

CLAM-2000 和 LCMS-8050 联用系统测定人血清中同型半胱氨酸含量

LCMSMS-375

摘要：本文建立了一种使用岛津在线自动前处理仪 CLAM-2000 和超高效液相三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统测定人血清中同型半胱氨酸含量的方法。此方法使用岛津在线自动前处理仪 CLAM-2000 处理血清样品，内标法定量，每个样品分析时间仅需 2.5 min，线性范围为 5~45 $\mu\text{mol/L}$ ，相关系数为 0.999，检出限为 0.014 $\mu\text{mol/L}$ ，定量限为 0.048 $\mu\text{mol/L}$ 。质控品均在靶值范围内，质控品日内准确度平均值为 99.6%，精密度 RSD 为 1.7%。此联用系统在线自动处理样品且数据重复性好，只需简单放入采血管、必要试剂和专用处理管，便可在线自动进行前处理，每个样品并行处理，优化仪器的使用和样品通量，提供可视化的图表和数据，可实时提醒用户试剂量的减少和质控品结果的变化等，是一种全自动化的分析系统，有助于更快、更简单、更安全地实现临床研究中高精度的工作流程。

关键词：CLAM-2000 在线自动前处理 三重四极杆质谱仪 同型半胱氨酸

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

法的测试操作相对简便，但其专用试剂大多按人份计算，价格较贵。而液相色谱 - 串联质谱联用法测定血清 HCY 浓度具有分析时间短、样品处理快速简便、专属性强、准确性和灵敏度高以及成本低等优点。

本研究使用岛津在线自动前处理仪 CLAM-2000 及岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统测定人血清中 HCY 含量，此联用系统实现了样品在线自动前处理与液质分析一体化，实现了实验中关键工作流程的自动化，只需简单放置采血管或其他样品管，系统就会自动完成对血样或其他样品的前处理，然后自动输送至 LCMS 进行分析。因此，该系统能够最大限度地减少人为误差和样品前处理的差异；有助于更快，更简单，更安全地实现临床研究中高精度的工作流程。

实验部分

1.1 仪器

CLAM-2000 和 LCMS-8050 联用系统（见图 1）。具体配置为：在线自动前处理仪 CLAM-2000，CLAM-2000 Ver. 1.13 在线自动前处理仪工作站，LC-30AD \times 2 输液泵，DGU-20A5R 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪配 ESI 离子源，LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。



图1 岛津CLAM-2000和LCMS-8050联用系统

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱: Shim-pack GIST (2.1 mmI.D.
×100 mmL, 2 μm)

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

流速: 0.2 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 0.5 μL

洗脱方式: 等度洗脱, B相浓度为 10%。

分析时间: 2.5 min

质谱条件

离子源: ESI +

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 10 L/min

接口温度: 300°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

干燥气流速: 10 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 100 ms

MRM 参数: 见表 1

表1 MRM优化参数

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

1.3 标准样品、质控品及样品制备

使用同型半胱氨酸检测试剂盒 (液相色谱 - 串联质谱法, 上海复星长征公司)。

该试剂盒包含以下部分:

内标液: DL- 同型半胱氨酸 -D4 (6 mL, 浓度为 5 μmol/L) ;

标准物质: 3 个水平的标准样品 (250 μL, 浓度分别为 50 μmol/L、150 μmol/L、450 μmol/L)

质控品: 1 个水平的标准样品 (250 μL, 浓度分别为 200 μmol/L)

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

在 CLAM-2000 工作站界面优化自动前处理参数、蛋白沉淀剂使用量、震荡转速、震荡时间、抽滤时间等。确定样品自动前处理程序具体操作为 (1)、吸取 20 μL 甲醇活化过滤管, 准备上样; (2)、吸取对照品、质控品或血清样品 20 μL 上样; (3)、吸取还原剂 20 μL; (4)、转速 1200 rpm 震荡 90 s 进行还原; (5)、吸取甲醇 160 μL; (6)、转速 2400 rpm 震荡 90 s; (7)、使用 -50~-60 kPa 的负压抽滤过滤管 150 s; (8) 接收管转移至液相自动进样器, 进样 0.5 μL (详见图 2)。

