



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102662013 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 12

(21) 申请号 201210154590. 4

(22) 申请日 2012. 05. 18

(71) 申请人 上海市徐汇区中心医院

地址 200031 上海市徐汇区淮海中路 966 号

(72) 发明人 李水军 余琛 周菊珍 邴俊生
朱建民 贾晶莹 刘罡一 张梦琪
茅晓寅

(74) 专利代理机构 上海申汇专利代理有限公司
31001

代理人 俞宗耀 俞昉

(51) Int. Cl.

G01N 30/02 (2006. 01)

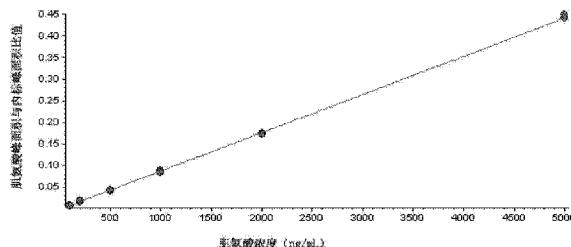
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种尿样中肌氨酸的定量检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种尿样中肌氨酸的定量检测方法,属化学定量分析领域,其步骤依次为:(1)用有机溶剂乙腈对尿样进行稀释处理,加入内标工作液肌氨酸-d₃,混旋离心,弃沉淀,吸取上清液与乙腈混合,供分析测试;(2)以硅胶键合相填料为分析柱,流动相乙腈水溶液中加入甲酸和甲酸铵作为改性剂,使肌氨酸与其他干扰物质色谱分离;(3)采用电喷雾离子化串联质谱仪,在正离子检测模式下,检测肌氨酸;(4)结果计算:以获得的峰面积或峰高度,按同位素稀释内标法计算肌氨酸在尿样中的含量。本发明方法的特异性、灵敏度和准确性高,且成本低廉、简单快速,适用于临床上低成本、大批量尿样中肌氨酸定量检测的要求。



1. 一种尿样中肌氨酸的定量检测方法,其特征在于:

(1)尿样乙腈稀释:随机取 100 μ L 尿样,加入 20 μ L 浓度为 50 μ g/mL 肌氨酸-d3 内标工作液,加入 200 μ L 乙腈,混旋 30s,15000 rpm 离心 3 min,弃沉淀,吸取 100 μ L 上清液与 300 μ L 乙腈混合,转移至进样瓶,供分析测试;

(2)色谱分离:以硅胶键合相填料为分析柱,以水溶液为流动相 A,乙腈溶液为流动相 B,所述 A 相中含有 0.02 ~ 0.4% 甲酸和 1 ~ 5mmol/L 甲酸铵作为改性剂,流速为 0.1 ~ 1 mL/min,等度洗脱或者梯度洗脱,将肌氨酸从分析柱上洗脱;

(3)质谱检测:采用电喷雾离子源串联质谱仪,在正离子检测模式下,多反应监测扫描分析,检测肌氨酸;

(4)结果计算:以质谱检测获得的肌氨酸峰面积或峰高度,按同位素稀释内标法计算肌氨酸在尿样中的含量。

2. 根据权利要求 1 所述尿样中肌氨酸的定量检测方法,其特征在于:所述步骤(3)质谱检测离子源参数设置为肌氨酸检测通道 m/z 90/44,肌氨酸-d3 检测通道 m/z 93/47,离子通道范围为 ± 0.5 m/z。

一种尿样中肌氨酸的定量检测方法

技术领域

[0001] 本发明属化学定量分析技术领域,具体涉及一种肌氨酸的定量检测方法,尤其涉及一种尿样中肌氨酸的定量检测方法。

背景技术

[0002] 目前前列腺癌的筛查诊断方法主要包括血清前列腺特异抗原测定(PSA)、直肠指检、经直肠超声检查、前列腺组织穿刺活检等。PSA 筛查被认为是预测前列腺癌最好的指标,并在临床上广泛应用。但其特异性有限,有些前列腺增生和前列腺炎患者 PSA 也会升高,误诊情况时有发生。前列腺系统性穿刺活检是诊断前列腺癌最可靠的方法,属于侵入性检查,需要在 B 超引导下进行,检查结果严重依赖于穿刺位置的准确性。更为重要的是,已有的诊断方法往往使临床肿瘤医生能轻易地诊断出前列腺癌,却无法判断癌细胞的生物学特性是侵袭性还是非侵袭性,即判断癌症的危险性。而这有可能导致恶性前列腺癌患者丧失了最佳的治疗机会。

