

串联质谱用于血清中脂溶性维生素含量测定

LCMSMS-554

摘要：使用串联质谱建立了血清中 VA、25OHVD2、25OHVD3、VE 和 VK1 同时测定方法，使用内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性良好，标准曲线相关系数均大于 0.996，质控品测定准确度结果与理论值接近，回收率在 94%~108% 之间，RSD 在 1.9%~6.2% 之间，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于血清脂溶性维生素含量测定。

关键词：串联质谱 脂溶性维生素 血清

脂溶性维生素 (fat-soluble vitamins) 是不溶于水而溶于脂肪及非极性有机溶剂 (如苯、乙醚及氯仿等) 的一类维生素，包括维生素 A(VA)、维生素 D(VD)、维生素 E(VE) 和维生素 K1(VK1)。维生素 A 缺乏引起夜盲症、上皮干燥、增生及角化，眼干燥症等。维生素 D，俗称“阳光维生素”，主要生理功能是将血钙和血磷水平维持在正常范围内，对于维持钙的代谢和骨骼健康至关重要。血清中 25-羟基维生素 D2(25OHVD2) 和 25-羟基维生素 D3(25OHVD3) 的浓度测量，已经应用于监控人体内维生素 D 的状况及低血钙代谢性骨疾病和高血钙代谢性骨疾病的鉴别诊断。维生素 E 具有抗衰老、抗癌及防止动脉粥样硬化作用，促进生殖功能使促性腺激素分泌增加，参与多种酶活动增强微粒体

中混合功能氧化酶的活性。维生素 K1 可以促进肝脏合成四种凝血因子，凝血酶原、转变加速因子，抗血友病因子，促进血液凝固，并可以舒张内脏平滑肌，缓解肾绞痛、胆绞痛、泌尿系出血。由于遇光遇热不稳定，且血清中含有大量干扰物质等，血清中脂溶性维生素的测定十分困难，一针法同时测定脂溶性维生素更是鲜有报道。

本文使用超高效液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8045，建立了血清中 VA、25OHVD2、25OHVD3、VE 和 VK1 同时测定方法，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于脂溶性维生素含量测定。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用超高效液相色谱与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为：

输液泵：LC-40D XR×2

在线脱气机：DGU-405

自动进样器：SIL-40C XR

柱温箱：CTO-40C

系统控制器：CBM-40

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GIST 50 mm×2.1 mm I.D.,
2 μm; P/N: 227-30001-02; 岛津 (上海)
实验器材有限公司

流动相：A: 0.1% 甲酸水 (含 2 mM 乙酸铵)

B: 0.1% 甲酸甲醇 (含 2 mM 乙酸铵)

柱温：40°C

流速：0.4 mL/min

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 70%，洗脱程序见表 1。

进样量：10 μL

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.20	泵	B.Conc	70
1.50	泵	B.Conc	100
5.50	泵	B.Conc	100
5.51	泵	B.Conc	70
7.00	控制器	Stop	

质谱条件:

分析仪器: LCMS-8045

离子源: ESI (+)

雾化气流速: 3.0 L/min

干燥气流速: 10.0 L/min

加热器流速: 10.0 L/min

DL 温度: 150°C

加热模块温度: 500°C

离子源温度: 300°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
VA	269.3	93.2	-14	-21	-19
	269.3	119.2	-14	-21	-12
VA-IS	274.3	93.2	-14	-21	-19
25OHVD2	413.3	337.3	-11	-12	-12
	413.3	355.3	-13	-10	-25
25OHVD2-IS	419.3	355.5	-13	-10	-25
25OHVD3	401.3	365.3	-12	-12	-26
	401.3	257.0	-10	-14	-12
25OHVD3-IS	407.4	371.4	-12	-12	-26
VE	431.4	137.1	-12	-20	-24
	431.4	165.1	-13	-65	-30
VE-IS	437.4	143.1	-12	-20	-24
VK1	451.4	187.1	-12	-23	-19
	451.4	197.0	-12	-26	-13
VK1-IS	458.5	194.1	-12	-23	-19

1.3 标准品及样品制备

基质匹配标准曲线制备: 取 5 种脂溶性维生素混标母液, 用甲醇稀释成相应浓度混标液。内标溶液使用乙腈: 甲醇 =9: 1 溶液配置成内标工作液。取 180 μ L 5%BSA 溶液, 20 μ L 混标液, 涡旋混匀 10 s, 得替代基质标准溶液。

标准品及样品溶液制备: 取 200 μ L 替代基质标准溶液或样品, 400 μ L 内标工作液, 涡旋混匀 1 min, 加入 1 mL 正己烷, 涡旋混匀 1 min, 4000 rpm 离心 5 min, 取 800 μ L 上清液, 室温氮气吹干, 复溶后上机测定。

