

# 稳定同位素稀释-质谱技术分析 KIC 的负化学电离法

戴腾昌 施 菊 夏宗勤

(上海第二医科大学 上海 200025)

**[摘要]**  $\alpha$ -酮异己酸(KIC)是亮氨酸在体内经转氨后的产物,本文以  $D_3$ -KIC 为同位素稀释内标准物,经  $\alpha$ -Br-五氟苯酯化后,用 GC/MS 负化学电离法测定血浆 KIC 的浓度。分析精度:批内 CV 为 0.79%,批间 CV 为 0.78%,对 10 例正常人血浆分析结果,平均含量为  $44.07 \pm 2.87 \mu\text{mol/L}$ 。

**关键词:** GC/MS 负化学电离法 同位素稀释法  $\alpha$ -酮异己酸(KIC)

$\alpha$ -酮异己酸(KIC)是亮氨酸在体内经转氨后的产物,可进一步氧化脱羧和供能,其分析方法有多种,早期工作是将其制备成 2,4-二硝基苯胺酯,或制成 O-甲基胍甲酯的衍生物进行气相色谱分析<sup>[1,2]</sup>,近期有人将其制成噻啉醇及其硅烷化的衍生物,用高效液相色谱<sup>[3]</sup>和气相色谱<sup>[4]</sup>或气相色谱-质谱分析<sup>[5]</sup>,这些方法灵敏度都不很高。本实验采用[5,5- $^2\text{H}_3$ ]-4 甲基-2-酮基戊酸( $D_3$ -KIC)为内标准物的同位素稀释法和高灵敏度的负化学电离质谱技术,以及用  $\alpha$ -Br-五氟苯的衍生化方法<sup>[6]</sup>,建立了灵敏度相当高的  $\alpha$ -酮异己酸微量分析法。

## 1 材料和方法

**1.1 试剂:**  $\alpha$ -酮异己酸(KIC)(Sigma); [5,5,5- $^2\text{H}_3$ ]-4-甲基-2-酮基戊酸( $D_3$ -KIC)(Cambridge Isotope Laboratories); 硫酸氢四丁胺(TBA)(Sigma);  $\alpha$ -Br-五氟甲苯(PFB-Br)(Sigma); 正己烷(AR,金城试剂厂)。

**1.2 仪器:** HP5989 气-质联用仪。

**1.3 方法:**

### 1.3.1 样品衍生化

衍生化试剂配制:将 PFB-Br 用二氯甲烷配成 0.13mol/L 的储备液,隔天配置一次。将 TBA 用 pH 为 7.4 0.05mol/L 的磷酸缓冲液配成 0.1mol/L 的 TBA 应用液。

衍生化步骤:(1) 标样:取 100 $\mu\text{L}$ (100 $\mu\text{g}$ )KIC 标样加入 2mL 安瓿内,再分别加入 0.1538 $\mu\text{mol}$  $D_3$ -KIC、200 $\mu\text{L}$  TBA 储备液和 200 $\mu\text{L}$  PFB-Br,封口,室温旋涡混匀,再超声

1994 年 5 月 30 日收

振荡 1 小时, 室温反应过夜, 次日开封加入 2mL 正己烷, 封口, 抽提 5~10 分钟, 离心 (RPM 3000), 吸取上层有机相至另一安瓿,  $N_2$  吹干, 加入 30 $\mu$ L 正己烷, 封口, 待 GC/MS 分析; (2) 血样: 与标样类同, 取 200 $\mu$ L 血浆, 按上述量加入  $D_3$ -KIC、TBA 和 PFB-Br, 经旋涡混匀, 超声振荡后, 改为 4 $^{\circ}$ C 反应过夜, 用 10% (V/V) 乙醇-正己烷抽提, 取有机相,  $N_2$  吹干, 溶于 30 $\mu$ L 正己烷, 待 GC/MS 分析。

