

УДК 543.632.562.1

# Хиральный хроматографический анализ аминокислот с предколоночной модификацией о-фталевым альдегидом: улучшение определения энантиомеров с помощью ион-парных реагентов

Н. В. Панин<sup>1</sup>, И. В. Пирогов<sup>2</sup>, Д. Ф. Гуранда<sup>1</sup>, В. К. Швядас<sup>1,3\*</sup><sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, 119234 Россия<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119234 Россия<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, 119234 Россия

\*E-mail: vyta@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 20.05.2025

Принята к печати 05.08.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27703

**РЕФЕРАТ** Разработка эффективных и доступных методов хирального анализа аминокислот является важной научной и практической задачей. Одной из наиболее распространенных и удобных методик является хроматографическое определение отдельных энантиомеров аминокислот с предварительным превращением энантиомеров в диастереомеры, которые затем можно разделить на обычных ахиральных колонках. Нами показано, что добавление ион-парных реагентов в состав элюента и варьирование их структуры позволяют регулировать эффективность хирального анализа аминокислот, основанного на хроматографическом определении и разделении диастереомерных изоиндолов, полученных при предколоночной модификации аминокислот под действием о-фталевых альдегидов в присутствии N-ацетил-L-цистеина. Использование ион-парных реагентов позволяет добиться лучшего разделения пиков диастереомерных изоиндолов, при этом время анализа можно существенно сократить за счет увеличения ионной силы. Таким образом, добавление ион-парных реагентов и оптимизация состава подвижной фазы являются важным подходом в инженерии хирального анализа аминокислот наряду с синтезом новых хиральных SH-соединений и подбором стационарных фаз.

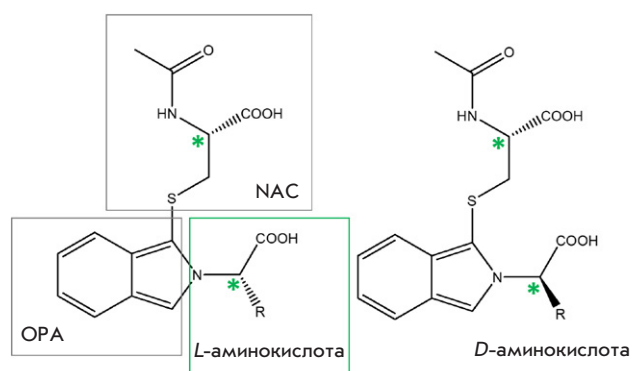
**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** хиральный анализ аминокислот, о-фталевый альдегид, N-ацетил-L-цистеин, предколоночная модификация, условия ВЭЖХ, ион-парные реагенты, разделение диастереомерных изоиндолов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ОРА – о-фталевый альдегид; НАС – N-ацетил-L-цистеин; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ИПР – ион-парный реагент; ТВА – бромид тетрабутиламмония; ОТМА – бромид октилтриметиламмония; ХДР – хиральный дериватизирующий SH-реагент; ВТСС – этиловый эфир N-трет-бутилтиокарбамоил-L-цистеина; НАР – N-ацетил-D-пеницилламин; НМС – N-(R)-манделил-L-цистеин; ДиС – N,N-диметил-L-цистеин; ИВЛС – N-изобутирил-L-цистеин; НРРС – N-фенилацетил-(R)-фенилглицил-L-цистеин; МР – 1-меркапто-2-пропанол; ВС – Вос-L-цистеин; у.е. – условные единицы.

## ВВЕДЕНИЕ

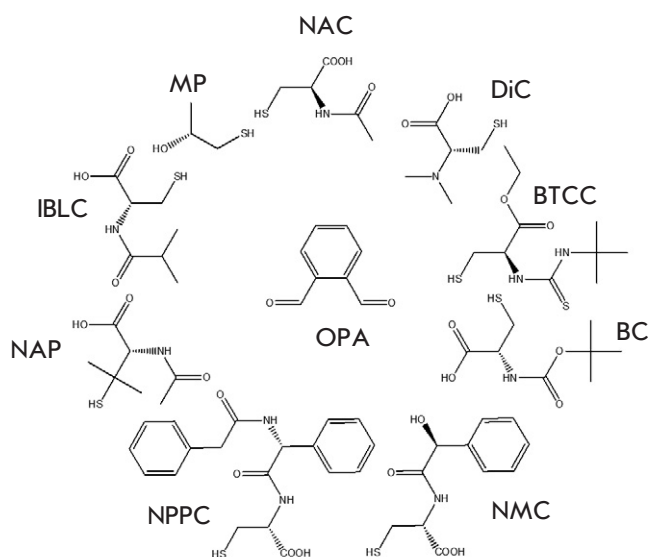
Необходимость определения отдельных энантиомеров в общем содержании аминокислот и других аминосоединений является важной задачей

