固相萃取-高效液相色谱-电喷雾串联质谱技术分析大鼠血浆中的氨基酸及其在电离辐射损伤动物模型中的应用

汤新星, 顾 源, 蔡 尚, 徐美玲, 王 畅*

(苏州大学医学部放射医学与防护学院, 江苏 苏州 215123)

摘要 :建立了基于高效液相色谱-电喷雾串联质谱(HPLC-ESI-MS/MS)与固相萃取(SPE)相结合的大鼠血浆中氨基酸的分析方法。以硅胶基质的强阳离子交换固相萃取柱(SCX-SPE)提取血浆中的氨基酸和降低基质效应, HPLC-ESI MS/MS 进行测定。对 SPE 处理的样品 pH 值进行了优化,发现 pH 2.8 时 SCX-SPE 提取氨基酸的回收率和重现性比较令人满意。除赖氨酸和鸟氨酸外,氨基酸的总体回收率在 33.6% ~ 107.7% 之间,除精氨酸外,氨基酸标准曲线的线性相关系数 $r^2 > 0.99$; 25 种氨基酸测定的日内精密度和日间精密度较好,相对标准偏差(RSD)分别低于 9.0% 和 19.1%。此外,将该分析方法用于电离辐射对大鼠血浆氨基酸代谢的影响研究。结果表明,辐射可导致血浆中氨基酸代谢紊乱,并且其紊乱程度与电离辐射损伤程度正相关。研究结果为筛选新的急性辐射损伤标记物研究提供了实验依据。

关键词 :固相萃取 ; 高效液相色谱-电喷雾串联质谱 ; 氨基酸 ; 血浆 ; 基质效应 ; 电离辐射

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2012)07-0696-09

Analysis of amino acids in rat plasma by solid phase extraction-high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry and the application to radiation injury rat model

TANG Xinling, GU Yuan, CAI Shang, XU Meiling, WANG Chang*

(School of Radiation Medicine and Protection, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract : A robust and sensitive high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-ESI MS/MS) method was developed with solid phase extraction (SPE) sample preparation. It was optimized for the analysis of various amino acids in rat plasma. Silica-based strong cationic exchange SPE cartridges were used to extract amino acids and minimize the ion-suppression effect. The SPE cleanup protocol was optimized and it was found that the sample loading pH was very critical for the recovery and reproducibility. When the plasma sample was mixed with 0.1 mol/L acetic acid (pH 2.8) and loaded on SPE cartridge, the recoveries and repeatability for most of the amino acids were satisfactory. The method was fully validated. The analytical characteristics such as total recoveries (33.6% – 107.7%, except lysine and ornithine), linearities ($r^2 > 0.99$ except arginine), intra-day precisions (relative standard deviation (RSD) < 9.0%) and inter-day precisions (RSD < 19.1%) were satisfactory for most of the amino acids. Furthermore, the method was successfully applied to study the ionizing radiation exposure induced changes in amino acid concentration of plasma samples from rats. Experimental results showed that the ionization radiation could lead to metabolism disorder of plasma amino acids, and the degree of disorder was related with the degree of inju-

* 通讯联系人 :王 畅,副教授,主要从事电离辐射损伤及生物样本的液相色谱-质谱联用技术研究。E-mail : wangchang@ suda.edu.cn.

基金项目 :国家自然科学基金项目(31000385),江苏省高校自然科学基金项目(10KJB310012),江苏省高校自然科学基金研究重大项目(09KJA310004),江苏省博士后基金项目(0901052C)和苏州大学大学生创新性实验计划项目(5731511910).

收稿日期 2012-01-23

ry by the ionization radiation injury. Some of the amino acids may be potential biomarkers of ionization radiation injury. These results provide experimental basis for screening of new markers of the acute radiation damage.

Key words : solid phase extraction (SPE); high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-ESI MS/MS); amino acids ; plasma ; matrix effect ; ionizing radiation

氨基酸是生命活动中至关重要的一类物质^[1],具有广泛的生物学功能:作为蛋白质的基本组成单位和细胞信号分子,在基因表达和蛋白质磷酸化中起重要调节作用^[1-3],及作为合成激素及小分子含氮化合物的重要前体。因此,检测生物样本如血浆、尿液、脑脊液或羊水水中的氨基酸生理浓度有着重要意义。目前定量分析生物样本中氨基酸浓度时,应用最广泛的技术是离子交换色谱分析-柱后茚三酮衍生法^[4],其次是柱前荧光衍生-反相高效液相色谱法^[5,6]。但这两种方法的衍生化步骤都会不可避免地产生一些干扰,使得分析缺乏特异性。

近年来,利用可挥发性的离子对试剂,快速、简便、灵敏的高效液相色谱-电喷雾串联质谱(HPLC-ESI MS/MS)方法开始用于复杂生物基质(血浆或尿液)中的非衍生化氨基酸分析^[7-10]。与传统的分析方法相比, HPLC-ESI MS/MS 技术具有高特异性、高灵敏度和高通量的优势。然而,有必要小心验证和仔细评估这项技术,包括研究生物样品中的基质效应等^[11-14]。由于质谱检测的高选择性,基质效应的影响在色谱图上往往观察不到,即空白基质色谱图表现为一条直线,但这些共流出组分会改变待测物的离子化效率,引起待测物检测信号的抑制或提高,影响分析结果的重现性和准确性。前人的研究工作表明,利用液相色谱-串联质谱技术测定生物样本中的氨基酸是可行的^[7-10]。然而,迄今为止尚未利用这项技术在测定生物样品中氨基酸时评估其基质效应的报道。

目前测定血样中氨基酸的研究中,一般都是利用同位素标记的氨基酸作为内标,全血或血浆经过简单的蛋白沉淀和稀释就直接进行 HPLC-MS/MS 分析^[7-10]。而简单的稀释很显然会影响方法的灵敏度,在许多情况下都是不合适的^[15]。由于其与待分析物有着相似的性质和行为包括色谱保留和质谱电离行为,一般认为稳定同位素内标(SIL-IS)可以补偿大部分的基质效应^[16]。但其价格昂贵,并且在许多情况下买不到合适的商品化稳定同位素标记物。同位素标记物的纯度、不同 MS/MS 离子通道之间的交叉污染、同位素稳定问题和在样品预处理

