

## 化学衍生化技术在靶向代谢组学 LC-MS 中的应用与进展

张玺恩, 王 笛, 许风国\*

(中国药科大学药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 210009)

**摘 要** 体内代谢物轮廓变化与外界刺激密切相关, 代谢物的浓度可以直接反映生物体生理或病理状态。LC-MS 是内源性代谢物定量测定的主要分析方法, 但由于检测偏向性问题, 该方法存在分析覆盖面窄、灵敏度较低等不足。近年来, 化学衍生化技术与 LC-MS 的整合应用发展迅速, 与氨基、羟基、羧基、羰基、巯基等基团靶向反应的各类衍生化试剂已被广泛应用于代谢组学研究。本文根据代谢物基团分类介绍了各种衍生化反应及其在代谢组学分析中的应用, 综述了多基团衍生化方法的特点, 并对衍生化分析方法的应用前景和挑战进行了展望。

**关键词** 衍生化; LC-MS; 代谢组学; 定量分析

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2021)01-0031-07

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20210104

引用本文 张玺恩, 王笛, 许风国. 化学衍生化技术在靶向代谢组学 LC-MS 中的应用与进展[J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(1): 31–37.

Cite this article as: ZHANG Xien, WANG Di, XU Fengguo. Applications and progress of chemical derivatization in targeted metabolomics LC-MS analysis[J]. J China Pharm Univ, 2021, 52(1): 31–37.

## Applications and progress of chemical derivatization in targeted metabolomics LC-MS analysis

ZHANG Xien, WANG Di, XU Fengguo\*

Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance (Ministry of Education), China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** The changes of metabolic profile are closely related to external stimulus, and the concentration of the metabolite can directly reflect the physiological or pathological states of organisms. Therefore, the quantitative detection of metabolites is necessary. However, traditional targeted metabolomic methods have such drawbacks as narrow coverage and low sensitivity. In recent years, derivatization techniques have developed rapidly in the field of metabolomics. Derivatization reagents for amine, hydroxyl, carboxyl, carbonyl, hydrosulphonyl and other groups have been used in metabolomics research. This paper introduces various derivatization reactions and their applications according to group classification and reviews the characteristics of multi-group derivatization techniques, with a prospect of their research directions and challenges.

**Key words** derivatization; LC-MS; metabolomics; quantitative analysis

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82073812, No. 81773682, No. 81773861) and the Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars of Jiangsu Province (No. BK20180027)

代谢组学的研究对象为生物体内的小分子代谢物, 其相对分子质量通常小于 1 000。由于代谢物结构各异、数量繁多, 这导致部分代谢物色谱分

离困难、不易离子化等结果。因此, 在分析复杂生物样品时, 传统基于 LC-MS 的代谢组学方法在测定物质的种类、数量与灵敏度等方面的表现并不

收稿日期 2020-07-26 \* 通信作者 Tel: 025-83271021 E-mail: fengguoxu@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 82073812, No. 81773682, No. 81773861); 江苏省杰出青年基金资助项目 (No. BK20180027)

理想。化学衍生化技术与LC-MS的整合应用可以调整待测物色谱保留、提高质谱响应。衍生化试剂的结构通常由3个部分组成,分别为反应基团、色谱改性基团与质谱增敏基团。其中反应基团化学性质活泼,与代谢物分子中特定的官能团靶向反应;色谱改性基团可以改善物质极性,进而优化其色谱行为;质谱增敏基团能够提供特征的离子碎片,提升质谱信号强度。待测物质经衍生化后,其色谱分离度和检测灵敏度均显著提高,故近年来衍生化技术越来越多地被应用于靶向代谢组学LC-MS分析方法的开发。本文基于代谢物官能团分类,总结了衍生化试剂单独使用与组合使用的研究进展,并对未来的发展方向进行了展望。

