

Liquid Chromatography

作者:

Chi Man Ng

Wilhad M. Reuter

PerkinElmer, Inc.
Shelton, CT

高效液相色谱质谱 联用测定未衍生的 氨基酸

简介

氨基酸分析在食品、饮料和生物医学行业上都有广泛而重要的作用。常见的氨基酸分析方法为柱前或柱后衍生高效液相色谱法，该方法有利于提高其分析的灵敏度和/或增加其分析的保留时间。

大多数衍生化方法使用邻苯二甲醛 (OPA)，芴基甲氧基羰酰氯 (FMOC) 和沃特世AccQ-Tag™ (6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚氨基甲酸酯) 作为衍生试剂。尽管这些方法在文献上已经被很好的理解和接受，但该方法往往是费时费力的。

未衍生的氨基酸分析的能力不仅仅体现其方便、简易和重现性，并兼有较高的灵敏度和分离度。消除衍生化反应步骤有可能降低副反应和衍生试剂干扰或者消除样品本身带来的污染和降解。¹

本应用文献介绍了高效液相色谱质谱联用分析未衍生的氨基酸的实验条件和实验数据, 包括得到的线性和重复性。

实验部分

仪器/软件

所用色谱分析采用PerkinElmer Altus™ HPLC系统, 包括Altus A-10系列的溶剂样品系统, 一体化的真空脱气机, A-10柱温箱和Altus SQ质谱检测器。所有的仪器控制, 样品检测和数据分析都由Waters® Empower® 3色谱数据软件(CDS)平台控制和执行。

方法参数

表1和2中分别列出了高效液相色谱和质谱方法参数。

表1. 高效液相色谱方法参数

色谱柱:	Intrada™ Amino Acid, 5 µm 100 x 3-mm column (Intakt, Portland, OR)																																										
流动相:	溶剂A: 乙腈/四氢呋喃 (THF) /25-mM 甲氨酸/甲酸; 9 / 75 / 16 / 0.3 (w/v/v/v)																																										
	溶剂B: 乙腈/100-mM甲氨酸; 20 / 80 (v/v)																																										
	溶剂洗脱程序:																																										
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>时间 (min)</th> <th>流速 (mL/min)</th> <th>%A</th> <th>%B</th> <th>曲线</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>初始</td> <td>0.400</td> <td>100.0</td> <td>0.0</td> <td>初始</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>5.00</td> <td>0.400</td> <td>100.0</td> <td>0.0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>12.00</td> <td>0.400</td> <td>83.0</td> <td>17.0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>19.00</td> <td>0.400</td> <td>0.0</td> <td>100.0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>25.00</td> <td>0.400</td> <td>0.0</td> <td>100.0</td> <td>11</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>25.10</td> <td>0.400</td> <td>100.0</td> <td>0.0</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table>		时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线	1	初始	0.400	100.0	0.0	初始	2	5.00	0.400	100.0	0.0	6	3	12.00	0.400	83.0	17.0	6	4	19.00	0.400	0.0	100.0	6	5	25.00	0.400	0.0	100.0	11	6	25.10	0.400	100.0	0.0	6
	时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线																																						
1	初始	0.400	100.0	0.0	初始																																						
2	5.00	0.400	100.0	0.0	6																																						
3	12.00	0.400	83.0	17.0	6																																						
4	19.00	0.400	0.0	100.0	6																																						
5	25.00	0.400	0.0	100.0	11																																						
6	25.10	0.400	100.0	0.0	6																																						
分析时间:	25min.																																										
流速:	0.400mL/min.																																										
压力:	2100psi																																										
柱温:	35°C																																										
检测器	Altus SQ MS																																										
进样体积:	5µL																																										
采样 (数据) 速率:	2pts./sec																																										

表2. 质谱方法参数

离子化模式:	电喷雾正离子模式 (+)
毛细管电压:	3.50kV
离子源温度:	150°C
锥孔电压:	35V
脱溶剂气温度:	400°C
脱溶剂气:	700L/hr
锥孔气流量:	25L/hr

