

基于氨基酸同位素稀释质谱法分析

——以血清淀粉样蛋白A为例

汤艳茹, 吴明凯, 黎梓欣, 黄彦捷*

广东省计量科学研究院科研部, 广东 广州

收稿日期: 2026年3月3日; 录用日期: 2026年3月16日; 发布日期: 2026年5月19日

摘要

同位素稀释质谱法是小分子及蛋白质绝对定量的金标准, 是微量、痕量和超痕量元素检测的权威方法, 目前已成为国内外计量机构用于蛋白质定量和相关标准物质研制的首选方法。血清淀粉样蛋白A (SAA) 是炎症相关疾病的关键标志物, 其准确测定对临床检测标准化及标准物质的研制具有重要意义。本研究建立了一种基于氨基酸同位素稀释质谱法的SAA纯度分析方法, 系统优化了水解条件、液相色谱分离条件及质谱检测参数, 实现了SAA的绝对定量。实验选取Phe、Pro和Ile三种氨基酸作为特征氨基酸, 以¹³C标记同位素为内标, 通过重量法配制标准溶液, 最终确定最优实验条件为: 8 mol/L盐酸中水解40 h, 采用ZORBAX Eclipse Plus C18柱等度洗脱(流动相为97% 0.1%甲酸水溶液与3% 0.1%甲酸乙腈溶液), 并优化了锥孔电压(200 V)及碰撞能(Phe/¹³C₉-Phe 54 eV、Pro/¹³C₅-Pro 78 eV、Ile/¹³C₆-Ile 73 eV)。采用括号法计算SAA纯度, 通过系统评估氨基酸标准物质纯度、水解效率、称量误差、峰面积比、分子量及测量重复性等不确定度分量, 测得重组人SAA纯度为86.40 μg/g, 扩展不确定度为1.34% ($k = 2$), 表明方法重复性良好, 且测量结果可溯源至SI国际单位。本研究构建的分析方法准确、可靠、具备溯源性, 为SAA纯度标准物质研制及参考测量程序建立提供了坚实的技术支持。

关键词

同位素稀释质谱法, 血清淀粉样蛋白A, 纯度分析

Analysis Based on Amino Acid Isotope Dilution Mass Spectrometry

—A Case Study of Serum Amyloid A

Yanru Tang, Mingkai Wu, Zixin Li, Yanjie Huang*

Scientific Research Department, Guangdong Provincial Institute of Metrology, Guangzhou Guangdong

Received: March 3, 2026; accepted: March 16, 2026; published: May 19, 2026

*通讯作者。

Abstract

Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS) is recognized as the gold standard for the absolute quantification of small molecules and proteins, as well as an authoritative method for the detection of trace, micro, and ultratrace elements. It has become the preferred method for protein quantification and the development of reference materials in metrological institutions worldwide. Serum Amyloid A (SAA), a key biomarker for inflammation-related diseases, requires accurate determination for the standardization of clinical assays and the production of certified reference materials. This study established a novel purity analysis method for SAA based on amino acid IDMS. The method involved systematic optimization of hydrolysis conditions, liquid chromatography separation, and mass spectrometric detection parameters, enabling the absolute quantification of SAA. Three amino acids, Phe, Pro, and Ile, were selected as characteristic analytes. Using weight-based preparation of standard solutions with ^{13}C -labeled isotopic analogues as internal standards, the optimal experimental conditions were determined as follows: hydrolysis in 8 mol/L HCl for 40 hours, isocratic elution on a ZORBAX Eclipse Plus C18 column (mobile phase: 97% 0.1% formic acid in water/3% 0.1% formic acid in acetonitrile), with optimized cone voltage (200 V) and collision energies (54 eV for Phe/ $^{13}\text{C}_9$ -Phe, 78 eV for Pro/ $^{13}\text{C}_5$ -Pro, and 73 eV for Ile/ $^{13}\text{C}_6$ -Ile). The purity of recombinant human SAA was calculated using the bracketing method. By systematically evaluating uncertainty components, including the purity of amino acid reference materials, hydrolysis efficiency, weighing errors, peak area ratios, molecular weight, and measurement repeatability, the SAA purity was determined to be 86.40 $\mu\text{g/g}$ with an expanded uncertainty of 1.34% ($k = 2$), demonstrating good repeatability. The measurement result is traceable to the International System of Units. The established analytical method is accurate, reliable, and metrologically traceable, providing robust technical support for the development of SAA purity reference materials and the establishment of reference measurement procedures.

Keywords

Isotope Dilution Mass Spectrometry, Serum Amyloid A, Purity Analysis

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

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



Open Access

1. 引言

血清淀粉样蛋白 A (serum amyloid A, SAA) 是一种由肝脏合成的急性时相反应蛋白, 是由多基因编码的、具有 104~112 个氨基酸的低分子量蛋白质家族, 也是一类亲脂性载脂蛋白[1]-[3]。在机体受到感染、创伤、炎症等刺激后会迅速升高, 发挥免疫调节作用, 在炎症反应的早期(24~48 h), 血清浓度可迅速增加至 1000 倍以上[4], 可作为类风湿性关节炎、心血管疾病、肿瘤或病毒感染等多种炎症相关疾病的标志物, 因此常用来评估炎症和感染状态[2] [5] [6]。

