

# 使用安捷伦 Infinity LC Clinical Edition/ K6460 液相色谱串联质谱系统结合试剂盒定量分析血液中的同型半胱氨酸

## 作者

胡楠，徐聪，王少珍  
安捷伦科技（中国）有限公司

## 摘要

采用安捷伦 Infinity LC Clinical Edition/K6460 液相色谱串联质谱系统与上海复星长征有限公司生产的同型半胱氨酸检测试剂盒（液相色谱-串联质谱法），定量分析血液中的同型半胱氨酸。通过方法验证及临床样品检测，证明 K6460 系统可以稳定地提供高准确度的定量结果。

## 前言

质谱仪，尤其是三重四极杆质谱仪，是痕量检测和定量分析的首选仪器，具有灵敏度高、稳定性出色和抗干扰能力强等优点，可同时分析多种目标物。三重四极杆质谱在药物检测、内分泌与生物标志物、诊断指示物、治疗监控化合物等方面都有广泛的应用。



图 1. 安捷伦 Infinity LC Clinical Edition/K6460 液相色谱串联质谱系统

同型半胱氨酸 (HCY) 又称高半胱氨酸、巯基丁氨酸, 与冠心病、脑血管疾病、外周血管疾病和静脉血栓的发生和发展相关。目前临床实验室用于血清或血浆中同型半胱氨酸的检测方法有酶联免疫法、荧光偏振免疫法、液相色谱法、液相色谱-串联质谱法等。其中液相色谱-串联质谱方法灵敏度高、特异性好、定量结果准确, 受到越来越多临床实验室的青睐。

本应用简报采用 Agilent Infinity LC Clinical Edition/K6460 三重四极杆液质联用系统与相应的试剂盒结合, 定量检测人血清或血浆中总同型半胱氨酸, 方法验证及临床样品检测结果表明, 该方法检测适用浓度范围宽、测定结果准确, 适用于同型半胱氨酸的日常定量分析。

## 实验部分

### 试剂盒

同型半胱氨酸检测试剂盒 (液相色谱-串联质谱法) 购自上海复星长征有限公司, 注册号: 沪械注准 20162400091。

### 仪器和设备

安捷伦 Infinity LC Clinical Edition/K6460 液相色谱串联质谱系统, 液相色谱仪配备如下: 二元泵 (部件号 K1312B)、真空脱气机 (部件号 K4225A)、自动进样器 (部件号 K1367E)、恒温器 (部件号 K1330B)、柱温箱 (部件号 K1316C); 质谱系统为三重四极杆质谱仪; 并配备相关的采集、定性和定量软件。

### 还原剂的配制

取试剂盒内还原剂, 在室温下准确加入 6.0 mL 纯化水, 摇匀, 备用。

### 对照品、质控品的配制

在室温下, 分别准确吸取 5  $\mu$ L 对照品或质控品于离心管中; 分别加入 45  $\mu$ L 稀释液、50  $\mu$ L 内标液和 50  $\mu$ L 还原剂, 混匀; 放置 30 分钟后, 再加入 50  $\mu$ L 蛋白沉淀剂, 涡旋混合 30 秒, 高速离心 (15000 rpm) 3 分钟, 吸取上清液供色谱进样分析。

### 样本前处理

准确吸取 50  $\mu$ L 待测样本于 1.5 mL 离心管中; 分别加入 50  $\mu$ L 内标液和 50  $\mu$ L 还原剂, 混匀; 在室温下放置 30 分钟后, 加入 50  $\mu$ L 蛋白沉淀剂, 涡旋混合 30 秒, 高速离心 (15000 rpm) 3 分钟, 吸取上清液供色谱进样分析。

### 液相色谱条件

色谱柱: 2.1  $\times$  50 mm C18 分析柱

流速: 0.2 mL/min

柱温: 25  $^{\circ}$ C

流动相: 0.02% 甲酸的甲醇溶液:0.02% 甲酸水溶液 (10:90)

### 质谱条件

离子源: 喷射流技术离子源 (AJS)

雾化气、干燥气及碰撞气均为氮气

毛细管电压: 3500 V

雾化气压力: 35.0 psi

干燥气温度: 250  $^{\circ}$ C

干燥气流速: 5 L/min

鞘气温度: 350  $^{\circ}$ C

鞘气流速: 11 L/min

检测模式: 多反应监测 (MRM)

MRM 参数: 如表 1 所示

表 1. HCY 及其氘代内标 HCY-d4 的 MRM 参数

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	碰撞电压 (V)	极性
HCY	136	90	70	8	正
HCY-d4	140	94	70	8	正

