

## 衍生化法分离(2*R*, 4*R*)-4-甲基-2-哌啶甲酸乙酯酒石酸盐手性异构体

石涛<sup>1,2</sup>, 张慕军<sup>1,2,3</sup>, 王文倩<sup>1</sup>, 康江鹏<sup>1,2</sup>, 王洪湘<sup>1,2</sup>, 王梦菲<sup>1,2</sup>, 潘毅<sup>1,2</sup>, 雷勇胜<sup>1,2,3\*</sup>, 陈蔚<sup>1,2</sup>, 陈华<sup>1</sup>

1. 天津药物研究院有限公司, 天津 300450
2. 天津泰普制药有限公司 技术研发中心, 天津 300450
3. 中国医学科学院 药物代谢新技术创新单元, 天津 300450

**摘要:** 目的 建立衍生化法分离(2*R*, 4*R*)-4-甲基-2-哌啶甲酸乙酯酒石酸盐(MPFET) 3种手性异构体。方法 以2, 3, 4, 6-四-*O*-乙酰基-β-*D*-吡喃葡萄糖异硫氰酸酯(GITC)为柱前衍生化试剂, 对MPFET手性异构体进行分离, 并对衍生化条件进行优化。采用Venusil AQ C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱作为固定相进行分离、监测和定量。以0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调pH至3.6)-乙腈(60:40)为流动相, 体积流量1.5 mL/min进行等度洗脱, 采用紫外检测器, 检测波长266 nm; 柱温30 °C; 进样量20 μL。结果 MPFET与2*S*, 4*S*-异构体分离度为1.76。2*S*, 4*R*-异构体的线性范围为1.500~8.999 μg/mL, 2*R*, 4*S*-异构体的线性范围为0.255 2~1.531 0 μg/mL, 2*S*, 4*S*-异构体的线性范围为0.250 1~75.000 0 μg/mL, MPFET的线性范围为0.250 1~600.100 0 μg/mL, 回收率均在90%~108%内, RSD均不大于3.0%。结论 柱前衍生化法分离MPFET中3种手性异构体, 专属性强、准确度高、灵敏度高、重复性好, 可用于MPFET手性异构体的分离和质量控制。

**关键词:** (2*R*, 4*R*)-4-甲基-2-哌啶甲酸乙酯酒石酸盐(MPFET); 手性异构体; 高效液相色谱; 衍生化法

中图分类号: R914 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2021) 10-2170-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.10.019

## Separation of chiral isomers in (2*R*, 4*R*)-4-methyl-2-piperidine carboxylate ethyl tartrate by derivatization

SHI Tao<sup>1,2</sup>, ZHANG Mujun<sup>1,2,3</sup>, WANG Wenqian<sup>1</sup>, KANG Jiangpeng<sup>1,2</sup>, WANG Hongxiang<sup>1,2</sup>, WANG Mengfei<sup>1,2</sup>, PAN Yi<sup>1,2</sup>, LEI Yongsheng<sup>1,2,3</sup>, CHEN Wei<sup>1,2</sup>, CHEN Hua<sup>1</sup>

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Co., Ltd, Tianjin 300450, China
2. Technology R&D Center of Tianjin Taipu Pharmaceutical Co., Ltd, Tianjin 300450, China
3. Research Unit for Drug Metabolism, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300450, China

