

· 论 著 ·

高效液相色谱法及串联质谱法在苯丙酮尿症筛查诊断中的应用*

张 瑞, 周铁成, 郝晓柯, 岳乔红[△]

(第四军医大学第一附属医院西京医院检验科, 陕西西安 710032)

摘要:目的 考查了高效液相色谱(HPLC)法和串联质谱(MS/MS)法在遗传代谢性疾病苯丙酮尿症(PKU)筛查中的应用及意义。方法 利用 MS/MS 法和 HPLC 法分别分析了 1 860 例出生 3 d 至 11 岁儿童的干血滤纸片及全血标本中苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)浓度及其比值。结果 MS/MS 法和 HPLC 法 Phe 线性范围为 26.02~101.11 $\mu\text{mol/L}$ 和 32.04~132.50 $\mu\text{mol/L}$, Tyr 线性范围为 41.50~253.07 $\mu\text{mol/L}$ 和 32.85~111.50 $\mu\text{mol/L}$, 平均回收率 Phe 为 97.36% 和 98.43%, Tyr 为 96.71% 和 98.99%, 批内 CV Phe 为 4.31% 和 3.97%, Tyr 为 4.09% 和 4.01%, 批间 CV Phe 为 5.73% 和 4.58%, Tyr 为 6.01% 和 5.24%。结论 两种方法均能灵敏、特异的测定血中 Phe 和 Tyr 浓度, 满足对 PKU 筛查及诊断的需要。

关键词: 苯丙氨酸; 酪氨酸; 苯丙酮尿症

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.06.017

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)06-0758-03

Application of MS/MS method and HPLC method for screening and diagnosis of PKU*

Zhang Rui, Zhou Tiecheng, Hao Xiaoke, Yue Qiaohong[△]

(Department of Clinical Laboratory, Xijing Hospital, First Affiliated Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China)

Abstract: Objective To investigate the application and significance of the MS/MS method and the HPLC method for the screening and diagnosis of genetic metabolic disease phenylketonuria (PKU). **Methods** The MS/MS method and the HPLC method were adopted to analyze the concentrations of phenylalanine(Phe) and tyrosine(Tyr) and its ratio in the dried blood spot specimen on filter paper and the whole blood specimen in 1 860 children aged from 3 d to 11 years old. **Results** The linear ranges of Phe by the MS/MS method and the HPLC method were 26.02—101.11 $\mu\text{mol/L}$ and 32.04—132.50 $\mu\text{mol/L}$, which of Tyr were 41.50—253.07 $\mu\text{mol/L}$ and 32.85—111.50 $\mu\text{mol/L}$, the average recovery rates of Phe were 97.36% and 98.43%, which of Tyr were 96.71% and 98.99%, in-run CV of Phe were 4.31% and 3.97%, which of Tyr were 4.09% and 4.01%, between-run CV of Phe were 5.73% and 4.58%, which of Tyr were 6.01% and 5.24%, respectively. **Conclusion** Both methods can sensitively and specifically detect blood Phe and Tyr concentrations and meet the requirements of screening and diagnosis of PKU.

Key words: phenylalanine; tyrosine; phenylketonuria

苯丙酮尿症(PKU)是一种常染色体隐性遗传性疾病,我国的发病率为万分之一,患者因苯丙氨酸羟化酶(PAn)缺陷引起苯丙氨酸(Phe)代谢障碍不能被转化为酪氨酸(Tyr),从而导致过量的 Phe 毒性代谢产物在脑、血液及尿液中过量蓄积,使患者中枢神经系统受到不可逆的损害而造成智力低下等严重不良后果^[1-3]。但是该病若在早期发现并给予积极治疗,患儿智力发育可以完全正常,是少数几种可以通过早期诊断、治疗预防其智能障碍出现的疾病之一^[4]。血中 Phe 和 Tyr 浓度及其比值的检测对于 PKU 的诊断、治疗等具有十分重要价值^[5-6]。PKU 筛查的方法有多种,主要有细菌抑制法(BLA),荧光法(FELA),比色法,高效液相色谱法(HPLC),串联质谱法,高效毛细管电泳法(HPCE)等^[7-8],本文对直接测定血中 Phe 和 Tyr 浓度进行 PKU 筛查和诊断的 HPLC 法和 MS/MS 法进行了分析比较。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2013 年 5 月至 2014 年 6 月共采集标本 1 860 例主要来自陕西省,其中健康儿童组男 342 例,女 358 例,共 700 例。健康新生儿组男 449 例,女 453 例,共 902 例。通过检测健康婴幼儿血中 Phe 和 Tyr 浓度确定本实验室的正常上下

