

双重保留机理下液相色谱-质谱法直接分析 18 种氨基酸

杨茜 肖炳坤 杨建云 黄荣清*

(军事科学院军事医学研究院, 辐射医学研究所, 北京 100850)

摘 要 采用反相和阳离子交换双重保留机理, 无需添加离子对和衍生化试剂, 建立了 18 种游离氨基酸的液相色谱-质谱联用直接分析方法。采用高效液相色谱-三重四极杆串联质谱 (HPLC-MS/MS) 系统, 使用 OSAKA SODA CAPCELL PAK CR 1:4 (150 mm × 2.1 mm, 5 μm; SCX: C₁₈ = 1:4) 色谱柱, 以 0.1% 甲酸 (A)-乙腈 (含 0.1% 甲酸) (B)-50 mmol/L 甲酸铵 (C) 为流动相进行三元梯度洗脱, 对 18 种氨基酸进行分离检测, 可得到良好的分析结果。色谱峰面积精密度 (RSD) 范围为 0.7% ~ 5.9%; 标准曲线线性关系良好 ($R^2=0.993 \sim 0.999$); 对 SD 大鼠血清和尿液样品加样回收率范围为 92.2% ~ 113.6%。本方法流动相条件简单, 灵敏度高, 可用于血清和尿液中游离氨基酸分析, 为生物样品中氨基酸检测或其它复杂基质中氨基酸的检测提供了新的方法和思路。

关键词 高效液相色谱-串联质谱法; 氨基酸分析; 非衍生化生物样品; 双重保留机理

1 引言

氨基酸是构成蛋白质的基础, 是生命活动中不可或缺的一类小分子物质。对生物体内氨基酸的分析研究, 有助于了解生命过程, 对于疾病的诊断^[1,2] 和药物的研究^[3,4] 具有重要作用。

氨基酸的分离检测技术一直是研究者的关注点之一, 尽管氨基酸分析方法多种多样, 但改进现有方法, 使其具有更好的专属性与灵敏度一直是研究的热点和难点问题^[5]。现有分离方法包括毛细管电泳法、气相色谱法、液相色谱法等, 氨基酸分离后再通过荧光、紫外、蒸发光散射、质谱等检测器进行检测。其中, 液相色谱是一种常用分离手段。在氨基酸的液相分离中, 由于氨基酸类物质含有氨基和羧基两种官能团, 一方面自身极性很强, 难以直接在反相 C₁₈ 色谱柱上得到良好保留, 另一方面紫外吸收弱, 生命体中常见的 20 种氨基酸中, 除酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸外, 均难以在紫外检测器 (UV) 上得到高灵敏响应。为了改善氨基酸的保留与检测问题, 通常使用衍生化试剂在柱前或柱后对氨基酸进行衍生。从最初的茚三酮比色分析^[6] 方法, 到现阶段常用的邻苯二甲醛 (OPA)、氯甲酸苄酯 (FMOC-Cl)、丹磺酰氯 (Dansyl-Cl)、6-氨基喹啉-*N*-羟基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯 (AQC)、异硫氰酸苯酯 (PITC) 等衍生化试剂, 均能很好地改善氨基酸在液相色谱分析中保留差、吸收弱的缺点, 建立在线或离线的液相色谱分析方法^[7~12]。但衍生化试剂的引入, 对衍生环境条件及氨基酸结构要求高, 如 OPA 只对一级氨基酸具有衍生作用, Dansyl-Cl、PITC 衍生速度慢, 操作方法繁琐, 相对重现性较差^[13~16]。对于生物样品分析, 衍生化试剂的引入会将原本就复杂的体系进一步复杂化, 增加解析的难度。

近年来, 质谱技术的高速发展在一定程度上满足了氨基酸高灵敏检测的需求。氨基酸容易离子化, 在电喷雾源 (ESI) 正离子模式下能够得到很好的响应^[17], 同时由于质谱检测的信号为质荷比 (m/z), 即使未能达到基线分离的情况, 也可通过不同质荷比进行定量分析^[18], 因此在氨基酸的液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 分析中, 氨基酸在色谱柱上的保留成为关键。目前, 氨基酸的 LC-MS 分析方法多通过衍生化或添加离子对试剂改善其保留行为, 如在流动相中添加七氟丁酸、九氟戊酸等挥发性离子对试剂^[19], 但该类物质的加入又会在一定程度上影响质谱离子源的离子化^[20]。为了改善氨基酸在 LC-MS 上的保留问题, 诸多新机理的色谱柱被应用, 如使用石墨化碳 (Hypercarb) 柱可将氨基酸由酸性至碱性顺序洗脱^[21,22]; 使用亲水性相互作用 (HILIC) 柱可将极性氨基酸良好保留^[23] 等。双重机理色谱同样也可作为氨基酸分析的全新分离保留手段^[24], Choi 等^[25] 利用固定相中嵌入亲水性和阳离

