

LC-MS/MS 检测 24 小时或随机尿液中尿酸和肌酐含量

LCMSMS-711

摘要： 本文建立了一种使用岛津临床质谱 LCMS-8045CL 测定人尿液中尿酸和肌酐的定量分析方法，使用同位素内标定量法对标准样品、基质加标样品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性范围 UA: 10~3000 $\mu\text{g/mL}$, Cr: 20~3000 $\mu\text{g/mL}$, 满足临床参考区间要求，标准曲线相关系数均大于 0.9994，质控品准确度偏差均在 -1.3%~3.3%，精密度 RSD 均 <5.0%，该方法采用柱后补偿技术，能显著提高分析结果的稳定性和待测物灵敏度，尿肌酐的联合检测方便了肌酐校正法的计算，可满足临床 24 小时尿液和随机尿液样本的检验需求。该方法分析速度快，单针分析时间：6 分钟，灵敏度高，专属性强，前处理简单，可为相关从业人员提供参考。

关键词： 临床检测 LC-MS/MS 尿酸 肌酐

尿酸 (Uric Acid, UA) 是人体内嘌呤化合物的终末代谢产物。当体内嘌呤代谢紊乱时可导致高尿酸血症 (Hyperuricemia, HUA)，本病患病率受到遗传、性别、年龄、生活方式、饮食习惯等多方面影响。

在我国，HUA 的发病率近年来呈上升和年轻化趋势，患病率由 2015~2016 年的 11.4%，发展至 2018~2019 年的 14%，其中 18-29 岁男性的患病率最高。高尿酸早已成为高血压、高血糖、高血脂之外的“第四高”，并成为日益严重的公共卫生问题，HUA 不仅是痛风的关键危险因素，也与肾脏疾病、高血压、糖尿病、心血管疾病等密切相关^{[1][2]}，因此尿酸的检测和分析对临床诊断，了解病情进展，有重要参考价值。

肌酐 (Creatinine, Cr)，是肌肉在人体内代谢的产物，主要由肾小球滤过排出体外，一般情况下人体每天从尿液中排出的肌酐量恒定，不受饮食、饮水和利尿剂影响，肌酐的浓度反映了整体尿液浓度。因此，对于随机尿中待测成分含量的测定通常采用肌酐校正法计算，随着高尿酸血症患病率的年轻化趋势，

对于难以采集 24 小时尿液标本的患者（如儿童），尿酸肌酐比值可用于近似 24 小时尿液样本排泄值，从而提高了检测的便利性。

目前，测定尿酸的方法主要有酶法、伏安法、磷钨酸还原法、毛细管电泳法、液相色谱法等。临床上常用的检测尿酸的方法为单酶法，但样本中高水平的胆红素和抗坏血酸可能会干扰该方法的测定结果。近年来，随着 LCMSMS 技术的普及，串联质谱法因其高灵敏度、高特异性、高分辨率、兼具高通量、高效率等优势，在临床化学检测领域发挥着越来越多的作用。

本文参考中国医师协会检验医师分会临床质谱检验医学专业委员会的《液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证》，基于岛津 LCMS-8045CL 平台建立了一种简单高效的液相色谱质谱法同时测定血清中 UA 和 Cr 含量，

通过柱后补偿技术的优化，使得正负离子同时检测的灵敏度和稳定性大大提高，可满足临床尿液样本的检验需求，供相关人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津临床质谱 LCMS-8045CL，具体配置如下：

输液泵：LC-40B X3，LC-30AD

自动进样器：SIL-40C X3

系统控制器：SCL-40

检测器：LCMS-8045

柱温箱：CTO-40S

工作站软件：LabSolutions Version 5.99

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱: Shim-pack Velox Biphenyl (50 mm × 2.1 mm × 1.8 μm), 货号: 227-32013-02

流动相: A相: 0.05% 甲酸 - 水, B相: 甲醇, C相: 0.5% 氨水 (补偿泵)

洗脱方式: 梯度洗脱, 时间程序见表 1

流速: 主泵: 0.2 mL/min, 补偿泵: 0.4 mL/min

柱温: 40°C

进样器温度: 15°C

进样量: 2 μL

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.01	92	8
0.50	92	8
4.00	10	90
5.00	10	90
5.01	92	8
6.00	92	8

