



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109061179 A

(43)申请公布日 2018. 12. 21

(21)申请号 201810798829.9

(22)申请日 2018.07.19

(71)申请人 中国人民解放军第二军医大学第二附属医院

地址 200003 上海市黄浦区凤阳路415号

(72)发明人 陈万生 杨阳 张凤 高守红
王志鹏 李明明 位华 仲人前

(74)专利代理机构 上海顺华专利代理有限责任
公司 31203

代理人 陆林辉

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

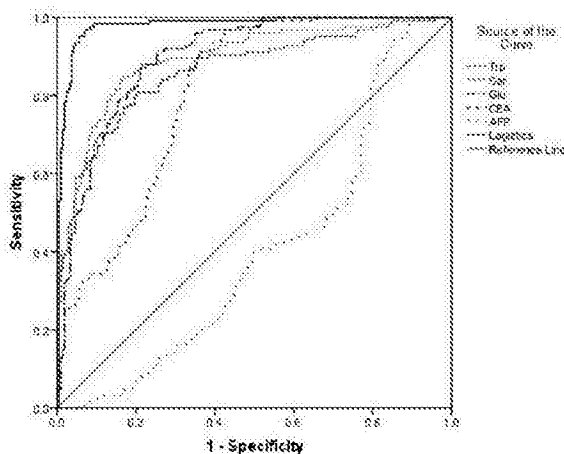
权利要求书2页 说明书37页 附图19页

(54)发明名称

氨基酸联合因子在构建结直肠癌血液学诊断模型中的应用

(57)摘要

本发明涉及恶性肿瘤血液学诊断技术领域,提供了色氨酸(Trp)、肌氨酸(Sar)、谷氨酸(Glu)三个氨基酸因子作为结直肠癌血液学诊断生物标志物的应用,以及在构建结直肠癌血液学氨基酸联合因子诊断模型中的应用,该诊断模型的回归方程基于Trp、Sar、Glu进行Logistics回归后建立,回归方程为:联合因子=0.001×C_{Trp}+0.029×C_{Sar}-0.002×C_{Glu}-9.427(C_{Trp}、C_{Sar}、C_{Glu}的单位为ng/mL)。本发明建立的结直肠癌血液学诊断模型简单、判断容易,对结直肠癌诊断的准确度高、灵敏度高、特异性强,特别适用于进行结直肠癌大规模的人群筛查,为结直肠癌的临床诊断提供了一种有效可靠便捷的方法,具有良好的结直肠癌辅助诊断价值。



1. 氨基酸联合因子在构建结直肠癌血液学诊断模型中的应用。

2. 根据权利要求1所述的氨基酸联合因子在构建结直肠癌血液学诊断模型中的应用,其特征在於:所述氨基酸联合因子包括色氨酸(Trp)、肌氨酸(Sar)、谷氨酸(Glu)三个氨基酸因子。

3. Trp、Sar、Glu三个氨基酸因子在构建结直肠癌血液学诊断模型中的应用。

4. 根据权利要求3所述的Trp、Sar、Glu三个氨基酸因子在构建结直肠癌血液学诊断模型中的应用,其特征在於:该诊断模型建立过程是基于Trp、Sar、Glu进行Logistics回归后得到的联合因子回归方程,所述的回归方程为,联合因子 $=0.001 \times C_{\text{Trp}} + 0.029 \times C_{\text{Sar}} - 0.002 \times C_{\text{Glu}} - 9.427$,其中, C_{Trp} 、 C_{Sar} 、 C_{Glu} 的单位均为ng/mL。

5. 根据权利要求4所述的Trp、Sar、Glu三个氨基酸因子在构建结直肠癌血液学诊断模型中的应用,其特征在於:回归方程中联合因子的截断值为2.433。

6. 采用权利要求4的结直肠癌血液学诊断模型进行结直肠癌诊断的血液学检测方法,包括以下步骤:

A、空腹抽取检测者外周静脉血3~4mL,离心分离后获取血浆;

B、采用液相-串联质谱联用检测方法检测血浆中的Trp、Sar、Glu的含量;

C、根据联合因子回归方程(联合因子 $=0.001 \times C_{\text{Trp}} + 0.029 \times C_{\text{Sar}} - 0.002 \times C_{\text{Glu}} - 9.427$, C_{Trp} 、 C_{Sar} 、 C_{Glu} 的单位为ng/mL)计算联合因子,并与截断值进行比较。

7. 根据权利要求6所述的采用结直肠癌血液学诊断模型进行结直肠癌诊断的血液学检测方法,其特征在於:步骤B中,液相采用Agilent 1290超高效液相色谱仪系统:色谱柱为Agilent Zorbax SB-C₁₈柱(规格3.0mm×150mm,5μm),柱温为50℃;流动相A相为含体积分数为0.02%七氟丁酸(HFBA)及体积分数为0.2%甲酸(FA)的水溶液,流动相B相为甲醇,流速为0.4mL/min。停止时间为10min,后运行时间为4min,自动进样器进样盘温度为4℃,进样体积为2μL,冲洗进针口,洗针进样,进样针吸取速度为0.2mL/min,注射速度为0.2mL/min;

流动相洗脱程序如下:

时间 (min)	A相 (%)	B相 (%)
0	98	2
1.0	85	15
4.0	85	15
5.0	80	20
10.0	20	80

8. 根据权利要求6所述的采用结直肠癌血液学诊断模型进行结直肠癌诊断的血液学检测方法,其特征在於:步骤B中,串联质谱采用Agilent 6460三重四极杆串联质谱仪系统:采集模式为MSE,离子化模式为电喷雾电离正离子模式(ESI⁺),监测模式为多反应监测(MRM);毛细管电压为5000V,驻留时间为40,碰撞气为高纯N₂,压力0.1MPa;雾化气和干燥气均为N₂,雾化气压力为50psi,干燥气温度为325℃,干燥气流速为10L/min,鞘气温度为350℃,鞘气流速为12L/min。

9. 根据权利要求6所述的采用结直肠癌血液学诊断模型进行结直肠癌诊断的血液学检测方法,其特征在於:步骤B中,Trp的内标氨基酸为Phe-d₅,Sar、Glu的内标氨基酸均为Met-d₃。

10. Trp、Sar、Glu三个氨基酸因子联用在制备结直肠癌血液学检测试剂盒中的应用,所述的试剂盒包含采用液相-串联质谱联用检测方法检测人血浆氨基酸含量的试剂。

氨基酸联合因子在构建结直肠癌血液学诊断模型中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及恶性肿瘤血液学诊断技术领域,具体的说,涉及氨基酸联合因子在构建结直肠癌血液学诊断模型中的应用,更具体涉及基于色氨酸(Trp)、肌氨酸(Sar)、谷氨酸(Glu)建立的联合因子在构建结直肠癌血液学诊断模型中的应用。

背景技术

[0002] 结直肠癌(colorectal cancer,CRC),又称大肠癌,为消化系统常见的恶性肿瘤。2008年,全球结直肠癌新发病例超过120万人,死亡病例超过60.87万人[Jemal A,Bray F,Center MM,et al.Global cancer statistics.Ca:A Cancer Journal for Clinicians,2011,61(2):69-90.];新发病例排名常见肿瘤的第三位,死亡病例排名肿瘤死亡的第四位[Qiu YP,Cai GX,Su MM,et al.Serum metabolite profiling of human colorectal cancer using GC-TOFMS and UPLC-QTOFMS.Journal of Proteome Research,2009,8(10):4844-4850.]。

[0003] 结直肠癌也是我国常见的恶性肿瘤之一,严重威胁人民群众的健康生活与生命安全。目前国内结直肠癌发病率处于世界中等水平,稍高于欠发达国家。然而,近十年的趋势表明,国内结直肠癌原发病率和年龄标准化发病率均持续增长[Liu SZ,Zheng RS,Zhang M,et al.Incidence and mortality of colorectal cancer in China,2011.Chinese Journal of Cancer Research,2015,27(1):22-28.]。据报道,2013年国内结直肠癌新发病例34.8万人,发病率为25.57人/十万人,紧随肺癌、胃癌、肝癌之后,排名恶性肿瘤发病的第四位;死亡病例16.5万人,死亡率为12.11人/十万人,紧随肺癌、肝癌、胃癌、食管癌之后,排名恶性肿瘤死亡的第五位[陈万青,郑荣寿,张思维,等.2013年中国恶性肿瘤发病和死亡分析.中国肿瘤,2017,26(1):1-7.]。结直肠癌潜伏期较长、生长较慢、进展缓慢,其诊断分期对于患者的愈后有着较大的影响,早期患者98%能够生存5年以上。若能够在结直肠肿瘤发生的早期,寻找到具有一定预警作用的肿瘤生物标志物,进行肿瘤发生和转移的预测,对于提高患者的治疗效果,改善患者预后有着重要的意义。由于生活方式及医疗保健意识等传统原因,我国大多数结直肠癌患者确诊时已属中晚期,从而失去了早期诊断和治疗的最佳时机,故国内结直肠癌患者五年生存率一直较低。

[0004] 结直肠癌诊断方法主要为影像学检查、生化检验和病理学检查。然而,目前结直肠癌诊断技术均存在一定的局限性,特别是早期诊断较为困难[Bezabeh T,Somorjai R,Dolenko B,et al.Detecting colorectal cancer by ^1H magnetic resonance spectroscopy of fecal extracts.NMR in Biomedicine,2009,22(6):593-600.]。影像学检查对结直肠癌病灶的检出率较低,患者大多处于中晚期时才开始出现影像学改变。粪便隐血试验和特定的肿瘤标记物检查已用于临床诊断,例如癌胚抗原(carcinoembryonic antigen,CEA)、甲胎蛋白(α -fetoprotein,AFP)等,但均为肿瘤相关性抗原,而非特异性抗原,其灵敏度和特异性均比较差[Fletcher RH.Carcinoembryonic antigen.Annals of Internal Medicine,1986,104(1):66-73.Kronborg O,Fenger C,Olsen J,et

al. Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. *The Lancet*, 1996, 348 (9040) : 1467-1471.]. 结肠镜检查为结直肠癌诊断的金标准, 是癌前病变和发病最有效的筛查方法 [Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. *The New England Journal of Medicine*, 1993, 329 (27) : 1977-1981.], 其检查价格昂贵, 具有人体侵入性 [Qiu YP, Cai GX, Su MM, et al. Urinary metabolomic study on colorectal cancer. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9 (3) : 1627-1634.], 检查耐受性较差, 容易在检查中引起并发症, 而胃肠道病理专家的经验等人为因素也显著影响检查结果 [Wu H, Xue RY, Tang ZQ, et al. Metabolomic investigation of gastric cancer tissue using gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 396 (4) : 1385-1395. Hu JD, Tang HQ, Zhang Q, et al. Prediction of gastric cancer metastasis through urinary metabolomic investigation using GC/MS. *World Journal of Gastroenterology*, 2011, 17 (6) : 727-734.], 不适合做大规模人群的早期筛查。因此, 迫切需要研究开发更好的技术和手段进行结直肠癌的检测、诊断以及监测。

[0005] 近年来, 由于组学 (omics) 的不断发展, 逐渐兴起了应用组学技术寻找具有差异性的代谢物, 以发现疾病新型的、特异性的肿瘤生物标志物的研究潮流。其中, 代谢组学 (metabolomics, 又称 metabolomics) 因其自身具有的固有优势而被广泛关注。代谢组学能够对特定生理时期内的生物体内所有低分子量的代谢物同时进行定性定量分析, 结合模式识别的手段, 判断出机体的病理生理状态, 从中得到代谢物与生理病理变化的相对关系, 以找到与疾病相关的生物标志物 [Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, et al. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in Biotechnology*, 2004, 22 (5) : 245-252.]. 患者机体肿瘤细胞发生任何微小的变化均会产生代谢物的异常改变。而反映这一改变最终结果的这些代谢物则能够准确地反映患者肿瘤所处的状态 [Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 100 (1) : 57-70. Henry CM. New 'ome' in town. *Chemical & Engineering News*, 2002, 80 (48) : 66-70.]. 因此, 了解和掌握结直肠癌发病和进展中代谢物的改变, 可能会使结直肠癌的预防或治疗能够找到更好的诊断方法或是发现新的路径 [Williams MD, Reeves R, Resar LS, et al. Metabolomics of colorectal cancer: past and current analytical platforms. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405 (15) : 5013-5030.]. 已经证明代谢组学用于包括结直肠癌在内的各种癌症的诊断和个性化治疗具有巨大的潜力 [Ni Y, Xie GX, Jia W. Metabolomics of human colorectal cancer: new approaches for early diagnosis and biomarker discovery. *Journal of Proteome Research*, 2014, 13 (9) : 3857-3870.].

[0006] 基于代谢组学发现结直肠癌的肿瘤生物标志物, 具有无创或微创、取样量少、易于实施、简便快捷等诸多优点, 且患者依从性好, 适用于进行大规模的人群筛查。氨基酸 (amino acid) 在机体新陈代谢中起着重要的作用, 对于维持正常的细胞功能和生物生存至关重要。血液、尿液和体液样本中的氨基酸失衡对于临床生化常规检查具有重要意义。随着肿瘤细胞代谢的改变而发生变化的氨基酸, 可能涉及原发肿瘤的形成、生长和浸润转移等情况。已有文献报道结直肠癌患者和健康志愿者的血液、尿液和粪便中氨基酸的组成不同,

在癌组织与正常组织之间的氨基酸组成也存在一定的差异性。液相-串联质谱联用检测方法同时使用液相色谱分离和质谱离子对检测,具有灵敏度高、特异性强的特点。因此,基于液相-串联质谱联用检测方法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry,LC-MS/MS)的靶向代谢组学研究结直肠癌患者血液中的内源性氨基酸代谢谱变化,寻找其变化规律,发展成为肿瘤生物标志物,对于结直肠癌的诊断有着重要的临床价值和现实意义。

[0007] 目前尚未有科研工作者对此进行详细的研究,也未见氨基酸及其联合因子能够作为结直肠癌诊断/辅助诊断标志物的相关报道。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于,依托上述研究背景,提供一种能够作为结直肠癌生物标记物的氨基酸联合因子,并基于该氨基酸联合因子构建结直肠癌血液学氨基酸联合因子诊断模型,同时利用该模型进行结直肠癌血液学检测,进而基于检测结果,实现结直肠癌的辅助诊断。

[0009] 本发明的技术方案为:首先,建立同时检测人血浆32种氨基酸含量的液相-串联质谱联用检测方法,并通过方法学验证项目验证该检测方法的有效性;其次,将受试人员中的结直肠癌患者、健康志愿者及结直肠癌前病变患者按照约1:1比例分成训练集和测试集,进行该检测方法在人血浆氨基酸含量测定中的应用,即对受试人员进行血浆32种氨基酸的含量测定;而后,通过训练集样本的多维统计分析进行靶向氨基酸代谢组学研究,确定差异性代谢物Trp、Sar、Glu可以作为潜在的诊断结直肠癌患者的生物标志物;最后,通过Logistics回归,基于Trp、Sar、Glu三个氨基酸因子建立结直肠癌血液学联合因子诊断模型,该诊断模型的联合因子回归方程为:联合因子= $0.001 \times C_{Trp} + 0.029 \times C_{Sar} - 0.002 \times C_{Glu} - 9.427$ (C_{Trp} 、 C_{Sar} 、 C_{Glu} 的单位为ng/mL),经测试集样本以及全体受试人员样本验证后证实该诊断模型对结直肠癌的各项诊断评价指标。

[0010] 所述的同时检测的人血浆32种氨基酸包括:甘氨酸(glycine,Gly)、丙氨酸(alanine,Ala)、缬氨酸(valine,Val)、赖氨酸(lysine,Lys)、亮氨酸(leucine,Leu)、异亮氨酸(isoleucine,Ile)、谷氨酰胺(glutamine,Gln)、谷氨酸(glutamic acid,Glu)、甲硫氨酸(methionine,Met)、组氨酸(histidine,His)、苯丙氨酸(phenylalanine,Phe)、精氨酸(arginine,Arg)、酪氨酸(tyrosine,Tyr)、色氨酸(tryptophan,Trp)、丝氨酸(serine,Ser)、脯氨酸(proline,Pro)、苏氨酸(threonine,Thr)、5-氧代-脯氨酸(5-oxo-proline,Opr)、门冬酰胺(asparagine,Asn)、鸟氨酸(ornithine,Orn)、瓜氨酸(citrulline,Cit)、胱氨酸(cystine,Cyss)、半胱氨酸(cysteine,Cys)、羟脯氨酸(hydroxy-proline,Hpr)、门冬氨酸(aspartic acid,Asp)、非对称二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginine,ADMA)、对称二甲基精氨酸(symmetrical dimethylarginine,SDMA)、犬尿氨酸(kynurenine,Kyn)、3-氨基丙酸(3-aminopropanoic acid,Apa)、肌氨酸(sarcosine,Sar)、3-氨基-2-甲基丙酸(3-amino-2-methylpropanoic acid,Amp)、马尿酸(hippuric acid,Hia)。

[0011] 所述的液相-串联质谱联用检测方法包括以下步骤:首先利用液相系统将32种氨基酸色谱分离,其次利于串联质谱系统以内标定量法建立32种氨基酸的标准曲线,再确定32种氨基酸的线性范围及线性关系,最后考察32种氨基酸的选择性、提取回收率与基质效应、定量下限、日内日间精密度准确度、稳定性、稀释效应及残留效应等方法学验证项目。

[0012] 所述的血浆靶向氨基酸代谢组学研究包括：采用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 模型、正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 模型对结直肠癌患者、健康志愿者血浆进行多维统计分析。通过OPLS-DA模型中的变量投影重要性分析 (variable importance for the projection, VIP) 找到14个VIP值大于1的差异性代谢物，分别为Trp、Sar、Glu、Ser、Met、Ala、Cys、Cyss、Tyr、Opr、Apa、Gln、Hia、Arg，其中VIP值大于1.5的差异性代谢物Trp、Sar、Glu可以作为潜在的诊断结直肠癌的生物标志物。

[0013] 本发明的第一方面，提供了氨基酸联合因子在构建结直肠癌血液学诊断模型中的应用。

[0014] 通过实验筛选，氨基酸联合因子优选为包括色氨酸 (Trp)、肌氨酸 (Sar)、谷氨酸 (Glu) 三个氨基酸因子。

[0015] 本发明的第二方面，提供了Trp、Sar、Glu三个氨基酸因子在构建结直肠癌血液学诊断模型中的应用。

[0016] 优选的，该诊断模型建立过程是基于Trp、Sar、Glu进行Logistics回归后得到的联合因子回归方程，该回归方程为，联合因子 = $0.001 \times C_{\text{Trp}} + 0.029 \times C_{\text{Sar}} - 0.002 \times C_{\text{Glu}} - 9.427$ ， C_{Trp} 、 C_{Sar} 、 C_{Glu} 的单位均为ng/mL。优选的，回归方程中联合因子的截断值为2.433，

[0017] 由此，本发明的第三方面，提供了一种结直肠癌血液学氨基酸联合因子诊断模型，该诊断模型基于上述回归方程建立。

[0018] 本发明的第四方面，提供了结直肠癌血液学氨基酸联合因子诊断模型在结直肠癌诊断中的应用，当检测结果小于截断值时，诊断为高度疑似结直肠癌患者，可结合其它常规检查手段进行结直肠癌的最终确诊。

[0019] 本发明的第五方面，提供了一种采用结直肠癌血液学诊断模型进行结直肠癌诊断的血液学检测方法，其特征在于，包括以下步骤：

[0020] A、空腹抽取检测者外周静脉血3~4mL，离心分离后获取血浆；

[0021] B、采用液相-串联质谱联用检测方法检测血浆中的Trp、Sar、Glu的含量；

[0022] C、根据联合因子回归方程 (联合因子 = $0.001 \times C_{\text{Trp}} + 0.029 \times C_{\text{Sar}} - 0.002 \times C_{\text{Glu}} - 9.427$ ， C_{Trp} 、 C_{Sar} 、 C_{Glu} 的单位为ng/mL) 计算联合因子，并与截断值进行比较。

[0023] 优选的，步骤B中，液相采用Agilent 1290超高效液相色谱仪系统：色谱柱为Agilent Zorbax SB-C₁₈柱 (规格3.0mm × 150mm, 5μm)，柱温为50℃；流动相A相为含体积分数为0.02%七氟丁酸 (HFBA) 及体积分数为0.2%甲酸 (FA) 的水溶液，流动相B相为甲醇，流速为0.4mL/min。停止时间为10min，后运行时间为4min，自动进样器进样盘温度为4℃，进样体积为2μL，冲洗进针口，洗针进样，进样针吸取速度为0.2mL/min，注射速度为0.2mL/min；

[0024] 流动相洗脱程序如下：

	时间 (min)	A相 (%)	B相 (%)
[0025]	0	98	2
	1.0	85	15
	4.0	85	15
[0026]	5.0	80	20
	10.0	20	80

[0027] 优选的，步骤B中，串联质谱采用Agilent 6460三重四极杆串联质谱仪系统：采集

模式为MS_E,离子化模式为电喷雾电离正离子模式(ESI⁺),监测模式为多反应监测(MRM);毛细管电压为5000V,驻留时间为40,碰撞气为高纯N₂,压力0.1MPa;雾化气和干燥气均为N₂,雾化气压力为50psi,干燥气温度为325℃,干燥气流速为10L/min,鞘气温度为350℃,鞘气流速为12L/min。

[0028] 优选的,步骤B中,Trp的内标氨基酸为Phe-d₅,Sar、Glu的内标氨基酸均为Met-d₃。

[0029] 本发明的第六方面,提供了Trp、Sar、Glu三个氨基酸因子联用在制备结直肠癌血液学检测试剂盒中的应用,所述的试剂盒包含采用液相-串联质谱联用检测方法检测人血浆氨基酸含量的试剂。

[0030] 本发明的有益保障及效果:

[0031] 本发明提供了一种氨基酸联合因子在构建结直肠癌血液学诊断模型中的应用,具有如下技术效果:

[0032] 1、该诊断模型采用液相-串联质谱联用检测方法同时检测人血浆32种氨基酸含量,检测氨基酸数量多、针对性强,方法学验证项目能够满足生物样本分析要求,且血浆前处理过程简单,分析时间短,适用于临床样本的高通量分析检验。2、该诊断模型使用的人血浆样本较结直肠组织样本容易取样获得,较尿液、粪便样本容易被待测人群心理接受,避免患者进行影像学检查时的射线损伤、结直肠镜检查时的侵入损伤,患者依从性好,特别适用于进行结直肠癌大规模的人群筛查。3、该诊断模型基于血浆三种氨基酸含量进行构建,模型简单、计算方便、判断容易,且模型对结直肠癌诊断的准确度高、灵敏度高、特异性强,各项诊断评价指标均优于临床常用的CEA诊断。

[0033] 本发明构建的结直肠癌血液学诊断模型为结直肠癌的临床诊断提供了一种有效可靠便捷的方法,具有良好的结直肠癌辅助诊断价值。

附图说明

[0034] 图1为32种氨基酸及3种内标氨基酸的MS/MS离子图;

[0035] 图2为代表性总离子流图和多反应监测色谱图[图中,a.空白“模拟血浆”,b.标准添加“模拟血浆”(QC2),c.血浆实测样本(CRC-a)];

[0036] 图3为32种氨基酸的标准曲线图(n=9);

[0037] 图4为训练集血浆样本氨基酸总离子流图(图中,a.结直肠癌患者血浆样本,b.健康志愿者血浆样本);

[0038] 图5为训练集血浆样本氨基酸含量(图中,*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001、****p<0.0001);

[0039] 图6为测试集血浆样本氨基酸总离子流图(图中,a.结直肠癌患者血浆样本,b.癌前病变患者血浆样本,c.健康志愿者血浆样本);

[0040] 图7为测试集血浆样本氨基酸含量;

[0041] 图8为结直肠癌患者、健康志愿者血浆样本代谢谱PCA-X模型下每个主成分的R₂、Q₂积累图;

[0042] 图9为结直肠癌患者、健康志愿者血浆样本代谢谱PCA-X模型的得分散点图;

[0043] 图10为结直肠癌患者、健康志愿者血浆样本代谢谱OPLS-DA模型下每个主成分的R₂、Q₂积累图;

- [0044] 图11为结直肠癌患者、健康志愿者血浆样本代谢谱OPLS-DA模型的得分散点图；
- [0045] 图12为响应置换检验图；
- [0046] 图13为结直肠癌早期、晚期患者，健康志愿者血浆样本代谢谱OPLS-DA模型的得分散点图；
- [0047] 图14为结直肠癌I、II、III、IV期患者血浆样本代谢谱PCA模型的得分散点图；
- [0048] 图15为血浆样本氨基酸代谢谱的载荷图；
- [0049] 图16为血浆样本氨基酸代谢谱的S形曲线图；
- [0050] 图17为代表预测失量的回归系数图；
- [0051] 图18为预测VIP值图；
- [0052] 图19为各氨基酸及CEA、AFP的ROC曲线；
- [0053] 图20为联合因子、各氨基酸及CEA、AFP的ROC曲线。