溶剂, 标样和样品

所有的溶剂和稀释剂都采用色谱级的溶剂并通过0.45µm滤膜过滤。使用0.1N盐酸作为稀释剂。

17种氨基酸混标购自Thermo Scientific™(Rockford, Illinois)公司, 包括丙氨酸(Ala), 精氨酸(Arg), 天冬氨酸(Asp), 胱氨酸(Cys), 谷氨酸(Glu), 甘氨酸(Gly), 组氨酸(His), 异亮氨酸(Ile), 亮氨酸(Leu), 赖氨酸(Lys), 蛋氨酸(Met), 苯丙氨酸(Phe), 脯氨酸(Pro), 丝氨酸(Ser), 苏氨酸(Thr), 酪氨酸(Tyr), 和缬氨酸(Val). 除胱氨酸(Cys)浓度为1.25µmol/mL以外, 其他各种氨基酸浓度为2.50µmol/mL, 用0.1N盐酸配制。标准溶液用稀释剂稀释为浓度为1.0µmol/mL工作标准液(WS1)和0.1µmol/mL工作标准液(WS2)。WS1用于丙氨酸和胱氨酸的校准。更低水平的标准溶液都是通过这两个工作标准溶液逐级稀释得到。

进样前所有的校准液和样品用0.45µm滤膜过滤以移除一些微小颗粒。

结果和讨论

图1是17种氨基酸选择离子扫描 (SIRs) 叠加色谱图, 使用上述优化的条件。分析时间是25分钟。表3是用于分析每种氨基酸的保留时间(RT)和选择离子扫描模式 (SIR) 时间窗口和离子质荷比。

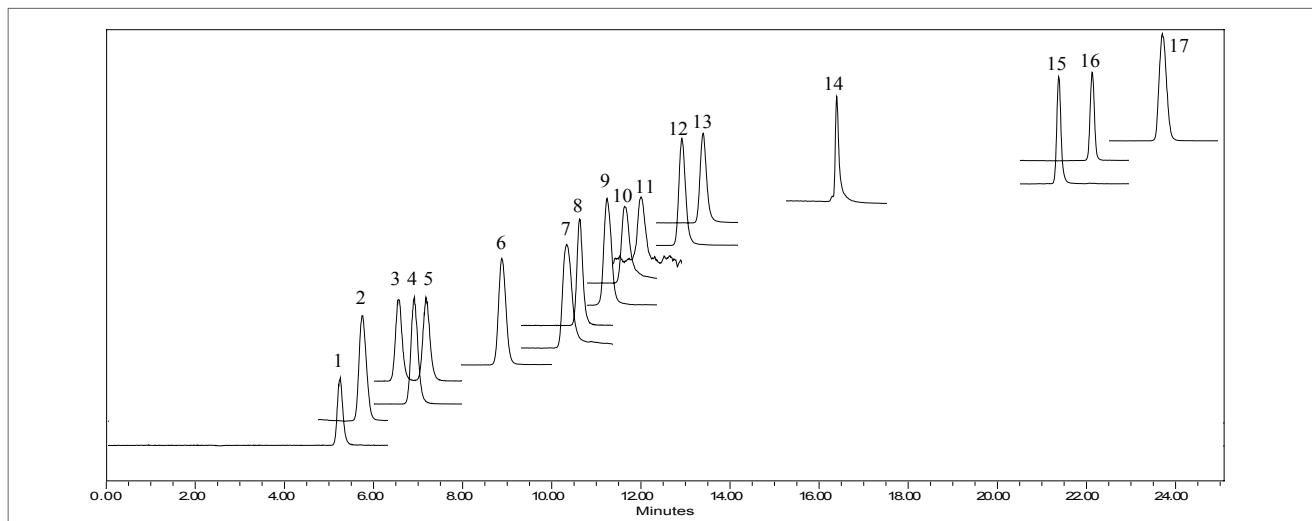


图1. 17种氨基酸SIRs重叠色谱图: 1-Phe; 2-Tyr; 3-Leu; 4-Met; 5-Ile; 6-Val; 7-Glu; 8-Pro; 9-Thr; 10-Asp; 11-Ala; 12-Ser; 13-Gly; 14-Cys; 15-His; 16-Lys; 17-Arg.

