

# LCMS-8060 测定人血浆中的总同型半胱氨酸

## LCMSMS-248

**摘要：** 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用检测人血浆中总同型半胱氨酸的检测方法。样品经处理后，用超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8060 在 1.5 min 内完成定量分析。同型半胱氨酸在人血清中 0.794~6.86 mg/L 内线性良好，相关系数大于 0.9996；使用试剂盒内的标定浓度为 1.22 mg/L、3.49 mg/L 的人血浆质控样本进行了批内批间的精密度实验，实验结果表明批内批间的精密度 RSD% 均小于 4.238%；分别考察了进样器放置稳定性和 -20℃ 放置的稳定性，结果表明样品在该条件下存放时稳定性良好。

**关键词：** 血浆 同型半胱氨酸 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 又称高半胱氨酸，为蛋氨酸代谢的中间产物。据报道，遗传因素、环境因素和某些疾病、药物均可导致体内 Hcy 的升高，而血中 Hcy 的积蓄可导致血管损害，Hcy 已被公认为是一种心血管致病因子。目前常用的体内 Hcy 分析方法可分为免疫法和色谱法两大类。免疫法的测试操作相对简便，但其专用试剂大多按人份计算，价格较贵。而色谱法大多采用通用仪器和试剂，其检测的专一性强而技术要求较

高，操作复杂、费时。本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用，建立了以 D4-Hcy 为内标的体内 Hcy 的定量分析方法，该方法操作简捷、特异性好、灵敏度高、分析速度快，适用大规模临床 Hcy 检测的需要。本文建立了一种适用于人血浆样本的 Hcy 的分析方法，该方法可以在 Hcy 临床检验方面发挥较大的作用。供相关检测人员参考。

## 实验部分

### 1.1 仪器

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

### 1.2 分析条件

#### 液相色谱条件

色谱柱: Discovery HS F5-3 (2.1 mmI.D. ×150 mmL, 3 μm)

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

流速: 0.50 mL/min

柱温: 40℃

进样体积: 0.5 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, 初始比例 5%B  
MRM 采集条件见表 1。

表1 通用梯度洗脱程序

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

质谱条件

分析仪器: LCMS-8060

离子源: ESI+

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 10.0 L/min

接口温度: 300°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 450°C

干燥气流速: 10.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM), MRM 参数见表 2

表2 化合物信息及MRM参数

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

\*表示定量离子

### 1.3 样品制备

使用商业化的临床总同型半胱氨酸试剂盒 RECIPE (MS2013、MS2012 和 23082, Germany)。该试剂盒包含以下部分:

内标: 25 µg D4- 同型半胱氨酸 (根据试剂盒配制要求, 溶于 5 mL 超纯水);

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

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

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

## 结果讨论

### 2.1 标准样品扫描质谱图

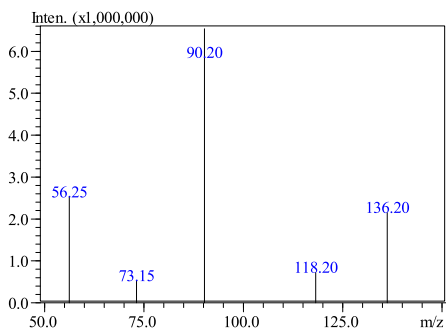


图1 Hcy二级扫描质谱图

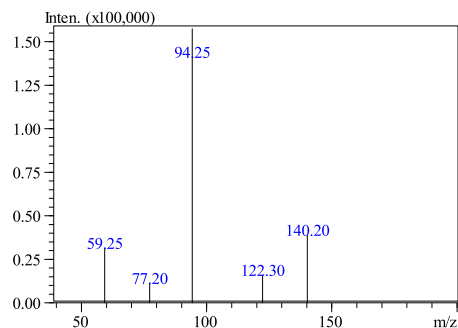


图2 内标二级扫描质谱图

## 2.2 标准样品的 MRM 色谱图

标准样品的 MRM 色谱图:

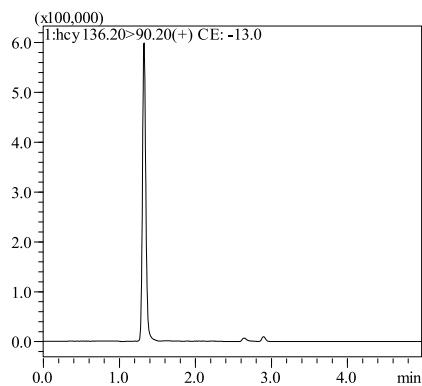


图3 Hcy MRM色谱图(0.117 mg/L)