具体实施方式

[0054] 为了更清楚地说明本发明，下面结合优选实施例对本发明做进一步的说明。本领域技术人员应当理解，下面所具体描述的内容是说明性的而非限制性的，不应以此限制本发明的保护范围。

[0055] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照制造厂商所建议的条件。本发明实施例所用试剂除另有注明，均可以从销售公司获得。

[0056] 实施例1：同时检测人血浆32种氨基酸含量的液相-串联质谱联用检测方法的建立

[0057] 1目的

[0058] 以Gly、Ala、Val、Lys、Leu、Ile、Gln、Glu、Met、His、Phe、Arg、Tyr、Trp、Ser、Pro、Thr、Opr、Asn、Orn、Cit、Cyss、Cys、Hpr、Asp、ADMA、SDMA、Kyn、Apa、Sar、Amp、Hia作为待测物质，建立人血浆32种氨基酸的液相-串联质谱联用检测方法。

[0059] 2实验仪器与材料

[0060] 2.1仪器

[0061] Agilent 6460三重四极杆串联质谱仪系统；Agilent 1290超高效液相色谱仪系统，包括G4220A型二元泵、G1969-80230型真空脱气机、G4226A型自动进样器、G1316C型柱温箱；Agilent Mass Hunter数据处理工作站，Agilent Qualitative Analysis B.07.00Tools软件，均为美国安捷伦(Agilent)公司产品。微量电子天平，MSE3.6P-0CE-DM型(最大载荷3.1g，分度值0.001mg)，德国赛多利斯(Sartorius)公司产品。移液器，Research plus型，单道可调量程20 μ L、100 μ L、200 μ L、1000 μ L，德国艾本德(Eppendorf)公司产品。涡旋混匀仪，Vortex QL-901型，海门市其林贝尔仪器制造有限公司产品。高速离心机，Centrifuge 5810R型，德国艾本德公司产品。冷冻离心机，Universal 320R型，德国海蒂诗(Hettich)公司产品。医用超低温保存箱，DW-88L728J型，青岛海尔(Haier)特种电器有限公司产品。

[0062] 2.2试剂与耗材

[0063] 甲醇、乙腈，质谱纯，德国默克(Merck)公司生产。磷酸盐缓冲盐溶液(phosphate buffered solution, PBS)，细胞培养级(10 \times)，大连美仑生物科技有限公司生产，批号MA0016-May-19B。七氟丁酸(heptafluorobutyric acid, HFBA)，美国阿达玛斯(Adamas)试

剂有限公司生产,批号P11933。甲酸(formic acid,FA),上海麦克林(Macklin)生化有限公司生产,批号C10009619。盐酸(hydrochloric acid,HCl)为分析纯,国药集团化学试剂有限公司生产,批号20130726。0.9%氯化钠注射液(sodium chloride injection),1000mL/袋,上海长征医院药材科制剂室生产,批号160613。超纯净水,经美国密理博(Millipore)公司Milli-QAcademic超纯水器处理得到。

[0064] 一次性使用Vacuette真空采血管,EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid,乙二胺四乙酸)K3型,5mL,奥地利葛莱纳第一生化(Greiner Bio-one)有限公司生产。一次性使用CryoMax冻存管,内旋盖型,2mL,上海万格(Avantech)科学器材有限公司生产。一次性使用离心管,1.5mL、5mL、10mL,爱思进(Axygen)生物技术有限公司生产。一次性使用移液器枪头,10 μ L、200 μ L、1000 μ L,爱思进生物技术有限公司生产。

[0065] 2.3氨基酸对照品

[0066] 32种氨基酸及3种内标(internal standard,IS)氨基酸对照品信息见表1。

[0067] 表1 32种氨基酸及3种内标氨基酸对照品

对照品品名	缩写	分子量	生产公司	批号	纯度	分子结构式
甘氨酸	Gly	75.07	中国食品药品 检定研究院	140624-201506	99.9%	
L-丙氨酸	Ala	89.09	中国食品药品 检定研究院	140624-201506	99.9%	
L-丝氨酸	Ser	105.09	中国食品药品 检定研究院	140624-201506	99.9%	
L-缬氨酸	Val	117.15	中国食品药品 检定研究院	140624-201506	99.9%	
L-苏氨酸	Thr	119.12	中国食品药品 检定研究院	140624-201506	99.9%	
L-亮氨酸	Leu	131.17	中国食品药品 检定研究院	140624-201506	99.9%	
L-异亮氨酸	Ile	131.17	中国食品药品 检定研究院	140624-201506	99.9%	
[0068] L-门冬酰胺	Asn	132.12	上海源叶生物 科技有限公司	SM0503GA13	≥98%	
L-门冬氨酸	Asp	133.10	中国食品药品 检定研究院	140624-201506	99.9%	
盐酸-L-赖氨酸 (用于测定赖氨酸)	Lys·HCl	182.65	中国食品药品 检定研究院	140624-201506	100%	
L-谷氨酰胺	Gln	146.14	大连美仑生物 科技有限公司	J1105AS	>98%	
L-谷氨酸	Glu	147.13	中国食品药品 检定研究院	140624-201506	99.9%	
L-甲硫氨酸	Met	149.21	中国食品药品 检定研究院	140624-201506	99.9%	
L-半胱氨酸	Cys	121.16	上海源叶生物 科技有限公司	SA0410GA14	≥98%	
L-胱氨酸	Cyss	240.30	中国食品药品 检定研究院	140624-201506	99.8%	

L-精氨酸	Arg	174.20	中国食品药品 检定研究院	140624-201506	99.9%	
盐酸-L-鸟氨酸 (用于测定鸟氨酸)	Orn·HCl	168.62	大连美仑生物 科技有限公司	A0821AS	>98%	
L-瓜氨酸	Cit	175.19	大连美仑生物 科技有限公司	M0510A	>99%	
N ^ω ,N ^ω -二甲基-L- 精氨酸二盐酸盐 (用于测定非对称 二甲基精氨酸)	ADMA ·2HCl	275.18	Sigma-aldrich Inc. Darmstadt, Germany	SLBK4505V	≥98%	
N ^ω ,N ^ω -二甲基-L- 精氨酸(对称二甲 基精氨酸)	SDMA	202.25	大连美仑生物 科技有限公司	20130525	>95%	
L-脯氨酸	Pro	115.13	中国食品药品 检定研究院	140624-201506	99.9%	
5-氧代-L-脯氨酸	Opr	129.11	大连美仑生物 技术有限公司	M0108A	>99%	
[0069] 4-羟基-L-脯氨酸	Hpr	131.13	大连美仑生物 科技有限公司	N0524AS	>98%	
L-组氨酸	His	155.15	中国食品药品 检定研究院	140624-201506	99.9%	
L-苯丙氨酸	Phe	165.19	中国食品药品 检定研究院	140624-201506	100%	
L-酪氨酸	Tyr	181.19	中国食品药品 检定研究院	140624-201506	99.3	
L-色氨酸	Trp	204.23	中国食品药品 检定研究院	140624-201506	99.9	
L-犬尿氨酸	Kyn	208.21	大连美仑生物 科技有限公司	M0208AS	>98%	
肌氨酸	Sar	89.09	大连美仑生物 科技有限公司	A0810A	>99%	
鸟氨酸	His	179.17	大连美仑生物 科技有限公司	20130510	>98%	

3-氨基丙酸 (β-丙氨酸)	Apa	89.09	上海源叶生物 科技有限公司	G31A4G1	≥98%	
3-氨基-2-甲基丙酸 (β-氨基异丁酸)	Amp	103.12	上海源叶生物 科技有限公司	A21D7L27358	≥98%	
IS: L-丙氨酸-d4	Ala-d4	93.12	Toronto Research Chemicals Inc. Toronto, Canada	11-MIC-77-1	-	
IS: L-甲硫氨酸-d3	Met-d3	152.23	Toronto Research Chemicals Inc. Toronto, Canada	22-SSR-125-1	-	
IS: L-苯丙氨酸-d5	Phe-d5	170.22	Toronto Research Chemicals Inc. Toronto, Canada	23-XIZ-28-1	-	

[0071] 2.4 血浆样本

[0072] 选取海军军医大学附属长征医院普外科住院的6例结直肠癌患者行腹腔镜结直肠癌切除术前血液样本(编号CRC-a~CRC-f)、第九七医院体检中心体检的6例健康志愿者(healthy volunteer, HV)血液样本(编号HV-a~HV-f),作为血浆实测样本进行实验。

[0073] 3液相-串联质谱联用检测方法

[0074] 3.1 相关溶液的配制与前处理

[0075] 3.1.1 氨基酸对照品储备溶液的配制

[0076] 取对照品Gly、Ala、Ser、Val、Thr、Leu、Ile、Phe、Arg、Pro、Met、His、Cit、Sar、Apa、Amp、Opr、Hpr、Hia、Kyn约2.5mg, Lys·HCl、Orn·HCl约3.0mg, 精密称定质量, 分别置于1.5mL离心管中, 定量加入5%甲醇水溶液溶解, 配制成Gly、Gly、Ala、Ser、Val、Thr、Leu、Ile、Lys、Phe、Arg、Pro、Met、His、Cit、Sar、Apa、Amp、Opr、Hpr、Orn、Hia、Kyn浓度分别为2.5mg/mL的储备溶液。

[0077] 取对照品Gln、Glu、Trp约2.5mg, 精密称定质量, 分别置于1.5mL离心管中, 定量加入0.2%FA水溶液溶解, 配制成Gln、Glu、Trp浓度分别为2.5mg/mL的储备溶液。

[0078] 取对照品Asp、Tyr、Asn、Cys、Cyss、SDMA约2.5mg, ADMA·2HCl约3.0mg, 精密称定质量, 分别置于1.5mL离心管中, 定量加入4%HCl水溶液溶解, 配制成Asp、Tyr、Asn、Cys、ADMA、Cyss、SDMA浓度分别为2.5mg/mL的储备溶液。

[0079] 上述氨基酸对照品储备溶液分装后置于-80℃冰箱内保存。

[0080] 3.1.2 内标氨基酸对照品储备溶液的配制

[0081] 取IS氨基酸对照品Ala-d4、Met-d3、Phe-d5约1mg, 分别置于1.5mL离心管中, 定量加入5%甲醇水溶液溶解, 配制成Ala-d4、Met-d3、Phe-d5浓度分别为1.0mg/mL的IS氨基酸对照品储备溶液。上述IS氨基酸对照品储备溶液置于-80℃冰箱内保存。

[0082] 3.1.3 工作溶液的配制

[0083] 精密量取PBS溶液(10×)2.5mL, 置于25mL容量瓶中, 加入纯水稀释至刻度, 定容, 配制成PBS溶液(1×), 作为“模拟血浆”使用。

[0084] 精密吸取上述Gly、Ala、Leu、Ile储备溶液各100μL, 置于1.5mL离心管中混合, 加入5%甲醇水溶液稀释至1mL, 涡旋混匀, 配制成Gly、Ala、Leu、Ile浓度分别为250μg/mL的工作溶液。

[0085] 精密吸取上述Val、Lys、Gln、Glu、Met、His、Phe、Arg、Tyr、Trp储备溶液各100 μ L,置于1.5mL离心管中混合,涡旋混匀,配制成Val、Lys、Gln、Glu、Met、His、Phe、Arg、Tyr、Trp浓度分别为250 μ g/mL的工作溶液。

[0086] 精密吸取上述Ser、Pro、Thr、Opr、Asn、Orn、Cit、Cyss储备溶液各100 μ L,置于1.5mL离心管中混合,加入5%甲醇水溶液稀释至1mL,涡旋混匀,配制成Ser、Pro、Thr、Opr、Asn、Orn、Cit、Cyss浓度分别为250 μ g/mL的工作溶液。

[0087] 精密吸取上述Cys、Hpr、Asp、ADMA、SDMA、Kyn储备溶液各100 μ L, Apa、Sar、Amp、Hia储备溶液各50 μ L,置于1.5mL离心管中混合,加入5%甲醇水溶液稀释至1mL,涡旋混匀,配制成Cys、Hpr、Asp、ADMA、SDMA、Kyn浓度分别为250 μ g/mL, Apa、Sar、Amp、Hia浓度分别为125 μ g/mL的工作溶液。

[0088] 精密吸取上述Ala-d4、Met-d3、Phe-d5储备溶液各100 μ L,混合置于250mL容量瓶中,加入乙腈(含0.2%FA),稀释至刻度,定容,配制成含3种IS氨基酸各400ng/mL的乙腈蛋白沉淀剂工作溶液。

[0089] 上述工作溶液置于4 $^{\circ}$ C冰箱内短暂保存,现配现用。

[0090] 3.1.4标准曲线工作溶液的配制

[0091] 精密吸取上述工作溶液适量,分别置于1.5mL离心管中混合,加入“模拟血浆”稀释至1mL,涡旋混匀,再加入“模拟血浆”逐级稀释,配制成Gly、Ala、Val、Lys、Leu、Ile、Gln、Glu、Met、His、Phe、Arg、Tyr、Trp浓度分别为80000、60000、40000、20000、8000、3200、1600、800、400ng/mL, Ser、Pro、Thr、Opr、Asn、Orn、Cit、Cyss浓度分别为16000、12000、8000、4000、1600、640、320、160、80ng/mL, Cys、Hpr、Asp、ADMA、SDMA、Kyn浓度分别为8000、6000、4000、2000、800、320、160、80、40ng/mL, Apa、Sar、Amp、Hia浓度分别为4000、3000、2000、1000、400、160、80、40、20ng/mL的标准曲线工作溶液。

[0092] 3.1.5标准曲线工作溶液前处理

[0093] 精密吸取上述标准曲线工作溶液50 μ L,置于1.5mL离心管中,加入乙腈蛋白沉淀剂工作溶液150 μ L,静置3min,涡旋2min混匀,置于离心机中4 $^{\circ}$ C、19060 \times g下离心15min,取上清液,转移至进样小瓶进行分析。

[0094] 3.1.6质量控制样本的配制

[0095] 将“模拟血浆”按照“3.1.4标准曲线工作溶液的配制”项下方法制备3个浓度的质量控制(quality control, QC)样本,用于各批次实测样本的质控。

[0096] QC1样本中Gly、Ala、Val、Lys、Leu、Ile、Gln、Glu、Met、His、Phe、Arg、Tyr、Trp浓度为800ng/mL, Ser、Pro、Thr、Opr、Asn、Orn、Cit、Cyss浓度为160ng/mL, Cys、Hpr、Asp、ADMA、SDMA、Kyn浓度为80ng/mL, Apa、Sar、Amp、Hia浓度为40ng/mL。QC2样本中Gly、Ala、Val、Lys、Leu、Ile、Gln、Glu、Met、His、Phe、Arg、Tyr、Trp浓度为8000ng/mL, Ser、Pro、Thr、Opr、Asn、Orn、Cit、Cyss浓度为1600ng/mL, Cys、Hpr、Asp、ADMA、SDMA、Kyn浓度为800ng/mL, Apa、Sar、Amp、Hia浓度为400ng/mL。QC3样本中Gly、Ala、Val、Lys、Leu、Ile、Gln、Glu、Met、His、Phe、Arg、Tyr、Trp浓度为60000ng/mL, Ser、Pro、Thr、Opr、Asn、Orn、Cit、Cyss浓度为12000ng/mL, Cys、Hpr、Asp、ADMA、SDMA、Kyn浓度为6000ng/mL, Apa、Sar、Amp、Hia浓度为3000ng/mL。

[0097] 3.1.7质量控制样本的前处理同“3.1.5标准曲线工作溶液前处理”。

[0098] 3.2色谱条件

[0099] 使用Agilent 1290超高效液相色谱仪系统。色谱柱为Agilent Zorbax SB-C₁₈柱(规格3.0mm×150mm,5μm),柱温为50℃。流动相A相为水(含0.02%HFBA、0.2%FA),流动相B相为甲醇,流速为0.4mL/min。流动相洗脱程序见表2。停止时间为10min,后运行时间为4min。自动进样器进样盘温度为4℃,进样体积为2μL,冲洗进针口,洗针进样,进样针吸取速度为0.2mL/min,注射速度为0.2mL/min。

[0100] 表2流动相洗脱程序

[0101]

时间 (min)	A相 (%)	B相 (%)
0	98	2
1.0	85	15
4.0	85	15
5.0	80	20
10.0	20	80

[0102] 3.3质谱条件

[0103] 使用Agilent 6460三重四极杆串联质谱仪系统。采集模式为MS_E,离子化模式为电喷雾电离正离子模式(electrospray ionization positive,ESI⁺),监测模式为多反应监测(multiple reaction monitoring,MRM)。毛细管电压为5000V,驻留时间为40。碰撞气为高纯N₂,压力0.1MPa。雾化气和干燥气均为N₂,雾化气压力为50psi,干燥气温度为325℃,干燥气流速为10L/min。鞘气温度为350℃,鞘气流速为12L/min。32种氨基酸及3种IS氨基酸的MRM优化参数见表3,MS/MS离子图见图1。

[0104] 表3 32种氨基酸及3种内标氨基酸的多反应监测优化参数(正离子电喷雾电离模式)

[0105]

编号	氨基酸	分子量	母离子	子离子	F 值 (V)	CE 值 (eV)
1	Gly	75.07	76	30	50	13
2	Ala	89.09	90	44	50	8
3	Val	117.15	118	72	60	7
4	Lys	146.19	147	84	70	11
5	Leu	131.17	132	86	65	7
6	Ile	131.17	132	86	65	7
7	Gln	146.14	147	84	65	12
8	Glu	147.13	148	84	70	12
9	Met	149.21	150	56	65	13
10	His	155.15	156	110	80	13
11	Phe	165.19	166	120	65	10
12	Arg	174.20	175	70	90	16
13	Tyr	181.19	182	136	70	11
14	Trp	204.23	205	188	70	5
15	Ser	105.09	106	60	65	9
16	Pro	115.13	116	70	70	15
17	Thr	119.12	120	74	65	9
18	Opr	129.11	130	84	75	12
19	Asn	132.12	133	74	60	11
20	Orn	132.16	133	70	65	10
21	Cit	175.19	176	159	70	7
22	Cyss	240.30	241	152	80	12
23	Cys	121.16	122	59	60	21
24	Hpr	131.13	132	86	75	13
25	Asp	133.10	134	74	65	12
26	ADMA	202.25	203	46	90	16
27	SDMA	202.25	203	172	90	14
28	Kyn	208.21	209	192	70	7
29	Apa	89.09	90	30	60	12
30	Sar	89.09	90	44	55	10
31	Amp	103.12	104	30	60	11

[0106]

32	Hia	179.17	180	105	65	6
IS1	Ala-d4	93.12	94	48	50	9
IS2	Met-d3	152.23	153	56	65	13
IS3	Phe-d5	170.22	171	125	70	11

[0107] 3.4血浆样本的前处理

[0108] 采用蛋白沉淀法 (protein precipitation, PPT) 进行样本前处理, 精密吸取血浆 50 μ L, 置于 1.5mL 离心管中, 加入乙腈蛋白沉淀剂工作溶液 150 μ L, 静置 3min, 涡旋 2min 混匀, 置于离心机中 4 $^{\circ}$ C、19060 \times g 下离心 15min, 取上清液, 转移至进样小瓶进行分析。

[0109] 3.5方法学验证

[0110] 参照文献[国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 2015年版, 四部. 北京: 中国医药科吃的技出版社, 2015, 363-368. Department of Health and Human Sevrics, Food and Drug Administration. Guidance for Industry on Bioanalytical Method Validation. Fed Regist, 2001, 66 (100) : 28526 (Docket No. 98D-1195). <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf>.]要求进行。

[0111] 3.5.1 选择性

[0112] 选择性(selectivity)是指该分析方法应该能够区分待测氨基酸和内标与基质的内源性组分或样品中其他组分。分别称取牛磺酸、S-腺苷甲硫氨酸、肌酸、肌醇、肌酐等内源性物质对照品适量,加入5%甲醇水溶液溶解后混合,稀释,加入“模拟血浆”,配制成6批次各内源性物质浓度分别为1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合溶液,作为空白“模拟血浆”,按照“3.1.5标准曲线工作溶液前处理”项下方法操作;按照“3.1.6质量控制样本的配制”项下方法配制6批次QC2样本,作为标准添加32种氨基酸和3种IS氨基酸的“模拟血浆”,按照“3.1.5标准曲线工作溶液前处理”项下方法操作;吸取6份结肠直肠癌患者或健康志愿者血浆实测样本,按照“3.4血浆样本的前处理”项下方法操作。进行分析,比较以上三组样本的色谱图差异,确定是否存在内源性物质干扰。

[0113] 3.5.2 定量下限与检测限

[0114] 定量限(limit of quantification, LOQ)是指样本中待测氨基酸能被定量检测出的最低量,一般以信噪比 $S/N=10:1$ 时相应浓度确定LOQ;定量下限(low limit of quantification, LLOQ)是能够被可靠定量的样品中待测氨基酸的最低浓度,具有可接受的准确度和精密度。LLOQ值应在 $-20\% \sim 20\%$ 范围内、相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)值应 $\leq 20\%$,以符合方法学对准确度和精密度的要求。同法配制5批次标准曲线工作溶液最低浓度点溶液,按照“3.1.5标准曲线工作溶液前处理”项下方法操作后,于1日内连续进行测定,计算日内(intra-day)准确度和精密度。连续3天重复上述操作,每日测定1次,计算日间(inter-day)准确度和精密度。检测限(limit of detection, LOD)是指样本中待测氨基酸能被检测出的最低量,一般以信噪比 $S/N=3:1$ 时相应浓度确定LOD。

[0115] 3.5.3 线性与浓度范围

[0116] 线性(linearity)是指在浓度范围内检测响应值与样本中待测氨基酸浓度呈比例关系的程度。加入已知浓度的待测氨基酸和内标于空白基质中,制备各浓度的标准曲线;纵坐标y采用待测氨基酸峰面积 S_{AA} 与IS氨基酸峰面积 S_{IS} 的比值表示,横坐标x采用待测氨基酸浓度 C_{AA} 与IS氨基酸浓度 C_{IS} 的比值表示,回归计算采用“ $1/x^2$ 加权”的最小二乘法进行。以该分析方法能够使待测氨基酸达到一定相对误差(relative error, 简称RE)、RSD和线性要求时的高低限浓度区间确定该待测氨基酸的线性浓度范围,线性浓度范围应该尽量覆盖预期浓度范围。

[0117] 3.5.4 提取回收率与基质效应

[0118] 基质效应(matrix effects, ME)是指被测样品中除被分析物以外的组分,对分析物的分析有显著干扰,并影响分析结果的准确性,这些干扰和影响被称为基质效应[Taylor PJ. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. Clinical Biochemistry, 2005, 38 (4) : 328-334.]. 配制6批次低、高浓度(浓度分别等同于QC1、QC3样本)的标准添加

氨基酸的“模拟血浆”样本,按照“3.1.5标准曲线工作溶液前处理”项下方法操作后,测定仪器的氨基酸响应值 $RV_{\text{预处理前}}$ (模拟血浆样本预处理前的氨基酸响应值)。将“模拟血浆”按照“3.1.5标准曲线工作溶液前处理”项下方法操作后,标准添加氨基酸至6批次低、高浓度(浓度分别等同于QC1、QC3样本),测定仪器的氨基酸响应值 $RV_{\text{预处理后}}$ (模拟血浆样本预处理后的氨基酸响应值)。配制6批次低、高浓度(浓度分别等同于QC1、QC3样本)的标准添加氨基酸的空白5%甲醇水溶液样本,按照“3.1.5标准曲线工作溶液前处理”项下方法操作后,测定仪器的氨基酸响应值 $RV_{\text{纯溶剂}}$ (纯溶剂中的氨基酸响应值)。提取回收率(extraction recovery, ER)、基质效应计算公式如下:

$$[0119] \quad ER\% = \frac{RV_{\text{预处理前}}}{RV_{\text{预处理后}}} \times 100\% \quad ; \quad ME\% = \frac{RV_{\text{预处理后}}}{RV_{\text{纯溶剂}}} \times 100\% \quad .$$

[0120] 3.5.5准确度与精密度

[0121] 准确度(accuracy)是指采用该方法测定氨基酸的测定值与标示浓度的接近程度,采用RE表示,RE值应在-15%~15%范围内;精密度(precision)是指待测氨基酸重复测定的接近程度,采用RSD表示,RSD值应 $\leq 15\%$ 。同法配制5批次QC1、QC2、QC3样本,按照“3.1.5标准曲线工作溶液前处理”项下方法操作后,于1日内连续进行测定,计算日内(intra-day)准确度和精密度,每日测定1次,连续测定3日,计算日间(inter-day)准确度和精密度。

[0122] 3.5.6稳定性

[0123] 稳定性(stability)包括待测样本室温下放置的稳定性、反复冻融的稳定性、自动进样器放置下的短期稳定性、冰冻下保存的长期稳定性。同法配制3批次QC1、QC2、QC3样本,按照“3.1.5标准曲线工作溶液前处理”项下方法操作后,分别于20℃下放置6h、-20℃下反复冻融3次、4℃下自动进样器放置24h、-80℃下保存90d后,按照“3.1.5标准曲线工作溶液前处理”项下方法操作后进行测定。采用RE表示测定结果与氨基酸真实值的差异,采用RSD表示同一份均匀样本经多次取样检测氨基酸的结果之间的接近程度。