как в фундаментальных исследованиях и медицинской диагностике, так и при характеристике исходного сырья и продуктов фармацевтической и пищевой промышленности [1–12]. Существенное



**Рис. 1.** Диастереомерные изоиндолные аддукты, образующиеся при модификации аминокислот при помощи ОРА и хирального тиола (N-ацетил-L-цистеина). R — боковой радикал аминокислоты

внимание к стереоизомерии аминокислот в окружающей среде в пребиотических условиях уделяется также в исследованиях, посвященных происхождению жизни [13, 14]. Масштабность и сложность задач определения отдельных энантиомеров аминокислот в сложных смесях существенно возросла в последнее время в связи с необходимостью разработки высокоэффективных методов хиральной метаболомики [15–17]. При системном изучении живых систем в постгеномную эру необходимы методы эффективного, быстрого и широкодоступного хирального анализа аминокислот как строительных блоков физиологически активных соединений и маркеров различных патологических процессов. Наибольшее распространение в хиральном анализе аминсоединений получили хроматографические методы, в первую очередь высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с предварительным превращением энантиомеров в диастереомеры, которые затем можно разделить на обычных ахиральных колонках. Одной из наиболее доступных, удобных и эффективных методик является предколоночная модификация аминсоединений о-фталевым альдегидом (ОРА) и хиральным производящим SH-реагентом (ХДР) [18, 19]. Такая модификация аминсоединений протекает достаточно быстро, в отличие от методики с использованием нингидрина нет необходимости повышения температуры, образующиеся диастереомерные изоиндолы, как правило, стабильны в условиях анализа и отличаются временами удерживания на стандартных ВЭЖХ-колонках. Изоиндолы имеют характерный максимум поглощения при 340 нм с коэффициентом молярного поглощения  $6000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  и являются хорошими флуорофорами, что позволяет определять фемтомоли аминсоединений при использовании флуоресцентных детекторов, если чувстви-



**Рис. 2.** Хиральные тиолы, используемые для предколоночной модификации с ОРА

тельность недостаточна при спектрофотометрической регистрации [20, 21].

В наиболее известной версии этого метода при определении энантиомеров  $\alpha$ -аминокислот используется весьма дешевый и доступный ХДР – N-ацетил-L-цистеин (NAC) (рис. 1) [18], однако не для всех соединений этого класса, а также других аминсоединений удается добиться необходимого разделения. С целью улучшения эффективности данной методики предложены аналоги NAC (рис. 2): N-изобутирил-L-цистеин [22], этиловый эфир N-трет-бутилтиокарбамоил-L-цистеина (BTCC) [23], Вос-L-цистеин, N-ацетил-(R)-пеницилламин (NAP) [24], N-фенилацетил-(R)-фенилглицил-L-цистеин (NPPC) [25], N-(R)-манделил-L-цистеин (NMC) [26, 27], N,N-диметил-L-цистеин (DiC) [28], 1-мерkapто-2-пропанол (MP) [29] и другие SH-реагенты.

Использование SH-реагентов различной структуры позволяет существенно расширить применение методики для определения энантиомеров широкого круга аминсоединений – аминокислот, первичных аминов и аминспиртов. Так, если в случае традиционного NAC удастся добиться приемлемого разделения только незначительного числа алифатических аминов, то при использовании R-NMC, содержащего в своей структуре два хиральных центра и большое число внутримолекулярных контактов, можно разделить целый ряд энантиомеров аминов и аминспиртов, в том числе неразделяемых даже на хиральных колонках [26]. Однако большинство предложенных SH-соединений малодоступны, так как не являются коммерческими реагентами и в основном использу-

ются лишь предложившими их научными группами для решения ограниченного круга аналитических задач. Это затрудняет оценку перспектив более широкого применения новых SH-реагентов.

Наряду с созданием новых ХДР альтернативным подходом для улучшения эффективности хроматографического определения диастереомеров аминокислотных соединений может быть инженерия самого аналитического процесса – стационарной и подвижной фазы, а также условий анализа. Одной из неизученных возможностей инженерии подвижной фазы в обращенно-фазовой ВЭЖХ для более эффективного разделения диастереомеров является добавление ион-парных реагентов. На перспективность такого подхода указывает опыт применения ион-парных реагентов для улучшения хроматографического разделения структурно подобных соединений [30–32]. Введение ион-парного реагента, содержащего заряженную функциональную группу и неполярные фрагменты (алкильные радикалы), может привести к увеличению удерживания аналитов на хроматографической колонке за счет сорбции реагента на поверхности обращенно-фазового адсорбента и изменения условий взаимодействия с аналитом. Так, улучшение разделения органических кислот наблюдали при добавлении в подвижную фазу солей четвертичного аммония, среди которых наибольшее распространение получил бромид тетрабутиламмония (ТВА) [30].

