

基于SCIEX LC-MS/MS系统对血浆中13种水溶性维生素检测

Determination of 13 water-soluble vitamins in Plasma by SCIEX LC-MS/MS

刘瑞琛, 王冬, 裴旭哲, 黄超, 赵祥龙, 郭立海

Liu Ruichen, Wang Dong, Pei Xuzhe, Huang Chao, Zhao Xianglong, Guo Lihai

关键词: water-soluble vitamins, plasma

引言

水溶性维生素及其代谢产物作为辅酶参与人体细胞代谢, 以防止代谢紊乱。同时水溶性维生素也参与体内各项能量代谢, 例如磷酸化形式的硫胺素(Thiamine)在三羧酸循环中起着关键作用, 核黄素(Riboflavin)、烟酸(Nicotinic acid)、泛酸(Pantothenic acid)、吡哆醛(Pyridoxal)、叶酸(Folic acid)参与氧化、还原反应, 脂肪酸和神经递质合成以及碳代谢等。水溶性维生素的缺乏会影响人体正常生理功能, 因此临床亟待开发同时检测多种水溶性维生素方案并应用临床诊断。

目前, 水溶性维生素在血浆中的检测仍存在诸多难点, 如检测灵敏度差、提取回收率低、不稳定和基质干扰严重等。因此, 建立一种高通量、广覆盖、快速的分析方法实现血浆中多种水溶性维生素具有重要意义。

本方案基于SCIEX液相色谱串联质谱系统, 建立了一种高通量水溶性维生素LC-MS/MS检测方法, 采用沉淀蛋白法对血浆中13种水溶性维生素进行精准定量及分析。该方法样品前处理简单, 样本用量少, 分离时间短, 方法经过系统方法学验证, 检测方法具有良好的精密度和准确性。

实验部分

1. 样品前处理:

准确量取100 μ L血浆样品于沉淀过滤板中, 加入10 μ L内标混合工作液、30 μ L含稳定剂的400 mM硫酸锌溶液和30 μ L甲醇, 振荡混匀1 min, 4000 rpm离心10 min, 将收集板内液体氮吹后100 μ L初始流动相复溶, 待LC-MS/MS分析。

2. 色谱质谱条件:

色谱柱: Atlantis T3 (3 μ m, 2.1 \times 150 mm), 流动相: A: 0.1% 甲酸、10 mmol/L甲酸铵水溶液, B: 0.1%甲酸、10 mmol/L甲酸铵 95%乙腈溶液, 柱温: 40 $^{\circ}$ C, 进样量: 20 μ L, 梯度洗脱, 液相梯度见表1。

表1. 液相梯度洗脱条件

时间 (min)	A(%)	B(%)
0.0	98	2
1.0	98	2
3.0	60	40
3.1	0	100
5.5	0	100
5.6	98	2
8.0	98	2

质谱条件: ESI源

气帘气 CUR: 30 psi 碰撞气 CAD: Medium

雾化气 GS1: 50 psi 辅助气 GS2: 50 psi

IS电压: 5500 V 源温度 TEM: 500 $^{\circ}$ C

质谱参数见表2

结果与讨论

1. 方法灵敏度

以磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 为替代基质, 考察13种水溶性维生

表2. 目标组分和同位素内标物质的质谱参数

分析物	Q1	Q3	Dwell Time	ID	DP	CE
硫胺素 (Thiamine)	265.0	122.1	15	Thiamine-1*	33	45
	265.0	144.2	15	Thiamine-2	33	18
	268.1	122.1	15	Thiamine-IS	46	25
核黄素 (Riboflavin)	377.1	243.3	12	Riboflavin-1*	120	32
	377.1	172.1	12	Riboflavin-2	120	50
	383.1	249.1	12	Riboflavin-IS	120	31
烟酸 (Nicotinic acid)	124.2	80.0	15	Nicotinic acid-1*	80	45
	124.2	78.0	15	Nicotinic acid-2	80	45
	128.0	84.1	15	Nicotinic acid-IS	85	27
烟酰胺 (Nicotinamide)	123.0	80.0	15	Nicotinamide-1*	80	60
	123.0	53.0	15	Nicotinamide-2	80	70
泛酸 (Pantothenic acid)	220.1	90.0	12	Pantothenic acid-1*	80	19
	220.1	201.9	12	Pantothenic acid-2	80	17
	224.2	94.1	12	Pantothenic acid-IS	72	18
吡哆醇 (Pyridoxine)	170.0	152.0	15	Pyridoxine-1*	65	30
	170.0	134.0	15	Pyridoxine-2	65	50
吡哆胺 (Pyridoxamine)	169.0	152.0	15	Pyridoxamine-1*	40	30
	169.0	134.0	15	Pyridoxamine-2	40	17
	170.7	153.1	12	Pyridoxamine-IS	51	19
吡哆醛 (Pyridoxal)	168.0	150.0	15	Pyridoxal-1*	40	30
	168.0	122.1	15	Pyridoxal-2	40	28
吡哆酸 (Pyridoxic acid)	184.1	166.1	12	Pyridoxic acid-1*	40	18
	184.1	148.2	12	Pyridoxic acid-2	40	29
生物素 (Biotin)	245.2	227.2	12	Biotin-1*	70	21
	245.2	123.2	12	Biotin-2	70	37
	247.2	229.1	12	Biotin-IS	70	21
五甲基四氢叶酸 (5-Methyltetrahydrofolate)	460.2	313.2	12	5-MTHF-1*	91	50
	460.2	180.1	12	5-MTHF-2	91	70
钴胺素 (Cobalamin)	678.4	359.2	12	Cobalamin-1*	100	31
	678.4	147.2	12	Cobalamin-2	100	85
叶酸 (Folic acid)	442.2	295.2	12	Folic acid-1*	41	53
	442.2	176.1	12	Folic acid-2	41	24

