

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.13.006

衍生化串联质谱检测 55 种酰基肉碱方法的建立及其临床应用^{*}

丁 丽,樊 新[#],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** 建立衍生化串联质谱检测人体中 55 种酰基肉碱的方法,考察该方法的影响因素及其在西部地区新生儿遗传代谢性病筛查中的应用和意义,为其有效防治提供科学的依据。**方法** 利用衍生化串联质谱法分析比较 2 869 例出生 3 d 至 1 岁婴幼儿的干血滤纸片。采足跟血于空白采血滤纸上,完全渗透。用已知水平的酰基肉碱同位素内标液萃取干血滤纸片中的 55 种酰基肉碱,经过 20 min 衍生化反应后,用串联质谱仪分析标本中的 55 种酰基肉碱并计算其水平。**结果** 采用衍生化质谱法对新生儿进行遗传代谢病筛查,最好使用不含抗凝剂的血标本,标本于 4 ℃ 存放 14 d 内进行检测,使用的内标液于 4 ℃ 条件下存放不超过 28 d,氮气吹干 15 min 以上可得到较为理想的结果。酰基肉碱批内变异系数为 7.3%~9.9%,批间变异系数为 11.3%~13.9%。经统计学分析男、女之间酰基肉碱水平差异无统计学意义($P>0.5$)。**结论** 衍生化串联质谱法进行血滤纸片中 55 种酰基肉碱分析,有较高的回收率,能够达到较高的精确性和准确性,能灵敏、特异地测定血中酰基肉碱水平,为相关疾病的筛查诊断提供更多可能性,满足临床对遗传代谢疾病筛查及诊断的需要。

关键词:衍生化; 串联质谱; 酰基肉碱; 有机酸代谢病; 脂肪酸代谢病

中图法分类号:R722.11

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)13-1843-06

Establishment and clinical application of 55 carnitine detection methods by derivative tandem mass spectrometry^{*}

DING Li, FAN Xin[#], 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 derivative tandem mass spectrometry method for the detection of 55 acylcarnitine in human body, and to investigate the influencing factors of this method and its application and significance in screening of neonatal genetic and metabolic diseases in Western area of China, so as to provide scientific basis for its effective prevention and treatment. **Methods** The dry blood filter discs of a total of 2 869 infants aged 3 days to 1 year were analyzed and compared by derivative derivative tandem mass spectrometry method. The heel blood was collected on the blank blood filter paper and penetrated completely. A total of 55 kinds of acyl carnitine in dried blood filter paper were extracted with known concentration of acyl carnitine isotope internal standard liquid. After 20 min derivatization reaction, 55 kinds of acyl carnitine in samples were analyzed by tandem mass spectrometry and their concentrations were calculated. **Results** The best conditions for the derivatization-tandem mass spectrometry method for the inherited metabolic disorders screening was using noncontaining anticoagulant blood specimens which would better to be stored at 4 ℃ within 14 days. The standard solution would better be detected and stored at 4 ℃ within 28 days. The extract solution would better be dried by nitrogen within 15 minutes. The in-run coefficient of variation and between-run coefficient of variation of acylcarnitine were 7.3%—9.9%, 11.3%—13.9% respectively. There was no significant difference in acylcarnitine between male and female ($P>0.05$). **Conclusion** Derivative tandem mass spectrometry method for the analysis of 55 kinds of acyl carnitine in blood filter paper has high recovery rate, can achieve high precision and accuracy, and can sensitively and specifically determine the concentration of acyl carnitine in blood, so as to provide more possibilities for the screening and diagnosis of related diseases

^{*} 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,主要从事临床生化研究。[#] 共同第一作者:樊新,女,主管技师,主要从事临床生化研究。

[△] 通信作者, E-mail: ruizhang_zr@sina.com。

本文引用格式:丁丽,樊新,张瑞. 衍生化串联质谱检测 55 种酰基肉碱方法的建立及其临床应用[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(13): 1843-1847.

and meet the needs of clinical screening and diagnosis of genetic and metabolic diseases.

