

大鼠血浆中痕量氨基酸的 柱前衍生-高效液相色谱串联质谱测定

赵先恩^{1,4} 尤进茂^{1,2} 刘洪珍³ 索有瑞^{*1}

¹ (中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001) ² (曲阜师范大学化学科学学院, 曲阜 273165)
³ (曲阜师范大学体育学院, 曲阜 273165) ⁴ (中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘 要 以 1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙基氯甲酸酯 (BCEOC) 作为柱前荧光衍生试剂, 在 Hypersil BDS C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) 反相色谱柱上, 荧光检测波长为 390 nm (激发波长为 333 nm), 采用梯度洗脱实现了 20 种氨基酸标准品衍生物的分离检测。20 种组分的线性范围为 51.6 fmol ~ 105.6 pmol, 线性回归系数均大于 0.9995; 检出限为 6.3 ~ 177.6 fmol (S/N = 3.1)。经柱后串联质谱电喷雾电离源 (ESI Source) 实现了各组分的质谱鉴定, 并以酪氨酸 (Tyr) 衍生物为例进行了质谱裂解机理解析。对 A、B、C 三组 (A: 安静对照组; B: 运动力竭即刻组; C: 力竭恢复 12 h 组) 24 只大鼠血浆中氨基酸的定量测定结果表明, 运动力竭即刻较安静状态大鼠血浆氨基酸含量明显增加; 力竭恢复 12 h 后血浆氨基酸水平基本恢复到运动前状态。方法的灵敏度高、重现性好, 为大鼠血浆中氨基酸的测定提供了一种新方法。

关键词 大鼠血浆, 氨基酸, 柱前衍生, 高效液相色谱串联质谱, 荧光检测

1 引言

氨基酸不仅是人类和动植物必需的营养来源, 而且是调节机体生理活动的重要物质。近年来的研究表明, 兴奋性与抑制性氨基酸递质在运动生理学^[1]和脑缺血的病理生理过程^[2]中具有重要作用; 人体内氨基酸的含量变化与多种疾病有密切关系, 血清中支链氨基酸与芳香氨基酸之比 (BCAA/AAA) 已被广泛应用于肝病氨基酸代谢异常的判断^[3,4]。因此, 氨基酸的痕量测定对运动生理学、临床医学、神经生理学、食品科学、疾病诊断及控制等具有重要意义。

多数氨基酸在紫外-可见光区没有吸收或吸收很弱, 光度法难以准确测定。近年来, 柱前衍生液相色谱荧光检测法得到广泛应用。主要的柱前衍生试剂有邻苯二甲醛 (OPA)^[5,6]、氯甲酸苄酯 (FMOC-Cl)^[7]、6-氨基喹啉基-N-琥珀酰亚胺碳酸酯 (AQC)^[8]及异硫氰酸苯酯 (PITC)^[9]等, 但 OPA 不与二级胺反应且重现性和衍生物的稳定性较差, FMOC-Cl 虽然已被广泛应用, 但衍生后需经萃取消除过量试剂的干扰, 操作繁琐且易造成疏水衍生物的丢失, AQC 在水中的荧光量子效率很低, 不利于梯度洗脱。PITC 衍生反应速度快, 产物单一、稳定, 但只能用紫外检测, 检出限大约 1 pmol, 灵敏度不够高^[10]。前期工作已经用 1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙基氯甲酸酯 (BCEOC) 作为柱前衍生试剂成功地分析了牛血清白蛋白、瓜子、苔藓中的氨基酸^[11,12], 本实验采用 BCEOC 作为衍生试剂测定了 3 种状态下 (安静、运动力竭即刻、力竭恢复 12 h) 大鼠血浆中的氨基酸, 从兴奋性与抑制性氨基酸神经递质及支链与芳香氨基酸的角度分析了运动对大鼠血浆中氨基酸的影响。结果显示, 该法灵敏度高, 重现性好, 为血浆中氨基酸的分析检测提供了一种新手段。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

1100 型高效液相色谱-质谱联用仪 (Agilent 公司), 配备四元梯度泵、在线真空脱气机、荧光检测器、100 位自动进样器和电喷雾电离源 (ESI); 650-10S 型荧光分光光度计 (日本日立公司)。

2006-11-24 收稿; 2007-02-02 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 20075016) 和国家“863”计划引导项目 (No. 2004AA001440) 资助

