การทำอนุพันธ์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทางเภสัชกรรม
(Derivatization in Pharmaceutical Analysis)

จำนวนหน่วยกิจการศึกษาต่อเนื่อง
3 หน่วยกิต

ผู้เขียนบทความ
อ.ภญ.สิริกัญญา แก้วประดิษฐ์
สำนักวิชาเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

บทคัดย่อ

การทำอนุพันธ์ (derivatization) เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์กับสารที่ใช้ในปฏิกิริยาทำให้เกิดอนุพันธ์ (derivatizing agent) เพื่อเพิ่มความสามารถในการวิเคราะห์ เช่น ระเหยได้ง่ายขึ้น (volatility) เพิ่มความไว (sensitivity) เพิ่มความคงตัว (stability) หรือเพิ่มความจำเพาะ (selectivity) เป็นต้น ซึ่งทำได้ 3 รูปแบบ ได้แก่ pre-column derivatization, post-column derivatization และ on-column derivatization ทั้งนี้ สารที่เลือกใช้เป็น derivatizing agent จำแนกได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ non-fluorescent reagents, fluorescent reagents, fluorogenic reagents และสารที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์ผ่านปฏิกิริยารีด็อกซ์ โดยในทางเภสัชกรรมมีการใช้การทำอนุพันธ์เพื่อช่วยในการวิเคราะห์กับเทคนิควิเคราะห์หลายประเภท เช่น การทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ระเหยง่ายขึ้นและคงทนต่ออุณหภูมิมากขึ้นใน gas chromatography (GC) การทำให้สารที่สนใจมี chromophore เพื่อการวิเคราะห์ใน UV-Vis Spectroscopy และการติดสารที่มี fluorophore เพื่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค fluorescence spectroscopy ทั้งนี้ การเลือกใช้ derivatizing agent ต้องคำนึงถึงความเข้ากันได้ของชนิดของปฏิกิริยาและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นต่อเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ รวมไปถึงความจำเป็นในการทำอนุพันธ์เพื่อใช้ในเทคนิควิเคราะห์นั้นๆด้วย

วัตถุประสงค์เชิงพฤติกรรม

1. เข้าใจความหมาย รูปแบบ และประโยชน์ของการทำอนุพันธ์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์
2. เข้าใจความหมาย คุณสมบัติที่สำคัญและประเภทของ derivatizing agents
3. ทราบหลักการและแนวทางการใช้ปฏิกิริยาอนุพันธ์สำหรับเครื่องมือวิเคราะห์แต่ละชนิด

คำสำคัญ
derivatization, pharmaceutical analysis, sample preparation, sensitivity

การทำอนุพันธ์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทางเภสัชกรรม
(Derivatization in Pharmaceutical Analysis)

บทนำ

การทำอนุพันธ์ (derivatization) เป็นกระบวนการดัดแปลงทางเคมีที่มีการใช้ในเคมีวิเคราะห์ โดยมีการทำปฏิกิริยาระหว่างตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ (analyte) กับสารที่ใช้ในปฏิกิริยาการทำให้เกิดอนุพันธ์ เรียกสารดังกล่าวว่า derivatizing agent [1] เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีโครงสร้างทางเคมีบางส่วนคล้ายกับสารตั้งต้น การทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุพันธ์สามารถทำได้จากปฏิกิริยาเคมีอินทรีย์ เช่น ปฏิกิริยาการเติม (addition reactions) หรือปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมี เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชัน ปฏิกิริยารีดักชัน [2] ซึ่งการทำอนุพันธ์มีประโยชน์เพื่อเพิ่มคุณสมบัติบางประการของสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ เช่น เพิ่มความสามารถในการตรวจพบ (detectability) เพิ่มความคงทนต่ออุณหภูมิ (thermal stability) และเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) หรือใช้เพื่อบดบังหมู่ฟังก์ชันบางอย่าง เช่น ไฮดรอกซิล คาร์บอกซิลิก ที่มักทำให้เกิด tailing เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC จากการมีพันธะไฮโดรเจน โดยสามารถบดบังหมู่ฟังก์ชันดังกล่าวได้โดยการทำอนุพันธ์ผ่านปฏิกิริยา silylation และ acetylation เป็นต้น [3] อีกทั้งอาจส่งผลให้คุณสมบัติบางประการของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลงไปจากสารตั้งต้น เช่น ค่าการละลาย (solubility) จุดเดือด (boiling point) จุดหลอมเหลว (melting point) ส่วนประกอบทางเคมี (chemical composition) การทำอนุพันธ์จึงเป็นส่วนหนึ่งในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์ในเทคนิควิเคราะห์หลายประเภท เช่น gas chromatography (GC) liquid chromatography (LC) สำหรับวิเคราะห์ด้วย fluorescence spectroscopy [3] ซึ่งการทำอนุพันธ์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ที่จักกล่าวต่อไปนี้เป็นการประยุกต์ใช้ในเทคนิคทาง chromatography

คำจำกัดความ

- derivatization หมายถึง การทำอนุพันธ์ ซึ่งในที่นี้หมายถึงกระบวนการทำอนุพันธ์ที่เป็นการดัดแปลงทางเคมีที่มีการทำปฏิกิริยาระหว่างตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ (analyte) กับสารที่ใช้ในปฏิกิริยาการทำให้เกิดอนุพันธ์
- derivatizing agent หมายถึง สารที่ใช้ในปฏิกิริยาทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นอนุพันธ์

ประโยชน์ของการทำอนุพันธ์ในทางเภสัชกรรม

ในทางเภสัชกรรมมีการใช้การทำอนุพันธ์เพื่อช่วยเพิ่มความสามารถในการวิเคราะห์หลายประการ เช่น

- ทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์ระเหยได้ง่ายขึ้น (volatility) มักใช้ร่วมในการเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์ด้วย Gas chromatography [4]
- เพิ่มความคงตัว (stability) เช่น ความคงตัวต่ออุณหภูมิ (thermal stability) ในการวิเคราะห์ด้วย GC [4]
- เพื่อทำให้สารที่สนใจสามารถวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-VIS spectroscopy ได้โดยการติด chromophore ที่สารนั้น [4] จากการทำปฏิกิริยากับ derivatizing agent ที่มี chromophore
- เพิ่มความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity)
- เพิ่มความจำเพาะ (selectivity)
- เพื่อทำสัญลักษณ์ที่สารที่ต้องการวิเคราะห์เสมือนการติดป้ายโดยใช้ปฏิกิริยาเคมีมักนิยมใช้ในการวิเคราะห์ด้วย UV หรือ fluorescent [5]

