

临床质谱检测血清中 9 种水溶性维生素

LCMSMS-773

摘要：使用岛津临床质谱建立了血清中 9 种水溶性维生素的检测方法。该方法线性良好，校准曲线相关系数均大于 0.99；质控测定的准确度均在 89.90%~105.40% 之间；质控测定的精密度 RSD 均在 1.02%~4.69% 之间。该方法检测效率高、准确性好、可靠性出色，可用于人体内水溶性维生素的精准检测，为临床医学提供参考依据。

关键词：临床质谱 血清 水溶性维生素

技术特点：

- ❖ 前处理简便快捷，仅需简单蛋白沉淀即可上样分析。
- ❖ 一针法同时测定 9 种水溶性维生素。

维生素是维持人体正常生理功能的微量有机物质，在人体生长、代谢、发育过程中发挥重要作用。水溶性维生素是维生素的一类，可溶于水而不溶于有机溶剂，在人体内不需消化，直接从肠道吸收后，通过循环到达机体需要的组织中，多余的部分大多由泌尿系统排出。

水溶性维生素主要由八种 B 族维生素和维生素 C 组成。维生素 B1，即硫胺素，也叫抗神经炎素，具有维持正常糖代谢的作用。维生素 B2，即核黄素，主要以辅酶形式参与氧化还原反应。维生素 B3，有烟酸和烟酰胺两种形式，在人体内可相互转化，烟酰胺（NAM）是辅酶 I 和辅酶 II 的组成部分，作为许多脱氢酶的辅酶，缺乏时可影响细胞的正常呼吸和代谢而引起糙皮病。维生素 B5，即泛酸，可在人体内转变成辅酶 A 或酰基载体蛋白参与脂肪酸代谢反应。维生素 B6，即吡哆素，包括吡哆醇、吡哆醛及吡哆胺，在人体中上述物质约 90% 很快转变为代谢产物吡哆酸（PA）；临床上应用维生素 B6 制剂防治妊娠呕吐和放射病呕吐。维生素 B7，即生物素，是脂肪和蛋

白质正常代谢不可或缺的物质。维生素 B9，即叶酸，在蛋白质合成及细胞分裂与生长过程中具有重要作用，对正常红细胞的形成有促进作用，而在血清中主要以 5-甲基四氢叶酸（5-MTHF）的活性形式发挥作用。维生素 B12，即钴胺素，特指氰钴胺，稳定性最好，此外还有甲钴胺、羟钴胺和腺苷钴胺等形式，参与制造骨髓红细胞，具有防止恶性贫血，防止大脑神经受到破坏的生理作用。维生素 C，即抗坏血酸，参与机体复杂的代谢过程，能促进生长和增强对疾病的抵抗力，可用作营养增补剂、抗氧化剂。

水溶性维生素的检测主要包括微生物法、光度法、毛细管电泳法、超临界流体色谱法、液相色谱法和液相色谱-质谱联用等方法。而质谱法目前是公认的“金标准”。

本文使用岛津液相色谱-三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8050 CL 建立了血清中 9 种水溶性维生素的测定方法，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于人体内水溶性维生素的精准检测。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 CL。具体配置为：

系统控制器：CBM-20A CL

在线脱气机：DGU-20A_{5R} CL

输液泵：LC-30AD CL×2

柱温箱：CTO-30A CL

自动进样器：SIL-30AC_{MP} CL

质谱仪：LCMS-8050 CL

色谱工作站：Labsolutions CL

1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱： Shim-pack GIST-HP 2.1×100 mm(HSS), 1.9 μm C18-AQ;
 P/N: 227-30807-02; 岛津(上海)实验器材有限公司

流 动 相： A-0.1% 甲酸水溶液 (含 2 mM 乙酸铵);
 B-0.1% 甲酸甲醇溶液 (含 2 mM 乙酸铵)

进 样 体 积： 10 μL 柱 温： 45°C

流 速： 0.3 mL/min 洗 针 液： 甲醇 / 水 =1:1 (v:v)

