. *Food Science*, 2016, 37(8): 159
芮鸿飞, 张晓瑜, 刘兴泉, 等. *食品科学*, 2016, 37(8): 159
- [29] Zeng F, Ou J, Huang Y, et al. *Food Anal Method*, 2015, 8(2): 428
- [30] Wang X Y, Qi W M, Zhao X E, et al. *Chinese Journal of*

- Chromatography, 2014, 32(6): 623
- 王晓燕, 元伟梅, 赵先恩, 等. 色谱, 2014, 32(6): 623
- [31] Teshima K, Kondo T. J Pharmaceut Biomed, 2008, 47(3): 560
- [32] Licea-Perez H, Junnotula V, Zohrabian S, et al. Anal Meth-ods, 2016, 8(15): 323
- [33] You J, Ming Y, Shi Y, et al. Talanta, 2005, 68(2): 448
- [34] Zhao X, Suo Y. Talanta, 2008, 76(3): 690
- [35] Hanh V T, Kobayashi Y, Maebuchi M, et al. Food Chem, 2016, 190: 345
- [36] Zang T, Tamae D, Mesaros C, et al. J Steroid Biochem, 2017, 165: 342
- [37] Huo F, Wang X, Han Y, et al. Talanta, 2012, 99: 420
- [38] Wu Q, Wu D, Shen Z, et al. J Chromatogr A, 2013, 1297: 56
- [39] Newmeyer M N, Concheiro M, Huestis M A. J Chromatogr A, 2014, 1358: 68
- [40] Shu I, Alexander A, Jones M, et al. J Chromatogr B, 2016, 1028: 145
- [41] Nakanishi K, Katagi M, Zaitsu K, et al. Anal Bioanal Chem, 2012, 404(8): 2427
- [42] Liu H, Qiu Y. Chinese Journal of Antibiotics, 2016, 41(1): 45
- 刘浩, 裴亚. 中国抗生素杂志, 2016, 41(1): 45
- [43] Yu Z, Liu B, Jiang Z, et al. J Chromatogr A, 2009, 1216(15): 3090
- [44] Wang G, Hsieh Y, Wang L, et al. Anal Chim Acta, 2003, 492(1/2): 215
- [45] Takahashi M, Pang H, Kawabata K, et al. J Pharmaceut Biomed, 2008, 48(4): 1219
- [46] Mompelat S, Fourmond M, Laurentie M, et al. J Chromatogr A, 2015, 1407: 119
- [47] Chang W Y, Wang C Y, Jan J L, et al. J Chromatogr A, 2012, 1248: 41
- [48] Shen R, Yang R Z, Li L. Grain Distribution Technology, 2017, 10(19): 124
- 沈锐, 杨荣振, 李磊. 粮食流通技术, 2017(19): 124
- [49] Pourghobadi Z, Heydari R, Pourghobadi R, et al. Monatsh Chem, 2013, 144(6): 773
- [50] Wang C Y, Tung S Y, Lo Y S, et al. Talanta, 2016, 152: 475
- [51] Liu J, Yuan B, Feng Y. Talanta, 2015, 136: 54
- [52] Wu S, Cai C, Cheng J, et al. Anal Chim Acta, 2016, 935: 113
- [53] Lü C H, Huang C Q, Chen M, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2012, 30(12): 1287
- 吕春华, 黄超群, 陈梅, 等. 色谱, 2012, 30(12): 1287
- [54] Michail K, Moneeb M S. J Pharmaceut Biomed, 2011, 55(2): 317
- [55] Han J, Lin K, Sequeira C, et al. Anal Chim Acta, 2015, 854: 86
- [56] Chen D, Ding J, Wu M K, et al. J Chromatogr A, 2017, 1493: 57
- [57] Yu L, Liu P, Wang Y, et al. Analyst, 2015, 140(15): 5276
- [58] Lee W, Park N H, Ahn T B, et al. J Chromatogr A, 2017, 1526: 47
- [59] Ding J, Jiang L, Feng Y Q. Chinese Journal of Chromatography, 2014, 32(10): 1094
- 丁俊, 蒋丽, 冯钰琦. 色谱, 2014, 32(10): 1094
- [60] Liu Ping. [PhD Dissertation]. Wuhan: Wuhan University, 2016
- 刘平. [博士学位论文]. 武汉: 武汉大学, 2016
- [61] Li X M, Wang J, Zhang Q H, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2015, 33(11): 1147
- 李晓敏, 王景, 张庆合, 等. 色谱, 2015, 33(11): 1147
- [62] Wang G Q, Yu J S, Hu J, et al. Food Science, 2016, 37(1): 269
- 王光强, 俞剑桑, 胡健, 等. 食品科学, 2016, 37(1): 269
- [63] Jin L C, Fan Y M, Hou X R, et al. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2015, 35(9): 1520
- 金力超, 范玉明, 侯晓蓉, 等. 药物分析杂志, 2015, 35(9): 1520
- [64] Zhang Y S, Lin Z H, Hu Y L, et al. Journal of Instrumental Analysis, 2016, 35(2): 127
- 张艳树, 林振华, 胡玉玲, 等. 分析测试学报, 2016, 35(2): 127