В данной работе впервые исследована возможность использования ион-парных реагентов для более эффективного хроматографического разделения диастереомеров, получаемых в результате предколонной дериватизации  $\alpha$ -аминокислот под действием ОРА и хирального тиола НАС.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реактивы

о-Фталевый альдегид (ОРА; 99%, Koch Light, Англия), N-ацетил-L-цистеин (НАС; 99%, AppliChem, Германия), фенилаланин («Реахим», Россия), глутамат («Аурат», Россия), лейцин, аспарагин и аргинин (Reanal, Венгрия), бромид тетрабутиламмония (ТВА), бромид октилтриметиламмония (ОТМА) (GmbH, Германия). Компоненты буферных растворов, кислоты, щелочи – препараты отечественного производства марок «х.д.» и «ч.д.а.». Метанол (для анализа, PanReac, Испания), ацетонитрил (0 сорт, «Криохром», Россия).

### ВЭЖХ-анализ

ВЭЖХ-анализ проводили в хроматографической системе Perkin Elmer 200 Series: колонка для об-

ращенно-фазовой хроматографии Kromasil Eternity 5-C18 4.6 × 250 мм, объем вкола 10 мкл, скорость потока 1 мл/мин. Для приготовления подвижной фазы с заданной концентрацией ацетонитрила использовали двухканальный режим работы системы: канал А – 5 мМ фосфатный буфер pH 6.8, 10% ацетонитрила; канал Б – 5 мМ фосфатный буфер pH 6.8, 80% ацетонитрила.

При изучении влияния ИПР элюирование проводили в изократическом режиме при использовании одного канала А. В состав подвижной фазы на основе 5 мМ фосфатного буфера pH 6.8 добавляли ТВА или ОТМА в конечной концентрации 5 мМ и в разных экспериментах 15, 20 или 30% ацетонитрила. ВЭЖХ-анализ при добавлении ИПР проводили после предварительного уравнивания колонки в течение 1 ч для максимальной воспроизводимости результатов. При изучении влияния ионной силы в канал А дополнительно добавляли NaCl в конечной концентрации 50 мМ. Изоиндолные диастереомеры детектировали спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Интенсивность поглощения измеряли в мкВ (у.е.). Управление ВЭЖХ-системой и обработка данных – TotalChrom Navigator 6.3.2.

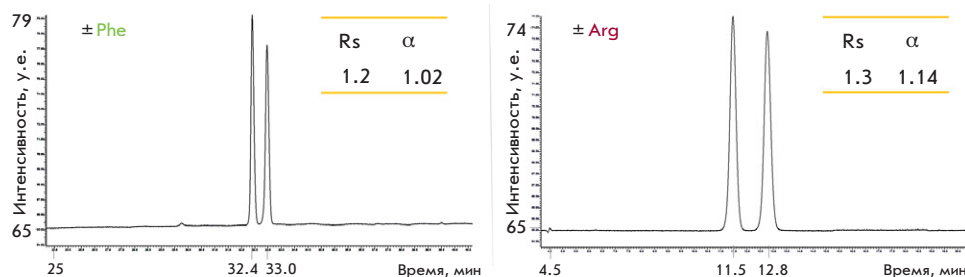
### Предколонная модификация

Модификацию первичных аминокислот проводили в автоматическом режиме при использовании программной функции автодозатора Derivatization следующим образом: в ячейку, содержащую 500 мкл 0.1 М боратного буфера pH 9.6, с помощью иглы автодозатора последовательно вносили 20 мкл 5 мМ раствора аминокислоты, 20 мкл 10 мМ метанольного раствора ОРА и 20 мкл 40 мМ раствора НАС с последующим перемешиванием реакционной смеси иглой автодозатора в автоматическом режиме. Подготовленную таким образом смесь оставляли на 15 мин, после чего (в случае необходимости) добавляли 50 мкл 50 мМ раствора ион-парного реагента для предварительного уравнивания системы и затем анализировали с помощью ВЭЖХ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Разделение энантиомеров аминокислот после предколонной модификации

Модельный ряд разделяемых энантиомеров включал  $\alpha$ -аминокислоты с различными физико-химическими характеристиками бокового радикала: глутаминовую кислоту, аргинин, фенилаланин, лейцин и аспарагин. На первом этапе хроматографический анализ после предколонной модификации под действием ОРА и НАС проводили на обычной ахиральной C18-колонке при нейтральном pH 6.8



**Рис. 3.** Хроматограммы изоиндолльных производных энантиомеров фенилаланина и аргинина, полученных в результате предколоночной модификации ОРА в присутствии НАС. Градиентный режим элюирования: 5 мМ фосфатный буфер pH 6.8, 0–10 мин 10% CH<sub>3</sub>CN, 10–60 мин 10–40% CH<sub>3</sub>CN

в градиентном режиме элюирования (0–10 мин: 10% CH<sub>3</sub>CN, 10–60 мин: 10–40% CH<sub>3</sub>CN). В этих условиях наблюдали разделение диастереомерных изоиндолльных производных только в случае аргинина и фенилаланина (рис. 3) и для улучшения разделения других анализов в подвижную фазу на следующем этапе добавляли ион-парные реагенты.