洗 脱 方 式： 梯度洗脱, B 相起始浓度为 1%, 时间程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
1.5	泵	B.Conc	1
2.00	泵	B.Conc	40
4.80	泵	B.Conc	40
4.81	泵	B.Conc	98
8.00	泵	B.Conc	98
8.01	泵	B.Conc	1
11.00	控制器	Stop	

质谱条件

离子化模式： ESI+

雾化气流速： 3.0 L/min

接口电压： 4.5 kV

干燥气流速： 5.0 L/min

接口温度： 350°C

加热气流速： 9.0 L/min

D L 温度： 150°C

碰撞气： 氦气

加热模块温度： 400°C

扫描模式： 多反应监测 (MRM)

MRM 参数： 见表 2

表 2 MRM 参数

ID	化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	维生素 B1	265.20	122.15	-12	-13	-12
2	维生素 B1-D3	268.20	122.05	-12	-13	-12
3	维生素 B2	377.30	243.20	-18	-23	-24
4	维生素 B2-D6	383.15	249.20	-18	-23	-24
5	维生素 B3-NAM	123.00	80.10	-12	-21	-13
6	维生素 B3-NAM-D4	127.10	84.10	-12	-21	-13
7	维生素 B5	220.20	90.05	-24	-14	-14
8	维生素 B5-D4	224.20	94.20	-24	-14	-14
9	维生素 B6-PA	184.20	148.05	-19	-21	-14
10	维生素 B6-PA-D3	187.20	150.15	-19	-21	-14
11	维生素 B7	245.20	227.20	-12	-13	-22
12	维生素 B7-D2	247.20	229.10	-12	-13	-22

13	维生素 B9-5-MTHF	460.00	313.10	-22	-20	-20
14	维生素 B9-5-MTHF-D4	464.30	317.25	-22	-20	-20
15	维生素 B12	678.40	147.15	-24	-47	-14
16	维生素 C	177.20	141.10	-18	-9	-13
17	维生素 C-D6	183.06	100.11	-18	-9	-13

1.3 替代基质溶液的配制

精确称取 BSA（牛血清白蛋白）0.5 g，NaCl 0.9 g，DTT（二硫苏糖醇）0.02 g 充分溶解于适量纯化水中，将溶液倒入 100 mL 容量瓶中，加纯化水定容至刻度。使用 0.22 μm 滤膜过滤后即得替代基质溶液。

1.4 校准品溶液的配制

校准储备溶液：精确称取标准品适量，用含 0.1% 甲酸，及 0.2 g/L DTT 的水溶液配制成含不同浓度维生素的混合储备溶液，具体浓度见表 3。

表 3 标准储备溶液浓度

序号	成分名称	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	序号	成分名称	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)
1	维生素 B1	20	6	维生素 B7	10
2	维生素 B2	50	7	维生素 B9-5-MTHF	50
3	维生素 B3-NAM	200	8	维生素 B12	10
4	维生素 B5	200	9	维生素 C	50000
5	维生素 B6-PA	50			

校准工作溶液：取适量标准储备溶液，用替代基质溶液逐级稀释，配制不同浓度的工作溶液，具体浓度见表 4。（注：校准工作溶液建议现配现用）

表 4 标准工作溶液浓度

序号	成分名称	浓度 (ng/mL)						
		STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7
1	维生素 B1	0.31	0.63	1.25	2.50	5.00	10.00	20.00
2	维生素 B2	0.78	1.56	3.13	6.25	12.50	25.00	50.00
3	维生素 B3-NAM	3.13	6.25	12.50	25.00	50.00	100.00	200.00
4	维生素 B5	3.13	6.25	12.50	25.00	50.00	100.00	200.00
5	维生素 B6-PA	0.78	1.56	3.13	6.25	12.50	25.00	50.00
6	维生素 B7	0.16	0.31	0.63	1.25	2.50	5.00	10.00
7	维生素 B9-5-MTHF	0.78	1.56	3.13	6.25	12.50	25.00	50.00
8	维生素 B12	0.16	0.31	0.63	1.25	2.50	5.00	10.00
9	维生素 C	780	1560	3130	6250	12500	25000	50000

