

SCIEX液相色谱串联质谱法同时测定人血清中三甲胺和三甲胺-N-氧化物

Quantification of TMA and TMAO in Human Serum by SCIEX Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

胡凤梅, 刘丹, 黄超

Hu Fengmei, Liu Dan, Huang Chao

Keywords: TMA; TMAO; Trimethylamine; Trimethylamine oxide; Derivatization; LC-MS/MS

引言

在人体肠道中, 膳食胆碱和甜菜碱可被微生物代谢为三甲胺 (TMA), 当 TMA 被肝脏吸收时, 它可以被肝脏中的黄素单加氧酶 (FMOs) 快速氧化为无味的三甲胺-N-氧化物 (TMAO)。据报道, 三甲胺 (TMA) 及三甲胺-N-氧化物 (TMAO) 与肾功能密切相关, 并与普通人群和慢性肾病 (CKD) 患者的心血管事件增加密切相关。

液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS) 以其卓越的特异性, 极高的检测灵敏度和高通量样本测定等优点, 受到广大检测人员的青睐。但是TMA在体内含量较低, 直接检测, 灵敏度无法满足检测要求, 本实验中采用衍生化法来检测TMA和TMAO。

本方法基于SCIEX液相色谱串联质谱系统, 采用同位素内标校正法, 建立了衍生化方法, 一次分析, 同时准确检测血清中三甲胺和三甲胺-N-氧化物的定量方法。本实验采用衍生化同时蛋白沉淀法进行样品前处理, 步骤较简单, 实验耗时较短, 可以满足临床检测样品的需求。检测化合物相关信息如下。

表1 待测化合物信息列表

中文名	英文名	缩写	CAS编号	分子式
三甲胺	Trimethylamine	TMA	75-50-3	C ₃ H ₉ N
三甲胺-N-氧化物	Trimethylamine oxide	TMAO	1184-78-7	C ₃ H ₉ NO

实验部分

样品前处理

本实验采用衍生化的同时对血浆进行蛋白沉淀的方法进行处理, 步骤如下:

取一定体积的血清样品, 依次加入同位素内标溶液、含tert-butyl bromoacetate (TBA) 的乙腈溶液和氨水, 涡流混匀后室温孵育30 min, 然后补加含甲酸的乙腈溶液, 涡流混匀后, 室温下进行离心, 取上清液加入超纯水进行稀释后进样分析。

色谱条件

色谱柱: Kinetex F5, 100 × 2.1mm, 2.6 μm;

流动相: A相为含0.1%甲酸的10 mM甲酸铵水溶液, B相为含0.1%甲酸的10 mM甲酸铵的90%乙腈-水溶液;

流速: 0.5 mL/min;

柱温: 40 °C;

进样体积: 3.00 μL。

洗脱方式: 梯度洗脱, 见表2;

质谱条件

质谱平台: AB SCIEX Triple Quad™ 4500MD

电离方式: 电喷雾离子源, 正离子模式;

表2. 液相梯度洗脱条件

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	75	25
1.0	75	25
2.0	10	90
3.7	10	90
3.8	75	25
5.0	75	25

检测方式: 多反应监测 (MRM);

离子源温度 (TEM): 450°C; 雾化气 (Gas1): 50 psi;

辅助气 (Gas2): 50 psi; 气帘气 (Gurtain Gas): 30psi;

电喷雾电压: 5500V;

对应MRM通道及参数见表3。

表3. 待测组分和内标物质的质谱参数 (正离子模式)

中文名	英文名	Q1	Q3	DP	CE
三甲胺 (衍生后)	Trimethylamine	174.3	118.1*	45	20
		174.3	59.2	45	30
三甲胺-N-氧化物	Trimethylamine oxide	76.0	58.1*	35	40
		76.0	59.2	35	30
三甲胺-d9 (衍生后)	Trimethylamine-d9	183.1	127.2	45	20
三甲胺-N-氧化物-d9	Trimethylamine oxide-d9	85.0	66.0	35	28

*为定量离子对

表4. TMA和TMAO的标准曲线

化合物	斜率	截距	r ²	LLOQ ng/mL	ULOQ ng/mL	拟合方程
TMA	0.05550	4.63e-4	0.9990	0.500	100	y=0.05550x+4.63e-4
TMAO	0.17806	0.08525	0.9965	5.00	1000	y=0.17806x+0.08525

结果与讨论

三甲胺和三甲胺-N-氧化物在各自出峰位置峰形对称, 响应良好。在本方法条件下, 两种化合物不存在互相干扰。典型液相色谱图如图1 (TMA浓度为10.00 ng/mL; TMAO浓度为100.0 ng/mL)。

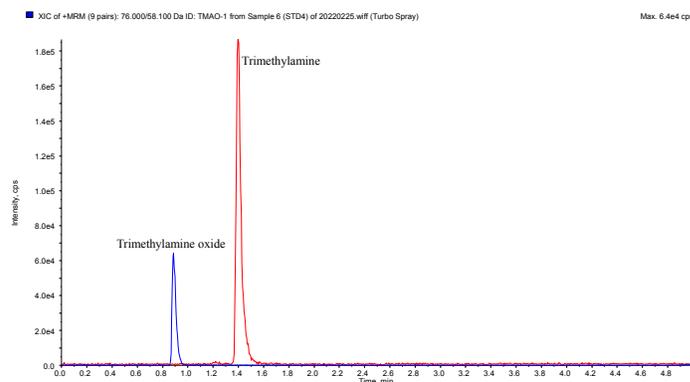


图1. TMA和TMAO典型液相色谱图

标准曲线

以水为替代基质, 配制标准工作曲线。各待测物在各自的曲线范围内线性良好, $r^2 > 0.99$, 符合生物样本检测的通用要求。具体结果见表4。

加标回收率

向实际血清样本中分别添加低、中、高三个浓度的混标溶液, 得到低、中、高三个添加浓度的加标样品。数据表明TMA和TMAO两个化合物血清的平均回收率均在85%~115%范围内, 符合生物样本检测要求。具体结果见表5。

表5. TMA和TMAO的平均加标回收率

TMA			TMAO		
加标1	加标2	加标3	加标1	加标2	加标3
107.33%	99.79%	114.77%	96.74%	95.5%	98.86%

总结

本实验在SCIEX液质联用平台上，实现了三甲胺（TMA）和三甲胺-N-氧化物（TMAO）同时检测。采用衍生化同时蛋白沉淀法对样本进行前处理，并加入同位素内标进行校准，对血清中三甲胺（TMA）和三甲胺-N-氧化物（TMAO）进行定量。方法线性良好，加标回收率、精密度准确度均满足相关文件要求。可用于临床实际样本的检测。

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. 或在英国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14655-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：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：SCIEX-China