

# 高效液相色谱三重四极杆质谱法测定人血清中游离氨基酸含量

## LCMSMS-418

**摘要：**本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 CL 及氨基酸检测试剂盒（高效液相色谱 - 串联质谱法），建立了人血清中 20 种游离氨基酸同时测定的方法。使用试剂盒的内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法专属性良好，标准曲线相关系数均大于 0.996，准确度及精密度均满足试剂盒要求。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。

**关键词：**LCMS-8040 CL 游离氨基酸 血清

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。血清中氨基酸的浓度取决于内源性蛋白质的释放与各组织利用之间的动态平衡。当这种动态平衡被打破时，就会出现氨基酸浓度的改变，表现为氨基酸代谢紊乱，研究发现血清中氨基酸水平可作为多种疾病的监控指标。目前，文献报道血清中游离氨基酸含量的检测方法大多需要衍生化，而采用非衍生化方法测定人体内的游离

氨基酸，由于受到氨基酸色谱不保留及血清复杂基质等因素影响，报道较少。

本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 CL 及氨基酸检测试剂盒（高效液相色谱 - 串联质谱法，北京华大吉比爱生物技术有限公司），建立了人血清中游离氨基酸含量测定方法，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，供相关人员参考。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津临床用超高效液相色谱与三重四极杆质谱仪联用系统。具体配置为 LC-20ADXR CL×2（输液泵），DGU-20A5R CL（在线脱气机），SIL-20ACXR CL（自动进样器），CTO-20ACXR CL（柱温箱），CBM-20A CL 系统控制器，LCMS-8040 CL 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：氨基酸专用色谱柱（试剂盒提供）

流动相：流动相 A 流动相 B（试剂盒提供）

流速：0.4 mL/min

柱温：40°C

进样量：10 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
0.50	Pumps	Pump B Conc.	2
1.50	Pumps	Pump B Conc.	10
3.50	Pumps	Pump B Conc.	35
3.51	Pumps	Pump B Conc.	95
5.50	Pumps	Pump B Conc.	95
5.51	Pumps	Pump B Conc.	2
9.00	Controller	Stop	

质谱条件:

分析仪器: LCMS-8040 CL

DL 温度: 250°C

离子源: ESI (+)

加热模块温度: 400°C

雾化气流速: 3.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

干燥气流速: 15.0 L/min

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
Ala	90.0	44.0	-11	-13	-17
Ala-IS	94.1	48.0	-11	-13	-17
Arg	175.1	70.1	-23	-24	-20
Arg-IS	180.0	75.0	-23	-24	-20
Asn	133.1	74.0	-13	-18	-30
Asn-IS	136.1	75.1	-13	-18	-30
Asp	134.0	74.0	-16	-14	-30
Asp-IS	137.1	75.0	-16	-14	-30
Cit	176.1	159.0	-22	-12	-15
Cit-IS	183.2	166.1	-22	-12	-15
Gln	147.1	130.0	-18	-14	-22
Gln-IS	152.1	135.1	-18	-14	-22
Glu	148.1	84.3	-18	-17	-14
Glu-IS	153.1	89.1	-18	-17	-14
His	156.1	110.1	-20	-15	-18
His-IS	159.1	113.1	-20	-15	-18
Ile	132.0	86.0	-16	-11	-14
Ile-IS	142.1	96.1	-16	-11	-14
Leu	132.1	86.1	-18	-12	-14

Leu-IS	135.1	89.0	-18	-12	-14
Lys	147.1	84.1	-16	-18	-14
Lys-IS	151.2	88.0	-16	-18	-14
Met	150.0	61.0	-15	-22	-24
Met-IS	153.2	64.1	-15	-22	-24
Orn	133.1	70.2	-18	-18	-28
Orn-IS	139.1	76.1	-18	-18	-28
Phe	166.1	120	-10	-13	-20
Phe-IS	175.1	128.1	-10	-13	-20
Pro	116.0	70.1	-11	-16	-28
Pro-IS	122.0	75.0	-11	-16	-28
Ser	106.3	60.0	-14	-12	-22
Ser-IS	110.1	63.0	-14	-12	-22
Thr	120.1	74.0	-15	-12	-30
Thr-IS	124.1	77.0	-15	-12	-30
Trp	205.1	188.1	-10	-10	-18
Trp-IS	210.1	192.1	-10	-10	-18
Tyr	182.1	136.1	-11	-13	-22
Tyr-IS	186.1	140.1	-11	-13	-22
Val	118.1	72.1	-11	-12	-29
Val-IS	126.2	80.1	-11	-12	-29

