

消化系统肿瘤

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.000104

反相高效液相色谱法同时测定肝癌相关酪氨酸、缬氨酸对映体

蔺晓娟¹, 黄平², 陈进², 赵丹¹, 朱丹¹, 丁世家¹

(1. 重庆医科大学检验医学院、临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学附属第一医院肝胆外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:建立柱前衍生反向高效液相色谱荧光检测法同时对肝癌相关 L-酪氨酸(L-tyrosine, L-Tyr)、D-酪氨酸(D-tyrosine, D-Tyr)、L-缬氨酸(L-valine, L-Val)、D-缬氨酸(D-valine, D-Val)进行拆分测定。比较正常人与原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)(以下简称原发性肝癌)患者血浆中酪氨酸与缬氨酸对映体含量的变化,考察它们与原发性肝癌的关系。**方法:**柱前衍生化试剂:邻苯二甲醛(O-phthalaldehyde, OPA)和 N-乙酰-L-半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC);色谱柱:菲罗门 Gemini C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:20.0 mmol/L 磷酸二氢钠(pH 6.8)-乙腈为流动相的梯度洗脱;荧光检测波长设定:激发波长(λ_{ex})为 350 nm,发射波长(λ_{em})为 450 nm;流速 1 ml/min;柱温 30℃;进样量 10 μl。**结果:**4 种物质的回收率在 90.74%~106.80%之间,线性关系良好,检出限分别为 6.79 pg/ml(L-Tyr), 7.81 pg/ml(D-Tyr), 1.86 pg/ml(L-Val), 1.95 pg/ml(D-Val)。利用该方法,对 20 名健康志愿者和 23 名 HCC 患者的血浆进行测定,统计分析结果表明, L-Tyr 明显升高($P=0.011$), L-Val($P=0.019$)、D-Val($P=0.006$)显著性降低, D-Tyr($P=0.973$)无明显变化。**结论:**该方法准确、灵敏、重复性好,适用于实验室研究与临床检测。

【关键词】高效液相色谱法;原发性肝细胞癌;氨基酸对映体;血浆

【中图分类号】R446.39

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-12-20

作者介绍:蔺晓娟, Email: xjlin2014@163.com,

研究方向:生物分析化学。

通信作者:丁世家, Email: dingshijia@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:21075141)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000104.html>

细胞迁移、侵袭和血管形成,这为食管癌的防治提供了很好的方向,但是本实验采用质粒转染的方法不易在活体动物身上实现,探讨更加有效的靶向介导方法是下一步实验的方向。

参 考 文 献

- [1] He J, Shao K. The epidemiology current status of management, challenge and future for esophageal cancer in China[J]. China Oncology, 2011, 21(7): 501-504.
- [2] International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2008 [EB/OL]. <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wer/.2008/wer-2008.pdf>.
- [3] Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation[J]. Science, 2000, 290(5497): 1717-1721.
- [4] Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double edged sword[J]. Science, 2004, 306(5698): 990-995.
- [5] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277-300.
- [6] Eisenberg-Lerner A, Kimchi A. The paradox of autophagy and its implication in cancer etiology and therapy[J]. Apoptosis, 2009, 14(4): 376-391.
- [7] Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1[J]. Nature, 1999, 402(6762): 672-676.
- [8] Liu J, Lin Y, Yang H, et al. The expression of p33(ING1), p53, and autophagy-related gene Beclin1 in patients with non-small cell lung cancer[J]. Tumour Biol, 2011, 32(6): 1113-1121.
- [9] Dong M, Wan XB, Yuan ZY, et al. Low expression of Beclin 1 and elevated expression of HIF-1 α refine distant metastasis risk and predict poor prognosis of ER-positive, HER2-negative breast cancer[J]. Med Oncol, 2013, 30(1): 355.
- [10] Yu M, Gou WF, Zhao S, et al. Beclin 1 expression is an independent prognostic factor for gastric carcinomas[J]. Tumour Biol, 2013, 34(2): 1071-1183.
- [11] Lee SJ, Kim HP, Jin Y, et al. Beclin 1 deficiency is associated with increased hypoxia-induced angiogenesis[J]. Autophagy, 2011, 7(8): 829-839.
- [12] Sivridis E, Koukourakis MI, Mendrinou SE, et al. Beclin-1 and LC3A expression in cutaneous malignant melanomas: a biphasic survival pattern for beclin-1[J]. Melanoma Res, 2011, 21(3): 188-195.
- [13] Nguyen TM, Subramanian IV, Kelekar A, et al. Kringle 5 of human plasminogen, an angiogenesis inhibitor, induces both autophagy and apoptotic death in endothelial cells[J]. Blood, 2007, 109(11): 4793-4802.