[0003] 通过检测生物样本中小分子或者大分子生物标志物是疾病筛查与诊断的有效手段,对于疾病的早期诊断、治疗和预后具有重要的参考价值 and 临床意义。因此无论从解决临床前列腺癌诊治难题的角度出发,还是从提高癌症患者的生存率并降低治疗成本的角度出发,寻找特异性更高的生物标志物,特别是能表征前列腺癌侵袭性的生物标志物,都是临床上亟需解决的问题。

[0004] 肌氨酸是一种存在于人体肌肉和其他组织的天然氨基酸,为甘氨酸的代谢产物。研究表明,肌氨酸在侵袭性前列腺癌中含量显著升高,且可在尿样中检测出来,66 例前列腺癌患者和 200 例正常健康人尿肌氨酸水平分别为 404 ng/mL 和 104 ng/mL,肌氨酸值在前列腺癌病例中明显增加($p < 0.001$)。尿样中肌氨酸及肌氨酸/肌酐比值的受试者工作特征曲线(ROC 曲线)下面积分别为 0.904 和 0.946。提示肌氨酸具有非常高的检验灵敏度和特异性。这使得肌氨酸成为前列腺癌非损伤性诊断的一个候选生物标志物,也有可能成为新的更好的前列腺癌诊断标志物。目前对于肌氨酸的检测,分别采用高效液相色谱法、气相色谱-质谱法和液相色谱-质谱法,主要缺陷是特异性差,难以实现肌氨酸与干扰物质的完全分离,样品的处理方法步骤比较复杂。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种尿样中肌氨酸的定量检测方法,能准确灵敏地定量检测尿样中肌氨酸的含量。

[0006] 为达到上述目的,本发明提供的一种尿样中肌氨酸的定量检测方法,其特征在于:

(1)尿样乙腈稀释:随机取 100 μ L 尿样,加入 20 μ L 浓度为 50 μ g/mL 肌氨酸-d3 内标工作液,加入 200 μ L 乙腈,混旋 30s,15000 rpm 离心 3 min,弃沉淀,吸取 100 μ L 上清液与 300 μ L 乙腈混合,转移至进样瓶,供分析测试;

(2) 色谱分离:以硅胶键合相填料为分析柱,以水溶液为流动相 A,乙腈溶液为流动相 B,所述 A 相中含有 0.02~0.4% 甲酸和 1~5mmol/L 甲酸铵作为改性剂,流速为 0.1~1 mL/min,等度洗脱或者梯度洗脱,将肌氨酸从分析柱上洗脱,与其他干扰物质实现色谱分离;

(3) 质谱检测:采用电喷雾离子源串联质谱仪,在正离子检测模式下,多反应监测扫描分析,检测肌氨酸;

(4) 结果计算:以质谱检测获得的肌氨酸峰面积或峰高度,按同位素稀释内标法计算肌氨酸在尿样中的含量。

[0007] 所述步骤(3)质谱检测离子源参数设置为肌氨酸检测通道 m/z 90/44,肌氨酸-d3 检测通道 m/z 93/47,离子通道范围为 ± 0.5 m/z。

[0008] 本发明定量检测尿样中肌氨酸的含量,属于非损伤性检测方法。采用乙腈稀释处理尿样,以硅胶键合相填料柱为分析柱,流动相添加甲酸和甲酸铵为改性剂,等度洗脱或者梯度洗脱,在正离子模式下,以多反应监测法测定,以肌氨酸质谱检测获得的峰面积或峰高度,按同位素稀释内标法定量检测。本发明能够实现肌氨酸和内源性干扰物完全分离而不相互干扰,肌氨酸的最低定量限可达 100 ng/mL,方法的精密度(以相对标准偏差计)小于 12%,准确度为 87.8%-99.5%。方法的特异性、灵敏度、精密度和准确性较高,且成本低廉、简单快速,适用于临床上低成本、大批量尿样中肌氨酸定量检测的要求。

附图说明

[0009] 图 1 肌氨酸的标准曲线;

以肌氨酸浓度为 X 轴,以肌氨酸与内标峰面积比值为 Y 轴,经过 1/X 权重处理,在浓度 100 ng/mL 至 5000 ng/mL 范围内,线性相关系数为 0.9998。

