

HPLC-MS/MS 测定血浆中甜菜碱和游离胆碱及其稳定性研究

张珍真¹, 王佳佳², 谭炳炎³, 王 娴¹, 郑 琳³, 常 颖¹, 朱惠莲^{1*}

(中山大学公共卫生学院 1.营养学系;2.卫生检验与检疫专业;3.实验教学中心,广东 广州 510080)

摘要:【目的】建立高效液相色谱串联质谱法(HPLC-MS/MS)测定血浆甜菜碱和游离胆碱水平,并研究血浆中两种物质的稳定性。【方法】以 d₉-氯化胆碱、d₉-甜菜碱为内标,血浆经乙腈除蛋白后,采用 SiO₂ 柱(2.1 mm × 100 mm, 5 μm)乙腈-甲酸铵缓冲液(15 mmol/L, pH = 3.5)等度洗脱,经电喷雾电离,选择多反应监测模式(MRM)同时测定血浆中甜菜碱和游离胆碱。【结果】血浆中甜菜碱和游离胆碱得到良好分离,最低定量限均为 0.62 μmol/L,线性范围均为 0.62 ~ 400 μmol/L。对游离胆碱的测定,日内相对标准差(RSD)为 5.10% ~ 5.85%,日间 RSD 为 4.54% ~ 13.26%,回收率 94.15% ~ 103.70%;对甜菜碱的测定,日内 RSD 为 3.60% ~ 7.30%,日间 RSD 为 2.70% ~ 8.10%,回收率 90.03% ~ 103.88%。稳定性研究中,游离胆碱和甜菜碱浓度随保存时间及温度增加,游离胆碱在血浆分离 48 h 内变化小于 15%,甜菜碱超过 3 h 后变化即大于 15%。3 个反复冻融循环内游离胆碱浓度稳定;甜菜碱变化明显,第一个冻融循环后即增加至原始浓度 3 倍。【结论】高效液相色谱串联质谱法同时检测血浆中甜菜碱和游离胆碱是一种快速、准确且灵敏的方法。血浆保存时应注意保存温度、时间及反复冻融对血浆中甜菜碱和游离胆碱浓度的影响。

关键词: 血浆; 甜菜碱; 游离胆碱; 稳定性; 高效液相色谱串联质谱

中图分类号: R151.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2011)03-0406-05

Quantitative Measurement and Stability Study of Betaine and Free Choline in Human Plasma by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

ZHANG Zhen-zhen¹, WANG Jia-jia², TAN Bing-yan³, WANG Xian¹, ZHENG Lin³, CHANG Ying¹, ZHU Hui-lian^{1*}

(1. Faculty of Nutrition, 2. Department of Inspection and Quarantine, 3. Experimental Center, School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To establish a method for the quantitative measurement of betaine and free choline in plasma simultaneously using liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) and to study the stability of the two analytes in plasma. 【Methods】Separation was achieved on a normal-phase silica column (2.1 mm × 100 mm, 5 μm) with acetonitrile/15 mmol/L formic acid (6:4v/v) under isocratic elution. A mass spectrometry was applied to measure the objective analytes. Acetonitrile, contained d₉-choline and d₉-betaine, as internal standards, was added into plasma to precipitate protein. 【Results】For both betaine and choline, the lower limit of quantitation (LLOQ) was 0.62 μmol/L and the response was linear over the range investigated (0.62 μmol/L-400.00 μmol/L, r² > 0.999). The within-day relative standard deviation (RSD) were below 8% and between-day below 15%. The recoveries were over 90%. For the stability tests, the concentration of the two analytes increased with the storage temperature and time. Choline was stable throughout three freeze-thaw cycles while concentration of betaine had a significantly rise after the first cycle. 【Conclusion】This is a technically simple and accurate method that can be carried out with HPLC-MS/MS. Attention should be paid to the critical effects of storage temperature and time and freeze-thaw cycle on the measurement.

