



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

手性氨基酸的测定 柱前衍生—高效液相色谱串联质谱法

High throughput determination of chiral amino acids by pre-column derivatisation—
high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(工作组讨论稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会（SAC/TC387）提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

全国生化检测标准化技术委员会

手性氨基酸的测定 柱前衍生-高效液相色谱串联质谱法

1 范围

本文件规定了采用柱前衍生高效液相色谱串联质谱法检测D-/L-丙氨酸、D-/L-丝氨酸、D-/L-脯氨酸、D-/L-缬氨酸、D-/L-苏氨酸、D-/L-半胱氨酸、D-/L-亮氨酸、D-/L-异亮氨酸、D-/L-天冬酰胺、D-/L-天冬氨酸、D-/L-谷氨酰胺、D-/L-谷氨酸、D-/L-组氨酸、D-/L-苯丙氨酸、D-/L-精氨酸、D-/L-色氨酸、D-/L-赖氨酸、D-/L-鸟氨酸、D-/L-瓜氨酸、D-/L-羟基脯氨酸、D-/L- α -氨基己二酸、D-/L-磷酸丝氨酸、D-/L-犬尿氨酸、D-/L-2-氨基丁酸、D-/L-甲硫氨酸和D-/L-酪氨酸的高通量测定方法。

本文件适用于氨基酸生化试剂、动物组织和血清中上述游离手性氨基酸含量的高通量测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 游离手性氨基酸 Free chiral amino acids

没有与其它氨基酸结合构成蛋白质或肽类物质的单个氨基酸，包括游离D-氨基酸和游离L-氨基酸。

4 原理

试样中的蛋白质经磷基水杨酸蛋白沉淀处理后，采用甲酸水溶液提取氨基酸，在三乙胺的催化下与N- α -(5-氟-2,4-二硝基苯基)-L-丙胺酰胺发生衍生反应，衍生物用三重四极杆液相色谱串联质谱仪测定，内标法定量。

5 试剂耗材

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

5.1.2 乙腈（C₂H₃N）：色谱纯。

5.1.3 醋酸（C₂H₄O₂）：色谱纯。

- 5.1.4 乙酸铵($C_2H_7NO_2$): 色谱纯。
- 5.1.5 丙酮 (C_3H_6O)。
- 5.1.6 三乙胺 ($C_6H_{15}N$)。
- 5.1.7 盐酸: $\rho = 1.19 \text{ g/ml}$, 优级纯。
- 5.1.8 N- α -(5-氟-2,4-二硝基苯基)-L-丙胺酰胺 (Marfey's reagent, FDAA): CAS 号: 95713-52-3。
- 5.1.9 甲酸 (CH_2O_2): 质谱纯。
- 5.1.10 磺基水杨酸 ($C_7H_6O_6S$): 分析纯, CAS 号: 5965-83-3。
- 5.1.11 盐酸 (HCl), 色谱纯。

5.2 试剂配制

- 5.2.1 10%乙腈水溶液: 吸取 10 mL 乙腈, 加入纯水 90 mL, 涡旋混匀。
- 5.2.2 0.1%甲酸水溶液: 准确吸取甲酸 (5.1.9) 50.0 μL 于 50 mL 容量瓶中, 定容至刻度。临用现配。
- 5.2.3 10%磺基水杨酸水溶液: 准确称取 2.50 g 磺基水杨酸 (5.1.10) 用一级水溶解并转移至 25 mL 容量瓶中, 定容至刻度, 室温保存 3 个月。
- 5.2.4 1 mg/mL FDAA 衍生试剂: 准确称取 10.0 mg FDAA (5.1.8) 用丙酮溶解并转移至 10 mL 容量瓶中, 定容至刻度, 临用现配。
- 5.2.5 0.1 mol/L 盐酸水溶液: 准确吸取 556 μL 盐酸溶液 (5.1.7) 于 100 mL 容量瓶中, 用一级水定容至刻度, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 3 个月。
- 5.2.6 0.05 mol/L 三乙胺溶液: 准确称取 0.25g 三乙胺用甲醇溶解并转移至 100 mL 容量瓶中, 定容至刻度, 避光室温保存 3 个月。
- 5.2.7 0.1 mol/L 醋酸溶液: 准确称取 0.60 g 醋酸用一级水溶解并转移至 100 mL 容量瓶中, 定容至刻度, 室温保存 3 个月。
- 5.2.8 10 mmol/L 乙酸铵水溶液: 准确称取 0.77 g 乙酸铵用一级水溶解并转移至 1 L 容量瓶中定容至刻度, 临用现配。

5.3 标准品

L-/D-氨基酸标准物质及稳定同位素内标物, 纯度大于或等于98%或有证标准物质, 26对L-/D-氨基酸中文名称、英文名称、CAS登录号、分子式、相对分子质量等详见附录A; 。

5.4 标准溶液配制

- 5.4.1 外标标准储备液 (2 000 $\mu\text{g/mL}$): 分别准确称取 0.200 g (精确至 0.0001 g) 各标准品用一级水

溶解并转移至 100 mL 容量瓶中，定容至刻度，4 °C 避光保存，保存期为 3 个月。

5.4.2 13 种稳定同位素内标标准储备液（200 µg/mL）：分别准确称取 0.020 g（精确至 0.0001 g）各标准品用一级水溶解并转移至 100 mL 容量瓶中，定容至刻度。4 °C 避光保存，保存期为 3 个月。

5.4.3 外标混合标准中间液（10 µg/mL）：准确移取 125 µL 各外标标准储备液（5.4.1）于 25 mL 容量瓶，用一级水定容至刻度。4 °C 避光保存，保存期为 3 个月。

5.4.4 内标混合标准中间液（10 µg/mL）：准确移取 500 µL 稳定同位素内标标准储备液（5.4.2）于 10 mL 容量瓶中，用一级水定容至刻度。临用现配。

