

利用 HPLC-MS/MS 联用技术定量测定 人血浆中叶酸及 5-甲基四氢叶酸浓度的方法学研究

高世宏¹, 王玉珏², 胡蓓¹, 江骥¹, 张联²

(1. 中国协和医科大学北京协和医院临床药理中心, 北京 100730;

2. 北京大学医学部肿瘤研究所, 北京 100034)

摘要: 为定量测定人血浆中叶酸及 5-甲基四氢叶酸浓度, 建立了利用 HPLC-MS/MS 联用技术的分析方法。血浆样品在弱光环境下, 经 SPE 萃取处理, 以 5 mmol/L 甲醇与乙酸铵 (pH 6.0) ($V(\text{甲醇})/V(\text{乙酸铵}) = 25/75$) 为流动相, 经 Waters XTerra MS C18 色谱柱初步分离, 利用串联质谱多反应离子监测 (MRM) 方式监测叶酸、5-甲基四氢叶酸和内标的正离子, 然后进行定量测定。结果表明: 叶酸和 5-甲基四氢叶酸的最低定量浓度均为 0.5 ng/mL; 线性范围为 0.5~25 ng/mL, 标准曲线相关系数 $r = 0.99$, 精密度和准确度均在 $\pm 15\%$ 之内。此法专属、灵敏、准确, 可以用于测定人血浆叶酸和 5-甲基四氢叶酸的浓度。

关键词: 质谱学; 叶酸和 5-甲基四氢叶酸定量测定; 高效液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS); 人血白蛋白
中图分类号: O 657.63; Q 563.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2004)03-145-05

Quantitative Determination of Folic Acid and 5-Methyltetrahydrofolic Acid in Human Plasma by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

GAO Shi-hong¹, WANG Yu-jue², HU Pei¹, JIANG Ji¹, ZHANG Lian²

(1. Clinical Pharmacology Research Center, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China;

2. Cancer Research Institute, Peking University, Beijing 100034, China)

Abstract: A sensitive and specific HPLC-MS/MS method was developed for the quantitative determination of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid in human plasma. Plasma samples were prepared through SPE cartridges under subdued laboratory light environment and separated through an Waters XTerra MS C18 column with methanol: 5 mmol/L ammonium: acetate (pH 6.0) = 25/75 (v/v) as the mobile phase. Analytes were ionized in the gas-auxiliary electrospray ionization source (ESI) and positive ions were detected by mass analyzer in multiple reaction monitoring mode. Then peak areas were quantitated. The results showed both of the limits of quantitation of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid were 0.5 ng/mL, and the linear ranges were 0.5—25 ng/mL. Correlation coefficients of all standard curve are $r = 0.99$. Accuracies and precisions of this method are within $\pm 15\%$. This method is specific, sensitive and accurate and will be applied to the determination of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid in human plasma.

收稿日期: 2004-04-04; 修回日期: 2004-04-27

作者简介: 高世宏(1978~), 男(汉族), 四川内江人, 在读硕士研究生, 药理学专业, 从事临床药代动力学研究。

E-mail: coolpredator1978@hotmail.com



Key words: mass spectrometry; quantitative determination of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); human albumin