Key words: derivatization; tandem mass spectrometry; acylcarnitine; organic acid metabolic disease; fatty acid metabolic disease

有机酸代谢病和脂肪酸氧化代谢病均属于常染色体隐性遗传病,是常见的遗传代谢病,在新生儿和成人中均可发病,临床表现无特异性,主要表现为肝病、心肌病及肌肉疾病等^[1-3]。虽然许多种类的遗传代谢病目前已有相应的有效治疗方法,但是病死率和多种后遗症发生率的降低都依赖于早期的快速诊断和及时的干预治疗^[4-6]。在过去,遗传代谢病的诊断和治疗大多数依赖于医生的临床经验和一些非特异性的生化指标检测。近年来,随着临床诊断学的不断发展,这种局面已经改观。其中,串联质谱分析技术在临床诊断,尤其是遗传代谢病筛查中的作用不容忽视^[7-9],自 1989 年 MILLINGTON 等^[10]首次将串联质谱用于新生儿筛查以来,该项技术迅速发展,在遗传代谢病筛查中的作用越来越重要。但是目前常用的串联质谱法只能检测 31 种酰基肉碱^[11-13],扩大酰基肉碱的检测种类将为临床相关疾病的诊断提供更多可能性,本研究利用衍生化串联质谱法检测了 55 种酰基肉碱,考察了该检测方法的多种影响因素,并运用该方法对西部地区婴幼儿进行筛查诊断,以期为我国新生儿筛查项目的发展提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源 2014 年 5 月至 2016 年 1 月采集来自西部地区自愿选择串联质谱筛查的婴幼儿标本 2 869 例,新生儿组入选标准为出生后 3~28 d 健康的新生儿,男 999 例,女 927 例;儿童组入选标准为 28 d 至 1 岁的健康婴幼儿,男 490 例,女 453 例。本项目已通过空军军医大学第一附属医院伦理委员会审批。

1.2 标本收集与保存 儿童组:研究对象在上午 7~9 时采集空腹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,采足跟血于空白采血滤纸上,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 型串联质谱仪购自美国 AB 生物应用系统公司,高效液相色谱仪采用美国安捷伦公司产品(Agilent 1200),96 孔板加热吹干装置购于杭州奥盛公司(MD200)。

甲醇、正丁醇、乙酰氯、乙腈等试剂购于美国 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 孔聚丙烯板购于北京博奥生物集团有限公司。实验中所用氮气的纯度为 99.9% 以上。

酰基肉碱内标有 8 种:游离肉碱内标(d9-C0)、乙酰肉碱内标(d3-C2)、丙酰肉碱内标(d3-C3)、丁酰肉碱内标(d3-C4)、异戊酰肉碱内标(d9-C5)、辛酰肉碱内标(d3-C8)、十四酰肉碱内标(d9-C14)、十六酰肉碱内标(d3-C16),上述同位素内标用甲醇稀释成萃取液,4 ℃冰箱保存,1 个月内用完。

1.4 检测指标 检测健康婴幼儿血中 55 种肉碱:游离肉碱(C0)、乙酰肉碱(C2)、丙酰肉碱(C3)、丁酰肉碱(C4)、异戊酰肉碱(C5)、己酰肉碱(C6)、庚酰肉碱(C7)、辛酰肉碱(C8)、壬酰肉碱(C9)、癸酰肉碱(C10)、十二酰肉碱(C12)、十四酰肉碱(C14)、十六酰肉碱(C16)、十七酰肉碱(C17)、十八酰肉碱(C18)、二十碳酰肉碱(C20)、二十二碳酰肉碱(C22)、二十四碳酰肉碱(C24)、二十五碳酰肉碱(C25)、二十六碳酰肉碱(C26)、甲基巴豆酰肉碱(C5:1)、辛烯酰肉碱(C8:1)、癸烯酰肉碱(C10:1)、癸二烯酰肉碱(C10:2)、癸三烯酰肉碱(C10:3)、十二烯酰肉碱(C12:1)、十四烯酰肉碱(C14:1)、十四碳二烯酰肉碱(C14:2)、十六烯酰肉碱(C16:1)、十八烯酰肉碱(C18:1)、十八碳二烯酰肉碱(C18:2)、二十碳烯酰肉碱(C20:1)、二十碳二烯酰肉碱(C20:2)、二十碳三烯酰肉碱(C20:3)、丙二酰肉碱(C3DC)、甲基丙二酰肉碱(C4DC)、戊二酰肉碱(C5DC)、己二酰肉碱(C6DC)、辛二酰肉碱(C8DC)、癸二酰肉碱(C10DC)、十二碳二酰肉碱(C12DC)、十四碳二酰肉碱(C14DC)、十六碳二酰肉碱(C16DC)、十八碳二酰肉碱(C18DC)、二十碳二酰肉碱(C20DC)、羟基丁酰肉碱(C4-OH)、羟基异戊酰肉碱(C5-OH)、羟基己酰肉碱(C6-OH)、羟基十二酰肉碱(C12-OH)、羟基十四酰肉碱(C14-OH)、羟基十六烯酰肉碱(C16:1-OH)、羟基十六酰肉碱(C16-OH)、羟基十八烯酰肉碱(C18:1-OH)、羟基十八酰肉碱(C18-OH)、羟基二十酰肉碱(C20-OH)水平,确定本实验室的参考值范围。