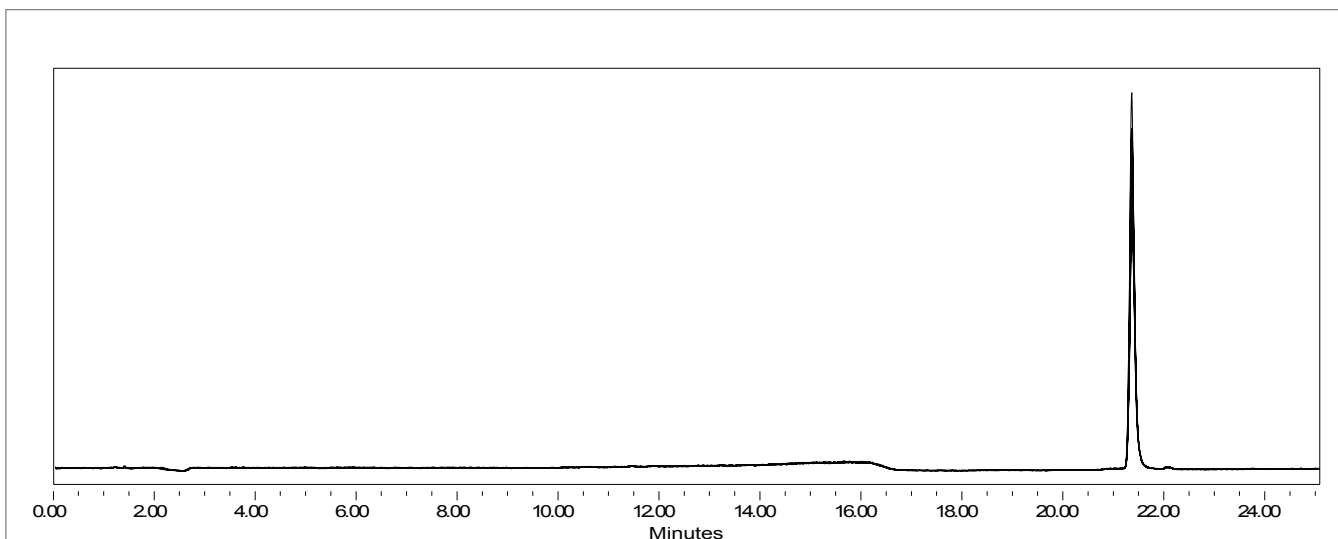


图2. 0.1- $\mu\text{mol/mL}$ 组氨酸标准溶液10针重叠色谱图

表3. 17种分析物保留时间和选择离子扫描模式时间窗/离子质荷比

保留时间 (min.)	氨基酸	SIR时间窗	SIR - m/z
5.18	Phe	0.00-6.40	166.0
5.80	Tyr	4.60-6.50	182.0
6.57	Leu	6.00-8.00	132.0
6.90	Met	6.00-8.00	150.0
7.19	Ile	6.00-8.00	132.0
8.87	Val	8.00-10.00	118.2
10.40	Glu	9.30-11.50	148.0
10.70	Pro	9.30-11.50	116.0
11.22	Thr	10.40-12.20	120.1
11.68	Asp	10.60-12.90	134.0
11.97	Ala	11.40-12.90	90.0
12.90	Ser	12.30-14.20	106.1
13.40	Gly	12.30-14.20	76.0
16.40	Cys	15.30-17.50	241.0
21.40	His	20.50-22.50	156.0
22.20	Lys	20.50-22.50	147.0
23.80	Arg	22.50-25.0	175.1

设定了5个校正浓度, 线性范围从0.006到0.10 $\mu\text{mol/mL}$, 丙氨酸和胱氨酸的线性范围从0.06到1.0 $\mu\text{mol/mL}$ 。

图3是以天冬氨酸, 甘氨酸, 组氨酸和蛋氨酸为代表的标准曲线。表4中是17种氨基酸的标准曲线的线性 (2阶) 和相关系数 $R^2 > 0.999$, 所有样品连续3次进样。

