

团体标准

T/CNSS 034—2024

人体血液中叶酸的测定

Determination of folate in human blood

2024 - 12 - 16 发布

2024 - 12 - 16 实施

中国营养学会 发布

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。

本文件由中国营养学会提出并归口。

本文件起草单位：中国疾病预防控制中心营养与健康所、首都儿科研究所、浙江省疾病预防控制中心、中营惠营养健康研究院、中国医学科学院北京协和医院、北京积水潭医院、民航总医院。

本文件主要起草人：李岩、卓勤、王惠君、王晶波、毛宏梅、张兵、霍军生、张霆、王瑛瑶、章荣华、张敏、张俊彦、胡争艳、国秀芝、陈晨、石丽丽、宫照龙、韩超、郑伟、王芳、刘岩、杨静。

引 言

叶酸是一种水溶性维生素，也是一种人体必需的营养素。叶酸缺乏可导致巨幼红细胞贫血、新生儿神经管畸形、孕妇先兆子痫、高同型半胱氨酸血症等。叶酸的检验方法多，检测指标不统一，不利于正确地评价人体的叶酸营养状况，因此迫切需要规范叶酸的检测方法，为叶酸营养状况的评估提供依据。

T/CNSS

人体血液中叶酸的测定

1 范围

本文件描述了人体血液中叶酸的测定方法，包括微生物法、液相色谱串联质谱法和竞争性蛋白结合法。

本文件微生物法适用于测定血清和红细胞中叶酸；液相色谱串联质谱法适用于测定血清中5-甲基四氢叶酸和强化叶酸；竞争性蛋白结合法适用于临床筛查测定血清和红细胞中叶酸。

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 225 临床化学检验血液标本的收集与处理

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

叶酸 folate

生物体内一组由蝶啶、对氨基苯甲酸和谷氨酸结合而成的化合物的统称。

注：根据谷氨酸的个数、氧化还原状态及一碳单位的不同分为不同的组分。

3.2

强化叶酸 folic acid; FA

食品中强化的氧化型蝶酰单谷氨酸。

3.3

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

血液中一种具有生物活性的还原型蝶酰单谷氨酸。

注：占血液叶酸总量的80%以上。

4 血液样品的采集与保存

按附录 A 的方法进行。

5 微生物法

5.1 原理

叶酸是鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) 生长所必需的营养素。在一定控制条件下，将鼠李糖乳杆菌菌液接种至含有待测样品的培养基中，培养一段时间后测定吸光度值，在一定测定范围内可以根据叶酸含量与吸光度值的标准曲线计算出受试样品中叶酸的含量。

5.2 试剂或材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯。水为GB/T 6682规定的一级水，电阻率 $>18\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ 。

5.2.1 试剂

- 5.2.1.1 氢氧化钠 (NaOH)。
- 5.2.1.2 抗坏血酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$)。
- 5.2.1.3 抗坏血酸钠 ($\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6\text{Na}$)。
- 5.2.1.4 甘油 ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)。
- 5.2.1.5 氯霉素 ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$)。

5.2.2 试剂配制

- 5.2.2.1 氢氧化钠溶液 (0.01 mol/L)：称取 0.4 g 氢氧化钠加水溶解并稀释至 1 L，于 $2\text{ }^\circ\text{C}\sim 8\text{ }^\circ\text{C}$ 保存，有效期 2 个月。
- 5.2.2.2 0.5% 抗坏血酸钠溶液：称取 0.5 g 抗坏血酸钠加水溶解并稀释至 100 mL，现用现配。
- 5.2.2.3 1% 抗坏血酸溶液：称取 1.0 g 抗坏血酸加水溶解并稀释至 100 mL，裂解全血标本时现用现配。
- 5.2.2.4 80% 甘油：量取 80 mL 甘油，与 20 mL 水混匀， $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压 15 min，冷却后 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存，有效期 1 个月。
- 5.2.2.5 氯霉素储备液 (3 mg/mL)：称取 600 mg 氯霉素，加 2 mL 乙醇溶解后 (可温水助溶)，加水至 200 mL，采用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜于超净工作台或生物安全柜中过滤除菌，EP 管分装，每管 1 mL，于 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

