

SCIEX液相色谱串联质谱系统检测尿液中粘多糖

Determination of GAGs in Urine by SCIEX LC-MS/MS System

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

Key words: Determination; MPS; GAGs; Urine; LC-MS/MS

引言

粘多糖贮积症 (MPS) 是一种罕见的遗传代谢性疾病。由于身体溶酶体内缺乏能分解粘多糖的酶, 导致粘多糖在体内不断累积, 在各种组织内沉积而影响细胞的正常功能, 破坏身体多个器官, 比如骨骼的病变, 还可累及中枢神经系统、心血管系统以及肝、脾、关节、肌腱、皮肤等。MPS是多系统进行性疾病, 早期诊断、早期治疗极其重要^[1]。

糖胺多糖 (Glycosaminoglycans, GAGs), 又称为粘多糖, 是一种长链复合糖分子, 广泛存在于人体细胞中, 是分子量在50~140 kDa之间的大分子物质。粘多糖是一个大家族, 它们参与许多细胞、生理以及病理进程。GAGs根据其单糖组成、连接方式、数量等差异, 可分为硫酸软骨素(Chondroitin sulfate, CS)、硫酸皮肤素(Dermatan sulfate, DS)、硫酸乙酰肝素(Heparan sulfate, HS)等。

MPS患者体内无法完全降解的GAGs沉积于溶酶体及各组织器官内, 并通过尿液排出。所以对于MPS的诊断, 尿液中显著升高的GAGs的分析有很重要的参考意义。对于尿液GAGs筛查, 通常使用1,9-二甲基蓝反应进行比色检测, 这种方法廉价简单, 但缺乏特异性和敏感性, 经常出现假阴性假阳性的结果^[2]。质谱有高特异性和高灵敏度的特性, 可以很好的满足GAGs检测的高特异性和敏感性的要求。

基于SCIEX质谱平台, 我们开发了定量尿液样本中GAGs的稳定可靠的检测方法。由于GAGs属于高分子量的化合物, 我们采用了化学方法, 利用甲醇降解GAGs产生小片段的二聚体产物, 然后分析所得的二聚体产物(如图1所示, 以CS醇解过程为例)。同时, 采用同位素标记内标物, 提高了定量准确度和精密度。该方法能够准确定量检测尿液样本中的CS、DS和HS。

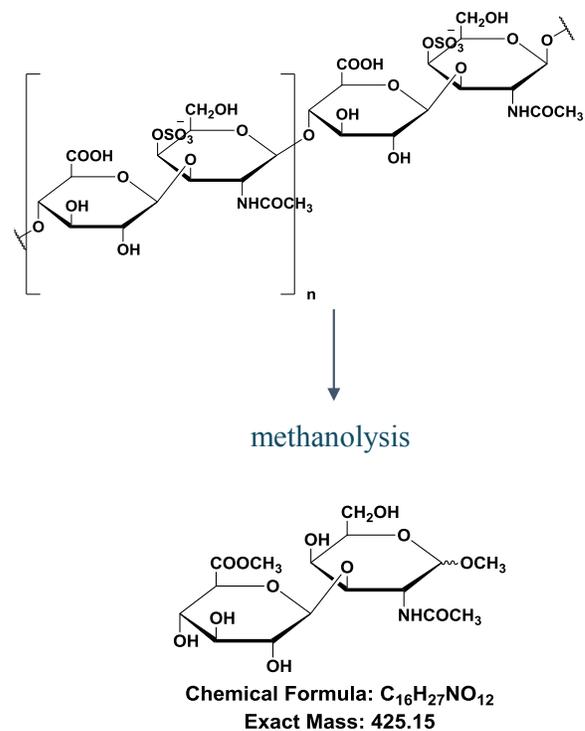


图1. CS的甲醇醇解过程示意图

实验部分

1. 前处理方法

取20 μ L标准溶液或尿液样本于小瓶中, 加入甲醇涡旋混匀, 至氮气流下吹干;吹干后小瓶中添加10 μ L的保护剂, 再快速加入盐酸甲醇溶液, 盖上密封瓶盖, 涡旋混匀, 放入加热箱中反应75 min。待反应完成后取出小瓶, 氮气流吹干后加入内标复溶, 涡旋混匀, 过滤之后进样分析。

2. 色谱方法

色谱柱使用Kinetex C8 色谱柱进行分离，流动相选用水缓冲溶液和甲醇缓冲溶液，柱温设为40℃，进样量为1 μL；进行梯度洗脱，液相梯度见表1。

表1. 洗脱梯度

时间 (min)	Flow	B(%)
0	0.25	5
1.4	0.25	10
2.9	0.25	13
3.1	0.25	95
3.9	0.25	95
4.0	0.25	5
5.0	0.25	5

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) 为50 psi, 辅助加热气 (GS2) 为50 psi, 脱溶剂气温度为500℃, 气帘气 (Curtain Gas, CUR) 为30 psi, 碰撞气 (Collision Gas, CAD) 为7。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), 目标物定量离子对、定性离子对以及内标物监测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

