

文章编号: 1004-4353(2021)03-0260-06

手性衍生化试剂 PPZ-Pro-NHS 的合成及其 在 D/L-氨基酸分离中的应用

冯磊宁¹, 张波², 金佑熙¹, 金彪³, 金东日^{1*}

(1. 延边大学 理学院, 吉林 延吉 133002; 2. 吉林烟草工业有限责任公司 延吉卷烟厂, 吉林 延吉 133001;
3. 延边大学 分析测试中心, 吉林 延吉 133002)

摘要: 以(S)-1-(5-(4-甲基哌嗪-1-基)-2,4-二硝基苯基)吡咯烷-2-羧酸(PPZ-Pro)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)为反应物合成了一种新型衍生化试剂(S)-2,5-二氧吡咯烷-1-基-1-(5-(4-甲基哌嗪-1-基)-2,4-二硝基苯基)吡咯烷-2-羧酸酯(PPZ-Pro-NHS), 并采用核磁共振波谱法(¹H NMR, ¹³C NMR)和质谱(MS)对其结构进行了表征. 研究显示: 在碱性介质中 PPZ-Pro-NHS 与氨基酸反应生成非对映体氨基酸衍生物, 且当在反应条件为 100 mmol/L 三乙胺介质、反应温度为 25 °C 和反应时间为 40 min 条件下所生成的非对映体氨基酸衍生物的色谱峰面积最大. 以水-乙腈为流动相, 用 C18 柱对 19 种氨基酸对映体进行分离显示, 其分离度(Rs)大于 1.20(除天冬氨酸外), 达到基线分离. 因此, 制备的 PPZ-Pro-NHS 在氨基酸对映体和手性药物的分离和分析方面具有较好的应用前景.

关键词: 手性; 氨基酸; 衍生化试剂; PPZ-Pro-NHS

中图分类号: O658.9

文献标识码: A

Synthesis of chiral derivatization reagent PPZ-Pro-NHS and its application in D/L-amino acids separation

FENG Leining¹, ZHANG Bo², JIN Youxi¹, JIN Biao³, JIN Dongri^{1*}

(1. College of Science, Yanbian University, Yanji 133002, China;

2. Yanji Cigarette Factory, Jilin Tobacco Industry CO., Ltd., Yanji 133001, China;

3. Analysis and Testing Center, Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: A new derivatization reagent (S)-2,5-dioxypyrrolidine-1-yl-1-(5-(4-methylpiperazine-1-yl)-2,4-dinitrophenyl)pyrrolidine-2-carboxylic acid ester (PPZ-Pro-NHS) was synthesized from (S)-1-(5-(4-methylpiperazine-1-yl)-2,4-dinitrophenyl)pyrrolidine-2-carboxylic acid (PPZ-Pro) and N-hydroxysuccinimide (NHS). Its structure was characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H NMR, ¹³C NMR) and mass spectroscopy (MS). The results showed that in alkaline medium, PPZ-Pro-NHS reacts with amino acids to produce the diastereomeric derivatives of amino acids, and the highest peak area of amino acid derivatives was obtained when the reaction conditions were 100 mmol/L triethylamine medium, reaction temperature 25 °C and reaction time 40 min. Nineteen kinds of amino acid enantiomers were separated by C18 column with water-acetonitrile as mobile phase. The resolution (Rs) was greater than 1.20 (except aspartic acid), which reached the baseline separation. Therefore, PPZ-Pro-NHS will have a good application prospect in the separation and analysis of amino acid enantiomers and chiral drugs.

Keywords: chirality; amino acids; derivatization reagent; PPZ-Pro-NHS

收稿日期: 2021-06-23

基金项目: 国家自然科学基金(22064017)

* 通信作者: 金东日(1965—), 男, 博士, 教授, 研究方向为药物分析.

0 引言

L-氨基酸是构成人体中某些生物酶和活性蛋白质分子的重要物质,目前已在食品、医药以及化妆品等领域被广泛应用^[1]. 2002年, N. Fujii 在动物和人体中发现了D-氨基酸^[2], 随后经其他学者进一步研究发现D-氨基酸与人的某些疾病密切相关, 如阿尔兹海默症、抑郁症和精神分裂症等^[3-6], 但人体过量摄取D-氨基酸会引发中毒. 氨基酸是众多药物合成的中间物质原料^[7]. 在选用氨基酸合成药物时, 为使药物形成单一对映体, 通常选用D-氨基酸或L-氨基酸; 然而非天然氨基酸绝大部分都是以外消旋体形式存在的, 因此建立一种能够对D/L-氨基酸进行高效的分离分析方法具有重要意义.