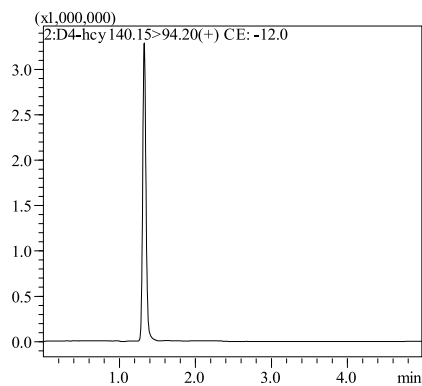


图4 内标MRM色谱图(0.588 mg/L)

## 2.3 专属性考察

按照 1.3 中的样品前处理方法制备 blank 和 double blank 样品, 按照 1.2 中条件进行分析后得到的色谱图如下所示:

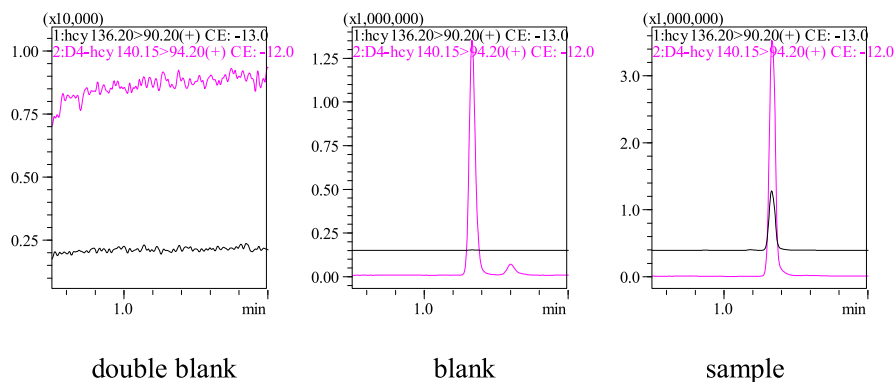


图5 Hcy 专属性色谱图

## 2.4 线性关系

连续三天对试剂盒内的标准品, 按 1.2 中的分析条件进行了 5 个批次的分析, 以浓度为横坐标, 峰面积比值为纵坐标, 内标法制作校准曲线, 5 次分析拟合的标准曲线标线如下图所示。在 0.794~6.86 mg/L 浓度范围内线性良好。线性方程、线性范围和相关系数见表 3。

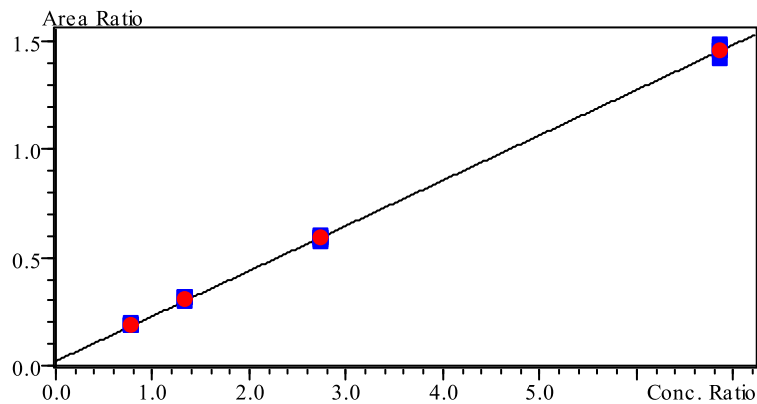


图6 标准工作曲线(n=5)

表3 校准曲线参数

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

### 2.5 检出限和定量限

对浓度为 0.794 mg/L 的标准样品按照 1.3 的方法进行前处理后进样分析, 最低检出限 (S/N=3, LOD 表示)、最低定量限 (S/N=10, LOQ 表示) 结果如表 4 所示。

表4 检出限和定量限

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

### 2.6 质控样本准确度考察

按 1.2 中的分析条件和 1.3 中的前处理方法对试剂盒中的质控样本进行分析, 两个浓度的质控样本的准确度结果如下表所示, 结果显示测定结果与理论值接近, 完全落在质控样本的靶值范围之内。

表5 质控样本一测试结果

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

表6 质控样本二测试结果

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

## 2.7 批内、批间精密度实验

连续三天对试剂盒中的质控样本（两个浓度，每个浓度 5 份）进行三个批次分析，考察批内、批间的精密度，结果如表 5 所示。HCY 的批内和批间精密度均小于 4.238%。

表7 批内批间精密度结果 (mg/L)

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

## 2.8 稳定性实验

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

表8 进样器放置稳定性考察结果

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

表9 -20℃放置稳定性考察结果

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

## 结论

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

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