

LC-MS/MS 用于脂溶性维生素试剂盒的验证

LCMSMS-962

摘要： 本文使用岛津液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050RX 及贝知上海医疗科技有限公司脂溶性维生素试剂盒，建立了人血清中脂溶性维生素的测定方法。使用试剂盒内标、标准品及质控品进行了方法的线性、精密度和准确度的考察。结果显示方法的专属性良好，线性相关系数均大于 0.99，每日 10 针连续进样的批内 CV% 在 1.11 ~ 6.86% 之间，连续 3 天的批间 CV% 在 0.16 ~ 2.97%，准确度以及精密密度均满足临床检测的要求。

关键词： LCMS-8050RX 脂溶性维生素 试剂盒

技术特点：

- ❖ 验证脂溶性维生素试剂盒，该方法各项结果满足临床检测要求。
- ❖ 批内 CV% 在 1.11 ~ 6.86% 之间，连续 3 天批间 CV% 在 0.16 ~ 2.97%，稳定性好。

脂溶性维生素是人体保持最佳新陈代谢状态所必需的微量营养素，主要包括维生素 A、维生素 D、维生素 E 和维生素 K 四种。随着研究的深入，脂溶性维生素的作用早已不局限于人们的初步认识，比如夜盲症（维生素 A 缺乏）、骨软化症（维生素 D 缺乏）、氧化应激异常（维生素 E 缺乏）和异常出血（维生素 K 缺乏）等，而是发现脂溶性维生素的异常变化与越来越多的疾病及其他生理状态有关。有研究表明 VA 可促进免疫系统发育，增强免疫能力，其含量低甚至与成人早期肥胖有关；维生素 D 在某些精

神性疾病和糖尿病的预防方面有一定作用；适宜浓度的 VE 对癌症预防和糖尿病肾病、非酒精性脂肪肝的治疗有所帮助；维生素 K 则与儿童的矮小症和成人的冠心病有一定关联。因此建立一种快速、准确的临床检测多种脂溶性维生素的方法愈发重要，这将大大加快人们研究以及运用各种脂溶性维生素的进程。

随着对于脂溶性维生素检测的需求越来越多，各种商品化的试剂盒也应运而生，因此本文使用 LC-MS/MS 对市售的脂溶性维生素试剂盒进行了验证，为后续使用试剂盒的用户提供参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪 LC-40 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050RX 联用系统。具体配置为：

系统控制器：	CBM-40	质谱仪：	LCMS-8050RX
输液泵：	LC-40B X3×2	自动进样器：	SIL-40C X3
柱温箱：	CTO-40C	色谱工作站：	LabSolutions Ver.5.128

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：	脂溶性维生素专用柱		
流动相：	A-0.2 mM 乙酸铵水溶液（含 0.1% 甲酸）；B-0.1% 甲酸甲醇溶液		
流速：	0.5 mL/min	柱温：	40°C
进样体积：	5 μ L		
洗脱方式：	梯度洗脱，B 相初始浓度为 80%，初始“Oven Valve 2”值设置为“0”，具体时间程序见表 1。		

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.60	Pump	B.Conc	80
2.00	Pump	B.Conc	98
2.00	柱温箱	Oven Valve 2	1
4.00	Pump	B.Conc	98
4.01	Pump	B.Conc	80
5.00	柱温箱	Oven Valve 2	0
5.50	Control	Stop	

*注：“0”号阀位进废液，“1”号阀位进质谱

质谱条件

离子化模式：CoreSpray (+)	接口电压：4.0 kV
雾化气流速：5.0 L/min	接口温度：280°C
加热模块温度：350°C	干燥气流速：10 L/min
D L 温度：200°C	加热气流速：10 L/min
MRM 参数：见表 2	扫描模式：多反应监测 (MRM)

表 2 MRM 参数

No.	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	VA	269.1*	93.1	-14	-45	-10
		269.1	119.2	-12	-45	-13
2	VA-IS	275.3	122.1	-14	-21	-19
3	25(OH)D2	413.3*	337.3	-21	-13	-25
		413.2	355.3	-12	-12	-17
4	25(OH)D2-IS	416.3	298.3	-12	-13	-21
5	25(OH)D3	383.3*	257.2	-30	-15	-27
		383.3	107.2	-14	-32	-11
6	25(OH)D3-IS	404.3	386.3	-12	-12	-26
7	VE	431.3*	165.3	-5	-55	-24
		431.3	137.1	-13	-30	-30
8	VE-IS	437.4	171.1	-14	-55	-12
9	VK1	451.4*	187.1	-13	-27	-20
		451.4	197.0	-23	-25	-21
10	VK1-IS	458.5	194.1	-12	-23	-19

