

串联质谱法测定血清中 20 种游离氨基酸含量

张轶雯^{1,2},倪君君²,相 婷²,高慧媛¹,李 玮²,吴立军^{1△}(1. 沈阳药科大学, 辽宁沈阳 110016;
2. 北京国立柏林医学科技发展有限公司 100011)

【摘要】 目的 建立串联质谱法(LC-MS/MS)测定血清中 20 种游离氨基酸含量,为临床血清氨基酸检测提供可靠方法。**方法** 血清样本未经衍生化处理,采用 LC-MS/MS 法,于电喷雾源(ESI)正离子模式下使用选择反应性离子扫描(SRM)进行定量。**结果** 20 种氨基酸线性相关系数为 0.995 7~0.999 9,日内、日间变异系数分别为 0.5%~9.0%和 0.6%~12.3%,加样回收率为 87.6%~115.5%。样本在常温放置 24 h,8 次冻融循环及-20 ℃冻存 20 d 等条件下稳定性良好。**结论** 该方法简便、稳定、定量准确,适用于血清氨基酸的临床检测,为氨基酸代谢疾病的临床诊断提供了重要的生化依据。

【关键词】 氨基酸; 串联质谱法; 未衍生

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.19.002

中图分类号:R446.11

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2010)19-2051-03

Quantitative analysis of 20 free amino acids in serum by LC-MS/MS ZHANG Yi-wen^{1,2}, NI Jun-jun², XIANG Ting², GAO Hui-yuan¹, LI Wei², WU Li-jun^{1△}. 1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, Liaoning 110016, China; 2. Beijing Grand Berlin Medical Technology Co., Ltd., Beijing 100011, China

【Abstract】 Objective To establish a tandem mass spectrometric(LC-MS/MS) method for the determination of 20 amino acids in serum to provide the reliable method to serum amino acid detection. **Methods** Without derivative treatment of serum sample, LC-MS/MS method was adopted. The reactive ion scanning was selected in positive ion mode by electrospray ionization (ESI) to quantitatively analyze amino acids. The precision, accuracy and recovery of method were analyzed, and the stability of sample under different conditions were also investigated. **Results** The correlation coefficients of 20 kinds of amino acid were ranged from 0.995 7 to 0.999 9. The inter-day and intra-day precisions ranged from 0.5% to 9.0% and from 0.6% to 12.3%, respectively; the recoveries ranged from 87.6% to 115.5%. The sample under the conditions, such as placing for 24 h under normal temperature, freeze thawing for 8 cycles and frozen storage for 20 d, had better stability. **Conclusion** The quantitative analysis method of amino acid is accurate, convenient and stable, which could be suitable to the clinical detection of serum amino acids and provides the important biochemical foundation to the clinical diagnosis of amino acid metabolic disorders.

【Key words】 amino acids; tandem mass spectrometric; underivatized

氨基酸是蛋白质、多肽的基本组成结构和新陈代谢中重要的小分子物质。人体内参与氨基酸代谢的相关蛋白和酶发生缺陷,或者各种病理状态都会导致氨基酸代谢异常和血清氨基酸水平的改变^[1]。研究机体在生理和病理条件下血清氨基酸水平,不仅可监测机体的营养状况还有助于各种疾病的病理机制认识,鉴别诊断和治疗。

因此,血清氨基酸含量已作为一项重要的临床诊断指标受到了广泛关注。传统的氨基酸分析法多采用衍生化,使其生成具有紫外或荧光基团的衍生物后进行检测^[2-3]。其方法操作繁琐、影响因素多、分析时间长,给临床检测带来诸多不便。本文建立了血清游离氨基酸串联质谱(LC-MS/MS)分析法,无需衍生,可在较短时间内完成测定^[4]。本实验还对血清样本的常温、冻融、冻存稳定性进行考察,以确定临床血清样本的存放时间及条件。并与德国柏林医学诊断检验中心(MDI)进行了室内比对,进一步考察方法的准确性。

