

毛细管电动色谱分离手性氨基酸及其在生物样品分析中的应用

付煜荣^{1,2} 颜流水¹ 罗国安^{*1} 陈翠真³ 王义明¹ 张兰桐⁴

¹(清华大学分析中心, 北京 100084) ²(河北北方学院化学教研室, 张家口 075000)

³(北京市眼科研究所, 北京 100005) ⁴(河北医科大学药学院, 石家庄 050017)

摘 要 建立了 MEKC 法分离丙氨酸(Ala)、谷氨酸(Glu)和天门冬氨酸(Asp)三对手性氨基酸,并对大鼠正常组和白内障组晶体和血清中 *D*-Ala、*L*-Ala、*D*-Glu、*L*-Glu、*D*-Asp 和 *L*-Asp 进行定量分析。利用 FITC 柱前衍生,以 β -环糊精(β -CD)作为手性添加剂,激光诱导荧光检测(LIF),优化电泳条件为:气压进样 5 s,分离温度 25 $^{\circ}\text{C}$,分离电压为 20 kV,运行缓冲溶液为 40 mmol/L 硼砂缓冲溶液(pH 9.3),其中包含 50 mmol/L SDS 和 13 mmol/L β -CD。考察了硼砂缓冲溶液浓度、pH 值、分离电压、 β -环糊精浓度对分离的影响。在优化电泳条件下,上述 3 种氨基酸对映体均得到基线分离,并可对大鼠的晶体和血清进行定量分析。本方法操作简单,检测灵敏度高,可用于药品质量监测以及生物样品的分析。

关键词 毛细管电动色谱,激光诱导荧光,氨基酸对映体, β -环糊精,大鼠

1 引言

对映体异构体的分离要求分离技术具有高灵敏度、高选择性和高分辨率。毛细管电动色谱(MEKC)是手性拆分常用的分离模式之一,只需在背景电解质中添加手性选择剂,构建手性环境,即可进行手性拆分。环糊精及其衍生物(CDs)是应用最广泛的手性选择剂^[1,2]。人体中存在 *D*-氨基酸,其含量一般较 *L* 型低,随着检测技术的不断发展,检测极微量 *D*-氨基酸成为可能。文献[3]以气相色谱法研究了 Asp 消旋化的增长率与年龄的相关性。Fisher 等^[4]报道了老年前期痴呆患者脑室和腰椎脑脊液中存在游离的 *D*-氨基酸。某些 *D*-氨基酸与疾病的相关性正引起人们的重视。

本实验所研究的丙氨酸、谷氨酸和天门冬氨酸是与生命科学密切相关的手性氨基酸。丙氨酸(Ala)、谷氨酸(Glu)和天门冬氨酸(Asp)是分子量较小且均不含苯环的氨基酸,因而手性拆分难度较大。本实验利用荧光素异硫氰酸酯(FITC)进行柱前衍生化的方法,采用 MEKC 分离模式,以十二烷基硫酸钠(SDS)为准固定相,以 β -环糊精(β -CD)作为手性选择添加剂,拆分 *D*、*L*-Ala、*D*、*L*-Glu 和 *D*、*L*-Asp,并以高灵敏度的激光诱导荧光(LIF)检测器进行检测。本方法也可用于正常组和白内障组大鼠晶体、血清中 3 种氨基酸 *D*、*L* 含量的分析,为临床检验和深入研究发病机理提供重要的理论依据。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

P/ACE 5500 型毛细管电泳仪及激光诱导荧光检测器(美国 Beckman 公司), λ_{ex} 488 nm, λ_{em} 520 nm;未涂渍石英毛细管柱,37 cm $\times$ 50 μm i. d.,(河北永年光纤厂);pH 计(Beckman 公司);CX-100 型超声波清洗机(北京市医疗设备二厂);高速离心机(上海安亭科学仪器厂), 1.6×10^4 r/min。硼砂($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 分析纯,北京红星化工厂)。十二烷基硫酸钠(SDS, USA, 电泳级);氢氧化钠,分析纯(北京化工厂);荧光素异硫氰酸酯(FITC, $M_r = 384.1$)、 β -CD(美国 Sigma 公司),含量大于 99%;*D*-Asp、*D*-Glu 和 *D*-Ala 为美国 Fluka 公司产品,纯度大于 99.8%。*L*-Asp、*L*-Glu 和 *L*-Ala(上海第二军医大学化学试剂研究室),生化试剂。实验用水为二次去离子水。

