

血液中¹⁵N 标记氨基酸同位素丰度

雷雯^{1 2} 侯捷¹ 杜晓宁^{* 1}, 张维冰²

¹(上海稳定性同位素工程技术研究中心,上海化工研究院,上海 200062)

²(化学与分子工程学院,华东理工大学,上海 200237)

摘 要 以硅烷化试剂 *N*-甲基-*N*-(三甲基硅烷)三氟乙酰胺(MSTFA)对氨基酸加以衍生,建立了衍生化¹⁵N 标记丙氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和尿素同位素丰度的气相色谱-质谱联用检测方法。在优化的色谱和质谱条件下,5 种衍生生物均得到基线分离。通过对 5 种衍生生物物的 EI 质谱图进行解析,选择合适的特征碎片离子作为同位素丰度的计算依据,并采用同位素峰簇算法计算同位素丰度,实现了多种化合物同位素丰度同时测定。以高丰度¹⁵N 标记氨基酸和尿素对照品对方法进行验证,方法的精密度优于 0.15%,同位素丰度相对偏差小于 1.4%。本方法已成功用于测定动物血液中¹⁵N 标记的 4 种氨基酸和尿素的同位素丰度。

关键词 同位素丰度;氨基酸;气相色谱-质谱联用;氮同位素标记

1 引 言

在生物医学领域,稳定同位素标记氨基酸常作为示踪剂对生物体的新陈代谢^[1]进行表达或用于蛋白质合成率^[2]的测定,同时也被用于蛋白质质量组学^[3]。通过将标记的氨基酸如甘氨酸-¹⁵N、丙氨酸-¹⁵N、谷氨酸-¹⁵N 等经静脉注射入生物体内,通过测定血液、尿液或组织样品中同位素丰度则可计算出蛋白质的更新率、合成率和分解率等,而尿素是代谢过程中的最终产物,因而监测尿素-¹⁵N₂的同位素丰度也可提供相应的代谢信息。《Cell》杂志近期报道了以同位素标记的谷氨酰胺和葡萄糖作为示踪剂,得到在 MYC 癌基因表达及缺氧的条件下细胞中谷氨酰胺的代谢情况,从而指导癌症疾病的靶向治疗的研究^[4]。血液或组织液中标记氨基酸同位素丰度的准确测定直接影响到了代谢过程的精准表达。气体同位素质谱法可用于化学纯度较高的单一氨基酸同位素丰度的测定^[5]。而实际血液或组织液样品中基质较为复杂,氨基酸含量较低^[6-8],其同位素丰度的检测则是难点所在。Nakamura 等^[9]使用 LC-MS/MS 分析了老鼠血浆氮代谢循环中多种氨基酸¹⁵N 与¹⁴N 的同位素丰度比((M+1)/M),从而反应出¹⁵N 在老鼠不同部位的富集情况。江骥等^[10]采用衍生化-气相色谱-质谱(GC-MS)联用法测定了血浆中¹⁵N 标记甘氨酸的同位素丰度。在¹³C 代谢流分析中,有报道使用 GC-MS 测定了大肠杆菌、酵母等微生物中或菌体蛋白中¹³C 标记氨基酸同位素丰度^[11,12]。目前还未有 GC-MS 同时测定血浆或组织液中¹⁵N 标记多种氨基酸同位素丰度的报道。本研究采用 GC-MS 法研究血液中¹⁵N 标记丙氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和尿素的同位素丰度同时测定的方法,首先在优化的 GC-MS 条件下对上述 5 种化合物进行分离,分析每种氨基酸衍生物在 EI 谱图的碎裂规律,找出适用于¹⁵N 同位素丰度计算的碎片离子,建立同位素丰度计算方法;进而对高丰度氨基酸和尿素对照品进行测定,以验证方法的准确性;最后对实际血液样品进行分析。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

气相色谱-质谱联用仪(GC-MS/MS,7890B-7000C,美国 Agilent 公司);HP-5MS 毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm,美国 Agilent 公司);超纯水系统(美国 Merck Millipore Simplicity 公司);低温高速离心机(韩国 Heraeus);电子天平(美国 Ohaus 精度 0.01 mg);氮吹仪(上海安谱科技有限公司)。

