

# 应用 LCMS-8050 CL 检测人血清中脂溶性维生素含量

## LCMSMS-373

**摘要:** 本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 及广州达瑞品牌脂溶性维生素检测试剂盒（串联质谱法），建立了人体血清中维生素 A、25-羟基维生素 D<sub>2</sub>、25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 和维生素 E 四种脂溶性维生素同时测定的方法。使用试剂盒的内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度、精密度及稳定性的考察。结果显示该方法专属性良好，标准曲线相关系数均大于 0.994，准确度及精密度均满足试剂盒要求。该方法对维生素 A/D/E 缺乏的临床判断、治疗管理和生理评估具有辅助诊断的意义。

**关键词:** LCMS-8050 CL 维生素 A 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 维生素 E 人血清

维生素 A(VA)、维生素 D(VD) 和维生素 E(VE) 均为脂溶性维生素。维生素 A 缺乏病是由于膳食中维生素 A 或其前体胡萝卜素缺少或吸收不良而引起的全身性疾病，其主要病理变化是全身上皮组织角质变性，于眼部出现最早，可引起视觉功能异常，并影响呼吸道、消化道、泌尿生殖道等的黏膜，乃至皮肤、骨骼及免疫系统。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，以维持大部分生命过程不可或缺的代谢功能，对于维持钙的代谢和骨骼健康至关重要。血清中 25OHD<sub>2</sub> 和 25OHD<sub>3</sub> 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 是体内生物膜上的重要组成部分，当维生素 E 缺乏时，生物

膜上的多不饱和脂肪酸容易发生过氧化反应，特别是微粒体和线粒体的膜；并且当维生素 E 缺乏时，红细胞膜上的多不饱和脂肪酸易发生过氧化反应，使红细胞的膜受损，产生溶血，出现贫血症状。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。

本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 及广州达瑞品牌脂溶性维生素检测试剂盒（串联质谱法），建立了人体血清中维生素 A、25-羟基维生素 D<sub>2</sub>、25-羟基维生素 D<sub>3</sub>、维生素 E 的含量测定方法，对维生素 A/D/E 缺乏的临床判断、治疗管理和生理评估具有辅助诊断的意义。

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30A CL 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用系统。具体配置为 LC-30AD CL×2（输液泵），DGU-20A5R CL（在线脱气机），SIL-30ACMP CL（自动进样器），CTO-30A CL（柱温箱），CBM-20A CL 系统控制器，LCMS-8050 CL 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.60 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

#### 液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GISTC18 (2.1 mm I.D. × 50 mm L., 2 μm)

流动相：A 相 -0.1% 甲酸 -1 mM 乙酸铵水

B 相 -0.1% 甲酸 -1 mM 乙酸铵甲醇

流速：0.4 mL/min

柱温：40°C

进样量：10 μL

自动进样器温度：4°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 75%，时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.00	Pumps	Pump B Conc.	98
5.50	Pumps	Pump B Conc.	98
5.51	Pumps	Pump B Conc.	75
7.00	Controller	Stop	

质谱条件:

分析仪器: LCMS-8050 CL

离子源: ESI (+)

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 5.0 L/min

接口温度: 350°C

DL 温度: 150°C

加热模块温度: 500°C

干燥气流速: 15.0 L/min

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	驻留时间(ms)	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
VA	269.25	93.20	28	-18	-21	-10
d6-VA	275.30	96.20	28	-16	-11	-34
25OHD2	413.30	337.30	28	-14	-11	-23
d6-25OHD2	419.35	355.45	28	-24	-11	-18
25OHD3	401.40	365.35	28	-24	-11	-26
d6-25OHD3	407.35	371.45	28	-24	-12	-18
VE	431.40	165.10	28	-14	-35	-28
d6-VE	437.40	171.20	28	-14	-21	-28

### 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 (串联质谱法, 广州达瑞生物公司)。该试剂盒包含以下部分:

标准物质: 6 个水平的标准品牛血清白蛋白冻干粉

质控品: 2 个水平的质控品牛血清白蛋白冻干粉

内标: 含 d6-VA、d6-25OHD2、d6-25OHD3 和 d6-VE 四种内标的牛血清白蛋白冻干粉

蛋白沉淀剂: 40 mL

样品释放剂: 100 mL

样品复溶液: 20 mL

标准品、质控品和内标配制:

标准品 (A、B、C、D、E、F) 和质控品 (C1、C2): 室温条件下, 准确量取 1000  $\mu$ L 纯水至每瓶校准品或质控品中, 至冻干粉完全溶解 (不少于 20 分钟), 备用, 具体浓度见表 3。