限值。疑似 PKU 患者 258 例,临床主要表现为智力运动发育落后,均是原因不明者。

1.2 标本收集与保存 HPLC 方法:(1)儿童组在上午 7~9 时采取末梢血 100 μL 于装有 EDTA-K 固体抗凝剂的采血管内,充分混匀。(2)新生儿组出生 72 h 后,哺乳 3 次以上,采集 100 μL 足跟血于装有 EDTA-K 固体抗凝剂的采血管内,充分混匀。MS/MS 方法:(1)儿童组在上午 7~9 时采集末梢血滴于专用采血滤纸上,待自然干燥后,放于封口塑料袋内,保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中待检。(2)新生儿组出生 72 h 后,哺乳 3 次以上,采集足跟血滴于专用采血滤纸上,待自然干燥后,放于封口塑料袋内,保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中待检。

1.3 仪器与试剂 3200QTRAP 型串联质谱仪购自美国生物应用系统公司,高效液相色谱仪购于美国安捷伦公司(Agilent 1200)。加热震荡仪购于 Thermo Scientific 公司(Iems Incubator/Shaker HT220-240V)。离心机购于上海安亭科学仪器厂(TDL-16G)。Phe、Tyr 标准品购自美国 Sigma 公司;乙腈、高氯酸等的纯度均为色谱级;实验用水为经美国 Millipore 公司 MilliQ 纯水器处理的超纯水。MS/MS 非衍生试剂盒购自芬兰 Wallac Oy 公司。其他试剂为国产优级纯或分析纯。

1.4 方法

1.4.1 高效液相色谱-紫外检测法(HPLC-UV) (1)实验原理。根据 phe 和 Tyr 具有紫外吸收的特点,血清标本去蛋白后,上清液中的 phe 和 Tyr 经色谱柱分离后在一定紫外波长下进行检测,即可得到 phe 和 Tyr 的液相色谱图。(2)仪器及色谱条件。色谱柱为 Elipse XDB C18 不锈钢柱(4.6×150 mm,5 μm,Agilent)。流动相为乙腈-水(体积比 3:97),流速为 1.5 mL/min,紫外检测波长 210 nm,检测时间 8 min,进样量 20 μL。(3)样品处理方法。吸取全血 100 μL 于离心管内,加入等量的 5%高氯酸溶液,盖紧后于漩涡混合器上混合 1 min,放 10 min 后,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液进样检测。(4)资料分析。将其与已知浓度 phe 和 Tyr 标准品的峰面积(或峰高)比较,即可定量检测出全血标本中 phe 和 Tyr 的浓度及其比值。

1.4.2 串联质谱检测法(MS/MS) (1)实验原理。基于高效液相色谱仪的自动进样器使样品通过进样系统进入离子源,由于结构性质不同而将 Phe 和 Tyr 电离为不同质荷比(m/z)的分子离子和碎片离子,而后带有不同信息的两类离子碎片被加速进入质量分析器,经记录即得到 Phe 和 Tyr 的图谱。(2)仪器及色谱条件。自动进样器设置为每次进样 20 μL,测定采用多反应监测模式,一个样品测试约需 2 min。(3)样品处理方法。将滤纸片用打孔器制直径 3 mm 的圆形滤纸血片(高低各 1 个质控),置于 96 孔聚丙烯板中,每孔加入含 Phe 和 Tyr 同位素内标的甲醇溶液 100 μL, Teflon 膜覆盖,45 °C 密封震荡 45 min,振荡频率 650 r/min,萃取血片中的 Phe 和 Tyr,室温下放置 20 min,转移 75 μL 至另一个 96 孔聚丙烯板,铝膜覆盖,即可上样检测。(4)资料分析。定量分析采用软件 ChemoView 1.2(美国生物应用系统公司),根据 Phe、Tyr 同位素内标和 Phe、Tyr 的离子峰强度,由已知浓度的内标,自动计算出所测样品中 Phe 和 Tyr 的浓度。

