

# 超高效液相色谱-串联质谱法 测定人血浆中精氨酸及衍生物含量

田 晔<sup>1,2</sup>, 江 骥<sup>2</sup>, 胡 蓓<sup>2</sup>, 薛金萍<sup>1</sup>, 王洪允<sup>2</sup>

(1. 福州大学化学学院, 福建省功能材料工程研究中心, 福建省光动力治疗药物与诊疗工程技术研究中心, 福建 福州 350108;

2. 中国医学科学院北京协和医院临床药理中心, 北京 100730)

**摘要:**建立了超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法同时测定使用艾普拉唑后人血浆中二甲基精氨酸(ADMA)、对称二甲基精氨酸(SDMA)、单甲基精氨酸(NMMA)、瓜氨酸(Cit)和 L-精氨酸(L-Arg)的浓度。采用 HILIC 亲水相互作用色谱和非衍生化的蛋白沉淀法进行分离分析, 色谱柱选取 Waters Atlantic HILIC 柱(2.1 mm×50 mm×3 μm), 流动相由乙腈(含 0.5% 乙酸和 0.025% 三氟乙酸)-水(含 0.5% 乙酸和 0.025% 三氟乙酸)(85:15, V/V)组成, 流速 0.25 mL/min。采用多反应离子监测(MRM)模式, 以电喷雾离子源(ESI)正离子方式检测。结果显示, ADMA、SDMA、NMMA、L-Arg 和 Cit 的线性关系良好, 相关系数  $r$  均大于 0.994 0; ADMA、SDMA 和 NMMA 的线性范围为 0.1~5 mmol/L, L-Arg 和 Cit 的线性范围为 10~250 mmol/L; 5 种氨基酸的日内、日间精密度均小于 15%, 准确度在 85%~115% 之间。该方法快速、简便、灵敏, 可为相关疾病的临床诊断提供一种高效的检测手段。

**关键词:**超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS); 艾普拉唑; 蛋白沉淀法; 亲水性色谱

**中图分类号:** O657.63

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1004-2997(2016)05-0446-07

**doi:** 10.7538/zpxb.youxian.2016.0036

## Determination of Amino Acid Biomarkers in Human Plasma

## by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

TIAN Ye<sup>1,2</sup>, JIANG Ji<sup>2</sup>, HU Pei<sup>2</sup>, XUE Jin-ping<sup>1</sup>, WANG Hong-yun<sup>2</sup>

(1. Fujian Engineering Research Center for Drug and Diagnoses-Treat of Photodynamic Therapy,

College of Chemistry, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China;

2. Clinical Pharmacology Research Center, Peking Union Medical College Hospital,

Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100730, China)

**Abstract:** An ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was developed for the simultaneous determination of ADMA, SDMA, NMMA, L-Arg and Cit in human plasma after administration of ilaprazole. The plasma samples were prepared using protein precipitation by acetonitrile after addition of deuterated internal standard. The analytical column was Waters Atlantic HILIC

收稿日期: 2015-12-29; 修回日期: 2016-03-01

作者简介: 田 晔(1988—), 女(汉族), 河南周口人, 硕士研究生, 从事药代动力学研究。E-mail: tianye504@163.com

通信作者: 王洪允(1975—), 男(满族), 辽宁抚顺人, 副研究员, 从事药代动力学研究。E-mail: wanghy@pumch.cn

网络出版时间: 2016-07-05; 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20160705.1020.004.html>

