

液相色谱-串联质谱法结合化学衍生化技术在血清小分子代谢物标志物筛选中的应用研究

张明*

(咸宁市妇幼保健院, 咸宁 437100)

摘要: **目的** 分析液相色谱-串联质谱法结合化学衍生化技术在血清小分子代谢物标志物筛选中应用的效能。**方法** 选取本院 2025 年 3—10 月期间, 收治入院的 80 例原发性高血压患者进行研究, 采用随机数字表法为观察组和对照组, 各 40 例。对照组单一使用串联质谱技术, 观察组在此基础上, 联合应用化学衍生化技术分析血清样本, 对比两组血清小分子代谢物种类、数量, 标志物检测灵敏度与特异性, 探究不同代谢物在两组间的浓度差异。**结果** 观察组脂质、氨基酸、糖类代谢物数量均高于对照组($P<0.05$); 观察组检测灵敏度、特异度与准确度均优于对照组($P<0.05$); 观察组葡萄糖(glucose, GLU)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)等指标水平显著低于对照组($P<0.05$)。**结论** 液相色谱-串联质谱法联合化学衍生化技术的临床应用, 能够提高血清小分子代谢物标志物筛选准确性, 为疾病早期诊断与病情评估提供科学依据, 具有临床应用推广的价值意义。

关键词: 液相色谱-串联质谱法; 化学衍生化技术; 血清; 小分子代谢物; 标志物筛选

0 引言

在代谢病临床治疗中, 筛选血清小分子代谢物标志物, 对疾病早期诊断、干预, 具有重要意义。原发性高血压(primary hypertension, PH)是全球高发的慢性代谢性基础疾病, 在我国成人发病率约为 28%, 近几年患者数量不断上升, 目前已超 2.45 亿, 且发展趋势呈年轻化特点^[1]。PH 病理机制复杂, 与机体能量代谢异常有关, 同时受神经递质紊乱及肾素血管紧张素醛固酮系统过度激活的影响^[2]。临床诊断中, 传统方法难以做到全面解析, 无法准确解析代谢网络动态变化, 尤其在血清小分子代谢物标志物筛选中, 效果较差。液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)具备高特异性特点, 但在病理检测诊断中, 需结合化学衍生化技术, 对目标分子结构进行修饰, 从而提升离子化效率, 改善色谱保留行为并降低基质效应^[3]。本研究以 PH 患者为对象, 开展血清代谢组学分析, 构建基于衍生化辅助 LC-MS/MS 的标志物筛选平台, 揭示疾病特异性代谢特征, 为高血压早期诊断及病理机制研究提供新型技术支撑。

1 材料与方法

1.1 样本来源

选取本院 2025 年 3—10 月期间收治入院的 80 例 PH 患者为研究对象, 利用随机数字表法, 随机分为观察组与对照组, 各 40 例。其中, 观察组男性 23 例, 女性 17 例, 年龄(57.62 ± 9.37)岁, 对照组男性 21 例, 女性 19 例, 年龄(58.15 ± 9.68)岁。两组基线资料对比, 无明显差异, 具有可比性($P>0.05$)。该研究经本院伦理委员会审核批准。

纳入标准: (1)临床资料完整, 入院时间 ≥ 3 d; (2)无精神类疾病, 语言沟通无障碍; (3)符合《中国高血压防治指南》中 PH 诊断标准; (4)了解研究情况, 自愿参与并签署知情同意书。

排除标准: (1)合并传染性疾病、严重肝肾功能不全者; (2)明确存在肾动脉狭窄、嗜铬细胞瘤等继发性高血压病因者; (3)妊娠期、哺乳期女性; (4)中途退出、失访者。

