十种一碳代谢关键产物的 HPLC-MS/MS 定量检测方法*

张丽娟 张 敏 陈 倩 刘 驰 权 力△

(北京大学首都儿科研究所教学医院 北京 100020)

摘要 目的：利用 HPLC-MS/MS 方法对十种一碳代谢相关产物进行定量分析。方法：采用 Aglient ZORBAX SB-AQ C18 柱(2.1 mm × 100 mm, 3.5 m)、电喷雾离子源(ESI)，以多离子反应监测方式(MRM)进行正离子检测。对游离叶酸(FA)、5-甲酰四氢叶酸(5-FT)、5-甲基四氢叶酸(5-MT)、S-腺苷蛋氨酸(SAM)、S-腺苷同型半胱氨酸(SAH)、胱硫醚(CYSTA)、组氨酸(HIS)、丝氨酸(SER)、蛋氨酸(MET)、同型半胱氨酸(HCY)进行定量分析。结果：FA、5-FT、5-MT、SAM、SAH、CYSTA、HIS、SER、MET、HCY 的检测限分别为 0.1 ng·L^{-1}、0.25 ng·L^{-1}、0.1 ng·L^{-1}、0.1 ng·L^{-1}、0.25 ng·L^{-1}、0.25 ng·L^{-1}、0.1 ng·L^{-1}、0.025 ng·L^{-1}、0.1 ng·L^{-1}、0.1 ng·L^{-1}。FA、5-FT、5-MT、SAH、CYSTA 浓度测定方法线性范围为 2~50 ng·L^{-1}，SER、SAM 浓度测定方法线性范围 20~500 ng·L^{-1}，MET、HCY 浓度测定方法线性范围 200~5000 ng·L^{-1}，HIS 浓度测定方法线性范围为 400~10000 ng·L^{-1}，r 均在 0.993 以上，全部涵盖了已报道的血清中指标的含量范围。结论 建立了 HPLC-MS/MS 方法，可同时分析十种一碳代谢通路的关键产物，所需样品量少，检测速度快，同时实现分项检测，可为多种代谢性疾病系统性地检测一碳代谢中间产物体液分析方法建立实验条件基础。

关键词：一碳代谢；定量检测；高效液相色谱 - 串联质谱法；叶酸

中图分类号：R446 **文献标识码**：A **文章编号**：1673-6273(2012)23-4405-07

Quantitative Method of 10 Pivotal Metabolites in One-Marbon Metabolism by High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*

ZHANG Li-juan, ZHANG Min, CHEN Qian, LIU Chi, QUAN Li△

(*Peking University Teaching Hospital-Capital Institute of Pediatrics, Beijing, 100020, China*)

ABSTRACT Objective: To quantify 10 pivotal compounds in one-carbon metabolism by using high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Methods: The separation was carried out on a Aglient ZORBAX SB-AQ C18 column (2.1 mm × 100 mm, 3.5 m) at 25 ℃. ESI was performed in the positive-ion mode using the MRM mode. Using target ions at m/z 442.1-295.3 for folate acid, m/z 474.1-299.3 for 5-FT, m/z 460.0-313.0 for 5-MT, m/z 399.0-298.3 for SAM, m/z 385.0 -136.0 for SAH, m/z 106.0-60.0 for CYSTA , m/z 156.0-110.0 for HIS, m/z 106.0-60.0 for SER, m/z 150.0-55.9 for MET, m/z 136.0-90.0 for HCY. Results: The LLOD of the compounds was 0.1 ng·L^{-1} for FA, 0.25 ng·L^{-1} for 5-FT, 0.1 ng·L^{-1} for 5-MT, 0.1 ng·L^{-1} for SAM, 0.25 ng·L^{-1} for SAH, 0.25 ng·L^{-1} for CYSTA, 0.1 ·ng L^{-1} for HIS, 0.025 ng·L^{-1} for SER, 0.1 ng·L^{-1} for MET, 0.1 ng·L^{-1} for HCY. The calibration curve was obtained with good correlation(r ≥ 0.993), using the concentration range of 2~50 ng·L^{-1} for FA, 5-FT, 5-MT, SAH, and CYSTA; 20~500 ng·L^{-1} for SER, and SAM; 200~5 000 ng·L^{-1} for MET, and HCY; 400~10 000ng·L^{-1} for HIS, coverd ranges of most compounds in serum that have published previously. Conclusion: A sensitive method for 10 pivotal compounds in one-carbon metabolism was developed. It should be a reliable method for quantifying many compounds simultaneously with less sample and short time. And this result can provide a quantitive detection method for the diagnosis and prevention of the diseases associated with one carbon metabolism.

Key words: One carbon metabolism; Quantification; HPLC-MS/MS; Folates

Chinese Library Classification: R446 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2012)23-4405-07

前言

一碳代谢涉及人体多种循环通路的重要代谢途径，可以概括为参与甲基化过程和 DNA 合成两大通路[1]。一碳单位主要从食物中的氨基酸获取，进入人体后转移给四氢叶酸，四氢叶酸以其不同的氧化形式去结合、转运和提供一碳单位，这些氧化形式包括甲基、亚甲基、次甲基或 10-甲酰，为嘌呤合成和胸腺嘧啶的合成提供一碳单位。另一条通路是协同依赖维生素 B12 的甲基转移酶，将同型半胱氨酸转化成 S-腺苷蛋氨酸，作为甲基的直接供体，为 DNA、RNA、蛋白质、膜磷脂、神经递质、激素等多种物质的甲基化过程提供甲基[2-4]。

近年来，一碳代谢逐渐在多种疾病的研究中受到关注[5]，如

* 基金项目：北京市科技新星(2009B36)；国家自然科学基金青年科学基金项目(NSFC20905051)