**Abstract: Objective** To establish a derivatization method for the separation of three chiral isomers of (2*R*, 4*R*)-4-methyl-2-piperidine formate ethyl tartrate (MPFET). **Methods** 2, 3, 4, 6-tetra-*O*-acetyl was used-β-*D*-glucopyranose isothiocyanate (GITC) was used as pre column derivatization reagent to separate the chiral isomers of MPFET, and the derivatization conditions were optimized. Use venusil AQ C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) chromatographic column is used as stationary phase for separation, monitoring and quantification. 0.01 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (adjust pH to 3.6 with phosphoric acid)-acetonitrile (60:40) was used as mobile phase, and the volume flow was 1.5 mL/min for isocratic elution. UV detector was used with detection wavelength of 266 nm, column temperature 30 °C, injection volume 20 μL. **Results** The separation of MPFET from 2*S*, 4*S* isomers was 1.76. The linear range of 2*S*, 4*R* isomers was 1.500—8.999 μg/mL, the linear range of 2*R*, 4*S* isomers was 0.255 2—1.531 0 μg/mL, the linear range of 2*S*, 4*S* isomers was 0.250 1—75.000 0 μg/mL, the linear range of MPFET was 0.250 1—600.100 0 μg/mL, the recoveries were within 90%—108%, and the RSD was not greater than 3.0%. **Conclusion** Precolumn derivatization has strong specificity, high accuracy, high sensitivity and good repeatability. It can be used for the separation and quality control of chiral isomers in MPFET.

收稿日期: 2021-06-15

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目资助(2019-I2M-5-020);天津市科技计划项目(18YFZCSY00090)

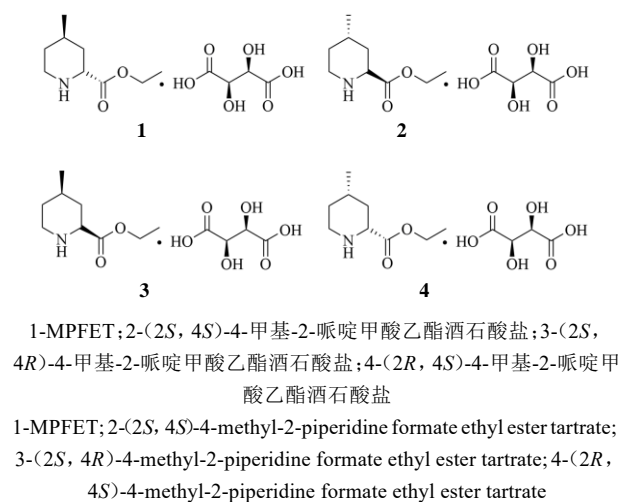
第一作者: 石涛,男,硕士,主要从事药物分析工作。E-mail: shitao@tipr.com

\*通信作者: 雷勇胜,男,副研究员,主要从事药物分析工作。E-mail: leiys@tipr.com

**Key words:** (2*R*, 4*R*)-4-methyl-2-piperidine formate ethyl tartrate; chiral isomers; high performance liquid chromatography; derivatization method

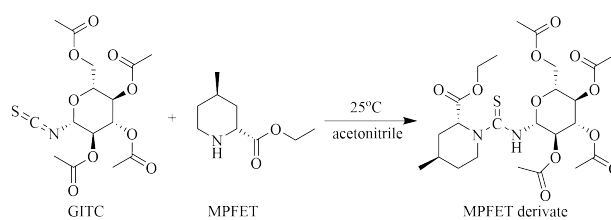
(2*R*, 4*R*)-4-甲基-2-哌啶甲酸乙酯酒石酸盐(MPFET)是一类良好生物活性的含氮杂环化合物,是合成阿加曲班的关键起始物料,同时也可用于凝血酶抑制剂、抗血栓药、脑卒中溶栓药、抗血小板减少等药物的合成。其质量将直接影响合成后药物的质量,对其进行质量控制研究具有现实意义。

