

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.16.001

22 种氨基酸衍生化串联质谱高通量检测方法的建立 及其在遗传代谢病中的应用*

丁 丽,张 瑞[△]

空军军医大学第一附属医院检验科,陕西西安 710032

摘 要:目的 建立高通量快速检测全血中 22 种氨基酸的衍生化串联质谱法,考察该方法的影响因素及其在遗传代谢病筛查中的应用和意义。**方法** 新生儿采足后跟血、儿童采末梢血于空白采血滤纸上,完全渗透,晾干。用已知浓度的氨基酸同位素内标液萃取干血滤纸片中的 22 种氨基酸,衍生化 20 min,建立衍生化串联质谱法,高通量快速检测全血中 22 种氨基酸,采用方差分析优化其影响因素,分析 2 869 例 2014 年 5 月至 2018 年 1 月西部 5 省部队在空军军医大学第一附属医院自愿选择衍生化串联质谱法筛查遗传代谢病的 3 d 至 1 岁新生儿及儿童的干血滤纸片。**结果** 建立衍生化串联质谱法高通量快速检测全血中 22 种氨基酸并优化了该方法的影响因素;使用新鲜末梢血,标本 4 ℃ 保存不超过 2 周,内标液 4 ℃ 保存有效期为 1 个月左右,氮气最佳吹干时间为 20 min。衍生化串联质谱法定量检出限为 0.3~10.0 μmol/L。批内变异系数为 5.3%~7.9%,批间变异系数为 7.1%~8.6%。经统计学分析男、女氨基酸浓度差异无统计学意义($P>0.5$)。加标回收率为 96.1%~98.1%,偏倚<10.0%。**结论** 衍生化串联质谱法高通量快速检测全血中 22 种氨基酸有较高的回收率、精确性和准确性,可以灵敏、特异地检测全血中 22 种氨基酸,满足临床对遗传代谢病筛查及诊断的需要。

关键词:衍生化; 高通量; 串联质谱; 氨基酸; 遗传代谢病**中图分类号:**R-33**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2021)16-2305-05

Establishment of a high throughput method for the determination of 22 amino acids by derivatization tandem mass spectrometry and its application in genetic metabolic disease*

DING Li,ZHANG Rui[△]*Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Air Force Medical
University, Xi'an, Shaanxi 710032, China*

Abstract: Objective To establish a high-throughput derivatization tandem mass spectrometry method for rapid detection of 22 amino acids in whole blood, and to investigate the influencing factors of this method and its application and significance in screening of genetic and metabolic diseases. **Methods** The heel blood of newborn and the peripheral blood of children were collected on the blank blood filter paper, completely penetrated and dried. Twenty-two kinds of amino acids in dry blood filter paper were extracted with known concentration of amino acid isotope internal standard solution and derivatized for 20 min. A derivatization tandem mass spectrometry method was established for rapid detection of 22 kinds of amino acids in whole blood. The influencing factors were optimized by analysis of variance, and 2 869 cases of dry blood filter paper of infants and children aged 3 days to 1 year old in the First Affiliated Hospital of Air Force Medical University from May 2014 to Jan 2018 were analyzed. **Results** The high flux rapid detection of 22 amino acids in the whole blood by derivatization tandem mass spectrometry was established and the influencing factors of the method were optimized: the whole blood without anticoagulant was used, the sample was kept at 4 ℃ for no more than 2 weeks, the internal standard solution was kept for about 1 month at 4 ℃, and the best blowing dry time of nitrogen was 20 min. The quantitative detection limit of this method was 0.3—10.0 μmol/L. The variation coefficient in batch was 5.3%—7.9%, and the coefficient of variation between batches was 7.1%—8.6%, and there was no statistical significance in amino acid content between men and women ($P>0.5$). The recovery rate of the standard addition is 96.1%—98.1%, the bias was less than 10.0%. **Conclusion** Derivatization tan-