1.5 内标溶液的配制

内标储备溶液：使用含 0.1% 甲酸，及 0.2 g/L DTT 的水溶液制成浓度为 1 mg/mL 的每种内标的单储备溶液。

内标中间溶液：使用含 0.1% 甲酸，及 0.2 g/L DTT 的水溶液稀释内标储备溶液，配制成含不同浓度维生素内标的混合中间溶液，具体浓度见表 5。

表 5 内标中间溶液浓度

序号	成分名称	浓度 (µg/mL)	序号	成分名称	浓度 (µg/mL)
1	维生素 B1-D3	2.5	5	维生素 B6-PA-D3	6.25
2	维生素 B2-D6	6.25	6	维生素 B7-D2	1.25
3	维生素 B3-NAM-D4	25	7	维生素 B9-5-MTHF-D4	6.25
4	维生素 B5-D4	25	8	维生素 C-D6	6250

内标工作溶液：使用 10% 三氯乙酸 (w/v) 将内标中间溶液稀释 1000 倍，制成内标工作溶液，直接用于前处理操作。（注：内标工作溶液建议现配现用）

1.6 质控品溶液的配制

质控储备溶液：精确称取标准品适量，用含 0.1% 甲酸，及 0.2 g/L DTT 的水溶液配制成含不同浓度维生素的混合储备溶液，具体浓度见表 6。

表 6 质控储备溶液浓度

序号	成分名称	浓度 (µg/mL)	序号	成分名称	浓度 (µg/mL)
1	维生素 B1	10	6	维生素 B7	5
2	维生素 B2	25	7	维生素 B9-5-MTHF	25
3	维生素 B3-NAM	100	8	维生素 B12	5
4	维生素 B5	100	9	维生素 C	25000
5	维生素 B6-PA	25			

质控工作溶液：取适量质控储备溶液，用替代基质溶液分别稀释 2500 倍和 1000 倍，配制成高低两浓度的工作溶液，具体浓度见表 7。（注：质控工作溶液建议现配现用）

表 7 质控工作溶液浓度

序号	成分名称	浓度 (ng/mL)		序号	成分名称	浓度 (ng/mL)	
		LQC	HQC			LQC	HQC
1	维生素 B1	4	10	6	维生素 B7	2	5
2	维生素 B2	10	25	7	维生素 B9-5-MTHF	10	25
3	维生素 B3-NAM	40	100	8	维生素 B12	2	5
4	维生素 B5	40	100	9	维生素 C	10000	25000
5	维生素 B6-PA	10	25				

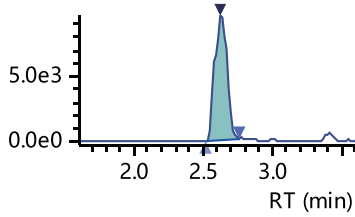
1.7 样品前处理

取校准工作溶液、质控工作溶液以及血清样品（提前加入终浓度 0.2 g/L 的 DTT）各 150 µL 于棕色 1.5 mL 离心管中，分别加入 100 µL 内标工作溶液，漩涡振荡 5 min。然后 13000 rpm 离心 10 min，取上清液于棕色 1.5 mL 进样瓶中，上机检测。

■ 结果讨论

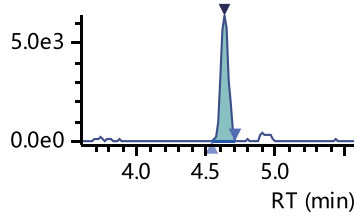
2.1 MRM 色谱图

Q 265.2000>122.1500 (+) 9.67e3



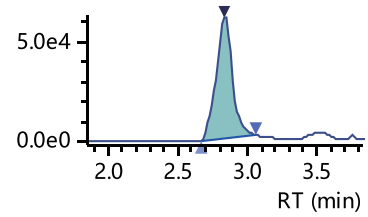
维生素 B1 (0.31 ng/mL)