ปัจจุบันมีการใช้ปฏิกิริยาอนุพันธ์เป็นส่วนหนึ่งในการวิเคราะห์ในหลายภาคส่วน เช่น การวิเคราะห์ยา (drugs) วัตถุเจือปนอาหาร (food additive) สัตวแพทยศาสตร์ (veterinary medicine) สารพิษ (natural toxins) สารปนเปื้อนในอาหาร (food contaminants) และสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม (environmental contaminants) เป็นต้น [6]

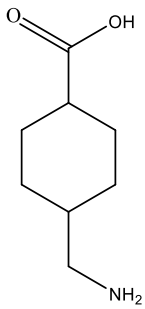
รูปแบบการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์

การทำอนุพันธ์สามารถทำได้ 3 รูปแบบ [3] ได้แก่

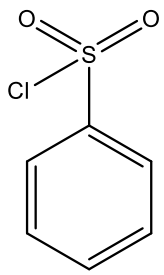
1. **Pre-column derivatization**

การทำอนุพันธ์ก่อนการวิเคราะห์ หรือ pre-column derivatization เป็นการทำให้เกิดปฏิกิริยาจนได้สารที่เป็นอนุพันธ์ก่อนเข้าสู่กระบวนการแยกสารผ่านคอลัมน์ โดยสามารถทำได้ทั้งในรูปแบบทำปฏิบัติการเองหรือรูปแบบใช้ระบบอัตโนมัติที่ต่อกับเครื่องวิเคราะห์โดยตรง ซึ่งการทำให้เกิดอนุพันธ์ก่อนการวิเคราะห์นี้สามารถประยุกต์ได้หลากหลายกว่ารูปแบบ post-column derivatization เนื่องสามารถปรับปัจจัยในปฏิกิริยาได้ เช่น เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (reaction time) สารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา (solvent reaction) รวมไปถึงการกำจัดสารตั้งต้นที่หลงเหลือหรือผลิตภัณฑ์อื่นๆซึ่งเป็นผลพลอยได้ของกระบวนการ (by-product) ได้สะดวก ก่อนจะเข้าสู่กระบวนการแยกสารผ่านคอลัมน์ต่อไป [4]

ตัวอย่างเช่น การวิเคราะห์ tranexamic acid ที่โครงสร้างไม่มี fluorophore หรือ chromophore จึงนำมาทำให้เกิดอนุพันธ์โดยใช้ benzene sulfonyl chloride เป็น derivatizing agent เพื่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มี chromophore ก่อน แล้วจึงวิเคราะห์โดยใช้ UV เป็น detector [7]



tranexamic acid

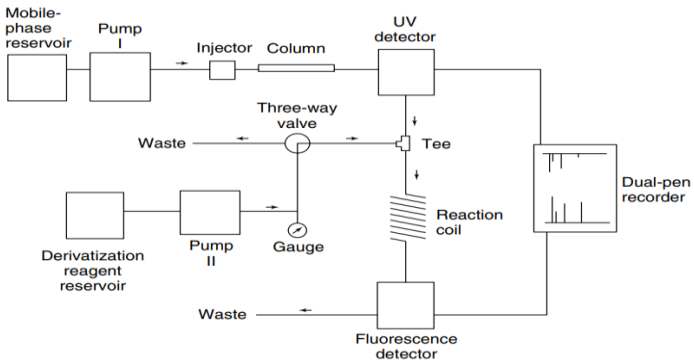


benzene sulfonyl chloride

2. Post-column derivatization

การทำอนุพันธ์ขณะสารออกจากคอลัมน์ หรือ post-column derivatization เป็นการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นหลังจากสารถูกชะออกจากคอลัมน์ โดยปฏิกิริยาจะเกิดใน reaction coil ซึ่งความยาวของ coil จะเป็นตัวกำหนดเวลาในการทำปฏิกิริยา จากนั้นจึงเข้าสู่ตัวตรวจวัด (detector) [3] มักใช้ใน liquid chromatography เพื่อเพิ่ม detectability ในการวิเคราะห์ ดังแสดงในภาพที่ 2 ทั้งนี้ สิ่งสำคัญในการทำปฏิกิริยาให้เกิดอนุพันธ์แบบ post-column derivatization คือส่วนประกอบต่างๆ เช่น สารละลาย (solvent) สารที่ใช้ทำปฏิกิริยา (derivatizing agent) ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (products) และรูปแบบของปฏิกิริยาทำอนุพันธ์จะต้องเข้าได้กับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ของวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ในขั้นตอนถัดไปด้วย ซึ่งโดยทั่วไปจะมีการเติม derivatizing agent หลังจากที่สารที่ต้องการวิเคราะห์ถูกแยกผ่านคอลัมน์แล้ว โดยเติมในเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) จากนั้นปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นใน reactor ที่ตั้งอยู่ระหว่างคอลัมน์และเครื่องวิเคราะห์ (detector) [4]

ในปี 1982 Nelson PE และคณะ มีการศึกษาทำปฏิกิริยาอนุพันธ์รูปแบบ post-column derivatization เพื่อวิเคราะห์มอร์ฟีนและใช้ alkaline potassium ferricyanide เป็น derivatizing agent ซึ่งอยู่ใน reservoir และเมื่อสารถูกแยกผ่านคอลัมน์ HPLC แล้ว สารจะมาทำปฏิกิริยากับ derivatizing agent ที่ reaction coil ก่อนเข้าสู่ตัว Fluorescence detector เพื่อวิเคราะห์ต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 1 [8]



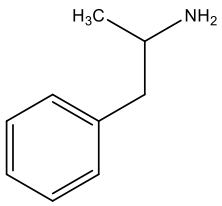
ภาพที่ 1 การทำอนุพันธ์ขณะสารออกจากคอลัมน์ HPLC (post-column derivatization) วิเคราะห์ผ่าน fluorescence spectrometer [8]