(2.1 mm×50 mm×3 μm), and the mobile phase was composed of acetonitrile (containing 0.5% acetic acid and 0.025% trifluoroacetic acid)-water (containing 0.5% acetic acid and 0.025% trifluoroacetic acid) (85 : 15, V/V). The flow rate was 0.25 mL/min and the sample run time was 3.0 min. A tandem mass spectrometer coupled with positive electro-spray ionization (ESI) source was used for detection. The quantitative analysis was performed on selective ion chromatograms acquired by a multiple reaction monitoring (MRM) mode of following transitions: ADMA ( $m/z$  203.2→46.0), SDMA ( $m/z$  203.2→172.1), NMMA ( $m/z$  189.0→70.0), Cit ( $m/z$  176.0→70.0), *L*-Arg ( $m/z$  175.1→60.071), and D<sub>7</sub>-ADMA ( $m/z$  210.0→77.1). The specificity, accuracy, linearity, intra-day and inter-day precision, recovery and matrix effect were investigated in this study according to the guidance issued by the Food and Drug Administration (FDA) of USA. The method was validated over the concentration range of 0.1-5 mmol/L for ADMA, SDMA and NMMA, 10-250 mmol/L for *L*-Arg and Cit, respectively. Inter-day and intra-day precision were less than 15% and accuracy was within 85%-115%. The linear regression (weighed by  $1/x^2$ ) was applied to establish the relationship between plasma concentration and peak area ratio of each analyte (minus that of the blank) to its IS. Topical equations of ADMA, SDMA, NMMA, *L*-Arg and Cit were as follows:  $y=0.3851x+0.2077$  ( $r=0.9967$ ),  $y=0.4180x+0.2007$  ( $r=0.9983$ ),  $y=0.3662x+0.04831$  ( $r=0.9985$ ),  $y=0.01153x+1.2049$  ( $r=0.9980$ ), and  $y=0.04321x+8.3154$  ( $r=0.9941$ ), respectively. The extraction recoveries of ADMA, SDMA, NMMA, Cit and *L*-Arg were  $(92.5 \pm 8.6)\%$ ,  $(88.5 \pm 6.5)\%$ ,  $(50.6 \pm 3.1)\%$ ,  $(27.0 \pm 0.3)\%$  and  $(33.9\% \pm 2.1)\%$ , respectively. The matrix effects about ADMA, SDMA, NMMA, Cit and *L*-Arg were  $(90.5 \pm 6.3)\%$ ,  $(83.0 \pm 3.5)\%$ ,  $(50.6 \pm 2.5)\%$ ,  $(41.0 \pm 0.1)\%$ , and  $(32.9 \pm 0.2)\%$ , respectively. Therefore, this method is rapid, simple and sensitive, and which can provide a highly efficient detection means to the future clinical disease diagnosis.

**Key words:** ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); ilaprazole; protein precipitation; hydrophilic chromatography (HILIC)

一氧化氮是人体重要的信使分子,*L*-精氨酸(*L*-Arg)在一氧化氮全酶(NOS)的催化下,产生一氧化氮(NO)和瓜氨酸(Cit)<sup>[1-2]</sup>。蛋白精氨酸甲基转移酶(PRMTs)以 *S*-腺苷甲硫氨酸为甲基供体,可使各种多肽中的 *L*-精氨酸残基甲基化,甲基化的蛋白质水解后即可产生甲基化的精氨酸,此过程产生了不对称二甲基精氨酸(ADMA),单甲基精氨酸(NMMA)和对称二甲基精氨酸(SDMA),其关系示于图 1<sup>[3]</sup>。ADMA是 NOS 的内源性竞争抑制剂,通过抑制 NOS 的活性,从而抑制 NO 的产生<sup>[4-6]</sup>;研究表明,使用质子泵抑制剂(PPIs)可提高 ADMA 的水平,从而增加心血管不良事件的发生率<sup>[7]</sup>。虽然 NMMA 也可以抑制 NO 的产生,但其在

人体中的含量远远低于 ADMA。SDMA 不直接抑制 NO 的合成,但可与内皮细胞膜上的阳离子氨基酸转运体竞争,从而加剧精氨酸的缺

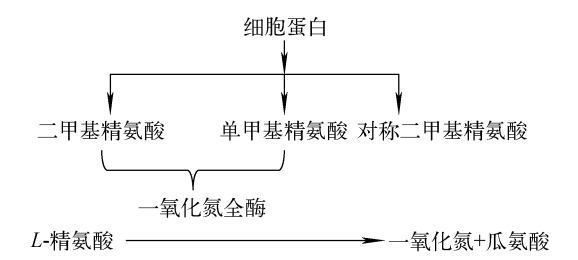


图 1 ADMA,SDMA,NMMA, Cit 和 *L*-Arg 的关系  
Fig. 1 Relationship of ADMA, SDMA, NMMA, Cit and *L*-Arg

