Tandem Mass Spectrometry를 이용한 갈락토오스혈증의 선별검사

연세대학교 대학원

의 과 학 과

임 재 균

Tandem Mass Spectrometry를 이용한 갈락토오스혈증의 선별검사

연세대학교 대학원

의 과 학 과

임 재 균

Tandem Mass Spectrometry를 이용한 갈락토오스혈증의 선별검사

지도 김 정 호 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

20004 년 12 월 5 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

임 재 균

임재균의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2004 년 12 월 5 일

감사의 글

이 논문을 쓰는데 끝까지 항상 지켜보다 주시고 어려울 때마다 힘이 되어주신 김정호 지도교수님께 감사의 글을 올립니다. 그리고 박민수 교수님과 박형천 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 실험에 조언을 아끼지 않았던 양송현 선생님을 비롯한 녹십자의료재단 식구들이 이 연구를 마치는데 큰 도움이 되었습니다. 연구는 한 사람만의 노력이 아닌 연구자 주위의 많은 분들의 정성으로 이루어진다는 것을 새삼 알게 되었습니다.

그리고 언제나 곁에서 성실하게 저를 보아 준 아내와 아들 유진이게게도 감사의 뜻을 전합니다.

저자 씀

<차례>

그림 및 표 차례
국문요약 · 1
Ⅰ. 서론 · 3
II. 재료 및 방법 · 6
1. 재료 · 6
2. 방법 · 6
가. Enzymatic colorimetric assay (ECA) · · · · · · · · · 6
나. MS/MS · 6
(1) 검체 전처리 · 6
(2) MS/MS · 7
다. Calibration · 7
III. 결과 · 8
1. HMPs의 검출 · 8
2. HMPs의 분획 형태 · · · · · · · · · · · · · · · · · · · 8
3. Calibration · 9
4. HMP 농도와 ion abundance ratio (IAR) · · · · · · · · 10
5. ECA법과의 비교 · 11
6. ECA법과의 정밀도 비교 · · · · · · · · · · · · · · · · 14
7. 갈락토오스혈증 환자 · · · · · · · · · · · · · · · · · · 15
8. 진단적 유용성 · 16
IV. 고찰 · 17
V. 결론 · 20
참고문헌 · 21
영문요약 · 24

그림 차례

그림 1. Precusor ion scan of HMPs · · · · · · · · 8

그림 2. Fragmentation patterns of HMP · · · · · 9

그림 3. Calibration curves for HMP assays · · · 10

그림 4. HMP concentration and ion abundance ratio · 11

그림 5. Correlation between galactose (by ECA) and HMP concentration (m/z 79) · · · · · · · · · · · · 13

그림 6. Correlation between galactose (by ECA) and HMP (m/z 97) concentration · · · · · · · · · · · · 14

표 차례

표 1. Comparison between galactose (by ECA) and HMP concentrations (by MS/MS) · · · · · · · · 12

표 2. Precision of ECA method · · · · · · · · · · 15

표 3. Precision of MS/MS method · · · · · · · · 15

표 4. Characteristics of galactosemia patients and samples · 16

국문요약

Tandem mass spectrometry를 이용한 갈락토오스혈증의 선별검사

갈락토오스혈증은 상염색체 우성으로 유전되는 대사이상질환으로 galactose-1-phosphate uridyl transferase, galactokinase , 또는 UDP-galactose-4-epimerase 의 결핍으로 혈액과 조직 내에 galactose-1-phosphate (gal-1-P)가 축적되어 그 증상이 나타난다.

갈락토오스혈증의 선별검사로는 기존에 여러 방법들이 소개되었으나 기존 방법들은 검체 전처리에 여러 과정과 여러시약들을 필요로 하며 검사소요시간이 길다는 단점을 가지고 있다. 본 연구는 tandem mass spectrometry (MS/MS)를 이용하여 갈락토오스혈증 선별검사를 시도하였다. Hexose monophosphates (HMPs)를 측정하여 간접적으로 갈락토오스혈증 진단의 표지자인 gal-1-P의 정량을 시도하였다.

생후 3-6일 사이의 신생아의 혈액여지를 이용하였으며 갈락토오스혈증으로 진단된 3예를 포함해서 158개의 혈액여지를 분석하였다. MS/MS를 이용하여 negative-ion mode에서 스캔하여 HMPs 농도를 이용하여 gal-1-P를 간접적으로 측정하였으며 ion abundance ratio (IAR, 전하질량 79과 97의 비)을 산출하였으며 상품화된 gal-1-P를 외부 표준물질로 이용하였다.

정상군에서 MS/MS법으로 실시한 aldose monophosphate (전하질량 79)의 평균 농도는 각각 1.46 mmol/L이었으며 ketose monophosphate (전하질량 97) 평균 농도는 2.63 mmol/L이었으며, 평균 IAR은 1.22,

0.50이었다. 그리고 갈락토오스혈증 환자에서 이들 각각의 aldose monophosphate 농도는 24.9, 20.4, 18.5 mmol/L이었으며 IAR은 각각 1.54, 1.67, 1.72로 정상군에 보여 증가되었다. 그리고, 기존 ECA법과도 좋은 상관관계를 보여주었다.

