

一步衍生法同时测定人血清中28种氨基酸的含量

Simultaneous determination of 28 amino acids in human serum by one-step derivation

刘丹 胡凤梅 黄超 赵祥龙 郭立海

Liu Dan, Hu Fengmei, Huang Chao, Zhao Xianglong, Guo Lihai

SCIEX应用支持中心, 中国

SCIEX, China

前言

氨基酸是蛋白质和其他基本生物分子的关键组成部分，体内很多代谢或生理过程变化都与氨基酸关系密切，比如血清中鸟氨酸(ornithine, Orn)和瓜氨酸(citrulline, Cit)是合成多肽和蛋白质的重要指标，也是尿素合成周期紊乱的重要生物标志物。此外，氨基酸在糖尿病、肾脏疾病、炎症性疾病及癌症等疾病诊断中都有重要的参考意义。因此，准确定量血清中氨基酸水平具有重要意义。

应用于氨基酸分析的分析技术多种多样，目前主要方法是液相色谱法(紫外/荧光)、液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)。大多数氨基酸缺乏发色团，使用液相色谱法通常需要采用衍生化来允许检测，并且实现色谱分离需要较长的分析时间。使用液相色谱串联质谱法可以多个通道同时检测，更短的分析时间有更高的分析通量；由于氨基酸的强亲水性会导致在常规反相色谱(Reversion Phase chromatography, RP)条件下保留较差，通常会考虑在亲水作用色谱(hydrophilic interaction chromatography, HILIC)条件下增加保留及分离效果，但由于HILIC模式更容易受到多种因素影响从而影响方法的稳定性及重现性，所以本实验采用了更简单通用的色谱柱及反相分析模式，样本采用简单一步衍生化处理，同时检测血清样本中28种氨基酸及其关键代谢物，方法灵敏度高，同分异构体分离效果好，可以为血清氨基酸检测及代谢研究提供重要参考。

本方法具有以下特点：

- 样本用量较少 (10 μ L)
- 简单快速一步衍生法 (15 min)

- 同时准确定量28种氨基酸
- 通用色谱柱及简单反相梯度
- 可实现多组异构体的分离

1 实验部分

1.1 样品前处理

准确取10 μ L标曲样本/质控样本/待测血清样本，加入甲醇(含同位素内标)进行沉淀，涡旋混匀离心，取出上清， N_2 气流(40 $^{\circ}$ C)吹干，加入衍生试剂，反应15 min， N_2 气流吹干，用初始流动相复溶，混匀后进样分析。

1.2 色谱条件

色谱柱为C18。流动相采用A水(甲酸铵, 0.1%甲酸)，B甲醇(甲酸铵, 0.1%甲酸)，柱温设定为40 $^{\circ}$ C。进样量为2 μ L。洗脱梯度见表1。

表1. 洗脱梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	B (%)
1.5	0.4	2
2.0	0.4	40
5.0	0.4	40
6.0	0.4	85
8.8	0.4	85
9.0	0.4	2
12	0.4	2

1.3 质谱条件

采用电喷雾离子源 (Electrospray Ionization, ESI) 和多反应监测 (Multiple Reaction Monitoring, MRM) 模式进行质谱扫描。离子源参数: 加热气 (GS1) 和辅助加热气 (GS2) 分别为55 psi 和50 psi, 脱溶剂气温度为 550°C; 气帘气 (Curtain Gas, CUR) 为 35 psi, 碰撞气 (Collision Gas, CAD) 为8; 喷雾针 (Ionspray,

IS) 电压为 5500 V。为了获取较好的稳定性和灵敏度, 各化合物监测离子对的去簇电压 (Declustering Potential, DP) 和碰撞电压 (Collision Energy, CE), 目标物及内标物监测离子对等参数均经过系统优化, 离子对信息见表2。