作者简介：张丽娟(1986)，女，硕士研究生，研究方向：代谢组学

电话：010-85695585，E-mail：dajuan889@gmail.com

△通讯作者：权力，E-mail:quanli.ql@gmail.com

(收稿日期：2012-03-03 接受日期：2012-03-26)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

先天畸形[6, 7]、肿瘤[8-10]，心血管疾病[11-13]、贫血[14]、认知性疾病[15]等，已经被证明与叶酸的缺乏和代谢紊乱有直接的关系。因此对一碳代谢通路的全面研究，可以更全面的了解叶酸的作用机制，为多种疾病的治疗提供更多的理论依据。传统检测叶酸的方法如微生物法，竞争性蛋白结合法，操作简单，常被应用于临床检验中。为众多疾病的临床治疗，做出了很大贡献。但微生物法耗时长，检测限高，需要样品量大，竞争经蛋白结合法在不同试剂盒之间检测结果差异大的特点，且叶酸多种衍生物形式与结合蛋白的结合力有很大差别，因而很难实现同时检测多种化合物。高效液相色谱紫外法(HPLC-UV)、高效液相色谱电化学法(HPLC-ED)或高效液相色谱荧光法 (HPLC-FD) 等，方法灵敏度和准确性高，检出限低，节约样本量，但是 HPLC 依据保留时间定性，方法特异性有待提高，且荧光法需要复杂的衍生处理，增加了实验难度[16, 17]。

本文建立了同时测定十种一碳代谢相关代谢产物的 HPLC-MS/MS 方法，在传统方法对叶酸定量的基础上，可以对一碳代谢通路中的叶酸(FA)、5- 甲酰四氢叶酸(5-FT)、5- 甲基四氢叶酸(5-MT)这些叶酸辅酶形式进行分项检测定量。除此之外，还对游离 S- 腺苷蛋氨酸 (SAM)、S- 腺苷同型半胱氨酸(SAH)、胱硫醚(CYSTA)、蛋氨酸(MET)、同型半胱氨酸(HCY)、丝氨酸(SER)、组氨酸(HIS)这些一碳单位的来源和中间产物同时进行了检测，其检测范围涵盖了一碳代谢通路中的大部分关键化合物。同时在短时间内对多种物质的检测，可以适用于大样本量的检测，操作简单，结果重复性好。同时分项定量检测多种化合物，可以为临床疾病机制的阐明，治疗靶点的寻找以及队列研究提供更多信息。

1 材料和方法

1.1 仪器与装置

使用 Aglient 1200 型高效液相色谱仪，由一台真空除气装置 (G1322A)、一台二元泵 (G1312B)，一台柱温箱 (G1316B)、一台带有 200 L 定量环六通阀的自动进样器 (G1367D) 及流通管线组成。检测器为 Aglient 6410 三重四级杆串联质谱仪 (QQQ)，液相色谱系统通过电喷雾离子源 (Aglient G1948B) 与 QQQ 相连，使用的色谱柱为 Aglient ZORBAX SB-AQ C18 (2.1 mm × 100 mm，3.5 m)，仪器操作和数据处理均通过 Aglient MassHunter 液质工作站完成。

所有样品称量均在一台 METTLER TOLEDO XS205 天平上进行，Milli Q 纯水净化装置来自 Biopak 公司。

1.2 药品与试剂

实验中使用的标准品：FA、5-FT、5-MT、SAM、SAH、CYSTA、HIS、SER、MET、HCY 均购自 SIGMA 公司。甲醇 (色谱纯) 购自 Merck 公司，甲酸 (色谱纯，批号为 50144) 购自迪马公司，甲酸铵 (分析纯，批号为 17843) 购自 FLUKA 公司，十二烷基苏糖醇 (DTT) (分析纯) 购自科盟普瑞生物技术有限公司，柠檬酸 (分析纯，批号为 F20080901) 和抗坏血酸 (分析纯，批号为 F20080714) 购自国药集团化学试剂有限公司，实验用超纯水为屈臣氏蒸馏水经 miliipore 净水机过滤 (电阻率≥ 18. 2 MΩ · cm)。

1.3 储备液配制

标准品储备液配置，标准曲线溶液储备液配制，稀释级别见表 6。

分别称取抗坏血酸 100 mg、柠檬酸 100 mg、DDT 100 mg，溶解于 100 mL 超纯水中。制成 10 倍浓缩抗氧化剂溶液 (以下简称 ssw 溶液)，分装存放与 -20 ℃冰箱备用。使用时取 1 mL 加入 9 mL 超纯水，得到所需浓度，为超纯水 (100 $g \cdot mL^{-1}$ 抗坏血酸 +100 $g \cdot mL^{-1}$ 柠檬酸 +100 $g \cdot mL^{-1}$ DTT)。

用分析天平分别称取 5-FT、5-MT、SAM、SAH、HIS、SER、MET、HCY 共八种标准品各 5 mg，分别置于 2 mL 的 EP 管中，用移液枪加 ssw 溶液 1 mL 溶解，摇匀，得到八种标准品的 5 $mg \cdot mL^{-1}$ 的储备液，分别称取 FA、CYSTA 各 5 mg，溶于 15 mL 离心管，用移液枪加 ssw 溶液 5 mL 溶解，超声 20 分钟以使之充分溶解，摇匀，得到两种标准品的 1 $mg \cdot mL^{-1}$ 的储备液，存放于 -20 ℃冰箱备用。