叶酸是 20 世纪 40 年代中后期被发现分离出来的水溶性 B 族维生素,是具有喋酰古氨酸分子结构的一类化合物的总称。自然界存在 100 多种叶酸衍生物^[1],其中喋酰古氨酸外,二氢叶酸、四氢叶酸、5-甲基四氢叶酸及 5-甲酰基四氢叶酸^[2]等 5 种化合物与生物活性有关,在人体血浆中主要以 5-甲基四氢叶酸形式存在。研究表明,叶酸除了与巨幼红细胞性贫血^[3]有关以外,还与神经管畸形^[4]、某些癌症(如结肠癌)^[5]、心脑血管疾病^[6,7]以及儿童智力低下^[8]有关。因此,快速、准确地测定食物和人体组织中的叶酸,对于预防、诊断和治疗由叶酸引起的疾病都有十分重要的意义。由于叶酸的稳定性差且组成复杂,在天然样品中含量很低,因此对叶酸的检测具有很大挑战。目前,用于食物和生物样品中叶酸的测定方法主要有微生物法、放射免疫分析法、毛细管电泳法和色谱法^[9]。高效液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS)于 1999 年最早报道应用于叶酸分析,该技术不仅能够快速、高效地分离叶酸化合物,而且质谱仪的高灵敏度满足了低检出限的要求,具有样品用量少、自动化程度高等优点,对定性及定量分析都显示了很大的优势^[10]。目前,利用 HPLC-MS 联用方法检测叶酸化合物主要集中于食品^[11]和临床样品,如血清^[12]、尿^[3]等分析领域,并且都已显示出较好的应用前景。本工作拟建立应用 HPLC-MS/MS 技术定量测定人体血浆中的叶酸及 5-甲基四氢叶酸浓度的方法。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

Waters 2790 液相色谱仪:美国 Waters 公司产品;Micromass Quattro Ultima 三重四极杆串联质谱:英国 Micromass 公司产品,电喷雾离子源(ESI),Masslynx 3.5 工作站;Biofuge Stratas 高速离心机:美国 Heraeus 公司产品;Mettler Toledo AX 105 十万分之一分析天平:美国 Mettler Toledo 公司产品;Techne DB30 样品浓缩仪:美国 Techne 公司产品。

1.2 主要试剂

甲醇(HPLC 级):美国 Burdick & Jackson 公司提供;纯水:Milli-Q 生产超纯水;叶酸和 5-甲基四氢叶酸(含量 > 99%):美国 Sigma 公司提供;氨甲喋呤(内标,含量 > 99%):美国 Fluka 公

司提供;人血白蛋白:华兰生物工程股份有限公司提供;其它试剂均为分析纯。

1.3 HPLC-MS 分析条件

1.3.1 色谱条件 Waters XTerra MS C18 色谱柱,内径 2.1 mm × 50 mm,粒径 5 μm;预柱为 Waters XTerra MS C18 柱;SPE 萃取柱:Waters Oasis MAX, 30 μm;流动相:5 mmol/L 甲醇与乙酸铵(pH = 6.0) (V(甲醇)/V(乙酸铵) = 25/75),室温,流速 0.3 mL/min,进样 10 μL,自动进样器温度 4 ℃。

1.3.2 质谱条件 电离方式 ESI+,离子源温度 300 ℃,脱溶剂气温度 100 ℃;毛细管电压 3.5 kV;锥孔电压(V):叶酸 15, 5-甲基四氢叶酸 25 和内标 50;碰撞室离子能量(eV):叶酸 15, 5-甲基四氢叶酸 20 和内标 20;死时间 Dwell time (s):叶酸 0.3, 5-甲基四氢叶酸 0.2 和内标 0.2;电子倍增器电压 670 V;雾化气流速最大,脱溶剂气流量 610 L/h;碰撞室真空度 0.16~0.18 Pa。

以多反应监测(MRM)的质谱扫描方式,测定叶酸、5-甲基四氢叶酸和内标的正离子,分别为: m/z 442.295, m/z 460.313 和 m/z 455.308。

1.4 实验步骤

1.4.1 样品预处理 取血浆样品 450 μL,加入 500 μL 水(抗氧化剂包括维生素 C、柠檬酸和 2-巯基乙醇,含量均为 1 μg/mL 和 50 μL 内标溶液(5 ng/mL)震荡混合;依次加 1000 μL 甲醇、500 μL 水和 500 μL 水(含抗氧化剂,同上)活化 SPE 萃取柱。将前面混合液上样,自然流下,再依次加 500 μL 水(含抗氧化剂,同上)和 250 μL 甲醇(含抗氧化剂,同上)冲洗,最后用 500 μL 2% 甲酸甲醇(含抗氧化剂,同上)溶液洗脱。在样品浓缩仪上氮气吹干收集的洗脱液,温度 35 ℃。用 100 μL 的 5 mmol/L 乙酸铵溶液(pH = 8.0)复溶,10 μL 进样分析。以上操作要求弱光环境。

