

固相萃取-超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法 测定水体中 18 种氨基酸

梁锦汉^{1,2}, 刘则华^{1,2}, 刘婉琼³, 董燕珊³

(1. 华南理工大学环境与能源学院, 广东 广州 510006; 2. 华南理工大学, 工业聚集区污染控制与生态修复教育部
重点实验室, 广东 广州 510006; 3. 佛山市三水佛水供水有限公司, 广东 佛山 528100)

摘要: 在自来水消毒过程中, 氨基酸可以与氯、氯胺等消毒剂发生反应, 生成具有生物毒性和异味的消毒副产物, 需要特别关注。然而, 水体中的氨基酸浓度较低, 这给检测提出了极高的要求。为此, 本研究建立了一种基于固相萃取-超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱测定水体中 18 种氨基酸的方法, 并对样品前处理条件和仪器条件进行优化。优化后的最适水样 pH 2.8、淋洗液为甲醇-乙酸溶液(1:9, V/V), 洗脱液为氨水-甲醇溶液(1:9, V/V), 流动相为 0.2%甲酸水溶液和含 0.2%甲酸的甲醇-乙腈溶液(1:9, V/V)。结果表明, 18 种氨基酸标准曲线的线性关系良好, 相关系数(R^2)大于 0.991 3, 检出限和定量限分别为 0.06~0.23 nmol/L 和 0.19~0.76 nmol/L, 回收率在 60.1%~123.2%之间, 相对标准偏差为 1.7%~18.7%, 日间和日内精密度的分别为 3.7%~7.0%和 3.3%~7.1%。采用本方法测定华南地区某自来水厂源水, 氨基酸总浓度为 300~500 nmol/L, 其中, 丙氨酸、缬氨酸、天冬氨酸和天冬酰胺的浓度水平占比较高。

关键词: 固相萃取; 氨基酸; 定量分析; 含氮有机物前体; 超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2025)02-0242-12

DOI: 10.7538/zpxb.2024.0122

CSTR: 32365.14.zpxb.2024.0122

Determination of 18 Amino Acids in Water by Solid Phase Extraction-Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Triple Quadrupole Mass Spectrometry

LIANG Jin-han^{1,2}, LIU Ze-hua^{1,2}, LIU Wan-qiong³, DONG Yan-shan³

(1. School of Environment and Energy, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China;

2. Key Laboratory of Pollution Control and Ecological Remediation of Industrial Aggregation Area,

Ministry of Education, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China;

3. Foshan Sanshui Foshui Water Supply Co., Foshan 528100, China)

Abstract: Amino acids (AAs) are dissolved organic nitrogen, which are widely found in water bodies. During chlorine disinfection, AAs can be converted to potentially biotoxic disinfection byproducts such as haloacetonitrile, halogenated nitroalkanes and haloamides. During the process of chlorine disinfection, chlorine rapidly reacts with the vast majority of free amino acids, particularly α -amino acids, forming organic monochloramines or dichloramines. These organic monochloramines undergo decarboxylation and dechlorination reactions, resulting in the formation of aldehydes and

other odorous disinfection by products. Odor has been an important problem and challenge in the water supply industry, which can cause residents to worry about the safety of tap water, and the rapid warning and the traceability of tap water odor are an effective strategy to deal with the odor of the tap water. Therefore, it is necessary to determine the concentration of AAs in water bodies, especially the tap water. However, the concentration of AAs in water bodies is trace amounts, mostly in the range of nanograms to micrograms per liter, which puts more demand on the development of analytical method. In this work, a method of solid-phase extraction-ultra performance liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was developed for the determination of 18 amino acids in water bodies, and the sample pretreatment conditions and instrument conditions of UPLC were optimized. The optimal pH value of water sample is 2.8, the eluent of the drip washing is methanol-acetic acid solution (1:9, *V/V*), the eluent of the purge is ammonia-methanol solution (1:9, *V/V*), and the mobile phases are 0.2% formic acid in water and 0.2% formic acid in methanol-acetonitrile solution (1:9, *V/V*). The results showed that the standard curves of this method for 18 AAs have good linearity with the correlation coefficient (R^2) larger than 0.991 3, the limits of detection and the limits of quantification are 0.06-0.23, 0.19-0.76 nmol/L, respectively. The recoveries are 60.1%-123.2%, the relative standard deviations (RSDs) are 1.7%-18.7%, and the inter-day and intra-day precisions are 3.7%-7.0% and 3.3%-7.1%, respectively. This method was used to determine the source water in a drinking water treatment plant, the total concentrations of 18 amino acid are 300-500 nmol/L, in which the concentration contribution ratios of alanine, valine, aspartic acid and asparagine are relative high.

Key words: solid phase extraction; amino acids; quantitative analysis; nitrogen-containing organic precursors; ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)

氨基酸(amino acids, AAs)是水体中广泛存在的溶解性有机氮(DON),在地表水和海洋中的DON中占比分别高达75%和25%^[1]。在氯消毒过程中,AAs能够转化为卤乙腈、卤代硝基烷烃和卤代酰胺等具有潜在生物毒性的消毒副产物^[2]。2019年,我国学者在评估氯消毒致细胞和遗传毒性的原因时指出,天冬氨酸和天冬酰胺是重要的前体物,氯消毒前应尽可能降低其浓度,从而减少有毒消毒副产物的形成^[3]。与此同时,在氯消毒过程中,氯可与绝大多数游离氨基酸的 α -氨基迅速反应形成有机一氯胺或二氯胺,而且有机一氯胺能够脱羧与氯发生消除反应形成醛等异味消毒副产物^[4]。长期以来,异味是供水行业面临的难题和挑战,它直接引起居民对自来水安全的担忧,快速预警和异味溯源是应对的有效策略^[5]。因此,无论从有毒消毒副产物的控制,还是从饮用水异味的应对策略,均需要准确把握水体(尤其是自来水)中AAs浓度水平。然而,AAs在水体的浓度大多处于纳克至微克每升,这给分析方法的建立提出了极高要求。

1983年,日本学者开发了基于高效液相色谱测定8种氨基酸的方法,但其检出限高达30~50 mg/L^[6]。后续相继开发了气相色谱-质谱(GC-MS)法和液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法,其灵敏度有所改善,检出限可低至0.1 nmol/L^[7]。与GC-MS法相比,LC-MS/MS法的灵敏度更高,在测定更多氨基酸时无需衍生化^[8],但检测对象多为尿液、血液、头发等基质^[9-16],而将其应用于水体测定则极为有限。How等^[17]利用LC-MS法测定了河水中18种氨基酸,但赖氨酸、精氨酸、组氨酸和半胱氨酸的回收率较低,分别为20%、25%、20%、0%,且需要500 mL水样。王钰芳等^[18]基于LC-MS/MS法测定了河水中17种氨基酸,但直接进样易造成色谱柱堵塞,且检出限较高,为0.3~1.5 nmol/L。Qiu等^[19]建立了固相萃取结合LC-MS/MS法测定河水中17种氨基酸,但赖氨酸和精氨酸的重复性较差,其相对标准偏差分别高达33%和35%,且需要500 mL水样。水体中有机污染物浓度通常为微量,为准确测定目标化合物,常需要使用500 mL以上的水样进行浓

