

## 酪氨酸对映体的柱前手性衍生高效液相色谱-化学发光联用法研究\*

徐豪杰<sup>1</sup>, 高山<sup>1</sup>, 任艳丽<sup>1</sup>, 荣守华<sup>2</sup>

(1. 郑州大学第三附属医院药学部, 郑州 450052; 2. 郑州大学第三附属医院检验科, 郑州 450052)

**摘要 目的:** 建立酪氨酸对映体的柱前手性衍生高效液相色谱-化学发光联用新方法, 并用于体内外酪氨酸对映体的高效检测。**方法:** 利用柱前手性衍生高效液相色谱法对酪氨酸对映体进行分离, 联用化学发光检测器对酪氨酸对映体进行检测。考察了色谱流动相配比、流速、柱温以及化学发光条件对酪氨酸对映体分离结果的影响。采用柱前手性衍生高效液相色谱-化学发光联用法对生物样品中的酪氨酸对映体进行分离分析。**结果:** 最佳色谱条件下, 流动相为甲醇-0.01 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾溶液(35:65, pH 6.0), 流速为 0.7 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为室温; 最优化学发光体系为氢氧化钠、鲁米诺和高锰酸钾, 其浓度分别为 0.15、4.0×10<sup>-5</sup> 和 4.0×10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>。在此优化条件下, 酪氨酸对映体可以达到完全分离( $R_s > 2.0$ ), 线性检测范围为 2.5×10<sup>-7</sup>~3.2×10<sup>-5</sup> g·mL<sup>-1</sup>, *L*-/*D*-酪氨酸的检测下限分别为 2.96×10<sup>-8</sup>、3.59×10<sup>-8</sup> g·mL<sup>-1</sup>。**结论:** 柱前手性衍生高效液相色谱-化学发光联用法可对酪氨酸对映体进行高选择性、高灵敏度检测。

**关键词:** 柱前衍生化; 手性色谱法; 化学发光法; 酪氨酸对映体; 高灵敏

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)11-1994-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.11.20

## Determination of tyrosine enantiomers by HPLC-CL with precolumn chiral derivatization\*

XU Hao-jie<sup>1</sup>, GAO Shan<sup>1</sup>, REN Yan-li<sup>1</sup>, RONG Shou-hua<sup>2</sup>

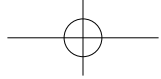
(1. Department of Pharmacy, The Third Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China;

2. Department of Clinical Laboratory, The Third Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, 450052, China)

**Abstract Objective:** To establish a novel HPLC-CL method with precolumn chiral derivatization for the determine of tyrosine enantiomers, and to detect chiral substances *in vivo* and *in vitro*. **Methods:** The tyrosine enantiomers were separated by HPLC with precolumn chiral derivatization and detected by chemiluminescence detector; the chromatographic mobile phase, flow rate, column temperature and chemiluminescence conditions were investigated; the established method was used to analyze the tyrosine enantiomers in biological samples. **Results:** The chromatographic mobile phase consisted of methanol and 0.01 mol·L<sup>-1</sup> monopotassium phosphate solution(35:65, pH 6.0), the flow rate was 0.7 mL·min<sup>-1</sup>, and the column temperature was room temperature. The chemiluminescence system was composed of sodium hydroxide(0.15 mol·L<sup>-1</sup>), luminol(4.0×10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>) and potassium permanganate

\* 河南省教育厅基金资助项目(17A350015)

第一作者 Tel: 13937138353; E-mail: 13937138353@163.com



( $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Under the optimized conditions, the tyrosine enantiomers could be completely separated ( $R_s > 2.0$ ) with the linear range of  $2.5 \times 10^{-7} \sim 3.2 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , and the detection limits of *L*- and *D*-tyrosine were  $2.96 \times 10^{-8}$  and  $3.59 \times 10^{-8} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively. **Conclusion:** The established method can be used to selectively and sensitively determine tyrosine enantiomers.