1.5 方法

1.5.1 样品处理方法 用打孔器在干血片上取直径 3 mm 的圆形血片(4 个质控,一个空白),置于 96 孔板中,每孔加入 1.3 中制备的萃取液 100 μL,室温密封振荡 15 min 萃取血片中的 22 种氨基酸,转移萃取液至另一个 96 孔聚丙烯板,40 ℃加热氮气吹干,再加入 60 μL 1.3 中制备的衍生化试剂,eflon 膜覆盖,置于 65 ℃恒温箱内反应 20 min,随后 40 ℃氮气吹干,再加入 80%乙腈 100 μL 溶解,铝膜覆盖,串联质谱仪检测。

1.5.2 仪器设置状态 乙腈作为流动相,设置液相

色谱的流速为 300 $\mu\text{L}/\text{min}$,进样量为 20 μL ,每次测定酰基肉碱采用母离子扫描,子离子质荷比(m/z)为 85 Da 片段,扫描范围为 m/z 210~502,一个样品测试需时间约 2 min。

1.5.3 资料分析 定量分析采用软件 ChemoView 2.0.2 版本(美国 AB 生物应用系统公司),根据经过衍生化的同位素内标和各种酰基肉碱的离子峰强度,计算出所测标本中 55 种酰基肉碱的水平。

1.6 影响因素的考察 分别考察抗凝剂使用、标本的保存时间、不同氮气吹干时间、内标液保存时间对测定结果的影响。

1.6.1 抗凝剂使用对测定结果的影响 为了考察抗凝剂使用对测定结果的影响,将无抗凝剂的标本结果与含有乙二胺四乙酸(EDTA)及肝素标本的结果比较。直接采末梢血滴于干滤纸片上制备无抗凝剂的标本,采静脉血于含有 EDTA 的真空管混匀后滴于干滤纸片上制备含有 EDTA 的标本,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制备含有肝素抗凝剂的标本。

1.6.2 标本的保存时间对测定结果的影响 通过比较将标本自然晾干后放置 1 d 的结果与自然晾干后放置 7、14、21、28、35 d 后进行检测的结果来考察过长的保存时间是否对本方法的测定结果有影响。

1.6.3 不同氮气吹干时间对测定结果的影响 由于人体内酰基肉碱检测相对水平较低且性质不稳定,因此 55 种酰基肉碱是否可以完全衍生化,依赖于标本的前期处理。水的存在会直接影响衍生化,不同氮气吹干时间会影响标本中是否有水的存在从而影响衍生化过程,为此笔者考察了不同氮气吹干时间对实验结果的影响,比较了 50 $^{\circ}\text{C}$,0.2 MPa 氮气吹干条件下氮气吹干 10、15、20 min 对实验结果的影响。

1.6.4 内标液保存时间与测定结果的影响 为了考察内标液的稳定性,笔者选择内标液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 1、7、14、21、28、42、56 d 后进行检测,根据目标化合物的平均值和相对于第 1 天的偏差来比较保存时间对结果的影响。

1.7 线性范围考察 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 2016 年 1 月 2 869 例西部地区出生的 3 d 至 1 岁健康婴幼儿全血标本进行 55 种酰基肉碱检测,初步建立本实验室衍生化串联质谱法检测 55 种酰基肉碱的线性范围。