*代表定量离子对。

1.3 标准品、质控品及样品制备

使用脂溶性维生素检测试剂盒（液相色谱 - 串联质谱法，贝知上海医疗科技有限公司）

样品、校准品、质控品溶液配制：

- 1) 精密移取 200 μL 样品（校准品、质控品、血清样本）与 96 孔深孔板中；
- 2) 精密加入 20 μL 内标液溶液，涡旋 5 min；
- 3) 加入稀释液 1 mL，旋转混匀 10 min；
- 4) 12000 rpm/min，离心 5 min；
- 5) 转移 800 μL 上清液至 96 孔板，转移时切勿触碰底部沉淀；
- 6) 将 96 孔板液置于氮吹仪吹干；
- 7) 吹至透明无液体后，每孔中加入 100 μL 甲醇复溶，盖膜密闭，漩涡器振荡 2 min；
- 8) 上机检测。

■ 结果与讨论

2.1 MRM 色谱图

各化合物的定量限浓度色谱图如图 1 所示。

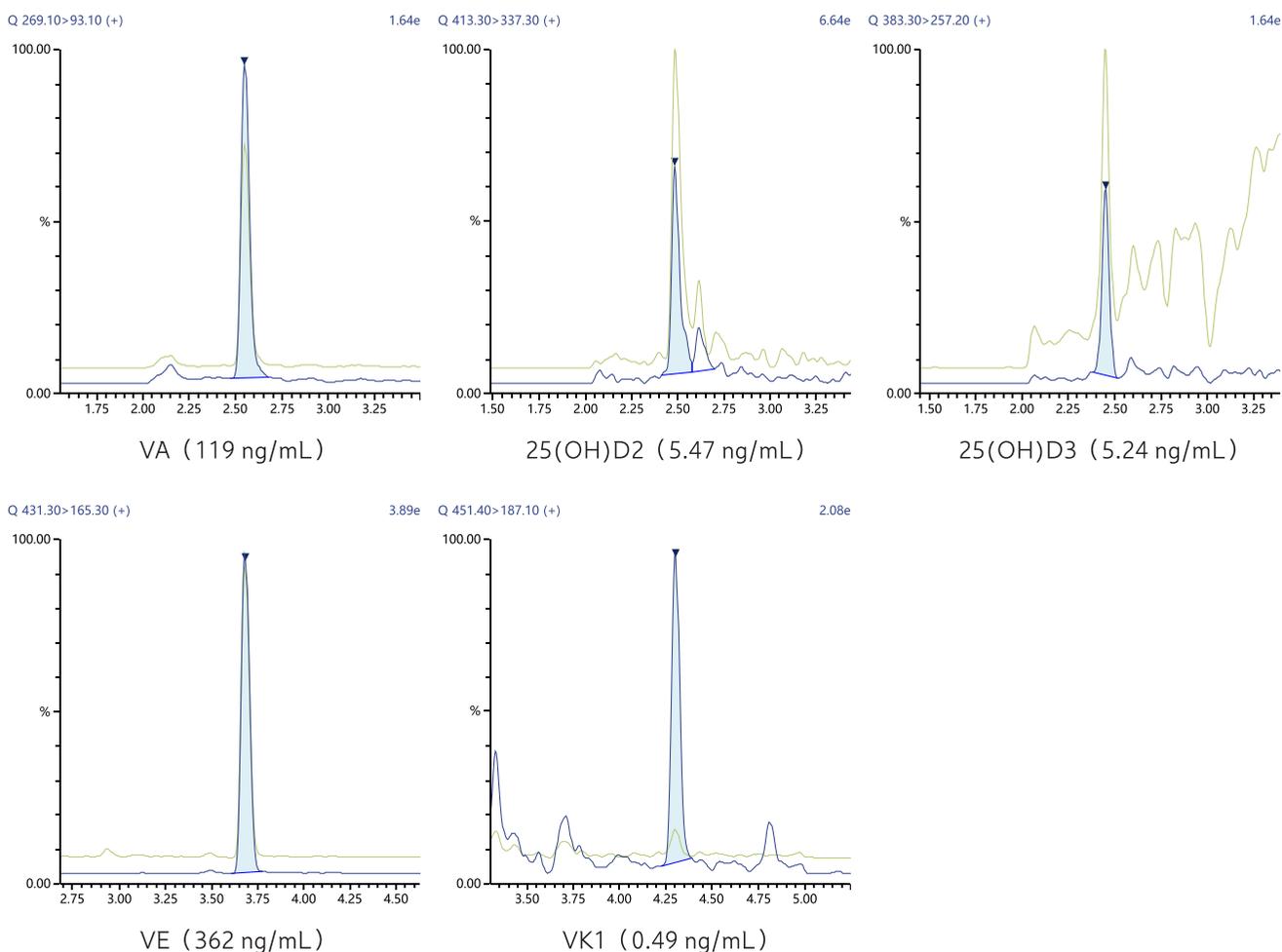


