

LCMS-8050 CL 测定人血浆中草酸含量

LCMSMS-482

摘要： 本文使用岛津临床质谱用 LCMS-8050 CL 联用建立了人体血浆中草酸含量测定的方法。考察了方法的线性、准确度、精密度、回收率；结果显示该方法线性范围宽，标准曲线相关系数均大于 0.994，方法准确度及精密度均可满足临床日常检验需求。该方法操作简捷、特异性好、灵敏度高、分析速度快，可以为考察人血浆草酸含量与肾脏疾病相关性的临床研究提供参考。

关键词： LCMS-8050 CL 草酸 血浆

草酸是自然界中最简单的二羧酸，外源性草酸主要来源于绿叶植物如菠菜、芹菜、茶叶等，主要以草酸钙的形式存在于肠道，人体吸收很少；内源性草酸主要来源于维生素 C 和乙醛酸代谢，由于人体不能进一步代谢草酸，如浓度过高，其不能有效从尿液排出，就会导致其在包括肾组织在内的软组织中沉积，从而引发如间质性肾炎、肾结石、肾钙化、关节炎、软骨钙化等各器官验证、纤维化和功能障碍等各种疾病。

血中草酸浓度的测定方法主要有酶分析法、毛细管电泳法、液相色谱法、同位素稀释法等，其中液相色谱法多有报道。草酸极性大、在普通反向柱上无保留；采用 HILIC 模式分析时峰型不佳、血浆基质中杂

质峰干扰、分离度差等问题，亦难以准确定量。另外，草酸在人血浆中含量较低，仅为尿中浓度的 1%，而此次检测的目标基质为肾脏肿瘤患者、肾移植患者血浆（经过血透析），其血浆尿酸含量可能会更低；因此，需建立一种更加灵敏、稳定、准确的草酸含量测定方法。

本实验参考文献报道方法，盐酸酸化血浆后，利用草酸与邻苯二胺反应生成 2,3-二羟基喹啉，再使用 LCMS-8050 CL 进行检测；结果表明 LC-MS/MS 法的专属性好、灵敏度高、重复性好、分析时间短，在 7 min 内即可对血浆中低浓度的草酸含量进行测定，可供合作方临床研究参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津临床质谱 LCMS-8050 CL (国械注进 20182400195)。具体配置为 LC-30AD CL×2 (输液泵)，DGU-20A5R CL (在线脱气机)，SIL-30ACMP CL (自动进样器)，CTO-30A CL (柱温箱)，CBM-20A CL 系统控制器，LCMS-8050 CL 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.95 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：InertSustain- C18 HP 100 mm×3.0 mm I.D., 3 μm.

(P/N: 227-31012-05; 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液；B 相 - 甲醇

流速：0.4 mL/min

柱温：40°C

进样量：1 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	泵	B.Conc	5
3.00	柱温箱	CTO.RVR	1
3.50	泵	B.Conc	95
4.50	柱温箱	CTO.RVR	0
5.00	泵	B.Conc	95
5.01	泵	B.Conc	5
7.00	控制器	Stop	

*CTO.RVR 为柱后切换阀, Value 值“0”表示流路连接废液;“1”表示进入质谱。梯度程序中需使用柱后切换阀, 使过量衍生试剂邻苯二胺(此梯度条件下邻苯二胺 RT=1.5min±0.2min) 不进入质谱。

质谱条件:

分析仪器: LCMS-8050 CL

离子源: ESI (+)

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 10.0 L/min

接口温度: 380°C

DL 温度: 260°C

加热模块温度: 450°C

干燥气流速: 10.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q1 Pre Bias (V)
2,3- 二羟基喹啉	163.05*	90.05	-10	-28	-19
	163.05	117.05	-11	-24	-14

* 检测通道为草酸与邻苯二胺衍生产物 -2,3- 二羟基喹啉; 定量离子对为 163.05 > 90.05。

1.3 标准品及样品制备

标准溶液配制: 精密称取草酸, 用 0.1% 盐酸水溶液配制成为系列浓度的工作液备用。具体浓度见表 3。

表 3 工作液浓度信息 (ng/mL)

编号	名称	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7
1	草酸	50	200	400	1000	2000	4000	10000

标准曲线样品前处理方法: 取 95 μL 纯水, 加入 5 μL 草酸工作液、10 μL 浓盐酸; 加入 100 μL 纯水混匀, 12000 rpm 离心 5 min, 取 100 μL 上清液加入 100 μL 邻苯二胺水溶液 (1g/mL), 混匀后于 125°C 衍生 90min; 取出后室温冷却后加入 500 μL 甲醇沉淀, 涡旋 60s 后, 12000 rpm 离心 10 min, 取 300 μL 上清液, 进样 1 μL。

质控样品: 制备方法与标准曲线样品相同, 配制浓度为 5、20、200、1000 ng/mL。

血浆样品前处理方法: 取 100 μL 血浆样本, 加入 10 μL 浓盐酸混匀后, 其余处理步骤同标准曲线样品。

血浆加标回收样品: 取 95 μL 血浆基质 (为 3 组草酸本底值最低的血浆混合基质), 加入 5 μL 草酸工作液, 配制成草酸浓度为 40、200、1000 ng/mL、加入 10 μL 浓盐酸混匀, 其余处理步骤同标准曲线样品。

