

液相 - 三重四极杆质谱法进行新生儿遗传代谢病筛查的应用方案

LCMSMS-281

摘要: 遗传代谢性疾病是一类由于单基因缺陷而引起代谢途径阻断的疾病。许多遗传代谢性疾病对新生儿危害极大，因此是新生儿筛查的主要内容。串联质谱用于新生儿筛查是自 Guthrie 将细菌抑制法用于苯丙酮尿症筛查以来，新生儿筛查史上最重要的技术革新。本文建立了一种应用非衍生化液相 - 三重四极杆质谱法检测新生儿足跟干血斑中氨基酸及酰基肉碱的各项指标来进行遗传代谢缺陷筛查的技术。

关键词: 新生儿筛查 液相 - 三重四极杆质谱仪 非衍生化法 氨基酸酰基肉碱

国际新生儿遗传代谢病筛查发展趋势逐步提高到以串联质谱技术为中心的筛查。通过检测滤纸干血片中氨基酸和酰基肉碱浓度，进行氨基酸代谢、有机酸和脂肪酸代谢障碍等的筛查，使患儿得到早期诊断和及时治疗，

避免体格和智力发育障碍。本文应用非衍生化样本处理的串联质谱技术 (tandem mass spectrometry, MS/MS) 检测新生儿足跟干血斑中的氨基酸及酰基肉碱浓度，以便于氨基酸、有机酸及脂肪酸代谢病的检测和筛查。

实验部分

1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050CL 联用系统。

具体配置为 LC-20ADXR×2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30ACMP 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050CL 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver.5.82 色谱工作站；孵育震荡仪 (Labsystems iEMS)。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：无，安装在线过滤器

流动相：新生儿筛查试剂盒流动相

初始流速：0.1 mL/min

柱温：室温自动进样器温度：4℃

进样量：1 μL

洗脱方式：流速梯度见表 1

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.10	Pumps	Total flow	0.05
0.60	Pumps	Total flow	0.12
0.61	Pumps	Total flow	1
1.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：ESI，+

雾化气：3.0 L/min

加热气：10.0 L/min

接口温度：350℃

驻留时间：10 ms

扫描模式：MRM

干燥气：10.0 L/min

加热模块温度：400℃

DL 温度：250℃

MRM：见表 2

表2 氨基酸、酰基肉碱及其同位素内标的MRM参数

MRM	Name	Precursor ion	Product ion	CE
1	Ala	90.2	44.0	-15
2	Ala IS	94.2	48.0	-15
3	Val	118.2	72.2	-14
4	Val IS	126.2	80.2	-14
5	Gly	76.1	30.0	-13
6	Gly IS	78.1	32.0	-13
7	Orn	133.2	70.2	-17
8	Orn IS	135.2	72.2	-17
9	Arg	175.2	70.2	-24
10	Arg IS	180.2	75.2	-24
11	Leu	132.2	86.1	-11
12	Leu IS	135.2	89.1	-11
13	Met	150.2	104.1	-13
14	Met IS	153.2	107.1	-13
15	Phe	166.2	120.1	-14
16	Phe IS	172.2	126.1	-14
17	Tyr	182.2	136.1	-14
18	Tyr IS	188.2	142.1	-14
19	Cit	176.2	113.1	-17
20	Cit IS	178.2	115.1	-17
21	Pro	116.2	70.1	-18
22	C0	162.3	103.1	-17
23	C0 IS	171.3	103.1	-17
24	C2	204.3	85.1	-19
25	C2 IS	207.3	85.1	-19
26	C3	218.3	85.1	-22
27	C3 IS	221.3	85.1	-22
28	C4OH/C3DC	248.3	85.1	-23
29	C4OH/C3DC IS	255.3	85.1	-22
30	C4	232.3	85.1	-20
31	C4 IS	235.3	85.1	-20
32	C5OH/C4DC	262.1	85.1	-23
33	C5OH/C4DC IS	291.1	85.1	-22
34	C5	246.3	85.0	-23
35	C5 IS	255.3	85.0	-22
36	C5:1	244.3	85.0	-23
37	C5DC/C6OH	276.1	85.1	-27
38	C6	260.1	85.1	-23
39	C6DC	290.1	85.1	-27
40	C8	288.1	85.1	-23
41	C8:1	286.1	85.1	-23
42	C10	316.2	85.2	-27