갈락토오스혈증 선별검사를 위한 MS/MS법은 기존 ECA법과 좋은 상관관계를 보이며 갈락토오스혈증 환자에서 현저히 증가된 값을보였다. MS/MS을 이용한 갈락토오스혈증 선별검사는 보다 소요시간이 짧고 검체 전처리에 적은 과정이 필요하며 위양성을 줄일 수 있는 좋은 검사로 사료되었다.

핵심되는 말: 갈락토오스혈증, MS/MS, galactose-1-phosphate, 신생아 선별검사

Tandem mass spectrometry를 이용한 갈락토오스혈증의 선별검사

<지도교수 김정호>

연세대학교 대학원 의과학과

임 재 균

Ⅰ. 서론

갈락토오스혈증 (OMIM 230400)은 상염색체 열성으로 유전되는 선천성 대사 이상질환의 하나로 발생 빈도는 출생아 50,000-60,000 명 중 한 명으로 알려져 있다. 신체 증상은 galactose-1-phosphate (gal-1-P)가 여러 기관, 특히 간, 뇌, 신 세뇨관에 축적되어 증상을 나타내는 것으로 알려져 있다. 조기진단하여 조기에 갈락토오스가 없는 식이

요법을 시작하는 것이 환자의 예후에 많은 영향을 미친다. 이 질환은 결핍 효소의 종류에 따라 galactose-1-phosphate-uridyltransferase (GALT) 결핍, galactokinase (GALK) 결핍, UDP-galactose-4-epimerase (GALE) 로 나누고 있다[1].

갈락토오스혈증의 선별검사로는 가장 간단한 방법으로 소변에서 환원물질을 측정하는 방법[2]이 있으며 가장흔히 검사에 이용되는 검체는 혈액여지를 이용하는 방법이며 이 방법은 Paigen 등[3]에 의해 고안된 미생물학적으로 galactose와 gal-1-P를 측정하는 방법이 있으나 자동화가 어렵고, 신생아나 산모가 항균제 치료를 받는 경우 결과에 영향을 미칠 수 있다. 최근 검사실에서 흔히 이용하는 방법은 ECA 법으로 이 방법 역시 gal-1-P 이외에 다른 부산물들을 함께측정하므로 위양성율이 높은 것으로 보고되고 있다.또한 이들 방법들은 모두검체 전처리에 여러 과정이 필요하고, 검체전처리 시간과 분석시간이 많이 소요되며 민감도와 특이도가 낮고 위양성율이 높은 단점들을 가지고 있다.최근 gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS)를 이용하는 방법[4,5]이 개발되었으나 방사선 동위원소를 이용하는 단점이 있다.

최근 신생아 대사이상 선별검사에서 MS/MS의 이용범위가 널리 확대되고 있다. Tandem mass spectrometry 또는 MS/MS라고 불리우는 이 방법은 한번의 검사로 아미노산 대사 이상, 유기산 혈증, 지방산 대사이상 등의여러 질환들을 짧은 검사시간 안에 선별 가능하게 만들었으며[6-9] 민감도와 특이도가 높고, 검사 소요시간이 짧은 장점을 가지고 있다. 그 영역 또한 면역억제제 등을포함한 치료적 약물농도 검사[10-12], 약물 남용검사[13] 등으로 영역을 넓혀가고 있다.

MS/MS를 이용한 갈락토오스혈증의선별검사는 Jensen 등[14]에 의해 처음으로 소개되었고 이 방법은 galactose가HMP (hexose monophosphate)를 측정하여 간접적으로 gal-1-P를 측정하였다. 본 연

구는 MS/MS를 이용한 갈락토오스혈증의 신생아 선별검사의 가능성을 알아보고자 시도되었다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

녹십자의료재단에 신생아 대사이상선별검사를 위해의뢰된 혈액여지를 사용하였다. 검체는 모두 생후3일에서 6일 사이에 채취되었으며 기존의 enzymatic colorimetric assay (ECA) 에서 양성반응 (참고범위: <12.0 mg/dL)을 보인검체 (N=47)와 음성반응을 보인 검체 (N=111)를 대상으로 하였다.

그리고 본 기관에 의뢰되어 효소학적 검사에서 갈락토오스혈증으로 진단된 검체 3예를 대상으로 하였다. 진단 당시 환자의 연령은 각각 생후 24일, 27일, 2년 3개월이었다.

2. 방법

가. Enzymatic colorimetric assay (ECA)

ECA법을 이용하였으며 상품화된 QuantaseTM Neonatal Total Galactose Screening (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 키트를 이용하였으며, 술식은 제조자의 권고에 따랐다.

나. MS/MS

(1) 검체 전처리

검체는 혈액여지를 이용하였으며 직경 3.2 mm로 펀칭한 후 acetonitril과 증류수를 1:1로 혼합한 용액으로 액체를 추출하였으며 10 μL을 주입하였다.

(2) MS/MS

모든 측정은 API 3000TM tandem mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)를 이용하였다.

Precursor ion은 모든 HMP의 분자 이온에 상응하는 259로 맞추었으며 fragment ion은 전하질량 50에서 300까지의 이온 스펙트럼 중 10개의 산물로 결정하였다. 기계적인 조건은 gal-1-P의 전하질량 79에 최적화하였다. (needle voltage, -4.9 kV; collision energy, -25eV)

다. Calibration

Galactose-1-phosphate (Sigma, St. Louis, MO, USA) 16 mM을 external standard로 사용하였다.