1.4 标准曲线配置

取 FA、5-FT、5-MT、SAH、CYSTA 标准品储备液逐级稀释至 5× 10^3 $ng \cdot mL^{-1}$，取 HCY、MET 标准品储备液稀释至 5× 10^5 $ng \cdot mL^{-1}$，取 SER、SAM 标准品储备液逐级稀释至 5× 10^4 $ng \cdot mL^{-1}$。分别取浓度为 5× 10^3 $ng \cdot mL^{-1}$ 的 FA、5-FT、5-MT、SAH、CYSTA 的标准品溶液 200 L，取浓度为 5× 10^5 $ng \cdot mL^{-1}$ 的 HCY、MET 标准品溶液 200 L，取浓度为 5× 10^4 $ng \cdot mL^{-1}$ 的 SER、SAM 标准品溶液 200 L，取浓度 1× 10^6 $ng \cdot mL^{-1}$ 的 HIS 标准品溶液 200 L。混合得 2 mL 的混合溶液储存，使用时混合溶液稀释 10 倍得到混标溶液的最高浓度溶液。连续进样检测，记录色谱图，如图 1。

1.5 HPLC 条件

采用 Aglient ZORBAX SB-AQ C18 (2.1 mm × 100 mm，3.5 m) 色谱柱，流动相 A 为超纯水 (含 20 mM 的甲酸铵和 0.15 % 体积的甲酸)，流动相 B 为甲醇 (含 0.15 %体积的甲酸)。流动相梯度在 10 分钟内由 100 %的流动相 A 变化到 100 %的流动相 B，实现十种化合物的梯度洗脱，之后以 100 %的甲醇冲洗柱子流路，最后恢复到纯水相冲洗流路，平稳柱压。见表 1。流速为 0.2 $mL \cdot min^{-1}$，进样体积为 10 L，进样针冲洗液用比例为 10:2:88 的甲醇:甲酸:水溶液，洗针程序设置为流动洗针液冲洗进样针 5 秒。

表 1 流动相梯度

Table 1 Mobile phase

Time (min)	Organic gradient (%)
0	0
10	100
13	100
13.1	0
18	0

1.6 质谱 (MS/MS) 条件

HPLC 系统通过电喷雾电离 (ESI) 与 (MS/MS) 相连，正离子模式。离子源干燥气的温度为 350 ℃，流速为 12 $L \cdot min^{-1}$，喷雾器电压为 50 PSI，毛细管电压为 4000 V，驻留时间 50 ms，采

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用多反应监测(MRM)模式检测多种目标化合物,各种目标化合物的多反映模式参数见表2。

表2 各化合物的多反映模式(MRM)参数

Table 2 MRM parameters for each analyte

Compound	MRM transition	Fragmenter (V)	CE (V)
HCY	136.0--90.0	70	5
5-MT	460.0--313.0	115	20
5-FT	474.1--299.3	120	35
MET	150.0--55.9	80	10
FA	442.1--295.3	100	8
SER	106.0--60.0	65	10
SAH	385.0--136.0	110	14
SAM	399.0--298.3	110	4
HIS	156.0--110.0	85	12
CYSTA	223.1--134.1	90	8

2 结果

2.1 色谱结果

由色谱图(图1)可见,在不达到基线分离的情况下,对一碳代谢通路中十种关键化合物进行选择定量。其中CYSTA、HIS、MET、HCY、SER五种化合物在1.5 min-2.5 min之内出峰,SAM在3.5 min左右出峰,SAH在6 min左右出峰,5-MT在7 min左右出峰,FA、5-FT在7.5 min-8 min出峰。整个分析过程在8 min内完成。

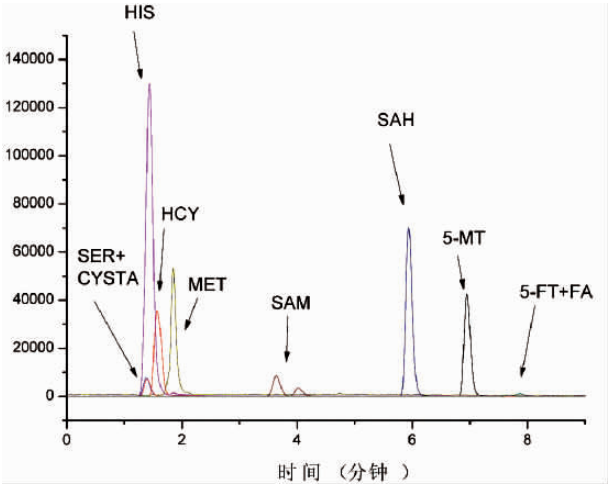


图1 混标溶液的MRM色谱图。Aglient ZORBAX SB-AQ C18(2.1 mm × 100 mm,3.5 m)色谱柱,柱温25 ℃。流动相A为超纯水(含20 mM的甲酸铵和0.15 %体积的甲酸),流动相B为甲醇(含0.15 %体积的甲酸)。流动相梯度在10分钟内由100 %的流动相A变化到100 %的流动相B。流速0.2 mL/min

Fig. 1 Multiple reaction monitoring chromatogram of each analyte in mixture solution. The column was Aglient ZORBAX SB-AQ C18 (2.1 mm x100 mm,3.5 m),held at 25 ℃.Mobile phase A was pure water containing 0.15 %(v/v) formic acid and 20 mM ammonium formate. Mobile phase B was methanol containing 0.15 %(v/v) formic acid. The flow rate of the mobile phase was 0.2 ml/min. The mobile phase gradient started at 100 % mobile phase A to mobile phase B over 10 min.