1.8 方法精密度考察 根据批内变异系数及批间变异系数来考察本方法的精密度,同一标本,平行分为 20 组,一天内采用本方法同时进行标本前处理并检测,得到批内精密度。之后 20 d 内重复上述实验,得到批间精密度。

1.9 统计学处理 采用 SPSS13.0 进行数据处理。通过单因素 ANOVA 方法计算各指标的 95% 参考区间,用 $\bar{x}\pm s$ 表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗凝剂使用对测定结果的影响 EDTA 可使检测结果降低,肝素抗凝剂会使部分结果升高,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酰基肉碱项目检测。因篇幅有限,仅列出 C0、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10 检测结果,见表 1。

表 1 抗凝剂对肉碱检测结果的影响($\bar{x}\pm s,\mu\text{mol}/\text{L}$)				
检测物	<i>n</i>	无抗凝剂	EDTA	肝素
C0	5	33.30 $\pm$ 3.90	31.60 $\pm$ 4.10	38.40 $\pm$ 3.80
C2	5	31.50 $\pm$ 2.60	27.10 $\pm$ 3.30 ^a	33.40 $\pm$ 2.40
C3	5	2.63 $\pm$ 0.95	2.00 $\pm$ 0.32	2.33 $\pm$ 0.49
C4	5	1.50 $\pm$ 0.14	1.71 $\pm$ 0.18	1.40 $\pm$ 0.14
C5	5	0.15 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.02
C6	5	0.14 $\pm$ 0.03	0.11 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.04
C7	5	1.02 $\pm$ 0.08	1.13 $\pm$ 0.05 ^a	1.10 $\pm$ 0.06
C8	5	1.20 $\pm$ 0.19	1.52 $\pm$ 0.24	1.22 $\pm$ 0.22
C9	5	0.21 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.02 ^a
C10	5	0.12 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.02

注:与无抗凝剂比较,^a $P<0.05$ 。

2.2 标本的保存时间对测定结果的影响 长链肉碱水平随着标本保存时间的延长而降低,建议标本在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 14 d 以内完成检测。因篇幅有限,仅列出 C0、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10 检测结果,见表 2。

表 2 标本保存时间对肉碱检测结果的影响($\bar{x}\pm s,\mu\text{mol}/\text{L}$)						
检测物	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
C0	47.70 $\pm$ 10.10	45.40 $\pm$ 14.60	49.50 $\pm$ 13.40	46.20 $\pm$ 10.70	51.50 $\pm$ 17.20	54.40 $\pm$ 15.30
C2	26.40 $\pm$ 6.20	28.20 $\pm$ 5.40	26.10 $\pm$ 3.80	25.20 $\pm$ 5.20	29.60 $\pm$ 7.40	32.30 $\pm$ 8.10
C3	2.63 $\pm$ 0.95	2.52 $\pm$ 1.03	2.39 $\pm$ 0.90	2.57 $\pm$ 0.73	2.66 $\pm$ 0.86	2.75 $\pm$ 1.24
C4	1.37 $\pm$ 0.19	1.41 $\pm$ 0.25	1.42 $\pm$ 0.16	1.39 $\pm$ 0.13	1.36 $\pm$ 0.27	1.30 $\pm$ 0.23
C5	0.32 $\pm$ 0.08	0.28 $\pm$ 0.09	0.31 $\pm$ 0.08	0.33 $\pm$ 0.10	0.29 $\pm$ 0.11	0.28 $\pm$ 0.11
C6	0.17 $\pm$ 0.04	0.18 $\pm$ 0.04	0.15 $\pm$ 0.06	0.19 $\pm$ 0.06	0.15 $\pm$ 0.07	0.17 $\pm$ 0.05
C7	0.92 $\pm$ 0.19	0.90 $\pm$ 0.24	0.87 $\pm$ 0.14	0.67 $\pm$ 0.13	0.71 $\pm$ 0.18 ^a	0.58 $\pm$ 0.21 ^a

续表 2 标本保存时间对肉碱检测结果的影响($\bar{x}\pm s, \mu\text{mol/L}$)

检测物	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
C8	0.20±0.05	0.22±0.05	0.25±0.06	0.18±0.05	0.16±0.04	0.19±0.06
C9	0.24±0.05	0.27±0.08	0.22±0.06	0.19±0.05	0.21±0.06	0.18±0.04 ^a
C10	0.15±0.03	0.14±0.04	0.12±0.03	0.16±0.05	0.14±0.04	0.11±0.03 ^a

