

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定血清和尿液中氨基酸含量

LCMSMS-279

摘要： 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定血清和尿液中氨基酸含量。该方法在 14 min 内完成 20 种氨基酸的分离，分析速度快、重复性好、灵敏度高，适合血清和尿液基质中 20 种氨基酸的高灵敏度快速检测。

关键词： 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪 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作用。传统的游离氨基酸分析采用离子交换色谱分离后，用茚三酮进行柱后衍生化，然后在 570 nm 波长下进行吸光度检测。但是该方法灵敏度低、所需样品量大、分析时间长，给临床检测带来诸多不便。随着现代氨基酸分析技术的发展，质谱作为高选择性和高灵敏度的检测工具，在氨基酸分析中发挥着重要作用。氨基酸分析时为了提高分析检测的灵敏度和分离选择性，常常需要将氨基酸衍生。

为实现临床诊断上快速、高灵敏度和准确测定血清和尿液等基质中氨基酸含量，我们开发出无需衍生的氨基酸 LC-MS/MS 定量方法。该方法采用超高效液相色谱三重四极杆液质联用仪，仅需 14 分钟，即可同时分析 20 种氨基酸。

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱 LCMS-8060 联用，建立了血清和尿液中 20 种氨基酸的液相色谱 - 串联质谱的同时分析方法，供相关人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为：LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A₃ 在线脱气机，SIL-30ACMP 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.82 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

流速：0.35 mL/min

分析仪器：LC-30A 系统

进样体积：1 μL

色谱柱：Discovery HS F5-3, 2.1 mm I.D.×150 mm L.,
3.0 μm

柱温：40°C

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 0%，时间
程序见表 1

B 相 -0.1% 甲酸乙腈

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.40	Pumps	Pump B Conc.	0
3.50	Pumps	Pump B Conc.	25
7.50	Pumps	Pump B Conc.	35
7.60	Pumps	Pump B Conc.	95
10.00	Pumps	Pump B Conc.	95
10.10	Pumps	Pump B Conc.	0
14.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI, 正离子模式

离子喷雾电压: +4.5 kV

雾化气流速: 氮气 3.0 L/min

干燥气流速: 氮气 10 L/min

加热气流速: 空气 10 L/min

碰撞气: 氩气

MRM 参数: 见表 2

碰撞气: 氩气

DL 温度: 300°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 8 ms

延迟时间: 3 ms

表2 MRM参数

化合物名	CAS	MRM 通道(m/z)	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)	
胱氨酸	Cysteine	56-89-3	240.95→151.95*	-11.0	-14.0	-30.0
			240.95→74.0	-11.0	-28.0	-30.0
天冬酰胺	Asparagine	70-47-3	133.00→74.05*	-15.0	-17.0	-29.0
			133.00→87.05	-16.0	-11.0	-17.0
丝氨酸	Serine	302-84-1	106.05→60.05*	-10.0	-13.0	-24.0
			106.05→42.05	-10.0	-24.0	-16.0
天冬氨酸	Aspartic acid	6899-03-2	134.00→74.05*	-10.0	-16.0	-30.0
			134.00→88.00	-10.0	-12.0	-17.0
甘氨酸	Glycine	56-40-6	76.05→30.10*	-10.0	-14.0	-27.0
			76.05→31.00	-11.0	-30.0	-30.0
谷氨酰胺	Glutamine	56-85-9	147.05→84.00*	-10.0	-19.0	-16.0
			147.05→130.00	-10.0	-14.0	-24.0
苏氨酸	Threonine	72-19-5	120.05→74.05*	-11.0	-13.0	-28.0
			120.05→56.05	-10.0	-16.0	-22.0
丙氨酸	Alanine	56-41-7	90.00→44.05*	-16.0	-13.0	-16.0
			90.00→42.85	-16.0	-12.0	-27.0
谷氨酸	Glutamic acid	56-86-0	148.00→84.05*	-10.0	-17.0	-16.0
			148.00→130.00	-10.0	-14.0	-27.0
赖氨酸	Lysine	56-87-1	147.05→84.05*	-10.0	-18.0	-15.0
			147.05→130.05	-10.0	-15.0	-25.0
脯氨酸	Proline	147-85-3	116.10→84.05*	-10.0	-17.0	-26.0
			116.10→130.05	-13.0	-17.0	-10.0
组氨酸	Histidine	71-00-1	156.05→110.10*	-10.0	-15.0	-20.0
			156.05→83.05	-10.0	-26.0	-30.0