■ 结果讨论

2.1 MRM 色谱图

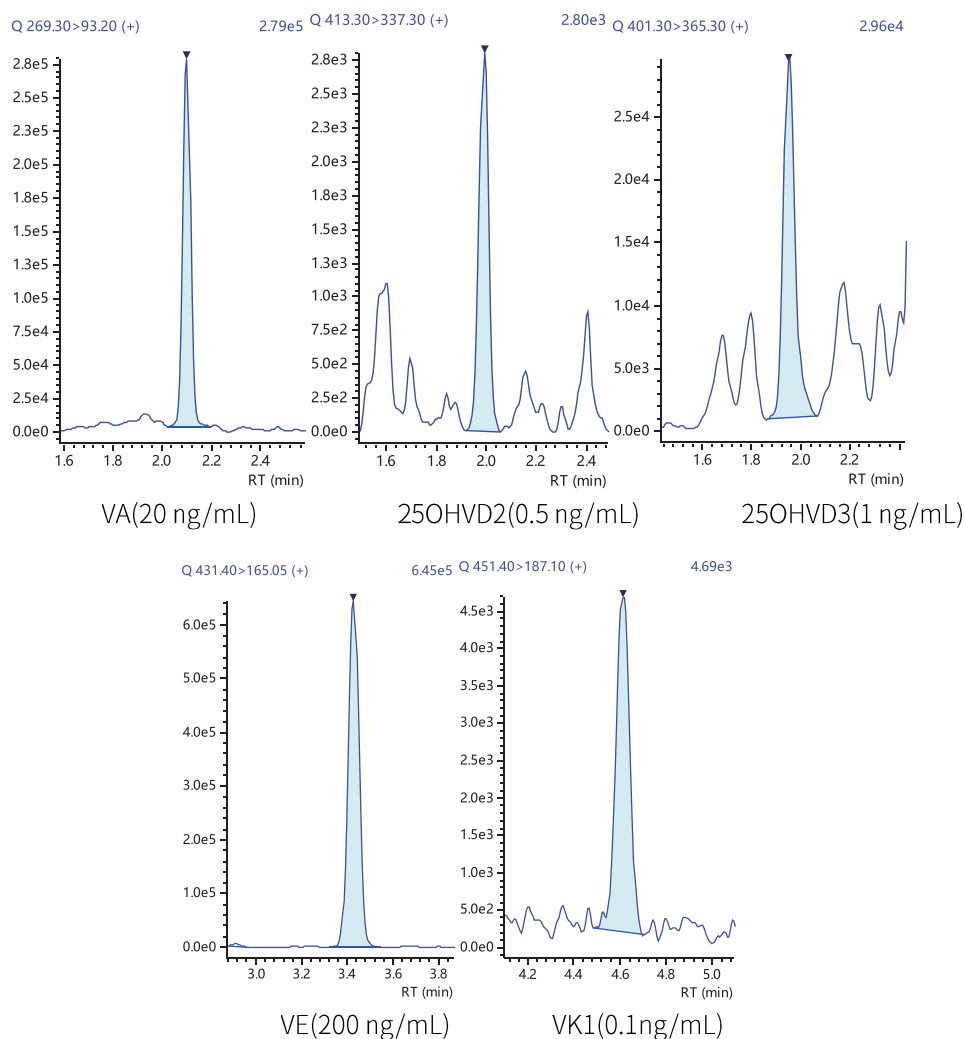


图 1 标准曲线最低点谱图

2.2 线性测定结果

对标准品按 1.2 中的分析条件进行分析，内标法制作标准曲线。标准曲线结果见表 3，5 种脂溶性维生素在标准曲线浓度范围内线性相关系数均大于 0.996，准确度在 93.9%~110.2% 之间，满足测定需求。

表 3 标准曲线结果

编号	名称	线性方程	线性范围 (ng/mL)	相关系数	准确度 (%)
1	VA	$Y = (0.00792700)X + (0.207331)$	20~2000	0.9968	95.6~110.0
2	25OHVD2	$Y = (0.0308505)X + (0.00544785)$	0.5~50	0.9994	96.0~105.2
3	25OHVD3	$Y = (0.0135708)X + (0.00469350)$	1~100	0.9987	93.9~110.2
4	VE	$Y = (0.00113429)X + (0.0422688)$	200~20000	0.9992	97.1~104.2
5	VK1	$Y = (0.0687768)X + (0.00103948)$	0.1~10	0.9992	95.1~104.4