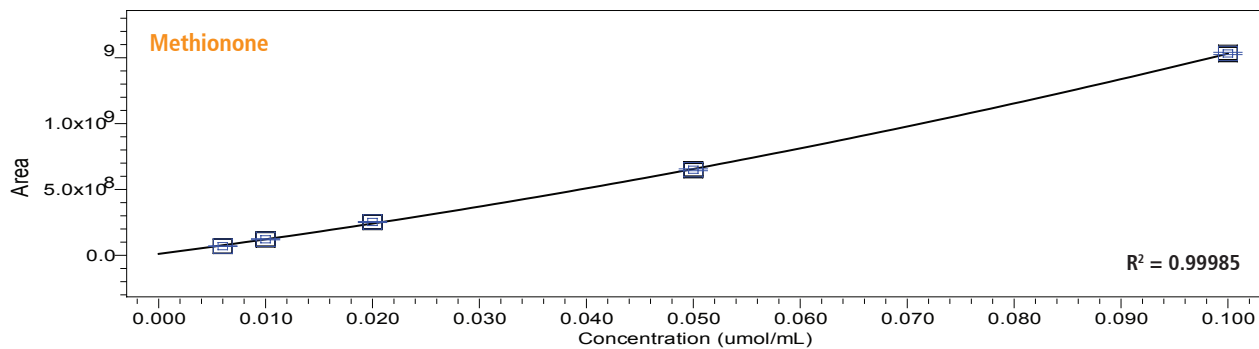
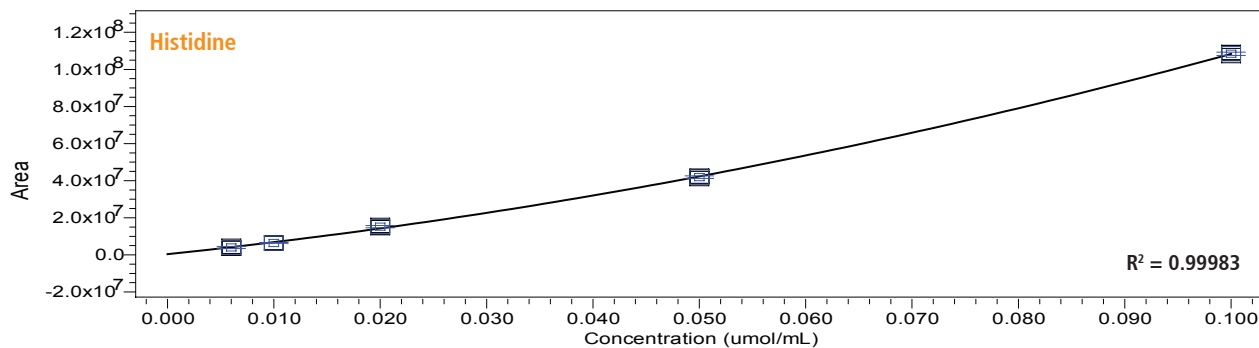
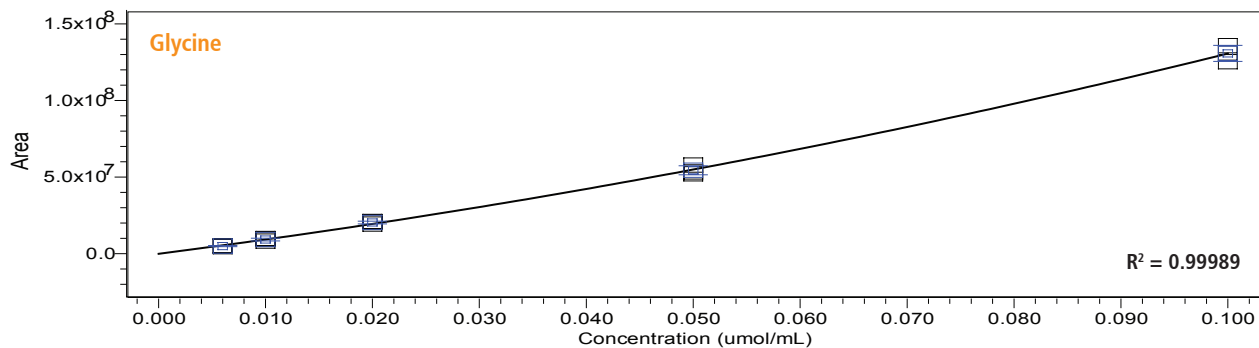
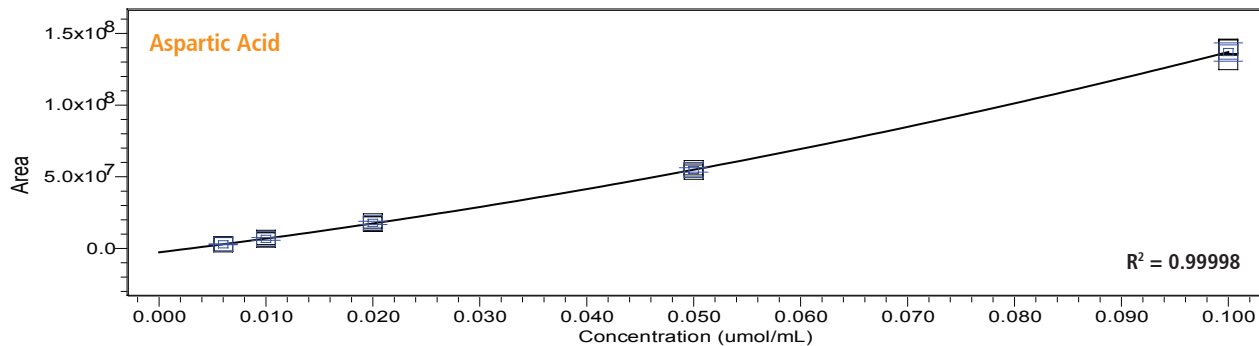