过程中的一致性等问题均需谨慎对待^[17,18]。应用稳定同位素标记物时,如不能保证分析物/内标物比例的一致性^[19],也就不能完全补偿其基质效应^[19,20]。近年来,有不少报道显示,固相萃取(SPE)能够有效降低基质效应^[21-24],尤其在测定低含量物质时还具有预浓缩样品待测成分的优势。

本研究建立了一个灵敏、稳定、可靠的 HPLC-MS/MS 方法用于分析血浆中的氨基酸。实验中使用了强阳离子交换固相萃取柱提取血浆中的氨基酸和降低基质效应,对分析方法的回收率、线性、精密度和准确度进行了考察;并将该方法用于电离辐射对大鼠血浆氨基酸影响的研究。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); ABI QTrap2000 质谱仪(美国 Applied Biosystems/ MDS Sciex 公司);固相萃取装置(美国 Waters 公司);硅胶基质强阳离子交换固相萃取柱(SCX-SPE, 6 mL, 500 mg, 无锡科奥美萃生物技术公司)。

实验所用氨基酸标准品:天冬氨酸(Asp)、甘氨酸(Gly)、丝氨酸(Ser)、赖氨酸(Lys)、丙氨酸(Ala)、酪氨酸(Tyr)、蛋氨酸(Met)、谷氨酸(Glu)、苯丙氨酸(Phe)、天冬酰胺(Asn)、 β -氨基异丁酸(β -AIB)、谷氨酰胺(Gln)、脯氨酸(Pro)、组氨酸(His)、羟脯氨酸(Hyp)、色氨酸(Trp)、瓜氨酸(Cit)、苏氨酸(Thr)、胱氨酸(Cy2)、L-精氨酸(Arg)、戊氨酸(Nov)、异亮氨酸(Ile)、缬氨酸(Val)、半胱氨酸(Cys)、亮氨酸(Leu)、鸟氨酸(Orn)和离子对试剂全氟庚酸(TDFHA)购自 Sigma-Aldrich 公司(纯度 $\geq 99\%$);稳定同位素标记的氨基酸[2,3,3,3-D]丙氨酸(Ala-d4)、[环-D]苯丙氨酸(Phe-D5)、[5,5,5-D]亮氨酸(Leu-d3)、[4,4,5,5-D]赖氨酸(Lys-d4·2HCl)、[吡啶-D]色氨酸(Trp-d5)购自 Cambridge Isotope Laboratories 公司(纯度 98%)。甲酸、乙酸、乙腈(HPLC 级)和醋酸铵(NH_4Ac)购自美国 TEDIA 公司,盐酸、氨水

(分析纯)购自上海国药化学试剂公司 ;甲醇(HPLC 级)购自德国 Merck 公司 ;水为 Millipore 超纯水。

1.2 标准溶液的配制

准确称取氨基酸标样(包括同位素标记氨基酸)溶于 0.1%(体积分数 ,下同)盐酸或者水中配制 成储备液 ,冻存于 - 20 ℃ 冰箱中。TDFHA 储备液 用纯水制备 ,并冻存于 - 20 ℃ ,进行 LC-MS/MS 分 析前用水稀释至 0.5 mmol/L。

1.3 动物处理及血浆样本的采集

雄性远交群(SD)大鼠(体重 160 ~ 180 g ,苏州 大学动物实验中心)38 只 ,随机分为对照组(14 只) 和照射组(24 只)。照射组再随机分成 2 小组(每小 组 12 只大鼠) ,分别以 4 Gy 和 8 Gy 的剂量进行 X 射线全身照射 ,剂量率为 2 Gy/min。

照射组大鼠于照射后 24 h 用乙醚麻醉 ,腹腔静 脉采血 ,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝 ,以 3 000 r/min 离心 10 min 取血浆。对照组大鼠以同样处理方式 取血。每个样本中取 100 μL 并混匀后得到质量控 制(QC)样本 ,所有血浆样本置于 - 80 ℃ 冰箱保存。

1.4 样本预处理

直接稀释进行 HPLC-MS/MS 分析的血浆样 品 200 μL 血浆加入 800 μL 甲醇沉淀后 ,13 000 r/min 离心 10 min 取上清液进行 LC-MS/MS 分析。

优化后的 SPE 提取步骤 :先用 5 mL 甲醇及 5 mL 0.1 mol/L 醋酸(pH 2.8)顺序活化 SPE 柱 ,接 着将 50 μL 血浆与 100 μL 的混合内标溶液、150 μL 0.1 mol/L 醋酸(pH 2.8)混合均匀后上样 ;依次用 5 mL 0.1 mol/L 醋酸(pH 2.8)和 5 mL 甲醇进行淋 洗 ,最后用 5 mL 含 5% 氨水的甲醇洗脱分析物。洗 脱液用氮气吹干 ,并保存在 - 20 ℃ 冰箱 ,分析前用 200 μL 初始流动相(乙腈-0.05 mmol/L TDFHA , 1:9 ,v/v)重新溶解。

1.5 高效液相色谱及质谱条件

Waters XBridge C18 色谱柱(150 mm × 2.1 mm ,5 μm) ,柱温 26 ℃ ,流动相流速 200 μL/min , 进样量 3 μL。流动相 A 为乙腈 ,流动相 B 为 0.05 mmol/L TDFHA。梯度洗脱程序 :0 ~ 6 min ,10% A ;6 ~ 9 min ,10% A ~ 25% A ;9 ~ 15 min ,25% A ; 15 ~ 18 min ,25% A ~ 80% A ;18 ~ 22 min ,80% A ; 22 ~ 22.5 min ,80% A ~ 100% A ;22.5 ~ 27.5 min , 100% A ;27.5 ~ 28 min ,100% A ~ 10% A。

质谱电喷雾电压为 + 5 500 V(正离子模式) ,毛 细管加热温度为 530 ℃ ;雾化气压为 413.8 kPa ,辅 助加热气压为 344.8 kPa。定量采用多反应监测 (MRM)模式 ,优化后的部分质谱参数见表 1。

