

# LC-MS/MS法测定尿液中泌尿结石相关标志物

## Determination of biomarkers associated with urinary calculi in urine by LC-MS/MS

刘丹 胡凤梅 黄超 赵祥龙 郭立海

Liu Dan, Hu Fengmei, Huang Chao, Zhao Xianglong, Guo Lihai

SCIEX应用支持中心, 中国

SCIEX, China

### 前言

泌尿结石是泌尿系统的常见病和多发病, 随着全球饮食结构变化, 尿路结石的患病率为1%~15%, 且治疗后易复发, 给患者带来了极大的痛苦, 给家庭带来了沉重的心理和经济负担<sup>[1]</sup>。

24小时尿液代谢评估是目前国内外泌尿外科指南推荐的, 应用于复杂性结石的患者(复发性结石、存在肾内残留结石和具有危险因素的结石患者), 为其提供系统全面代谢评估, 从而制定有效的预防结石复发的方案。24小时尿液评估是指通过收集泌尿结石患者24小时内全部尿液, 检测患者24小时尿液中草酸、枸橼酸、胱氨酸、尿酸、肌酐、钙、磷、钾等关键代谢物的水平。在24小时尿液检测指标中, 草酸、枸橼酸、尿酸、胱氨酸及肌酐是重要的代谢指标。

目前对于尿液中这些指标的检测, 国内外常用方法为离子色谱法和紫外分光光度仪酶法<sup>[2]</sup>。这两种方法或操作复杂, 或重复性不高, 难以对尿液样品中的各项指标进行直接的定量分析。质谱检测被认为是一种更灵敏、更准确的方法, 同时与离子色谱法和酶法相比, 在操作流程中更为简便, 也减少了处理过程中所带来的误差, 因此本研究旨在建立一种液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)方法对尿液中草酸、枸橼酸、尿酸、胱氨酸及肌酐进行直接检测, 分析结石患者尿中的代谢情况, 为开展结石预防及治疗提供新的方法和依据。

## 1 实验部分

### 1.1 尿液样品前处理

**样品采集:** 使用集尿容器收集患者24 h尿。尽量保证样本存放低温环境。

**样品处理:** 20  $\mu$ L尿液样本, 加入内标, 加入稀释溶液, 震荡离心后上样。

### 1.2 色谱条件

色谱柱为C18。流动相采用0.5 mM氯化铵水溶液和乙腈, 柱温设定为40°C。进样量为1  $\mu$ L。洗脱梯度见表1。

表1. 洗脱梯度

时间 (min)	流速(mL/min)	B(%)
0.00	0.3	3
3.00	0.3	8
3.10	0.3	85
3.70	0.3	85
3.80	0.3	3
5.00	0.3	3

### 1.3 质谱条件

采用电喷雾离子源(Electrospray Ionization, ESI)和多反应监测(Multiple Reaction Monitoring, MRM)模式进行质谱扫描。离子源参数: 加热气(GS1)和辅助加热气(GS2)分别为55 psi和50 psi, 脱溶剂气温度为550°C; 气帘气(Curtain Gas, CUR)为35 psi, 碰撞气(Collision Gas, CAD)为9; 喷雾针(Ionspray, IS)电压为+5500 V/-4500。为了获取较好的稳定性和灵敏度, 各化合物监测离子对的去簇电压(Declustering Potential, DP)和碰撞电压(Collision Energy, CE), 目标物离子对以及内标物离子对等参数均经过系统优化, 离子对信息见表2。

表2. 待测组分和内标物质的质谱参数

名称	Q1	Q3	ID	DP/V	CE/V
肌酐	114	86	CR-1	69	15
	114	72	CR-2	69	22
胱氨酸	241.3	152	CYS-1	52	18
	241.3	120	CYS-2	63	22
肌酐内标	117	89	CR-IS	63	32
胱氨酸内标	247.3	155.2	CYS-IS	63	20
柠檬酸	191	111.1	CA-1	-80	-17
	191	87	CA-2	-80	-23
尿酸	167	124	UA-1	-64	-20
	167	96	UA-2	-64	-26
草酸	89	61	OA-1	-18	-11
	89	45	OA-2	-18	-13
柠檬酸内标	195	132	CA-IS	-15	-17
尿酸内标	168.9	124.9	UA-IS	-90	-20
草酸内标	91	62	OA-IS	-18	-12

## 2 结果与讨论

### 2.1 回归方程及线性

在本实验条件下，以PBS为替代基质制作标准工作曲线。各分析物线性范围、相关系数及保留时间结果如下表3所示，各化合物在其线性范围内线性良好，r值大于0.995。

表3. 各分析物线性及相关系数

英文名	线性范围* ( $\mu\text{g/mL}$ )	线性方程	相关系数
肌酐	1-200	$y=0.01841x-6.70147e-4$	0.9997
胱氨酸	0.24-48	$y=0.15837x+0.01714$	0.9991
柠檬酸	1-200	$y=0.01940x+0.01157$	0.9976
尿酸	1-200	$y=0.00763x+0.00768$	0.9965
草酸	1-200	$y=0.05630x+0.07664$	0.9967