(责任编辑: 冉明会)

Simultaneous determination of hepatoma-associated tyrosine and valine amino acid enantiomers by reversed-phase high performance liquid chromatography

Lin Xiaojuan¹, Huang Ping², Chen Jin², Zhao Dan¹, Zhu Dan¹, Ding Shijia¹

(1. College of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics of Ministry of Education, Chongqing Medical University; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To establish reversed-phase high performance liquid chromatography-fluorescence detection (RP-HPLC-FLD) method, to determine hepatoma-associated tyrosine and valine amino acid enantiomers (L-tyrosine (L-Tyr), D-tyrosine (D-Tyr), L-valine (L-Val) and D-valine (D-Val)), to compare changes in tyrosine and valine amino acid enantiomers concentrations in plasma between hepatocellular carcinoma (HCC) patients and healthy controls and to investigate their possible relationship. **Methods:** O-phthalaldehyde (OPA) and N-acetyl-L-cysteine (NAC) were served as the pre-column derivatization reagents. Separation was carried out on a Phenomenex Gemini C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a programmed gradient elution. The mobile phase was consisted of 20.0 mmol/L sodium dihydrogen phosphate (pH 6.80) and acetonitrile. The eluted solution was monitored using a fluorescence detector with excitation wavelength at 350 nm and emission wavelength at 450 nm. **Results:** The presented method exhibited an excellent linearity for all the analytes over their respective concentration ranges. The recoveries ranged from 90.74% to 106.80%. The detection limits were 6.79 pg/ml, 7.81 pg/ml, 1.86 pg/ml and 1.95 pg/ml for L-Tyr, D-Tyr, L-Val and D-Val, respectively. Twenty plasma samples of healthy humans and 23 plasma samples of HCC patients were tested and the HCC patients demonstrated higher levels of L-Tyr ($P=0.011$) and lower levels of L-Val ($P=0.019$) and D-Val ($P=0.006$) in plasma while no change was observed in D-Tyr ($P=0.973$). **Conclusion:** This method is simple, accurate and suitable for routine scientific research and clinical measurement.

【Key words】 high performance liquid chromatography; hepatocellular carcinoma; amino acid enantiomers; plasma

原发性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) (以下简称原发性肝癌) 是临床上最常见的恶性肿瘤之一, 其具有较高的发病率和死亡率^[1]。据报道, HCC 患者的血浆氨基酸谱有明显的变化, 如芳香族氨基酸有明显的升高, 而支链氨基酸的水平降低, 这些氨基酸谱的变化, 在一定程度上能够反映肝脏的损伤和坏死程度^[2]。随着 D-氨基酸在哺乳动物中被发现, 这些 D-氨基酸在生物体内的分布、来源、生理作用以及与疾病的关系备受关注^[3-4]。人类血浆中的 D-氨基酸的水平异常变化参与了很多疾病的发病机制和致病机理过程, 如抑郁症^[5]、精神分裂症^[6]、阿尔茨海默氏病^[7]和肌萎缩性侧索硬化症^[8]等, 因此测定生物样本中 D-氨基酸的含量具有重要的临床意义。

本研究建立了柱前衍生反相高效液相色谱荧光检测法对 L-酪氨酸 (L-tyrosine, L-Tyr)、D-酪氨酸 (D-tyrosine, D-Tyr)、L-缬氨酸 (L-valine, L-Val)、D-缬氨酸 (D-valine, D-Val) 进行分离测定。与其他分离技术相比, 该方法具有可以对多个手性氨基酸

