

基于 CLAM+LCMSMS 的全自动分析系统检测人血清中脂溶性维生素含量

LCMSMS-642

摘要：本文建立了岛津在线自动前处理仪 CLAM-2030 和超高效液相三重四极杆质谱仪 LCMS-8050CL 联用系统测定人血清中 5 种脂溶性维生素含量的方法。此联用系统利用蛋白沉淀的原理实现自动化样本前处理及在线 LC-MS/MS 分析，只需简单放入采血管、配合脂溶性维生素专用试剂盒及方法包，便可完成实时的在线分析。本文对分析方法的线性、准确度和精密度性能做了考察，并检测 6 例临床样本，结果显示：各分析物线性范围内校准曲线相关系数均大于 0.9966，质控品准确度均值靶值范围内，精密度 CV 值均小于 11%，实测临床样本无基质干扰，可满足临床检验需求。该方法自动化程度高，对检测人员友好，有助于更快、更简单、更安全地完成日常临床检测任务。

关键词：临床检测 自动化 医用质谱仪 脂溶性维生素

维生素 A、维生素 D、维生素 E 和维生素 K 为四种常见脂溶性维生素。维生素 A 缺乏病是由于膳食中维生素 A 或其前体胡萝卜素缺少或吸收不良而引起的全身性疾病，其主要病理变化是全身上皮组织角质变性，于眼部出现最早，可引起视觉功能异常，并影响呼吸道、消化道、泌尿生殖道等的黏膜，乃至皮肤、骨骼及免疫系统。维生素 D，俗称“阳光维生素”，主要生理功能是将血钙和血磷水平维持在正常范围内，以维持大部分生命过程不可或缺的代谢功能，血清中 25OHD2 和 25OHD3 的浓度测量已经应用于监控人体内维生素 D 的状况及低血钙代谢性骨疾病和高血钙代谢性骨疾病的鉴别诊断。维生素 E 是体内生物膜上的重要组成部分，当维生素 E 缺乏时，生物膜上的多不

饱和脂肪酸容易发生过氧化反应，以红细胞为例，其细胞膜上的多不饱和脂肪酸因发生过氧化反应而受损时会发生溶血反应，继而出现贫血症状。维生素 K1，又名叶绿醌，在食物、人体中广泛存在。维生素 K1 是肝脏合成凝血因子 II、VII、IX、X 所必须的物质，能促进血液凝固；当其缺乏时可引起这些凝血因子合成障碍或异常。

本文利用在线自动前处理仪 CLAM-2030 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050CL 联用对人血清中维生素 A、25OHD2、25OHD3、维生素 E 和维生素 K1 进行定性定量分析。有助于高通量、更简单、更安全、更准确地实现临床脂溶性维生素的检测。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津在线自动前处理仪 CLAM-2030 和岛津临床质谱 LCMS-8050CL，具体配置如下：

输液泵：LC-30AD X2

脱气机：DGU-20A_{5R}

自动进样器：SIL-30AC

柱温箱：CTO-20A

检测器：LCMS-8050CL

前处理模块：CLAM-2030

系统控制器：CBM-20A

工作站软件：LabSolutions Version 5.93



图 1 CLAM-2030+LCMS-8050CL 联用系统

1.2 分析条件

色谱柱: Shim-pack GIST C18 (50 mm × 2.1 mm × 2 μm), 岛津 (上海) 实验器材有限公司,

P/N: 227-30001-02

流动相: A 相 - 水, B 相 -0.1% 甲酸甲醇 (含 1 mM 甲酸铵)

洗脱方式: 梯度洗脱, 时间程序见表 1

流速: 0.5 mL/min

柱温: 50°C

进样器温度: 15°C

进样量: 40 μL

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.01	30	70
0.20	30	70
3.80	0	100
5.90	0	100
6.00	30	70
7.00	30	70

质谱条件

离子化模式: APCI(+)