ทั้งนี้ การทำอนุพันธ์แบบ post-column derivatization มีข้อจำกัดคือ การกำจัด derivatizing agent ที่หลงเหลืออยู่ในระบบค่อนข้างยากหรือไม่สามารถจำกัดได้ ดังนั้น จึงควรเลือกใช้ derivatizing agent ที่ไม่รบกวนการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ [4]

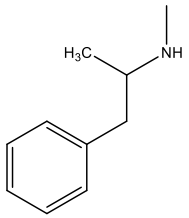
3. On-column derivatization

เป็นปฏิกิริยาการเกิดอนุพันธ์ที่ใช้ใน gas chromatography ซึ่งมีการทำปฏิกิริยาในบริเวณจุดฉีด (injection port) หรือคอลัมน์ที่มีอุณหภูมิสูง มีข้อดีคือปฏิกิริยาเกิดได้เร็วและง่าย เนื่องจากเป็นการฉีดสารผสมระหว่างตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์กับ derivatizing agent เข้าไปในระบบ ซึ่งช่วยประหยัดเวลา [3]

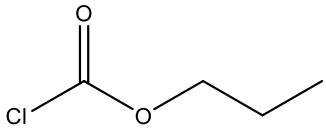
ตัวอย่างเช่น การวิเคราะห์ amphetamine และ metamphetamine ในเลือดโดยให้มีการไหลของ propylchloroformate ซึ่งเป็น derivatizing agent เข้าไปในคอลัมน์ก่อนอย่างน้อย 10 นาที ก่อนฉีดตัวอย่างคือ amphetamine เข้าไปเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์ในคอลัมน์ซึ่งในที่นี้ใช้ GC-MS ในการวิเคราะห์ [9]



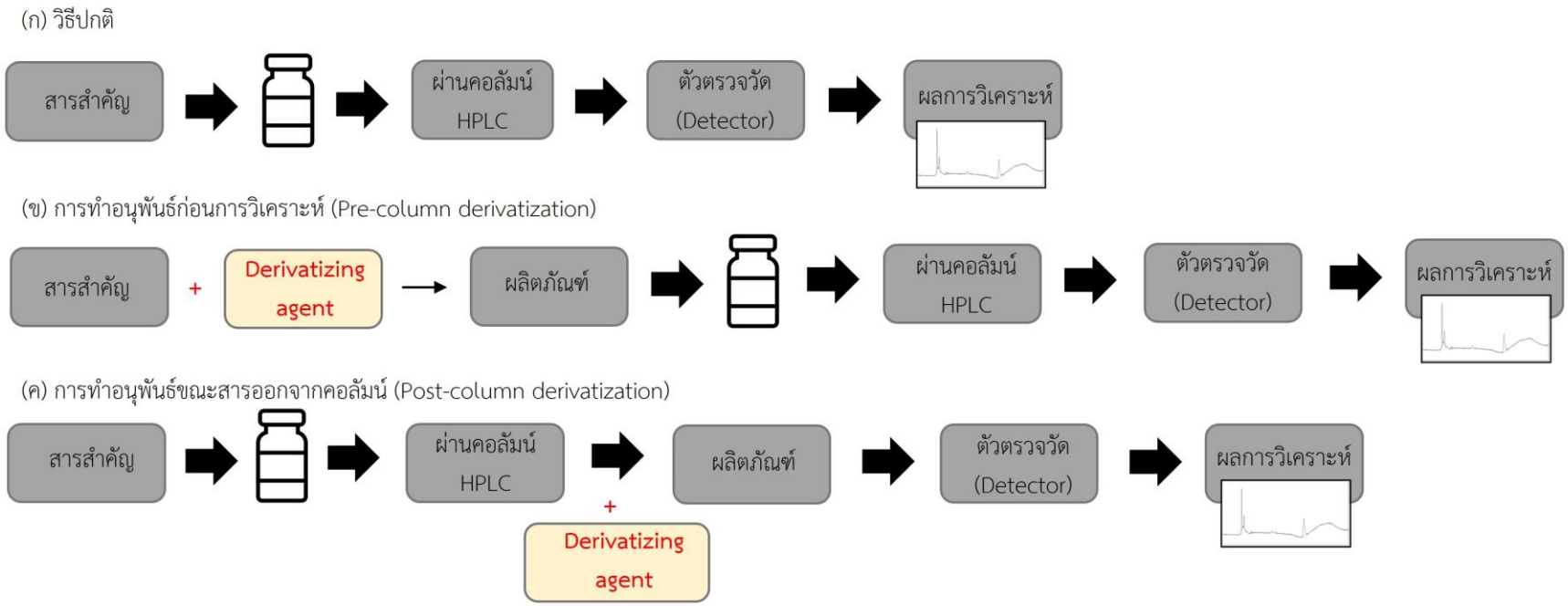
amphetamine



metamphetamine



propylchloroforma



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบการวิเคราะห์ด้วย HPLC แบบ (ก) วิธีปกติ (ข) ทำอนุพันธ์ก่อนการวิเคราะห์ (pre-column derivatization) (ค) การทำอนุพันธ์ขณะสารออกจากคอลัมน์ (post-column derivatization) ดัดแปลงจาก [10]

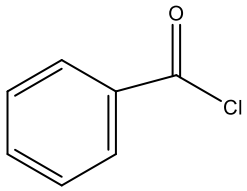
Derivatizing agent เป็นสารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ เพื่อเพิ่มความสามารถในการวิเคราะห์ ซึ่งสารที่เลือกใช้เป็น derivatizing agent ควรมีคุณสมบัติดังนี้ [11]

- เป็นสารที่ไม่ทำปฏิกิริยากับคอลัมน์ หรือส่วนประกอบของเครื่องมือวิเคราะห์ที่สัมผัสโดยตรงกับปฏิกิริยา
- สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์ได้โดยใช้เวลาไม่นาน
- ไม่ทำให้ตัวอย่างสูญเสียไประหว่างการทำปฏิกิริยา
- มีความสามารถในการทำให้เกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์ได้อย่างน้อย 95% ของสารตัวอย่าง

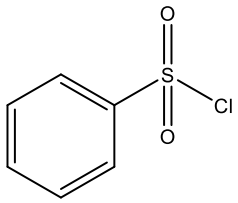
สารที่ใช้เป็น Derivatization reagents จำแนกได้เป็น 4 กลุ่ม [2] ดังนี้