正常组和白内障组 Wistar 大鼠晶体、血清由北京眼科研究所陈翠真研究员提供,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下冰冻保存。鼠龄为 30 天龄,白内障模型用链脲佐菌素诱导^[5]。

2003-12-20 收稿;2004-05-09 接受

本文系国家 973 项目资助(No. 2001CB510306)

2.2 生物样品预处理

- 2.2.1 血清预处理 取一定体积的血清 (<100 μL) 于 1 mL 离心管中,加入 5 倍体积的丙酮去蛋白,静置 1 min, 1.2×10^4 r/min 高速离心 20 min,取全部上清液,0.45 μm 滤膜过滤后,衍生化和 CE 分析。
- 2.2.2 晶体预处理 准确称取 10.00 mg 冰冻保存的大鼠晶体(湿重)于匀浆套管,加入 300 μL 40 mmol/L 硼砂缓冲溶液(pH 9.3),冰冻匀浆 10 min,将溶液转移至 1 mL 离心管中,用 200 μL 上述缓冲液洗涤匀浆棒和套管,合并溶液,加 1 滴 35 %HClO₄ 去蛋白,静置 1 min, 1.2×10^4 r/min 高速离心 20 min,取上清液,以 1 mol/L NaOH 调节 pH 为 9.3,经 0.45 μm 滤膜过滤后,进行衍生化和 CE 分析。

2.3 化学衍生化

依据文献[4,6]并做改进,取一定量待测样品,加入过量的浓度为 2.5×10^{-3} mol/L 荧光素异硫氰酸酯(FITC)的丙酮溶液(加入的 FITC 的量为待测样品中氨基酸总含量的 8~10 倍,大鼠晶体和血清中氨基酸总量参考文献[7]),加入丙酮,使 FITC 和丙酮的体积之和为 400 μL,2 滴 0.5 %丙酮-吡啶溶液,加入 40 mmol/L、pH = 9.3 的硼砂缓冲溶液至 1 mL。在 (40 ±0.5) °C 下避光恒温 12 h,即可上机测定。

2.4 电泳条件

- 2.4.1 运行缓冲溶液 40 mmol/L 硼砂溶液 (pH = 9.3),其中包含 13 mmol/L 的 β-CD、50 mmol/L 的 SDS,电泳前用 0.45 μm 滤膜过滤,并超声脱气。
- 2.4.2 分离条件 将衍生化后的样品以 3.0 kPa 气压进样 5 s,分离电压为 20 kV (540 V/cm),电泳温度为 25 °C,电泳时间 10 min,激光诱导荧光(LIF)检测,氩离子激光器,激发波长 488 nm,发射波长 520 nm。

2.5 标准曲线的绘制

配制 50.00 mg/L 标准品水溶液各 50.0 mL (4 °C 下存放);用上述标准储备液配制 2.5、5.0、10.0、15.0、20.0、30.0、40.0 及 50.0 mg/L 系列标准溶液各 10.0 mL;取 40 μL 系列标准溶液,按“2.3”进行衍生化,以优化后的电泳条件“2.4”进行分离分析,LIF 检测,记录吸收峰面积扣除试剂空白值。以浓度 *C* 对吸收峰面积 *A* 作图。6 种物质的回归方程、相关系数 *r*、线性范围和检出限 (*S*/*N* = 3) 见表 1。

表 1 6 种氨基酸回归方程、线性范围和检出限 (*n* = 6)
Table 1 The regressive equation, linear ranges and determination limits of amino acids (*n* = 6)

氨基酸 Amino acids	回归方程 Regression equation	相关系数 <i>r</i>	线性范围 (mg/L) Linear ranges	检出限 (mg/L) Determination limits
<i>D</i> -Ala	<i>A</i> = 278.4 <i>C</i> - 2.446	0.9994	0.05 ~ 2.00	0.005
<i>L</i> -Ala	<i>A</i> = 271.4 <i>C</i> - 5.684	0.9990	0.12 ~ 2.00	0.010
<i>D</i> -Gu	<i>A</i> = 158.3 <i>C</i> - 13.68	0.9991	0.12 ~ 2.00	0.050
<i>L</i> -Gu	<i>A</i> = 99.14 <i>C</i> - 5.691	0.9993	0.12 ~ 2.00	0.050
<i>D</i> -Asp	<i>A</i> = 61.03 <i>C</i> - 1.425	0.9993	0.12 ~ 1.50	0.050
<i>L</i> -Asp	<i>A</i> = 67.77 <i>C</i> - 1.515	0.9991	0.12 ~ 1.50	0.050