乏<sup>[8]</sup>;另有研究表明,SDMA 可作为肾功能和缺血性中风所引起死亡的新型标记物<sup>[9]</sup>。

目前,检测氨基酸含量常用的方法有薄层色谱法(TLC)、气相色谱法(GC)、电泳法(EC)、高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱-质谱联用法(GC/MC)、氨基酸分析仪法等<sup>[10-12]</sup>。近年来,超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法在生物医学和药物研究领域的应用发展迅速。

根据 ADMA、SDMA、NMMA、Cit 和 *L*-Arg 之间的关系,本工作拟选用强极性和强亲水性的 HILIC 色谱柱,采用 UPLC 技术进行色谱分离,以电喷雾离子源正离子方式和多反应离子扫描模式测定人服用 PPIs 后,血浆中 ADMA、SDMA、NMMA、Cit 和 *L*-Arg 的浓度,希望为相关疾病的临床诊断提供方法参考。

# 1 实验部分

## 1.1 主要仪器与装置

Acquity UPLC 超高效液相色谱仪,Xevo TQS 三重串联四极杆质谱仪;美国 Waters 公司产品,配有电喷雾离子源及 MassLynx 4.0 数据处理系统;低温高速离心机和涡流混合器:德国 Heraeus 公司产品;纯水机:美国 Milli-Q

公司产品;AX240 十万分之一分析天平:瑞士 Mettler Toledo 公司产品;WinNonlin 软件 Version 6.3;美国 Pharsight 公司产品。

## 1.2 主要材料与试剂

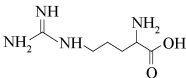
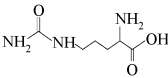
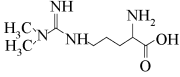
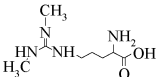
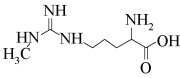
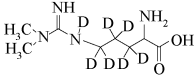
ADMA、SDMA、NMMA、Cit 和 *L*-Arg 标准对照品:美国 Sigma 公司产品,其结构列于表 1;*D*<sub>7</sub>-ADMA 内标对照品:美国 Cambridge Isotope 公司产品;乙腈(色谱纯):美国 Honeywell Burdick & Jackson 公司产品;乙酸(色谱纯):美国 Fisher Scientific 公司产品;三氟乙酸(TFA,色谱纯):百灵威科技有限公司产品;实验用水:由 Milli-Q 纯化系统制备;空白血浆:由北京协和医院血库提供。

## 1.3 实验条件

**1.3.1 色谱条件** 色谱柱:Waters Atlantic HILIC 柱(2.1 mm×50 mm×3 μm);流动相:乙腈(含 0.5% 乙酸和 0.025% TFA)-水(含 0.5% 乙酸和 0.025% TFA)(85:15,V/V);流速:0.25 mL/min;进样体积:10 μL。

**1.3.2 质谱条件** 电喷雾离子源正离子模式(ESI<sup>+</sup>);毛细管电压 3 kV;锥孔电压 50 V;锥孔气流速 150 L/h;脱溶剂气温度 350 ℃;脱溶剂气流速 650 L/h;碰撞气为氩气;以多反应监测(MRM)扫描方式进行测定,详细的质谱参数列于表 1。

表 1 *L*-Arg、Cit、ADMA、SDMA 和 NMMA 的 MRM 参数  
Table 1 MRM parameters of *L*-Arg, Cit, ADMA, SDMA and NMMA

| 化合物                         | 化学结构                                                                                | 母离子( <i>m/z</i> ) | 子离子( <i>m/z</i> ) | 锥孔电压/V | 碰撞能/V |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|--------|-------|
| <i>L</i> -Arg               |  | 175.100           | 60.071            | 34     | 30    |
| Cit                         |  | 176.000           | 70.000            | 40     | 15    |
| ADMA                        |  | 203.200           | 46.000            | 40     | 15    |
| SDMA                        |  | 203.200           | 172.100           | 40     | 12    |
| NMMA                        |  | 189.000           | 70.000            | 40     | 20    |
| <i>D</i> <sub>7</sub> -ADMA |  | 210.000           | 77.100            | 40     | 20    |