\*注：实际线性范围请根据标准品浓度和实际应用进行调整。

### 2.2 样本采集谱图

在本方法条件下，化合物在各自出峰位置峰形对称，响应良好，标准曲线定量下限（LLOQ）样品及实际人尿液样品中各分析物色谱图如图1和2，人尿液样本中出峰位置无干扰，专属性良好。

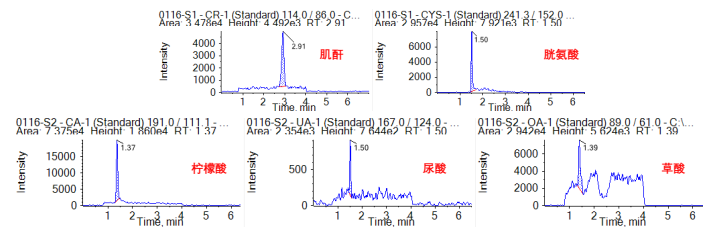


图1. 标准曲线LLOQ样品中各分析物的色谱图

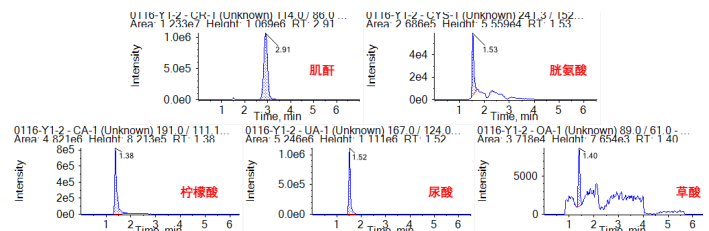


图2. 人尿液样品中各分析物的色谱图

### 2.3 方法性能验证

为了考察方法的重现性及准确性等，分别进行各化合物的精密度、加标回收率的方法验证。

使用尿液样本添加标液的方式制备低、高浓度质控样本，每个浓度平行制备4份，计算精密度RSD%，从表4可以看出，各化合物精密度RSD在1.0%~10.9%以内。

表4. 各分析物精密度RSD

RSD (n=4)	肌酐	胱氨酸	柠檬酸	尿酸	草酸
LQC	1.0%	2.8%	10.9%	6.6%	3.8%
HQC	6.2%	2.4%	5.1%	2.2%	9.0%

取混合来源尿液样本，分为3份，1份用于测定样本浓度，另外2份分别加入低、高2个不同浓度水平的待测溶液，用于测定添加后浓度，根据测定结果，分别计算各化合物的尿液基质中的加标回收率。结果如表5中，各化合物的低、高浓度的加标回收率在91.0%~112.0%之间。

表5. 各分析物加标回收率

加标回收率	肌酐	胱氨酸	柠檬酸	尿酸	草酸
Recovery-L	99.5%	112.0%	102.3%	96.5%	101.2%
Recovery-H	102.7%	95.5%	107.5%	107.1%	91.0%

### 3 总结

本方法是基于SCIEX液相色谱串联质谱系统开发，建立了可对尿液中草酸、枸橼酸、尿酸、胱氨酸及肌酐进行准确性定量检测的液相色谱串联质谱方法。样本前处理采用直接稀释法，前处理简单，不需要衍生且尿样用量少，可快速、特异的检测尿液中草酸、枸橼酸、尿酸、胱氨酸及肌酐的含量，为分析结石患者尿中的代谢情况，开展结石预防及治疗提供有效的参考和依据。

### 参考文献

- [1] Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, et al. 坎贝尔-沃尔什泌尿外科学[M]. 郭应禄, 周利群, 主译. 北京: 北京大学医学出版社, 2009: 1440.
- [2] Scales CD Jr, Smith AC, Hanley JM, et al. Prevalence of kidney stones in the United States[J]. Eur Urol, 2012, 62(1): 160-165. DOI: 10.1016/j.eururo.2012.03.052.

仅限专业展会等使用、仅向专业人士提供的内部资料

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-28047-A



#### SCIEX中国

北京分公司  
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院  
1号楼5层  
电话: 010-5808-1388  
传真: 010-5808-1390  
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心  
上海市长宁区福泉北路518号  
1座502室  
电话: 021-2419-7201  
传真: 021-2419-7333  
官网: [sciex.com.cn](http://sciex.com.cn)

广州办公室  
广州国际生物岛星岛环北路1号  
B2栋501、502单元  
电话: 020-8842-4017

官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)