表 1 MRM 扫描模式下测定氨基酸的质谱参数
Table 1 MS instrumental parameters for the amino acid determination in MRM scan mode

Amino acid	Ion pair for quantification (m/z)	Declustering potential/V	Collision entrance potential/V	Collision energy/V
Trp	205.2/188.2	25	7.2	21
His	156.1/110.1	30	18	23
Arg	175.2/70.0	34	12	35
Tyr	182.2/136.1	22.9	20	21.6
Cy2	241.1/120.1	29	21	27
Phe	166.2/120.1	34	16.4	24
Ala	90.1/90.1	32.4	8.7	7.8
Gln	147.2/84.1	34	16	24
β-AIB	104.0/86.0	33	11	12.4
Hyp	132.1/86.1	35	19	21.6
Asn	133.1/74.1	28	11	23
Glu	148.1/84.1	28	13	18
Thr	120.1/74.1	29	12	13
Leu	132.1/86.1	22	16	16
Val	118.1/72.2	17	8	15
Pro	116.1/70.0	32	14	25
Ile	132.1/86.2	21	17	19
Asp	134.0/74.1	20	16	18
Gly	75.8/75.8	20	10	15
Ser	106.0/60.1	19	16	15
Lys	147.1/84.1	28	8	25
Cit	176.1/159.1	26	17	18
Nov	118.1/72.2	17	10	16
Orn	133.1/70.0	22	5.5	27
Cys	122.0/76.0	29	13	20.5
Ala-d5	94.1/94.1	32.4	8.7	7.8
Phe-d5	171.2/125.0	34	16.4	23
Lys-d4	151.1/88.1	26	9	23
Leu-d3	135.1/89.1	22	15	15
Trp-d5	210.2/192.2	23	7.2	19

1.6 定量研究

由于分析对象是生物样本内源性氨基酸 ,采用 QC 样本作为基质 ,标准添加法^[25]做标准曲线。实 验时 ,将从高到低浓度等倍稀释的氨基酸混合标样 作为工作液。将不同浓度(包含“ 0 ”)的工作液与 100 μL 内标物混合液加入到 50 μL QC 样本中 , SCX-SPE 处理。对于有自身同位素内标的氨基酸 , 标准曲线的绘制是以添加的氨基酸的峰面积与相应 的内标物峰面积之比为纵坐标(即同位素稀释法) ; 对于没有相应内标物的氨基酸 ,以添加的氨基酸峰 面积(即外标法)为纵坐标 ,以添加的氨基酸浓度为 横坐标进行绘制。

通过 3 个实验来考察提取回收率、基质效应回 收率和总体回收率^[26]。将低(50 μmol/L)、中(100 μmol/L)、高(250 μmol/L)3 个浓度水平的氨基酸 混合标准溶液分别添加到 QC 样本中。提取回收率 为各浓度水平的氨基酸标准溶液在 SPE 处理后与

处理前的峰面积比值;基质效应回收率为各浓度水平的氨基酸在 QC 样本与在溶剂中(即标准溶液)同样经 SPE 处理得到的峰面积比值;总体回收率综合了提取回收率和基质效应回收率,为各浓度水平的氨基酸添加到 QC 样本中经 SPE 处理后得到的峰面积与标准溶液的峰面积的比值。

不同辐射剂量组与对照组血浆中氨基酸含量的比较采用方差分析法(SPSS 15.0 软件),多变量统计分析采用正交信号法(orthogonal signal correction, OSC)和偏最小二乘法(partial least squares, PLS) (Simca-P 11.0 软件)。

2 结果与讨论

2.1 血浆中氨基酸的定性和定量离子对的选择

根据氨基酸断裂的模式及机理^[27-29],选定正离子模式用于氨基酸的分析以获得较高的灵敏度。将氨基酸标准溶液通过注射泵引入质谱进行产物离子扫描,获得其产物离子(或碎片离子),产物离子与文献^[27]报道比较一致。血浆中氨基酸的定性主要依据是色谱保留时间和在串联质谱中的产物离子与其标准样品相对应。氨基酸中的同分异构体在质谱中产生相同的碎片离子。因此选择定量离子对时不但考虑其灵敏度,同时也兼顾特异性以保证那些色谱保留时间非常相近的氨基酸在定量时无干扰。

2.2 基质效应和 SPE 条件的优化

基质效应会导致样本中待测物保留时间发生漂移和离子抑制现象^[4,8-10,14],这在我们的实验中也得到了证实。最初,血浆样本仅经过简单的蛋白沉淀和稀释后进样。如图 1 所示, β -AIB、Nov 未检测到,并且 Trp、His 的保留时间与标样相比漂移较大,分别为 3.2 min 和 1.5 min。这可能是由于生物样品的组成极其复杂,其中含有的内源性物质的绝对量常常高于待测成分数倍乃至数千万倍,基质在色谱柱上过载,甚至成分之间相互影响,从而造成出峰时间出现偏差。在近期的文献报道中,Waterval 等^[9]利用 QTrap4000 LC-MS/MS 系统,通过溶剂稀释(160 倍)和大量的稳定同位素标记物作为内标来补偿基质效应的影响,直接测定了尿液和血浆中的氨基酸。在该报告中,研究者自己也承认方法对仪器的灵敏度要求比较高(与 QTrap2000 LC-MS/MS 系统相比,QTrap4000 LC-MS/MS 系统的灵敏度至少要高 2 个数量级),而且实验中会有多种因素影响到仪器的灵敏度。这在一定程度上限制了该方法的推广和应用。为了降低基质效应,我们选取 SPE 柱来提取血浆中的氨基酸。

图 1 利用 LC-MS/MS 技术在正离子 MRM 扫描模式下得到的经蛋白沉淀和稀释后的大鼠血浆样品中氨基酸分析的总离子流(TIC)图谱

Fig. 1 Total ion chromatogram of amino acids by LC-MS/MS in positive MRM scan mode in rat plasma prepared by using protein precipitation and dilution