43	C10 IS	381.2	85.2	-24
44	C10:1	314.2	85.2	-27
45	C10:2	312.2	85.2	-27
46	C12	344.2	85.2	-27
47	C12:1	342.2	85.2	-27
48	C14	372.2	85.2	-24
49	C14:1	370.2	85.2	-27
50	C14:2	368.2	85.2	-27
51	C14OH	388.5	85.1	-26
52	C14OH IS	403.5	85.1	-27
53	C16	400.5	85.1	-27
54	C16:1	398.5	85.1	-32
55	C16:1OH	414.5	85.1	-32
56	C16OH	416.5	85.1	-32
57	C18	428.5	85.1	-29
58	C18:1	426.5	85.1	-29
59	C18:2	424.5	85.1	-29
60	C18:1OH	442.5	85.1	-29
61	C18OH	444.5	85.1	-29

1.3 材料与方法

1.3.1 材料

检测样本：待检测样本为滤纸干血片样本。采集微量血滴于 S&S903 滤纸上，室温下自然晾干，-20℃冰箱保存待用。

试剂：非衍生化法串联质谱法新生儿筛查检测试剂盒，包含 10 种氨基酸及 9 种酰基肉碱的同位素内标 (CIL 品牌)，流动相采用试剂盒提供的流动相。

1.3.2 方法

方法原理：使用稳定同位素标记的氨基酸及酰基肉碱标准品的溶剂萃取滤纸干血片中的氨基酸及肉碱，然后用 MS/MS 系统进行分析。通过测定每个氨基酸及肉碱与其对应的同位素内标的离子峰强度，由已知水平的内标，即可通过岛津新生儿筛查软件自动计算出所测样本的氨基酸及酰基肉碱水平。

样本前处理方法：用直径 3 mm 打孔器在滤纸血片上取样，置于平底 96 孔板中，每孔加入含氨基酸及酰基肉碱同位素内标的甲醇溶液 90 μL，覆膜，45℃密封孵育震荡 (650~750 r/min) 45 min，吸取 75 μL 萃取液转移至 V 型底 96 孔板内，铝膜覆盖，上机检测。如图 1 所示。

接上机分析。



图1 样本前处理及分析流程

■ 结果讨论

2.1 标准品的 MRM 色谱图

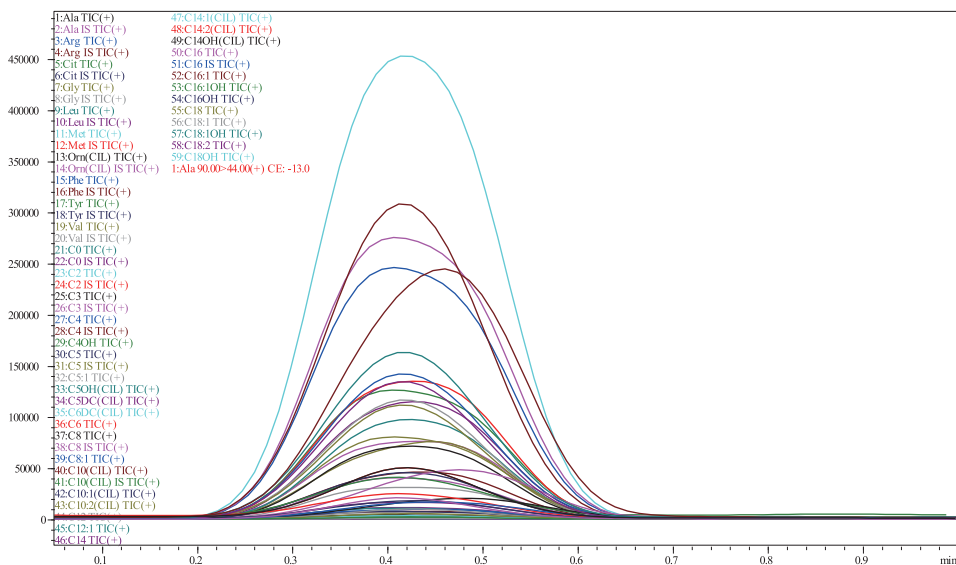
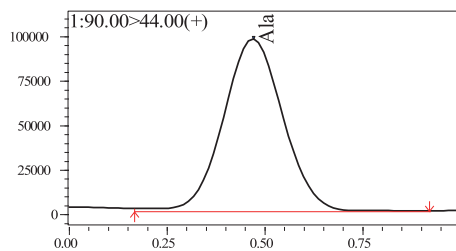
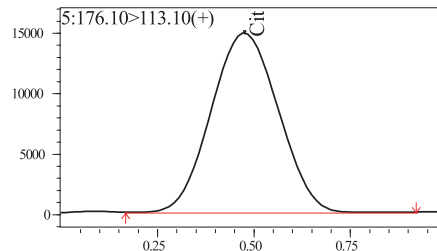