质谱条件

离子化模式: ESI

离子源温度: 350°C

加热气: 空气 15.0 L/min

DL 管温度: 200°C

雾化气: 氮气 3.0 L/min

加热模块温度: 400°C

干燥气: 氮气 5.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 20 ms

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

#	名称	电离模式	前体离子	产物离子	Q1 Pre	CE	Q3 Pre
1	Cr*	ESI(+)	114.2*	44.1*	-14	-40	-18
			114.2	86.3	-14	-15	-17
2	Cr-d3	ESI(+)	117.2	47.05	-13	-40	-19
3	UA*	ESI(-)	167.2*	124.1*	19	18	21
			167.2	96.1	17	20	17
6	UA-15N2	ESI(-)	169.2	125.2	19	14	22

* 表示定量离子对

1.3 样品制备和前处理

1.3.1 标准品 & 内标信息

表 3 标准品信息

#	中文名	英文简称	CAS 号	M.W.
1	肌酐	Cr	60-27-5	113.12
2	肌酐 -d3	Cr-d3	143827-20-7	116.14
3	尿酸	UA	96-23-2	168.11
4	尿酸 -1,3-15N2	UA-15N2	62948-75-8	170.10

1.3.2 样本制备

(1) 储备液配制 & 尿酸稳定性考察

①肌酐和肌酐-d3 水溶性良好，故使用超纯水配制终浓度分别为 5 mg/mL (Cr)、1 mg/mL (Cr-d3) 的储备液并于 -20°C 保存备用。

②尿酸和尿酸-1,3-15N2 在纯溶剂中的溶解性较差，经测试：尿酸在水、醇类、醚类、甲酸、烷烃、丙酮、氯仿、DMF、DMSO 中溶解度均 <1 mg/mL，据文献报道^[4]，碱性溶液对尿酸有更好的溶解能力，但碱性环境亦会影响化合物的稳定性。通过对不同 pH 环境下尿酸的溶解性和稳定性考察（如图 1 所示），结果表明：尿酸在 ≥ 2 mM 浓度的 KOH 水溶液中溶解度较高 (>1 mg/mL)，当 KOH 浓度 >100 mM 时，尿酸稳定性将骤降。

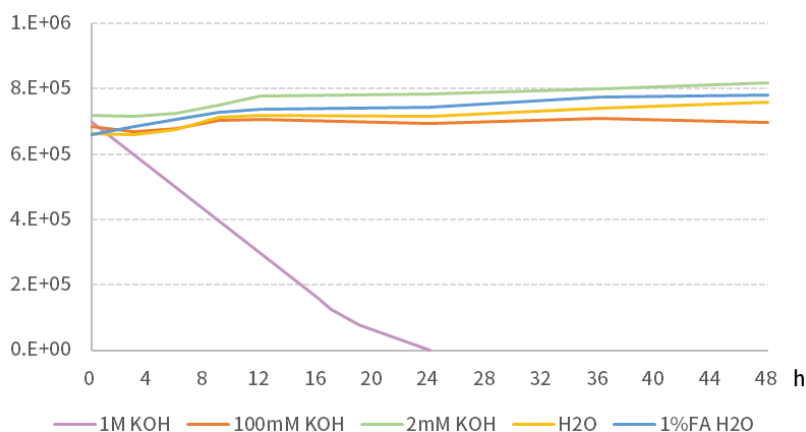


图 1 尿酸在不同 pH 环境的水溶液中稳定性

③基于②中实验结果，使用 20 mM KOH 水溶液配制终浓度分别为 5 mg/mL (UA)、1 mg/mL (UA-15N2) 的储备液并于 -20°C 保存备用；

(2) 内标萃取液：分别移取内标储备液于 50 mL 容量瓶中，加入甲醇溶液定容得到内标萃取液 (Cr-d3: 50 μg/mL, UA-15N2: 25 μg/mL)；

(3) 校准品：分别移取标准品储备液于 2 mL 容量瓶中，加入纯水定容得到 7 个浓度的校准品，浓度详情如表 4 所示；

(4) 质控品：以正常人尿液样本作为本底质控 (BASIC)，分别移取标准品储备液添加至正常人尿液样本中得到 2 个浓度的尿液基质质控品 (QC1 和 QC2)，浓度详情如表 4 所示。