5.2.3 培养基

- 5.2.3.1 菌种生长培养基：按附录 B 中 B.1 的规定配制。
- 5.2.3.2 叶酸检测培养基：按 B.2 的规定配制。

5.2.4 叶酸标准储备液的配制

- 5.2.4.1 叶酸标准品 ($\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6$, CAS: 59-30-3)：纯度 $\geq 97\%$ 。或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
- 5.2.4.2 叶酸标准储备液 (20 mg/L) 的配制：称取叶酸标准品 20 mg (精确至 0.01 mg)，用 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液溶解并转移至容量瓶，定容至 1 L，混匀后分装， $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 以下保存。

5.3 仪器设备

- 5.3.1 分析天平：感量 1 mg、0.1 mg 和 0.01 mg。
- 5.3.2 恒温培养箱： $37\text{ }^\circ\text{C}\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 。
- 5.3.3 压力蒸汽灭菌器。
- 5.3.4 紫外分光光度计 (含 256 nm 波长)。
- 5.3.5 涡旋振荡器。
- 5.3.6 超净工作台或生物安全柜。
- 5.3.7 酶标仪 (含 590 nm 波长)。
- 5.3.8 微孔滤膜 ($0.22\text{ }\mu\text{m}$)。
- 5.3.9 96 微孔板 (无菌)。

5.4 菌种的活化与保存

- 5.4.1 菌种：鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 27773 或 *Lactobacillus rhamnosus* NCIB

10463), 是 *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 经过氯霉素诱导后的菌种。

5.4.2 菌种的活化制备与保存: 按附录 C 的规定进行。

5.5 分析步骤

5.5.1 叶酸标准储备液的定值

准确吸取1 mL 20 mg/L的叶酸标准储备液和4 mL 0.01 mol/L氢氧化钠溶液至离心管中, 混匀。重复此操作共3次, 得到三管标准溶液。采用紫外分光光度计测定三管标准溶液256 nm波长下的吸光度值, 以0.01 mol/L氢氧化钠溶液调零点, 按公式(1)计算叶酸标准储备液的实际叶酸浓度, 即为叶酸标准储备液的定值。

$$C = \frac{\bar{A} \times M \times 5 \times 1000}{E} \dots \dots \dots (1)$$

式中:

C ——标准储备液的叶酸浓度, 单位为毫克每升 (mg/L);

\bar{A} ——平均吸光度值;

M ——叶酸相对分子质量, 数值为 441.42;

5 ——稀释倍数;

1000——由克每升换算为毫克每升的换算系数;

E ——摩尔消光系数, 数值为24500。

5.5.2 叶酸标准系列溶液配制

根据叶酸标准储备液定值的结果, 采用新鲜配制的0.5%抗坏血酸钠将叶酸标准储备液稀释为1 mg/L (即1 μ g/mL), 然后用0.5%抗坏血酸钠溶液将1 μ g/mL的叶酸标准品溶液稀释至1 ng/mL。再依次用0.5%抗坏血酸钠制备浓度分别为0.5 ng/mL、0.4 ng/mL、0.3 ng/mL、0.2 ng/mL、0.15 ng/mL、0.1 ng/mL、0.05 ng/mL、0 ng/mL的标准系列溶液。

5.5.3 血液样品稀释

5.5.3.1 血清样品稀释: 用0.5%的抗坏血酸钠稀释血清样品, 建议按1:75的比例进行稀释, 用涡旋振荡器混匀。

5.5.3.2 全血溶血样品稀释: 用0.5%的抗坏血酸钠稀释全血溶血样品 (见附录A), 建议按1:100~1:200的比例进行稀释, 用涡旋振荡器混匀。

5.5.4 接种菌液的制备

取200 μ L活化储备菌种加至100 mL的叶酸检测培养基, 混匀。

5.5.5 接种与培养

将100 μ L不同浓度的叶酸标准曲线溶液或血液样品加至96微孔板, 每孔再加200 μ L接种菌液, 用密封膜封闭, 轻微混匀, 于37 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C恒温培养箱内培养45 h。建议每个叶酸标准浓度或血液样品做三个平行孔。

5.5.6 测定

培养结束, 充分颠倒混匀, 使微孔板内每孔聚集的菌落分散均匀, 缓慢撕下密封膜, 静置 (等待时间不应超过10 min), 待各孔没有气泡后, 用酶标仪测定590 nm波长下的吸光度值。