## 1.4 血浆样品的测定

**1.4.1 标准曲线和质控血浆样品的测定** 取 20  $\mu\text{L}$  空白血浆,加入 20  $\mu\text{L}$  待测化合物工作液和 10  $\mu\text{L}$  10 mg/L 内标工作液,涡旋振荡 20 s;随后加入 160  $\mu\text{L}$  乙腈(含 0.5% 乙酸和 0.025% TFA),再涡旋振荡 3 min,以 13 000 r/min 离心 10 min 后,取上清液,进样测定,进样体积 10  $\mu\text{L}$ 。

**1.4.2 实际血浆样本的测定** 取 20  $\mu\text{L}$  实际血浆样品,加入 20  $\mu\text{L}$  纯水和 10  $\mu\text{L}$  10 mg/L 内标工作液,涡旋振荡 20 s;随后加入 160  $\mu\text{L}$  乙腈(含 0.5% 乙酸和 0.025% TFA),再涡旋振荡 3 min,以 13 000 r/min 离心 10 min 后,取上清液,进样测定,进样体积 10  $\mu\text{L}$ 。

## 1.5 方法学考察

参照美国食品药品监督管理局(FDA)在 2013 年颁布的指导原则<sup>[13]</sup>,对本方法的标准曲线线性,准确度和日内、日间精密度,萃取回收率和基质效应进行考察。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱分析

空白样品中,除不加内标外,其他按 1.4 节条件进行分析,因 *L*-Arg、Cit、ADMA、SDMA、NMMA 均为内源性氨基酸,故在空白血浆中均有检出,其质量色谱图示于图 2。可见,*L*-Arg、Cit、ADMA、SDMA 和 NMMA 的保留时间分别为 0.96、0.95、0.96、0.95 和 0.96 min,色谱峰形良好。

### 2.2 标准曲线线性和方法定量限

按照 1.4.1 节方法制备并测定血浆标准曲线样品,ADMA、SDMA 和 NMMA 的标准曲线浓度点依次为 0.1、0.25、0.5、1、2、4 和 5 mmol/L;*L*-Arg 和 Cit 的标准曲线浓度点依次为 10、25、50、100、200、400 和 500 mmol/L。由于 ADMA、SDMA、NMMA、*L*-Arg 和 Cit 均属于内源性物质,故每批制备 5 个 BK(只含内标不含化合物的样品),分别计算出 5 个 BK 中 5 种氨基酸的峰面积,并将其与内标峰面积之比的均值作为空白本底。以 ADMA、SDMA、NMMA、*L*-Arg 和 Cit 浓度为横坐标,以 5 种氨基酸峰面积与内标峰面积之比减去空白本底为纵坐标,权重系数  $1/x^2$ ,进行线性

回归,得到的回归方程列于表 2。

### 2.3 准确度和日内、日间精密度

按照 1.4.1 节方法制备并测定低、中、高 3 种浓度的质控样品,低浓度质控样品中,ADMA、SDMA 和 NMMA 的浓度均为 0.3 mmol/L,Cit 和 *L*-Arg 的浓度均为 25 mmol/L;中浓度质控样品中,ADMA、SDMA 和 NMMA 的浓度均为 2.5 mmol/L,Cit 和 *L*-Arg 的浓度均为 250 mmol/L;高浓度质控样品中,ADMA、SDMA 和 NMMA 的浓度均为 4 mmol/L,Cit 和 *L*-Arg 的浓度均为 400 mmol/L。每个浓度平行测定 5 个样品,连续测定 3 天,计算准确度和日内、日间精密度,结果列于表 3。

