

质谱技术在氨基酸分析方法中的应用

熊霞, 杨焕胜, 印遇龙*

(中国科学院亚热带农业生态研究所, 湖南长沙, 410125)

摘要:氨基酸分析方法是测定含游离氨基酸, 多肽或蛋白质样品中氨基酸含量的方法。在过去几十年中, 氨基酸分析主要是由经典的柱后衍生-离子交换色谱和柱前衍生-高效液相色谱完成的。随着现代氨基酸分析技术的发展, 高通量和高灵敏性的质谱被广泛应用于氨基酸分析中, 并发挥了重要的作用。作者就近年来国内外气相色谱、液相色谱和毛细管电泳与质谱联用技术在氨基酸分析中的应用进行了综述并比较了这几种氨基酸分析技术。

关键词:氨基酸分析; 色谱; 毛细管电泳; 质谱

中图分类号:Q 33 **文献标志码:**A **文章编号:**1673—1689(2012)011—1121—07

Application of Mass Spectrometry in Amino Acids Analysis

XIONG Xia, YANG Huan-sheng, YIN Yu-long*

(Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China)

Abstract: Amino acid analysis is used to determine the amino acid content of amino acid-, peptide- and protein-containing samples. In the last decades, amino acid separations have been carried out mainly by ion-exchange chromatography with post-column derivatization and RP-HPLC with pre-column derivatization. Along with the modern technique of amino acid analysis, high throughput and sensitivity mass spectrometry has been widely used in the analysis of amino acids and brings significant benefits. This review focus on the application of the gas chromatography, liquid chromatography and capillary electrophoresis in combination with mass spectrometry in the analysis of amino acids, for which comparison are made.

Keywords: amino acid analysis, chromatography, capillary electrophoresis, mass spectrometry

氨基酸不仅是蛋白质的组成单位, 也是参与调节基因表达和蛋白质磷酸化级联反应的细胞信号分子。此外, 氨基酸还是肠道主要能量来源和合成神经递质、多胺和 NO 的前体物质^[1-3]。氨基酸作为代谢过程的重要靶标, 它们的定量分析对于疾病诊断

以及阐明不同营养状况对机体生理机能的影响非常重要。氨基酸分析方法就是测定含游离氨基酸, 多肽或蛋白质样品中氨基酸含量的方法。目前, 氨基酸分析在氨基酸代谢系统疾病的临床诊断、生物医药研究、生物工程、食品科学等领域中有着广泛

收稿日期: 2012-07-01

基金项目: 国家自然科学基金重大国际合作项目(31110103909); 国家 973 计划项目(2009CB118800)。

作者简介: 熊霞(1979—), 女, 湖南长沙人, 理学博士, 副研究员, 主要从事动物营养研究。E-mail: xx79911@126.com

* 通信作者: 印遇龙(1951—), 男, 湖南桃源人, 理学博士, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事氨基酸营养研究。E-mail: yinyulong@isa.ac.cn

而重要的应用^[4]。

目前存在的氨基酸分析方法有柱前衍生-离子交换色谱^[5-8]、气相色谱^[9-12]、液相色谱^[13-14]和毛细管电泳^[15-16]等。在过去几十年中,氨基酸分析主要是通过柱前衍生-离子交换色谱和邻苯二甲醛(OPA)与氯甲酸苄酯(FMOC)柱前衍生-液相色谱分离,光度检测法检测完成的。柱前衍生-离子交换色谱法重复性高,但分析时间长,耗费高。柱前衍生液相色谱法灵敏快速,但对分析物的特异性不强。而且这两种方法都不能区分¹⁴N和¹⁵N标记氨基酸,不能进行同位素标记定量。随着现代氨基酸分析技术的发展,质谱作为高选择性和高灵敏度的检测工具,在氨基酸分析中发挥着重要作用。作者就近30年来国内外液相色谱-质谱联用(LC-MS)、气相色谱质谱联用(GC-MS)和毛细管电泳-质谱联用(GE-MS)技术在氨基酸分析中的应用进行了综述并对目前存在的主要氨基酸分析技术进行了比较。