1. non-fluorescent reagents

เป็นสารที่มี chromophore มักวิเคราะห์ผ่านเครื่อง UV-Vis spectroscopy โดย chromophore เป็นสารที่มีหมู่ฟังก์ชันแบบไม่อิ่มตัว มีพันธะคู่สลับกับพันธะเดี่ยว ตัวอย่าง derivatizing agent ที่มีการใช้ เช่น benzoyl chlorides และ sulfonyl benzene



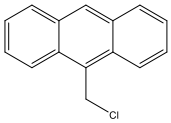
benzoyl chloride



Benzenesulfonyl chloride

2. fluorescent reagents

เป็นสารที่มี fluorophore ซึ่งเป็นสารที่มีวงอะโรมาติกที่มีโครงสร้างไม่ยืดหยุ่น (rigid) หรือวงอะโรมาติกที่เชื่อมกันหลายวง โดยสารกลุ่มนี้จะมีคุณสมบัติการเปล่งแสง (fluorescence) เช่น 9-(Chloromethyl) anthracene [12]

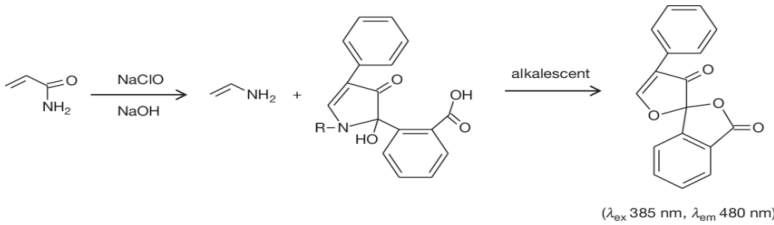


9-(chloromethyl)anthracene

3. fluorogenic reagents

จัดเป็นสารที่มีคุณสมบัติ non-fluorescent หรือเป็นสารที่ไม่มีคุณสมบัติ fluorescence แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างแล้วส่งผลให้โครงสร้างเปลี่ยนเป็นสารที่มีคุณสมบัติ fluorescence เช่น fluorescamine ซึ่งเป็นสารที่ non-fluorescent แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนชนิดปฐมภูมิจะเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติ fluorescent [13]

จากงานวิจัยของ Congcong Liu และคณะในปี 2014 [14] มีการใช้ fluorescamine เป็น derivatizing agent ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับ acrylamide ซึ่งเป็นสารที่มักพบในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบและผ่านกระบวนการให้ความร้อน เช่น ทอด อบ คั่ว และ acrylamide จัดเป็นสารก่อมะเร็งประเภท 2A ตาม Agency for Research on Cancer (IARC) จึงมีการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ระหว่าง acrylamide กับ fluorescamine เกิดเป็น fluorescent derivative เพื่อให้ acrylamide สามารถตรวจวัดด้วย Fluorescence Spectrometer) ได้ ดังแสดงในภาพที่ 3 [15]



ภาพที่ 3 ปฏิกิริยาการทำอนุพันธ์ระหว่าง acrylamide กับ fluorescamine เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติ fluorescent [15]

4. **สารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ผ่านปฏิกิริยารีด็อกซ์** เช่น 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) เช่น

ตัวอย่างเช่น ในการวิเคราะห์ Fe(II) และ Fe(III) cyanide complexes โดยใช้คอลัมน์ประเภท porous graphitic carbon (PGC) ซึ่งหาก PGC column ที่ใช้มีการทำให้เกิดการไหลผ่านของ sodium sulfite ก่อนแล้วจึงนำมาวิเคราะห์ เมื่อสารตัวอย่างไหลผ่านจะพบว่า Fe(III) cyanide complex ถูกรีดิวซ์กลายเป็น Fe(II) cyanide complex แต่หาก PGC column ที่ใช้มีการทำให้เกิดการไหลผ่านของ hydrogen peroxide ก่อนแล้วจึงนำมาวิเคราะห์ เมื่อสารตัวอย่างไหลผ่านจะพบว่า Fe(II) cyanide complex ถูกออกซิไดซ์กลายเป็น Fe(III) cyanide complex [16]

การทำอนุพันธ์เพื่อใช้ในเทคนิควิเคราะห์ต่างๆ

การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เพื่อพัฒนาวิเคราะห์มีการใช้ในเทคนิคต่างๆ เช่น gas chromatography, liquid chromatography ที่ตรวจวัดด้วย UV-Vis spectroscopy, fluorescence spectroscopy และ mass spectroscopy และเทคนิคอื่นๆ เช่น capillary electrophoresis เป็นต้น ซึ่งตัวอย่างเทคนิคการวิเคราะห์ที่ใช้ปฏิกิริยาอนุพันธ์ร่วมในการวิเคราะห์ทางเภสัชกรรม เช่น

1. Liquid chromatography มีการใช้ร่วมกับ detector ต่างๆ ดังนี้

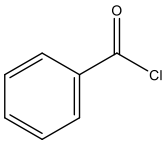
1.1 UV-VIS detector

สารที่ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วง UV-visible ได้ เรียกว่า chromophore ซึ่ง chromophore เป็นโครงสร้างที่มีการคอนจูเกตหรือเป็นโครงสร้างที่มีพันธะคู่สลับเดี่ยว [17] ทั้งนี้ เนื่องจากสารที่วิเคราะห์ทางเภสัชกรรมหลายชนิดไม่มี chromophore ในโครงสร้างและหลายชนิดดูดกลืนแสงในช่วง 200-330 นาโนเมตร ซึ่งอาจถูกรบกวนโดยสัญญาณจากสารอื่นที่ดูดกลืนแสงในช่วงนี้ เช่น สารช่วย (excipient) สารละลาย (solvent) เป็นต้น ดังนั้น การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์จะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่มากที่สุดของสารมากขึ้นไปที่ช่วง 380-800 nm [18] จึงอาจช่วยลดปัญหาสัญญาณวิเคราะห์ถูกรบกวนจากสัญญาณของสารอื่นในระบบได้

Derivatizing agent ที่ใช้มักเป็นสารที่มี chromophore ในโมเลกุล ซึ่งเป็นสารที่โครงสร้างมีหมู่ฟังก์ชันไม่อิ่มตัวสลับกับพันธะเดี่ยว โดยทั่วไป chromophore สามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1. กลุ่มที่ไม่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว เช่น -C=C-C=C-
2. กลุ่มที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว เช่น