## 结果与讨论

### 方法学验证

按照试剂盒推荐的蛋白沉淀进行样品前处理及梯度洗脱进行液相分离, 分析结果良好, 如图 2 所示。HCY 峰形良好, 且与血液基质实现了有效分离。在试剂盒的最低定量点 5  $\mu$ mol/L 下, 信噪比  $\geq$  20000, 表明所用仪器具有良好的灵敏度。在试剂盒标准要求的 HCY 检测的线性范围 5–45  $\mu$ mol/L 内,  $R^2$  平均值  $>$  0.998, 对照品的检测偏差均  $<$  5%。对于质控样品 (QC), 多次测量准确度接近 100%, RSD = 0.47% (如表 2), 表明所用方法具有优异的定量能力和稳定性。

表 2. 预期浓度 20 μmol/L 的所有批次样品的 QC 检测结果，准确度接近 100%

样品				Hcy 方法	Hcy 结果					Hcy-d4	
名称	类型	级别	采集日期时间	预期的浓度	RT	响应	计算浓度	最终浓度	准确度	RT	响应
20180416-Z7-01	QC	4	2018/4/16 12:06	20.0000	1.278	14051	20.0171	20.0171	100.1	1.278	14398
20180416-Z7-02	QC	4	2018/4/16 13:23	20.0000	1.278	14517	20.0347	20.0347	100.2	1.278	14863
20180417-Z7-01	QC	4	2018/4/17 11:48	20.0000	1.293	14932	20.0121	20.0121	100.1	1.293	15305
20180417-Z7-02	QC	4	2018/4/17 13:05	20.0000	1.296	14418	20.1339	20.1339	100.7	1.296	14687
20180418-Z7-01	QC	4	2018/4/18 11:34	20.0000	1.281	14899	20.3135	20.3135	101.6	1.281	15040
20180418-Z7-02	QC	4	2018/4/18 12:51	20.0000	1.291	14008	20.2361	20.2361	101.2	1.291	14196
20180419-Z7-01	QC	4	2018/4/19 11:59	20.0000	1.280	15962	19.7176	19.7176	98.6	1.280	16609
20180419-Z7-02	QC	4	2018/4/19 13:05	20.0000	1.290	16210	19.7135	19.7135	98.6	1.290	16871

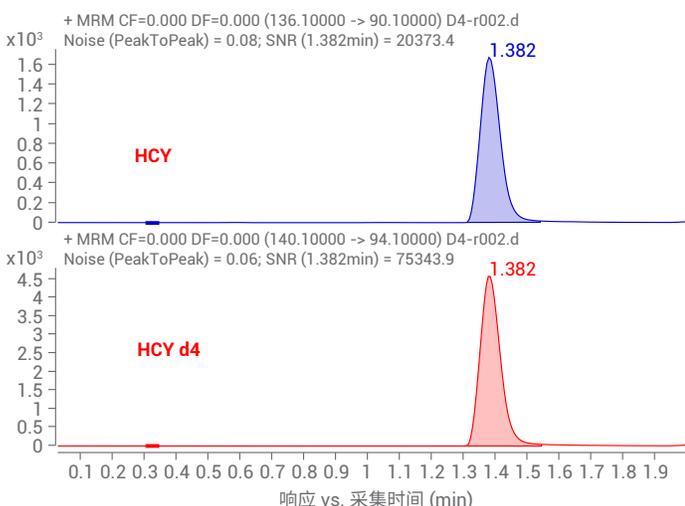


图 2. 5 μmol/L 最低浓度点及内标的色谱图

### 优异的线性及稳定性

经过连续 4 天的临床样品测试得到，方法线性及系统稳定性良好。将同一医院的数据整合分析，标准曲线线性良好， $R^2 > 0.998$  (图 3)。所有批次的 QC (包括日内和日间检测的结果) 均值 20.02 μmol/L，准确度 100.1%，RSD = 1.09%。全部标准品及 QC 的内标峰面积 RSD = 6.56% (表 3)。

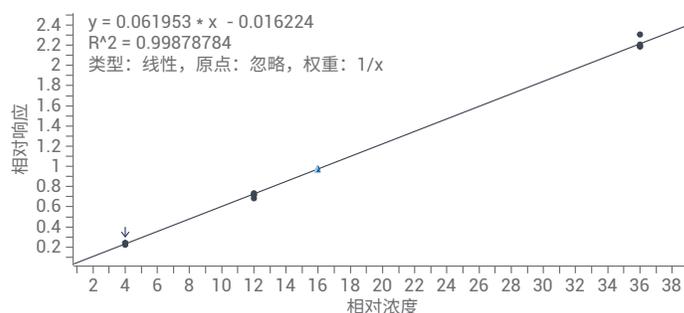


图 3. 同一医院 4 天的标准品 (黑色圆点) 线性良好，质控品 QC (蓝色三角点) 结果准确 (共 3 个校正浓度，12 个校正点；8 个 QC)

