

20种氨基酸非衍生的分析方法

王姣

应用及技术服务部

天津博纳艾杰尔科技有限公司, 天津开发区西区南大街179号, 300462

概述

氨基酸是构成多肽和蛋白质的基本组成单元, 是非常重要的一类化合物。随着生物药的发展, 氨基酸的分析需求也越来越大。但由于氨基酸的特殊基团性质, 氨基和羧基使得分子整体极性很大, 不能直接通过常规C18反相方法实现分离。这也使氨基酸的分析非常具有挑战性。本文同时比较建立了三款色谱柱对于20种氨基酸的质谱分析方法, 为氨基酸的非衍生分析提供了更多的选择性。

关键词

氨基酸; Kinetex HILIC; Luna Omega Sugar; Biozen Glycan; LC-MS/MS;

化合物信息

表1. 化合物信息

化合物名称	简称	CAS	结构式	分子量
L-天冬酰胺	Asn	70-47-3	C4H8N2O3	132.12
L-酪氨酸	Tyr	60-18-4	C9H11NO3	181.19
L-缬氨酸	Val	72-18-4	C5H11NO2	117.15
L-苏氨酸	Thr	72-19-5	C4H9NO3	119.12
L-色氨酸	Trp	73-22-3	C11H12N2O2	204.23
L-谷氨酸	Glu	56-86-0	C5H9NO4	147.13
L-异亮氨酸	Ile	73-32-5	C6H13NO2	131.17
L-苯丙氨酸	Phe	63-91-2	C9H11NO2	165.19
L-赖氨酸	Lys	56-87-1	C6H14N2O2	146.19
L-脯氨酸	Pro	147-85-3	C5H9NO2	115.13
L-天门冬氨酸	Asp	56-84-8	C4H7NO4	133.1
甘氨酸	Gly	56-40-6	C2H5NO2	75.07
L-精氨酸	Arg	74-79-3	C6H14N4O2	174.2
4-氨基丁酸	GABA	56-12--2	C4H9NO2	103.12
L-羟脯氨酸	Hyp	51-35-4	C5H9NO3	131.13
L-丙氨酸	Ala	56-41-7	C3H7NO2	89.09
L-丝氨酸	Ser	56-45-1	C3H7NO3	105.09
L-组氨酸	His	71-00-1	C6H9N3O2	155.15
L-亮氨酸	Leu	61-90-5	C6H13NO2	131.17

L-蛋氨酸 Met 63-68-3 C5H11NO2S 149.21

实验部分

1.1主要仪器设备

液相色谱串联质谱仪(AB SCIEX Triple Quad™5500+), 配有电喷雾离子源(ESI);

1.2试剂

实验用水、乙腈均为色谱级, 甲酸铵、甲酸为分析纯。

200mmol/L甲酸铵溶液: 称取6.36g甲酸铵, 溶解于500mL水中, 用甲酸调节PH至3。

流动相A: 取50mL 200mmol/L甲酸铵溶液, 加入450mL水, 混匀;

流动相B: 取50mL 200mmol/L甲酸铵溶液, 加入450 mL乙腈, 混匀。

1.3标准品

20种氨基酸单标20 μmol/mL, 有客户配制提供; 混合工作标液用乙腈稀释至1 μmol/L; 甘氨酸由于响应太低稀释至50 μmol/L, 上机检测。

1.4质谱条件

离子源类型: 电喷雾离子源 (ESI+)

扫描方式: 多反应监测负离子模式 (MRM)

喷雾针电压: 4500 V

离子源温度: 500 °C

加热器 (GS1): 55 psi

辅助加热气 (GS2): 55 psi

气帘气 (CUR): 35 psi

碰撞气 (CAD): 9 psi

为获得较好的稳定和灵敏度, 各化合物监测离子对的去簇电压 (DP) 和碰撞电压 (CE), 目标化合物定量离子对以及内标监测离子对等参数均经过系统优化, 优化信息参见表2。

表2. 化合物定性、定量离子和质谱分析参数

化合物	Q1	Q3	DP/V	CE/V
1-Asn	133.1	86.9	32	39
	133.1	116	32	13
	133.1	74	32	24
2-Tyr	182	165	68	14
	182	136	68	24
	182	91	68	31
3-Val	118.1	72	55	19
	118.1	55	55	30
4-Thr	120	102	45	13
	120	74	45	18
	120	56	45	24
5-Trp	205.1	188	83	15
	205.1	146	83	25
	205.1	118.1	83	31
6-Glu	148.1	130.1	41	14
	148.1	102	41	20
	148.1	84	41	23
7-Ile	132.1	86	71	16
	132.1	69	71	25
8-Phe	166	120.1	86	18
	166	103	86	37
	166	77	86	50
9-Lys	147.1	130.2	49	15
	147.1	84	49	21
	147.1	56.3	49	38
10-Pro	116	70	76	20
	116	68	76	36
11-Asp	134	88.1	43	15
	134	74	43	20
12-Gly	76	30.1	18	15
	76	48.1	18	15
13-Arg	175.1	70	103	29
	175.1	60	103	21
14-GABA	104.1	87	36	12
	104.1	69	36	21
	104.1	45	36	29
15-Hyp	132.1	86	58	21
	132.1	68	58	29
16-Ala	90.1	44	30	22
	106.1	60	30	13
17-Ser	106.1	42	30	32
	156.1	110	65	21
18-His	156.1	83	65	30
	156.1	93	65	31
19-Leu	132.1	86	78	13
	132.1	44	78	31
20-Met	150	133	68	13
	150	104	68	15
	150	61	68	35

1.5 Kinetex HILIC方法

1.5.1 色谱条件

色谱柱: Kinetex HILIC (2.1×100mm, 2.6μm, 100Å) ; P/N:00D-4461-AN

流动相A: 20mmol/L 甲酸铵水 (PH≈3.5) ;

