

# A Preliminary Study on Free Amino Acid Fingerprint of Human Serum

Hui Xu, Qihong Chen, Daoping Huang, Meiqing Su

Guangxi Center for Analysis and Test Research, Nanning Guangxi

Email: 2336870@163.com

Received: Dec. 28<sup>th</sup>, 2016; accepted: Feb. 5<sup>th</sup>, 2017; published: Feb. 8<sup>th</sup>, 2017

---

## Abstract

**Object:** To establish free amino acid fingerprint of human serum. **Method:** The free amino acid of serum from the healthy persons was determined by the L-8900 automatic amino acid analyzer, and 15 major characteristic peaks of fingerprint were chosen as the common peak. **Result:** Free amino acid fingerprint of 12 batches of human serum was established. **Conclusion:** The fingerprint has preferably precision, repeatability and stability; it can be used as the theoretical basis of free amino acid fingerprint database of human serum.

## Keywords

Human Serum, Free Amino Acid, Fingerprint

---

# 人血清中游离氨基酸指纹图谱的初步研究

徐 慧, 陈秋虹, 黄岛平, 苏梅清

广西分析测试研究中心, 广西 南宁

Email: 2336870@163.com

收稿日期: 2016年12月28日; 录用日期: 2017年2月5日; 发布日期: 2017年2月8日

---

## 摘 要

**目的:** 建立人血清中游离氨基酸的指纹图谱。**方法:** 采用L-8900全自动氨基酸分析仪测定健康人群血清中的游离氨基酸, 选择15个主要特征峰为指纹图谱共有峰。**结果:** 建立了12批人血清样品的游离氨基酸指纹图谱。**结论:** 建立的指纹图谱有较好的精密度、重复性和稳定性, 可作为人血清游离氨基酸指纹图谱库的理论基础。

## 关键词

人血清, 游离氨基酸, 指纹图谱

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

近年来, 人们已逐渐认识到血液中氨基酸水平与身体各项机能的关系, 且有大量的医学研究表明, 氨基酸含量的改变影响人体的生理功能并产生某些疾病, 而某些疾病又影响氨基酸的代谢而使氨基酸含量发生改变, 因此人血清中的氨基酸含量不再单纯的被当做评价营养状态的指标, 而是被当做评价病理状态的指标来看待。不少研究都表明遗传代谢病的发生是由氨基酸代谢异常引起, 人血清中游离氨基酸含量检测分析已经成为遗传代谢病筛查与诊断的主要技术。氨基酸代谢与人的健康和疾病状态有直接关系。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 样品来源

中国疾病预防控制中心营养与食品安全所提供, 具体见表 1。

### 2.2. 主要试剂及仪器

磺基水杨酸(分析纯)

氨基酸混合标准(日立)

漩涡振荡器

高速冷冻离心机

L-8900 日立全自动氨基酸分析仪

Table 1. Sample list

表1. 样品表

血液编号	血液提供者性别	血液提供者年龄(岁)	血液提供者健康状况
0220	男	22	良好
0334	女	25	良好
0265	男	30	良好
0523	男	37	良好
0664	女	28	良好
0314	男	25	良好
0522	女	29	良好
0321	女	32	良好
0535	男	26	良好
0466	男	32	良好
0415	男	34	良好
0333	女	31	良好

### 3. 实验方法

#### 3.1. 样本采集与处理

将储存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 的冷冻血液解冻, 3000 转/min 离心 10 min, 取上清液, 然后 15,000 转/min 离心 10 min, 吸取 500  $\mu\text{L}$  上清液(血清)加 8% 磺基水杨酸 500  $\mu\text{L}$  于离心管中混匀, 置漩涡振荡器上漩涡 2 min, 15,000 转/min 离心 20 min, 取上清液用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 备用上机。

#### 3.2. 色谱条件

分析柱是 Li 型离子交换色谱柱(4.6 mm  $\times$  60 nm, 3  $\mu\text{m}$ ) (填料为磺酸型阳离子树脂), 流动性为锂盐缓冲液, 双通道检测, 流速分别是 0.45 mL/min、0.35 mL/min, 检测波长分别是 420 nm、570 nm, 分离柱柱温  $57^{\circ}\text{C}$ , 柱后衍生, 衍生剂为茚三酮反应液, 反应柱温度为  $135^{\circ}\text{C}$ 。将混合标准液稀释至 25 nmol/mL, 标准液和供试液进样量均为 20  $\mu\text{L}$ , 色谱记录时间为 120 分钟。氨基酸色谱图见图 1 和图 2。