1.4.2 标准曲线和质量控制样品的制备 精密称取叶酸和 5-甲基四氢叶酸标准品 5.00 mg,置于 10 mL 容量瓶中,先用约 250 μL 的 5 mmol/L 乙酸铵(pH = 10.0)溶液助溶,再用 5 mmol/L 乙酸铵:甲醇(含抗氧化剂,同上)(体积比为 1:1)混合溶液定容。用代血浆(4% 人血白蛋白)作为稀释液,依次配制浓度为 0.5、1.0、5.0、

10、15、25 ng/mL 的系列标准品代血浆样品, 按照 1.4.1 项所述处理样品进行测定。结果示于图 1。同样步骤再次称量标准品配制浓度为 1.0

12、20 ng/mL 的三种浓度的质量控制样品。以上操作要求弱光环境。

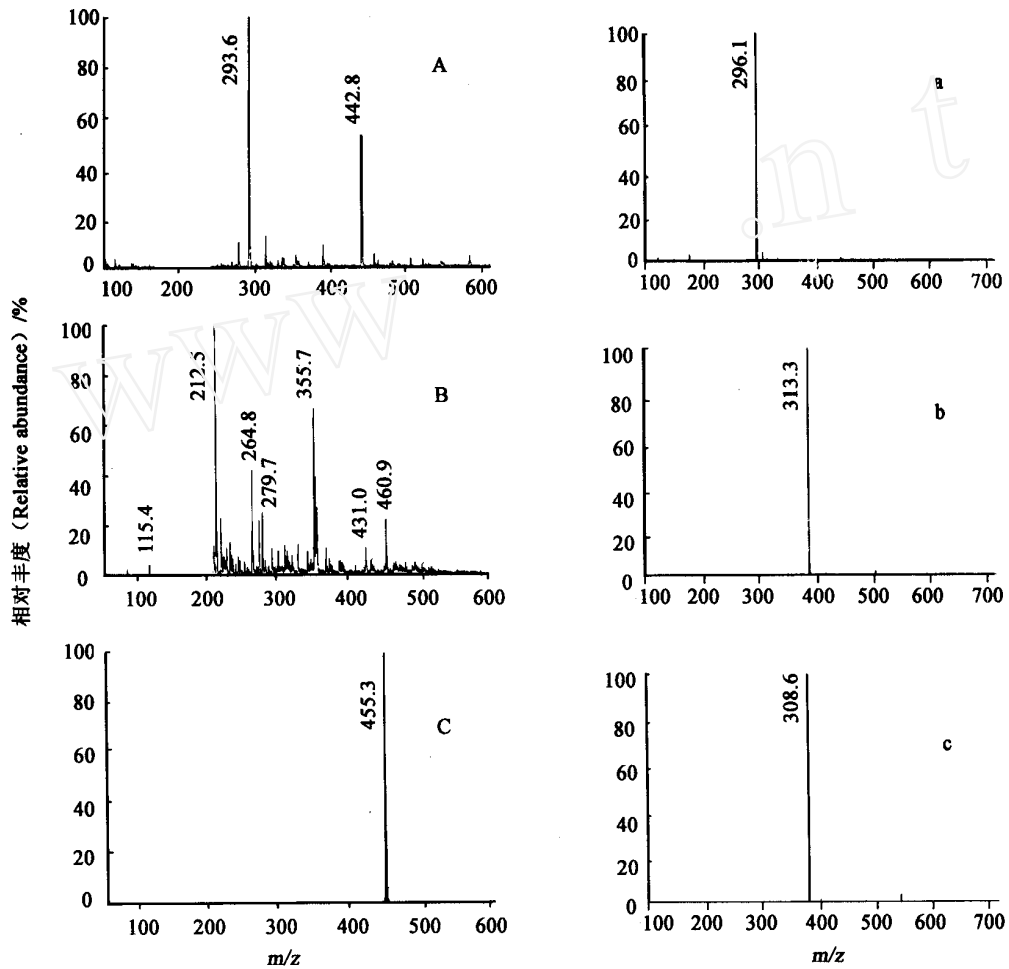


图 1 叶酸(A)、5-甲基四氢叶酸(B)和内标(C)及各自子离子(分别为 a, b, c)质谱图

Fig 1 Mass spectra of sample, standard and their fragment ions

A—叶酸(folic acid); B—5-甲基四氢叶酸(5-methyltetrahydrofolic acid); C—内标(IS)

1.4.3 代血浆与空白血浆萃取一致性考察 为了排除人血浆中叶酸和 5-甲基四氢叶酸本底对样品测定的干扰, 实验中采用人血白蛋白的生理盐水溶液作为真实空白血浆的替代品。因此比较代血浆和真实血浆在提取过程中对提取率影响的一致性作了考察。取 5 份不同来源的真实空白血浆, 按 1.4.2 项所述制备标准曲线样品, 分别比较代血浆与真实空白血浆标准曲线回归方程的斜率, 进行统计分析。

