

体内 *D*-酸性氨基酸分析的 自动二维手性高效液相色谱法的建立及应用

韩海* 王启钦 吴慧慧 王欢
(暨南大学药学院, 广州 510632)

摘 要 *D*-酸性氨基酸的生理功能和疾病标志物作用已逐渐成为代谢组学和创新药物开发的研究热点, 本研究利用硅胶基质 ODS 整体柱为第一维分离色谱柱, 乙腈-三氟醋酸-水(9: 0.05: 92, *V/V*) 为流动相; Chiral-pak QD-1-AX 微径手性色谱柱为第二维手性分离柱, 10 mmol/L 柠檬酸的甲醇-乙腈(50: 50, *V/V*) 溶液为流动相, 4-氟-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂恶二唑(NBD)-F 衍生化荧光法检测, 建立了二维手性高效液相色谱全自动分析系统。本系统实现了对生物样品中酸性氨基酸异构体的高效快速分离($R_s > 2.5$); 高灵敏度检测($LOD = 1 \text{ fmol}$) 及定量值的确证, 酸性氨基酸异构体回收率均在 97% ~ 104% 之间, 日内日间精密度的 $RSD < 5\%$ 。应用本系统对免疫功能低下的老年病小鼠动物模型快速老化小鼠亚系 1 (SAMP1) 进行分析, 测得 SAMP1 小鼠胸腺和脾脏中 *D*-天门冬氨酸的含量分别为 $(206 \pm 18) \text{ nmol/g}$ 和 $(264 \pm 21) \text{ nmol/g}$ 。首次发现了其胸腺和脾脏中 *D*-天门冬氨酸的含量较对照组同龄抗快速老化小鼠亚系 1 (SAMR1) 有显著升高趋势($p < 0.01$)。

关键词 *D*-酸性氨基酸, 异构体, 全自动, 二维高效液相色谱, 快速老化小鼠亚系 1

1 引 言

几乎所有构成蛋白质的氨基酸都可以分为 *D*-型和 *L*-型。自 1980 年起, 数种内源性 *D*-型氨基酸被发现微量存在于人类和哺乳动物的体液和组织中, 并发挥着重要的生理作用^[1], 如 *D*-天门冬氨酸(*D*-Asp)^[2] 和 *D*-谷氨酸(*D*-Glu)^[3] 等酸性氨基酸。*D*-型酸性氨基酸的生理功能和疾病标志物作用已逐渐成为代谢组学和创新药物开发的研究热点。然而, 在体内分析中, 由于大量存在的 *L*-型氨基酸和极性内源性干扰物的影响, 样品中酸性氨基酸 *D*, *L* 体的高选择性同时快速定量分析较难实现, 其生理作用也难以进一步阐明。为进一步研究酸性氨基酸的代谢组学, 有必要建立其高选择性和高灵敏度的体内自动分析方法。目前, 酸性氨基酸的异构体的体内分析方法主要有气相色谱法(GC)^[4], 高效液相色谱法(HPLC)^[5~10], 毛细管电泳法(CE)^[11] 和胶束电动毛细管色谱法(MEKC)^[12] 等, 但多存在专属性不足^[4,7,11,12], 灵敏度不高^[4,6~8] 线性范围较窄^[9], 衍生化反应操作繁琐^[4,7] 等不足。二维 HPLC 方法具有较高的专属性, 而现有的酸性氨基酸的异构体的体内分析的二维 HPLC 方法较为耗时, 且异构体分离度不高^[9]。本研究考察了多种手性固定相, 并以奎尼丁型手性色谱柱配合硅胶基质 ODS 整体柱, 采用 4-氟-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂恶二唑(NBD-F) 柱前衍生化荧光检测, 建立了体内样品中酸性氨基酸 *D*, *L* 体的同时分离和定量分析的二维手性 HPLC 法, 全过程实现了自动化控制和定量值的在线确证, 其分析速度、异构体色谱峰峰型、分离度和方法灵敏度均优于已报道方法。本方法应用于疾病模型动物体液和组织中酸性氨基酸异构体的分析, 首次观察到快速老化小鼠模型 SAMP1 胸腺和脾脏组织中 *D*-天门冬氨酸的增高趋势。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

NANOSPACE SI-2 高效液相色谱仪及 3013 型荧光检测器, 3033 型自动进样器(日本资生堂公司); Micro SmashTM MS-100R 微量组织匀浆机(日本 Tomy 公司); 硅胶基质 ODS 整体柱(750 mm ×

