

HPLC-MS/MS检测血清Hcy谱的方法建立及在CKD中的临床应用

崔宝玲, 李晓菲, 秦永亮, 刘今硕, 刘泽林, 史 敏*

(河北医科大学第二医院检验科, 河北 石家庄 050000)

[摘要] **目的** 建立高效液相色谱串联质谱(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)定量检测血清同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)谱的检测方法及在慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)中的临床应用。**方法** 选取2024年1月—2025年1月初次就诊于河北医科大学第二医院的临床诊断为CKD的患者308例(CKD组)和健康体检人群103例(CON组)为研究对象,检测2组人群血清Hcy、半胱氨酸(cysteine, Cys)及甲硫氨酸(methionine, Met)水平。检测采用HPLC-MS/MS系统,使用色谱柱[(2.1×100.0) mm, 2.1 μm]分离,柱温40℃,流动相为0.2%甲酸水溶液和纯乙腈,梯度洗脱,并应用线性、定量下限、精密度、正确度、基质效应、样本稳定性、残留、干扰及稀释一致性等参数进行方法的性能验证。**结果** 共411例CON人群及CKD患者入选该研究,CON组103例,年龄(50.01±12.41)岁,男性58例,女性45例,CKD组308例,年龄(54.44±15.38)岁,男性172例,女性136例;Hcy、Cys、Met的线性范围分别是1~100、5~500、2~200 μmol/L;定量下限分别是1.5、2 μmol/L;批内、批间变异系数(coefficient of variation, CV)均<±15%;回收率分别是97%~105%、93%~111%、102%~109%;1:1混合样本的Hcy、Cys、Met测定值比血清基质样本及纯溶液样本测定值的均值低1.45%、3.52%、2.18%;血清Hcy、Cys、Met的浓度含量在7 d内以及样本处理后24 h内与首次测定结果的相对偏差均<±15%;该方法残留较少,且不受溶血、黄疸和脂血的干扰;稀释5倍、10倍和20倍血清样品中的Hcy、Cys及Met测定值CV均小于15%,且回收率均在85%~115%以内;与CON组相比,CKD组血清Hcy及Cys水平显著升高($P<0.001$)。**结论** 本研究建立的血清Hcy谱HPLC-MS/MS检测方法性能良好,可用于检测CKD患者血清Hcy谱的含量。

[关键词] 肾疾病;高效液相色谱串联质谱法;同型半胱氨酸 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2026.01.015

[中图分类号] R692 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2026)01-0107-11

Establishment of HPLC-MS/MS method for serum homocysteine profile detection and its clinical application in chronic kidney disease

CUI Bao-ling, LI Xiao-fei, QIN Yong-liang, LIU Jin-shuo, LIU Ze-lin, SHI Min*

(Department of Laboratory Medicine, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for quantitative detection of serum homocysteine (Hcy) profile by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) and its clinical application in chronic kidney disease (CKD). **Methods** This study enrolled individuals initially presenting to the Second Hospital of Hebei Medical University between January 2024 and January 2025, including 308 patients with a clinical diagnosis of CKD (CKD group) and 103 healthy individuals undergoing physical examinations (control group, CON). Serum levels of Hcy, cysteine (Cys) and methionine (Met) were measured and compared between the two groups. The detection was carried out using a HPLC-MS/MS system. A chromatographic column [(2.1×100.0) mm, 2.1 μm] was used for separation at a column temperature of 40℃. The mobile phase was a 0.2% formic acid aqueous solution and pure acetonitrile, with gradient elution. The performance of the method was verified by applying parameters such

[收稿日期]2025-12-09

[基金项目]河北省医学科学研究课题计划项目(20260362)

[作者简介]崔宝玲(1990-),女,河北衡水人,河北医科大学第二医院主管技师,医学硕士,从事临床检验诊断研究。

*通信作者。E-mail:sm8344@sina.com

as linear range, lower limit of quantification (LLOQ), precision, accuracy, matrix effect, sample stability, residue, interference and dilution consistency. **Results** A total of 411 people, including healthy controls and patients with CKD, were enrolled in this study. There were 103 patients in the CON group, with an age of (50.01 ± 12.41) years, including 58 males and 45 females. There were 308 patients in the CKD group, with an age of (54.44 ± 15.38) years, including 172 males and 136 females. The linear ranges of Hcy, Cys and Met were 1–100 $\mu\text{mol/L}$, 5–500 $\mu\text{mol/L}$ and 2–200 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The LLOQ was 1 $\mu\text{mol/L}$, 5 $\mu\text{mol/L}$, and 2 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The coefficients of variation (CV) within and between batches were within $\pm 15\%$ and the recovery rates were 97%–105%, 93%–111% and 102%–109%, respectively. Compared with the mean of mixed serum samples and pure solution samples, the measured values of mixed samples were 1.45%, 3.52% and 2.18% lower in concentration. The relative deviation between the concentration of serum Hcy, Cys and Met within 7 d after detection and 24 h after the initial measurement were within $\pm 15\%$. The method exhibited low residue in detecting Hcy metabolite profiles and remained unaffected by hemolysis, jaundice and lipemia. The CV of Hcy, Cys and Met in serum samples diluted 5, 10 and 20 times were all less than 15% and the recovery rates were between 85%–115%. Compared with the CON group, the levels of serum Hcy and Cys in the CKD group were significantly increased (all $P < 0.001$). **Conclusion** The HPLC-MS/MS method for detecting serum Hcy profile established in this study demonstrated favorable performance and can be reliably utilized to quantify serum Hcy profile in CKD patients.

