

# 离子色谱质谱联用法检测甲基丙二酸尿症

## Detection of Methylmalonic Aciduria by Ion Chromatography Tandem Mass Spectrometry

丛宇婷, 姜振邦, 王祝伟, 刘宏伟, 李国庆

Cong Yuting, Jiang Zhenbang, Wang Zhuwei, Liu Hongwei, Li Guoqing

SCIEX, 中国

SCIEX, China

**Keywords:** Methylmalonic Aciduria; Methylmalonic Acid; Succinic Acid; Ion Chromatography Tandem Mass Spectrometry

### 引言

甲基丙二酸尿症 (Methylmalonic aciduria, MMA) 是先天性有机酸代谢异常中常见的一类疾病, 属于常染色体遗传病。患者体内甲基丙二酰辅酶A至琥珀酰辅酶A代谢障碍, 导致体内三羧酸循环中 $\alpha$ -酮戊二酸到琥珀酸途径异构, 产生琥珀酸的异构体——甲基丙二酸, 甲基丙二酸在体内蓄积, 造成患者血液和尿液排泄物中可检测到大量甲基丙二酸。

目前国内外报道对患者体液中甲基丙二酸的定性定量分析方法主要包括气质联用和液质联用法<sup>[1-4]</sup>。因为甲基丙二酸为双羧酸结构, 极性较大, 因此报道的这些方法主要方式都在于前处理时的目标待测物转化, 即需要柱前衍生化使其成为适宜气相色谱和液相色谱保留的化合物。众所周知, 衍生化有处理时间长, 衍生化效率稳定性, 以及衍生试剂对操作人员的危害等弊端, 因此常规分析方法中应尽量采用直接测定方式。对于极性较大的化合物, 尤其是有机酸类使用离子色谱分离非常方便, 国内有报道采用离子色谱法检测血清中甲基丙二酸<sup>[5]</sup>, 但方法所耗样品量多达1 mL, 同时分析时间较长。

此外, 琥珀酸是人体中常见的有机酸, 含量较大, 同时为甲基丙二酸的同分异构体, 需要甄别其他疾病导致尿液中琥珀酸增高带来的假阳性。本试验利用离子色谱法对有机酸的选择保留优点再结合串联质谱的高灵敏度、高准确性及高选择性优势, 建立了一种针对甲基丙二酸尿症患者尿液中甲基丙二酸和琥珀酸同时检测的定量方法, 该方法简单、快速、准确、灵敏度高。

### 实验部分

**样品前处理:** 取待测尿液500  $\mu$ L, 加500  $\mu$ L甲醇, 涡旋混合1 min, 12000 rpm离心10 min, 上清液直接进样。

**实验设备:** 940型离子色谱仪, 配889型自动进样器 (瑞士万通公司), API 3200型三重四极杆质谱仪

**色谱条件:** 流动相A相为去离子水, B相为20 mmol/L碳酸钠水溶液。色谱柱为Metrosep A supp 5 (5  $\times$  50mm), 柱温设为40 $^{\circ}$ C。抑制器再生使用5%稀硫酸。进样体积: 20  $\mu$ L。洗脱梯度设置见表1。

表1. 洗脱梯度设置。

| 时间 (min) | 流速 (mL/min) | A相 (%) | B相 (%) |
|----------|-------------|--------|--------|
| 0.00     | 0.80        | 95     | 5      |
| 2.00     | 0.80        | 95     | 5      |
| 11.00    | 0.80        | 20     | 80     |
| 12.00    | 0.80        | 20     | 80     |
| 18.00    | 0.80        | 95     | 5      |

**质谱条件:** 喷雾电压设为-4500V, 离子源温度设为450 $^{\circ}$ C, 气帘气设为20 psi, GS1设为55 psi, GS2设为50 psi, 碰撞气设为6。甲基丙二酸和琥珀酸质谱参数请见表2。

表2. 甲基丙二酸和琥珀酸质谱参数。

|       | Q1    | Q3   | DP  | EP | CE  |
|-------|-------|------|-----|----|-----|
| 甲基丙二酸 | 116.8 | 54.8 | -20 | -5 | -25 |
| 琥珀酸   | 116.8 | 98.9 | -20 | -5 | -16 |

## 结果与讨论

### 1. 线性关系与检出限

使用甲醇-水 (1:1) 溶液配制甲基丙二酸0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、50.0 µg/L系列标准溶液, 按上述色谱和质谱条件进样检测, 得线性回归方程为 $y=1970x+2370$ ,  $r=0.9996$ 。如图 1。以信噪比S/N为3进行计算, 方法检出限为0.167 µg/L。

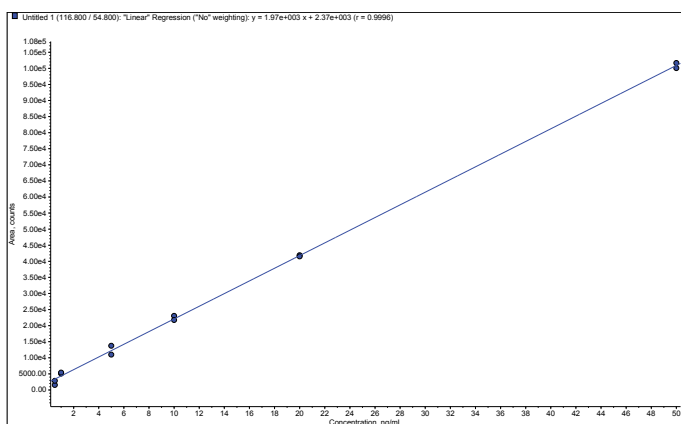


图1. 甲基丙二酸标准曲线。

### 2. 专属性

琥珀酸是人体中常见的有机酸, 含量较大, 同时为甲基丙二酸的同分异构体, 需要甄别其他疾病导致尿液中琥珀酸增高带来的假阳性。分别对琥珀酸和甲基丙二酸进行产物离子扫描 (MS<sup>2</sup>), 如图2。72.9为两种有机酸共同的离子碎片, 此外54.8和98.9分别为甲基丙二酸和琥珀酸特有的离子碎片。因此, 甲基丙二酸选择54.8的产物离子作为定量离子, 建立116.8-54.8的MRM定量离子对, 配制含甲基丙二酸和琥珀酸的混合标准溶液在上述色谱质谱条件下进样采集, 结果表明琥珀酸对其没有干扰, 色谱图如图3。