Key words: plasma; betaine; free choline; stability; HPLC-MS/MS

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(3):406-410]

收稿日期: 2011-03-02

基金项目: 国家自然科学基金(30872099); 广东省科技计划项目(2008B030301100)

作者简介: 张珍真, 英国谢菲尔德大学公共卫生硕士, 中山大学硕士研究生, 研究方向: 营养与健康, E-mail: suezhang815@hotmail.com; * 通信作者, 朱惠莲, E-mail: zhuhl@mail.sysu.edu.cn

胆碱(choline)和甜菜碱(betaine)作为体内重要的甲基供体,在代谢上有着密切联系,它们在同型半胱氨酸的再甲基化、脂肪代谢以及DNA甲基化等生理生化反应中发挥着重要作用^[1-3]。目前,检测胆碱或甜菜碱的方法有酶放射性同位素法^[4],高效液相色谱电化学检测^[5]和气相色谱法^[6-7]等,但前者的准确性较差,色谱法虽有较好的准确性和精密度,却需要复杂的样品提取或者衍生过程;准确而稳定的核磁共振成像方法^[8]也因仪器较为昂贵,难以推广,而且这些方法都是对两种物质单独进行检测。本实验室曾采用HPLC-MS/MS对血清中甜菜碱和游离胆碱进行同时检测,检测效率得以提高,对两种物质检测的准确度和精密度也得到改善。但血清中两种物质的稳定性较差,对样本的保存条件和时间要求较高。因此我们将已建立的血清甜菜碱和胆碱的检测方法应用于血浆并作适当调整,对方法的准确度、精密度进行验证,同时探讨血浆中甜菜碱和游离胆碱的稳定性,并结合之前的研究结果比较、分析血清和血浆中两种物质浓度及稳定性,以期为科研和临床检验提供参考。

1 材料和方法

1.1 主要仪器与试剂

Agilent Technologies 1200 series 高效液相色谱仪, Agilent 6410A Triple Quad 三重四级杆质谱仪;氯化胆碱(Sigma), d₉-氯化胆碱(Isotec), 甜菜碱(Sigma), d₉-甜菜碱(Isotec), 乙腈(Merck), 甲酸铵(Alfa Aesar)

1.2 样品采集

抽取健康体检自愿者清晨空腹静脉全血3 mL, 枸橼酸钠抗凝, 半个小时内4℃、3 000 × g离心15 min分离出血浆, 不同温度下保存。

1.3 溶液配制

1.3.1 标准应用液 用PBS分别配制20 mmol/L的甜菜碱和胆碱标准储备液, -20℃冻存。检测时将储备液用稀释血浆(PBS10倍稀释)倍比稀释成不同浓度标准应用液(甜菜碱:0.62、1.25、3.12、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00、200.00、400.00, 依次标记为B1~B10; 胆碱0.62、1.25、3.12、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00、200.00、400.00, 依次标记为C1~C10。单位均为μmol/L), 4℃保存。

1.3.2 内标液(即除蛋白液) 含10 μmol/L的d₉-甜菜碱和d₉-氯化胆碱的乙腈。

1.3.3 流动相 超纯水配制的15 mmol/L的甲酸铵溶液(pH 3.5), 0.45 μm滤膜过滤及超声脱气。

1.4 色谱与质谱条件

1.4.1 色谱条件 固定相:SiO₂色谱柱(2.1 mm×100 mm, 5 μm, Welch Materials); 流动相:乙腈:15 mmol/L 甲酸铵(pH 3.5)=6:4, 等度洗脱; 流速:0.2 mL/min; 进样量:5 μL; 柱温:25℃。

1.4.2 质谱条件 离子源:电喷雾离子源; 干燥气温度:300℃; 雾化气(N₂)流速:6 L/min; 喷雾压力:5 500 eV; 碰撞电压:28 eV; 去簇电压:31 V; 扫描方式:多反应监测模式(multiple reaction monitor, MRM); 扫描离子对:甜菜碱 m/z 118.0→59.3, d₉-甜菜碱 m/z 127.3→68.3, 胆碱 m/z 104.3→60.2, d₉-胆碱 m/z 113.3→69.2。