表 4 校准品 & 质控品浓度信息

#	名称	校准品 (μg/mL)							质控品 (μg/mL)		
		STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	BASIC	QC1	QC2
1	肌酐	20	30	100	200	1000	2000	3000	X	X+30	0.90•X+500
2	尿酸	10	30	50	100	500	1000	3000	X	X+30	0.94•X+300

*X 表示正常人尿液本底浓度

1.3.3 样本前处理

- (1) 移取 30 μL 校准品 / 质控品 / 待测尿液样本于 1.5 mL 离心管；
- (2) 加入 300 μL 内标萃取液于 2000 rpm 涡旋混合 1 min；
- (3) 10000 rpm 4°C 离心 5 min；
- (4) 取 50 μL 上清于进样小瓶并加入 250 μL 1% 甲酸水混匀；
- (5) 上机后自动进样器以 2 μL 进样分析。

■ 实验结果

2.1 临床参考区间

表 5 临床参考区间

#	名称	年龄 / 性别	浓度范围
1	肌酐 (随机尿)	男性	20-320mg / dL
		女性	20-275mg / dL
2	尿酸 (随机尿)	≥ 18 岁	<0.60 mg/mg creatinine.
		<18 岁	<0.594 ~2.378 mg/mg creatinine(95%)
3	尿酸 (24 h 尿)	男性 ≥ 18 岁	200-1,000 mg/24 hours
		女性 ≥ 18 岁	250-750 mg/24 hours

* 数据来源于 SelfDecode 和 MayoClinicLabs

2.2 线性关系

将 7 个标准浓度的校准品按 1.3.3 中前处理条件进行分析测定，以浓度比为横坐标，面积比为纵坐标，内标法制作校准曲线（如图 2 所示），线性相关系数、范围和校准品准确度详情见表 6。

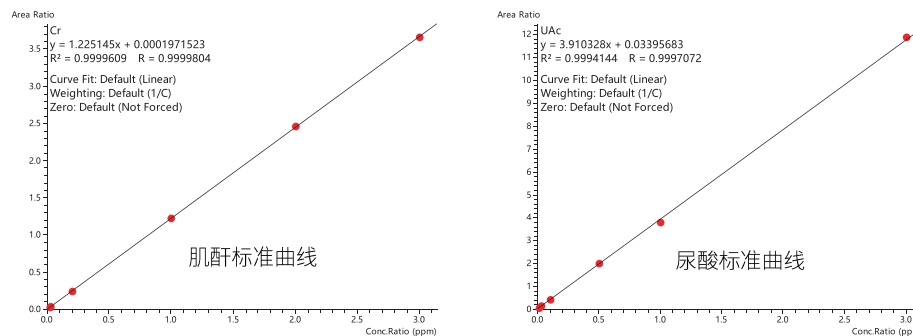


图 2 肌酐和尿酸标准曲线

表 6 标准曲线参数 (1/C 加权)

#	名称	相关系数	范围 (µg/mL)	准确度 (%)
1	肌酐	0.9999	20~3000	98.0~101.1
2	尿酸	0.9994	10~3000	86.4~112.6

2.3 精密度 & 准确度实验

本实验分别对正常人尿液样本 (BASIC) 和尿液基质加标样本 (QC1 和 QC2) 进行 6 次重复测定，结果：肌酐的精密度相对标准偏差为：1.7% (BASIC)、5.0% (QC1)、0.4% (QC 2)，准确度偏差为 3.3% (QC1)、3.3% (QC2)；尿酸的精密度相对标准偏差为：3.7% (BASIC)、2.4% (QC1)、1.6% (QC2)，准确度偏差为 -1.3% (QC1)、2.3% (QC2) 满足临床检测要求，数据结果见附录表 7。

表 7 精密度 & 准确度结果 (n=6)

质控	名称	均值 (µg/mL)	%CV	理论值 (µg/mL)	% 偏差
BASIC	肌酐	196.2	1.7	—	—
	尿酸	122.4	3.7	—	—
QC1	肌酐	233.7	5.0	226.2	3.3
	尿酸	150.4	2.4	152.4	-1.3
QC2	肌酐	699.1	0.4	676.6	3.3
	尿酸	424.8	1.6	415.1	2.3

