

• 检验技术与方法 •

AQC 柱前衍生-UPLC 测定人体血清中 17 种游离氨基酸

徐凤仙, 于嘉屏[△]

(上海迪安医学检验所研发实验室, 上海 200433)

摘要:目的 建立 6-氨基喹啉基-N-羟基丁二酰亚胺基-氨基甲酸酯(AQC)柱前衍生-超高效液相色谱法测定人体血清中 17 种游离氨基酸。方法 血清样品经乙腈沉淀蛋白后,在硼酸盐缓冲液中,游离氨基酸与 AQC 反应生成结构稳定的有紫外吸收的衍生物,用反相 C18 柱分离,紫外检测器检测,外标法定量分析。结果 17 种游离氨基酸的批内精密密度范围为 2.81%~7.35%,批间精密密度范围为 7.44%~15.40%,在 2.5~250 $\mu\text{mol/L}$ 范围线性良好,线性相关系数为 0.996 0~1.000 0,相对标准偏差小于 3%。结论 该方法测定血清中 17 种游离氨基酸,10 min 能够完全分离,结果准确、稳定、高效。

关键词:色谱法,高压液相; 氨基酸类; 血清

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.05.038

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)05-0596-02

Determination of 17 kinds of free amino acid in serum by UPLC with AQC pre-column derivatization

Xu Fengxian, Yu Jiaping[△]

(Research and Development Laboratory, Shanghai Dian Medical Testing Institute, Shanghai 200433, China)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of 17 kinds of free amino acid in serum by the ultra performance liquid chromatography(UPLC) with AQC pre-column derivatization. **Methods** After proteins precipitation in serum sample by acetonitrile, free amino acids with aminoquinoline-N-butyl hydroxy diimide and carbamate(AQC) were reacted to generate the structural stable derivative products with ultraviolet absorption. These products were separated by reversed-phase C18 column, detected with UV detector and quantitated by the external standard. **Results** The within-run precision of 17 kinds of free amino acid was 2.81%~7.35% and the between-run precision was 7.44%~15.40%. The linear relationship was good in the range of 2.5~250 $\mu\text{mol/L}$, the linear correlation coefficient was 0.9960~1.0000, RSD<3%. **Conclusion** Using this method for determining 17 kinds of amino acid in serum, the complete separation is obtained within 10 min, the results are accurate, stable and highly efficient.

Key words: chromatography, high pressure liquid; amino acids; serum

血清中各种游离氨基酸的测定是评估人体营养状况、蛋白质代谢^[1]情况以及某些疾病诊断的常用指标,对预测与防治亚健康群体、对临床诊断如肝性脑病、肝硬化进程等有着非常重要的参考价值,建立一个快速、准确的氨基酸分析方法对于临床某些疾病的诊断具有非常重要的指导意义。目前,氨基酸的分析普遍采用离子色谱法^[2]、高效液相色谱法^[3-5]、液相色谱-质谱法^[6-8]等。本文探讨了 6-氨基喹啉基-N-羟基丁二酰亚胺基-氨基甲酸酯(AQC)柱前衍生-超高效液相色谱法测定氨基酸的方法,并应用于人体血清中 17 种游离氨基酸的测定。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 超高效液相色谱仪(UPLC,美国 Waters 公司, H-class 型);医用高速冷冻离心机(北京白洋医疗器械有限公司);电热恒温干燥箱(上海森信实验仪器有限公司);超纯水仪(成都优普超纯科技有限公司)等。色谱纯甲醇(Anaqua Chemicals Supply 公司);色谱纯异丙醇(Anaqua Chemicals Supply 公司);色谱纯乙腈(Anaqua Chemicals Supply 公司);衍生化试剂(AQC, Waters 公司);C18 氨基酸专用分析色谱柱(Waters 公司);流动相 A 浓缩液(Waters 公司);流动相 B 浓缩液(Waters 公司)。标准品溶液:L-精氨酸(Arg)、L-组氨酸(His)、L-异亮氨酸(Ile)、L-亮氨酸(Leu)、L-赖氨酸(Lys)、L-甲硫氨酸(Met)、L-苯丙氨酸(Phe)、L-苏氨酸(Thr)、L-缬氨酸(Val)、L-丙氨酸(Ala)、L-天冬氨酸(Asp)、L-胱氨酸(Cys, 1.25 mmol/L)、L-谷氨酸(Glu)、L-甘氨酸(Gly)、L-脯氨酸(Pro)、L-丝氨酸(Ser)、L-酪氨酸(Tyr)混合标准品溶液购自 Waters 公