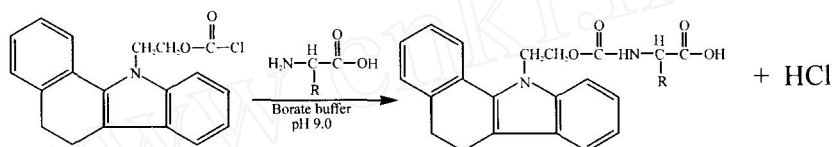
* E-mail: yrsuo@163.com

1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙基氯甲酸酯 (BCEOC, 自制)^[11,12], 20 种氨基酸标准样品 (Sigma 公司); 光谱纯级乙腈 (德国 Merck 公司), 硼酸、盐酸、氢氧化钠 (北京化学试剂厂), 其它试剂均为分析纯。Wistar 雄性大鼠 (山东鲁南制药集团有限公司实验动物中心, 体重 180 ~ 220 g, 运动训练由曲阜师范大学体育学院刘洪珍完成); 纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制 称取定量氨基酸标准品, 先用少量 6 mol/L HCl 溶解后, 再用 6 mol/L NaOH 溶液调至中性, 用 pH 9.0 硼酸缓冲溶液配成 0.01 mol/L 的溶液。实验操作液氨基酸标准品 (50 μmol/L) 用光谱级乙腈稀释而成。称取 32.6 mg BCEOC, 用无水乙腈定容至 10 mL, 浓度为 0.01 mol/L, 低浓度的衍生试剂操作液 (1.0×10^{-3} mol/L) 用乙腈稀释。

2.2.2 标准品的衍生 2 mL 安培瓶中依次加入 160 μL 乙腈, 300 μL 硼酸缓冲溶液 (pH 9.0), 15 μL 混合氨基酸标品, 60 μL 衍生试剂溶液, 混匀封口后于 40 °C 水浴中反应 10 min, 取出加入 10 μL 30% 乙酸溶液调至 pH 5~7 后, 即可直接进样分析。衍生反应如下:



2.2.3 色谱质谱条件 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm, 大连依利特公司)。流动相 A: 30% 乙腈水溶液 (含有 30 mmol/L 甲酸, 用氨水调至 pH 3.7); 流动相 B: 50% 乙腈; 流动相 C: 95% 乙腈。流动相流速 1.0 mL/min, 进样量 10 μL, 柱温恒定为 30 °C。荧光激发和发射波长分别为 333 nm 和 390 nm。梯度洗脱程序见表 1。

电喷雾电离源 (ESI source), 喷雾压力 0.24 MPa, 干燥气流量为 9 L/min, 干燥气温度 350 °C, 毛细管电压 3500 V^[13]。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间 Time (min)	A (%)	B (%)	C (%)	时间 Time (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0	70	30	0	40	0	80	20
15	55	45	0	50	0	20	80
20	2	98	0	55	0	5	95
28	2	96	2	57	0	0	100
28.3	2	88	10	65	0	0	100
30	2	83	15				

2.2.4 大鼠分组及运动方案 大鼠 24 只适应性训练一星期, 采用国产电动鼠类跑台进行, 跑台速度 10 m/min, 运动时间 20 min/d。一星期后按体重随机分为: A 组 (安静对照组)、B 组 (运动力竭即刻组) 和 C 组 (力竭恢复 12 h 组) 3 组 (每组 8 只)。在电动跑台速度为 10 m/min 情况下使 B、C 两组大鼠运动至力竭 (力竭判断标准: 采用跑台方式, 动物不能保持持续运动, 腹部贴近跑台, 四肢不能支撑躯体, 刺激驱赶无效, 从跑台取下大鼠, 腹部朝上放置, 大鼠不能翻身, 精神呆滞, 反应迟钝); B 组在力竭即刻状态取血; C 组力竭恢复 12 h 后同法取血; A 组在安静状态下取血。

2.2.5 大鼠血浆中氨基酸的提取 各组大鼠分别在其相应状态下断头取血, 抗凝后室温静置 10 min, 采用离心机加速红细胞沉淀 (3000 r/min, 15 min), 取上清血浆。取 200 μL 血浆置于 5 mL 塑料离心管内, 加入等体积 5% HClO₄, 加盖后于旋涡混匀器上混匀 30 s, 室温下放置 10 min, 以充分沉淀血浆中的蛋白质, 然后 18000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 用 20% NaOH 水溶液调至 pH 8, -80 °C 低温保存待测。

