

衍生化电喷雾串联质谱法快速检测 甲基丙二酸尿症

孙 萍¹, 梁琼麟¹, 王义明¹, 罗国安^{1*}, 张 霆², 王立文²

(1. 清华大学生命科学与医学研究院化学生物学教育部重点实验室, 北京 100084;

2. 首都儿科研究所, 北京 100020)

摘要 甲基丙二酸尿症的主要标志物为甲基丙二酸。采用正丁醇衍生化, 以结合同位素化合物为内标, 用电喷雾串联质谱快速、准确且选择性地定量检测了尿液中的甲基丙二酸。同时定量检测了病人治疗过程中尿液的肌酐, 应用甲基丙二酸与肌酐的比值对两例甲基丙二酸病人的治疗过程予以监控。所建立的定量方法具有快速、准确和高选择性等特点, 既可用于大规模和高通量的筛查(2 min/样), 又可用于病人治疗过程中的监控。

关键词 甲基丙二酸尿症; 衍生化; 串联质谱

中图分类号 O 657

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2005)03-0421-05

甲基丙二酸尿症(Methylmalonic acidemia, MMAemia)是一种常见的有机酸代谢疾病, 是我国发病率最高的遗传性代谢疾病之一。临床表现主要为嗜睡、生长发育迟缓、发作性呕吐、脱水、呼吸困难和肌张力低下, 少数出现肝大、昏迷、腱反射减弱或消失等症状, 约有半数病人有白细胞减少、血小板减少和贫血的症状。通常患者尿液与血液中的甲基丙二酸含量大大高于同龄正常人, 检测血样或尿样中的甲基丙二酸可进行新生儿代谢疾病筛查及病人治疗过程的监控。由于尿液中甲基丙二酸的浓度通常高于血清和其它体液, 且标本最易于收集, 因此将尿液作为分析对象更为适宜。但尿液中代谢产物的含量受人体各种因素的影响变化较大, 因此通常采用尿样中的甲基丙二酸/肌酐比值作为检测的指标。

目前, 对于甲基丙二酸尿症筛查或诊断的化学方法有GC-MS^[1~4]、毛细管电泳^[5~7]、HPLC-MS^[8,9]及MS/MS^[10,11]等。甲基丙二酸尿症检测的困难在于: 尿液中同时存在浓度相当的甲基丙二酸同分异构体——丁二酸, 它与甲基丙二酸的色谱性质及质谱碎片性质十分相近, 用GC-MS和HPLC-MS法不能区分甲基丙二酸与丁二酸, 而且GC-MS及HPLC-MS法的分析时间较长, 不适于大规模的筛查应用。MS/MS方法比GC-MS和HPLC-MS法分析的速度快得多, 可同时分析多种代谢病标志物, 应用前景广泛。但丁二酸的质谱碎片与甲基丙二酸的基本相同, 直接的MS/MS测定仍然无法避免丁二酸的干扰, 这就需要探索高选择性的衍生化方法。

我们采用正丁醇衍生化甲基丙二酸与丁二酸, 发现两者的衍生化产物的特征质谱碎片有显著差异, 从而不必采取色谱分离即可直接用串联质谱达到定量所需的选择性, 把定量分析的时间从几十分钟缩短到2 min, 大大提高了分析的速度。同时, 同位素化合物内标的使用避免了尿液复杂基质的干扰, 保证了定量分析的准确性和精确性。此外还采用MS/MS法同时定量检测了病人治疗过程中尿液的肌酐含量, 应用甲基丙二酸与肌酐的比值对甲基丙二酸病人的治疗予以监控。本文建立的衍生化结合同位素内标串联质谱的定量方法具有快速、准确和高选择性的特点, 既可以用于大规模、高通量的筛查(2 min/样), 又可用于病人治疗过程的监控。

收稿日期: 2004-06-16

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(批准号: 2001CB510306)资助

联系人简介: 罗国安(1946年出生), 男, 教授, 博士生导师, 从事生命分析化学方面的研究

E-mail: luoga@mails.tsinghua.edu.cn

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

甲基丙二酸(Methylmalonic Acid, MMA)、丁二酸(Succinic Acid, SA)及肌酐均购自Sigma公司; d_3 -甲基丙二酸及 d_3 -肌酐均购自Cambridge Isotope Laboratory; 甲醇(HPLC级)购自Fisher公司; 自制饱和氯化氢的正丁醇溶液

API 3000 三级四极杆质谱(Perkin Elmer公司), 电离电压4 800 V, 碰撞气为 N_2 气, 小孔电压为26 V, 液相泵为PE 200二元泵, 样品浓缩仪购自Techne公司