[0010] 图 2 尿样中肌氨酸的色谱图。

[0011] 图中 1—肌氨酸色谱峰,2—干扰物色谱峰。由图示可见,本发明能够实现肌氨酸 1 和干扰物 2 的完全分离而不相互干扰,具有良好的色谱分辨能力。

具体实施方式

[0012] 下面结合具体实施方式对本发明作进一步阐述,旨在说明本发明涉及的技术方案,揭示本发明的最佳实施例,使本领域技术人员能够理解和实施本发明。但应当理解本发明并不限于公示的实施例,基于本发明的启示,任何显而易见的变换或替代,也应当被认为是落入本发明的保护范围。

[0013] 标准曲线和质控配制:用 20% 乙腈的水溶液配制,肌氨酸标准曲线浓度为 100、200、500、1000、2000、5000 ng/mL。用 20% 乙腈的水溶液配制肌氨酸最低定量浓度(100 ng/mL),低浓度(300 ng/mL),中浓度(1200 ng/mL),高浓度(4000 ng/mL)的质控样品。另随机取 6 份尿样,作为方法检测的实际尿液样品。

[0014] 实施例中各物料的浓度除特别注明的以外,均为体积百分浓度。

[0015] 实施例 1

检测尿样中肌氨酸浓度。

[0016] (1)尿样乙腈稀释:随机取 100 μ L 尿样,加入 20 μ L 浓度为 50 μ g/mL 肌氨酸-d3 内标工作液,加入 200 μ L 乙腈,混旋 30s,15000 rpm 离心 3 min,弃沉淀,吸取 100 μ L 上

清液与 300 μ L 乙腈混合,转移至进样瓶,供分析测试。

[0017] (2) 色谱分离:以硅胶键合相填料柱 (2.1 \times 100mm,5 μ m,Hypersil,Thermo) 为分析柱;流动相 A 为含 0.02% 甲酸和 1mmol/L 甲酸铵的水溶液,流动相 B 为乙腈,流动相 A : 流动相 B 的体积比为 60% : 40%,流速为 0.3mL/min,等度洗脱,进样量 5 μ L,将肌氨酸从分析柱上洗脱。

[0018] (3) 质谱检测:采用电喷雾离子源串联质谱仪(API 4000,美国 AB Sciex 公司),在正离子检测模式下,多反应监测扫描分析,肌氨酸检测通道 90/44 (\pm 0.5 m/z),肌氨酸 -d3 检测通道 93/47 (\pm 0.5 m/z)。离子源参数设置为:离子化电压:5000V;离子化温度:550 $^{\circ}$ C;喷雾气:60 psi;加热气:60 psi;气帘气:25 psi;碰撞气:中等;去簇电压:21 V;入口电压:4 V;碰撞能:20 V;出口电压:6 V。

[0019] (4) 结果计算方法为,以质谱检测获得的肌氨酸峰面积,与标准曲线比较,按内标法计算尿样中肌氨酸的含量。建立肌氨酸的标准曲线,以肌氨酸浓度为 X 轴,以肌氨酸与内标峰面积比值为 Y 轴,经过 1/X 权重处理,在浓度 100 ng/mL 至 5000 ng/mL 范围内,线性相关系数为 0.9998 (图 1)。说明本发明提供的尿样中肌氨酸的检测方法线性关系良好。

[0020] 质控样品中肌氨酸的检测精密度(以相对标准偏差计)为 3.68%~10.5%,准确度为 92.6%~103.5%,说明本发明具有精密准确的定量能力。

[0021] 随机取 6 份尿样,编号为 1、2、3、4、5、6,经过标准曲线计算,尿肌氨酸浓度分别为 136、147、150、215、246、107 ng/mL,说明本发明能实现尿样中肌氨酸的测定。尿样中肌氨酸的色谱图见图 2,图中,1 为尿样中的肌氨酸的色谱峰,2 为干扰物的色谱峰。肌氨酸的色谱保留时间为 5.88 min。由图 2 所示可见,本发明具有良好的色谱分辨能力,能实现肌氨酸 1 和干扰物 2 的完全分离而不相互干扰。

[0022] 实施例 2

流动相 A 改为含改性剂 0.1% 甲酸和 1mmol/L 甲酸铵的水溶液,流动相 B 为乙腈,流动相 A : 流动相 B 的体积比为 60% : 40%,等度洗脱,流速改为 0.1mL/min,进样量 5 μ L,其它同实施例 1 操作,同样测定 6 份尿样中肌氨酸浓度,分别为 127、135、142、218、250、112 ng/mL,与实施例 1 测定结果接近,说明采用本实施例的流动相组合,同样能实现肌氨酸的准确测定。