**Keywords:** precolumn derivatization; chiral chromatography; chemiluminescence; tyrosine enantiomers; high sensitive

不同手性物质的理化性质、药理作用等存在较大差异,因此,手性物质的拆分对于安全合理用药十分重要。目前色谱拆分法<sup>[1]</sup>在分离手性物质中的应用较为广泛,然而,单一的分析方法很难有效分离分析生物样品中的手性物质,且检测灵敏度相对较低,需要联用多种方法进行检测。近年来,由于化学发光法(chemiluminescence, CL)具有灵敏度高,选择性好,线性范围宽,相对简单和仪器经济等优点,已经成为用于高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)的新型检测方法<sup>[2-3]</sup>。高效液相色谱-化学发光检测法已经成功用于一些化合物的测定,包括酚类化合物<sup>[4-5]</sup>、低分子量氨基硫醇<sup>[6]</sup>和芳香族化合物<sup>[7]</sup>,目前尚未发现手性衍生色谱-化学发光联用的方法及其应用于手性物质研究领域的报道。本文拟建立手性衍生色谱-化学发光联用法,并对体内外手性化合物进行有效检测。

酪氨酸(tyrosine, Tyr)在生命系统中起着非常重要的作用,*D*-和*L*-酪氨酸在人体中具有不同的药理作用<sup>[8]</sup>。研究体内酪氨酸对映体的检测方法,对于相关疾病如神经系统损害、肝肾损伤、恶性肿瘤等具有非常重要的临床价值。曾有文献报道利用高效液相色谱<sup>[9]</sup>、毛细管电泳<sup>[10]</sup>和电化学方法<sup>[11]</sup>对酪氨酸对映体进行分离分析。然而,这些方法具有灵敏度低,可重复性差或仪器昂贵等缺点。本文通过手性衍生色谱-化学发光联用法,拟对酪氨酸对映体进行高选择性、高灵敏度的检测,并用于生物样品的分析。这一研究结果对神经性疾病、肿瘤等的辅助检测、诊断具有十分重要的意义。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪, MD200-2 型氮气吹扫仪(杭州奥盛仪器有限公司),流动注射化学发光检测系统(西安瑞迈分析仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

*D*-/*L*-酪氨酸(北京鼎国生物有限公司);邻苯二甲醛和 *N*-乙酰基-*L*-半胱氨酸(纯度 >90%)(上海阿拉丁试剂有限公司);鲁米诺(北京索莱宝生物科技有限公司);高锰酸钾(天津科密欧化学试剂有限公司)。人血清样品来自河南省红十字会血液中心。

## 2 方法

### 2.1 *D*-/*L*-酪氨酸的柱前衍生

称取酪氨酸 20 mg,加入  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液 10 mL 进行溶解,于  $4^\circ\text{C}$  下黑暗处保存 2 周,制备酪氨酸的标准溶液。称取邻苯二甲醛 10 mg 和 *N*-乙酰基-*L*-半胱氨酸 30 mg,加入甲醇 1.0 mL 溶解,每隔 1 d 制备衍生化试剂。将水 500  $\mu\text{L}$ 、衍生化试剂 200  $\mu\text{L}$  和  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硼酸盐缓冲液(pH 9.6)[准确称取  $\text{Na}_4\text{B}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (科密欧化学试剂有限公司,天津) 3.814 g,溶解于 100 mL 二次蒸馏水中,用  $2.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的氢氧化钠溶液调节其 pH 至 9.6] 500  $\mu\text{L}$  逐渐加入到 100  $\mu\text{L}$  酪氨酸标准溶液中,室温下振荡 4 min 进行衍生反应,即可得到酪氨酸对映体的衍生物。

### 2.2 色谱条件

色谱柱: Shim-pack ODS 分析柱(150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相: 甲醇- $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾溶液(pH 6.0);检测器: 荧光检测器及化学发光检测器;检测波长: 激发波长 340 nm,发射波长 450 nm;流速:  $0.3 \sim 1.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ;柱温:  $15 \sim 35^\circ\text{C}$ ;进样量: 20  $\mu\text{L}$ 。

### 2.3 生物样品的预处理

取人血浆样品 100  $\mu\text{L}$  于 1.5 mL 离心管中,加入甲醇 300  $\mu\text{L}$ ,用来沉淀蛋白,充分涡旋 3 min,  $4^\circ\text{C}$ 、12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min,吸取上清,在  $25^\circ\text{C}$  的氮气流下吹干,用去离子水复溶后稀释到标准曲线范围内进行测定。以不含样品的血浆作空白对照。从河南省实验动物中心购入 3 只小鼠,体质量 20~30 g,每只小鼠尾静脉注射  $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  酪氨酸对映体,小鼠给药 10 min 后收集小鼠眼眶静脉血样,在

