

# 亲水相互作用色谱-高分辨质谱法测定水样中 7 种氨基酸含量

鞠敏<sup>1,2</sup> 万慧慧<sup>1\*</sup> 孙玉明<sup>1</sup> 赵金凤<sup>1</sup> 周丽娜<sup>1</sup> 宋玉明<sup>2</sup>

(1. 大连理工大学分析测试中心, 辽宁 大连 116024;

2. 大连理工大学化工学院, 辽宁 大连 116024)

**摘要:** 氨基酸作为蛋白质的组成部分, 在生物体新陈代谢中发挥中重要作用。建立氨基酸化合物快速准确的分析检测方法对于分析测试平台支撑生命科学、医工交叉、环境健康等相关学科的发展具有重要意义。本研究建立了亲水作用超高效液相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱技术测定氨基酸的方法。在 Glycan BEH Amide (150 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱上进行色谱分离, 以 0.3 mL/min 的流速进行梯度洗脱。7 种氨基酸化合物在 0.5~80 μM 范围内线性关系良好, 相关性  $R^2 \geq 0.9915$ , 检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 分别小于 1 μM 和 5 μM, 回收率在 86.13%~118.8% 之间, 相对标准偏差 (RSD) 为 1.9%~11.9%, 日内和日间精密度的相对标准偏差 (RSD) 分别小于 12.8% 和 13.3%。该方法具有快速、高效和样品消耗少等优点, 可用于氨基酸的分析测定, 为相关学科的发展提供了分析技术支持。

**关键词** 亲水相互作用色谱; 高分辨质谱; 氨基酸

## Determination of seven amino acid in water by hydrophilic interaction liquid chromatography-high resolution mass spectrometry

Ju Min<sup>1,2</sup>, WAN Huihui<sup>1\*</sup>, SUN Yuming<sup>1</sup>, ZHAO Jinfeng<sup>1</sup>, ZHOU lina<sup>1</sup>, SONG Yuming<sup>2</sup>

(1. Instrumental Analysis Center, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;

2. School of Chemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

**Abstract:** Amino acids, as building blocks of protein, play an important role in the metabolism of organisms. It is of great significance to establish a rapid and accurate detection method for amino acid compounds to support the development of life science, interdisciplinary medical engineering and environmental health related disciplines for analytical testing platforms. A rapid and accurate method for the determination of amino acids by hydrophilic interaction ultra-high performance liquid chromatography coupled with electrostatic field orbit trap high-resolution mass spectrometry has been developed. The chromatographic separation was carried out on a Glycan BEH Amide (150 mm×2.1 mm, 1.7 μm) column with gradient elution at a flow rate of 0.3 mL/min. The seven

amino acid compounds showed good linearity in the range of 0.5-80  $\mu\text{M}$  with the correlation  $R^2 \geq 0.9915$ , and the limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) were less than 1  $\mu\text{M}$  and 5  $\mu\text{M}$ , respectively. The recoveries were in the range of 86.13%~118.8% with the relative standard deviations (RSDs) of 1.9%~11.9%, and the relative standard deviations for the intra-day and inter-day precision (RSD) were less than 12.8% and 13.3%. This method is fast, efficient, and less sample-consuming for the determination of 7 amino acids. It provides analytical technical support for the development of related disciplines.

**Keywords:** hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC); High resolution mass spectrometry; Amino acid

氨基酸是蛋白质的组成部分，广泛存在于从生物体液到植物和动物组织的多种基质中。同时氨基酸在生物体的新陈代谢中发挥着重要作用，临床样本中的氨基酸水平是身体健康状况的重要指示<sup>[1, 2]</sup>。因此，建立高灵敏、高准确度的氨基酸检测方法具有重要的意义。

由于氨基酸通常是从复杂的生物体系中提取得到，提取液中除氨基酸以外，往往含有多种不同的代谢物，因此，在氨基酸在检测前需要进行不同方式的分离。分离模式包括液相色谱法(LC)、气相色谱(GC)和薄层色谱法(TLC)在内的色谱分离方法和毛细管电泳(CE)。检测方法包括质谱法(MS)和分光光度法检测器，如紫外(UV)、可见光(Vis)或荧光检测(FLD)<sup>[3, 4, 5]</sup>。

