

# 儿童健康医学检验应用手册



# 前言

儿童是国家的未来、民族的希望，儿童健康是经济社会可持续发展的重要保障。为落实《“健康中国2030”规划纲要》和《健康中国行动（2019—2030年）》，进一步提高儿童健康水平，2021年11月5日国家卫健委妇幼健康司发布《健康儿童行动提升计划（2021-2025年）》，计划中要求聚焦胎儿期、新生儿期、婴幼儿期、学龄前期、学龄期等不同阶段，为儿童连续提供健康监测和医疗保健服务。突出强调坚持预防为主，防治结合。针对出生缺陷、贫血、肥胖、视力不良、孤独症、听力障碍、不合理用药等严重危害儿童健康的风险因素，要求落实早筛查、早诊断、早治疗的防控策略，降低疾病负担，促进儿童健康。

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，主要研究如何应用实验室技术、医疗仪器设备，通过检验患者的体液、血液、排泄物、感染微生物等标本，为临床医生提供诊疗依据。其作为疾病预防诊疗的关键组成部分，有着不可替代的作用。医学检验是一项“系统工程”，其作用不再局限于完成标本的检测和报告的发放，而是深入参与到整个临床的诊断和治疗过程中。可以说现在的检验医学科已不是单纯的临床辅助科室，其对疾病诊断、监测、预防等发挥着重要作用。

目前，色谱、光谱及质谱等现代分析技术，近年来在医学检测中得到了广泛应用。质谱技术作为一种特异性好、灵敏度及准确性高的检测技术，在医学检测及研究中的应用最为热门。最常用的质谱类型有三重四极杆质谱仪 LC-MS/MS、气相色谱质谱仪 GC-MS、基质辅助激光解析质谱仪 MALDI-TOF、四极杆飞行时间质谱仪 Q-TOF 和电感耦合等离子体质谱仪 ICP-MS 等。其成熟应用于医学检测领域，如新生儿出生缺陷、内分泌系统疾病、心血管泌尿系统疾病、营养水平及疾病、治疗药物监测以及细菌感染等疾病的诊断与辅助治疗，均推动了医学检测的发展。

## 岛津质谱仪系列产品



LCMS-8040 CL 三重四极杆液质联用仪



LCMS-8050 CL 三重四极杆液质联用仪



LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪



LCMS-8060NX 三重四极杆液质联用仪



LCMS-9030 液相串联四极杆飞行时间质谱仪



GCMS 系列质谱仪



ICPMS-2030 电感耦合等离子体质谱仪



MALDI-TOF 系列质谱仪

作为全球知名的实验室分析测试服务供应商，岛津始终坚持“以科学技术向社会做贡献”，并以实现“为了人类和地球的健康”这一愿望作为公司的经营思想，自 LCMS-8040 CL 和 LCMS-8050 CL 获得了中华人民共和国第二类医疗器械注册证以来，岛津公司在健康中国建设以及儿童健康保障提升行动中，一直孜孜不倦进行着努力，为儿童相关疾病的早筛查、早诊断、早治疗提供了丰富的解决方案。现汇编《儿童健康医学检验应用手册》，供该行业相关从业人员参考。

本手册仅供内部参考交流，不用做任何诊断途径！

岛津企业管理（中国）有限公司  
分析中心

# 目 录

<b>一、 出生缺陷筛查领域的应用 .....</b>	<b>1</b>
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 .....	10
1.4 LCMS-8050 衍生化法测定干血斑中氨基酸和酰基肉碱 .....	20
1.5 气相色谱质谱联用法在有机酸尿症诊断中的应用 .....	23
1.6 LCMS-8050 CL 用于罕见病 X-ALD 筛查应用研究 .....	26
1.7 LCMS-8050 CL 用于肌酸缺乏综合征筛查应用研究 .....	31
1.8 LCMS-8050 CL 用于多种有机酸血症筛查应用研究 .....	36
1.9 串联质谱法应用于先天性肾上腺皮质增生症筛查研究 .....	40
<b>二、 内分泌及代谢疾病诊疗领域的应用 .....</b>	<b>44</b>
2.1 引言 .....	44
2.2 LCMS-8050 CL 检测人血浆中儿茶酚胺及其代谢物 .....	45
2.3 LCMS-8050 CL 测定人血浆中 27 种激素含量 .....	51
2.4 LCMS-8050 CL 同时测定血清中血管紧张素 I、II .....	59
2.5 LCMS-8050 CL 检测人血清中游离脂肪酸含量 .....	63
2.6 液相色谱三重四极杆质谱法测定人血清中游离氨基酸含量 .....	69
2.7 LCMS-8050 CL 测定人血清中 17 种胆汁酸含量 .....	75
2.8 LCMS-8050 CL 用于高同型半胱氨酸血症诊断应用研究 .....	84
2.9 LC-MS/MS 结合蛋白沉淀法用于血浆中胰岛素样生长因子 1 的测定 .....	89
2.10 超高效液相色谱三重四极杆质谱法测定血清甲基丙二酸的含量 .....	93
2.11 LCMS-8050 选择离子监测模式测定血液糖化血红蛋白含量 .....	102
2.12 LCMS-8045 多反应监测模式测定血液糖化血红蛋白含量 .....	106
2.13 LCMS-8050 CL 定量分析人血清中甲状腺激素 T3 和 T4 含量 .....	110
<b>三、 营养水平评估及相关疾病诊疗领域的应用 .....</b>	<b>115</b>
3.1 引言 .....	115
3.2 LCMS-8040 CL 检测人血清中 25-羟基维生素 D2/D3 含量 .....	116
3.3 平行液相串联质谱检测人血清中 25-羟基维生素 D2/D3 含量 .....	121
3.4 串联质谱用于血清中脂溶性维生素含量测定 .....	129
3.5 平行液相色谱质谱联用系统测定人血清中的 VA 和 VE 含量 .....	134
3.6 LCMS-8050 CL 测定血清中的维生素 K1 .....	141
3.7 LCMS-8050 CL 检测人血清中维生素 B1、B2 和 B6 含量 .....	148

3.8 LCMS-8050 CL 检测人血清中全谱氨基酸.....	153
3.9 ICPMS-2030 在临床尿液碘含量测定中的应用.....	162
3.10 ICPMS-2030 测定尿液中多种金属元素的含量.....	165
3.11 ICPMS-2030 碰撞池技术测定血清中微量元素的含量.....	169
<b>四、 治疗药物监测与合理用药.....</b>	<b>174</b>
4.1 前言.....	174
4.2 岛津《治疗药物监测（TDM）质谱分析方案》简介.....	175
<b>附录一：检测项目与岛津仪器应对一览表.....</b>	<b>182</b>
<b>附录二：法规标准、指南与共识列表.....</b>	<b>184</b>



SHIMADZU  
Excellence in Science

# 一、 出生缺陷筛查领域的应用

## 1.1 引言

出生缺陷是指婴儿出生前发生的身体结构、功能或代谢异常，是导致早期流产、死胎、婴幼儿死亡和先天残疾的主要原因。出生缺陷病种多，病因复杂，目前已知的出生缺陷超过 8000 种，基因突变等遗传因素和环境因素均可导致出生缺陷发生。据估算，我国出生缺陷总发生率约 5.6%。出生缺陷严重影响儿童的生存和生活质量，给患儿及其家庭带来巨大痛苦和经济负担。党中央、国务院历来高度重视防治出生缺陷、提高出生人口素质工作。自 1994 年，颁布《中华人民共和国母婴保健法》以来，相继在 2001 年国务院公布《母婴保健法实施办法》，2004 年《新生儿疾病筛查技术规范》，2010 年《新生儿疾病筛查技术规范》，2018 年颁布《全国出生缺陷综合防治方案》、《母婴安全行动计划（2018-2020 年）》和《健康儿童行动计划（2018-2020 年）》。“健康中国 2030”规划纲要中也明确加大对出生缺陷的防控。

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。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。与传统的生化检测方法相比，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、肉碱的筛查检测有非衍生 LC-MS/MS 法和衍生 LC-MS/MS 法，有机酸主要用 GC-MS 分析。除此之外，遗传代谢病筛查还包括 X-ALD 筛查、CAH 筛查等。本章列出了岛津公司先进的质谱技术在遗传代谢病筛查中的应用，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筛查诊断。

### 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-8040 CL 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-8040 CL 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

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

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	

质谱条件

离子源：ESI (+)

驻留时间：10 ms

雾化气：3.0 L/min

扫描模式：MRM

加热模块温度：450°C

干燥气：12.0 L/min

DL 温度: 250°C

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筛试剂盒，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，即可计算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。

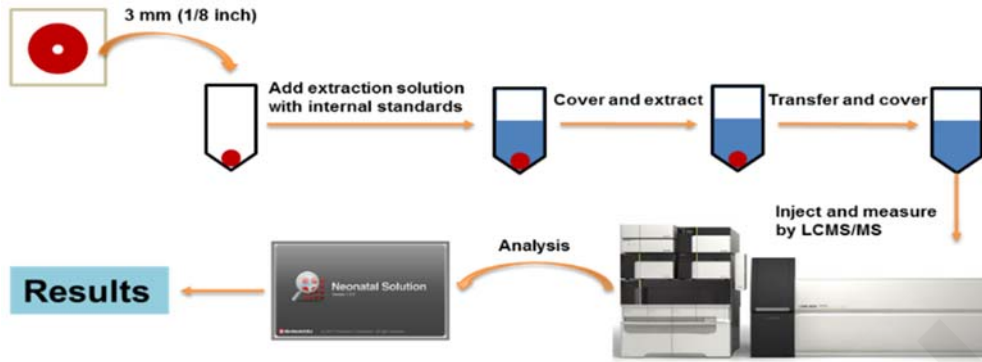


图1. 样本前处理及分析流程

## 2. 结果讨论

### 2.1 标准品的 MRM 色谱图

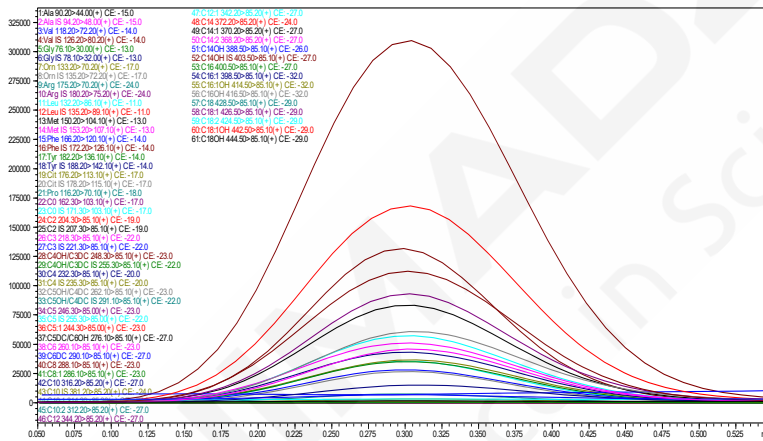


图 2. 含混合内标的提取液色谱图

### 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 个不同批号室内质控品进行检测，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-8040 CL 联用系统成功建立了非衍生化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. 高浓度氨基酸 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
测定均值	228.8	311.8	354.6	89.3	8.6	330.6	83.0	197.0	212.4
靶值	213.2	291.9	367.4	85.6	9.5	322.4	91.4	196.4	221.7
相对误差	7.3%	6.8%	-3.5%	4.3%	-9.7%	2.5%	-9.2%	0.3%	-4.2%
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

表 8. 高浓度氨基酸 QC 样本检测准确度评价

目标物	Ala	Val	Gly	Orn	Arg	Leu	Met	Phe	Tyr
测定均值	237.6	827.0	370.1	119.6	67.2	752.3	384.0	544.0	484.9
靶值	231.2	842.9	395.5	134.9	74.1	843.9	443.9	609.1	563.9
相对误差	2.8%	-1.9%	-6.4%	-11.4%	-9.3%	-10.9%	-13.5%	-10.7%	-14.0%
2 倍 SD 靶值范围	184.2-278.3	628.7-1057.2	307.7-483.3	84.1-185.7	47.6-100.7	643.2-1044.6	360.5-587.2	450.8-769.5	417.9-729.8

表 9. 低浓度肉碱 QC 样本检测准确度评价

目标物	C0	C2	C3	C4	C5	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
测定均值	16.7	15.7	3.5	1.1	0.5	0.4	0.5	0.3	0.3	0.4	3.4	1.4
靶值	18.8	17.7	3.9	1.1	0.6	0.5	0.5	0.4	0.4	0.5	3.9	1.4
相对误差	-11.2%	-11.5%	-9.0%	-3.5%	-14.4%	-13.0%	-9.6%	-28.2%	-20.2%	-13.4%	-13.5%	-0.7%
2 倍 SD 靶值范围	14.6-23.3	11.3-23.4	2.7-5.0	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	C4	C5	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
测定均值	36.7	32.9	11.6	4.8	2.6	1.8	2.2	1.4	1.7	3.2	9.2	5.0
靶值	38.2	35.5	12.0	4.7	2.8	2.0	2.3	1.9	2.0	3.5	10.1	4.8
相对误差	-4.1%	-7.3%	-3.6%	1.1%	-7.8%	-8.5%	-5.3%	-25.9%	-15.3%	-9.3%	-8.9%	5.2%
2 倍 SD 靶值范围	28.3-49.0	23.3-46.8	8.1-15.8	3.7-5.8	2.3-3.5	1.5-2.5	1.5-3.0	1.1-2.7	1.4-2.8	2.2-4.9	7.3-13.1	3.4-6.2



SHIMADZU  
Excellence in Science

## 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-8050 CL 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-8050 CL 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

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: 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	

质谱条件

离子源: ESI (+)

加热气: 10.0 L/min

雾化气: 3.0 L/min

接口温度: 350°C

驻留时间: 10 ms  
扫描模式: MRM  
干燥气: 10.0 L/min

加热模块: 400°C  
DL 温度: 250°C  
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。

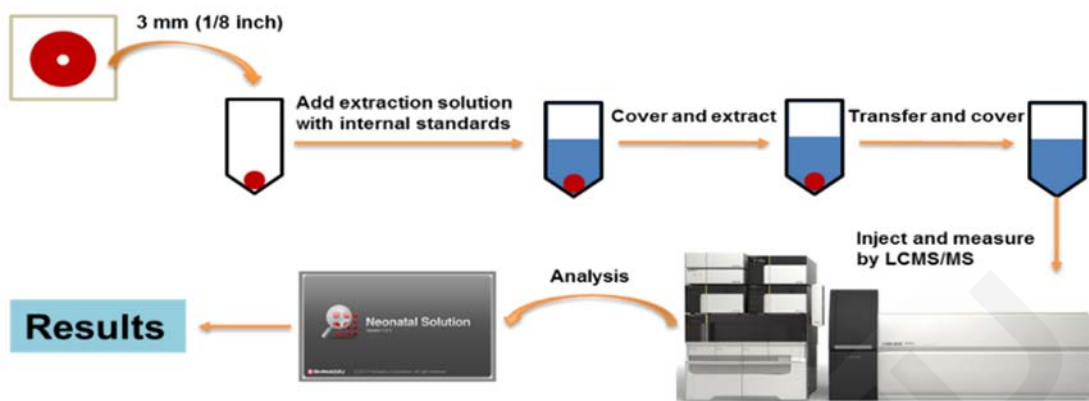


图1. 样本前处理及分析流程

## 2 结果讨论

### 2.1 标准品的 MRM 色谱图

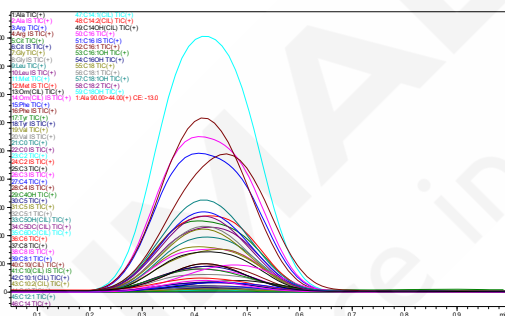
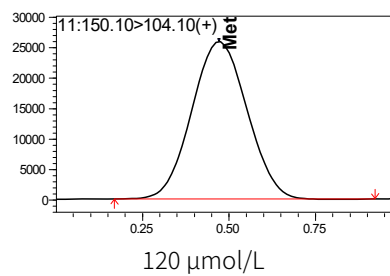
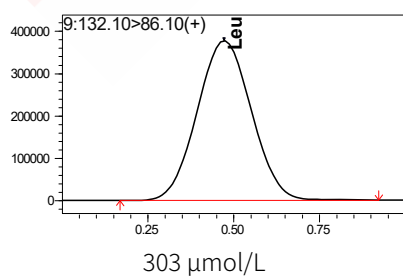
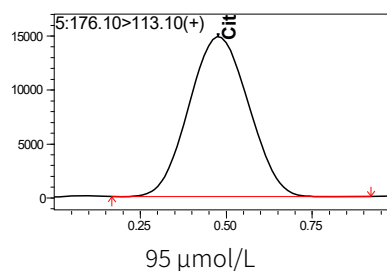
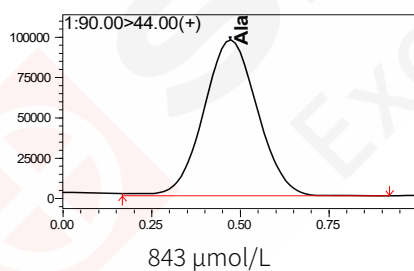


图 2. 含混合内标的提取液色谱图

### 2.2 低浓度水平质控部分色谱图



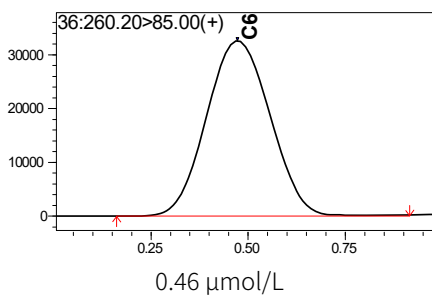
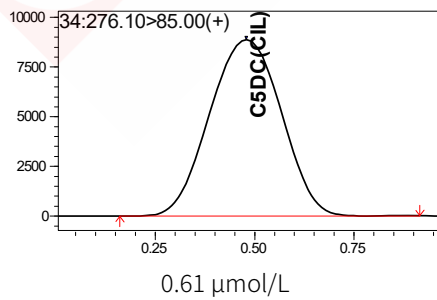
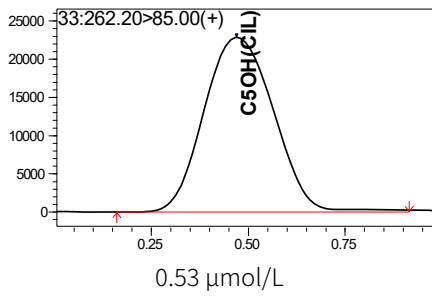
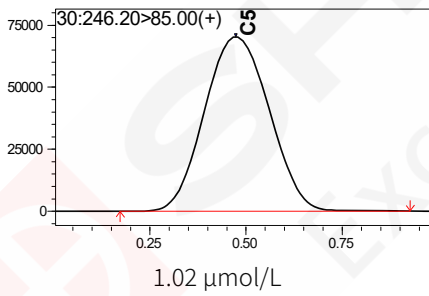
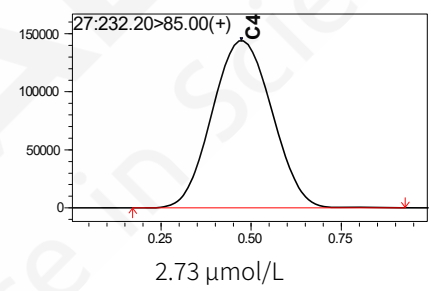
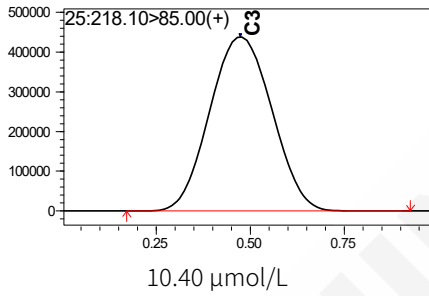
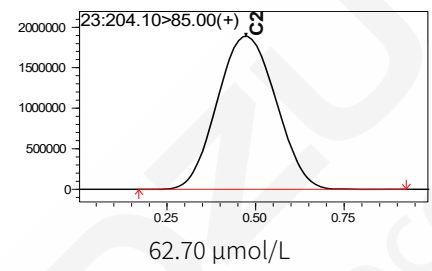
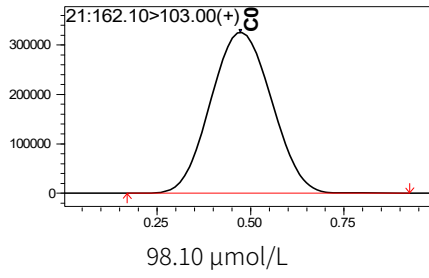
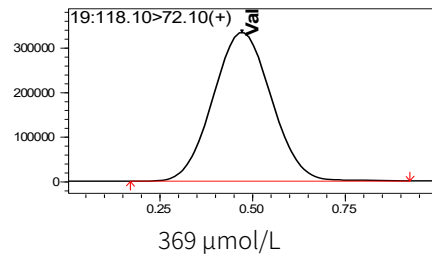
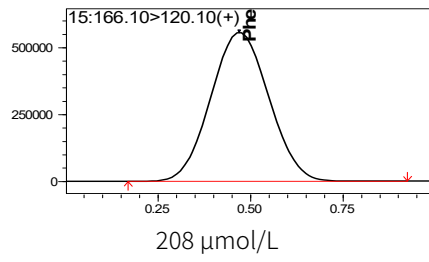


图 3. 典型质谱图

## 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-8050 CL 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。

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
LQC 靶值	843	95	814	303	120	208	353	369	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
HQC 靶值	1922	294	2232	734	425	628	1162	935	241	159.3	27.9	7.67	2.83	1.65	1.28	1.9	2.62	4.86	4.54	31.7	4.97
LQC	521.1	88.8	683.7	287.2	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
HQC	1064.4	247.9	1408.1	561.0	278.4	485.7	770.3	641.2	139.4	143.8	26.2	6.4	2.1	0.3	1.0	1.4	1.6	3.2	3.4	22.8	3.0
L-IF	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	1.14	1.21	1.45	1.34	1.20	1.31	1.55
H-IF	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	1.24	1.36	1.69	1.54	1.34	1.39	1.65
AVG	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	1.19	1.28	1.57	1.44	1.27	1.35	1.60

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
HQC-01	1945.90	251.22	1983.88	657.14	404.56	579.52	1072.00	856.00
HQC-02	1859.40	258.40	1875.20	670.37	382.44	596.69	1112.36	869.25
HQC-03	1732.21	282.28	1936.69	671.18	432.11	609.71	1079.59	867.44
HQC-04	1808.92	309.59	1892.69	661.39	381.67	595.72	1115.38	862.94
HQC-05	1780.39	278.24	2036.62	657.24	392.89	601.81	1095.91	863.35
HQC-06	1776.95	279.72	1934.81	669.96	394.77	588.05	1082.76	896.25
HQC-07	1778.44	289.81	2013.75	671.95	382.97	608.61	1137.95	873.08

HQC-08	1839.61	313.53	1971.23	660.87	365.57	598.30	1096.70	882.28
HQC-09	1825.87	267.78	1878.11	655.13	439.68	599.31	1069.26	869.36
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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%

## 1.4 LCMS-8050 衍生化法测定干血斑中氨基酸和酰基肉碱

**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。

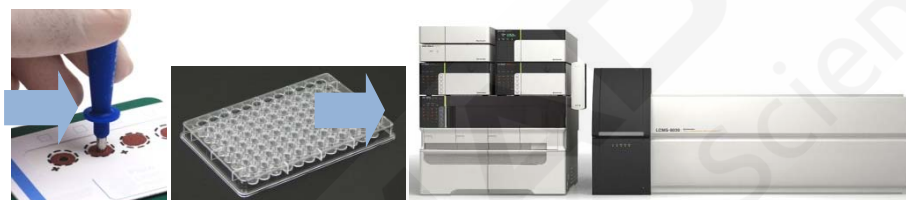


图 1 LC-MS/MS 进行新生儿筛查工作的一般流程

### 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。

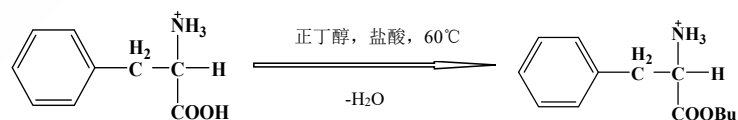


图 2. 氨基酸衍生化反应

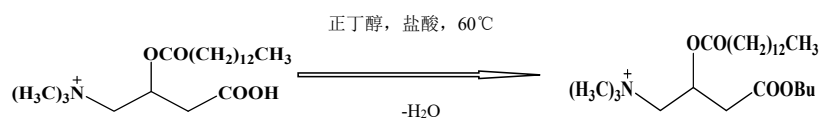


图 3. 酰基肉碱衍生化反应

### 3. 仪器分析条件和离子流图

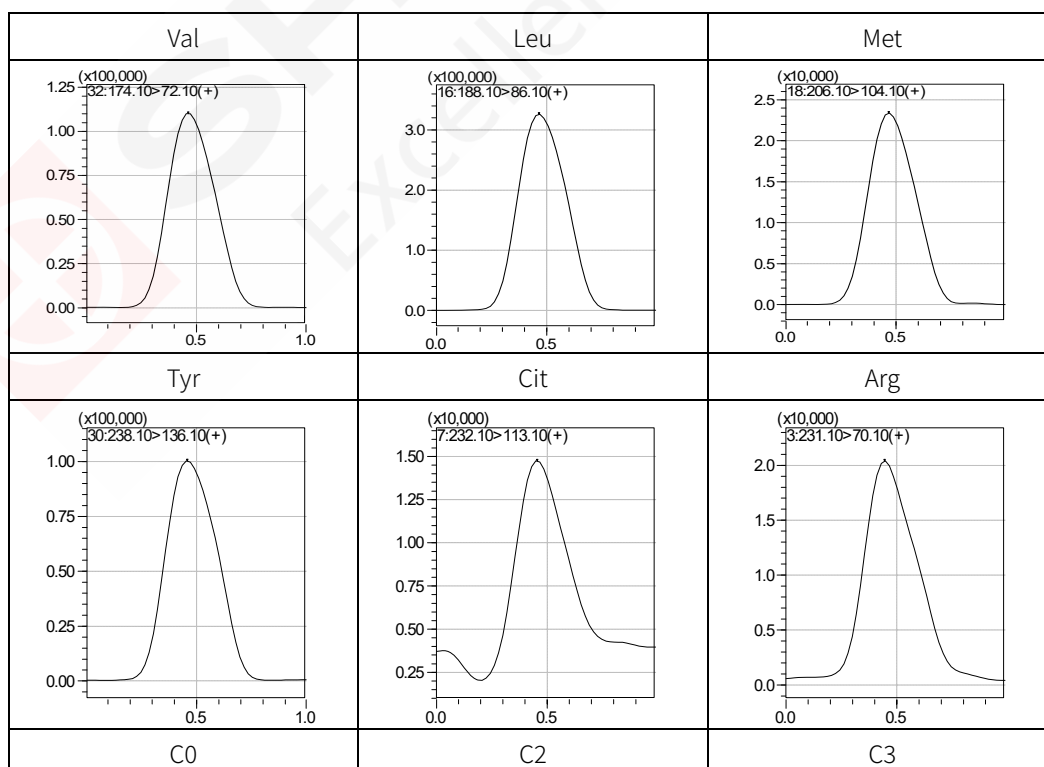
处理后的样品采用自动进样器进样，进样量 1  $\mu\text{L}$ ，进样后无需使用色谱柱进行分离，直接进入质谱检测，1 min 内即可完成一次样本分析。在待测样品中添加相应同位素内标，根据目标化合物与对应同位素内标峰面积或峰高的比值进行目标化合物的定量计算，本文采用多反应检测方式 (MRM) 采集数据。流动相采用乙腈：(0.02%甲酸水溶液) =80:20，流速时间程序和质谱条件分别如表 1 和表 2 所示，部分氨基酸和酰基肉碱的离子流图如图 4 所示。

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°C
离子源接口电压	4.5 KV	脱溶剂管管温度	250°C
加热气	空气 8 L/min	HB 温度	400°C
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



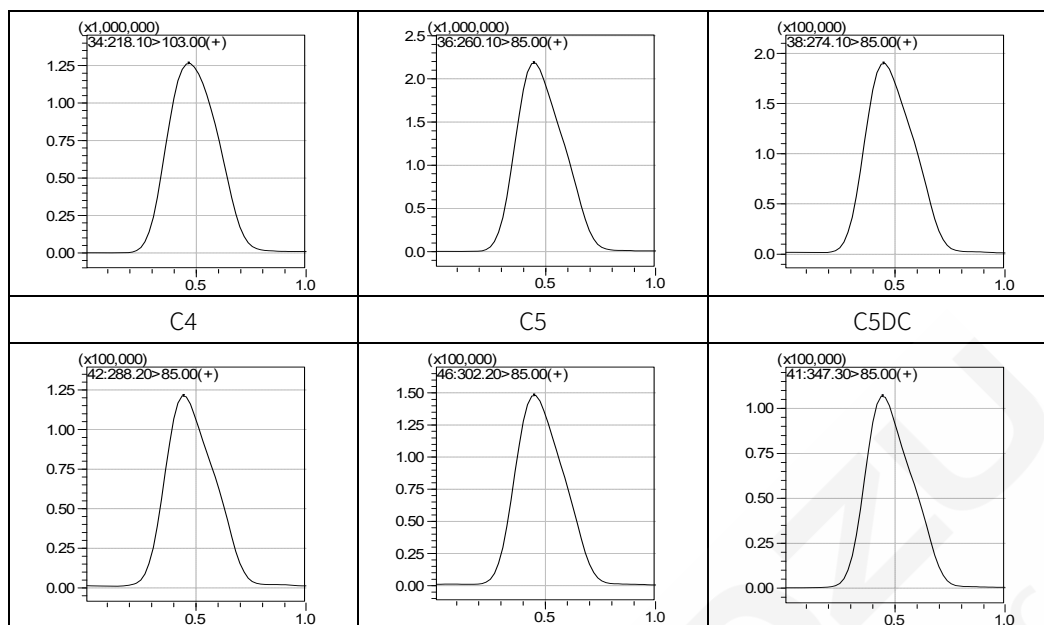


图 4. 部分氨基酸和酰基肉碱的离子流图

#### 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限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	中链脂肪酸去氢酵素缺乏症
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% 盐酸羟铵在室温下反应 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。

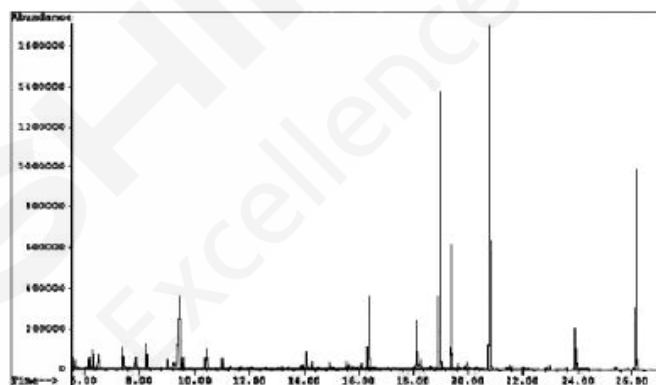


图 1. 正常尿有机酸谱

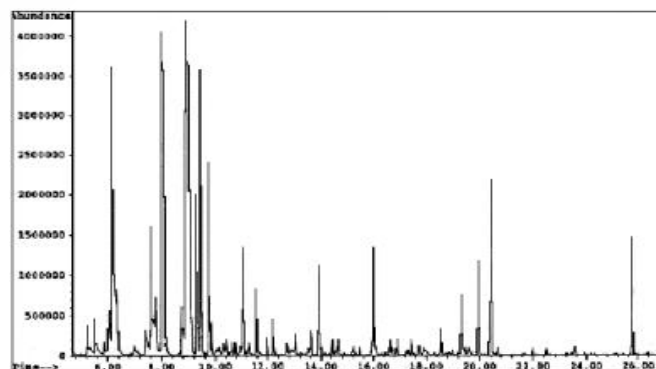


图 2. 甲基丙二酸尿症患者尿有机酸谱

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		30.10	6.20	284.10	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	Acetylglutamic-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	Thiodiglycolic-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	Phenylactic-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		30.10	6.20	284.10	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。

## 1.6 LCMS-8050 CL 用于罕见病 X-ALD 筛查应用研究

**摘要：** 本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 及 X-连锁肾上腺脑白质营养不良筛查和诊断试剂盒（液相色谱-串联质谱法，质谱生物科技有限公司），建立了干血片中 4 种溶血磷脂酰胆碱同时测定的方法，该方法可辅助筛查诊断 X-连锁肾上腺脑白质营养不良。使用试剂盒的内标、标准品、质控品及新生儿滤纸干血片进行了方法的准确度及精密度考察，使用岛津 Neonatal 新筛数据处理软件对筛查结果进行数据处理。结果显示该方法准确度及精密度均满足试剂盒要求，Neonatal 新筛数据处理软件可以应用于筛查数据处理。该方法对 X-连锁肾上腺脑白质营养不良的临床判断、治疗管理和生理评估具有辅助筛查诊断的意义。

**关键词：** LCMS-8050 CL 罕见病 X-ALD 筛查

X-连锁肾上腺脑白质营养不良（X-linked adrenoleukodystrophy, X-ALD）是过氧化物酶体功能异常导致的脂代谢异常疾病，属于遗传代谢病。临床主要表现为大脑白质进行性脱髓鞘病变和肾上腺皮质功能不全。该病由X染色体上（Xq28）ABCD1（adenosine triphosphate-binding cassetteD1）基因突变引起，导致过氧化物酶体功能缺失，长链脂肪酸不能被 $\beta$ 氧化，大量极长链脂肪酸（very long chain fatty, VLCFA）沉积于大脑白质和肾上腺，导致神经系统功能异常及肾上腺皮质功能减退。95%的患者为男性，而女性多为杂合子，属于疾病基因突变的携带者。男性X-ALD的发病率为1/21000~1/15500，而男性X-ALD和女性杂合子携带者的共同发病率为1/17000。X-ALD临床表现多样，典型X-ALD患者出现中枢神经系统损害和肾上腺皮质功能低下两类症状。通过准确定量患者干血

片中四种溶血磷脂酰胆碱（lysophosphatidylcholine, LPC）：二十碳溶血磷脂酰胆碱（C20:0 LPC）、二十二碳溶血磷脂酰胆碱（C22:0 LPC）、二十四碳溶血磷脂酰胆碱（C24:0 LPC）和二十六碳溶血磷脂酰胆碱（C26:0 LPC），可快速筛查诊断X-ALD，从而尽早进行饮食控制、类固醇替代、造血干细胞移植等治疗，可预防患儿智力、精神、运动发育落后和肾上腺皮质功能受损。

本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪LCMS-8050 CL及X-连锁肾上腺脑白质营养不良筛查和诊断试剂盒（高效液相色谱-串联质谱法，质谱生物科技有限公司），建立了滤纸干血片中4种溶血磷脂酰胆碱含量测定方法，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可供相关人员参考。

### 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与三重四极杆质谱仪联用系统。具体配置为 LC-30AD CL×2（输液泵），DGU-20A<sub>SR</sub> CL（在线脱气机），SIL-30AC<sub>MP</sub> CL（自动进样器），CTO-30A CL（柱温箱），SPD-M20A CL（二极管阵列检测器）CBM-20A CL 系统控制器，LCMS-8050 CL 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站，Neonatal Ver.2.30 筛查结果处理软件。

## 1.2 分析条件

### 液相色谱条件

- 色谱柱：在线过滤器 (2  $\mu\text{m}$ , P/N6010-55100)  
流动相：试剂盒提供  
柱温：室温  
进样量：1  $\mu\text{L}$   
洗脱方式：流速梯度洗脱，初始流速为 0.1 mL/min，时间程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.10	Pumps	T.Flow	0.05
0.65	Pumps	T.Flow	0.25
0.66	Pumps	T.Flow	1
1.00	Controller	Stop	

### 质谱条件

- 分析仪器：LCMS-8050 CL      DL 温度：250°C  
离子源：ESI (+)      加热模块温度：400°C  
雾化气流速：3.0 L/min      离子源温度：300°C  
干燥气流速：10.0 L/min      扫描模式：多反应监测(MRM)  
加热器流速：10.0 L/min      MRM 参数：见表 2

表 2. MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 PreBias(V)	CE (V)	Q3 PreBias(V)
C20:0 LPC	552.5	104.1	-22	-32	-20
C22:0 LPC	580.5	104.1	-22	-32	-20
C24:0 LPC	608.5	104.1	-22	-32	-20
C26:0 LPC	636.5	104.1	-22	-32	-20
C26:0 LPC-IS	642.5	104.1	-22	-32	-20

## 1.3 材料与方法

### 1.3.1 材料

- 高质控干血片：试剂盒提供  
低质控干血片：试剂盒提供  
内标准溶液：试剂盒提供  
样品稀释液：试剂盒提供

### 1.3.2 方法

方法原理：使用含稳定同位素标记的 C26:0 LPC 内标准品的溶剂萃取滤纸干血片中的 4 种溶血磷脂酰

胆碱，然后用串联质谱进行分析。通过测定 4 种溶血磷脂酰胆碱与 C26:0 LPC 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 4 种溶血磷脂酰胆碱浓度水平。

样本前处理方法：用直径 3 mm 打孔器在质控干血片及新生儿血片上取样，置于 96 孔板中，每孔加入含 C26:0 LPC 同位素内标的溶液 100  $\mu$ L，45  $^{\circ}$ C 密封孵育震荡(650~750 rpm) 45 min，室温放置 5 min，提取 75  $\mu$ L 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。

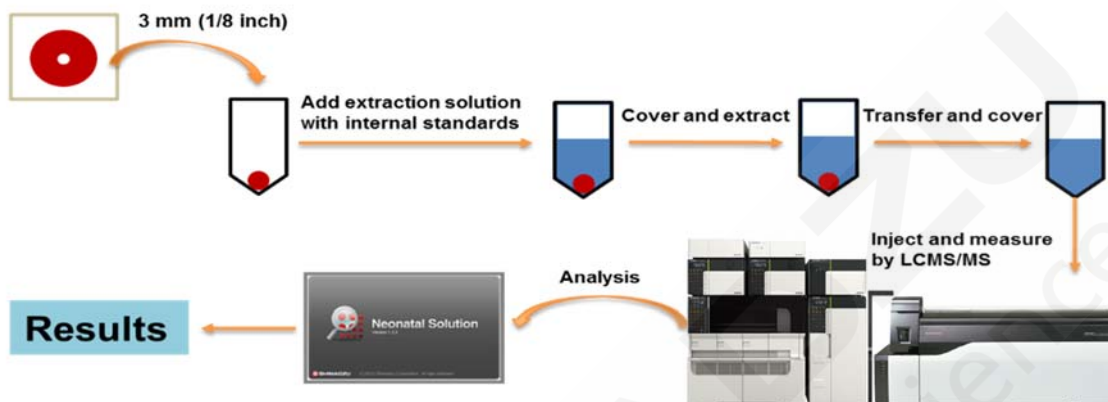


图 1. 样本前处理及分析流程

## 2. 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图

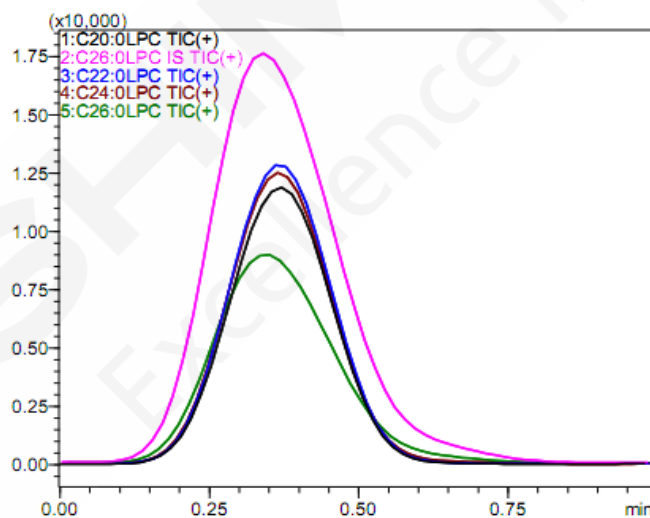


图 2. 低质控干血片谱图

### 2.2 质控样本准确度考察

按 1.3 中的前处理方法和 1.2 中的分析条件对试剂盒中的高低质控干血片进行分析，高低质控干血片各处理 4 份，以考察准确度，使用岛津 Neonatal 新筛数据处理软件对筛查结果进行数据处理，结果见表 3，结果显示，高低质控干血片中 4 种溶血磷脂酰胆碱均在靶值范围内，准确度良好。

表 3. 质控准确度考察结果( $\mu\text{mol/L}$ )

目标物	LQC 测定值	LQC 靶值范围	HQC 测定值	HQC 靶值范围
C20:0 LPC	1.04	0.66~1.50	3.82	2.47~5.34
	1.12		4.15	
	0.99		3.54	
	1.07		4.01	
C22:0 LPC	1.55	1.00~1.99	4.70	3.09~6.43
	1.58		5.15	
	1.32		5.13	
	1.41		4.52	
C24:0 LPC	1.57	0.92~2.03	5.12	3.02~6.26
	1.57		5.72	
	1.29		4.97	
	1.36		5.01	
C26:0 LPC	0.93	0.55~1.34	4.43	2.20~5.76
	1.01		4.85	
	0.89		4.68	
	0.85		4.61	

### 2.3 精密度考察

按 1.3 中的前处理方法和 1.2 中的分析条件对试剂盒中的低质控干血片连续进样分析 6 针，以考察仪器精密度，具体结果见表 4，结果显示，连续分析 6 针低质控干血片，RSD 在 1.2%~3.6%之间，仪器精密度良好，满足临床测定需求。

表 4. 精密度考察数据

NO.	C20:0 LPC	C22:0 LPC	C24:0 LPC	C26:0 LPC
测定 1	0.99	1.32	1.29	0.89
测定 2	0.91	1.28	1.28	0.84
测定 3	0.98	1.28	1.27	0.89
测定 4	1.00	1.31	1.33	0.92
测定 5	0.95	1.30	1.26	0.87
测定 6	0.94	1.30	1.28	0.88
RSD%	3.6	1.2	1.9	3.0

### 2.4 临床样品测定结果

取 10 批次新生儿滤纸干血片，按 1.3 中的前处理方法及 1.2 中的分析条件进行测定，谱图见图 3，结果见表 5，结果显示，LCMS-8050 CL 配套该试剂盒使用可以满足临床检测需求。

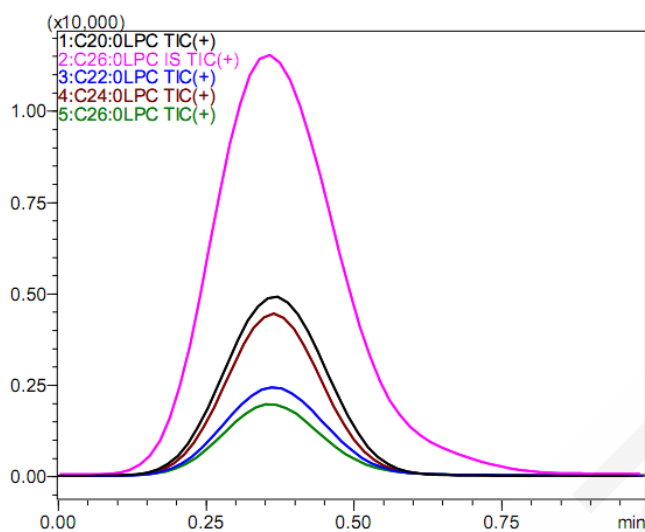


图 3. Sample-1 谱图

表 5. 人血清临床样品检测结果( $\mu\text{mol/L}$ )

NO.	C20:0 LPC	C22:0 LPC	C24:0 LPC	C26:0 LPC
Sample-1	0.88	0.85	1.10	0.52
Sample-2	0.54	0.48	0.63	0.33
Sample-3	0.54	0.64	0.86	0.36
Sample-4	0.84	0.64	0.95	0.38
Sample-5	0.36	0.44	0.57	0.31
Sample-6	0.52	0.50	0.74	0.35
Sample-7	0.49	0.51	0.76	0.31
Sample-8	0.67	0.72	0.95	0.37
Sample-9	0.51	0.49	0.71	0.35
Sample-10	0.49	0.63	0.84	0.34

### 3. 结论

本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 及 X-连锁肾上腺脑白质营养不良筛查和诊断试剂盒（液相色谱-串联质谱法，质谱生物科技有限公司），建立了干血片中 4 种溶血磷脂酰胆碱同时测定的方法，该方法可辅助筛查诊断 X-连锁肾上腺脑白质营养不良。使用试剂盒的内标、标准品、质控品及新生儿滤纸干血片进行了方法的准确度及精密度考察，使用岛津 Neonatal 新筛数据处理软件对筛查结果进行数据处理。结果显示该方法准确度及精密度均满足试剂盒要求，Neonatal 新筛数据处理软件可以应用于筛查数据处理。该方法对 X-连锁肾上腺脑白质营养不良的临床判断、治疗管理和生理评估具有辅助筛查诊断的意义。

## 1.7 LCMS-8050 CL 用于肌酸缺乏综合征筛查应用研究

**摘要:** 本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 及胍基乙酸和肌酸检测试剂盒（液相色谱-串联质谱法，质谱生物科技有限公司），建立了干血片中胍基乙酸和肌酸同时测定的方法，该方法可辅助筛查诊断肌酸缺乏综合征。使用试剂盒的内标、质控品及新生儿滤纸干血片进行了方法的准确度及精密度考察，使用岛津 Neonatal 新筛数据处理软件对筛查结果进行数据处理。结果显示该方法准确度及精密度均满足试剂盒要求，Neonatal 新筛数据处理软件可以应用于胍基乙酸和肌酸筛查数据处理。该方法对肌酸缺乏综合征的临床判断、治疗管理和生理评估具有辅助筛查诊断的意义。

**关键词:** LCMS-8050 CL 胍基乙酸 肌酸 肌酸缺乏综合征

肌酸是一种自然存在于脊椎动物体内的含氮有机酸，主要作用是辅助能量供应，在肌肉和神经组织高能量消耗过程中发挥重要的能量转换功能。胍基乙酸在肌酸合成反应中具有重要作用。肌酸缺乏综合征 (creatine deficiency syndromes, CDS) 是一组影响肌酸合成及转逆的先天性遗传代谢性疾病，其生化特点为脑肌酸缺乏。临床表现为智力缺损、语言发育迟缓、孤独症、癫痫发作、肌张力减退、以锥体外系损害为主的运动障碍和行为问题。肌酸缺乏综合征可分为胍基乙酸甲基转移酶 (GAMT) 缺陷，精氨酸:甘氨酸脒基转移酶 (AGAT) 缺陷，SLC6A8基因突变所致的肌酸转运 (CRTR) 缺陷。

GAMT缺陷患者在尿、血浆、脑脊液、干血纸片样本中出现胍基乙酸增高，肌酸和肌酐减低，肌酸/肌酐比值不变。AGAT缺陷患者尿、血浆、脑脊液、干血纸片样本中出现胍基乙酸降低，肌酸和肌酐减低，肌酸/肌酐比值不变。SLC6A8基因缺陷患者胍基乙酸正常，尿肌酸可正常或升高，而肌酐降低，故肌酸/肌酐比值升高。

本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 及胍基乙酸和肌酸检测试剂盒（高效液相色谱-串联质谱法，质谱生物科技有限公司），建立了滤纸干血片中胍基乙酸和肌酸含量测定方法，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于肌酸缺乏综合征的辅助诊断。

### 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-三重四极杆质谱联用系统 LCMS-8050 CL。具体配置为：

输 液 泵	: LC-30AD CL×2	在 线 脱 气 机	: DGU-20A <sub>5R</sub> CL
自 动 进 样 器	: SIL-30AC <sub>MP</sub> CL	柱 温 箱	: CTO-30A CL
二极管阵列检测器	: SPD-M30A CL	系 统 控 制 器	: CBM-20A CL
筛查结果处理软件	: Neonatal Ver.2.30	色 谱 工 作 站	: LabSolutions Ver. 5.91

#### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：在线过滤器 (2 μm, P/N6010-55100, SGLC)  
 流动相：试剂盒提供  
 柱温：室温  
 进样量：1 μL  
 洗脱方式：流速梯度洗脱，初始流速为 0.1 mL/min，时间程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.10	Pumps	T.Flow	0.05
0.65	Pumps	T.Flow	0.20
0.66	Pumps	T.Flow	1
1.00	Controller	Stop	

#### 质谱条件

分析仪器：LCMS-8050 CL                      DL 温度：150°C  
 离子源：ESI (+)                                加热模块温度：450°C  
 雾化气流速：3.0 L/min                        离子源温度：100°C  
 干燥气流速：10.0 L/min                      扫描模式：多反应监测(MRM)  
 加热器流速：10.0 L/min                      MRM 参数：见表 2

表 2. MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
GAA	118.1	76.1	-11	-13	-14
GAA-d2	120.1	78.1	-11	-13	-14
CRE	132.1	90.1	-12	-14	-17
CRE-d3	135.1	93.1	-12	-14	-17

### 1.3 材料与方法

#### 1.3.1 材料

质控干血片、内标准溶液、样品稀释液：试剂盒提供

#### 1.3.2 方法

方法原理：使用含 2 种稳定同位素标记的内标的溶剂萃取滤纸干血片中的胍基乙酸和肌酸，然后用串联质谱进行分析。通过测定胍基乙酸和肌酸与对应同位素内标的离子峰强度，由已知水平的质控及内标，即可通过岛津新生儿筛查软件自动计算出所测样本的胍基乙酸和肌酸浓度水平。

样本前处理方法：用直径 3 mm 打孔器在质控干血片及新生儿血片上取样，置于 96 孔板中，每孔加入含同位素内标的溶液 100 μL，45 °C 密封孵育震荡(650~750 rpm) 45 min，室温放置 5 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。

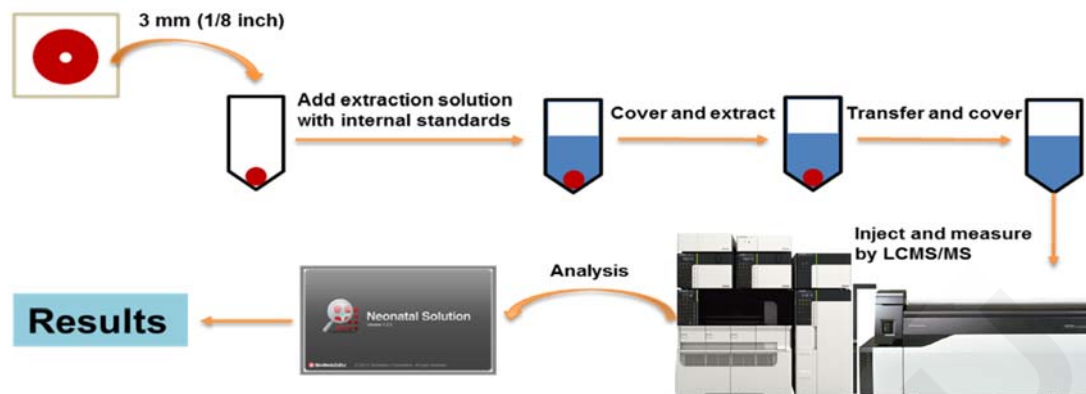


图 1. 样本前处理及分析流程

## 2. 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图

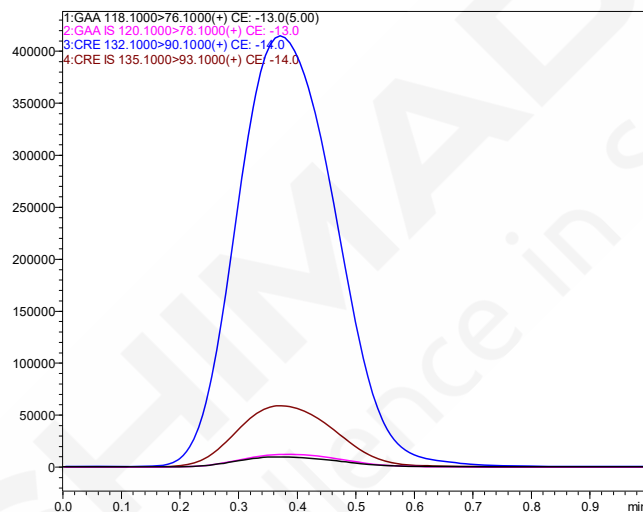


图 2. 低质控干血片谱图

### 2.2 质控样本准确度考察

按 1.3 中的前处理方法和 1.2 中的分析条件对试剂盒中的高低质控干血片进行分析，高低质控干血片各处理 3 份，以考察准确度，使用岛津 Neonatal 新筛数据处理软件对筛查结果进行数据处理，结果见表 3，结果显示，高低质控干血片中胍基乙酸和肌酸均在靶值范围内，准确度良好。

表 3. 质控准确度考察结果( $\mu\text{mol/L}$ )

目标物	LQC 测定值	LQC 靶值范围	HQC 测定值	HQC 靶值范围
GAA	3.99	2.92~5.41	8.10	5.44~10.70
	3.92		8.94	
	4.01		8.55	
CRE	223.69	169.60~323.36	484.58	319.90~665.02
	254.61		534.15	
	241.27		524.61	

## 2.3 精密度考察

按 1.3 中的前处理方法和 1.2 中的分析条件对试剂盒中的低质控干血片连续进样分析 6 针，以考察仪器精密度，具体结果见表 4，结果显示，连续分析 6 针低质控干血片，RSD 在 0.5%~3.2%之间，仪器精密度良好，满足临床测定需求。

表 4. 精密度考察数据

No.	GAA	CRE
测定 1	4.11	256.07
测定 2	3.98	257.17
测定 3	3.85	254.26
测定 4	3.89	254.88
测定 5	3.86	256.47
测定 6	4.13	254.02
RSD%	3.2	0.5

## 2.4 临床样品测定结果

取 10 批次新生儿滤纸干血片，按 1.3 中的前处理方法及 1.2 中的分析条件进行测定，谱图见图 3，使用岛津 Neonatal 新筛数据处理软件处理结果见表 5，结果显示，LCMS-8050 CL 配套该试剂盒使用可以满足临床检测需求，使用岛津 Neonatal 新筛数据处理软件可用于该筛查数据分析。