4 ℃、4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 得血浆样品。精密量取小鼠血浆样品各 100 μL, 按以上方法进行预处理。

## 2.4 实验方法

酪氨酸对映体首先在 25 ℃、0.7 mL·min<sup>-1</sup> 的条件下, 采用 ODS 柱在高效液相色谱仪上进行手性分离, 色谱柱流出液(包含样品和流动相混合液)通过 PEEK 管与鲁米诺溶液、高锰酸钾溶液在混合器里混合, 并同时进入流通池检测化学发光信号, 该化学发光信号由光电倍增管来检测。本研究采用相对化学发光强度  $\Delta I = I_s - I_0$  对样品进行定量分析, 其中  $I_s$  为加入酪氨酸对映体后的化学发光信号, 而  $I_0$  是空白溶液的化学发光信号。

## 3 实验结果

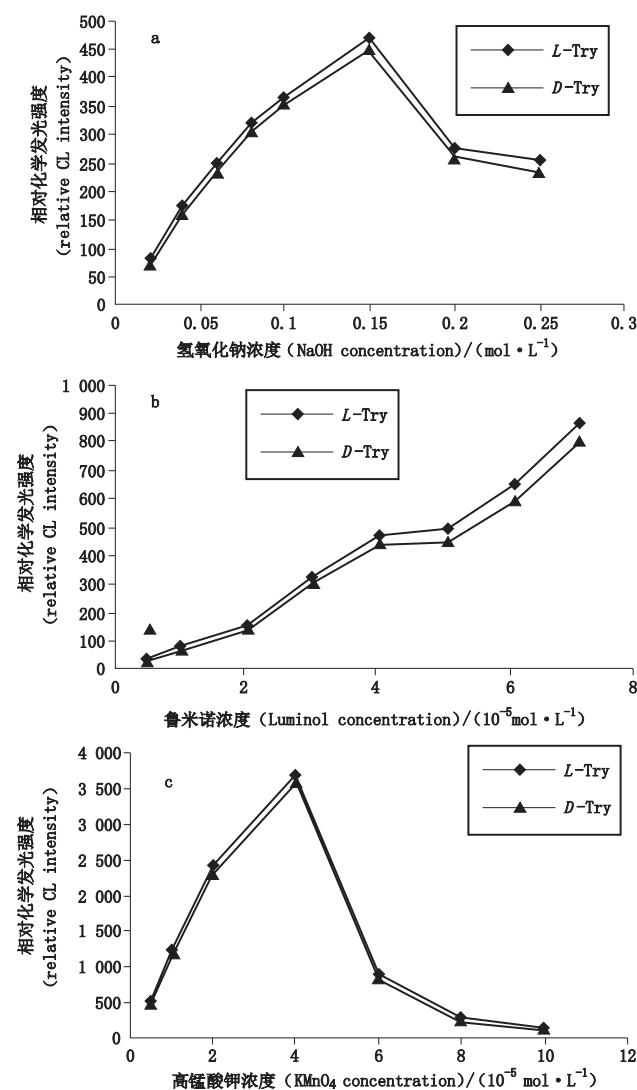
手性衍生化试剂法(chiral derivatization reagent, CDR)是被分析物先与高纯度的手性衍生试剂发生化学反应, 生成非对映异构体缔合物, 然后在 HPLC 色谱柱上进行分离的方法。*L*-亮氨酸、*L*-脯氨酸、*L*-半胱氨酸、*L*-酪氨酸及其衍生物为氨基酸类衍生剂, 适用于 HPLC 拆分胺类、醇类及羧酸类化合物, 该类手性衍生试剂在氨基酸中的应用较为广泛, 拆分效果也最好。在实际样品分析时, 常常引入芳基, 如邻苯二甲醛、苄酯及硝基苯等来提高样品的检测灵敏度。如在 *N*-乙酰基-*L*-半胱氨酸、*N*-乙酰基-*D*-青霉胺等光学纯硫醇存在的前提下, 邻苯二甲醛能将胺类化合物转化为异吡啶类化合物, 这一衍生反应被广泛用于氨基醇、氨基酸及胺的手性分离上。Nimura 等<sup>[13]</sup>以邻苯二甲醛/*N*-乙酰基-*L*-半胱氨酸作手性衍生剂, 在反相 HPLC 条件下, 手性拆分氨基酸对映体, 并应用于多种天然手性氨基酸的分离分析。