图2 含混合内标的提取液色谱图

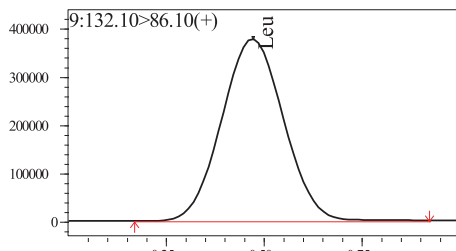
2.2 低浓度水平质控典型色谱图



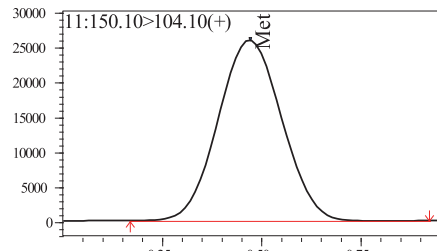
843 μmol/L



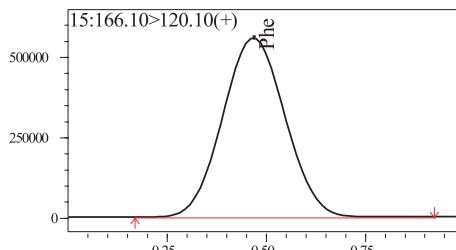
95 μmol/L



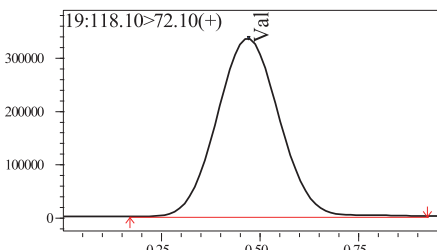
303 μmol/L



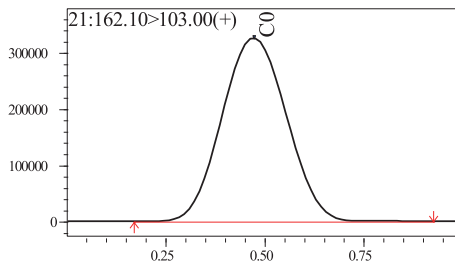
120 μmol/L



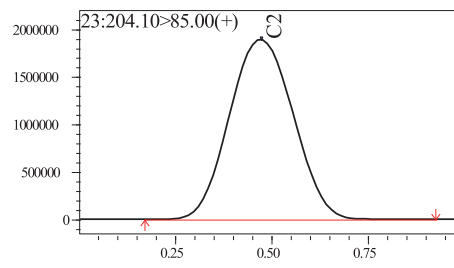
208 μmol/L



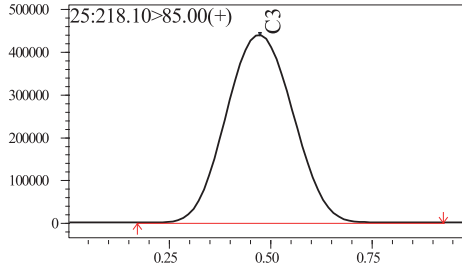
369 μmol/L



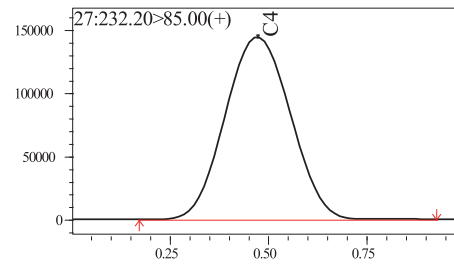
98.10 $\mu\text{mol/L}$



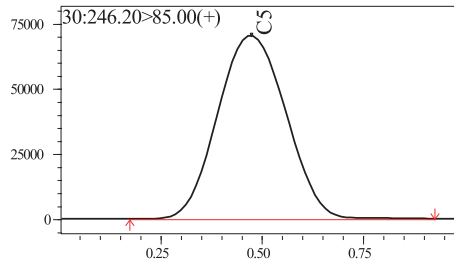
62.70 $\mu\text{mol/L}$



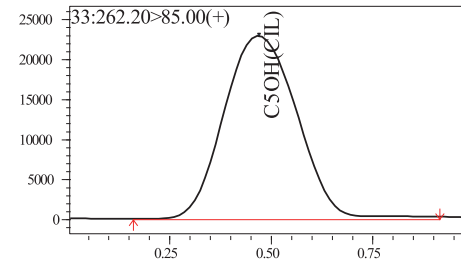
10.40 $\mu\text{mol/L}$



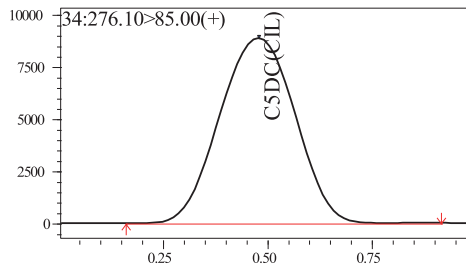
2.73 $\mu\text{mol/L}$



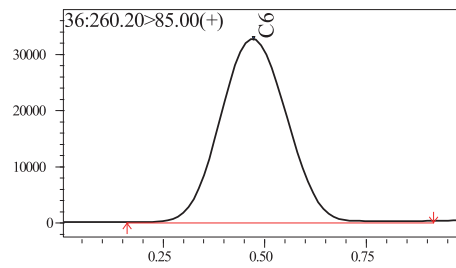
1.02 $\mu\text{mol/L}$



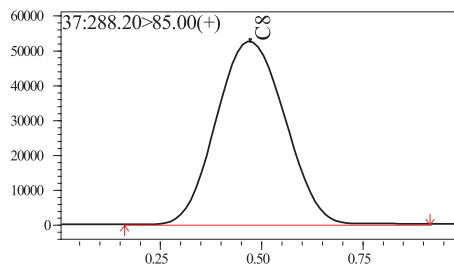
0.53 $\mu\text{mol/L}$



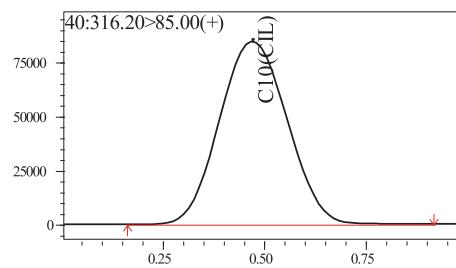
0.61 $\mu\text{mol/L}$



