

LCMS-8040CL 测定人血浆中的总同型半胱氨酸

LCMSMS-302

摘要：本文建立了一种使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30ACL 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040CL 联用检测人血浆中总同型半胱氨酸的检测方法。样品经同型半胱氨酸试剂盒处理后，使用临床用超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8040CL 在 2.0 min 内完成定量分析。同型半胱氨酸在浓度范围 5~45 $\mu\text{mol/L}$ 内线性良好，相关系数大于 0.9999；使用试剂盒内标定浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的标准样品进行了批内和批间的精密度实验，实验结果表明批内和批间的精密度 RSD 分别小于 0.58% 和 3.0%；同时考察了进样器放置稳定性，结果表明样品在该条件下存放时稳定性良好。此方法快速、简单、选择性强且灵敏度高，可以为临床中人血浆中总同型半胱氨酸的检测提供很好的借鉴和参考。

关键词：临床超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪 同型半胱氨酸

体外诊断，即 IVD(In Vitro Diagnosis)，是指在人体之外，通过对人体样本（血液、体液、组织等）进行检测而获取临床诊断信息，进而判断疾病或机体功能的产品和服务。应用于体外诊断的医疗器械均需经过国家食品药品监督管理局的注册认证后，才可以应用于临床体外诊断测定。在体外诊断器械的帮助下，临床实验室可对患者的生物样本进行定性或定量分析，从多方面协助临床学家进行病情的诊断和治疗。同型半胱氨酸 (homocysteine, HCY) 是心脑血管疾病的独立危险因素。快速准确检测 HCY 浓度可为心脑血管疾病的预防、诊断及治疗提供依据。目前，临床同型半胱氨酸的测定方法主要有高效液相色谱法、气相色谱 - 质谱联用法、生

化法、免疫法、液相色谱 - 串联质谱联用法。这些方法中，高效液相色谱法、气相色谱 - 质谱联用法需要进行 HCY 衍生等步骤，操作比较复杂且耗时，免疫法的测试操作相对简便，但其专用试剂价格较贵。而液相色谱 - 串联质谱联用法测定血浆 HCY 浓度具有分析时间短、样品处理快速简便、专属性强、准确性和灵敏度高以及成本低等优点。本文使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30ACL 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040CL 联用，建立了以 D4-HCY 为内标的血浆中 HCY 的定量分析方法，该方法操作简捷、特异性好、灵敏度高、分析速度快，适用大规模临床 HCY 检测的需要，该方法可以在 HCY 临床检验方面发挥较大的作用，供相关检测人员参考。

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仪 LC-30ACL 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040CL 联用系统。具体配置为 LC-30ADCL \times 2(输液泵)，DGU-20A5R CL(在线脱气机)，SIL-30ACMP CL(自动进样器)，CTO-30ACL(柱温箱)，CBM-20ACL 系统控制器，LCMS-8040CL 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.60 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GIST (2.1 mmI.D. \times 100 mmL, 2.0 μm)

流动相：A 相 -(0.02% 甲酸) 水，
B 相 -(0.02% 甲酸) 甲醇

流速：0.32 mL/min

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

进样体积：1 μL

洗脱方式：等度洗脱，90 : 10(v/v)

分析时间：2.5 min

质谱条件

分析仪器：LCMS-8040CL

离子源：ESI +

雾化气流速：3.0 L/min

DL 温度：250 $^{\circ}\text{C}$

加热模块温度：400 $^{\circ}\text{C}$

干燥气流速：15 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)，MRM 参数见表 1

表1 化合物信息及MRM参数

编号	名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	HCY	454-29-5	136.00	90.00	-12.0	-10.0	-18.0
2	D4-HCY	-	140.00	94.00	-12.0	-10.0	-18.0

1.3 标准样品、质控品及样品准备

使用同型半胱氨酸检测试剂盒（液相色谱 – 串联质谱法，上海复星长征公司）。该试剂盒包含以下部分：

内标液：DL- 同型半胱氨酸 -D4(6 mL，浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$)；

标准物质：3 个水平的标准样品 (250 μL ，浓度分别为 50 $\mu\text{mol/L}$ 、150 $\mu\text{mol/L}$ 、450 $\mu\text{mol/L}$)

质控品：1 个水平的质控品 (250 μL ，浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$)

还原剂：1,4- 二硫苏糖醇 (0.277 g，使用前准确加入 6 mL 纯水稀释备用)

蛋白沉淀剂：三氯醋酸 (6 mL，浓度为 15%(w/v))

稀释液：小牛血浆水溶液 (1 mL)