硅烷化试剂 *N*-甲基-*N*-(三甲基硅烷)三氟乙酰胺(MSTFA,美国 RegisTechnologies 公司);天然丰度

2015-05-11 收稿;2015-06-12 接受

本文系上海市科技人才计划博士后基金(No. 14R21421800),上海市科委技术标准专项基金(No. 13DZ0502601),科技部专项基金(No. 2014EG116258)资助

* E-mail: xiaoningdu@163.com

氨基酸对照品丙氨酸(纯度 98.5%)、甘氨酸(纯度 99%)、谷氨酸(纯度 98.5%)、天冬氨酸(纯度 98.5%) 均购于上海惠生生化试剂有限公司; 尿素(纯度 98.5% 美国 USP 公司); 稳定同位素¹⁵N 标记丙氨酸(纯度 98% ,丰度 98.52%) ,甘氨酸(纯度 98% ,丰度 98.10%) ,谷氨酸(纯度 98% ,丰度 98.11%) ,天冬氨酸(纯度 98% ,丰度 98.07%) ,尿素-¹⁵N₂(纯度 99% ,丰度 98.14%) 均为上海化工研究院同位素所研制产品, 同位素丰度由气体同位素质谱仪测定, 作为高丰度对照品使用; 动物血液样品(羊血液, 西南大学提供), 甲酸(HPLC 级, CNW 公司); 乙腈(LC-MS 级, Scharlab 公司); 吡啶和甲氧胺(分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 样品制备 天然丰度对照品: 分别称取 1.0 mg 甘氨酸、1.2 mg 丙氨酸、1.8 mg 天冬氨酸、2.0 mg 谷氨酸、1 mg 尿素于 1.5 mL 气相进样瓶。40℃ 下真空干燥 2 h, 加入 2% 甲氧胺吡啶溶液 600 μL, 充分溶解混合后, 放入烘箱 37℃ 下预混合 1 h。加入 600 μL MSTFA 60℃ 下反应 2 h, 待 GC-MS 分析。高丰度对照品的处理方法同天然丰度对照品。

血液实际样品: 取待测血样 1 mL 加入 9 mL 丙酮于 25 mL 离心管中充分混合, 在 4000 r/min 下离心 10 min, 然后取上清液, 氮吹至干燥, 加入 2% 甲氧胺吡啶溶液 300 μL, 充分溶解混合后, 放入烘箱 37℃ 下预混合 1 h。加入 300 μL MSTFA 60℃ 下反应 2 h, 经 0.22 μm 滤头过滤后待 GC-MS 分析。

2.2.2 实验条件 色谱条件: 色谱柱: Agilent HP-5 MS 毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm); 载气 He(99.999%) 流速 1.0 mL/min; 进样口温度 290℃; 升温程序: 初始 100℃, 以 40℃/min 升温至 160℃, 再以 10℃/min 升温至 250℃, 最后以 20℃/min 升温至 300℃; 进样量 1.0 μL, 分流比 50: 1。

GC-MS 质谱分析条件: 电子轰击离子源(EI), 电离能量 70 eV; 全扫描(Scan) 模式, 扫描范围 *m/z* 50 ~ 400; 离子源温度 230℃, 四级杆温度 150℃, 接口温度 300℃。

3 结果与讨论

3.1 GC-MS 图谱分析

对气相色谱升温程序进行了优化, 在优化的色谱条件下, 按照出峰顺序, 天然丰度丙氨酸、尿素、甘氨酸、天冬氨酸和谷氨酸均基线分离, 且峰型良好, 总离子流图(TIC) 如图 1a 所示。高丰度对照品与天然丰度对照品保留时间一致, 如图 1b 所示。

