

在生物医学研究中使用Kairos氨基酸试剂盒对20种氨基酸进行UPLC-MS分析

Padhraic Rossiter, Jaime Salcedo Dominguez, Norma Breen, Lisa J. Calton

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

本应用纪要将介绍使用Kairos氨基酸试剂盒对溶液中的20种氨基酸进行分析。Kairos氨基酸试剂盒使生物医学研究人员能够通过一套灵活的试剂盒获得值得信赖的结果，利用这套试剂盒，他们能够在10分钟内使用ACQUITY UPLC/ACQUITY QDa联用系统对处于正常生理浓度范围内的20种氨基酸进行准确定量。

优势

- 色谱方法具有出色的分析选择性，可以分离同分异构体
- 分析运行时间短(<10 min)
- 峰检测的可信度高
- 灵活性更高，系统可用于其它分析

简介

Kairos氨基酸试剂盒（部件号：176004379，仅供研究使用）设计使生物医学研究人员能够在10分钟内完成对多达45种生物相关氨基酸的分析。已在适用情况下使用更高级参比物质为试剂盒校准品进行赋值，从而提高分析结果的可信度。Kairos氨基酸试剂盒校准品（部件号：186009048）中9种氨基酸的量值可溯源至日本国家计量院（NMIJ CRM 6011a-6018a, 6022a），另外8种可溯源至美国国家标准技术研究所(NIST SRM 2389a)，其余氨基酸使用购自Sigma-Aldrich的TraceCERT标准品通过重量法制得。

本文将介绍使用Kairos氨基酸试剂盒对溶液中的20种氨基酸进行分析。使用配备CORTECS UPLC C₁₈ 1.6 μm, 2.1 × 150 mm色谱柱（部件号：186007096）的ACQUITY UPLC H-Class系统进行色谱分离，然后使用ACQUITY QDa质谱检测器进行检测，该检测器经过专门设计，具有自动化设置功能，简便易用（图1）。利用样品溶液对试剂盒和分析系统的性能进行评估，并出于生物医学研究目的，对NIST SRM 2389a物质进行分析。

所用的色谱条件可以分离亮氨酸和丙氨酸同分异构体。



图1. Waters ACQUITY UPLC H-Class/ACQUITY QDa质谱检测器联用系统

实验

试剂盒

Kairos氨基酸试剂盒（部件号：176004379）

LC条件

系统：	ACQUITY UPLC H-Class柱温箱(CH-A)
进样针：	15 μ L
色谱柱：	CORTECS UPLC C ₁₈ 2.1 x 150 mm, 1.6 μ m（部件号：186007096）
保护柱：	ACQUITY UPLC色谱柱在线过滤器套件（部件号：205000343）
流动相A：	0.1%甲酸的水溶液
流动相B：	0.1%甲酸的乙腈溶液
洗针液：	流动相B
清除溶剂：	流动相A
柱温：	55 $^{\circ}$ C
进样体积：	2 μ L
流速：	0.5 mL/min
梯度：	见表1

运行时间： 9 min

MS条件

系统： ACQUITY QDa质谱检测器

采集模式： 单离子扫描(SIR) (详见表2和表3)

极性： ESI+

毛细管电压： 0.8 kV

离子源温度： 120 °C

脱溶剂气温度： 600 °C

锥孔电压： 10 V

数据管理

带TargetLynx应用管理软件的MassLynx软件4.1版

试剂盒复溶

复溶冻干的Kairos氨基酸试剂盒时，请按照维护和使用手册(720006448EN)进行操作。用2 mL 0.1 M HCl复溶校准品和QC样品，在室温下混合至少30 min，确保所有物质完全溶解。

用2 mL水复溶内标，在室温下混合10 min，确保所有物质完全溶解。将样品瓶内容物转移至容量瓶中，使用试剂盒中提供的10%磺基水杨酸将其定容至10 mL。

试剂制备

制备Kairos氨基酸试剂盒试剂、硼酸盐缓冲液和AccQ·Tag Ultra “3X” 衍生化试剂盒试剂时，请按照维护和使用手册(720005448EN)进行操作。硼酸盐缓冲液制备：将430 µL 0.5 M NaOH水溶液加入衍生化试剂盒中提供的6

mL硼酸盐缓冲液中（试剂1）有效期：3个月。储存条件：室温。

AccQ·Tag Ultra “3X” 试剂：用1.5 mL乙腈（试剂2A）复溶AccQ·Tag Ultra “3X”（试剂2B）。在55 °C下加热10 min并涡旋混合。有效期：5天。储存条件：室温。AccQ·Tag Ultra“3X”复溶后，应储存在干燥器内。