Ⅲ. 결과

1. HMPs의 검출

Precursor ion 스캔에서 전하질량 258.9를 가지는 물질을 검출하였다. 이 전하질량 값이 원하는 hexose monophosphates이다 (그림 1).

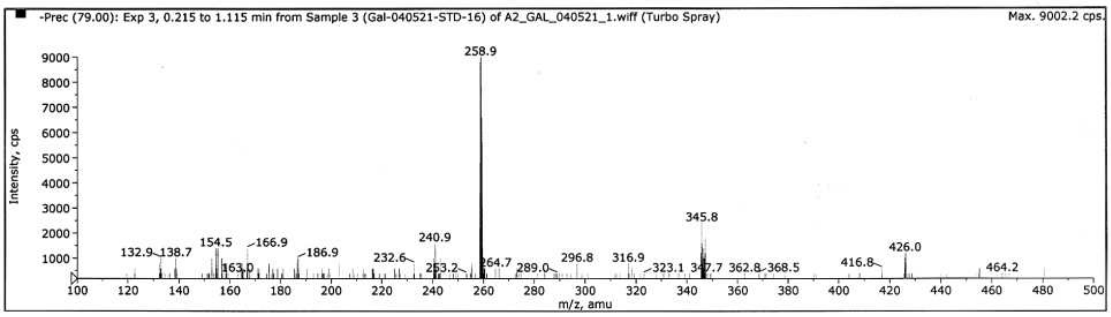

그림 1. Precursor ion scan of HMPs.

2. HMPs의 분획 형태

MS/MS의 스펙트럼 분석에서 세 개의 전하질량 79, 97, 139를 갖는 물질들을 스캔하였으며 각각전하질량 79에서는 aldose monophosphates (AMPs), 즉 galactose-1-phosphate와 glucose-1-phosphate)가 주로 존재하며, 전하질량 97에서는 ketose monophosphates (KMPs), 즉 fructose 1-phosphate, fructose 6-phosphate가 주로 존재한다 (그림 2). 그리고 IAR이 gal-1-P를 간접적으로 측정할 수 있다.

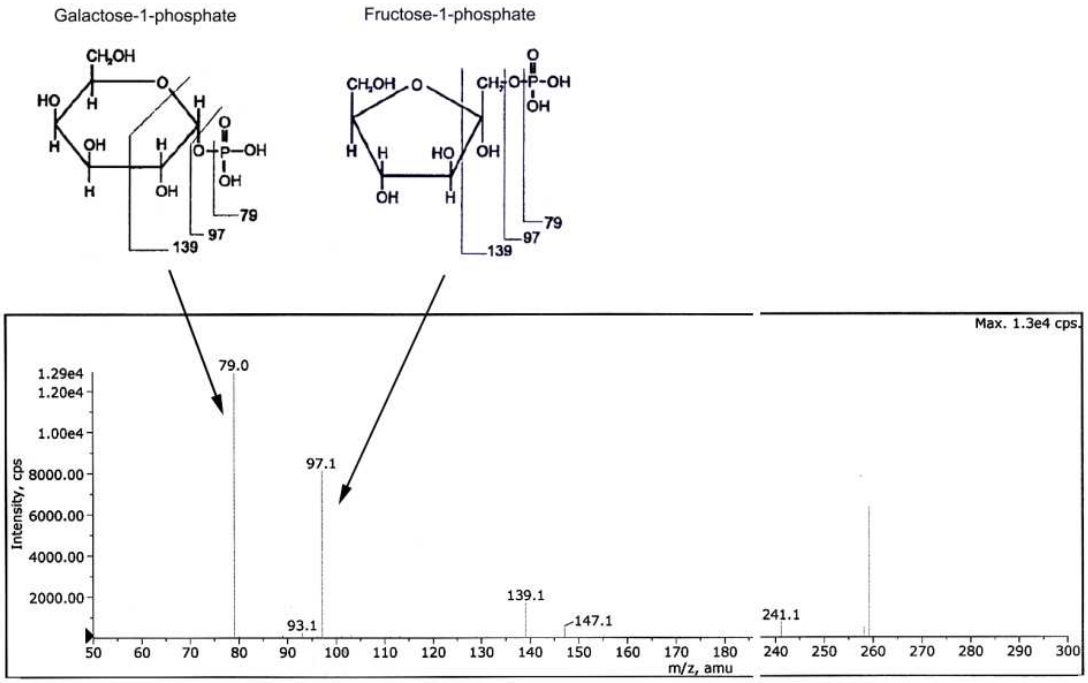

그림 2. Fragmentation patterns of HMP.

3. Calibration

3개의 HMP 분획에서 gal-1-P에 대하여 그래프를 나타냈으며 모든 분획은 각각 전하질량 79, 97, 139에 대해 R2=0.9941, R2=0.9945, R2=0.9938의 우수한 상관관계를 나타냈다 (그림 3).