1 氨基酸分析中的色谱或电泳与质谱联用技术

1.1 样品制备

根据不同的样品特性通常采取不同的预处理以保证氨基酸分析的准确^[18-19],如对不同状态(液体或固体)、食品或生物样品采取的预处理方式不同。如果是分析生物样品中的游离氨基酸首先需要去掉其中的蛋白质,通常采用的去蛋白试剂为磺基水杨酸、三氯乙酸或高氯酸去蛋白然后超滤。如果样品中含有质量分数10%以上的脂肪,则可能需要在水解前对样品进行脱脂,特别是对分析样品中色氨酸来说这点更是重要。而蛋白质或多肽中的氨基酸分析首先需要把蛋白质或多肽水解成氨基酸后再进行分析,水解方法包括酸水解、碱水解、酶水解和微波水解,具体方法详见相关文献^[18-19]。此外,根据分离仪器的不同,需要不同的样品的预处理,如反相高效液相色谱(RP-HPLC)和GC分离前需要进行氨基酸衍生。

1.2 气相色谱-质谱联用法

在20世纪70年代,GC-MS开始应用于氨基酸分析。GC-MS是用来分析挥发性或半挥发性小分子化合物的重要分析方法,对难挥发和分子质量的代谢物的检测效果不太好。GC法用来分析氨基酸前需要对氨基酸进行衍生,目前主要的氨基酸衍生

方法包括硅烷化、烷基化和酰基化^[10]。其中硅烷化是主要的衍生方法,它主要是通过N,O-双(三甲基硅基)三氟乙酰基(BSTFA)^[11]和N-(特丁基二甲基硅烷)-N-甲基三氟乙酰胺(MTBSTFA)^[12]在干燥的条件下加热或酯化/酰化而完成的^[20]。但并不是所有的硅烷化后的氨基酸衍生物都稳定,如精氨酸衍生物会裂解为鸟氨酸以及谷氨酸,谷氨酸会转变为焦谷氨酸。而且,衍生过程样品中水分的存在会严重影响衍生产物的结构^[21]。虽然硅烷化是使用最广泛的方法,但它存在单一分析物对应多个副产物的缺点。为了克服这些缺点,研究者们用氯甲酸酯间接烷基化或酰化衍生^[22]。氨基酸与氯甲酸酯进行的间接烷基化反应能直接在液相中反应而不必事先除去蛋白质。氨基酸的酰化和酯化衍生是通过酐/醇如五氟丙酸酐和异丙醇,或在乙醇和吡啶存在的条件下与氯甲酸酯反应形成烷基化完成的^[23-24]。氨基酸与衍生试剂的反应非常迅速,衍生物通过有机酸萃取并直接进到质谱仪检测^[11,25-27]。

GC-MS分析方法灵敏度高,分辨率和重复性好,主要用于疾病、植物等氨基酸定量分析及氨基酸对映异构体鉴定中^[28-30]。Duncan等人采用同位素稀释气相色谱离子捕获负电离质谱鉴定了样品中微量成分准确可靠的数据^[11]。Deng等通过固相微萃取和GC-MS快速测定了新生儿血液样本氨基酸^[24]。结果显示该方法是筛查新生儿苯丙酮尿症和枫糖尿症的强大工具。Kaspar等人直接通过氯甲酸丙酯衍生理体液中的游离氨基酸,用GC-MS全自动完成了整个分析过程,30 min内测定了30种氨基酸,并用19种稳定同位素标记氨基酸作为内标以校正生理体液在样品制备、衍生不完全和电离效率过程中氨基酸的损失,其检测和定量范围在0.03~12 $\mu\text{mol/L}$ 和0.3~30 $\mu\text{mol/L}$ ^[3]。Chen等通过固相离子交换色谱分离了植物样品中的氨基酸再衍生并通过GC-MS鉴定,在30 min内鉴定了19种氨基酸。结果证明该法有效,特别是对氨基酸的同位素分布检测,而且样品制备简便,快速,经济,易于自动化,适合于大量样品的分析^[31]。而且GC/MS在分析氨基酸的对映异构体上有特殊的作用^[30]。此外,二维气相色谱(GC X GC)-TOF-MS已成为代谢组学研究领域的新兴技术^[28]。