研究表明, 高效液相色谱法(HPLC)分离测定氨基酸具有速度快、灵敏度高、选择性好等优点, 已成为目前分离分析对映体化合物的主要方法之一^[8]. HPLC分离对映体化合物的方法可分为直接法(手性流动相法和手性固定相法)和间接法(手性衍生化试剂(CDR)法)^[9-10], 其中间接法更适用于分离分析氨基酸^[11]. 目前, 利用间接法分离分析氨基酸时使用的衍生化试剂主要有N-[1-氧代-5-(三苯基膦)戊基]-(R)-1,3-噻唑烷-4-N-羟基琥珀酰亚胺酯溴盐^[12]、(±)-1-(9-苄基)氯甲酸乙酯^[13]、焦谷氨酸丁二酰亚胺酯(l-PGA-OSu)^[14]和(S)-2,5-二氧吡咯烷-1-基-1-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)吡咯烷-2-羧酸盐(DMT-(S)-Pro-OSu)^[15]等, 但这些衍生化试剂都存在反应易生成多级衍生物、反应条件需要密闭避光、衍生化试剂水解产物影响分离、衍生化试剂制备繁琐等问题^[16]. 2021年, Jin等^[17]合成了一种手性衍生化试剂(S)-1-(5-(4-甲基哌嗪-1-基)-2,4-二硝基苯基)吡咯烷-2-羧酸(PPZ-Pro), 但研究发现PPZ-Pro与氨基酸进行衍生化反应时, 氨基酸之间会缩合生成副产物肽, 即PPZ-Pro不适用于氨基酸的衍生化反应; 为此, 本文在PPZ-Pro基础上设计合成了一种新的衍生化试剂(S)-2,5-二氧吡咯烷-1-基-1-(5-(4-甲基哌嗪-1-基)-2,4-二硝基苯基)吡咯烷-2-羧酸酯(PPZ-Pro-NHS). PPZ-Pro-

NHS可在温和的反应条件下选择性地与氨基酸反应生成氨基酸衍生物. 利用HPLC法将PPZ-Pro-NHS应用于19种氨基酸的分离中显示, 其可有效实现19种氨基酸对映体的分离.

1 实验部分

1.1 实验仪器

SPD-16 高效液相色谱仪, 日本岛津制作所; AV III-Ascend 500 HD 超导傅里叶核磁共振谱仪, 布鲁克公司; 1200RRLC-6410B 液相-串联四级杆液质仪, 安捷伦公司; FD-ID-50 冷冻干燥机, 上海比朗仪器制造有限公司; N-100 旋转蒸发仪, 上海爱朗仪器有限公司; FD-ID-50 冷冻干燥机, 上海比朗仪器制造有限公司; X-5 显微熔点测定仪-控温型, 北京泰克仪器有限公司.

1.2 实验试剂

乙腈(分析纯), 天津市大茂化学试剂厂; 二氯甲烷(分析纯)、甲醇(分析纯), 天津市富宇精细化工有限公司; 甲酸(色谱级)、L-脯氨酸(99.0%)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(98.0%)、D/L-缬氨酸(98.0%)、D/L-苏氨酸(>98.0%)、D/L-半胱氨酸(97.0%)、D/L-谷氨酸(>92.0%)、D/L-苯丙氨酸(>98.0%)、D/L-丝氨酸(98.0%)、D/L-丙氨酸(99.0%)、D/L-天冬氨酸(98.0%)、D/L-精氨酸(98.0%)、D/L-组氨酸(98.0%)、D/L-异亮氨酸(98.0%)、D/L-赖氨酸(99.0%)、D/L-脯氨酸(99.0%)、D/L-甲硫氨酸(99.0%), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 三乙胺(>99.0%)、N-羟基琥珀酰亚胺(>98.0%), 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; 无水硫酸镁(分析纯), 天津市科密欧化学试剂有限公司; D/L-酪氨酸(99.0%), 北京伊诺凯科技有限公司; D/L-谷氨酰胺(>98.0%), 阿达玛斯试剂有限公司; D/L-亮氨酸(>98.0%), 上海皓鸿生物医药科技有限公司; D/L-天冬酰胺(98.0%)、D/L-色氨酸(98.0%)、L-缬氨酸、L-苏氨酸、L-半胱氨酸、L-酪氨酸、L-谷氨酸、L-苯丙氨酸、L-丝氨酸、L-丙氨酸、L-天冬氨酸、L-谷氨酰胺、L-精氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-赖氨酸、L-天冬酰胺、L-亮氨酸、L-色氨酸、L-脯氨酸、L-甲硫氨酸, 吉尔生化(上海)有

