

高效液相色谱串联质谱法同时测定人血清8种叶酸循环代谢物

李慧敏¹,刁嘉茵²,郑康帝²,张 召^{2,3},林炳耀⁴,林东子^{4*} (1. 东莞市滨海湾中心医院, 广东东莞 523900; 2. 广东省人体微生态工程技术研究中心, 广东广州 524000; 3. 广东南芯医疗科技有限公司, 广东广州 524000; 4. 佛山市第四人民医院, 广东佛山 528000)

摘要:目的 建立同时测定人血清8种叶酸循环代谢物的高效液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)法。方法 人血清样本沉淀蛋白后挥发干,有机试剂复溶,采用Waters ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱、有机试剂梯度洗脱法进行分离,电喷雾正负离子模式下以多反应检测方式检测,内标法定量。结果 8种叶酸循环代谢物标准曲线的线性相关系数为0.994~0.999,精密度RSD值为3.9%~12.3%,回收率RSD值为85.4%~113.1%,最低检出限为0.128 μg/L。结论 LC-MS/MS法具有重现性好、灵敏度高、通量高的特点,可同时测定多种人体叶酸循环代谢物。

关键词: 高效液相色谱串联质谱; 叶酸; 循环代谢物

中图分类号: Q56

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2021)04-0395-05

Simultaneous detection of 8 folate metabolites in human serum using LC-MS/MS

LI Hui-min¹, DIAO Jia-yin², ZHENG Kang-di², ZHANG Zhao^{2,3}, LIN Bin-yao⁴, LIN Dong-zi^{4*} (1. Dongguan Binhaiwan Central Hospital, Dongguan 523900, China; 2. Guangdong Provincial Center of Human Microecology Engineering and Technology, Guangzhou 524000, China; 3. Guangdong Longsee Biomedical Corporation, Guangzhou 524000, China; 4. Foshan Fourth People's Hospital, Foshan 528000, China)

Abstract: Objective To establish a LC-MS/MS method for simultaneous detection of 8 folate metabolites in human serum. Methods The protein precipitation extracted from human serum was evaporated and redissolved in organic reagents. The analytes were separated using waters ACQUITY UPLC HSS T3 column and then eluted by gradient elution with organic reagents. The folate metabolites were detected using positive and negative ion electrospray in multiple reaction monitoring (MRM) mode, and the quantification was determined by internal standard method. Results The linear coefficients of 8 folate metabolites were 0.994–0.999. Relative standard deviations of precision and recovery were 3.9%–12.3% and 85.4%–113.1% respectively, and minimum detection limit was 0.128 μg/L. Conclusion LC-MS/MS is reproducible, sensitive, and high-throughput for simultaneous detection of multiple folate metabolites in human blood.

Key words: LC-MS/MS; folic acid; circulating metabolites

叶酸及其衍生物5-甲酰四氢叶酸(5-FoTHF, 亚叶酸)、5-甲基四氢叶酸(5-MeTHF)、5,10-亚甲基四氢叶酸(5,10-CH₂-THF)和四氢叶酸(THF)等主要影响DNA合成和DNA甲基化两个过程^[1-2],可以治疗贫血及神经系统疾病,也可以用作早孕期间预防胎儿畸形^[3-9]。在尿嘧啶脱氧核苷酸(dUMP)到胸腺嘧啶脱

氧核苷酸(dTMP)的转化过程中,dUMP因叶酸缺乏导致积累,错误掺入DNA,进而在DNA复制和修复过程中诱发基因突变、DNA单双链断裂、染色体断裂等各种遗传异常^[10-11]。叶酸摄入不足将影响同型半胱氨酸(Hcy)代谢途径,导致DNA和RNA甲基化异常及改变基因表达,从而引发各类相关疾病的发生^[12-13]。随着生活水平的不断提高、三胎政策的放开、出生率的降低等一系列因素,叶酸检测已成为母婴阶段的重要检测指标。目前,临床叶酸检测多以化学发光法为主,常单独测试叶酸及同型半胱氨酸,主要因为此方法具有自动化程度高、重现性好、灵敏度高等优点^[14-15],但化学发光法无法对叶酸代谢中的多种衍生物同时进行检测^[15-16]。为协助临床医生明确患者叶酸