Rat plasma of 200 μ L was precipitated with 800 μ L methanol. Then, the upper supernatant was collected and 5 μ L was injected onto LC-MS/MS. Retention times of amino acids: Trp, 6.4 min; His, 7.52 min; Arg, 1.47 min; Tyr, 2.12 min; Cys, 1.31 min; Phe, 3.76 min; Ala, 1.6 min; Gln, 1.32 min; β -AIB, not determined; Hyp, 1.1 min; Asn, 1.3 min; Glu, 1.36 min; Thr, 1.36 min; Leu, 3.55 min; Val, 2.01 min; Pro, 1.26 min; Ile, 3.17 min; Asp, 1.23 min; Gly, 1.49 min; Ser, 1.32 min; Lys, 13.3 min; Cit, 1.42 min; Nov, not determined. Mobile phases: A, acetonitrile; B, 0.05 mmol/L TDFHA. Gradient elution conditions: 0–6 min, 10% A; 6–9 min, 10% A–25% A; 9–15 min, 25% A; 15–18 min, 25% A–80% A; 18–22 min, 80% A; 22–22.5 min, 80% A–100% A; 22.5–27.5 min, 100% A; 27.5–28 min, 100% A–10% A. The other experimental conditions are the same as in the described experimental section.

氨基酸是一类包含至少一个羧基和一个氨基官能团的化合物,因此,不同的 pH 条件下,氨基酸以阳离子、阴离子和中性分子 3 种形式存在。根据文献^[14,30]报道,无论提取血浆中的氨基酸还是水中的氨基酸,均选用了(强)阳离子基质的 SPE 柱,但这两篇报道所选用的样品 pH 值不同(前者 pH 接近 1,后者 pH 为 3.1),且均未对样品 pH 作详细讨论。SCX-SPE 的提取效果取决于样品 pH 值。一般来说,当样品 pH 值为中性时,洗脱物最为纯净,基质效应也最小;当样品 pH 值较低时,SCX-SPE 柱清除基质效应的能力下降,洗脱物中杂质较多,但与此同时,增加了样品离子与 SPE 固定相的交换能力^[31,32]。因此,样品 pH 值的选择必须同时兼顾提高回收率和降低基质效应两个方面。为此,实验中利用氨基酸混合标准溶液为样品,比较其不同 pH 值对氨基酸提取回收率的影响。这几种 pH 值包括 pH 1(0.1 mol/L HCl), pH 2.4(0.1 mol/L 甲酸), pH 2.8(0.1 mol/L 醋酸), pH 3.5(0.01 mol/L 醋酸铵)和 pH 4.8(0.01 mol/L 醋酸铵)。结果表明,

在 pH 4.8 和 pH 1.0 时 ,只有少数氨基酸有信号响应。当样品 pH 值为 3.5、2.8、2.4 时 ,25 种氨基酸均有信号响应。考虑到实际生物样本基质效应的复杂性 ,我们比较了 pH 2.8 和 pH 3.5 时实际血浆样本中氨基酸处理的重现性。实验表明 ,利用 SCX-SPE 处理血浆样品 ,pH 2.8 时 25 种氨基酸的重现性以相对标准偏差(RSD , $n = 6$)计为 3.0 ~ 16.5 ,要远远优于 pH 3.5 时的重现性(RSD 为 4.7 ~ 39.4 , $n = 6$)。其原因可能与离子交换的机理有关 :在低 pH 条件下 ,氨基酸与 SCX-SPE 柱之间的交换作用较强 ,因而样品中的氨基酸能较好地被保留在 SPE 柱上。氨基酸混合标准溶液在 pH 2.8 和 pH 2.4 时经 SPE 处理后的信号强度无显著性差异 ,考虑到较高的样品 pH 值清除基质效应的能力较强 ,我们选择样品 pH 值为 2.8 (0.1 mol/L 醋酸)。图 2 给出了经 SCX-SPE 处理后血浆中氨基酸在 LC-MS/MS 分析中的总离子流图。

2.3 添加回收率试验

由表 2 可见 ,对于大部分氨基酸 ,其加标提取回收率在 64% ~ 100% 之间 ,基质效应回收率在 60% ~ 130% 之间 ,总体回收率在 50% ~ 100% 之间。基质效应回收率反映了基质效应对待测物回收率的影

图 2 利用 LC-MS/MS 技术在正离子 MRM 扫描模式下得到的经 SCX-SPE 处理后的大鼠血浆样品中氨基酸分析的 TIC 图谱

Fig. 2 Total ion chromatogram of amino acids by LC-MS/MS in positive MRM scan mode in rat plasma prepared by using SCX-SPE

The experimental procedure and conditions are described in the experimental section. The sample injection volume was 3 μ L. Retention times of amino acids : Trp , 21.3 min ; His , 20.5 min ; Arg , 2.5 min ; Tyr , 5.3 min ; Cy2 , 2.4 min ; Phe , 15.0 min ; Ala , 2.6 min ; Gln , 2.1 min ; β -AIB , 15.6 min ; Hyp , 1.7 min ; Asn , 2.0 min ; Glu , 2.1 min ; Thr , 2.2 min ; Leu , 14.3 min ; Val , 4.1 min ; Pro , 2.0 min ; Ile , 11.8 min ; Asp , 1.7 min ; Gly , 2.4 min ; Ser , 2.1 min ; Lys , 21.3 min ; Cit , 2.3 min ; Nov , 5.3 min ; Orn , 21.3 min ; Cys , 2.2 min.

表 2 pH 2.8 时氨基酸的添加回收率($n = 3$)
Table 2 Recoveries of amino acids at pH 2.8 ($n = 3$)