2014-01-03 收稿; 2014-03-06 接受

本文系国家自然科学基金(No. 81202499)及广东高校优秀青年创新人才培育计划(No. 2012LYM_0020)资助项目

* E-mail: thanhaik@jnu.edu.cn

0.53 mm, 日本资生堂公司); Sumichiral OA-2000S, OA-2500S, OA-3100S, OA-3300S, OA-4600SS, OA-4700SR 手性色谱柱(250 mm × 1.5 mm, 5 μm, 日本住友化学公司); Chiralpak QN-1-AX, QD-1-AX 手性色谱柱(150 mm × 1.5 mm, 5 μm, 法国 Chiral Technologies Europe 公司)。天门冬氨酸、谷氨酸外消旋体及 *D*-, *L*-体对照品(纯度均大于 99.6%, 日本和光公司); NBD-F(美国 Sigma 公司); 甲醇、乙腈均为色谱纯; 柠檬酸、硼酸、三氟醋酸均为市售分析纯。

2.2 实验动物

雄性 7 周龄快速老化 SAMP1 小鼠及同龄正常老化小鼠 SAMR1(日本京都大学竹田研究所)在 SPF 级环境饲养, 3 只/笼, 自由活动、饮水和进食。

2.3 实验方法

2.3.1 酸性氨基酸的柱前衍生化反应 于 2 mL 棕色离心管中分别加入 0.125 μmol/L 各氨基酸异构体标准品水溶液 10 μL, 硼酸钠缓冲溶液(pH 8.0) 10 μL 及 20 mmol/L NBD-F 乙腈溶液 10 μL, 漩涡振荡后置于 60 °C 水浴中加热 2 min, 立即加入 2% 三氟醋酸溶液 95 μL 终止反应, 取 1 μL 进样测定。

2.3.2 分离酸性氨基酸异构体手性柱的考察 分别以 Pirkle 型 Sumichiral OA-2000S, OA-2500S, OA-3100S, OA-3300S, OA-4600SS, OA-4700SR 和离子交换型 Chiralpak QN-1-AX, QD-1-AX 手性柱(其固定相化学结构见图 1)为色谱柱, 含 5 mmol/L 柠檬酸的甲醇-乙腈(50: 50, V/V)溶液为流动相, 柱温: 40 °C, 荧光检测波长为 $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ 。

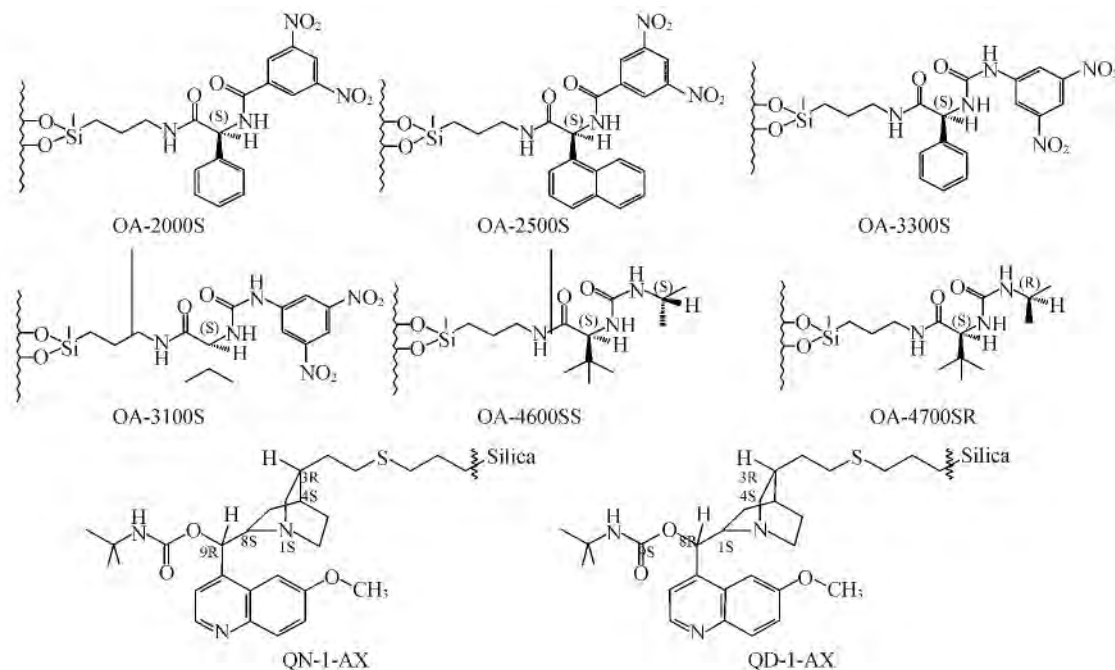


图 1 Pirkle 型手性固定相和离子交换固定相的结构图

Fig. 1 Structures of Pirkle type and anion exchange type chiral stationary phases