注:与 1 d 比较, ^a $P<0.05$ 。

2.3 不同氮气吹干时间对测定结果的影响 吹干 10 min 肉碱水平普遍偏低,吹干 20 min 肉碱个别指标偏移较大,吹干 15 min 肉碱指标均较理想。因篇幅有限,仅列出 C0、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10 检测结果,见表 3。

2.4 内标液保存时间与测定结果的影响 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,相比于第 1 天的测定结果,经过 28 d 左右个别指标变化就达到 10%,建议同位素内标复溶后尽快使用,4 ℃冰箱保存效期为 28 d 左右。因篇幅有限,仅列出 C0、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10 检测结果,见表 4。

表 3 不同氮气吹干时间对肉碱检测的影响

检测物	吹干 10 min		吹干 15 min		吹干 20 min	
	测定值($\bar{x}\pm s, \mu\text{mol/L}$)	偏差(%)	测定值($\bar{x}\pm s, \mu\text{mol/L}$)	偏差(%)	测定值($\bar{x}\pm s, \mu\text{mol/L}$)	偏差(%)
C0	162.60±6.80	-13.5	197.40±3.10	5.0	200.20±4.30	6.5
C2	25.30±3.90	-26.5	36.10±1.90	4.9	37.30±2.40	8.4
C3	7.00±0.90	-32.0	9.20±0.50	-10.7	10.30±0.80	0.0
C4	1.88±0.23	-37.3	3.24±0.15	8.0	3.04±0.73	1.3
C5	1.21±0.23	4.3	1.11±0.16	-4.3	1.31±0.14	12.9
C6	0.61±0.03	-3.2	0.69±0.03	9.5	0.72±0.04	14.3
C7	0.90±0.05	-55.0	2.10±0.03	5.0	2.30±0.17	15.0
C8	0.61±0.08	-11.6	0.77±0.14	11.6	0.64±0.09	-7.2
C9	0.22±0.08	-9.6	0.23±0.04	-3.3	0.23±0.02	-1.7
C10	0.29±0.04	-38.3	0.53±0.07	12.8	0.59±0.05	25.5

表 4 内标液保存时间与肉碱检测结果的关系[$\mu\text{mol/L}$ 或 $\mu\text{mol/L}(\%)$]

检测物	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d	42 d	56 d
	测定值	测定值(偏差)	测定值(偏差)	测定值(偏差)	测定值(偏差)	测定值(偏差)	测定值(偏差)
C0	160.00	158.00(-0.6)	163.00(1.9)	167.0(3.8)	175.00(9.4)	182.0(13.8)	202.00(26.3)
C2	37.20	36.20(-2.7)	37.80(1.6)	38.60(3.8)	38.40(3.2)	40.40(8.6)	42.80(15.1)
C3	8.80	9.20(4.5)	9.20(4.5)	9.40(6.8)	9.80(11.4)	10.40(18.2)	11.20(27.3)
C4	0.51	0.51(0.0)	0.54(5.9)	0.54(5.9)	0.57(11.8)	0.60(17.6)	0.71(39.2)
C5	2.24	2.20(-1.8)	2.30(2.7)	2.28(1.8)	2.46(9.8)	2.79(24.6)	3.15(40.6)
C6	0.54	0.51(-5.6)	0.53(-1.9)	0.55(1.9)	0.54(0.0)	0.59(9.3)	0.66(22.2)
C7	0.89	0.92(3.4)	0.92(3.4)	0.95(6.7)	0.94(5.6)	1.06(19.1)	1.14(28.1)
C8	0.64	0.67(4.7)	0.67(4.7)	0.66(3.1)	0.70(9.4)	0.79(23.4)	0.91(42.2)
C9	0.19	0.19(0.0)	0.20(5.2)	0.20(5.2)	0.22(15.8)	0.25(31.6)	0.28(47.4)
C10	0.60	0.61(1.7)	0.58(-3.3)	0.59(-1.7)	0.60(0.0)	0.67(11.7)	0.72(20.0)