子交换配体的混合型柱对尿液中的氨基酸进行了分析。本研究引入阳离子交换和反相作用双重机理,通过阳离子交换作用对氨基酸的氨基部分进行保留,同时通过反相作用对疏水性差异进行识别,增强分离能力。最终在 LC-MS 上仅使用甲酸-乙腈-甲酸铵的简单分析体系,无需衍生化和添加离子对试剂,实现了 18 种氨基酸的高灵敏定量分析,并采用此方法测定了 SD 大鼠血清和尿液中的氨基酸含量。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Nanospace 高效液相色谱仪系统,配备脱气机,二元高压泵,高压单泵,高精度自动进样器 NASCA,柱温箱(日本 Osaka Soda 公司);QTRAP 5500 三重串联四极杆质谱仪(美国 SCIEX 公司);ML204/02 万分之一天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司);Fungilab 超声波仪(西班牙 Fungilab 公司);Centrifuge H-501FR 离心机(日本 Kokusan 公司);Milli-Q Ultrapure Ion-Ex-TM 超纯水机(美国 Millipore 公司)。

乙腈、甲酸、甲酸铵(色谱纯,北京百灵威公司);18 种氨基酸标准品:甘氨酸(批号 140689-201605)、丙氨酸(批号 140680-201604)、脯氨酸(批号 140677-201507)、缬氨酸(批号 140681-200401)、苏氨酸(批号 140682-201302)、亮氨酸(批号 140687-201503)、异亮氨酸(批号 140683-201302)、组氨酸(批号 140693-201803)、苯丙氨酸(批号 140676-201706)、精氨酸(批号 140685-201003)、酪氨酸(批号 140609-201513)购于中国药品生物制品检定所;丝氨酸(批号 20121017)、天冬氨酸(批号 20130717)、天冬酰胺(批号 20130308)、赖氨酸(批号 20131104)、谷氨酸(批号 20130717)、甲硫氨酸(批号 20130702)和色氨酸(批号 20130418)购于国药集团化学试剂有限公司。实验用水为 Milli-Q 系统制备的超纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 色谱条件 采用 CAPCELL PAK CR 1:4(150 mm×2.1 mm, 5 μ m)色谱柱(日本 Osaka Soda 公司),流动相为 0.1% 甲酸(A)-乙腈(含 0.1% 甲酸)(B)-50 mmol/L 甲酸铵(C),采用梯度洗脱:0~3.0 min, 100% A, 0.2 mL/min; 3.0~10.0 min, 100%~30% A, 0%~70% B, 0.2~0.3 mL/min; 10.0~15.0 min, 0%~100% C, 0.3 mL/min; 15.0~20.0 min, 100% C, 0.3 mL/min; 20.0~20.1 min, 0%~100% A, 0.3 mL/min; 20.1~30.0 min, 100% A, 0.3 mL/min。柱温 35℃,进样量 2 μ L。

2.2.2 质谱条件 Turbo-V 电喷雾离子源,采用正离子模式检测,喷雾电压 5500 V,离子源温度 400℃,喷雾气体(GAS1)20 psi,干燥气体(GAS2)20 psi,气帘气(Curtain GAS)20 psi。采用多反应监测(MRM)模式,入口电压(EP)10 V,碰撞室出口电压(CXP)10 V,各个物质母离子、子离子、去簇电压(DP)和碰撞能量(CE)等参数见表 1。