精氨酸	Arginine	74-79-3	175.05→70.10*	-12.0	-24.0	-25.0
			175.05→60.05	-10.0	-15.0	-25.0
缬氨酸	Valine	72-18-4	118.05→72.05*	-10.0	-12.0	-28.0
			118.05→55.00	-10.0	-23.0	-20.0
甲硫氨酸	Methionine	63-68-3	150.00→56.05*	-10.0	-18.0	-22.0
			150.00→61.00	-10.0	-25.0	-24.0
酪氨酸	Tyrosine	60-18-4	182.05→91.05*	-10.0	-29.0	-17.0
			182.05→136.05	-10.0	-14.0	-27.0
异亮氨酸	Isoleucine	73-32-5	132.05→86.05*	-16.0	-12.0	-15.0
			132.05→69.10	-15.0	-19.0	-27.0
亮氨酸	Leucine	61-90-5	132.05→86.05*	-17.0	-12.0	-16.0
			132.05→30.10	-14.0	-18.0	-30.0
苯丙氨酸	Phenylalanine	63-91-2	166.00→120.10*	-20.0	-16.0	-20.0
			166.00→103.05	-11.0	-27.0	-19.0
色氨酸	Tryptophan	54-12-6	205.05→188.10*	-10.0	-11.0	-20.0
			205.05→146.05	-10.0	-18.0	-29.0

注：*表示定量离子

1.3 样品前处理

用纯水配制 20 种氨基酸的标准曲线：浓度分别为 0.05 nmol/mL、0.1 nmol/mL、0.5 nmol/mL、1.0 nmol/mL、5.0 nmol/mL、10.0 nmol/mL，配制好的混标直接上机分析。

血清和尿液样品前处理方法：取 500 μ L 血清或尿液样品，在室温下离心 1 分钟 (13000 rpm)，吸取 100 μ L 离心后上清液到新的离心管中，然后加入 300 μ L 有机溶剂 (乙腈/甲醇=1/1)，涡旋使充分混匀，室温下离心 15 分钟 (13000 rpm)，精密吸取上清液 50 μ L，加入 950 μ L 水，涡旋混匀，上机分析。

结果讨论

2.1 标准品分析色谱图

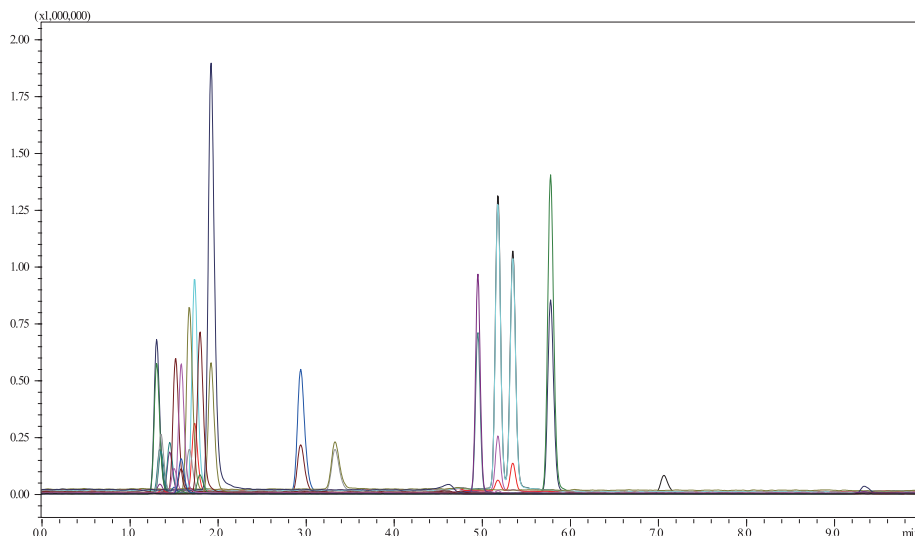


图1 20种氨基酸标准品分析色谱图(1.0 nmol/mL)

