

SCIEX 液相色谱串联质谱系统同时检测人血浆中20种氨基酸

Simultaneous Determination of 20 Amino Acids in Human Plasma by SCIEX LC-MS/MS

胡凤梅, 黄超, 赵祥龙, 郭立海

Hu Fengmei, Huang Chao, Zhao Xianglong, Guo Lihai

引言

氨基酸是人体必需的有机化合物,也是人体重要的代谢物。它们在蛋白质组成、新陈代谢、基因表达的调节和提供能量来源等方面发挥着重要作用。体内的氨基酸含量变化也可以反映各器官的功能,氨基酸可被用于多种先天性代谢遗传病的诊断,如苯丙酮尿、枫糖尿病等。此外,有研究表明,氨基酸与人体心血管病、II型糖尿病以及多种癌症等都有相关性。氨基酸的检测是临床早期诊断先天性氨基酸代谢紊乱的重要工具,为了更进一步研究氨基酸与人类各种疾病或者健康状态的关系,也促使人们需要一种可靠的、高通量的、快速的检测方法来定量人体中的氨基酸。

本试验在SCIEX液质系统上,建立了一种同时测定人血浆中20种氨基酸浓度的方法,该法操作简单,专一性强,灵敏度高,可以满足人血浆中氨基酸检测的需要。检测化合物相关信息见表1。

实验部分

样品前处理

样品前处理:向1.5 mL离心管里依次加入50 μ L 血浆、10 μ L 内标和140 μ L 乙腈,涡旋1 min后,15000 r/min离心5 min。取上清液进行LC-MS/MS分析。

色谱条件

色谱柱:Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 3.0 \times 100 mm I.D, 2.7 μ m

流动相:A相:含1%FA的20mM甲酸铵水溶液

B相:含20mM甲酸铵的90%的1%FA乙腈-水

流速:0.3 mL/min

柱温:40 C

表1. 待测化合物信息列表

中文名	英文名	缩写	CAS编号	分子式	内标
L-赖氨酸	L-Lysine	Lys	56-87-1	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	赖氨酸-d4
L-精氨酸	L(+)-Arginine	Arg	74-79-3	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	精氨酸-d7
L-组氨酸	L-Histidine	His	71-00-1	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	组氨酸-d3
L-丙氨酸	L-Alanine	Ala	56-41-7	C ₃ H ₇ NO ₂	丙氨酸-d4
L-丝氨酸	L-Serine	Ser	56-45-1	C ₃ H ₇ NO ₃	丝氨酸-d3
L-天冬酰胺	L-Asparagine	Asn	70-47-3	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	天冬酰胺-15N2
L-谷氨酰胺	L-Glutamine	Gln	56-85-9	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	谷氨酰胺-d5
L-苏氨酸	L-Threonine	Thr	72-19-5	C ₄ H ₉ NO ₃	苏氨酸-d5
L-谷氨酸	L-Glutamic acid	Glu	56-86-0	C ₅ H ₉ NO ₄	谷氨酸-d3
L-天冬氨酸	L-Aspartic acid	Asp	56-84-8	C ₄ H ₅ NNaO ₄	天冬氨酸-d3
L-脯氨酸	L-Proline	Pro	147-85-3	C ₅ H ₉ NO ₂	脯氨酸-d3
L-缬氨酸	L-Valine	Val	72-18-4	C ₅ H ₁₁ NO ₂	缬氨酸-d8
L-蛋氨酸	L-Methionine	Met	63-68-3	C ₃ H ₁₁ NO ₂ S	蛋氨酸-d3
L-酪氨酸	L-Tyrosine	Tyr	60-18-4	C ₉ H ₁₁ NO ₃	酪氨酸-d4
L-异亮氨酸	L-Isoleucine	Ilu	73-32-5	C ₆ H ₁₃ NO ₂	异亮氨酸-d10
L-亮氨酸	L-Leucine	Leu	61-90-5	C ₆ H ₁₃ NO ₂	亮氨酸-d3
L-苯丙氨酸	L-Phenylalaine	Phe	63-91-2	C ₉ H ₁₁ NO ₂	苯丙氨酸-d5
L-色氨酸	L-Tryptophan	Try	73-22-3	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	色氨酸-d5
L-瓜氨酸	L-Citrulline	Cit	372-75-8	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	瓜氨酸-d7
L-鸟氨酸	L-Ornithine	Orn	70-26-8	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	鸟氨酸-d6