### 2.4 萃取回收率

**2.4.1 萃取样品** 取 20  $\mu\text{L}$  血浆样品,加入 20  $\mu\text{L}$  待测化合物工作液(低、中、高浓度的质控样品, $n=6$ ),涡旋振荡 20 s,随即加入 160  $\mu\text{L}$  乙腈(含 0.5% 乙酸和 0.025% TFA),按 1.4 节方法制备并测定。

**2.4.2 未萃取样品** 配制与 2.3 节相同的低、中、高 3 种浓度的质控样品(溶剂为乙腈,含 0.5% 乙酸和 0.025% TFA),取空白血浆,按照 1.4 节方法处理,取 180  $\mu\text{L}$  上清液,加入 20  $\mu\text{L}$  标准溶液,涡旋振荡并测定(每一浓度平行测定 6 个样品,共 18 个)。

将萃取样品与相同浓度未萃取样品的峰面积进行比较,计算 ADMA、SDMA、NMMA、Cit 和 *L*-Arg 的萃取回收率分别为:  $(92.5 \pm 8.6)\%$ 、 $(88.5 \pm 6.5)\%$ 、 $(50.6 \pm 3.1)\%$ 、 $(27.0 \pm 0.3)\%$  和  $(33.9 \pm 2.1)\%$ 。

### 2.5 基质效应

配制与 2.3 节相同的低、中、高 3 种浓度的质控样品(溶剂为乙腈,含 0.5% 乙酸和 0.025% TFA)。取 6 份来自不同个体的空白血浆,按 1.4 节方法处理,取 180  $\mu\text{L}$  上清液,加入 20  $\mu\text{L}$  标准溶液,涡旋振荡并测定(每一浓度测定 6 个样品,共 18 个);将 180  $\mu\text{L}$  乙腈(含 0.5% 乙酸和 0.025% TFA)加入 20  $\mu\text{L}$  标准溶液中,直接测定获得的峰面积,计算基质效应。ADMA、SDMA、NMMA、Cit 和 *L*-Arg 的基质效应分别为:  $(90.5 \pm 6.3)\%$ 、 $(83.0 \pm 3.5)\%$ 、 $(50.6 \pm 2.5)\%$ 、 $(41.0 \pm 0.1)\%$  和  $(32.9 \pm 0.2)\%$ 。