缩富集^[20]。然而,氨基酸是重要的水体异味前体物质,当自来水厂出现相关异味时,开展异味溯源往往需要较高频率的取样,而大多数水厂没有专门的样品冷藏室,大体积取样势必会面临样品无法有效保存的窘境。针对上述问题,李颖强等^[21]建立了一种基于固相萃取-超高效液相色谱-质谱测定水体中15种氨基酸的方法,仅需20 mL水样,且回收率和灵敏度良好。然而,该方法仅限于15种氨基酸,无法测定 α -氨基的赖氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。

本研究建立基于固相萃取-超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱(UPLC-MS/MS)法测定水体中包含赖氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺在内的18种氨基酸,在样品前处理和色谱条件优化的基础上,对该方法进行有效性验证,并将其应用于实际水样的测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC-20ADXR 超高效液相色谱仪:日本岛津公司产品;AB Sciex API 4000 三重四极杆串联质谱仪:美国 Applied Biosystems 公司产品;0.45 μm 玻璃纤维滤膜、涡旋振荡器:中国 OALCLAB 公司产品;Milli-Q 超纯水仪:美国 Millipore 公司产品。

甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、甲硫氨酸、丝氨酸、苏氨酸、脯氨酸和组氨酸等18种氨基酸标准品:纯度均大于99%,中国上海 ANPEL 实验室技术有限公司产品;甲硫氨酸-d₃(内标):北京坛墨质检公司产品;乙腈、甲醇:均为色谱级,美国 Fisher Scientific 公司产品;冰乙酸(HPLC级,纯度 $\geq 99.9\%$):上海麦克林生化科技股份有限公司产品;甲酸(纯度99%)、氨水(色谱级,纯度 $\geq 25\%$):上海阿拉丁生化科技股份有限公司产品;浓盐酸:广州化学试剂公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 标准品配制 单氨基酸标准溶液的配制:称量相应质量的氨基酸粉末,用0.1 mol/L HCl 定容至10 mL,配制成18 mmol/L 单氨基酸标准溶液。

18种氨基酸混合标准溶液的配制:分别从18种氨基酸标准溶液中提取1 mL至25 mL 容量瓶,用0.1 mol/L HCl 定容并混合均匀,将其倒

入25 mL 棕色玻璃瓶(720 $\mu\text{mol/L}$);然后从棕色瓶中移取34.72 μL 混合液至25 mL 容量瓶,用0.1 mol/L HCl 定容并混合均匀,配制成1 000 nmol/L 氨基酸混合标准溶液,将其倒入棕色玻璃瓶,于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 固相萃取处理 利用强阳离子交换固相萃取柱(CNW SCX SPE Cartridge)对水样中的氨基酸进行提取和浓缩处理。具体步骤:分别用4.5 mL 甲醇和9 mL 冰乙酸(pH 2.8)活化萃取柱,然后将20 mL 水样(pH 2.8)均匀缓慢地通过萃取柱;进样完成后,为降低基质效应的影响,用5 mL 含10%甲醇的冰乙酸溶液(pH 2.8)淋洗萃取柱,真空干燥30 min;待干燥完成后,用8 mL 含10%氢氧化铵的甲醇溶液洗脱,收集洗脱液并加入50 μL 甲硫氨酸-d₃(2 000 nmol/L)内标;随后在40 $^{\circ}\text{C}$ 下,利用温和氮吹缓慢蒸发洗脱液;最后用1 mL 超纯水复溶,并转移至1.5 mL 琥珀瓶中,待进样。

1.2.3 UPLC-MS/MS 条件 Acquity UPLC BEH C18 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm);流动相:A 为0.2%甲酸水溶液,B 为含0.2%甲酸的乙腈-甲醇溶液(9:1, V/V);梯度洗脱程序:0~2.5 min (5%~10%B), 2.5~3.5 min (10%~50%B), 3.5~7 min (50%~90%B), 7~9 min (90%~30%B), 9~12 min (30%~10%B)。

正离子检测模式和多反应监测(MRM)模式,离子源温度150 $^{\circ}\text{C}$,离子喷射电压2 500 V,入口电位10 V,碰撞压强41.37 kPa,离子源1和2的气体压强344.74 kPa。

1.2.4 方法学验证 分别配制5、10、25、50、100、200、400、800 nmol/L 浓度水平的18种氨基酸混合标准溶液,并绘制标准曲线。配制5个100 nmol/L 标准氨基酸平行水样,测试在室温下存放0、6、12、24 h 的稳定性,以计算不同时间点测量浓度与初始浓度的比值作为稳定性依据。通过向静置24 h 的自来水样品中添加浓度为5、25、100、300 nmol/L 的标准目标物进行回收率实验,计算回收率时扣除自来水背景浓度。向自来水中添加5 nmol/L 氨基酸,经固相萃取处理后,重复进样7次,根据标准偏差的3倍和10倍信噪比分别计算各氨基酸的检出限(LOD)和定量限(LOQ)。为评价日间和日内精密度,分别测定100 nmol/L 混合标准溶液在1天内和连续3天所

测得结果的相对标准偏差(RSD)。

1.2.5 实际样品采集 利用升降式收集装置采集广东省佛山市某水厂源水端的实际水样,收集完毕后,加入配制好的稀盐酸溶液调至 pH 值接近 2,以保证氨基酸在常温下稳定存在 48 h^[21]。随后,将样品迅速运回实验室,在真空状态下利用 0.45 μm 玻璃纤维滤膜对水体进行初步过滤,于 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,待测。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理优化

2.1.1 pH 值对萃取效率的影响 根据强离子交换柱(SCX)的吸附原理,该柱在目标物为阳离子状态时的吸附效率最大,而氨基酸在酸性 pH 值时会转化为阳离子状态。前期研究表明^[21],pH 2.8 为最佳条件,但未包含赖氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。因此,本实验考察了水样在 pH 1.3、1.8、2.3、2.5、2.8、4.5 条件下的氨基酸回收率,结果示于图 1。可见,当 $\text{pH} < 2.8$ 时,部分氨基酸的回收率出现不同程度下降,pH 值越低现象越明显,推断为萃取柱吸附剂的性能受低 pH 值的影响而下降;当 pH 2.8 时,赖氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺的回收率分别达 81.1%、116.6%、99.5%。虽然在 pH 1.8、2.3、2.5 和 2.8 时,18 种氨基酸的回收率均能够满足 60%~120% 的基本要求,但 pH 2.8 时的整体回收率最佳,与前期研究^[21]一致。