### 1.3.2 气相色谱-质谱分析

气相色谱分析条件:  $\alpha$ -酮异己酸-五氟苯酯的气相色谱分离采用 FFAP30m $\times$ 0.25mm 毛细管柱, 以甲烷气为载气, 流量 2mL/min; 程序升温, 80 $^{\circ}$ C~200 $^{\circ}$ C, 速率 6 $^{\circ}$ C/min, 进样口温度 250 $^{\circ}$ C, 标样用分流进样, 血样无分流进样。

质谱分析条件: 电子轰击电离 (EI) 分析用 70eV。氩气为载气; 正负化学电离分析 (PCI、NCI) 用 230eV, 甲烷气既为反应气又为载气, 离子源温度 200 $^{\circ}$ C, 四极矩温度 100 $^{\circ}$ C, 离子源压力 1.2mbar。分析样品时采用选择性离子监测 (SIM)。

### 1.3.3 同位素稀释标准曲线的制作

分别配制标样 KIC 和  $D_3$ -KIC 的等克分子浓度溶液 (0.3845mmol/L), 取不同的体积配制一系列不同克分子的标准样品, 每一样品皆做双复管, 按上述衍生化方法制成  $\alpha$ -Br-五氟苯酯的衍生物, 在上述分析条件下, 用负化学离子源和 SIM 分析方式监测  $m/z$ 129、130、132 离子, 测定其离子强度值。

## 2 结果

2.1 KIC 的 PFB 酯的 EI、PCI、NCI 质谱见图 1, 在 EI 质谱中 (图 1a), 有  $m/z$ 57、85 和 181 三个主要离子碎片峰, 还有很小的  $m/z$  为 310 的分子离子峰。57、85 碎片峰都含有氘标记原子, 为 KIC 碳链裂解的碎片离子。181 为五氟苯次甲基碎片离子。KIC 的 PFB 酯的 PCI 质谱见图 1b, 基峰为  $m/z$ 181, 来自五氟苯基,  $m/z$ 311 为准分子离子峰。KIC 的 NCI 质谱见图 1c, 基峰为  $m/z$ 129, 来自 KIC 基团, 极小峰  $m/z$ 196 来自 PFB 基团, 选择 129 峰做为 KIC 的 SIM 定量检测峰。

表 1 KIC 和  $D_3$ -KIC 同位素比值的精密度和准确度的测定

$m/z$	理论比值	KIC	CV (%)	$D_3$ -KIC	CV (%)
129	100.000	100.000		0.733 $\pm$ 0.035	10.67
130	6.969	7.280 $\pm$ 0.016	0.51	0.174 $\pm$ 0.006	7.71
131	0.819	1.132 $\pm$ 0.011	2.20	1.455 $\pm$ 0.022	3.38
132	0.046	0.197 $\pm$ 0.016	18.16	100.000	
133	0.003			7.234 $\pm$ 0.013	0.40
134				1.146 $\pm$ 0.013	2.54
135				0.083 $\pm$ 0.002	5.39