* 定量离子

素的线性范围最低点灵敏度和峰形情况，结果表明化合物灵敏度高、峰形良好，13种水溶性维生素特征图谱见图1。

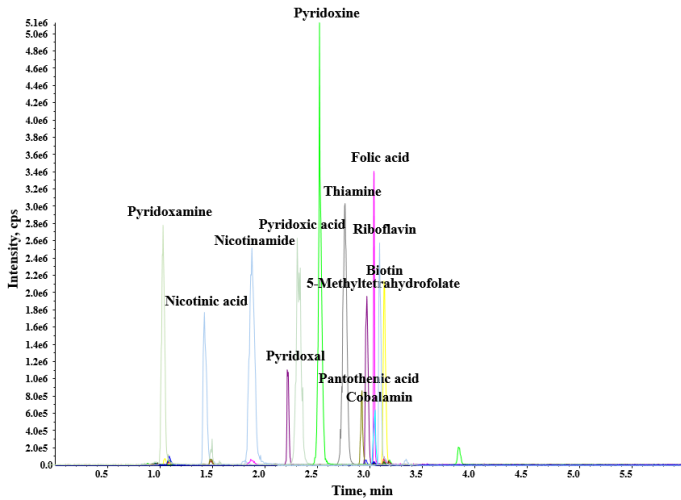


图1. 13种水溶性维生素色谱图

2. 线性

以PBS为替代基质，配制混合标曲溶液，按上述前处理步骤进行处理，制作标准工作曲线。表3显示，13种水溶性维生素在各自线性范围内均具有良好的线性，其回归系数 $R > 0.99$ 。

3. 重复性

以PBS为替代基质，配置低质控样本，按上述前处理步骤进行处理，平行处理6个样本。表3显示，13种水溶性维生素在低质控浓度水平均具有良好的重复性，其 $CV < 7.77$ 。

总结

本方案基于SCIEX Triple Quad™系统，建立了血浆中13种水溶性维生素含量测定LC-MS/MS方法。该方法通过简便快捷的沉淀蛋白法，在8 min内实现同时检测13种水溶性维生素，方法具有高通

表3. 线性和重复性实验结果

分析物	工作曲线	R	线性范围 (ng/mL)	低质控重复性 (%)
硫胺素	$Y=0.01441x+0.00207$	0.998	0.16~80	3.53
核黄素	$Y=0.07435x+0.000554$	0.997	0.16~80	2.86
烟酸	$Y=0.05979x+0.00151$	0.999	0.4~200	6.90
烟酰胺	$Y=0.0007406x+0.0006905$	0.996	0.4~200	5.18
泛酸	$Y=0.00416x+0.000261$	0.998	1.8~900	6.01
吡哆醇	$Y=0.00352x+0.00137$	0.999	0.16~80	7.77
吡哆胺	$Y=0.02289x+0.00137$	0.997	0.16~80	1.91
吡哆醛	$Y=0.00138x+0.000038$	0.998	0.16~80	4.82
吡哆酸	$Y=0.00159x+0.000022$	0.995	0.16~80	3.11
生物素	$Y=0.04872x+0.00159$	0.997	0.01~5	5.56
五甲基四氢叶酸	$Y=0.00510x+0.000113$	0.997	0.3~150	4.66
钴胺素	$Y=38147.3x+952.848$	0.998	0.04~20	5.74
叶酸	$Y=0.00663x+0.00101$	0.996	0.1~50	3.21

量、高灵敏度、稳定性好的特点。该方案可为临床相关疾病辅助诊断提供精准水溶性维生素的浓度水平信息。

参考文献

- [1] Meisser Redeuil K, Longet K, Bénét S, Munari C, Campos-Giménez E. Simultaneous quantification of 21 water soluble vitamin circulating forms in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr A. 2015 Nov 27;1422:89-98. doi: 10.1016/j.chroma.2015.09.049. Epub 2015 Oct 19.

仅限专业展会等使用、仅向专业人士提供的内部资料。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15722-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7201
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话: 020-8842-4017

官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)