对映体进行同时检测、样本预处理简单、分析成本较低、线性范围宽、灵敏度高等优点。本研究将该方法成功的应用到临床样本氨基酸对映体含量的检测, 对 HCC 患者血浆中 L-Tyr、D-Tyr、L-Val 和 D-Val 同时进行分离和测定, 考察了氨基酸对映体含量的变化与 HCC 的关系, 对 HCC 的诊治具有一定的指导意义。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (配有 G1314A 型荧光检测器, 美国 Agilent 公司); Millipore 超纯水过滤装置 (美国 Millipore 公司); Thermo 微量离心机 (美国 Thermo Scientific 公司); FA1004 电子天平 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司); KQ3200DB 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 雷磁 PHS-3C pH 计 (上海楚柏实验室设备有限公司)。

L-Tyr、D-Tyr、L-Val、D-Val、邻苯二甲醛 (O-phthalaldehyde, OPA) 和 N-乙酰-L-半胱氨酸 (N-acetyl-L-cysteine, NAC) 均购于美国 Sigma 公司; 乙腈和甲醇为色谱纯,

购于美国 Tedia 公司;磷酸二氢钠、硼酸钠、氢氧化钠为国产分析纯,购于四川成都市科龙化工试剂厂;实验用水均为超纯水。

1.2 溶液的配制

准确分别称取 L-Tyr、D-Tyr、L-Val 和 D-Val 标准品 0.005 g,用超纯水溶解并稀释于 10 ml 的容量瓶中,配成浓度为 500 ng/ml 的标准溶液,在 4 °C 条件下保存备用。准确分别称取 OPA 和 NAC 标准品 0.02 g 溶于 2 ml 无水乙醇中,用 0.2 mmol/L 的硼酸钠溶液 (pH9.8) 稀释定容至 10 ml,配成浓度为 2 mg/ml 的衍生化试剂,在 4 °C 条件下保存备用。

1.3 样本采集与处理

1.3.1 样本收集 收集重庆医科大学附属第一医院 23 例 HCC 患者的血浆,患者年龄 38~65 岁,有明确的影像学和组织病理学诊断,无肾、肺、血液等其他系统疾病;20 例正常健康人的血浆样本取自重庆医科大学附属第一医院健康志愿者,年龄 39~62 岁,2 组有相同的年龄组成与性别比例。所有受试者于清晨空腹抽取静脉血 2 ml,于 3 500 r/min 离心 5 min,取上层血浆放 -20 °C 保存备用。

1.3.2 样本处理 取 EDTA 抗凝血浆 100 μ l,加入 2 ml 甲醇溶液沉淀蛋白 (v:v 为 1:20),将去蛋白血浆样本旋涡震荡混匀 1 min,然后于 3 500 r/min 离心 10 min;取离心上清液 1 ml,60 °C 氮气微气流下慢慢吹干。将预处理吹干后的血浆样本溶于 20 μ l 衍生化试剂中,震荡衍生反应 2 min,取 10 μ l 进样分析。

1.4 色谱条件

色谱柱为菲罗门 Gemini C18 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);柱温:30 °C;流速:1 ml/min;进样量:10 μ l;荧光检测的激发波长 (λ_{ex}) 为 350 nm,发射波长 (λ_{em}) 为 450 nm;流动相 A:20.0 mmol/L 磷酸二氢钠溶液 (pH 6.8),流动相 B:乙腈。梯度洗脱程序为:0 min (12.0%B) $\rightarrow$ 13 min (18.0%B) $\rightarrow$ 23 min (26.0%B) $\rightarrow$ 30 min (26.0%B)。

1.5 统计学处理

实验数据用 SAS 9.2 统计软件进行处理,计量资料用均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,应用两样本均数差别的 t 检验分析组间差异性,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 色谱条件的确定

2.1.1 流动相中缓冲盐种类和有机溶剂种类的考察 在反相色谱条件下,由于各氨基酸对映体分子结构相似分离较为困难,为此考察了流动相中缓冲溶液的种类,有机洗脱溶剂的种类对 4 种氨基酸对映体分离情况的影响,结果发现,磷酸盐-乙腈流动相的分离和洗脱效果优于醋酸铵-乙腈流动相和磷酸盐-甲醇流动相,因此本研究选择磷酸盐-乙腈作为氨基酸对映体分离的流动相。