## 1 靶向特定基团的衍生化方法及应用

### 1.1 氨基类衍生化试剂

氨基酸、核苷酸、吡啶等氨基类物质在生物体内含量丰富,且具有重要的生理功能。氨基电负性强,化学性质活泼,易与衍生化试剂结构中正电性的位点结合,发生亲核取代或亲核加成反应。氨基类衍生化试剂大致可以分为:酰氯类<sup>[1]</sup>、亚氨基甲酯类<sup>[2]</sup>、琥珀酰亚胺类<sup>[3]</sup>、邻苯二甲醛类<sup>[4]</sup>及含卤化合物<sup>[5]</sup>(图1)。其中氨基与邻苯二甲醛类试剂发生亲核加成反应,与其余各类试剂发生亲核取代反应。Lkhagva等<sup>[6]</sup>学者综合比较了5种常见的氨基类衍生化试剂在植物代谢组学分析中的表现。实验结果显示上述试剂均能显著提升待测物质的质谱响应,且各类衍生化试剂的质谱增敏效果没有明显差异。总体而言,酰氯类试剂反应效

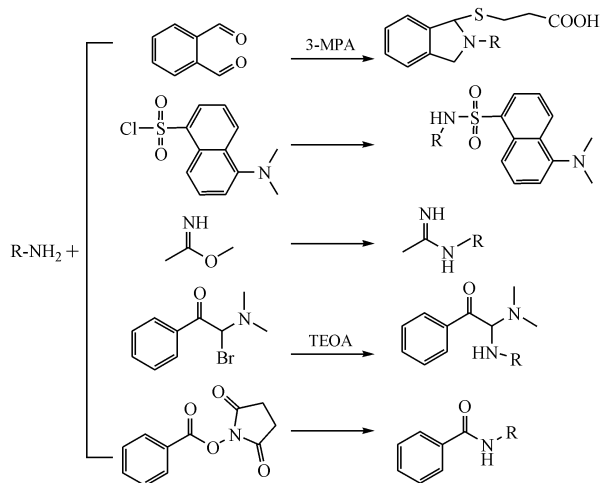


Figure 1 Representative derivatization reagents for amino

率对pH的依赖性较小,具有普遍的适用性。Guo等<sup>[1]</sup>利用丹磺酰氯及其配对的乙基丹磺酰氯,开发了氨基类物质的定量测定方法,研究了长春新碱所致大鼠肠梗阻模型中色氨酸代谢通路中各氨基类代谢物的含量变化。在接近生理状态的pH条件下,邻苯二甲醛类与含卤化合物类试剂反应活性较高,适用于pH敏感型代谢物,能在保证底物稳定存在的前提下获得较高的反应产率。某些衍生化试剂可用于手性氨基类物质分析,其与手性代谢物反应能够生成非对映异构体产物,利用相应的色谱方法实现手性代谢物的分离检测。例如Takayama等<sup>[7]</sup>研究人员使用同位素标记的1-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)吡咯烷-3-胺定量测定了阿尔茨海默病患者脑脊液中D/L型氨基酸类物质的含量。

### 1.2 羟基类衍生化试剂

羟基类代谢物极性大,难以在反相色谱系统中实现分离,且该类物质的质谱检测多为负离子模式,质谱响应较低。通过化学衍生化引入色谱改性与质谱增敏基团可以有效地改善色谱分离,提升质谱响应。羟基类衍生化试剂大致可以分为:酰氯类<sup>[8-9]</sup>和苯甲酸类<sup>[10]</sup>(图2)。目前利用衍生化方法测定的羟基类代谢物主要包括:小分子醇、食源性多酚类物质和固醇类激素。Zhao等<sup>[8]</sup>提出了稳定同位素标记的衍生化策略,设计并合成了<sup>13</sup>C核素标记的丹磺酰氯,将其与QC样本中的羟基类物质反应。反应生成的同位素标记的衍生化产物解决了因缺少代谢物同位素标准品造成的定量测定难题。此方法被成功地应用于人体尿液中含酚羟基物质代谢轮廓的测定<sup>[9]</sup>。激素在生物体内具有重要的生理学功能,由于存在级联放大作用,部分羟基类激素在体内含量极低且同位素标准品价格昂贵,传统LC-MS方法不易实现对该类代谢物的检测。Liu等<sup>[10]</sup>借鉴了上述策略,设计并合成了4-(二甲基氨基)苯甲酸和对应的苄核试剂,与羟基位点靶向反应,高通量测定了大鼠尿液

