

+ICS 点击此处添加 ICS 号

CCS 点击此处添加 CCS 号

T/ZSMM

浙江省数理医学学会团体标准

T/ZSMM XXXX—XXXX

血清 5-甲基四氢叶酸检测 同位素稀释液 相色谱-串联质谱法

Measurement of 5-methyltetrahydrofolate in human serum—Isotope dilution liquid
chromatography tandem mass spectrometry

（征求意见稿）

2026 年 7 月 7 日

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

浙江省数理医学学会 发布

内部资料，
严禁外传

内部资料，
严禁外传

内部资料，
严禁外传

内部资料，
严禁外传

目 次

前言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	1
5 检测原理和方法	2
6 试剂和配制	2
6.1 试剂	2
6.2 配制溶液	2
7 仪器与设备	2
7.1 液相色谱串联质谱检测系统	3
7.2 液相色谱柱	3
7.3 分析天平	3
7.4 离心机	3
7.5 旋涡式混合器	3
7.6 加热吹干装置	3
7.7 微量移液器	3
7.8 通风设备	3
8 样品	3
8.1 通则	3
8.2 样品用量	3
8.3 样品的保存	3
8.4 样品前处理	3
9 检测系统和分析部分的准备	3
9.1 液相色谱串联质谱检测系统的准备	4
9.2 检测方法	4
9.3 结果分析	5
10 方法学性能评价	6
10.1 精密度	6
10.2 回收率	6
10.3 线性	6
10.4 LOD 和 LLMI	6
10.5 基质效应	6
10.6 稳定性	6
11 特殊情况的处理	6
11.1 样本相关异常	6
11.2 仪器与试剂异常	6

T/ZSMM XXXX—XXXX

11.3. 结果异常.....	6
参考文献.....	7

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由浙江省数理医学学会提出并归口。

本文件起草单位：重庆医科大学附属第一医院、浙江大学附属第二医院、重庆医科大学附属大足医院、重庆师范大学、重庆工商大学。

本文件主要起草人：赖晓霏、曹炬、陶志华、石永军、王艳、李进、许晓曾。

内部资料，
严禁外传

内部资料，
严禁外传

内部资料，
严禁外传

内部资料，
严禁外传

血清 5-甲基四氢叶酸检测 同位素稀释液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了测定血清5-甲基四氢叶酸含量的同位素稀释液相色谱-串联质谱法的技术要求，包括原理和方法、试剂与配置、仪器与设备、样品、检测系统和分析部分的准备、方法学性能评价、特殊情况处理等内容。

本文件适用于医疗机构临床实验室、法定计量检定机构、检验检测机构等单位利用同位素稀释液相色谱-串联质谱法检测血清5-甲基四氢叶酸。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

WS/T 478—2024 血清25-羟基维生素D₂和D₃的检测 同位素稀释液相色谱串联质谱法

3 术语和定义

WS/T 478—2024界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

叶酸 folate

食物中自然存在的一类水溶性B族维生素的总称，也被称为维生素B₉，是人体生长发育和正常生理代谢不可或缺的营养素。

3.2

5-甲基四氢叶酸 5-methyltetrahydrofolate; 5-MTHF

叶酸(3.1)在人体内的主要活性代谢形式，是一种还原型蝶酰单谷氨酸，在血液中占比约82%~93%。

3.3

同位素稀释液相色谱-串联质谱法 isotope-dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry; ID-LC-MS/MS

一种高精度的痕量分析技术，整合同位素稀释技术的定量优势、液相色谱的分离能力与串联质谱的高特异性检测能力，主要用于复杂基质中目标化合物的准确定量与定性分析。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

5-MTHF: 5-甲基四氢叶酸(5-Methyltetrahydrofolate)

CV: 变异系数(Coefficient Of Variation)

ESI: 电喷雾离子源(Electro-Spray Ionization)

ID-LC-MS/MS: 同位素稀释液相色谱-串联质谱法(Isotope Dilution-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry)

LOD: 检出限(limit Of Detection)

LLMI: 定量检测下限(Lower Limit Of Measuring Interval)

MRM: 多反应监测(Multiple Reaction Monitor)

S/N: 信噪比(Signal To Noise Ratio)

5 检测原理和方法

本文件建立的5-MTHF检测方法以ID-LC-MS/MS法为检测原理。方法是以稳定同位素标记的5-MTHF为内标添加至血清中，内标与血清均匀混合后，通过加入偏磷酸溶液释放出与蛋白结合的5-MTHF，加入巯基乙醇混合溶液将其从血清当中萃取出来，将萃取液用氮气吹干，用流动相初始比例溶液进行复溶。利用液相色谱串联质谱分离并检测血清5-MTHF和内标特异的离子对。通过建立的标准品工作曲线以5-MTHF与各自内标峰面积比计算血清5-MTHF浓度。