1.2 检测甲基丙二酸含量

1.2.1 标准溶液配置 配制甲基丙二酸及 d_3 -甲基丙二酸贮存标准溶液, 浓度分别为5和0.15 mmol/L, 溶剂为甲醇 将MMA标准溶液依次稀释为0.010, 0.040, 0.016, 0.400, 0.600, 0.800和1.000 mmol/L. 将50 μ L MMA标准溶液与10 μ L d_3 -MMA内标溶液混合

1.2.2 衍生化条件的选择 分别取4份0.40 mmol/L甲基丙二酸标准溶液50 μ L, 加入200 μ L自制饱和氯化氢的无水正丁醇, 衍生化温度分别为55, 60, 65和70 $^{\circ}C$, 封闭加热20 min, 用 N_2 气吹干, 加入500 μ L甲醇和水(体积比80:20)溶解, 留待分析

分别取4份0.40 mmol/L甲基丙二酸标准溶液50 μ L, 衍生化步骤同上, 衍生化时间分别为10, 15, 20和25 min

1.2.3 尿样前处理 将100 μ L尿液, 400 μ L甲醇及100 μ L内标溶液混合, 振荡5 min, 在8 000 g下离心10 min, 取上清液60 μ L, 在 N_2 气流下挥发至干, 加入200 μ L饱和HCl的正丁醇溶液, 在密闭状态下于65 $^{\circ}C$ 加热15 min, 用 N_2 气吹干. 加入500 μ L甲醇和水(体积比80:20)留待分析

1.2.4 质谱分析甲基丙二酸含量 用0.10 mmol/L甲基丙二酸标准溶液按上述方法衍生化后优化质谱条件, 质谱检测为多反应监测模式, 选择监测的质谱反应离子对分别为: 甲基丙二酸 231 \rightarrow 119, 231 \rightarrow 175; d_3 -甲基丙二酸 234 \rightarrow 122, 234 \rightarrow 178

定量分析: 采用流动注射进样; 流动相为甲醇和水(体积比80:20, 含体积分数为0.1%的甲酸), 流速为200 μ L/min; 每个样品的分析时间为2 min, 进样量为20 μ L.

1.3 检测肌酐含量

1.3.1 标准溶液的配制 配制浓度分别为0.002, 0.008, 0.020, 0.040, 0.060, 0.080和0.10 mmol/L的系列标准溶液, 内标 d_3 -肌酐溶液浓度为0.068 mmol/L, 溶剂均为纯甲醇 将50 μ L标准溶液与10 μ L内标溶液混合后留待分析

1.3.2 尿样前处理 将50 μ L尿液与10 μ L内标溶液混合, 于4 000 g下离心10 min, 取上层清液进行分析

1.3.3 质谱分析肌酐含量 质谱检测采用负离子检测多反应监测模式: 肌酐 114 \rightarrow 44; d_3 -肌酐 117

47. 流动注射法分析同甲基丙二酸方法

2 结果与讨论

2.1 正丁醇衍生化的必要性与条件优化

图1为检测甲基丙二酸和丁二酸未衍生化时的质谱碎片图(负离子检测).

甲基丙二酸与丁二酸母离子裂解都可生成 m/z 73碎片(丢失 CO_2), 因此无法用 m/z 73定量 丁二酸脱水生成 m/z 99的碎片, 虽然甲基丙二酸没有发生此碎裂, 但脱水反应不是特异性裂解, 用于定量检测稳定性不够, 因此直接的MS/MS检测无法排除丁二酸同分异构体的干扰, 衍生化前一定要进行处理