3. กลุ่มวงเบนซีน หรืออนุพันธ์ของวงเบนซีน เช่น benzoyl chloride

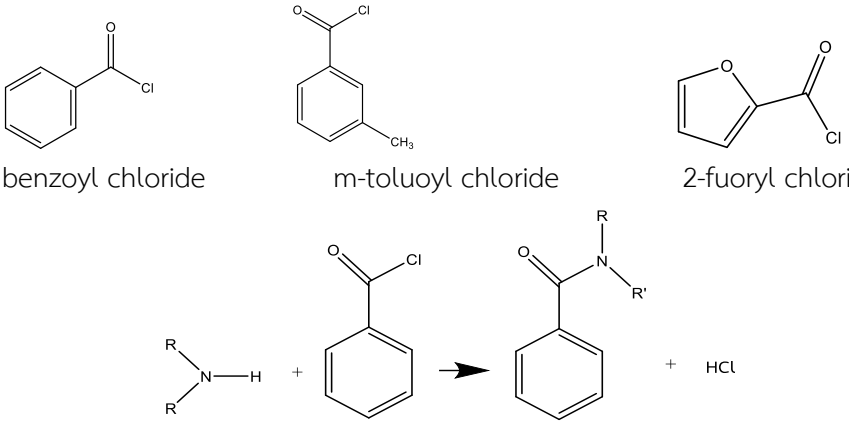


benzoyl chloride

ตัวอย่าง derivatizing agent ที่ใช้

- Acyl chloride

เป็นสารที่ประกอบด้วยวงอะโรมาติกและ chloride เช่น benzoyl chloride, m-toluoyl chloride และ 2-fuoryl chloride ใช้ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับสารตัวอย่างที่มีหมู่ฟังก์ชันเอมีนหรือหมู่ไฮดรอกซี [4] ดังแสดงภาพที่ 4

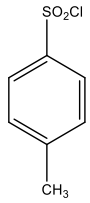


ภาพที่ 4 ปฏิกิริยาอนุพันธ์ระหว่าง benzoyl chloride กับตัวอย่างที่มีหมู่เอมีนเป็นส่วนประกอบ เกิดผลิตภัณฑ์ในกลุ่มเอไมด์ ดัดแปลงจาก [19]

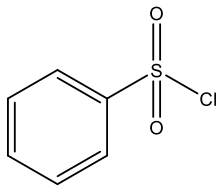
ตัวอย่างการใช้ derivatizing agent กลุ่มนี้ในทางเภสัชกรรม เช่น การใช้ benzoyl chloride ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับ 4-aminopyridine เพื่อวิเคราะห์ 4-aminopyridine ในซีรัมและปัสสาวะของผู้ป่วย โดยใช้ high-performance liquid chromatography-ultraviolet (HPLC-UV) ในการวิเคราะห์ จากการศึกษาโดย Ram N. ในปี 1996 พบว่าการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ระหว่าง 4-AP และ benzoyl chloride ช่วยในการแยก 4-AP ออกจาก endogenous compounds ชนิดอื่นที่อยู่ในสารน้ำในร่างกาย โดยมีสมมติฐานว่า ปฏิกิริยาการทำอนุพันธ์จะสามารถแยก 4-MP ออกจากสารอื่นที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็น primary และ secondary amine ได้ จากการที่เมื่อทำปฏิกิริยาแล้วได้ผลิตภัณฑ์มีขนาดใหญ่ขึ้น และช่วยให้แยก 4-AP เอมีนชนิดอื่นที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ ซึ่งปฏิกิริยาการเติม benzoyl เข้าไปที่โมเลกุลเรียกว่า benzoylation [20]

- Arylsulfonyl chlorides

Derivatizing agent ในกลุ่มนี้เป็นสารที่ประกอบด้วยวงอะโรมาติก คลอไรด์ และหมู่ซัลโฟนิล ($R–S(=O)_2–R'$) เช่น toluenesulfonyl chloride และ benzene sulfonyl chloride [4]

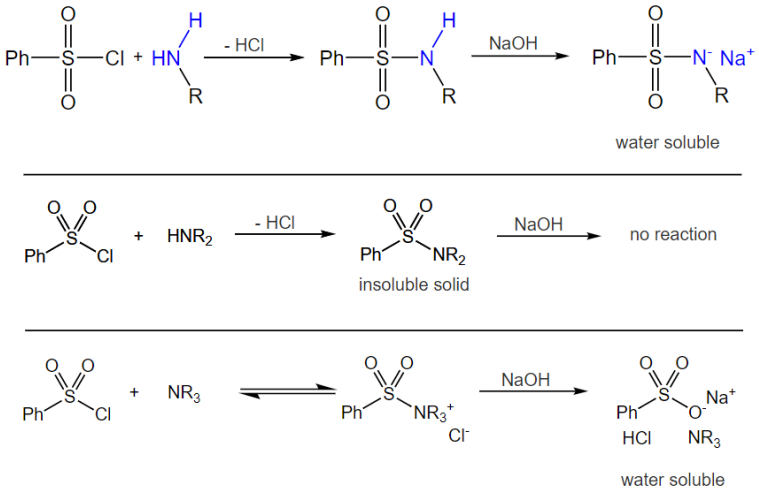


toluenesulfonyl chloride



benzene sulfonyl chloride

Derivatizing agent กลุ่มดังกล่าวใช้ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่มีหมู่ฟังก์ชันเอมีนเป็นส่วนประกอบในสภาวะที่เป็นด่าง [21] ตัวอย่างปฏิกิริยา ดังแสดงในภาพที่ 5

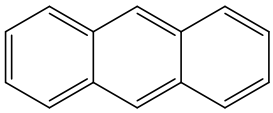


ภาพที่ 5 ปฏิกิริยาระหว่าง benzene sulfonyl chloride กับตัวอย่างที่มีหมู่เอมีนเป็นส่วนประกอบ [22]

1.2 Fluorescence

ข้อดีของการวิเคราะห์โดยการวัดความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์คือมีความไว (sensitivity) สูง เมื่อเทียบกับการวัดโดยใช้ UV-VIS detector สามารถใช้วิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อยได้และมีความจำเพาะสูง (selectivity) เนื่องจากสารที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้มีคุณสมบัติการเปล่งแสง (fluorescence) ในตัวของมันเองซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ค่อนข้างเฉพาะตัว [4]