6 试剂和配制

6.1 试剂

可选用的试剂如下：

- 水：除非有特别说明，应使用 GB/T 6682 定义的一级水；
- 甲醇：色谱纯；
- 甲酸：色谱纯；
- 乙腈：色谱纯；
- 偏磷酸：分析纯，CAS 号：37267-86-0；
- β -巯基乙醇：分析纯，CAS 号：60-24-2；
- 5-MTHF 标准品：纯度 $\geq 98\%$ ，CAS 号：68792-52-9；
- 5-MTHF-[谷氨酸- $^{13}\text{C}5$]：同位素标记纯度 $\geq 95\%$ 。

6.2 配制溶液

6.2.1 空白基质溶液

模拟人血清基质的条件，选择适当离子强度、适当pH及蛋白成分的物质进行配制，尽量模拟人血清基质的环境。如获得人血清纯化后无5-MTHF的空白基质为更佳。适用时，可按照WS/T 478—2024的6.2.1中a)~e)步骤进行。

该溶液2℃~8℃稳定期为1个月。

6.2.2 内标溶液及标准溶液的制备

可根据生产厂商说明书进行符合要求的相应调整，适用时，可采用下述方法进行配制。

6.2.2.1 内标工作液

配置方法如下：

取同位素标记的5-MTHF-[谷氨酸- $^{13}\text{C}5$]，加入甲醇，配置浓度为10 ng/mL内标工作液。

6.2.2.2 标准品工作液

配制方法如下：

分别取5-MTHF标准品，加入甲醇及空白基质溶液，配置浓度为1 ng/mL，3 ng/mL，5.0 ng/mL，10 ng/mL，25 ng/mL，50 ng/mL和100 ng/mL的标准品工作液。

6.2.3 流动相 A

向500 mL超纯水中添加0.5 mL甲酸，混匀后超声排除气泡。每日检测前配制流动相。

6.2.4 流动相 B

向500 mL甲醇中添加0.5 mL甲酸，混匀后超声排除气泡。配置量应适合当日使用量需求。

6.2.5 质控品

应具有与待测样品相似或相同的基质，且均匀性和稳定性较好。

7 仪器与设备

7.1 液相色谱串联质谱检测系统

使用高效液相色谱仪或超高效液相色谱仪与三重四极杆串联质谱仪联用，配有ESI，各项参数指标符合正常工作的要求。

7.2 液相色谱柱

具有良好稳定性和重现性的C18键合色谱柱，其规格内径等参数满足使用要求。

7.3 分析天平

感量0.01 mg，应具有年度校准合格报告。

7.4 离心机

水平转头离心机，离心力应满足12000 g。

7.5 旋涡式混合器

可连续涡旋震荡的混合装置。

7.6 加热吹干装置

可连接氮气源的吹干装置。

7.7 微量移液器

经校准合格的微量移液器，量程10 μ L~100 μ L，20 μ L~200 μ L和200 μ L~1000 μ L移液器各一支。

7.8 通风设备

应当装备必需的通风设施，如通风柜等。

8 样品

8.1 通则

血清样品应新鲜或冰冻或冻干。

在处理样品时，应严格遵从对潜在生物传染性样品处理的相关规定，操作时遵循生物安全规则，并根据规定对废物进行处理。

8.2 样品用量

取样量不宜低于0.1 mL。

8.3 样品的保存

新鲜血清样品若不立即检测，应于2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C避光保存，保存时间不超过3 天。-20 $^{\circ}$ C及以下避光可稳定保存7 天，可根据试剂说明书进行符合要求的相应调整。使用前应在室温下避光融解、充分混匀。

冻干样品应按照说明书描述的使用期限和条件保存，临用前按照说明复溶，充分混匀后使用。

8.4 样品前处理

样品前处理包括标准品工作液和待测血清样品。可根据生产厂商说明书进行符合要求的相应调整。适用时，可采用下述方法进行样品前处理：

- 移取血清样品或标准品工作液 70 μ L，分别加入 140 μ L 内标工作液；
- 在涡旋混合仪上混匀 10 min；
- 12000 g、4 $^{\circ}$ C条件下离心 7 min；
- 取 100 μ L 上清液至洁净的 96 孔板中，上机检测。