图 1 标准曲线最低点 MRM 色谱图

2.2 校准曲线

采用内标法建立校准曲线，结果图 2 和表 3 所示。五种化合物在各自线性浓度范围内均线性良好，相关系数均大于 0.99。

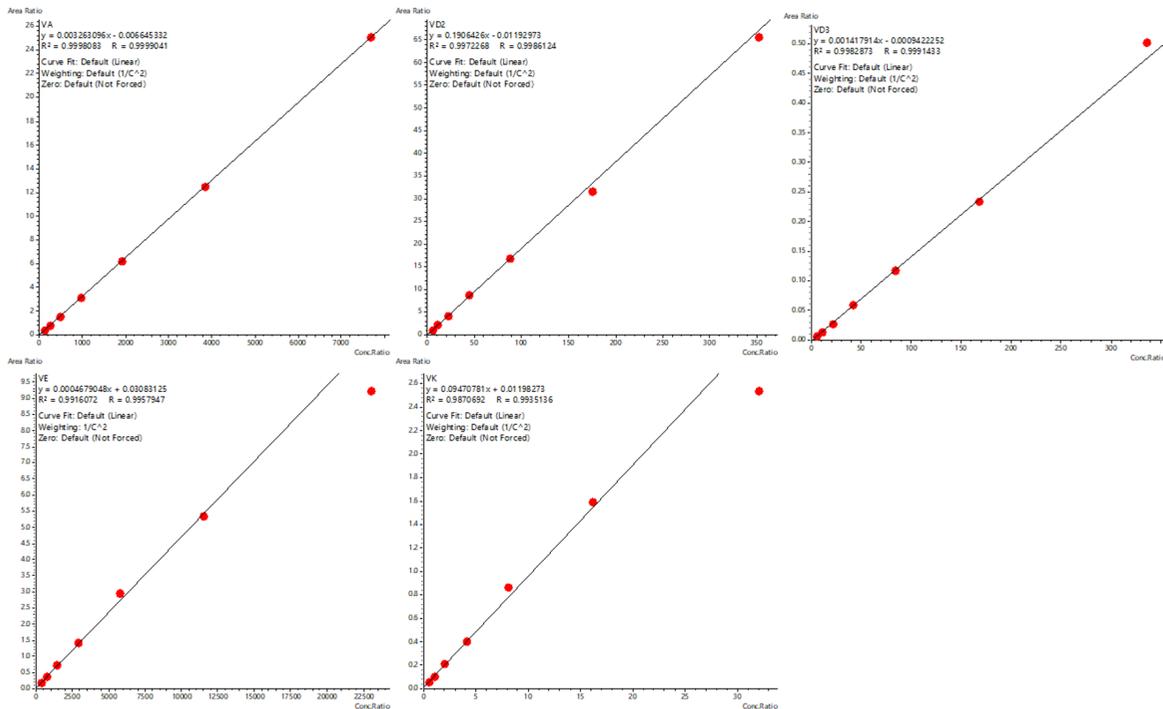


图 2 标准曲线结果

表 3 校准曲线结果

No.	目标物	线性范围 (ng/mL)	相关系数 (r)	精密度 (%)
1	VA	119 ~ 7686	0.9999	98.27 ~ 102.02
2	25(OH)D2	5.47 ~ 352.23	0.9986	94.54 ~ 106.22
3	25(OH)D3	5.24 ~ 335.72	0.9991	96.13 ~ 105.70
4	VE	362 ~ 23028	0.9957	85.31 ~ 108.66
5	VK1	0.49 ~ 32.03	0.9935	83.22 ~ 111.06

