

LCMS-8050CL 用于罕见病 X-ALD 筛查应用研究

LCMSMS-471

摘要： 本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 及 X- 连锁肾上腺脑白质营养不良筛查和诊断试剂盒（液相色谱 - 串联质谱法，质谱生物科技有限公司），建立了干血片中 4 种溶血磷脂酰胆碱同时测定的方法，该方法可辅助筛查诊断 X- 连锁肾上腺脑白质营养不良。使用试剂盒的内标、标准品、质控品及新生儿滤纸干血片进行了方法的准确度及精密度考察，使用岛津 Neonatal 新筛数据处理软件对筛查结果进行数据处理。结果显示该方法准确度及精密度均满足试剂盒要求，Neonatal 新筛数据处理软件可以应用于筛查数据处理。该方法对 X- 连锁肾上腺脑白质营养不良的临床判断、治疗管理和生理评估具有辅助筛查诊断的意义。

关键词： LCMS-8050 CL 罕见病 X-ALD 筛查

X- 连锁肾上腺脑白质营养不良 (X-linked adrenoleukodystrophy, X-ALD) 是过氧化物酶体功能异常导致的脂代谢异常疾病，属于遗传代谢病。临床主要表现为大脑白质进行性脱髓鞘病变和肾上腺皮质功能不全。该病由 X 染色体上 (Xq28) ABCD1 (adenosine triphosphate-binding cassetteD1) 基因突变引起，导致过氧化物酶体功能缺失，长链脂肪酸不能被 β 氧化，大量极长链脂肪酸 (very long chain fatty, VLCFA) 沉积于大脑白质和肾上腺，导致神经系统功能异常及肾上腺皮质功能减退。95% 的患者为男性，而女性多为杂合子，属于疾病基因突变的携带者。男性 X-ALD 的发病率为 1/21000 ~ 1/15500，而男性 X-ALD 和女性杂合子携带者的共同发病率为 1/17000。X-ALD 临床表现多样，典型 X-ALD 患者出现中枢神经系统损害和肾上腺皮质功能低下两类症状。通过准确定量患者干血

片中四种溶血磷脂酰胆碱 (lysophosphatidylcholine, LPC)：二十碳溶血磷脂酰胆碱 (C20:0 LPC)、二十二碳溶血磷脂酰胆碱 (C22:0 LPC)、二十四碳溶血磷脂酰胆碱 (C24:0 LPC) 和二十六碳溶血磷脂酰胆碱 (C26:0 LPC)，可快速筛查诊断 X-ALD，从而尽早进行饮食控制、类固醇替代、造血干细胞移植等治疗，可预防患儿智力、精神、运动发育落后和肾上腺皮质功能受损。

本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 及 X- 连锁肾上腺脑白质营养不良筛查和诊断试剂盒（高效液相色谱 - 串联质谱法，质谱生物科技有限公司），建立了滤纸干血片中 4 种溶血磷脂酰胆碱含量测定方法，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可供相关人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津临床用超高效液相色谱与三重四极杆质谱仪联用系统。具体配置为 LC-30AD CL \times 2 (输液泵)，DGU-20A_{5R} CL (在线脱气机)，SIL-30AC_{MP} CL (自动进样器)，CTO-30A CL (柱温箱)，SPD-M20A CL (二极管阵列检测器) CBM-20A CL 系统控制器，LCMS-8050 CL 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站，Neonatal Ver.2.30 筛查结果处理软件。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：在线过滤器 (2 μ m, P/N6010-55100)

流动相：试剂盒提供

柱温：室温

进样量：1 μ L

洗脱方式：流速梯度洗脱，初始流速为 0.1 mL/min，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.10	Pumps	T.Flow	0.05
0.65	Pumps	T.Flow	0.25
0.66	Pumps	T.Flow	1
1.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8050 CL

DL 温度: 250°C

离子源: ESI (+)

加热模块温度: 400°C

雾化气流速: 3.0 L/min

离子源温度: 300°C

干燥气流速: 10.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

加热器流速: 10.0 L/min

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
C20:0 LPC	552.5	104.1	-22	-32	-20
C22:0 LPC	580.5	104.1	-22	-32	-20
C24:0 LPC	608.5	104.1	-22	-32	-20
C26:0 LPC	636.5	104.1	-22	-32	-20
C26:0 LPC-IS	642.5	104.1	-22	-32	-20

1.3 材料与方法

1.3.1 材料

高质控干血片: 试剂盒提供

低质控干血片: 试剂盒提供

内标准溶液: 试剂盒提供

样品稀释液: 试剂盒提供

1.3.2 方法

方法原理: 使用含稳定同位素标记的 C26:0 LPC 内标准品的溶剂萃取滤纸干血片中的 4 种溶血磷脂酰胆碱, 然后用串联质谱进行分析。通过测定 4 种溶血磷脂酰胆碱与 C26:0 LPC 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 4 种溶血磷脂酰胆碱浓度水平。

样本前处理方法: 用直径 3 mm 打孔器在质控干血片及新生儿血片上取样, 置于 96 孔板中, 每孔加入含 C26:0 LPC 同位素内标的溶液 100 μ L, 45 °C 密封孵育震荡 (650 ~ 750 rpm) 45 min, 室温放置 5 min, 提取 75 μ L 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。