2.3.3 色谱系统 第一维采用硅胶基质 ODS 整体柱(500 mm × 0.53 mm), 流动相为乙腈-三氟醋酸-水(9: 0.05: 92, V/V), 柱温: 40 °C, 流速: 20 μL/min。第二维采用 Chiralpak QD-1-AX 手性柱(150 mm × 1.5 mm, 5 μm)为分析柱, 流动相为含 10 mmol/L 柠檬酸的甲醇-乙腈溶液(50: 50, V/V), 且并联一根 Sumichiral OA-2500S 手性柱(250 mm × 1.5 mm, 5 μm)用于确证生物样品中 *D*-酸性氨基酸的含量, 流动相为含 5 mmol/L 柠檬酸的甲醇-乙腈(50: 50, V/V)溶液, 柱温: 40 °C, 流速: 200 μL/min。第一维及第二维荧光检测波长均为 $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ 。两维之间采用多环阀装置连接, 色谱系统的构成图见图 2。在经过第一维反相分离后, NBD-Asp 的流出部分被收集到第一环中(图 2A), 之后迅速被切入第二维的 QD-1-AX 或 OA-2500S 手性柱中进行分析(图 2B); NBD-Glu 的流出部分被收集到第二环中, 待 NBD-Asp 的第二维分析结束后再切入第二维的 QD-1-AX 或 OA-2500S 手性柱中进行分析(图

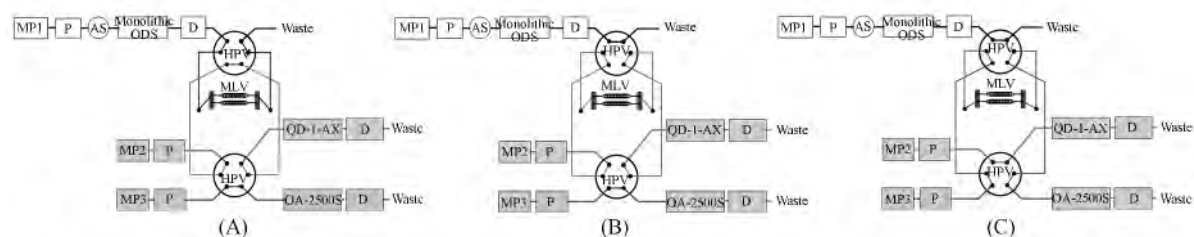


图2 全自动二维手性 HPLC 装置图

Fig.2 Flow diagram of the full automatic 2D-HPLC system

MP. 流动相 (Mobile phase); W. 冲洗液 (Washing solution); P. 泵 (Pump); AS. 自动进样器 (Auto sampler); D. 检测器 (Detector); HPV. 高压切换阀 (High pressure valve); MLV. 多环阀装置 (Multi-loop valve)。

2C)。

2.3.4 生物样品的前处理 取实验用 SAMP1 和 SAMR1 小鼠,用 0.125 mg/g 体重用量的苯巴比妥麻醉,腹部静脉抽血处死,迅速摘除胸腺和脾脏组织,取适量精密称重,置于 2 mL 离心管中,按每 mg 组织重量 20 μL 比例加入甲醇,再加入钢珠 1 粒,于微量组织匀浆机中于 4 $^{\circ}\text{C}$ 匀浆 2 min,匀浆速度为 3500 r/min。所得混旋液离心 10 min,转速为 13400 r/min,取上清液 10 μL 置于 2 mL 棕色离心管中,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 减压干燥得残渣。残渣中加入超纯水 10 μL ,加硼酸钠缓冲溶液 (pH 8.0) 10 μL 及 20 mmol/L NBD-F 乙腈溶液 10 μL ,漩涡振荡 1 min,离心,置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 2 min,立即加入 2% 三氟醋酸溶液 95 μL 终止反应。