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(No.82003786),广州市科技计划项目(No.202002030200),佛山市自筹经费类科技计划项目(医学类科技攻关)(No.1920001000648)

收稿日期: 2021-03-21; **修订日期:** 2021-06-07

作者简介: 李慧敏(1976-),女,本科,副主任技师

通信作者: 林东子(1981-),男,硕士,主任技师, E-mail:

dongzi_001@163.com

缺乏的原因,探究叶酸检测指标丰富、检测结果稳定、灵敏度高、叶酸上下游产物共检等要求已成为该领域的难点。本文基于液相串联质谱平台对叶酸代谢过程中的多种关键化合物进行定量检测,以期为临床上叶酸缺乏相关症状的诊治提供参考。

1 资料和方法

1.1 仪器试剂

岛津 LC-20AC 型液相色谱仪;岛津 CL8050 型质谱仪;乙腈、甲酸铵和甲酸(St. Louis, 美国);去离子水(Millipore、MA、USA);叶酸、5-FoTHF、5-MeTHF、THF 标准品均购买自 Sigma-Aldrich 上海阿拉丁生化科技股份有限公司,纯度均大于 98%。

1.2 方法

1.2.1 校准品、质控品及提取试剂配制 (1)PBS 缓冲液:称取磷酸二氢钾 0.24 g,磷酸氢二钠 1.44 g,氯化钠 8 g,氯化钾 0.2 g,加入去离子水约 800 mL 充分搅拌溶解,然后加入浓盐酸调 pH 至 7.4,定容至 1 L 即得。(2)牛血清白蛋白溶液:称取适量牛血清白蛋白,按 50 g/L 加入 PBS 缓冲液溶解,混匀即得。(3)三联抗氧化剂:称取抗坏血酸、柠檬酸、二硫苏糖醇(DTT)适量,加入甲醇,分别配制成 1 g/L 甲醇溶液,然后按抗坏血酸:柠檬酸:DTT:水=1:1:1:7 配制成为质量浓度为 100 mg/L 的三联抗氧化剂。(4)储备液配制:称取适量各标准品叶酸、5-FoTHF、5-MeTHF、THF、5,10-CH₂-THF、S-腺苷甲硫氨酸(SAM)、S-腺苷同型半胱氨酸(SAH)和 Hcy,分别加入三联抗氧化剂,配制成 1 g/L 的各储备液。(5)混合内标溶液配制:取叶酸内标和 Hcy 储备液,用三联抗氧化剂稀释成叶酸内标为 1 g/L, Hcy 为 20 g/L 的混合内标溶液。(6)校准品的配置:先将各储备液配制成梯度混合标准品溶液,然后按混标:牛血清白蛋白溶液=1:99 配制成如下质量浓度校准品,见表 1。(7)质控品的配置:先将各储备液配制成 2 个混合标准品溶液,然后按混标:牛血清白蛋白溶液=1:99 配制成如下浓度质控品,见表 2。(8)提取液配置:提取液 1 为配制含 100 mg/L 抗坏血酸、柠檬酸、二硫苏糖醇的甲醇溶液;复溶液 2 为配制含 100 mg/L 抗坏血酸、柠檬酸、二硫苏糖醇的 10% 乙腈溶液。(9)前处理方法:取 100~200 μL 样本(血清、校准品或质控品)至 EP 管中,加入 5 μL 混合内标溶液和 500 μL 提取液 1 后涡旋振荡 1 min,混匀。离心后转移 400~500 μL 上清于 96 孔进样板中。氮气吹干,加入 100 μL 复溶液 2,覆上铝箔封膜,检测备用。将 96 孔进样板放入自动进样器中,准备上机。