Amino acid	Extraction efficiency			Matrix effect			Extraction efficiency + matrix effect			%
	50 μ mol/L	100 μ mol/L	250 μ mol/L	50 μ mol/L	100 μ mol/L	250 μ mol/L	50 μ mol/L	100 μ mol/L	250 μ mol/L	
Trp	96.8	95.3	97.0	97.0	82.9	78.1	93.9	78.9	75.8	
His	53.2	54.3	65.6	126.5	127.9	104.9	67.2	69.5	68.8	
Arg	95.6	96.5	96.3	36.3	37.4	35.6	34.7	36.1	34.3	
Tyr	98.1	97.8	95.1	66.1	89.1	76.4	64.8	87.1	72.6	
Cy2	75.3	88.7	69.7	88.3	84.0	101.4	66.5	74.5	70.7	
Phe	92.1	95.5	99.2	89.9	91.4	92.5	82.8	87.3	91.8	
Ala	99.1	98.2	98.1	92.9	107.4	92.8	92.1	105.5	91.1	
Gln	72.7	83.4	88.6	46.4	40.3	47.5	33.7	33.6	42.1	
β -AIB	48.1	48.3	48.2	97.6	107.7	95.0	46.9	52.0	45.8	
Hyp	68.9	63.5	71.7	89.6	76.4	84.8	61.7	48.5	60.8	
Asn	69.3	85.7	87.9	68.7	67.3	66.2	47.6	57.7	58.2	
Glu	35.2	34.1	37.1	104.1	104.3	103.4	36.6	35.6	38.4	
Thr	71.3	81.1	85.2	79.4	91.5	86.2	56.6	74.2	73.5	
Leu	97.5	95.8	94.8	62.2	84.9	83.4	60.6	80.0	79.1	
Val	97.6	99.1	98.6	76.7	75.9	74.7	74.8	75.2	73.7	
Pro	69.8	80.8	99.1	106.6	89.9	78.3	74.4	72.6	77.5	
Ile	98.5	95.7	94.7	92.9	95.2	90.7	91.5	91.1	85.9	
Asp	96.9	87.4	99.5	72.5	61.6	74.3	70.2	53.8	73.9	
Gly	95.7	93.9	96.2	112.5	77.8	103.1	107.7	73.0	99.2	
Ser	98.8	91.9	97.8	71.2	72.1	62.1	70.3	66.3	60.7	
Lys	6.6	8.5	16.4	88.45	91.78	93.19	5.9	7.8	15.3	
Cit	97.4	95.9	96.1	89.3	95.1	96.4	87.0	91.2	92.7	
Nov	96.3	93.9	94.0	97.7	106.0	100.3	94.1	99.5	94.2	
Orn	17.8	19.7	28.0	94.0	99.7	91.9	16.7	19.6	25.7	
Cys	64.4	64.3	65.4	132.8	133.4	129.2	85.5	85.8	84.5	

响,对大部分氨基酸来说基质抑制了其离子信号(基质效应回收率 < 100%),尤其是对于 Gln 和 Arg 相反,对于 His 和 Cys 基质增强了其离子信号(基质效应回收率 > 100%)。SPE 处理前,由于基质效应的影响,血浆中 β -AIB 和 Nov 用 QTrap2000 串联质谱仪检测不出;经 SCX-SPE 处理后, β -AIB 和 Nov 在 3 个添加浓度水平上的基质效应回收率分别为 95% ~ 108% 和 97% ~ 106%,基本消除了信号抑制现象。因而血浆样品经 SPE 处理后,可用 QTrap2000 串联质谱仪对 β -AIB 和 Nov 进行较好的测定。整体回收率是提取回收率和基质效应回收率的综合体现。Lys 和 Orn 的整体回收率较低(< 30%),但由于其在大鼠血浆样本中的生理浓度较高,仍可实现较好的定量。

2.4 标准曲线、精密度及准确度

线性的考察通过标准添加法^[25]。对于有同位素内标的氨基酸(Trp、Phe、Lys、Leu 和 Ala),使用同位素稀释法和外标法两种线性拟合方法;对于没有同位素内标的氨基酸,使用外标法进行线性拟合(见表 3)。使用外标法时,除 Arg 外,各氨基酸的线性相关系数(r^2)均大于 0.99。此外,对于 Trp、Phe、Lys、Leu 和 Ala,比较了同位素稀释法和外标法的结果。线性范围和 r^2 方面,除 Leu 线性范围稍窄外,两者之间没有显著性的差异。这进一步说明在没有合适内标的情况下,可利用 SCX-SPE 和外标法实现生物样本中氨基酸的定量,从而避免了高通量样本分析时使用多个同位素内标的高昂费用,大大降低了分析成本,便于方法的推广和应用。检出限(LOD)和定量限(LOQ)分别依据氨基酸定量离子对的信噪比大于 3 和 10 倍确定。25 种氨基酸的 LOD 范围为 0.005 ~ 13.5 $\mu\text{mol/L}$,LOQ 范围为 0.0125 ~ 42.1 $\mu\text{mol/L}$ (见表 3)。

日内、日间精密度和准确度通过在 3 份平行血浆样品中加入低(50 $\mu\text{mol/L}$)、中(100 $\mu\text{mol/L}$)、高(250 $\mu\text{mol/L}$)3 种浓度水平混合标准溶液,按 1.4 节实验步骤进行 SPE 处理。同一天内重复进样 7 次经过 SCX-SPE 处理的 3 个浓度水平的加标血浆样品得到日内精密度;连续 7 天重复进样 3 个浓度水平的加标血浆样品得到日间精密度。所有精密度的计算基于氨基酸面积,其结果见表 4。25 种氨基酸测定的日内和日间精密度较好,RSD 分别小于 9.0%和 19.1%,这对于复杂生物样品的氨基酸分析来说,已是令人较为满意的结果。较好的日间精密度也说明了外标法线性拟合标准曲线是可靠的。准确度由添加 3 个浓度水平的血浆样品计算得到的加

标量(由标准曲线得到)与理论加标量的比值得到。该方法中氨基酸的准确度在 84.4% ~ 122.6% 之间(见表 4),结果比较满意。

表 3 HPLC-MS/MS 法测定血浆中氨基酸的分析特性
Table 3 Analytical characteristics of HPLC-MS/MS method for determination of amino acids in plasma

