

磁性固相萃取串联质谱法用于血清中 5 种脂溶性维生素含量测定

LCMSMS-928

摘要： 本文建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪测定血清中脂溶性维生素 A、25-羟基维生素 D2、D3、维生素 E 和维生素 K1 的方法。采用磁性固相萃取对血清进行前处理，并通过内标法进行校正。可在 12 分钟完成 32 个测试处理，无需氮吹和离心处理。使用标准品、质控对方法线性、精密度、准确度进行考察。结果使用智能积分功能，无需设置参数，正确积分，避免积分到临近干扰峰。方法线性良好，相关系数 r 在 0.993 以上。质控精密度 RSD 在 0.94%-13.6% 之间，方法精密度良好。质控品测定准确度在 86.2%~107.8% 之间，方法准确度良好。该方法可用于血清中脂溶性维生素的准确定量检测，供相关从业人员参考。

关键词： 三重四极杆液质联用仪 磁性固相萃取 脂溶性维生素 Peakintelligence

技术特点：

- ❖ 采用磁性固相萃取方法前处理效率高，12 分钟可以完成 32 个测试处理，无需氮吹和离心处理。
- ❖ 同时检测 5 种脂溶性维生素，对于维生素 K1 定量限可以达到 0.06 ng/mL。
- ❖ 使用 Peakintelligence™ 智能积分功能，无需设置积分参数，正确积分，避免积分到临近干扰峰。

脂溶性维生素是指不溶于水而溶于脂肪及有机溶剂的维生素，包括维生素 A (VA)、维生素 D (VD)、维生素 E (VE) 和维生素 K (VK)。VA 的主要生理功能有维持上皮细胞完整、维持视觉、促进生长发育等。VD 的主要生理功能有调节钙磷代谢、保持骨骼健康、调节免疫功能、促进生长发育等。VD 在血清中两种主要形式是 25-羟基维生素 D2 (25-OHVD2) 和 25-羟基维生素 D3 (25-OHVD3)。VE 的生理功能有抗氧化作用、促进生殖健康、保护神经系统、支持免疫系统等。脂溶性 VK 包括维生素 K1 (VK1) 和 K2 (VK2)，人体直接摄入的活性形式为 VK1 具有促进血凝、促进肝脏中凝血酶原合成、参与氧化等功能。监测脂溶性维生素的含量，为医生和营养专家提供依据，便于评估体内维生素营养状态、吸收障碍或毒性水平，对指导维生素类药物的安全补充，做好疾病预防具有重要意义。

临床上常规检测血清中脂溶性维生素的前处理方法为液液萃取法、固相萃取法等。其中液液萃取法需要用到多种有机溶剂进行萃取，需要较多的人工操作步骤较为耗时，氮吹富集步骤容易造成回收损失。固相萃取法前序步骤也使用有机溶剂对血清蛋白进行沉淀，离心后样品才可以经过 SPE 柱提取和净化，较为耗时。磁性固相萃取 (MSPE) 在生物样品前处理中应用广泛，它利用磁性修饰的吸附剂 (磁珠) 吸附分析物，具有操作简单、无需加压过柱、易于自动化的优势，可省去离心、氮吹等步骤，并能兼容高粘度或者浑浊样本。

本文利用了一种夹心式表面键合非极性功能团的磁珠及自动化前处理设备对血清前处理，并在 LCMS-8050 上建立了血清中 5 种脂溶性维生素的分析方法，该方法灵敏度高、特异性好、前处理过程简单，可为相关从业者参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-40B X3 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为：

系统控制器：SCL-40

柱温箱：CTO-40C

输液泵：LC-40B X3

质谱仪：LCMS-8050

自动进样器：SIL-40C X3

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.128

1.2 分析条件

液相条件

色 谱 柱 : Shim-pack GISS C18 (50 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm);
岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-30048-04