1.2.2 测定方法 (1)色谱条件:色谱柱 Waters AC-

QUITY UPLC HSS T3 色谱柱,流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液,流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液。流速 450 μL/min,柱温 40 °C,进样量 5 μL,洗脱梯度见表 3。(2)质谱条件:在电喷雾离子正离子检测模式下,采用 MRM (Multi Reaction Monitoring) 扫描分析,离子源参数雾化气流量为 3 L/min,干燥气流量为 2 L/min,加热气流量为 15 L/min。DL 管(Dashlaunch)温度为 100~400 °C,接口温度为 100~400 °C,加热块温度为 100~400 °C,碰撞诱导裂解气压为 100~300 kPa,前体与产物离子通道见表 4。

1.2.3 方法学探究 低、中、高浓度的质控样本分别在提取前和提取后加入内标,按样品处理方法进行样本提取与上机检测,分析方法的精密性。同一样本平

表 1 8 种人体叶酸循环代谢物标准品的配置信息

(C1-C6 为标曲的 6 个质量浓度,μg/L)

指标	C1	C2	C3	C4	C5	C6
叶酸	0.512	1.28	3.2	8	20	50
THF	0.512	1.28	3.2	8	20	50
5-MeTHF	1.024	2.56	6.4	16	40	100
5-FoTHF	0.512	1.28	3.2	8	20	50
5,10-CH ₂ -THF	0.512	1.28	3.2	8	20	50
Hcy	51.2	128	320	800	2 000	5 000
SAM	0.512	1.28	3.2	8	20	50
SAH	0.512	1.28	3.2	8	20	50

表 2 8 种人体叶酸循环代谢物质控品的配置信息 (μg/L)

指标	QCH(高浓度质控)	QCL(低浓度质控)
叶酸	25	1
THF	25	1
5-MeTHF	50	2
5-FoTHF	25	1
5,10-CH ₂ -THF	25	1
Hcy	2 500	100
SAM	25	1
SAH	25	1

表 3 8 种人体叶酸循环代谢物流动相洗脱信息

时间/min	B 泵
0.01	3
2.5	70
4	100
4.5	100
4.6	3
7	3

表4 8种人体叶酸循环代谢物液质检测前体与离子碎片信息

化合物	前体离子/(m/z)	产物离子/(m/z)	Q1Pre/V	CE/V	Q3Pre/V
叶酸	442.00	295.10	-20	-17	-21
THF	447.15	295.30	-13	-17	-20
5-MeTHF	460.10	313.20	-21	-21	-22
5-FoTHF	474.05	327.15	-22	-19	-23
SAM	456.00	412.20	-28	-30	-21
SAH	399.10	250.20	-25	-15	-27
Hcy	385.00	136.25	-18	-20	-15
叶酸内标	136.10	90.20	-13	-13	-18
Hcy内标	140.05	94.15	-12	-13	-10

Q1Pre 为母离子进入第1重4级杆的能量; CE 为碰撞能; Q3Pre 为碎片离子在第3重4级杆筛选的能量。

均分成6份,前3份每份按样本提取方法提取后分别加入低、中、高浓度的内标作为组1质控样本上机检测;后3份每份分别加入低、中、高浓度的内标按提取方法提取后作为组2质控样本上机检测回收率。

2 结果

2.1 标曲线性范围与检测限

8种人体叶酸循环代谢物的总离子流图谱见图1。各叶酸循环代谢的线性相关系数为0.994~0.999,表明线性关系良好,最低检出限为0.128 μg/L。采用内标进行定量,叶酸、5-FoTHF、5-MeTHF、THF、5,10-CH₂-THF 均共用叶酸内标。SAM、SAH 和 Hcy 共用