Amino acid	Linear range/ ($\mu\text{mol/L}$)	r^2	LOD/ ($\mu\text{mol/L}$)	LOQ/ ($\mu\text{mol/L}$)
Trp	1.25 ~ 62.5 ^a	0.9966	0.2	0.8
	1.25 ~ 12.5	0.9974		
His	12.5 ~ 500	0.9997	2.5	6.3
Arg	125 ~ 500	0.9872	13.5	42.1
Tyr	2.5 ~ 500	0.9983	0.8	1.25
Cy2	0.125 ~ 25	0.9998	0.03	0.08
	25 ~ 125	0.9923		
Phe	2.5 ~ 62.5 ^a	0.9991	0.1	0.5
	1.25 ~ 62.5	1		
Ala	25 ~ 500 ^a	0.996	0.3	2.5
	2.5 ~ 125	0.9982		
Gln	12.5 ~ 62.5	0.9999	1.5	8.6
	62.5 ~ 500	0.9997		
β -AIB	0.125 ~ 62.5	0.9936	0.03	0.125
Hyp	0.25 ~ 62.5	0.9967	0.05	0.25
Asn	0.25 ~ 62.5	0.9942	0.03	0.10
Glu	2.5 ~ 125	0.9968	0.5	0.8
Thr	12.5 ~ 62.5	0.9996	1.5	5.0
	62.5 ~ 500	0.9923		
Leu	2.5 ~ 500 ^a	0.9999	0.5	1.0
	2.5 ~ 62.5	0.9976		
Val	2.5 ~ 62.5	0.9977	0.8	1.0
Pro	1.25 ~ 125	0.9939	0.3	1.25
Ile	2.5 ~ 62.5	0.9979	0.3	0.8
Asp	0.25 ~ 125	0.9985	0.1	0.25
Gly	25 ~ 125	0.9967	2.5	10
Ser	2.5 ~ 125	0.9935	0.2	0.6
	12.5 ~ 500 ^a	0.9975		
Lys	25 ~ 250	0.9944	2.5	12.5
	1.25 ~ 62.5	0.9988		
Cit	1.25 ~ 62.5	0.9988	0.3	1.25
Nov	0.0125 ~ 62.5	0.9979	0.005	0.0125
Orn	12.5 ~ 500	0.9949	0.2	4.5
Cys	2.5 ~ 62.5	0.9976	0.02	2.5

Note : a. with stable isotope dilution method ; the others with external standard method. LOD : limit of detection ; LOQ : limit of quantification.

2.5 方法应用

将上述建立的基于 LC-MS/MS 的血浆中氨基酸分析方法用于研究电离辐射对大鼠血浆氨基酸代谢的影响,其结果见表 5。急性电离辐射 24 h,大鼠血浆中多种氨基酸发生显著性变化。例如,辐射后 24 h,大鼠血浆中 Phe 和 Tyr 含量明显升高,且 Tyr 随辐射剂量的增加呈现出显著性上升趋势。Tyr 同 Phe 是人体不可缺少的芳香族氨基酸,在神经的发展和功能中具有重要的作用^[1]。例如,Tyr 和 Phe 的含量变化在筛选新生儿苯丙酮尿症

表 4 加标大鼠血浆中氨基酸分析的日内、日间精密度和准确度

Table 4 Inter-day and intra-day precisions , and accuracies of amino acid analysis in spiked plasma samples										%
Amino acid	Intra-day (n = 7)			Inter-day (n = 7)			Accuracy (n = 3)			
	50 μmol/L	100 μmol/L	250 μmol/L	50 μmol/L	100 μmol/L	250 μmol/L	50 μmol/L	100 μmol/L	250 μmol/L	
Trp	1.6	2.8	2.1	15.0	4.9	5.0	107.8	105.0	99.0	
His	7.7	4.9	6.9	7.4	12.1	9.3	94.1	93.2	97.5	
Arg	6.3	4.2	3.2	19.1	8.0	6.2	93.2	106.7	98.7	
Tyr	2.0	2.6	1.3	6.4	8.1	6.4	101.8	105.0	104.4	
Cy2	2.2	1.2	1.3	7.2	3.2	3.9	98.2	100.5	105.7	
Phe	1.6	3.3	4.2	9.7	4.2	6.5	99.3	99.6	100.1	
Ala	1.0	0.9	1.6	7.9	7.5	7.6	106.0	99.8	109.6	
Gln	2.1	1.2	1.1	6.5	5.3	5.2	102.7	99.8	101.8	
β-AIB	3.1	1.7	3.2	9.7	3.5	8.0	106.1	114.5	97.4	
Hyp	3.3	2.2	2.3	8.1	7.8	7.2	116.9	92.0	100.6	
Asn	3.4	1.8	1.0	6.1	8.4	6.8	112.7	108.6	98.1	
Glu	1.6	4.8	2.1	5.7	9.6	5.9	114.3	109.4	100.7	
Thr	1.9	4.1	2.9	7.8	4.7	7.6	91.6	103.3	99.7	
Leu	2.4	3.2	3.3	10.1	17.5	15.5	84.9	104.6	99.8	
Val	0.9	1.0	0.8	8.7	8.1	6.6	106.0	104.7	99.1	
Pro	1.8	1.8	0.6	7.6	7.3	6.0	122.6	111.3	116.1	
Ile	6.5	1.6	1.4	10.4	8.7	7.4	103.6	107.2	98.7	
Asp	1.3	2.2	2.6	8.2	8.9	3.1	109.2	84.4	98.5	
Gly	1.5	3.3	1.1	10.9	8.1	5.1	89.8	105.7	99.0	
Ser	1.3	1.6	1.7	7.0	7.1	4.8	104.3	115.8	103.3	
Lys	6.7	2.6	4.6	10.8	12.4	8.6	116.3	89.5	101.6	
Cit	1.8	1.7	1.9	6.9	6.3	4.2	106.4	104.1	99.1	
Nov	1.9	1.2	0.5	7.9	8.5	6.4	105.3	108.9	98.4	
Orn	1.4	5.8	9.0	13.5	6.0	15.3	96.1	117.7	112.5	
Cys	5.5	4.5	3.8	9.5	7.3	11.2	110.6	95.4	100.8	