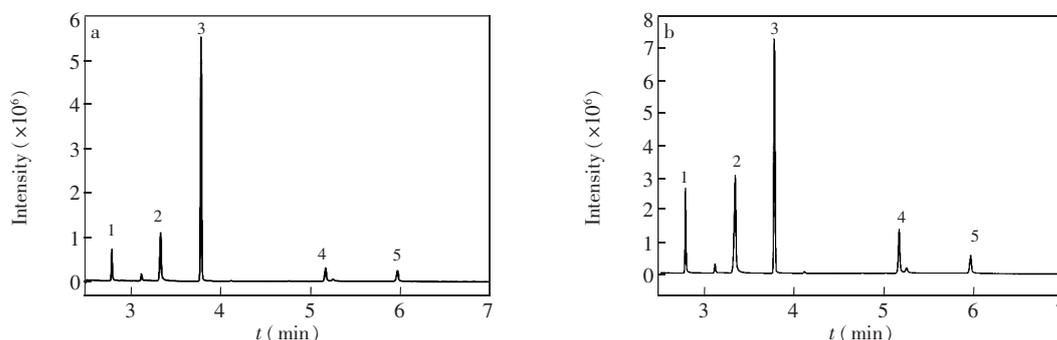


图 1 天然丰度对照品(a) 和高丰度对照品(b) 衍生化物的 GC-MS 总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of natural abundance (a) and high abundance ¹⁵N labeling (b) reference substance derivatives

1: 丙氨酸; 2: 尿素; 3: 甘氨酸; 4: 天冬氨酸; 5: 谷氨酸。

1: Alanine; 2: Urea; 3: Glycine; 4: Aspartic acid; 5: Glutamic acid.

3.2 衍生化氨基酸特征离子解析

通过对 GC-MS 的 TIC 图进一步解析, 可以得到每种氨基酸的 EI 质谱图。氨基酸在与 MSTFA 衍生化试剂反应后, 其结构和分子量均发生了变化。以丙氨酸为例, 氨基端的和羧基端的氢原子分别与硅烷化试剂反应, 相对分子量由 89 变为 233, 如图 2 所示。其余氨基酸的反应机理与甘氨酸相似, 尿素则为两个氨

氨基酸的氢与硅烷化试剂反应, 反应后各物质的相对分子量列于表 1。

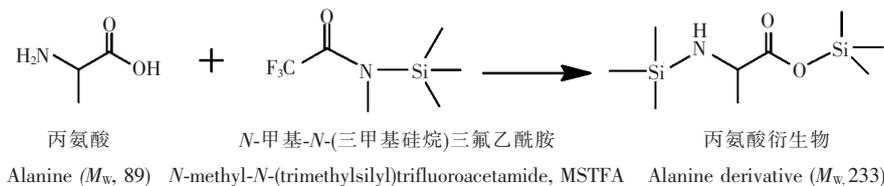


图 2 丙氨酸衍生化反应示意图

Fig. 2 Derivatization reaction of alanine

在上述物质衍生物的 EI 谱图中, 分子离子峰几乎完全碎裂为碎片离子, 对于¹⁵N 同位素丰度的计算, 需要选择带有 N 原子的碎片离子进行计算, 并且为了减小误差, 该碎片离子最好为基峰或者具有较高的峰强度。以丙氨酸为例, 天然丰度标准品的 EI 质谱图如图 3a 所示。丙氨酸衍生物的分子离子峰完全碎裂

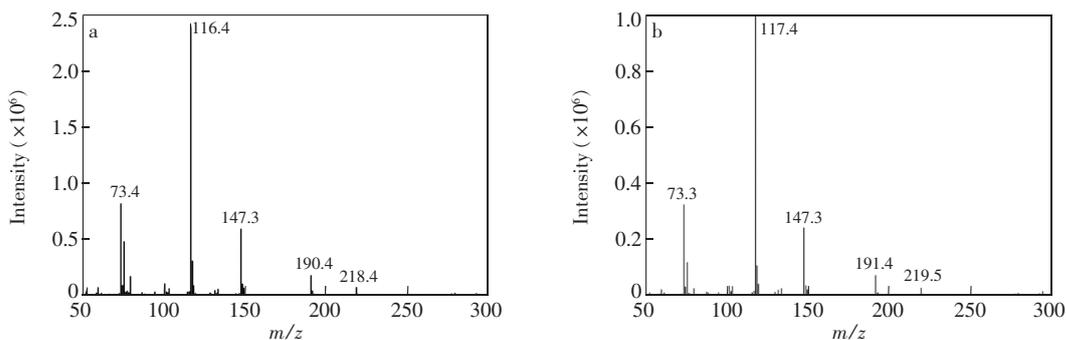


图 3 天然丰度 (a) 丙氨酸和高丰度 (b) 丙氨酸电子轰击 EI 质谱图

Fig. 3 Electron impact (EI) spectra of natural alanine (a) and high abundance ¹⁵N labeling alanine (b)