Q 377.3000>243.2000 (+) 6.43e3



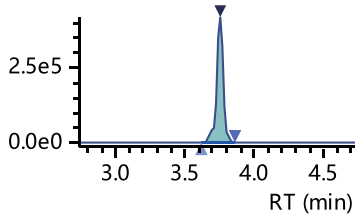
维生素 B2 (0.78 ng/mL)

Q 123.0000>80.1000 (+) 6.37e4



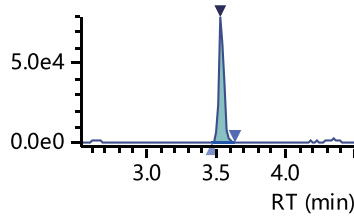
维生素 B3-NAM (3.13 ng/mL)

Q 220.2000>90.0500 (+) 4.20e5



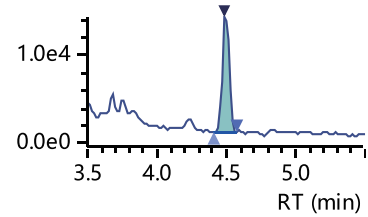
维生素 B5 (3.13 ng/mL)

Q 184.2000>148.0500 (+) 7.94e4



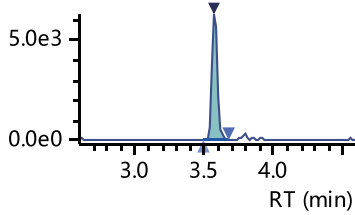
维生素 B6-PA (0.78 ng/mL)

Q 245.2000>227.2000 (+) 1.44e4



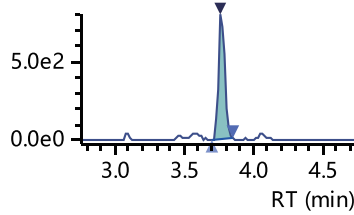
维生素 B7 (0.16 ng/mL)

Q 460.0000>313.1000 (+) 6.30e3



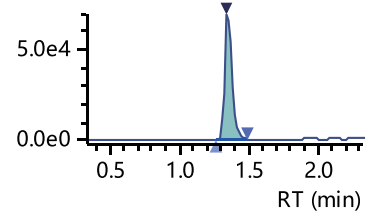
维生素 B9-5-MTHF (0.78 ng/mL)

Q 678.4000>147.1500 (+) 8.00e2



维生素 B12 (0.16 ng/mL)

Q 177.2000>141.1000 (+) 6.96e4

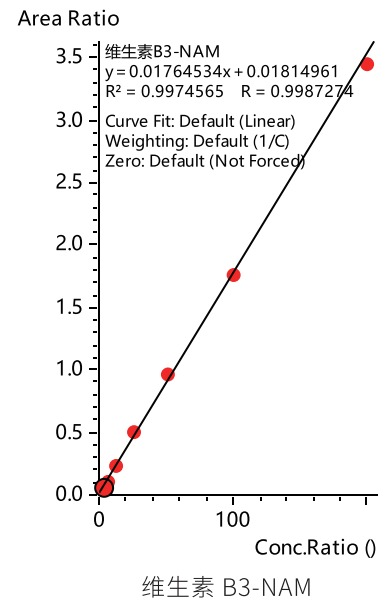
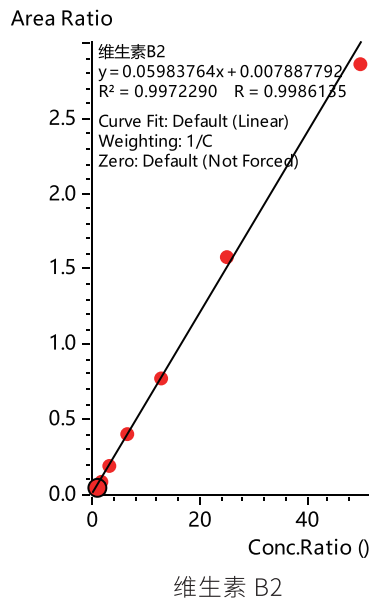
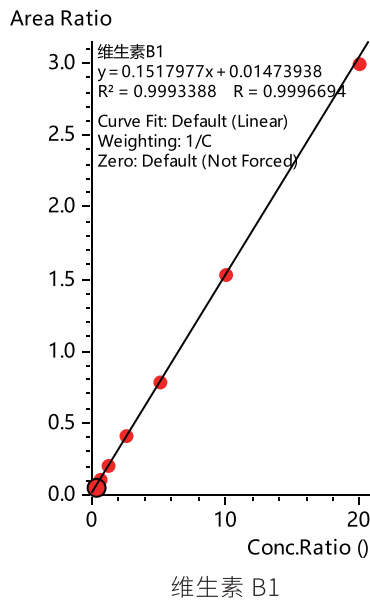