5.5.7 试验数据处理

以标准曲线溶液的叶酸浓度为横坐标、吸光度值为纵坐标, 进行标准曲线的拟合, 选择二项式曲线拟合。根据样品的吸光度值, 使用标准曲线计算血液样品中叶酸的相应浓度, 即拟合计算值。红细胞叶

酸浓度按公式（2）计算。

$$C_1 = \frac{C_2 \times 11 - C_3 (1 - HCT)}{HCT} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

C_1 ——红细胞叶酸的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

C_2 ——全血溶血叶酸的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）， C_2 =拟合计算值×稀释倍数；

C_3 ——血清叶酸的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）， C_3 =拟合计算值×稀释倍数；

HCT ——红细胞压积（%）。

注：检测红细胞叶酸需提前用全血进行 HCT 测定。

示例：

血清样品稀释倍数为 75 倍，血清叶酸拟合计算值为 0.22 ng/mL，则血清叶酸的浓度 $C_3=0.22 \times 75=16.5$ ng/mL。
 全血样品红细胞压积为 40%，全血溶血样品稀释倍数为 100 倍，全血溶血叶酸拟合计算值为 0.12 ng/mL，则全血溶血叶酸的浓度 $C_2=0.12 \times 100=12$ ng/mL。
 按照公式（2），红细胞叶酸的浓度 $C_1 = \frac{12 \times 11 - 16.5 \times (1 - 40/100)}{40/100} = 305.25$ ng/mL

5.6 质量控制和保证

5.6.1 标准曲线拟合： $R^2 \geq 0.99$ 。

5.6.2 精密度：样品板内变异系数（ CV ） $\leq 15\%$ 。

6 液相色谱串联质谱法

6.1 原理

血清中的5-甲基四氢叶酸（5-MeTHF）和叶酸（FA）经固相萃取柱净化富集，使用液相色谱法分离，串联质谱多反应监测模式（MRM）检测，同位素内标法定量，该方法可以测定血清叶酸中的5-MeTHF和FA。

6.2 试剂或材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯。水为GB/T 6682规定的一级水。

6.2.1 试剂

- 6.2.1.1 甲醇（ CH_3OH ）：色谱纯。
- 6.2.1.2 甲酸（ $HCOOH$ ）：色谱纯。
- 6.2.1.3 半胱氨酸（ $C_3H_7NO_2S$ ）：纯度 $\geq 98.5\%$ 。
- 6.2.1.4 抗坏血酸（ $C_6H_8O_6$ ）：优级纯。
- 6.2.1.5 磷酸盐缓冲液：20 mmol/L，pH 7.2。
- 6.2.1.6 甲酸铵（ NH_4HCO_2 ）：分析纯。
- 6.2.1.7 乙腈（ CH_3CN ）：色谱纯。
- 6.2.1.8 乙酸（ CH_3COOH ）：分析纯。

6.2.2 试剂配制

- 6.2.2.1 1%甲酸铵溶液：称取5.0 g甲酸铵加水溶解并稀释至500 mL，混匀。2℃~8℃避光存放，有效期7天。
- 6.2.2.2 样品缓冲液：称取1.0 g抗坏血酸用200 mL 1%甲酸铵溶液溶解，混匀，2℃~8℃避光存放，有效期2天。

6.2.2.3 0.05 %甲酸铵溶液：取10 mL 1 %甲酸铵溶液用纯水稀释至200 mL，2 °C~8 °C避光存放，有效期7天。

6.2.2.4 清洗液：称取0.4 g抗坏血酸用0.05 %甲酸铵溶液溶解并稀释至200 mL，混匀，2 °C~8 °C避光存放，有效期2天。

6.2.2.5 洗脱液：称取1.225 g抗坏血酸加水溶解并稀释至245 mL，再加入甲醇200 mL、乙腈50 mL、乙酸5 mL，混匀。2 °C~8 °C避光存放，有效期2天。

6.2.2.6 含0.1 %半胱氨酸的磷酸盐缓冲液：称取0.1 g半胱氨酸用磷酸盐缓冲液（20 mmol/L，pH 7.2）溶解并稀释至100 mL，混匀。2 °C~8 °C避光存放，有效期2天。