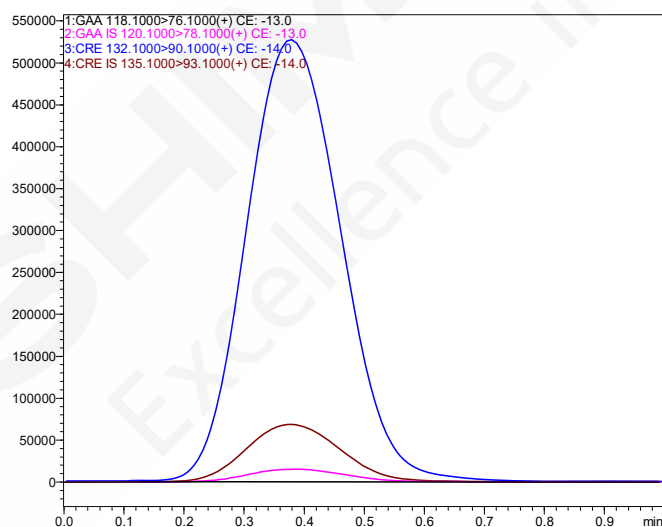


图 3. Sample-1 谱图

表 5. 人血清临床样品检测结果( $\mu\text{mol/L}$ )

NO.	GAA	CRE
Sample-1	1.08	383
Sample-2	1.38	295
Sample-3	0.74	390
Sample-4	1.10	279
Sample-5	1.10	383
Sample-6	0.57	345
Sample-7	0.83	347
Sample-8	0.60	298
Sample-9	1.36	514
Sample-10	0.98	293

### 3. 结论

本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 及胍基乙酸和肌酸检测试剂盒（液相色谱-串联质谱法，质谱生物科技有限公司），建立了干血片中胍基乙酸和肌酸同时测定的方法，该方法可辅助筛查诊断肌酸缺乏综合征。使用试剂盒的内标、质控品及新生儿滤纸干血片进行了方法的准确度及精密度考察，使用岛津 Neonatal 新筛数据处理软件对筛查结果进行数据处理。结果显示该方法准确度及精密度均满足试剂盒要求，Neonatal 新筛数据处理软件可以应用于该筛查数据处理。该方法对肌酸缺乏综合征的临床判断、治疗管理和生理评估具有辅助筛查诊断的意义。

## 1.8 LCMS-8050 CL 用于多种有机酸血症筛查应用研究

**摘要:** 使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30A CL 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用及丙二酸、甲基丙二酸、乙基丙二酸、2-甲基枸橼酸、总同型半胱氨酸测定试剂盒（高效液相色谱-串联质谱法，质谱生物科技有限公司），建立了干血片中 5 种有机酸同时测定的方法。使用试剂盒的内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性良好，标准曲线相关系数均大于 0.994，准确度及精密度均满足试剂盒要求。该方法对多种有机酸血症相关疾病的临床诊断、治疗管理和生理评估具有重要的意义。

**关键词:** 有机酸血症 丙二酸 甲基丙二酸 乙基丙二酸 总同型半胱氨酸 2-甲基枸橼酸

有机酸(organic acid)为氨基酸降解、糖酵解、脂肪酸氧化等分解代谢过程中产生的中间产物(羧基酸)。正常情况下，这些中间产物(羧基酸)在体内迅速转化，在体液内含量极低；某些相关酶缺陷可导致其代谢发生障碍，大量有机酸在体内蓄积，血浓度增高，并从尿中大量排出，导致有机酸血(尿)症。常见的有机酸血症有丙二酸血症、甲基丙二酸血症、丙酸血症、同型半胱氨酸血症等。患儿临床表现各异，在诊断中最常见为神经损伤和发育迟缓，其他相关的症状还包括反应差、拒食、嗜睡、昏迷、呕吐、脱水、营养不良、肌张力低下、顽固性惊厥、代谢性酸中毒、低血糖、酮症酸中毒、高氨血症，如果不及时治疗会造成患者死亡。甲基丙二酸及相关有机酸血症，如能早期筛查，早期诊断可以最大限度的改变患儿预后，部分有机酸血症通过新生儿

筛查，及时给予治疗，可和正常儿童一样生长发育。当婴幼儿患有甲基丙二酸及相关有机酸血症时，其体内丙二酸、甲基丙二酸、乙基丙二酸、2-甲基枸橼酸、总同型半胱氨酸含量均会表现出异常，准确测定干血片中相关有机酸含量可准确筛查诊断相关有机酸血症。

本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 及丙二酸、甲基丙二酸、乙基丙二酸、2-甲基枸橼酸、总同型半胱氨酸测定试剂盒（高效液相色谱-串联质谱法，质谱生物科技有限公司），建立了滤纸干血片中丙二酸、甲基丙二酸、乙基丙二酸、2-甲基枸橼酸、总同型半胱氨酸含量测定方法，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于相关有机酸血症辅助筛查诊断。

### 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与三重四极杆质谱仪联用系统。具体配置为 LC-30AD CL×2 (输液泵)，DGU-20A<sub>5R</sub> CL (在线脱气机)，SIL-30AC<sub>MP</sub> CL (自动进样器)，CTO-30A CL (柱温箱)，SPD-M20A CL (二极管阵列检测器) CBM-20A CL 系统控制器，LCMS-8050 CL 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.99 色谱工作站。

#### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱 : Shim-pack GIST (50 mm×2.1 mm I.D., 2.0 μm)  
 流动相 : 试剂盒提供  
 柱温 : 40 °C  
 进样量 : 5 μL  
 洗脱方式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 10%, 洗脱程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	B.Conc	10
2.50	Pumps	B.Conc	98
3.00	Pumps	B.Conc	98
3.10	Pumps	B.Conc	10
6.00	Controller	Stop	

#### 质谱条件

分析仪器 : LCMS-8050 CL                      DL 温度 : 150°C  
 离子源 : ESI (+)                                加热模块温度 : 450°C  
 雾化气流速 : 3.0 L/min                        离子源温度 : 350°C  
 干燥气流速 : 8.0 L/min                        扫描模式 : 多反应监测(MRM)  
 加热器流速 : 12.0 L/min                        MRM 参数 : 见表 2

表 2. MRM 参数

名称	英文名	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
丙二酸	MA	217.2	105.1	-18	-15	-20
丙二酸内标	MA-IS	220.2	108.1	-18	-15	-20
甲基丙二酸	MMA	231.2	119.1	-11	-11	-22
甲基丙二酸内标	MMA-IS	234.2	122.1	-11	-11	-22
乙基丙二酸	EMA	245.2	133.0	-29	-10	-26
乙基丙二酸内标	EMA-IS	250.2	138.0	-29	-10	-26
总同型半胱氨酸	HCY	192.1	90.1	-14	-13	-10
同型半胱氨酸内标	HCY-IS	196.1	94.1	-14	-13	-10
2-甲基枸橼酸	MCA	375.1	199.2	-26	-28	-30
2-甲基枸橼酸内标	MCA-IS	378.1	202.1	-26	-28	-30

### 1.3 材料与方法

#### 1.3.1 材料

5 浓度标准品干血片、高低质控干血片、内标准溶液、样品稀释液均由试剂盒提供。

#### 1.3.2 方法

方法原理: 使用含 5 种稳定同位素标记的内标准品的溶剂萃取滤纸干血片中的丙二酸、甲基丙二酸、

乙基丙二酸、2-甲基枸橼酸、总同型半胱氨酸，然后使用衍生化试剂（乙酰氯及正丁醇）衍生，串联质谱进行分析。通过测定丙二酸、甲基丙二酸、乙基丙二酸、2-甲基枸橼酸、总同型半胱氨酸与对应同位素内标的离子峰强度，由已知水平的质控及内标，即可计算出所测样本的丙二酸、甲基丙二酸、乙基丙二酸、2-甲基枸橼酸、总同型半胱氨酸浓度水平。

样本前处理方法：参考试剂盒说明书进行。

## 2. 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图

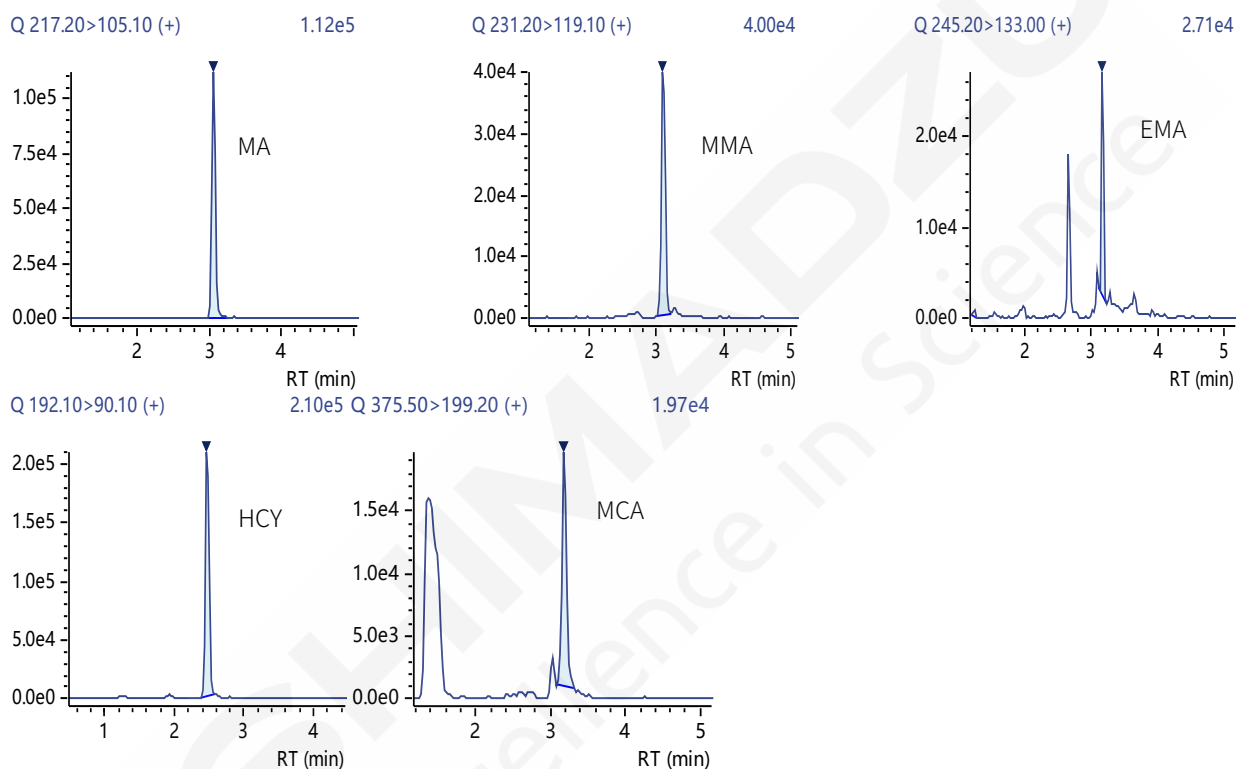


图 1. 标准曲线最低点谱图

### 2.2 线性测定结果

对标准品按 1.2 中的分析条件进行分析，内标法制作标准曲线。标准曲线结果见表 3，5 种有机酸在标准曲线浓度范围内线性相关系数均大于 0.994，准确度在 90.8%~109.3%之间，满足需求。

表 3. 标准曲线结果

编号	名称	线性方程	线性范围( $\mu\text{mol/L}$ )	相关系数	准确度(%)
1	MA	$Y = (0.138716)X + (0.871968)$	6.70~44.21	0.9941	90.8~105.6
2	MMA	$Y = (0.214986)X + (0.363957)$	2.23~30.68	0.9981	96.0~106.9
3	EMA	$Y = (0.0444793)X + (-0.0128290)$	3.45~52.82	0.9981	94.3~106.4
4	HCY	$Y = (0.218807)X + (-0.127514)$	4.94~32.52	0.9933	91.6~109.3
5	MCA	$Y = (0.0123486)X + (0.211304)$	5.62~54.74	0.9942	88.2~105.7

### 2.3 准确度及精密度测定结果

按 1.3 中的前处理方法对低高浓度质控品前处理, 按 1.2 中的分析条件对质控品进行分析, 每个样品平行制备 6 份, 质控品的准确度及精密度结果如表 4 所示, 结果显示质控品测定准确度结果与理论值接近, 均在赋值范围内, 满足临床测定需求。样品平行制备 6 份进样分析, 测定结果 RSD 在 2.9%~8.3%之间, 满足临床测定需求。

表 4. 质控准确度考察结果(n=3)

名称	LQC				HQC			
	理论浓度( $\mu$ mol/L)	测定浓度( $\mu$ mol/L)	赋值范围 ( $\mu$ mol/L)	RSD(%)	理论浓度( $\mu$ mol/L)	测定浓度( $\mu$ mol/L)	赋值范围 ( $\mu$ mol/L)	RSD(%)
MA	15.67	13.51	10.14~21.20	4.5	29.14	28.41	14.24~26.45	3.9
MMA	9.51	10.40	6.45~12.56	5.9	19.93	19.69	20.23~38.04	2.9
EMA	15.62	16.10	10.42~20.81	4.8	33.21	32.55	13.65~26.21	3.6
HCY	12.03	11.99	7.93~16.13	5.9	20.35	18.50	21.75~44.67	4.4
MCA	17.43	19.36	10.60~24.26	8.3	34.33	31.55	19.78~48.88	4.8

### 2.4 临床样品测定结果

取 5 批次新生儿干血斑样品, 按 1.3 中的前处理方法及 1.2 中的分析条件进行测定, 结果见表 5, 该方法可满足临床检验需求。

表 5. 临床样品测定结果 (( $\mu$ mol/L)

Name	sample1	sample2	sample3	sample4	Sample5
MA	6.479	5.054	6.246	5.391	7.275
MMA	2.264	2.684	2.546	1.711	3.073
EMA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
HCY	1.667	4.442	3.124	2.096	2.855
MCA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

## 3. 结论

使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30A CL 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用及丙二酸、甲基丙二酸、乙基丙二酸、2-甲基枸橼酸、总同型半胱氨酸测定试剂盒(高效液相色谱-串联质谱法, 质谱生物科技有限公司), 建立了干血片中 5 种有机酸同时测定的方法。使用试剂盒的内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性良好, 标准曲线相关系数均大于 0.994, 准确度及精密度均满足试剂盒要求。该方法对多种有机酸血症相关疾病的临床诊断、治疗管理和生理评估具有重要的意义。

## 1.9 串联质谱法应用于先天性肾上腺皮质增生症筛查研究

**摘要:** 使用串联质谱及 21-羟化酶缺乏症五种相关激素测定试剂盒,建立了滤纸干血片中 17-羟孕酮 (17-OHP)、雄烯二酮 (A4)、11-脱氧皮质醇 (S)、21-脱氧皮质醇 (21-DOC)、皮质醇 (F)含量测定方法。使用试剂盒的内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。该方法前处理简便,分析速度快,灵敏度高,专属性强,假阳性率低,可用于先天性肾上腺皮质增生症辅助筛查诊断。

**关键词:** 串联质谱 先天性肾上腺皮质增生症 滤纸干血片 筛查诊断

先天性肾上腺皮质增生症 (Congenital adrenal hyperplasia, CAH) 是一组由肾上腺皮质类固醇合成过程中各类催化酶的缺陷,引起以皮质类固醇合成障碍为主要特征的常染色体隐性遗传性疾病。CAH 按照酶缺陷类型的不同大致可分为六型,其中以 21-羟化酶缺乏症 (21-Hydroxylase deficiency, 21-OHD) 最常见,约占 90%~95%;其次为 11 $\beta$ -羟化酶缺乏症,约占 3%~5%。21-OHD 在新生儿中的发病率约为 1/20000~1/10000。在新生儿出生后开展 CAH 的早期筛查、尽早诊断、及时治疗,对降低新生儿死亡率、减少女婴外生殖器男性化而造成性别误判、改善生长发育具有重要意义。目前,我国已将 CAH 作为优先推荐筛查病种,常规筛查通过免疫法检测血中 17-羟孕酮 (17-

OHP)水平实现 CAH 筛查,但该方法假阳性率较高,召回率较高。《先天性肾上腺皮质增生新生儿筛查共识》推荐使用 LC-MS/MS 法同时测定干血片中 17-羟孕酮 (17-OHP)、雄烯二酮 (A4)、11-脱氧皮质醇 (S)、21-脱氧皮质醇 (21-DOC)、皮质醇 (F),该方法具有较高的特异性及敏感性,假阳性率低。

本文使用超高效液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8045及21-羟化酶缺乏症五种相关激素测定试剂盒 (液相色谱-串联质谱法,北京华大吉比爱生物科技有限公司),建立了滤纸干血片中17-OHP、A4、S、21-DOC、F含量测定方法,该方法前处理简便,分析速度快,灵敏度高,专属性强,假阳性率低,可用于CAH辅助筛查诊断。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器

本实验使用超高效液相色谱与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为:

输液泵	: LC-40D XR×2	在线脱气机	: DGU-405
自动进样器	: SIL-40C XR	柱温箱	: CTO-40C
系统控制器	: CBM-40		

#### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱: Shim-pack Velox C18 50 mm×2.1 mm I.D., 1.8 $\mu$ m; P/N: 227-32007-02; 岛津 (上海) 实验器材有限公司	流动相: A: 0.1%甲酸水 (含 2 mM 乙酸铵) B: 0.1%甲酸甲醇 (含 2 mM 乙酸铵)
	进样量: 10 $\mu$ L

柱温：45°C  
流速：0.4 mL/min

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 45%，洗脱程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	B.Conc	45
3.00	Pumps	B.Conc	95
3.50	Pumps	B.Conc	95
3.60	Pumps	B.Conc	45
5.00	Controller	Stop	

#### 质谱条件

分析仪器	: LCMS-8045	DL 温度	: 150°C
离子源	: ESI (+)	加热模块温度	: 450°C
雾化气流速	: 3.0 L/min	离子源温度	: 300°C
干燥气流速	: 8.0 L/min	扫描模式	: 多反应监测(MRM)
加热气流速	: 12.0 L/min	MRM 参数	: 见表 2

表 2. MRM 参数

名称	英文名	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
17-羟孕酮	17-OHP	331.2	109.1	-16	-32	-20
		331.2	97.1	-10	-29	-16
17-羟孕酮内标	17-OHP-IS	334.2	112.1	-16	-32	-20
雄烯二酮	A4	287.2	97.1	-13	-30	-22
		287.2	109.1	-15	-25	-16
雄烯二酮内标	A4-IS	290.2	100.1	-13	-30	-22
11-脱氧皮质醇	S	347.2	109.1	-15	-28	-20
		347.2	97.1	-14	-25	-18
11-脱氧皮质醇内标	S-IS	352.2	113.1	-15	-28	-20
21-脱氧皮质醇	21-DOC	347.2	311.2	-16	-16	-20
		347.2	269.2	-16	-15	-29
21-脱氧皮质醇内标	21-DOC-IS	355.3	319.2	-16	-16	-20
皮质醇	F	363.2	121.2	-15	-25	-21
		363.2	327.2	-20	-15	-25
皮质醇内标	F-IS	367.2	121.2	-15	-25	-21

### 1.3 材料与方法

#### 1.3.1 材料

8 个浓度标准品干血片、高低质控干血片、内标准品均由试剂盒提供

#### 1.3.2 方法

内标准品溶液制备：向内标准品瓶中加入 500  $\mu\text{L}$  甲醇，涡旋 30 s，得到内标储备液；使用时，将内标储备液与甲醇按照 1:99 稀释，混匀，得到内标工作液。

样本处理方法：用打孔器将标准品，质控品及样品干血片打出血点，放入 96 孔板中，每孔 2 个；加入 200  $\mu\text{L}$  内标工作液，封膜，在 25 $^{\circ}\text{C}$ ，500 rpm 下，混匀 30 min；静置后，每孔取 150  $\mu\text{L}$  上清液于另一 96 孔板中，氮气吹干；每孔中加入 75  $\mu\text{L}$  45% 甲醇复溶，覆膜后涡旋混匀 3 min，上机测定。

## 2. 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图

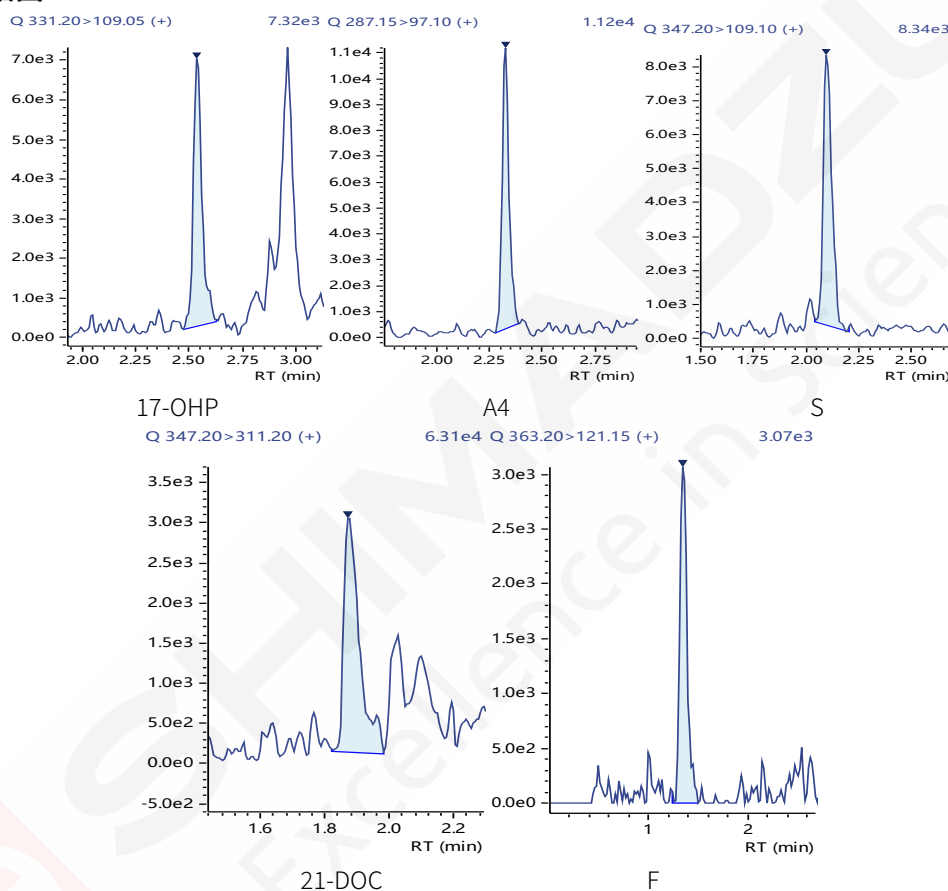


图 1. 标准曲线最低点谱图

### 2.2 线性测定结果

对标准品按 1.2 中的分析条件进行分析，内标法制作标准曲线。标准曲线结果见表 3，5 种激素在标准曲线浓度范围内线性相关系数均大于 0.994，准确度在 86.8%~113.8%之间，满足测定需求。

表 3. 标准曲线结果

编号	名称	线性方程	线性范围(ng/mL)	相关系数	准确度(%)
1	17-OHP	$Y = (0.0214767)X + (0.0127906)$	1.5~400	0.9945	86.8~111.4
2	A4	$Y = (0.0276090)X + (0.00192108)$	1.5~400	0.9970	90.5~110.7
3	S	$Y = (0.0281403)X + (0.00568528)$	1.5~400	0.9967	93.0~113.8
4	21-DOC	$Y = (0.0355860)X + (0.0208844)$	1.5~400	0.9971	92.3~113.5
5	F	$Y = (0.0268318)X + (0.0262039)$	1.5~400	0.9968	89.8~109.0

### 2.3 准确度测定结果

按 1.3 中的前处理方法对低高浓度质控品前处理, 按 1.2 中的分析条件对质控品进行分析, 质控品的准确度结果如表 4 所示, 结果显示质控品测定准确度结果与理论值接近, 均在赋值范围内, 满足临床测定需求。

表 4. 质控准确度考察结果(ng/mL)

名称	LQC			HQC		
	理论浓度	测定浓度	赋值范围	理论浓度	测定浓度	赋值范围
17-OHP	20.4	21.3	17.1~23.7	299.7	283.2	256.2~343.2
A4	3.7	3.9	2.9~4.4	296.4	270.1	250.9~341.9
S	19.2	18.5	15.9~22.4	312.6	198.3	255.6~369.7
21-DOC	5.0	5.2	4.1~5.9	303.2	292.4	252.0~354.4
F	17.9	17.7	13.4~22.5	311.0	301.9	259.8~362.1

### 2.4 精密度测定结果

取低浓度质控品溶液, 连续进样 6 针, 考察精密度, 具体峰面积精密度见表 5, 结果显示, 5 种激素在测定浓度下峰面积精密度在 1.2%~4.8% 之间, LCMS-8045 测定 5 种激素精密度良好。

表 5. 精密度测定结果 (ng/mL)

Name	平均峰面积	RSD%
17-OHP	196883	2.1
A4	80656	1.2
S	275174	2.6
21-DOC	33705	4.8
F	108649	1.9

## 3. 结论

使用超高效液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 及 21-羟化酶缺乏症五种相关激素测定试剂盒 (液相色谱-串联质谱法, 北京华大吉比爱生物科技有限公司), 建立了滤纸干血片中 17-羟孕酮(17-OHP)、雄烯二酮(A4)、11-脱氧皮质醇(S)、21-脱氧皮质醇(21-DOC)、皮质醇(F)含量测定方法。使用试剂盒的内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性良好, 标准曲线相关系数均大于 0.994, 准确度及精密度均满足试剂盒要求。该方法对先天性肾上腺皮质增生症的筛查诊断具有重要参考意义。

## 二、 内分泌及代谢疾病诊疗领域的应用

### 2.1 引言

内分泌系统是由内分泌腺及存在于某些脏器中的内分泌组织和细胞所组成的一个体液调节系统。其主要功能是在神经系统支配下和物质代谢反馈基础上释放激素，调节人体的生长、发育、生殖、代谢、运动、病态、衰老等生命现象，维持人体内环境的相对稳定。内分泌疾病的发生，是由于内分泌腺及组织发生病理改变所致。许多疾病通过代谢紊乱也可影响内分泌系统的结构和功能。人体主要内分泌腺包括：下丘脑、垂体、甲状腺、甲状旁腺、肾上腺、胰岛、性腺等。

内分泌疾病，即内分泌紊乱或称内分泌失调，内分泌腺或内分泌组织本身的分泌功能和（或）结构异常时发生的症候群，还包括激素来源异常、激素受体异常和由于激素或物质代谢失常引起的生理紊乱所发生的症候群。儿科常见内分泌疾病主要有垂体功能减退症，甲状腺疾病及肾上腺皮质疾病。甲状腺疾病主要分为单纯性甲状腺肿，甲状腺功能亢进症，甲状腺功能减退症。肾上腺皮质疾病主要包括库欣综合征，原发性慢性肾上腺皮质功能减退症，嗜铬细胞瘤，糖尿病，肥胖症，痛风，骨质疏松症等。因此通过测定体内类固醇激素，儿茶酚胺等激素水平可准确反映出相关内分泌疾病。目前国内多版专家共识均强烈推荐使用串联质谱诊断内分泌代谢疾病，如《新生儿先天性肾上腺皮质增生症筛查与诊断实验室检测技术专家共识》、《原发性醛固酮增多症诊断治疗专家共识》、《多卵巢综合征诊治内分泌专家共识》、《嗜铬细胞瘤和副神经节瘤诊断治疗的专家共识》等。

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。

随着医学检验的发展，目前已有多种通过测定体内小分子代谢物含量诊断疾病，如体内氨基酸含量测定诊断氨基酸代谢紊乱相关疾病，体内胆汁酸含量测定诊断不同肝胆疾病，体内脂肪酸含量测定诊断脂肪酸代谢异常相关疾病等。

本章对岛津临床质谱对体内类固醇激素、儿茶酚胺、血管紧张素等内分泌激素及氨基酸、脂肪酸、胆汁酸等小分子代谢物的检测方法进行介绍，供相关人员参考。

## 2.2 LCMS-8050 CL 检测人血浆中儿茶酚胺及其代谢物

**摘要:** 本文使用岛津临床用超高效液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 建立了同时检测人血浆中 3 种儿茶酚胺及其 3 种代谢物的方法。本方法使用同位素内标、标准样品及加标样品进行了方法的线性、精密密度及稳定性的考察。结果显示该方法线性范围宽, 标准曲线相关系数均大于 0.997, 准确度及精密密度均可满足日常检验要求。该方法操作简捷、特异性好、灵敏度高、分析速度快, 可以为临床人血浆中儿茶酚胺类物质的检测提供很好的借鉴和参考。

**关键词:** LCMS-8050 CL 血浆 儿茶酚胺 代谢物

儿茶酚胺 (CA) 包括肾上腺素 (E)、去甲肾上腺素 (NE) 和多巴胺 (DA), 其代谢产物包括变肾上腺素 (MN)、去甲变肾上腺素 (NMN) 及 3-甲氧基酪胺 (3-MT), 是一类含有儿茶酚和胺基的神经类物质。儿茶酚胺类物质在体内调节基本生理功能, 传递生理信号, 是正常生理过程中重要的信号介质, 同时在病理过程中也出现其含量的相应变化。研究发现, 儿茶酚胺含量增高常见于嗜铬细胞瘤、交感神经细胞瘤、原发性高血压、高血压性心力衰竭、心绞痛、急性心肌梗死、慢性肾功能不全、甲状腺功能减退症等, 含量过低常见于低血压、尿毒症、甲状腺功能亢进、营养不良、风湿热等。由于人体内儿茶酚胺含量随采样时间, 采样部位及采样体位

影响较大, 目前, 大多数研究将更稳定的代谢物作为主要的标志物进行测定。临床上, 儿茶酚胺及其代谢物含量的测定可以用于辅助诊断嗜铬细胞瘤、神经母细胞瘤、高血压和甲亢等内分泌相关疾病。而在人血浆中儿茶酚胺类物质含量极低, 血浆中儿茶酚胺的准确定量是临床检测的一大难点。

本文使用岛津临床用超高效液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL, 建立了人血浆中 3 种儿茶酚胺及其 3 种代谢物的含量测定方法, 该方法操作简捷、特异性好、灵敏度高、分析速度快, 适用临床检测的需要, 可在临床检验方面发挥较大的作用。供相关检测人员参考。

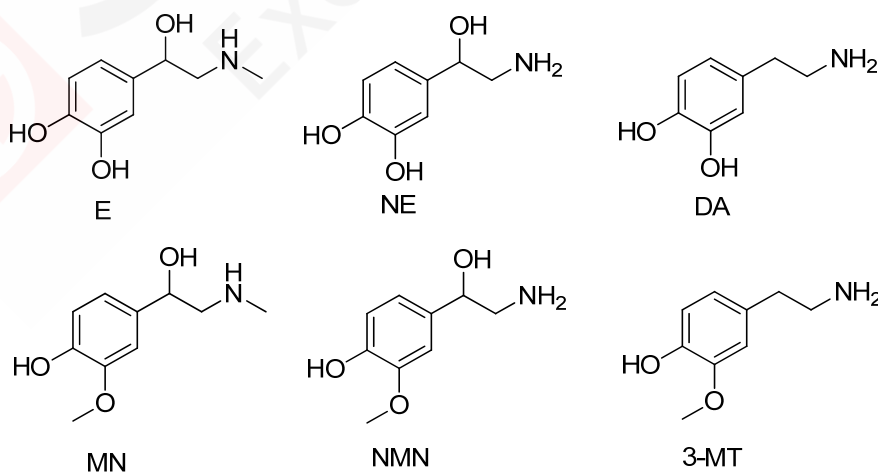


图 1 儿茶酚胺及其代谢物结构式

## 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 CL 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用系统。具体配置为 LC-30AD CL×2 (输液泵), DGU-20A5R CL (在线脱气机), SIL-30ACMP CL (自动进样器), CTO-30A CL (柱温箱), CBM-20A CL 系统控制器, LCMS-8050 CL 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱 : Ascentis Express F5 (2.1 mm I.D. × 100 mm L., 2.7 μm)

流动相 : A相-0.1%甲酸水 B相-乙腈

流速 : 0.2 mL/min

柱温 : 45°C

进样量 : 30 μL

自动进样器温度 : 4°C

洗脱方式: 梯度洗脱, B相初始浓度为5%, 时间程序见表1。

表1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	5
5.50	Pumps	Pump B Conc.	99
5.51	Pumps	Pump B Conc.	5
8.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器 : LCMS-8050 CL      DL 温度 : 150°C  
离子源 : ESI (+)      加热模块温度 : 500°C  
雾化气流速 : 3.0 L/min      干燥气流速 : 5.0 L/min  
加热气流速 : 15.0 L/min      扫描模式 : 多反应监测(MRM)  
接口温度 : 350°C      MRM 参数 : 见表2

表2. MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
NE	151.90	107.10	-17	-20	-19
NE-IS	158.00	111.00	-17	-20	-19
E	183.90	166.05	-20	-12	-11
E-IS	187.00	169.00	-20	-12	-11
NMN	166.10	134.10	-16	-18	-22
NMN-IS	169.10	109.10	-15	-23	-27
DA	154.05	91.10	-16	-25	-15

DA-IS	158.10	141.10	-16	-13	-24
MN	198.15	148.15	-20	-19	-14
MN-IS	201.10	151.10	-20	-19	-14
3-MT	151.00	119.10	-16	-16	-23
3-MT-IS	155.00	122.90	-16	-16	-23

### 1.3 标准品、质控品及样品制备

#### 1.3.1 标准工作曲线配制

用甲醇（含 0.1% 抗坏血酸）配制浓度均为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  单标对照品储备液，随后用纯水将标准储备溶液配制为一定浓度的混合对照品溶液，再稀释成混合标准工作液；用甲醇（含 0.1% 抗坏血酸）配制浓度均为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  内标对照品储备液，随后用纯水将标准储备溶液配置为一定浓度的混合内标溶液，备用。

#### 1.3.2 标准品、样品前处理方法

取 250  $\mu\text{L}$  对照品或血浆样品于 1.5 mL 离心管中，加入 50  $\mu\text{L}$  内标混合溶液，涡旋 10 s 充分混匀。将经过预处理的样品加载到经 200  $\mu\text{L}$  甲醇和 200  $\mu\text{L}$  20 mM 乙酸铵溶液预处理的 WCX 96 孔板中。加载样品之后，依次使用 200  $\mu\text{L}$  10% 甲醇和 200  $\mu\text{L}$  异丙醇对 96 孔板进行清洗。然后将 96 孔板在正压条件下干燥 30 s。使用 4 份 40  $\mu\text{L}$  含有 5% 甲酸的甲醇，将目标化合物由板洗脱到 200  $\mu\text{L}$  的 96 孔样品收集板中。40 $^{\circ}\text{C}$  氮气吹干后，用 80  $\mu\text{L}$  纯水溶解，混匀。取 30  $\mu\text{L}$  进样。

#### 1.3.3 加标回收样品前处理方法

取 225  $\mu\text{L}$  空白血浆样品于 1.5 mL 离心管中，加入 25  $\mu\text{L}$  一定浓度对照品混合溶液及 50  $\mu\text{L}$  内标混合溶液，涡旋 10 s 充分混匀；后按 1.3.2 方法进行前处理。

## 2 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图

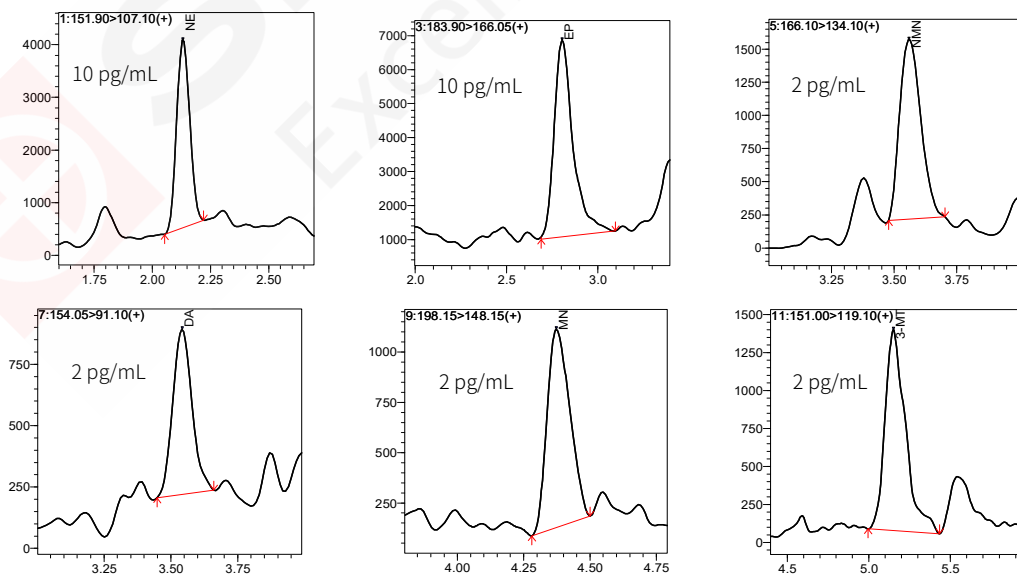


图 2. 检出限色谱图

## 2.2 线性关系

采用内标法建立标准曲线，结果如图 3 及表 3 所示。结果显示，3 种儿茶酚胺及其 3 种代谢物在线性浓度范围内线性相关性良好，相关系数均在 0.997 以上，准确度在 89.0~108.0%之间。

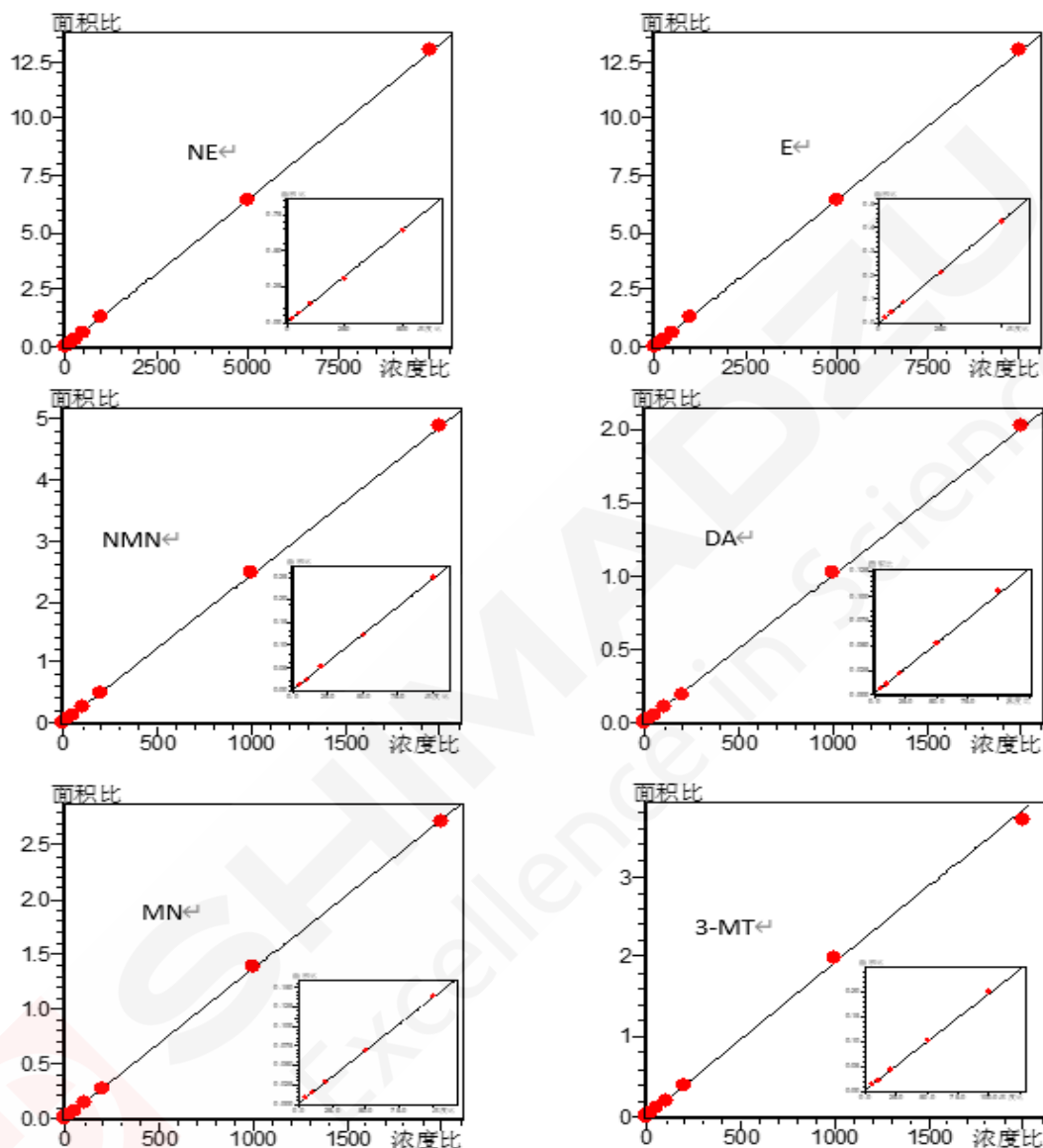


图 3. 标准曲线结果

表 3. 标准曲线参数

目标物	线性方程	线性范围 (pg/mL)	相关系数	准确度(%)
NE	$Y = (0.00129293)X + (-0.000326262)$	25~10000	0.9987	95.2~105.7
E	$Y = (0.000822777)X + (0.000817387)$	25~10000	0.9991	94.5~102.7
NMN	$Y = (0.00243273)X + (0.00169814)$	5~2000	0.9988	89.0~103.7
DA	$Y = (0.00100419)X + (0.00196735)$	5~2000	0.9989	91.6~103.5
MN	$Y = (0.00136455)X + (0.00148183)$	5~2000	0.9998	97.6~103.9
3-MT	$Y = (0.00182434)X + (0.00337147)$	5~2000	0.9972	91.6~108.0

## 2.3 精密度验证

取 10 pg/mL 标准品 (NE 及 E 浓度为 50 pg/mL)，直接进样，连续分析 5 次，峰面积结果如表 4 所示，结果显示，所测定 6 种物质峰面积精密度在 1.9%~4.4%之间，符合日常检测需求。

表 4. 峰面积精密度考察结果

编号	NE	E	NMN	DA	MN	3-MT
1	96325	305332	17170	20922	9365	11718
2	93033	306118	15276	22518	9762	11795
3	94183	296996	16885	20842	9899	11868
4	98031	292453	16507	22442	9026	10853
5	99690	302837	16666	21032	9135	12155
平均值	96252	300747	16501	21551	9437	11678
CV%	2.8	1.9	4.4	3.9	4.1	4.2

## 2.4 加标回收实验

按 1.2 中的分析条件和 1.3.3 中的前处理方法对低中高 3 种浓度加标样品进行分析，每个浓度加标回收样品重复 3 次，准确度结果如表 5 所示。从表中可见，6 种物质在低中高 3 种浓度下，回收率分别在 82.0%~114.0%之间，85.7%~106.3%之间，87.5%~105.6%之间。

表 5. 加标回收实验考察结果

名称	NE	E	NMN	DA	MN	3-MT
加标浓度(pg/mL)	50	50	10	10	10	10
测定浓度均值(pg/mL)	46.2	51.2	8.2	11.4	10	9.4
回收率均值 (%)	92.4	102.4	82.0	114.0	100.0	94.0
回收率 RSD(%)	9.5	3.8	3.8	6.0	4.2	4.1
加标浓度(pg/mL)	500	500	100	100	100	100
测定浓度均值(pg/mL)	428.6	507.3	101.8	106.3	94.9	96.7
回收率均值 (%)	85.7	101.5	101.8	106.3	94.9	96.7
回收率 RSD(%)	1.6	0.5	2.4	1.5	2.5	1.3
加标浓度(pg/mL)	5000	5000	1000	1000	1000	1000
测定浓度均值(pg/mL)	4374.0	4969.8	990.3	1055.9	978.1	979.8
回收率均值 (%)	87.5	99.4	99.0	105.6	97.8	98.0
回收率 RSD(%)	2.4	0.5	0.6	1.3	0.8	1.0

## 2.5 临床样品测定结果

取混合血浆样品，按 1.3 中的前处理方法及 1.2 中的分析条件进行测定，结果见图 4 及表 6 所示。

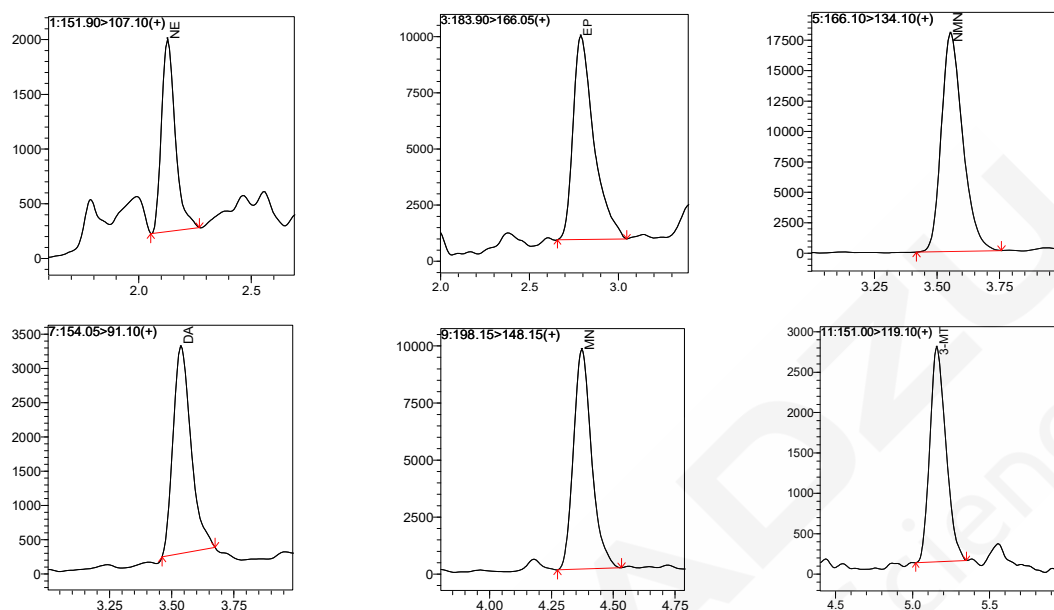


图 4. 血浆样品谱图

表 8. 人血清临床样品检测结果

名称	NE	E	NMN	DA	MN	3-MT
测定浓度(pg/mL)	27.2	26.4	76.1	11.2	37.6	8.6

## 3. 结论

使用岛津临床用超高效液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 建立了人体血浆中 3 种儿茶酚胺（肾上腺素、去甲肾上腺素和多巴胺）及其 3 种代谢物（变肾上腺素、去甲变肾上腺素和 3-甲氧酪胺）同时测定的方法。使用同位素内标、标准样品及加标样本进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性范围宽，标准曲线相关系数均大于 0.997，方法准确度及精密度均可满足临床日常检验需求。该方法操作简捷、特异性好、灵敏度高、分析速度快，可以为临床人血浆中儿茶酚胺类物质的检测提供很好的借鉴和参考。

## 2.3 LCMS-8050 CL 测定人血浆中 27 种激素含量

**摘要：** 本文使用岛津临床用超高效液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 建立了人血浆中 20 种内源性激素及 7 种外源性激素同时测定的方法。使用同位素内标、标准样品及基质加标样品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性范围宽，标准曲线相关系数均大于 0.994，方法准确度及精密度均可满足临床日常检验需求。该方法分析速度快，灵敏度高，专属性强，前处理简单，可为相关从业人员提供参考。

**关键词：** LCMS-8050 CL 27 种激素 血浆

类固醇激素又称甾体激素，是内分泌细胞分泌的高效能生物化学物质，在维持生命、调节机体物质代谢、促进性器官发育和维持生育等方面起着重要作用，其代谢过程见图1。临床上将类固醇激素水平作为较多疾病的诊断指标，包括先天性类固醇代谢紊乱和获得性类固醇代谢紊乱等，主要涉及到8个Panel，包括肥胖组合、肾上腺皮质功能减退组合、原发性醛固酮增多症组合、库欣综合征组合、肾上腺增生组合、男性性功能减退组合、多囊卵巢综合征组合及地塞米松抑制实验组合，且一种疾病常伴有多种类固醇激素异常，如先天性肾上腺皮质增生症 (Congenital adrenal hyperplasia, CAH) 筛查时需要同时检测17-羟孕酮 (17-OH-P)、雄烯二酮

(A4)、肾上腺皮质醇 (F)、11-脱氧皮质醇 (S) 和 21-脱氧皮质醇 (21-DOC) 等多种类固醇激素的水平。除此之外，外源性激素，如泼尼松、地塞米松、氟米龙、甲基泼尼松龙等在临床上作为抗炎类激素药物应用广泛，但这些药物的长期使用和过度使用会导致内分泌代谢紊乱的临床表现，患者可能呈现库欣综合征的临床特征。因此，临床上急需一种同时测定多种内源性激素及外源性激素的方法。

本实验使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪LCMS-8050 CL, 建立了人血浆中27种激素含量测定方法，该方法分析速度快，灵敏度高，专属性强，前处理简单，可为相关从业人员提供参考。

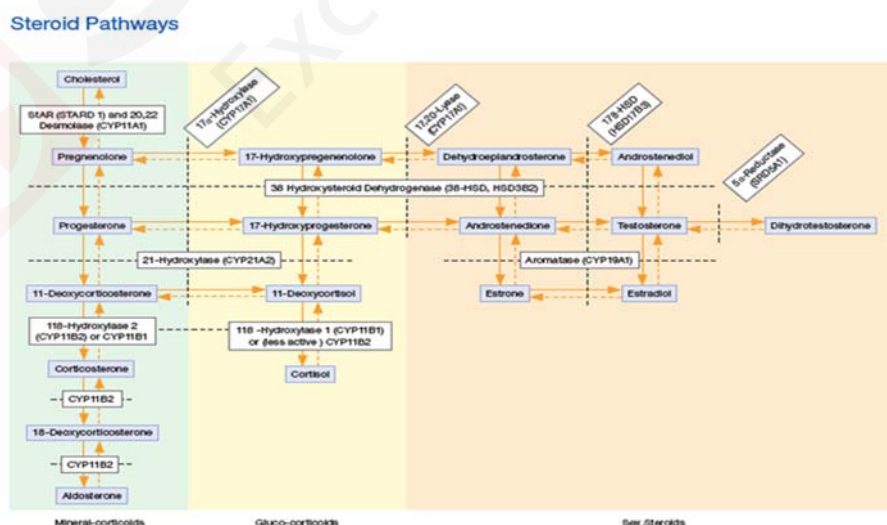


图 1. 类固醇激素代谢图径 (引自梅奥医学官网)

## 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 CL 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用系统。具体配置为 LC-30AD CL×2 (输液泵), DGU-20A<sub>5R</sub> CL (在线脱气机), SIL-30AC<sub>MP</sub> CL (自动进样器), CTO-30A CL (柱温箱), CBM-20A CL 系统控制器, LCMS-8050 CL 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

#### 液相色谱条件

色谱柱	: Shim-pack Velox SP-C18 (50 mm×2.1 mm I.D., 1.8 μm)
预柱	: Velox EXP Guard SP-C18 (5 mm×2.1 mm I.D., 1.8 μm)
流动相	: A 相-0.05 mM 氟化铵水溶液; B 相-甲醇
流速	: 0.4 mL/min
柱温	: 45°C
进样量	: 10 μL
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
2.00	泵	B.Conc	40
4.00	泵	B.Conc	50
6.00	泵	B.Conc	70
7.50	泵	B.Conc	95
8.50	泵	B.Conc	95
8.51	泵	B.Conc	40
10.00	控制器	Stop	

#### 质谱条件

分析仪器	: LCMS-8050 CL	DL 温度	: 150°C
离子源	: ESI (±)	加热模块温度	: 450°C
雾化气流速	: 3.0 L/min	干燥气流速	: 8.0 L/min
加热气流速	: 12.0 L/min	扫描模式	: 多反应监测(MRM)
接口温度	: 400°C	MRM 参数	: 见表 2

表 2. MRM 参数

编号	名称	英文简写	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q1 Pre Bias (V)
1	褪黑素	Melatonin	233.1	174.1	-17	-16	-30
2	醛固酮	ALD	361.2	315.15	-29	-19	-22
3	可的松	COR	361.15	163.15	-14	-24	-29

4	皮质醇	F	363.2	121.15	-14	-25	-23
5	21-脱氧皮质醇	21DOC	347.2	311.2	-13	-16	-21
6	皮质酮	CORT	347.2	121.1	-26	-23	-23
7	11-脱氧皮质醇	S	347.2	97.1	-14	-25	-19
8	雄烯二酮	A4	287.15	97.1	-21	-15	-18
9	11-脱氧皮质酮	DOC	331.2	109.05	-10	-26	-11
10	睾酮	T	289.2	109.1	-11	-25	-23
11	脱氢表雄酮	DHEA	271.2	253.2	-10	-12	-28
12	17 $\alpha$ -羟孕酮	17 $\alpha$ -OH-P	331.2	109.05	-13	-27	-19
13	双氢睾酮	DHT	291.2	255.2	-15	-16	-26
14	孕酮	P	315.2	109.1	-12	-25	-18
15	孕烯醇酮	Pregnenolone	299.2	159.2	-15	-23	-12
16	脱氢表雄酮硫酸酯	DHEAS	367.2	97	20	17	20
17	雌三醇	E3	287.15	145.1	10	42	13
18	雌二醇	E2	271.2	183.15	10	40	18
19	雌酮	E1	269.1	145.1	12	38	25
20	17-羟基孕烯醇酮	17-OH-PR	331.2	287.25	12	20	18
21	曲安西龙	Triamcinolone	395.2	375.15	-16	-10	-27
22	泼尼松	Prednisone	359.2	341.15	-29	-20	-24
23	氟氢可的松	Fludrocortisone	381.2	239.15	-28	-24	-26
24	泼尼松龙	Prednisolone	361.2	343.15	-17	-11	-23
25	地塞米松	Dexamethasone	393.2	355.2	-10	-13	-17
26	氟米龙	Fluorometholone	377.2	279.15	-18	-17	-19
27	甲基泼尼松龙	Methylprednisolone	375.2	357.2	-10	-11	-25
28	褪黑素-内标	Melatonin -IS	236.1	177.1	-17	-16	-30
29	醛固酮-内标	ALD-IS	368.2	350.2	-27	-17	-16
30	可的松-内标	COR-IS	368.15	169.1	-14	-24	-29
31	皮质醇-内标	F-IS	367.2	121.15	-14	-25	-23
32	地塞米松-内标	Dexamethasone-IS	398.2	378.2	-10	-10	-27
33	皮质酮-内标	CORT-IS	355.2	125.1	-26	-23	-23
34	11-脱氧皮质醇-内标	S-IS	352.2	100.1	-14	-25	-19
35	雄烯二酮-内标	A4-IS	290.2	100.1	-21	-15	-18
36	11-脱氧皮质酮-内标	DOC-IS	339.2	113.1	-10	-26	-11
37	脱氢表雄酮-内标	DHEA-IS	276.2	218.2	-20	-15	-22
38	17 $\alpha$ -羟孕酮-内标	17 $\alpha$ -OH-P-IS	334.2	112.1	-13	-27	-19
39	孕酮-内标	P-IS	318.2	112.1	-12	-25	-18
40	孕烯醇酮-内标	Pregnenolone-IS	303.2	159	-23	-21	-16
41	脱氢表雄酮硫酸钠-内标	DHEAS-IS	373.2	98	20	17	20
42	雌三醇-内标	E3-IS	290.2	173.15	21	36	17
43	雌二醇-内标	E2-IS	274.2	145.1	10	38	12