目前, 临床上对 SAA 的检测方法主要有胶体金免疫检测技术、酶联免疫法、免疫比浊法、荧光免疫法等, 这些方法虽具有操作简便、检测快速的优点, 但通常难以实现绝对定量[7]-[9]。同位素稀释质谱法 (Isotope Dilution Mass Spectrometry, IDMS) 是在试样中加入已知量的、与被测元素或物质相同但同位素丰度不同的稀释剂, 混合均匀达到同位素组成的平衡后, 用质谱法测量混合样品中被测元素的同位素比值, 由此计算出被测元素或物质的含量[10]。该方法在痕量分析中表现出卓越的准确性与高度特异性, 被认为

是小分子及蛋白质绝对定量的金标准,是微量、痕量和超痕量元素检测的权威方法[11][12],因此, IDMS 已成为国内外计量机构用于蛋白质定量和相关标准物质研制的首选方法。

本研究采用氨基酸同位素稀释质谱法对 SAA 的纯度进行准确测定。通过对氨基酸水解时间、液相色谱分离条件及质谱参数进行系统优化,成功构建了一种可精准定量 SAA 的分析方法。该方法测定结果可溯源至 SI 国际单位,并完成了不确定度评估,从而为 SAA 的准确检测提供了坚实的技术基础。

2. 材料与amp;方法

2.1. 主要仪器与试剂

重组人血清淀粉样蛋白 A (纯度>98%, 上海甄融生物科技有限公司); 乙腈(色谱级, 德国默克); 盐酸(优级纯, 广州化学试剂厂); 甲酸(色谱级, 上海麦克林); GBW09235 L-苯丙氨酸纯度标准物质(Phe, 纯度 99.8%, $U_{rel}=0.4$, $k=2$, 中国计量科学研究院); GBW(E)100084 L-脯氨酸纯度标准物质(Pro, 纯度 99.0%, $U_{rel}=1.5$, $k=2$, 中国计量科学研究院); GBW09238 L-异亮氨酸纯度标准物质(Ile, 纯度 99.7%, $U_{rel}=0.3$, $k=2$, 中国计量科学研究院); $^{13}\text{C}_9$ -苯丙氨酸($^{13}\text{C}_9$ -Phe)、 $^{13}\text{C}_5$ -脯氨酸($^{13}\text{C}_5$ -Pro)、 $^{13}\text{C}_6$ -异亮氨酸($^{13}\text{C}_6$ -Ile) (99%, 美国剑桥同位素实验室)。

电子天平(感量 0.01 mg, CPA225D, 德国赛多利斯); 超高效液相色谱串联质谱仪(1290 infinity II-6470, 美国安捷伦); 单道手动可调式移液枪(10~100 μL , 德国艾本德); 真空干燥箱(DZF-6050, 上海一恒); 氮吹仪(HGC-24A, 北京恒奥); 超纯水系统(Millipore Elix Milli-Q, 德国默克)。

2.2. 实验方法

2.2.1. 特征氨基酸的选择

为确保定量结果的准确性与代表性,本研究基于 SAA 的氨基酸序列信息(UniProt 数据库登录号: P0DJ18), 系统选择了 Phe、Pro 和 Ile 作为特征定量氨基酸。该蛋白由 104 个氨基酸残基组成, 其中 Phe 残基数为 8 个, Pro 残基数为 4 个, Ile 残基数为 3 个, 三种氨基酸在序列中分布均匀, 残基数适中, 既能反映蛋白的整体组成特征, 又便于定量计算与结果验证。从水解稳定性角度分析, Phe、Pro 和 Ile 均为疏水性氨基酸, 在酸性水解条件下表现出良好的化学稳定性, 适合作为蛋白质水解定量的标志物[13]。在质谱检测方面, 三种氨基酸及其 ^{13}C 标记同位素内标($^{13}\text{C}_9$ -Phe、 $^{13}\text{C}_5$ -Pro、 $^{13}\text{C}_6$ -Ile)在电喷雾离子化条件下具有明确的母离子与碎片离子特征, 多反应监测通道无交叉干扰, 色谱峰形对称, 可实现高特异性检测。综合以上因素, Phe、Pro 和 Ile 在序列代表性、水解稳定性、检测特异性方面均满足特征氨基酸的选择要求, 可作为 SAA 纯度定量的可靠标志物。

2.2.2. 标准溶液制备

SAA 样品制备: 用电子天平准确称取一定量的重组人 SAA 冻干粉末, 将其溶于超纯水中, 使其终浓度为 100 $\mu\text{g/g}$, 配制完成后置于 -80°C 低温保存。

氨基酸标准溶液母液及混合液的配制: 用电子天平分别准确称量 Phe、Pro 及 Ile 固体粉末 10 mg, 分别溶于浓度为 0.1 mol/L 的盐酸中, 使其终浓度为 0.2 mg/g, 记为氨基酸标准溶液母液。采用重量法准确称取一定量的三种氨基酸标准溶液母液, 加入浓度为 0.1 mol/L 的盐酸中, 稀释后的样品记为氨基酸标准溶液混合液。

氨基酸同位素标记溶液母液及混合液的配制: 用电子天平分别准确称量 $^{13}\text{C}_9$ -Phe、 $^{13}\text{C}_5$ -Pro 及 $^{13}\text{C}_6$ -Ile 同位素固体粉末 10 mg, 分别溶于浓度为 0.1 mol/L 的盐酸中, 使其终浓度为 0.2 mg/g, 记为氨基酸同位素标记溶液母液。采用重量法称取一定量的三种氨基酸同位素标记溶液母液, 加入浓度为 0.1 mol/L 的盐酸中, 得到氨基酸同位素标记溶液混合液。