限公司;按文献[17]方法制备 PPZ-Pro;实验用水为超纯水,由延边大学理学院化学实验楼超纯水制造系统制备。

1.3 PPZ-Pro-NHS 的合成及表征

在含有 30 mL 二氯甲烷的 100 mL 茄形瓶中分别加入 PPZ-Pro (379 mg, 1 mmol)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) (0.126 6 g, 1.1 mmol) 和 EDC (0.210 9 g, 1.1 mmol) 和, 超声震荡 1 min 后在室温下(25 °C)搅拌反应 12 h. 反应结束后, 用 5 mL 的超纯水对反应后所得的溶液进行洗涤萃取(萃取 3 次). 收集(含有 PPZ-Pro-NHS)二氯甲烷层后向其中加入无水 MgSO_4 , 并在 4 °C 温度下静置 2 h. 过滤去除 MgSO_4 , 在 2~4 °C 的温度下对溶液进行减压浓缩, 得到黄色黏液状产物. 冷冻干燥该黄色黏液状产物, 得到黄色的固体粉末(PPZ-Pro-NHS) 161.8 mg, 产率为 34%. PPZ-Pro-NHS 的 m. p. 为 107.2~107.5 °C, 色谱纯度为 95.3%. ESI-MS: $m/z = 477.3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; ^1H NMR(500 MHz, MeOD) δ 8.54(s, 1H), 6.33(s, 1H), 5.14(t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 3.65~3.42(m, 2H), 3.32(t, $J = 4.9$ Hz, 4H), 2.86(s, 4H), 2.71(t, $J = 3.0$ Hz, 4H), 2.54(s, 3H), 2.35(ddt, $J = 13.1, 9.0, 6.8$ Hz, 1H), 2.26~2.03(m, 3H). ^{13}C NMR(500 MHz, MeOD) δ 174.82(s), 170.07(d, $J = 255.4$ Hz), 150.40(d, $J = 57.8$ Hz), 146.31(d, $J = 56.7$ Hz), 129.26(s), 106.04(s), 63.62(s), 55.10(d, $J = 4.9$ Hz), 53.06(d, $J = 19.5$ Hz), 50.85(s), 45.27(s), 31.87(s), 26.34(s), 25.92(d, $J = 42.5$ Hz).

1.4 标准溶液的配制

称取 47.6 mg(0.1 mmol) PPZ-Pro-NHS 置于 10 mL 的容量瓶中, 然后用乙腈将其溶解并定容至 10 mL, 由此得到 10 mmol/L 的 PPZ-Pro-NHS 标准溶液。

分别称取 D/L-亮氨酸、L-亮氨酸、D/L-异亮氨酸、L-异亮氨酸、D/L-丙氨酸、L-丙氨酸、D/L-色氨酸、L-色氨酸、D/L-脯氨酸、L-脯氨酸、D/L-缬氨酸、L-缬氨酸、D/L-甲硫氨酸、L-甲硫氨酸、D/L-苯丙氨酸、L-苯丙氨酸、D/L-丝氨酸、L-丝氨酸、D/L-苏氨酸、L-苏氨酸、D/L-谷氨酰胺、L-谷氨酰胺、D/L-半胱氨酸、L-半胱氨酸、D/L-赖氨酸、L-赖氨酸、D/L-精氨酸、L-