5.4.5 外标混合标准工作液（4 µg/mL）：准确移取 4 mL 外标混合标准中间液（5.4.3）至 10 mL 容量瓶中，用一级水定容至刻度。临用现配。

5.4.6 内标混合标准工作液（2.5 µg/mL）：准确移取 1.25 mL 内标混合标准中间液（5.4.4）至 5 mL 容量瓶中，用一级水定容至刻度。临用现配。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联三重四极杆质谱仪：配有电喷雾（ESI）离子源。

6.2 分析天平：感量 0.0001 g。

6.3 恒温水浴装置。

6.4 冷冻高速离心机，转速不低于 18 000 r/min。

6.5 涡旋混合器。

6.6 超声波清洗仪。

7 分析步骤

7.1 试样提取

7.1.1 生化试剂（固体）和生物组织样本

称取约 25mg 固体样本，分别加入 10 µL 2500 ppb 内标、10 µL 10% 磺基水杨酸和 180 µL 0.1% 甲酸水后加入两颗钢珠振荡研磨仪研磨 3 min，加入 300 µL 0.1% 磺基水杨酸涡旋混匀后超声 15 min，于 4 °C 18000 r 离心机离心 15min 取 50 µL 上清液，待衍生。

7.1.2 生化试剂（液体）和生物血液样本

准确移取 100 µL 液体样本，分别加入 10 µL 2500ppb 内标和 10 µL 10% 磺基水杨酸后加入 380 µL 0.1% 甲酸水定容至 500 µL 涡旋混匀后超声 15min，于 4 °C 18000 r 离心机离心 15 min 取 50 µL 上清

液，待衍生。

注：新鲜血清样品若不立即检测，应于2℃~8℃避光保存，保存时间不超过1周。-20℃及以下避光可稳定保存28天，可根据实际情况进行符合要求的相应调整。使用前应在室温下避光将血清融化、充分混匀。

7.2 衍生

精密吸取上述待衍生溶液50 μL(7.1.1, 7.1.2)置于1.5 mL离心管中，加入衍生试剂FDAA(1.0 mg/mL)溶液100 μL，加入50 μL 0.05 mol/L 三乙胺溶液，涡旋混匀，拧紧管盖并采用封口膜密封，置于40℃水浴锅中反应16 h，取出后加入50 μL 0.1 mol/L 醋酸溶液，150 μL 10%乙腈水溶液，涡旋混匀后转移至进样小瓶待测定。

7.3 仪器参考条件

7.3.1 液相条件

- 色谱柱：五氟苯基柱，或相当者；
- 流动相：乙腈和10 mmol/L乙酸铵水溶液；
- 流速：0.5 mL/min；
- 柱温：35℃±0.5℃；
- 样量：1 μL；
- 洗脱梯度见表1。

表1 超高效液相色谱洗脱梯度参考条件

| 时间 (min) | 流速 (mL/min) | 流动相A (%) | 流动相B (%) |
|-------------|----------------|-------------|-------------|
| 0.000 | 0.500 | 90 | 10 |
| 2.000 | 0.500 | 90 | 10 |
| 20.000 | 0.500 | 55 | 45 |
| 21.000 | 0.500 | 0 | 100 |
| 23.000 | 0.500 | 0 | 100 |
| 23.100 | 0.500 | 90 | 10 |
| 27.000 | 0.500 | 90 | 10 |

7.3.2 质谱条件

- 离子源：电喷雾离子源（ESI）；
- 检测方式：多反应监测（MRM）；
- 扫描方式：负离子模式；
- 毛细管电压：负离子模式：5 500 V；
- 离子源温度：350℃；
- 气帘气：30 psi；
- 喷雾气：40 psi；
- 辅助加热气：40 psi；

i) 碰撞气: 9 psi;

j) 监测离子对和定量离子对等信息详见附录B; 26对L-/D-氨基酸及13种内标物的多反应监测(MRM)质量色谱图详见附录C。

7.4 标准曲线的制作

用0.1%甲酸水溶液(5.2.2)、4 μg/mL外标混合标准工作液(5.4.5)、2.5 μg/mL内标混合标准工作液(5.4.6)配制混合标准溶液工作曲线: 0.5、1、2.5、5、10、25、50、100、250、500、1000 ng/mL。标准系列工作溶液中各内标的浓度为62.5 ng/mL。配置完成后取50 μL标准溶液进行衍生步骤同7.2衍生方法。

将衍生后标准系列工作液由低浓度到高浓度依次进样,以26对手性氨基酸与相应同位素内标的峰面积比值为纵坐标,以标准系列工作液浓度(ng/mL)为横坐标,分别绘制26对手性氨基酸的标准曲线。不同物质根据实际情况采用不同范围的标准曲线。

7.5 定性和定量

7.5.1 保留时间

被测试样中目标色谱峰与相应标准色谱峰的保留时间相比较,相对误差应在±2.5%之内。

7.5.2 离子丰度比

按照高效液相色谱-串联质谱条件测定试样和标准工作溶液,记录试样和标准溶液中各化合物的色谱保留时间,以相对于最强离子丰度的百分比作为定性离子对的相对丰度,记录浓度相当的试样与标准工作溶液中相应成分的相对离子丰度。

表 2 定性时离子丰度比的最大允许偏差

| 相对丰度 (%) | 最大允许偏差 (%) |
|----------------------|------------|
| $K > 50\%$ | ± 20 |
| $50\% \geq K > 20\%$ | ± 25 |
| $20\% \geq K > 10\%$ | ± 30 |
| $K \leq 10\%$ | ± 50 |

7.5.3 试样溶液的测定

将处理完毕的试样(7.1)按仪器参考条件(7.3)进行测定,得到相应的样品溶液的色谱峰面积。根据标准曲线得到待测液中组分的浓度,平行测定次数不少于两次。

8 结果计算

将液相色谱-质谱测得浓度代入下式计算含量:

$$X = \frac{c \times V_1}{V_2} K \dots \dots \dots (1)$$

式中:

X — 试样中各待测物的含量,单位为纳克每毫升(ng/mL);

c — 从标准曲线中读出的供试品溶液中各待测物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V₁ — 样液最终定容体积,单位为毫升(mL);

V_2 — 取样体积，单位为毫升（mL）；

K— 稀释倍数。

结果保留三位有效数字。

9 灵敏度、精密度

9.1 灵敏度

各氨基酸的定量限及检出限见附录D。

9.2 精密度

依据已发布的行业标准等规范性文件，对方法的精密度进行验证，定量检测下限浓度附近低值 $CV < 20\%$ ，其余浓度 $CV < 15\%$ 。

全国生化检测标准化技术委员会

附录 A
(规范性)

26 种手性氨基酸的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量

表 A.1 26 种手性氨基酸标准品的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量

| 序号 | 中文名称 | 英文名称 | CAS号 | 分子式 | 相对分子质量 |
|----|--------|-----------------|------------|---|--------|
| 1 | L-精氨酸 | L-Arginine | CAS号 | C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂ | 174.2 |
| 2 | D-精氨酸 | D-Arginine | 74-79-3 | C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂ | 174.2 |
| 3 | L-赖氨酸 | L-Lysine | 157-06-2 | C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ | 146.19 |
| 4 | D-赖氨酸 | D-Lysine | 56-87-1 | C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ | 146.19 |
| 5 | L-天冬酰胺 | L-Asparagine | 923-27-3 | C ₄ H ₈ N ₂ O ₃ | 132.12 |
| 6 | D-天冬酰胺 | D-Asparagine | 70-47-3 | C ₄ H ₈ N ₂ O ₃ | 132.12 |
| 7 | L-天冬氨酸 | L-Aspartic acid | 2058-58-4 | C ₄ H ₇ NO ₄ | 133.1 |
| 8 | D-天冬氨酸 | D-Aspartic acid | 56-84-8 | C ₄ H ₇ NO ₄ | 133.1 |
| 9 | L-谷氨酸 | L-Glutamic acid | 1783-96-6 | C ₅ H ₉ NO ₄ | 147.13 |
| 10 | D-谷氨酸 | D-Glutamic acid | 56-86-0 | C ₅ H ₉ NO ₄ | 147.13 |
| 11 | L-谷氨酰胺 | L-Glutamine | 6893-26-1 | C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃ | 146.14 |
| 12 | D-谷氨酰胺 | D-Glutamine | 56-85-9 | C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃ | 146.14 |
| 13 | L-甲硫氨酸 | L-Methionine | 5959-95-5 | C ₅ H ₁₁ NO ₂ S | 149.21 |
| 14 | D-甲硫氨酸 | D-Methionine | 63-68-3 | C ₅ H ₁₁ NO ₂ S | 149.21 |
| 15 | L-苏氨酸 | L-Threonine | 348-67-4 | C ₄ H ₉ NO ₃ | 119.12 |
| 16 | D-苏氨酸 | D-Threonine | 72-19-5 | C ₄ H ₉ NO ₃ | 119.12 |
| 17 | L-苯丙氨酸 | L-Phenylalanine | 632-20-2 | C ₉ H ₁₁ NO ₂ | 165.19 |
| 18 | D-苯丙氨酸 | D-Phenylalanine | 63-91-2 | C ₉ H ₁₁ NO ₂ | 165.19 |
| 19 | L-酪氨酸 | L-Tyrosine | 673-06-3 | C ₉ H ₁₁ NO ₃ | 181.19 |
| 20 | D-酪氨酸 | D-Tyrosine | 60-18-4 | C ₉ H ₁₁ NO ₃ | 181.19 |
| 21 | L-色氨酸 | L-Tryptophan | 556-02-5 | C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂ | 204.23 |
| 22 | D-色氨酸 | D-Tryptophan | 73-22-3 | C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂ | 204.23 |
| 23 | L-丙氨酸 | L-Alanine | 153-94-6 | C ₃ H ₇ NO ₂ | 89.09 |
| 24 | D-丙氨酸 | D-Alanine | 56-41-7 | C ₃ H ₇ NO ₂ | 89.09 |
| 25 | L-组氨酸 | L-Histidine | 338-69-2 | C ₆ H ₉ N ₃ O ₂ | 155.15 |
| 26 | D-组氨酸 | D-Histidine | 71-00-1 | C ₆ H ₉ N ₃ O ₂ | 155.15 |
| 27 | L-丝氨酸 | L-Serine | 351-50-8 | C ₃ H ₇ NO ₃ | 105.09 |
| 28 | D-丝氨酸 | D-Serine | 56-45-1 | C ₃ H ₇ NO ₃ | 105.09 |
| 29 | L-脯氨酸 | L-Proline | 312-84-5 | C ₅ H ₉ NO ₂ | 115.13 |
| 30 | D-脯氨酸 | D-Proline | 147-85-3 | C ₅ H ₉ NO ₂ | 115.13 |
| 31 | L-犬尿氨酸 | L-Kynurenine | 344-25-2 | C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃ | 208.20 |
| 32 | D-犬尿氨酸 | D-Kynurenine | 2922-83-0 | C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃ | 208.20 |
| 33 | L-半胱氨酸 | L-Cysteine | 13441-51-5 | C ₃ H ₇ NO ₂ S | 121.16 |

