

在线固相萃取净化-液相色谱-高分辨质谱法 测定海洋沉积物中的L型和D型氨基酸

何秀平^{1,2}, 李芳¹, 陈军辉^{1,2}, 辛明^{1,2}, 王保栋^{1,2}

(1. 自然资源部第一海洋研究所, 青岛市现代分析与近海生态环境安全保障重点实验室, 青岛 266061;
2. 青岛海洋科技中心, 海洋生态与环境科学功能实验室, 青岛 266071)

摘要 氨基酸(L-氨基酸和D-氨基酸)是海洋沉积环境有机质来源及成岩过程的重要生物标志物, 因此, 开发精准检测海洋沉积物中主要手性氨基酸的方法尤为重要. 本文采用在线固相萃取(SPE)结合液相色谱-飞行时间质谱联用技术(LC-TOF/MS), 建立了一种同步测定海洋沉积物中L-和D-氨基酸的新方法. 采用C₁₈保护柱为在线SPE柱, 填料粒径为1.8 μm的超高效反相C₁₈柱为分析柱, 基于酸性和碱性双流动相分离体系, 实现了海洋沉积物中各种L-/D-氨基酸的高效分离; 采用高分辨电喷雾TOF/MS全扫描模式下在线检测. 结果表明, 海洋沉积物样品经盐酸水解处理后稀释5倍, 进行衍生化处理, 采用在线SPE-LC-TOF/MS直接进样分析可实现各种L-/D-氨基酸的准确测定. 各种氨基酸的加标回收率在66.1%~106.8%之间, 相对标准偏差(RSD)为2.40%~12.3%, 并且具有较宽的线性范围, 相关系数(R²)均大于0.990. 与传统的液相色谱法相比, 该方法仅需少量(0.01~0.10 g)沉积物样品, 是深海及大洋热液区沉积物中手性氨基酸生物标志物检测的有效方法. 采用该方法对西印度洋表层沉积物中的L-/D-氨基酸进行了检测, 所有样品中均检出了17种L-氨基酸和7种D-氨基酸, 总含量在1.69~19.30 μmol/g(干重)范围内, 并且发现海底热液活动对深海沉积环境中有机碳、氮的循环有重要影响.

关键词 在线固相萃取; 高分辨质谱; 海洋沉积物; D-氨基酸; 深海热液喷口

中图分类号 O657 文献标志码 A doi: 10.7503/cjcu20250195

Determination of L- and D-Amino Acids in Marine Sediments Using Online Solid-phase Extraction Cleanup Coupled with Liquid Chromatography-high-resolution Mass Spectrometry

HE Xiuping^{1,2}, LI Fang¹, CHEN Junhui^{1,2*}, XIN Ming^{1,2}, WANG Baodong^{1,2}

(1. Qingdao Key Laboratory of Analytical Technology Development and Offshore Eco-Environment Conservation, The First Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Qingdao 266061, China;
2. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266071, China)

Abstract Amino acids (both L- and D-enantiomers) serve as crucial biomarkers for indicating the sources of organic matter and diagenetic processes within marine sedimentary environments. Consequently, developing methods for their precise detection in marine sediments is of significant importance. This study established a novel method for the simultaneous determination of 17 L-amino acids and 7 D-amino acids in marine sediments using online solid-phase extraction (SPE) coupled with liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry (LC-TOF/MS). A C₁₈ guard column served as the online SPE column, while an ultra-high-performance reversed-phase C₁₈ analytical column

收稿日期: 2025-07-12. 网络首发日期: 2025-10-15.

联系人简介: 陈军辉, 男, 博士, 研究员, 主要从事海洋分析/环境化学方面的研究. E-mail: jhchen@fio.org.cn

基金项目: 全球变化与海气相互作用(二期)专项基金(批准号: GASI-01-ATP-STwin)资助.

Supported by the Fund of the Global Change and Air-Sea Interaction II, China(No.GASI-01-ATP-STwin).

(1.8 μm particle size) was employed for separation. Utilizing dual acidic and alkaline mobile phase systems, efficient separation of various *L*- and *D*-amino acids was achieved. Detection was performed online using high-resolution electrospray ionization TOF/MS in full scan mode. The results demonstrate that accurate quantification of various *L*- and *D*-amino acids can be achieved by direct injection analysis using online SPE-LC-TOF/MS following hydrochloric acid hydrolysis of marine sediment samples, 5-fold dilution, and derivatization. The spiked recoveries for the various amino acids ranged from 66.1% to 106.8%, with relative standard deviations (RSD) between 2.40% and 12.3%. The method exhibited wide linear ranges, and all correlation coefficients (R^2) were greater than 0.990. Compared to conventional liquid chromatography methods, this approach requires only a small sediment sample amount (0.01—0.10 g), making it an effective method for detecting chiral amino acid biomarkers in deep-sea and oceanic hydrothermal vent sediments. Applying this method to analyze *L*- and *D*-amino acids in surface sediments from the Western Indian Ocean revealed the presence of all 17 *L*-amino acids and 7 *D*-amino acids in all samples, with total concentrations ranging from 1.69 to 19.30 $\mu\text{mol/g}$ (dry weight). Furthermore, the analysis indicated that submarine hydrothermal activity significantly influences the cycling of organic carbon and nitrogen in the deep-sea sedimentary environment.

Keywords Online solid phase extraction; High resolution mass spectrometry; Marine sediment; *D*-amino acid; Deep-sea hydrothermal vent

氨基酸(Amino acid, AA)是海洋有机碳和有机氮的重要储存库,在海洋有机碳、氮的生物地球化学循环过程中起着重要作用^[1]. 氨基酸不仅是海水有机质的重要组成,也是海底沉积物有机质的重要载体,占海底沉积物总氮含量的30%~40%以及总有机碳的10%~15%^[2]. 由于海底沉积物中的氨基酸易于被异养微生物利用,因此,其含量和组成常用于指示有机质的来源、迁移转化与成岩过程^[3]. 在自然界中,大部分氨基酸有2种构型:*L*型和*D*型异构体^[4],但主要以*L*型氨基酸(*L*-AA)形式存在,用于生命体蛋白质合成. 海洋中的氨基酸也以*L*型为主,但许多海洋微生物能够产生*D*型氨基酸(*D*-AA),主要包括用于细菌细胞壁构建的*D*-天冬氨酸(*D*-Asp)、*D*-谷氨酸(*D*-Glu)、*D*-丝氨酸(*D*-Ser)和*D*-丙氨酸(*D*-Ala)^[5];以及通常以游离形式分泌的*D*-精氨酸(*D*-Arg)、*D*-亮氨酸(*D*-Leu)和*D*-异亮氨酸(*D*-Ile)等. 尽管海洋沉积物中的*D*-AA含量较低,但其难以被海洋细菌和其它底栖生物利用^[6],因此,海洋沉积物中的*D*-AA可作为指示有机质降解状态的生物标志物^[7],也是研究海洋沉积物有机质来源及新鲜度的重要指标^[8].