1.5 统计学处理 所有数据资料输入计算机由 SPSS10.0 统计软件包处理,数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

1.6 诊断依据 运用液相色谱及液相色谱-串联质谱检测到的相应特异指标,结合临床表现,常规实验室检查进行筛查诊断。苯丙酮尿症显示 Phe 浓度以及 Phe/Tyr 浓度的比值显著增高。

2 结 果

2.1 线性范围和检测限 HPLC 法检测 Phe 和 Tyr 的线性范围分别为 32.04~132.50 μmol/L 和 32.85~111.50 μmol/L,最低检测限为 0.070 μmol/L 和 0.12 μmol/L, Phe/Tyr 线性范围为 0.81~1.82。经统计学分析男、女之间 Phe 和 Tyr 浓度差异无统计学意义(*P*=0.289, *P*=0.316)。MS/MS 法检测 Phe 和 Tyr 的线性范围为 26.02~101.11 μmol/L 和 41.50~253.07 μmol/L,最低检测限为 0.001 2 μmol/L 和 0.027 μmol/L, Phe/Tyr 线性范围为 0.21~1.15。经统计学分析男、女之间 Phe 和 Tyr 浓度差异无统计学意义(*P*=0.301, *P*=0.384)。

2.2 回收率和精密度 HPLC 法检测 Phe 和 Tyr 平均回收率为 98.43%和 98.99%,批内 CV 为 3.97%和 4.01%,批间 CV 为 4.58%和 5.24%。MS/MS 法检测 Phe 和 Tyr 的平均回收率为 97.36%和 96.71%,批内 CV 为 4.07%,批间 CV 为 7.17%。

2.3 健康儿童全血 phe 和 Tyr 浓度 HPLC 法测定 1 602 例

体格检查健康的婴幼儿,全血中 Phe 和 Tyr 浓度分别为(61.09±20.31)μmol/L 和(67.51±18.02)μmol/L。MS/MS 法测得 1 602 例体格检查健康的婴幼儿,全血中 Phe 和 Tyr 浓度分别为(53.07±14.16)μmol/L 和(87.51±16.31)μmol/L。

2.4 PKU 患儿全血 phe 和 Tyr 值 采用 MS/MS 法和 HPLC 法同时测定 258 例 PKU 疑似患儿 phe 和 Tyr 浓度,阳性结果 16 例,阳性测定结果见表 1。由表 1 可知 16 例阳性患儿的 Phe 结果显著增高,且无论是 HPLC 法还是 MS/MS 法 16 例阳性患儿的 Phe/Tyr 值均大于 4,本研究认为,本地区苯丙酮尿症患儿的诊断除了 Phe 结果显著增高外, HPLC 法和 MS/MS 法 Phe/Tyr 值大于 4 可作为辅助诊断苯丙酮尿症阳性的切点。结果显示两种方法在苯丙酮尿症诊断中差异无统计学意义(*P*>0.05)。

表 1 两种方法检测 PKU 阳性患儿结果(μmol/L)

标本号	HPLC 法		MS/MS 法	
	Phe	Tyr	Phe	Tyr
1	561.48	122.48	534.57	102.04
2	671.85	137.92	624.54	127.34
3	928.17	169.25	890.46	151.27
4	509.36	112.44	472.07	100.49
5	805.08	95.95	765.14	90.38
6	693.42	129.75	637.82	115.73
7	592.57	103.59	544.65	102.18
8	673.21	99.79	637.94	96.54
9	709.23	112.46	654.87	100.02
10	743.58	101.49	696.31	90.64
11	690.24	120.14	632.46	101.23
12	909.24	173.24	859.34	153.25
13	505.34	102.11	476.34	90.99
14	672.01	113.59	623.19	101.70
15	447.32	96.37	402.33	90.15
16	497.99	101.73	451.76	94.61

