

超高效液相色谱三重四极杆质谱法测定血清中甲基丙二酸的含量

LCMSMS-293

摘要： 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用，建立了血清中甲基丙二酸的定量检测方法，并依据临床检验相关指导原则完成了方法学验证。实验结果表明，该方法对血清中甲基丙二酸测定的可报告范围为 20-1280 nM，日内和日间精密度 (%CV) 分别为 2.7-7.3%、5.4-7.0%，准确度范围为 87.4-112.3%。该方法分析速度快、稳定性和准确度好，适用于血清中甲基丙二酸的定量分析，能够为临床检验行业的从事人员提供参考。

关键词： LCMS-8050 甲基丙二酸 血清临床检验

在细胞线粒体中，甲基丙二酸 (MMA) 是丙酸向琥珀酸 (SA) 转化过程中的代谢中间体。其中甲基丙二酰变位酶催化 MMA 重排为 SA，而维生素 B₁₂(VB₁₂) 作为甲基丙二酰变位酶的一个不可或缺的辅酶，其缺乏将导致机体中 MMA 水平增加。此外，VB₁₂ 在红细胞形成和维护神经机能中起到重要作用，其缺乏可导致造血和神经系统紊乱，此类疾病可通过早期诊断而及时治疗。

然而，血清或血浆中 VB₁₂ 含量并不能完全反应机体组织中 VB₁₂ 水平，常出现机体 VB₁₂ 缺乏但血中含量仍然正常。此外，VB₁₂ 对光敏感，稳定性较差。

MMA 稳定性比 VB₁₂ 好，更为重要的是当机体 VB₁₂ 出现早期缺乏时，MMA 立刻随之增加，而此时血液中 VB₁₂ 含量未出现变化。因此，血清中 MMA 含量是指示机体 VB₁₂ 是否缺乏的重要生物标记物。

对此，我们使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用，并采用 d3-MMA 为内标，建立了血清中 MMA 的定量分析方法，并结合临床检验相关指导原则，完成了方法的全验证，以供相关从业人员参考。

实验部分

1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为：LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.86 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：PC HILIC(2.0 mm I.D. × 150 mm L., 5 μm)

流动相：A 相 - 水；

B 相 - 乙腈 (含 0.1% 甲酸)

流速：0.5 mL/min

柱温：55°C

进样量：10 μL

自动进样器温度：15°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 98%，时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.80	Pumps	Pump B Conc.	98
2.50	Pumps	Pump B Conc.	10
3.50	Pumps	Pump B Conc.	10
3.60	Pumps	Pump B Conc.	98
5.50	Controller	Stop	

质谱条件

离子源: ESI (-)

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 10.0 L/min

接口温度: 400°C

DL 温度: 180°C

加热模块温度: 440°C

干燥气流速: 10.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 122ms

MRM 参数: 见表 2

表2 MRM参数

名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q ₁ Pre Bias (V)	CE (V)	Q ₃ Pre Bias (V)
MMA	516-05-2	116.85	55.05*	10.0	23.0	19.0
			73.05	10.0	23.0	13.0
d3-MMA	-	120.00	58.05*	10.0	23.0	19.0
			76.05	10.0	23.0	13.0

*表示定量离子对

1.3 样品制备
1.3.1 标准工作曲线配制

称取 4.0 g BSA 溶于 100 mL PBS, 配制 4% BSA 溶液作为血清的替代基质溶液, 用于配制标准工作曲线。用甲醇配制浓度为 50 mM 的 MMA 标准储备液, 随后用甲醇将混合标准溶液逐级稀释成浓度为 2.0 μM、4.0 μM、8.0 μM、16 μM、32 μM、64 μM、128 μM 的标准工作液。取 10 μL 标准工作液加入 990 μL 替代基质溶液, 依次配制标准曲线。用甲醇配制浓度为 10 mM d3-MMA 内标储备液, 再用甲醇稀释为浓度为 10 μM 的内标工作液。

