

1.2 岛津串联质谱技术在新生儿筛查中的应用

摘要: 新生儿疾病筛查是母婴保健技术的重要内容之一。本文介绍新生儿筛查的测试内容, 衍生法和非衍生法样品前处理流程, 液相色谱串联质谱检测原理。并介绍了岛津液相色谱串联质谱进行新生儿筛查的检测结果及数据处理流程。

关键词: 新生儿筛查 液相色谱串联质谱 遗传代谢疾病筛查

新生儿筛查是指在新生儿群体中, 用快速、敏感的实验室方法对新生儿的遗传代谢病、先天性内分泌异常以及某些危害严重的遗传性疾病进行筛查的总称, 其目的是对那些患病的新生儿在临床症状尚未表现之前或表现轻微时通过筛查, 得以早期诊断、早期治疗, 防止机体组织器官发生不可逆的损伤, 避免患儿发生智力低下、严重的疾病或死亡。新生儿筛查一般是在婴儿出生后三天采取脐血或足跟血的纸片进行。

常见的新生儿筛查疾病涉及氨基酸代谢病、有机酸代谢病、内分泌疾病、血红素疾病、脂肪酸代谢病等几大类。目前氨基酸代谢病、有机酸代谢病、脂肪酸代谢病等可使用 LC-MS/MS 方法进行检测。LC-MS/MS 法整体分析过程极为简便并可实现自动化, 可在一次分析中检测多种目标组分, 为多种不同类型先天性疾病的诊断提供依据。

在新生儿筛查中 LC-MS/MS 法主要应用于血液中氨基酸、酰基肉碱两类化合物的检测。进行新生儿遗传代谢病筛查的血片经过相应的前处理后置于 96 孔板中直接在液相色谱串联质谱仪中分析得到检测结果。基于不同的前处理方法, 针对氨基酸、酰基肉碱的新生儿筛查检测有衍生 LC-MS/MS 法和非衍生 LC-MS/MS 法。

■ 测定方法

目前使用 LCMSMS 技术主要检测的氨基酸及酰基肉碱, 可分别作为氨基酸代谢异常、脂肪酸代谢异常和有机酸代谢异常等疾病的判断指征。

表 1. LCMSMS 的检测目标及对应代谢疾病的列表

检测目标	对应代谢疾病类型
氨基酸	氨基酸代谢异常
酰基肉碱	脂肪酸代谢异常 有机酸代谢异常

表 2 及表 3 总结了市售常见新生儿筛查用试剂盒或标准品公司提供的常见氨基酸及酰基肉碱, 还可根据实际检测需求添加表 2、表 3 以外其它相关检测项目, 例如半胱氨酸等。除具体氨基酸或酰基肉碱的检测项目以外, 不同氨基酸或酰基肉碱之间的比值也是相关代谢疾

病的重要判断依据。岛津 Neonatal Solution 新生儿筛查软件不仅可提供单一氨基酸或酰基肉碱的定量计算结果，也可同时提供不同项目的比值信息。

表 2 常见被检测氨基酸的种类

	氨基酸	缩写
1	丙氨酸	Ala
2	精氨酸	Arg
3	瓜氨酸	Cit
4	甘氨酸	Gly
5	亮氨酸/异亮氨酸/羟基脯氨酸	Leu/Ile/Pro-OH
6	蛋氨酸	Met
7	鸟氨酸	Orn
8	苯丙氨酸	Phe
9	脯氨酸	Pro
10	酪氨酸	Tyr
11	缬氨酸	Val
12	天冬氨酸	Asp
13	丝氨酸	Ser
14	苏氨酸	Thr
15	谷氨酸	Glu
16	精氨基琥珀酸	ASA