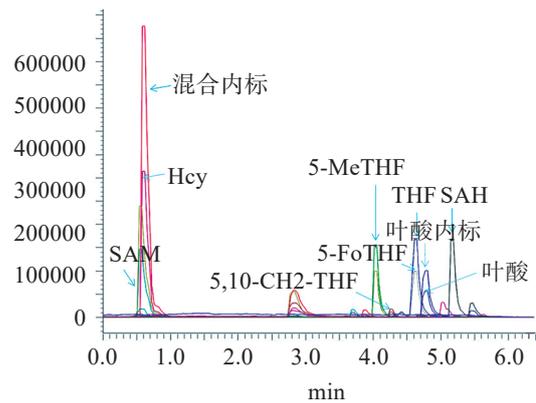


图1 8种人体叶酸循环代谢物总离子流图谱

Hcy 内标。以校准品待测物峰面积与对应内标峰面积的比值作为纵坐标(y),以各校准品的质量浓度为横坐标(x),绘制标准曲线。标准曲线拟合后,相关系数 $r > 0.99$ 。此外质控品测试准确度符合85%~115%,各个指标的检测限及定量限如表5所示。

2.2 精密度与准确度

由表6可知,8种人体叶酸循环代谢物精密度RSD 值为3.9%~12.3%,回收率RSD 值为85.4%~113.1%,精密度良好,回收率较高,说明方法的准确度良好。

2.3 样本检测结果

分别取儿童、孕妇志愿者样本各50份,按1.2.1方法处理后,测定叶酸循环代谢产物含量,结果范围如表7所示。

表5 8种人体叶酸循环代谢物的回归方程、相关系数、准确度及检测线

指标	标准曲线	r 值	质控品/(μg/L)	准确度/%	检测限/(μg/L)	定量限/(μg/L)	
叶酸	$y=252.95x-5.68$	0.9998	QCL	0.92	92	0.128	0.256
			QCH	26.85	107		
THF	$y=264.72x-0.04$	0.9999	QCL	0.86	86	0.256	0.512
			QCH	23.55	94		
5-MeTHF	$y=28.91x-0.58$	0.9999	QCL	1.98	99	0.128	0.256
			QCH	49.21	98		
5-FoTHF	$y=29.66x-0.34$	0.9996	QCL	0.95	95	0.128	0.256
			QCH	24.63	99		
5,10-CH ₂ -THF	$y=100.53x-0.03$	0.9997	QCL	0.89	89	0.256	0.512
			QCH	27.18	109		
Hcy	$y=1116.50x+94.71$	0.9983	QCL	94.22	94	6.4	12.8
			QCH	2402.23	96		
SAM	$y=18.72x-0.06$	0.9982	QCL	0.88	88	0.128	0.256
			QCH	22.72	91		
SAH	$y=12.34x+0.91$	0.9983	QCL	0.90	90	0.128	0.256
			QCH	25.01	100		

表6 8种人体叶酸循环代谢物的精密度及回收率

指标	低浓度		中浓度		高浓度	
	精密度/%	回收率/%	精密度/%	回收率/%	精密度/%	回收率/%
叶酸	8.0	90.3	6.7	94.3	2.3	99.2
THF	12.3	86.1	8.2	85.4	6.7	87.8
5-MeTHF	3.9	100.1	4.1	102.3	2.8	100.7
5-FoTHF	4.3	105.2	2.0	94.5	1.1	93.3
5,10-CH ₂ -THF	9.8	110.7	9.3	113.1	7.7	109.4
Hcy	5.4	92.6	5.6	94.5	4.3	89.7
SAM	10.7	88.7	9.8	84.6	5.2	85.0
SAH	7.3	113.2	8.2	108.6	5.0	110.5

表7 样本检测结果

指标	结果范围/($\mu\text{g/L}$)
叶酸	4.22~10.85
THF	0.00~1.77
5-MeTHF	18.36~42.19
5-FoTHF	0.98~1.62
5,10-CH ₂ -THF	0.00~2.31
Hcy	392.47~1 012.89
SAM	1.16~2.23
SAH	3.14~4.25