2.2.6 样品测定方法 采用外标法定量。通过优化建立标准品的衍生、色谱分离、质谱鉴定方法, 得出了 20 种氨基酸的线性回归方程, 以此对未知样品进行定量分析。依照最优化的方法, 对各组大鼠血浆

样品逐一测定,经线性方程计算得出各样品中氨基酸的含量。

3 结果与讨论

3.1 衍生条件优化

影响衍生率的主要因素为:缓冲溶液 pH 值、衍生反应时间、衍生温度及衍生试剂用量,优化过程可参考文献 [11, 12],优化结果为:缓冲溶液 pH 9.0,衍生试剂用量为氨基酸总量的 4 倍,在 40 衍生反应 10 min 可达完全衍生。选取 5 种氨基酸作代表绘制了缓冲溶液 pH 值及衍生试剂用量与衍生率的关系图 (见图 1)。

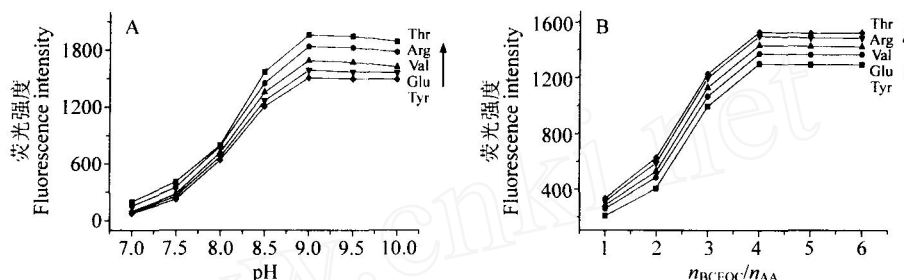


图 1 缓冲溶液 pH 值 (A) 及衍生试剂用量 (B) 对衍生率的影响

Fig 1 Effect of pH of buffer (A) and excess reagent (B) on amino acid derivatization yields

Arg 精氨酸 (arginine); Glu 谷氨酸 (glutamic acid); Thr 苏氨酸 (threonine); Val 缬氨酸 (valine); Tyr 酪氨酸 (tyrosine)。

3.2 色谱分离条件优化

既要快速分离又要使 20 种氨基酸有足够的分离度,以实现准确定量和避免其它组分衍生物的干扰。通过调整梯度洗脱程序及流动相 A 的 pH 值,确定了最优化的分离。由于 BCEOC 荧光环中含一个弱碱性的氮原子,用 pH 3.7 的甲酸氨缓冲液控制流动相的 pH 值,实现了较难分离的 Asp 和 Ser 的近基线分离,其它氨基酸衍生物均获得满意的分离。若流动相 A 的 pH 值小于 3.5 或大于 3.8 时, Asp 和 Ser, BDC-OH 和 Met, Ile 和 Leu 出现共洗脱。同时,弱酸性的流动相溶液能够为柱后串联质谱鉴定的离子化提供氢质子,提高质谱检测灵敏度。

3.3 标准品色谱分离及质谱鉴定

按前述的优化条件,20 种氨基酸衍生物的色谱分离见图 2。采用柱后串联质谱电喷雾电离源进行质谱鉴定,各组分的质谱分子离子峰见表 2。代表性的酪氨酸衍生物质谱图见图 3,其质谱裂解机理解析见图 4。在 20 种氨基酸中,只有丝氨酸 (Ser)、苏氨酸 (Thr)、酪氨酸 (Tyr) 具有羟基。但 Ser 与 Thr 中的醇羟基没有被 BCEOC 衍生,而酪氨酸 (Tyr) 中的酚羟基被衍生了,这是因为酚羟基中的 p 轨道与苯环形成 p-共轭体系,氢氧之间电子密度比醇羟基的低,也就是氢氧之间的结合力较醇羟基弱。因此,酚羟基中的氢较醇羟基中的氢更容易以 H⁺ 形式离解^[14],生成的苯氧负离子在 pH 9.0 的缓冲溶液体系中亲核进攻 BCEOC 分子中的酰氯活性基团,从而达到了酚羟基的衍生。