2.2 标曲和线性范围

本方法采用外标定量法,以待测物浓度为横坐标,以待测物峰面积为纵坐标,分别做线性回归运算和平方回归运算,得到标准曲线方程。相关标品的回归方程,FA、5-FT、5-MT、SAH、CYSTA浓度测定方法线性范围为2~ 50 ng·mL^{-1},SER、SAM浓度测定方法线性范围20~ 500 ng·mL^{-1},MET、HCY浓度测定方法线性范围200~5000 ng·mL^{-1},HIS浓度测定方法线性范围为400~10000 ng·mL^{-1},r均在0. 993以上。详细数据以及相关系数见表3。

2.3 检测限和定量限

检测限以十种标准品的标准溶液倍比稀释后分别测得。检测标准是以信噪比≥ 3:1时相应的样品浓度作为检测限,以信噪比≥ 10:1时相应的样品浓度作为定量限,检测结果见表3。

2.4 重复性和稳定性

将十种标准品分别配制5个浓度,FA、5-FT、5-MT、SAH分别配制成2、5、10、20、50 ng·mL^{-1}共5种浓度的溶液;CYSTA配制成1、2、5、10、20 ng·mL^{-1}共5种浓度的溶液;SER、SAM各配制成20、,50、100、200、500 ng·mL^{-1}共5种浓度的溶液;MET、HCY各配制成200、500、1000、2000、5000 ng·mL^{-1}共5种浓度的溶液;HIS配制成400、1000、2000、5000、10000 ng·mL^{-1}共5种浓度的溶液(表6)。每个浓度每天测定5次,连续测定5天,分别以标准差比上均值得到的相对标准偏差RSD和变异系数CV来考察方法的日内精密度(表4)和日间精密度,以及稳定性和重复性(表5)。以检测浓度均值比上理论浓度计算得到该方法的回收率(表7)。一日内精密度在1 %-13 %之间,其中只有5-FT和SAM有两个浓度超过了10 %,原始数据分析,5-FT浓度较低,使得检测相对标准偏差稍大,SAM是双峰的形式定量,在积分过程中,误差干扰造成检测相对标准偏差稍微偏大。日间精密度均在8 %以下。结果表示方法的精密度,稳定性和重复性良好,可以进行下一步的实际样品的检

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 3 标准方程，10 种化合物的检测限和定量限

Table 3 The regression equations, limits of detection and limits of quantitation

Compound	Regression equation	Linear range(ng·mL^{-1})	R^2	LOD (ng·mL^{-1})	LOQ (ng·mL^{-1})
HCY	$Y=-1.353\ 0\times 10^{-1}X^2+1.344\ 5\times 10^2X+3.217\ 6\times 10^5$	200-5 000	0.997 6	0.01	0.025
5-MT	$Y=4.535\ 6\times 10^1X-1.866\ 9\times 10^1$	2-50	0.997 3	0.1	0.8
5-FT	$Y=3.661\ 7\times 10^1X+5.787\ 4$	2-50	0.995 5	0.25	2
MET	$Y=-3.874\ 2\times 10^{-1}X2+3.420\ 2\times 10^3X+5.905\ 5\times 10^5$	200-5 000	0.993 2	0.1	0.5
FA	$Y=1.633\ 2\times 10^2X-3.205\ 3\times 10^1$	2-50	0.995 7	0.1	1
SER	$Y=1.243\ 4\times 10^2X+1.406\ 9\times 10^3$	20-500	0.999 1	0.025	0.1
SAH	$Y=5.801\ 6\times 10^2X+6.078\ 1\times 10^2$	2-50	0.999 5	0.25	0.8
SAM	$Y=5.924\ 4\times 10^2X-7.506\ 7\times 10^3$	20-500	0.998 7	0.1	0.5
HIS	$Y=-1.114\ 3\times 10^{-1}X2+2.825\ 0\times 10^3X+1.027\ 7\times 10^6$	400-10 000	0.999 2	0.1	0.3
CYSTA	$Y=1.260\ 4\times 10^2X-1.086\ 0\times 10^1$	1-50	0.998 4	0.25	1

表 4 各化合物的标准溶液浓度，检测浓度，日间精密度

Table 4 Spiked concentration, detection concentration, and Inter-day precision for each analyte

Compound	Concentration (ng·mL^{-1})	Inter-day (n=5, $\bar{x}\pm s$)					
		The first day	The second day	The third day	The forth day	The fifth day	CV (%)
HCY	200	180.3± 10.8	169.4± 7.1	165.4± 7.4	189.1± 7.1	172.5± 6.2	5.4
	500	537.1± 11.5	543.3± 3.7	532.8± 1.5	529.0± 6.4	546.6± 7.9	1.4
	1 000	1 023.1± 19.9	1 088.1± 3.5	1 060.1± 27.1	1 059.3± 6.2	1 090.3± 6.6	2.6
	2 000	1 948.4± 67.0	1 902.7± 39.5	1 896.0± 27.0	1 857.3± 16.4	1 858.0± 15.5	2.0
	5 000	4 427.4± 109.6	4 091.6± 72.4	4 029.0± 72.4	4 071.3± 57.9	4 202.2± 59.7	3.9
5-MT	2	2.2± 0.1	2.0± 0.2	2.0± 0.2	2.2± 0.1	2.0± 0.3	4.9
	5	5.0± 0.1	5.0± 0.5	5.4± 0.3	5.1± 0.3	5.0± 0.4	3.3
	10	9.6± 0.8	9.8± 0.5	9.2± 0.8	9.6± 0.4	10.2± 0.4	3.7
	20	20.0± 0.8	21.1± 1.7	21.4± 1.3	20.1± 1.6	19.5± 0.9	3.9
	50	49.7± 1.7	50.6± 2.2	50.7± 1.8	50.5± 1.3	50.0± 0.8	0.9
5-FT	2	1.9± 0.1	2.2± 0.1	2.0± 0.1	1.9± 0.2	2.2± 0.1	6.5
	5	4.8± 0.5	4.6± 0.5	5.1± 0.4	4.9± 0.1	5.2± 0.7	4.8
	10	9.9± 0.6	9.7± 0.6	9.5± 1.0	9.9± 0.2	10.1± 0.9	2.3
	20	20.5± 1.6	20.3± 1.1	20.7± 1.6	19.8± 1.4	20.4± 1.5	1.7
	50	49.8± 2.2	50.2± 1.7	50.2± 0.5	50.1± 0.4	49.3± 1.7	0.7
MET	200	182.1± 0.6	171.5± 2.5	169.3± 1.7	180.9± 1.8	182.5± 1.8	3.6
	500	549.3± 13.1	548.3± 3.9	564.2± 5.8	548.8± 3.6	549.3± 7.3	1.2
	1 000	1 045.8± 7.1	1 079.4± 32.7	1 056.1± 10.7	1 066.3± 5.7	1 081.1± 8.9	1.4
	2 000	1 831.1± 23.2	1 864.7± 23.8	1 877.1± 16.8	1 822.± 22.4	1 808.9± 17.6	1.6
	5 000	4 137.6± 46.2	4 271.4± 51.5	4 350.8± 64.4	4 167.5± 41.6	4 201.2± 86.8	2.0
FA	2	2.1± 0.1	1.9± 0.1	2.3± 0.1	2.3 ± 0.1	2.1 ± 0.3	7.7
	5	4.3± 0.3	4.8 ± 0.4	4.7± 0.1	4.7 ± 0.2	4.6 ± 0.2	4.1
	10	9.9± 0.8	11.0 ± 0.6	9.8 ± 0.1	9.3± 0.1	10.8± 0.3	7.0
	20	20.9± 0.7	19.6± 1.3	20.2± 0.7	20.6± 0.3	19.3 ± 1.0	3.3
	50	49.7 ± 2.7	50.2± 1.4	50.0± 1.7	50.0± 1.7	49.6 ± 1.9	0.4