1.4.4 稳定性实验 在不同的实验条件下(冷冻保存、反复冻融、室温放置 6 h 和自动进样器放置 12 h)对方法考核学样品进行稳定性实验 ($n=6$)。

(1) 冷冻保存稳定性: 质量控制样品在 -30 温度下避光保存 6 天; 反复冻融稳定性: 质量控制样品完全冷冻 2 h 后, 取出置于弱光室温环境下解冻 30 min, 然后再次放入冰箱, 如此反复 3 次;

(2) 室温放置 6 h 稳定性: 质量控制样品在弱光环境室温下放置 6 h。

(3) 自动进样器放置 12 h 稳定性: 质量控制样品经过样品制备后立即放入自动进样器中(完全避光), 温度 4 , 12 h 后测定。

2 结果与讨论

2.1 专属性考察

采用独立样本 T 检验考察了对代血浆和真实血浆在提取过程中对提取率影响的一致性。结果显示两种基质回归方程斜率之间无显著性差异(叶酸: $P = 0.312$; 5-甲基四氢叶酸: $P = 0.560$), 说明代测物在两种基质中提取效率一致。从图 2 可以看出, 代血浆中的杂质不会干扰样品的分析测定。

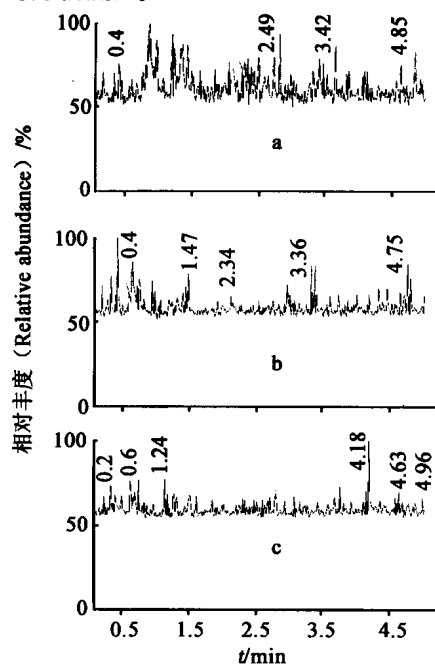


图 2 空白代血浆的质谱色谱图

Fig 2 MRM chromatograms of blank plasma substitute

a—5-甲基四氢叶酸(5-methyltetrahydrofolic acid);
b—内标(IS); c—叶酸(folic acid)