表 3 常见被检测酰基肉碱的种类

#	肉碱	缩写	#	肉碱	缩写
1	游离肉碱	C0	17	十二碳酰肉碱	C12
2	乙酰肉碱	C2	18	十二碳烯酰肉碱	C12:1
3	丙酰肉碱	C3	19	十四碳酰肉碱（肉豆蔻酰肉碱）	C14
4	丙二酰肉碱/3-羟基-丁酰肉碱	C3DC/C4OH	20	十四碳烯酰肉碱	C14:1
5	丁酰肉碱	C4	21	十四碳二烯酰肉碱	C14:2
6	甲基丙二酰肉碱/3-羟基-异戊酰肉碱	C4DC/C5OH	22	3-羟基-十四碳酰肉碱	C14OH
7	异戊酰肉碱	C5	23	十六碳酰肉碱（棕榈酰肉碱）	C16
8	异戊烯酰肉碱	C5:1	24	十六碳烯酰肉碱	C16:1
9	戊二酰肉碱/3-羟基-己酰肉碱	C5DC/C6OH	25	3-羟基-十六碳酰肉碱	C16OH
10	己酰肉碱	C6	26	3-羟基-十六碳烯酰肉碱	C16:1OH
11	己二酰肉碱	C6DC	27	十八碳酰肉碱（硬脂酰肉碱）	C18
12	辛酰肉碱	C8	28	十八碳烯酰肉碱（油酸肉碱）	C18:1
13	辛烯酰肉碱	C8:1	29	十八碳二烯酰肉碱（亚油酸肉碱）	C18:2
14	癸酰肉碱	C10	30	3-羟基-十八碳酰肉碱	C18OH
15	癸烯酰肉碱	C10:1	31	3-羟基-十八碳烯酰肉碱	C18:1OH
16	癸二烯酰肉碱	C10:2			

■ 新生儿筛查血片前处理方法

一般 LCMSMS 新生儿筛查血片的前处理方法可根据是否进行衍生化反应分为衍生化法和非衍生化法两大类，两种前处理方法在各实验室或检测机构均有使用，具体操作细节可能有所不同，其大致流程如下图 1 所示：

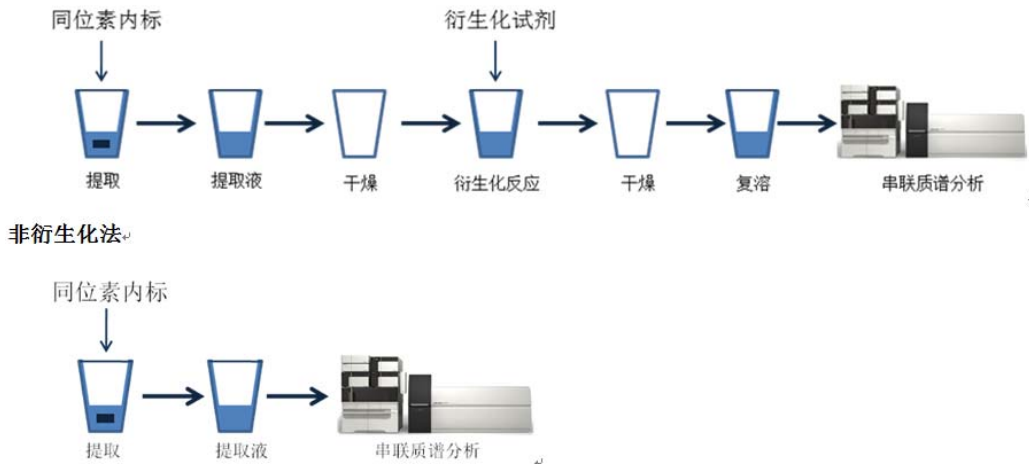


图 1 衍生化法（上）和非衍生化（下）的一般操作流程*

*参考タネムマス・スクリーニングガイドブック 島根大学医学部小児科学教授 山口清次 編集

衍生化法是指使用盐酸正丁醇（3 mol/L）作为衍生试剂进行前处理的方法。盐酸正丁醇由正丁醇和乙酰氯按照体积比 9:1, v/v 进行配制。目前衍生化法多参考 Zytkowicz 等报道的方法，一般按照如下具体步骤进行操作：将 3 mm 干血滤纸片置于 96 孔过滤板中，每孔加入 100 μL 含有同位素内标的甲醇溶液，室温放置 20 min，将萃取液离心至 96 孔聚丙烯板，55 $^{\circ}\text{C}$ 加热吹干，再加入 60 μL 盐酸正丁醇，Teflon 膜覆盖，置 65 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱内 15 min，随后 55 $^{\circ}\text{C}$ 加热吹干，再加入 100 μL 80% 乙腈，铝膜覆盖后即可进行串联质谱检测。经过衍生化反应后目标化合物与盐酸正丁醇反应生成丁酯化氨基酸或丁酯化酰基肉碱，如表 4 所示。

非衍生化法相比衍生化法，前操作步骤则较为简单，一般将 3 mm 干血滤纸片置于提取 96 孔板中，加入含有同位素内标的水甲醇溶液，覆膜，经过 30 min 左右的加热振荡孵育，转移提取液至进样 96 孔板，铝膜覆盖后即可进行串联质谱检测。以 Phe 和 C14 为例，表 4 总结了非衍生化法和衍生化法检测离子的差异。

表 4 衍生化法和非衍生化法检测目标化合物差别(以 Phe 和 C14 为例)