1.2 材料与试剂

丹磺酰氯(LiChropur™系列纯度 $\geq 99.0\%$, BioReagent

级别, 纯度 $\geq 99.0\%$, 德国默克集团); 异硫氰酸苯酯(分析纯, 美国赛默飞世尔科技公司); 七氟丁酰基咪唑(色谱纯, 东京化成工业株式会社); 2,4-二硝基氟苯(优级纯, 英国阿法埃莎化学有限公司); 三甲基硅烷化试剂(美国雷吉斯科科技公司); 乙酸酐(分析纯, 北京百灵威科技有限公司); N-甲基-N-(三甲基硅基)三氟乙酰胺(色谱纯, 上海雅拓化学公司); 3-甲基-1-苯基-2-吡啶啉-5-酮[阿拉丁试剂(上海)有限公司]; 9-苄基氯甲酸酯(瑞士弗卢卡化学公司); 对溴苯甲酰甲基溴(分析纯, 上海泰坦科技股份有限公司)。

1.3 仪器与设备

Agilent 1260/6460 液相色谱-三重四极杆串联质谱联用仪、通用型 C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m)(美国安捷伦科技有限公司); UPLC-MS/MS 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪(美国 SCIEX 公司); Q-TOF 四极杆-飞行时间串联质谱仪、GCMS-TQ8050 气相色谱-三重四极杆串联质谱联用仪(日本岛津制作所); LTQ Orbitrap Velos Pro 液相色谱-离子阱串联质谱仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.4 方法

对照组运用液相色谱-三重四极杆串联质谱联用仪开展实验, 采集 500 μ L 血清样本置于洁净离心管中, 经 4000 r/min 转速离心处理 20 min, 去除杂质与蛋白质沉淀, 获取上清液作为待测样本。随后进行液相色谱分离, 将处理后样本注入液相色谱系统, 选用 C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m)。流动相采用乙腈水溶液, 甲酸体积占比为 0.1%, 进行梯度洗脱。初始阶段, 乙腈体积占比为 5%, 保持 2 min; 随后在 8 min 内乙腈体积占比线性上升至 95%, 并维持该比例 2 min; 最后在 1 min 内乙腈体积占比降至 5%, 平衡色谱柱 5 min, 为下次进样做准备。流动相比例随时间变化, 使不同极性的小分子代谢物在色谱柱上实现分离, 依据保留时间先后流出色谱柱。

质谱分析阶段, 经分离代谢物随流动相进入质谱仪。仪器配备 2 种电离源, 分别为电喷雾电离源(electrospray ionization, ESI)、大气压化学电离源(atmospheric pressure chemical ionization, APCI)。对极性较强, 易在 ESI 模式下电离的代谢物, 选用 ESI 源, 设置离子源温度为 350 $^{\circ}$ C, 喷雾电压为 4500 V; 对于极性较弱, APCI 模式下电离效果较好的代谢物, 选用 APCI 源, 设离子源温度为 400 $^{\circ}$ C, 雾化气压力为 30 psi, 以此来选取合适的电离源。电离后的离子进入三重四极杆质量分析器, 采用多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)扫描模式。第一重四极杆依据预设质量数筛选母离子, 允许特定质量数母离子通过; 第二重四极杆作为碰撞室, 使母离子与碰撞气体碰撞发生碎裂, 产生特征子离子; 第三重四极杆筛选特定子离子进行检测。基于 MRM 模式, 同时监测数 10 种目标代谢物, 依据等离子信号强度进行定量分析。实验过程中, 严格控制离