为碎片离子, 其中 m/z 116 的碎片离子结构如图 4 中方框中所示, 其中 N 原子为标记位点(图中* 为¹⁵N 标记位点), 因此该碎片离子可用于同位素丰度计算。由图 3b 可见, 高丰度丙氨酸的特征离子为 m/z 117, 与图 4 中标记位点相符。尿素、甘氨酸、天冬氨酸和谷氨酸的特征离子选择原则与甘氨酸类似, 特征离子的碎裂情况和相对分子量均列于表 1。

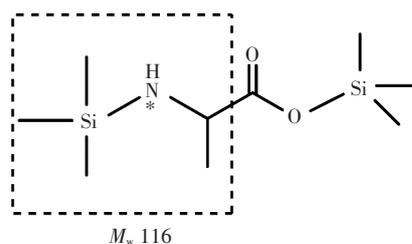


图 4 丙氨酸衍生物特征离子碎裂示意图 (* 代表¹⁵N 标记位点)

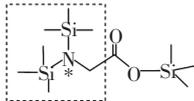
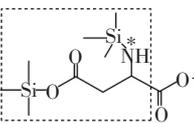
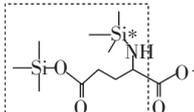
Fig. 4 Characteristic fragment of alanine derivative (* : ¹⁵N labeling site)

表 1 种氨基酸和尿素衍生化前后分子量及特征碎片离子信息

Table 1 Molecular weight (M_w) before and after derivatization and characteristic fragment of amino acids and urea

化合物 Compound	分子量 M_w		特征碎片离子 Characteristic fragment		
	衍生化前 Before derivatization	衍生化后 After derivatization	化学式 Formula	分子量 M_w	碎裂方式 Fracture location
丙氨酸 Alanine (Ala)	89	233	$C_5H_{14}NSi$	116	
尿素 Urea	60	204	$C_6H_{17}N_2OSi_2$	189	

续表 1(Continued to Table 1)

化合物 Compound	分子量 M_w		化学式 Formula	特征碎片离子 Characteristic fragment	
	衍生化前 Before derivatization	衍生化后 After derivatization		分子量 M_w	碎裂方式 Fracture location
甘氨酸 Glycine (Gly)	75	291	$C_7H_{20}NSi_2$	174	
天冬氨酸 Aspartate (Asp)	133	349	$C_9H_{22}NO_2Si_2$	232	
谷氨酸 Glutamate (Glu)	147	363	$C_{14}H_{33}NO_4Si_3$	246	

* 为 ^{15}N 标记位点(* ^{15}N labeling site)。

3.3 同位素丰度计算

以丙氨酸衍生物为例,天然丰度的特征离子 m/z 116 具有天然的同位素分布,包括 m/z 116, 117 和 118 的同位素峰簇,其天然的同位素丰度比为 100: 12.8: 4.5, 归一化之后为 0.852: 0.109: 0.038。相应的, ^{15}N 标记的特征离子所对应的峰为 m/z 117, 其同位素峰簇为 m/z 117, 118 和 119, 如表 2 所示。然而,在实际样品中可能会出现不完全标记的情况,质谱图中同时存在 $C_5H_{14}^{14}NSi^{++}$ 和 $C_5H_{14}^{15}NSi^{++}$ 两种离子,定义以上两种离子的摩尔分数分别为 X_0 和 X_1 ,二者相对分子质量差 1 dalton,这两种离子均具有一致的同位素分布,即同位素峰簇的峰强比一致,定义 A_0^i 和 A_1^i 分别为 X_0 和 X_1 在 $m/z = i$ 时的峰强,从而得出式(1)。在实测质谱图中 m/z 60 ~ 63 范围内的质谱峰强度为两种离子同位素峰簇的叠加,定义 A_{mix}^i 为实测质谱图在 $m/z = i$ 时的峰强,则有式(2) ~ (5)。

