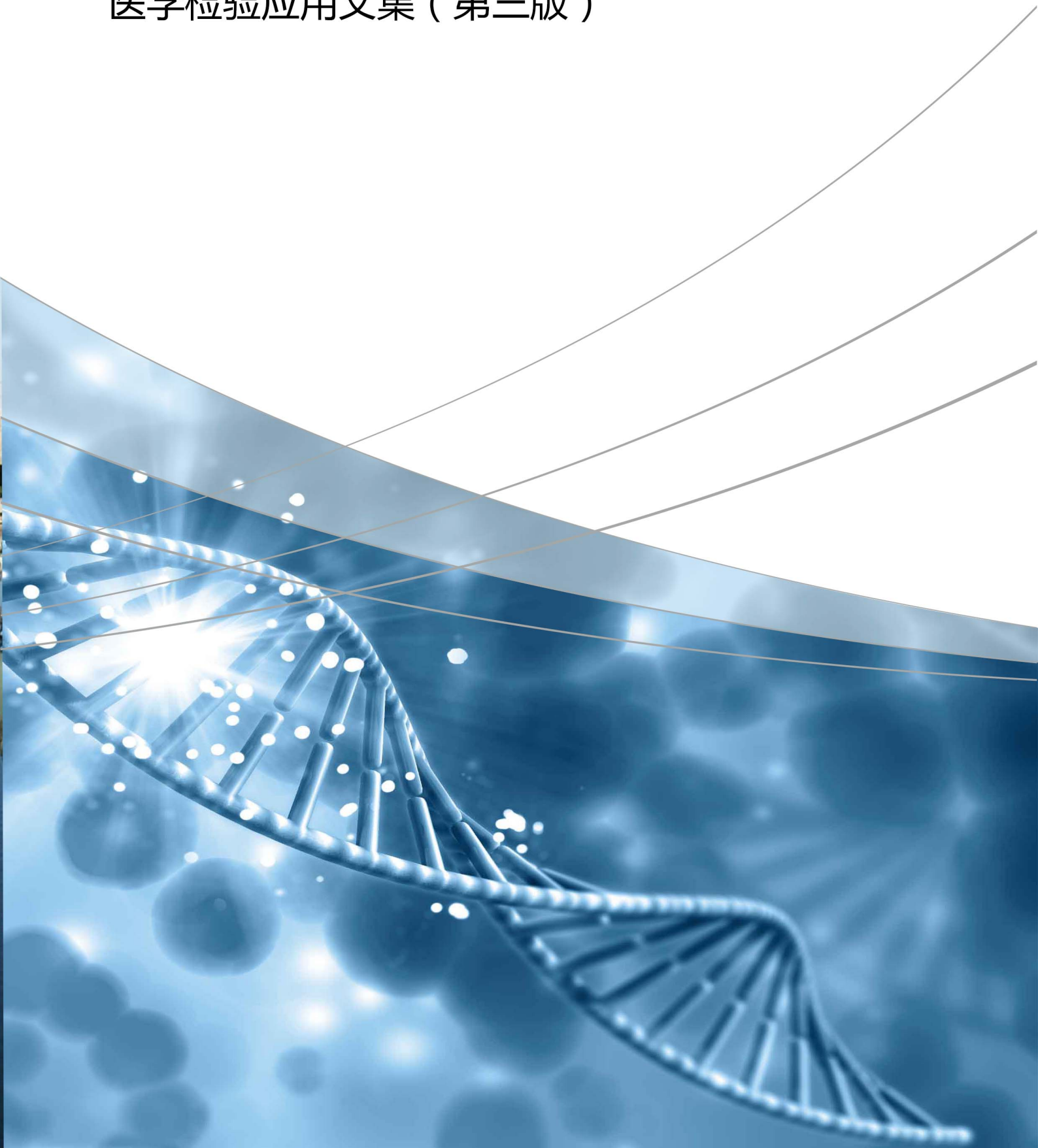


# 医学检验应用文集（第三版）



# 前 言

医学检验是运用现代物理化学方法、手段进行医学诊断的一门学科，主要研究如何通过实验室技术、医疗仪器设备为临床诊断、治疗提供依据。医学检验的主要项目有临床检验、生化检验、免疫检验、微生物检验、分子生物学检验、血液检验、病理学检验等。从事医学检验的机构和组织有：医院（检验科、血液科等）、血站、疾控中心、独立医学检验公司等。

随着时代发展和科技进步，医学检验行业呈现了如下的发展趋势。第一个发展趋势是：从医学检验逐渐到检验医学。医学检验是以标本为中心，以检验数据为目的，封闭而孤立的实验室操作方式，这在上世纪七八十年代以前是通行的方式。进入到 20 世纪末期，基础医学与临床医学飞速发展及密切结合，要求实验室工作必须以患者为中心，以通过实验技术得出的实验指标，转化成高效的诊断信息提供给临床，并参与临床的诊断和治疗，这就是现代检验医学理念。第二个发展趋势是独立医学检验公司蓬勃兴起。在美国，以 Quest 和 LabCorp 为代表的独立医学检验公司占据了 35% 左右的市场份额。在我国，虽然医院仍旧占据了绝大多数的医学检验市场份额，但独立医学检验公司近年来发展势头迅猛。第三个发展趋势是先进的检验手段不断取代传统落后的手段，比如激素检测从传统的 ELISA 方法逐渐过渡到 LC-MS/MS 方法，结果更准确、假阳性率更低，更有利于临床给出针对性的治疗方案，缩短疾病诊断和治疗进程，节约社会医疗开支。第四个发展趋势是自动化、信息化、个性化等。医学检验仪器的自动化程度越来越高，集中度越来越高。“大数据”、“互联网+”等新兴理念与医疗相结合，为医学检验技术的发展带来了新的挑战和机遇。精准医学实现精准的疾病分类及诊断，制定具有个性化的疾病预防和治疗方案。其中质谱技术在精准医学中的应用前景不可限量。

岛津公司作为全球著名的分析仪器综合生产厂商，进入中国已经 30 多年，始终秉承创业宗旨“以科学技术向社会做贡献”，不断钻研领先时代、满足社会需求的科学技术。岛津公司迎合客户需求和行业发展趋势，推出了《医学检验应用文集》。本应用文集根据检验项目的种类，分成九个章节，分别为遗传代谢病筛查、诊断标志物分析、激素检测、维生素与氨基酸检测、治疗药物监测、基因检测、元素分析、功能医学与精准医疗。文集详细介绍了岛津 LC-MS/MS、GC-MS、ICPMS、微芯片电泳仪等分析仪器在各个检验项目的应用实例，供广大医学检验行业从业人员参考。

岛津企业管理（中国）有限公司  
分析中心  
2018 年 7 月

# 目 录

第一章 遗传代谢病筛查.....	1
1.1 引言 .....	1
1.2 非衍生化-三重四极杆液质联用法进行新生儿遗传代谢缺陷筛查的应用研究.....	2
1.3 液相-三重四极杆质谱法进行新生儿遗传代谢病筛查的应用方案.....	11
1.4 使用 LCMS-8050 衍生化法测定 DBS 中的氨基酸和酰基肉碱.....	25
1.5 气相色谱质谱联用法在有机酸尿症诊断中的应用.....	29
第二章 诊断标志物分析.....	33
2.1 引言 .....	33
2.2 LCMS-8060 测定人血浆中的总同型半胱氨酸.....	34
2.3 超高效液相色谱三重四极杆质谱法测定血清中甲基丙二酸的含量.....	41
2.4 LCMS-8050 选择离子监测模式快速测定人体血液中糖化血红蛋白含量.....	51
2.5 LCMS-8045 多反应监测模式快速测定人体血液中糖化血红蛋白含量.....	57
2.6 超高效液相色谱质谱联用检测血清中 1,5-脱水葡萄糖醇.....	63
第三章 激素检测.....	69
3.1 引言 .....	69
3.2 超高效液相色谱三重四极杆质谱法测定血清中 25-羟基维生素 D <sub>2</sub> /D <sub>3</sub> 含量.....	70
3.3 超高效液相色谱三重四极杆质谱法定量检测血清中类固醇激素含量.....	83
3.4 使用三重四极杆 LC-MS/MS 定量分析血浆中的儿茶酚胺类物质.....	96
第四章 维生素与氨基酸检测.....	101
4.1 引言 .....	101
4.2 LCMS-8060 测定血浆中的维生素 K <sub>1</sub> .....	102
4.3 LCMS-8040 测定人微量血浆中维生素 A 和维生素 E.....	108
4.4 LCMS-8045 检测血浆中 VA 和 VE 长期稳定性考察.....	115
4.5 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定血清和尿液中氨基酸含量.....	121
第五章 治疗药物监测.....	128
5.1 引言 .....	128
5.2 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定血浆中替比夫定.....	129
5.3 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法检测八种精神病药含量.....	137

第六章 基因检测.....	145
6.1 引言 .....	145
6.2 应用微芯片电泳仪 MultiNA 检测食物中毒相关基因 .....	146
6.3 应用微芯片电泳仪 MultiNA 高通量检测诺如病毒基因 .....	149
6.4 一种高通量和自动化用于宫颈癌筛选和预测的人乳头瘤病毒分型方法 .....	152
6.5 微芯片电泳 MultiNA 在二代测序 (NGS) 文库质控中的应用 .....	157
第七章 元素分析.....	159
7.1 引言 .....	159
7.2 石墨炉原子吸收光谱法测定血样中的铅和镉含量.....	160
7.3 ICPMS-2030 碰撞池技术快速测定血清中微量金属元素的含量.....	164
7.4 LC-ICP-MS 直接测定血浆中 Pt 元素含量.....	169
7.5 ICPMS-2030 测定尿液中碘的含量 .....	173
第八章 功能医学.....	177
8.1 引言 .....	177
8.2 气相色谱-质谱法检测血清中的 5 种脂肪酸含量.....	178
8.3 Co-Sense LC-PDA-MS 系统直接分析测定血清中双酚 A 和 4-辛基酚含量.....	183
第九章 精准医疗.....	186
9.1 引言 .....	186
9.2 《Nature》: 血浆中 $\beta$ -淀粉样蛋白生物标记物对阿尔兹海默疾病的高效诊断.....	187
9.3 《Oncotarget》: 应用气相色谱质谱联用法对结直肠癌进行早期诊断筛查 .....	189
9.4 《Biological and Pharmaceutical Bulletin》: 基于 nSMOL 酶解技术对利妥昔单抗的 LC/MS 生物分析及方法验证.....	191

# 第一章 遗传代谢病筛查

## 1.1 引言

遗传代谢病又称遗传代谢异常或先天代谢缺陷,是由于维持机体正常代谢所必需某类多肽(蛋白)的基因发生突变而导致的疾病。遗传代谢病一部分病因由基因遗传导致,还有一部分是后天基因突变造成,发病期不仅仅是新生儿,覆盖各个年龄阶段。

据统计,我国每年诞生遗传代谢病患儿达 40 万至 50 万,占全部出生人口的 2%到 3%,为社会和家庭带来了巨大的负担。我国政府对新生儿遗传代谢病筛查非常重视,除了颁布了《中华人民共和国母婴保健法》外,2000 年 6 月 20 日国务院还公布了《中华人民共和国母婴保健法实施办法》等一系列法律法规,新生儿疾病筛查成为母婴保健技术的重要内容之一。2002 年卫生部、中国残联人联合会发布《中国提高出生人口素质,减少出生缺陷和残疾行动计划(2002-2010)》,再次强调了推广新生儿疾病筛查的重要性。卫生部多次组织全国新生儿疾病筛查专家编写和修改《新生儿疾病筛查管理办法》,规范新生儿疾病筛查工作。

常见的新生儿筛查疾病涉及氨基酸代谢病、有机酸代谢病、内分泌疾病、血红素疾病、脂肪酸代谢病等几大类,筛查手段包括生化检测及质谱检测。二十世纪九十年代,美国、澳大利亚等国家开始了新生儿筛查质谱方法(GC-MS、GC-MS/MS、LC-MS/MS)的开发。目前氨基酸代谢病、有机酸代谢病、脂肪酸代谢病等可使用质谱仪进行检测。与传统的生化学检测方法相比,如 Guthrie 法等,质谱法可处理血液、尿液等多种检材,只需使用极少量的检材即可进行相对准确的定量。质谱法整体分析过程极为简便并可实现自动化,可在一次分析中检测多种目标组分,为多种不同类型先天性疾病的诊断提供依据。2000 年以来,使用质谱技术进行新生儿筛查的工作在世界范围受到广泛的关注,在美国、欧洲、亚洲等地区普及,成为新生儿先天性代谢疾病早期发现、诊断的有利手段。

目前针对氨基酸、酰肉碱的筛查检测有非衍生 LC-MS/MS 法和衍生 LC-MS/MS 法,而有机酸主要用 GC-MS 分析。本章列出了岛津公司利用先进的质谱技术在以上三个分析方法中的应用,供相关技术人员参考。

## 1.2 非衍生化-三重四极杆液质联用法进行新生儿遗传代谢缺陷筛查的应用研究

**摘要:** 遗传代谢性疾病是一类由于单基因缺陷而引起代谢途径阻断的疾病。许多遗传代谢性疾病对新生儿危害极大,因此是新生儿筛查的主要内容。串联质谱用于新生儿筛查是自 Guthrie 将细菌抑制法用于苯丙酮尿症筛查以来,新生儿筛查史上最重要的技术革新。本文建立了一种应用非衍生化-三重四极杆液质联用法检测新生儿足跟干血斑中氨基酸及肉碱的各项指标来进行遗传代谢缺陷筛查的技术。

**关键词:** 新生儿筛查 三重四极杆质谱仪 非衍生化法 氨基酸 肉碱

国际新生儿遗传代谢病筛查发展趋势逐步提高到以串联质谱技术为中心的筛查。通过检测滤纸干血片中氨基酸和酰基肉碱浓度,进行氨基酸代谢、有机酸和脂肪酸代谢障碍等的筛查,使患儿得到早期诊断和及时治疗,避免体格和智力发育障碍。本文应用非衍生化样本处理的串联质谱技术(tandem mass spectrometry, MS/MS)检测新生儿足跟血干血斑中的氨基酸及肉碱浓度,以便用于氨基酸、有机酸及脂肪酸代谢病的检测和筛查。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器

岛津高效液相色谱仪 LC-20A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040CL 联用系统。

具体配置为 LC-20ADXR×2 输液泵, DGU-20A5 在线脱气机, SIL-20AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040CL 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver.5.82 色谱工作站; 孵育震荡仪(Labsystems iEMS)。

#### 1.2 分析条件

##### 1.2.1 液相色谱条件:

色谱柱: 无, 安装在线过滤器  
自动进样器温度: 4°C  
流动相: 0.05%甲酸水: 乙腈: 甲醇=1:2:2  
进样量: 1 μL  
初始流速: 0.1 mL/min  
洗脱方式: 流速梯度 见表 1  
柱温: 室温

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
-----------	--------	---------	-------

0.75	Pumps	Total flow	0.1
0.76	Pumps	Total flow	1.2
1.00	Controller	Stop	

### 1.2.2 质谱条件:

离子源: ESI(+)

扫描模式: MRM

雾化气: 3.0 L/min

干燥气: 12.0 L/min

加热模块温度: 450°C

DL 温度: 250°C

驻留时间: 10 ms

MRM: 见表 2

表 2 氨基酸、肉碱及其同位素内标的 MRM 参数

MRM	Name	Precursor ion	Product ion	CE
1	Ala	90.2	44.0	-15
2	Ala IS	94.2	48.0	-15
3	Val	118.2	72.2	-14
4	Val IS	126.2	80.2	-14
5	Gly	76.1	30.0	-13
6	Gly IS	78.1	32.0	-13
7	Orn	133.2	70.2	-17
8	Orn IS	135.2	72.2	-17
9	Arg	175.2	70.2	-24
10	Arg IS	180.2	75.2	-24
11	Leu	132.2	86.1	-11
12	Leu IS	135.2	89.1	-11
13	Met	150.2	104.1	-13
14	Met IS	153.2	107.1	-13
15	Phe	166.2	120.1	-14
16	Phe IS	172.2	126.1	-14
17	Tyr	182.2	136.1	-14
18	Tyr IS	188.2	142.1	-14

19	Cit	176.2	113.1	-17
20	Cit IS	178.2	115.1	-17
21	Pro	116.2	70.1	-18
22	C0	162.3	103.1	-17
23	C0 IS	171.3	103.1	-17
24	C2	204.3	85.1	-19
25	C2 IS	207.3	85.1	-19
26	C3	218.3	85.1	-22
27	C3 IS	221.3	85.1	-22
28	C4OH/C3DC	248.3	85.1	-23
29	C4OH/C3DC IS	255.3	85.1	-22
30	C4	232.3	85.1	-20
31	C4 IS	235.3	85.1	-20
32	C5OH/C4DC	262.1	85.1	-23
33	C5OH/C4DC IS	291.1	85.1	-22
34	C5	246.3	85.0	-23
35	C5 IS	255.3	85.0	-22
36	C5:1	244.3	85.0	-23
37	C5DC/C6OH	276.1	85.1	-27
38	C6	260.1	85.1	-23
39	C6DC	290.1	85.1	-27
40	C8	288.1	85.1	-23
41	C8:1	286.1	85.1	-23
42	C10	316.2	85.2	-27
43	C10 IS	381.2	85.2	-24
44	C10:1	314.2	85.2	-27
45	C10:2	312.2	85.2	-27
46	C12	344.2	85.2	-27
47	C12:1	342.2	85.2	-27

48	C14	372.2	85.2	-24
49	C14:1	370.2	85.2	-27
50	C14:2	368.2	85.2	-27
51	C14OH	388.5	85.1	-26
52	C14OH IS	403.5	85.1	-27
53	C16	400.5	85.1	-27
54	C16:1	398.5	85.1	-32
55	C16:1OH	414.5	85.1	-32
56	C16OH	416.5	85.1	-32
57	C18	428.5	85.1	-29
58	C18:1	426.5	85.1	-29
59	C18:2	424.5	85.1	-29
60	C18:1OH	442.5	85.1	-29
61	C18OH	444.5	85.1	-29

### 1.3 材料与方法

#### 1.3.1 材料

**检测样本：**待检测样本为滤纸干血片样本。采集微量血滴于S&S903滤纸上，室温下自然晾干，-20℃冰箱保存待用。

**试剂：**非衍生化法串联质谱法新生儿筛查检测试剂盒，包含10种氨基酸及9种肉碱的同位素内标。

#### 1.3.2 方法

**方法原理：**使用含稳定同位素标记的氨基酸及肉碱内标的溶剂萃取滤纸干血片中的氨基酸及肉碱，然后用MS/MS系统进行分析。通过测定每个氨基酸及肉碱与其对应的同位素内标的离子峰强度，由已知水平的内标，即可通过岛津新生儿筛查软件自动计算出所测样本的氨基酸及肉碱水平。

**样本前处理方法：**用直径3 mm打孔器在滤纸血片上取样，置于96孔板中，每孔加入含氨基酸及肉碱同位素内标的甲醇溶液100 μL，45℃密封孵育震荡（650~750 rpm）45 min，提取75 μL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

## 2 结果讨论

### 2.1 标准品的 MRM 色谱图

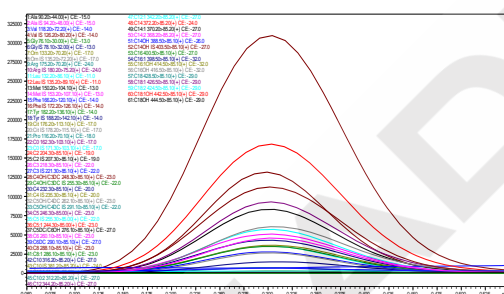


图 2 含混合内标的提取液色谱图

### 2.2 精密度考察

取试剂盒内提供的高、低 2 个水平的质控品，每次各测定 25 个样本，连续测定 10 天，得出批内和批间变异系数 (CV)，结果显示：氨基酸低值的批内变异系数范围为 2.5%-9.6%，平均值为 5.8%，批间变异系数范围为 3.3%-10.8%，平均值为 7.1%；氨基酸高值的批内变异系数范围为 2.0%-10.7%，平均值为 5.3%，批间变异系数范围为 2.8%-14.0%，平均值为 6.2%；肉碱低值的批内变异系数范围为 1.7%-12.8%，平均值为 5.5%，批间变异系数范围为 2.3%-14.0%，平均值为 6.5%；肉碱高值的批内变异系数范围为 1.0%-8.3%，平均值为 4.2%，批间变异系数范围为 2.9%-12.0%，平均值为 6.2%。计算结果详见表 3-6。

### 2.3 准确度考察

取试剂盒厂商提供的 5 个不同批号室间质控品进行检测，对其中的氨基酸和肉碱进行分析，计算检测值与靶值的相对误差及判断检测值是否在靶值 2 倍标准偏差范围内。结果显示：低浓度氨基酸 QC 样本检测值与靶值相对误差绝对值范围为 0.3%-9.7%；高浓度氨基酸 QC 样本检测值与靶值相对误差绝对值范围为 1.9%-14.0%；低浓度肉碱 QC 样本检测值与靶值相对误差绝对值范围为 0.7%-28.2%；高浓度肉碱 QC 样本检测值与靶值相对误差绝对值范围为 1.1%-25.9%，所有检测值均在靶值 2 倍 SD 范围内。计算结果详见表 7-10。

## 2.4 临床应用

从新生儿遗传代谢缺陷筛查样本中，得到了 3 个已经过诊断证明指标异常的样本，用本文建立的方法进行了相关检测，具体结果如表 11 所示。

表 11 异常样本检测结果

样本号	异常指标	实测值	参考值
1	C4OH/C3DC	0.56	0.02-0.27
	C4OH/C3DC/C4	2.07	0.13-1.50
	C4OH/C3DC/C10	6.39	0.001-5.00
2	C4OH/C3DC	0.36	0.02-0.27
	C4OH/C3DC/C4	2.59	0.13-1.50
	C4OH/C3DC/C10	11.67	0.001-5.00
	C10:2/C10	1.42	0.001-1.20
3	C4OH/C3DC	0.75	0.02-0.27
	C4OH/C3DC/C4	2.89	0.13-1.50
	C4OH/C3DC/C10	19.37	0.001-5.00
	Ala	389	62.5-328.0

\*结果仅作为研究用，无临床参考意义

## 3 结论

本文利用岛津高效液相色谱仪 LC-20A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040CL 联用系统成功建立了非衍生液相串联质谱法测定干血斑中氨基酸及肉碱的浓度的方法。通过精密度、准确度的考察，证明该方法可以快速、准确、稳定的进行氨基酸及肉碱含量的检测；通过异常样本的检测结果可以得出，该方法能够正常检测出异常样本，能够满足临床检测的应用。

表 3 低浓度氨基酸 QC 批内与批间 CV

目标物	Ala	Val	Gly	Orn	Arg	Leu	Met	Phe	Tyr	Cit	Pro
concentration	212.8	322.8	367.2	97.4	26.7	331.6	85.8	203.7	240.6	62.8	175.2
批内 CV	5.3%	2.6%	9.4%	5.4%	6.5%	3.2%	9.6%	2.5%	6.5%	9.4%	3.0%
批间 CV	9.9%	3.3%	10.6%	5.9%	7.5%	4.3%	10.6%	3.7%	6.7%	10.8%	4.7%

表 4 低浓度氨基酸 QC 批内与批间 CV

目标物	Ala	Val	Gly	Orn	Arg	Leu	Met	Phe	Tyr	Cit	Pro
concentration	286.1	970.4	422.1	176.3	85.7	929.6	474.6	663.4	646.3	267.2	212.4
批内 CV	6.3%	3.9%	10.7%	4.9%	4.3%	2.9%	4.6%	2.0%	6.8%	7.4%	4.1%
批间 CV	7.7%	4.1%	14.0%	5.2%	5.0%	3.1%	5.8%	2.8%	7.1%	8.5%	4.6%

表 5 低浓度肉碱 QC 批内与批间 CV

目标物	C0	C2	C3	C4OH/C3DC	C4	C5OH/C4DC	C5	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
concentration	16.3	15.6	3.5	0.3	1.1	1.1	0.5	0.4	0.5	0.3	0.4	0.4	3.5	1.3
批内 CV	2.4%	1.7%	2.3%	9.1%	2.7%	4.7%	3.6%	5.2%	6.2%	12.8%	11.5%	10%	1.7%	3.2%
批间 CV	3.5%	2.9%	3.9%	10.0%	3.6%	5.2%	5.1%	6.9%	6.9%	14.0%	11.9%	11%	2.3%	3.6%

表 6 高浓度肉碱 QC 批内与批间 CV

目标物	C0	C2	C3	C4OH/C3DC	C4	C5OH/C4DC	C5	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
concentration	36.7	32.9	11.6	0.8	4.8	2.8	2.6	1.8	2.1	1.4	1.7	3.2	9.2	5.0
批内 CV	1.8%	1.6%	2.5%	5.6%	3.5%	4.9%	2.7%	4.8%	4.5%	8.3%	8.1%	8%	1.0%	1.7%
批间 CV	5.1%	3.3%	3.1%	6.6%	3.1%	5.4%	6.0%	6.3%	5.2%	11.6%	11.8%	12%	2.9%	4.4%

表 7 低浓度氨基酸 QC 样本检测准确度评价

目标物	Ala	Val	Gly	Orn	Arg	Leu	Met	Phe	Tyr	Cit	Pro
测定均值	228.8	311.8	354.6	89.3	8.6	330.6	83.0	197.0	212.4	56.0	173.0
靶值	213.2	291.9	367.4	85.6	9.5	322.4	91.4	196.4	221.7	56.2	165.0
相对误差	7.3%	6.8%	-3.5%	4.3%	-9.7%	2.5%	-9.2%	0.3%	-4.2%	-0.4%	4.8%
2 倍 SD 靶值范围	159.6-266.8	213.5-370.19	283.9-450.8	55.4-115.9	5.6-13.4	238.7-406.1	69.2-113.6	140.7-252.2	153.8-289.5	39.4-72.9	112.8-217.2

表 8 低浓度氨基酸 QC 样本检测准确度评价

目标物	Ala	Val	Gly	Orn	Arg	Leu	Met	Phe	Tyr	Cit	Pro
测定均值	237.6	827.0	370.1	119.6	67.2	752.3	384.0	544.0	484.9	211.3	163.6
靶值	231.2	842.9	395.5	134.9	74.1	843.9	443.9	609.1	563.9	232.3	169.3
相对误差	2.8%	-1.9%	-6.4%	-11.4%	-9.3%	-10.9%	-13.5%	-10.7%	-14.0%	-9.0%	-3.4%

<b>2 倍 SD 靶值范</b>	184.2-	628.7-	307.7-	84.1-	47.6-	643.2-	360.5-	450.8-		169.4-	124.1-
<b>围</b>	278.3	1057.2	483.3	185.7	100.7	1044.6	587.2	769.5	417.9-729.8	295.3	214.6

表 9 低浓度肉碱 QC 样本检测准确度评价

目标物	C0	C2	C3	C4OH/C3DC	C4	C5OH/C4DC	C5	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
<b>测定均值</b>	16.7	15.7	3.5	0.3	1.1	1.0	0.5	0.4	0.5	0.3	0.3	0.4	3.4	1.4
<b>靶值</b>	18.8	17.7	3.9	0.3	1.1	1.2	0.6	0.5	0.5	0.4	0.4	0.5	3.9	1.4
<b>相对误差</b>	-11.2%	-11.5%	-9.0%	20.0%	-3.5%	-10.4%	-14.4%	-13.0%	-9.6%	-28.2%	-20.2%	-13.4%	-13.5%	-0.7%
<b>2 倍 SD 靶值</b>	14.6-													
<b>范围</b>	23.3	11.3-23.4	2.7-5.0	0.2-0.4	0.9-1.4	0.9-1.4	0.4-0.7	0.4-0.6	0.3-0.7	0.2-0.6	0.3-0.6	0.3-0.7	3.0-4.8	1.0-1.8

表 10 高浓度肉碱 QC 样本检测准确度评价

	C0	C2	C3	C4OH/C3DC	C4	C5OH/C4DC	C5	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
<b>测定均值</b>	36.7	32.9	11.6	0.8	4.8	2.9	2.6	1.8	2.2	1.4	1.7	3.2	9.2	5.0
<b>靶值</b>	38.2	35.5	12.0	1.0	4.7	2.8	2.8	2.0	2.3	1.9	2.0	3.5	10.1	4.8
<b>相对误差</b>	-4.1%	-7.3%	-3.6%	-20.6%	1.1%	3.3%	-7.8%	-8.5%	-5.3%	-25.9%	-15.3%	-9.3%	-8.9%	5.2%
<b>2 倍 SD 靶值</b>	28.3-	23.3-	8.1-		3.7-								7.3-	
<b>范围</b>	49.0	46.8	15.8	0.6-1.4	5.8	2.1-3.4	2.3-3.5	1.5-2.5	1.5-3.0	1.1-2.7	1.4-2.8	2.2-4.9	13.1	3.4-6.2

### 1.3 液相-三重四极杆质谱法进行新生儿遗传代谢病筛查的应用方案

**摘要：**遗传代谢性疾病是一类由于单基因缺陷而引起代谢途径阻断的疾病。许多遗传代谢性疾病对新生儿危害极大，因此是新生儿筛查的主要内容。串联质谱用于新生儿筛查是自 Guthrie 将细菌抑制法用于苯丙酮尿症筛查以来，新生儿筛查史上最重要的技术革新。本文建立了一种应用非衍生化液相-三重四极杆质谱法检测新生儿足跟干血斑中氨基酸及酰基肉碱的各项指标来进行遗传代谢缺陷筛查的技术。

**关键词：**新生儿筛查 液相-三重四极杆质谱仪 非衍生化法 氨基酸 酰基肉碱

国际新生儿遗传代谢病筛查发展趋势逐步提高到以串联质谱技术为中心的筛查。通过检测滤纸干血片中氨基酸和酰基肉碱浓度，进行氨基酸代谢、有机酸和脂肪酸代谢障碍等的筛查，使患儿得到早期诊断和及时治疗，避免体格和智力发育障碍。本文应用非衍生化样本处理的串联质谱技术（tandem mass spectrometry, MS/MS）检测新生儿足跟血干血斑中的氨基酸及酰基肉碱浓度，以便用于氨基酸、有机酸及脂肪酸代谢病的检测和筛查。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050CL 联用系统。

具体配置为 LC-20ADXR×2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30ACMP 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050CL 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver.5.82 色谱工作站；孵育震荡仪（Labsystems iEMS）。

### 1.2 分析条件

#### 1.2.1 液相色谱条件：

色谱柱：无，安装在线过滤器

自动进样器温度：4℃

流动相：新生儿筛查试剂盒流动相

进样量：1 μL

初始流速：0.1 mL/min

洗脱方式：流速梯度，见表 1

柱温：室温

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.10	Pumps	Total flow	0.05

0.60	Pumps	Total flow	0.12
0.61	Pumps	Total flow	1
1.00	Controller	Stop	

### 1.2.2 质谱条件:

离子源: ESI(+)

扫描模式: MRM

雾化气: 3.0 L/min

干燥气: 10.0 L/min

加热气: 10.0 L/min

加热模块: 400°C

接口温度: 350°C

DL 温度: 250°C

驻留时间: 10 ms

MRM: 见表 2

表 2 氨基酸、酰基肉碱及其同位素内标的 MRM 参数

MRM	Name	Precursor ion	Product ion	CE
1	Ala	90.2	44.0	-15
2	Ala IS	94.2	48.0	-15
3	Val	118.2	72.2	-14
4	Val IS	126.2	80.2	-14
5	Gly	76.1	30.0	-13
6	Gly IS	78.1	32.0	-13
7	Orn	133.2	70.2	-17
8	Orn IS	135.2	72.2	-17
9	Arg	175.2	70.2	-24
10	Arg IS	180.2	75.2	-24
11	Leu	132.2	86.1	-11
12	Leu IS	135.2	89.1	-11
13	Met	150.2	104.1	-13
14	Met IS	153.2	107.1	-13
15	Phe	166.2	120.1	-14
16	Phe IS	172.2	126.1	-14
17	Tyr	182.2	136.1	-14
18	Tyr IS	188.2	142.1	-14

19	Cit	176.2	113.1	-17
20	Cit IS	178.2	115.1	-17
21	Pro	116.2	70.1	-18
22	C0	162.3	103.1	-17
23	C0 IS	171.3	103.1	-17
24	C2	204.3	85.1	-19
25	C2 IS	207.3	85.1	-19
26	C3	218.3	85.1	-22
27	C3 IS	221.3	85.1	-22
28	C4OH/C3DC	248.3	85.1	-23
29	C4OH/C3DC IS	255.3	85.1	-22
30	C4	232.3	85.1	-20
31	C4 IS	235.3	85.1	-20
32	C5OH/C4DC	262.1	85.1	-23
33	C5OH/C4DC IS	291.1	85.1	-22
34	C5	246.3	85.0	-23
35	C5 IS	255.3	85.0	-22
36	C5:1	244.3	85.0	-23
37	C5DC/C6OH	276.1	85.1	-27
38	C6	260.1	85.1	-23
39	C6DC	290.1	85.1	-27
40	C8	288.1	85.1	-23
41	C8:1	286.1	85.1	-23
42	C10	316.2	85.2	-27
43	C10 IS	381.2	85.2	-24
44	C10:1	314.2	85.2	-27
45	C10:2	312.2	85.2	-27
46	C12	344.2	85.2	-27
47	C12:1	342.2	85.2	-27

48	C14	372.2	85.2	-24
49	C14:1	370.2	85.2	-27
50	C14:2	368.2	85.2	-27
51	C14OH	388.5	85.1	-26
52	C14OH IS	403.5	85.1	-27
53	C16	400.5	85.1	-27
54	C16:1	398.5	85.1	-32
55	C16:1OH	414.5	85.1	-32
56	C16OH	416.5	85.1	-32
57	C18	428.5	85.1	-29
58	C18:1	426.5	85.1	-29
59	C18:2	424.5	85.1	-29
60	C18:1OH	442.5	85.1	-29
61	C18OH	444.5	85.1	-29

### 1.3 材料与方法

#### 1.3.1 材料

**检测样本：**待检测样本为滤纸干血片样本。采集微量血滴于S&S903滤纸上，室温下自然晾干，-20℃冰箱保存待用。

**试剂：**非衍生化法串联质谱法新生儿筛查检测试剂盒，包含10种氨基酸及9种酰基肉碱的同位素内标（CIL品牌），流动相采用试剂盒提供的流动相。

#### 1.3.2 方法

**方法原理：**使用稳定同位素标记的氨基酸及酰基肉碱标准品的溶剂萃取滤纸干血片中的氨基酸及肉碱，然后用MS/MS系统进行分析。通过测定每个氨基酸及肉碱与其对应的同位素内标的离子峰强度，由已知水平的内标，即可通过岛津新生儿筛查软件自动计算出所测样本的氨基酸及酰基肉碱水平。

**样本前处理方法：**用直径3 mm打孔器在滤纸血片上取样，置于平底96孔板中，每孔加入含氨基酸及酰基肉碱同位素内标的甲醇溶液90 μL，覆膜，45℃密封孵育震荡（650~750r/min）45min，吸取75 μL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

## 2 结果讨论

### 2.1 标准品的 MRM 色谱图

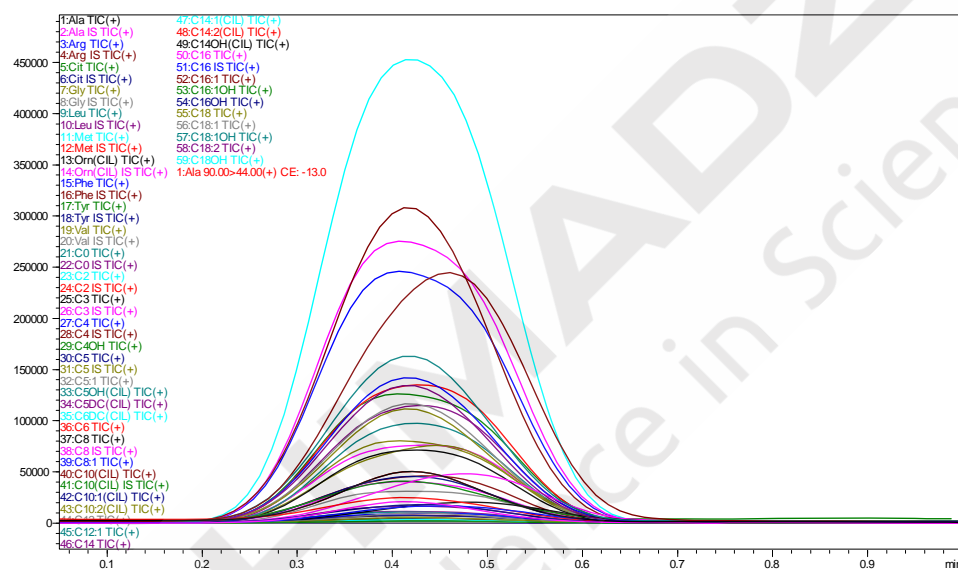
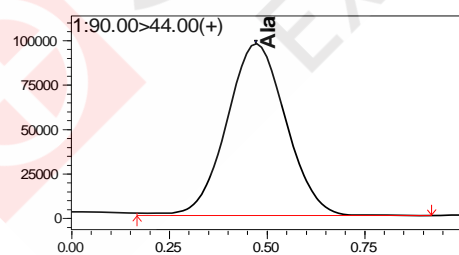
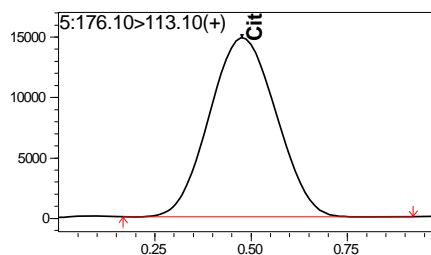


图2 含混合内标的提取液色谱图

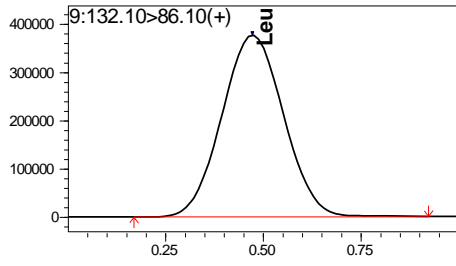
### 2.2 低浓度水平质控典型色谱图



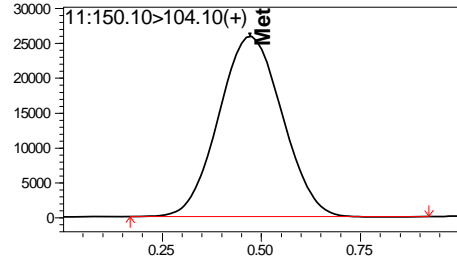
843  $\mu\text{mol/L}$



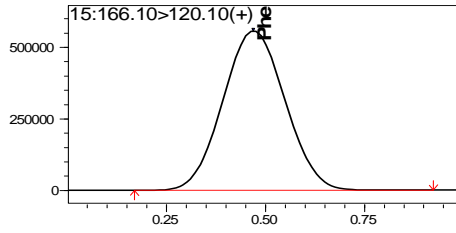
95  $\mu\text{mol/L}$



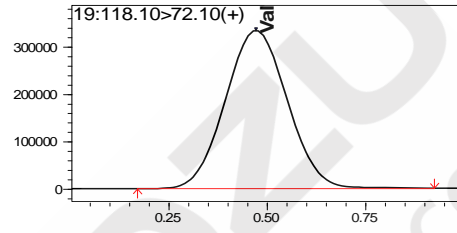
303  $\mu\text{mol/L}$



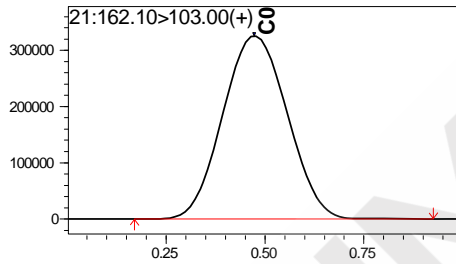
120  $\mu\text{mol/L}$



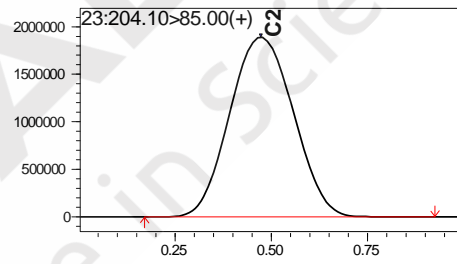
208  $\mu\text{mol/L}$



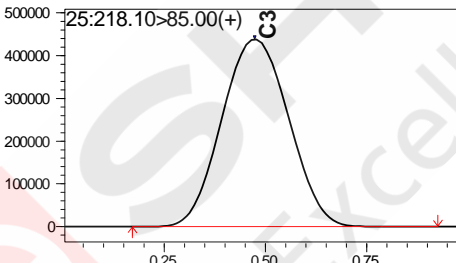
369  $\mu\text{mol/L}$



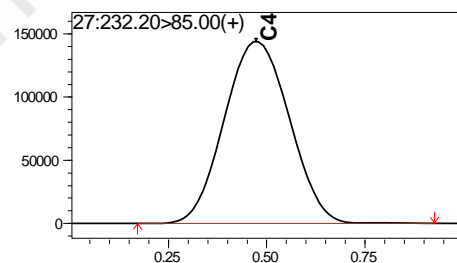
98.10  $\mu\text{mol/L}$



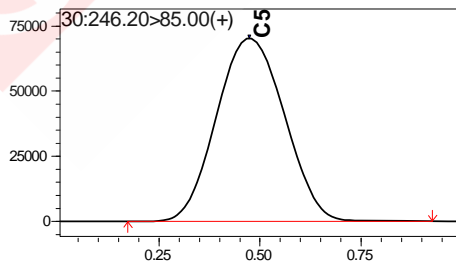
62.70  $\mu\text{mol/L}$



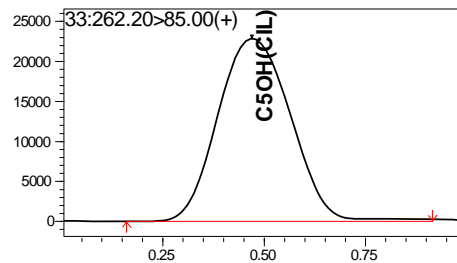
10.40  $\mu\text{mol/L}$



2.73  $\mu\text{mol/L}$



1.02  $\mu\text{mol/L}$



0.53  $\mu\text{mol/L}$

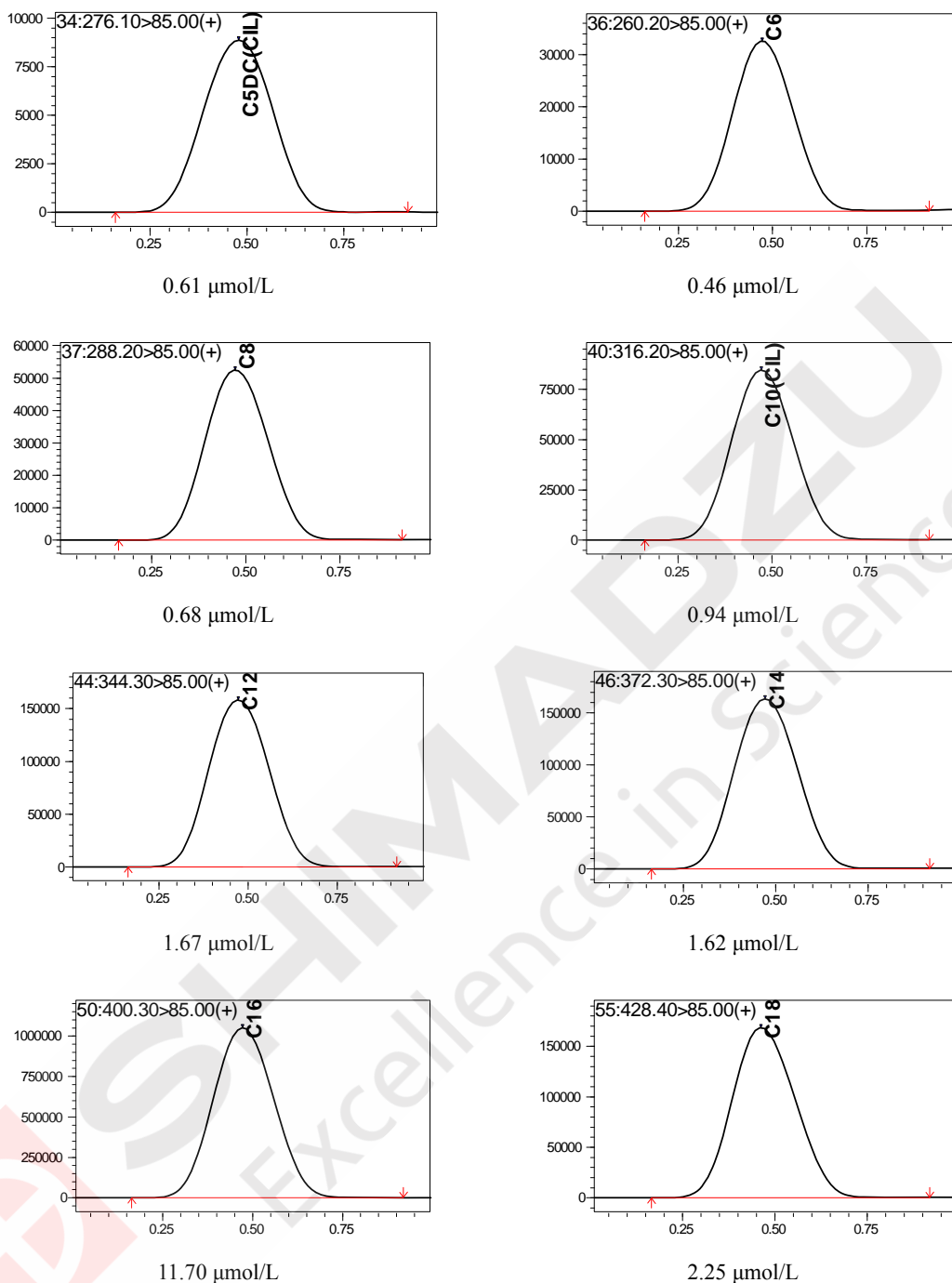


图 3 典型质谱图

### 2.3 校正因子计算

计算公式为：校正因子 = 靶值/实测值，具体结果见表 3 所示。

### 2.4 精密度考察

取试剂盒内提供的高、低 2 个浓度水平的质控品，每次各测定 25 个样本，连续测定 10 天，得出批内和批间变异系数(CV)，结果显示：氨基酸低值的变异系数范围为 2.04%-9.84%；氨基酸高值的变异系数范围为 1.34%-7.17%；酰基肉碱低值的变异系数范围为 1.82%-5.37%；

酰基肉碱高值的变异系数范围为 1.7%-3.72%。所得变异系数均在 15%以内，结果符合相关要求。计算结果详见表 4-7。

## 2.5 准确度考察

取试剂盒厂商提供的铂金埃尔默 (PE) 室间质控品进行检测，对其中的氨基酸和酰基肉碱进行分析，计算检测值与靶值的相对误差。结果显示：低浓度氨基酸 QC 样本检测值与靶值相对误差绝对值范围为 5.09%-8.29%；高浓度氨基酸 QC 样本检测值与靶值相对误差绝对值范围为 4.71%-9.81%；低浓度酰基肉碱 QC 样本检测值与靶值相对误差绝对值范围为 3.12%-9.96%；高浓度酰基肉碱 QC 样本检测值与靶值相对误差绝对值范围为 2.97%-8.90%，所有检测值与靶值的相对误差均在 10%范围内。计算结果详见表 8-11。

## 3 结论

本文利用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050CL 联用系统成功建立了非衍生化液相串联质谱法测定新生儿干血斑中氨基酸及酰基肉碱的浓度的方法。通过精密度、准确度的考察，证明该方法可以快速、准确、稳定地进行氨基酸及酰基肉碱含量的检测，能够用于液质法遗传代谢病筛查。

表 3 校正因子计算

	Ala	Cit	Gly	Leu	Met	Phe	Tyr	Val	C0	C2	C3	C4	C5	C5DC	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
<b>LQC 靶值</b>	843	95	814	303	120	208	353	369	98	61.7	10.4	2.73	1.02	0.61	0.4	0.6	0.9	1.6	1.6	11.7	2.25
															6	8	4	7	2		
<b>HQC 靶值</b>	1922	294	2232	734	425	628	1162	935	241	159.3	27.9	7.67	2.83	1.65	1.2	1.9	2.6	4.8	4.5	31.	4.97
															8		2	6	4	7	
<b>LQC</b>	521.1	88.8	683.7	287.	88.7	177.7	263.2	292.4	63.7	60.2	10.8	2.6	0.9	0.1	0.4	0.6	0.6	1.2	1.3	8.9	1.5
				2																	
<b>HQC</b>	1064.	247.	1408.	561.	278.4	485.7	770.3	641.2	139.	143.8	26.2	6.4	2.1	0.3	1.0	1.4	1.6	3.2	3.4	22.	3.0
	4	9	1	0				4												8	
<b>L-IF</b>	1.62	1.07	1.19	1.05	1.35	1.17	1.34	1.26	1.54	1.03	0.96	1.06	1.16	4.95	1.1	1.2	1.4	1.3	1.2	1.3	1.55
															4	1	5	4	0	1	
<b>H-IF</b>	1.81	1.19	1.59	1.31	1.53	1.29	1.51	1.46	1.73	1.11	1.07	1.21	1.32	6.28	1.2	1.3	1.6	1.5	1.3	1.3	1.65
															4	6	9	4	4	9	
<b>AVG</b>	1.71	1.13	1.39	1.18	1.44	1.23	1.42	1.36	1.63	1.07	1.02	1.13	1.24	5.62	1.1	1.2	1.5	1.4	1.2	1.3	1.60
															9	8	7	4	7	5	

注：单位=μmol/L 如使用 CIL 内标，由于缺少 C5DC 内标，PE 及 Chromsystem 质控计算出的 C5DC 校正因子均偏大，如使用 PE 及 Chromsystem 试剂盒，则不会出现此现象。

表 5 高浓度氨基酸 QC 精密度 CV 值

目标物	Ala	Cit	Gly	Leu	Met	Phe	Tyr	Val
PE-HQC-01	1945.90	251.22	1983.88	657.14	404.56	579.52	1072.00	856.00
PE-HQC-02	1859.40	258.40	1875.20	670.37	382.44	596.69	1112.36	869.25
PE-HQC-03	1732.21	282.28	1936.69	671.18	432.11	609.71	1079.59	867.44
PE-HQC-04	1808.92	309.59	1892.69	661.39	381.67	595.72	1115.38	862.94
PE-HQC-05	1780.39	278.24	2036.62	657.24	392.89	601.81	1095.91	863.35
PE-HQC-06	1776.95	279.72	1934.81	669.96	394.77	588.05	1082.76	896.25
PE-HQC-07	1778.44	289.81	2013.75	671.95	382.97	608.61	1137.95	873.08
PE-HQC-08	1839.61	313.53	1971.23	660.87	365.57	598.30	1096.70	882.28
PE-HQC-09	1825.87	267.78	1878.11	655.13	439.68	599.31	1069.26	869.36
PE-HQC-10	1853.85	270.82	2050.04	644.42	432.65	596.84	1077.00	880.77
AVG	1820.15	280.14	1957.30	661.97	400.93	597.46	1093.89	872.07
SD	59.58	20.09	64.20	8.95	25.56	8.89	22.25	11.64
CV	3.27%	7.17%	3.28%	1.35%	6.38%	1.49%	2.03%	1.34%

表 6 低浓度酰基肉碱 QC 精密度 CV 值

目标物	C0	C2	C3	C4	C5	C5DC	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
PE-LQC-01	65.32	10.80	2.89	1.11	0.70	0.47	0.75	0.97	1.75	1.64	12.18	2.28	104.39
PE-LQC-02	65.19	10.95	2.91	1.11	0.67	0.51	0.73	0.94	1.74	1.72	12.37	2.45	104.99
PE-LQC-03	62.87	11.60	2.83	1.10	0.69	0.48	0.75	1.09	1.95	1.85	11.33	2.22	105.74
PE-LQC-04	66.06	10.68	2.96	1.10	0.73	0.48	0.72	1.05	1.92	1.80	12.60	2.39	104.29
PE-LQC-05	62.34	11.61	2.71	1.07	0.70	0.49	0.70	1.08	1.75	1.67	12.74	2.32	104.37
PE-LQC-06	65.46	11.07	3.02	1.09	0.69	0.49	0.71	1.04	1.77	1.64	11.99	2.29	102.11
PE-LQC-07	64.65	11.04	2.72	1.04	0.69	0.46	0.70	1.02	1.74	1.70	11.70	2.20	106.16
PE-LQC-08	64.30	10.39	3.13	1.06	0.65	0.46	0.70	1.02	1.80	1.66	12.06	2.32	104.10
PE-LQC-09	63.96	10.70	2.87	1.14	0.77	0.50	0.75	1.02	1.82	1.78	11.52	2.35	104.17
PE-LQC-10	63.93	11.20	3.16	1.07	0.64	0.45	0.69	0.98	1.76	1.65	12.17	2.42	97.79
AVG	64.41	11.00	2.92	1.09	0.69	0.48	0.72	1.02	1.80	1.71	12.06	2.32	103.81
SD	1.17	0.39	0.15	0.03	0.04	0.02	0.02	0.05	0.08	0.07	0.45	0.08	2.38
CV	2.29%	1.82%	3.57%	5.16%	2.69%	5.37%	3.79%	3.42%	4.64%	4.24%	4.37%	3.74%	3.48%

表 7 高浓度酰基肉碱 QC 精密度 CV 值

目标物	C0	C2	C3	C4	C5	C5DC	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
PE-HQC-01	222.38	157.70	26.02	7.17	2.78	1.51	1.28	1.78	2.44	4.65	4.34	31.20	5.03
PE-HQC-02	226.95	149.77	26.71	7.14	2.59	1.45	1.16	1.72	2.43	4.58	4.38	31.10	4.95
PE-HQC-03	226.29	159.89	25.43	6.95	2.63	1.53	1.25	1.73	2.44	4.61	4.30	30.81	4.66
PE-HQC-04	219.71	153.31	25.80	7.23	2.75	1.52	1.24	1.76	2.46	4.68	4.21	29.54	4.67
PE-HQC-05	232.75	152.79	26.36	6.82	2.55	1.46	1.17	1.76	2.48	4.61	4.35	32.49	4.89
PE-HQC-06	228.05	155.74	27.28	7.33	2.72	1.52	1.25	1.80	2.57	4.79	4.45	28.91	4.68
PE-HQC-07	230.31	150.21	28.09	7.50	2.63	1.42	1.18	1.75	2.34	4.28	4.24	31.98	4.89
PE-HQC-08	228.76	151.38	26.83	7.29	2.61	1.45	1.23	1.94	2.30	4.28	4.13	30.67	4.88
PE-HQC-09	230.40	153.56	26.67	7.41	2.69	1.42	1.25	1.87	2.50	4.60	4.41	31.24	4.78
PE-HQC-10	226.37	154.31	27.53	6.96	2.64	1.48	1.26	1.77	2.44	4.49	4.33	29.65	4.76
AVG	227.20	153.87	26.67	7.18	2.66	1.48	1.23	1.79	2.44	4.56	4.31	30.76	4.82
SD	3.87	3.21	0.81	0.22	0.07	0.04	0.04	0.07	0.08	0.16	0.10	1.11	0.13
CV	1.70%	2.08%	3.05%	3.00%	2.74%	2.76%	3.41%	3.72%	3.11%	3.59%	2.25%	3.62%	2.64%

表 8 低浓度氨基酸 QC 样本检测准确度评价

目标物	Ala	Cit	Gly	Leu	Met	Phe	Tyr	Val
测定均值	891.11	100.33	950.37	338.94	127.70	218.58	373.77	397.61
靶值	843	95	884	313	120	208	353	369
相对误差	5.71%	5.61%	7.51%	8.29%	6.42%	5.09%	5.89%	7.75%

表 9 高浓度氨基酸 QC 样本检测准确度评价

目标物	Ala	Cit	Gly	Leu	Met	Phe	Tyr	Val
测定均值	1820.15	280.14	1957.30	661.97	400.93	597.46	1093.89	872.07
靶值	1922	294	2132	734	425	628	1162	935
相对误差	-5.30%	-4.71%	-8.19%	-9.81%	-5.66%	-4.86%	-5.86%	-6.73%

表 10 低浓度酰基肉碱 QC 样本检测准确度评价

目标物	C0	C2	C3	C4	C5	C5DC	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
测定均值	103.81	64.41	11.00	2.92	1.09	0.69	0.48	0.72	1.02	1.80	1.71	12.06	2.32
靶值	98	61.7	10.4	2.73	1.02	0.61	0.46	0.68	0.94	1.67	1.62	11.7	2.25
相对误差	5.93%	4.39%	5.81%	7.00%	6.80%	9.96%	4.47%	5.97%	8.41%	7.72%	5.67%	3.12%	3.18%

表 11 高浓度酰基肉碱 QC 样本检测准确度评价

目标物	C0	C2	C3	C4	C5	C5DC	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
测定均值	227.20	153.87	26.67	7.18	2.66	1.48	1.23	1.79	2.44	4.56	4.31	30.76	4.82
靶值	241	159.3	27.9	7.67	2.83	1.62	1.28	1.9	2.62	4.86	4.54	31.7	4.97
相对误差	-5.73%	-3.41%	-4.40%	-6.39%	-6.07%	-8.90%	-4.10%	-5.93%	-6.92%	-6.24%	-4.98%	-2.97%	-3.05%



SHIMADZU  
Excellence in Science

## 1.4 使用 LCMS-8050 衍生化法测定 DBS 中的氨基酸和酰基肉碱

**摘要:** 本文介绍了以衍生法作为前处理, 使用三重四极杆色谱质谱联用仪测定干血斑中的氨基酸和脂酰肉碱的方法。本方法灵敏度高, 分析时间短, 使用岛津专用新生儿筛查软件 Neonatal Solution 自动得到各组分的定量计算结果, 同时根据预设的限值, 自动标注超出限值的结果。

**关键词:** 氨基酸 脂酰肉碱 新生儿筛查

在新生儿筛查中高效液相色谱-三重四极杆串联质谱技术 (LC-MS/MS) 主要应用于血液中氨基酸、酰基肉碱两类化合物的检测。进行新生儿遗传代谢病筛查的血片 (Dried Blood Spot, DBS) 经过相应的前处理后置于 96 孔板中直接在液相色谱串联质谱仪中分析得到检测结果 (流程如图 1 所示)。

样品的前处理方法一般分为衍生化法和非衍生化法两大类, 本文为您介绍对血片进行衍生化处理后, 使用岛津 LCMS-8050 进行检测的方法。

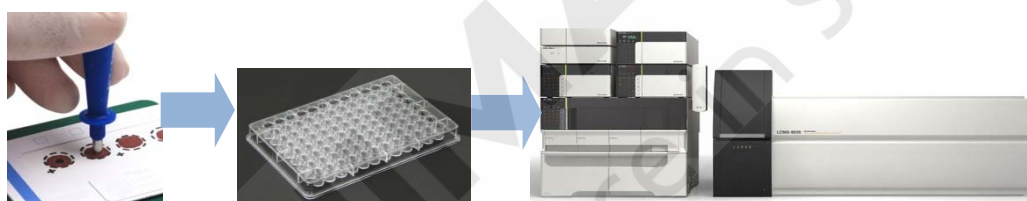


图 1 LC-MS/MS 进行新生儿筛查工作的一般流程

### 1 血片采集

采集干血样本需要熟练的采集、处理及运输技术。涉及新生儿样品, 其采集技术见 CLSI 文件 LA4-A5, 中国地区请参考《新生儿疾病筛查技术规范 (2010 版)》中《新生儿遗传代谢病筛查血片采集技术规范》。血样直接采集到滤纸上, 滤纸应与试剂盒质控品所使用的滤纸一致。

### 2 衍生化方法

衍生化法操作步骤详见说明书。

经过衍生化反应后目标化合物与盐酸正丁醇反应生成丁酯化氨基酸或丁酯化酰基肉碱, 图 2 和图 3 分别以 Phe 和 C14 为例说明氨基酸和酰基肉碱的衍生化反应过程。