2.1.2 磷酸二氢钠浓度的选择 L-Tyr、D-Tyr、L-Val 和 D-Val 在血液中的浓度很低,需要荧光衍生化试剂 OPA 和 NAC 衍生以后,用反相高效液相色谱将氨基酸对映体分离检测。而流动相中缓冲盐的浓度会对衍生后的峰面积以及保留时间产生影响,分别对 5.0、15.0、20.0、30.0、40.0 mmol/L 磷酸二氢钠浓度下的氨基酸对映体的分离洗脱进行优化,结果见图 1A 和 1B。随着磷酸二氢钠浓度的增加,峰面积略有下降,而保留时间逐渐增加;但是低磷酸盐浓度时,峰宽较宽,峰形较差,随着盐浓度的增加峰形逐渐变好,但是保留时间会延长,而且磷酸盐浓度过高,易形成结晶堵塞色谱柱以及其他分析部件,因此本研究选择 20.0 mmol/L 作为流动相缓冲盐的浓度。

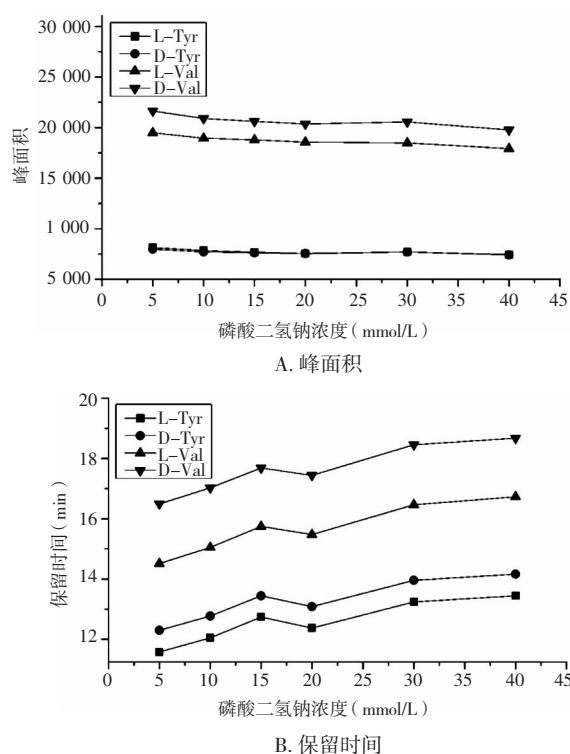


图 1 流动相中磷酸二氢钠的浓度对分析物的影响

Fig.1 Effect of concentration of sodium dihydrogen phosphate

2.1.3 流动相 pH 对峰面积和保留时间的影响 配置 20.0 mmol/L 的磷酸二氢钠溶液,并用氢氧化钠溶液和磷酸调至不同的 pH 值 (2.85、4.30、6.15、6.80、7.60、9.80),对混合标准溶液进行分析。pH 对 4 种待测物的峰面积有较大的影响,如图 2A,在缓冲盐 pH 为 2.85 时,4 种检测物的峰面积均为零,说明在此强酸性条件下,4 种氨基酸衍生物完全被酸分解;在 pH 为 4.30 时,4 种氨基酸有一定的峰面积,但是在该酸性条件下氨基酸衍生物仍不稳定,部分被酸分解;随着 pH 的增加,在其大于等于 6.15 时,峰面积逐渐趋于最大值,并且维持不变。另外,本研究也考察了 pH 的大小对保留时间的影响,如图 2B,在 pH 为 2.85 时氨基酸衍生物被完全分解,而在 pH 为 4.30 时, L-Tyr 的保留时间略小,随着 pH 的增加,4 种氨基酸

表 1 L-Tyr,D-Tyr,L-Val 和 D-Val 的线性关系、检出限 (LOD,S/N=3)