A: peak area; *C*: (mg/L)

2.6 回收率测定

取已知含量的血清 20 μL,称取 10.0 mg 已知含量的晶体 3 份,分别加入浓度为 20 mg/L 的 6 种标准溶液 40、30 和 20 μL,按“2.2”进行预处理,按“2.3”衍生化和按“2.4”进行电泳分析,测得回收率及 RSD 见表 2 和表 3。

表 2 分析血清方法的回收率和精密度
Table 2 The recovery and precision from rat serum

成分 Components	回收率 Recovery (%, <i>n</i> = 6)	RSD (%)	RSD (%)	
			日内 Intra-day (<i>n</i> = 9)	日间 Inter-day (<i>n</i> = 5)
<i>D</i> -Ala	100.7	4.1	4.2	4.6
<i>L</i> -Ala	100.4	4.8	2.3	3.5
<i>D</i> -Gu	102.0	4.7	3.8	4.7
<i>L</i> -Gu	96.3	3.6	4.9	6.4
<i>D</i> -Asp	102.0	4.7	3.2	2.7
<i>L</i> -Asp	100.6	5.2	2.2	3.0

表 3 分析晶体方法的回收率和精密度
Table 3 The recovery and precision from rat lens

成分 Components	回收率 Recovery (%, <i>n</i> = 6)	RSD (%)	RSD (%)	
			日内 Intra-day (<i>n</i> = 9)	日间 Inter-day (<i>n</i> = 5)
<i>D</i> -Ala	101.9	3.5	2.9	2.2
<i>L</i> -Ala	99.6	5.5	4.5	5.0
<i>D</i> -Gu	101.7	5.1	4.9	4.8
<i>L</i> -Gu	97.6	4.2	2.2	4.2
<i>D</i> -Asp	102.8	4.5	3.4	5.4
<i>L</i> -Asp	101.0	5.9	4.8	4.7

2.7 精密度考察

选定某一浓度的血清样品和晶体样品,按“2.2”进行预处理,按“2.3”衍生化,按“2.4”进行电泳分析,于一日内重复测定 9 次,计算 *D*-Ala、*L*-Ala、*D*-Glu、*L*-Glu、*D*-Asp 和 *L*-Asp 日内精密度;于同一条件连续测定 5 日,每日测 3 次,计算 6 种组分的日间精密度。血清和晶体中 6 种组分测定的精密度分别见表 2 和表 3。

3 结果与讨论

3.1 电泳条件的优化

依文献[6~8]选择硼砂缓冲液为背景电解质,包含 50 mmol/L SDS。本实验采用 50 μm $\times$ 37 cm 融硅毛细管进行电泳条件的优化;考察了背景电解质的浓度、pH 值、电压和手性选择剂的浓度对分离的影响。

3.1.1 背景电解质(BGE)浓度对拆分的影响 考察了硼砂缓冲溶液(pH = 9.3)浓度分别为 20、40、60 mmol/L 时,对 3 种氨基酸对映体拆分的影响,其它条件同“2.4”。结果显示,3 种浓度条件下,*D*、*L*-Glu、*D*、*L*-Asp 均能很好的被分离。而对于 *D*、*L*-Ala,只有 40 mmol/L 的硼砂缓冲溶液可以使这 3 种对映体同时达到基线分离,且也可与其它试剂峰达到基线分离。*D*、*L*-Ala 的 R_s 为 1.57,*D*、*L*-Glu 的 R_s 为 3.15,*D*、*L*-Asp 的 R_s 为 2.77。谱图见图 1。