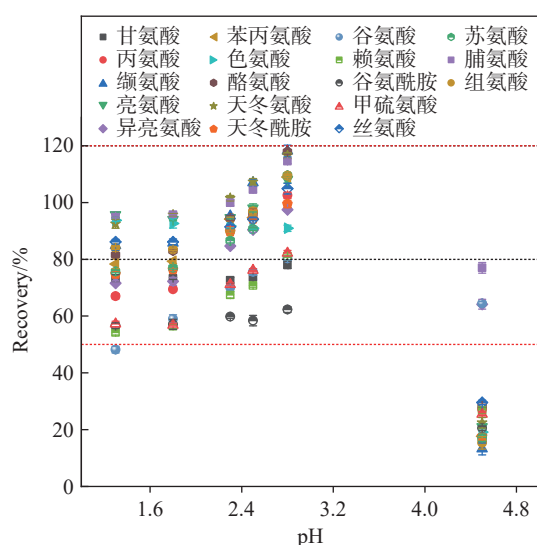


图 1 不同 pH 值条件下,18 种氨基酸的加标回收率
Fig. 1 Spiked recoveries of eighteen amino acids under different pH values

2.1.2 淋洗液对基质效应的影响 基质效应指样品基质对目标物测定过程中产生的干扰现象,基质会导致分析仪器中离子信号的增强或减弱,并可能对仪器造成损害。在萃取优化过程中发现,经固相萃取富集后,用含 5% 甲醇的冰乙酸溶液淋洗萃取柱可有效降低基质效应^[21]。然而,该淋洗液对赖氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺的优化效果并不明显。为此,本实验以冰乙酸(pH 2.8)作为淋洗液的基本组分,考察添加不同体积甲醇(0%、5%、10%、20%、50%)对降低基质干扰的效果,结果示于图 2。可见,甲醇体积为 10% 时,18 种氨基酸的回收率均可以达到 60% 以上,表现最佳,尤其是赖氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺的回收率分别为 106.1%、67.2%、80.1%,优于含 5% 甲醇的冰乙酸溶液。因此,选择含 10% 甲醇的冰乙酸作为淋洗液。

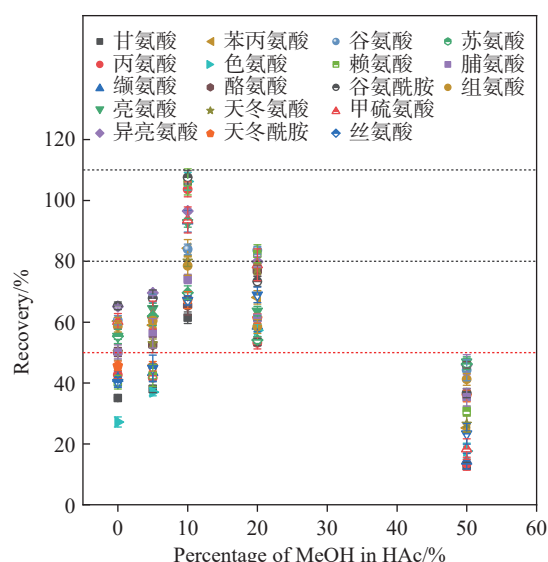


图 2 在不同体积甲醇淋洗液下,18 种氨基酸的加标回收率

Fig. 2 Spiked recoveries of eighteen amino acids under different methanol volume eluents

2.1.3 洗脱液对回收率的影响 洗脱步骤是影响目标物回收率的关键环节,选择合适的洗脱液至关重要。基于阳离子交换萃取柱的特点,在实验初期,通过降低 pH 值使氨基酸转化为阳离子状态能够实现更好的吸附。因此,应使用碱性洗脱液。在选定甲醇作为洗脱剂时,考察了不同 NH_4OH 体积(0%、5%、10%、20%和 30%)对氨基酸回收率的影响,结果示于图 3。当 NH_4OH 体积 $\leq 5\%$,赖氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺的回收率

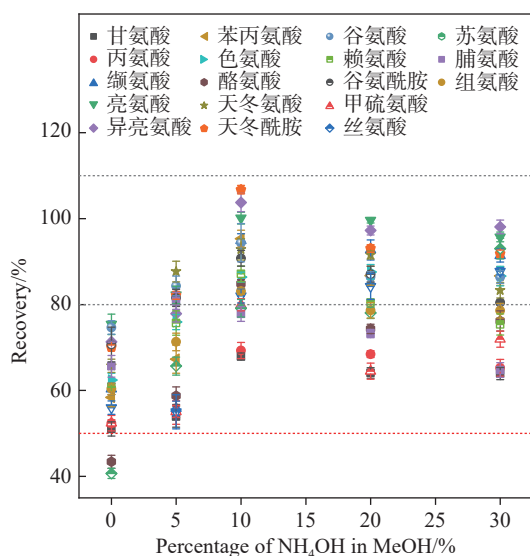


图3 在不同体积 NH_4OH 洗脱液下,
18种氨基酸的加标回收率

Fig. 3 Spiked recoveries of eighteen amino acids
under different ammonia volume eluents

均不足 55%; 随着 NH_4OH 体积比例提高, 回收率趋于 80%。相比于 5% NH_4OH , 各氨基酸回收率

在 10% NH_4OH 时的效果更好, 特别是赖氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺的回收率分别为 87.1%、106.7%、92.8%。提高氨水比例会显著延长后续的氮吹时间, 故选择 10% NH_4OH 的甲醇作为洗脱液。

2.2 仪器方法优化

2.2.1 串联质谱参数优化 基于先前的实验结论^[21], Acquity UPLC BEN C18 柱对氨基酸的分离效果理想、出峰峰形平滑且响应值较高, 故使用该柱进行分离。根据三重四极杆原理, 离子源对目标物进行轰击得到的子离子碎片会被仪器捕获, 最终得到相关的离子浓度。因此, 目标离子信息准确与否决定了所测离子浓度是否更接近实际浓度。本实验采用阳离子模式, 通过单标进样方式来确定目标物的母离子和子离子, 并对其余参数进行优化, 结果列于表 1。

2.2.2 梯度洗脱程序优化 梯度洗脱程序对待测物的洗脱效率和分离效果有着重要影响。本研究发现, 在 3.5~7 min 内, 将流动相 B 从 50% 调至 90% 能够显著改善亮氨酸和异亮氨酸这 2 种同分异构体的分离效果, 有效避免了多峰重