2.2 线性范围

将配制的 0.05 nmol/mL、0.1 nmol/mL、0.5 nmol/mL、1.0 nmol/mL、5.0 nmol/mL、10.0 nmol/mL 不同浓度的标准溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，利用外标法制作校准曲线，线性良好，线性方程、相关系数、线性范围和准确度见表 3。

表3 20种氨基酸标准曲线相关参数

名称	校准曲线	相关系数 R	线性范围 (nmol/mL)	准确度%
胱氨酸	$Y = (2.39418e+006)X + (2803.37)$	0.9995	0.05~10	96.9~104.2
天冬酰胺	$Y = (674109)X + (8354.66)$	0.9982	0.05~10	92.6~106.4
丝氨酸	$Y = (701760)X + (15196.9)$	0.9983	0.05~10	90.6~104.4
天冬氨酸	$Y = (1.05010e+006)X + (10160.1)$	0.9991	0.05~10	94.8~105.3
甘氨酸	$Y = (63881.3)X + (5691.56)$	0.9947	0.10~10	85.6~111.8
谷氨酰胺	$Y = (1.59988e+006)X + (10350.4)$	0.9998	0.05~10	98.0~102.1
苏氨酸	$Y = (916938)X + (7945.39)$	0.9997	0.05~10	97.8~101.6
丙氨酸	$Y = (443949)X + (2968.61)$	0.9994	0.05~10	96.9~105.4
谷氨酸	$Y = (2.60514e+006)X + (26101.8)$	0.9993	0.05~10	97.1~105.9
赖氨酸	$Y = (3.60138e+006)X + (-343.719)$	0.9999	0.05~10	98.8~101.2
脯氨酸	$Y = (2.83020e+006)X + (9971.50)$	0.9994	0.05~10	96.4~103.4
组氨酸	$Y = (4.15454e+006)X + (-5438.52)$	0.9986	0.05~10	96.3~105.3
精氨酸	$Y = (7.26286e+006)X + (26278.4)$	0.9994	0.05~10	95.7~104.0
缬氨酸	$Y = (2.93196e+006)X + (14935.0)$	0.9998	0.05~10	97.8~101.1
甲硫氨酸	$Y = (1.28278e+006)X + (-14110.6)$	0.9990	0.05~10	94.3~104.3
酪氨酸	$Y = (2.98264e+006)X + (66239.4)$	0.9996	0.05~10	97.9~104.2
异亮氨酸	$Y = (4.84882e+006)X + (16493.1)$	0.9997	0.05~10	98.5~103.1
亮氨酸	$Y = (3.87797e+006)X + (49194.4)$	0.9992	0.05~10	93.9~103.0
苯丙氨酸	$Y = (5.94487e+006)X + (479910)$	0.9970	0.05~10	88.4~106.1
色氨酸	$Y = (463673)X + (18719.7)$	0.9989	0.05~10	99.3~107.1

2.3 方法精密度和准确度

用纯水溶剂配制 3 个浓度质控样，浓度分别为 LQC 0.15 nmol/mL，MQC 0.8 nmol/mL，HQC 8.0 nmol/mL，每个浓度质控样平行配制 6 份，分别进样，峰面积 RSD 见表 4。

表4 精密度检测结果(n=6)