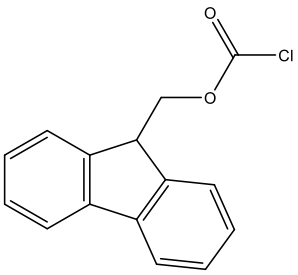
สารที่สามารถวิเคราะห์โดยเทคนิค fluorescence spectroscopy ได้จะเป็นสารที่มี fluorophore ซึ่งประกอบด้วยวงอะโรมาติกที่มีโครงสร้างไม่ยืดหยุ่น (rigid) หรือวงอะโรมาติกที่เชื่อมกันหลายวง เช่น anthracene



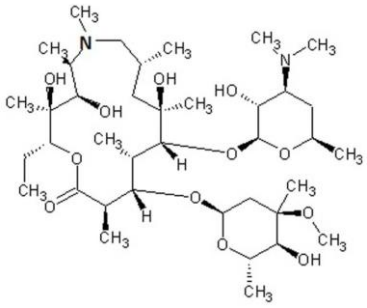
Anthracene

ตัวอย่างการวิเคราะห์ทางเภสัชกรรม เช่น

- การใช้ 9-fluorenylmethyl chloroformate เป็น derivatizing agent เพื่อเพิ่มความไว (sensitivity) ในการวิเคราะห์ azithromycin ในซีรัม (serum) [23]



9-fluorenylmethyl chloroformate



azithromycin (24)

- การใช้ 2-naphthalenesulfonyl chloride เป็น derivatizing agent เพื่อเพิ่มความไว (sensitivity) ในการวิเคราะห์ tobramycin ในรูปแบบยาหยอดตา [25]
- ตัวอย่าง การใช้ปฏิกิริยาอนุพันธ์เพื่อวิเคราะห์ทางเภสัชกรรม เช่น การวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะในนมด้วยเทคนิค fluorescence ดังแสดงในตารางที่ x เป็นการใช้ derivatizing agent ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เพื่อเพิ่ม florescence signal [15]

ตารางที่ 1 ตัวอย่าง derivatizing agent ที่ใช้วิเคราะห์ยาปฏิชีวนะในนม ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC [15]

Antibiotic	*Reagent*
Gentamicin	OPA-mercaptoacetic acid
Streptomicin/dihydrostreptomicin	1,2-Naphtoquinone-4-sulfonate
Ampicillin	Salicylaldehyde
Amoxicillin	Salicylaldehyde
Ampicillin	Formaldehydeþtrichloroacetic acid
Tetracycline, oxitetraycline, chlortetracycline	Magnesium ions
Nalidixic acid, oxolinic acid and flumequine	
Fluoroquinolones	Tb_4O_7NPs

2. Gas Chromatography

การวิเคราะห์สารโดย gas chromatography (GC) นั้น เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) อยู่ในรูปแบบแก๊ส โดยที่สารตัวอย่างจะระเหยและผสมกับแก๊สพา (carrier gas) ซึ่งเป็นแก๊สเฉื่อยที่ไม่เกิดปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง เช่น nitrogen (N_2), Helium (He) และ Hydrogen (H_2) ซึ่ง gas chromatography สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างได้ทั้งในสถานะของเหลว ของแข็ง และแก๊ส แต่จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่เป็นไอที่บริเวณหัวฉีดที่มีอุณหภูมิสูงก่อนเข้าสู่การวิเคราะห์ [26]

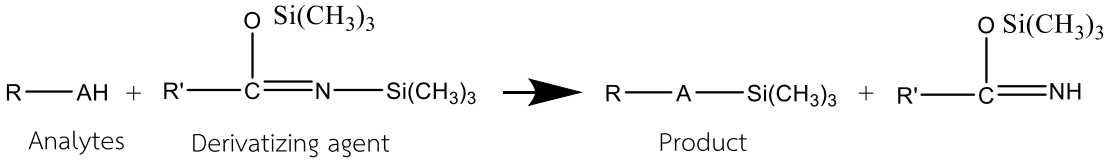
ปัญหาที่สำคัญของ GC คือสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่เป็นสารอินทรีย์บางชนิดเป็นสารที่มีความสามารถในการระเหยต่ำ (poor-volatile) และบางชนิดไม่คงตัวต่ออุณหภูมิ (thermal instability) [27] จึงมีการใช้การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ใน GC เพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างเคมีของสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ให้กลายเป็นอนุพันธ์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการวิเคราะห์ด้วย GC มากขึ้น เช่น ระเหยได้ง่ายขึ้น (volatility) เพิ่มความคงตัวต่ออุณหภูมิ (temperature stability) และเพิ่มความไวในการตรวจวิเคราะห์ (sensitivity) เป็นต้น [6]

การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ในการเตรียมตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วย GC มักทำโดยการแทนที่หมู่ฟังก์ชันที่มีขั้ว (polar) ที่ระเหยยากหรือไม่ระเหย (non-volatile) โดยแทนที่อะตอมของไฮโดรเจนบนหมู่เอมีน (-NH_2) คาร์บอกซิลิก (-COOH) ไฮดรอกซี (-OH) หรือหมู่ไทออล (-SH) เพื่อให้สารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ที่ระเหยได้ง่ายขึ้น [28]

ปฏิกิริยาการทำให้เกิดอนุพันธ์ที่นิยมใช้ มีดังนี้

- silylation

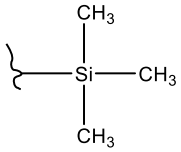
การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์แบบ silylation เป็นการเติมหมู่ silyl group (-SiH_3) ไปที่โมเลกุลสารตัวอย่างโดยแทนที่อะตอมของไฮโดรเจนบนโมเลกุลของสารตัวอย่างที่หมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิล (-OH) คาร์บอกซิลิก (-COOH) เอมีน (-NH_2) หรือซัลฟ์ไฮดริล (-SH) เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 การทำปฏิกิริยาระหว่างสารที่ต้องการวิเคราะห์ (analytes) กับ derivatizing agent ผ่านปฏิกิริยา silylation ที่มีการแทนที่อะตอมของไฮโดรเจนบนโมเลกุลของสารตัวอย่างด้วยหมู่ silyl group(-SiH_3) ดัดแปลงจาก [27]

