

## 液相串联质谱系统大队列检测人血浆中肠道代谢衍生物苯乙酰谷氨酰胺

# Big Cohort Detection of Intestinal Metabolic Derivatives Phenylacetylglutamine in human plasma by SCIEX Liquid Chromatography Mass Spectrometry

肖梦晴<sup>1</sup>; 余芳<sup>2</sup>; 龙志敏<sup>1</sup>

Xiao Mengqing<sup>1</sup>, Yu Fang<sup>2</sup>, Long Zhimin<sup>1</sup>

1. SCIEX应用支持中心 (上海); 2. 中南大学湘雅医院神经内科

1. SCIEX Application and Support Center (Shanghai); 2. Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, China

**Keywords:** Big Cohort, Phenylacetylglutamine, LC-MS/MS

### 引言

苯乙酰谷氨酰胺 (Phenylacetylglutamine, PAGln) 是一种近年来受到广泛关注的代谢物。人体摄入必需氨基酸苯丙氨酸以后, 由肠道微生物作用产生苯乙酸, 苯乙酸在肝脏中与谷氨酰胺结合生成 PAGln, 后经肾脏排出体外。PAGln 可通过肾上腺素能受体调节血小板反应性进而促进血栓形成, 与心血管疾病及主要不良心血管事件的发生具有独立相关性, 微生物产生的代谢物 PAG 通过促进血小板反应和肾上腺素受体形成血栓从而与人类心血管疾病和死亡相关<sup>1</sup>。本文开发并验证了一种 LC-MS/MS 方法, 对 PAGln 进行定量检测分析。结果表明, 该方法在连续进样超过 1000 针的情况下, 专属性好、灵敏度高、稳定性好, 可作为大队列组学分析的检测方案。

### 方法特点

1. 高通量, 一针进样只需 4 min, 时间短, 满足大队列检测的需求;
2. QTRAP® 6500+ 系统灵敏度高, 稳定性好, 重现性强;
3. 前处理方法简单, 血浆经过蛋白沉淀即可上样检测;
4. 灵敏度高, PAGln 在正常人体内含量为  $3.34 \pm 0.31 \mu\text{M}^2$ , 本方法中最低检出限为  $1\text{ng/mL}$ , 约  $0.004\mu\text{M}$ , 完全满足检测需求。

### 样品前处理

血浆样本 10 倍稀释, 添加内标, 三倍体积预冷乙醇沉淀蛋白, 涡旋, 离心 ( $21000\text{g}/4^\circ\text{C}/15\text{min}$ ), 取上清待检测。

### 仪器设备

ExionLC™ AD 系统+ SCIEX QTRAP® 6500 系统



### 液相条件

色谱柱: Acquity UPLC BEH C18 column ( $50 \times 2.1 \text{ mm}, 1.7 \mu\text{m}$ )

柱温:  $45^\circ\text{C}$

进样体积:  $1 \mu\text{L}$

流动相: A 水含0.1%乙酸, B 乙腈含0.1%乙酸

流速: 0.3 mL/min

梯度: 见表1

表1. 液相梯度洗脱, 液相总运行时间为4 min

Time (min)	%B
0	5
2.5	95
3	95
3.1	5
4	5

## 质谱条件

SCIEX QTRAP® 6500系统

离子源: ESI源;

扫描方式: MRM采集模式,

IS电压: 5500 V;

气帘气CUR: 40 psi;

雾化气GS1: 60 psi;

辅助气: 55 psi;

离子源温度为550 °C;

碰撞气: 9 psi

化合物质谱参数见表2

表2. 化合物的质谱参数

No	Name	Q1	Q3	DP	CE
1	PAGIn	265.2	130.1	50	17
2	D5-PAGIn	270.1	130.1	50	20

## 实验结果

### 1 方法学验证

基质效应根据加标血浆检测值与空白血浆和标准品检测值之和的比值计算为103% (表3), 说明经内标校正后, 血浆基质对待测物无影响;

表3. 基质效应检测结果

检测物质	添加量	检测值(ng/ml)
空白血浆	10倍稀释血浆	12.87
标准品	10ng/ml (理论值)	10.26
血浆+标准品	10倍稀释血浆+10ng/mL标准品	23.56

