

液相色谱-串联质谱法 快速检测干血点样品中尿酸

李广林, 韩吉春, 王小臣, 赵雅君, 骆亦奇

(杭州量康医学检验所, 浙江 杭州 310052)

摘要:建立了一种高通量液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)检测干血点(DBS)样品中尿酸(UA)的方法。采用自动液体操作平台对样品进行高通量自动化前处理,首先用含有UA-1,3-¹⁵N₂稳定同位素内标的Tris水溶液进行萃取,然后用含有0.1%甲酸、0.05%三氟乙酸的乙腈溶液沉淀蛋白质。处理后的样品经CN色谱柱分离,多反应监测(MRM)模式进行LC-MS/MS分析。结果表明,在DBS样品中,UA在7.8~1 000 μmol/L浓度范围内的线性关系良好($R^2=0.999$);检出限为3.1 μmol/L(S/N=3);定量限为12.5 μmol/L(S/N=10);平均回收率为95%~101%;日内相对标准偏差(RSD)为4.2%~12%;日间RSD为5.3%~14%。以样品中UA检测结果的总体RSD不超过15%来考察样品稳定性,分别将样品在-20℃保持30天、在37℃保持7天、反复冻融5次,样品中UA检测结果总体RSD小于10%,表明样品稳定性良好。将该方法与传统生化分析方法相比较,并分析了204份血样,相关性较好($R^2=0.946$)。此方法可为有限采血条件下UA的检测及UA相关疾病的大规模筛查提供新途径。

关键词:液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS);干血点;自动液体操作平台;尿酸

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2018)02-0250-07

doi:10.7538/zpxb.2017.0029

Determination of Uric Acid in Dried Blood Spot Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

LI Guang-lin, HAN Ji-chun, WANG Xiao-chen, ZHAO Ya-jun, LUO Y. Ruben

(Quantum Health Medical Laboratory, Hangzhou 310052, China)

Abstract: Uric acid (UA) is a metabolite of purine compounds and an essential component of urine. The UA level of blood is an important clinical indicator to assist with the diagnosis of gout, kidney stones, kidney failure and other diseases. The methods of determining the UA level in serum samples include conventional enzymatic assays and recently reported methods, such as high performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS), isotope dilution mass spectrometry (IDMS) and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

收稿日期:2017-02-17;修回日期:2017-05-16

作者简介:李广林(1989—),男(汉族),陕西西安人,硕士研究生,临床质谱诊断检测专业。E-mail: hi999@126.com

通信作者:骆亦奇(1980—),男(汉族),浙江杭州人,博士研究生,从事临床质谱诊断检测方法研究。E-mail: rubenluo@gmail.com

网络出版时间:2018-02-11;网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20180210.1313.002.html>

(HPLC-MS/MS). Among these methods, HPLC-MS/MS stands out for clinical diagnostic applications due to its advantages of broad sample compatibility, excellent specificity and sensitivity, rapidity of analysis. The broad sample compatibility allows HPLC-MS/MS to work with a variety of sample forms including normal whole blood, serum samples and dried blood spot (DBS). DBS is a form of sampling where blood samples are blotted and dried on filter paper. It can be easily prepared and shipped to a remote clinical laboratory for analyzing. The easy-to-use feature facilitates field applications of DBS sampling which can significantly extend the scope of clinical diagnosis, such as chronic disease monitoring and health checkup. Thus, it is meaningful to combine HPLC-MS/MS with DBS in determination of important clinical diagnostic markers such as UA. In this study, a high-throughput method to measure UA in DBS by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was established and validated. The DBS sample processing includes adding 0.2 mol/L tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) solution as extraction solvent which contains internal standard UA-1,3- $^{15}\text{N}_2$, followed by adding acetonitrile with 0.1% formic acid (FA) and 0.05% trifluoroacetic acid (TFA) as protein precipitant. This procedure was carried out in a 96-well plate on an automated liquid handling platform to facilitate high-throughput analysis. The processed sample was separated on a CN column with 95% water with 0.1% formic acid and 5% acetonitrile with 0.1% formic acid (A : B, V/V). Quantitation was implemented using multiple reaction monitoring (MRM) mode. The results show that the linear range of UA in DBS samples are 7.8-1 000 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2=0.999$), limit of detection is 3.1 $\mu\text{mol/L}$ ($S/N=3$), the limit of quantitation is 12.5 $\mu\text{mol/L}$ ($S/N=10$), average recovery is 95%-101%, the intra-day relative standard deviation (RSD) is 4.2%-12%, the inter-day RSD is 5.3%-14%. DBS sample stability was confirmed by the RSD of results in different cases for sample. The RSD is less than 15% within 30 days at $-20\text{ }^\circ\text{C}$, 7 days at room temperature and $37\text{ }^\circ\text{C}$. The DBS samples are stable after 5 freeze-thaw cycles with the RSD less than 10%. The analytical method was compared with a conventional biochemistry assay using blood samples from 204 individuals, each blood sample has two forms: anti-coagulated whole blood for making DBS samples for LC-MS/MS analysis and serum for biochemistry assay. An excellent correlation ($R^2=0.946$) of the two methods is observed.