离子源温度: 375°C

雾化气: 氮气 3.0 L/min

DL 管温度: 225°C

干燥气: OFF

加热模块温度: 250°C

驻留时间: 18 ms

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

表 2 MRM 参数

#	名称	前体离子 > 产物离子	Q1 Pre	CE	Q3 Pre
1	25OH-VD2	395.35>377.35	-13	-19	-16
2	25OH-VD3	383.35>365.30	-13	-15	-22
3	25OH-VD2-d3	398.35>380.25	-24	-18	-24
4	25OH-VD3-d6	389.35>371.25	-13	-17	-25
5	VA	269.30>93.20	-14	-21	-19
6	VA-d6	275.30>96.20	-16	-20	-34
7	VE	431.40>137.10	-12	-20	-24
8	VE-d6	437.40>171.20	-12	-23	-24
9	VK1	451.35>187.15	-14	-27	-19
10	VK1-d7	458.50>194.10	-20	-23	-19

1.3 样品制备和前处理

1.3.1 标准样品、质控品及样品制备

标准样品和质控品: 使用脂溶性维生素检测试剂盒 (液相色谱 - 串联质谱法, 苏州帕诺米克公司, 产品编号: DP000008, 批号: 2021122101)。该试剂盒包含以下部分: 样本提取剂: 维生素 A-d6、25-羟基维生素 D2-d3、25-羟基维生素 D3-d6、维生素 E-d6、维生素 K1-d7、稳定剂、防腐剂; 校准品: 6 个浓度水平冻干粉样本 (含标准浓度的维生素 A、25-羟基维生素 D2、25-羟基维生素 D3、维生素 E、维生素 K1); 质控品: 3 个浓度水平冻干粉样本 (含标准浓度的维生素 A、25-羟基维生素 D2、25-羟基维生素 D3、维生素 E、维生素 K1)。

临床样本：6 例人血清临床样本来自上海市某医院（仅作科研用途）。

1.3.2 样品前处理

在 CLAM-2030 工作站界面优化自动前处理参数、蛋白沉淀剂使用量、震荡转速、震荡时间、抽滤时间等。确定样品自动前处理程序具体操作为：

- (1) 吸取 20 μL 甲醇活化过滤管，准备上样；
- (2) 吸取校准品、质控品或血清样品 30 μL 上样；
- (3) 吸取样本提取剂 150 μL ；
- (4) 转速 2000 rpm 震荡 30 s 进行提取；
- (5) 使用 -50~-60 kPa 的负压抽滤过滤管 60 s；
- (6) 接收管转移至自动进样器，进样 40 μL （详见图 2）。

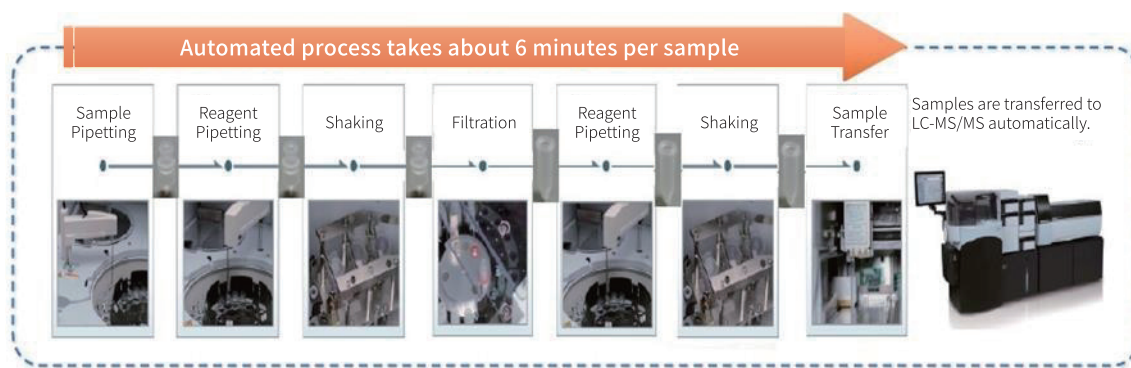


图 2 CLAM-2030 在线自动前处理过程

■ 实验结果

2.1 线性关系

将 6 个标准浓度的校准品按 1.3.2 中前处理条件进行分析测定，以浓度比为横坐标，面积比为纵坐标，内标法制作校准曲线得到相关系数、线性范围和校准品准确度见表 3。