[0124] 3.5.7稀释效应

[0125] 当样本中的待测物浓度高于线性范围的最高浓度时,可通过适当的稀释使得待测物浓度处于线性范围内。稀释效应(dilution effect)是指将已知高浓度样本稀释一定倍数后的实测浓度与其稀释后理论浓度进行比较的结果,采用RE表示,RE值应 $\leq 15\%$ 。精密吸取上述氨基酸工作溶液适量,加入“模拟血浆”稀释,配制成Gly、Ala、Val、Lys、Leu、Ile、Gln、Glu、Met、His、Phe、Arg、Tyr、Trp浓度为80000ng/mL, Ser、Pro、Thr、Opr、Asn、Orn、Cit、Cyss浓度为16000ng/mL, Cys、Hpr、Asp、ADMA、SDMA、Kyn浓度为8000ng/mL, Apa、Sar、Amp、Hia浓度为4000ng/mL的溶液。加入“模拟血浆”稀释5倍,同法稀释2批次,再按照“3.1.5标准曲线工作溶液前处理”项下方法操作后进行测定,考察此稀释条件对待测氨基酸浓度测定的影响。

[0126] 3.5.8残留效应

[0127] 考察该分析方法的残留效应,在最高浓度的标准曲线样品进样之后注射空白样品,以评估残留。空白样品中的残留应不超过定量下限的20%。

[0128] 3.6数据处理

[0129] 采用Agilent Mass Hunter数据处理工作站和Agilent Qualitative Analysis B.07.00 Tools软件进行质谱数据处理。

[0130] 4结果

[0131] 4.1方法学验证结果

[0132] 4.1.1选择性结果

[0133] 在上述实验条件下,空白“模拟血浆”、标准添加“模拟血浆”(QC2)、结直肠癌患者血浆实测样本(CRC-a)的总离子流图和MRM色谱图分别见图2,32种氨基酸的保留时间见表4。表明血浆样本中各内源性物质对待测氨基酸、IS氨基酸均不产生干扰,且待测氨基酸、IS氨基酸之间具有良好的分离度。

[0134] 4.1.2定量下限与检测限结果

[0135] 32种氨基酸LLOQ和LOD结果见表4。日内LLOQ的RE值为-18.97%~14.62%,RSD值为1.00%~7.89%,日间LLOQ的RE值为-17.95%~13.09%,RSD值为1.38%~10.79%,结果见表6;相应LOD的S/N>3。表明LLOQ和LOD结果符合血浆样本分析方法学要求。

[0136] 4.1.3线性与浓度范围结果

[0137] 制备9份不同浓度的系列氨基酸对照品溶液进行线性的观察,在相应的浓度范围内,32种氨基酸均显示出良好的线性(相关系数R值均>0.99)。32种氨基酸的回归方程、相关系数、线性范围及对应内标见表4,标准曲线见图3,表明符合血浆样本分析方法学要求。

[0138] 表4 32种氨基酸保留时间、回归方程、相关系数、线性范围、定量下限、检测限及对应内标

[0139]

氨基酸	保留时间 (min)	回归方程 (n=9)	相关系数 R ²	线性范围 (ng/mL)	定量下限 (ng/mL)	检测限 (ng/mL)	IS 氨基酸
Gly	1.834	$y=1.408347 \times 10^{-4}x - 0.013475$	0.98582	400 ~ 80000	400	120	Ala-d4
Ala	2.075	$y=0.002538x - 0.168700$	0.99370	400 ~ 80000	400	120	Ala-d4
Val	3.550	$y=0.005778x + 1.830754$	0.98115	400 ~ 80000	400	120	Met-d3
Lys	2.936	$y=9.940892 \times 10^{-4}x + 0.226252$	0.99073	400 ~ 80000	400	120	Phe-d5
Leu	6.412	$y=0.024999x + 1.108079$	0.98289	400 ~ 80000	400	120	Met-d3
Ile	5.853	$y=0.026991x + 2.122592$	0.98482	400 ~ 80000	400	120	Met-d3
Gln	1.853	$y=0.006403x + 6.876114$	0.99293	400 ~ 80000	400	120	Met-d3
Glu	2.026	$y=0.002283x + 1.880188$	0.99085	400 ~ 80000	400	120	Met-d3
Met	3.570	$y=0.001387x + 0.285862$	0.99543	400 ~ 80000	400	120	Met-d3
His	2.638	$y=0.003621x + 3.112060$	0.99343	400 ~ 80000	400	120	Met-d3
Phe	7.542	$y=0.007100x - 0.409140$	0.98150	400 ~ 80000	400	120	Phe-d5
Arg	3.292	$y=0.002207x + 2.699688$	0.99349	400 ~ 80000	400	120	Met-d3
Tyr	4.390	$y=1.430477 \times 10^{-4}x - 0.012265$	0.99419	400 ~ 80000	400	120	Phe-d5
Trp	8.795	$y=3.900596 \times 10^{-4}x - 0.005289$	0.99875	400 ~ 80000	400	120	Phe-d5
Ser	1.782	$y=0.001837x + 0.660443$	0.99511	80 ~ 16000	80	24	Met-d3
Pro	2.107	$y=0.009629x + 0.661802$	0.99168	80 ~ 16000	80	24	Met-d3
Thr	1.985	$y=0.002269x + 0.271843$	0.99731	80 ~ 16000	80	24	Met-d3
Opr	2.502	$y=6.663413 \times 10^{-5}x + 0.005910$	0.99627	80 ~ 16000	80	24	Phe-d5
Asn	1.738	$y=8.222158 \times 10^{-4}x + 0.120465$	0.99659	80 ~ 16000	80	24	Met-d3
Orn	2.620	$y=0.001509x + 0.410648$	0.99365	80 ~ 16000	80	24	Met-d3
Cit	2.081	$y=0.003262x + 0.093758$	0.99470	80 ~ 16000	80	24	Met-d3
Cyss	1.819	$y=2.124226 \times 10^{-4}x + 0.031618$	0.99362	80 ~ 16000	80	24	Met-d3
Cys	2.011	$y=9.350257 \times 10^{-4}x - 0.013901$	0.99222	40 ~ 8000	40	12	Met-d3
Hpr	1.735	$y=0.015695x + 0.550025$	0.99416	40 ~ 8000	40	12	Met-d3
Asp	1.763	$y=0.001026x + 0.080160$	0.98832	40 ~ 8000	40	12	Met-d3
ADMA	3.556	$y=0.001968x - 0.037319$	0.99350	40 ~ 8000	40	12	Met-d3

[0140]

SDMA	3.563	$y=5.455779 \times 10^{-4}x - 0.001570$	0.99030	40 ~ 8000	40	12	Met-d3
Kyn	6.338	$y=4.133766 \times 10^{-4}x + 0.024274$	0.98545	40 ~ 8000	40	12	Phe-d5
Apa	2.375	$y=1.909906 \times 10^{-4}x + 0.001053$	0.99145	20 ~ 4000	20	6	Phe-d5
Sar	1.827	$y=0.006076x + 0.078098$	0.99079	20 ~ 4000	20	6	Met-d3
Amp	3.119	$y=2.176638 \times 10^{-4}x + 7.747455 \times 10^{-4}$	0.99459	20 ~ 4000	20	6	Phe-d5
Hia	7.070	$y=6.058453 \times 10^{-4}x - 0.003212$	0.99681	20 ~ 4000	20	6	Phe-d5

[0141] 4.1.4提取回收率与基质效应结果

[0142] 32种氨基酸及3种IS氨基酸在低、高QC样本浓度下提取回收率平均值为50.37%~182.44%，RSD值为0.62%~14.16%；基质效应平均值为41.02%~136.37%，RSD值为0.56%~10.31%。上述结果见表5，表明提取回收率和基质效应结果能够满足血浆样本分析要求。

[0143] 表5 32种氨基酸及3种内标氨基酸的提取回收率和基质效应 (n=6)

[0144]

氨基酸	标示浓度 (ng/mL)	提取回收率		基质效应	
		Mean±SD (%)	RSD (%)	Mean±SD (%)	RSD (%)
Gly	800	99.45±2.16	2.17	102.53±1.63	1.59
	60000	104.49±0.89	0.85	96.74±2.01	2.07
Ala	800	98.45±1.22	1.24	96.38±1.09	1.13
	60000	91.68±0.92	1.00	104.63±1.10	1.05
Val	800	93.64±3.42	3.66	104.33±1.23	1.18
	60000	84.70±1.72	2.03	118.03±4.47	3.78
Lys	800	95.18±3.54	3.72	104.91±0.59	0.56
	60000	104.02±1.05	1.01	98.52±1.01	1.03
Leu	800	98.92±2.53	2.55	102.08±1.35	1.32
	60000	111.76±0.88	0.79	91.06±1.45	1.59
Ile	800	103.00±4.27	4.15	96.26±3.71	3.85
	60000	114.51±0.71	0.62	88.82±2.40	2.70
Gln	800	99.43±0.74	0.74	98.13±2.05	2.09
	60000	103.10±1.01	0.98	98.83±1.12	1.14
Glu	800	94.52±1.82	1.92	101.48±1.95	1.92
	60000	94.38±0.82	0.87	106.44±1.88	1.76
Met	800	73.98±5.02	6.79	131.42±6.51	4.95
	60000	142.96±1.71	1.20	70.20±2.88	4.10
His	800	99.97±0.66	0.66	99.75±1.18	1.18
	60000	103.44±0.71	0.69	98.66±2.36	2.39
Phe	800	96.77±1.34	1.38	100.96±1.93	1.91
	60000	108.80±0.93	0.85	94.16±1.00	1.06
Arg	800	93.03±7.13	7.67	103.14±1.67	1.62
	60000	102.91±1.33	1.30	98.41±1.38	1.40
Tyr	800	90.88±8.48	9.34	101.55±6.76	6.66
	60000	103.51±2.71	2.61	97.60±8.61	8.83

[0145]

Trp	800	97.81±2.45	2.50	100.28±1.62	1.62
	6000	103.36±1.22	1.18	99.63±1.33	1.34
Ser	160	96.81±2.16	2.23	112.02±2.63	2.35
	12000	99.57±2.07	2.07	100.57±1.26	1.25
Pro	160	182.44±25.00	13.70	41.02±4.23	10.31
	12000	155.69±5.68	3.65	55.68±3.16	5.67
Thr	160	94.02±1.47	1.56	110.47±2.52	2.28
	12000	97.78±1.25	1.28	103.44±1.40	1.35
Opr	160	128.28±8.31	6.48	75.59±6.63	8.77
	12000	89.72±1.58	1.77	116.35±4.81	4.13
Asn	160	97.69±2.78	2.85	98.45±2.77	2.81
	12000	99.61±1.28	1.28	99.86±2.68	2.68
Orn	160	98.47±1.70	1.73	110.69±1.42	1.29
	12000	99.38±2.01	2.02	102.60±0.89	0.87
Cit	160	57.88±8.20	14.16	88.18±4.02	4.55
	12000	115.41±2.18	1.89	82.67±1.26	1.53
Cyss	160	112.35±6.41	5.71	89.51±4.21	4.70
	12000	101.99±1.98	1.94	99.11±3.08	3.11
Cys	80	50.37±2.61	5.17	136.37±4.27	3.13
	6000	93.25±1.34	1.44	106.53±1.70	1.59
Hpr	80	101.73±4.89	4.81	102.41±1.79	1.74
	6000	99.90±0.94	0.94	101.63±1.52	1.49
Asp	80	92.43±1.29	1.39	109.94±5.09	4.63
	6000	99.48±1.98	1.99	99.48±2.08	2.09
ADMA	80	90.79±12.23	13.47	111.45±5.62	5.04
	6000	126.87±2.18	1.72	80.02±6.24	7.80
SDMA	80	106.31±4.83	4.55	94.25±7.71	8.18
	6000	104.41±9.25	8.86	102.52±8.05	7.85
Kyn	80	94.07±9.65	10.26	102.86±5.84	5.67
	6000	109.94±2.93	2.66	93.43±6.05	6.48
Apa	40	93.54±2.44	2.61	101.28±5.59	5.52
	3000	99.48±1.79	1.80	97.39±2.54	2.60
Sar	40	92.57±3.02	3.26	98.42±2.53	2.57
	3000	100.83±0.80	0.79	98.63±1.08	1.10
Amp	40	89.64±5.88	6.56	102.51±3.26	3.18
	3000	102.73±1.30	1.27	95.94±2.85	2.97
Hia	40	94.58±2.28	2.41	104.55±3.05	2.92
	3000	102.95±1.06	1.03	97.88±1.15	1.17
L-Ala-d4	400 (QC1)	132.16±2.48	1.88	70.81±1.11	1.56
	400 (QC3)	118.58±1.33	1.12	79.19±1.96	2.47
L-Met-d3	400 (QC1)	106.47±6.80	6.38	97.69±4.75	4.87
	400 (QC3)	140.84±2.40	1.71	71.22±3.76	5.27
L-Phe-d5	400 (QC1)	133.80±3.24	2.42	74.32±0.94	1.26
	400 (QC3)	141.98±2.55	1.79	74.05±1.93	2.60

[0146] 4.1.5准确度与精密度结果

[0147] 32种氨基酸在低、中、高QC样本浓度下日内RE值为-14.29%~13.72%，日内RSD值为0.38%~8.77%；日间RE值为-14.35%~13.40%，日间RSD值为0.52%~12.22%。上述结果见表6，表明准确度和精密度符合血浆分析方法学要求。

[0148] 表6 32种氨基酸的日内、日间准确度和精密度 (n=5)

氨基酸	标示浓度 (ng/mL)	日内准确度和精密度			日间准确度和精密度		
		测定浓度 (ng/mL)	RE (%)	RSD (%)	测定浓度 (ng/mL)	RE (%)	RSD (%)
Gly	400	421.34±11.89	5.34	2.82	434.46±14.18	8.61	3.26
	800	712.47±15.56	-10.94	2.18	722.99±16.20	-9.63	2.24
	8000	7188.36±150.23	-10.15	2.09	7195.98±99.70	-10.05	1.39
	60000	65772.85±881.74	9.62	1.34	65935.03±882.19	9.89	1.34
Ala	400	411.15±6.63	2.79	1.61	416.07±8.19	4.02	1.97
	800	739.52±5.57	-7.56	0.75	739.53±10.55	-7.56	1.43
	8000	7494.33±63.28	-6.32	0.84	7478.63±70.95	-6.52	0.95
	60000	64402.21±1488.90	7.34	2.31	64693.83±1037.27	7.82	1.60
Val	400	327.57±5.85	-18.11	1.79	331.77±6.14	-17.06	1.85
	800	736.78±19.77	-7.90	2.68	727.44±20.00	-9.07	2.75
	8000	9012.50±92.49	12.66	1.03	8987.38±121.49	12.34	1.35
	60000	51423.23±193.01	-14.29	0.38	51392.73±265.22	-14.35	0.52
Lys	400	411.19±14.41	2.80	3.50	399.69±14.83	-0.08	3.71
	800	909.73±7.24	13.72	0.80	907.24±10.34	13.40	1.14
	8000	7192.50±177.87	-10.09	2.47	7078.33±161.01	-11.52	2.27
	60000	60238.27±1320.60	0.40	2.19	59654.40±1115.23	-0.58	1.87
Leu	400	325.43±4.75	-18.64	1.46	328.18±5.57	-17.95	1.70
	800	690.14±6.40	-13.73	0.93	695.58±20.28	-13.05	2.92
	8000	7967.48±222.02	-0.41	2.79	7969.60±193.03	-0.38	2.42
	60000	59920.54±1957.59	-0.13	3.27	61317.63±3548.07	2.20	5.79
Ile	400	324.12±3.25	-18.97	1.00	329.82±6.46	-17.55	1.96
	800	704.63±14.06	-11.92	2.00	713.93±26.75	-10.76	3.75
	8000	8150.06±197.28	1.88	2.42	8142.56±214.37	1.78	2.63
	60000	58703.44±1530.38	-2.16	2.61	60177.76±3259.41	0.30	5.42
Gln	400	333.50±7.06	-16.62	2.12	333.67±9.04	-16.58	2.71
	800	770.70±30.46	-3.66	3.95	762.73±48.51	-4.66	6.36
	8000	8173.97±168.20	2.17	2.06	8049.59±216.30	0.62	2.69
	60000	53669.02±1881.50	-10.55	3.51	54642.01±2848.48	-8.93	5.21
Glu	400	335.02±11.01	-16.25	3.29	339.58±9.90	-15.11	2.92
	800	735.74±26.97	-8.03	3.67	736.53±45.03	-7.93	6.11
	8000	8478.18±219.61	5.98	2.59	8476.51±218.45	5.96	2.58
	60000	53188.64±1956.38	-11.35	3.68	54695.16±3192.10	-8.84	5.84
Met	400	360.73±9.77	-9.82	2.71	353.88±15.95	-11.53	4.51
	800	736.18±21.29	-7.98	2.89	724.46±26.88	-9.44	3.71

[0149]

[0150]

	8000	8501.15±213.26	6.26	2.51	8354.01±223.72	4.43	2.68
	60000	61545.23±2510.59	2.58	4.08	63832.77±3313.24	6.39	5.19
His	400	331.41±7.32	-17.15	2.21	334.39±15.52	-16.40	4.64
	800	759.76±18.46	-5.03	2.43	755.84±30.28	-5.52	4.01
	8000	7398.74±233.87	-7.52	3.16	7203.83±250.89	-9.95	3.48
	60000	59075.29±1773.15	-1.54	3.00	59805.56±3353.19	-0.32	5.61
Phe	400	342.59±5.35	-14.35	1.56	345.30±7.88	-13.68	2.28
	800	686.06±4.41	-14.24	0.64	685.27±7.86	-14.34	1.15
	8000	7604.80±189.95	-4.94	2.50	7635.44±172.67	-4.56	2.26
	60000	62479.73±1955.14	4.13	3.13	64282.47±3219.00	7.14	5.01
Arg	400	330.58±4.17	-17.36	1.26	337.27±13.54	-15.68	4.01
	800	840.42±26.23	5.05	3.12	826.12±39.10	3.27	4.73
	8000	7784.31±166.98	-2.70	2.15	7650.62±200.51	-4.37	2.62
	60000	56693.96±1864.81	-5.51	3.29	57506.67±3327.41	-4.16	5.79
Tyr	400	449.63±15.28	12.41	3.40	449.96±18.20	12.49	4.04
	800	806.18±22.92	0.77	2.84	816.96±38.97	2.12	4.77
	8000	7367.83±120.88	-7.90	1.64	7368.01±230.90	-7.90	3.13
	60000	67368.93±2032.88	12.28	3.02	65687.95±2470.14	9.48	3.76
Trp	400	390.30±14.01	-2.43	3.59	394.73±9.84	-1.32	2.49
	800	810.67±13.49	1.33	1.66	800.25±16.96	0.03	2.12
	8000	7994.69±115.89	-0.07	1.45	8038.29±166.72	0.48	2.07
	60000	58403.06±1967.08	-2.66	3.37	58986.32±1313.07	-1.69	2.23
Ser	80	65.83±1.39	-17.71	2.11	69.17±7.46	-13.53	10.79
	160	139.74±1.51	-12.66	1.08	139.99±2.14	-12.50	1.53
	1600	1518.14±61.04	-5.12	4.02	1539.85±64.55	-3.76	4.19
	12000	11250.73±482.73	-6.24	4.29	11530.02±795.19	-3.92	6.90
Pro	80	67.38±2.15	-15.78	3.20	67.73±2.05	-15.34	3.03
	160	151.13±11.83	-5.55	7.83	156.99±8.79	-1.88	5.60
	1600	1700.05±85.71	6.25	5.04	1722.55±81.86	7.66	4.75
	12000	11323.17±993.17	-5.64	8.77	11262.56±749.64	-6.15	6.66
Thr	80	66.50±1.64	-16.87	2.47	67.24±1.46	-15.95	2.16
	160	139.87±1.81	-12.58	1.29	142.16±4.80	-11.15	3.38
	1600	1559.24±64.07	-2.55	4.11	1549.60±51.59	-3.15	3.33
	12000	11498.57±486.24	-4.18	4.23	11717.71±833.81	-2.35	7.12
Opr	80	83.62±3.82	4.53	4.57	88.61±4.66	10.76	5.25
	160	167.04±12.70	4.40	7.61	166.34±11.87	3.96	7.14
	1600	1740.26±39.52	8.77	2.27	1697.38±83.16	6.09	4.90
	12000	12223.99±306.08	1.87	2.50	12067.27±453.51	0.56	3.76
Asn	80	66.55±2.50	-16.81	3.75	66.43±1.87	-16.96	2.81
	160	141.39±3.70	-11.63	2.62	148.48±10.93	-7.20	7.36
	1600	1578.93±58.42	-1.32	3.70	1559.57±48.79	-2.53	3.13
	12000	11201.11±430.10	-6.66	3.84	11347.94±674.63	-5.43	5.94
Orn	80	90.65±2.61	13.31	2.88	90.47±4.76	13.09	5.26
	160	150.10±3.50	-6.19	2.33	149.73±9.51	-6.42	6.35
	1600	1483.69±40.51	-7.27	2.73	1444.88±56.06	-9.70	3.88

		12000	12701.37±504.71	5.84	3.97	12773.91±786.80	6.45	6.16
		80	90.79±3.52	13.48	3.87	83.80±7.53	4.75	8.99
		160	164.56±8.45	2.85	5.13	166.10±10.97	3.81	6.61
		1600	1729.61±146.43	8.10	8.47	1601.42±195.69	0.09	12.22
	Cit	12000	11161.99±436.88	-6.98	3.91	11308.65±602.36	-5.76	5.33
		80	66.92±1.31	-16.35	1.96	68.35±3.65	-14.56	5.34
		160	163.51±10.31	2.19	6.31	173.30±9.72	8.31	5.61
	Cyss	1600	1493.72±53.79	-6.64	3.60	1545.40±77.37	-3.41	5.01
		12000	12085.75±411.33	0.71	3.40	12472.62±843.44	3.94	6.76
		40	34.79±1.11	-13.03	3.20	34.30±1.12	-14.26	3.26
		80	69.92±1.23	-12.60	1.76	72.55±5.02	-9.31	6.92
	Cys	800	790.66±27.57	-1.17	3.49	742.17±44.65	-7.23	6.02
		6000	5422.16±226.76	-9.63	4.18	5405.08±227.36	-9.92	4.21
		40	32.87±0.81	-17.83	2.46	33.42±1.31	-16.45	3.92
		80	81.60±2.38	2.00	2.92	81.89±3.65	2.37	4.46
	Hpr	800	800.54±16.10	0.07	2.01	799.28±19.09	-0.09	2.39
		6000	5412.01±222.89	-9.80	4.12	5579.21±341.90	-7.01	6.13
		40	32.97±0.95	-17.59	2.90	33.31±0.98	-16.74	2.94
		80	70.87±1.87	-11.41	2.63	69.54±1.51	-13.07	2.17
	Asp	800	750.24±30.21	-6.22	4.03	740.41±23.43	-7.45	3.16
		6000	5813.93±217.64	-3.10	3.74	5898.71±387.82	-1.69	6.57
		40	45.85±1.00	14.62	2.17	44.62±4.13	11.55	9.25
		80	77.55±2.31	-3.06	2.98	77.84±5.30	-2.70	6.81
	ADMA	800	825.67±31.72	3.21	3.84	811.60±30.78	1.45	3.79
		6000	5648.77±117.35	-5.85	2.08	5758.30±243.61	-4.03	4.23
		40	35.71±1.51	-10.72	4.23	36.16±2.12	-9.61	5.86
		80	73.86±2.96	-7.67	4.01	73.52±3.18	-8.10	4.32
	SDMA	800	832.81±34.23	4.10	4.11	816.80±34.82	2.10	4.26
		6000	5864.71±139.76	-2.25	2.38	5961.17±335.55	-0.65	5.63
		40	39.90±2.71	-0.25	6.79	42.49±3.90	6.21	9.18
		80	71.16±2.39	-11.05	3.35	72.95±3.68	-8.81	5.05
	Kyn	800	879.31±7.68	9.91	0.87	872.10±42.02	9.01	4.82
		6000	5688.06±185.21	-5.20	3.26	5560.47±180.89	-7.33	3.25
		20	18.52±0.93	-7.41	5.00	17.92±1.10	-10.38	6.11
		40	41.65±0.96	4.13	2.31	40.38±1.88	0.96	4.66
	Apa	400	415.14±7.82	3.78	1.88	414.97±10.88	3.74	2.62
		3000	2752.28±45.17	-8.26	1.64	2740.90±35.36	-8.64	1.29
		20	16.51±0.25	-17.44	1.54	16.52±0.23	-17.40	1.38
		40	34.39±1.53	-14.03	4.45	35.28±1.53	-11.81	4.32
	Sar	400	439.73±10.61	9.93	2.41	440.12±13.53	10.03	3.08
		3000	2670.24±100.11	-10.99	3.75	2724.84±146.95	-9.17	5.39
		20	18.23±1.44	-8.83	7.89	18.48±1.03	-7.61	5.58
		40	39.08±2.25	-2.30	5.76	39.55±2.02	-1.14	5.11
	Amp	400	417.91±9.00	4.48	2.15	419.46±10.61	4.87	2.53
		3000	2775.29±34.70	-7.49	1.25	2788.12±34.64	-7.06	1.24
		20	22.46±0.75	12.28	3.36	22.38±0.69	11.91	3.07
		40	37.90±0.46	-5.25	1.21	38.48±1.09	-3.81	2.82
	Hia	400	388.65±7.88	-2.84	2.03	390.39±8.10	-2.40	2.07
		3000	3084.58±72.86	2.82	2.36	3084.82±51.29	2.83	1.66