44	雌酮-内标	E1-IS	273.1	147.1	12	38	25
45	睾酮-内标	T-IS	292.2	112.1	-11	-25	-23

### 1.3 标准品及样品制备

标准溶液制备：取 27 种激素混标母液，用甲醇稀释成相应浓度混标中间液，再用纯水稀释成系列浓度的标准工作液。内标溶液使用甲醇配置成内标工作液。取 250  $\mu\text{L}$  标准工作液，加入 10  $\mu\text{L}$  内标溶液，涡旋混匀，加入 250  $\mu\text{L}$  甲醇，涡旋混匀，加入 250  $\mu\text{L}$  水，涡旋混匀。

样品溶液制备：取 250  $\mu\text{L}$  血浆样本，加入 10  $\mu\text{L}$  内标溶液，涡旋混匀，加入 250  $\mu\text{L}$  甲醇，涡旋混匀，加入 250  $\mu\text{L}$  水，涡旋混匀后，13000 rpm 高速离心 5 min。

标准品及样品净化：取标准品溶液及样品上清液 600  $\mu\text{L}$  至 HLB 型 96 孔固相萃取板中（固相萃取板使用前经 200  $\mu\text{L}$  乙腈及 200  $\mu\text{L}$  甲醇活化，再经 200  $\mu\text{L}$  纯化水平衡两次），下接废液收集板，弃去废液，使用 200  $\mu\text{L}$  5% 甲醇洗涤固相萃取板 2 次，弃去废液，再使用 200  $\mu\text{L}$  正己烷洗涤固相萃取板 1 次，弃去废液，将接收板改为全新 96 孔接收板，使用 50  $\mu\text{L}$  乙腈洗脱固相萃取板两次，将收集液氮气吹干，加 50  $\mu\text{L}$  初始流动相复溶，振摇混匀后上机测定。

## 2. 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图

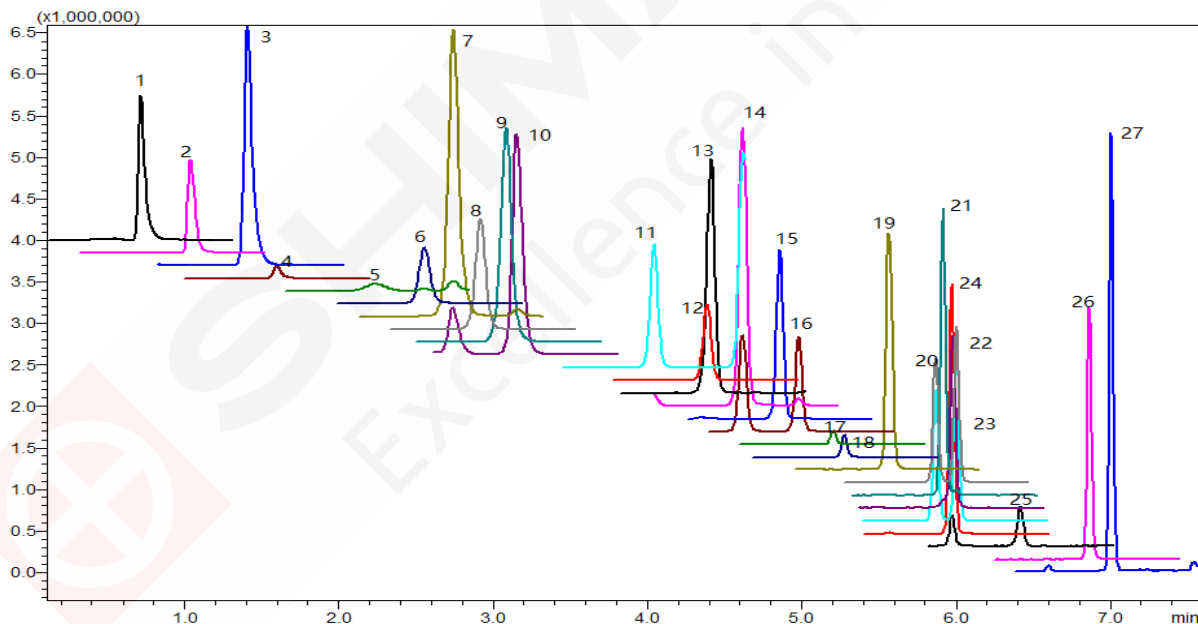


图 2. 标准品色谱图

( 1-Melatonin, 2-DHEAS, 3-Triamcinolone, 4-E3, 5-ALD, 6-Prednisolone, 7-COR, 8-Fludrocortisone, 9-F, 10-Prednisolone, 11-21DOC, 12-Dexamethasone, 13-Methylprednisolone, 14-CORT, 15-Fluorometholone, 16-S, 17-E2, 18-E1, 19-A4, 20-DOC, 21-17-OH-PR, 22-DHEA, 23-17 $\alpha$ -OH-P, 24-T, 25-DHT, 26-P, 27-Pregnenolone )

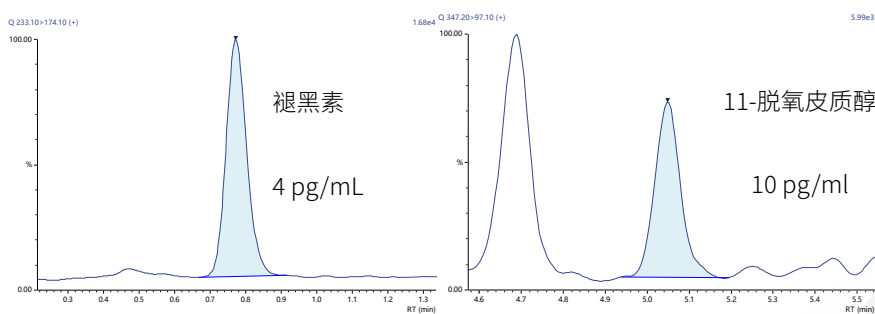


图 3. 类固醇激素典型谱图

## 2.2 线性测定结果

对标准品按 1.2 中分析条件进行分析，内标法制作标准曲线。标准曲线结果见表 3，27 种激素在标准曲线浓度范围内线性相关系数均大于 0.994，准确度在 87.3%~114.1%之间，满足测定需求。

表 3. 标准曲线结果

编号	名称	线性方程	线性范围 (ng/mL)	相关系数	准确度(%)
1	Melatonin	$Y = (24.6346)X + (-0.000927508)$	0.0004~4	0.9974	90.5~108.2
2	ALD	$Y = (2.89603)X + (0.0100745)$	0.006~6	0.9973	94.0~106.2
3	COR	$Y = (0.474865)X + (0.00159505)$	0.02~200	0.9969	89.5~112.8
4	F	$Y = (0.0367086)X + (0.000154501)$	0.1~200	0.9971	88.3~108.0
5	21DOC	$Y = (7.97450)X + (-0.00880704)$	0.004~10	0.9953	87.3~113.2
6	CORT	$Y = (8.84417)X + (0.00369258)$	0.006~60	0.9976	89.8~111.8
7	S	$Y = (1.01268)X + (0.00314685)$	0.005~10	0.9957	89.0~110.8
8	A4	$Y = (0.363220)X + (0.00104317)$	0.008~16	0.9987	92.3~109.2
9	DOC	$Y = (17.0724)X + (0.0342154)$	0.005~10	0.9974	92.6~106.3
10	T	$Y = (1.85069)X + (2.49286e-005)$	0.004~20	0.9984	91.6~110.3
11	DHEA	$Y = (0.219019)X + (0.00341440)$	0.12~60	0.9988	93.7~109.0
12	17a-OH-P	$Y = (1.41590)X + (0.00165019)$	0.01~50	0.9990	92.4~105.6
13	DHT	$Y = (3.37220)X + (0.0582751)$	0.008~4	0.9958	91.7~110.3
14	P	$Y = (0.670008)X + (0.000460979)$	0.003~30	0.9991	93.0~106.9
15	Pregnenolone	$Y = (1.04419)X + (0.00210575)$	0.05~100	0.9987	93.5~108.9
16	DHEAS	$Y = (0.594097)X + (0.156454)$	2~1000	0.9992	94.3~106.5
17	E3	$Y = (4.57957)X + (-0.0281651)$	0.02~4	0.9950	88.5~112.2
18	E2	$Y = (0.434300)X + (0.00141817)$	0.02~40	0.9975	92.0~111.2
19	E1	$Y = (0.249536)X + (0.00525737)$	0.03~30	0.9988	94.2~107.1
20	17-OH-PR	$Y = (0.723912)X + (0.0715243)$	0.1~200	0.9948	89.2~113.3
21	Triamcinolone	$Y = (0.992006)X + (0.0254733)$	0.1~100	0.9965	89.9~113.5
22	Prednisone	$Y = (1.22615)X + (0.00532629)$	0.1~100	0.9969	87.9~105.5

23	Fludrocortisone	$Y = (2.26075)X + (-0.0277486)$	0.1~100	0.9972	87.9~111.9
24	Prednisolone	$Y = (0.0323217)X + (0.00105096)$	0.1~100	0.9963	98.8~114.1
25	Dexamethasone	$Y = (0.0062866)X + (0.000193387)$	0.1~100	0.9950	85.9~114.0
26	Fluorometholone	$Y = (1.77818)X + (-0.0352560)$	0.1~100	0.9992	95.0~105.5
27	Methylprednisolone	$Y = (0.0298736)X + (0.00111742)$	0.1~100	0.9945	87.3~113.0

### 2.3 精密度测定结果

取混合对照品溶液，连续进样 6 针，考察仪器精密度，具体测定浓度及峰面积精密度见表 4，结果显示，27 种激素在测定浓度下峰面积精密度在 1.1%~8.9%之间，LCMS-8050 CL 测定 27 种激素精密度良好。

表 4. 精密度实验结果 (n=6, ng/mL)

名称	测定浓度	RSD%	名称	测定浓度	RSD%
Melatonin	0.04	1.1	Pregnenolone	1	2.4
ALD	0.06	4.9	DHEAS	10	1.2
COR	2	1.8	E3	0.04	7.5
F	10	2.4	E2	0.4	7.3
21DOC	0.2	2.8	E1	0.3	8.9
CORT	0.6	1.7	17-OH-PR	2	3.5
S	0.1	3.7	Triamcinolone	3	3.6
A4	0.16	3.0	Prednisone	1	4.0
DOC	0.1	3.0	Fludrocortisone	1	2.9
T	0.2	1.2	Prednisolone	1	1.9
DHEA	0.6	6.1	Dexamethasone	1	1.8
17a-OH-P	0.5	2.1	Fluorometholone	1	1.8
DHT	0.04	8.7	Methylprednisolone	1	3.6
P	0.3	1.3			

### 2.4 准确度测定结果

按 1.3 中的前处理方法对空白血浆添加低高浓度标准品作为低高浓度质控品，按 1.2 中的分析条件对质控品进行分析，每个样品平行制备 3 份，质控品的准确度结果如表 5 所示，结果显示质控品测定准确度结果与理论值接近，均在 81.2%~116.6%之间，满足临床测定需求。样品平行制备 3 份进样分析，测定结果 RSD 在 0.5%~9.5%之间，满足临床测定需求。

表 5. 质控准确度考察结果(n=3)

名称	LQC			HQC		
	添加浓度(ng/mL)	回收率(%)	RSD(%)	添加浓度(ng/mL)	回收率(%)	RSD(%)
Melatonin	0.06	94.8	4.1	0.60	84.3	6.9
ALD	0.09	98.2	5.9	0.90	92.0	5.9
COR	3.0	98.3	1.8	30.0	81.3	3.6
F	15.0	100.2	2.9	150.0	84.9	4.4
21DOC	0.30	100.8	0.6	3.00	99.3	8.0

CORT	0.9	96.6	1.6	9.0	90.4	7.0
S	0.15	104.1	2.3	1.50	82.4	2.0
A4	0.24	93.3	3.9	2.40	81.7	4.1
DOC	0.15	107.1	7.7	1.50	97.6	1.6
T	0.3	93.8	6.2	3.0	83.8	4.3
DHEA	0.9	97.6	7.0	9.0	85.6	4.2
17a-OH-P	0.75	97.0	3.4	7.50	84.9	3.1
DHT	0.06	87.7	1.4	0.60	85.9	3.2
P	0.45	91.3	3.9	4.5	82.9	3.3
Pregnenolone	1.50	109.0	4.4	15.05	94.1	2.2
DHEAS	15.00	96.3	3.1	150.00	94.3	2.2
E3	0.06	87.2	4.1	0.60	82.8	3.9
E2	0.60	92.0	3.3	6.00	82.7	3.8
E1	0.45	99.1	9.5	4.50	84.1	3.2
17-OH-PR	3.00	95.1	2.2	30.00	92.4	2.7
Triamcinolone	4.50	98.0	5.1	45.00	83.5	3.5
Prednisone	1.50	93.9	8.7	15.00	85.8	5.7
Fludrocortisone	1.50	99.7	4.1	15.00	83.5	5.0
Prednisolone	1.50	108.6	4.1	15.00	81.2	3.7
Dexamethasone	1.50	110.7	3.1	15.00	86.1	6.0
Fluorometholone	1.50	112.7	0.5	15.00	97.6	5.5
Methylprednisolone	1.50	116.6	4.3	15.00	86.3	4.8

## 2.5 临床样品测定结果

取 6 批次血浆样品，按 1.3 中的前处理方法及 1.2 中的分析条件进行测定，结果见图 4 和表 6，该方法可满足临床检验需求。

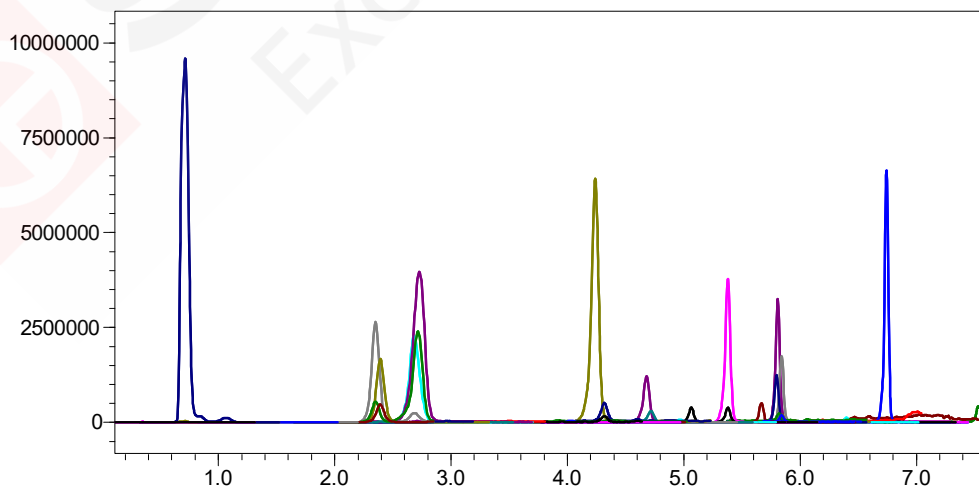


图 4. sample1 色谱图

表 6. 临床样品测定结果 (ng/mL)

Name	sample1	sample2	sample3	sample4	Sample5	Sample6
Melatonin	0.010	0.003	0.001	0.006	0.007	0.019
ALD	0.13	0.23	0.06	0.50	0.18	0.06
COR	23.7	13.7	12.3	25.3	23.2	17.8
F	83.5	42.3	29.2	93.1	40.8	78.2
21DOC	0.03	0.04	0.02	0.04	0.02	0.01
CORT	1.5	1.0	0.4	1.4	0.6	1.7
S	0.15	0.08	0.04	0.50	0.21	0.08
A4	1.24	0.93	0.69	2.40	0.11	0.49
DOC	0.01	0.02	0.02	0.07	0.03	0.03
T	0.32	0.18	0.17	0.61	0.03	0.44
DHEA	4.7	2.3	3.4	2.9	0.4	3.1
17a-OH-P	0.46	0.53	1.24	2.24	0.18	1.50
DHT	0.09	0.09	0.04	0.11	0.01	0.14
P	0.06	1.25	7.25	8.18	0.06	6.84
Pregnenolone	0.54	0.28	0.56	0.52	0.09	0.38
DHEAS	876	353	637	311	44	959
E3	0.01	0.01	0.01	0.02	N.D.	0.01
E2	0.02	0.05	0.08	0.49	N.D.	0.13
E1	0.21	0.10	0.19	0.90	0.02	0.26
17-OH-PR	1.7	0.7	1.4	1.1	0.4	1.6
Triamcinolone	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Prednisone	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Fludrocortisone	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Prednisolone	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Dexamethasone	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Fluorometholone	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Methylprednisolone	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

### 3. 结论

使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 建立了人血浆中 27 种激素同时测定的方法。使用同位素内标、标准样品及基质加标样品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性范围宽，标准曲线相关系数均大于 0.994，方法准确度及精密度均可满足临床日常检验需求。该方法可以为临床人血浆中内源性激素及外源性激素同时检测提供很好的借鉴和参考。

## 2.4 LCMS-8050 CL 同时测定血清中血管紧张素 I、II

**摘要：** 本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 建立了人血清中血管紧张素 I、II 同时分析的方法。该方法采用内标法定量，线性相关系数在 0.998 以上；人血清样品中添加两个不同浓度的标准溶液，加标回收率在 99.2~107.5%之间，平行处理三次的相对标准偏差在 0.33~8.45%之间，方法准确可靠，可用于实际样品的检测。

**关键词：** LCMS-8050 CL 三重四极杆液质联用系统 血清 血管紧张素

肾素-血管紧张素系统 (RAS) 是人体调节血压的重要的内分泌系统,由一系列激素及相应的酶所组成,在调节水、电解质平衡以及血容量、血管张力和血压方面具有重要作用。肾素是由肾脏近球体分泌分子量为40000的一种羧基蛋白水解酶,它作用于血管紧张素原产生血管紧张素I (Ang I),血管紧张素I本身无生理活性,在血管紧张素转换酶的作用下水解为有活性的血管紧张素 II (Ang II),血管紧张素 II 可引起小动脉血管收缩,促进肾上腺皮质合成和分泌醛固酮。

血浆肾素活性 (PRA) 和Ang II的检测已成为肾性高血压、内分泌型高血压的诊断所必需,也是高肾素低血容量型高血压、低肾素高血容量型高血压、正

常肾素正常血容量型高血压分类的依据。血浆肾素活性 (PRA) 的测定多以血管紧张素I的产生速率来间接反映,血管紧张素II可直接测定。目前检测血管紧张素I、II的方法大多采用免疫法或者采用高效液相色谱法与酶联免疫相结合,但此类方法制备抗体复杂,特异性较差。液相色谱串联质谱法具有比较高的灵敏度及特异性,样品前处理简单,检测结果更加准确可靠。

本文采用岛津临床用三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 CL,建立了人血清中血管紧张素I、II同时分析的方法,该方法灵敏度高、分析速度快,供相关人员参考。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器

岛津 LCMS-8050 CL 三重四极杆液质联用系统。具体配置为 LC-30AD CL×2 输液泵, DGU-20A<sub>5</sub> CL 在线脱气机, SIL-30ACMP CL 自动进样器, CTO-30A CL 柱温箱, CBM-20A CL 系统控制器, LCMS-8050 CL 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

#### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱 : Shim-pack Scepter C18-120 (100 mm×2.1 mm I.D., 3 μm, Shimadzu SGLC  
P/N: 227-31014-05)

流 动 相 : A 相-0.5%乙酸水; B 相-乙腈

流 速 : 0.4 mL/min

柱 温 : 40°C

进 样 量 : 20 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
0.05	泵	B.Conc	10
2.00	泵	B.Conc	30
3.00	泵	B.Conc	98
5.00	泵	B.Conc	98
5.01	泵	B.Conc	10
7.00	控制器	Stop	

#### 质谱条件

离子源：ESI (+)	接口电压：1.0 kV
雾化气流速：3 L/min	加热模块温度：400°C
D L 温度：200°C	扫描模式：多反应监测(MRM)
接口温度：300°C	干燥气流速：10.0 L/min
M R M 参数：见表 2	加热气流量：10.0 L/min

表 2. MRM 参数

中文名	简写	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
血管紧张素 I	Ang I	432.9	110.1*	-10	-29	-12
			647.3	-23	-18	-36
血管紧张素 I-内标	Ang I-IS	435.1	110.1*	-10	-29	-12
			654.3	-16	-19	-34
血管紧张素 II	Ang II	523.8	263.2*	-28	-22	-28
			784.3	-26	-20	-22
血管紧张素 II-内标	Ang II-IS	527.3	791.3*	-26	-21	-24
			263.2	-28	-22	-13

注：\*表示定量离子

### 1.3 标准曲线的配置

称取 1.0 g BSA 溶于 50 mL PBS，配制 2% BSA 溶液作为血清的替代基质溶液，用于配制标准工作曲线。取血管紧张素 I、II 标准贮备液，用 2% BSA 溶液做溶剂逐级稀释为 20、40、80、200、500、1250 pg/mL 的标准系列工作溶液。

### 1.4 样品前处理方法

血清样品预处理：取血清样品，按每1 mL血清样品加入10 μL 8-羟基喹啉（0.32 mol/L），涡旋混匀静置 30 min。

取150 μL标准样品或预处理后的血清样品，加入50 μL内标工作液（1 ng/mL），再加入450 μL1%氨水，涡旋混匀；取600 μL上述处理后的溶液至已活化好的MAX型96孔固相萃取板中（固相萃取板经150 μL乙腈活化后再经150 μL1%氨水平衡）；使用正压装置将液体全部压下，下接废液收集板，弃去废液；使用

100  $\mu$ L 含 1% 氨水的 10% 乙腈溶液洗涤固相萃取板 2 次并压干；换用全新低吸附 96 孔接收板，使用 45  $\mu$ L 含 1% 甲酸的 10% 乙腈溶液洗脱固相萃取板 2 次，将洗脱液转至低吸附进样小瓶中，上机分析。

## 2. 结果与讨论

### 2.1 标准曲线最低点 MRM 色谱图

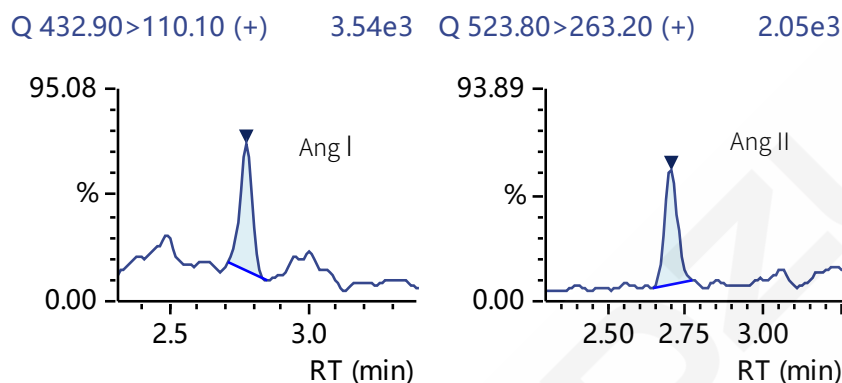


图 1. 标准曲线最低点 (20 pg/mL) MRM 色谱图

### 2.2 线性范围

按照 1.3 配制标准系列工作溶液，参考 1.4 的前处理流程，处理后直接上机分析，以内标法绘制标准曲线，标准曲线如图 2，曲线结果如下表 3 所示，所得校准曲线线性关系良好，线性相关系数在 0.998 以上，准确度在 96.1%-105.5% 之间。

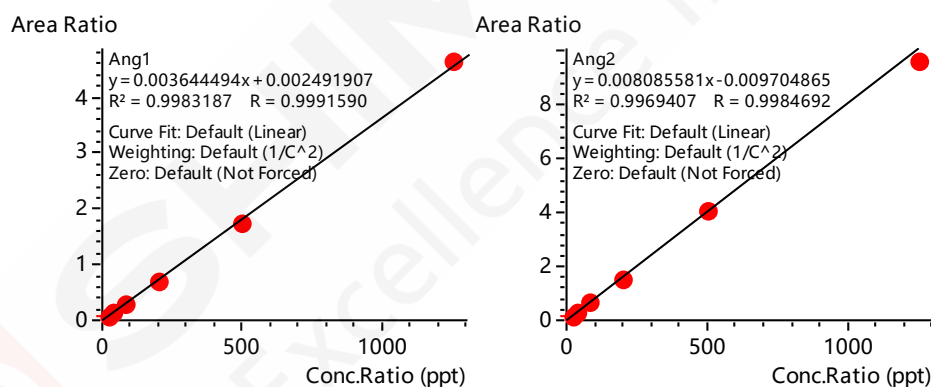


图 2. 血管紧张素 I、II 标准曲线

表 3. 标准曲线结果

化合物	线性方程	线性范围 (pg/mL)	相关系数	准确度 (%)
Ang I	$Y = (0.003644494)X + (0.002491907)$	20-1250	0.999	96.1-105.5
Ang II	$Y = (0.008085581)X - (0.009704865)$	20-1250	0.998	97.2-103.8

### 2.3 重复性考察

用含 1% 甲酸的 10% 乙腈溶液配制 40 pg/mL 混合标准溶液，连续进样 6 次，考察保留时间和峰面积的重复性，结果如下表 4 所示。保留时间和峰面积的相对标准偏差(RSD%)分别小于 0.28% 和 6.41%，仪器精密度高。

表 4. 重复性测试 (n=6)

化合物	40 pg/mL	
	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
Ang I	0.22	5.11
Ang II	0.28	6.41

## 2.4 加标回收实验

人血清样品中添加两个不同浓度的标准溶液，每个浓度的加标样品平行处理三份，结果如表 5 所示，两个不同浓度加标回收率在 99.2~107.5%之间，平行处理三次的相对标准偏差在 0.33~8.45%之间，方法准确可靠。

表 5. 加标回收实验结果 (n=3)

化合物	加标浓度 (pg/mL)	回收率%	重复性 RSD%	加标浓度 (pg/mL)	回收率%	重复性 RSD%
Ang I	80	107.5	8.45	400	102.5	0.33
Ang II	80	99.2	4.41	400	106.5	0.89

## 3. 结论

本实验建立了一种使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 同时测定人血清中血管紧张素 I、II 的方法。采用内标法定量，灵敏度高、分析速度快，前处理采用 MAX 型 96 孔固相萃取板，操作简单；人血清样品中两个不同浓度的加标回收率在 99.2~107.5%之间，平行处理三次的相对标准偏差在 0.33~8.45%之间，方法准确可靠，可用于临床及科研工作中血管紧张素 I 和 II 浓度的检测，供相关从业人员参考。

## 2.5 LCMS-8050 CL 检测人血清中游离脂肪酸含量

**摘要:** 本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 及游离脂肪酸检测试剂盒(高效液相色谱-串联质谱法), 建立了人血清中 11 种游离脂肪酸同时测定的方法。使用试剂盒的内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法专属性良好, 标准曲线相关系数均大于 0.994, 准确度及精密度均满足试剂盒要求。该方法分析速度快, 灵敏度高, 专属性强, 供相关人员参考。

**关键词:** LCMS-8050 CL 游离脂肪酸 血清

存在于人体内的脂质, 大致可以分为胆固醇、中性脂肪、磷脂质、游离脂肪酸等4种。游离脂肪酸是中性脂肪分解成的物质。当肌肉活动所需能源肝糖耗尽时, 脂肪组织会分解中性脂肪成为游离脂肪酸来充当能源使用。所以, 游离脂肪酸是进行持久活动所需的物质。

正常的游离脂肪酸水平对人体健康至关重要, 不同的游离脂肪酸在不同的生理和病理状态下发挥着不同作用。流行病学研究表明, 游离脂肪酸与胰岛素抵抗、心血管疾病、2型糖尿病、高血压、肥胖等慢性病以及乳腺癌、结肠癌等疾病的发生具有一定关联性。在某些病理条件下, 如糖尿病、甲状腺功能亢进、心肌梗死、糖供给或利用障碍时,

体内游离脂肪酸增加, 而在甲状腺功能低下、慢性肾上腺皮质功能减退症时体内游离脂肪酸下降。血清中游离脂肪酸的组成及其水平是人体摄入脂肪酸和代谢的重要指标, 其异常是很多疾病最早出现的状态, 进行游离脂肪酸的测定有助于健康状况评价。但游离脂肪酸血清中含量很少, 如用小量血清标本测定必须采用灵敏的方法, 并要避免脂肪水解产生的脂肪酸的干扰。

本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪LCMS-8050 CL及游离脂肪酸检测试剂盒(高效液相色谱-串联质谱法), 建立了人血清中游离脂肪酸含量测定方法, 该方法分析速度快, 灵敏度高, 专属性强, 供相关人员参考。

表 1. 脂肪酸样品信息

编号	名称	英文简写
1	十六碳一烯酸	C16-1
2	十八碳一烯酸	C18-1
3	十八碳二烯酸	C18-2
4	$\alpha$ -十八碳三烯酸	$\alpha$ -C18-3
5	$\gamma$ -十八碳三烯酸	$\gamma$ -C18-3
6	二十碳一烯酸	C20-1
7	二十碳四烯酸	C20-4
8	二十碳五烯酸	C20-5
9	二十二碳六烯酸	C22-6
10	OMEGA 3-二十二碳五烯酸	OMEGA3-C22-5
11	OMEGA 6-二十二碳五烯酸	OMEGA6-C22-5

## 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 CL 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用系统。具体配置为 LC-30AD CL×2 (输液泵), DGU-20A5R CL (在线脱气机), SIL-30ACMP CL (自动进样器), CTO-30A CL (柱温箱), CBM-20A CL 系统控制器, LCMS-8050 CL 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

#### 液相色谱条件

色谱柱	: 脂肪酸专用色谱柱 (试剂盒提供)
流动相	: 流动相 A 流动相 B (试剂盒提供)
流速	: 0.4 mL/min
柱温	: 40°C
进样量	: 2 $\mu$ L
洗脱方式	: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 70%, 时间程序见表 2。

表 2. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
8.00	Pumps	Pump B Conc.	100
10.00	Pumps	Pump B Conc.	100
10.10	Pumps	Pump B Conc.	70
12.00	Controller	Stop	

#### 质谱条件

分析仪器	: LCMS-8050 CL	DL 温度	: 250°C
离子源	: ESI (+)	加热模块温度	: 400°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	: 300°C	MRM 参数	: 见表 3

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)	内标组
C16-1	345.40	92.05	-12	-33	-14	3
C18-1	373.30	92.15	-13	-20	-13	1
C18-2	371.15	92.15	-13	-20	-15	2
$\alpha$ -C18-3	369.10	92.05	-13	-36	-14	3
$\gamma$ -C18-3	369.15	92.15	-13	-39	-13	1
C20-1	401.40	92.05	-14	-39	-14	4
C20-4	395.40	92.10	-27	-39	-30	3

C20-5	393.25	92.10	-14	-37	-30	4
C22-6	419.10	92.10	-15	-45	-14	5
OMEGA3-C22-5	421.35	92.00	-15	-44	-14	5
OMEGA6-C22-5	421.20	92.15	-15	-42	-14	4
C18-1-13C18_IS	391.30	92.15	-13	-37	-13	1
C18-2-13C18_IS	389.15	92.15	-13	-39	-15	2
C18-3-13C18_IS	387.15	92.05	-13	-39	-13	3
C20-5-d5_IS	398.25	92.15	-14	-37	-30	4
C22-6-d5_IS	424.10	92.05	-15	-45	-14	5

### 1.3 标准品、质控品及样品制备

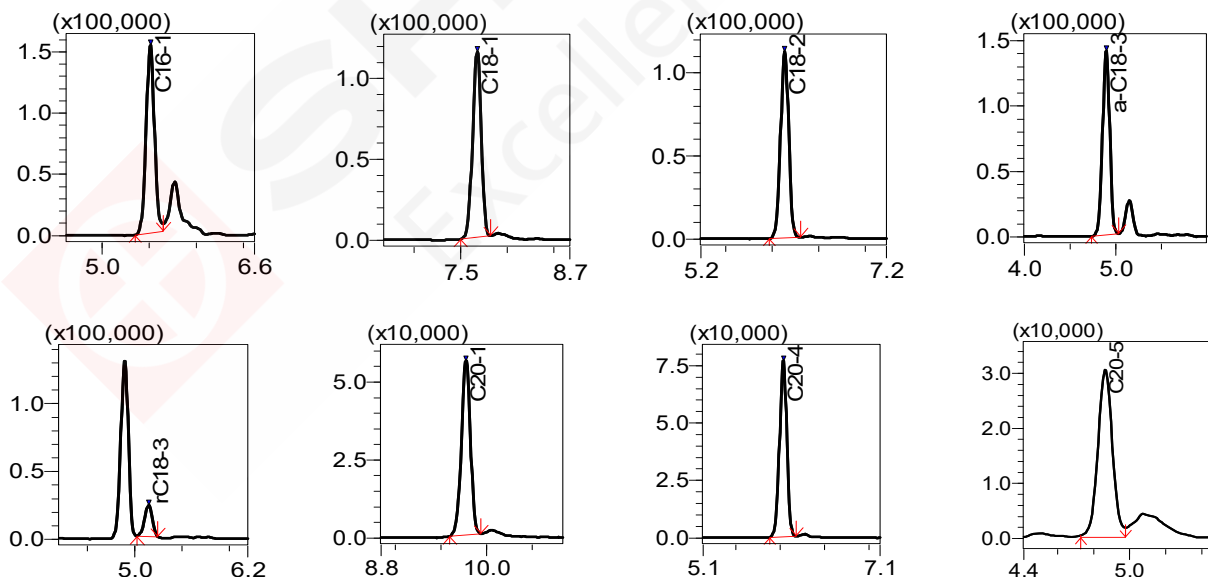
标准品和质控品前处理步骤:

血清样品前处理前使用样品稀释剂（试剂盒提供）1: 1.5 稀释混匀。

分别取标准品、质控品、稀释后血清样品各 100  $\mu$ L 于 EP 管中，加入内标提取液 50  $\mu$ L，涡旋混匀（2000 rpm，0.5 min）；加入 600  $\mu$ L 脂肪酸提取液（试剂盒提供），涡旋混匀（2000 rpm，5 min）；离心（13000 rpm，5 min）；取上清液 400  $\mu$ L 于 96 孔板管中，37 $^{\circ}$ C 氮气吹干；加入游离脂肪酸转化液 1（试剂盒提供）200  $\mu$ L，室温 500 rpm 震荡衍生 30 min，37 $^{\circ}$ C 氮气吹干；加入游离脂肪酸转化液 2（试剂盒提供）200  $\mu$ L，室温 500 rpm 震荡衍生 5 min，37 $^{\circ}$ C 氮气吹干；加入复溶液（试剂盒提供）500  $\mu$ L，500 rpm 混匀 5 min，前处理完毕。

## 2. 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图



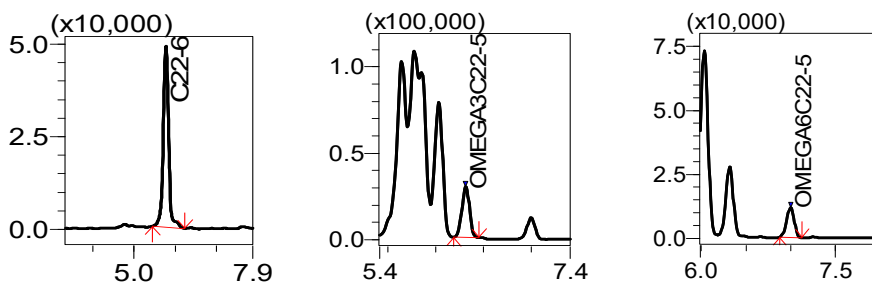


图 1. 标准曲线最低浓度点色谱图

## 2.2 线性关系

采用内标法建立标准曲线结果如表 4 所示。结果显示，11 种游离脂肪酸在线性浓度范围内线性相关性良好，相关系数均在 0.994 以上。

表 4. 标准曲线结果

目标物	线性方程	线性范围( $\mu\text{mol/L}$ )	相关系数	准确度(%)
C16-1	$Y = (0.859426)X + (0.0255367)$	0.4~40	0.9998	98.1~101.7
C18-1	$Y = (0.0193842)X + (0.00985065)$	5~500	0.9998	99.4~101.8
C18-2	$Y = (0.00284473)X + (0.000283386)$	3~300	0.9994	96.9~103.4
$\alpha$ -C18-3	$Y = (0.555401)X + (0.0230878)$	0.5~50	0.9999	98.5~101.7
$\gamma$ -C18-3	$Y = (0.268358)X + (-0.00837828)$	0.1~10	0.9945	89.6~109.4
C20-1	$Y = (0.526170)X + (0.00340874)$	0.1~10	0.9998	98.0~101.8
C20-4	$Y = (0.409893)X + (0.00662861)$	0.4~40	0.9994	97.0~103.3
C20-5	$Y = (0.223178)X + (0.000541717)$	0.1~10	0.9983	94.8~105.8
C22-6	$Y = (0.0811023)X + (0.00187642)$	0.4~40	0.9989	95.8~104.6
OMEGA3-C22-5	$Y = (0.142727)X + (-0.00141417)$	0.1~10	0.9999	99.4~100.7
OMEGA6-C22-5	$Y = (0.207648)X + (-0.000381269)$	0.05~5	0.9996	97.4~102.8

## 2.3 质控样本准确度及精密度考察

按 1.3 中的前处理方法和 1.2 中的分析条件对试剂盒中的高低质控品进行分析，每个样品平行处理分析 6 次，质控品的准确度结果如表 5 及表 6 所示，结果显示质控品测定结果与理论值接近，完全符合试剂盒质控品准确度 70%~130% 的要求。低浓度质控品 11 种游离脂肪酸测定结果准确度在 84.2%~118.5% 之间，高浓度质控品 11 种游离脂肪酸测定结果准确度在 98.6%~107.7% 之间。低浓度质控品 11 种游离脂肪酸测定结果（平行处理 6 份）RSD 在 0.9%~7.3% 之间，高浓度质控品 11 种游离脂肪酸测定结果（平行处理 6 份）RSD 在 1.0%~4.8% 之间。

表 5. 低浓度质控品准确度及精密度考察结果(n=6)

名称	浓度平均值 ( $\mu\text{mol/L}$ )	浓度理论值 ( $\mu\text{mol/L}$ )	平均准 确度(%)	RSD(%)
C16-1	2.1	2.2	95.5	6.2
C18-1	27.6	28.1	98.2	4.8
C18-2	16.5	16.6	99.4	5.3
$\alpha$ -C18-3	2.7	2.8	96.4	4.7
$\gamma$ -C18-3	0.47	0.52	90.4	3.6
C20-1	0.54	0.52	103.8	4.0
C20-4	2.2	2.2	100.0	5.8
C20-5	0.55	0.52	105.8	1.4
C22-6	2.2	2.2	100.0	4.5
OMEGA3-C22-5	0.55	0.52	105.8	3.9
OMEGA6-C22-5	0.27	0.27	100.0	4.1

表 6. 高浓度质控品准确度及精密度考察结果(n=6)

名称	浓度平均值 ( $\mu\text{mol/L}$ )	浓度理论值 ( $\mu\text{mol/L}$ )	平均准 确度(%)	RSD(%)
C16-1	22.2	22	100.9	1.5
C18-1	279.7	280	99.9	2.6
C18-2	166.2	166.5	99.8	0.6
$\alpha$ -C18-3	28.2	28.1	100.4	1.4
$\gamma$ -C18-3	5.5	5.2	105.8	2.3
C20-1	5.5	5.2	105.8	4.2
C20-4	22.1	22.0	100.5	2.9
C20-5	5.6	5.2	107.7	2.5
C22-6	21.7	22.0	98.6	1.4
OMEGA3-C22-5	5.6	5.2	107.7	2.0
OMEGA6-C22-5	2.8	2.7	103.7	3.8

## 2.4 临床样品测定结果

取混合血清，按 1.3 中前处理方法及 1.2 中的分析条件进行测定，结果见表 7。

表 7. 人血清临床样品检测结果

编号	氨基酸	浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )
1	C16-1	0.9
2	C18-1	11.8
3	C18-2	7.1
4	$\alpha$ -C18-3	1.1
5	$\gamma$ -C18-3	0.2
6	C20-1	0.2

7	C20-4	0.9
8	C20-5	0.2
9	C22-6	1.0
10	OMEGA3-C22-5	0.2
11	OMEGA6-C22-5	0.1

---

### 3. 结论

本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 及游离脂肪酸检测试剂盒（液相色谱-串联质谱法），建立了人血清中 11 种游离脂肪酸同时测定的方法。使用试剂盒的内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性良好，标准曲线相关系数均大于 0.994，准确度及精密度均满足试剂盒要求。该方法分析速度快，灵敏度高，专属性强，供相关人员参考。

## 2.6 液相色谱三重四极杆质谱法测定人血清中游离氨基酸含量

**摘要：**本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 CL 及氨基酸检测试剂盒(高效液相色谱-串联质谱法)，建立了人血清中 20 种游离氨基酸同时测定的方法。使用试剂盒的内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法专属性良好，标准曲线相关系数均大于 0.996，准确度及精密度均满足试剂盒要求。该方法对氨基酸代谢紊乱相关疾病的临床判断、治疗管理和生理评估具有辅助诊断的意义。

**关键词：**LCMS-8040 CL 游离氨基酸 血清

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意义。血清中氨基酸的浓度取决于内源性蛋白质的释放与各组织利用之间的动态平衡。当这种动态平衡被打破时，就会出现氨基酸浓度的改变，表现为氨基酸代谢紊乱，研究发现血清中氨基酸水平可作为多种疾病的监控指标。目前，文献报道血清中游离氨基酸含量的检测方法大多需要衍生化，而采用非衍生化

方法测定人体内的游离氨基酸，由于受到氨基酸色谱不保留及血清复杂基质等因素影响，报道较少。

本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 CL 及氨基酸检测试剂盒 (高效液相色谱-串联质谱法，北京华大吉比爱生物技术有限公司)，建立了人血清中游离氨基酸含量测定方法，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，供相关人员参考。

### 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与三重四极杆质谱仪联用系统。

具体配置为 LC-20AD<sub>XR</sub> CL×2 (输液泵)，DGL-20A<sub>5R</sub> CL (在线脱气机)，SIL-20AC<sub>XR</sub> CL (自动进样器)，CTO-20AC<sub>XR</sub> CL (柱温箱)，CBM-20A CL 系统控制器，LCMS-8040 CL 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。

#### 1.2 分析条件

液相色谱条件

- 色 谱 柱 : 氨基酸专用色谱柱 (试剂盒提供)
- 流 动 相 : 流动相 A 流动相 B (试剂盒提供)
- 流 速 : 0.4 mL/min
- 柱 温 : 40°C
- 进 样 量 : 10 μL
- 洗脱方式 : 梯度洗脱，B 相初始浓度为 2%，时间程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	2
1.50	Pumps	Pump B Conc.	10
3.50	Pumps	Pump B Conc.	35
3.51	Pumps	Pump B Conc.	95
5.50	Pumps	Pump B Conc.	95
5.51	Pumps	Pump B Conc.	2
9.00	Controller	Stop	

## 质谱条件

分析仪器 : LCMS-8040 CL      DL 温度 : 250°C  
 离子源 : ESI (+)      加热模块温度 : 400°C  
 雾化气流速 : 3.0 L/min      扫描模式 : 多反应监测(MRM)  
 干燥气流速 : 15.0 L/min      MRM 参数 : 见表 2

表 2. MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
Ala	90.0	44.0	-11	-13	-17
Ala-IS	94.1	48.0	-11	-13	-17
Arg	175.1	70.1	-23	-24	-20
Arg-IS	180.0	75.0	-23	-24	-20
Asn	133.1	74.0	-13	-18	-30
Asn-IS	136.1	75.1	-13	-18	-30
Asp	134.0	74.0	-16	-14	-30
Asp-IS	137.1	75.0	-16	-14	-30
Cit	176.1	159.0	-22	-12	-15
Cit-IS	183.2	166.1	-22	-12	-15
Gln	147.1	130.0	-18	-14	-22
Gln-IS	152.1	135.1	-18	-14	-22
Glu	148.1	84.3	-18	-17	-14
Glu-IS	153.1	89.1	-18	-17	-14
His	156.1	110.1	-20	-15	-18
His-IS	159.1	113.1	-20	-15	-18
Ile	132.0	86.0	-16	-11	-14
Ile-IS	142.1	96.1	-16	-11	-14
Leu	132.1	86.1	-18	-12	-14
Leu-IS	135.1	89.0	-18	-12	-14
Lys	147.1	84.1	-16	-18	-14

Lys-IS	151.2	88.0	-16	-18	-14
Met	150.0	61.0	-15	-22	-24
Met-IS	153.2	64.1	-15	-22	-24
Orn	133.1	70.2	-18	-18	-28
Orn-IS	139.1	76.1	-18	-18	-28
Phe	166.1	120	-10	-13	-20
Phe-IS	175.1	128.1	-10	-13	-20
Pro	116.0	70.1	-11	-16	-28
Pro-IS	122.0	75.0	-11	-16	-28
Ser	106.3	60.0	-14	-12	-22
Ser-IS	110.1	63.0	-14	-12	-22
Thr	120.1	74.0	-15	-12	-30
Thr-IS	124.1	77.0	-15	-12	-30
Trp	205.1	188.1	-10	-10	-18
Trp-IS	210.1	192.1	-10	-10	-18
Tyr	182.1	136.1	-11	-13	-22
Tyr-IS	186.1	140.1	-11	-13	-22
Val	118.1	72.1	-11	-12	-29
Val-IS	126.2	80.1	-11	-12	-29

### 1.3 标准品、质控品及样品制备

标准品共 7 个浓度点、质控品共 2 个浓度点及血清样本，按说明书前处理步骤进行处理，进样体积 10  $\mu$ L。

## 2. 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图

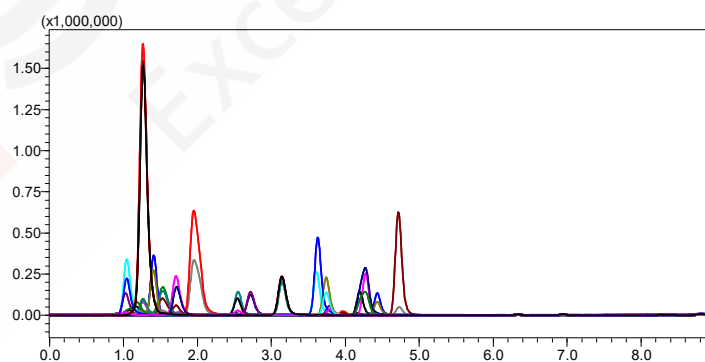


图 1. 标准曲线最低浓度点色谱图

### 2.2 线性关系

采用内标法建立标准曲线结果如表 3 所示。结果显示，20 种氨基酸在线性浓度范围内线性相关性良好，相关系数均在 0.996 以上。

表 3. 标准曲线结果(权重为 1/C<sup>2</sup>)

目标物	线性方程	线性范围 ( $\mu\text{mol/L}$ )	相关系数	准确度(%)
Ala	$Y = (0.00864620)X + (0.142174)$	9.4-602.7	0.999	90.5-106.6
Arg	$Y = (0.0754389)X + (0.234874)$	3.3-208.7	0.997	94.8-112.2
Asn	$Y = (0.0397093)X + (-0.0226878)$	6.8-434	0.999	94.9-108.5
Asp	$Y = (0.291474)X + (0.633749)$	21.9-1403.8	0.999	94.7-105
Cit	$Y = (0.153626)X + (0.0633004)$	1.7-106.7	0.999	91.9-109.6
Gln	$Y = (0.0158814)X + (-0.0450356)$	1.4-88.8	0.999	92.7-111.1
Glu	$Y = (0.0262527)X + (0.406151)$	8-515.1	0.999	92.4-109.4
His	$Y = (0.192924)X + (0.487882)$	17.5-1121.2	0.998	91.9-104.3
Ile	$Y = (0.0749449)X + (0.147790)$	8.1-516	0.996	91.5-107.2
Leu	$Y = (0.0966912)X + (0.405584)$	2-127	0.999	93.8-107.2
Lys	$Y = (0.0673522)X + (0.462227)$	3.6-230.7	0.999	93.6-108.5
Met	$Y = (0.139050)X + (0.172242)$	11.7-745.9	0.999	93.7-110.3
Orn	$Y = (0.122811)X + (0.0583404)$	4-254.9	0.999	92.3-109.6
Phe	$Y = (0.0982378)X + (0.276017)$	1.7-109.4	0.998	93-108.8
Pro	$Y = (0.181969)X + (0.957810)$	8.9-571	0.999	92.9-106.5
Ser	$Y = (0.0410516)X + (0.263398)$	2.6-169.1	0.998	90.9-106
Thr	$Y = (0.0309626)X + (0.193447)$	4-254	0.998	93.3-107.8
Trp	$Y = (0.0182492)X + (0.0132503)$	5.2-333	0.999	92.5-108.2
Tyr	$Y = (0.0844607)X + (0.130085)$	2.9-188.3	0.999	91.9-110.7
Val	$Y = (0.0863544)X + (0.530067)$	2-126.2	0.999	91.5-108

### 2.3 质控样本准确度及精密度考察

按试剂盒的前处理方法和 1.2 中的分析条件对试剂盒中的高低质控品进行分析, 每个样品平行处理分析 6 次, 质控品的准确度结果如表 4 所示, 结果显示质控品测定结果与理论值接近, 完全符合试剂盒质控品准确度 80%~120%的要求。低浓度质控品 20 种氨基酸测定结果准确度在 89.3%~118.7%之间, 高浓度质控品 20 种氨基酸测定结果准确度在 83.8%~117.3%之间。低浓度质控品 20 种氨基酸测定结果(平行处理 6 份) RSD 在 1.6%~8.8%之间, 高浓度质控品 20 种氨基酸测定结果(平行处理 6 份) RSD 在 0.5%~7.9%之间。

表 4. 质控准确度及精密度考察结果(n=6)

目标物	LQC 理论 值( $\mu\text{mol/L}$ )	LQC 回收 率 (%)	LQC 回收率 RSD (%)	HQC 理论 值( $\mu\text{mol/L}$ )	HQC 回收 率 (%)	HQC 回收率 RSD (%)
Ala	155.6	95.5	3.8	653.6	94.4	1.2
Arg	24.7	101.5	2.9	101.7	107.0	3.2
Asn	13.4	95.6	4.0	93.7	103.5	2.0
Asp	14.5	89.3	4.7	45.5	84.3	1.8
Cit	9.4	115.9	3.8	35.6	116.8	3.7

Gln	139.9	108.4	6.0	769.8	117.3	3.8
Glu	46.5	107.5	8.4	261.6	83.8	6.4
His	7.5	96.3	7.7	79.5	97.7	3.8
Ile	26.5	108.5	8.8	112.9	102.2	7.9
Leu	42.9	90.0	3.5	153.4	91.1	3.5
Lys	47.5	113.3	4.1	254.6	110.1	3.2
Met	9	118.7	3.9	45.4	106	4.6
Orn	18.1	102.3	2.5	119	100.7	1.2
Phe	27.8	99.5	3.4	93.1	89.3	3.5
Pro	75.6	92.4	1.6	335.6	101.2	7.3
Ser	42.1	108.1	4.9	234.2	88.2	3.4
Thr	38.1	115.8	3.5	241.0	94.6	2.7
Trp	15.3	111.2	4.6	65.6	100.7	0.5
Tyr	26.9	104.3	7.2	101.7	96.6	7.5
Val	69.4	106.3	7.6	287.8	98.2	4.6

## 2.4 临床样品测定结果

取 6 批次血清样品，按试剂盒的前处理方法及 1.2 中的分析条件进行测定，谱图见图 2，结果见表 5，该试剂盒配套 LCMS-8040 CL 使用可以满足临床检测需求。

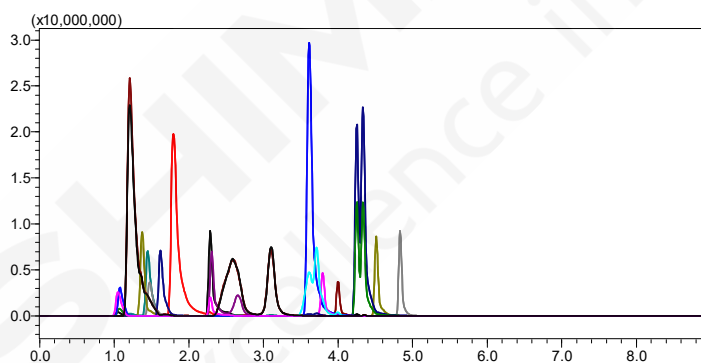


图 2. Sample-001 谱图

表 5. 人血清临床样品检测结果( $\mu\text{mol/L}$ )

氨基酸	Sample-001	Sample-002	Sample-003	Sample-004	Sample-005	Sample-006
Ala	114.1	84.4	78.9	123.7	124.4	100.4
Arg	12.1	19.8	18.7	13.8	14.5	9.3
Asn	13.6	12.4	12.1	13.8	14.5	9.5
Asp	9.8	5.8	7.1	10.6	11.3	6
Cit	8.7	6.2	7.3	9.1	9.8	3.5
Gln	62.1	51.9	45.2	68.4	69.1	36.9
Glu	63.4	46	64.1	72.8	73.5	44.9
His	24.4	20.3	20.5	26.1	26.8	16.3
Ile	19.6	17.2	12.1	21.8	22.5	16.1
Leu	42.4	26.7	21	37.4	38.1	23.1