| 序号 | 中文名称 | 英文名称 | CAS号 | 分子式 | 相对分子质量 |
|----|------------|-----------------------|------------|--|--------|
| 34 | D-半胱氨酸 | D-Cysteine | 52-90-4 | C ₃ H ₇ NO ₂ S | 121.16 |
| 35 | L-亮氨酸 | L-Leucine | 921-01-7 | C ₆ H ₁₃ NO ₂ | 131.17 |
| 36 | D-亮氨酸 | D-Leucine | 61-90-5 | C ₆ H ₁₃ NO ₂ | 131.17 |
| 37 | L-异亮氨酸 | L-Isoleucine | 328-38-1 | C ₆ H ₁₃ NO ₂ | 131.17 |
| 38 | D-异亮氨酸 | D-Isoleucine | 73-32-5 | C ₆ H ₁₃ NO ₂ | 131.17 |
| 39 | L-缬氨酸 | L-Valine | 319-78-8 | C ₅ H ₁₁ NO ₂ | 117.15 |
| 40 | D-缬氨酸 | D-Valine | 72-18-4 | C ₅ H ₁₁ NO ₂ | 117.15 |
| 41 | L-2-氨基丁酸 | L-2-Aminobutyric acid | 640-68-6 | C ₄ H ₉ NO ₂ | 103.12 |
| 42 | D-2-氨基丁酸 | D-2-Aminobutyric acid | 1492-24-6 | C ₄ H ₉ NO ₂ | 103.12 |
| 43 | L-瓜氨酸 | L-Citrulline | 2623-91-8 | C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃ | 175.19 |
| 44 | D-瓜氨酸 | D-Citrulline | 372-75-8 | C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃ | 175.19 |
| 45 | L-磷酸丝氨酸 | L-O-Phosphoserine | 407-41-0 | C ₃ H ₈ NO ₆ P | 185.07 |
| 46 | D-磷酸丝氨酸 | D-O-Phosphoserine | 73913-63-0 | C ₃ H ₈ NO ₆ P | 185.07 |
| 47 | L-鸟氨酸 | L-Ornithine | 41617 | C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂ | 132.16 |
| 48 | D-鸟氨酸 | D-Ornithine | 70-26-8 | C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂ | 132.16 |
| 49 | 4-羟基-L-脯氨酸 | L-Hydroxyproline | 16682-12-5 | C ₅ H ₉ NO ₃ | 131.13 |
| 50 | 4-羟基-D-脯氨酸 | D-Hydroxyproline | 51-35-4 | C ₅ H ₉ NO ₃ | 131.13 |
| 51 | L-2-氨基己二酸 | L-2-Amino adipic acid | 2584-71-6 | C ₆ H ₁₁ NO ₃ | 161.16 |
| 52 | D-2-氨基己二酸 | D-2-Amino adipic acid | 1118-90-7 | C ₆ H ₁₁ NO ₃ | 161.16 |

注：纯度均≥98%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

附录 B

26 对手性氨基酸及内标物的定量定性离子对及碰撞能量、碎裂电压

26对手性氨基酸及内标物的定量定性离子对及碰撞能量、碎裂电压见表B.1。

表 B.1 26对手性氨基酸及内标物的定量定性离子对及碰撞能量、碎裂电压

| 序号 | 化合物 | 母离子 (m/z) | 子离子 (m/z) | 碰撞能量 (V) | 碎裂电压 (V) |
|----|--------|---------------|---------------|----------|----------|
| 1 | 丙氨酸 | 340 | 231.107 | 11.78 | 67 |
| | | | 261.125* | 12.92 | 67 |
| 2 | 2-氨基丁酸 | 354.2 | 275.155 | 12.75 | 55 |
| | | | 292.137* | 9.97 | 55 |
| 3 | 丝氨酸 | 356.2 | 162.071* | 25.72 | 59 |
| | | | 192.071 | 14.94 | 59 |
| 4 | 脯氨酸 | 366.2 | 232.054* | 17.76 | 67 |
| | | | 248.125 | 15.36 | 67 |
| 5 | 缬氨酸 | 368 | 190.774 | 20.92 | 59 |
| | | | 263.161* | 12.03 | 59 |
| 6 | 磷酸丝氨酸 | 436.0 | 216.0 | 25.0 | 78 |
| | | | 338.0* | 35.0 | 78 |
| 7 | 苏氨酸 | 370 | 162.071* | 26.36 | 58 |
| | | | 192.071 | 15.28 | 58 |
| 8 | 羟基脯氨酸 | 382 | 176.042 | 27.33 | 66 |
| | | | 248.071* | 17.47 | 66 |
| 9 | 亮氨酸 | 382 | 288.125 | 20.54 | 55 |
| | | | 320.125* | 10.77 | 55 |
| 10 | 异亮氨酸 | 382.161 | 263.071 | 10.253 | 67 |
| | | | 320.111* | 10.253 | 67 |
| 11 | 天冬酰胺 | 383.122 | 176* | 26.57 | 44 |
| | | | 321 | 10.253 | 44 |
| 12 | 天冬氨酸 | 384.122 | 268* | 15.562 | 74 |
| | | | 340 | 10.253 | 74 |
| 13 | 谷氨酰胺 | 397.152 | 289 | 12.983 | 66 |