0.46 $\mu\text{mol/L}$



0.68 $\mu\text{mol/L}$



0.94 $\mu\text{mol/L}$

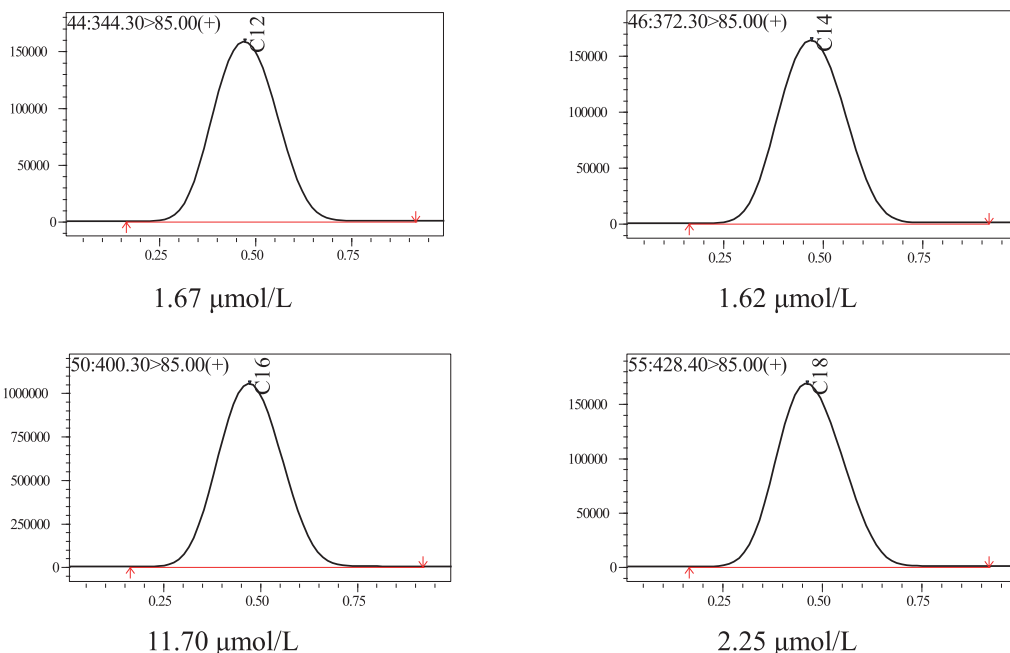


图3 典型质谱图

2.3 校正因子计算

计算公式为：校正因子 = 靶值 / 实测值，具体结果见表 3 所示。

2.4 精密度考察

取试剂盒内提供的高、低 2 个浓度水平的质控品，每次各测定 25 个样本，连续测定 10 天，得出批内和批间变异系数 (CV)，结果显示：氨基酸低值的变异系数范围为 2.04%-9.84%；氨基酸高值的变异系数范围为 1.34%-7.17%；酰基肉碱低值的变异系数范围为 1.82%-5.37%；酰基肉碱高值的变异系数范围为 1.7%-3.72%。所得变异系数均在 15% 以内，结果符合相关要求。计算结果详见表 4-7。

2.5 准确度考察

取试剂盒厂商提供的铂金埃尔默 (PE) 室间质控品进行检测，对其中的氨基酸和酰基肉碱进行分析，计算检测值与靶值的相对误差。结果显示：低浓度氨基酸 QC 样本检测值与靶值相对误差绝对值范围为 5.09%-8.29%；高浓度氨基酸 QC 样本检测值与靶值相对误差绝对值范围为 4.71%-9.81%；低浓度酰基肉碱 QC 样本检测值与靶值相对误差绝对值范围为 3.12%-9.96%；高浓度酰基肉碱 QC 样本检测值与靶值相对误差绝对值范围为 2.97%-8.90%，所有检测值与靶值的相对误差均在 10% 范围内。计算结果详见表 8-11。

结论

本文利用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050CL 联用系统成功建立了非生化液相串联质谱法测定新生儿干血斑中氨基酸及酰基肉碱的浓度的方法。通过精密度、准确度的考察，证明该方法可以快速、准确、稳定地进行氨基酸及酰基肉碱含量的检测，能够用于液质法遗传代谢病筛查。