维生素 C (0.78 μg/mL)

图 1 校准曲线最低点 MRM 色谱图

2.2 校准曲线

对校准工作溶液按 1.7 中前处理条件进行处理，按 1.2 中的分析条件进行分析，内标法制作校准曲线。9 种水溶性维生素的校准曲线见图 2，校准曲线统计结果见表 8。



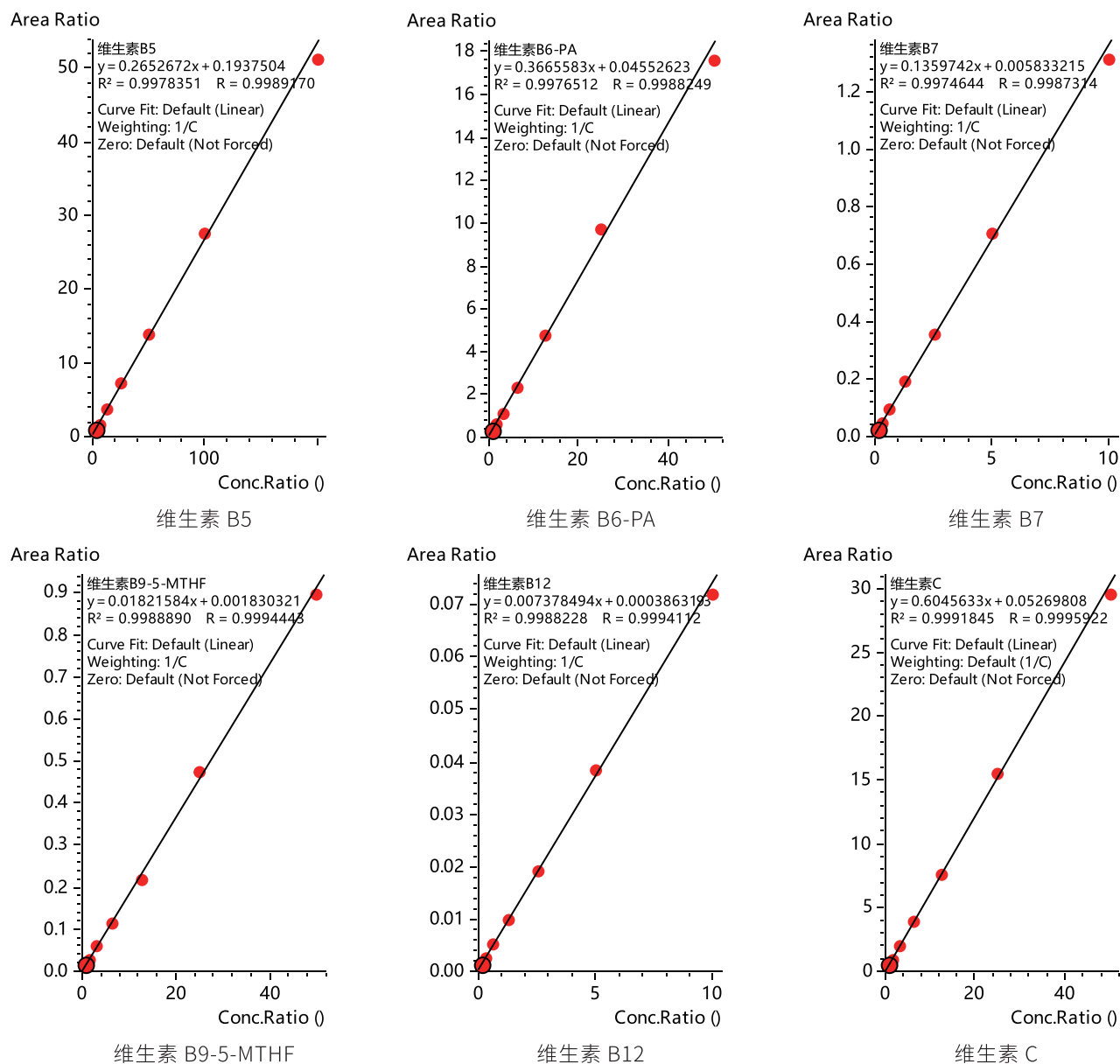


图 2 9 种水溶性维生素的校准曲线

表 8 校准曲线统计结果

序号	化合物名称	线性范围 (ng/mL)	相关系数	准确度 (%)
1	维生素 B1	0.31~20.00	0.9997	88.91%~105.45%
2	维生素 B2	0.78~50.00	0.9986	87.20%~107.21%
3	维生素 B3-NAM	3.13~200.00	0.9987	87.34%~110.37%
4	维生素 B5	3.13~200.00	0.9989	88.09%~108.68%
5	维生素 B6-PA	0.78~50.00	0.9988	94.21%~105.78%
6	维生素 B7	0.16~10.00	0.9987	86.35%~110.41%
7	维生素 B9-5-MTHF	0.78~50.00	0.9994	92.34%~105.45%
8	维生素 B12	0.16~10.00	0.9994	88.74%~105.37%
9	维生素 C	780~50000	0.9996	93.80%~105.00%

2.3 准确度及精密度考察结果