| | | | | | |
|----|---|---------|----------|--------|-----|
| | | | 353* | 10.253 | 66 |
| 14 | 谷氨酸 | 398.122 | 201.946 | 25.18 | 48 |
| | | | 354.214* | 14.998 | 48 |
| 15 | 甲硫氨酸 | 400 | 274.125* | 16.42 | 60 |
| | | | 338.125 | 10.64 | 60 |
| 16 | 氨基己二酸 | 412.05 | 216.071 | 21 | 86 |
| | | | 368.125* | 14 | 86 |
| 17 | 苯丙氨酸 | 416.2 | 265.125 | 24.84 | 65 |
| | | | 337.155* | 13.64 | 65 |
| 18 | 精氨酸 | 425.183 | 274* | 15.663 | 78 |
| | | | 381.125 | 10.253 | 78 |
| 19 | 瓜氨酸 | 426 | 321.155 | 12.96 | 63 |
| | | | 383.125* | 10.9 | 63 |
| 20 | 色氨酸 | 455.2 | 264.125* | 12.41 | 73 |
| | | | 376.137 | 15.19 | 73 |
| 21 | 犬尿氨酸 | 459 | 207 | 24 | 75 |
| | | | 268.017* | 13.26 | 75 |
| 22 | 鸟氨酸 | 635.183 | 274* | 25.421 | 128 |
| | | | 483.04 | 20.517 | 128 |
| 23 | 赖氨酸 | 649.183 | 407 | 36.292 | 128 |
| | | | 479.125* | 22.944 | 128 |
| 24 | 组氨酸 | 658.23 | 506.208 | 29.01 | 124 |
| | | | 549.208* | 19.66 | 124 |
| 25 | 酪氨酸 | 684 | 280.125 | 44.51 | 116 |
| | | | 352.155* | 26.1 | 116 |
| 26 | 半胱氨酸 | 743.2 | 294.155 | 29.47 | 119 |
| | | | 338.125* | 23.58 | 119 |
| 27 | L-天冬氨酸- ¹³ C ₄ | 389.1 | 329.113 | 5.25 | 70 |
| | | | 348.125* | 5.25 | 70 |
| 28 | L-丙氨酸- ¹³ C ₃ | 343.5 | 254.012 | 11.19 | 62 |
| | | | 263.167* | 11.07 | 62 |
| 29 | L-丝氨酸- ¹³ C ₃ , ¹⁵ N | 360.5 | 263.155* | 14.52 | 46 |
| | | | 324.208 | 8.75 | 46 |

| | | | | | |
|----|---|--------|----------|-------|-----|
| 30 | L-脯氨酸-D ₃ | 369.5 | 233.042 | 18.69 | 52 |
| | | | 249.125* | 13.76 | 52 |
| 31 | L-亮氨酸-D ₃ | 385.5 | 288.208 | 19.91 | 53 |
| | | | 323.208* | 10.27 | 53 |
| 32 | L-天冬酰胺- ¹⁵ N ₂ | 385.66 | 270.107* | 14.18 | 63 |
| | | | 307.125 | 14.18 | 63 |
| 33 | L-天冬氨酸- ¹⁵ N ₂ | 387.05 | 141* | 13.47 | 60 |
| | | | 235.054 | 23.28 | 60 |
| 34 | L-谷氨酰胺- ¹⁵ N ₂ | 399.7 | 292.125 | 14.69 | 58 |
| | | | 356.125* | 11.91 | 58 |
| 35 | L-谷氨酸- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N | 404.5 | 278.155 | 15.19 | 59 |
| | | | 359.155* | 13.76 | 59 |
| 36 | L-苯丙氨酸-D ₅ | 421.5 | 270.125* | 24.67 | 57 |
| | | | 342.208 | 13 | 57 |
| 37 | L-精氨酸- ¹⁵ N ₄ | 429.1 | 275.125* | 17.09 | 68 |
| | | | 385.208 | 11.78 | 68 |
| 38 | L-色氨酸- ¹³ C ₁₁ , ¹⁵ N ₂ | 468.5 | 266.125* | 12.41 | 67 |
| | | | 388.208 | 14.35 | 67 |
| 39 | L-鸟氨酸-D ₆ | 641.5 | 263.083* | 25.98 | 96 |
| | | | 277.137 | 28.46 | 96 |
| 40 | L-赖氨酸- ¹⁵ N ₂ | 651.2 | 409.137 | 39.29 | 102 |
| | | | 481.208* | 25.3 | 102 |

注：带*为定量离子。对于不同质谱仪器，仪器参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化到最佳。

附录 C

(资料性)

