

LCMS-8050 CL 检测人血清中全谱氨基酸

LCMSMS-463

摘要： 本文利用岛津临床用 LCMS-8050 CL 三重四极杆液质联用系统建立了人血清 42 种氨基酸同时分析的方法。该方法采用内标法定量，42 种氨基酸线性相关系数均在 0.993 以上；不同浓度混合标准溶液处理后上机分析，连续进样 6 次保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别在 0.04~1.26% 和 0.59~8.47% 之间；人血清样品中添加两个不同浓度的标准溶液，加标回收率在 76.5~119.4% 之间，平行处理三次的相对标准偏差在 0.60~8.70% 之间，方法准确可靠，可用于实际样品的检测。

关键词： LCMS-8050 CL 三重四极杆液质联用系统 血清 氨基酸

氨基酸是生命体的三大营养物质之一，是组成酶和蛋白质的基本单位。作为生物小分子，体内的游离氨基酸对生理功能和临床诊断具有重要意义。生理状态下，体内的氨基酸处于一个平衡状态。氨基酸的失衡是众多疾病的诱因或表现形式，体内氨基酸代谢紊乱可分为两类：一类是与氨基酸代谢有关的器官如肝、肾等出现严重病变导致的继发性氨基酸代谢紊乱；另一类是由于参与氨基酸代谢的酶或其他蛋白因子缺乏引起的遗传性疾病。

氨基酸检测可以作为健康诊断或疾病筛查的重要

手段，可以为预防疾病、改善身体营养状态和营养补充提供参考标准。氨基酸检测通过对人体内氨基酸的精确检测，揭示人体内详细的氨基酸代谢状况，从而从不同的代谢路径提示人体的健康状况。目前，分析氨基酸含量的检测方法有高效液相色谱法，气相色谱法，毛细管电泳法，光谱法等。但血清中生物基质复杂，上述方法很难对血清中氨基酸进行精确定量。

本文采用岛津临床用三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 CL，建立了人血清中 42 种氨基酸的分析方法，该方法灵敏度高、分析速度快，供相关人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-8050 CL 三重四极杆液质联用系统。具体配置为 LC-30AD CL×2 输液泵，DGU-20A₅CL 在线脱气机，SIL-30ACMP CL 自动进样器，CTO-30A CL 柱温箱，CBM-20A CL 系统控制器，LCMS-8050 CL 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱：InertSustain AQ-C18 (100 mm×2.1 mm I.D., 1.9 μm, Shimadzu SGLC P/N: 5020-89939)

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水； B 相 - 乙腈

流速：0.5 mL/min

柱温：45°C

进样量：1 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 2%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
4.00	泵	B.Conc	5
10.00	泵	B.Conc	22.5
11.00	泵	B.Conc	25
11.50	泵	B.Conc	95
12.00	泵	B.Conc	95
12.10	泵	B.Conc	2
15.00	控制器	Stop	

液相色谱条件:

离子源: ESI (+)

雾化气流速: 3 L/min

DL 温度: 250°C

接口温度: 300°C

MRM 参数: 见表 2

接口电压: 1.0 kV

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

干燥气流速: 10.0 L/min

加热气流量: 10.0 L/min

表 2 MRM 参数

中文名	简写	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
肌氨酸	Sar	260.1	171.1	-19	-15	-16
β- 丙氨酸	b-Ala	260.1	171.1	-19	-15	-16
丙氨酸	Ala	260.1	171.1	-19	-15	-16
丙氨酸内标	Ala-IS	264.1	171.1	-19	-19	-16
丝氨酸	Ser	276.1	171.2	-19	-19	-16
脯氨酸	Pro	286.1	171.1	-21	-13	-16
脯氨酸内标	Pro-IS	291.1	171.2	-21	-21	-16
缬氨酸	Val	288.2	171.0	-21	-13	-16
缬氨酸内标	Val-IS	296.2	171.0	-15	-21	-16
苏氨酸	Thr	290.2	171.1	-20	-26	-16
羟基脯氨酸	Hyp	302.1	171.2	-22	-22	-16
异亮氨酸	Ile	302.1	171.2	-22	-11	-16
亮氨酸	Leu	302.1	171.2	-22	-11	-16
亮氨酸内标	Leu-IS	305.1	171.2	-22	-22	-16
天冬酰胺	Asn	303.1	171.1	-22	-21	-16
谷氨酸	Glu	318.1	171.0	-17	-23	-16
蛋氨酸	Met	320.1	171.2	-17	-15	-17
蛋氨酸内标	Met-IS	323.1	171.2	-17	-22	-17
组氨酸	His	326.1	156.0	-23	-12	-26
苯丙氨酸	Phe	336.1	171.0	-18	-13	-17
苯丙氨酸内标	Phe-IS	342.1	171.2	-25	-22	-17