[0151]

[0152]

[0153] 4.1.6稳定性结果

[0154] 32种氨基酸在低、中、高QC样本浓度下室温下放置的稳定性RE值为-12.82%~11.94%，RSD值为0.73%~11.98%；反复冻融的稳定性RE值为-14.59%~13.05%，RSD值为0.17%~11.31%；自动进样器放置下的短期稳定性RE值为-13.38%~13.04%，RSD值为0.43%~13.92%；冰冻下保存的长期稳定性RE值为-12.57%~12.02%，RSD值为1.15%~12.59%。上述结果见表7，表明稳定性符合血浆分析方法学要求。

[0155] 表7 32种氨基酸的稳定性结果 (n=3)

氨基酸	浓度 (ng/mL)	室温稳定性		冻融稳定性		短期稳定性		长期稳定性	
		RE (%)	RSD (%)	RE (%)	RSD (%)	RE (%)	RSD (%)	RE (%)	RSD (%)
Gly	800	-9.83	3.06	-10.27	3.27	-10.71	1.72	-10.45	2.74
	8000	-9.58	1.47	-10.61	1.22	-9.29	1.57	-10.01	1.51
	60000	9.40	2.07	8.65	1.87	10.48	1.78	9.44	1.99
Ala	800	-7.47	1.55	-8.14	2.98	-8.51	1.26	-7.27	1.53
	8000	-6.27	1.14	-6.20	0.66	-6.07	1.50	-6.23	1.18
	60000	7.24	1.89	5.70	0.46	8.04	2.17	7.19	1.90
Val	800	-0.28	2.51	3.31	0.30	-1.01	3.39	2.09	4.23
	8000	10.04	2.26	7.38	0.71	9.58	3.21	9.14	3.30
	60000	-12.74	2.03	-11.94	2.66	-13.38	2.73	-12.57	2.85
Lys	800	10.61	2.24	0.30	4.08	8.85	1.81	9.42	2.65
	8000	-10.64	1.44	-13.22	1.39	-10.64	2.08	-11.79	2.27
	60000	0.44	1.65	-3.88	1.81	1.42	1.65	-0.67	2.21
Leu	800	-9.36	2.32	-5.36	0.81	-9.95	3.13	-6.88	4.52
	8000	-1.61	2.17	4.01	1.59	-1.30	2.52	-0.18	3.20
	60000	2.56	3.50	3.79	1.24	4.46	2.28	2.30	3.74
Ile	800	-8.37	2.64	-2.40	0.74	-9.11	3.87	-5.60	5.05
	8000	-0.16	2.67	5.85	1.24	0.65	3.10	1.34	3.41
	60000	0.72	3.26	2.21	1.17	3.01	1.53	0.66	3.65
Gln	800	2.34	5.10	-5.31	2.32	2.02	7.82	2.90	5.31
	8000	0.58	1.80	0.07	1.65	0.66	1.75	-0.35	2.71
	60000	-8.23	2.74	-11.60	1.66	-6.64	1.55	-9.73	3.50
Glu	800	-3.63	5.31	-4.46	3.24	-3.78	8.01	-2.20	5.68
	8000	5.02	1.59	7.46	1.20	4.58	1.51	5.63	2.75
	60000	-9.34	3.10	-10.41	2.39	-8.07	3.93	-9.91	3.09
Met	800	-5.47	5.61	-3.32	0.70	-2.03	1.86	-4.92	4.65
	8000	3.04	3.60	7.64	1.28	1.95	5.06	4.06	3.41
	60000	-4.09	6.22	-3.29	7.52	-7.05	2.08	-4.35	5.26

[0156]

[0157]

His	800	2.18	6.54	-6.19	2.73	2.05	9.93	2.09	5.65
	8000	-10.69	3.00	-11.73	0.17	-11.24	2.64	-11.34	3.27
	60000	1.21	3.46	-1.02	2.38	3.13	2.33	-0.51	4.04
Phe	800	-12.82	1.62	-9.10	1.83	-11.79	1.03	-11.77	2.50
	8000	-6.55	2.11	1.28	1.18	-6.99	2.83	-4.67	3.76
	60000	6.83	3.36	9.10	1.10	8.27	2.92	6.93	3.47
Arg	800	11.19	4.30	-1.32	3.97	11.78	6.27	9.91	4.49
	8000	-7.03	2.78	-5.66	1.97	-7.21	1.26	-7.32	2.46
	60000	-4.35	4.04	-1.64	1.41	-1.43	1.44	-4.44	3.95
Tyr	800	0.31	4.30	6.51	4.45	3.75	1.33	3.71	6.06
	8000	-5.00	5.16	-0.77	2.27	-0.71	2.21	-4.05	4.37
	60000	9.41	3.86	9.03	3.07	13.04	0.79	10.47	3.42
Trp	800	1.57	3.25	8.77	3.18	4.00	1.50	1.83	2.96
	8000	1.51	1.47	8.17	2.56	1.98	1.99	3.13	2.90
	60000	-1.23	1.87	3.63	1.72	-0.37	2.20	0.29	3.28
Ser	160	-6.41	5.90	-10.27	4.81	-2.23	4.94	-7.27	5.32
	1600	-3.62	2.48	-0.71	1.92	-4.46	2.70	-3.57	3.16
	12000	-2.87	2.80	-3.18	3.35	-1.20	1.84	-3.91	3.04
Pro	160	-8.59	7.65	6.16	3.98	-4.98	9.33	-6.50	7.83
	1600	7.67	5.08	1.15	8.75	5.48	5.30	7.64	4.27
	12000	-5.98	3.89	-4.29	11.31	-6.01	6.08	-2.23	6.71
Thr	160	-10.14	3.15	-9.76	4.74	-10.27	2.18	-10.15	2.70
	1600	-3.76	2.26	-1.75	0.78	-3.45	3.33	-3.59	2.51
	12000	-1.52	3.14	-0.47	1.55	0.95	2.17	-1.66	2.75
Opr	160	0.93	5.81	-4.35	7.76	4.38	4.79	-1.26	6.56
	1600	5.25	3.36	-0.53	1.91	4.66	5.24	4.77	3.08
	12000	-8.38	7.81	-0.08	3.44	-9.60	1.74	-3.27	10.05
Asn	160	-7.36	6.61	-6.07	8.33	-9.33	8.41	-4.33	7.72
	1600	-3.50	1.71	-0.78	1.78	-4.00	2.04	-2.98	2.45
	12000	-3.77	4.81	-6.02	3.82	-0.05	1.88	-5.08	4.40
Orn	160	4.14	6.68	-3.80	2.85	5.12	7.70	3.69	5.43
	1600	-10.60	3.22	-10.28	3.92	-10.91	3.38	-11.09	2.79
	12000	8.31	3.95	6.71	1.63	12.08	1.24	6.82	4.33
Cit	160	1.96	8.05	5.96	2.90	7.09	5.99	2.51	6.46
	1600	-6.69	10.80	11.59	1.73	-1.98	13.92	-0.22	12.59
	12000	-5.70	2.52	-9.69	2.37	-5.91	2.86	-7.40	3.66
Cys ^s	160	5.16	9.29	7.07	4.50	0.77	13.13	5.71	8.25
	1600	-5.46	4.43	5.89	5.31	-8.49	3.50	-2.65	6.24
	12000	3.82	1.09	8.41	3.31	4.10	0.82	6.15	3.46
Cys	80	-9.10	5.52	-12.60	3.08	-5.76	5.72	-10.22	4.84
	800	-3.12	11.98	-13.89	0.94	7.48	0.43	-6.42	11.17
	6000	-8.82	6.47	-14.28	0.80	-3.53	1.47	-10.40	5.84
Hpr	80	4.41	4.49	5.21	1.44	1.79	2.60	7.15	5.20
	800	-1.22	2.60	0.00	1.30	-1.74	2.22	-0.84	2.64
	6000	-6.18	3.02	-6.90	1.82	-4.19	0.73	-7.42	3.28

	80	-10.88	3.51	-9.31	2.98	-10.57	4.15	-10.61	3.36
Asp	800	-4.81	1.09	-3.35	1.63	-4.41	0.74	-5.56	2.55
	6000	0.38	4.63	-0.45	2.98	4.25	0.88	-0.67	4.06
	80	6.49	7.70	13.05	0.83	8.47	6.64	7.96	6.41
ADMA	800	2.16	0.73	0.41	2.88	1.75	0.92	1.44	1.52
	6000	-6.83	3.94	-9.11	1.68	-3.73	1.98	-7.91	4.03
	80	-6.28	3.72	-6.76	8.94	-4.05	1.86	-6.82	3.64
SDMA	800	2.63	4.57	1.10	2.97	4.76	4.10	2.82	3.99
	6000	-1.12	3.88	-3.40	1.48	1.51	2.95	-2.02	4.17
	80	-9.72	5.38	-9.04	5.32	-11.80	3.82	-10.20	4.56
Kyn	800	11.94	1.15	9.97	1.71	12.12	0.66	12.02	1.15
	6000	-7.54	2.97	-11.83	1.37	-5.23	1.57	-7.76	2.95
	40	1.50	4.07	-4.82	3.73	1.78	4.84	-0.91	5.68
Apa	400	5.28	3.78	-3.59	1.00	3.18	2.01	2.74	4.96
	3000	-8.62	2.04	-12.97	1.09	-8.22	3.06	-9.70	2.63
	40	-9.18	3.35	-5.65	5.63	-7.60	4.12	-6.32	6.10
Sar	400	10.11	1.23	10.50	0.78	9.83	1.70	9.56	1.42
	3000	-8.92	2.63	-8.90	2.31	-7.49	1.42	-9.72	2.73
	40	-0.16	5.23	-10.41	2.03	-2.46	6.05	-4.22	7.87
Amp	400	6.69	2.01	-0.50	0.72	6.34	2.38	4.09	4.24
	3000	-6.46	1.96	-11.47	2.49	-5.69	1.94	-7.46	2.48
	40	-3.10	2.55	-10.78	4.46	-1.67	0.80	-6.63	6.06
Hia	400	-1.87	1.32	-14.59	0.37	-2.59	0.83	-5.88	6.51
	3000	2.37	1.58	-13.50	1.49	2.18	2.31	-1.97	6.80

[0158] 4.1.7 稀释效应结果

[0160] 32种氨基酸的稀释效应RE值为-13.97%~13.52%，RSD值为0.34%~8.31%。上述结果见表8，表明在5倍稀释条件下，对血浆的氨基酸含量测定无影响。

[0161] 表8 32种氨基酸的稀释效应结果 (n=3)

氨基酸	5倍稀释			氨基酸	5倍稀释		
	测定浓度 (ng/mL)	RE (%)	RSD (%)		测定浓度 (ng/mL)	RE (%)	RSD (%)
Gly	13765.0±168.3	-13.97	1.22	Thr	2832.3±77.6	-11.49	2.74
Ala	14490.5±114.0	-9.43	0.79	Opr	3085.0±191.9	-3.59	6.22
Val	17221.2±284.9	7.63	1.65	Asn	3011.0±57.7	-5.91	1.92
Lys	17247.5±59.4	7.80	0.34	Orn	2894.5±153.4	-9.55	5.30
Leu	13924.3±296.9	-12.97	2.13	Cit	3494.2±56.6	9.19	1.62
Ile	13917.5±135.3	-13.02	0.97	Cyss	3543.2±114.4	10.72	3.23
Gln	17001.2±219.2	6.26	1.29	Cys	1407.3±27.0	-12.04	1.92
Glu	15998.4±414.0	-0.01	2.59	Hpr	1695.1±31.4	5.94	1.85
Met	14752.1±114.3	-7.80	0.77	Asp	1397.0±6.3	-12.69	0.45
His	16741.0±392.0	4.63	2.34	ADMA	1438.8±28.3	-10.08	1.97
Phe	14316.8±259.5	-10.52	1.81	SDMA	1425.3±46.3	-10.92	3.25
Arg	18163.3±155.4	13.52	0.86	Kyn	1697.0±141.0	6.06	8.31
Tyr	14603.0±454.1	-8.73	3.11	Apa	802.5±31.1	0.31	3.88
Trp	15424.5±172.1	-3.60	1.12	Sar	737.6±11.4	-7.80	1.55
Ser	2791.3±13.4	-12.77	0.48	Amp	765.1±6.3	-4.37	0.82
Pro	2914.9±82.5	-8.91	2.83	Hia	720.2±14.8	-9.98	2.06

[0163] 4.1.8 残留效应结果

[0165] 经考察,32种氨基酸的残留效应符合血浆样本分析方法学要求。

[0166] 4.2血浆样本测定结果

[0167] 结直肠癌患者血浆样本、健康志愿者血浆样本测定结果见表9。

[0168] 表9结直肠癌患者血浆样本、健康志愿者血浆样本中32种氨基酸的含量测定结果

[0169]

样本	氨基酸含量 (ng/mL)							
	Gly	Ala	Val	Lys	Leu	Ile	Gln	Glu
CRC-a	9071.1	18384.4	38109.1	2081.3	26869.5	17215.3	25369.9	4190.8
CRC-b	10109.3	19798.0	32769.1	1697.4	22343.6	12341.3	19377.0	7170.3
CRC-c	10537.4	20489.2	31975.3	1416.3	21488.2	11607.2	25104.8	2340.6
CRC-d	22608.6	62436.4	30068.9	3441.5	22227.4	10405.0	29628.6	2895.6
CRC-e	9241.8	17579.9	26575.6	1443.2	14382.5	9299.8	18873.5	2571.0
CRC-f	13644.7	24138.5	16856.6	1091.1	10070.2	7193.6	19616.5	4428.7
HV-a	9787.1	36223.2	36159.3	976.5	26210.8	13378.0	18933.3	1521.3
HV-b	15750.8	46279.5	30077.0	1462.7	18505.0	9634.1	20254.0	2389.4
HV-c	16034.4	22758.2	31032.6	1597.5	21669.8	10542.1	26720.9	1951.8
HV-d	12771.3	27299.4	37736.7	1604.1	19907.2	9835.3	27313.4	1385.5
HV-e	10195.4	32268.8	28242.2	1110.8	15782.8	8347.8	17103.6	1194.1
HV-f	20266.7	47497.5	38197.8	2210.6	27698.5	15624.3	28908.8	3420.5

[0170] 续上表

[0171]

样本	氨基酸含量 (ng/mL)							
	Met	His	Phe	Arg	Tyr	Trp	Ser	Pro
CRC-a	3345.2	994.6	10830.3	5309.9	6293.0	8491.1	3427.6	626.3
CRC-b	2622.2	895.2	11526.2	5152.8	5417.8	8849.2	3213.3	915.5
CRC-c	3315.5	1194.3	12130.9	3540.0	5206.5	7008.3	3163.3	1122.1
CRC-d	7371.5	1208.9	20027.6	6771.6	10544.5	13775.2	4943.1	1988.1
CRC-e	2148.5	874.4	14613.2	3478.1	6150.6	8230.8	2660.3	326.6
CRC-f	2491.3	491.2	10642.9	1804.7	5951.0	7495.8	2412.7	772.3
HV-a	3736.8	952.1	16189.3	4095.9	7077.1	14378.2	1910.1	3408.7
HV-b	4822.3	1343.2	15124.4	3758.9	9835.5	17080.9	2502.4	1630.3
HV-c	4125.9	1077.6	14199.8	4475.4	6457.5	11756.0	2688.9	1542.7
HV-d	3173.9	1449.5	14860.0	5342.3	4574.5	9954.5	2828.8	662.4
HV-e	2844.2	1053.1	12400.0	2557.6	6499.0	10625.7	1454.8	3696.5
HV-f	5779.7	1579.3	18102.5	6618.2	10517.5	15715.5	2533.9	4114.9

[0172] 续上表

[0173]

样本	氨基酸含量 (ng/mL)							
	Thr	Opr	Asn	Orn	Cit	Cyss	Cys	Hpr
CRC-a	5581.7	1115.2	403.4	394.0	2366.6	84.3	295.7	130.4
CRC-b	4702.7	371.0	298.4	470.7	2614.3	195.7	482.0	279.4
CRC-c	5791.4	597.8	273.9	474.7	1377.5	159.5	426.3	202.7
CRC-d	14728.6	1227.7	374.6	1754.3	5509.9	211.3	383.2	339.9
CRC-e	4338.5	1097.6	234.9	260.2	3764.2	156.3	393.9	106.4
CRC-f	3846.0	1156.6	197.8	434.7	2369.9	251.4	407.3	266.2
HV-a	4298.3	605.7	281.7	161.7	1167.4	228.5	289.0	245.1
HV-b	6119.2	964.7	303.3	402.6	3639.6	362.7	265.3	407.4
HV-c	5854.5	752.1	264.9	527.6	1580.7	332.8	237.5	510.4
HV-d	6379.9	714.8	262.5	878.7	1942.3	725.8	194.8	226.5
HV-e	3463.0	480.9	269.7	262.2	1248.6	165.8	193.2	113.1
HV-f	6503.6	633.8	319.0	625.6	2311.9	507.4	230.1	424.3

[0174] 续上表

[0175]

样本	氨基酸含量 (ng/mL)							
	Asp	ADMA	SDMA	Kyn	Apa	Sar	Amp	Hia
CRC-a	1804.7	74.1	151.1	105.5	35.5	228.3	149.7	73.0
CRC-b	583.5	87.2	99.0	316.4	23.5	235.5	-	25.4
CRC-c	860.8	82.6	64.7	230.6	30.9	203.6	129.5	511.1
CRC-d	1571.9	117.3	56.4	356.9	38.1	218.8	28.1	37.5
CRC-e	611.0	89.5	185.6	622.5	41.0	158.7	322.3	176.2
CRC-f	680.0	83.1	116.6	778.2	51.6	207.7	297.7	47.7
HV-a	630.6	51.6	75.8	399.5	47.8	347.4	185.5	269.2
HV-b	707.7	72.1	61.0	395.6	36.8	361.9	34.8	160.6
HV-c	813.9	73.1	96.2	345.4	42.5	296.7	118.6	747.5
HV-d	804.6	116.4	139.6	192.6	48.8	293.8	187.9	4227.7
HV-e	586.2	61.6	68.9	252.1	44.1	213.7	153.7	410.1
HV-f	904.6	107.8	130.3	563.1	53.5	322.4	78.2	249.4

[0176] 注：“-”表示低于检测限。

[0177] 5血浆氨基酸液相-串联质谱联用检测方法的建立

[0178] 5.1血浆待测氨基酸种类的确定

[0179] 预实验表明,人血浆中主要含有Gly、Ala、Val、Lys、Leu、Ile、Gln、Glu、Met、His、Phe、Arg、Tyr、Trp、Ser、Pro、Thr、Opr、Asn、Orn、Cit、Cyss、Cys、Hpr、Asp、ADMA、SDMA、Kyn、Apa、Sar、Amp、Hia等32种氨基酸,故建立血浆32种氨基酸含量检测方法。

[0180] 5.2分析条件的优化

[0181] 生物样本常见的前处理方法主要为固相萃取法(solid phase extraction,SPE)、液液萃取法(liquid-liquid extraction,LLE),以及蛋白沉淀法(PPT)。采用PPT法进行前处理,具有操作简单、成本低廉等优势,适用于生物样本高通量含量检测。本实验采用PPT法,蛋白沉淀剂经过优化,确定为乙腈(含0.2%FA,400ng/mLAla-d4、Met-d3、Phe-d5),且血

浆与蛋白沉淀剂的比例为1:3、血浆用量仅为50 μ L,各待测氨基酸的提取回收率与基质效应均符合生物样本前处理要求且提取回收率最佳。因待测氨基酸数量较多,为改善色谱分离效果,本实验色谱柱选择Agilent Zorbax SB-C18柱(3.0mm \times 150mm,5 μ m),并优化流动相洗脱程序,色谱时间为10min。

[0182] 5.3“模拟血浆”的选择

[0183] 应用LC-MS/MS对生物样本中的内源性化合物进行定量分析,选择合适方法制备标准曲线样本和QC样本是方法学开发中的重要部分。其解决策略主要有以下两种:一是在真实基质中使用替代分析物,二是在替代基质中使用真实分析物[van de Merbel NC. Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques. Trends in Analytical Chemistry, 2008, 27 (10):924-933.]。理想的替代基质是完全无分析物的,并在分析物的溶解度和可萃取性方面与真实基质完全相同。对于内源性化合物的检测,真实基质通常含有未知浓度的分析物,故其不适用制备标准曲线样本和QC样本;在实际研究中,也很难找到含有足够低浓度内源性化合物的、合适的真实生物基质样本作为空白基质使用。

[0184] 本实验检测结直肠癌患者血浆氨基酸含量,待测氨基酸数量较多,且大多数氨基酸的血浆含量较低,如使用牛血清白蛋白生理盐水溶液作为“模拟血浆”,则会严重干涉大多数内源性氨基酸分析方法学的建立,预实验结果也予以证实。已有文献采用活性炭吸附法制备空白基质[Zhang S, Jian WY, Sullivan S, et al. Development and validation of an LC-MS/MS based method for quantification of 25 hydroxyvitamin D2 and 25 hydroxyvitamin D3 in human serum and plasma. Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences, 2014, 961 (2):62-70.]。但预实验证实,经活性炭吸附制备的血浆基质通过质谱检测,其中仍含有较高浓度的氨基酸,故文献方法不能应用。由于不存在不含分析物的真实基质样本,只能通过某种人造或替代基质中添加分析物来制备标准曲线样本。人血液或组织液中含有多种蛋白质、脂质以及多种电解质,具有更为复杂的组成,难以模仿。最简单的替代基质是纯水或PBS溶液。已有文献选用PBS溶液或流动相作为替代基质建立内源性氨基酸的含量测定方法[Furtado DZS, de Moura Leite FBV, Barreto CN, et al. Profiles of amino acids and biogenic amines in the plasma of Cri-du-Chat patients. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2017, 140:137-145. Roy C, Tremblay PY, Bienvenu JF, et al. Quantitative analysis of amino acids and acylcarnitines combined with untargeted metabolomics using ultra-high performance liquid chromatography and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Journal of Chromatography B, 2016, 1027:40-49.]。PBS溶液的pH值(7.4)、渗透压以及离子浓度(150mmol/L)与人体体液基本一致,通常用于血液或组织液分析[van de Merbel NC. Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques. Trends in Analytical Chemistry, 2008, 27 (10):924-933.]。相对流动相能够更为密切对应实际的生物基质。PBS溶液对内源性氨基酸含量测定无干扰,能够用于生物样本分析,故而检测血浆32种氨基酸选择PBS溶液作为“模拟血浆”使用。

[0185] 5.4内标氨基酸的选定

[0186] 稳定同位素标记物与待测化合物的化学性质相似,因此在样本前处理、色谱分离以及质谱离子化过程中受到的作用一致[Viswanathan CT,Bansal S,Booth B,et al.Workshop/conference report-quantitative bioanalytical methods validation and implementation:best practices for chromatographic and ligand binding assays.The Aaps Journal,2007,9(1):E30-E42.]。理想的IS应为待测化合物的稳定同位素标记物,可有效降低基质效应,一般选用氘代试剂作为IS。但实际实验中由于经费、合成或获得困难等客观条件限制,很难配齐待测化合物的氘代IS对照品。本实验预实验中,曾分别选择Ala-d4、Met-d3、Phe-d5并仅使用其中1种IS氨基酸,结果表明选用单一IS氨基酸,很难建立32种氨基酸的回归方程。预实验发现,在标准曲线系列浓度溶液由低至高连续进样测定中,以上3种IS氨基酸的质谱响应表现出不同程度的离子化抑制,Ala-d4离子化抑制程度最大、Met-d3离子化抑制程度中等、Phe-d5离子化抑制程度最小。而32种待测氨基酸的质谱响应也相应表现出不同程度的离子化抑制,经对比并匹配,最终确定2种氨基酸Ala、Gly选用Ala-d4作为IS氨基酸,21种氨基酸Val、Leu、Ile、Gln、Glu、Met、His、Arg、Ser、Pro、Thr、Asn、Orn、Cit、Cyss、Cys、Hpr、Asp、ADMA、SDMA、Sar选用Met-d3作为IS氨基酸,9种氨基酸Lys、Phe、Tyr、Trp、Opr、Kyn、Apa、Amp、Hia选用Phe-d5作为IS氨基酸。

[0187] 6小结

[0188] 本实施例建立了同时检测人血浆32种氨基酸含量的液相-串联质谱联用检测方法,并进行了方法学的验证。该方法32种待测氨基酸及IS氨基酸拥有较好的色谱分离与质谱响应,各待测氨基酸的标准曲线在各自的线性范围内呈现良好的线性关系,生物样本分析所要求的提取回收率与基质效应值、定量下限值、日内日间精密度准确度值、稳定性值均可达到,适用于下一步进行人血浆32种氨基酸的含量测定。