常用于检测不同类型样品中*L*-AA的方法主要有高效液相色谱(HPLC)法、毛细管电泳法(CE)、气相色谱法(GC)和液相色谱-质谱法(LC-MS)等^[9];对于*D*-AA则可采用HPLC或GC手性柱进行分离^[10],然而手性分离柱价格昂贵、耐用性相对较差,不适于AA的日常测定. 氨基酸通过衍生反应得到的非对映异构体可使用非手性液相色谱固定相进行分离^[11],还能够获得更高的检测灵敏度^[9],已经成为*L*-AA和*D*-AA同步分离的主要方法. 常用的衍生试剂主要有邻苯二甲醛(OPA)、异硫氰酸荧光素(FITC)、*N*-(4-硝基苯氧基羰基)-*L*-苯丙氨酸2-甲氧基乙酯[(*S*)-NIFE]和Marfey试剂等^[12]. 对于海洋环境AA的测定,应用最广泛的方法是以OPA作为衍生试剂进行样品处理,再通过反相高效液相色谱分离,荧光检测器检测^[13]. 然而,该方法存在同步分离*L*-AA和*D*-AA耗时长、基质干扰大及灵敏度相对较低等问题;难以满足深海、开阔大洋和极地等寡营养区AA含量较低样品的测定要求,特别是深海沉积物中*D*-AA含量远低于*L*-AA^[14],使得准确测定*D*-AA更为困难.

近年来,随着LC-MS技术在AA分析领域的快速发展,已成为AA测定的高效方法,具有超高的灵敏度和选择性,可以检测复杂基质中极低浓度的AA^[9]. Visser等^[15]采用LC-MS/MS法,以(*S*)-NIFE为衍生试剂,实现了体液中痕量*D*-AA的准确测定;Barbas-Bernardos等^[16]基于(*S*)-NIFE衍生化法,建立了食品中17种*D*-AA同步测定的LC-MS/MS方法. 然而,海洋沉积物样品基质与文献[15,16]报道的体液和食品完全不同,并且盐含量较高、各种氨基酸的含量较低,因此,需要对样品制备方法和仪器检测方法进行改进,以适用于海洋沉积物中各种*L*-AA和主要*D*-AA的测定.

在线固相萃取(SPE)技术是一种用于高效液相色谱在线净化、富集复杂基质样品中目标分析物的

自动化技术,即上样泵自动加载样品溶液,经在线SPE柱净化后,直接切入色谱分析柱,通过检测器实现目标化合物的在线检测^[17].近年来,在线SPE技术结合LC-MS已被应用于微藻毒素^[18]、药物^[19]、抗生素^[20]和全氟化合物^[21,22]等的自动化在线富集、净化分析,能减少样品溶液中盐对LC-MS仪器的污染^[23],有效提高检测方法的自动化程度、选择性和灵敏度.飞行时间质谱(TOF/MS)是一种高分辨率质谱(HR-MS)技术^[24,25],可提供准确的化合物分子量和全扫描灵敏度^[26,27].Konya等^[28]借助液相色谱-飞行时间质谱法(LC-TOF/MS)建立了蛋白原AA对映异构体的测定方法,实现了各种AA的快速分离和高灵敏度检测.然而,采用反相液相色谱结合高分辨质谱测定海洋沉积物中L-AA和主要D-AA的方法研究仍鲜见报道.本文通过对样品前处理条件、在线SPE实验条件进行系统优化,开发一种基于高分辨率质谱同步检测深海沉积物中17种常见L-AA和7种主要D-AA的新方法,并将该方法用于印度洋深海沉积物及热液喷口附近沉积物中各种L-AA和D-AA的测定.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

氨基酸标准溶液:L-酪氨酸(L-Tyr)、L-亮氨酸(L-Leu)、L-异亮氨酸(L-Ile)、L-甲硫氨酸(L-Met)、L-缬氨酸(L-Val)、L-苏氨酸(L-Thr)、L-丙氨酸(L-Ala)、L-脯氨酸(L-Pro)、L-丝氨酸(L-Ser)、L-甘氨酸(L-Gly)、L-谷氨酸(L-Glu)、L-天冬氨酸(L-Asp)、L-精氨酸(L-Arg)、L-胱氨酸(L-Cys)、L-赖氨酸(L-Lys)、L-组氨酸(L-His)、D-亮氨酸(D-Leu);D-异亮氨酸(D-Ile)、D-丙氨酸(D-Ala)、D-丝氨酸(D-Ser)、D-谷氨酸(D-Glu)、D-天冬氨酸(D-Asp)和D-精氨酸(D-Arg)(上海Sigma-Aldrich公司); γ -氨基丁酸(γ -ABA)(纯度 $\geq 98\%$,北京Solarbio公司);乙腈(质谱纯,美国TEDIA公司);甲醇(质谱纯,上海麦克林公司);N-(4-硝基苯氧基羰基)-L-苯丙氨酸-2-甲氧基乙酯[(S)-NIFE,美国Cayman公司];氢氧化钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);盐酸(分析纯,烟台远东精细化工有限公司);碳酸氢铵(纯度99.995%,源叶生物有限公司);四硼酸钠(纯度99.998%,上海Sigma-Aldrich公司);抗坏血酸(分析纯,上海沪试实验室器材股份有限公司).

1200型高效液相色谱仪(HPLC,美国Agilent公司),配有自动进样器、带有两位六通切换阀的柱温箱、两个四元梯度泵和二极阵列检测器;G1969A型飞行时间质谱仪(TOF/MS,美国Agilent公司),配有带双喷针的电喷雾离子源;Unique-LC型实验室纯水系统(厦门锐思捷水纯化技术有限公司);FA1104型电子天平(上海精天电子仪器厂);Vortex 3000型涡旋混合器(德国Wiggins公司);HC-3018型高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司).

1.2 标准溶液及衍生化试剂的配制

标准溶液的配制:取17种L-AA和7种D-AA的标准储备液,用超纯水稀释,配制成混合标准液,其中,L-Cys浓度为12.5 $\mu\text{mol/L}$,其余L-AA浓度为25.0 $\mu\text{mol/L}$;D-Leu和D-Ile浓度为25.0 $\mu\text{mol/L}$,其余D-AA浓度为50.0 $\mu\text{mol/L}$.

(S)-NIFE溶液的配制:称取25.00 mg (S)-NIFE,溶于1667 μL 乙腈中,超声至完全溶解,得到浓度为15.00 mg/mL的(S)-NIFE乙腈溶液.

1.3 深海沉积物样品的采集

实验用深海沉积物和热液区沉积物样品采自西印度洋海域和印度洋中脊,位置见图1.10个深海表层沉积物样品(DMs, ZD-01,水深4000多米)由自然资源部第一海洋研究所“向阳红01”科考船在执行“全球变化与海气相互作用(二期)”专项任务期间(2021年11月至2022年2月),通过远程遥控电抓斗抓取.3个热液区沉积物样品(LQ-1, LQ-2, TZ)由中国大洋一号科考船在执行中国大洋52航次第III航段考察任务期间采集(2019年3月至2019年5月),使用远程遥控无人潜水器(海龙-III)插管获得, LQ1和LQ2样品采集于龙旗热液区(热液喷口仍处于活跃期),TZ样品采自天作热液区(热液喷口为休眠状态).鉴于热液区沉积物稀薄,取样深度为10 cm以内.龙旗(LQ)热液区位于西南印度洋脊28脊段滑脱断层末端,水深约2750 m;天作(TZ)热液区位于天作海山东南约14 km处,水深约3630 m,处于

圆顶状结构的顶部, 通常与大洋滑脱断层和超镁铁质露头有关^[29]. 采集的沉积物样品均立即置于-20 °C条件下冷冻保存.