瓜氨酸	Cit	346.1	171.2	-26	-23	-17
瓜氨酸内标	Cit-IS	348.1	171.0	-26	-23	-17
酪氨酸	Tyr	352.1	171.2	-26	-15	-17
酪氨酸内标	Tyr-IS	358.0	171.2	-25	-24	-15
乙醇胺	Etn	232.1	171.2	-17	-20	-17
赖氨酸	Lys	244.1	171.2	-30	-21	-16
羟基赖氨酸	Hyl	252.1	171.2	-30	-21	-10
γ -氨基丁酸	GABA	274.1	171.1	-20	-15	-16
β -氨基异丁酸	b-Aiba	274.1	171.1	-20	-15	-16
α -氨基正丁酸	a-ABA	274.1	171.1	-20	-13	-16
高丝氨酸	Hse	289.6	171.1	-20	-25	-17
牛磺酸	Tau	296.2	171.2	-15	-20	-16
哌啶酸	Pip	300.0	171.2	-21	-22	-28
天冬氨酸	Asp	304.1	171.1	-21	-22	-16
谷氨酰胺	Gln	317.1	171.2	-23	-25	-16
α -氨基己二酸	Aad	332.1	171.0	-17	-25	-29
3-甲基组氨酸	3MHis	340.1	171.2	-24	-18	-16
1-甲基组氨酸	1MHis	340.1	171.2	-24	-18	-16
精氨酸	Arg	345.1	171.2	-18	-25	-17
精氨酸内标	Arg-IS	350.1	171.1	-18	-25	-17
色氨酸	Trp	375.1	171.0	-26	-15	-16
犬尿氨酸	Kyn	379.1	171.1	-20	-29	-28
肌肽	Car	397.1	227.0	-20	-15	-23
甘氨酸	Gly	246.1	171.1	-18	-20	-16
甘氨酸内标	Gly-IS	249.1	171.0	-18	-20	-16
半胱氨酸	Cys	292.1	171.2	-11	-19	-17
同型半胱氨酸	Hcy	306.1	171.1	-16	-21	-16
鹅肌肽	Ans	411.2	241.1	-16	-19	-24
胱硫醚	Cysthi	282.1	171.1	-20	-33	-16
肌酸酐	Creatinine	226.6	171.1	-26	-17	-10
鸟氨酸	Orn	237.1	171.1	-15	-25	-15
鸟氨酸内标	Orn-IS	240.1	171.1	-15	-25	-15

1.3 标准溶液的配置

取氨基酸标准贮备液，用 50% 甲醇做溶剂逐级稀释为 0.5、1、2.5、5、10、20、50、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$ (犬尿酸和 α -氨基己二酸浓度为 0.05、0.1、0.25、0.5、1、2、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 的标准系列工作溶液，实验中也可采用 4%BSA 作为替代血清基质来配置标准系列工作溶液，采用同位素内标的方式绘制校准曲线对定量结果没有太大影响。