子源温度、喷雾电压、碰撞能量等仪器参数, 确保实验结果准确性。

观察组在对照组的基础上结合化学衍生化技术, 同样先进行血清样本采集与预处理, 采集后置于离心管中, 以 3000 r/min 转速离心 15 min, 获取血清上清液, 随后进入化学衍生化步骤。依据目标代谢物类型选择合适衍生化试剂, 分析氨基酸类代谢物时选用异硫氰酸苯酯, 分析羧酸类代谢物时选用七氟丁酰基咪唑。以氨基酸衍生化为例, 量取 200 μ L 血清上清液置于洁净玻璃试管中, 加入 50 μ L 异硫氰酸苯酯与吡啶按 1:1 (V:V)配制的混合溶液。将试管置于恒温水浴锅中, 在 60 $^{\circ}$ C 温度条件下反应 40 min, 使氨基酸与试剂充分发生反应生成衍生化产物。反应结束后, 向试管中加入 1 mL 有机溶剂正己烷, 振荡摇匀后静置 5 min, 利用正己烷萃取衍生化产物。此时溶液分层, 上层为含衍生化产物的正己烷相, 下层为水相及多余试剂与杂质。吸取上层有机相转移至另一洁净玻璃试管中, 将该试管置于氮吹仪上, 在 40 $^{\circ}$ C, 氮气流速 1 L/min 条件下进行干燥处理, 待有机溶剂完全挥发。干燥后, 向试管中加入 100 μ L 乙腈水(1:1, V:V)混合溶液进行复溶, 振荡摇匀后获取衍生化后样本溶液。

将衍生化样本溶液注入超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪, 该仪器采用 D-Jet 离子聚焦技术与 OptiFlow Pro 离子源, 离子传输效率提升 3 倍。选用粒径为 1.7 μ m 的小粒径色谱柱, 流动相为乙腈/水(30:70, V:V)溶液, 含 0.1%甲酸, 设置流速为 0.4 mL/min 进行梯度洗脱, 实现快速分离, 提高分离效率。分离后衍生化代谢物进入质谱仪, 因其化学结构改变, 电离效率与质谱行为发生变化。仪器采用动态 MRM 模式, 根据衍生化代谢物保留时间动态调整监测窗口, 监测窗口宽度设为 0.2 min, 减少非目标离子干扰。通过碰撞、诱导、解离、碎裂, 产生特征子离子, 并依据子离子信号强度进行定量分析。

1.5 数据处理

利用统计学软件包 SPSS 27.0 分析整理统计数据, 计数资料用百分比(%)体现, 进行 χ^2 检验, 计量资料表示为均数 \pm 标准差, 进行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 两组血清代谢物种类数量对比

如表 1 所示, 对比不同技术方法对 PH 患者血清小分子代谢物标志物筛选结果, 对比血清代谢物种类数量, 发现观察组脂质代谢物数量为 28 例(70.0%), 氨基酸代谢物数量 15 例(37.5%), 糖类代谢物数量 12 例(30.0%), 显著高于对照组 20 例脂质代谢物(50.0%), 10 例氨基酸代谢物(25.0%)和 8 例糖类代谢物(20.0%), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。数据表明, 运用串联质谱结合化学衍生化技术筛

选后, PH 患者血清中脂质代谢、氨基酸代谢及糖类代谢 3 种小分子代谢物种类数量明显增多^[4]。

表 1 两组血清代谢物种类数量对比[n (%)]

分组	脂质代谢物 数量	氨基酸代谢物 数量	糖类代谢物 数量
观察组 (n=40)	28 (70.0)	15 (37.5)	12 (30.0)
对照组 (n=40)	20 (50.0)	10 (25.0)	8 (20.0)
χ^2	4.904	3.209	3.842
<i>P</i>	0.027	0.037	0.040

2.2 两组标志物检测性能对比

如表 2 所示, 观察组灵敏度为 87.5%, 显著高于对照组 72.5%, $P=0.007$; 两组特异度对比, 观察组为 90%, 显著高于对照组 80% ($P=0.014$); 准确度对比, 观察组 88.75% 显著高于对照组 76.25% ($P=0.010$)。标志物检测各项性能指标比较, 观察组均显著高于对照组, $P<0.05$, 说明串联质谱结合化学衍生化的技术方法, 对 PH 患者血清小分子代谢物标志物筛选, 具有较高的灵敏度、特异度及准确度, 临床检测效果优于单一串联质谱技术。

表 2 两组标志物检测结果对比(%)

