

# 高效液相色谱 - 同位素稀释质谱法 测定血清中的苯丙氨酸

武利庆, 王 晶

(中国计量科学研究院 生物能源环境所, 北京 100013)

苯丙酮尿症 (PKU) 是一种世界性分布的遗传疾病, 病人体内缺少苯丙氨酸羟化酶 (PAH), 导致苯丙氨酸 (Phe) 不能正常代谢为酪氨酸, 引起 Phe 代谢产物在人体中过量蓄积, 造成患者中枢神经系统受到不可逆的损害而影响智力。但是该病若在早期发现并给予积极治疗, 患者智力发育可以完全正常, 因此血清中苯丙氨酸含量测定对于 PKU 的诊断和治疗具有十分重要的意义<sup>[1]</sup>。Phe 的检测方法有多种, 主要有细菌抑制法、荧光法、气相色谱法、高效液相色谱法 (HPLC)、高效毛细管电泳法 (HPCE) 等<sup>[2-4]</sup>, 但是这些测定方法存在易受复杂血清基体的干扰, 可能存在系统误差、结果精度低等问题, 因此不能作为基准方法。同位素稀释质谱法由于能够最大限度减少基体物质对测定结果的影响, 大大提高结果的准确度和精密度, 成为各国计量机构研究的重点之一<sup>[5]</sup>。1995 年国际计量委员会 (CIPM) 下的物质质量咨询委员会 (CCQM) 决定将同位素稀释质谱方法列为 5 个化学测量基准方法的首位, 用于开展化学计量溯源性研究。本文利用同位素稀释质谱法对血清中的苯丙氨酸进行了测定, 5 次重复分析的相对标准偏差仅为 0.5%, 并且测定结果可以通过 Phe 标准物质直接溯源到 SI 单位, 该方法可用于我国血清苯丙氨酸标准物质的定值及溯源体系的建立。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器及试剂

乙腈 (色谱纯, 德国 Merck); 全氟庚酸、三氟乙酸 (美国 Sigma 公司); 苯丙氨酸标准物质 (纯度 99.2% ± 1.6%)、人血清样品 (中国计量科学研究院化学所); D<sub>8</sub> 标记苯丙氨酸 (美国剑桥同位素实验室)、盐酸 (优级纯, 北京化学试剂公司); 咖啡因、MRFA 四肽、Ultramark 1620; 实验用水都经 Milli Q 纯水系统纯化。

液相色谱质谱联用仪 (Thermo-Finnigan LTQ), 台式离心机 (Sigma 3K15), 漩涡混合器 (MS2 Minishaker), 移液器 (Gilson), 天平 (Sartorius ME235S, 0.01 mg 感量; Mettler Toledo UMX2, 0.1 μg 感量)

### 1.2 样品处理

称取 2.5 mg 苯丙氨酸或苯丙氨酸的同位素标记物, 分别溶于 10 mL 1% 甲酸 - 水中, 配制成储备液, 使用时用 1% 甲酸 - 水稀释 10 倍后使用。根据 HPLC 测定的血清中苯丙氨酸含量, 在血清样品中添加等量的苯丙氨酸同位素标记物, 2 000 r/min 离心 2 min, 在 4 °C 冰箱中放置 24 h 后使用。取添加有同位素标记物的血清, 室温下平衡 1 h, 加入等体积的乙腈沉淀蛋白, 3 000 r/min 离心 10 min 后取上清, 转移到安培瓶中用高纯 N<sub>2</sub> 吹干。残渣用 1% 甲酸 - 水复溶, 经 0.45 μm 滤膜过滤后用于液质联用分析。同时配制苯丙氨酸含量与血清中苯丙氨酸含量接近, 但是苯丙氨酸与标记苯丙氨酸质量比值约为 0.95 和 1.05 的标准溶液, 经 0.45 μm 滤膜过滤后用于液质联用分析。进样时按照低标 - 样品 - 高标 - 样品 - 低标的顺序重复分析。

### 1.3 色谱条件与质谱条件

使用 Agilent 的 SB-Aq C18 250 × 4.6 mm 色谱柱, 柱温 25.0 °C, 每次进样 10 μL。流动相 A 的组成为含有 0.8 mmol/L 全氟庚酸和 0.05% 三氟乙酸的水, B 为乙腈, 在 20 min 内由 100% A 变成 40% A, 流速为 0.4 mL/min。质谱仪喷雾电压 4.5 kV; 壳气流速 30 arb; 辅助气流速 5 arb; 干燥气温度 300 °C; 归一化碰撞能量 33。采用多反应监测模式 (MRM), 分别监测苯丙氨酸 ( $m/z$  166 - 120) 和标记苯丙氨酸