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

SER	20	19.1± 0.8	19.6± 0.8	18.9 ± 0.6	19.7± 1.7	21.8± 1.5	5.7
	50	48.9 ± 2.0	47.7± 2.1	49.2± 1.9	44.0± 2.3	48.4± 1.8	4.5
	100	98.5± 1.0	103.6± 1.4	103.6 ± 2.3	99.5± 4.1	103.2 ± 1.6	2.4
	200	205.2± 3.9	201.9± 5.9	196.6± 1.9	211.9 ± 5.0	196.2 ± 4.7	3.2
	500	499.9± 6.4	504.1± 9.9	502.8± 7.3	497.5± 4.6	505.2 ± 8.4	0.6
SAH	2	1.8 ± 0.2	1.9± 0.1	2.1 ± 0.1	1.9± 0.2	2.1 ± 0.1	7.1
	5	5.0± 0.2	4.9 ± 0.4	5.1 ± 0.4	5.0± 0.2	5.1± 0.3	2.0
	10	10.1 ± 0.3	9.8 ± 0.4	9.7± 0.3	10.0 ± 0.3	9.8 ± 0.3	1.8
	20	20.0± 0.4	20.2± 0.3	20.2 ± 0.6	19.8 ± 0.5	20.1 ± 0.6	0.8
	50	49.9± 0.3	50.3 ± 0.7	49.8± 0.9	50.3 ± 1.1	49.7± 1.0	0.5
SAM	20	21.6± 1.1	21.1± 1.7	22.6± 1.0	22.8± 0.7	22.6± 1.2	3.3
	50	50.5± 6.2	47.1± 3.4	49.8 ± 3.2	52.5± 2.2	48.2 ± 2.2	4.2
	100	96.2± 5.6	99.2 ± 3.3	94.6± 2.7	96.2± 5.0	94.7± 3.3	2.0
	200	198.3 ± 7.6	198.4 ± 6.2	200.5 ± 4.2	198.3± 6.0	198.4 ± 5.4	0.5
	500	502.5± 3.1	500.5 ± 3.7	501.3± 3.3	499.9 ± 6.7	499.1± 6.7	0.3
HIS	400	384.1± 14.5	342.5± 4.0	338.6± 3.9	380.4± 4.5	334.4± 7.0	6.8
	1 000	993.3± 9.7	1 026.5 ± 8.7	1 040.3 ± 5.7	1 066.3± 11.5	1 041.1± 19.2	2.6
	2 000	2 064.9± 17.6	2 077.2± 31.1	2 075.1± 19.5	2 020.6± 10.2	2 066.3± 30.9	1.1
	5 000	3 097.6± 54.1	3 964.0± 65.2	3 940.1± 25.2	3 886.6± 46.7	3 916.0± 26.3	0.9
	10 000	10 218.3± 201.7	10 178.3± 201.7	10 057.6± 96.1	10 208.3 ± 357.1	10 108.9± 279.4	0.7
CYSTA	1	1.1± 0.1	1.0 ± 0.2	0.9± 0.1	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1	9.7
	2	2.2 ± 0.1	1.8± 0.1	2.1± 0.2	2.0± 0.1	2.0 ± 0.2	6.1
	5	4.9± 0.1	4.7± 0.5	5.0 ± 0.1	5.4± 0.2	5.4± 0.2	6.1
	10	10.4± 0.4	10.3± 0.4	10.0 ± 0.6	9.9 ± 0.5	9.9 ± 0.5	1.9
	20	19.6± 1.0	20.0± 0.7	20.0± 1.3	19.7± 0.4	19.7± 0.4	1.7

Note: 1) CV :The ratio of the mean and standard deviation in five days.