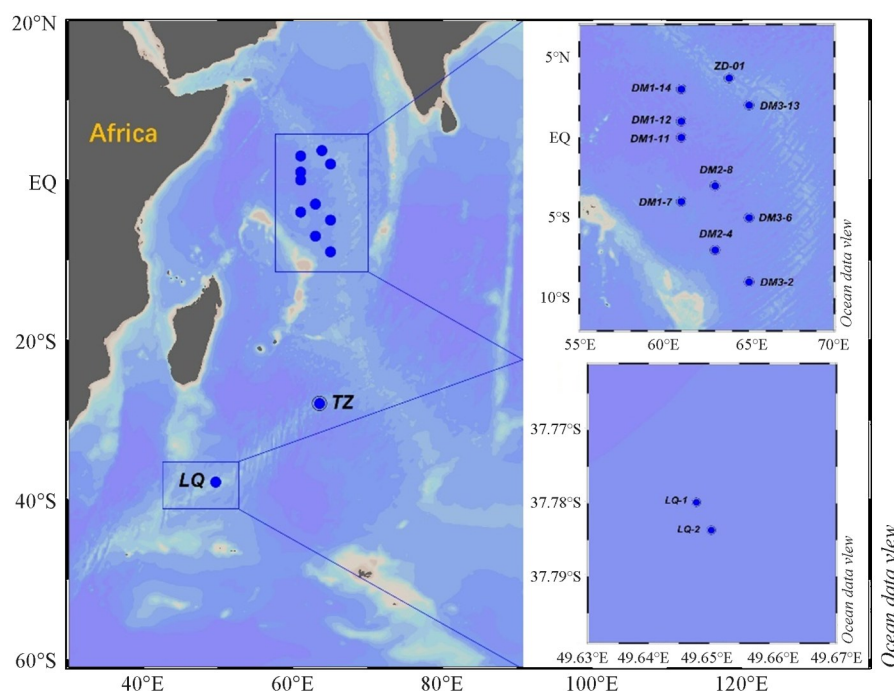


Fig. 1 Bitmap of sampling stations for surface sediments in the Western Indian Ocean

Sediments at stations Longqi (LQ) and Tianzuo (TZ) were collected in 2019 by Chinese Dayang Cruise 52 III, and sediments at other stations were collected in 2021 by Chinese XiSan Cruise.

1.4 海洋沉积物的酸水解处理

准确称取冷冻干燥的海洋沉积物干粉样品(经研磨后过65目筛)0.10 g, 置于带密封盖的5 mL玻璃水解瓶中, 加入2 mL 15%(体积分数)盐酸溶液, 随后加入4 μ L 5.00 mg/mL 抗坏血酸水溶液. 向玻璃水解瓶内通氮气2 min, 密封后置于110 °C烘箱内水解24 h, 水解完成后, 用10%氢氧化钠水溶液将水解液的pH值调至8.6, 以10000 r/min转速离心2 min, 弃去沉淀, 将上层清液转移至2 mL离心管中, 待用.

1.5 氨基酸衍生化

移取10 μ L pH=8.6的海洋沉积物水解液置于2 mL离心管中, 加入40 μ L超纯水和35 μ L 0.15 mol/L 硼酸盐缓冲溶液, 涡旋1 min; 加入50 μ L 2.5 mg/mL的(S)-NIFE乙腈溶液, 涡旋15 s; 室温(25 °C)下衍生化反应20 min, 加入15 μ L 4 mol/L 盐酸溶液终止反应, 将溶液转移至带有内插管的进样小瓶中, 待测.

1.6 色谱质谱条件

在线SPE-LC-TOF/MS分析系统由配有在线富集模块的高效液相色谱仪和飞行时间质谱系统构成; 在线SPE模块由自动进样器、四元梯度泵(泵1)和两位六通切换阀构成(图2). 使用Agilent ZORBAX Extend C₁₈保护柱(2.1 mm \times 12.5 mm, 5 μ m)作为在线SPE柱, 体积分数为10%甲醇水溶液作为样品加载溶剂. 泵1以0.5 mL/min的流速将5 μ L样品溶液加载到SPE柱上进行脱盐除杂, 加载时间2.0 min; 随后, 六通阀由1-6位置[图2(A)]切换至1-2位置[图2(B)], 将SPE柱由样品加载通路切换至在线色谱分离通路, 进行AA的色谱分离和质谱检测.

采用Agilent ZORBAX RRHD Extend C₁₈色谱柱(3.0 mm \times 100 mm, 1.8 μ m)作为分析柱; 流动相A为含有10 mmol/L碳酸氢铵的水溶液, 流动相B为90%乙腈, 流动相C为纯甲醇, 流动相D含有0.3%甲酸的10%乙腈溶液; 采用两个洗脱条件进行L-/D-AA的分离, 使用洗脱条件1(表1)时, 可将除L-/D-Asp, L-/D-Glu和L-/D-Arg外的各种L型和D型氨基酸完全分离; 使用洗脱条件2(表2)时,

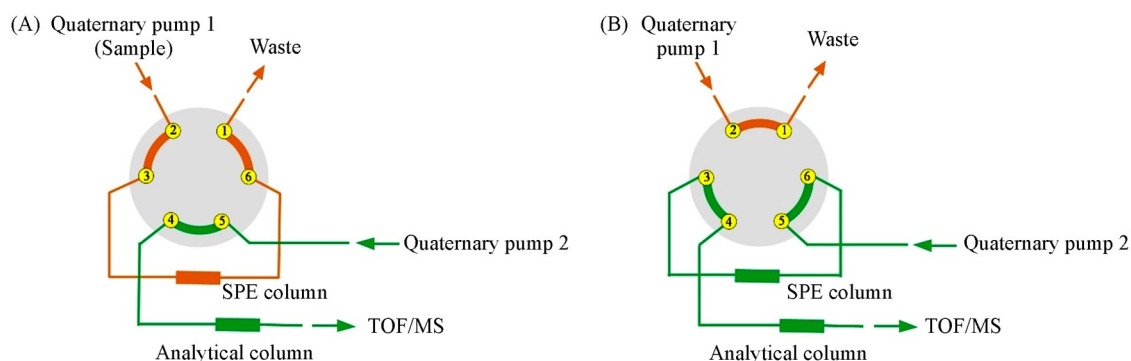


Fig. 2 Switch schematic diagram of six-way valve for online solid phase extraction(SPE) system

(A) Sample loading step; (B) elution and analysis step.