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81401744);陕西省自然科学基金项目(2017JQ8013)。

作者简介:丁丽,女,主管技师,主要从事临床生化检验研究。 [△] 通信作者, E-mail: ruizhang_zr@sina.com。

本文引用格式:丁丽,张瑞. 22 种氨基酸衍生化串联质谱高通量检测方法的建立及其在遗传代谢病中的应用[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(16): 2305-2309.

dem mass spectrometry has high recovery, accuracy and accuracy in rapid detection of 22 amino acids in whole blood. It can be used to determine the concentration of 22 amino acids in whole blood sensitively and specifically, and meet the needs of clinical screening and diagnosis of genetic and metabolic diseases.

Key words: derivatization; high throughput; tandem mass spectrometry; amino acid; inherited metabolic diseases

先天性代谢异常又称遗传代谢病,大多属于隐性基因遗传性疾病,多数在婴儿期内起病,发病的机制复杂,尤其是临床表现的多样性和检测指标缺乏特异性导致遗传代谢病的精准诊断和治疗困难^[1-3]。遗传代谢病的诊断和治疗依赖于医生的临床经验和一些非特异性的生化指标,多数情况下,临床医生只能根据经验推测遗传代谢病的可能性而难以做出具体病因诊断^[4-5]。近年来,随着临床诊断学的不断发展,液相色谱-质谱分析技术在临床诊断尤其是遗传代谢病筛查中的应用越来越广泛^[6-8],但是目前遗传代谢病筛查大部分只检测 13 种氨基酸,本研究利用衍生化串联质谱法建立了 22 种氨基酸全血检测方法,扩大了氨基酸的检测种类,将其运用于新生儿及儿童遗传代谢病筛查,并分析该检测方法的各种影响因素,为相关疾病诊断的进一步发展提供科学依据。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2014 年 5 月至 2018 年 1 月西部 5 省部队在空军军医大学第一附属医院自愿选择衍生化串联质谱筛查的 2 869 例各项医学检测指标均正常的 3 d 至 1 岁新生儿及儿童为研究对象。出生后 3~28 d 设为新生儿组($n=1\,926$),男 999 例,女 927 例; >28 d 至 1 岁设为儿童组($n=943$),男 490 例,女 453 例。通过检测健康新生儿及儿童外周血中 22 种氨基酸浓度来确定本实验室的正常上、下限值,22 种氨基酸包括丙氨酸、精氨酸、天冬氨酸、瓜氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、同型半胱氨酸、组氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、鸟氨酸、苯丙氨酸、六氢吡啶羧酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、缬氨酸。本研究虽然同时得到了 22 种氨基酸的结果,但是由于论文篇幅有限,为了结果的系统性、科学性、可比性,选择甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸为代表进行分析讨论。

1.2 标本收集与保存 儿童组:研究对象于上午 7:00—9:00 空腹采集末梢血滴于专用采血滤纸上,形成几个均匀血斑,完全渗透,待自然晾干后,封于塑料袋内,−20℃冰箱保存待检。新生儿组:新生儿出生 3 d 后,哺乳多次,采足后跟血于专用采血滤纸上,完全渗透,待自然晾干后,封于塑料袋内,−20℃冰箱保存待检。

1.3 仪器与试剂 API3200 串联质谱仪购自美国 AB 生物应用系统公司,高效液相色谱仪购自美国安捷伦公司(Agilent1200),96 孔板加热吹干装置购自杭州奥盛公司(MD200)。甲醇、正丁醇、乙酰氯、乙腈

等试剂购自美国 Thermo Fisher 公司,均为色谱级。将正丁醇和乙酰氯按体积比 9:1 配制成 3 mol/L 的盐酸正丁醇溶液作为衍生化试剂备用,96 孔板购自博奥公司。实验中所用氮气的纯度在 99.9% 以上。12 种氨基酸内标,包括丙氨酸、精氨酸、天冬氨酸、瓜氨酸、谷氨酸、甘氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、鸟氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、缬氨酸,用甲醇溶解并稀释配制成萃取液,4℃保存,1 个月内用完。