2.2.3 样品制备 (1)混合对照品溶液的制备 分别称取甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、脯氨酸、缬氨酸、苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、赖氨酸、谷氨酸、甲硫氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、精氨酸、酪氨酸、色氨酸标准品,精密称定后,酪氨酸和天冬氨酸使用 0.1% (V/V)氨水溶解,苯丙氨酸使用 50% (V/V)乙腈溶解,其余氨基酸均使用超纯水溶解,制成对照品储备液。分别移取适量对照品储备液,加流动相 A 稀释成混合对照品溶液(甘氨酸 3.08 μ g/mL、丙氨酸 0.5 μ g/mL、丝氨酸 0.6 μ g/mL、脯氨酸 0.1 μ g/mL、缬氨酸 0.15 μ g/mL、苏氨酸 0.8 μ g/mL、亮氨酸 0.145 μ g/mL、异亮氨酸 0.145 μ g/mL、天冬氨酸 0.115 μ g/mL、天冬酰胺 0.9 μ g/mL、赖氨酸 0.2 μ g/mL、谷氨酸 0.7 μ g/mL、甲硫氨酸 0.550 μ g/mL、组氨酸 0.275 μ g/mL、苯丙氨酸 0.140 μ g/mL、精氨酸 0.7 μ g/mL、酪氨酸 0.2 μ g/mL、色氨酸 0.375 μ g/mL),摇匀,备用。(2)实验动物 雄性 SD 大鼠 6 只,饲养室光照 12 h,黑暗 12 h,模拟正常环境,室温(25±2)℃,相对湿度 35%~45%。适应性饲养 3 天后,常规饲料饲养一周,自由饮水,置于代谢笼中收集 12 h 尿液后,第二日腹主动脉取血,12000 r/min 离心后获得血清。(3)血清样品前处理 取血清 50 μ L,加入 200 μ L 超纯水,振荡 30 s 后超声 10 min,取 50 μ L,加入 200 μ L 乙腈沉淀蛋白,再次振荡并超声,12000 r/min 离心 15 min,上清液过 0.22 μ m 滤膜,用流动相 A 稀释 10 倍,待上样分析。(4)尿液样品前处理 取 200 μ L 尿液,12000 r/min 离心 5 min,取 50 μ L 上清液,加入 200 μ L 超纯水,振荡 30 s 后超声 10 min。取 50 μ L,加入 200 μ L 乙腈沉淀蛋白,再次振荡并超声,12000 r/min 离心 15 min,上清液过 0.22 μ m 滤膜,使用流动相 A 稀释 10 倍,待上样分析。

表 1 18 种氨基酸多反应监测(MRM)定量离子参数
Table 1 Quantitation ions of 18 kinds of amino acids in multiple reaction monitoring (MRM) mode

氨基酸 Amino acid	母离子 Precursor ion (<i>m/z</i>)	子离子 Product ion (<i>m/z</i>)	去簇电压 Declustering potential (V)	碰撞能量 Collision energy (eV)
甘氨酸 Glycine (Gly)	76.1	29.9	135	21
丙氨酸 Alanine (Arg)	90.1	44.1	40	16
丝氨酸 Serine (Ser)	106.1	60.1	40	13
脯氨酸 Proline (Pro)	116.1	70.1	40	20
缬氨酸 Valine (Val)	118.2	72.1	40	16
苏氨酸 Threonine (Thr)	120.1	74.1	40	14
亮氨酸(异亮氨酸) Leucine(Isoleucine) (Leu (Ile))	132.2	86.1	40	13
天冬氨酸 Aspartic acid (Asp)	133.1	87.1	40	12
天冬酰胺 Asparagine (Asn)	134.1	74.1	40	19
赖氨酸 Lysine (Lys)	147.2	84.2	40	22
谷氨酸 Glutamic acid (Glu)	148.2	84.1	40	21
甲硫氨酸 Methionine (Met)	150.2	104.0	40	13
组氨酸 Histidine (His)	156.1	110.1	40	21
苯丙氨酸 Phenylalanine (Phe)	166.2	120.1	40	20
精氨酸 Arginine (Arg)	175.2	70.1	120	47
酪氨酸 Tyrosine (Tyr)	182.2	136.2	40	18
色氨酸 Tryptophan (Trp)	205.2	188.2	40	13

3 结果与讨论

3.1 保留模式的选择

为了实现氨基酸类物质在液相色谱柱上的良好保留，考察了不同机理色谱柱的保留能力。首先使用反相模式 C₁₈ 色谱柱(CAPCELL PAK C₁₈ MGIII 150 mm × 2.1 mm, 5 μm)进行分析, 3 min 内以 0.1% 甲酸进行反相保留, 在随后的 12min 逐渐添加有机相乙腈至 80% 比例, 结果发现除甲硫氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸以外的氨基酸保留时间均不足 2min, 出峰均在死时间附近, 因此使用反相色谱柱在不衍生、不添加离子对试剂的情况下, 无法将大多数氨基酸良好保留。