1.4 衍生化试剂及缓冲液的配置

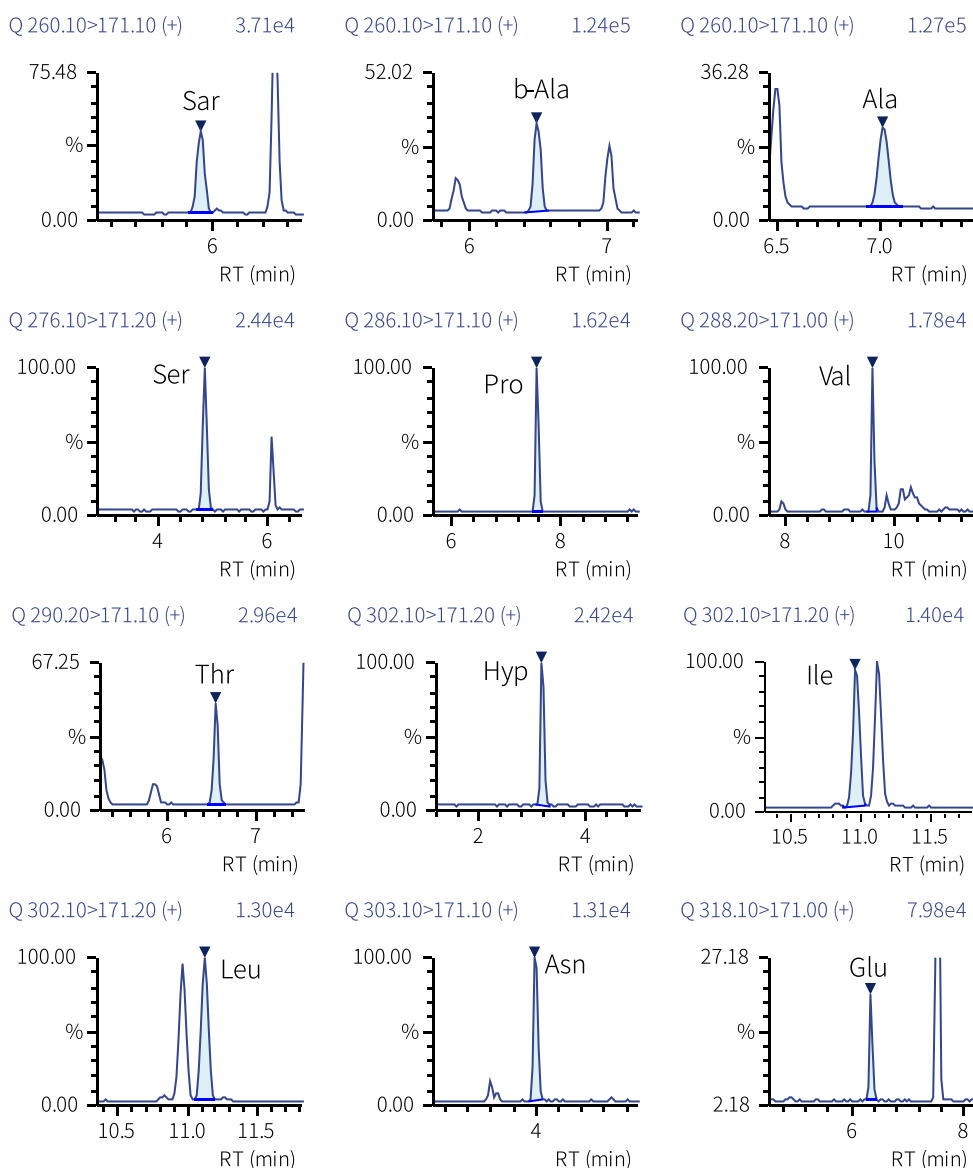
衍生化试剂为 3 mg/mL 的 6-氨基喹啉基 -N-琥珀酰 - 亚胺基甲酸酯乙腈溶液，缓冲液为 PH 8.9 左右的硼酸盐缓冲液。

