

1.3 使用 LCMS-8050 衍生化法测定 DBS 中的氨基酸和酰基肉碱

摘要：本文介绍了以衍生法作为前处理，使用三重四极杆色谱质谱联用仪测定干血斑中的氨基酸和脂酰肉碱的方法。本方法灵敏度高，分析时间短，使用岛津专用新生儿筛查软件 Neonatal Solution 自动得到各组分的定量计算结果，同时根据预设的限值，自动标注超出限值的结果。

关键词：氨基酸 脂酰肉碱 新生儿筛查

在新生儿筛查中高效液相色谱-三重四极杆串联质谱技术(LC-MS/MS)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(Dried Blood Spot, DBS)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（流程如图 1 所示）。

样品的前处理方法一般分为衍生化法和非衍生化法两大类，本文为您介绍对血片进行衍生化处理后，使用岛津 LCMS-8050 进行检测的方法。

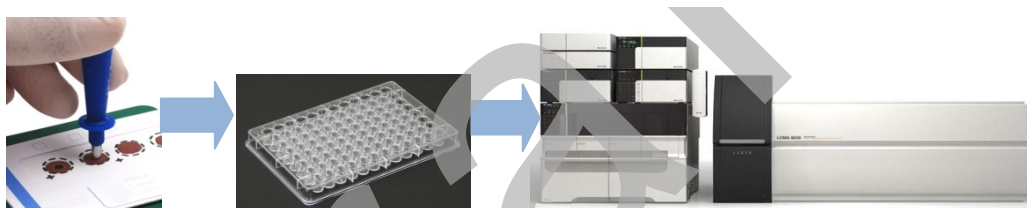


图 1. LCMSMS 进行新生儿筛查工作的一般流程

■ 血片采集

采集干血样本需要熟练的采集、处理及运输技术。涉及新生儿样品，其采集技术见 CLSI 文件 LA4-A5. 中国地区请参考《新生儿疾病筛查技术规范（2010 版）》中《新生儿遗传代谢病筛查血片采集技术规范》。血样直接采集到滤纸上，滤纸应与试剂盒质控品所使用的滤纸一致。

■ 衍生化方法

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：使用打孔器在血片滤纸上切取直径 3mm 的干血滤纸片，置于 96 孔过滤板中，每孔加入 100 μ L 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 $^{\circ}$ C 加热吹干，再加入 60 μ L 盐酸正丁醇，Teflon 膜覆盖，

置 65℃ 恒温箱内 15 min，随后 55℃ 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，图 2 和图 3 分别以 Phe 和 C14 为例说明氨基酸和酰基肉碱的衍生化反应过程，图 4 为衍生化流程。