3 讨论

叶酸是促进机体健康的重要物质,是人体细胞生长和繁殖的必须物质,在造血系统中对红细胞形态和代谢有着重要的作用^[17]。叶酸可以协助胎儿发育,预防胎儿神经管畸形的发生,准妈妈在备孕期间服用叶酸可大幅度降低胎儿神经管畸形率^[18]。同时,叶酸与同型半胱氨酸代谢关系密切,对预防心血管疾病的发生具有重要的意义^[13]。随着生活水平的不断提高、三胎政策的放开,叶酸保健品的市场占有份额不断增大,但由于缺乏科学的指导,叶酸使用现状混乱。因此,通过检测人体内叶酸及其循环代谢物的真实状态,针对性地调整、明确叶酸潜在需求,更符合个性化治疗要求。

饮食摄入的叶酸主要以多聚谷氨酸盐的形式,叶酸代谢首先在肠黏膜上水解,二氢叶酸转移酶先是将叶酸还原为二氢叶酸,再生成四氢叶酸。四氢叶酸产生甲酰基、甲基、亚甲基等叶酸形式底物,亚甲基四氢叶酸经甲基四氢叶酸还原酶催化转变为5-甲基四氢叶酸。5-甲基四氢叶酸即是叶酸在血液的主要形式。当前,临床在进行叶酸检测分析时,不能明确全部叶酸循环代谢产物的含量,大大限制了医生对患者叶酸缺乏的判断。为此,临床急需一种可同时、快速、准确检测人体叶酸循环代谢物的方法。检测叶酸的主要方法为高效液相色谱法、时间分辨法、免疫化学发光法。免疫化学发光法稳定性较好但特异性差,高效液

相色谱法灵敏度高但稳定性差,但这几种方法均难以同时检测多种叶酸循环代谢产物指标^[16]。

本文基于液相串联质谱全面对叶酸代谢过程中的多种关键化合物进行定量检测,方法高效、灵敏,检测下限较低,准确度高,能对整个人体叶酸代谢水平进行全面评估^[19],可满足人体叶酸循环代谢物常规测定的要求,但其普适性有待进一步的研究确定。

参考文献:

- [1] 杨洁. 叶酸结构性质、测定与应用[J]. 安徽冶金科技职业学院学报, 2012, 22(4):39-42.
- [2] NANDABIA J, KOKKONEN M, EURO L, et al. Simultaneous measurement of folate cycle intermediates in different biological matrices using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatog B, 2018, 1092:168-178.
- [3] LIEW S C, GUPTA E D. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases [J]. Eur J Med Genet, 2015, 58(1): 1-10.
- [4] BEAUDIN A E, STOVER P J. Folate-mediated one-carbon metabolism and neural tube defects:balancing genome synthesis and gene expression [J]. Birth Defects Res (Part C), 2007, 81(3): 183-203.
- [5] WANG B J, LIU M J, WANG Y, et al. Association between SNPs in genes involved in folate metabolism and preterm birth risk [J]. Genet Mol Res, 2015, 14(1): 850-859.
- [6] TSUCHIMINE S, SAITO M, KANEKO S, et al. Decreased serum levels of polyunsaturated fatty acids and folate, but not brain-derived neurotrophic factor, in childhood and adolescent females with depression [J]. Psychiat Res, 2015, 225(1-2):187-190.
- [7] LIU H Y, LIU S M, ZHANG Y Z. Maternal folic acid supplementation mediates offspring health via DNA methylation [J]. Reprod Sci, 2020, 27(4):963-976.
- [8] 包燕, 钱碧霞, 谢妮. 个体化补充叶酸对新生儿出生缺陷的影响[J]. 中国妇幼健康研究, 2019, 30(3):338-341.
- [9] 毛宝宏, 邱伟涛, 王燕侠, 等. 孕前及孕期叶酸摄入对出生缺陷发生风险的影响[J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 25(9):95-98.