1.5 样本处理

30 μL血浆或标准应用溶液中加入3倍体积除蛋白液, 漩涡混匀后4℃、13 000 × g离心10 min。取上清(约100 μL)至吸附柱(DNA提取试剂盒内附), 4℃、3 000 × g离心2 min。取离心后收集管中的液体(约90 μL)转移至密封进样瓶, 上机检测。

1.6 方法学评价

依照Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation^[9]进行。每份样本均重复测定取均值进行后续的分析比较。

1.6.1 标准曲线和最低定量限 各浓度标准应用液照“样本处理”后测定, 以内标峰面积与标准品峰面积比值为纵坐标, 标准品浓度为横坐标绘制标准曲线。同时利用已配制的“标准应用液”倍比稀释至0.05、0.10、0.25、0.50、0.62、1.25、6.25 μmol/L, 每个浓度3份, 每天重复测定2次, 连续测定5 d, 以线性良好且CV < 20%的最小浓度为最低定量限(the lower limit of quantitation, LLOQ)。

1.6.2 日内及日间精密度 取低、中、高浓度(甜菜碱:B6、B7、B8; 胆碱:C4、C6、C8)的标准应用液, 每个浓度3份, 每天重复测定5次, 连续测定5 d。

1.6.3 准确度 混合血浆中按体积比1:1分别加入B6、B7、B8和C4、C6、C8, 每个浓度3份, 连续测定3 d, 计算回收率。回收率=[(加标血浆浓度-未加标准血浆浓度)/加入标准液浓度]×100%

1.7 稳定性

小于或等于15%的浓度变化为可接受稳定

性, 每份样本均重复测定取均值进行后续的分析比较。

1.7.1 保存时间和温度 分离得到血浆后立即分别取 10 管置于冰箱(4 °C)和室温环境(25 °C), 在分离出血浆后的 0、3、6、12、24、48、72、144 h 时进行样本处理并立即测定。

1.7.2 反复冻融 血浆 10 管反复冻融: -80 °C 冷冻 24 h, 室温解冻 30 min, 漩涡混匀, 样本处理并测定, -80 °C 冷冻 24 h。循环 3 次。

1.7.3 处理好的样本的稳定性 按照“样本处理”后的血浆上机检测后即置于 4 °C 冰箱, 24 h 后重复测定, 比较两次测定结果的变化。

1.8 检测方法的应用

取 15 名健康男性体检自愿者新鲜血浆, 用上述测定方法测定血浆中甜菜碱和游离胆碱水平。

2 结果

2.1 色谱分离、质谱检测结果

按照试验确定的色谱条件, 血浆中的甜菜碱和胆碱得到良好分离, 峰型稳定清晰。甜菜碱和 d₉-甜菜碱的保留时间为 3.0 min, 胆碱和 d₉-胆碱保留时间为 2.8 min。图 1 是某血浆中甜菜碱和游离胆碱的 MRM 图, 甜菜碱浓度为 35.63 μmol/L, 游离胆碱的浓度为 7.81 μmol/L。

2.2 方法学评价

2.2.1 标准曲线和 LLOQ 在 0.62 ~ 400 μmol/L 范围内, 对于甜菜碱: $Y = 0.0119X + 0.0345$, $r^2 = 0.9996$, LLOQ 为 0.62 μmol/L (CV = 9%); 对于胆碱: $Y = 0.0321X + 0.0406$, $r^2 = 1$, LLOQ 为 0.62 μmol/L (CV = 12%; 图 2)。

2.2.2 日内、日间精密度及准确度 对于甜菜碱和游离胆碱, 各浓度的日内相对标准差(relative standard deviation, RSD) 小于 8%, 日间 RSD 小于 15%; 回收率分别在 90.03% ~ 103.88% 和 94.15% ~ 103.70%, 满足定量分析要求(表 1)。

2.3 稳定性

2.3.1 保存时间和温度 在 4 °C 或 25 °C 保存, 血浆分离 3 h 后甜菜碱浓度迅速升高, 变化超过 15%。对于胆碱, 4 °C 保存时, 其在 48 h 内的浓度变化小于 10%, 稳定较好; 25 °C 保存, 在 6 h 时胆碱浓度变化达到 -26.04%, 之后其浓度又逐渐增加, 至 144 h 时变化达到 102.03%。对于甜菜碱, 在