1.3.2 样品前处理方法

萃取溶液配制: 1 mL 磷酸溶于 29 mL 甲基叔丁醚;

取 990 μL 样品于 1.5 mL 离心管中, 加入 10 μL 的内标溶液, 涡旋溶解。再取出 200 μL 样品 +800 μL 萃取溶液, 涡旋萃取收集有机层, 氮吹挥干后, 100 μL 乙腈复溶, 10000 r/min 离心 15 min, 取上清进样分析。

日内精密度和准确度考察: 一天内制备 4 批不同浓度 (LOQ、MOQ 和 HOQ) 的样本, 每批当中不同浓度的样品平行处理 5 个。样品进样分析后, 统计精密度变异系数 (CV) 和准确度。

日间精密度和准确度考察: 每天制备 2 批不同浓度 (LOQ、MOQ 和 HOQ) 的样本, 每批当中不同浓度的样品平行处理 5 个, 连续考察 3 天。统计精密度变异系数 (CV) 和准确度。

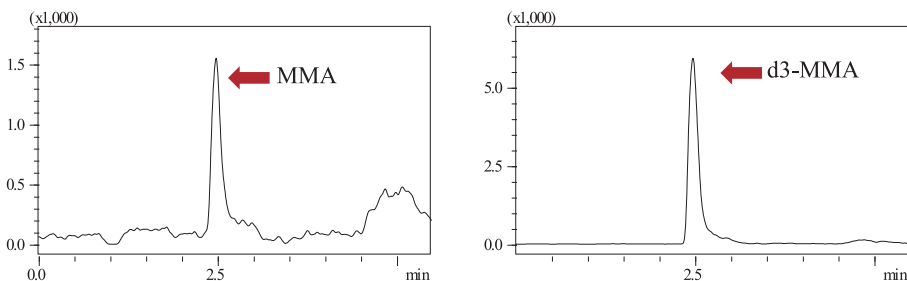
结果讨论
2.1 MRM 色谱图


图1 替代基质中MMA(20 nM)及其内标物(100 nM)的MRM色谱图

2.2 替代基质与血清基质一致性验证

考虑到正常人血清中含有一定量的MMA，空白血清样品经处理分析后，检测到一定量的MMA(如图2所示)。因此不宜使用空白血清配制MMA标准曲线，而考虑用4% BSA 溶液作为血清的替代基质溶液。在此，需要对替代基质与血清基质进行一致性验证。

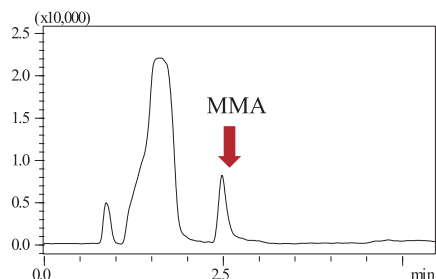


图2 空白血清样品分析结果

2.2.1 替代基质标曲和血清标曲的比较

分别用血清和4% BSA 溶液依照“标准工作曲线配制”中的方法，配制标准曲线溶液，样品经过前处理后，进样分析，分别绘制出血清基质标曲和替代基质标曲(如图3和4所示)。