[0023] 实施例 3

采用硅胶键合相填料柱 (4.6 \times 150mm,5 μ m,Hypersil,Thermo) 为分析柱,流动相 A 改为含改性剂 0.4% 甲酸和 5 mmol/L 甲酸铵的水溶液,流动相 B 为乙腈,流动相 A : 流动相 B 的体积比为 60% : 40%,等度洗脱,流速改为 1.0 mL/min,进样量 10 μ L。采用峰高法计算,其它同实施例 1 操作,同样测定 6 份尿样中肌氨酸浓度,分别为 141、152、158、223、248、115 ng/mL,与实施例 1 测定结果接近,说明采用本实施例的流动相组合,同样能实现肌氨酸的准确测定。

[0024] 实施例 4

将实施例 1 中流动相 A 改为含改性剂 0.2% 甲酸和 5mmol/L 甲酸铵的水溶液,流动相 B 为乙腈,梯度洗脱。洗脱程序为:0~1 min,流动相 B 体积占总体积的 30%;1~2min,流动相 B 占 70%;2~3min,流动相 B 占 90%;3~6min,流动相 B 又改为占 30%。流速 0.3mL/min,进样量 5 μ L,其它同实施例 1 操作,同样测定 6 份尿样中肌氨酸浓度,分别为 133、142、

147、210、241、109 ng/mL,与实施例1测定结果接近,说明采用本实施例的流动相组合,同样能够实现肌氨酸的准确测定。

[0025] 实施例 5

对尿样中肌氨酸测定方法进行方法学验证。尿样中肌氨酸的批内精密度(以相对标准偏差计)小于12%,准确度为87.8%~99.5%。批间精密度(以相对标准偏差计)小于10%,准确度为91.4%~97.4%。稳定性试验结果表明,经预处理后的待测尿样在自动进样器中(4℃)放置48小时,尿样室温放置24小时、经过3次冻融都保持稳定、尿样-20℃冻存49天,均保持稳定。

[0026] 1. 标准曲线和定量范围

按实施例1方法配制肌氨酸标准曲线,分3批次,每个浓度配制平行样2次,进样分析。以肌氨酸浓度为x轴,肌氨酸与内标峰面积之比为Y轴,进行线性回归,建立回归方程。由图1结果可见,肌氨酸具有良好的线性相关性。本法肌氨酸的最低定量限为100 ng/mL。

[0027] 2. 准确度与精密度

按实施例1方法配制肌氨酸的质控样品。每种浓度配制6份,在同一天内按上述样品处理方法及检测分析条件进行处理和分析,计算批内精密度和准确度。按上述方法,分3天配制3批样品处理和分析,计算批间精密度和准确度,结果见表1。

表1 肌氨酸准确度和精密度结果(3批次,每批n=6)

添加浓度 (ng/mL)	批内						批间	
	精密度 (%)			准确度 (%)			精密度 (%)	准确度 (%)
	批次1	批次2	批次3	批次1	批次2	批次3		
100	11.2	6.07	10.5	90.7	87.8	95.8	9.80	91.4
300	4.85	2.55	4.65	96.3	92.8	96.6	4.34	95.2
1200	2.86	2.63	2.53	95.8	99.5	97.0	3.00	97.4
4000	1.65	7.38	5.26	96.8	94.1	93.9	5.16	95.0

[0028] 3. 回收率

样品浓度、处理方法和进样条件都同精密度和正确度测定项下,测得的回收率为85.9%~90.5%。

[0029] 4. 稳定性

样品浓度、处理方法和进样条件都同精密度和准确度测定项下,考察自动进样器中48小时、冻融3次、室温放置24小时、-20℃放置49天,稳定性试验结果表明,经预处理后的待测尿样和化学样品的肌氨酸在自动进样器中(4℃)放置48h,尿样室温放置24h、经过3次冻融都保持稳定、尿样-20℃冻存49d,均保持稳定。

[0030] 尿样中肌氨酸的最低定量限为100 ng/mL, 100-5000 ng/mL浓度范围内,线性相关系数大于0.99,准确度在87.8%~99.5%之间,批内、批间精密度均小于12%。本方法可区分样品中结构类似的干扰物,样本经稀释后直接检测,在特异性方面具有明显优势,且试剂成本低廉,适用于临床大量样本的检测要求。