表2. 待测组分和内标物质的质谱参数

母离子 (Da)	子离子 (Da)	中文名称	英文名称	通道名称	去簇电压 (DP)	碰撞电压 (CE)	母离子 (Da)	子离子 (Da)	中文名称	英文名称	通道名称	去簇电压 (DP)	碰撞电压 (CE)
146.1	44.0	丙氨酸	Alanine	Ala-1	40	25	172.1	57.0	脯氨酸	Proline	Pro-1	50	28
146.1	57.0			Ala-2	40	20	172.1	41.0			Pro-2	50	42
246.2	144.1	天冬氨酸	Aspartic acid	Asp-1	50	19	206.2	56.0	甲硫氨酸	Methionine	Met-1	50	28
246.2	88.0			Asp-2	50	27	206.2	104.0			Met-2	50	18
260.2	56.0	谷氨酸	Glutamic acid	Glu-1	55	60	203.2	130.1	赖氨酸	Lysine	Lys-1	50	21
260.2	102.0			Glu-2	55	28	203.2	84.0			Lys-2	50	26
222.2	103.1	苯丙氨酸	Phenylalanine	Phe-1	45	49	188.2	132.1	亮氨酸	Leucine	Leu-1	50	15
222.2	120.1			Phe-2	45	30	188.2	86.0			Leu-2	50	18
238.2	136.1	酪氨酸	Tyrosine	Tyr-1	50	23	188.2	86.0	异亮氨酸	Isoleucine	Ile-1	50	18
238.2	165.1			Tyr-2	50	19	188.2	132.1			Ile-2	50	15
261.2	244.2	色氨酸	Tryptophane	Trp-1	50	16	188.2	68.0	羟脯氨酸	Hydroxyproline	Hyp-1	55	39
261.2	159.1			Trp-2	50	28	188.2	132.1			Hyp-2	55	19
174.1	55.0	缬氨酸	Valine	Val-1	40	40	232.2	113.1	瓜氨酸	Citrulline	Cit-1	50	25
174.1	72.0			Val-2	40	20	232.2	70.0			Cit-2	50	40
231.2	70.0	精氨酸	Arginine	Arg-1	65	42	146.1	90.0	肌氨酸	Sarcosine	Sar-1	40	14
231.2	172.1			Arg-2	65	21	146.1	44.0			Sar-2	40	23
132.1	57.0	甘氨酸	Glycine	Gly-2	30	18	203.2	84.1	谷氨酰胺	Glutamine	Glum-1	35	23
132.1	76.0			Gly-1	30	11	203.2	130.1			Glum-2	35	13
189.2	70.1	鸟氨酸	Ornithine	Orn-1	40	30	226.2	124.1	1-甲基组氨酸	1-Methylhistidine	1-Mehis-1	65	25
189.2	172.1			Orn-2	40	15	226.2	83.0			1-Mehis-2	65	42
212.2	83.0	组氨酸	Histidine	His-1	55	45	226.2	96.0	3-甲基组氨酸	3-Methylhistidine	3-Mehis-1	80	34
212.2	110.1			His-2	55	25	226.2	170.1			3-Mehis-2	80	24
162.1	60.0	丝氨酸	Serine	Ser-1	40	22	160.1	86.0	β -氨基异丁酸	β -Aminobutyric acid	B-Aib-1	40	15
162.1	88.0			Ser-2	40	18	160.1	75.1			B-Aib-2	40	24
176.1	102.0	苏氨酸	Threonine	Thr-1	40	18	160.1	58.0	α -氨基丁酸	α -Aminobutyric acid	A-Abu-1	40	22
176.1	74.0			Thr-2	40	20	160.1	104.0			A-Abu-2	40	13

表2. 待测组分和内标物质的质谱参 (续)

母离子 (Da)	子离子 (Da)	中文名称	英文名称	通道名称	去簇电压 (DP)	碰撞电压 (CE)
146.1	72.0	β-丙氨酸	β-Alanine	B-Ala-1	45	15
146.1	90.0			B-Ala-2	45	14
274.2	98.0	α-氨基己二酸	α-Amino adipic acid	A-Aad-1	65	31
274.2	172.1			A-Aad-2	65	22
150.1	48.0			IS-Ala	40	25
250.2	148.1			IS-Asp	50	15
265.2	61.0			IS-Glu	55	60
230.2	109.1			IS-Phe	45	49
242.2	140.1			IS-Tyr	50	23
266.2	249.2			IS-Trp	50	16
182.1	62.0			IS-Val	40	40
237.2	74.0			IS-Arg	65	42
135.1	57.0			IS-Gly	30	18
196.2	77.0			IS-Orn	40	30
218.2	87.0			IS-His	55	45
165.1	63.0			IS-Ser	40	22
178.1	104.0			IS-Thr	40	17
179.1	57.0	内标	Internal standard	IS-Pro	50	28
209.2	56.0			IS-Met	50	28
207.2	134.1			IS-Lys	50	21
191.2	135.1			IS-Leu	50	15
191.2	71.0			IS-Hyp	55	39
239.2	120.1			IS-Cit	50	25
149.1	93.0			IS-Sar	40	14
229.3	127.2			IS-1Methis	65	25
229.3	99.2			IS-3Methis	80	34
163.1	89.0			IS-B-Aib	40	15
165.9	64.2			IS-A-Abu	40	22
150.1	76.1			IS-B-Ala	45	15
277.2	101.1			IS-A-Aad	65	31