流 动 相 : A 相 - 0.2% 甲酸水溶液, B 相 - 0.2% 甲酸甲醇溶液

柱 温 : 50°C 流 速 : 0.25 mL/min

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, 初始浓度为 B 相 70%, 进 样 体 积 : 20 μL

洗脱程序见表 1

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
2.50	Pumps	Pump B Conc.	100
7.50	Pumps	Pump B Conc.	100
7.60	Pumps	Pump B Conc.	70
10.00	Pumps	Pump B Conc.	70
10.00	Controller	Stop	

质谱条件

离 子 源 : ESI, 正离子模式 DL 管 温 度 : 200°C

接 口 电 压 : 4.0 kV 加 热 模 块 温 度 : 400°C

雾 化 气 : 氮气 3.0 L/min 接 口 温 度 : 350°C

干 燥 气 : 氮气 6.0 L/min 扫 描 模 式 : 多反应监测 (MRM)

加 热 气 : 空气 10.0 L/min MRM 参 数 : 见表 2

碰 撞 气 : 氩气 (230 kPa)

表 2 MRM 参数

No.	化合物	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
1	VA	68-26-8	269.15	93.05*	-29	-23	-15
				77.05	-13	-55	-30
2	VA-d6	2483831-77-0	275.15	96.05	-28	-22	-16
3	25-OHVD2	21343-40-8	395.25	105.00*	-19	-48	-18
				269.20	-29	-20	-19
4	25-OHVD3	19356-17-3	383.25	257.20*	-18	-18	-30
				107.10	-19	-29	-12
5	25-OHVD3-d3	80666-48-4	407.20	371.20	-21	-13	-22
6	VE	59-02-9	431.30	137.00*	-21	-5	-22
				165.10	-21	-5	-22
7	VE-d6	118584-54-6	437.30	143.10	-21	-44	-24

8	VK1	84-80-0	451.20	187.10*	-22	-26	-18
				197.10	-22	-25	-19
9	VK1-d7	1233937-39-7	458.20	194.10	-20	-24	-18

注：1. * 表示定量离子。
2. VE 并非最佳参数，因其标曲浓度水平较高，在质谱上响应值较大。
3. 25-OHVD2 的内标为 VA-d6。

■ 样品前处理、标准溶液和质控溶液配制

2.1 样品前处理

样品前处理使用样本前处理系统（MIP32，南京艾迪迈科技有限公司）处理，见图 1。



图 1 前处理设备外观、内部结构及上机深孔板

①磁珠混悬工作液（磁珠，型号：MSP2012PD-C1B，南京艾迪迈科技有限公司）：使用 80% 甲醇溶液到磁珠粉中配置成磁珠工作液浓度为 10 mg/mL，涡旋混匀 30 s，使用前混匀，-4℃储存。

②样本工作液：取 7.5 μL 内标液加入到 142.5 μL 血清样本中，涡旋混匀 30 s。

③深孔板内加入的试剂和样本如下：

1. 磁珠孔：150 μL 磁珠混悬工作液
2. 上样吸附孔：150 μL 样品工作液 + 150 μL 纯水 + 450 μL 甲醇
3. 平衡液孔：500 μL 30% 甲醇水
4. 淋洗液孔：500 μL 20% 甲醇水
5. 淋洗液孔：500 μL 20% 甲醇水
6. 洗脱液孔：150 μL（甲醇 - 异丙醇洗脱液）