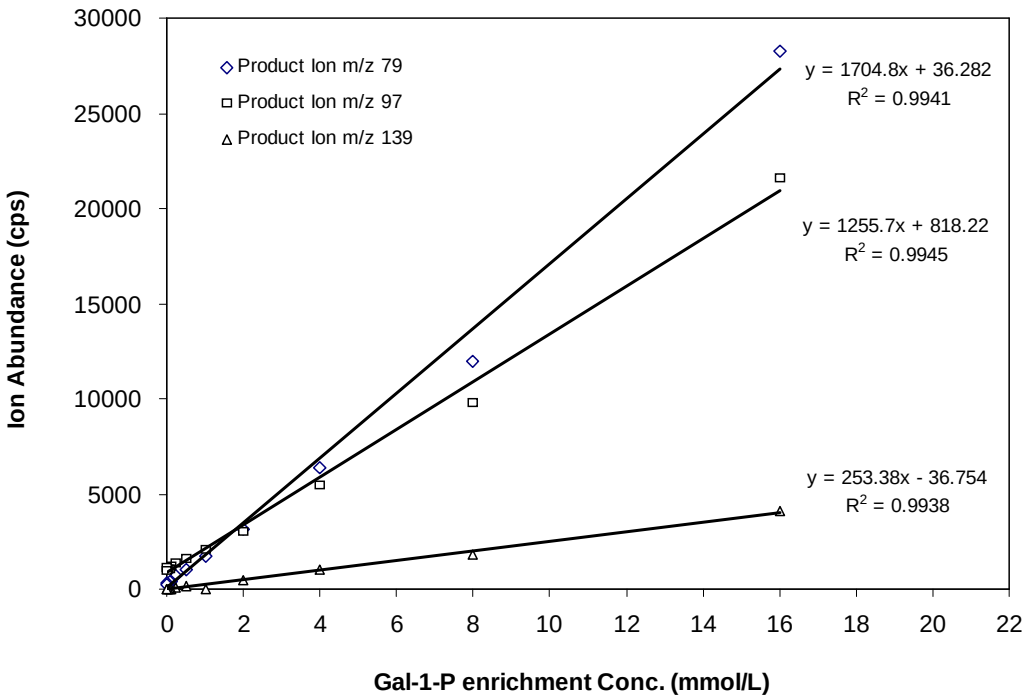

그림 3. Calibration curves for HMP assay.

4. HMP 농도와 ion abundance ratio (IAR)

전하질량 79을 갖는 HMP와 IAR과의 분포를 보았다. ECA법에서 양성으로 나온 검체에서 AMP (전하질량 79)는 평균 10.62 mmol/L (범위: 5.07-23.14 mmol/L), IAR은 0.96에서 1.41의 분포를 보였으며, 음성으로 나온 검체에서는 AMP가 평균 1.46 mmol/L (범위: 0.00-5.70 mmol/L), IAR은 0.00에서 1.07의 분포를 보였다 (그림 4).

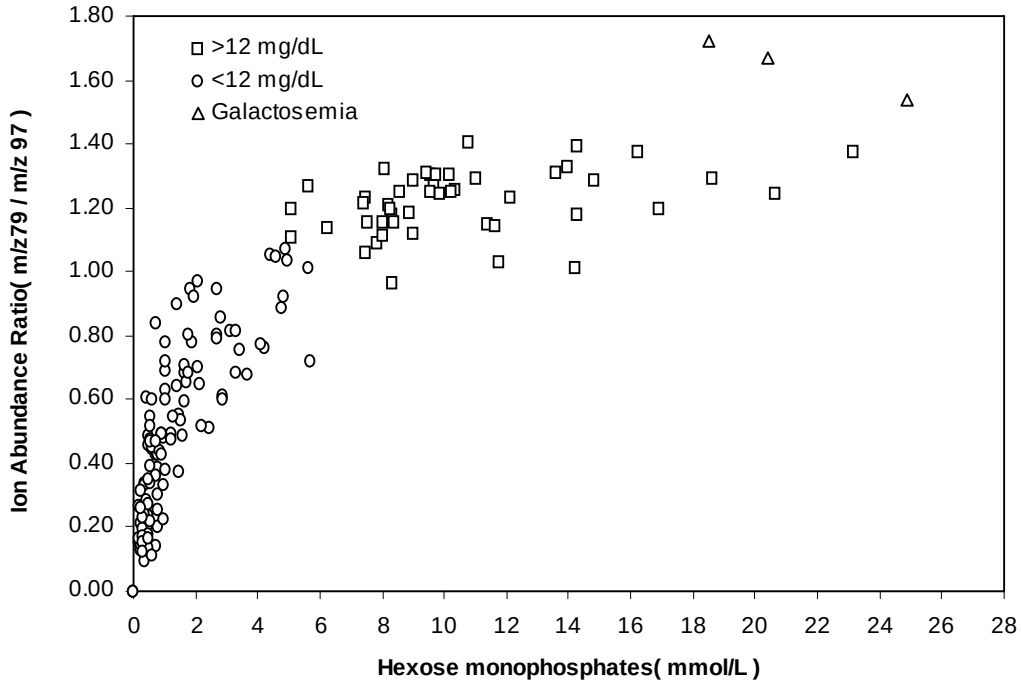

그림 4. HMP concentration and ion abundance ratio.