1.4 检测方法 (1)样本处理方法:用打孔器在干血滤纸片上制直径 3 mm 的圆形血滤纸片(4 个质控、1 个空白),将其置于 96 孔板中,每孔加入 1.3 中制备的萃取液 100 μ L,室温密封震荡 15 min 萃取血片中的 22 种氨基酸,然后转移萃取液至另一个 96 孔板,40℃加热氮气吹干,再加入 60 μ L 1.3 中制备的衍生化试剂,Teflon 膜覆盖,置于 65℃恒温箱内反应 20 min,随后 40℃氮气吹干,再加入 100 μ L 80%乙腈溶解,铝膜覆盖,串联质谱仪检测。(2)仪器设置状态:乙腈作为流动相,设置液相色谱的流速为 300 μ L/min,进样量为 20 μ L,质谱检测中性氨基酸采用中性丢失扫描[中性丢失片段质荷比为 102 Da,扫描范围为 140~280 m/z]和多反应监测 2 种模式,每个样本 22 种氨基酸检测只需要 2 min。(3)资料分析:采用美国 AB 生物应用系统公司 ChemoView 2.0.2 软件进行定量分析,根据经过衍生化的 22 种氨基酸及其同位素内标的离子峰强度,得出所测样本中 22 种氨基酸的浓度。

1.5 影响因素的考察

1.5.1 抗凝剂使用对检测结果的影响 采用 3 种方式[直接采末梢血于干滤纸片上、采静脉血于含有乙二胺四乙酸(EDTA)的真空管混匀后滴于干滤纸片上、采静脉血于含有肝素抗凝剂的真空管混匀后滴于干滤纸片上]来考察抗凝剂的使用对本方法的检测结果是否有影响。

1.5.2 标本保存时间对检测结果的影响 将标本自然晾干放置 1、7、14、21、28、35 d 后的检测结果进行比较,考察标本保存时间对检测结果的影响。

1.5.3 不同氮气吹干时间对检测结果的影响 在 50℃、0.2 MPa 氮气吹干条件下考察氮气吹干 10、15、20 min 对检测结果的影响。

1.5.4 内标液保存时间对检测结果的影响 选择内标液于 4℃保存 1、7、14、21、28、42、56 d 后进行检测,考察内标液保存时间对检测结果的影响。

1.6 方法性能验证 参照美国食品及药物管理局的

生物分析方法^[9],验证建立的衍生化串联质谱法检测 22 种氨基酸的基本性能。

1.6.1 定量检出限 系列稀释标准品,每个浓度重复检测 5 次,将同时满足变异系数(CV)<20.0%,偏倚<20.0%。

1.6.2 精密度评价 使用高、中、低 3 个浓度的混合全血作为待测样本,分别同时检测 20 次,评价批内精密度。将混合全血制成的滤纸片在-20℃保存,连续检测 5 d,每天重复 3 次,评价批间精密度。

1.6.3 回收试验 在已知浓度的全血中同时加入 2 种不同浓度的标准品作为待测样本,每份样本重复检测 3 次,取均值,并与理论值进行比较,计算回收率。回收率在 80.0%~120.0%判断为可接受。

1.6.4 准确度评价 取 2 份已知浓度的全血标本,重复检测 3 次取均值,偏倚<10.0%判断为可接受。

1.7 统计学处理 所有数据采用 SPSS10.0 统计软件处理,计数资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验或方差分析。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 抗凝剂使用对氨基酸检测结果的影响 EDTA