Lys	57.7	39.3	41.6	65.1	65.8	34
Met	8.3	5.3	6.4	9.1	9.8	4.5
Orn	46.8	29.1	41.1	51	51.7	21.2
Phe	34.7	15.4	17.7	37.9	38.6	20.3
Pro	41.9	44.9	34.5	49	49.7	26.7
Ser	45.1	30.1	30.7	46.6	47.3	27.1
Trp	16.4	12.4	13.3	19	19.7	16.4
Tyr	18.3	15.3	16.9	19.9	20.6	13.3
Val	69	51.1	43	78.1	78.8	52.9

### 3. 结论

本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 CL 及氨基酸检测试剂盒（液相色谱-串联质谱法，北京华大吉比爱生物技术有限公司），建立了人血清中 20 种游离氨基酸同时测定的方法。使用试剂盒的内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性良好，标准曲线相关系数均大于 0.996，准确度及精密度均满足试剂盒要求。

## 2.7 LCMS-8050 CL 测定人血清中 17 种胆汁酸含量

**摘要：** 本文使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30A CL 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用建立了人体血清中 17 种胆汁酸同时测定的方法。使用同位素内标、标准样品及加标样品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性范围宽，标准曲线相关系数均大于 0.994，方法准确度及精密度均可满足临床日常检验需求。该方法操作简捷、特异性好、灵敏度高、分析速度快，可以为临床人血清中胆汁酸的检测提供很好的借鉴和参考。

**关键词：** LCMS-8050 CL 胆汁酸 血清

胆汁酸由胆固醇代谢产生，根据合成途径，可以分为由胆固醇为原料直接合成的初级胆汁酸和代谢产生的次级胆汁酸。研究发现胆汁酸在动物体内可乳化脂肪，扩大与脂肪酶的接触面积；调控胰脂肪酶和脂蛋白酯酶的活性提高其对脂肪的水解代谢；在肠道内转运脂肪，促进脂肪的吸收。而不同的胆汁酸亚型在临床上具有不同的诊断意义，不同种类的胆汁酸对疾病的作用差异较大，如去氧胆酸是胃肠道致癌因子，而熊去氧胆酸具有一定的抑制癌症作用。因此检测每一种亚型的胆汁酸在体

内的水平而非简单地定量测量总胆汁酸水平，对于肝胆疾病的筛查、诊断和鉴别诊断具有重要意义。

目前临床上主要开展胆汁酸的检测方法包括气相色谱法、液相色谱法、毛细管电泳法、气相色谱-质谱联用法，以及液相色谱-串联质谱法等，但是目前对于检测人体血清中多种胆汁酸亚型的研究相对较少。本实验使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL，建立了人血清中 17 种胆汁酸含量测定方法，该方法分析速度快，灵敏度高，专属性强，前处理简单，供相关人员参考。

### 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 CL 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用系统。具体配置为 LC-30AD CL×2（输液泵），DGU-20A<sub>5R</sub> CL（在线脱气机），SIL-30AC<sub>MP</sub> CL（自动进样器），CTO-30A CL（柱温箱），CBM-20A CL 系统控制器，LCMS-8050 CL 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。

#### 1.2 分析条件

液相色谱条件

- 色谱柱 : Shim-pack Velox SP-C18 2.1 mm I.D. × 100 mm L., 1.8 μm
- 流动相 : A 相-5 mM 乙酸铵水溶液；B 相-甲醇：乙腈=1：1
- 流速 : 0.5 mL/min
- 柱温 : 60°C
- 进样量 : 10 μL
- 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
2.00	泵	B.Conc	40
2.50	泵	B.Conc	45
3.50	泵	B.Conc	50
4.60	泵	B.Conc	55
5.70	泵	B.Conc	55
5.80	泵	B.Conc	70
7.50	泵	B.Conc	70
7.50	泵	T.Flow	0.5
7.51	泵	B.Conc	95
7.51	泵	T.Flow	0.8
8.50	泵	B.Conc	95
8.50	泵	T.Flow	0.8
8.51	泵	B.Conc	35
8.51	泵	T.Flow	0.5
10.00	控制器	Stop	

## 质谱条件

分析仪器	: LCMS-8050 CL	DL 温度	: 300°C
离子源	: ESI (-)	加热模块温度	: 500°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	MRM 参数	: 见表 2

表 2. MRM 参数

名称	英文简写	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q1 Pre Bias (V)
石胆酸	LCA	375.1	375.1	11	21	16
脱氧胆酸	DCA	391.2	391.1	15	38	18
鹅脱氧胆酸	CDCA	391.2	391.1	15	40	18
熊脱氧胆酸	UDCA	391.2	391.1	12	21	18
胆酸	CA	407.2	407.1	12	39	18
甘氨石胆酸	GLCA	432.3	74.1	18	39	15
甘氨脱氧胆酸	GDCA	448.2	74.1	11	28	15
甘氨鹅脱氧胆酸	GCDCA	448.2	74.1	11	20	15
甘氨熊脱氧胆酸	GUDCA	448.2	74.1	11	37	15
甘氨猪脱氧胆酸	GHDCA	448.2	74.1	11	37	15
甘氨胆酸	GCA	464.3	74.1	11	41	15

牛磺石胆酸	TLCA	482.2	124.0	11	52	11
牛磺脱氧胆酸	TDCA	498.2	80.0	12	84	27
牛磺鹅脱氧胆酸	TCDC	498.3	79.9	19	76	28
牛磺熊脱氧胆酸	TUDCA	498.3	79.9	12	74	28
牛磺猪脱氧胆酸	THDCA	498.2	79.9	19	76	16
牛磺胆酸	TCA	514.2	80.0	20	78	17
石胆酸-D4	LCA-D4	379.1	379.1	11	21	16
脱氧胆酸-D5	DCA-D5	396.2	396.1	15	37	18
鹅脱氧胆酸-D4	CDCA-D4	395.2	395.1	15	23	18
熊脱氧胆酸-D4	UDCA-D4	395.2	395.1	12	21	18
胆酸-D4	CA-D4	411.2	411.1	12	21	18
甘氨酸鹅脱氧胆酸-D5	GCDCA-D5	453.2	74.1	11	37	15
甘氨酸熊脱氧胆酸-D7	GUDCA-D7	455.2	74.1	11	37	15
甘氨酸胆酸-D5	GCA-D5	469.3	74.1	11	41	15
牛磺石胆酸-D5	TLCA-D5	487.2	124.0	11	52	11
牛磺鹅脱氧胆酸-D5	TCDC	503.2	124.0	12	54	11
牛磺熊脱氧胆酸-D5	TUDCA-D5	503.2	124.0	12	50	11
牛磺胆酸-D5	TCA-D5	519.2	124.0	20	54	11
牛磺脱氧胆酸-D4	TDCA-D4	502.3	124.1	12	54	11

### 1.3 标准品及样品制备

标准溶液配制：取 17 种胆汁酸混标母液，用初始流动相逐步稀释成系列浓度的标准工作液，具体浓度见表 3。内标溶液使用初始流动相配置成内标工作液。取 100  $\mu$ L 标准溶液，加入 10  $\mu$ L 内标，涡旋混匀，进样 10  $\mu$ L。

表 3. 标准曲线浓度信息 (ng/mL)

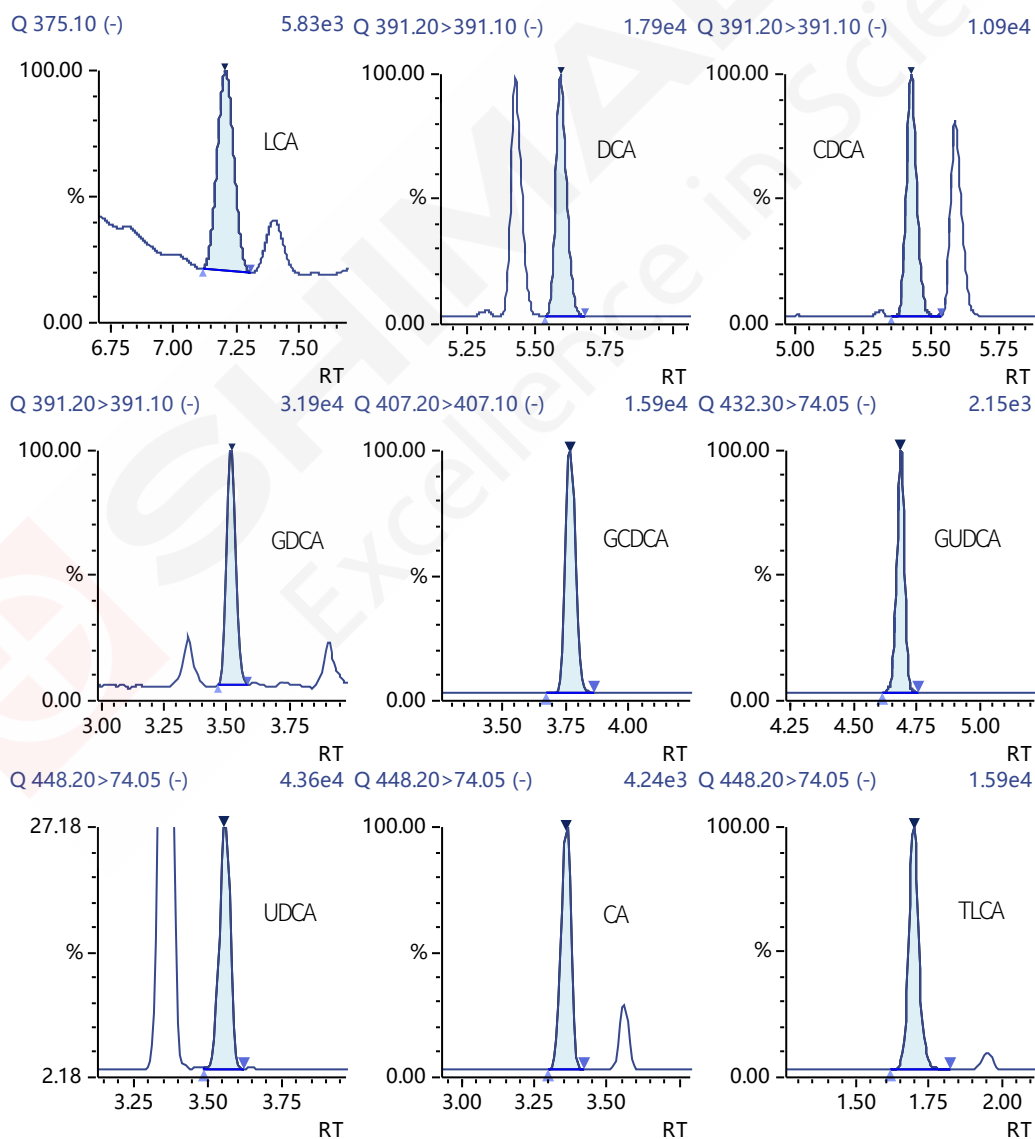
编号	名称	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7
1	LCA	0.25	0.5	2.5	5	25	50	100
2	DCA	5	10	50	100	500	1000	2000
3	CDCA	5	10	50	100	500	1000	2000
4	UDCA	1.25	2.5	12.5	25	125	250	500
5	CA	5	10	50	100	500	1000	2000
6	GLCA	0.25	0.5	2.5	5	25	50	100
7	GDCA	6.25	12.5	62.5	125	625	1250	2500
8	GCDCA	12.5	25	125	250	1250	2500	5000
9	GUDCA	2.5	5	25	50	250	500	1000
10	GHDC	0.125	0.25	1.25	2.5	12.5	25	50

11	GCA	3.75	7.5	37.5	75	375	750	1500
12	TLCA	0.25	0.5	2.5	5	25	50	100
13	TDCA	2.5	5	25	50	250	500	1000
14	TCDCA	2.5	5	25	50	250	500	1000
15	TUDCA	0.25	0.5	2.5	5	25	50	100
16	THDCA	0.125	0.25	1.25	2.5	12.5	25	50
17	TCA	0.625	1.25	6.25	12.5	62.5	125	250

样品前处理方法：取 100  $\mu$ L 血清样本，加入 300  $\mu$ L 乙腈（内含 10  $\mu$ L 内标），涡旋均匀，13000 rpm 离心 5 min，取 300  $\mu$ L 上清液，60 $^{\circ}$ C 氮气吹干，用 100  $\mu$ L 初始流动相复溶，振荡均匀后，转瓶进样 10  $\mu$ L。

## 2. 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图



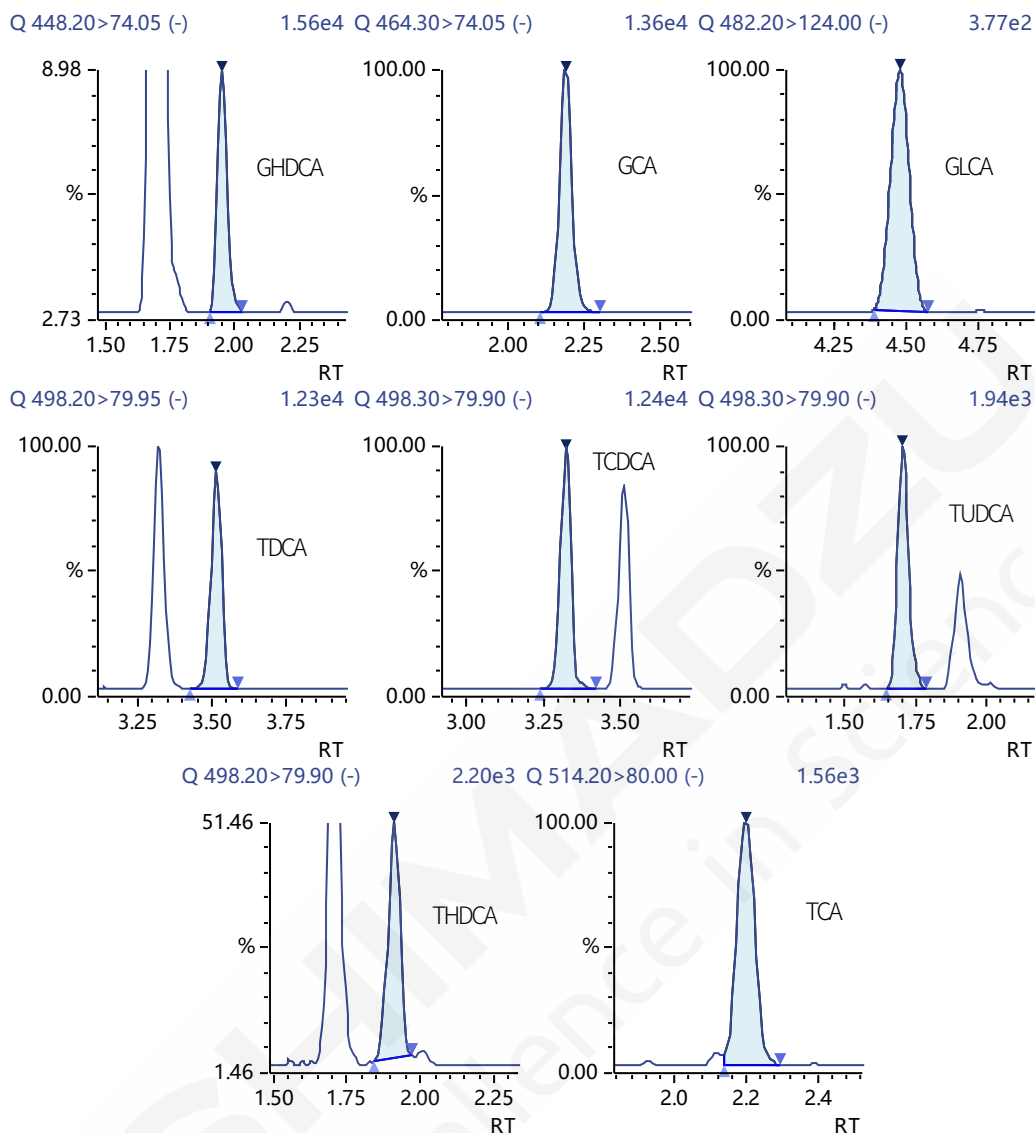


图 1. 标准曲线 L1 浓度点色谱图

## 2.2 线性测定结果

对标准品按 1.2 中的分析条件进行分析，内标法制作标准曲线。标准曲线结果见表 4，17 种胆汁酸在标准曲线浓度范围内线性相关系数均大于 0.994，准确度满足 100±15% 以内的要求。

表 4. 标准曲线结果

编号	名称	线性方程	线性范围(ng/mL)	相关系数	准确度(%)
1	LCA	$Y = (0.107336)X + (0.00484765)$	0.25~100	0.999	95.3~106.8
2	DCA	$Y = (0.00465773)X + (0.00226675)$	5~2000	0.999	97.7~102.3
3	CDCA	$Y = (0.000470887)X + (0.000572060)$	5~2000	0.999	96.6~101.4
4	UDCA	$Y = (0.0162286)X + (0.00650418)$	1.25~500	0.999	95.0~110.6
5	CA	$Y = (0.000608651)X + (0.000332210)$	5~2000	0.999	95.4~103.1
6	GLCA	$Y = (0.00268132)X + (-1.18436e-005)$	0.25~100	0.999	96.2~107.1
7	GDCA	$Y = (0.000833592)X + (-0.000634302)$	6.25~2500	0.998	92.2~107.6

8	GCDCA	$Y = (0.000459801)X + (0.000742539)$	12.5~5000	0.999	94.8~106.4
9	GUDCA	$Y = (0.206122)X + (-0.00552275)$	2.5~1000	0.999	95.5~106.0
10	GHDCA	$Y = (0.271931)X + (-0.00569851)$	0.125~50	0.997	89.6~110.5
11	GCA	$Y = (0.00614234)X + (0.000231065)$	3.75~1500	0.999	96.5~106.1
12	TLCA	$Y = (0.0708446)X + (-0.000773494)$	0.25~100	0.998	89.7~107.2
13	TDCA	$Y = (0.0128844)X + (-0.000860893)$	2.5~1000	0.996	91.3~114.0
14	TCDCa	$Y = (0.0164394)X + (-0.00236681)$	2.5~1000	0.994	87.7~113.1
15	TUDCA	$Y = (0.0115057)X + (0.00153150)$	0.25~100	0.999	94.7~106.7
16	THDCA	$Y = (0.793129)X + (0.00922271)$	0.125~50	0.996	87.9~103.7
17	TCA	$Y = (0.0625649)X + (-0.000302437)$	0.625~250	0.997	87.1~107.6

### 2.3 准确度及精密度测定结果

按 1.3 中的前处理方法对空白血清添加低中高浓度标准品作为低中高浓度质控品，按 1.2 中的分析条件对质控品进行分析，每个样品平行制备 6 份，质控品的准确度结果如表 5 所示，结果显示质控品测定回收率结果与理论值接近，均在 90.9~113.4 之间，满足临床测定需求。样品平行制备 6 份进样分析，峰面积的 RSD 在 0.2%~13.5%之间，满足临床测定需求。

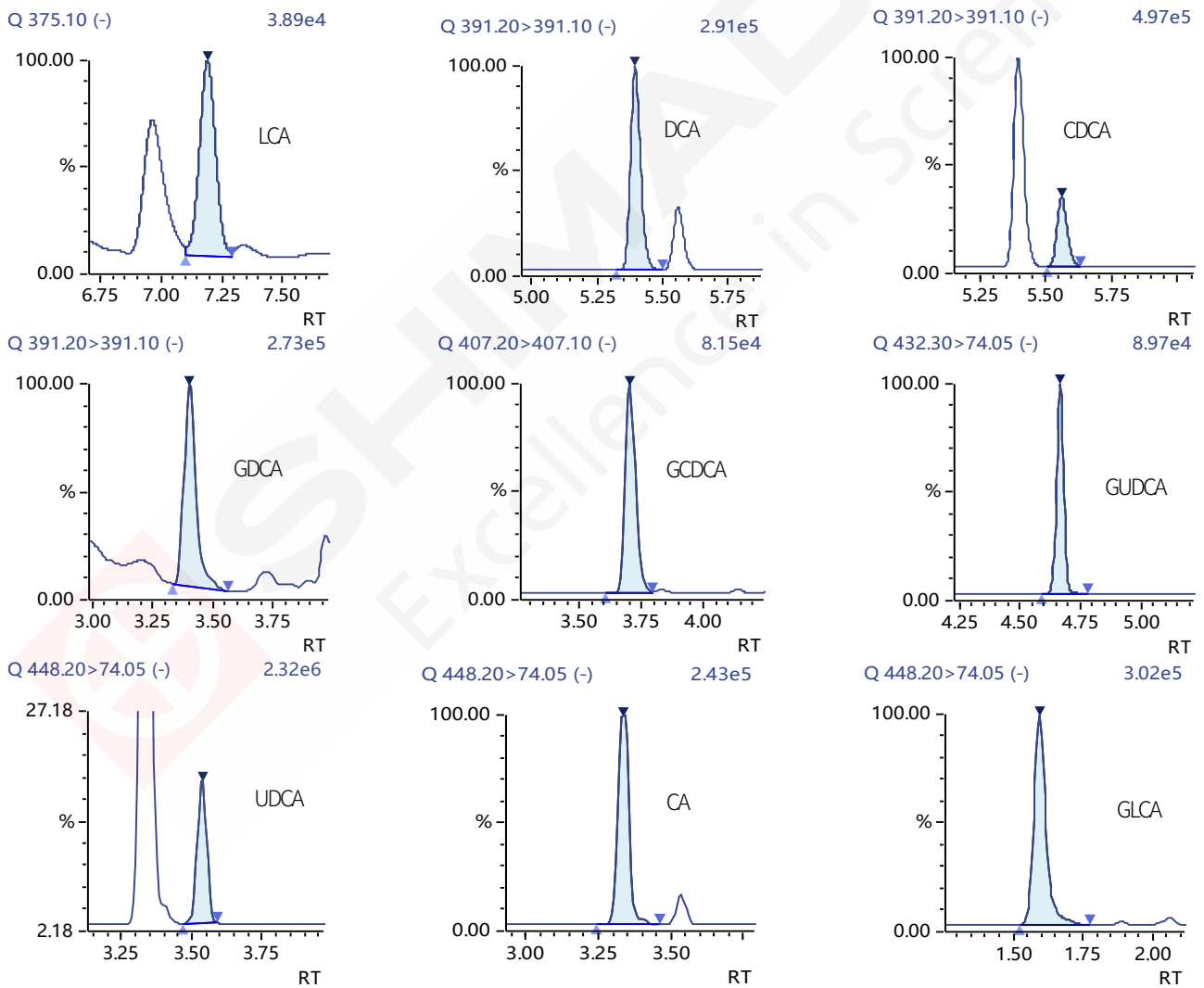
表 5. 质控准确度及精密度考察结果(n=6)

名称	LQC			MQC			HQC		
	添加浓度 (ng/mL)	回收率 (%)	RSD(%)	添加浓度 (ng/mL)	回收率 (%)	RSD(%)	添加浓度 (ng/mL)	回收率 (%)	RSD(%)
LCA	1.0	101.3	2.6	10.0	97.5	1.8	80.0	93.2	2.1
DCA	20	94.9	1.9	200	94.6	1.7	1600	95.9	1.8
CDCA	20	97.9	0.2	200	95.7	1.8	1600	93.3	1.4
UDCA	5.0	95.2	3.0	50.0	93.4	4.2	400	92.2	3.0
CA	20	93.6	3.6	200	95.4	3.7	1600	96.9	2.1
GLCA	1.0	96.5	2.1	10.0	94.9	3.6	80.0	98	2.5
GDCA	25	92.5	4.6	250	100.6	2.0	2000	94.7	2.4
GCDCA	50	97.3	1.1	500	100.7	1.3	4000	109.5	2.4
GUDCA	10	99.3	5.0	100	98.4	1.9	800	107.5	1.9
GHDCA	0.5	90.9	8.0	5.0	93.5	6.4	40.0	100.9	2.2
GCA	15	99.4	0.7	150	100.5	1.0	1200	106.3	1.3

TLCA	1.0	99.3	13.5	10.0	100.8	5.7	80.0	107.2	1.0
TDCA	10	102.4	2.7	100	108.3	2.6	800	113.4	3.2
TCDCA	10	91.5	1.3	100	91.9	3.2	800	102.8	4.3
TUDCA	1.0	97.7	4.9	10.0	104.5	1.0	80.0	92.1	2.1
THDCA	0.5	96.3	10.0	5.0	112.5	6.1	40.0	94.3	7.2
TCA	2.5	99.4	5.5	25.0	95.3	0.3	200	95.7	4.8

## 2.4 临床样品测定结果

取 4 批次血清样品，按 1.3 中的前处理方法及 1.2 中的分析条件进行测定，结果见图 2 和表 6，该方法灵敏度及分离度可满足临床检验需求。



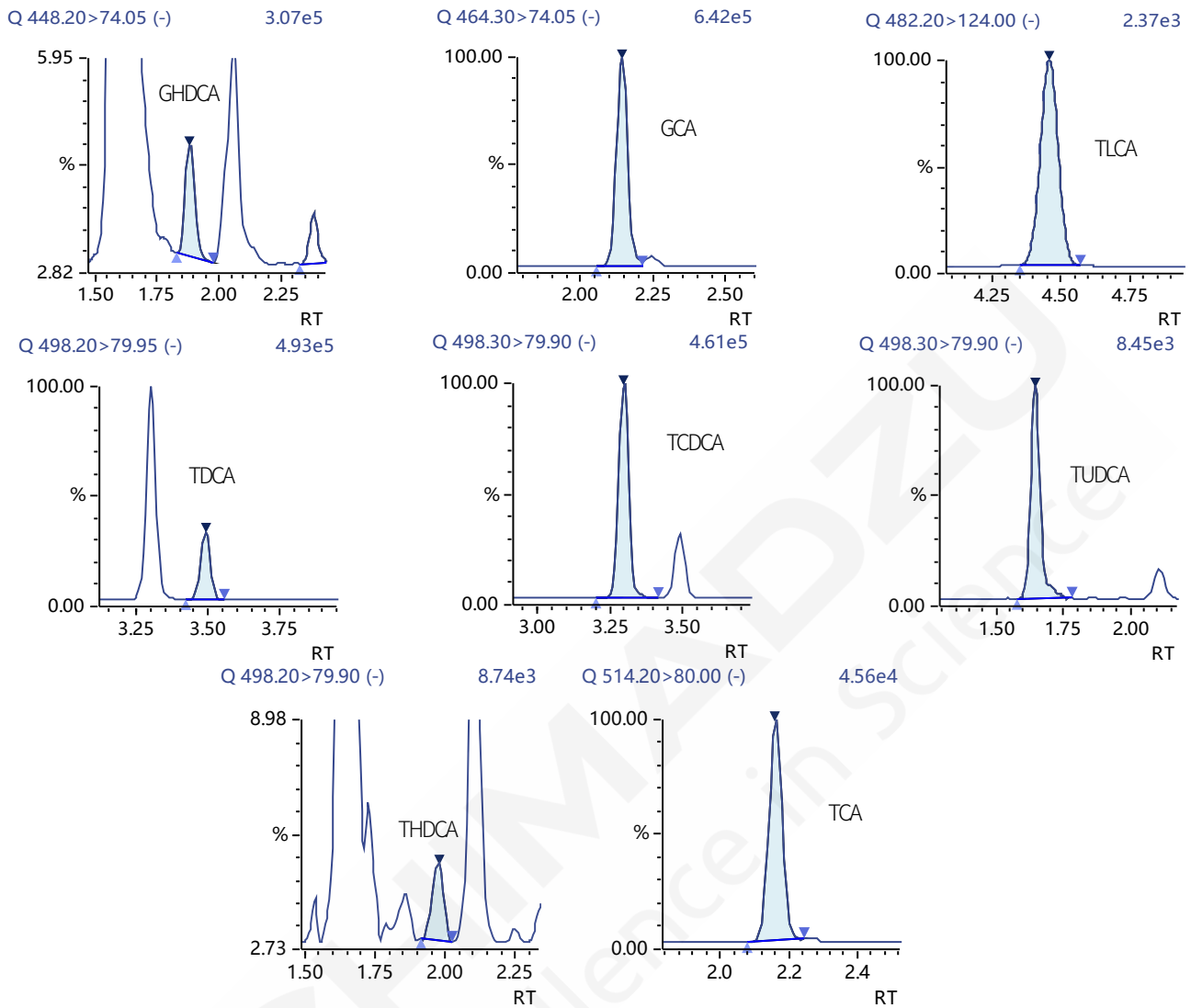


图 2. sample1 色谱图

表 6. 临床样品测定结果

Name	sample1	sample2	sample3	sample4
LCA	4.4732	3.008	1.874	3.359
DCA	79.5083	55.37	44.406	54.789
CDCA	255.1568	49.012	45.654	112.067
UDCA	27.8956	8.805	6.745	14.994
CA	48.301	15.565	12.801	18.421
GLCA	8.244	1.63	0.802	3.833
GDCA	175.6594	18.659	46.876	24.182
GCDCA	15.4634	43.298	72.684	110.192
GUDCA	132.3333	5.947	9.633	14.74
GHDCA	0.993	0.44	0.52	0.64
GCA	257.429	17.7	43.38	13.841
TLCA	1.9435	1.221	0.468	0.374

TDCa	48.1455	45.485	69.934	6.997
TCDCa	212.3142	62.329	56.05	18.472
TUDCa	5.057	1.251	1.101	0.28
THDCa	0.128	0.56	0.528	0.153
TCA	44.171	17.935	24.092	2.149

### 3. 结论

使用超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8050 CL 建立了人体血清中 17 种胆汁酸同时测定的方法。使用同位素内标、标准样品及加标样品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性范围宽，标准曲线相关系数均大于 0.994，方法准确度及精密度均可满足临床日常检验需求。该方法可以为临床人血清中胆汁酸的检测提供很好的借鉴和参考。

## 2.8 LCMS-8050 CL 用于高同型半胱氨酸血症诊断应用研究

**摘要：** 本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 及高同型半胱氨酸血症诊断试剂盒（液相色谱-串联质谱法，质谱生物科技有限公司），建立了人体血清中同型半胱氨酸、甲硫氨酸、叶酸和 5-甲基四氢叶酸同时测定的方法。使用试剂盒的内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度、精密度的考察。结果显示该方法专属性良好，标准曲线相关系数均大于 0.998，准确度及精密度均满足试剂盒要求。该方法对高同型半胱氨酸血症的临床判断、治疗管理和生理评估具有辅助诊断的意义。

**关键词：** LCMS-8050 CL 高同型半胱氨酸血症 诊断

同型半胱氨酸 (Hcy) 是一种含硫氨基酸，为蛋氨酸代谢过程中的中间产物。由于各种原因导致同型半胱氨酸代谢受阻，体内同型半胱氨酸异常堆积，外周血中同型半胱氨酸升高，即为高同型半胱氨酸血症。高同型半胱氨酸血症病因复杂，主要分为先天遗传型及后天获得型。后天获得型可由生活方式、饮食习惯、基础疾病（糖尿病、脑卒中、慢性肾脏病、肿瘤等）及药物等因素导致。据统计，全球高同型半胱氨酸血症的发病率是5%~7%，我国高同型半胱氨酸血症的发病率在20%以上，远高于一些发达国家，在北部地区、沿海地区患病率更高。

经典型同型半胱氨酸血症需与血同型半胱氨

酸升高的其他相关疾病共同鉴别，包括钴胺素代谢障碍所致同型半胱氨酸血症、叶酸代谢障碍导致的疾病（如亚甲基脱氢酶缺陷及亚甲基四氢叶酸还原酶缺陷），还有获得性的如叶酸缺乏等。

本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪LCMS-8050 CL及高同型半胱氨酸血症诊断试剂盒（液相色谱-串联质谱法，质谱生物科技有限公司），建立了血清中同型半胱氨酸、甲硫氨酸、叶酸和5-甲基四氢叶酸含量测定方法，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，供相关人员参考。

### 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与三重四极杆质谱仪联用系统。

具体配置为 LC-30AD CL×2（输液泵），DGU-20A<sub>5R</sub> CL（在线脱气机），SIL-30AC<sub>MP</sub> CL（自动进样器），CTO-30A CL（柱温箱），SPD-M20A CL（二极管阵列检测器）CBM-20A CL 系统控制器，LCMS-8050 CL 三重四极杆质谱仪， LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。

#### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱    : 试剂盒提供  
流 动 相   : 试剂盒提供  
流 速       : 0.4 mL/min  
柱 温       : 40°C

进样量 : 2  $\mu$ L

洗脱方式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 1%, 时间程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.50	泵	B.Conc	1
1.60	泵	B.Conc	80
2.50	泵	B.Conc	95
4.50	泵	B.Conc	95
4.51	泵	B.Conc	1
6.00	控制器	Stop	

质谱条件

分析仪器 : LCMS-8050 CL

DL 温度 : 150°C

离子源 : ESI (+)

加热模块温度 : 400°C

雾化气流速 : 3.0 L/min

离子源温度 : 300°C

干燥气流速 : 10.0 L/min

扫描模式 : 多反应监测(MRM)

加热器流速 : 10.0 L/min

MRM 参数 : 见表 2

表 2. MRM 参数

名称	简称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
同型半胱氨酸	Hcy	136.00	90.00	-28	-11	-17
同型半胱氨酸内标	Hcy-IS	140.00	94.00	-28	-11	-17
甲硫氨酸	Met	150.05	104.10	-14	-10	-30
甲硫氨酸内标	Met-IS	155.00	108.10	-14	-10	-30
叶酸	FA	442.10	295.05	-30	-16	-30
叶酸内标	FA-IS	447.10	295.10	-30	-16	-30
5-甲基四氢叶酸	5-MTHF	460.20	313.05	-16	-19	-23
5-甲基四氢叶酸内标	5-MTHF-IS	465.20	313.05	-16	-19	-23

### 1.3 材料与方法

#### 1.3.1 材料

校准品: 6 个浓度牛血清白蛋白冻干品

质控品: 高低浓度牛血清白蛋白冻干品

内标品: 含 4 种测定组分同位素内标

蛋白沉淀剂: 试剂盒提供

复溶液: 试剂盒提供

### 1.3.2 方法

内标品溶液的配制：内标品使用前平衡至室温，用移液器精密量取 2.4 mL 复溶液至内标品小瓶中进行复溶，超声处理 30 min，涡旋混匀，使其完全溶解。

试剂盒校准品及质控品样本的准备：校准品及质控品使用前平衡至室温，取试剂盒中校准品/质控品分别用 400  $\mu$ L 超纯水进行复溶，室温静置 10 min 使其完全溶解。

样本前处理：取校准品、质控品和血清样本各 120  $\mu$ L，依次加入到标记好的洁净的 2 mL 离心管中。向以上各管分别加入预先配制好的内标品溶液 20  $\mu$ L，室温下振荡孵育 30 min 后，向各离心管中加入 460  $\mu$ L 蛋白沉淀剂，再振荡 5 min，使蛋白充分变性。振荡结束后，取一个 96 孔蛋白磷脂去除板放在一个收集板上，从各离心管中吸取 500  $\mu$ L 溶液，加入 96 孔蛋白磷脂去除板各孔中。将加好溶液的 96 孔蛋白磷脂去除板和收集板放在正压装置上，加压将 96 孔蛋白磷脂去除板中溶液全部压下，收集全部滤液，将收集板放在氮吹仪上，常温氮气吹干后，向各孔中加入 50  $\mu$ L 复溶液，用微孔板粘贴膜密封。设定振荡频率为 700 rpm，振荡 10 min 后，将深孔板中的溶液转移至 V 型 96 孔板中，用铝箔制微孔板封套紧密覆盖 V 型 96 孔板，上机测定。

## 2. 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图

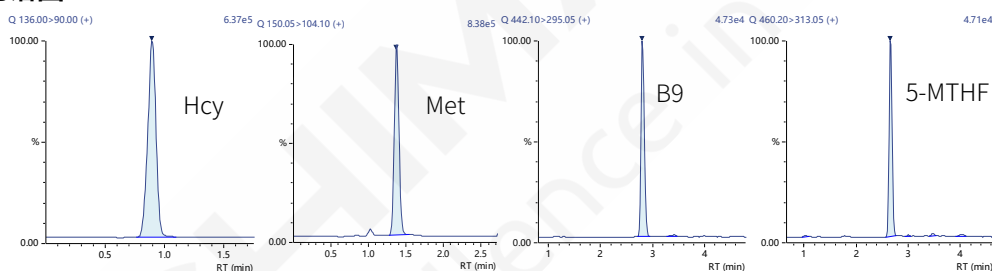
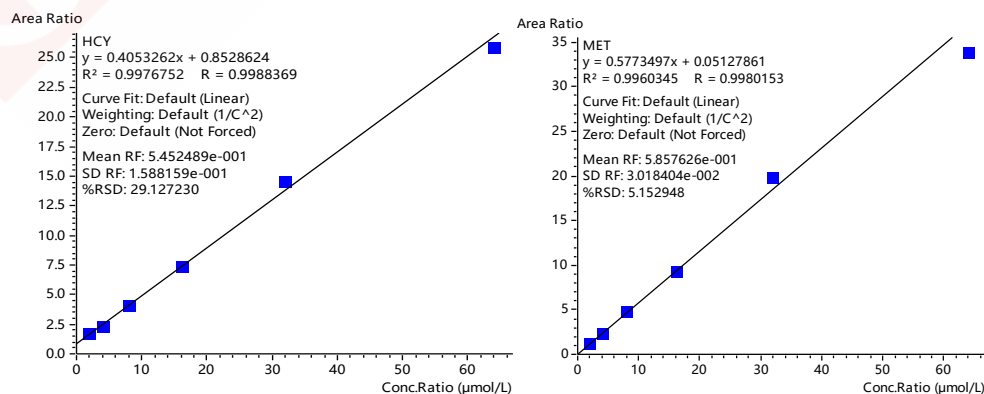


图 1. 标准曲线最低浓度点色谱图

### 2.2 线性关系

采用内标法建立标准曲线，结果如图 2 与表 3 所示。结果显示，Hcy 在 2~64  $\mu$ mol/L、Met 在 2~64  $\mu$ mol/L、B9 在 8~256 nmol/L、5-MTHF 在 8~256 nmol/L 线性浓度范围内线性相关性良好，相关系数均在 0.998 以上，各标准点准确度在 91.7%~107.0%之间，满足临床测定需求。



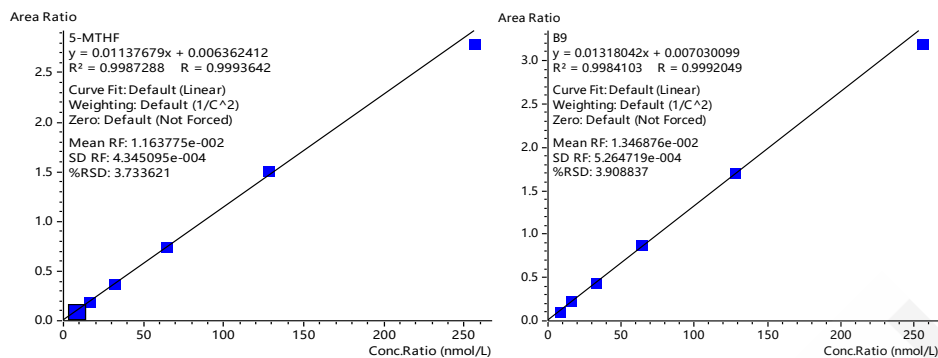


图 2. 标准曲线图

表 3. 标准曲线结果

目标物	线性方程	线性范围	浓度单位	相关系数	准确度(%)
Hcy	$Y = (0.405326)X + (0.852862)$	2~64	μmol/L	0.9989	95.5~105.9
Met	$Y = (0.576301)X + (0.0645820)$	2~64	μmol/L	0.9980	91.7~107.0
B9	$Y = (0.0131804)X + (0.00703010)$	8~256	nmol/L	0.9992	94.3~102.9
5-MTHF	$Y = (0.0113624)X + (0.00635704)$	8~256	nmol/L	0.9994	95.5~102.8

### 2.3 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品进行分析，质控品的准确度结果如表 4 所示，结果显示，高低浓度质控品测定结果在 94.0%~102.5%之间，完全符合试剂盒质控品准确度 80%~120%的要求。

表 4. 准确度考察结果

名称	质控	理论值	测定值	浓度单位	准确度 (%)
Hcy	低质控	8.0	7.76	μmol/L	97.1
	高质控	32.0	30.09	μmol/L	94.0
Met	低质控	8.0	7.85	μmol/L	98.1
	高质控	32.0	32.81	μmol/L	102.5
FA	低质控	32.0	31.88	nmol/L	99.6
	高质控	128.0	123.38	nmol/L	96.4
5-MTHF	低质控	32.0	31.62	nmol/L	98.8
	高质控	128.0	128.59	nmol/L	100.50

### 2.4 精密度验证

将标准曲线最低浓度点连续进样分析 6 次，峰面积精密度结果如表 5 所示，结果显示，所测定四种物质峰面积精密度在 1.1%~3.5%之间，符合日常检测需求。

表 5. 精密度考察结果

编号	Hcy	Met	FA	5-MTHF
1	3088545	3631184	206003	186330
2	3151232	3693452	210234	180278
3	3121287	3751287	211654	178439
4	3108971	3651289	218298	175490
5	3052367	3667658	209129	189223
6	3118911	3659127	226156	185901
平均值	3106886	3675666	213579	182610
CV%	1.1	1.2	3.5	2.9

## 2.5 临床样品测定结果

取 3 批次血清样品, 按 1.3 中的前处理方法及 1.2 中的分析条件进行测定, 结果见图 3 及表 6。

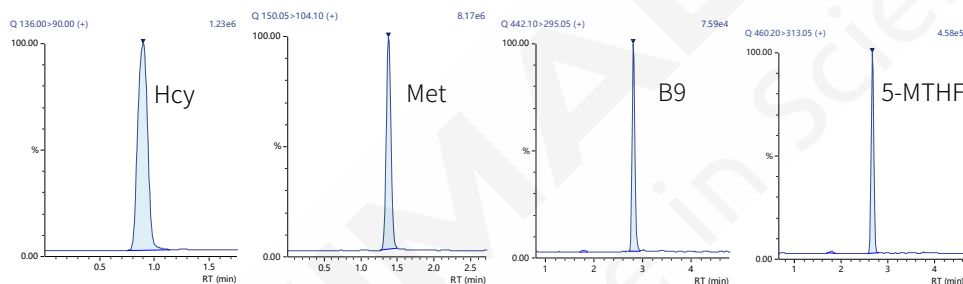


图 3. sample-1 样品色谱图

表 6. 人血清样本测定结果

编号	Hcy( $\mu\text{mol/L}$ )	Met( $\mu\text{mol/L}$ )	B9(nmol/L)	5-MTHF(nmol/L)
Sample-1	3.5	26.3	17.8	87.5
Sample-2	13.2	33.1	5.0	29.5
Sample-3	7.0	23.9	6.1	34.0

## 3. 结论

本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪LCMS-8050 CL及高同型半胱氨酸血症诊断试剂盒(液相色谱-串联质谱法, 质谱生物科技有限公司), 建立了人体血清中同型半胱氨酸、甲硫氨酸、叶酸和 5-甲基四氢叶酸同时测定的方法。使用试剂盒的内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度、精密度的考察。结果显示该方法专属性良好, 标准曲线相关系数均大于0.998, 高、低浓度质控品测定结果准确度在94.0%~102.5%之间, 峰面积精密度在1.1%~3.5%之间。该方法对高同型半胱氨酸血症的临床判断、治疗管理和生理评估具有辅助诊断的意义。

## 2.9 LC-MS/MS 结合蛋白沉淀法用于血浆中胰岛素样生长因子 1 的测定

**摘要:** 使用岛津临床液相色谱质谱联用系统结合蛋白沉淀前处理方法, 建立了人血浆中完整胰岛素样生长因子 1 测定的方法。并对方法的线性、准确度及精密度进行了考察。结果显示该方法线性良好, 标准曲线相关系数大于 0.999, 准确度及精密度均满足要求, 可用于临床研究, 辅助疾病诊断。

**关键词:** 临床质谱 血浆 蛋白沉淀 IGF-1 胰岛素

胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 亦称为生长介素, 是一种小肽类激素, 结构与胰岛素原相似, 其分子量为 7.6kDa。IGF-1 的重要作用之一是介导生长激素 (GH) 在外周靶器官组织的促生长作用。

前期我们已经完成了固相萃取法的方案, 本文使用蛋白沉淀法, 建立了人血浆中 IGF-1 含量测定方法, 该方法易操作, 成本低, 灵敏度高, 专属性强, 可用于临床中相关疾病的诊断, 对于 IGF-1 的临床研究亦有重要意义。

### 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与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用系统。具体配置为:

输液泵	: LC-30AD CL×2	在线脱气机	: DGU-20A5R CL
自动进样器	: SIL-30ACMP CL	柱温箱	: CTO-30A CL
系统控制器	: CBM-20A CL	工作站	: LabSolutions Ver. 5.99

#### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱	: ACQUITY UPLC Peptide CSH C18 100 mm×2.1 mm I.D., 1.7 μm
流动相	: A 相-0.1%甲酸水, B 相-0.1%甲酸乙腈
柱温	: 55°C
进样量	: 10 μL
流速	: 0.4 mL/min
洗脱方式	: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 20%, 洗脱程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.50	Pumps	B.Conc	30
3.50	Pumps	B.Conc	50
3.51	Pumps	B.Conc	95
4.00	Pumps	B.Conc	95
4.01	Pumps	B.Conc	20
5.00	Controller	Stop	

## 质谱条件

分析仪器	: LCMS-8050 CL	DL 温度	: 250°C
离子源	: ESI (+)	加热模块温度	: 400°C
雾化气流速	: 2.0 L/min	接口温度	: 300°C
干燥气流速	: 10.0 L/min	扫描模式	: 多反应监测(MRM)
加热器流速	: 10.0 L/min	MRM 参数	: 见表 2

表 2. MRM 参数

名称	英文名	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 PreBias (V)
胰岛素样生长因子-1	IGF-1	1093.5 <sup>7+</sup>	1093.5 <sup>*</sup>	-44	-37	-34
			1196.4	-42	-40	-38
胰岛素样生长因子-1 内标	<sup>15</sup> N-IGF-1	1106.9 <sup>7+</sup>	1106.9 <sup>*</sup>	-42	-15	-40
			1211.2	-42	-35	-40

注：“\*”表示定量离子。

### 1.3 标准样品、质控样品及内标溶液配制

用纯水溶解配制 100 µg/mL IGF-1 储备液,用 50%甲醇水溶液逐级稀释成浓度为 156.15、312.5、625、1250、2500、5000、10000、20000 ng/mL 的工作溶液。分别取标准工作溶液 5 µL 加入 95 µL 人空白血浆中,依次配制成浓度为 7.8125、15.625、31.25、62.5、125、250、500、1000 ng/mL 的标准样品;分别取三个不同浓度工作溶液 5 µL 加入 95 µL 人空白血浆中,依次配制成浓度为 15.625、62.5、500 ng/mL 质控样品。

用纯水溶解配制浓度为 100 µg/mL 的 <sup>15</sup>N-IGF-1 储备液,用 50%甲醇水溶液稀释为 200 ng/mL 内标溶液。

### 1.4 人血浆样品前处理方法

- 取人血浆样品 100 µL,加入内标溶液 20 µL,涡旋混匀;
- 加入 150 µL 50%三氟乙醇水溶液,涡旋混匀;
- 加入 200 µL 20%乙腈丙酮溶液(含 5%乙酸),涡旋混匀;
- 4000 g 离心 10 min;
- 吸取 200 µL 上清液加入 1600 µL 冰乙醇,混匀置于-20°C 放置 45 min;
- 4000 g 离心 30 min;
- 将上清液倒出,用 1600 µL 冰乙醇清洗沉淀;
- 取 100 µL 10%乙腈水溶液(含 1%甲酸)溶解沉淀,上机分析。

## 2. 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图

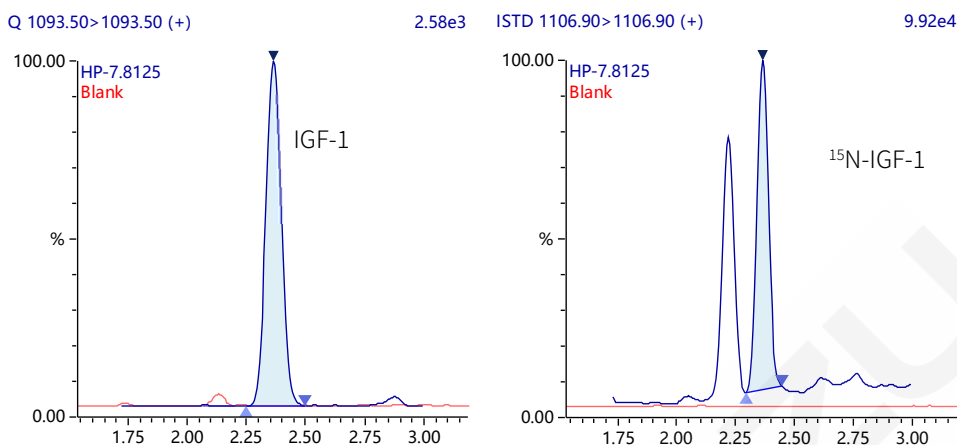


图 1. 标准样品 (7.8125 ng/mL) 及空白样品谱图

标准样品及空白样品谱图如图 1 所示, 从图中可以看到空白样品对 IGF-1 及内标的检测均无干扰, 方法专属性良好。

### 2.2 线性测定结果

标准样品经过 1.4 中的前处理后按 1.2 中的分析条件进行分析, 内标法制作标准曲线。标准曲线结果见表 3, 线性相关系数大于 0.999, 准确度在 88.5%~109.6%之间, 满足测定需求。

表 3. 标准曲线结果

编号	名称	线性方程	线性范围(ng/mL)	相关系数	准确度(%)
1	IGF-1	$Y = (0.006088576)X + (0.01493820)$	7.8125~1000	0.999	88.5~109.6

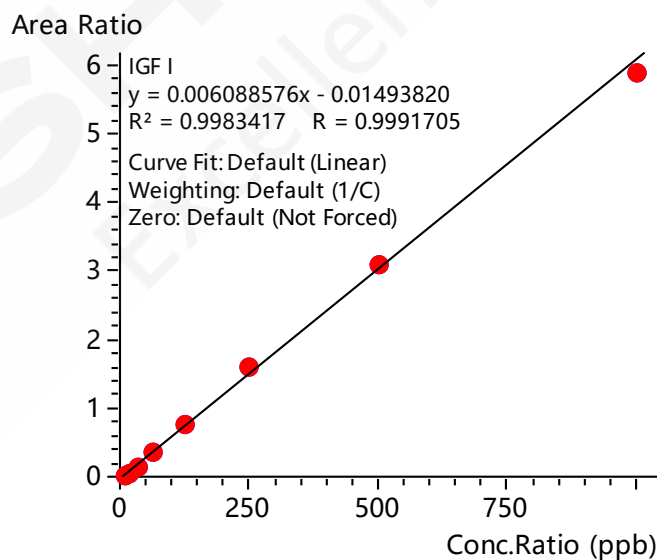


图 2. 标准曲线

### 2.3 准确度及精密度测定结果

按 1.4 中的前处理方法对低中高三浓度质控样品进行前处理，按 1.2 中的分析条件对质控样品进行分析，每个样品平行制备 6 份，质控品的准确度及精密度结果如表 4 所示，结果显示质控品测定准确度结果与理论值接近，均在理论值的±20%范围内，满足临床测定需求。样品平行制备 6 份进样分析，测定结果 RSD 在 2.1%~6.7%之间，满足临床测定需求。

表 4. 质控样品准确度及精密度考察结果(n=6)

样品类型	理论浓度 (ng/mL)	准确度%	精密度 RSD%
LQC	15.625	91.2	5.6
MQC	62.5	93.4	1.1
HQC	500	98.5	2.4

### 3. 结论

使用岛津临床液相色谱质谱联用系统结合蛋白沉淀法，建立了人血浆中胰岛素样生长因子 1 测定的方法。并对方法的线性、准确度及精密度进行了考察。结果显示该方法线性良好，准确度及精密度均满足临床要求，易操作，成本低。该方法可供临床研究参考。

## 2.10 超高效液相色谱三重四极杆质谱法测定血清甲基丙二酸的含量

**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 联用系统，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 (%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 联用系统，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 μL
自动进样器温度	：	15°C