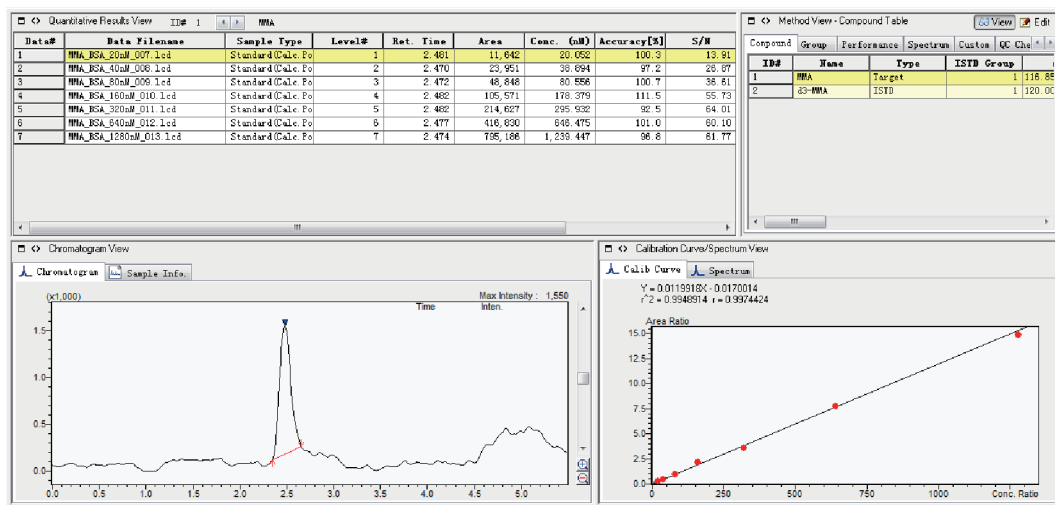


图3 MMA4% BSA溶液标准曲线

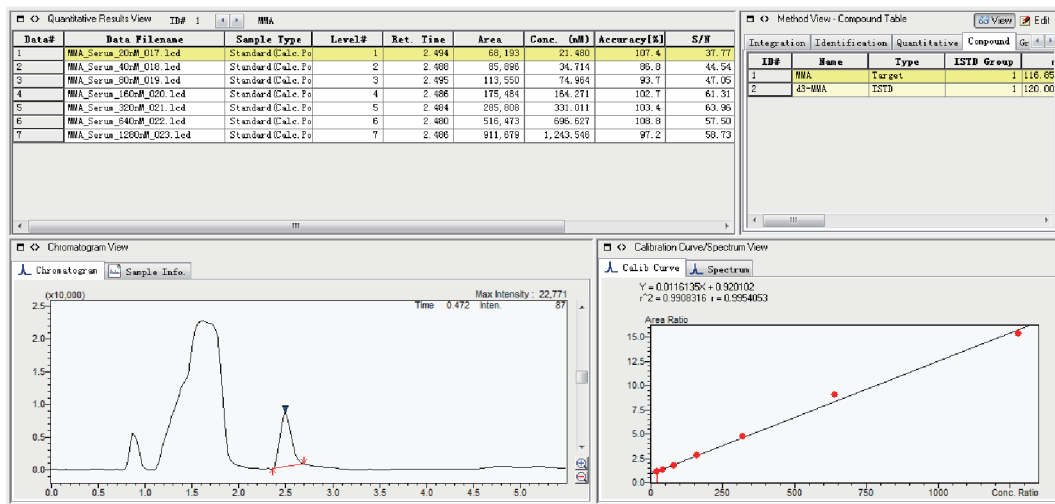


图4 MMA血清标准曲线

从结果上看，4% BSA 溶液配制的替代基质标曲和血清基质标曲相比，曲线斜率基本相当 (如表 3 和图 5 所示)。此外，依据标准加入法外推得到 X 轴负截距，可以计算出血清中 MMA 的含量为 79.2 nM。