自从1940年代后期阳离子交换色谱法成功分析氨基酸后，氨基酸的研究得到进一步的发展<sup>[6]</sup>。由于氨基酸本身的物理化学性质，大部分的氨基酸挥发性低、极性较大、缺乏特异性紫外和荧光生色团(除酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸)，因此需要将其衍生化以增加保留和提高灵敏度后才能进行紫外或荧光分析<sup>[7]</sup>。随着分析技术的不断发展，非衍生化的方法，即毛细管电泳、高效液相色谱与质谱检测器联用在减少了复杂的衍生化步骤前提下，也为氨基酸的测定提供了更好的分离及检测效果<sup>[8]</sup>。因毛细管与质谱联用需考虑电路的兼容性及其适合质谱使用的缓冲液，而液相色谱因其高度通用性和稳定性<sup>[9]</sup>，所以目前对于氨基酸的测定广泛采取的是高效液相色谱与质谱联用的方法<sup>[10, 11]</sup>。

与反相液相色谱相比，亲水相互作用色谱(hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC)是一种针对高极性化合物的色谱分离技术，它采用传统的极性固定相，如硅胶、氨基或氰基固定相，以及与反相液相色谱模式中类似的流动相<sup>[12]</sup>。HILIC由Alpert于1990年首次提出，它在一定程度上解决了普通相或极性嵌入式色谱柱给质量检测器带来的一些改变质谱的灵敏度的问题，例如使用离子配对剂和高水性流动相。使用亲水相互作用色谱模式时，通过增加水性流动相中有机溶剂的比例，可提高极性化合物的保留率。因此，它适用于分离多种高极性化合物，包括肽、氨基酸、碳水化合物、核碱基和核苷以及许多其他重要的生物化合物<sup>[2, 13]</sup>。

本研究建立了亲水相互作用模式的超高效液相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱方法定量测定水中7种氨基酸化合物分析方法，并进行了详细的方法学验证。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器，试剂与材料

Q Exactive plus 超高效液相色谱-静电场轨道阱质谱联用系统（美国 Thermo Scientific 公司），Xcalibur 4.4 软件用于仪器控制和数据处理；Milli-Q 超纯水系统（美国 Billerica 公司）。

乙腈（色谱纯，美国 Thermo Scientific 公司），甲酸（色谱纯，北京迪科马科技有限公司），甲酸铵（色谱级，德国 Honeywell 公司）。7 种氨基酸混标丙氨酸（L-Alanine, Ala）、4-氨基丁酸（4-Aminobutyric Acid, GABA）、谷氨酸（L-Glutamic Acid, Glu）、蛋氨酸（L-Methionine, Met）、脯氨酸（L-Proline, Pro）、丝氨酸（L-Serine, Ser）、茶氨酸（L-Theanine, The）购自坛墨质检科技股份有限公司。

## 1.2 溶液的配制

取氨基酸混合标准溶液（1 mM）1 mL 用 0.1 M 盐酸定容到 10 mL，配成氨基酸混合标准中间液。将混合标准液用 50% 乙腈稀释成一系列的混合标准工作溶液，浓度分别为 0.25  $\mu$ M、0.5  $\mu$ M、1  $\mu$ M、5  $\mu$ M、10  $\mu$ M、20  $\mu$ M、40  $\mu$ M、50  $\mu$ M、64  $\mu$ M、80  $\mu$ M。

## 1.3 仪器分析条件

### 1.3.1 色谱条件

色谱柱选用 ACQUITY UPLC® Glycan BEH Amide (150 mm  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu$ m)；流动相 A 为 10% 乙腈水溶液（含 5 mM 甲酸铵和 0.1% 甲酸），流动相 B 为 90% 乙腈水溶液（含 5 mM 甲酸铵和 0.1% 甲酸）。柱温：30°C。梯度洗脱程序：0~3 min, 100%B~80%B；3~12 min, 80%B~40%B；12~15 min, 40%B；15~16 min, 40%B~100%B；16~26 min, 100%B。流速：0.3 mL/min；进样量：1  $\mu$ L。