氨基酸为两性化合物, 通过调整 pH 值可使其带正电荷或负电荷, 因此可使用离子交换模式进行保留。本研究考察了直接使用阳离子交换型 SCX(CAPCELL PAK SCX 150 mm×2.1 mm, 5 μm) 色谱柱进行分析的效果。在阳离子交换机理下, 反相机理中无法保留的甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、赖氨酸、谷氨酸得到保留, 但出峰时间均较为接近, 碱性氨基酸(组氨酸、精氨酸和色氨酸) 由于保留过强, 在 50 mmol/L 甲酸铵缓冲盐条件下无法洗脱。因此, 考虑将反相和阳离子交换机理相结合, 通过一定的阳离子交换作用实现氨基酸的保留, 同时在反相机理的参与下也更有利于氨基酸分离与洗脱。色谱柱选择混合填料型(混合比 SCX : C₁₈ = 1 : 4) 的 CAPCELL PAK CR 1 : 4(150 mm×2.1 mm, 5 μm) 与键合型(硅胶球孔内键合反相和阴离子交换特性的固定相, 硅胶球间键合阳离子交换的固定相) Acclaim Trinity P1(100 mm×3.0 mm, 5 μm) 两种同时具有离子交换与反相作用的色谱柱进行比较分析。在离子交换和反相双重机理作用下, CR 或 P1 色谱柱对极性氨基酸的保留时间均延长至 3 min 以上, 双重机理 CR 色谱柱和反相 C₁₈ 色谱柱的保留时间对比见表 2, 在双重机理模式作用下, C₁₈ 色谱柱无法保留的天冬酰胺、天冬氨酸、丝氨酸等氨基酸均获得了良好保留, 实现了氨基酸的非生化法直接保留。由于 P1 色谱柱对精氨酸、组氨酸和苯丙氨酸峰型拖尾, 峰宽超过 2 min, 最终选择 CR 色谱柱进行了分析方法建立。

3.2 流动相的选择和梯度条件优化

在双重保留机理色谱柱上, 对于反相疏水作用使用乙腈(B)为洗脱溶剂, 对于离子交换作用使用甲酸铵(C)作为洗脱溶剂, 在三元梯度条件下进行方法建立。考察甲酸铵浓度在 10、25 和 50 mmol/L 时的洗脱效果, 结果表明, 使用 10 和 25 mmol/L 甲酸铵, 无法将组氨酸和精氨酸洗脱, 因此最终选择使用 50 mmol/L 甲酸铵作为洗脱溶剂。离子交换作用是一种比较强的作用力, 为了加快洗脱效率, 缩

表 2 CR 和 C₁₈ 色谱柱保留时间对比表
Table 2 Comparison of retention time on CR and C₁₈ columns

氨基酸 Amino acid	CR 柱保留时间 Retention time (CR) (min)	C ₁₈ 柱保留时间 Retention time (C ₁₈) (min)	氨基酸 Amino acid	CR 柱保留时间 Retention time (CR) (min)	C ₁₈ 柱保留时间 Retention time (C ₁₈) (min)
天冬酰胺 Asn	3.29	1.78	缬氨酸 Val	6.27	2.68
天冬氨酸 Asp	3.87	1.73	甲硫氨酸 Met	6.87	3.39
丝氨酸 Ser	3.89	1.73	酪氨酸 Tyr	7.61	4.13
苏氨酸 Thr	4.01	1.78	亮氨酸(异亮氨酸) Leu (Ile)	7.62	4.20
谷氨酸 Glu	4.13	1.82	苯丙氨酸 Phe	10.23	8.13
赖氨酸 Lys	4.19	1.75	色氨酸 Trp	15.83	8.66
脯氨酸 Pro	4.22	1.99	组氨酸 His	16.79	1.59
甘氨酸 Gly	4.59	1.72	精氨酸 Arg	17.71	1.61
丙氨酸 Ala	4.84	1.77			

短整体分析时间, 在 C 相洗脱过程中将流速从 0.2 mL/min 增加至 0.3 mL/min, 直至分析结束。18 种氨基酸标准品在优化的色谱条件下(见 2.2.1 节)分析谱图见图 1(亮氨酸和异亮氨酸未分离)。