Q1	Q3	Dwell time	Name	DP/V	CE/V
426	236.1	65	CS-1	84	25
426	394.1	65	CS-2	84	15
426.1	236	65	DS-1	83	13
426.1	204	65	DS-2	83	22
384.2	161.9	65	HS-1	100	25
432.1	239	65	CS-d6	83	22
432	239	65	DS-d6	83	13
390.2	161.9	65	HS-d6	100	25

结果

标准曲线样本中CS/DS/HS的色谱图如图2, 峰形良好, 出峰位置无干扰, 专属性良好。其中CS与DS作为一组同分异构体, 保留时间完全分离, 避免彼此干扰相互影响。实际尿液样本经过前处理后的样品色谱图如图3, 样本中无特殊干扰。

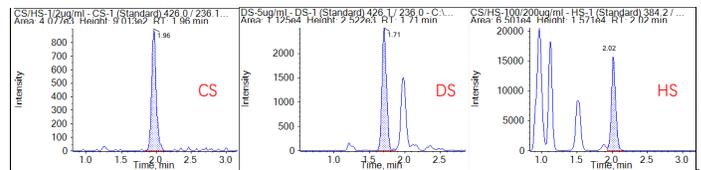


图2. 标准曲线样本中3种粘多糖色谱图

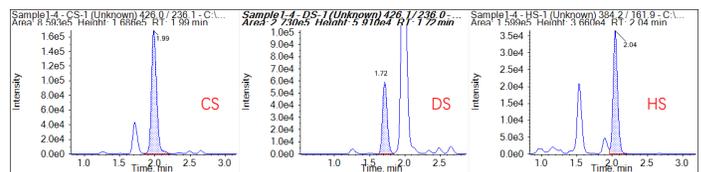


图3. 尿液样本中3种粘多糖色谱图

CS/DS/HS三种粘多糖回归方程和线性范围见表3, 其在各自相应的浓度范围内线性良好, r均大于0.995。

表3. 三种粘多糖线性

化合物名称	回归方程	相关系数 (r)	线性范围
CS	y=0.01354x-0.00235	r=0.99668	1~250 μg/mL
DS	y=0.06236x-0.00645	r=0.99885	2~500 μg/mL
HS	y=0.03478x+0.00011	r=0.99526	2~500 μg/mL

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CS、DS及HS的精密度、加标回收率以及基质效应进行了方法验证。

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3份, 连续测定2批次, 计算批间精密度, 从表4可以看出, CS精密度 (CV) 在1.9~2.8%以内, DS精密度 (CV) 在4.3~6.7%以内, HS精密度 (CV) 在5.1~10.4%以内。

表4. 3种粘多糖化合物的精密度结果

	CS (n=6)		DS (n=6)		HS (n=6)	
	mean (µg/mL)	cv	mean (µg/mL)	cv	mean (µg/mL)	cv
LQC	4.35	2.8%	6.39	6.7%	5.91	10.4%
HQC	48.01	1.9%	48.33	4.3%	50.70	5.1%

选择3个不同来源尿液样本，进行低、高浓度水平的添加以及基质混合实验，以考察加标回收率及基质效应。结果如表5中，CS的低、高浓度的加标回收率在92.1%~97.4%之间，DS的低、高浓度的加标回收率在96.7%~97.7%之间，HS的低、高浓度的加标回收率在92.0%~109.5%之间。如表5所示，CS/DS及HS3种粘多糖化合物在低、高浓度水平下的基质效应在91.4%~110.8%之间。

表5. 3种粘多糖化合物的加标回收率及基质效应结果

		CS	DS	HS
加标回收率	Sample+CS/DS/HS-L	92.1%	97.7%	109.5%
	Sample+CS/DS/HS-H	97.4%	96.7%	92.0%
基质效应	ME-CS/DS/HS-L	91.4%	108.9%	108.7%
	ME-CS/DS/HS-H	106.6%	110.8%	97.1%

总结

本方法使用SCIEX 高灵敏度和高稳定性的三重四极杆质谱系统。实现了同时检测人尿液样本中三种粘多糖CS/DS/HS的浓度。本方法前处理采用甲醇醇解粘多糖的方式，降解为二聚体产物，

采用ESI+电喷雾离子源和MRM多反应监测模式对二聚体产物进行快速的定性和定量分析。CS及DS作为一组异构体，实现了良好的色谱分离，与HS之间也无互相干扰及影响。三种粘多糖在各自的测定范围内线性良好，并进行了方法学验证的考察，满足方法学要求。该方法对于MPS的筛查定量，以及分型鉴定有重要的参考意义。

参考文献

1. H.Z. Zhang, S.P. Young, D.S. Millington, Quantification of Glycosaminoglycans in Urine by Isotope-Dilution Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 2013,76:17.12.1-17.12.14.
2. C.K. Chuang, S.P. Lin, S.F. Chung, Diagnostic Screening for Mucopolysaccharidoses by the Dimethylmethylene Blue Method and Two Dimensional Electrophoresis, *Chinese. Med. J (Taipei)* 2001, 64:15-22.

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. RUO-MKT-02-15463-ZH-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

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)