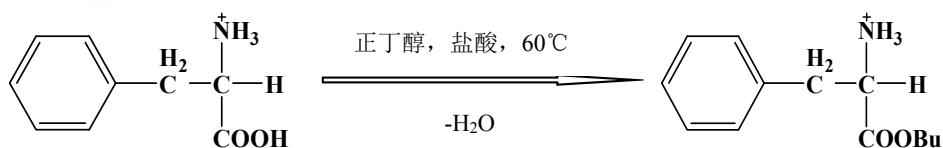


图 2 氨基酸衍生化反应

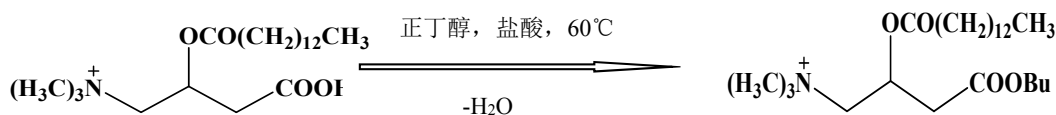


图3 酰基肉碱衍生化反应

### 3 仪器分析条件和离子流图

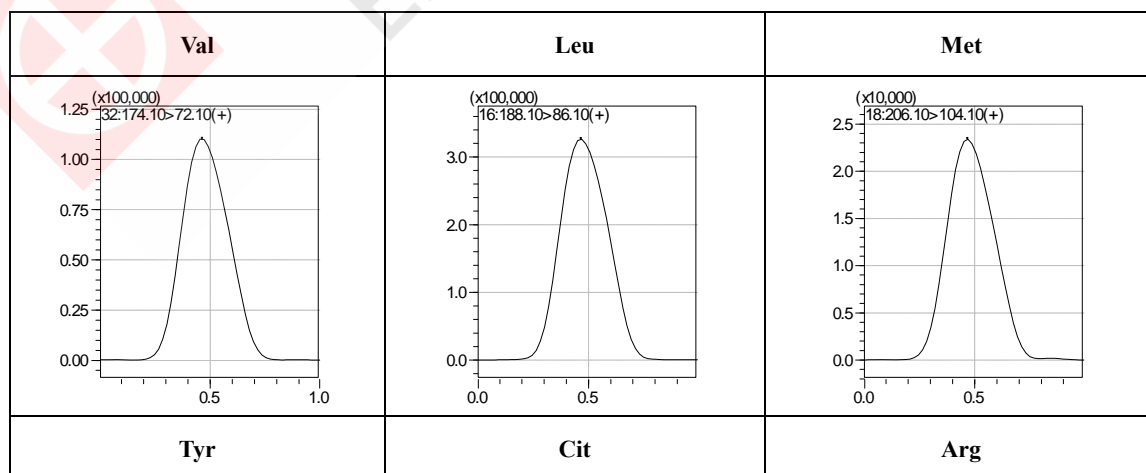
处理后的样品采用自动进样器进样，进样量 1 μL，进样后无需使用色谱柱进行分离，直接进入质谱检测，1 min 内即可完成一次样本分析。在待测样品中添加相应同位素内标，根据目标化合物与对应同位素内标峰面积或峰高的比值进行目标化合物的定量计算，本文采用多反应检测方式（MRM）采集数据。流动相采用乙腈：（0.02%甲酸水溶液）=80:20，流速时间程序和质谱条件分别如表 1 和表 2 所示，部分氨基酸和酰基肉碱的离子流图如图 4 所示。

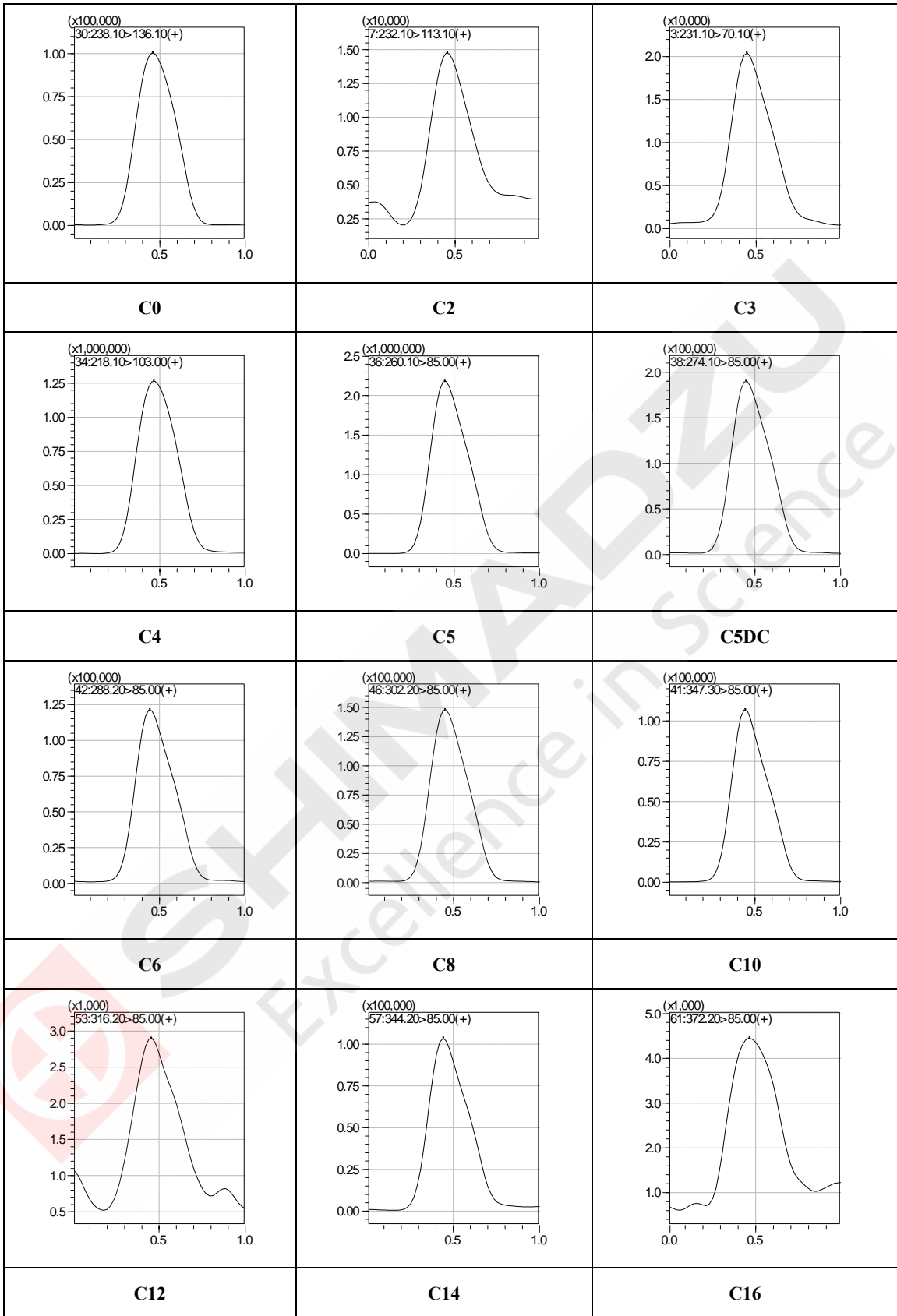
表 1 流速时间程序

Time	Module	Command	Value
0.10	Pumps	Total Flow	0.05
0.65	Pumps	Total Flow	0.10
0.66	Pumps	Total Flow	1.00
1.00	Controller	Stop	

表 2 质谱条件

条件	参数	条件	参数
分析仪器	LCMS-8050	碰撞气	氩气
离子源	ESI(+)	Interface 温度	300℃
离子源接口电压	4.5 KV	脱溶剂管管温度	250℃
加热气	空气 8 L/min	HB 温度	400℃
雾化气	氮气 2 L/min	扫描模式	多反应监测（MRM）
干燥气	氮气 10 L/min	驻留时间	10 ms





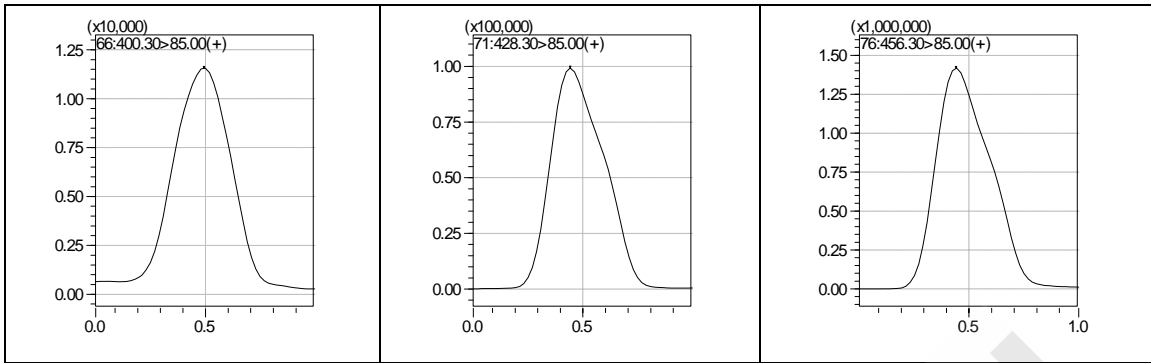


图 4 部分氨基酸和酰基肉碱的离子流图

#### 4 Neonatal Solution 和样品结果

采用 Neonatal Solution 新生儿筛查软件,对 LabSolutions 工作站采集得到的数据进行处理,自动得到各组分的定量计算结果,根据预设的限值,自动使用各种颜色标注超出限值的结果。其中,紫色标注部分表示检测结果超出标准限警告值,黄色标注部分表示检测结果达到标准提醒值而未超出警告值,结果如图 5 所示。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	<b>Neonatal Solution</b>								
2									
3	Analysis Time	2015/02/13							
4									
5		Date Acqui	Tray:Vial	Ala	Arg	Asp	Glu	Gly	Leu
6	Criteria Upper Limit (Caution)	-	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
7	Criteria Upper Limit (Notice)	-	-	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00
8	Criteria Lower Limit (Notice)	-	-	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
9	Criteria Lower Limit (Caution)	-	-	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
10	c1	2/13/2015	1:2	6.26	0.24	63.01	2.46	2.64	2.99
11	c2	2/13/2015	1:3	33.56	4.04	149.44	29.66	22.94	10.70
12	ns	2/13/2015	1:4	4.85	0.25	27.03	6.70	5.75	3.13

图 5 样品结果

## 1.5 气相色谱质谱联用法在有机酸尿症诊断中的应用

**摘要：**有机酸尿症是儿童遗传代谢性疾病中较常见的病种，是重要的遗传代谢疾病筛查项目。本文介绍了岛津公司开发的有机酸遗传代谢病分析方法和辅助诊断软件，可使用岛津 GC/MS 自动对 40 种有机酸代谢病进行分析并给出诊断结果，大大提高分析效率。

**关键词：**有机酸尿症 GC/MS 遗传代谢疾病筛查

有机酸尿症又称有机酸血症，是儿童遗传代谢性疾病中较常见的病种，是导致小儿神经系统损害的重要原因，迄今已发现了近 40 种疾患，总体发病率较高，如不能及时诊断、合理治疗，死亡率很高，存活者常遗留严重神经系统损害。

有机酸尿症临床诊断困难，目前应用 GC/MS 分析尿中有机酸是有机酸尿症筛查与诊断的可靠方法，已开始作为常规筛查手段运用于新生儿筛查或高危筛查。为了进一步提高分析速度和准确性，岛津公司开发了有机酸遗传代谢病辅助诊断软件，可自动对 40 种有机酸代谢病（表 1）给出诊断结果，大大提高了分析效率。

表 1 可自动诊断的 40 种有机酸代谢病

1	甲基丙二酸尿症	15	羟甲戊酸尿症	28	二羧基酸尿症
2	丙酸尿症	16	甘油尿症	29	3-羟基-二羧基酸尿症
3	$\beta$ -酮硫解酶缺乏症	17	草酸尿症	30	泽尔韦格氏综合征
4	异戊酸尿症	18	L-甘油酸尿症	31	卡纳万氏综合征
5	甲基巴豆酰辅酶 A 羧化酶 缺乏症	19	2-酮酯酸尿症	32	丙戊酸治疗
6	多种羧化酶缺乏症	20	黑酸尿症	33	羧甲半胱氨酸摄入
7	3-羟基-3-甲基戊二酸尿症	21	鸟氨酸氨甲酰基转移酶 缺乏症	34	延胡索酸酶缺乏症
8	3-甲基戊烯二酸尿症	22	乳清酸尿症	35	维生素 C 摄入
9	戊二酸尿症 I 型	23	枫糖酸尿症	36	中链脂肪酸去氢醇素 缺乏症
10	戊二酸尿症 II 型	24	酪氨酸尿症 I 型	37	苯丙酮酸尿症
11	3-羟基异丁酸尿症	25	酪氨酸尿症	38	甲基丙二酸半醛脱氢酶 缺乏症
12	5-氧合脯氨酸尿症	26	乳酸尿症	39	阿司匹林摄入
13	2-羟基戊二酸尿症	27	酮症	40	维生素 B1 缺乏病
14	4-羟基丁酸尿症				

## 1 分析条件

### 气相条件

色谱柱: DB-5 30 m × 0.25 mm × 1.0 μm

柱箱温度: 100°C (4 min)-(4°C/min)

-280°C (10 min)

进样口温度: 280°C

线速度: 43.0 cm/sec

分流比: 20:1

质谱条件离子源温度: 200°C

接口温度: 280°C

扫描范围: m/z 50~500

### 仪器与试剂

仪器: GCMS-QP2010 Ultra

试剂: 正构烷烃标样

软件: GCMSsolution

Inborn Errors of Metabolism

Screening System

## 2 样品前处理

取相当于含 0.2 mg 肌酐的尿样, 依次加入 MGA (托品酸) 和 C24 烷酸作为内标, 加水稀释到 2.0 mL。加入 2.5 N 的氢氧化钠调节 pH 值为 12~14, 添加 5% 盐酸羟胺在室温下反应 60 min, 加入 6.0 N 的盐酸调节 pH 值为 1.0, 用 6 mL 乙酸乙酯萃取两次, 分取有机相, 加无水硫酸钠 5 g 去除残余水分, 60°C 氮气吹干, 加入 100 μL BSTFA 和 TMCS (10:1), 80°C 下反应 30 min, 进行甲基硅烷化衍生。

## 3 实验结果

图 1-4 为 GC-MS 分析色谱图及诊断结果。

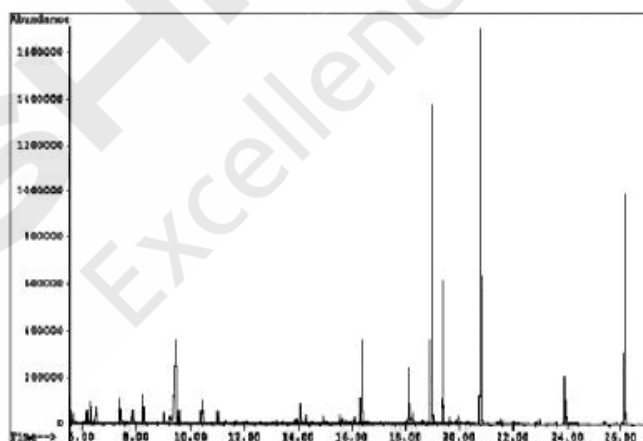


图 1 正常尿有机酸谱

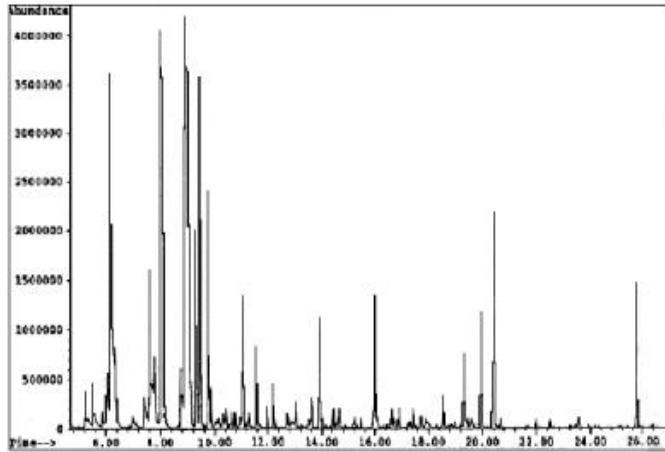


图2 甲基丙二酸尿症患者尿有机酸谱

ID	Compound Name	MRA	MARK	NORMAL	NORMAL (low)	NORMAL (high)	FACTOR
39	Succinic-2	15.49		32.70	6.50	65.80	0.47
42	Uracil-2	9.15		2.80	0.00	7.00	3.27
71	5-Oxoproline-2(pyroglutamic)	2.40		0.90	0.00	7.60	2.67
86	3-OH-phenylacetic-2	7.51	*	0.40	0.00	0.90	18.77
87	2-Ketoglutaric-OX-2(1)	6.23		26.10	3.00	102.90	0.24
88	4-OH-benzoic-2	44.73	*	3.80	0.00	7.80	11.77
89	4-OH-phenylacetic	13.03		27.10	8.60	73.20	0.48
90	2-Ketoglutaric-OX-2(2)	6.23		3.50	0.30	21.30	1.78
100	Aconitic-3	25.21		64.70	15.10	86.10	0.39
103	Homovanillic-2(HVA)	7.12		16.30	5.80	24.90	0.44
105	Hippuric-2	2.44		2.20	0.00	11.70	1.11
106	Isocitric-4	8.57		22.90	8.30	29.00	0.37
107	Citric-4	125.37		441.10	31.40	572.30	0.28
109	Hippuric-1	30.60		301.0	6.20	2841.0	1.02
133	Tetracosane(C24)	76.05		0.00	0.00	0.00	?
134	IS-2(tropic acid)	300.04	*	0.00	0.00	0.00	?

No. Disease suspected of

图3 正常尿有机酸诊断结果

ID	Compound Name	MRA	MARK	NORMAL	NORMAL (low)	NORMAL (high)	FACTOR
4	Glycolic-2	5.33	*	0.70	0.00	2.20	7.62
12	3-OH-isobutyric-2	11.29		2.50	0.00	9.00	4.51
14	2-Methyl-3-OH-butyric-1-2	197.76	*	0.10	0.00	0.30	1977.61
15	Malonic-2	25.17	*	0.00	0.00	0.10	?
18	Methylmalonic-2	197.76	*	0.30	0.20	3.60	659.20
32	Phosphoric-3	80.38	*	6.60	0.00	43.00	12.18
34	Ethylmalonic-2	4.56		0.90	0.00	6.20	5.07
36	Acetylglucine-1	13.94	*	0.00	0.00	0.10	?
39	Succinic-2	130.23	*	32.70	6.50	65.80	3.98
51	Glutaric-2	8.33		1.90	0.00	4.00	4.38
64	3-Methylglutaconic-2	6.22		1.50	0.00	2.90	4.15
73	Thiodiethylglycolic-2	258.27	*	0.00	0.00	0.00	?
76	5-OH-methyl-2-furoic-1	9.80	*	0.00	0.00	0.00	?
83	Phenylacetic-2	4.83		0.30	0.00	4.90	16.10
86	3-OH-phenylacetic-2	7.25	*	0.40	0.00	0.90	18.12
88	4-OH-benzoic-2	40.57	*	3.80	0.00	7.80	10.68
89	4-OH-phenylacetic	36.77		27.10	8.60	73.20	1.36
100	Aconitic-3	117.80		64.70	15.10	86.10	1.82
102	Vanillic-2	17.68	*	0.90	0.00	0.00	19.64
103	Homovanillic-2(HVA)	27.53		16.30	5.80	24.90	1.69
104	Azelaic-2	6.16		3.90	0.00	10.70	1.58
105	Hippuric-2	9.55		2.20	0.00	11.70	4.34
106	Isocitric-4	44.39		22.90	8.30	29.00	1.94
107	Citric-4	1107.92	*	441.10	31.40	572.30	2.51
109	Hippuric-1	63.74		301.0	6.20	2841.0	2.12
116	Sebacic-2	4.58		2.20	0.40	7.00	2.08
129	Uric-4	16.02		2.60	0.00	7.20	6.16
133	Tetracosane(C24)	82.53		0.00	0.00	0.00	?
134	IS-2(tropic acid)	300.40	*	0.00	0.00	0.00	?

No. Disease suspected of  
1 Methylmalonic acidemia

图4 甲基丙二酸尿症患者尿有机酸诊断结果

#### 4 结论

应用 GC-MS 检测尿中有机酸，是有机酸尿症筛查与诊断的可靠方法。应用有机酸遗传代谢病辅助诊断软件，可对 GC-MS 的结果进行自动分析，无需有机酸标样，即可对 40 种有机酸代谢病给出诊断结果，大大提高了有机酸尿症的诊断与筛查的效率。目前，GC-MS 分析技术已开始作为常规筛查手段运用于新生儿筛查或高危筛查，为有机酸尿症的早期诊断和治疗提供了很好的依据。



## 第二章 诊断标志物分析

### 2.1 引言

某一疾病的发生和恶化过程中，生物体的体表特征或主观感受虽然没有明显恶化，但疾病相关的生化指标可能会因病变细胞合成产生或因应激反应而异常升高。在现代医学诊断和研究中，常通过监测与某类疾病相关的生化指标，来确诊疾病、判断疾病分期，或者用来评价新药、新疗法在目标人群中的安全性及有效性，这类生化指标称为该疾病的诊断标志物。

同型半胱氨酸是存在于血浆中的一种氨基酸，正常状态下其在血浆中浓度为 5~15  $\mu\text{mol/L}$ ；因遗传或获得性因素，同型半胱氨酸浓度持续超出正常值范围，即成为“高同型半胱氨酸血症”；血浆中同型半胱氨酸的升高与心脑血管疾病的发病率呈正相关，对该类疾病的预防有重要意义。甲基丙二酸是维生素  $\text{B}_{12}$  缺乏的生物标志物，维生素  $\text{B}_{12}$  缺乏可导致不可逆的神经系统损害、贫血、骨质疏松症、脑血管及心血管疾病；甲基丙二酸也是甲基丙二酸血症这类疾病的一种特殊诊断标志。糖化血红蛋白是人体血液中红细胞内的血红蛋白与血糖结合的产物，能够反映过去 2~3 个月血糖控制的平均水平，不受偶尔一次血糖升高或降低的影响，对糖化血红蛋白进行测定，可以比较全面地了解过去一段时间的血糖控制水平。血液中 1,5-脱水葡萄糖醇对血糖的变化是极其敏感的，可以实时反映血糖的变化，因此 1,5-脱水葡萄糖醇也可以用作一种短期血糖控制的标志物。

用现代分析技术手段来检测诊断标志物可以在生物体受到严重毒性伤害之前提供早期警报，使医生尽早确诊疾病并对症下药，起到防微杜渐的效果。基于稳定同位素稀释的 LC-MS/MS 分析方法确保了准确度和精密度，同时有非常高的灵敏度、选择性和抗干扰能力，是目前较受推崇的诊断标志物分析方法。

本章介绍了 LC-MS/MS 方法测定血浆中总同型半胱氨酸的含量、血清中甲基丙二酸、血液中糖化血红蛋白及血清中 1,5-脱水葡萄糖醇的含量，供相关技术人员参考。

## 2.2 LCMS-8060 测定人血浆中的总同型半胱氨酸

**摘要：** 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用建立了人血浆中总同型半胱氨酸的检测方法。样品经处理后，用超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8060 在 1.5 min 内完成定量分析。同型半胱氨酸在人血清中 0.794~6.86 mg/L 内线性良好，判定系数大于 0.9996；使用试剂盒内的标定浓度为 1.22 mg/L、3.49 mg/L 的人血浆质控样本进行了批内批间的精密度实验，实验结果表明批内批间的精密度 RSD 均小于 4.238%；分别考察了进样器放置稳定性和-20℃放置的稳定性，结果表明样品在该条件下存放时稳定性良好。

**关键词：** 血浆 同型半胱氨酸 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 称高半胱氨酸，为蛋氨酸代谢的中间产物。据报道，遗传因素、环境因素和某些疾病、药物均可导致体内 Hcy 的升高，而血中 Hcy 的积蓄可导致血管损害，Hcy 已被公认为是一种心血管致病因子。目前常用的体内 Hcy 分析方法可分为免疫法和色谱法两大类。免疫法的测试操作相对简便，但其专用试剂大多按人份计算，价格较贵。而色谱法大多采用通用仪器和试剂，其检测的专一性强而技术要求较高，操作复杂、费时。本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用，建立了以 D4-Hcy 为内标的体内 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。本文建立了一种适用于人血浆样本的 Hcy 的分析方法，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。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 (输液泵)，DGU-20A5R (在线脱气机)，SIL-30ACMP (自动进样器)，CTO-20AC (柱温箱)，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.82 色谱工作站。

#### 1.2 分析条件

##### 1.2.1 液相色谱条件

色 谱 柱： Discovery HS F5-3 (2.1 mmI.D. ×150 mmL, 3 μm)

流 动 相： A 相- (0.1%甲酸) 水， B 相- (0.1%甲酸) 乙腈

流速：0.50 mL/min

柱温：40℃

进样体积：0.5 μL

洗脱方式：梯度洗脱，初始比例 5%B

表 1 通用梯度洗脱程序

Time (min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	5
2.00	Pumps	Pump B Conc.	35
3.00	Pumps	Pump B Conc.	90
3.01	Pumps	Pump B Conc.	5
5.00	Controller	Stop	

### 1.2.2 质谱条件

分析仪器：LCMS-8060

离子源：ESI +

雾化气流速：3.0 L/min

加热气流速：10.0 L/min

接口温度：300℃

DL 温度：250℃

加热模块温度：450℃

干燥气流速：10.0 L/min

扫描模式：多反应监测（MRM），MRM 参数见表 2

表 2 化合物信息及 MRM 参数

编号	名称	CAS.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	HCY	454-29-5	136.20	90.20*	-29.0	-13.0	-10.0
				56.25	-29.0	-19.0	-11.0
2	D4-HCY	-	140.15	94.20	-11.0	-12.0	-10.0

\*表示定量离子

### 1.3 样品制备

使用商业化的临床总同型半胱氨酸试剂盒 RECIPE（MS2013、MS2012 和 23082, Germany）。

该试剂盒包含以下部分：

内标：25  $\mu\text{g}$  D4-同型半胱氨酸（根据试剂盒配制要求，溶于 5 mL 超纯水）；

标准物质：4 个水平的血清标准样品（浓度分别为 0.794、1.35、2.74、6.86 mg/L），根据试剂盒的要求溶于 1 mL 超纯水中；

质控样品：共两个水平血浆质控样品，浓度分别为 1.22 mg/L（靶值 0.976-1.46 mg/L）和 3.49 mg/L（靶值 2.79-4.19 mg/L），根据试剂盒的要求溶于 3mL 超纯水中。

样品前处理方法：取 50  $\mu\text{L}$  样品加入 40  $\mu\text{L}$  内标后加入 50  $\mu\text{L}$  还原剂，混匀后 200  $\mu\text{L}$  乙腈进行蛋白沉淀，振匀后高速离心取上清进行分析。

## 2 结果讨论

### 2.1 标准样品扫描质谱图

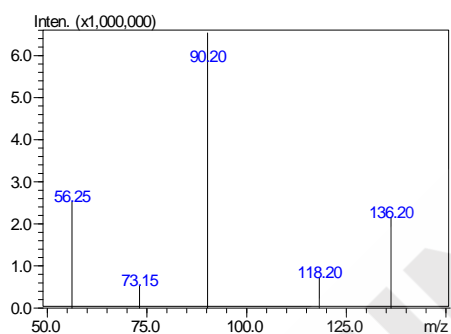


图 1 Hcy 二级扫描质谱图

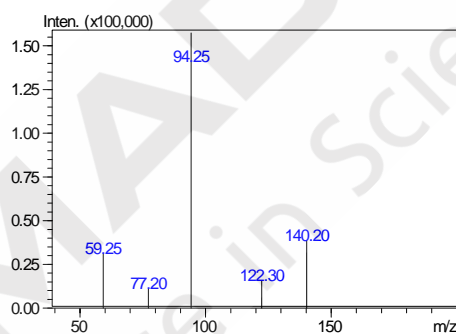


图 2 内标二级扫描质谱图

### 2.2 标准样品的 MRM 色谱图

标准样品的 MRM 色谱图：

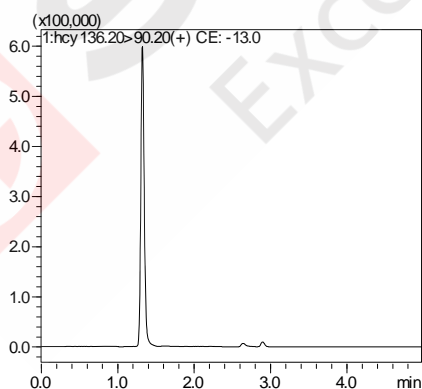


图 3 Hcy MRM 色谱图(0.117 mg/L)

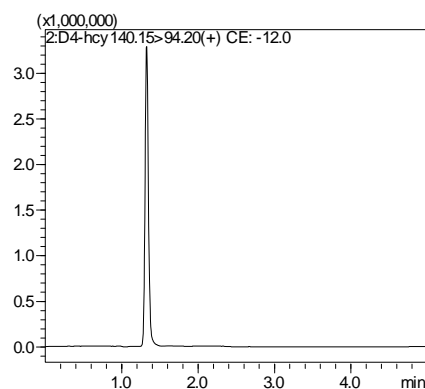


图 4 内标 MRM 色谱图(0.588 mg/L)

### 2.3 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

得到的色谱图如下所示：

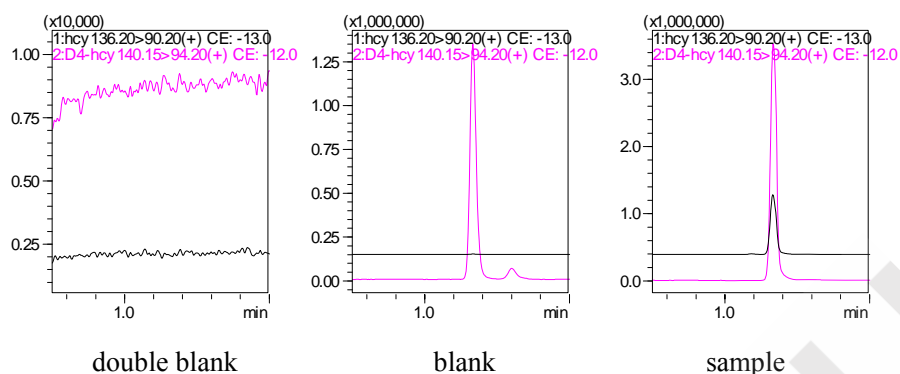


图 5 Hcy 专属性色谱图

## 2.4 线性关系

连续三天对试剂盒内的标准品，按 1.2 中的分析条件进行了 5 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，5 次分析拟合的标准曲线标线如下图所示。在 0.794~6.86 mg/L 浓度范围内线性良好。线性方程、线性范围和判定系数见表 3。

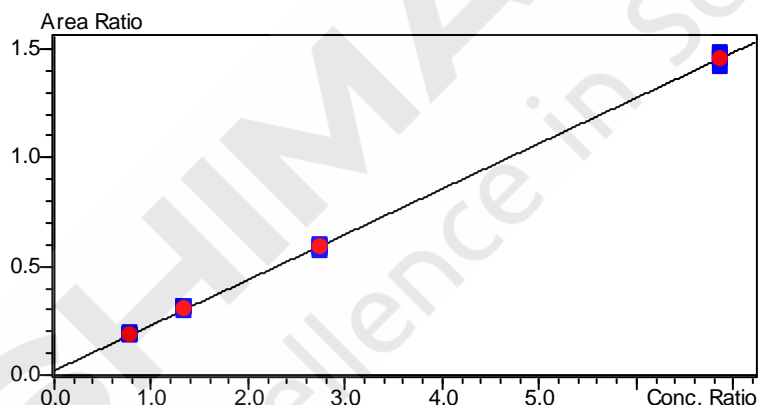


图 6 标准工作曲线(n=5)

表 3 校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	线性范围 mg/L	准确度 (%)	判定系数 $r^2$
1	批 1	$Y = (0.203677)X + (0.0224451)$	0.794~6.86	99.5~100.5	0.9999
2	批 2	$Y = (0.209386)X + (0.0173543)$	0.794~6.86	97.1~103.4	0.9996
3	批 3	$Y = (0.208276)X + (0.0226225)$	0.794~6.86	98.1~102.7	0.9999
4	批 4	$Y = (0.211866)X + (0.0211702)$	0.794~6.86	99.5~100.6	0.9999
5	批 5	$Y = (0.212178)X + (0.0195130)$	0.794~6.86	98.3~102.6	0.9998
6	拟合	$Y = (0.209077)X + (0.0206210)$	0.794~6.86	96.7~103.7	0.9999

## 2.5 检出限和定量限

对浓度为0.794 mg/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 4 所示。

表 4 检出限和定量限

No.	名称	信噪比	检出限 (mg/L)	定量限 (mg/L)
1	Hcy	8976.67	0.00026	0.00087

## 2.6 质控样本准确度考察

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样本进行分析,两个浓度的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。

表 5 质控样本一测试结果

HCY	靶值范围 (mg/L)	Conc. (mg/L)
QC1-1		1.234
QC1-2		1.134
QC1-3	0.976-1.46	1.134
QC1-4		1.130
QC1-5		1.124
%RSD		4.04

表 6 质控样本二测试结果

HCY	靶值范围 (mg/L)	Conc. (mg/L)
QC2-1		3.558
QC2-2		3.557
QC2-3	2.79-4.19	3.633
QC2-4		3.338
QC2-5		3.348
%RSD		3.87

## 2.7 批内、批间精密度实验

连续三天对试剂盒中的质控样本(两个浓度,每个浓度 5 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均小于 4.238%。

表 7 批内批间精密度结果 (mg/L)

理论值	批内精密度 (n=5)		批间精密度 (n=15)	
	实测值±SD	RSD%	实测值±SD	RSD%
1.22	1.185±0.0476	4.015	1.181±0.05	4.238
3.49	3.541±0.106	2.994	3.511±0.116	3.313

## 2.8 稳定性实验

对试剂盒内的生物样本按照要求进行复溶后, 取部分血浆样品进行前处理后进行进样器放置 4 h 和 12 h 稳定性考察; 另外对血浆样品进行-20℃冰箱放置 1 天和 2 天的稳定性考察, 结果如下表所示:

表 8 进样器放置稳定性考察结果

0 时实测浓度 (mg/L)	放置时间 (hour)	测定浓度 (%)
1.185	0	100.00
	4	100.25±4.14
	12	98.31±3.86
3.541	0	100.00
	4	98.30±1.88
	12	101.24±1.99

表 9 -20℃放置稳定性考察结果

0 时实测浓度 (mg/L)	放置时间 (day)	测定浓度 (%)
1.185	0	100.00
	1	100.59±5.19
	2	98.40±4.04
3.541	0	100.00
	1	97.63±3.16
	2	99.80±3.87

## 3 结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定人血浆中总同型半胱氨酸。使用 RECIPE 试剂盒的内标、标准曲线及质控样本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，5 个批次拟合的标准曲线判定系数  $R^2$  为 0.9999，批内和批间精密度均小于 4.238%，进样器和冰箱放置的稳定性满足样品检测的需要。

此方法快速、简单、选择性强和灵敏度高，可以为临床人血浆中总同型半胱氨酸的检测提供很好的借鉴和参考。



## 2.3 超高效液相色谱三重四极杆质谱法测定血清中甲基丙二酸的含量

**摘要：** 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用，建立了血清中甲基丙二酸的定量检测方法，并依据临床检验相关指导原则完成了方法学验证。实验结果表明，该方法对血清中甲基丙二酸测定的可报告范围为 20-1280 nM，日内和日间精密度的 (%CV) 分别为 2.7-7.3%、5.4-7.0%，准确度范围为 87.4-112.3%。该方法分析速度快、稳定性和准确度高，适用于血清中甲基丙二酸的定量分析，能够为临床检验行业的从事人员提供参考。

**关键词：** LCMS-8050 甲基丙二酸 血清 临床检验

在细胞线粒体中，甲基丙二酸 (MMA) 是丙酸向琥珀酸 (SA) 转化过程中的代谢中间体。其中甲基丙二酰变位酶催化 MMA 重排为 SA，而维生素 B<sub>12</sub> (VB<sub>12</sub>) 作为甲基丙二酰变位酶的一个不可或缺的辅酶，其缺乏将导致机体中 MMA 水平增加。此外，VB<sub>12</sub> 在红细胞形成和维护神经机能中起到重要作用，其缺乏可导致造血和神经系统紊乱，此类疾病可通过早期诊断而及时治疗。

然而，血清或血浆中 VB<sub>12</sub> 含量并不能完全反应机体组织中 VB<sub>12</sub> 水平，常出现机体 VB<sub>12</sub> 缺乏但血中含量仍然正常。此外，VB<sub>12</sub> 对光敏感，稳定性较差。MMA 稳定性比 VB<sub>12</sub> 好，更为重要的是当机体 VB<sub>12</sub> 出现早期缺乏时，MMA 立刻随之增加，而此时血液中 VB<sub>12</sub> 含量未出现变化。因此，血清中 MMA 含量是指示机体 VB<sub>12</sub> 是否缺乏的重要生物标记物。

对此，我们使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用，并采用 d3-MMA 为内标，建立了血清中 MMA 的定量分析方法，并结合临床检验相关指导原则，完成了方法的全验证，以供相关从业人员参考。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为：LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.86 色谱工作站。

#### 1.2 分析条件

##### 液相色谱条件

色 谱 柱 : PC HILIC (2.0 mm I.D. × 150 mm L., 5 μm)  
流 动 相 : A 相-水;

B 相-乙腈（含 0.1%甲酸）

流 速 : 0.5 mL/min

柱 温 : 55°C

进 样 量 : 10  $\mu$ L

自动进样器温度 : 15°C

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 98%, 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.80	Pumps	Pump B Conc.	98
2.50	Pumps	Pump B Conc.	10
3.50	Pumps	Pump B Conc.	10
3.60	Pumps	Pump B Conc.	98
5.50	Controller	Stop	

#### 质谱条件:

离 子 源 : ESI (-)

加热模块温度 : 440°C

雾化气流速 : 3.0 L/min

干燥气流速 : 10.0 L/min

加热气流速 : 10.0 L/min

扫描模式 : 多反应监测 (MRM)

接口温度 : 400°C

驻留时间 : 122 ms

D L 温度 : 180°C

M R M 参 数 : 见表 2

表 2 MRM 参数

名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q <sub>1</sub> Pre Bias (V)	CE (V)	Q <sub>3</sub> Pre Bias (V)
MMA	516-05-2	116.85	55.05*	10.0	23.0	19.0
			73.05	10.0	23.0	13.0
d3-MMA	-	120.00	58.05*	10.0	23.0	19.0
			76.05	10.0	23.0	13.0

\*表示定量离子对

### 1.3 样品制备

#### 1.3.1 标准工作曲线配制

称取 4.0 g BSA 溶于 100 mL PBS, 配制 4% BSA 溶液作为血清的替代基质溶液, 用于配制标准工作曲线。用甲醇配制浓度为 50 mM 的 MMA 标准储备液, 随后用甲醇将混合标准溶液逐级稀释成浓度为 2.0  $\mu$ M、4.0  $\mu$ M、8.0  $\mu$ M、16  $\mu$ M、32  $\mu$ M、64  $\mu$ M、128  $\mu$ M 的标准工作液。取

10  $\mu\text{L}$  标准工作液加入 990  $\mu\text{L}$  替代基质溶液，依次配制标准曲线。用甲醇配制浓度为 10  $\text{mM}$  d3-MMA 内标储备液，再用甲醇稀释为浓度为 10  $\mu\text{M}$  的内标工作液。

### 1.3.2 样品前处理方法

萃取溶液配制：1  $\text{mL}$  磷酸溶于 29  $\text{mL}$  甲基叔丁醚；

取 990  $\mu\text{L}$  样品于 1.5  $\text{mL}$  离心管中，加入 10  $\mu\text{L}$  的内标溶液，涡旋溶解。再取出 200  $\mu\text{L}$  样品+800  $\mu\text{L}$  萃取溶液，涡旋萃取收集有机层，氮吹挥干后，100  $\mu\text{L}$  乙腈复溶，10000  $\text{r}/\text{min}$  离心 15  $\text{min}$ ，取上清进样分析。

日内精密度和准确度考察：一天内制备 4 批不同浓度（LOQ、MOQ 和 HOQ）的样本，每批当中不同浓度的样品平行处理 5 个。样品进样分析后，统计精密变异系数（CV）和准确度。

日间精密度和准确度考察：每天制备 2 批不同浓度（LOQ、MOQ 和 HOQ）的样本，每批当中不同浓度的样品平行处理 5 个，连续考察 3 天。统计精密变异系数（CV）和准确度。

## ■ 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图

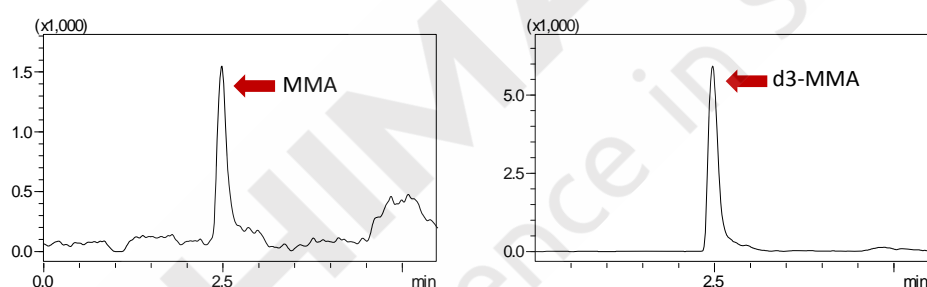


图 1 替代基质中 MMA (20  $\text{nM}$ ) 及其内标物 (100  $\text{nM}$ ) 的 MRM 色谱图

### 2.2 替代基质与血清基质一致性验证

考虑到正常人血清中含有一定量的 MMA，空白血清样品经处理分析后，检测到一定量的 MMA（如图 2 所示）。因此不宜使用空白血清配制 MMA 标准曲线，而考虑用 4% BSA 溶液作为血清的替代基质溶液。在此，需要对替代基质与血清基质进行一致性验证。

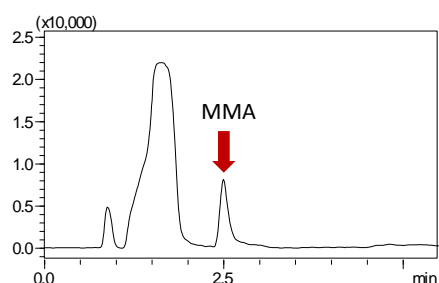


图 2 空白血清样品分析结果

#### 2.2.1 替代基质标曲和血清标曲的比较

分别用血清和 4% BSA 溶液依照“标准工作曲线配制”中的方法，配制标准曲线溶液，样品

经过前处理后，进样分析，分别绘制出血清基质标曲和替代基质标曲（如图 3 和 4 所示）。

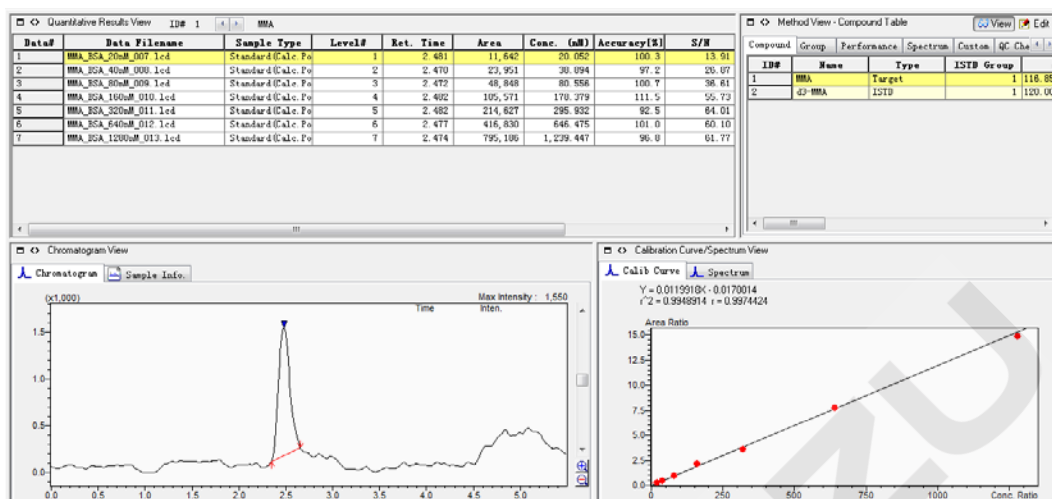


图 3 MMA 4% BSA 溶液标准曲线

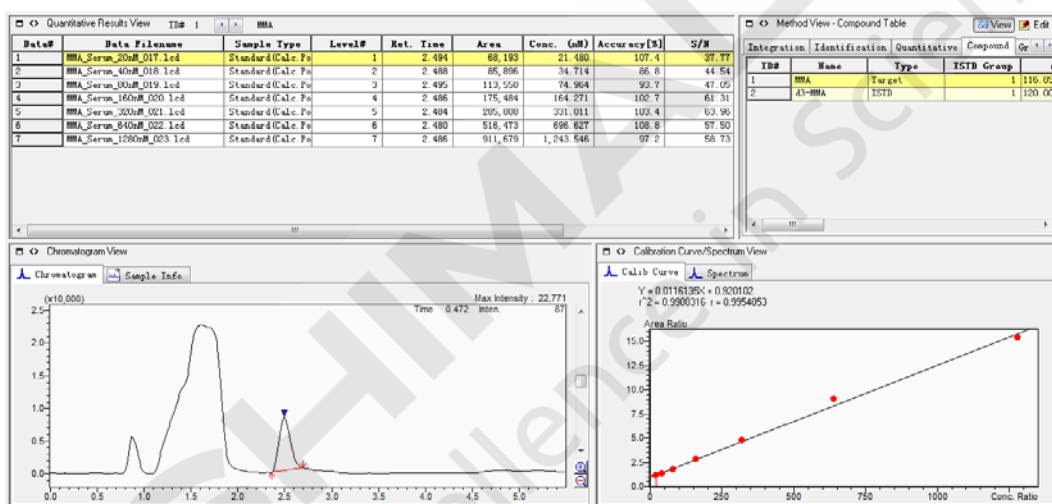


图 4 MMA 血清标准曲线

从结果上看，4% BSA 溶液配制的替代基质标曲和血清基质标曲相比，曲线斜率基本相当（如表 3 和图 5 所示）。此外，依据标准加入法外推得到 X 轴负截距，可以计算出血清中 MMA 的含量为 79.2 nM。

表 3. 替代基质标曲和血清基质标准曲线比较

目标物	标准曲线	
	4% BSA	血清
MMA	$Y=0.0119918X-0.0170014$	$Y=0.0116135X+0.920102$

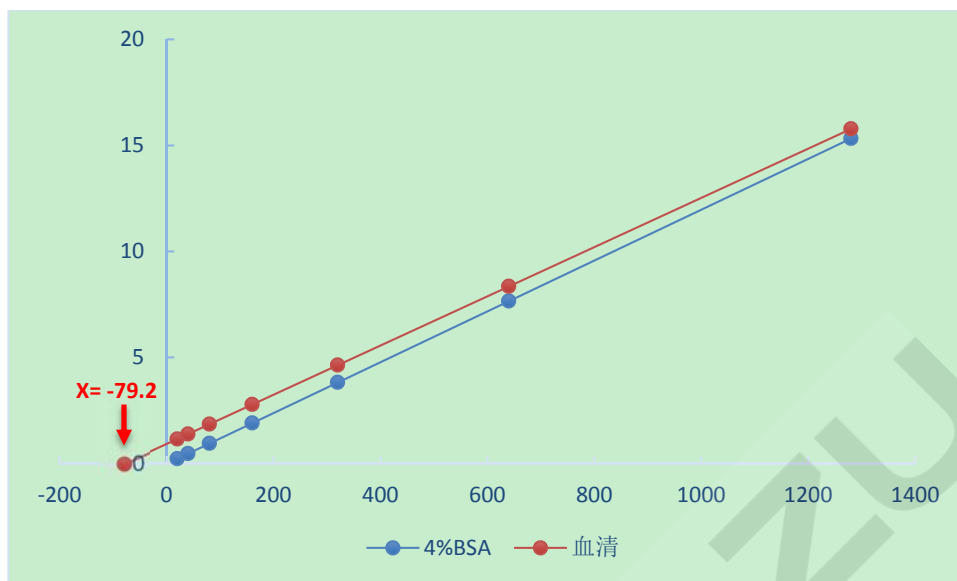


图 5 MMA 替代基质标曲和 MMA 血清标曲比较

### 2.2.2 替代基质标曲测定血清及血清加标样品中 MMA 含量

分别制备血清及血清加标样品（加入 MMA 浓度为 20 nM、160 nM 和 1000 nM），依照上述前处理方法，各浓度样品平行处理 6 份，进样分析后根据替代基质标曲计算目标物浓度，结果如表 4 所示。

表 4. 血清及血清加标样品中 MMA 含量测定结果

项目	血清 (E)	血清加标 (E+20 nM)	血清加标 (E+160 nM)	血清加标 (E+1000 nM)
检测均值 (nM)	78.9	102.0	239.2	1041.3
理论值 (nM)	79.2	99.2	239.2	1078.9
样品数量 (n)	6	6	6	6
相对误差 (%RE)	-0.4	2.8	0.0	-3.5
变异系数 (%CV)	3.2	2.1	2.9	3.4

从结果上看，使用替代基质标曲测定各组样品，其检测均值和理论值相对误差均 $<15\%$ ，变异系数 $<15\%$ ，均在可接受范围之内。

### 2.2.3 替代基质稀释血清基质

采用替代基质稀释血清基质，分别测定不同稀释倍数下得到的空白基质中内源性物质 MMA 的浓度，该浓度与理论值的偏差在接受范围内（相对误差均 $<15\%$ ，变异系数 $<15\%$ ），结果如表 5 所示。

表 5. 不同稀释倍数下血清中 MMA 含量测定结果

项目	1.25 倍稀释	2.5 倍稀释	4 倍稀释
检测均值 (nM)	62.6	34.9	19.8
理论值 (nM)	63.4	31.7	19.8
样品数量 (n)	6	6	6

相对误差 (%RE)	-1.3	10.1	0
变异系数 (%CV)	4.1	4.3	2.5

### 2.2.4 小结

综上所述，在血清中 MMA 的检测实验中，4% BSA 溶液和血清配制的标准曲线，二者斜率基本一致。替代基质标曲测定血清和血清加标样品，检测结果与理论值偏差在可接受范围内。此外，采用替代基质稀释血清，对不同稀释倍数下的样品测定结果，仍然表现出良好的准确度和精密度。因此，4% BSA 溶液作为血清替代基质，用于配制 MMA 标准曲线或质控样品。

### 2.3 线性范围及其验证

使用 4% BSA 溶液配制标准曲线，按上述处理方法和分析条件，采用内标法建立标准曲线。如图 6 所示，MMA 在 20-1280 nM 的线性浓度范围内，线性相关性良好，相关系数 r 分别为 0.9974，准确度范围分别为 92.5-111.5%。

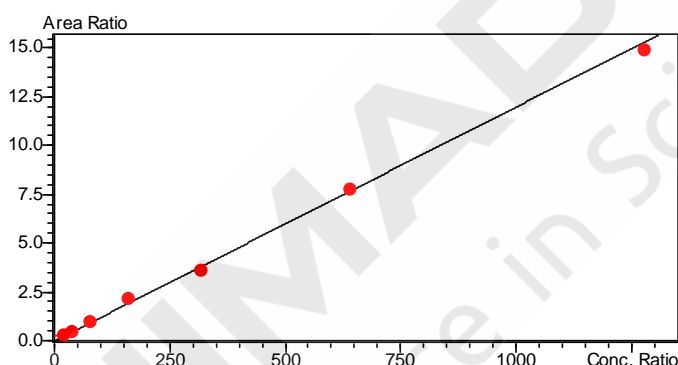


图 6 MMA 的替代基质标准曲线

确定线性范围后，还需要对线性范围进行进一步验证。配制上限浓度 (H, 1280 nM) 和下限浓度 (L, 20 nM) 各 1 例，按照 L、4L+1H、3L+2H、2L+3H、1L+4H、H 的体积比，混合成 6 个不同浓度的样品，每个样品测定 2 次。以理论浓度值为 X，测定浓度均值为 Y，计算回归方程  $Y=bX+a$  (如图 7 所示)。线性方程相关系数  $r \geq 0.975$ ，b 在 0.97-1.03 范围内，表明实验结果可接受。

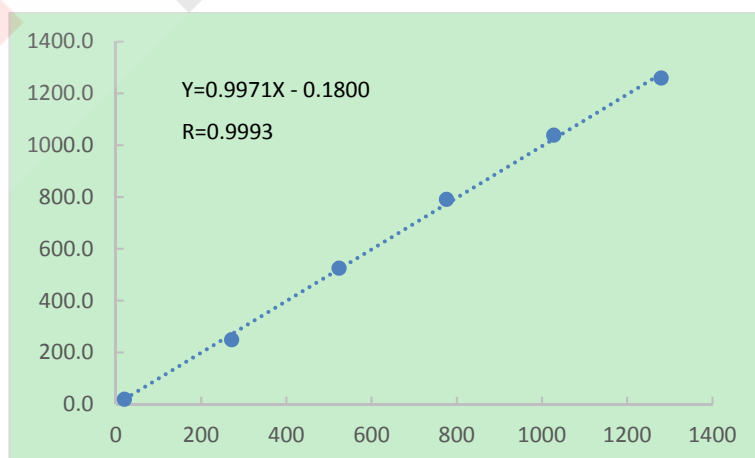


图 7 MMA 的线性范围验证

## 2.4 特异性验证

分别考察空白替代基质、空白替代基质加内标和 20 nM 替代基质加标样品，结果表明，替代基质对目标物 MMA 及其内标的检测均无干扰，同时内标 d3-MMA 亦不干扰 MMA 的检测（见图 8）。

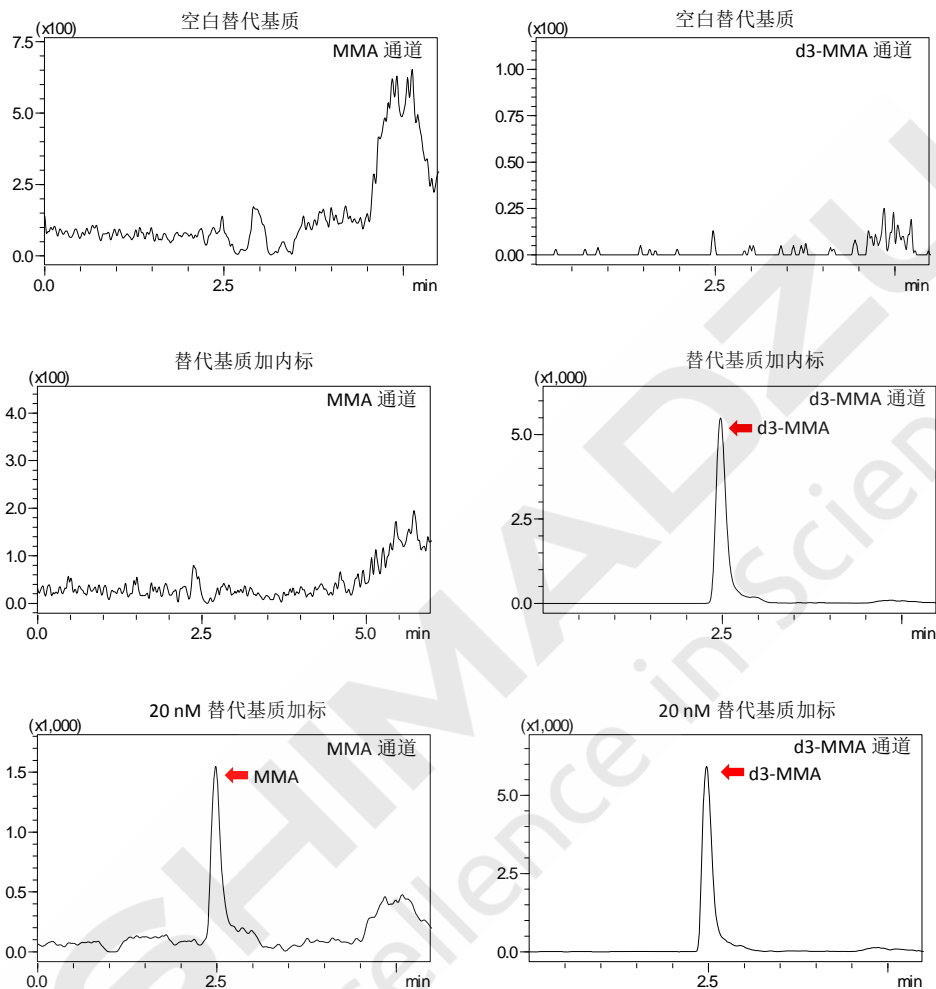


图 8 特异性验证结果

## 2.5 检出限验证

用替代基质配制浓度为 20 nM 的 MMA 样品，共处理 8 份样品并进样分析，统计 RR 值， $RR \text{ 值} = \text{目标峰面积 (A-MMA)} / \text{内标峰面积 (A-d6-MMA)}$ ，数据结果（见表 6），CV%值小于 20，表明 20 nM 可作为方法检出限。

表 6. 检出限验证统计结果 (n=8)

样品	MMA	d3-MMA	RR
1	18244	81411	0.22
2	18585	75907	0.24
3	16248	81127	0.20

4	16097	74380	0.22
5	15720	83376	0.19
6	16409	76504	0.21
7	16525	78845	0.21
8	17288	79909	0.22
<b>%CV</b>	<b>6.2</b>	<b>3.9</b>	<b>7.7</b>

## 2.6 精密度和准确度验证

### 2.6.1 日内精密度和准确度

用替代基质配制低、中、高三个浓度的样品，即 LOQ (40 nM)、MOQ (300 nM) 和 HOQ (1000 nM)。在同一天内，共处理 4 批样品，同一批次中 LOQ、MOQ 和 HOQ 各处理 5 个。样品经分析后，数据统计分析得到变异系数 (%CV) 和准确度 (%accuracy)，结果如表 7 所示。

表 7. 日内精密度和准确度考察结果 (n=20)

样品	LOQ	MOQ	HOQ
1-1	35.3	308.1	1032.4
1-2	36.3	308.9	989.0
1-3	36.8	301.9	992.0
1-4	42.0	333.4	1037.1
1-5	35.1	300.3	990.7
2-1	35.6	308.6	1054.8
2-2	42.5	339.1	1037.8
2-3	37.6	310.7	996.2
2-4	41.9	304.7	1061.9
2-5	40.6	311.9	982.4
3-1	35.1	299.7	1003.8
3-2	40.6	288.7	1059.6
3-3	40.8	280.8	1034.3
3-4	35.8	298.1	1053.1
3-5	38.5	321.5	1035.4
4-1	36.5	294.8	1047.2

4-2	42.5	280.7	1051.4
4-3	41.7	287.4	1043.4
4-4	40.0	288.3	1063.8
4-5	35.8	281.5	1014.7
均值	38.6	302.5	1029.0
%CV	7.3	5.4	2.7
%accuracy (MIN)	87.8	93.6	106.4
%accuracy (MAX)	106.3	113.0	98.2

### 2.6.2 日间精密度和准确度

每天处理 1 批样品，同一批次中 LOQ、MOQ 和 HOQ 各处理 7 个，连续 3 天。样品经分析后，数据统计分析得到变异系数 (%CV) 和准确度 (%accuracy)，结果如表 8 所示。

表 8. 日间精密度和准确度考察结果 (n=21)

样品	LOQ	MOQ	HOQ
Day 1-1	34.9	317.1	952.6
Day 1-2	38.2	313.0	899.2
Day 1-3	39.9	310.2	898.0
Day 1-4	36.4	294.3	976.5
Day 1-5	42.9	319.2	991.6
Day 1-6	36.4	314.9	970.5
Day 1-7	39.0	297.3	900.6
Day 2-1	35.7	350.9	885.2
Day 2-2	36.0	331.7	895.7
Day 2-3	40.4	320.3	904.8
Day 2-4	35.8	295.3	1036.3
Day 2-5	35.2	337.0	1070.2
Day 2-6	39.0	280.1	942.7
Day 2-7	43.1	292.9	1002.0
Day 3-1	35.1	330.4	1062.8
Day 3-2	38.2	325.7	897.4