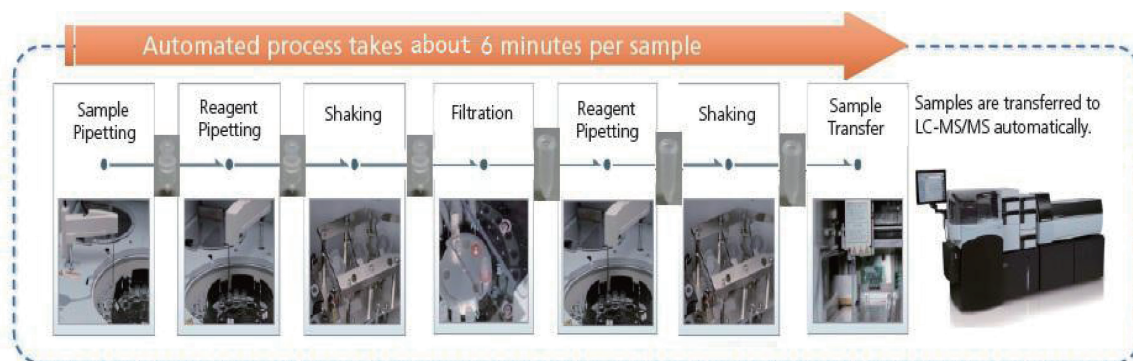


图2 CLAM-2000在线自动前处理过程

结果与讨论

2.1 专属性考察

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

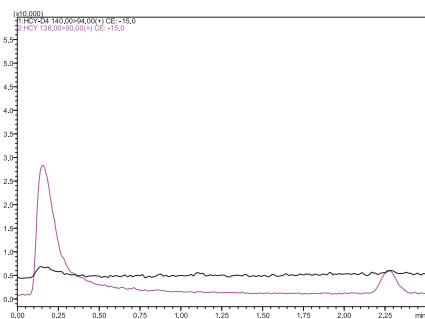


图3 double blank 谱图

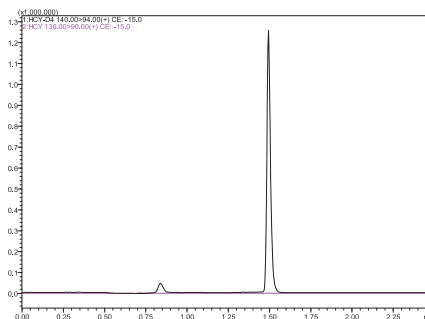


图4 blank 谱图

2.2 线性关系

对试剂盒内三个浓度的标准样品，按 1.2 中的分析条件进行分析，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。校准曲线在 5~45 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内线性良好，相关系数符合试剂盒要求（试剂盒要求相关系数大于 0.99）。线性方程、线性范围和相关系数见图 3。

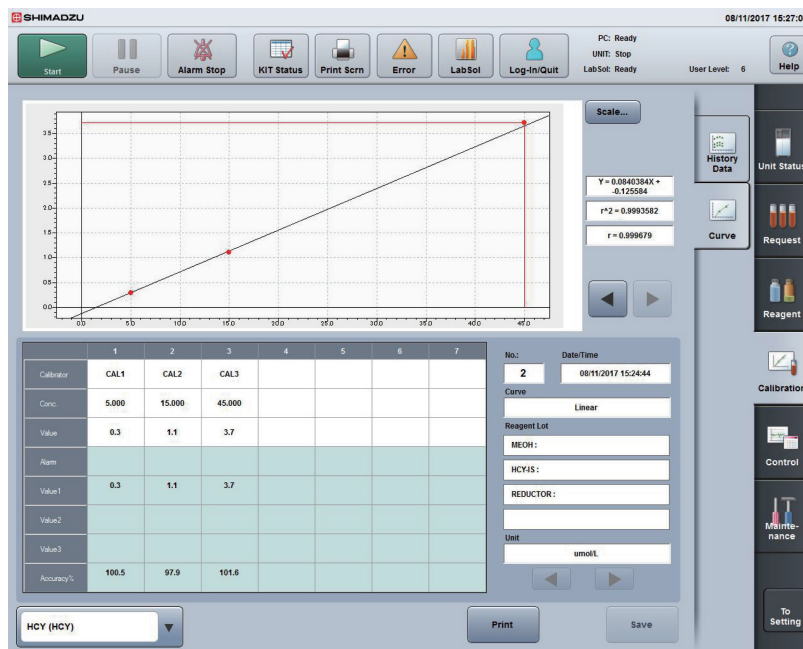


图5 HCY标准曲线图

2.3 检出限和定量限

对浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的标准样品按照 1.3 的方法进行前处理后进样分析，最低检出限（ $S/N=3$ ，LOD 表示）、最低定量限（ $S/N=10$ ，LOQ 表示）结果如表 2 所示。