表 1 优化的质谱参数

Table 1 Optimized parameters of mass spectrometry

名称 Name	母离子 Precursor ion (m/z)	子离子 Product ion (m/z)	去簇电压 Declustering potential/V	碰撞能量 Collision energy/eV	碰撞室出口电压 Cell exit potential/V
甘氨酸	76	56	41	14	6
丙氨酸	90	44.3	29	16	7
缬氨酸	118	72.1	38	15	6
亮氨酸	131.9	86.2	38	15	6
异亮氨酸	132.1	86.2	44	13	7
苯丙氨酸	166.7	120.1	46	14	14
色氨酸	205.1	146	58	23	9
酪氨酸	182	135.9	39	19	6
天冬氨酸	134	88.1	30	14	7
天冬酰胺	133	74	45	20	3
谷氨酸	148	84.1	49	21	7
赖氨酸	147.1	84	43	22	15
谷氨酰胺	147.2	84.1	40	22	6
甲硫氨酸	150.2	104.2	43	14	9
丝氨酸	105.9	60	26	15	5
苏氨酸	120	74	36	14	6
脯氨酸	116	70.2	42	20	6
组氨酸	156.1	110	64	20	5.5
甲硫氨酸-d3	153.1	136.1	51	13.3	7.53

叠的问题, 示于图4。不仅如此, 优化后的洗脱程序在新引入的3种氨基酸上也展现出较好的分离效果, 解决了前期开发的15种氨基酸分析方法中无法测定的问题, 示于图5。

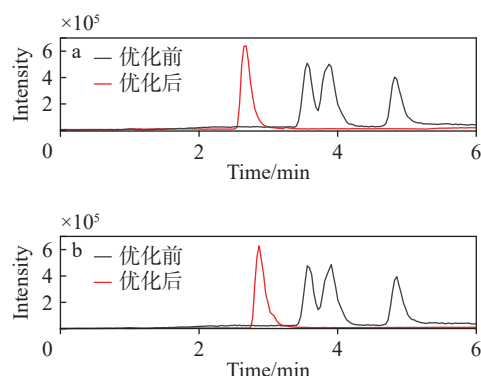
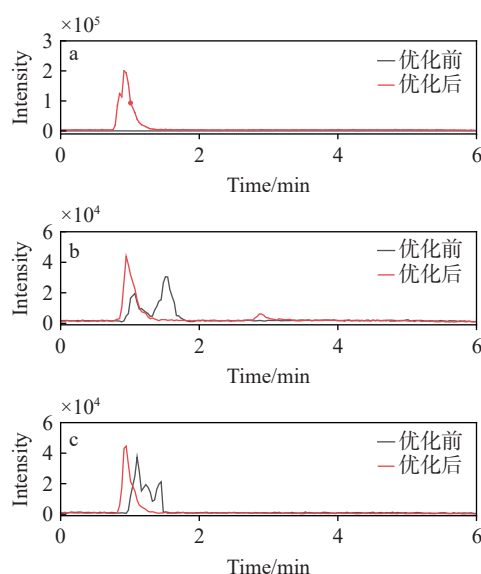


图4 异亮氨酸(a)与亮氨酸(b)在仪器方法优化前后的UPLC-MS/MS图

Fig. 4 UPLC-MS/MS spectra of isoleucine (a) and leucine (b) before and after optimization of the instrumental method



注: a. 赖氨酸; b. 天冬酰胺; c. 谷氨酰胺

图5 新增的3种氨基酸在仪器方法优化前后的UPLC-MS/MS图

Fig. 5 UPLC-MS/MS spectra of the three newly added amino acids before and after optimization of the instrumental method

2.2.3 流动相优化 流动相对待测物质的分离效果、峰形质量以及电离效率具有重要的影响。一方面, 本研究探讨了在流动相A中添加

微量甲酸、甲酸铵和乙酸铵对分离效果的影响。实验发现, 虽然甲酸铵和乙酸铵能够增强响应, 但效果并不显著, 且会出现响应值高的溶剂杂峰问题, 而甲酸不存在此问题。同时还发现, 在流动相B中加入甲酸能够进一步改善峰形和提高响应值。因此, 在流动相A和B中均加入甲酸, 并考察不同体积分数(0%、0.1%、0.2%、0.3%)的甲酸对分析性能的影响。结果表明, 0.2%甲酸体积分数的流动相效果最佳。另一方面, 评估了流动相B中不同体积比的甲醇-乙腈(1:9、2:8、3:7)对氨基酸分离效果的影响。发现当甲醇-乙腈的体积比为1:9时, 18种氨基酸的分离效果最佳。因此, 确定流动相A为含0.2%甲酸的水溶液, 流动相B为含0.2%甲酸的甲醇-乙腈溶液(1:9, V/V)。优化后的标准色谱图示于图6(每个氨基酸浓度800 nmol/L)。

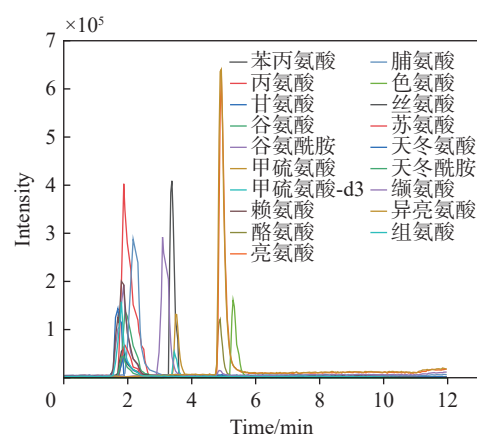


图6 18种氨基酸和同位素内标在仪器方法优化后的总离子流图

Fig. 6 Total ion chromatogram of eighteen amino acids and the isotope internal standard after the optimization

2.3 分析方法有效性验证

对本方法进行有效性验证, 结果列于表2。在5~800 nmol/L浓度范围内, 18种氨基酸的线性关系良好, 相关系数(R^2)大于0.991 3, 4种不同浓度的加标回收率为60.1%~123.2%, RSD为1.7%~17.5%, 能够满足日本国土交通省关于微量污染物分析的要求^[22], 即回收率应在50%~120%之间, RSD小于20%。

采用标准偏差公式计算18种氨基酸的LOD和LOQ分别为0.06~0.23、0.19~0.76 nmol/L, 结果列于表3。可知, Gargano等^[12]利用信噪比

表 2 18 种氨基酸的线性范围、相关系数、检出限、定量限和回收率
Table 2 Linear ranges, correlation coefficients, limits of detection, limits of quantification and recoveries of 18 amino acids