26 种手性氨基酸衍生物的多反应监测 (MRM) 图

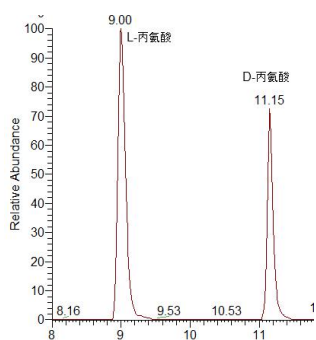


图 B.1 D/L-丙氨酸

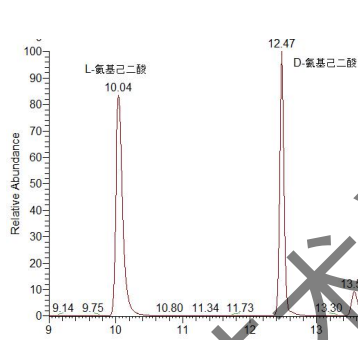


图 B.2 D/L-氨基己二酸

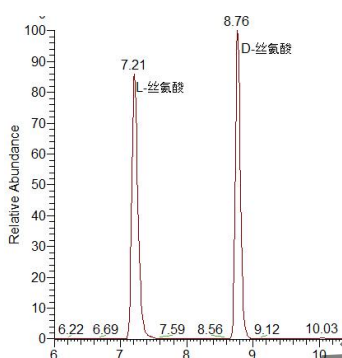


图 B.3 D/L-丝氨酸

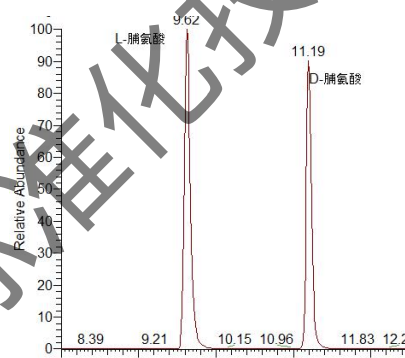


图 B.4 D/L-脯氨酸

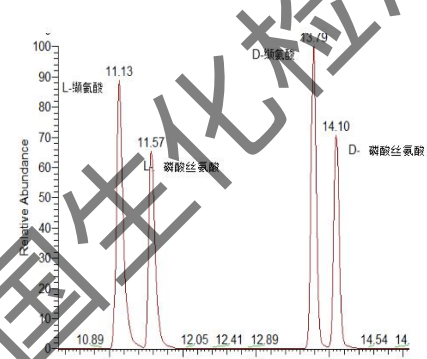


图 B.5 D/L-磷酸丝氨酸

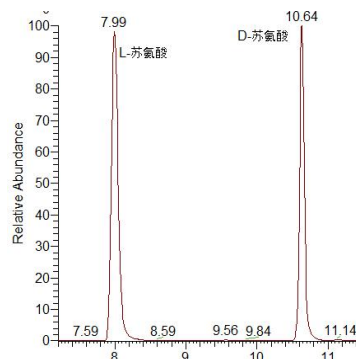


图 B.6 D/L-苏氨酸

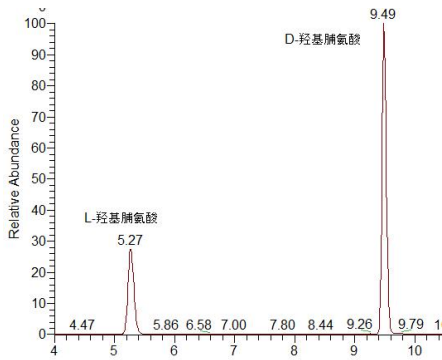


图 B.7 D/L-羟基脯氨酸

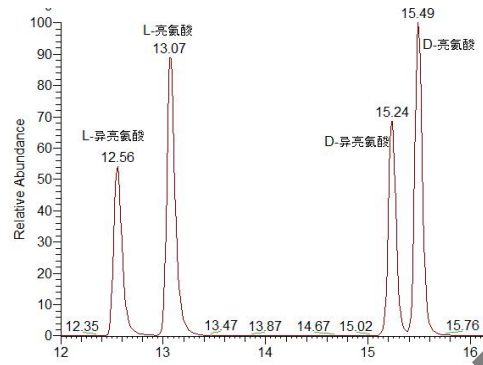


图 B.8 D/L-异亮氨酸

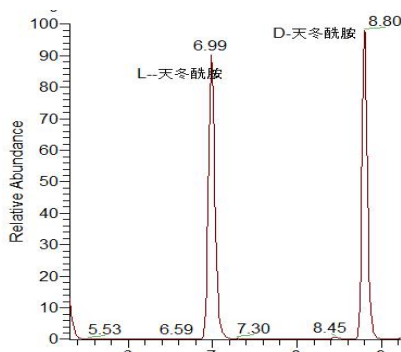


图 B.9 D/L-天冬酰胺

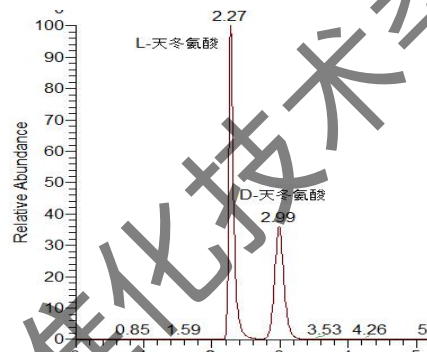


图 B.10 D/L-天冬氨酸

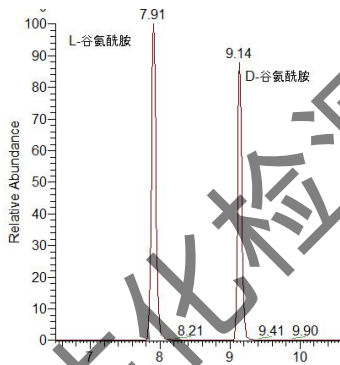


图 B.11 D/L-谷氨酰胺

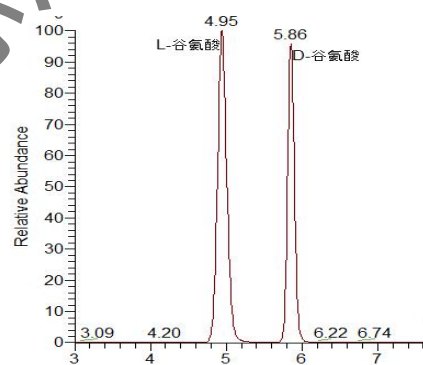


