

非衍生化 – 三重四极杆液质联用法进行新生儿遗传代谢缺陷筛查的应用研究

LCMSMS-253

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 – 三重四极杆液质联用法检测新生儿足跟干血斑中氨基酸及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 三重四极杆质谱仪 非衍生化法 氨基酸 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肉碱浓度，以便用于氨基酸、有机酸及脂肪酸代谢病的检测和筛查。

实验部分

1.1 仪器

岛津高效液相色谱仪 LC-20A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040CL 联用系统。

具体配置为 LC-20ADXR×2 输液泵, DGU-20A₃ 在线脱气机, SIL-20AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040CL 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: 0.05% 甲酸水: 乙腈: 甲醇 = 1:2:2

初始流速: 0.1 mL/min

柱温: 室温

自动进样器温度: 4°C

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
0.75	Pumps	Total flow	0.1
0.76	Pumps	Total flow	1.2
1.00	Controller	Stop	

质谱条件:

离子源: ESI, +

扫描模式: MRM

雾化气: 3.0 L/min

干燥气: 12.0 L/min

加热模块温度: 450°C

DL 温度: 250°C

驻留时间: 10 ms

MRM: 见表 2

表2 氨基酸、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 种肉碱的同位素内标。

1.3.2 方法

方法原理：使用含稳定同位素标记的氨基酸及肉碱内标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 96 孔板中，每孔加入含氨基酸及肉碱同位素内标的甲醇溶液 100 μL，45℃密封孵育震荡 (650~750 rpm) 45 min，提取 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

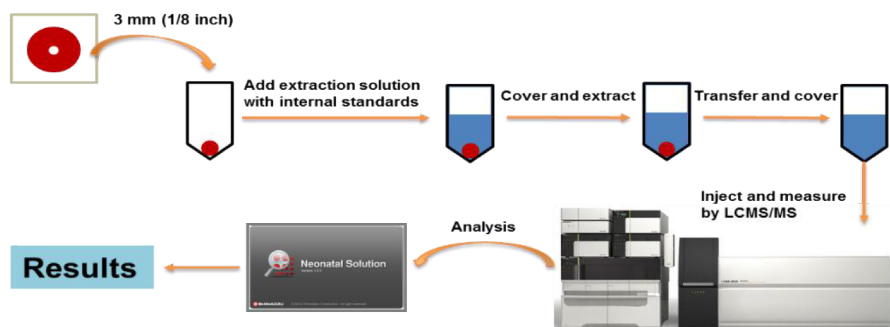


图1 样本前处理及分析流程

结果讨论

2.1 标准品的 MRM 色谱图

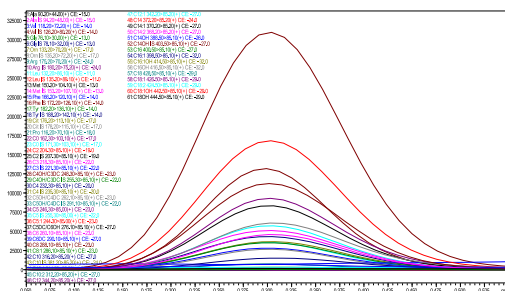


图2 含混合内标的提取液色谱图

2.2 精密度考察

取试剂盒内提供的高、低 2 个水平的质控品，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：氨基酸低值的批内变异系数范围为 2.5%-9.6%，平均值为 5.8%，批间变异系数范围为 3.3%-10.8%，平均值为 7.1%；氨基酸高值的批内变异系数范围为 2.0%-10.7%，平均值为 5.3%，批间变异系数范围为 2.8%-14.0%，平均值为 6.2%；肉碱低值的批内变异系数范围为 1.7%-12.8%，平均值为 5.5%，批间变异系数范围为 2.3%-14.0%，平均值为 6.5%；肉碱高值的批内变异系数范围为 1.0%-8.3%，平均值为 4.2%，批间变异系数范围为 2.9%-12.0%，平均值为 6.2%。计算结果详见表 3-6。