[Key words] kidney diseases; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; homocysteine

慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 是一种以持续3个月以上的肾脏结构或功能异常为特征的疾病, 患病率高, 预后差。CKD起病较隐匿, 疾病知晓率低, 晚期患者临床结局更差、生活质量更低, 若能早发现、早治疗, 可控制甚至逆转病情, 因此早期筛查CKD的意义重大^[1–5]。CKD患者肾功能下降, 血清同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 普遍升高, 并且常伴有Hcy代谢途径异常, Hcy代谢过程有多种分子参与, 共同组成了Hcy谱, 其中Hcy、半胱氨酸 (cysteine, Cys)、甲硫氨酸 (methionine, Met) 及其衍生物在Hcy代谢的再甲基化和转硫化途径中起着重要作用^[6–10], 因此, 除了肾功能等与CKD相关的传统指标, 这些Hcy代谢物可能会是筛查CKD患者肾功能不全和代谢异常的有前景的标志物。目前实验室检测Hcy主要采用放射酶法、循环酶法、化学发光法以及酶联免疫吸附试验法等传统方法^[11–14], 具有有生物危害、低敏感度、低特异度, 且只能单一检测Hcy的缺点。高效液相色谱串联质谱 (high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS) 是代谢组学的常用技术之一, 目前被广泛认为是小分子定量分析的重要方法^[15–19]。有研究^[20–23]建立了液相色谱串联质谱技术, 可精确定量人血浆中Hcy及Cys等代谢物, 但其保留时间较长, 使得临床检测量受到限制。基于上述方法的不足, 亟需对Hcy代谢物的检测技术进行优化。因

此, 本研究旨在建立一种简单、快速、稳健、高通量的HPLC-MS/MS法对血清中Hcy代谢通路中的Hcy、Cys及Met三种代谢物同时进行测定, 并对此方法进行性能评估, 为CKD的临床诊疗提供新的技术支持。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究选取2024年1月—2025年1月初次就诊于河北医科大学第二医院的临床诊断为CKD的患者308例 (CKD组) 和健康体检人群103例 (CON组)。纳入标准: CKD组选取初次就诊且临床诊断为CKD的患者; CON组选取无慢性肾脏病病史、肾功能正常及无其他严重疾病 (如恶性肿瘤、严重心血管疾病等) 的健康体检人群。排除标准: CKD组排除患有其他肾脏疾病、有血液透析或腹膜透析史及其他严重疾病 (如恶性肿瘤、严重心血管疾病等) 的人群; CON组排除近期服用影响肾脏功能药物 (如某些抗生素、非甾体抗炎药等) 的人群。CKD组308例, 男性172例, 女性136例, 年龄19~80岁, 平均 (54.44 ± 15.38) 岁。CON组103例, 男性58例, 女性45例, 年龄25~74岁, 平均 (50.01 ± 12.41) 岁。CON组与CKD组性别、年龄差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

本研究经河北医科大学第二医院伦理委员会批准通过 (批准文号: 2025-R455)。

1.2 HPLC-MS/MS法检测Hcy谱

1.2.1 样品采集 使用5 mL含促凝剂的分离胶真空采血黄管采集患者静脉血, 2 h内离心并分离血清, 4 ℃冷藏待检。

1.2.2 仪器与试剂 Jasper HPLC系统(高压液相色谱系统)(美国, AB SCIEX); Triple Quad 4500MD质谱仪(美国, AB SCIEX); 氮气发生器(中国, 上海毕克气体仪器贸易有限公司)。标准物质Hcy(中国, Cato Research Chemicals Inc)、Cys(德国, Sigma-Aldrich), Met(中国, 中国食品药品检定研究院); 内标物质Hcy-d4、Cys-d2及Met-d3(美国, Cambridge Isotope Laboratories); 色谱级甲醇(美国, Thermo Fisher Scientific); 色谱级乙腈(美国, Thermo Fisher Scientific); 色谱级甲酸(美国, Thermo Fisher Scientific); 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)(美国, Thermo Fisher Scientific); 小牛血清溶液(美国, Thermo Fisher Scientific)。

1.2.3 试剂配制

1.2.3.1 还原剂配制 于0.2 g DTT中加入6 mL小牛血清溶液, 充分振荡。

1.2.3.2 沉淀剂配制 按照乙腈: 纯水: 甲酸=100: 20: 0.01的体积比配制, 并充分振荡。

1.2.3.3 内标工作液配制 分别称取3种代谢物内标物质至5 mL离心管中, 加入50%乙腈水溶液中, 得到浓度为50、100、100 mmol/L的母液。再将母液用50%乙腈水溶液稀释成浓度为1、10、10 mmol/L的一级内标液。最后将一级内标液用50%乙腈水溶液稀释为浓度为25、250、100 μmol/L的内标工作液, 4 ℃保存, 内标工作液按照批次配制与使用。

1.2.3.4 标准品及质控品配制 分别称取3种标准物质至5 mL离心管中, 加入50%乙腈水溶液中, 得到浓度为50、250、100 mmol/L的母液。再将母液用50%乙腈水溶液稀释成浓度为5、25、10 mmol/L的一级标准品。最后将一级标准品用50%乙腈水溶液稀释得到标准品工作液及质控品工作液, 标准品工作液用于绘制标准曲线, 浓度见表1。

1.2.4 样本处理 分别取50 μL标准品、质控品和患者血清加入10 μL内标工作液, 再加入50 μL还原剂, 涡旋振荡混匀后, 30 ℃恒温反应15 min, 再加入800 μL沉淀剂, 涡旋振荡3 min, 4 ℃下15 000 g高速离心10 min, 取200 μL上清液用于液相色谱串联质谱检测。

表1 标准品及质控品浓度

Table 1 The concentration of standard and quality control samples

试剂组成	浓度(μmol/L)		
	Hcy	Cys	Met
S1	1	5	2
S2	2	10	4
S3	5	25	10
S4	20	100	40
S5	50	250	100
S6	100	500	200
L	10	50	20
M	40	200	80
H	80	400	160

1.2.5 色谱条件 选择Waters CORTECS T3 [(2.1×100.0) mm, 2.1 μm] 色谱柱进行检测, 柱温40 ℃; 进样量2 μL; 流动相: 0.2%甲酸水溶液(A相)、纯乙腈(B相)、50%甲醇水溶液(洗针液)。流动相梯度见表2。

表2 流动相梯度

Table 2 The mobile phase gradient

时间(min)	流速(mL/min)	A(%)	B(%)
0.00~1.00	0.30	96	4
1.00~1.05	0.30	96~40	4~60
1.05~1.45	0.30	40	60
1.45~1.46	0.30	40~96	60~4
1.46~2.00	0.30	96	4

1.2.6 质谱条件 采用电喷雾离子源正离子模式; 喷雾电压5 500 V; 射入电压10 V; 碰撞池出口电压7 V; 离子源温度500 ℃; Ion Source Gas1(GS1) 55 Psi; Ion Source Gas2(GS2) 60 Psi; 扫描方式: 多重反应监测模式(multiple reaction monitoring mode, MRM)。各代谢物母离子Q1、子离子Q3、去簇电压、碰撞能量等质谱参数见表3。

表3 MRM下定量分析Hcy谱的质谱参数

Table 3 The mass spectrum parameters for quantitative analysis of Hcy metabolite spectrum under MRM