Day 3-3	35.4	327.0	898.5
Day 3-4	38.9	309.8	923.2
Day 3-5	40.6	294.0	920.2
Day 3-6	39.8	333.7	895.0
Day 3-7	42.7	295.5	917.0
均值	38.3	313.0	944.8
%CV	7.0	5.4	6.2
%accuracy (MIN)	87.4	93.4	88.5
%accuracy (MAX)	110.2	112.3	107.0

### 2.6.3 小结

综上所述, LOQ、MOQ 和 HOQ 的日内精密度分别为及准确度范围分别为 2.7-7.3%和 87.8-113.0%, 日间精密度及准确度分别为 5.4-7.0%和 87.4-112.3%, 均在可接受范围内。

### 2.7 携带污染率验证

制备高浓度样品 (H, 1280 nM) 和低浓度样品 (L, 20 nM) 各 1 例。连续测定 H 样品 3 次, 得到的浓度值分别为 H1、H2、H3; 再测定 L 样品 3 次, 得到的浓度值分别为 L1、L2、L3。依据公式: 携带污染率= $|(L1-L3)/(H3-L3)| \times 100\%$ , 计算得到污染率。当携带污染率 $<2\%$ , 表明没有携带污染。实验结果如表 9 所示, MMA 的计算携带污染率为 0.13%, 表明高浓度样品分析不会造成携带污染。

表 9. 携带污染率考察结果

H1	H2	H3	L1	L2	L3	携带污染率
1280.0	1271.6	1224.3	18.2	18.3	19.8	0.13%

## 3. 结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用, 通过替代基质配制标曲, 结合液液萃取法及内标定量法, 建立了在 5.5 min 内测定血清中 MMA 的分析方法, 并依据临床检验相关指导原则完成了方法学验证。实验结果表明, 该方法对 MMA 测定的可报告范围为 20-1280 nM, 日内和日间精密度 (%CV) 分别为 2.7-7.3%、5.4-7.0%, 准确度范围为 87.4-112.3%, 均能满足临床检测要求。该方法分析速度快、稳定性和准确度好, 适用于临床实验中测定人血液中 MMA 的含量, 从而指导相关疾病的诊断与治疗。

## 2.4 LCMS-8050 选择离子监测模式快速测定人体血液中糖化血红蛋白含量

**摘要：**糖化血红蛋白（HbA1c）是测定长期血糖水平的金标准，作为糖尿病并发症风险预测因子在临床上广泛应用。国际临床化学协会（IFCC）的 HPLC-MS 方法是采用质谱的选择离子监测模式（SIM）进行测定，本文在 IFCC 参考方法的基础上建立了基于岛津超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪选择离子监测（SIM）快速准确测定人体血液中糖化血红蛋白含量的方法。校准曲线线性良好，线性相关数 $>0.9999$ ，回收率 99.6~100.3%；对两个浓度的质控样品进行了检测精密度、重复性及准确度的考察，保留时间、峰面积、测定浓度的相对标准偏差范围分别为 0.196~0.323%、1.781~1.832%、0.864~1.300%，高低质控样品测定值与靶值的相对误差分别为 0.645%、0.220%，测定结果满足国际临床检验协会（IFCC）相关要求。

**关键词：**糖尿病 糖化血红蛋白 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 选择离子监测

糖化血红蛋白（HbA1c）不仅是 WHO 及一些国家专业学术团体推荐的糖尿病诊断标准，也是糖尿病血糖控制目标，以及评价糖尿病治疗方案有效性的指标。与血糖监测相比，HbA1c 检测有一定的优势，HbA1c 没有短期波动，其结果相对稳定且在一天的任意时间段都可以检测。国际上主要的标准化检测方法是美国糖化血红蛋白标准化计划（NGSP）制定的 HPLC 法及国际临床化学协会（IFCC）制定的 HPLC-MS 法。

国际临床化学协会(IFCC)的方法被公认为糖化血红蛋白检测的标准参考方法。它的原理是通过葡萄糖-C 蛋白内切蛋白酶将血红蛋白裂解为  $\beta$  链上糖化和未糖化的 N-端六肽。这些六肽从肽混合物中分离出来，再通过 HPLC-ESI/MS 法或 CE-UV 法定量测定。本文用岛津 LCMS-8050 对糖化血红蛋白水解六肽进行测定，该方法能够简单、快速、准确的测定糖化血红蛋白的含量。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统，包括 LC-30AD $\times$ 2（输液泵），SIL-30AC（自动进样器），CTO-30AC（柱温箱），CBM-20A（系统控制器），DGU-20A<sub>5</sub>（在线脱气机），LCMS-8050（三重四极杆液质）和 LabSolutions Ver 5.86。



## 1.2 分析条件

### 1.2.1 液相色谱条件

流动相: A相-0.1%甲酸水溶液, B相-0.1%甲酸乙腈溶液

流速: 0.5 mL/min

色谱柱: Shim-pack GISS 2.1 mm I.D. × 50 mm L., 1.9 μm

柱温: 50°C

洗脱方式: 梯度洗脱, 初始浓度为B相10%, 时间程序见表1

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	B.Conc	10
2.50	Pumps	B.Conc	25
2.51	Pumps	B.Conc	98
4.00	Pumps	B.Conc	98
4.01	Pumps	B.Conc	10
5.00	Controller	Stop	

进样量: 0.5 μL

### 1.2.2 质谱条件

分析仪器:	LCMS-8050	碰撞气:	氦气
离子源:	ESI (+)	源温:	350°C
离子源接口电压:	4.5 kV	脱溶剂管温度:	250°C
加热气:	空气 10 L/min	加热模块温度:	500°C
雾化气:	氮气 3.0 L/min	扫描模式:	选择离子监测(SIM)
干燥气:	氮气 10 L/min	驻留时间及延迟时间:	100 ms、3 ms

表2 SIM 参数

物质名称	英文名	SIM 离子
糖化血红蛋白(HbA1c)	Glycated hemoglobin	429.2
非糖化血红蛋白(HbA0 IS)	Non-glycated hemoglobin	348.2

### 1.3 标准溶液的配制及样品前处理

标准溶液配制：将 HbA1c 浓度为 0、3.029%、6.191%、9.601%、13.199%、17.192% 的校准液、质控品、样品，用纯水稀释 100 倍待测

样品前处理步骤：均按照 IFCC 推荐前处理方法进行样本制备；新鲜的血液采用 EDTA 抗凝，取 1.5 mL 血 8℃ 3000×g 离心 10 min，弃去血浆，10 mL 盐水洗涤沉淀 2 次。10 mL 盐水溶液混溶，37℃ 孵育细胞 4 h。弃去上清，1.0 mL 水混匀细胞。计算总血红蛋白浓度，与等量的 50 mM β-吗啉代乙磺酸混合，将总血红蛋白稀释至 50 mg/mL。加 NaOH(4 mol/L) 调整 pH 至 6.2。3000×g 离心 20 min 去除细胞碎片。加入 50 μL 内切蛋白酶 Glu-C，约 1 mg 总血红蛋白溶解在 500 μL 消化液中。轻轻盖上瓶盖，37℃ 孵育，轻微摇动 18 h，形成糖基化的和未糖基化的 β 链 N 末端六肽。-20℃ 冷冻 2 h 终止蛋白水解。解冻样本，8000×g 离心 2 min，取上清进样分析。

## 2 结果讨论

### 2.1 标准品色谱图

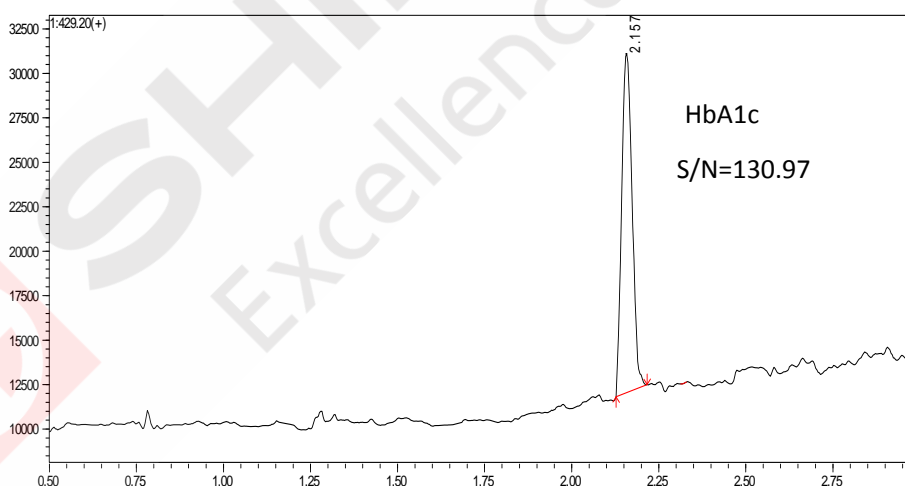


图 1 HbA1c 校准点 2(3.029%) 色谱图

### 2.2 线性关系

将 HbA1c 浓度为 0、3.029%、6.191%、9.601%、13.199%、17.192% 的校准液，用纯水稀释 100 倍，按前述分析条件测定，以浓度为横坐标，峰面积比为纵坐标，HbA0 为内标，制作校准曲线，相关数据及标准曲线如图 2 所示。线性方程、线性范围和相关系数见表 4。

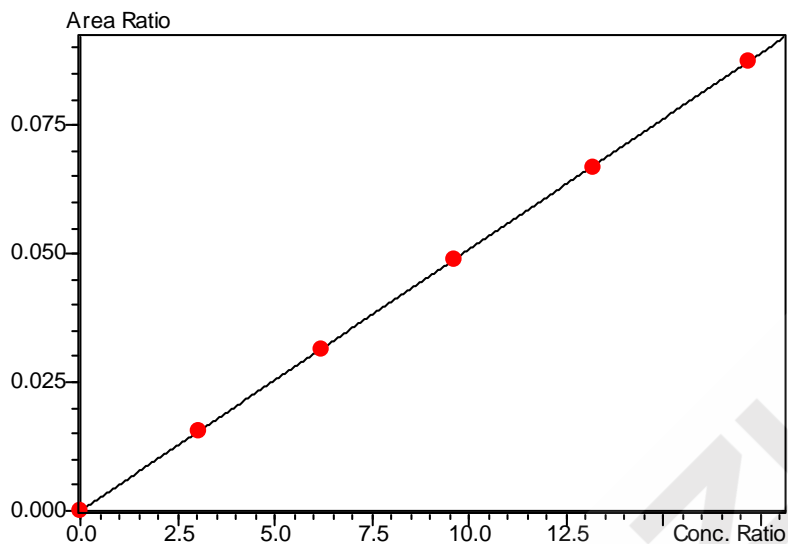


图2 HbA1c 校准曲线

表3 HbA1c 线性方程及相关系数

物质名称	校准曲线	线性范围 (%)	准确度 (%)	相关系数 R
HbA1c	$Y = 0.0051X + (-7.6 \times 10^{-7})$	0-17.192	99.6~100.3	0.9999

### 2.3 重复性实验

将 QC1, QC2, 用纯水稀释100倍, 各平行测定6次, 计算保留时间、峰面积及质控浓度的相对标准偏差, 考察仪器和方法的重复性。相关原始数据如图3所示, 保留时间、峰面积及质控浓度的相对标准偏差如表5所示, 测量值与靶值的相对误差如表6所示

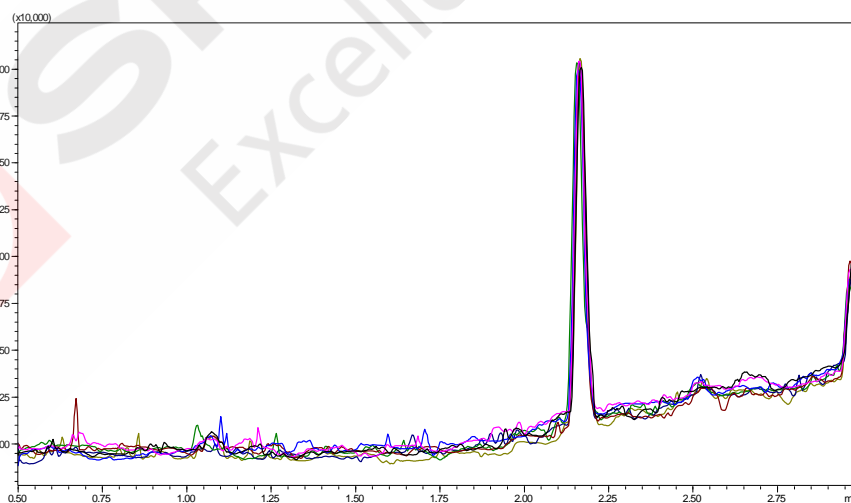


图3 HbA1c 质控品 QC2重复性数据及色谱图

表4 HbA1c 保留时间、峰面积、浓度的重复性结果(n=6)

物质名称	RSD %(QC 1)			RSD %(QC 2)		
	R.T.	Area	Conc.	R.T.	Area	Conc.

HbA1c	0.323	1.781	0.864	0.196	1.823	1.300
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

表5 HbA1c 浓度检测结果与靶值的相对误差%(n=6)

物质名称	QC 1			QC 2		
	测量均值	靶值	相对误差%	测量均值	靶值	相对误差%
HbA1c	5.286	5.252	0.645	3.281	3.274	0.220

## 2.4 实际样品测定结果

将提供的实际样品，用纯水稀释100倍，直接进样测定，结果如表7所示。

表6 21份样品中 HbA1c 定值结果

客户编号	NGSP HbA1c 含量(%)	IFCC HbA1c 含量 (mmol/mol)
Sample 1	3.469	14.397
Sample 2	4.523	25.918
Sample 3	7.454	57.958
Sample 4	10.648	92.873
Sample 5	6.775	50.536
Sample 6	5.292	34.324
Sample 7	7.991	63.828
Sample 8	10.964	96.327
Sample 9	3.401	13.653
Sample 10	4.468	25.317
Sample 11	5.304	34.456
Sample 12	6.813	50.951
Sample 13	9.668	82.160
Sample 14	4.237	22.792
Sample 15	3.687	16.780
Sample 16	5.377	35.254
Sample 17	7.042	53.454
Sample 18	7.829	62.057
Sample 19	5.461	36.172
Sample 20	8.071	64.703

注：NGSP 美国糖化血红蛋白标准化计划

IFCC 国际临床化学协会

单位换算公式： $Y_{\text{NGSP}}=0.09148X_{\text{IFCC}}+2.152$

### 3 结论

本文建立了基于岛津超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪选择离子监测模式快速测定人体血液中糖化血红蛋白含量的方法。结果显示：校准曲线线性良好，线性相关系数 $>0.9999$ ，对两个浓度的质控样品进行了检测精密度、重复性及准确度的考察，保留时间、峰面积、测定浓度的相对标准偏差范围分别为 0.196~0.323%、1.781~1.832%、0.864~1.300%，高低质控样品测定值与靶值的相对误差分别为 0.645%、0.220%，测定结果满足国际临床检验协会（IFCC）相关要求。21 份样品中的 HbA1c 测定结果见表 7。综上所述，该方法能够简单、快速、准确的测定糖化血红蛋白的含量，可作为该物质的标准测定方法推广应用。



SHIMADZU  
Excellence in Science

## 2.5 LCMS-8045 多反应监测模式快速测定人体血液中糖化血红蛋白含量

**摘要:** 糖化血红蛋白 (HbA1c) 是测定长期血糖水平的金标准, 作为糖尿病并发症风险预测因子在临床上广泛应用。国际临床化学协会 (IFCC) 的 HPLC-MS 方法是采用质谱的选择离子监测模式 (SIM) 进行测定, 本文在 IFCC 参考方法的基础上建立了基于岛津超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪多反应监测模式 (MRM) 快速准确测定人体血液中糖化血红蛋白含量的方法。该方法灵敏度高、特异性好, 校准曲线线性良好, 线性相关系数 $>0.9998$ , 准确度 98.6~101.3%; 对两个浓度的质控样品进行了检测精密密度、重复性及准确度的考察, 保留时间、峰面积、测定浓度的相对标准偏差范围分别为 0.632~0.917%、1.923~2.132%、1.005~1.436%, 高低质控样品测定值与靶值的相对误差分别为 0.592%、0.483%, 测定结果满足国际临床检验协会 (IFCC) 相关要求。

**关键词:** 糖尿病 糖化血红蛋白 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 多反应监测模式

糖化血红蛋白 (HbA1c) 不仅是 WHO 及一些国家专业学术团体推荐的糖尿病诊断标准, 也是糖尿病血糖控制目标, 以及评价糖尿病治疗方案有效性的指标。与血糖监测相比, HbA1c 检测有一定的优势, HbA1c 没有短期波动, 其结果相对稳定且在一天的任意时间段都可以检测。国际上主要的标准化检测方法是美国糖化血红蛋白标准化计划 (NGSP) 制定的 HPLC 法及国际临床化学协会 (IFCC) 制定的 HPLC-MS 法。

国际临床化学协会 (IFCC) 的方法被公认为糖化血红蛋白检测的标准参考方法。它的原理是通过葡萄糖-C 蛋白内切蛋白酶将血红蛋白裂解为  $\beta$  链上糖化和未糖化的 N-端六肽。这些六肽从肽混合物中分离出来, 再通过 HPLC-ESI/MS 法或 CE-UV 法定量测定。本文用岛津 LCMS-8045 对糖化血红蛋白水解六肽进行测定, 该方法能够简单、快速、准确的测定糖化血红蛋白的含量。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-20A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统, 包括 LC-20AD $\times$ 2 (输液泵), SIL-30ACMP (自动进样器), CTO-20AC (柱温箱), CBM-20A (系统控制器), DGU-20A<sub>5</sub> (在线脱气机), LCMS-8045 (三重四极杆液质) 和 LabSolutions Ver 5.86。



## 1.2 分析条件

### 1.2.1 液相色谱条件

流动相: A相-0.1%甲酸水溶液, B相-0.1%甲酸乙腈溶液

流速: 0.5 mL/min

色谱柱: Shim-pack GISS 2.1 mm I.D. × 50 mm L., 1.9 μm

柱温: 50°C

洗脱方式: 梯度洗脱, 初始浓度为B相5%, 时间程序见表1

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	B. Conc	8
2.50	Pumps	B. Conc	28
2.51	Pumps	B. Conc	95
4.00	Pumps	B. Conc	95
4.01	Pumps	B. Conc	5
6.50	Controller	Stop	

进样量: 0.5 μL

### 1.2.2 质谱条件

分析仪器:	LCMS-8045	碰撞气:	氩气
离子源:	ESI(+)	源温:	300°C
离子源接口电压:	4.5 kV	脱溶剂管温度:	250°C
加热气:	空气 10 L/min	加热模块温度:	400°C
雾化气:	氮气 3.0 L/min	扫描模式:	多反应监测 (MRM)
干燥气:	氮气 10 L/min	驻留时间及延迟时间:	50 ms、3 ms

表2 MRM 参数

物质名称	英文名	MRM 离子对	Q1	CE	Q3
糖化血红蛋白(HbA1c)	Glycated hemoglobin	429.2>245.0	-22	-18	-25
非糖化血红蛋白(HbA0 IS)	Non-glycated hemoglobin	348.2>70.05	-18	-29	-17

### 1.3 标准溶液的配制及样品前处理

标准溶液配制：将 HbA1c 浓度为 0、3.029%、6.191%、9.601%、13.199%、17.192% 的校准液、质控品、样品，解冻后 8000 rpm 离心 2 min，用纯水稀释 100 倍待测。

样品前处理步骤：均按照 IFCC 推荐前处理方法进行样本制备；新鲜的血液采用 EDTA 抗凝，取 1.5 mL 血 8℃ 3000×g 离心 10 min，弃去血浆，10 mL 盐水洗涤沉淀 2 次。10 mL 盐水溶液混溶，37℃ 孵育细胞 4 h。弃去上清，1.0 mL 水混匀细胞。计算总血红蛋白浓度，与等量的 50 mM β-吗啉代乙磺酸混合，将总血红蛋白稀释至 50 mg/mL。加 NaOH (4 mol/L) 调整 pH 至 6.2。3000×g 离心 20 min 去除细胞碎片。加入 50 μL 内切蛋白酶 Glu-C，约 1 mg 总血红蛋白溶解在 500 μL 消化液中。轻轻盖上瓶盖，37℃ 孵育，轻微摇动 18 h，形成糖基化的和未糖基化的 β 链 N 末端六肽。-20℃ 冷冻 2 h 终止蛋白水解。解冻样本，8000×g 离心 2 min，取上清进样分析。

## 2 结果讨论

### 2.1 标准品色谱图

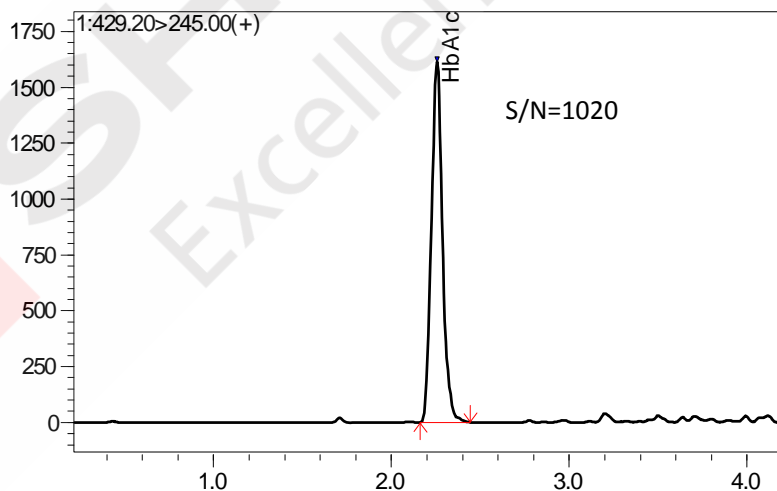


图 1 HbA1c 校准点 2(3.029%)色谱图

### 2.2 线性关系

将 HbA1c 浓度为 0、3.029%、6.191%、9.601%、13.199%、17.192% 的校准液，用纯水稀释 100 倍，按前述分析条件测定，以浓度为横坐标，峰面积比为纵坐标，HbA0 为内标，制作校准曲线，相关数据及标准曲线如图 2 所示。线性方程、线性范围和相关系数见表 4。

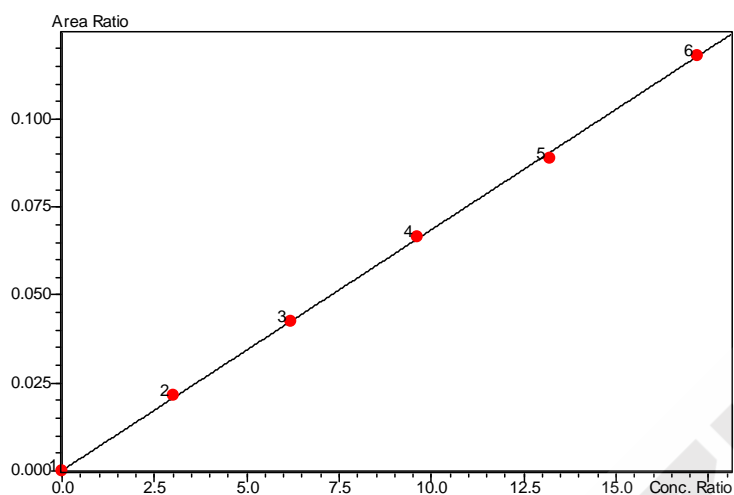


图2 HbA1c 校准曲线

表3 HbA1c 线性方程及相关系数

物质名称	校准曲线	线性范围 (%)	准确度 (%)	相关系数 R
HbA1c	$Y = (0.00684436)X + (0.000166784)$	0-17.192	98.6~101.3	0.9998

### 2.3 重复性实验

将 QC1、QC2用纯水稀释100倍，各平行测定6次，计算保留时间、峰面积及质控浓度的相对标准偏差，考察仪器和方法的重复性。相关原始数据如图3所示，保留时间、峰面积及质控浓度的相对标准偏差如表5所示，测量值与靶值的相对误差如表6所示

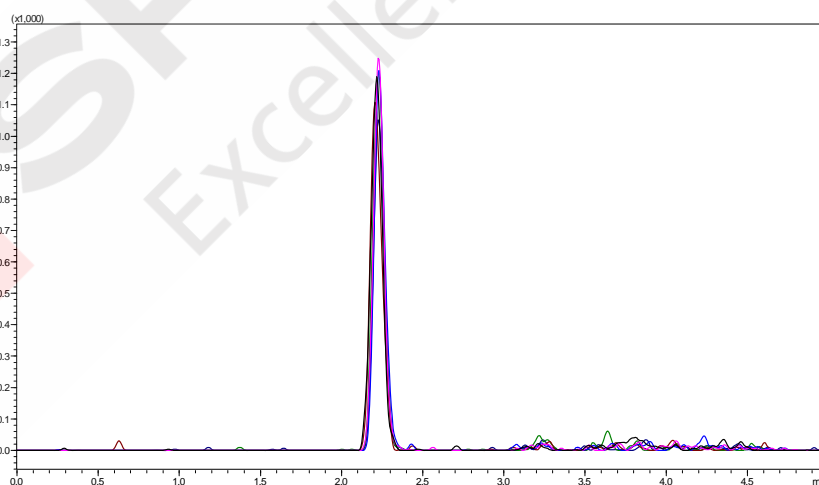


图3 HbA1c 质控品 QC2重复性数据及色谱图

表4 HbA1c 保留时间、峰面积、浓度的重复性结果 (n=6)

物质名称	RSD %(QC 1)			RSD %(QC 2)		
	R.T.	Area	Conc.	R.T.	Area	Conc.

HbA1c	0.917	1.923	1.005	0.632	2.132	1.436
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

表5 HbA1c 浓度(%)检测结果与靶值的相对误差% (n=6)

物质名称	QC 1			QC 2		
	测量均值	靶值	相对误差%	测量均值	靶值	相对误差%
HbA1c	5.221	5.252	0.592	3.258	3.274	0.483

## 2.4 实际样品测定结果

将提供的实际样品，用纯水稀释100倍，直接进样测定，结果如表7所示。

表6 21份样品中 HbA1c 定值结果

样品编号	NGSP HbA1c 含量 (%)	IFCC HbA1c 含量 (mmol/mol)
Sample 1	3.364	13.249
Sample 2	4.274	23.196
Sample 3	6.930	52.230
Sample 4	10.424	90.424
Sample 5	6.323	45.595
Sample 6	5.282	34.215
Sample 7	7.560	59.117
Sample 8	11.203	98.940
Sample 9	3.202	11.478
Sample 10	4.329	23.798
Sample 11	5.186	33.166
Sample 12	6.158	43.791
Sample 13	9.399	79.220
Sample 14	3.946	19.611
Sample 15	3.636	16.222
Sample 16	5.335	34.794
Sample 17	6.600	48.623
Sample 18	7.359	56.920
Sample 19	5.362	35.090

Sample 20	7.847	62.254
Sample 21	4.121	21.524

注：NGSP 美国糖化血红蛋白标准化计划

IFCC 国际临床化学协会

单位换算公式： $Y_{\text{NGSP}}=0.09148X_{\text{IFCC}}+2.152$

### 3 结论

本文基于岛津超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪建立了多反应监测模式快速测定人体血液中糖化血红蛋白含量的方法。结果显示：该方法灵敏度高、特异性好，校准曲线线性良好，线性相关系数 $>0.9998$ ，准确度 98.6~101.3%。对两个浓度的质控样品进行了检测精密密度、重复性及准确度的考察，保留时间、峰面积、测定浓度的相对标准偏差范围分别为 0.632~0.917%、1.923~2.132%、1.005~1.436%，高低质控样品测定值与靶值的相对误差分别为 0.592%、0.483%，测定结果满足国际临床检验协会（IFCC）相关要求。21 份样品中的 HbA1c 测定结果见表 7。综上所述，该方法能够简单、快速、准确的测定糖化血红蛋白的含量，与 IFCC 推荐的 SIM 模式检测方法相比，该方法灵敏度更高、特异性更好，并且能够通过进一步稀释样品减少仪器污染，提高仪器稳定性与耐用性，因此该方法可作为糖化血红蛋白检测更有效的测定方法。



SHIMADZU  
Excellence in Science

## 2.6 超高效液相色谱质谱联用检测血清中 1,5-脱水葡萄糖醇

**摘要：** 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用检测人血清中 1,5-脱水葡萄糖醇的方法。样品经 1,5-脱水葡萄糖醇试剂盒中提供的试剂处理后，使用超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8050 在 5.0 min 内完成定量分析。1,5-脱水葡萄糖醇在浓度范围 1~50 mg/L 内线性良好，相关系数大于 0.9999；使用试剂盒标定浓度为 10 mg/L 的血清标准样品进行了批内批间的精密度实验，实验结果表明批内批间的精密度 RSD 均小于 1.3%；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。

**关键词：** 临床 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪 1,5-脱水葡萄糖醇

糖尿病是一种代谢综合症，主要的特征就是高血糖，它是因为胰岛素分泌缺陷或相应的生物功能受损所导致，或两者兼有导致。在目前的临床实践中，最为常见的用来评估血糖状态的两个指标分别是果糖胺和糖化血红蛋白(HbA1c)。果糖胺能够反映过去的 2、3 周内血糖平均水平，且突发的血糖升高或降低不会对其产生影响，是一个比较可靠的近期糖尿病血糖控制的指标。HbA1c 则是过去 2、3 个月内血糖平均水平的反映，对它进行测定，可以较为全面的了解过去一段时间内血糖控制情况，但它不能准确的体现血糖波动，这种波动有可能伴随餐后高血糖或低血糖的发生。1,5-脱水葡萄糖醇(1,5-anhydroglucitol, 1,5-AG)是一种天然存在的吡喃环结构的六碳糖，是葡萄糖 C-1 位置上缺少一个羟基的还原型，它是人体主要多元醇之一，在体内广泛分布于各个器官、组织中，不参与能量代谢。研究表明，在糖尿病患者中，1,5-AG 含量是明显降低的。其原因是 1,5-AG 与葡萄糖结构类似，1,5-AG 与葡萄糖一起由尿排泄从肾小球滤出。高血糖状态下，当血糖超过肾小管的肾糖阈时，1,5-AG 在肾小管的重吸收会受到尿糖的竞争性抑制，最终导致尿 1,5-AG 排出量增加，而其血液中浓度明显下降。研究显示，1,5-AG 对血糖的变化是极其敏感的，也可以说 1,5-AG 可以实时反映血糖的变化，说明了 1,5-AG 可以用作为一种短期血糖控制的标志。

本文使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用，建立人血清中 1,5-脱水葡萄糖醇含量测定方法，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 1,5-脱水葡萄糖醇检测的需要，该方法可以在临床检验方面发挥较大的作用。供相关检测人员参考。

### 1. 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-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联

用系统。具体配置为 LC-30AD × 2 (输液泵), DGU-20A<sub>SR</sub> (在线脱气机), SIL-30AC (自动进样器), CTO-30A (柱温箱), CBM-20A 系统控制器, LCMS-8050 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.89 色谱工作站。

## 1.2 分析条件

### 液相色谱条件

色谱柱: Shim-pack GISS-HP C18(2.1 mm I.D.×100 mm L.,3.0 μm)

流动相: A 相-水 B 相-乙腈

流速: 0.2 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 2 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 10%, 时间程序见表 1

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	Pumps	Pump B Conc.	10
2.50	Pumps	Pump B Conc.	80
2.51	Pumps	Pump B Conc.	80
5.00	Controller	Stop	

### 质谱条件

分析仪器: LCMS-8050

离子源: ESI -

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 10 L/min

接口温度: 300°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 450°C

干燥气流速: 10 L/min

扫描模式: 多反应监测(MRM), MRM 参数见表 2

表 2 化合物信息及 MRM 参数

编号	名称	CAS.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	1,5 - AG	154-58-5	163.00	101.00	28.0	12.0	16.0
2	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> - 1,5 - AG	-	169.00	105.00	28.0	12.0	16.0

## 1.3 标准样品、质控品及样品准备

使用 1,5 - 脱水葡萄糖醇检测试剂盒 (液相色谱-串联质谱法)。该试剂盒包含以下部分:

标准物质: 3 个水平的标准样品 (1.5 mL, 浓度分别为 1 mg/L、10 mg/L、50 mg/L)

质控品: 1 个水平的质控品 (1.5 mL, 浓度为 15 mg/L)

沉淀剂（含内标）： $^{13}\text{C}_6$ -1,5-脱水葡萄糖醇（4.8 mL，浓度为 20 mg/L）

标准样品、质控品前处理方法：取 50  $\mu\text{L}$  标准样品或质控品于 1.5 mL 离心管中，分别加入 20  $\mu\text{L}$  沉淀剂、180  $\mu\text{L}$  乙腈，混匀，涡旋混合 30 s，高速离心（20000 rpm）3 min，吸取 50  $\mu\text{L}$  上清液，加入 50  $\mu\text{L}$  水，混匀后供色谱进样分析。（经前处理后对照品进样浓度相当于 0.1 mg/L、1 mg/L、5 mg/L；质控品浓度相当于 1.5 mg/L）

样品前处理方法：取 50  $\mu\text{L}$  血清样品于 1.5 mL 离心管中，分别加入 20  $\mu\text{L}$  沉淀剂、180  $\mu\text{L}$  乙腈，混匀，涡旋混合 30 s，高速离心（20000 rpm）3 min，吸取 50  $\mu\text{L}$  上清液，加入 50  $\mu\text{L}$  水，混匀后供色谱进样分析。

## 2.结果讨论

### 2.1 标准样品的 MRM 色谱图

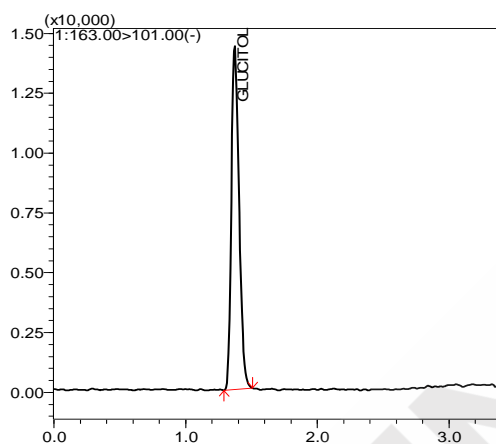


图1 对照品 MRM 色谱图(浓度为 0.1 mg/L)

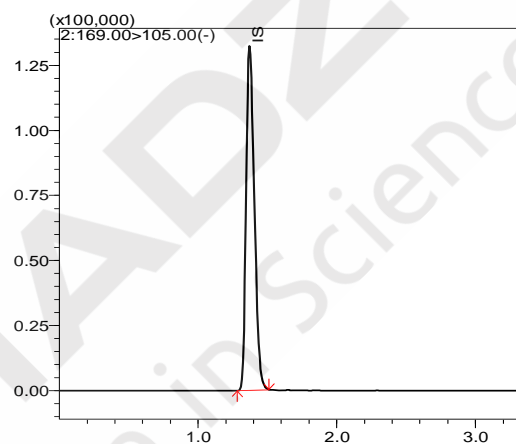


图2 对照品内标 MRM 色谱图

### 2.2 质控品的 MRM 色谱图

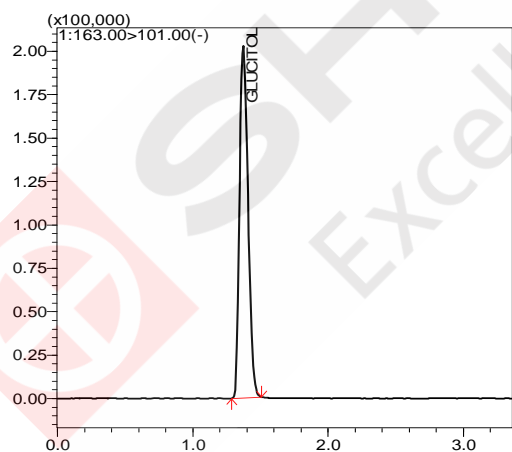


图3 质控品 MRM 色谱图(浓度为 1.5 mg/L)

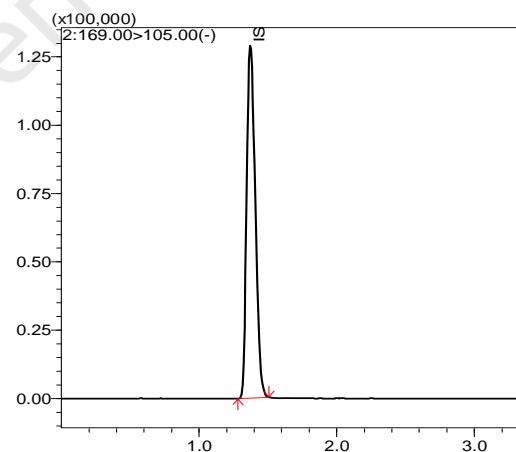


图4 质控品内标 MRM 色谱图

### 2.3 样品的 MRM 色谱图

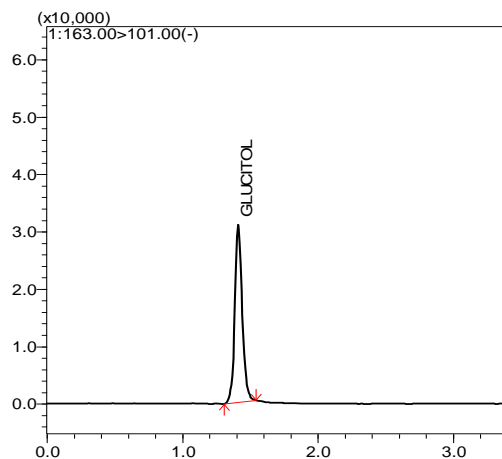


图5 样品 MRM 色谱图(浓度为 26.51 mg/L)

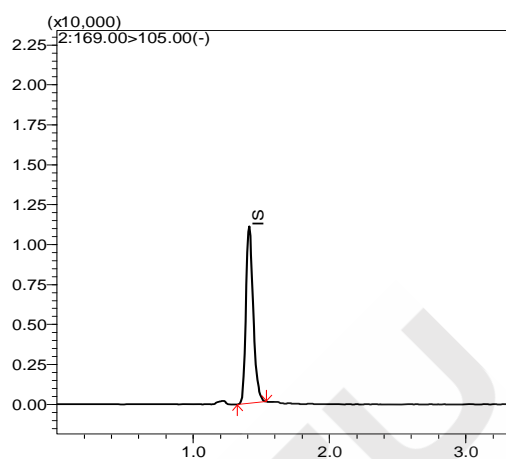


图6 样品内标 MRM 色谱图

## 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如下所示，下图显示，本方法专属性强。

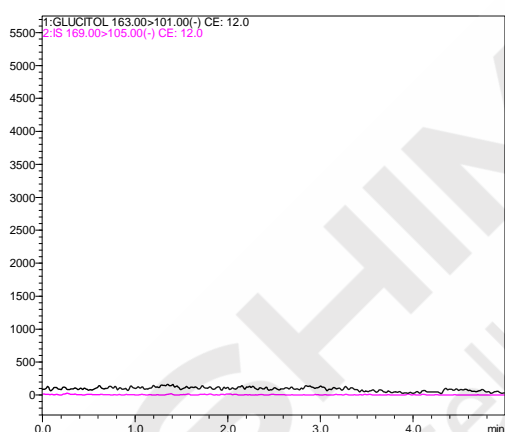


图7 double blank 谱图

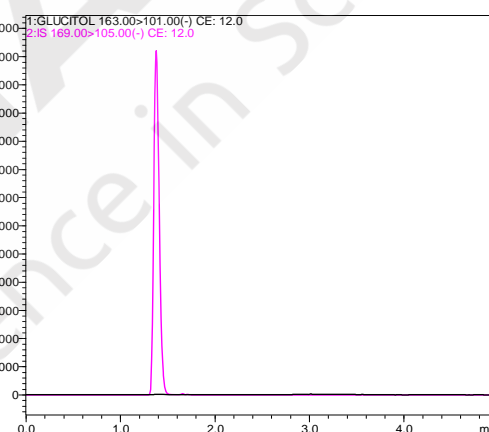


图8 blank 谱图

## 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 1~50 mg/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 3。

表 3 校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	线性范围 mg/L	准确度 (%)	相关系数 r
1	批 1	$Y = (0.108595)X + (-0.00206101)$	1~50	98.6~100.4%	0.9999
2	批 2	$Y = (0.109333)X + (-0.00788114)$	1~50	98.0~101.3%	0.9999
3	批 3	$Y = (0.107609)X + (-0.00345924)$	1~50	98.4~100.6%	0.9999

## 2.6 检出限和定量限

对浓度为 1 mg/L 的标准样品按照 1.5 的方法进行前处理后进样分析（进样浓度 0.1 mg/L），

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 4 检出限和定量限

名称	信噪比	检出限(mg/L)	定量限(mg/L)
1,5 - AG	230.1	0.001	0.004

## 2.7 质控样本准确度考察

按 1.4 中的分析条件和 1.5 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, 测定结果与靶值接近, 完全落在质控样本的靶值范围之内

表 5 质控样本测试结果

编号	靶值(mg/L)	靶值范围(mg/L)	测定浓度(mg/L)	准确度%
QC-1			14.42	96.1
QC-2			14.46	96.4
QC-3	15	13.5~16.5	14.36	95.7
QC-4			14.38	95.9
QC-5			14.54	96.9
QC-6			14.43	96.2
RSD			0.45%	

## 2.8 批内、批间精密度实验

连续三天对试剂盒中浓度为 10 mg/L 的校准品, 分别测定 6 次, 进行三个批次分析, 考察批内、批间的精密度, 结果如表 7 所示。1,5 - AG 批内和批间精密度分别小于 0.69% 和 0.85%。

表 6 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
10	9.970	0.69%	9.952	0.85%

## 2.9 稳定性实验

取 3 批次血清样品, 按 1.5 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 7 进样器放置稳定性考察结果

样品	0 天实测浓度(mg/L)	放置时间(天)	浓度比例百分比(%)
样品 1	26.18	0	100.0
		1	100.0
		2	99.8
样品 2	27.98	0	100.0
		1	99.1
		2	100.7
样品 3	32.90	0	100.0
		1	100.0
		2	99.1

## 3. 结论

使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用建立了测定人血清中 1,5- 脱水葡萄糖醇的方法用于。使用 1,5- 脱水葡萄糖醇试剂盒的内标、标准样品及质控样本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，标准曲线相关系数均大于 0.9999，批内和批间精密度均小于 1.0%，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、选择性强和灵敏度高，可以为临床人血浆中总同型半胱氨酸的检测提供很好的借鉴和参考。



SHIMADZU  
Excellence in Science

## 第三章 激素检测

### 3.1 引言

激素是高度分化的内分泌细胞合成并直接分泌进入血液的化学信息物质，它通过调节各种组织细胞的代谢活动来影响人体的生理活动。由内分泌腺或内分泌细胞分泌的高效生物活性物质，在体内作为信使传递信息，对机体生理过程起调节作用的物质称为激素。它是我们生命中的重要物质。激素作用甚广，但不参加具体的代谢过程，只对特定的代谢和生理过程起调节作用，调节代谢及生理过程的进行速度和方向，从而使机体的活动更适应于内外环境的变化。

激素种类繁多，按化学结构大体分为四类：类固醇，氨基酸衍生物，肽与蛋白质，以及脂肪酸衍生物。类固醇激素与代谢、神经信号传导、细胞信号传导等控制过程有着密切的关系；类固醇不仅具有镇静作用和能够预防各种发作，在癌症治疗和再生医学等广泛领域中的应用效果也得到了验证。维生素 D 也是一种类固醇激素，具有抗佝偻病的作用，其含量是佝偻病、骨质疏松、钙、磷缺失等病症的重要诊断指标。儿茶酚胺类物质包括去甲肾上腺素、肾上腺素和多巴胺，它们既是类固醇类激素又是神经递质，由肾上腺髓质、交感神经、副神经节的嗜铬细胞合成分泌；嗜铬细胞瘤会引起儿茶酚胺分泌增加，该疾病可伴有致死性心血管并发症，需要早期诊断并合理治疗。

激素及其相关物质的检测在医学诊断、临床治疗和药物研发领域有非常重要的意义。然而，激素种类繁多且浓度极微量，在生物体内经过复杂的转化可产生更多、含量更低的活性代谢产物，加上生物样本基质复杂，使激素及其相关物质的检测困难重重。传统的检测方法如竞争性结合检测、免疫检测和 HPLC 法等已经逐渐被淘汰，而 LC-MS/MS 具有选择性强、准确性高、灵敏度好等优势有望成为未来激素及其相关物质的主要检测方法。

本章介绍了 25-羟基维生素 D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>、类固醇类、儿茶酚胺类物质的 LC-MS/MS 检测方法，供分析人员参考。

## 3.2 超高效液相色谱三重四极杆质谱法测定血清中 25-羟基维生素

### D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> 含量

**摘要：** 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用，建立了血清中 25-羟基维生素 D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> 的定量检测方法，并依据临床检验相关指导原则完成了方法学验证。实验结果表明，该方法对血清中 25-羟基维生素 D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> 测定的可报告范围为 5-500 ng/mL，日内和日间精密度 (%CV) 分别为 1.4-4.6%、3.3-6.9%，准确度范围为 86.7-111.8%。该方法分析速度快、稳定性和准确度好，适用于血清中 25-羟基维生素 D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> 的定量分析，能够为临床检验行业的从事人员提供参考。

**关键词：** LCMS-8045 25-羟基维生素 D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> 血清 临床检验

维生素 D 是一类脂溶性激素原，对人体的骨骼健康，钙、磷的体内平衡调节起到重要作用，此外维生素 D 还有着广泛的非骨骼效应，与心血管疾病、免疫疾病、糖尿病和肿瘤等疾病密切相关。维生素 D 的缺乏可导致骨骼发育受损，以及各类慢性疾病的发病风险增加，如类风湿性关节炎、软骨化、冠心病、糖尿病和肿瘤等。人体维生素 D 的来源主要有两个途径，一是通过膳食途径摄入的维生素 D<sub>2</sub>（酵母或真菌）和维生素 D<sub>3</sub>（鱼、鱼肝油或蛋黄），二是机体经光照将皮肤中的 7-脱氢胆固醇转化为维生素 D<sub>3</sub>。

维生素 D 在肝脏中可转化为 25-羟基维生素 D（25OHD），从而被机体转运或储藏，因此体内 25OHD 含量可有效反映人体维生素 D 的营养状态。此外，25OHD 在体内稳定，半衰期长，其浓度水平与体内维生素 D 含量直接相关，因此 25OHD 可作为一类主要的生物标志物用于体现机体维生素 D 水平。

目前，25OHD 的检测方法有多种，包括免疫检测、HPLC 法和 LC-MSMS 方法等。其中，LC-MS/MS 法具有特异性强、准确度高、分析时间短等特点，被认为是评价机体维生素 D 营养状况的“金标准”。对此，我们使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用，并采用 D6-25OHD<sub>2</sub> 和 D6-25OHD<sub>3</sub> 为内标，建立了血清中 25OHD<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> 的定量分析方法，并结合临床检验相关指导原则，完成了方法的全验证，以供相关从事人员参考。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为：LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-

20A 系统控制器, LCMS-8045 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.86 色谱工作站。

## 1.2 分析条件

### 1.2.1 液相色谱条件

色 谱 柱 : Shim-pack XR-C8 (2.0 mm I.D. × 50 mm L., 2.2 μm)

流 动 相 : A 相-2 mM 乙酸铵水溶液 (含 0.1%甲酸);

B 相-2 mM 乙酸铵甲醇溶液 (含 0.1%甲酸)

流 速 : 0.4 mL/min

柱 温 : 25°C

进 样 量 : 5 μL

自动进样器温度 : 10°C

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 85%, 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.50	Pumps	Pump B Conc.	85
3.00	Pumps	Pump B Conc.	98
4.00	Pumps	Pump B Conc.	98
4.10	Pumps	Pump B Conc.	85
6.00	Controller	Stop	

### 1.2.2 质谱条件:

离 子 源 : ESI(+)

加热模块温度 : 300°C

雾化气流速 : 3.0 L/min

干燥气流速 : 10.0 L/min

加热气流速 : 8.0 L/min

扫描模式 : 多反应监测 (MRM)

接口温度 : 300°C

驻留时间 : 59 ms

D L 温度 : 150°C

M R M 参 数 : 见表 2

表 2 MRM 参数

名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q <sub>1</sub> Pre Bias (V)	CE (V)	Q <sub>3</sub> Pre Bias (V)
25OHD <sub>2</sub>	21343-40-8	413.40	395.35*	-27.0	-9.0	-18.0
			355.35	-27.0	-10.0	-23.0
25OHD <sub>3</sub>	63283-36-3	401.40	383.35*	-13.0	-9.0	-25.0
			365.35	-26.0	-10.0	-12.0
D6-25OHD <sub>2</sub>	-	419.45	401.40*	-28.0	-10.0	-13.0

			355.35	-28.0	-8.0	-16.0
D6-25OHD <sub>3</sub>	-	407.45	389.40*	-27.0	-10.0	-26.0
			371.35	-27.0	-11.0	-17.0

\*表示定量离子对

## 1.3 样品制备

### 1.3.1 标准工作曲线配制

称取 4.0 g BSA 溶于 100 mL PBS，配制 4% BSA 溶液作为血清的替代基质溶液，用于配制标准工作曲线。用甲醇配制浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  的 25OHD<sub>2</sub> 和 25OHD<sub>3</sub> 混合标准储备液，随后用甲醇将混合标准溶液逐级稀释成浓度为 0.5  $\mu\text{g/mL}$ 、1.0  $\mu\text{g/mL}$ 、2.0  $\mu\text{g/mL}$ 、5.0  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$ 、20  $\mu\text{g/mL}$  和 50  $\mu\text{g/mL}$  的标准工作液。取 10  $\mu\text{L}$  标准工作液加入 990  $\mu\text{L}$  替代基质溶液，依次配制标准曲线。用甲醇配制浓度为 25  $\mu\text{g/mL}$  的 D6-25OHD<sub>2</sub> 和 D6-25OHD<sub>3</sub> 的混合内标储备液，再用甲醇稀释为浓度为 250 ng/mL 的内标工作液。

### 1.3.2 样品前处理方法

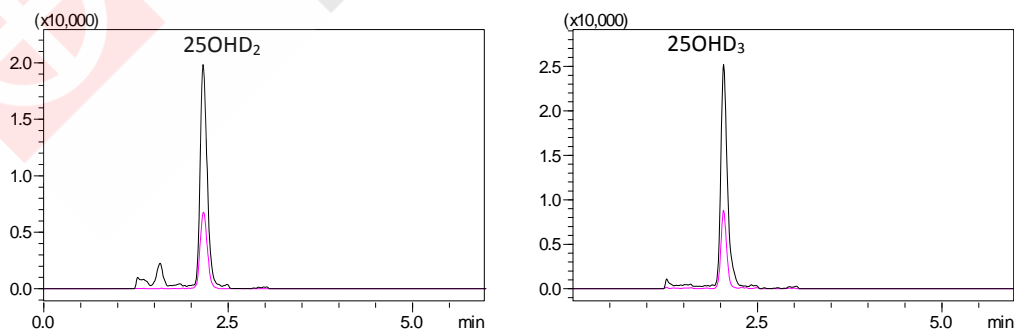
取 50  $\mu\text{L}$  样品于 1.5 mL 离心管中，加入 10  $\mu\text{L}$  的内标溶液，再加入 140  $\mu\text{L}$  甲醇，涡旋蛋白沉淀，13000 g 高速离心 10 min，取上清液进样分析。

日内精密度和准确度考察：一天内制备 4 批不同浓度（LOQ、MOQ 和 HOQ）的样本，每批当中不同浓度的样品平行处理 5 个。样品进样分析后，统计精密度的变异系数（CV）和准确度。

日间精密度和准确度考察：每天制备 2 批不同浓度（LOQ、MOQ 和 HOQ）的样本，每批当中不同浓度的样品平行处理 5 个，连续考察 3 天。统计精密度的变异系数（CV）和准确度。

## 2 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图



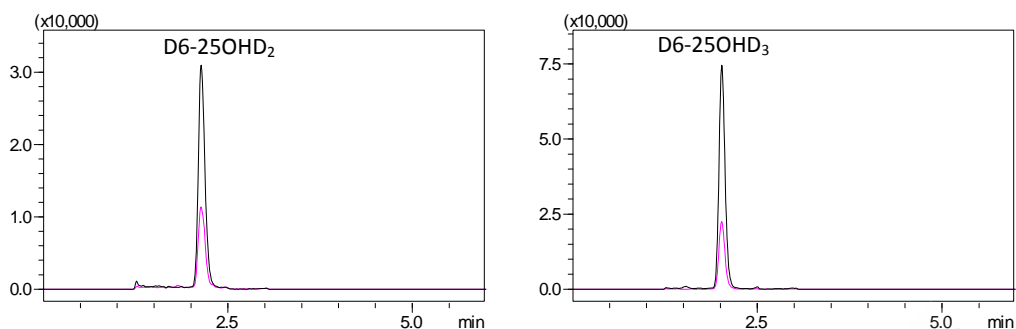


图 1 25OHD<sub>2</sub> 和 25OHD<sub>3</sub> (20 ng/mL) 及其内标物 (50 ng/mL) 的 MRM 色谱图

## 2.2 替代基质与血清基质一致性验证

考虑到正常人血清中含有一定量的 25OHD，空白血清样品经处理分析后，检测到一定量的 25OHD<sub>3</sub>，但未检出 25OHD<sub>2</sub>（如图 2 所示）。因此不宜使用空白血清配制 25OHD 标准曲线，而考虑用 4% BSA 溶液作为血清的替代基质溶液。在此，需要对替代基质与血清基质进行一致性验证。

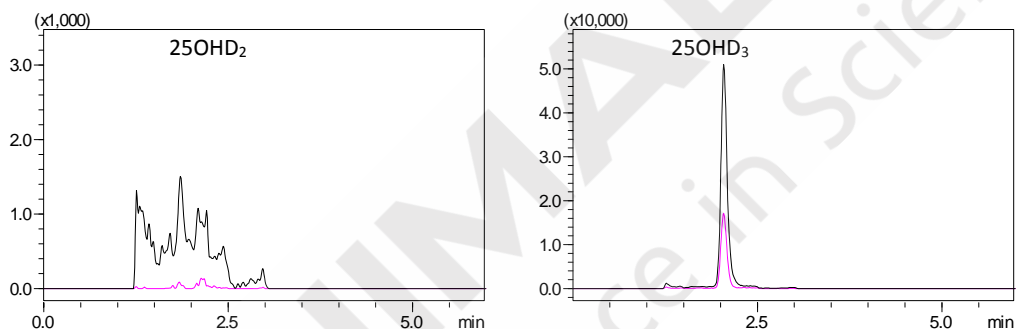
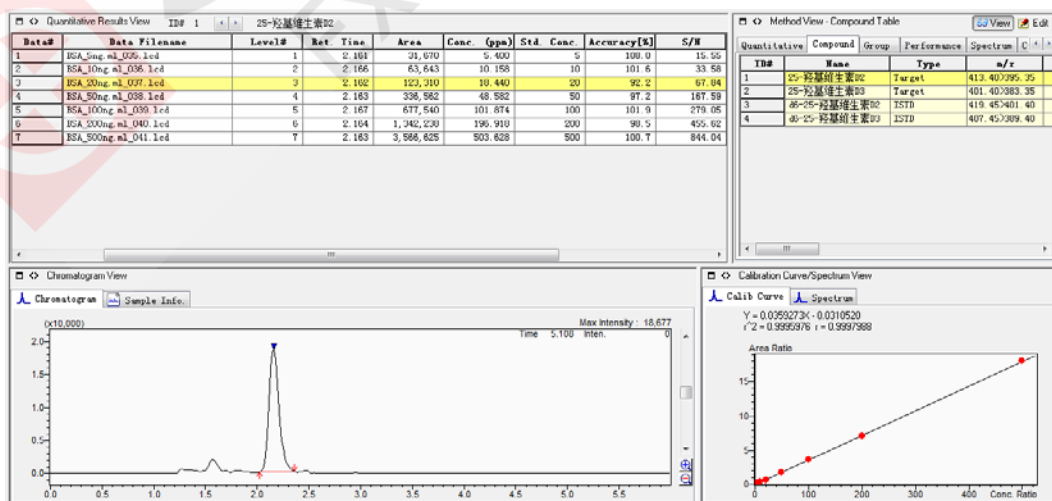


图 2 空白血清样品分析结果

### 2.2.1 替代基质标曲和血清标曲的比较

分别用血清和 4% BSA 溶液依照“标准工作曲线配制”中的方法，配制标准曲线溶液，样品经过前处理后，进样分析，分别绘制出血清基质标曲和替代基质标曲（如图 3 和 4 所示）。



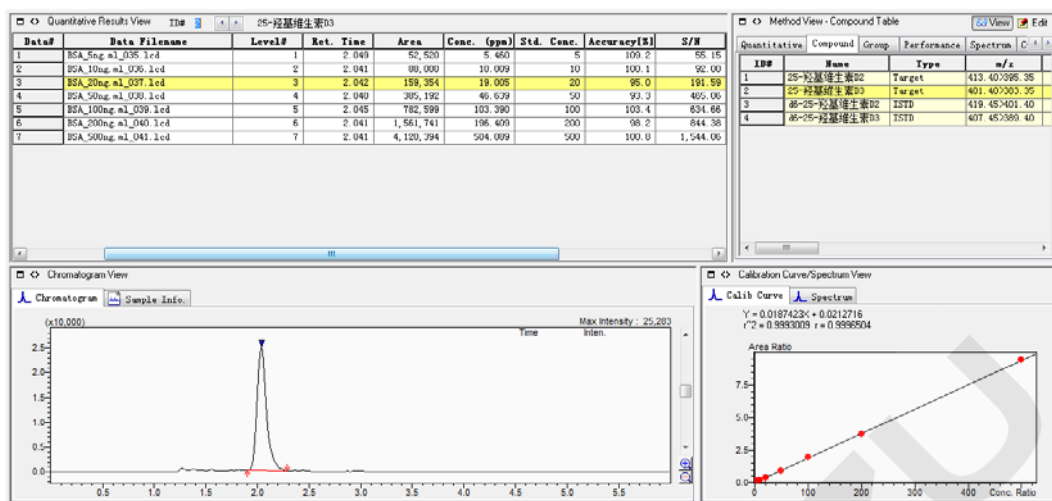


图 3 25OHD 4% BSA 溶液标准曲线（上图为 25OHD<sub>2</sub>，下图为 25OHD<sub>3</sub>）

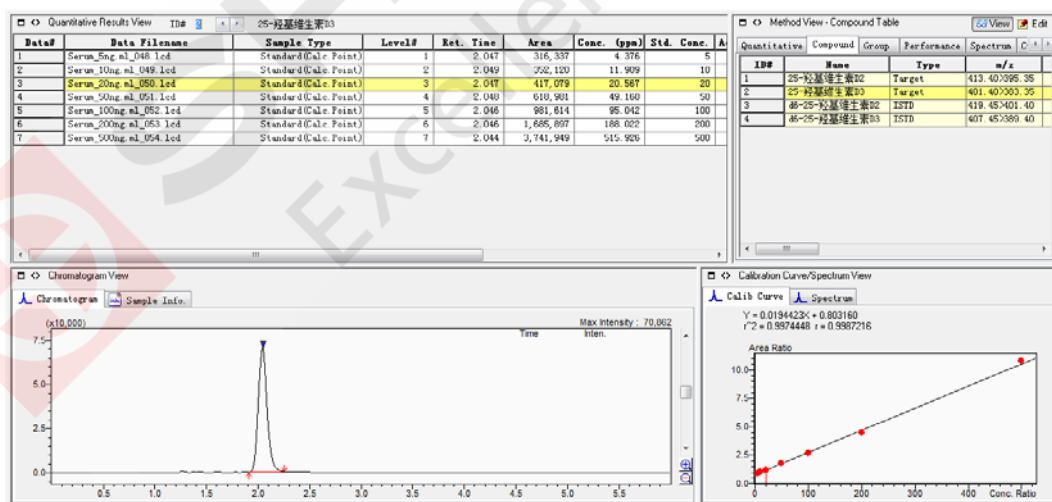
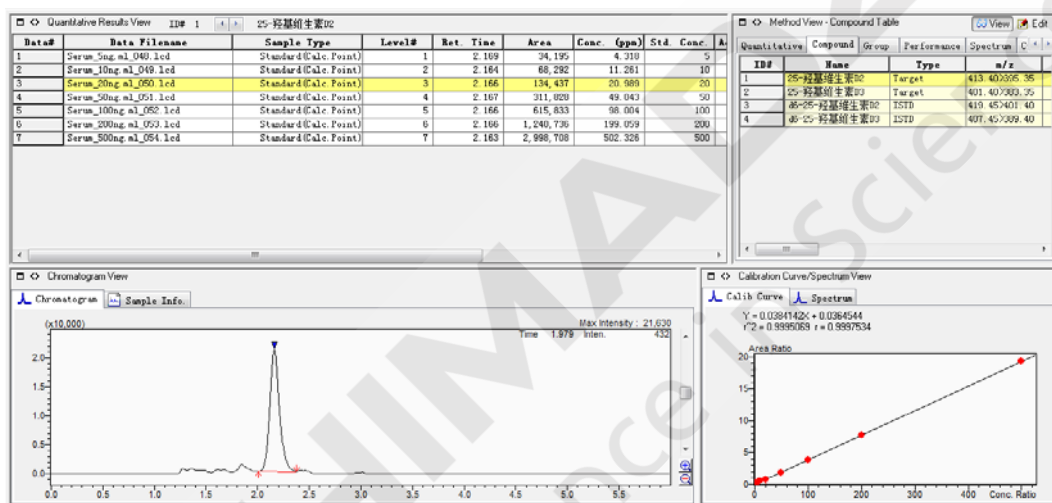