2.3 准确度及精密度测定结果

按 1.3 中的前处理方法对 5%BSA 中添加标准溶液作为质控品，每个浓度质控品重复制备 3 份，按 1.2 中的分析条件对质控品进行分析，质控品的准确度结果如表 4 所示，结果显示质控品测定准确度结果与理论值接近，回收率在 94%~108% 之间，RSD 在 1.9%~6.2% 之间，满足临床测定需求。

表 4 质控准确度考察结果 (n=3, 浓度单位 ng/mL)

质控	项目	VA	25OHVD2	25OHVD3	VE	VK1
LQC	理论浓度	40	1	2	400	0.2
	测定浓度	43.1	0.96	2.11	412	0.21
	回收率 %	108	96	106	103	105
	RSD%	5.1	6.2	3.7	2.6	4.5
MQC	理论浓度	200	5	10	2000	1
	测定浓度	210	4.8	9.6	2135	1.05
	回收率 %	105	96	96	107	105
	RSD%	3.1	4.5	3.1	2.3	3.2
HQC	理论浓度	1000	25	50	10000	5
	测定浓度	1021	23.8	47.1	10326	5.12
	回收率 %	102	95	94	103	102
	RSD%	2.3	2.8	3.1	1.9	2.2

2.4 临床样品测定结果

取 4 批次血清样品, 按 1.3 中的前处理方法及 1.2 中的分析条件进行测定, 结果见图 2 和表 5, 该方法灵敏度及分离度可满足临床检验需求。

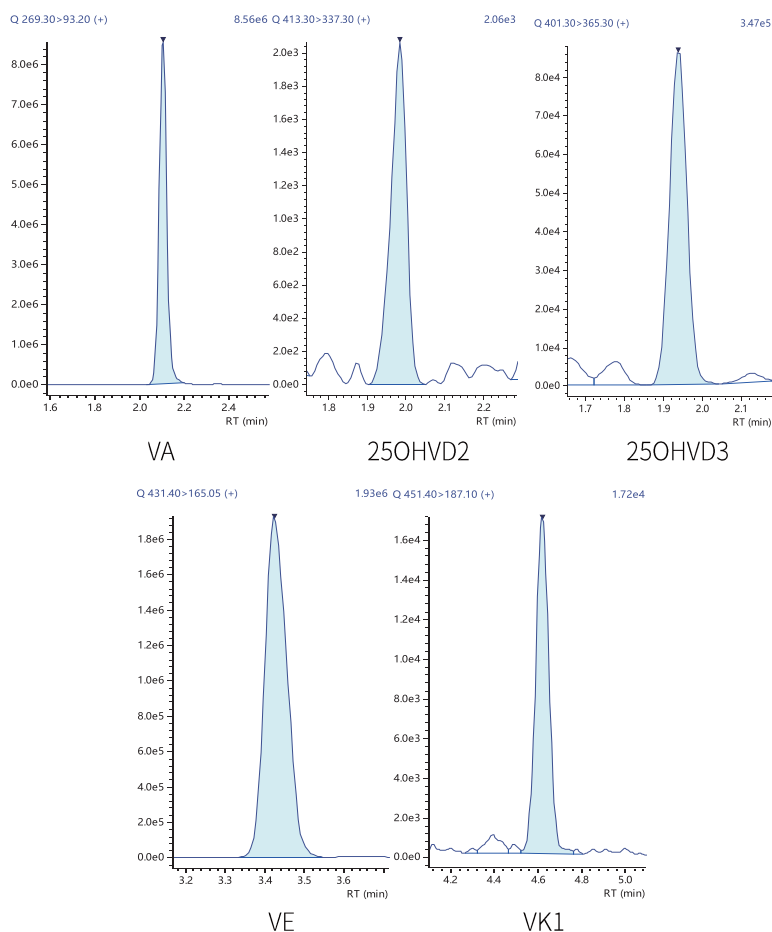


图 2 sample1 色谱图

表 5 临床样品测定结果 (ng/mL)

Name	sample1	sample2	sample3	sample4
VA	721	210	371	148
25OHVD2	0.52	N.D.	0.58	N.D.
25OHVD3	5.61	5.24	2.72	4.77
VE	7711	75621	4927	8041
VK1	0.89	0.84	0.65	0.90

■ 结论

使用超高效液相色谱仪三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用，建立了血清中 VA、25OHVD2、25OHVD3、VE 和 VK1 同时测定方法，使用内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性良好，标准曲线相关系数均大于 0.996，质控品测定准确度结果与理论值接近，回收率在 94%~108% 之间，RSD 在 1.9%~6.2% 之间，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于人体脂溶性维生素含量测定。

岛津应用云