代谢物	一级母离子质量(Da)	二级子离子质量(Da)	去簇电压(V)	碰撞能量(V)
Hcy	136.00	56.00	40.00	24.00
Cys	122.00	76.00	35.00	19.00
Met	150.10	56.00	45.00	21.00
Hcy-d4	140.10	94.10	40.00	16.00
Cys-d2	124.10	61.20	35.00	18.00
Met-d3	153.10	56.00	45.00	25.00

1.3 HPLC-MS/MS 法检测 Hcy 谱的性能验证 参照《CLSI C62-A: A New Standard for Clinical Mass Spectrometry》^[24]、《液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证》^[25]及《液相色谱—质谱临床应用建议》^[26]对方法的线性、定量下限、精密密度、正确度、基质效应、样本稳定性、残留、干扰及稀释一致性进行验证。

1.3.1 线性 将6个浓度(S1~S6)的标准品分别重复测定3次。各浓度的偏差(deviation, DEV) < ±15%, 变异系数(coefficient of variation, CV) < 20%, 采用线性回归方程绘制标准曲线, 计算回归系数 $r \geq 0.99$, 即可判定满足线性评价要求。

1.3.2 定量下限 通过测量检测限附近5个样本来考察方法定量下限, 每个样本重复测定10次, 评估每个浓度样本的CV及其浓度测定均值与理论浓度的相对偏差, 将信噪比(signal-to-noise ratio, S/N) ≥ 10 , 且CV < 20%、DEV在±15%范围内的最低浓度样本的测定均值作为方法的定量下限。

1.3.3 精密密度 选取低(L)、中(M)、高(H)3个浓度质控样本, 每个浓度测定10次, 连续测定3个批次, 共计90份样本。计算每个浓度的批内CV和批间CV, 批内CV、批间CV < ±15%, 视为可接受。

1.3.4 正确度 采用加标回收实验, 选取一个血清样本作为原始样本, 重复测定6次, Hcy、Cys及Met本底浓度均值(C_0)分别为9.76 $\mu\text{mol/L}$ 、247.96 $\mu\text{mol/L}$ 、25.16 $\mu\text{mol/L}$, 向一定体积($V_0=46 \mu\text{L}$)该血清样本中加入一定体积($V=4 \mu\text{L}$)的L、M、H3个浓度(C_s)的标准质控品溶液, 制备出3个浓度加标样本, 每个加标样本分为5份, 每份重复测定3次, 计算加标样本的检测浓度均值(C), 用以下公式计算各浓度下的加标回收率R。
$$R = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0}{V \times C_s} \times 100\%$$
 加标回收率R

要求为85%~115%, 则证明建立方法的正确度符合要求。

1.3.5 基质效应 选取M质控纯溶液、血清样本及二者1:1混合液, 按照样品处理方法将每个样品平行制备3份, 每份重复进样6次。计算血清基质样本与质控纯溶液样本测定结果的均值, 评估其与混合溶液样本测定结果间的差异, CV < 15%, 偏倚在±15%以内, 视为可接受。

1.3.6 样本稳定性 选取一个已知浓度的人源血清样本作为原始样本, 向一定体积的该人源血清样本中分别加入一定体积的L、M、H3种浓度质控溶液, 处理后样本置于4℃保存24 h, 每间隔一定时间进样测定分析; 再将样本置于4℃保存7 d, 每间隔一定时间处理样本并进样分析, 计算不同时间点各组分含量的相对于初始检测点含量的相对偏差, 重复3次, 结果偏差应在±15%内。

1.3.7 残留 参考《液相色谱-质谱临床应用建议》, 先重复进样线性最低点S1, 再进样线性最高点S6, 进样顺序为S1-S1-S1-S1-S1, S6-S1, S6-S1, S6-S1, S6-S6-S1。分别计算不被S6污染的S1实测值均值(A1)和可能被S6污染的S1实测值均值(A2), A2与A1的差应小于A1的3SD。

1.3.8 干扰 在2个浓度的血清样品分别加入重度干扰浓度的血红蛋白(100 g/L)、结合型胆红素(5.76 g/L)、非结合型胆红素(4 g/L)、三酰甘油(472.8 g/L)干扰物以模拟重度溶血、黄疸、脂血样血清, 各干扰样品平行处理4次后进样, 计算样本的平均浓度及相对偏差, 相对偏差在±15%以内。

1.3.9 稀释一致性 将一级标准品稀释(用50%乙腈水溶液)至2、10、4 mmol/L, 取20 μL 该标准溶液(C_s)与180 μL 本底血清样本(C_0)混匀后, 将混匀后的血清样本分别按1:5、1:10及1:20稀释, 每个浓度制备6份, 样本处理后分别检测, 计算浓度均值(C), 计算每个浓度的CV, 并按照以下公式计算回收率R,
$$R = \frac{C \times \text{稀释倍数}}{(C_0 \times 180 \mu\text{L} + C_s \times 20 \mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}} \times 100\%$$
 要求R在85%~115%以内, 且CV < 15%。

1.4 统计学方法 应用SPSS 26.0统计软件分析数据。计量资料正态性检验采用Kolmogorov-Smirnov检验。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用 t 检验; 非正态分布的计量资料以M(QR)表示, 比较采用Mann-Whitney U检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 方法学建立结果 在上述实验条件下, Hcy、Cys及Met三种待测物与内标的色谱图响应较高, 背景噪音低, 具有较良好的峰型, 且提高色谱速度至2 min, 见图1。