3.4 稳定性与重现性

取新衍生的同一份标准品衍生液 (50 pmol),分别在室温放置 0、1、2、4、8、16、24 及 72 h 时进行色谱分析,计算得各时间点下各氨基酸衍生物峰面积对 0 h 时的标准偏差值均小于 3.0%,表明衍生物对于常规色谱分析稳定性良好。

在相同洗脱条件下,50 pmol 20 种氨基酸衍生物平行 6 次分析,保留时间和峰面积重现性良好 (表 2)。

3.5 线性回归方程及检出限

进样量在 51.6 fmol ~ 105.6 pmol 范围内,依据峰面积和实际进样量进行线性回归,所得回归方程、相关系数和各种氨基酸衍生物检出限见表 2。各氨基酸衍生物的线性相关系数均大于 0.9995,检出限为 6.3 ~ 177.6 fmol (S/N = 3.1)。AQC 自报道以来已成为广泛使用的氨基酸衍生试剂^[15],本研究对

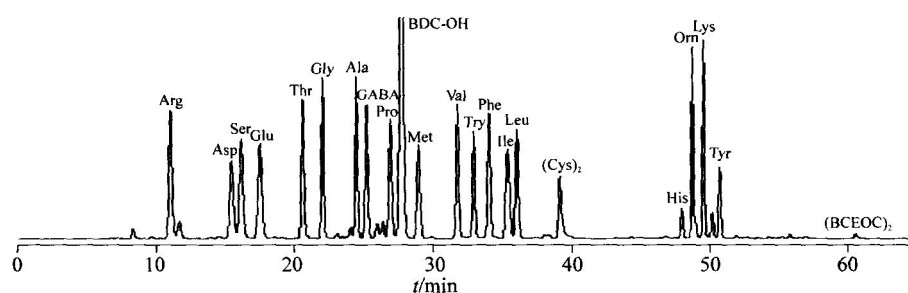


图 2 20种氨基酸衍生物的色谱图

Fig 2 Chromatogram of 20 amino acid derivatives

色谱条件见实验部分 (chromatographic conditions as described in experimental section); Arg (精氨酸 arginine); Asp (天冬酸 aspartic acid); Ser (丝氨酸 serine); Glu (谷氨酸 glutamic acid); Thr (苏氨酸 threonine); Gly (甘氨酸 glycine); Ala (丙氨酸 alanine); GABA (四氨基丁酸 4-amino-butyrac acid); Pro (脯氨酸 proline); Met (蛋氨酸 methionine); Val (缬氨酸 valine); Phe (苯丙氨酸 (phenylalanine); Trp (色氨酸 tryptophan); Ile (异亮氨酸 iso-leucine); Leu (亮氨酸 norLeucine); (Cys)₂ (胱氨酸 cystine); His (组氨酸 histidine); Om (鸟氨酸 omithine); Lys (赖氨酸 lysine); Tyr (酪氨酸 tyrosine); BDC-OH (1,2-苯并-3,4-二氢吡唑-9-羟乙基 1,2-benzo-3,4-dihydrocarbazole-9-ethanol); (BCEOC)₂ (二-(1,2-苯并-3,4-二氢吡唑-9-乙基)碳酸酯 bis-(1,2-benzo-3,4-dihydrocarbazole-9-ethyl) carbonate)。