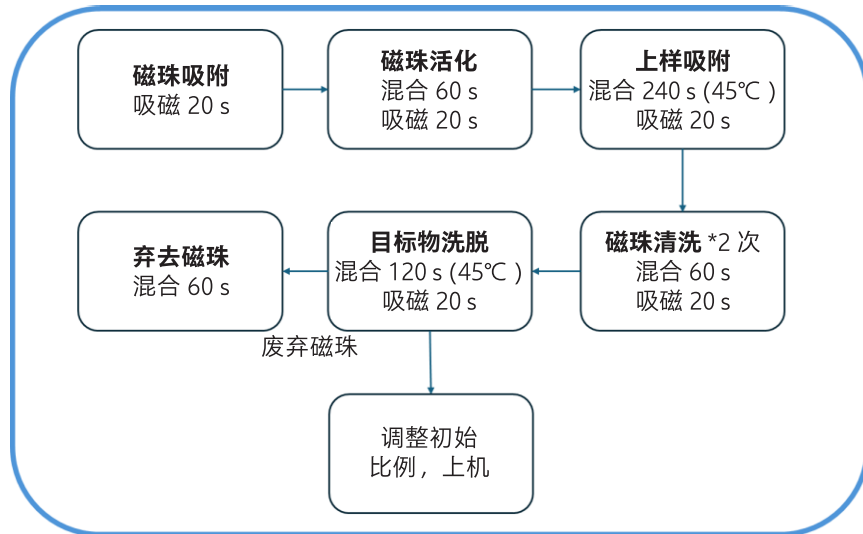


图 2 前处理设备自动化程序

前处理过程如图 2 所示，样品经过磁珠吸附、萃取、淋洗和洗脱后得到样品溶液，取 100 μL 样品溶液加入 20 μL 水涡旋混匀后上机测试。

2.2 系列标准溶液和质控配制

量取适量标准品母液，使用乙腈配置标准中间储备液，使其浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ， -18°C 储存。

混合并稀释上述储备液及母液得到混合标准中间工作液，浓度为：VA-40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25-OHVD2-3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25-OHVD3-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、VE-400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、VK1-0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

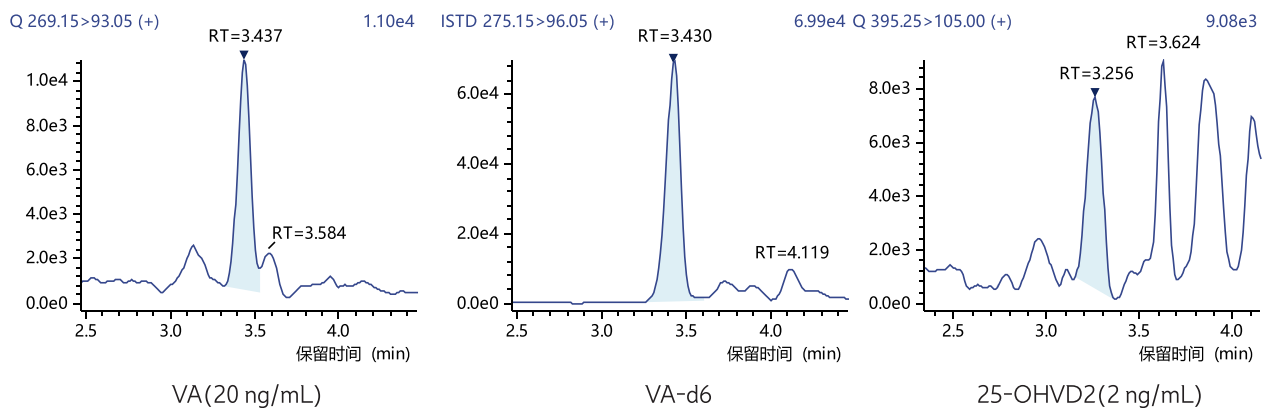
配制 5% 的牛血清白蛋白 (BSA) 水溶液作为血清基质替代品，取 950 μL 5% BSA 溶液加入 50 μL 混合标准中间工作液，涡旋混匀，得到系列混合标准工作溶液浓度分别为 400、800、1600、4000、8000、16000、400000 ng/mL (以 VA 计)，临用现配。

质控使用混合标准中间工作液加 5% BSA 溶液稀释到 40、250、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (以 VA 计)，临用现配。