### 1.3.2 质谱条件

采用电喷雾电离（ESI）源，正离子模式，喷雾电压 3.6 kV，归一化碰撞能量（NCE）15、35、55，毛细管温度 320°C；辅助气温度 310°C；鞘气 35 arb，辅助气 10 arb；检测方式为全扫描/数据依赖二级扫描（Full-MS/dd-MS<sup>2</sup>）模式；Full-MS 分辨率 70,000，自动增益控制（AGC target） $3 \times 10^6$ ，最大离子注入时间（Maximum IT）100 ms，Full-MS 扫描范围 m/z 50~500；dd-MS<sup>2</sup> 分辨率 17,500，AGC target  $1 \times 10^5$ ，Maximum IT 50 ms，隔离窗口（Isolation window）4.0。氨基酸类化合物的质谱信息见表 1，以分析物的母离子为定量离子，以产物离子为定性离子。

表 1 氨基酸类化合物的质谱信息

Table 1 Mass spectrometry information of amino acid compounds

序号	化合物	保留时间/min	离子模式	理论值(m/z)	母离子(m/z)	碎片离子(m/z)
1	丙氨酸	6.16	[M+H] <sup>+</sup>	90.05496	90.05506	72.08087
2	4-氨基丁酸	5.58	[M+H] <sup>+</sup>	104.07060	104.07072	87.04413
3	谷氨酸	6.61	[M+H] <sup>+</sup>	148.06043	148.06058	84.04449
4	蛋氨酸	5.28	[M+H] <sup>+</sup>	150.05832	150.05852	104.05289, 133.03188
5	脯氨酸	5.62	[M+H] <sup>+</sup>	116.07060	116.07069	70.06524
6	丝氨酸	6.72	[M+H] <sup>+</sup>	106.04986	106.08646	60.04467
7	茶氨酸	5.68	[M+H] <sup>+</sup>	175.10771	175.10793	84.04448, 158.08113

## 2 结果和讨论

### 2.1 色谱条件优化

本实验对比了 Hypersil GOLD C18 (100 mm×2.1mm, 3 μm, 美国 Thermo Scientific 公司) 和 ACQUITY UPLC® Glycan BEH Amide (150 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 两种色谱柱。实验结果表明: 氨基酸在反相模式下在 C18 色谱柱上保留较弱。因此, 实验选择在 Glycan BEH Amide 色谱柱 (150 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 上进行亲水色谱模式的分离分析。实验比较了 10% 乙腈水溶液 (含 5 mM 甲酸铵和 0.1% 甲酸, A) /90% 乙腈水溶液 (含 5 mM 甲酸铵和 0.1% 甲酸, B) 与 10% 乙腈水溶液 (含 10 mM 甲酸铵和 0.2% 甲酸, A) /90% 乙腈水溶液 (含 10 mM 甲酸铵和 0.2% 甲酸, B) 作为流动相对氨基酸的测定。梯度洗脱条件: 0~3min, 100%B~80%B; 3~12min, 80%B~40%B; 12~15min, 40%B; 15~16min, 40%B~100%B; 16~26min, 100%B。实验结果表明: 与 5 mM 甲酸铵 0.1% 甲酸相比, 10 mM 甲酸铵和 0.2% 甲酸作为改性剂对氨基酸的分离和保留影响不大。因此, 选择 90% 乙腈水溶液 (含 5 mM 甲酸铵和 0.1% 甲酸) 和 10% 乙腈水溶液 (含 5 mM 甲酸铵和 0.1% 甲酸) 作为流动相, 以梯度模式进行洗脱。氨基酸类化合物的提取离子流色谱图见图 1。

### 2.2 质谱参数优化

本实验使用超高效液相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱进行目标化合物的检测, 首先采取单针进样的方式, 对目标化合物的混合标准工作液进行质谱条件的优化。通过一级全扫描, 得到目标化合物加氢后的准分子离子峰, 并将其确定为目标化合物的母离子。通过调整气流、温度、电压等参数, 进行质谱条件的进一步优化。优化后的质谱条件如 1.3.2 节所示, 采用