化学发光(CL)指的是化学反应的反应物(或生成物)吸收了反应所释放出来的化学能, 电子从基态跃迁至激发态, 再由激发态返回到基态时, 产生的光发射现象。高能量、不放热、不做电功或其他功的化学反应释放能量, 激发体系中某些化学物质分子而产生次级光发射, 然后通过 HPLC 对样品产生的化学发光进行检测。化学发光试剂鲁米诺具有性质稳定, 易于合成, 发光效率高, 水溶性好等优点, 在 HPLC-CL 法中得到广泛应用。鲁米诺在碱性环境里, 能和氧化剂发生氧化还原反应, 生成激发态的中间产物, 当中间产物返回基态时便会发出 425 nm 的蓝光<sup>[14]</sup>, 通过测定化学发光强度, 可测定出待测组分的含量。

### 3.1 化学发光条件的优化

鲁米诺化学发光反应在碱性溶液中发生, 本实

验所选用流动相(甲醇-0.01 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾溶液)为酸性溶液, 因此需要优化鲁米诺溶液中氢氧化钠的浓度, 得到最佳化学发光强度。鲁米诺作为发光试剂, 其浓度是影响化学发光强度的重要因素之一, 此外高锰酸钾对鲁米诺-高锰酸钾发光体系的影响较明显, 因此本实验分别考察了氢氧化钠、鲁米诺、高锰酸钾的浓度对化学发光强度的影响, 结果如图 1 所示。由图可知, 当氢氧化钠、鲁米诺和高锰酸钾的浓度分别为 0.15、 $4.0 \times 10^{-5}$  和  $4.0 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> 时化学发光强度最大。



反应条件(reaction conditions): a. luminol,  $5.0 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>; KMnO<sub>4</sub>,  $1.0 \times 10^{-4}$  mol·L<sup>-1</sup> b. NaOH, 0.15 mol·L<sup>-1</sup>; KMnO<sub>4</sub>,  $1.0 \times 10^{-4}$  mol·L<sup>-1</sup> c. NaOH, 0.15 mol·L<sup>-1</sup>; luminol,  $4.0 \times 10^{-4}$  mol·L<sup>-1</sup>

a. 氢氧化钠(sodium hydroxide) b. 鲁米诺(luminol) c. 高锰酸钾(potassium permanganate)

图 1 3 种物质的浓度变化对相对化学发光强度的影响

Fig. 1 Effects of concentration changes of three substances on relative chemiluminescence intensity



### 3.2 色谱条件的优化

**3.2.1 流动相配比** 本实验选择由甲醇和  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾溶液组成的流动相用于等度洗脱,考察了流动相比对酪氨酸对映体手性分离的影响,见表 1。

表 1 流动相比对酪氨酸对映体手性分离的影响

Tab. 1 Effects of the volume fraction in mobile phase on chiral separation of Tyr enantiomers

| 甲醇 (methanol) - $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$<br>磷酸二氢钾溶液 (monopotassium<br>phosphate solution) | $t_{R1}/\text{min}$ | $t_{R2}/\text{min}$ | $R_s$ |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|-------|
| 45:55                                                                                                   | 3.814               | 4.762               | 1.03  |
| 40:60                                                                                                   | 6.105               | 7.421               | 1.66  |
| 35:65                                                                                                   | 9.426               | 12.063              | 2.24  |
| 30:70                                                                                                   | 21.556              | 29.358              | 2.81  |

结果表明,保留时间和分离度随甲醇量的增加而降低,当甲醇量大于 40% 时,不能获得酪氨酸对映体的基线分离,还发现甲醇存在时可降低化学发光信号强度。考虑到分析时间、分辨率和甲醇量对化学发光信号的影响,选择甲醇 -  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾溶液 (35:65, pH 6.0) 用于进一步的优化研究。