Key words: liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); dried blood spot (DBS); automated liquid handling platform; uric acid

尿酸(uric acid, UA)是人体内嘌呤代谢的最终产物,主要经肾脏排出。血液 UA 水平是临床诊断痛风、肾结石和肾衰竭的重要指标之一。研究表明^[1-10],高尿酸血症是脑白质病变、糖尿病、高血压、冠心病及代谢综合征的风险因子之一,低尿酸血症则可能增加心血管、骨损伤及胆囊疾病的风险。因此,准确、快速地检测血液 UA 水平可以为某些疾病的预防、诊断及治疗提供依据。

目前,UA 的检测方法包括磷钨酸还原法、酶法^[11]、高效液相色谱法(HPLC)^[12-13]、气相色谱-质谱联用法(GC/MS)^[14]、高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)^[15-16]以及同位素稀释质谱法(IDMS)^[17]等。临床上最常用的是酶法,该方法操作简便,但仅适用于血清样品;HPLC 法受生物基质影响较大,特异性较差;GC/MS 法在一定程度上解决了特异性问题,但样品需衍生化,前处理较繁琐。LC-MS/

MS法具有样品适用性广、特异性好、灵敏度高、检测速度快等特点,但样品的前处理过程复杂、耗时较长,且人工操作引入的误差容易导致检测方法不稳定。而样品前处理的自动化能够较好地解决人为因素造成的误差,同时可以进行批量处理,提高工作效率。

干血点(dried blood spot, DBS)是将抗凝全血收集在特定的滤纸卡片上,晾干后通过一定处理即可进行检测的一种血液样品形态。早在20世纪60年代,DBS样品就已被用于苯丙酮尿症的新生儿筛查中^[18]。随着色谱、质谱技术及健康产业的蓬勃发展,DBS样品在各类疾病的诊断及筛查中的应用价值日益凸显。与传统的临床液体血样相比,DBS样品具有如下优势:首先,样品采集简单方便、成本低,用户个人可自助完成采样,无需具有采血资质的专业人士操作,无需离心机等专业设备;其次,采样不受地域限制,自助采完血样并晾干,然后通过邮寄等方式送至实验室即可进行检测,适合慢性疾病的长期监控;再次,DBS样品稳定性好,可承受较长时间的运输和储存,且运输过程不需要特殊的冷链设施;最后,DBS样品交叉感染风险小,基本无生物危害性,在运输、保存和检测操作中,安全性强。

本研究拟建立一种基于LC-MS/MS与高通量自动移液平台联用检测DBS中UA的方法,使样品前处理过程实现自动化,并采用LC-MS/MS多反应监测(MRM)模式检测分析。希望为人体内血液UA水平的大规模筛查提供方法参考。

1 实验部分

1.1 仪器和材料

Agilent 1290-6495液相色谱-串联质谱仪,Bravo自动液体操作平台,在线过滤器:美国Agilent公司产品;色谱柱:Luna CN柱(100 mm×2 mm×3 μm),美国Phenomenex公司产品;Hitachi7180全自动生化仪:日本Hitachi公司产品;分析天平:德国Sartorius公司产品;3 mm打孔器及打孔垫:美国Ted Pella公司产品;超纯水仪:德国EDM Millipore公司产品;96孔透明深孔板,8道深孔板:美国Axygen公司产品;96孔PCR进样板:美国Bio-Rad公司