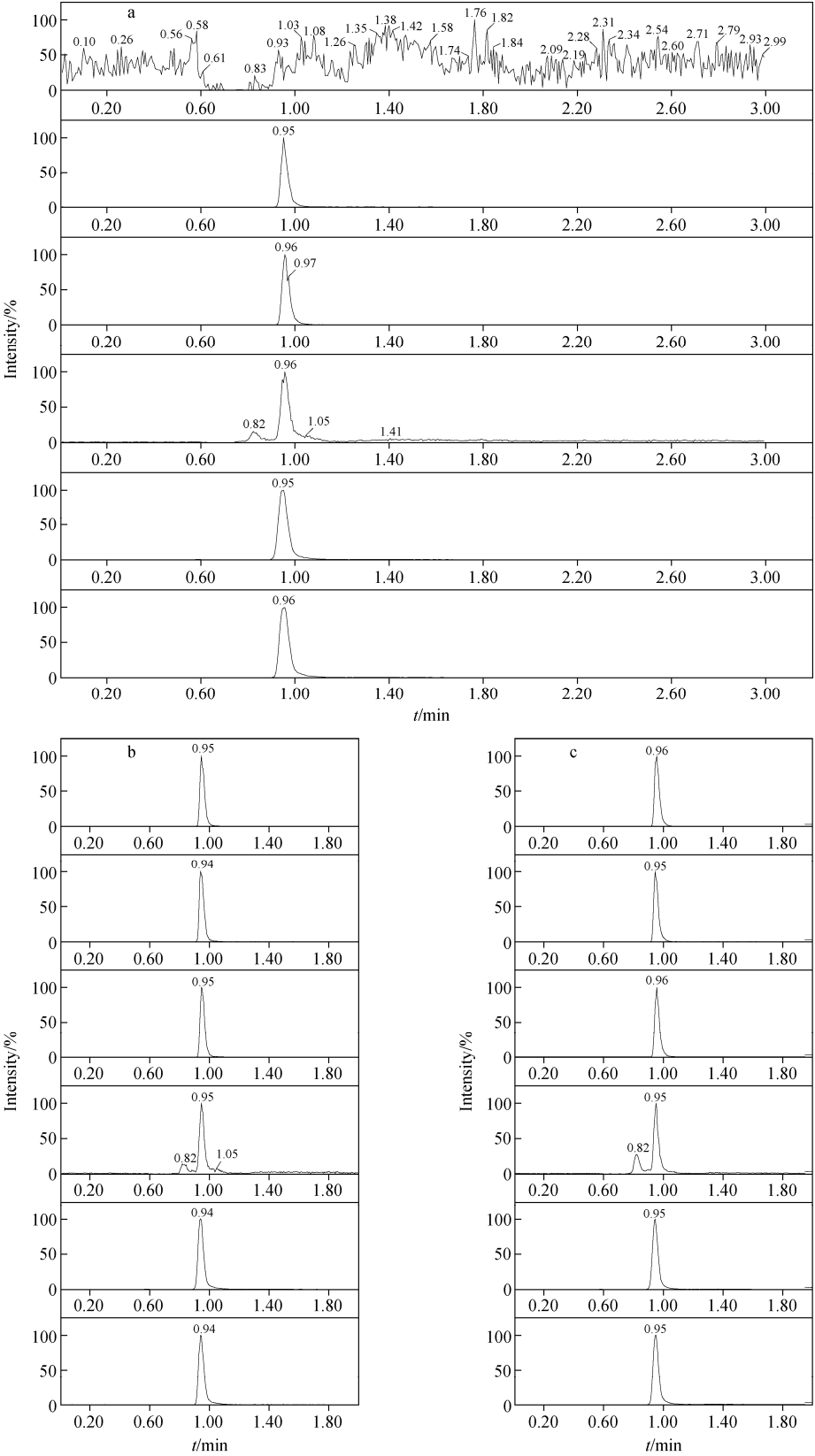


图 2 空白血浆 (a), 空白血浆中加入内标 (b) 和受试者服药 2 h 后 (c) 的典型质量色谱图  
Fig. 2 Typical MRM chromatograms of double blank plasma (a), blank plasma spiked with IS (b) and a subject plasma sample after 2 h post-dose (c)

表 2 ADMA,SDMA,NMMA,L-Arg 和 Cit 的线性方程,相关系数和方法定量限  
Table 2 Linear equations,correlation coefficients and quantification limits of ADMA, SDMA, NMMA, L-Arg and Cit

| 化合物   | 线性方程                | 相关系数( <i>r</i> ) | 定量限/(mmol/L) | 线性范围/(mmol/L) |
|-------|---------------------|------------------|--------------|---------------|
| ADMA  | $y=0.3851x+0.2077$  | 0.9967           | 0.1          | 0.1~5         |
| SDMA  | $y=0.4180x+0.2007$  | 0.9983           | 0.1          | 0.1~5         |
| NMMA  | $y=0.3662x+0.04831$ | 0.9985           | 0.1          | 0.1~5         |
| L-Arg | $y=0.01153x+1.2049$ | 0.9980           | 10           | 10~500        |
| Cit   | $y=0.04321x+8.3154$ | 0.9941           | 10           | 10~500        |

表 3 ADMA,SDMA,NMMA,L-Arg 和 Cit 的准确度和日内、日间精密度  
Table 3 Accuracy, intra-day and inter-day precision of ADMA, SDMA, NMMA, L-Arg and Cit

