

串联质谱法用于尿液中甲基丙二酸含量测定

LCMSMS-602

摘要：使用超高效液相色谱仪三重四极杆质谱仪联用，建立了尿液中甲基丙二酸测定方法，使用内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性良好，质控品测定准确度结果与理论值接近，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于尿液中甲基丙二酸含量测定。

关键词：串联质谱 甲基丙二酸 尿液

甲基丙二酸血症 (methylmalonic acidemia, MMA) 又称甲基丙二酸尿症 (Methylmalonic aciduria)，是我国最常见的常染色体隐性遗传的有机酸代谢病，已被列入罕见病诊疗指南。MMA 由甲基丙二酰辅酶 A 变位酶或其辅酶钴胺素代谢缺陷所导致。根据酶缺陷类型，可以分为 MCM 缺陷型 (Mut 型) 及维生素 B12 代谢障碍型 (cbl 型) 两大类。MMA 总患病率在国外不同人种之间为 1/169 000 ~ 1/50 000。中国台湾地区约 1/86 000。中国大陆尚无确切数据报道，根据新生儿串联质谱筛查结果估算出生患病率约 1/28 000，但北方有些地区发病率可高于 1/10 000。MMA

在各年龄段中的临床表现不尽相同。通常发病年龄越早，急性代谢紊乱和脑病表现越严重。2019 年版罕见病诊疗指南及梅奥医学均推荐通过检测尿液中甲基丙二酸含量来判定该罕见病。串联质谱法测定甲基丙二酸具有灵敏度高、专属性强、前处理简单等优点，已成为梅奥医学等大型检测机构的首选推荐检测方法。

本文使用超高效液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8045，建立了尿液中甲基丙二酸测定方法，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，供相关人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用超高效液相色谱与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为：

输液泵：LC-40D XR×2 在线脱气机：DGU-405
自动进样器：SIL-40C XR 柱温箱：CTO-40C
系统控制器：CBM-40

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GIST 100 mm×2.1 mm I.D., 2 μm；P/N: 227-30001-04；岛津（上海）实验器材有限公司

流动相：A：0.2% 甲酸水 B：0.2% 甲酸甲醇 流速：0.4 mL/min

柱温：40°C 进样量：5 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 10%，洗脱程序见表 1

表 1 梯度洗脱时间程序

| Time(min) | Module | Command | Value |
|-----------|--------|---------|-------|
| 1.00 | 泵 | B.Conc | 10 |
| 2.00 | 泵 | B.Conc | 95 |
| 2.50 | 泵 | B.Conc | 95 |
| 2.51 | 泵 | B.Conc | 10 |
| 5.00 | 控制器 | Stop | |

质谱条件：

| | |
|------------------|------------------|
| 分析仪器：LCMS-8045 | DL 温度：150°C |
| 离子源：ESI (-) | 加热模块温度：450°C |
| 雾化气流速：3.0 L/min | 离子源温度：400°C |
| 干燥气流速：10.0 L/min | 扫描模式：多反应监测 (MRM) |
| 加热气流速：10.0 L/min | MRM 参数：见表 2 |

表 2 MRM 参数

| 名称 | 前体离子 | 产物离子 | Q1 Pre Bias(V) | CE (V) | Q3 Pre Bias (V) |
|--------|-------|------|----------------|--------|-----------------|
| MMA | 117.0 | 73.0 | 23 | 13 | 19 |
| | | 55.0 | -23 | 25 | 23 |
| MMA-IS | 120.0 | 76.0 | 23 | 13 | 19 |

1.3 标准品及样品制备

标准曲线制备：取甲基丙二酸标准品溶液适量，用水分别稀释成 0.424 μmol/L、2.12 μmol/L、8.47 μmol/L、42.37 μmol/L、84.75 μmol/L、169.49 μmol/L 标准曲线溶液。

标准品及样品溶液制备：取 50 μL 标准溶液或尿样，加入 20 μL 内标工作液及 200 μL 蛋白沉淀剂（甲醇：乙腈 =1:1），涡旋混匀 2 min，4000 rpm 离心 10 min，取 200 μL 上清液，80°C 氮气吹干，加入 200 μL 0.2% 甲酸水溶液复溶后上机测定。

结果讨论

2.1 MRM 色谱图

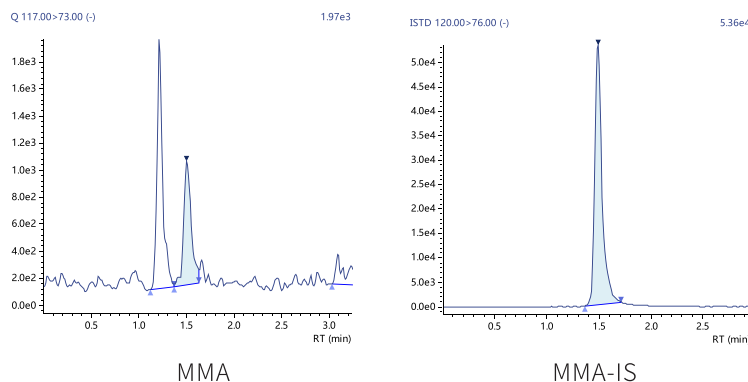


图 1 标准曲线最低点谱图及内标谱图

2.2 线性测定结果

对标准品按 1.2 中的分析条件进行分析，内标法制作标准曲线。标准曲线结果见图 2 及表 3，MMA 在标准曲线浓度范围内线性相关系数为 0.9989，准确度在 95.6~107.8% 之间，满足测定需求。

