

# 基于SCIEX LC-MS/MS系统对血浆中同型半胱氨酸、甲基丙二酸、叶酸及其代谢物检测

## Determination of homocysteine, methylmalonic acid, folic acid and its metabolite in Plasma by SCIEX LC-MS/MS

刘瑞琛, 赵祥龙, 郭立海

Liu Ruichen, Zhao Xianglong, Guo Lihai

**Keywords:** homocysteine, methylmalonic acid, folic acid, 5-Methyltetrahydrofolate, plasma

### 引言

甲基丙二酸血症是一种染色体隐性遗传疾病, 由酶缺陷导致甲基丙二酸不能正常进行新陈代谢, 在血液中贮积。甲基丙二酸血症伴同型半胱氨酸血症是甲基丙二酸血症中钴胺素代谢缺陷的一种类型, 导致腺苷钴胺素和甲基钴胺素合成不足, 引起相应的甲硫氨酸合成酶和甲基丙二线辅酶A变位酶活性降低, 从而使体内甲基丙二酸及同型半胱氨酸蓄积, 造成神经、血液、肝脏、肾脏和皮肤等多系统损伤。

巨幼红细胞性贫血, 常见于孕前或孕中缺乏维生素B12或(和)叶酸。这种贫血的特点是骨髓里的幼稚红细胞量多, 红细胞核发育不良, 成为特殊的巨幼红细胞。这两种营养素都是在红细胞的合成阶段发挥巨大作用的物质。维生素B12在体内主要以甲钴胺和腺苷钴胺两种形式存在, 由于其含量低、易受基质干扰, 且甲基丙二酸在腺苷钴胺的作用下转化生成琥珀酸参与三羧酸循环, 同型半胱氨酸在甲钴胺的作用下转化为甲硫氨酸, 因此临床常通过检测甲基丙二酸和同型半胱氨酸的含量反映维生素B12的情况。5-甲基四氢叶酸是叶酸在体内的主要存在形式。当叶酸缺乏或某些药物抑制了叶酸还原酶, 使叶酸不能转变为5-甲基四氢叶酸, 都可影响血细胞的发育和成熟, 造成巨幼红细胞性贫血。人在怀孕期, 由于需要量增高易导致叶酸及5-甲基四氢叶酸缺乏, 严亏者可使胎儿发生神经管畸形。

本方法采用蛋白沉淀法提取, 结合SCIEX液相色谱串联质谱系统, 以同位素内标法定量, 对血浆中同型半胱氨酸、甲基丙二

酸、叶酸和5-甲基四氢叶酸的含量进行精准定量及分析, 以期为临床诊断甲基丙二酸血症、同型半胱氨酸血症及巨幼红细胞性贫血等疾病提供方法和数据支持。

### 实验部分

#### 1、溶液制备

叶酸标准物质粉末经过纯水(含0.1%氨水)溶解制得的1 mg/mL储备液, 同型半胱氨酸标准物质粉末经过纯水溶解制得的1 mg/mL储备液, 5-甲基四氢叶酸标准物质粉末经过纯水:甲醇=1:3(含10 mM AcNH<sub>4</sub>、10% Vc、2% DTT)溶解制得的1 mg/mL储备液, 甲基丙二酸标准物质粉末经过纯水(含0.01% Vc)溶解制得的1 mg/mL储备液。分析物和同位素内标的二级储备液由储备液的溶剂稀释得到10 µg/mL, 分析物的工作溶液由二级储备液经含纯水:甲醇=1:3(含10 mM AcNH<sub>4</sub>、10% Vc、2% DTT)稀释得到。分析物及同位素内标的储备液置于实验室-80°C冻存。

#### 2、样品前处理

准确量取100 µL血清样品于1.5 mL塑料离心管中, 加入10 µL内标混合标准工作液(10 ng/mL)和190 µL乙腈(含1%FA), 涡旋混匀1 min, 14000 r/min离心10 min, 精密移取上清液100 µL至96孔板, 待LC-MS/MS分析。

#### 3、检测方法

色谱条件: 色谱柱: HSS T3 (2.5 µm, 150 mm column XP), 流动相: A: 含0.1%甲酸、10 mmol/L甲酸铵的水溶液, B: 含0.1%

甲酸、10 mmol/L 甲酸铵的乙腈溶液，柱温：40°C，梯度洗脱，液相梯度见表1。

表1. 液相梯度洗脱条件

| 时间 (min) | A(%) | B(%) |
|----------|------|------|
| 0.0      | 95   | 5    |
| 1.0      | 95   | 5    |
| 2.0      | 50   | 50   |
| 5.0      | 1    | 99   |
| 5.1      | 95   | 5    |
| 6.0      | 95   | 5    |

质谱条件：离子源：ESI源正模式

气帘气 CUR: 20 psi                      碰撞气 CAD: medium

雾化气 GS1: 50 psi                      辅助气 GS2: 50 psi

IS电压: +5500 V/-4500 V              源温度 TEM: 550°C

质谱参数见表2

表2. 目标组分的质谱参数

| 中文名      | Q1    | Q3    | Dwell time | ID            | DP  | CE  |
|----------|-------|-------|------------|---------------|-----|-----|
| 5-甲基四氢叶酸 | 460.2 | 313.2 | 10         | 5-MTHF-1*     | 91  | 28  |
|          | 460.2 | 180.1 | 10         | 5-MTHF-2      | 91  | 52  |
| 同型半胱氨酸   | 136.2 | 47.0  | 10         | HCY-1*        | 75  | 40  |
|          | 136.2 | 90.0  | 10         | HCY-2         | 75  | 15  |
| 叶酸       | 442.1 | 295.1 | 10         | Folic acid-1* | 90  | 25  |
|          | 442.1 | 176.0 | 10         | Folic acid-2  | 90  | 52  |
| 甲基丙二酸    | 117.1 | 73.1  | 10         | MMA-1*        | -50 | -13 |
|          | 117.1 | 55.1  | 10         | MMA-2         | -50 | -34 |