HPLC法分离手性化合物的方法有手性固定相法<sup>[1-2]</sup>、手性流动相添加剂法<sup>[3-4]</sup>、手性衍生化法<sup>[5-6]</sup>。MPFET母核含有2个手性中心,有3种手性异构体(图1),利用普通色谱柱很难将这3种手性异构体分离。MPFET及其手性异构体分子结构中无共轭基团,没有紫外吸收,HPLC中紫外检测器无法检出,故采用衍生化法将其衍生成非手性异构体,提高紫外吸收,利用HPLC法将其分离。MPFET哌啶环中含有一个仲胺,以此为衍生的反应位点。常见与胺或醇衍生的试剂主要有异氰酸酯类<sup>[7]</sup>、异硫氰酸酯类<sup>[8-11]</sup>、苯甲醛类<sup>[12]</sup>、酰氯类<sup>[13]</sup>、氯甲酸酯类<sup>[14]</sup>等。由于MPFET含有盐基,故需要对其进行游离,再以2,3,4,6-四-*O*-乙酰基-β-*D*-吡喃葡萄糖异硫氰酸酯(GITC)与其衍生成成硫脲类衍生物(图2、3)后在HPLC上进行分离。经液质联用仪测定衍生后溶液,溶液中4个峰即为图3中4个衍生物。本研究采用GITC作为柱前衍生化试剂,通过试验优化游离、萃取、衍生的条件和色谱条件,建立一套可以用来检测MPFET中3种手性异构体的衍生化法,为MPFET质量控制研究提供参考。



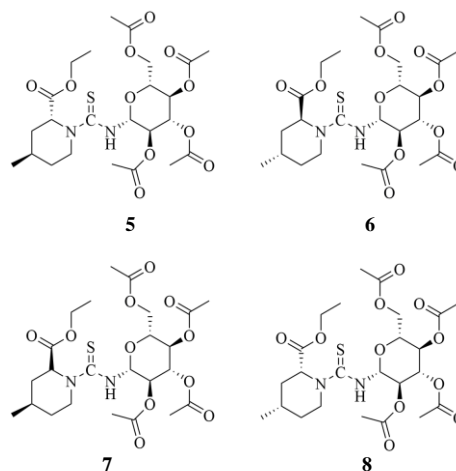
**图1 MPFET及其手性异构体结构式**

**Fig. 1 Chemical structures of MPFET and chiral isomers**



**图2 MPFET衍生化反应**

**Fig. 2 Derivatization reaction of MPFET**



5-MPFET 衍生物; 6-2*S*, 4*S*-异构体衍生物; 7-2*S*, 4*R*-异构体衍生物; 8-2*R*, 4*S*-异构体衍生物  
5-MPFET derivative; 6-2*S*, 4*S*-isomer derivative; 7-2*S*, 4*R*-isomer derivative; 8-2*R*, 4*S*-isomer derivative

**图3 MPFET及其手性异构体衍生物**

**Fig. 3 Derivate of MPFET and chiral isomers**

## 1 仪器与试剂

Waters e2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Mettler XS205DU 十万分之一电子天平、Mettler Toledo S210 酸度计(瑞士梅特勒公司); Sciex X500R LC-QTOF 液质联用仪(AB Sciex 公司); KQ-300 超声波清洗器(昆山市超声仪器公司)。

二氯甲烷、乙腈(天津市康科德科技有限公司)均为色谱纯试剂;磷酸二氢钾、碳酸钾(天津市风船化学试剂科技有限公司)均为分析纯试剂;磷酸(天津市科密欧化学试剂有限公司)为色谱纯试剂;水为超纯水;GITC(质量分数98%,成都化夏化学试剂有限公司);MPFET(批号 AP-20200705、AP-20200720、AP-20200801)、MPFET 对照品(质量分数99.14%,批号 1102200602)、(2*S*, 4*S*)-4-甲基-2-哌啶甲酸乙酯酒石酸盐对照品(质量分数98.57%,批号 160307)、(2*S*, 4*R*)-4-甲基-2-哌啶甲酸乙酯酒石

酸盐对照品(质量分数 98.36%, 批号 AJ-ZHH-200529)、(2*R*, 4*S*)-4-甲基-2-哌啶甲酸乙酯酒石酸盐对照品(质量分数 98.07%, 批号 20191001), 均由天津泰普制药有限公司技术研发中心提供。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