内标: 室温条件下, 准确量取 1000  $\mu$ L 纯水至内标瓶中, 至冻干粉完全溶解 (不小于 20 分钟), 备用, 具体浓度见表 3。

内标工作液: 按内标比蛋白沉淀剂等于 1 比 24, 把内标储液稀释 25 倍, 配制成内标工作液 (1.0 mL 内标准品 +24 mL 蛋白沉淀剂)。

表3 标准品及质控品浓度(ng/mL)

编号	A	B	C	D	E	F	C1	C2
VA	0	80	256	521	1101	3418	453	1349
25OHD2	0	2.6	7.3	13.6	24.9	74.8	10.4	39.9
25OHD3	0	2.9	7.5	15.1	27.5	82.4	10.9	51.1
VE	0	678	1852	3695	7117	21388	3735	11253

标准品、质控品和样品前处理方法：

分别精密吸取 100  $\mu$ L 标准品、质控品或血清样品溶液于 2 mL 离心管中，然后加入 200  $\mu$ L 内标工作液，涡旋 30 s；再加入 450  $\mu$ L 样本释放剂，充分振摇 15 min，然后 13000 rpm 离心 15 min；离心后吸取 350  $\mu$ L 上清液至 1.5 mL 离心管，氮气室温彻底吹干；然后加入 100  $\mu$ L 样品复溶液，振荡孵育 5 min，转移至 1.5 mL 进样瓶，LCMS 分析，进样量 10  $\mu$ L。

## 结果与讨论

### 2.1 MRM 色谱图

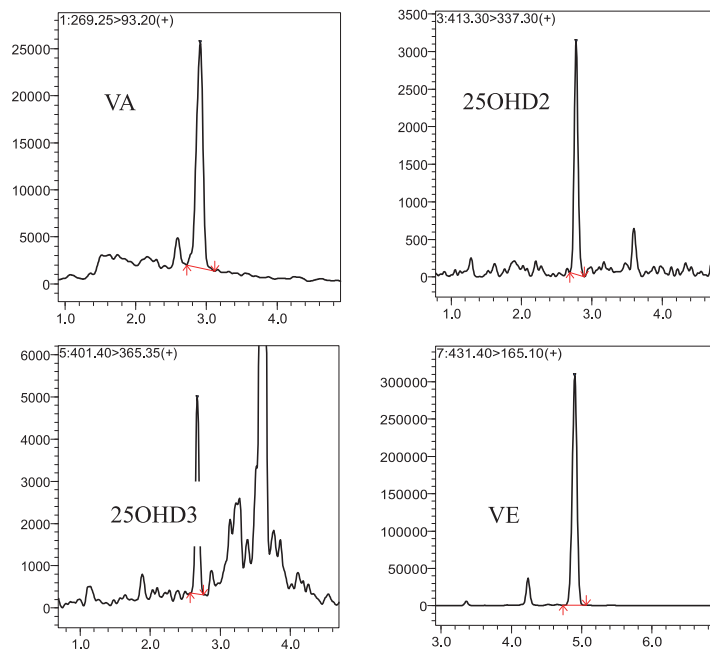
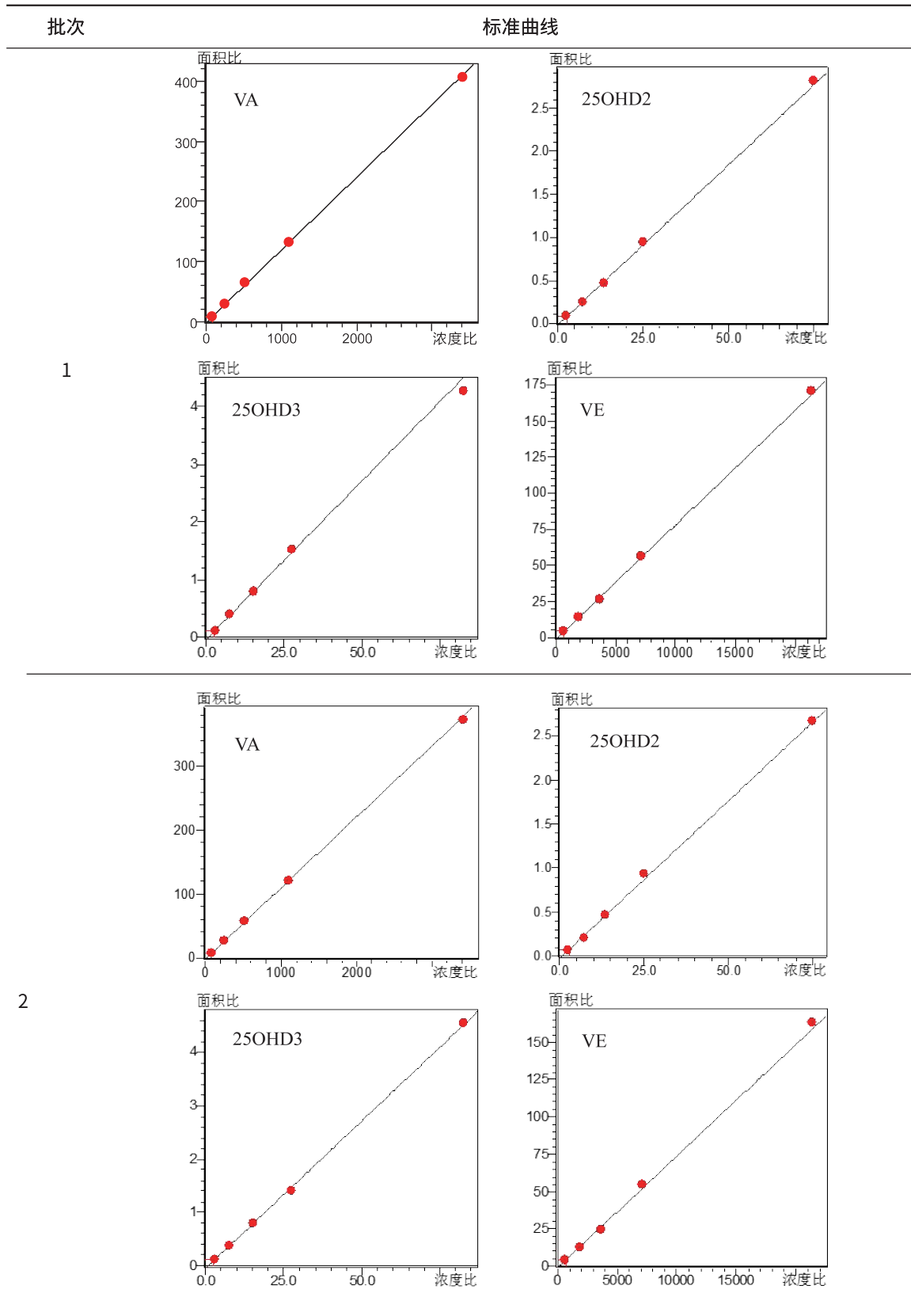