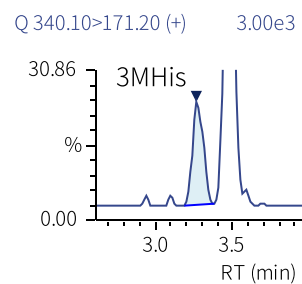
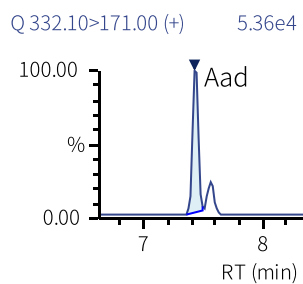
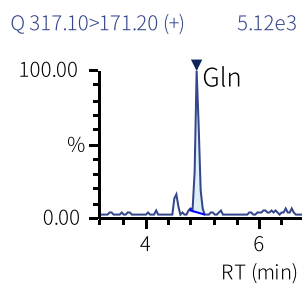
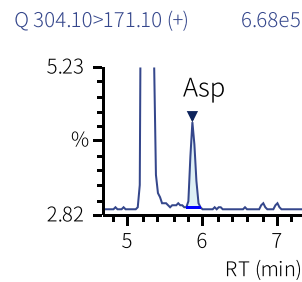
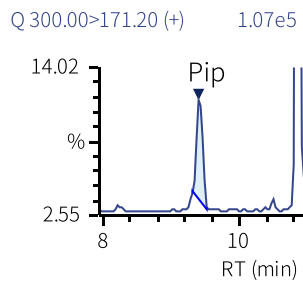
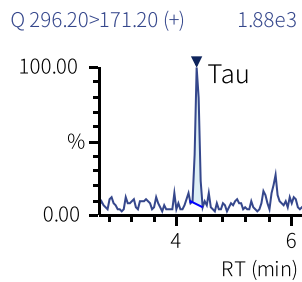
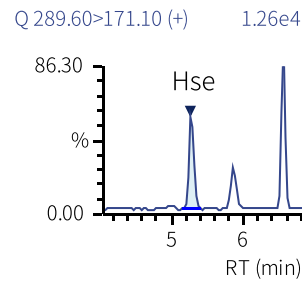
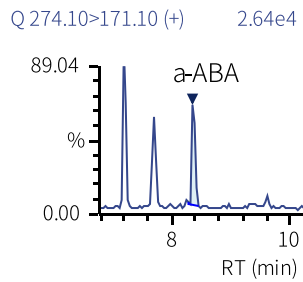
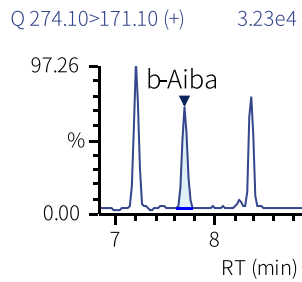
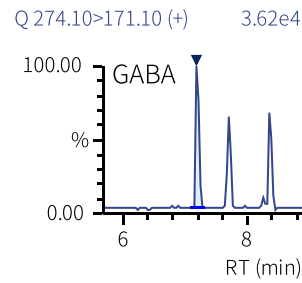
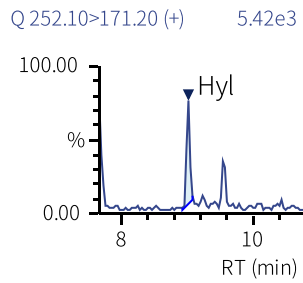
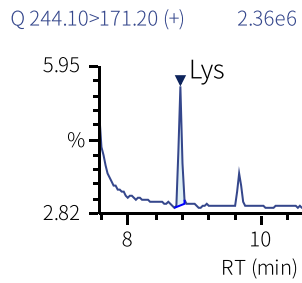
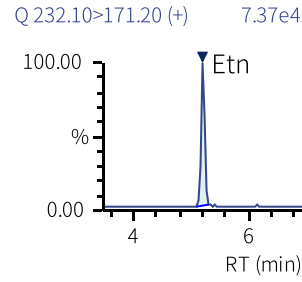
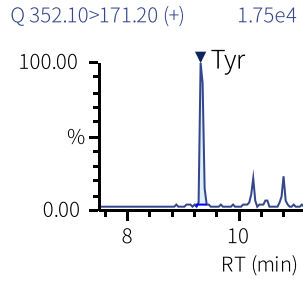
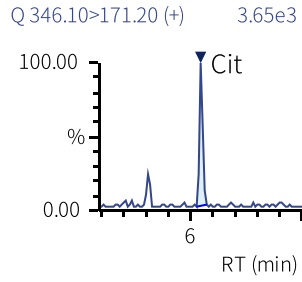
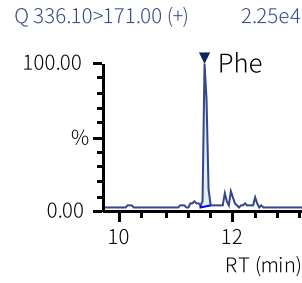
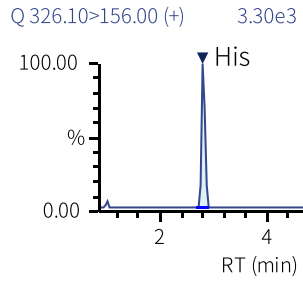
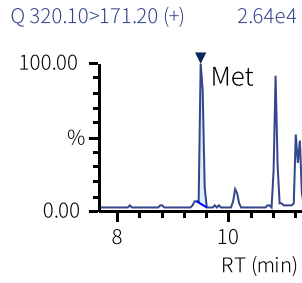
1.5 样品前处理方法