$$A_0^{116}: A_0^{117}: A_0^{118} = A_1^{117}: A_1^{118}: A_1^{119} = 0.852: 0.109: 0.038 \quad (1)$$

$$A_{mix}^{116} = x_0 \cdot A_0^{116} = x_0 \cdot 0.852 \quad (2)$$

$$A_{mix}^{117} = x_0 \cdot A_0^{117} + x_1 \cdot A_1^{117} = x_0 \cdot 0.109 + x_1 \cdot 0.852 \quad (3)$$

$$A_{mix}^{118} = x_0 \cdot A_0^{118} + x_1 \cdot A_1^{118} = x_0 \cdot 0.038 + x_1 \cdot 0.109 \quad (4)$$

$$A_{mix}^{119} = x_1 \cdot A_1^{119} = x_1 \cdot 0.038 \quad (5)$$

同时,各类离子摩尔分数之和应该为 1,因此 $x_0 + x_1 = 1$ 。由于方程个数大于未知数,因此使用式(1) ~ (3) 即可求解,通过联立解方程组,求得两种离子的摩尔分数。进而,由式(6)求得丙氨酸的 ^{15}N 同位素丰度。由于氨基酸的标记个数为 1 个,因此所得到分子百分比等于氨基酸的原子百分比。

$$^{15}N \text{ atom}(\%) = \Sigma(n \cdot x_n) / (n \cdot \Sigma x_n) = 98.8\%$$

(6) 表 2 ^{15}N 标记丙氨酸衍生物特征离子在 EI 质谱中的分类Table 2 Characteristic fragment ions of ^{15}N labeling alanine derivative and classification in mass spectrum

分子式 Formula	同位素峰簇 Isotope peak cluster (m/z)	摩尔分数 Mole fraction	摩尔分数计算结果 Mole fraction results (% , $n = 5$)				
$C_5H_{14}^{14}NSi^{++}$	116, 117, 118	X_0	1.1	1.2	1.1	1.2	1.1
$C_5H_{14}^{15}NSi^{++}$	117, 118, 119	X_1	98.9	98.8	98.9	98.8	98.9

使用相同的方法,结合表 1 中的特征离子和表 3 中的天然同位素分布,可对甘氨酸、天冬氨酸和谷氨酸进行计算,结果列于表 3。由于 ^{15}N 标记的尿素有两个标记位点,因此在实际样品中会出现 $C_6H_{17}OSi_2^{14}N^{14}N^{++}$, $C_6H_{17}OSi_2^{14}N^{15}N^{++}$ 和 $C_6H_{17}OSi_2^{15}N^{15}N^{++}$ 这种情况,需要定义这 3 种离子为 x_0 , x_1 和 x_2 ,相似的方法联立方程组求得 3 种离子的分子百分比。由于尿素- $^{15}N_2$ 的标记个数为 2 个,其 ^{15}N 原子百分比与分子百分比不同,需要使用式(6)求解,计算结果列于表 3。由于天然丰度分布的基准同样为衍生化后的特征离子,因此衍生化试剂所引入同位素丰度变化可以在计算过程中被抵消,所得到衍生化氨基酸