หมู่ฟังก์ชันที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา silylation จากมากไปน้อย ได้แก่ alcohol, phenol, carboxyl, amine และ amide กับ hydroxyl ตามลำดับ [29] ซึ่งการใช้ปฏิกิริยาทำอนุพันธ์แบบ silylation ส่งผลให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีความเป็นขั้วลดลง สารสามารถระเหยได้ง่ายขึ้น แต่มีข้อจำกัดคือสารกลุ่ม silyl reagents ไวต่อความชื้น ฉะนั้น สารตัวอย่างควรแห้งและสารละลาย(solvent) ที่ใช้ควรมีความบริสุทธิ์และใช้ในปริมาณน้อยที่สุดเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดพีคปะปนและพีคของสารละลาย ซึ่งสารละลายที่ใช้มาก เช่น pyridine [30]

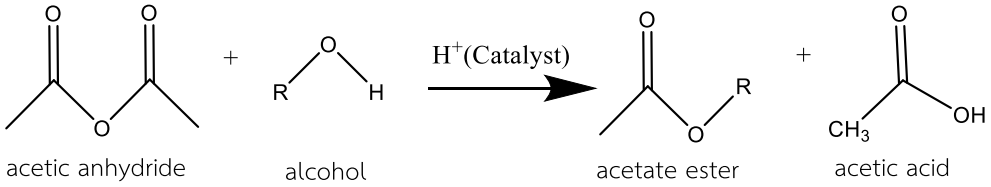
ตัวอย่าง derivatizing agent เช่น สารกลุ่ม trimethylsilyl (–$Si(CH_3)_3$ (28)



trimethylsilyl (–$Si(CH_3)_3$)

- acylation

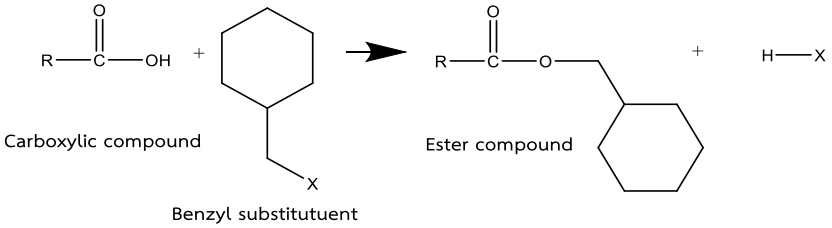
การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์โดย acylation เป็นการเติมหมู่ acyl (RCO-) ลงในโมเลกุลสารตัวอย่างที่มีหมู่ฟังก์ชันซัลฟ์ไฮดริล (-SH) ไฮดรอกซิล (–OH) หรือเอมีน (-NH) เป็นองค์ประกอบ ทำให้โมเลกุลตัวอย่างเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยหมู่ thioesters หรือ esters หรือ amides ตามลำดับ ได้ผลิตภัณฑ์ที่ระเหยได้ง่ายขึ้น และความคงตัวต่ออุณหภูมิ (thermal stability) มากขึ้น ซึ่งตัวอย่าง derivatizing agent เช่น acyl chlorides และ acetic anhydride ดังแสดงในภาพที่ 7 [30]



ภาพที่ 7 การทำปฏิกิริยาระหว่าง acetic anhydride กับ alcohol ได้ผลิตภัณฑ์เป็น acetate ester ดัดแปลงจาก [30]

- alkylation

เป็นการเติมหมู่ alkyl (C_nH_{2n+1}) ไปที่โมเลกุลสารตัวอย่าง โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา alkylation จะมีความเป็นขั้วน้อยกว่าตัวตั้งต้น เนื่องจากไฮโดรเจนบนโมเลกุลสารตัวอย่าง เช่น คาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) ของโมเลกุลสารตัวอย่างจะถูกแทนที่ด้วยหมู่อัลคิล (alkyl group) ทำให้เกิดเป็นหมู่เอสเทอร์ที่มีขั้วต่ำลง ส่งผลให้ระเหยได้ง่ายขึ้น ตัวอย่าง derivatizing agent ที่นิยมใช้ เช่น methyl group (-CH_3), diazomethane [28]



ภาพที่ 8 การทำปฏิกิริยาระหว่างสารตัวอย่างที่มีหมู่คาร์บอซิลิก กับหมู่ benzyl ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นหมู่เอสเตอร์ โดยหมู่ x อาจเป็นแฮโลเจนหรืออัลคิลอื่นๆ ดัดแปลงจาก [30]

จากภาพที่ 8 การที่อะตอมไฮโดรเจนบนหมู่คาร์บอซิลิกของโมเลกุลสารตัวอย่างถูกแทนที่ด้วยหมู่ benzyl ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นหมู่เอสเตอร์ซึ่งมีความเป็นขั้วน้อยกว่าสารตั้งต้นที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก เนื่องจากคาร์บอกซิลิกประกอบด้วย hydroxy group (-OH) ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้

บทสรุป

การทำอนุพันธ์ (derivatization) สามารถนำไปใช้ช่วยในการวิเคราะห์ทางเภสัชกรรม เนื่องจากช่วยเพิ่มความสามารถในการวิเคราะห์หลายประการ เช่น ช่วยให้สารที่วิเคราะห์ระเหยได้ง่ายขึ้น (volatility) สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC ช่วยเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ช่วยเพิ่มความคงตัว (stability) หรือช่วยเพิ่มความจำเพาะ (selectivity) ซึ่งปัจจุบันในเภสัชตำรับมีการใช้การทำอนุพันธ์ (derivatization) เป็นขั้นตอนหนึ่งในการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ (assay) และสารปนเปื้อน (impurity) บางชนิด และมีงานวิจัยจำนวนมากที่ใช้การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์สำหรับการวิเคราะห์ระดับยาในเลือดหรือในปัสสาวะมากขึ้น