图 B.12 D/L-谷氨酸

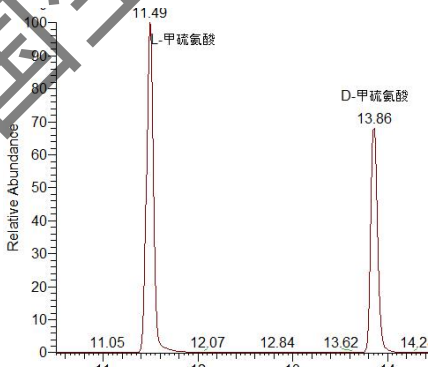


图 B.13 D/L-甲硫氨酸

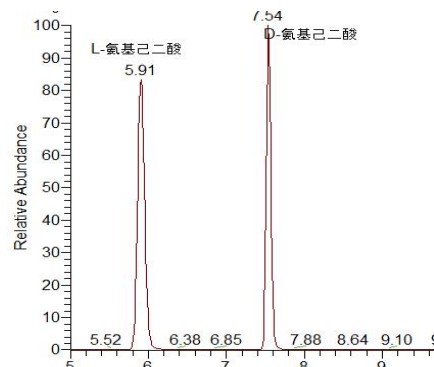


图 B.14 D/L-氨基己二酸

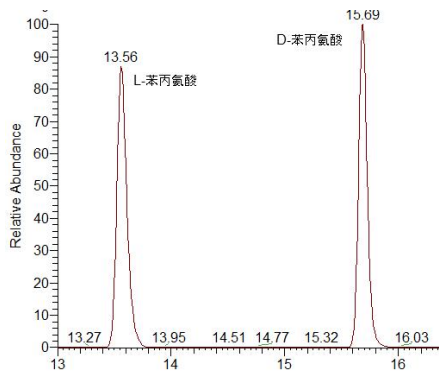


图 B. 15 D/L -苯丙氨酸

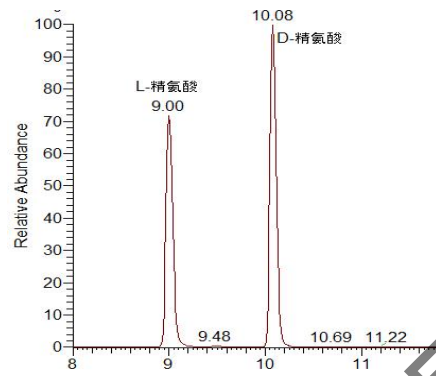


图 B. 16 D/L -精氨酸

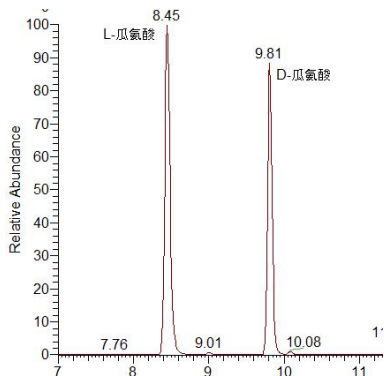


图 B. 17 D/L-瓜氨酸

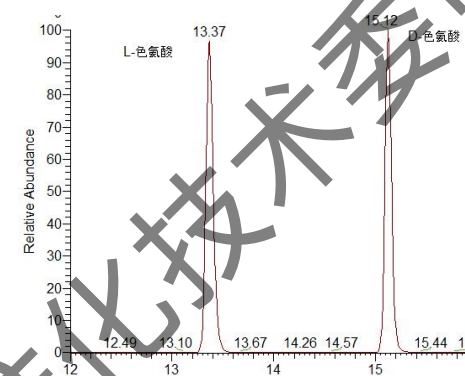


图 B. 18 D/L -色氨酸

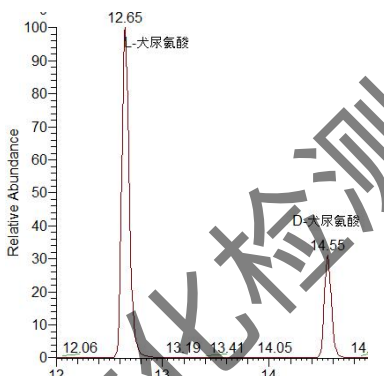


图 B. 19 D/L -犬尿氨酸

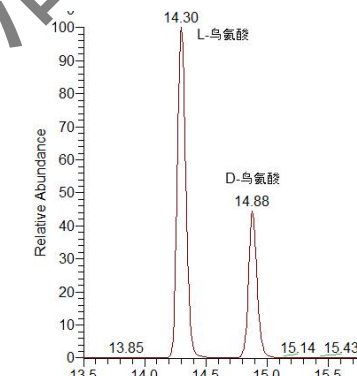


图 B. 20 D/L -鸟氨酸

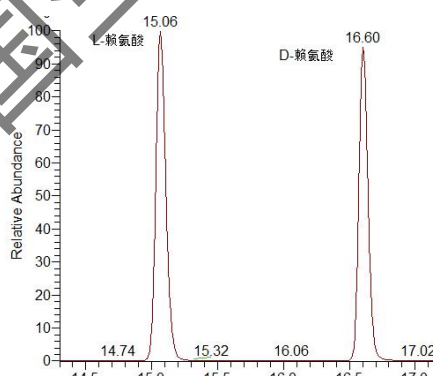


图 B. 21 D/L-赖氨酸

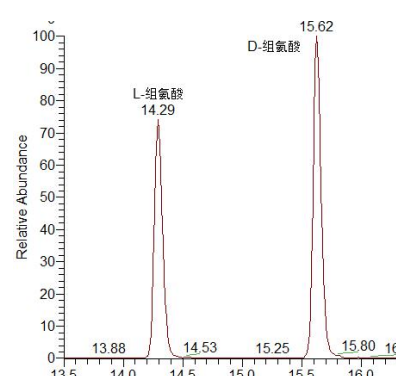
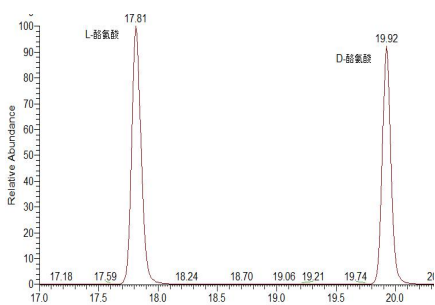
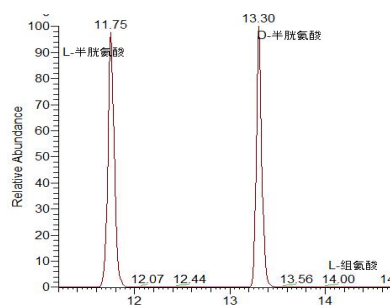