| 化合物   | 低浓度质控样品 |       |      | 中浓度质控样品 |       |     | 高浓度质控样品 |       |     |
|-------|---------|-------|------|---------|-------|-----|---------|-------|-----|
|       | 准确度/%   | 精密度/% |      | 准确度/%   | 精密度/% |     | 准确度/%   | 精密度/% |     |
|       |         | 日内    | 日间   |         | 日内    | 日间  |         | 日内    | 日间  |
| ADMA  | 107.6   | 5.9   | 11.5 | 99.8    | 6.8   | 5.3 | 95.9    | 3.5   | 4.4 |
| SDMA  | 97.52   | 6.2   | 12.3 | 97.4    | 5.1   | 5.6 | 95.3    | 3.1   | 3.7 |
| NMMA  | 105.1   | 4.3   | 4.4  | 101.0   | 8.0   | 5.8 | 91.6    | 3.2   | 4.3 |
| Cit   | 106.4   | 7.1   | 12.6 | 93.0    | 7.3   | 5.0 | 91.3    | 7.1   | 7.4 |
| L-Arg | 91.9    | 8.4   | 14.1 | 114.2   | 7.9   | 6.7 | 94.1    | 4.0   | 5.6 |

2.6 方法应用

艾普拉唑是一种质子泵抑制剂,在十二指肠溃疡患者中多次给药试验后,检测体内ADMA、SDMA、NMMA、Cit 和 L-Arg 的浓度变化。选取 10 名十二指肠溃疡患者进行随机、开放、平行、阳性药对照试验,给药剂量20 mg,于第 1 天早晨静脉输注,采集给药后 25 min、45 min、55 min、1.5 h、2 h、3 h、5 h、8 h、12 h 和 24 h 共计 11 个采血点的系列血样。采用 UPLC-MS/MS 法测定 10 名受试者的系列血样,得到的平均血药浓度-时间曲线示于图 3。结果表明,在短时间内,使用高剂量的 PPIs,体内 ADMA、SDMA、NMMA、Cit 和 L-Arg 的浓度并没有发生明显的改变。

2.7 讨论

本工作建立了同时测定血浆中 ADMA、SDMA、NMMA、L-Arg 和 Cit 浓度的 UPLC-MS/MS 方法,鉴于以上 5 种氨基酸水溶性较强,且有一定的极性,因此采用 ESI<sup>+</sup> 模式进行测定。实验选择了 HILIC 亲水相互作用色谱柱,因其可为强极性和强亲水性化合物提供合

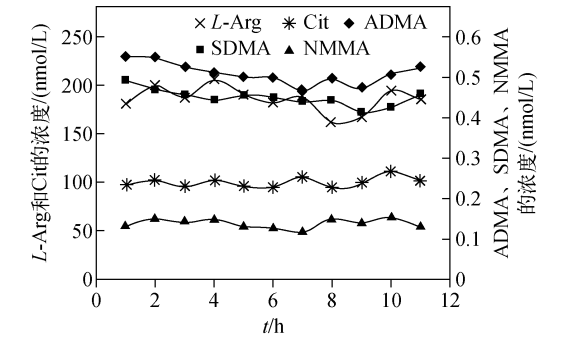


图 3 十二指肠溃疡患者静脉注射 20 mg 艾普拉唑后, ADMA、SDMA、NMMA、Cit 和 L-Arg 的平均血药浓度-时间曲线 (n=10)  
Fig.3 Mean plasma concentration-time curves of ADMA, SDMA, NMMA, Cit and L-Arg in duodenal ulcer patients intravenous PPIs 20 mg (n=10)

适的保留,通过优化多个色谱参数,有利于实现目标组分和基质中干扰物质的分离,从而降低基质效应的影响;又因其流动相中含高比例水溶性有机相,有利于提高质谱的离子化效率和分析灵敏度。实验选择蛋白沉淀法或固相萃取法进行样品前处理,因固相萃取法价格昂贵,技

术要求高,操作步骤繁琐,故采用了既能满足要求,操作又相对简单的蛋白沉淀法,即加入沉淀剂,直接取上清液进样。此外,分析过程中氘代同位素内标的使用有效地提高了本方法的准确性和适用性。