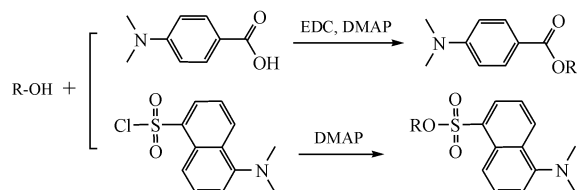


Figure 2 Representative derivatization reagents for hydroxyl

中固醇类激素水平。

### 1.3 羧基类衍生化试剂

生物体内含有多类羧基代谢物,例如三羧酸循环及 $\beta$ -氧化等能量代谢通路会产生大量的小分子有机酸;此外,高级脂肪酸如花生四烯酸及其下游代谢产物,它们在机体炎症反应与免疫调节中发挥着重要的作用。针对羧基易与氨基发生酰胺化反应的特点,研究人员构建了多种含有氨基的衍生化反应体系,代表性的衍生化试剂如图 3 所示。在对有机酸的研究中,以 1-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪)-3-氨基吡咯烷为母核,Fukui 等<sup>[11]</sup>合成了 $^{12}\text{C}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、D 标记的衍生化试剂,并将其应用于微生物代谢产物的分析。三羧酸循环过程生成的有机酸极性大,存在分子内氢键,不易在反相色谱柱上保留。4-溴-N-甲基苄胺<sup>[12]</sup>作为一种新的衍生化试剂,由于引入了卤素原子,使反应产物的极性降低,能有效改善有机酸的色谱分离效果,因此被用于三羧酸循环中羧基类代谢产物的检测。衍生化技术在脂肪酸测定中也有广泛的应用,本课题组自主设计合成了新型衍生化试剂丹磺酰哌嗪及其

配对的乙基衍生化试剂,成功建立了具有一一对应内标的能够覆盖短、中、长链脂肪酸的定量分析方法<sup>[13]</sup>。此方法被成功应用于顺铂致大鼠肾损伤模型及伊立替康致大鼠胃肠道损伤模型血清样本中脂肪酸的定量测定。由于高级脂肪酸具有长碳链,在反相色谱系统中其保留时间较长,造成单次进样分析时间较长,不利于分析大批量生物样本。Bian 等<sup>[14]</sup>利用(2-氨基乙基)-三甲基-氯化铵对花生四烯酸进行衍生化,反应产物的极性显著升高。在此基础上建立了花生四烯酸及其下游代谢产物的靶向代谢组学快速分析方法,可在 21 min 内分析 30 余种花生四烯酸相关物质。同时,应用该方法定量测定了哮喘发生后花生四烯酸代谢产物含量变化,为揭示哮喘的病理机制提供了依据。基于同样的反应原理,Kim 等<sup>[15]</sup>利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱,测定了给予罗格列酮时,PPAR $\gamma$ 结合态的前列腺素含量变化情况,为探索药物干扰下内源性小分子的代谢物-蛋白质相互作用关系提供了新的思路。

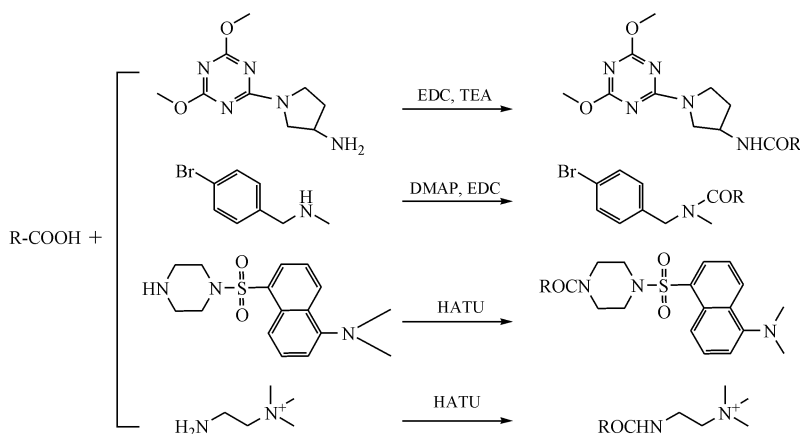


Figure 3 Representative derivatization reagents for carboxyl

### 1.4 羰基类衍生化试剂

羰基化合物化学性质较稳定且不易离子化,故该类物质难以被质谱检出。目前,羰基类衍生化试剂的反应原理为羰基腙化反应(图 4)。Zhao 等<sup>[16]</sup>应用丹磺酰肼与羰基代谢物反应,反应产物和代谢物原型相比检测灵敏度提升了 1~3 个数量级;在此基础上开发了代谢物丹磺酰肼衍生产物数据库,利用该数据库鉴定了人体尿液中的醛酮类物质;并应用稳定同位素内标策略建立了该类化合物的定量方法。Deng 等<sup>[17]</sup>利用 *N*-[2-(胺氧