低浓度、高浓度混合溶液的配制：采用重量法分别准确称取氨基酸标准溶液混合液及氨基酸同位素标记溶液混合液配制低标及高标溶液，其中低标溶液中 Phe 及 $^{13}\text{C}_9\text{-Phe}$ 、Pro 及 $^{13}\text{C}_5\text{-Pro}$ 、Ile 及 $^{13}\text{C}_6\text{-Ile}$ 质量比均约为 0.9:1，高标溶液中 Phe 及 $^{13}\text{C}_9\text{-Phe}$ 、Pro 及 $^{13}\text{C}_5\text{-Pro}$ 、Ile 及 $^{13}\text{C}_6\text{-Ile}$ 质量比均约为 1.1:1。准确记录移液质量和溶液总质量。

2.2.3. 样品水解条件优化

为明确 SAA 样品的最优水解条件，本研究结合实验室前期研究基础，对水解体系中的盐酸浓度进行优化考察，设置两组平行水解方案：方案一为 6 mol/L 盐酸，水解时长 40 h；方案二为 8 mol/L 盐酸，水解时长 40 h。以水解效率为核心评价指标，采用同位素稀释质谱法进行定量分析，具体实验操作如下：

(1) 水解前预处理：将 SAA 样品与 $^{13}\text{C}_9\text{-Phe}$ 、 $^{13}\text{C}_5\text{-Pro}$ 及 $^{13}\text{C}_6\text{-Ile}$ 同位素标记溶液的混合液从冰箱中取出，平衡至室温；

(2) 样品制备与水解：采用电子天平精密移取 25 μL SAA 样品与 50 μL 同位素标记混合溶液，共同加入至洁净的水解管中；随后加入 400 μL 对应浓度(6 mol/L 或 8 mol/L)的盐酸溶液，涡旋振荡 1 min 至混合均匀，采用氮吹仪吹脱 2 min 以去除体系中的氧气；将密封后的水解管置于 110 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥箱中，进行水解反应；

(3) 后续处理与检测：水解反应结束后，取出水解管冷却至室温，将样品转移至氮吹仪中吹干；向干燥后的样品中加入 1 mL 0.1% (v/v) 甲酸水溶液，涡旋混匀使样品充分复溶；复溶后样品经 0.22 μm 有机相滤膜过滤，收集滤液用于 IDMS 分析。

2.2.4. 液相色谱条件优化

基于相关文献报道及本实验室前期研究基础[7][14]，为建立 SAA 样品中目标分析物的高效分离检测体系，对液相色谱分离条件进行优化，选用两种洗脱模式(梯度洗脱与等度洗脱)进行对比考察，具体色谱条件如下：

1、色谱系统与核心参数：(1) 色谱柱：ZORBAX Eclipse Plus C18 柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μm , Agilent Technologies, USA)；(2) 进样量：2 μL ；(3) 流动相流速：0.2 mL/min；(4) 柱温：30 $^{\circ}\text{C}$ ；(5) 流动相组成：A 相为 0.1% (v/v) 甲酸水溶液，B 相为 0.1% (v/v) 甲酸乙腈溶液。

2、洗脱方案设计：方案一：梯度洗脱程序：(0~10) min, 2% B；(10~11) min, 2%~95% B；(11~14) min, 95% B；(14~14.1) min, 95%~2% B；(14.1~18) min, 2% B。方案二：等度洗脱程序：流动相比保持恒定：97% (v/v) A 相 + 3% (v/v) B 相，全程洗脱时长为 35 min。实验过程中通过对比两种洗脱模式下目标分析物的峰形对称性、分离度及峰纯度等关键指标，筛选出适用于本研究的最优洗脱方案。

2.2.5. 质谱条件优化

为确保目标氨基酸与对应稳定同位素标记内标的离子化效率及裂解效率的一致性，采用仪器自动优化功能，分别对 Phe (母离子 m/z 166.2 \rightarrow 子离子 m/z 120.2)、 $^{13}\text{C}_9\text{-Phe}$ (母离子 m/z 175.2 \rightarrow 子离子 m/z 128.2)、Pro (母离子 m/z 116.1 \rightarrow 子离子 m/z 70.0) 及 $^{13}\text{C}_5\text{-Pro}$ (母离子 m/z 121.1 \rightarrow 子离子 m/z 74.1)、Ile (母离子 m/z 132.2 \rightarrow 子离子 m/z 86.1)、 $^{13}\text{C}_6\text{-Ile}$ (母离子 m/z 138.2 \rightarrow 子离子 m/z 91.1) 的锥孔电压和碰撞能进行单独优化。其中，锥孔电压优化范围设定为 0~250 V，碰撞能优化范围设定为 0~80 eV。

2.2.6. 蛋白含量的计算

采用括号法对蛋白质的含量进行定量测定，3 个平行样品，每份重复检测 3 次，根据公式(1)和公式(2)计算得到 SAA 蛋白水解后 Phe、Pro、Ile 三种氨基酸的浓度，再根据公式(3)分别以每种氨基酸浓度计算蛋白浓度。

$$I_R = \frac{R_{SAA}(I_2 - I_1) - (I_2R_1 - I_1R_2)}{R_2 - R_1} \quad (1)$$

式中: I_R 为 SAA 中氨基酸质量比(非标记/标记); R_{SAA} 为 SAA 中氨基酸色谱峰面积比(非标记/标记); I_1 为低浓度混合溶液中氨基酸质量比(非标记/标记); I_2 为高浓度混合溶液中氨基酸质量比(非标记/标记); R_1 为低浓度混合溶液中氨基酸响应比值(非标记/标记); R_2 为高浓度混合溶液中氨基酸响应比值(非标记/标记)。