2.2 标准曲线和线性范围

以待测化合物与内标峰面积的比值为纵坐标, 浓度为横坐标, 权重系数 $1/X$, 进行直线回归计算, 得标准曲线, 示于图 3。线性相关系数 $r > 0.99$, 而且各点标示浓度与计算值的偏差都在 $\pm 15\%$ 之内(最低定量限为 $\pm 20\%$), 最低定量浓度均为 0.5 ng/mL 。

2.3 精密度和准确度

方法考核学样品(Validation 样品)为 1、12 和 20 ng/mL 三种浓度, $n = 6$, run (方法学考核批次)为 3 次。结果列于表 1。结果表明, 此方法精密度和准确度偏差均在 $\pm 15\%$ 之内。

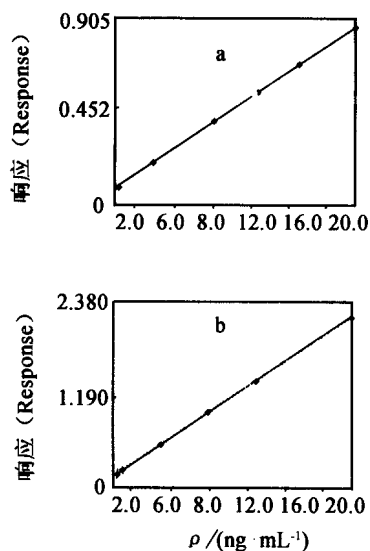


图 3 FA 和 5-甲基四氢叶酸的标准曲线

Fig 3 Standard curve of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid

a—叶酸(folic acid);
b—5-甲基四氢叶酸(5-methyltetrahydrofolic acid)

表 1 定量测定叶酸和 5-甲基四氢叶酸的准确度和精密度

Table 1 Accuracy and precision of the analysis results of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid

化合物 substance	$\rho / (\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$ concentration		RSD / %		回收率 / % recovery rate
	标定值 nominal	测定值 found	日内 ($n = 6$) intra-day	日间 ($n = 18$) inter-day	
叶酸 FA	1	1.12	12.1	13.8	40.0
	12	13.5	6.7	7.2	37.4
	20	21.3	5.1	5.9	32.3
5-甲基四氢叶酸 5M-THFA	1	0.933	9.6	12.4	51.6
	12	13.5	7.7	8.7	56.4
	20	21.9	6.8	6.9	52.3

3 小结

3.1 实验环境的选择

叶酸和5-甲基四氢叶酸稳定性差, 强光和高温都会对其造成破坏。因此在实验过程中, 有针对地采用了加入抗氧化剂(柠檬酸、维生素C和2-巯基乙醇)或尽可能多的步骤中使用封口膜、弱光或避光环境、尽量使用低温环境等措施, 以最大限度减少损失。

3.2 流动相及其组成

参照文献[12], 确定流动相中水相为乙酸铵溶液。流动相里甲醇和5 mmol/L 乙酸铵的比例将影响代测物的峰形和保留时间, 有机相所占比例大, 代测物峰形更拖尾, 保留时间更长。在本实验中, 甲醇:5 mmol/L 乙酸铵体积比为25:75与10:90的情况下灵敏度差别不大, 考虑到有机相比例越大越有助于离子化的效率, 决定选用5 mmol/L 甲醇与乙酸铵(pH 6.0) ($V(\text{甲醇})/V(\text{乙酸铵})=25/75$)的流动相。实验中将流动相中的甲醇换成乙腈会导致灵敏度明显下降, 同时峰形变宽。流动相pH对代测物灵敏度的影响较大, pH越小, 灵敏度降低, 主要原因在于叶酸和5-甲基四氢叶酸在低的pH环境下变得更不稳定, 导致代测物在某过程中损失较大, 从而影响灵敏度。为减少样品分析时间, 将流速0.2 mL/min增加至0.3 mL/min, 由于流动相中有机相比例较大, 所以流动相雾化效果好。