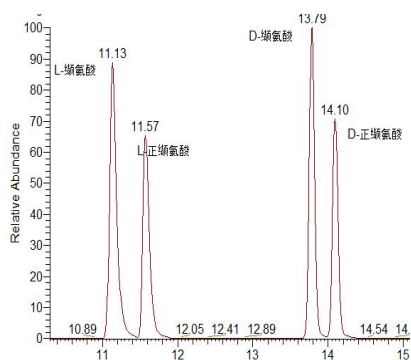
图 B. 22 D/L-组氨酸



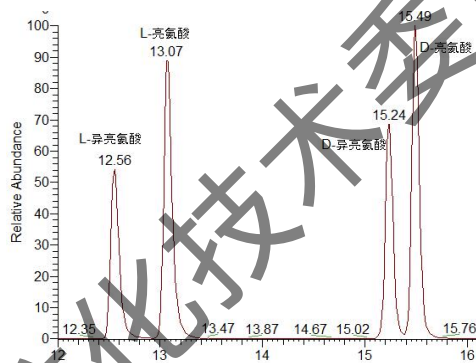
图B. 23 D/L-酪氨酸



图B. 24 D/L-半胱氨酸



图B. 25 D/L-缬氨酸



图B. 26 D/L-亮氨酸

全国生化检测标准

附录 D

26 对手性氨基酸的检出限、定量限

26对手性氨基酸的检出限、定量限见表D.1。

表 D.1 26对氨基酸的检出限、定量限

| 序号 | 名称 | 定量限 (ng/mL) | 检出限 (ng/mL) |
|----|--------------------|-------------|-------------|
| 1 | D-丙氨酸 | 2.5 | 1.0 |
| 2 | D-苏氨酸 | 2.5 | 1.0 |
| 3 | D-丝氨酸 | 2.5 | 1.0 |
| 4 | D-脯氨酸 | 1.0 | 0.5 |
| 5 | D-精氨酸 | 2.5 | 1.0 |
| 6 | D-赖氨酸 | 2.5 | 1.0 |
| 7 | D-半胱氨酸 | 10.0 | 2.5 |
| 8 | D-酪氨酸 | 5.0 | 2.5 |
| 9 | D-苯丙氨酸 | 2.5 | 1.0 |
| 10 | D-谷氨酸 | 5.0 | 2.5 |
| 11 | D-谷氨酰胺 | 10.0 | 5.0 |
| 12 | D-天冬氨酸 | 5.0 | 2.5 |
| 13 | D-天冬酰胺 | 10.0 | 2.5 |
| 14 | D-蛋氨酸 | 5.0 | 2.5 |
| 15 | D-色氨酸 | 5.0 | 2.5 |
| 16 | D-缬氨酸 | 5.0 | 2.5 |
| 17 | D-亮氨酸 | 1.0 | 0.5 |
| 18 | D-异亮氨酸 | 2.5 | 1.0 |
| 19 | D-组氨酸 | 2.5 | 1.0 |
| 20 | D-鸟氨酸 | 2.5 | 1.0 |
| 21 | D-犬尿氨酸 | 5.0 | 2.5 |
| 22 | D- α -氨基己二酸 | 10.0 | 5.0 |
| 23 | D-2-氨基丁酸 | 2.5 | 1.0 |
| 24 | D-磷酸丝氨酸 | 2.5 | 1.0 |
| 25 | D-瓜氨酸 | 5.0 | 2.5 |
| 26 | D-羟基脯氨酸 | 5.0 | 2.5 |
| 27 | L-丙氨酸 | 2.5 | 1.0 |
| 28 | L-苏氨酸 | 2.5 | 1.0 |

| | | | |
|----|--------------------|------|-----|
| 29 | L-丝氨酸 | 2.5 | 1.0 |
| 30 | L-脯氨酸 | 2.5 | 1.0 |
| 31 | L-精氨酸 | 2.5 | 1.0 |
| 32 | L-赖氨酸 | 2.5 | 1.0 |
| 33 | L-半胱氨酸 | 5.0 | 2.5 |
| 34 | L-酪氨酸 | 2.5 | 1.0 |
| 35 | L-苯丙氨酸 | 2.5 | 1.0 |
| 36 | L-谷氨酸 | 2.5 | 1.0 |
| 37 | L-谷氨酰胺 | 2.5 | 1.0 |
| 38 | L-天冬氨酸 | 5.0 | 2.5 |
| 39 | L-天冬酰胺 | 5.0 | 2.5 |
| 40 | L-蛋氨酸 | 5.0 | 2.5 |
| 41 | L-色氨酸 | 5.0 | 2.5 |
| 42 | L-缬氨酸 | 10.0 | 2.5 |
| 43 | L-亮氨酸 | 2.5 | 1.0 |
| 44 | L-异亮氨酸 | 10.0 | 1.0 |
| 45 | L-组氨酸 | 2.5 | 1.0 |
| 46 | L-鸟氨酸 | 2.5 | 1.0 |
| 47 | L-犬尿氨酸 | 2.5 | 1.0 |
| 48 | L- α -氨基己二酸 | 2.5 | 1.0 |
| 49 | L-2-氨基丁酸 | 5.0 | 2.5 |
| 50 | L-磷酸丝氨酸 | 5.0 | 2.5 |
| 51 | L-瓜氨酸 | 10.0 | 1.0 |
| 52 | L-羟基脯氨酸 | 5.0 | 2.5 |

参 考 文 献

- [1] Wu, S., Ye, Q., Wu, D., Tao, Y., & Kong, Y. (2020). Enantioselective recognition of chiral tryptophan with achiral glycine through the strategy of chirality transfer. *Anal. Chem.*, 92(17), 11927-11934. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02335>
- [2] Huang, R., Shen, K., He, Q., Hu, Y., Sun, C., Guo, C., & Pan, Y. (2021). Metabolic profiling of urinary chiral amino-containing biomarkers for gastric cancer using a sensitive chiral chlorine-labeled probe by HPLC-MS/MS. *J. Proteome Res*, 20(8), 3952-3962. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00267>
- [3] Han, M., Xie, M., Han, J., Yuan, D., Yang, T., & Xie, Y. (2018). Development and validation of a rapid, selective, and sensitive LC-MS/MS method for simultaneous determination of d-and l-amino acids in human serum: application to the study of hepatocellular carcinoma. *Anal. Bioanal. Chem.*, 410, 2517-2531.

全国生化检测标准化技术委员会