Table 1 Gradient elution program of analytical pump under alkaline mobile phase condition

Time/min	Mobile phase A(%)	Mobile phase B(%)	Flow rate/(mL·min ⁻¹)	Valve position
0	95	5	0.4	1-6
2.0	95	5	0.4	1-2
5.0	95	5	0.4	1-2
11.0	80	20	0.4	1-2
15.0	80	25	0.4	1-2
18.0	75	36	0.4	1-2
21.0	75	40	0.4	1-2
22.0	70	90	0.4	1-2
23.0	50	90	0.4	1-2
27.0	0	100	0.4	1-2
29.0	0	100	0.4	1-2
30.0	95	5	0.2	1-6

Table 2 Gradient elution program of analytical pump under acidic mobile phase condition

Time/min	Mobile phase C(%)	Mobile phase D(%)	Flow rate/(mL·min ⁻¹)	Valve position
0	0	100	0.3	1-6
2.0	7	93	0.3	1-2
20.0	70	30	0.3	1-2
20.1	100	0	0.3	1-2
24.0	100	0	0.3	1-2
25.0	0	100	0.2	1-6

L-*D*-Asp、*L*-*D*-Glu 和 *L*-*D*-Arg 可实现基线分离。质谱仪器参数：ESI 正离子模式，干燥气温度 350 °C，干燥气流速 11 L/min，雾化器压力 40 psi，毛细管电压 4000 V，破碎电压 155 V，锥孔电压 45 V。在全扫描(Scan)模式下进行各种 *L*-*D*-AA 的检测，扫描范围 *m/z* 100~1000。

1.7 定性定量方法

AA 的定性：对样品溶液的在线 SPE-LC-TOF/MS 全扫描分析结果进行 24 种 AA 手性衍生物的 [M+H]⁺ 离子峰精确质量数提取，获得了 24 种 AA 的质谱分析提取离子色谱图(EIC)；将样品中目标化合物的 EIC 峰保留时间及对应质谱图中的精确质量数与 AA 标准品分析结果对比，样品中 AA 的 EIC 峰保留时间与标准品的 EIC 峰偏差在 ±0.10 min 以内，TOF/MS 分析获得的 AA 精确质量数偏差在 ±5×10⁻⁶ 以内，则认为是样品中含有该 AA。

AA 的定量：采用在线 SPE-LC-TOF/MS 对不同浓度的 24 种 AA 标准溶液(衍生反应后)进行分析，以 TOF/MS 获得的 AA 精确质量数 EIC 峰面积为纵坐标(Y)，标准溶液中 AA 的质量浓度为横坐标(X)，建立标准工作曲线，采用外标法对样品中的目标分析物 AA 进行定量；24 种 AA 手性衍生物的色谱分离保留时间、分子式及精确分子量等列于表 3。

Table 3 Retention time, chemical formula and measured accurate mass error of the derivatized *L/D*-amino acids determined by LC-TOF/MS

Amino acids	Retention time/min	Formula	Ion detected	Calculated <i>m/z</i>	Measured <i>m/z</i>	Error(10^{-6})
<i>D</i> -Asp	13.2	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₈	[M+H] ⁺	383.1449	383.1461	3.1320
<i>L</i> -Asp	13.7	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₈	[M+H] ⁺	383.1449	383.1456	1.8270
<i>L</i> -Ser	14.1	C ₁₆ H ₂₂ N ₂ O ₇	[M+H] ⁺	355.1500	355.1496	-1.1263
<i>L</i> -Thr	14.2	C ₁₇ H ₂₄ N ₂ O ₇	[M+H] ⁺	369.1656	369.1656	0.0000
<i>D</i> -Ser	14.3	C ₁₆ H ₂₂ N ₂ O ₇	[M+H] ⁺	355.1500	355.1494	-1.6894
<i>L</i> -Ala	14.5	C ₁₆ H ₂₂ N ₂ O ₆	[M+H] ⁺	339.1551	339.1550	-0.2949
<i>L</i> -Gly	14.5	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₆	[M+H] ⁺	325.1394	325.1395	0.3076
<i>L</i> -His	14.5	C ₁₉ H ₂₄ N ₄ O ₆	[M+H] ⁺	405.1769	405.1763	-1.4808
<i>L</i> -Pro	14.6	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₆	[M+H] ⁺	365.1707	365.1705	-0.5477
γ-ABA	14.7	C ₁₇ H ₂₄ N ₂ O ₆	[M+H] ⁺	353.1707	353.1705	-0.5663
<i>D</i> -Ala	15.4	C ₁₆ H ₂₂ N ₂ O ₆	[M+H] ⁺	339.1551	339.1550	-0.2949
<i>L</i> -Val	16.2	C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₆	[M+H] ⁺	367.1864	367.1866	0.5447
<i>L</i> -Arg	16.3	C ₁₉ H ₂₉ N ₅ O ₆	[M+H] ⁺	424.2191	424.2230	4.1934
<i>L</i> -Glu	16.5	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₈	[M+H] ⁺	397.1605	397.1620	3.7768
<i>L</i> -Leu	20.0	C ₁₉ H ₂₈ N ₂ O ₆	[M+H] ⁺	381.2020	381.2020	0.0000
<i>D</i> -Arg	16.6	C ₁₉ H ₂₉ N ₅ O ₆	[M+H] ⁺	424.2191	424.2228	4.7219
<i>D</i> -Glu	17.0	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₈	[M+H] ⁺	397.1605	397.1619	3.5250
<i>L</i> -Met	18.1	C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₆ S	[M+H] ⁺	399.1584	399.1586	0.5011
<i>L</i> -Ile	19.1	C ₁₉ H ₂₈ N ₂ O ₆	[M+H] ⁺	381.2020	381.2021	0.2623
<i>D</i> -Ile	22.5	C ₁₉ H ₂₈ N ₂ O ₆	[M+H] ⁺	381.2020	381.2021	0.2623
<i>D</i> -Leu	23.0	C ₁₉ H ₂₈ N ₂ O ₆	[M+H] ⁺	381.2020	381.2030	2.6233
<i>L</i> -Cys	24.3	C ₃₂ H ₄₂ N ₄ O ₁₂ S ₂	[M+H] ⁺	739.2313	739.2307	-0.8117
<i>L</i> -Lys	25.7	C ₃₂ H ₄₄ N ₄ O ₁₀	[M+H] ⁺	645.3130	645.3132	0.3099
<i>L</i> -Tyr	26.1	C ₃₅ H ₄₁ N ₃ O ₁₁	[M+H] ⁺	680.2814	680.2819	0.7350

1.8 质量控制

为了保证实验结果的可靠性,对实验过程进行严格质量控制,包括检测试剂空白、过程空白和加标质控样品等;实验所用容器均用甲醇和去离子水交替清洗3遍,以降低外源污染;样品在线SPE-LC-TOF/MS检测过程中,每进样检测10个样品后进样1个质量控制样品和空白样品,以评估检测结果的可靠性。

2 结果与讨论

2.1 仪器分析条件的优化

2.1.1 在线固相萃取条件优化 对不同加载溶剂进行了考察,包括碱性(含10 mmol/L碳酸氢铵的10%甲醇溶液)、酸性(含0.3%甲酸的10%甲醇溶液)和中性(10%甲醇水溶液)加载溶液。结果如图3所示,碱性加载溶剂条件下,Gly, Ser, GAGB和Thr等AA衍生物未能很好地保留,在图3(A)上看不到这些化合物的峰;图3(B)和(C)为使用酸性和中性加载溶剂的实验结果,各个目标分析物的保留效果较好,其中中性加载溶剂净化能力强于酸性加载溶剂。因此,最终选择含10%甲醇/90%水的中性溶液作为样品加载溶剂。另外,样品加载时间也会影响目标化合物的净化效果,加载时间过短可能导致样品净化不充分,而加载时间过长会浪费时间和溶剂。考察了不同加载时间对*L/D*-AA分离的影响,发现样品加载2 min时,大多数目标*L/D*-AA能获得最佳的检测灵敏度和峰形。总体而言,采用在线SPE方法进行在线脱盐和净化,样品溶液中的一部分基质被去除,而目标*L/D*-AA被保留在柱前,降低了基质效应,从而提高各种*L/D*-AA的检测灵敏度,并且该方法操作简单、样品制备耗时短、样品利用率更高,可适用于少量沉积物样品(约0.01 g)中各种常见*L/D*-AA的测定。