进样体积：1.0 μL

洗脱方式：梯度洗脱，见表2

表2. 液相梯度洗脱条件

时间 (min)	A(%)	B(%)
0	5	95
2	5	95
7	20	80
8	90	10
12	90	10
12.1	5	95
15	5	95

质谱条件

采用正离子电喷雾离子源 (Electrospray Ionization, ESI) 和多反应监测 (Multiple Reaction Monitoring, MRM) 模式进行质谱检测。离子源参数：喷雾针 (IonSpray Voltage, IS) 正模式电压为2500V，加热气 (GS1) 和辅助加热气 (GS2) 分别为55 psi 和65 psi，离子源温度为650 °C；气帘气 (Curtain Gas, CUR) 为30 psi，碰撞气 (Collision Gas, CAD) 为9。为了获取较好的稳定性和灵敏度，各化合物监测离子对的去簇电压 (Declustering Potential, DP) 和碰撞电压 (Collision Energy, CE)，目标物离子对以及内标物监测离子对等参数均经过系统优化，离子对信息见表3。

结果与讨论

本实验使用正离子检测模式同时对20种氨基酸进行定量，典型的色谱图如图1。

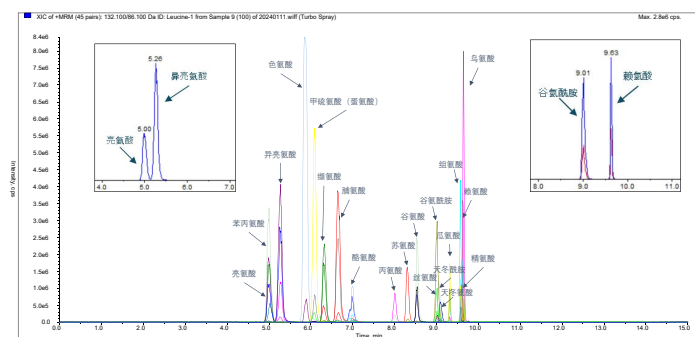


图1. 20种氨基酸的典型色谱图

表3. 20种氨基酸及其对应内标物的MRM离子通道参数

Name	ID	Q1	Q3	DP	CE	CXP
L-Leucine	Leu	132.1	86.1	35	30	6
L-Threonine	Thr	120.1	74	35	14	6
L-Valine	Val	118.1	72	35	34	6
L-Proline	Pro	116.1	70.1	35	55	6
L-Serine	Ser	106.1	60.1	35	15	6
L-Alanine	Ala	90.1	44.1	35	19	12
L-Isoleucine	Ile	132.1	86.1	35	28	6
L-Histidine	His	156.1	110	50	36	8
L-Methionine	Met	150.1	104	40	14	7
L-Glutamic Acid	Glu	148.1	84	45	23	6
L-Glutamine	Gln	147.101	84.101	30	45	6
L-Aspartic Acid	Asp	134.2	88	40	14	6
L-Asparagine	Asn	133.1	74	40	21	6
L-Lysine	Lys	147.1	84.1	30	38	6
L-Tyrosine	Tyr	182.1	136.1	50	35	10
L-Arginine	Arg	175.1	70	60	14	7
L-Phenylalanine	Phe	166.2	103	40	20	7
L-Tryptophan	Try	205.1	188	40	23	6
L-Ornithine	Orn	133.1	70.1	50	23	6
L-Citrulline	Cit	176.2	113.1	70	22	6
L-Lysine-IS	Lys-IS	151.1	88.2	30	22	6
L-Arginine-IS	Arg-IS	182.1	77.1	60	31	7
L-Histidine-IS	His-IS	159.1	113	50	20	8
L-Alanine-IS	Ala-IS	94.1	48.1	35	19	12
L-Serine-IS	Ser-IS	109.1	63.1	35	15	6
L-Asparagine-IS	Asn-IS	135.3	75.1	40	21	6
L-Glutamine-IS	Glu-IS	152.1	89.1	30	25	6
L-Threonine-IS	Thr-IS	125.1	79.2	35	14	6
L-Glutamic Acid-IS	Glu-IS	151.2	87	45	23	6
L-Aspartic Acid-IS	Asp-IS	137.2	91	40	14	6
L-Proline-IS	Pro-IS	119.1	73.2	35	22	6
L-Valine-IS	Val-IS	126.2	80.1	35	17	6
L-Methionine-IS	Met-IS	153.1	107.1	40	14	7
L-Tyrosine-IS	Tyr-IS	186.1	140.2	50	19	10
L-Isoleucine-IS	Ile-IS	142.3	96.1	35	15	6
L-Phenylalanine-IS	Phe-IS	171.3	106	40	39	7
L-Tryptophan-IS	Try-IS	210.1	192.1	50	15	6
L-Cityulline-IS	Cit-IS	183.2	120.1	70	24	8
L-Ornithine-IS	Orn-IS	139.1	76.1	40	27	6
L-Leucine-IS	Leu-IS	135.3	89.1	35	15	6

本实验中使用PBS作为替代基质，各氨基酸色谱图峰形良好，灵敏度较高，其中赖氨酸和谷氨酰胺、亮氨酸和异亮氨酸互为同分异构体，在本液相洗脱条件下，具有较好的分离度，能完全分开不会相互干扰。