Tab.1 Linear relationship and limitation of detection of L-Tyr,D-Tyr,L-Val and D-Val(LOD,S/N=3)							
氨基酸对映体	线性方程	相关系数 (r^2)	残差的标准差 ($S_{y.x}$)	F 值	P 值	线性范围 (ng/ml)	检出限 ($\mu\text{g/ml}$)
L-Tyr	$y=387.52x-69.40$	0.999 7	163.6	31 990	0.000	0.025 0~250	6.79
D-Tyr	$y=403.65x-68.47$	0.999 8	146.3	43 420	0.000	0.025 0~125	7.81
L-Val	$y=1212.9x-141.1$	0.999 8	392.0	54 590	0.000	0.025 0~250	1.86
D-Val	$y=1247.5x-109.6$	0.999 9	325.2	83 900	0.000	0.025 0~125	1.95

注: $P<0.000\ 1$,认为浓度与面积存在线性关系

分析物的保留时间趋于平稳基本保持不变。生物样本的 pH 接近 6.80,考虑到生物样本物检测的稳定性,以及色谱柱的耐碱性和色谱分析系统的安全性,本研究选择流动相的 pH 为 6.80。

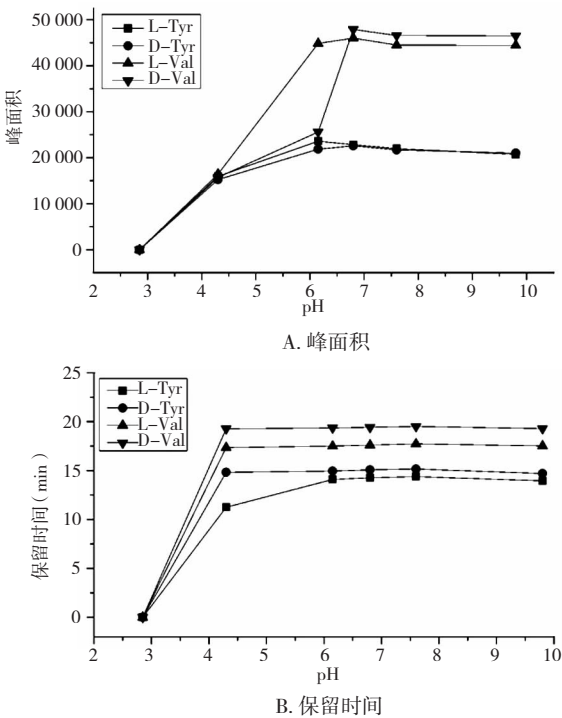


图 2 流动相 pH 对峰面积和保留时间的影响
Fig.2 Effect of pH of mobile phase on peak area and retention time

2.2 方法学评价

2.2.1 色谱峰的确定 本方法对血浆中 L-Tyr、D-Tyr、L-Val 和 D-Val 色谱分离效果良好,如图 3 所示,其中图 3a 是混标溶液的色谱图,图 3b 是健康志愿者血浆中氨基酸对映体分离的色谱图,图 3c 是在该志愿者血浆中添加了一定浓度混标溶液的色谱图。从图 3b 和 3c 的对比可以看出,随着混标溶液的加入,在相应氨基酸对映体处的色谱峰面积有明显的增加,可以进一步验证,血浆中的氨基酸对映体即为测定的靶物质。

2.2.2 标准曲线及检出限 分别将 4 种氨基酸对映体的标准溶液稀释成一系列浓度的标准工作液,按照上述最优色谱条件进行进样,测定峰面积,以浓度(ng/ml)为横坐标(x),峰面积为纵坐标(y),拟合回归直线,并对所拟合的回归直线做

单因素方差分析假设检验,以信噪比(signal/noise,S/N)=3 时所对应的检测物浓度作为方法的检出限(limitation of detection,LOD),结果见表 1。

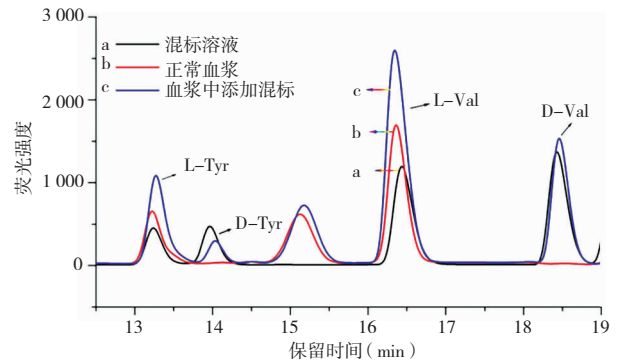


图 3 待测物混标溶液 (a)、正常血浆 (b)和正常血浆中
添加混标溶液 (c)的色谱图

Fig.3 Chromatograms of (a) the mixed standard compounds, (b) the plasma sample and (c) the plasma sample spiked with mixed standard compounds