表3 替代基质标曲和血清基质标准曲线比较

目标物	标准曲线	
	4% BSA	血清
MMA	$Y=0.0119918X-0.0170014$	$Y=0.0116135X+0.920102$

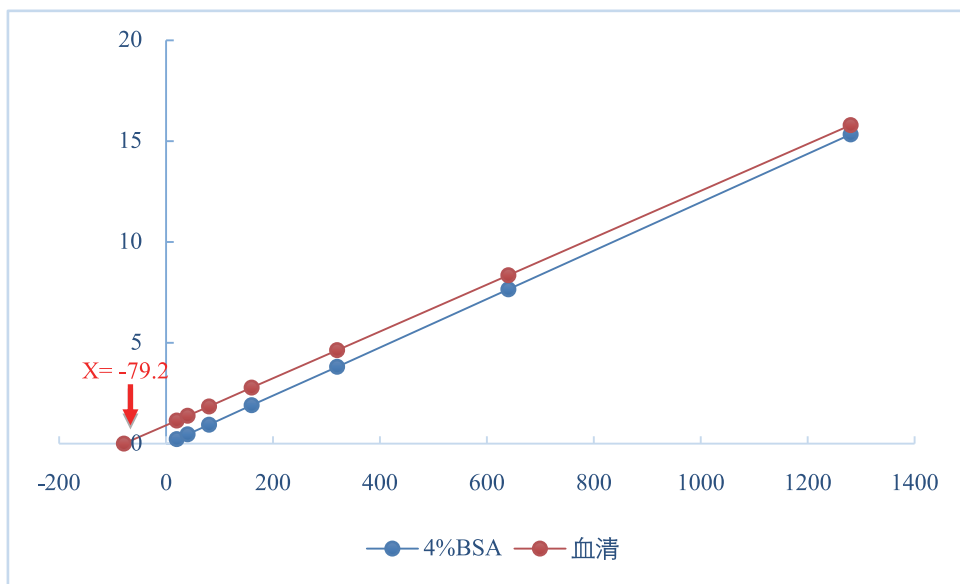


图5 MMA替代基质标曲和MMA血清标曲比较

2.2.2 替代基质标曲测定血清及血清加标样品中 MMA 含量

分别制备血清及血清加标样品 (加入 MMA 浓度为 20 nM、160 nM 和 1000 nM)，依照上述前处理方法，各浓度样品平行处理 6 份，进样分析后根据替代基质标曲计算目标物浓度，结果如表 4 所示。

表4 血清及血清加标样品中MMA含量测定结果

项目	血清 (E)	血清加标 (E+20 nM)	血清加标 (E+160 nM)	血清加标 (E+1000nM)
检测均值 (nM)	78.9	102.0	239.2	1041.3
理论值 (nM)	79.2	99.2	239.2	1078.9
样品数量 (n)	6	6	6	6
相对误差 (%RE)	-0.4	2.8	0.0	-3.5
变异系数 (%CV)	3.2	2.1	2.9	3.4

从结果上看，使用替代基质标曲测定各组样品，其检测均值和理论值相对误差均 <15%，变异系数 <15%，均在可接受范围之内。

2.2.3 替代基质稀释血清基质

采用替代基质稀释血清基质，分别测定不同稀释倍数下得到的空白基质中内源性物质 MMA 的浓度，该浓度与理论值的偏差在接受范围内（相对误差均 <15%，变异系数 <15%），结果如表 5 所示。

表5 不同稀释倍数下血清中MMA含量测定结果

项目	1.25 倍稀释	2.5 倍稀释	4 倍稀释
检测均值 (nM)	62.6	34.9	19.8
理论值 (nM)	63.4	31.7	19.8
样品数量 (n)	6	6	6
相对误差 (%RE)	-1.3	10.1	0
变异系数 (%CV)	4.1	4.3	2.5

2.2.4 小结

综上所述，在血清中 MMA 的检测实验中，4% BSA 溶液和血清配制的标准曲线，二者斜率基本一致。替代基质标曲测定血清和血清加标样品，检测结果与理论值偏差在可接受范围内。此外，采用替代基质稀释血清，对不同稀释倍数下的样品测定结果，仍然表现出良好的准确度和精密度。因此，4% BSA 溶液作为血清替代基质，用于配制 MMA 标准曲线或质控样品。

2.3 线性范围及其验证

使用 4% BSA 溶液配制标准曲线，按上述请处理方法和分析条件，采用内标法建立标准曲线。如图 6 所示，MMA 在 20-1280 nM 的线性浓度范围内，线性相关性良好，相关系数 r 分别为 0.9974，准确度范围分别为 92.5-111.5%。