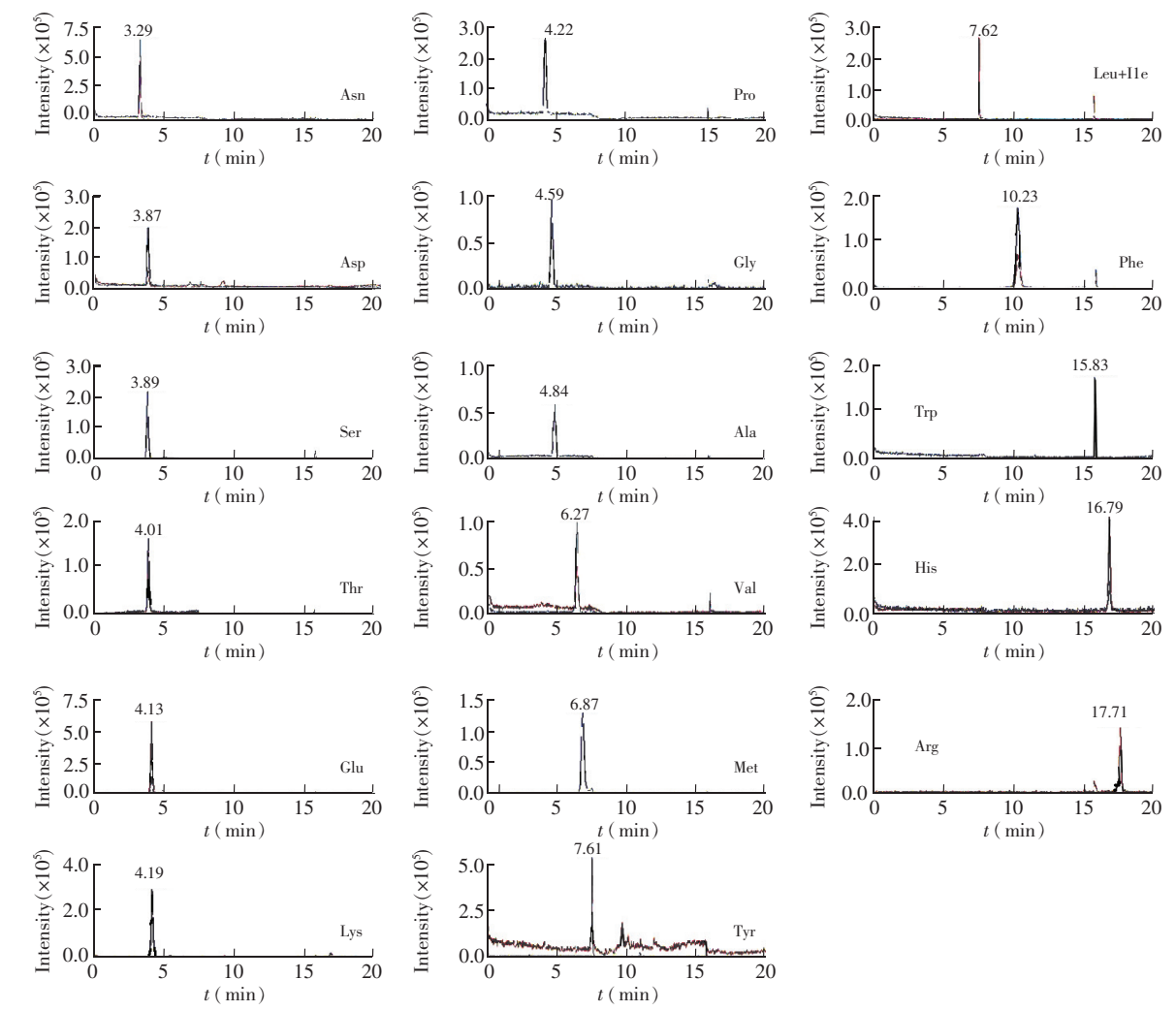


图 1 双重保留模式下氨基酸标准品分析谱图, 出峰顺序: 天冬酰胺、天冬氨酸、丝氨酸、苏氨酸、谷氨酸、赖氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、酪氨酸、亮氨酸+异亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸、精氨酸)
Fig. 1 Extracted ion chromatograms of the analytes. Elution order: Asn, Asp, Ser, Thr, Glu, Lys, Pro, Gly, Ala, Val, Met, Tyr, Leu+ Ile, Phe, Trp, His, Arg

3.3 回收率及提取条件优化

对血清和尿液样品添加标准品后(添加浓度:甘氨酸 3.0 μg/mL、丙氨酸 50.0 μg/mL、丝氨酸 60.0 μg/mL、脯氨酸 10.0 μg/mL、缬氨酸 15.0 μg/mL、苏氨酸 80.0 μg/mL、亮氨酸 14.5 μg/mL、异亮氨酸 14.5 μg/mL、天冬氨酸 11.5 μg/mL、天冬酰胺 9.0 μg/mL、赖氨酸 20.0 μg/mL、谷氨酸 7.0 μg/mL、甲硫氨酸 5.5 μg/mL、组氨酸 27.5 μg/mL、苯丙氨酸 14.0 μg/mL、精氨酸 70.0 μg/mL、酪氨酸 20.0 μg/mL、色氨酸 37.5 μg/mL),按照 2.2.3 节方法进行前处理,血清样品加样回收率为 92.2% ~ 113.6%;尿液样品加样回收率为 95.2% ~ 109.3%。