3.3 萃取条件的选择

在建立SPE样品制备方法的过程中, 比较Waters Oasis MAX (30 μm) SPE萃取柱和Waters Oasis HLB (30 μm) SPE萃取柱的结果。发现纯品溶液上样之后, 随后500 μL 水(含抗氧化剂)洗涤让Oasis HLB SPE萃取柱上保留的代测物流失严重, 而使用Oasis MAX SPE萃取柱时, 500 μL 水(含抗氧化剂)和250 μL 甲醇(含抗氧化剂)并未冲洗掉太多代测物, 大多数代测物被500 μL 的2%甲酸抗氧甲醇(含抗氧化剂)溶液洗脱。因此选用Oasis MAX SPE萃取柱。使用纯品溶液来研究不同酸度的洗脱液的洗脱能力, 发现酸度越强, 灵敏度降低越大, 同样是因为叶酸和5-甲基四氢叶酸在低的pH环境下更不稳定所致。

3.4 pH值的影响

复溶液(5 mmol/L 乙酸铵溶液)的pH大小也影响灵敏度。pH为3、6、8、10的条件下, pH越大, 灵敏度越高, 这是因为叶酸和5-甲基四氢叶酸在高pH时溶解度越大。本实验中选用pH

8.0, 而不是10, 是考虑样品分析时间短, 如果流动相与复溶液pH差别太大, 显然不利于色谱柱的平衡, 会导致峰形不好, 且保留时间重复性差。

总之, 本工作建立的利用HPLC-MS/MS技术分析血浆中叶酸和5-甲基四氢叶酸浓度, 该方法具有样品分析迅速、取样量少、灵敏度高、准确度高、专属性强等特点。

参考文献:

- [1] Antony AC. The Biological Chemistry of Folate Receptor[J]. Blood, 1992, 79, 2807~2820
- [2] Nelson BC, Dalluge JJ, Margolis SA. Preliminary Application of Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry to the Detection of 5-Methyltetrahydrofolic Acid Monoglutamate in Human Plasma [J]. J of Chromatogr B, 2001, 765, 141~150
- [3] Ames BN. Micronutrient Deficiencies: A Major Cause of DNA Damage [J]. Ann NY Acad Sci, 1999, 889: 87~106
- [4] 张师前. 叶酸、维生素B12与神经管缺陷[J]. 国外医学(妇幼保健分册), 1994, 5(2): 61~63
- [5] 宋宏良, 刘爱恒. 叶酸应用研究新进展[J]. 西北药学杂志, 2002, 17(1): 38~39
- [6] 汤佩麟. 冠心病患者血浆高半胱氨酸和血脂水平的关系[J]. 临床心血管杂志, 1998, 14(2): 76~78
- [7] Weir DG, Scott JM. Homocysteine as a Risk Factor for Cardiovascular and Related Disease: Nutritional Implications [J]. Nutr Res Reviews, 1998, 11(2): 311~318
- [8] 程志萍. 神经管缺陷的研究现状及进展[J]. 实用预防医学, 2003, 10(2): 263~265
- [9] 郝玲, 唐仪, 李竹. 叶酸检测方法研究进展[J]. 中华预防医学杂志, 1999, 33(3): 177~179
- [10] Smith RD, Loo JA, Edmonds CG, et al. Sensitivity Consideration for Large Molecule Detection by Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization Mass Spectrometry [J]. J of Chromatogr, 1990, 516: 157~165
- [11] Rychlik M, Netzel M, Pfannebecker I, et al. Application of Stable Isotope Dilution Assays Based on Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for the Assessment of Folate Bioavailability [J]. J of Chromatogr B, 2003, 792: 167~176
- [12] Garbis SD, Melse-Boonstra A, West CE, et al. Determination of Foliates in Human Plasma Using Hydrophilic Interaction Chromatography-Tandem Mass Spectrometry [J]. Anal Chem, 2001, 73: 5358~5364