精氨酸、D/L-组氨酸、L-组氨酸、D/L-天冬氨酸、L-天冬氨酸、D/L-谷氨酸、L-谷氨酸各 0.1 mmol, 将其分别转移至 10 mL 的容量瓶中后用乙腈溶剂($V(\text{水}) : V(\text{乙腈}) = 7 : 3$)将其定容至 10 mL, 由此得到 10 mmol/L 的上述溶液的标准溶液。

分别称取 D/L-酪氨酸、L-酪氨酸、D/L-天冬酰胺和 L-天冬酰胺各 0.1 mmol, 将其分别转移至 100 mL 的容量瓶中后用乙腈溶剂($V(\text{水}) : V(\text{乙腈}) = 7 : 3$)将其定容至 100 mL, 由此得到 1 mmol/L 的上述溶液的标准溶液。

吸取 280 μL 的三乙胺(TEA)(2 mmol)置于 10 mL 的容量瓶中, 然后用乙腈将其稀释至 10 mL, 由此得到 200 mmol/L 的三乙胺溶液. 上述所有溶液均在 4 °C 下密封保存。

1.5 衍生化反应

分别取 100 mmol/L TEA(120 μL)、10 mmol/L PPZ-Pro-NHS(40 μL) 和 1 mmol/L 氨基酸(40 μL) 并将其加入到 1.5 mL 聚丙烯离心管中. 用漩涡混合器震荡 1 min 后将离心管放入到恒温(25 °C)金属浴装置内反应 40 min. 反应结束后, 取反应液 2 μL 进行 HPLC-UV 检测。

1.6 色谱条件

色谱柱为 Mightsil RP-18 GP(150 mm \times 4.6 mm, 3 μm); 流动相 A 为水溶液(含体积分数为 0.1% 的甲酸), 流动相 B 为甲醇(含体积分数为 0.1% 的甲酸); 流速为 0.3 mL/min; 柱温为 25 °C; UV 检测器波长为 354 nm; 进样量为 2 μL 。

2 结果与讨论

2.1 PPZ-Pro-NHS 的结构认定

在二氯甲烷溶剂中, PPZ-Pro 与 NHS 反应生成 PPZ-Pro-NHS. 根据反应液中各组分的水溶性(PPZ-Pro、EDC 和 NHS 易溶于水, PPZ-Pro-NHS 易溶于二氯甲烷), 以水为萃取剂萃取未反应的 PPZ-Pro、NHS 和 EDC. 由此得到的 PPZ-Pro-NHS 的色谱纯度如图 1 所示. 由图 1 可以看出, 其色谱纯度达到 95.3%. 利用核磁共振波谱法(^1H NMR、 ^{13}C NMR)和质谱(MS)对其结构进行表征显示, 该物质为目标物 PPZ-Pro-NHS。

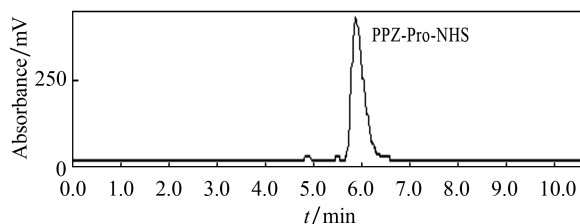


图1 PPZ-Pro-NHS 的色谱纯度

2.2 PPZ-Pro-NHS 与氨基酸发生衍生化反应的条件

图2为PPZ-Pro-NHS与氨基酸的反应式。由图2可以看出,在碱性介质(TEA)中PPZ-Pro-NHS与氨基酸反应生成的是稳定的衍生物。在TEA介质中,本文以D-Leu和L-Leu作为氨基酸模型,探究反应介质浓度、反应温度和反应时间对该衍生化反应的影响。

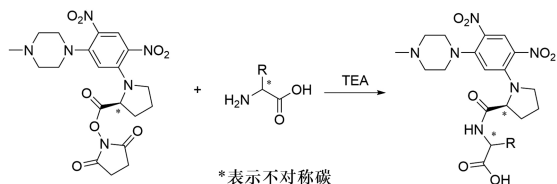


图2 PPZ-Pro-NHS 与氨基酸的反应

1) 反应介质(TEA)的浓度对衍生化反应的影响。在25℃下,选取5个不同浓度的TEA溶液(分别为0、50、100、150、200 mmol/L)分别与D-Leu和L-Leu进行衍生化反应(反应时间均为40 min),其结果如图3所示。由图3可以看出:当TEA浓度小于100 mmol/L时,D-Leu和L-Leu衍生物的峰面积随TEA浓度的增加而增大;当TEA浓度大于100 mmol/L时,各衍生物峰面积基本保持恒定。因此,本文将100 mmol/L TEA溶液作为最佳反应介质。