表 3 标准曲线结果

| 名称 | 线性方程 | 线性范围 (μmol/L) | 相关系数 | 准确度 (%) |
|-----|-------------------------------------|---------------|--------|------------|
| MMA | $Y = (0.04954392)X + (-0.00110206)$ | 0.424~169.49 | 0.9989 | 95.6~107.8 |

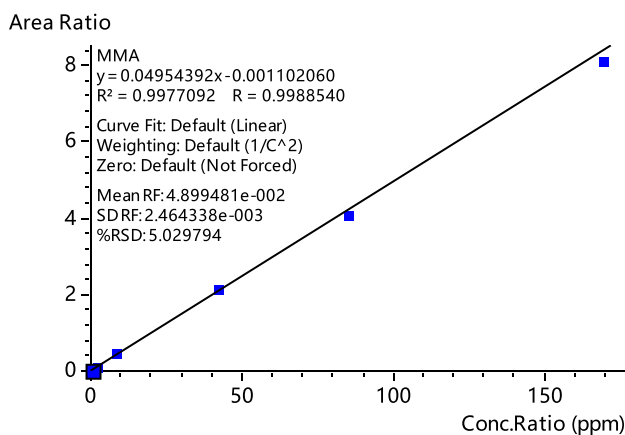


图2 标准曲线谱图

2.3 准确度及精密度测定结果

按 1.3 中的前处理方法对尿液低中高浓度质控品，每个浓度质控品重复制备 3 份，按 1.2 中的分析条件对质控品进行分析，质控品的准确度结果如表 4 所示，结果显示质控品测定准确度结果与理论值接近，回收率在 96%~107% 之间，RSD 在 4.2%~6.5% 之间，满足临床测定需求。

表 4 质控准确度考察结果 (n=3, 浓度单位 $\mu\text{mol/L}$)

| 项目 | LQC | MQC | HQC |
|-------|-------|------|------|
| 理论浓度 | 0.527 | 5.18 | 83.9 |
| 测定浓度 | 0.564 | 5.02 | 80.6 |
| 回收率 % | 107 | 97 | 96 |
| RSD% | 6.5 | 5.6 | 4.2 |

2.4 临床样品测定结果

取 30 批次儿童尿液样品，按 1.3 中的前处理方法及 1.2 中的分析条件进行测定，结果见图 3 和表 5，该方法灵敏度及分离度可满足临床检验需求。

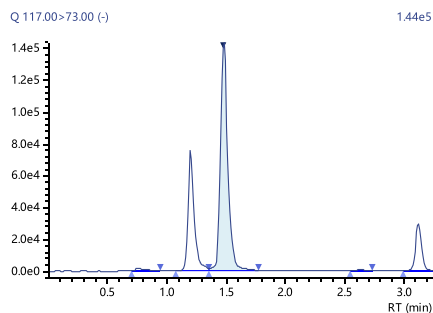


图3 Sample001 色谱图

表 5 临床样品测定结果 (μmol/L)

| Name | Conc. | Name | Conc. | Name | Conc. |
|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|
| sample001 | 13.6 | sample011 | 7.3 | sample021 | 10.6 |
| sample002 | 24.0 | sample012 | 15.0 | sample022 | 8.8 |
| sample003 | 23.0 | sample013 | 7.8 | sample023 | 13.3 |
| sample004 | 10.1 | sample014 | 9.4 | sample024 | 12.1 |
| sample005 | 5.6 | sample015 | 11.4 | sample025 | 16.2 |
| sample006 | 8.1 | sample016 | 29.7 | sample026 | 9.8 |
| sample007 | 3.9 | sample017 | 17.9 | sample027 | 8.7 |
| sample008 | 8.4 | sample018 | 9.6 | sample028 | 9.9 |
| sample009 | 7.8 | sample019 | 13.1 | sample029 | 6.5 |
| sample010 | 17.8 | sample020 | 8.4 | sample030 | 10.2 |

■ 结论

使用超高效液相色谱仪三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用，建立了尿液中甲基丙二酸测定方法，使用内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性良好，标准曲线相关系数为 0.9989，质控品测定准确度结果与理论值接近，回收率在 96%~107% 之间，RSD 在 4.2%~6.5% 之间，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于尿液中甲基丙二酸含量测定。

岛津应用云