- [10] 吴暇玉, 汪旭, 曹能, 等. 维生素B12与蛋氨酸缺乏诱发人类淋巴细胞株微核形成[J]. 癌变. 畸变. 突变, 2005(6):18-21.
- [11] THOMAS F, FENECH M. Methylene tetrahydrofolate reductase, common polymorphisms, and relation to disease [J]. Vitam Horm, 2008, 79:375-379.
- [12] NAZI F H, SAMEER A S, GANAIE B A. Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases [J]. Gene, 2014, 533(1):11-20.
- [13] 冯志伟, 侯淑琳, 张晓铮, 等. 叶酸代谢与神经管畸形[J]. 生命的化学, 2020, 40(7):1000-1008.
- [14] 卢菲, 王世杰, 陈祥, 等. 血清叶酸化学发光免疫检测技术及试剂盒的研发[J]. 生物学杂志, 2019, 36(2):98-102
- [15] CHEN X, ZHOU Q, ZHANG T, et al. Development of a sensitive chemiluminescence immunoassay for the quantification of folic acid in human serum [J]. J Anal Methods Chem, 2019, 2019:5402903.
- [16] 贾永娟, 刘春冉, 郑春梅, 等. 叶酸及其代谢物不同检测方法结果比较分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2019, 26(9):1583-1586.
- [17] 陈伟才, 李忠信, 渠海, 等. 叶酸及维生素B₁₂检测方法的发展及现状[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(5):357-360.
- [18] 沈佩芳, 胡惠敏. 叶酸预防胎儿神经管缺陷的效果观[J]. 中国药业, 2011, 20(11):67-68.
- [19] MEADOWS S. Multiplex biomarker techniques: Multiplex measurement of serum folate vitamers by UPLC-MS/MS [J]. Springer Link, 2017, 1546: 245-256.

29例肺诺卡菌病的临床特征分析

唐癸丹¹, 黄丹², 吴东², 李文^{2*} (1. 广东医科大学, 广东湛江 524023; 2. 广东医科大学附属医院呼吸与危重症医学科, 广东湛江 524001)

摘要: 目的 总结肺诺卡菌病临床特征。方法 分析29例肺诺卡菌病患者临床表现、影像学特征、治疗、预后。结果 29例肺诺卡菌病患者中, 男16例, 女13例, 发病年龄(62.0±13.9)岁; 均伴有基础疾病, 其中支气管扩张症18例、2型糖尿病8例、肺结核病4例; 10例使用糖皮质激素或免疫抑制剂。常见症状为咳嗽(28例)、咳痰(26例)、发热(15例)、气促(15例)等。胸部影像学表现为斑片状及结节影(24例)、胸膜增厚(17例)、胸腔积液(11例)、纵膈淋巴结肿大(10例)、实变和空洞(各9例)。24例采用复方新诺明联用其他抗生素治疗, 5例用其他抗生素治疗。治疗有效26例(其中2例复发), 3例放弃治疗。结论 肺诺卡菌病多见于结构性肺病、免疫功能受损患者, 对于常规治疗无效的支气管扩张症患者应高度怀疑肺诺卡菌病的可能。

关键词: 肺诺卡菌病; 诺卡菌; 支气管扩张症

中图分类号: R519

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2021)04-0399-04

Clinical analysis of 29 cases of pulmonary nocardiosis

TANG Gui-dan¹, HUANG Dan², WU Dong², LI Wen^{2*} (1. Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China; 2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: Objective To summarize the clinical features of pulmonary nocardiosis. Methods Clinical manifestations, radiological features, treatment, and prognosis were analyzed in 29 cases of pulmonary nocardiosis. Results Of 29 cases, 16 were males and 13 females, with mean onset age of 62.0±13.9 years. All patients were accompanied with underlying diseases including bronchiectasis (18 cases), type 2 diabetes (8), and tuberculosis (4), and 10 received glucocorticoids or immunosuppressive agents. Common symptoms were cough (28), expectoration (26), fever (15), and polypnea (15). Chest imaging findings included patchy and nodular shadow (24), pleural thickening (17), pleural effusion (11), mediastinal lymphadenopathy (10), consolidation (9), and cavity (9). Twenty-four patients were treated with combined

收稿日期: 2021-02-23; 修订日期: 2021-05-08

作者简介: 唐癸丹(1993-), 女, 在读硕士生

通信作者: 李文(1970-), 男, 本科, 主任医师, E-mail: 158850419@qq.com