**3.2.2 流速和柱温** 考察了流速和柱温对酪氨酸对映体手性分离的影响,实验结果见表 2。

表 2 流速和柱温对酪氨酸对映体手性分离的影响

Tab. 2 Effects of the flow rate and column temperature on chiral separation of Tyr enantiomers

| 流速<br>(flow rate) /<br>( $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) | $t_{R1}/\text{min}$ | $t_{R2}/\text{min}$ | $R_s$ | $T/^\circ\text{C}$ | $t_{R1}/\text{min}$ | $t_{R2}/\text{min}$ | $R_s$ |
|--------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|-------|--------------------|---------------------|---------------------|-------|
| 0.3                                                          | 20.445              | 25.661              | 3.69  | 15                 | 10.612              | 14.531              | 2.43  |
| 0.5                                                          | 12.693              | 16.079              | 3.12  | 20                 | 9.864               | 12.915              | 2.31  |
| 0.7                                                          | 9.426               | 12.063              | 2.24  | 25                 | 9.426               | 12.063              | 2.24  |
| 0.9                                                          | 6.478               | 7.211               | 1.47  | 30                 | 8.873               | 11.388              | 2.15  |
| 1.1                                                          | 3.912               | 4.535               | 1.02  | 35                 | 8.447               | 10.876              | 2.09  |

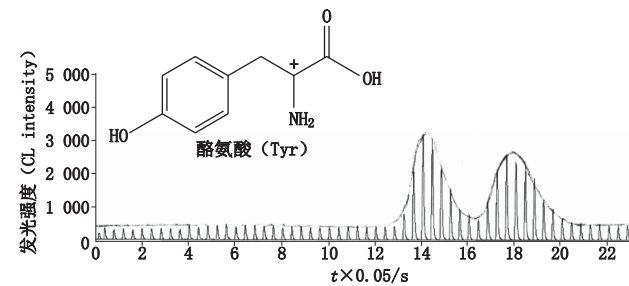
保持流动相组成及柱温 ( $25^\circ\text{C}$ ) 不变,在  $0.3 \sim 1.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  范围内考察流速对酪氨酸对映体手性分离的影响,由表 2 可知,在  $0.3 \sim 1.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  范围内,随着流速的增加,酪氨酸对映体衍生物分离度逐渐减小。当流速为  $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  时,对映体衍生物能得到很好的分离,但当流速增加到  $0.9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  时,对映体便不能达到基线分离。因此,为了缩短分析时间并获得较好的分离效果,本实验选用  $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  作为流动相的最佳流速。

固定流速为  $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,在其他色谱条件不变的情况下,考察了柱温在  $15 \sim 35^\circ\text{C}$  范围内对酪氨酸对映体手性分离的影响,由表 2 可知,柱温相对其他色谱条件对酪氨酸对映体手性分离的影响较小,由于  $25^\circ\text{C}$  接近于室温,操作方便,便于控制,因此选用  $25^\circ\text{C}$ 。

由表 2 可知,当流速为  $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,柱温为  $25^\circ\text{C}$  时满足分离要求。因此,选择甲醇 -  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾溶液 (35:65, pH 6.0),流速为  $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,柱温为  $25^\circ\text{C}$  时为最合适的色谱条件。

### 3.3 酪氨酸对映体手性衍生色谱 - 化学发光联用色谱分析

构建了手性衍生色谱 - 化学发光联用法,并首次用于酪氨酸对映体的分析。最佳色谱条件为甲醇 -  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾溶液 (35:65, pH 6.0),流速为  $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,最佳化学发光条件为氢氧化钠、鲁米诺和高锰酸钾的浓度分别为  $0.15$ 、 $4.0 \times 10^{-5}$  和  $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,在此最佳条件下对酪氨酸对映体进行联用分析,色谱图如图 2 所示。

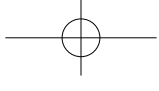


1. L-Tyr 2. D-Tyr

图 2 鲁米诺 - 高锰酸钾的酪氨酸对映体色谱图

Fig. 2 Tyr enantiomeric chromatogram of luminol-potassium permanganate

图 2 为酪氨酸对映体的手性衍生色谱 - 化学发光联用法色谱图,并在优化条件下进行方法学验证。由结果可知,手性衍生色谱 - 化学发光联用



法对酪氨酸对映体的分离具有高灵敏度,在 $2.5 \times 10^{-7} \sim 3.2 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内呈良好的线性关系,对质量浓度为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的酪氨酸对映体进行11次的平行测定,得RSD分别为0.92% (*L*-Tyr)、1.1% (*D*-Tyr)。根据IUPAC的建议,计算*L*-/*D*-酪氨酸的检测下限分别是 $2.96 \times 10^{-8}$ 、 $3.59 \times 10^{-8} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,两者在该线性范围内可用于微量酪氨酸对映体的分析,也可用于生物样品中类似手性物质的测定分析。