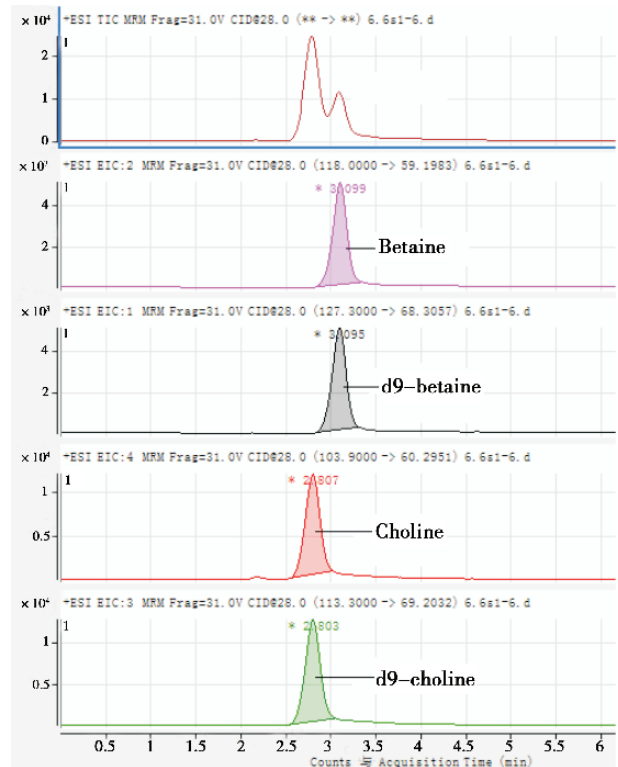


图 1 血浆中甜菜碱和游离胆碱的 MRM 色谱图

Fig.1 MRM chromatogram results of a plasma sample

不同温度下, 无论血浆还是血清在分离 3 h 后其浓度迅速升高(表 2, 图 3)。血浆中的游离胆碱水平变化在血浆分离后 48 h 内仍在可接受范围内, 而血清中的仅能在 12 h 内维持在较稳定水平(表 2, 图 4)。

2.3.2 反复冻融 反复冻融 1 次后甜菜碱水平变化已大于 15%; 而对于游离胆碱, 反复冻融 3 次, 其血浆浓度变化小于 10%(图 5)。

2.3.3 处理好的样本的稳定性 处理好的血浆上机检测后即置于 4 °C, 24 h 后重复测量, 甜菜碱和游离胆碱浓度变化分别是 11.2% 和 4.3% (n = 15)。

2.4 体检人群血浆中甜菜碱和游离胆碱水平

15 人中游离胆碱浓度最大值为 9.12 μmol/L, 最小值为 6.05 μmol/L, 平均水平为 7.59 μmol/L; 甜菜碱浓度最大值为 45.20 μmol/L, 最小值为 33.45 μmol/L, 平均水平为 39.95 μmol/L, 与文献^[10-11]报道结果相近。

3 讨论

本法样本处理步骤简单快速, 无需衍生, 单个样本检测时间短(约 6 min)。仪器每批可连续自动

表1 血浆中胆碱和甜菜碱的最低定量限、回收率和日间、日内精密度

Table 1 LLOQ, recovery, within-day and between-day RSD of the method

($\mu\text{mol/L}$)

Analyte	LLOQ($n = 10$)	Endogenous	Added	Recoveries(%)	Within-day(%, $n = 15$)	Between-day(%, $n = 15$)
Choline	0.62(CV = 12%)	7.32	6.25	94.15	5.85	13.26
			25.00	103.70	5.43	7.60
			100.00	99.13	5.10	4.54
Betaine	0.62(CV=9%)	35.25	25.00	90.03	7.30	8.10
			50.00	97.83	5.67	5.29
			100.00	103.88	3.60	2.70