[0189] 实施例2:人血浆32种氨基酸的含量测定

[0190] 1目的

[0191] 采用液相-串联质谱联用方法对结直肠癌患者、健康志愿者,以及结直肠癌前病变(precancerosis,PC)患者进行血浆32种氨基酸的含量测定。

[0192] 实验通过海军军医大学附属长征医院生物医学伦理委员会审批。

[0193] 2实验仪器与材料

[0194] 2.1仪器

[0195] 同“实施例1 2.1仪器”。

[0196] 2.2试剂与耗材

[0197] 同“实施例1 2.2试剂与耗材”。

[0198] 2.3氨基酸对照品

[0199] 同“实施例1 2.3氨基酸对照品”。

[0200] 2.4受试人员血浆样本收集

[0201] 2.4.1结直肠癌患者血浆样本收集

[0202] 结直肠癌患者来自于本课题责任单位——海军军医大学附属长征医院普外科2016年7月至2017年12月的住院结直肠癌患者。诊断标准为《中国结直肠癌诊疗规范(2015版)》[中华人民共和国卫生和计划生育委员会医政医管局中华医学会肿瘤学会分会.中国结直肠癌诊疗规范(2015版).中华普通外科学文献(电子版),2015,9(6):506-523.]。根据

TNM分期,将结直肠癌患者分为0期~IV期。入选标准:患者知情同意,自愿加入本试验,签署知情同意书;年龄大于18岁;经结直肠组织病理活检确诊为结直肠癌。排除标准:严重代谢性疾病或营养不良患者;孕妇或处于哺乳期的患者;严重感染患者;合并患有其它癌症患者;课题研究人员认为不宜入组的结直肠癌患者。收集结直肠癌患者行腹腔镜下结直肠癌切除术前早晨空腹外周静脉血液标本,采血前患者隔夜禁食不禁水12h,使用Vacuette EDTA K3真空采血管收集患者前臂静脉血3~4mL,2h内离心(4℃,2000×g下15min),将血浆、血细胞分别置于CryoMax冻存管中,浸入液氮罐中暂存,然后转运至-80℃冰箱内统一冻存。记录患者住院号、性别、年龄、身高、体质量、脉搏、血压等一般资料,癌症分期、血常规、生化指标、乙肝两对半指标、尿常规、粪常规等信息,以及CEA、AFP等肿瘤诊断指标。共收集到结直肠癌患者血浆样本246例。

[0203] 2.4.2健康志愿者血浆样本收集

[0204] 健康志愿者来自于本课题合作单位——第九七医院体检中心2017年1月至2017年5月的体检人员。入选标准:患者知情同意,自愿加入本试验,签署知情同意书;男女各半、年龄大于18岁;无癌症史;无消化道异常、代谢异常疾病、神经系统疾病等病史,无过敏史;近两周内未服用过其它药物,近一周内未喝过任何含酒精的饮料。收集体检人员早晨空腹外周静脉血液标本,采血前体检人员隔夜禁食不禁水12h,使用Vacuette EDTA K3真空采血管收集体检人员前臂静脉血3~4mL,2h内离心(4℃,2000×g下15min),将血浆、血细胞分别置于CryoMax冻存管中,浸入液氮罐中暂存,然后转运至-80℃冰箱内统一冻存。记录健康志愿者体检号、性别、年龄、身高、体质量等资料;血常规,生化指标、乙肝两对半指标、尿常规、粪常规等信息,以及CEA、AFP等肿瘤诊断指标。共收集到健康志愿者血浆样本411例。

[0205] 2.4.3结直肠癌前病变患者血浆样本收集

[0206] 结直肠癌前病变患者来自于本课题合作单位——江苏省泰兴市人民医院消化内科2017年11月至2018年1月的住院患者。入选标准:患者知情同意,自愿加入本试验,签署知情同意书;主要包括结直肠息肉及腺瘤患者、炎性结肠病患者;年龄大于18岁;无癌症史;无代谢异常疾病、神经系统疾病等病史,无过敏史;近两周内未服用过其它药物,近一周内未喝过任何含酒精的饮料。收集患者行结肠镜术前早晨空腹外周静脉血液标本,采血前患者隔夜禁食不禁水12h,使用Vacuette EDTA K3真空采血管收集患者前臂静脉血3~4mL,2h内离心(4℃,2000×g下15min),将血浆、血细胞分别置于CryoMax冻存管中,浸入液氮罐中暂存,然后转运至-80℃冰箱内统一冻存。记录患者门诊号、性别、年龄、身高、体质量等资料;疾病诊断、血常规,生化指标、乙肝两对半指标、尿常规、粪常规等信息,以及CEA、AFP等肿瘤诊断指标。共收集到结直肠癌前病变患者33例。

[0207] 2.5受试人员分组

[0208] 将受试人员中的结直肠癌患者、健康志愿者按照约1:1的比例分成训练集和测试集,训练集用于模型的建立,测试集用于测试所建立模型的性能。结直肠癌前病变患者因数量较少,仅归入测试集。

[0209] 2.5.1训练集

[0210] 训练集包括结直肠癌患者130例,健康志愿者216例。

[0211] 2.5.2测试集

[0212] 其余的受试人员为测试集,包括结直肠癌患者116例,结直肠癌前病变患者33例,

健康志愿者195例。

[0213] 3液相-串联质谱联用检测方法

[0214] 3.1相关溶液的配制及前处理

[0215] 同“实施例1 3.1相关溶液的配制及前处理”。

[0216] 3.2色谱条件

[0217] 同“实施例1 3.2色谱条件”。

[0218] 3.3质谱条件

[0219] 同“实施例1 3.3质谱条件”。

[0220] 3.4血浆样本前处理

[0221] 同“实施例1 3.4血浆样本前处理”。

[0222] 3.5数据处理及统计方法

[0223] 采用Agilent Mass Hunter数据处理工作站和Agilent Qualitative Analysis B.07.00 Tools软件进行质谱数据处理。采用GraphPad Prism 6.01软件绘制血浆氨基酸含量图。采用t检验比较各组血浆氨基酸含量差异,以 $p < 0.05$ 为具有统计学意义。

[0224] 4结果

[0225] 4.1训练集人员基本信息

[0226] 代谢组学研究中,要求能够尽量减少癌症以外的因素对于代谢组学研究的影响,以利于分析得到差异性较为显著的因素,从而获得较佳的分析结果。对于训练集样本,选择年龄、性别分布等与结直肠患者尽量匹配的健康志愿者作为对照,结直肠癌癌前病变患者未归入测试集。训练集人员基本信息见表10。对训练集中结直肠癌患者、健康志愿者的年龄进行统计分析,经t检验, $t = 1.320 < t_{0.05/2,344} = 1.967$, $p = 0.188 > 0.05$;对性别分布进行统计分析,经 χ^2 检验, $\chi^2 = 0.135 < \chi^2_{0.05,1} = 3.84$, $p = 0.713 > 0.05$ 。训练集两组人员的年龄、性别分布具有一致性。

[0227] 表10训练集人员基本信息

[0228]

项目	单位	结直肠癌患者	健康志愿者
样本数量	例	130	216
性别(男/女)	例	72/58	124/92
年龄(均值±标准差)	岁	59.68±11.53	58.07±10.65
年龄范围	岁	28~89	24~83
CEA(中位数,范围)	ng/mL	3.22, 0.49~2056	0.70, 0.08~8.96
AFP(中位数,范围)	U/mL	2.54, 1.04~8.00	2.98, 0.15~11.75
癌症分期	I期	例	26
	II期	例	39
	III期	例	42
	IV期	例	14
NA	例	9	/

[0229]

[0230] 4.2训练集血浆样本氨基酸总离子流图

[0231] 训练集130例结直肠癌患者、216例健康志愿者血浆样本氨基酸总离子流图见图4。

- [0232] 4.3训练集血浆样本氨基酸含量测定结果
- [0233] 训练集130例结直肠癌患者、216例健康志愿者血浆样本氨基酸含量见图5。
- [0234] 4.4测试集人员基本信息
- [0235] 测试集人员基本信息见表11。
- [0236] 表11测试集人员基本信息
- [0237]

基本信息	单位	结直肠癌患者	癌前病变患者	健康志愿者
样本数量	例	116	33	195
性别（男/女）	例	83/33	22/11	89/106
年龄（均值±标准差）	岁	61.38±12.51	50.94±12.18	48.02±14.87
年龄范围	岁	26~89	24~72	24~76
癌症分期	I 期	例	19	/
	II 期	例	43	/
	III 期	例	44	/
	IV 期	例	7	/
	NA	例	3	/
癌前病变	结直肠息肉	例	/	20
	炎性结肠病	例	/	7
	肠梗阻	例	/	1
	混合痔	例	/	5

- [0238] 4.5测试集血浆样本氨基酸总离子流图
- [0239] 测试集116例结直肠癌患者、33例癌前病变患者、195例健康志愿者血浆样本氨基酸总离子流图见图6。
- [0240] 4.6测试集血浆样本氨基酸含量测定结果
- [0241] 测试集116例结直肠癌患者、33例癌前病变患者、195例健康志愿者血浆样本氨基酸含量见图7。
- [0242] 5小结
- [0243] 采用实施例1中建立的液相-串联质谱联用检测方法测定了246例结直肠癌患者血浆、411例健康志愿者血浆、33例结直肠癌前病变患者血浆样本32种氨基酸含量,以便下一步进行血浆靶向氨基酸代谢组学研究。
- [0244] 实施例3:结直肠癌患者血浆靶向氨基酸代谢组学研究
- [0245] 1目的
- [0246] 进行结直肠癌患者血浆靶向氨基酸代谢组学研究。
- [0247] 2数据处理及统计方法
- [0248] 采用Umetrics Simca 14.1软件进行多维统计处理,进行主成分分析、正交偏最小二乘-判别分析。采用t检验比较各组血浆氨基酸含量差异,以 $p < 0.05$ 为具有统计学意义。
- [0249] 3血浆氨基酸多维统计分析
- [0250] 3.1主成分分析(PCA)
- [0251] 为了寻找结直肠癌患者血浆与健康志愿者血浆相互区别的氨基酸代谢信息,首先,建立非监督的PCA-X模型对130例结直肠癌患者血浆、216例健康志愿者血浆样本进行分

析。建立的PCA-X模型的解释率 $R^2X(cum) = 0.499$ 、预测率 $Q^2(cum) = 0.292$ ，4个主成份的 R^2 、 Q^2 积累图见图8，得分散点图见图9。图9中，结直肠癌患者血浆与健康志愿者血浆的氨基酸代谢谱存在一定的差异性，具有区分趋势；健康志愿者血浆氨基酸分布比较紧凑，而结直肠癌患者分布比较分散。结果表明：此PCA-X模型预测率较低，对结直肠癌患者血浆与健康志愿者血浆区分程度较低。

[0252] 3.2正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA)

[0253] 由于采用PCA-X建模不能完全将结直肠癌患者血浆与健康志愿者血浆区分开，采用有监督的OPLS-DA模型重新进行分析。建立的OPLS-DA模型的解释率 $R^2X(cum) = 0.414$ 、区分程度 $R^2Y(cum) = 0.853$ 、预测率 $Q^2(cum) = 0.834$ ，1个主成分及2个正交成分的 R^2 、 Q^2 积累图见图10，得分散点图见图11。图11中，结直肠癌患者血浆与健康志愿者血浆的氨基酸代谢谱能够完全分开。进行响应置换检验，模型没有出现“过拟合”，说明模型可靠，200次置换的置换检验图见图12。结果表明：此OPLS-DA模型具有较高的稳定性，特别是区分程度、预测率均较高，可以用来鉴别结直肠癌患者血浆，可能用于结直肠癌的诊断。

[0254] 将结直肠癌患者分为65例早期患者(I期、II期)、56例晚期患者(III期、IV期)两组，联合216例健康志愿者，建立OPLS-DA模型评估结直肠癌患者的癌症分期情况。建立的OPLS-DA模型的解释率 $R^2X(cum) = 0.353$ 、区分程度 $R^2Y(cum) = 0.495$ 、预测率 $Q^2(cum) = 0.486$ ，1个主成分及1个正交成分的得分散点图见图13。健康志愿者主要分布在图中右侧区域，结直肠癌患者主要分布在图中左侧区域，但早期患者、晚期患者的区分程度较差，基本无分离趋势。

[0255] 去除健康志愿者样本，单独建立模型对各期结直肠癌患者进行分期。2个主成分的PCA模型得分散点图见图14。尝试进行OPLS-DA建模时失败，实验证实了单纯的靶向氨基酸代谢组学无法进行结直肠癌患者临床分期。

[0256] 4血浆样本差异性变量分析

[0257] 4.1氨基酸含量差异的t检验结果

[0258] 采用t检验分析结直肠癌患者血浆与健康志愿者血浆中32种氨基酸含量差异，检验结果见图5。结直肠癌患者血浆Gln、Ser、Glu、Asn、Opr、Orn、Lys、Cys、Amp、SDMA含量均极显著高于健康志愿者血浆中的含量($p < 0.0001$)，Gly、Ala、Val、Phe、Trp、Pro、Arg、Met、Tyr、Cyss、His、Hia、Hpr、Sar、Apa均极显著低于健康志愿者血浆中的含量($p < 0.0001$)，结直肠癌患者血浆Asp含量显著高于健康志愿者血浆中的含量($p < 0.05$)，结直肠癌患者血浆Leu、Kyn含量显著低于健康志愿者血浆中的含量($p < 0.05$)，两组血浆Ile、Thr、Cit、ADMA含量差异无统计学意义。以上分析表明：结直肠癌患者血浆与健康志愿者血浆中的氨基酸代谢谱具有较大差异。

[0259] 4.2变量投影重要性分析(VIP)

[0260] 针对基于130例结直肠癌患者血浆、216例健康志愿者血浆样本建立的OPLS-DA模型进行分析，32种氨基酸的载荷图见图15。S形曲线图见图16，图中，偏离中心点越远的氨基酸表明其对此模型的贡献率越大，图中右侧区域上部的氨基酸在结直肠癌患者血浆中显著升高，图中左侧区域下部的氨基酸在结直肠癌患者血浆中显著降低。

[0261] 代表预测失量的回归系数图见图17，预测VIP值图见图18。其中，找到了14个VIP值大于1的差异性代谢物，分别为Trp、Sar、Glu、Ser、Met、Ala、Cys、Cyss、Tyr、Opr、Apa、Gln、

Hia、Arg,各差异性代谢物的VIP值及t检验结果见表12;VIP值大于1.5的差异性代谢物有Trp、Sar、Glu,可以作为潜在的诊断结直肠癌患者的生物标志物。

[0262] 表12变量的VIP值及t检验结果

[0263]

变量	VIP 值	t 检验结果 (p 值)
Trp	1.70147	$p < 0.0001$
Sar	1.69872	$p < 0.0001$
Glu	1.62941	$p < 0.0001$
Ser	1.42921	$p < 0.0001$
Met	1.41820	$p < 0.0001$
Ala	1.40305	$p < 0.0001$
Cys	1.35692	$p < 0.0001$
Cyss	1.17065	$p < 0.0001$
Tyr	1.16002	$p < 0.0001$
Opr	1.09176	$p < 0.0001$
Apa	1.05048	$p < 0.0001$
[0264]		
Gln	1.04221	$p < 0.0001$
Hia	1.03793	$p < 0.0001$
Arg	1.02590	$p < 0.0001$

[0265] 5小结

[0266] 对实施例2中测定的血浆样本进行血浆靶向氨基酸代谢组学研究,表明结直肠癌患者血浆与健康志愿者血浆中的氨基酸代谢谱具有较大差异,差异性代谢物为Trp、Sar、Glu,可作为潜在的诊断结直肠癌患者的生物标志物,以便下一步进行结直肠癌血液学诊断模型的建立。

[0267] 实施例4:结直肠癌血液学氨基酸联合因子诊断模型的建立

[0268] 1目的

[0269] 基于血浆氨基酸联合因子建立结直肠癌诊断模型,并进行模型验证。

[0270] 2数据处理及统计方法

[0271] 采用IBM SPSS Statistics 21.0软件进行统计分析,绘制受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve,ROC曲线)。

[0272] 3结直肠癌诊断模型的建立

[0273] 3.1结直肠癌诊断单因子模型

[0274] ROC曲线是以假阳性率[以1-特异性(1-specificity)表示]为横坐标、真阳性率[以灵敏度(sensitivity)表示]为纵坐标绘制的曲线,主要用于评价临床指标对疾病的诊断效能,以确认最佳的诊断截断值,并可以比较多种不同的临床诊断指标对疾病的诊断效能。对VIP值大于1.5的差异性代谢物Trp、Sar、Glu,进行单因子ROC曲线的绘制,并与临床常用的CEA、AFP指标进行比较,结果见图19。各诊断因子的ROC曲线下的面积见表13,表明:Trp、Sar、Glu三种氨基酸单因子的AUC值分别为0.861、0.888、0.896,均高于CEA的AUC值0.809、AFP的AUC值0.402。

[0275] 表13各诊断因子的ROC曲线下面积

[0276]

变量	曲线下面积	标准误	渐进意义	渐近95%置信区间	
				下限	上限
Trp	0.861	0.022	0.000	0.818	0.903
Sar	0.888	0.019	0.000	0.852	0.925
Glu	0.896	0.016	0.000	0.864	0.928
CEA	0.809	0.023	0.000	0.764	0.853
AFP	0.402	0.031	0.002	0.341	0.462

[0277] 3.2结直肠癌诊断联合因子模型

[0278] 3.2.1联合因子回归方程的建立

[0279] 由于氨基酸为内源性代谢物,其代谢容易受到疾病因素之外的机体状态、饮食和生活方式等多种因素的影响。故采用联合因子进行结直肠癌诊断,可在一定程度上综合以上因素的影响,从而提高疾病的诊断准确率。基于Trp、Sar、Glu三个氨基酸因子进行Logistics回归,建立联合因子回归方程,回归模型参数见表14。该联合因子回归方程为:联合因子=0.001×C_{Trp}+0.029×C_{Sar}-0.002×C_{Glu}-9.427,其中,C_{Trp}、C_{Sar}、C_{Glu}的单位为ng/mL。

[0280] 表14 Logistics回归模型参数

[0281]

	B值	标准误	Wals值	df值	P值	Exp(B)值	Exp(B) 95%置信区间	
							下限	上限
Trp	0.001	0.000	34.034	1	0.000	1.001	1.001	1.001
Sar	0.029	0.005	29.559	1	0.000	1.029	1.019	1.040
Glu	-0.002	0.000	52.036	1	0.000	0.998	0.998	0.999
常量	-9.427	1.720	30.025	1	0.000	0.000	-	-

[0282] 注:“-”表示无数据。

[0283] 3.2.2联合因子模型效能评估

[0284] 进行联合因子的ROC曲线的绘制,并与氨基酸单因子、CEA、AFP指标进行比较,结果见图20。联合因子的ROC曲线下的面积见表15。表明,联合因子的AUC较佳,AUC值为0.980,高于Trp、Sar、Glu的AUC值。血浆氨基酸含量联合因子对结直肠癌的诊断效能高于血浆氨基酸含量单因子,也高于CEA、AFP。

[0285] 表15联合因子的ROC曲线下面积

[0286]

变量	曲线下面积	标准误	渐进意义	渐近95%置信区间	
				下限	上限
联合因子	0.980	0.007	0.000	0.965	0.994

[0287] 选取约登指数(Youden's index)为最大时所对应的各变量值作为其截断值(cutoff值),此时该变量的敏感度和特异性均较高。各诊断因子的效能评估见表16。表中,联合因子的截断值为2.433。将受试人员血浆的Trp、Sar、Glu测定值(单位ng/mL)代入联合因子回归方程进行计算,如计算结果小于2.433,即可诊断为结直肠癌患者。

[0288] 表16各诊断因子的效能评估

[0289]

变量	截断值	灵敏度	1-特异性	最大约登指数
Trp	10509.57 ng/mL	0.808	0.204	0.604
Sar	237.09 ng/mL	0.823	0.162	0.661
Glu	2492.72 ng/mL	0.869	0.218	0.652
联合因子	2.433	0.954	0.056	0.898

[0291] 3.2.3联合因子模型诊断训练集的价值使用联合因子诊断模型(以2.433为诊断截断值)对训练集的130例结直肠癌患者、216例健康志愿者进行诊断,诊断训练集的价值结果见表17。

[0292] 表17结直肠癌诊断模型诊断训练集的价值

[0293]

诊断模型诊断	金标准诊断		合计
	阳性(结直肠癌患者)	阴性(健康志愿者)	
阳性	124	12	136
阴性	6	204	210
合计	130	216	346

[0294] 4结直肠癌诊断模型的验证

[0295] 4.1联合因子模型诊断测试集的价值

[0296] 使用联合因子诊断模型(以2.433为诊断截断值)对测试集的116例结直肠癌患者、33例结直肠癌前病变患者、195例健康志愿者进行诊断,诊断测试集的价值结果见表18。

[0297] 表18结直肠癌诊断模型诊断测试集的价值

[0298]

诊断模型诊断	金标准诊断				合计
	阳性 (结直肠癌患者)	阴性(非癌者)			
		癌前病变患者	健康志愿者	小计	
阳性	81	2	1	3	84
阴性	35	31	194	225	260
合计	116	33	195	228	344

[0299] 4.2结直肠癌诊断模型的诊断价值

[0300] 使用联合因子诊断模型(以2.433为诊断截断值)对全体受试人员(包括训练集、测试集)进行诊断,其诊断价值结果见表19。结直肠癌诊断模型的准确率为91.9%、灵敏度为83.3%、特异性为96.6%、漏诊率为16.7%、误诊率为3.4%、阳性预测值93.2%、阴性预测值91.3%、阳性似然比24.667、阴性似然比0.172。

[0301] 同时,使用CEA(以5ng/mL为诊断截断值)对全体受试人员进行诊断,诊断价值结果见表20。CEA诊断的准确率为71.6%、灵敏度为33.3%、特异性为92.8%、漏诊率为66.7%、误诊率为7.2%、阳性预测值71.9%、阴性预测值71.5%、阳性似然比4.625、阴性似然比0.718。

[0302] 表明,该联合因子诊断模型对结直肠癌的各项诊断评价指标均优于CEA诊断。

[0303] 表19结直肠癌诊断模型的诊断价值

[0304]

诊断模型诊断	金标准诊断				合计
	阳性	阴性(非癌者)			
	(结直肠癌患者)	癌前病变患者	健康志愿者	小计	
阳性	205	2	13	15	220
阴性	41	31	398	429	470
合计	246	33	411	444	690