### 4. 方法学考察

#### 4.1. 共有峰的确定

在 120 分钟内选择峰面积较高的 15 个主要特征峰为共有峰。通过与对照品图谱比对, 其中保留时间为 50.73 分钟的 10 号峰 Leu 峰作为参比峰(表 2)。

#### 4.2. 精密度考察

精密吸取供试品溶液 20  $\mu\text{L}$ , 连续进样 6 次, 直观观察指纹图谱的全貌无明显差别, 用相似度计算, 色谱指纹图谱的相似度均大于 0.980, 表明该仪器的精密度良好。

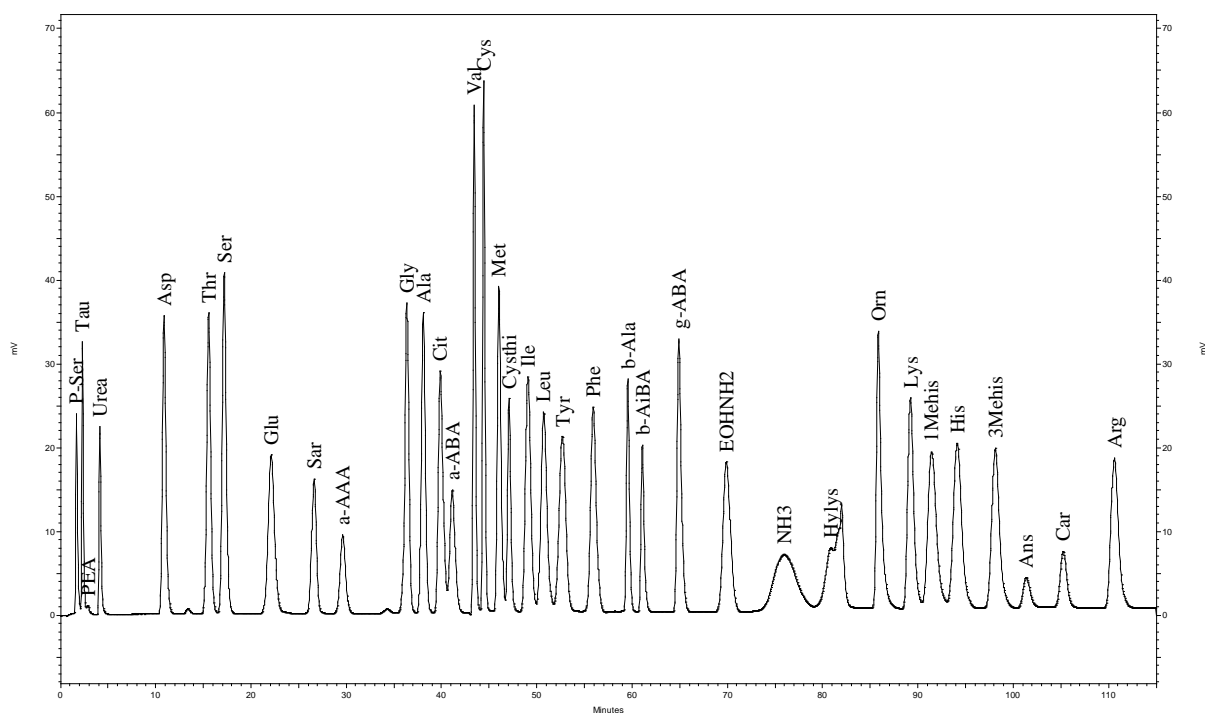
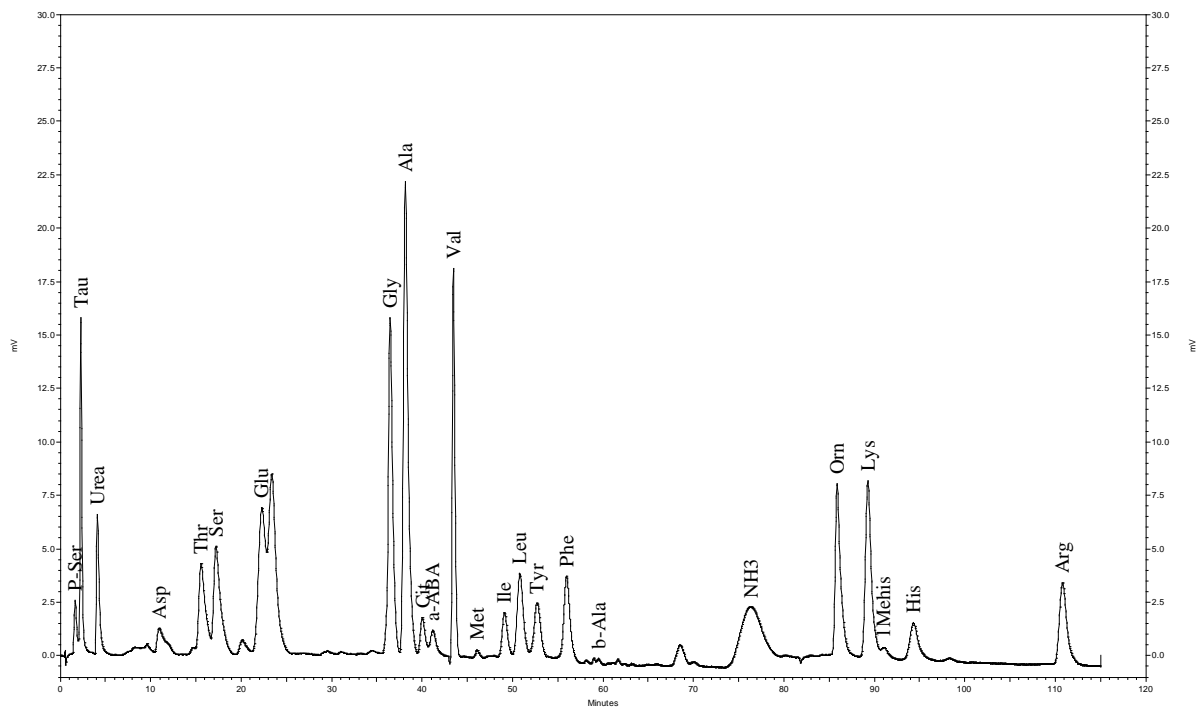