溶剂稀释标准品的标准曲线线性范围为1ng/ml~500ng/ml, 可覆盖样本血浆的检测浓度, 线性方程R<sup>2</sup>大于0.999, 线性良好; 对中高低三个浓度的QC进行检测, 天内准确度分别为95.266%、94.006%、105.754%, 正确度基本在±5%以内, 天内RSD分别为1.39%、0.8%、0.8%, 天间RSD分别为6%、14%、4%, 天内SRD小于2%, 天间RSD小于15%, 在合理偏差范围(表4)。

表4. 标准曲线及QC检测结果

Linearity range (ng/ml)	Regression equation (weighting: 1/x)	R2	Accuracy(%)			RSD(%)					
			intra-day			intra-day			inter-day		
			low	medium	high	low	medium	high	low	medium	high
1-500	y=0.08919x+0.00251	0.99913	95.266	94.006	105.754	1.39%	0.80%	0.80%	6%	14%	4%

## 2 实验结果

本方法中, PAGIn出峰时间为2.23 min (图1), 共检测951个样本, 每隔20个样本检测一次标准品质控: 低值质控 (low-QC, 6ng/ml)、中值质控 (medium-QC, 50ng/ml) 或高值质控 (medium-QC, 450ng/ml), QC样本检测结果如图2, 低值质控检测偏差在92%~108%之间, 中值质控检测偏差在94%到114%之间, 高值质控检测偏差在85%到120%之间, 质控总体偏差在±15%以内的样本数占98%, 保证了待测样本数据的稳定性。

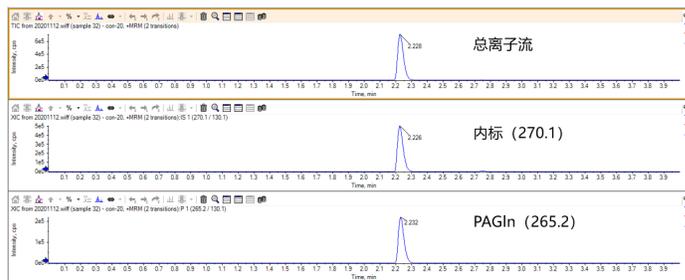


图1. PAGIn及其内标D5-PAGIn

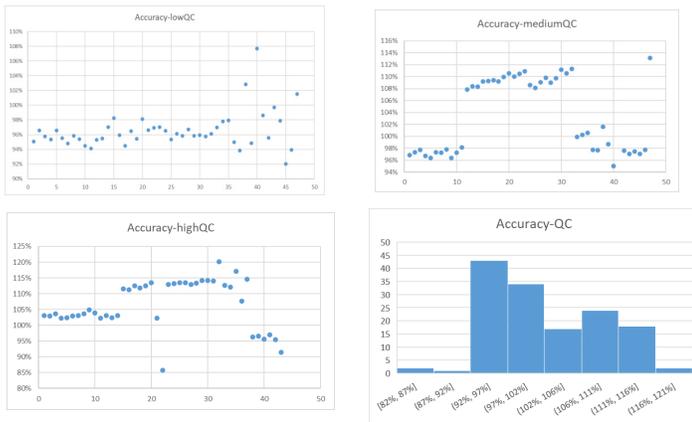


图2. 质控准确性统计分析

## 小结

本文使用QTRAP 6500系统进行肠道代谢衍生物苯乙酰谷氨酰胺的定量分析，共检测951例样本，连续进样超过1000针，质控检测偏差在82%到121%之间，质控总体偏差在 $\pm 15\%$ 以内的样本数占98%，保证了数据的准确性；仪器优异的抗污染和抗基质干扰能力，稳定性好，保证组学研究中大批量样本的数据重现性和准确性。

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. 或在和美国/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14759-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：021-2419-7200  
传真：021-2419-7333  
官网：[sciex.com.cn](http://sciex.com.cn)

广州分公司  
广州市海珠区广州国际生物岛星岛环北路  
1号B2栋5层501、502单元  
电话：020-8510-0200  
传真：020-3876-0835  
官方微信：SCIEX-China