2.3 质控样本准确度

按照 1.2 中的分析条件和 1.3 中前处理方法对质控品进行分析, 每个浓度点平行配制 5 个样, 依次进行分析, 结果如表 4 所示。质控品的准确度在 90.89% ~ 101.11%, 精密度 CV% 在 1.50~5.89%。

表 4 质控品分析结果 (n=5)

质控	项目	VA	25(OH)D2	25(OH)D3	VE	VK1
LQC	理论值 (ng/mL)	719.00	33.02	31.48	2160.00	3.05
	平均测定浓度 (ng/mL)	704.92	30.69	31.83	2104.44	2.83
	平均回收率 (%)	98.04	92.93	101.11	97.43	92.89
	CV(%)	2.53	4.46	4.84	4.45	3.72
MQC	理论值 (ng/mL)	1437.00	66.07	63.31	4310.00	6.02
	平均测定浓度 (ng/mL)	1409.37	63.23	62.76	4180.98	5.75
	平均回收率 (%)	98.08	95.70	99.12	97.01	95.59
	CV(%)	1.50	5.89	2.90	3.72	3.26

HQC	理论值 (ng/mL)	2876.00	131.66	125.49	8630.00	11.98
	平均测定浓度 (ng/mL)	2786.61	123.17	126.06	8070.32	10.89
	平均回收率 (%)	96.89	93.55	100.45	93.51	90.89
	CV(%)	2.79	5.26	1.61	3.30	3.34

2.4 精密度验证

由于维生素 K1 稳定性较差, 故选择了其中 4 种物质进行精密度的考察, 选择了某一浓度的标准品按照 1.3 中的前处理方法进行处理, 平行配置多份后混匀, 将混匀后的溶液分为 3 份。每天选取一份溶液进行连续 10 针的测试后关机, 后一天再激活仪器进行连续进样分析, 按照此操作连续分析 3 天。结果如表 5 所示, 每日 10 针连续进样的批内 CV% 在 1.11 ~ 6.86% 之间, 连续 3 天的批间 CV% 在 0.16 ~ 2.97%, 三天的总 CV% 在 1.75 ~ 6.50%, 精密度良好。

表 5 精密度验证结果 (批内 n=10, 批间 n=3)

名称	时间	面积比均值	批内 CV(%)	批间 CV(%)	总 CV(%)	面积比总均值
VA	Day1	6.208	2.14			
	Day2	6.192	2.00	0.16	1.75	6.197
	Day3	6.191	1.11			
25(OH)VD2	Day1	9.140	5.52			
	Day2	8.756	6.86	2.97	6.50	9.056
	Day3	9.273	6.29			
25(OH)VD3	Day1	0.206	4.30			
	Day2	0.216	4.25	2.77	4.53	0.213
	Day3	0.216	3.55			
VE	Day1	22.330	3.58			
	Day2	22.189	2.15	0.40	3.07	22.228
	Day3	22.166	3.53			

■ 结论

本文使用岛津液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050RX 及贝知上海医疗科技有限公司脂溶性维生素试剂盒, 建立了人血清中 5 种脂溶性维生素的测定方法。使用试剂盒内标、标准品及质控品进行了方法的线性、精密度和准确度的考察。采用内标法定量, 五种化合物在各自线性浓度范围内均线性良好, 相关系数均大于 0.99; 考察了方法的准确度, 低中高浓度点的准确度在 90.89% ~ 101.11%, 精密度 CV% 在 1.50~5.89%; 考察了精密度, 连续 3 天, 每天进行了 10 针的连续进样分析, 每日 10 针连续进样的批内 CV% 在 1.11 ~ 6.86% 之间, 连续 3 天的批间 CV% 在 0.16 ~ 2.97%, 三天的总 CV% 在 1.75 ~ 6.50%, 均满足临床检测的要求。

岛津应用云