结果与讨论

3.1 MRM 色谱图

标准曲线最低浓度点 MRM 谱图如下，色谱峰形良好，通道无干扰。



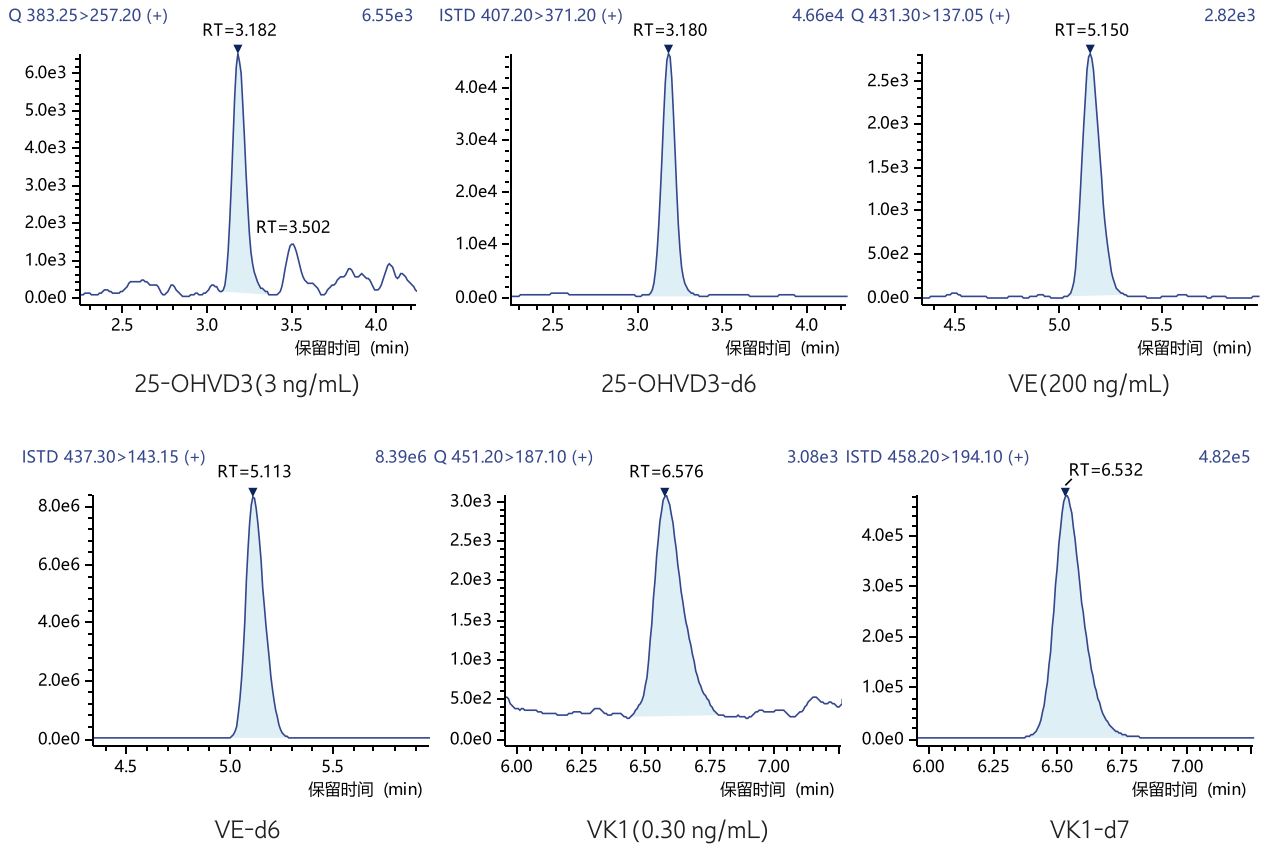
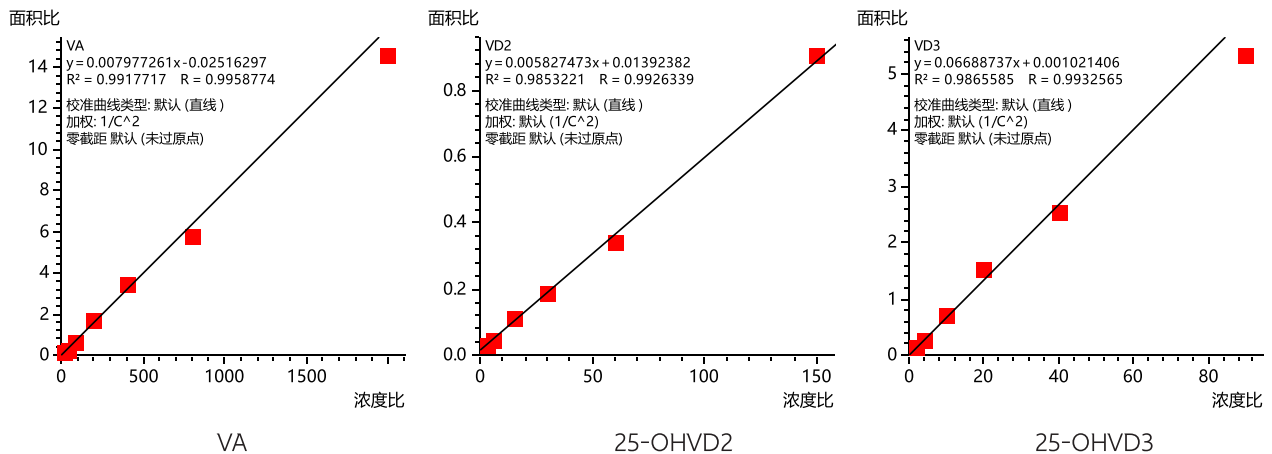