Figure 1. Standard chromatogram of amino acid  
图 1. 氨基酸标准图谱



**Figure 2.** Free amino acid chromatogram of human serum

**图 2.** 人血清游离氨基酸图谱

**Table 2.** Common peak information

**表 2.** 共有峰信息

峰号	氨基酸名称	保留时间(Min)
1	P-Ser	1.68
2	Tau	2.30
3	Asp	10.92
4	Thr	15.59
5	Ser	17.24
6	Glu	22.29
7	Gly	36.23
8	Ala	38.13
9	Val	43.42
10	Leu	50.73
11	Phe	55.97
12	Orn	85.87
13	Lys	89.25
14	His	94.26
15	Arg	110.79

### 4.3. 稳定性考察

设置样品盘温度为 4℃，取同一份供试品溶液在 0、1、1.5、2、5、10 h 分别测定，直观观察指纹图谱的全貌无明显变化，用相似度计算，指纹图谱的相似度均大于 0.980，供试品溶液的成分在 72 小时内是稳定的。

### 4.4. 重复性

同一批样品取样 5 份，按 3.1 项下操作，依 3.2 条件检测定，6 份供试品溶液测得的色谱指纹图谱的全貌直观观察无明显变化，用相似度计算，指纹图谱的相似度均大于 0.980，该方法的重复性较好。