司(除单独标注外浓度均为 2.5 mmol/L)。

1.2 方法

1.2.1 衍生原理 衍生化试剂为 6-氨基喹啉基-N-羟基丁二酰亚胺基-氨基甲酸酯(AQC),是一种活性 N-羟基丁二酰亚胺的氨基甲酸酯,一种氮衍生化化合物。其化学结构见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

AQC 与初级氨基酸和次级氨基酸快速反应生成稳定性极高的脲衍生物,见图 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。过量的试剂水解生成 6-氨基喹啉(AMQ),这是一种无干扰的副产物。

1.2.2 色谱条件 各流动相根据 WATERS 提供的流动相 A 浓缩液、流动相 B 浓缩液及超纯水配制而成。表 1 中的流动相 A 为流动相 A 浓缩液;流动相 B 为 10%流动相 A;流动相 C 为超纯水;流动相 D 为流动相 B 浓缩液。流动相梯度见表 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

1.2.3 应用标准溶液配制 将 2.5 mmol/L 标准品母液用超纯水稀释 10 倍,分别移取稀释液 10、25、100、250、500 μL ,再分别加入超纯水 990、975、900、750、500 μL ,得到浓度为 2.5、6.25、25、62.5、125、250 $\mu\text{mol/L}$ 的应用标准溶液。

1.2.4 样品处理 标准品处理:准确移取 70 μL 硼酸盐缓冲液到色谱瓶中,移取 10 μL 氨基酸应用标准品至色谱瓶中,加入 20 μL 衍生化试剂,盖上盖子,立即涡旋混合数秒钟,在室温下放置 1 min,将色谱瓶置于恒温加热仪内,55 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min。血清样品前处理:准确移取 100 μL 血清样品至 1.5 mL 离心管

中,加入 100 μ L 乙腈,混匀 30 s,然后置于-4 $^{\circ}$ C 10 min,在高速冷冻离心机上以 13 000 r/min 离心 20 min,离心结束取出静置 20 min,移取 10 μ L 样品上清液,按照标准品标准操作步骤进行衍生化处理。

2 结 果

2.1 标准品分离图谱 17 种氨基酸标准品完全分离,峰型比较对称,基本上没有杂峰干扰,说明在此条件下能够得到良好的分离,色谱图见图 3(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.2 血清样品分离图谱 血清样品中氨基酸完全分离,有部分峰有干扰,但对于目标峰来说没有影响,血清中 17 种氨基酸对应的色谱图见图 4(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.3 精密度试验 取健康人血清样品从衍生反应开始重复 10 次,以外标法定量测定各氨基酸浓度,批内精密度范围为 2.81%~7.35%;一日内分 6 批测定,计算批间精密度,范围为 7.44%~15.40%。结果见表 2。

表 2 精密度试验结果

氨基酸	批内			批间		
	x	s	CV%	x	s	CV%
His	3.21	0.11	3.40	1.69	0.13	7.91
Ser	9.46	0.27	2.81	8.44	0.97	11.48
Arg	7.50	0.34	4.55	7.49	0.86	11.50
Gly	17.53	1.07	6.11	12.44	1.38	11.12
Asp	1.81	0.10	5.40	1.48	0.23	15.40
Glu	9.11	0.52	5.76	8.12	1.07	13.21
Thr	7.67	0.32	4.13	7.23	0.82	11.33
Ala	32.33	1.82	5.64	28.95	3.56	12.28
Pro	13.00	0.63	4.84	12.67	1.44	11.36
Cys	2.86	0.21	7.35	1.40	0.17	12.45
Lys	11.15	0.63	5.67	11.27	0.99	8.77
Tyr	4.74	0.20	4.17	4.23	0.54	12.77
Met	1.37	0.06	4.35	1.64	0.20	12.27
Val	17.22	0.71	4.10	16.89	1.54	9.12
Ile	4.47	0.17	3.79	4.46	0.34	7.51
Leu	9.12	0.34	3.71	8.77	0.65	7.44
Phe	5.82	0.18	3.11	5.70	0.44	7.65

2.4 线性范围试验 按照 1.2.3 配制好不同浓度的标准品溶液,以浓度为横坐标(X),对应的峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,17 种氨基酸的线性回归方程及相关系数见表 3(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”),在 2.5~250 μ mol/L 范围内线性良好,相关系数为 0.996 0~1.000 0。平行测定 6 次相对标准偏差小于 3%。

(上接第 595 页)

试验的干扰 2 例[J]. 中国输血杂志,2003,16(4):284.

