

利用SCIEX Triple Quad™ 4500 LC-MS/MS系统建立血清中三甲胺和氧化三甲胺同时测定的检测方法

SCIEX Triple Quad™ 4500 LC-MS/MS System on Simultaneously Detection of Trimethylamine and Trimethylamine Oxide in human serum

崔敬文, 张元媛, 李国庆

Cui Jingwen, Zhang Yuanyuan, Li Guoqing

SCIEX应用支持中心, 中国

SCIEX China Clinical BU

Keywords: SCIEX Triple Quad™ 4500; Trimethylamine; Trimethylamine Oxide, Human Specimen

Abstract: Objective: The aim of this work is to develop and validate a rapid, sensitive and accurate method to determine trimethylamine N-oxide (TMAO) and trimethylamine (TMA) in human serum that can reflect the risk of coronary atherosclerotic heart diseases (CAD) using stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Method: The analytes were separated by an ACQUITY UPLC BEH Amide, 2.1 × 100 mm, 1.7 μm and was analyzed via electrospray ionization mass spectrometry. A binary gradient by mixing water and acetonitrile with formic acid and ammonium formate was generated to elute the analytes. Aliquots of 50 μl standard solutions, serum samples and quality controls were mixed with 20 μl internal standards and were extracted with 130 μl acetonitrile: methanol= 85:15. The mix was vortexed and centrifuged (12000 rpm for 10 min) before the supernatant was transferred and analyzed. Result: The chromatographic separation method was controlled within 5 min. The mean linear correlation coefficients were higher than 0.99. The analytical recoveries ranged from 92.0 to 110.9% with an average of 103.4%. The intra-run and total CVs for measurement of these metabolites were 0.84-6.19% and 1.71-8.26% respectively. Conclusion: An isotope dilution LC-MS/MS method for simultaneous measurement of two CAD related metabolites was developed and validated in this work.

引言

动脉粥样硬化性心脏病 (Coronary atherosclerotic heart disease, CAD) 是危害人类健康最严重的疾病, 动脉粥样硬化进展缓慢, 很难逆转, 早期发现其危险因素并进行干预是降低CAD发病率和死亡率的重要手段。临床和流行病学研究表明循环Trimethylamine Oxide (TMAO) 水平的升高与心脑血管疾病如心梗、卒中的发生风险密切相关, TMAO的纳入可提高传统心血管风险模型的预测能力, 同时循环TMAO水平对慢性肾病、外周动脉疾病患者、卒中患者等都有一定的预后价值^{[1], [2]}。meta分析表明TMAO与高血压、糖尿病、肥胖等因子均呈现相关性^[3]。此外, TMAO的非氧化态形式Trimethylamine (TMA) 来源于食物中或者由胆碱、甜菜碱等在肠道中转化而来, TMA在肝脏中经过三甲胺氧化酶的作用转化成TMAO, 同时监测TMA和TMAO的含量可以更精确的帮助判断罹患心血管疾病的风险。

本实验研究旨在建立可测定血清中TMAO水平的简便准确的LC-MS/MS方法, 该方法样品前处理简单, 样本用量少, 色谱分离时间短, 具有良好的精密度和准确性。

实验部分

前处理方法:

向1.5 mL离心管里依次加入50 μL 血浆样本、20 μL内标混合液, 130 μL一定比例的甲醇乙腈混合试剂, 涡旋5秒后, 5,000 r/min离心10 min。取150 μL上清液进行LC-MS/MS分析, 进样量2 μL。

液相条件:

色谱柱: Amide;
流速: 0.4 mL/min;
柱温: 40 °C;
进样量: 2 μL;

时间 (min)	流速 (ml/min)	流动相A (%)	流动相B (%)
起始	0.4	10	90
0.5	0.4	10	90
1.4	0.4	40	60
3.4	0.4	40	60
3.5	0.4	10	90
5.0	0.4	10	90

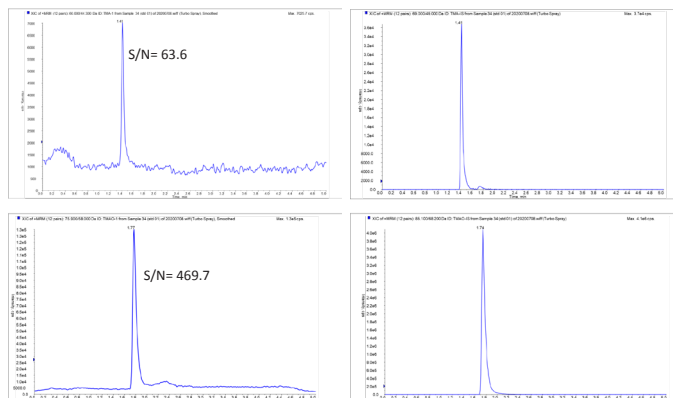


图1. 线性最低点处提取的TMA (左上图, 50 ng/mL) 和TMAO (左下图, 50 ng/mL) 及其内标物 (TMA-右上图, TMAO-右下图) 的离子流图

如图1所示, 在线性最低点处信噪比仍能达到60以上, 充分满足信噪比 ≥ 10 定量限要求。

质谱方法:

使用SCIEX Triple Quad™ 4500MD系统。采用采用电喷雾离子源 (Electrospray Ionization, ESI) 正离子模式和多反应监测 (Multiple Reaction Monitoring, MRM) 模式进行质谱扫描。离子源参数: 加热气 (GS1) 为60 psi, 辅助加热气 (GS2) 为60 psi, 脱溶剂气温度为550°C, 气帘气 (Curtain Gas, CUR) 为30 psi, 碰撞气 (Collision Gas, CAD) 为8 psi。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1。

表1. 化合物的质谱参数

名称	Q1 MASS(Da)	Q3 MASS(Da)	DP (volts)	CE (volts)	Dwell Time(msec)
TMAO-1	75.9	58.0	40	50	25
TMAO-2	75.9	59.1	40	37	25
d9-TMAO	85.1	68.2	65	28	25
TMA-1	60.0	44.0	100	30	25
TMA-2	60.0	45.0	100	18	25
d9-TMA	69.0	49.0	27	30	25

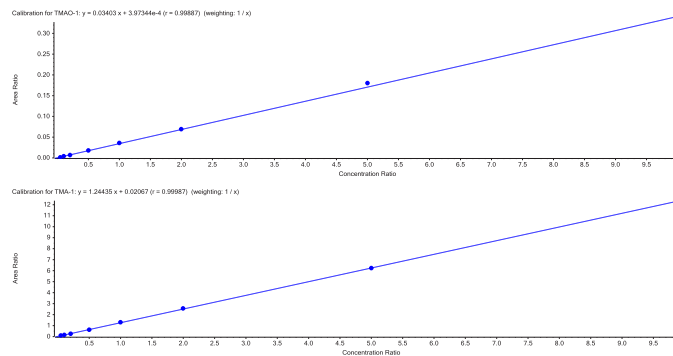


图2. TMAO和TMA定量的线性曲线拟合。

图2中所示为TMAO和TMA在0.05-10 μg/mL范围内采用内标校正法进行的浓度与响应的线性拟合结果, 可见在测试范围内拟合良好, 相关数据结果总结如表2。

表2. 线性范围, 拟合方程, 权重以及相关系数

化合物	回归方程	权重	相关系数r	线性范围 (μg/mL)
TMAO	$y = 0.03403x + 3.97344e-4$	1/x	0.99887	0.05- 10
TMA	$y = 1.24435x + 0.02067$	1/x	0.99987	0.05- 10

方法初步建立后，进行了系统化的性能验证，包括精密度，正确度以及基质效应的考察等，获得的结果如表三和表四中所示。其中，精密度和正确度的测试中选取了低中高三个不同的浓度点，每个浓度点重复5次进行测试，结果显示精密度%RSD最大偏差不超过10.6%，而回收率均在90.0%- 101.2%之间。

表3. TMAO 和TMA加标回收率的精密度方法验证数据(n=5)

化合物	加标量 (ng/mL)	检测值	% RSD	回收率
TMAO	250	234	4.4	93.6
	500	494	2.3	98.8
	1000	965	6.6	96.5
TMA	50	51	10.6	101.2
	100	97	7.3	92.8
	200	180	3.3	90.0

在基质效应的考察中，对比了目标物在基质和在纯溶剂中的响应情况，结果显示，TMA和TMAO定量检测过程中基质效应均控制在91.2%- 105.8%之间，完全符合质谱检测方法的相关要求。

结论

本文通过高灵敏度的 Triple Quad™ 4500MD 质谱系统，对人体血清中氧化三甲胺 (TMAO) 和三甲胺 (TMA) 进行测定，方法进行了线性、精密度、正确度以及基质效应等方面的验证，该方法准确可靠，有极高的灵敏度，完全满足检测要求。方法已成功用于实际血液样本的检测，可准确可靠的检测实际样本浓度！

仅限专业展会等使用、仅向专业人士提供的内部资料

表4. TMAO和TMA基质效应考察结果数据(n=4)

化合物	加标量 (ng/mL)	Area ratio (目标物/内标)	基质效应结果百分比
TMA	0	0.45039	/
	50	12.19952	96.7
	100	21.85285	91.2
TMAO	200	39.62379	92.7
	0	0.04400	/
	250	0.30135	102.8
	500	0.50306	91.7
	1000	0.97326	105.8

参考文献

- [1] Senthong V, Wang Z, Fan Y, Wu Y, Hazen SL, Tang WH. Trimethylamine N-Oxide and Mortality Risk in Patients With Peripheral Artery Disease[J]. Journal of the American Heart Association. 2016,5(10).
- [2] Nie J, Xie L, Zhao BX, Li Y, Qiu B, Zhu F, Li GF, He M, Wang Y, Wang B et al. Serum Trimethylamine N-Oxide Concentration Is Positively Associated With First Stroke in Hypertensive Patients[J]. Stroke. 2018,49(9):2021-8.
- [3] Ge X, Zheng L, Zhuang R, Yu P, Xu Z, Liu G, Xi X, Zhou X, Fan H. The Gut Microbial Metabolite Trimethylamine N-Oxide and Hypertension Risk: A Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis[J]. Advances in nutrition (Bethesda, Md). 2020,11(1):66-76.

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。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-12464-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: [ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)