图3 标准工作溶液级别 1 的 MRM 色谱图

3.2 校准曲线和检出限

将配制的系列标准溶液进样分析，以定量离子峰面积为纵坐标，浓度为横坐标，绘制校准曲线如图 4 所示。根据校准曲线级别 1 浓度标样数据，以 3 倍信噪比计算脂溶性维生素的方法检出限、10 倍信噪比计算定量限，各化合物检出限、定量限以及线性相关系数如表 3 所示。



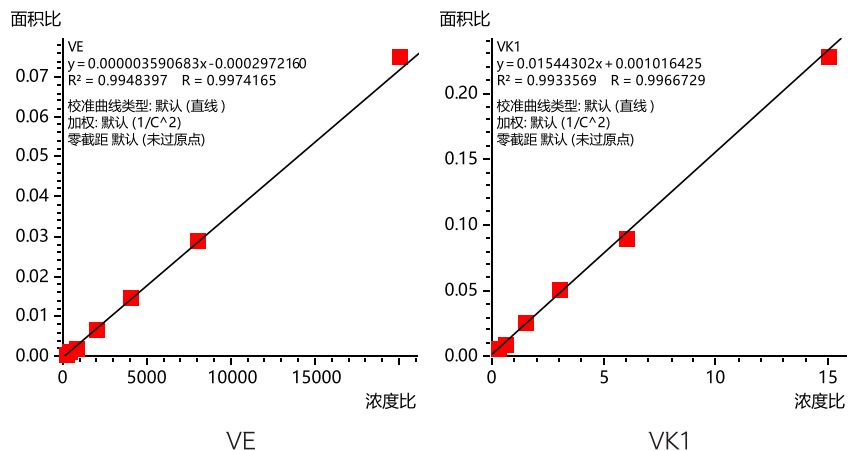


图 4 脂溶性维生素校准曲线

表 3 脂溶性维生素的校准曲线及检测限、定量限

编号	化合物	线性范围 (ng/mL)	相关系数 R	准确度 %	检测限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
1	VA	20-2000	0.996	91.3 110.3	2.462	8.205
2	25-OHVD2	3-150	0.993	89.9-113.1	0.689	2.298
3	25-OHVD3	2-100	0.993	88.6-114.6	0.242	0.808
4	VE	200-20000	0.997	88.6-105.1	3.116	10.386
5	VK1	0.3-15	0.997	90.6-108.9	0.018	0.060

