

同位素稀释超高效液相色谱串联质谱法快速检测血清中多种脂溶性维生素含量

易婉婉¹ 史秋园¹ 陈从艳² 袁芳² 吕中伟¹ 刘瑾¹

¹同济大学附属第十人民医院核医学科,上海 200072;²杭州佰辰医学检验所有限公司 310012

通信作者:刘瑾, Email: 18321775325@163.com

【摘要】 目的 建立同位素稀释超高效液相色谱串联质谱(ID-UPLC-MSMS)同时测定血清中 5 种脂溶性维生素的方法,以满足临床检测多种脂溶性维生素的需要。**方法** 选取 2019 年 4 月至 2019 年 8 月间上海市第十人民医院的血清样本并通过萃取法提取脂溶性维生素,采用 ID-UPLC-MSMS 进行检测,参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)的相关文件,对该方法进行性能验证。**结果** 提出并成功验证了 ID-UPLC-MSMS 快速检测血清中多种脂溶性维生素的方法,该方法的检测线性范围分别为维生素 A(VA):25~2 500 $\mu\text{g/L}$, 25-羟基维生素 D₂[25(OH)D₂]: 2~200 $\mu\text{g/L}$, 25-羟基维生素 D₃[25(OH)D₃]: 2~200 $\mu\text{g/L}$, 维生素 E(VE): 0.25~50 mg/L, 维生素 K1(VK1): 0.1~20 $\mu\text{g/L}$ 。5 种分析物的批内和批间精密标准偏差均在 $\pm 15\%$ 以内, 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 标准品测试结果的准确度为 96.44%~102.37%。**结论** 采用 ID-UPLC-MSMS 法同时测定 5 种脂溶性维生素,方法学性能满意,结果准确可靠,适合临床样本分析。

【关键词】 维生素类; 色谱法, 高压液相; 串联质谱法

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20190930-00216

Rapid determination of various fat-soluble vitamins in serum by isotope dilution ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Yi Wanwan¹, Shi Qiuyuan¹, Chen Congyan², Yuan Fang², Lyu Zhongwei¹, Liu jin¹

¹Department of Nuclear Medicine, Tenth People's Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200072, China; ²Hangzhou BIOZON Medical Co., Hangzhou 310012, China

Corresponding author: Liu jin, Email: 18321775325@163.com

【Abstract】 Objective To establish an analytical method for the simultaneous determination of five fat-soluble vitamins in serum using isotope dilution ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (ID-UPLC-MSMS). **Methods** Fat-soluble vitamins were obtained from serum samples which collected from Shanghai Tenth People's Hospital between April 2019 and August 2019 by the extraction method, and were detected by ID-UPLC-MSMS. The performance of the method was verified by referring to the relevant documents of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Results** The ID-UPLC-MSMS method for the rapid detection of various fat-soluble vitamins in serum was proposed and successfully verified. The linear range of the method: vitamin A: 25~2 500 $\mu\text{g/L}$, 25(OH)D₂: 2~200 $\mu\text{g/L}$, 25(OH)D₃: 2~200 $\mu\text{g/L}$, vitamin E: 0.25~50 mg/L, vitamin K1: 0.1~20 $\mu\text{g/L}$. The intra- and inter-assay precision standard deviations of the five analytes were within $\pm 15\%$, and the accuracy of the test results of the 25(OH)D₂ and 25(OH)D₃ standards was 96.44%~102.37%. **Conclusion** The performance of ID-UPLC-MSMS method for the simultaneous determination of five fat-soluble vitamins is satisfying, and the result is accurate and reliable, which suggested it can be used for the clinical sample.

【Key words】 Vitamins; Chromatography, high pressure liquid; Tandem mass spectrometry

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20190930-00216

维生素是机体必需的营养素,主要通过组成辅酶或辅基的形式,参与体内的物质和能量代谢^[1]。在脂溶性维生素检测方法中,荧光分析法仅适用于自身或其衍生物能产生荧光的维生素;放射免疫分析法有一定的放射性,高效液相色谱法检出限有限,且只能单组分检测;电化学发光法易受温湿度等相关

因素的影响,且临床应用时间较短,需要大量临床数据验证其分析的可靠性^[2-3]。同位素稀释超高效液相色谱串联质谱(isotope dilution ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, ID-UPLC-MSMS)是近年来发展迅速的一门新型技术,其操作简单、灵敏度高,且可实现多种化合物同时检测。

资料与方法

1. 仪器与试剂。主要仪器: Waters Acquity UPLC-TQD 型液质联用仪(美国, Waters 公司)。试剂: 维生素 A (vitamin A, VA) 购自 Sigma Aldrich 公司(美国); 2H8-VA、25-羟基维生素 D₃ [25(OH)D₃]、水合 2H6-25(OH)D₃、25-羟基维生素 D₂ [25(OH)D₂]、水合 2H3-25(OH)D₂、维生素 E (vitamin E, VE)、2H6-VE、维生素 K1 (vitamin K1, VK1)、2H7-VK1 均购自 IsoSciences 公司(美国)。色谱甲醇、乙腈、正己烷购自默克公司(德国), 色谱级甲酸铵购自上海麦克林生化科技有限公司。本研究符合《赫尔辛基宣言》的原则。样本采集与处理: 选取 2019 年 4 月至 2019 年 8 月于上海市第十人民医院就诊患者血清样本。采集静脉血 2 ml 于专用无添加剂的真空静脉采血管中, 室温下 3 000 r/min (离心半径 20 cm) 离心 5 min 备用。

