

使用固相衍生化法分析有机酸和氨基酸

中川裕贵

技术特点

- ◆ 使用 SP-Deriv 可在 10 分钟内完成样品前处理
- ◆ 结合 TraverseMS™ 综合统计工具，5 分钟内完成多变量数据分析
- ◆ 减少高糖含量样品对仪器的污染

前言

分析含糖量高的样品中的有机酸及氨基酸时，前处理过程会遇到诸多问题。例如，冷冻干燥过程中发生爆沸导致样品损失，衍生化过程中，糖分会消耗衍生化试剂，从而导致氨基酸组测定重复性变差。

为解决此类问题，在衍生化之前，通过使用 Presh-SPE 固相萃取柱（Wakayama, Japan, AiSTI Co., Ltd）的固相衍生化法（简称 SP-Deriv），从含糖量高的样品中选择性的除去糖分。

本文采用 AiSTI SCIENCE 株式会社 SP-Deriv 方法分析含糖量高的拿铁咖啡中有有机酸及氨基酸，并将分析结果与 Smart Metabolites Database 方法包推荐的前处理方法（简称传统方法）进行比较。

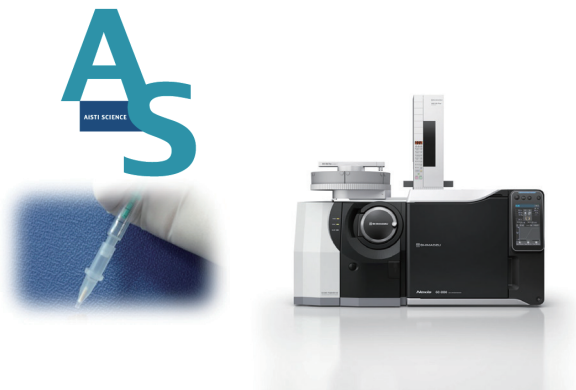


图 1 Presh (左) 与 GCMS-TQ™M8040 NX (右)

样品前处理

分别采用传统方法和 SP-Deriv 方法萃取市售拿铁咖啡中的有机酸和氨基酸。

传统方法：参照岛津制作所代谢组学前处理手册（文件编号 C146-2181），前处理时间约为 1.5 天。

SP-Deriv 方法：参照 Presh-SPE ACX（P/N SA-5589-003、AiSTI SCIENCE 株式会社）的操作说明，移取相同拿铁咖啡试样 50 μ L，于 SP-Deriv 试剂包中甲氧基化和 TMS 衍生化。前处理时间约为 10 分钟。

表 1 仪器配置

GC-MS	: GCMS-TQ 8040 NX
自动注射器	: AOC-20i Plus
自动进样器	: AOC-20s Plus
分析柱	: BPX-5 (30 m \times 0.25 mm I.D., df=0.25 μ m) P/N: 054101

表 2 分析条件

GC	
气化室温度	: 250 °C
进样方式	: 分流
分流比	: 30:1
载气	: 氮气
控制模式	: 恒线速度 (39.0cm/sec)
柱温箱温度	: 60°C (1分) \rightarrow (15°C/分) \rightarrow 330°C (1分) 合计 23.0 分钟
吹扫气流量	: 5 mL/min
进样量	: 1 μ L
MS	
离子源温度	: 200 °C
接口温度	: 280 °C
检测模式	: MRM
MRM 测量离子 (m/z)	: 参见 Smart Metabolites Database

使用三重四极杆质谱仪，MRM 模式进行分析，以提高准确度，改善峰形和缩短分析时间（表 1 和 2）。

■ 结果

使用两种前处理方法处理样品时，拿铁咖啡中检出的有机酸和氨基酸数量基本相同（表 3）。

表 3 有机酸及氨基酸的检出数量

检出化合物数量	传统方法	SP-Deriv方法
有机酸	41	40
氨基酸	7	7

有机酸和氨基酸的重复性 (n=5) 也基本相同 (结果见表 4)。在使用 Presh-SPE 萃取柱处理含糖量高的样品时，无需减少样品量，样品也无需稀释，氨基酸的重复性更好。

表 4 有机酸及氨基酸的重复性

RSD (%)	传统方法	SP-Deriv方法
有机酸	18.0	25.2
氨基酸	47.2	27.2

在传统方法中，爆沸会导致样品损失，猝灭会导致衍生化效率低，进而导致提取效率降低、选择性变差，不能去除糖类组分的干扰，如图 2 所示。

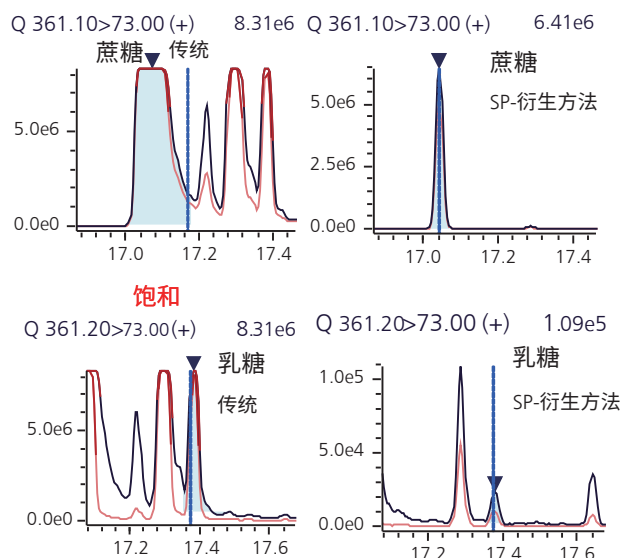


图 2 去除糖分结果比较

通过去除糖分可以明显减少背景干扰，延长仪器维护周期。并且与传统方法相比，SP-Deriv 方法可检测到有机酸和氨基酸数量基本相同。

当进行多变量分析时，考虑到需要进行数据的预处理（缺失值处理、基于 p 值变量处理、基于相关关系的变量处理、基于正态分布的变量处理等）和样品量较多，所以变量 121 和 102 没有太大差异。

表 5 检出的总化合物数量

检测到的化合物数量	传统	Presh
总计	121	102

因此，为进一步提高分析效率，可采用 TraverseMS 软件 (Reifycs 公司)，利用 MRM PROBS 算法，读取数据 5 分钟后即可输出多变量分析结果。

■ 总结

众所周知，含糖量高的样品在预处理过程中容易出现。而样品中的糖分较难去除。

当分析含糖量高的拿铁咖啡等样品时，分别使用传统方法和 AiSTI SCIENCE 株式会社的 SP-Deriv 方法进行样品前处理，SP-Deriv 方法前处理过程仅需 10 分钟，优于传统方法的 1.5 天，而有机酸和氨基酸化合物的检出数量基本一致。

本实验得到了 AiSTI SCIENCE 株式会社佐野僚一先生对固相衍生生化法相关技术指导，在此表示衷心地感谢。

GCMS-TQ、GCMS-QP 及 Smart Metabolites Database 是岛津制作所株式会社在日本和其他国家的商标。
Traverse MS 是 Life Fix 株式会社的商标。

岛津应用云



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话：800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2020 年 11 月