图 4 25OHD 血清标准曲线（上图为 25OHD<sub>2</sub>，下图为 25OHD<sub>3</sub>）

从结果上看，4% BSA 溶液配制的替代基质标曲和血清基质标曲相比，曲线斜率基本相当（如表 3 和图 5 所示）。此外，依据标准加入法外推得到 X 轴负截距，可以计算出血清中 25OHD<sub>3</sub> 的含量为 41.3 ng/mL。

表 3 替代基质标曲和血清基质标准曲线比较

目标物	标准曲线	
	4% BSA	血清
25OHD <sub>2</sub>	Y=0.0359273X-0.0310520	Y=0.038412X+0.0364544
25OHD <sub>3</sub>	Y=0.0187423X+0.0212716	Y=0.0194423X+0.803160

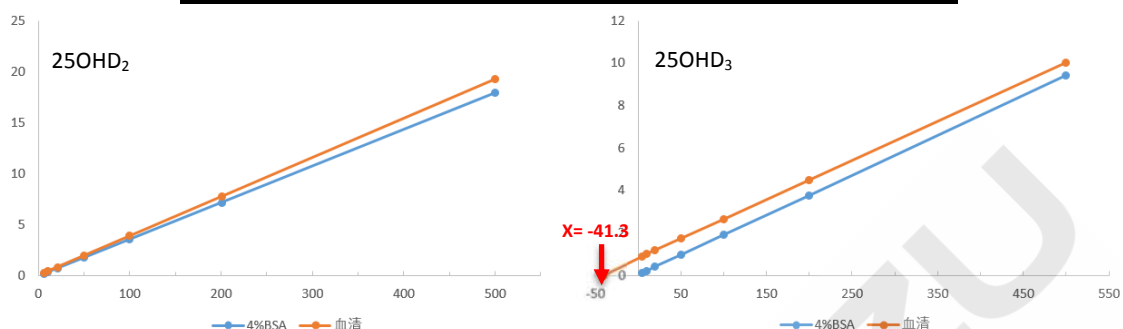


图5 替代基质标曲和血清标曲比较

### 2.2.2 替代基质标曲测定血清及血清加标样品中 25OHD 含量

分别制备血清及血清加标样品（加入 25OHD 浓度为 15 ng/mL、50 ng/mL 和 450 ng/mL），依照上述前处理方法，各浓度样品平行处理 6 份，进样分析后根据替代基质标曲计算目标物浓度，结果如表 4 所示。

表 4 血清及血清加标样品中 25OHD 含量测定结果

项目	血清		血清加标		血清加标		血清加标	
	(E)		(E+15 ng/mL)		(E+50 ng/mL)		(E+450 ng/mL)	
	25OHD <sub>2</sub>	25OHD <sub>3</sub>	25OHD <sub>2</sub>	25OHD <sub>3</sub>	25OHD <sub>2</sub>	25OHD <sub>3</sub>	25OHD <sub>2</sub>	25OHD <sub>3</sub>
检测均值 (ng/mL)	-	40.3	13.0	55.7	56.4	93.2	465.7	482.3
理论值 (ng/mL)	-	41.3	15.0	56.3	50.0	91.3	450.0	491.3
样品数量 (n)	6	6	6	6	6	6	6	6
相对误差 (%RE)	-	2.3	13.5	1.0	12.9	2.1	3.5	1.8
变异系数 (%CV)	-	2.8	5.3	5.8	2.7	3.6	4.5	2.3

从结果上看，使用替代基质标曲测定各组样品，其检测均值和理论值相对误差均<15%，变异系数<15%，均在可接受范围之内。

### 2.2.3 替代基质稀释血清基质

采用替代基质稀释血清基质，分别测定不同稀释倍数下得到的空白基质中内源性物质 25OHD 的浓度，该浓度与理论值的偏差在接受范围内（相对误差均<15%，变异系数<15%），结果如表 5 所示。

表 5 不同稀释倍数下血清中 25OHD 含量测定结果

项目	1.25 倍稀释		2.5 倍稀释		4 倍稀释	
	25OHD <sub>2</sub>	25OHD <sub>3</sub>	25OHD <sub>2</sub>	25OHD <sub>3</sub>	25OHD <sub>2</sub>	25OHD <sub>3</sub>
检测均值 (ng/mL)	-	34.1	-	17.9	-	10.2
理论值 (ng/mL)	-	33.0	-	16.5	-	10.3
样品数量 (n)	6	6	6	6	6	6

相对误差 (%RE)	-	3.3	-	8.6	-	0.9
变异系数 (%CV)	-	5.7	-	59.2	-	4.6

## 2.2.4 小结

综上所述，在血清中 25OHD 的检测实验中，4% BSA 溶液和血清配制的标准曲线，二者斜率基本一致。替代基质标曲测定血清和血清加标样品，检测结果与理论值偏差在可接受范围内。此外，采用替代基质稀释血清，对不同稀释倍数下的样品测定结果，仍然表现出良好的准确度和精密度。因此，4% BSA 溶液作为血清替代基质，用于配制 25OHD 标准曲线或质控样品。

## 2.3 线性范围及其验证

使用 4% BSA 溶液配制标准曲线，按上述处理方法和分析条件，采用内标法建立标准曲线。如图 6 所示，25OHD<sub>2</sub> 和 25OHD<sub>3</sub> 在 5-500 ng/mL 的线性浓度范围内，线性相关性良好，相关系数 r 分别为 0.9998 和 0.9997，准确度范围分别为 92.2-108.0%和 95.0-109.2%。

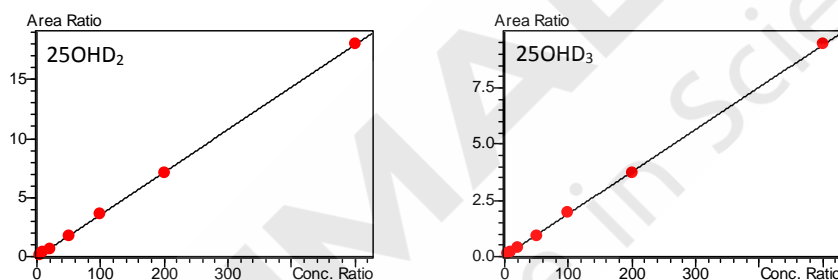


图 6 25OHD<sub>2</sub> 和 25OHD<sub>3</sub> 的标准曲线

确定线性范围后，还需要对线性范围进行进一步验证。配制上限浓度 (H, 500 ng/mL) 和下限浓度 (L, 5 ng/mL) 各 1 例，按照 L、4L+1H、3L+2H、2L+3H、1L+4H、H 的体积比，混合成 6 个不同浓度的样品，每个样品测定 2 次。以理论浓度值为 X，测定浓度均值为 Y，计算回归方程  $Y=bX+a$  (如图 7 所示)。线性方程相关系数  $r \geq 0.975$ ，b 在 0.97-1.03 范围内，表明实验结果可接受。

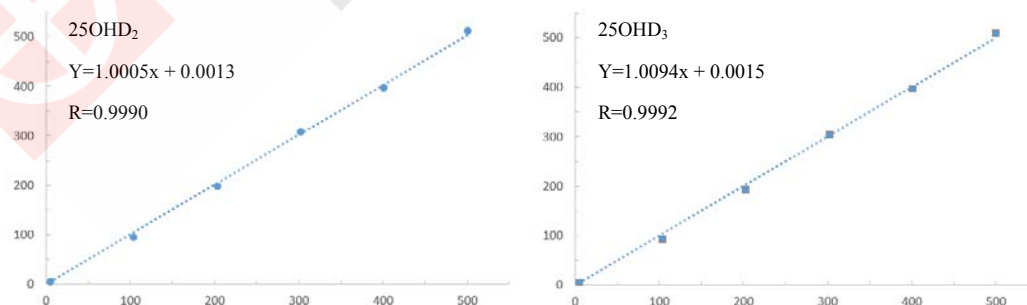


图 7 25OHD<sub>2</sub> 和 25OHD<sub>3</sub> 的线性范围验证

## 2.4 特异性验证

分别考察空白替代基质、空白替代基质加内标和 5 ng/mL 替代基质加标样品，结果表明，替代基质对目标物 25OHD<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> 及其内标的检测均无干扰，同时内标亦不干扰 25OHD<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> 的检

测（见图 8）。

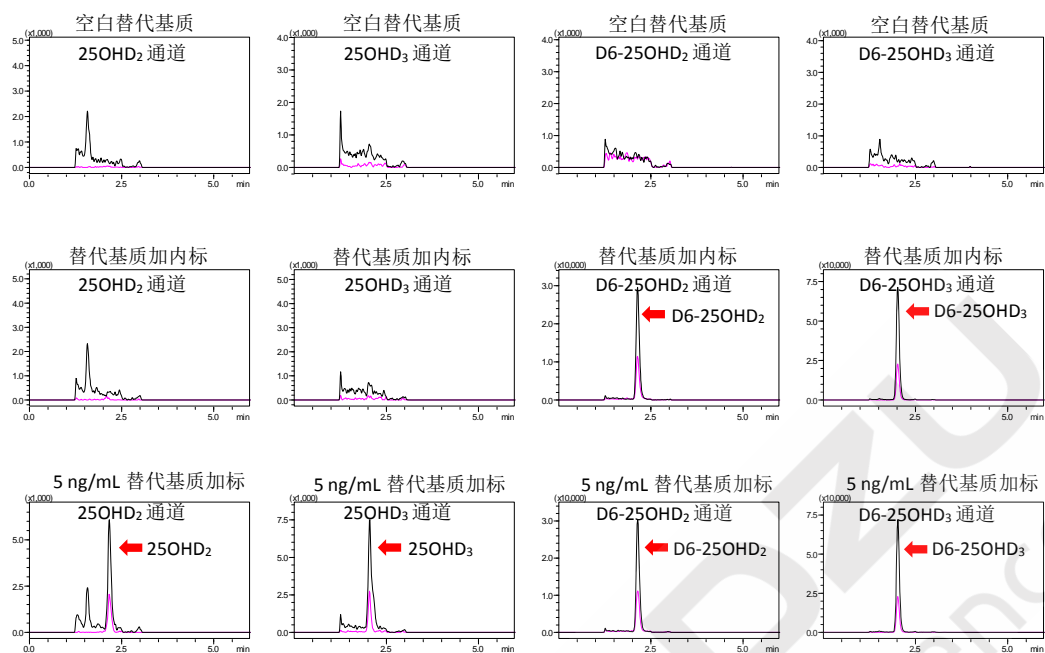


图 8 特异性验证结果

## 2.5 检出限验证

用替代基质配制浓度为 5 ng/mL 的 25OHD 样品，共处理 20 份样品并进样分析，统计 RR 值，RR 值=目标峰面积（A-25OHD）/内标峰面积（A-D6-25OHD），数据结果（见表 6），CV% 值小于 20，表明 5 ng/mL 可作为方法检出限。

表 6 检出限验证统计结果（n=20）

样品	25OHD <sub>2</sub>			25OHD <sub>3</sub>		
	A-25OHD <sub>2</sub>	A-D6-25OHD <sub>2</sub>	RR 值	A-25OHD <sub>3</sub>	A-D6-25OHD <sub>3</sub>	RR 值
1	30524	162909	0.187	41001	428336	0.096
2	27096	168014	0.161	48929	438004	0.112
3	31283	170608	0.183	48011	434552	0.110
4	28958	174152	0.166	44346	439456	0.101
5	27145	165930	0.164	43656	434848	0.100
6	25931	152855	0.170	44131	395863	0.111
7	28192	164807	0.171	44188	442351	0.100
8	28680	168208	0.171	46255	431137	0.107
9	28177	169696	0.166	45224	437627	0.103
10	25357	163940	0.155	44321	437362	0.101

11	26167	155843	0.168	43840	392601	0.112
12	26384	158522	0.166	45897	425985	0.108
13	29323	163174	0.180	42284	415843	0.102
14	28447	163700	0.174	43635	428778	0.102
15	27268	162107	0.168	43305	415396	0.104
16	26545	138219	0.192	40201	379425	0.106
17	26001	159800	0.163	45370	412973	0.110
18	29092	152625	0.191	40220	394639	0.102
19	26598	163945	0.162	44245	413205	0.107
20	27566	159563	0.173	39745	402631	0.099
%CV	5.7	4.9	<b>5.9</b>	5.5	4.4	<b>4.6</b>

## 2.6 精密度和准确度验证

### 2.6.1 日内精密度和准确度

用替代基质配制低、中、高三个浓度的样品，即 LOQ (10 ng/mL)、MOQ (100 ng/mL) 和 HOQ (400 ng/mL)。在同一天内，共处理 4 批样品，同一批次中 LOQ、MOQ 和 HOQ 各处理 5 个。样品经分析后，数据统计分析得到变异系数 (%CV) 和准确度 (%accuracy)，结果如表 7 所示。

表 7 日内精密度和准确度考察结果 (n=20)

样品	25OHD <sub>2</sub> (ng/mL)			25OHD <sub>3</sub> (ng/mL)		
	LOQ	MOQ	HOQ	LOQ	MOQ	HOQ
1-1	9.0	96.6	383.0	9.3	106.6	430.9
1-2	9.0	87.9	385.9	9.7	96.9	431.3
1-3	9.4	92.1	368.5	10.4	108.9	430.5
1-4	9.0	90.9	375.6	10.2	103.4	416.1
1-5	9.1	93.3	398.4	10.1	105.9	431.7
2-1	8.9	95.4	385.5	10.2	106.1	433.9
2-2	9.5	93.6	386.6	10.3	107.8	429.0
2-3	9.2	97.5	384.6	10.4	108.6	432.5
2-4	8.8	87.0	367.5	9.9	97.8	419.3

2-5	10.0	92.8	389.9	9.5	105.5	437.9
3-1	9.2	100.4	385.4	10.2	106.5	433.5
3-2	9.1	86.8	372.8	9.5	100.5	422.4
3-3	9.0	94.4	377.2	9.6	108.5	420.9
3-4	8.8	98.8	377.3	10.3	106.4	426.5
3-5	8.9	92.9	388.3	10.2	104.0	435.3
4-1	9.3	98.7	387.5	9.2	105.1	434.5
4-2	10.0	87.4	387.4	10.4	98.8	426.6
4-3	9.2	92.9	379.2	9.9	106.3	433.3
4-4	9.1	86.7	375.7	9.9	96.1	425.6
4-5	9.3	91.1	380.4	10.0	102.4	430.9
均值	9.2	93.0	381.9	10.0	104.2	429.0
%CV	3.6	4.6	2.0	3.7	3.9	1.4
%accuracy (MIN)	87.7	86.7	91.9	81.7	92.2	96.1
%accuracy (MAX)	100.3	100.4	99.6	102.9	103.8	108.9

### 2.6.2 日间精密度和准确度

每天处理 2 批样品，同一批次中 LOQ、MOQ 和 HOQ 各处理 5 个，连续 3 天。样品经分析后，数据统计分析得到变异系数 (%CV) 和准确度 (%accuracy)，结果如表 8 所示。

表 8 日间精密度和准确度考察结果 (n=30)

样品	25OHD <sub>2</sub> (ng/mL)			25OHD <sub>3</sub> (ng/mL)		
	LOQ	MOQ	HOQ	LOQ	MOQ	HOQ
Day 1-1	9.0	96.6	383.0	9.3	106.6	430.9
Day 1-2	9.0	87.9	385.9	9.7	96.9	431.3
Day 1-3	9.4	92.1	368.5	10.4	108.9	430.5
Day 1-4	9.0	90.9	375.6	10.2	103.4	416.1
Day 1-5	9.1	93.3	398.4	10.1	105.9	431.7
Day 1-6	8.9	95.4	385.5	10.2	106.1	433.9
Day 1-7	9.5	93.6	386.6	10.3	107.8	429.0
Day 1-8	9.2	97.5	384.6	10.4	108.6	432.5

Day 1-9	8.8	87.0	367.5	9.9	97.8	419.3
Day 1-10	10.0	92.8	389.9	9.5	105.5	437.9
Day 2-1	9.4	98.0	372.4	10.2	102.0	421.5
Day 2-2	9.2	92.0	380.2	9.5	97.5	438.6
Day 2-3	10.1	99.5	384.5	9.6	106.3	434.4
Day 2-4	9.6	90.3	408.7	9.8	96.4	440.7
Day 2-5	9.2	90.0	372.5	9.9	106.2	421.2
Day 2-6	9.0	100.5	378.8	9.4	105.8	428.1
Day 2-7	9.0	91.5	391.9	10.5	107.5	426.5
Day 2-8	9.7	111.6	388.7	9.7	107.2	434.2
Day 2-9	9.2	108.7	403.3	9.3	104.1	430.2
Day 2-10	10.0	106.7	401.2	9.9	98.7	433.4
Day 3-1	9.7	106.3	433.8	10.0	106.3	412.1
Day 3-2	10.0	106.4	442.8	10.0	106.4	414.1
Day 3-3	10.3	95.8	434.8	9.8	95.8	409.9
Day 3-4	10.1	106.6	433.4	10.2	106.6	401.8
Day 3-5	9.7	107.5	441.0	10.1	107.5	407.8
Day 3-6	9.7	99.5	447.4	9.7	99.5	418.3
Day 3-7	10.2	98.1	428.3	10.0	98.1	416.6
Day 3-8	10.2	99.1	420.2	9.8	99.1	409.8
Day 3-9	10.5	103.6	434.1	10.1	103.6	408.1
Day 3-10	9.9	102.2	444.6	10.2	102.2	412.6
均值	9.6	98.0	402.3	9.9	103.5	423.8
%CV	5.2	6.9	6.6	3.3	4.0	2.6
%accuracy (MIN)	87.8	87.0	91.9	92.7	92.9	100.5
%accuracy (MAX)	105.5	111.6	111.8	105.3	108.9	110.2

### 2.6.3 小结

综上所述, LOQ、MOQ 和 HOQ 的日内精密度分别为及准确度范围分别为 1.4-4.6%和 86.7-109.5%, 日间精密度及准确度分别为 3.3-6.9%和 87.8-111.8%, 均在可接受范围内。

## 2.7 携带污染率验证

制备高浓度样品（H, 500 ng/mL）和低浓度样品（L, 5 ng/mL）各 1 例。连续测定 H 样品 3 次，得到的浓度值分别为 H1、H2、H3；再测定 L 样品 3 次，得到的浓度值分别为 L1、L2、L3。依据公式：携带污染率= $(L1-L3)/(H3-L3) \times 100\%$ ，计算得到污染率。当携带污染率 $<2\%$ ，表明没有携带污染。实验结果如表 9 所示，25OHD<sub>2</sub> 和 25OHD<sub>3</sub> 的计算携带污染率分别为 0.06% 和 0.04%，表明高浓度样品分析不会造成携带污染。

表 9 携带污染率考察结果

	H1	H2	H3	L1	L2	L3	携带污染率
25OHD <sub>2</sub>	492.0	491.0	499.6	5.3	4.8	5.0	0.06%
25OHD <sub>3</sub>	536.6	536.5	520.9	4.6	4.9	4.8	0.04%

## 2.8 临床样品测定结果

共获取正常人血清临床样品 10 个，经前处理后分别进行测定，结果如表 10 所示。一般正常人体内 25-OHD 的含量为 10-60 ng/mL，各临床样品测定数值均在正常范围内，因此该方法适用于临床血清样品的检测。

表 10 正常人血清临床样品检测结果

编号	25OHD <sub>2</sub> (ng/mL)	25OHD <sub>3</sub> (ng/mL)	总计 (ng/mL)
1	未检出	25.1	25.1
2	未检出	27.9	27.9
3	未检出	31.5	31.5
4	未检出	29.3	29.3
5	未检出	30.2	30.2
6	未检出	30.1	30.1
7	未检出	29.7	29.7
8	未检出	30.9	30.9
9	未检出	33.1	33.1
10	未检出	33.8	33.8

## 3 结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用，通过替代基质配制标曲，结合蛋白沉淀法及内标定量法，建立了在 6 min 内测定血清中 25-羟基维生素

D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>的分析方法，并依据临床检验相关指导原则完成了方法学验证。实验结果表明，该方法对25OHD<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>测定的可报告范围为5-500 ng/mL，日内和日间精密度（%CV）分别为1.4-4.6%、3.3-6.9%，准确度范围为86.7-111.8%，均能满足临床检测要求。该方法分析速度快、稳定性和准确度高，适用于临床实验中测定人血液中25-羟基维生素D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>的含量，从而指导相关疾病治疗及临床合理用药。



### 3.3 超高效液相色谱三重四极杆质谱法定量检测血清中类固醇激素含量

**摘要：** 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用，建立了血清中类固醇激素的定量检测方法，采用 SLE(固相支撑液液萃取)方法对样品进行预处理，可准确、灵敏、快速定量检测血清中类固醇激素含量。实验结果表明，该方法对血清中类固醇类激素的定量检测范围为 0.01-10 ng/mL (DHEA 和 Estrone 为 0.1-100 ng/mL, Aldosterone 为 0.05-10 ng/mL)，准确度范围为 84.0-113.8%。该方法分析速度快、稳定性和准确度好，适用于血清中类固醇激素的定量分析，能够为相关人员提供参考。

**关键词：** LCMS-8060 类固醇激素 血清 替代基质

类固醇激素，又称甾体激素，具有极重要的医药价值。在维持生命、调节性功能，对机体发展、免疫调节、皮肤疾病治疗及生育控制方面有明确的作用。类固醇激素药物的发现与发展是药物化学学科发展的重要阶段。

人体类固醇激素的升高或者降低与一些临床疾病如先天性肾上腺增生、多囊卵巢综合征、肾上腺皮质功能不全等相关。因此建立一种可以同时准确测定多种类固醇激素的分析方法对于临床疾病的诊断具有非常重要的指导意义。

目前测定类固醇激素常用的方法有放射免疫法、气相色谱-质谱联用法和高效液相色谱串联质谱法等。常规的免疫法操作简单，但是方法开发历时久、成本高，而且存在交叉反应和基质干扰而导致其缺乏特异性，且灵敏度较低。质谱法则因灵敏度高和特异性强已成为复杂机体样本（如生物样本）检测的强有力工具，尤其是 LC-MS/MS，可以有效排除假阳性信号的干扰，检测结果更加准确可靠，目前已广泛应用于治疗药物监测、遗传代谢病筛查、毒理学诊断等临床应用领域。

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用，采用一系列氘代化合物作为内标，建立了血清中类固醇激素的定量分析方法，并结合临床检验相关指导原则，完成了方法的全验证，以供相关人员参考。

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为：

LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A5 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8060 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.86 色谱工作站。

## 1.2 分析条件

### 液相色谱条件

色 谱 柱 : Shim-pack FC-ODS (2 mm I.D. ×75 mm L., 3 μm)  
流 动 相 : A 相-5 mM 甲酸铵水溶液;  
          B 相-5 mM 甲酸铵甲醇溶液  
流 速 : 0.3 mL/min  
柱 温 : 40℃  
进 样 量 : 10 μL  
自动进样器温度 : 10℃  
洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 35%, 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.5	Pump	B.Conc	35
4	Pump	B.Conc	45
12	Pump	B.Conc	80
12.01	Pump	B.Conc	95
15	Pump	B.Conc	95
15.01	Pump	B.Conc	35
18	Controller	Stop	

### 质谱条件:

离 子 源 : ESI +/-                    加热模块温度 : 450℃  
雾化气流速 : 3.0 L/min            干燥气流速 : 7.0 L/min  
加热气流速 : 13.0 L/min          扫描模式 : 多反应监测(MRM)  
接口温度 : 370℃                  驻留时间 : 20 ms  
D L 温度 : 150℃                  M R M 参 数 : 见表 3

## 1.3 样品制备

### 1.3.1 标准工作曲线配制

称取 2.0 g BSA 溶于 50 mL PBS, 配制 4% BSA 溶液作为血清的替代基质溶液, 用于配制标准工作曲线。用甲醇配制浓度为 100 μg/mL 的混合标准储备液, 随后用甲醇将混合标准溶液逐级稀释成浓度为 1.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL、1 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL 的标准工作液。取 10.0 μL 标准工作液加入 990 μL 替代基质溶液, 依次配制标准曲线。并用甲醇配制混合内标工作液 100 ng/mL。

### 1.3.2 样品前处理方法

取 100  $\mu\text{L}$  样品于 1.5 mL 离心管中，加入 1  $\mu\text{L}$  的内标溶液，再加入 300  $\mu\text{L}$  纯水，涡旋混匀，全部转移到 ISOLUTE<sup>®</sup>SLE+硅藻土板上；通过加正压导入。静置五分钟，被硅藻土吸收；在孔板中加入二氯甲烷（900  $\mu\text{L}\times 2$ ）进行洗脱。在进行五分钟自然下落后，通过加压进行洗脱；将洗脱液进行氮吹干燥，用 100  $\mu\text{L}$  溶剂（65%流动相 A，35%流动相 B，v/v）再溶解后，进行离心处理，取上清上机分析。

表 2 类固醇激素及其内标基本信息

Name		CAS No.	ISTD group	Ret. Time (min)
17-OHP	17-羟孕酮	68-96-2	1	10.348
21-OHP	21-羟孕酮	64-85-7	1	9.834
Corticosterone	皮质酮	50-22-6	2	8.454
11-Deoxy cortisol	11-脱氧皮质醇	152-58-9	3	8.661
21-Deoxy cortisol	21-脱氧皮质醇	641-77-0	1	8.079
Testosterone	睾酮	58-22-0	1	10.093
DHEA	脱氢表雄酮	53-43-0	1	10.602
Progesterone	孕酮	57-83-0	4	11.963
Estrone	雌酮	53-16-7	1	9.663
Androstenedione	雄烯二酮	1963/5/8	5	9.465
Aldosterone	醛固酮	52-39-1	6	6.079
17-OHP-d8	17-羟孕酮-d8	850023-80-2	1	10.29
Corticosterone-d8	皮质酮-d8	1271728-07-4	2	8.384
11-Deoxy cortisol-d5	11-脱氧皮质醇-d5	1258063-56-7	3	8.622
Progesterone-d9	孕酮-d9	15775-74-3	4	11.88
Androstenedione-13C3	雄烯二酮-13C3	327048-86-2	5	9.456
Aldosterone-d7	醛固酮-d7	1261254-31-2	6	5.352

表 3 MRM 参数

名称	Precursor ion m/z	Product ion m/z	Q <sub>1</sub> Pre Bias (V)	CE (V)	Q <sub>3</sub> Pre Bias (V)
17-OHP	331.2	109.1	-10	-28	-20
		97.1	-10	-25	-18
21-OHP	331.2	109.1	-10	-26	-20
		97.1	-10	-24	-18
Corticosterone	347.25	329.15	-11	-16	-23
		121.0	-11	-26	-22
11-Deoxy cortisol	347.25	109.0	-11	-30	-20
		97.0	-10	-27	-18
21-Deoxy cortisol	347.25	311.15	-11	-17	-22
		121.0	-11	-27	-22
Testosterone	289.2	109.1	-10	-26	-19
		97.1	-10	-23	-17
DHEA	271.2	253.15	-11	-13	-28
		213.1	-10	-16	-23
Progesterone	315.25	109.05	-10	-26	-19
		97.05	-10	-23	-18
Estrone	271.2	253.05	-10	-14	-17
		133.05	-10	-23	-24
Androstenedione	287.2	97.1	-10	-23	-18
		109.05	-10	-25	-20
Aldosterone	361.15	343.1	-10	-18	-24
		315.15	-12	-19	-22
17-OHP-IS	339.2	100.05	-12	-27	-19
		113.05	-11	-30	-21
Corticosterone-IS	355.2	337.2	-12	-17	-24
		125.05	-12	-26	-23
11-Deoxy cortisol-IS	352.2	113.05	-12	-30	-21
		100.05	-12	-28	-18
Progesterone-IS	324.2	100.1	-11	-23	-18
		113.1	-11	-29	-21
Androstenedione-IS	290.15	100.1	-10	-23	-18
		112.1	-10	-25	-21
Aldosterone-IS	368.15	350.2	-10	-18	-25
		332.2	-10	-20	-24

## 2. 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图

使用以上液相和质谱分析条件对替代基质加标样品进行分析，色谱图如图 1 所示。

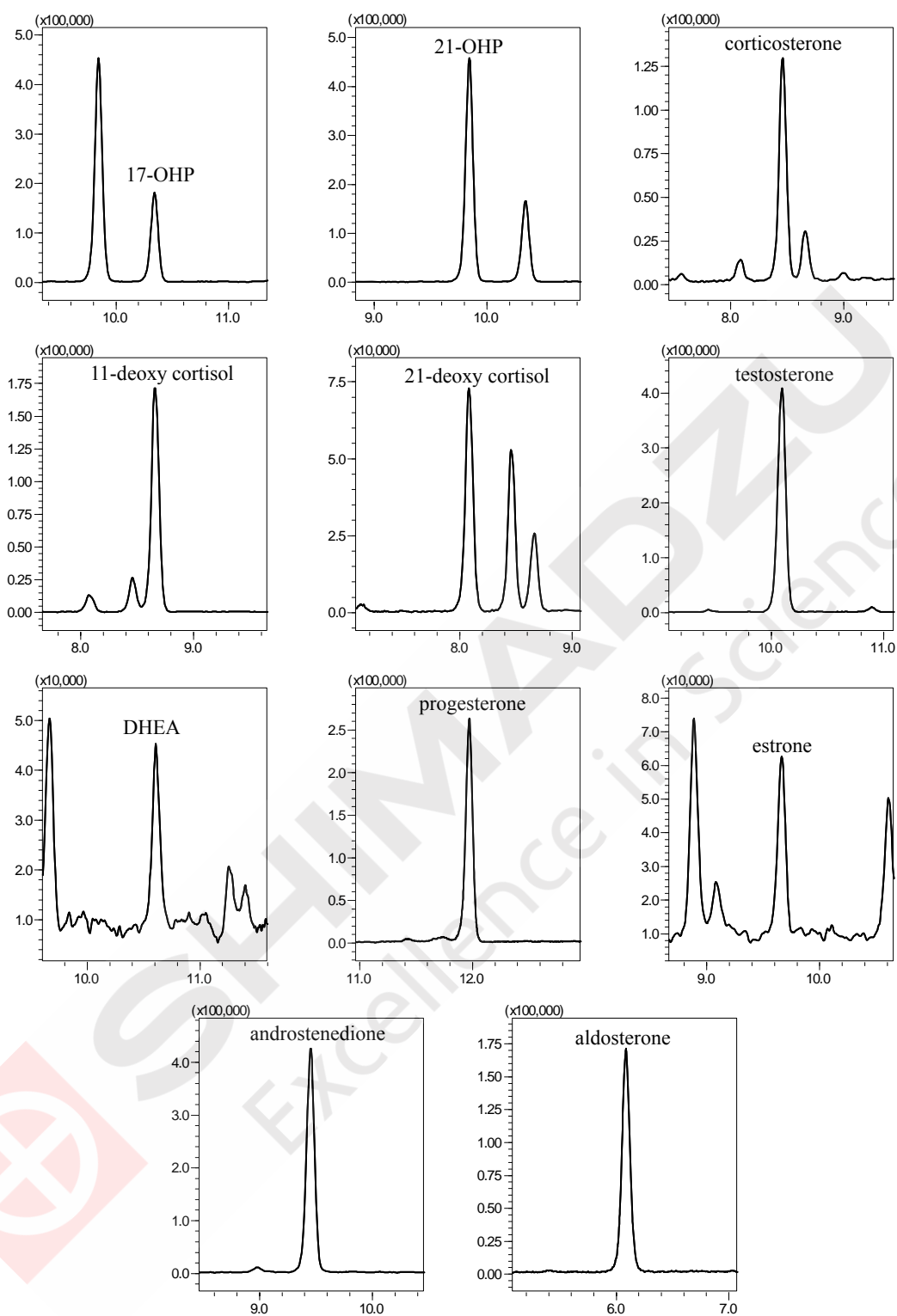


图 1 类固醇激素 (1.0 ng/mL, 替代基质) 的 MRM 色谱图

## 2.2 替代基质与血清基质一致性验证

考虑到正常人血清中含有一定量的类固醇激素，空白血清样品经处理分析后，检测到一定量的类固醇激素（如图 2 所示）。因此不宜使用空白血清配制类固醇激素标准曲线，可考虑用 4% BSA 溶液（图 3）作为血清的替代基质溶液。在此，需要对替代基质与血清基质进行一致性验证。

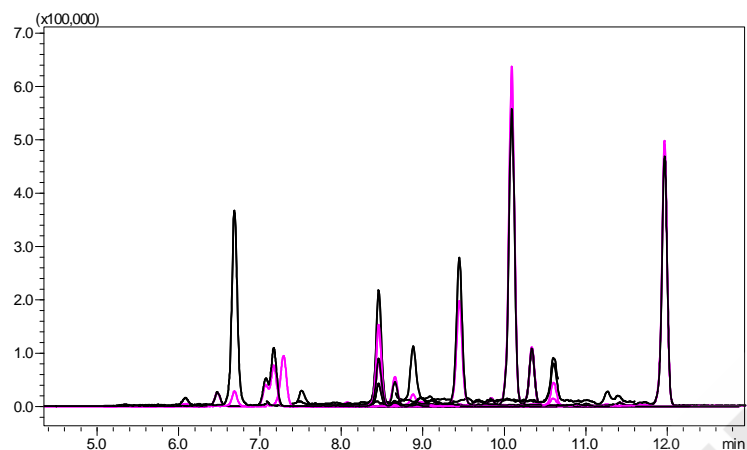


图2 空白血清样品分析结果

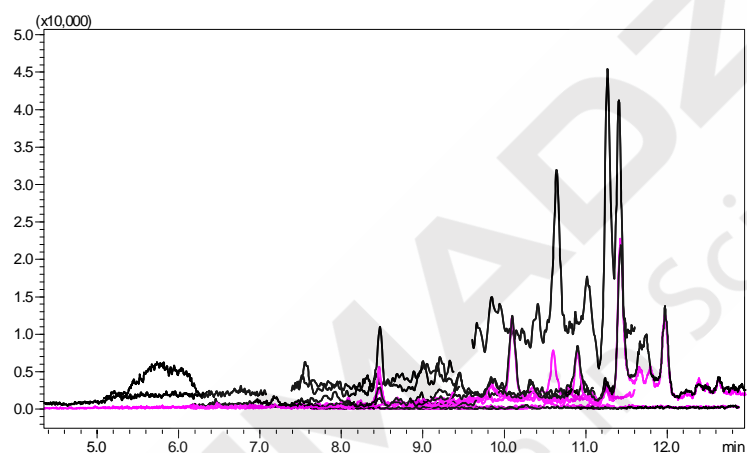


图3 空白替代基质分析结果

### 2.2.1 替代基质标曲和血清标曲的比较

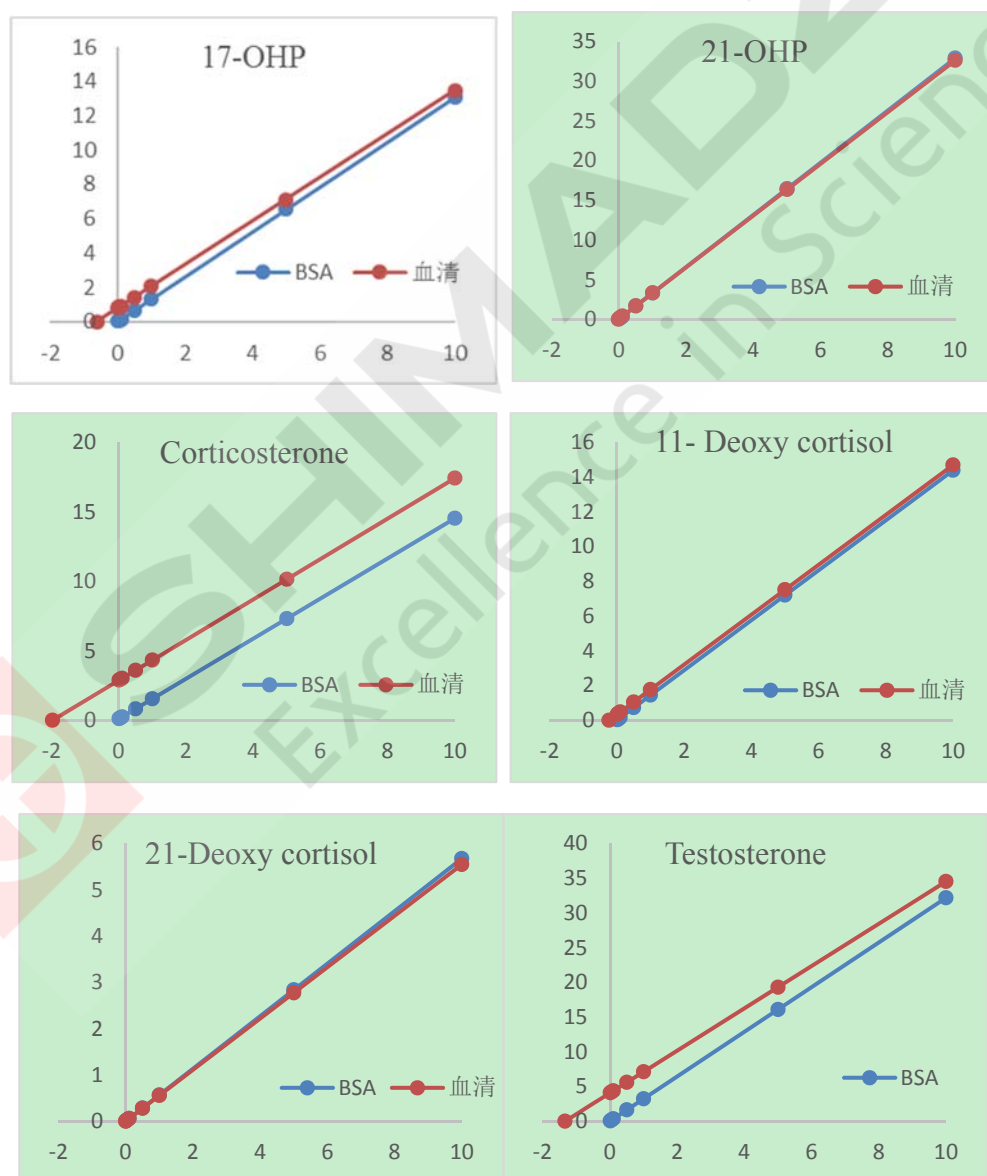
分别用血清和替代基质溶液依照“标准工作曲线配制”中的方法，配制标准曲线溶液，样品经过前处理后进样分析，分别绘制出替代基质标曲和血清基质标曲（如表4和5所示）。

表4 类固醇激素替代基质标准曲线相关参数（采用  $1/C^2$  加权）

名称	校准曲线	相关系数 R	线性范围 (ng/mL)	准确度%
17-OHP	$Y = (1.30490)X + (0.0170905)$	0.9993	0.01~10	94.4~109.5
21-OHP	$Y = (3.28999)X + (0.0129247)$	0.9997	0.01~10	93.0~108.9
Corticosterone	$Y = (1.44564)X + (0.0954756)$	0.9995	0.01~10	96.0~102.3
11-Deoxy cortisol	$Y = (1.43924)X + (0.0114591)$	0.9985	0.01~10	90.9~107.0
21-Deoxy cortisol	$Y = (0.567380)X + (0.002302)$	0.9985	0.01~10	88.6~107.9
Testosterone	$Y = (3.21552)X + (0.0278648)$	0.9994	0.01~10	96.8~113.8
DHEA	$Y = (0.230511)X + (0.011386)$	0.9986	0.1~100	91.6~105.3
Progesterone	$Y = (0.854176)X + (0.0262510)$	0.9993	0.01~10	94.7~105.4
Estrone	$Y = (0.348118)X + (0.0183813)$	0.9983	0.1~10	89.2~103.2
Androstenedione	$Y = (1.19755)X + (0.00362078)$	0.9991	0.01~10	94.8~105.8
Aldosterone	$Y = (3.19875)X + (0.0354719)$	0.9990	0.05~10	95.3~105.0

表 5 类固醇激素血清基质标准曲线相关参数 (采用 1/C<sup>2</sup> 加权)

名称	校准曲线	相关系数 R	线性范围 (ng/mL)	准确度%
17-OHP	$Y = (1.26661)X + (0.787147)$	0.9996	0.01~10	94.1~103.5
21-OHP	$Y = (3.25665)X + (0.0658247)$	0.9994	0.01~10	89.8~107.2
Corticosterone	$Y = (1.45711)X + (2.87288)$	0.9990	0.01~10	92.0~113.0
11-Deoxy cortisol	$Y = (1.43735)X + (0.335956)$	0.9978	0.01~10	92.6~113.8
21-Deoxy cortisol	$Y = (0.554446)X + (0.002933)$	0.9974	0.01~10	86.4~108.9
Testosterone	$Y = (3.04658)X + (4.07787)$	0.9994	0.01~10	89.4~102.4
DHEA	$Y = (0.243697)X + (0.502122)$	0.9975	0.1~100	87.9~104.2
Progesterone	$Y = (0.793838)X + (1.63251)$	0.9990	0.01~10	84.0~106.9
Estrone	$Y = (0.324936)X + (0.002360)$	0.9973	0.1~10	88.8~105.2
Androstenedione	$Y = (1.13990)X + (0.766600)$	0.9992	0.01~10	93.0~104.5
Aldosterone	$Y = (3.14498)X + (0.201571)$	0.9984	0.05~10	94.3~107.6



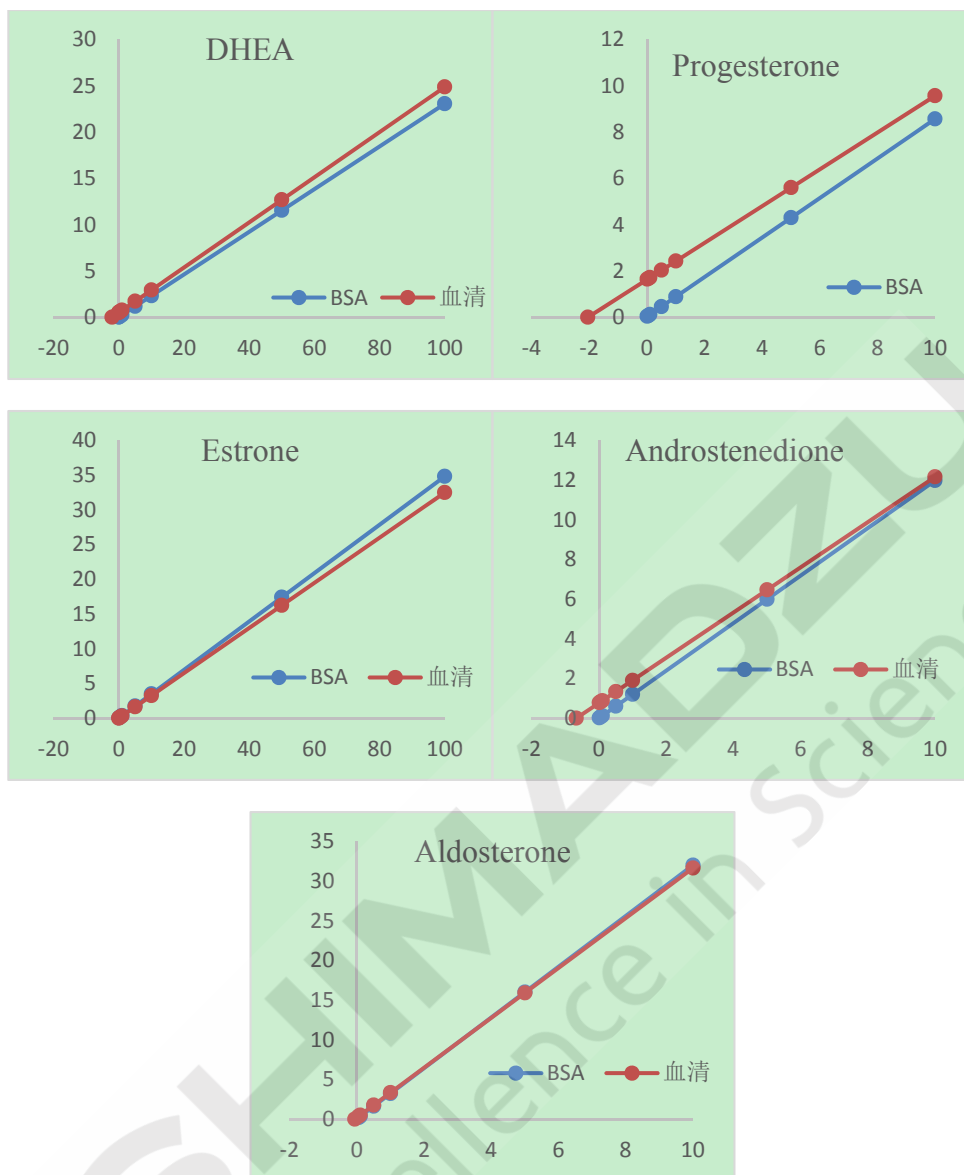


图4 替代基质标曲和血清标曲比较

从图4可看出，替代基质标曲和血清基质标曲相比，曲线斜率基本相当。依据标准加入法外推得到X轴负截距，可以计算出血清基质中各个类固醇激素含量，具见表5。

### 2.2.2 替代基质标曲测定血清样品中类固醇激素含量

依照上述前处理方法平行处理6份血清样品，进样分析后根据替代基质标曲计算目标物浓度，结果如表6所示，表6中理论值为血清标曲外延至Y=0所得到的X负截距值。

表6 血清样品中类固醇激素含量测定结果

名称	理论值 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	相对误差 (%)	精密度 (%)
17-OHP	0.62146	0.6796	9.36	4.23
21-OHP	0.02021	0.018	-10.94	6.22
Corticosterone	1.97163	1.874	-4.95	5.19
11-Deoxy cortisol	0.23373	0.214	-8.44	3.40
21-Deoxy cortisol	-	-	-	-

Testosterone	1.3385	1.105	-9.97	4.18
DHEA	2.0604	2.004	-2.74	4.90
Progesterone	2.05648	1.712	-11.89	2.82
Estrone	-	-	-	-
Androstenedione	0.67251	0.56	-12.27	5.33
Aldosterone	0.06409	0.056	-12.62	5.80

注：“-”表示未检出/低于检出限

从结果上看，使用替代基质标曲测定各组样品，其检测均值和理论值相对误差均<15%，精密度<10%，均在可接受范围之内。

### 2.2.3 替代基质标曲测定 3 个浓度血清加标样品中类固醇激素含量

依照上述前处理方法平行处理 6 份血清加标样品，加标量分别为 0.1 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL（DHEA 和 Estrone 高点加标为 50 ng/mL），进样分析后根据替代基质标曲计算目标物浓度，结果如表 7-9 所示。

表 7 血清基质加标 0.1 ng/mL 类固醇激素含量测定结果

名称	理论值 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	相对误差 (%)	精密度 (%)
17-OHP	0.721	0.614	-14.89	3.15
21-OHP	0.120	0.107	-10.99	4.33
Corticosterone	2.072	1.908	-7.90	2.17
11-Deoxy cortisol	0.334	0.306	-8.31	3.24
21-Deoxy cortisol	0.100	0.090	-10.00	4.77
Testosterone	1.439	1.230	-14.49	3.20
DHEA	2.160	1.920	-11.13	3.10
Progesterone	2.156	1.957	-9.25	2.09
Estrone	0.100	0.110	10.00	5.32
Androstenedione	0.773	0.695	-10.03	4.14
Aldosterone	0.164	0.172	4.82	4.08

表 8 血清基质加标 1 ng/mL 类固醇激素含量测定结果

名称	理论值 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	相对误差 (%)	精密度 (%)
17-OHP	1.621	1.391	-14.21	2.54
21-OHP	1.020	0.903	-11.49	3.12
Corticosterone	2.972	2.694	-9.34	1.03
11-Deoxy cortisol	1.234	1.088	-11.81	3.01
21-Deoxy cortisol	1.000	0.887	-11.30	3.19
Testosterone	2.339	2.272	-2.84	2.11
DHEA	3.060	2.85	-6.87	4.01

Progesterone	3.056	2.791	-8.69	2.14
Estrone	1.000	1.143	14.30	3.31
Androstenedione	1.673	1.435	-14.20	4.02
Aldosterone	1.064	0.983	-7.62	3.28

表 9 血清基质加标 5 ng/mL 类固醇激素含量测定结果

名称	理论值 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	相对误差 (%)	精密度 (%)
17-OHP	5.621	4.856	-13.61	3.07
21-OHP	5.020	5.003	-0.35	3.55
Corticosterone	6.972	5.997	-13.98	3.08
11-Deoxy cortisol	5.234	4.619	-11.75	2.11
21-Deoxy cortisol	5.000	4.386	-12.27	3.08
Testosterone	6.339	5.793	-8.60	3.22
DHEA	52.060	54.007	-13.34	2.17
Progesterone	7.056	6.170	-12.56	1.00
Estrone	50.000	50.247	0.49	2.56
Androstenedione	5.673	5.884	3.72	2.16
Aldosterone	5.064	4.547	-10.22	3.42

从以上结果可看出，使用替代基质标曲测定低、中、高三组加标样品，其检测均值和理论值相对误差均<15%，精密度<10%，均在可接受范围之内。

#### 2.2.4 替代基质稀释血清基质

采用替代基质稀释血清基质，分别测定不同稀释倍数下得到的空白基质中内源性类固醇激素的浓度，该浓度与理论值的偏差在接受范围内（相对误差均<15%，精密度<10%），结果如表 10-12 所示。

表 10 稀释倍数为 1.25 时血清中类固醇激素含量测定结果

名称	理论值 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	相对误差 (%)	精密度 (%)
17-OHP	0.497	0.458	-7.847	4.71
21-OHP	0.016	0.016	0.000	6.70
Corticosterone	1.577	1.267	-13.316	4.33
11-Deoxy cortisol	0.187	0.187	0.000	4.40
21-Deoxy cortisol	-	-	-	-
Testosterone	1.070	0.869	-9.439	5.00
DHEA	1.648	2.018	10.316	2.91
Progesterone	1.645	1.428	-13.191	3.02
Estrone	-	-	-	-
Androstenedione	0.538	0.479	-10.967	4.88
Aldosterone	0.051	0.045	-11.765	6.11

注：“-”表示未检出/低于检出限

表 11 稀释倍数为 2.5 时血清中类固醇激素含量测定结果

名称	理论值 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	相对误差 (%)	精密度 (%)
17-OHP	0.249	0.231	-7.074	5.18
21-OHP	0.008	0.007	-13.409	7.22
Corticosterone	0.789	0.690	-12.509	4.95
11-Deoxy cortisol	0.093	0.086	-8.014	5.40
21-Deoxy cortisol	-	-	-	-
Testosterone	0.535	0.462	-13.709	4.15
DHEA	0.824	0.743	-9.848	3.44
Progesterone	0.823	0.749	-8.946	2.99
Estrone	-	-	-	-
Androstenedione	0.269	0.259	-3.719	2.78
Aldosterone	0.026	0.025	-2.481	6.89

注：“-”表示未检出/低于检出限

表 12 稀释倍数为 5 时血清中类固醇激素含量测定结果

名称	理论值 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	相对误差 (%)	精密度 (%)
17-OHP	0.124	0.113	-9.085	4.27
21-OHP	0.004	-	-	-
Corticosterone	0.394	0.398	0.932	5.13
11-Deoxy cortisol	0.047	0.043	-8.014	6.42
21-Deoxy cortisol	-	-	-	-
Testosterone	0.268	0.240	-10.347	4.00
DHEA	0.412	0.383	-7.057	2.65
Progesterone	0.411	0.361	-12.229	2.90
Estrone	-	-	-	-
Androstenedione	0.135	0.132	-1.860	4.90
Aldosterone	0.013	0.011	-14.183	7.03

注：“-”表示未检出/低于检出限

综上所述，在血清中类固醇激素的检测实验中，4% BSA 溶液和血清配制的标准曲线，二者斜率基本一致。替代基质标曲测定血清，检测结果与理论值偏差在可接受范围内。此外，采用替代基质稀释血清，对不同稀释倍数下的样品测定结果具有良好的准确度和精密度。因此，4% BSA PBS 溶液作为血清替代基质，用于配制类固醇激素标准曲线。

### 2.3 精密度测定

用替代基质配制低、中、高三个浓度的样品，即 LQC (0.1 ng/mL)、MQC (1 ng/mL) 和 HQC (8 ng/mL)，DHEA 和 Estrone 的 HQC 浓度为 80 ng/mL。数据统计分析得到精密度和准确度，结果如表 13 所示。

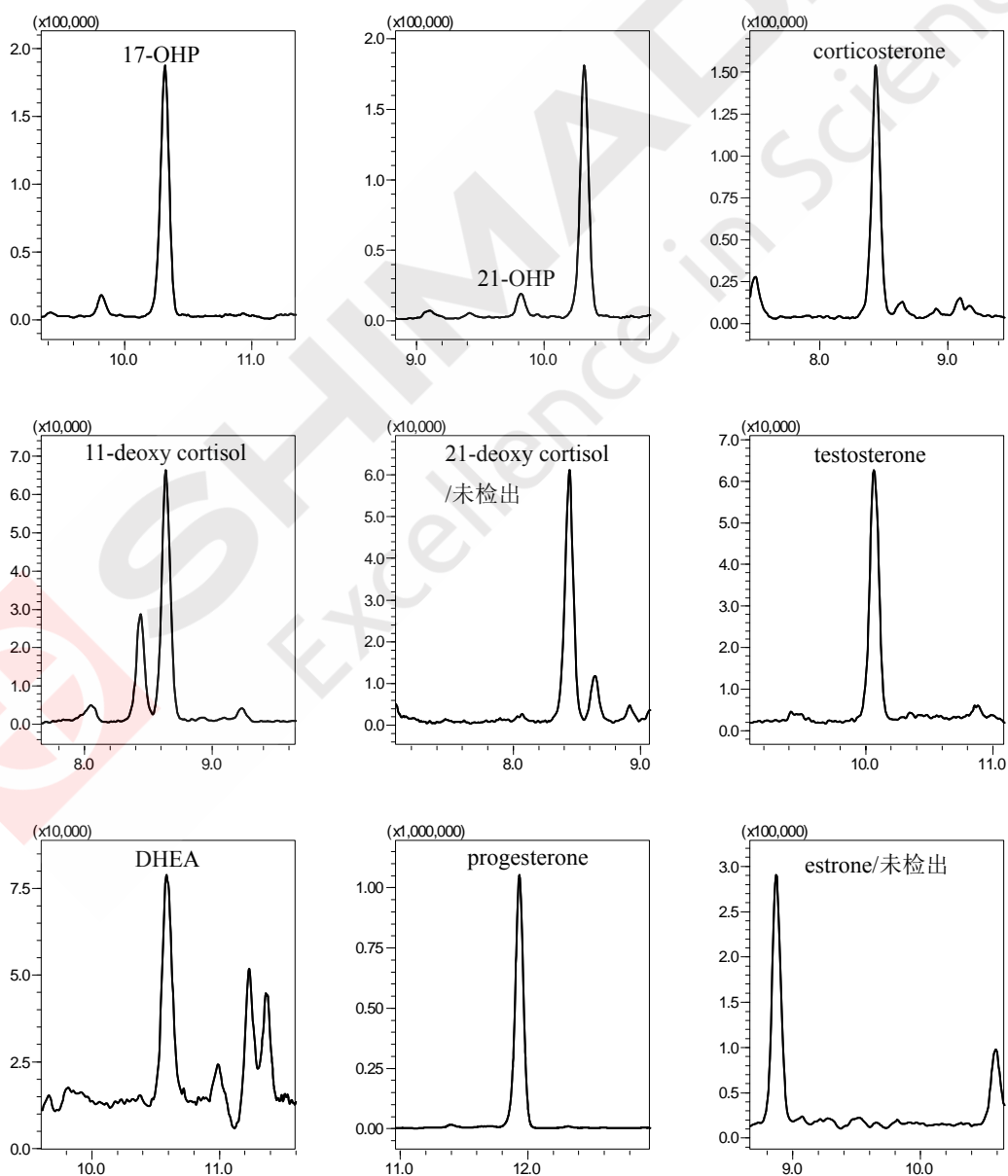
表 13 替代基质中类固醇激素精密度和准确测定结果

名称	LQC		MQC		HQC	
	精密度%	准确度%	精密度%	准确度%	精密度%	准确度%
17-OHP	1.46	97.3~103.2	1.15	96.8~104.3	1.63	98.2~102.3

21-OHP	3.68	93.2~106.4	0.55	96.7~105.0	0.47	96.7~108.9
Corticosterone	1.71	91.5~103.9	0.28	96.8~102.1	0.69	93.3~99.9
11-Deoxy cortisol	2.08	94.5~106.1	0.72	95.3~104.5	1.40	95.3~103.0
21-Deoxy cortisol	3.66	96.6~102.8	0.35	96.9~105.2	0.50	98.6~108.1
Testosterone	1.75	98.1~103.2	1.13	97.3~103.5	0.39	97.8~101.4
DHEA	4.84	98.8~102.6	2.04	94.9~102.5	0.44	94.5~99.1
Progesterone	2.03	97.9~106.4	0.54	92.4~104.1	0.45	96.1~103.9
Estrone	4.38	98.2~105.4	2.53	99.3~107.1	0.57	92.1~110.1
Androstenedione	3.17	94.8~102.1	0.62	94.5~104.0	1.34	93.4~100.7
Aldosterone	1.10	96.4~103.4	1.91	92.2~103.8	2.38	95.0~108.0

## 2.4 临床样品测定结果

共获取体检人血清临床样品 10 个，经前处理后分别进行测定，色谱图见图 5，结果如表 14 所示。



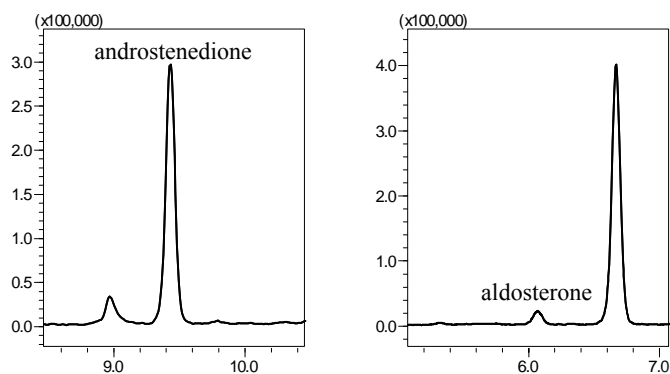


图 5 体检人血清临床样品 No.7 的 MRM 色谱图

表 14 体检人血清临床样品检测结果 (ng/mL)

化合物	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10
17-OHP	0.189	1.206	0.366	0.658	0.377	0.212	0.794	0.314	0.099	0.094
21-OHP	-	-	-	0.010	0.021	0.011	0.021	0.017	-	-
Corticosterone	0.158	0.402	4.683	1.846	2.968	0.834	0.974	3.056	0.264	0.262
11-Deoxy cortisol	0.161	0.044	0.723	0.290	0.400	0.119	0.322	0.262	0.123	0.044
21-Deoxy cortisol	-	0.014	0.029	-	0.043	-	-	0.027	-	-
Testosterone	0.181	3.154	0.188	0.328	0.226	0.118	0.101	0.217	0.114	0.087
DHEA	1.230	-	2.971	2.039	1.687	1.677	0.561	3.570	-	-
Progesterone	0.066	0.07	0.029	0.026	0.033	0.061	3.523	0.027	0.126	-
Estrone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Androstenedione	0.744	0.865	0.841	1.807	0.67	0.697	0.605	1.265	0.382	0.523
Aldosterone	-	-	0.076	0.100	-	0.076	0.092	0.095	-	-