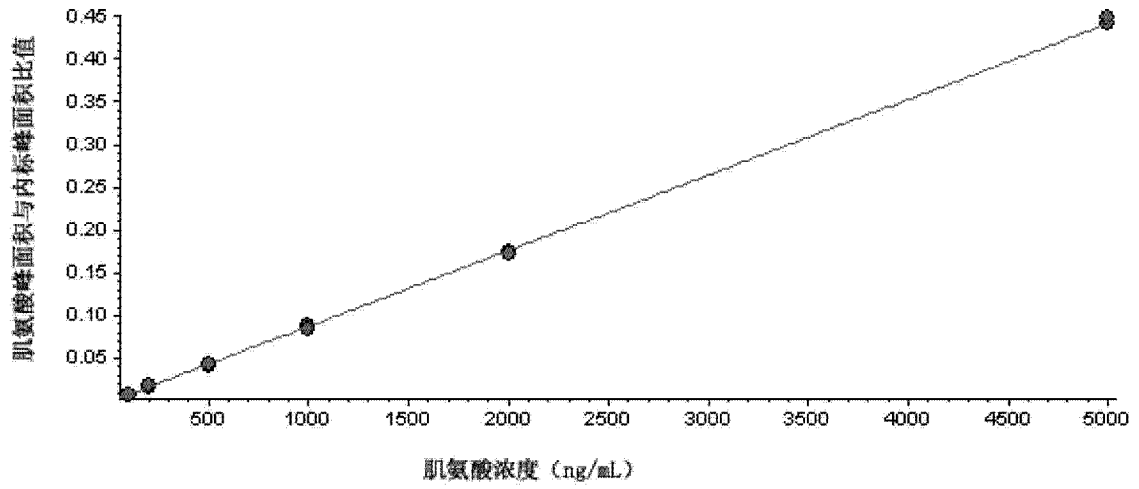


图 1

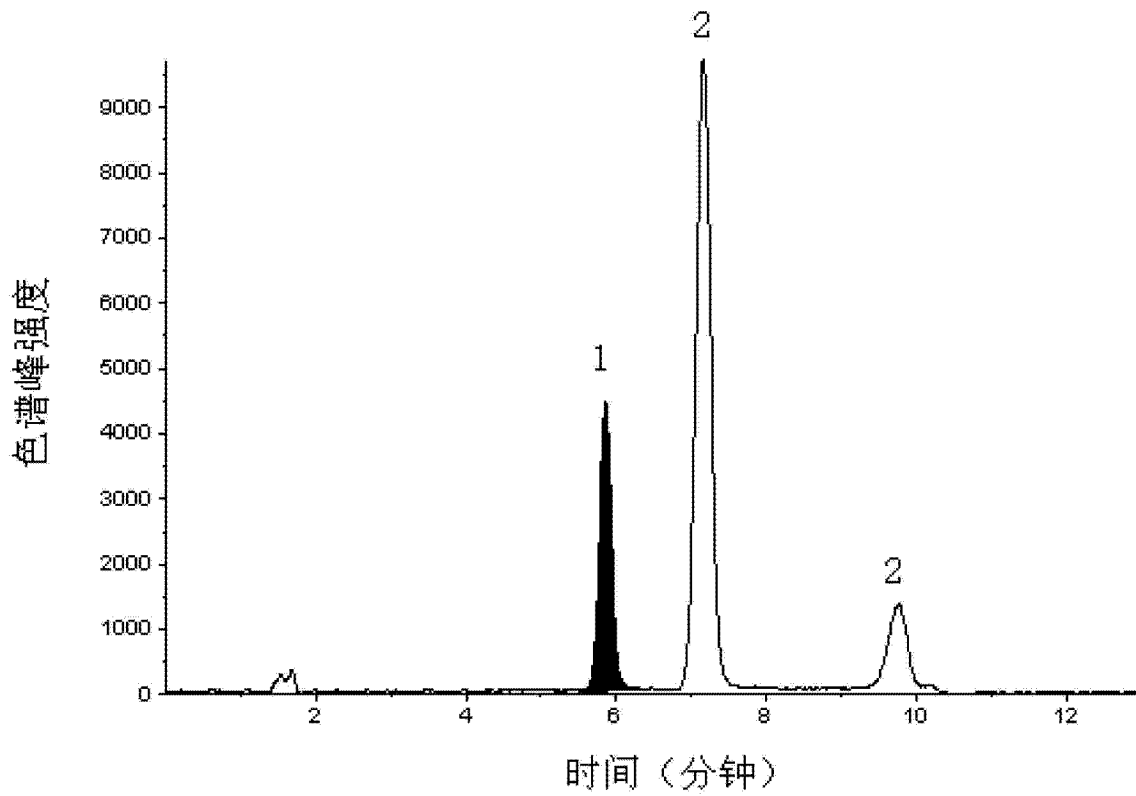


图 2