1.3 液相色谱-质谱联用法

柱前衍生-液相色谱-光学检测法是氨基酸分

析中应用广泛的一种方法,其中使用到的柱前衍生试剂有邻苯二甲醛(OPA)、二甲氨基萘磺酰氯(dansyl-cl)、2,4-二硝基氟苯(FDNB)、异硫氰酸苯酯(PITC)、异硫氰酸荧光素(FITC)、氯甲酸酯类和氨基苯甲酸酯类等^[4,32]。该法重复性好和灵敏度高,但特异性不强。由于复杂生物样品中一些非蛋白氨基酸或化合物跟氨基酸有相似的保留时间,从而造成了分析的不确定性。此外,光学检测方法也不适合于分析含同位素样品。而质谱能区分共洗脱复合物,除非它们等压或有相同的破碎模式。而在过去的十年中,HPLC-MS-MS由于它高特异性分析,对大分子和小分子化合物的广泛适用性,高度的灵活能力等优点在多个研究领域被应用如临床诊断等^[33]。目前用于氨基酸分析的液相色谱质谱联用技术包括离子对液相色谱串联质谱(IP-LC-MS/MS)、稳定同位素标记相对或绝对定量/液相色谱串联质谱(iTRAQ-LC-MS-MS)和亲水作用色谱-质谱联用(HILIC-MS)等。

IP-LC-MS/MS能通过反相C18柱分离未衍生的氨基酸,挥发性的IP试剂如全氟羧酸能在液相色谱-电喷雾串联质谱(LC-ESI-MS)中使用。Piraud等人通过IP-HPLC-MS在20分钟内用十三氟庚酸测定了76种氨基酸,有16种氨基酸通过它们的稳定同位素标记物内标得到定量^[34]。Armstrong等通过IP-RP-HPLC/偶联时间飞行质谱(TOF-MS)定量了人血液中25种未衍生氨基酸,线性动态范围在 $1.56\sim 400\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[35]。Harder等通过IP-LC-MS鉴定了血浆中22种氨基酸,包括蛋白氨基酸、瓜氨酸和鸟氨酸^[36]。

相对和绝对定量同位素标记(iTRAQ)技术是美国应用生物系统公司推出的一项新的体外同位素标记技术^[37]。分析物与反应基团反应后带上一个等量异位标签。该标签中含有的报告基团在二级质谱中碰撞诱导解离并被检测。由于报告基团相对分子质量相差1,因此不同报告基团离子强度的差异就能进行氨基酸的定量。iTRAQ-LC-MS-MS的最大优势在于能让每种分析物都有一个内标,但对含硫氨基酸如蛋氨酸和半胱氨酸定量则没那么精确。尿液氨基酸分析通常是通过茚三酮与紫外检测器柱后衍生阳离子交换层析完成的,但这种方法缺乏高通量和特异性。目前对尿液氨基酸的分析方法有CE-TOF-MS, ^{13}C 核磁共振谱(NMR),GE-MS和同

位素稀释LC-MS/MS。Kaspar等比较了GC-MS和iTRAQ-LC-MS法和氨基酸分析仪对尿液氨基酸的分析。研究表明,GC-MS和iTRAQ-LC-MS/MS都适合高通量的氨基酸分析,但GC-MS重复率更高以及样品前处理能达到全自动,而iTRAQ-LC-MS/MS灵敏度更高^[38]。李鹏飞等人通过iTRAQ-LC-MS-MS定量分析了人体中42种氨基酸。与传统的CE、HPLC和氨基酸分析仪相比,无论是精度还是检测限和检测结果的准确度都有了很大的提高^[39]。