度的样品平行处理 5 个，连续考察 3 天。统计精密度变异系数（CV）和准确度。

## 2. 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图

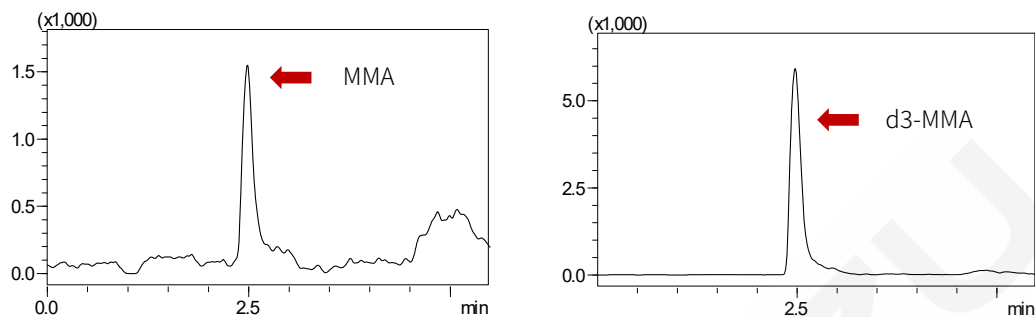


图 1. 替代基质中 MMA (20 nM) 及其内标物 (100 nM) 的 MRM 色谱图

### 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。

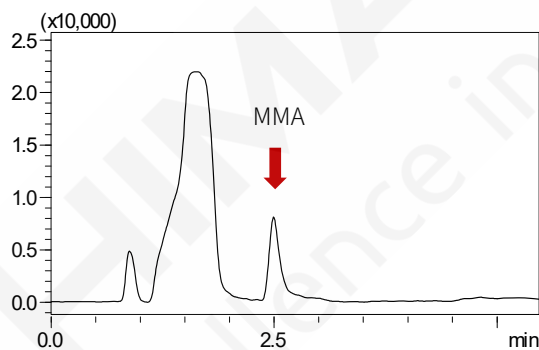


图 2. 空白血清样品分析结果

#### 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）。

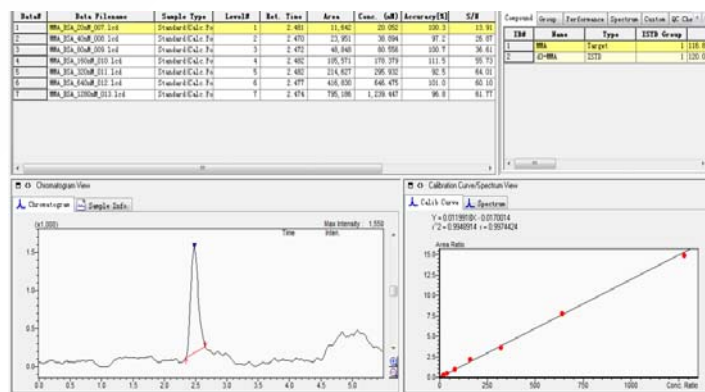


图 3. MMA 4% BSA 溶液标准曲线

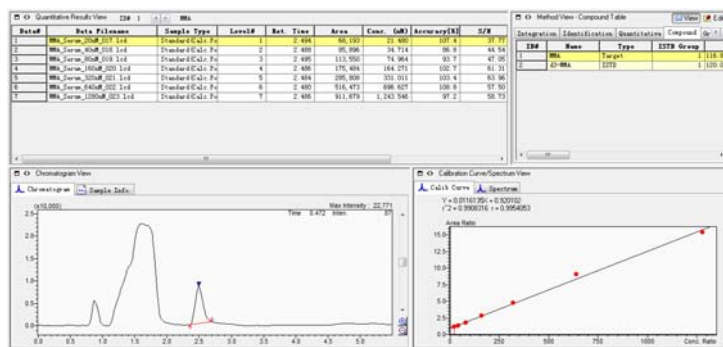


图 4. MMA 血清标准曲线

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	$Y=0.0119918X-0.0170014$	$Y=0.0116135X+0.920102$

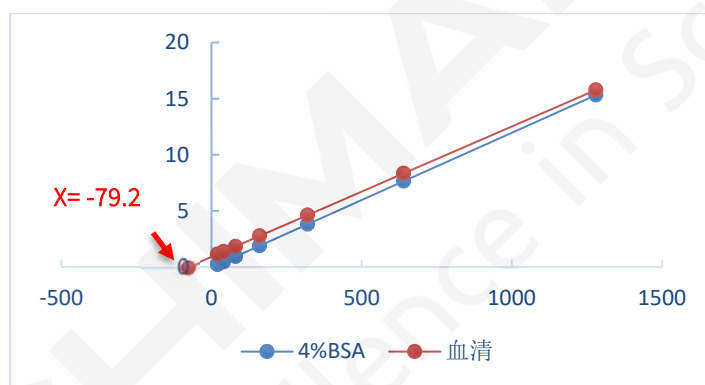


图 5. MMA 替代基质标曲和 MMA 血清标曲比较

### 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，按上述请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%。

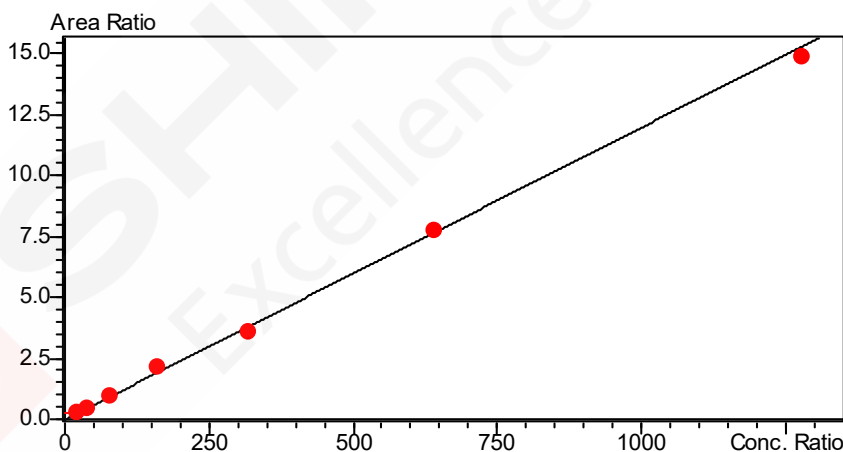


图 6. MMA 的替代基质标准曲线

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  $r>0.975$ ，b 在 0.97-1.03 范围内，表明实验结果可接受。

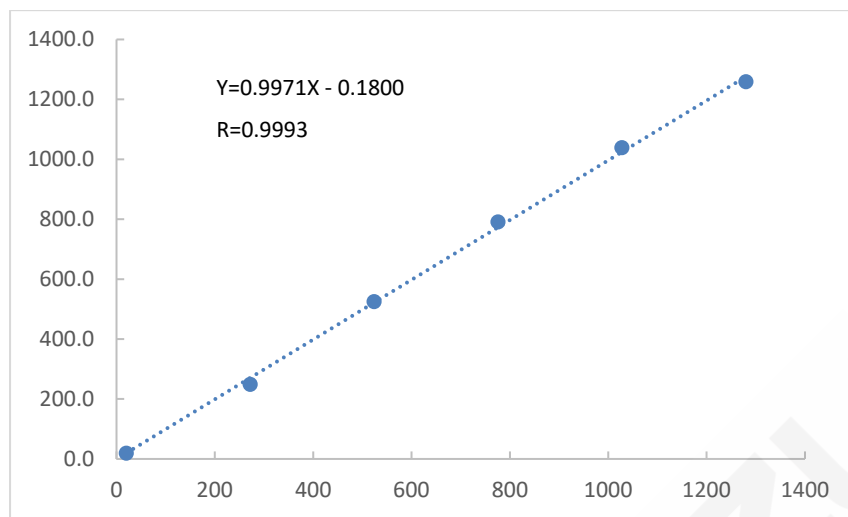


图 7. MMA 的线性范围验证

## 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）。

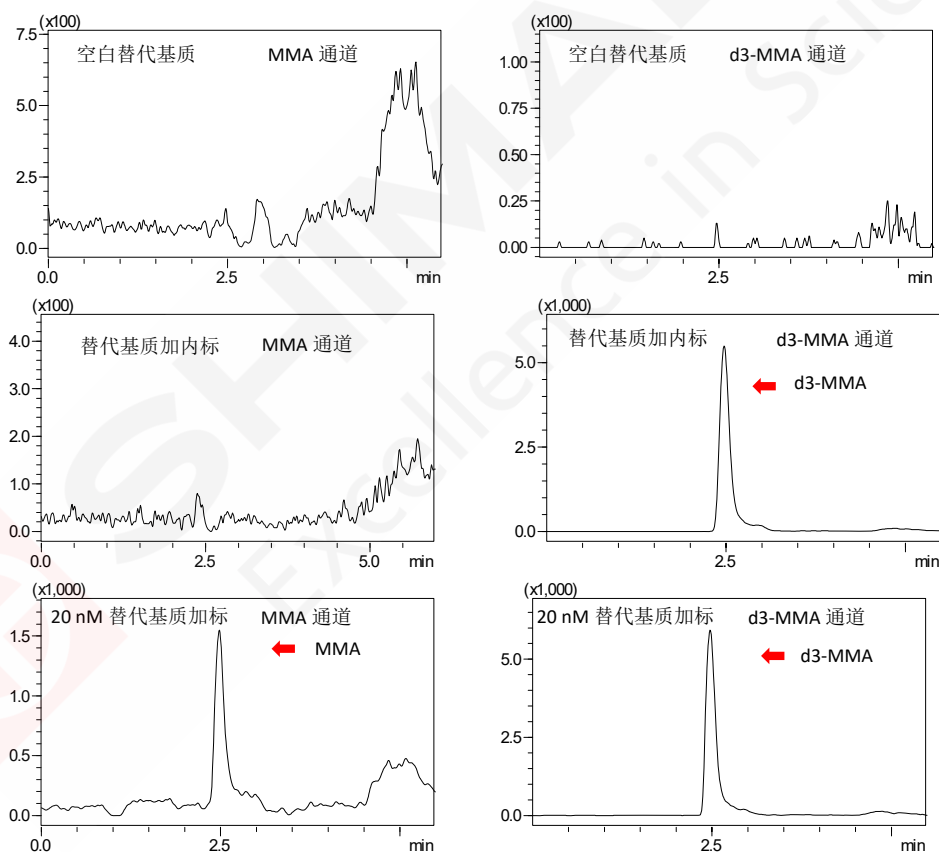


图 8. 特异性验证结果

## 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 值=目标峰面积 (A-MMA) /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
%CV	6.2	3.9	7.7

## 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)，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 联用系统，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、稳定性和准确度高，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。



## 2.11 LCMS-8050 选择离子监测模式测定血液糖化血红蛋白含量

**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

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.  $\times$  50 mm L., 1.9  $\mu$ m

柱温: 50 $^{\circ}$ C

洗脱方式: 梯度洗脱, 初始浓度为 B 相 10%, 时间程序见表 1

进样量: 0.5  $\mu$ L

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	

## 质谱条件

分析仪器:	LCMS-8050	碰撞气:	氩气
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°C 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°C 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°C 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°C 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

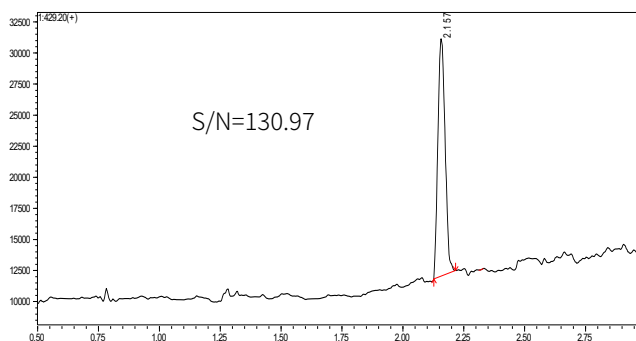


图 1 HbA1c 校准点 2(3.029%)色谱图

## 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。

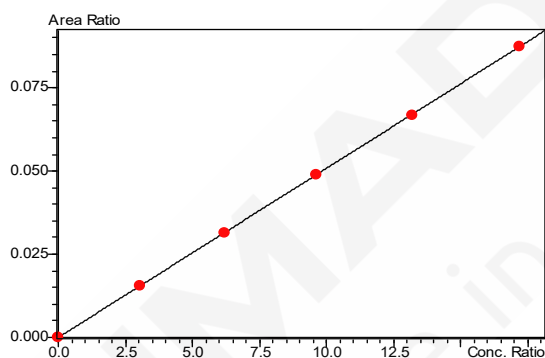


图2 HbA1c 校准曲线

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

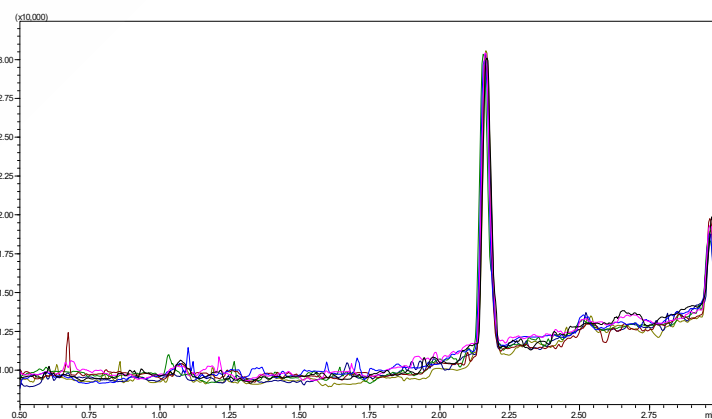


图3 HbA1c 质控品 QC2重复性数据及色谱图

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

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	4.002	20.223

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。

## 2.12 LCMS-8045 多反应监测模式测定血液糖化血红蛋白含量

**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

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.  $\times$  50 mm L., 1.9  $\mu$ m

柱温: 50 $^{\circ}$ C

洗脱方式: 梯度洗脱, 初始浓度为 B 相 5%, 时间程序见表 1

进样量: 0.5  $\mu$ L

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	

## 质谱条件

分析仪器:	LCMS-8045	碰撞气:	氦气
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°C 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°C 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°C 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°C 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

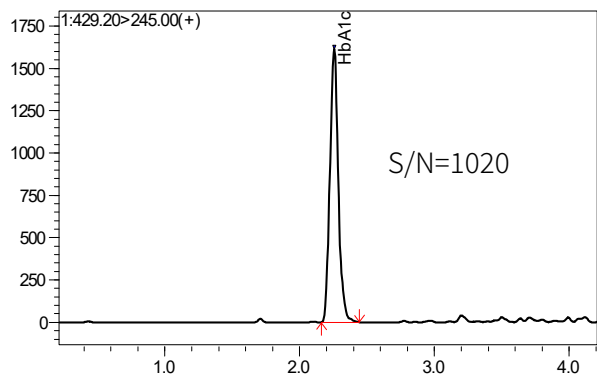


图1 HbA1c 校准点 2(3.029%)色谱图

## 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。

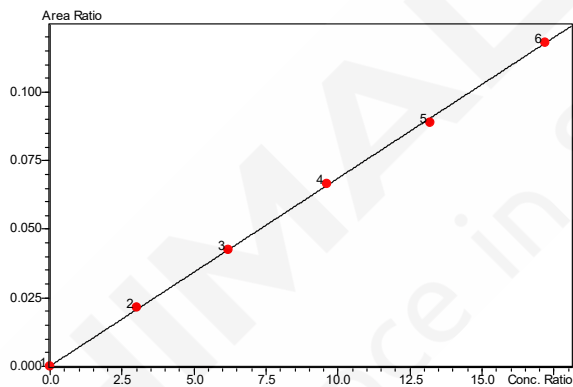


图2 HbA1c 校准曲线

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

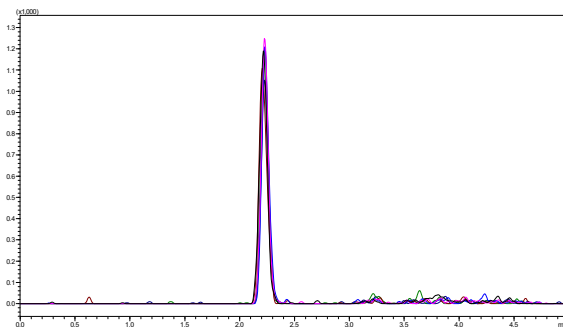


图3 HbA1c 质控品 QC2 重复性数据及色谱图

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	4.121	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： $Y_{\text{NGSP}} = 0.09148 X_{\text{IFCC}} + 2.152$

## 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性、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。

## 2.13 LCMS-8050 CL 定量分析人血清中甲状腺激素 T3 和 T4 含量

**摘要:** 本文建立了一种使用岛津临床质谱 LCMS-8050 CL 测定人血清中三碘甲状腺原氨酸 (T3) 和四碘甲状腺原氨酸 (T4) 的定量分析方法。使用同位素内标、标准样品及基质加标样品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性范围 T3: 0.26~5.06 ng/mL, T4: 4~200 ng/mL, 满足临床参考区间要求, 标准曲线相关系数均大于 0.9990, 方法准确度及精密度均可满足临床日常检验需求。该方法分析速度快, 灵敏度高, 专属性强, 前处理简单, 可为相关从业人员提供参考。

**关键词:** 临床质谱 LCMSMS 甲状腺素

甲状腺主要合成和分泌甲状腺素 (T4) 和三碘甲状腺原氨酸 (T3) 两种激素, T3 的活性大约是 T4 的 5 倍, 但含量较低, 这两种激素的生理功能主要为促进糖、蛋白质、脂肪等营养物质代谢, 调节生长发育过程; 提高大多数组织的耗氧量, 促进能量代谢, 增加产热和提高基础代谢。甲状腺疾病类型多样, 主要包括甲亢、甲减、甲状腺炎症、甲状腺肿和甲状腺肿瘤等。

甲状腺疾病在诊断、治疗过程中都需要定期进行甲状腺功能检测, 其检测指标主要包括: 血清总三碘甲状腺原氨酸 (TT3)、血清总甲状腺素 (TT4)、血清游离三碘甲状腺原氨酸 (FT3)、血清游离甲状腺素 (FT4) 和促甲状腺激素 (TSH)。其中血清 TT4 和 TT3 是判断甲状腺功能最基本的筛选试验。血清 TT4 和 TT3 浓度增高主要见于甲状腺功能亢进, 血

清 TT4 和 TT3 浓度降低主要见于甲状腺功能低下。检测手段方面目前临床多用免疫学方法对人体中 TT3 和 TT4 进行定量, 该方法的准确性和重复性较差, 因此为了进一步提高检测结果的准确性和可靠性, 岛津开发了 TT4 和 TT3 的 LC-MS/MS 定量方法。

本文参考中国医师协会检验医师分会临床质谱检验医学专业委员会的《液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证》, 在岛津 LCMS-8050 CL 平台上建立了一种简单高效的液相色谱质谱法同时测定人血清中 TT4 和 TT3 的定量分析方法。血清样本经蛋白沉淀和引入同位素内标后, 加水适当稀释后进样分析, 内标法定量人血清中 TT4 和 TT3 含量。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质谱 LCMS-8050 CL, 具体配置如下:

输液泵:	LC-30A CL	在线脱气机:	DGU-20A <sub>5R</sub> CL
自动进样器:	SIL-30AC <sub>MP</sub> CL	柱温箱:	CTO-30AC CL
系统控制器:	CBM-20A CL	工作站软件:	LabSolutions Version 5.87

#### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱: Shim-pack Velox PFPP(50mm × 2.1mm × 1.9 μm), 货号: 227-32019-02

流动相: A 相-0.1%甲酸水, B 相-0.1%甲酸甲醇

洗脱方式： 梯度洗脱，B 相初始浓度为 40%，时间程序见表 1

流 速： 0.4 mL/min 进样器温度： 15°C

柱 温： 45°C 进 样 量： 30  $\mu$ L

表 1.梯度洗脱程序

时间(min)	A (%)	B (%)
0.01	60	40
0.2	60	40
1.4	5	95
2.4	5	95
2.5	60	40
3.0	60	40

质谱条件

离子化模式： ESI(+)  
加 热 气： 空气 10.0 L/min  
雾 化 气： 氮气 3.0 L/min  
干 燥 气： 氮气 10.0 L/min  
驻 留 时 间： 47 ms

离子源 温度： 300°C  
DL 管 温 度： 150°C  
加热模块温度： 400°C  
扫 描 模 式： 多反应监测(MRM)  
MRM 参 数： 见表 2

表 2. MRM 参数

化合物	前体离子>产物离子	Q1 Pre	CE	Q3 Pre
T4	777.80>731.75	-38	-31	-38
T3-13C6	657.95>611.95	-34	-21	-30
T4-13C6	783.80>737.85	-22	-26	-40
651.80_T3	651.80>478.85	-32	-33	-23

### 1.3 样品制备和前处理

#### 1.3.1 标准品

表 3.标准品信息

名称	CAS	品牌	货号
四碘甲腺原氨酸	51-48-9	LGC	G1008796
四碘甲腺原氨酸- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	720710-30-5	Cerilliant	T-076
三碘甲状腺原氨酸	6893-02-3	Sigma	T-2877
三碘甲状腺原氨酸- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	1213431-76-5	Cerilliant	T-077

### 1.3.2 样本制备

- (1) 混标工作液：分别称取 1 mg T3 和 T4 标准品于 10 mL 容量瓶，用含 1%甲酸的甲醇溶液定容得 0.1 mg/mL 浓度储备液，之后取 10  $\mu$ L T3 储备液和 400  $\mu$ L T4 储备液于 10 mL 容量瓶，用甲醇定容得含 0.1  $\mu$ g/mL T3 和 4  $\mu$ g/mL T4 混标工作液；
- (2) 内标工作液：分别移取 T3- $^{13}$ C<sub>6</sub> 和 T4- $^{13}$ C<sub>6</sub> 标准品于试剂瓶中加入含 0.1%甲酸的甲醇溶液得到内标工作液（T3- $^{13}$ C<sub>6</sub> 为 1.5 ng/mL，T4- $^{13}$ C<sub>6</sub> 为 50 ng/mL）；
- (2) 校准品：将 T3&T4 混标工作液加入到含 1%BSA 的 1xPBS 溶液得到 6 个系列浓度的校准品（T3 为 0.69~3.91 ng/mL，T4 为 53.53~199.14 ng/mL）；
- (3) 质控品：将 T3&T4 混标工作液加入到混合人血清中得到 3 个系列浓度的质控品（T3 为 0.16~5.06 ng/mL，T4 为 4~200 ng/mL）。

### 1.3.3 样本前处理

- (1) 移取 50  $\mu$ L 校准品/质控品/待测血清样本于 1.5 mL 离心管；
- (2) 加入 200  $\mu$ L 内标工作液于 2000 rpm 涡旋混合 1 min；
- (3) 10000 rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 5min；
- (4) 取 100  $\mu$ L 上清于进样小瓶并加入 200 $\mu$ L 纯水混匀；
- (5) 上机后自动进样器以 30  $\mu$ L 进样分析。

## 2. 实验结果

### 2.1 临床参考区间

表 4.临床参考区间(免疫发光法)

检测指标	摩尔浓度	质量浓度
血清总 T3	1.01~2.48 nmol/L	0.65~1.60 ng/mL
血清总 T4	69.97~152.52 nmol/L	54.6~118.97 ng/mL

### 2.2 线性关系

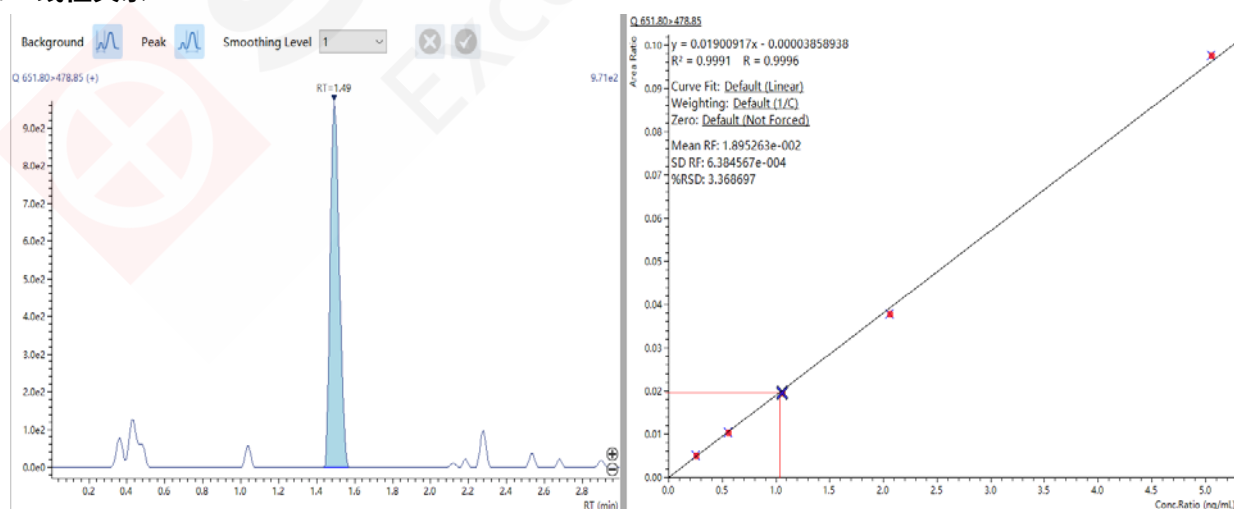


图 1. T3 STD-3 色谱图&T3 标准曲线

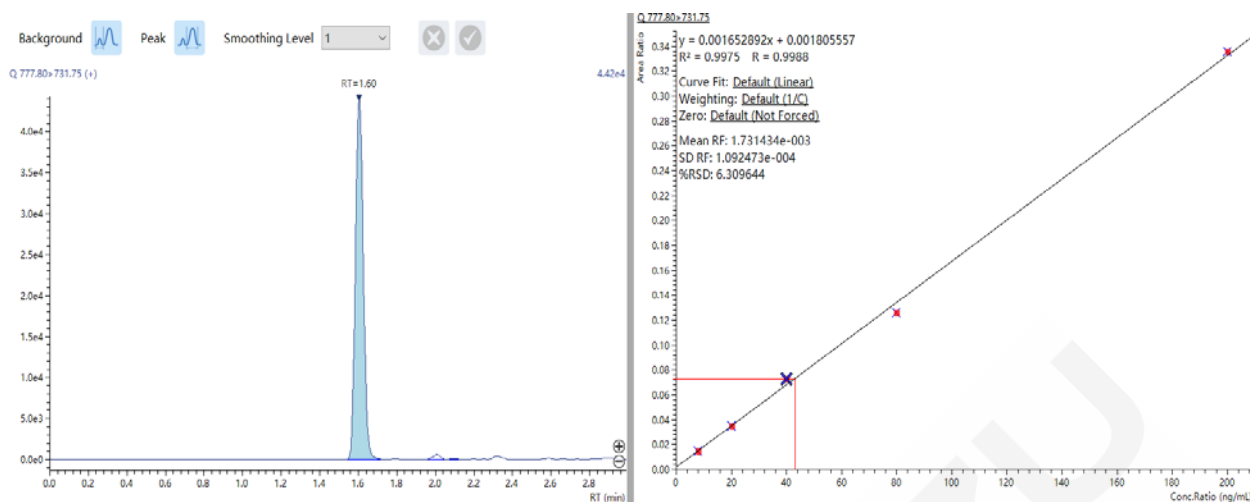


图 2. T4 STD-3 色谱图&T4 标准曲线

标准浓度校准品 (T3 为 0.26、0.56、1.06、2.06 和 5.06 ng/mL; T4 为 4、8、20、40、80 和 200 ng/mL) 按 1.3.3 中前处理条件进行分析测定, 以浓度比为横坐标, 面积比为纵坐标, 内标法制作校准曲线得到的线性方程、相关系数及线性范围见表 5。

表 5. 标准曲线参数

#	名称	线性方程	相关系数	线性范围 (ng/mL)	准确度(%)
1	T3	$f(x)=0.01900917*x-0.00003858938$	$r=0.9996$	0.26-5.06	96.8~105.5
2	T4	$f(x)=0.001653930*x+0.001723166$	$r=0.9990$	4-200	93.8~107.8

### 2.3 精密度&准确度实验

本实验分别对低、中、高三个浓度的 T3 和 T4 正常人血清基质加标样 (质控品) 进行 5 次重复测定, 精密度相对标准偏差范围分别在 6.6%~13.0% (T3) 和 0.8%~5.6%(T4)之间, 准确度度相对标准偏差范围分别在 8.0%~14.2% (T3) 和-0.4%~-8.0%(T4)之间, 满足临床检测要求, 数据结果见附表 6 和表 7。

表 6. T3 精密度&准确度结果(n=5)

Sample	Mean(ng/mL)	%RSD	Target(ng/mL)	%Dev
LQC	0.74	13.0	0.69	8.0
MQC	1.15	7.8	1.02	12.4
HQC	4.47	6.6	3.91	14.2

表 7. T4 精密度&准确度结果

Sample	Mean(ng/mL)	%RSD	Target(ng/mL)	%Dev
LQC	49.23	5.6	53.53	-8.0
MQC	67.40	3.3	70.97	-5.0
HQC	198.40	0.8	199.14	-0.4

## 2.4 定量限色谱图

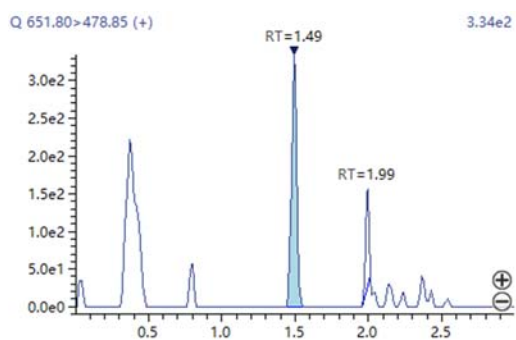


图 3. 0.26 ng/mL T3 色谱图(1%BSA 基质)

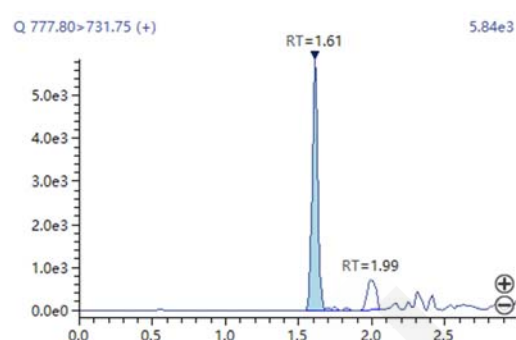


图 4. 4 ng/mL T4 色谱图(1%BSA 基质)

## 3. 结论

使用岛津临床质谱 LCMS-8050 CL 建立了检测人血清中三碘甲腺原氨酸 (T3) 和四碘甲腺原氨酸 (T4) 的定量分析方法。方法线性范围 T3: 0.26~5.06 ng/mL, T4: 4~200 ng/mL, 涵盖临床参考区间, 线性宽度高于免疫方法, 标准曲线的相关系数均大于 0.9990。对 T3 和 T4 低、中、高不同浓度的质控品进行精密度和准确度实验, 结果表明 T3 和 T4 精密度相对标准偏差均在  $\pm 13.0\%$  以内, 准确度相对标准偏均在  $14.2\%$  以内, 满足临床检测要求。

## 三、 营养水平评估及相关疾病诊疗领域的应用

### 3.1 引言

营养是儿童生长发育和健康成长的基础，良好的营养状况可以保障和促进儿童体格和大脑的发育，而营养不良给儿童带来的危害往往是不可逆转的，这不仅会造成体格、智力发育迟缓，身体素质下降，也会大大增加成年后罹患心脑血管疾病、糖尿病、高血压等慢性病的风险。营养不良包括营养不足、微量营养素缺乏症和超重肥胖三种形式。生长迟缓、低体重、消瘦是儿童营养不足的主要表现。

碳水化合物、油脂、蛋白质、维生素、水和无机盐是人体所需的六大营养素，营养素主要分为人体需求量较大的宏量营养素和需求量较小的微量营养素。其中宏量营养素包括碳水化合物、脂肪、纤维素、蛋白质以及水。微量营养素包括矿物质和维生素。

以维生素为例，其可分为脂溶性维生素与水溶性维生素两大类。脂溶性维生素包括有：维生素 A、D、E、K；水溶性维生素则包括有维生素 B1、B2、B6、B12 以及烟酸、叶酸、维生素 C。维生素在儿童的生长发育和生理功能方面是必不可少的有机物质。如果缺少维生素，会导致代谢过程障碍、生理功能紊乱、抵抗力减弱，以及引发多种病症，比如坏血症、佝偻病、手足抽搐症等。一般天然食物中就含有各种我们所需要的营养素，而且比例适宜，只有在缺乏时，才需要额外补充维生素。要注意，过量摄入维生素和维生素缺乏都会导致不良后果。

氨基酸是生命的最基础的物质，蛋白质在人体内的消化吸收都必须通过氨基酸来完成，氨基酸是我们身体每一个细胞成长或者重生的最主要物质；氨基酸合成蛋白质、促进氮平衡、参与合成酶与激素、参与机体营养运输、氨基酸在食物营养素中占有重要的地位和作用。儿童成长所需的必需氨基酸包含十种：精氨酸、组氨酸、赖氨酸、色氨酸、蛋氨酸（甲硫氨酸）、苏氨酸、亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和苯丙氨酸，它和成年人所需要的氨基酸有所不同。

无机盐也叫矿物质，包括常量元素和微量元素，也是人体代谢中的必要物质。常量元素在体内的含量大于体重的 0.01%，如钙、磷、钠、钾、氯、镁和硫。微量元素在体内的含量小于体重的 0.01%，如铁、铜、锌、硒等。儿童少年时期对钙、磷、铁的需要量较高，缺钙会导致佝偻病，缺铁会引起缺铁性贫血，缺锌会导致发育不良。

综上所述，营养素过量或者缺乏均会对儿童健康产生影响，因此需要根据儿童发育状况进行营养水平评估，进而指导儿童合理膳食以及疾病的诊治等。

本章介绍了维生素的 LC-MS/MS 检测方法及常量元素和微量元素的测定方法，供分析人员参考。

## 3.2 LCMS-8040 CL 检测人血清中 25-羟基维生素 D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> 含量

**摘要：**本文使用岛津液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 CL 及经 CE 认证的 ZIVAK 品牌人血清中 25-羟基维生素 D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> 含量检测试剂盒中的校准溶液和质控溶液，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，并进行了部分方法学验证。实验结果表明，该方法线性关系良好、灵敏度高、检测稳定性及准确度高，可适用于血清中 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业人员提供参考。

**关键词：**LCMS-8040 CL 25-羟基维生素 D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> 人血清 临床检验

维生素 D 是一类脂溶性激素，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（25-OHD），从而被机体转运或储藏，因此体内 25-OHD 含量可有效反映人体维生素 D 的营养状

态。此外，25-OHD 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 25-OHD 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，25-OHD 的检测方法有多种，包括免疫检测、HPLC 法和 LC-MS/MS 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，我们使用岛津液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 CL 及经 CE 认证的 ZIVAK 品牌人血清中 25-羟基维生素 D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> 含量检测试剂盒中的校准溶液和质控溶液，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，并进行了部分方法学验证。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器

岛津液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 CL。

具体配置为：LC-20ADXR×2 输液泵，DGU-20A3 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-8040 CL 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.60 色谱工作站。

#### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱	柱	: Shim-pack GISS-HP C18 (2.1 mm I.D. × 100 mm L., 3 μm)
流 动	相	: A 相-0.1%甲酸-1 mM 乙酸铵水    B 相-0.1%甲酸-1 mM 乙酸铵甲醇
流	速	: 0.35 mL/min
柱	温	: 25°C
进 样	量	: 10 μL

自动进样器温度 : 4°C

洗脱方式 : 梯度洗脱, B相初始浓度为70%, 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.	100
3.30	Pumps	Pump B Conc.	100
3.31	Pumps	Pump B Conc.	70
6.00	Controller	Stop	

### 质谱条件

离子源 : ESI (+)

加热模块温度 : 500°C

雾化气流速 : 3.0 L/min

干燥气流速 : 17.0 L/min

D L 温度 : 150°C

扫描模式 : 多反应监测(MRM)

驻留时间 : 100 ms

M R M 参数 : 见表2

表2 MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
25-OHD <sub>2</sub>	413.30	395.30	-14.0	-10.0	-27.0
25-OHD <sub>3</sub>	401.30	383.30	-26.0	-10.0	-26.0
d6-25-OHD <sub>3</sub>	407.30	389.30	-26.0	-10.0	-26.0

## 1.3 样品前处理

取 750  $\mu$ L 血清样品 (标准工作液或质控品) 于 10 mL 离心管中, 加入 150  $\mu$ L 内标溶液, 充分混匀 10 s; 再加入饱和硫酸锌溶液 500  $\mu$ L; 剧烈震荡 10 s, 室温静置 15 min; 加入 2 mL 正己烷, 剧烈震荡 10 s, 4000 rpm 离心 5 min; 取最上层 1700  $\mu$ L, 室温下氮气吹干, 加入 75% 甲醇溶液 300  $\mu$ L, 充分混匀 10 s, 14000 rpm 离心 2 min, 进样分析。

## 2. 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图

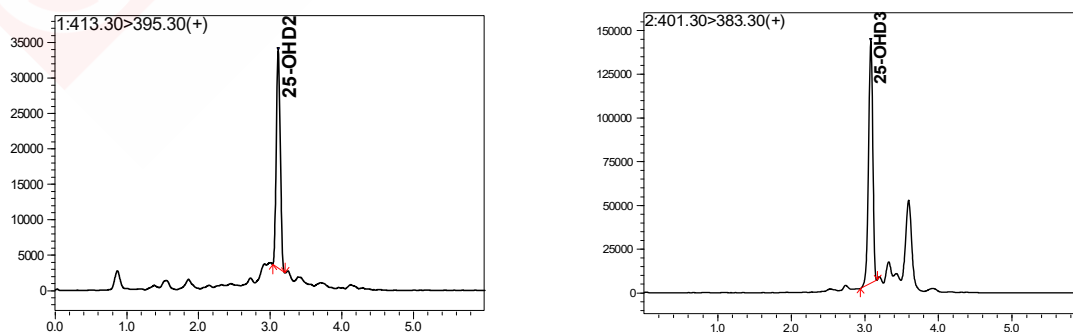


图1 校准液最低浓度点 9.99 ng/mL 25-OHD<sub>2</sub> 和 14.71 ng/mL 25-OHD<sub>3</sub> 色谱图

## 2.2 线性关系

采用内标法建立标准曲线，连续考察 3 天，结果如表 3 与表 4 所示，25-OHD<sub>2</sub> 在 9.99 – 53.74 ng/mL、25-OHD<sub>3</sub> 在 14.71 – 39.8 ng/mL 的线性浓度范围内线性相关性良好。

表 3 连续 3 天标准曲线

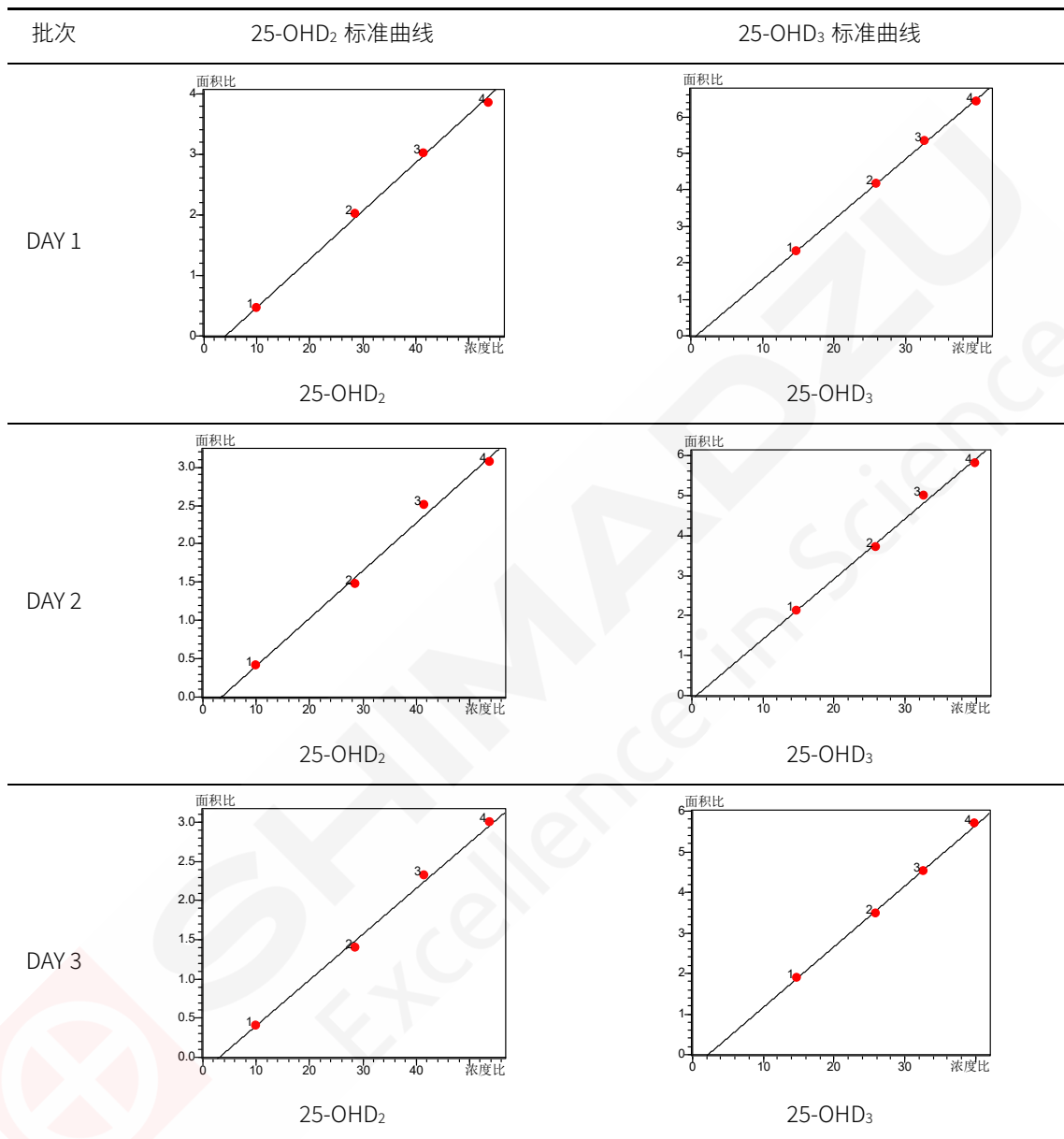


表 4 标准曲线结果

批次	目标物	线性方程	相关系数	准确度
DAY 1	25-OHD <sub>2</sub>	$Y = (0.0795692)X + (-0.322606)$	0.9995	97.6-102.2%
	25-OHD <sub>3</sub>	$Y = (0.1659350)X + (-0.126083)$	0.9998	99.2-100.9%
DAY 2	25-OHD <sub>2</sub>	$Y = (0.0621809)X + (-0.215256)$	0.9974	94.7-105.5%
	25-OHD <sub>3</sub>	$Y = (0.150495)X + (-0.0938719)$	0.9978	97.7-103.5%
DAY 3	25-OHD <sub>2</sub>	$Y = (0.0583642)X + (-0.178867)$	0.9986	94.7-103.0%
	25-OHD <sub>3</sub>	$Y = (0.1495900)X + (-0.330483)$	0.9996	98.6-101.3%

## 2.3 检出限与定量限

表 5 检出限与定量限结果

目标物	Level 1 (ng/mL)	信噪比	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
25-OHD <sub>2</sub>	9.99	422.10	0.06	0.18
25-OHD <sub>3</sub>	14.71	1625.60	0.03	0.08

## 2.4 日内及日间精密度

分别取处理后低、高两个浓度的质控样品，25-OHD<sub>2</sub> 靶值：LQC = 13.66 ng/mL、HQC = 30.40 ng/mL，25-OHD<sub>3</sub> 靶值：LQC = 18.20 ng/mL、HQC = 27.56 ng/mL。样品经连续 3 天分别重复 6 次进样分析后，数据统计分析得到变异系数 (CV%) 结果如表 6 所示。

表 6. 日内 (n=6) 及日间 (n=18) 精密度考察结果

批次	样品号	25-OHD <sub>2</sub> (ng/mL)		25-OHD <sub>3</sub> (ng/mL)	
		LQC	HQC	LQC	HQC
DAY 1	1	15.133	29.405	17.837	28.689
	2	14.326	31.362	17.568	27.110
	3	14.381	30.654	17.766	27.259
	4	15.436	31.645	18.194	30.875
	5	14.469	31.989	17.744	27.653
	6	14.812	30.960	18.299	27.531
	平均值	14.760	31.003	17.901	28.186
	CV%	3.05	2.95	1.58	5.07
DAY 2	1	14.956	30.519	18.696	29.003
	2	15.267	28.884	18.432	27.723
	3	14.778	30.083	18.403	28.526
	4	14.016	30.217	17.454	28.716
	5	14.949	29.175	18.048	28.003
	6	14.193	29.493	17.742	27.967
	平均值	14.693	29.729	18.129	28.323
	CV%	3.30	2.16	2.58	1.76
DAY 3	1	13.837	28.937	18.869	30.740
	2	13.728	29.730	19.490	29.824
	3	13.690	30.293	18.967	30.172
	4	14.486	30.561	19.391	31.102
	5	14.728	30.886	19.702	29.893
	6	14.943	31.515	19.239	30.307
	平均值	14.235	30.320	19.276	30.340
	CV%	3.87	2.97	1.64	1.63
日间精密度	CV%	3.61	3.12	3.84	4.60

## 2.5 准确度验证

### 2.5.1 质控回收率

取处理后低浓度的质控样品，即 25-OHD<sub>2</sub> 靶值：LQC = 13.66 ng/mL，25-OHD<sub>3</sub> 靶值：LQC = 18.20 ng/mL，经连续 3 天分别重复 6 次进样分析后，数据统计分析得到回收率%结果如表 7 所示。

表 7 低值质控回收率

批次	样品号	25-OHD <sub>2</sub> (ng/mL)			25-OHD <sub>3</sub> (ng/mL)		
		LQC	靶值	回收率	LQC	靶值	回收率
DAY 1	1	15.133		110.8%	17.837		98.0%
	2	14.326		104.9%	17.568		96.5%
	3	14.381		105.3%	17.766		97.6%
	4	15.436	13.66	113.0%	18.194	18.20	100.0%
	5	14.469		105.9%	17.744		97.5%
	6	14.812		108.4%	18.299		100.5%
	平均值	14.760		108.1%	17.901		98.4%
DAY 2	1	14.956		109.5%	18.696		102.7%
	2	15.267		111.8%	18.432		101.3%
	3	14.778		108.2%	18.403		101.1%
	4	14.016	13.66	102.6%	17.454	18.20	95.9%
	5	14.949		109.4%	18.048		99.2%
	6	14.193		103.9%	17.742		97.5%
	平均值	14.693		107.6%	18.129		99.6%
DAY 3	1	13.837		101.3%	18.869		103.7%
	2	13.728		100.5%	19.490		107.1%
	3	13.690		100.2%	18.967		104.2%
	4	14.486	13.66	106.0%	19.391	18.20	106.5%
	5	14.728		107.8%	19.702		108.3%
	6	14.943		109.4%	19.239		105.7%
	平均值	14.235		104.2%	19.276		105.9%

## 3. 结论

本文使用岛津液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 CL，利用 ZIVAK 品牌人血清中 25-羟基维生素 D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> 含量检测试剂盒中的校准溶液和质控溶液，建立了人血清中 25-羟基维生素 D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> 的定量检测方法，并进行了部分方法学验证。实验结果表明，该方法灵敏度高、稳定性好、检测结果准确可靠，可适用于人血清中 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业人员提供参考。

### 3.3 平行液相串联质谱检测人血清中 25-羟基维生素 D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> 含量

**摘要：**本文使用岛津 Nexera MX System 平行液相和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统，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> 测定的可报告范围分别为 0.3900 – 50.00 ng/mL、1.172 – 150.0 ng/mL；精密度 (CV%) 分别为 1.6 - 3.1%，准确度范围分别为 96.9 - 106.9%。该方法分析速度快、稳定性和准确度高，且大大提高了分析效率，节省仪器采购与检测成本，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业人员提供参考。

**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，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 (25-OHD)，从而被机体转运或储藏，因此体内 25-OHD 含量可有效反映人体维生素 D 的营养状态。此外，25-OHD 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 25-OHD 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，25-OHD 的检测方法有多种，包括免疫检测、HPLC 法和 LC-MS/MS 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 Nexera MX System 平行液相系统和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用，建立了血清中 25-OHD<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> 的定量分析方法，该方法是第一次将平行液相技术应用于 25-OHD<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> 的检测，较常规 LCMS 方法，极大地缩短了分析检测时间，降低了设备及分析成本，提高了检测效率及经济效益，凸显了该技术的优势。

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器

岛津 Nexera MX System 平行液相与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。

具体配置为：LC-20AD<sub>XR</sub> × 4 输液泵，DGU-20A5 × 2 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-8045 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 XR-C8 (2.0 mm I.D. × 50 mm L., 2.2 μm)
流 动 相	: A 相-0.1%甲酸水 B 相-0.1%甲酸-2 mM 乙酸铵-甲醇
流 速	: 0.4 mL/min

柱 温 : 25°C  
 进 样 量 : 20 µL  
 自动进样器温度 : 4°C  
 洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 85%, 时间程序见表 1 - 3。  
 阀 切 换 时 间 : 0.15 min  
 液 相 模 式 : Binary gradient × 2  
 平行液相分析模式 : Automatic 1

表 1. parallel LC 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	85
0.51	Pumps	Pump B Conc.	98
2.00	Controller	Stop	

表 2. parallel LC 2 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0	Pumps	Pump B Conc.	85
2.00	Controller	Stop	

表 3. 单液相梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.5	Pumps	Pump B Conc.	85
0.51	Pumps	Pump B Conc.	98
1.60	Pumps	Pump B Conc.	98
1.61	Pumps	Pump B Conc.	85

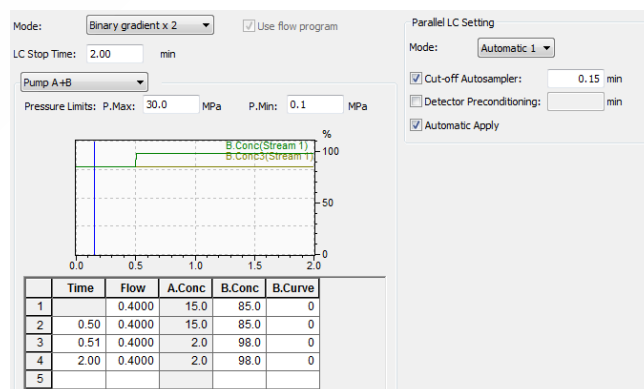


图 1. 液相分析条件

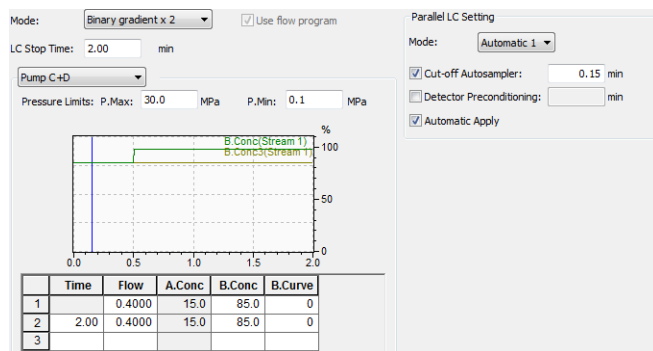
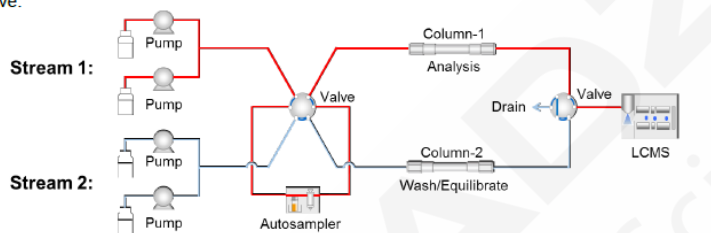


图 2. 液相冲洗平衡条件

1. Loading Sample

Hold as initial condition until the sample injected from Autosampler is loaded out of flow selection valve.



2. Cutting Off Autosampler Flow Path

Switch flow selection valve and cut off Autosampler flow path.