3 讨 论

其他各种苯丙酮尿症筛查方法假阳性率或假阴性率较高,且不同厂商的试剂盒和仪器检测同一样本有的结果相差 2 倍之多^[9-10]。而 MS/MS 法和 HPLC 法通过测定 Phe 和 Tyr 浓度筛查苯丙酮尿症高效、快速、灵敏度高,特异度好,检测时间短,不需衍生化处理。结果显示,上述两种方法所需试剂种类少,方法全定量,线性范围宽,精密度高,重复性好,血量少,MS/MS 法在精密度及缩短分析检测时间上略优于 HPLC 法, HPLC 法在样品前处理及成本上优于 MS/MS 法。本研究表明测定同份标本的 Phe 和 Tyr 值时 HPLC 法略高于 MS/MS 法测定值,测定 PKU 阳性患儿时两种方法比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。两种方法均适合临床使用,均是 PKU 筛查、诊断和治疗监测的良好检测方法,但两种方法所用仪器价格昂贵,对技术人员要求较高。

参考文献

[1] 喻唯民. 积极开展新生儿筛查工作[J]. 中华检验(下转第 762 页)

细胞荧光强度 log 对数值的一半认定荧光强度的升高或降低, 抗原表达在治疗前后仍为阳性; 另一方面各研究人员所选择的监测瘤细胞的抗体也并不完全相同。但免疫表型的不稳定性确实存在的。免疫表型不稳定的认知对骨髓瘤患者后续残留疾病的检测提出了挑战。采用有限的抗体组合会干扰临床诊断的正确性。

浆细胞克隆性评估是判断浆细胞良恶性的另外一种有效方法, 由于是胞浆抗原的检测, 在样本制备方面不同于常规的表面抗原染色, 但对瘤细胞的监测尤其在 MRD 检测中的作用愈来愈引起人们的重视。健康人群中浆细胞胞浆免疫球蛋白轻链 Kappa 与 Lambda 轻链的比值大概在 0.5~2, 而骨髓瘤患者经常出现比值高于 2 以上或低于 0.5 的 Kappa 单克隆阳性群或 Lambda 阳性群。应用胞浆 Kappa 和 Lambda, 比值低于 0.2 或大于 16 与高水平的浆细胞相关且预后不良^[3]。值得注意的是如果浆细胞克隆性评估用于 MRD 的监测, 应采用多克隆优于单克隆的胞浆免疫球蛋白轻链进行检测^[9]。本文研究也证实胞浆免疫球蛋白轻链是最稳定的标记之一, 治疗前后未有显著变化, 其检测可作为评估浆细胞良恶性的一种稳定可靠的方法。

Spears 等^[6]指出, 采用胞浆轻链分析而不是表面标记的免疫表型进行 MRD 的评估可提升残留瘤细胞的检测能力, 更为重要的是对那些已转化良性的免疫表型但仍保留轻链抑制的残留瘤细胞的鉴别。由于免疫表型的变化, 部分病例化疗后获得了 CD19 的表达, 与良性浆细胞非常相似, 这些病例如果不采用轻链检测, 鉴别瘤细胞是不可能的。

在后期的样本中增加了胞浆免疫球蛋白的检测, 收集至少 3 万以上的细胞, 确实更加容易监测瘤细胞。3 例 MRD 阴性的患者其浆细胞呈 Kappa、Lambda 的多克隆表达, 认定为良性浆细胞。

目前, 研究人员分析浆细胞除常规的 CD19、CD56 外, 也渐渐补充 CD27、CD28 等标记的检测^[10-11], 无疑提升临床诊断的正确性及残留疾病的监测能力, 但免疫表型结合克隆分析是流式定义浆细胞性质的最好方法, 尤其在治疗后检测异常细胞时, 克隆评估是唯一可能提供的信息, 是临床疗效强有力的预测指标。广泛的抗体组合、多参数的流式细胞术对多发性骨髓瘤的诊断疗效及预后的判断具有重要意义。

参考文献

[1] Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, et al. Report of the European

Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders [J]. *Haematologica*, 2008, 93(3): 431-438.
[2] Lin P, Owens R, Tricot G, et al. Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma [J]. *Am J Clin Pathol*, 2004, 121(4): 482-488.
[3] Deshmukh M, Elderfield K, Rahemtulla A, et al. Immunophenotype of neoplastic plasma cells in AL amyloidosis [J]. *J Clin Pathol*, 2009, 62(8): 724-730.
[4] Cannizzo E, Bellio E, Sohani AR, et al. Multiparameter immunophenotyping by flow cytometry in multiple myeloma: The diagnostic utility of defining ranges of normal antigenic expression in comparison to histology [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010, 78(4): 231-238.
[5] Peceliunas V, Janiulioniene A, Matuzeviciene R, et al. Six color flow cytometry detects plasma cells expressing aberrant immunophenotype in bone marrow of healthy donors [J]. *Cytometry B*, 2011, 80(5): 318-323.
[6] Spears MD, Olteanu H, Kroft SH, et al. The immunophenotypic stability of plasma cell myeloma by flow cytometry [J]. *Int J Lab Hematol*, 2011, 33(5): 483-491.
[7] Cao W, Goolsby CL, Nelson BP, et al. Instability of immunophenotype in plasma cell myeloma [J]. *Am J Clin Pathol*, 2008, 129(6): 926-933.
[8] Gupta R, Bhaskar A, Kumar L, et al. Flow cytometric immunophenotyping and minimal residual disease analysis in multiple myeloma [J]. *Am J Clin Pathol*, 2009, 132(5): 728-732.
[9] Van Velzen JF, van den Blink D, Bloem AC. Inability of a monoclonal anti-light chain antibody to detect clonal plasma cells in a patient with multiple myeloma by multicolor flow cytometry [J]. *Cytometry Part B*, 2013, 84(1): 30-32.
[10] Cannizzo E, Carulli G, Del Vecchio L, et al. The role of CD19 and CD27 in the diagnosis of multiple myeloma by flow cytometry: A new statistical model [J]. *Am J Clin Pathol*, 2012, 137(3): 377-386.
[11] Mateo G, Montalbán MA, Vidriales MB, et al. Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PET-HEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(16): 2737-2744.

(收稿日期: 2014-11-08)

(上接第 759 页)

医学杂志, 2001, 24(6): 325.
[2] Alien KR, Degg TJ, Rushworth PA, et al. Measurement of phenylalanine and tyrosine in plasma by high-performance liquid chromatography using the inherent fluorescence of aromatic amino acids [J]. *Ann Clin Biochem*, 1999, 36(2): 207-211.
[3] Tcherkas YV, Kartsova LA, Krasnova IN. Analysis of amino acids in human serum by isocratic reversed phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 913(1/2): 303-308.
[4] 蔡宗友, 胡定波, 曹小英, 等. 苯丙酮尿症的新生儿筛查及方法比较 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2002, 10(4): 95.
[5] Pey AI, Desviat LR, Gamez A, et al. Phenylketonuria: Genotype-Phenotype correlations based on expression analysis of structural

and functional mutations in PAH [J]. *Hum Mutat*, 2003, 21(4): 370-378.
[6] 莫喜明, 唐爱国. HPLC 法测定末梢血中苯丙氨酸与酪氨酸及在苯丙酮尿症中的应用 [J]. *现代检验医学杂志*, 2008, 23(4): 20-23.
[7] 闫卫东. 苯丙酮尿症常用筛查方法的比较 [J]. *生物学通报*, 2007, 42(4): 10-11.
[8] 唐爱国, 洪敏, 莫喜明, 等. 两种血清苯丙氨酸高效液相色谱测定法的比较 [J]. *中国实验诊断学*, 2005, 9(4): 607-609.
[9] 包日新, 梁东春. 两种苯丙氨酸荧光检测试剂盒的比较 [J]. *天津医科大学学报*, 2003, 9(3): 346.
[10] 田国力, 许洪平, 朱伟明, 等. 新生儿苯丙酮尿症两种实验室筛查方法的质量评价 [J]. *检验医学*, 2007, 22(2): 171-173.

(收稿日期: 2014-12-08)