6.2.2.7 1 %抗坏血酸溶液：称取1.0 g抗坏血酸加水溶解并稀释至100 mL，混匀。现用现配。

6.2.3 标准品

6.2.3.1 5-甲基四氢叶酸标准品（Levomefolic Acid, 5-MeTHF, CAS: 134-35-0）：纯度≥97 %或有证标准物质。

6.2.3.2 叶酸标准品（Folic Acid, FA, CAS: 59-30-3）：纯度≥97 %或有证标准物质。

6.2.3.3 同位素内标5-甲基四氢叶酸标准品（Levomefolic Acid-13C, d3, 5-MeTHF-13C, d3, CAS: 1356019-94-7）：纯度≥95 %或有证标准物质。

6.2.3.4 同位素内标叶酸标准品（Folic Acid-d4, FA-d4, CAS: 171777-72-3）：纯度≥97 %或有证标准物质。

6.2.4 标准品溶液配制

6.2.4.1 5-MeTHF标准品储备液（100 μg/mL）：称取1 mg 5-MeTHF 标准品（精确至0.01 mg）和 50 mg 抗坏血酸用含0.1 %半胱氨酸的磷酸盐缓冲液稀释并定容至5 mL，再用1 %抗坏血酸按照1:1进行稀释，制备成浓度为100 μg/mL的5-MeTHF标准品储备液。分装后-70 °C冻存，有效期2年。

6.2.4.2 FA标准品储备液（100 μg/mL）：称取1 mg FA标准品（精确至0.01 mg），用磷酸盐缓冲液稀释并定容至5 mL，再用去离子水按照1:1进行稀释，制备成浓度为100 μg/mL的FA标准品储备液。分装后-70 °C冻存，有效期2年。

6.2.4.3 5-MeTHF标准品中间液：移取100 μL 5-MeTHF标准品储备液，用0.1 %抗坏血酸溶液稀释并定容至10 mL，制备成浓度为1 μg/mL的5-MeTHF标准品中间液。分装后-70 °C冻存，有效期2个月。

6.2.4.4 FA标准品中间液：移取100 μL FA标准品储备液，用0.1 %抗坏血酸溶液稀释并定容至10 mL，制备成浓度为1 μg/mL的FA标准品中间液。分装后-70 °C冻存，有效期2个月。

6.2.4.5 5-MeTHF/FA标准品工作液（5-MeTHF/FA浓度为100/50 ng/mL）：取1 μg/mL的5-MeTHF标准品中间液100 μL和1 μg/mL的FA标准品中间液50 μL，加样品缓冲液850 μL，混匀，现用现配。

6.2.4.6 5-MeTHF/FA标准系列溶液：将5-MeTHF/FA标准品工作液用样品缓冲液进行系列稀释，得到5-MeTHF/FA的终浓度分别为 50/25 ng/mL、20/10 ng/mL、10/5 ng/mL、5/2.5 ng/mL、1/0.5 ng/mL、0.2/0.1 ng/mL 的标准系列溶液。

6.2.5 内标溶液配制

6.2.5.1 5-MeTHF-13C, d3内标储备液（100 μg/mL）：称取5-MeTHF-13C, d3内标标准品1 mg（精确至0.01 mg），用0.1 %抗坏血酸溶液稀释并定容至10 mL。分装后-70 °C冻存，备用。

6.2.5.2 FA-d4内标储备液（100 μg/mL）：称取FA-d4内标标准品1 mg（精确至0.01 mg），用0.1 %抗坏血酸溶液稀释并定容至10 mL。分装后-70 °C冻存，备用。

6.2.5.3 混合内标工作液（5-MeTHF-13C, d3/FA-d4浓度为100/50 ng/mL）：取 5-MeTHF-13C, d3和FA-d4内标储备液各100 μL加0.1 %抗坏血酸溶液900 μL，制备成浓度为10 μg/mL的5-MeTHF-13C, d3和

FA-d4内标溶液。再取10 $\mu\text{g/mL}$ 的5-MeTHF-13C, d3内标溶液10 μL 和FA-d4内标溶液5 μL , 加0.1 %抗坏血酸溶液985 μL , 制备成混合内标工作液, 混匀, 现用现配。