的同位素丰度值即为目标氨基酸的同位素丰度。

表 3 高丰度氨基酸和尿素的同位素丰度计算值

Table 3 Isotope abundance of ¹⁵N labeling amino acids and urea

化合物 Compound	天然丰度特征离子分布 Distribution of natural abundance fragment		高丰度特征离子 ¹⁵ N labeling fragment 峰强度 Peak intensity	同位素 丰度计算值 ^a Calculated value of isotope abundance (%)	RSD (%, n = 5)	同位素丰度对照值 ^b Reference value of isotope abundance (%)	相对偏差 Relative deviation (%)
	m/z	峰强度 Peak intensity					
丙氨酸 Ala	116	100	1.16	98.8	0.03	98.5	0.3
	117	12.8	100				
	118	4.50	12.5				
尿素 Urea	189	100	0.27	97.5	0.12	98.1	0.6
	190	19.0	4.50				
	191	9.90	100				
甘氨酸 Gly	174	100	1.31	98.7	0.03	98.1	0.6
	175	18.6	100				
	176	8.21	21.1				
甘氨酸 天冬氨酸 Asp	232	100	0.49	99.5	0.02	98.1	1.4
	233	18.9	100				
	234	11.2	21.0				
谷氨酸 Glu	246	100	0.50	99.5	0.05	98.1	1.4
	247	23.3	100				
	248	7.81	22.0				

^an = 5; ^b由同位素质谱仪依次测定 (Measured by isotope mass spectrometer) [6]。

由表 3 可见,方法精密度良好,符合检测要求。其中 4 种氨基酸的精密度均小于 0.1%, 尿素为 0.1%。上述 5 种高丰度化合物由同位素质谱仪测定的同位素丰度对照值同样列于表 3, 计算值与对照值基本符合, 相对偏差均小于 1.4%。因此,所发展的同位素丰度计算方法可以满足测定需求。

3.4 实际血液样品的检测

对血液样品进行前处理,使用方法进行分析,GC-MS 离子流图如图 5 所示,图中可以识别 40 余个峰,其中种目标化合物均被检出。丙氨酸、尿素、甘氨酸、天冬氨酸和谷氨酸衍生物的 EI 质谱图如图 6 所示,每种化合物的保留时间与天然丰度对照品一一对应(图 1a),特征离子与表 1 一致。通过质谱图(图 6)中特征离子峰簇,计算得出同位素丰度值列于表 4。因此,所发展的方法可以成功测定血液中氨基酸和尿素的同位素丰度值。

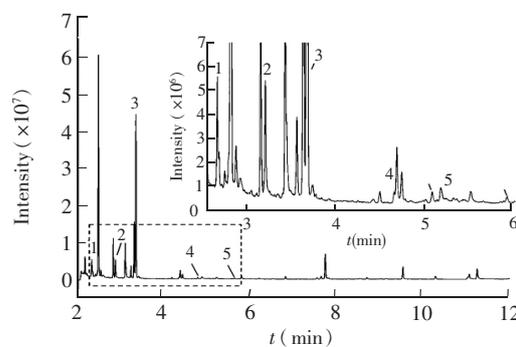


图 5 血液中衍生化氨基酸和尿素的 GC-MS 离子流图
Fig.5 Total ion chromatogram (TIC) of amino acids and urea-derivatives in blood

1. 丙氨酸; 2. 尿素; 3. 甘氨酸; 4. 天冬氨酸; 5. 谷氨酸)。

1: Alanine, 2: Urea, 3: Glycine, 4: Aspartic acid, 5: Glutamic acid.

4 结论

建立了衍生化-气质联用测定血液中丙氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和尿素同位素丰度的方法。对衍生化的氨基酸和尿素的 EI 质谱图进行解析,选择了包含同位素标记位点且峰强度较高的碎片离子作为同位素丰度的计算依据,使用同位素峰簇算法对同位素丰度进行计算。使用高丰度的氨基酸和尿素对照品对方法进行验证,方法的精密度优于 0.15%, 同位素丰度相对偏差小于 1.4%。方法还可以扩展至生物体组织、尿液等实际样品中氨基酸或尿素的同位素丰度检测。

