

# SCIEX液相色谱串联质谱系统测定微量血中的脂溶性维生素

## Determination of Liposoluble Vitamins in Micro Blood Samples by SCIEX Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

荆莲艳, 李国庆

Jing Lianyan, Li Guoqing

SCIEX China Clinical BU

**Keywords:** micro blood, liposoluble vitamins, vitamin A, 25-hydroxyvitamin D2, 25-hydroxyvitamin D3, vitamin E, vitamin K1

### 引言

脂溶性维生素(Liposoluble Vitamins) 包括维生素A、维生素D、维生素E、维生素K, 不溶于水而溶于脂肪及有机溶剂, 由长的碳氢链或稠环组成的聚戊二烯化合物。维生素是维持身体健康所必需的一类有机化合物。这类物质在体内既不能是构成身体组织的原料, 也不是能量的来源, 而是一类调节物质, 在物质代谢中起重要作用。维生素A: 维持正常视觉, 维持上皮细胞、组织完整, 增强机体免疫力, 参与铁代谢; 维生素E: 抗氧化、清除自由基, 保护神经功能, 增强机体免疫力, 维持正常生育功能; 维生素D: 维持骨骼发育, 调节抗原提呈细胞的分化、淋巴细胞的增值, 影响免疫力、智力发育; 维生素K: 参与凝血因子的合成, 参与骨钙素的合成。

本方法首先采用液液萃取方法对生物样本进行前处理, 然后SCIEX液相色谱串联质谱系统系统, 以待测目标物的同位素标记物为内标, 检测人血清中维生素A (VA)、25-羟基维生素D2 (25OHVD2)、25-羟基维生素D3 (25OHVD3)、维生素E (VE)、维生素K1 (VK1)。

### 实验部分

样品处理: 向1.5 mL EP管中, 依次加入10  $\mu$ L内标工作液(表2)、50  $\mu$ L全血和140  $\mu$ L甲醇; 涡旋20秒, 混匀; 再加入0.6 mL正己烷, 3,000 r/min涡旋100 s, 然后10,000 rpm离心3分钟; 取离心后的上清液, 在氮气下吹干。残渣用100  $\mu$ L 80%甲醇复溶、离心, LC-MS/MS进样20  $\mu$ L分析。

#### 色谱条件:

色谱柱使用Phenomenex kinetex C18 column (50  $\times$  3.0 mm,

表1. 内标工作液浓度。

VA-d6 (ng/mL)	25OHVD2-d6 (ng/mL)	25OHVD3-d6 (ng/mL)	VE-d6 (ng/mL)	VK1-d7 (ng/mL)
250	100	100	500	20

2.6  $\mu$ m) 进行分离, 流动相选用水 (含0.1% 甲酸) 作为A相, 和甲醇 (含0.1% 甲酸) 作为B相, 柱温设为40  $^{\circ}$ C, 进样量为20  $\mu$ L; 进行梯度洗脱, 液相梯度见表2。

#### 质谱条件:

表2. 液相梯度洗脱条件。

Time min	流速 mL/min	A %	B %
0.00	0.6	30	70
0.01	0.6	30	70
0.50	0.6	30	70
2.00	0.6	10	90
3.0	0.6	10	90
3.1	0.6	0	100
5.9	0.6	0	100
6.0	0.6	30	70
6.50	0.6	30	70

使用SCIEX TripleQuad™ 4500MD质谱系统。采用Heated Nebulizer (APCI) 和多反应监测 (Multiple Reaction Monitoring, MRM) 模式进行质谱扫描。离子源参数: 加热气 (GS1) 为60 psi, 脱溶剂气温度为550  $^{\circ}$ C; 气帘气 (Curtain Gas, CUR) 为35 psi, 碰撞气 (Collision Gas, CAD) 为6 psi; 雾化器电流 (Nebulizer Current, NC): 5  $\mu$ A。为了获取较好的稳定性和灵敏

度，各化合物监测离子对的去簇电压（Declustering Potential, DP）和碰撞电压（Collision Energy, CE），目标物定量离子对、定性离子对以及内标物监测离子对等参数均经过系统优化，离子对信息见表3。