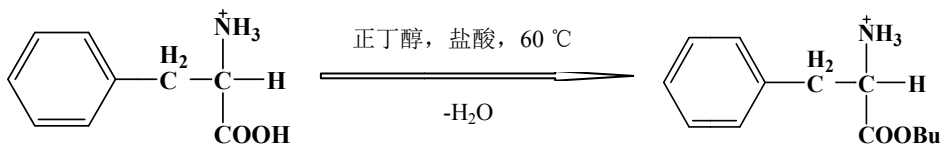


图 2. 氨基酸衍生化反应

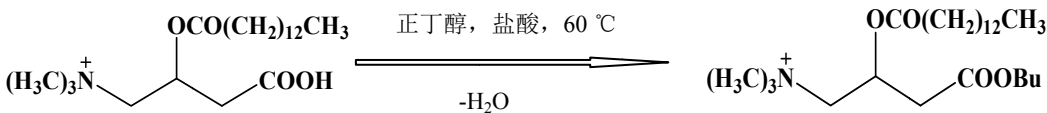


图 3. 酰基肉碱衍生化反应

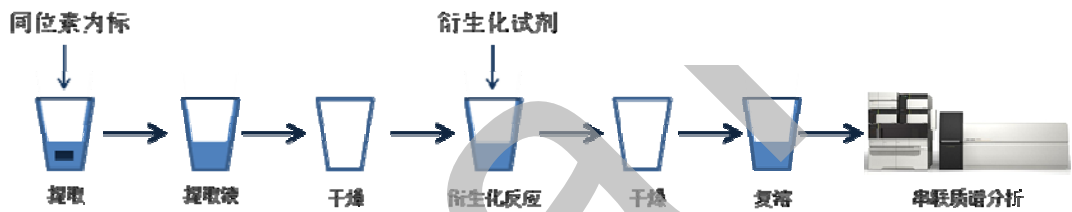


图 4. 衍生化前处理流程

■ 仪器分析条件和离子流图

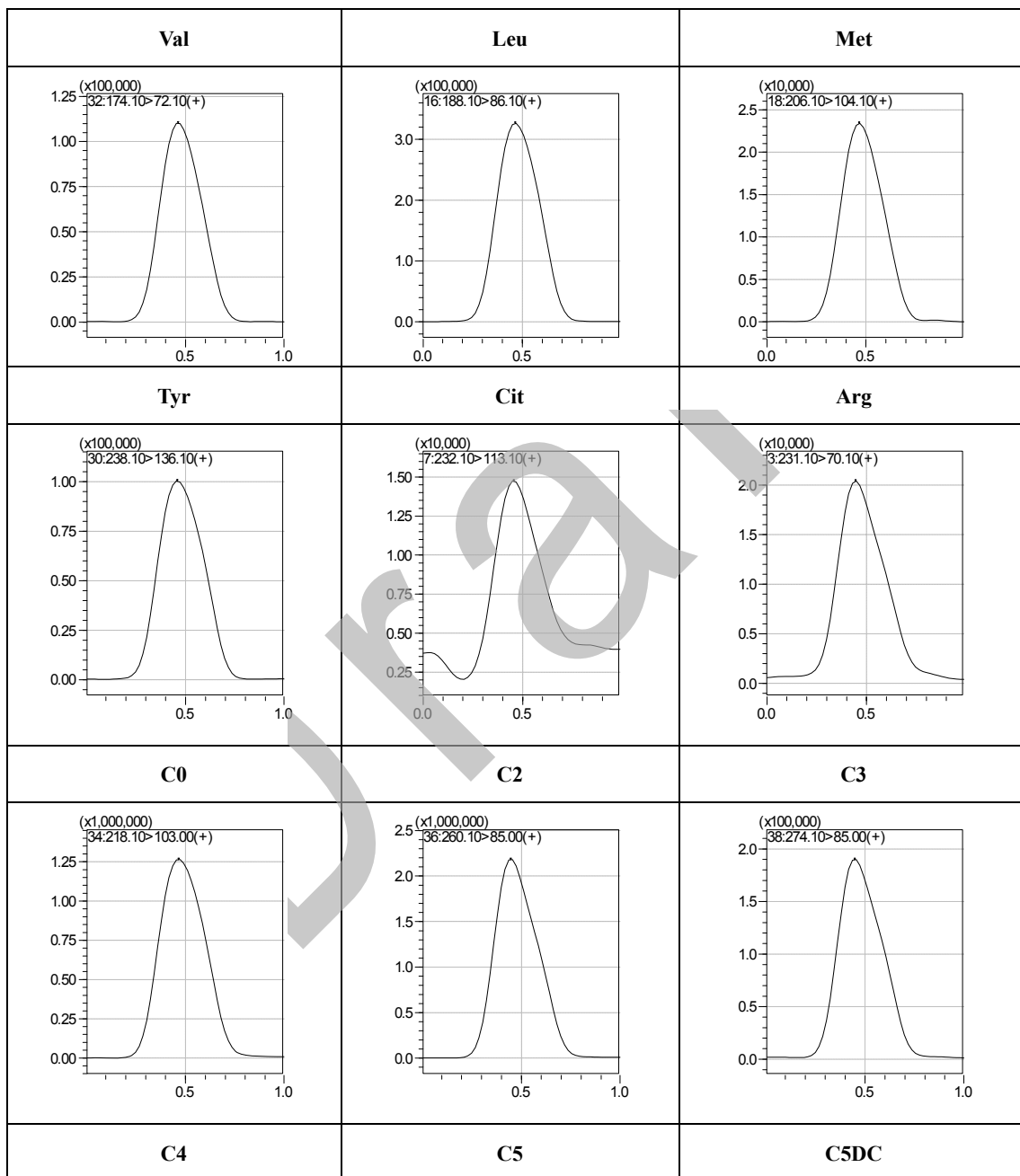
处理后的样品采用自动进样器进样，进样量 1 μL，进样后无需使用色谱柱进行分离，直接进入质谱检测，1 min 内即可完成一次样本分析。在待测样品中添加相应同位素内标，根据目标化合物与对应同位素内标峰面积或峰高的比值进行目标化合物的定量计算，本文采用多反应检测方式(MRM)采集数据。流动相采用乙腈：(0.02% 甲酸水溶液) = 80:20，流速时间程序和质谱条件分别如表 1 和表 2 所示，部分氨基酸和酰基肉碱的离子流图如图 5 所示。

表 1. 流速时间程序

Time	Module	Command	Value
0.10	Pumps	Total Flow	0.05
0.65	Pumps	Total Flow	0.10
0.66	Pumps	Total Flow	1.00
1.00	Controller	Stop	

表 2. 质谱条件

分析仪器	LCMS-8050	碰撞气	氩气
离子源	ESI(+)	Interface 温度	300℃
离子源接口电压	4.5 KV	DL 管温度	250℃
加热气	空气 8 L/min	HB 温度	400℃
雾化气	氮气 2 L/min	扫描模式	多反映监测(MRM)
干燥气	氮气 10 L/min	驻留时间	10 ms