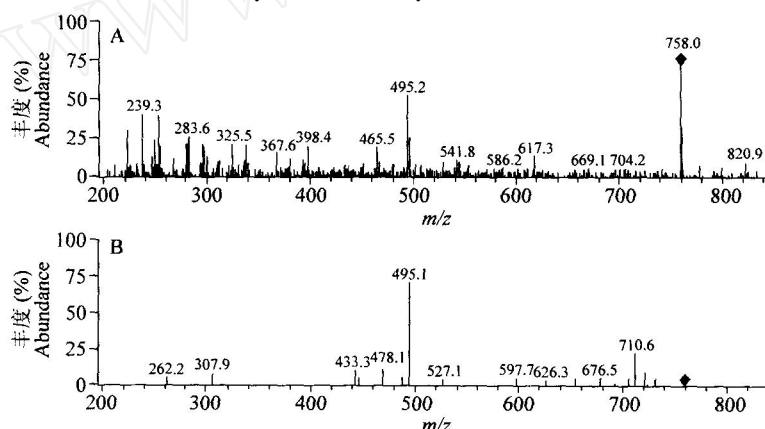


图 3 酪氨酸衍生物的质谱图

Fig 3 MS chromatogram of representative tyrosine derivative

负离子模式 (negative ion mode); A: 分子离子质谱 (molecular ion MS); B: 二级质谱 (MS/MS)。

比了 BCEOC 与 AQC 的检出限,从表 2 中可知, BCEOC 对氨基酸的检出限要比 AQC 低 1 个数量级,可见 BCEOC 灵敏度较高。

3.6 回收率

取同批次购买并相同环境饲喂的大鼠于安静状态取血,每只大鼠的血浆同时分为两等份,其中一份加入 10 μL 1.0 × 10⁻⁴ mol/L 氨基酸标准品,另一份不加。两份血浆按照前述方法提取后进行衍生和测定。每次 3 只重复 3 次,扣除血浆中原有氨基酸,平均回收率为 87.86% ~ 104.7%,回收率令人满意。

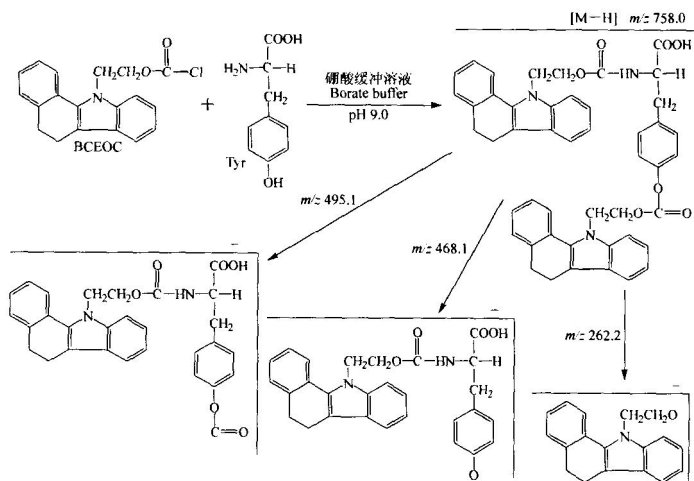


图 4 酪氨酸衍生物质谱裂解机理解析 (负离子模式)

Fig 4 MS cleavage mode of tyrosine derivative (negative ion mode)

表 2 氨基酸衍生物的线性回归方程、相关系数、检出限、质谱数据和重现性

Table 2 Linear regression equations, correlation coefficients, detection limits, MS and reproducibility for retention time and peak area ($n=6$) of amino acid derivatives

氨基酸 Amino acid	$Y=A \cdot X+B$	相关系数 Correlation coefficients	检出限 Detection limits (fmol)		质谱 MS [M+H] ⁺	保留时间 RSD Retention time RSD (%)	峰面积 RSD Peak area RSD (%)
			BCEOC	AQC [*]			
Arg	$Y=28.07X+3.85$	0.9997	12	119	464	0.009	1.32
Asp	$Y=17.15X+0.47$	0.9999	27	311	423	0.012	1.47
Ser	$Y=25.30X+3.89$	0.9995	17	237	395	0.010	1.28
Glu	$Y=24.03X-3.77$	0.9997	20	315	437	0.011	1.32
Thr	$Y=24.86X+3.86$	0.9999	13	162	409	0.006	1.18
Gly	$Y=27.09X+4.75$	0.9999	9.3	293	365	0.005	1.29
Ala	$Y=26.01X+3.94$	0.9999	10	155	379	0.004	1.11
GABA	$Y=25.48X+1.51$	0.9999	12	#	393	0.005	1.20
Pro	$Y=25.77X+3.14$	0.9999	13	278	405	0.004	1.04
Met	$Y=25.95X+2.48$	0.9999	13	74	439	0.007	1.48
Val	$Y=28.04X+9.39$	0.9999	14	57	407	0.006	1.02
Try	$Y=25.90X+9.28$	0.9999	9.2	#	494	0.004	0.86
Phe	$Y=27.01X+9.45$	0.9999	8.3	38	455	0.007	0.96
Ile	$Y=26.68X+4.84$	0.9999	19	47	421	0.005	1.08
Leu	$Y=24.90X+5.46$	0.9999	10	48	421	0.006	1.07
(Cys) ₂	$Y=19.66X-6.20$	0.9998	19	794	ND	0.045	2.29
His	$Y=3.60X+1.63$	0.9998	178	188	734	0.018	1.51
Om	$Y=32.79X+4.08$	0.9999	7.7	#	711	0.013	1.32
Lys	$Y=34.91X+6.24$	0.9998	6.3	112	723 ^{**}	0.009	1.54
Tyr	$Y=15.40X+2.16$	0.9999	16	93	758 ^{**}	0.009	1.43