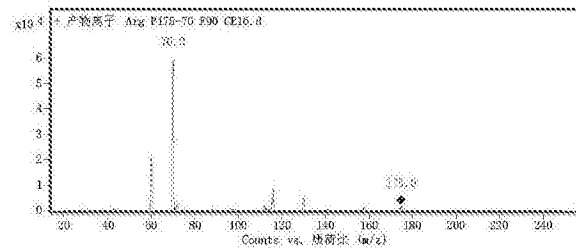
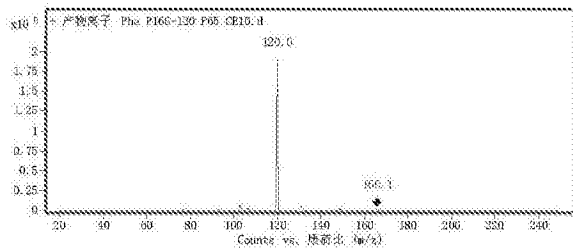
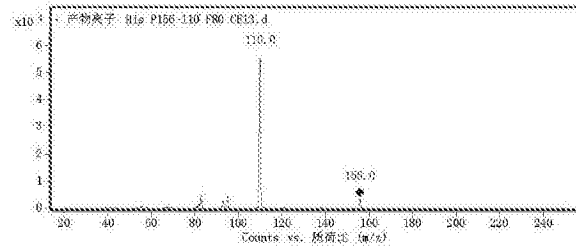
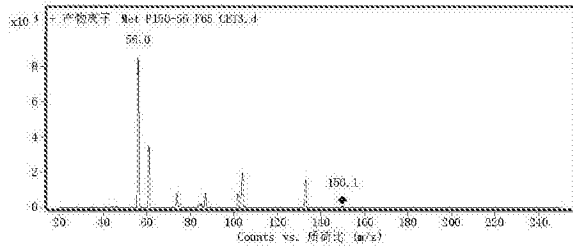
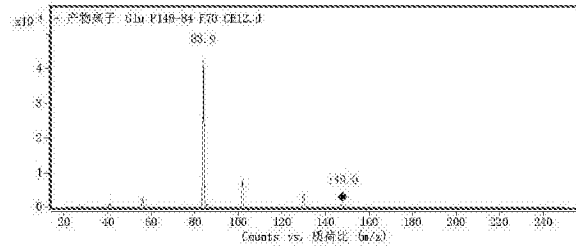
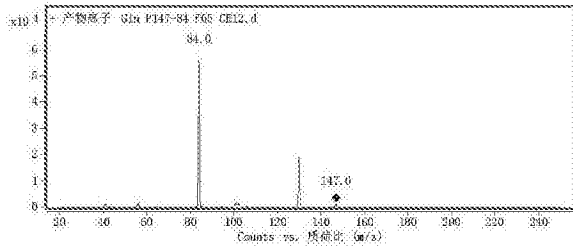
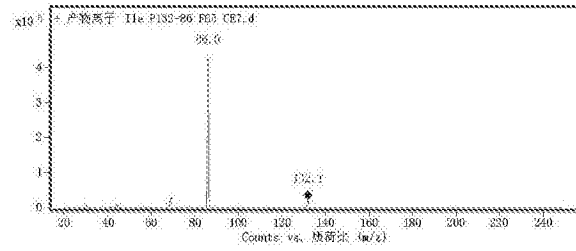
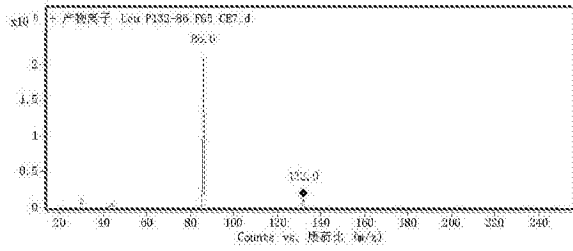
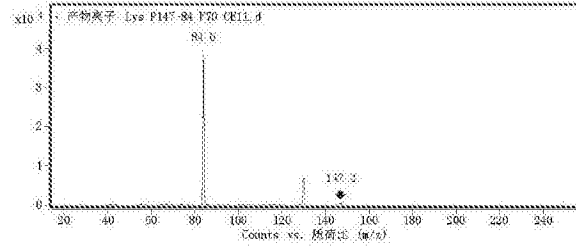
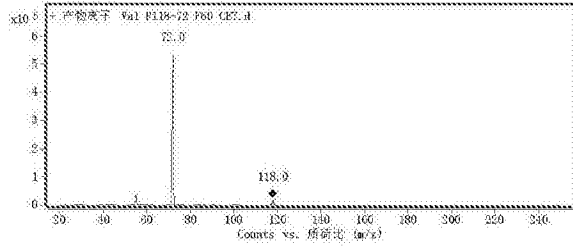
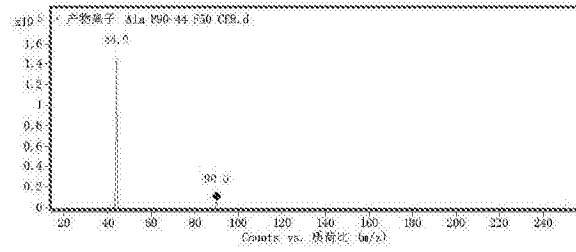
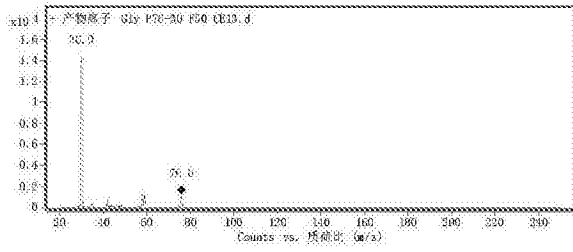
[0305] 表20癌胚抗原的诊断价值

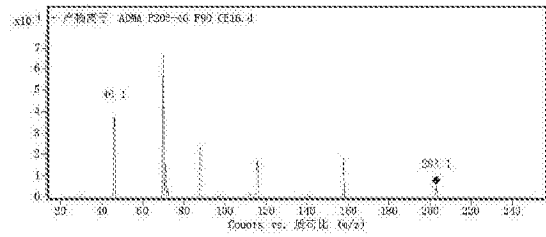
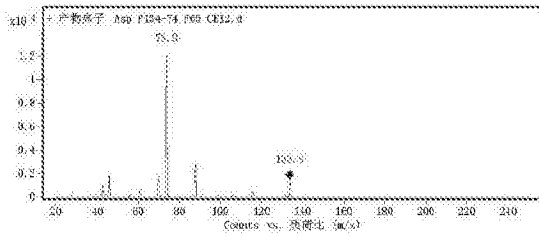
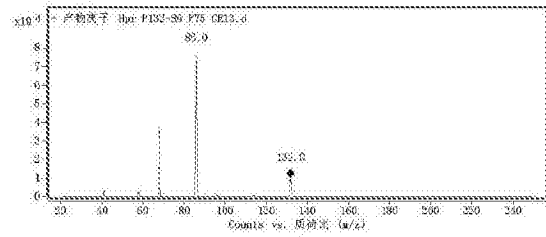
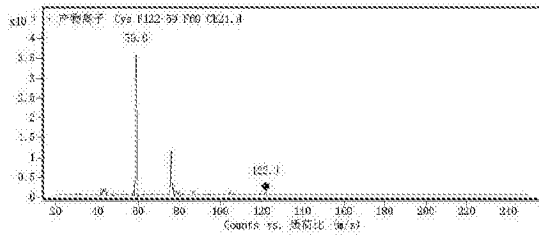
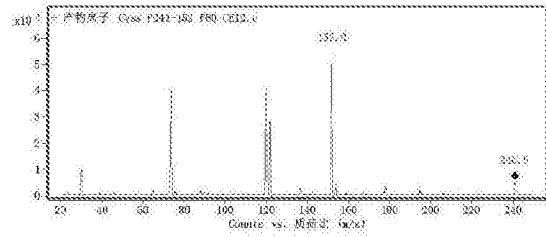
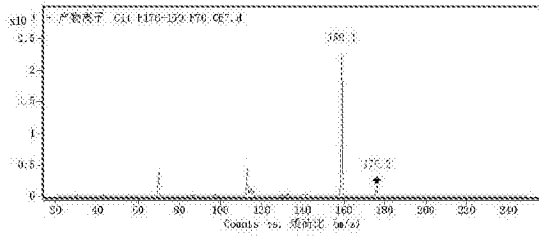
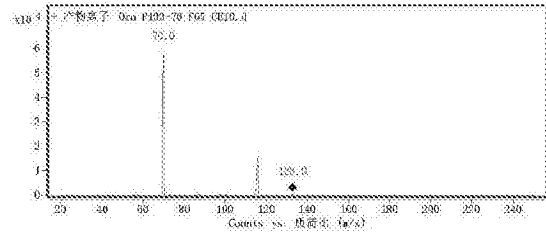
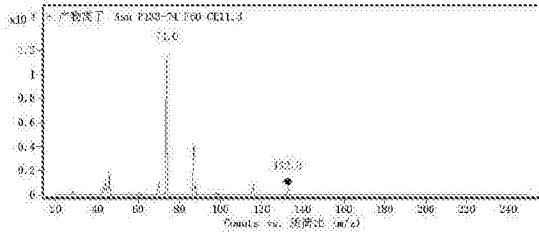
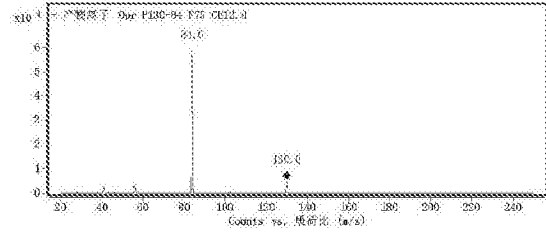
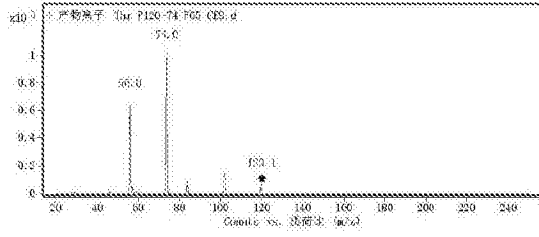
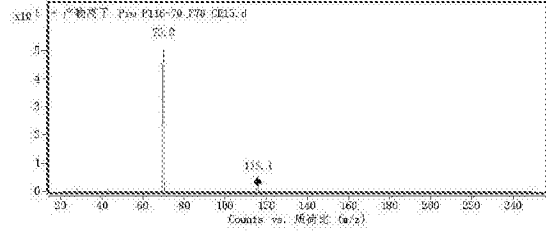
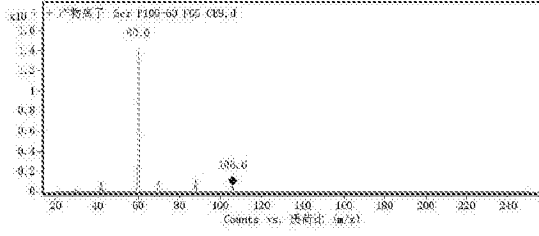
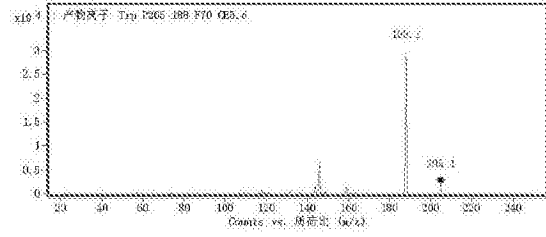
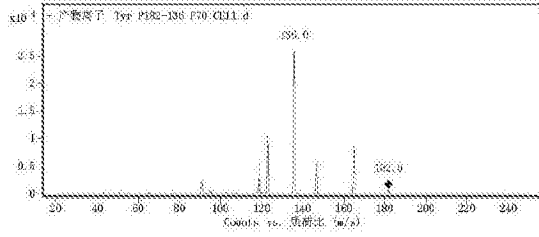
[0306]

癌胚抗原诊断	金标准诊断				合计
	阳性	阴性(非癌者)			
	(结直肠癌患者)	癌前病变患者	健康志愿者	小计	
阳性	82	1	31	32	114
阴性	164	32	380	412	576
合计	246	33	411	444	690

[0307] 5小结

[0308] 在实施例3中血浆靶向氨基酸代谢组学研究基础上,通过Logistics回归,基于Trp、Sar、Glu三个氨基酸建立了联合因子诊断模型,诊断模型方程为:联合因子=0.001×Trp+0.029×Sar-0.002×Glu-9.427 (Trp、Sar、Glu单位ng/mL),联合因子截断值为2.433 (小于截断值,诊断为结直肠癌患者);对结直肠癌的诊断效能高于血浆氨基酸含量单因子、高于临床常用的血清诊断指标CEA、AFP。该结直肠癌诊断模型对上述血浆样本的诊断准确率为91.9%、灵敏度为83.3%、特异性为96.6%、阳性预测值93.2%、阴性预测值91.3%,各项诊断评价指标均优于CEA诊断,具有良好的结直肠癌辅助诊断价值,可用于结直肠癌的诊断。





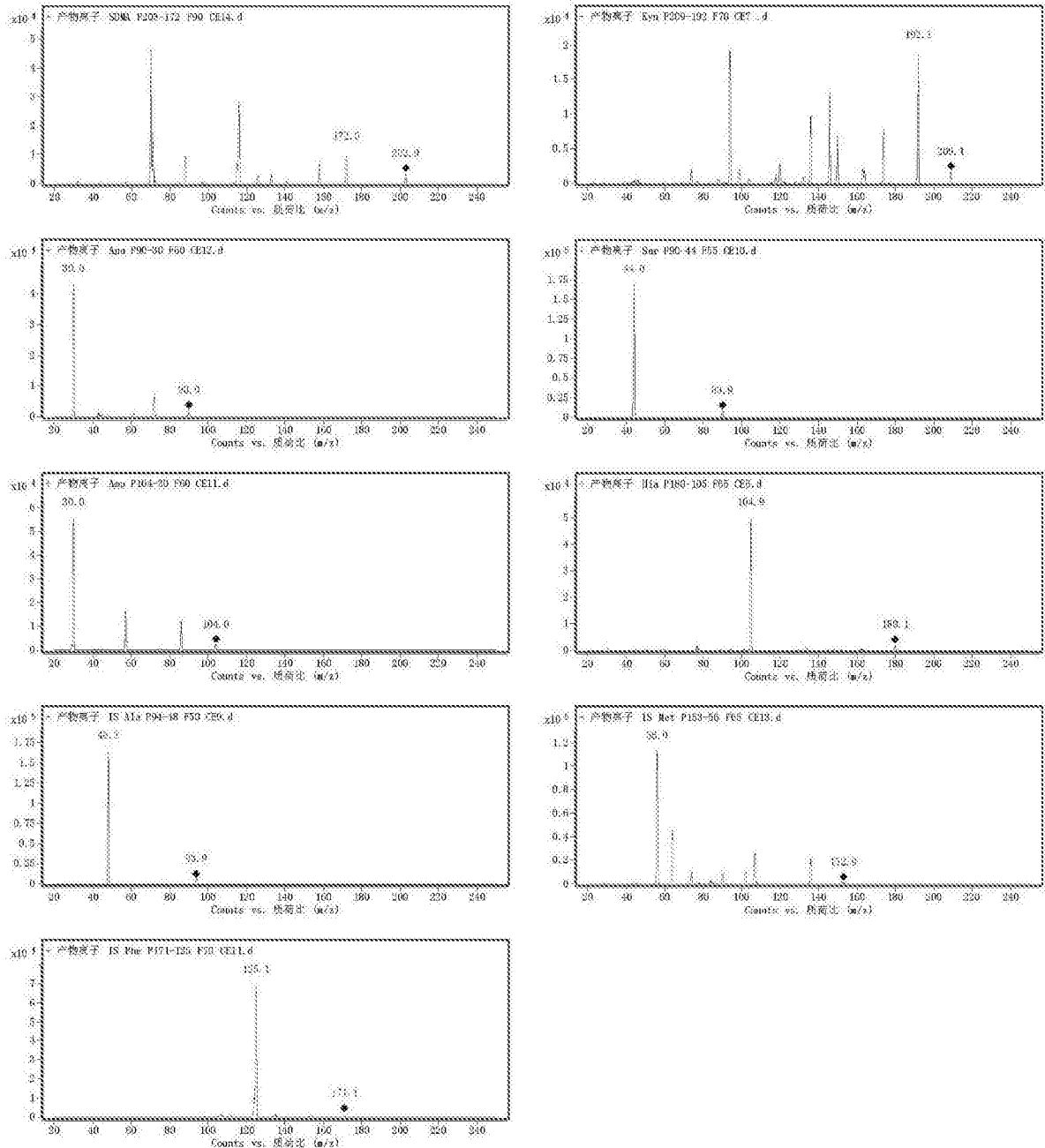
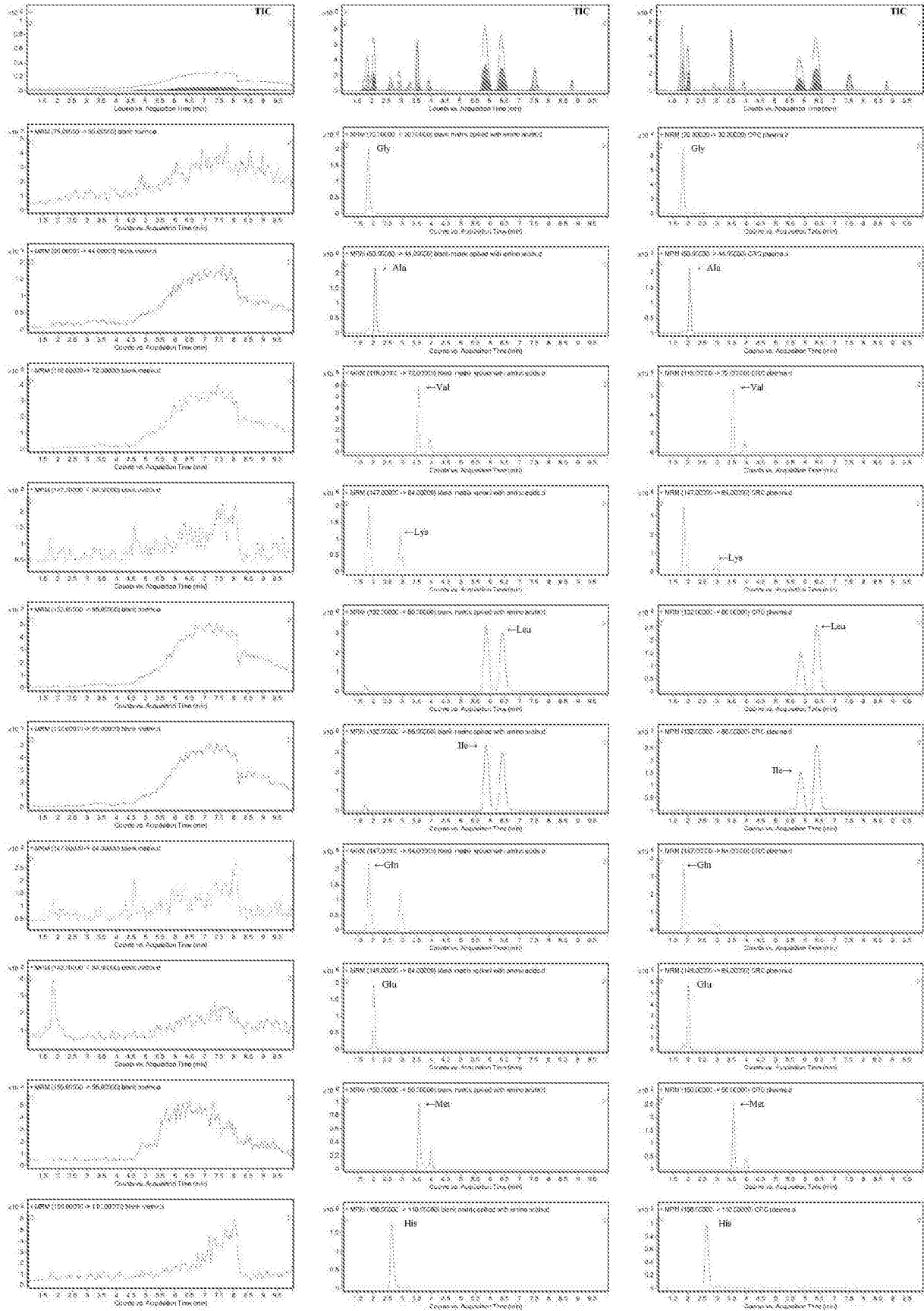
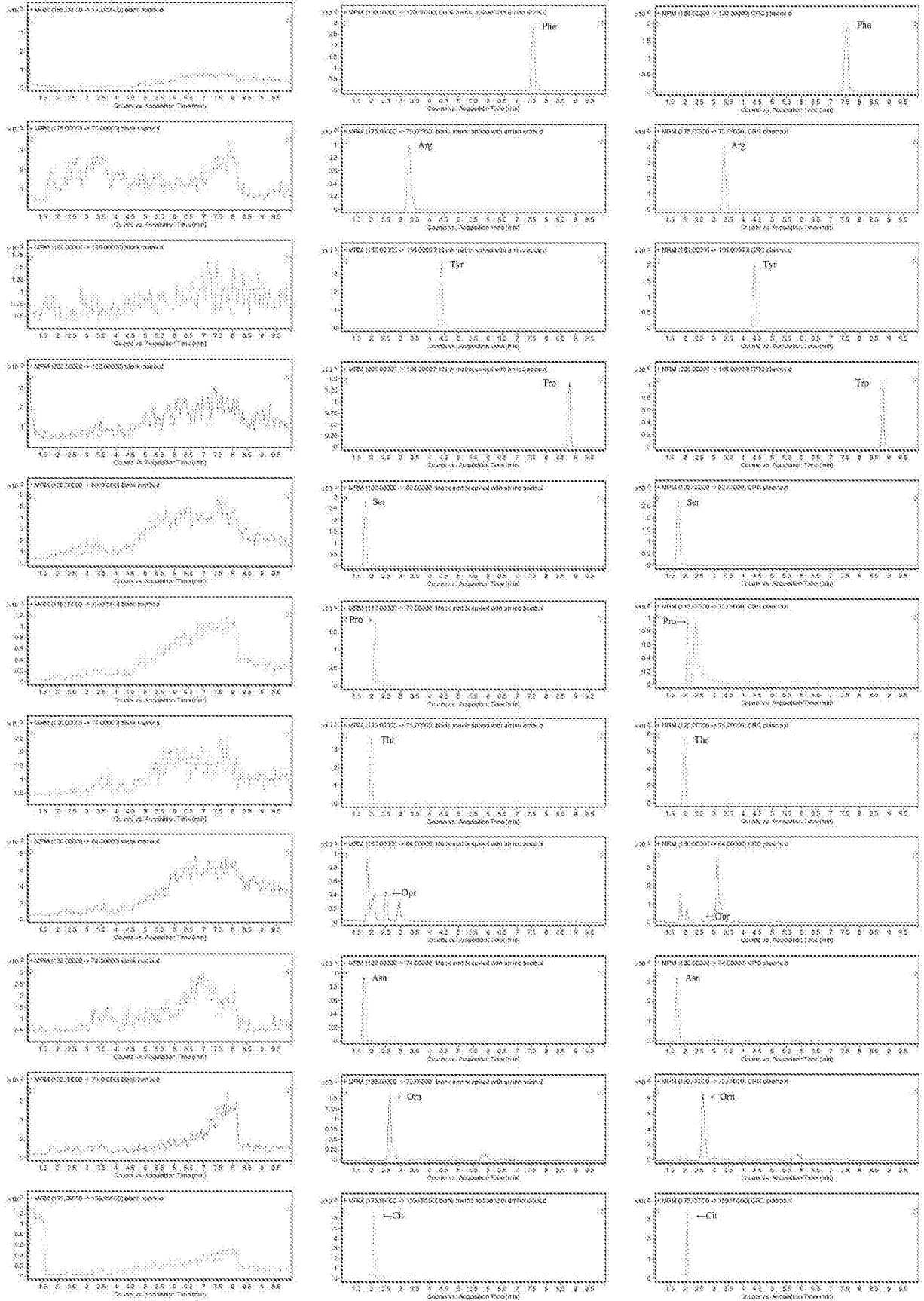
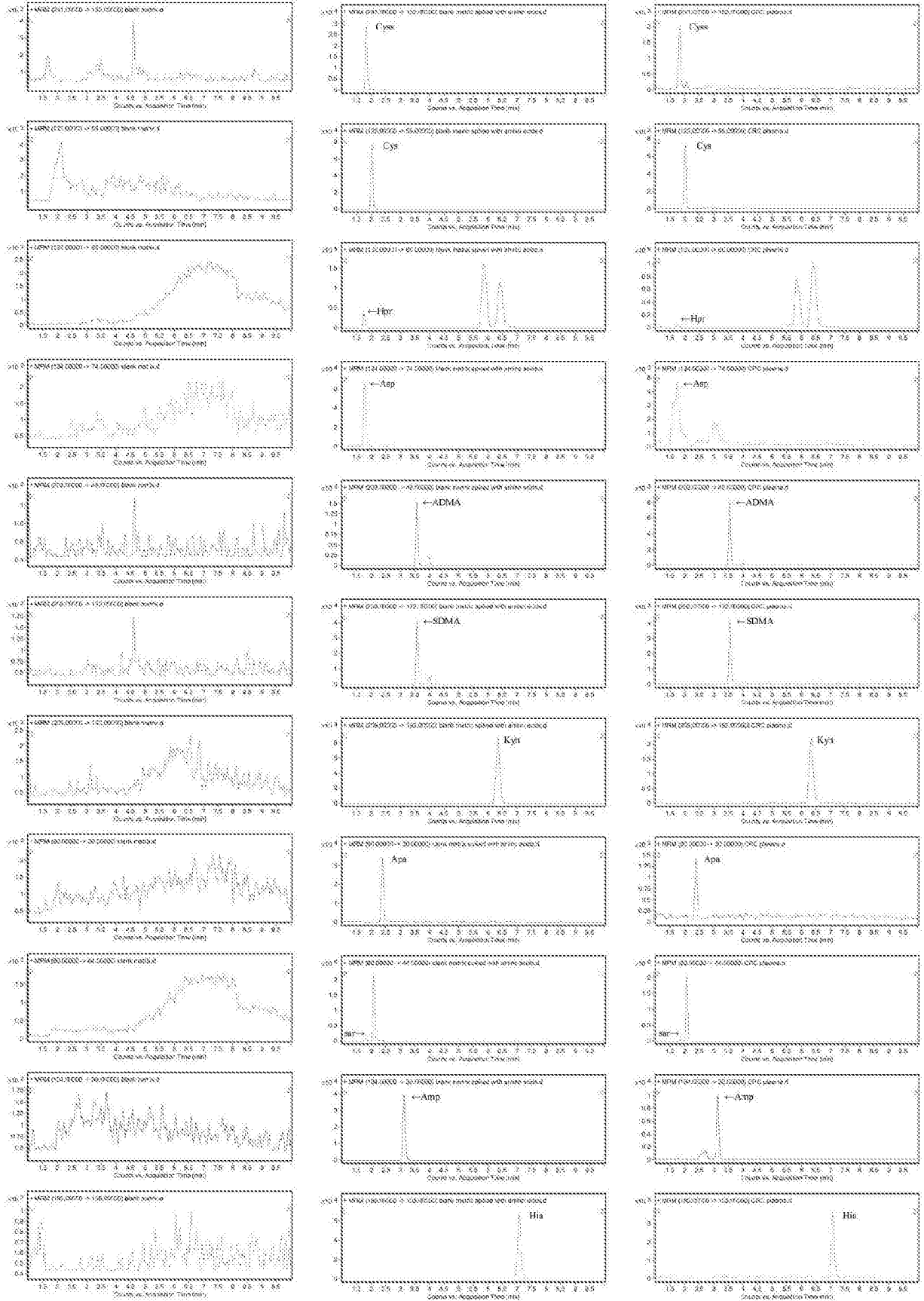