图3. 是天冬氨酸, 甘氨酸, 组氨酸和蛋氨酸的标准曲线 (n=3)。

表4中列出了每个化合物的LOD (最低检出限) 和LOQ (最低定量限) 水平。基于LOD信噪比>3/1, LOQ信噪比>10/1。因为具有较低的离子化效率, 对于氨基酸来说, 这些值是相当高。

表4. 线性和LOD/LOQ结果

氨基酸	R ² 值	LOD (nmol/mL)	LOQ (nmol/mL)
Ala	0.99967	35.07	116.9
Arg	0.99908	0.360	1.200
Asp	0.99998	1.104	3.680
Cys	0.99982	1.439	4.798
Glu	0.99987	0.129	0.430
Gly	0.99989	0.631	2.104
His	0.99983	0.428	1.426
Ile	0.99998	0.157	0.524
Leu	0.99996	0.155	0.516
Lys	0.99915	0.779	2.596
Met	0.99985	0.147	0.490
Phe	0.99995	0.198	0.659
Pro	0.99997	0.121	0.404
Ser	0.99982	0.246	0.820
Thr	0.99983	0.549	1.830
Tyr	0.99989	0.261	0.870
Val	0.99983	0.199	0.662

结论

该研究表明, 高效液相色谱质谱联用用于分析氨基酸是一个简单, 快速和直接的方法。建立的氨基酸分析方法无需柱前和柱后衍生化, 同时也拥有较高的灵敏度和选择性。实验结果显示在线性范围内保留时间的重复性和线性良好。

除丙氨酸 (因为其较低的离子化效率) 没有更高的检出限外, 其他所有检测的氨基酸的LODs范围都在0.12到1.44nmol/mL。并且, 除丙氨酸外, LOD/LOQ值比报道的通过OPA衍生氨基酸测定的值下降了5倍以上。²

参考文献

1. P. Agrafiotou, S. Sotiropoulos, A. Pappa. J. Sep. Sci., 2009, 32, 949-954.
2. M. P. Bartolomeo and F. Maisano. J. Biomol. Tech., 2006, 17, 131-137.

珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司
 地址: 上海 张江高科技园区 张衡路1670号
 邮编: 201203
 电话: 021-60645888
 传真: 021-60645999
www.perkinelmer.com.cn



要获取全球办事处的完整列表, 请访问<http://www.perkinelmer.com.cn/AboutUs/ContactUs/ContactUs>

版权所有 ©2014, PerkinElmer, Inc. 保留所有权利。PerkinElmer® 是PerkinElmer, Inc. 的注册商标。其它所有商标均为其各自持有者或所有者的财产。