图1 标准曲线最低浓度点色谱图 (B点)

### 2.2 线性关系

采用内标法建立标准曲线，连续考察 3 天，结果如表 4 与表 5 所示。结果显示，VA 在 80~1349 ng/mL、25OHD2 在 2.6~39.9 ng/mL、25OHD3 在 2.9~51.1 ng/mL、VE 在 678~11253 ng/mL 线性浓度范围内线性相关性良好，相关系数均在 0.994 以上。

表4 连续3天标准曲线



3

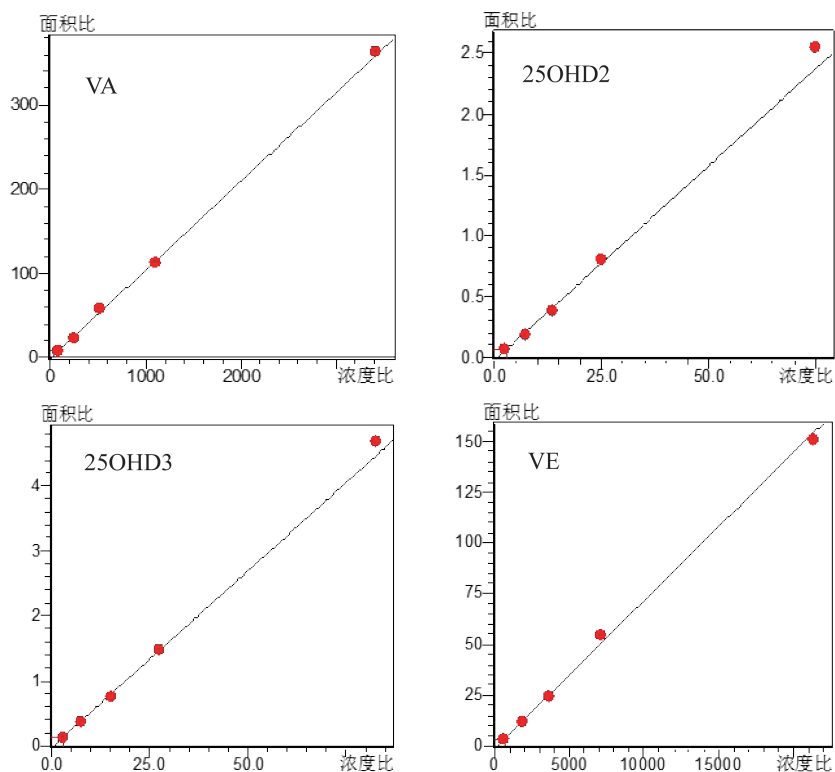


表5 标准曲线结果

批次	目标物	线性方程	相关系数	准确度(%)
1	VA	$Y = (0.121185)X + (-1.61691)$	0.9995	97.0~103.8
	25OHD2	$Y = (0.0368731)X + (-0.0158060)$	0.9989	94.9~104.3
	25OHD3	$Y = (0.0551478)X + (-0.0407025)$	0.9989	94.6~104.0
	VE	$Y = (0.00792136)X + (-1.12147)$	0.9987	93.2~103.7
2	VA	$Y = (0.111209)X + (-1.58351)$	0.9998	98.3~102.3
	25OHD2	$Y = (0.0357558)X + (-0.0224918)$	0.9945	85.8~108.3
	25OHD3	$Y = (0.0553091)X + (-0.0483678)$	0.9992	96.1~104.5
3	VE	$Y = (0.00749441)X + (-1.13542)$	0.9984	92.3~104.0
	VA	$Y = (0.105759)X + (-1.65509)$	0.9978	92.4~107.8
	25OHD2	$Y = (0.0319866)X + (-0.0242523)$	0.9963	91.1~107.3
	25OHD3	$Y = (0.0544391)X + (-0.0303690)$	0.9991	96.0~104.8
	VE	$Y = (0.00728962)X + (-1.47648)$	0.9985	95.3~107.2

### 2.3 精密度验证

取处理后人血清样品，连续进样分析 5 次，结果如表 6 所示，结果显示，所测定四种物质精密度在 2.6%~4.0% 之间，符合日常检测需求。

表6 精密度考察结果 (ng/mL)

编号	VA	25OHD2	25OHD3	VE
1	610.4	13.3	15.3	4537.0
2	601.5	14.3	15.3	4807.6
3	623.2	13.7	14.5	4708.8
4	628.4	14.5	15.7	4788.7
5	642.9	14.7	15.3	5003.0
平均值	621.3	14.1	15.2	4769.0
CV%	2.6	4.0	2.9	3.5

### 2.4 质控样本准确度考察

按 1.2 中的分析条件和 1.3 中的前处理方法连续三天对试剂盒中的质控品进行分析，质控品的准确度结果如表 7 所示，结果显示质控品测定结果与理论值接近，完全符合试剂盒质控品准确度 85%~115% 的要求。低浓度质控品 (C1) 三天测定结果准确度在 88.8%~109.7% 之间，高浓度质控品 (C2) 三天测定结果准确度在 87.2%~111.9% 之间。

表7 日内及日间精密度考察结果

编号	DAY 1		DAY 2		DAY 3	
	测定值	准确度	测定值	准确度	测定值	准确度
	(ng/mL)	(%)	(ng/mL)	(%)	(ng/mL)	(%)
C1-VA	410.6	90.6	451.2	99.6	402.5	88.8
C1-25-OHD2	9.33	89.7	10.6	101.8	10.1	96.8
C1-25-OHD3	11.96	109.7	10.8	99.2	10.7	97.7
C1-VE	3561.9	95.4	3674.4	98.4	4077.2	109.2
C2-VA	1226.8	90.9	1297.4	96.2	1266.6	93.9
C2-25-OHD2	43.3	108.5	44.6	111.9	42.0	105.4
C2-25-OHD3	51.4	100.6	52.4	102.6	53.6	105.0
C2-VE	9812.0	87.2	10246.0	91.1	11000.1	97.8

### 2.5 临床样品测定结果

取 3 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，结果见表 8。

表8 人血清临床样品检测结果

编号	VA(ng/mL)	25OHD2(ng/mL)	25OHD3(ng/mL)	VE(ng/mL)
Sample-1	610.4	13.3	15.3	4537.0
Sample-2	1851.3	1.3	25.8	14709.0
Sample-3	1216.9	0.9	27.2	9823.5

## ■ 结论

本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 及广州达瑞品牌脂溶性维生素检测试剂盒（串联质谱法），建立了人体血清中维生素 A、25-羟基维生素 D2、25-羟基维生素 D3 和维生素 E 四种脂溶性维生素同时测定的方法。使用试剂盒的内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度、精密度及稳定性的考察。结果显示该方法专属性良好，标准曲线相关系数均大于 0.994，准确度及精密度均满足试剂盒要求。该方法对维生素 A/D/E 缺乏的临床判断、治疗管理和生理评估具有辅助诊断的意义。