表 3 标准曲线参数 (1/C² 加权)

#	名称	相关系数	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)
1	25OH-VD2	0.9981	2.5~75	89.0~109.8
2	25OH-VD3	0.9996	5~150	97.0~102.3
3	VA	0.9997	50~1500	97.8~103.5
4	VE	0.9995	1000~30000	95.2~108.6
5	VK1	0.9966	0.1~3	89.0~105.7

2.2 精密度 & 准确度实验

本实验分别对低、中、高浓度质控样品进行 5 次重复测定，精密度相对标准偏差范围分别在 3.99%~10.99% (LQC)、2.31%~9.49% (MQC)、1.70%~10.14%(HQC) 之间，准确度结果均落在质控品允许范围内，满足临床检测要求，数据结果见附录表 4~ 表 6。

表 4 LQC 精密度 & 准确度结果 (n=5)

#	名称	均值 (ng/mL)	CV(%)	理论值 (ng/mL)	准确度要求
1	25OH-VD2	7.5	10.99	6~9	满足
2	25OH-VD3	15.0	5.99	12~18	满足
3	VA	152.8	9.80	120~180	满足
4	VE	2984.1	3.99	2400~3600	满足
5	VK1	0.31	9.74	0.24~0.36	满足

表 5 MQC 精密度 & 准确度结果 (n=5)

#	名称	均值 (ng/mL)	CV(%)	理论值 (ng/mL)	准确度要求
1	25OH-VD2	22.4	2.31	18~27	满足
2	25OH-VD3	45.8	4.02	36~54	满足
3	VA	441.7	9.29	360~540	满足
4	VE	9201.2	3.14	7200~10800	满足
5	VK1	0.89	9.49	0.72~1.08	满足

表 6 HQC 精密度 & 准确度结果 (n=5)

#	名称	均值 (ng/mL)	CV(%)	理论值 (ng/mL)	准确度要求
1	25OH-VD2	42.8	1.70	36~64	满足
2	25OH-VD3	88.6	1.92	72~108	满足
3	VA	874.1	10.14	720~1080	满足
4	VE	17719.1	2.17	14400~21600	满足
5	VK1	1.69	3.48	1.44~2.16	满足

2.3 临床样本实测

为考察本方法在实际样本检测中抗干扰能力，分别选取 6 例临床样本进行测试（其中 01、02 号为正常血清样本，04、05、06 号分别为轻度溶血、轻度黄疸和轻度脂血样本），各维生素浓度检测结果详见表 7，临床样本色谱图详细图 3。

表 7 临床样本实测结果 (单位: ng/mL)

#	名称	样本 01	样本 02	样本 03	样本 04	样本 05	样本 06
1	25OH-VD2	BLQ	2.8	BLQ	BLQ	6.6	BLQ
2	25OH-VD3	25.4	13.2	22.2	19.7	10.5	15.8
3	VA	601.9	389.8	462.1	329.2	508.7	218.6
4	VE	12814.0	10297.1	15114.4	8777.6	10123.1	12038.6
5	VK1	0.66	0.59	0.29	0.37	0.30	0.37