3 结果与讨论

3.1 分离酸性氨基酸异构体手性柱的考察

分离经 2.3.1 节衍生化反应制备的 NBD-Asp 及 NBD-Glu 的 D-型及 L-型异构体,保留时间,手性选择因子及分离度见表 1。结果表明,Chiralpak QD-1-AX 和 Sumichiral OA-2500S 色谱柱对于两种酸性氨基酸异构体具有最佳的手性拆分效果。

表1 8种手性固定相对天门冬氨酸及谷氨酸异构体的分离结果

Table 1 Enantiomer separations of aspartic acid (Asp) and glutamic acid (Glu) on 8 chiral stationary phases

色谱柱 Column	天门冬氨酸 Aspartic acid				谷氨酸 Glutamic acid			
	保留时间 Retention time (min)		α		保留时间 Retention time (min)		α	
	D	L			D	L		
OA-2000S	19.6	20.6	1.05	—	8.8	n. s.	n. s.	
OA-2500S	25.5	29.8	11.8	1.80	12.1	14.2	1.19	1.63
OA-3100S	8.3	9.8	1.21	0.99	4.8	5.2	1.13	0.51
OA-3300S	14.8	16.2	1.10	1.31	8.0	8.5	1.07	0.68
OA-4600SS	18.5	n. s.	n. s.		11.8	n. s.	n. s.	
OA-4700SR	19.2	21.8	1.14	1.33	10.4	11.8	1.16	1.14
QN-1-AX	30.8	26.8	1.15	1.65	14.5	15.4	1.06	0.51
QD-1-AX	34.8	42.2	1.22	2.64	17.1	14.2	1.22	2.57

n. s. 未分离 (Not separated)。

3.2 2D-HPLC 系统分离酸性氨基酸异构体 按 2.3.1 节制备 Asp 和 Glu 的外消旋体溶液进样,如图 3 所示。在分析时间内,天门冬氨酸和谷氨酸对映体各个峰均达到良好分离 ($R_s > 2.5$),各峰间无干扰,表明方法具有良好的专属性。同时用超纯水同法制备不含氨基酸标准品的阴性对照溶液,以相同方法测定,阴性对照溶液在天门冬氨酸和谷氨酸对映体各峰出峰时间均未见干扰峰。

3.3 生物样品的分析及专属性

取 2.3.4 节制得的样品溶液,按 2.3.3 节的色谱条件,进样 1 μL 测定,SAMP1 和 SAMR1 小鼠脾脏组织色谱图见图 4。在分析时间内,除 D-Glu 未从小鼠脾脏组织中检出外,其它酸性氨基酸各异构体与内源性杂质之间均能完全分离,未产生干扰,且对所有生物样品均使用 Sumichiral OA-2500S 色谱柱再次测定以确证其酸性氨基酸异构体含量 (图 2),其确证结果与 Chiralpak QD-1-AX 分析柱的测定结果的相对误差均不小于 5%,表明此方法的专属性较高。

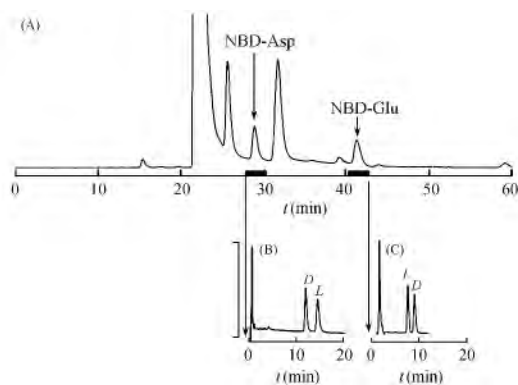


图 3 天门冬氨酸和谷氨酸的第一维 (A) 和第二维 (B, C) 液相色谱分离色谱图

Fig. 3 HPLC Chromatograms of aspartic acid and glutamic acid in the 1st dimension (A) and the 2nd dimension (B, C)

λ_{ex} : 470 nm; λ_{em} : 530 nm.