2.2 性能验证结果

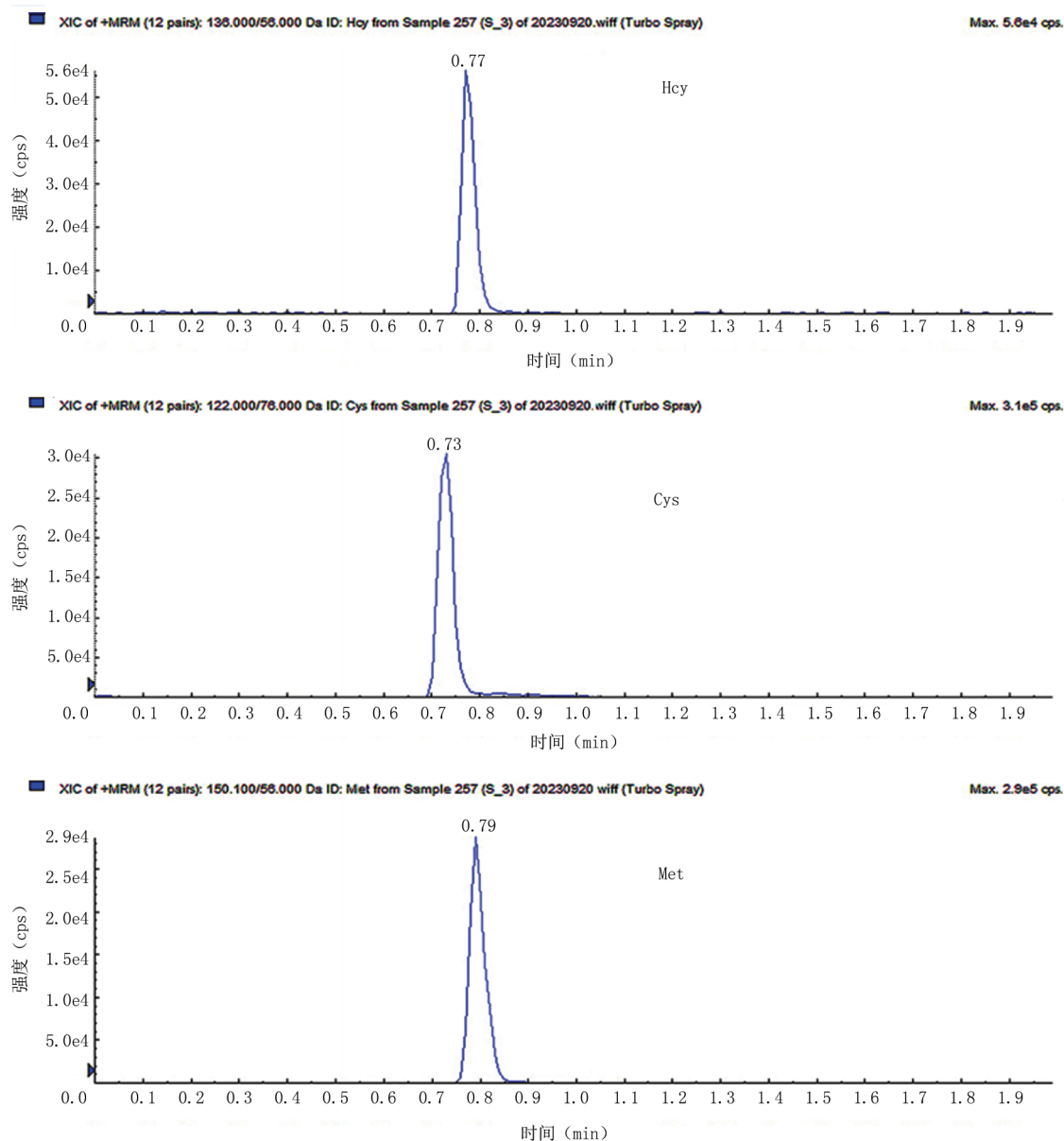
2.2.1 线性 Hcy、Cys、Met的相关系数 r 分别为0.9999、0.9986、0.9997,均 >0.990 ,且6个浓度点Hcy、Cys及Met的DEV均 $<\pm 15\%$,CV均 $<20\%$,表明Hcy在1~100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内呈良好的线性关系;Cys在5~500 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内呈良好的线性关系;Met在2~200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内呈良好的线性关系。

2.2.2 定量下限 分别计算每个浓度样本测定均值的CV及其与理论浓度的DEV,Hcy、Cys及Met分别为1 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 及2 $\mu\text{mol/L}$ 时,CV $<20\%$ 、DEV在 $\pm 15\%$ 范围内,且信噪比均 $>30:1$,故HPLC-MS/MS检测Hcy、Cys及Met的定量下限分别为1 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 及2 $\mu\text{mol/L}$,见表4。

2.2.3 精密度 分别对3个浓度的质控样本进行Hcy谱测定,结果显示,Hcy、Cys和Met三种代谢物的批内、批间CV均 $<\pm 15\%$,表明HPLC-MS/MS检测Hcy谱具有良好的精密度。每个浓度的批内CV和批间CV见表5。

2.2.4 正确度 分别对3个浓度加标样本进行检测,结果发现,Hcy、Cys及Met在3个浓度范围的回收率均为85%~115%,见表6,表明HPLC-MS/MS法检测Hcy谱具有良好的正确度。

2.2.5 基质效应 使用同位素内标进行校准后,纯溶液、血清基质样本及1:1混合样本的Hcy、Cys及Met测定值的CV均 $<15\%$,且1:1混合样本的Hcy、Cys及Met测定值比血清基质样本及纯溶液样本测定值的均值低1.45%、3.52%、