可使检测结果降低,肝素抗凝剂可使检测结果升高,故临床标本采集不宜使用抗凝血,使用新鲜末梢血制成的干血片可以用于氨基酸的检测。使用不同抗凝剂的结果见表 1。

2.2 标本保存时间对检测结果的影响 部分氨基酸指标随着保存时间的延长而降低,故建议 4℃保存标本并在 2 周以内检测。标本保存时间对检测结果的影响见表 2。

表 1 抗凝剂使用对氨基酸检测结果的影响

氨基酸	<i>n</i>	无抗凝剂	EDTA		肝素	
			检测值	<i>P</i>	检测值	<i>P</i>
甘氨酸	5	132.0±6.4	97.9±5.1	<0.01	141.0±7.4	0.1
丙氨酸	5	231.0±11.3	164.0±7.4	<0.01	222.0±10.9	0.1
缬氨酸	5	116.0±5.6	95.3±5.3	<0.01	121.0±6.2	0.1
亮氨酸	5	74.5±6.0	66.7±6.4	0.1	78.1±4.8	0.1
甲硫氨酸	5	15.0±2.6	12.2±2.2	0.1	16.2±2.4	0.1
苯丙氨酸	5	36.8±3.7	23.5±3.1	<0.01	33.1±4.1	0.1
酪氨酸	5	13.7±1.8	11.7±2.1	0.1	12.9±2.0	0.1

注:*P* 值为与无抗凝剂结果进行比较。

表 2 标本保存时间对氨基酸检测结果的影响

氨基酸	1 d	7 d		14 d		21 d		28 d		35 d	
		检测值	<i>P</i>	检测值	<i>P</i>	检测值	<i>P</i>	检测值	<i>P</i>	检测值	<i>P</i>
甘氨酸	140.5±12.5	142.2±13.3	0.3	136.4±11.7	0.3	133.1±12.4	0.4	128.2±15.2	0.0	124.3±19.5	<0.01
丙氨酸	109.2±10.2	107.3±14.5	0.3	103.2±9.6	0.4	105.4±10.6	0.3	102.7±8.1	0.2	94.8±7.7	<0.01
缬氨酸	155.6±17.6	151.6±12.4	0.2	153.4±18.2	0.3	150.3±15.3	0.5	146.3±18.3	0.2	144.2±18.8	0.3
亮氨酸	122.7±13.4	125.3±12.8	0.2	122.5±13.1	0.4	119.6±18.8	0.9	115.4±14.6	0.2	107.6±13.6	<0.01
甲硫氨酸	19.7±2.9	18.4±2.2	0.9	18.6±3.5	0.4	18.1±2.2	0.4	17.3±3.8	0.3	16.4±2.58	<0.01
苯丙氨酸	45.0±3.5	45.6±3.1	0.4	42.3±4.2	0.6	44.3±3.1	0.5	42.9±4.2	0.2	42.1±4.64	0.4
酪氨酸	27.5±4.6	25.4±4.3	0.5	24.9±4.1	0.4	26.3±5.1	0.4	23.6±6.1	0.2	23.4±5.52	0.2

注:*P* 值为与 1 d 后结果进行比较。

2.3 不同氮气吹干时间对检测结果的影响 吹干 10 min 检测指标普遍偏低,吹干 20 min 氨基酸指标偏移较小,选择 20 min 吹干氨基酸均较为理想。不同氮气吹干时间条件下的检测结果见表 3。

2.4 内标液保存时间对检测结果的影响 同位素内标复溶后会逐渐分解或衰减,致使标准降低,检测结果增高,1 个月左右个别指标变化达 10.0%,建议同位素内标复溶后尽快使用,4℃冰箱保存效期为 1 个月左右。内标液在不同保存时间下的实验结果见表 4。

2.5 方法性能验证

2.5.1 定量检出限 衍生化串联质谱法检测 22 种氨基酸的定量检出限分别为:丙氨酸 6.0 μmol/L,精氨酸 0.3 μmol/L,天冬氨酸 0.3 μmol/L,瓜氨酸 0.5 μmol/L,半胱氨酸 0.4 μmol/L,谷氨酰胺 1.0 μmol/L,谷氨酸 3.0 μmol/L,甘氨酸 10.0 μmol/L,