产品;Whatman 903 CF12滤纸:美国GE公司产品。

UA标准品:纯度≥98%,上海安谱公司产品;UA稳定同位素内标UA-1,3-¹⁵N₂:纯度≥98%,美国CIL公司产品;Tris-HCl晶体:美国Sigma-Aldrich公司产品;乙腈,甲酸:均为质谱级,上海安谱公司产品;盐酸:质谱级,西班牙Scharlau公司产品;抗凝全血样品及血清样品:由江山人民医院提供。

1.2 标准溶液的配制

用40.0 mmol/L NaOH溶液溶解,配制25.0 mmol/L UA母液。用0.2 mol/L Tris缓冲溶液溶解,配制5.0 mmol/L UA-1,3-¹⁵N₂内标母液,并分装。将内标母液用0.2 mol/L Tris溶液稀释为100.0 μmol/L内标工作液,并分装。将配制的母液与内标标准溶液于-80℃保存,使用时配制所需浓度的标准溶液。

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱:CN柱(100 mm×2 mm×3 μm),前端配有在线过滤器;流动相:0.1%甲酸的水溶液-0.1%甲酸的乙腈溶液(95:5,V/V),等度洗脱,流速0.3 mL/min;进样体积1.0 μL;柱温25℃。

1.3.2 质谱条件 采用电喷雾离子源正离子检测模式;多反应监测模式;干燥气温度150℃,流速16 L/min;鞘气温度350℃,流速11 L/min;毛细管电压3 000 V;喷嘴电压500 V;离子漏斗高、低射频电压分别为150和100 V。UA和UA-1,3-¹⁵N₂准分子离子峰分别为 m/z 169.0和 m/z 171.1,通过进一步二级质谱碎裂,最终确定UA的特征离子对分别为 m/z 169.0>141.1和 m/z 169.0>126.1,其中 m/z 169.0>141.1为定量离子对,相应UA内标UA-1,3-¹⁵N₂的定量离子对为 m/z 171.1>143.0。UA和UA-1,3-¹⁵N₂主要质谱采集参数列于表1。

1.4 DBS样品的制备及前处理

将20.0 μL抗凝全血滴于滤纸片上,室温下晾2 h后,于-80℃保存,待测。用打孔器取2片制备的直径3.0 mm的DBS样品于96孔深孔板中,加入40.0 μL 100 μmol/L UA-1,3-¹⁵N₂内标工作液,室温下振荡5 min,然

表1 UA和UA-1,3-¹⁵N₂质谱采集参数
Table 1 Mass parameters of UA and UA-1,3-¹⁵N₂

化合物 Compound	保留时间 <i>t_R</i> /min	离子对 Transition (<i>m/z</i>)	裂解电压 Fragmentor voltage/V	碰撞能量 Collision energy/eV	极性 Polarity
UA	1.105	169.0>141.1	380	15	正
UA	1.105	169.0>126.1	380	20	正
UA-1,3- ¹⁵ N ₂	1.105	171.1>143.0	380	15	正

后加入 400 μL 沉淀剂(含体积分数为 0.1% 甲酸、0.05% 三氟乙酸的乙腈溶液),振荡 5 min,以 3 500 r/min 离心 10 min,吸取 70.0 μL 上清液至 96 孔 PCR 进样板中,进行 LC-MS/MS 分析。整个前处理过程中,除打孔外,其余步骤均在 Bravo 自动液体操作平台上进行。

2 结果与讨论

2.1 方法学验证

2.1.1 标准曲线 为准确检测 DBS 样品中 UA 含量,采用基质添加方法制备标准曲线。取 9 等份抗凝全血,分别添加不同浓度的 UA 标准品至终浓度为 0.0、7.8、15.6、31.3、62.5、125、250、500 和 1 000 μmol/L。然后按照 1.4 节方法制备 DBS,并进行前处理,各浓度重复测定 6 次。以扣除本底抗凝全血中 UA 和 UA-1,3-¹⁵N₂ 峰面积比值为 *y*,以添加的 UA 标准品浓度为 *x* (μmol/L),绘制标准曲线,权重取 1/*x*,示于图 1。结果表明,UA 检测结果与 UA 添加浓度在 7.8~1 000 μmol/L 范围内的线性关系良好,线性方程为 $y=0.00136x+0.00025$,线性相关系数 $R^2=0.999$ 。人血清中 UA 浓度参考范围为 90~420 μmol/L^[19],