标准样品、质控品前处理方法: 取 5 μL 标准样品或质控品于 1.5 mL 离心管中, 分别加入 45 μL 稀释液、50 μL 内标、50 μL 还原剂, 混匀, 室温放置 30 min 后, 加入 50 μL 蛋白沉淀剂, 涡旋混合 30 s, 高速离心 (15000 rpm)3 min, 吸取上清液供色谱进样分析。(对照品浓度相当于 5 $\mu\text{mol/L}$ 、15 $\mu\text{mol/L}$ 、45 $\mu\text{mol/L}$; 质控品浓度相当于 20 $\mu\text{mol/L}$)

样品前处理方法: 取 50 μL 样品于 1.5 mL 离心管中, 分别加入 50 μL 内标、50 μL 还原剂, 混匀, 室温放置 30 min 后, 加入 50 μL 蛋白沉淀剂, 涡旋混合 30 s, 高速离心 (15000 rpm)3 min, 吸取上清液供色谱进样分析。

结果与讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

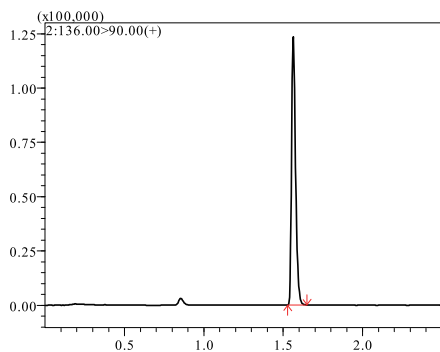
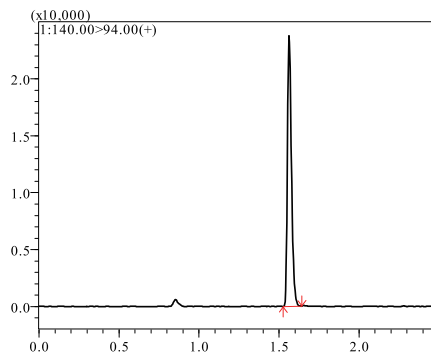

 图1 标准样品MRM色谱图(浓度为45 $\mu\text{mol/L}$)


图2 标准样品内标MRM色谱图

2.2 质控品的 MRM 色谱图

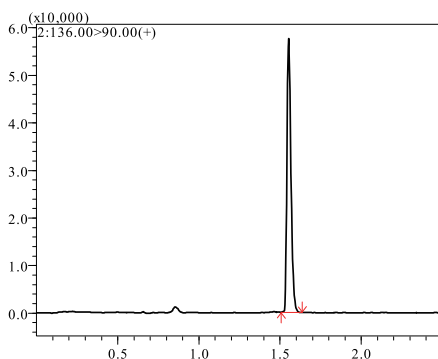
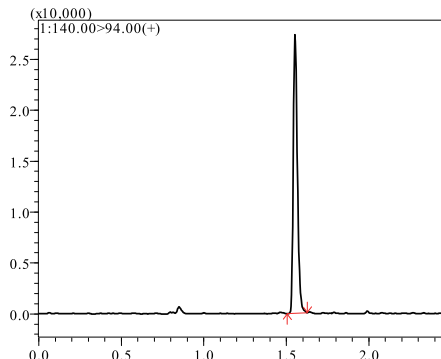

 图3 质控品MRM色谱图(浓度为20 $\mu\text{mol/L}$)


图4 质控品内标MRM色谱图

2.3 样品的 MRM 色谱图

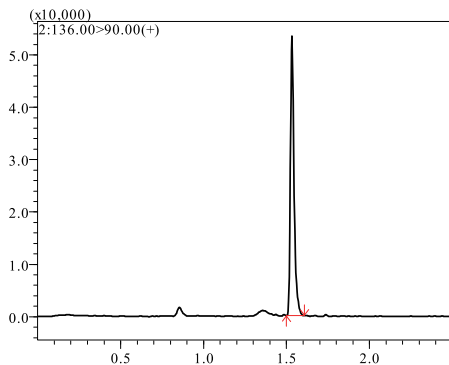


图5 样品MRM色谱图(浓度为27.03 μmol/L)

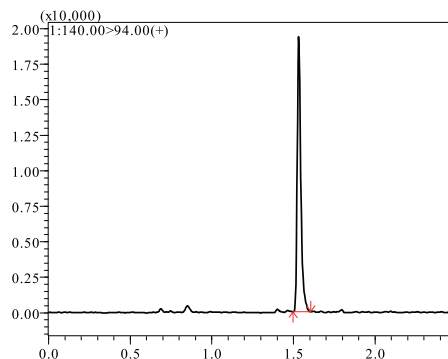


图6 质控品内标MRM色谱图

2.4 专属性考察

按照 1.3 中的样品前处理方法制备 blank 和 double blank 样品，按照 1.2 中条件进行分析后得到的色谱图图 7、图 8 所示，色谱图显示，本方法专属性强。