甲基丙二酸、丁二酸与正丁醇发生酯化反应生成二丁酯, 质谱检测采用正离子模式, 第一级MS选择母离子231, 二级质谱采用子离子扫描, 质谱图见图2

由图2可知, 甲基丙二酸二丁酯有 m/z 175, 119碎片, 而丁二酸二丁酯的这两个碎片峰强度均非

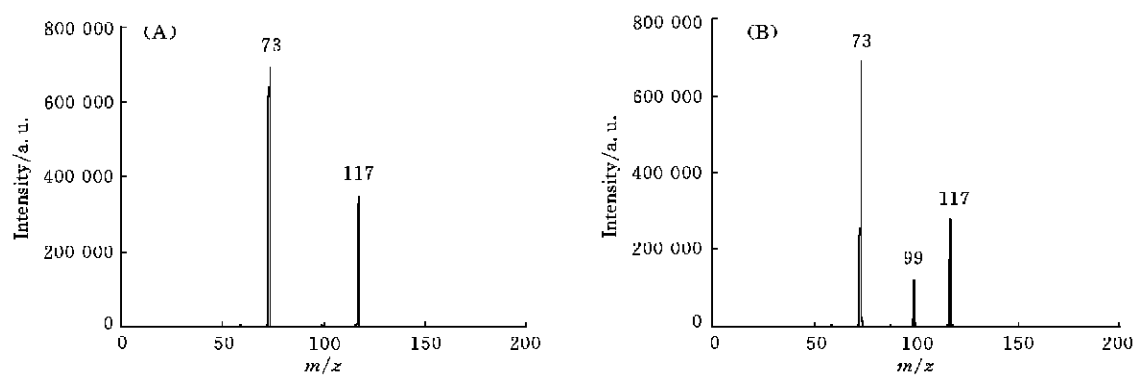


Fig 1 Ms spectra of fragments of the product ions of MMA (A) and SA (B) without derivation (m/z 117)

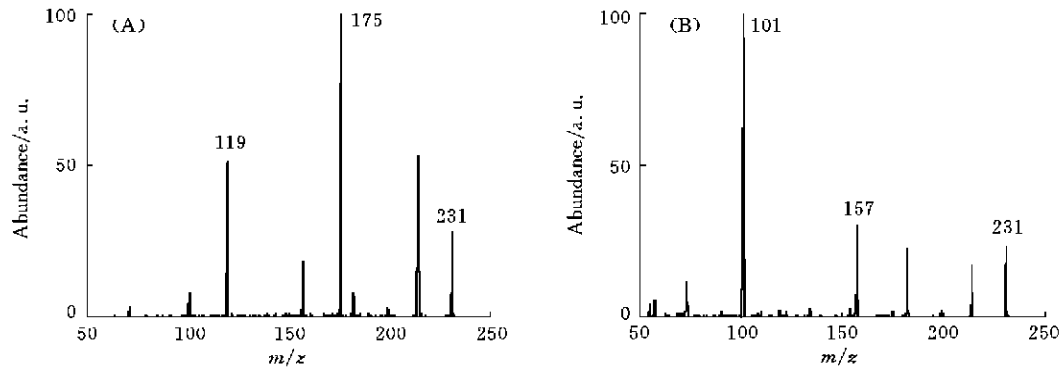


Fig 2 Ms spectra of fragments of product ions of the *n*-butyl esters of MMA (A) and SA (B)

常低 对于丁二酸二丁酯, 较强的子离子为 m/z 101 和 157, 这是因为失去丁烯(m/z 56)后, 更倾向于失去 H_2O (m/z 18), 产物可形成稳定的五元环正离子, 而甲基丙二酸二丁酯无法形成五元环离子. 进一步的实验表明, 当两者浓度相同时, 丁二酸二丁酯 m/z 175 和 119 峰的强度约是甲基丙二酸相应峰强度的 1%~5%, 其中 m/z 119 峰更小, 所以选择 m/z 119 作为质谱监测的二级离子, 从而定量地检测甲基丙二酸, 可区分甲基丙二酸与丁二酸 同时监测 m/z 175 碎片, 作为定性分析的辅助离子.

考察了加热反应的时间与温度对反应完全程度的影响 以质谱检测离子对 m/z 231 119 强度为指标, 确定检测时间 15 min, 温度 65 为最佳衍生化条件.

2.2 甲基丙二酸定量方法的考察

线性工作曲线为 $Y=12.81c-0.0026$, c 为标准品的浓度, 单位为 $mmol/L$, Y 为峰面积的比值, 相关系数 $R^2=0.9996$ 检测限($S/N=3$)为 0.001 mmol/L .

采用稳定同位素内标法可很好地避免基质的影响及质谱仪器的波动

检测 3 份低、中及高浓度的尿样, 连续 6 d, 每天进样测试 6 次, 考察定量方法的精密度, 分析结果如表 1 所示 处理后的样品保存在 4 冰箱中.