以 Agela Venusil AQ C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为固定相; 以 0.01 mol/L 磷酸二氢钾(用磷酸调 pH 至 3.6)-乙腈(60:40) 为流动相; 检测波长 266 nm; 柱温 30 °C; 体积流量 1.5 mL/min; 进样量 20 μL。

### 2.2 萃取条件的确定

取 MPFET 样品, 先加水溶解, 再加入不同量的碱(30% 碳酸钾) 溶液进行游离, 随后加入 5 mL 二氯甲烷进行萃取, 不同萃取条件见表 1。

表 1 不同萃取条件

Table 1 Different extraction conditions

萃取方式	温度/°C	二氯甲烷/mL	碱/mL	t/min
I	25	5.0	1	10
II	25	5.0	1	5+5
II	25	5.0	3	5+5
II	25	5.0	5	5+5
II	35	5.0	1	5+5
II	45	5.0	1	5+5
II	25	2.5	1	5+5
II	25	10.0	1	5+5
II	25	5.0	1	2.5+2.5

I-加入碱溶液后再加入二氯甲烷直接进行萃取; II-加入碱溶液后先游离再加入二氯甲烷进行萃取; t 为游离时间+萃取时间

I-after adding alkali solution, dichloromethane was added for direct extraction; II-free after adding alkali solution, and then add dichloromethane for extraction; The time was free and extraction time

结果表明萃取方式 I 各手性异构体峰面积均小于方式 II; 不同萃取温度对萃取结果影响不明显; 碱溶液大于 1 mL 时各异构体峰面积基本不变, 碱溶液 1 mL 时能够完全游离出各手性异构体; 二氯甲烷 2.5 mL 时不能完全萃取出各异构体, 5、10 mL 没有明显变化, 故 5 mL 二氯甲烷即可萃取完全; 游离和萃取时间减半手性异构体萃取量没有明显变化, 为保证游离和萃取完全选取游离 5 min 萃取 5 min 的方式。

### 2.3 衍生条件的确定

精密量取 1 mL 异构体萃取溶液, 精密加入 1 mL

GITC 溶液, 在不同条件下进行衍生, 衍生条件考察了不同温度、衍生试剂的质量浓度及衍生时间, 各衍生条件见表 2。

表 2 不同衍生条件

Table 2 Different derivation conditions

序号	温度/°C	GITC/(mg·mL <sup>-1</sup> )	t/min
1	35	3.5	10
2	45	3.5	10
3	25	3.0	10
4	25	4.0	10
5	25	3.5	5
6	25	3.5	10

结果表明, 在 25~45 °C 下衍生结果没有显著性差异; 表中 GITC 的量与异构体物质的量比均大于 1.5, 物质的量比大于 1.5 时不同质量浓度 GITC 对衍生结果没有显著性影响; 衍生时间对衍生结果没有显著性影响, 为保证衍生完全, 确定衍生时间为 10 min。

### 2.4 溶液配制

**2.4.1 GITC 溶液** 取 GITC 约 35 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀。

**2.4.2 30% 碳酸钾溶液** 取碳酸钾约 3 g, 称定, 置 10 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀。

**2.4.3 系统适用性溶液** 称取 MPFET 对照品约 188 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加 5 mL 纯化水溶解, 再加入 1 mL 30% 的碳酸钾溶液, 振摇 5 min, 转移至分液漏斗, 加入 5 mL 二氯甲烷, 振摇 5 min, 静置 15 min, 取下层溶液 0.5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加乙腈稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL 置西林瓶中, 精密加入 1 mL GITC 溶液, 置 25 °C 环境下振摇 10 min, 作为系统适用性溶液。