表3 校正因子计算

	Ala	Cit	Gly	Leu	Met	Phe	Tyr	Val	C0	C2	C3	C4	C5	C5DC	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
LQC 靶值	843	95	814	303	120	208	353	369	98	61.7	10.4	2.73	1.02	0.61	0.46	0.68	0.94	1.67	1.62	11.7	2.25
HQC 靶值	1922	294	2232	734	425	628	1162	935	241	159.3	27.9	7.67	2.83	1.65	1.28	1.9	2.62	4.86	4.54	31.7	4.97
LQC	521.1	88.8	683.7	287.2	88.7	177.7	263.2	292.4	63.7	60.2	10.8	2.6	0.9	0.1	0.4	0.6	0.6	1.2	1.3	8.9	1.5
HQC	1064.4	247.9	1408.1	561.0	278.4	485.7	770.3	641.2	139.4	143.8	26.2	6.4	2.1	0.3	1.0	1.4	1.6	3.2	3.4	22.8	3.0
L-IF	1.62	1.07	1.19	1.05	1.35	1.17	1.34	1.26	1.54	1.03	0.96	1.06	1.16	4.95	1.14	1.21	1.45	1.34	1.20	1.31	1.55
H-IF	1.81	1.19	1.59	1.31	1.53	1.29	1.51	1.46	1.73	1.11	1.07	1.21	1.32	6.28	1.24	1.36	1.69	1.54	1.34	1.39	1.65
AVG	1.71	1.13	1.39	1.18	1.44	1.23	1.42	1.36	1.63	1.07	1.02	1.13	1.24	5.62	1.19	1.28	1.57	1.44	1.27	1.35	1.60