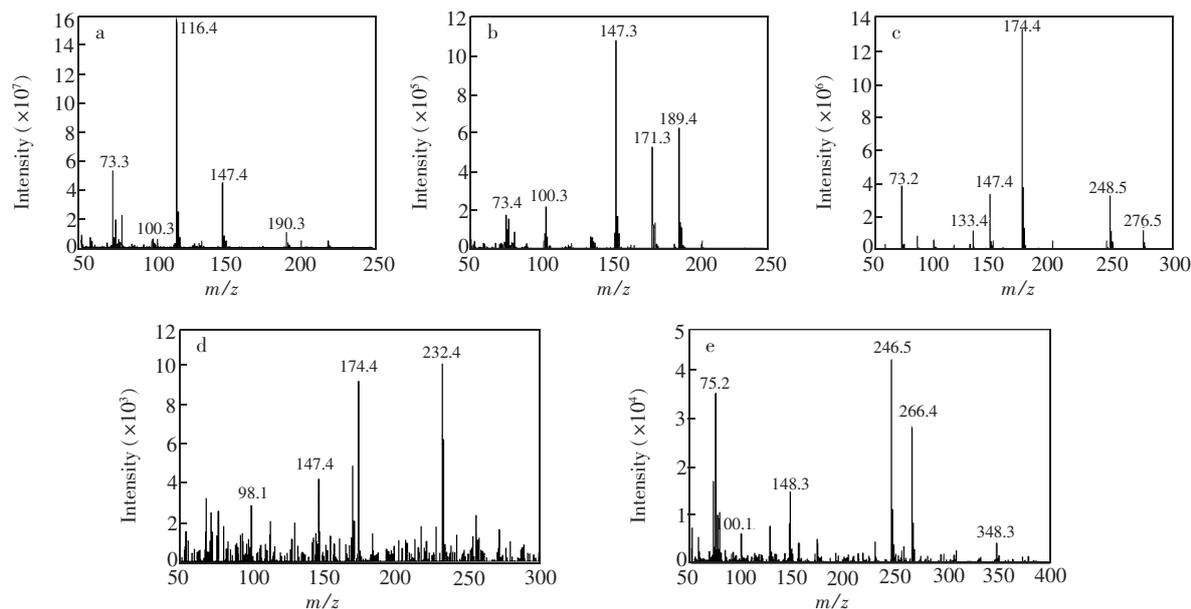


图 6 GC-MS 测定血液中衍生氨基酸和尿素 EI 质谱图

Fig. 6 EI spectra of amino acids and urea derivatives in blood

a. 丙氨酸; b. 尿素; c. 甘氨酸; d. 天冬氨酸; e. 谷氨酸。

a. Alanine; b. Urea; c. Glycine; d. Aspartic acid; e. Glutamic acid.

表 4 血液中种氨基酸和尿素同位素丰度计算结果

Table 4 Isotope abundance of amino acids and urea in blood

化合物 Compound	特征离子 Fragment		同位素丰度 Isotope abundance (atom, %)	化合物 Compound	特征离子 Fragment		同位素丰度 Isotope abundance (atom, %)
	m/z	峰强度 Peak intensity			m/z	峰强度 Peak intensity	
丙氨酸 Ala	116	100	天然丰度 Natural abundance	天冬氨酸 Asp	232	100	19.8
	117	12.4			233	43.4	
	118	4.5			234	23.8	
尿素 Urea	189	100	15.3	谷氨酸 Glu	246	100	11.5
	190	21.8			247	36.3	
	191	17.5			248	11.8	
甘氨酸 Gly	174	100	8.49				
	175	27.9					
	176	9.84					

References

- LI Peng-Fei, WANG Yan, TAO Bei-Bei, WANG Jing, LUO Jing, ZHANG Xu-De, AN Zhuo-Ling, LIU Li-Hong. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2012**, 40(5): 762-767
李鹏飞, 王燕, 陶蓓蓓, 王静, 罗静, 张绪得, 安卓玲, 刘丽宏. *分析化学*, **2012**, 40(5): 762-767
- ZHOU Ji-Hong, LI You-Sheng, LI Jie-Shou. *Parenteral & Enteral Nutrition*, **2005**, 12(1): 46-49
周济宏, 李幼生, 黎介寿. *肠外与肠内营养*, **2005**, 12(1): 46-49
- Webhofer C, Zhang Y, Brusis J, Reckow S, Landgraf R, Maccarrone G, Turk C W, Filiou M D. *Journal of Proteomics.*, **2013**, 88(2): 27-33
- Le A, Lane A N, Hamaker M, Bose S, Gouw A, Barbi J, Tsukamoto T, Rojas C J, Slusher B S, Zhang H, Zimmerman L J, Liebler D C, Slebos R J C, Lorkiewicz P K, Higashi R M, Fan T W M, Dang C V. *Cell Metabolism*, **2012**, 15(1): 110-121
- SONG Ming-Ming, DU Xiao-Ning. *Journal of Isotopes*, **2010**, 11(4): 23-27
宋明鸣, 杜晓宁. *同位素*, **2010**, 11(4): 23-27