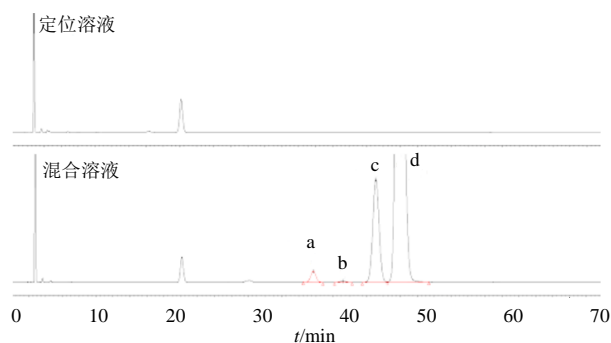
**2.4.4 手性异构体储备液** 分别称取各异构体对照品约 188 mg, 精密称定, 分别置 25 mL 量瓶中, 加 5 mL 纯化水溶解, 再加入 1 mL 30% 的碳酸钾溶液, 振摇 5 min, 转移至分液漏斗, 加入 5 mL 二氯甲烷, 振摇 5 min, 静置 15 min, 取下层溶液 0.5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加乙腈稀释至刻度, 摇匀, 作为各手性异构体储备液。

### 2.5 系统适用性试验

按“2.1”项色谱条件, 将“2.4.3”项系统适用性溶液进样分析, 结果表明 MPFET 与 2*S*, 4*S*-异构体分离度为 1.76。

## 2.6 专属性试验

取 MPFET 与其手性异构体,按“2.4.3”项下系统适用性溶液方法分别配限制度浓度的定位溶液及混合溶液。进样分析,结果表明 MPFET 衍生物与其手性异构体衍生物均能达到基线分离,空白无干扰。色谱图见图4。



a-2S, 4R 异构体衍生物;b-2R, 4S 异构体衍生物;c-2S, 4S 异构体衍生物;d-MPFET 衍生物  
a-2S, 4R isomer derivate; b-2R, 4S isomer derivate; c-2S, 4S isomer derivate; d-MPFET derivate

图4 定位溶液和混合溶液 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of blank and mixture solution

## 2.7 检测限和定量限确定

分别称取 MPFET 及各手性异构体对照品约 188 mg,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加 5 mL 纯化水溶解,再加入 1 mL 30% 的碳酸钾溶液,振摇 5 min,转移至分液漏斗,加入 5 mL 二氯甲烷,振摇 5 min,静置 15 min,取下层溶液逐级稀释,精密量取 1 mL 置西林瓶中,精密加入 1 mL GITC 溶液,置 25 °C 环境下振摇 10 min。取各浓度溶液进行测定,当  $S/N$  约为 10 时,该浓度为定量限浓度。当  $S/N$  约为 3 时,该浓度为检测限浓度。2S, 4R-异构体定量限质量浓度为 1.499  $\mu\text{g/mL}$  (相当于样品质量浓度的 0.3%),检测限为 0.499 7  $\mu\text{g/mL}$  (相当于样品质量浓度的 0.01%); 2R, 4S-异构体定量限质量浓度为 0.256 8  $\mu\text{g/mL}$  (相当于样品质量浓度的 0.05%),检测限为 0.085 6  $\mu\text{g/mL}$  (相当于样品质量浓度的 0.017%); 2S, 4S-异构体定量限质量浓度为 0.249 3  $\mu\text{g/mL}$  (相当于样品质量浓度的 0.05%),检测限为 0.083 1  $\mu\text{g/mL}$  (相当于样品质量浓度的 0.017%); MPFET 定量限质量浓度为 0.250 4  $\mu\text{g/mL}$  (相当于样品质量浓度的 0.05%),检测限为 0.083 47  $\mu\text{g/mL}$  (相当于样品质量浓度的 0.017%)。平行配制 6 份定量限溶液,分别进样测定。结果表明 MPFET 及其手性异构体定量限峰面积  $RSD(n=6)$  均不大于 4.0%,均符合要求。