表 5 电离辐射对 SD 大鼠血浆中氨基酸代谢的影响

Table 5 Effect of ionization radiation on amino acid metabolism in SD rat plasma										μmol/L
Amino acid	Control (n = 14)			4 Gy (n = 12)			8 Gy (n = 12)			
Trp	63.69 ± 14.54			72.11 ± 16.27			73.72 ± 16.61			
His	77.09 ± 15.00			92.68 ± 11.28 *			78.28 ± 10.54 #			
Arg	5327.73 ± 2477.39			4552.29 ± 967.43			7161.39 ± 2316.21 * , ##			
Tyr	267.02 ± 62.39			313.17 ± 20.65 *			391.65 ± 41.55 ** , ##			
Cy2	8.60 ± 4.12			7.74 ± 5.83			7.00 ± 7.19			
Phe	62.92 ± 10.44			76.48 ± 10.01 **			74.87 ± 11.42 **			
Ala	411.41 ± 104.17			517.98 ± 99.26 **			480.24 ± 93.30			
Gln	2077.21 ± 309.67			2998.45 ± 366.10 **			2844.27 ± 396.72 **			
AIB	72.42 ± 24.39			71.56 ± 17.30			67.87 ± 10.13			
Hyp	67.52 ± 9.49			59.47 ± 6.59 *			49.91 ± 3.66 ** , ##			
Asn	59.43 ± 10.78			61.91 ± 12.38			70.79 ± 11.60 *			
Glu	160.79 ± 100.73			175.54 ± 61.65			162.43 ± 85.01			
Thr	227.19 ± 94.02			340.92 ± 77.71 **			370.82 ± 77.77 **			
Leu	158.42 ± 35.26			195.04 ± 28.56 *			168.35 ± 37.41			
Val	178.39 ± 34.91			217.27 ± 31.10 *			224.57 ± 44.14 **			
Pro	183.72 ± 52.76			191.31 ± 40.36			250.99 ± 48.99 ** , ##			
Ile	86.16 ± 19.08			97.44 ± 15.16			94.93 ± 23.86			
Asp	11.84 ± 3.60			12.97 ± 5.00			13.59 ± 9.27			
Gly	189.46 ± 32.71			236.38 ± 23.69 **			233.11 ± 34.08 **			
Ser	261.28 ± 49.44			361.56 ± 60.15 **			401.15 ± 72.91 **			
Lys	616.02 ± 87.82			874.58 ± 179.89 **			717.61 ± 104.04 * , ##			
Cit	44.52 ± 8.46			35.98 ± 2.97 **			33.78 ± 5.28 **			
Orn	109.98 ± 15.29			104.98 ± 19.10			112.31 ± 29.40			
Cys	19.98 ± 9.92			32.70 ± 5.65 **			40.04 ± 11.48 **			

Note : * . significant difference at $P < 0.05$ compared to control ; ** . significant difference at $P < 0.01$ compared to control ; # . significant difference at $P < 0.05$ compared to that of the 4 Gy ; ## . significant difference at $P < 0.01$ compared to that of the 4 Gy .

(PKU)^[33]、神经精神疾病^[34]和肝肾疾病^[35]的诊断和治疗中的重要作用近年来报道较多。辐射暴露后,血浆中 Phe 和 Tyr 显著性上升或许与急性电离辐射所致大鼠食欲减退、精神萎靡有关。从表 5 可以看出,急性电离辐射使血浆中大部分氨基酸呈上升趋势,但也有少许氨基酸呈下降趋势。例如,辐射可使大鼠血浆中 Hyp 显著降低,并表现出一定的剂量效应关系。Hyp 是胶原肽链合成后在脯氨酸羟化酶的作用下将肽链上的脯氨酸羟化而形成的,约占胶原成分的 10%^[36],因而在各种组织、血浆和尿液中的变化成为与胶原代谢相关的一个重要指标^[37]。有报道指出在肾脏中 Hyp 是合成 Ser 的主要前体,而 Gly 是中间体^[38]。由表 5 可以看出,电离辐射使血浆中的 Ser 和 Gly 显著性增加,表现出与 Hyp 变化相反的特点。这或许与急性辐射导致肾功能发生障碍有关。与 Hyp 变化趋势相同,辐射暴露可使大鼠血浆中 Cit 呈显著下降趋势。Cit 是一种非蛋白质氨基酸,是小肠上皮细胞代谢的终端含氮产物^[39],它在调节蛋白合成和氧化应激方面具有重要的作用^[40]。血浆中的 Cit 已经成为小肠上皮细胞数量和功能有关的生物标记物^[41,42]。并且在多起电离辐射事故中,血浆中 Cit 含量已作为胃肠损伤指标用于辐射损伤生物剂量估计研究中^[43,44]。小肠是一个对电离辐射高度敏感的组织,电离辐射可导致小肠上皮细胞严重受损进而影响其吸收功能。射线既可以使蛋白质分子结构破坏,又可使蛋白质代谢发生紊乱。作为蛋白质的基本构成单位,电离辐射对氨基酸的代谢影响比较复杂,在血浆中的变化包含上升、下降或者先上升后下降或者先下降再上升,其复杂变化亦体现在表 5 中。鉴于电离辐射所致氨基酸变化的复杂性,本文利用多变量统计分析 OSC-PLS 方法^[45]对对照组大鼠和电离辐射组大鼠进行了分类研究,结果如图 3 所示。该模型的相关参数 $A = 3$, $R^2 Y = 0.959$, $Q^2 Y = 0.908$, $R^2\text{-intercept} = 0.29$ (< 0.4), $Q^2\text{-intercept} = -0.42$ (< 0.05), 置换检测次数为 100 次。其中 A 为模型的主成分数, $R^2 Y$ 代表模型对原数据矩阵中 Y 变量的保留程度, $Q^2 Y$ 为模型的稳定性和预测性, R^2 -和 Q^2 -intercept 表示在置换检测中模型是否过拟合。结果表明,上述模型具有良好的预测性和稳定性^[46]。从图 3 可以看出,随着电离辐射暴露剂量的增加,辐射组与对照组之间的分离愈加明显,亦即辐射可导致血浆中氨基酸代谢发生紊乱,并且其紊乱程度与电离辐射损伤程度正相关。其中一些氨基酸有可能成为潜在的辐射损伤标记物。但仍有许多

工作需要深入开展,包括电离辐射剂量-效应关系,辐射剂量率的影响和射线种类的影响等。

图 3 LC-MS/MS 法分析大鼠血浆中氨基酸数据的
OSC-PLS 模型分类图谱

Fig. 3 Scores of biplots of OSC-PLS of amino acids in
rat plasma analyzed by LC-MS/MS