样品制备

第1步	向1.5 mL Eppendorf管中加入 50 μ L样品
第2步	加入50 μ L内标
第3步	涡旋混合5 s
第4步	加入50 μ L水
第5步	涡旋混合5 s
第6步	仅适用于高浓度样品 - 加入 1000 μ L稀释剂(0.1 M HCl)
第7步	在9000 g下离心15 min
第8步	向最大回收样品瓶中加入70 μ L 硼酸盐缓冲液
第9步	向硼酸盐缓冲液中加入10 μ L上 清液并移取混合液
第10步	加入20 μ L AccQ·Tag Ultra “3X” 试剂
第11步	旋涡混合5 s

第12步	在室温下静置样品1 min
第13步	在55 °C下加热10 min
第14步	进样2 μL

在精密度和准确度研究中，用0.1 M HCl通过重量法为所有氨基酸制得浓度为20、150、400和700 μM的样品组合，并另外为丙氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸和谷氨酰胺制得浓度为2500 μM的高浓度样品组合。

方法条件

表1.用于分离氨基酸的梯度表

表2. 氨基酸的SIR参数与校准品浓度范围

表3. 内标的SIR参数

结果与讨论

分析高浓度样品之后，在后续的空白进样中未观察到明显的系统残留污染（校准品1的检测器响应≤20%）。

在三天内连续配制样品组合并重复分析五次(n=15)来测定精密度，计算每组样品的日内和日间精密度(%CV)。每组样品的日内精密度≤12.0% CV，日间精密度≤14.7% CV，平均日内和日间精密度≤11.3% CV，如表4所示。

表4. 溶液中20种氨基酸的平均日内和日间分析精密度

为评估线性，在三天内每天对Kairos氨基酸试剂盒校准品进行分析。回归分析的结果表明，对于所分析的20种氨

氨酸，在考察的浓度范围内使用1/x加权均实现了线性拟合（表5）。各氨酸的确定系数(r^2)均大于0.99，其中校准品的反算浓度处于标示值±15%的范围内（在LLOQ的浓度下除外，其反算浓度处于标示值±20%的范围内）。至少75%的校准品满足这一标准。

表5. 溶液中Kairos氨酸试剂盒的线性

在一天内对用0.1 M HCl制得的浓度范围为1–20 μ M的样品重复分析五次进行灵敏度评估。在分析物峰的信噪比 $\geq 10:1$ 且重复分析的精密度 $\leq 20\%$ CV的情况下，测定每种分析物的LOQ。分析的所有20种氨酸的LOQ均 $\leq 4 \mu$ M，如表6所示。

表6. 溶液中Kairos氨酸试剂盒的灵敏度

通过分析单独制备的样品以及NIST SRM 2389a（开始分析前，采用重量法将浓度稀释至400 μ M）进行准确度评估。所有样品的浓度偏差均 $\leq \pm 12.3\%$ （范围为-10.2~+12.3%），且NIST SRM 2389a稀释后浓度计算值的浓度偏差 $\leq \pm 8.9\%$ （范围为-8.9~+6.2%），如表7所示。

表7. 溶液中Kairos氨酸试剂盒的准确度

结论

Kairos氨酸试剂盒使生物医学研究人员能够通过一套灵活的试剂盒获得值得信赖的结果，利用这套试剂盒，他们能够在10分钟内使用ACQUITY UPLC/ACQUITY QDa联用系统对处于正常生理浓度范围内的20种氨酸进行准确定量。

采用AccQ · Tag Ultra “3X” 衍生化试剂盒对样品进行衍生化，可通过简单、稳定且快速的反相UPLC方法分析氨酸，无需使用流动相缓冲液或离子对试剂。这意味着无需专用系统，因此ACQUITY UPLC/ACQUITY QDa联用系统还可以用于其它分析。衍生化样品具有良好的稳定性，并且在所用的色谱条件下，研究人员在10分钟内即可分离氨酸异构体，并提供可靠的峰鉴定结果。

Kairos氨基酸试剂盒（仅供研究使用）中所述的方法使研究人员能够使用ACQUITY UPLC/ACQUITY QDa联用系统对溶液中的20种氨基酸进行分析，并获得良好的精密度、线性、灵敏度和准确度。

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/10138533>>

ACQUITY QDa质谱检测器 <<https://www.waters.com/134761404>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720006488ZH, 2019年1月

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.