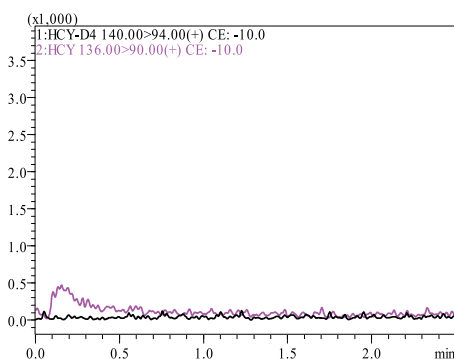


图7 double blank谱图

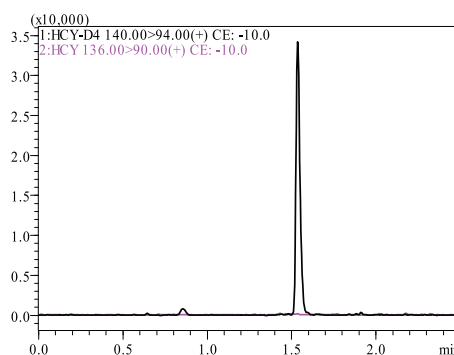


图8 blank谱图

2.5 线性关系

连续三天对试剂盒内三个浓度的标准品，按 1.2 中的分析条件进行了 3 个批次的分析，以浓度为横坐标，峰面积比值为纵坐标，内标法制作校准曲线。在 5~45 μmol/L 浓度范围内线性良好。线性方程、线性范围和相关系数见表 2。

表2 校准曲线参数

编号	校准曲线	线性范围(μmol/L)	准确度(%)	相关系数 r
批 1	$Y = (0.118630)X + (-0.172330)$	5~45	98.5~104.3%	0.9999
批 2	$Y = (0.110802)X + (-0.104318)$	5~45	96.9~100.9%	0.9999
批 3	$Y = (0.118190)X + (-0.133213)$	5~45	98.4~106.8%	0.9999

2.6 检出限和定量限

对浓度为 50 μmol/L 的标准样品按照 1.3 的方法进行前处理后进样分析，最低检出限 (S/N=3, LOD 表示)、最低定量限 (S/N=10, LOQ 表示) 结果如表 3 所示。

表3 检出限和定量限

名称	信噪比	检出限(μmol/L)	定量限(μmol/L)
HCY	338.4	0.05	0.15

2.7 质控品准确度考察

按 1.2 中的分析条件和 1.3 中的前处理方法对试剂盒中的质控品进行分析, 质控样本的准确度结果如下表所示, 结果显示测定结果与理论值接近, 完全落在质控样本的靶值范围之内(靶值由试剂盒提供)。

表4 质控样本测试结果

编号	靶值范围($\mu\text{mol/L}$)	测定浓度(mg/L)
QC-1	18~22	19.038
QC-2		19.230
QC-3		19.129
RSD		0.52%

2.8 批内、批间精密度实验

连续三天对试剂盒中的标准样品(浓度为 $50 \mu\text{mol/L}$, 每个浓度 6 份)进行三个批次分析, 考察批内、批间的精密度, 结果如表 5 所示。HCY 的批内和批间精密度分别小于 0.58% 和 3.0%。

表5 批内批间精密度结果(mg/L)

理论值	批内精密度($n=6$)		批间精密度($n=18$)	
	平均实测值	RSD	平均实测值	RSD
50	49.2	0.58%	50.2	3.0%

2.9 稳定性实验

取 3 批次血浆样品, 按 1.3 中的前处理方法处理样品后, 进行进样器放置 0 天、1 天及 2 天稳定性考察, 结果如下表所示, 表中结果显示, 该方法稳定性良好。

表6 进样器放置稳定性考察结果

0 天实测浓度(mg/L)	放置时间(天)	浓度比例百分比(%)
27.03	0	100.0
	1	94.5
	2	98.6
11.51	0	100.0
	1	100.7
	2	100.0
13.79	0	100.0
	1	100.0
	2	101.3

结论

建立了使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30ACL 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040CL 联用测定人血浆中总同型半胱氨酸的检测方法。使用同型半胱氨酸试剂盒的内标、标准样品及质控品进行了方法的专属性、线性、精密度及稳定性的考察。结果显示该方法专属性良好, 标准曲线相关系数大于 0.9999, 批内和批间精密度分别小于 0.58% 和 3.0%, 进样器放置的稳定性满足样品检测的需要。此方法快速、简单、选择性强、灵敏度高, 可以为临床中人血浆总同型半胱氨酸的检测提供很好的借鉴和参考。