3 结论

本研究成功建立了用于生物样本中氨基酸测定的 SPE-HPLC-ESI MS/MS 方法,并将该方法应用于电离辐射对大鼠血浆中氨基酸含量影响的研究。本文采用 SCX-SPE 替代传统的简单稀释直接进样方法,有效降低了复杂生物样本中的基质效应。如果采用 96 孔板式 SPE 柱,将使生物样本的高通量制备成为可能,因此具有重要的科学意义与应用前景。此外,基于该方法的电离辐射损伤动物模型的研究结果也为筛选新的急性辐射损伤标记物提供了重要的实验依据。

参考文献:

- [1] Wu G. Amino Acids, 2009, 37(1):1
- [2] Pali S S, Kays C E, Deval C, et al. Amino Acids, 2009, 37(1):79
- [3] Curis E, Crenn P, Cynober L. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2007, 10(5):620
- [4] Reilly A A, Bellissario R, Pass K A. Clin Chem, 1998, 44(2):317
- [5] Han X F, Wang L X, Yang Q X, et al. Chinese Journal of Chromatography (韩晓菲, 王龙星, 杨乾棚, 等. 色谱), 2011, 29(4):330
- [6] Gatti R, Gioia M G. Biomed Chromatogr, 2008, 22(2):207
- [7] Zoppa M, Gallo L, Zaccchello F, et al. J Chromatogr B, 2006, 831(1/2):267
- [8] Armstrong M, Jonscher K, Reisdorph N A. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21(16):2717
- [9] Waterval W A, Scheijen J L, Ortmans-Ploemen M M, et al. Clin Chim Acta, 2009, 407(1/2):36
- [10] Piraud M, Vianey-Saban C, Bourdin C, et al. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005, 19(22):3287

- [11] Van Eeckhaut A , Lanckmans K , Sarre S , et al. J Chromatogr B , 2009 , 877(23) : 2198
- [12] Souverain S , Rudaz S , Veuthey J L. J Chromatogr A , 2004 , 1058 (1/2) : 61
- [13] Chambers E , Wagrowski-Diehl D M , Lu Z , et al. J Chromatogr B , 2007 , 852(1/2) : 22
- [14] Ismaiel O A , Zhang T , Jenkins R G , et al. J Chromatogr B , 2010 , 878(31) : 3303
- [15] Antignac J P , De Wasch K , Monteau F , et al. Anal Chim Acta , 2005 , 529(1/2) : 129
- [16] Niessen W M , Manini P , Andreoli R. Mass Spectrom Rev , 2006 , 25(6) : 881
- [17] Matuszewski B K , Constanzer M L , Chavez-Eng C M. Anal Chem , 1998 , 70(5) : 882
- [18] Matuszewski B K , Constanzer M L , Chavez-Eng C M. Anal Chem , 2003 , 75(13) : 3019
- [19] Jemal M , Schuster A , Whigan D B. Rapid Commun Mass Spectrom , 2003 , 17(15) : 1723
- [20] Wang S , Cyronak M , Yang E. J Pharm Biomed Anal , 2007 , 43(2) : 701
- [21] Pucci V , Di Palma S , Alfueri A , et al. J Pharm Biomed Anal , 2009 , 50(5) : 867
- [22] Chambers E , Wagrowski-Diehl D M , Lu Z , et al. J Chromatogr B , 2007 , 852(1/2) : 22
- [23] Marchi I , Rudaz S , Veuthey J L. J Pharm Biomed Anal , 2009 , 49(2) : 459
- [24] Wu J , Qian X , Yang Z , et al. J Chromatogr A , 2010 , 1217 (9) : 1471
- [25] Cuadros-Rodríguez L , Bagur-González M G , Sánchez-Vinas M , et al. J Chromatogr A , 2007 , 1158(1/2) : 33
- [26] Unterwurzacher I , Koal T , Bonn G K , et al. Clin Chem Lab Med , 2008 , 46(11) : 1589
- [27] Piraud M , Vianey-Saban C , Petritis K , et al. Rapid Commun Mass Spectrom , 2003 , 17(12) : 1297
- [28] Rogalewicz F , Hoppilliard Y , Ohanessian G. Int J Mass Spectrom , 2000 , 195/196 : 565
- [29] Rogalewicz F , Hoppilliard Y. Int J Mass Spectrom , 2000 , 199(1/3) : 235
- [30] Spanik I , Horvathova G , Janacova A , et al. J Chromatogr A , 2007 , 1150(1/2) : 145
- [31] Liu Y , Zhang W , Yang Y. Talanta , 2008 , 77(1) : 412
- [32] Liu Y. J Liq Chromatogr Relat Technol , 2006 , 29(10) : 1405
- [33] Chace D H , Sherwin J E , Hillman S L , et al. Clin Chem , 1998 , 44(12) : 2405
- [34] Ehrlich S , Franke L , Schneider N , et al. Int J Eat Disord , 2009 , 42(2) : 166
- [35] Dejong C H , van de Poll M C , Soeters P B , et al. J Nutr , 2007 , 137(6 Suppl 1) : 1597S
- [36] Morleo M A , Musi E. Boll Chim Farmaceutico , 1993 , 132 (8) : 281
- [37] Rekhter M D , Hicks G W , Brammer D W , et al. Circ Res , 2000 , 86(1) : 101
- [38] Lowry M , Hall D E , Brosnan J T. Metabolism , 1985 , 34 (10) : 955
- [39] Lutgens L , Lambin P. World J Gastroenterol , 2007 , 13 (22) : 3033
- [40] Cynober L , Moinard C , De Bandt J P. Clin Nutr , 2010 , 29 (5) : 545
- [41] Crenn P , Vahedi K , Lavergne-Slove A , et al. Gastroenterology , 2003 , 124(5) : 1210
- [42] Lutgens L C , Deutz N E , Gueulette J , et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys , 2003 , 57(4) : 1067
- [43] Bertho J M , Roy L , Souidi M , et al. Radiat Res , 2008 , 169 (5) : 543
- [44] Bertho J M , Roy L , Souidi M , et al. Biomarkers , 2009 , 14 (2) : 94
- [45] Wold S , Antti H , Lindgren F , et al. Chemometr Intell Lab , 1998 , 44(1/2) : 175
- [46] Li X , Lu X , Tian J , et al. Anal Chem , 2009 , 81(11) : 4468