2.5 本方法精密度的考察 经过测量本方法 55 种酰基肉碱的批内变异系数为 7.3%~9.9%,批间变异系数为 11.3%~13.9%。

2.6 55 种酰基肉碱的实验室参考范围 儿童全血 9 种酰基肉碱(C0、C2、C3、C4、C5、C6、C16、C18、C5DC)

的参考区间随年龄的不同而异。与儿童组的各酰基肉碱参考区间比较发现,新生儿组 C0 低于儿童组;新生儿组 C2、C3、C4、C5、C6、C16、C18、C5DC 高于儿童组;新生儿组 C8、C10、C14、C5-OH 与儿童组相近。采用本实验室建立的串联质谱法检测健康婴幼儿全

血中 55 种酰基肉碱的健康人群参考范围见表 5。

表 5 衍生化串联质谱法检测 55 种酰基肉碱的参考值范围(μmol/L)

酰基肉碱	参考值范围	酰基肉碱	参考值范围	酰基肉碱	参考值范围
C0	5.95~60.00	C2	<43.00	C3	<5.20
C4	<0.59	C5	<0.68	C6	<0.20
C7	<1.11	C8	<0.24	C9	<0.32
C10	<0.27	C12	<0.29	C14	<0.47
C16	<4.06	C17	<0.12	C18	<1.25
C20	<0.16	C22	<0.152	C24	<0.13
C25	<0.06	C26	<0.102	C5:1	<0.10
C8:1	<0.39	C10:1	<0.22	C10:2	<0.09
C10:3	<0.28	C12:1	<0.22	C14:1	<0.27
C14:2	<0.13	C16:1	<0.43	C18:1	<1.94
C18:2	<0.78	C20:1	<0.12	C20:2	<0.14
C20:3	<0.12	C3DC	<0.13	C4DC	<0.71
C5DC	<0.14	C6DC	<0.20	C8DC	<0.14
C10DC	<4.63	C12DC	<0.26	C14DC	<0.10
C16DC	<0.10	C18DC	<0.06	C20DC	<0.07
C4-OH	<0.38	C5-OH	<0.34	C6-OH	<0.20
C12-OH	<0.10	C14-OH	<0.09	C16:1-OH	<0.12
C16-OH	<0.11	C18:1-OH	<0.09		
C20-OH	<0.06	C18-OH	<0.07		

3 讨 论

液相串联质谱技术主要是将被测物质分子电离成各种 m/z 不同的带电粒子,应用电磁学原理使粒子产生分离排列,通过测定离子峰的强度,获得确定化合物的相对分子质量、分子式^[14-16]。该技术能在 2~3 min 内对一份标本进行几十种代谢产物分析,而通过对这些产物的分析,可以对 30 余种遗传性代谢病,包括有机酸代谢紊乱和脂肪酸代谢紊乱性疾病进行筛查和诊断^[17-21]。

本研究结果表明,标本处理过程的最佳条件为:使用新鲜末梢血或肝素抗凝血制成的干血片于 4℃保存标本,14 d 以内完成检测,氮气吹干 15 min,同位素内标复溶后尽快使用,4℃冰箱保存效期为 28 d 左右。本研究还根据优化的衍生化串联质谱法建立了本实验室的 55 种酰基肉碱的参考值范围。本实验室建立的衍生化串联质谱法具有快速、准确、特异的特点。此外,本研究还表明,儿童全血 9 种酰基肉碱的参考区间随年龄的不同而异。与儿童的各酰基肉碱参考区间比较发现,新生儿 C0 低于儿童;新生儿 C2、C3、C4、C5、C6、C16、C18、C5DC 高于儿童;新生儿 C8、C10、C14、C5-OH 与儿童相近。一方面可能是由于新生儿的肝、肾等重要脏器尚未发育成熟,在酰基

肉碱的代谢方面可能明显不同于儿童;另一方面可能是由于新生儿的饮食主要为母乳或者奶粉,来源比较单一,而儿童的食物来源比较丰富,因此这两个群体之间酰基肉碱的摄入和利用存在明显不同,导致酰基肉碱的分布出现明显差异。

本文建立的衍生化质谱法可以测定更多的酰基肉碱,检测种类的增加为今后新生儿遗传代谢病的筛查乃至其他病种的临床研究和治疗提供了更多的可能性。儿科医生尤其是新生儿科医生应重视利用衍生化串联质谱技术进行遗传代谢病检测,以达到早诊断、早治疗的目的。

参考文献

[1] 韩连书. 重视脂肪酸氧化代谢病的筛查与诊治[J]. 中国实用儿科杂志, 2019, 34(1): 6-10.