取 20 μL 标准品或血清样品，加入 15 μL 内标工作液，再加入 15 μL 二硫代苏糖醇 (0.1M)，涡旋混匀静置 15 分钟；再加入 50 μL 乙腈，混匀后 13000 rpm 离心 10 分钟；取 10 μL 上清，加入 70 μL 硼酸盐缓冲液，再加入 20 μL 衍生化试剂，涡旋混匀 55 $^{\circ}\text{C}$ 衍生 10 分钟后，上样分析。

■ 结果与讨论

2.1 标准曲线最低点 MRM 色谱图





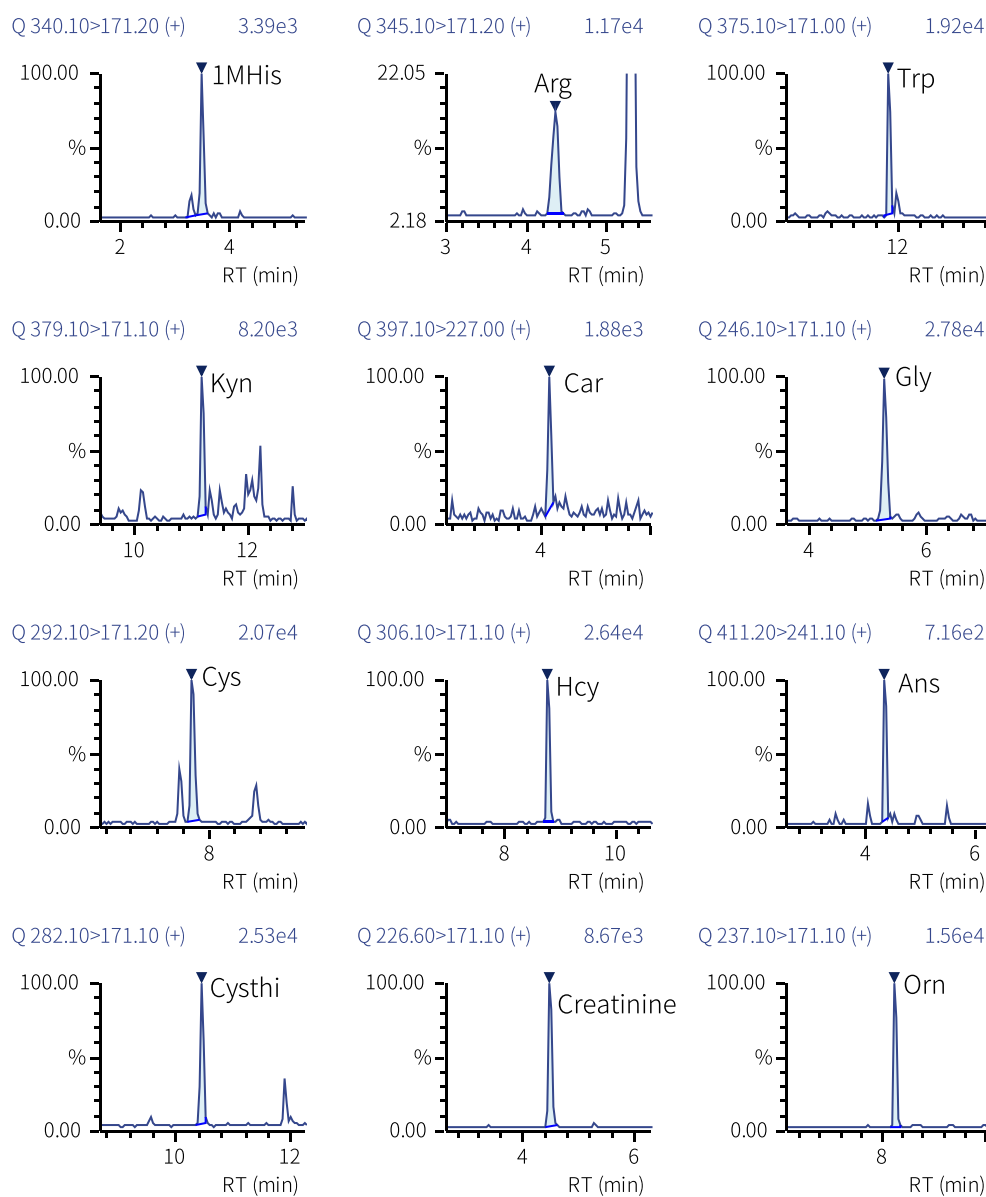


图 1 标准曲线最低点 MRM 色谱图

2.2 线性范围

按照 1.3 配制成各浓度标准溶液，参考 1.5 的前处理流程，处理后直接上样分析，以内标法绘制标准曲线，曲线结果如下表 3 所示，所得校准曲线线性关系良好，线性相关系数在 0.993 以上，准确度在 85.0%-111.7% 之间。

表 3 标准曲线结果

化合物	线性方程	线性范围(μmol/L)	相关系数	准确度 (%)
Sar	$Y = (0.0432610)X + (0.00342680)$	0.5-400	0.998	95.7-107.9
b-Ala	$Y = (0.0552166)X + (0.0250543)$	0.5-100	0.997	89.4-108.9
Ala	$Y = (0.0440845)X + (0.0118237)$	0.5-400	0.998	95.6-105.7
Ser	$Y = (0.0214956)X + (0.00637183)$	1-400	0.998	93.3-109.9
Pro	$Y = (0.0403779)X + (0.00189372)$	0.5-400	0.999	95.4-102.5
Val	$Y = (0.0240905)X + (0.00168934)$	0.5-400	0.999	96.1-105.2
Thr	$Y = (0.0255789)X + (0.00530432)$	0.5-400	0.998	90.7-106.7
Hyp	$Y = (0.0379659)X + (0.00138096)$	1-400	0.998	92.1-105.7
Ile	$Y = (0.0159381)X + (0.00139644)$	0.5-400	0.999	95.8-103.2
Leu	$Y = (0.0166803)X + (0.00132907)$	0.5-400	0.999	95.9-105.8
Asn	$Y = (0.0233500)X + (0.00228741)$	1-400	0.998	90.7-105.5
Glu	$Y = (0.0360494)X + (0.00247521)$	0.5-400	0.999	93.8-104.5
Met	$Y = (0.0362803)X + (0.00779599)$	0.5-400	0.998	95.4-104.8
His	$Y = (0.00109492)X + (-0.000831514)$	5-400	0.997	92.5-108.2
Phe	$Y = (0.0249426)X + (0.00183467)$	0.5-400	0.999	94.3-105.0