## 2.8 线性关系考察

取 MPFET 及各手性异构体对照品适量,按“2.2.3”项下系统适用性溶液方法配制成系列浓度的溶液,进样测试。以衍生前质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,得回归方程  $y=0.472x+0.03$  (2S, 4R-异构体,  $r=1.000$ ,线性范围 1.500~8.999  $\mu\text{g/mL}$ ),  $y=0.477x+0.013$  (2R, 4S-异构体,  $r=1.000$ ,线性范围 0.255 2~1.531 0  $\mu\text{g/mL}$ ),  $y=0.486x-0.001$  (2S, 4S-异构体,  $r=1.000$ ,线性范围 0.250 1~75.000 0  $\mu\text{g/mL}$ ),  $y=0.496x+0.357$  (MPFET,  $r=1.000$ ,线性范围 0.250 1~600.100 0  $\mu\text{g/mL}$ ),线性关系良好。并计算校正因子,2S, 4R-异构体为 1.05, 2R, 4S-异构体为 1.04, 2S, 4S-异构体为 1.02。

## 2.9 精密度的试验

称取 MPFET 供试品约 188 mg,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加 5 mL 纯化水溶解,再加入 1 mL 30% 的碳酸钾溶液,振摇 5 min,转移至分液漏斗,再加入 5 mL 二氯甲烷,振摇 5 min 后,静置 15 min,萃取,取下层溶液 0.5 mL,置 10 mL 量瓶中,精密加入各手性异构体储备液适量,用乙腈稀释至刻度,摇匀,精密量取 1 mL 置西林瓶中,精密加入 1 mL GITC 溶液,置 25 °C 环境下振摇 10 min,得 100% 限度加标溶液。平行配制 6 份,作为精密度溶液。进样测定,按面积归一化法计算,各异构体质量分数  $RSD$  均  $\leq 3.0\%$ 。

## 2.10 回收率试验

按“2.9”项下精密度试验方法,分别加入适量手性异构体储备液按 80%、100%、120% 水平配制,每个质量浓度平行配制 3 份,分别进样测定。结果表明,按面积归一化法和外标法计算回收率均在 90%~108%,回收率  $RSD(n=9)$  均  $\leq 3.0\%$ 。

## 2.11 耐用性试验

考察色谱柱柱温、流动相 pH 和流动相比比例等条件的微小变动,对各手性异构体的测定含量变化的影响。按“2.9”项下精密度试验方法配制耐用性溶液。按照表 3 进行色谱条件调整,结果表明柱温、流动相 pH 和流动相比比例等参数的微小变化对各异构体测定无显著性的影响。

## 2.12 溶液稳定性试验

按“2.9”项下精密度试验方法配制溶液稳定性测定溶液,分别于室温条件下放置 0、3、6、10、25 h,进样测定,按面积归一化法计算各异构体含量,结果表明各异构体含量  $RSD$  均  $\leq 2.0\%$ ,含量变化绝对

表3 耐用性试验色谱条件参数

Table 3 Parameters of chromatographic conditions in durability test

色谱条件	规定值	变动值
柱温/°C	30	25、35
体积流量/(mL·min <sup>-1</sup> )	1.5	1.4、1.6
流动相pH	3.6	3.4、3.8
流动相(0.01 mol/L 磷酸二氢钾-乙腈)比例	60:40	65:35、55:45

值均不大于0.02%，溶液室温条件下放置25 h内稳定。

### 2.13 中间精密度试验

由另一实验人员在不同分析时间，不同试验仪器按“2.7”项下精密度试验方法进行中间精密度试验，与精密度试验数据合并计算共12份溶液中各异构体含量RSD( $n=12$ )均 $\leq 6.0\%$ 。

### 2.14 样品测定

取3批MPFET供试品样品，按“2.4.3”项下系统适用性溶液方法配制溶液，分别测定，按加校正因子的面积归一化法计算各异构体含量，结果见表4。

表4 样品中异构体的测定结果

Table 4 Determination of isomers in sample

批号	质量分数/%		
	2S, 4R-异构体	2R, 4S-异构体	2S, 4S-异构体
AP-20200705	0.10	0.06	1.27
AP-20200720	0.09	0.07	1.34
AP-20200801	0.10	0.06	1.77