1 材料与与方法

1.1 仪器与试剂 Finnigan TSQ Quantum Ultra triple-qu-

adrupole mass spectrometer (Finnigan Surveyor Autosampler Plus and MS Pump Plus)、微量移液器(Biohit, Finland),电子天平(AB135-S, Mettler Toledo),湘仪高速冷冻离心机(H-1850R, 湖南湘仪),涡旋仪(MS3 basic, IKA),氮吹浓缩仪(MD200, 杭州奥盛),超声波清洗器, Milli-Q 超纯水系统。氨基酸对照品:α-氨基己二酸(α-ADA),丙氨酸(Ala),精氨酸(Arg),天冬氨酸(Asp),瓜氨酸(Cit),胱氨酸(Cys-Cys),谷氨酸(Glu),甘氨酸(Gly),组氨酸(His),亮氨酸(Leu),异亮氨酸(Ile),赖氨酸(Lys),蛋氨酸(Met),鸟氨酸(Orn),苯丙氨酸(Phe),脯氨酸(Pro),苏氨酸(Thr),色氨酸(Trp),酪氨酸(Tyr),缬氨酸(Val),上述对照品均购自 Sigma-aldrich, NSK-A, 乙腈(Merck, 色谱纯),甲醇(Fisher, 色谱纯),纯水(Milli-Q 超纯水系统制备)。

1.2 色谱质谱条件 氨基酸经色谱柱以 10%~90%的含酸乙腈梯度洗脱,流速 200 μL/min,进样量 3 μL,柱温恒定为 40 ℃。电喷雾电离源(ESI source)喷雾电压 4 500 V,毛细管温度 350 ℃,碰撞气 1.5 mTorr,鞘气 30 psi,辅助气 10 psi,正离子

△ 通讯作者, E-mail: wulijun_111@hotmail.com.

模式下选择性反应检测(SRM),各氨基酸质谱参数见表 1。

1.3 样本处理 取 10 μ L 血清于 EP 管中,加入 230 μ L 同位素内标溶液,2 000 r/min 涡旋混匀 30 s 后置于 12 000 r/min 高速离心 10 min,移取 200 μ L 上清液于 1.5 mL 塑料离心管

中,55 $^{\circ}$ C 下氮气吹干,复溶。1 500 r/min 涡旋混匀 1 min。置于超声中提取 1 min 后 12 000 r/min 离心 1 min,取上清液进样。

表 1 氨基酸质谱参数

氨基酸	离子对(M/Z)	扫描宽度(M/Z)	碰撞能量(V)	氨基酸	离子对(M/Z)	扫描宽度(M/Z)	碰撞能量(V)
α -ADA	162/98	1	15	Ile	132/86	1	15
Ala	90/44	0.2	10	Lys	147/84	1	15
Arg	175/70	1	15	Met	150/104	1	15
Asp	134/74	1	15	Orn	133/70	1	15
Cit	176/159	1	15	Phe	166/120	1	15
Cys-Cys	241/74	1	15	Pro	116/70	1	15
Glu	148/84	1	15	Thr	120/74	1	15
Gly	76/30	0.2	8	Trp	205/188	1	15
His	156/110	1	15	Tyr	182/165	1	15
Leu	132/86	1	15	Val	118/72	1	15

1.4 方法学考察 本实验考察该方法的准确度,精密度,并对 5 份血清样本常温放置、冻融循环及冻存稳定性进行考察。

1.5 临床应用 检测 7 例疑似氨基酸代谢患者,并与德国 MDI(德国柏林医学诊断检验中心)测定结果进行室间对比。

2 结 果

2.1 色谱分离及质谱鉴定 本实验质谱部分采用 ESI 源正离子模式下 SRM 扫描监测各氨基酸离子对,从而进行定性定量分析。大多数氨基酸在该质谱条件下失去 NH_3 ($\text{MW}=17$) 形成 $[\text{R-CH-COOH}]^+$,或失去 HCOOH ($\text{MW}=46$) 重排生成 $[\text{R-CH=NH}_2]^+^{[5]}$ 。其中,亮氨酸和异亮氨酸为同分异构体,产生的碎裂片段相同。定量时需对其进行色谱分离。优化液相条件后,可实现该分离并精确定量。