2 结果与讨论

2.1 回归方程及线性

在本实验条件下, 同时测定28种氨基酸在各自的线性范围内标准曲线线性良好, r 值大于0.995。标准曲线上各浓度点的准确度偏差小于 $\pm 15\%$, 满足定量分析需求。各氨基酸线性范围、线性方程以及相关系数如下表3所列。

表3. 各氨基酸线性范围及线性情况

化合物	线性范围 (μM)	线性方程	相关系数
Alanine	15-1000	$y=0.48501x+5.04355e-4$	0.9992
Aspartic acid	3-100	$y=0.07013x+0.03665$	0.9991
Glutamic acid	10-800	$y=0.02136x+0.30574$	0.9987
Phenylalanine	5-250	$y=0.05692x+0.08365$	0.9996
Tyrosine	5-250	$y=0.02886x+0.02222$	0.9996
Tryptophane	2-200	$y=0.07880x+0.14626$	0.9972
Valine	20-1000	$y=0.00671x+0.02432$	0.9997
Arginine	3-200	$y=0.05713x+0.03652$	0.9948
Glycine	20-1000	$y=0.01142x+0.01086$	0.9986
Ornithine	5-450	$y=0.01139x+0.00874$	0.9987
Histidine	5-450	$y=0.01323x+0.01423$	0.9991
Serine	20-1000	$y=0.01188x+0.00819$	0.9979
Threonine	20-1000	$y=0.01982x+0.14287$	0.9985
Proline	20-1000	$y=0.01670x+0.01354$	0.9955
Methionine	2-200	$y=0.02719x+0.05391$	0.9995
Lysine	5-1000	$y=0.01992x+0.18508$	0.9998
Leucine	5-500	$y=9.23704e-4x+0.00272$	0.9996
Isoleucine	5-500	$y=0.00351x+7.43025e-4$	0.9985
Glutamine	0.1-10	$y=3.80235x+0.07847$	0.9999
Hydroxyproline	1-100	$y=0.06360x+0.08010$	0.9974
Citrulline	2-200	$y=0.08652x+0.26251$	0.9979
Sarcosine	0.2-20	$y=1.32672x+0.93157$	0.9972
1-Methylhistidine	0.5-50	$y=0.04809x+0.02944$	0.9984
3-Methylhistidine	0.1-10	$y=0.10601x+0.04529$	0.9996
β-Aminobutyric acid	0.3-30	$y=0.15388x+0.02184$	0.9989
α-Aminobutyric acid	2-100	$y=0.03553x+0.01106$	0.9997
β-Alanine	4-200	$y=0.06152x+0.03199$	0.9970
α-Amino adipic acid	0.1-10	$y=0.81257x+0.03893$	0.9972

2.2 样本采集谱图

人血清样品中28种氨基酸的色谱图(如图1), 色谱信号明显, 色谱峰峰型良好。本方法检测的28种氨基酸中存在多组同分异构的情况, 图2分别展示了几组不同异构体的分离情况, 分别是组一(赖氨酸/谷氨酰胺)、组二(羟脯氨酸/亮氨酸/异亮氨酸)、组三(1-甲基组氨酸/3-甲基组氨酸)和组四(丙氨酸/ β -丙氨酸), 在本方法条件下, 经过简单衍生生化方法后, 各组同分异构体分离情况良好, 无相互干扰。