名称 Name	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient (R^2)	线性范围 Linear range/(nmol/L)	加标浓度 Spiked concentration ($n=3$)												检出限 LOD/(nmol/L)	定量限 LOQ/(nmol/L)
				5 nmol/L			25 nmol/L			100 nmol/L			300 nmol/L				
				回收率 Recovery/ %	相对 标准偏差 RSD/%	相对 标准偏差 RSD/%	回收率 Recovery/ %	相对 标准偏差 RSD/%	相对 标准偏差 RSD/%	回收率 Recovery/ %	相对 标准偏差 RSD/%	相对 标准偏差 RSD/%	回收率 Recovery/ %	相对 标准偏差 RSD/%	相对 标准偏差 RSD/%		
甘氨酸	$y=0.03514x+0.04527$	0.9965	5~800	60.1	8.7	8.7	70.1	9.3	9.3	72.9	4.5	4.5	71.9	2.7	2.7	0.10	0.35
丙氨酸	$y=0.09132x+0.07382$	0.9947	5~800	73.2	17.5	17.5	94.1	7.7	7.7	103.2	5.0	5.0	81.1	2.9	2.9	0.10	0.33
缬氨酸	$y=0.62413x+0.03851$	0.9939	5~800	76.1	11.1	11.1	82.8	8.9	8.9	117.5	4.4	4.4	81.5	3.3	3.3	0.11	0.38
亮氨酸	$y=0.32951x+0.07423$	0.9961	5~800	95.8	8.6	8.6	80.1	6.0	6.0	108.2	10.3	10.3	87.4	8.5	8.5	0.14	0.46
异亮氨酸	$y=0.32751x+0.01542$	0.9930	5~800	97.2	12.8	12.8	105.3	9.6	9.6	95.1	8.8	8.8	78.3	9.5	9.5	0.18	0.60
苯丙氨酸	$y=0.26589x+0.01428$	0.9925	5~800	103.2	9.9	9.9	90.4	9.4	9.4	109.2	9.1	9.1	101.3	9.6	9.6	0.06	0.19
色氨酸	$y=0.39854x+0.02983$	0.9927	5~800	80.7	12.2	12.2	94.4	9.8	9.8	88.4	3.6	3.6	62.8	8.5	8.5	0.15	0.50
酪氨酸	$y=0.28145x+0.06251$	0.9939	5~800	66.5	7.7	7.7	84.5	9.7	9.7	123.2	9.8	9.8	104.8	5.3	5.3	0.18	0.61
天冬氨酸	$y=0.20753x+0.06952$	0.9931	5~800	100.8	10.9	10.9	101.4	8.8	8.8	115.9	7.3	7.3	67.0	7.1	7.1	0.17	0.56
天冬酰胺	$y=0.14563x+0.03214$	0.9952	5~800	80.4	9.2	9.2	93.9	6.5	6.5	98.2	5.7	5.7	82.7	4.0	4.0	0.14	0.48
谷氨酸	$y=0.28145x+0.00451$	0.9939	5~800	107.6	6.7	6.7	120.1	4.8	4.8	67.8	13.1	13.1	100.0	4.3	4.3	0.10	0.34
赖氨酸	$y=0.65413x+0.00954$	0.9947	5~800	65.0	18.7	18.7	82.2	6.3	6.3	77.8	5.5	5.5	84.5	2.4	2.4	0.16	0.54
谷氨酰胺	$y=0.53714x+0.00723$	0.9945	5~800	92.0	7.6	7.6	64.7	8.2	8.2	60.7	4.9	4.9	61.9	5.9	5.9	0.22	0.72
甲硫氨酸	$y=0.44521x+0.06217$	0.9962	5~800	71.6	15.0	15.0	73.3	3.4	3.4	72.1	9.4	9.4	89.1	7.3	7.3	0.20	0.67
丝氨酸	$y=0.14725x+0.05234$	0.9913	5~800	77.2	11.5	11.5	71.2	8.1	8.1	104.2	1.7	1.7	101.0	9.4	9.4	0.20	0.67
苏氨酸	$y=0.17354x+0.05734$	0.9963	5~800	79.6	13.1	13.1	73.3	6.4	6.4	108.5	8.6	8.6	79.5	7.2	7.2	0.23	0.76
脯氨酸	$y=0.71845x+0.00978$	0.9954	5~800	77.7	15.1	15.1	77.0	5.1	5.1	113.9	7.6	7.6	97.5	5.6	5.6	0.11	0.38
组氨酸	$y=0.21347x+0.07854$	0.9938	5~800	78.2	13.5	13.5	85.8	9.1	9.1	107.9	9.5	9.5	99.2	2.8	2.8	0.14	0.48

表 3 本方法与其他相关研究的检出限和定量限比较
Table 3 Comparison of the limits of detection and limits of quantification
between this method and other related studies

方法 Method	测定环境 Measurement environment	待测目标物 Target to be measured	样品前处理 Sample pretreatment	计算方法 Calculation method	检出限 LOD/ (nmol/L)	定量限 LOQ/ (nmol/L)	参考 文献 Reference
高效液相色谱- 串联质谱	血浆	甘氨酸、丙氨酸、 缬氨酸等(7)	—	—	$0.01\times10^9\sim$ 0.20×10^9	$0.001\times10^9\sim$ 0.100×10^9	[24]
	氨基酸工业品	L-丙氨酸、L-丝氨 酸、D-天冬氨酸等 (26)	N- α -(2,4-二硝基-5- 氟苯基)-L-丙氨酸酰 胺(FDAA)	—	0.49~ 4.20	2.45~ 8.40	[25]
	牛皮蓝湿草水解液	天冬氨酸、谷氨 酸、丝氨酸等(18)	二硝基氟苯 (DNFB)衍生化	信噪比	20~ 470	80~ 1570	[26]
液相色谱-质谱	细胞培养基	丙氨酸、苯丙氨酸 等(20)	尿素衍生化	信噪比	11.64~ 58.60	38.80~ 195.40	[27]
超高效液相色谱- 四极杆-静电场轨 道阱高分辨质谱	运动营养食品	L-色氨酸、瓜氨 酸、鸟氨酸等(26)	磁性分散固相 微萃取	信噪比	—	0.10~ 0.25 mg/kg	[28]
超高效液相色谱- 四极杆飞行时间 质谱	运动型功能饮料	组氨酸、赖氨酸、 缬氨酸等(15)	—	信噪比	6.05~ 95.16	—	[29]
	茶叶	缬氨酸、天冬氨 酸、谷氨酸等(35)	离心萃取、 滤膜过滤	信噪比	0.13~ 25.00 mg/kg	0.25~ 50.00 mg/kg	[30]
超高效液相色谱- 单四级杆质谱	血浆	组氨酸、天冬酰 胺、谷氨酰胺等 (34)	6-氨基喹啉-N-羟 基琥珀酰亚胺基氨 基甲酸酯衍生化	信噪比	$1\times10^2\sim$ 1×10^4	$2\times10^2\sim$ 2×10^4	[31]
高效液相色谱	大米肽	天冬氨酸、谷氨 酸、丝氨酸等(16)	异硫氰酸苯酯 (PITC)衍生化	信噪比	$3\times10^6\sim$ 18×10^6	$10\times10^6\sim$ 59×10^6	[32]
液相色谱- 串联质谱	毛发	丝氨酸、脯氨酸、 精氨酸等(21)	水解	信噪比	0.0001~ 1.00	0.001~ 10.000	[12]
固相萃取- 超高效液相色谱- 串联质谱	水	丝氨酸、甘氨酸、 亮氨酸等(20)	固相萃取	信噪比	0.20~ 38.16	0.65~ 123.47	[19]
	水	丝氨酸、甘氨酸、 亮氨酸等(15)	固相萃取	标准偏差	0.01~ 0.27	0.04~ 0.90	[21]
	水	丝氨酸、甘氨酸、 亮氨酸等(18)	固相萃取	标准偏差	0.06~ 0.23	0.19~ 0.76	本方法