Table 1 Precision statistics of the MS/MS assay

MMA concentration/ ($mmol\cdot L^{-1}$)	RSD (%)	
	Intra-day($n=6$)	Inter-day($n=6$)
0.052 6	3.9	6.6
0.219 0	3.9	5.0
0.485 0	1.6	1.5

该定量方法的日间和日内精密度分别在 1.5%~6.6% 和 1.6%~3.9% 之间, 低浓度时的结果也令人满意 此外, 尿样衍生化后在 6 d 内检测, 结果重现性好, 说明生成的正丁酯具有很好的稳定性, 作为定量分析是可靠的

在两份(低和高浓度)尿液中分别加入 0.080, 0.320 和 0.600 $mmol/L$ 和 MMA 标准溶液, 每份样品检测 5 次, 计算回收率与精密度, 结果如表 2 所示 可见, 回收率在 90.3%~101.5% 之间, 说明该

定量方法具有很好的准确性

Table 2 Recovery statistics of the MS/MS assay

Sample	$c(\text{Addition})/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	$c(\text{Found})/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	Retrievability (%)	RSD (%) ($n=5$)
1	0	0.138 ± 0.010	—	6.9
2	0.080	0.214 ± 0.009	96.1	4.2
3	0.32	0.453 ± 0.005	98.7	1.1
4	0.60	0.679 ± 0.024	90.3	3.5
5	0	0.575 ± 0.017	—	3.0
6	0.08	0.652 ± 0.014	96.3	2.1
7	0.32	0.894 ± 0.013	99.7	1.4
8	0.60	1.186 ± 0.032	101.5	2.7

2 3 肌酐定量方法的建立及考察

对肌酐和 d₃-肌酐标准溶液做质谱检测, 子离子扫描质谱图如图 3 所示

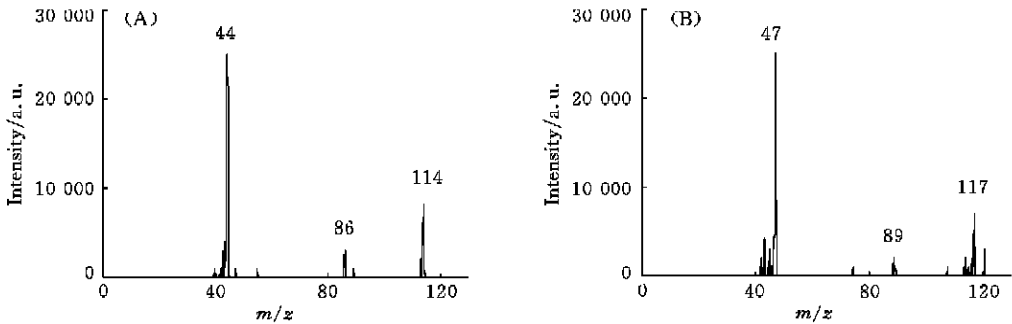


Fig 3 Ms spectra of fragments of product ions of creatinine(A) and d₃-creatinine(B)

肌酐定量分析的结果如下: 在 0.001 0~ 0.10 mmol/L 范围内线性良好 ($R^2=0.999\ 3\sim 0.999\ 9$); 加样回收率在 92.3%~ 98.7% 之间, 日内和日间精密度分别为 1.9%, 5.2% 和 2.7%, 6.8%. 说明该定量方法具有良好的准确性和稳定性

由于尿液中含有较多的盐, 对被测物的离子化可产生显著影响, 因此必须采用内标法来消除基质影响. 同位素化合物与分析物具有几乎完全相同的化学性质, 基质对它们的影响完全一致, 因此, 当定量分析甲基丙二酸与肌酐时, 均采用同位素化合物作为内标. 分析结果表明, 同位素内标定量法具有很好的准确性与稳定性, 可满足定量分析的要求

2 4 检测甲基丙二酸尿症病人治疗过程中的尿样

MMA 按治疗效果可分为 V it B₁₂有效型和 V it B₁₂无效型两种. 对两位甲基丙二酸尿症病人治疗过程的尿样(首都儿科研究所提供, 经 GC-MS 确诊, 入院治疗后确认为 V it B₁₂有效型, 病人甲: 男, 6 个月; 病人乙: 女, 8 岁)进行质谱分析, 结果如图 4 所示

由图 4 可知: (1) 甲基丙二酸浓度与甲基丙二酸/肌酐浓度比值的变化趋势不同, 仅检测甲基丙二酸对于病人治疗过程的监控是不够的, 检测肌酐是必要的; (2) 病人尿液中 MMA/Creatinine 浓度比值在注射前最高, 注射后下降, 后又回升, 此后的 36 h 再次下降并回升, 到 48 h 时回复到注射前水平. 所以在 48 h 左右需再次注射 V it B₁₂, 以缓解病人体内的代谢异常. 这与临床治疗情况较吻合, 2 d 注射一次 V it B₁₂在治疗过程中具有比较好的临床效果