### 临床样品检测结果

基于试剂盒推荐的参考范围，同型半胱氨酸的正常值为 5–15 μmol/L，轻度升高为 13–30 μmol/L，中度升高为 30–100 μmol/L，> 100 μmol/L 为严重升高。临床试验选取了两个地区一百多例病人血液样本进行检测，浓度分布为 5.04–62.64 μmol/L，均值为 13.71 μmol/L，超过半数的样本在正常范围。调查发现，本次研究人群普遍年龄偏大，平均年龄接近 60 岁，HCY 测试结果符合人们对同型半胱氨酸的认知。

表 3. 同一医院所有批次标准品及 QC 数据结果表

样品				Hcy 方法	Hcy 结果					Hcy-d4	
名称	类型	级别	采集日期时间	预期的浓度	RT	响应	计算浓度	最终浓度	准确度	RT	响应
20180416-D4	校正	1	2018/4/16 11:55	5.0000	1.278	3553	5.1485	5.4185	103.0	1.278	14869
20180416-D5	校正	2	2018/4/16 11:59	15.0000	1.268	10542	14.9278	14.9278	99.5	1.269	14568
20180416-D6	校正	3	2018/4/16 12:02	45.0000	1.282	30366	44.5231	44.5231	98.9	1.282	13863
20180416-Z7-01	QC	4	2018/4/16 12:06	20.0000	1.278	14051	20.0171	20.0171	100.1	1.278	14398
20180416-Z7-02	QC	4	2018/4/16 13:23	20.0000	1.278	14517	20.0347	20.0347	100.2	1.278	14863
20180417-D4	校正	1	2018/4/17 11:37	5.0000	1.291	3670	5.1636	5.1636	103.3	1.291	15310
20180417-D5	校正	2	2018/4/17 11:40	15.0000	1.288	11238	15.0951	15.0951	100.6	1.288	15354
20180417-D6	校正	3	2018/4/17 11:44	45.0000	1.289	33744	44.4882	44.4882	98.9	1.289	15417
20180417-Z7-01	QC	4	2018/4/17 11:48	20.0000	1.293	14932	20.0121	20.0121	100.1	1.293	15305
20180417-Z7-02	QC	4	2018/4/17 13:05	20.0000	1.296	14418	20.1339	20.1339	100.7	1.296	14687
20180418-D4	校正	1	2018/4/18 11:23	5.0000	1.283	3403	5.0570	5.0570	101.1	1.283	14516
20180418-D5	校正	2	2018/4/18 11:26	15.0000	1.281	11029	14.0916	14.0916	93.9	1.281	16167
20180418-D6	校正	3	2018/4/18 11:30	45.0000	1.290	32086	46.9241	46.9241	104.3	1.290	13893
20180418-Z7-01	QC	4	2018/4/18 11:34	20.0000	1.281	14899	20.3135	20.3135	101.6	1.281	15040
20180418-Z7-02	QC	4	2018/4/18 12:51	20.0000	1.291	14008	20.2361	20.2361	101.2	1.291	14196
20180419-D4	校正	1	2018/4/19 11:48	5.0000	1.295	3708	4.8998	4.8998	98.0	1.295	16363
20180419-D5	校正	2	2018/4/19 11:52	15.0000	1.288	12350	14.8097	14.8097	98.7	1.288	17206
20180419-D6	校正	3	2018/4/19 11:56	45.0000	1.280	36382	44.8713	44.8713	99.7	1.280	16480
20180419-Z7-01	QC	4	2018/4/19 11:59	20.0000	1.280	15962	19.7176	19.7176	98.6	1.280	16609
20180419-Z7-02	QC	4	2018/4/19 13:05	20.0000	1.290	16210	19.7135	19.7135	98.6	1.290	16871

## 结论

本研究表明，安捷伦 Infinity LC Clinical Edition/K6460 液相色谱串联质谱系统与上海复星长征有限公司生产的同型半胱氨酸检测试剂盒（液相色谱-串联质谱法）结合，可以提供高度准确、稳定的定量结果，满足血液中同型半胱氨酸的检测要求。

## 声明

此材料中所涉及的试验结果是安捷伦公司在一定条件下进行并得出的。此材料仅为一个技术参考以证明我们的仪器在一定条件下可以对目标检测物进行测试和分析。在临床上对患者的实际检测应遵守相关法规同时实验方法和条件也应根据实际情况进行优化。如果您有任何疑问，也可以咨询安捷伦客户服务中心。

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)



微信搜一搜

安捷伦视界

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2020  
2020年6月16日，中国出版  
5994-2166ZHCN