表2 检出限和定量限

名称	信噪比	检出限($\mu\text{mol/L}$)	定量限($\mu\text{mol/L}$)
HCY	104	0.014	0.048

2.4 质控品准确度考察

按 1.2 中的分析条件和 1.3 中的前处理方法对试剂盒中的质控品进行分析, 质控结果如图 4 及表 3 所示, 结果显示, 测定结果与靶值接近, 完全落在质控样本的靶值范围之内。(靶值由试剂盒提供)

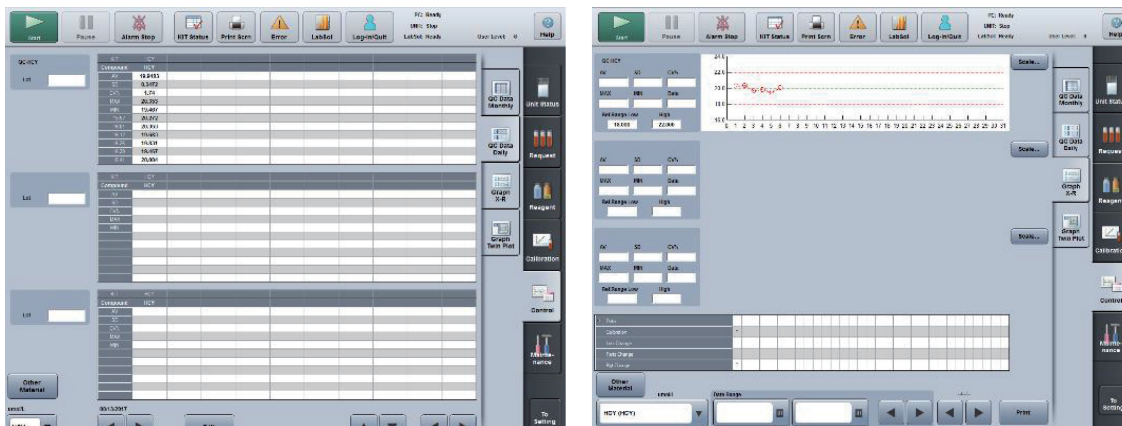


图4 质控样品控制图 (A-日内质控统计数据; B-日内质控图)

表3 质控样本测试结果

靶值 ($\mu\text{mol/L}$)	参考区间 ($\mu\text{mol/L}$)	测定浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	平均浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	平均 准确度	RSD%
20	18~22	20.272	19.950	99.8%	1.7
		20.353			
		19.683			
		19.831			
		19.467			
		20.084			

2.5 实测患者血清样品

取 2 批次血清样品, 使用该联用系统测定人血清中 HCY 的浓度, 结果见表 4。结果显示, 该系统可以用于测定人血清中 HCY 的浓度。

表4 血清样品浓度

样品	测定浓度($\mu\text{mol/L}$)
Sample-001	9.7
Sample-002	37.4

■ 结论

本文建立了一种使用岛津在线自动前处理仪 CLAM-2000 及岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统测定人血清中同型半胱氨酸含量的方法。此方法使用岛津在线自动前处理仪 CLAM-2000 处理血清样品, 内标法定量, 每个样品分析时间仅需 2.5 min, 线性范围为 5~45 $\mu\text{mol/L}$, 相关系数为 0.999, 检出限为 0.014 $\mu\text{mol/L}$, 定量限为 0.048 $\mu\text{mol/L}$ 。质控品均在靶值范围内, 质控品日内准确度平均值为 99.6%, 精密度 RSD 为 1.7%。此联用系统在线自动处理样品且数据重复性好, 消除手动操作生物样品带来的风险, 最大限度地减少操作人员与生物样本的接触, 只需简单放入采血管、必要试剂和专用处理管, 便可进行在线自动前处理, 每个样品并行处理, 以优化仪器的使用和样品通量, 并且通过软件来管理试剂、校准曲线、控制样品和系统维护, 确保系统的性能和可靠性, 系统提供可视化的图表和数据, 可实时提醒用户试剂量的减少或 QC 样品结果的变化等, 是一种全自动化的分析系统。