基金项目: 科技基础条件平台资助项目

作者简介: 武利庆 (1978-), 男, 河北赞皇人, 助理研究员, 博士, Tel: 010 - 64276678, E-mail: wulq@nim.ac.cn

( $m/z$  174 128)的质谱信号。

#### 1.4 血清中苯丙氨酸含量的计算

血清中苯丙氨酸含量按下面的公式计算： $c = \{ P m_{\text{标}} [ R_{\text{样}} ( I_1 - I_2 ) - ( I_1 R_2 - I_2 R_1 ) ] \} / [ m ( R_1 - R_2 ) ]$ ，其中： $m_{\text{标}}$ 为血清中苯丙氨酸同位素标记物的质量， $R_{\text{样}}$ 为样品苯丙氨酸与苯丙氨酸标记物的峰面积比， $I_1$ 为高标溶液中苯丙氨酸与苯丙氨酸标记物的质量比， $I_2$ 为低标溶液中苯丙氨酸与苯丙氨酸标记物的质量比， $R_1$ 为高标溶液中苯丙氨酸与苯丙氨酸标记物的峰面积比， $R_2$ 为低标溶液中苯丙氨酸与苯丙氨酸标记物的峰面积比， $m$ 为血清质量， $P$ 为苯丙氨酸标准物质的纯度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 血清中游离苯丙氨酸的同位素稀释质谱测定

同位素稀释质谱的典型质谱图见图 1 所示。

根据测得的苯丙氨酸和标记物的峰面积比，根据 1.4 中的公式计算得到 5 次重复样品测定的结果分别为  $25.46 \times 10^{-3}$ 、 $25.45 \times 10^{-3}$ 、 $25.65 \times 10^{-3}$ 、 $25.69 \times 10^{-3}$ 、 $25.42 \times 10^{-3}$  mg/g，测定结果的平均值为  $25.53 \times 10^{-3}$  mg/g，标准偏差为 0.13 mg/g，相对标准偏差为 0.5%，可见同位素稀释质谱法作为基准方法与一般方法相比具有很高的精密度。

### 2.2 测定结果的不确定度评估

分析结果的不确定度包括 A 类不确定度和 B 类不确定度<sup>[6]</sup>，A 类不确定度  $u_A$  用多次重复测量的标准偏差来表示，所以： $u_A$

$$= S_n / \sqrt{n} = 0.13 / \sqrt{5} = 0.058 \text{ mg/g}$$

B 类不确定度主要来源有以下几个方面：

(1) 苯丙氨酸标准物质纯度定值的不确定度  $u_p$ ，在标准物质证书上标示，引用不确定度按照矩形分布考虑，标准不确定度  $u_p = u_p / \sqrt{3}$ ，由此计算得到： $u_p = 0.016 / 1.732 = 9.2 \times 10^{-3}$ 。

(2) 苯丙氨酸和苯丙氨酸标记物称量引起的不确定度  $u_m$  和  $u_{m'}$ ，按照天平制造商给出的线性分量按照矩形分布折算成标准不确定度： $u_m = u_{m'} = 0.1 \times 10^{-3} / 1.732 = 5.77 \times 10^{-5}$  mg。

(3) 溶液称量引起的不确定度  $u_M$ ，按照天平制造商给出的线性分量按照矩形分布折算成标准不确定度： $u_M = 0.01 / 1.732 = 5.77 \times 10^{-3}$  mg。

(4) 由空气浮力、相对分子质量、温度、湿度等引起的测量不确定度忽略不计，将以上各不确定度分量合成  $u_B / c = [ ( u_p / P )^2 + ( u_m / m_{\text{标}} )^2 + ( u_M / m )^2 + ( u_{m'} / m )^2 ]^{1/2} = 9.3 \times 10^{-3}$ ， $u_B = 9.3 \times 10^{-3} c = 0.24 \times 10^{-3}$  mg/g 合成不确定度  $u_c = \sqrt{u_A^2 + u_B^2} = 0.25 \times 10^{-3}$  mg/g，取包含因子  $k=2$ ，则扩展不确定度可以表示为  $U = k \times u = 2 \times 0.25 = 0.5 \times 10^{-3}$  mg/g，测定结果可以表示为  $(25.5 \pm 0.5) \times 10^{-3}$  mg/g，可以看出不确定度主要来源于苯丙氨酸标准物质纯度定值的不确定度，其次是方法的精密度，这充分体现了同位素稀释基准方法的优越性。