5. ECA법과의 비교

ECA법과 비교했을 때 양성검체에서는 평균 17.3 mg/dL이었고, 음성검체에서는 1.57 mg/dL이었고, 이 검체를 MS/MS로 실시한 aldose monophosphate (전하질량 79)농도는 각각 10.62 mmol/L, 1.46 mmol/L이었고, ketose monophosphate (전하질량 97) 농도는 각각 8.67 mmol/L, 2.63 mmol/L이었으며 IAR 은 각각 1.22, 0.50이었다 (표 1).

상관관계를 비교하면 AMP가 KMP에 비해 더 나은 상관관계를 보였다 (R2=0.926, R2=0.8466, 그림 5 및 그림6).

표 1. Comparison between galactose (by ECA) and HMP concentrations (by MS/MS)

	ECA (12.0 mg/dL				ECA (<12.0 mg/dL)			
	ECA (mg/dL)	AMP (mmol/L)	KMP (mmol/L)	IAR	ECA (mg/dL)	AMP (mmol/L)	AMP (mmol/L)	IAR
Mean	17.3	10.62	8.67	1.22	1.57	1.46	2.63	0.50
SD	5.20	3.89	2.95	0.10	1.46	1.37	1.43	0.27
Max	31.30	23.14	16.79	1.41	6.70	5.70	7.89	1.07
Min	12.40	5.07	4.24	0.96	0.50	0.00	0.74	0.00

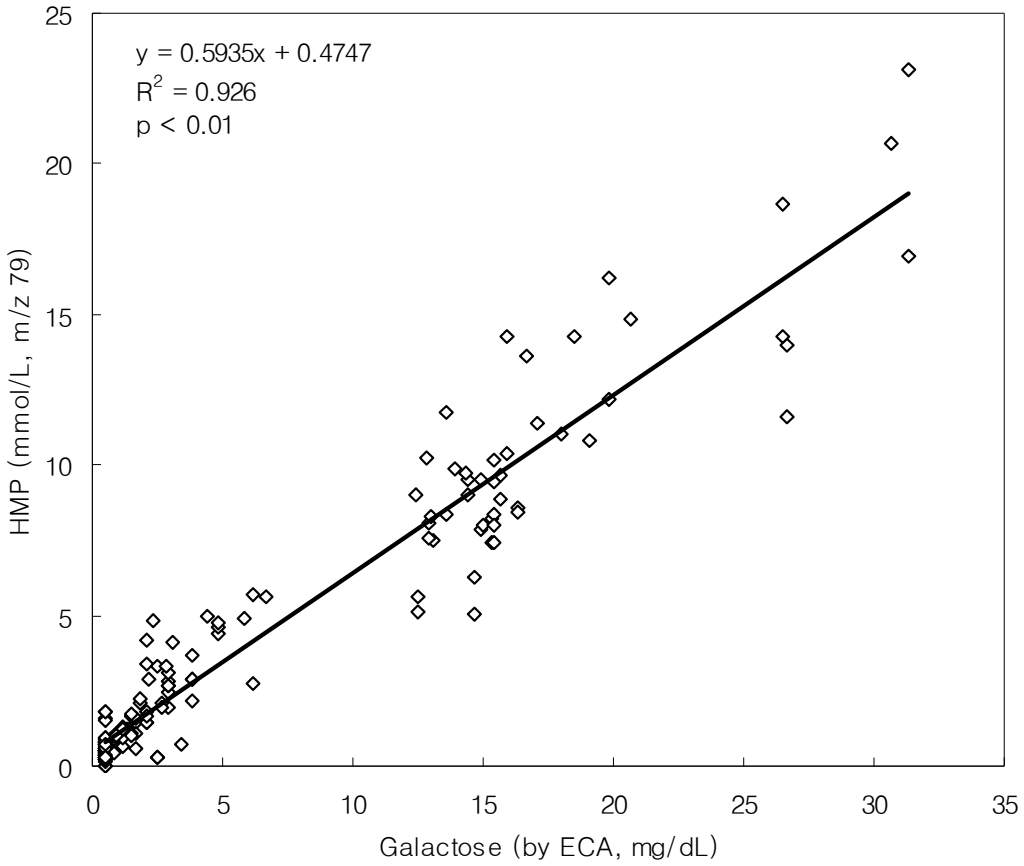

그림 5. Correlation between galactose (by ECA) and HMP concentration (m/z 79).