### 1.3 标准品、质控品及样品制备

标准品共 7 个浓度点、质控品共 2 个浓度点及血清样本，按说明书前处理步骤进行处理，进样体积 10  $\mu$ L。

## ■ 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图

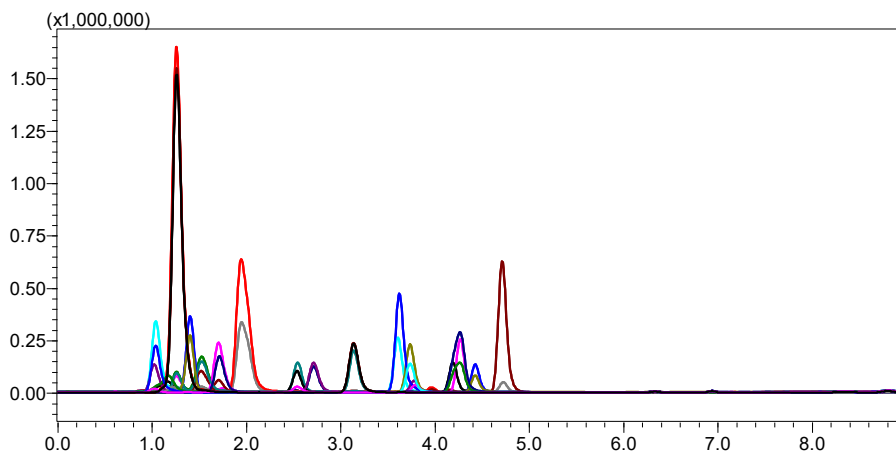


图 1 标准曲线最低浓度点色谱图

## 2.2 线性关系

采用内标法建立标准曲线结果如表 3 所示。结果显示，20 种氨基酸在线性浓度范围内线性相关性良好，相关系数均在 0.996 以上。

表 3. 标准曲线结果 (权重为  $1/C^2$ )

目标物	线性方程	线性范围 ( $\mu\text{mol/L}$ )	相关系数	准确度 (%)
Ala	$Y = (0.00864620)X + (0.142174)$	9.4-602.7	0.999	90.5-106.6
Arg	$Y = (0.0754389)X + (0.234874)$	3.3-208.7	0.997	94.8-112.2
Asn	$Y = (0.0397093)X + (-0.0226878)$	6.8-434	0.999	94.9-108.5
Asp	$Y = (0.291474)X + (0.633749)$	21.9-1403.8	0.999	94.7-105
Cit	$Y = (0.153626)X + (0.0633004)$	1.7-106.7	0.999	91.9-109.6
Gln	$Y = (0.0158814)X + (-0.0450356)$	1.4-88.8	0.999	92.7-111.1
Glu	$Y = (0.0262527)X + (0.406151)$	8-515.1	0.999	92.4-109.4
His	$Y = (0.192924)X + (0.487882)$	17.5-1121.2	0.998	91.9-104.3
Ile	$Y = (0.0749449)X + (0.147790)$	8.1-516	0.996	91.5-107.2
Leu	$Y = (0.0966912)X + (0.405584)$	2-127	0.999	93.8-107.2
Lys	$Y = (0.0673522)X + (0.462227)$	3.6-230.7	0.999	93.6-108.5
Met	$Y = (0.139050)X + (0.172242)$	11.7-745.9	0.999	93.7-110.3
Orn	$Y = (0.122811)X + (0.0583404)$	4-254.9	0.999	92.3-109.6
Phe	$Y = (0.0982378)X + (0.276017)$	1.7-109.4	0.998	93-108.8
Pro	$Y = (0.181969)X + (0.957810)$	8.9-571	0.999	92.9-106.5
Ser	$Y = (0.0410516)X + (0.263398)$	2.6-169.1	0.998	90.9-106
Thr	$Y = (0.0309626)X + (0.193447)$	4-254	0.998	93.3-107.8
Trp	$Y = (0.0182492)X + (0.0132503)$	5.2-333	0.999	92.5-108.2
Tyr	$Y = (0.0844607)X + (0.130085)$	2.9-188.3	0.999	91.9-110.7
Val	$Y = (0.0863544)X + (0.530067)$	2-126.2	0.999	91.5-108

## 2.3 质控样本准确度及精密度考察

按试剂盒的前处理方法和 1.2 中的分析条件对试剂盒中的高低质控品进行分析，每个样品平行处理分析 6 次，质控品的准确度结果如表 4 所示，结果显示质控品测定结果与理论值接近，完全符合试剂盒质控品准确度 80%~120% 的要求。低浓度质控品 20 种氨基酸测定结果准确度在 89.3%~118.7% 之间，高浓度质控品 20 种氨基酸测定结果准确度在 83.8%~117.3% 之间。低浓度质控品 20 种氨基酸测定结果（平行处理 6 份）RSD 在 1.6%~8.8% 之间，高浓度质控品 20 种氨基酸测定结果（平行处理 6 份）RSD 在 0.5%~7.9% 之间。

表 4 质控准确度及精密度考察结果 (n=6)