分组	灵敏度	特异度	准确度
观察组(n=40)	87.5	90	88.75
对照组(n=40)	72.5	80	76.25
<i>P</i>	0.007	0.014	0.010

2.3 两组代谢物水平对比

如表 3 所示, 观察组 GLU 水平为(5.26±0.42) mmol/L、TC (4.87±0.52) mmol/L、TG 为(1.51±0.30) mmol/L, 三项指标水平均低于对照组(5.78±0.51)、(5.32±0.58)与(1.89±0.37) mmol/L, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。研究选取 GLU、TC、TG 3 项代谢物指标进行对比, 其中 GLU 是机体能量代谢重要物质, 其水平变化可表示能量供应与消耗平衡状态, 因 PH 患者常伴能量代谢异常, 检测 GLU 水平变化, 能够反映疾病对能量代谢的影响程度。TC 与 TG 作为脂质代谢关键指标, 多用于体现机体脂质合成、转运与分解情况。因 PH 患者脂质代谢紊乱较为常见, 对比两项指标水平变化, 可揭示疾病状态下脂质代谢特征。

表 3 两组代谢标志物水平对比(mmol/L)

分组	GLU	TC	TG
观察组(n=40)	5.26±0.42	4.87±0.52	1.51±0.30
对照组(n=40)	5.78±0.51	5.32±0.58	1.89±0.37
<i>t</i>	-4.237	-3.874	-4.018
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论与结论

3.1 血清代谢物种类数量变化分析

本研究结果揭示串联质谱与化学衍生化技术联合应用中, 对代谢疾病患者血清小分子代谢物标志物筛选的重要作用。串联质谱技术具有高分辨率与高灵敏度特点, 可精准检测血清中各类小分子代谢物, 与化学衍生化技术相结合, 能够改变代谢物化学性质, 提高其离子化效率, 进一步提高检测准确性和稳定性^[5]。该技术联用方案应用于临床, 能够扩大血清小分子代谢物检测范围, 准确发现更多潜在标志物, 为 PH 患者早期诊断、治疗及病情评估, 提供数据支撑^[6]。依据联合检测获取的丰富信息, 深入了解 PH 发病机制, 为探索新的诊断及治疗策略提供科学依据。

3.2 标志物检测性能提升效果分析

液相色谱-串联质谱与化学衍生化技术的联合应用, 有助于提升代谢疾病患者标志物检测性能, 揭示串联质谱结合化学衍生化技术在筛选血清小分子代谢物标志物中强化效能与重要作用。串联质谱技术具备高分辨率, 可精准区分不同质量数的代谢物, 有效降低假阳性与假阴性结果检测率, 为灵敏度提升奠定基础^[7]。化学衍生化技术通过与代谢物发生化学反应, 改变其化学结构与性质, 提高代谢物在质谱中离子化效率, 使原本难以检测的微量代谢物得以有效检出, 进而提高检测灵敏度^[8]。同时, 二者结合能有效排除干扰物质影响, 提升检测特异性, 确保检测结果准确性, 反映血清中真实代谢物水平。在技术联用的综合作用下, 准确度大幅提高, 将其用于 PH 患者诊断, 可借助高灵敏度技术优势, 尽早发现 PH 疾病迹象。高特异度能避免误诊、漏诊, 而高准确度效能体现为精准病情评估, 为临床治疗决策提供可靠依据, 有力推动 PH 临床诊疗水平提升。

3.3 代谢物水平差异的临床意义

基于代谢物指标水平变化来看, GLU、TC 及 TG 等指标水平变化, 蕴含疾病发生发展的重要信息。其中, GLU 是能量代谢核心物质, 其水平降低说明 PH 患者能量代谢出现紊乱, 借助串联质谱结合化学衍生化技术, 可精准识别该指标变化。两种技术联合应用, 可依靠技术高灵敏度与精确性, 敏锐感知疾病状态下能量代谢相关代谢物的改变, 为剖析 PH 能量代谢异常机制, 提供新思路与新路径^[9]。TC 与 TG 代表脂质代谢核心指标, 在 PH 患者体内水平降低, 可体现为脂质代谢异常。通过串联质谱与化学衍生化技术的联合应用, 高效筛选出此类标志物, 清晰界定其水平差异, 有助于深入探究 PH 脂质代谢紊乱的内在机制, 为开发针对脂质代谢调节治疗手段提供依据^[10]。