名称	LQC %	MQC %	HQC %
胱氨酸	2.56	2.39	1.37
天冬酰胺	3.99	2.26	1.25
丝氨酸	3.95	2.64	1.28
天冬氨酸	4.08	2.61	1.40
甘氨酸	3.50	2.00	2.10
谷氨酰胺	3.28	1.19	0.35
苏氨酸	4.72	2.37	1.36
丙氨酸	4.08	2.54	0.80
谷氨酸	4.16	1.32	0.85
赖氨酸	1.83	2.27	1.38
脯氨酸	3.54	1.30	0.90
组氨酸	3.34	1.74	0.82
精氨酸	3.61	2.87	1.53
缬氨酸	3.60	0.50	0.96
甲硫氨酸	3.86	2.00	0.63
酪氨酸	3.92	2.38	3.71
异亮氨酸	0.95	1.40	1.45
亮氨酸	3.47	3.02	1.42
苯丙氨酸	2.78	1.14	1.40
色氨酸	3.43	1.98	1.06

2.4 血清和尿液样本中 20 种氨基酸浓度

按照 1.3 样品前处理流程分别处理 5 个血清样品和 5 个尿液样本，利用以上建立的外标定量方法进行定量，结果见表 4。

表4 血清和尿液样本中20种氨基酸含量(nmol/mL)

名称	血清 1	血清 2	血清 3	血清 4	血清 5	尿液 1	尿液 2	尿液 3	尿液 4	尿液 5
胱氨酸	25.63	32.34	32.86	20.48	24.22	36.18	129.19	25.84	36.08	31.06
天冬酰胺	54.65	42.23	51.79	55.93	43.04	39.82	92.66	74.49	68.34	20.78
丝氨酸	144.65	134.02	133.06	168.75	140.7	113.91	365.36	222.46	205.21	92.7
天冬氨酸	39.11	27.23	29.73	26.29	27.57	5.06	9.14	8.94	8.41	4.35
甘氨酸	281.71	259.87	261	304.65	299.19	312.58	770.64	961.11	612.47	221.56
谷氨酰胺	511.51	453.25	445.93	664.06	572.48	265.65	812.61	367.87	520.05	210.06
苏氨酸	85.62	69.75	95.99	118.17	99.71	69.76	312.74	113.47	103.59	54.26
丙氨酸	458.24	220.29	329.19	330.05	387.66	120.35	523.16	126.08	158.83	112.76
谷氨酸	119.93	46.38	104.71	61.94	49.01	3.24	13.14	6.13	7.62	3.00
赖氨酸	165.78	140.54	161.43	136.45	97.23	127.47	769.62	100.29	149.23	104.19
脯氨酸	216.73	109.9	156.86	194.47	191.61	2.43	23.37	3.74	4.75	2.49
组氨酸	89.92	70.7	68.68	78.29	65.1	390.74	1641.42	629.74	697.74	322.98
精氨酸	49.66	68.48	37.13	80.00	67.4	8.99	66.23	12.28	17.14	7.99
缬氨酸	295.38	198.39	226.93	227.48	178.16	16.53	76.52	21.47	33.07	16.46
甲硫氨酸	30.23	24.91	27.89	35.2	24.65	8.13	39.52	11.73	11.54	4.12
酪氨酸	91.15	56.62	59.47	76.76	64.54	57.25	135.59	51.8	57.54	29.84
异亮氨酸	100.12	55.93	58.78	85.24	58.27	5.63	39.21	11.89	16.92	5.27
亮氨酸	189.08	130.82	142.08	149.22	113.86	16.75	106.99	24.75	35.75	11.01
苯丙氨酸	114.15	84.89	81.87	71.99	87.51	30.78	109.93	31.66	52.64	18.48
色氨酸	588.13	517.03	515.91	490.7	486.64	338.34	953.04	294.08	484.63	197.76

结论

采用岛津公司 LCMS-8060 三重四极杆液质联用仪建立了 20 种氨基酸的外标定量方法, 无需衍生, 前处理方便快捷, 14 分钟即可完成 20 种氨基酸的分析检测。20 种氨基酸的标准曲线相关系数均大于 0.9970, 标准品准确度范围在 85.6~111.8% 之间。利用该定量方法分析检测了 5 个血清样本和 5 个尿液样本中 20 种氨基酸的含量。该方法分析速度快、重复性好、灵敏度高, 适合血清和尿液中 20 种氨基酸的高灵敏度检测。