对人血浆样本进行分析，各氨基酸的色谱峰如图2所示。

20种氨基酸的线性范围、相关系数和保留时间等信息见表4，r均大于0.995，各氨基酸在其相应的浓度范围内线性良好。

以混合实际人血浆添加标液的形式制备质控样本，对20种氨基酸定量的加标回收率以及精密度进行验证。从表5可以看出，不同浓度质控样本的准确度均在85.0~115.0%之内，精密度均在±15.0%以内，满足FDA和CLSI相关法规要求。

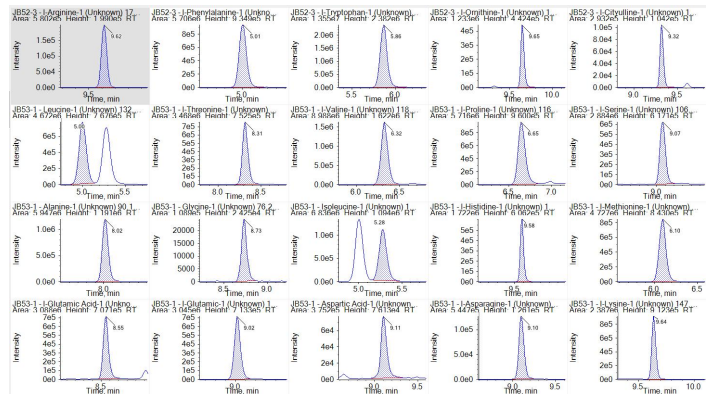


图2. 人血浆样本中各氨基酸提取离子流色谱图

表4. 20种氨基酸的线性范围和相关系数及保留时间

化合物	线性范围 (µg/mL)	相关系数	保留时间 (min)
l-Leucine	0.3-30	0.9997	5.00
l-Threonine	0.5-50	0.9953	8.30
l-Valine	0.5-50	0.9959	6.31
l-Proline	0.5-50	0.9967	6.65
l-Serine	0.5-50	0.9973	9.05
l-Alanine	1-100	0.9992	8.00
l-Isoleucine	0.2-20	0.9983	5.26
l-Histidine	0.3-30	0.9961	9.58
l-Methionine	0.1-10	0.9996	6.08
l-Glutamic Acid	0.3-30	0.9975	8.53
l-Glutamine	2-200	0.9969	9.01
l-Aspartic Acid	0.06-6	0.9981	9.09
l-Asparagine	0.2-20	0.9991	9.10
l-Lysine	0.5-50	0.9989	9.63
l-Tyrosine	0.3-30	0.9992	6.98
l-Arginine	0.5-50	0.9979	9.61
l-Phenylalanine	0.3-30	0.999	5.01
l-Tryptophan	0.2-20	0.9971	5.85
l-Ornithine	0.2-20	0.9986	9.64
l-Citrulline	0.1-10	0.9979	9.31

表5. 血浆中20种氨基酸各浓度加标回收率及精密度

Analyte	Recovery		Precision	
	L	H	L	H
l-Leucine	96.5%	95.0%	2.9%	3.1%
l-Threonine	95.9%	94.8%	4.7%	2.3%
l-Valine	100.3%	94.9%	3.4%	0.4%
l-Proline	98.1%	96.4%	4.3%	1.8%
l-Serine	96.7%	93.4%	3.2%	4.7%
l-Alanine	100.1%	96.0%	1.9%	2.1%
l-Isoleucine	98.1%	96.0%	1.9%	0.3%
l-Histidine	93.8%	97.2%	0.7%	7.6%
l-Methionine	95.8%	96.5%	0.8%	1.4%
l-Glutamic Acid	95.3%	94.5%	0.3%	2.8%
l-Glutamine	93.3%	90.4%	3.2%	2.7%
l-Aspartic Acid	101.5%	95.6%	3.5%	5.5%
l-Asparagine	100.1%	96.1%	1.9%	2.1%
l-Lysine	97.6%	99.7%	3.2%	6.4%
l-Tyrosine	96.5%	99.2%	5.9%	1.8%
l-Arginine	99.1%	96.9%	3.1%	3.9%
l-Phenylalanine	98.2%	94.7%	2.3%	1.1%
l-Tryptophan	94.0%	92.5%	2.5%	3.2%
l-Ornithine	100.5%	95.8%	7.6%	3.4%
l-Cityulline	103.7%	103.8%	3.4%	2.0%

总结

本方法采用正离子搭配ESI电喷雾离子源采集模式和MRM多反应监测模式，可对人血浆中20种氨基酸进行快速的定量分析。该方法具有特异性高、线性好、准确度高等优点，可以满足临床检测氨基酸的需要。

仅限专业展会等使用、仅向专业人士提供的内部资料。

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. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-31040-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：021-2419-7201
传真：021-2419-7333

官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：[SCIEX-China](#)