该线性范围可以满足 DBS 中 UA 的检测。

2.1.2 检出限与定量限 抗凝全血中含有内源性 UA,因此本研究以 UA 稳定同位素内标 UA-1,3-¹⁵N₂ 评估检出限(LOD)和定量限(LOQ)。在抗凝全血中添加不同浓度的 UA-1,3-¹⁵N₂,混匀后按照 1.4 节方法制备 DBS 样品。前处理过程在 1.4 节基础上有所改变,将原来添加的 40.0 μL 内标工作液改为 40.0 μL 0.2 mol/L Tris 溶液。前处理完成后,按 1.3 节方法分析。结果表明,DBS 样品中 UA 检出限为 3.1 μmol/L(S/N=3),定量限为 12.5 μmol/L(S/N=10)。在浓度分别为 3.1、12.5、200 μmol/L 时,UA-1,3-¹⁵N₂ 的 MRM 图示于图 2。

2.1.3 精密度与回收率 取抗凝全血,添加不同浓度的 UA 标准品至终浓度分别为低(50.0 μmol/L)、中(300 μmol/L)、高(700 μmol/L),按照 1.4 节方法进行 DBS 样品制备和前处理,按照 1.3 节方法分析样品。日内精密度实验中,各添加水平样品重复测定 10 次。日间精密度实验中,各添加水平样品连续测定 5 天,每天重复测定 5 次。将日间精密度实验中每日的实验结果取平均值,得到当天的 UA 检测值,再将 5 天的 UA 检测值取平均值,得到平均 UA 检测值和平均回收率。其中,添加样品 UA 检测值为实测 UA 数值减去本底 UA 数值。各添加水平样品在 5 天实验中的平均回收率为 95%~101%。结果表明,该方法的精密度与准确度良好,具体结果列于表 2。

2.1.4 样品稳定性 DBS 样品在不同温度下随时间变化的稳定性:取 3 份抗凝全血,添加不同浓度的标准品至终浓度分别为低(50.0 μmol/L)、中(300 μmol/L)、高(700 μmol/L),按照 1.4 节方法制备 DBS,将 3 种浓度样品均分 3 份并分 3 组,每组包含低、中、高样品。将

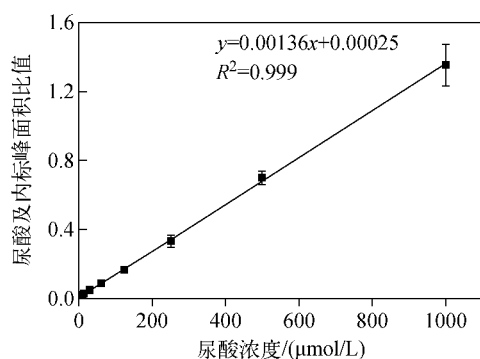


图1 UA定量检测标准曲线

Fig. 1 Standard curve of UA quantitation

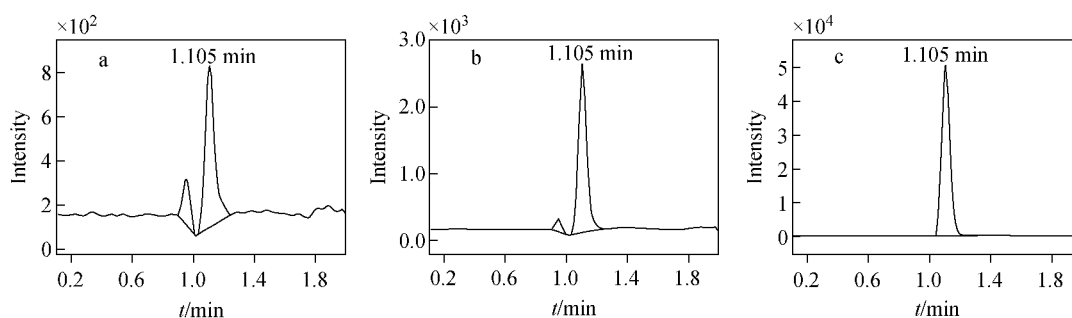


图2 浓度为3.1(a),12.5(b)和200 μmol/L(c)时,UA-1,3-¹⁵N₂的MRM图
Fig. 2 MRM chromatograms of UA-1,3-¹⁵N₂ with 3.1 (a), 12.5 (b) and 200 μmol/L (c)

