

LCMS-8050CL 用于多种有机酸血症筛查应用研究

LCMSMS-519

摘要：使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30A CL 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用及丙二酸、甲基丙二酸、乙基丙二酸、2-甲基枸橼酸、总同型半胱氨酸测定试剂盒（高效液相色谱 - 串联质谱法，质谱生物科技有限公司），建立了干血片中 5 种有机酸同时测定的方法。使用试剂盒的内标、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，标准曲线相关系数均大于 0.994，准确度及精密度均满足试剂盒要求。该方法对多种有机酸血症相关疾病的临床诊断、治疗管理和生理评估具有重要的意义。

关键词：有机酸血症 丙二酸 甲基丙二酸 乙基丙二酸 总同型半胱氨酸 2-甲基枸橼酸

有机酸 (organic acid) 为氨基酸降解、糖酵解、脂肪酸氧化等分解代谢过程中产生的中间产物 (羧基酸)。正常情况下，这些中间产物 (羧基酸) 在体内迅速转化，在体内含量极低；某些相关酶缺陷可导致其代谢发生障碍，大量有机酸在体内蓄积，血浓度增高，并从尿中大量排出，导致有机酸血症 (尿) 症。常见的有机酸血症有丙二酸血症、甲基丙二酸血症、丙酸血症、同型半胱氨酸血症等。患儿临床表现各异，在诊断中最常见为神经损伤和发育迟缓，其他相关的症状还包括反应差、拒食、嗜睡、昏迷、呕吐、脱水、营养不良、肌张力低下、顽固性惊厥、代谢性酸中毒、低血糖、酮症酸中毒、高氨血症，如果不及时治疗会造成患者死亡。甲基丙二酸及相关有机酸血症，如能早期筛查，早期诊断可以最大限度的改变患儿预后，部分有机酸

血症通过新生儿筛查，及时给予治疗，可和正常儿童一样生长发育。当婴幼儿患有甲基丙二酸及相关有机酸血症时，其体内丙二酸、甲基丙二酸、乙基丙二酸、2-甲基枸橼酸、总同型半胱氨酸含量均会表现出异常，准确测定干血片中相关有机酸含量可准确筛查诊断相关有机酸血症。

本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 及丙二酸、甲基丙二酸、乙基丙二酸、2-甲基枸橼酸、总同型半胱氨酸测定试剂盒（高效液相色谱 - 串联质谱法，质谱生物科技有限公司），建立了滤纸干血片中丙二酸、甲基丙二酸、乙基丙二酸、2-甲基枸橼酸、总同型半胱氨酸含量测定方法，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于相关有机酸血症辅助筛查诊断。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津临床用超高效液相色谱与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050CL 联用系统。具体配置为：

输液泵：LC-30AD CL × 2

在线脱气机：DGU-20A_{5R} CL

自动进样器：SIL-30ACMP CL

柱温箱：CTO-30A CL

二极管阵列检测器：SPD-M30A CL

系统控制器：CBM-20A CL

筛查结果处理软件：Neonatal Ver.2.30

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GIST 50 mm × 2.1 mm I.D., 2.0 μm; P/N: 227-30001-02; 岛津 (上海) 实验器材有限公司

流动相：试剂盒提供

柱温：40 °C

进样量：5 μL

流速：0.4 mL/min

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	Pumps	B.Conc	10
2.50	Pumps	B.Conc	98
3.00	Pumps	B.Conc	98
3.10	Pumps	B.Conc	10
6.00	Controller	Stop	

质谱条件：

分析仪器：LCMS-8050 CL

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：350 °C

干燥气流速：8.0 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

加热器流速：12.0 L/min

MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

名称	英文名	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q3 Pre Bias (V)
丙二酸	MA	217.2	105.1	-18	-15	-20
丙二酸内标	MA-IS	220.2	108.1	-18	-15	-20
甲基丙二酸	MMA	231.2	119.1	-11	-11	-22
甲基丙二酸内标	MMA-IS	234.2	122.1	-11	-11	-22
乙基丙二酸	EMA	245.21	133	-29	-10	-26
乙基丙二酸内标	EMA-IS	250.2	138	-29	-10	-26
总同型半胱氨酸	HCY	192.1	90.1	-14	-13	-10
同型半胱氨酸内标	HCY-IS	196.1	94.1	-14	-13	-10
2- 甲基枸橼酸	MCA	375.1	199.2	-26	-28	-30
2- 甲基枸橼酸内标	MCA-IS	378.1	202.1	-26	-28	-30

1.3 材料与方法

1.3.1 材料

5 浓度标准品干血片：试剂盒提供

高低质控干血片：试剂盒提供

内标准溶液：试剂盒提供

样品稀释液：试剂盒提供

1.3.2 方法

方法原理：使用含 5 种稳定同位素标记的内标的溶剂萃取滤纸干血片中的丙二酸、甲基丙二酸、乙基丙二酸、2- 甲基枸橼酸、总同型半胱氨酸，然后使用衍生化试剂（乙酰氯及正丁醇）衍生，串联质谱进行分析。通过测定丙二酸、甲基丙二酸、乙基丙二酸、2- 甲基枸橼酸、总同型半胱氨酸与对应同位素内标的离子峰强度，由已知水平的质控及内标，即可计算出所测样本的丙二酸、甲基丙二酸、乙基丙二酸、2- 甲基枸橼酸、总同型半胱氨酸浓度水平。