数据为平均值 $\pm$ SE

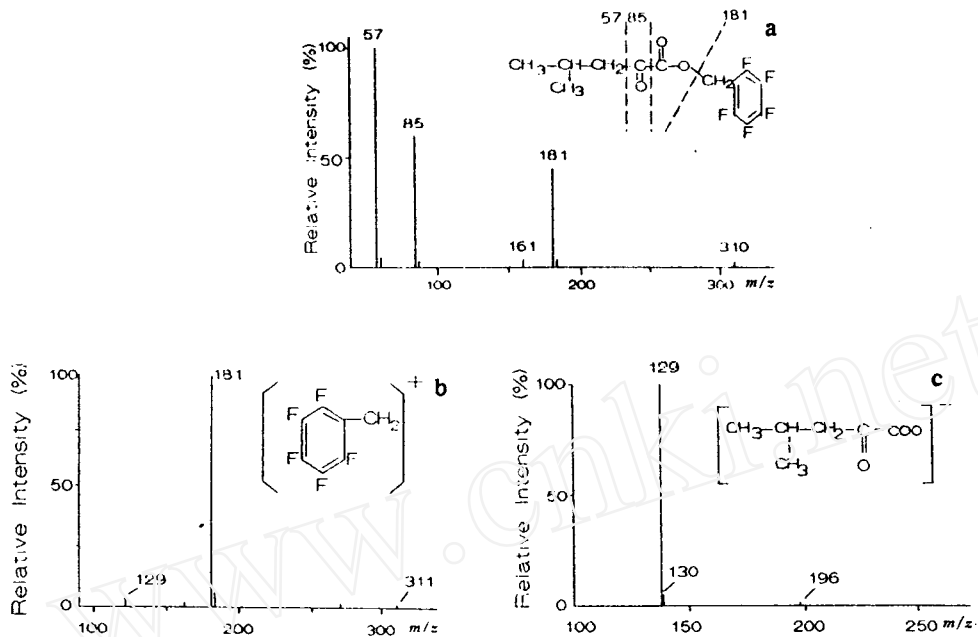


图 1 KIC 五氟-甲苯酯的电子轰击(a)、正化学电离(b)和负化学电离(c)质谱图

2.2 用负化学离子源质谱检测,对 KIC 和  $D_3$ -KIC 连续测量 5 次,测定其同位素比值的准确度和精密度,结果见表 1。同位素比值  $(M+1)/M$ 、 $(M+2)/M$  和  $(M+3)/M$ ,KIC 和  $D_3$ -KIC 的测定值略高于理论值,可能是由于在离子源内 KIC 的酮基部分被还原(约 2%)所致,所形成外加离子在短时间内是恒定的,所以从同位素丰度测定精度来考虑,对测定值无影响<sup>[6]</sup>。

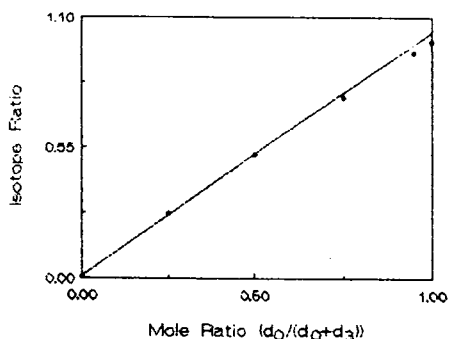


图 2 KIC 同位素稀释标准曲线

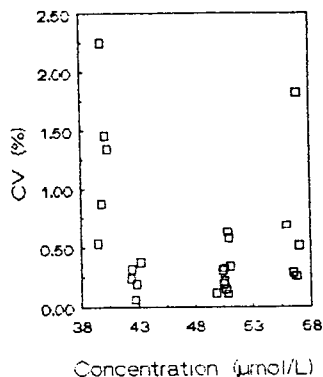


图 3 样品批内变异分布图

2.3 用同位素稀释法制作的标准曲线见图 2,线性关系良好,相关系数  $R=0.998$ 。

2.4 样品批间和批内变异,同一正常人 5 份血浆,每份取双复管分析,在 15 天内分批重复测定 5 次,25 个样品双复管的 CV 分布见图 3,除低浓度样品 CV 分布偏高外,其他样品 CV 值都较集中分布在 1 以下,平均  $CV=0.79\%$ ,按平均  $CV=\sqrt{\sum(CV_n)^2/n}$  计算 5 个样品双复管重复 5 次平均 CV 值,得出其批间 CV 为 0.78%,见表 2。

表2 样品批间变异测定结果

$\bar{X} \pm SD (\mu\text{mol/L})$	CV (%)	平均 CV (%)
56.64 ± 0.42	0.74	$\sqrt{\sum (CV)^2 / 5} = 0.78$
50.78 ± 0.25	0.49	
50.61 ± 0.46	0.91	
42.73 ± 0.35	0.81	
39.96 ± 0.34	0.86	