$$C_{AA} = \frac{m_{IS} \times C_{IS} \times I_R}{m_{SAA}} \quad (2)$$

式中: C_{AA} 为 SAA 中 Phe、Pro、Ile 的浓度, $\mu\text{g/g}$; m_{IS} 为 SAA 中加入 $^{13}\text{C}_9$ -Phe、 $^{13}\text{C}_5$ -Pro 及 $^{13}\text{C}_6$ -Ile 同位素标记混合溶液中间液的浓度, mg ; C_{IS} 为 $^{13}\text{C}_9$ -Phe、 $^{13}\text{C}_5$ -Pro 及 $^{13}\text{C}_6$ -Ile 同位素标记混合溶液中间液的浓度, $\mu\text{g/g}$; m_{SAA} 为 SAA 样品质量, mg 。

$$C_{SAA-AA} = \frac{C_{AA} \times M_{SAA}}{M_{AA} \times n} \quad (3)$$

式中: C_{SAA-AA} 为氨基酸计算得到的 SAA 纯度; AA 为 Phe、Pro、Ile, $\mu\text{g/g}$; M_{SAA} 为 SAA 的分子量, 11682.70 g/mol ; M_{AA} 为氨基酸的分子量; n 为 SAA 中氨基酸个数, 其中 $n_{\text{Phe}} = 8$, $n_{\text{Pro}} = 4$, $n_{\text{Ile}} = 3$ 。

按照公式(4)取 Phe、Pro、Ile 含量计算得到的蛋白质浓度结果的平均值作为 SAA 纯度测定的结果, 记为 C_{SAA} , 单位: $\mu\text{g/g}$ 。

$$C_{SAA} = \frac{C_{SAA-\text{Pro}} + C_{SAA-\text{Phe}} + C_{SAA-\text{Ile}}}{3} \quad (4)$$

3. 结果与分析

3.1. 样品水解条件优化

为确定 SAA 样品的最优水解条件, 本研究基于实验室前期研究基础, 对水解体系中盐酸浓度进行优化探究, 设计两组平行水解实验: 方案一采用 6 mol/L 盐酸, 水解时长 40 h ; 方案二采用 8 mol/L 盐酸, 水解时长 40 h , 相关实验结果如表 1 所示。

以水解出的非标记氨基酸与同位素标记的氨基酸的峰面积比(R)为核心评价指标, 若两者基本保持水平, 说明已经水解完全。由表 1 数据可见, 方案一的水解反应未完全进行, 而方案二可满足实验要求, 因此确定方案二(8 mol/L 盐酸、水解时长 40 h)作为后续实验的最优水解条件。

Table 1. Optimization of hydrochloric acid concentration for hydrolysis

表 1. 水解用盐酸浓度优化

| 水解条件 | R(Phe)/R($^{13}\text{C}_9$ -Phe) | | | R(Pro)/R($^{13}\text{C}_5$ -Pro) | | | R(Ile)/R($^{13}\text{C}_6$ -Ile) | | |
|------------|-----------------------------------|------|------|-----------------------------------|------|------|-----------------------------------|------|------|
| | 平行 1 | 平行 2 | 平行 3 | 平行 1 | 平行 2 | 平行 3 | 平行 1 | 平行 2 | 平行 3 |
| 6 mol/L 盐酸 | 0.27 | 0.26 | 0.24 | 0.23 | 0.24 | 0.23 | 0.27 | 0.24 | 0.28 |
| 8 mol/L 盐酸 | 1.10 | 1.11 | 1.10 | 0.98 | 0.97 | 0.98 | 1.04 | 1.04 | 1.05 |

3.2. 液相色谱条件优化

为构建 SAA 样品中目标分析物高效、可靠的分离检测体系, 本研究对液相色谱洗脱条件进行了系统

优化, 对比评估了梯度洗脱与等度洗脱两种模式对三种目标氨基酸及其同位素内标的分离效果, 以色谱峰形对称性、分离度及峰纯度为核心评价指标, 结果如图 1 所示。实验结果表明, 梯度洗脱模式下仅呈现 2 个色谱峰, 目标分析物未能实现基线分离, 这一现象可归因于多重因素的共同影响: (1) Phe、Pro 和 Ile 均为中性氨基酸, 极性差异较小, 在反相 C18 色谱柱上的保留行为相似, 而梯度洗脱过程中有机相比例的变化难以有效区分三者, 易导致共洗脱或分离不完全; (2) 洗脱程序在 1 min 内将 B 相比从 2% 快速升至 95%, 变化速率过快, 使目标物在短时间内集中洗脱, 无法实现有效的色谱分离。相比之下, 等度洗脱模式采用恒定的流动相配比(97% 0.1%甲酸水溶液 + 3% 0.1%甲酸乙腈), 不仅使各目标分析物的色谱峰分离度显著提升, 且在保留时间、峰形对称性和峰纯度方面均获得显著改善, 完全满足检测要求。该配比恰好平衡了保留强度与洗脱能力, 使 Phe、Pro、Ile 及其标记内标在 35 min 内实现基线分离。综上, 确定等度洗脱为后续实验的最优洗脱方案。