注：“-”表示未检出/低于检出限

### 3. 结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用，通过替代基质配制标曲，结合 SLE（固相支撑液液萃取）前处理方法，建立了血清中类固醇激素的定量分析方法。实验结果表明，该方法的标准曲线定量范围为 0.01-10 ng/mL（DHEA 和 Estrone 为 0.1-100 ng/mL，Aldosterone 为 0.05-10 ng/mL），准确度范围为 84.0-113.8%，该方法分析速度快、稳定性和准确度好，可为临床类固醇激素的检测提供参考。

### 3.4 使用三重四极杆 LC-MS/MS 定量分析血浆中的儿茶酚胺类物质

**摘要：** 本文利用 EVOLUTE WCX 固相萃取系统处理血浆样品，以超高灵敏度三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 为检测仪器，通过建立基质加标曲线，内标法对血浆样品中的儿茶酚胺类物质进行了定量分析。该方法快速准确，灵敏度高，符合临床上高灵敏度和高通量检测的要求。

**关键词：** 血浆 儿茶酚胺 LCMS-8060 固相萃取 WCX

儿茶酚胺是一种含有儿茶酚和胺基的神经类物质，其主要存在于大脑、肾上腺髓质和其他神经系统中，包括去甲肾上腺素（NE）、肾上腺素（EP）和多巴胺（DA），这三种儿茶酚胺都是由酪氨酸为前提转化得到的。临床上通常通过血浆里儿茶酚胺水平的变化来判定不同的病态情形：比如肾上腺髓质瘤会结合大量的儿茶酚胺导致其循环失常；在心血管系统中，儿茶酚胺含量超标会引发高血压与心肌梗塞，含量过低时则通常导致低血压，儿茶酚胺含量水平的不同和心脏猝死及冠状心脏病和心脏不充血等也有潜在联系。因此，很有必要建立高灵敏度和高通量的测定血浆中儿茶酚胺含量的方法。

本文使用 Biotage 公司 EVOLUTE WCX 固相萃取系统对复杂血浆样品进行前处理，结合超高灵敏度三重四极杆质谱仪岛津 LCMS-8060，可对血浆中的儿茶酚胺进行快速准确的定量分析。

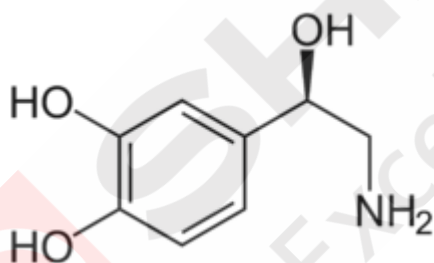


图 1. 去甲肾上腺素

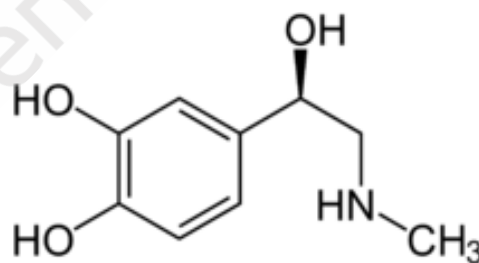


图 2. 肾上腺素

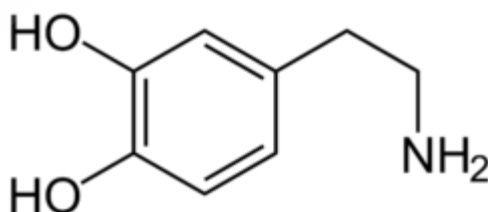


图 3. 多巴胺

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-20A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统，包括 LC-20AD×2（输液泵），SIL-20A（自动进样器），CTO-20A（柱温箱），CBM-20A（系统控制

器), DGU-20A<sub>5</sub> (在线脱气机), LCMS-8060 (三重四极杆质谱) 和 LabSolutions Ver 5.80 (工作站)。

## 1.2 分析条件

### 液相色谱条件

流动相: A相: 0.1%甲酸/水;  
B相: 0.05%甲酸/甲醇  
流速: 0.2 mL/min, 添加柱后溶剂为 B  
相 0.2 mL/min  
色谱柱: Shimpack MAqC-ODS I  
2.0 mm I.D.× 150 mm L., 5 μm  
洗脱方式: 梯度洗脱, 初始浓度为 B 相 1%,  
时间程序见表 1  
进样量: 5 μL

### 质谱条件

分析仪器: LCMS-8060  
离子源: ESI (+)  
离子源接口电压: 0.6 kV  
加热气: 空气 17 L/min  
雾化气: 氮气 1.8 L/min  
干燥气: 氮气 3 L/min  
碰撞气: 氩气  
源温: 250°C  
脱溶剂管温度: 250°C  
加热模块温度: 400°C  
扫描模式: 多反应监测 (MRM)

表 1 梯度时间程序

Time	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	1
3.00	Pumps	Pump B Conc.	50
3.10	Pumps	Pump B Conc.	99
7.00	Pumps	Pump B Conc.	99
7.10	Pumps	Pump B Conc.	1
12.00	Controller	Stop	

表 2 目标物的 MRM 定量离子对

化合物名称	前体离子	产物离子
去甲肾上腺素	152.1	107.1
去甲肾上腺素-d6	158.1	111.1
肾上腺素	184.1	166.1
肾上腺素-d6	190.1	172.1
多巴胺	154.1	91.1
多巴胺-d4	158.1	95.1

## 1.3 血浆样品前处理

采用以阳离子交换为主的混合模式固相萃取板 (EVOLUTE WCX, Biotage 公司) 处理血浆样品, 不需搅拌、离心分离等离线步骤, 可在短时间内对血浆样品进行简单的预处理。具体步

骤如表 3 所示。

表 3 样品前处理步骤

样品准备	市售人血浆样品等量分装保存。分析前取出血浆样品加入氘代内标（500pg/mL）和不同浓度儿茶酚胺标样。取 300 $\mu$ L 加标血浆与等体积 50mM（pH=7.0）乙酸铵水溶液混合。
步骤 1	向 EVOLUTE WCX 萃取板的每个萃取孔中，加入 900 $\mu$ L 甲醇进行润洗至排干。
步骤 2	加入 900 $\mu$ L 乙酸铵（pH=7.0）进行平衡至排干。
步骤 3	将准备好的 600 $\mu$ L 血浆和乙酸铵混合物加入萃取孔流动萃取至排干。
步骤 4	加入 300 $\mu$ L 10% 甲醇进行除杂至排干。
步骤 5	待无液滴流出，加入 300 $\mu$ L 异丙醇至排干
步骤 6	加入 1000 $\mu$ L 5% 甲酸+95% 甲醇混合溶液进行解吸，收集解吸液。
步骤 7	40 $^{\circ}$ C 氮气吹干解吸液
步骤 8	加入 150 $\mu$ L 0.1% 甲酸水溶液重溶，待测

## 2 结果讨论

### 2.1 标准品的 MRM 色谱图

由于儿茶酚胺类目标物极性较大，其在普通 C18 色谱柱上保留较弱，本文采用含金属的 Shimpack MAqC-ODS I 色谱柱，除疏水性作用力外，还具有阳离子交换模式，增强了目标物的保留，3 种目标物均得到了良好分离（如图 4 所示）。

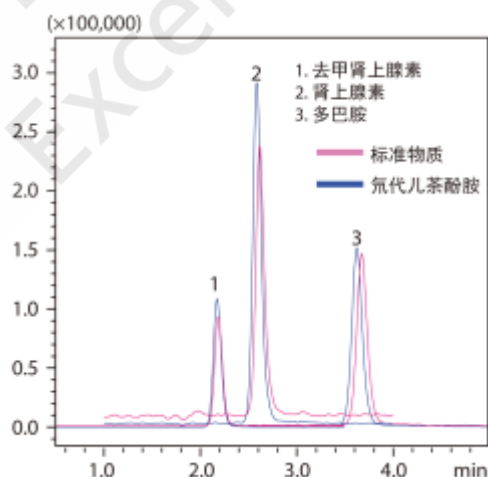


图 4 3 种儿茶酚胺类化合物 MRM 色谱图

### 2.2 定量下限和校准范围

由于血浆样品中包含内源性儿茶酚胺，难以得到实测样品的定量下限。因此，本文将原本

作为内标物质的氘代儿茶酚胺改为标准溶液以测定定量下限。将内标物以 HPLC 级甲醇逐级稀释可得标准溶液校准曲线，血浆样品加标后经固相萃取可得基质匹配校准曲线，其结果如表 4 所示。

表 4 标准溶液和基质添加样品的校准范围

化合物名称	标准曲线		基质标准曲线	
	校准范围 (pg/mL)	回归系数 ( $r^2$ )	校准范围 (pg/mL)	回归系数 ( $r^2$ )
去甲肾上腺素-d6 158.1 > 111.1	2.5 - 2000	0.9999	2.5 - 2000	0.9997
肾上腺素-d6 190.1 > 172.1	10 - 2000	0.9999	10 - 2000	0.9994
多巴胺-d4 158.1 > 95.1	5 - 2000	0.9999	10 - 2000	0.9995

### 2.3 方法的适应性

通过在血浆中加入固定浓度的内标和不同浓度的目标物，经 EVOLUTE WCX 固相萃取后，可得一系列 QC 样品。根据扣减空白后绘制的基质标准曲线，可以测定血浆中的儿茶酚胺浓度，并对定量重复性进行评估，其结果如表 5 所示。

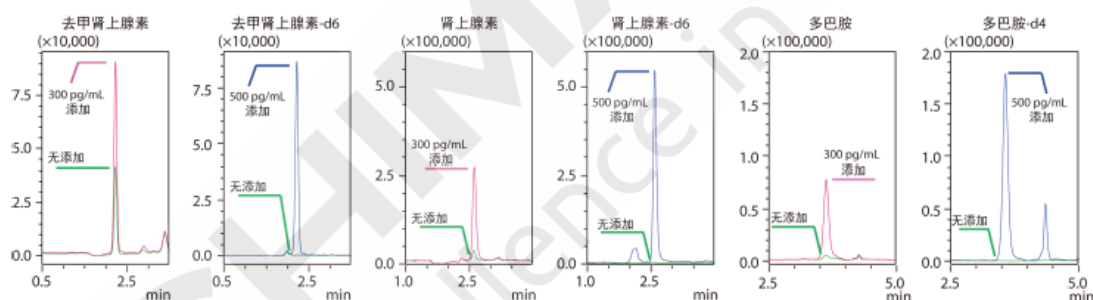


图 5 血浆中内源性儿茶酚胺及其加标样的 MRM 色谱图

表 5 QC 样品中儿茶酚胺的测定结果

化合物名称	添加浓度 (pg/mL)	测定值 (面积比)	线性 ( $r^2$ )	理论浓度 (pg/mL)	测定浓度 (pg/mL)	准确度	重复性 %RSD (n=2)
去甲肾上腺素 (152.1 > 107.1)	0	0.4969	0.9994	292.2	-	-	0.6%
	18.1	0.4862		310.3	282.0	92.3%	4.5%
	72.5	0.6023		364.7	346.6	95.8%	3.4%
	300	1.0176		592.2	577.3	97.2%	0.5%
	600	1.5652		892.2	881.5	97.9%	1.4%
	1200	2.6390		1492.2	1478.1	97.6%	0.1%
肾上腺素 (184.1 > 166.1)	0	0.1590	0.9986	52.2	-	-	1.2%
	18.1	0.2056		70.3	66.3	94.4%	2.4%
	72.5	0.3947		124.7	123.7	99.2%	3.7%
	300	1.1140		352.2	341.8	97.0%	0.7%
	600	2.0267		652.2	618.5	94.8%	3.9%
	1200	4.2128		1252.2	1281.3	102.3%	2.7%
多巴胺 (154.1 > 91.1)	0	0.0223	0.9999	13.5	-	-	6.0%
	18.1	0.0511		31.6	34.6	109.4%	4.3%
	72.5	0.1260		86.0	89.4	104.0%	4.7%
	300	0.4281		313.5	310.5	99.0%	1.7%
	600	0.8436		613.5	614.5	100.2%	0.2%
	1200	1.6754		1213.5	1223.2	100.8%	0.1%

### 3 结论

本文利用 EVOLUTE WCX 固相萃取系统处理血浆样品，以超高灵敏度三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 为检测仪器，通过建立基质加标曲线，内标法对血浆样品中的儿茶酚胺类物质进行了定量分析。该方法快速准确，灵敏度高，符合临床上高灵敏度和高通量检测的要求。



## 第四章 维生素与氨基酸检测

### 4.1 引言

维生素是维持身体健康所必需的一类有机化合物，这类物质在体内既不是构成身体组织的原料，也不是能量的来源，而是一类调节物质，对机体的新陈代谢、生长、发育均有极其重要作用。氨基酸，含有碱性氨基和酸性羧基的一类有机化合物的通称，是生命体的三大营养物质之一，是组成酶和蛋白质的基本单位。氨基连在 $\alpha$ -碳上的为 $\alpha$ -氨基酸。组成蛋白质的氨基酸大部分为 $\alpha$ -氨基酸。氨基酸在人体内通过代谢可以发挥合成组织蛋白质，变成酸、激素、抗体、肌酸等含氮物质，转变为碳水化合物和脂肪，氧化成二氧化碳和水及尿素，产生能量等作用。

维生素与氨基酸都对人体健康至关重要，一旦缺乏，会引起生理机能障碍而发生某种疾病，对人体健康造成损害。维生素 K 为脂溶性维生素，是肝脏合成凝血酶原不可缺少的物质，可促使凝血酶原前体转变为凝血酶原。维生素 K 缺乏时会引起低凝血酶原血症，出现凝血障碍。维生素 A 又称视黄醇或抗干眼病因子，具有维持正常视觉功能、维护上皮组织细胞的健康和促进免疫球蛋白的合成、维持骨骼正常生长发育等多种作用，维生素 A 缺乏时会得干眼病、夜盲症等，摄入过量将出现皮肤干燥、脱屑和脱发等症状。维生素 E 在体内主要起到保护细胞生物膜结构的作用，虽然在临床上维生素 E 缺乏症非常罕见，但多与新生儿发育不良及代谢和遗传病有关。氨基酸对人体不仅提供了合成蛋白质的重要原料，而且对于促进生长，进行正常代谢、维持生命提供了物质基础。如果人体缺乏或减少其中某一种，人体的正常生命代谢就会受到障碍，甚至导致各种疾病的发生或生命活动终止。

常规对于维生素的检测多采用高效液相色谱，分析氨基酸则多采用离子交换色谱后茚三酮进行柱后衍生化进行检测。然而经典的测定方法虽仍被广泛应用，但灵敏度不足、样品量大、分析时间长等缺点均限制了这些方法的广泛应用。随着分析技术的发展，质谱作为高选择性与高灵敏度的检测工具，在维生素与氨基酸的检测中发挥着重要作用。

本章对岛津利用三重四极杆液质联用方法对维生素 K1、维生素 A、维生素 E 以及氨基酸的检测方法进行介绍，供相关人员参考。

## 4.2 LCMS-8060 测定血浆中的维生素 K1

**摘要：** 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用检测血浆中 VK1 的检测方法。样品经前处理后，用超高效液相色谱 LC-30A 在 5.0 min 内完成分析，三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 进行定量分析。VK1 在 0.05~50 ng/mL 内线性良好，判定系数大于 0.9996；分别用浓度为 0.2 ng/mL、2.0 ng/mL 和 10 ng/mL 的混合标准溶液进行了精密度实验，实验结果表明连续 6 次进样保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.13 ~ 0.16% 和 3.05 ~ 3.82%之间，仪器精密度良好。

**关键词：** 维生素 K 血浆 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

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，临床可见出血倾向，凝血时间延长。目前，维生素K1的血药浓度测定方法有HPLC 荧光检测法、HPLC-UV法、GC-MS法和HPLC-APCI/MS法。这些方法的操作过程繁琐，成本较高，不利于大量生物样品的分析。文献报道人体中维生素K1的含量大约为0.045~3.92 ng/mL，随食物及时间的不同，其浓度的波动范围没有显著变化；但该文献并没有报道测定方法。本文建立了灵敏度较高的血浆中维生素K1的HPLC-ESI/MS测定法，标准曲线的最低浓度为0.05 ng/mL，可应用于血浆中维生素K1 的研究。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配制为 LC-30AD×2（输液泵），DGU-20A5R（在线脱气机），SIL-30ACMP（自动进样器），CTO-30A（柱温箱），CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.80 色谱工作站。

#### 1.2 分析条件

##### 1.2.1 液相色谱条件

色 谱 柱： Kinetex C8 Column (2.1 mm I.D.×150 mm L., 2.6 μm)

流 动 相： A 相：(0.1%甲酸)水， B 相： 甲醇

流 速： 0.40 mL/min

柱 温： 40℃

进样体积： 10 μL

洗脱方式： 梯度洗脱， 初始比例 80%B

表 1 通用梯度洗脱程序

Time (min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	80
0.51	Pumps	Pump B Conc.	95
4.50	Pumps	Pump B Conc.	95
4.60	Pumps	Pump B Conc.	80
8.00	Controller	Stop	

### 1.2.2 质谱条件

分析仪器： LCMS-8060

离子源： ESI +

雾化气流速： 3.0 L/min

加热气流速： 15.0 L/min

接口温度： 350℃

DL 温度： 250℃

加热模块温度： 400℃

干燥气流速： 5.0 L/min

扫描模式： 多反应监测 (MRM)，

MRM 参数见表 2

表 2 化合物信息及 MRM 参数

名称	CAS.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
VK1	84-80-0	451.40	187.15*	-17.0	-26.0	-20.0
			105.10	-17.0	-53.0	-21.0

\*表示定量离子

### 1.3 样品制备

标准溶液配制：维生素 K1 标准品称取适量用环己烷/甲醇（1:1）的混合溶剂配制 2.5 mg/mL 的单标准贮备液，用空白基质溶液逐步稀释成 0.05、0.1、0.5、1、5、10 和 50 ng/mL 系列浓度的混合标准工作液。

样品前处理方法：因人血浆获取比较困难，又为了考察血浆带来的基质影响所以暂以大鼠血浆代替人血浆。取 1 mL 大鼠血浆加入 4 mL 纯甲醇，振荡均匀后 14000 rpm 离心 10 min，取 4 mL 上清加入 16 mL 环己烷振荡，3500 rpm 离心 5 min，取 16 mL 上层液吹干后用 4 mL 环己烷/甲醇（1:9）的混合溶剂复溶，此溶液为空白基质溶液。

另取 0.2 mL 大鼠血浆加入 10  $\mu$ L 1  $\mu$ g/mL 的 VK1 标准溶液再加入 0.8 mL 纯甲醇，振荡均匀后 14000 rpm 离心 10 min，取 0.8 mL 上清加入 4 mL 环己烷振荡，3500 rpm 离心 5 min，取 4 mL 上层液吹干后用 1 mL 环己烷/甲醇（1:9）的混合溶剂复溶，此溶液为基质加标溶液。

## 2 结果讨论

### 2.1 标准样品的 MRM 色谱图

标准样品的 MRM 色谱图如图 1 所示：

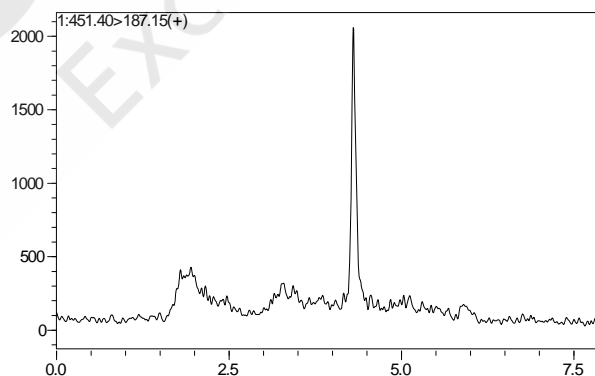


图 1 标准样品的 MRM 色谱图（0.1 ng/mL）

### 2.2 线性关系

配制浓度为 0.05、0.1、0.5、1、5、10 和 50 ng/mL 的标准曲线，按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线，标线如下图所示。在 0.05~50

ng/mL 浓度范围内线性良好。线性方程、线性范围和判定系数见表 3。

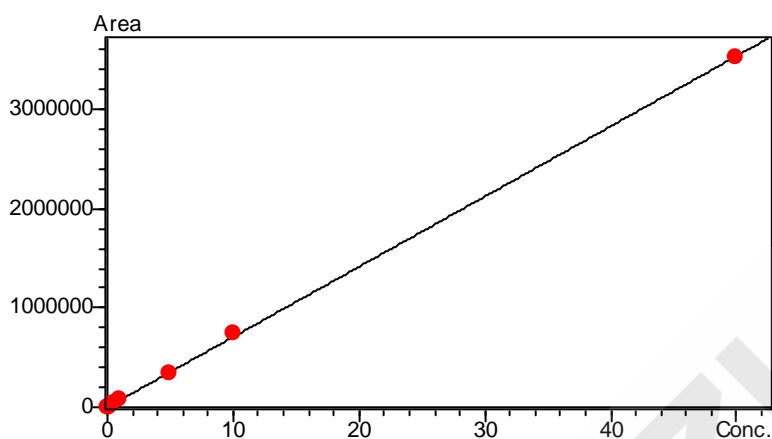


图 2 标准工作曲线

表 3 校准曲线参数

名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)	判定系数 $r^2$
VK1	$Y = (70754.6)X + (1662.38)$	0.05~50	96.9~103.8	0.9996

## 2.3 检出限和定量限

对浓度为 0.05 ng/mL 的混合标准溶液进样分析，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 4 所示。

表 4 检出限和定量限

名称	信噪比	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
VK1	103.71	0.0015	0.0048

## 2.4 精密度实验

对三个浓度的混合标准溶液连续 6 次进样，考察仪器的精密度、保留时间和峰面积的重复性结果如表 5 所示。三个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.13 ~ 0.16% 和 3.05 ~ 3.82% 之间，仪器精密度良好。

表 5 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

样品名称	RSD% ((0.2 ng/mL)		RSD%(2 ng/mL)		RSD%(10 ng/mL)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
VK1	0.16	3.82	0.14	3.05	0.13	3.80

## 2.5 选择性和回收率实验

按照 1.3 中样品制备方法提取净化得到空白基质，平行三份前加标的 10 ng/mL 基质加标样品，具体结果如表 6，加标回收率为 27.36%。空白基质色谱图如图 3 所示，基质加标样品色谱图如图 4 所示，由图 3 和图 4 的结果可看出该方法有较好的选择性。

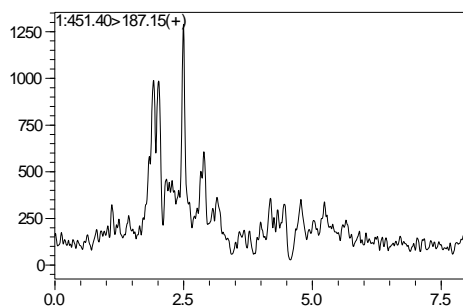


图 3 空白基质色谱图

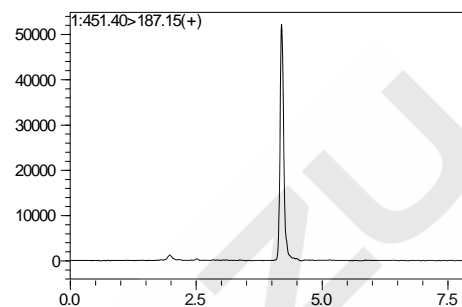


图 4 加标回收色谱图 (10 ng/mL)

表 6 加标样的回收率结果(n=3)

样品名称	实测平均值 (ng/mL)	回收率 (%)
VK1	2.736	27.36

## 2.6 携带效应实验

标准曲线的最大浓度点 50 ng/mL 的样品分析完成后直接对空白基质样品进行采集得到的谱图和统计结果如下所示：

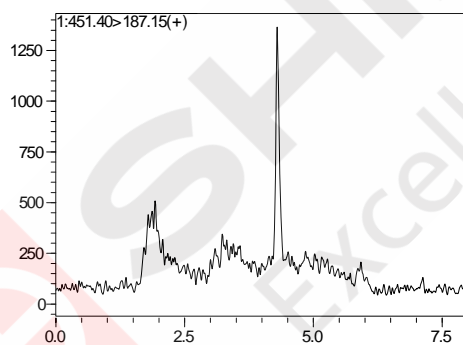


图 5 基质标准品 (0.05 ng/mL) 色谱图

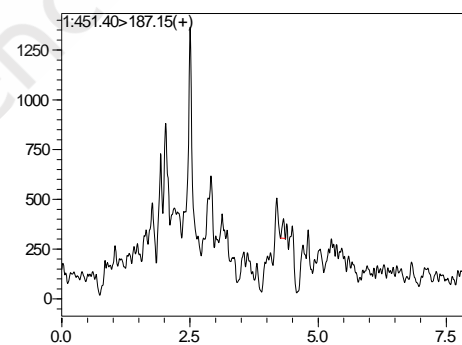


图 6 空白基质色谱图

表 7 携带效应统计结果

序号	样品	R.T	Area	Area 2/ Area 1
1	0.05 ng/mL	4.301	5242	5.49%
2	blank	4.325	288	

空白基质样品和标准曲线的最低浓度点 0.05 ng/mL 的样品的峰面积比值为 5.49% < 15%，符合生物样本检测携带效应的要求。

### 3 结论

使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定血浆中维生素 K1。在 0.05~50 ng/mL 浓度范围内维生素 K1 的基质标准曲线线性良好，判定系数大于 0.9996；加标样品的回收率为 27.36%；分别用浓度为 0.2 ng/mL、2.0 ng/mL 和 10 ng/mL 的基质标准溶液进行了精密度实验，实验结果表明连续 6 次进样保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.13 ~ 0.16%和 3.05 ~ 3.82%之间，仪器精密度良好；维生素 K1 的检出限和定量限分别为 0.0015 和 0.0048 ng/mL，具有较高的检测灵敏度。

此方法快速、简单、选择性强和灵敏度高，满足血浆样品中维生素 K1 的检测要求。



SHIMADZU  
Excellence in Science

### 4.3 LCMS-8040 测定人微量血浆中维生素 A 和维生素 E

**摘要:** 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱与三重四极杆质谱联用仪配合内标定量法在 5 分钟内测定 10  $\mu\text{L}$  血浆中 VA 和 VE 的分析方法。VA 在 5.00~1000  $\mu\text{g/L}$  线性范围内, 相关系数为 0.9967; VE 在 0.05~10  $\text{mg/L}$  线性范围内, 相关系数为 0.9973。对低中高不同浓度的血浆加标样品进行精密度实验, 连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.07%~0.50% 和 1.35%~5.19% 之间, 仪器和方法精密度良好。不同浓度加标回收率在 93.56~103.57% 之间, RSD 在 2.33~4.22% 之间。提取回收率和基质效应考察均符合要求。实验结果表明该方法分析速度快、线性良好、灵敏度高、稳定性好、准确度优异, 可以用于微量血浆中 VA 和 VE 的快速、准确定量分析。

**关键词:** 维生素 A 维生素 E 微量血浆 超高效液相色谱串联质谱法

维生素A、维生素E是维持人体正常代谢功能所必需的脂溶性维生素, 体内不能自行合成, 需从食物中摄取, 维生素缺乏或过量均可导致相应疾病。维生素A具有促进生长、维持上皮组织正常机能的作用, 并参与视紫质的合成, 能增强视网膜的感光力。维生素E在生物体内可阻断自由基链锁反应, 保护细胞膜的稳定性, 从而具有抗衰老、保护皮肤、防止习惯性流产等作用。近年来的研究发现, 维生素A和维生素E与儿童的生长发育及一些营养代谢疾病有密切关系。婴幼儿时期维生素A容易缺乏。维生素A亚临床缺乏(SVAD)时无任何临床表现, 但可使机体抵抗力降低, 导致疾病易于发生。我国儿童亚临床维生素A缺乏现象较普遍, VA营养不良是我国亟待解决的儿童健康问题之一。婴儿特别是新生儿往往缺乏维生素E, 结果会导致贫血、浮肿及皮肤散在红色斑丘的症状, 影响儿童健康。因此, 建立测定人血中维生素A、维生素E的含量对于与维生素相关疾病的临床预防、诊断、治疗具有重要的意义。

VA 和 VE 常用的检测方法是 HPLC 法, 灵敏度较低以致检测时所需样品量较大, 而 LC-MS/MS 法具有灵敏度高、准确性高、特异性强等优势, 有望成为未来的主要检测方法。本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用, 建立了微量血浆中 VA 和 VE 的快速检测方法, 供相关检测人员参考。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

本系统由岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 组成。具体配置为: LC-30AD $\times$ 2 输液泵, 20  $\mu\text{L}$  混合器, DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器,

CTO-30A 柱温箱, FCV-20AH<sub>2</sub> 柱后切换阀, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.75 色谱工作站。

## 1.2 分析条

### 液相条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS III, 2.0 mm I.D.

× 50 mm L., 1.6 μm 粒径

流动相: A = 0.1% 甲酸水; B = 0.1% 甲酸甲  
醇

流速: 0.4 mL/min

进样体积: 5 μL

柱温: 25°C

洗脱方式: 梯度洗脱, B相初始浓度为92%,  
时间程序见表1。

### 质谱条件

分析仪器: LCMS-8040

离子源: ESI正离子模式同时分析

雾化气流速: 2.0 L/min

脱溶剂管温度: 150°C

加热模块温度: 500°C

干燥气流速: 12.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 100 ms

MRM参数: 见表2

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.30	Pumps	Pump B Conc.	92
0.31	Pumps	Pump B Conc.	100
3.00	Pumps	Pump B Conc.	100
3.01	Pumps	Pump B Conc.	92
5.00	Controller	Stop	

表2 MRM 参数

化合物名称	CAS 号	前体离子	产物离子	Q <sub>1</sub> Pre Bias (V)	CE (V)	Q <sub>3</sub> Pre Bias (V)
VA	68-26-8	269.30	213.20	-13.0	-10.0	-24.0
VA IS	-	274.30	218.10	-13.0	-12.0	-25.0
VE	10191-41-0	431.20	165.10	-30.0	-19.0	-32.0
VE IS	-	437.20	171.15	-30.0	-22.0	-32.0

## 1.3 样品制备

标准工作曲线配制: 用乙醇配制浓度为 500 mg/L 的四种标样母液 (维生素 A、E 的标准溶液需临用前用紫外分光光度计标定其准确浓度), 用乙醇稀释制备得到 10 mg/L 的内标混合标样储备液以及含 10 mg/L 的 VA 和 100 mg/L 的 VE 外标混合标样储备液; 再依次用乙醇配制外标浓度分别为 VA: 0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 mg/L; VE: 0.05、0.1、0.2、0.5、

1.0、2.0、5.0、10.0 mg/L，内标浓度统一为 1 mg/L 的标准工作液用于建立标准曲线。

样品前处理方法：参考相关文献，最终采用液液萃取方法（提取溶剂使用正己烷）提取样品，上清液室温条件下氮气吹干。向上述吹干后的离心管中加入一定量的甲醇，涡旋混匀并高速离心，取上清液 5  $\mu$ L 进样分析。

## 2 结果讨论

### 2.1 标准样品的 MRM 色谱图

混合标准样品的 MRM 色谱图如图 1 所示。

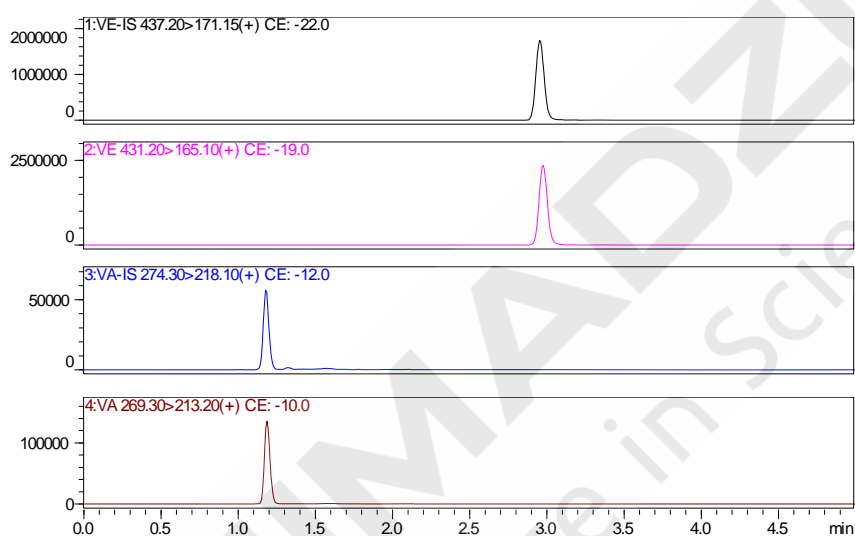


图 1 VA 和 VE 的浓度分别为 0.1 mg/L 和 1.0 mg/L，内标浓度为 1 mg/L 的 MRM 色谱图

### 2.2 线性关系

由于人体血液中存在较大浓度的 VA 和 VE，所以不适于用基质加标法建立标准曲线。按 1.2 中的分析条件进行测定，采用内标法建立校准曲线。如图 2 所示，VA 和 VE 分别在 0.005~1 mg/L 和 0.05~10 mg/L 的浓度范围内线性关系良好，相关系数分别为 0.9994 和 0.9987，方法检出限和定量限见表 3。

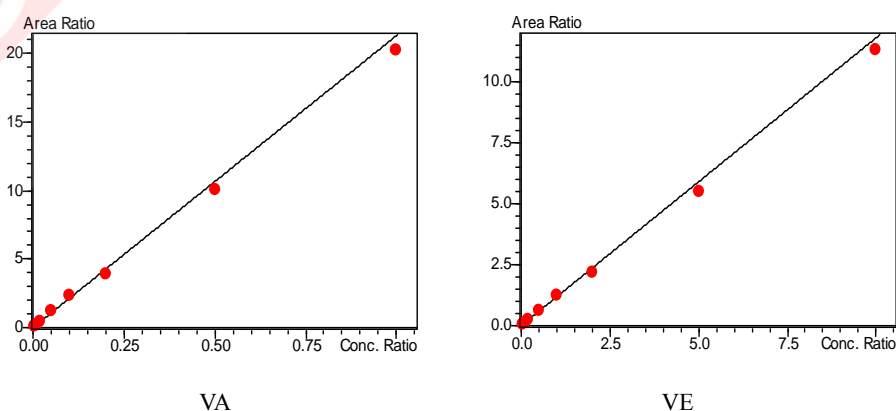


图 2 VA 和 VE 的标准曲线

表 3 VA 和 VE 的校准曲线参数、检出限及定量限

名称	校准曲线	线性范围 (mg/L)	相关系数 (R)	准确度范围 (%)	检出限 ( $\mu\text{g/L}$ )	定量限 ( $\mu\text{g/L}$ )
VA	$Y = (21.3125)X + (0.0148143)$	0.005~1.0	0.9967	90.6~109.7	0.18	0.60
VE	$Y = (1.17639)X + (0.0116530)$	0.05~10	0.9973	92.5~107.0	0.21	0.69

### 2.3 血液加标样品的精密度实验

以已知浓度的混合血浆（来自两个未服用 VA 和 VE 药物的成年人）为基质，往血浆基质中添加 VA 和 VE 及同位素内标混合标样（加标浓度 LQC: VA-0.2 mg/L, VE-2.0 mg/L; MQC: VA-1.0 mg/L, VE-10.0 mg/L; HQC: VA-8.0 mg/L, VE-80.0 mg/L），配制低中高不同血浆浓度的样品，按 1.3 项下样品前处理方法操作，平行测定 6 次，4 个组分的保留时间相对标准偏差和峰面积的相对标准偏差分别在 0.07%~0.50%和 1.35%~5.19%之间，结果表明仪器系统及本方法具有良好的精密度。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

化合物 名称	RSD% (LQC)		RSD% (MQC)		RSD% (HQC)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
VA	0.23	4.04	0.10	4.45	0.09	3.04
VA IS	0.22	5.19	0.10	3.83	0.09	2.80
VE	0.50	1.35	0.14	2.22	0.07	2.55
VE IS	0.48	2.93	0.15	1.94	0.07	1.76

### 2.4 血液加标样品回收率实验

图 3 为血浆基质按照 1.3 中样品制备方法所得 MRM 色谱图。往血浆基质中添加 VA 和 VE 及同位素内标混合标样，加标 MRM 色谱图如图 4 所示，从图 4 中可以看到，基质加标样品有很好的响应，加标回收率结果见表 5。

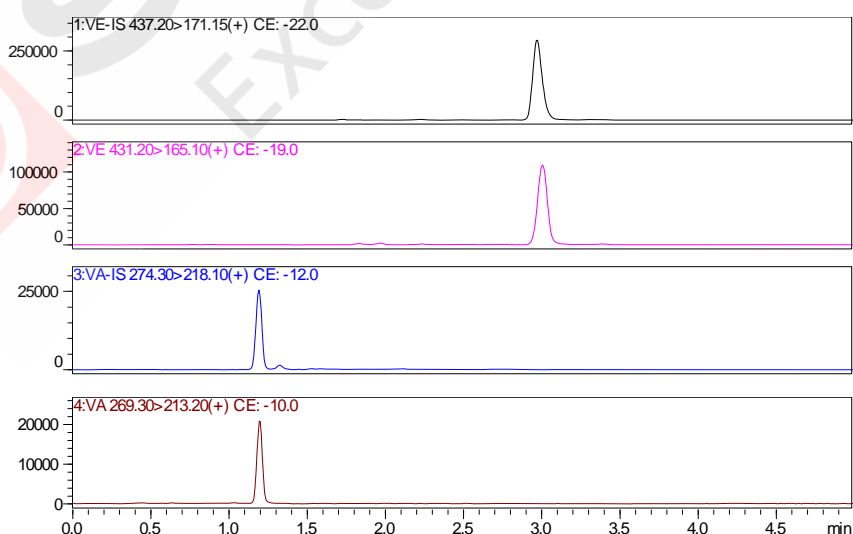


图 3 血浆基质的 MRM 色谱图

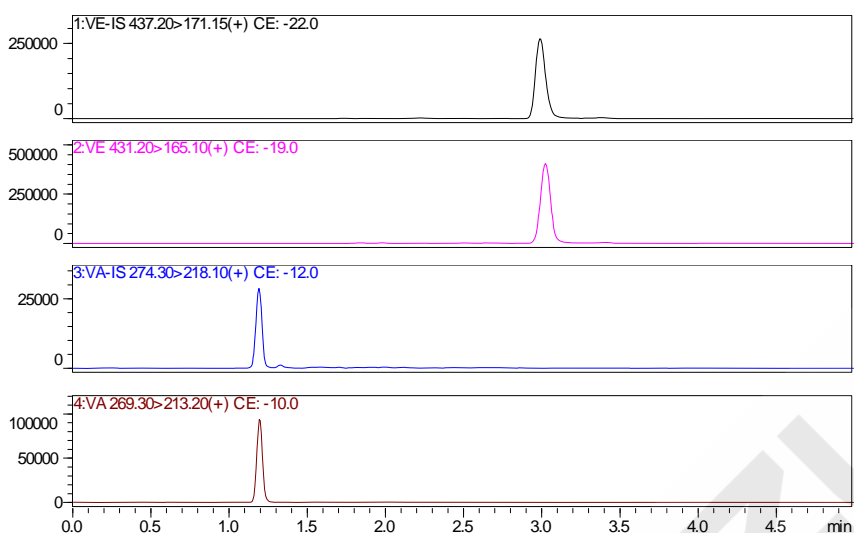


图4 血浆基质加标 (MQC) 的MRM 色谱图

表5 血浆加标回收率结果 (n=3)

目标物	本底值 mg/L	加标浓度 LQC		加标浓度 MQC		加标浓度 HQC	
		回收率 %	RSD %	回收率 %	RSD %	回收率 %	RSD %
VA	0.34*	97.08	3.17	103.57	3.55	93.56	2.89
VE	3.01	100.71	4.22	101.98	2.35	94.81	2.33

\*内标法检出浓度

## 2.5 提取回收率考察

取已知浓度的血浆基质，往血浆基质中添加 VA 和 VE 及同位素内标混合标样，制备低中高不同添加量的质控样品，进行 6 样本分析。同时另取血浆基质，除不加内标外，其他按 1.3 项下样品前处理方法操作，取上清液加入相应浓度的标准溶液和内标溶液，涡流混合，氮气流下吹干，残留物加甲醇溶解，取 5  $\mu$ L 进样分析，获得相应峰面积。将第一种处理方法获得的峰面积扣除掉血浆本底值后除以第二种处理方法的峰面积扣除血浆本底值计算提取回收率。结果见表 6 和表 7。VA 和 VE 在各浓度水平的回收率均大于 70%。

表6 VA 提取回收率结果 (n=6)

浓度水平	提取回收率 (%)	RSD (%)
LQC	110.3	8.5
MQC	95.9	8.4
HQC	95.3	9.2

表7 VE 提取回收率结果 (n=6)

浓度水平	提取回收率 (%)	RSD (%)
LQC	72.7	14.9
MQC	84.8	3.6
HQC	86.7	8.2

## 2.6 基质效应考察

取血浆基质，除不加标准溶液和内标外，按 1.3 项下样品前处理方法操作，往萃取后的上清液中添加标样和内标，涡旋混匀，氮气吹干，甲醇复溶制备得低中高 3 个浓度未经提取的样品，6 样本分析。另以甲醇配制相应上述浓度的样品，每个浓度 3 样本分析。以前者处理后样品测得的峰面积扣除血浆本底值与后者甲醇直接配制样品测得的峰面积相比，考察样品的基质效应，结果见表 8 和表 9。

表 8 VA 基质效应考察结果 (n=6)

浓度水平	内标归一化基质效应因子 (%)	RSD(%)
LQC	87.1	2.1
MQC	99.1	3.1
HQC	100.8	2.2

表 9 VE 基质效应考察结果 (n=6)

浓度水平	内标归一化基质效应因子 (%)	RSD(%)
LQC	82.5	2.8
MQC	109.0	4.8
HQC	106.1	2.3

## 2.7 医院提供血液样品分析结果

某医院取得样品三个，实际样品按 1.3 项下样品前处理方法的步骤处理。将处理后的样品注入液相色谱-串联质谱仪，测得相应的峰面积，根据标准曲线得到血浆中 VA 和 VE 的浓度，平行测定 3 次，结果见表 10。

表 10 实际样品中 VA 和 VE 检测结果

样品	VA( $\mu\text{g/L}$ )	RSD(%) (n=3)	VE(mg/L)	RSD(%) (n=3)
Sample 1	379.13	3.75	2.80	1.19
Sample 2	338.72	2.18	2.60	0.65
Sample 3	757.09	3.77	5.73	1.00

## 3 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱与三重四极杆质谱联用仪配合内标定量法在 5 分钟内测定微量血浆中 VA 和 VE 的分析方法。VA 在 5.00~1000  $\mu\text{g/L}$  线性范围内，相关系数为 0.9967；VE 在 0.05~10 mg/L 线性范围内，相关系数为 0.9973。对低中高不同浓度的血浆加标样品进行精密度实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.07%~0.50 % 和 1.35%~5.19% 之间，仪器和方法精密度良好。不同浓度加标回收率在 93.56~103.57 % 之间，RSD

在 2.33~4.22 %之间。提取回收率和基质效应考察均符合要求。实验结果表明该方法分析速度快、线性良好、灵敏度高、稳定性好、准确度优异，可以用于微量血浆中 VA 和 VE 的快速、准确定量分析。



## 4.4 LCMS-8045 检测血浆中 VA 和 VE 长期稳定性考察

**摘要：** 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用，连续 30 天测定血浆中维生素 A 和维生素 E，分别考察了日内精密度和日间精密度的。实验数据表明，在没有使用阀切换情况下，30 天内维生素 A 和维生素 E 的平均 RR 值稳定，相对偏差小于 10%，能够为临床诊断提供参考。

**关键词：** LCMS-8045 VA 和 VE 血浆 稳定性

维生素是人和动物为维持正常的生理功能而必须从食物中获得的一类微量有机物质，在人体生长、代谢、发育过程中发挥着重要的作用。维生素 A 能够促进发育、细胞生长发育和再生、维持免疫系统，是构成视觉细胞中感受弱光的视紫红质的组成成分。维生素 E 是天然的抗氧化剂，阻止细胞膜上的不饱和脂肪酸的过氧化反应，具有抗衰老、保护皮肤等作用。近年来的研究发现，维生素 A 和维生素 E 与儿童的生长发育及一些营养代谢疾病有密切关系。因此，能够及时、准确地掌握体内的维生素 A 和维生素 E 的水平对疾病的预防、诊断和治疗具有重要意义。

在临床检测中，维生素 A 和维生素 E 检测常用液相色谱法，但该方法存在灵敏度低、样品用量大、易被干扰等问题。液相色谱串联质谱在分析中具有分析速度快、灵敏度高、定性定量准确度高、抗干扰能力强的优势，而被越来越多的应用于临床检测中。

为了验证液相色谱串联质谱法在临床检测中应对大量样品分析时的稳定性，本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用，连续 30 天测定血浆中维生素 A 和维生素 E 的 RR 值（RR 值=目标峰面积/内标峰面积），并计算连续 30 天的相对偏差。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为：LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8045 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.86 色谱工作站。

#### 1.2 分析条件

##### 1.2.1 液相色谱条件

色 谱 柱 ： C8 (50 mm L.×3.0 mm ID., 5 μm)  
流 动 相 ： A 相-0.1%甲酸水；B 相-0.1%甲酸甲醇



日间精密度考察：每天取 1 份吹干的样本，经复溶后上机测试，每份样本重复进样 15 针，统计每个样本平均 RR 值（RR 值=目标峰面积/内标峰面积），以第一天样本的  $V_A$  和  $V_E$  的 RR 值为基准，计算每天的相对偏差；连续考察 30 天。

## 2 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图

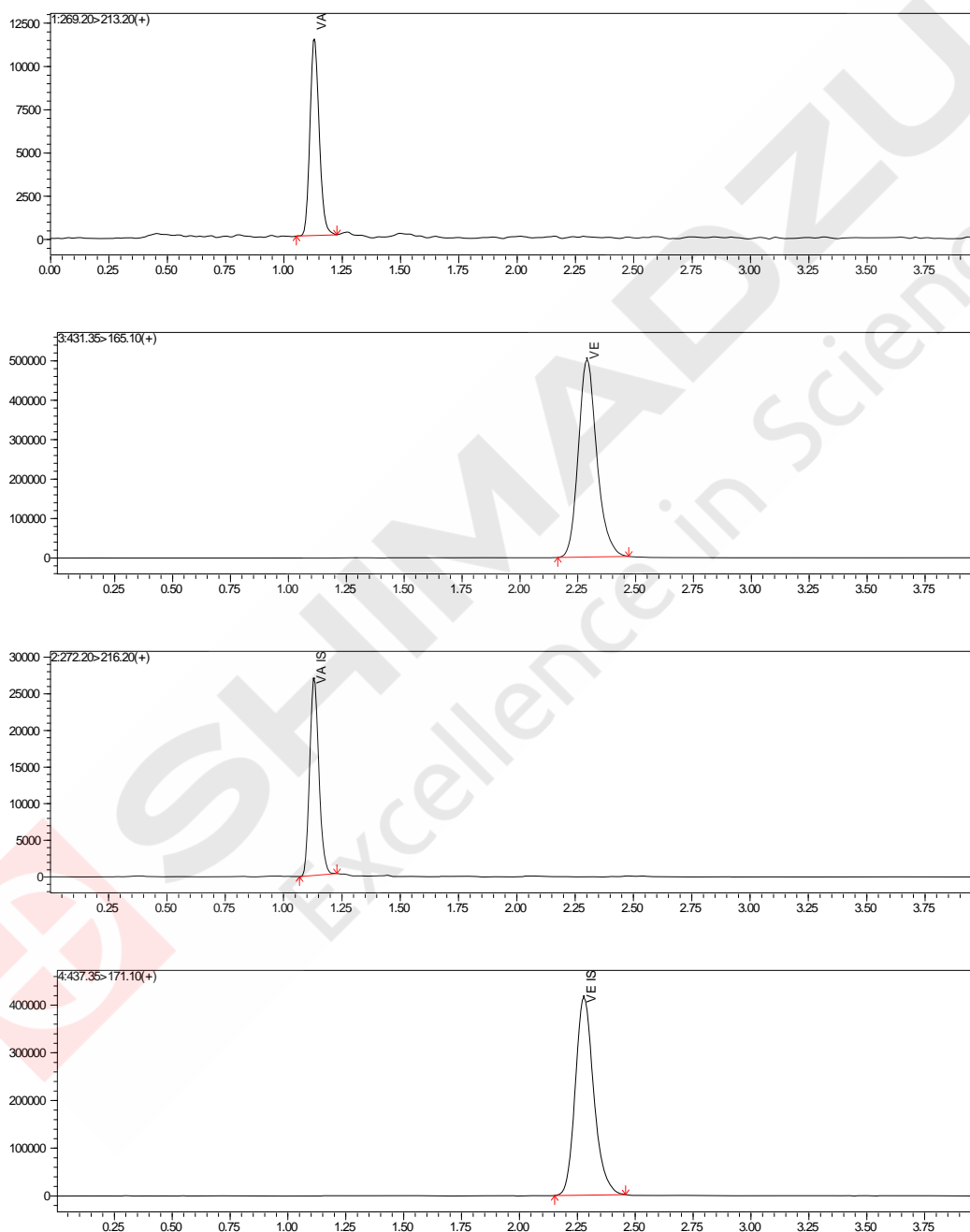


图 1  $V_A$  和  $V_E$  及其内标物的 MRM 色谱图

### 2.2 灵敏度考察

健康人群血浆中维生素 A 的浓度为 300-360  $\mu\text{g/L}$ ，维生素 E 的浓度为 5~20  $\text{mg/L}$ <sup>[1, 2]</sup>。复溶

后的样本用甲醇稀释 40 倍时,连续进样 10 次,  $V_A$  的平均信噪比为 19.39, 峰面积和峰高的 RSD 均小于 10%; 复溶后的样本用甲醇稀释 4000 倍时,  $V_E$  的平均信噪比为 52.75, 连续进样 10 次, 峰面积和峰高的 RSD 均小于 10%。具体结果如表 3, 结果表明 LCMS-8045 完全能够满足样品检测要求。

表 3  $V_A$  和  $V_E$  的连续 10 针进样统计结果 (n=10)

项目	$V_A$		$V_E$	
	平均值	RSD/%	平均值	RSD/%
保留时间	1.125	0.39	2.295	0.33
峰面积	1432	7.60	2846	4.44
峰高	595	8.05	544	6.35

Data#	Data Filename	Sample	Leve	Ret. Time	Area	Height	S/N
1	18#_40倍稀释_016.lcd	Unknown	0	1.127	1,529	576	17.74
2	18#_40倍稀释_017.lcd	Unknown	0	1.123	1,494	549	18.20
3	18#_40倍稀释_018.lcd	Unknown	0	1.125	1,598	569	21.81
4	18#_40倍稀释_019.lcd	Unknown	0	1.118	1,473	599	17.64
5	18#_40倍稀释_020.lcd	Unknown	0	1.129	1,508	495	13.36
6	18#_40倍稀释_021.lcd	Unknown	0	1.128	1,219	620	22.17
7	18#_40倍稀释_022.lcd	Unknown	0	1.125	1,372	637	23.20
8	18#_40倍稀释_023.lcd	Unknown	0	1.127	1,371	646	17.77
9	18#_40倍稀释_024.lcd	Unknown	0	1.117	1,371	636	19.94
10	18#_40倍稀释_025.lcd	Unknown	0	1.131	1,384	623	22.11

Data#	Data Filename	Sample	Leve	Ret. Time	Area	Height	S/N
1	VE_18#_4000倍稀释_002	Unknown	0	2.292	2,772	573	56.06
2	VE_18#_4000倍稀释_003	Unknown	0	2.303	2,635	582	47.62
3	VE_18#_4000倍稀释_004	Unknown	0	2.296	2,790	560	41.26
4	VE_18#_4000倍稀释_005	Unknown	0	2.307	2,904	542	42.15
5	VE_18#_4000倍稀释_006	Unknown	0	2.295	3,088	573	54.66
6	VE_18#_4000倍稀释_007	Unknown	0	2.292	3,204	584	69.25
7	VE_18#_4000倍稀释_008	Unknown	0	2.293	3,208	590	55.47
8	VE_18#_4000倍稀释_009	Unknown	0	2.299	3,043	458	52.04
9	VE_18#_4000倍稀释_010	Unknown	0	2.279	2,947	513	60.53
10	VE_18#_4000倍稀释_011	Unknown	0	2.293	2,767	537	56.33

图 2.  $V_A$  和  $V_E$  连续 10 针进样信息统计

### 2.3 日内精密度

同一天的不同时间取 3 份样本, 每份样本重复进样 15 针, 统计每个样本平均 RR 值 (RR 值=目标峰面积/内标峰面积), 具体见下表 4。

表 4 日内精密度样本平均 RR 值统计 (n=15)

序号	V <sub>A</sub> 的 RR 值	V <sub>E</sub> 的 RR 值
1	0.4218	1.2424
2	0.4249	1.1920
3	0.4404	1.2396

## 2.4 日间精密度

每天取 1 份样本, 用甲醇复溶, 每份样本重复进样 15 针, 统计每个样本平均 RR 值 (RR 值=目标峰面积/内标峰面积), 以第一天样本的 V<sub>A</sub> 和 V<sub>E</sub> 的 RR 值为基准, 计算相对偏差, 具体结果见表 5, V<sub>A</sub> 和 V<sub>E</sub> 的 RR 值在 30 天内的相对偏差小于 10%。

表 5 日间精密度样本平均 RR 值统计 (n=15)

序号	V <sub>A</sub>		V <sub>E</sub>	
	RR 值	相对偏差/%	RR 值	相对偏差/%
1	0.4254	--	1.2021	--
2	0.4289	0.82	1.2001	-0.17
3	0.4218	-0.85	1.2424	3.35
4	0.4258	0.09	1.2387	3.04
5	0.4343	2.09	1.2414	3.27
6	0.4343	2.09	1.2675	5.44
7	0.4454	4.70	1.3011	8.24
8	0.406	-4.56	1.1865	-1.30
9	0.3961	-6.89	1.1549	-3.93
10	0.4262	0.19	1.2270	2.07
11	0.4099	-3.64	1.2204	1.52
12	0.4425	4.02	1.2404	3.19
13	0.4356	2.40	1.2833	6.75
14	0.4391	3.22	1.2581	4.66
15	0.4068	-4.37	1.1276	-6.20
16	0.3967	-6.75	1.1281	-6.16
17	0.3974	-6.58	1.1303	-5.97

18	0.3924	-7.76	1.1572	-3.74
19	0.3932	-7.57	1.1656	-3.04
20	0.3938	-7.43	1.1646	-3.12
21	0.3930	-7.62	1.1540	-4.00
22	0.4021	-5.48	1.2129	0.90
23	0.4131	-2.89	1.2308	2.39
24	0.4085	-3.97	1.2103	0.68
25	0.3944	-7.29	1.1642	-3.15
26	0.3985	-6.32	1.1946	-0.62
27	0.3914	-7.99	1.1464	-4.63
28	0.4045	-4.91	1.2546	4.37
29	0.4219	-0.82	1.2746	6.03
30	0.4232	-0.52	1.2077	0.47

相对偏差 =  $\frac{x - x_{first}}{x_{first}} \times 100$ ,  $x_{first}$  为第一天  $V_A$  和  $V_E$  的平均 RR 值

### 3 结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用, 连续 30 天测定血浆中维生素 A 和维生素 E, 实验中分别考察了日内精密度和日间精密度。实验数据表明, 在没有使用阀切换情况下, 维生素 A 和维生素 E 不仅日内精密度良好, 而且 30 天内的平均 RR 值稳定, 且相对偏差小于 10%, 能够为临床诊断提供参考, 由此可见 LCMS-8045 能够应对复杂生物样本的大量分析。

### 参考文献

1. 刁娟娟, 田兰, 孙伟, 李新霞. 《化学通报》, 2010(9): 826-831.
2. 许蕴, 马经野, 付林等. 《中国医院药学杂志》, 2006, 26(4): 412-414.