### 3.4 生物样品中酪氨酸对映体的分析

采用所建立的手性衍生色谱-化学发光联用法测定人和小鼠血浆中的*D*-/*L*-酪氨酸。为避免基质效应采用标准加入法进行定量,并以回收试验验证该方法的稳定性。精密量取人和小鼠血浆样品各100  $\mu\text{L}$ ,按“2.2”项下的步骤进行处理,并将血浆样品稀释一定倍数分别配制*D*-/*L*-酪氨酸对映体高、中、低3个浓度的样品,使其落在线性范围内进行测定,每一浓度采用6样本分析,分析结果列于表3和表4。由表3和表4实验结果可知,采用该方法测得生物样品中*D*-/*L*-酪氨酸对映体的平均回收率在93.5%以上,RSD均小于2.6%,该新方法具有准确、可靠,重现性好的优点,可用于微量*D*-/*L*-酪氨酸的测定,也可用于生物样品中类似手性物质的分析测定。

表3 人血浆样品中酪氨酸对映体的回收率 ( $n=3$ )

| Tab. 3 The recoveries of Tyr enantiomers in human plasma samples |                                                                        |                                                                        |                         |           |
|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-----------|
| 对映体<br>(enantiomer)                                              | 加样量<br>(added)/<br>( $\times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 测量值<br>(found)/<br>( $\times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 回收率<br>(recovery)/<br>% | RSD/<br>% |
| <i>L</i> -Tyr                                                    | 0.50                                                                   | 0.48                                                                   | 96.0                    | 1.7       |
|                                                                  | 2.00                                                                   | 2.05                                                                   | 102.5                   | 1.6       |
|                                                                  | 4.00                                                                   | 3.81                                                                   | 95.2                    | 1.8       |
| <i>D</i> -Tyr                                                    | 0.50                                                                   | 0.47                                                                   | 94.0                    | 2.3       |
|                                                                  | 2.00                                                                   | 2.02                                                                   | 101.0                   | 2.1       |
|                                                                  | 4.00                                                                   | 3.75                                                                   | 93.8                    | 2.2       |

表4 小鼠血浆样品中酪氨酸对映体的回收率 ( $n=3$ )

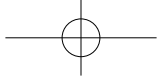
| Tab. 4 The recoveries of Tyr enantiomers in mice plasma samples |                                                                         |                                                                        |                                                                        |                         |           |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-----------|
| 对映体<br>(enantiomer)                                             | 含量<br>(content)/<br>( $\times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 加样量<br>(added)/<br>( $\times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 测量值<br>(found)/<br>( $\times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 回收率<br>(recovery)/<br>% | RSD/<br>% |
| <i>L</i> -Tyr                                                   | 4.29                                                                    | 3.00                                                                   | 7.09                                                                   | 97.3                    | 1.8       |
|                                                                 | 5.43                                                                    | 3.00                                                                   | 8.66                                                                   | 102.7                   | 1.8       |
|                                                                 | 6.71                                                                    | 3.00                                                                   | 9.21                                                                   | 94.8                    | 2.3       |
| <i>D</i> -Tyr                                                   | 4.20                                                                    | 3.00                                                                   | 6.97                                                                   | 96.8                    | 2.0       |
|                                                                 | 5.36                                                                    | 3.00                                                                   | 8.52                                                                   | 96.8                    | 1.9       |
|                                                                 | 6.63                                                                    | 3.00                                                                   | 9.16                                                                   | 95.1                    | 2.5       |

## 4 结论

本文建立了一种新型酪氨酸对映体的手性衍生色谱-化学发光联用的分析方法,并用于体内酪氨酸对映体的检测。结果表明,该方法可以为酪氨酸对映体提供良好的分离( $R_s > 2.0$ )和高灵敏的检测( $\times 10^{-8} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),可成功应用于生物样品中酪氨酸对映体的分离和测定。该方法为临床上高效、灵敏的检测神经性疾病、肿瘤等的发展提供了理论依据。