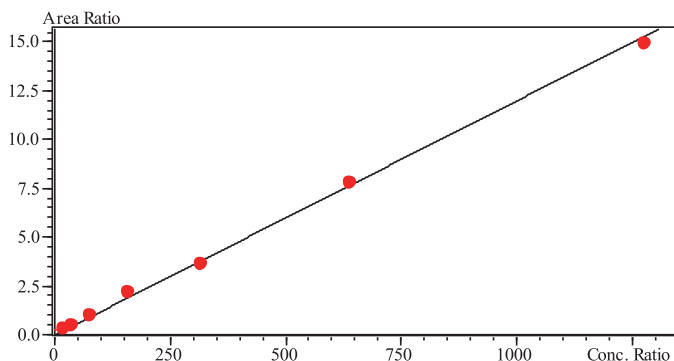


图6 MMA的替代基质标准曲线

确定线性范围后，还需要对线性范围进行进一步验证。配制上限浓度 (H, 1280nM) 和下限浓度 (L, 20 nM) 各 1 例，按照 L、4L+1H、3L+2H、2L+3H、1L+4H、H 的体积比，混合成 6 个不同浓度的样品，每个样品测定 2 次。以理论浓度值为 X，测定浓度均值为 Y，计算回归方程 $Y=bX+a$ (如图 7 所示)。线性方程相关系数 $r>0.975$ ，b 在 0.97-1.03 范围内，表明实验结果可接受。

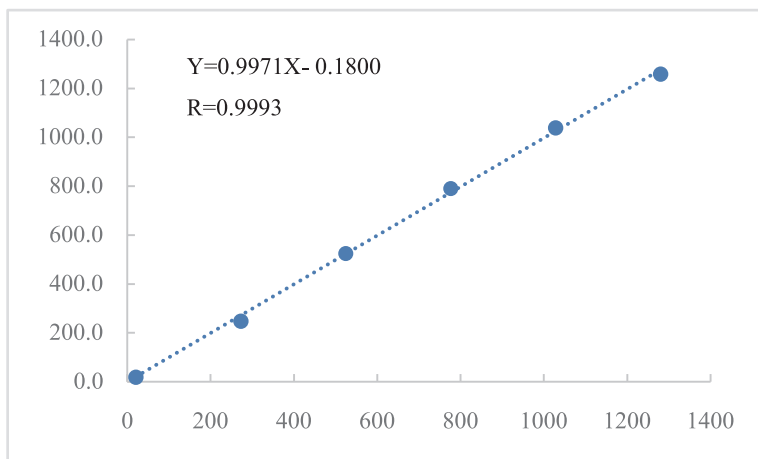


图7 MMA的线性范围验证

2.4 特异性验证

分别考察空白替代基质、空白替代基质加内标和 20 nM 替代基质加标样品，结果表明，替代基质对目标物 MMA 及其内标的检测均无干扰，同时内标 d3-MMA 亦不干扰 MMA 的检测（见图 8）。