6.3 仪器设备

6.3.1 液相色谱串联质谱联用仪: 带电喷雾离子源 (ESI)。

6.3.2 分析天平: 感量0.1 mg、0.01 mg。

6.3.3 生物样品前处理仪: 配备固相萃取装置, 可输出0.01 psi~5.0 psi的正压压力。

注: 1 psi=6.895 kPa。

6.3.4 旋涡混合器。

6.3.5 含非极性键合硅胶基材料的固相萃取柱 (SPE) 的96微孔板。

6.4 分析步骤

6.4.1 样品处理

6.4.1.1 样品预处理

取血清150 μL 血, 加入样品缓冲液370 μL 和混合内标工作液30 μL , 混匀。将混匀后样品放置2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育20 min。

6.4.1.2 固相萃取柱 (SPE) 处理

取含SPE柱的96微孔板放置于生物样品前处理仪中, 配套使用96微孔收集板, 使用乙腈、甲醇及缓冲液依次分别活化SPE柱, 然后将孵育好的样品上样, 用清洗液清洗SPE柱3次, 清洗完成后用96微孔收集板 (2 mL) 进行洗脱操作, 收集洗脱液 (见表1)。将处理过后的洗脱液14000 r/min离心5 min后, 取出适量的上清液进行分析。

表1 SPE 样品处理步骤

流程	试剂	次数	体积/ μL	压力/psi	时间/min	备注
活化	乙腈	1	500	0.01	2	
	甲醇	1	500	0.01	2	倒废液
	缓冲液	2	550	0.01	2	
			550	0.02	2	倒废液
上样	样品	1	500	0.005	4	
		2		0.01	1	
清洗	清洗液	3	450	0.01	2	倒废液
			450	0.01	2	
			450	0.02	2	
洗脱	洗脱液	2	250	0.005	5	换收集板
			250	0.005	5	

6.4.2 标准曲线溶液配制

分别取6种不同浓度的5-MeTHF/FA标准系列溶液各150 μL , 加样品缓冲液370 mL和混合内标工作液30 μL , 混匀制成标准曲线溶液。各标准曲线溶液中5-MeTHF (13C, d3) 内标浓度为5.5 ng/mL, FA (d4) 内标浓度为2.75 ng/mL。

6.4.3 液相色谱串联质谱联用仪参数设置

6.4.3.1 液相色谱分析参考条件：

- 色谱柱：Waters HSS T3色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）色谱柱，或等效柱；
- 流动相：流动相A为0.1%甲酸水溶液，流动相B为甲醇；
- 流速：0.3 mL/min；
- 进样量：5 μL；
- 柱温：35 ℃。

液相梯度洗脱程序见表2。

表2 液相梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	曲线
0	85.0	15.0	0
0.50	70.0	30.0	6
3.50	15.0	85.0	6
3.60	85.0	15.0	1
5.00	85.0	15.0	1

6.4.3.2 质谱测定参考条件：

- 电离模式：ESI+；
- 毛细管电压：3.26 kV；
- 检测方式：多反应监测模式（MRM）；
- 脱溶剂气温度：450 ℃；
- 脱溶剂气流量：1000 L/h；
- 源温度：150 ℃。

MRM离子对参数见表3。

表3 离子对参数

分类	目标化合物	MRM (m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
待测物	5-MeTHF	460.17>180.07	40	38
		460.17>313.20 ^a	40	22
	FA	442.09>176.10	22	38
		442.09>295.14 ^a	22	16
内标物	5-MeTHF (13C, d3)	464.25>317.20 ^a	23	19
	FA (d4)	446.20>299.10 ^a	24	14

^a 为定量离子。

6.4.4 试验数据处理

6.4.4.1 工作曲线的建立

在液相色谱串联质谱分析条件下，将 6.4.2 得到的标准曲线溶液由低浓度到高浓度进行进样分析，分别以 5-MeTHF 与 5-MeTHF (13C, d3) 色谱峰，FA 与 FA (d4) 色谱峰的峰面积比值-浓度进行线性回归，得到标准曲线溶液的直线拟合方程[见公式 (3)]。其线性相关系数 $R^2 \geq 0.99$ 。

$$\frac{A_{\text{std}}}{A_{\text{IS}}} = a \times \frac{C_{\text{std}}}{C_{\text{IS}}} + b \quad (3)$$