Cit	$Y = (0.0500451)X + (0.00534449)$	0.5-200	0.998	91.0-108.2
Tyr	$Y = (0.0330823)X + (0.00241715)$	0.5-400	0.999	94.0-105.0
Etn	$Y = (0.109143)X + (0.0471809)$	0.5-100	0.995	86.1-110.8
Lys	$Y = (0.0242765)X + (0.00703587)$	2.5-400	0.997	91.2-113.1
Hyl	$Y = (0.00805908)X + (0.000649421)$	0.5-200	0.997	90.5-108.0
GABA	$Y = (0.0693604)X + (0.0101033)$	0.5-100	0.995	85.0-111.4
b-Aiba	$Y = (0.0589655)X + (0.00327171)$	0.5-100	0.998	90.7-105.1
a-ABA	$Y = (0.0380617)X + (0.00168270)$	0.5-400	0.999	95.7-105.1
Hse	$Y = (0.0169864)X + (0.00367987)$	0.5-200	0.997	89.6-110.8
Tau	$Y = (0.00487792)X + (0.000847976)$	0.5-400	0.998	94.8-111.7
Pip	$Y = (0.00388923)X + (0.0141811)$	1-100	0.995	86.0-108.5
Asp	$Y = (0.0231779)X + (0.00385287)$	0.5-400	0.999	95.3-106.8
Gln	$Y = (0.0171393)X + (-0.000223585)$	0.5-400	0.997	93.1-111.6
Aad	$Y = (0.118180)X + (0.0310810)$	0.25-10	0.993	86.0-109.5
3MHis	$Y = (0.000224737)X + (-0.000132848)$	5-200	0.998	97.1-105.2
1MHis	$Y = (0.000862714)X + (-0.000161549)$	5-200	0.997	95.1-108.6
Arg	$Y = (0.0565411)X + (0.00181589)$	2.5-400	0.996	88.1-109.4
Trp	$Y = (0.0389541)X + (0.00267096)$	0.5-400	0.998	94.0-110.8
Kyn	$Y = (0.00179981)X + (0.000473128)$	0.5-10	0.999	96.9-104.0
Car	$Y = (0.000870364)X + (-0.000189326)$	2.5-100	0.998	92.8-105.8
Gly	$Y = (0.942670)X + (0.396402)$	0.5-400	0.997	88.5-109.2
Cys	$Y = (0.0528492)X + (0.00276025)$	0.5-200	0.998	92.1-104.9