3.4 标准曲线, 检出限及定量下限

0.125 $\mu\text{mol/L}$ 各氨基酸标准品水溶液用超纯水稀释成系列浓度, 按 2.3.1 节制备标准溶液, 在 2.3.3 节色谱条件下进样测定, 以峰面积为纵坐标, 标准氨基酸的量 (pmol) 为横坐标, 分别绘制标准曲线, 并测定各氨基酸异构体在 $S/N=3$ 时的检出限及 $S/N=10$ 时的定量限 (表 2)。

表 2 天门冬氨酸及谷氨酸异构体的标准曲线及定量限, 检出限

Table 2 Calibration curve, LOD and LOQ of aspartic acid and glutamic acid enantiomers

标准氨基酸 Standard amino acids	线性范围 Calibration range (pmol)	标准曲线方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	检出限 LOD (fmol)	定量限 LOQ (fmol)
D-Asp	0.005 ~ 5	$y = 10.32x - 0.01$	0.9999	1.0	5.0
L-Asp	0.005 ~ 5	$y = 8.29x + 0.04$	0.9998	1.0	5.0
D-Glu	0.005 ~ 5	$y = 17.95x - 0.01$	0.9998	1.0	5.0
L-Glu	0.005 ~ 5	$y = 14.15x + 0.04$	0.9998	1.0	5.0

3.5 方法回收率及精密度

取已测定 4 种氨基酸异构体浓度的小鼠脾脏组织样品 1 份, 按 2.3.4 节生物样品处理方法, 制得残渣数份。于每管残渣中加入含 D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu 各 0.0125 $\mu\text{mol/L}$ 的氨基酸标准品水溶液 10 μL 代替超纯水, 剩余步骤按 2.3.4 节“加硼酸钠缓冲溶液”起的步骤操作, 制得样品溶液, 取 1 μL 进样, 测定方法回收率及日内, 日间精密度。本方法对 D-Asp, L-Asp, D-Glu 和 L-Glu 的回收率平均值分别为 98.1%, 100.8%, 103.5% 和 97.3%。日内日间精密度的 RSD 均小于 5% ($n=5$)。

3.6 SAMP1 及 SAMR1 小鼠胸腺和脾脏中酸性氨基酸异构体的测定

取实验用 SAMP1 小鼠及 SAMR1 各 6 只, 各用 0.125 mg/g 体重用量的苯巴比妥麻醉, 按 2.3.2 节处理, 取制得的样品溶液, 各进样 1 μL 测定 (表 3)。SAMP1 小鼠胸腺和脾脏组织中的 D-Asp 含量明显高于

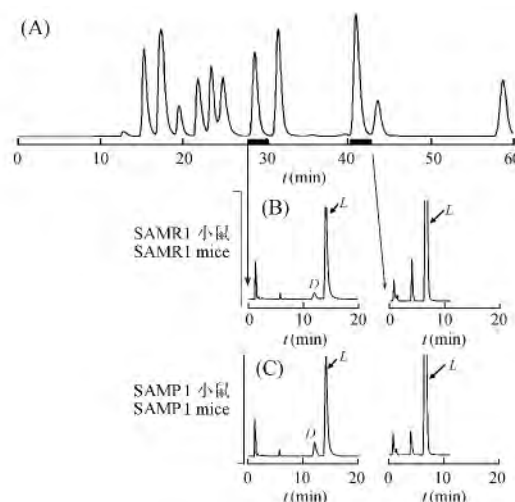


图 4 二维 HPLC 法分离测定 SAMR1 与 SAMP1 小鼠脾脏组织中天门冬氨酸和谷氨酸异构体第一维 (A) 和第二维天门冬氨酸 (B), 谷氨酸 (C) 的色谱图

Fig. 4 2D-HPLC chromatograms of the 1st dimension (A) and the 2nd dimension of aspartic acid (B), glutamic acid (C) enantiomers determination in SAMR1 and SAMP1 mice spleen

λ_{ex} : 470 nm; λ_{em} : 530 nm.

表 3 SAMP1 及 SAMR1 小鼠胸腺和脾脏中天门冬氨酸和谷氨酸异构体的测定结果 ($\bar{x} \pm \text{SE}$, $n=6$)

Table 3 Determination results of aspartic acid and glutamic acid enantiomers in the thymus and spleen of SAMP1 and SAMR1 mice ($\bar{x} \pm \text{SE}$, $n=6$)

酸性氨基酸 Acidic amino acids	胸腺 Thymus (nmol/g)		脾脏 Spleen (nmol/g)	
	SAMP1	SAMR1	SAMP1	SAMR1
D-Asp	206 $\pm$ 18*	133 $\pm$ 16	264 $\pm$ 21*	155 $\pm$ 18
L-Asp	2084 $\pm$ 305	1849 $\pm$ 276	2212 $\pm$ 199	2040 $\pm$ 309
D-Glu	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
L-Glu	6356 $\pm$ 543	5886 $\pm$ 578	6850 $\pm$ 806	7236 $\pm$ 981