### Влияние добавки ион-парного реагента

В качестве ион-парных агентов были выбраны соли четвертичного аммония с различными алкильными заместителями, поскольку разделяемые изоиндолльные аддукты в условиях хроматографического анализа при pH 6.8 содержат две отрицательно заряженные карбоксильные группы. Добавление в элюент ион-парного реагента – бромид тетрабутиламмония (ТВА) – приводит к хроматографическому разделению изоиндолльных производных энантиомеров лейцина и глутаминовой кислоты, а также существенному улучшению в случае фенилаланина (рис. 4). Эффективный хиральный анализ энантиомеров глутамата достигается при более низкой концентрации органического растворителя в элюенте.

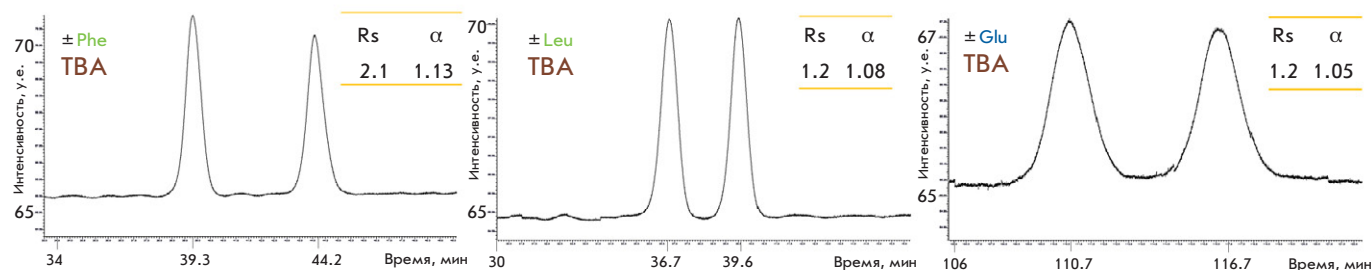
Интересно, что добавление данного ИПР не приводит к улучшению хроматографического разделения аргинина, так как образование ион-парного ассоциата с ТВА, по-видимому, затруднено из-за наличия в боковом радикале аминокислоты поло-

жительно заряженной гуанидиновой группы, и эффективный хиральный анализ аргинина можно проводить в «обычном» режиме (см. рис. 3).

### Влияние структуры ион-парного реагента

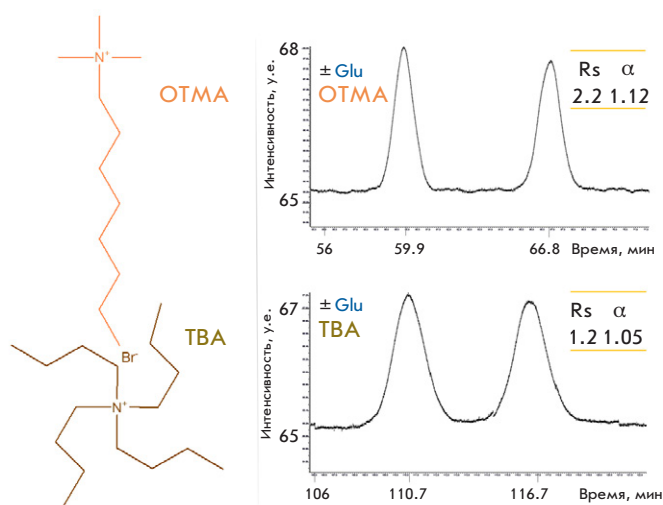
При изучении влияния структуры ион-парного реагента на разделение изоиндолльных производных энантиомеров аминокислот наряду с симметричным ТВА был использован асимметричный ИПР – бромид октилтриметиламмония ОТМА (рис. 5).