### 4.5. 样品指纹图谱检测

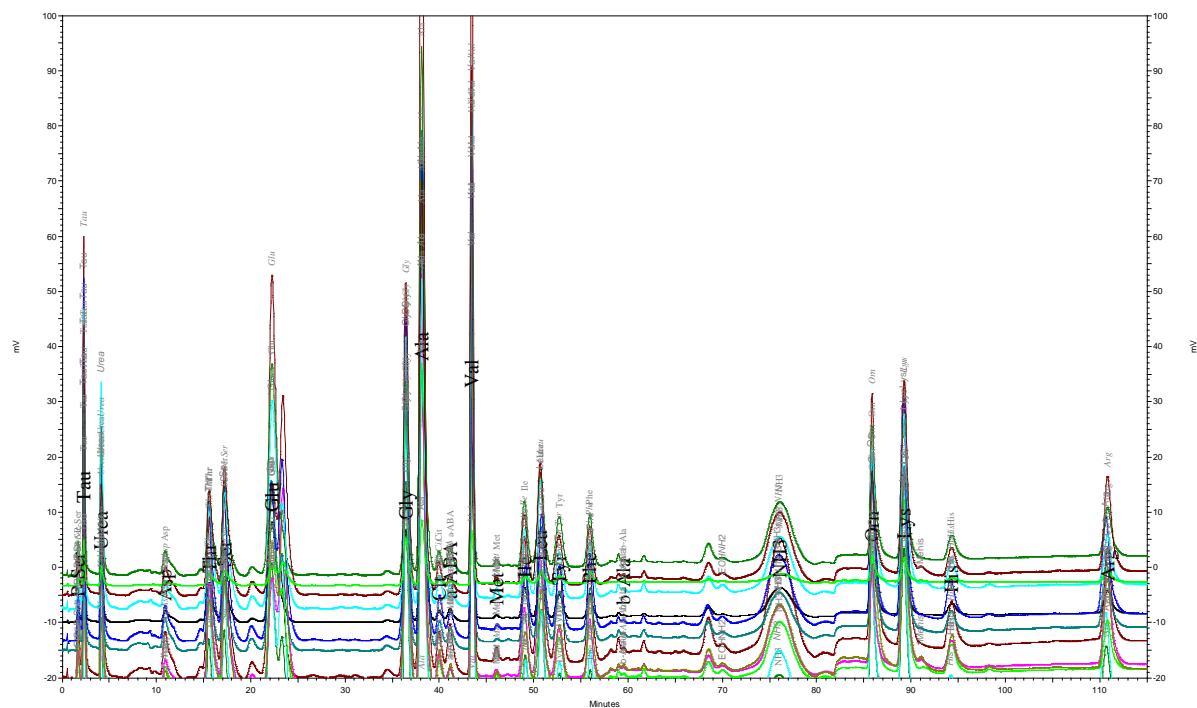
取样品 12 批次，按 3.1 项下操作，依 3.2 条件检测定，得出 12 批样品游离氨基酸图谱，对应的保留时间和峰面积见表 3 和表 4。

## 5. 结果

指纹图谱相似度计算：按检测方法进行测定，得出 12 批样品的游离氨基酸图谱，用 12 批次样品图谱分别与样品 0321 对比，采用中药材指纹图谱相似度评价软件，12 批样品指纹游离氨基酸图谱匹配后的图谱见图 3，根据公式计算夹角余弦和相关系数，结果见表 5。

**Table 3.** Retention time of common peak in chromatogram of free amino acid fingerprints of 12 batches of samples  
**表 3.** 12 批人血清游离氨基酸指纹色谱图共有峰保留时间

样品 峰号	0220	0334	0265	0523	0664	0314	0522	0321	0535	0466	0415	0333
1-P-Ser	1.681	1.663	1.686	1.685	1.691	1.692	1.682	1.691	1.691	1.686	1.685	1.690
2-Tau	2.306	2.264	2.306	2.305	2.300	2.306	2.302	2.310	2.311	2.306	2.299	2.300
3-Asp	10.915	10.750	10.924	10.911	10.912	10.912	10.909	10.915	10.915	10.924	10.922	10.920
4-Thr	15.558	15.328	15.581	15.568	15.564	15.566	15.574	15.570	15.567	15.567	15.571	15.575
5-Ser	17.214	16.956	17.217	17.217	17.209	17.217	17.215	17.245	17.213	17.243	17.220	17.189
6-Glu	22.257	21.931	22.270	22.245	22.256	22.277	22.270	22.271	22.277	22.271	22.260	22.250
7-Gly	36.459	35.912	36.480	36.469	36.469	36.450	36.452	36.475	36.463	36.364	36.470	36.464
8-Ala	38.156	37.565	38.131	38.179	38.140	38.142	38.144	38.130	38.154	38.137	38.160	38.150
9-Val	43.453	42.804	43.469	43.457	43.441	43.461	43.474	43.456	43.442	43.464	43.469	43.450
10-Leu	50.793	50.093	50.787	50.892	50.779	50.802	50.811	50.766	50.791	50.788	50.752	50.765
11-Phe	55.999	55.358	55.998	56.220	56.187	56.024	56.131	56.122	56.002	55.999	56.000	55.999
12-Orn	85.891	83.831	85.891	85.896	85.923	85.932	85.886	85.891	85.933	85.893	85.923	85.894
13-Lys	89.289	87.948	89.289	89.285	89.335	89.285	89.285	89.455	89.153	89.285	89.288	89.285
14-His	94.302	92.867	94.398	94.298	94.119	94.649	94.381	94.298	94.248	94.298	94.282	94.301
15-Arg	110.109	108.557	110.320	110.222	110.333	110.799	110.163	110.802	110.186	110.799	110.254	110.324