2.1.2 色谱分离条件的优化 据文献[30]报道,采用反相C₁₈色谱柱和碱性流动相洗脱体系,可以分离

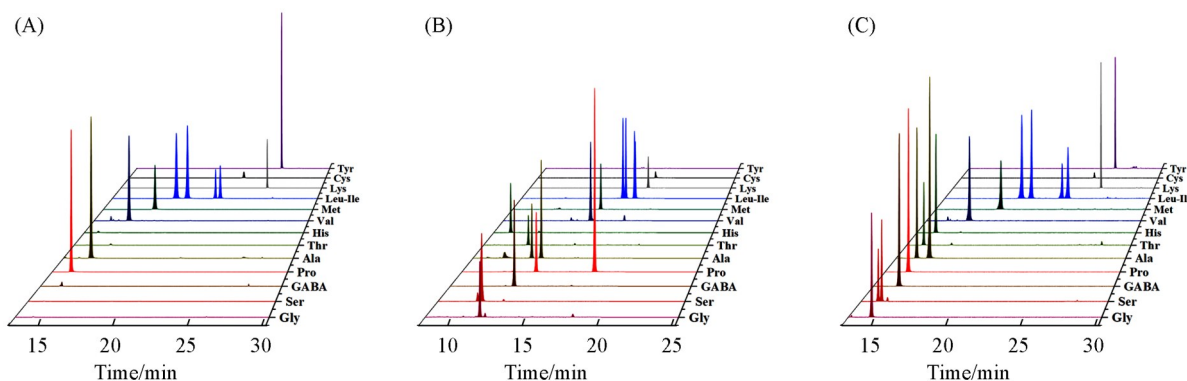


Fig. 3 Effect of the sample loading solvent on determination of *L-/D-AA* by on-line SPE-LC-TOF/MS

(A) Extracted ion chromatograms (EICs) of *L-/D-AA* using alkaline solvent as sample loading mobile phase; (B) acidic solvent as sample loading mobile phase; (C) neutral solvent as sample loading mobile phase

大部分 *L-/D-AA*. 基于此, 本文采用碱性流动相体系对 *L-/D-AA* 进行色谱分离, 选用具有耐高 pH 性能的 Agilent ZORBAX RRHD Extend- C_{18} 色谱柱 (3.0 mm×100 mm, 1.8 μm) 和 Agilent ZORBAX Extend- C_{18} 分析柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 进行了测试. 结果显示, 2 根色谱柱对各种 *L-/D-AA* 的分离效果相近, 但超高效分析柱 (1.8 μm 填料) 分离各种 *L-/D-AA* 的峰宽、峰形和信噪比均优于填料为 5 μm 的色谱柱, 有利于测定低含量样品中的 *L-/D-AA*, 并且超高效色谱柱的分析时间明显缩短, 因此, 选择填料粒径为 1.8 μm 的 Extend- C_{18} 分析柱用于 *L-/D-AA* 的分离. 然而, 采用碱性流动相体系, 2 组酸性 AA 手性对映体 (*L-Asp/D-Asp* 和 *L-Glu/D-Glu*) 在分析柱上保留较弱, 且碱性氨基酸 *L-Arg* 和 *D-Arg* 的分离度较低. 因此, 针对这 3 组对映体在碱性流动相体系中难以有效分离的 AA 手性对映体, 选择酸性流动相体系进行分离. 考察了 90% 乙腈/10% 水溶液和纯甲醇溶液作为有机相强洗脱溶剂对手性对映体分离的影响, 使用 90% 乙腈/10% 水溶液时, 3 组手性对映体的色谱分离结果见图 4(A), 可见, *L-Asp* 和 *D-Asp* 以及 *L-Arg* 和 *D-Arg* 均达到了基线分离, 但 *L-Glu* 和 *D-Glu* 未达到基线分离; 以纯甲醇为有机相时, 3 组手性对映体的 *L-/D* 型均可达到基线分离 [图 4(B)], 说明纯甲醇作为有机相溶剂优于乙腈. 值得注意的是, 尽管大部分手性氨基酸中 *D-AA* 在色谱柱上的保留强于 *L-AA*, 但是在酸性流动相体系下, *D-Arg* 的保留能力比 *L-Arg* 弱. 基于以上结果, 选择纯甲醇作为酸性流动相的有机相. 综上所述, 采用碱性流动相体系和酸性流动相体系相结合的思路, 实现了对 17 种常见 *L-AA* 和 7 种 *D-AA* 的有效分离, 各组手性对映体分离良好、色谱峰尖锐对称, 能满足实际样品中 *L-/D-AA* 同步测定的要求.

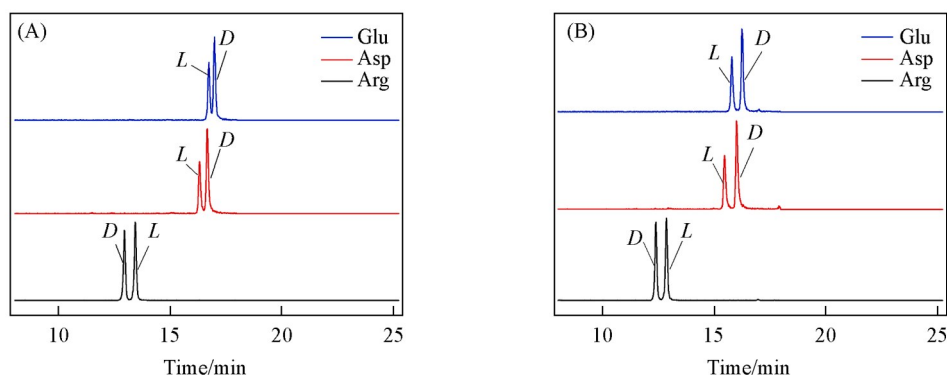


Fig. 4 Chromatographic separation results of three groups of amino acid enantiomers (*L-Glu/D-Glu*, *L-Asp/D-Asp* and *L-Arg/D-Arg*), which are effective to separate under the condition of acidic mobile phase

(A) 90% acetonitrile-10% aqueous solution is used as strong elution solvent; (B) pure methanol solution as strong elution solvent.

2.2 样品前处理条件的优化

2.2.1 海洋沉积物酸水解溶液浓度的优化

海洋沉积物样品经冷冻干燥后, 大量盐 (NaCl) 被保留在沉积物粉末中. 海洋沉积物酸水解溶液不经稀释直接进行衍生化反应, 方法的重复性较差, 平行实验相

对标准偏差RSD>20%,说明样品中的盐和基质干扰了目标化合物的测定,因此在处理样品时应适当降低基质组分的影响.将调好pH值的酸水解溶液,分别稀释2,5,10,20倍后,再进行衍生化反应,以不稀释的酸水解溶液作为对照,对其目标化合物的检测效果进行了考察.图5(A)~(D)分别展示出了L-/D-Ala和L-/D-Ser的检测结果(两组对映体在海洋沉积物中含量较为丰富),可见海洋沉积物酸水解溶液稀释20,10和5倍后浓度降低为原始浓度的5%,10%和20%,目标化合物的质谱信号响应呈线性关系;而稀释2倍(浓度为原始浓度的50%)时,分析物的质谱响应增幅明显放缓,尤其是图5(D)所示D-Ser稀释2倍时的质谱信号比稀释5倍时略大,不再呈线性关系,说明稀释倍数为5及以上时AA的衍生化效果较好.为了保证痕量D-AA的有效测定,应尽可能地降低稀释倍数,因此,最终确定对海洋沉积物酸水解溶液稀释5倍后再进行衍生化处理作为最佳实验条件.