HILIC采用亲水的极性固定相,如硅胶填充柱、极性聚合物填料或离子交换吸附剂,结合反相型的溶液体系分离极性物质。它作为一种分离极性化合物的液相色谱模式,应用的研究领域有药物分析、代谢组学和蛋白质组学等。HILIC流动相组成简单、分离效率高,与质谱兼容。Schlichtherle-Cerv等通过HILIC-ESI-MS检测了食品中小分子量的极性物质,如氨基酸、二肽或三肽和有机酸等^[40]。Langrock等通过聚酰胺柱结合ESI-MS-MS在中性丢失扫描模式下25 min内分离了16种蛋白氨基酸(PAA)^[41]。

1.4 毛细管电泳-质谱联用法

毛细管电泳是20世纪80年代发展起来的一种分离技术,毛细管电泳分离和激光诱导荧光检测方法为氨基酸及其对映异构体分析提供了低成本,高分辨率和高灵敏度的显微分离平台^[42-43]。毛细管电泳进行氨基酸分析不需要衍生,但氨基酸衍生后检测灵敏度能提到提高。大部分适用于HPLC的衍生试剂也适用于毛细管电泳方法,如FMOC、NDA、OPA和FITC^[44]。而且GE中的样品富集和化学衍生很容易在线整合,不要复杂的离线样品处理步骤,所以很容易实现自动化。但CE分离后通过光度法或电化学检测方法检测复杂样品进行精确而可靠的定量还是稍显欠缺。

CE-ESI-MS是以少量的样品处理鉴定复杂生物样品中氨基酸谱的高选择性,灵敏而可靠的方法。氨基酸及其类似衍生物的质谱分析一般是在强酸性的条件下正离子模式检测,随着在线样品富集,化学衍生,ESI接口设计的新进展,氨基酸异构体分辨率和低浓度的不稳定氨基硫醇检测限得到进一步提高。Soga等通过毛细管电泳电喷雾串联四级杆质谱(CE-ESI-QqQ-MS)分析了尿液中未衍生游离氨基酸,这种方法的检测限(LOD)值在 $0.1\sim 14\mu\text{mol/L}$,线性动态范围大约 $100\sim 200\mu\text{mol/L}$ ^[45-46]。该

方法具有分析时间短,灵敏度高以及几乎没有基质干扰的优点。Wakayama 等同时分析出了 34 种胺类物质和氨基酸,阳离子模式和阴离子模式下的检测限分别为 $2.5 \mu\text{mol/L}$ 和 $5 \mu\text{mol/L}$ ^[47]。氨基酸的羧基丁基化后能提高离子化效率和检测灵敏度。Sanchez-Hernandez 等把植物油中提取的氨基酸残基(鸟氨酸、丙氨酸、)在 80°C 与丁醇反应 30 min,酸性条件迁移(0.1 mol/L 甲酸缓冲液和未涂层弹性石英毛细管柱)和 ESI-MS-MS 检测。它们的 LOD 值分别为 0.04 和 0.19 ng/g ^[48]。而且通过对分析物在 CE 迁移行为的精确预测和 MS 提供的精准的质量等信息能促进新的氨基酸或肽类似物的鉴定^[49,50]。

近年来毛细管电泳质谱(CE-MS)在氨基酸分析中得到广泛使用,包括食品安全、植物生理、临床诊断研究^[45,51]。为了辨别橄榄油中是否掺入种子油, Sanchez-Hernandez 等通过基于离子阱质量分析器的 CE-MS 鉴定到了 6 种丁醇衍生后的非蛋白氨基酸(鸟氨酸、 β -丙氨酸、GABA、别异亮氨酸、瓜氨酸和焦谷氨酸),其中鸟氨酸和别异亮氨酸是种子油而非橄榄油中的^[48]。水稻是研究最多的农作物之一,基于 CE-MS 的代谢组学研究发现氧化应激状态下