Full-MS/dd-MS<sup>2</sup> 模式，氨基酸类化合物的高分辨二级质谱图、母离子和碎片离子信息如图 2 所示。

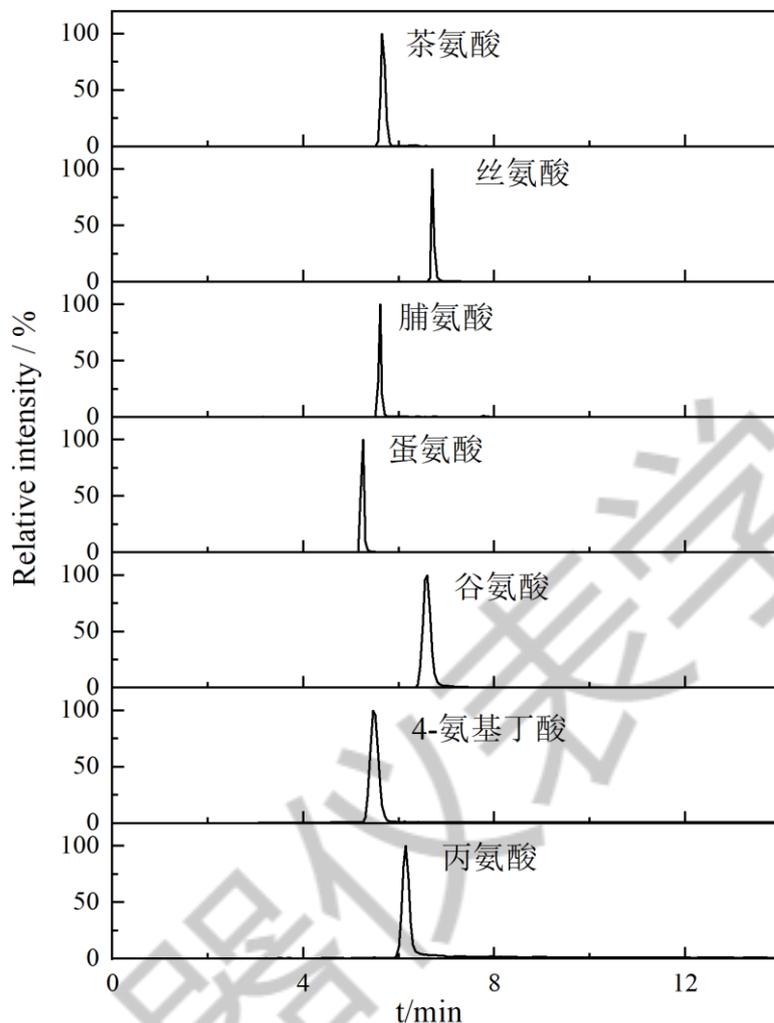


图 1 7 种氨基酸类化合物的提取离子流色谱图

Figure 1 Extraction ion flow chromatography of compounds Extracted ion chromatograms of the seven amino acid compounds

### 2.3 线性范围、检出限和定量限

本实验采取外标法建立标准曲线，将氨基酸混合标准溶液（0.1 mM）用 50% 乙腈配制一系列的混合标准工作液，0.25  $\mu\text{M}$ 、0.5  $\mu\text{M}$ 、1  $\mu\text{M}$ 、5  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$ 、20  $\mu\text{M}$ 、40  $\mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{M}$ 、64  $\mu\text{M}$ 、80  $\mu\text{M}$  进行定量检测。以氨基酸的摩尔浓度为横坐标，以目标分析物母离子的色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。如表 2 结果所示，目标化合物在一定范围内线性关系良好，相关系数  $R^2 \geq 0.9915$ 。以信噪比  $S/N \geq 3$  的摩尔浓度为检出限（LOD）， $S/N \geq 10$  的摩

尔浓度为定量限 (LOQ)，逐级稀释标准溶液，通过液质分析得到目标化合物的 LOD 值和 LOQ 值。实验结果表明：方法的检出限小于 1  $\mu\text{M}$ ，方法的定量限小于 5  $\mu\text{M}$ 。