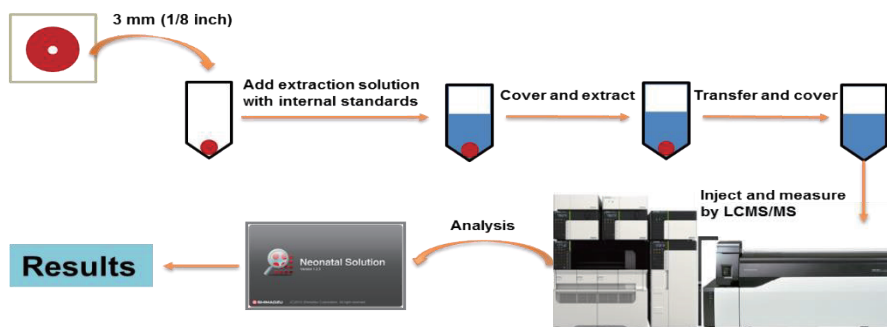


图 1 样本前处理及分析流程

■ 结果与讨论

2.1 MRM 色谱图

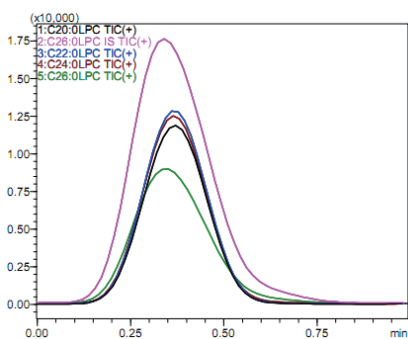


图 2 低质控干血片谱图

2.2 质控样本准确度考察

按 1.3 中的前处理方法和 1.2 中的分析条件对试剂盒中的高低质控干血片进行分析，高低质控干血片各处理 4 份，以考察准确度，使用岛津 Neonatal 新筛数据处理软件对筛查结果进行数据处理，结果见表 3，结果显示，高低质控干血片中 4 种溶血磷脂酰胆碱均在靶值范围内，准确度良好。

表 3 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

目标物	LQC 测定值	LQC 靶值范围	HQC 测定值	HQC 靶值范围
C20:0 LPC	1.04	0.66~1.50	3.82	2.47~5.34
	1.12		4.15	
	0.99		3.54	
	1.07		4.01	
C22:0 LPC	1.55	1.00~1.99	4.70	3.09~6.43
	1.58		5.15	
	1.32		5.13	
	1.41		4.52	
C24:0 LPC	1.57	0.92~2.03	5.12	3.02~6.26
	1.57		5.72	
	1.29		4.97	
	1.36		5.01	

	0.93		4.43	
C26:0 LPC	1.01	0.55~1.34	4.85	2.20~5.76
	0.89		4.68	
	0.85		4.61	

2.3 精密度考察

按 1.3 中的前处理方法和 1.2 中的分析条件对试剂盒中的低质控干血片连续进样分析 6 针，以考察仪器精密度，具体结果见表 4，结果显示，连续分析 6 针低质控干血片，RSD 在 1.2%-3.6% 之间，仪器精密度良好，满足临床测定需求。

表 4 精密度考察数据

NO.	C20:0 LPC	C22:0 LPC	C24:0 LPC	C26:0 LPC
测定 1	0.99	1.32	1.29	0.89
测定 2	0.91	1.28	1.28	0.84
测定 3	0.98	1.28	1.27	0.89
测定 4	1.00	1.31	1.33	0.92
测定 5	0.95	1.30	1.26	0.87
测定 6	0.94	1.30	1.28	0.88
RSD%	3.6	1.2	1.9	3.0

2.4 临床样品测定结果

取 10 批次新生儿滤纸干血片，按 1.3 中的前处理方法及 1.2 中的分析条件进行测定，谱图见图 3，结果见表 5，结果显示，LCMS-8050 CL 配套该试剂盒使用可以满足临床检测需求。

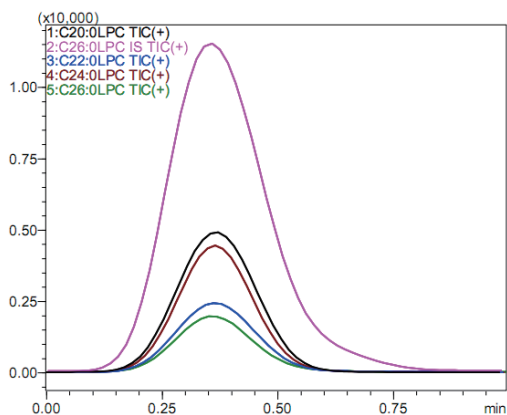


图 3 Sample-1 谱图

表 5 人血清临床样品检测结果 ($\mu\text{mol/L}$)

NO.	C20:0 LPC	C22:0 LPC	C24:0 LPC	C26:0 LPC
Sample-1	0.88	0.85	1.10	0.52
Sample-2	0.54	0.48	0.63	0.33
Sample-3	0.54	0.64	0.86	0.36
Sample-4	0.84	0.64	0.95	0.38
Sample-5	0.36	0.44	0.57	0.31
Sample-6	0.52	0.50	0.74	0.35
Sample-7	0.49	0.51	0.76	0.31
Sample-8	0.67	0.72	0.95	0.37
Sample-9	0.51	0.49	0.71	0.35
Sample-10	0.49	0.63	0.84	0.34

■ 结论

本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 及 X- 连锁肾上腺脑白质营养不良筛查和诊断试剂盒（液相色谱 - 串联质谱法，质谱生物科技有限公司），建立了干血片中 4 种溶血磷脂酰胆碱同时测定的方法，该方法可辅助筛查诊断 X- 连锁肾上腺脑白质营养不良。使用试剂盒的内标、标准品、质控品及新生儿滤纸干血片进行了方法的准确度及精密度考察，使用岛津 Neonatal 新筛数据处理软件对筛查结果进行数据处理。结果显示该方法准确度及精密度均满足试剂盒要求，Neonatal 新筛数据处理软件可以应用于筛查数据处理。该方法对 X- 连锁肾上腺脑白质营养不良的临床判断、治疗管理和生理评估具有辅助筛查诊断的意义。

岛津应用云