式中：

A_{std} ——标准曲线溶液中 5-MeTHF 或 FA 定量离子 MRM 积分峰面积；

A_{IS} ——标准曲线溶液中同位素内标 MRM 积分峰面积；

a ——拟合直线的斜率；

C_{std} ——标准曲线溶液中 5-MeTHF 或 FA 的浓度，单位为纳克每毫升 (ng/mL)；

C_{IS} ——标准曲线溶液中同位素内标的浓度，单位为纳克每毫升 (ng/mL)；

b ——拟合直线的截距。

6.4.4.2 样品结果计算

在超高效液相色谱串联质谱分析参考条件下，将得到的待测样品溶液进样分析，按内标法计算待测试样溶液中目标物的质量浓度。根据公式 (3) 得到的标准曲线，可计算得到公式 (4) 中 C_{target} 值，即待测样品中 5-MeTHF 或 FA 的浓度。

将公式 (3) 中拟合得到的参数 a 、 b 代入式 (4)，得到工作曲线。

$$\frac{A_{\text{target}}}{A_{\text{IS}}} = a \times \frac{C_{\text{target}}}{C_{\text{IS}}} + b \quad (4)$$

式中：

A_{target} ——待测样品中 5-MeTHF 或 FA 定量离子 MRM 积分峰面积；

A_{IS} ——待测样品中同位素内标 MRM 积分峰面积；

C_{target} ——待测样品中 5-MeTHF 或 FA 的浓度，单位为纳克每毫升 (ng/mL)；

C_{IS} ——待测样品中同位素内标的浓度，单位为纳克每毫升 (ng/mL)；

a ——式 (3) 中拟合得到直线斜率；

b ——式 (3) 中拟合得到截距。

计算结果表示到小数点后两位。

6.5 质量保证和控制

6.5.1 内部质量控制

实验室应制定测试结果质量控制程序，明确内部质量控制的内容、方式和要求。随同样品检测需测定质量控制样品，绘制质量控制图，观察测试工作的稳定性、系统偏差及趋势，及时发现异常现象并采取相应的改进措施。

6.5.2 外部质量控制

实验室应参加国内外实验室认可机构组织的能力验证活动，参加国际间、国内同行间的实验室比对试验。根据外部评审、能力验证、考核、比对等结果评估检验结果的质量并采取相应的改进措施。

6.6 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的 15%。

6.7 检出限和定量限

本方法5-MeTHF、FA检出限分别为 0.0005 ng/mL、0.1 ng/mL，5-MeTHF、FA定量限分别为 0.00125 ng/mL、0.2 ng/mL。

6.8 回收率

本方法5-MeTHF的加标回收率为96.0 %~110.0 %，FA的加标回收率为92.0 %~112.0 %。

7 竞争性蛋白结合法

7.1 原理

样品中的叶酸和添加的标记叶酸与叶酸结合蛋白竞争性结合，依据电化学/化学发光检测体系中叶酸浓度与体系的电化学/化学发光强度在一定条件下呈线性定量关系的原理进行叶酸含量检测。

7.2 试剂和材料

7.2.1 叶酸检测试剂盒（化学发光/电化学发光法）。

7.2.2 叶酸检测定标品、质控品。

7.2.3 仪器基础试剂和耗材。

7.3 仪器设备

电化学发光仪或化学发光仪。

7.4 分析步骤

7.4.1 按照仪器说明书和试剂盒使用说明，准备仪器、试剂、标准品和质控品。试剂盒至少包含两水平的质控品。

7.4.2 进行仪器系统测试及叶酸含量检测试剂盒定标和质控品测定，质控品检测结果符合要求，方可进行样品中叶酸的测定。

7.4.3 应使血液样品的温度达到室温，混合均匀后进行测定，确保样品杯中无气泡。为了防止液体挥发影响结果，所有样品、标准品、质控品上机后都应在2 h内测定。

7.4.4 按照仪器操作说明要求进行标准品、质控品及样品的测定，并读取、保存、计算检测结果。

7.5 质量保证和控制

7.5.1 精密度：在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的15 %。

7.5.2 实验室应制定测试结果质量控制程序，明确内部质控的内容、方式及要求，并参加国内外的外部质控，根据外部审评、能力验证、考核、对比等结果评估检验结果的质量并采取相应的改进措施。

附 录 A

(规范性)

血液样品的采集与保存

A.1 样品采集

根据 WS/T 225 的要求采集空腹静脉血，用于血清叶酸检测的样品使用不含抗凝剂的采血管采集血液 1 mL~2 mL，用于红细胞叶酸检测的样品使用含乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝剂的采血管采集血液 1 mL~2 mL。