## 3 讨论

### 3.1 流动相的选择

选择不同的流动相pH进样测定，pH大于3.6时，MPFET峰及手性异构体峰宽逐渐增大且灵敏度逐渐降低，pH达到3.6及3.6以下时，峰宽小，灵敏度高，故选择磷酸二氢钾溶液(用磷酸调pH至3.6)-乙腈作为流动相。调节流动相比比例，当有机相比比例大于35%时，主成分与手性异构体分离度达不到要求；当有机相比比例大于45%，保留时间太长，灵敏度降低，故选择磷酸二氢钾溶液(用磷酸调pH至3.6)-乙腈(60:40)作为流动相。

### 3.2 色谱柱的选择

采用相同的流动相体系，比较Venusil MP C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和Venusil AQ C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm)，AQ色谱柱中MPFET与手性异构体峰分离度高，MPFET理论塔板数高，故选择Venusil

AQ C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱作为固定相。

本实验采用GITC作为柱前衍生化试剂，对MPFET及其手性异构体进行衍生，衍生化后既提高了MPFET及其手性异构体的紫外吸收，又使其在普通色谱柱中得以分离。柱前衍生化受多种因素影响，本实验重点考察了衍生化温度、GITC浓度和衍生化时间，并对其进行了优化。同时对色谱条件优化后，实现了MPFET及其手性异构体的分离，达到了分离测定的目的。本研究建立的柱前衍生化法分离MPFET中3种手性异构体，专属性强、准确度高、灵敏度高、重复性好，为MPFET中手性异构体的分离和含量测定提供了可靠的方法，对药物质量控制具有重要的现实意义。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] 滕怀凤, 温晓丽. HPLC手性固定相法分离5个康唑类药物对映体[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(3): 436-441.  
Teng H F, Wen X L. Separation of five enantiomers of conazole by HPLC with chiral stationary phase[J]. Chin J Pharm Anal, 2020, 40(3): 436-441.
- [2] 李泽众, 李晨, 朱子豪, 等. HPLC手性固定相法分离5种H<sub>1</sub>-受体阻断剂药物对映体[J]. 沈阳药科大学学报, 2018, 35(11): 943-946.  
Li Z Z, Li C, Zhu Z H, et al. Separation of five H<sub>1</sub>-receptor blocker enantiomers with chiral HPLC[J]. J Shenyang Pharm Univ, 2018, 35(11): 943-946.
- [3] 陈希, 刘绪平, 肖钦钦, 等. 羟丙基-β-环糊精手性流动相添加剂法拆分那氟沙星对映体[J]. 分析试验室, 2020, 39(12): 1426-1429.  
Chen X, Liu X P, Xiao Q Q, et al. Separation of nadifloxacin enantiomers by HPLC using hydroxypropyl-β-cyclodextrin as chiral mobile phase additive[J]. Anal Lab, 2020, 39(12): 1426-1429.
- [4] 翟明翠, 韩爽, 王颖, 等. 高效液相色谱手性流动相添加剂法拆分愈创甘油醚对映体[J]. 分析科学学报, 2020, 36(1): 139-142.  
Zhai M H, Han S, Wang Y, et al. Enantiomeric separation