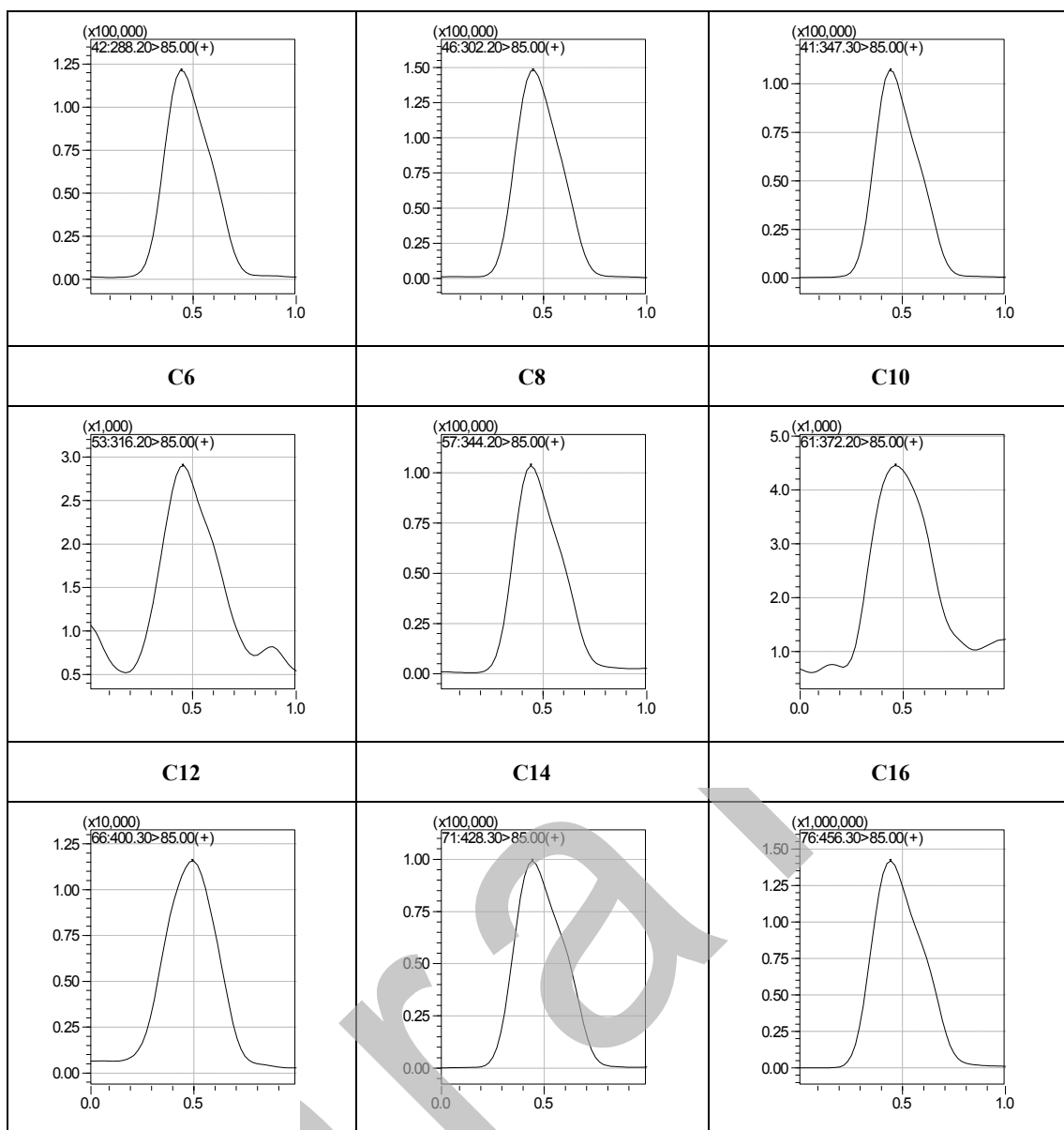


图 5. 部分氨基酸和酰基肉碱的离子流图

■ Neonatal Solution 和样品结果

采用 Neonatal Solution 新生儿筛查软件，对 LabSolutions 工作站采集得到的数据进行处理，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。其中，紫色标注部分表示检测结果超出标准限警告值，黄色标注部分表示检测结果达到标准限提醒值而未超出警告值，结果如图 6 所示。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	Neonatal Solution								
2									
3	Analysis Time	2015/02/13							
4									
5		Date Acqui	Tray:Vial	Ala	Arg	Asp	Glu	Gly	Leu
6	Criteria Upper Limit (Caution)	-	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
7	Criteria Upper Limit (Notice)	-	-	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00
8	Criteria Lower Limit (Notice)	-	-	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
9	Criteria Lower Limit (Caution)	-	-	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
10	c1	2/13/2015	1:2	6.26	0.24	63.01	2.46	2.64	2.99
11	c2	2/13/2015	1:3	33.56	4.04	149.44	29.66	22.94	10.70
12	ns	2/13/2015	1:4	4.85	0.25	27.03	6.70	5.75	3.13
13									

图 6. 样品结果