2.2.3 精密度和回收率 分别取含高、中、低浓度的氨基酸对映体的血浆样本进行精密度和回收率的测定,按 1.3.2 中“样本处理”项进行操作。日内对每个浓度水平重复测定 5 次,连续测定 5 d。日内相对标准偏差(relative standard deviation,RSD)在 1.32%~4.20%之间,日间 RSD 在 1.54%~4.60%之间。4 种待测物的回收率在 90.74%~106.80%之间,结果如表 2 所示。

表 2 L-Tyr,D-Tyr,L-Val 和 D-Val 的回收率和精密度 ($n=5$)
Tab.2 Recoveries and precisions of L-Tyr,D-Tyr, L-Val and D-Val ($n=5$)

氨基酸对映体	样本浓度 (ng/ml)	加入浓度 (ng/ml)	回收率 (%)	精密度 (RSD, %)	
				日内	日间
L-Tyr	125.32	10.42	95.11 ± 0.19	1.81	3.62
	125.32	20.83	106.80 ± 4.89	3.30	1.54
	125.32	41.66	94.69 ± 3.82	3.15	2.98
D-Tyr	5.43	5.21	101.63 ± 1.01	3.45	2.71
	5.43	10.42	96.43 ± 2.85	1.70	2.75
	5.43	20.83	93.32 ± 0.29	4.16	3.37
L-Val	127.46	10.42	96.64 ± 1.07	2.05	2.37
	127.46	20.83	106.69 ± 3.12	4.20	3.36
	127.46	41.66	100.80 ± 2.04	2.74	4.60
D-Val	2.48	5.21	94.66 ± 3.02	2.78	1.98
	2.48	10.42	90.74 ± 4.78	1.32	2.66
	2.48	20.83	100.30 ± 2.32	2.69	3.58

2.4 实际样品的测定

本研究采用外标法对正常人、HCC 患者血浆中 L-Tyr、D-Tyr、L-Val 和 D-Val 的含量进行了测定,并且对 2 组样本中氨基酸对映体的含量用 SAS 9.2 软件做 2 样本均数差别的 *t* 检验分析,结果表明,在 HCC 患者血浆中,L-Tyr 明显高于正常组,L-Val、D-Val 明显低于正常组, $P<0.05$,而 D-Tyr 无明显差异,结果如表 3 所示。

表 3 HCC 患者组与正常对照组血浆中 L-Tyr、D-Tyr、L-Val 和 D-Val 的含量

Tab.3 Concentration of L-Tyr, D-Tyr, L-Val and D-Val in plasma in HCC patients and healthy controls

氨基酸 对映体	血浆浓度 (ng/ml)		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
	正常对照组 (<i>n</i> =20)	HCC 患者组 (<i>n</i> =23)		
L-Tyr	124.21 ± 30.69	149.02 ± 31.58 ^a	2.67	0.011
D-Tyr	5.36 ± 1.70	5.37 ± 1.94	0.03	0.973
L-Val	125.69 ± 20.89	105.87 ± 32.61 ^a	-2.44	0.019
D-Val	2.36 ± 0.95	1.46 ± 0.69 ^a	-2.95	0.006

注:a, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义

3 讨 论

HCC 患者,常存在严重的氨基酸代谢紊乱,以往很多研究,探讨了总芳香族氨基酸和支链氨基酸水平变化与 HCC 的关系以及给予氨基酸营养支持治疗对纠正 HCC 患者氨基酸代谢紊乱的重要意义^[9-10]。目前尚未检索到,同时对 HCC 患者血浆中氨基酸对映体含量进行研究和测定的方法。