2.5 正常人血浆 KIC 含量测定:对 10 例志愿献血者血浆 KIC 含量测定结果见表 3,平均值为  $44.07 \pm 2.87 \mu\text{mol/L}$ 。

表3 正常人血浆 KIC 含量测定值

No	正常人血浆含量 ( $\mu\text{mol/L}$ )	平均值 ( $\mu\text{mol/L}$ )
1	56.64	$44.07 \pm 2.87$
2	50.79	
3	50.63	
4	42.74	
5	40.01	
6	32.77	
7	43.62	
8	35.54	
9	32.30	
10	55.70	

数据为平均值 ± SE

### 3 讨论

3.1 适用于同位素稀释-质谱分析技术测定酮酸的衍生化方法有多种,酮酸与邻苯二甲胺反应形成喹啉醇,再与双三甲基硅三氟乙酰胺(BSTFA)硅烷化形成 O-三甲基硅喹啉醇(O-(trimethyl)quinoxalinalns)<sup>[7,8]</sup>,此法步骤较多,费时较长,且邻苯二甲胺为致癌剂同时又易氧化<sup>[9]</sup>,易产生副产物,影响分析灵敏度;酮酸也可与羟胺(hydroxylamin-HCl)形成肟,再与硅烷化试剂形成硅烷化的肟衍生物<sup>[10]</sup>,上述 2 种衍生物都含有硅的成份,而 <sup>29</sup>Si 和 <sup>30</sup>Si 的天然丰度较高,导致同位素测量本底升高,影响测量精度。另外酮所形成的肟衍生物存在正反对映体,使分析更加复杂化。选用酮酸与  $\alpha$ -Br-五氟甲苯形成酯的衍生物,可以避免上述缺点, $\alpha$ -Br-五氟甲苯与酮酸形成酯的衍生物最初用于脂肪酸和前列腺素的分析<sup>[6]</sup>,此法反应迅速,步骤简单,因此被推广用于支链  $\alpha$ -酮酸的分析,本实验采用这种衍生化方法,在负化学电离方式下仅出现  $m/z$  为 129 的单一质谱峰,可使测试灵敏度显著提高,血浆用量可小到  $60 \mu\text{L}$  以下。

3.2 GC/MS 分析时, KIC-PFB 酯经电子轰击电离(EI), 得到 3 个主要碎片离子峰( $m/z$  57、85、181, 见图 1a), 由于 EI 条件下分子绝大部分被打碎, 分子离子峰很小, 采用  $D_3$ -KIC 为内标, 4 个碎片离子都含有 3 个氘标记原子, 但是由于离子强度低限制了分析灵敏度; 另一方面  $m/z$  57 峰虽然离子强度值较高, 但由于质量数较低, 很易受低质量离子的干扰, 影响其分析的准确度, 不宜采用。KIC-PFB 酯经正化学电离(PCI)后, 形成  $m/z$  为 181 的基峰, 由  $CH_2C_6F_5$  基团形成, 准分子离子峰( $MW=311$ )也很低, 对 KIC 分析无实际应用价值, 而经负化学电离(NCI)后, 则得到  $m/z$  为 129 基峰的质谱。由 KIC [ $(CH_3)_2CH_2CH(CO)COO^-$ ]基团所形成, 未见分子离子峰。 $m/z$  为 129 的质谱峰含有整个 KIC 分子结构, 正好满足分析要求, 由于只有 1 个基峰及 1 个  $m/z$  为 196 的极弱碎片峰(见图 1c), 有利于提高分析灵敏度。本研究结果证明, 此法的灵敏度可达 ng 级水平, 高于目前有关这方面分析的其它衍生化方法。