基)-乙基]-*N,N*-二甲基-1-十二烷基铵作为衍生化试剂,将衍生化方法与高分辨质谱相结合测定了大鼠体内移植瘤组织中羰基化合物的含量。

### 1.5 巯基类衍生化试剂

不同价态的巯基类代谢物在生物体内会发生互相转化,通常作为电子载体参与氧化还原反应。此外,巯基具有高度的还原性,在空气中极易被氧化,这极大地增加了该类物质准确分析测定的难度。目前在代谢组学研究中关于巯基的衍生化反应报道较少,主要的衍生化试剂为 *N*-乙基马来酰

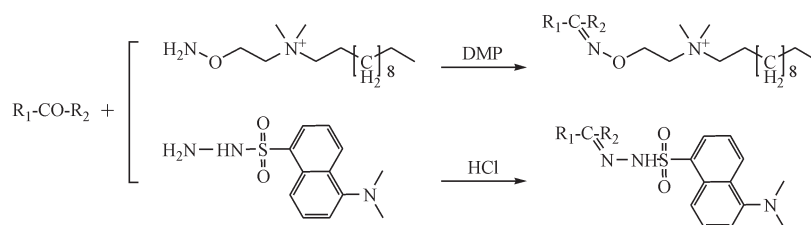


Figure 4 Representative derivatization reagents for carbonyl

亚胺,反应原理如图5所示。利用衍生化反应将易氧化的巯基转化为化学性质较稳定的碳-硫键,增加了此类代谢物的稳定性,解决了巯基化合物不易被准确测定的难题。Ortmayr等<sup>[18]</sup>利用*N*-乙基马来酰亚胺与巯基反应,研究体内含硫化合物的代谢通路。Zhang等<sup>[19]</sup>为研究中药方剂“少腹逐瘀汤”对血瘀模型大鼠的治疗作用,运用衍生化方法分析了大鼠血浆样本中5种含硫化合物的浓度变化情况。Xu等<sup>[20]</sup>应用该试剂与谷胱甘肽反应,建立了大鼠体内谷胱甘肽及相关代谢物的含量测定方法。

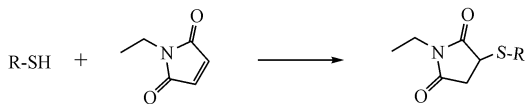


Figure 5 Representative derivatization reagents for hydrosulphonyl

## 1.6 衍生化反应方式

**1.6.1 柱前衍生化** 柱前衍生化可以相对自由地选择反应条件,不受反应动力学限制,允许多步反应的进行,是目前代谢组学研究中最为常用的衍生化方法。上述各类衍生化试剂及其应用实例均采用了柱前衍生化方式。然而,柱前衍生化容易引入杂质,过量的衍生化试剂进入仪器时可能对产物检测造成干扰,尤其在LC-MS靶向代谢组学中,与检测器不兼容的衍生化试剂需要进行反应后处理。为避免冗余的衍生化试剂进入质谱造成强烈的基质效应。目前已开发了多种衍生化反应后处理方法,Li课题组为了解决丹磺酰氯与丹磺酰肼衍生化试剂与质谱仪器不兼容的难题,利用氢氧化钠和氯化铜分别水解两种衍生化试剂,水解产物在反相色谱柱上不保留,从而消除了反应剩余的衍生化试剂对衍生化产物测定的影响<sup>[8,21]</sup>。Gomez等<sup>[22]</sup>为了避免过量的邻苄基羟胺进入检测器,反应结束后加入了乙酸乙酯对反应溶液进行萃取。极性大的产物被保留在有机相

中,将其吹干后复溶进样分析。

**1.6.2 柱后衍生化** 柱后衍生化可直接应用于已建立的代谢物原型分析方法,有助于缩短分析方法的开发周期。同时,由于衍生化反应发生后产物直接进入检测器,对衍生化产物的稳定性要求不高,适用于化学性质活泼的代谢物检测。目前研究人员综合比较了柱前衍生化与柱后衍生化在测定人胎盘组织液中氨基酸含量实验中的表现<sup>[23]</sup>,结果表明虽然两种方法均能满足18种氨基酸的体内测定要求,但柱后衍生法在反应产率及产物稳定性方面优于柱前衍生法。