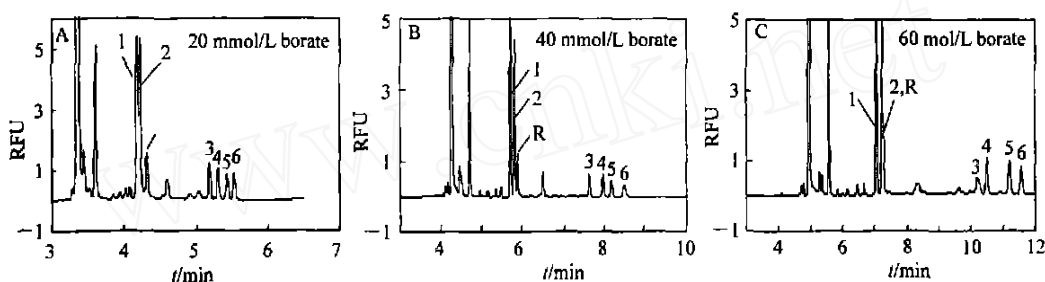


图 1 不同硼砂浓度对 3 种氨基酸对映体分离的影响

Fig. 1 Effects of different concentration of borate buffer on separation

电泳条件(condition): pH 9.3 的硼砂缓冲液(borate buffer at pH 9.3) 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS): 50 mmol/L; β -环糊精(β -cyclodextrin (β -CD)): 13 mmol/L; 电压(voltage): 20 kV; 柱温(temperature): 25 $^{\circ}\text{C}$; 气压进样(pressure injection): 5 s; 激光诱导荧光检测(laser-induced fluorescence (LIF) detector)。6 种组分浓度均为 1 mg/L (the contents of components were 1 mg/L)。1. *D*-alanine (*D*-Ala); 2. *L*-alanine (*L*-Ala); 3. *D*-glutamic acid (*D*-Glu); 4. *L*-glutamic acid (*L*-Glu); 5. *D*-aspartic acid (*D*-Asp); 6. *L*-aspartic acid (*L*-Asp); R 及其余峰均为系统峰(system peaks)。

3.1.2 背景电解质的 pH 值对分离的影响 在其它条件不变的情况下,40 mmol/L 硼砂缓冲溶液用 1 mol/L NaOH 及 1 mol/L H_3BO_3 调节 pH 值分别为 8.5、9.0、9.3、10.0 和 10.5,考察不同 pH 值的缓冲液对分离的影响。在所研究的 3 种氨基酸中,*D*、*L*-Ala 最难分离,可能是其相对分子量最小的缘故。实验表明,pH = 8.5 时,*D*、*L*-Ala 未能分离;pH $\geq$ 9.3 可达到基线分离。但随着 pH 增大,电流明显增大,且迁移时间延长。电流越大,则产生的焦耳热越多,引起区带展宽,分离度下降。为此实验选择背景电解质的 pH 值为 9.3。

3.1.3 分离电压对分离的影响 在其它条件不变的情况下,本实验考察了分离电压为 10、15、20 和 25 kV 时对分离的影响。实验表明,10、15 和 20 kV 均可达到基线分离。但随着分离电压的降低,迁移时间延长。10 kV 时,分离时间达 20 min。增大分离电压,迁移时间变短,分离度降低。25 kV 时,*L*-Ala 峰与试剂峰重合。且增大电压,电流也随之增大。分离电压为 25 kV 时,电流已达 110 μA 。本实验选择分离电压为 20 kV,分离可在 10 min 内完成,电流为 73 μA 。不同电压对分离的影响见图 2。

3.1.4 手性选择剂浓度对拆分的影响 环糊精(CDs)是一类具有较强手性选择性的手性试剂,经过筛选实验,选择 β -CD 作为手性选择剂^[9,10]。考察了 β -CD 的浓度为 4、6、8、10、13 和 16 mmol/L 对拆分的影响,结果显示,当其浓度 $\geq$ 13 mmol/L 时 3 对氨基酸对映体均可达基线分离,而 $<$ 13 mmol/L 时,则不能达基线分离,且随着 β -CD 浓度的减小,分离度明显降低,不同 β -CD 的浓度对分离的影响见图 3。

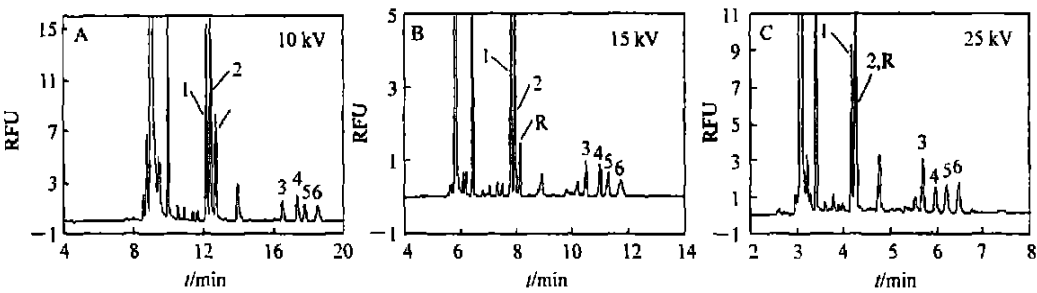


图 2 不同电压对分离的影响
Fig. 2 Effects of different voltage on separation
其它条件同图 1 中 B (Other separation condition and peaks are identical to B in Fig. 1)。