在加标回收实验中发现,若直接使用乙腈沉淀血清和尿液中的蛋白,会导致溶解度低的氨基酸回收率较差,如谷氨酸、天冬氨酸、酪氨酸用此方法的回收率约为 80%。为了避免前处理过程中可能的氨基酸损失,优化了前处理方案,采取先加 4 倍量水到血清(尿液)中进行稀释并提取氨基酸后,再加入乙腈沉淀蛋白。通过改善前处理方法,血清的加标回收率由 76.1% ~ 96.9% 上升至 92.2% ~ 113.6%,尿液加标回收率由 75.5% ~ 101.6% 上升至 95.2% ~ 109.3%。

3.4 线性范围、定量限和精密度

取 2.2.3 节的混合对照品溶液,以流动相 A 进行倍比稀释,分别稀释 2、4、8、16、32 倍后,进样 2 μL 进行分析测定。

以每个对照品质量浓度为横坐标(ρ , ng/mL),相应的色谱峰面积为纵坐标(y),拟合标准曲线。以信噪比(S/N)为 10 时对照品的质量浓度为定量限(LOQ), $S/N=3$ 时对照品的质量浓度为检出限(LOD)。方法的线性范围、回归方程、相关系数、LOD 及 LOQ 见表 3。

精密吸取混合对照品溶液 2 μL,连续进样 6 次,记录各色谱峰的峰面积,精密度(RSD)范围为 0.7% ~ 5.9%;次日再次进样,日间 RSD 为 0.5% ~ 6.8%,精密度良好。

表 3 18 种氨基酸标准品的线性方程、相关系数、线性范围、定量限及检出限
Table 3 Linear equations, correlation coefficients, linear range, limits of quantification (LOQs) and limits of detection (LODs) of 18 kinds of amino acids

氨基酸 Amino acid	线性方程 Liner equation	相关系数 Correlation coefficient (R^2)	线性范围 Linear range (μg/mL)	定量限 LOQ (μg/mL)	检出限 LOD (μg/mL)
甘氨酸 Gly	$y=158.53x+3343$	0.998	0.096 ~ 3.1	0.11	0.034
丙氨酸 Ala	$y=4381.9x+68252$	0.999	0.016 ~ 0.50	0.014	0.0042
丝氨酸 Ser	$y=7504.6x+249691$	0.993	0.019 ~ 0.60	0.0040	0.0012
脯氨酸 Pro	$y=39718x+164013$	0.998	0.0031 ~ 0.10	0.0031	0.00092
缬氨酸 Val	$y=23328x+59415$	0.998	0.0047 ~ 0.15	0.0012	0.00037
苏氨酸 Thr	$y=4979.6x+70416$	0.997	0.025 ~ 0.80	0.014	0.0041
亮氨酸(异亮氨酸) Leu (Ile)	$y=9985x+27700$	0.998	0.0091 ~ 0.29	0.0015	0.00046
天冬氨酸 Asp	$y=7226.4x+30219$	0.997	0.036 ~ 1.2	0.017	0.0052
天冬酰胺 Asn	$y=13667x+142246$	0.999	0.028 ~ 0.90	0.0060	0.0018
赖氨酸 Lys	$y=60524x+118414$	0.995	0.0063 ~ 0.20	0.0012	0.00036
谷氨酸 Glu	$y=17123x+299112$	0.998	0.022 ~ 0.70	0.0070	0.0019
甲硫氨酸 Met	$y=8272.6x-65973$	0.998	0.0018 ~ 0.55	0.014	0.0043
组氨酸 His	$y=2442.2x+99324$	0.995	0.0086 ~ 0.28	0.0037	0.0011
苯丙氨酸 Phe	$y=58504x+145287$	0.999	0.0044 ~ 0.14	0.0024	0.00072
精氨酸 Arg	$y=533.72x+11641$	0.994	0.022 ~ 0.70	0.013	0.0040
酪氨酸 Tyr	$y=1865x+20321$	0.999	0.0062 ~ 0.20	0.0038	0.0012
色氨酸 Trp	$y=4468.9x+22458$	0.999	0.012 ~ 0.38	0.0038	0.0012

3.5 生物样品分析

利用本方法对大鼠血清和尿液生物样品中游离氨基酸进行测定,结果见表 4,表明本方法能够用于生物样品中游离氨基酸的定量检测。

表 4 大鼠血清及尿液中氨基酸含量
Table 4 Determination results of amino acids in serum and urine of rats