## 4.5 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定血清和尿液中氨基酸含量

**摘要：** 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定血清和尿液中氨基酸含量。该方法在 14 min 内完成 20 种氨基酸的分离，分析速度快、重复性好、灵敏度高，适合血清和尿液基质中 20 种氨基酸的高灵敏度快速检测。

**关键词：** 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪 氨基酸

氨基酸是生命体的三大营养物质之一，是组成酶和蛋白质的基本单位。作为小分子，体内的游离氨基酸对生理功能和临床诊断具有重要作用。传统的游离氨基酸分析采用离子交换色谱分离后，用茚三酮进行柱后衍生化，然后在 570 nm 波长下进行吸光度检测。但是该方法灵敏度低、所需样品量大、分析时间长，给临床检测带来诸多不便。随着现代氨基酸分析技术的发展，质谱作为高选择性和高灵敏度的检测工具，在氨基酸分析中发挥着重要作用。氨基酸分析时为了提高分析检测的灵敏度和分离选择性，常常需要将氨基酸衍生。

为实现临床诊断上快速、高灵敏度和准确测定血清和尿液等基质中氨基酸含量，我们开发出无需衍生的氨基酸 LC-MS/MS 定量方法。该方法采用超高效液相色谱三重四极杆液质联用仪，仅需 14 分钟，即可同时分析 20 种氨基酸。

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱 LCMS-8060 联用，建立了血清和尿液中 20 种氨基酸的液相色谱-串联质谱的同时分析方法，供相关人员参考。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为：LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机，SIL-30AC<sub>MP</sub> 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.82 色谱工作站。

#### 1.2 分析条件

##### 1.2.1 液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Discovery HS F5-3, 2.1 mm I.D.× 150 mm L., 3.0 μm

流动相: A相-0.1%甲酸水溶液

B相-0.1%甲酸乙腈

流速: 0.35 mL/min

进样体积: 1  $\mu$ L

柱温: 40 $^{\circ}$ C

洗脱方式: 梯度洗脱, B相初始浓度为0%, 时间程序见表1

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.40	Pumps	Pump B Conc.	0
3.50	Pumps	Pump B Conc.	25
7.50	Pumps	Pump B Conc.	35
7.60	Pumps	Pump B Conc.	95
10.00	Pumps	Pump B Conc.	95
10.10	Pumps	Pump B Conc.	0
14.00	Controller	Stop	

### 1.2.2 质谱条件

离子化模式: ESI, 正离子模式

碰撞气: 氩气

离子喷雾电压: +4.5 kV

DL 温度: 300 $^{\circ}$ C

雾化气流速: 氮气 3.0 L/min

加热模块温度: 400 $^{\circ}$ C

干燥气流速: 氮气 10 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

加热气流速: 空气 10 L/min

驻留时间: 8 ms

碰撞气: 氩气

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 2

表2 MRM 参数

化合物名	CAS	MRM 通道(m/z)	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
胱氨酸 Cysteine	56-89-3	240.95 $\rightarrow$ 151.95*	-11.0	-14.0	-30.0
		240.95 $\rightarrow$ 74.0	-11.0	-28.0	-30.0
天冬酰胺 Asparagine	70-47-3	133.00 $\rightarrow$ 74.05*	-15.0	-17.0	-29.0
		133.00 $\rightarrow$ 87.05	-16.0	-11.0	-17.0

丝氨酸	Serine	302-84-1	106.05→60.05*	-10.0	-13.0	-24.0
			106.05→42.05	-10.0	-24.0	-16.0
天冬氨酸	Aspartic acid	6899-03-2	134.00→74.05*	-10.0	-16.0	-30.0
			134.00→88.00	-10.0	-12.0	-17.0
甘氨酸	Glycine	56-40-6	76.05→30.10*	-10.0	-14.0	-27.0
			76.05→31.00	-11.0	-30.0	-30.0
谷氨酰胺	Glutamine	56-85-9	147.05→84.00*	-10.0	-19.0	-16.0
			147.05→130.00	-10.0	-14.0	-24.0
苏氨酸	Threonine	72-19-5	120.05→74.05*	-11.0	-13.0	-28.0
			120.05→56.05	-10.0	-16.0	-22.0
丙氨酸	Alanine	56-41-7	90.00→44.05*	-16.0	-13.0	-16.0
			90.00→42.85	-16.0	-12.0	-27.0
谷氨酸	Glutamic acid	56-86-0	148.00→84.05*	-10.0	-17.0	-16.0
			148.00→130.00	-10.0	-14.0	-27.0
赖氨酸	Lysine	56-87-1	147.05→84.05*	-10.0	-18.0	-15.0
			147.05→130.05	-10.0	-15.0	-25.0
脯氨酸	Proline	147-85-3	116.10→84.05*	-10.0	-17.0	-26.0
			116.10→130.05	-13.0	-17.0	-10.0
组氨酸	Histidine	71-00-1	156.05→110.10*	-10.0	-15.0	-20.0
			156.05→83.05	-10.0	-26.0	-30.0
精氨酸	Arginine	74-79-3	175.05→70.10*	-12.0	-24.0	-25.0
			175.05→60.05	-10.0	-15.0	-25.0
缬氨酸	Valine	72-18-4	118.05→72.05*	-10.0	-12.0	-28.0
			118.05→55.00	-10.0	-23.0	-20.0
甲硫氨酸	Methionine	63-68-3	150.00→56.05*	-10.0	-18.0	-22.0
			150.00→61.00	-10.0	-25.0	-24.0
酪氨酸	Tyrosine	60-18-4	182.05→91.05*	-10.0	-29.0	-17.0
			182.05→136.05	-10.0	-14.0	-27.0
异亮氨酸	Isoleucine	73-32-5	132.05→86.05*	-16.0	-12.0	-15.0

			132.05→69.10	-15.0	-19.0	-27.0
亮氨酸	Leucine	61-90-5	132.05→86.05*	-17.0	-12.0	-16.0
			132.05→30.10	-14.0	-18.0	-30.0
苯丙氨酸	Phenylalanine	63-91-2	166.00→120.10*	-20.0	-16.0	-20.0
			166.00→103.05	-11.0	-27.0	-19.0
色氨酸	Tryptophan	54-12-6	205.05→188.10*	-10.0	-11.0	-20.0
			205.05→146.05	-10.0	-18.0	-29.0

注：\*表示定量离子

### 1.3 样品前处理

用纯水配制 20 种氨基酸的标准曲线：浓度分别为 0.05 nmol/mL、0.1 nmol/mL、0.5 nmol/mL、1.0 nmol/mL、5.0 nmol/mL、10.0 nmol/mL，配制好的混标直接上机分析。

血清和尿液样品前处理方法：取 500  $\mu$ L 血清或尿液样品，在室温下离心 1 分钟（13000 rpm），吸取 100  $\mu$ L 离心后上清液到新的离心管中，然后加入 300  $\mu$ L 有机溶剂（乙腈/甲醇=1/1），涡旋使充分混匀，室温下离心 15 分钟（13000 rpm），精密吸取上清液 50  $\mu$ L，加入 950  $\mu$ L 水，涡旋混匀，上机分析。

## 2 结果及讨论

### 2.1 标准品分析色谱图

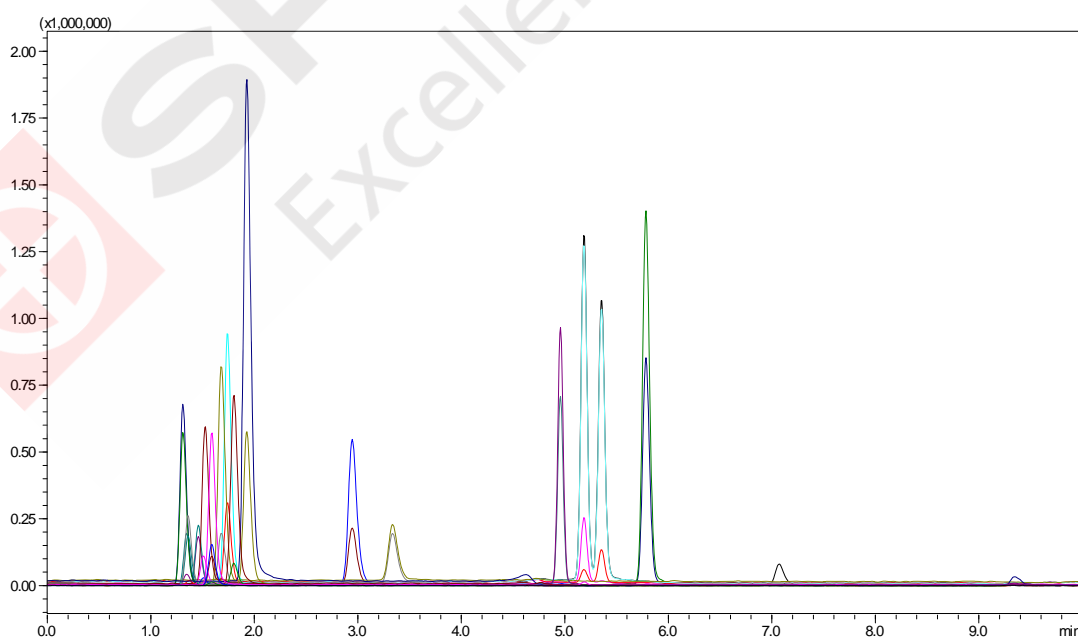


图 1 20 种氨基酸标准品分析色谱图（1.0 nmol/mL）

## 2.2 线性范围

将配制的 0.05 nmol/mL、0.1 nmol/mL、0.5 nmol/mL、1.0 nmol/mL、5.0 nmol/mL、10.0 nmol/mL 不同浓度的标准溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，利用外标法制作校准曲线，线性良好，线性方程、相关系数、线性范围和准确度见表 3。

表 3 20 种氨基酸标准曲线相关参数

名称	校准曲线	相关系数 R	线性范围 (nmol/mL)	准确度%
胱氨酸	$Y = (2.39418e+006)X + (2803.37)$	0.9995	0.05~10	96.9~104.2
天冬酰胺	$Y = (674109)X + (8354.66)$	0.9982	0.05~10	92.6~106.4
丝氨酸	$Y = (701760)X + (15196.9)$	0.9983	0.05~10	90.6~104.4
天冬氨酸	$Y = (1.05010e+006)X + (10160.1)$	0.9991	0.05~10	94.8~105.3
甘氨酸	$Y = (63881.3)X + (5691.56)$	0.9947	0.10~10	85.6~111.8
谷氨酰胺	$Y = (1.59988e+006)X + (10350.4)$	0.9998	0.05~10	98.0~102.1
苏氨酸	$Y = (916938)X + (7945.39)$	0.9997	0.05~10	97.8~101.6
丙氨酸	$Y = (443949)X + (2968.61)$	0.9994	0.05~10	96.9~105.4
谷氨酸	$Y = (2.60514e+006)X + (26101.8)$	0.9993	0.05~10	97.1~105.9
赖氨酸	$Y = (3.60138e+006)X + (-343.719)$	0.9999	0.05~10	98.8~101.2
脯氨酸	$Y = (2.83020e+006)X + (9971.50)$	0.9994	0.05~10	96.4~103.4
组氨酸	$Y = (4.15454e+006)X + (-5438.52)$	0.9986	0.05~10	96.3~105.3
精氨酸	$Y = (7.26286e+006)X + (26278.4)$	0.9994	0.05~10	95.7~104.0
缬氨酸	$Y = (2.93196e+006)X + (14935.0)$	0.9998	0.05~10	97.8~101.1
甲硫氨酸	$Y = (1.28278e+006)X + (-14110.6)$	0.9990	0.05~10	94.3~104.3
酪氨酸	$Y = (2.98264e+006)X + (66239.4)$	0.9996	0.05~10	97.9~104.2
异亮氨酸	$Y = (4.84882e+006)X + (16493.1)$	0.9997	0.05~10	98.5~103.1
亮氨酸	$Y = (3.87797e+006)X + (49194.4)$	0.9992	0.05~10	93.9~103.0
苯丙氨酸	$Y = (5.94487e+006)X + (479910)$	0.9970	0.05~10	88.4~106.1
色氨酸	$Y = (463673)X + (18719.7)$	0.9989	0.05~10	99.3~107.1

## 2.3 方法精密度和准确度

用纯水溶剂配制 3 个浓度质控样，浓度分别为 LQC 0.15 nmol/mL，MQC 0.8 nmol/mL，

HQC 8.0 nmol/mL, 每个浓度质控样平行配制 6 份, 分别进样, 峰面积 RSD 见表 4。

表 4 精密度检测结果(n=6)

名称	LQC%	MQC%	HQC%
胱氨酸	2.56	2.39	1.37
天冬酰胺	3.99	2.26	1.25
丝氨酸	3.95	2.64	1.28
天冬氨酸	4.08	2.61	1.40
甘氨酸	3.50	2.00	2.10
谷氨酰胺	3.28	1.19	0.35
苏氨酸	4.72	2.37	1.36
丙氨酸	4.08	2.54	0.80
谷氨酸	4.16	1.32	0.85
赖氨酸	1.83	2.27	1.38
脯氨酸	3.54	1.30	0.90
组氨酸	3.34	1.74	0.82
精氨酸	3.61	2.87	1.53
缬氨酸	3.60	0.50	0.96
甲硫氨酸	3.86	2.00	0.63
酪氨酸	3.92	2.38	3.71
异亮氨酸	0.95	1.40	1.45
亮氨酸	3.47	3.02	1.42
苯丙氨酸	2.78	1.14	1.40
色氨酸	3.43	1.98	1.06

#### 2.4 血清和尿液样本中 20 种氨基酸浓度

按照 1.3 样品前处理流程分别处理 5 个血清样品和 5 个尿液样本, 利用以上建立的外标定量方法进行定量, 结果见表 4。

表 4 血清和尿液样本中 20 种氨基酸含量 (nmol/mL)

名称	血清 1	血清 2	血清 3	血清 4	血清 5	尿液 1	尿液 2	尿液 3	尿液 4	尿液 5
胱氨酸	25.63	32.34	32.86	20.48	24.22	36.18	129.19	25.84	36.08	31.06

天冬酰胺	54.65	42.23	51.79	55.93	43.04	39.82	92.66	74.49	68.34	20.78
丝氨酸	144.65	134.02	133.06	168.75	140.7	113.91	365.36	222.46	205.21	92.7
天冬氨酸	39.11	27.23	29.73	26.29	27.57	5.06	9.14	8.94	8.41	4.35
甘氨酸	281.71	259.87	261	304.65	299.19	312.58	770.64	961.11	612.47	221.56
谷氨酰胺	511.51	453.25	445.93	664.06	572.48	265.65	812.61	367.87	520.05	210.06
苏氨酸	85.62	69.75	95.99	118.17	99.71	69.76	312.74	113.47	103.59	54.26
丙氨酸	458.24	220.29	329.19	330.05	387.66	120.35	523.16	126.08	158.83	112.76
谷氨酸	119.93	46.38	104.71	61.94	49.01	3.24	13.14	6.13	7.62	3.00
赖氨酸	165.78	140.54	161.43	136.45	97.23	127.47	769.62	100.29	149.23	104.19
脯氨酸	216.73	109.9	156.86	194.47	191.61	2.43	23.37	3.74	4.75	2.49
组氨酸	89.92	70.7	68.68	78.29	65.1	390.74	1641.42	629.74	697.74	322.98
精氨酸	49.66	68.48	37.13	80.00	67.4	8.99	66.23	12.28	17.14	7.99
缬氨酸	295.38	198.39	226.93	227.48	178.16	16.53	76.52	21.47	33.07	16.46
甲硫氨酸	30.23	24.91	27.89	35.2	24.65	8.13	39.52	11.73	11.54	4.12
酪氨酸	91.15	56.62	59.47	76.76	64.54	57.25	135.59	51.8	57.54	29.84
异亮氨酸	100.12	55.93	58.78	85.24	58.27	5.63	39.21	11.89	16.92	5.27
亮氨酸	189.08	130.82	142.08	149.22	113.86	16.75	106.99	24.75	35.75	11.01
苯丙氨酸	114.15	84.89	81.87	71.99	87.51	30.78	109.93	31.66	52.64	18.48
色氨酸	588.13	517.03	515.91	490.7	486.64	338.34	953.04	294.08	484.63	197.76

### 3 结论

采用岛津公司 LCMS-8060 三重四极杆液质联用仪建立了 20 种氨基酸的外标定量方法, 无需衍生, 前处理方便快捷, 14 分钟即可完成 20 种氨基酸的分析检测。20 种氨基酸的标准曲线相关系数均大于 0.9970, 标准品准确度范围在 85.6~111.8%之间。利用该定量方法分析检测了 5 个血清样本和 5 个尿液样本中 20 种氨基酸的含量。该方法分析速度快、重复性好、灵敏度高, 适合血清和尿液中 20 种氨基酸的高灵敏度检测。

## 第五章 治疗药物监测

### 5.1 引言

治疗药物监测 (therapeutic drug monitoring, 简称 TDM) 是在药代动力学原理的指导下, 应用现代化的分析技术, 测定血液或其他体液中的药物浓度, 从而达到满意的疗效及避免发生毒副反应, 同时也可以为药物过量中毒的诊断和处理提供有价值的实验室依据, 将临床用药从传统的经验模式提高到比较科学的水平。

替比夫定是一种 L 型核苷, 具有高效、选择性以及抑制乙型肝炎病毒复制的特异性抗病毒活性, 能够有效地抑制乙肝病毒 DNA 复制。研究替比夫定的药代参数对于治疗不同程度的肝损伤乙肝患者具有非常重要的临床指导意义。抗精神病药, 按药理作用可分为氯丙嗪为代表的典型抗精神病药物与以氯氮平为代表的非典型抗精神病药物。出于用药安全性和合理性考虑, 临床使用对抗精神病药浓度监控的要求较高, 以助于临床医生确定给药方案及评估治疗效果, 减少不良反应的发生。单克隆抗体药物是利用淋巴细胞杂交瘤或基因工程技术制备得到的药物, 与传统化疗药物相比, 单克隆抗体药物表现出专一性强、疗效显著的特点, 在肿瘤治疗中应用较多。可靠的单抗血药浓度检测方法对治疗效果、用药安全性评价与指导临床用药剂量, 均具有重要作用。

TDM 是随着分析技术的发展、先进仪器的使用而发展起来的。放射免疫分析法、酶联免疫分析法、荧光偏振免疫分析法等在常规 TDM 工作中应用较多, 但免疫分析法都存在试剂昂贵、定性存在误判、无法定量等缺点。LC-MS/MS 将色谱的高效分离能力和质谱的特异性、高灵敏度、多组分分析相结合, 在 TDM 领域的应用日益广泛。

本章介绍了使用岛津 LC-MS/MS 仪器检测血浆/血清中替比夫定、抗精神病药的含量方法, 供分析人员参考。

## 5.2 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定血浆中替比夫定

**摘要:** 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用建立并验证了血浆中替比夫定的测定方法。方法采用同位素内标法替比夫定-D3 定量, 方法定量限 1.0 ng/mL, 线性范围为 1.0~10000 ng/mL, 相关系数 0.9999。方法选择性实验表明空白血浆中不存在明显干扰, 方法的日内精密密度 1.52~2.18%, 日间精密密度 1.58~2.11%, 各浓度水平质控样品的准确度 91.6~114.4%, 能够很好地满足血浆中药物浓度准确定量的要求; 各浓度水平替比夫定的回收率均在 100%左右, 基质效应因子均大于 80%, 内标归一化基质效应因子在 100%左右; 稳定性实验结果表明样品在室温下放置 8 小时稳定, 3 次冻融循环浓度无显著变化, 处理后的样品在自动进样器内 (10℃) 放置 72 小时替比夫定无显著变化。将方法用于给药后病人血药浓度分析, 结果表明相同给药剂量和采样时间下, 不同病人体内血药浓度差异显著, 利用本方法能够为临床个性化给药方案的确定提供有力保障。方法具有分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点, 适合血浆中替比夫定含量的快速检测, 可用于人体替比夫定血药浓度的测定及其人体药代动力学研究。

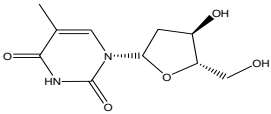
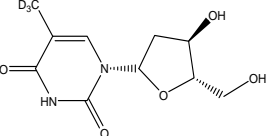
**关键词:** 超快速液相色谱 三重四极杆质谱 血浆 替比夫定

### 1 实验部分

#### 1.1 化合物信息

目标化合物及内标化合物信息见表 1

表 1 化合物信息

化合物名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
替比夫定	Telvivudine	3424-98-4	$C_{10}H_{14}N_2O_5$	
替比夫定-D3 (IS)	Telvivudine-D3	/	$C_9H_{11}N_2O_5CD_3$	

#### 1.2 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8050 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.60 SP2 色谱工作站。

### 1.3 分析条件

#### 1.3.1 液相条件

色谱柱: Inertsil Sustain C18 Column (3.0 mm I.D.×100 mm L., 3 μm)

流动相: A 相-0.1% 甲酸水溶液;B 相-乙腈

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40℃

进样量: 2 μL

自动进样器温度: 10℃

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 5%, 洗脱程序见表 2。

表 2 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
4.00	Pumps	Pump B Conc.	80
4.10	Pumps	Pump B Conc.	5
6.00	Controller	Stop	

#### 1.3.2 质谱条件

分析仪器:	LCMS-8050	加热模块温度:	350℃
离子源:	ESI, 正离子模式分析	干燥气流速:	12.0 L/min
雾化气流速:	3.0 L/min	扫描模式:	多反应监测 (MRM)
加热气流速:	8.0 L/min	驻留时间:	100 ms
接口温度:	250℃	MRM 参数:	见表 3
DL 温度:	150℃		

表 3 MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q3 Pre Bias (V)
替比夫定	243.10	127.10	-26.0	-10.0	-13.0
替比夫定-D3	246.10	130.10	-16.0	-9.0	-25.0

### 1.4 标准样品和质控样品的配制

用纯水配制两份 1.0 mg/mL 替比夫定储备液。一份储备液用纯水逐级稀释成浓度为 0.1 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL、

500 µg/mL、1000 µg/mL 的工作曲线；另一份储备液用 50% 甲醇溶液逐级稀释成浓度为 0.3 µg/mL、40 µg/mL、800 µg/mL 的质控溶液。取 10 µL 标准工作曲线加入 990 µL 空白血浆中，依次配制成标准曲线；取 10 µL 质控溶液加入 990 µL 空白血浆中，依配制成低浓度 (LQC)、中浓度 (MQC)、高浓度 (HQC) 质控样。

用纯水配制 1.0 mg/mL nngn 替比夫定-D3 储备液，用纯水稀释至 100 µg/mL，配制成内标工作液。

含酶内标工作液配制：取 40 µL 内标工作液，加到试管中，加入 200 µL 替比夫定水解酶 (>1 U/µL)，再加入 360 µL 纯水，得到含酶工作液。同时取 40 µL 内标工作液，加到试管中，加入 560 µL 纯水，制得不含酶工作液。

### 1.5 样品前处理方法

由于替比夫定进入体内会被磷酸化，为测定血浆中的替比夫定，在前处理过程中首先通过磷酸水解酶将去磷酸化后，再进一步对血浆中的替比夫定进行提取。

取 100 µL 血浆样品，加入 40 µL 含酶内标工作液，涡旋振荡 1 分钟，37°C 水浴孵育 1 小时，水解酶在孵育的过程中将血浆中的磷酸化替比夫定完全去磷酸化后，加入 200 µL 乙腈，13000 r/min 离心 5 分钟，取 200 µL 上清液进样分析，进样体积 2 µL。

### 1.6 方法验证

考察方法的选择性，对空白基质样品进行样品前处理后进样分析。

最低定量限 (LLOQ) 的考察，分别处理 6 份 LLOQ 样品，分析结果满足 6 次的相对标准偏差不得超过 20%，测量误差不超过理论值的 80~120%，同时目标化合物大于 10 倍信噪比。线性关系的考察，通过分析空白血浆配制的标准曲线，在三个不同的分析批中对线性关系进行考察，采用浓度与化合物面积和内标面积比值计算回归曲线，权重采用 1/x。

方法精密度和准确度的考察，在方法验证的三个分析批中考察三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (3 ng/mL、400 ng/mL、8000 ng/mL)，日内精密度通过计算一个分析批中每个质控样品浓度的相对标准偏差，日间精密度通过计算不同天完成的三个分析批中每个质控样品浓度的相对标准偏差；方法准确度通过公式计算：测量浓度/理论浓度×100%计算。准确度在 85~115% 范围内，精密度不超过 15%。

替比夫定回收率考察，三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次)，比较经过样品前处理的质控样品和空白基质后加标样品，两者的目标化合物面积平均值的比值为回收率。

基质效应考察，三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次)，通过

比较空白基质后加标样品与浓度一致的标准溶液, 两者的目标化合物面积平均值所得比值评价基质效应。

稳定性考察, 三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次), 比较室温下放置 8 小时/3 次冻融循环的质控样品的测定浓度与理论浓度之间的差异, 三个浓度水平的质控样品测定值与理论值的差异应均在 $\pm 15\%$ 以内, CV%值均小于 15%。

提取样品的自动进样器稳定性, 处理后的分析批在自动进样器中放置 72 小时内再次分析, 再次分析的结果应满足整个分析批的接收标准。

## 2 结果与讨论

### 2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

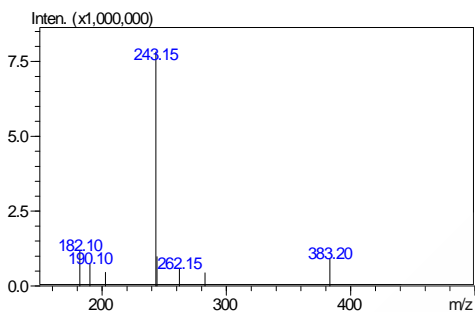


图 1 替比夫定的一级质谱图

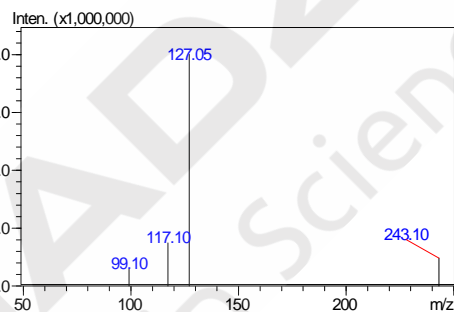


图 2 替比夫定的产物离子扫描图(CE 值-8 V)

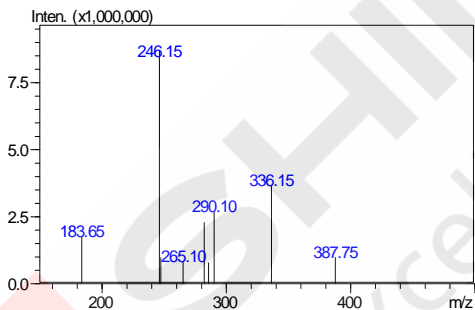


图 3 替比夫定-D<sub>3</sub>的一级质谱图

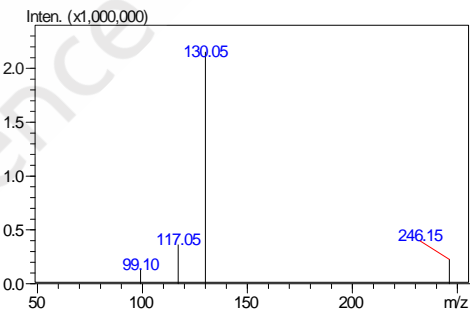


图 4 替比夫定-D<sub>3</sub>的产物离子扫描图(CE 值-8 V)

### 2.2 方法选择性

考察空白基质和 1 ng/mL 血浆基质加标样品, 结果如图 5、6 所示, 替比夫定及其同位素内标的检测通道中目标化合物的干扰均不对最低定量限造成干扰。

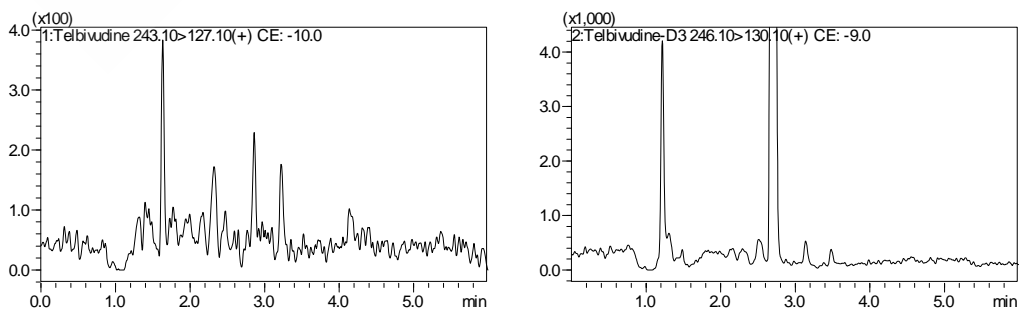


图 5 空白血浆样品的 MRM 色谱图

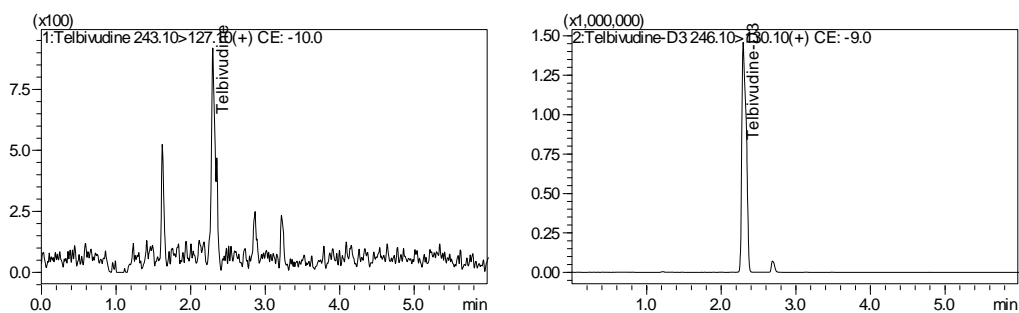


图 6 1 ng/mL 血浆基质加标样品的 MRM 色谱图

考察同位素内标对替比夫定测定结果的影响，处理过程加入同位素内标的空白样品（QC0 样品）如图 7 所示，与图 6 1 ng/mL 血浆基质加标样品的 MRM 色谱图比较，替比夫定的检测通道中目标化合物的干扰不对最低定量限造成干扰。结果表明同位素内标不会对替比夫定的准确测定造成影响。

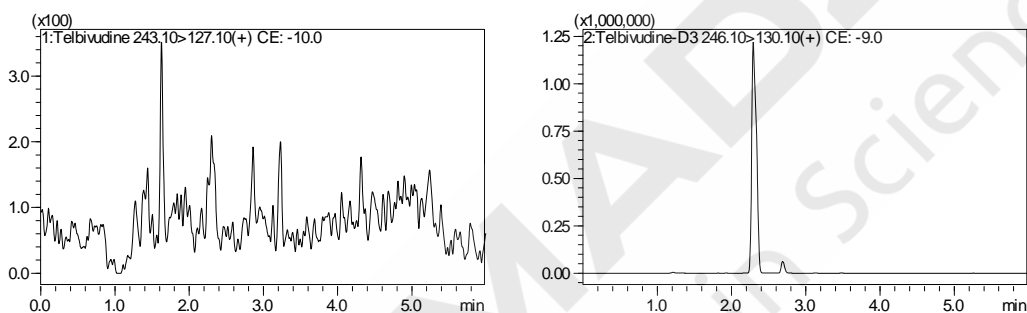


图 7 QC0 的 MRM 色谱图

考察目标化合物对同位素内标响应值的影响，选择 10000 ng/mL 的血浆基质加标样品在处理过程不加入同位素内标，结果如图 8 所示，重复 6 个样品分析所得到的同位素内标通道的干扰峰面积平均值为 5198，此分析批同位素内标的面积最小值为 4075831，干扰峰面积仅占同位素内标的最小峰面积的 0.1%，替比夫定不会对其同位素内标的响应值造成明显干扰。

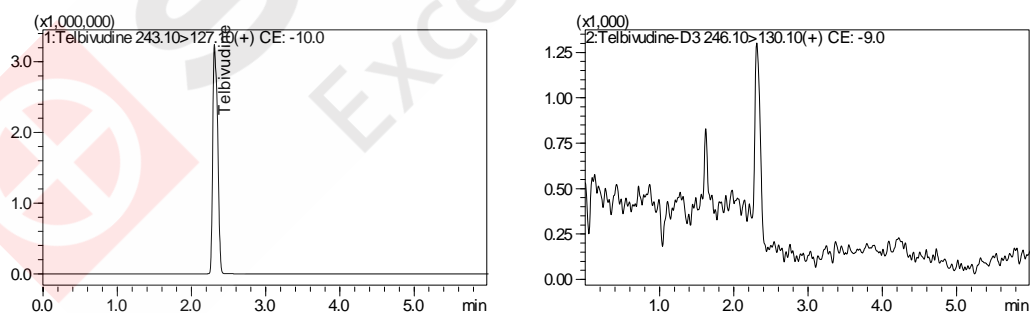


图 8 10000 ng/mL 的血浆基质加标样品（无内标）的 MRM 色谱图

### 2.3 线性范围和最低定量限

按照 1.4 中的条件制备 1 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL、2000 ng/mL、5000 ng/mL、10000 ng/mL 的血浆加标样品，按 1.5 中的前处理条件处理样品，按照 1.3 中的仪器条件进行测定，同位素内标法进行定量。所得校准曲线如图 9 所示，线性方程及相关系数见表 4，其中 y 值代表替比夫定峰面积与替比夫

定-D3 峰面积的比值, x 值代表血浆中替比夫定浓度。方法检出限确定为 1 ng/mL, 在此浓度水平, 精密度和准确度均在接受标准内, 6 次重复分析 RSD 为 5.98%, 准确度为 98.2~114.8%, S/N 平均值为 22.4。

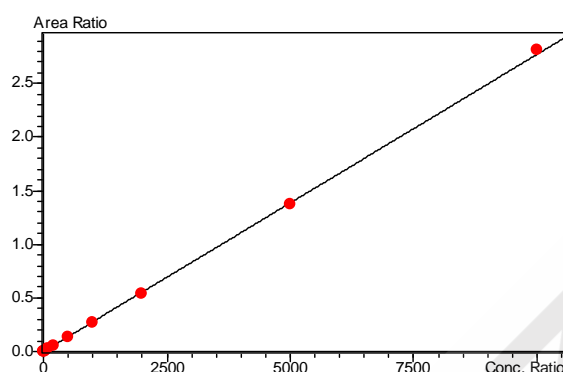


图9 替比夫定标准曲线

表4 校准曲线参数 (线性回归, 权重为 1/C)

化合物	校准曲线	线性范围(ng/mL)	准确度 (%)	相关系数 r
替比夫定	$Y = (2.77 \times 10^{-4})X + (3.39 \times 10^{-5})$	1~10000	93.1~116.6	0.9998

## 2.4 方法精密度和准确度考察

考察三个浓度水平质控样品的日间精密度和日内精密度的结果如表5所示。方法的日内精密度 1.52~2.18%, 日间精密度 1.58~2.11%, 各浓度水平质控样品的准确度 91.6~114.4%。

表5 方法日间精密度和日内精密度的结果 (3 天, 每天重复 6 次)

理论浓度(ng/mL)	日内精密度 CV%	日间精密度 CV%	准确度%
3	2.18	2.11	107.7~114.4
400	1.52	1.58	91.6~95.9
8000	1.76	1.68	95.4~101.3

## 2.5 方法回收率考察

考察三个质控样品LQC、MQC、HQC (每个浓度重复6次)的回收率, 结果如表6所示, 各浓度水平替比夫定的回收率分别为 $100.6 \pm 2.5\%$ ,  $104.5 \pm 1.5\%$  and  $104.3 \pm 1.6\%$ , 内标的回收率为 $106.7 \pm 1.4\%$ 。实验结果表明替比夫定及其内标的回收率一致, 并且与浓度无相关性, 满足准确定量的要求。

表6 方法回收率结果(n=6)

浓度水平	浓度(ng/mL)	平均回收率%
LQC	3	100.6

MQC	400	104.5
HQC	8000	104.3

## 2.6 基质效应考察

基质效应的考察三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC（每个浓度重复 6 次），分别计算各浓度水平的基质效应及内标归一化基质效应，结果见表 7，各浓度水平基质效应因子均大于 80%，内标归一化基质效应因子均在 100%左右。

表 7 基质效应考察结果(n=6)

浓度水平	理论浓度(pg/mL)	基质效应因子	内标归一化基质效应因子
LQC	3	82.3%	99.0%
MQC	400	81.7%	101.0%
HQC	8000	90.8%	101.5%
内标基质效应因子		83.1%	

## 2.7 稳定性考察

由于采样过程中样品会放置在室温条件下，因此方法验证过程中考察样品的 8 小时室温稳定性，比较三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC（每个浓度重复 6 次）放置在室温下 8 小时后进行测定的浓度值与理论值的差异，结果表明三个浓度水平的质控样品测定值与理论值的差异均在 $\pm 5\%$ 以内，并且 CV%值均小于 1.5%。血浆中替比夫定在室温下 8 小时内具有稳定性。

样品采集后保存在 $-20^{\circ}\text{C}$ ，测定前室温放置融化后再混匀进行测定，因此需要对样品的冻融稳定性进行考察。比较三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC（每个浓度重复 6 次）经过 3 次冻融循环后进行测定的浓度值与理论值的差异，结果表明测定值与理论值的差异均在 $\pm 5\%$ 以内，并且 CV%值均小于 2.0%。说明血浆中替比夫定的浓度在 3 次冻融循环的过程中不会发生显著的改变。

## 2.8 提取样品在自动进样器内的稳定性

考察提取样品在自动进样器（ $10^{\circ}\text{C}$ ）中的稳定性，整个分析批完成分析后依然放置在自动进样器中，72 小时内重复分析，实验结果表明 72 小时内重复分析的分析批中标准曲线、质控样品均满足准确定量的要求，由此表明所提取的样品在自动进样器内放置 72 小时内具有稳定性。

## 2.9 实际样品分析

利用经过验证的血浆中替比夫定的测定方法，对服用替比夫定一定时间后所采集的 64 例病人血浆中药物浓度进行测定，典型色谱图如图 10、11 所示，其中病人 1 血药浓度为 108 ng/mL，病人 2 血药浓度为 4320 ng/mL。结果表明在同一给药剂量的情况下，服药后相同采样时间的情况下，不同病人体内的血药浓度差异非常大，对于临床合理用药提供指导。

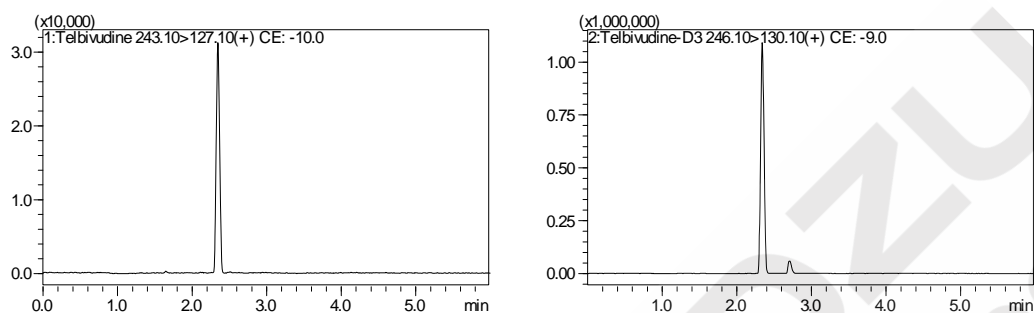


图 10 病人 1 的 MRM 色谱图

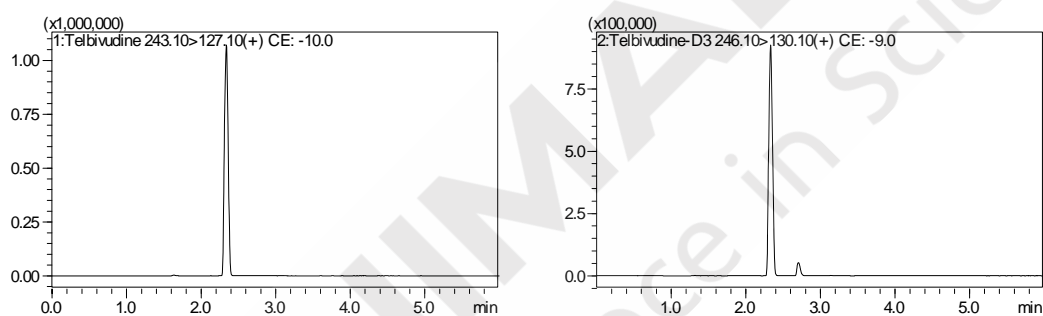


图 11 病人 2 的 MRM 色谱图

## 3 结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 MS-8050 联用建立了一种测定血浆中替比夫定的方法。该方法在 6 min 内完成血浆中替比夫定的检测，采用同位素内标法定量，方法定量限 1 ng/mL，线性范围为 1~10000 ng/mL，相关系数在 0.9998。选择性考察结果表明空白血浆中没有对分析造成明显干扰的物质，并且替比夫定和其同位素内标之间无相互干扰。方法的日内精密度 1.52~2.18%，日间精密度 1.58~2.11%，各浓度水平质控样品的准确度 91.6~114.4%，能够满足血浆中药物浓度准确定量的要求；各浓度水平替比夫定的回收率均在 100%左右，基质效应因子均大于 80%，内标归一化基质效应因子在 100%左右；稳定性实验结果表明样品在室温下放置 8 小时稳定，3 次冻融循环替比夫丁浓度无显著变化，处理后的样品在自动进样器内（10℃）放置 72 小时替比夫定无显著变化。实验样品分析结果表明本方法能够成功用于临床病人样品分析，为指导临床合理用药提供帮助。方法具有分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点，适合血浆中替比夫定含量的快速准确检测。

## 5.3 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法检测八种精神病药含量

**摘要：** 建立一种测定人血清中临床治疗精神病药物血药浓度的超高效液相色谱串联质谱法（UHPLC-MS/MS）并用于考察某医院新接收患者治疗前目标药物血药浓度。样品经处理后，用超高效液相色谱LC-30A快速分离八种临床常用精神病治疗用药，三重四极杆质谱仪LCMS-8060进行定量分析，使用D6-氯丙嗪同位素内标定量，在 $0.1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ~ $500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内绘制校准曲线，线性良好，相关系数为0.9981以上。对高、中、低三浓度生物样品进行批次内、批次间精密度考察，RSD%在10.10以下。

**关键词：** 治疗药物监测 精神病用药 超高效液相色谱串联质谱法

治疗药物监测（Therapeutic Drug Monitoring, TDM）是在临床药理学和现代分析化学的基础上发展的一门边缘学科；根本目的是促进临床安全有效用药，对那些安全范围窄、个体差异大或需要长期使用的药物，通过药物浓度检测和实施剂量调整，达到个体化用药和治疗的目的。其临床意义在于：①、实现给药方向个体化；②缩短治疗时间、提高治疗成功率，降低质量费用；③诊断和处理药物过量中毒；④提高患者用药依从性。精神病指严重的心理障碍，患者的认识、情感、意志、动作行为等心理活动均可出现持久的明显的异常；不能正常的学习、工作、生活；动作行为难以被一般人理解；在病态心理的支配下，有自杀或攻击、伤害他人的动作行为。药物治疗是治疗手段的其中一种，但由于患者本身属性问题，可能很难表述前期用药情况。本文意在建立 8 种精神病常用药的 LCMSMS 检测方法，客观反映患者在入院给药前的血药浓度情况。

### 1 实验部分

#### 1.1 药物

氯氮平、喹硫平、利培酮、阿立哌唑、奋乃静、氟哌啶醇、氯丙嗪、舒必利、D6-氯丙嗪由北京大学医学部公共卫生学院提供，纯度均大于 98%。

#### 1.2 血清

取自山东某精神病治疗医院检验科。病人入院采血离心取上清得。

#### 1.3 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机，SIL-30ACMP 自动进样器，CTO-20A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.80

色谱工作站; AG-135 电子天平 (瑞士 Mettler 公司); XW-80A 型微型漩涡混合仪 (金坛市盛蓝仪器制造有限公司); Heraeus Pico 21 离心机 (Thermo Scientific, 德国)。

#### 1.4 试剂

乙腈购自美国 Fisher 公司 (Fairlawn, NJ, USA); 实验用水由 Milli-Q Plus 水净化系统 (Millipore, Ltd.) 经去离子与二次净化制得; 甲酸 (纯度 99%, LCMS 级, Wako, Japan); 其余试剂均为分析纯, 购自北京化学试剂公司。

## 2 方法和结果

### 2.1 对照品溶液及内标溶液的配制

精密称取 5 mg 各对照品, 置于 50 mL 容量瓶中, 加乙腈溶解定容, 配制成  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品储备液, 从各个容量瓶中取出 100  $\mu\text{L}$  溶液置 10 mL 容量瓶中, 以甲醇定容后倍比稀释得到一系列不同浓度的对照品溶液 1, 2, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 另精密称取盐酸巴马汀, 以甲醇配制成  $20 \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的内标溶液。

### 2.2 标准曲线与质控样品的配制

取空白血清 100  $\mu\text{L}$ , 加入混合对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 加入内标 5  $\mu\text{L}$ , 配制成相当于血清浓度为 0.1, 0.2, 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 按“生物样品处理”项下操作, 记录各个化合物与内标的峰面积, 以浓度为横坐标, 峰面积比值为纵坐标, 绘制标准曲线。

### 2.3 血清样品处理方法

取人血清 100  $\mu\text{L}$ , 加入 5  $\mu\text{L}$  内标, 乙腈补足 300  $\mu\text{L}$  体积, 12000 rpm 离心 15 min, 分离上清液, 1  $\mu\text{L}$  进行 LC-MS/MS 分析。

### 2.4 色谱条件

色谱柱采用岛津 Inertsil® ODS-4 2.1 $\times$ 100 mm, 2.1  $\mu\text{m}$ 。色谱条件为流动相: 乙腈-水 (0.01% 甲酸); 梯度: 0.00 min: 25:75; 3.50 min: 30:70; 3.51 min: 25:75; 5.00 min: 25:75; 流速: 0.4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量为 1  $\mu\text{L}$ 。

### 2.5 质谱条件

离子化模式: ESI (+)

DL 温度: 250 $^{\circ}\text{C}$

离子喷雾电压: 4.5 kV

接口温度: 300 $^{\circ}\text{C}$

雾化气: 氮气 3.0 L/min

加热模块温度: 400 $^{\circ}\text{C}$

加热气: 氮气 10.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

干燥气: 氮气 10.0 L/min

驻留时间: 30 ms

碰撞气: 氩气

延迟时间: 2 ms

MRM 参数：见表 1

表 1 MRM 优化参数

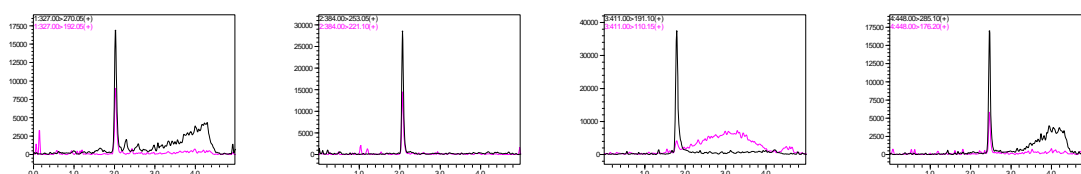
化合物名称	CAS 号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
氯氮平	5786-21-0	327.00	270.05*	-22.0	-25.0	-20.0
Clozapine			292.05	-16.0	-50.0	-19.0
喹硫平	111974-69-7	384.00	253.05*	-20.0	-25.0	-20.0
Quetiapine			221.10	-20.0	-35.0	-20.0
利培酮	106266-06-2	411.00	191.10*	-20.0	-30.0	-20.0
Risperidone			110.15	-29.0	-50.0	-12.0
阿立哌唑	129722-12-9	448.00	285.10*	-17.0	-27.0	-11.0
Aripiprazole			176.20	-17.0	-33.0	-13.0
奋乃静	58-38-8	404.00	171.15*	-29.0	-24.0	-30.0
Prochlorperazine			143.20	-29.0	-29.0	-15.0
氟哌啶醇	52-86-8	375.90	165.10*	-24.0	-25.0	-22.0
Haloperidol			123.05	-23.0	-45.0	-21.0
氯丙嗪	50-53-3	319.00	86.10*	-23.0	-21.0	-29.0
Chlorpromazine			58.20	-22.0	-45.0	-22.0
舒必利	15676-16-1	342.00	112.05*	-24.0	-26.0	-23.0
Sulpiride			214.10	-24.0	-34.0	-15.0
D6-氯丙嗪 Chlorpromazine-D6	1228182-46-4	325.00	92.10	-23.0	-21.0	-23.0

\*为定量离子对

## 2.6 方法学考察

### 2.6.1 专属性试验

选择性是通过对人空白血清 (n>6) 的检测进行验证的。所有样品的结果表明生物基质不干扰待测物的测定。正离子、多反应检测模式下，典型的多反应检测图谱如图 2。



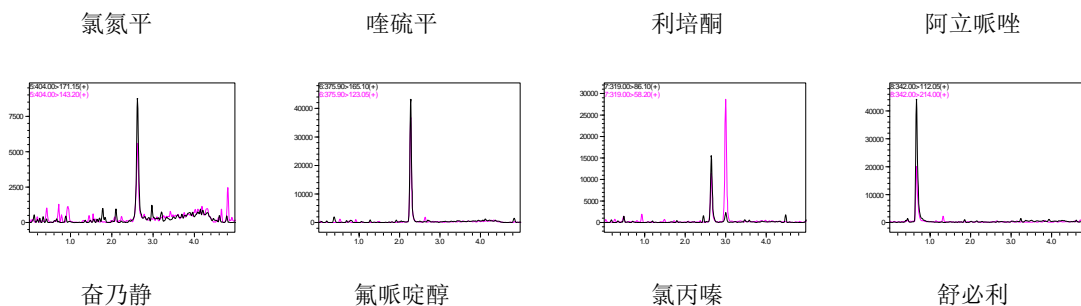


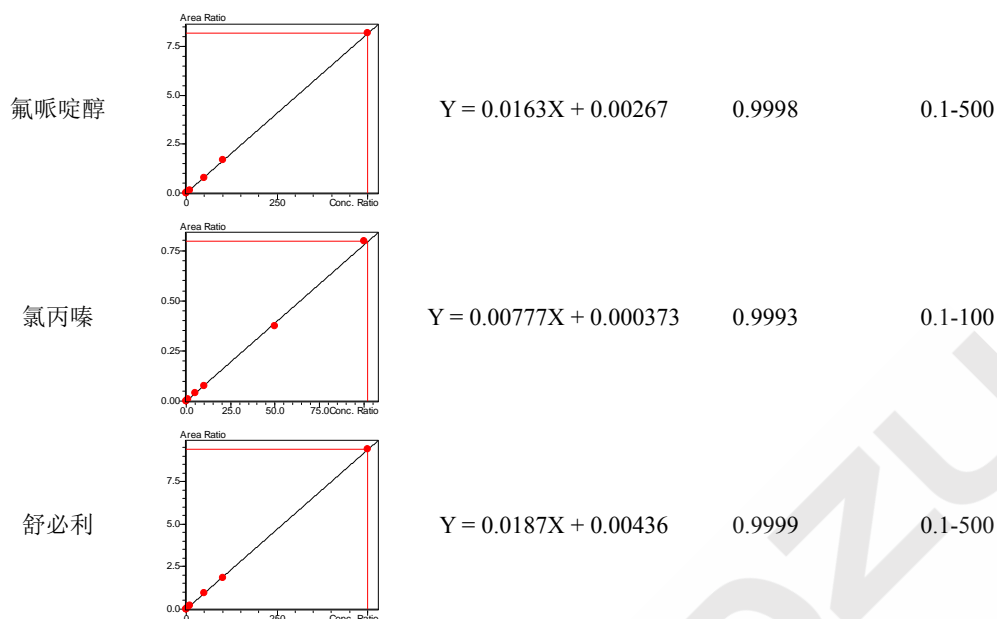
图 1 人血清 1.0 ng/mL 溶液各个药物典型色谱图

## 2.6.2 线性关系考察

分别取空白生物样品，加入适量的系列浓度标准溶液，配制成系列浓度的模拟生物样品。按“2.3 生物样品处理方法”进行处理后进样。记录各成分与内标的峰面积比值，以浓度与峰面积比值做线性回归绘制标准曲线，结果如表 2 所示。

表 2 线性结果

化合物	校准曲线	回归方程	回归系数 r	线性范围 (ng/mL)
氯氮平		$Y = 0.0112X + 0.000194$	0.9994	0.1-500
喹硫平		$Y = 0.0166X - 0.000288$	0.9996	0.1-500
利培酮		$Y = 0.0242X + 0.00101$	0.9983	0.1-500
阿立哌唑		$Y = 0.00654X + 0.00191$	0.9981	0.1-100
奋乃静		$Y = 0.00558X + 0.000220$	0.9981	0.1-100



### 2.6.3 准确度

对校准曲线上所有点进行准确度分析，结果见表 3。

表 3 准确度结果

浓度 (ng/mL)	0.1	0.2	1	5	10	50	100	500
氯氮平	94.8	82.2	91.8	97	94.1	95.2	103.6	100.5
喹硫平	109.8	85.9	87.6	97.5	90.7	93.1	100.6	101.2
利培酮	101.5	102.1	91.4	104.1	92.5	102.7	113.5	102.5
阿立哌唑	110.6	113.4	93.6	96.1	97.1	94.4	104.7	-
奋乃静	90.3	85.8	88.9	94.9	93.4	93.1	104.6	-
氟哌啶醇	113.4	105.2	92.7	97.1	93.5	96.5	103.1	100.1
氯丙嗪	108.1	99.1	87.2	101.4	98.5	95.7	102.4	-
舒必利	96.2	104.9	91.4	103.3	104.1	102.1	101.3	100.1

### 2.6.4 精密度

分别取空白生物样品，加入适量的对照品标准溶液，配制低、中、高三个浓度的 QC 样品，按“2.3 生物样品处理方法”进行处理后进样。每个浓度进行 6 样本分析，连续测定三批，进行回收率和精密度实验，结果见表 4，结果表明，方法的回收率、批内及批间精密度符合要求。

表 4 精密度结果

化合物	加入量 (ng·mL <sup>-1</sup> )	批内精密度	RSD	批间精密度	RSD
		( $\bar{x} \pm s, n=6$ )	(%)	( $\bar{x} \pm s, n=5$ )	(%)

	0.2	0.202±0.014	6.96	0.198±0.014	7.09
氯氮平	10	10.57±0.33	4.25	9.936±0.989	5.25
	100	89.21±2.55	2.86	92.98±8.38	10.10
	0.2	0.214±0.012	5.66	0.207±0.016	7.94
喹硫平	10	10.74±0.106	1.21	10.12±0.768	9.46
	100	100.68±1.09	1.08	95.44±6.92	7.25
	0.2	0.180±0.009	5.24	0.189±0.017	9.12
利培酮	10	9.60±0.064	2.84	9.46±0.275	2.91
	100	104.71±1.20	1.05	105.83±3.04	2.63
	0.2	0.194±0.017	8.60	0.201±0.017	8.35
阿立哌唑	10	9.28±0.386	4.67	9.96±0.516	6.48
	100	102.79±3.37	3.28	101.28±4.98	4.92
	0.2	0.196±0.009	4.54	0.200±0.013	6.28
奋乃静	10	9.71±0.230	2.98	10.23±0.469	6.49
	100	96.44±3.68	4.26	105.65±5.09	5.94
	0.2	0.194±0.008	4.37	0.196±0.011	5.57
氟哌啶醇	10	9.54±0.203	2.13	9.54±0.205	2.15
	100	103.78±1.30	1.25	105.59±2.75	2.60
	0.2	0.196±0.011	5.59	0.186±0.015	8.26
氯丙嗪	10	9.74±0.298	3.06	9.66±0.297	3.07
	100	107.28±3.87	3.61	109.17±4.19	3.83
	0.2	0.212±0.014	7.55	0.200±0.018	9.11
舒必利	10	10.16±0.267	2.63	10.18±0.247	2.42
	100	106.47±1.33	1.25	109.94±3.92	3.56

## 2.7 入院病人血清筛查

对入院进行治疗的精神病患者进行治疗前抽血化验，筛查治疗前用药种类以及用药剂量，以实现对症下药，结果如下见表5

表5 精神病患者入院血清筛查结果(ng/mL)

No.	氯氮平	喹硫平	利培酮	阿立哌唑	奋乃静	氟哌啶醇	氯丙嗪	舒必利
-----	-----	-----	-----	------	-----	------	-----	-----

1	1.748	1.577	9.507	2.804	8.734	4.094	0.390	----
2	1.093	0.761	3.554	0.569	7.457	6.924	0.399	----
3	20.081	12.331	17.645	----	58.363	9.128	----	----
4	----	3.024	1.422	----	4.924	5.236	----	----
5	3.709	----	2.107	9.384	4.256	1.656	----	----
6	4.666	1.491	2.311	2.524	6.355	5.807	----	----
7	----	0.715	1.247	1.390	2.012	1.206	----	0.228
8	----	----	----	273.731	----	2.971	3.489	----
9	8.476	2.032	3.552	18.225	11.269	6.193	2.249	1.038
10	109.852	3.358	6.400	13.843	13.812	9.154	----	----
11	0.892	94.973	1.141	0.220	2.615	8.573	0.823	----
12	0.274	156.824	0.676	0.353	1.589	----	0.249	----
13	0.197	0.466	0.458	----	1.338	----	0.217	----
14	0.191	0.149	12.988	0.561	1.005	----	0.349	----
15	131.097	0.139	0.263	34.999	1.017	----	0.491	----
16	1.252	1.188	3.685	3.307	6.227	0.738	----	134.264
17	124.038	1.334	3.929	21.692	7.147	3.245	5.143	1.043
18	5.249	0.529	2.153	12.199	----	12.548	2.927	----
19	0.235	0.158	0.299	----	0.962	5.365	1.057	----
20	----	0.124	0.306	0.157	0.980	----	1.276	----
21	----	0.195	0.378	0.087	0.875	----	0.442	----
22	----	1.067	2.131	7.632	----	4.033	----	0.459
23	----	0.811	1.048	4.881	2.214	3.934	0.835	0.651
24	8.661	2.215	2.744	12.606	----	14.882	4.824	1.542
25	0.313	0.137	0.239	0.600	0.820	----	0.153	----
26	----	3.663	3.815	7.551	2.706	3.362	2.150	----
27	0.262	0.162	0.245	----	1.204	5.431	0.136	----
28	0.152	0.256	0.300	----	0.449	----	0.339	----
29	----	83.432	9.697	0.213	0.519	----	0.185	----

30	----	82.884	0.558	2.196	----	0.603	0.636	----
31	0.155	0.145	11.892	----	0.647	3.643	0.301	----
32	36.116	1.721	2.040	8.529	3.250	2.617	----	----
33	45.814	0.155	0.618	----	1.079	----	0.195	0.363
34	0.508	0.411	0.517	0.046	0.818	3.939	0.175	1.187
35	3.511	18.368	2.309	17.227	2.581	4.370	2.031	0.545
36	0.147	----	0.751	0.126	0.307	----	0.984	----
37	0.248	0.117	0.143	----	0.296	11.872	0.389	----
38	----	0.069	0.179	----	----	3.398	0.940	----
39	1.877	1.255	1.692	0.968	1.470	3.195	0.497	5.561

### 3 结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用进行神经病患者治疗药物监测，根据监测结果可以清楚患者入院前体内的药物种类及其含量，指导用药处方，能够更准确进行个体化用药，缩短治疗周期，提高治疗效果。

## 第六章 基因检测

### 6.1 引言

基因是 DNA 分子上的一个功能片断，是遗传信息的基本单位，是决定一切生物物种最基本的因子。基因通过指导蛋白质的合成来表达自己所携带的遗传信息，从而控制生物个体的性状表现。基因检测是通过血液、其他体液或细胞对 DNA 进行检测的技术。基因检测可以诊断疾病，也可以用于疾病风险的预测。

目前在医学检验，基因检测主要有以下 6 个方面应用：1、通过检测微生物的基因，确认疾病的类型，例如肝病、结核病、流感、食物中毒等，从而对症使用抗生素；2、检测突变基因指导肿瘤病人个体化用药，因为特定的肿瘤药物只对有特定的突变基因的个体有效，而对无突变的无效；3、血液病研究中检测突变基因；4、无创 DNA 产前检测技术，检测各种遗传病；5、癌症前期的肿瘤标志物检测；6、利用基因检测技术在疾病发生前就发现疾病发生的风险，提早预防或采取有效的干预措施。

针对医学检测基因检测领域，岛津推出普通 PCR 和全自动微芯片电泳仪 MultiNA 联用高效的检测方法。应用此方法，可进行微生物的鉴定从而检测食物中毒细菌类型和诺如病毒。目前，DNA 二代测序在疾病检测方面发挥着越来越重要的作用，应用岛津微芯片电泳 MultiNA 及 Smear Analysis 软件可对二代测序文库样品进行分析，同时得到文库的尺寸分布及浓度。另外，微芯片电泳仪 MultiNA 与 PCR-限制性片段长度多态性 (RFLP) 方法的联用可实现宫颈癌的人乳头瘤病毒 (HPV) 生物标志物的检测。本文展示了全自动微芯片电泳仪 MultiNA 在以上几个方面的解决方案。

## 6.2 应用微芯片电泳仪 MultiNA 检测食物中毒相关基因

**摘要：**本文介绍应用 MCE-202 MultiNA 微芯片电泳仪的基因分析检测食物毒菌。此系统相对于琼脂糖凝胶电泳，提供了更为高速、自动分析、高灵敏度的优势。

**关键词：**MultiNA 食物中毒基因 基因检测

近年来，基因检测方法已经被普遍用来鉴定致病因子，这些致病因子可导致食物中毒、过敏、传染性疾病，例如流感。最流行和传统基因水平的检测方法包括以 PCR（聚合酶链反应）扩增特异性的基因，电泳检测扩增产物极其尺寸。传统的电泳从准备凝胶到得到结果，其过程非常繁琐。另外，计算尺寸需用已知尺寸的条带进行目测对比得到，由于依靠个人的主观性，会导致结果的偏差。

这里我们介绍应用 MCE-202 MultiNA 微芯片电泳仪的基因分析检测食物毒菌。此系统相对于琼脂糖凝胶电泳，提供了更为高速、自动分析、高灵敏度的优势。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器

MCE-202 MultiNA

#### 1.2 试剂

Ampdirect®Plus (For International) (WAKO pure chem) 604-21469; (Shimadzu corp.) S241-08800-99; DNA-500 Reagent Kit for MultiNA (岛津制作所) 292-27910-91; SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen) S-11494; 25 bp DNA Ladder (Invitrogen) 10597-011

表1 所示10种食物相关的基因作为目标分析物。

名称	片段长度/bp
肠炎弧菌耐热性溶血毒素类似毒素基因 (trh1&2)	250
黄色葡萄球菌肠毒素 A 基因	423
黄色葡萄球菌毒素性休克症候群毒素基因	228
沙门氏菌 invA 基因	378
毒素原性大肠菌 LT 基因	263
毒素原性大肠菌 STh 基因	131
毒素原性大肠菌 STp 基因	123
肠管出血性大肠菌 VT1 基因	349
肠管出血性大肠菌 VT2 基因	404
肠管出血性大肠菌 VT1, VT2 基因	171

#### 1.3 分析条件

DNA-500 on chip 模式

#### 1.4 分析步骤

样品使用从菌株提取、纯化的 DNA。使用本公司的基因扩增用试剂“Ampdirect® Plus”进行 PCR，以 MultiNA 分析获得的 PCR 扩增产物，实验过程如图 1 所示。