**Figure 3.** Fingerprint matching chromatogram of free amino acid

**图 3.** 游离氨基酸指纹图谱匹配图

**Table 4.** The area of common peak in chromatogram of free amino acid fingerprints of 12 batches of samples

**表 4.** 12批人血清游离氨基酸指纹色谱图共有峰的峰面积

样品 峰号	0220	0334	0265	0523	0664	0314	0522	0321	0535	0466	0415	0333
1-P-Ser	269,169	268,985	279,784	269,123	294,576	234,914	222,485	295,448	269,375	291,233	239,274	305,224
2-Tau	995,821	1,179,188	1,084,674	934,745	832,048	1,306,284	1,148,534	1,449,685	836,645	1,465,835	786,343	1,265,374
3-Asp	283,067	409,815	386,546	285,464	482,656	385,675	197,346	389,064	401,342	332,475	421,947	411,650
4-Thr	877,768	1,375,751	927,346	1,023,863	902,733	1,234,756	923,745	1,108,443	889,342	1,034,852	993,052	1,281,319
5-Ser	1,067,894	1,581,776	1,325,367	1,123,547	1,593,742	1,137,422	1,537,465	1,293,745	1,145,353	1,342,546	1,501,242	1,385,139
6-Glu	3,102,892	2,895,477	2,894,783	3,294,785	2,239,485	2,957,675	3,892,873	3,089,844	2,904,755	3,856,535	2,947,535	2,780,328
7-Gly	2,115,717	257,315	2,846,547	2,689,645	2,836,463	3,164,345	3,013,457	3,369,656	2,998,976	2,974,546	2,256,763	2,387,483
8-Ala	3,190,835	4,335,535	3,564,675	3,274,534	4,134,325	3,476,476	4,135,674	3,862,842	3,746,546	2,536,776	2,047,658	3,653,365
9-Val	1,503,122	3,196,548	2,543,564	1,634,647	2,532,567	3,143,546	2,654,568	1,974,645	3,564,645	3,097,587	1,547,655	3,020,309
10-Leu	735,430	1,629,693	2,846,463	857,367	1,023,847	1,348,576	2,018,237	1,837,455	1,867,744	1,637,856	834,976	1,590,614
11-Phe	708,162	866,380	797,437	856,757	896,468	908,647	757,438	686,898	908,974	989,674	795,470	767,836
12-Orn	1,307,541	1,806,771	1,867,363	1,263,863	1,908,327	1,342,363	1,346,473	1,634,433	1,583,643	1,286,735	1,793,743	1,717,799
13-Lys	1,511,604	2,174,960	1,673,584	1,973,643	1,458,354	2,018,734	1,826,343	1,638,463	1,923,642	1,453,846	2,017,863	2,152,814
14-His	394,302	532,827	402,742	397,826	428,352	523,438	521,437	486,534	390,476	586,343	481,634	408,848
15-Arg	866,002	921,935	897,342	972,634	1,110,276	1,087,342	902,784	895,284	1,209,384	1,247,837	862,534	1,053,302

**Table 5.** Similarity comparison of free amino acid fingerprints of 12 batches of samples  
**表5.** 12批样品游离氨基酸指纹图谱相似度比较

样品批号	样品名称	相似度(夹角余弦)
1	0220	0.9723
2	0334	0.9623
3	0265	0.9468
4	0523	0.9324
5	0664	0.9567
6	0314	0.9512
7	0522	0.9711
8	0321	1.0000
9	0535	0.9123
10	0466	0.9032
11	0415	0.9612
12	0333	0.9521