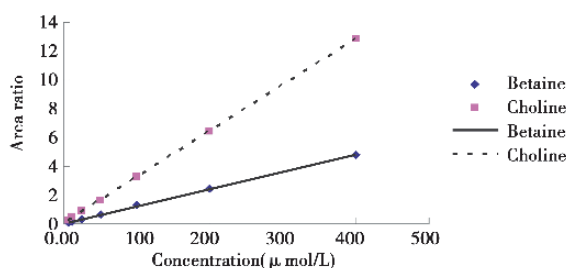


图2 血浆甜菜碱和游离胆碱标准曲线图

Fig.2 Linearity for betaine and free choline in plasma

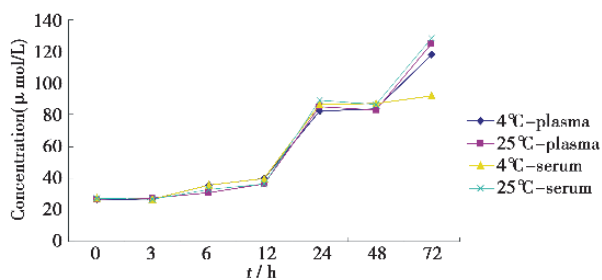


图3 比较血浆和血清中甜菜碱浓度在不同保存温度下随时间的变化

Fig.3 Comparison of changes of betaine concentration in plasma and serum when stored at 4 °C or 25 °C at various time point

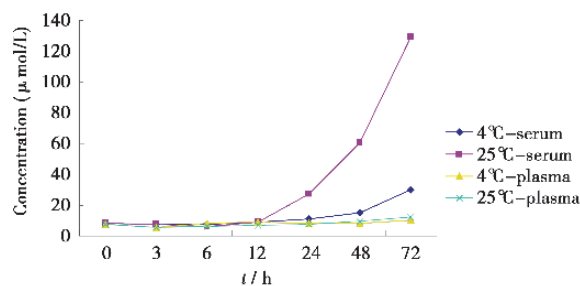


图4 比较血浆和血清中游离胆碱浓度在不同保存温度下随时间的变化

Fig.4 Comparison of changes of free choline concentration in plasma and serum when stored at 4 °C or 25 °C at various time point

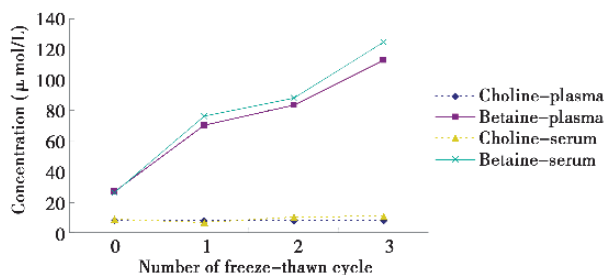


图5 反复冻融对血浆中甜菜碱和游离胆碱浓度的影响

Fig.5 Stability of betaine and free choline in plasma and serum over three freeze-thaw cycles

进样 99 个,一天内可检测近 200 个样本,且能同时测定样本中甜菜碱和游离胆碱水平,大大提高了检测效率。样本需要量小(30 μL),进样量最低可调至 5 μL ,很好实现了微量检测。其次我们加入的内标与相应的待测物质同时出峰,可以很好校正样品处理及进样上所产生的误差,提高了测定的准确度。

关于稳定性的研究,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,在 48 h 内血浆中游离胆碱的浓度变化小于 10%,稳定较好。25 $^{\circ}\text{C}$

保存,在 6 h 时游离胆碱的变化即达到-26.04%,之后其浓度又逐渐增加,至 144 h 时变化达到 102.03%。反复冻融 3 次,血浆游离胆碱的浓度变化也都在 10%内,稳定性好,与国外报道一致^[5,12]。而对于甜菜碱,在不同温度下,血浆分离 3 h 后其浓度迅速升高,反复冻融条件下甜菜碱水平变化亦较大,均超过 15%。处理好的样本放置 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,24 h 内游离胆碱、甜菜碱的浓度变化均在可接受的