目标物	LQC 理论值 ( $\mu\text{mol/L}$ )	LQC 回收率 (%)	LQC 回收率 RSD (%)	HQC 理论值 ( $\mu\text{mol/L}$ )	HQC 回收率 (%)	HQC 回收率 RSD (%)
Ala	155.6	95.5	3.8	653.6	94.4	1.2
Arg	24.7	101.5	2.9	101.7	107.0	3.2
Asn	13.4	95.6	4.0	93.7	103.5	2.0
Asp	14.5	89.3	4.7	45.5	84.3	1.8
Cit	9.4	115.9	3.8	35.6	116.8	3.7
Gln	139.9	108.4	6.0	769.8	117.3	3.8
Glu	46.5	107.5	8.4	261.6	83.8	6.4
His	7.5	96.3	7.7	79.5	97.7	3.8
Ile	26.5	108.5	8.8	112.9	102.2	7.9
Leu	42.9	90.0	3.5	153.4	91.1	3.5
Lys	47.5	113.3	4.1	254.6	110.1	3.2
Met	9	118.7	3.9	45.4	106	4.6
Orn	18.1	102.3	2.5	119	100.7	1.2
Phe	27.8	99.5	3.4	93.1	89.3	3.5
Pro	75.6	92.4	1.6	335.6	101.2	7.3
Ser	42.1	108.1	4.9	234.2	88.2	3.4
Thr	38.1	115.8	3.5	241.0	94.6	2.7
Trp	15.3	111.2	4.6	65.6	100.7	0.5
Tyr	26.9	104.3	7.2	101.7	96.6	7.5
Val	69.4	106.3	7.6	287.8	98.2	4.6

## 2.4 临床样品测定结果

取 6 批次血清样品, 按试剂盒的前处理方法及 1.2 中的分析条件进行测定, 谱图见图 2, 结果见表 5, 该试剂盒配套 LCMS-8040 CL 使用可以满足临床检测需求。

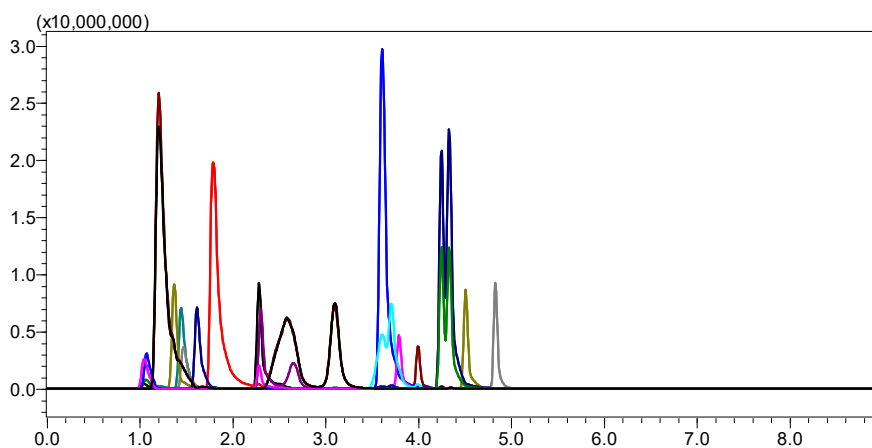


图 2 Sample-001 谱图

表 5 人血清临床样品检测结果 (μmol/L)

氨基酸	Sample-001	Sample-002	Sample-003	Sample-004	Sample-005	Sample-006
Ala	114.1	84.4	78.9	123.7	124.4	100.4
Arg	12.1	19.8	18.7	13.8	14.5	9.3
Asn	13.6	12.4	12.1	13.8	14.5	9.5
Asp	9.8	5.8	7.1	10.6	11.3	6
Cit	8.7	6.2	7.3	9.1	9.8	3.5
Gln	62.1	51.9	45.2	68.4	69.1	36.9
Glu	63.4	46	64.1	72.8	73.5	44.9
His	24.4	20.3	20.5	26.1	26.8	16.3
Ile	19.6	17.2	12.1	21.8	22.5	16.1
Leu	42.4	26.7	21	37.4	38.1	23.1
Lys	57.7	39.3	41.6	65.1	65.8	34
Met	8.3	5.3	6.4	9.1	9.8	4.5
Orn	46.8	29.1	41.1	51	51.7	21.2
Phe	34.7	15.4	17.7	37.9	38.6	20.3
Pro	41.9	44.9	34.5	49	49.7	26.7
Ser	45.1	30.1	30.7	46.6	47.3	27.1
Thr	26.2	26.1	31.6	28.5	29.2	15.4
Trp	16.4	12.4	13.3	19	19.7	16.4
Tyr	18.3	15.3	16.9	19.9	20.6	13.3
Val	69	51.1	43	78.1	78.8	52.9

## 结论

本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 CL 及氨基酸检测试剂盒（液相色谱 - 串联质谱法，北京华大吉比爱生物技术有限公司），建立了人血清中 20 种游离氨基酸同时测定的方法。使用试剂盒的内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性良好，标准曲线相关系数均大于 0.996，准确度及精密度均满足试剂盒要求。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。