

# LCMS-8050CL 用于高同型半胱氨酸血症诊断应用研究

LCMSMS-472

**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 高同行半胱氨酸血症 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。

## ■ 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），DGLU-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。

### 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 μL

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

离子源: ESI (+)

雾化气流速: 3.0 L/min

干燥气流速: 10.0 L/min

加热器流速: 10.0 L/min

DL 温度: 150°C

加热模块温度: 400°C

离子源温度: 300°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

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

试剂的配制

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  $\mu\text{L}$ ，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  $\mu\text{L}$ ，室温下振荡孵育 30 min 后，向各离心管中加入 460  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 MRM 色谱图

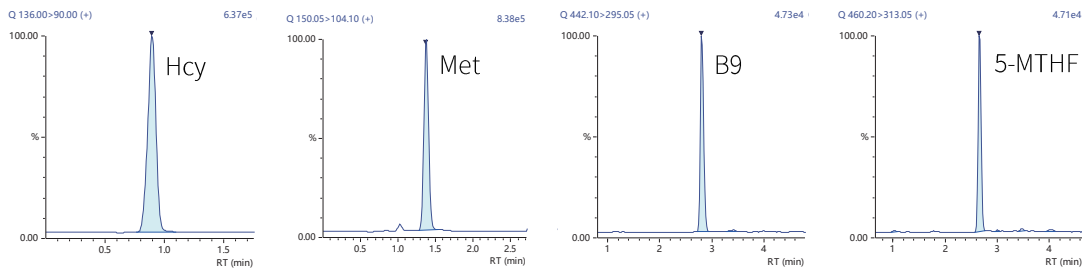


图 1 标准曲线最低浓度点色谱图

### 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  $\mu\text{mol/L}$ 、Met 在 2~64  $\mu\text{mol/L}$ 、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。

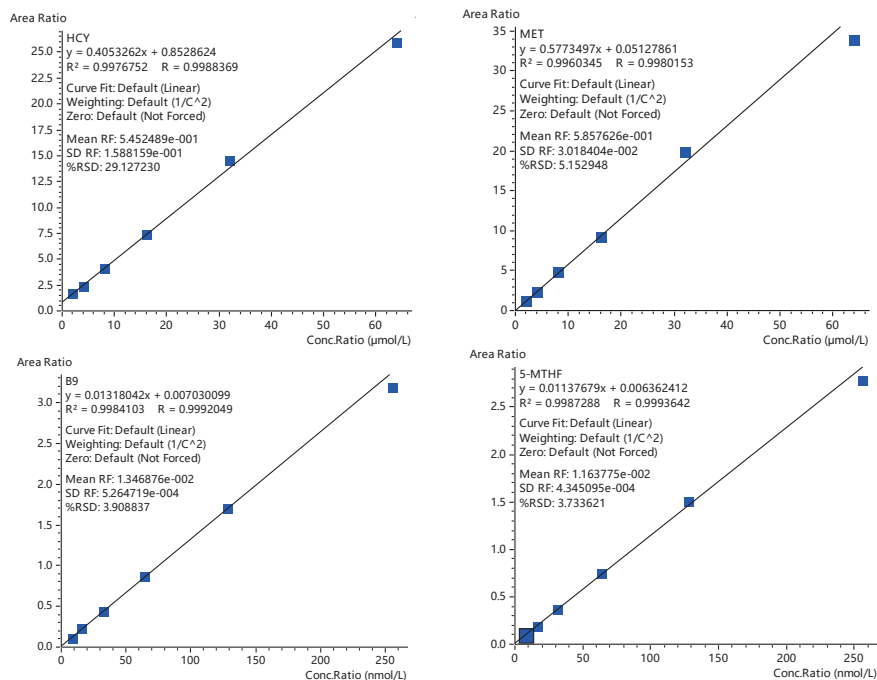


图 2 标准曲线图

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 准确度考察结果

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。

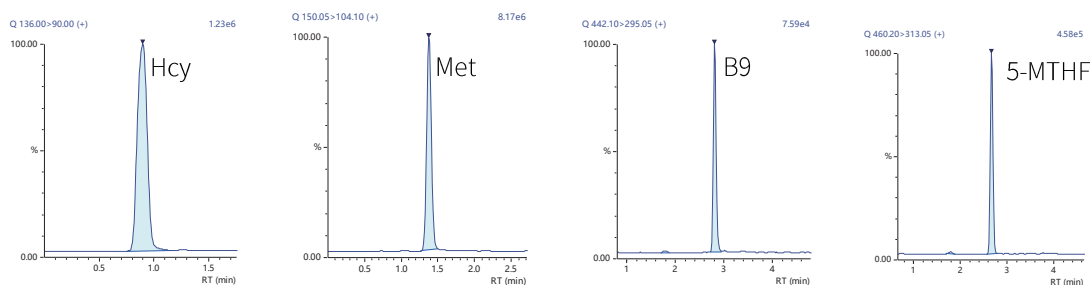


图3 sample-1 样品色谱图

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

## ■ 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。

岛津应用云