本实验对 10 名十二指肠溃疡患者服用艾普拉唑后的血样进行药代动力学分析,结果发现,使用艾普拉唑并未造成体内 ADMA、SDMA、NMMA、Cit 和 *L*-Arg 的浓度水平发生明显的变化,说明人体在使用艾普拉唑后,不会增加心血管不良事件的发生率,此结论在 Ghebremariam 等<sup>[14]</sup>研究兰索拉唑与心血管疾病的关系时得到证实。

### 3 结论

本工作建立了同时测定血浆中 ADMA、SDMA、NMMA、*L*-Arg 和 Cit 浓度的 UPLC-MS/MS 方法,可实现 5 种氨基酸在 3.0 min 内的快速检测。该方法采用 HILIC 亲水相互作用色谱和非衍生化的蛋白沉淀法,具有快速、简便和灵敏的优点,可为今后相关疾病的临床诊断提供一种高效的检测手段。

### 参考文献:

- [1] DENNIS J S, NYOUN S K, CARL F N, et al. *N*<sup>w</sup>-hydroxy-*L*-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from *L*-arginine[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(10): 6 259-6 263.
- [2] JULIE L, MARIANNE Z, JEAN-CLAUDE G, et al. Arginine and nitric oxide synthase: Regulatory mechanisms and cardiovascular aspects[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2014, 58(1):101-116.
- [3] POPE A J, KARUPPIAH K, CARDOUNEL A J. Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production[J]. Toxicology & Applied Pharmacology, 1985, 79(1): 11-27.
- [4] ZOLTAN N, ATTILA C, SANDOR S, et al. Elevated levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in the pericardial fluid of cardiac patients correlate with cardiac hypertrophy[J]. Plos One, 2015, 10(8): 1-19.
- [5] ALPOIM P N, SOUSA L P N, MOTA A P L, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) in

cardiovascular and renal disease[J]. Clinica Chimica Acta, 2014, 440C: 36-39.

- [6] ZHANG L, WAN Y N, ZHAO J H, et al. The association between systemic sclerosis, arginine and asymmetric dimethylarginine[J]. Inflammation, 2015, 38(1): 1-6.
- [7] GHEBREMARIAM Y T, PAEA L P, LEE J C, et al. Unexpected effect of proton pump inhibitors: Elevation of the cardiovascular risk factor asymmetric dimethylarginine[J]. Circulation, 2013, 128(8): 845-853.
- [8] RAINER H, BÖGER M D, STEFANIE M, et al. Asymmetric dimethylarginine, derangements of the endothelial nitric oxide synthase pathway, and cardiovascular diseases[J]. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 2000, 26(5): 539-545.
- [9] LÜNEBURG N, LIEB W, ZELLER T, et al. Genome-wide association study of *L*-arginine and dimethylarginines reveals novel metabolic pathway for symmetric dimethylarginine[J]. Circulation Cardiovascular Genetics, 2014, 7(6): 264.
- [10] 暴海霞,戴新华. 氨基酸检测方法的进展和现状[J]. 化学试剂, 2013, 35(7): 577-584.  
BAO Haixia, DAI Xinhua. The progress and status of amino acid detection methods[J]. Chemical Reagent, 2013, 35(7): 577-584(in Chinese).
- [11] 周文芳. 血浆中氨基酸检测技术探讨[J]. 氨基酸和生物资源, 2012, 34(3): 25-28.  
ZHOU Wenfang. Discussion on the detection technology of plasma amino acids[J]. Amino Acids & Biotic Resources, 2012, 34(3): 25-28 (in Chinese).
- [12] WATERVAL W A H, SCHEIJEN J L J M, ORTMANS-PLOEMEN M M J C, et al. Quantitative UPLC-MS/MS analysis of underivatized amino acids in body fluids is a reliable tool for the diagnosis and follow-up of patients with inborn errors of metabolism[J]. Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry, 2009, 407(1/2): 36-42.
- [13] Food and Drug Administration. Guideline for Industry: Bioanalytical Method Validation (Draft) [S]. 2013.
- [14] GHEBREMARIAM Y T, COOKE J P, KHAN F, et al. Proton pump inhibitors and vascular function: A prospective cross-over pilot study[J]. Vascular Medicine, 2015, 20(4): 309-316.