2.3 准确度考察

取试剂盒厂商提供的 5 个不同批号室内质控品进行检测，对其中的氨基酸和肉碱进行分析，计算检测值与靶值的相对误差及判断检测值是否在靶值 2 倍标准偏差范围内。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 0.3%-9.7%；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 1.9%-14.0%；低浓度肉碱 QC 样本检测值与靶值相对误差绝对值范围为 0.7%-28.2%；高浓度肉碱 QC 样本检测值与靶值相对误差绝对值范围为 1.1%-25.9%，所有检测值均在靶值 2 倍 SD 范围内。计算结果详见表 7-10。

2.4 临床应用

从新生儿遗传代谢缺陷筛查样本中，得到了 3 个已经过诊断证明指标异常的样本，用本文建立的方法进行了相关检测，具体结果如表 11 所示。

表11 异常样本检测结果

样本号	异常指标	实测值	参考值
1	C4OH/C3DC	0.56	0.02-0.27
	C4OH/C3DC/C4	2.07	0.13-1.50
	C4OH/C3DC/C10	6.39	0.001-5.00
2	C4OH/C3DC	0.36	0.02-0.27
	C4OH/C3DC/C4	2.59	0.13-1.50
	C4OH/C3DC/C10	11.67	0.001-5.00
	C10:2/C10	1.42	0.001-1.20
3	C4OH/C3DC	0.75	0.02-0.27
	C4OH/C3DC/C4	2.89	0.13-1.50
	C4OH/C3DC/C10	19.37	0.001-5.00
	Ala	389	62.5-328.0

*结果仅作为研究用，无临床参考意义

■ 结论

本文利用岛津高效液相色谱仪 LC-20A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040CL 联用系统成功建立了非衍生化液相串联质谱法测定干血斑中氨基酸及肉碱的浓度的方法。通过精密度、准确度的考察，证明该方法可以快速、准确、稳定的进行氨基酸及肉碱含量的检测；通过异常样本的检测结果可以得出，该方法能够正常检测出异常样本，能够满足临床检测的应用。

表3 低浓度氨基酸QC批内与批间CV

目标物	Ala	Val	Gly	Orn	Arg	Leu	Met	Phe	Tyr	Cit	Pro
concentration	212.8	322.8	367.2	97.4	26.7	331.6	85.8	203.7	240.6	62.8	175.2
批内 CV	5.3%	2.6%	9.4%	5.4%	6.5%	3.2%	9.6%	2.5%	6.5%	9.4%	3.0%
批间 CV	9.9%	3.3%	10.6%	5.9%	7.5%	4.3%	10.6%	3.7%	6.7%	10.8%	4.7%

表4 低浓度氨基酸QC批内与批间CV

目标物	Ala	Val	Gly	Orn	Arg	Leu	Met	Phe	Tyr	Cit	Pro
concentration	286.1	970.4	422.1	176.3	85.7	929.6	474.6	663.4	646.3	267.2	212.4
批内 CV	6.3%	3.9%	10.7%	4.9%	4.3%	2.9%	4.6%	2.0%	6.8%	7.4%	4.1%
批间 CV	7.7%	4.1%	14.0%	5.2%	5.0%	3.1%	5.8%	2.8%	7.1%	8.5%	4.6%

表5 低浓度肉碱QC批内与批间CV

目标物	C0	C2	C3	C4	C5	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
concentration	16.3	15.6	3.5	1.1	1.1	0.4	0.5	0.3	0.4	0.4	3.5	1.3
批内 CV	2.4%	1.7%	2.3%	2.7%	4.7%	5.2%	6.2%	12.8%	11.5%	10%	1.7%	3.2%
批间 CV	3.5%	2.9%	3.9%	3.6%	5.2%	6.9%	6.9%	14.0%	11.9%	11%	2.3%	3.6%