同型半胱氨酸 4.0 μmol/L,组氨酸 2.0 μmol/L,亮氨酸 3.0 μmol/L,赖氨酸 0.8 μmol/L,甲硫氨酸 0.8 μmol/L,鸟氨酸 1.0 μmol/L,苯丙氨酸 1.0 μmol/L,六氢哌啶羧酸 2.0 μmol/L,脯氨酸 10.0 μmol/L,丝氨酸 1.0 μmol/L,苏氨酸 1.0 μmol/L,色氨酸 2.0 μmol/L,酪氨酸 1.5 μmol/L,缬氨酸 3.0 μmol/L。

2.5.2 精密度评价 检测高、中、低 3 个浓度的混合全血待测样本中 22 种氨基酸用于评估氨基酸的精密度,高浓度混合全血待测样本批内 CV 为 5.3%~7.2%,中浓度混合全血待测样本批内 CV 为 5.8%~7.4%,低浓度混合全血待测样本批内 CV 为 5.6%~7.9%;高浓度混合全血待测样本批间 CV 为 7.1%~8.1%,中浓度混合全血待测样本批间 CV 为 7.4%~8.3%,低浓度混合全血待测样本批间 CV 为 7.3%~8.6%。经统计学分析,男、女氨基酸浓度差异无统计学意义(*P*>0.5)。

表 3 不同氮气吹干时间对氨基酸检测结果的影响

氨基酸	标准值	吹干 10 min		吹干 15 min		吹干 20 min	
		检测值	P	检测值	P	检测值	P
甘氨酸	544.0	471.0±11.3	<0.01	556.1±26.9	0.4	568.3±18.1	0.3
瓜氨酸	179.0	135.8±3.9	<0.01	182.4±4.2	0.4	186.3±4.5	0.3
丙氨酸	642.0	608.4±5.5	0.1	632.0±3.9	0.4	622.3±6.2	0.3
缬氨酸	400.0	320.6±26.4	<0.01	383.1±30.3	0.6	411.5±36.1	0.4
亮氨酸	507.0	443.2±11.1	<0.01	523.1±16.7	0.6	518.5±5.3	0.4
酪氨酸	304.0	228.1±25.2	<0.01	298.6±18.3	0.7	296.9±24.8	0.3
甲硫氨酸	88.0	64.6±4.5	<0.01	83.1±4.2	0.3	92.9±1.9	0.4
苯丙氨酸	199.0	181.4±8.1	<0.01	205.5±11.3	0.4	219.3±4.2	0.3

注:P 值为与标准值结果进行比较。

表 4 内标液保存时间对氨基酸检测结果的影响

氨基酸	1 d	7 d		14 d		21 d		28 d		42 d		56 d	
		检测值	P	检测值	P	检测值	P	检测值	P	检测值	P	检测值	P
甘氨酸	540.5±11.3	542.2±10.0	0.4	544.4±11.7	0.9	547.3±19.5	0.3	553.1±12.4	0.3	568.2±15.5	<0.01	590.3±14.7	<0.01
丙氨酸	643.2±10.1	641.3±11.1	0.5	643.2±9.6	0.6	644.8±7.7	0.6	650.4±10.6	0.4	670.7±8.1	<0.01	694.8±7.9	<0.01
缬氨酸	400.6±12.3	403.6±11.4	0.9	403.4±12.2	0.6	404.2±11.8	0.5	410.3±13.3	0.3	420.3±18.3	0.3	444.2±18.1	<0.01
亮氨酸	507.7±10.9	505.3±11.8	0.7	506.5±13.1	0.8	507.6±11.6	0.4	510.6±18.8	0.9	515.4±14.6	0.3	557.6±13.6	<0.01
甲硫氨酸	89.4±3.0	88.4±2.2	0.6	89.6±3.5	0.4	91.4±2.8	0.4	93.1±2.2	0.5	97.3±3.8	0.4	106.4±2.6	<0.01
苯丙氨酸	199.4±3.6	198.6±4.3	0.8	199.3±4.0	0.4	200.1±4.6	0.6	204.3±3.1	0.6	206.9±4.2	0.4	212.1±4.6	<0.01
酪氨酸	307.5±3.9	308.4±4.3	0.7	308.9±4.1	0.5	310.4±5.0	0.5	312.3±5.3	0.4	313.6±6.1	0.4	335.4±5.5	<0.01