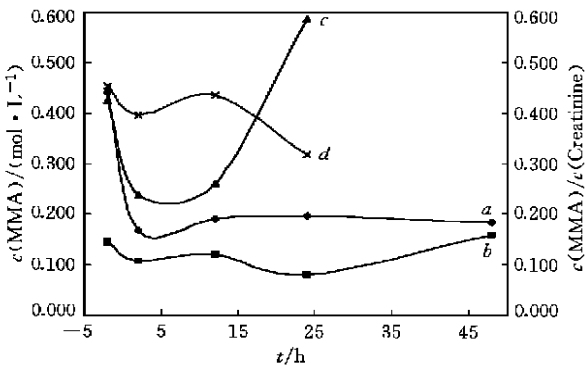


Fig 4 Variation in urinary detection of methylmalonic acid and creatinine with time

a Case 1: MMA concentration; b case 1: $c(\text{MMA})/c(\text{Creatinine})$; c case 2: MMA concentration; d case 2: $c(\text{MMA})/c(\text{Creatinine})$.

治疗过程对于甲基丙二酸患者非常重要, 合理并及时的治疗可有效地控制病症。在治疗过程中, 首先需判断患者为V it B₁₂有效型, 还是V it B₁₂无效型, 其次需确定药量及用药时间。这两步是治疗过程中的关键步骤。用所建立的检测方法可达到这两个目的, 因此本方法具有重要的临床应用价值, 对患者的治疗具有指导意义。

3 结 论

本文采用正丁醇衍生化与电喷雾串联质谱的定量分析方法检测甲基丙二酸尿症, 与传统的GC-MS筛查方法相比, 每个样品的分析时间由40 min 缩短到2 min; 与其它串联质谱(MS-MS)方法相比, 正丁醇衍生化方法的使用避免了直接质谱测定存在的同分异构体干扰, 大大提高了分析方法的选择性及准确性; 用串联质谱同时定量尿液中的肌酐, 避免了其它生化检测方法带来的误差。方法学验证及初步临床实践应用表明, 该方法快速、准确且灵敏, 可以用于新生儿代谢疾病筛查及病人治疗过程的监控, 对于提高治疗效果具有指导意义。

参 考 文 献

- [1] Mccann M. T., Thompson M. M., Gueron I. C. *et al.* Clin. Chem. [J], 1996, **42**(6): 910—914
- [2] Kushnir M. M., Komaromy-Hiller G. J. Chromatogr. B [J], 2000, **741**(2): 231—241
- [3] ZHAO Ji-Yuan (赵基源), WANG Yi-Ming (王义明), LUO Guo-An (罗国安) *et al.* Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报) [J], 2003, **24**(8): 1368—1372
- [4] Pfeiffer C. M., Jay S. S., Miller D. T. *et al.* Clin. Chem. [J], 1999, **45**(8): 2236—2242
- [5] Schneede J., Ueland P. M. Anal. Chem. [J], 1995, **67**(5): 812—819
- [6] Schneede J., Mortensen J. H., Kvalheim G. *et al.* J. Chromatogr. A [J], 1994, **669**(1—2): 185—193
- [7] Marsh D. B., Nuttall K. L. J. Capillary Electroph. [J], 1995, **2**(2): 63—67
- [8] Toyoshima S., Saido H., Watanabe F. *et al.* Biosci. Biotech. Biochem. [J], 1994, **58**(10): 1882—1883
- [9] Babidge P. J., Babidge W. J. Anal. Biochem. [J], 1994, **216**(2): 424—426
- [10] Magera M. J., Helgeson J. K., Matern D. *et al.* Clin. Chem. [J], 2000, **46**(11): 1804—1810
- [11] Kushnir M. M., Komaromy-Hiller G., Shushan B. *et al.* Clin. Chem. [J], 2001, **47**(11): 1993—2002

Rapid Detection of Methylmalonic Acidemia by Derivation and Electrospray Tandem Mass Spectrometry

SUN Ping¹, LANG Qiong-Lin¹, WANG Yi-Ming¹, LUO Guo-An^{1*}

ZHANG Ting², WANG Li-Wen²

(1. Key Lab of Chemical Biology of Ministry of Education, Institute of Biomedicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China)

Abstract The main biomarker of methylmalonic acidemia was known as methylmalonic acid. Therefore, a rapid, selective and accurate method is developed to determine methylmalonic acid in urine by using electrospray tandem mass spectrometry with *n*-butyl ester derivation and stable isotope dilution. The concentration of creatinine in urine was also determined without derivation. With this quantitative method of *c*(MMA)/*c*(creatinine), the urines samples of two MMAemia patients were analyzed through the process of treatment. The result shows that it can be used not only for the screening of inborn errors of metabolism, but also in the treatment process of MMAuria patients.

Keywords Methylmalonic acidemia; Derivation; Tandem mass spectrometry

(Ed: A, G)