- 6 LI Peng-Fei, TAO Bei-Bei, ZHANG Xu-De, AN Zhuo-Ling, ZHANG Qian, LI Yue, HAO Qian-Qian, LIU Li-Hong. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2013**, 41(9): 1347–1352
李鹏飞, 陶蓓蓓, 张绪得, 安卓玲, 张茜, 李悦, 郝倩倩, 刘丽宏. *分析化学*, **2013**, 41(9): 1347–1352
- 7 YANG Fen, WANG Hong-Yun, HU Bei, JIANG Ji. *Chin. J. Pharm. Anal.*, **2013**, 33(8): 1322–1326
杨芬, 王洪允, 胡蓓, 江骥. *药物分析杂志*, **2013**, 33(8): 1322–1326
- 8 Bruckner H, Haasmann S, Friedric A. *Amino Acids*, **1994**, 6(2): 205–211
- 9 Nakamura H, Karakawa S, Watanabe A, Kawamata Y, Kuwahara T, Shimbo K, Sakai R. *Anal. Biochem.*, **2015**, 475(1): 67–77
- 10 JIANG Ji, WANG Shi-Zhen. *Nuclear Electronics & Detection Technology*, **1984**, 4(1): 19–25
江骥, 王世真. *核电子学与探测技术*, **1984**, 4(1): 19–25
- 11 LI Ming-Chao, HUANG Ming-Zhi, LIU Yu-Wei, CHU Ju, ZHUANG Ying-Ping, ZHANG Si-Liang. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2014**, 42(10): 1408–1413
李敏超, 黄明志, 刘玉伟, 储炬, 庄英萍, 张嗣良. *分析化学*, **2014**, 42(10): 1408–1413
- 12 WANG Jian, WANG Ze-Jian, HUANG Ming-Zhi, QIAN Jiang-Chao, CHU Ju, ZHANG Si-Liang. *China Biotechnology*, **2009**, 29(7): 87–93
王建, 王泽建, 黄明志, 钱江潮, 储炬, 张嗣良. *中国生物工程杂志*, **2009**, 29(7): 87–93

Determination of Isotope Abundance of ¹⁵N Labeled Amino Acids by Gas Chromatography–Mass Spectrometry

LEI Wen^{1,2}, HOU Jie¹, DU Xiao-Ning^{*1}, ZHANG Wei-Bing²

¹(Shanghai Engineering and Technological Research Center for Stable Isotope, Shanghai Research Institute of Chemical Industry, Shanghai 200062, China)

²(College of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract The determination method of isotope abundance for ¹⁵N labeled alanine, glycine, aspartic acid, glutamic acid and urea which derived by *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) was developed. The five derivatives were baseline separated under optimized GC–MS conditions. The suitable characteristic fragment ions were chosen for isotopic abundance calculation by analyzing the EI mass spectrum. The isotope abundance can be obtained by isotope peak cluster algorithm. Isotope abundance of various compounds can be determined at same time by this method. The developed method was validated by ¹⁵N labeled reference substance of amino acids and urea. The results showed that the RSD of the method was less than 0.15%, and the relative deviation of isotope abundance was less than 1.4%. The isotope abundance of four ¹⁵N labeled amino acids and ¹⁵N labeled urea in blood were successfully determined.

Keywords Isotope abundance; Amino acid; Gas chromatography–mass spectrometry; ¹⁵N labeled

(Received 11 May 2015; accepted 12 June 2015)

This work was supported by the Shanghai Science and Technology Talent Planning Postdoctoral Fund (No. 14R21421800), the Special Fund of Shanghai Science and Technology Commission for Technical Standards (No. 13DZ0502601), and the Special Fund of Science and Technology Ministry (No. 2014EG116258).