表 5 各化合物的日内标准偏差

Table 5 Intra-day RSD for each analyte

	Intra-day RSD (%)				
Compound	C1	C2	C3	C4	C5
HCY	6.0	2.1	1.9	3.4	2.5
5-MT	5.1	2.8	8.0	3.9	3.4
5-FT	6.0	10.6	6.3	7.7	4.4
MET	0.3	2.4	0.7	1.2	1.1
FA	5.7	6.3	8.2	3.5	5.4
SER	4.1	4.1	1.0	1.9	1.3
SAH	9.4	4.8	2.8	1.8	0.7
SAM	5.1	12.3	5.8	3.8	0.6
HIS	3.8	1.0	0.9	1.4	2.0
CYSTA	8.1	6.2	2.3	4.0	5.2

Note: 1) Spiked concentration C1-C5 were described in table 6.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 6 各化合物的标准溶液浓度

Table 6 Spiked concentration for each analyte

	Spiked concentration (ng·mL^{-1})				
Compound	C1	C2	C3	C4	C5
HCY	200	500	1 000	2 000	5 000
5-MT	2	5	10	20	50
5-FT	2	5	10	20	50
MET	200	500	1 000	2 000	5 000
FA	2	5	10	20	50
SER	20	50	100	200	500
SAH	2	5	10	20	50
SAM	20	50	100	200	500
HIS	400	1 000	2 000	5 000	10 000
CYSTA	1	2	5	10	20

表 7 各化合物的精确度

Table 7 Accuracy for each analyte

	Accuracy (%)				
Compound	C1	C2	C3	C4	C5
HCY	90.2	107.4	102.3	97.4	88.5
5-MT	108.6	99.4	96.0	99.9	99.4
5-FT	96.9	96.5	98.8	102.6	99.7
MET	91.1	109.9	104.6	91.6	82.8
FA	104.1	86.9	99.5	104.6	99.4
SER	95.6	97.8	98.5	102.6	99.9
SAH	89.7	100.7	101.3	99.8	99.8
SAM	108.3	101.1	96.3	99.2	100.5
HIS	96.0	99.3	103.2	99.4	102.2
CYSTA	111.2	108.5	98.2	103.9	98.2

Note: 1) Spiked concentration C1-C5 were described in table 6.

测实验。

3 讨论

本方法旨在为多种疾病系统性地检测体液样本中一碳代谢中间产物分析方法建立实验条件基础。一碳代谢体液样品在处理检测过程中多会遇到的几个难点问题：1，一碳代谢相关产物易氧化易变质，在检测过程中难以保存。2，水溶性维生素在反向色谱柱上难以保留，分离定量困难。3，一碳代谢通路中有多种中间产物，包括人体内一碳单位是通过摄入食物中的多种氨基酸得到的，方法需对多种产物分项检测，才能得到更全面的数据来反映多种疾病机理。4，儿童患者取样困难，样品量少，一碳代谢产物血液中含量较低，对检测的灵敏度和样品用量有较高要求。

为了控制一碳代谢产物在空气中的氧化速度，在溶液配制过程中，通过加入了柠檬酸，抗坏血酸和十二烷基苏糖醇（DTT）作为抗氧化剂，可以保持蝶呤环的还原状态，同时可以通过阻止 C9-N10 键的氧化断裂而导致的叶酸变质。同时 DTT 可防止同型半胱氨酸二硫化物的产生，维持同型半胱氨酸的单体状态[18]。实验中选用甲醇和纯水作为流动相，实验中考察了以甲醇加入抗氧化剂来稀释进样标准品，和以纯水加入抗氧化剂来稀释标准品的实际效果。结果表明，溶剂中含有甲醇有明显的溶剂效应，使得待测物在柱上保留能力变弱，保留时间变短，峰出现分叉，漂移现象，峰型不稳定，基底变宽，峰堆积在起始处，如图 2 所示。故最后选用纯水加入抗氧化剂作为最终溶液条件。

水溶性维生素大多数是强极性化合物，在反相色谱柱上保留很差，难以分离。在流动相中加入离子对试剂，一定程度上缓冲溶液的 pH 值，同时可以影响水溶性维生素的解离行为，使之和固定相相互作用增强，从而延长水溶性维生素在柱上的保留时间，明显改善这类化合物的保留和分离。同时，离子对试剂

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

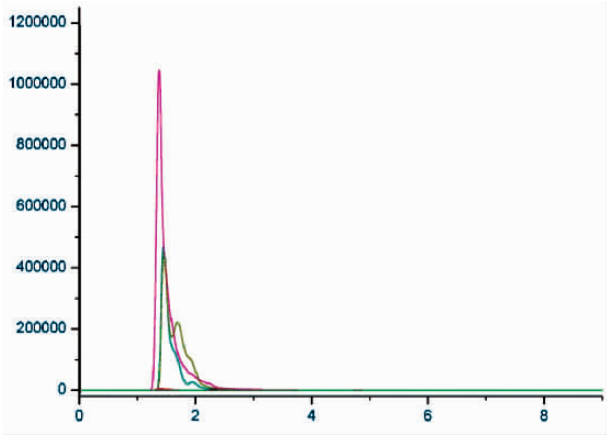


图 2 甲醇效应色谱图

Fig.2 Chromatogram of Methanol effect

的加入，还可以增加被检测物的离子化程度，提高检测的灵敏度。本实验中通过优化流动相 A 中添加甲酸铵的含量至 20 mM，明显的改善保留时间，优化分离，全部分离化合物仅需要 8 分钟。参照 2008 年 Wang Y 等[7]的文章所检测的神经管畸形患者相关样本以及正常血清中的十一种一碳代谢相关化合物浓度，除叶酸外，本方法中标准品的检测范围可以完全涵盖血清中检测浓度，适合用于儿科血清样品的检测。相比于 Wang Y 的实验，全部分离出化合物的时间由 17 分钟缩短为 8 分钟，节省了约 50 %的时间。