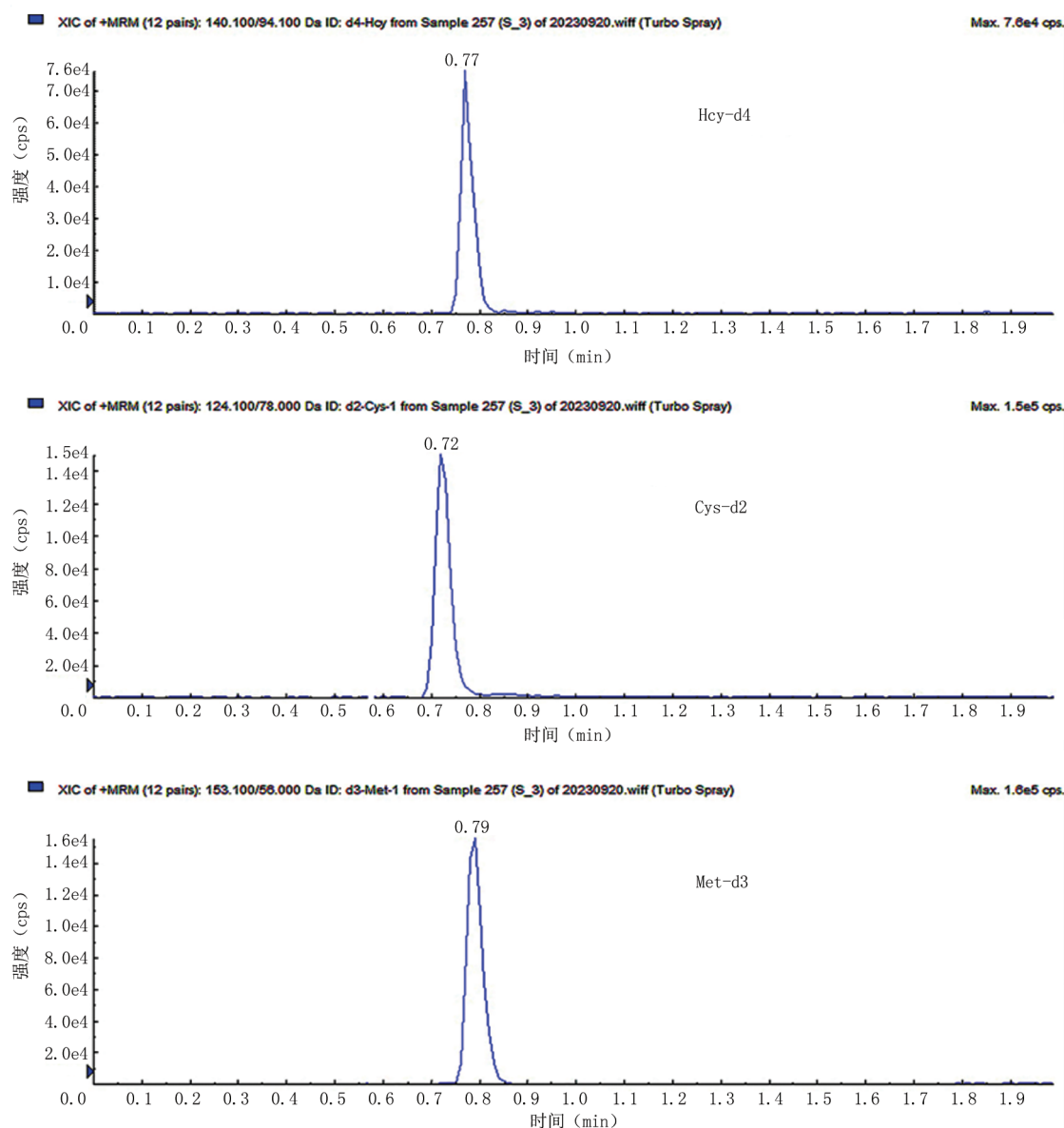


图1 HPLC-MS/MS法检测血清Hcy谱的典型色谱图

Figure 1 The typical chromatogram of serum Hcy metabolite profiles detected by HPLC-MS/MS

2.18%，见表7，表明样本血清基质对检测结果存在一定的抑制效应，但不会对方法的准确定量造成影响。

2.2.6 样本稳定性 血清中Hcy谱3种浓度在7 d内不同时间点以及处理后样本在24 h内不同时间点与首次测定结果的相对偏差均 $< \pm 15\%$ ，见表8，表明血清样本在4℃保存7 d内以及处理后样本4℃保存24 h内，HPLC-MS/MS法检测Hcy谱的结果是稳定的。

2.2.7 残留 通过验证发现，HPLC-MS/MS法检测Hcy、Cys及Met三种代谢物不被污染的S1实测值均值（A1）和可能被污染的S1实测值均值（A2）之差小于A1的3SD，见表9，表明

HPLC-MS/MS法检测Hcy谱残留较少，满足要求。

2.2.8 干扰 HPLC-MS/MS法检测重度溶血、黄疸和脂血样本中的Hcy、Cys及Met三种代谢物测定值与对照样本测定值的相对偏差均在 $\pm 15\%$ 以内，见表10，说明HPLC-MS/MS法对Hcy谱的含量测定不受溶血、黄疸和脂血的干扰。

2.2.9 稀释一致性 HPLC-MS/MS法检测稀释5倍、10倍及20倍样本的Hcy、Cys及Met三种代谢物浓度， $CV < 15\%$ ，且回收率在85%~115%以内，见表11，证明该方法可满足按照1:5、1:10及1:20稀释高浓度样本的要求。

2.3 HPLC-MS/MS检测Hcy谱在CKD中的临床

表4 HPLC-MS/MS检测Hcy谱的定量下限验证

Table 4 The validation of lower limit of quantification of Hcy metabolite profiles detected by HPLC-MS/MS

代谢物	编号	理论浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	测定均值 ($\mu\text{mol/L}$)	CV (%)	DEV (%)
Hcy	1/4A	0.25	0.43	9.11	73.20
	1/2A	0.75	0.56	7.35	-24.93
	A	1.00	1.12	6.93	11.60
	1/2B	1.50	1.69	2.20	12.73
	3/4B	2.00	2.07	4.89	3.60
Cys	1/4A	1.25	0.64	48.81	-48.56
	1/2A	3.75	1.09	34.91	-71.04
	A	5.00	4.91	7.87	-1.72
	1/2B	7.50	7.51	8.88	7.26
	3/4B	10.00	10.03	3.39	0.27
Met	1/4A	0.50	0.58	7.42	15.60
	1/2A	1.50	1.20	17.22	-20.13
	A	2.00	2.06	2.65	2.75
	1/2B	3.00	3.23	2.53	7.57
	3/4B	4.00	3.95	2.77	-1.15

应用 与CON组相比,CKD组血清Hcy及Cys水平显著升高 ($P<0.001$),其余指标差异无统计学意义 ($P>0.05$),见表12。

3 讨 论

CKD是全球公共卫生事业的一项巨大挑战,患病率持续上升,随病情进展,CKD患者各种不

良预后风险增加,严重影响患者的生命质量,甚至威胁患者生命^[27-29]。近年来,大量研究^[30-32]表明,高Hcy是CKD的危险因素,Hcy水平与CKD的诊断和预后相关,肾脏不仅参与了Hcy的代谢,还起到了排泄Hcy的功能。当肾功能受损,Hcy在体内积累,导致血管收缩和肾微血管系统的损害,进而导致慢性肾功能衰竭,形成一个恶性循环^[20,33-35]。因此,Hcy的代谢异常反映了肾功能不全,这些代谢物可能会是预测普通人群中肾脏疾病发生的有前景的标志物。

本研究建立了一种HPLC-MS/MS方法,相较于传统方法仅可以检测Hcy一种化合物,此方法可同时检测血清中Hcy谱的含量,包括Hcy、Cys、Met。HPLC-MS/MS法检测化合物之前需要选择合适的前处理方法,避免影响方法的稳定性和敏感度^[36],常用方法有蛋白沉淀法和固相萃取法等。由于血液循环中有多种形式的Hcy,很大一部分处于氧化状态,主要通过二硫键与自身或Cys相连,血浆中70%~85%的Hcy还与白蛋白和其他血液蛋白结合,为了准确地测量总Hcy含量,血液样品必须首先用二硫苏糖醇还原,然后才能变性和沉淀内源性蛋白,以释放样品中大部分Hcy。并且蛋白沉淀法相对于固相萃取法,具有步骤相对简单,成本低的优点,更适用于临床大批量检测^[37-38],