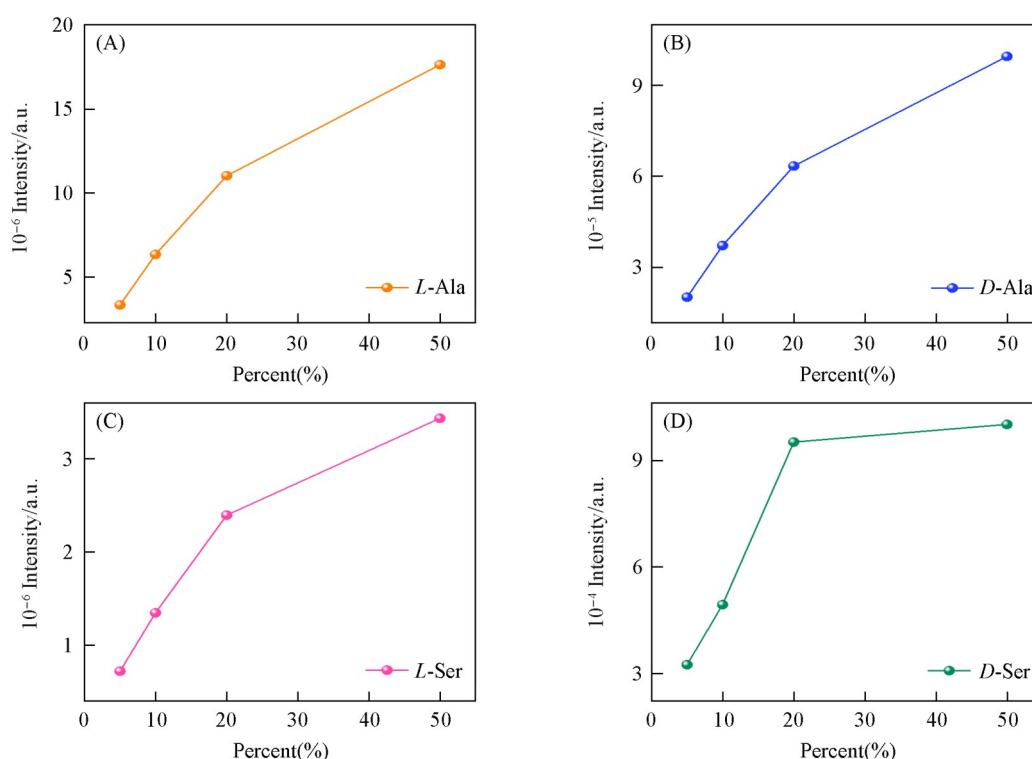


Fig. 5 Effect of dilution of acid hydrolysis solution of marine sediments on L-/D-Ala and L-/D-Ser determination

2.2.2 衍生剂浓度的优化 与其它衍生剂相比,(S)-NIFE具有较好的质谱分析灵敏度和对AA对映体拆分的选择性^[15].衍生化需要在碱性条件下完成,因此在衍生过程中加入四硼酸钠作为缓冲液.据文献[15,16]报道,不同浓度的(S)-NIFE均可以实现各种AA的衍生化.为了降低实验成本,提高衍生剂的利用率,分别对2.5,5.0和15.0 mg/mL(S)-NIFE乙腈溶液的衍生化效率进行了考察.以L-/D-Ala与L-/D-Ser的测定结果为例,由图6可见,3个不同浓度(S)-NIFE的衍生化效率基本一致,其它L-/D-AA的结果与图6也一致,故选用2.5 mg/mL的(S)-NIFE作为衍生剂浓度条件.

2.3 方法学考察

2.3.1 灵敏度和线性范围 为了评估在线SPE-LC-TOF/MS测定海洋沉积物中不同L-/D-AA的灵敏度和定量动态线性范围,对方法的检出限(LOD)、定量限(LOQ)和线性范围进行了考察(表4).将检测样品溶液获得的AA质谱信号与噪音的比值[信噪比(S/N)]分别为3和10时对应的AA摩尔浓度定义为LOD和LOQ.对于L-Phe,由于受到衍生试剂的干扰,该方法不适用于样品中低浓度L-Phe的检测,此结果与文献[16]结果一致.7种D-AA和17种L-AA衍生物的LOD在0.20~11.76 nmol/g范围内,LOQ在0.67~39.61 nmol/g之间,由于海洋沉积物中各种AA的总含量通常在几十nmol/g至几十 μ mol/g范围,该方法完全能满足海洋沉积物中各种L-AA和D-AA检测的灵敏度要求,并且各种目标化合物定量线性范围较

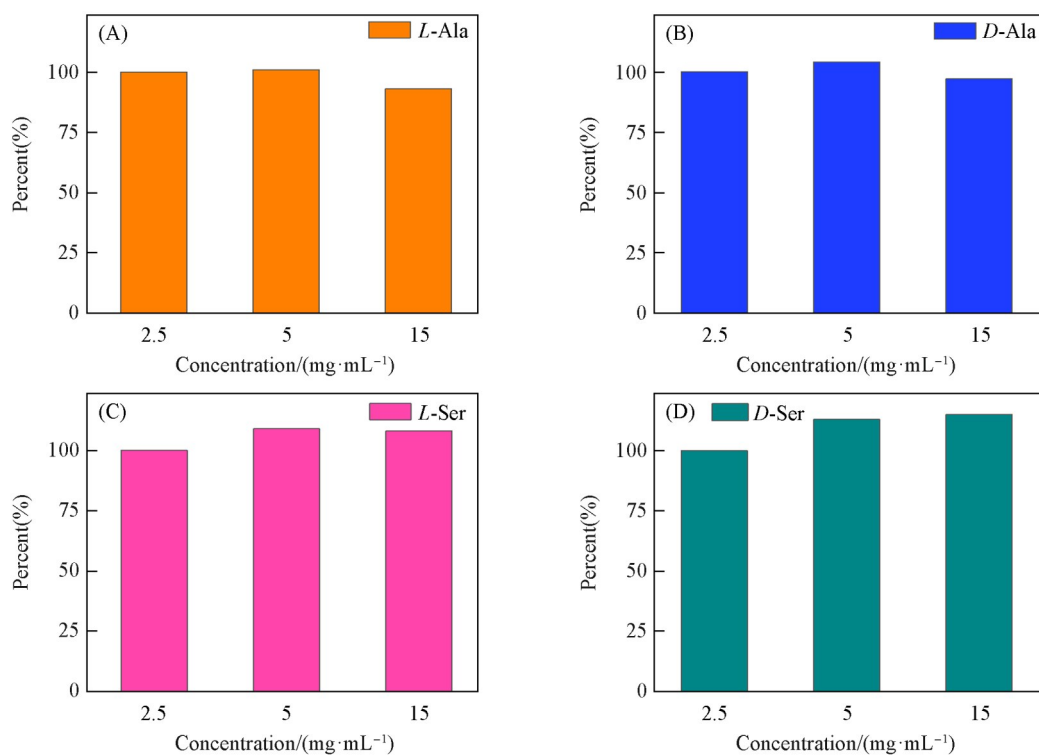


Fig. 6 Influence of the concentration of derivatization reagent[(S)-NIFE] on the determination results of L-/D-Ala and L-/D-Ser

(A) L-Ala; (B) D-Ala; (C) L-Ser; (D) D-Ser.