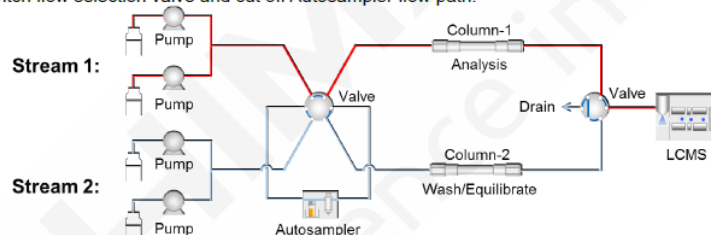


图 3. parallel LC 简易设计图及工作原理示意图

Nexera MX System Method

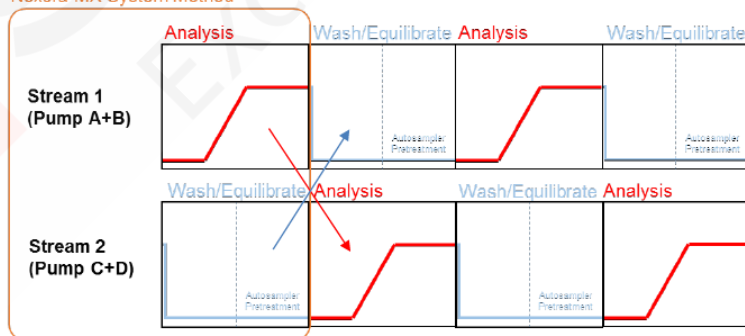


图 4. Parallel LC 分析方法切换方式示意图

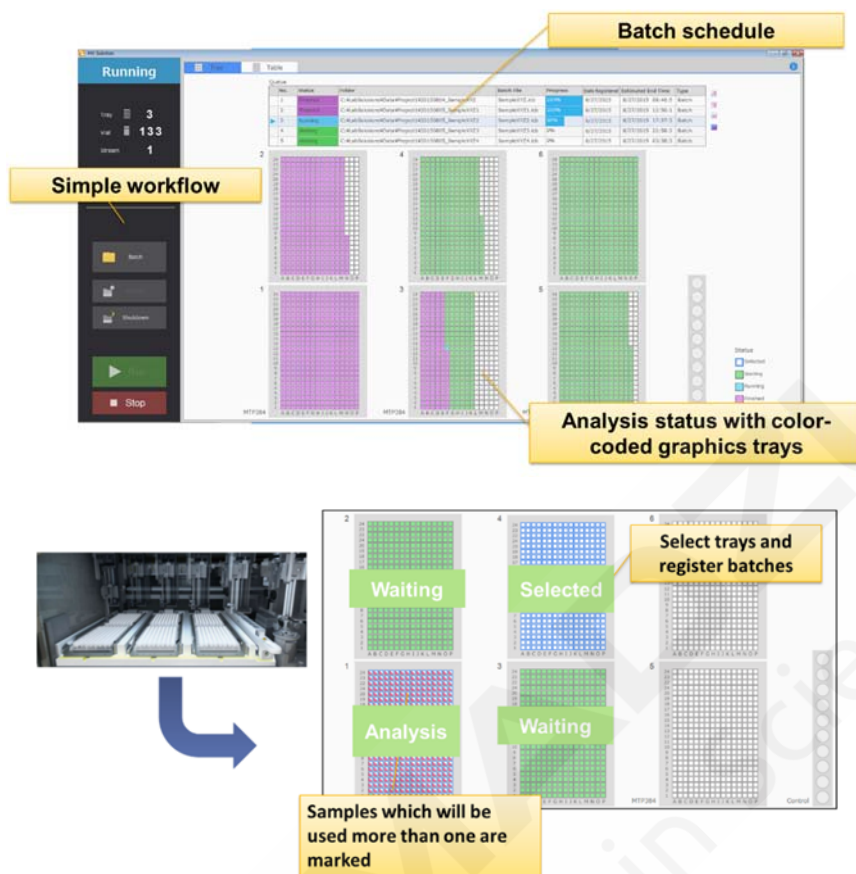


图 5. MX Solution 软件布局及功能

质谱条件

离子源 : ESI (+)	加热模块温度 : 500°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 : 300°C	驻留时间 : 100 ms
D L 温度 : 150°C	M R M 参数 : 见表 4

表 4 MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
25-OHD2	413.3	337.3	-15.0	-11.0	-24.0
25-OHD3	401.3	365.4	-20.0	-11.0	-17.0
d3-25-OHD2	416.3	340.4	-12.0	-12.0	-21.0
d6-25-OHD3	407.3	371.3	-29.0	-11.0	-25.0

1.3 样品制备

1.3.1 标准工作曲线配制

用乙醇配制 25-OHD<sub>2</sub> 和 25-OHD<sub>3</sub> 浓度分别为 100 µg/mL、300 µg/mL 的混合标准储备液, 随后用 75%

甲醇 (0.1%甲酸) 将混合标准储备溶液逐级稀释成浓度为 0.3900 ng/mL、0.7810 ng/mL、1.563 ng/mL、2.344 ng/mL、6.250 ng/mL、12.50 ng/mL、25.00 ng/mL 和 50.00 ng/mL 的 25-OHD<sub>2</sub> 标准工作液；1.172 ng/mL、2.344 ng/mL、4.688 ng/mL、9.375 ng/mL、18.75 ng/mL、37.50 ng/mL、75.00 ng/mL、150.0 ng/mL 的 25-OHD<sub>3</sub> 标准工作液；用乙醇配制 d3-25-OHD<sub>2</sub> 和 d6-25-OHD<sub>3</sub> 浓度分别为 100.0 μg/mL、300.0 μg/mL 的混合内标储备液，再用 75%甲醇 (0.1%甲酸) 稀释为浓度为 50.00 ng/mL、150.0 ng/mL 的内标工作液。

### 1.3.2 样品前处理方法

取 100 μL 血清样品或标准工作液于 1.5 mL 离心管中，加入 10 μL 内标溶液，充分混匀；加入 200 μL 乙醇；剧烈震荡 30 s，室温静置 15 min；加入 1 mL 正己烷，剧烈震荡 30 s，14000 g 以上离心 5 min；取最上层有机层 850 μL，室温下氮气吹干，加入 75%甲醇 (0.1%甲酸) 溶液 100 μL，充分混匀 30s。

## 2. 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图

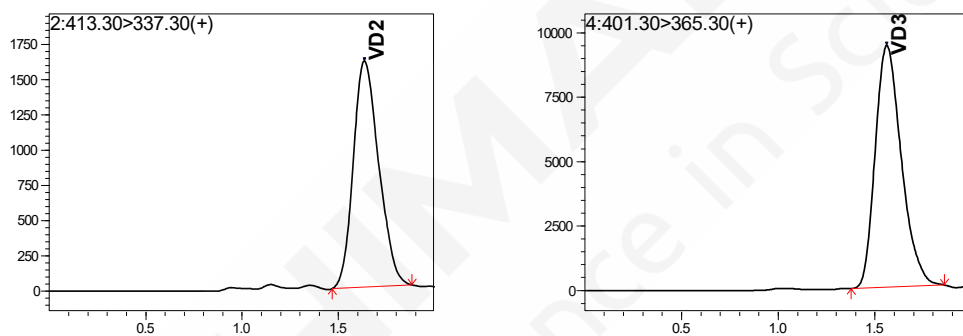


图 6. 定量下限 0.3900 ng/mL 25-OHD<sub>2</sub> 和 1.172 ng/mL 25-OHD<sub>3</sub> 色谱图

### 2.2 线性关系

采用内标法建立标准曲线。如图 7 所示，25-OHD<sub>2</sub> 在 0.3900-50.00 ng/mL 的线性浓度范围内，25-OHD<sub>3</sub> 在 1.172 – 150.0 ng/mL 线性相关性良好，相关系数  $r$  分别为 0.9998 和 0.9998，准确度范围分别为 97.6-105.2%和 99.5-103.8%。

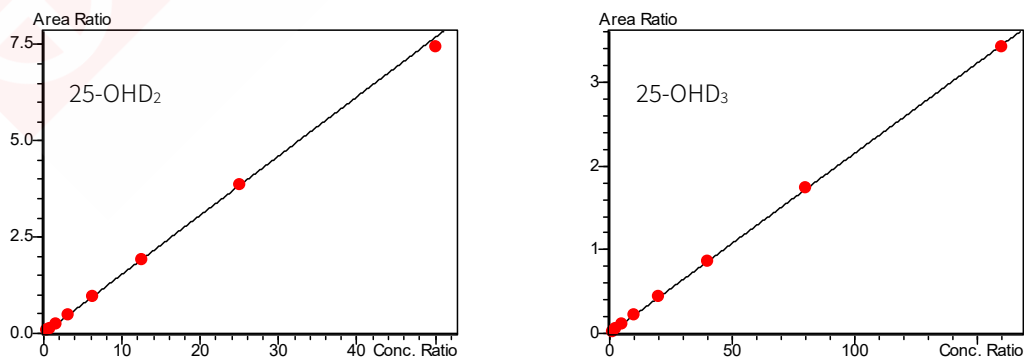


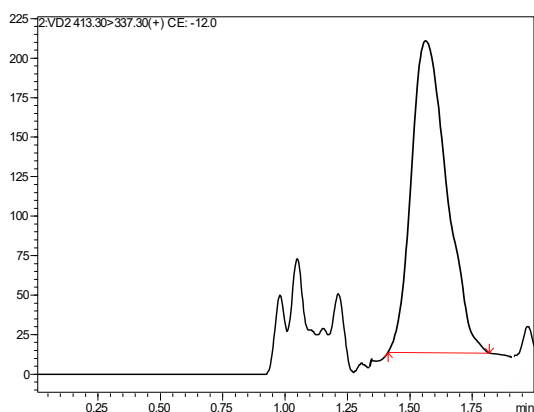
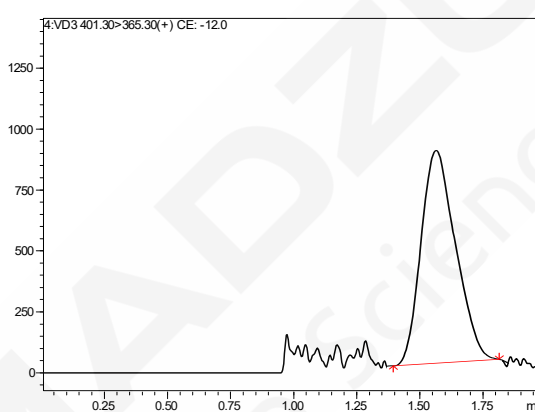
图 7. 25-OHD<sub>2</sub> 和 25-OHD<sub>3</sub> 的标准曲线

表 5 标准曲线结果

目标物	线性方程	相关系数	准确度
25-OHD <sub>2</sub>	$Y = (0.153748)X + (-7.87094e-005)$	0.9998	97.6-105.2%
25-OHD <sub>3</sub>	$Y = (0.0215177)X + (-0.000397393)$	0.9998	99.5-103.8%

### 2.3 检出限与定量限

将 25-OHD<sub>2</sub> 与 25-OHD<sub>3</sub> 的标准曲线最低点用稀释液逐级稀释得到信噪比约为 3 时，得到检出限，浓度分别为 0.0390 ng/mL 与 0.1172 ng/mL，色谱图见图 8-9。

图 8. 25-OHD<sub>2</sub> 检出限色谱图图 9. 25-OHD<sub>3</sub> 检出限色谱图

关于定量下限的确定，综合考虑定量下限的准确度与精密度以及人体中 25-OHD 的实际含量范围，经验证，25-OHD<sub>2</sub> 与 25-OHD<sub>3</sub> 的定量下限分别为 0.3900 ng/mL 与 1.172 ng/mL 时，更加能够保证检测的准确有效性。色谱图见图 6。

### 2.4 精密度验证

分别取处理后且已知浓度的低、高两个浓度的质控样品，25-OHD<sub>2</sub> 即 LQC (2.439 ng/mL)、HQC (9.367 ng/mL)，25-OHD<sub>3</sub> 即 LQC = 5.297 ng/mL、HQC = 26.28 ng/mL。样品经分析后，数据统计分析得到变异系数 (CV%) 结果如表 6 所示。

表 6. 精密度考察结果 (n=6)

样品号	25-OHD <sub>2</sub> (ng/mL)		25-OHD <sub>3</sub> (ng/mL)	
	LQC	HQC	LQC	HQC
1	2.364	9.159	5.249	28.09
2	2.415	9.541	5.384	28.00
3	2.435	9.111	5.133	26.18
4	2.397	9.253	5.257	27.07
5	2.417	9.365	5.219	26.36
6	2.485	9.516	5.290	27.77
平均值	2.419	9.324	5.255	27.24
CV%	1.7	1.9	1.6	3.1

## 2.5 准确度验证

分别取处理后且已知浓度的低、高两个浓度的质控样品，25-OHD<sub>2</sub> 即 LQC (2.439 ng/mL)、HQC (9.367 ng/mL)，25-OHD<sub>3</sub> 即 LQC = 5.297 ng/mL、HQC = 26.28 ng/mL。样品经分析后，数据统计分析得到准确度 (%) 结果如表 7 - 8 所示。

表 7. 25-OHD<sub>2</sub> (ng/mL) 准确度验证结果

	LQC	靶值	准确度	HQC	靶值	准确度
QC-1	2.364	2.439	96.9%	9.159	9.367	97.8%
QC-2	2.415	2.439	99.0%	9.541	9.367	101.9%
QC-3	2.435	2.439	99.8%	9.111	9.367	97.3%
QC-4	2.397	2.439	98.3%	9.253	9.367	98.8%
QC-5	2.417	2.439	99.1%	9.365	9.367	100.0%
QC-6	2.485	2.439	101.9%	9.516	9.367	101.6%
平均值	2.419	2.439	99.2%	9.324	9.367	99.5%

表 8. 25-OHD<sub>3</sub> (ng/mL) 准确度验证结果

	LQC	靶值	准确度	HQC	靶值	准确度
QC-1	5.249	5.297	99.1%	28.09	26.28	106.9%
QC-2	5.384	5.297	101.6%	28.00	26.28	106.5%
QC-3	5.133	5.297	96.9%	26.18	26.28	99.6%
QC-4	5.257	5.297	99.2%	27.07	26.28	103.0%
QC-5	5.219	5.297	98.5%	26.36	26.28	100.3%
QC-6	5.290	5.297	99.9%	27.77	26.28	105.7%
平均值	5.255	5.297	99.2%	27.24	26.28	103.7%

## 2.6 临床样品测定结果

共获取已证明为 25-羟基维生素 D 含量正常的人血清样品 8 个，经前处理后分别进行测定，结果如表 13 所示。一般正常人体内 25-羟基维生素 D 的总含量范围为 10-60 ng/mL，各临床样品测定数值均在正常范围内，故该方法适用于临床血清样品中 25-羟基维生素 D 含量准确定量。

表 9. 人血清临床样品检测结果

编号	25-OHD <sub>2</sub> (ng/mL)	25-OHD <sub>3</sub> (ng/mL)	总计 (ng/mL)
Sample-1	1.459	52.64	54.10
Sample-2	4.290	5.466	9.756
Sample-3	1.596	16.48	18.07
Sample-4	0.9190	32.23	33.14

Sample-5	0.2120	25.69	25.90
Sample-6	1.336	23.73	25.06
Sample-7	0.3580	21.02	21.38
Sample-8	0.9820	15.05	16.03

### 3. 结论

本文使用岛津 Nexera MX System 平行液相和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统，建立了 2 分钟内超快速定量检测人血清中 25-羟基维生素 D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> 的方法，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> 测定的可报告范围分别为为 0.3900 – 50.00 ng/mL、1.172 – 150.0 ng/mL；精密度 (CV%) 分别为 1.6 - 3.1%，准确度范围分别为 96.9 - 106.9%。该技术通过巧妙且合理的设计，使得该检测方法不仅分析速度快、稳定性和准确度好，而且提高了约 3 倍分析效率，大大节省了临床实验室仪器采购与检测成本，十分适用于相关医学检验实验室大批量人血清样品中 25-羟基维生素 D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> 的定量分析，该技术有望成为一种在医学检验领域备受青睐且广泛应用的液相色谱质谱联用技术，创造更多的社会价值。



SHIMADZU  
Excellence in Science

### 3.4 串联质谱用于血清中脂溶性维生素含量测定

**摘要:** 使用串联质谱建立了血清中 VA、25OHVD2、25OHVD3、VE 和 VK1 同时测定方法, 使用内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性良好, 标准曲线相关系数均大于 0.996, 质控品测定准确度结果与理论值接近, 回收率在 94%~108%之间, RSD 在 1.9%~6.2%之间, 该方法前处理简便, 分析速度快, 灵敏度高, 专属性强, 可用于血清脂溶性维生素含量测定。

**关键词:** 串联质谱 脂溶性维生素 血清

脂溶性维生素(fat-soluble vitamins)是不溶于水而溶于脂肪及非极性有机溶剂(如苯、乙醚及氯仿等)的一类维生素, 包括维生素 A(VA)、维生素 D(VD)、维生素 E(VE)和维生素 K1(VK1)。维生素 A 缺乏引起夜盲症、上皮干燥、增生及角化, 眼干燥症等。维生素 D, 俗称“阳光维生素”, 主要生理功能是将血钙和血磷水平维持在正常范围内, 对于维持钙的代谢和骨骼健康至关重要。血清中 25-羟基维生素 D2(25OHVD2)和 25-羟基维生素 D3(25OHVD3)的浓度测量, 已经应用于监控人体内维生素 D 的状况及低血钙代谢性骨疾病和高血钙代谢性骨疾病的鉴别诊断。维生素 E 具有抗衰老、抗癌及防止动脉粥样硬化作用, 促进生殖功能使促性腺激素分泌增加,

参与多种酶活动增强微粒体中混合功能氧化酶的活性。维生素 K1 可以促进肝脏合成四种凝血因子, 凝血酶原、转变加速因子, 抗血友病因子, 促进血液凝固, 并可以舒张内脏平滑肌, 缓解肾绞痛、胆绞痛、泌尿系出血。由于遇光遇热不稳定, 且血清中含有大量干扰物质等, 血清中脂溶性维生素的测定十分困难, 一针法同时测定脂溶性维生素更是鲜有报道。

本文使用超高效液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8045, 建立了血清中 VA、25OHVD2、25OHVD3、VE 和 VK1 同时测定方法, 该方法前处理简便, 分析速度快, 灵敏度高, 专属性强, 可用于脂溶性维生素含量测定。

#### 1. 实验部分

##### 1.1 仪器

本实验使用超高效液相色谱与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为:

输液泵	: LC-40D XR×2	在线脱气机	: DGU-405
自动进样器	: SIL-40C XR	柱温箱	: CTO-40C
系统控制器	: CBM-40		

##### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱	: Shim-pack GIST 50 mm×2.1 mm I.D., 2 μm; P/N: 227-30001-02; 岛津(上海)实验器材有限公司	流动相	: A: 0.1%甲酸水(含 2 mM 乙酸铵) B: 0.1%甲酸甲醇(含 2 mM 乙酸铵)
流速	: 0.4 mL/min	柱温	: 40°C

进样量 : 10  $\mu$ L

洗脱方式 : 梯度洗脱, B 相初始浓 70%

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.20	泵	B.Conc	70
1.50	泵	B.Conc	100
5.50	泵	B.Conc	100
5.51	泵	B.Conc	70
7.00	控制器	Stop	

#### 质谱条件

分析仪器 : LCMS-8045      DL 温度 : 150 $^{\circ}$ C  
离子源 : ESI (+)      加热模块温度 : 500 $^{\circ}$ C  
雾化气流速 : 3.0 L/min      离子源温度 : 300 $^{\circ}$ C  
干燥气流速 : 10.0 L/min      扫描模式 : 多反应监测(MRM)  
加热气流速 : 10.0 L/min      MRM 参数 : 见表 2

表 2. MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
VA	269.3	93.2	-14	-21	-19
	269.3	119.2	-14	-21	-12
VA-IS	274.3	93.2	-14	-21	-19
25OHVD2	413.3	337.3	-11	-12	-12
	413.3	355.3	-13	-10	-25
25OHVD2-IS	419.3	355.5	-13	-10	-25
25OHVD3	401.3	365.3	-12	-12	-26
	401.3	257.0	-10	-14	-12
25OHVD3-IS	407.4	371.4	-12	-12	-26
VE	431.4	137.1	-12	-20	-24
	431.4	165.1	-13	-65	-30
VE-IS	437.4	143.1	-12	-20	-24
VK1	451.4	187.1	-12	-23	-19
	451.4	197.0	-12	-26	-13
VK1-IS	458.5	194.1	-12	-23	-19

### 1.3 标准品及样品制备

基质匹配标准曲线制备: 取 5 种脂溶性维生素混标母液, 用甲醇稀释成相应浓度混标液。内标溶液使用乙腈: 甲醇=9: 1 溶液配置成内标工作液。取 180  $\mu$ L 5%BSA 溶液, 20  $\mu$ L 混标液, 涡旋混匀 10 s, 得替代基质标准溶液。

标准品及样品溶液制备：取 200  $\mu\text{L}$  替代基质标准溶液或样品，400  $\mu\text{L}$  内标工作液，涡旋混匀 1 min，加入 1 mL 正己烷，涡旋混匀 1 min，4000 rpm 离心 5 min，取 800  $\mu\text{L}$  上清液，室温氮气吹干，复溶后上机测定。

## 2. 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图

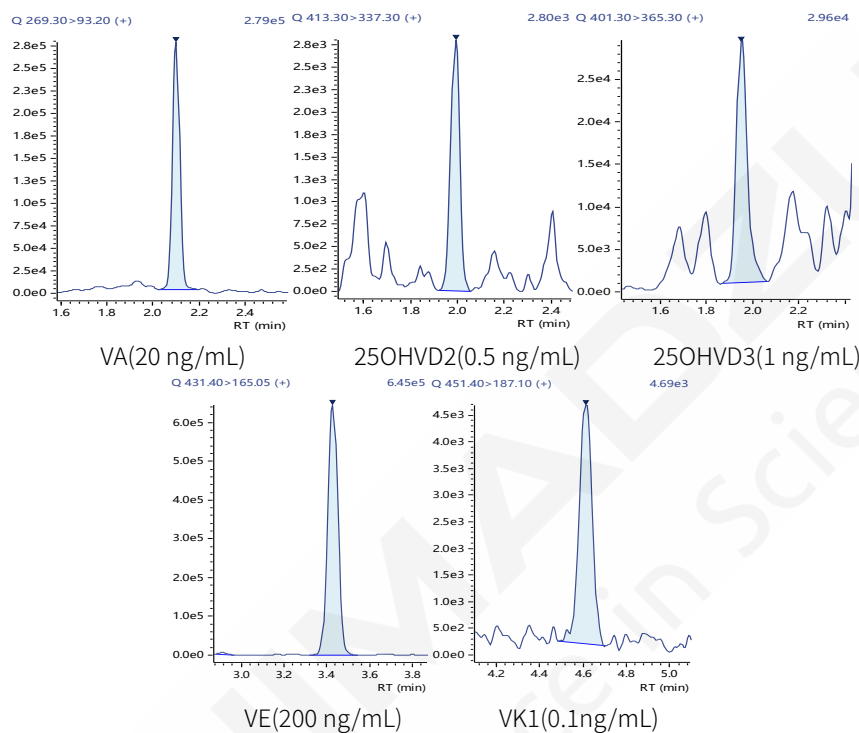


图 1. 标准曲线最低点谱图

### 2.2 线性测定结果

对标准品按 1.2 中的分析条件进行分析，内标法制作标准曲线。标准曲线结果见表 3，5 种脂溶性维生素在标准曲线浓度范围内线性相关系数均大于 0.996，准确度在 93.9%~110.2%之间，满足测定需求。

表 3. 标准曲线结果

编号	名称	线性方程	线性范围(ng/mL)	相关系数	准确度(%)
1	VA	$Y = (0.00792700)X + (0.207331)$	20~2000	0.9968	95.6~110.0
2	25OHVD2	$Y = (0.0308505)X + (0.00544785)$	0.5~50	0.9994	96.0~105.2
3	25OHVD3	$Y = (0.0135708)X + (0.00469350)$	1~100	0.9987	93.9~110.2
4	VE	$Y = (0.00113429)X + (0.0422688)$	200~20000	0.9992	97.1~104.2
5	VK1	$Y = (0.0687768)X + (0.00103948)$	0.1~10	0.9992	95.1~104.4

### 2.3 准确度及精密度测定结果

按 1.3 中的前处理方法对 5%BSA 中添加标准溶液作为质控品，每个浓度质控品重复制备 3 份，按 1.2 中的分析条件对质控品进行分析，质控品的准确度结果如表 4 所示，结果显示质控品测定准确度结果与理论值接近，回收率在 94%~108%之间，RSD 在 1.9%~6.2%之间，满足临床测定需求。

表 4. 质控准确度考察结果(n=3, 浓度单位 ng/mL)

质控	项目	VA	25OHVD2	25OHVD3	VE	VK1
LQC	理论浓度	40	1	2	400	0.2
	测定浓度	43.1	0.96	2.11	412	0.21
	回收率%	108	96	106	103	105
	RSD%	5.1	6.2	3.7	2.6	4.5
MQC	理论浓度	200	5	10	2000	1
	测定浓度	210	4.8	9.6	2135	1.05
	回收率%	105	96	96	107	105
	RSD%	3.1	4.5	3.1	2.3	3.2
HQC	理论浓度	1000	25	50	10000	5
	测定浓度	1021	23.8	47.1	10326	5.12
	回收率%	102	95	94	103	102
	RSD%	2.3	2.8	3.1	1.9	2.2

## 2.4 临床样品测定结果

取 4 批次血清样品，按 1.3 中的前处理方法及 1.2 中的分析条件进行测定，结果见图 2 和表 5，该方法灵敏度及分离度可满足临床检验需求。

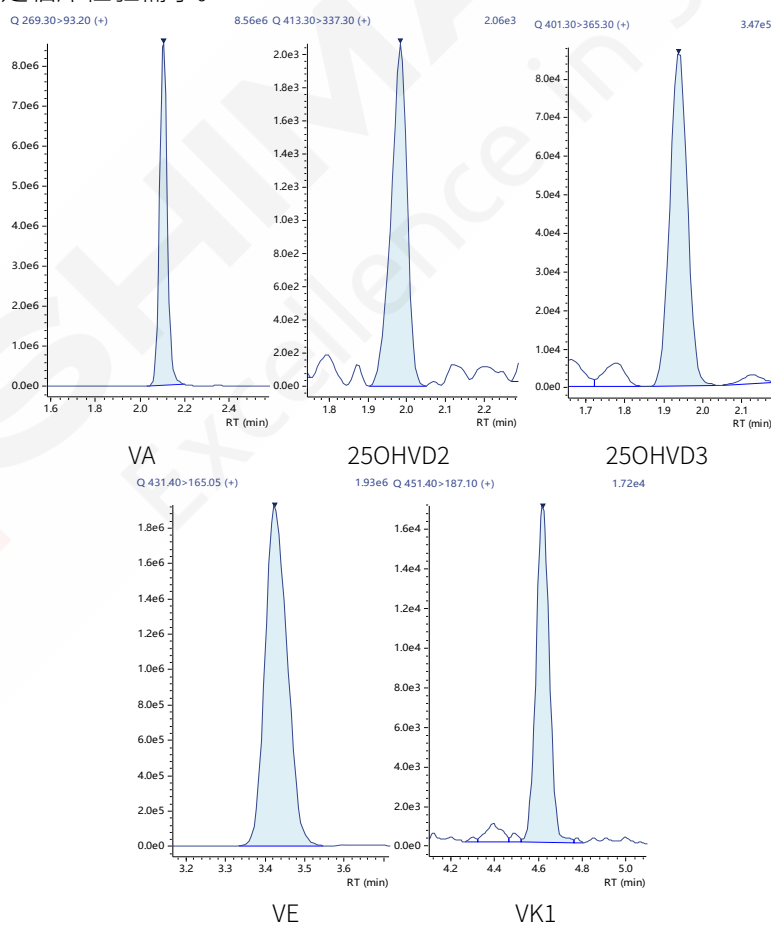


图 2. sample1 色谱图

表 5. 临床样品测定结果(ng/mL)

Name	sample1	sample2	sample3	sample4
VA	721	210	371	148
25OHVD2	0.52	N.D.	0.58	N.D.
25OHVD3	5.61	5.24	2.72	4.77
VE	7711	75621	4927	8041
VK1	0.89	0.84	0.65	0.90

### 3. 结论

使用超高效液相色谱仪三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用,建立了血清中 VA、25OHVD2、25OHVD3、VE 和 VK1 同时测定方法,使用内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性良好,标准曲线相关系数均大于 0.996,质控品测定准确度结果与理论值接近,回收率在 94%~108%之间,RSD 在 1.9%~6.2%之间,该方法前处理简便,分析速度快,灵敏度高,专属性强,可用于人体脂溶性维生素含量测定。

### 3.5 平行液相色谱质谱联用系统测定人血清中的 VA 和 VE 含量

**摘要:** 本文使用岛津 Nexera MX 平行液相色谱质谱联用系统, 建立了人血清中 VA 和 VE 含量测定方法。样品经液液萃取处理后, 采用该系统在 3.5 min 内完成目标物分析。VA、VE 在 0.05~5.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和 0.5~50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度范围内线性良好, 相关系数分别为 0.9992 和 0.9995。并通过 2 例实际血清样品, 考察方法稳定性, 检测结果 CV% 均小于 5.0%。该方法具有分析速度快、重复性好的特点, 可为临床中人血清中 VA、VE 的快速筛查提供良好借鉴和参考。

**关键词:** Nexera MX 平行液相 三重四极杆质谱仪 血清 VA VE

维生素A (VA) 和维生素E (VE) 是一类脂溶性维生素, 在人体内有着重要的生理功能。其中VA具有维持暗视觉作用、维持和增强免疫功能、抑制肿瘤细胞生长的作用; VE则具有抗脂质过氧化、维持生殖机能等作用。VA和VE的缺乏将导致代谢异常, 严重影响机体健康。因此, 准确测定血清中VA、VE的含量, 对预防、诊断和治疗VA、VE缺乏有非常重要意义。

本文使用岛津Nexera MX平行液相色谱质谱联

用系统, 建立了人血清中VA和VE含量测定方法。与常规液质联用方法相比, Nexera MX系统在保证方法精密性与稳定性的基础上, 通过交替平行进样分析, 有效节省样品分析过程中冲洗系统、色谱柱平衡、自动进样器进样等分析时间, 大大提升了LCMS处理速度与样品分析速率。通过Nexera MX平行液相色谱质谱联用系统开发的人血清中VA和VE含量测定方法, 可实现VA、VE高通量快速筛查。

## 1. 实验部分

### 1.1 化合物信息

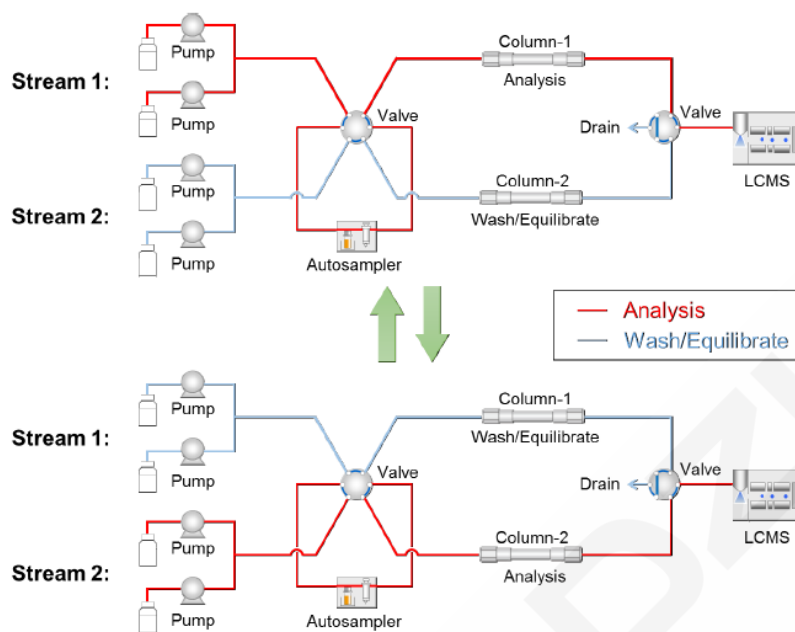
表 1. 化合物信息

化合物名称	英文名	CAS No.	分子式
VA	Vitamin A	68-26-8	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O
VE	Vitamin E	10191-41-0	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>
VA-d5 (IS)	Vitamin A-d5	-	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> D <sub>5</sub> O
VE-d6 (IS)	Vitamin E-d6	-	C <sub>29</sub> H <sub>44</sub> D <sub>6</sub> O <sub>2</sub>

### 1.2 仪器

本实验使用岛津 Nexera MX 超高效平行液相与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×4 输液泵, DGU-20A5R×2 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. 5.91 色谱工作站。

### 1.3 仪器结构及原理



### 1.4 分析条件

液相色谱条件

色谱柱: Shim-pack GIST C18 (2.1 mm I.D. × 50 mm L., 2.0 μm)

流动相: A 相-水 (含 0.1%甲酸)      B 相-甲醇 (含 0.1%甲酸)

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 1 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 88%, 洗脱程序见表 2、表 3。(表 4 为常规液相梯度洗脱程序, B 相初始浓度为 88%, 两系统液相梯度曲线图见图 1、图 2。)

表 2. 分析流路梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.00	Pumps	Pump B Conc.	88
0.60	Pumps	Pump B Conc.	88
0.61	Pumps	Pump B Conc.	98
3.50	Controller	Stop	

表 3. 冲洗平衡流路梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.00	Pumps	Pump B Conc.	88
2.50	Controller	Stop	

表 4. 常规液相梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.60	Pumps	Pump B Conc.	88
0.61	Pumps	Pump B Conc.	98
3.50	Pumps	Pump B Conc.	98
3.51	Pumps	Pump B Conc.	88
6.00	Controller	Stop	

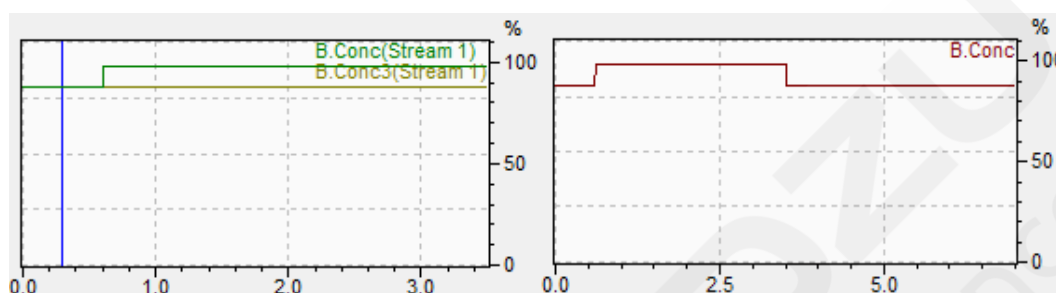


图 1. MX 系统液相梯度曲线图

图 2. 常规液相梯度曲线图

质谱条件

分析仪器：LCMS-8060

离子化模式：ESI (+)

离子源接口电压：4.0 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

加热气：空气 10.0 L/min

干燥气：氮气 10.0 L/min

碰撞气：氩气

接口温度：300°C

DL 温度：250°C

加热模块温度：400°C

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：22 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 5

表 5. MRM 优化参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
VA	269.15	213.15*	-13.0	-14.0	-20.0
		93.10	-13.0	-22.0	-15.0
VE	431.20	165.10*	-21.0	-21.0	-15.0
		137.05	-21.0	-41.0	-11.0
VA-d5	274.15	218.20	-13.0	-14.0	-22.0
VE-d6	437.20	171.20	-21.0	-22.0	-15.0

\*表示定量离子对

## 1.5 标准曲线及样品制备

80%甲醇溶液配制 VA/VE 混标工作溶液，浓度依次分别为 100/1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、40/400  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、20/200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、10/100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、4/40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、2/20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、1/10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。80%甲醇溶液配制 VA-d<sub>5</sub>/VE-d<sub>6</sub> 混标工作溶液，浓度分别为 0.5/20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。称取 4.0 g 牛血清白蛋白 (BSA)，溶于 100 mL PBS 中，得到 4% BSA 溶液。

分别取 20  $\mu\text{L}$  VA/VE 混标工作溶液溶于 180  $\mu\text{L}$  4% BSA 溶液中，得到 VA/VE 替代基质标准曲线，浓度分别为 5/50、2/20、1/10、0.5/5、0.2/2、0.1/1、0.05/0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

样品前处理方法：超纯水 10 倍稀释样品 (4% BSA 溶液或血清)，取 100  $\mu\text{L}$  稀释后样品于 2 mL 离心管中，加入 10  $\mu\text{L}$  内标工作液及 200  $\mu\text{L}$  甲醇，涡旋混匀后 10000 g 离心 10 min。加入 1 mL 正己烷，充分涡旋萃取后，10000 g 离心 10 min，取出 900  $\mu\text{L}$  正己烷于 2 mL 离心管中。氮吹挥干正己烷，加入 100  $\mu\text{L}$  80%甲醇溶液复溶后，直接进样分析。

## 2. 结果与讨论

### 2.1 标准样品的 MRM 色谱图

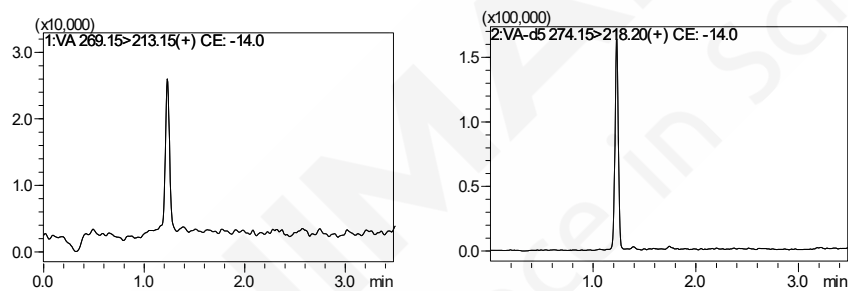


图 3. VA 标样 ( $0.05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) MRM 色谱图 (左) 及 VA-d<sub>5</sub> 内标 ( $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) MRM 色谱图 (右)

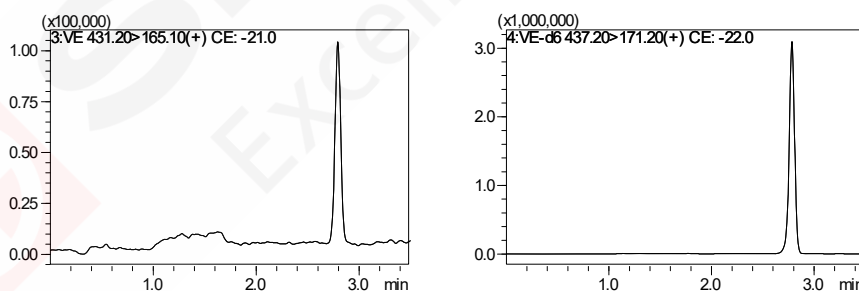


图 4. VE 标样 ( $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) MRM 色谱图 (左) 及 VE-d<sub>6</sub> 内标 ( $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) MRM 色谱图 (右)

### 2.2 线性关系

使用 4% BSA 溶液配制标准曲线，按上述前处理方法和分析条件，采用内标法建立标准曲线。如图 5 所示，VA、VE 分别在  $0.05\text{-}5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和  $0.5\text{-}50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的线性浓度范围内，线性相关性良好，相关系数  $r$  分别为 0.9992 和 0.9995，准确度范围分别为 94.3-104.0%和 96.2-103.6%。

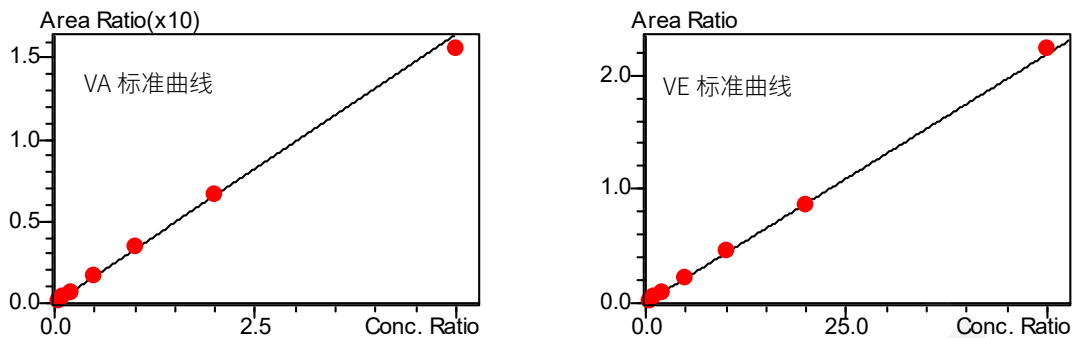


图 5. VA、VE 标准曲线

表 6. VA、VE 标准曲线参数 (线性回归, 权重系数为  $Y=1/C^2$ )

化合物	校准曲线	线性范围 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	准确度(%)	相关系数 r
VA	$Y = (3.29013)X + (0.00878511)$	0.05-5	94.3-104.0	0.9992
VE	$Y = (0.0436573)X + (0.00257555)$	0.5-50	96.2-103.6	0.9995

### 2.3 方法对比

为验证 Nexera MX 平行液相系统对目标物检测分析的高效性, 实验另外采用常规超高效液相 LC-30A 对样品进行检测。在相同的洗脱程序下, 将常规液质联用系统与 MX 液质联用系统所得色谱图进行对比, MX 液质联用系统检测所需的时间比常规液质联用系统检测缩短约 40%。

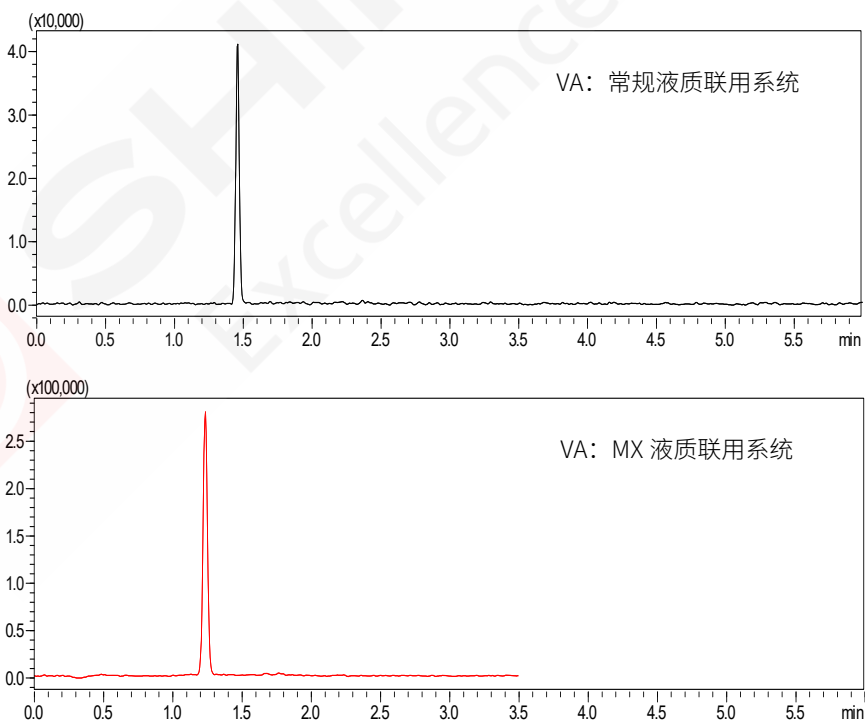


图 6. 常规液质联用系统 (上) 与 MX 液质联用系统 (下) 检测 VA 样品色谱图对比

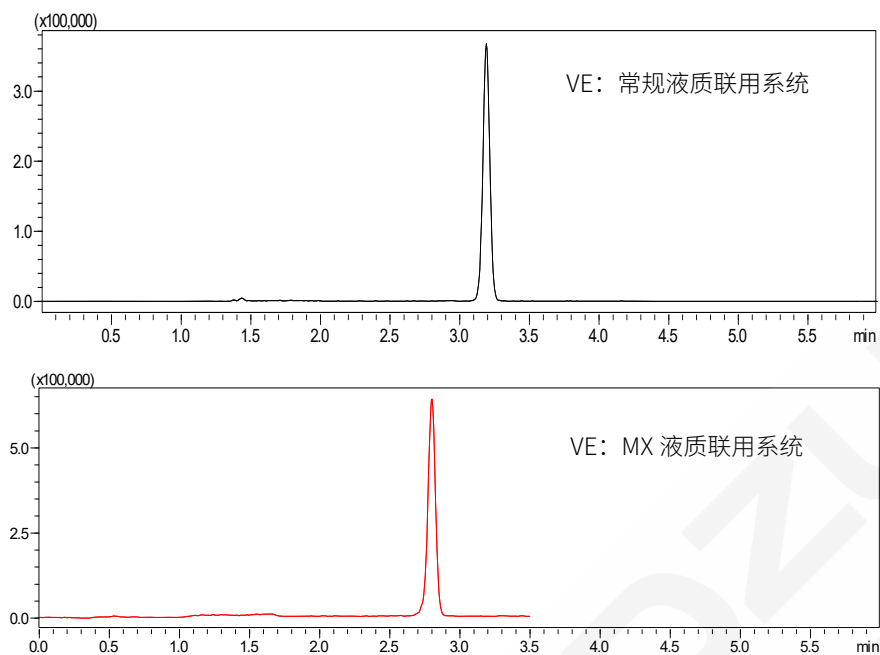


图 7. 常规液质联用系统（上）与 MX 液质联用系统（下）检测 VE 样品色谱图对比

## 2.4 残留

在高浓度样品 ( $VA/VE = 5/50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 后进样分析空白溶剂，考察 VA、VE 及其内标的残留情况，结果如图 8 所示。结果表明，高浓度样品进样分析后 VA、VE 及其内标均无明显残留现象。

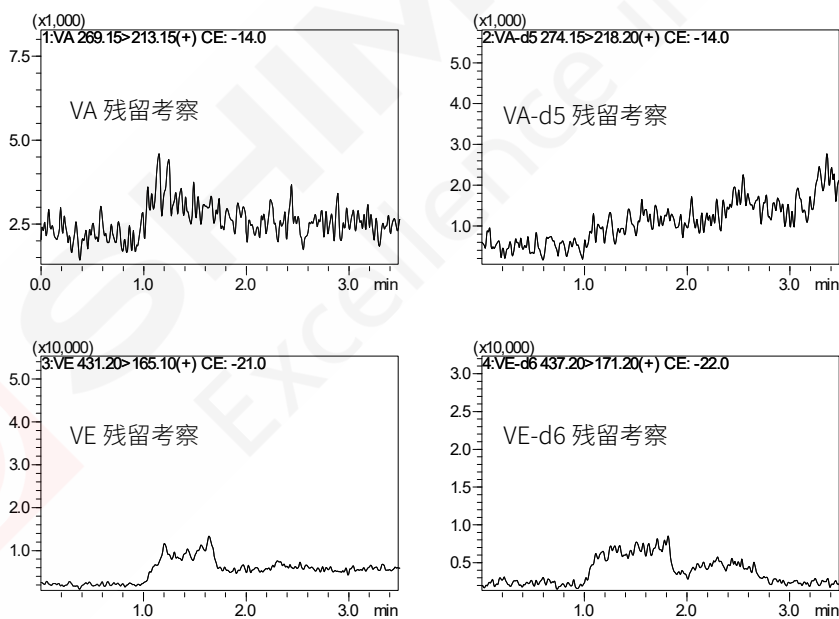


图 8. 残留考察

## 2.5 方法稳定性

取 2 例血清样品，按 1.5 中的前处理方法处理样品，每个样品平行处理 6 份后进样分析，考察方法稳定性。结果如图 9-10 及表 7 所示，检测结果 CV% 小于 5.0%，表明该方法稳定性良好。

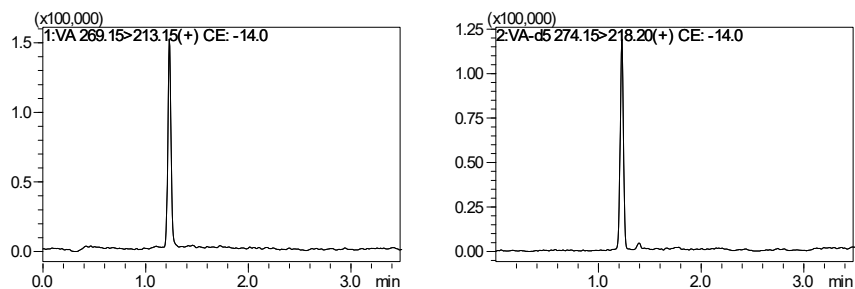


图 9. 血清样品 1 中 VA MRM 色谱图 (左) 及 VA-d5 内标 (0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) MRM 色谱图 (右)

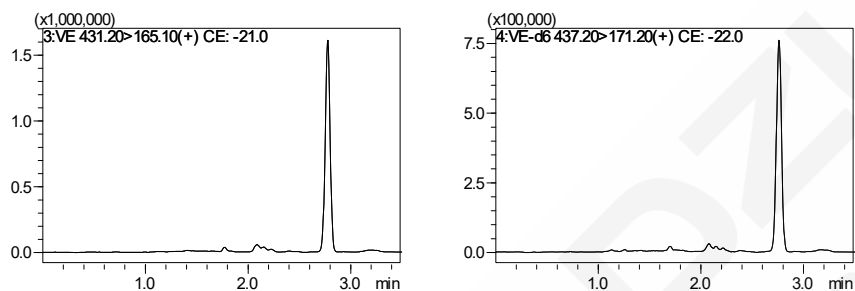


图 10. 血清样品 1 中 VE MRM 色谱图 (左) 及 VE-d6 内标 (20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) MRM 色谱图 (右)

表 7. 方法稳定性考察结果

项目	VA ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )		VE ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	
	样品 1	样品 2	样品 1	样品 2
1	0.38	0.51	46.5	39.1
2	0.39	0.50	47.8	38.6
3	0.38	0.51	46.3	38.2
4	0.38	0.50	46.7	37.3
5	0.38	0.51	47.0	38.4
6	0.38	0.46	47.5	38.7
均值 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	0.38	0.50	47.0	38.4
CV (%)	1.5	3.6	1.1	1.5

### 3. 结论

本文使用岛津 Nexera MX 平行液相色谱质谱和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统, 建立了人血清中 VA 和 VE 含量测定方法。该方法在 3.5 min 内完成血清中 VA、VE 含量的检测分析, 采用同位素内标法定量, VA、VE 在  $0.05\sim 5.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和  $0.5\sim 50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度范围内线性良好, 相关系数分别为 0.9992 和 0.9995。通过 2 例实际血清样品, 考察方法稳定性, 检测结果 CV% 均小于 5.0%, 表明方法稳定性良好。

与常规液质联用方法相比, Nexera MX 系统充分利用系统冲洗、色谱柱平衡、自动进样器进样等分析时间, 有效提升 LCMS 处理速度与分析能力, 显著缩短分析时间, 提高生物样品检测速率, 适用于大样本分析的超高通量检测, 可为临床中人血清中 VA、VE 的快速筛查提供良好借鉴和参考。

## 3.6 LCMS-8050 CL 测定血清中的维生素 K1

**摘要:** 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A CL 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用检测血清中 VK1 的检测方法。血清样品使用试剂除蛋白后, 萃取离心, 浓缩复溶移取上清液, 进样分析。采用 APCI 离子源模式, MRM 模式采集数据, 内标法定量, 用超高效液相色谱 LC-30A CL 在 7.0 min 内完成分析, 三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 进行定量分析。结果显示, VK1 在 0.1~12.5 ng/mL 内线性良好; 低、中、高三个浓度水平的加标血清样品进行了加标回收率实验, 其回收率在 85% ~ 113%之间, 精密度实验结果良好。该方法可用于临床样本的快速、准确定量。

**关键词:** 维生素 K1 血清 液相色谱-三重四极杆质谱 医用质谱仪

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。国外权威医学机构 Mayo 报道人体中正常维生素 K1 的含量大约为 0.1~2.2 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。本文建立了灵敏度较高, 且满足临床需求的人血清中维生素 K1 的 HPLC-APCI/MS/MS 测定法, 经方法学验证定量限浓度为 0.1 ng/mL, 线性范围 0.1~12.5 ng/mL, 可应用于血清中维生素 K1 的定性定量研究。

本文利用岛津超高效液相色谱仪和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用对人血清中维生素 K1 进行定性定量分析。有助于高通量、更简单、更安全、更准确地实现临床维生素 K1 的检测。

### 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 CL 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用系统。具体配置为 LC-30AD CL×2 (输液泵), DGU-20A5R CL (在线脱气机), SIL-30AC (自动进样器), CTO-30A CL (柱温箱), CBM-20A CL 系统控制器, LCMS-8050 CL 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。

#### 1.2 分析条件

液相色谱条件

流动相: A 相-0.1%甲酸水溶液; B 相-甲醇

流速: 0.5 mL/min

色谱柱: BEH C18 2.1 mm I.D. ×100 mm L., 1.7 μm

柱温: 40°C

进样体积: 20 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, 见表 1

表 1. 梯度洗脱条件

时间	单元	处理命令	值
0.00	泵	B.Conc	85
3.50	泵	B.Conc	90
4.00	泵	B.Conc	100
7.00	泵	B.Conc	100
7.10	泵	B.Conc	85
11.00	控制器	Stop	

质谱条件

离子源: APCI                      接口电压: 3.0 KV                      雾化气: 3.0 L/min  
干燥气流量: 5.0 L/min              接口温度: 300°C                      DL 管温度: 150°C  
加热块温度: 250°C                      扫描模式: MRM 模式, 见表 2

表 2. MRM 参数

化合物	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
维生素 K1	84-80-0	451.35	187.15*	-14	-27	-19
		451.35	185.20	-14	-22	-19
D7-维生素 K1	1233937-39-7	458.30	194.10	-20	-23	-18

\*定量离子对

### 1.3 标准品、及样品制备

标准溶液配制: 维生素 K1 标准品称取适量乙醇溶剂配制 1.0 mg/mL 的单标准贮备液, 用 30%甲醇-水溶液逐步稀释成 0.1、0.2、0.5、1.25、2.5、5 和 12.5 ng/mL 系列浓度的标准工作液。

样品前处理方法: 取 200  $\mu$ L 标准溶液或血清加入 500  $\mu$ L 含内标 (2 ng/mL) 蛋白沉淀剂 (乙腈-甲醇=9:1), 振荡均匀 10 min 后加入 800  $\mu$ L 正己烷振荡 15 min, 10000 rpm 离心 3 min, 取 750  $\mu$ L 上清液吹干后用 100  $\mu$ L 甲醇-水-0.1%甲酸 (85:15) 的混合溶剂复溶, 振荡均匀 10 min 后, 10000 rpm 离心 3 min, 转瓶进样 20  $\mu$ L。

## 2. 结果与讨论

### 2.1 空白及标准品色谱图

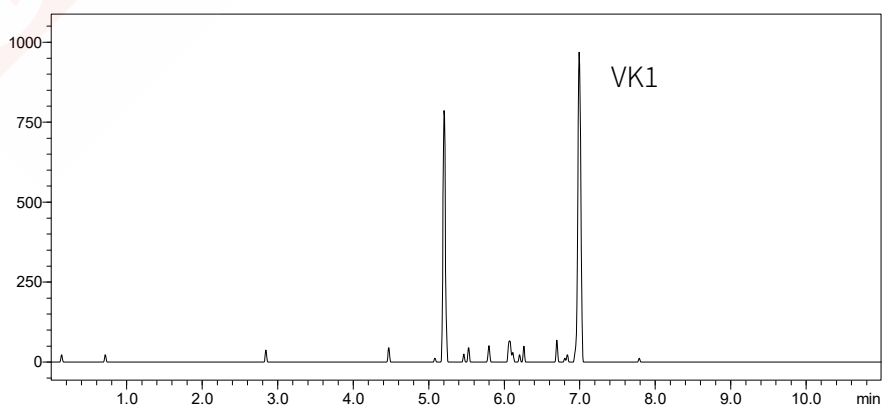


图 1. 标准品 Level 1 浓度色谱图

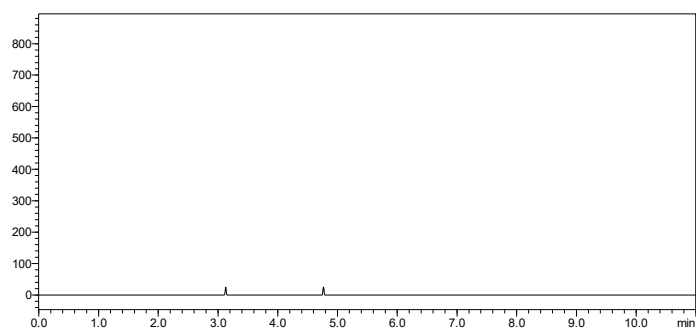


图 2. 空白基质色谱图

## 2.2 基质效应验证

使用配制标准曲线的基质（30%甲醇-水）溶解高、中、低三个不同浓度水平的标准溶液，分别将标准溶液和基质样本按 1: 1 比例进行混合得混合样本，将混合样本平行处理 3 个样，上机检测；混合样本的响应值（待分析物/内标）与病人样本和标准溶液响应均值的差异应小于 20%，则说明无相对基质效应。其中理论浓度为进行 1:1 混合后混合样本的理论值，应为基础浓度均值的一半。验证结果如表 3 所示。

表 3. 基质效应

基础浓度 (ng/mL)	基础浓度均值 (ng/mL)	理论浓度 (ng/mL)	实测浓度 (ng/mL)	回收率 (%)
4.38			2.16	98.9
4.28	4.35	2.18	2.13	97.8
4.40			2.27	104.1
7.35			3.47	91.4
7.07	7.57	3.79	3.65	96.4
8.31			3.33	88.0
9.65			4.76	100.2
9.47	9.50	4.75	4.29	90.4
9.38			4.98	104.8

## 2.3 线性范围

对标准品按 1.2 中的分析条件进行了 6 个批次的分析，内标法制作校准曲线。表 4，表 5 显示，该方法线性范围宽，最低点信噪比  $S/N > 10$ ， $RSD = 2.85\%$  小于 20%，标准曲线相关系数均大于 0.995，因此方法定量限为 0.1 ng/mL，线性范围为 0.1~12.5 ng/mL。