9 检测系统和分析部分的准备

9.1 液相色谱串联质谱检测系统的准备

9.1.1 质谱系统准备

测量前应对质谱系统进行性能检查，包括但不限于：

- 最近 6 个月内至少进行一次校准，符合正常工作的要求；
- 装配有 ESI 和大气压化学电离源，运行稳定；
- 真空度达到正常工作要求的范围，辅助气体纯度和流量符合正常工作的要求。

9.1.2 液相系统准备

测量前应对液相系统进行准备，包括但不限于：

- 流动相准备：超纯水，甲酸，乙腈；
- 近色谱柱的平衡：用初始流动相冲洗色谱柱，直至色谱柱达到平衡。

9.2 检测方法

9.2.1 液相色谱条件

9.2.1.1 液相色谱仪器条件

使用者可以实现目标物与其他分析物有效分离并获得良好峰型为原则进行条件优化，包括：

- 色谱柱：见本文件第 7.2 条；
- 流动相：见本文件第 6.2.3 条和第 6.2.4 条；
- 流速：0.7 mL/min；
- 进样量：15 μ L；
- 柱温：40 $^{\circ}$ C；
- 进样器温度：10 $^{\circ}$ C。

9.2.1.2 液相色谱洗脱条件

使用者可根据实验需要进行液相色谱洗脱条件优化，见表1。

表1 液相色谱洗脱条件

时间 min	流动相A %	流动相B %
0	99	1
0.5	55	45
2.2	0	90
2.5	0	90
2.6	99	1
5.5	99	1

9.2.2 质谱条件

使用者可以有效提高离子化效率为原则，优化离子源的类型、温度，以及雾化气、干燥气温度和流量等参数；以有效提高离子传输效率为原则，优化锥孔电压，碰撞能量等参数，进而实现提高检测灵敏度的目的，合理选择反应模式，使用者可根据实验需要进行质谱条件优化，见表2、表3。

表2 离子对参数

名称	定量/定性	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时间 (S)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (V)
5-MTHF	定量	464.1	317.2	20	41	20
	定性	464.1	194.2	20	41	42

表3 质谱参数

电离模式	ESI (+)	扫描模式	MRM
毛细管电压	0.50 kV	脱溶剂气温度	550 ℃
脱溶剂气流量	1000 L/Hr	源温度	100 ℃
电离模式	ESI (-)	扫描模式	MRM
毛细管电压	0.50 kV	脱溶剂气温度	550 ℃
脱溶剂气流量	1000 L/Hr	源温度	100 ℃

注：根据所用仪器不同，离子源条件参数有所不同。参数设置以最优化离子化效率为原则。

9.2.3 液相色谱串联质谱检测

按照以下步骤进行液相色谱串联质谱检测：

- 按照本文件第 8.4 条的方法对 5-MTHF 标准品工作液和待测血清样品进行前处理，按照本文件第 9.2.1 条和第 9.2.2 条的条件进行液相色谱串联质谱参数设置和优化；
- 标准品工作液经前处理后，按照浓度由低到高顺序进行液相色谱串联质谱分析；
- 待测血清样品进行前处理后，进行液相色谱串联质谱分析。

9.3 结果分析

9.3.1 保留时间

5-MTHF 在液相色谱中的保留时间根据使用的色谱柱性能不同而有差异，分析物与标准品溶液保留时间差值宜小于 0.1 min (6 s)。

9.3.2 工作曲线的建立

9.3.2.1 直线拟合

对 5-MTHF 按表 2 分别提取 MRM 离子色谱图，积分得各自的峰面积。以标准品定量离子峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标，以标准品浓度与内标物浓度的比值为横坐标进行直线拟合，按式 (1) 得到工作曲线参数 a, b 值。

$$\frac{A_{std}}{A_{IS}} = a \times \frac{C_{std}}{C_{IS}} + b \quad (1)$$

式中：

- A_{std} ——标准品工作液中 5-MTHF 定量离子 MRM 积分峰面积；
- A_{IS} ——标准品工作液中 5-MTHF 内标物 MRM 积分峰面积；
- C_{std} ——标准品工作液中 5-MTHF 的浓度；
- C_{IS} ——标准品工作液中 5-MTHF 内标物的浓度，本方案中此浓度为 20 ng/mL；
- a ——拟合直线的斜率；
- b ——拟合直线的截距。