图1







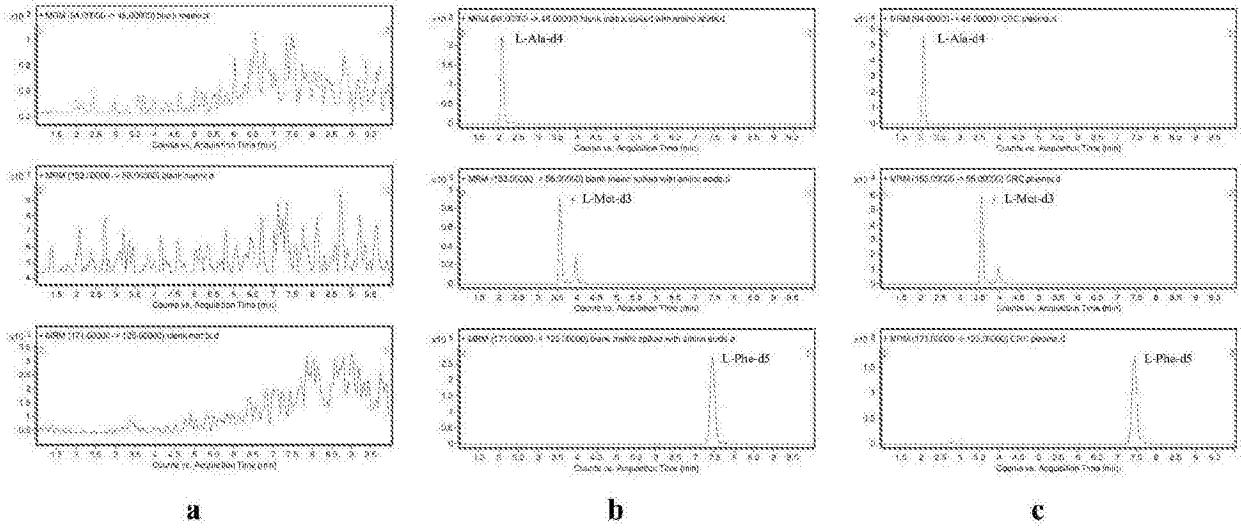
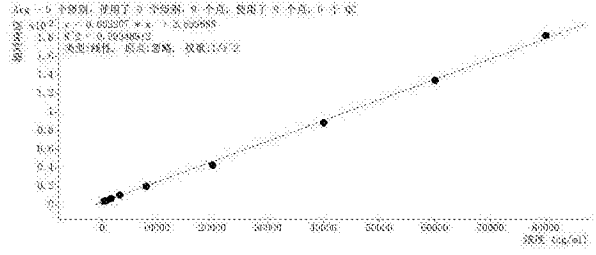
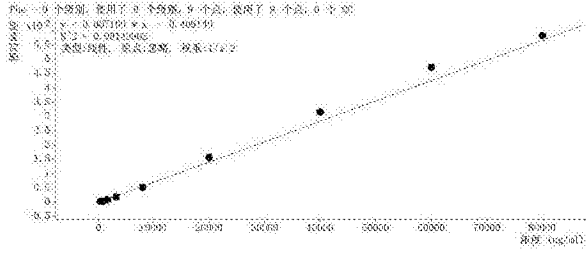
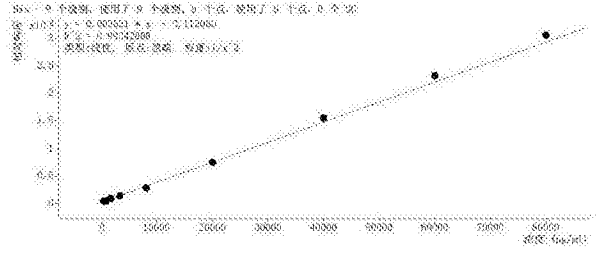
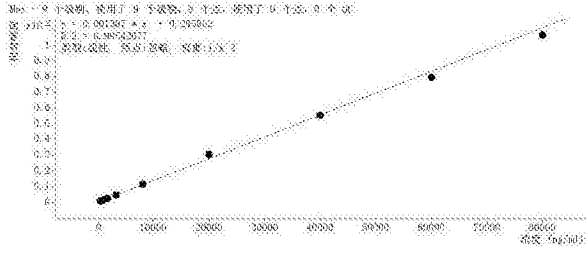
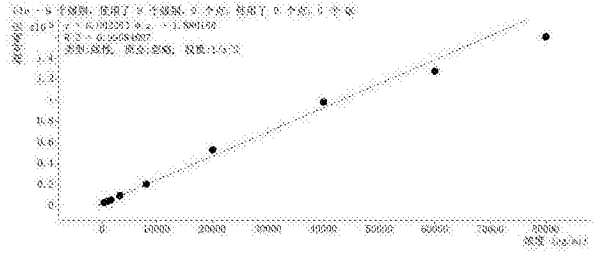
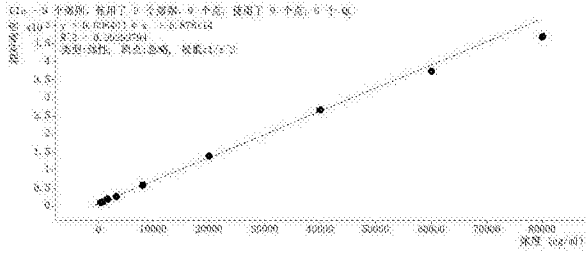
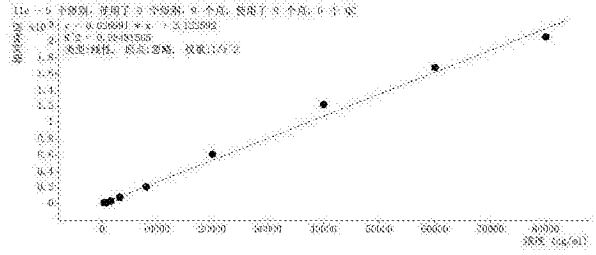
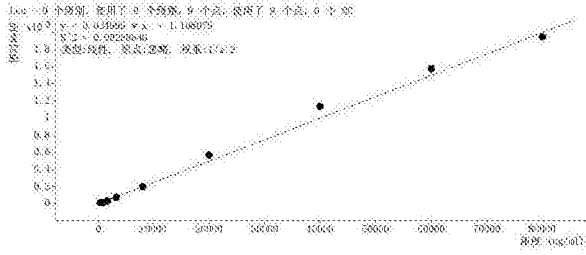
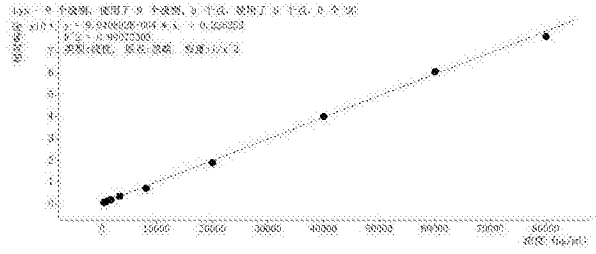
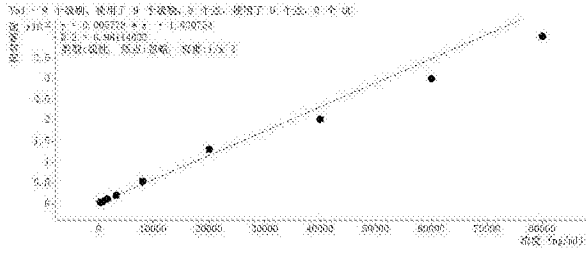
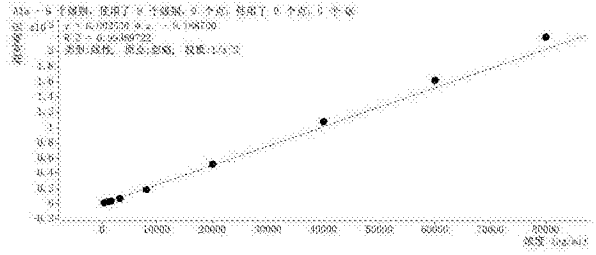
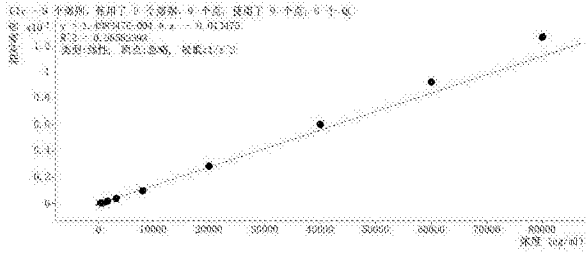
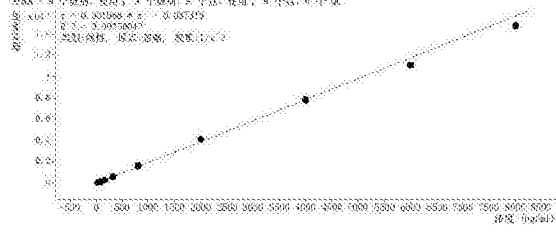
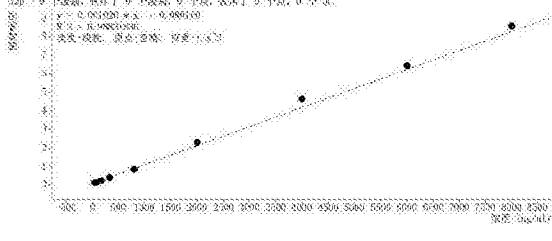
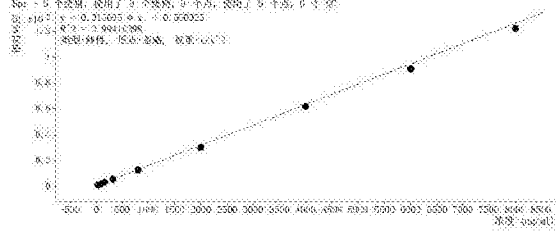
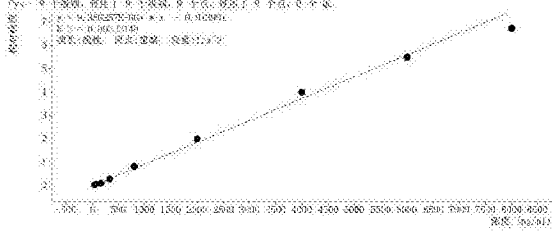
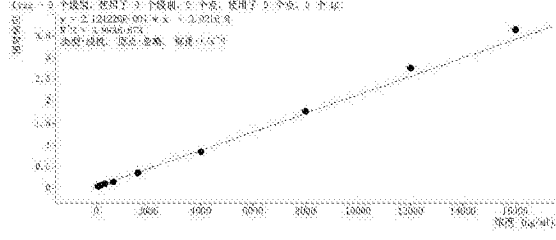
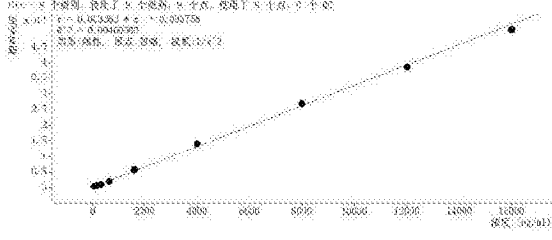
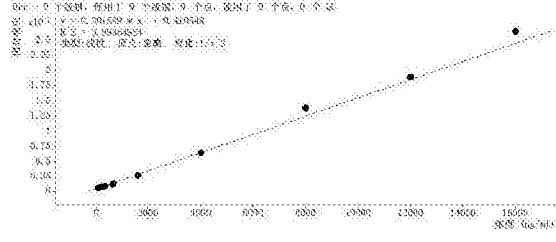
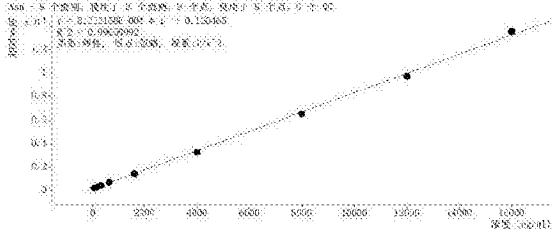
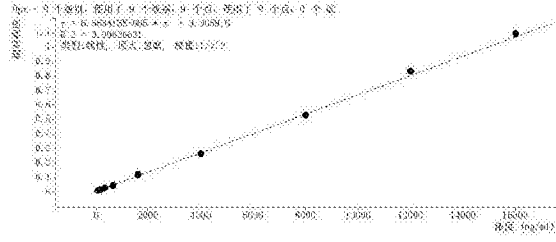
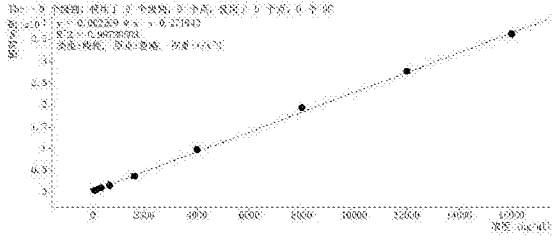
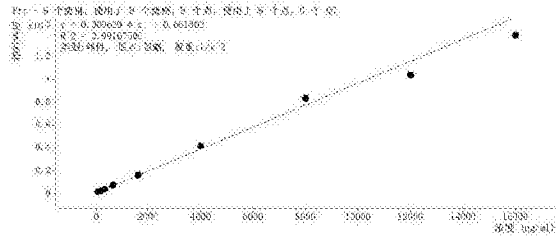
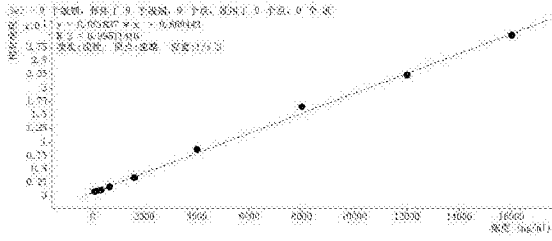
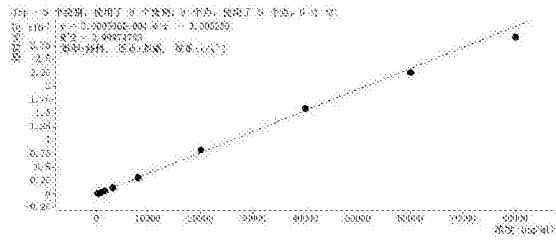
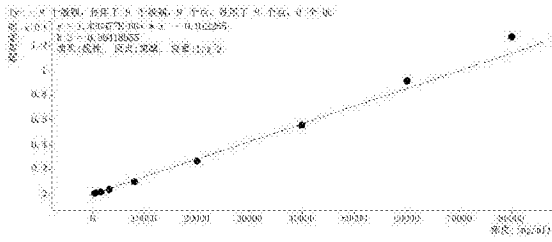