Hcy	$Y = (0.139983)X + (0.0133104)$	0.5-100	0.997	90.7-110.8
Ans	$Y = (0.00108482)X + (-5.65792e-005)$	0.5-100	0.997	90.8-111.2
Cysthi	$Y = (0.0301590)X + (0.00533457)$	0.5-100	0.997	87.3-110.3
Creatinine	$Y = (0.00464356)X + (0.00114362)$	2.5-400	0.997	90.2-111.9
Orn	$Y = (0.0578990)X + (0.0184991)$	0.5-400	0.996	88.1-109.5

2.3 重复性考察

不同浓度混合标准溶液，按照 1.5 中的前处理方法，处理后上机分析，每个浓度的样品连续进样 6 次，考察保留时间和峰面积的重复性，结果如下表 4 所示。保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别在 0.04~1.26% 和 0.59~8.47% 之间，仪器精密度良好。

表 4 重复性测试 (n=6)

化合物	10 $\mu\text{mol/L}$		50 $\mu\text{mol/L}$	
	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
Sar	0.23	3.37	0.14	1.44
b-Ala	0.15	2.48	0.06	1.52
Ala	0.15	3.69	0.06	1.01
Ser	0.37	3.00	0.23	2.16
Pro	0.14	2.75	0.06	2.13
Val	0.12	3.66	0.06	1.67
Thr	0.18	3.40	0.07	1.47
Hyp	0.91	4.13	0.52	2.33
Ile	0.12	2.03	0.05	1.24
Leu	0.12	1.96	0.05	0.59
Asn	0.49	2.23	0.36	2.04
Glu	0.18	3.06	0.09	1.28
Met	0.12	2.15	0.05	1.48
His	0.94	5.25	0.98	3.69
Phe	0.11	1.65	0.05	0.61
Cit	0.21	2.68	0.13	2.35
Tyr	0.12	3.17	0.04	0.99
Etn	0.28	2.16	0.12	1.28
Lys	0.12	2.62	0.05	0.83
Hyl	0.13	2.61	0.05	2.32
GABA	0.14	2.45	0.06	1.27
b-Aiba	0.14	2.51	0.06	1.50
a-ABA	0.12	2.16	0.06	0.82
Hse	0.36	2.14	0.18	1.16
Tau	0.45	3.79	0.27	1.99
Pip	0.12	3.64	0.05	3.62