对多种化合物同时分项检测，是质谱检测方法的突出优势。一碳代谢通路中，有叶酸的多种衍生物形式存在[2]，用一般的化学分析方法不能将各种衍生物分别进行检测，液相色谱质谱联用方法可以将液相色谱的高分离能力与质谱的高选择性和高灵敏度结合起来，可以同时给出化合物的保留时间、特征结构碎片等多个信息[19,20]。本实验可以在 8 分钟内同时检测一碳代谢循环通路中的十种化合物，覆盖了体内一碳代谢的大部分关键化合物。利用串联质谱的双重选择特征离子，可以对每一个化合物单独提取色谱图，实现分项检测并且定量。本方法可以克服复杂基质对样品分离检测的影响，极大地缩短分离时间，并且在一次分析中单独对每一种代谢产物进行定量。因此此方法在血液和尿液及组织标本的检测中优势较为突出。可以为临床标本的一碳代谢紊乱提供可靠的实验室数据，为多种疾病治疗提供更多理论依据。此外，该方法每次进样量仅为 10 L，较传统方法极大地节约了标本量，非常适合于儿科的小样品量检测。

实验过程中，也有一些新问题的出现。SAM 化合物峰单独提取出来，出现了双峰现象，但在每次进样中，两个峰出峰稳定，峰型，保留时间都相近，考虑为同分异构情况。考察 SAM 的化合物分子结构可以发现，化合物内部确实有手性碳原子的存在，故考虑为 R 和 S 对映同分异构体，两种异构体分别对应的峰尚且没有合理的实验依据解释，但对两个同时满足定量要求的峰全部计算入积分面积内，根据峰面积的积分，做出线性回归方程，线性拟合良好，相关系数达到 0.999，完全可以满足定量要求。

本试验方法利用高效液相色谱和串联质谱的优势结合，采用全扫描检测模式，提高了检测灵敏度，选择两种特征离子对样品中相关代谢产物进行定量，结合保留时间，可以对代谢循环中的十种化合物进行精准定性，避免基质以及假阳性干扰。一碳代谢的十种化合物在 8 分钟之内全部定量，所需的样本小，分析时间短，适合大批量的微量标本的定量检测。具有推广作为儿科疾病研究中一碳代谢检测的基准方法的应用潜力。

致谢

本研究工作感谢感谢北京市科技新星项目（2009B36），国家自然科学青年科学基金项目（NSFC20905051），对本课题的支持。感谢安捷伦公司的技术支持。

参 考 文 献(References)

[1] Appling DR. Compartmentation of folate-mediated one-carbon metabolism in eukaryotes[J]. FASEB J,1991,5(12):2645-2651

[2] Selhub J. Folate, vitamin B12 and vitamin B6 and one carbon metabolism[J].J Nutr Health Aging,2002,6(1):39-42

[3] Reed MC, Nijhout HF, Neuhouser ML, et al. A mathematical model gives insights into nutritional and genetic aspects of folate-mediated one-carbon metabolism[J].J Nutr,2006,136(10):2653-2661

[4] Young JE, Matyska MT, Pesek JJ. Liquid chromatography/mass spectrometry compatible approaches for the quantitation of folic acid in fortified juices and cereals using aqueous normal phase conditions [J]. J Chromatogr A,2011,1218(15):2121-2126

[5] Li N, Li H, Wei Z, et al. A Survey on vitamin B12 nutritional status of children at the age of 2 to 7 years in 4 cities in China [J].Chin J Evid Based Pediatrl,2009,4(5):424-430

[6] Mitchell LE. Epidemiology of neural tube defects,Am J Med Genet C Semin Med Genet,2005,135C(1):88-94

[7] Wang Y, Zhang H, Liang Q et al. Simultaneous quantification of 11 pivotal metabolites in neural tube defects by HPLC-electrospray tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B,2008,863(1):94-100

[8] Low PS, Kularatne SA. Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer[J]. Curr Opin Chem Biol,2009,13(3):256-262

[9] Ulrich CM. Nutrigenetics in cancer research-folate metabolism and colorectal cancer,J Nutr,2005,135(11):2698-2702

[10] Ulrich CM. Folate and cancer prevention: a closer look at a complex picture[J].Am J Clin Nutr,2007,86(2):271-273

[11] Blom HJ, Smulders Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects [J].Journal of inherited metabolic disease,2011,34 (1): 75-81

[12] Cui R, Iso H, Date C, et al. Dietary Folate and Vitamin B6 and B12 Intake in Relation to Mortality From Cardiovascular Diseases [J]. Stroke,2010,41(6):1285-1289

[13] Yu Z, Han S, Guo X. Meta-analysis of the association between 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphisms and congenital heart disease [J].Chin J Evid Based Pediatrl,2009,4(003): 253-262

[14] Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Circulating unmetabolized folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive test performance in American seniors[J]. Am J Clin Nutr,2010,91(6):1733-1744

[15] Fuso A, Scarpa S. One-carbon metabolism and Alzheimer's disease: is it all a methylation matter? [J]. Neurobiol Aging,2011,32 (7): 1192-1195

（下转第 4495 页）

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

性急性髓细胞性白血病(附 2 例报告)[N].苏州大学学报(医学版),2011,31(2):272-275
Tang X W, Wei X A, Sun A N, et al. Treatment of Refractory Acute Myeloid Leukemia with Decitabine Combined with Gemtuzumab Ozogamicin: A Report of 2 Cases [N]. Jourcal of Soo Chow University Medical Science Edition,2011,31(2):272-275

[3] 孟凡义. 成人高危急性髓系白血病的诊治策略 [J]. 实用医学杂志,2008,24(12):2017-2018
Meng FY. Therapy Strategy of Adult High Risk Acute Myeloid Leukemia[J]. Journal Of Practical Medical,2008,24(12):2017-2018