注：单位=umol/L如使用CIL内标，由于缺少C5DC内标，PE及Chromsystem质控计算出的C5DC校正因子均偏大，如使用PE及Chromsystem试剂盒，则不会出现此现象。

表5 高浓度氨基酸QC精密度CV值

目标物	Ala	Cit	Gly	Leu	Met	Phe	Tyr	Val
PE-HQC-01	1945.90	251.22	1983.88	657.14	404.56	579.52	1072.00	856.00
PE-HQC-02	1859.40	258.40	1875.20	670.37	382.44	596.69	1112.36	869.25
PE-HQC-03	1732.21	282.28	1936.69	671.18	432.11	609.71	1079.59	867.44
PE-HQC-04	1808.92	309.59	1892.69	661.39	381.67	595.72	1115.38	862.94
PE-HQC-05	1780.39	278.24	2036.62	657.24	392.89	601.81	1095.91	863.35
PE-HQC-06	1776.95	279.72	1934.81	669.96	394.77	588.05	1082.76	896.25
PE-HQC-07	1778.44	289.81	2013.75	671.95	382.97	608.61	1137.95	873.08
PE-HQC-08	1839.61	313.53	1971.23	660.87	365.57	598.30	1096.70	882.28
PE-HQC-09	1825.87	267.78	1878.11	655.13	439.68	599.31	1069.26	869.36
PE-HQC-10	1853.85	270.82	2050.04	644.42	432.65	596.84	1077.00	880.77
AVG	1820.15	280.14	1957.30	661.97	400.93	597.46	1093.89	872.07
SD	59.58	20.09	64.20	8.95	25.56	8.89	22.25	11.64
CV	3.27%	7.17%	3.28%	1.35%	6.38%	1.49%	2.03%	1.34%

表6 低浓度酰基肉碱QC精密度CV值

目标物	C0	C2	C3	C4	C5	C5DC	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
PE-LQC-01	65.32	10.80	2.89	1.11	0.70	0.47	0.75	0.97	1.75	1.64	12.18	2.28	104.39
PE-LQC-02	65.19	10.95	2.91	1.11	0.67	0.51	0.73	0.94	1.74	1.72	12.37	2.45	104.99
PE-LQC-03	62.87	11.60	2.83	1.10	0.69	0.48	0.75	1.09	1.95	1.85	11.33	2.22	105.74
PE-LQC-04	66.06	10.68	2.96	1.10	0.73	0.48	0.72	1.05	1.92	1.80	12.60	2.39	104.29
PE-LQC-05	62.34	11.61	2.71	1.07	0.70	0.49	0.70	1.08	1.75	1.67	12.74	2.32	104.37
PE-LQC-06	65.46	11.07	3.02	1.09	0.69	0.49	0.71	1.04	1.77	1.64	11.99	2.29	102.11
PE-LQC-07	64.65	11.04	2.72	1.04	0.69	0.46	0.70	1.02	1.74	1.70	11.70	2.20	106.16
PE-LQC-08	64.30	10.39	3.13	1.06	0.65	0.46	0.70	1.02	1.80	1.66	12.06	2.32	104.10
PE-LQC-09	63.96	10.70	2.87	1.14	0.77	0.50	0.75	1.02	1.82	1.78	11.52	2.35	104.17
PE-LQC-10	63.93	11.20	3.16	1.07	0.64	0.45	0.69	0.98	1.76	1.65	12.17	2.42	97.79
AVG	64.41	11.00	2.92	1.09	0.69	0.48	0.72	1.02	1.80	1.71	12.06	2.32	103.81
SD	1.17	0.39	0.15	0.03	0.04	0.02	0.02	0.05	0.08	0.07	0.45	0.08	2.38
CV	2.29%	1.82%	3.57%	5.16%	2.69%	5.37%	3.79%	3.42%	4.64%	4.24%	4.37%	3.74%	3.48%