Table 4 Method performance parameters for L-/D-AA

Amino acids	R^2	Linear range/(nmol·g ⁻¹)	LOD/(nmol·g ⁻¹)	LOQ/(nmol·g ⁻¹)	Recovery(%)	Precision(RSD, %)
L-Gly	0.997	2.53—2834.13	0.76	2.53	98.1	2.81
L-Ala	0.999	1.71—3223.35	0.51	1.71	86.3	7.66
D-Ala	0.998	2.76—2661.05	0.83	2.76	104.5	6.14
γ -ABA	0.999	4.28—4203.61	1.28	4.28	66.1	7.95
L-Ser	0.999	1.05—2603.24	0.31	1.05	106.8	5.60
D-Ser	0.999	2.79—2079.11	0.84	2.79	99.9	7.06
L-Pro	0.999	2.28—2947.86	0.69	2.28	94.3	5.05
L-Val	0.999	2.46—3016.77	0.74	2.46	92.1	4.22
L-Thr	0.999	3.68—2670.67	1.10	3.68	104.0	5.39
L-Leu	0.999	2.05—3019.91	0.61	2.05	92.1	4.41
D-Leu	0.999	3.58—3134.16	1.07	3.58	88.7	6.25
L-Ile	0.999	2.71—2972.13	0.81	2.71	93.5	2.40
D-Ile	0.999	3.95—3106.15	1.18	3.95	89.5	5.02
L-Asp	0.999	14.63—3928.85	4.39	14.63	76.6	10.4
D-Asp	0.999	39.21—3169.90	11.76	39.21	87.7	12.3
L-Glu	0.999	27.70—3802.42	8.31	27.70	73.1	7.30
D-Glu	0.999	27.11—2067.81	8.13	27.11	86.3	7.35
L-Met	0.999	4.54—3313.47	1.36	4.54	83.9	6.36
L-His	0.998	0.67—4093.82	0.20	0.67	67.9	5.79
L-Arg	0.999	0.94—2831.25	0.28	0.94	98.2	7.23
D-Arg	0.999	2.34—2624.97	0.70	2.34	105.9	8.01
L-Lys	0.999	3.39—2690.41	1.02	3.39	103.3	4.56
L-Tyr	0.998	0.86—2798.82	0.26	0.86	99.3	5.04
L-Cys	0.998	1.69—3095.77	0.51	1.69	89.8	6.72

宽(3个数量级), 相关系数 R^2 均达到了0.990以上, 表明线性关系良好.

2.3.2 回收率和精密度 使用采自印度洋开阔海域的实际沉积物样品, 利用标准加入法对方法的回收率和精密度进行了考察. 平行称取6份海洋沉积物样品(每份0.10 g), 加入L-AA和D-AA标准溶液(L-Cys浓度为62.5 nmol/g, 其余L-AA浓度均为125 nmol/g; D-Leu和D-Ile浓度各为50 nmol/g, 其余D-AA浓度均为100 nmol/g), 采用本文方法进行处理和检测, 以未加标的海洋沉积物样品作为对比, 用于计算各种目标化合物的绝对回收率. 6个平行样品中各目标化合物的加标回收率在66.1%~106.8%之间, 目标化合物峰面积的相对标准偏差(RSD)范围为2.40%~12.3%, 表明该方法具有良好的准确度和精密度.

2.4 西印度洋表层沉积物中L-/D-氨基酸的分析

开阔大洋海洋沉积物样品采集较为困难, 特别是采集到的沉积物岩芯样品量通常较少, 通常由于样品量不足制约了对多种环境指标的测定, 尤其是在一些特殊的深海区域, 如热液喷口、冷泉及深渊区域等. 本文对采自西印度洋4000多米深海域的10个表层沉积物以及3个热液喷口附近海域表层沉积物中L-/D-AA的组成和浓度进行了分析, 结果如图7所示, 所有17种L-AA和7种常见的D-AA在所有样品中均能检出, 氨基酸总浓度(Σ AA)的范围为1.69~19.30 $\mu\text{mol/g}$, 其中含量最高的L-AA和D-AA是L-Asp和D-Asp, 浓度分别为0.23~2.82 $\mu\text{mol/g}$ 和0.05~0.37 $\mu\text{mol/g}$, 分别占 Σ AA的13.7%~24.0%和1.4%~5.6%.

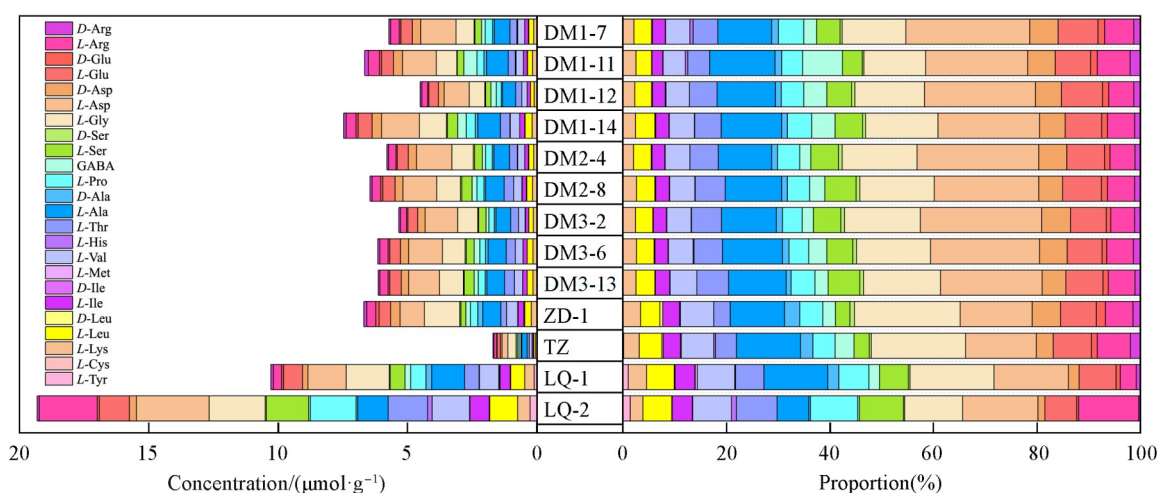


Fig. 7 Concentrations and composition of L-AA and D-AA in the surface sediments of the Western Indian Ocean

深海热液喷口沿大洋中脊分布, 通常被称为深海生命绿洲, 热液系统作为典型的化学能源生态系统, 对深海沉积化学具有显著影响^[29]. 由于TZ热液区的喷口已休眠, 生物量会急剧下降, 因此, TZ站位沉积物中 Σ AA的含量最低($<2 \mu\text{mol/g}$), 并且D-AA/L-AA的比值也相对较大(图8), 充分说明有机质降解严重; LQ-2站位沉积物中 Σ AA最高(19.30 $\mu\text{mol/g}$), 这可能是由于该站位受热液活动的影响, 海底生命活动旺盛, 产生了大量新鲜的有机质. 此外, LQ-2站位沉积物D-AA/L-AA的比值也相对很小, 充分说明有机质降解程度很低是新鲜的有机质.