По сравнению с ТВА добавление ОТМА приводит к уменьшению времени выхода изоиндолльных производных глутаминовой кислоты, фенилаланина и лейцина. При этом для отрицательно заряженной глутаминовой кислоты, в отличие от нейтральных фенилаланина и лейцина, не только сокращается время анализа, но и улучшается разделение по сравнению с ТВА (рис. 5). Этот эффект можно объяснить тем, что при добавлении в подвижную фазу несимметричного ОТМА длинный алифатический радикал глубоко и прочно связывается неподвижной C18-фазой, происходит формирование классического сильного анионообменника [33], на котором по конкурирующему механизму происходит разделение анионов. На ионообменный механизм сорбции анионов указывает тот факт, что удержание сильно зависит от ионной силы элюента, которая является основным средством регулирования прочности удерживания анионов.



**Рис. 4.** Эффект добавления ИПР в подвижную фазу при проведении хроматографического анализа изоиндолльных производных, полученных в результате предколоночной модификации энантиомеров фенилаланина, лейцина и глутамата под действием ОРА в присутствии НАС. Изократический режим, 5 мМ фосфатный буфер pH 6.8, 5 мМ ТВА, 20% CH<sub>3</sub>CN (в случае Glu), 30% CH<sub>3</sub>CN (в случае Leu, Phe)

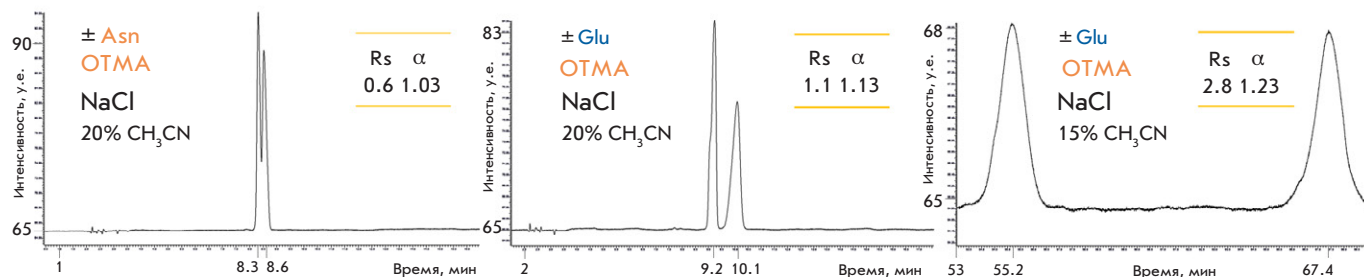




**Рис. 5.** Влияние симметричного (ТВА) и асимметричного (ОТМА) ИПР на хроматографическое разделение изоиндольных производных, полученных в результате предколоночной модификации энантиомеров глутаминовой кислоты под действием ОРА в присутствии НАС. Изократический режим: 5 мМ фосфатный буфер pH 6.8, 20%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 5 мМ ИПР

#### Влияние ионной силы

Чтобы изучить влияние ионной силы на эффекты, обусловленные добавлением в подвижную фазу ион-парных реагентов, в элюент, содержащий ОТМА, добавляли соль NaCl в концентрации 50 мМ. Исследование показало, что увеличение ионной силы приводит к существенному уменьшению времени удерживания диастереомерных изоиндолов и сокращению времени анализа (рис. 6, слева и по центру). В этих условиях также начинают разделяться изоиндольные производные полярного незаряженного аспарагина (рис. 6, слева). Улучшить разделение можно при более низких концентрациях органического растворителя в элюенте (сравните рис. 6 справа и по центру).



**Рис. 6.** Хроматограммы изоиндольных производных энантиомеров глутаминовой кислоты и аспарагина, полученных в результате предколоночной модификации ОРА в присутствии НАС. Изократический режим: 5 мМ фосфатный буфер pH 6.8, 5 мМ ОТМА, 50 мМ NaCl, 20%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (слева и по центру) и 15%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (справа)

Проведенные эксперименты позволили установить, что добавлением ион-парных реагентов в состав элюента и варьированием их структуры можно регулировать эффективность хирального анализа аминокислот, основанного на хроматографическом определении и разделении диастереомерных изоиндолов, полученных при предколоночной модификации аминокислот под действием о-фталевого альдегида в присутствии N-ацетил-L-цистеина. С использованием ион-парных реагентов можно добиться лучшего разделения пиков определяемых изоиндолов фенилаланина, лейцина, глутаминовой кислоты и аспарагина, и, хотя это сопровождается более длительным удерживанием аналитов на колонке, время анализа можно сократить при использовании асимметричного ИПР (ОТМА) и увеличении ионной силы элюента. Характерное влияние различных факторов на эффективность хроматографического разделения изоиндольных производных энантиомеров аминокислот на примере глутаминовой кислоты представлено на рис. 7.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка эффективных и доступных методов хирального анализа аминокислот является важной задачей как для научных исследований, медицинской диагностики, так и для характеристики широкого круга продуктов фармацевтической и пищевой промышленности. Хроматографическое определение отдельных энантиомеров природных и синтетических аминокислот с использованием ахиральных колонок после предколоночной модификации образцов под действием ОРА в присутствии хиральных SH-соединений представляет одну из наиболее распространенных и удобных методик. Проведенное исследование показало, что при использовании ион-парных реагентов можно добиться лучшего разделения пиков определяемых диастереомерных изоиндолов. Варьирование