## 参考文献

- [1] 张美玲,赵琰,屈会化. 拆分手性化合物色谱填料的研究进展[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(5): 755
- [2] ZHANG ML, ZHAO Y, QU HH. Research progress of chromatographic packing on resolution of chiral compounds[J]. China J Pharm Anal, 2017, 37(5): 755
- [3] LÜ Y, ZHANG SC, LIU GH, *et al.* Development of a detector for liquid chromatography based on aerosol chemiluminescence on porous alumina[J]. Anal Chem, 2005, 77(5): 1518
- [4] FU AH, ZHANG ZJ, CHEN LL, *et al.* High performance liquid chromatography with immobilized  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ - $\text{KMnO}_4$  chemiluminescence detection and its application in metabolism of repaglinide in pig liver microsomes[J]. Chin Chem Lett, 2011, 22(10): 1245
- [5] ZHANG QL, WU L, LÜ C, *et al.* A novel on-line gold nanoparticle-catalyzed luminol chemiluminescence detector for high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 2012, 1242(2): 84
- [6] CUI H, ZHOU J, XU F, *et al.* Determination of phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with  $\text{Ce}^{4+}$ -Tween 20 chemiluminescence detection[J]. Anal Chim Acta, 2004, 511(2): 273
- [7] LI QQ, SHANG F, LU C, *et al.* Fluorosurfactant-prepared triangular gold nanoparticles as postcolumn chemiluminescence reagents for high-performance liquid chromatography assay of low molecular weight amino thiols in biological fluids[J]. J Chromatogr A, 2011,



- 1218 ( 50 ): 9064
- [ 8 ] KODAMATANI H, SHIMIZU H, SAITO K, *et al.* Probing chiral amino acids at sub-picomolar level based on bovine serum albumin enantio selective films coupled with silver-enhanced gold nanoparticles [ J ]. *J Chromatog A*, 2006, 1120 ( 1-2 ): 200
- [ 9 ] BI WW, LEI SR, YANG XR, *et al.* Separation of tyrosine enantiomer derivatives by capillary electrophoresis with light-emitting diode-induced fluorescence detection [ J ]. *Talanta*, 2009, 78 ( 3 ): 1167
- [ 10 ] ZHANG LJ, SONG MF, TIAN Q, *et al.* Chiral separation of *l*, *d*-tyrosine and *l*, *d*-tryptophan by ct DNA [ J ]. *Se Purif Technol*, 2007, 55 ( 3 ): 388
- [ 11 ] ELEK J, MANGELING D, IVANYI T, *et al.* Enantioselective capillary electrophoretic separation of tryptophane-and tyrosine-methylesters in a dual system with a tetra-oxadiaz-crown-ether derivative and a cyclodextrin [ J ]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 38 ( 4 ): 601
- [ 12 ] WANG YX, YIN XL, SHI MH, *et al.* Probing chiral amino acids at sub-picomolar level based on bovine serum albumin enantioselective films coupled with silver-enhanced gold nanoparticles [ J ]. *Talanta*, 2006, 69 ( 5 ): 1240
- [ 13 ] OHTAKI T, AKASAKA K, KABUTO C, *et al.* Chiral discrimination of secondary alcohols by both <sup>1</sup>H-NMR and HPLC after labeling with a chiral derivatization reagent, 2-( 2, 3-anthracenedicarboximide ) cyclohexane carboxylic acid [ J ]. *Chirality*, 2005, 17 ( 1 ): 171
- [ 14 ] NALEWAJKO-SIELIWONIUK E, MALEJKO J, MOZOLEWSKA M, *et al.* Determination of polyphenolic compounds in *Cirsium palustre* ( L. ) extracts by high performance liquid chromatography with chemiluminescence detection [ J ]. *Talanta*, 2015, 133: 38
- [ 15 ] ZHOU J, XU H, WAN GH, *et al.* Enhancing and inhibiting effects of aromatic compounds on luminol-dimethylsulfoxide-OH<sup>-</sup> chemiluminescence and determination of intermediates in oxidative hair dyes by HPLC with chemiluminescence detection [ J ]. *Talanta*, 2004, 64 ( 2 ): 467

( 本文于 2017 年 9 月 18 日收到 )