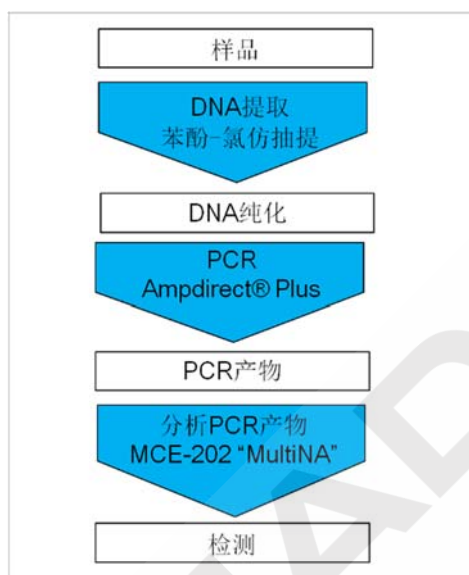


图 1 食物中毒相关基因分析的实验过程

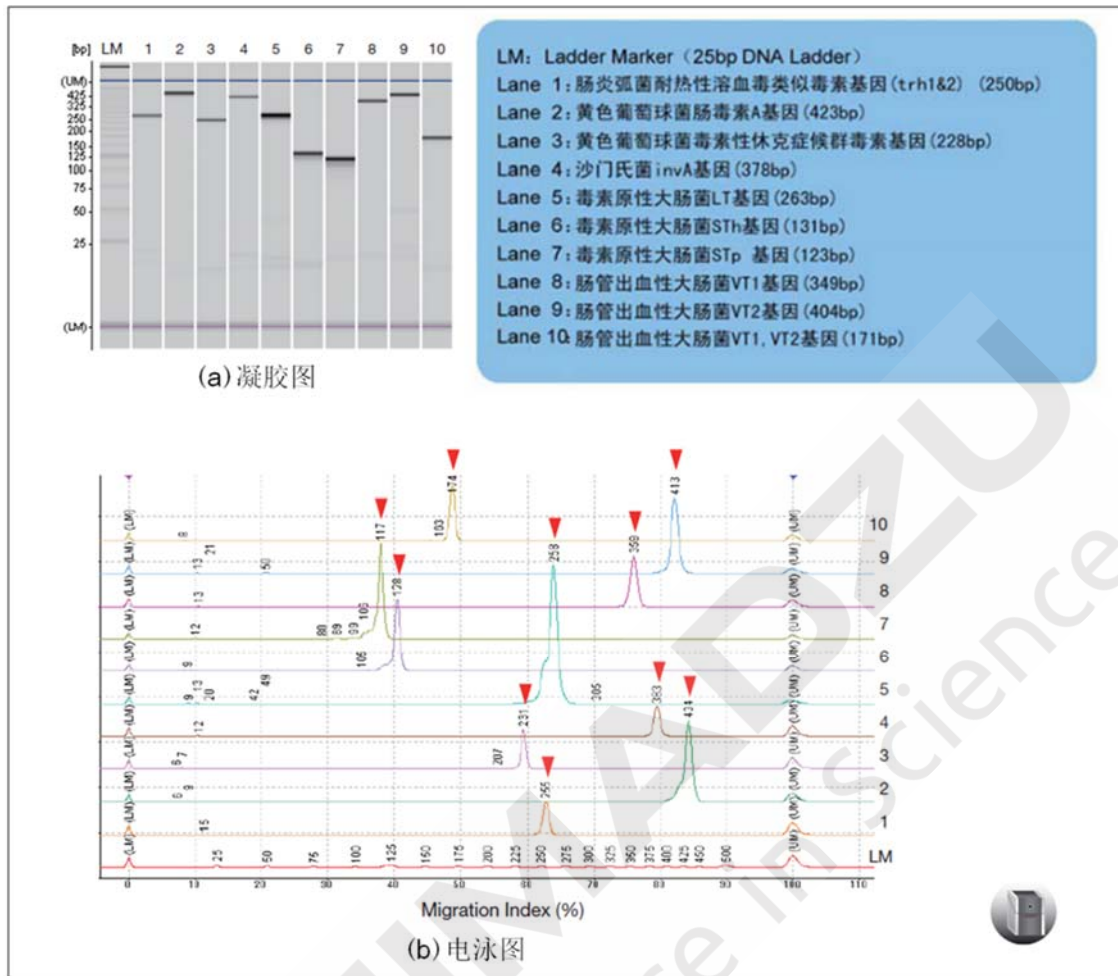


图2 10种样品的食物中毒相关的目标基因区域检测结果

### 3 结果讨论

10 种样品的食物中毒相关的目标基因区域检测结果如图 2 所示。所有的食物中毒相关的基因都被检测到。MCE-202 MultiNA 的分析结果同时得到凝胶图和电泳图。根据标准样品 (Ladder) 制作的标准曲线, 可计算得到未知样品的尺寸和浓度, 这样便可简单、可靠地评估 PCR 扩增产物。

### 4 结论

本文采用岛津公司 MCE-202 MultiNA 检测了 10 种与食物中毒相关的基因, 本方法操作简便, 结果可靠, 可供相关检测机构参考, 从而保证食品的安全食用。

## 6.3 应用微芯片电泳仪 MultiNA 高通量检测诺如病毒基因

**摘要：**MultiNA MCE-202 与诺如病毒检测试剂组件的组合，前处理及检测操作简便、准确、省力，实现高通量的诺如病毒基因检测。

**关键词：**MultiNA 实时荧光 PCR 诺如病毒扩增试剂盒 诺如病毒 基因检测

诺如病毒（Norovirus）是造成病毒性急性肠胃炎的主要原因，检测一般采用 RT-PCR 等基因扩增法。但是，在生物样品中大量存在强力分解 RNA 的酶（RNase）、干扰 RT 反应、PCR 反应的物质，因此，在进行诺如病毒 RNA 基因扩增之前，首先进行病毒分离，并需要提取、纯化其中所含的 RNA，并且检测时还要进行琼脂糖电泳等进一步的操作，显著损害基因扩增法的快速性。本文介绍使用 DNA/RNA 分析装置 MultiNA MCE-202 和无需 RNA 纯化的诺如病毒检测试剂组件，检测获得的 RT-PCR 扩增产物的实例。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器

MCE-202 MultiNA

#### 1.2 试剂

检测诺如病毒 G1 RNA 的直接 RT-PCR 试剂盒（岛津制作所）241-08905-91

检测诺如病毒 G2 RNA 的直接 RT-PCR 试剂盒（岛津制作所）241-08905-91

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA（岛津制作所）292-27910-91

SYBR<sup>®</sup> Gold nucleic acid gel stain（Invitrogen）S-11494

25bp DNALadder（Invitrogen）10597-011

（注）有关诺如病毒 G1/G2 扩增试剂盒的详细信息，请参照试剂盒的操作手册。

样品：

G1+：G1 扩增试剂盒处理过的诺如病毒 G1 阳性样品

G2+：G2 扩增试剂盒处理过的诺如病毒 G2 阳性样品

#### 1.3 分析条件

DNA-500 Pre-mix 模式

#### 1.4 分析步骤

样品准备及实验方法见图1。

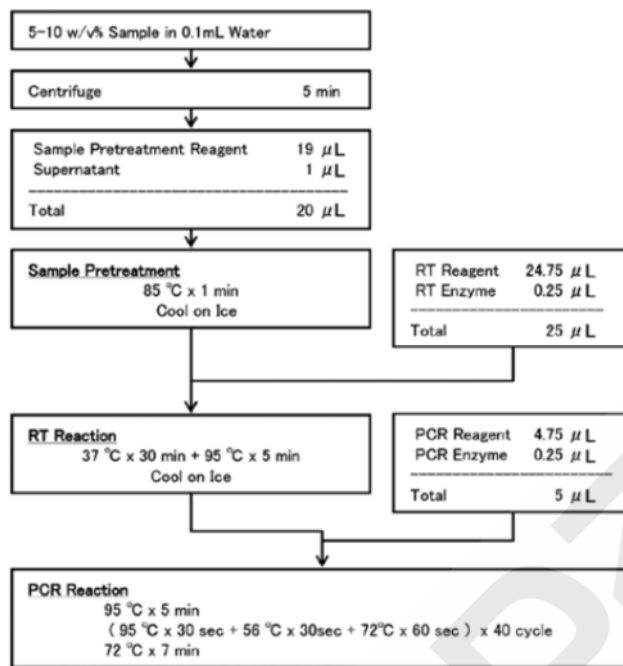


图1 样品准备及实验方法

## 2 结果讨论

将诺如病毒试剂盒G1/G2处理过的样品使用MCE-202 MultiNA进行分析，分析结果如图2所示。在G1与G2阳性样品中，结果检测到来自86 bp (G1) 和142 bp (内标)，以及98 bp (G2) 和205 bp (内标) 的扩增产物。作为对照，琼脂糖凝胶电泳-诺如病毒G1/G2扩增试剂盒检测诺如病毒结果如图3所示。MultiNA结果比琼脂糖凝胶电泳结果清晰，并且给出数字化结果。

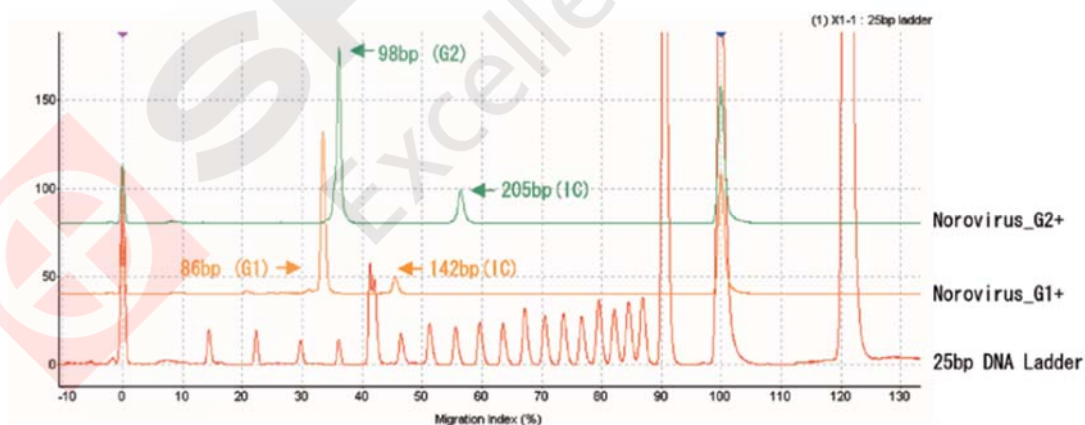


图2 使用诺如病毒G1/G2扩增试剂盒的扩增样品电泳图



图3 诺如病毒G1/G2扩增试剂盒检测诺如病毒-琼脂糖电泳检测

### 3 结论

本文采用岛津公司MCE-202 MultiNA及无需RNA纯化的诺如病毒检测试剂盒检测了诺如病毒,该方法操作简易,灵敏性强,是诺如病毒检测从而确保食品被安全食用强有力的手段。



SHIMADZU  
Excellence in Science

## 6.4 一种高通量和自动化用于宫颈癌筛选和预测的人乳头瘤病毒分型方法

**摘要:**一种基于限制性片段长度多态性(RFLP)和微芯片电泳仪的新型的人乳头瘤病毒(HPV)方法被建立,这种方法可用于宫颈癌的筛选和预测,具有高灵敏度和高通量的优势。这种检测限是 $2 \times 10^2$ 拷贝数、基于PCR-RFLP-微芯片电泳仪的高灵敏度和精确的分型方法确保了它的成功诊断结果比细胞学对于感染率的检测高4倍。这种方法在分子水平上的病理检测有巨大的潜力。

**关键词:** 微芯片电泳仪 MultiNA 人乳头瘤病毒 HPV 病毒分型 宫颈癌

已被证实连续地感染某种人乳头瘤病毒(HPV)会导致上皮损伤例如子宫瘤和尖锐湿疣。由于人乳头瘤病毒DNA在致癌过程方面起着很多的作用,故癌症前期的恶性细胞中存在着人乳头瘤病毒的DNA。目前,已经发现一百多种HPV,这些病毒的DNA之间有区别。根据它们病理学上的风险程度,这些HPV被分为高风险型和低风险型。低风险型在宿主细胞保存完整会引起尖锐湿疣。而高风险型HPVDNA会整合到宿主细胞中,会引起宫颈癌的发展,另外高风险型还会抑制肿瘤抑制器,这会导致人类细胞的恶性生长。因此,HPV的基因型分型分析对于宫颈癌的初步筛选非常重要,同时也关系着研究HPV和其他癌症的关系。在许多国家,由于HPV的筛选代替细胞学的测试,对宫颈癌的初步筛选具有重要的作用,因此,迫切需要快速、方便地筛选HPV的方法。目前,基于PCR的方法由于其高灵敏度和方便使用得到了广泛的关注。

限制性片段长度多态性(RFLP)方法是一种无标签、经济化的方法。然而,PCR-RFLP进行HPV筛选被分离所使用的平板凝胶电泳或毛细管电泳限制了。另外,分型决定的过程是耗时和需要专业技术的。另一方面,微芯片电泳仪由于使用较短的分离通道和非胶的筛分技术,被广泛地用于生物分析。然而,使用微芯片电泳进行HPV筛分还没有被报道过。

本文首次应用PCR-RFLP和微芯片电泳开发了一种新型的HPV基因分型的方法。另外,自行设计的软件可以自动化地进行分型。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器

MCE-202 MultiNA

## 1.2 试剂

TIANamp Micro DNA Kit (Tiangen 生物公司)

PCR 相关试剂 (Excell Co., Ltd)

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA (岛津制作所) 292-27910-91

SYBR<sup>®</sup> Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen) S-11494

25 bp DNA Ladder (Invitrogen, 10597-011)

Pst I, Hae III, Dde I 和 Rsa I 限制性内切酶 (New England Biolabs)

DNA Gel 提取试剂盒 (Sangon Biotech 公司)

引物和 pUCm-T 载体 (Sangon Biotech 公司)

## 1.3 分析条件

DNA-500 on chip 模式

## 1.4 分析步骤

### 1.4.1 样品前处理

基于液体的细胞学测试样品以 1500 rpm 速度进行离心, 得到细胞之后, 目标 DNA 被提取和纯化。另一整份的样品被用作细胞学测试。

### 1.4.2 PCR 扩增

HPV DNA 的引物根据另一篇文献设计。PCR 时, 模板使用 10 到 20 ng, 另包含 1×PCR buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 12.5 pmol 每种引物, 200 M 脱氧核苷三磷酸盐和 1.75 unit 的 HotStart Taq DNA 聚合酶及纯水。PCR 热循环过程: DNA 变性 95°C 9 min; 之后 38 个循环的 94°C 持续 20 s, 58°C 持续 40 s, 72°C 持续 20 s; 最终 72°C 5 min。

### 1.4.3 限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析

PCR 产物被限制性内切酶 Pst I, Hae III, Dde I 和 Rsa I 酶解, 酶解片段被微芯片电泳 MultiNA 所分析。

## 2 结果讨论

### 2.1 PCR-RFLP-微芯片电泳自动分型方法的设计和原理

HPV 鉴定体系如图 1 所示。此体系使用引物去扩增多个 HPV 目标物的 L1 片段作为一个反应中的游离基因或综合体。微芯片电泳仪可以自动地实现 DNA 的分析, 激光诱导荧光检测器提供很高的灵敏度。不同类型的 HPV 被区分根据其片段长度的不同, 得到这样的不同长度则是采用了 4 种限制性内切酶。当识别样品的类型时, 则需根据所有 HPV 类型的参考尺寸去判定。因此类型判定软件根据尺寸识别的地图来自动鉴定。图 1 中的 s 代表可能性。

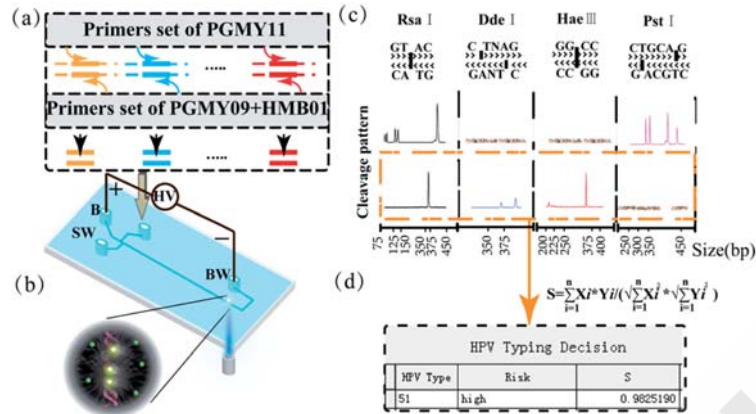


图1 PCR-RFLP-微芯片电泳仪方法自动分型分析示意图。(a) PCR引物扩增多个潜在HPV DNA，(b) 微芯片电泳仪分析DNA，S、SW、B和BW分别代表样品储液池、废液储液池、分离缓冲液储液池和分离缓冲液废液池，(c) RFLP分析产生的尺寸信息，(d) RFLP产物自动分析软件。

## 2.2 PCR-RFLP-微芯片电泳仪对HPV基因分型的检测

Hela和Caski细胞被用来评估方法的性能，这两种细胞中都含有HPV的DNA。Hela和Caski细胞的PCR产物被内切酶Rsa I处理，产生HPV 16和HPV 18的单一鉴定图。图2a和2b显示成功检测到了Hela和Caski细胞的阳性感染，268 bp和450 bp的片段对应β-球蛋白和HPV扩增子。我们可以很容易证明Caski细胞包含HPV 16，而Hela细胞包含HPV 18，这个判断来自于Caski细胞的72，210，216，310和444 bp和Hela细胞的72，85，125，135，213和242 bp的RFLP片段，如图2c和2d所示。杂交捕获是被FDA证明是最准确的方法，其检测极限是 $5 \times 10^3$  copies/mL，而我们的方法检测极限是 $2 \times 10^2$  copies/mL。

为使HPV分析方法更能被应用，我们制作了标准“2D密码”，13种高风险和2种低风险的HPV鉴定卡对于病理诊断非常重要，如图3所示。HPV鉴定卡的准备包括HPV筛选和RFLP分型系统。为了测定阳性样品，通过同时扩增内部对照和HPV L1基因来进行HPV筛选过程。β-球蛋白，一种人类细胞的管家基因，作为内部对照来扩增，从而保证从人类细胞中DNA提取的完整性。检测β-球蛋白可以避免临床检测的假阴性检出。富含信息的DNA片段被微芯片电泳仪检测得到，尺寸在25-500 bp。鉴定卡中的直线被用来表示鉴定图中每个确定的峰。15个重要HPV类型的标准鉴定卡如图4所示。通过参照这些鉴定卡，内科医生可以很快地做出临床诊断。

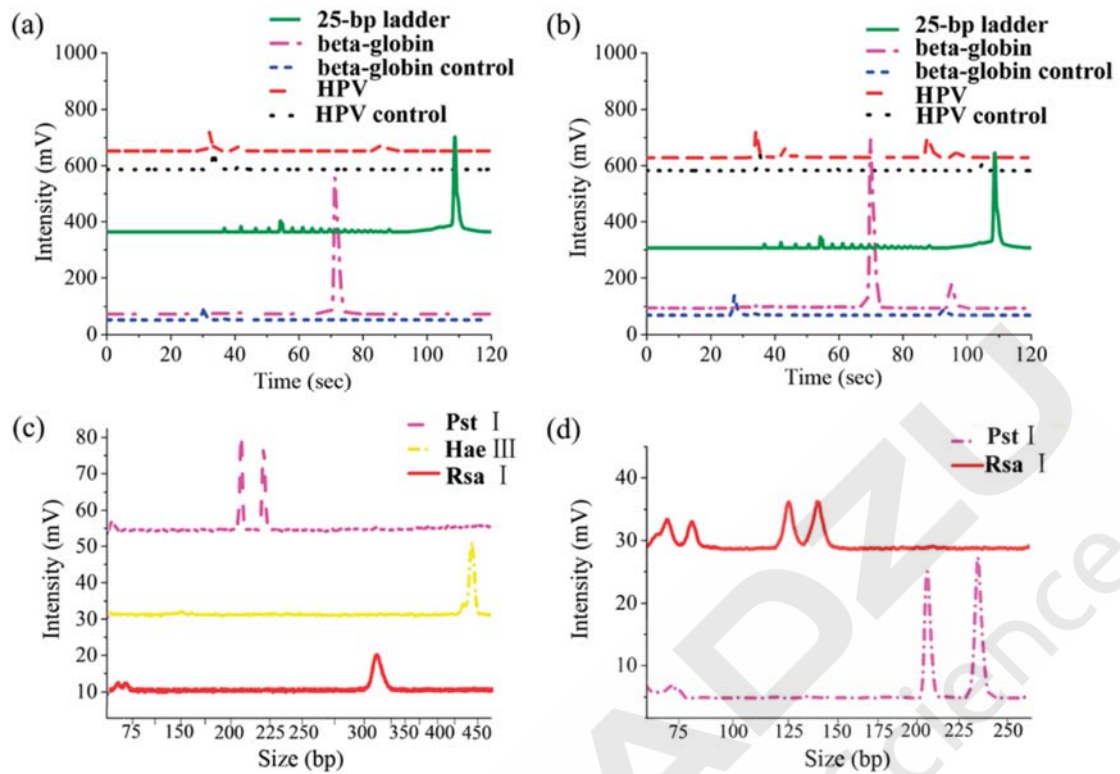


图2 25-bp Ladder、阴性对照、 $\beta$ -球蛋白和HPV扩增子的电泳图。(a) Caski细胞的 $2 \times 10^2$  copies/mL的HPV 16 DNAs, (b) HeLa细胞的 $2 \times 10^2$  copies/mL的HPV 18 DNAs, (c) 用Rsa I、Hae III和Pst I鉴定 $2 \times 10^2$  copies/mL的HPV 16 DNAs, (d) 用Rsa I和Pst I鉴定 $2 \times 10^2$  copies/mL的HPV 18 DNAs

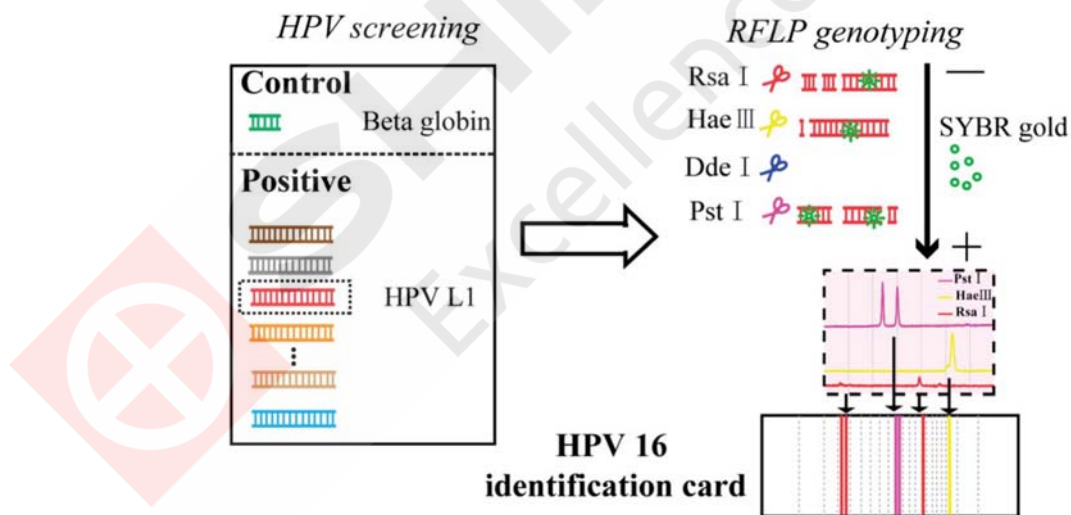


图3 鉴定卡的准备机制

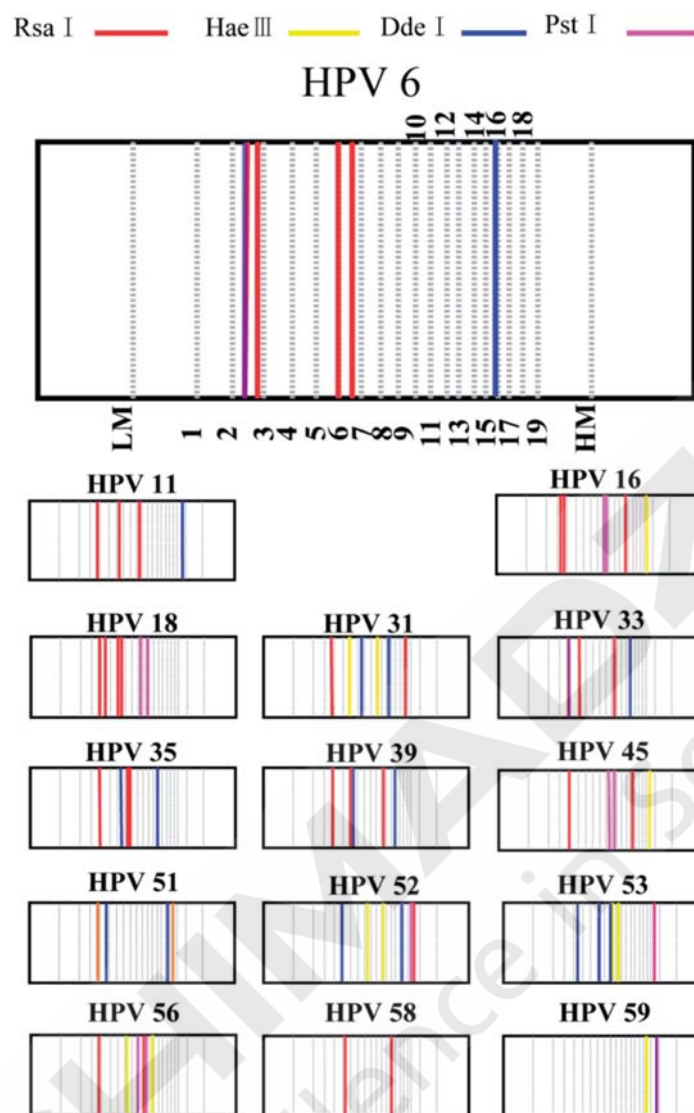


图4 15种临床重要HPV类型的鉴定卡

### 3 结论

本文开发了一种新型、高效率用于HPV分型的鉴定方法。应用微芯片电泳仪提高了PCR-RFLP方法性能，这种方法不需要特异性的探针或引物，在自动分析和快速地HPV基因分型鉴定中具有潜力。

本文整理来自于High-throughput and automatic typing via human papillomavirus identification map for cervical cancer screening and prognosis, Linglu Yi, Xueqin Xu\*, Xuexia Lin, Haifang Li, Yuan Ma, and Jin-Ming Lin\*, Analyst, 2014, 139 (13), 3330 – 3335.

## 6.5 微芯片电泳 MultiNA 在二代测序（NGS）文库质控中的应用

**摘要：**本文应用岛津微芯片电泳 MultiNA 及 Smear Analysis 软件对二代测序文库样品进行分析，同时得到文库的尺寸分布及浓度信息，与传统方法应用琼脂糖凝胶电泳测量尺寸分布及实时荧光 PCR 进行定量相比，本方法操作简便、快速、价格低廉，适合高通量质控二代测序文库。

**关键词：**微芯片电泳 MultiNA 二代测序（NGS） 文库质控

目前，随着二代测序技术发展，其在生物学、临床检测领域发挥着越来越重要的作用。为了得到良好准确的测序结果，要求了解二代测序文库样品的尺寸分布和浓度。传统的方法是使用琼脂糖凝胶电泳获得文库的尺寸分布，文库的浓度信息则是通过实时荧光 PCR 或分光光度计获得。这样的操作需要一系列的步骤，繁琐费时，效率低下。另外，随着测序技术的成熟，需要进行质量控制的文库数量大大增多。因此，目前迫切需要操作简便、高效且价格低廉的操作方法。

为了满足以上的要求，本文应用岛津微芯片电泳 MultiNA 及 Smear Analysis 软件对二代测序文库样品进行分析，同时得到了文库的尺寸分布及浓度信息，本方法对于质控二代测序文库具有操作简单、自动化、高通量的特点。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器

MCE-202 MultiNA

#### 1.2 试剂

SYBR<sup>®</sup> Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, S-11494)

1×TE Buffer

25 bp DNA Ladder (Invitrogen, 10597-011)

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA (岛津公司, P/N 292-27911-91)

样品：人的二代测序文库样品

#### 1.3 分析条件

MultiNA Marker 混合模式：On-chip 混

#### 1.4 MultiNA 检测

文库样品进入 MultiNA 进行测定。根据产物片段大小，实验中选用 500 bp 的试剂盒进行测定。使用 Smear Analysis 软件对样品浓度进行定量。

## 2 结果讨论

在NGS文库的质量控制过程中，使用MultiNA的Smear Analysis软件能够计算出文库的尺寸平均大小与浓度。使用MultiNA的Smear Analysis软件时，可自由输入要分析Smear片段的起始和终止大小。本实验文库样本片段起始尺寸为220 bp，终止尺寸为500 bp。在MultiNA的文库质量控制中确认大小分布，还能够在常规分析中同时进行定量。使用MultiNA可最多对108个文库自动进行电泳和分析，缩短了操作时间，特别是NGS文库有所增加时，将MultiNA应用到文库质量控制中，可快速简便地进行质量控制。

## 3 结论

本文应用微芯片电泳 MultiNA 及 Smear Analysis 软件成功分析了二代测序文库样本，同时得到了样本的平均片段大小和浓度信息，本方法操作简便，速度快，适合高通量的二代测序样本的质控分析。

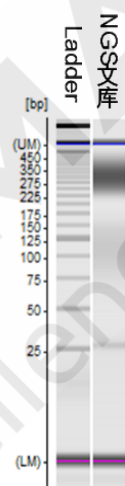


图1 MultiNA检测二代测序（NGS）文库样品的凝胶图

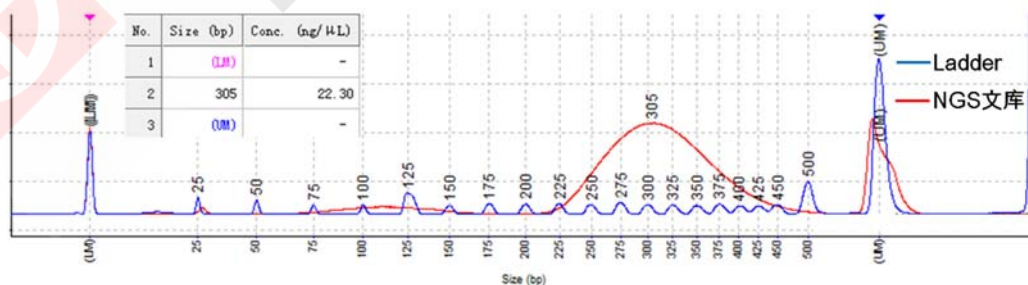


图2 MultiNA检测二代测序（NGS）文库样品的电泳图及浓度信息

# 第七章 元素分析

## 7.1 引言

在构成人体的元素中，有部分已被科学研究证明在维持人体正常新陈代谢方面发挥着重要作用，比如：磷是构成骨质、核酸的基本成分，既是肌体内代谢过程的储能和释能物质，又是细胞内的主要缓冲剂；镁是很好的镇静剂，也是人体内多种酶的活化剂，对于蛋白质的合成、脂肪和糖类的利用及数百组酶系统都有重要作用；铁是血红蛋白的重要组成部分，能增强白血球抵抗病菌的能力；锌有助于增强记忆力和提高智力，尤其对胎儿的大脑发育有重要作用等。另外，有部分元素被证实如果在体内的量超过一定程度的话，会对人体造成极大伤害，比如：儿童体内铅过量时，会对智力发育、体格生长和听力产生不利影响；镉超标会造成“骨痛病”等。鉴于此，对于人体内的某些元素含量进行监控就显得比较必要和重要。

在检测人体内元素含量方面，原子光谱可以发挥重要作用：石墨炉原子吸收光谱法（GFAAS）因其灵敏度高、光谱干扰少等特点成为国家卫生行业标准推荐的检测血铅和血镉含量的方法。电感耦合等离子体质谱仪（ICPMS）具有定性能力强、可多元素同测等特点，使其在同时检测多种元素含量时，成为不错的选择。

本章为您介绍岛津在使用原子吸收光谱仪、电感耦合等离子体质谱仪在元素检测方面所做的一些工作，敬请关注。



## 7.2 石墨炉原子吸收光谱法测定血样中的铅和镉含量

**摘要：**本文参照中国卫生行业标准 WS/T 20-1996 和 WS/T 34-1996，将血样以 0.2% Triton X-100 溶液稀释后，以标准加入法制作校准曲线，石墨炉原子吸收光谱法检测了血样中的铅和镉含量。实验以冻干牛血铅、镉标准物质 GBW09139 为质控样进行了考察，所得结果与标准值相符，且多次测量的结果之间亦有较好的重复性。

**关键词：**血样 铅 镉 石墨炉 标准加入法

铅和镉是对人体有害的重金属元素，铅、镉超标均会对人体产生一系列的危害，如铅超标会损害人体的神经系统，影响儿童智力发育，损害人体免疫系统，镉超标则会损害人体骨骼，造成“骨痛病”，同时损害人体肾脏和肺部等。血铅和血镉是最能准确反映出人体铅、镉中毒程度的指标，因此，血铅和血镉含量检测是最常用和最有效的判定是否铅、镉中毒的手段。国家卫生行业标准 WS/T 20-1996《血中铅的石墨炉原子吸收光谱测定方法》、WS/T 34-1996《血中镉的石墨炉原子吸收光谱测定方法》和 WS/T 174-1999《血中铅、镉的石墨炉原子吸收光谱测定方法》等均推荐石墨炉原子吸收光谱法作为检测血铅和血镉的方法。

本文参照相关标准，将血样以 0.2% Triton X-100 溶液稀释后，以标准加入法制作校准曲线，石墨炉原子吸收光谱法检测了血样中的铅和镉含量。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器

岛津 AA-7000 原子吸收分光光度计

#### 1.2 样品及试剂

玻璃器皿（烧杯和容量瓶）经 30% 硝酸浸泡并以超纯水冲洗干净后使用；

实验所用硝酸为优级纯试剂，Triton X-100 为分析纯试剂，水为超纯去离子水。

#### 1.3 样品制备

- (1) 以 1% 硝酸为介质，配制浓度为 0.2% (v/v) 的 Triton X-100 溶液；
- (2) 将浓度为 1000 mg/L 的铅、镉标准溶液以 0.2% Triton X-100 溶液为稀释剂，分别逐级稀释配制浓度为 100  $\mu\text{g/L}$  的 Pb 标准溶液和浓度为 2  $\mu\text{g/L}$  的 Cd 标准溶液；
- (3) 选取早晨空腹采集的静脉血样，按照表 1 浓度依次制备加标样品，以未加标血样为标曲空白；
- (4) 以 0.2% Triton X-100 为稀释剂，将质控样 GBW09139 稀释 10 倍待测。未知样品同法

处理；

(5) 以 0.2% Triton X-100 溶液为样品空白。

表 1 加标样品的制备

No.(Pb)	1	2	3	4	No.(Cd)	1	2	3	4
100 µg/L Pb(mL)	0	0.1	0.2	0.4	2 µg/L Cd(mL)	0	0.2	0.4	0.6
Triton X-100(mL)	0.9	0.8	0.7	0.5	Triton X-100(mL)	0.9	0.7	0.5	0.3
血样(mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	血样(mL)	0.1	0.1	0.1	0.1
加标浓度(µg/L)	0	10	20	40	加标浓度(µg/L)	0	0.4	0.8	1.2

#### 1.4 仪器条件和参数

采用石墨炉原子化法进行实验，其中仪器光学参数和优化后的石墨炉升温程序分别参照表 2 和表 3、表 4。

表 2 光学参数

元素	检测波长(nm)	点灯方式	狭缝宽(nm)	灯电流(mA)
Pb	283.3	BGC-D2	0.7	10
Cd	228.8	BGC-D2	0.7	8

表 3. Pb 石墨炉升温程序（平台石墨管）

	温度(°C)	时间(s)	加热方式	灵敏度	气体流量
1	60	3	RAMP		0.10
2	150	40	RAMP		0.10
3	300	10	STEP		0.10
4	600	10	RAMP		1.00
5	700	3	RAMP		1.00
6	850	10	STEP		1.00
7	850	3	STEP	√	0.00
8	2200	3	STEP	√	0.00
9	2500	2	STEP		1.00

表 4 Cd 石墨炉升温程序（平台石墨管）

	温度(°C)	时间(s)	加热方式	灵敏度	气体流量
1	60	3	RAMP		0.10
2	150	40	RAMP		0.10
3	300	10	RAMP		0.10
4	650	10	RAMP		1.00
5	650	10	STEP		1.00
6	650	3	STEP	√	0.00
7	2200	3	STEP	√	0.00
8	2500	3	STEP		1.50

## 2 结果与讨论

### 2.1 升温程序和进样体积

由于本方法采用将全血样品以 Triton X-100 稀释后直接进样的方式进行分析检测，血样里大量的蛋白等有机物的存在，使得样品兼具粘稠和基体复杂等不利分析的特点，因此在分析时，升温程序的优化显得至关重要：在干燥阶段，采用较为缓慢的升温速率可以避免样品飞溅；基体改进剂 Pd 盐的使用，可在灰化阶段可以采用较高的温度以及较长的灰化时间，以便更彻底的去掉复杂的基体组分。

适当的减少进样体积，也可以较好的降低样品由于粘稠和基体复杂带来的不利影响，因此经过反复尝试后，将血铅检测的进样体积定为 15  $\mu\text{L}$ ，血镉检测的进样体积定为 10  $\mu\text{L}$ ，基体改进剂 Pd 盐（浓度为 50 mg/L）的进样体积为 5  $\mu\text{L}$ 。

### 2.2 标准曲线及方程式

将按照“1.3 样品制备”所得的加标样品进样分析，以吸光度值为纵坐标，加标浓度为横坐标得校准曲线分别如图 1 和图 2 所示。

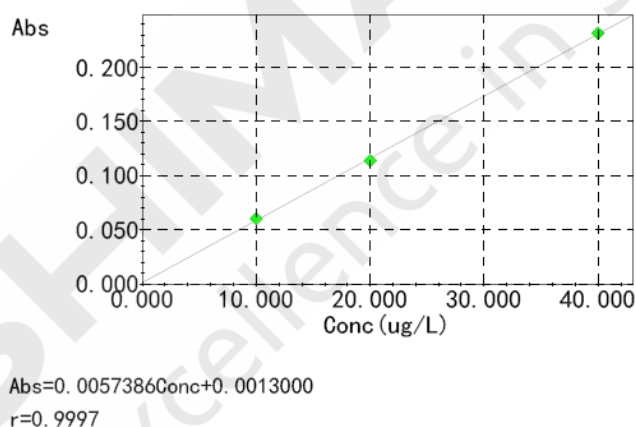


图 1 Pb 元素校准曲线

在加标浓度范围内，Pb 的吸光度与浓度有着良好的线性关系，相关系数为  $r=0.9996$ 。

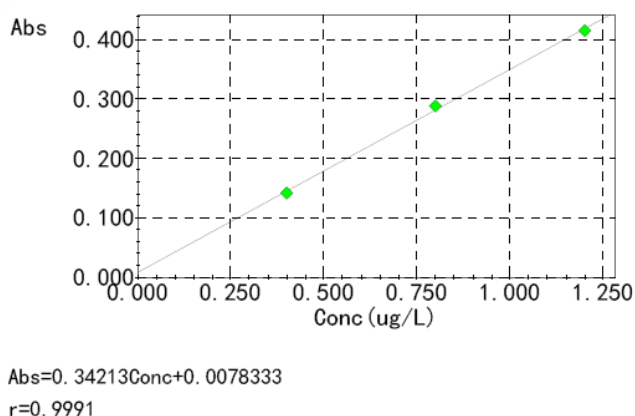


图 2 Cd 元素校准曲线

在加标浓度范围内，Cd 的吸光度与浓度有着良好的线性关系，相关系数为  $r=0.9991$ 。

### 2.3 样品检测结果和精密度

以标准加入法制备的校正曲线计算冻干全血铅、镉成分分析标准物质 GBW09139 中铅和镉的含量，并考察了重复测定结果的 RSD，具体结果见表 5。

表 5 冻干全血标准样品中 Pb 和 Cd 测定结果

元素	检测含量 ( $\mu\text{g/L}$ )	稀释倍数	实样浓度 ( $\mu\text{g/L}$ )	参考浓度 ( $\mu\text{g/L}$ )	RSD(n=5) (%)
Pb	13.30	10	133.0	120 $\pm$ 15	1.6
Cd	0.148	10	1.48	1.44 $\pm$ 0.09	3.0

### 3 结论

本文参照中国卫生行业标准 WS/T 20-1996 和 WS/T 34-1996，将血样以 0.2% Triton X-100 溶液稀释后，以标准加入法制作校准曲线，石墨炉原子吸收光谱法检测了血样中的铅和镉含量。以冻干牛血铅、镉标准物质 GBW09139 为质控样对方法进行了考察，所得结果与标准值相符，且多次测量的结果之间亦有较好的重复性。



SHIMADZU  
Excellence in Science

## 7.3 ICPMS-2030 碰撞池技术快速测定血清中微量金属元素的含量

**摘要：**参考标准WS-T-93-1996 《血清中铜的火焰原子吸收光谱测定方法》，采用稀酸直接稀释血清样品，使用岛津ICPMS-2030型电感耦合等离子体质谱仪结合碰撞池技术测定了样品中微量元素Ca、Cu、Fe、Mg和Zn的含量。结果表明，这五种元素的方法检出限在17~300  $\mu\text{g/L}$ ，使用物标准物质Seronorm™ Trace Elements进行验证，测定值与标准值吻合；样品测定精密度（RSD，n=6）小于4%，平行样品相对标准偏差小于1.4%。该方法操作简单快速，精密度和准确度高，可满足血清样品中微量元素成分分析的要求。

**关键词：**血清 微量元素 直接稀释法 ICPMS-2030

在临床检测中，常需分析血清中的Ca、Cu、Mg、Fe和Zn 5个元素，这5个元素是人体必需的元素。

在临床分析中，上述5个元素主要采用的分析方法是火焰原子吸收法，该法的缺点是只能单元素分析，速度慢，不利于大规模样品的分析检测。电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)法以其多元素同时测定，线性范围宽、测试速度快、准确度高等优点正在被广大工作者使用。

本文采用稀酸直接稀释样品，使用岛津 ICPMS-2030 型电感耦合等离子体质谱仪结合碰撞池技术测定了血清样品中微量元素含量。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器

岛津 ICPMS-2030 电感耦合等离子体质谱仪

#### 1.2 实验器皿及试剂

实验所用器皿分别为塑料或玻璃材质，使用硝酸溶液（1+1）浸泡24小时后，用去离子水冲洗，干燥备用；实验用硝酸为优级纯硝酸；实验用水为超纯去离子水。

#### 1.3 样品处理

将样品用1%硝酸稀释100倍后测定。

#### 1.4 仪器参数

**等离子体参数：**

高频功率：1.2 kW

等离子体气流速：8.0 L/min

辅助气流速：1.1 L/min

载气流速：0.7 L/min

炬管类型：Mini

雾化器类型：同心

雾化室：旋流

雾室温度：5℃

采样深度：5.0 mm

高频频率：27.12 MHz

**碰撞池参数：**

碰撞气种类: He

碰撞气流速: 6.0 mL/min

池电压: -21 V

能量过滤器电压: 7.0 V

## 2. 结果与讨论

### 2.1 标准曲线溶液配制

使用 1%硝酸配制不同浓度的混合标准溶液, 标准溶液浓度见表 1。使用在线内标组件, 内标元素为 Sc、Ge, 浓度均为 500 ppb。

表 1 标准溶液浓度及分析质量数

元素	质量数 (amu)	标准曲线浓度(μg/L)							
		STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	STD8
Ca	44	0	-	-	-	-	100	500	1000
Cu	63	0	1	5	10	50	--	--	--
Fe	56	0	1	5	10	50	--	--	--
Mg	24	0	1	5	-	50	200	--	--
Zn	68	0	1	5	10	50	-	-	--

注: 为使用氦气碰撞模式

### 2.2 元素标准曲线如下:

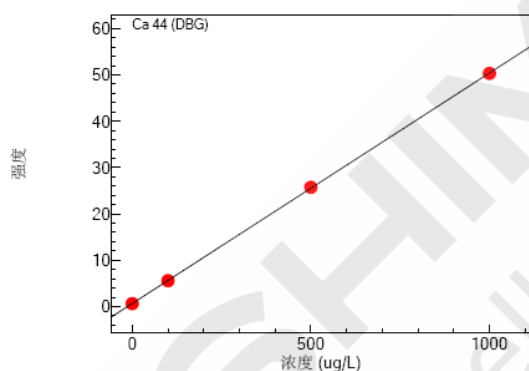


图 1 Ca 元素的标准曲线  $r=0.99998$

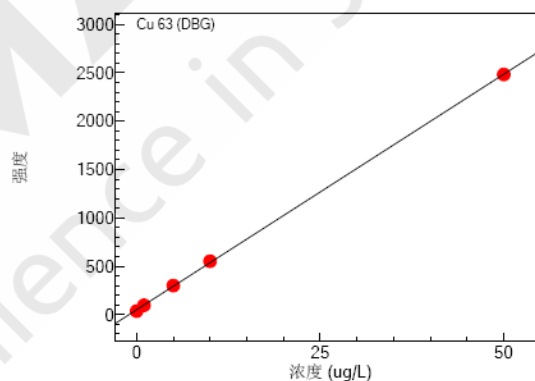


图 2 Cu 元素的标准曲线  $r=0.99994$

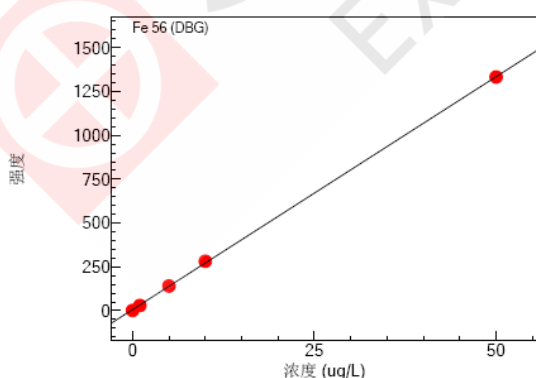


图 3 Fe 元素的标准曲线  $r=0.99994$

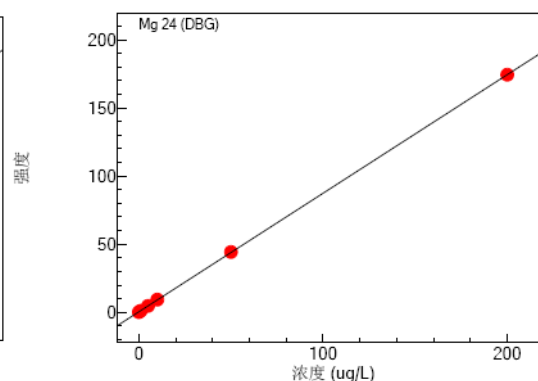


图 4 Mg 元素的标准曲线  $r=0.99999$

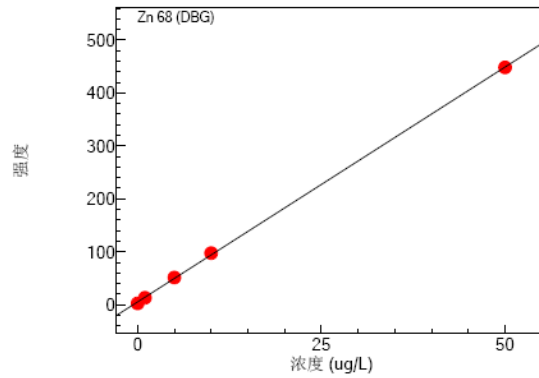


图 5 Zn 元素的标准曲线  $r=0.99991$

### 2.3 碰撞池技术及元素质量轮廓图

ICP-MS 分析中, 由于多原子离子形成的谱线干扰, 造成灵敏度下降以及测定值产生误差。血清分析中具有代表性的干扰包括:  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$  对  $^{56}\text{Fe}$  的干扰,  $^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}$  对  $^{63}\text{Cu}$  的干扰,  $^{40}\text{Ar}^{24}\text{Mg}$  对  $^{66}\text{Zn}$  的干扰, 针对这些干扰, ICPMS-2030 的八极杆碰撞池通过引入氦气碰撞, 可以有效地消除多原子离子干扰。下图为元素的质谱峰轮廓图。

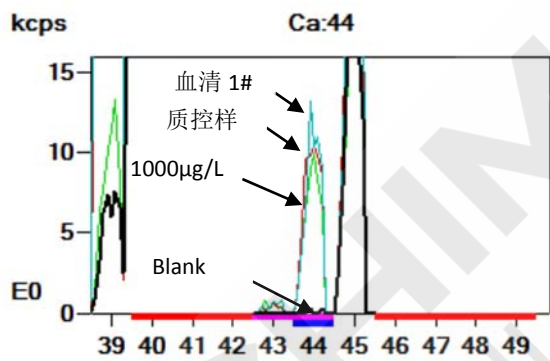


图 6 Ca 的谱峰轮廓图

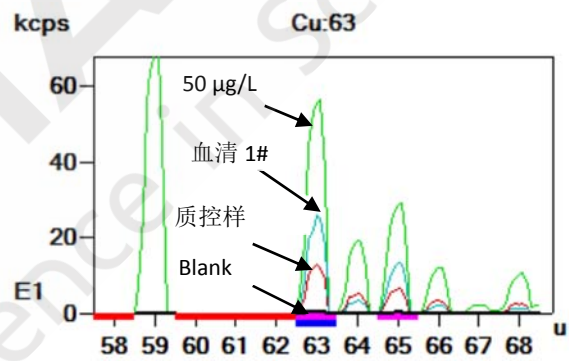


图 7 Cu 的谱峰轮廓图

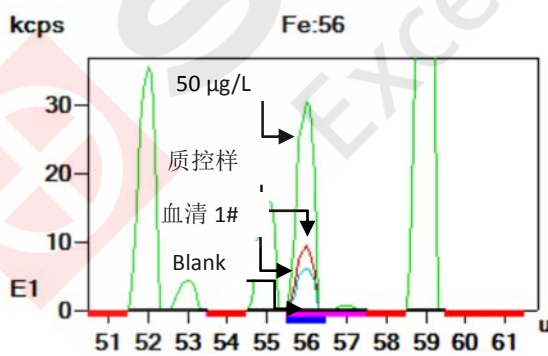


图 8 Fe 的谱峰轮廓图

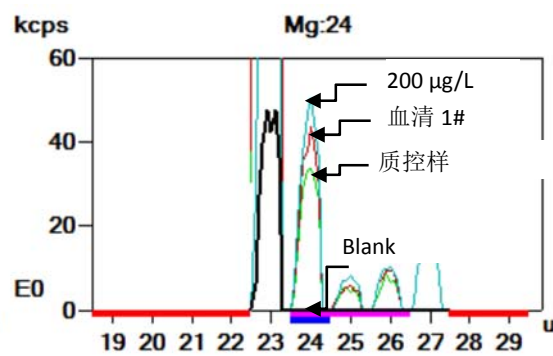


图 9 Mg 的谱峰轮廓图

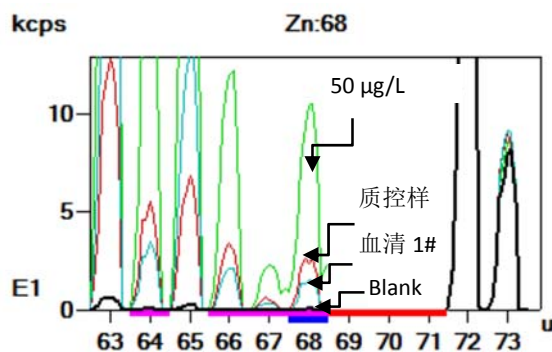


图 10 Zn 的谱峰轮廓图

## 2.4 方法检出限

按照实验方法对标准曲线空白的分析元素进行 11 次测定，以结果的 3 倍标准偏差所对应的浓度值作为仪器检出限，并根据样品处理方法计算方法检出限，结果列于表 2。

表 2 方法检出限

元素	仪器检出限 (µg/L)	方法检出限 (µg/L)
Ca	3.0	300
Cu	0.053	53
Fe	0.017	17
Mg	0.026	26
Zn	0.023	23

## 2.5 方法准确性

按照实验方法，测定血清标准物质 Seronorm™ Trace Elements 标准样品。分析结果表明，样品测定值与标准值吻合，3 次测定的标准偏差小于 4%。该法的精密度和准确度较高。

表 3 血清质控样品的测定结果

样品名称	分析元素	理论值 (mg/L)	测定值 (mg/L)	RSD (n=6) (%)
Seronorm™ Trace Elements	<sup>44</sup> Ca*	86±17	87.4	0.57
	<sup>63</sup> Cu*	1.088±0.088	1.00	3.80
Serum L1	<sup>56</sup> Fe*	1.47±0.30	1.35	2.21
	<sup>24</sup> Mg*	16.8±3.4	16.9	0.96
	<sup>68</sup> Zn*	1.097±0.145	1.17	2.86

## 2.6 样品分析结果

使用 ICPMS-2030 测定了 3 个人血清中样品中的多元素的含量，其中 3#-1 和 3#-2 为平行样品，实验结果见表 4。从分析结果可以看出，各元素测定结果的相对标准偏差均小于 4%，平行样品标准偏差为 0.4~1.4%。

表 4 血清样品分析结果

样品名称	分析元素	测定值 (mg/L)	RSD (n=3) (%)	样品名称	分析元素	测定值 (mg/L)	RSD (n=3) (%)
血清 1#	<sup>44</sup> Ca*	84.5	1.57	血清 2#	<sup>44</sup> Ca*	83.2	1.49

	$^{63}\text{Cu}^*$	1.88	1.46		$^{63}\text{Cu}^*$	1.89	2.09
	$^{56}\text{Fe}^*$	0.947	0.5		$^{56}\text{Fe}^*$	0.897	0.86
	$^{24}\text{Mg}^*$	19	2.72		$^{24}\text{Mg}^*$	20.2	0.96
	$^{68}\text{Zn}^*$	0.638	2.2		$^{68}\text{Zn}^*$	0.646	1.78
样品名称	分析元素	测定值 (mg/L)	RSD (n=6) (%)	样品名称	分析元素	测定值 (mg/L)	RSD (n=3) (%)
	$^{44}\text{Ca}^*$	87	1.71		$^{44}\text{Ca}^*$	85.3	2.71
血清 3#-1	$^{63}\text{Cu}^*$	1.94	0.87	血清 3#-2	$^{63}\text{Cu}^*$	1.92	3.12
	$^{56}\text{Fe}^*$	0.947	2.01		$^{56}\text{Fe}^*$	0.936	2.41
	$^{24}\text{Mg}^*$	19	1.67		$^{24}\text{Mg}^*$	18.9	3.03
	$^{68}\text{Zn}^*$	0.603	1.72		$^{68}\text{Zn}^*$	0.606	3.11

### 3. 结论

使用岛津公司新品 ICPMS-2030 电感耦合等离子体质谱仪并结合碰撞池技术，测定了人体血清中微量元素的含量。实验结果表明，质控样品测定值与标准值吻合，精密度均小于 4%，样品平行性标准偏差小于 1.4%。该方法具有灵敏度高，检出限低，精密度高，分析速度快，操作简单，准确度高等特点，可满足血清样品中微量元素分析的要求。



SHIMADZU  
Excellence in Science

## 7.4 LC-ICP-MS 直接测定血浆中 Pt 元素含量

**摘要:** 采用样品无稀释、高效液相色谱仪直接进样,电感耦合等离子体质谱法(HPLC-ICP-MS)测定了血浆中Pt元素的含量。分析结果表明,线性范围在0.5~500 ng/mL范围内,线性r为0.9996,方法检出限0.16 ng/mL,考察 1、20和400 ng/mL的准确度范围为100.7~106.7%之间,重复性实验RSD<1.4%(n=15),2天测定的重现性RSD<2.9%,适用于生物样本采样量少且大批量分析。

**关键词:** Pt 血浆 HPLC-ICP-MS

铂植入剂作为抗肿瘤长效制剂,可在组织器官中植入给药或外科手术中给药,实现局部的药物高浓度及较小的周边血药浓度。药用铂制剂主要包括顺铂、卡铂、奥沙利铂、奈达铂、舒铂、洛铂6种,其中顺铂和卡铂是临床使用最多的广谱抗癌药物。

抗肿瘤铂制剂在临床应用中可引起广泛的不良反应,通过监测血液铂含量以使药物长期维持在安全有效浓度范围之内,间接反映临床用药对生物组织器官的毒性反应,进而提供药动力学研究资料,做好不良反应的预防和处理,提高疗效并减轻毒副作用。

血浆样品通常样品量很少,血浆中铂的检测需要保证进样量少、灵敏度高、结果准确。本文采用样品无稀释、岛津高效液相色谱 LC-20Ai 直接进样,电感耦合等离子体质谱仪 ICPMS-2030 对血浆中铂进行检测。

### 1 实验部分

#### 1.1 对照品

Pt 元素购于国家标准物质中心。

#### 1.2 实验检材

血浆。

#### 1.3 仪器

本实验使用岛津高效液相色谱仪 LC-20Ai 与电感耦合等离子体质谱仪 ICPMS-2030 联用系统。

#### 1.4 试剂

硝酸购自德国 Merck 公司;实验用水由 Milli-Q 水净化系统经去离子与二次净化制得。

### 2 方法和结果

#### 2.1 对照品溶液配制

用空白血浆将 Pt 稀释为 0.0、0.5、1.5、5.0、15.0、50.0、150.0、500 ng/mL 的标准序列。

#### 2.2 样品的处理方法

将适量血浆转移至离心管中,放入离心机中12000 r/min离心5 min,收集上层清液,进LC-ICP-MS分析。

## 2.3 色谱条件

## 2.4 质谱条件

高频功率：	1.20kW	等离子体气流速：	8.0 L/min
辅助气流速：	1.10 L/min	载气流速：	0.25 L/min
炬管类型：	Mini	雾化器类型：	同轴
雾化室：	旋流	雾化室温度：	5℃
采样深度：	5.0 mm	高频频率：	27.12 MHz

## 2.5 方法学考察

### 2.5.1 标准曲线和质谱峰轮廓图

使用空白血浆 Pt 标准溶液，标液浓度为 0.5、1.5、5、15、50、150 和 500 ng/mL。标准曲线及谱峰轮廓图分别如图 1 和图 2 所示。线性系数  $r=0.99956$ 。

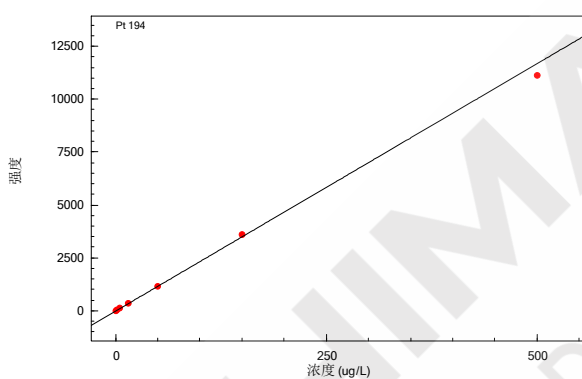


图 1. Pt 校正曲线

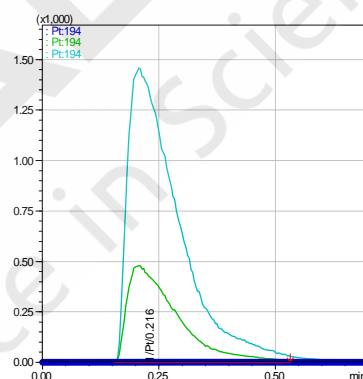


图 2. Pt 谱峰轮廓图

### 2.5.2 方法检出限

以进样体积 20  $\mu\text{L}$ ，浓度为 0.5 ng/mL 样品溶液，考察 Pt 的信噪比，根据信噪比  $S/N=3$  和  $S/N=10$ ，求出仪器检出限和定量限分别为 0.16 ng/mL 和 0.52 ng/mL。

### 2.5.3 方法准确性

以空白血浆分别配制定量限 0.5 ng/mL、低点 1 ng/mL、中间点 20 ng/mL 和高点浓度 400 ng/mL 各三份样品溶液，回收率范围为 99.75~110%，回收率良好。

表 3. 回收率结果

样品名称	定量值 /ng/mL	回收率/%	样品名称	定量值 /ng/mL	回收率/%
LLOQ-0.5	0.54	108	QCM-20	21.2	106
LLOQ-0.5	0.54	108	QCM-20	20.9	104.5
QCL-1	1.1	110	QCH-400	399	99.75
QCL-1	1.1	110	QCH-400	406	101.5
QCL-1	1	100	QCH-400	403	100.75

### 2.5.4 仪器耐用性考察

同一条标准曲线，仪器连续测定 3 天，对 1、15、50 ng/mL 的标液进行准确度的考察，结果如下：

表 4. 耐用性结果 (ng/mL)