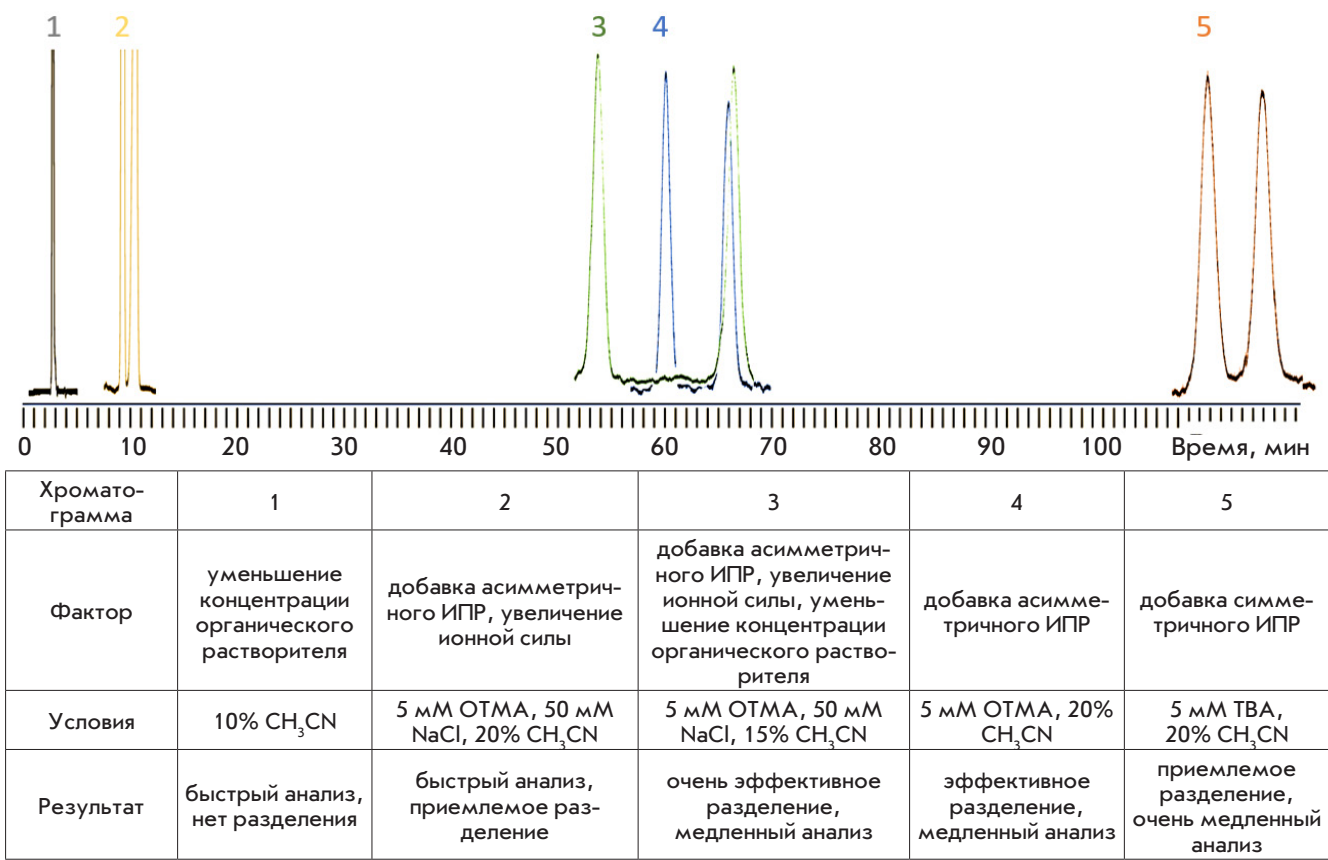


Рис. 7. Влияние различных факторов на скорость анализа и эффективность хроматографического разделения изоиндолных производных энантимеров глутаминовой кислоты, полученных в результате предколоночной модификации ОРА в присутствии NAC. Изократический режим: 5 мМ фосфатный буфер pH 6.8

структуры ион-парного реагента и увеличение ионной силы подвижной фазы способствуют более эффективному разделению диастереомеров и уменьшению времени анализа. Таким образом, добавление ион-парных реагентов в состав подвижной фазы является важным фактором инженерии хирального анализа аминокислот наряду

с синтезом хиральных SH-соединений и подбором стационарных фаз. ●

Исследование выполнено по гостеме  
НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ  
119042590056-2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knol MGE, Wulfmeyer VC, Müller RU, Rinschen MM. Amino acid metabolism in kidney health and disease. *Nature Reviews Nephrology*. 2024;20:771–788. <https://doi.org/10.1038/s41581-024-00872-8>.