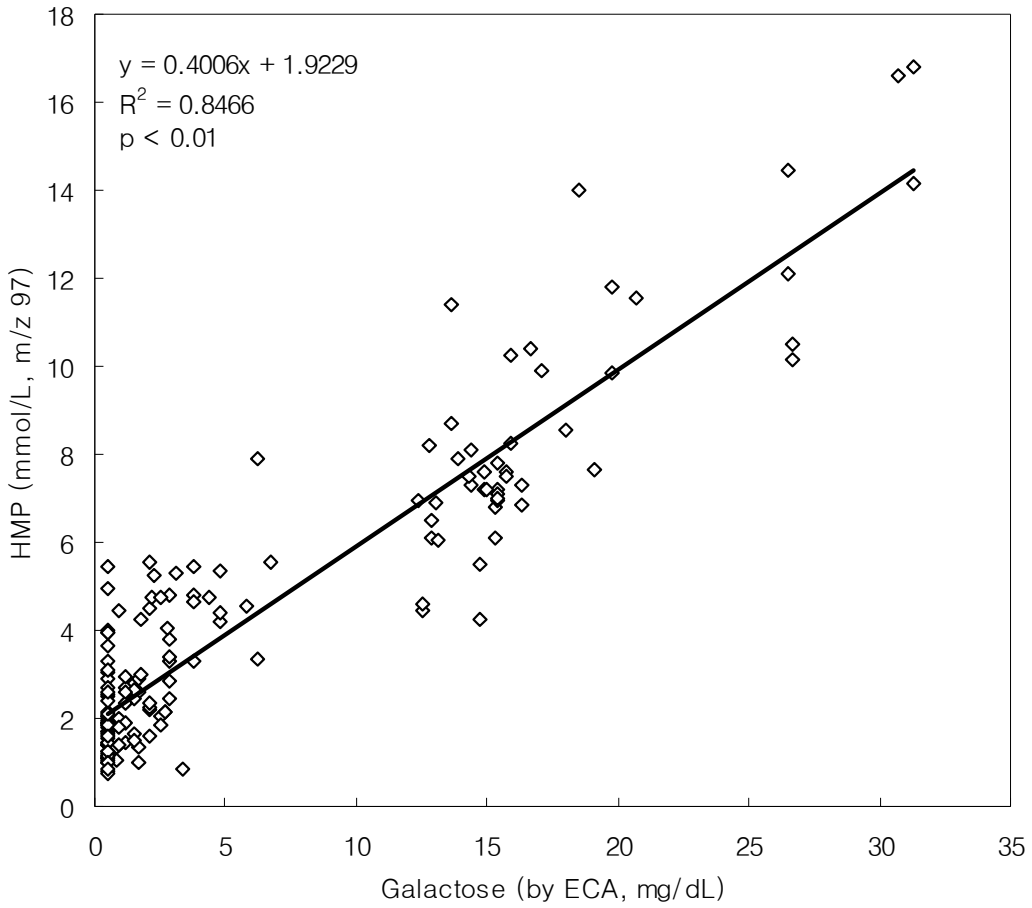

그림 6. Correlation between galactose (by ECA) and HMP (m/z 97) concentration.

6. ECA법과의 정밀도 비교

ECA법과 MS/MS법과의 정밀도를 비교해 보았을 때 ECA법의 변이계수는 8.53에서 17.42%, MS/MS법의 변이계수는 2.05에서 5.12%로 MS/MS법이 우수한 정밀도를 나타냈다 (표 2 및 표 3).

표 2. Precision of ECA method

Mean galctose concentration (mg/dL)	SD	CV (%)	n
1.43	0.25	17.42	39
6.96	0.44	6.27	40
14.53	1.08	7.43	40
33.58	2.86	8.53	40

표 3. Precision of MS/MS method

Gal-1-P enrichment level (mmol/L)	Mean	SD	CV (%)	n
16	12.7	0.40	3.06	10
8	5.29	0.17	3.17	10
4	2.55	0.10	4.13	10
2	1.34	0.06	4.68	10
1	0.76	0.04	4.83	
0.5	0.41	0.02	5.12	

7. 갈락토오스혈증 환자

갈락토오스혈증 환자는 효소검사가 의뢰된 환자 3예에서 실시하였다. 모두 UDP-gal-4-epimerase 결핍이었으며 각각의 HMP 농도 (전하질량 79) 24.9, 20.4, 18.5 mmol/L였으며, IAR은 각각 1.54, 1.67, 1.72였다 (표 4).

표 4. Characteristics of galactosemia patients and samples

Patients	Samples	
Deficient enzyme	HMP conc (m/z 79), mmoL/L	IAR
UDP-Gal-4-epimerase	24.9	1.54
UDP-Gal-4-epimerase	20.4	1.67
UDP-Gal-4-epimerase	20.4	1.67

8. 진단적 유용성

ECA법에서 갈락토오스 농도가 12.0 mg/dL 이상으로 나온 환자 중 MS/MS법의 임계치를 HMP 농도를 16 mmol/L, IAR을 1.5로 기준으로 할 경우ECA법에서 위양성으로 추정되는 경우는 17예였다.

Ⅳ. 고찰

갈락토오스혈증은 질환의 빈도가 낮고 기존 선별검사방법이 위양성율이 높고, 조기 진단해서 조기 치료를 시작해야 합병증을 줄일 수 있으므로 선별검사가 중요하다.

본 연구에서는 MS/MS를 이용한 갈락토오스혈증 선별검사를 시도하였다. 분석을 목표로 한 물질은 gal-1-P였으며 검사원리는 MS/MS를 이용하여 전체 hexose monophosphates (HMPs) 농도를 측정하는 것이었다. HMP의 분획 형태는 그 화학적 구조에 따라 전하질량 79를 갖는AMP와 전하질량 97을 갖는 KMP를 갖는다. AMP는 galactose-1-phosphate, glucose-1-phosphate로 주로 구성되어지며 KMP는 fructose-1-phosphate, fructose-6-phosphate로 주로구성되므로 전하질량 79을 갖는 AMP가 gal-1-P를 더욱 잘 반영한다. Ion abundance ratio (전하질량 79와, 97의 비)는 gal-1-P를 간접적으로 잘 반영하는 표지자였다. 이 결과들은 Jensen 등의 방법과 일치하는 결과를 보여주었다.