表5 HPLC-MS/MS检测Hcy谱的精密度验证

Table 5 The precision validation of HPLC-MS/MS for detecting Hcy metabolite profiles

(%)

浓度批次	Hcy		Cys		Met	
	批内 CV	批间 CV	批内 CV	批间 CV	批内 CV	批间 CV
L-1	4.68	4.65	6.17	4.26	2.41	2.98
L-2	5.10		3.43		3.87	
L-3	2.79		2.70		2.41	
M-1	4.67	10.86	4.91	7.81	2.01	7.25
M-2	3.45		2.21		3.35	
M-3	3.61		3.82		1.90	
H-1	4.93	3.41	2.12	3.92	2.26	2.85
H-2	1.92		1.95		1.71	
H-3	2.65		3.47		1.88	

表6 HPLC-MS/MS检测Hcy谱的正确度验证

Table 6 The accuracy verification of HPLC-MS/MS for detecting Hcy metabolite profiles

加标样本	Hcy			Cys			Met		
	Cs ($\mu\text{mol/L}$)	C ($\mu\text{mol/L}$)	R(%)	Cs ($\mu\text{mol/L}$)	C ($\mu\text{mol/L}$)	R(%)	Cs ($\mu\text{mol/L}$)	C ($\mu\text{mol/L}$)	R(%)
L-s	50	13.17	105	250	250.34	111	100	31.84	109
M-s	100	17.14	102	500	272.20	110	200	40.36	108
H-s	400	40.05	97	2000	377.00	93	400	88.23	102

表7 HPLC-MS/MS检测Hcy谱的基质效应验证

Table 7 The matrix effect verification of HPLC-MS/MS for detecting Hcy metabolite profiles

代谢物	样本	测定结果($\mu\text{mol/L}$)				CV(%)	DEV(%)
		第1批	第2批	第3批	均值		
Hcy	纯溶液	18.16	18.23	17.56	17.99	2.05	-1.45
	血清样本	15.94	15.75	15.54	15.74	1.26	
	1:1混合溶液	16.96	16.73	16.17	16.62	2.45	
Cys	纯溶液	100.60	100.59	95.44	98.88	3.01	-3.52
	血清样本	282.61	290.28	267.99	280.30	4.04	
	1:1混合溶液	191.28	180.04	177.40	182.91	4.03	
Met	纯溶液	40.56	41.06	39.45	40.36	2.04	-2.18
	血清样本	26.65	26.87	24.89	26.13	4.15	
	1:1混合溶液	33.62	32.01	31.93	32.52	2.93	

表8 HPLC-MS/MS检测Hcy谱样本的稳定性验证

Table 8 The stability verification of HPLC-MS/MS for detecting Hcy metabolite profiles samples

代谢物	编号	L		M		H	
		测定均值 ($\mu\text{mol/L}$)	DEV(%)	测定均值 ($\mu\text{mol/L}$)	DEV(%)	测定均值 ($\mu\text{mol/L}$)	DEV(%)
Hcy	0 h	10.09	0.00	29.92	0.00	53.42	0.00
	12 h	9.82	-2.68	29.76	-0.52	52.86	-1.05
	24 h	9.87	-2.21	28.54	-4.59	52.45	-1.83
	2 d	10.24	1.42	31.00	3.61	54.62	2.25
	4 d	11.18	10.73	34.00	13.66	60.42	13.10
	6 d	10.57	4.72	31.92	6.69	58.14	8.83
	7 d	10.54	7.30	31.03	4.27	57.25	8.31
Cys	0 h	289.40	0.00	381.87	0.00	481.41	0.00
	12 h	285.28	-1.42	379.20	-0.70	490.45	1.88
	24 h	275.59	-4.77	387.29	1.42	488.12	1.39
	2 d	264.20	-8.71	367.11	-3.87	471.86	-1.98
	4 d	283.53	-2.03	377.49	-1.15	495.90	3.01
	6 d	277.45	-4.13	381.00	-0.23	497.80	3.40
	7 d	290.92	1.98	398.39	5.06	497.63	1.46
Met	0 h	41.18	0.00	91.60	0.00	153.94	0.00
	12 h	41.50	0.78	91.83	0.25	149.76	-2.71
	24 h	41.88	1.71	94.05	2.68	153.19	-0.49
	2 d	44.17	7.27	98.81	7.87	162.97	5.87
	4 d	44.86	8.95	102.32	11.70	173.19	12.50
	6 d	46.07	11.89	102.40	11.79	173.29	12.57
	7 d	46.89	13.01	104.71	14.03	172.12	14.93

表9 HPLC-MS/MS检测Hcy谱的残留验证

Table 9 The residue validation of HPLC-MS/MS for detecting Hcy metabolite profiles

代谢物	均值 A1($\mu\text{mol/L}$)	SD	3SD	均值 A2($\mu\text{mol/L}$)	A2-A1($\mu\text{mol/L}$)
Hcy	0.89	0.12	0.36	0.95	0.06
Cys	4.97	0.54	1.61	5.41	0.44
Met	2.01	0.07	0.21	2.00	-0.01

同时本研究所采用方法的验证结果未出现明显的基质抑制效应,因此选择蛋白沉淀法作为前处理方法。

再者,由于同位素标记类似物与待测物具有

等效的物理化学性质,可补偿样品制备过程中样品稳定性、基质效应、萃取回收率等性能参数的变化,JCTLM数据库推荐采用稳定同位素标记的内标品作为HPLC-MS/MS测定血清中Hcy的参考

表 10 HPLC-MS/MS检测 Hcy 谱的干扰验证

Table 10 The interference validation of HPLC-MS/MS for detecting Hcy metabolite profiles