相似度评价：以 8 号样品为参照，1、2、7、11 号样品游离氨基酸指纹图谱相似度较好，相似度均大于 0.960。

人血清氨基酸含量分析，结果见表 6。

## 6. 讨论

本文选用人血中的游离氨基酸来研究氨基酸指纹图谱，较之常规的 18 种氨基酸分析程序，采用氨基酸生理体液测定系统测定人血中的游离氨基酸的含量，分析时间较长(120 min)，分析氨基酸的种类更多，除组成天然蛋白质基本结构的 20 种氨基酸外，还可分析很多特殊的其他氨基酸，这些特殊氨基酸都是 20 种基本氨基酸中某种氨基酸的衍生物，都是在其母体氨基酸参与多肽链后经酶促修饰生产的，此类氨基酸都是某些特种蛋白质的成分。这些氨基酸的功能和作用有些已明确，有些尚在研究中。研究表明，氨基酸代谢与人的健康和疾病状态有直接关系，氨基酸的失衡会导致机体各种生理病理学改变。肿瘤患者多数为高代谢状态，体内蛋白质合成及分解代谢均增高，产生的代谢产物及血液中各种物质成分也随之改变。而作为蛋白质合成的原料及分解代谢产物，氨基酸成分及浓度改变也往往反应了肿瘤患者的不同状态。癌肿快速生长和癌细胞无限制增殖需要大量的营养底物，特别是氨基酸会被大量摄取并消耗，这必然会引起癌组织氨基酸代谢库的改变[1]。各种疾病是否对氨基酸代谢不同，这有待于进一步的研究证实。从本文的研究结果表明，用 L-8900 氨基酸分析仪建立的人血中游离氨基酸指纹图谱有较好的精密度、重复性和稳定性。根据本文的分析结果，虽然可以初步确定人血中氨基酸的指纹图谱，但是由于样品有限，尚难以证明本方法的有效性和代表性。本研究需要建立大量样品基础，才具有统计学意义。今后仍要通过收集多样具有代表性的样本，开展氨基酸指纹研究，经严谨细致的数据统计分析，从中得出规律和差异，才能确立人血中游离氨基酸的可靠稳定指纹图谱库。

**Table 6.** The quantitative results of free amino acid fingerprints of 12 batches of samples (Unit:  $\mu\text{mol/L}$ )  
**表 6.** 12 批人血清氨基酸定量分析结果(单位:  $\mu\text{mol/L}$ )

氨基酸 \ 样品	0220	0334	0265	0523	0664	0314	0522	0321	0535	0466	0415	0333	$\bar{x} \pm s$
1-P-Ser	20.96	20.95	21.79	20.96	22.94	18.30	17.33	23.01	20.98	22.68	18.63	23.77	$21.03 \pm 2.03$
2-Tau	62.86	74.43	68.47	59.00	52.52	82.45	72.50	91.51	52.81	92.53	49.64	79.87	$69.88 \pm 14.89$
3-Asp	15.50	22.44	21.16	15.63	26.43	21.12	10.81	21.30	21.98	18.20	23.10	22.54	$20.02 \pm 4.25$
4-Thr	40.84	64.01	43.15	47.64	42.00	57.45	42.98	51.57	41.38	48.15	46.20	59.61	$48.75 \pm 7.80$
5-Ser	43.28	64.11	53.71	45.54	64.59	46.10	62.31	52.43	46.42	54.41	60.84	56.14	$54.16 \pm 7.65$
6-Glu	172.98	161.42	161.38	183.68	124.85	164.88	217.02	172.25	161.93	214.99	164.32	155.00	$171.22 \pm 25.14$
7-Gly	101.48	12.34	136.53	129.01	136.05	151.78	144.54	161.62	143.84	142.67	108.24	114.51	$123.55 \pm 39.30$
8-Ala	212.71	289.02	237.63	218.29	275.61	231.75	275.70	257.51	249.76	169.11	136.50	243.55	$233.10 \pm 44.53$
9-Val	67.09	142.68	113.53	72.96	113.04	140.31	118.49	88.14	159.11	138.26	69.08	134.81	$113.13 \pm 31.84$
10-Leu	33.83	74.97	130.94	39.44	47.10	62.04	92.84	84.53	85.92	75.34	38.41	73.17	$69.88 \pm 27.95$
11-Phe	34.06	41.66	38.35	41.20	43.11	43.70	36.42	33.03	43.71	47.59	38.25	36.92	$39.83 \pm 4.38$
12-Orn	54.70	75.58	78.12	52.87	79.83	56.16	56.33	68.37	66.25	53.83	75.04	71.86	$65.74 \pm 10.40$
13-Lys	68.68	98.82	76.04	89.67	66.26	91.72	82.98	74.44	87.40	66.05	91.68	97.81	$82.63 \pm 11.97$
14-His	16.16	21.83	16.50	16.30	17.55	21.45	21.37	19.94	16.00	24.03	19.73	16.75	$18.97 \pm 2.76$
15-Arg	43.42	46.23	44.99	48.77	55.67	54.52	45.27	44.89	60.64	62.57	43.25	52.81	$50.25 \pm 6.80$

## 基金项目

广西分析测试研究中心 2012 年公益性科研院所基本业务费项目(2012ACZ02)。

## 参考文献 (References)

- [1] 周淑芬, 刘树业, 丁贤. 肝硬化与肝癌患者血浆氨基酸分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2009, 25(3): 22.

### 期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [aac@hanspub.org](mailto:aac@hanspub.org)