表2 UA检测方法的精密度和回收率

Table 2 Precision and recovery of UA measurement

尿酸添加浓度 Spiked UA level/ (μmol/L)	精密度 Precision		平均尿酸检测值 Average UA level/ (μmol/L)	平均回收率 Average recovery/%
	日内 Intra-day RSD/%	日间 Inter-day RSD/%		
空白	3.4	8.7	273±9	—
50.0	12	14	51±6	101±12
300	6.3	5.3	285±18	95±6
700	4.2	5.9	683±29	98±4

3组样品分别储存于37℃、室温、-20℃环境下,于放置的第1、2、3、4、5、7、10、15、20、30天进行样品前处理并检测。结果表明,在-20℃环境下,30天内的RSD为5.0%~9.0%,样品稳定性良好;在37℃和室温环境下,样品在7天内的检测结果总体RSD小于15%。

DBS样品反复冻融稳定性:按上述方法对样品分组,并进行冻融稳定性实验。样品于-20℃放置22h,室温下放置2h为一个冻融循环,连续进行5次。结果表明,低、中、高浓度样品反复冻融的RSD分别为5.9%、9.2%、2.0%,冻融稳定性良好。

2.2 实际样品检测

采集204个抗凝全血样品,按1.4节方法制备DBS,LC-MS/MS检测分析UA。同时,采用传统临床诊断中常用的Hitachi 7180全自动生化仪检测204个临床血清样品中的UA。以传统生化法检测血清中UA浓度为 x (μmol/L),以本实验方法检测UA浓度为 y (μmol/L),绘制曲线,示于图3。得到拟合曲

线方程 $y=0.909x+3.345$,线性相关系数 $R^2=0.946$,说明本实验方法与传统生化法检测UA的相关性良好。

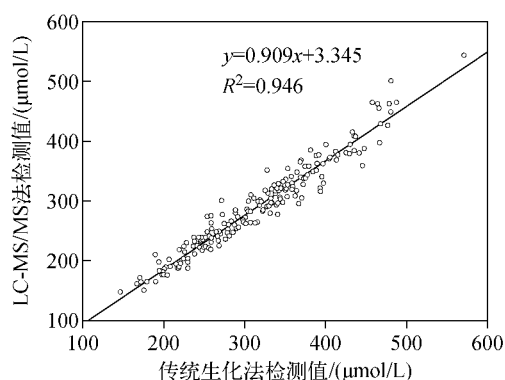


图3 LC-MS/MS检测DBS中UA与传统生化法检测血浆中UA浓度的比较($n=204$)

Fig. 3 Comparison of UA concentrations in the DBS samples determined by LC-MS/MS and in the plasma samples by conventional biochemistry assay ($n=204$)

3 结论

本研究建立了一种基于液相色谱-串联质谱检测 DBS 样品中 UA 的方法,该方法简单方便、生物稳定性好、方便储存和运输。前处理过程使用 Bravo 自动化液体处理平台及高通量的 96 孔板,降低了人为误差,提高了方法精密度。使用同位素内标避免了基质效应。该方法与传统生化方法的相关性好,适用于有限采血条件下 UA 的检测及相关疾病的大规模筛查。

参考文献:

- [1] KUTZING M K, FIRESTEIN B L. Altered uric acid levels and disease states[J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2008, 324(1): 1-7.
- [2] de OLIVEIRA E P, BURINI R C. High plasma uric acid concentration: causes and consequences [J]. *Diabetology and Metabolic Syndrome*, 2012, 4(1): 1-7.
- [3] SUN M J, LI B H, LONG C Y, et al. Association between serum uric acid levels and cerebral white matter lesions in Chinese individuals[J]. *International Journal of Neuroscience*, 2016, 126(12): 1 103-1 111.
- [4] DEHGHAN A, van HOEK M, SIJBRANDS E J, et al. High serum uric acid as a novel risk factor for type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2008, 31(2): 361-362.
- [5] BORGHI C, VERARDI F M, PAREO I, et al. Hyperuricemia and cardiovascular disease risk [J]. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 2014, 12(10): 1 219-1 225.
- [6] DING X H, WANG X N, CAO R H, et al. GW27-e0533 A higher baseline plasma uric acid level is an independent predictor of arterial stiffness: a community-based prospective study[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2016, 68(16): C79-C79.
- [7] DENOBLE A E, HUFFMAN K M, STABLER T V, et al. Uric acid is a danger signal of increasing risk for osteoarthritis through inflammatory activation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(5): 2 088-2 093.
- [8] MENDE C. Management of chronic kidney disease: the relationship between serum uric acid and development of nephropathy[J]. *Advances in Therapy*, 2015, 32(12): 1 177-1 191.
- [9] WANG J Y, CHEN Y L, HSU C H, et al. Predictive value of serum uric acid levels for the diagnosis of metabolic syndrome in adolescents[J]. *Journal of Pediatrics*, 2012, 161(4): 753-756.
- [10] 安映红, 翁余海, 陈友谊, 等. 浙江舟山群岛居民高尿酸血症人群分布及发病率分析[J]. *现代检验医学杂志*, 2016, 31(3): 102-104.
- AN Yinghong, WENG Yuhai, CHEN Youyi, et al. Population distribution and incidence analyses of hyperuricemia in zhoushan island[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2016, 31(3): 102-104(in Chinese).
- [11] 张江涛, 张传宝, 曾洁, 等. 血清尿酸 13 种常规检验系统正确度的评价[J]. *中华检验医学杂志*, 2015, 38(9): 609-612.
- ZHANG Jiangtao, ZHANG Chuanbao, ZENG Jie, et al. Trueness evaluation of 13 routine measurements for serum uric acid[J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2015, 38(9): 609-612(in Chinese).
- [12] LI X L, SHI Q, JIN W L, et al. Uric acid quantification in fingernail of gout patients and healthy volunteers using HPLC-UV[J]. *Biomedical Chromatography*, 2016, 30(8): 1 338-1 342.
- [13] 马玉花, 黄冬群, 张瑞, 等. 高效液相色谱法同时测定尿液中 4 种非蛋白氮的含量[J]. *色谱*, 2013, 31(11): 1 102-1 105.
- MA Yuhua, HUANG Dongqun, ZHANG Rui, et al. Simultaneous determination of four common nonprotein nitrogen substances in urine by high performance liquid chromatography[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2013, 31(11): 1 102-1 105(in Chinese).
- [14] SUN Y P, CHEN J, QI H Y. Graphitic carbon nitrides modified hollow fiber solid phase micro-extraction for extraction and determination of uric acid in urine and serum coupled with gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2015, (1 004): 53-59.
- [15] LUO X, CAI N F, CHENG Z N. Determination of uric acid in plasma by LC-MS/MS and its application to an efficacy evaluation of recombinant urate oxidase[J]. *Analytical Sciences*, 2013, 29(7): 709-713.

- [16] KWON K, KIM J Y, SUH S, et al. Simultaneous determination of creatinine and uric acid in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with polarity switching electrospray ionization[J]. *Forensic Science International*, 2012, 221(11-13): 57-64.
- [17] DAI X H, FANG X, ZHANG C M, et al. Determination of serum uric acid using high-performance liquid chromatography (HPLC)/isotope dilution mass spectrometry (ID-MS) as a candidate reference method[J]. *Journal of Chromatography B*, 2007, 857(2): 287-295.
- [18] 韩吉春,李广林,王小臣,等. 液相色谱-串联质谱法检测干血点中的同型半胱氨酸[J]. *色谱*, 2016,34(6):567-571.
- HAN Jichun, LI Guanglin, WANG Xiaochen, et al. Determination of homocysteine in dried blood spots using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2016, 34(6): 567-571 (in Chinese).
- [19] 从玉隆,王金良,李晓军,等. 实用检验医学[M]. 北京:人民卫生出版社,2013:576-577.
- [20] NAGENDRA S, YOGARAJE G C V, KARSHINATH R T. A comparative study of plasma uric acid, erythrocyte uric acid and urine uric acid levels in type 2 diabetic subjects[J]. *Merit Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2015, 3(12): 571-574.