目前 D-氨基酸的测定方法主要有酶法^[11]、气相色谱法^[12]以及液相色谱法^[13-14]等。酶法对 D-氨基酸进行测定,灵敏度较低,同时由于酶对底物催化反应的专一性,同时测定多种氨基酸对映体较为困难;气相色谱法测定手性氨基酸,往往需要耗时、繁琐的样本前处理和衍生化反应;液相色谱质谱也用于手性氨基酸对映体的检测,该方法特异性强,灵敏度高,但是需要昂贵的实验仪器和专业的操作人员,这些缺点,很大程度上限制了其应用。

本研究建立了反向高效液相色谱荧光检测法,同时测定 L-Tyr、D-Tyr、L-Val 和 D-Val,并且成功的应用到 HCC 患者血浆标本的检测,探讨了在 HCC 患者中,各个氨基酸对映体含量的改变。其中,L-Tyr 明显升高,L-Val、D-Val 明显降低,D-Tyr 无明显变化,血浆中这 4 种氨基酸对映体为 HCC 的诊治提供了参考。该方法样本预处理简单,衍生化反应快(仅需 2 min),分析时间短(小于 20 min),仪器操作简便,线性关系良好,灵敏度高,重复性好,适用于

临床监测与科研。

参 考 文 献

- [1] Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, surveillance, and diagnosis[J]. Semin Liver Dis, 2010, 30(1): 3-16.
- [2] Hirayama C, Suyama K, Horie Y, et al. Plasma amino acid patterns in hepatocellular carcinoma[J]. Biochem Med Metab Biol, 1987, 38(2): 127-133.
- [3] Friedman M. Origin, microbiology, nutrition, and pharmacology of D-amino acids[J]. Chem Biodivers, 2010, 7(6): 1491-1530.
- [4] Hamase K, Miyoshi Y, Ueno K, et al. Simultaneous determination of hydrophilic amino acid enantiomers in mammalian tissues and physiological fluids applying a fully automated micro-two-dimensional high-performance liquid chromatographic concept[J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(7): 1056-1062.
- [5] Detera-Wadleigh SD, McMahon FJ. G72/G30 in schizophrenia and bipolar disorder: review and meta-analysis[J]. Biol Psychiatry, 2006, 60(2): 106-114.
- [6] Ferraris DV, Tsukamoto T. Recent advances in the discovery of D-amino acid oxidase inhibitors and their therapeutic utility in schizophrenia[J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(2): 103-111.
- [7] Samakshvili S, Ibáñez C, Simó C, et al. Analysis of chiral amino acids in cerebrospinal fluid samples linked to different stages of Alzheimer disease[J]. Electrophoresis, 2011, 32(19): 2757-2764.
- [8] Sasabe J, Chiba T, Yamada M, et al. D-serine is a key determinant of glutamate toxicity in amyotrophic lateral sclerosis[J]. EMBO J, 2007, 26(18): 4149-4159.
- [9] Ishikawa T. Branched-chain amino acids to tyrosine ratio value as a potential prognostic factor for hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(17): 2005-2008.
- [10] Mizuguchi T, Kawamoto M, Meguro M, et al. Prognostic impact of preoperative the branched-chain amino acid to the tyrosine ratio in hepatocellular carcinoma patients after initial hepatectomy[J]. J Gastrointest Surg, 2011, 15(8): 1433-1439.
- [11] Rosini E, Molla G, Rossetti C, et al. A biosensor for all D-amino acids using evolved D-amino acid oxidase[J]. J Biotechnol, 2008, 135(4): 377-384.
- [12] Waldhier MC, Dettmer K, Gruber MA, et al. Comparison of derivatization and chromatographic methods for GC-MS analysis of amino acid enantiomers in physiological samples[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878(15-16): 1103-1112.
- [13] Miyoshi Y, Hamase K, Okamura T, et al. Simultaneous two-dimensional HPLC determination of free D-serine and D-alanine in the brain and periphery of mutant rats lacking D-amino-acid oxidase[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011, 879(29): 3184-3189.
- [14] Visser WF, Verhoeven-Duif NM, Ophoff R, et al. A sensitive and simple ultra-high-performance-liquid chromatography-tandem mass spectrometry based method for the quantification of D-amino acids in body fluids[J]. J Chromatogr A, 2011, 1218(40): 7130-7136.

(责任编辑:关蕴良)