表3. 脂溶性维生素及其内标物MRM离子通道参数。

化合物	离子对 Q1 / Q3 (m/z)	驻留时间 Dwell Time (msec)	去簇电压 DP (V)	碰撞电压 CE (V)
VA	269.2 / 93.1 <sup>a</sup>	20	40	70
	269.2 / 119.1 <sup>b</sup>	20	40	70
25OHVD2	395.4 / 269.0 <sup>a</sup>	20	50	23
	395.4 / 211.0 <sup>b</sup>	20	50	33
25OHVD3	383.4 / 257.2 <sup>a</sup>	20	70	23
	383.4 / 365.4 <sup>b</sup>	20	70	25
VE-1	431.3 / 165.2 <sup>a</sup>	20	110	85
	431.3 / 137 <sup>b</sup>	20	110	85
VK1-1	451.4 / 187.1 <sup>a</sup>	20	100	30
	451.4 / 199 <sup>b</sup>	20	100	34
VA-d6	275.2/96.1	25	40	25
25OHVD2-d6	401.4/269	25	76	28
25OHVD3-d6	389.3/263	25	70	23
VE-d6	437.3/171.2	25	40	25
VK1-d7	458.4/194.1	25	60	31

注：<sup>a</sup>为定量离子对，<sup>b</sup>为定性离子对。

## 结果与讨论

图1 VA、25OHVD2、25OHVD3、VE和VK1在定量下限LOQ提取离子流图。图2是人全血中VA、25OHVD2、25OHVD3、VE和VK1的提取离子流色谱图，峰型对称，响应良好。

VA、25OHVD2、25OHVD3、VE和VK1回归方程和线性范围见表3，VA、25OHVD2、25OHVD3、VE和VK1在相应的浓度范围内线性良好，r均大于0.996。

表3. 回归方程和线性范围。

化合物	回归方程	权重	相关系数r	线性范围
VA	Y=0.00194 X -0.00905	1/X <sup>2</sup>	r=0.99700	25~1600 ng/mL
25OHVD2	Y=0.04887 X -0.01136	1/X <sup>2</sup>	r=0.99630	0.312~20 ng/mL
25OHVD3	Y=0.04970 X +0.03362	1/X <sup>2</sup>	r=0.99875	1.56~100 ng/mL
VE	Y=0.23404 X +0.01396	1/X <sup>2</sup>	r=0.99906	0.625~40 μg/mL
VK1	Y=0.82734 X +0.25927	1/X <sup>2</sup>	r=0.99975	0.156~10 ng/mL