[2] 陆妹, 杨艳玲. 线粒体脂肪酸氧化代谢病与猝死[J]. 中国实用儿科杂志, 2019, 34(7): 551-555.

[3] 韩连书. 质谱技术在遗传代谢病及产前诊断中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(10): 761-765.

[4] 孙茂, 黄萍, 成胜权, 等. 陕西省新生儿遗传代谢性疾病的筛查研究[J]. 中外医学研究, 2016, 307(11): 54-55.

[5] 郑文吉, 王飞, 余颀, 等. 11 204 例新生儿串联质谱筛查结果分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2016, 22(2): 82-83.

[6] 余洁红, 梁宝嫦, 黎晓绮, 等. 串联质谱技术在儿童遗传性代谢病疾病筛查中的应用价值[J]. 中外医学研究, 2015, 308(27): 61-62.

[7] 赵振东, 王洁. 海南省某医院 337 例 NICU 患儿串联质谱结果分析[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(23): 5458-5460.

[8] 宋玮婷. 闽东地区新生儿血液串联质谱游离肉碱水平临床观察[J]. 中国优生与遗传杂志, 2017(12): 71-72.

[9] 李丽. 串联质谱在新生儿遗传代谢性疾病筛查中的应用价值[J/CD]. 临床检验杂志(电子版), 2019, 8(1): 60-62.

[10] 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.

[11] 谢金水, 陈小娜, 毛莲, 等. 串联质谱技术在喀什地区遗传代谢病高危儿筛查中的应用价值[J]. 中国医药导报, 2019, 16(32): 91-94.

[12] 李娴, 李林飞, 李东晓, 等. 应用串联质谱法建立正常儿童干血斑氨基酸及酰基肉碱的参考区间[J]. 国际医药卫生导报, 2019, 25(19): 3231-3233.

[13] 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.

[14] 杨宇奇, 韩小亚, 周红, 等. 早产儿游离肉碱和酰基肉碱代谢变化特点[J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(30): 56-61.

[15] 李惠中, 周伟, 王传霞, 等. 串联质谱筛查新生儿肉碱吸收障碍的临床研究[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2019, 34(14): 1053-1059.

(下转第 1852 页)

指标。血常规检测目前在临床上广泛开展,且具有标本易得、费用低廉、检测速度快等特点,其中 NLR、MPV、PDW 均可快速获取。本研究中 48 h NLR、NLR 变化率、MPV、PDW 与 PCT、PCIS 和 PRISM III 评分具有相近的应用价值,有很好的应用前景。脓毒症是一个复杂的病理、生理过程,单一的炎症反应指标或单一的一次炎症反应指标检测均不能很好地反映患儿病情变化,应联合使用多个临床指标动态评估患儿病情,及时调整治疗方案,改善患儿预后。

参考文献

- [1] FLEISCHMANN-STRUZEK C, GOLDFARB D M, SCHLATTMANN P, et al. The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review[J]. *Lancet Respir Med*, 2018, 6(3): 223-230.
- [2] 陈雪婷, 钱素云. 全球儿童脓毒症流行病学及病原学研究进展[J]. *中华儿科杂志*, 2019, 57(5): 380-383.
- [3] REINHART K, DANIELS R, KISSOON N, et al. Recognizing sepsis as a global health priority—a WHO resolution[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(5): 414-417.
- [4] 孙维维, 韩旭东, 黄晓英. 血中性粒细胞/淋巴细胞比值及其变化率与 ICU 脓毒症患者预后的相关性[J]. *南通大学学报(医学版)*, 2015, 35(5): 455-456.
- [5] 王蔚, 周恩, 陈华, 等. 脓毒症早期血小板容积指数对脓毒症患者预后价值的研究[J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2019, 18(4): 357-361.
- [6] 樊寻梅. 儿科感染性休克(脓毒性休克)诊疗推荐方案[J]. *中华儿科杂志*, 2006, 44(8): 596-598.
- [7] POLLACK M M, PATEL K M, RUTTIMANN U E. PRISM III: an updated Pediatric Risk of Mortality score[J]. *Crit Care Med*, 1996, 24(5): 743-752.
- [8] 张亮, 刘万周, 程涛. 降钙素原和急性生理与慢性健康评分 II 对脓毒症患者预后的评估[J]. *新乡医学院学报*, 2016, 33(7): 629-631.
- [9] LA RUSSA R, MAIESE A, VIOLA R V, et al. Searching for highly sensitive and specific biomarkers for sepsis: State-of-the-art in post-mortem diagnosis of sepsis through immunohistochemical analysis[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2019, 33: 2058738419855226.