- of guaifenesin by high performance liquid chromatography with chiral mobile phase additives [J]. *J Anal Sci*, 2020, 36(1): 139-142.
- [5] 刘浩, 裘亚. 手性衍生化-HPLC法测定达托霉素中8种手性氨基酸的D, L-构型 [J]. *中国抗生素杂志*, 2016, 41(1): 45-49, 69.
- Liu H, Qiu Y D. L-configuration determination of eight kinds of chiral amino acids in daptomycin by chiral derivatization and HPLC [J]. *Chin J Antibiot*, 2016, 41(1): 45-49, 69.
- [6] 姚青青, 屈伯宣, 周权, 等. 非索非那定对映体柱前手性衍生化反相高效液相色谱分析方法的建立 [J]. *浙江大学学报: 医学版*, 2014, 43(2): 155-159.
- Yao Q Q, Qu B X, Zhou Q, et al. Establishment of reverse phase high-performance liquid chromatography with chiral reagent derivatization for separation of fexofenadine enantiomers [J]. *J Zhejiang Univ: Med Sci*, 2014, 43(2): 155-159.
- [7] 杨玉焕, 霍燃, 王子铭, 等. 大鼠ig桦木酸的血浆药动学研究 [J]. *药物评价研究*, 2015, 38(6): 629-632.
- Yang Y H, Huo R, Wang Z M, et al. Pharmacokinetics study of betulinic acid in rats after oral administration [J]. *Drug Eval Res*, 2015, 38(6): 629-632.
- [8] 邓小娟, 周维义, 李文斌. D-吡喃葡萄糖基异硫氰酸酯柱前衍生化高效液相色谱法分离胺类对映异构体 [J]. *分析测试学报*, 2007, 26(3): 381-384.
- Deng X J, Zhou W Y, Li W B. Separation of amine enantiomers by high performance liquid chromatography with pre column derivatization of D-glucopyranosyl isothiocyanate [J]. *J Instrum Anal*, 2007, 26(3): 381-384.
- [9] 尹艳微, 姚广哲, 马文娟, 等. 疏血通注射液中游离氨基酸的UPLC指纹图谱研究 [J]. *药物评价研究*, 2019, 42(7): 1350-1354.
- Yin Y W, Yao G Z, Ma W J, et al. Study on UPLC fingerprint of free amino acid in Shuxuetong Injection [J]. *Drug Eval Res*, 2019, 42(7): 1350-1354.
- [10] 蒋清伟, 王威, 刘姝畅, 等. 柱前衍生化HPLC法测定天麻提取物中18种氨基酸含量 [J]. *中国新药杂志*, 2020, 29(15): 1785-1790.
- Jiang Q W, Wang W, Liu S C, et al. Determination of 18 amino acids in *Rhizoma gastrodiae* extract by precolumn derivatization HPLC [J]. *Chin New Drugs J*, 2020, 29(15): 1785-1790.
- [11] 顾志荣, 马转霞, 马天翔, 等. 柱前衍生化RP-HPLC同时测定不同产区锁阳中17种游离氨基酸含量及其多元统计分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(10): 148-155.
- Gu Z R, Ma Z X, Ma T X, et al. Pre-column derivatization RP-HPLC for simultaneous determination of 17 amino acids in *Cynomorii Herba* from different producing areas and its multivariate statistical analysis. [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2020, 26(10): 148-155.
- [12] 刘爱赟, 袁永兵, 靳文仙, 等. 药物中胍类基因毒性杂质分析研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2020, 43(2): 356-360.
- Liu A Y, Yuan Y B, Jin W X, et al. Advances on analysis of genotoxic impurities of hydrazines in pharmaceuticals [J]. *Drug Eval Res*, 2020, 43(2): 356-360.
- [13] 陈秀. 27种胺类物质与间甲基苯甲酰氯的衍生化特点及LC-MS定性分析方法 [J]. *分析测试技术与仪器*, 2016, 22(1): 28-35.
- Chen X. Derivatization characteristics of 27 amines with m-methylbenzoyl chloride and LC-MS qualitative analysis method [J]. *Anal Test Technol Instrum*, 2016, 22(1): 28-35.
- [14] 张琳, 平贵臣, 尤进茂, 等. 咪唑-9-乙基氯甲酸酯柱前衍生胺类化合物高效液相色谱分离 [J]. *分析化学*, 2003, 31(7): 808-811.
- Zhang L, Ping G C, You J M, et al. Determination of amines by High Performance Liquid Chromatography with a pre-column derivatization and fluorescence detection [J]. *Chin J Anal Chem*, 2003, 31(7): 808-811.

[责任编辑 刘东博]