表 2 氨基酸线性回归方程、相关系数、定量范围

氨基酸	$Y=aX+b$	相关系数 (r^2)	定量范围 ($\mu\text{mol/L}$)
α -ADA	$Y=0.075X-0.018$	0.999 0	1~40
Ala	$Y=0.017X+0.011$	0.999 4	25~1 000
Arg	$Y=0.012\ 4X-0.066$	0.999 0	7.5~300
Asp	$Y=0.014\ 5X+0.026$	0.994 4	2.5~100
Cit	$Y=0.016X+0.038$	0.999 3	3~120
Cys-Cys	$Y=0.001\ 3X-0.001$	0.999 9	3.75~150
Glu	$Y=1.103X+0.008$	0.998 1	12.5~500
Gly	$Y=0.002X+0.025$	0.998 0	17.5~700
His	$Y=0.006\ 17X+0.012\ 7$	0.999 8	3~1 200
Leu	$Y=0.000\ 191X+0.000\ 721$	0.999 4	10~400
Ile	$Y=0.002\ 9X+0.005\ 5$	0.999 8	8~320
Lys	$Y=0.006\ 0X-0.010\ 6$	0.999 8	15~600
Met	$Y=0.019\ 2X+0.029\ 9$	0.998 4	4~160
Orn	$Y=0.001\ 9X+0.002\ 61$	0.999 5	7.5~300

续表 2 氨基酸线性回归方程、相关系数、定量范围

氨基酸	$Y=aX+b$	相关系数 (r^2)	定量范围 ($\mu\text{mol/L}$)
Phe	$Y=0.464X-0.020$	0.999 0	20~800
Pro	$Y=2.450X+0.689$	0.996 8	25~1 000
Thr	$Y=0.012X+0.085$	0.999 9	12.5~500
Trp	$Y=0.082\ 4X-0.199$	0.995 7	5~200
Tyr	$Y=0.017\ 2X+0.044\ 8$	0.999 6	8~320
Val	$Y=0.012\ 4X-0.066$	0.999 3	24~960

2.2 线性回归方程与定量范围 本实验采用内标法在 Xcalibur 工作站中进行定量。回归方程、相关系数(r^2)及定量范围见表 2。因血清中各氨基酸含量差异较大,故根据实际需要制定各氨基酸不同定量范围。

2.3 加样回收 取血清样本,分别加入低中高 3 个浓度的标准品进行加样回收实验,各浓度平行制作 3 份,求得加样回收率以考察准确度。各氨基酸低浓度标准品加样回收率为 87.6%~115.5%,中浓度标准品加样回收率为 87.4%~112.3%,高浓度标准品加样回收率为 87.6%~112.7%。

2.4 精密度 考察各氨基酸低、中、高 3 个浓度日间和日内精密度。日间精密度($n=15$)和日内精密度($n=15$)的 RSD 分别在 0.5%~9.0%和 0.6%~12.3%之间。

2.5 稳定性 本实验平行考察了 5 份血清样本在常温放置 6、12、24 h,8 个冻融循环及-20 $^{\circ}$ C 冻存 10、20 d 的稳定性。测定并计算常温、冻融及冻存测定值的平均 RSD(%)(见表 3),结果显示均小于 13.9%,提示血清样本在此条件下稳定性良好。但-20 $^{\circ}$ C 冻存 20 d 以上的样本稳定性本实验未加以考察。

2.6 临床应用 本实验对 7 例疑似氨基酸代谢患者血清样本进行检测并与德国柏林医学诊断检验中心(MDI)进行了室间比对,对酪氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、瓜氨酸、蛋氨酸结

果做图表分析,见图 1。经 SPSS 统计学软件配对 t 检验得酪氨酸($t=0.177,P=0.865$)、缬氨酸($t=1.577,P=0.166$)、亮氨酸($t=2.277,P=0.063$)、异亮氨酸($t=0.752,P=0.480$)、瓜氨酸($t=1.851,P=0.114$)、蛋氨酸($t=3.255,P=0.017$)。