流动相B: 20mmol/L 甲酸铵90%乙腈 (PH≈3.5) ;

流速: 0.4 mL/min;

柱温: 40 °C;

进样量: 5 μL;

梯度程序见表3:

表3. Kinetex HILIC梯度条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0.4	0	100
2.5	0.4	5	95
3.5	0.4	5	95
6.0	0.4	40	60
6.5	0.4	55	45
8.0	0.4	55	45
8.1	0.4	0	100
10.0	0.4	0	100

1.5.2 色谱图

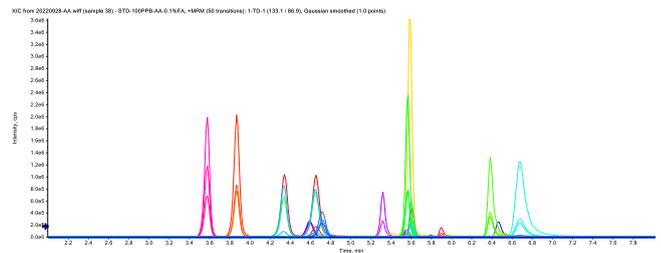


图1. Kinetex HILIC 采集色谱图

1.6 Luna Omega Sugar方法

1.6.1 色谱条件

色谱柱: Luna Omega Sugar (2.1×100mm, 3μm, 100Å) ; P/N:00D-4775-AN

流动相A: 20mmol/L 甲酸铵水 (PH≈3.5) ;

流动相B: 20mmol/L 甲酸铵90%乙腈 (PH≈3.5) ;

流速: 0.4 mL/min;

柱温: 40 °C;

进样量: 5 μL;

梯度程序见表4:

表4. Luna Omega Sugar梯度条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0.4	0	100
1.5	0.4	10	90
3.0	0.4	10	90

5.0	0.4	90	10
7.5	0.4	90	10
7.6	0.4	0	100
10.0	0.4	0	100

1.6.2 色谱图

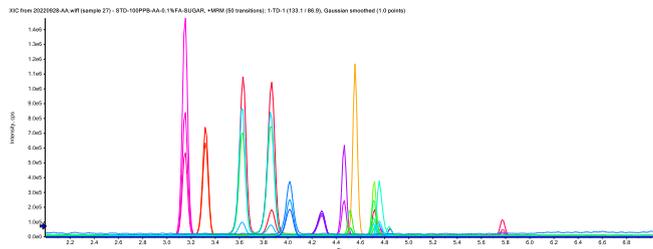


图2. Luna Omega Sugar采集色谱图

1.7 Biozen Glycan方法

1.7.1 色谱条件

- 色谱柱:** Biozen Glycan (2.1×100mm, 2.6μm) ; P/N:00D-4773-AN
- 流动相A:** 20mmol/L 甲酸铵水 (PH≈3.5) ;
- 流动相B:** 20mmol/L 甲酸铵90%乙腈 (PH≈3.5) ;
- 流速:** 0.4 mL/min;
- 柱温:** 40 °C;
- 进样量:** 5 μL;
- 梯度程序见表5:

表5. Biozen Glycan梯度条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0.4	0	100
2.0	0.4	10	90
3.5	0.4	10	90
5.0	0.4	80	20
7.0	0.4	80	20
7.1	0.4	0	100
10.0	0.4	0	100

1.7.2 色谱图

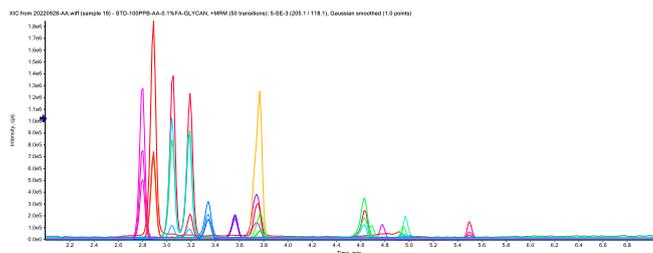


图3. Biozen Glyca采集色谱图

结论

本实验对比了三款色谱柱Kinetex HILIC、Luna Omega Sugar、Biozen Glycan对于20种氨基酸的分离效果和灵敏度差异。从结果看，三款色谱柱分离模式相同，均属于HILIC模式，Sugar和Glycan的保留相对较强，相同流动相条件，它们需要的水相洗脱比例更高，灵敏度比较差异不大，三款色谱柱均可用于氨基酸的质谱分析，后续可根据货期综合考虑选择。





Xccelerator 加速服务

探索分离, 使命加速

Mission to Accelerate Separation

在新药、仿制药研发和科学研究过程中, 抢占先机越来越多被大家提及, 同时在食品、环境、临床等行业的客户也都面临着项目周期压缩的压力。基于此, 我们成立了上海和天津两个方法开发服务中心, 为客户加快项目进度提供支持。

Xccelerator 以客户为中心, 以色谱技术为中心, 为药物研发和科学研究提供全方位加速服务。

三大研发中心

中国天津

地址: 天津市开发区西区南大街179号

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

中国上海

地址: 上海市长宁区福泉北路518号1号楼1层

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

美国总部

地址: 411 Madrid Avenue Torrance, CA 90501-1430, USA

Tel: +1 (310) 212-0555

Fax: +1 (310) 328-7768

Email: cninfo@phenomenex.com

仅用于研究目的, 不可用于临床诊断程序。

© 2022 天津博纳艾杰尔科技有限公司保留所有权利。



如果您对于本方法的执行有任何问题, 或想要了解更多信息, 请拨打400-606-8099 联系我们的技术专家, 我们很乐意为您提供帮助!

Confidential - Company Proprietary