表 4. 线性范围验证

批次	级别	S/N	标准浓度 (ng/mL)	准确度 (%)	相关系数
	1	45	0.1	107.9	0.995
	2	79	0.2	85.4	
	3	278	0.5	92.7	
1	4	3,607	1.25	109.1	
	5	2,095	2.5	102.8	
	6	3,624	5	102.3	
	7	15,201	12.5	99.9	

	1	146	0.1	100.7	0.998
	2	243	0.2	95.4	
	3	350	0.5	106.6	
2	4	1,163	1.25	104.6	
	5	1,605	2.5	98.5	
	6	6,072	5	100.5	
	7	7,564	12.5	93.6	
	1	79	0.1	103.9	0.995
	2	96	0.2	88	
	3	598	0.5	113.1	
3	4	3,397	1.25	91.6	
	5	2,130	2.5	99.8	
	6	6,058	5	104.7	
	7	7,564	12.5	98.8	
	1	15	0.1	102.4	0.997
	2	51	0.2	90.7	
	3	72	0.5	88.2	
4	4	241	1.25	96.3	
	5	635	2.5	101.5	
	6	803	5	105.8	
	7	3,062	12.5	105.7	
	1	13	0.1	107.2	0.995
	2	53	0.2	90.1	
	3	200	0.5	86	
5	4	373	1.25	103.8	
	5	1,095	2.5	102.2	
	6	2,822	5	103.4	
	7	3692	12.5	107.3	
	1	60	0.1	103.1	0.997
	2	137	0.2	89.8	
	3	109	0.5	113.5	
6	4	1,803	1.25	92	
	5	2,340	2.5	100.3	
	6	4,428	5	95.1	
	7	8,771	12.5	106.3	

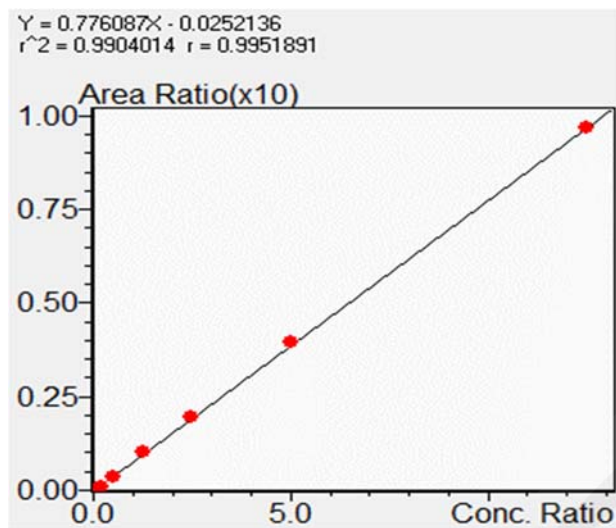


图 3. 维生素 K1 的线性方程及相关系数

表 5. 线性范围结果汇总

	方法检出限 LOD	方法定量限 LOQ	线性范围 AMR
K1 (ng/mL)	0.05	0.1	0.1~12.5

## 2.4 准确度及精密度

分别制备并处理已知浓度的低、中、高三个浓度的样品，LQC 为 2.0 ng/mL、MQC 为 9.0 ng/mL、HQC 为 11.0 ng/mL，按 1.3 所述前处理方法处理后进样分析，精密度结果如表 6。通过基质加标的方式验证准确度，结果如表 7 所示。从表中可见，维生素 K1 准确度 RSD 在 89.3%~109.2% 范围内，精密度分别在 5.5%~7.9% 范围内，均符合标准。

表 6. 批内精密度考察结果

样品编号	时间 (min)	低浓度 (ng/mL)	时间 (min)	中浓度 (ng/mL)	时间 (min)	高浓度 (ng/mL)
1	6.99	2.00	7.16	8.60	7.14	11.32
2	6.99	1.94	7.11	8.02	7.04	11.61
3	6.98	2.11	7.11	9.54	7.06	11.92
4	7.00	1.96	7.05	8.35	7.03	10.96
5	6.99	2.23	7.04	9.50	7.02	9.50
6	6.98	2.13	7.12	8.30	7.03	10.59
平均值	6.99	2.06	7.10	8.72	7.05	10.98
RSD(%)	0.07	5.54	0.63	7.42	0.67	7.87

表 7. 准确度考察结果

基础浓度 (ng/mL)	基础浓度均值 (ng/mL)	理论浓度 (ng/mL)	实测浓度 (ng/mL)	回收率 (%)
0.26			4.38	91.6
0.21	0.26	4.50	4.28	89.3
0.31			4.40	92.0
0.26	0.26	7.37	7.35	96.2
0.21			7.07	92.4

0.31			8.31	109.2
0.26			9.65	96.9
0.21	0.26	9.69	9.47	95.0
0.31			9.38	94.1

## 2.5 临床可报告范围

采用高浓度加标样本，用 30% 甲醇-水溶液，分别将其稀释 2、4 倍，稀释前与稀释后的病人样本分别平行处理 3 个，每个检测一次，以稀释前的浓度为参考靶值，计算各稀释后浓度样本的回收率，回收率在 85%~115% 之间则认为该稀释倍数可接受。检测结果如表 8 所示，维生素 K1 可接受的倍数至少为 4 倍，则维生素 K1 的临床可报告范围为 (CRR) 0.1~50 ng/mL，该范围足以满足临床检测的需求。

表 8. 临床可报告范围考察结果

基础浓度 (ng/mL)	基础浓度均值 (ng/mL)	理论浓度 (ng/mL)	实测浓度 (ng/mL)	回收率 (%)
9.65			4.76	98.1
9.47	9.69	4.85	4.29	88.5
9.38			4.98	102.7
9.65			2.36	97.7
9.47	9.69	2.42	2.09	86.5
9.38			2.60	107.4

## 2.6 携带效应

取样本加标至高浓度曲线点附近，作为高浓度样本 ULOQ；取病人样本加标至低浓度曲线点附近，作为低浓度样本 LLOQ；C1=LLOQ，C2=ULOQ，C3=LLOQ；按照 C1-C2-C3 顺序检测，重复检测 3 次；(C3-C1)/C1 峰面积比值小于 20%；检测结果如表 9 所示，说明携带效应通过，满足检测要求。

表 9. 携带效应考察结果

样品编号	K1	
	结果 (ng/mL)	(C3-C1)/C1 (%)
C1-1	0.93	
C2-1	6.21	4.93
C3-1	0.98	
C1-2	0.99	
C2-2	6.26	-2.83
C3-2	0.96	
C1-3	1.00	
C2-3	6.52	1.50
C3-3	1.02	

## 2.7 实际样本测定

表 10. 实际样本测定结果

	样本 1	样本 2
VK1 含量 (ng/mL)	0.25	1.07

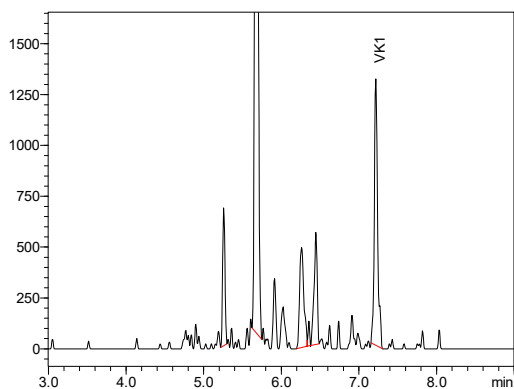


图 4 实际血清样本 1 色谱图

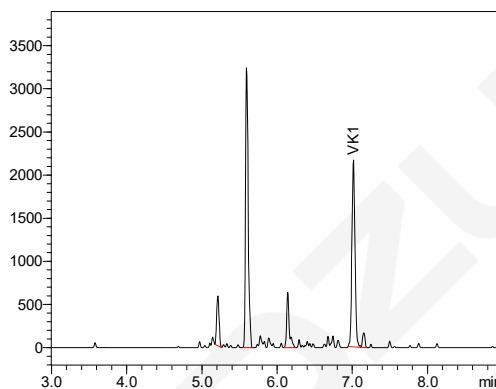


图 5 实际血清样本 2 色谱图

## 3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A CL 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用检测血清中 VK1 的检测方法。此方法经过验证，该方法无携带效应，VK1 在 0.1~12.5 ng/mL 内线性良好，线性相关系数大于 0.995；低，中，高三个浓度水平的加标回收率在 85%~113%之间，保留时间和含量相对标准偏差分别在 0.07~0.67%和 5.54~7.87%之间，仪器和方法的精密度良好。同时经过基质效应的验证，可使用纯溶剂替代生物基质进行校准曲线的配制和使用，该方法验证均能满足临床检测的需求，可为临床检测维生素 K1 提供参考。LC-30A CL 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用系统可满足临床检测维生素 K1 的需求。

## 3.7 LCMS-8050 CL 检测人血清中维生素 B1、B2 和 B6 含量

**摘要:** 本文建立了使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30A CL 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用系统测定人血清中维生素 B1、B2 和 B6 的测定方法。本方法使用同位素内标、标准样品及质控样品进行了方法的线性、精密度及稳定性的考察。结果显示该方法线性范围宽,标准曲线相关系数均大于 0.995,准确度及精密度均可满足日常检验要求。此方法简单、快速、稳定,可以为临床人血清中水溶性维生素的检测提供很好的借鉴和参考。

**关键词:** LCMS-8050 CL 人血清 维生素B1 维生素B2 维生素B6

人体必需维生素可分为两类:水溶性维生素和脂溶性维生素。其中水溶性维生素又以B族维生素最为重要。维生素B1是维持糖类代谢和神经功能的基础物质,轻微缺乏会出现非特异性的症状,严重缺乏维生素B1会导致神经和心脏疾病。维生素B2作为机体最重要辅酶的组成成分,参与各种氧化还原反应,包括糖、脂肪或氨基酸氧化过程以及脂肪酸的合成与氧化等代谢过程。维生素B2缺乏可以影响糖代谢与脂肪代谢,并且可以改变血浆、组织中磷脂的浓度,影响体内摄取维生素B9,并影响维生素B6转变为各自的辅酶衍生物。维生素B6在体内以多种生物的辅酶形式发挥作用,是人体约140种酶的辅酶,参与催化80多种生化反应,在人体蛋白质代谢、糖类及脂类代谢中具有不可替代的作用。维生素B6由吡哆醛(PL)、吡哆醇(PN)和吡哆胺(PM)组

成,而磷酸吡哆醛(PLP)是维生素B6的主要辅酶形式,维生素B6通过其辅酶形式PLP发挥生理作用。水溶性维生素的分析方法有微生物法、分光光度法、高效液相色谱法、电化学法等。但这些方法或操作过程复杂,测定周期长,特异性差,灵敏度低,或仅用于复合维生素片剂、饮料、口服液等的含量测定。而血清中水溶性维生素浓度低,基质复杂,上述方法难以满足多种水溶性维生素同时测定的要求。

本文使用岛津临床用超高效液相色谱仪LC-30A CL和三重四极杆质谱仪LCMS-8050 CL联用系统,建立人血清中维生素B1、B2和B6含量测定方法,该方法操作简捷、分析速度快,适用于临床大规模维生素B1、B2和B6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 CL 与三重四极杆质谱仪LCMS-8050 CL联用系统。具体配置为LC-30AD CL×2(输液泵),DGU-20A5R CL(在线脱气机),SIL-30ACMP CL(自动进样器),CTO-30A CL(柱温箱),CBM-20A CL系统控制器,LCMS-8050 CL三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.91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 μm)

流动相 : A相-0.1%甲酸水溶液 B相-0.1%甲酸甲醇溶液

流速 : 0.2 mL/min

柱温 : 30°C

进样量 : 10  $\mu$ L

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
3.00	Pumps	Pump B Conc.	95
4.00	Pumps	Pump B Conc.	95
4.01	Pumps	Pump B Conc.	10
6.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器 : LCMS-8050 CL      DL温度 : 200°C  
离子源 : ESI (+)      加热模块温度 : 400°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 : 300°C      MRM参数 : 见表2

表 2. MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q <sub>1</sub> Pre Bias (V)	CE (V)	Q <sub>3</sub> Pre Bias (V)
B1	265.20	144.05	-13.0	-12.0	-15.0
B2	377.20	243.10	-19.0	-23.0	-16.0
PLP	248.00	150.00	-19.0	-17.0	-14.0
d <sub>4</sub> -B1	269.20	148.05	-13.0	-12.0	-15.0
d <sub>3</sub> -B2	380.15	246.05	-19.0	-23.0	-16.0
d <sub>3</sub> -PL	171.10	97.15	-18.0	-24.0	-15.0

### 1.3 样品制备

#### 1.3.1 标准工作曲线配制

用 0.01 mol/L 的盐酸配制浓度均为 100  $\mu$ g/mL 维生素 B1、B2 和 PLP 混合对照品储备液, 随后用 0.1% 甲酸水溶液将标准储备溶液稀释成浓度为 1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、200 ng/mL、400 ng/mL 和 800 ng/mL 的混合标准工作液; 用 0.01 mol/L 的盐酸配制浓度均为 100  $\mu$ g/mL d<sub>4</sub>-B1、d<sub>3</sub>-B2 和 d<sub>3</sub>-PL 混合内标储备液, 随后用 0.1% 甲酸水溶液将内标储备溶液稀释为浓度分别 20 ng/mL 内标工作液。

#### 1.3.2 标准品前处理方法

取 50  $\mu$ L 空白血清于 1.5 mL 离心管中, 加入 50  $\mu$ L 对照品溶液, 加入 50  $\mu$ L 内标溶液, 涡旋 10 s 充分混匀; 加入 100  $\mu$ L 20% 三氯乙酸溶液 (含 20% 甲醇); 涡旋 30 s, 室温静置 30 min; 14000 g 离心 10 min, 取上清液进样分析, 进样量 10  $\mu$ L。

#### 1.3.3 样品前处理方法

取 50  $\mu$ L 血清样品于 1.5 mL 离心管中, 加入 50  $\mu$ L 水, 加入 50  $\mu$ L 内标溶液, 涡旋 10 s 充分混匀; 加入 100  $\mu$ L 20% 三氯乙酸溶液 (含 20% 甲醇); 涡旋 30 s, 室温静置 30 min; 14000 g 离心 10 min, 取

上清液进样分析，进样量 10  $\mu$ L。

## 2. 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图

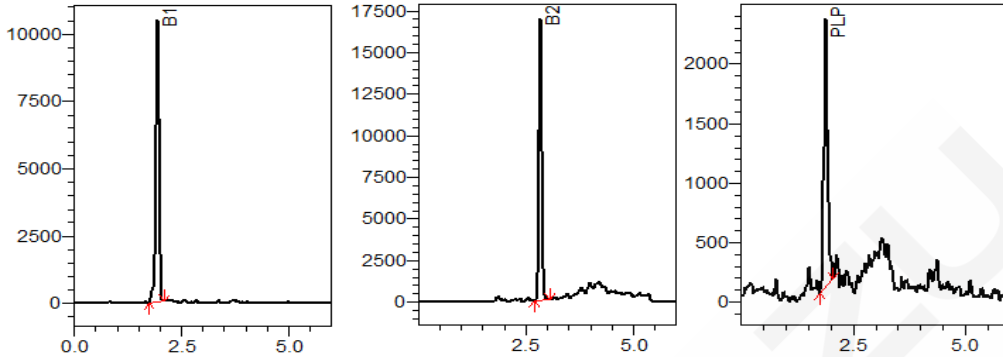


图 1. 标准曲线最低点色谱图

### 2.2 线性关系

连续三天对标准品按 1.2 中的分析条件进行了 3 个批次的分析，以浓度比为横坐标，峰面积比值为纵坐标，内标法制作校准曲线。第 1 批次线性方程见图 2，3 批次线性方程和相关系数见表 3。表 3 显示，该方法线性范围宽，标准曲线相关系数均大于 0.995，且三天 3 批次校准曲线数据稳定。

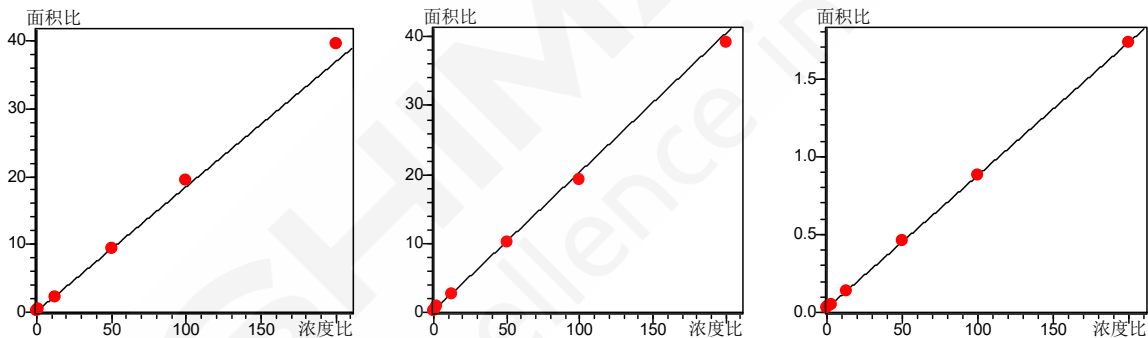


图 2. 维生素 B1、B2 及 PLP 线性方程

表 3. 线性方程和相关系数

批次	目标物	线性方程	相关系数	准确度%
1	B1	$Y = (0.046011)X + (0.139343)$	0.9985	93.9~106.9
	B2	$Y = (0.050382)X + (0.244469)$	0.9989	94.9~106.5
	PLP	$Y = (0.0021380)X + (0.0265237)$	0.9998	96.2~101.8
2	B1	$Y = (0.046914)X + (0.174067)$	0.9987	93.3~105.6
	B2	$Y = (0.050511)X + (0.279025)$	0.9992	97.8~107.5
	PLP	$Y = (0.0019595)X + (0.0285436)$	0.9996	96.0~102.6
3	B1	$Y = (0.044012)X + (0.139424)$	0.9959	88.2~110.6
	B2	$Y = (0.0475378)X + (0.266560)$	0.9991	94.2~107.2
	PLP	$Y = (0.00213694)X + (0.0217436)$	0.9972	92.8~110.9

### 2.3 准确度及精密度实验

分别取处理后且已知浓度的低、中、高三个浓度的质控样品，LQC 为 8 ng/mL、MQC 为 40 ng/mL、

HQC 为 700 ng/mL, 按 1.3 所述前处理方法处理后进样分析, 准确度及精密度结果如表 4、表 5 及表 6 所示。从表中可见, 维生素 B1、B2 和 PLP 准确度平均值分别在 86.9%~109.1%之间、98.0%~102.1%之间、102.3%~105.5%之间; 维生素 B1、B2 和 PLP 精密度分别在 1.7%~4.1%之间、4.6%~7.1%之间、2.9%~4.6%之间。

表 4. 维生素 B1 准确度及精密度考察结果 (n=5)

编号	LQC(8 ng/mL)		MQC(40 ng/mL)		HQC(700 ng/mL)	
	测定值 ng/mL	准确度%	测定值 ng/mL	准确度%	测定值 ng/mL	准确度%
1	7.68	96.1	35.08	87.7	663.24	110.5
2	7.52	94.0	34.04	85.1	653.36	108.9
3	7.72	96.3	35.12	87.8	650.36	108.4
4	6.96	87.0	35.44	88.6	639.04	106.5
5	7.36	92.2	34.12	85.3	666.08	111.0
平均值	7.6	93.1	34.8	86.9	654.4	109.1
CV%	4.1	4.1	1.8	1.8	1.7	1.7

表 5. 维生素 B2 准确度及精密度考察结果 (n=5)

编号	LQC(8 ng/mL)		MQC(40 ng/mL)		HQC(700 ng/mL)	
	测定值 ng/mL	准确度%	测定值 ng/mL	准确度%	测定值 ng/mL	准确度%
1	8.16	101.9	42.48	106.2	590.52	98.4
2	7.96	99.5	40.48	101.2	587.60	97.9
3	7.52	93.9	41.48	103.7	619.76	103.3
4	7.68	96.1	37.80	94.5	542.08	90.3
5	9.00	112.3	42.08	105.2	600.80	100.1
平均值	8.0	100.7	40.8	102.1	588.0	98.0
CV%	7.1	7.1	4.6	4.6	4.9	4.9

表 6. PLP 准确度及精密度考察结果 (n=5)

编号	LQC(8 ng/mL)		MQC(40 ng/mL)		HQC(700 ng/mL)	
	测定值 ng/mL	准确度%	测定值 ng/mL	准确度%	测定值 ng/mL	准确度%
1	8.08	101.1	10.38	103.8	623.44	103.9
2	8.56	107.1	10.87	108.7	593.88	99.0
3	8.20	102.4	9.92	99.2	627.00	104.5
4	9.04	113.2	10.00	100.0	595.64	99.3
5	8.32	103.9	10.35	103.5	629.80	105.0
平均值	8.4	105.5	10.3	103.0	614.0	102.3
CV%	4.6	4.6	3.7	3.7	2.9	2.9

## 2.4 临床样品测定结果

取 2 批次正常的人血清样品，经前处理后分别进行测定，结果如图 3 及表 7 所示：

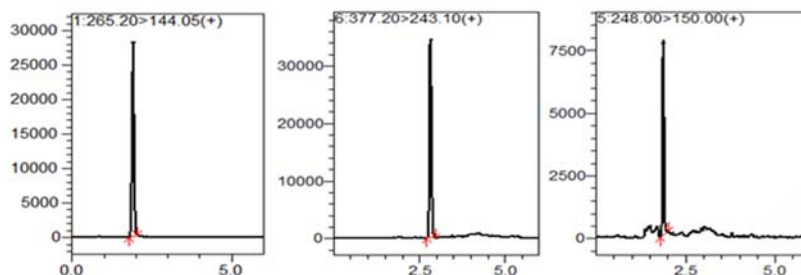


图 3. Sample-1 样品谱图

表 7. 人血清临床样品检测结果

编号	B1(ng/mL)	B2(ng/mL)	PLP(ng/mL)
Sample-1	15.6	21.9	24.6
Sample-2	13.2	19.0	35.3

## 3. 结论

使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30A CL 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用系统建立了测定人血清中维生素 B1、B2 和 B6 的方法。使用同位素内标、标准样品及质控样本进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性范围宽，标准曲线相关系数均大于 0.995，方法准确度及精密度均可满足日常检验。此方法快速、简单、稳定，可以为临床人血清中水溶性维生素的检测提供很好的借鉴和参考。（注：本方法使用三氯乙酸，对质谱负离子测定有抑制）

## 3.8 LCMS-8050 CL 检测人血清中全谱氨基酸

**摘要：**本文利用岛津临床用 LCMS-8050 CL 三重四极杆液质联用系统建立了人血清 42 种氨基酸同时分析的方法。该方法采用内标法定量，42 种氨基酸线性相关系数均在 0.993 以上；不同浓度混合标准溶液处理后上机分析，连续进样 6 次保留时间和峰面积的相对标准偏差(RSD%)分别在 0.04~1.26%和 0.59~8.47%之间；人血清样品中添加两个不同浓度的标准溶液，加标回收率在 76.5~119.4%之间，平行处理三次的相对标准偏差在 0.60~8.70%之间，方法准确可靠，可用于实际样品的检测。

**关键词：**LCMS-8050 CL 三重四极杆液质联用系统 血清 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。作为生物小分子，体内的游离氨基酸对生理功能和临床诊断具有重要意义。生理状态下，体内的氨基酸处于一个平衡状态。氨基酸的失衡是众多疾病的诱因或表现形式，体内氨基酸代谢紊乱可分为两类：一类是与氨基酸代谢有关的器官如肝、肾等出现严重病变导致的继发性氨基酸代谢紊乱；另一类是由于参与氨基酸代谢的酶或其他蛋白因子缺乏引起的遗传性疾病。

氨基酸检测可以作为健康诊断或疾病筛查的重要手段，可以为预防疾病、改善身体营养状态和

营养补充提供参考标准。氨基酸检测通过对人体内氨基酸的精确检测，揭示人体内详细的氨基酸代谢状况，从而从不同的代谢路径提示人体的健康状况。目前，分析氨基酸含量的检测方法有高效液相色谱法，气相色谱法，毛细管电泳法，光谱法等。但血清中生物基质复杂，上述方法很难对血清中氨基酸进行精确定量。

本文采用岛津临床用三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 CL，建立了人血清中42种氨基酸的分析方法，该方法灵敏度高、分析速度快，供相关人员参考。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器

岛津 LCMS-8050 CL 三重四极杆液质联用系统。具体配置为 LC-30AD CL×2 输液泵， DGU-20A<sub>5</sub> CL 在线脱气机，SIL-30ACMP CL 自动进样器，CTO-30A CL 柱温箱，CBM-20A CL 系统控制器，LCMS-8050 CL 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

#### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱 : InertSustain AQ-C18 (100 mm×2.1 mm I.D., 1.9 μm, Shimadzu SGLC  
P/N: 5020-89939)

流 动 相 : A 相-0.1%甲酸水; B 相-乙腈

流 速 : 0.5 mL/min

柱 温 : 45°C

进 样 量 : 1 μL

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 2%, 时间程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
4.00	泵	B.Conc	5
10.00	泵	B.Conc	22.5
11.00	泵	B.Conc	25
11.50	泵	B.Conc	95
12.00	泵	B.Conc	95
12.10	泵	B.Conc	2
15.00	控制器	Stop	

## 质谱条件

离子源 : ESI(+)	接口电压 : 1.0 kV
雾化气流速 : 3 L/min	加热模块温度 : 400°C
D L 温度 : 250°C	扫描模式 : 多反应监测(MRM)
接口温度 : 300°C	干燥气流速 : 10.0 L/min
MRM 参数 : 见表 2	加热气流量 : 10.0 L/min

表 2. MRM 参数

中文名	简写	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
肌氨酸	Sar	260.1	171.1	-19	-15	-16
β-丙氨酸	b-Ala	260.1	171.1	-19	-15	-16
丙氨酸	Ala	260.1	171.1	-19	-15	-16
丙氨酸内标	Ala-IS	264.1	171.1	-19	-19	-16
丝氨酸	Ser	276.1	171.2	-19	-19	-16
脯氨酸	Pro	286.1	171.1	-21	-13	-16
脯氨酸内标	Pro-IS	291.1	171.2	-21	-21	-16
缬氨酸	Val	288.2	171.0	-21	-13	-16
缬氨酸内标	Val-IS	296.2	171.0	-15	-21	-16
苏氨酸	Thr	290.2	171.1	-20	-26	-16
羟基脯氨酸	Hyp	302.1	171.2	-22	-22	-16
异亮氨酸	Ile	302.1	171.2	-22	-11	-16
亮氨酸	Leu	302.1	171.2	-22	-11	-16
亮氨酸内标	Leu-IS	305.1	171.2	-22	-22	-16
天冬酰胺	Asn	303.1	171.1	-22	-21	-16
谷氨酸	Glu	318.1	171.0	-17	-23	-16
蛋氨酸	Met	320.1	171.2	-17	-15	-17
蛋氨酸内标	Met-IS	323.1	171.2	-17	-22	-17
组氨酸	His	326.1	156.0	-23	-12	-26
苯丙氨酸	Phe	336.1	171.0	-18	-13	-17
苯丙氨酸内标	Phe-IS	342.1	171.2	-25	-22	-17

瓜氨酸	Cit	346.1	171.2	-26	-23	-17
瓜氨酸内标	Cit-IS	348.1	171.0	-26	-23	-17
酪氨酸	Tyr	352.1	171.2	-26	-15	-17
酪氨酸内标	Tyr-IS	358.0	171.2	-25	-24	-15
乙醇胺	Etn	232.1	171.2	-17	-20	-17
赖氨酸	Lys	244.1	171.2	-30	-21	-16
羟赖氨酸	Hyl	252.1	171.2	-30	-21	-10
$\gamma$ -氨基丁酸	GABA	274.1	171.1	-20	-15	-16
$\beta$ -氨基异丁酸	b-Aiba	274.1	171.1	-20	-15	-16
$\alpha$ -氨基正丁酸	a-ABA	274.1	171.1	-20	-13	-16
高丝氨酸	Hse	289.6	171.1	-20	-25	-17
牛磺酸	Tau	296.2	171.2	-15	-20	-16
哌啶酸	Pip	300.0	171.2	-21	-22	-28
天冬氨酸	Asp	304.1	171.1	-21	-22	-16
谷氨酰胺	Gln	317.1	171.2	-23	-25	-16
$\alpha$ -氨基己二酸	Aad	332.1	171.0	-17	-25	-29
3-甲基组氨酸	3MHis	340.1	171.2	-24	-18	-16
1-甲基组氨酸	1MHis	340.1	171.2	-24	-18	-16
精氨酸	Arg	345.1	171.2	-18	-25	-17
精氨酸内标	Arg-IS	350.1	171.1	-18	-25	-17
色氨酸	Trp	375.1	171.0	-26	-15	-16
犬尿氨酸	Kyn	379.1	171.1	-20	-29	-28
肌肽	Car	397.1	227.0	-20	-15	-23
甘氨酸	Gly	246.1	171.1	-18	-20	-16
甘氨酸内标	Gly-IS	249.1	171.0	-18	-20	-16
半胱氨酸	Cys	292.1	171.2	-11	-19	-17
同型半胱氨酸	Hcy	306.1	171.1	-16	-21	-16
鹅肌肽	Ans	411.2	241.1	-16	-19	-24
胱硫醚	Cysthi	282.1	171.1	-20	-33	-16
肌酸酐	Creatinine	226.6	171.1	-26	-17	-10
鸟氨酸	Orn	237.1	171.1	-15	-25	-15
鸟氨酸内标	Orn-IS	240.1	171.1	-15	-25	-15

### 1.3 标准溶液的配制

取氨基酸标准贮备液，用 50% 甲醇做溶剂逐级稀释为 0.5、1、2.5、5、10、20、50、100、200、400  $\mu\text{mol/L}$ （犬尿氨酸和  $\alpha$ -氨基己二酸浓度为 0.05、0.1、0.25、0.5、1、2、5、10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ ）的标准系列工作溶液，实验中也可采用 4% BSA 作为替代血清基质来配置标准系列工作溶液，采用同位素内标的方式绘制校准曲线对定量结果没有太大影响。

### 1.4 衍生化试剂及缓冲液的配置

衍生化试剂为 3 mg/mL 的 6-氨基喹啉基-N-琥珀酰-亚胺基甲酸酯乙腈溶液，缓冲液为 PH 8.9 左右

的硼酸盐缓冲液。

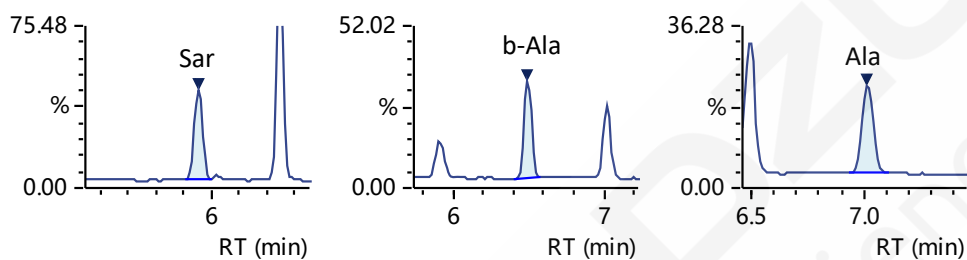
## 1.5 样品前处理方法

取20  $\mu\text{L}$ 标准品或血清样品，加入15  $\mu\text{L}$ 内标工作液，再加入15  $\mu\text{L}$ 二硫代苏糖醇 (0.1M)，涡旋混匀，静置15分钟；再加入50  $\mu\text{L}$ 乙腈，混匀后13000 rpm离心10分钟；取10  $\mu\text{L}$ 上清，加入70  $\mu\text{L}$ 硼酸盐缓冲液，再加入20  $\mu\text{L}$ 衍生化试剂，涡旋混匀55 $^{\circ}\text{C}$ 衍生10分钟后，上样分析。

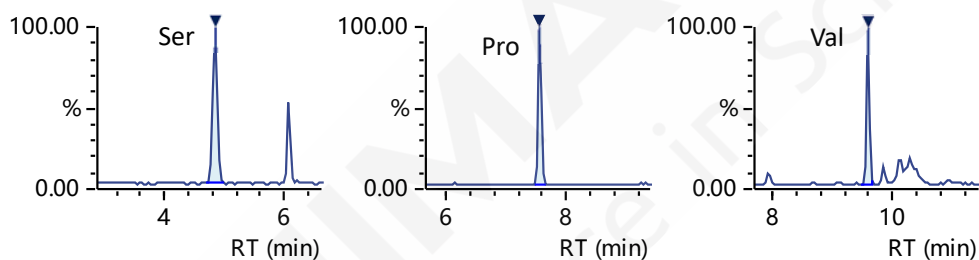
## 2. 结果与讨论

### 2.1 标准曲线最低点 MRM 色谱图

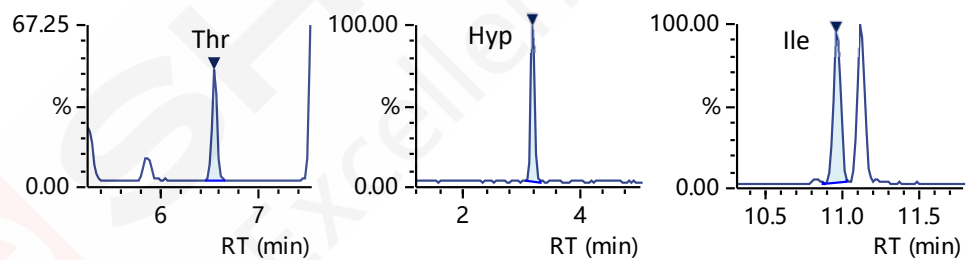
Q 260.10>171.10 (+) 3.71e4 Q 260.10>171.10 (+) 1.24e5 Q 260.10>171.10 (+) 1.27e5



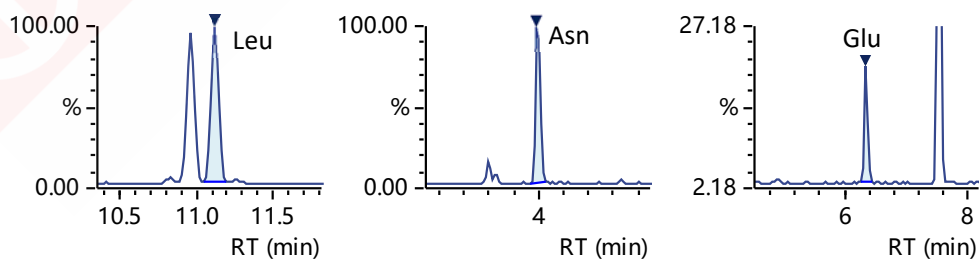
Q 276.10>171.20 (+) 2.44e4 Q 286.10>171.10 (+) 1.62e4 Q 288.20>171.00 (+) 1.78e4



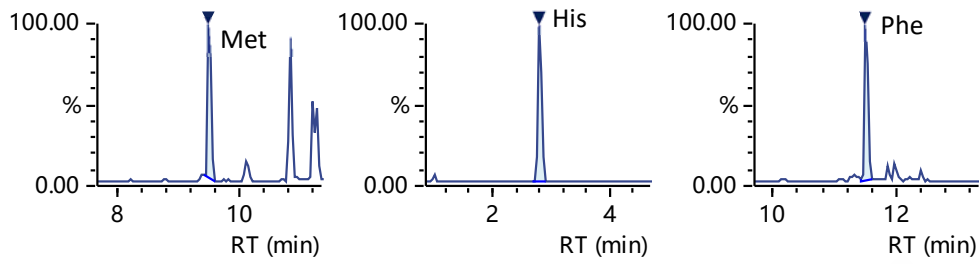
Q 290.20>171.10 (+) 2.96e4 Q 302.10>171.20 (+) 2.42e4 Q 302.10>171.20 (+) 1.40e4



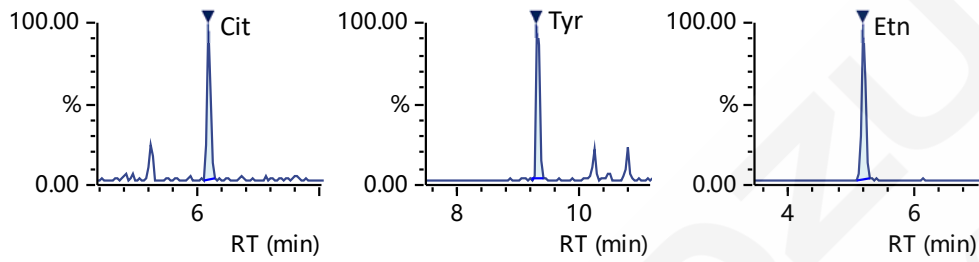
Q 302.10>171.20 (+) 1.30e4 Q 303.10>171.10 (+) 1.31e4 Q 318.10>171.00 (+) 7.98e4



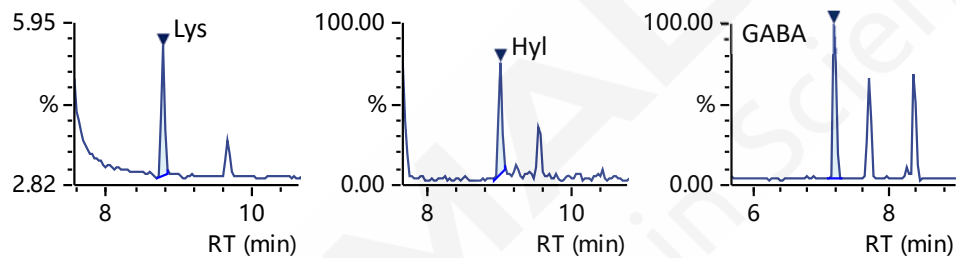
Q 320.10>171.20 (+) 2.64e4 Q 326.10>156.00 (+) 3.30e3 Q 336.10>171.00 (+) 2.25e4



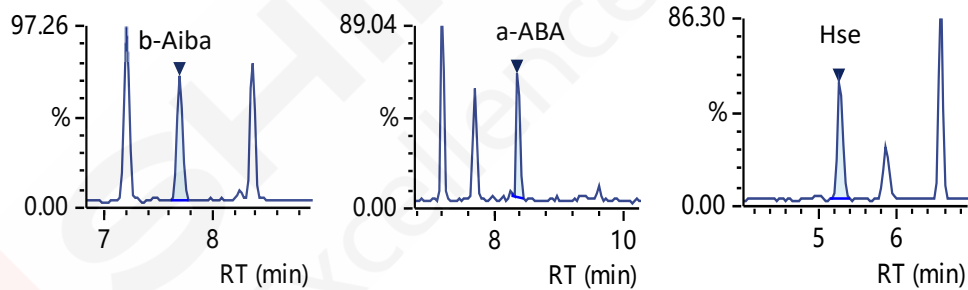
Q 346.10>171.20 (+) 3.65e3 Q 352.10>171.20 (+) 1.75e4 Q 232.10>171.20 (+) 7.37e4



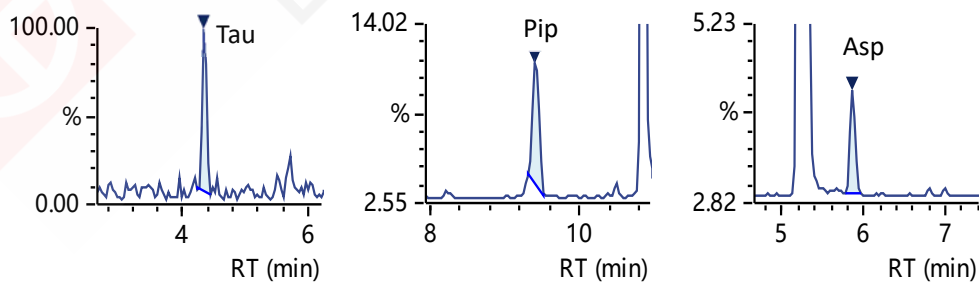
Q 244.10>171.20 (+) 2.36e6 Q 252.10>171.20 (+) 5.42e3 Q 274.10>171.10 (+) 3.62e4



Q 274.10>171.10 (+) 3.23e4 Q 274.10>171.10 (+) 2.64e4 Q 289.60>171.10 (+) 1.26e4



Q 296.20>171.20 (+) 1.88e3 Q 300.00>171.20 (+) 1.07e5 Q 304.10>171.10 (+) 6.68e5



Q 317.10>171.20 (+) 5.12e3 Q 332.10>171.00 (+) 5.36e4 Q 340.10>171.20 (+) 3.00e3

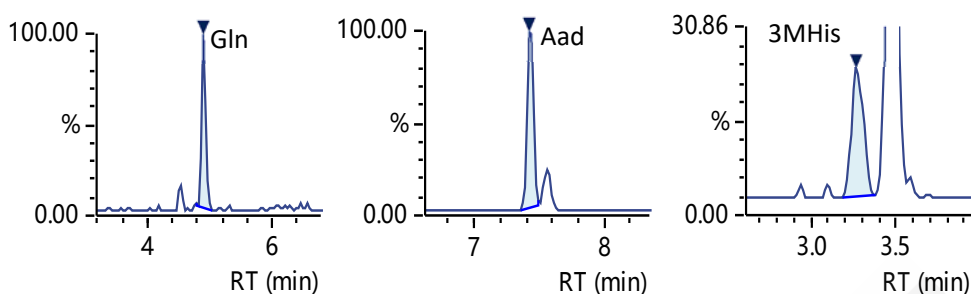


图 1. 标准曲线最低点部分 MRM 色谱图

## 2.2 线性范围

按照 1.3 配制成各浓度标准溶液，参考 1.5 的前处理流程，处理后直接上样分析，曲线结果如下表 3 所示，所得校准曲线线性相关系数在 0.993 以上，准确度在 85.0%-111.7%之间。

表 3. 标准曲线结果

化合物	线性方程	线性范围 (μmol/L)	相关系数	准确度 (%)
Sar	$Y = (0.0432610)X + (0.00342680)$	0.5-400	0.998	95.7-107.9
b-Ala	$Y = (0.0552166)X + (0.0250543)$	0.5-100	0.997	89.4-108.9
Ala	$Y = (0.0440845)X + (0.0118237)$	0.5-400	0.998	95.6-105.7
Ser	$Y = (0.0214956)X + (0.00637183)$	1-400	0.998	93.3-109.9
Pro	$Y = (0.0403779)X + (0.00189372)$	0.5-400	0.999	95.4-102.5
Val	$Y = (0.0240905)X + (0.00168934)$	0.5-400	0.999	96.1-105.2
Thr	$Y = (0.0255789)X + (0.00530432)$	0.5-400	0.998	90.7-106.7
Hyp	$Y = (0.0379659)X + (0.00138096)$	1-400	0.998	92.1-105.7
Ile	$Y = (0.0159381)X + (0.00139644)$	0.5-400	0.999	95.8-103.2
Leu	$Y = (0.0166803)X + (0.00132907)$	0.5-400	0.999	95.9-105.8
Asn	$Y = (0.0233500)X + (0.00228741)$	1-400	0.998	90.7-105.5
Glu	$Y = (0.0360494)X + (0.00247521)$	0.5-400	0.999	93.8-104.5
Met	$Y = (0.0362803)X + (0.00779599)$	0.5-400	0.998	95.4-104.8
His	$Y = (0.00109492)X + (-0.000831514)$	5-400	0.997	92.5-108.2
Phe	$Y = (0.0249426)X + (0.00183467)$	0.5-400	0.999	94.3-105.0
Cit	$Y = (0.0500451)X + (0.00534449)$	0.5-200	0.998	91.0-108.2
Tyr	$Y = (0.0330823)X + (0.00241715)$	0.5-400	0.999	94.0-105.0
Etn	$Y = (0.109143)X + (0.0471809)$	0.5-100	0.995	86.1-110.8
Lys	$Y = (0.0242765)X + (0.00703587)$	2.5-400	0.997	91.2-113.1
Hyl	$Y = (0.00805908)X + (0.000649421)$	0.5-200	0.997	90.5-108.0
GABA	$Y = (0.0693604)X + (0.0101033)$	0.5-100	0.995	85.0-111.4
b-Aiba	$Y = (0.0589655)X + (0.00327171)$	0.5-100	0.998	90.7-105.1
a-ABA	$Y = (0.0380617)X + (0.00168270)$	0.5-400	0.999	95.7-105.1
Hse	$Y = (0.0169864)X + (0.00367987)$	0.5-200	0.997	89.6-110.8
Tau	$Y = (0.00487792)X + (0.000847976)$	0.5-400	0.998	94.8-111.7
Pip	$Y = (0.00388923)X + (0.0141811)$	1-100	0.995	86.0-108.5
Asp	$Y = (0.0231779)X + (0.00385287)$	0.5-400	0.999	95.3-106.8
Gln	$Y = (0.0171393)X + (-0.000223585)$	0.5-400	0.997	93.1-111.6

Aad	$Y = (0.118180)X + (0.0310810)$	0.25-10	0.993	86.0-109.5
3MHis	$Y = (0.000224737)X + (-0.000132848)$	5-200	0.998	97.1-105.2
1MHis	$Y = (0.000862714)X + (-0.000161549)$	5-200	0.997	95.1-108.6
Arg	$Y = (0.0565411)X + (0.00181589)$	2.5-400	0.996	88.1-109.4
Trp	$Y = (0.0389541)X + (0.00267096)$	0.5-400	0.998	94.0-110.8
Kyn	$Y = (0.00179981)X + (0.000473128)$	0.5-10	0.999	96.9-104.0
Car	$Y = (0.000870364)X + (-0.000189326)$	2.5-100	0.998	92.8-105.8
Gly	$Y = (0.942670)X + (0.396402)$	0.5-400	0.997	88.5-109.2
Cys	$Y = (0.0528492)X + (0.00276025)$	0.5-200	0.998	92.1-104.9
Hcy	$Y = (0.139983)X + (0.0133104)$	0.5-100	0.997	90.7-110.8
Ans	$Y = (0.00108482)X + (-5.65792e-005)$	0.5-100	0.997	90.8-111.2
Cysthi	$Y = (0.0301590)X + (0.00533457)$	0.5-100	0.997	87.3-110.3
Creatinine	$Y = (0.00464356)X + (0.00114362)$	2.5-400	0.997	90.2-111.9
Orn	$Y = (0.0578990)X + (0.0184991)$	0.5-400	0.996	88.1-109.5

### 2.3 重复性考察

不同浓度混合标准溶液,按照 1.5 中的前处理方法,处理后上机分析,每个浓度的样品连续进样 6 次,考察保留时间和峰面积的重复性,结果如下表 4 所示。保留时间和峰面积的相对标准偏差(RSD%)分别在 0.04~1.26%和 0.59~8.47%之间,仪器精密度良好。

表 4. 重复性测试 (n=6)

化合物	10 $\mu\text{mol/L}$		50 $\mu\text{mol/L}$	
	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
Sar	0.23	3.37	0.14	1.44
b-Ala	0.15	2.48	0.06	1.52
Ala	0.15	3.69	0.06	1.01
Ser	0.37	3.00	0.23	2.16
Pro	0.14	2.75	0.06	2.13
Val	0.12	3.66	0.06	1.67
Thr	0.18	3.40	0.07	1.47
Hyp	0.91	4.13	0.52	2.33
Ile	0.12	2.03	0.05	1.24
Leu	0.12	1.96	0.05	0.59
Asn	0.49	2.23	0.36	2.04
Glu	0.18	3.06	0.09	1.28
Met	0.12	2.15	0.05	1.48
His	0.94	5.25	0.98	3.69
Phe	0.11	1.65	0.05	0.61
Cit	0.21	2.68	0.13	2.35
Tyr	0.12	3.17	0.04	0.99
Etn	0.28	2.16	0.12	1.28
Lys	0.12	2.62	0.05	0.83
Hyl	0.13	2.61	0.05	2.32
GABA	0.14	2.45	0.06	1.27
b-Aiba	0.14	2.51	0.06	1.50

a-ABA	0.12	2.16	0.06	0.82
Hse	0.36	2.14	0.18	1.16
Tau	0.45	3.79	0.27	1.99
Pip	0.12	3.64	0.05	3.62
Asp	0.22	4.02	0.11	1.76
Gln	0.46	2.93	0.23	0.99
Aad	0.13	2.39	0.06	1.77
3MHis	1.26	4.74	0.82	5.72
1MHis	0.91	8.47	0.77	2.29
Arg	0.62	6.36	0.51	3.37
Trp	0.10	1.38	0.04	0.89
Kyn	0.11	4.13	0.05	1.82
Car	0.67	4.85	0.40	2.76
Gly	0.36	2.27	0.17	1.57
Cys	0.13	3.62	0.06	1.72
Hcy	0.12	4.23	0.06	1.77
Ans	0.40	6.11	0.17	2.00
Cysthi	0.13	1.84	0.06	0.74
Creatinine	0.39	4.85	0.18	4.90
Orn	0.13	2.33	0.05	1.25

## 2.4 加标回收实验

人血清样品中添加两个不同浓度的标准溶液，每个浓度的加标样品平行处理三份，结果如表 5 所示，两个不同浓度加标回收率在 76.5~119.4%之间，平行处理三次的相对标准偏差在 0.60~8.70%之间，方法准确可靠。

表 5. 加标回收实验结果 (n=3)

化合物	浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	回收率%	重复性 RSD%	浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	回收率%	重复性 RSD%
Sar	10	111.3	3.52	50	111.6	2.15
b-Ala	10	108.6	2.26	50	104.6	3.90
Ala	50	96.2	2.89	200	93.6	3.83
Ser	50	101.4	1.71	200	106.6	3.09
Pro	50	101.1	2.16	200	102.6	4.67
Val	50	99.6	1.51	200	101.3	2.81
Thr	50	99.2	3.20	200	95.1	3.09
Hyp	10	100.8	3.39	50	99.9	4.25
Ile	50	101.5	2.29	200	99.3	4.20
Leu	50	98.3	0.93	200	93.2	3.21
Asn	10	103.1	3.20	50	105.1	1.44
Glu	50	99.0	2.54	200	95.2	2.18
Met	10	97.7	1.12	50	97.7	1.27
His	10	99.7	2.51	50	109.8	5.05
Phe	50	99.8	0.61	200	100.3	2.81
Cit	10	98.7	2.63	50	98.9	1.56
Tyr	50	101.2	1.35	200	102.3	3.60

Etn	10	99.8	3.56	50	98.4	2.70
Lys	50	106.5	4.61	200	106.5	4.98
Hyl	10	106.3	2.84	50	117.1	6.08
GABA	10	111.5	2.64	50	103.1	3.57
b-Aiba	10	111.8	1.27	50	104.9	3.32
a-ABA	10	102.1	1.19	50	103.9	2.29
Hse	10	98.8	5.62	50	97.4	2.76
Tau	50	101.7	2.24	200	104.9	3.83
Pip	10	103.2	6.42	50	83.3	8.74
Asp	50	106.7	2.08	200	98.1	3.01
Gln	50	101.4	3.24	200	102.0	3.19
Aad	1	91.5	3.01	5	91.2	5.05
3MHis	10	119.2	6.73	50	119.4	7.23
1MHis	10	111.7	4.00	50	112.3	3.53
Arg	50	98.6	4.90	200	103.5	7.18
Trp	50	93.9	7.42	200	90.2	7.65
Kyn	1	104.6	4.45	5	101.7	3.98
Car	10	107.8	7.71	50	117.6	4.00
Gly	50	99.8	2.77	200	96.5	4.88
Cys	10	98.0	1.65	50	92.6	4.09
Hcy	10	88.0	2.81	50	76.5	2.46
Ans	10	102.4	3.49	50	114.0	3.42
Cysthi	10	102.8	8.15	50	108.1	2.38
Creatinine	10	97.4	2.00	50	96.6	2.87
Orn	50	100.1	2.29	200	94.7	5.61

### 3. 结论

本实验建立了 LCMS-8050 CL 测定人血清中全谱氨基酸的方法，采用内标法定量，灵敏度高、分析速度快，15 min 即可完成 42 种氨基酸同时分析。该方法对氨基酸代谢紊乱相关疾病的临床判断、治疗管理和生理评估具有辅助诊断的意义，供相关人员参考。

### 3.9 ICPMS-2030 在临床尿液碘含量测定中的应用

**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临床尿液中碘的含量, 同时以冻干人尿中碘成分分析标准物质 GBW09111 作为质控样, 对分析方法进行了验证。实验结果表明, 质控样品分析结果与标准值吻合, 临床病人尿碘样品测定结果在 26.9-644  $\mu\text{g/L}$  之间, 测定结果的 RSD 值小于 2.41% ( $n=3$ ), 精密度良好。该方法操作简单, 定量准确, 线性范围宽, 可用于批量临床病人尿碘的测定。

**关键词:** ICP-MS 尿碘 临床

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, 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。我国甲状腺疾病的病例自 1995 年逐年显著增加, 甲状腺癌的病例也在增加, 有关专家认为, 患甲状腺疾病增多的原因大多与患者体内碘过量有关。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% 由尿液排出, 尿碘排泄基本恒定, 排出量基本可以反应出它的摄入量, 因此尿碘是一项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  $\mu\text{g/L}$ 。目前尿碘的检测主要有砷钼催化分光光度法和电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS) 两种方法, ICP-MS 法具有灵敏度高、线性范围宽、精密度好、准确度高等优点, 可以轻松应对人尿中碘含量测定要求。

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 和临床病人尿液中碘的含量。

#### 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 仪器分析条件

ICP-MS 仪器分析条件见表 1。

表 1. ICP-MS 分析条件

参数	设定值	参数	设定值
高频功率	1.20 kW	等离子体气流速	9.0 L/min
辅助气流速	1.10 L/min	载气流速	0.70 L/min
炬管类型	Mini 炬管	雾化器	同轴
雾化室	旋流	雾化室温度	5°C
采样深度	5.0 mm	高频频率	27.12 MHz
碰撞气体	He	碰撞气流速	6 mL/min
池电压	-21 V	能量过滤器电压	7.0 V

## 1.3 溶液配制

### 1.3.1 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。

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

取 5 mL 四甲基氢氧化铵 (25%, 水溶液) 和 10 mL 曲拉通 X-100 (1.3.1), 纯水稀释至 500 mL。

## 2. 样品前处理

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。

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 临床尿样, 各加入 1.0 mL 纯水及 8.0 mL 稀释剂 (1.3.2), 混匀待测。

## 3. 结果与讨论

### 3.1 标准溶液配制

使用 0.25% 四甲基氢氧化铵溶液逐级稀释市售碘标准溶液 (1000 mg/L) 至浓度为 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  $\mu\text{g/L}$  的标准溶液, 待用。