2. Chen J, Cui L, Lu S, Xu S. Amino acid metabolism in tumor biology and therapy. *Cell Death and Disease*. 2024;15:42. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06435-w>.

3. Gałęzowska G, Ratajczyk J, Wolska L. Determination of amino acids in human biological fluids by high-performance liquid chromatography: Critical review. *Amino Acids*. 2021;53:993–1009. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03002-x>.

4. Ksenofontov AL, Boyko AI, Mkrtchyan GV, Tashlitsky VN, Timofeeva AV, Graf AV, Bunik VI, Baratova LA. Analysis of free amino acids in mammalian brain extracts. *Biochemistry Moscow*. 2017;82(10):1183–1192. <https://doi.org/10.1134/S000629791710011X>.

5. Pereira V, Pontes M, Câmara JS, Marques JC. Simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in honey and wine samples using in loop orthophthalaldehyde derivatization procedure. *J. Chromatogr A*. 2008;1189(1–2):435–443. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.12.014>.

6. Cuchiaro H, Laurens LML. Total Protein Analysis in Algae via Bulk Amino Acid Detection: Optimization of Amino Acid Derivatization after Hydrolysis with O-Phthalaldehyde 3-Mercaptopropionic Acid (OPA-3MPA). *J. Agric. Food Chem*. 2019;67(19):5672–5679. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00884>.

7. Hall AE, Moraru CI. Comparative effects of high pressure processing and heat treatment on in vitro digestibility of pea protein and starch. *Science of Food*. 2022;6(1):1–12. <https://doi.org/10.1038/s41538-021-00116-0>.