3.3 同位素稀释-质谱分析法的准确度和灵敏度都很高, 特别是准确度高于目前所有的分析方法。因为样品是通过 GC 分离, 由质谱检测出特异性高的待分析离子, 另一方面因其所用内标准物是同位素标记的与待检测物同一结构的化合物, 可起“载体作用”, 对低含量样品有利于提高灵敏度和准确性。加入样品中的内标量为待测物的 2~10 倍, 因此其分析灵敏度也比用其它非同位素标记内标法定量分析高 2~10 倍。本实验所用内标准物  $D_3$ -KIC, 其分子量比待测 KIC 大 3 个质量单位, 可避免待测物的天然丰度对离子强度的干扰, 降低测量本底。加入  $D_3$ -KIC 的量约为待测样品中 KIC 量的 2.5 倍, 可测到几十纳克(ng), 灵敏度显著提高。

### 参 考 文 献

- 1 Kallio H, Linko R R. Gas-liquid chromatographic analysis of 2, 4-dinitrophenylhydrazones of keto acid methyl esters. *J Chromatogr*, 1973; 76: 229
- 2 Liebich H M, Pickert A, Woll J. Analysis of the oxocarboxylic acid fraction in serum and urine as O-methyloximes by thermionic specific detection. *J Chromatogr*, 1981; 217: 255
- 3 Nissen S L, Huysen C V, Haymond M W. Measurement of branched-chain amino acids and branched-chain  $\alpha$ -keto acids in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1982; 232: 170
- 4 Cree T C, Hutson S M, Harper A E. Gas-liquid chromatography of  $\alpha$ -keto acids quantification of the branched-chain  $\alpha$ -keto acids from physiological source. *Anal Biochem*, 1979; 92: 158
- 5 Rocchiccioli F, Leroux J P, Cartier P. Quantitation of  $\alpha$ -keto acids in biological fluids by gas chromatography chemical ionization mass spectrometry of O-trimethylsilylquinoxalinol derivatives. *Bio-medical Mass Spectrometry*, 1981; 8: 160
- 6 Hachey D L, Patterson W P, Reeds P J. Isotopic determination of organic keto acid pentafluorobenzyl esters in biological fluids by negative chemical ionization gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem*, 1991; 63: 919

- 7 Schwartz H P, Karl I E, Bier D M. The  $\alpha$ -keto acids of branched-chain amino acids: simplified complete preparation as quinoxadinols by packed column gas chromatography. *Anal Biochem*, 1980, 108: 360
- 8 Early R J, Thompson J R, Meallister T *et al.* Branched-chain  $\alpha$ -keto acid analysis in biological fluids: preparation clean-up anion-exchange and analysis by capillary gas chromatography. *J Chromatogr*, 1984, 310: 1
- 9 Livesey G, Edwards W T E. Quantification of branched-chain  $\alpha$ -keto acid as quinoxalinols: importance of excluding oxygen during derivatization. *J Chromatogr*, 1985, 337: 98
- 10 Lancaster P, Lamm P, Scriver C R. Quantitative analysis of branched-chain  $\alpha$ -keto acids as their trimethylsilylated Oximes. *Clin Chim Acta*, 1973, 48: 279

## Measurement of Plasma KIC by Stable Isotope Dilution-Negative Chemical Ionization Gas Chromatography/ Mass Spectrometry

Dai Tengchang, Shi Ju, Xia Zongqin

(Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China)

Received 1994-05-30

### Abstract

$\alpha$ -ketoisocaproate (KIC) is the metabolic product of leucine. Using  $D_3$ -KIC as the internal standard of isotope dilution, the KIC in human plasma were converted to its pentafluorobenzyl ester and analysed with methane negative chemical ionization gas chromatography/mass spectrometry. The intra-batch and inter-batch coefficients of variation were 0.79% and 0.78% respectively. The mean concentration of plasma KIC of 10 normal adult volunteers was  $44.07 \pm 2.87 \mu\text{mol/L}$ .

**Key Words:** gas chromatography/mass spectrometry, negative chemical ionization, stable isotope dilution analysis,  $\alpha$ -ketoisocaproate