[8] 田建良, KCL 和 VitC 对凝聚胺法交叉配血试验的干扰[J]. 中国输血杂志,2003,16(2):98.

[9] 武建. 凝聚胺法交叉配血的干扰及影响[J]. 临床血液学杂志, 2008,21(2):98-99.

[10] 杨世明, 田榆, 张勇萍, 等. 微柱凝胶法交叉配血试验及其影响因

3 讨 论

血清中常见游离氨基酸有 20 种,本方法所购置的标准品是 17 种混合标准液,标准品溶解在盐酸溶液中,而色氨酸在酸性环境下易被破坏,可将色氨酸在碱性溶液中进行稀释,然后进行衍生化处理,单独建立校正曲线。

批间精密度试验中有些氨基酸变异较大,可能与样品的保存、衍生的温度、酸碱度等条件的变化相关,因此控制实验条件的一致性对结果的重现性具有重要作用。针对样品本身基质的复杂性一定要控制好其保存条件,在条件允许下,可以进行几个不同温度下保存,对照处理,验证其结果的稳定性,以确定最优保存条件。

目前国内外采用高效液相色谱仪分析氨基酸的方法有很多,但大多操作繁琐,分析条件要求苛刻,且耗时较长,导致结果报告时间很长。本文应用 AQC 柱前衍生反相超高效液相色谱法仅用 10 min 即可成功分离血清中 17 种游离氨基酸,建立了 17 种氨基酸的定量方法。衍生化处理步骤比较简单,试剂用量少、灵敏度高、分析时间短、基线波动小、稳定性好,是准确、快速、稳定、可靠的氨基酸分析方法。

参考文献

[1] Cabooter D, Wuyts B, Desmet G, et al. Variable column length method development strategy for amino acid analysis in serum samples of neonates with metabolic disorders[J]. J Chromatogr A,2013,1292(1):229-238.

[2] 周政华,杨元,洪君蓉,等. 固相萃取-离子色谱-积分脉冲安培法测定人血清中游离氨基酸[J]. 分析化学研究简报,2007,35(7):1063-1066.

[3] 张露蓉, 江国荣. DABS-Cl 柱前衍生 RP-HPLC 法定量测定血清中游离氨基酸[J]. 苏州大学学报,2004,20(3):65-71.

[4] 赵剑虹,杨柳桦,李永新,等. 柱前衍生-高效液相色谱法测定大熊猫血清中 18 种游离氨基酸[J]. 分析试验室,2007,26(11):15-19.

[5] 边春香,孙志红,李莉,等. 反相高效液相色谱法测定血清中的游离氨基酸[J]. 色谱,2005,23(3):317.

[6] Tcherkas YV, Kartsova LA, Krasnova IN. Analysis of amino acids in human serum by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection[J]. J Chromatogr A,2001,913(1/2):303-308.

[7] Armstrong M, Jonscher K, Reisdorph NA. Analysis of 25 underivatized amino acids in human plasma using ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom,2007,21(16):2717-2726.

[8] Bunk DM, Lowenthal MS. Isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry for quantitative amino acid analysis [J]. Method Mol Biol,2012,828(1):29-38.

(收稿日期:2013-11-08)

素的探讨[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2007,23(8):780-781.

[11] 赵领军. 用 ROC 曲线评价纸板法凝聚胺法与微柱凝胶法在血型抗体测定中的作用[J]. 山西医药杂志,2010,39(11):1137.

[12] 危艳顺, 姚明. 凝聚胺法、微柱凝胶法两种配血方法学评价[J]. 临床和实验医学杂志,2013,12(8):623-624.

(收稿日期:2013-11-14)