MS/MS법은 기존에 이용하여 있는 ECA법과도 좋은 상관관계를 보였다. 그러나 본 연구의 제한점 중 하나는 ECA법에서 양성으로 나온 군에 대해 일부만을 갈락토오스혈증을 확인할 수 있었으므로 이에 대한진단적 민감도, 특이도를 정확히 추정할 수 없었다. 또한 갈락토오스혈증의 빈도가 매우 낮아 연구의 제한점이 있으므로 더욱 많은 증례를 통한 후후 연구가 진행되어야 합리적인 임계치를 산출할 수 있을 것이다.

본 연구에서 이용된 갈락토오스혈증 환자는 모두 UDP-gal-4-epimerase 결핍환자였다. 이 검체들은 2003년 12월부터 2004년 9월까지 본원에 갈락토오스혈증이 의심되어 의뢰된 검체 중 갈락토오스혈증으로 확인된 환자들이었다. 이들 각각의 HMP 농도 (전하질

량 79) 24.9, 20.4, 18.5 mmol/L였으며, IAR은 각각 1.54, 1.67, 1.72였다. 따라서 IAR 값은 1.5, HMP (전하질량) 은 16 mmol/L으로 임계치를 정하면 위양성율을 줄이는데 많은도움을 줄 것이다. 그러나 본 연구에서 ECA법으로 양성이 나온 환자들의 효소 검사를 실시하지 않아서 정확한 위양성율이나 특이도를 산출할 수 없는한계가 있었다. 추후 ECA법과의 더 많은 비교 연구및 병행된 효소 검사를 통해 실제로 이 검사를 임상에 사용할 수 있을지 결정할 수 있을 것으로 사료된다. 한편, 갈락토오스혈증 중 가장 심각한 임상 증상을 나타내는 galactose-1-phosphate-uridyltransferase (GALT) 결핍환자가 포함되어 있지 않았으나, Jensen 등에 의하면 IAR값이 모두 1.69 이상으로 보고하고 있어 민감도의 문제는 없을것으로 사료되었다[14]. 또한 정밀도를 비교하였을 때에도 ECA법 보다는 우수한 정밀도를 나타냈다 (표 2 및 표 3).

그리고, Jensen 등14에 의하면 신생아의 출산당시 몸무게에 따라서도 HMP 농도의 차이를 보이므로 이에 대한 추후 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이 방법은 gal-1-P를 직접 측정하는 것이 아니라, 전체 HMP를 측정하므로 HMP의 대사에 영향을 미치는 다른 질환에서도 영향을 받을 수 있다. 예를 들면hereditary fructose intolerance (OMIM 229600) 는 fructose-1-phosphate가 증가하고[15], fructose-1,6-biphosphatase 결핍 (OMIM 229700)에서는 fructose 1,6-diphosphate가 증가할 수 있다[16]. 따라서 MS/MS로 HMP 측정시 이런 질환들에 대한 영향에 대한 추후 연구가 필요할 것이다.

다른 선별검사 방법과 마찬가지로 갈락토오스혈증 검사는 측정물질이 어느 정도 축적되어 있느냐에 영향을 많이 받는다. 이 방법은 ECA법과 마찬가지로 갈락토오스를 함유하지 않는 식이를 할 경우에는 위음성

을 보일 가능성이 있다.

이 방법의 장점들은 혈액여지를 이용하므로 검체소요량이 적어, 신생아 선별검사의 한 방법으로 이용할 수 있으며 검체전처리 방법이 간단하며 소요시간이 짧아 기존 방법들에 비해 이점을 갖는다. 또한 검사소요시간이 2분 미만으로 기존 검사법에 비해 짧아 많은 신생아들을 선별검사할 수 있다는 장점이 있으며 소요되는 시약도 적은 장점을 가지고 있다. 그러나 MS/MS법이 negative-ion mode에서 진행되므로 아미노산이나 acylcarnitine을 측정하는 positive-ion mode와는 달라서 현재 실시하고 있는 MS/MS에 의한신생아 대사이상 선별검사와는 동시에 작업을 할 수가 없다. 또한 MS/MS에 의한신생아 대사이상선별검사와는 달리 butyl 유도화 과정이 다르므로 HMP 분석은 독립적인 과정으로 이루어져야 한다.

MS/MS의 소개는 신생아 대사이상선별검사의 한 변혁으로 간주되고 있다. 기존 방법과는 다르게 한 번에 여러질환의 선별검사를 보다 정확하게 가능하게 했고6,7, 치료적 약물농도 검사에서도 같은 성과를 보여주었고10 점차적으로 그 이용영역이 확대되고 있다.이렇듯 MS/MS를 이용한 갈락토오스혈증에서의 gal-1-P 측정은 신생아 대사이상 선별검사, 추적검사, 치료중 경과 관찰에 이용할 수 있을 것이다.

Ⅴ. 결론

MS/MS에 의한 HMP의 측정은 기존 ECA법과 좋은 상관관계를 보였고, 갈락토오스혈증으로 확진된 예에서 확연히 증가되었고, 기존 ECA법보다 소요시간이 짧고 재현성이 높으며 위양성을 줄일 수 있어 갈락토오스혈증 선별 검사로서 유용한 검사로 사료되었다.