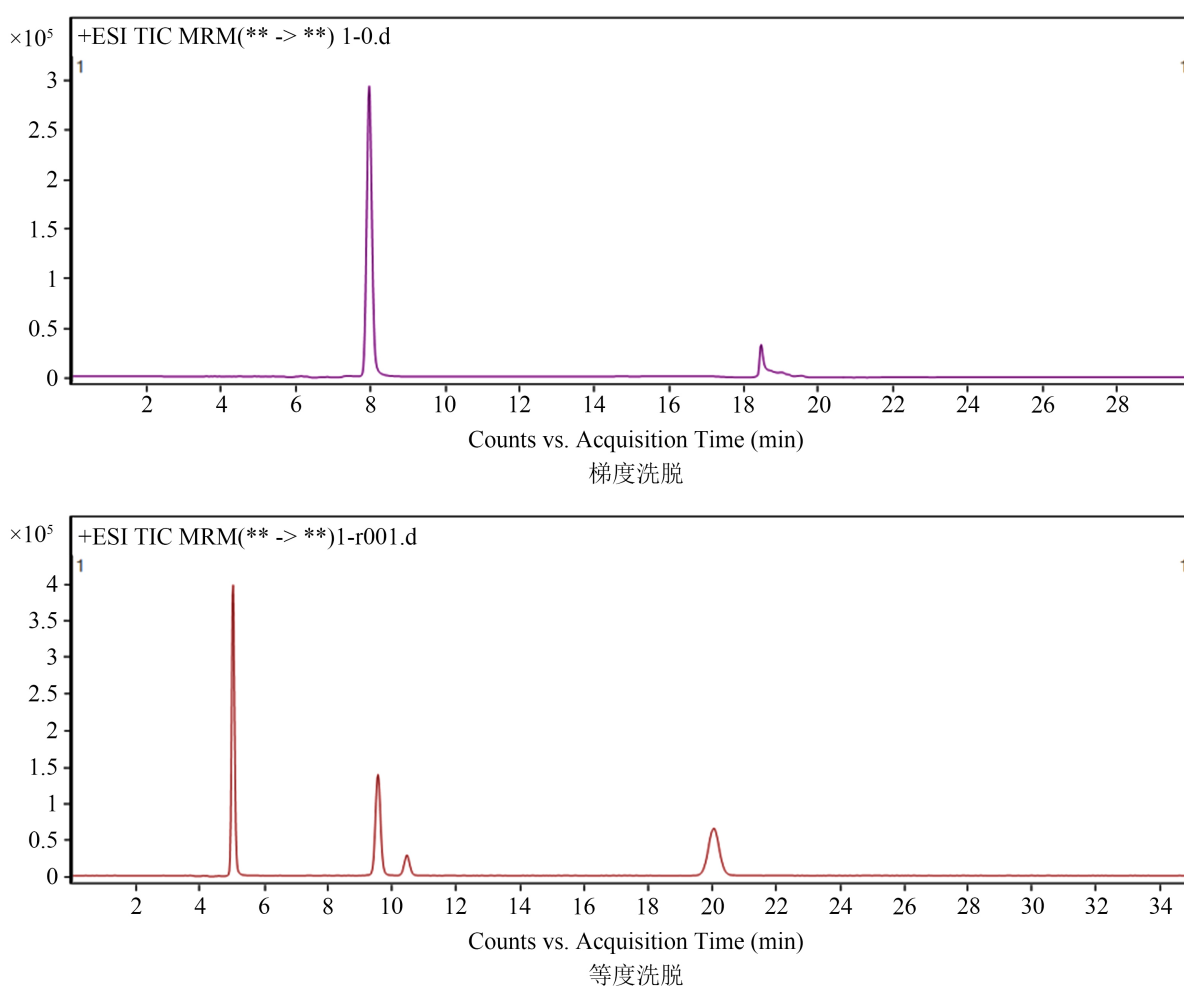


Figure 1. Optimization of liquid chromatography conditions

图 1. 液相色谱条件优化

3.3. 质谱条件优化

采用仪器自动优化功能, 分别对 Phe、 $^{13}\text{C}_9$ -Phe、Pro、 $^{13}\text{C}_5$ -Pro、Ile、 $^{13}\text{C}_6$ -Ile 的锥孔电压和碰撞能进行了单独优化, 结果如表 2 所示。

Table 2. Results of mass spectrometry condition optimization
表 2. 质谱条件优化结果

| | 气体温度 | | | 325°C | |
|-----------------------------------|-------|-------|------|----------|---------|
| | 气体流速 | | | 10 L/min | |
| | 雾化器 | | | 20 psi | |
| | 鞘气温度 | | | 350°C | |
| | 鞘气流速 | | | 11 L/min | |
| 多反应监测条件 | 母离子 | 子离子 | 锥孔电压 | 碰撞能 | 碰撞池加速电压 |
| Phe | 166.2 | 120.2 | 200 | 54 | 16 |
| Pro | 116.1 | 70.0 | 200 | 78 | 17 |
| Ile | 132.2 | 86.1 | 200 | 73 | 9 |
| ¹³ C ₉ -Phe | 175.2 | 128.2 | 200 | 54 | 16 |
| ¹³ C ₅ -Pro | 121.1 | 74.1 | 200 | 78 | 17 |
| ¹³ C ₆ -Ile | 138.2 | 91.1 | 200 | 73 | 9 |