2.4 正常人尿液样本和尿液加标质控样本色谱图

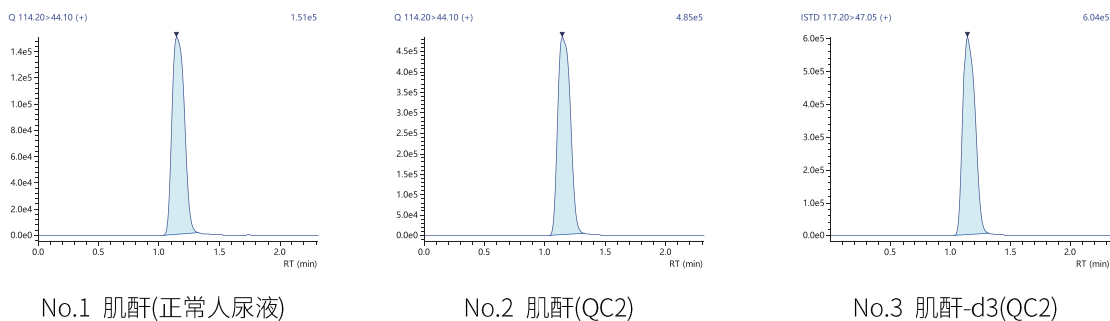


图3 正常人尿液样本和尿液质控样本中肌酐和肌酐-d3 色谱图

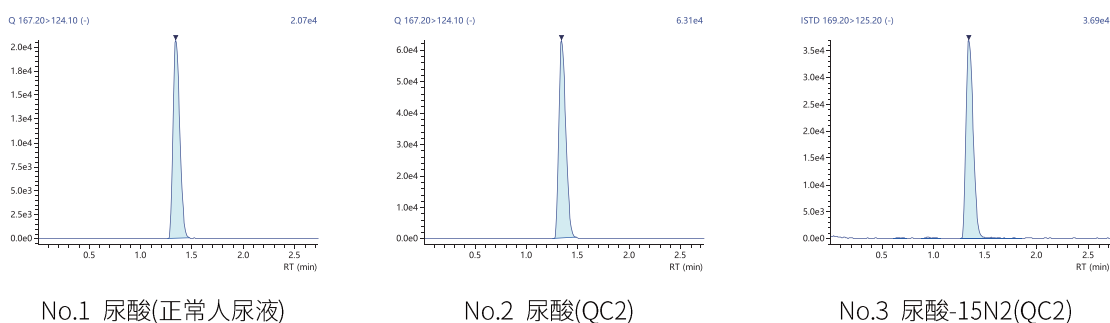


图4 正常人尿液样本和尿液质控样本中尿酸和尿酸-15N2 色谱图

如图3和图4所示,实测正常人尿液样本和尿液加标质控样本中各化合物及同位素内标的色谱图峰形对称,保留时间稳定,无内源性基质干扰,峰面积定量可靠。

■ 结论

建立了一种使用岛津质谱 LCMS-8045CL 测定人尿液中尿酸和肌酐的定量分析方法。利用蛋白沉淀的前处理方法,以内标法建立标准曲线,线性范围涵盖临床参考区间,分别考察了方法的线性、准确度和精密度性能。通过柱后补偿技术调整了柱后流动相酸碱环境,从而加强化合物在负离子模式下的灵敏度和稳定性。结果显示:各分析物线性范围内标准曲线相关系数均大于 0.9994,质控品准确度偏差均在 -1.3%~3.3%,精密度 RSD 均 <5.0%,可满足临床日常检验需求。

■ 参考文献

- [1] Zhang M, Zhu X, Wu J, et al. Prevalence of Hyperuricemia Among Chinese Adults: Findings From Two Nationally Representative Cross-Sectional Surveys in 2015-16 and 2018-19[J]. Front Immunol. 2022 Feb 7;12:791983.
- [2] 谢丽玲,贺盼攀,秦献辉,聂静. 高尿酸血症治疗的研究进展 [J]. 生物医学转化, 2021,2(04):34-40.
- [3] 曹正,李水军,沈敏,程雅婷,马志军,韩连书. 液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证 [J]. 检验医学, 2019,34(03):189-196.
- [4] 张春梅,戴新华,杨屹,齐韬,方向. 高效液相色谱法准确测定血清中的尿酸 [J]. 分析试验室, 2008,(05):84-87.

岛津应用云