表7 高浓度酰基肉碱QC精密度CV值

目标物	C0	C2	C3	C4	C5	C5DC	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
PE-HQC-01	222.38	157.70	26.02	7.17	2.78	1.51	1.28	1.78	2.44	4.65	4.34	31.20	5.03
PE-HQC-02	226.95	149.77	26.71	7.14	2.59	1.45	1.16	1.72	2.43	4.58	4.38	31.10	4.95
PE-HQC-03	226.29	159.89	25.43	6.95	2.63	1.53	1.25	1.73	2.44	4.61	4.30	30.81	4.66
PE-HQC-04	219.71	153.31	25.80	7.23	2.75	1.52	1.24	1.76	2.46	4.68	4.21	29.54	4.67
PE-HQC-05	232.75	152.79	26.36	6.82	2.55	1.46	1.17	1.76	2.48	4.61	4.35	32.49	4.89
PE-HQC-06	228.05	155.74	27.28	7.33	2.72	1.52	1.25	1.80	2.57	4.79	4.45	28.91	4.68
PE-HQC-07	230.31	150.21	28.09	7.50	2.63	1.42	1.18	1.75	2.34	4.28	4.24	31.98	4.89
PE-HQC-08	228.76	151.38	26.83	7.29	2.61	1.45	1.23	1.94	2.30	4.28	4.13	30.67	4.88
PE-HQC-09	230.40	153.56	26.67	7.41	2.69	1.42	1.25	1.87	2.50	4.60	4.41	31.24	4.78
PE-HQC-10	226.37	154.31	27.53	6.96	2.64	1.48	1.26	1.77	2.44	4.49	4.33	29.65	4.76
AVG	227.20	153.87	26.67	7.18	2.66	1.48	1.23	1.79	2.44	4.56	4.31	30.76	4.82
SD	3.87	3.21	0.81	0.22	0.07	0.04	0.04	0.07	0.08	0.16	0.10	1.11	0.13
CV	1.70%	2.08%	3.05%	3.00%	2.74%	2.76%	3.41%	3.72%	3.11%	3.59%	2.25%	3.62%	2.64%

表8 低浓度氨基酸QC样本检测准确度评价

目标物	Ala	Cit	Gly	Leu	Met	Phe	Tyr	Val
测定均值	891.11	100.33	950.37	338.94	127.70	218.58	373.77	397.61
靶值	843	95	884	313	120	208	353	369
相对误差	5.71%	5.61%	7.51%	8.29%	6.42%	5.09%	5.89%	7.75%

表9 高浓度氨基酸QC样本检测准确度评价

目标物	Ala	Cit	Gly	Leu	Met	Phe	Tyr	Val
测定均值	1820.15	280.14	1957.30	661.97	400.93	597.46	1093.89	872.07
靶值	1922	294	2132	734	425	628	1162	935
相对误差	-5.30%	-4.71%	-8.19%	-9.81%	-5.66%	-4.86%	-5.86%	-6.73%

表10 低浓度酰基肉碱QC样本检测准确度评价

目标物	C0	C2	C3	C4	C5	C5DC	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
测定均值	103.81	64.41	11.00	2.92	1.09	0.69	0.48	0.72	1.02	1.80	1.71	12.06	2.32
靶值	98	61.7	10.4	2.73	1.02	0.61	0.46	0.68	0.94	1.67	1.62	11.7	2.25
相对误差	5.93%	4.39%	5.81%	7.00%	6.80%	9.96%	4.47%	5.97%	8.41%	7.72%	5.67%	3.12%	3.18%

表11 高浓度酰基肉碱QC样本检测准确度评价

目标物	C0	C2	C3	C4	C5	C5DC	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
测定均值	227.20	153.87	26.67	7.18	2.66	1.48	1.23	1.79	2.44	4.56	4.31	30.76	4.82
靶值	241	159.3	27.9	7.67	2.83	1.62	1.28	1.9	2.62	4.86	4.54	31.7	4.97
相对误差	-5.73%	-3.41%	-4.40%	-6.39%	-6.07%	-8.90%	-4.10%	-5.93%	-6.92%	-6.24%	-4.98%	-2.97%	-3.05%