使用高低两浓度的质控工作溶液，每个浓度重复制备 6 份样品，按 1.7 中前处理条件进行处理，按 1.2 中的分析条件进行分析。质控的准确度及精密度考察结果如表 9 所示。

表 9 质控准确度及精密度考察结果 (n=6, 浓度单位 ng/mL)

序号	化合物名称	LQC				HQC			
		理论浓度	实测浓度均值	准确度 %	RSD%	理论浓度	实测浓度均值	准确度 %	RSD%
1	维生素 B1	4	3.89	97.25	1.02	10	9.11	91.10	1.84
2	维生素 B2	10	8.99	89.90	2.92	25	23.37	93.48	4.05
3	维生素 B3-NAM	40	38.44	96.10	2.30	100	95.17	95.17	1.59
4	维生素 B5	40	37.92	94.80	1.40	100	97.60	97.60	1.72
5	维生素 B6-PA	10	9.65	96.50	4.69	25	25.00	100.00	3.92
6	维生素 B7	2	1.94	97.00	1.26	5	4.94	98.80	1.26
7	维生素 B9-5-MTHF	10	9.25	92.50	2.58	25	24.6	98.40	3.05
8	维生素 B12	2	1.94	97.00	2.85	5	5.27	105.40	3.48
9	维生素 C	10000	9200	92.00	2.26	25000	25220	100.88	2.17