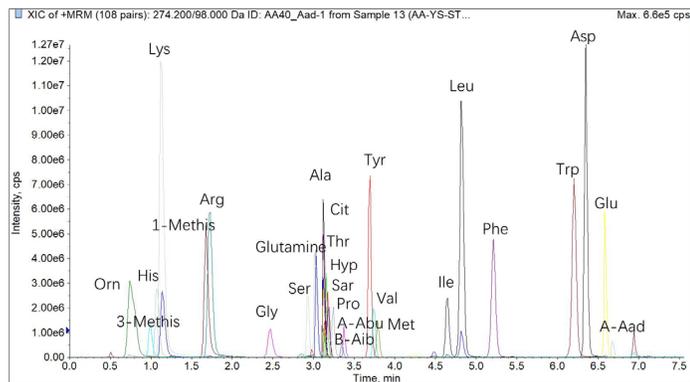


图 1. 人血清中28种氨基酸的色谱图

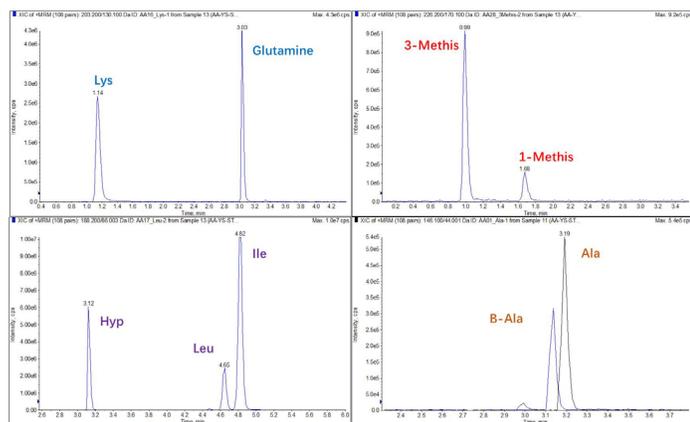


图 2. 血清样品中几组同分异构体氨基酸分离情况色谱图

2.3 方法验证

采用低、高两个浓度水平的质控品, 每个浓度平行测定3次, 根据测定结果计算精密度RSD以及准确度Accuracy。结果表明在本方法下, 28种氨基酸测试精密度在0.2%~13.8%范围内, 准确度在90.2%~111.4%(表4), 符合方法学分析要求。

表4. 28种氨基酸不同浓度质控样品准确度及精密度

	LQC		HQC	
	Accuracy (%)	RSD (%)	Accuracy (%)	RSD (%)
Alanine	108.4	3.4	104.5	5.9
Aspartic acid	94.3	2.2	95.9	2.1
Glutamic acid	103.6	10.8	100.5	0.2
Phenylalanine	106.0	4.4	104.7	5.4
Tyrosine	106.8	2.2	101.6	2.1
Tryptophane	107.1	4.5	111.9	3.1
Valine	97.5	1.3	98.2	3.7
Arginine	92.8	6.1	108.6	3.0
Glycine	98.2	10.6	92.9	0.4
Ornithine	98.8	5.5	102.2	7.5
Histidine	108.4	5.0	101.7	5.1
Serine	109.6	4.2	91.4	6.1
Threonine	104.4	13.1	99.4	12.2
Proline	95.3	9.6	96.1	8.5
Methionine	105.3	0.5	102.2	5.0
Lysine	111.4	4.1	107.4	3.7
Leucine	100.2	8.8	106.4	3.4
Isoleucine	94.2	7.0	103.0	2.7
Glutamine	99.5	8.0	95.1	10.8
Hydroxyproline	104.2	11.6	91.1	6.1
Citrulline	104.3	10.2	92.8	4.7
Sarcosine	106.4	4.9	102.2	3.8
1-Methylhistidine	103.3	4.0	110.4	2.5
3-Methylhistidine	100.4	6.9	90.2	3.3
β -Aminobutyric acid	102.5	11.0	100.8	9.8
α -Aminobutyric acid	104.9	13.8	95.7	0.8
β -Alanine	95.7	8.1	100.2	3.6
α -Aminoadipic acid	103.6	5.1	102.7	10.2

总结

本方法基于SCIEX液相色谱串联质谱系统，建立了人血清中28种氨基酸同时准确定量检测的液相色谱串联质谱方法。前处理过程通过简单的一步衍生法处理样本，样本需求量少，各氨基酸具有很好的灵敏度。通过方法验证证明方法稳定性好准确度高。各氨基酸有良好的保留及分离情况，且能有效分离内源性干扰。本方法的建立有助于准确检测血清中28种氨基酸的浓度，可为临床相关代谢及疾病研究提供参考。

仅限专业展会等使用、仅向专业人士提供的内部资料

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15966-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7201
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：[SCIEX-China](#)