3.4 技术应用前景与改进方向

代谢相关疾病临床诊断中, 联合应用串联质谱与化学衍生化技术, 可精准检测多种小分子代谢物, 为疾病早期诊断提供丰富可靠的标志物信息。研究发现该技术应用于 PH 患者诊断, 可发现与疾病相关的脂质、氨基酸及糖类代谢物, 此类标志物有助于早期识别和发现疾病迹象, 提高诊断准确性, 避免误诊、漏诊, 为临床治疗决策提供依据。在疾病机制研究方面, 该技术能全面解析代谢网络动态变化, 深入揭示疾病发病机制。分析不同代谢物水平变化, 明确疾病状态下能量代谢、脂质代谢等异常情况, 以此为依据, 制定针对性治疗策略。此外, 该技术还可用于药物研发, 通过监测药物对代谢物的影响, 评估药物疗效与安全性, 加速新药研发进程。

在未来应用中, 串联质谱结合化学衍生化技术还需不断改进, 持续改善化学衍生化试剂与方法, 提高衍生化效率及选择性, 减少副反应产生, 使代谢物衍生化过程高效、稳定。同时, 还可提升串联质谱仪器高分辨率、灵敏度与检测速度等性能, 缩短分析时间, 降低成本, 以期在血清小分子代谢物标志物筛选中发挥更大作用, 为疾病诊断、治疗及预防提供重要信息。

参考文献

[1] 唐勇, 何俊玲, 林驰量, 等. 电膜萃取-液相色谱质谱法高通量检测尿

液中内源性肽的研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2025, 56(5): 1226-1234.

- [2] 刘粮泽, 时正媛, 屈子裕, 等. 基于四极杆-线形离子阱串联质谱研究髓母细胞瘤氨基酸生物标志物定量分析方法[J]. 质谱学报, 2025, 46(4): 430-439.
- [3] 李洪俞, 季婵婵, 李萍, 等. 串联质谱技术在异戊酸血症产前诊断中的应用[J]. 临床检验杂志, 2025, 43(6): 433-435.
- [4] 林新丽, 吴畅, 谭力, 等. 基于柱前衍生-高效液相色谱-串联质谱联用技术的骨肽注射液中 10 种生物胺定量测定方法及其稳定性研究[J]. 药物分析杂志, 2024, 44(3): 405-418.
- [5] 李霞雪, 杨巧慧, 郑云华, 等. 非衍生化结合液相色谱-串联质谱技术测定茶叶中氯酚酸、茅草枯和草芽畏[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(11): 146-153.
- [6] 占霞, 高晓岚, 季文君, 等. 液相色谱串联质谱检测尿黏多糖在黏多糖贮积症患者诊断与随访中的应用[J]. 临床儿科杂志, 2024, 42(5): 399-406.
- [7] MAHAJAN S, PANDE M, CHAND N, *et al.* Oxidative stress, serum metabolites, inflammatory cytokine changes associated with lumpy skin disease in cattle [J]. BMC Veterinary Research, 2025, 21(1): 696-696.
- [8] 陈韦韦, 潘丽静, 袁旻嘉. 超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法测定壬二酸的含量[J]. 香料香精化妆品, 2024(1): 1-5.
- [9] 简瑞君, 瑕瑜. 自由基化学-串联质谱用于脂质精细结构解析的研究进展[J]. 质谱学报, 2024, 45(1): 57-68.
- [10] 李洁, 李玲, 王艳丽, 等. 非衍生化-气相色谱-串联质谱法测定植物油中 5 种植物甾醇[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(4): 24-31.