组别	代谢物	样本 1		样本 2	
		测定均值 ($\mu\text{mol/L}$)	DEV (%)	测定均值 ($\mu\text{mol/L}$)	DEV (%)
对照	Hcy	23.63	—	94.07	—
	Cys	290.55	—	653.39	—
	Met	45.48	—	201.57	—
非结合胆红素	Hcy	23.82	0.79	90.98	-3.29
	Cys	294.77	1.45	648.54	-0.74
	Met	44.64	-1.85	192.32	-4.59
结合胆红素	Hcy	23.81	0.74	90.33	-3.98
	Cys	293.27	0.94	658.21	0.74
	Met	45.08	-0.90	198.98	-1.29
脂血	Hcy	24.18	2.31	89.54	-4.82
	Cys	290.05	-0.17	639.55	-2.12
	Met	44.34	-2.51	188.27	-6.60
溶血	Hcy	23.03	-2.55	98.26	4.45
	Cys	283.24	-2.52	686.85	5.12
	Met	43.91	-3.46	206.75	2.57

表 11 HPLC-MS/MS检测 Hcy 谱的稀释一致性验证

Table 11 The verification of dilution consistency of HPLC-MS/MS for detecting Hcy metabolite profiles

指标	检测均值($\mu\text{mol/L}$)			
	本底血清 C_0	稀释 5 倍	稀释 10 倍	稀释 20 倍
Hcy	16.85	42.92	22.23	11.04
Cys	299.85	241.74	125.38	63.21
Met	26.85	83.24	45.00	21.59
指标	CV(%)			
	本底血清 C_0	稀释 5 倍	稀释 10 倍	稀释 20 倍
Hcy	3.24	4.92	3.29	3.43
Cys	3.56	4.18	4.08	3.00
Met	2.09	3.17	3.18	3.10
指标	R(%)			
	本底血清 C_0	稀释 5 倍	稀释 10 倍	稀释 20 倍
Hcy	—	99.74	104.28	102.62
Cys	—	95.18	98.73	99.55
Met	—	98.12	106.09	101.80

表 12 CON 组与 CKD 组血清 Hcy 谱水平的比较

Table 12 Comparison of serum Hcy metabolite profiles levels between CON group and CKD group

(μmol/L)				
组别	例数	Hcy[M(QR)]	Cys[M(QR)]	Met($\bar{x} \pm s$)
CON 组	103	10.58 (4.48)	260.00 (66.62)	25.96 $\pm$ 5.83
CKD 组	308	19.97 (17.97)	289.73 (98.57)	25.61 $\pm$ 6.85
U/t 值		4 064.000	1 037.000	0.453
P 值		<0.001	<0.001	0.650

测量程序,且使用稳定同位素标记的内标可提高该方法的测量准确性,前处理步骤相对简单^[39],

故本方法引入了稳定的同位素标记类似物作为内标,从而提高方法的准确性和精密度。

此外,色谱速度是对 HPLC-MS/MS 通量最明显的限制,这虽可以通过引入多重 LC 系统来部分缓解,然而,这些器械并没有注册为医疗设备,因此不能在临床环境中使用^[40],在本方法中,于流动相及沉淀剂中加入甲酸,有助于化合物获得单峰,优化峰型,缩短保留时间,使色谱速度提高至 2 min,明显优于 Jiang 等^[21-23]的 3~7 min,大大提高了检测速度,解除了对通量的限制,更适用于临床常规样本的大批量检测。

最后,本研究根据《CLSI C62-A: A New Standard for Clinical Mass Spectrometry》、《液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证》以及《液相色谱—质谱临床应用建议》对所建方法进行评估^[24-26],该方法的线性、定量下限、精密度、正确度、基质效应、样本稳定性、残留、干扰及稀释一致性等基本性能良好,可用于对临床 CKD 患者血清 Hcy、Cys 及 Met 水平进行准确定量。与 Cao 等^[20]的研究一致,本研究中 CKD 患者血清 Hcy、Cys 水平明显高于健康对照人群,可能是由于肾功能受损时,Hcy 代谢中的维生素缺乏及关键酶活性下降,再甲基化和转硫途径受阻,氧化应激与炎症增加,肾脏排泄功能下降,以及继发甲状旁腺功能亢进等多种因素,共同导致 Hcy 在体内积累^[20, 33-34],并且在肾脏损伤的情况下,Cys 转

化为谷胱甘肽或硫酸盐的代谢途径可能受阻,排泄减少,导致Cys在血液中积累。而Met是人体所必须的氨基酸,主要通过食物获得,受饮食因素的影响较大^[41],因此CKD患者血清Met水平与健康对照人群之间差异无统计学意义。

综上所述,本研究建立了一种可同时检测并准确定量人血清Hcy、Cys及Met的HPLC-MS/MS检测方法,并在CKD人群中进行了临床评估。该方法具有简单、快速、稳健、高通量的临床应用优势,期望能够通过更多的临床样本进行检测,优化检测流程,以为CKD的临床诊疗提供新的技术平台支持。

[参考文献]