表 3 氨基酸常温、冻融、冻存稳定性考察[RSD(%), $n=5$]

氨基酸	常温 稳定性	冻融 稳定性	冻存 稳定性	氨基酸	常温 稳定性	冻融 稳定性	冻存 稳定性
α -ADA	3.0	4.9	5.2	Ile	2.9	2.0	2.1
Ala	2.4	1.7	1.7	Lys	4.9	4.3	5.1
Arg	5.1	3.1	3.9	Met	5.5	4.5	5.7
Asp	3.8	2.7	3.7	Orn	4.6	5.6	4.0
Cit	3.4	4.2	4.1	Phe	3.9	1.6	2.1
Cys-Cys	3.7	4.2	4.7	Pro	6.2	3.2	13.6
Glu	4.3	3.7	6.0	Thr	2.8	3.3	3.1
Gly	2.4	3.0	6.8	Trp	3.0	4.1	2.0
His	2.9	3.2	5.3	Tyr	2.3	3.7	4.2
Leu	2.9	2.1	2.3	Val	2.6	2.3	2.7

3 讨 论

本文建立了血清中 20 种氨基酸的 LC-MS/MS 测定方法,可短时间内将各氨基酸精确定量。与传统的衍生化氨基酸分析方法相比,具有无需衍生,操作简便,干扰因素少、分析时间短,使用样本量小等特点,在国内相关研究中处于领先水平。本实验通过方法学考察证明了该方法具有线性范围良好、精密准确、灵敏度高、稳定性好等优点。

同时,与 MDI 进行了室间测定值对比。分析可知,两室结果除蛋氨酸外差异较小。蛋氨酸测定结果存在一定差异,MDI 实验室测定结果普遍高于本实验测定结果。分析其原因,可能由于德国实验室氨基酸检测方法中包含固相萃取及衍生步骤,其处理时这些引入的干扰因素可能引起对含硫氨基酸测定结果的差异。经方法学评价和室间对比和证明本实验方法准确、可靠,可为氨基酸代谢疾病和相关器官病理性改变的临床确诊和对症治疗提供了可信的生化指标和科学依据。

参考文献

[1] Luc A. Plasma Amino Acid Levels With a Note on Membrane Transport; Characteristics, Regulation, and Metabolic Significance[J]. Nutrition,2002,18:761-766.

[2] Devall J,Blake R,Langman N,et al. Monolithic column-based reversed-phase liquid chromatography separation for amino acid assay in microdialysates and cerebral spinal fluid[J]. Journal of Chromatography B, 2007, 848: 323-328.

[3] Gatti MG, Gioia P, Andreatta G. HPLC-fluorescence determination of amino acids in pharmaceuticals after pre-column derivatization with phanquinone [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004, 35: 339-348.

[4] 王—红,冯家力,潘振球,等. 液相色谱-质谱/质谱联用技术分析 18 种游离氨基酸[J]. 中国卫生检验杂志,2006, 16(2):161-163.

[5] 渠琛玲,张寒琦,张华蓉,等. 电喷雾质谱法研究人参皂苷 Rd 与生物分子的相互作用[J]. 分析化学,2009,37(1): 294.

(收稿日期:2010-04-07)

图 1 氨基酸室间抽样对比

(上接第 2050 页)

Manual versus computer aulomated semen analyses part 1 comparison of counting chambers[J]. Fertilsteril, 1996, 65(1):150-155.

[2] Davis RO,Boyers SP. The role of digital image analysis in reproductive biology[J]. Arch Path Lab Med,1992,116: 351.

[3] 张华,陈昭典,汪超军,等. 计算机辅助精子运动轨迹机静

态图质量分析[J]. 中华男科学,2001,7(5):338-340.

[4] 胡毓安,陆金春,吕年青,等. 4 种精子计数方法的比较 [J]. 中华男科学,2006,12(3):222-227.

[5] Jeqier AM,Komber U. Errors inherent in the performance of a routine semen analysis[J]. Br JU Rol,1983,55(4): 434-436.

(收稿日期:2010-04-08)