3.2 样品分析结果

实验分析了大鼠的正常组和白内障组晶体、血清中 3 种氨基酸 D、L 含量,样品电泳谱图见图 4,结果见表 4。从表中可看出,血清中正常组 D-Ala、L-Ala、L-Glu、L-Asp 含量较白内障组高 ($P < 0.05$), D-Glu 和 D-Asp 含量两组无显著性差异 ($P > 0.05$); 晶体中 D-Ala 含量正常组较白内障组高 ($P < 0.05$), L-Ala、D-Asp 含量正常组较白内障组低 ($P < 0.05$), D-Glu、L-Glu、L-Asp 含量两组无显著性差异 ($P > 0.05$)。D 型氨基酸在正常生物体内的检出,将有助于进一步揭示生物体的生理生化奥秘。

表 4 正常组和白内障组大鼠血清晶体 D-Ala、L-Ala、D-Glu、L-Glu、D-Asp 和 L-Asp 的含量

Table 4 The serum concentration and lens concentration of D-Ala, L-Ala, D-Glu, L-Glu, D-Asp and L-Asp in control rats and cataract rats

成分 Components	正常组 Control		白内障组 Cataract	
	$\bar{X} \pm SD (\mu\text{g/L})$ 血清 Serum	$\bar{X} \pm SD (\mu\text{g/g})$ 晶体 Lens	$\bar{X} \pm SD (\mu\text{g/L})$ 血清 Serum	$\bar{X} \pm SD (\mu\text{g/g})$ 晶体 Lens
D-Ala	20.1 $\pm$ 3.6	376 $\pm$ 71	13.6 $\pm$ 1.8	205 $\pm$ 87
L-Ala	27.0 $\pm$ 1.7	131 $\pm$ 43	23.0 $\pm$ 4.8	212 $\pm$ 98
D-Glu	4.51 $\pm$ 0.81	65.1 $\pm$ 7.9	4.62 $\pm$ 0.71	63.0 $\pm$ 10.0
L-Glu	15.0 $\pm$ 4.3	432 $\pm$ 132	9.3 $\pm$ 2.4	490 $\pm$ 140
D-Asp	3.53 $\pm$ 0.53	32.8 $\pm$ 3.9	3.64 $\pm$ 0.75	45.8 $\pm$ 3.8
L-Asp	6.3 $\pm$ 2.9	117 $\pm$ 40	4.39 $\pm$ 0.84	119 $\pm$ 36

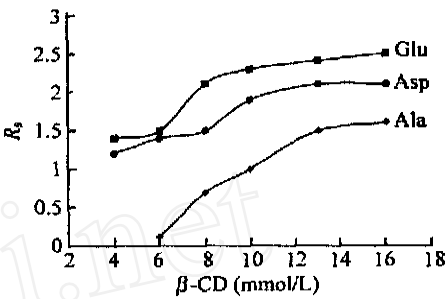


图 3 不同浓度 β -环糊精对分离度的影响
Fig. 3 Effects of different concentration of β -cyclodextrin (β -CD) on separation

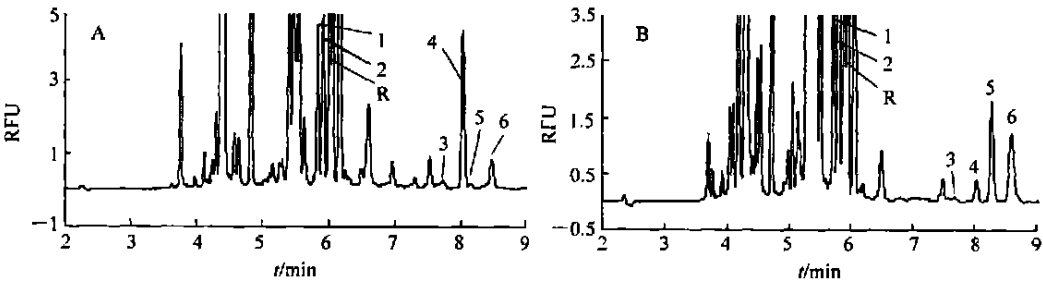


图 4 正常大鼠晶体和血清电泳谱图
Fig. 4 Electropherogram of lens and serum of control rat
电泳条件和峰的指认同图 1 中 B (conditions and peaks are identical to those in Fig. 1B); A. 晶体 (lens); B. 血清 (加入 20 μL 50 mg/L D、L-Asp 标准液) (serum, added 20 μL , 50 mg/L D、L-Asp standard solution)。