		非衍生化	衍生化
氨基酸	Phe	m/z 166	m/z 222

酰基肉碱	C14	m/z 372 	m/z 428

表 5 总结、比较了衍生化法及非衍生化法两种前处理方法的优缺点，可根据实际情况综合考虑各种因素选择合适的干血片处理方法。

表 5 衍生化法与非衍生化法的比较*

	衍生化法	非衍生化法
优点	离子化效率高、检测灵敏度高	前处理仅包含提取操作，不易引起测定目标化合物的分解
	目标化合物的质量数经衍生化反应后增大，提高分析的准确度	不需要使用衍生化试剂，也不需要特殊的前处理设备 前处理方法简单，特别是针对需检测大量样品的情况，有效提高样品血片前处理的效率，降低成本
不足	步骤繁多、耗时较长、	离子化效率略低，需使用高灵敏度仪器
	需要配备操作衍生化试剂（腐蚀性试剂）的实验器具	可能受到质量数较小的杂质的干扰，影响准确度
	可能发生由于衍生化反应导致待测目标化合物分解的情况	

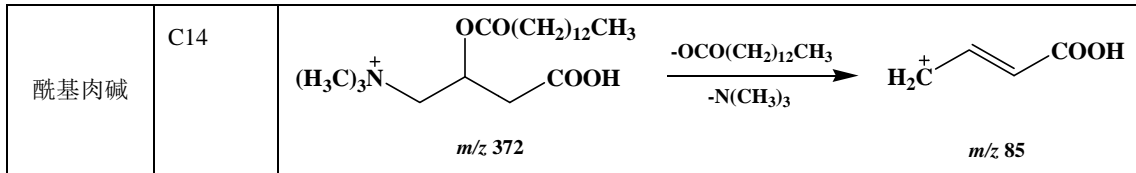
*参考タンデムマス・スクリーニングガイドブック 島根大学医学部小児科学教授 山口清次 編集

■ 液相色谱串联质谱的检测原理

新生儿串联质谱筛查使用四极杆质谱，该类串联质谱由四极杆质量分析器（Q1）、碰撞室、四极杆质量分析器（Q3）组成。待测化合物离子化后产生相应前体离子，前体离子（MS1）经碰撞室发生诱导碰撞解离（CID）产生产物离子碎片（MS2），导入检测器产生强度信号。常见的氨基酸或酰基肉碱的碎裂方式如表 6 所示。

表 6 氨基酸及酰基肉碱的常见碎裂方式(以非衍生化法 Phe 和 C14 为例)*

		以非衍生化法为例
氨基酸	Phe	<p>m/z 166 $\xrightarrow{-\text{HCOOH (46Da)}}$ m/z 120</p>



*参考タンデムマス・スクリーニングガイドブック 島根大学医学部小児科学教授 山口清次 編集

新生儿筛查一般使用流动注射（Flow injection, FI）的方式进行，进样后无需使用色谱柱进行分离，直接进入质谱进行检测。在待测样品中添加相应同位素内标，根据目标化合物与对应同位素内标峰面积或峰高的比值进行目标化合物的定量计算。图 2 显示了岛津液相色谱三重四极杆仪器使用多反应检测（MRM）得到离子流图，仅需要 1 min 即可完成 1 个样本的分析，获得所有待测氨基酸及酰基肉碱的分析结果，实现大量样品的高效准确测定。

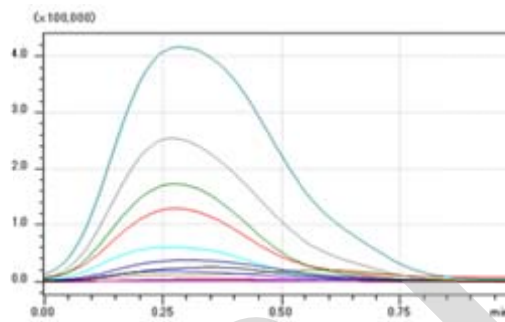


图 2. LC-MS/MS 检测得到的离子流图

■ 岛津液相色谱串联质谱进行新生儿筛查的检测结果及数据处理流程

岛津公司针对 LCMSMS 新生儿筛查工作专门开发了 Neonatal Solution 新生儿筛查软件（图 3），配合功能强大的 LabSolutions 工作站，为新生儿筛查工作提供完整的方法建立、数据采集、数据分析及自动准确度管理工具，可便捷、高效处理、分析、管理大批量新生儿筛查数据。