注: 待测目标物中的(n)指可测定n种氨基酸

计算得出的数值比本方法低,这是由于计算方式不同^[23]。综合来看,本方法具有低 LOD 和 LOQ,且各氨基酸的 LOD/LOQ 变动范围相比已有方法均更小,充分表明本方法更灵敏、更稳定。

如果仅限于环境水样,本方法与先前建立的 15 种氨基酸方法^[21]均具有较低的 LOD 和 LOQ,但详细对比每种氨基酸,可以得出本方法更灵敏、更稳定,结果列于表 4。在本方法中,所有氨基酸的 LOD 均低于 0.25 nmol/L, LOQ 均低于 0.80 nmol/L,变动范围较小,灵敏度和稳定性均有显著提高。例如,作为最常见的消毒副产物前体甘氨酸和丙氨酸,本方法的检出限更优。此外,本方法可以成功检出新增的 3 种氨基酸,且检出限较低。

18 种氨基酸在 24 h 内的日间和日内精密度

分别为 3.7%~7.0%、3.3%~7.1%,稳定性良好,结果列于表 5。

2.4 实际样品测试

利用本方法对广东佛山市某水厂的源水进行 6 个月的氨基酸含量测定,并与去年同期所测定的源水浓度数据对比,结果示于图 7a。可见,2023 年,18 种氨基酸的总浓度水平为 300~500 nmol/L,平均浓度为 403 nmol/L。与 2022 年相比,源水中氨基酸总含量显著增加,这可能与新冠疫情放开后工业生产活动恢复正常有关。

从图 7b 可以发现,源水中 18 种氨基酸均有检出,丙氨酸、苯丙氨酸含量占比较高。在新增的 3 种氨基酸中,天冬酰胺含量占比较高。天冬酰胺的氯消毒副产物已被证实能够对人体健康产生潜在危害,需要密切关注^[3]。此外,通过浓

表4 文献[21]与本方法测定氨基酸的 LODs 和 LOQs 对比

Table 4 Comparison of LODs and LOQs of amino acids determined between reference [21] and this method

氨基酸 Amino acid	检出限 LOD/(nmol/L)		定量限 LOQ/(nmol/L)	
	文献[21] Reference[21]	本方法 This method	文献[21] Reference[21]	本方法 This method
甘氨酸	0.22	0.10	0.71	0.35
丙氨酸	0.19	0.10	0.61	0.33
缬氨酸	0.05	0.11	0.18	0.38
亮氨酸	0.17	0.14	0.58	0.46
异亮氨酸	0.17	0.18	0.58	0.60
苯丙氨酸	0.01	0.06	0.04	0.19
色氨酸	0.04	0.15	0.12	0.50
酪氨酸	0.11	0.18	0.35	0.61
天冬氨酸	0.12	0.17	0.39	0.56
天冬酰胺	—	0.14	—	0.48
谷氨酸	0.24	0.10	0.80	0.34
赖氨酸	—	0.16	—	0.54
谷氨酰胺	—	0.22	—	0.72
甲硫氨酸	0.13	0.20	0.43	0.67
丝氨酸	0.17	0.20	0.57	0.67
苏氨酸	0.27	0.23	0.91	0.76
脯氨酸	0.24	0.11	0.80	0.38
组氨酸	0.11	0.14	0.38	0.48

表5 18种氨基酸的日间、日内精密度和稳定性数据

Table 5 Inter- and intra-day precisions and stability data of 18 amino acids

氨基酸 Amino acid	精密度 Precision/(RSD/%)		稳定性 Stability/%		
	日间 Inter-day	日内 Intra-day	6 h	12 h	24 h
甘氨酸	5.4	5.1	105.2±6.2	100.6±7.9	103.2±3.6
丙氨酸	4.8	4.3	100.7±2.1	104.1±1.4	101.1±3.2
缬氨酸	4.0	3.9	97.7±6.3	99.0±2.6	105.3±4.4
亮氨酸	6.3	6.5	99.9±6.7	101.0±5.6	100.4±1.6
异亮氨酸	4.1	3.9	106.4±3.5	101.1±2.1	102.3±1.4
苯丙氨酸	7.0	7.1	101.9±4.8	102.1±1.5	104.4±2.3
色氨酸	5.6	5.4	102.5±3.3	103.4±1.5	91.2±7.1
酪氨酸	4.9	4.2	101.2±4.1	102.6±0.6	102.6±1.2
天冬氨酸	3.7	3.6	102.8±1.3	102.1±1.0	97.0±6.3
天冬酰胺	5.2	5.9	101.6±3.6	100.7±3.1	101.2±6.0
谷氨酸	6.5	6.0	100.8±3.7	102.3±2.5	101.0±4.4
赖氨酸	3.3	3.7	101.7±3.4	102.5±1.2	101.4±2.8
谷氨酰胺	4.4	4.7	100.7±10.8	98.0±3.6	100.3±3.4
甲硫氨酸	6.1	6.3	108.9±5.4	101.7±0.7	103.6±1.0
丝氨酸	3.8	3.3	99.4±5.5	95.5±3.4	99.9±2.7
苏氨酸	6.8	6.1	98.8±4.3	92.8±6.7	100.2±2.5
脯氨酸	5.6	4.9	105.2±6.2	100.6±7.9	103.2±3.6
组氨酸	3.8	3.7	99.8±3.6	103.8±1.4	100.2±7.0