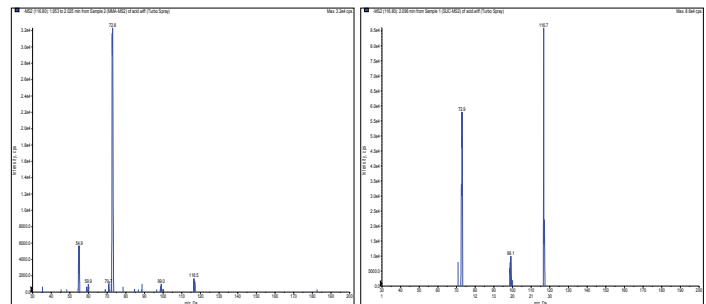


图2. 甲基丙二酸产物离子质谱图 (左) 琥珀酸产物离子质谱图 (右)。

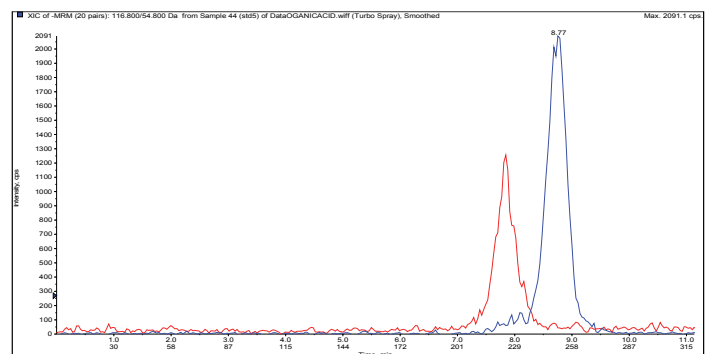


图3. 甲基丙二酸及琥珀酸典型色谱图。

### 3. 精密度与稳定性

分别配制含琥珀酸和甲基丙二酸浓度各为0.8、10.0和40.0 µg/L的尿样按测试条件各连续进样6针考察精密度, 测得各浓度的相对标准偏差为9.8%, 8.9%和4.7%, 表明方法精密度良好。配制含琥珀酸和甲基丙二酸浓度各为10.0 µg/L的尿样, 置于具塞透明玻璃试管中室温保存, 于0、2、4、和6小时取样处理后连续进样3针考察样品稳定性, 另取处理后样品于带盖样品瓶中室温保存, 于0、2、4、6、8和12小时进样3针考察稳定性, 测得结果如表3, 结果表明样品在6小时内室温保存稳定, 处理后样品室温保存12小时稳定。

表3. 稳定性考察。

|       |      | 0h        | 2h       | 4h        | 6h        | 8h       | 12h       |
|-------|------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|-----------|
| 未处理样品 | 测得值  | 10.1 µg/L | 9.8 µg/L | 10.3 µg/L | 10.2 µg/L |          |           |
|       | RSD% | 7.6%      | 4.6%     | 6.1%      | 5.2%      |          |           |
| 处理后样品 | 测得值  | 9.9 µg/L  | 9.9 µg/L | 10.2 µg/L | 10.4 µg/L | 9.7 µg/L | 10.3 µg/L |
|       | RSD% | 8.3%      | 6.2%     | 7.1%      | 9.6%      | 6.8%     | 5.9%      |

## 结论

本方法使用SCIEX的三重四极杆质谱系统及Metrohm的离子色谱系统联用，克服了分子量小、极性大的化合物干扰大和常规反向色谱柱难以保留的挑战，同时解决了常规体内代谢物琥珀酸对甲基丙二酸的同分异构体干扰。建立了高灵敏度、高选择性和高稳定性的快速IC-MS/MS检测方法。该方法具有线性好、准确度高等优点，具有较高的分析通量。

## 参考文献

1. 毋盛楠,韩连书,叶军等. 甲基丙二酸血症患者血串联质谱及尿气相色谱质谱检测分析[J]. 中华医学杂志. 2013 (08)
2. 崔学峰,倪君君,相婷等. LC-MS/MS方法检测血中甲基丙二酸含量及应用分析[J].中华检验医学杂志. 2010 (12)
3. Yoon, Hye-Ran; Thapa, Maheshwor. A Rapid, Simple Determination of Sulfur-containing Compounds and Methylmalonic Acid on Plasma using GC-MS-SIM for the Diagnosis of Homocysteinemia[J]. The Korean Society of Inherited Metabolic Disease, 2015(15)
4. Mark M. Kushnir, Gordon J. Nelson, Elizabeth L. Frank, et.al, High-Throughput Analysis of Methylmalonic Acid in Serum, Plasma, and Urine by LC-MS/MS. Method for Analyzing Isomers Without Chromatographic Separation[A], Clinical Applications of Mass Spectrometry in Biomolecular Analysis, 2016, 159-173
5. 颜金良, 俞明飞, 金米聪. 离子色谱法快速测定血清中甲基丙二酸含量[J], 中国卫生检验杂志, 2014 ( 24 )

\*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-02-12025-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](http://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)