的水稻细胞其代谢的动态变化主要受到胞内氨基酸的累积影响^[52]。Williams 等人通过 GC-MS 和 CE-MS 检测了植物细胞培养液中氨基酸的变化^[53],结果发现 CE-ESI-MS 与 GC-MS 相比鉴定了覆盖了更多种类的氨基酸,花费小而且样品处理相对简单。

2 其它氨基酸分析检测方法及其氨基酸分析方法间的比较

直接注入式串联质谱(Direct-infusion MS-MS)一般用来筛查具有先天性代谢缺陷的新生儿血液和尿液中的氨基酸变化如苯丙酮尿症。血液或尿液样品一般都是通过滤纸收集。将滤纸中的氨基酸用含稳定同位素氨基酸甲醇提取,然后在丁醇中与盐酸反应生成相应的丁酯^[54]。这个方法能分析大量的样品,但对亮氨酸和异亮氨酸等同分异构氨基酸不同区分。而 NMR 的主要优点是能同时检测出样品中所有含氢代谢物,重复性好而且定量结果可靠;能直接分析生理体液如尿液,其灵敏度不受分析物化学特性的限制。其主要的缺点在于与质谱相比灵敏度要差,对样品的要求较高。

表 1 氨基酸分析方法比较^[55]

Tab.1 Comparison of methods of amino acid analysis

方法	优点	缺点	LOD/LOQ/($\mu\text{mol/L}$)
amino acid analyzer	重复性好	耗费高,灵敏度低	
GC-MS	重复性好	不适用于不耐热的氨基酸衍生;衍生步骤复杂;不能检测 Arg	$0.03\sim 12(\text{LOD})$ $0.3\sim 30(\text{LOQ})$
LC-methods coupled with optical detection	重复性好 线性好	需要去蛋白以及氨基酸衍生、特异性不太好、不能区分共洗脱物质	$5(\text{LOQ})$
IP-LC-MS-MS	不需要衍生;对极性氨基酸分辨率好	需要去蛋白;会有离子抑制;IP 试剂对分析系统有污染	$3\times 10^{-4}\sim 9\times 10^{-4}(\text{LOD})$
HILIC	不需要衍生;与质谱兼容;适合分析极性化合物	需要去蛋白;重复性不太好;易发生离子抑制	$5(\text{LOD})$ $10(\text{LOQ})$
iTRAQ	分辨率高、分离快速、每个分离物质都有内标	需要去蛋白质、含硫氨基酸回收率差	$2\sim 10(\text{LOQ})$
CE-MS	不需要衍生、样品量少	需要去蛋白质、仅适合少量样品	$0.1\sim 14(\text{LOD})$
Direct-infusion MS-MS	不需要样品制备;高通量	需要衍生;不能区分同分异构体	
NMR	不必分离和衍生;需要样品量少;定量能力强	灵敏度不高;分析时间长	$20\sim 312(\text{LOD})$

3 结 语

氨基酸分析作为代谢组学的重要研究内容,其研究和改进一直受到人们的重视,如何减少样品制备和分析时间,进一步提高分析过程的分辨率、灵

敏度和重复性等一直是氨基酸分析方法中的研究重点。由于质谱具有高度灵敏性和选择性,以及在稳定同位素标记中的重要作用,为更快、更准确的定量氨基酸提供了基础。

参考文献:

- [1] Windmueller H G, Spaeth A E. Respiratory fuels and nitrogen metabolism in vivo in small intestine of fed rats. Quantitative importance of glutamine, glutamate, and aspartate[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1980, 255(1): 107-112.
- [2] WU G Y. Amino acids; metabolism, functions, and nutrition[J]. **Amino acid**, 2009, 37: 1-17.
- [3] KASPAR H, DETTMER K, GRONWALD W, et al. Automated GC-MS analysis of free amino acids in biological fluids[J]. **Journal of Chromatography B**, 2008, 870(2): 222-232.
- [4] 印遇龙. 猪的氨基酸与营养代谢[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [5] Osowska S, Moinard C, LOI C, et al. Citrulline increases arginine pools and restores nitrogen balance after massive intestinal resection[J]. **Gut**, 2004, 53(12): 1781-1786.
- [6] Miyaji K, Nagao K, Bannai M, et al. Characteristic metabolism of free amino acids in cetacean plasma: cluster analysis and comparison with mice[J]. **Plos One**, 2010, 5(11): e13808.
- [7] Boutry C, Matsumoto H, Airinei G, et al. Monosodium glutamate raises antral distension and plasma amino acid after a standard meal in humans[J]. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, 2011, 300(1): 137-145.
- [8] Boutry C, Matsumoto H, Bos C, et al. Decreased glutamate, glutamine and citrulline concentrations in plasma and muscle in endotoxemia cannot be reversed by glutamate or glutamine supplementation; a primary intestinal defect[J]. **Amino Acids**, 2012.
- [9] Revelsky I, Yashin Y, Sobolevsky T, et al. Electron ionization and atmospheric pressure photochemical ionization in gas chromatography-mass spectrometry analysis of amino acids[J]. **European Journal of Mass Spectrometry**, 2003, 9(5): 497.
- [10] MARQUEZ C D, WEINTRAUB S T, SMITH P C. Femtomole detection of amino acids and dipeptides by gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry following alkylation with pentafluorobenzyl bromide [J]. **Journal of Chromatography B**, 1999, 658(2): 213-221.
- [11] Duncan M W, Poljak A. Amino Acid analysis of peptides and proteins on the femtomole scale by gas chromatography/mass spectrometry[J]. **Analytical Chemistry**, 1998, 70(5): 890-896.
- [12] Starke I, Kleinpeter E, Kamm B, et al. Separation, identification, and quantification of amino acids in L-lysine fermentation potato juices by gas chromatography-mass spectrometry[J]. **Analytical Chemistry**, 2001, 371(3): 380.
- [13] 杨海麟, 张玉然, 辛瑜, 等. 啤酒酵母谷胱甘肽的高效抽提方法[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 29(6): 895-900.
YANG Hai-lin, ZHANG Yu-ran, XIN Yu, et al. An efficient method for glutathione extraction from dried saccharomyces cells[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 29(6): 895-900. (in Chinese)
- [14] Bosch L, Alegria A, Farre R. Application of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) reagent to the RP-HPLC determination of amino acids in infant foods[J]. **Journal of Chromatography B**, 2006, 831(1): 176-183.
- [15] Jambor A, Molnar-Perl I. Quantitation of amino acids in plasma by high performance liquid chromatography: simultaneous deproteinization and derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride [J]. **Journal of Chromatography A**, 2009, 1216(34): 6218-6223.
- [16] Waldhler M C, Gruber M A, Dettmer K, et al. Capillary electrophoresis and column chromatography in biomedical chiral amino acid analysis[J]. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, 2009, 394(3): 695-706.
- [17] Poinot V, Lacroix M, Maury D, et al. Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis [J]. **Electrophoresis**, 2006, 27(1): 176-94.
- [18] Davidson I, O'Connor P. Molecular biomethods handbook[J]. **Totowa: Humana press**, 2008: 793-808.
- [19] Rutherford S M, Gilani G S. Current protocols in protein science. 2009
- [20] Hell Z, Cwik A, Finta Z, et al. A new and convenient method for the acylation for amino acids in the presence of a modified