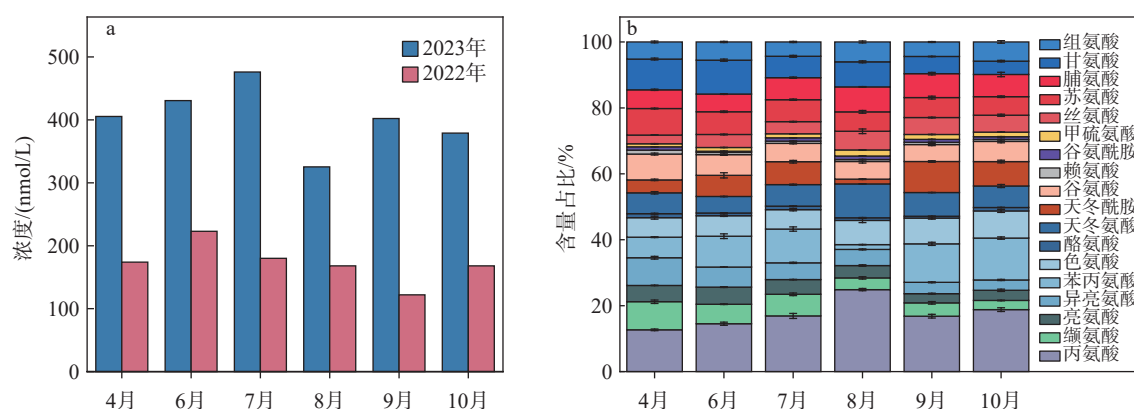


图7 不同月份源水中18种氨基酸的总浓度(a)及含量占比情况(b)

Fig. 7 Total concentration (a) and percentage (b) of 18 amino acids in source water of a waterworks in different months

度监测发现, 苯丙氨酸和丙氨酸等含量占比较高, 它们均是消毒副产物(如苯乙醛、乙醛等)的前体物^[33], 同样需要关注。

3 结论

本研究建立了一种基于固相萃取前处理技术的超高效液相色谱-串联质谱同时定量分析环境水体中18种氨基酸的方法。通过优化固相萃取步骤和仪器条件, 有效减少了环境基质效应对分析结果的干扰, 提高了方法的准确性和稳定性。该方法能够满足对水体中微量氨基酸的检测需求, 为氨基酸消毒副产物的风险评价和水质异味溯源提供了分析手段。利用本方法对华南地区某水厂6个月的氨基酸水平进行监测, 根据监测结果可知, 新冠疫情放开后, 水体中氨基酸浓度显著升高。在18种氨基酸中, 苯丙氨酸和丙氨酸含量占比较高, 而新增的3种氨基酸在水样中均有检出, 且天冬酰胺的消毒副产物能够对人体健康产生潜在危害, 需要密切关注。

参考文献:

- [1] HAGEDORN F, SCHLEPPI P, WALDNER P, FLÜHLER H. Export of dissolved organic carbon and nitrogen from Gleysol dominated catchments-the significance of water flow paths[J]. *Biogeochemistry*, 2000, 50(2): 137-161.
- [2] SHAH A D, MITCH W A. Halonitroalkanes, halonitriles, haloamides, and *N*-nitrosamines: a critical review of nitrogenous disinfection byproduct formation pathways [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(1): 119-131.

- [3] WU Q, YAN Y, LU Y, DU Y, LIANG Z, HU H. Identification of important precursors and theoretical toxicity evaluation of byproducts driving cytotoxicity and genotoxicity in chlorination[J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2019, 14(2): 25.
- [4] LUNTE S M, MOHABBAT T, WONG O S, KUWANA T. Determination of desmosine, isodesmosine, and other amino acids by liquid chromatography with electrochemical detection following precolumn derivatization with naphthalenedialdehyde/cyanide[J]. *Analytical Biochemistry*, 1989, 178(1): 202-207.
- [5] 刘则华. 水体异味化学物质: 类别、来源、分析方法及控制[M]. 北京: 科学出版社, 2019.
- [6] ZIEGLER J, ABEL S. Analysis of amino acids by HPLC/electrospray negative ion tandem mass spectrometry using 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride (Fmoc-Cl) derivatization[J]. *Amino Acids*, 2014, 46(12): 2799-2808.
- [7] KASPAR H, DETTMER K, GRONWALD W, OEFNER P J. Advances in amino acid analysis[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 393(2): 445-452.
- [8] WANG H, McNEIL Y R, YEO T W, ANSTEY N M. Simultaneous determination of multiple amino acids in plasma in critical illness by high performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection[J]. *Journal of Chromatography B*, 2013, 940: 53-58.
- [9] LE A, NG A, KWAN T, CUSMANO-OZOG K, COWAN T M. A rapid, sensitive method for quantitative analysis of underivatized amino acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)[J]. *Journal of Chromatography B*, 2014, 944: 166-174.
- [10] KLEPACKI J, KLAWITTER J, KLAWITTER J,