注:P 值为与 1 d 后结果进行比较。

2.5.3 回收试验 考察加入高、低浓度标准品的待测样本回收率。当加入低浓度标准品时回收率分别为丙氨酸 96.1%,精氨酸 97.4%,天冬氨酸 97.0%,瓜氨酸 97.2%,半胱氨酸 97.0%,谷氨酰胺 93.4%,谷氨酸 96.2%,甘氨酸 95.8%,同型半胱氨酸 96.2%,组氨酸 95.9%,亮氨酸 96.4%,赖氨酸 96.8%,甲硫氨酸 97.2%,鸟氨酸 96.5%,苯丙氨酸 96.0%,六氢吡啶羧酸 96.4%,脯氨酸 96.3%,丝氨酸 97.4%,苏氨酸 97.1%,色氨酸 96.5%,酪氨酸 96.3%,缬氨酸 96.1%。加入高浓度标准品时回收率为丙氨酸 97.5%,精氨酸 97.8%,天冬氨酸 98.0%,瓜氨酸 97.7%,半胱氨酸 97.5%,谷氨酰胺 97.2%,谷氨酸 98.1%,甘氨酸 97.0%,同型半胱氨酸 97.4%,组氨酸 97.3%,亮氨酸 97.8%,赖氨酸 97.5%,甲硫氨酸 97.9%,鸟氨酸 97.2%,苯丙氨酸 97.1%,六氢吡啶羧酸 97.6%,脯氨酸 97.9%,丝氨酸 98.1%,苏氨酸 97.8%,色氨酸 97.2%,酪氨酸 97.4%,缬氨酸 97.3%。总体样本的加标回收率为 96.1%~98.1%。

2.5.4 准确度评价 标本 1 的偏倚分别为丙氨酸 6.1%,精氨酸 7.8%,天冬氨酸 7.8%,瓜氨酸 7.6%,半胱氨酸 0.0%,谷氨酰胺 5.3%,谷氨酸 4.1%,甘氨酸 4.1%,同型半胱氨酸 4.5%,组氨酸 7.4%,亮氨酸 8.2%,赖氨酸 6.2%,甲硫氨酸 6.3%,鸟氨酸 5.8%,苯丙氨酸 9.3%,六氢吡啶羧酸 8.9%,脯氨酸 5.8%,丝氨酸 6.4%,苏氨酸 9.5%,色氨酸 6.0%,酪氨酸 5.1%,缬氨酸 7.4%。标本 2 的偏倚分别为丙氨酸

5.1%,精氨酸 4.9%,天冬氨酸 6.9%,瓜氨酸 9.7%,半胱氨酸 10.0%,谷氨酰胺 5.5%,谷氨酸 3.1%,甘氨酸 9.3%,同型半胱氨酸 4.7%,组氨酸 7.2%,亮氨酸 4.6%,赖氨酸 5.5%,甲硫氨酸 4.4%,鸟氨酸 5.7%,苯丙氨酸 8.7%,六氢吡啶羧酸 5.0%,脯氨酸 4.5%,丝氨酸 4.2%,苏氨酸 5.6%,色氨酸 5.1%,酪氨酸 5.5%,缬氨酸 5.2%。2 个标本的偏倚均<10.0%,准确度判断为可接受。