ทั้งนี้ หากจะพิจารณาใช้การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ร่วมเป็นขั้นตอนหนึ่งในการวิเคราะห์ อาจต้องคำนึงถึงความจำเป็นและความเข้ากันได้ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นกับส่วนประกอบต่างๆที่อยู่ในเทคนิควิเคราะห์ รวมถึงการเลือกสารที่ใช้เป็น derivatizing agent ซึ่งควรเป็นสารที่ไม่ทำปฏิกิริยาส่วนใดของเครื่องมือวิเคราะห์และไม่ทำให้โครงสร้างของสารนั้นเองรวมไปถึงโครงสร้างของสารตัวอย่างสูญเสียไประหว่างการวิเคราะห์ นอกจากนี้ การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์อาจเป็นการเพิ่มขั้นตอนในการวิเคราะห์เช่นกัน ดังนั้น การพิจารณาถึงความจำเป็นว่าตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์และเทคนิควิเคราะห์ที่ใช้จำเป็นต้องใช้การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ร่วมด้วยหรือไม่จึงเป็นสิ่งที่พึงคำนึงถึงเช่นกัน

เอกสารอ้างอิง

1. Miller JM. Chromatography: concepts and contrasts: John Wiley & Sons; 2005.

2. Coppex L. Derivatives for HPLC Analysis: University of Genf; 1999-2000.

3. Lawrence JF. Derivatization in chromatography introduction practical aspects of chemical derivatization in chromatography. Journal of Chromatographic Science. 1979;17(3):113-4.

4. Cardinael P, Casabianca H, Peulon-Agasse V, Berthod A. Sample derivatization in separation science. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co; 2015: 1725-56.

5. Niwa M. Derivatization and Labeling Techniques. In: Worsfold P, Poole C, Townshend A, Miró M, editors. Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition). Oxford: Academic Press; 2019: 210-3.

6. Toyo'oka T. Modern derivatization methods for separation sciences: Wiley Chichester; 1999.

7. Ashfaq M, Aslam A, Mustafa G, Danish M, Nazar MF, Asghar MN. Derivatization/chromophore introduction of tranexamic acid and its HPLC determination in pharmaceutical formulations. Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences. 2015;17:51-6.

8. Nelson PE, Nolan SL, Bedford KR. High-performance liquid chromatography detection of morphine by fluorescence after post-column derivatisation. Journal of Chromatography A. 1982;234(2):407-14.

9. Nishida M, Namera A, Yashiki M, Kojima T. On-column derivatization for determination of amphetamine and methamphetamine in human blood

by gas chromatography–mass spectrometry. Forensic science international. 2002;125(2-3):156-62.

10. Hameedat F, Hawamdeh S, Alnabulsi S, Zayed A. High performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection for quantification of steroids in clinical, pharmaceutical, and environmental samples: a review. Molecules. 2022;27(6):1807.

11. Prudhviraju CH, Swaminathan J, Sri Nataraj K, Rajasekhar B. Pre and post column derivatization of amino acid - a systematic review of hplc. Acta Scientific Pharmaceutical Sciences 5.8 (2020): 104-115.

12. Xie Z, Yu L, Yu H, Deng Q. Application of a Fluorescent Derivatization Reagent 9-Chloromethyl Anthracene on Determination of Carboxylic Acids by HPLC. Journal of Chromatographic Science. 2012;50(6):464-8.

13. Singer VL, Haugland RP. CHAPTER 4 - Fluorescent Imaging of Nucleic Acids and Proteins in Gels. In: Mason WT, editor. Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity (Second Edition). London: Academic Press; 1999: 51-62.

14. Liu C, Luo F, Chen D, Qiu B, Tang X, Ke H, et al. Fluorescence determination of acrylamide in heat-processed foods. Talanta 2014;123:95-100.

15. Fernández-Romero J, Aguilar-Caballos M. Fluorescence: Food Applications. Encyclopedia of Analytical Science. 2019;3:1-11.

16. Saitoh K, Soeta N, Minamisawa H, Shibukawa M. On-line redox derivatization liquid chromatography for selective separation of Fe(II) and Fe(III) cyanide complexes using porous graphitic carbon. Analytical Sciences. 2013;29(7):715-21.

17. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. Principles of Instrumental Analysis: Cengage Learning; 2017.

18. Adegoke OA. Chemical derivatization methodologies for UV-visible spectrophotometric determination of pharmaceuticals. Int J Pharm Sci Rev Res. 2012;14(2):6-24.

19. Lunn G HL, editors. Handbook of Derivatization Reactions for HPLC. George Lunn LCH, Libera, editor: Wiley; 1998.

20. Gupta RN, Hansebout RR. Optimization of the determination of 4-aminopyridine in human serum and urine by column liquid chromatography. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. 1996;677(1):183-9.

21. Ouellette RJ, Rawn JD. Organic chemistry: structure, mechanism, synthesis: Academic Press; 2018.

22. Hinsberg Synthesis [Internet]. [cited 2023 June 8]. Available from: https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/hinsberg-synthesis#reaction.

23. Bahrami G, Mirzaeei S, Kiani A. High performance liquid chromatographic determination of azithromycin in serum using fluorescence detection and its application in human pharmacokinetic studies. Journal of chromatography B. 2005;820(2):277-81.

24. Imperi F, Leoni L, Visca P. Antivirulence activity of azithromycin in Pseudomonas aeruginosa. Frontiers in microbiology. 2014;5:178.

25. Mabrouk MM, Soliman SM, El-Agizy HM, Mansour FR. A highly sensitive pre-column derivatization method for fluorescence detection of

tobramycin using 2-naphthalenesulfonyl chloride as a derivatizing agent. Discover Chemical Engineering. 2022;2(1):9.

26. Jwaili M. Pharmaceutical Applications of Gas Chromatography. Open Journal of Applied Sciences. 2019;09.

27. Soni NR. Improve GC separations with derivatization for selective response and detection in novel matrices. J Environ Life Sci. 2016;1:14-25.

28. Grob RL, Barry EF. Modern practice of gas chromatography: John Wiley & Sons; 2004.

29. Regis. Chromatography Catalog. 1998-1999:86-88.

30. Orata F. Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis. Advanced gas chromatography-Progress in agricultural, biomedical and industrial applications. 2012;91.

การเปิดเผยสถานภาพของผู้เขียนที่เกี่ยวข้องกับบทความ

อ.ภญ.สิริกัญญา แก้วประดิษฐ์ สำนักวิชาเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

การอนุญาตให้เผยแพร่บทความทางวิชาการที่ได้รับหน่วยกิตการศึกษาต่อเนื่องฯ บน website ของสถาบันหลัก

☑ อนุญาต ☐ ไม่อนุญาต