样本前处理方法：参考试剂盒说明书进行。

■ 结果讨论

2.1 MRM 色谱图

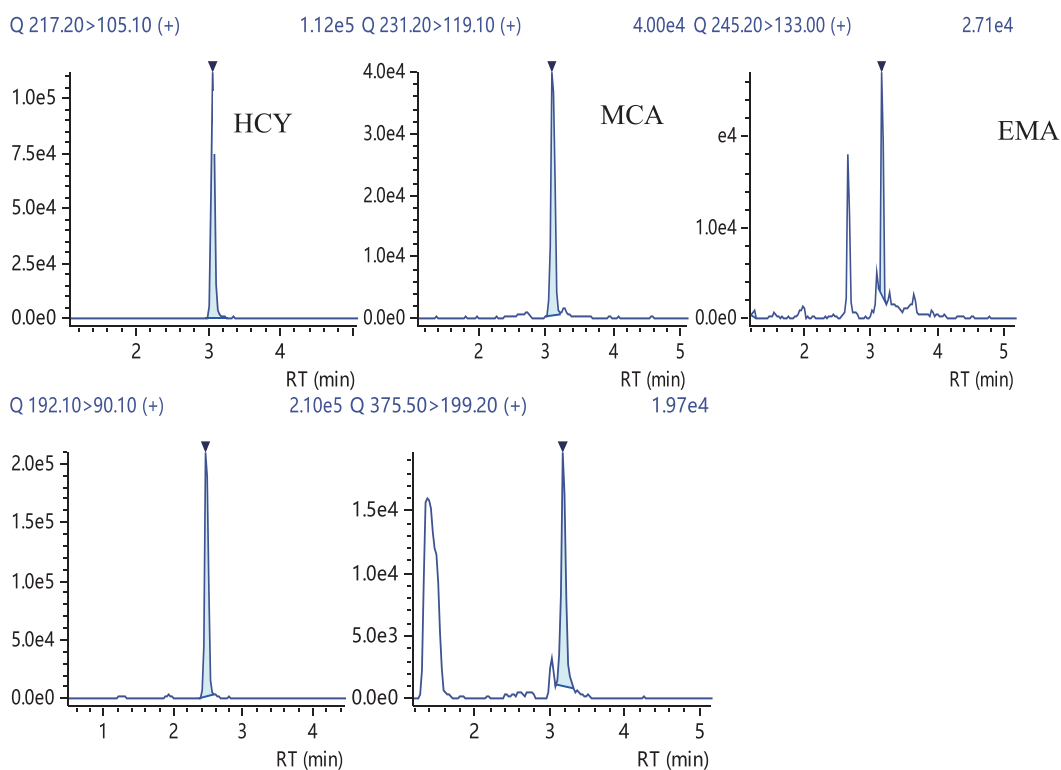


图 1 标准曲线最低点谱图

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。标准曲线结果见表 3，5 种有机酸在标准曲线浓度范围内线性相关系数均大于 0.994，准确度在 90.8%~109.3% 之间，满足测定需求。

表 3 标准曲线结果

编号	名称	线性方程	线性范围 (μmol/L)	相关系数	准确度 (%)
1	MA	$Y = (0.138716)X + (0.871968)$	6.70~44.21	0.9941	90.8~105.6
2	MMA	$Y = (0.214986)X + (0.363957)$	2.23~30.68	0.9981	96.0~106.9
3	EMA	$Y = (0.0444793)X + (-0.0128290)$	3.45~52.82	0.9981	94.3~106.4
4	HCY	$Y = (0.218807)X + (-0.127514)$	4.94~32.52	0.9933	91.6~109.3
5	MCA	$Y = (0.0123486)X + (0.211304)$	5.62~54.74	0.9942	88.2~105.7

2.3 准确度及精密度测定结果

按 1.3 中的前处理方法对低高浓度质控品前处理，按 1.2 中的分析条件对质控品进行分析，每个样品平行制备 6 份，质控品的准确度及精密度结果如表 4 所示，结果显示质控品测定准确度结果与理论值接近，均在赋值范围内，满足临床测定需求。样品平行制备 6 份进样分析，测定结果 RSD 在 2.9%~8.3% 之间，满足临床测定需求。

表 4 质控准确度考察结果 (n=3)

名称	LQC				HQC			
	理论浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	测定浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	赋值范围 ($\mu\text{mol/L}$)	RSD(%)	理论浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	测定浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	赋值范围 ($\mu\text{mol/L}$)	RSD(%)
MA	15.67	13.51	10.14~21.20	4.5	29.14	28.41	14.24~26.45	3.9
MMA	9.51	10.40	6.45~12.56	5.9	19.93	19.69	20.23~38.04	2.9
EMA	15.62	16.10	10.42~20.81	4.8	33.21	32.55	13.65~26.21	3.6
HCY	12.03	11.99	7.93~16.13	5.9	20.35	18.50	21.75~44.67	4.4
MCA	17.43	19.36	10.60~24.26	8.3	34.33	31.55	19.78~48.88	4.8

2.4 临床样品测定结果

取 5 批次新生儿干血斑样品, 按 1.3 中的前处理方法及 1.2 中的分析条件进行测定, 结果见表 5, 该方法可满足临床检验需求。

表 5 临床样品测定结果 ($\mu\text{mol/L}$)

Name	sample1	sample2	sample3	sample4	Sample5
MA	6.479	5.054	6.246	5.391	7.275
MMA	2.264	2.684	2.546	1.711	3.073
EMA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
HCY	1.667	4.442	3.124	2.096	2.855
MCA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

■ 结论

使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30A CL 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用及丙二酸、甲基丙二酸、乙基丙二酸、2-甲基枸橼酸、总同型半胱氨酸测定试剂盒(高效液相色谱-串联质谱法, 质谱生物科技有限公司), 建立了干血片中 5 种有机酸同时测定的方法。使用试剂盒的内标、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, 标准曲线相关系数均大于 0.994, 准确度及精密度均满足试剂盒要求。该方法对多种有机酸血症相关疾病的临床诊断、治疗管理和生理评估具有重要的意义。

岛津应用云