#### 参考文献：

- [1] THERRELL BL. Newborn screening: reviewing the past, exploring the future. Neonatal and Perinatal Screening: The Asian Pacific Perspectives[M]. The Chinese University of Hong Kong Press, 1996: 9 - 18
- [2] VALLAN S, MOENIH [J]. Clin Chem & Lab Med, 2006, 44: 1434 - 6621.

(下转第 103 页)

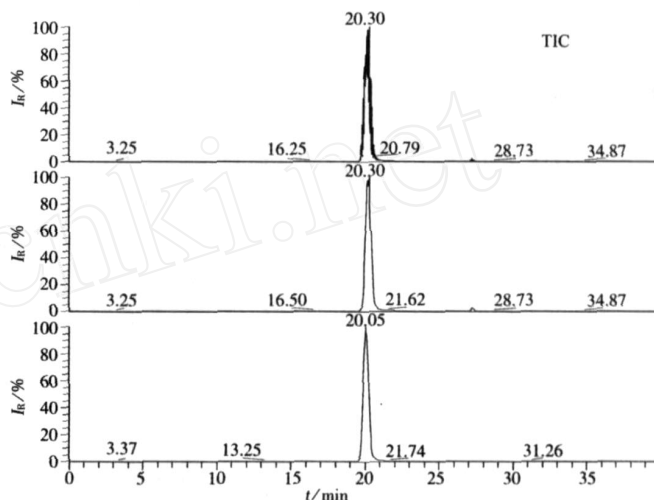


图 1 血清中苯丙氨酸含量同位素稀释质谱法测定的典型谱图

**Abstract:** Here we report a sensitive LC - MS/MS method capable of quantifying *n*-Butylphthalide (NBP) down to 0.5 ng/mL in rat and human hepatic microsome incubating solutions. The method was validated over linear range of 0.5 - 4 000 ng/mL using diazepam as the internal standard. Compound was simply prepared by protein precipitation method and analyzed on the LC - MS/MS, which was an API-4000 system equipped with ESI interface and a Symmetry C<sub>18</sub> column. The between-day and within-day precision and accuracy of quality control samples were 9.3% RSD% and 3.3% RE%. Sample stability (Stock solution, freeze/thaw, bench-top, short-term and long-term stability) were also investigated. This method has been applied to drug-drug interaction study of NBP in rat and human hepatic microsome incubating solutions.

**Key words:** *n*-Butylphthalide; LC - MS/MS; Quantitative analysis

(上接第 99 页)

- [3] LAURENS J B, MB ADA X Y, UBB NK J B. [J]. J Chromatogr, B, 2001, 762: 127 - 136
- [4] SPIERTO F W, WHITFIELD W, APETZ M, et al. [J]. Clin Chem, 1982, 28: 2282 - 2285.
- [5] WELCH M J, SNEGOSKIL T, PARRIS R M, et al. [J]. Metrologia, 2003, 40 (Suppl): 08003.
- [6] MLTON M J T, WIELGOSZ R I. [J]. Metrologia, 2000, 37: 199 - 206.

## Determination of Phenylalanine in Serum by HPLC Isotope Dilution Mass Spectrometry

WU Li-qing, WANG Jing

(Division of Biological, Energy and Environmental Measurement, National Institute of Metrology, Beijing 100013, China)

**Abstract:** Phenylalanine in serum was determined by HPLC isotope dilution mass spectrometry method with D<sub>8</sub> labeled phenylalanine as internal standard. Phenylalanine and its isotope labeled analogue were monitored at the transitions  $m/z = 166 \rightarrow 120$  and  $172 \rightarrow 126$  in multiple reaction monitoring (MRM) mode, respectively, which effectively eliminated the matrix effect. The RSD for 5 repeats measurement of the same sample was 0.5%. Uncertainty was evaluated, which showed the main uncertainty was from the purity assessment of phenylalanine reference material and the variation of method. The presented method can be applied into value assessment of reference material of phenylalanine in serum, and it can be also used for traceability establishment of the measurement of phenylalanine in serum.

**Key words:** Serum; Phenylalanine; Isotope dilution mass spectrometry; Uncertainty