A.2 样品制备(所有操作需避光进行)

A.2.1 血清样品

按照 WS/T 225 的要求分离制备血清样品。

A.2.2 溶血样品

A.2.2.1 EDTA 抗凝全血，需制备成溶血样品用于红细胞叶酸的测定或保存：

a) 微生物法：EDTA 抗凝管采集血样后反复颠倒 5 次~8 次，使抗凝全血充分混匀。取 100 μ L 抗凝全血和 1000 μ L 新鲜配制的 1% 抗坏血酸于 EP 管中，混匀后迅速于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻，制备溶血样品；

b) 竞争性蛋白结合法：按照红细胞叶酸试剂盒说明书的方法制备溶血样品。

A.2.2.2 全血宜在血液采集当天立即裂解溶血；如果不能当天操作，则将 EDTA 抗凝全血于 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 避光保存，48 h 内完成溶血样品的制备。

A.2.3 样品保存

制备好的血清样品可立即开展叶酸测定，也可适当稳定保存后测定，2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 冰箱冷藏保存不应超过 48 h，-20 $^{\circ}$ C 冷冻保存不应超过 28 d。-70 $^{\circ}$ C 以下可长期存放，避免反复冻融。

溶血样品宜 -20 $^{\circ}$ C 过夜冻存后测定叶酸，直至 28 d。若样品不能及时检测，应于 -70 $^{\circ}$ C 以下冰箱存放，避免反复冻融。

附录 B

(规范性)

培养基配置

B.1 菌种生长培养基

B.1.1 试剂

B.1.1.1 叶酸酪蛋白培养基。

B.1.1.2 抗坏血酸钠 ($C_6H_7O_6Na$)。

B.1.1.3 吐温 80 (Tween 80)。

B.1.2 叶酸标准品工作液 (100 ng/mL) 配制

准确移取 20 mg/L 的叶酸标准品储备液 0.5 mL 于 100 mL 容量瓶中，用新鲜配制的 0.5 % 抗坏血酸钠稀释并定容至刻度。

B.1.3 菌种生长培养基配制

称取 4.7 g 叶酸酪蛋白培养基，量取 100 mL 水溶解，加入 50 mg 抗坏血酸、20 μ L 吐温 80，混匀，121 $^{\circ}$ C 高压 5 min，冷却至室温后，无菌操作加入 20 mg 氯霉素 (6.67 mL 滤膜过滤后的氯霉素储备液)、15 ng 叶酸 (加入 150 μ L 滤膜过滤后的 100 ng/mL 的叶酸标准品工作液)，混匀，用 50 mL 离心管分装后 -20 $^{\circ}$ C 保存备用，有效期 2 个月。

B.2 叶酸检测培养基

B.2.1 试剂

B.2.1.1 叶酸酪蛋白培养基。

B.2.1.2 吐温 80 (Tween 80)。

B.2.1.3 抗坏血酸 ($C_6H_8O_6$)。

B.2.1.4 硫酸锰 ($MnSO_4$)。

B.2.2 试剂配制

称取 7.05 g 叶酸酪蛋白培养基，量取 100 mL 水溶解，加入 3 mg 氯霉素 (1 mL 氯霉素储备液)、30 μ L 吐温 80，混匀，加热煮沸。冷却至室温后，加 75 mg 抗坏血酸、15 mg 硫酸锰，混匀，备用，或 -20 $^{\circ}$ C 保存，有效期 2 个月。

附 录 C

(规范性)

菌种的活化制备与保存

C.1 接种培养

将 1 mL 鼠李糖乳杆菌菌种接种于 20 mL 菌种生长培养基，充分摇匀后，于 $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内，旋紧离心管瓶盖密闭培养 24 h。

C.2 活化培养

取 $100\text{ }\mu\text{L} \sim 300\text{ }\mu\text{L}$ 培养 24 h 的菌液接种于另一支 20 mL 菌种生长培养基，充分摇匀后，于 $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内密闭培养 24 h（该步骤重复进行 3 次）。

C.3 保存

取 C.2 操作后的菌液 2 mL 至 20 mL 菌种生长培养基，于 $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内密闭培养 20 h 后与无菌的 80 % 甘油 1 : 1 混合，即为活化的储备菌种，EP 管分装，每管 $500\text{ }\mu\text{L}$ ， $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存。