3.4. 蛋白含量的计算

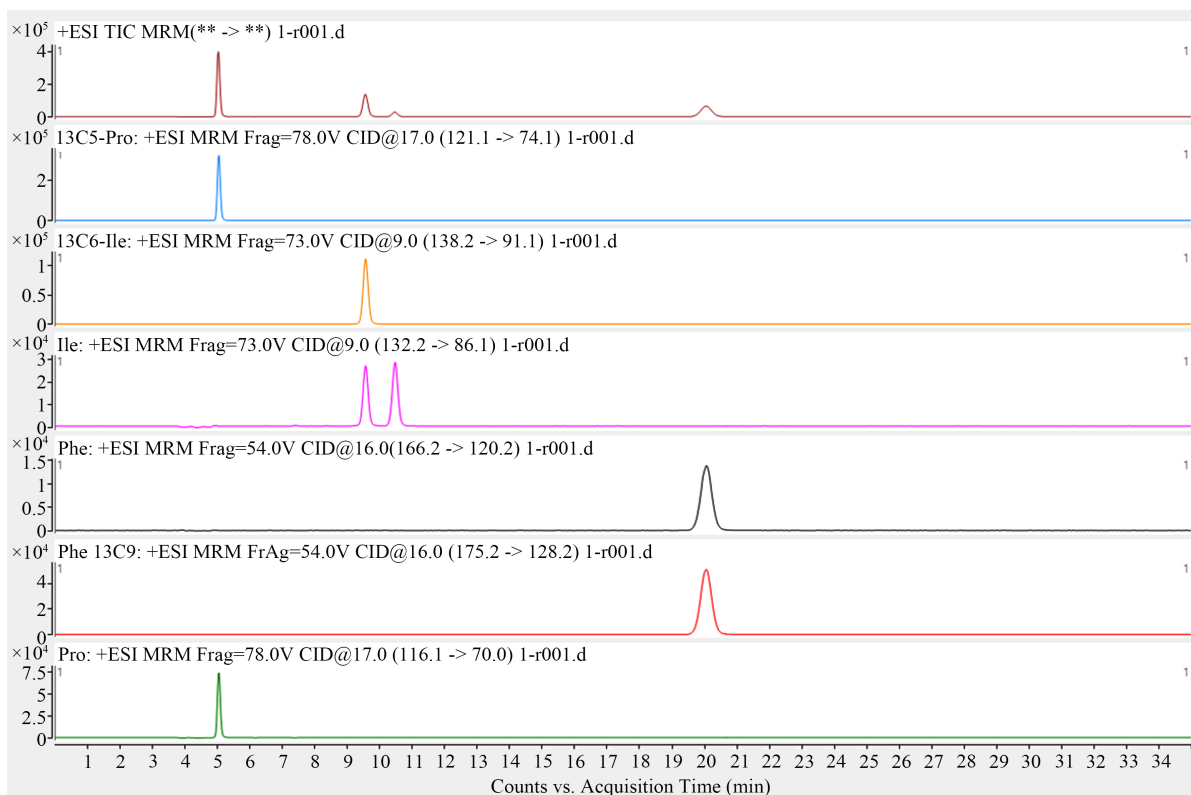


Figure 2. Mass spectrum of recombinant human SAA following optimization
图 2. 优化后测定重组人 SAA 的质谱结果图

采用建立的方法,测定重组人 SAA 蛋白水解产物中 3 种氨基酸及 3 种同位素标记的质谱峰面积,质谱结果见图 2。取 3 个平行样品,每份重复检测 3 次,结果见表 3。测得重组人 SAA 蛋白含量为 86.40 $\mu\text{g/g}$,测定结果的相对标准偏差为 0.32%,表明该方法测定重组人 SAA 蛋白样品浓度具有良好的重复性。

Table 3. Quantitative analysis results of recombinant human SAA protein
表 3. 重组人 SAA 蛋白定量分析结果

| 样品编号 | Phe ($\mu\text{g/g}$) | Pro ($\mu\text{g/g}$) | Ile ($\mu\text{g/g}$) | 平均值($\mu\text{g/g}$) |
|-------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| 1 | 84.66 | 86.13 | 87.63 | 86.14 |
| 2 | 84.78 | 85.64 | 87.85 | 86.09 |
| 3 | 84.42 | 85.32 | 88.53 | 86.09 |
| 4 | 85.70 | 85.67 | 87.82 | 86.40 |
| 5 | 85.82 | 85.55 | 87.51 | 86.29 |
| 6 | 86.36 | 86.01 | 87.08 | 86.48 |
| 7 | 86.24 | 86.11 | 87.42 | 86.59 |
| 8 | 86.24 | 86.94 | 87.49 | 86.89 |
| 9 | 85.92 | 85.87 | 88.18 | 86.65 |
| 平均值 | 85.57 | 85.91 | 87.72 | 86.40 |
| RSD/% | 0.88 | 0.55 | 0.49 | 0.32 |

4. 测量结果的不确定度评定

定值过程引入的不确定度来源主要包括:氨基酸有证标准物质的纯度、水解效率、天平称量、峰面积比(非标记/标记)重复性、分子量计算及测量结果重复性等,各分量按以下方式评定。

4.1. 氨基酸有证标准物质引入的不确定度 $u_{rel}(P)$

根据标准物质证书提供的参数,采用以下公式计算相对标准不确定度: $u_{rel}(P) = \frac{U_{rel}(P)}{k \times P}$, 式中: $u_{rel}(P)$ 为标准物质的相对扩展不确定度, k 为包含因子($k=2$), P 为标准物质纯度。

Phe 纯度标准物质的 $U_{rel}=0.4\%$, $P=99.8\%$, 则 $u_{rel}(P) = \frac{0.4\%}{2 \times 99.8\%} = 0.20\%$; Pro 纯度标准物质的 $U_{rel} = 1.5\%$, $P = 99.0\%$, 则 $u_{rel}(P) = \frac{1.5\%}{2 \times 99.0\%} = 0.76\%$; Ile 纯度标准物质的 $U_{rel} = 0.3\%$, $P = 99.7\%$, 则 $u_{rel}(P) = \frac{0.3\%}{2 \times 99.7\%} = 0.15\%$ 。