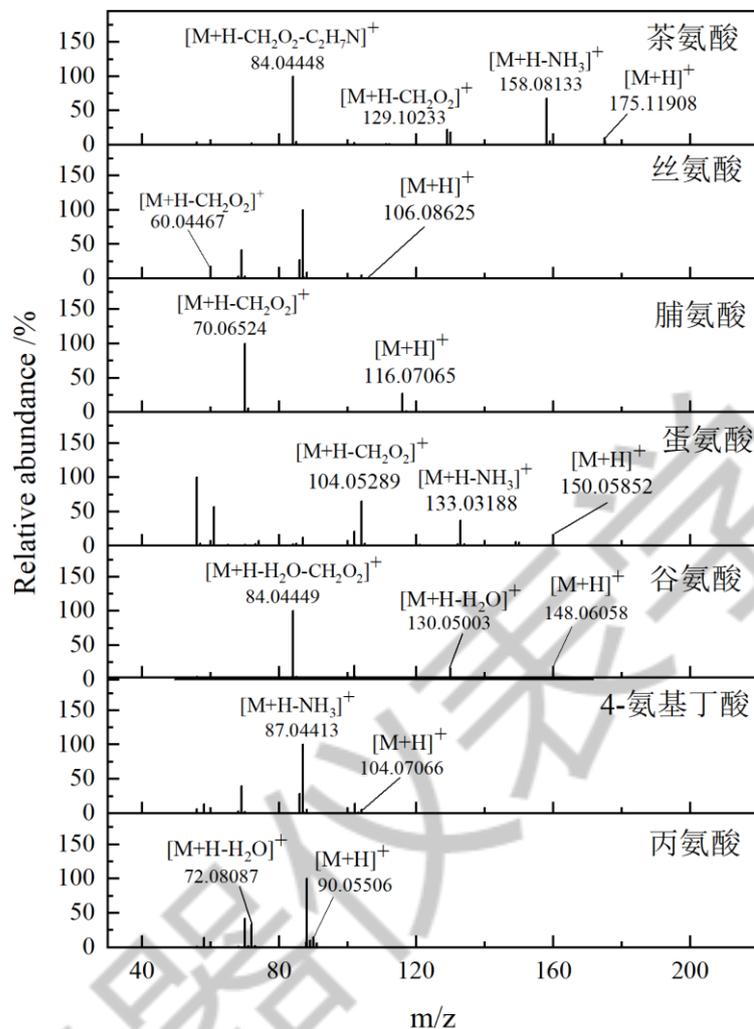


图 2 7 种氨基酸类化合物的二级质谱图

Figure 2 Secondary mass spectrometry of the seven amino acid compounds

表 2 7 种氨基酸的线性方程、相关系数、检出限和定量限

Table 2 Linear equations, correlation coefficients ( $R^2$ ), LODs and LOQs of the seven amino acids

序号	化合物	线性范围/ $\mu\text{M}$	线性方程	$R^2$	LOD/ $\mu\text{M}$	LOQ/ $\mu\text{M}$
1	丙氨酸	5~80	$Y=403052X-681153$	0.9961	1	5
2	4-氨基丁酸	5~80	$Y=2792780X-2090110$	0.9926	0.39	1.56

3	谷氨酸	5~80	Y=1333890X-2596710	0.9949	< 0.039	0.25
4	蛋氨酸	0.5~80	Y=1373220X-226971	0.9915	< 0.039	0.039
5	脯氨酸	1~80	Y=4997400X+1990690	0.9980	0.5	1
6	丝氨酸	5~80	Y=391991X-523344	0.9918	0.78	1
7	茶氨酸	1~80	Y=2479870X-784696	0.9967	< 0.039	< 0.039

## 2.4 回收率与精密度

向相同体积的 50% 乙腈中分别添加相同体积不同浓度 (6.25  $\mu\text{M}$ 、31.25  $\mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{M}$ ) 的标准氨基酸混合溶液, 每份样品六个平行, 然后计算得出实验的回收率, 结果见表 3。在同一天内对 50  $\mu\text{M}$  标准氨基酸混合溶液进行五次重复检测, 确定方法的日内精密度; 对 50  $\mu\text{M}$  标准氨基酸混合溶液连续五天进行重复检测, 确定方法的日间精密度, 使用 RSD% 表示。实验结果表明: 氨基酸的回收率在 86.13%~118.8% 的范围内, 日内精密度的 RSD 小于 12.8%, 日间精密度的 RSD 小于 13.3%。