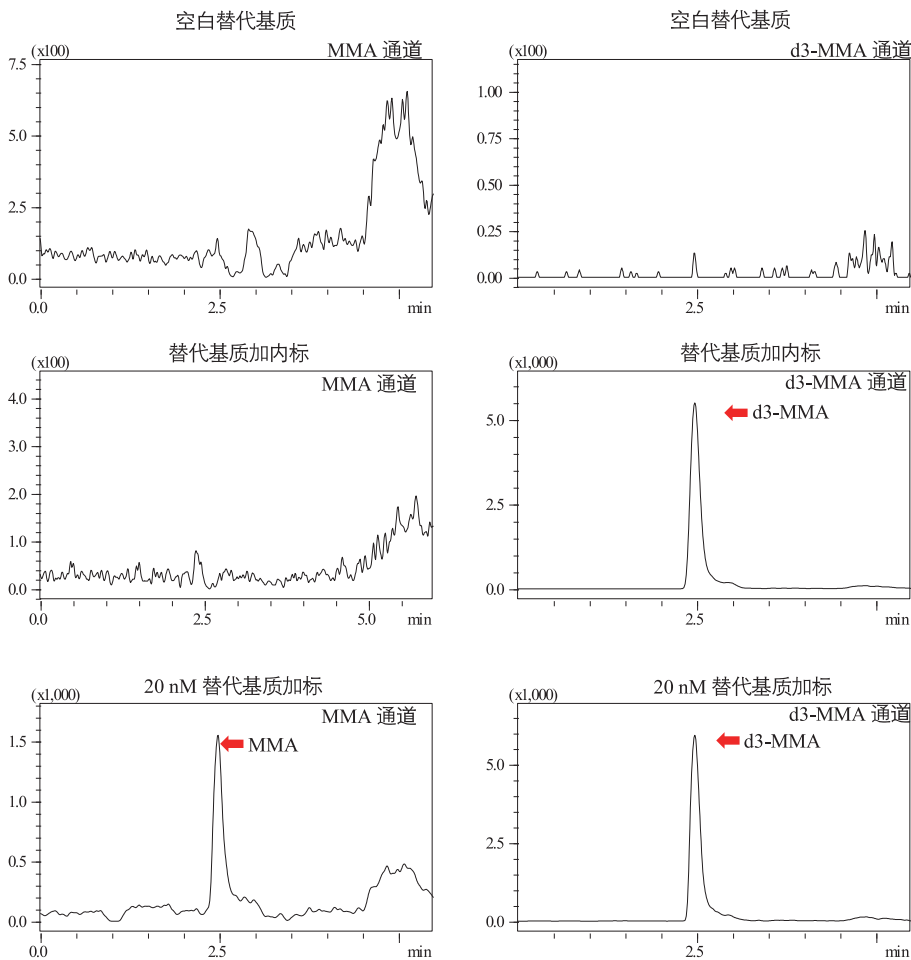


图8 特异性验证结果

2.5 检出限验证

用替代基质配制浓度为 20 nM 的 MMA 样品，共处理 8 份样品并进样分析，统计 RR 值，RR 值 = 目标峰面积 (A-MMA)/ 内标峰面积 (A-d6-MMA)，数据结果 (见表 6)，CV% 值小于 20，表明 20 nM 可作为方法检出限。

表6 检出限验证统计结果(n=8)

样品	MMA	d3-MMA	RR
1	18244	81411	0.22
2	18585	75907	0.24
3	16248	81127	0.20
4	16097	74380	0.22
5	15720	83376	0.19
6	16409	76504	0.21
7	16525	78845	0.21
8	17288	79909	0.22
%CV	6.2	3.9	7.7

2.6 精密度和准确度验证

2.6.1 日内精密度和准确度

用替代基质配制低、中、高三个浓度的样品，即 LOQ(40 nM)、MOQ(300 nM) 和 HOQ(1000 nM)。在同一天内，共处理 4 批样品，同一批次中 LOQ、MOQ 和 HOQ 各处理 5 个。样品经分析后，数据统计分析得到变异系数 (%CV) 和准确度 (%accuracy)，结果如表 7 所示。

表7 日内精密度和准确度考察结果(n=20)

样品	LOQ	MOQ	HOQ
1-1	35.3	308.1	1032.4
1-2	36.3	308.9	989.0
1-3	36.8	301.9	992.0
1-4	42.0	333.4	1037.1
1-5	35.1	300.3	990.7
2-1	35.6	308.6	1054.8
2-2	42.5	339.1	1037.8
2-3	37.6	310.7	996.2
2-4	41.9	304.7	1061.9
2-5	40.6	311.9	982.4
3-1	35.1	299.7	1003.8
3-2	40.6	288.7	1059.6