[4] Bobby Chawla, Abraham Sebastian Kanate, Salman Osman, et al. Clofarabine In Combination with Cyclophosphamide for Treatment of Relapsed/Refractory Acute Leukemia In Adult Patients [J]. Blood, 2010,116:4367-4372

[5] William Blum, Rebecca B. Klisovic, Heiko Becker, et al. Dose Escalation of Lenalidomide in Relapsed or Refractory Acute Leukemias[J]. Journal of Clinical Oncology,2010,28:4919-4925

[6] Guoqing Wei, Delong Liu. Meta-Analysis of CAG (cytarabine, aclarubicin, G-CSF) Regimen for the Treatment of 580 Patients with Acute Leukemia In China and Japan[J]. Blood,2010,116:1064

[7] Joanne Filicko-O'Hara, Bijoyesh Mookerjee, Onder Alpdogan, et al. Phase II Study of Bortezomib, Mitoxantrone and Etoposide In Relapsed/ Refractory Acute Leukemias[J]. Blood,2010,116:2192

[8] 王谦, 仇惠英, 吴德沛, 等. 抗 CD33 单抗联合化疗药物治疗复发或难治性急性髓系白血病的疗效观察[N]苏州大学学报(医学版),2011,31(2):317-320
Wang Q, Qiu H Y, Wu D P, et al. Therapeutic Effect Observation of Treatment of Refractory Acute Myeloid Leukemia with Chemotherapy Combined with Gemtuzumab Ozogamicin [N]. Jourcal of Soo Chow University Medical Science Edition,2011,31(2):317-320

[9] Kumar S, Rajkumar SV. Thalidomide and lenalidomide in the treatment of multiple myeloma[J]. Eur J Cancer,2006,42(11):1612-1622

[10] Richardson PG, Mitslades C, Hidesxima T, et al. Lenalidomide in multiple myeloma[J]. Expert Rev Anticancer,2006,6(8):1165-1173

[11] Kastritis E, Dimopoulos MA. The evolving role of lenalidomide in the treatment of hematologic malignancies [J]. Expert Opin Pharmacother,2007,8(4):497 -509

[12] Christine I. Chen, MD, Harminder Paul, Pantoja Mariela, et al. A Phase II Study of Lenalidomide in Previously Untreated, Symptomatic Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL)[J]. Blood,2007,110: 2042

[13] Marie-Luise Huetter, MD, Walter Fiedler, MD, Andrea Kuendgen, MD, et al. Open-Label, Multi-Center Phase I Dose Escalation Study with Lenalidomide In Patients with Acute Myeloid Leukemia [J]. Blood,2010,116:3279

[14] Jason C. Chandler, MD, Rebecca B. Klisovic, MD, Mitch A. Phelps, PhD, et al. Phase I Study of Lenalidomide in Acute Leukemia: Remissions in Post-Allogeneic Relapse of Acute Myeloid Leukemia [J]. Blood,2009,114:84

[15] Uwe Platzbecker, Detlef Haase, Friederike Braulke, et al. A Phase I Study of a Combination of 5-Azacyitidine Followed by Lenalidomide In High-Risk MDS or AML Patients with Chromosome 5 Abnormalities-Interim Results of the "AZALE" Trial[J]. Blood,2010,1146:4000

[16] Kami Maddocks, MD, Rosa Lapalombella, PhD, Kristie A Blum, MD, et al. Preliminary Results of a Phase I Study of Lenalidomide in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia[J]. Blood,2009,114:3446

[17] Gautam Borthakur, MD, Guillermo Garcia-Manero, MD, Stefan Faderl, MD, et al. Lenalidomide in High-Risk Myelodysplastic Syndrome and Acute Myelogenous Leukemia Associated with Chromosome 5 Abnormalities[J]. Blood,2007,110:1459

[18] William Blum, Rebecca B. Klisovic, Heiko Becker, et al. Dose Escalation of Lenalidomide in Relapsed or Refractory Acute Leukemias [J]. Journal Of Clinical Oncology,2010,28 (33): 4919-4925

[19] Craig C. Hofmeister, Xiaoxia Yang, Flavia Pichiorri, et al. Phase I Trial of Lenalidomide and CCI-779 in Patients With Relapsed Multiple Myeloma: Evidence for Lenalidomide-CCI-779 Interaction via P-Glycoprotein [J]. Journal Of Clinical Oncology,2011,29 (25): 3427-3434

[20] Francesco Zaja, Stefano De Luca, Umberto Vitolo, et al. Salvage treatment with lenalidomide and dexamethasone in relapsed/refractory mantle cell lymphoma: clinical results and effects on microenvironment and neo-angiogenic biomarkers [J]. Haematologica,2012,97(3): 416-422

[21] Xavier C. Badoux, Michael J. Keating,Sijin Wen, et al. Lenalidomide as initial therapy of elderly patients with chronic lymphocytic leukemia[J].Blood ,2011,118(13):3489-3498

(上接第 4411 页)

[16] Shane B. Folate status assessment history: implications for measurement of biomarkers in NHANES [J]. Am J Clin Nutr,2011,94(1): 3375-3425

[17] Vishnumohan S, Arcot J, Pickford R. Naturally-occurring folates in foods: Method development and analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)[J]. Food Chem,2011,125(2):736-742

[18] Nelson BC, Satterfield MB, Sniegoski LT. Simultaneous quantification of homocysteine and folate in human serum or plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry, Anal chem,2005,77(11):3586-3593

[19] Jimenez CR, Piersma S, Pham TV. High-throughput and targeted in-depth mass spectrometry-based approaches for biofluid profiling and biomarker discovery[J]. Biomarkers,2007,1(4):541-565

[20] Van den Ouweland JMW, Kema IP. The role of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory [J]. J Chromatogr B,2012,883-884(1):18-32

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net