2.6 实验室 22 种氨基酸参考区间的建立 采用本实验室建立的衍生化串联质谱法在上述优化条件下对 2014 年 5 月至 2018 年 1 月 2 869 例西部五省自愿在本院筛查的新生儿及儿童全血标本进行 22 种氨基酸检测,通过计算各指标的 2.5%~97.5%百分位数初步建立本实验室新生儿及儿童全血中 22 种氨基酸的健康人群参考范围,结果为丙氨酸 88.0~664.0 μmol/L,精氨酸 0.0~18.8 μmol/L,天冬氨酸 0.0~58.0 μmol/L,瓜氨酸 3.4~25.1 μmol/L,半胱氨酸 0.0~3.1 μmol/L,谷氨酰胺 22.0~204.2 μmol/L,谷氨酸 87.0~474.0 μmol/L,甘氨酸 125.0~750.0 μmol/L,同型半胱氨酸 0.0~28.7 μmol/L,组氨酸 31.5~214.6 μmol/L,亮氨酸 52.2~286.0 μmol/L,赖氨酸 7.3~119.8 μmol/L,甲硫氨酸 8.4~58.2 μmol/L,鸟氨酸 18.3~122.6 μmol/L,苯丙氨酸 20.9~137.0 μmol/L,六氢吡啶羧酸 110.0~771.0 μmol/L,脯氨酸 317.0~2186.0 μmol/L,丝氨酸 48.0~239.0 μmol/L,苏氨酸 16.0~116.0 μmol/L,色氨酸 4.0~72.0 μmol/L,酪氨酸 15.0~178.0

$\mu\text{mol/L}$, 缬氨酸 $60.0 \sim 265.0 \mu\text{mol/L}$ 。

3 讨论

作为蛋白质分子的基本单位,氨基酸无疑是构成人体最基本的物质之一,其重要性使其一直是科学研究领域的热点^[10]。随着科学技术的不断进步,氨基酸检测技术也在不断发展,其中液相色谱串联质谱的发展是最典型的代表^[11]。液相色谱串联质谱技术主要是运用液相色谱将待测样本中的多种成分进行分离,再根据被测物质在质谱中被离子化的特定质荷比的不同带电粒子,根据特征离子的质量色谱图及其检测的离子峰强度,获得待测化合物的相对分子质量、分子式^[12-13]。衍生化串联质谱法能在 2 min 内完成 1 个标本中 22 种氨基酸浓度的分析,通过对这些产物浓度的分析,对氨基酸代谢紊乱、有机酸代谢紊乱等多种遗传代谢病进行筛查和诊断^[14-16]。不断发展的氨基酸检测技术为相对快速诊断遗传代谢病以指导临床治疗提供了更多的可能性^[17-20]。本研究建立本实验室 22 种氨基酸的检测方法衍生化串联质谱法,并考察实验过程的影响因素,研究结果表明,样本处理过程的最佳条件为:使用新鲜末梢血制成的干血片于 4°C 保存标本 2 周以内检测,氮气吹干 20 min,同位素内标复溶后尽快使用, 4°C 冰箱保存有效期为 1 个月左右。本方法定量检出限为 $0.3 \sim 10.0 \mu\text{mol/L}$;批内 CV 为 $5.3\% \sim 7.9\%$,批间 CV 为 $7.1\% \sim 8.6\%$,经统计学分析,男、女氨基酸浓度差异无统计学意义($P > 0.5$)。加标回收率为 $96.1\% \sim 98.1\%$,偏倚 $< 10.0\%$ 。通过分析 2014 年 5 月至 2018 年 1 月采集的 2 869 例新生儿及儿童全血中的氨基酸浓度,建立本实验室新生儿及儿童全血中 22 种氨基酸的健康人群参考范围。本研究建立的 22 种氨基酸快速检测方法衍生化串联质谱法将为临床医生精准诊疗遗传代谢病提供更多的科学依据。