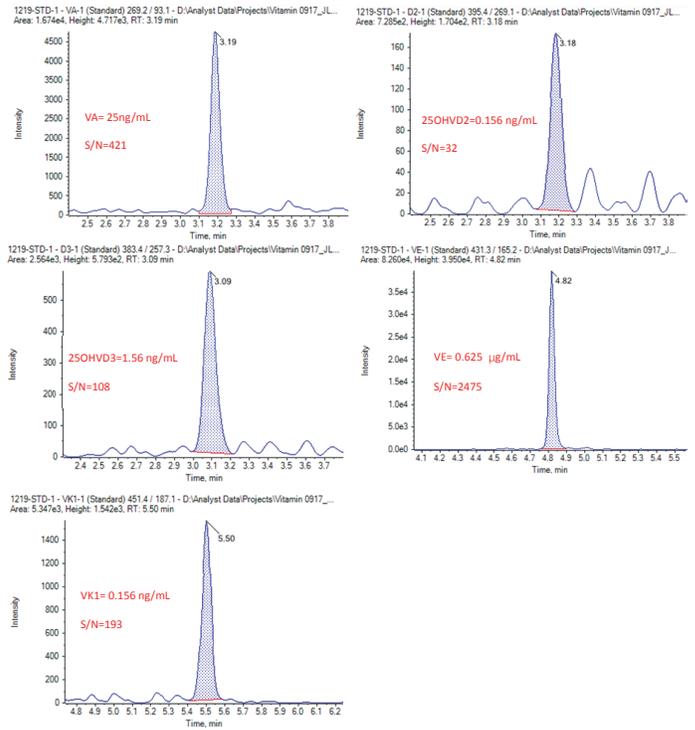


图1. VA、25OHVD2、25OHVD3、VE和VK1在定量下限LOQ提取离子流图。

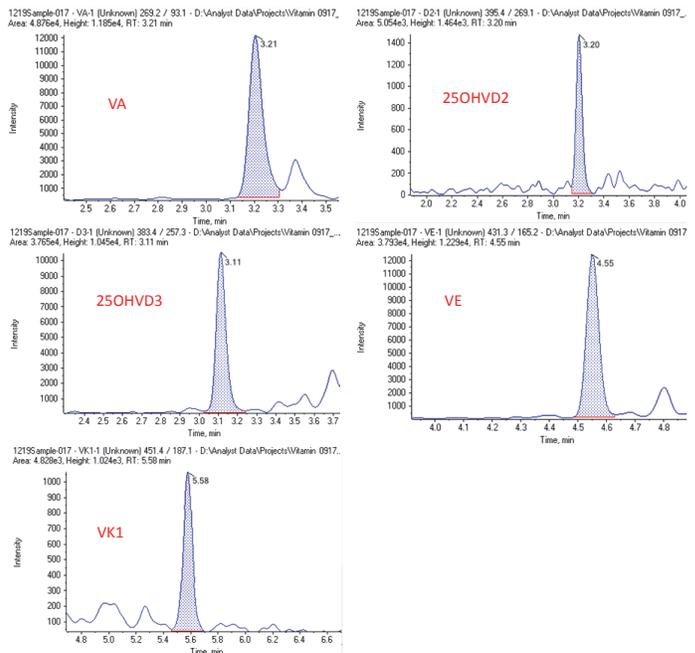


图2. 人全血中VA、25OHVD2、25OHVD3、VE和VK1的提取离子流色谱图。

为了考察方法的重现性及准确性，分别进行VA、25OHVD2、25OHVD3、VE和VK1的精密度(RSD)和准确度方法验证。从表4可以看出，VA、25OHVD2、25OHVD3、VE和VK1低、中、高浓度的精密度均在10%以内，准确度均在88-108%之内。

表4. 准确度及精密度。

化合物	理论浓度	实测值	准确度%	精密度%
VA (ng/mL)	25	27.1	108.43	4.50
	800	733	92.63	2.19
	1280	1126.78	88.03	3.55
25OHVD2 (ng/mL)	0.31	0.29	96.1	8.01
	10	9.64	96.48	1.71
	16	14.45	90.31	2.57
25OHVD3 (ng/mL)	1.56	1.63	104.72	4.49
	50	50.01	100.03	4.03
	80	76.22	95.27	6.26
VE ( $\mu$ g/mL)	0.63	0.61	97.29	9.35
	20	18.1	90.44	5.26
	32	32.40	101.26	3.31
VK1 (ng/mL)	0.16	0.16	100.05	10.7
	5	4.57	91.49	3.57
	8	7.29	91.20	6.64

## 总结

本方法使用SCIEX 高灵敏度和高稳定性的液相色谱串联质谱系统，实现了同时检测人全血中VA、25OHVD2、25OHVD3、VE和VK1浓度，本方法可对人全血中脂溶性维生素进行快速的定性和定量分析。该方法具有线性好、准确度高等优点，且每个样本分析仅需6.5 min，具有较高的分析通量。

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2018. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-9383-ZH-A



### SCIEX中国公司

北京分公司  
地址：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

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心  
地址：上海市长宁区福泉北路518号  
1座502室  
电话：021-2419 7200  
传真：021-2419 7333

网址：www.sciex.com.cn

广州分公司  
地址：广州市天河区珠江江西路15号  
珠江城1907室  
电话：020-8510 0200  
传真：020-3876 0835

微博：@SCIEX