## 2 靶向多类基团的衍生化方法及应用

单一衍生化试剂的使用能够改善物质的色谱分离与质谱响应,但是受限于化学反应的专属性,一类衍生化试剂往往只能与相对应的基团反应,导致检测覆盖范围有限。靶向多类基团的组合衍生化反应策略有助于进一步扩大代谢物检测范围,且目前已有多个衍生化试剂联用的代谢组学研究实例。多基团衍生化的典型实验流程如图6所示。根据衍生化试剂是否分步加入反应体系,可将多基团衍生化反应分为“一锅法”和“多步法”。

### 2.1 一锅法

植物激素在植物的生命历程中发挥着重要作用,同时测定多种植物激素的含量有助于理解植物发育过程中激素的生理功能与调控网络。Cai等<sup>[25]</sup>研究人员设计了“一锅法”衍生化方案,即反应体系含有底物与多种衍生化试剂,多类衍生化反应同时进行。其将*N,N*-二乙基乙二胺、2-甲基-4-苯甲氨基苯硼酸两种衍生化试剂与植物花器官样本置于同一反应体系,两种试剂将分别与羧基类激素和类固醇类激素反应,反应结束后,利用LC-MS分析植物样本中激素水平。由于两种衍生



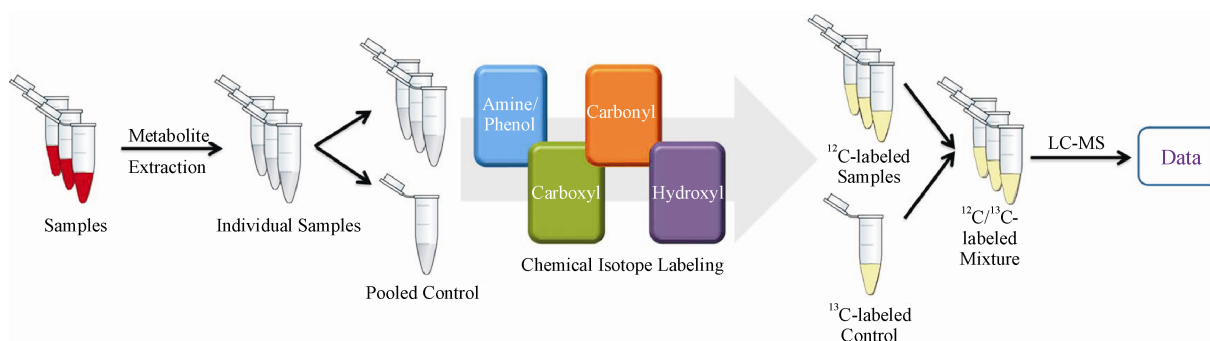


Figure 6 Typical scheme of multi-derivatization reaction<sup>[24]</sup>

化试剂具有基团靶向性且两者最佳反应条件相近,产物的归属相对明确,该方法与两种衍生化试剂各自单独反应相比能够缩短反应时间,提升分析通量。虽然该方法操作简单易行,但是受限于衍生化试剂的选择范围、反应条件等因素,各类代谢物衍生化效率无法同时达到最优。同时,多类衍生化试剂组成的反应体系较为复杂,衍生化过程可能生成大量副产物。因此,该方法在如何提高反应产率及降低副产物的生成等方面仍有待改善。