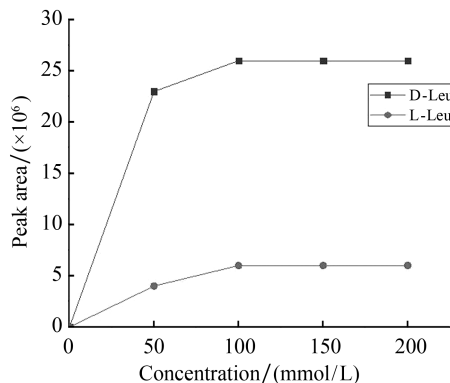


图3 TEA 浓度对衍生化反应的影响

2) 反应时间对衍生化反应的影响。在反应温度为25℃和反应介质为100 mmol/L TEA条件下,将D-Leu和L-Leu分别反应10、20、30、40、50、60 min,其结果如图4所示。由图4可以看出,反应时间为40 min时衍生化反应的产率最高,因此本文选定40 min为最佳反应时间。

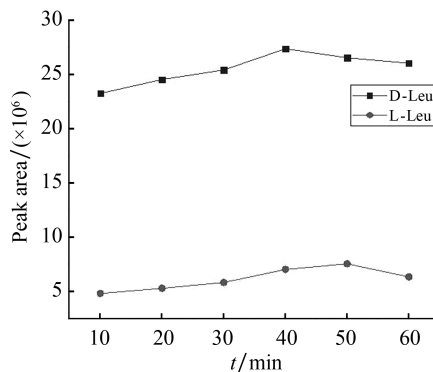


图4 反应时间对衍生化反应的影响

3) 反应温度对衍生化反应的影响。在反应介质为100 mmol/L TEA和反应时间为40 min的条件下,选取不同的反应温度(分别为10、20、30、40、50、60℃)进行D-Leu和L-Leu的衍生化反应,结果如图5所示。由图5可以看出,在不同温度下均能够顺利地进行衍生化反应,因此本实验选择常温(25℃)作为反应温度。

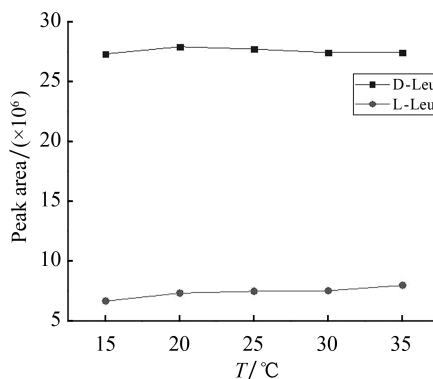


图5 反应温度对衍生化反应的影响

2.3 HPLC 分离 D/L-氨基酸

为分离不同氨基酸,本文使用6种不同的流动相比(A与B的体积比分别为49:51、55:45、58:42、60:40、70:30、75:25)对19种氨基酸进行了分离。

图6(a)是D/L-组氨酸衍生物的色谱图。图6(a)中有3个峰,其色谱保留时间分别为5.5、

6.1、24.4 min. 其中保留时间为 5.5 min 和 6.1 min 的峰是 D/L-组氨酸衍生物产生的峰,保留时间为 24.4 min 的峰是反应后剩余的衍生化试剂 PPZ-Pro-NHS 产生的峰. 为了确认 D-组氨酸和 L-组氨酸的流出顺序,对 L-组氨酸与 PPZ-Pro-NHS 反应后的产物进行了 HPLC 分析,结果如图 6(b)所示. 由图 6(b)可以看出,L-组氨酸在色谱柱上先流出,其分离度(R_s)为 1.38. 表 1 为 19 种氨基酸衍生物的保留时间(t_R)、 R_s 和流动性条件. 由表 1 可知,大部分氨基酸的 R_s 大于 1.5,其中 L-氨基酸先流出的是 Ser、Thr、Glu、Lys、Cys、Gln、Asp 和 Asn, D-氨基酸先流出的是 Phe、Trp、Leu、Ile、Val、Met、Pro、His、Arg、Tyr 和 Ala.