- zeolite[J]. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, 2002, 184: 191–195.
- [21] Halket J M, Waterman D, Przyborowska A M, et al. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS[J]. **The Journal of Experiment Botany**, 2005, 56(410): 219–243.
- [22] Husek P, Simek P. Alkyl chloroformates in sample derivatization strategies for GC analysis. Review on a decade use of the reagents as esterifying agents[J]. **Current Pharmaceutical Analysis**, 2006, 2(1): 23–43.
- [23] Wells R J. Recent advances in non-silylation derivatization techniques for gas chromatography[J]. **Journal of Chromatography A**, 1999, 843: 1–18.
- [24] DENG C, LI N, ZHANG X. Rapid determination of amino acids in neonatal blood samples based on derivatization with isobutyl chloroformate followed by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry[J]. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 2004, 18(21): 2558–64.
- [25] Husek P J. Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents [J]. **Journal of Chromatography B**, 1998, 717(1–2): 57–91.
- [26] Villas-Boas S G, Delicado D G, Akesson M, et al. Simultaneous analysis of amino and nonamino organic acids as methyl chloroformate derivatives using gas chromatography–mass spectrometry[J]. **Analytical Biochemistry**, 2003, 322(1): 134–138.
- [27] Fiamegos Y C, Stalikas C D. Gas chromatographic determination of amino acids via one-step phase-transfer catalytic pentafluorobenzoylation–preconcentration[J]. **Journal of Chromatography A**, 2006, 1110(1–2): 66–72.
- [28] Koek M M, Van Der Kloet F M, Kleemann R, et al. Semi-automated non-target processing in GC x GC–MS metabolomics analysis: applicability for biomedical studies[J]. **Metabolomics**, 2011, 7(1): 1–14.
- [29] Spagou K, Theodoridis G, Wilson I, et al. A GC–MS metabolic profiling study of plasma samples from mice on low- and high-fat diets[J]. **Journal of Chromatography B**, 2011, 879: 1467–1475.
- [30] Pasikanti K K, Ho P C, Chan E C. Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids [J]. **Journal of Chromatography A**, 2008, 871(2): 202–211.
- [31] CHEN W P, YANG X Y, Hegeman A D, et al. Microscale analysis of amino acids using gas chromatography–mass spectrometry after methyl chloroformate derivatization[J]. **Journal of Chromatography B**, 2010, 878(24): 2199–208.
- [32] 瞿其曙, 汤晓庆, 胡效亚, 等. 柱前衍生法在氨基酸分析测定中的应用[J]. **化学进展**, 2006, 18(6): 699–793.
- QU Qi-shu, TANG Xiao-qing, HU Xiao-ya, et al. Application of pre-column derivatization for amino acids analysis[J]. **Progress in Chemistry**, 2006, 18(6): 699–793. (in Chinese)
- [33] Piraud M, Ruet S, Boyer S. Amino acid profiling for the diagnosis of inborn errors of metabolism [J]. **Methods in Molecular Biology**, 2011, 708: 25–53.
- [34] Piraud M, Vianey-Saban C, Bourdin C, et al. A new reversed-phase liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for analysis of underivatized amino acids: evaluation for the diagnosis and the management of inherited disorders of amino acid metabolism[J]. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, 2005, 19(22): 3287–3297.
- [35] Armstrong M, Jonscher K, Reisdorph N. Analysis of 25 underivatized amino acids in human plasma using ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry [J]. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, 2007, 21(16): 2717–2726.
- [36] Harder U, Koletzko B, Peissner W. Quantification of 22 plasma amino acids combining derivatization and ion-pair LC–MS/MS[J]. **Journal of Chromatography B**, 2011, 879(7–8): 495–504.
- [37] Ross P L, Huang Y N, Marchese J N. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents[J]. **Molecular Cellular Proteomics**, 2004, 3(12): 1154–1169.
- [38] Kaspar H, Dettmer K, Chan Q, et al. Urinary amino acid analysis: a comparison of iTRAQ–LC–MS/MS, GC–MS, and amino acid analyzer[J]. **Journal of Chromatography B**, 2009, 877(20–21): 1838–1846.
- [39] 李鹏飞, 王燕, 陶蓓蓓, 等. 稳定同位素 iTRAQ 标记/高效液相色谱–串联质谱法同时定量分析人体中 42 种氨基酸及典型病例[J]. **分析化学**, 2012, 40(5): 762–767.
- LI Peng-fei, WANG Yan, TAO Bei-bei, et al. Simultaneous determination of 42 amino acids in human body by stable isotope isobaric tag for relative and absolute quantitation labeled–LC–MS/MS with typical example cases [J]. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, 2012, 40(5): 762–767. (in Chinese)