工作液样品: 95 μL 纯水, 加入 5 μL 草酸工作液、配制成草酸浓度为 40、200、1000 ng/mL, 加入 10 μL 浓盐酸混匀, 其余处理步骤同标准曲线样品。

■ 结果讨论

2.1 MRM 色谱图

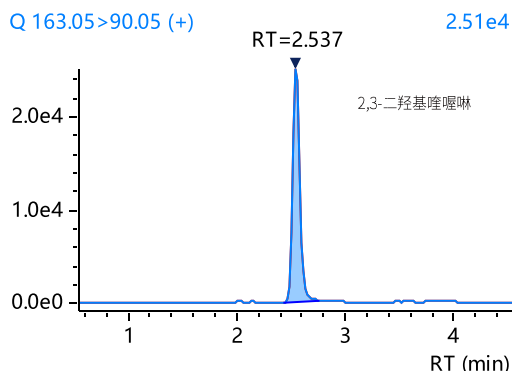


图1 标准曲线 L1 浓度点色谱图 (浓度 5 ng/mL)

2.2 线性测定结果

对标准品按 1.2 中的分析条件进行分析，外标法制作标准曲线。标准曲线结果见表 4，草酸衍生产物 -2,3-二羟基喹啉在标准曲线浓度范围内线性相关系数均大于 0.999，准确度满足 100±15% 以内的要求。

表 4 标准曲线结果

编号	名称	线性方程	线性范围 (ng/mL)	相关系数	准确度 (%)
1	2,3-二羟基喹啉	Y = 5257.96X - 3860.61	5~1000	0.9998	93.6~103.1

2.3 准确度及精密度测定结果

取质控样品，重复进样 6 次，测定，记录峰面积，计算目标物 RSD 及准确度。结果见表 5。

表 5 精密度考察结果 (n=6)

待测物质	样品浓度 (ng/mL)	精密度 RSD%	准确度 Accuracy%
草酸	5	2.06	98.2
	20	1.65	97.2
	200	0.65	101.9
	1000	1.57	98.3

结果各浓度 RSD 在 0.65~2.06 % 之间，准确度在 97.2~101.9% 之间。

2.4 血浆基质加标回收率样品测定结果

按 1.3 项下样品处理和测定方法，考察 3 个浓度血浆基质加标回收率，结果见表 6。

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{血浆加标回收样品峰面积}}{\text{工作液样品峰面积}} \times 100\%$$

表 6 加标回收率考察结果 (n=3)

待测物质 / 加标样品浓度 (ng/mL)	血浆草酸均值 (ng/mL)	加标后理论值 (ng/mL)	加标后实际测定均值 (ng/mL)	RSD%	回收率 %
草酸	40	145.3	137.9	9.58	94.9
	200	105.3	322.1	7.37	105.5
	1000	1105.3	1064.8	2.11	96.3

结果各浓度加标样品回收率在 94.9~105.5 % 之间, RSD 小于 10%。草酸为内源性物质, 加标回收率结果表明在线性范围内, 血浆基质无明显基质效应, 在未获得草酸空白血浆基质的前提下, 采用工作液标准曲线计算血浆样品中的草酸, 其准确度符合要求。

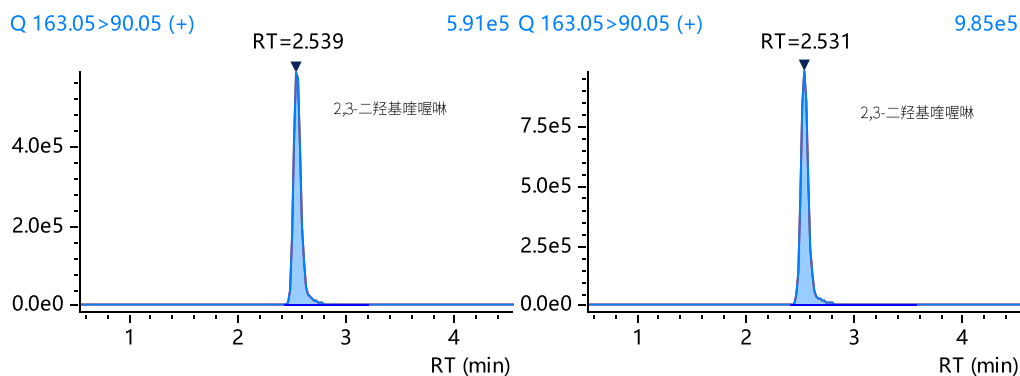


图2 加标回收样品色谱图 (137.9 ng/mL)

图3 临床血浆样品色谱图 (281.1 ng/mL)

■ 结论

使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30A CL 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用建立了人体血浆中草酸含量的测定方法。血浆经盐酸酸化, 可以抑制血浆基质中维生素 C 向草酸转化; 利用草酸与邻苯二胺反应生成 2,3-二羟基喹啉, 其在普通 C 18 色谱柱上即可很好的保留, 且峰型良好; 使用 LCMS-8050 CL 进行检测, 又具有远高于常规方法的灵敏度。鉴于 LC-MS/MS 法的专属性好、灵敏度高、重复性好、分析时间短, 在 7min 内即可对血浆中低浓度的草酸含量进行测定, 因此可供合作方临床研究参考。

岛津应用云