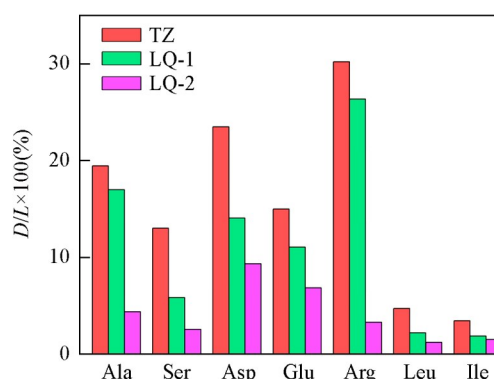


Fig. 8 Values of D-AA/L-AA in surface sediments of the hydrothermal area in Western Indian Ocean

3 结 论

建立了基于在线 SPE 脱盐净化, 采用 LC-TOF/MS 测定深海沉积物中 17 种常见 *L*-AA 和 7 种主要 *D*-AA 的新方法. 该方法具有良好的准确度和精密度, 灵敏度可以满足样品量较少 (0.10 g) 的深海沉积物及热液区沉积物中 *L*-AA 和 *D*-AA 同步测定的要求. 西印度洋沉积物样品中 Σ AA 的范围为 1.69~19.30 $\mu\text{mol/g}$, 其中含量最高的 *L*-/*D*-AA 分别为 *L*-Asp 和 *D*-Asp. 热液喷口休眠区域 (TZ 站位) 沉积物中 AA 的含量最低, 而热液喷口活跃区域 (LQ-2 站位) 沉积物中 AA 的含量最高, 说明热液活动在一定程度上影响了深海沉积环境中有机碳、氮的组成和含量.

参 考 文 献

- [1] Zonneveld K. A. F., Versteegh G. J. M., Kasten S., Eglinton T. I., Emeis K. C., Huguet C., Koch B. P., de Lange G. J., DeLeeuw J. W., Middelburg J. J., *Biogeosciences*, **2010**, 7(2), 483—511
- [2] Sañé E., Ingrassia M., Martorelli E., Chiocci F. L., *Org. Geochem.*, **2020**, 140, 103960
- [3] Wang K., Chen J. F., Jin H. Y., Li H. L., Zhang W. Y., *Sci. Total Environ.*, **2018**, 637/638, 1004—1013
- [4] Vranova V., Zahradnickova H., Janous D., Skene K. R., Matharu A. S., Rejsek K., Formanek P., *Plant Soil*, **2012**, 354(1/2), 21—39
- [5] Yan G., Kim G., Kim J., Jeong Y. S., Kim Y. I., *Geochim. Cosmochim. Ac.*, **2015**, 153, 1—14
- [6] Alvarez L., Aliashkevich A., de Pedro M. A., Cava F., *ISME J.*, **2018**, 12(2), 438—450
- [7] Møller M. H., Glombitza C., Lever M. A., Deng L. H., Morono Y., Inagaki F., Doll M., Su C., Lomstein B. A., *Front. Microbiol.*, **2018**, 9, 967
- [8] Chen Y., Yang G. P., Ji C. X., Zhang H. H., Zhang P. Y., *Org. Geochem.*, **2018**, 116, 51—61
- [9] Ferré S., González-Ruiz V., Guillarme D., Rudaz S., *J. Chromatogr. B*, **2019**, 1132, 121819
- [10] Opekar S., Zahradnickova H., Vodrazka P., Rimnacova L., Simek P., Moos M., *Amino Acids*, **2021**, 53(3), 347—358
- [11] Ishii C., Akita T., Mita M., Ide T., Hamase K., *J. Chromatogr. A*, **2018**, 1570, 91—98
- [12] Furman C., Howsam M., Lipka E., *TrAC-Trend. Anal. Chem.*, **2021**, 141, 116287
- [13] Ianiri H. L., Shen Y., Broek T. A. B., McCarthy M. D., *Mar. Chem.*, **2022**, 241, 104104
- [14] Fernandes D., Wu Y., Shirodkar P. V., Pradhan U. K., Zhu Z. Y., Zhang J., Limbu S. M., *Hydrol. Process*, **2019**, 33(20) 2642—2657
- [15] Visser W. F., Verhoeven-Duif N. M., Ophoff R., Bakker S., Klomp L. W., Berger R., de Koning T. J., *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218(40), 7130—7136
- [16] Barbas-Bernardos C., Garcia-Perez I., Lorenzo M. P., Alonso-Herranz V., Nicholson J., Carcia A., *J. Chromatogr. A*, **2020**, 1611, 460598
- [17] Wang J. M., Chen J. H., He X. P., Hao S., Wang Y. N., Zheng X. L., Wang B. D., *Chemosphere*, **2021**, 262, 128374
- [18] Beltrán E., Ibáñez M., Sancho J. V., Hernandez F., *J. Chromatogr. A*, **2012**, 1266, 61—68
- [19] Ferrer-Aguirre A., Romero-González R., Vidal J. L. M., Frenich A. G., *J. Chromatogr. A*, **2016**, 1446, 27—33
- [20] Choi K., Kim S., Kim C., Kim S., *Chemosphere*, **2007**, 66(6), 977—984
- [21] Shen N., Han T. Z., Sheng C. C., He X. P., Chen J. H., Liu C. G., Li X. G., *Chinese J. Anal. Chem.*, **2024**, 52(2), 286—295(申楠, 韩同竹, 盛璨璨, 何秀平, 陈军辉, 刘晨光, 李先国. 分析化学, **2024**, 52(2), 286—295)
- [22] Shen N., Tang J. L., Chen J. H., Sheng C. C., Han T. Z., He X. P., Liu C. G., Han C., Li X. G., *J. Hazard. Mater.*, **2024**, 471, 134256
- [23] Regueiro J., Rossignoli A. E., Álvarez G., Blanco J., *Food Chem.*, **2011**, 129(2), 533—540
- [24] Liu L. J., Chen J. H., He X. P., Hao S., Lian Z. R., Wang B. D., *Ecotox. Environ. Safe*, **2020**, 204, 111042
- [25] Wang R. X., Zhao Z. J., He F. Y., Yue H. L., Deng F. L., Li H., Li W. W., Duan Y. X., *Chem. J. Chinese Universities*, **2021**, 42(12), 3632—3640(王如新, 赵忠俊, 贺飞耀, 岳寒露, 邓辅龙, 李宏, 李雯雯, 段忆翔. 高等学校化学学报, **2021**, 42(12), 3632—3640)
- [26] Zhao L. F., Jiao C. X., Li H., Jiao L. L., Ma Y., Wu W., Liu S. Y., *Chem. J. Chinese Universities*, **2018**, 39(4), 667—673(赵乐凤, 焦传新, 李慧, 焦丽丽, 马悦, 吴巍, 刘淑莹. 高等学校化学学报, **2018**, 39(4), 667—673)
- [27] Chen J. H., Gao L. Y., Li Z. Y., Wang S., Li J. X., Cao W., Sun C. J., Zheng L., Wang X. R., *Anal. Chim. Acta*, **2016**, 914, 117—126
- [28] Konya Y., Taniguchi M., Furuno M., Nakano Y., Tanaka N., Fukusaki E., *J. Chromatogr. A*, **2018**, 1578, 35—44
- [29] Wang Y. N., Chen J. H., He X. P., Pang J. Y., Yang J. B., Cui Z. S., Xin M., Cao W., Wang B. D., Wang Z. L., *Chem. Geol.*, **2022**, 595, 120793
- [30] Violi J. P., Bishop D. P., Padula M. P., Steele J. R., Rodgers K. J., *TrAC-Trend. Anal. Chem.*, **2020**, 131, 116018

(Ed.: F, K)