Asp	0.22	4.02	0.11	1.76
Gln	0.46	2.93	0.23	0.99
Aad	0.13	2.39	0.06	1.77
3MHis	1.26	4.74	0.82	5.72
1MHis	0.91	8.47	0.77	2.29
Arg	0.62	6.36	0.51	3.37
Trp	0.10	1.38	0.04	0.89
Kyn	0.11	4.13	0.05	1.82
Car	0.67	4.85	0.40	2.76
Gly	0.36	2.27	0.17	1.57
Cys	0.13	3.62	0.06	1.72
Hcy	0.12	4.23	0.06	1.77
Ans	0.40	6.11	0.17	2.00
Cysthi	0.13	1.84	0.06	0.74
Creatinine	0.39	4.85	0.18	4.90
Orn	0.13	2.33	0.05	1.25

2.4 加标回收实验

人血清样品中添加两个不同浓度的标准溶液，每个浓度的加标样品平行处理三份，结果如表 5 所示，两个不同浓度加标回收率在 76.5~119.4% 之间，平行处理三次的相对标准偏差在 0.60~8.70% 之间，方法准确可靠。

表 5 加标回收实验结果 (n=3)

化合物	浓度 (μmol/L)	回收率 %	重复性 RSD%	浓度 (μmol/L)	回收率 %	重复性 RSD%
Sar	10	111.3	3.52	50	111.6	2.15
b-Ala	10	108.6	2.26	50	104.6	3.90
Ala	50	96.2	2.89	200	93.6	3.83
Ser	50	101.4	1.71	200	106.6	3.09
Pro	50	101.1	2.16	200	102.6	4.67
Val	50	99.6	1.51	200	101.3	2.81
Thr	50	99.2	3.20	200	95.1	3.09
Hyp	10	100.8	3.39	50	99.9	4.25
Ile	50	101.5	2.29	200	99.3	4.20
Leu	50	98.3	0.93	200	93.2	3.21
Asn	10	103.1	3.20	50	105.1	1.44
Glu	50	99.0	2.54	200	95.2	2.18
Met	10	97.7	1.12	50	97.7	1.27
His	10	99.7	2.51	50	109.8	5.05
Phe	50	99.8	0.61	200	100.3	2.81
Cit	10	98.7	2.63	50	98.9	1.56
Tyr	50	101.2	1.35	200	102.3	3.60
Etn	10	99.8	3.56	50	98.4	2.70

Lys	50	106.5	4.61	200	106.5	4.98
Hyl	10	106.3	2.84	50	117.1	6.08
GABA	10	111.5	2.64	50	103.1	3.57
b-Aiba	10	111.8	1.27	50	104.9	3.32
a-ABA	10	102.1	1.19	50	103.9	2.29
Hse	10	98.8	5.62	50	97.4	2.76
Tau	50	101.7	2.24	200	104.9	3.83
Pip	10	103.2	6.42	50	83.3	8.74
Asp	50	106.7	2.08	200	98.1	3.01
Gln	50	101.4	3.24	200	102.0	3.19
Aad	1	91.5	3.01	5	91.2	5.05
3MHis	10	119.2	6.73	50	119.4	7.23
1MHis	10	111.7	4.00	50	112.3	3.53
Arg	50	98.6	4.90	200	103.5	7.18
Trp	50	93.9	7.42	200	90.2	7.65
Kyn	1	104.6	4.45	5	101.7	3.98
Car	10	107.8	7.71	50	117.6	4.00
Gly	50	99.8	2.77	200	96.5	4.88
Cys	10	98.0	1.65	50	92.6	4.09
Hcy	10	88.0	2.81	50	76.5	2.46
Ans	10	102.4	3.49	50	114.0	3.42
Cysthi	10	102.8	8.15	50	108.1	2.38
Creatinine	10	97.4	2.00	50	96.6	2.87
Orn	50	100.1	2.29	200	94.7	5.61

■ 结论

本实验建立了一种使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30A CL 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用测定人血清中全谱氨基酸的方法，采用内标法定量，灵敏度高、分析速度快，15 min 即可完成 42 种氨基酸同时分析。人血清样品中两个不同浓度的加标回收率在 76.5~119.4% 之间，平行处理三次的相对标准偏差在 0.60~8.70% 之间，方法准确可靠，该方法对氨基酸代谢紊乱相关疾病的临床判断、治疗管理和生理评估具有辅助诊断的意义，供相关人员参考。

岛津应用云