3-3	40.8	280.8	1034.3
3-4	35.8	298.1	1053.1
3-5	38.5	321.5	1035.4
4-1	36.5	294.8	1047.2
4-2	42.5	280.7	1051.4
4-3	41.7	287.4	1043.4
4-4	40.0	288.3	1063.8
4-5	35.8	281.5	1014.7
均值	38.6	302.5	1029.0
%CV	7.3	5.4	2.7
%accuracy (MIN)	87.8	93.6	106.4
%accuracy (MAX)	106.3	113.0	98.2

2.6.2 日间精密度和准确度

每天处理 1 批样品，同一批次中 LOQ、MOQ 和 HOQ 各处理 7 个，连续 3 天。样品经分析后，数据统计分析得到变异系数 (%CV) 和准确度 (%accuracy)，结果如表 8 所示。

表8 日间精密度和准确度考察结果(n=21)

样品	LOQ	MOQ	HOQ
Day 1-1	34.9	317.1	952.6
Day 1-2	38.2	313.0	899.2
Day 1-3	39.9	310.2	898.0
Day 1-4	36.4	294.3	976.5
Day 1-5	42.9	319.2	991.6
Day 1-6	36.4	314.9	970.5
Day 1-7	39.0	297.3	900.6
Day 2-1	35.7	350.9	885.2
Day 2-2	36.0	331.7	895.7
Day 2-3	40.4	320.3	904.8
Day 2-4	35.8	295.3	1036.3
Day 2-5	35.2	337.0	1070.2
Day 2-6	39.0	280.1	942.7
Day 2-7	43.1	292.9	1002.0
Day 3-1	35.1	330.4	1062.8
Day 3-2	38.2	325.7	897.4
Day 3-3	35.4	327.0	898.5

Day 3-4	38.9	309.8	923.2
Day 3-5	40.6	294.0	920.2
Day 3-6	39.8	333.7	895.0
Day 3-7	42.7	295.5	917.0
均值	38.3	313.0	944.8
%CV	7.0	5.4	6.2
%accuracy (MIN)	87.4	93.4	88.5
%accuracy (MAX)	110.2	112.3	107.0

2.6.3 小结

综上所述，LOQ、MOQ 和 HOQ 的日内精密度分别为及准确度范围分别为 2.7-7.3% 和 87.8-113.0%，日间精密度及准确度分别为 5.4-7.0% 和 87.4-112.3%，均在可接受范围内。

2.7 携带污染率验证

制备高浓度样品 (H, 1280 nM) 和低浓度样品 (L, 20 nM) 各 1 例。连续测定 H 样品 3 次，得到的浓度值分别为 H1、H2、H3；再测定 L 样品 3 次，得到的浓度值分别为 L1、L2、L3。依据公式：携带污染率 = $[(L1-L3)/(H3-L3)] \times 100\%$ ，计算得到污染率。当携带污染率 < 2%，表明没有携带污染。实验结果如表 9 所示，MMA 的计算携带污染率为 0.13%，表明高浓度样品分析不会造成携带污染。

表9 携带污染率考察结果

H1	H2	H3	L1	L2	L3	携带污染率
1280.0	1271.6	1224.3	18.2	18.3	19.8	0.13%

结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用，通过替代基质配制标曲，结合液液萃取法及内标定量法，建立了在 5.5min 内测定血清中 MMA 的分析方法，并依据临床检验相关指导原则完成了方法学验证。实验结果表明，该方法对 MMA 测定的可报告范围为 20-1280 nM，日内和日间精密度 (%CV) 分别为 2.7-7.3%、5.4-7.0%，准确度范围为 87.4-112.3%，均能满足临床检测要求。该方法分析速度快、稳定性和准确度好，适用于临床实验中测定人血液中 MMA 的含量，从而指导相关疾病的诊断与治疗。