*BLQ 表示低于定量下限

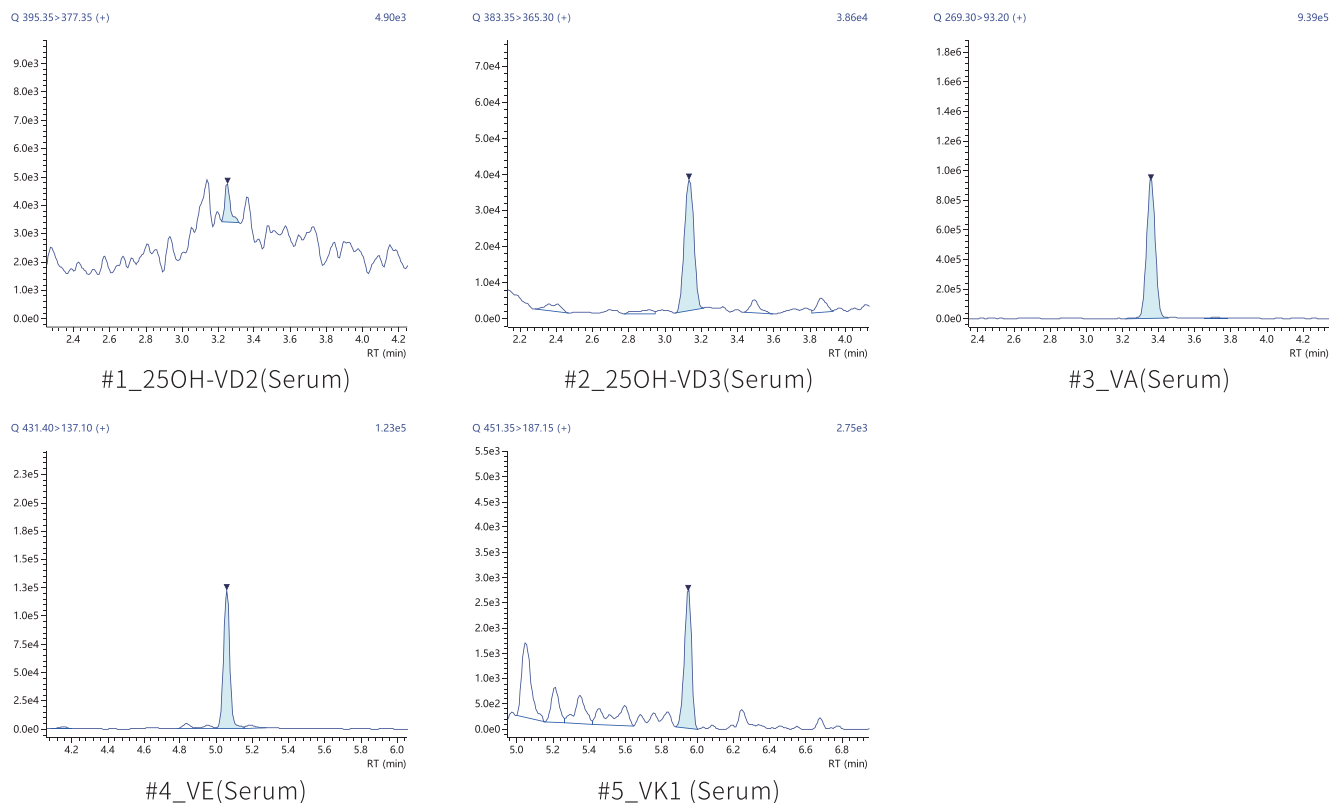


图3 临床样本(01号)25OH-VD2、25OH-VD3、VA、VE、VK1 色谱图

2.4 方法定量限

25OH-VD2、25OH-VD3、VA、VE 和 VK1 方法定量限分别 2.5、5、50、1000 和 0.1 ng/mL，定量限色谱图详见图 4。

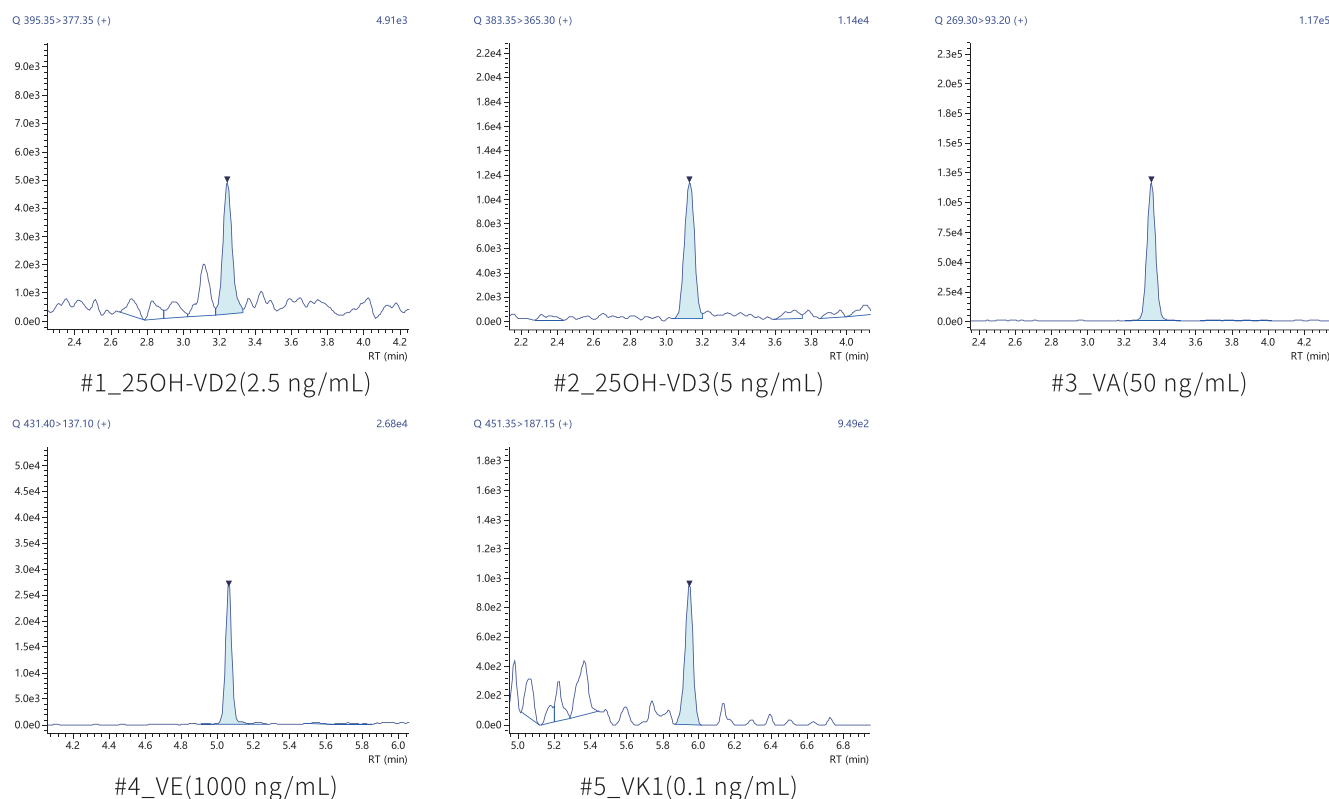


图4 定量限 25OH-VD2、25OH-VD3、VA、VE、VK1 色谱图

■ 结论

本文建立了一种使用岛津在线自动前处理仪 CLAM-2030 及岛津临床质谱 LCMS-8050CL 联用系统测定人血清中 5 种脂溶性维生素含量的方法。此方法使用岛津在线自动前处理方法进行 LC-MS/MS 分析，内标法定量，每个样品分析时间仅需 7 min，在线性范围内，5 种维生素相关系数均 >0.9966 ，定量限分别为 2.5 ng/mL(25OH-VD2)、5 ng/mL(25OH-VD3)、50 ng/mL(VA) 1000 ng/mL(VE)、0.1 ng/mL(VK1)。质控品均在靶值范围内，质控品精密度 RSD 均 $<11\%$ ，实测临床样本无基质干扰，可满足临床日常检验需求。

此联用系统在线自动处理样品且数据重复性好，消除手动操作生物样品带来的风险，最大限度地减少操作人员与生物样本的接触，只需简单放入采血管、必要试剂和专用处理管，便可进行在线自动前处理，每个样品并行处理，以优化仪器的使用和样品通量，并且通过软件来管理试剂、校准曲线、控制样品和系统维护，确保系统的性能和可靠性，系统提供可视化的图表和数据，可实时提醒用户试剂量的减少或 QC 样品结果的变化等，是一种全自动化的分析系统。

岛津应用云