- [40] Schlichtherle -Cerny H, Affolter M, Cerny C. Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry of small polar compounds in food analysis[J]. **Analytical Chemistry**, 2003, 75(10):2349-2354.
- [41] Langrock T, Czihal P, Horrmann R. Amino acid analysis by hydrophilic interaction chromatography coupled on-line to electrospray ionization mass spectrometry[J]. **Amino Acids**, 2006, 30(3):291-297.
- [42] Nouadje G, Rubie H, Chatelut E, et al. Child cerebrospinal fluid analysis by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection[J]. **Journal of Chromatography A**, 1995, 717(1-2):293-298.
- [43] Berqquist J, Gilman S D, Ewing A G, et al. Analysis of human cerebrospinal fluid by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection[J]. **Anal Chem**, 1994, 66(20):3512-3518.
- [44] Fukushima T, Usui N, Santa T, et al. Recent progress in derivatization methods for LC and CE analysis [J]. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2003, 30(6):1655-1687.
- [45] Soga T. Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry [J]. **Analytical Chemistry**, 2000, 72(6):1236-1241.
- [46] Soga T, Kakazu Y, Robert M, et al. Qualitative and quantitative analysis of amino acids by capillary electrophoresis-electrospray ionization-tandem mass spectrometry[J]. **Electrophoresis**, 2004, 25(13):1964-1972.
- [47] Wakayama M, Aoki N, Sasaki H, et al. Simultaneous analysis of amino acids and carboxylic acids by capillary electrophoresis-mass spectrometry using an acidic electrolyte and uncoated fused-silica capillary [J]. **Analytical Chemistry**, 2010, 82(24):9967-9976.
- [48] Sanchez -Hernandez L, Marina M L, CREGO A. A capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry methodology for the determination of non-protein amino acids in vegetable oils as novel markers for the detection of adulterations in olive oils[J]. **Journal of Chromatography A**, 2011, 1218(30):4944-4951.
- [49] Lee R, Niewczas L, Britz -Mckibbin P. Integrative metabolomics for characterizing unknown low-abundance metabolites by capillary electrophoresis-mass spectrometry with computer simulations[J]. **Analytical Chemistry**, 2007, 79(2):403-415.
- [50] Sugimoto M. Prediction of metabolite identity from accurate mass, migration time prediction and isotopic pattern information in CE-TOFMS data[J]. **Electrophoresis**, 2010, 31(14):2311-2318.
- [51] Poinot V, Gavard P, Feurer B, et al. Recent advances in amino acid analysis by CE[J]. **Electrophoresis**, 2010, 31(1):105-21.
- [52] Ishikawa T, Takahara K, Hirabayashi T, et al. Metabolome analysis of response to oxidative stress in rice suspension cells overexpressing cell death suppressor Bax inhibitor-1[J]. **Plant Cell Physiology**, 2010, 51(1):9-20.
- [53] Williams B J, Cameron C J, Workman R, et al. Amino acid profiling in plant cell cultures: an inter-laboratory comparison of CE-MS and GC-MS[J]. **Electrophoresis**, 2007, 28(9):1371-1379.
- [54] Chace D H, Kalas T A, Naylor E W. The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism[J]. **Annual Review Genomics and Human Genetics**, 2002, 3:17-45.
- [55] Kaspar H, Dettmer K, Gronwald W, et al. Advances in amino acid analysis [J]. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2009, 393(2):445-52.