- [10] SHARMA S, DUGGAL N. Role of procalcitonin, IL-6 and C-reactive protein in suspected cases of sepsis[J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2019, 62(4): 578-581.
- [11] 钟婉玲, 黄宇戈. 早期乳酸测定联合儿童危重病例评分在重症监护室脓毒症患者预后评估中的作用[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2019, 34(12): 934-937.
- [12] 许焯, 王猛. 脓毒症的免疫抑制[J]. *国际儿科学杂志*, 2018, 45(11): 817-821.
- [13] GÜROL G, ÇİFTCI H, TERİZİ H A, et al. Are there standardized cutoff values for neutrophil-lymphocyte ratios in bacteremia or sepsis? [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2015, 25(4): 521-525.
- [14] BEKDAS M, GOKSUGUR S B, SARAC E G, et al. Neutrophil/lymphocyte and C-reactive protein/mean platelet volume ratios in differentiating between viral and bacterial pneumonias and diagnosing early complications in children[J]. *Saudi Med J*, 2014, 35(5): 442-447.
- [15] 应佳云, 张铮铮, 陆国平. 儿童危重病例评分和第三代儿童死亡危险评分在危重患儿的应用情况[J]. *中国循证儿科杂志*, 2018, 13(3): 185-189.
- [16] GUCLU E, DURMAZ Y, KARABAY O. Effect of severe sepsis on platelet count and their indices[J]. *Afr Health Sci*, 2013, 13(2): 333-338.
- [17] KIM C H, KIM S J, LEE M J, et al. An increase in mean platelet volume from baseline is associated with mortality in patients with severe sepsis or septic shock[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119437.
- [18] DURSUN A, OZSOYLU S, AKYILDIZ B N. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and mean platelet volume can be useful markers to predict sepsis in children[J]. *Pak J Med Sci*, 2018, 34(4): 918-922.
- [19] VAGDATLI E, GOUNARI E, LAZARIDOU E, et al. Platelet distribution width: a simple, practical and specific marker of activation of coagulation [J]. *Hippokratia*, 2010, 14(1): 28-32.
- [20] 降钙素原急临床应用专家共识组. 降钙素原(PCT)急临床应用的专家共识[J]. *中华急诊医学杂志*, 2012, 21(9): 944-951.

(收稿日期: 2020-09-10 修回日期: 2021-02-16)

(上接第 1847 页)

- [16] 刘桂红, 邓伟楠, 谢倩, 等. 孕前 BMI 和新生儿体格生长与脐血氨基酸和酰基肉碱浓度的相关性[J]. *江苏医药*, 2020, 46(1): 13-17.
- [17] 张言, 强荣, 张瑞雪, 等. 1 例极长链酰基辅酶 A 脱氢酶缺乏患儿串联质谱及基因诊断结果分析[J]. *中国小儿急救医学*, 2020, 27(4): 306-308.
- [18] 刘丹阳, 王利, 沈海青, 等. 血清游离肉碱和酰基肉碱水平在早产儿营养支持中的动态变化[J]. *中华新生儿科杂志*, 2020, 35(2): 98-103.
- [19] 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.

- [20] 封纪珍, 贾立云, 王熙, 等. 石家庄地区 128 399 例新生儿多种遗传代谢病串联质谱筛查结果分析[J]. *临床检验杂志*, 2020, 38(5): 344-349.
- [21] BENOIST J F, GARNOTEL R, CÉCILE A B. Biochemical diagnosis of inherited metabolic diseases: metabolic profiles and difficulties for validating methods[J]. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2020, 78(5): 469-470.

(收稿日期: 2020-09-26 修回日期: 2021-02-19)