## 2.2 多步法

“多步法”衍生化方案为衍生化试剂依次与底物反应,一个反应体系中只存在一种衍生化试剂。多步法包括串联法与并联法,串联法为一份生物样本与多种衍生化试剂逐步反应,并联法为多份生物样本与多种衍生化试剂同时反应后分析进样。为了与氨基、羧基、羰基、巯基靶向反应,Yuan等<sup>[26]</sup>设计并合成了2-二甲基氨基乙胺、2-(2-胍基-2-乙氧基)-异唑啉-2-溴化铵、4-(*N,N*-二甲基氨基)苯基异硫氰酸酯、丙酮基唑啉溴化物4种衍生化试剂及对应的稳定同位素标记试剂,分别同生物样本反应后进入仪器分析,整合4组实验数据以实现多类代谢物的同时检测。研究人员从反应效率方面比较了串、并联衍生化反应模式,确定了丹磺酰氯与丹磺酰哌嗪两种衍生化试剂以并联模式靶向与氨基、羧基反应,实现了对80余种代谢物的绝对定量测定<sup>[27]</sup>。为了解决并联反应消耗样本量较多的问题,Huang等<sup>[28]</sup>开发了针对稀缺样本的代谢组学串联式组合衍生化方法。首先将2-(二甲基氨基)乙酰氯加入人体心脏组织样本匀浆液中与氨基反应,之后加入*N,N*-二乙基乙二胺与羧基反应,最后LC-MS分析检测人样本中各代谢物的含

量。表1从操作难易程度、时间成本、所需样品量及反应结果等多方面对上述两种反应模式进行了比较。相较于一锅法,多步衍生化法的实验过程更为复杂繁琐,耗时更长。然而,由于其无需考虑试剂兼容性问题,衍生化试剂选择范围更广,各类试剂不会相互干扰,衍生化反应可以在各自最优条件下进行使得反应效率能够达到最大化。

Table 1 Comparison of different multi-derivatization reaction methods

Factor	One-pot	Multi-steps
Operation	Easy	Complex
Selection range of reagents	Narrow	Wide
Time consumed	Short	Long
Sample needed	Less	More
Interference between reactions	Maybe severe	None or little
Efficiency	Relatively low	Relatively high
Product classification	Ambiguous	Clear

## 3 展望与挑战

### 3.1 新型衍生化试剂的合理设计与应用

衍生化方法测定生物小分子最早应用于LC-UV分析平台,因此,目前大多数衍生化试剂含有苯环等具有良好紫外吸收的结构。随着仪器不断更新,目前代谢组学的主流分析手段为LC-MS,然而相应的质谱专属衍生化试剂还未见报道。Xiao等<sup>[29]</sup>利用计算机模拟技术从量子化学角度探究了3种衍生化试剂结构与质谱响应之间的关系,利用质子亲和力、气体碱度和油水分配系数等参数建立了质谱离子化效率计算模型,模拟结果与实验结果一致。这项研究的结论提示可以通过计算、优化相应的参数来设计具有显著增敏效果的衍生化试剂。衍生化试剂结构与质谱增敏之间的定量关系还有待深入探索,该方面的研究将为质谱专

属的衍生化试剂的开发提供理论依据。蛋白质组学中用于肽段标记的 iTRAQ 试剂因其强大的定量能力备受科研人员青睐,该衍生化试剂也被引入代谢组学的研究中。An 等<sup>[30]</sup>为研究抗结核药物异烟肼致肝损伤的机制,利用 iTRAQ 试剂对氨基酸及其相关氨基类代谢物进行了定量测定。由于该试剂中报告基团的多样性,可最多同时对 8 类样本进行反应、检测,极大地提高了分析通量。因此设计与开发具有多个同位素标记位点的衍生化试剂将为高通量、宽覆盖的代谢组学分析方法的建立提供有力的支持。

### 3.2 新型材料与衍生化试剂的联合使用

常用的生物样本前处理方法包括蛋白沉淀法、液液萃取法、固相萃取法等。Wu 等<sup>[31]</sup>根据氨基、羧基等物质的结构特点,在加入有机试剂沉淀蛋白后加入相应的固相萃取材料,吸附的代谢物选择性地与靶向衍生化试剂反应。衍生化产物分别在亲水色谱柱与 C<sub>18</sub> 色谱柱上实现色谱分离后进入质谱分析,其与传统分析方法相比检测灵敏度更高。高效、彻底地将衍生化产物从复杂的反应体系中分离富集是方法灵敏度的重要保证。为阐明天麻素对创伤后抑郁大鼠治疗作用机制,Zhao 等<sup>[32]</sup>设计了一种新型氧化石墨烯材料,该材料能够选择性地吸附相应神经递质衍生化产物,简化了后处理步骤。与传统液液萃取方法相比,此方案能降低产物在萃取—吹干—复溶过程中的损失,减少了生物样本中可能存在的基质干扰,提升了分析方法的灵敏度与重现性。综上所述,代谢组学的样品前处理、衍生化反应及衍生化试剂反应后处理等过程相对独立,如何将三者高效地结合将是代谢组学方法开发的一大创新点。