注 (note): X: 进样量 (injected amount (pmol)); Y: 峰面积 (peak area)。* . 数据来自文献 [15] (data was from literature [15]); ** . 为负离子模式检测 (detected with negative ion mode); # 检出限文献未报道 (detection limits were not reported in corresponding literature); ND. 未检出 (undetected)。

3.7 样品测定及数据分析

3.7.1 样品测定 低温保存的提取液取出解冻后按前述优化的实验条件进行测定, 各组分借助标准品色谱保留时间和柱后串联质谱双重定性。代表性大鼠血浆样品中氨基酸色谱分离见图 5, 峰标注与图 2 相同。3 组大鼠相应状态下血浆中氨基酸含量见表 3, 相关氨基酸含量的比值见表 4。

表 3 不同状态下大鼠血浆中氨基酸含量 (均 ±S, $n=8$, nmol/mL)Table 3 Contents of amino acids in rat serum at different states (均 ±S, $n=8$, nmol/mL)

氨基酸 Amino acid	安静 Quiet	运动力竭即刻 At exercising exhaust	力竭后恢复 12 h 12 h After exercising exhaust	氨基酸 Amino acid	安静 Quiet	运动力竭即刻 At exercising exhaust	力竭后恢复 12 h 12 h After exercising exhaust
Arg	229.2 ±8.5	281.3 ±8.5 [*]	230.8 ±10.6	Val	323.9 ±6.5	371.2 ±12.8 [*]	334.6 ±9.6
Asp	184.5 ±6.6	223.3 ±10.7 [*]	189.3 ±11.4	Trp	109.8 ±0.3	186.7 ±7.2 ^{**}	118.2 ±7.0
Ser	540.5 ±9.7	608.3 ±12.2	549.3 ±14.8	Phe	117.6 ±5.8	166.3 ±7.6 [*]	125.2 ±4.5
Glu	281.6 ±10.3	346.8 ±10.3 [*]	290.5 ±8.8	Ile	157.8 ±3.5	180.8 ±10.3 [*]	149.0 ±3.9
Thr	474.4 ±11.3	539 ±13	476.4 ±7.6	Leu	306.0 ±9.5	352.2 ±10.8 [*]	314.4 ±8.8
Gly	749.1 ±7.8	832.5 ±12.6	740 ±13	(Cys) ₂	75.1 ±4.2	86.7 ±4.6	79.6 ±13.0
Ala	822 ±13	905 ±11	831 ±14	His	877 ±15	978.3 ±8.4	881 ±15
GABA	101.1 ±5.2	182.5 ±10.5 [*]	115.9 ±7.8	Om	89.2 ±6.9	102 ±11	86.7 ±6.6
Pro	582 ±14	664.5 ±7.6	590.3 ±8.7	Lys	213.3 ±8.6	266.7 ±10.9 [*]	221.7 ±7.5
Met	133.5 ±8.4	150.7 ±8.4	136.3 ±6.6	Tyr	132.4 ±6.7	188.6 ±6.3 [*]	140.4 ±4.4

* . 与安静对照组比较 (compared with the control) $P < 0.05$; ** 与安静对照组比较 (compared with the control) $P < 0.01$ 。

3.7.2 数据分析和小结 由表 3 和表 4 可知: (1) 运动力竭即刻组大鼠血浆中 20 种氨基酸含量明显比安静对照组高, 说明力竭性运动使大鼠体内氨基酸代谢增强; 运动力竭后恢复 12 h 组与安静对照组比较差异不大, 大鼠血浆氨基酸含量基本恢复到运动前状态, 无统计学意义。(2) 运动力竭即刻组与安静对照组对比, 大鼠血浆氨基酸含量升高具有显著性 ($P < 0.05$) 的为: Arg, Lys, 兴奋性神经递质 Glu,