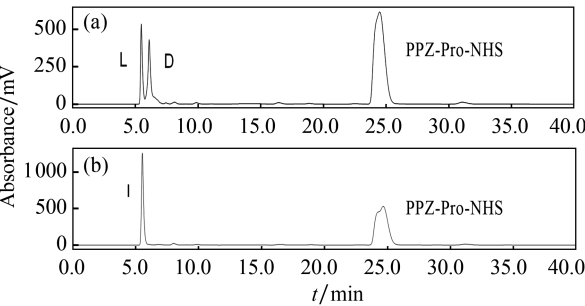


图 6 组氨酸衍生物的高效液相色谱图

表 1 19 种氨基酸的保留时间、分离度和流动相条件

氨基酸	t_R/min		R_s	A : B
	L	D		
Ser	7.054	8.020	1.42	60 : 40
Thr	7.098	8.809	3.31	60 : 40
Glu	7.290	8.377	1.77	60 : 40
Lys	7.993	10.446	3.85	60 : 40
Cys	11.837	12.948	1.45	60 : 40
Gln	5.961	7.561	1.85	60 : 40
Asp	22.806	23.933	1.05	75 : 25
Asn	6.175	7.093	1.22	60 : 40
Phe	15.251	11.190	6.08	49 : 51
Trp	11.529	7.431	5.07	49 : 51
Leu	11.775	10.073	2.27	49 : 51
Ile	12.222	10.006	2.95	49 : 51
Val	12.478	10.786	2.82	55 : 45
Met	15.272	13.831	1.50	58 : 42
Pro	13.586	8.620	3.21	58 : 42
His	6.111	5.483	1.38	70 : 30
Arg	6.181	5.476	1.45	70 : 30
Tyr	16.181	10.763	5.53	60 : 40
Ala	32.513	28.507	1.73	75 : 25

表 2 是 PPZ-Pro-NHS 和文献[14-15]报道的手性衍生化试剂对 19 种氨基酸的分离度. 由表 2 可以看出,文献[14-15]采用的色谱柱虽然比本实验所用的色谱柱的柱效更高,但 L-PGA-Osu 没能分离出 Ser、Thr、Glu、Lys、Cys、Gln、Asp、Asn、His 和 Arg, DMT-(S)-Pro-Osu 没能分离出 Ser 和 Cys. 这表明,本文制备的手性衍生化试剂 PPZ-Pro-NHS 对氨基酸对映体的分离能力优于文献[14-15]报道的衍生化试剂.

表 2 不同衍生化试剂对氨基酸对映体的分离度

氨基酸	R_s		
	PPZ-Pro-NHS	L-PGA-Osu ^[14]	DMT-(S)-Pro-Osu ^[15]
	Mightsil RP-18 GP (3 μm , 150 mm \times 4.6 mm i. d.)	ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μm , 100 mm \times 2.1 mm i. d.)	
Ser	1.42	—	—
Thr	3.31	—	1.8
Glu	1.77	—	2.0
Lys	3.85	—	2.4
Cys	1.45	—	—
Gln	1.85	—	1.2
Asp	1.05	—	3.1
Asn	1.22	—	1.4
Phe	6.08	3.27	9.0
Trp	5.07	3.75	8.3
Leu	2.27	5.21	1.7
Ile	2.95	8.05	1.9
Val	2.82	4.00	2.4
Met	1.50	2.11	1.7
Pro	3.21	1.95	2.0
His	1.38	—	2.9
Arg	1.45	—	1.8
Tyr	5.53	3.53	6.0
Ala	1.73	3.00	5.0

注: — 为未分离出氨基酸对映体.