尽管衍生化反应能够优化代谢物的分离与检测结果,但是现阶段该方法依然存在时间成本增加和可能引入副产物等缺陷。未来随着高效、专属、符合绿色化学要求的新型衍生化试剂的开发,衍生化技术将在靶向代谢组学研究领域中具有更广泛的应用前景。

## References

- [1] Guo HM, Jiao Y, Wang X, *et al.* Twins labeling-liquid chromatography/mass spectrometry based metabolomics for absolute quantification of tryptophan and its key metabolites[J]. *J Chromatogr A*, 2017, **1504**: 83-90.
- [2] Shortreed MR, Lamos SM, Frey BL, *et al.* Ionizable isotopic labeling reagent for relative quantification of amine metabolites by mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2006, **78**(18): 6398-6403.
- [3] Wagner M, Ohlund LB, Shiao TC, *et al.* Isotope-labeled differential profiling of metabolites using *N*-benzoyloxysuccinimide derivatization coupled to liquid chromatography/high-resolution tandem mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2015, **29**(18): 1632-1640.
- [4] Ji CJ, Li WL, Ren XD, *et al.* Diethylation labeling combined with UPLC/MS/MS for simultaneous determination of a panel of monoamine neurotransmitters in rat prefrontal cortex microdialysates[J]. *Anal Chem*, 2008, **80**(23): 9195-9203.
- [5] Willacey CCW, Naaktgeboren M, Lucumi Moreno E, *et al.* LC-MS/MS analysis of the central energy and carbon metabolites in biological samples following derivatization by dimethylaminophenacyl bromide[J]. *J Chromatogr A*, 2019, **1608**: 460413.
- [6] Lkhagva A, Shen CC, Leung YS, *et al.* Comparative study of five different amine-derivatization methods for metabolite analyses by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2020, **1610**: 460536.
- [7] Takayama T, Mizuno H, Toyo'oka T, *et al.* Isotope corrected chiral and achiral nontargeted metabolomics: an approach for high accuracy and precision metabolomics based on derivatization and its application to cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease[J]. *Anal Chem*, 2019, **91**(7): 4396-4404.
- [8] Zhao S, Luo X, Li L. Chemical isotope labeling LC-MS for high coverage and quantitative profiling of the hydroxyl submetabolome in metabolomics[J]. *Anal Chem*, 2016, **88**(21): 10617-10623.
- [9] Achaintre D, Buleté A, Cren-Olivé C, *et al.* Differential isotope labeling of 38 dietary polyphenols and their quantification in urine by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2016, **88**(5): 2637-2644.
- [10] Liu CX, Sheng X, Wang YM, *et al.* A sensitive approach for simultaneous quantification of carbonyl and hydroxyl steroids using 96-well SPE plates based on stable isotope coded-derivatization-UPLC-MRM: method development and application[J]. *RSC Adv*, 2018, **8**(35): 19713-19723.
- [11] Fukui S, Takayama T, Toyo'oka T, *et al.* An accurate differential analysis of carboxylic acids in beer using ultra high-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry based on chiral derivatization combining three isotopic reagents[J]. *Talanta*, 2019, **205**: 120146.
- [12] Marquis BJ, Louks HP, Bose C, *et al.* A new derivatization reagent for HPLC-MS analysis of biological organic acids[J]. *Chromatographia*, 2017, **80**(12): 1723-1732.