表 4 不同状态下大鼠血浆中相应氨基酸的比值

Table 4 Ratio of corresponding amino acids in rat serum at different states

比值 Ratio	安静 Quiet	运动力竭即刻 At exercising exhaust	力竭后恢复 12 h 12 h After exercising exhaust
Glu/GABA	2.79 ± 0.38	1.90 ± 0.34*	2.51 ± 0.35
BCAA/AAA**	2.19 ± 0.16	1.67 ± 0.28*	2.07 ± 0.32

*. 与安静对照组比较 $P < 0.05$, ** . BCAA 是 Leu, Ile, Val 3 种支链氨基酸的总量, AAA 是 Phe, Tyr, Trp 3 种芳香氨基酸的总量 (* compared with the control $P < 0.05$, ** BCAA is the summation of three branched-chain amino acids: Leu, Ile, Val, AAA is the summation of three aromatic amino acids: Phe, Tyr, Trp)。

Asp, 抑制性神经递质 GABA, 支链氨基酸 Val, Ile, Leu, 芳香氨基酸 Phe, Tyr, 升高具有极显著性 ($P <$

0.01) 的为芳香氨基酸 Trp (色氨酸), 可能的原因是: 力竭性运动时, Trp 显著升高, 会促使更多的 Trp 进入血脑屏障; 而 Trp 是带来运动中中枢疲劳的 5 羟色胺 (5-HT) 的合成前体, 这与力竭性运动疲劳的产生相吻合, 与 Bloomstrand 的报道^[16]一致; 有升高趋势, 但与安静态对比无统计学意义的氨基酸为: Ser, Thr, Gly, Ala, Pro, Met (Cys)₂, His 及 Orn。 (3) 运动力竭即刻组与安静对照组对比, 虽然兴奋性神经递质 Glu, Asp, 抑制性神经递质 GABA 的含量都显著增加 ($P < 0.05$) (表 3), 但 Glu 与 Asp 的增加程度比 GABA 小, 导致 Glu/GABA 的比值显著下降 ($P < 0.05$) (表 4), GABA 含量增加对中枢神经元有普遍的抑制作用, 说明大鼠在力竭即刻状态以抑制性为主, Glu/GABA 比值与安静对照组相比明显下降, 这种变化与运动性疲劳的发展相一致, 与文献报道一致^[17]。 (4) 运动力竭即刻组与安静对照组对比, 虽然支链氨基酸 Val, Ile 和 Leu, 芳香氨基酸 Phe, Tyr 和 Trp 含量升高都具有显著性 ($P < 0.05$) (表 3), 但支链氨基酸的增加程度比芳香氨基酸小, 导致 BCAA/AAA 比值显著下降 ($P < 0.05$) (表 4), 这将使某些单胺类中枢抑制性递质前体如 Phe, Tyr 和 Trp 进入脑组织, 引起脑内 5 羟色胺 (5-HT) 等递质的升高, 导致疲劳出现, 与文献报道一致^[18]。