\* 定量离子

## 结果与讨论

以50%甲醇为替代基质，考察了5-甲基四氢叶酸、同型半胱氨酸、叶酸和甲基丙二酸在线性范围最低点的灵敏度和峰形情况，结果表明化合物灵敏度高、峰形良好，见图1。

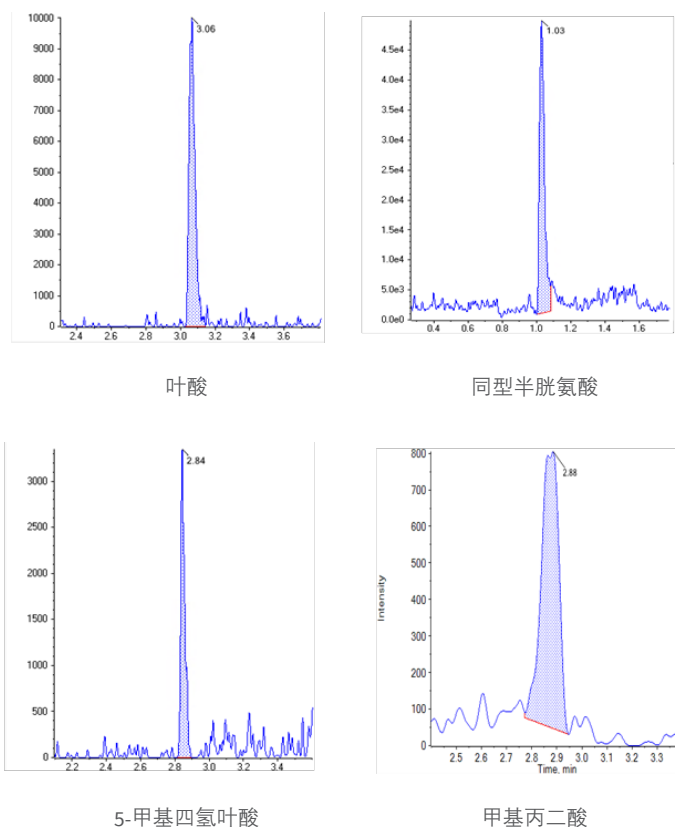


图1. 替代基质中叶酸 (100 pg/mL)、同型半胱氨酸 (1 ng/mL)、5-甲基四氢叶酸 (0.4 ng/mL) 和甲基丙二酸 (0.3 ng/mL) 色谱图

以50%甲醇为基质，配制混合标曲溶液，按上述前处理步骤进行处理，配作标准工作曲线 (浓度单位均为 ng/mL)。表3显示，叶酸、同型半胱氨酸、5-甲基四氢叶酸和甲基丙二酸在0.1-50 ng/mL、1-30000 ng/mL、0.4-200 ng/mL、0.3-30 ng/mL均具有良好的线性，其回归系数  $r > 0.999$ 。

## 总结

本方法使用SCIEX Triple Quad™系统建立血浆中叶酸、同型半胱氨酸、5-甲基四氢叶酸和甲基丙二酸测定的LC-MS/MS方法，并对方法的线性、准确度和精密度进行了系统的方法学验证。该方案可以满足临床患者血浆中叶酸、同型半胱氨酸、5-甲基四氢叶酸和甲基丙二酸浓度检测的需求，并且为临床诊疗提供方法参考和数据支持。

表3. 人血浆基质标准曲线

| 系列    | 叶酸             | 同型半胱氨酸           | 5-甲基四氢叶酸        | 甲基丙二酸            |
|-------|----------------|------------------|-----------------|------------------|
| STD1  | 0.1            | 1                | 0.4             | 0.3              |
| STD2  | 1              | 10               | 1               | 0.5              |
| STD3  | 2              | 50               | 4               | 1                |
| STD4  | 5              | 100              | 10              | 2                |
| STD5  | 10             | 200              | 80              | 5                |
| STD6  | 20             | 2000             | 100             | 10               |
| STD7  | 50             | 30000            | 200             | 30               |
| 线性方程  | $Y=3.4X+2.9e2$ | $Y=4.4e3X-1.6e3$ | $Y=0.79X+5.5e2$ | $Y=9.9e3X+6.3e3$ |
| 相关系数r | 0.99914        | 0.99956          | 0.99946         | 0.99942          |

## 参考文献

- [1] Mineva EM, Zhang M, Rabinowitz DJ, Phinney KW, Pfeiffer CM.  
An LC-MS/MS method for serum methylmalonic acid suitable for monitoring vitamin B12 status in population surveys. *Anal Bioanal Chem.* 2015 Apr;407(11):2955-64.
- [2] Meisser Redeuil K, Longet K, Bénet S, Munari C, Campos-Giménez E. Simultaneous quantification of 21 water soluble vitamin circulating forms in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2015 Nov 27;1422:89-98.

仅限专业展会等使用、仅向专业人士提供的内部资料。

SCIEX临床诊断产品仅用于体外诊断。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。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15425-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：021-2419-7201  
传真：021-2419-7333

官网：[sciex.com.cn](http://sciex.com.cn)

广州办公室  
广州国际生物岛星岛环北路1号  
B2栋501、502单元  
电话：020-8842-4017

官方微信：[SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)