表 3 氨基酸回收率 (n=6) 和精密度 (n=5)

Table 3 Amino acid recovery rate (n=6) and precision (n=5)

序号	化合物	添加/ $\mu\text{M}$	回收率 /%	RSD /%	日内精密度 (RSD/%)	日间精密度 (RSD/%)
1	丙氨酸	6.25	104.05	9.0	12.8	4.2
		31.25	88.94	5.9		
		50	92.69	8.7		
2	4-氨基丁酸	6.25	106.66	11.9	3.8	5.3
		31.25	86.13	6.9		
		50	103.04	1.9		
3	谷氨酸	6.25	109.25	1.9	4.1	10.1
		31.25	90.24	2.9		
		50	100.47	3.0		
4	蛋氨酸	6.25	99.22	5.2	5.3	7.7
		31.25	107.46	3.5		
		50	115.37	6.1		
5	脯氨酸	6.25	96.4	7.9	7.8	13.3

		31.25	89.90	6.5		
		50	105.94	5.0		
		6.25	118.8	6.0		
6	丝氨酸	31.25	98.3	5.8	4.1	5.4
		50	98.45	4.7		
		6.25	85.42	7.4		
7	茶氨酸	31.25	94.10	6.7	8.2	5.5
		50	102.57	7.4		

### 3 结论

本研究建立了基于亲水作用超高效液相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱法测定水中 7 种氨基酸类化合物的分析方法。该方法定量准确，重复性好，可以应用于生物体系、代谢产物、疾病健康筛查、环境安全监测等分析研究中，能够有效实现分析平台对相关学科的分析技术和分析手段的支撑。

## 参考文献

- [1] Akram, M, Asif, H M, Uzair M, et al. Amino acids: A review article. *Journal of Medicinal Plants Research* [J]. 2011. 5(17): 3997-4000.
- [2] Violi, J P, Bishop, D P, Padula, M P, et al. Considerations for amino acid analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A tutorial review [J]. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2020, 131.
- [3] Rutherford S M, Gilani G S, Amino Acid Analysis, *Current Protocols in Protein Science*, 2009 (Chapter 11), Unit 11.9.
- [4] Bhawani S A, Mohamad Ibrahim M N, Sulaiman O, et al. Thin-layer chromatography of amino acids: a review [J]. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* (2012) 35 (11): 1497e1516.
- [5] Lebedev A T, Damoc E, Makarov A A, et al. Discrimination of Leucine and Isoleucine in Peptides Sequencing with Orbitrap Fusion Mass Spectrometer [J]. *Anal. Chem.* 2014, 86: 7017–7022
- [6] Moore S, Stein W H. Photometric minhydrin method for use in the chromatography of amino acids [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1948, 176 (1): 367–388.
- [7] 朱曙东, 赵皓. 氨基酸的高效液相色谱分析[J]. *色谱*, 1994 (1): 20-24.
- [8] Yin X, Adam E, Van Schepdael A. Overview of chromatographic and electrophoretic methods for the determination of branched-chain amino acids [J]. *Journal of Separation Science*, 2023, 46 (15): 2300213.
- [9] Ferré S, González-Ruiz V, Guillarme, D, et al. Analytical Strategies for the Determination of Amino Acids: Past, Present and Future Trends [J]. *Journal of Chromatography B*, 2019, 1132, 121819.
- [10] 于泓, 牟世芬. 氨基酸分析方法的研究进展[J]. *分析化学*, 2005 (3): 398-404.
- [11] Buiarelli F, Gallo V, Filippo P D, et al. Development of a method for the analysis of underivatized amino acids by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: Application on Standard Reference Material 1649a (urban dust) [J]. *Talanta*, 2013, 115: 966-972.
- [12] Alpert A J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds [J]. *Journal of Chromatography A*, 1990, 499: 177-196.

- [13] 唐泽坤, 万慧慧, 李红等. 亲水相互作用色谱-静电场轨道阱高分辨质谱法测定 CO<sub>2</sub>吸收液中 9 种有机胺类化合物[J]. 色谱, 2023, 41 (9): 799-806.