表 2 不同保存温度下血浆中游离胆碱和甜菜碱浓度随时间变化的百分比

Table 2 Percentage changes of free choline and betaine concentration in plasma when stored at 4 °C or 25 °C at various time points up to 144 h

Time (h)	Choline (n = 10)		Betaine (n = 10)	
	4°C	25°C	4°C	25°C
3	-9.10	-26.04	5.97	8.62
6	7.90	-19.72	39.94	23.11
12	4.40	-10.44	58.73	44.95
24	4.60	4.40	225.01	236.49
48	8.80	22.55	232.23	228.76
72	34.41	56.71	368.14	394.25
144	81.83	102.33	466.16	482.82

The concentration of free choline and betaine at 0 h were 7.59 and 27.26 $\mu\text{mol/L}$.

范围内,这就较好地保证了在单批质谱检测最大样本量(99)时所得结果的准确性。因此,为保证结果的准确,样本采集后需尽快分离血浆,保存在 4 °C 条件下。并在血浆分离后 3 h 内完成样本处理,随后立即上机检测或可放置在 4 °C, 24 h 内测定。

比较血清和血浆中两种物质的稳定性发现,血浆中两种物质的稳定性较血清中好,反复冻融条件下两种标本类型中待测物质的稳定性近似。但如单独检测游离胆碱,血浆是更好的标本类型选择。对于甜菜碱,虽然其在血浆中的稳定性相对于血清较好,但其在各种保存条件下的变化仍较大,稳定性较差。因此对甜菜碱的测定,无论是血清还是血浆标本,标本都应按上述要求保存及处理。

参考文献:

- [1] Penry J, Manore M. Choline: an important micronutrient for maximal endurance-exercise performance [J]. *Int J Sport Nutr Exer Metab*, 2008, 18(2): 191-203.
- [2] Dizik M, Christman JK, Wainfan E. Alterations in expression and methylation of specific genes in livers of rats fed a cancer promoting methyl-deficient diet [J]. *Carcinogenesis*, 1991, 12(7): 1307-1312.
- [3] Georg A, Kaisa T, Katja N, et al. The effect of low doses of betaine on plasma homocysteine in healthy volunteers[J]. *Br J Nutr*, 2004, 92(4): 665-669.
- [4] McMahon KE, Farrell PM. Measurement of free choline concentrations in maternal and neonatal blood by micropyrolysis gas chromatography[J]. *Clin Chem Acta*, 1985, 149(1): 1-12.
- [5] Fossati T, Colombo M, Castiglioni C, et al. Determination of plasma choline by high-performance liquid chromatography with a postcolumn enzyme reactor and electrochemical detection [J]. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1994, 656(1): 59-64.
- [6] Pomfret EA, daCosta KA, Schurman LL, et al. Measurement of choline and choline metabolite concentrations using high pressure liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Anal Biochem*, 1989, 180(1): 85-90.
- [7] Allen RH, Stabler SP, Lindenbaum J. Serum betaine, N,N-dimethylglycine and N-methylglycine levels in patients with cobalamin and folate deficiency and related inborn errors of metabolism [J]. *Metabolism*, 1993, 42(11): 1448-1460.
- [8] Lundberg P, Dudman NP, Kuchel PW, et al. ¹H NMR determination of urinary betaine in patients with premature vascular disease and mild homocysteinemia [J]. *Clin Chem*, 1995, 41(2): 275-283.
- [9] U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation[S]. 2001.
- [10] Griffith CA, Owen LJ, Body R, et al. Development of a method to measure plasma and whole blood choline by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Ann Clin Biochem*, 2010, 47(pt1): 56-61.
- [11] Holm PI, Ueland PM, Kvalheim G, et al. Determination of choline, betaine, and dimethylglycine in plasma by a high-throughput method based on normal-phase chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Clin Chem*, 2003, 49(2): 286-294.
- [12] Yue B, Pattison E, Roberts WL, et al. Choline in Whole Blood and Plasma: Sample Preparation and Stability [J]. *Clin Chem*, 2008, 54(3): 590-593.

(编辑 孙慧兰)