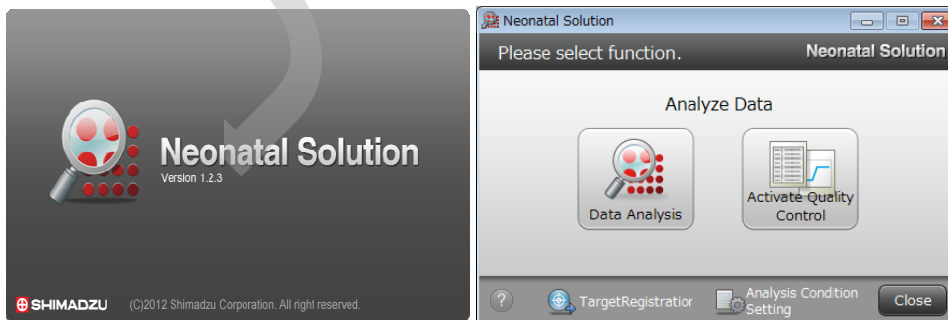


图 3. 岛津新生儿筛查软件 Neonatal Solution

经过 Neonatal Solution 的处理，自动得到各组分的定量计算结果，根据预设的限值，自动使用各种颜色标注超出限值的结果（图 4）。

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Neonatal Solution							
2								
3	Analysis Time	2014/06/11						
4								
5		Date Acquired	Tray:Vial	Val	Leu	Met	Phe	Tyr
6	Criteria Upper Limit (Caution)	-	-	250.00	350.00	80.00	180.00	200.00
7	Criteria Upper Limit (Notice)	-	-	200.00	300.00	60.00	150.00	150.00
8	Criteria Lower Limit (Notice)	-	-	-	-	-	-	-
9	Criteria Lower Limit (Caution)	-	-	-	-	-	-	-
10	Data-1	6/10/2014 8:36:29 PM	1:6	7.71	0.43	4.51	0.13	0.06
11	Data-2	6/10/2014 8:39:32 PM	1:7	128.40	234.30	20.05	59.53	89.35
12	Data-3	6/10/2014 8:42:34 PM	1:8	397.08	380.11	38.52	156.24	368.12
13	Data-4	6/10/2014 8:44:06 PM	1:9	845.25	900.21	111.98	569.37	963.87
14	Data-5	6/10/2014 8:45:37 PM	1:10	160.73	202.18	20.79	44.08	115.23
15	Data-6	6/10/2014 8:48:39 PM	1:11	210.30	306.35	35.68	69.94	156.73

图 4. 岛津新生儿筛查输出结果

考察系统的长期稳定性，检测 PE 高质控样品，连续进样 850 次，岛津 LCMSMS 显示良好的稳定性结果，代表性结果如图 5 所示。

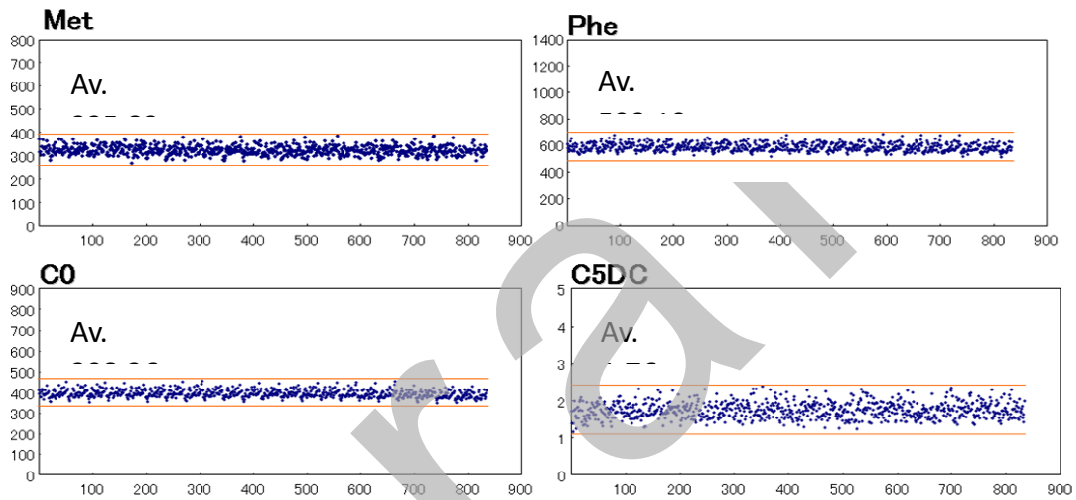


图 5. 稳定性结果

■ 总结

岛津公司为新生儿筛查工作提供从方法建立、数据采集、数据分析到质量管理的完善、统一的 LCMSMS 硬件和软件系统，具有高灵敏度、超快扫描速度的 LCMSMS 可使用户轻松获得可靠、稳定的检测结果，顺利开展新生儿筛查工作。