- [13] Jiang RQ, Jiao Y, Zhang P, *et al.* Twin derivatization strategy for high-coverage quantification of free fatty acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2017, **89**(22): 12223-12230.
- [14] Bian XQ, Li N, Tan BB, *et al.* Polarity-tuning derivatization-LC-MS approach for probing global carboxyl-containing metabolites in colorectal cancer [J]. *Anal Chem*, 2018, **90**(19): 11210-11215.
- [15] Kim KJ, Park HG, Hwang CH, *et al.* Quantitative targeted metabolomics for 15d-deoxy- $\Delta$ 12, 14-PGJ2 (15d-PGJ2) by MALDI-MS[J]. *Biotechnol Bioproc E*, 2017, **22**(1): 100-106.
- [16] Zhao S, Dawe M, Guo K, *et al.* Development of high-performance chemical isotope labeling LC-MS for profiling the carbonyl submetabolome [J]. *Anal Chem*, 2017, **89**(12): 6758-6765.
- [17] Deng P, Higashi RM, Lane AN, *et al.* Quantitative profiling of carbonyl metabolites directly in crude biological extracts using chemoselective tagging and nanoESI-FTMS [J]. *Analyst*, 2017, **143**(1): 311-322.
- [18] Ortmayr K, Schwaiger M, Hann S, *et al.* An integrated metabolomics workflow for the quantification of sulfur pathway intermediates employing thiol protection with *N*-ethyl maleimide and hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Analyst*, 2015, **140**(22): 7687-7695.
- [19] Zhang Y, Kang A, Deng HS, *et al.* Simultaneous determination of sulfur compounds from the sulfur pathway in rat plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry: application to the study of the effect of *Shao Fu Zhu Yu* decoction[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, **410**(16): 3743-3755.
- [20] Xu PY, Yang Y, Su MX, *et al.* Determination of endogenous glutathione in rat plasma by a new derivative LC-MS/MS method [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2018, **49**(12): 209-214.
- [21] Zhao S, Li L. Dansylhydrazine isotope labeling LC-MS for comprehensive carboxylic acid submetabolome profiling [J]. *Anal Chem*, 2018, **90**(22): 13514-13522.
- [22] Gomez-Gomez A, Soldevila A, Pizarro N, *et al.* Improving liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of polycarboxylic acids in human urine by chemical derivatization. Comparison of *o*-benzyl hydroxylamine and 2-picolyamine[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, **164**: 382-394.
- [23] Li YQ, Bao Y. Content comparison of 18 amino acids in placenta histolysate determined by post-column derivatization cation-exchange chromatography and pre-column derivatization HPLC[J]. *China Pharm* (中国药师), 2016, **19**(10): 1830-1846.
- [24] Zhao S, Li H, Han W, *et al.* Metabolomic coverage of chemical-group-submetabolome analysis: group classification and four-channel chemical isotope labeling LC-MS[J]. *Anal Chem*, 2019, **91**(18): 12108-12115.
- [25] Cai WJ, Yu L, Wang W, *et al.* Simultaneous determination of multiclass phytohormones in submilligram plant samples by one-pot multifunctional derivatization-assisted liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2019, **91**(5): 3492-3499.
- [26] Yuan BF, Zhu QF, Guo N, *et al.* Comprehensive profiling of fecal metabolome of mice by integrated chemical isotope labeling-mass spectrometry analysis[J]. *Anal Chem*, 2018, **90**(5): 3512-3520.
- [27] Huang YZ, Jiao Y, Gao YQ, *et al.* An extendable all-in-one injection twin derivatization LC-MS/MS strategy for the absolute quantification of multiple chemical-group-based submetabolomes[J]. *Anal Chim Acta*, 2019, **1063**: 99-109.
- [28] Huang TJ, Toro M, Lee R, *et al.* Multi-functional derivatization of amine, hydroxyl, and carboxylate groups for metabolomic investigations of human tissue by electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Analyst*, 2018, **143**(14): 3408-3414.
- [29] Xiao HM, Cai WJ, Ye TT, *et al.* Spatio-temporal profiling of abscisic acid, indoleacetic acid and jasmonic acid in single rice seed during seed germination[J]. *Anal Chim Acta*, 2018, **1031**: 119-127.
- [30] An ZL, Hu T, Lv Y, *et al.* Targeted amino acid and related amines analysis based on iTRAQ®-LC-MS/MS for discovering potential hepatotoxicity biomarkers[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, **178**: 112812.
- [31] Wu Q, Xu YM, Ji HC, *et al.* Enhancing coverage in LC-MS-based untargeted metabolomics by a new sample preparation procedure using mixed-mode solid-phase extraction and two derivatizations [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, **411**(23): 6189-6202.
- [32] Zhao XN, He YR, Zhu SY, *et al.* Stable isotope labeling derivatization and magnetic dispersive solid phase extraction coupled with UHPLC-MS/MS for the measurement of brain neurotransmitters in post-stroke depression rats administrated with gastrodin[J]. *Anal Chim Acta*, 2019, **1051**: 73-81.