3 结论

本文利用(S)-1-(5-(4-甲基哌嗪-1-基)-2,4-二硝基苯基)吡咯烷-2-羧酸(PPZ-Pro)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)成功地合成了一种新的手性衍生化试剂 PPZ-Pro-NHS. PPZ-Pro-NHS 可在温和的反应条件下选择性地与氨基酸反应生成氨基酸衍生物. 利用反相高效液相色谱仪对 PPZ-Pro-NHS 与氨基酸反应生成的氨基酸衍生物进行色谱分析显示,19 种氨基酸衍生物在

常规 C18 色谱柱上均具有较好的分离度(1.05~6.08),因此本文合成的 PPZ-Pro-NHS 在氨基酸对映体和手性药物的分离和分析方面具有较好的应用前景。

参考文献:

- [1] GIUFFRIDA A, MACCARRONE G, CUCINOTTA V, et al. Recent advances in chiral separation of amino acids using capillary electromigration techniques[J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1363: 41-50.
- [2] FUJII N. D-amino acids in living higher organisms [J]. *Origins Life Evolut B*, 2002, 32(2): 103-127.
- [3] 蔺晓娟, 黄平, 陈进, 等. 反相高效液相色谱法同时测定肝癌相关酪氨酸、缬氨酸对映体[J]. *重庆医科大学学报*, 2014, 39(12): 1718-1722.
- [4] 木肖玉, 齐莉, 苏圆, 等. 手性配体交换毛细管电泳在氨基酸手性分析中的应用研究进展[J]. *色谱*, 2016, 34(1): 21-27.
- [5] DU S, WANG Y, WEATHERLY C, et al. Variations of L- and D-amino acid levels in the brain of wild-type and mutant mice lacking D-amino acid oxidase activity[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(12): 2971-2979.
- [6] TOMONORI K, ATSUSHI H, YOSHITAKA I. D-amino acids and kidney diseases[J]. *Clin Exp Nephrol*, 2020, 24(5): 404-410.
- [7] MARCONE G L, ROSINI E, CRESPI R, et al. D-amino acids in foods[J]. *Appl Microbiol Biot*, 2020, 104(16): 555-574.
- [8] HSIAO S, ISHII C, FURUSHO A, et al. Determination of phenylalanine enantiomers in the plasma and urine of mammals and D-amino acid oxidase deficient rodents using two-dimensional high-performance liquid chromatography[J]. *BBA - Proteins Proteom*, 2021, 1869: 140540.
- [9] NDAW S, DENS F, MARSAN P, et al. Biological monitoring of occupational exposure to 5-fluorouracil: urinary α -fluoro- β -alanine assay by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry in health care personnel[J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878: 2630-2634.
- [10] 吴秀兰, 江金凤, 覃丽娟, 等. 浅谈手性药物拆分技术研究进展[J]. *海峡药学*, 2014, 26(7): 11-16.
- [11] 孙贤祥. 高效液相色谱间接拆分法的手性衍生化试剂研究进展[J]. *药学报*, 2002(11): 908-912.
- [12] HAN Y, JIN M, XU C, et al. Evaluation of chiral separation efficiency of a novel OTPTHE derivatization reagent: Applications to liquid-chromatographic determination of DL-serine in human plasma[J]. *Chirality*, 2019, 31(12): 1043-1052.
- [13] MOLDOVAN R, BODOKI E, SERVAIS A, et al. (+) or (-)-1-(9-fluorenyl) ethyl chloroformate as chiral derivatizing agent: A review[J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1513: 1-17.
- [14] MOCHIZUKI T, TODOROKI K, INOUE K, et al. Isotopic variants of light and heavy l-pyrroglutamic acid succinimidyl esters as the derivatization reagents for dl-amino acid chiral metabolomics identification by liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2014, 811: 51-59.
- [15] MOCHIZUKI T, TAKAYAMA T, TODOROKI K, et al. Towards the chiral metabolomics: Liquid chromatography-mass spectrometry based dl-amino acid analysis after labeling with a new chiral reagent, (S)-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-1-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)pyrrolidine-2-carboxylate, and the application to saliva of healthy volunteers[J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 875: 73-82.
- [16] VIOLI J P, BISHOP D P, PADULA M P, et al. Consideration for amino acid analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A tutorial review[J]. *Trends Anal Chem*, 2020, 131(7): 116018.
- [17] JIN Y, PAN Y, JIN B, et al. (S)-1-(5-(4-Methylpiperazin-1-yl)-2,4-dinitrophenyl)pyrrolidine-2-carboxylic acid as a derivatization reagent for ultrasensitive detection of amine enantiomers by HPLC-MS/MS and its application to the chiral metabolite analysis of (R)-1-aminoindan in saliva [J]. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2021, 194: 113815.