- [1] 上海市肾内科临床质量控制中心专家组.慢性肾脏病早期筛查、诊断及防治指南(2022年版)[J].中华肾脏病杂志,2022,38(5):453-464.
- [2] Oosting IJ, Colombijn JMT, Kaasenbrood L, et al. Polypharmacy in patients with CKD: A systematic review and meta-analysis[J]. Kidney360,2024,5(6):841-850.
- [3] 赵振平,王丽敏.中国慢性肾脏病防控面临的挑战和建议[J].中华流行病学杂志,2025,46(1):9-17.
- [4] 《延缓慢性肾脏病进展临床管理指南》专家组,刘必成,刘章锁,等.延缓慢性肾脏病进展临床管理指南(2025年版)[J].中华肾脏病杂志,2025,41(6):455-488.
- [5] Nagib SN, Abdelwahab S, Amin GEE, et al. Screening and early detection of chronic kidney disease at primary healthcare[J]. Clin Exp Hypertens, 2021, 43(5):416-418.
- [6] Wu X, Ao H, Wu X, et al. Sulfur-containing amino acids and risk of schizophrenia[J]. Schizophr Res,2023,262: 8-17.
- [7] Chen W, Liang X, Liang G, et al. Hyperhomocysteinemia and its association with decreased glomerular filtration rate in patients with chronic kidney disease: A comprehensive meta-analysis[J]. Peer J,2025,13:e20064.
- [8] Yaqub N, Zubairi AM, Kanani F, et al. An insight to hyperhomocysteinaemia in CKD patients of a tertiary care hospital, karachi[J]. J Coll Physicians Surg Pak,2025,35(2): 180-184.
- [9] Garibotto G, Picciotto D, Verzola D, et al. Homocysteine exchange across skeletal muscle in patients with chronic kidney disease[J]. Physiol Rep,2023,11(6):e15573.
- [10] Zheng X, Liu Q, Liu Z. Serum homocysteine concentration as a marker for advanced diabetic nephropathy in a cohort of elderly patients[J]. BMC Endocr Disord,2023,23(1):114.
- [11] 赵靖,邹晓,赵轩,等.连夏宁心汤治疗退行性心脏瓣膜病痰热扰心证37例[J].环球中医药,2023,16(10):2105-2108.
- [12] 王泉维,邢巍巍.血清同型半胱氨酸、对氧磷酶1水平与全频下降型突聋的相关性研究[J].听力学及言语疾病杂志,2025.
- [13] 张羿,陈道天,姚沁珂,等.围孕期母亲同型半胱氨酸与子代出生体重结局关联的前瞻性队列研究[J].中华儿科杂志,2024,62(2):120-128.
- [14] 唐晶,李环,张硕,等.急性缺血性脑卒中患者血清中同型半胱氨酸与炎症反应及氧化应激的关联性分析[J].吉林大学学报(医学版),2024,50(3):786-790.
- [15] Mujalli A, Farrash WF, Alghamdi KS, et al. Metabolite alterations in autoimmune diseases: A systematic review of metabolomics studies[J]. Metabolites,2023,13(9):987.
- [16] Wang C, Yang J, Li E, et al. Metabolic signatures of hepatolithiasis using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Metabolomics,2022,18(9):69.
- [17] Catanese S, Khanna RK, Lefevre A, et al. Validation of metabolomic and lipidomic analyses of human tears using ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Talanta,2023,253:123932.
- [18] Zenati RA, Giddey AD, Al-Hroub HM, et al. Evaluation of two simultaneous metabolomic and proteomic extraction protocols assessed by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Int J Mol Sci, 2023,24(2):1354.
- [19] Serafimov K, Tischlarik JR, Lämmerhofer M. Targeted and untargeted urinary metabolomics of alkaptonuria patients using ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal,2025,256:116684.
- [20] Cao Y, Xu D, Zhang L, et al. Determination of four forms of plasma thiol amino acids in individuals with chronic kidney disease by UPLC-MS/MS [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,2025,1251: 124418.
- [21] Jiang Y, Mistretta B, Elsea S, et al. Simultaneous determination of plasma total homocysteine and methionine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Clin Chim Acta,2017,464: 93-97.
- [22] Bártl J, Chrastina P, Krijt J, et al. Simultaneous determination of cystathionine, total homocysteine, and methionine in dried blood spots by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its utility for the management of patients with homocystinuria[J]. Clin Chim Acta,2014,437: 211-217.
- [23] Forgacsova A, Galba J, Mojzisova J, et al. Ultra-high performance hydrophilic interaction liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry method for determination of cysteine, homocysteine, cysteinyl-glycine and glutathione in rat plasma [J]. J Pharm Biomed Anal, 2019, 164: 442-451.
- [24] Clinical and Laboratory Standards Institute. Liquid chromatography-mass spectrometry methods [S]. C62-A, CLSI,2014.
- [25] 中国医师协会检验医师分会临床质谱检验医学专业委员会,曹正,李水军,等.液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证[J].检验医学,2019,34(3):189-196.
- [26] 中华医学会检验医学分会,潘柏申,郭玮,等.液相色谱-质谱临床应用建议[J].中华检验医学杂志,2017,40(10): 770-779.

- [27] Chen J, Deng M, Zheng R, et al. Global, regional, and national trends in chronic kidney disease burden (1990–2021): A systematic analysis of the global burden of disease in 2021[J]. *Trop Med Health*, 2025, 53(1): 26.
- [28] Adeoye M, Hamdallah H, Adeoye AM. Homocysteine levels and cardiovascular disease risk factors in chronic kidney disease (CKD), hypertensive and healthy Nigerian adults: A comparative retrospective study[J]. *BMJ Open*, 2025, 15(3): e089644.
- [29] Cockwell P, Fisher LA. The global burden of chronic kidney disease[J]. *Lancet*, 2020, 395(10225): 662-664.
- [30] R S, Saharia GK, Panda S, et al. Evaluation of homocysteine and gamma-glutamyl transferase concentrations as markers of chronic kidney disease: An indian perspective [J]. *Cureus*, 2022, 14(3): e22959.
- [31] Lin H, Geng S, Yang L, et al. The effect of metabolic factors on the association between hyperuricemia and chronic kidney disease: A retrospective cohort mediation analysis [J]. *Int Urol Nephrol*, 2024, 56(7): 2351-2361.
- [32] Wu D, Rong Y, Wang X, et al. The prognostic value of hyperhomocysteinemia in IgA nephropathy [J]. *Int Urol Nephrol*, 2025.
- [33] Capelli I, Cianciolo G, Gasperoni L, et al. Folic acid and vitamin B12 administration in CKD, Why not? [J]. *Nutrients*, 2019, 11(2): 383.
- [34] Long Y, Nie J. Homocysteine in renal injury[J]. *Kidney Dis*, 2016, 2(2): 80-87.
- [35] Yang J, Fang P, Yu D, et al. Chronic kidney disease induces inflammatory CD40⁺ monocyte differentiation via homocysteine elevation and DNA hypomethylation [J]. *Circ Res*, 2016, 119(11): 1226-1241.
- [36] 孙一健, 常靖, 邹波, 等. 生物样品中强心苷类药物的检验方法研究进展[J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(5): 721-730.
- [37] Kaiser AM, Aro R, Kärman A, et al. Comparison of extraction methods for per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in human serum and placenta samples- insights into extractable organic fluorine (EOF) [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2021, 413(3): 865-876.
- [38] 代文侠, 张利明, 辜艳琴, 等. 乙腈沉淀-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定2种尿苯代谢物 [J]. *分析化学*, 2024, 52(11): 1735-1744.
- [39] Wang M, Shi J, Song Y, et al. An accurate measurement method for serum homocysteine measurement by ID-LC/MS/MS and the application of external quality assessment [J]. *Clin Chim Acta*, 2025, 565: 120021.
- [40] Zou H, Liu M, Li Y, et al. An efficient LC-MS/MS method for simultaneous determination of four substances in the Hcy metabolism pathway [J]. *Bioanalysis*, 2023, 15(13): 727-737.
- [41] 赵祎, 王萌, 杨洋. 肿瘤中甲硫氨酸代谢及其相关基因的表达调控 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2022, 38(7): 849-857.

(本文编辑:赵丽洁)