氨基酸 Amino acid	含量(血) Mean content(serum) ($\mu\text{g/mL}$, $n=6$)	含量(尿) Mean content(urine) ($\mu\text{g/mL}$, $n=6$)	氨基酸 Amino acid	含量(血) Mean content(serum) ($\mu\text{g/mL}$, $n=6$)	含量(尿) Mean content(urine) ($\mu\text{g/mL}$, $n=6$)
甘氨酸 Gly	4.23±13.40	2.89±0.84	天冬酰胺 Asn	1.65±0.75	2.63±0.61
丙氨酸 Ala	28.33±5.66	107.6±61.8	赖氨酸 Lys	38.1±9.6	8.0±2.0
丝氨酸 Ser	29.86±4.56	6.53±3.97	谷氨酸 Glu	17.4±5.2	17.9±2.7
脯氨酸 Pro	12.57±1.85	25.20±9.14	甲硫氨酸 Met	5.60±0.47	8.0±4.4
缬氨酸 Val	14.89±3.40	6.87±1.66	组氨酸 His	18.19±2.10	27.04±1.07
苏氨酸 Thr	58.4±4.9	12.4±12.5	苯丙氨酸 Phe	6.65±1.22	10.1±2.4
亮氨酸(异亮氨酸) Leu (Ile)	26.7±3.0	22.7±2.2	精氨酸 Arg	36.32±3.39	45.4±1.9
天冬氨酸 Asp	8.02±3.68	7.15±1.25	酪氨酸 Tyr	8.64±3.29	6.65±0.18
			色氨酸 Trp	16.7±1.8	16.9±3.0

4 结 论

使用反相和离子交换双重机理型色谱柱，在不衍生化、不添加离子对试剂的简单条件下，实现了 18 种氨基酸的 LC-MS/MS 分离和定量测定。本方法操作简单，灵敏度高，虽然目前尚未将同分异构体氨基酸良好分离(如亮氨酸和异亮氨酸)，但此方法为生物样品中氨基酸检测或其它复杂基质中游离氨基酸的检测提供了新的方法和思路。

References

1 Piraud M, Ruet S, Boyer S, Acquaviva C, Clerc-Renaud P, Cheillan D, Vianey-Saban C. *Methods Mol. Biol.*, **2011**, 708: 25–53

2 Kiriyaama Y, Nochi H. *Scientifica (Cairo)*, **2016**, ID6494621

3 Adriana I, Maxime L, Diana L V, Dana C, Marie-Anne L, Bruno O V, Maria A M. *Drug Discov. Today*, **2017**, 22(2): 366–376

4 Zimmerman E S, Heibeck T H, Gill A, Li X F, Murray C J, Madlansacay M R, Cuong Tran, Nathan T U, Yin G, Rivers P J, Yam A Y, Wang W D, Steiner A R, Bajad S U, Penta K, Yang W, Hallam T J. *Bioconjugate Chem.*, **2014**, 25: 351–361

5 Hannelore K, Katja D, Wolfram G, Peter J O. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2009**, 393(2): 445–452

6 LIU Chang-Jiao, YANG Yue-Yue, WANG Ni, YU Ping. *China Food Additives*, **2018**, (1): 189–195
刘长皎, 杨越越, 王 妮, 余 平. 中国食品添加剂, **2018**, (1): 189–195

7 SU Jian-Kun, WANG Xue, LU Jian-Qiu, QIAO Yan-Jiang, GAO Xiao-Yan. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, **2012**, 18(15): 135–138
苏建坤, 王 雪, 卢建秋, 乔延江, 高晓燕. 中国实验方剂学杂志, **2012**, 18(15): 135–138

8 LU Ming, SUN Dai-Ni, WANG Yang, SHAO Hong. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, **2010**, 30(12): 2323–2327
陆 明, 孙黛妮, 汪 杨, 邵 泓. 药物分析杂志, **2010**, 30(12): 2323–2327

9 HE Xin-Rui, WU Zhong-Yong, YE Ying-Li, GAO Xu-Dong, CHEN Shi-En, MA Zhong-Ren. *Journal of Instrumental Analysis*, **2016**, 35(7): 922–928
赫欣睿, 武中庸, 叶永丽, 高旭东, 陈士恩, 马忠仁. 分析测试学报, **2016**, 35(7): 922–928

10 WANG Yuan, WANG Hai-Long, JIN Gao-Wa, ZHANG Fei-Fang, YANG Bing-Cheng, LIANG Xin-Miao. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Materia-World Science and Technology*, **2014**, 16(6): 1347–1352
汪 媛, 王海龙, 金高娃, 章飞芳, 杨丙成, 梁鑫森. 世界科学技术-中医药现代化, **2014**, 16(6): 1347–1352

11 DING Ya-Yun, XIE Meng-Xia, DENG Zhi-Wei. *Journal of Beijing Normal University (Natural Science)*, **2001**, 37(4): 526–529
丁雅韵, 谢孟峡, 邓志威. 北京师范大学学报(自然科学版), **2001**, 37(4): 526–529