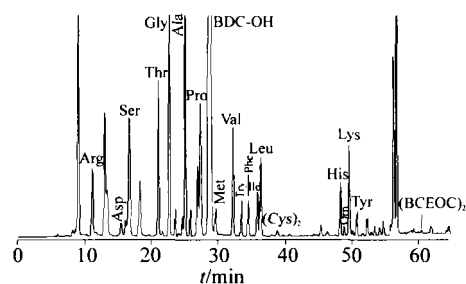


图 5 大鼠血浆中氨基酸衍生生物色谱图

Fig 5 Chromatogram of amino acid derivatives of Wistar mice serum

峰标注与图 2 相同 (peaks as in Fig 2)。

References

- 1 Aguilo A, Castano E, Tauler P. *J. Nutr Biochem.*, **2000**, 11: 81 ~ 86
- 2 Shu P Y, Chou S H, Lin C H. *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **2003**, 88: 93 ~ 101
- 3 Kano T, Nagaki M, Takahashi T, Ohnishi H, Saitoh K, Kimura K, Muto Y. *Gastroenterol JPN*, **1991**, 26(3): 344 ~ 349
- 4 Wang Zhonghui (王忠惠), Wang Huimin (王惠民), Wang Yueguo (王跃国), Li Li (李丽). *J. Mod Lab Med* (现代检验医学杂志), **2005**, 20(2): 16 ~ 18
- 5 Dobashi Y, Santa T, Nakagami K, Imai K. *Analyst*, **2002**, 127: 54 ~ 59
- 6 Nojiri S, Kamata K, Nishijima M. *J. Pharm. Biomed Anal*, **1998**, 16: 1357 ~ 1362
- 7 Bauza T, Blaise A, Daumass F, Cabanis J C. *J. Chromatogr A*, **1995**, 707: 373 ~ 379
- 8 Cohen S A, Deantonis K M. *J. Chromatogr A*, **1994**, 661: 25 ~ 34
- 9 Molnar Perl I. *J. Chromatogr A*, **1994**, 661: 43 ~ 50
- 10 Yu Hong (于泓), Mou Shifen (牟世芬). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2005**, 33(3): 398 ~ 404
- 11 Shi Yunwei (石运伟), Ming Yongfei (明永飞), Wang Caiping (王彩萍), Zhao Xian'en (赵先恩), Zhang Rui (张蕊), You Jimao (尤进茂). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2006**, 34(4): 503 ~ 507
- 12 You J M, Ming Y F, Shi Y W, Zhao X E, Suo Y R. *Talanta*, **2005**, 68: 448 ~ 458
- 13 Simonetta F, Sang W C, Gregory G, Dolnikowski, Jacob S. *Anal Chem.*, **2002**, 74: 4526 ~ 4531
- 14 Wang Xiaolan (汪小兰). *Organic Chemistry* (有机化学). Third Edition (第三版), Beijing (北京): Higher Education Press (高等教育出版社), **1997**: 112 ~ 113
- 15 Cohen S A, Michaud D P. *Anal Biochem.*, **1993**, 211(2): 279 ~ 287
- 16 Bloomstrand E. *Acta Physiol Scand*, **1988**, 133: 115 ~ 121

- 17 Zhong Xingning(钟兴明), Yao Hongen(姚鸿恩). *Chinese Journal of Sports Medicine* (中国运动医学杂志), 2000, 19(4): 404~405
- 18 Zhang Xiaoju(章小菊), Han Huiwan(韩慧婉), Yao Hongen(姚洪恩). *Journal of Beijing Teachers College of Physical Education* (北京体育师范学院学报), 1998, 10(4): 25~29

Pre-column Derivatization High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometric Determination of Trace Level of Amino Acids in Rat Serum

Zhao Xian-En^{1,4}, You Jin-Mao^{1,2}, Liu Hong-Zhen³, Suo You-Rui¹

¹ (Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001)

² (College of Chemistry Science, Qufu Normal University, Qufu 273165)

³ (College of Physical Education, Qufu Normal University, Qufu 273165)

⁴ (Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract A simple and sensitive method to determine trace level amino acids based on the derivatization of 20 amino acids with 1,2-benzo-3,4-dihydrocarbazole-9-ethyl chloroformate (BCEOC) as derivatization reagent on a reversed phase Hypersil BDS C₁₈ column (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) with a gradient elution followed by high performance liquid chromatography via fluorescence detection at 390 nm (excitation wavelength 333 nm) and tandem mass spectrometric identification has been developed. Optimum derivatization, giving the corresponding stable fluorescent derivatives, was obtained by reacting of amino acids with BCEOC at 40 for 10 min in borate buffer (pH 9.0) with 4 times excess of molar reagent. The linear range of 20 amino acids were 51.6 fmol~105.6 pmol, all correlation coefficients >0.9995, detection limits were 6.3 - 177.6 fmol (at signal to noise 3:1, S/N = 3:1). The identification of amino acid derivatives was carried out by post-column tandem mass spectrometry with electrospray ionization (ESI) source, and the MS/MS cleavage mode of representative tyrosine derivative was analyzed. Under all the above optimum experimental conditions, the contents of 20 amino acids in the serum of 3 groups (A: quiet, B: at exercising exhaust, C: 12 h after exercising exhaust) were determined. It is indicated that the contents of 20 amino acids in group B were obviously higher than those in group A, and the contents of amino acids of group C and group A were almost the same. The established method exhibits high sensitivity and excellent reproducibility, and provides a new technology for the determination of amino acids in rat serum.

Keywords Rat serum, amino acids, pre-column derivatization, high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, fluorescence detection

(Received 24 November 2006; accepted 2 February 2007)