3.3 准确度和精密度验证

取已配制好的低、中、高三个浓度水平质控样品，按照 2.1 方法制备，每个浓度的质控血浆样品进行 3 份平行样品分析，随行校准曲线，结果见表 4。

表 4 脂溶性维生素的质控准确度和精密度验证结果

编号	化合物	添加浓度 (ng/mL)	实测浓度均值 (ng/mL)	准确度 (%)	RSD (%)
1	VA	40	38.5	96.3	13.2
		250	222	88.8	5.78
		1000	1078	107.8	2.86
2	25-OHVD2	3.00	3.00	100.0	4.48
		18.8	16.2	86.2	1.32
		75.0	79.6	106.1	5.87
3	25-OHVD3	2.00	2.06	103.1	13.6
		12.5	11.4	91.2	10.4
		50.0	53.6	107.2	10.2
4	VE	600	624	104.0	13.4
		3750	3429	91.4	11.7
		15000	12750	85.0	11.9

5	VK1	0.30	0.32	106.6	5.40
		2.25	2.00	88.8	1.59
		9.00	8.80	97.8	0.94

3.4 Peakintelligence™ 色谱峰智能算法积分

本实验色谱图积分处理使用的是 Peakintelligence™ 色谱峰智能算法。进行数据处理时，仅需要在质谱数据处理软件 LabSolutions Insight 中打开 LC-MS/MS 采集的数据，在积分功能选择“Peakintelligence_Ver2”及模型“LCMS_Model_V1”无需设置任何积分参数，即可自动、快速、准确完成目标物色谱峰的积分。传统积分参数会将目标峰前后的干扰峰积分进去，而智能算法会智能识别前后的干扰峰，多余部分不会积入，保证积分结果的准确性，见图 5。

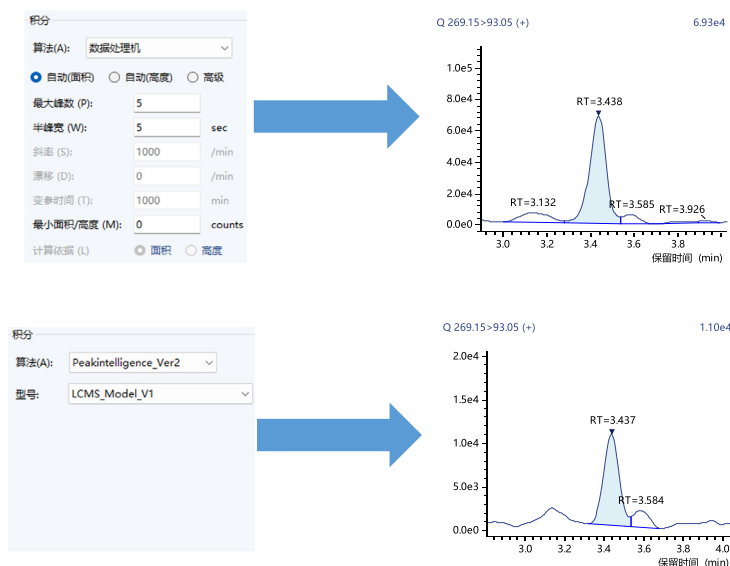


图 5 不同积分方法（下图为智能算法）对 VA（20 ng/mL）积分

■ 结论

本方法使用岛津 LCMS-8050 测定了血清基质中脂溶性维生素 VA、25-OHVD2、25-OHVD3、VE、VK1 物质。脂溶性维生素在线性范围内线性良好。对低中高三个浓度质控进行分析，平行测试三次，方法精密度良好。质控品测定准确度结果与理论值接近。磁性固相萃取前处理方法可以在 12 分钟内结束，并可同时检测 32 个样本，该方法相较液液萃取法和固相萃取法，前处理步骤更简单，自动化程度高，结果准确。Peakintelligence™ 色谱峰智能算法进一步提高了积分的准确度，避免积分到临近干扰峰。该方法可用于血清中脂溶性维生素的准确定量检测，供相关从业人员参考。

岛津应用云