12 WANG Wei-Hao, YANG Bin. *Chinese Pharmaceutical Journal*, **2017**, 52(5): 372–376
王维皓, 杨 滨. 中国药学杂志, **2017**, 52(5): 372–376

- 13 Tapuhi Y, Schich D E, Lindner W. *Anal. Biochem.*, **1981**, (115): 123–129
- 14 Ni J J, Li X, Li W, Wu L J. *Biomed. Chromatogr.*, **2016**, 30(11): 1796–1806
- 15 Muramoto K, Kamiya H, Kawauchi K. *Anal. Biochem.*, **1984**, 141: 446–450
- 16 Zhang G H, Jin W W, Fan P, Feng X N, Bai Y, Tao T, Yu L J. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2015**, 392: 1–6
- 17 ZHANG Jie, GE Yong-Hui, YANG Hui, ZHU Wen-Jing, ZHANG Xiang-Min, GENG Zhao-Liang. *Tobacco Science & Technology*, **2017**, 50(11): 58–65
张婕, 葛永辉, 杨慧, 朱文静, 章向敏, 耿召良. 烟草科技, **2017**, 50(11): 58–65
- 18 Krumpochov P, Bruyneel B, Molenaar D, Koukou A, Wuhler M, Niessen W M. A, Giera M. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2015**, 114: 398–407
- 19 LI Peng-Fei, TAO Pei-Pei, ZHANG Xu-De, AN Zhuo-Ling, ZHANG Qian, LI Yue, HAO Qian-Qian, LIU Li-Hong. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2013**, 41(9): 1347–1352
李鹏飞, 陶蓓蓓, 张绪得, 安卓玲, 张茜, 李悦, 郝倩倩, 刘丽宏. 分析化学, **2013**, 41(9): 1347–1352
- 20 Waterval W A H, Scheijen J L J M. Ortman-Ploemen M M J C, Habets-vander Poel C D, Bierau J. *Clin. Chim. Acta*, **2009**, 407: 36–42
- 21 Lea A, Ng A, Kwanb A, Cusmano-Ozoga K, Cowana T M. *J. Chromatogr. B*, **2014**, 944: 166–174
- 22 HUANG Xin, LI Shuai-Ping, ZHANG Yong, LIU Shu-Ying. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2016**, 44(11): 1652–1658
黄鑫, 李帅坪, 张勇, 刘淑莹. 分析化学, **2016**, 44(11): 1652–1658
- 23 LI Tai-Feng, XUE Wei, LI Min, SHI Ai-Xin, LI Ke-Xin. *Chinese Journal of New Drugs*, **2015**, 24(14): 1659–1664
李泰锋, 薛薇, 李敏, 史爱欣, 李可欣. 中国新药杂志, **2015**, 24(14): 1659–1664
- 24 Vilches A P, Norström S H, Bylund D. *J. Sep. Sci.*, **2017**, 40(7): 1482–1492
- 25 Choi M S, Rehman S U, Kima I S, Park H J, Song M Y, Yoo H H. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2017**, 145: 52–58

Determination of 18 Kinds of Amino Acids Based on A Mixed-mode Retention Mechanism by High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

YANG Qian, XIAO Bing-Kun, YANG Jian-Yun, HUANG Rong-Qing*

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract Amino acids are usually analyzed by derivatization or adding ion-pair reagents. In this work, a new method was established base on a mixed-mode retention mechanism (reversed-phase and cation-exchange) to determinate 18 kinds of amino acids, using simple mobile phase without the ion-pair and derivatization. In this method, 18 kinds of amino acids could be retained on a OSAKA SODA CAPCELL PAK CR 1:4 (150 mm×2.1 mm, 5 μm; SCX : C₁₈ = 1:4) column with a mobile phase of 0.1% formic acid(A)-acetonitrile (0.1% formic acid) (B) - 50 mmol/L ammonium formate (C) using a gradient elution program. Mass spectrometry (MS) detection was performed with multiple reaction monitoring (MRM) using positive electrospray ionization. The relative standard deviations (RSDs) of peak area ranged from 0.7% to 5.9%. The correlation coefficients (R^2) of 18 kinds of compounds were greater than 0.993. And the recoveries of serum and urine samples from SD rats ranged from 92.2% to 113.6%. This method was proved to be simple with good reproducibility. It provides a new method and idea for determination of amino acids in biological samples or other complex matrices.

Keywords High performance liquid chromatography-mass spectrometry; Amino acid analysis; Non-derivatized biological samples; Mixed-mode retention mechanism

(Received 18 September 2018; accepted 28 December 2018)