References

- 1 Luo Guoan(罗国安), Wang Yiming(王义明). *Chinese Journal of Chromatography*(色谱), **1995**, 13(4): 254 ~ 256
- 2 Deng Yanzhuo(邓延倬), He Jinlan(何金兰). *High Performance Capillary Electrophoresis*(高效毛细管电泳). Beijing(北京): Science Press(科学出版社), **2000**: 131 ~ 135
- 3 Mastets P M, Bada J L, Zioler J S. *Nature*, **1977**, 268: 71 ~ 73
- 4 Fisher G H, Petrucellil L, Gardner C. *Mol. Chem. Neuropathol.*, **1994**, 23(2-3): 115 ~ 124
- 5 Chen Cuizhen(陈翠真), Dong Bing(董冰), Song Xudong(宋旭东). *Chinese Journal of Clinical Ophthalmic Research*(眼科学研究), **2000**, 18(1): 38 ~ 40
- 6 Dabek Zlotorzynska E, Maruszak W. *J. Chromatogr. B*, **1998**, 714: 77 ~ 85
- 7 Shang Fu(商福), Chen Cuizhen(陈翠真), Dong Bing(董冰). *Chinese Journal of Capital Institute of Medicine*(首都医学院学报), **1992**, 13(4): 298 ~ 303
- 8 Causse E, Siri N. *J. Chromatogr. B*, **2000**, 741: 77 ~ 83
- 9 Yang Lili(杨莉莉), Yuan Zhuobin(袁倬斌). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **1999**, 27(9): 1065 ~ 1068
- 10 Bai Dongmei(白冬梅), Zhao Xueming(赵学明), Hu Zongding(胡宗定). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2001**, 29(4): 413 ~ 415

Chiral Analysis of Amino Acids in Biological Samples by Micellar Electrokinetic Chromatography with Laser-induced Fluorescence Detection

Fu Yurong^{1,2}, Yan Liushui¹, Luo Guoan^{*1}, Chen Cuizhen³, Wang Yiming¹, Zhang Lantong⁴

¹(Analytical Center, Tsinghua University, Beijing 100084)

²(Chemistry Department, Hebei North University, Zhangjiakou 075000)

³(Beijing Institute of Ophthalmology, Beijing 100005)

⁴(College of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017)

Abstract A micellar electrokinetic chromatography (MEKC) with laser-induced fluorescence detection (LIF) for chiral analysis of amino acids in biological samples was established. These amino acids, including *D* or *L*-alanine (Ala), *D* or *L*-glutamic acid (Glu) and *D* or *L*-aspartic acid (Asp), were derivatized with fluorescein isothiocyanate (FITC). The optimized conditions in electrophoresis were that uncoated fused-silica capillary (50 μ m $\times$ 37 cm, 30 cm to detector) was used, running voltage was 20 kV, running buffer was 40 mmol/L borate buffer (pH 9.3) containing 50 mmol/L sodium dodecyl sulfate (SDS) and 13 mmol/L β -cyclodextrin (β -CD), the sample solution was injected 5 s with pressure mode, separated at 25 $^{\circ}$ C, and monitored with a LIF detection. The baseline separation of these amino acid enantiomers was achieved. The linear ranges of six FITC-derivatives was about 0.050 ~ 2.000 mg/L, and the determination limits ($S/N=3$) were 0.005 ~ 0.050 mg/L. The average recoveries ($n=6$) and RSD of the six FITC-derivatives were 96.33% ~ 102.0% and 3.6% ~ 5.2% from rat serum, 97.59% ~ 102.8% and 3.5% ~ 5.9% from rat lens. The within-day precisions ($n=9$) and between-day precisions ($n=5$) of them were lower than 5.0% and 6.5% from rat serum, lower than 5.0% and 5.5% from rat lens, respectively.

Keywords Micellar electrokinetic chromatography, laser-induced fluorescence detection, amino acid enantiomers, β -cyclodextrin, rat

(Received 20 December 2003; accepted 9 May 2004)