* $p < 0.01$; nd: 未检出 (Not detected)。

SAMR1小鼠($P < 0.01, n = 6$), 而L-Asp及

L-Glu含量并无明显差异, 两组小鼠胸腺组织中均未检出D-Glu。

3.7 本方法的特点

2D-HPLC法是生物样品中D-型氨基酸分析方法中专属性较高的一类方法。本研究通过对分离酸性氨基酸异构体的手性固定相考察, 应用QD-4-AX型离子交换机理色谱柱为第二维手性分离柱, 并配合使用分离效能较高的硅胶基质ODS整体柱, 构建了全自动2D-HPLC系统对生物样品中NBD-F荧光衍生化的酸性氨基酸各异构体实现了同时分离, 并且在线确证了其定量值, 方法简便快速, 具有较高的异构体色谱峰形, 分离度($R_s > 2.5$), 灵敏度($LOD = 1 \text{ fmol}$)和专属性。

D-酸性氨基酸在哺乳动物体内虽然仅微量存在, 但其生理功能和疾病标志物作用最近受到广泛研究, 并已发现D-天门冬氨酸与一些老年性疾病(如老年性痴呆(Alzheimer disease, AD)^[3]、白内障^[3]等)有相关性。本研究首次在免疫功能低下的快速老化小鼠模型SAMP1^[4]的重要免疫器官胸腺和脾脏组织中观察到D-天门冬氨酸均有明显增高的趋势($p < 0.01$), 说明D-天门冬氨酸在胸腺和脾脏组织中的生理功能及其与老年性疾病, 免疫系统疾病之间的关系值得进一步研究。

References

- 1 Fujii N. *Orig. Life Evol. Biosph.*, **2002**, 32(2): 103–127
- 2 Aniello A D. *Brain Res. Rev.*, **2007**, 53(2): 215–234
- 3 Dudel J. *Eur. J. Neurosci.*, **2004**, 20(1): 161–166
- 4 Pätzold R, Schieber A, Brückner H. *Biomed. Chromatogr.*, **2005**, 19(6): 466–473
- 5 Han H, Miyoshi Y, Ueno K, Okamura C, Tojo Y, Mita M, Lindner W, Zaitzu K, Hamase K. *J. Chromatogr. B*, **2011**, 879(29): 3196–3202
- 6 LU Xin, LU Jie, LIU Cheng-Wei, ZHAO Shu-Lin. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2007**, 35(8): 1151–1154.
卢昕, 卢洁, 刘承伟, 赵书林. *分析化学*, **2007**, 35(8): 1151–1154
- 7 Tsesarskaia M, Galindo E; Szokan G. *Biomed. Chromatogr.*, **2009**, 23(6): 581–587
- 8 Morikawa A, Hamase K, Inoue T, Konno R, Niwa A, Zaitzu K. *J. Chromatogr. B*, **2001**, 757(1): 119–125
- 9 SHEN Han-Xi, YANG Guo-Sheng, GAO Ru-Yu, WANG Qin-Sun. *Chem. J. Chinese Universities*, **1995**, 16(7): 1072–1074
沈含熙, 杨国生, 高如瑜, 王琴孙. *高等学校化学学报*, **1995**, 29(7): 1072–1074
- 10 Song Y, Feng Y, LeBlanc MH, Zhao SL, Liu YM. *Anal. Chem.*, **2006**, 78(23): 8121–8128
- 11 Huang Y, Shi M, Zhao SL. *J. Sep. Sci.*, **2009**, 32(17): 3001–3006
- 12 Thorsen G, Bergquist J. *J. Chromatogr. B*, **2000**, 745(2): 389–397
- 13 Fujii N, Kaji Y, Fujii N. *J Chromatogr B*, **2011**, 879(29): 3141–3147
- 14 Toichi E, Hanada K, Hosokawa T, Higuchi K, Hosokawa M, Imamura S, Hosono M. *Mech. Ageing. Dev.*, **1997**, 99(3): 199–217

Establishment and Application of an Automated Chiral Two-dimensional High Performance Liquid Chromatography for Bio-analysis of D-Acidic Amino Acids

HAN Hai*, WANG Qi-Qin, WU Hui-Hui, WANG Huan
(College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract The physiological and bio-marker function of D-acidic amino acids is now becoming the hot topic on metabolomics study and new drug discovery. A fully automated two-dimensional high performance liquid chromatography (2D-HPLC) system was established by using monolithic ODS column as the first dimension