9.3.2.2 建立工作曲线

将本文件第 9.3.2.1 条中拟合得到的参数 a, b 带入式 (2)，得到工作曲线。

$$\frac{A_{target}}{A_{IS}} = a \times \frac{C_{target}}{C_{IS}} + b \quad (2)$$

式中：

- A_{target} ——血清样品中 5-MTHF 定量离子 MRM 积分峰面积；
- A_{IS} ——血清样品中 5-MTHF 内标物 MRM 积分峰面积；
- C_{target} ——血清样品中 5-MTHF 的浓度；
- C_{IS} ——血清样品中 5-MTHF 内标物的浓度，本方案中此浓度为 20 ng/mL；
- a ——按照本标准第 9.3.2.1 条中拟合得到的直线斜率；

b ——按照本标准第9.3.2.1条拟合得到的直线截距。

9.3.2.3 血清样品中 5-MTHF 浓度的计算

对血清样品中5-MTHF及同位素标记的5-MTHF按照表2分别提取MRM离子色谱图，积分得各自的峰面积。根据本文件第9.3.2.2条得到的工作曲线，可计算得到式(2)中 C_{target} 值，即血清样品中5-MTHF的浓度。

10 方法学性能评价

10.1 精密度

应对样品进行重复性测量，验证测量程序的精密度。批内和批间的LLMI附近低值CV<20%，其余浓度CV均应≤15%。

10.2 回收率

在患者混合血清中添加3个浓度标准品，按照8.4的方法进行处理，每个浓度平行测定9次。检测值应在理论靶值的±15%以内，即回收率在85%~115%以内。

10.3 线性

依据已发布的行业标准等规范性文件，对方法的线性进行验证：

如检测血清样品的线性范围2 ng/mL~100 ng/mL。如收集到足量的更低浓度血清样品，经验证后，可扩大线性范围的低限；如获得加入纯物质的更高值人血清，经验证后，可扩大线性范围的高限。

注：受标本本身浓度限制，高值血清为人血清加入纯物质获得，低值血清为收集的人血清。

10.4 LOD 和 LLMI

LLMI是当S/N=10时，检测到的目标分析物峰值所对应的最低分析物浓度。

评估方法：使用2个接近LOD的样品，每个样品测定5次，实测值与理论值的偏差应在±15%以内，CV应小于20%。本方法的LOD为0.161 ng/mL，LLMI为0.66 ng/mL。

10.5 基质效应

基质效应不应影响测量结果的准确度。应依据专业领域认可的规范性文件，评估不同浓度时基质效应对测量程序的影响。

10.6 稳定性

评价样品、质控品及内标等在不同储存条件下的稳定性。取低、中、高3个浓度的患者血清样品进行稳定性实验，每个样品测定4次。判断标准：与新鲜样品结果相比，偏差应在±15%以内。

11 特殊情况的处理

11.1 样本相关异常

溶血样本应予以重新采集；脂血样本应经10000 r离心10 min去除上层油脂，或加入专用脱脂剂预处理后重新检测；黄疸样本应通过基质匹配校准曲线校正胆红素干扰，或按1:5比例用专用稀释液稀释后验证检测回收率，回收率应在80%~120%范围内。

11.2 仪器与试剂异常

仪器故障、质控失控，应立即暂停检测，排查并纠正后再启动；试剂出现变质或有效期超期时，应立即更换并重新进行试剂平衡。

11.3 结果异常

检测值超出校准曲线线性范围时，高浓度样本应用空白血清基质倍比稀释后重新检测，低浓度样本应加大进样量，最大不超过初始进样量的3倍。

参 考 文 献

- [1] Cao, Yunfeng et al. "A sensitive, robust and high-throughput isotope dilution LC-MS/MS method for quantifying three folate forms in serum." *Bioanalysis* vol. 15,5 (2023): 249-258
- [2] Pawlosky, R J et al. "Determination of 5-methyltetrahydrofolic acid in human serum by stable-isotope dilution high-performance liquid chromatography-mass spectrometry." *Analytical biochemistry* vol. 298,2 (2001): 299-305
- [3] Hyung, Seok-Won et al. "Highly sensitive analytical method for the accurate determination of 5-methyltetrahydrofolic acid monoglutamate in various volumes of human plasma using isotope dilution ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry." *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* vol. 1179 (2021): 122725
- [4] Kirsch, Susanne H et al. "Quantification of key folate forms in serum using stable-isotope dilution ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* vol. 878,1 (2010): 68-75
- [5] Nelson, Bryant C et al. "Affinity extraction combined with stable isotope dilution LC/MS for the determination of 5-methyltetrahydrofolate in human plasma." *Analytical biochemistry* vol. 313,1 (2003): 117-27
- [6] 彭絮, 邹迎曙, 杨宗兵, 等. 同位素稀释液相色谱串联质谱法测定人血清中5-甲基四氢叶酸[J]. *临床检验杂志*, 2018, 36(3): 161-165
-