4.2. 水解效率引入的不确定度 $u_{rel}(P_H)$

参考冠状病毒 N 蛋白同位素稀释质谱法测量能力计量比对项目数据及参考文献研究结果[15], 评定其相对标准不确定度为 1.00%。

4.3. 称量引入的不确定度 $u_{rel}(m)$

实验中称量对象包括 SAA 样品、氨基酸标准物质、同位素内标及稀释溶剂,其中小质量称量对不确

定度贡献显著,重点评定 SAA 样品及氨基酸同位素标记溶液母液称量的不确定度。称量采用“去皮-称量”两步法,所用电子天平的最大允许误差为 ± 0.01 mg,按矩形分布评定(包含因子 $k = \sqrt{3}$)。

以 Pro 纯度标准物质称量为例,称量不确定度计算为 $u(m) = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0.01}{\sqrt{3}} = 5.77 \times 10^{-3}$ mg,相对标准不确定度为 $u_{rel}(m) = \frac{5.77 \times 10^{-3}}{9.41} = 0.09\%$,其余称量过程的不确定度分量按相同方法分析,结果见表 4。

4.4. 峰面积比(非标记/标记)重复性引入的不确定度 $u_{rel}(A_s)$

按照 A 类不确定度评定方法进行,对样品进行 9 次重复测量,得到 9 次非标记氨基酸和标记氨基酸的面积 A ,根据以下公式计算相对标准不确定度: $u_{rel}(A_s) = \frac{s}{\bar{A}\sqrt{n}}$,式中 S 为 9 次测量峰面积比的标准偏差, \bar{A} 为峰面积比的平均值, $n = 9$ 。

经计算, Phe 对应的 $u_{rel}(A_s) = 0.42\%$, Pro 对应的 $u_{rel}(A_s) = 0.25\%$, Ile 对应的 $u_{rel}(A_s) = 0.15\%$ 。

4.5. 分子量引入的不确定度 $u_{rel}(M)$

根据 SAA 的分子式($C_{510}H_{800}N_{134}O_{155}S_4$)及分子量($M_{SAA} = 11682.70$ g/mol),按以下公式计算分子量的相对标准不确定度: $u_{rel}(M) = \frac{1}{M} \times \sqrt{\sum_{i=1}^n [N_i u_i]^2}$ 。

式中: N_i 为元素 i 的原子个数; u_i 为元素 i 相对原子质量的标准不确定度(取自 IUPAC 国际原子量表); M 为目标物分子量。各元素的相对原子质量及标准不确定度分别为: C: 12.0107 ± 0.0008 ; H: 1.00794 ± 0.00007 ; O: 15.9994 ± 0.0003 ; N: 14.00674 ± 0.00007 ; S: 32.065 ± 0.005 。

因此,经计算: $u_{rel}(M_{SAA}) = 3.55 \times 10^{-5}$, $u_{rel}(M_{phe}) = 4.40 \times 10^{-5}$ 、 $u_{rel}(M_{pro}) = 3.56 \times 10^{-5}$ 、 $u_{rel}(M_{ile}) = 3.75 \times 10^{-5}$ 。

4.6. 测量结果重复性引入不确定度 $u_{rel}(Rep)$

通过 9 次重复测量结果计算重复性不确定度,公式如下: $u_{rel}(Rep) = \frac{1}{A} \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$ 。经计算, Pro 对应的 $u_{rel}(Rep) = 0.18\%$, Phe 对应的 $u_{rel}(Rep) = 0.29\%$, Ile 对应的 $u_{rel}(Rep) = 0.17\%$ 。

4.7. 合成不确定度 u_{rel}

将三种氨基酸的不确定度各分量按以下公式进行合成,分别得到三种氨基酸的合成相对标准不确定度 $u_{rel}(AA)$: $u_{rel}(AA) = \sqrt{u_{rel}(P)^2 + u_{rel}(水解)^2 + u_{rel}(m)^2 + u_{rel}(A_s)^2 + u_{rel}(M)^2 + u_{rel}(Rep)^2}$ 。最终取三种氨基酸的合成相对标准不确定度的平均值记为 SAA 定量结果的合成相对标准不确定度

$u_{rel} = \frac{1}{3} \sqrt{u_{rel}^2(Pro) + u_{rel}^2(Phe) + u_{rel}^2(Ile)}$,将合成相对标准不确定度 u_{rel} 乘以包含因子 k (置信概率 95%, $k = 2$),即为测量结果的相对扩展不确定度 U_{rel} 。

经计算, Pro 的合成相对标准不确定度

$u_{rel}(Pro) = \sqrt{(0.76\%)^2 + (1.00\%)^2 + (0.09\%)^2 + (0.25\%)^2 + (0.0036\%)^2 + (0.18\%)^2} = 1.30\%$,同理得出

$u_{rel}(Phe) = 1.14\%$, $u_{rel}(Ile) = 1.04\%$,因此定值结果的合成相对标准不确定度

$u_{rel} = \frac{1}{3} \sqrt{1.30\%^2 + 1.14\%^2 + 1.04\%^2} = 0.67\%$,取包含因子 $k = 2$ (置信概率 95%),则相对扩展不确定度为

$U_{rel} = u_{rel} \times k = 0.67\% \times 2 = 1.34\%$,最终 SAA 纯度测量结果可表示为: $86.40 \mu\text{g/g} \pm 1.16 \mu\text{g/g} (k = 2)$ 。