- KARIMPOUR-FARD A, THURMAN J, INGLE G, PATEL D, CHRISTIANS U. Amino acids in a targeted versus a non-targeted metabolomics LC-MS/MS assay. Are the results consistent?[J]. *Clinical Biochemistry*, 2016, 49(13/14): 955-961.
- [11] OOSTERINK J E, BUIJS N, van GOUDOEVEER J B, SCHIERBEEK H. A novel method for simultaneous measurement of concentration and enrichment of NO synthesis-specific amino acids in human plasma using stable isotopes and LC/MS ion trap analysis[J]. *Journal of Chromatography B*, 2014, 958: 10-15.
- [12] GARGANO E M, SELL S, LANGHOFF S, SCHMIDT C U, WIERLACHER S. Development and validation of a method for simultaneous analysis of hair underivatized amino acids and damage biomarkers, using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2021, 233: 122-125.
- [13] XIA T, GAO S, SHU C, WEN Y, YUN Y, TAO X, CHEN W, ZHANG F. Analysis of amino acids in human blood using UHPLC-MS/MS: potential interferences of storage time and vacutainer tube in pre-analytical procedure[J]. *Clinical Biochemistry*, 2016, 49(18): 1 372-1 378.
- [14] 杨茜, 肖炳坤, 杨建云, 黄荣清. 双重保留机理下液相色谱-质谱法直接分析 18 种氨基酸[J]. *分析化学*, 2019, 47(4): 627-633.
- YANG Qian, XIAO Bingkun, YANG Jianyun, HUANG Rongqing. Determination of 18 kinds of amino acids based on a mixed-mode retention mechanism by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2019, 47(4): 627-633(in Chinese).
- [15] 杨阳, 高守红, 张凤, 仲人前, 王志鹏, 陈万生. 靶向超高效液相色谱-串联质谱联用方法同时测定结肠癌患者血浆中 32 种氨基酸含量[J]. *分析化学*, 2022, 50(7): 1 083-1 092.
- YANG Yang, GAO Shouhong, ZHANG Feng, ZHONG Renqian, WANG Zhipeng, CHEN Wansheng. Simultaneous determination of 32 kinds of amino acids in plasma from colorectal cancer patients based on targeted ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2022, 50(7): 1 083-1 092(in Chinese).
- [16] SHI J L, MITCH W A. Lysine and arginine reactivity and transformation products during peptide chlorination [J]. *Environmental Science & Technology*, 2023, 57(14): 5 852-5 860.
- [17] HOW Z T, BUSETTI F, LINGE K L, KRISTIANA I, JOLL C A, CHARROIS J W A. Analysis of free amino acids in natural waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1 370: 135-146.
- [18] 王钰芳, 贝尔, 邱玉, 汪隼, 齐飞, 陈超. UPLC-MS/MS 测定水源水中 17 种氨基酸及其应用[J]. *中国给水排水*, 2020, 36(8): 106-112.
- WANG Yufang, BEI Er, QIU Yu, WANG Jun, QI Fei, CHEN Chao. Determination of 17 amino acids in source water by UPLC-MS/MS and its application[J]. *China Water & Wastewater*, 2020, 36(8): 106-112(in Chinese).
- [19] QIU J, CRAVEN C, WAWRYK N, CARROLL K, LI X F. Integration of solid phase extraction with HILIC-MS/MS for analysis of free amino acids in source water[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2022, 117: 190-196.
- [20] BUSZEWSKI B, SZULTKA M. Past, present, and future of solid phase extraction: a review[J]. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2012, 42(3): 198-213.
- [21] LI Y, LIU Z, CHEN S, WU Y, LIANG J, DANG Z, LIU Y. Trace determination of fifteen free amino acids in drinking source water via solid-phase extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2023, 30(1): 594-605.
- [22] LIU Z H, HASHIMOTO T, OKUMURA Y, KANJO Y, MIZUTANI S. Simultaneous analysis of natural free estrogens and their conjugates in wastewater by GC-MS[J]. *CLEAN-Soil, Air, Water*, 2010, 38(2): 181-188.
- [23] TANG Z, LIU Z H, WANG H, DANG Z, YIN H, ZHOU Y, LIU Y. Trace determination of eleven natural estrogens and insights from their occurrence in a municipal wastewater treatment plant and river water[J]. *Water Research*, 2020, 182: 115-126.
- [24] PANASKAR S N, SINGH S K. Quantification of amino acids in plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)[J]. *Chromatographia*, 2023, 86(7): 567-572.
- [25] 匡慧颖, 李子樱, 朱波, 张玉鑫, 倪一平, 肖伟敏, 叶新玉, 杨国武, 杨燕. 柱前衍生/高效液相色谱-串联质谱法测定氨基酸工业品中 26 种游离手性氨基酸含量[J]. *分析测试学报*, 2024, 43(5): 703-713.
- KUANG Huiying, LI Ziying, ZHU Bo, ZHANG Yuxin, NI Yiping, XIAO Weimin, YE Xinyu, YANG Guowu, YANG Yan. Determination of 26 free chiral amino acids in industrial products by pre-column derivatization and

- HPLC-MS/MS[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2024, 43(5): 703-713(in Chinese).
- [26] 付善超, 刘明慧, 陈志伟, 鹿文慧, 祝德义, 曹珊. 柱前衍生-高效液相色谱测定牛皮蓝湿革中18种氨基酸[J]. *分析实验室*, 2024, 43(9): 1 252-1 258.
- FU Shanchao, LIU Minghui, CHEN Zhiwei, LU Wenhui, ZHU Deyi, CAO Shan. Determination of 18 amino acids in wet-blue leather by pre-column derivatization combined with high performance liquid chromatography[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2024, 43(9): 1 252-1 258(in Chinese).
- [27] ZHAO R, HUANG B, LU G, FU S, YING J, ZHAO Y. A practical method for amino acid analysis by LC-MS using precolumn derivatization with urea[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(8): 7 332.
- [28] 黄嘉乐, 陈扬, 党华, 姚晓庆, 黄嘉瑜. 磁性分散固相微萃取/UHPLC-Q-Orbitrap HRMS测定运动营养食品中27种氨基酸[J]. *分析测试学报*, 2024, 43(3): 455-463.
- HUANG Jiale, CHEN Yang, DANG Hua, YAO Xiaoqing, HUANG Jiayu. Determination of 27 amino acids in sports nutrition food by magnetic dispersive solid phase microextraction coupled with UHPLC-Q-Orbitrap HRMS[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2024, 43(3): 455-463(in Chinese).
- [29] 陈妍, 倪炜华, 王丽丽, 陈晨. 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法测定运动型功能饮料中的多种氨基酸[J]. *食品科技*, 2024, 49(1): 297-302.
- CHEN Yan, NI Weihua, WANG Lili, CHEN Chen. Determination of multiple free amino acids in sports functional beverages by ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time of flight[J]. *Food Science and Technology*, 2024, 49(1): 297-302(in Chinese).
- [30] LI J, MA J, LI Q, FAN S, FAN L, MA H, ZHANG Y, ZHENG L. Determination of 35 free amino acids in tea using ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2021, 8: 767 801.
- [31] 瞿纯, 刘佳健, 郑丹, 郑晓校, 贾伟, 赵爱华. 超高效液相色谱-单四极杆质谱检测器快速定量血浆游离氨基酸的方法[J]. *分析科学学报*, 2023, 39(5): 557-564.
- QU Chun, LIU Jiajian, ZHENG Dan, ZHENG Xiaoxiao, JIA Wei, ZHAO Aihua. Rapid quantification of plasma free amino acids by ultra-performance liquid chromatography with single quadrupole mass spectrometry detector[J]. *Journal of Analytical Science*, 2023, 39(5): 557-564 (in Chinese).
- [32] 黄莹, 黄晶, 杨晓, 陈曦, 胡武瑶. PTC柱前衍生-高效液相色谱法测大米肽中的16种氨基酸含量[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(24): 279-285.
- HUANG Ying, HUANG Jing, YANG Xiao, CHEN Xi, HU Wuyao. Determination of 16 amino acids in rice peptides by PTC pre-column derivatization high performance liquid chromatography[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(24): 279-285(in Chinese).
- [33] HOW Z T, LINGE K L, BUSETTI F, JOLL C A. Formation of odorous and hazardous by-products from the chlorination of amino acids[J]. *Water Research*, 2018, 146: 10-18.

(收稿日期: 2024-07-15; 修回日期: 2024-08-23)