2.4 临床样品测定结果

使用三批次正常人血清样品，按 1.7 中前处理条件进行处理，按 1.2 中的分析条件进行分析。结果如图 3 和表 10 所示。

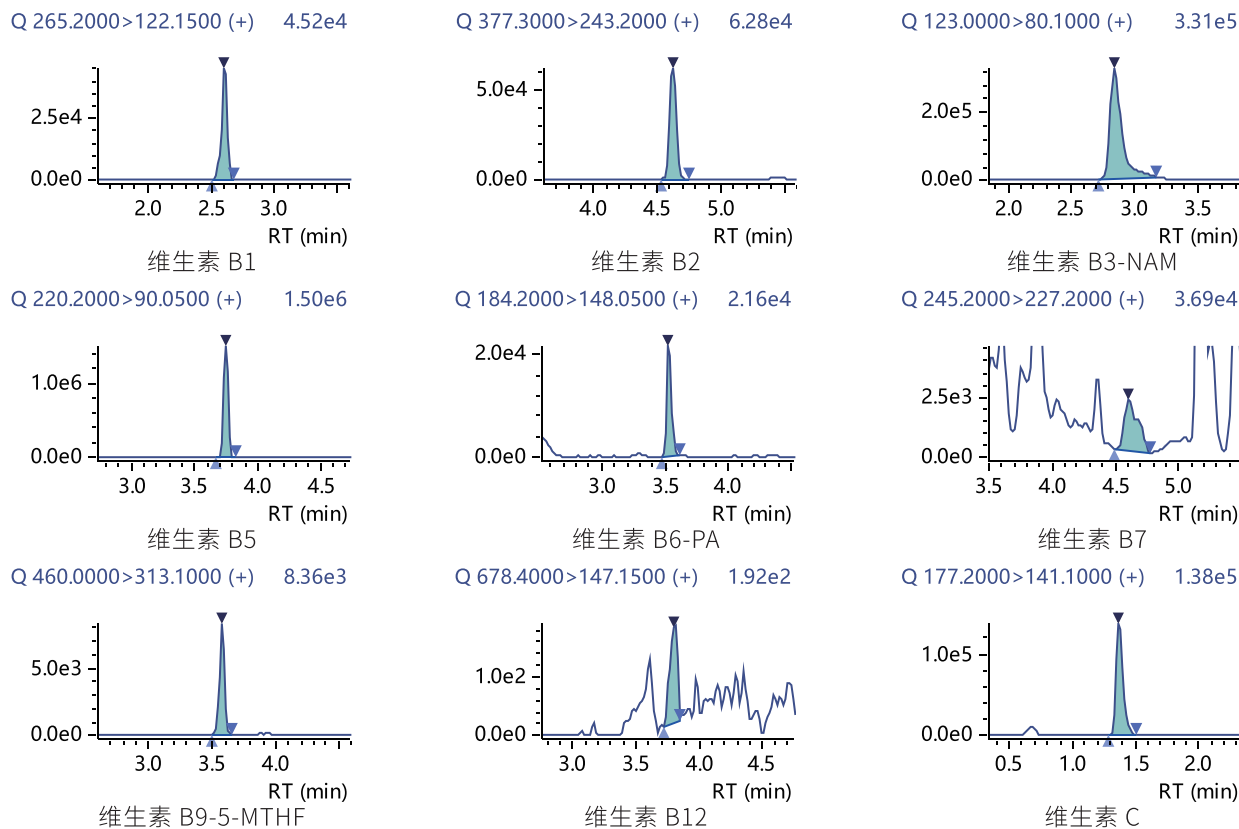


图 3 临床样品 Sample-01 谱图

表 10 临床样品检测结果 (ng/mL)

序号	化合物名称	Sample-01	Sample-02	Sample-03
1	维生素 B1	1.31	1.35	0.85
2	维生素 B2	12.29	15.73	7.19
3	维生素 B3-NAM	40.48	25.35	16.79
4	维生素 B5	44.99	42.38	46.01
5	维生素 B6-PA	2.57	1.81	2.09
6	维生素 B7	0.66	0.50	0.38
7	维生素 B9-5-MTHF	4.84	3.87	4.61
8	维生素 B12	0.56	0.08	0.13
9	维生素 C	4710	4110	5320

■ 结论

使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 CL，建立了血清中 9 种水溶性维生素的检测方法。使用校准品及质控进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性良好，质控测定准确度结果与精密度结果均符合要求。临床样品检测结果显示，方法适用性良好。

该方法简便快速、准确可靠，可供相关从业人员参考。

岛津应用云