8. Tanwar S, Bhushan R. Enantioresolution of Amino Acids: A Decade's Perspective, Prospects and Challenges. *Chromatographia*. 2015;78:1113–1134. <https://doi.org/10.1007/s10337-015-2933-8>.
9. Ilisz I, Péter A, Lindner W. State-of-the-art enantioseparations of natural and unnatural amino acids by high-performance liquid chromatography. *Trends Anal. Chem.* 2016;81:11–22. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.01.016>.
10. Grishin DV, Zhdanov DD, Pokrovskaya MV, Sokolov NN. D-amino acids in nature, agriculture and biomedicine. *All Life*. 2019;13(1):11–22. <https://doi.org/10.1080/21553769.2019.1622596>.
11. Uifălean A, Iacobescu M, Salantă LC, Heghes SC, Moldovan R-C, Iuga C-A. Biological and Analytical Perspectives on D-Amino Acids in Cancer Diagnosis and Therapy. *Pharmaceuticals*. 2025;18:705. <https://doi.org/10.3390/ph18050705>.
12. Pollegioni L, Kustrimovic N, Piubelli L, Rosini E, Rabattoni V, Sacchi S. d-amino acids: new functional insights. *The FEBS Journal*. 2025. doi: 10.1111/febs.70083.
13. Nemoto A, Horie M, Imai EI, Honda H, Hatori K, Matsuno K. Enantiomeric Excess of Amino Acids in Hydrothermal Environments. *Orig. Life Evol. Biosph.* 2005;35:167–174. <https://doi.org/10.1007/s11084-005-0638-y>.
14. Jiang L, Dziedzic P, Spacil Z, Zhao GL, Nilsson L, Ilag LL, Córdova A. Abiotic synthesis of amino acids and self-crystallization under prebiotic conditions. *Scientific Reports*. 2014;4:1–6. <https://doi.org/10.1038/srep06769>.
15. Kimura T, Hamase K, Miyoshi Y, Yamamoto R, Yasuda K, Mita M, Rakugi H, Hayashi T, Isaka Y. Chiral amino acid metabolomics for novel biomarker screening in the prognosis of chronic kidney disease. *Scientific Reports*. 2016;6:26137. <https://doi.org/10.1038/srep26137>.
16. Chang X, Zhang Y, Chen X, Li S, Mei H, Xiao H, Ma X, Liu Z, Li R. Gut microbiome and serum amino acid metabolome alterations in autism spectrum disorder. *Scientific Reports*. 2024;14:4037. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54717-2>.
17. Lella C, Nestor L, De Bundel D, Vander Heyden Y, Van Eeckhaut A. Targeted Chiral Metabolomics of D-Amino Acids: Their Emerging Role as Potential Biomarkers in Neurological Diseases with a Focus on Their Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis upon Chiral Derivatization. *Int. J. Mol. Sci.* 2024;25(22):12410. <https://doi.org/10.3390/ijms252212410>.
18. Nimura N, Kinoshita T. o-Phthalaldehyde - N-acetyl-L-cysteine as a chiral derivatization reagent for liquid chromatographic optical resolution of amino acid enantiomers and its application to conventional amino acid analysis. *J Chromatogr A*. 1986;352:169–177. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)83377-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)83377-X).
19. García Alvarez-Coque MC, Medina Hernández MJ, Villanueva Camaño RM, Mongay Fernández C. Studies on the formation and stability of isoindoles derived from amino acids, o-phthalaldehyde and N-acetyl-L-cysteine. *Anal. Biochem.* 1989;180(1):172–176. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90107-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90107-3).
20. Švedas VJK, Galaev IJ, Borisov IL, Berezin IV. The interaction of amino acids with o-phthalaldehyde: a kinetic study and spectrophotometric assay of the reaction product. *Anal. Biochem.* 1980;101:188–195. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90059-7](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(80)90059-7).
21. Meyer MW, Meyer VR, Ramseyer S. The kinetics of diastereomeric amino acids with o-phthalaldehyde. *Chirality*. 1991;3(6):471–475. <https://doi.org/10.1002/chir.530030611>.
22. Brückner H, Westhauser T, Godel H. Liquid chromatographic determination of d- and l-amino acids by derivatization with o-phthalaldehyde and N-isobutyryl-L-cysteine applications with reference to the analysis of peptidic antibiotics, toxins, drugs and pharmaceutically used amino acids. *J Chromatogr A*. 1995;711(1):201–215. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00158-J](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00158-J).
23. Nimura N, Fujiwara T, Watanabe A, Sekine M, Furuchi T, Yohda M, Yamagishi A, Oshima T, Homma H. A novel chiral thiol reagent for automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatographic enantioseparation of amino acids and its application to the aspartate racemase assay. *Anal. Biochem.* 2003;315:262–269. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00705-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00705-4).
24. Buck RH, Krummen K. High-performance liquid chromatographic determination of enantiomeric amino acids and amino alcohols after derivatization with ophthalaldehyde and various chiral mercaptans. *J Chromatogr A*. 1987;387:255–265. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)94529-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)94529-7).
25. Шаповалова ИВ, Гуранда ДТ, Швядас ВК. Новое N-ацильное производное (S)-цистеина для количественного определения энантиомеров аминокислот методом ВЭЖХ с предколоночной модификацией орто-фталевым альдегидом. *Биоорганическая химия*. 2004;30(5):451–457.
26. Guranda DT, Kudryavtsev PA, Khimiuk AY, Švedas VK. Efficient enantiomeric analysis of primary amines and amino alcohols by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization using novel chiral SH-reagent N-(R)-mandelyl-(S)-cysteine. *J Chromatogr A*. 2005;1095(1–2):89–93. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.125>.
27. Chernobrovkin MG, Shapovalova EN, Guranda DT, Kudryavtsev PA, Švedas VK, Shpigun OA. Chiral high-performance liquid chromatography analysis of  $\alpha$ -amino acid mixtures using a novel SH reagent-N-R-mandelyl-L-cysteine and traditional enantiomeric thiols for precolumn derivatization. *J Chromatogr A*. 2007;1175(1):89–95. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.034>.
28. Lkhagva A, Tai H-C. Dimethylcysteine (DiCys)/o-Phthalaldehyde Derivatization for Chiral Metabolite Analyses: Cross-Comparison of Six Chiral Thiols. *Molecules*. 2021;26(24):7416. <https://doi.org/10.3390/molecules26247416>.
29. Naghashian-Haghig A, Hemmateenejad B, Shamsipur M. Determination of enantiomeric excess of some amino acids by second-order calibration of kinetic-fluorescence data. *Anal. Biochem.* 2018;550:15–26. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.04.004>.
30. Сычев КС. Практическое руководство по жидкостной хроматографии. Москва: Техносфера; 2010:192–197.
31. Cecchi T. Ion Pairing Chromatography. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2008;38(3):161–213. <https://doi.org/10.1080/10408340802038882>.
32. Sagi-Kiss V, Li Y, Carey MR, Grover SJ, Siems K, Cirulli F, Berry A, Musillo C, Wilson ID, Want EJ, Bundy JG. Ion-Pairing Chromatography and Amine Derivatization Provide Complementary Approaches for the Targeted LC-MS Analysis of the Polar Metabolome. *J. Proteome Res.* 2022;21:1428–1437. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.2c00030>.
33. Сапрыкин ЛВ, Сапрыкина ЛВ. Некоторые аспекты практического применения динамического модифицирования в ВЭЖХ на силикагелевых сорбентах. *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2006;6(2):284–301.