图2





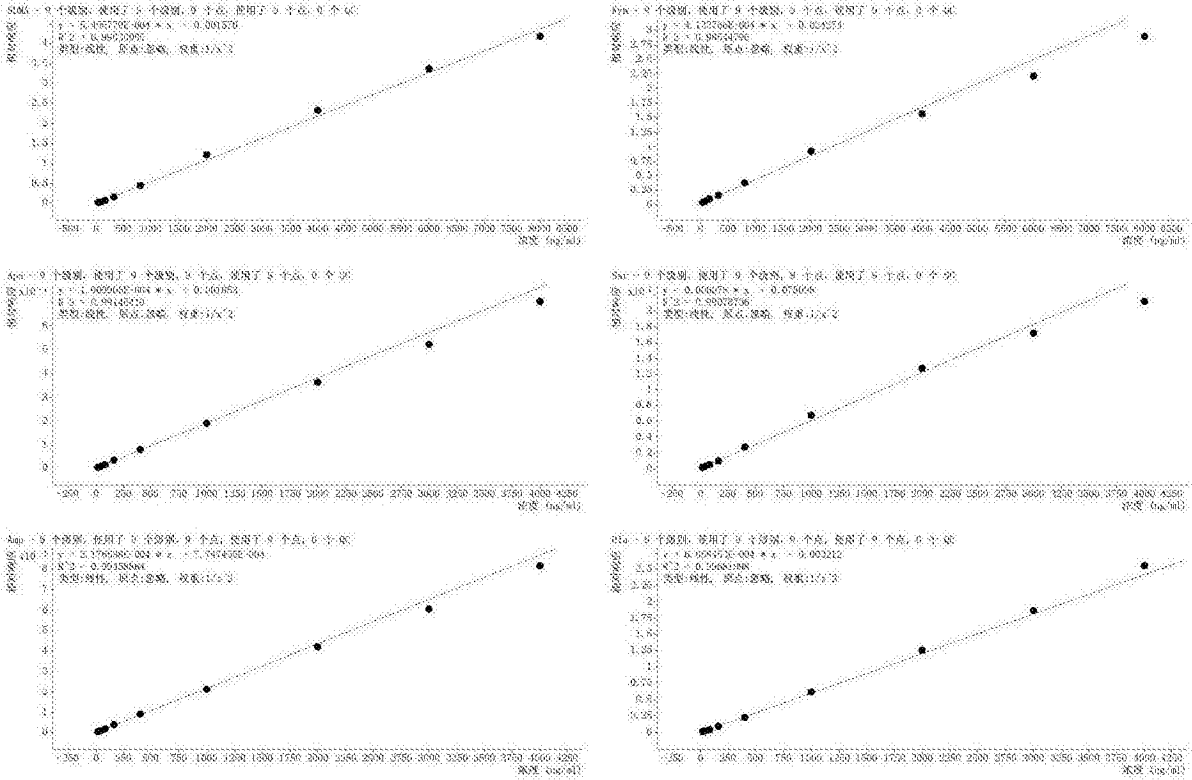


图3

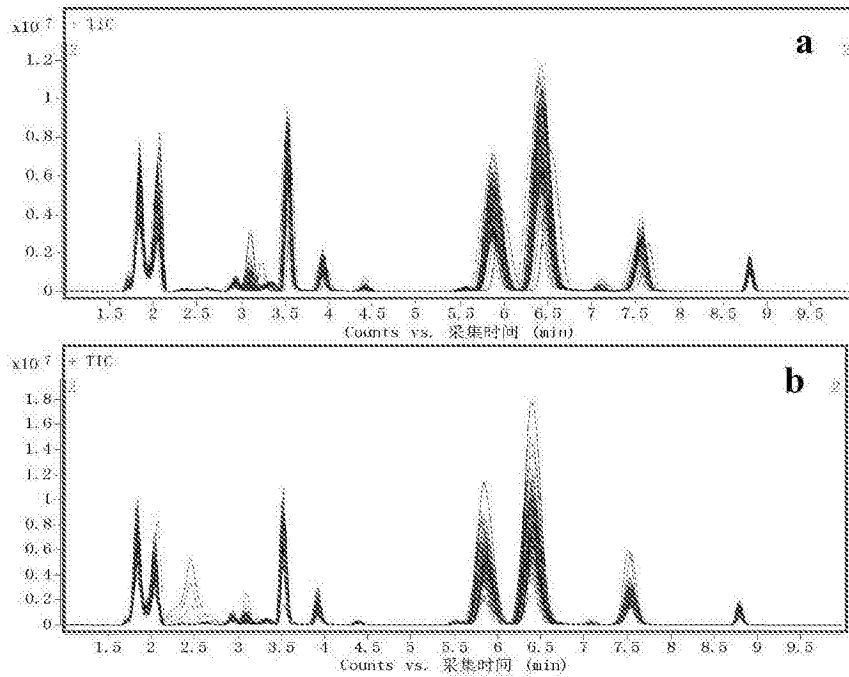


图4

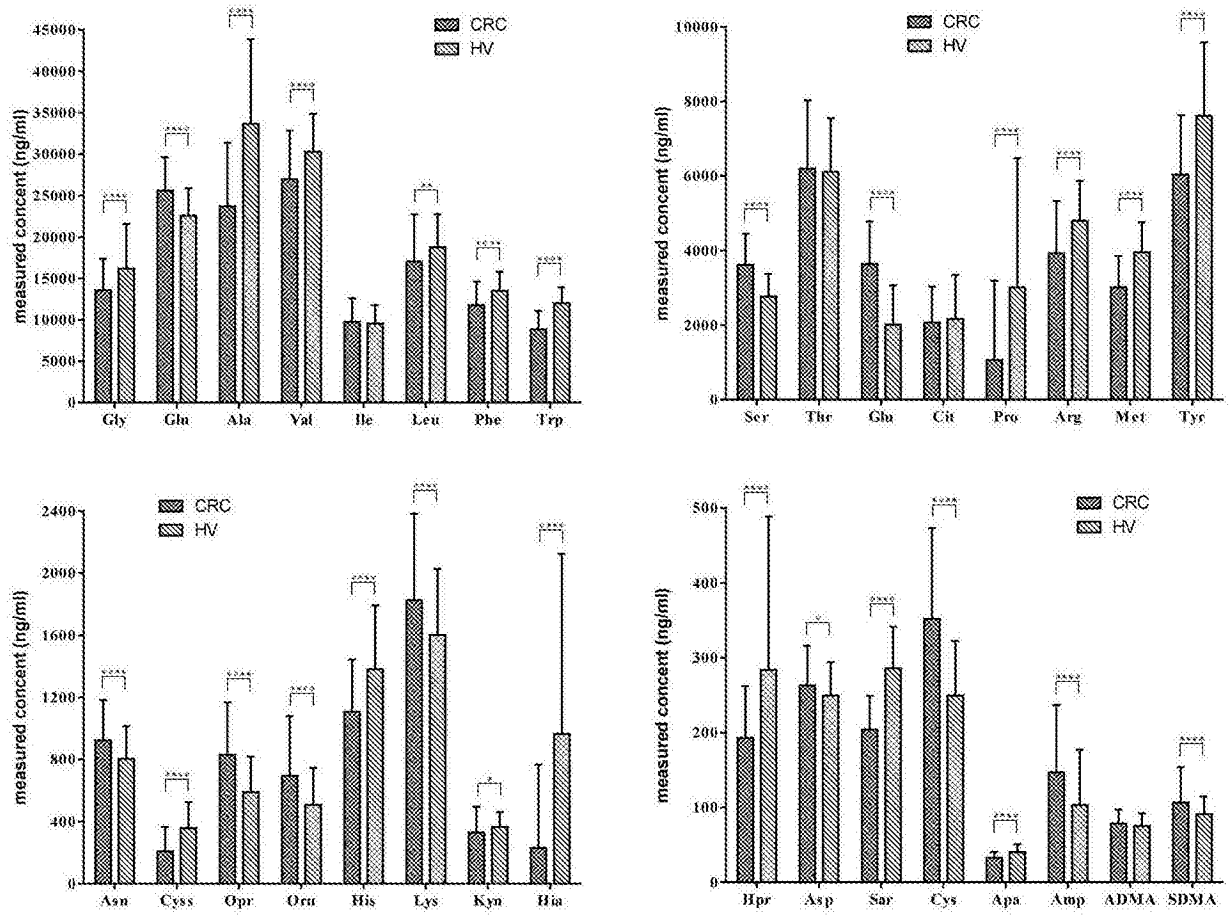


图5

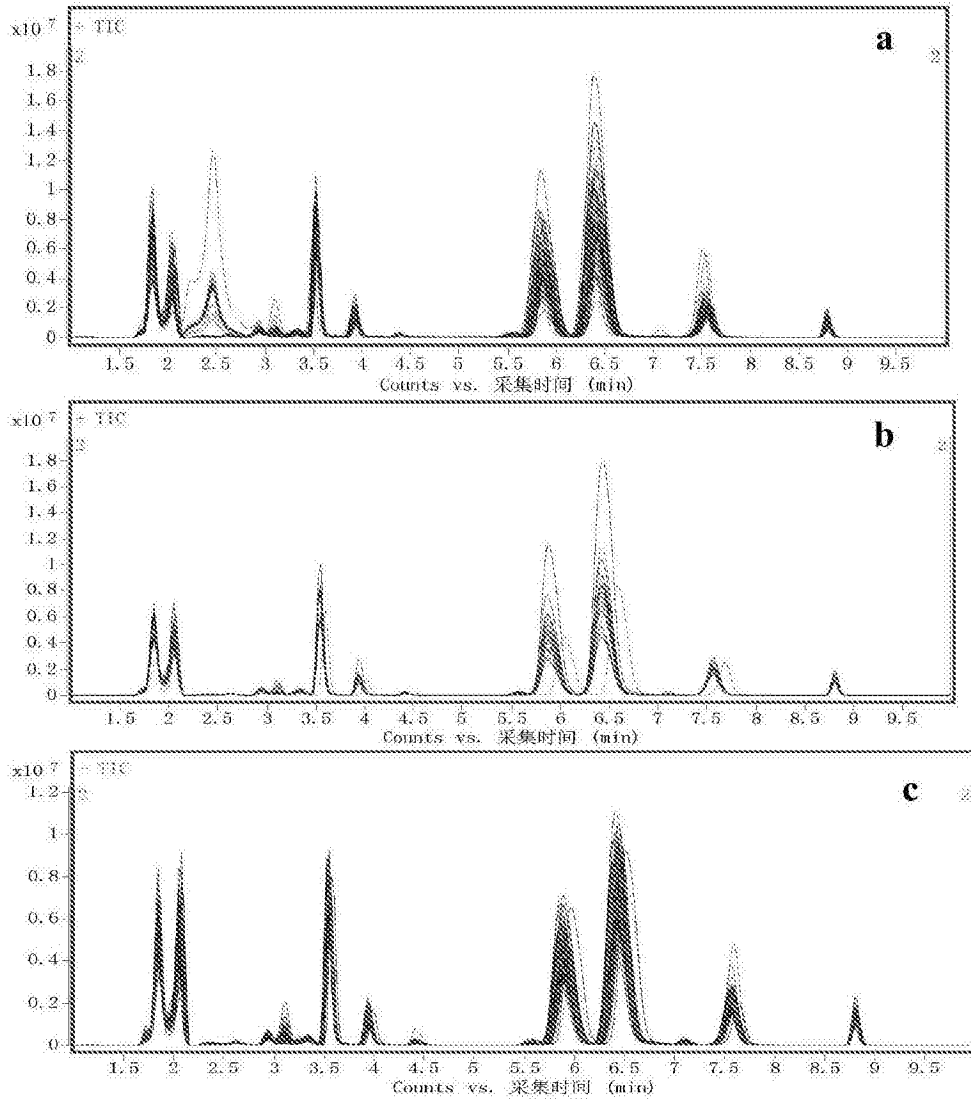


图6

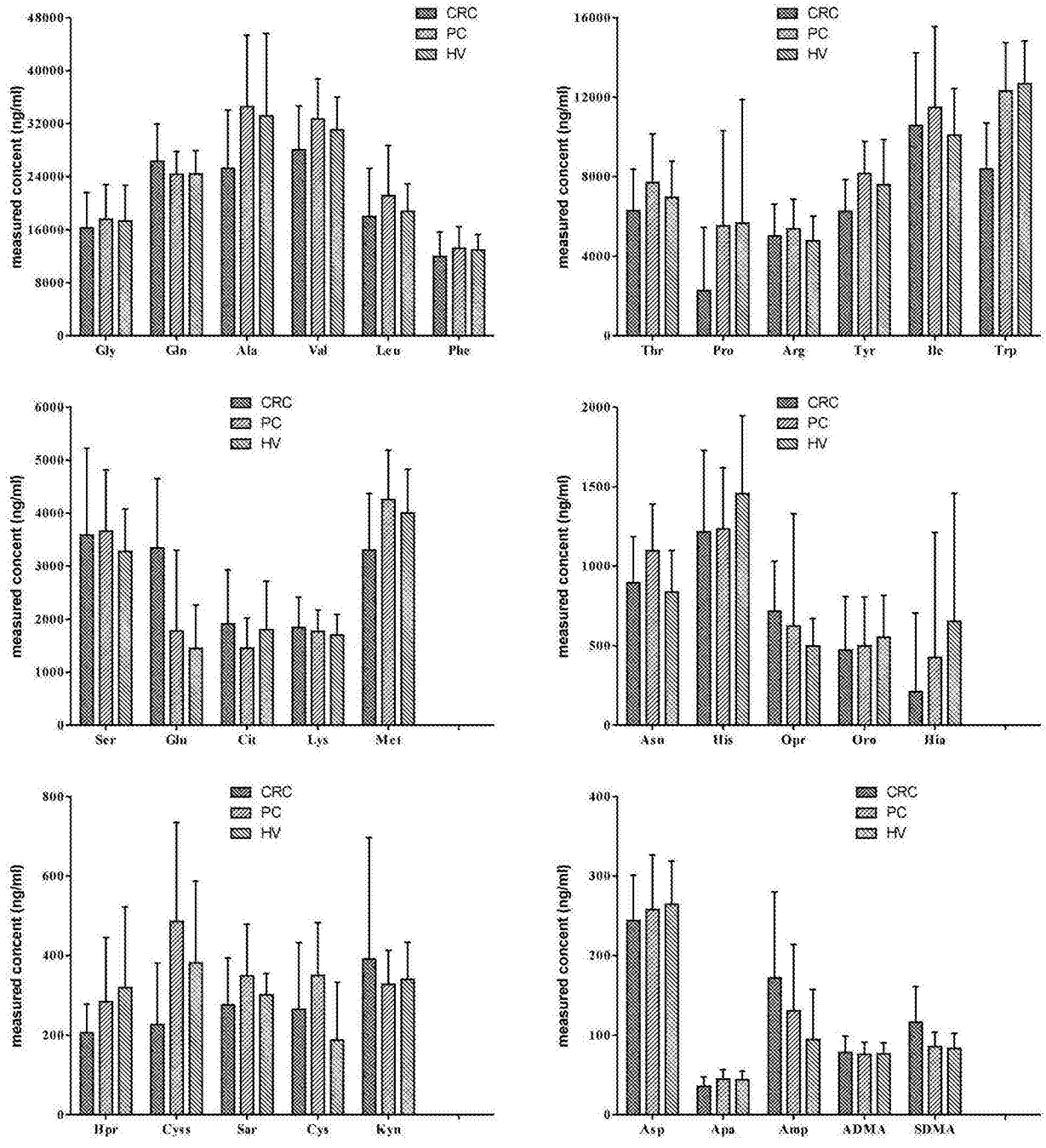


图7

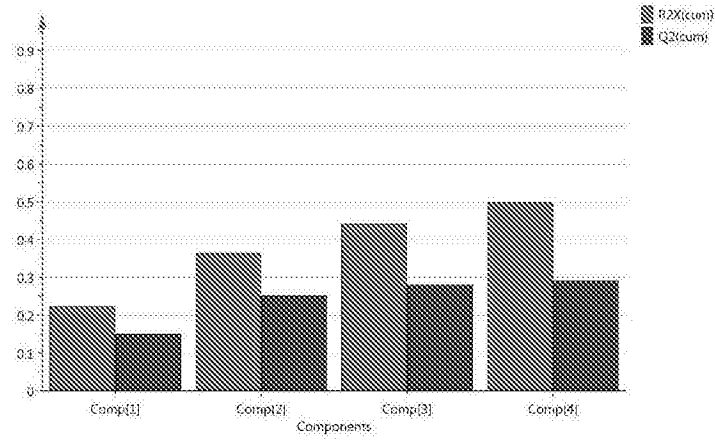


图8

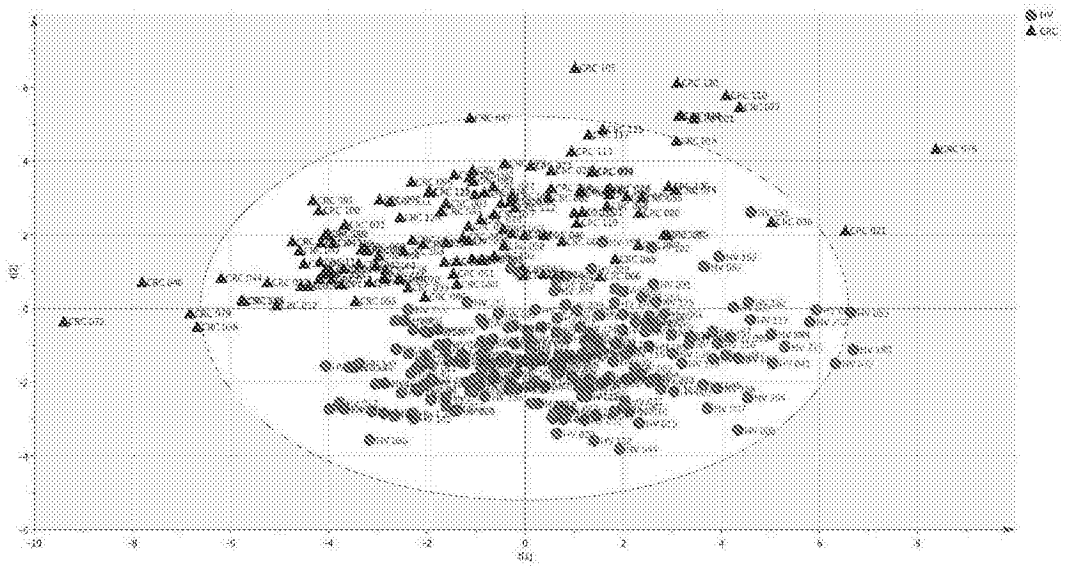


图9

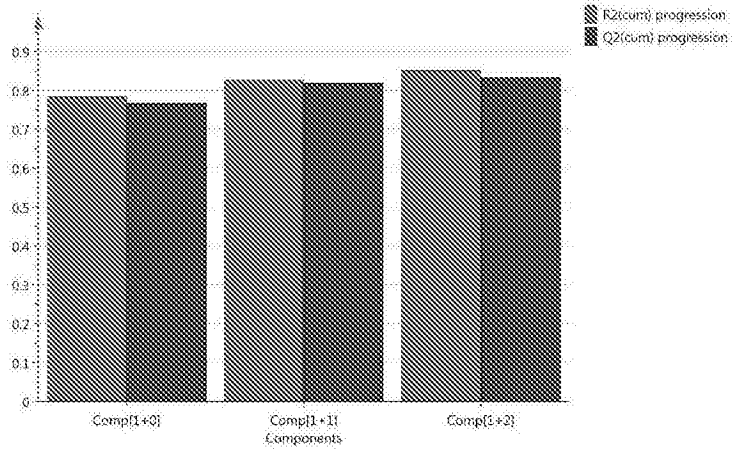


图10

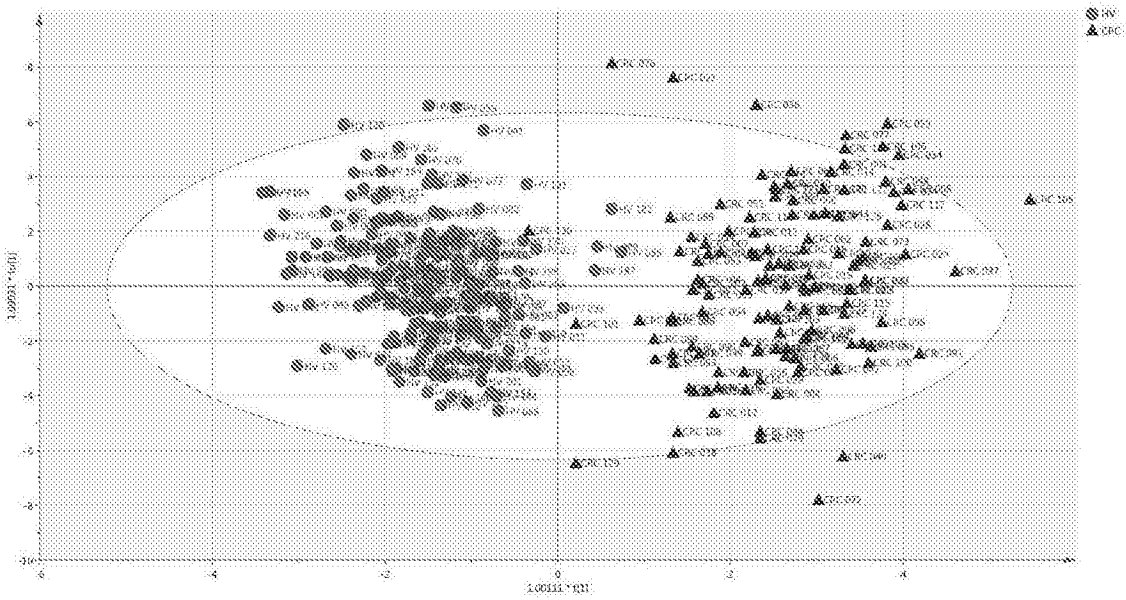


图11

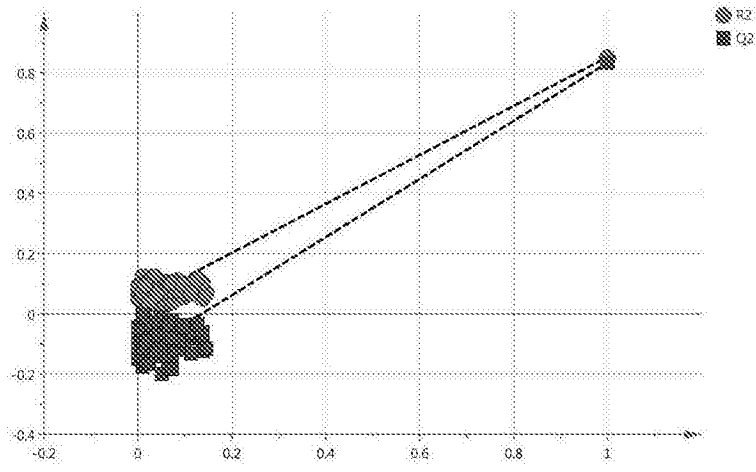


图12

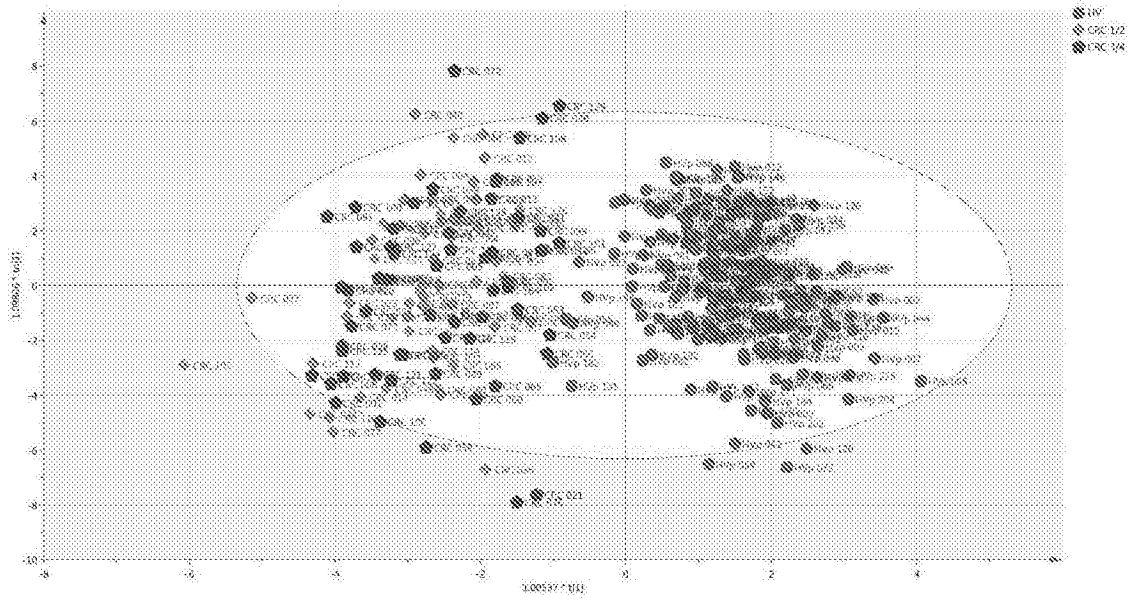


图13

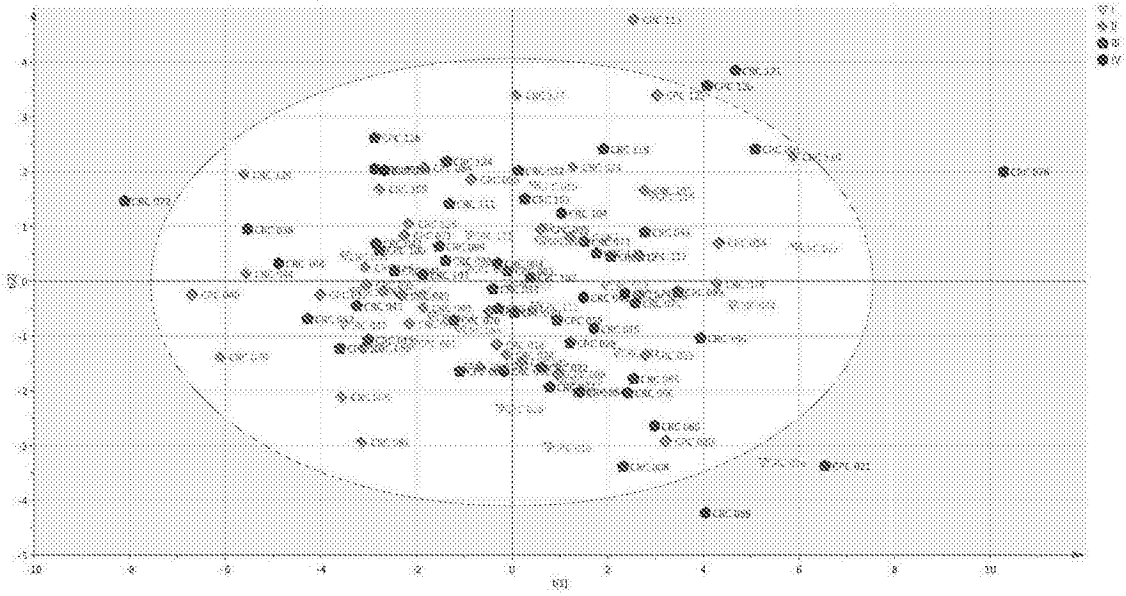


图14

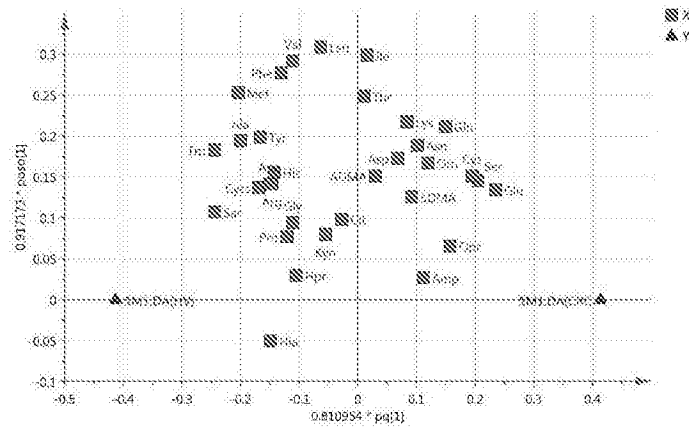


图15

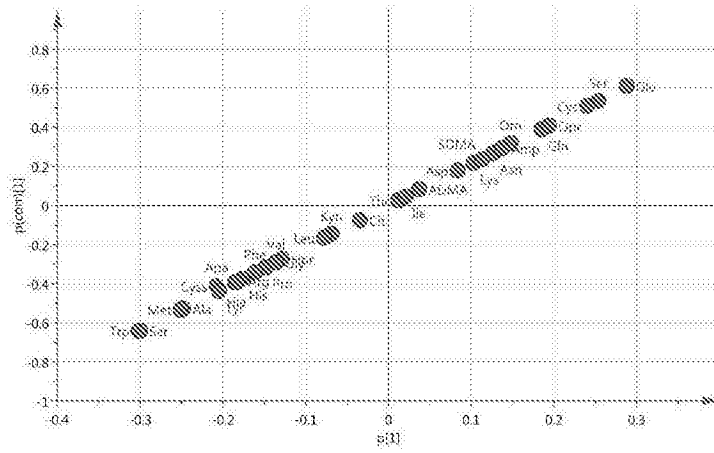


图16

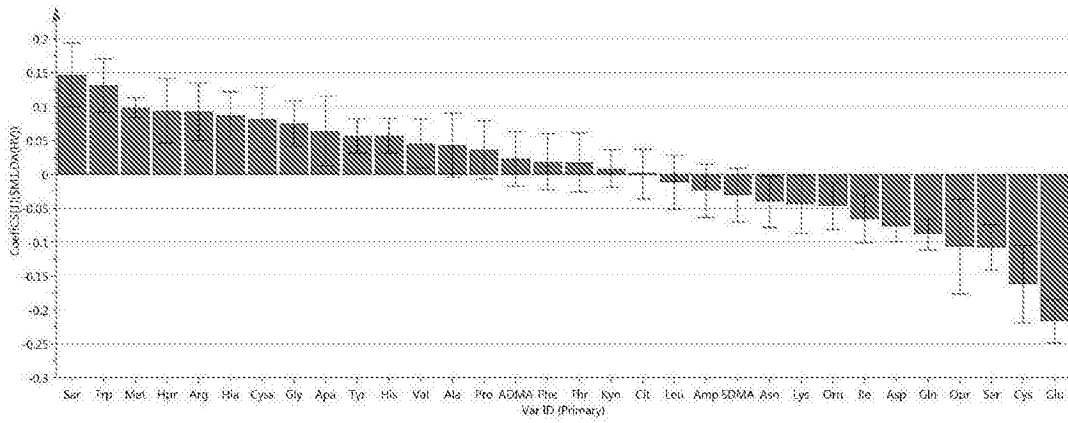


图17

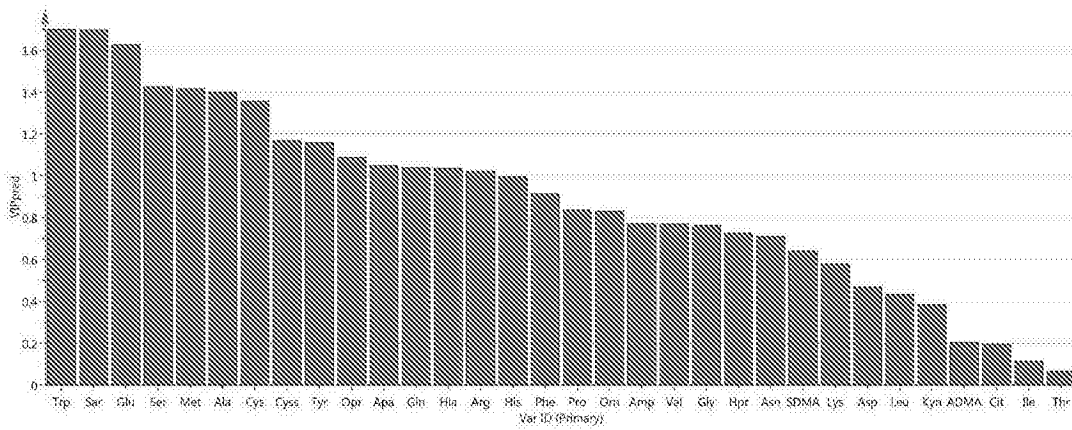


图18

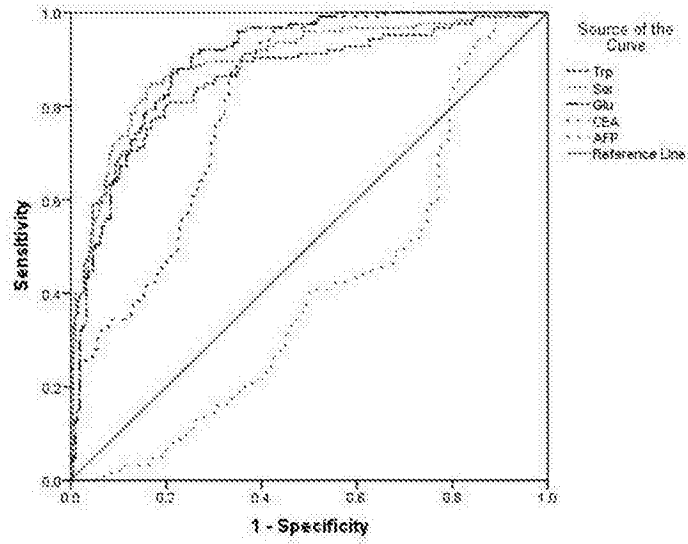


图19

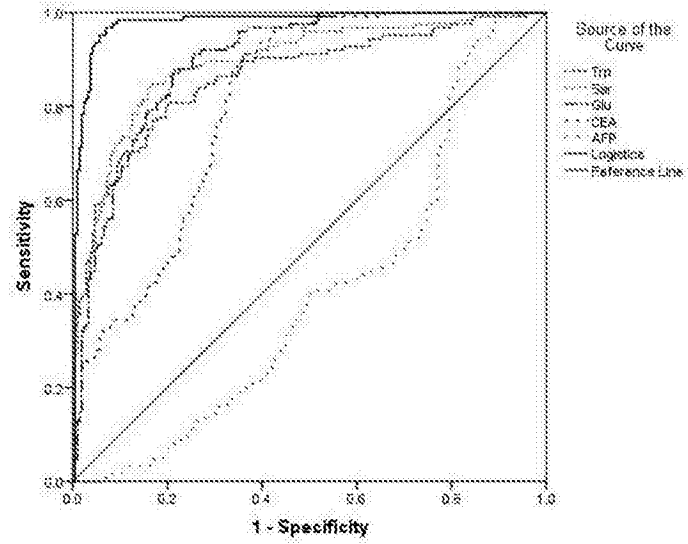


图20