表6 高浓度肉碱QC批内与批间CV

目标物	C0	C2	C3	C4	C5	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
concentration	36.7	32.9	11.6	4.8	2.8	1.8	2.1	1.4	1.7	3.2	9.2	5.0
批内 CV	1.8%	1.6%	2.5%	3.5%	4.9%	4.8%	4.5%	8.3%	8.1%	8%	1.0%	1.7%
批间 CV	5.1%	3.3%	3.1%	3.1%	5.4%	6.3%	5.2%	11.6%	11.8%	12%	2.9%	4.4%

表7 低浓度氨基酸QC样本检测准确度评价

目标物	Ala	Val	Gly	Orn	Arg	Leu	Met	Phe	Tyr	Cit	Pro
测定均值	228.8	311.8	354.6	89.3	8.6	330.6	83.0	197.0	212.4	56.0	173.0
靶值	213.2	291.9	367.4	85.6	9.5	322.4	91.4	196.4	221.7	56.2	165.0
相对误差	7.3%	6.8%	-3.5%	4.3%	-9.7%	2.5%	-9.2%	0.3%	-4.2%	-0.4%	4.8%
2倍SD靶值范围	159.6-266.8	213.5-370.19	283.9-450.8	55.4-115.9	5.6-13.4	238.7-406.1	69.2-113.6	140.7-252.2	153.8-289.5	39.4-72.9	112.8-217.2

表8 低浓度氨基酸QC样本检测准确度评价

目标物	Ala	Val	Gly	Orn	Arg	Leu	Met	Phe	Tyr	Cit	Pro
测定均值	237.6	827.0	370.1	119.6	67.2	752.3	384.0	544.0	484.9	211.3	163.6
靶值	231.2	842.9	395.5	134.9	74.1	843.9	443.9	609.1	563.9	232.3	169.3
相对误差	2.8%	-1.9%	-6.4%	-11.4%	-9.3%	-10.9%	-13.5%	-10.7%	-14.0%	-9.0%	-3.4%
2倍SD靶值范围	184.2-278.3	628.7-1057.2	307.7-483.3	84.1-185.7	47.6-100.7	643.2-1044.6	360.5-587.2	450.8-769.5	417.9-729.8	169.4-295.3	124.1-214.6

表9 低浓度肉碱QC样本检测准确度评价

目标物	C0	C2	C3	C4OH/C3DC	C4	C5OH/C4DC	C5	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
测定均值	16.7	15.7	3.5	0.3	1.1	1.0	0.5	0.4	0.5	0.3	0.3	0.4	3.4	1.4
靶值	18.8	17.7	3.9	0.3	1.1	1.2	0.6	0.5	0.5	0.4	0.4	0.5	3.9	1.4
相对误差	-11.2%	-11.5%	-9.0%	20.0%	-3.5%	-10.4%	-14.4%	-13.0%	-9.6%	-28.2%	-20.2%	-13.4%	-13.5%	-0.7%
2倍SD靶值范围	14.6-23.3	11.3-23.4	2.7-5.0	0.2-0.4	0.9-1.4	0.9-1.4	0.4-0.7	0.4-0.6	0.3-0.7	0.2-0.6	0.3-0.6	0.3-0.7	3.0-4.8	1.0-1.8

表10 高浓度肉碱QC样本检测准确度评价

目标物	C0	C2	C3	C4OH/C3DC	C4	C5OH/C4DC	C5	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
测定均值	36.7	32.9	11.6	0.8	4.8	2.9	2.6	1.8	2.2	1.4	1.7	3.2	9.2	5.0
靶值	38.2	35.5	12.0	1.0	4.7	2.8	2.8	2.0	2.3	1.9	2.0	3.5	10.1	4.8
相对误差	-4.1%	-7.3%	-3.6%	-20.6%	1.1%	3.3%	-7.8%	-8.5%	-5.3%	-25.9%	-15.3%	-9.3%	-8.9%	5.2%
2倍SD靶值范围	28.3-49.0	23.3-46.8	8.1-15.8	0.6-1.4	3.7-5.8	2.1-3.4	2.3-3.5	1.5-2.5	1.5-3.0	1.1-2.7	1.4-2.8	2.2-4.9	7.3-13.1	3.4-6.2