Table 4. Summary of measurement uncertainty for SAA purity**表 4.** SAA 纯度测量结果的不确定度汇总表

| | 相对标准不确定度 (Phe) | 相对标准不确定度 (Pro) | 相对标准不确定度 (Ile) | 相对标准不确定度 (SAA) |
|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 氨基酸有证标准物质 $u_{rel}(P)$ | 0.20% | 0.76% | 0.15% | - |
| 水解效率 $u_{rel}(P_H)$ | 1.00% | 1.00% | 1.00% | - |
| 称量 $u_{rel}(m)$ | 0.08% | 0.09% | 0.08% | - |
| 峰面积比重复性 $u_{rel}(A_s)$ | 0.42% | 0.25% | 0.15% | - |
| 分子量 $u_{rel}(M)$ | 0.0044% | 0.0036% | 0.0038% | 0.0036% |
| 测量结果重复性 $u_{rel}(Rep)$ | 0.29% | 0.18% | 0.17% | - |
| 合成相对标准不确定度 u_{rel} | 1.14% | 1.30% | 1.04% | |
| 相对扩展不确定度 $U_{rel}(k=2)$ | | 1.34% | | |

5. 结论

本研究针对 SAA 纯度绝对定量的需求, 成功建立了基于氨基酸同位素稀释质谱法的分析方法。系统优化了 SAA 水解条件、液相色谱分离条件及质谱检测关键参数, 确定了 8 mol/L 盐酸水解 40 h 为最优水解条件, 确保 SAA 完全水解为特征氨基酸; 等度洗脱模式相比梯度洗脱, 显著提升了 Phe、Pro、Ile 及其同位素内标的分离度; 通过仪器自动优化获得的质谱参数保障了目标物的高离子化效率与检测灵敏度。建立了可靠的定量计算方法, 以 3 种特征氨基酸为定量依据, 采用括号法实现了 SAA 纯度的绝对定量, 测量结果重复性优异, 且可通过氨基酸标准物质溯源至 SI 国际单位, 满足计量溯源性要求。完成了全面的不确定度评估, 系统识别并量化了氨基酸标准物质纯度、水解效率、称量误差、峰面积比重复性、分子量计算及测量结果重复性等关键不确定度分量, 合成相对标准不确定度为 0.67%, 扩展不确定度为 1.34% ($k=2$), 确保测量结果的可靠性与可比性。

本方法解决了传统免疫检测技术难以实现 SAA 绝对定量的问题, 为 SAA 纯度标准物质的研制、临床检测方法的校准及炎症相关疾病诊断的标准化提供了核心技术支撑, 具有重要的计量学意义与临床应用前景。

基金项目

广东省市场监督管理局科技项目(2024ZZ03); 广东省省级科技计划项目(2023A1111120024)。

参考文献

- [1] 廖婉婷, 薛成军. 血清淀粉样蛋白 A 在血管相关性疾病中的研究进展[J]. 临床医学研究与实践, 2025, 10(1): 191-194.
- [2] 程守正, 李太文, 赵蕾. 血清淀粉样蛋白 A 与牙周炎相关性的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2025, 52(1): 117-122.
- [3] 曹琳, 宋晓文, 任金来, 等. 血清淀粉样蛋白 A 的研究进展[J]. 安徽医药, 2019, 23(2): 221-224.
- [4] 万颖, 郑又文. 血清淀粉样蛋白 A 在肿瘤疾病中的研究进展[J]. 临床医学研究与实践, 2024, 9(5): 177-180.
- [5] 梁知锐, 杨开洪, 徐耀祥. 血清淀粉样蛋白 A 的检测方法及临床应用进展[J]. 医疗装备, 2020, 33(11): 201-203.
- [6] 王兰英, 潘桂芝, 门玉萍, 等. 血清淀粉样蛋白 A 检测在急性呼吸道感染中的新进展[J]. 大医生, 2025, 10(15):

- 134-138.
- [7] 朱天翼, 李兰英, 孟娇然, 等. 人血清淀粉样蛋白 A 纯品含量的同位素稀释质谱方法研究[J]. 化学试剂, 2025, 47(6): 21-27.
- [8] 何一泉, 吴前星, 熊燊, 等. 日立 7600 检测血清淀粉样蛋白 A 的实验室性能验证[J]. 中国医疗器械信息, 2023, 29(17): 56-58, 176.
- [9] 韩艳华, 黄光强, 蔡美玲, 等. 血清淀粉样蛋白 A 的检测方法及临床应用研究进展[J]. 生物化工, 2024, 10(3): 211-215.
- [10] 中国计量科学研究院. JJF 1267-2010 同位素稀释质谱基准方法[S]. 北京: 中国质检出版社, 2010.
- [11] 沈蕾, 季伙燕, 崔明, 等. 氨基酸分析-同位素稀释质谱法准确定量胱抑素 C 重组蛋白[J]. 交通医学, 2017, 31(3): 205-208.
- [12] Ji, H., Wang, J., Ju, S., Cong, H., Wang, X., Su, J., *et al.* (2017) Quantification of Cystatin-C in Human Serum by Stable Isotope Dilution Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **1059**, 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.04.007>
- [13] Bunk, D.M. and Lowenthal, M.S. (2019) Isotope Dilution Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for Quantitative Amino Acid Analysis. In: Alterman, M., Ed., *Amino Acid Analysis*, Springer, 143-151. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9639-1_12
- [14] 赖贵琦, 黄彦捷, 武利庆, 等. 基于质量平衡法和同位素稀释质谱法的牛血清白蛋白纯度分析[J]. 上海计量测试, 2025, 52(1): 17-21.
- [15] 孙雪晴, 胡高飞, 宋德伟, 等. 高效液相色谱-同位素稀释-串联质谱法测定人源瘦素的含量[J]. 质谱学报, 2015, 36(1): 16-22.