参考文献

- [1] HAN L S, YE J, QIU W J, et al. Selective screening for Inborn errors of metabolism on clinical patients using tandem mass spectrometry in china; a four year report[J]. J Inherit Metab Dis, 2007, 30(4): 507.
- [2] 江剑辉, 曾伟峰, 姜迪刚, 等. 1 748 例遗传代谢病高危儿串联质谱筛查研究[J]. 广东医学, 2008, 29(3): 357-359.
- [3] TCHERKAS Y V, KARTSOVA L A, KRASNOVA I N. Analys of amino acids in human serum by isocratic reversed phase high-performance liquid chromatography with electro chemical detection [J]. J Chromatogr A, 2001, 913(1/2): 303-308.
- [4] 顾学范, 韩连书, 高晓岚, 等. 串联质谱技术在遗传性代谢病高危儿童筛查中的初步应用[J]. 中华儿科杂志, 2004, 42(6): 401-404.

- [5] LEFKOWITCH J H. Advances in hepatobiliary pathology: update for 2010[J]. Clin Liver Dis, 2010, 14(4): 747-762.
- [6] MILLINGTON D S, NORWOOD D L, KODO N, et al. Application of fast atom bombardment with tandem mass spectrometry and liquid chromatography/mass spectrometry to the analysis of acylcarnitines in human urine, blood, and tissue[J]. Anal Biochem, 1989, 180(2): 331-339.
- [7] 张春花. 质谱分析技术在儿童代谢性肝病诊断方面的应用[J]. 临床肝胆病杂志, 2011, 27(7): 709-717.
- [8] 李启亮, 宋文琪, 徐桦巍, 等. 北京地区 529 例儿童全血 13 种酰基肉碱正常参考范围的调查研究[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(9): 854-856.
- [9] Food and Drug Administration. Guidance for industry bioanalytical method validation[EB/OL]. [2020-03-20]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>.
- [10] 尚世强, 杨建滨, 王治国. 新生儿遗传代谢病串联质谱筛查存在的问题及展望[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(4): 237-239.
- [11] 王雪莹, 姜永生, 李丹, 等. 串联质谱分析在遗传代谢病高危儿童中的意义[J]. 中国儿童保健杂志, 2015, 23(8): 814-816.
- [12] 王超杰. 遗传性代谢病高危儿童串联质谱筛查分析[J]. 中国民康医学, 2017, 29(22): 95-96.
- [13] 娄燕, 尹娜, 陈凤琴, 等. 串联质谱技术选择性筛查遗传代谢病高危患儿 552 例初步分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(4): 296-299.
- [14] 涂文军, 戴方, 王欣煜, 等. 液相串联质谱在遗传代谢病高危新生儿检测中运用研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2010, 18(5): 81-83.
- [15] 陈玉兰, 杨秀芳, 郑铠军, 等. 液相串联质谱技术在新生儿病房及儿科重症监护室患儿遗传代谢病检测中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 25(11): 104-106.
- [16] 李瑛, 刘向梅, 王欣煜, 等. 新生儿重症监护病房先天性遗传代谢病筛查及结局随访[J]. 中华新生儿科杂志, 2015, 30(1): 48-50.
- [17] 蒋文星, 陈丽萍, 李红, 等. 质谱检测联合下一代测序在新生儿遗传代谢病诊断中的应用[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(21): 1640-1647.
- [18] 孙云, 王彦云, 马定远, 等. 南京地区 175 767 例串联质谱技术新生儿筛查结果分析[J]. 中华围产医学杂志, 2020, 23(4): 224-231.
- [19] 张志强, 龙艳明, 钟继生, 等. 串联质谱技术在广东省惠州地区新生儿遗传性代谢病筛查中的应用研究[J]. 检验医学与临床, 2020, 17(3): 411-413.
- [20] 刘洪喜, 朱志平, 虞斌, 等. 串联质谱与高通量测序技术在新生儿疾病筛查中的应用[J]. 现代预防医学, 2020, 47(1): 115-118.