浓度 (ng/mL)	准确度 (%)
1.0	99.0
15	99.3
50	98.0

### 2.5.5 重复性试验

以 20 ng/mL 带基体标液和进样体积 20  $\mu$ L、500 ng/mL 标液和进样体积 1 $\mu$ L 对重新性进行考察，二者的标准标准偏差分别为 1.05%和 1.39%。

表 5. 20 ng/mL 标液连续测定结果 (n=9)

采样时间	进样体积/ $\mu$ L	峰面积	RSD/%
2017/10/17 15:38		492.7	
2017/10/17 15:40		493.6	
2017/10/17 15:42		499.8	
2017/10/17 15:44		504.3	
2017/10/17 15:45	20	501.8	1.05
2017/10/17 15:47		505.9	
2017/10/17 15:49		503.4	
2017/10/17 15:50		506.1	
2017/10/17 15:54		505.8	

表 6. 500 ng/mL 标液连续测定结果 (n=15)

采样时间	进样体积/ $\mu$ L	峰面积	RSD/%
2017/10/18 10:56		238.2	
2017/10/18 11:02		234.6	
2017/10/18 11:03		237.6	
2017/10/18 11:05		242.2	
2017/10/18 11:06		242.1	
2017/10/18 11:08		240.4	
2017/10/18 11:09		231.2	
2017/10/18 11:10	1	239.9	1.39
2017/10/18 11:13		236.6	
2017/10/18 11:14		237.2	
2017/10/18 11:16		236.9	
2017/10/18 11:17		236.8	
2017/10/18 11:18		238.2	
2017/10/18 11:20		232.5	

采样时间	进样体积/uL	峰面积	RSD/%
2017/10/18 11:21		233.1	

### 3.结论

使用岛津 LC-20i+ICPMS-2030 型电感耦合等离子体质谱仪测定了血浆样品中 Pt 元素含量。LC 装置中无色谱柱，仅利用 LC 的自动进样器，以应对生物样本取样量少的特点。该方法灵敏度高，方法检出限 0.52 ng/mL，不同浓度样品 3 天耐用性结果在 98.0-99.3%之间，重复性好 RSD% 低于 1.40%，该法适应于大批量取样量少的生物样本的批量分析。



SHIMADZU  
Excellence in Science

## 7.5 ICPMS-2030 测定尿液中碘的含量

**摘要：**参考《WS/T 107.2-2016 尿中碘的测定 第2部分：电感耦合等离子体质谱法》，使用岛津 ICPMS-2030型电感耦合等离子体质谱仪测定了尿液中碘的含量，同时以冻干人尿中碘成分分析标准物质GBW09111作为质控样，实验通过加标回收率实验对方法进行了验证。实验结果表明，尿液样品回收率在100%~105%之间，且质控样品分析结果与标准值吻合。该方法操作简单，定量准确，线性范围宽，可满足卫生部规定的对人尿中碘成分分析的要求。

**关键词：**尿碘 ICPMS-2030

碘是人体必需的微量元素之一，是人体合成甲状腺激素的必要元素。严重的碘缺乏会导致地方性甲状腺肿等疾病的发生，孕妇体内碘缺乏更是容易导致流产、胎儿发育不良等；而长期摄入碘过量也对人体有诸多危害，如引起高碘甲状腺肿、甲亢等疾病，因此，合理稳定的碘摄入对人体健康非常重要。人体通过饮食，空气，水等方式摄入的碘，80-90%由肾脏排出，因此尿碘是一种反映人体碘营养水平的重要指标，世界卫生组织（WHO）建议14岁以上的男性及非妊娠妇女的最适宜尿碘为100-500 μg/L。目前尿碘的检测主要有两种方法，砷铈催化分光光度法和电感耦合等离子体质谱法（ICP-MS），ICP-MS法具有灵敏度高、线性范围宽、测试速度快、准确度高等优点，相比于砷铈催化分光光度法，更适用于尿碘的快速分析。

本文参考《WS/T 107.2-2016 尿中碘的测定 第2部分：电感耦合等离子体质谱法》，采用岛津新品电感耦合等离子体质谱仪 ICPMS-2030 测定了冻干人尿中碘成分分析标准物质GBW09111 和尿样中碘的含量。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器

岛津 ICPMS-2030 电感耦合等离子体质谱仪

#### 1.2 实验器皿及试剂

实验所用器皿为玻璃材质，使用硝酸溶液（1+1）浸泡24小时后，用去离子水冲洗，干燥备用；实验所用的碘酸钾为基准试剂，实验所用四甲基氢氧化铵溶液（25%，水溶液）、曲拉通X-100为保证试剂，实验用水为超纯去离子水。

#### 1.3 溶液配制

### 1.3.1 四甲基氢氧化铵溶液（0.25%质量分数）

取 10 mL 四甲基氢氧化铵，用纯水稀释至 1000 mL。

### 1.3.2 曲拉通 X-100（1%质量分数）

取 1 mL 曲拉通 X-100，纯水稀释至 100 mL。

### 1.3.3 稀释剂（0.25% 四甲基氢氧化铵和 0.02% 曲拉通 X-100 混合溶液）

临用时取 10 mL 四甲基氢氧化铵（25%，水溶液）和 20 mL 曲拉通 X-100（1.3.2），纯水稀释至 1000 mL。

### 1.3.4 碘标准溶液

碘标准储备液[1000.0 mg/L]：准确称取 0.1686 g 经 105℃ 烘干至恒重的碘酸钾，加纯水溶解，并用纯水定容至 100 mL 棕色容量瓶中。4℃ 冰箱保存。

使用 0.25% 四甲基氢氧化铵溶液（1.3.1）逐级稀释至浓度为 0.0 μg/L、10.0 μg/L、50.0 μg/L、100.0 μg/L、150.0 μg/L、300.0 μg/L、600.0 μg/L、1000.0 μg/L 的标准溶液，待用。

### 1.3.5 内标溶液

使用 0.25% 四甲基氢氧化铵溶液(1.3.1)将碲元素单标溶液[1000.0 mg/L]稀释至 1 mg/L。

## 1.4 样品处理

向冻干人尿中碘成分分析标准物质 GBW09111 中加入 5.0 mL 纯水后震荡，得到冻干人尿中碘成分分析标准物质复原液。收集 50 mL 尿液，置于聚乙烯塑料瓶中。

分别取 1.0 mL 冻干人尿中碘成分分析标准物质复原液、1.0 mL 尿样，各加入 1.0 mL 纯水及 8.0 mL 稀释剂（1.3.3），混匀待测。

取 1.0 mL 尿样两份，分别加入 1.0 mL 浓度为 300.0 μg/L 和 600.0 μg/L 的碘标准溶液，各加入 8.0 mL 稀释剂（1.3.3），混匀待测。

## 1.5 仪器参数

等离子体参数：

高频功率：1.2 kW

等离子体气流速：8.0 L/min

辅助气流速：1.1 L/min

载气流速：0.7 L/min

矩管类型：Mini

雾化器类型：同心

雾化室：旋流

雾室温度：5℃

采样深度：5.0 mm

高频频率：27.12 MHz

碰撞池参数：

碰撞气种类：He

池电压：-21 V

碰撞气流速：6.0 mL/min

能量过滤器电压：5.0 V

## 2 结果与讨论

### 2.1 标准曲线溶液配制

分别取浓度为 0.0  $\mu\text{g/L}$ 、10.0  $\mu\text{g/L}$ 、50.0  $\mu\text{g/L}$ 、100.0  $\mu\text{g/L}$ 、150.0  $\mu\text{g/L}$ 、300.0  $\mu\text{g/L}$ 、600.0  $\mu\text{g/L}$ 、1000.0  $\mu\text{g/L}$  的碘标准溶液 1.0 mL，加入 1.0 mL 本底尿（碘含量低于 70  $\mu\text{g/L}$  的澄清尿样）及 8.0 mL 稀释剂（1.3.3），混匀。标准加入法分析样品溶液中碘的含量。

使用 1 mg/L 的碲元素标液作为内标溶液，采用在线内标加入方式进行内标校正。

表 1 标准溶液浓度及分析质量数

元素	质量数	标准曲线浓度( $\mu\text{g/L}$ )							
	(amu)	SA1	SA2	SA3	SA4	SA5	SA6	SA7	SA8
I*	127	0	1	5	10	15	30	60	100

注：\*为使用氦气碰撞模式

### 2.2 碘标准曲线如下：

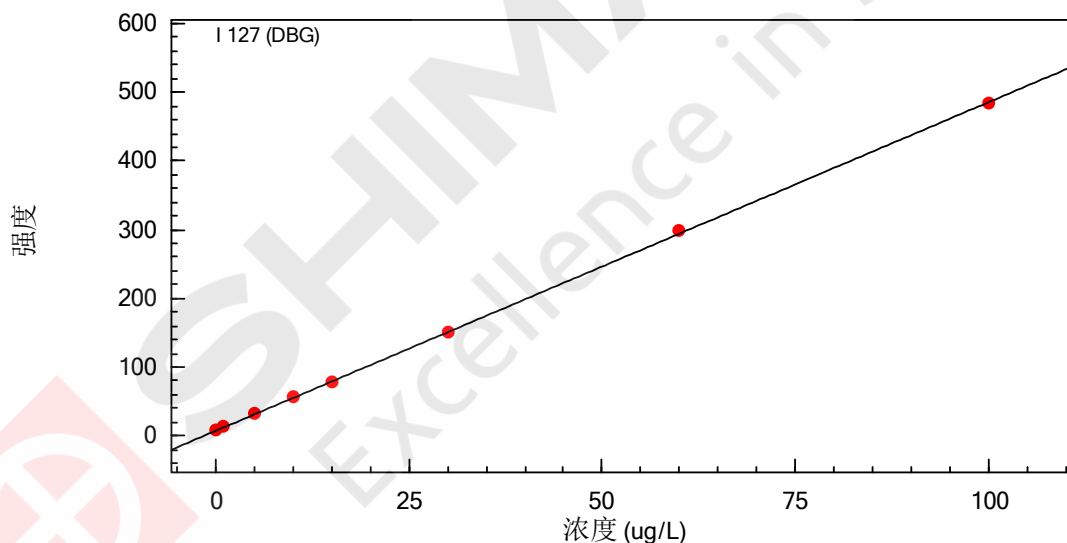


图 1 碘元素标准曲线  $r=0.99996$

### 2.3 元素质量轮廓图

质谱分析存在着同量异位素干扰、多原子离子干扰、难熔氧化物干扰、双电荷离子干扰和基体干扰等多种类型的干扰因素。ICPMS-2030 的八极杆碰撞池通过引入氦气碰撞，可以有效地消除干扰。当分析结果异常，需要经验去识别甄选时，岛津 LabSolutions ICPMS 软件具有独特的“诊断助手”功能，可根据各元素的质量灵敏度、等效背景浓度、干扰情况等因素综合判断，对结果做出“Best”，“Good”和“NG”的判断，并给出相应的诊断依据，可大大提高

分析效率并保证分析结果的准确性。

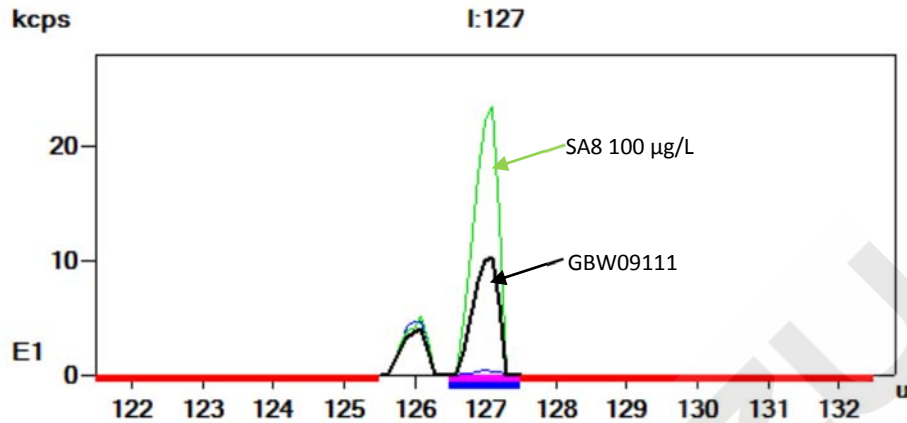


图 2 碘元素质量轮廓图

## 2.4 样品分析及加标回收率

使用 ICPMS-2030 标准加入法测定冻干人尿中碘成分分析标准物质 GBW09111，实验结果见表 3。测定尿样中碘的含量，并进行加标回收实验，实验结果见表 4。

表 2 冻干人尿中碘成分分析标准物质 GBW09111 分析结果

元素	校正内标	标准值 ( $\mu\text{g/L}$ )	测定值 ( $\mu\text{g/L}$ )	RSD(%) (n=3)
I*	$^{126}\text{Te}$	550 $\pm$ 17	545	0.85

表 3 尿样及尿样加标分析结果

元素	校正内标	测定值 ( $\mu\text{g/L}$ )	RSD(%) (n=3)	加标浓度 ( $\mu\text{g/L}$ )	加标后测定浓度 ( $\mu\text{g/L}$ )	加标回收率 (%)
I*	$^{126}\text{Te}$	422	1.10	300	735	104.3
				600	1040	103.0

注：\*为使用氦气碰撞模式

## 3 结论

使用岛津公司新品 ICPMS-2030 电感耦合等离子体质谱仪测定了人体尿液的碘的含量，并使用冻干人尿中碘成分分析标准物质 GBW09111 作为质控样。实验结果表明，质控样分析结果同标准值吻合，且尿样样品加标回收率在 100%~105%之间。该方法具有灵敏度高，检出限低，精密度高，分析速度快，操作简单，准确度高等特点，可满足卫生部规定的对人尿中碘成分分析的要求。

## 第八章 功能医学

### 8.1 引言

功能医学是应用国际上最先进的检测技术,利用定量检测反应器官功能的各种分子,从而评估器官功能,然后再根据检测结果进行维护或纠正的一门医学。它是结合现代分子生物学、预防医学、免疫学、营养学、抗衰老医学和遗传学为基础的临床医学,除了治疗疾病外,它更提倡健康的维护。利用各种特殊功能性检查来了解和系统分析身体各系统功能下降的原因,根据健康检查数据结合个人生活形态与饮食习惯,制定个性化健康管理方案,通过非药物方式帮助补充营养与能量并排除毒素、修复受损细胞和提升器官功能,从而逆转患病因子,帮助预防疾病,改善亚健康症状及慢性疾病的辅助治疗,达到获得健康的目的。

功能医学检验是通过收集受检者的血液、尿液、唾液、粪便和头发等标本,运用 LC/MS/MS、GCMS、ICP-MS 等高精度仪器物理学、化学和生物学等实验方法,检测、评估人体器官功能。了解人体内的致病因子、亚健康和慢性疾病产生的原因。功能医学检验是临床医学检验的补充,是预防医学的有效工具,也是一门多学科互相渗透、交叉融合的综合应用学科。功能医学检验的主要项目有营养评估、代谢系统评估、内分泌系统评估、免疫系统评估等。随着环境恶化、食品隐患、病菌变异等因素对人类的不断袭扰和折磨,“有病早治、无病预防”的健康理念逐渐深入,从“患病求医”向“健康管理”的转变也已经成为 21 世纪世界医疗卫生体系的重要思想和实践。

## 8.2 气相色谱-质谱法检测血清中的 5 种脂肪酸含量

**摘要:** 本文建立了气相色谱-质谱法 (GCMS) 检测血清中 5 种脂肪酸的方法。样品经甲醇-苯 (4:1) 提取, 乙酰氯衍生后, 用 GCMS 分离和检测。脂肪酸在 2~4000 nmol/mL 浓度范围内标准曲线线性良好, 相关系数均在 0.999 以上, 样品加标回收率在 82.1~108.6% 之间, 平行处理 5 份血清加标样品进样, 峰面积 RSD 值均小于 5.0%, 精密度良好。

**关键词:** 气相色谱-质谱 血清 脂肪酸

脂肪酸是人类饮食中的最重要的营养物质。脂肪酸包括饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸及多不饱和脂肪酸(PUFAs)。多不饱和脂肪酸 (PUFA) 按照从甲基端开始第 1 个双键的位置不同, 可分为  $\omega$ -3 和  $\omega$ -6 多不饱和脂肪酸。 $\omega$ 3 族脂肪酸, 主要包括  $\alpha$  亚麻酸( $\alpha$ LAL,C18:3)、二十碳五烯酸(EPA,C20:5)和二十二碳六烯酸(DHA,C22:6);  $\omega$ 6 族脂肪酸, 包括亚油酸(LA,C18:2)和花生四烯酸(AA,C20:4)。 $\omega$ 3 和  $\omega$ 6 之间不能相互转化, 但在体内可竞争相同的酶系而相互影响。 $\omega$ -3 不饱和脂肪酸中对人体最重要是 DHA 和 EPA。 $\omega$ 3 族脂肪酸中 EPA、DHA 对肿瘤细胞的生长、增殖、分化均有抑制作用, DHA 的抑制作用强于 EPA, 而且摄入  $\omega$ 6 与  $\omega$ 3 脂肪酸比值与癌症病死率成正相关。EPA 具有清理血管中的垃圾 (胆固醇和甘油三酯) 的功能; DHA 具有软化血管、健脑益智、改善视力的功效。 $\omega$ -3 不足容易导致心脏和大脑等重要器官障碍。

缺乏脂肪酸, 和缺乏其它任何一种营养一样, 都会造成身体的不适。脂肪酸平衡分析, 是功能医学评估人体营养状况的因素之一, 有助于医师或健康管理者准确评估每一位检测者的膳食摄入量和脂肪酸代谢量, 精确制定个人化营养治疗流程, 帮助预防疾病, 改善亚健康症状及慢性疾病, 达到获得健康的目的。

本文采用岛津 GCMS-QP2010 Ultra, 建立一种分析血液中脂肪酸的方法, 方法简单方便, 能够有效的测定血清中脂肪酸的含量, 为功能医学评估人体营养状况提供有力的支持。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器

岛津 GCMS-QP2010 Ultra 气质联用仪

#### 1.2 分析条件

色谱柱: Rtx-5 ms 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 1.0  $\mu$ m

柱温：150°C(1 min)\_10°C/min\_230(11 min)\_10°C/min\_250°C(3 min)\_30°C/min\_300°C(2.5 min)  
\_30°C/min\_320°C(3 min)

进样口温度：250°C

线速度：36.8 mL/min

进样方式：分流（10:1）

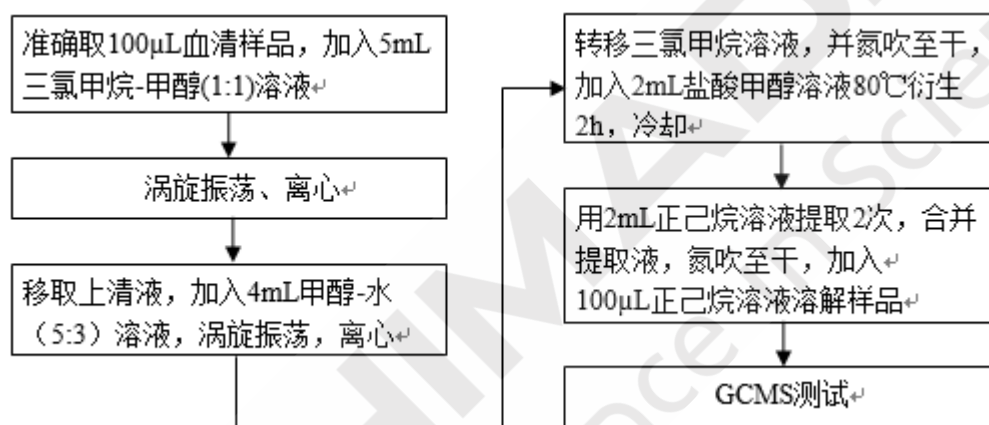
离子源温度：250°C

色谱质谱接口温度：280°C

全扫描范围：50~350 m/z

SIM & SCAN 同时扫描模式，具体离子见表 1。

### 1.3 样品前处理



## 2 结果讨论

### 2.1 标准谱图

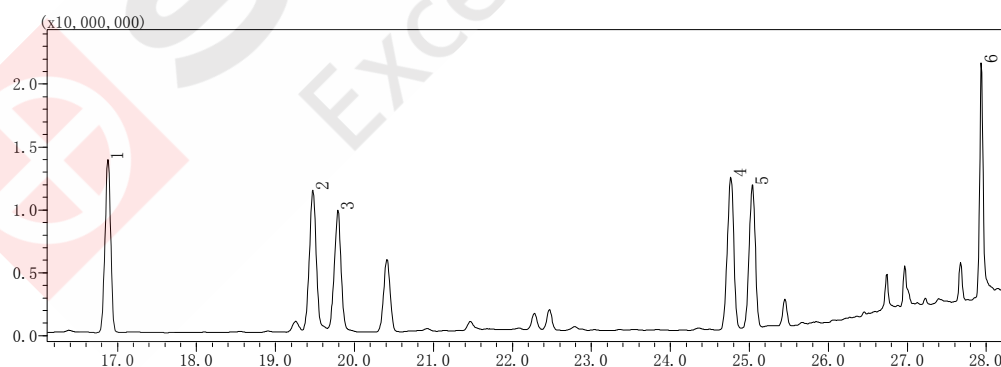


图 1. 5 种脂肪酸甲酯及内标的 TIC 图

表 1. 5 种脂肪酸甲酯及内标定量离子和参考离子

No.	化学名称	英文名称	CAS 号	保留时间 (min)	定量离子 (m/z)	参考离子 (m/z)
1	十七烷酸甲酯	Methyl heptadecanoate	1731-92-6	16.912	143.00	284.00-241.00
2	亚油酸甲酯	Methyl linoleate	112-63-0	19.548	262.00	294.00-263.00

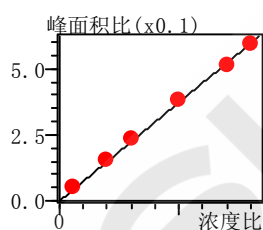
3	亚麻酸甲酯	Methyl linolenate	301-00-8	19.829	173.00	292.00-277.00
4	花生四烯酸甲酯	Methyl arachidonate	2566-89-4	24.803	106.00	119.00-150.00
5	EPA 甲酯	cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid methyl ester	2734-47-6	25.071	91.05	105.10-119.10
6	DHA 甲酯	methyl docosahexaenoate	28061-46-3	27.952	91.00	105.00-119.00

## 2.2 标准曲线

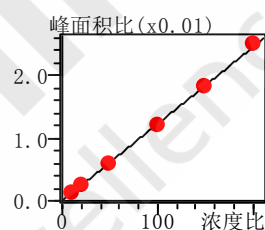
分别配制5种脂肪酸混合标准系列溶液（如表2所示，内标为十七烷酸），按照1.3步骤进行处理，取1 $\mu$ L进样，以SIM&SCAN方式采集，各组分监测离子见表1，各组分标准曲线及线性相关系数图2所示。

表2. 5种脂肪酸及内标的浓度系列(nmol/mL)

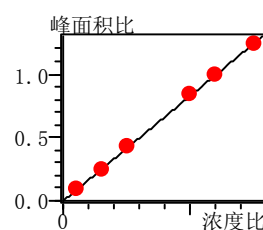
化学名称	英文名称	CAS 号	浓度 1	浓度 2	浓度 3	浓度 4	浓度 5	浓度 6
十七烷酸	Heptadecanoic acid	506-12-7	1000	1000	1000	1000	1000	1000
亚油酸	Linoleic acid	60-33-3	300	1000	1500	2500	3500	4000
亚麻酸	Linolenic acid	463-40-1	10	20	50	100	150	200
花生四烯酸	Arachidonic acid	506-32-1	100	300	500	1000	1200	1500
EPA	cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid	25378-27-2	2	8	14	60	100	120
DHA	cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid	6217-54-5	10	30	160	220	250	300



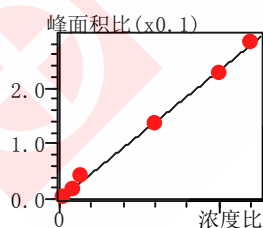
亚油酸甲酯(R = 0.9997)



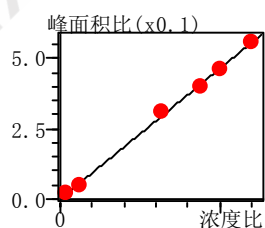
亚麻酸甲酯(R = 0.9997)



花生四烯酸甲酯(R = 0.9997)



EPA 甲酯(R = 0.9992)



DHA 甲酯 R = 0.9995)

图 2. 5 种脂肪酸甲酯标准曲线

## 2.3 精密度实验

平行取 4 份血清样品，分别添加适量的脂肪酸混合标准溶液及十七烷酸内标，按前处理步骤 1.3 进行衍生并提取，考察方法的重复性，测定结果见表 3。

表 3. 峰面积重复性结果(n=4)

No.	化合物	面积比 1	面积比 2	面积比 3	面积比 4	RSD (%)
1	亚油酸甲酯	0.05344	0.05225	0.05387	0.05664	3.4
2	亚麻酸甲酯	0.00212	0.00213	0.00210	0.00208	1.2
3	花生四烯酸甲酯	0.08834	0.08769	0.08720	0.08738	0.6
4	EPA 甲酯	0.02923	0.02948	0.02893	0.02880	1.0
5	DHA 甲酯	0.01511	0.01484	0.01575	0.01588	3.2

## 2.4 回收率实验

分别取 4 份血清样品，并加入 100 $\mu$ L 1000 nmol/mL 的十七烷酸内标，往其中 3 份样品中加入适量的脂肪酸标准溶液，按照 1.3 前处理方法进行处理，考察方法的回收率，测定结果如表 4 所示。

表 4. 添加回收结果

No.	化合物	添加量 1 (nmol/mL)	回收率 1 (%)	添加量 2 (nmol/mL)	回收率 2 (%)	添加量 3 (nmol/mL)	回收率 3 (%)
1	亚油酸甲酯	300	94.9	1500	97.6	3500	97.9
2	亚麻酸甲酯	10	82.1	50	98.2	150	102.3
3	花生四烯酸甲酯	100	101.7	500	106.9	1200	104.2
4	EPA 甲酯	2	104.9	14	108.6	100	101.9
5	DHA 甲酯	10	105.9	160	103.7	250	106.3

## 2.5 样品测试结果

取 100 $\mu$ L 血清样品，加入 100 $\mu$ L 1000 nmol/mL 十七烷酸内标溶液，按照 1.3 前处理方法进行处理，取 1 $\mu$ L 进样，得到样品的色谱图及测试结果如下：

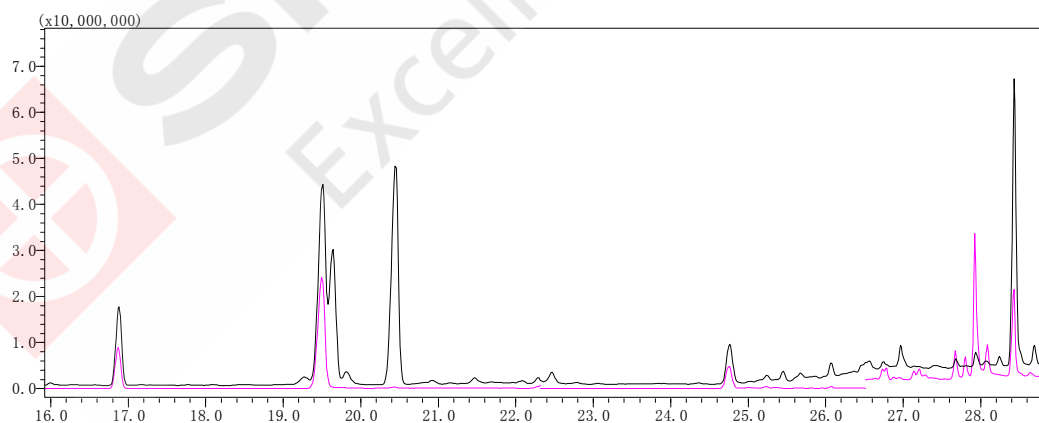


图 3. 血清样品 TIC 图

表 5. 血清样品测试结果

No.	组分名称	保留时间(min)	峰面积	浓度(nmol/mL)	健康人脂肪酸浓度范围(nmol/mL)
1	亚油酸甲酯	19.498	1586454	3318	350-3850
2	亚麻酸甲酯	19.781	6496	16.4	10-190
3	花生四烯酸甲酯	24.754	1483218	556.9	110-1490

4	EPA 甲酯	25.008	185118	25.0	2-100
5	DHA 甲酯	27.924	708816	119.1	10-250

表 6. 健康人群组与结直肠癌组多烯不饱和脂肪酸比较 (x±s)

组别	LA(%)	DGLA(%)	AA(%)	DPA(%)	总 ω-6(%)	ALA(%)	EPA(%)	DHA(%)	总 ω-3(%)	ω-3 指数	ω-6/ω-3
健康人群组 (n=156)	10.36±1.27	1.23±0.27	14.77±1.52	0.44±0.17	26.86±1.65	0.11±0.08	0.39±0.24	3.85±1.00	6.08±1.26	4.25±1.16	4.63±1.12
结直肠癌组 (n=38)	9.89±1.27	1.35±0.38	14.09±2.53	0.48±0.2	25.87±3.51	0.12±0.06	0.30±0.19	3.82±1.12	5.72±1.52	4.15±1.23	4.89±1.48
t 值	2.08	2.24	2.12	1.19	2.55	0.33	2.2	0.16	1.53	0.57	1.19
P 值	0.04	0.03	0.03	0.24	0.01	0.74	0.03	0.87	0.13	0.57	0.24

注: LA: 亚油酸; DGLA: 亚麻酸; AA: 花生四烯酸; DPA: 二十二碳五烯酸; ALA: α-亚麻酸; EPA 二十碳五烯酸; DHA: 二十二碳六烯酸

表 5 中 5 种不饱和脂肪酸含量都落在健康人体脂肪酸的正常范围内, 判断该样品是正常人的血清。王思平等<sup>[1]</sup>曾报道过结直肠癌与健康人群血多烯不饱和脂肪酸检测分析, 该文章中对 156 位健康人和 38 位结直肠癌人体中 7 种不饱和脂肪酸进行测定, 如表 6 所示, 在两组 FUFAs 中, 总 ω6 在结肠癌组均较正常人群组偏低, 总 ω3 脂肪酸在结肠癌组中也是偏低的, 其中 ω6 型 FUFAs 更明显, 这可能与结直肠癌的发生发展有一定关系。有报道指出膳食中的 FUFAs 对多种癌细胞诱变有独特的调控作用<sup>[2]</sup>。

## 2.6 检测限与定量限

根据 10nmol/mL 标样数据, 以 3 倍和 10 倍信噪比分别计算 5 种脂肪酸的检出限及定量限, 计算结果如表 5 所示。

表 7. 5 种脂肪酸的检出限及定量限

No.	组分名称	检出限 (nmol/mL)	定量限(nmol/mL)
1	亚油酸甲酯	0.17	0.55
2	亚麻酸甲酯	0.41	1.36
3	花生四烯酸甲酯	0.06	0.21
4	EPA 甲酯	0.13	0.44
5	DHA 甲酯	0.11	0.38

## 3. 结论

本方法采用岛津 GCMS-QP2010 Ultra 检测血清中的脂肪酸, 在 2~4000nmol/mL 范围内标准曲线线性良好, 相关系数均在 0.999 以上, 方法回收率在 82.1~108.6%之间, 平行处理 5 份加标样品并测试, 峰面积的相对标准偏差均小于 5.0%, 精密度良好。本方法操作简单, 可有效地检测血清中脂肪酸的含量。

### 【参考文献】

- [1] 王思平,李红,等.结直肠癌与健康人群血多烯不饱和脂肪酸检测分析[J].中国医药导报, 2012, 11(9): 170-173.
- [2] 王雪青,苗惠,胡萍.膳食中多不饱和脂肪酸营养与生理功能的研究进展[J].食品科学, 2004(11): 337-339.

### 8.3 Co-Sense LC-PDA-MS 系统直接分析测定血清中双酚 A 和 4-辛基酚含量

**摘要:** 对于生物样本血清中物质的测定一般都需经过繁琐的样品前处理, 本研究使用 Co-Sense LCMS 系统对直接进样的血清样品中双酚 A (Bisphenol A, BPA) 和 4-辛基酚 (4-Octylphenol, 4-OP) 进行含量测定, 选择大气压化学离子化负离子检测方式。

**关键词:** Co-Sense LCMS 直接进样 血清样品 双酚

环境激素是指外因性干扰生物体内分泌的化学物质。这些物质可模拟体内的天然激素, 与激素受体结合, 影响人体内激素的含量, 并使身体产生对体内激素的过度作用, 导致内分泌系统失调, 进而阻碍生殖、发育等机能, 甚至有引发恶性肿瘤与生物绝种的危害。

双酚 A 是环氧树脂和聚碳酸酯塑料的添加剂, 制成的塑料产品用于食品和饮料的包装, 树脂产品广泛用于金属的涂层包括食品罐头、瓶盖和供水管。烷基酚被广泛用作塑料增塑剂、工业用洗涤剂、农药乳化剂、纺织行业的整理剂等, 其包括 4-辛基酚。这两种化合物都属于环境激素, 可对人体内分泌系统造成干扰。

#### 1. 实验部分

Co-Sense LCMS 系统结构如下图 1 所示, 其中 Pump A/B 为输送流动相的二元泵, Pump C 为样品溶液导入泵, Pump D 作为稀释泵。通过阀切换, 样品前处理流路切换为样品分析流路。

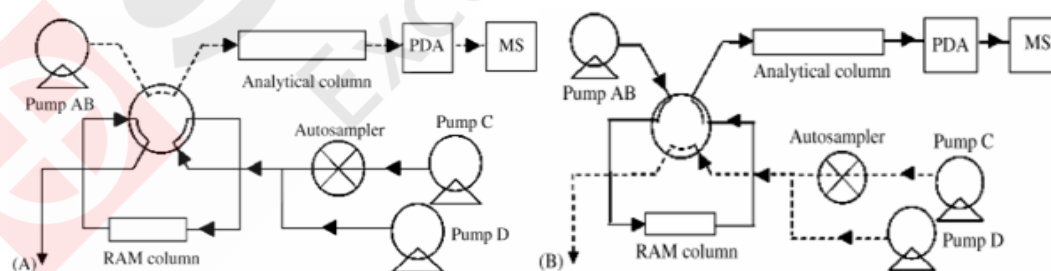
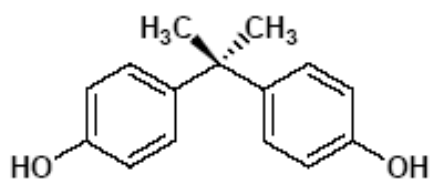


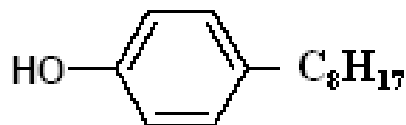
图 1 (A) 样品前处理 (B) 分析流路

两种化合物定量分析 SIM 方式选择[M-H]<sup>-</sup>作为检测离子, APCI 负离子检测方式, 化合物结构信息如下图 2 所示。



双酚 A (BPA)  $C_{15}H_{16}O_2$

$m/z$  227 [M-H]<sup>-</sup>



4-辛基酚 (4-OP)  $C_{14}H_{22}O$

$m/z$  205 [M-H]<sup>-</sup>

图 2 化合物结构信息

血清样品选择的前处理 Co-Sense 系统条件及 LCMS 条件如下所示:

表 1 血清样品分析条件时间程序

Time	Module	Action	Value	Time	Module	Action	Value
0.01	Pumps	C Flow	0.3	12.00	Pumps	Pump A B.Conc	100
0.01	Pumps	Pump A B.Conc	30	21.00	Pumps	Pump A B.Conc	100
0.01	Pumps	D Flow	2.1	21.00	Pumps	C Flow	0
4.99	Pumps	C Flow	0.3	21.00	Pumps	D Flow	0
4.99	Pumps	D Flow	2.1	21.00	Oven	CTO.RVR	0
5.00	Pumps	C Flow	0	21.01	Pumps	Pump A B.Conc	30
5.00	Pumps	D Flow	0	21.01	Pumps	C Flow	0.3
5.00	Oven	CTO.RVR	1	21.01	Pumps	D Flow	2.1
8.00	Pumps	Pump A B.Conc	30	25.00	Controller	Stop	

表 2 LCMS-2010EV 分析条件

色谱柱	Intersil-ODS(2.0 mmI.D.×150 mm, 5 μm)
前处理柱	MAYI-ODS(10 mm×4.6 mm, 50 μm)
Mobile phase A	水
Mobile phase B	甲醇
流动相流速	0.5 mL/min
Pump C(导入泵)	水-甲醇(95:5), 含 10 mM 醋酸铵
Pump D(稀释泵)	水-甲醇(95:5), 含 10 mM 醋酸铵
柱温	40℃
Probe voltage	4.5 kV APCI-Negative mode
Nebulizing gas flow	2.0 L/min
Interface Temperature	400℃
Drying Gas	0.03 MPa
CDL voltage	20 V

## 2. 结果讨论

化合物的色谱图结果如下图 3 所示

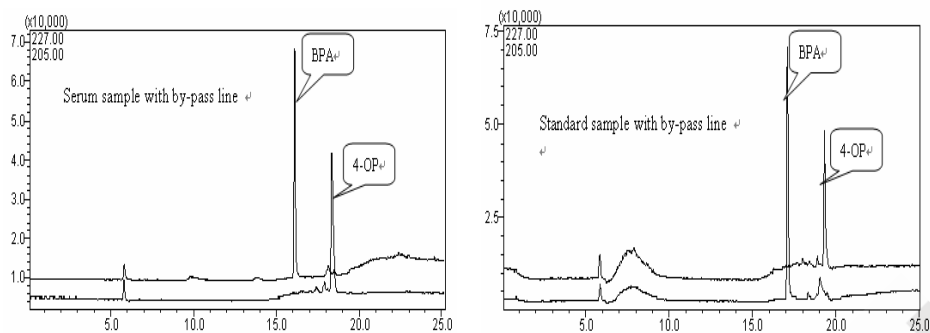


图3 化合物的色谱

对于生物样本中物质的测定，一般都需经过繁琐的样品前处理，Co-Sense LCMS 系统可简化前处理步骤。本文使用 Co-Sense LCMS 系统建立了血清中双酚 A 和 4-辛基酚检测方法，该方法大大简化样品前处理步骤，通过直接进样方式即可有效测定血清中双酚 A 和 4-辛基酚。



SHIMADZU  
Excellence in Science

## 第九章 精准医疗

### 9.1 引言

精准医疗是以个性化医疗为基础，将个人基因、环境与生活习惯差异考虑在内的疾病预防与处置的新兴方法，是随着基因组测序技术快速进步以及生物信息与大数据科学的交叉应用而发展起来的新型医学概念与医疗模式。其本质是通过基因组、蛋白质组等组学技术和医学前沿技术，对于大样本人群与特定疾病类型进行生物标记物的分析与鉴定、验证与应用，从而精确寻找到疾病的原因和治疗的靶点，并对一种疾病不同状态和过程进行精确分类，最终实现对于疾病和特定患者进行个性化精准治疗的目的，提高疾病诊治与预防的效益。

精准医疗是在对人、病、药深度认识基础上，形成的高水平医疗技术，其重点不在“医疗”，而在“精准”。与个性化医疗相比，精准医疗更重视“病”的深度特征和“药”的高度精准性，其实质主要包括精准诊断与精准治疗两个方面。目前精准医疗手段在各疾病领域中均有运用，如阿尔兹海默疾病、代谢疾病和癌症。该技术运用组学技术，寻找疾病生物标记物，从而对疾病进行早期诊断，迅速得出精准的诊断结果。针对精准诊断的技术需求，岛津相继推出代谢物数据库、初级代谢产物方法包、脂质介质方法包、磷脂质谱库等多种方法包，并可支持 SimLipid 脂类分析数据库，进行代谢组学研究，满足精准医疗检测需求。

岛津在疾病早期诊断方面，利用高分辨质谱仪 MALDI-TOF 测定血浆中  $\beta$ -淀粉样蛋白生物标记物，实现对阿尔兹海默疾病的诊断。利用三重四极杆气质联用仪的代谢组学分析技术，发现多种生物标记物，开发出了可在大肠癌早期阶段及时诊断的最新筛查方法。此外，在形成精准诊断结果后，还需采用精准的靶向治疗，结合一定的技术手段监控血药浓度，使病人得到最合适的治疗和药物，并在最佳剂量、最小副作用以及最精准用药时间的前提下用药，提高治疗效果。结合精准治疗的血药浓度监测要求，岛津具有针对抗体药物浓度检测的 nSMOL 酶解技术，并结合三重四极杆液质联用仪开发对单克隆抗体药物的定量分析方法，可供有关人员参考。

此外，精准医疗已在分子靶向药物、免疫疗法、精准放疗与化疗、成像技术、组学发展等多个方面进行广泛研究与应用，在治疗中发挥越来越重要的作用。可以预见，精准医疗技术的出现，将显著改善患者的诊疗体验和诊疗效果，发展潜力很大。

## 9.2 《Nature》：血浆中 $\beta$ -淀粉样蛋白生物标记物对阿尔兹海默疾病的高效诊断

### 研究简介：

日本国家老年病学和老年医学中心与岛津公司合作，使用岛津质谱仪（MALDI-TOF, AXIMA）完成了《血浆中  $\beta$ -淀粉样蛋白生物标记物对阿尔兹海默疾病的高效诊断》一文，该文于 2018 年 1 月 31 日在英国杂志《Nature》上发表。

阿尔兹海默疾病是以  $\beta$ -淀粉样蛋白 ( $A\beta$ ) 在脑部沉积为特征性疾病。然而，目前  $A\beta$  沉积水平的表征只能通过正电子放射断层造影术 (PET) 成像或测定脑脊液中  $A\beta$ 。因此，基于血液生物标志物检测手段，其对人体损伤小、成本低，更为患者所接受。日本国家老年病学和老年医学中心 Katsuhiko Yanagisawa 及其团队与日本岛津公司质谱研究实验室合作，采用免疫沉淀结合岛津质谱仪 (MALDI-TOF, AXIMA)，开发了血浆中  $A\beta$  生物标志物的高效检测方法。该方法有效预测患者脑部  $A\beta$  沉积状况，可广泛应用于临床诊断，为个体化医疗提供有力依据。



## LETTER

doi:10.1038/nature25456

### High performance plasma amyloid- $\beta$ biomarkers for Alzheimer's disease

Akinori Nakamura<sup>1</sup>, Naoki Kaneko<sup>2</sup>, Victor L. Villemagne<sup>3,4</sup>, Takashi Kato<sup>1,5</sup>, James Doecke<sup>6</sup>, Vincent Doré<sup>3,6</sup>, Chris Fowler<sup>4</sup>, Qiao-Xin Li<sup>4</sup>, Ralph Martins<sup>7</sup>, Christopher Rowe<sup>3,4</sup>, Taisuke Tomita<sup>8</sup>, Katsumi Matsuzaki<sup>9</sup>, Kenji Ishii<sup>10</sup>, Kazunari Ishii<sup>11</sup>, Yutaka Arahata<sup>5</sup>, Shinichi Iwamoto<sup>2</sup>, Kengo Ito<sup>1,5</sup>, Koichi Tanaka<sup>2</sup>, Colin L. Masters<sup>4</sup> & Katsuhiko Yanagisawa<sup>1</sup>

To facilitate clinical trials of disease-modifying therapies for Alzheimer's disease, which are expected to be most efficacious at the earliest and mildest stages of the disease<sup>1,2</sup>, supportive biomarker information is necessary. The only validated methods for identifying amyloid- $\beta$  deposition in the brain—the earliest pathological signature of Alzheimer's disease—are amyloid- $\beta$  positron-emission tomography (PET) imaging or measurement of amyloid- $\beta$  in cerebrospinal fluid. Therefore, a minimally invasive, cost-effective blood-based biomarker is desirable<sup>3,4</sup>. Despite much effort<sup>3-7</sup>, to our knowledge, no study has validated the clinical

we used IP-MS with matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, which can also be used for protein quantification<sup>10,11</sup>, to measure the ratio of plasma  $A\beta_{1-42}$  to a novel APP<sub>669-711</sub> fragment (APP<sub>669-711</sub>/ $A\beta_{1-42}$ ) (Extended Data Fig. 1a). Here we improved the general applicability and reproducibility of the previous IP-MS methodology through exploratory studies. We found that the ratio of  $A\beta_{1-40}$ / $A\beta_{1-42}$  also performed at the same level as APP<sub>669-711</sub>/ $A\beta_{1-42}$ , and that a composite biomarker score that incorporated both could further improve performance (Supplementary Information and Extended Data Fig. 1b). Thus, we hypothesized that

**摘要：**临床上对阿尔茨海默疾病 (AD) 的改善性治疗过程中，往往只对早期及轻度病症患者表现出最佳的治疗效果，因此相关生物标志物检测成为诊疗的关键因素。早期 AD 患者病理学变化信号是在大脑中出现  $\beta$ -淀粉样蛋白沉积，目前有效的诊断方法只能通过正电子放射断层造影术 (PET) 成像或测定脑脊液中  $\beta$ -淀粉样蛋白。因此，基于血液中生物标志物用于诊断早期 AD 技术，其微创和低成本特性更受到人们关注。尽管耗费了大量精力，但迄今尚未报道在临床上使用血液中  $\beta$ -淀粉样蛋白生物标志物对早期 AD 进行诊断。

在此，我们采用免疫沉淀结合质谱法，开发了血浆中  $\beta$ -淀粉样蛋白生物标志物的高效检测方法。通过研究  $\beta$ -淀粉样前体蛋白(APP)699-711/ $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ )1-42，及(A $\beta$ )1-40/(A $\beta$ )1-42 之间的比值关系，预测人体大脑中  $\beta$ -淀粉样蛋白呈阳性或阴性状态。研究结果证实，临床上使用该方法对血浆中生物标志物进行测定，可有效判断人体大脑中  $\beta$ -淀粉样蛋白病变状况。相比于目前技术，该方法成本低、拓展性强，可广泛应用于临床诊断和人群筛查。

**论文信息：** Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, et al. High performance plasma amyloid- $\beta$  biomarkers for Alzheimer's disease [J]. Nature, 2018, 554(7691): 249-254.



SHIMADZU  
Excellence in Science

### 9.3 《Oncotarget》：应用气相色谱质谱联用法对结直肠癌进行早期诊断筛查

#### 研究简介：

神戸大学の吉田准教授小组于 2012 年使用基于气相色谱质谱联用仪（GC-MS）的临床代谢组学分析技术，对大肠癌患者和正常样品的血清进行分析，开发出 4 种可用于大肠癌代谢物标记以及基于这些代谢物标记的高可靠性诊断预测方法。该预测方法虽然较以往的基于 CEA 及 CA 19-9 等肿瘤标记物方法有更高的实用性，但作为筛查方法在灵敏度、特异性方面还不够完善。

岛津制作所结合高速扫描控制技术（ASSP）和 Smart MRM 技术独创了高速、高灵敏度 GC/MS/MS 技术。岛津制作所和神戸大学组成的共同研究小组使用该技术，开发出了更高精度的血浆代谢物定量分析手法。采用这种手法，对国立癌症研究中心所保存的临床信息明确的 600 个以上的标本进行分析，最终开发出了大肠癌早期阶段及时诊断、高性能的最新筛查方法。通过对患者及正常人样本血浆中的代谢物进行综合分析，发现了 8 种多生物标记物可以用于大肠癌诊断（丙酮酸，乙醇酸，色氨酸，棕榈油酸，富马酸，鸟氨酸，赖氨酸，3-羟基异戊酸）。制作出基于这 8 种代谢物数据的灵敏度、特异度指标均高于 96% 的大肠癌诊断预测方法。经确认，最新开发的诊断预测方法对于处于阶段 0 和阶段 1 的早期大肠癌患者也获得很高的灵敏度。

该研究结果已刊登在 2017 年 2 月 4 日的美国科学杂志《Oncotarget》的电子期刊上。

[www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)

Oncotarget, 2017, Vol. 8, (No. 10), pp: 17115-17126

Research Paper

#### Investigations in the possibility of early detection of colorectal cancer by gas chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry

Shin Nishiumi<sup>1,\*</sup>, Takashi Kobayashi<sup>1,\*</sup>, Shuichi Kawana<sup>2</sup>, Yumi Unno<sup>2</sup>, Takero Sakai<sup>2</sup>, Koji Okamoto<sup>3</sup>, Yasuhide Yamada<sup>4</sup>, Kazuki Sudo<sup>4</sup>, Taiki Yamaji<sup>5</sup>, Yutaka Saito<sup>6</sup>, Yukihide Kanemitsu<sup>7</sup>, Natsuko Tsuda Okita<sup>4</sup>, Hiroshi Saito<sup>8</sup>, Shoichiro Tsugane<sup>9</sup>, Takeshi Azuma<sup>1</sup>, Noriyuki Ojima<sup>2</sup>, Masaru Yoshida<sup>1,10,11</sup>

<sup>1</sup>Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Kobe University Graduate School of Medicine, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0017, Japan

<sup>2</sup>Analytical and Measuring Instruments Division, Shimadzu Corporation, Nakagyo-ku, Kyoto 604-8511, Japan

<sup>3</sup>Division of Cancer Differentiation, National Cancer Center Research Institute, Tokyo 104-0045, Japan

**摘要：**在发达国家，结直肠癌患者的数量不断增加，而结直肠癌已成为癌症死亡病症中最常见的一种。为改善结直肠癌患者的生活质量，必须建立新的筛查方法，以便早发现结直肠癌病症。本研究使用气相色谱三重四极杆质谱技术对 282 名 0/I/II 期结直肠癌患者以及 291

名健康志愿者的血浆样本进行代谢组学分析, 尝试发现 0/I/II 期结直肠癌的代谢生物标志物。研究所选用的结直肠癌患者是不存在侵袭和转移的 0 期 (N=79), I 期 (N=80) 和 II 期 (N=123) 的患者。本研究使用气相色谱三重四极杆质谱技术分析了血浆样本中的 64 种代谢物, 其中 29 种代谢物水平在患者和健康志愿者之间有明显差别 (邦费罗尼校正  $p=0.000781$ )。基于此结果, 对各种代谢物生物标志物进行多重逻辑回归分析, 建立了 0/I/II 期结直肠癌预测模型。利用该模型检测 0/I/II 期结直肠癌患者血浆样品的曲线相关性、灵敏度和特异性值, 检测结果分别为 0.996, 99.3% 和 93.8%。该模型对每个疾病阶段的敏感性和特异性值均大于 90%, 令人惊讶的是该模型对 0 期的敏感性、0 期的特异性和 II 期疾病的敏感性均为 100%。该预测模型有助于早期诊断结直肠癌, 并且可作为不涉及淋巴转移或远处转移的结直肠癌病例的潜在的新型筛选方法。

**论文信息:** Nishiumi S, Kobayashi T, Kawana S, et al. Investigations in the possibility of early detection of colorectal cancer by gas chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(10): 17115.

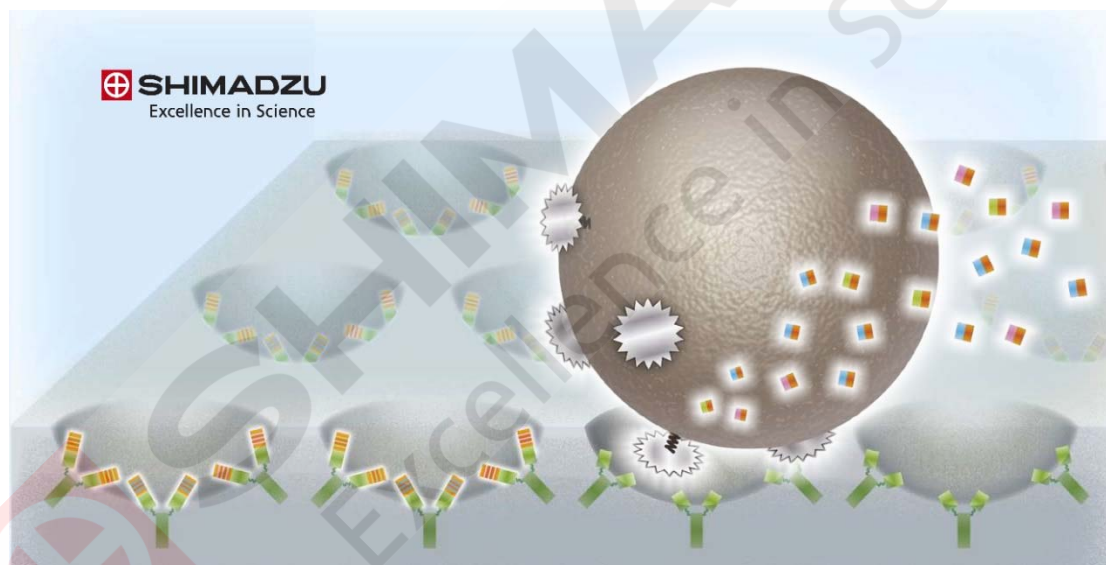


## 9.4 《Biological and Pharmaceutical Bulletin》：基于 nSMOL 酶解技术对利妥昔单抗的 LC/MS 生物分析及方法验证

### 研究简介：

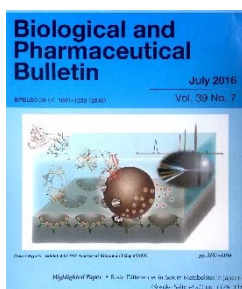
生物基质中单克隆抗体药物的定量分析常常面临着两个棘手的问题：首先是由于样品前处理方法不合适导致的选择性、重复性不佳；其次，若使用 LC-MS/MS 进行分析时，出现耗时或灵敏度不理想的情况。蛋白酶解方法是目前常用方法之一，其将单克隆抗体分子水解为多个多肽片段，通过对特征性肽段进行检测，从而实现对抗体药物的定量分析。然而，经该方法酶解得到的多肽片段种类数量众多，组分较复杂，因此大大减弱了检测灵敏度。

为了简化该前处理方法，岛津公司推出了一项全新的技术——纳米表面分子导向限制性酶解（nSMOL, nano-Surface and Molecular Orientation Limited Proteolysis）技术，可用于所有单克隆抗体药物的定量分析。



nSMOL 技术可在近生理条件下，完成对抗体药物的选择性酶解，并获得与之相应的特征性肽段组分。其工作原理是利用抗体树脂对样品中单克隆抗体药物进行捕获，之后通过蛋白酶纳米颗粒对树脂上抗体成分进行限制性酶解，得到多肽片段。该酶解主要针对抗体的 Fab 区域，Fab 区域外余下部分不受酶解作用且仍保留在原树脂上（如上图所示）。因此，nSMOL 技术不仅能够保证获得特异性的抗体序列片段，而且限制性酶解技术大大降低了样品的复杂性，缩短样品前处理时间，提高了检测灵敏度。

2016 年 4 月，该研究结果作为封面文章在日本药学会杂志《Biological and Pharmaceutical Bulletin》的电子期刊上刊登。

**Validated LC/MS Bioanalysis of Rituximab CDR Peptides Using Nano-surface and Molecular-Orientation Limited (nSMOL) Proteolysis**Noriko Iwamoto,<sup>a</sup> Megumi Takanashi,<sup>a</sup> Akinobu Hamada,<sup>b</sup> and Takashi Shimada\*<sup>a</sup><sup>a</sup>Life Science Research Center, Shimadzu Corporation; Kanda-Nishiki-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8448, Japan; and<sup>b</sup>Division of Clinical Pharmacology, National Cancer Center; Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan.

Received March 4, 2016; accepted April 21, 2016; advance publication released online April 28, 2016

**摘要:** 目前, 单克隆抗体 (mAbs) 治疗药物在全球具有巨大的销售额, 也逐渐受到来自于生物仿制药的竞争。我们之前报道过纳米表面分子导向限制性 (nSMOL) 酶解, 这是一类对血浆中抗体药物进行生物分析的最理想的方法。nSMOL 方法是一类 Fab 选择性的限制性酶解法, 其使用大小不同的蛋白酶纳米粒 (粒径 200 nm) 和抗体树脂 (孔径 100 nm)。在此篇报道中, 我们使用 nSMOL 酶解法进行人血浆中抗体利妥昔单抗的生物分析, 并完成方法全验证。蛋白 A 树脂从血浆中捕获免疫球蛋白后, 在非失活条件下使用 FG 纳米粒固化胰酶在 50°C 下进行 nSMOL 酶解, 并持续 6 小时。移除树脂和纳米粒后, 包含在利妥昔单抗补偿决定区 (CDR) 的信号肽 (GLEWIGAIYPGNGDTSYNQK、ASGYTFTSYNMHWVK 和 FSGSGSGTYSYSLTISR) 和内标物 P<sub>14</sub>R 通过多反应监测方法 (MRM) 同时测定。利用 nSMOL 酶解方法对利妥昔单抗的定量结果表明, 其定量下限 (LLOQ) 为 0.586  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 线性范围为 0.586-300  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。对 LLOQ、低浓度质控样 (LQC)、中浓度质控样 (MQC)、高浓度质控样 (HQC) 的批内和批间精密度测试结果分别为 5.45-12.9% 和 11.8%, 5.77-8.84% 和 9.22%, 2.58-6.39% 和 6.48%, 以及 2.69-7.29% 和 4.77%。这些结果表明 nSMOL 方法可用于利妥昔单抗的临床药动学研究。

**论文信息:** Noriko Iwamoto, Megumi Takanashi, Akinobu Hamada, et al. Validated LC/MS Bioanalysis of Rituximab CDR Peptides Using Nanosurface and Molecular-Orientation Limited (nSMOL) Proteolysis [J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2016, 39(7): 1187-1186.



本公司三条工厂获得 ISO 认证

JQA-0376

## ⊕ 岛津企业管理（中国）有限公司 / 岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

### 北京

北京市朝阳区朝外大街 16 号中国人寿大厦 14F  
 邮政编码：100020  
 电话：(010) 8525-2310/2312  
 传真：(010) 8525-2326/2329

### 上海

上海市徐汇区宜州路180号华鑫天地二期C801栋  
 邮政编码：200233  
 电话：(021) 3419-3888  
 传真：(021) 3419-3666

### 沈阳

辽宁省沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11F  
 邮政编码：110016  
 电话：(024) 2325-5577  
 传真：(024) 2383-6378

### 四川

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞创意成都B座12层  
 邮政编码：610015  
 电话：(028) 8619-8421/8422  
 传真：(028) 8619-8420

### 武汉

武汉市汉口建设大道568号新世界国贸大厦I座41层4116室  
 邮政编码：430022  
 电话：(027) 8555-7910  
 传真：(027) 8555-7920

### 广州

广州市流花路109号之9达宝广场7楼  
 邮政编码：510010  
 电话：(020) 8710-8603  
 传真：(020) 8710-8698

### 西安

陕西省西安市锦业一路56号研祥城市广场A座501  
 邮政编码：710000  
 电话：(029) 6273-7878  
 传真：(029) 6273-7879

### 乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14层H座  
 邮政编码：830000  
 电话：(0991) 230-6271/6272  
 传真：(0991) 230-6273

### 昆明

昆明市青年路 432 号天恒大酒店 908 室  
 邮政编码：650021  
 电话：(0871) 315-2987  
 传真：(0871) 315-2991

### 南京

南京市鼓楼区汉中中路2号金陵饭店亚太商务楼27层B单元  
 邮政编码：210005  
 电话：(025) 8689-0258  
 传真：(025) 8689-0237

### 重庆

重庆市渝中区青年路 38 号重庆国贸中心 1702 室  
 邮政编码：400010  
 电话：(023) 6380-6057/6058  
 传真：(023) 6380-6551

### 深圳

深圳市福田区天安数码城天展大厦1楼F2.6-1C  
 邮政编码：518042  
 电话：(0755) 8340-2852  
 传真：(0755) 8389-3100

### 河南

郑州市中原路220号裕达国际贸易中心A座20层2011室  
 邮政编码：450007  
 电话：(0371) 8663-2981  
 传真：(0371) 8663-2982

### 香港

Suite 1028, Ocean Centre, Harbour City,  
 Tsim Sha tsui, Kowloon, Hong-Kong  
 电话：(00852) 2375-4979  
 传真：(00852) 2199-7438

用户服务热线电话：800-8100439  
 400-6500439

本产品样本所宣传的内容，以本版本为准  
 样本中的试验数据除注明外为本公司的试验数据

日本总公司工厂已通过ISO质量·环境管理体系的认证

注：此样本所有信息仅供参考，如有变动恕不另行通知