

LCMS-8050CL 用于肌酸缺乏综合征筛查应用研究

LCMSMS-518

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 及胍基乙酸和肌酸检测试剂盒（液相色谱 - 串联质谱法，质谱生物科技有限公司），建立了干血片中胍基乙酸和肌酸同时测定的方法，该方法可辅助筛查诊断肌酸缺乏综合征。使用试剂盒的内标、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胍基乙酸和肌酸筛查数据处理。该方法对肌酸缺乏综合征的临床判断、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 胍基乙酸 肌酸 肌酸缺乏综合征

肌酸是一种自然存在于脊椎动物体内的含氮有机酸，主要作用是辅助能量供应，在肌肉和神经组织高能量消耗过程中发挥重要的能量转换功能。胍基乙酸在肌酸合成反应中具有重要作用。肌酸缺乏综合征（creatine deficiency syndromes, CDS）是一组影响肌酸合成及转逆的先天性遗传代谢性疾病，其生化特点为脑肌酸缺乏。临床表现为智力缺损、语言发育迟缓、孤独症、癫痫发作、肌张力减退、以锥体外系损害为主的运动障碍和行为问题。肌酸缺乏综合征可分为胍基乙酸甲基转移酶（GAMT）缺陷，精氨酸：甘氨酸脒基转移酶（AGAT）缺陷，SLC6A8 基因突变所致的肌酸转运（CRTR）缺陷。

GAMT 缺陷患者在尿、血浆、脑脊液、干血纸片

样本中出现胍基乙酸增高，肌酸和肌酐减低，肌酸 / 肌酐比值不变。AGAT 缺陷患者尿、血浆、脑脊液、干血纸片样本中出现胍基乙酸降低，肌酸和肌酐减低，肌酸 / 肌酐比值不变。SLC6A8 基因缺陷患者胍基乙酸正常，尿肌酸可正常或升高，而肌酐降低，故肌酸 / 肌酐比值升高。

本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 及胍基乙酸和肌酸检测试剂盒（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胍基乙酸和肌酸含量测定方法，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于肌酸缺乏综合征的辅助诊断。

■ 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 LCMS-8050CL 联用系统。具体配置为：

输液泵：LC-30AD CL×2

在线脱气机：DGU-20A_{5R} CL

自动进样器：SIL-30AC_{MP} CL

柱温箱：CTO-30A CL

二极管阵列检测器：SPD-M30A CL

系统控制器：CBM-20A CL

筛查结果处理软件：Neonatal Ver.2.30

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.91

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：在线过滤器（2 μm, P/N6010-55100，岛津（上海）实验器材有限公司）

流动相：试剂盒提供

柱温：室温

进样量：1 μL

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	0.20
0.66	Pumps	T.Flow	1
1.00	Controller	Stop	

质谱条件：

分析仪器：LCMS-8050 CL

离子源：ESI (+)

雾化气流速：3.0 L/min

干燥气流速：10.0 L/min

加热器流速：10.0 L/min

DL 温度：150 °C

加热模块温度：450 °C

离子源温度：100 °C

扫描模式：多反应监测 (MRM)

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)
GAA	118.1	76.1	-11	-13	-14
GAA-d2	120.1	78.1	-11	-13	-14
CRE	132.1	90.1	-12	-14	-17
CRE-d3	135.1	93.1	-12	-14	-17

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 2 种稳定同位素标记的内标的溶剂萃取滤纸干血片中的胍基乙酸和肌酸，然后用串联质谱进行分析。通过测定胍基乙酸和肌酸与对应同位素内标的离子峰强度，由已知水平的质控及内标，即可通过岛津新生儿筛查软件自动计算出所测样本的胍基乙酸和肌酸浓度水平。

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。

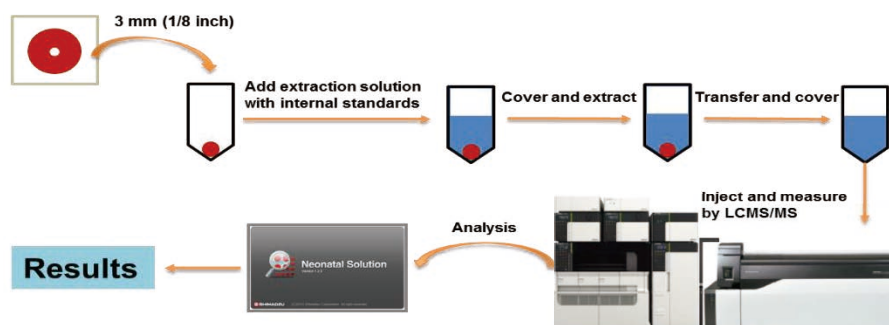


图 1 样本前处理及分析流程

■ 结果讨论

2.1 MRM 色谱图

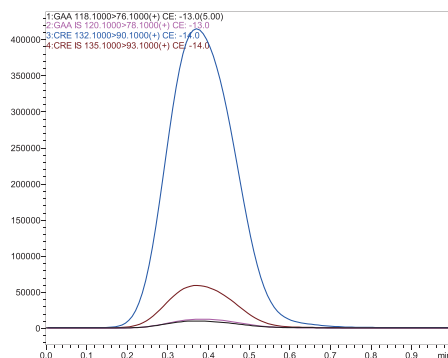


图 2 低质控干血片谱图

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 3 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，高低质控干血片中胍基乙酸和肌酸均在靶值范围内，准确度良好。

表 3 质控准确度考察结果 ($\mu\text{mol/L}$)

目标物	LQC 测定值	LQC 靶值范围	HQC 测定值	HQC 靶值范围
GAA	3.99	2.92~5.41	8.10	5.44~10.70
	3.92		8.94	
	4.01		8.55	
CRE	223.69	169.60~323.36	484.58	319.90~665.02
	254.61		534.15	
	241.27		524.61	

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 0.5%~3.2% 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.	GAA	CRE
测定 1	4.11	256.07
测定 2	3.98	257.17
测定 3	3.85	254.26
测定 4	3.89	254.88
测定 5	3.86	256.47
测定 6	4.13	254.02
RSD%	3.2	0.5

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，使用岛津 Neonatal 新筛数据处理软件处理结果见表 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，使用岛津 Neonatal 新筛数据处理软件可用于该筛查数据分析。

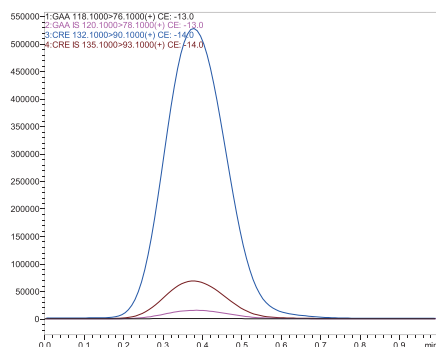


图 3 Sample-1 谱图

表 5 人血清临床样品检测结果 (μmol/L)

NO.	GAA	CRE
Sample-1	1.08	383
Sample-2	1.38	295
Sample-3	0.74	390
Sample-4	1.10	279
Sample-5	1.10	383
Sample-6	0.57	345
Sample-7	0.83	347
Sample-8	0.60	298
Sample-9	1.36	514
Sample-10	0.98	293

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 及胍基乙酸和肌酸检测试剂盒（液相色谱-串联质谱法，质谱生物科技有限公司），建立了干血片中胍基乙酸和肌酸同时测定的方法，该方法可辅助筛查诊断肌酸缺乏综合征。使用试剂盒的内标、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的考察，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该筛查数据处理。该方法对肌酸缺乏综合征的临床判断、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