참고문헌

1. Holton JB, Walter JH, Tyfiled LA. Galactosemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WA, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001:1553-1587.

2. Sophian LH, connoly VJ: Chromatographic identification of reducing sugars in urine. Am J Clin Pathol 1952;22:41-45.

3. Paigen K, Pacholec F, Levy HL. A new method of screening for inherited disorders of galactose metabolism. J Lab Clin Med. 1982;99:895-907.

4. Chen J, Yager C, Reynolds R, Pamieri M, Segal S. Erythrocyte galactose 1-phosphate quantified by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry. Erythrocyte galactose 1-phosphate quantified by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry. Clin Chem 2002;48:604-612.

5. Yager CT, Chen J, Reynolds R, Segal S: Galaccitol and galactonate in blood cells of galactosemia patients. Mol Genet Metab 2003;80:283-289.

6. Rashed S, Bucknall MP, Littel D, Awad A, Jacob M, Alamoudi M, et al.: Screening blood spots for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry with a microplate batch process and a computer algorithm for automated flagging of abnormal profiles. Clin Chem 1997;43:1129-1141.

7. Naylor EW, Chace DH. Automated tandem mass spectrometry for mass newborn screening for disorders in fatty acid, organic

acid, and amino acid metabolism. J Child Neurol 1999;14:S4-8.
8. Shigematsu Y, Hata I, Nakai A, Kikawa Y, Sudo M, Tanaka Y, et al. Prenatal diagnosis of organic acidemias based on amniotic fluid levels of acylcarnitines. Pediatr Res 1996;39:680-684.
9. Rashed MS, Ozand Pt, Bennett MJ, Barnard JJ, Govindarju DR, Rinoldo P. Inborn errors of metabolism diagnosed in sudden infant death cases by acylcarnitine analysis of postmortem bile. Clin Chem 1995;41:1109-1114.
10. Koal T, Deters M, Casetta B, Kaever V. Simultaneous determination of four immunosuppressants by means of high speed and robust on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004;805:215-222.
11. Maralikova B, Weinmann W. Confirmatory analysis for drugs of abuse in plasma and urine by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with respect to criteria for compound identification.J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004;811:21-30.
12. Kronstrand R, Nystrom I, Strandberg J, Druid H. Screening for drugs of abuse in hair with ion spray LC-MS-MS. Forensic Sci Int. 2004;145:183-190.
13. Simpson J, Zhang Q, Ozaeta P, Aboleneen H. A specific method for the measurement of cyclosporin A in human whole blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Ther Drug Monit. 199820:294-300.
14. Jensen UG, Brandt NJ, Christensen E, Skovby F,

Norgaard-Pedersen B, Simonsen H: neonatal screening for galactosemia by quantitative analysis of hexose monophosphates using tandem mass spectrometry: a retrospective study. Clin Chem 200147:1364-1372.

15. Ali M, Rellos P, Cox TM. Hereditary fructose intolerance. J Med Genet. 199835:353-365.

16. Buhrdel P, Bohme HJ, Didt L. Biochemical and clinical observations in four patients with fructose-1,6-diphosphatase deficiency. Eur J Pediatr. 1990149:574-576.

Abstract

Neonatal screening for galactosemia using tandem mass spectrometry

Jae Gyun Lim

Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Jeong-Ho Kim)

Galactosemia (OMIM 230400) is an inherited disorder in the metabolism of galactose caused by deficiency of the enzyme galactose-1-phosphate uridyl transferase, galactokinase, or UDP-galactose-4-epimerase, which leads to accumulation of galactose and galatose-1-phosphate (gal-1-P) in blood and tissues.

There are several methods for neonatal screening of galactosemia. Enzymatic colorimetric assay (ECA) is widely used method. But all current methods require special reagents with multistep sample preparation procedures, and are time-consuming. The object of this studyis to evaluate tandem mass spectrometry (MS/MS) for the screening of galactosemia. The specimens were analyzed by a MS/MS protocol to determine the hexose

monophosphates (HMPs) content, from which indirectly gal-1-P, a marker of galactosemia was determined.

We analyzed dried filter-paper blood samples obtained 3~6 days after birth for routine neonatal screening from 158 cases, including 3 galactosemia patients. Total HMPs were assayed by negative-ion mode electrospray tandem mass spectrometry (MS/MS). The predominant precursor/product ion pair (m/z 259/79) was used to quantify total HMPs by external standardization.

A total of 111 reference samples were available for this study. The mean concentration of aldose monophosphate and the mean concentration of ketose monophosphate were 1.46 mmol/L, 2.63 mmol/L, respectively. The mean ion abundance ratio (IAR) was 0.50. Samples from galactosemia patients (deficiency of UDP-galactose-4-epimerase) showed increased HMP (m/z 79) concentration (range for patients, 18.5-24.9 mmol/L) and IAR (range for patients, 1.52-1.72). MS/MS method was in good correlation with ECA (r2=0.926). And turn around time was less than 2 minutes.

In conclusion, quantitative analysis of HMPs by MS/MS was correlated well with conventional ECA method, reducing the turnaround time comparing with ECA method, and was regarded as useful for the galactosemia screening.

Key Words: MS/MS, galactosemia, galactose-1-phosphate, neonatal screening