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 (1.3.2), 混匀。标准加入法分析样品溶液中碘的含量, 表 2 为标准加入法标准溶液浓度。

使用 0.25% 四甲基氢氧化铵溶液将碲元素单标溶液 (1000 mg/L) 稀释至 1000  $\mu\text{g/L}$ , 作为内标溶液, 采用在线内标加入方式进行内标校正。

表 2. 标准溶液浓度

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

### 3.2 标准曲线

碘元素的标准加入法曲线如图 1 所示, 线性系数  $r=0.99992$ 。

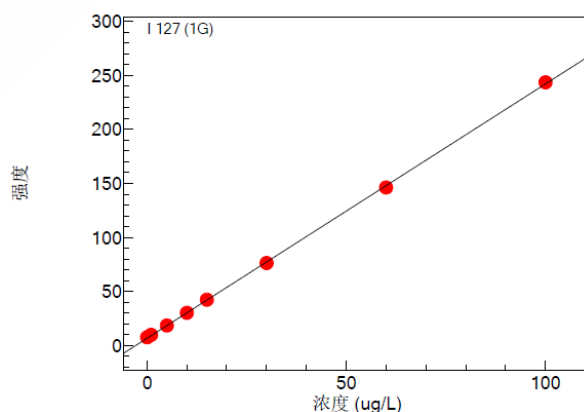


图 1. 碘元素标准曲线  $r=0.99992$

### 3.3 样品结果

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 和临床病人尿样中碘元素含量, 质控样测定结果与标准值吻合, 结果见表 3, 临床尿样结果见表 4。

表 3. 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	546	1.20

表 4. 临床病人碘元素分析结果

样品名称	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#
测定值( $\mu\text{g/L}$ )	531	214	56.3	292	26.9	214	554	644	626	637
RSD(%)/(n=3)	1.43	2.11	0.18	1.99	1.02	2.41	2.03	0.63	0.60	0.19

临床病人尿液碘的测定结果在 26.9-644  $\mu\text{g/L}$  之间, 世界卫生组织 (WHO) 建议的 14 岁以上的男性及非妊娠妇女的最适宜尿碘为 100-500  $\mu\text{g/L}$ , 3# 和 5# 病人尿液碘含量低于 100  $\mu\text{g/L}$ , 2#、4# 和 6# 在适宜范围之内, 1#、7#、8#、9# 和 10# 病人尿液碘含量已高于 500  $\mu\text{g/L}$ 。

### 4. 结论

使用岛津 ICPMS-2030 电感耦合等离子体质谱仪测定了临床病人尿液中碘的含量, 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, 临床病人碘含量在 26.9-644  $\mu\text{g/L}$  之间, 仪器精密度良好, RSD 值小于 2.41%。该方法具有灵敏度高, 线性范围宽, 精密度好, 准确度高优点, 可适用于批量临床病人尿碘的测定。

## 3.10 ICPMS-2030 测定尿液中多种金属元素的含量

**摘要:** 参考《SFZ JD0107017-2015 生物检材中32种元素的测定电感耦合等离子体质谱法》前处理方法,使用岛津ICPMS-2030型电感耦合等离子体质谱仪测定了尿液中的多种金属元素的含量,并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90%~110%之间。该方法操作简单,定量准确,线性范围宽,可满足人尿中多种金属元素成分分析的要求。

**关键词:** 尿液 金属 ICPMS-2030

微量元素在人体中存在适量的平衡,各种微量元素之间不仅各自独立作用,而且相互协调、相互拮抗,元素只有在人体内的比例合适才能发挥其良性效应。因此如何准确、快速、方便的检测人体内微量元素的含量及形态,补充微量元素,排除有害元素,更好的了解微量元素的摄入和排出情况,为疾病预防和临床治疗提供有价值的资料成为微量元素相关领域亟待解决的问题。目前常用的分析样品由血液、尿液、头发、指甲等。

因尿中铅、镉、锰等元素的浓度可以反应人体重金属的排出情况,间接反应机体的吸收量,是人体排出及吸收重金属的重要指标之一,因此尿液中

元素浓度是临床检测和评价重金属中毒和身体状况的重要依据之一。

早期国家规定的尿液中金属检测的方法主要是原子吸收光谱法,如《WST 32-1996 尿中镉的石墨炉原子吸收光谱测定方法》等,相比于之前的方法,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,更适用于尿液中多种金属元素的快速分析。

本文参考《SFZ JD0107017-2015 生物检材中32种元素的测定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 测定了人尿中多种金属元素的含量。

### 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

使用移液器移取 1.25 mL 尿液样品于 50 mL 容量瓶,添加内标溶液后使用 5%硝酸定容至刻度。内标元素 Sc、Y、Rh、Tb、Ho 浓度均为 5ppb。

#### 1.4 仪器参数

等离子体参数: 高频功率: 1.2 kW

辅助气流速: 1.1 L/min

炬管类型: Mini

雾化室: 旋流

等离子体气流速：8.0 L/min

载气流速：0.7 L/min

雾化器类型：同心

雾室温度：5 °C

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

使用 5%硝酸配制不同浓度的混合标准溶液，定容前加入内标溶液，标准溶液浓度见表 1。内标元素 Sc、Y、Rh、Tb、Ho 浓度均为 5 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
Ag	107	0	0.1	0.5	1	5	--	--	--
As	75	0	--	0.5	1	5	10	--	--
Ba	138	0	0.1	0.5	1	5	--	--	--
Be <sup>+</sup>	9	0	0.1	0.5	1	5	--	--	--
Cd	114	0	0.1	0.5	1	5	--	--	--
Co	59	0	0.1	0.5	1	5	--	--	--
Cr	52	0	0.1	0.5	1	5	--	--	--
Cs	133	0	0.1	0.5	1	5	--	--	--
Cu	63	0	0.1	0.5	1	5	--	--	--
Fe	56	0	--	--	1	5	10	50	--
Ga	69	0	0.1	0.5	1	5	--	--	--
Hg	200	0	0.1	0.5	1	5	--	--	--
Mn	55	0	0.1	0.5	1	5	--	--	--
Ni	58	0	0.1	0.5	1	5	--	--	--
Pb	208	0	0.1	0.5	1	5	--	--	--
Rb	85	0	--	--	--	5	10	50	200
Sr	88	0	--	0.5	1	5	10	--	--
V	51	0	0.1	0.5	1	5	--	--	--
Zn	64	0	--	--	1	5	10	50	--

注：\*为不使用氦气碰撞模式

## 2.2 部分元素标准曲线如下：

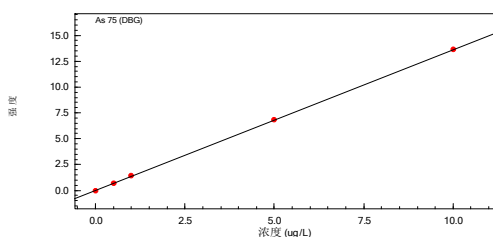


图 1. As 元素标准曲线  $r=0.99996$

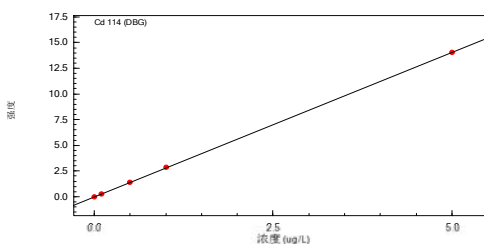


图 2. Cd 元素标准曲线  $r=0.99999$

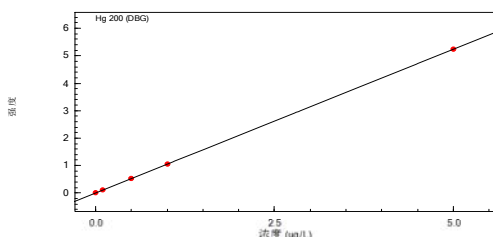


图 3. Hg 元素标准曲线  $r=1.00000$

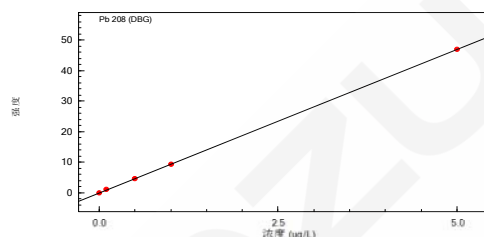


图 4. Pb 元素标准曲线  $r=0.99999$

## 2.3 部分元素质量轮廓图

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，可以有效地消除多原子离子等干扰。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。

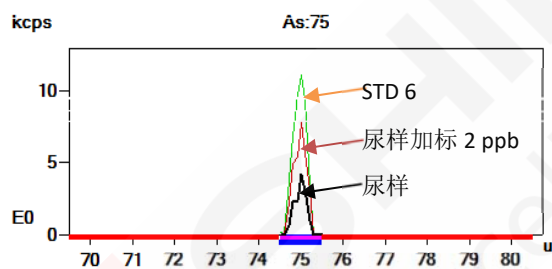


图 5. As 元素质量轮廓图

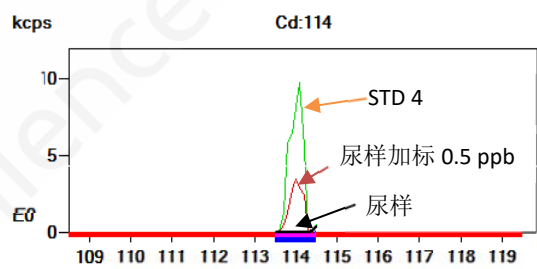


图 6. Cd 元素质量轮廓图

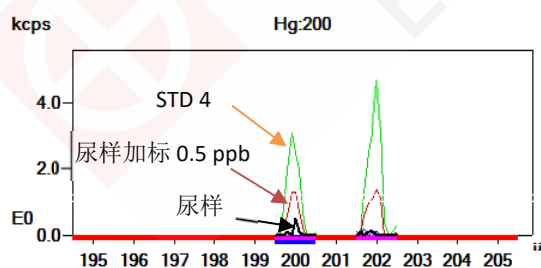


图 7. Hg 元素质量轮廓图

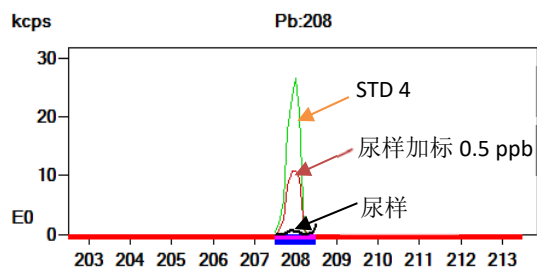


图 8. Pb 元素质量轮廓图

## 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( $\mu\text{g/L}$ )	方法检出限( $\mu\text{g/L}$ )	元素	仪器检出限( $\mu\text{g/L}$ )	方法检出限( $\mu\text{g/L}$ )
Ag	0.001	0.04	Ga	0.002	0.08
Fe	0.04	1.60	Hg	0.007	0.28
As	0.001	0.04	Mn	0.002	0.08
Ba	0.002	0.08	Ni	0.005	0.20
Be*	0.001	0.04	Pb	0.002	0.08
Cd	0.001	0.04	Rb	0.002	0.08
Co	0.001	0.04	Sr	0.001	0.04
Cr	0.003	0.12	V	0.001	0.04
Cs	0.001	0.04	Zn	0.009	0.36
Cu	0.07	2.80			

### 2.5 样品分析及加标回收率

使用 ICPMS-2030 直接测定尿样中多种金属元素的含量，并进行加标回收实验，实验结果见表 3。

表 3. 尿样及尿样加标分析结果

元素	校正内标	测定值 ( $\mu\text{g/L}$ )	加标浓度 ( $\mu\text{g/L}$ )	加标后测定浓度 ( $\mu\text{g/L}$ )	RSD(%) (n=3)	加标回收率 (%)	样品含量 ( $\mu\text{g/L}$ )
Ag	$^{103}\text{Rh}$	ND	0.50	0.501	2.55	100.2	ND
As	$^{89}\text{Y}$	2.74	2.00	4.78	0.97	102.0	109.6
Ba	$^{159}\text{Tb}$	0.021	0.50	0.537	3.17	103.4	0.84
Be*	$^{45}\text{Sc}$	ND	0.50	0.515	5.22	103.0	ND
Cd	$^{159}\text{Tb}$	ND	0.50	0.499	3.36	99.8	ND
Co	$^{89}\text{Y}$	0.004	0.50	0.478	3.02	94.8	0.16
Cr	$^{45}\text{Sc}$	0.007	0.50	0.495	2.75	97.6	0.28
Cs	$^{159}\text{Tb}$	0.274	0.50	0.815	3.36	108.2	10.96
Cu	$^{103}\text{Rh}$	ND	0.50	0.51	3.42	102.0	ND
Fe	$^{89}\text{Y}$	ND	2.00	2.11	3.86	105.5	ND
Ga	$^{89}\text{Y}$	0.002	0.50	0.487	2.40	96.9	0.08
Hg	$^{165}\text{Ho}$	0.05	0.50	0.507	3.05	91.4	2.00
Mn	$^{45}\text{Sc}$	ND	0.50	0.492	2.73	98.4	ND
Ni	$^{45}\text{Sc}$	0.035	0.50	0.505	3.05	94.0	1.40
V	$^{45}\text{Sc}$	0.068	0.50	0.59	6.43	104.0	2.72
Zn	$^{89}\text{Y}$	15.3	20.0	35.7	0.36	102.0	612

### 3. 结论

实验结果显示尿样样品加标回收率在 90%~110%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，准确度高特点，可满足人尿中多种金属元素分析的要求。

## 3.11 ICPMS-2030 碰撞池技术测定血清中微量元素的含量

**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

辅助气流速：1.1 L/min

炬管类型：Mini

雾化室：旋流

采样深度：5.0 mm

等离子体气流速：8.0 L/min

载气流速：0.7 L/min

雾化器类型：同心

雾室温度：5 °C

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：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：

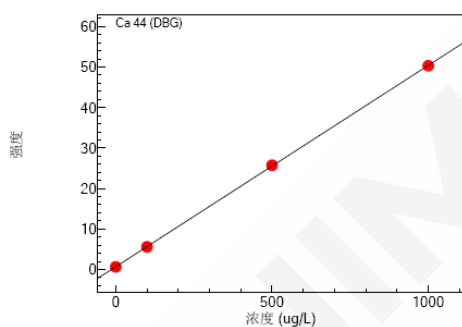


图 1. Ca 元素的标准曲线  $r=0.99998$

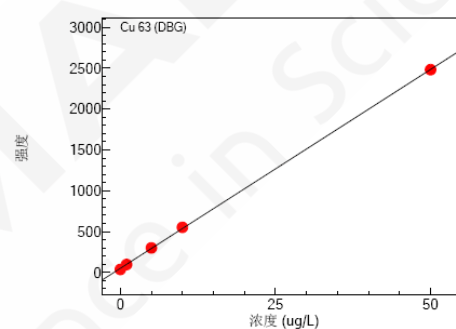


图 2. Cu 元素的标准曲线  $r=0.99994$

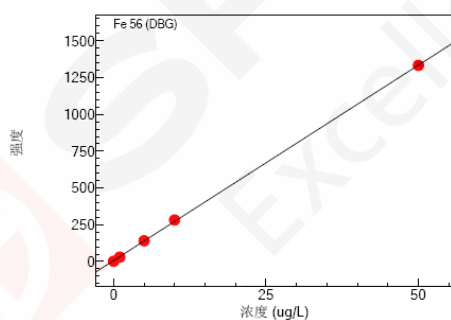


图 3. Fe 元素的标准曲线  $r=0.99994$

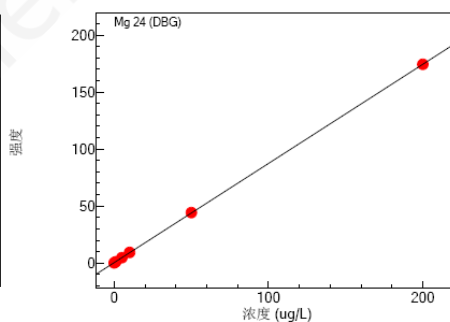


图 4. Mg 元素的标准曲线  $r=0.99999$

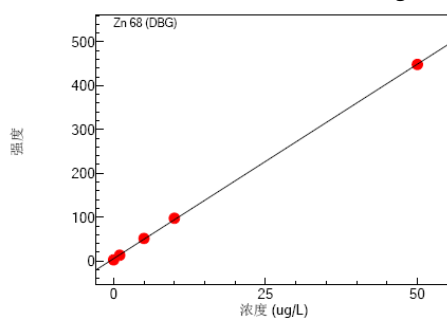


图 5. Zn 元素的标准曲线  $r=0.99991$

## 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。

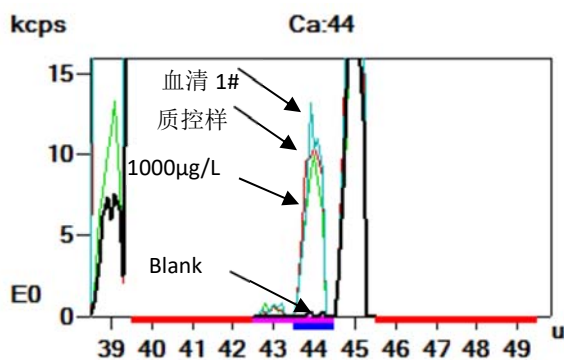


图 6. Ca 的谱峰轮廓图

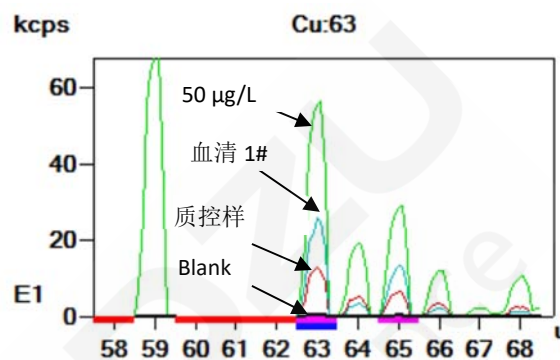


图 7. Cu 的谱峰轮廓图

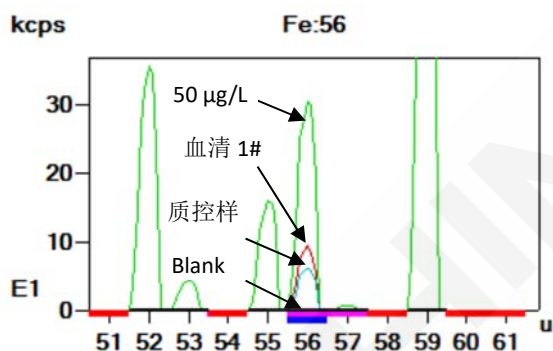


图 8. Fe 的谱峰轮廓图

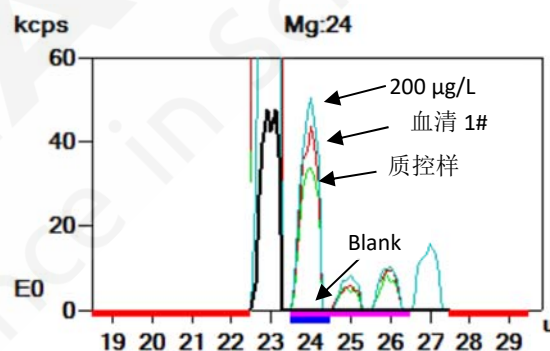


图 9. Mg 的谱峰轮廓图

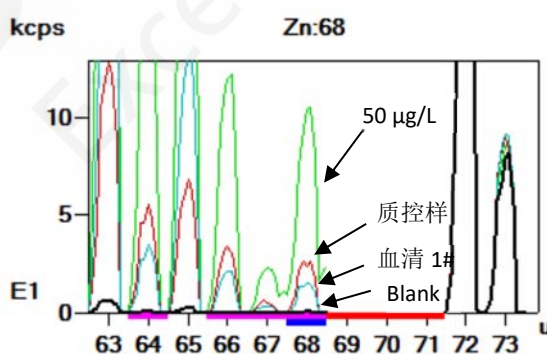


图 10. Zn 的谱峰轮廓图

## 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( $\mu\text{g/L}$ )	方法检出限( $\mu\text{g/L}$ )
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 (mg/L)	RSD (n=6) (%)
Seronorm™ Trace Elements Serum L1	$^{44}\text{Ca}^+$	86 $\pm$ 17	87.4	0.57
	$^{63}\text{Cu}^+$	1.088 $\pm$ 0.088	1.00	3.80
	$^{56}\text{Fe}^+$	1.47 $\pm$ 0.30	1.35	2.21
	$^{24}\text{Mg}^+$	16.8 $\pm$ 3.4	16.9	0.96
	$^{68}\text{Zn}^+$	1.097 $\pm$ 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#	$^{44}\text{Ca}^+$	84.5	1.57	血清 2#	$^{44}\text{Ca}^+$	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) (%)
血清 3#-1	$^{44}\text{Ca}^+$	87	1.71	血清 3#-2	$^{44}\text{Ca}^+$	85.3	2.71
	$^{63}\text{Cu}^+$	1.94	0.87		$^{63}\text{Cu}^+$	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。



## 四、 治疗药物监测与合理用药

### 4.1 前言

儿童药物研发、生产及其合理用药是提高儿童健康水平的重要组成部分。2021年11月15日国家卫生健康委药政司就《国家基本药物目录管理办法（修订草案）》（以下简称《修订草案》）公开征求意见。此次《修订草案》在基药目录范围中新纳入了儿童用药，这也是儿童用药目录首次被单独提出，足见国家对儿童健康及用药的重视程度，随着二胎政策的全面开放，儿童用药市场已呈现出加速发展趋势。

治疗药物监测(therapeutic drug monitoring, TDM)指在药代动力(pharmacokinetics, PK)原理指导下，应用现代分析技术定量测定患者治疗用药后体液中的药物及其代谢产物的浓度，从而设计或调整给药方案，以实现个体化治疗，提高疗效，避免或减少药物毒副反应。TDM是20世纪药物治疗学重大进展之一，是医师合理用药，提高医疗服务质量的有效途径。

儿童由于脏器和身体机能尚不成熟，不同年龄段儿童的身高、体重、体表面积、组织器官、内脏功能等差别较大，对药物的吸收、分布、代谢、排泄，以及所患疾病与成人相比存在差异，在药物的使用上应与成人有很大的区别。但是由于儿童用药规格不全、剂型少，造成临床上不得不将成人剂型、规格的药品分割后用于儿童，导致药效下降、剂量不准确、易产生不良反应甚至药物中毒等一系列问题，因此儿童用药需要特别慎重，是进行治疗药物监测的重点人群，其TDM的价值更大。我国儿童的TDM开展已有30余年，2015年9月由中华医学会儿科学分会临床药理学组发布了《儿童治疗性药物监测专家共识》，旨在为中国儿童TDM提供参考，促进儿童合理用药，保障儿童用药安全。

岛津经过多年的积累，已建立了近200个药物的检测方法，均收录在《治疗药物监测（TDM）质谱分析方案》中，基本覆盖儿童行TDM药物品种，可为儿童治疗药物监测提供检测方法参考，助力儿童用药安全。

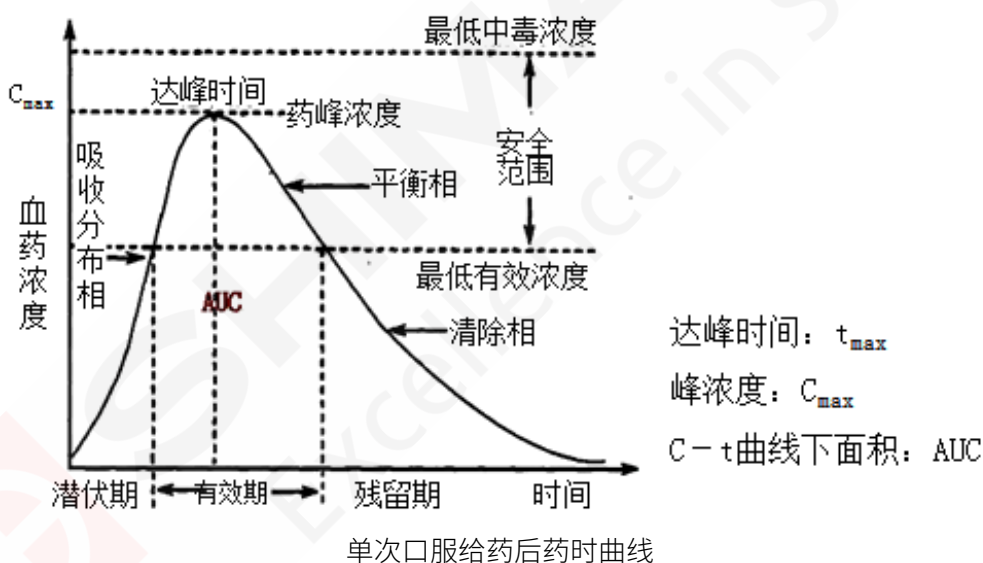
本章节将为您介绍岛津《治疗药物监测（TDM）质谱分析方案》。

## 4.2 岛津《治疗药物监测（TDM）质谱分析方案》简介

### 4.2.1 治疗药物监测基础知识

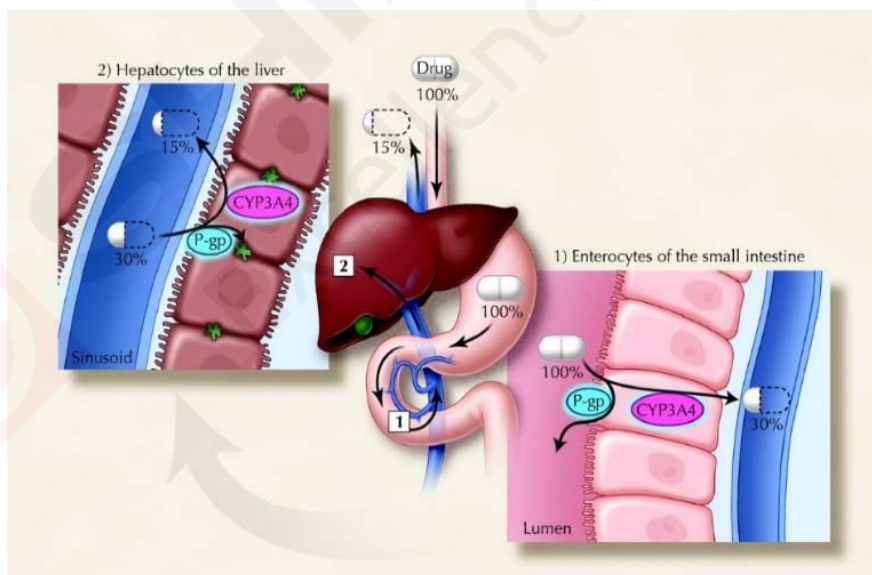
#### 1) 相关概念

- 治疗药物监测(therapeutic drug monitoring, TDM): 是一门研究个体化药物治疗机制、技术、方法和临床标准, 并将研究结果转化应用于临床治疗以达到最大化合理用药的临床实践药学学科。通过测定患者体内的药物暴露、药理标志物或药效指标, 利用定量药理模型, 以药物治疗窗为基准, 制订适合患者的个体化给药方案。其核心是个体化药物治疗。
- 个体化药物治疗(individualized medication): 依据药物在患者体内的药动学/药效学状态, 制订适合个体的给药方案, 并根据患者的生理病理状态、合并用药等因素的动态变化适时监测调整, 这样的药物治疗方式称为个体化药物治疗。
- 药物暴露(drug exposure): 这里特指人体内的药物暴露。药物在人体内滞留的量和时间程度一般用药动学参数“药-时曲线下面积(AUC)”来表示。血、尿、组织中的药物浓度都可在数学关系明确的情况下作为药物暴露的标示物, 用于日常的有效浓度范围标示。



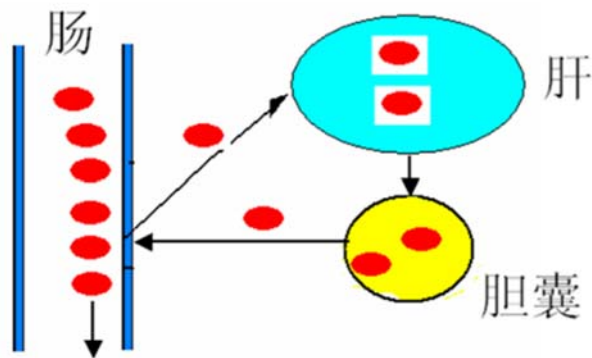
- 有效浓度范围(effective concentration range): 也称治疗窗(therapeutic window), 是指药物治疗过程中, 根据研究结果确定的最小有效浓度与最低中毒浓度之间的范围, 最常用有效血药浓度范围。在临床药物治疗实践中受人体生理病理状态、合并用药等复杂因素的影响, 这个阈值是一个统计学概念区间值, 符合多数人体和多数情况下的量效关系, 一般作为治疗的参考范围。
- 数学模型(mathematical model): 这里特指药物治疗中描述量效数学关系的定量药理模型。是指针对一定群体患者的药物治疗, 通过试验研究建立起的剂量-药物暴露-药效之间的多层次数学关系式。依据药物到达部位的速度快慢建立起的有模拟性质的“房室模型”, 根据实际测定值和药物在体内的滞留时间建起的有“非房室模型”, 还有“统计矩模型”“生理模型”等。

- 峰谷现象(peak and trough phenomenon): 血管外给药后, 药物峰浓度与谷浓度之间相差超出有效浓度范围, 在治疗效果上易出现毒性或无效结果的现象。
- 有限采样策略(limited sampling strategy, LSS): 在治疗药物监测常规工作中, 不可能像人体药理学试验一样通过采集过多时间点(一般为 13 个时间点以上)的样本数据来获得药-时曲线, 而是以尽可能少的时间点数据获得相关性最好的药-时曲线下面积计算方程, 像这样以最少的时间点采样获得相关性最好的药物暴露的监测方法称有限采样策略。
- 药物代谢动力学(pharmacokinetics, PK): 也称药代动力学, 简称药动学。美国药学会 1972 年给出的定义是, 研究动物和人体的药物吸收、分布、代谢和排泄, 以及相应的药理、治疗和毒性反应的动力学。药动学的应用研究领域包含生物利用度测定, 生理、病理因素对药物吸收、分布的影响, 疾病状态下或必要时药物剂量的调整, 药理效应与给药剂量的相关性, 药物相互作用评价, 临床预测(运用药动学参数制订个体化用药方案以此提供最有效的药物治疗)。
- 药物效应动力学(pharmacodynamics, PD): 也称药效动力学, 简称药效学。研究机体对药物反应的科学, 揭示药物在人体内的量效关系。
- 房室模型(compartment model): 按体内药物分布的速度(血流速度)将机体划分为一个或多个独立的抽象概念单元, 可对药物在体内的吸收、分布、消除特性做出模式图, 以建立数学模型, 揭示其动态变化规律。
- 首关效应(first-pass effect): 又称首过消除、首过效应。某些口服药物吸收透过胃肠壁, 进入门静脉, 在胃肠壁或肝脏内被广泛代谢、消除, 发生首过效应。一般来讲, 首过效应使得药物代谢增强, 生物利用度降低致药物暴露减少而疗效下降。



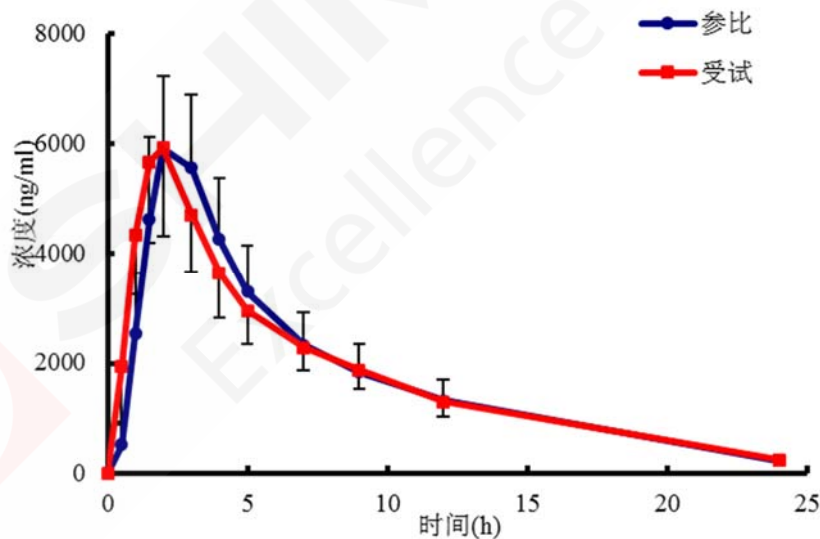
首关效应示意图

- 肝肠循环(hepato-enteral circulation): 指经胆汁或部分经胆汁排入肠道的药物在肠道中又重新被吸收, 经门静脉又返回肝脏的现象。此现象主要发生在经胆汁排泄的药物中, 如氯霉素、酚酞、吗替麦考酚酯等。在药动学上表现为药-时曲线出现双峰现象, 而在药效学上表现为药物的作用时间明显延长。



肝肠循环示意图

- 药动学参数(pharmacokinetic parameters): 是反映药物在体内的动态变化规律的一些常数, 定量描述药物在体内经时过程的动力学特点及作用变化规律。
- 生物利用度(bioavailability, BA): 是反映药物活性成分吸收进入体内的程度和速度的指标。可分为绝对生物利用度和相对生物利用度, 前者用于比较血管外给药途径相对于静脉给药的吸收差异, 后者用于评价两种制剂的吸收差异。
- 生物等效性(bioequivalence, BE): 在含有相同活性成分的仿制产品要替代它的原创制剂进入临床使用时, 鉴于药物浓度和治疗效果相关, 假设在同一受试者, 相同的药-时曲线意味着在作用部位能达到相同的药物浓度, 并产生相同的疗效, 那么就可以药动学参数作为替代的终点指标来建立等效性, 称为生物等效性。



药-时曲线

- 光谱分析(spectral analysis): 基于物质发射的电磁辐射, 或物质与辐射相互作用后产生的辐射信号或信号变化来测定物质的性质、含量和结构的一类仪器分析方法。
- 色谱分析(chromatographic analysis): 利用物质在两相中吸附或分配系数的微小差异达到分离的目的。当两相做相对移动时, 被测物质在两相之间进行反复多次的质量交换, 使原来微小的性质差异产生放大的效果, 从而分离、分析样品组成及测定样品的一些物理化学参数。

- 质谱分析(mass spectrographic analysis, MS): 利用多种离子化技术, 将物质分子在离子源内离子化后, 裂解成各种质荷比(m/z)的离子, 进而在电场和磁场的作用下被分离, 并被检测器测定, 从而进行物质结构鉴定、含量分析的方法。
- 酶免疫分析(enzyme immunoassay, EIA): 是抗原抗体特异性反应和酶的高效催化作用原理相结合的一种免疫学方法。其基本原理是将酶与抗原或抗体用交联剂偶合, 可与固相载体上(或液相中)响应的抗体或抗原发生特异性反应。加入响应的酶底物时, 可被酶催化生成可溶性或不溶性产物, 以肉眼或分光光度计进行定性或定量。
- 指南: WHO 对指南的定义是指任何包含有关卫生干预推荐意见的文件, 这些干预涉及临床、公共卫生或卫生政策。指南类型主要包括快速建议指南、标准指南、完整指南。

## 2) 治疗药物监测实施指征

### a) 个体差异

- 药动学差异: 人体的不同状态及个体之间对药物的处置存在吸收、分布、代谢和排泄 (ADME) 的动力学差异。
- 药效学差异: 除去人体药动学个体差异, 人体或个体间获得相同的药物暴露, 因药理效应的受体、信号通路的蛋白功能等多种因素的影响而导致的药物效应不同和改变。
- 说明: 药物治疗过程中, 治疗对象会同时存在不同程度的药动学、药效学个体间/个体内药物处置和药理效应差异。造成个体差异影响因素有多种, 遗传因素是其中之一。

b) 特殊患者群体, 针对接受药物治疗的患者中对药物的药动学和药效学规律发生重大改变的群体, 如婴幼儿、儿童、老年人、孕妇、不同种族等。

c) 药物相互作用, 患者的药物治疗方案中一般合并使用多种药物, 合并使用的药物会对目标药物的药动学或药效学产生影响。通过竞争性结合, 使得药物处置相关蛋白(如代谢酶、转运体、耐药蛋白等)和药理效应蛋白功能增强或降低, 分为酶诱导剂和酶抑制剂。

d) 病理状态的影响, 当人体处于肝肾功能异常、胃肠功能紊乱、感染和危急重症状态时, 药物的药动学和药效学状态发生较大的改变, 从而对药物效应产生影响。

e) 药物治疗窗窄的影响, 药物治疗窗窄亦称有效浓度范围、治疗阈小, 指药物的最小有效治疗浓度和最低中毒浓度之间的区域狭窄, 药物浓度不易控制在靶范围内。治疗窗窄的药物要进行监测。也可用治疗指数(最低中毒浓度与最小有效浓度的比值)大小来衡量, 以评估监测的必要性。

## 3) 常用的药动学参数

常用的药动学参数有:

$C_{max}$ : 大循环中的药物最高达峰浓度, 即最大血药浓度。

$t_{max}$ : 大循环中的药物达峰时间。

$t_{1/2}$ : 体内药物消除降低一半时所需要的时间。

K: 速率常数, 即单位时间内转运药物的单位数, 吸收速率常数为  $K_a$ , 消除速率常数为  $K_e$ 。

$V_d$ : 表观分布容积, 表示药物在体内的分布程度。

Cl: 清除率, 即单位时间内清除药物的程度。

Pb: 蛋白结合率, 表示与血浆蛋白结合的程度。

AUC: 药-时曲线下面积, 表示药物的体内暴露程度。

参考资料: 《治疗药物监测临床应用手册》 主编 张相林。人民卫生出版社, 2020: 1-6.



## 4.2.2 方案涉及药物品种统计

解决方案汇集了 LC、LCMSMS 等不同测试方法共 169 个药物品种。

《治疗药物监测（TDM）质谱分析方案》涉及药物一览表

药物分类	化合物
25 种精神安定剂 药物	舒必利、奥氮平、9-羟基利培酮、利培酮、氯氮平、喹硫平、异丙嗪、阿立哌唑、左美丙嗪、氯丙嗪、佐替平、氨磺必利、齐拉西酮、氯喹吩、脱氢阿立哌唑、去甲基奥氮平、美哌隆、去甲氯氮平、去甲喹硫平、培拉嗪、匹泮哌隆、丙硫喷地、舍吡哌、硫利达嗪、珠氯噻醇
33 种抗抑郁药	阿托西汀、安非他酮、西酞普兰、去甲基精氨酸、多苏列平、氟西汀、苯哌啶醋酸甲酯、米噻林、米尔纳西普兰、米氮平、奥匹哌醇、瑞波西汀、舍曲林、噻奈普汀、曲马多、曲唑酮、文拉法辛、沃替西汀、去甲基西他仑、去甲基氟西汀、O-去甲文拉法辛、丁氨苯丙酮、度洛西汀、氟伏沙明、羟基安非他酮、吗氯贝胺、奈法唑酮、帕罗西汀、利他尼酸、反苯环丙胺、去甲基米氮平、O-去甲曲马多、氯美噻唑
三环类抗抑郁药	度硫平、奥匹哌醇
5-羟色胺再摄取抑制 剂类抗抑郁药	西酞普兰，氟西汀，舍曲林，噻奈普汀，沃替西汀，去甲基西酞普兰，去甲基氟西汀，氟伏沙明，奈法唑酮，帕罗西汀
5-羟色胺-去甲肾上 腺素再摄取抑制剂	米那普仑、文拉法辛、O-去甲文拉法辛、度洛西汀
26 种抗癫痫药物	利卡西平、卡马西平、10-羟基-奥卡西平、卡马西平 10,11-环氧化物、非氨酯、加巴喷丁、拉科酰胺、拉莫三嗪、左乙拉西坦、奥卡西平、2-乙基-2-苯基丙二酰胺、吡仑帕奈、苯妥英、普瑞巴林、扑米酮、瑞替加滨、卢非酰胺、斯利潘托、噻加宾、乙琥胺、N-去甲基甲琥胺、苯巴比妥、舒噻嗪、托吡酯、丙戊酸、唑尼沙胺
中枢性镇咳药	右美沙芬、O-去甲右美沙芬
免疫抑制剂	环孢素 A、西罗莫司、依维莫司、他克莫司、霉酚酸
抗肿瘤药	克拉屈滨、克罗拉滨、奈拉滨、舒尼替尼、阿西替尼、甲氨蝶呤
抗菌药	氟胞嘧啶、两性霉素 B、阿尼芬净、氟康唑、羟基伊曲康唑、艾莎康唑、伊曲康唑、酮康唑、泊沙康唑、伏立康唑、莫西沙星、阿莫西林、林可霉素、磺胺嘧啶、氨苄西林、磺胺噻唑、左氧氟沙星、氧氟沙星、磺胺吡啶、土霉素、四环素、磺胺二甲嘧啶、呋喃西林、头孢噻肟、苯唑西林、替加环素、万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺
抗病毒药	洛匹那韦、利托那韦、利巴韦林、磷酸氯喹、阿比多尔、奥司他韦、缙更昔洛韦、更昔洛韦、替比夫定、羟氯喹
激素类药物	曲安西龙、泼尼松龙、泼尼松、甲基泼尼松龙、倍他米松、地塞米松、曲安奈德、曲安西龙双醋酸酯、泼尼松龙醋酸酯、氟米龙、泼尼松醋酸酯、甲基泼尼松龙醋酸酯、布地奈德、氟米龙醋酸酯、曲安奈德醋酸酯、倍他米松双丙酸酯、氟氢可的松
单抗药物	英利昔单抗药物、阿达木单抗药物、帕妥珠单抗药物、贝伐珠单抗、曲妥珠单抗
心血管类药物	地高辛、华法林
其他药物	茶碱、依折麦布、依折麦布葡萄糖酸苷、奥美拉唑、石杉碱甲、布洛芬

由于儿童及婴幼儿处于快速成长的阶段，因此，其药物代谢动力学性质与成人有显著不同。在新药研

发过程中，一般受试对象为健康成年人，很多药物在儿科患者中的应用尚缺乏经验，因此相对于成人，儿童是 TDM 的特殊人群，其 TDM 的价值更大。2015 年 9 月由中华医学会儿科学分会临床药理学组发布了《儿童治疗性药物监测专家共识》，旨在为中国儿童 TDM 提供参考，促进儿童合理用药，保障儿童用药安全。专家共识中筛选出七类推荐行 TDM 的药物，包括抗菌药物、抗癫痫药物、抗肿瘤药物、心血管药物、平喘药、免疫抑制剂及抗精神病药物。

《儿童治疗性药物监测专家共识》推荐行 TDM 药物列表

监测药物类别	临床监测药物名称
抗生素	万古霉素，庆大霉素，阿米卡星
抗癫痫药	卡马西平，丙戊酸，苯妥英，苯巴比妥，拉莫三嗪，奥卡西平
抗肿瘤药	甲氨蝶呤
强心苷类	地高辛
平喘药	氨茶碱
免疫抑制剂	环孢霉素，他克莫司，霉酚酸酯
抗躁狂药	碳酸锂（光谱法）

岛津经过多年的积累，已建立了 169 个药物品种的检测方法，均收录在《治疗药物监测（TDM）质谱分析方案》中，基本覆盖儿童行 TDM 药物品种，可为儿童治疗药物监测提供检测方法参考，助力儿童用药安全。

# 附录一：检测项目与岛津仪器应对一览表

## 检测项目与岛津仪器应对一览表

序号	检测领域	样本类型	检测项目	临床应用	岛津应对仪器	页码
1	出生缺陷筛查	干血斑	氨基酸、肉碱	多种遗传代谢病	LCMS-8040 CL LCMS-8050 CL	2 10 20
		尿液	有机酸	多种遗传代谢病	GCMS-QP2010 Ultra	23
		干血斑	二十碳溶血磷脂酰胆碱、 二十二碳溶血磷脂酰胆碱、 二十四碳溶血磷脂酰胆碱、 二十六碳溶血磷脂酰胆碱、	X-连锁肾上腺脑白质营养不良	LCMS-8050 CL	26
		干血斑	胍基乙酸、肌酸	肌酸缺乏综合征	LCMS-8050 CL	31
		干血斑	丙二酸、 甲基丙二酸、 乙基丙二酸、 2-甲基枸橼酸、 总同型半胱氨酸	有机酸血症	LCMS-8050 CL	36
		干血斑	17-羟孕酮、 雄烯二酮、 11-脱氧皮质醇、 21-脱氧皮质醇、 皮质醇	先天性肾上腺皮质增生	LCMS-8050 CL	40
2	内分泌及代谢疾病诊疗	血浆	肾上腺素、 去甲肾上腺素、 多巴胺、 肾上腺素、 去甲变肾上腺素、 3-甲氧基酪胺	嗜铬细胞瘤、副神经节瘤、高血压等	LCMS-8050 CL	45
		血清	27种激素	肾上腺皮质功能减退、原发性醛固酮增多症、库欣综合征、多囊卵巢综合征、性早熟等	LCMS-8050 CL	51
		血清	血管紧张素 I、II	原发性及继发性高血压诊断分型，原发性醛固酮增多症	LCMS-8050 CL	59
		血清	11种游离脂肪酸	心血管疾病、2型糖尿病、高血压、肥胖、乳腺癌等	LCMS-8050 CL	63
		血清	20种游离氨基酸	心血管疾病、肾病、甲亢及肿	LCMS-8040 CL	69

				瘤等		
		血清	17 种胆汁酸	肝胆疾病等	LCMS-8050 CL	75
		血清	同型半胱氨酸、 甲硫氨酸、 叶酸、 5-甲基四氢叶酸	高同型半胱氨酸血症	LCMS-8050 CL	84
		血浆	胰岛素样生长因子-1	儿童生长异常疾病、糖尿病等	LCMS-8050 CL	89
		血清	甲基丙二酸	甲基丙二酸血症	LCMS-8050 CL	93
		全血	糖化血红蛋白	糖尿病	LCMS-8045 LCMS-8050 CL	102 106
		血清	甲状腺激素 T3、T4	甲亢、甲减、甲状腺炎症、甲 状腺肿和甲状腺肿瘤等	LCMS-8050 CL	110
3	营养水平评估及相关疾病诊疗	血清	25-羟基维生素 D2/D3	佝偻病、骨骼发育迟缓、与心 血管疾病、免疫疾病、糖尿病 和肿瘤等疾病密切相关	LCMS-8040 CL LCMS-8050 CL	116
		血清	VA、25-羟基维生素 D2/D3、 VE、VK1	维生素水平评估、佝偻病、夜 盲症、心血管疾病等	LCMS-8045 LCMS-8050 CL	129 134 141
		血清	维生素 B1、B2、B6	维生素水平评估、多种疾病相 关指标	LCMS-8050 CL	148
		血清	42 种氨基酸	氨基酸水平、代谢紊乱疾病	LCMS-8050 CL	153
		尿液	碘	甲状腺相关疾病	ICPMS-2030	162
		尿液	19 种金属元素	微量元素水平评估、重金属中 毒	ICPMS-2030	165
		血清	Ca、Cu、Mg、Fe、Zn	必需元素水平评估	ICPMS-2030	169
4	治疗药物监测	全血、血 清、血 浆、干血 斑	169 种药物	合理用药及用药安全	LC-MS/MS 系列	174

## 附录二：法规标准、指南与共识列表

本手册参考的法规标准、指南及共识汇总如下表，不单独提供，读者如需原文，可自行下载查阅。

相关法规标准、指南与共识列表

序号	名称	类别	发布年份
1	矮身材儿童诊治指南	指南	2008
2	新生儿疾病筛查管理办法（卫生部令第64号）	法规	2009
3	新生儿疾病筛查技术规范（2010年版）	法规	2010
4	性早熟诊疗指南（试行）	指南	2011
5	先天性甲状腺功能减低症诊疗共识	共识	2011
6	临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证	卫生标准	2013
7	血清肌酐测定参考方法同位素稀释液相色谱串联质谱法	卫生标准	2013
8	血清甘油三酯测定参考方法同位素稀释气相色谱质谱法	卫生标准	2013
9	血清25-羟基维生素D3检测操作指南 同位素稀释液相色谱串联质谱法	卫生标准	2015
10	儿童治疗性药物监测专家共识	共识	2015
11	中枢性性早熟诊断与治疗共识	共识	2015
12	嗜铬细胞瘤和副神经节瘤诊断治疗的专家共识	共识	2016
13	先天性肾上腺皮质增生症21-羟化酶缺陷诊治共识	共识	2016
14	先天性肾上腺皮质增生症新生儿筛查共识	共识	2016
15	青春期多囊卵巢综合征诊治共识	共识	2016
16	尿中碘的测定 第2部分：电感耦合等离子体质谱法	卫生标准	2016
17	液相色谱-质谱临床应用建议	共识	2017
18	我国医学检验部门自建检测方法发展与管理建议	指南	2017
19	$\alpha$ 干扰素在儿科临床合理应用专家共识	共识	2018
20	多囊卵巢综合征诊治内分泌专家共识	共识	2018
21	女性性早熟的诊治共识	共识	2018
22	尿中多种金属同时测定 电感耦合等离子体质谱法	国家标准	2018
23	尿中镉的测定 第2部分：电感耦合等离子体质谱法	国家标准	2018
24	血中铅的测定 第2部分：电感耦合等离子体质谱法	国家标准	2018
25	血中镉的测定 第2部分：电感耦合等离子体质谱法	国家标准	2018
26	新生儿疾病串联质谱筛查技术专家共识	共识	2019

27	MS/MS 技术在新生儿氨基酸、有机酸及脂肪酸氧化代谢 障碍性疾病筛查中的应用共识	共识	2019
28	新生儿疾病筛查滤纸血片采集和递送及保存专家共识	共识	2019
29	新生儿先天性肾上腺皮质增生症筛查与诊断实验室检测技术专家共识	共识	2019
30	治疗药物监测工作规范专家共识 (2019 版)	共识	2019
31	质谱技术在临床微量元素检测中的应用共识	共识	2019
32	液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证	共识	2019
33	甲基丙二酸血症诊疗指南	指南	2019
34	X-连锁肾上腺脑白质营养不良诊疗指南	指南	2019
35	性发育异常的儿科内分泌诊断与治疗共识	共识	2019
36	罕见病诊疗指南 (2019 版)	指南	2019
37	原发性肉碱缺乏症诊疗指南	指南	2019
38	新生儿疾病筛查生物样本管理专家共识	共识	2020
39	治疗药物监测 (TDM) 结果解读专家共识	共识	2020
40	人群维生素 D 缺乏筛查方法	卫生标准	2020
41	原发性醛固酮增多症诊断治疗的专家共识	共识	2020
42	高同型半胱氨酸血症诊疗专家共识	共识	2020
43	中国儿童 1 型糖尿病标准化诊断与治疗专家共识 (2020 版)	共识	2020
44	戊二酸血症 1 型诊治专家共识	共识	2021
45	液相色谱-串联质谱法检测 25-羟维生素 D 标准化专家共识	共识	2021
46	儿童新型冠状病毒感染诊断、治疗和预防专家共识(第三版)	共识	2021
47	血清中碘的测定标准 电感耦合等离子体质谱法	卫生标准	2021
48	氨基酸和肉碱检测试剂盒 (串联质谱法)	医药标准	2021
49	医用质谱仪 第 1 部分: 液相色谱-质谱联用仪	医药标准	2021
50	妇幼保健机构医用设备配备标准	卫生标准	2022



岛津集团总公司日本岛津制作所自 1875 年创业以来，始终继承创始人岛津源藏的创业宗旨“以科学技术向社会做贡献”，并以此为公司宗旨，不断钻研满足社会需求的科学技术，为社会开发生产具有高附加值的产品。早在上世纪 50 年代岛津公司就先后研制出光电式分光光度计、气相色谱仪、X 射线分析仪等仪器。特别是在分析测试仪器、医疗仪器、航空产业机械等领域，以光技术、X 射线技术、图像处理技术这三大核心技术为基础不断推陈出新，满足更加广泛的市场需求，使岛津的高科技产品在全世界都享有很高的评价。

岛津公司作为分析测试仪器生产厂家，并没有仅仅停留在分析技术和分析计测技术这一层次，而是本着实现“为了人类和地球的健康”这一愿望，进一步利用所有技术，致力于解决与人类和地球生存息息相关的各种重要课题。

在“以科学技术向社会做贡献”的创业宗旨和实现“为了人类和地球的健康”这一愿望的经营理念的指导下，岛津人将始终致力于为用户提供更加进步的产品和更加满意的服务。





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14层  
邮政编码: 100020  
电话: (010)8525-2310/2312 传真: (010)8525-2531

### 沈阳

沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11层  
邮政编码: 110016  
电话: 024-23255577 传真: (024)2325-5577

### 西安

西安市锦业一路56号研祥城市广场A座501  
邮政编码: 710065  
电话: 029-62737878 传真: (029) 6273-7879

### 乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14H座  
邮政编码: 830002  
电话: (0991)230-6271/6272 传真: (0991)230-6273

### 郑州

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)8663-2981/2983 传真: (0371)8663-2982

### 上海

上海市徐汇区宜州路180号华鑫慧享城B2栋  
邮政编码: 200233  
电话: (021)3419-3888 传真: (021)3419-3666

### 成都

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞·创意成都写字楼  
B座12层  
邮政编码: 610063  
电话: (028)8619-8421/8422 传真: (028)8619-8420

### 南京

南京市鼓楼区汉中中路2号亚太商务楼27层B座  
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座  
邮政编码: 400010  
电话: (023)6380-6068/6058 传真: (023)6380-6551

### 武汉

武汉市武昌区临江大道96号武汉万达中心31层3112室  
邮政编码: 430060  
电话: (027) 5908-0488 传真: (027) 5908-0470

### 广州

广州市天河区高唐路230号广电智慧大厦  
邮政编码: 510656  
电话: (020) 3718-3888 传真: (020) 3718-3804

### 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)6315-2986/2987 传真: (0871)6315-2991

### 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: 518040  
电话: (0755)8340-2852 传真: (0755)8389-3100

### 长沙

湖南省长沙市芙蓉区解放西路188号国金中心T1大楼3115室  
邮政编码: 410005

### 香港

香港九龙尖沙咀海洋中心1028室  
SUITE 1028, OCEAN CENTRE, HARBOUR CITY,  
TSIM SHA TSUI, KOW LOON, 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