2. 方法。(1) 标准溶液和内标溶液配制。分别用甲醇配制维生素标准品储备液和内标储备液 [VA-*d*₈ 100 mg/L、25(OH)D₃-*d*₆ 10 mg/L、25(OH)D₂-*d*₃ 10 mg/L、VE-*d*₆ 200 mg/L、VK1-*d*₇ 2 mg/L], -20 °C 保存备用。(2) 样本前处理。向 100 μl 血清样本中加入 300 μl 含内标的甲醇溶液进行蛋白质沉淀, 涡旋振荡 3 min 后加入 600 μl 正己烷萃取溶剂, 涡旋振荡 5 min 后, 4 °C 条件下 11 000 r/min (离心半径 10 cm) 离心 15 min, 移取 300 μl 上清液并干燥, 加入 150 μl 质量分数 70% 甲醇进行复溶, 涡旋振荡 2 min 后, 4 °C 条件下 11 000 r/min (离心半径 10 cm) 离心 3 min 得到待测样品。(3) 色谱条件。色谱柱: 美国 Waters 公司 Acquity UPLC® BEH C18 IVD 2.1×50 mm, 1.7 μm, 柱温: 50 °C; 流动相 A: 体积分数 0.1% 甲酸的水; 流动相 B: 含有 0.1% 甲酸的甲醇溶液; 梯度洗脱条件: 0~1.00 min, 75%~86%B, 1.01~1.40 min, 86%~98%B, 1.41~2.60 min, 98%~100%B, 2.61~3.20 min, 100%~75%B, 流速: 0.4 ml/min, 进样量: 7 μl。(4) 质谱条件。选择正离子电喷雾离子化的多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式, 毛细管电压 3.5 kV; 锥孔电压 25 V; 脱溶剂温度 500 °C; 脱溶剂气 800 L/Hr, 锥孔气 50 L/hr。5 种脂溶性维生素的 MRM 条件见表 1。

3. 方法学评价。(1) 评价依据。参照美国临床和实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 相关文件^[4-5], 以 2015 版《中国药典》四部中指导原则 9012《生物样品定量分析方法

表 1 5 种脂溶性维生素的 MRM 条件

维生素种类	母离子 质量 (Da)	子离子 质量 (Da)	锥孔电压 (V)	碰撞电压 (V)
VA	269.16	93.06	26	20
VA- <i>d</i> ₈	277.36	98.27	26	20
25(OH)D ₂	413.29	107.01	20	24
25(OH)D ₂ - <i>d</i> ₃	416.35	398.35	18	8
25(OH)D ₃	401.35	383.34	22	8
25(OH)D ₃ - <i>d</i> ₆	407.35	389.34	22	8
VE	431.29	165.08	30	20
VE- <i>d</i> ₆	437.41	171.13	30	18
VK1	451.35	187.07	44	28
VK1- <i>d</i> ₇	458.41	194.08	48	26

注: 25(OH)D₂ 为 25-羟基维生素 D₂, 25(OH)D₃ 为 25-羟基维生素 D₃, MRM 为多反应监测, VA 为维生素 A, VE 为维生素 E, VK 为维生素 K

验证指导原则^[6]以及《液相色谱-质谱临床应用建议^[7]》为依据, 同时参考文献[8-9]进行评价。(2) 定量下限。倍数稀释标准品储备液, 每个浓度重复检测 6 次, 满足相对标准偏差 < 20%, 且信噪比 > 10:1 的最低浓度值定为定量下限。(3) 线性范围。将储备液稀释, 按照正常样本处理程序进行处理并分析, 统计仪器响应值与实际浓度之间的线性关系。(4) 精密度评价。对低、中、高浓度的质控血清进行测定, 每份样本重复操作 5 次, 评价批内精密度和 3 d 的批间精密度。(5) 准确度实验。将低、中、高浓度标准品加入到混合血清。每个浓度重复 6 次实验, 计算加样回收率。检测值在目标靶值的 ±15% 以内, 低浓度点在 ±20% 以内。(6) 正确度验证。采用本研究建立的 ID-UPLC-MSMS 方法检测美国国家标准技术研究所 (National Institute of Standards and Technology, NIST) 制定的“标准参照样品 (standard reference materials, SRM)”中的 SRM972a [25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃] 的不同水平 [25(OH)D₂ 的靶值水平为 13.62 μg/L, 25(OH)D₃ 的靶值水平分别为 30.61 μg/L、19.80 μg/L、55.40 μg/L], 每个水平重复检测 2 次, 并取均值, 考察方法的正确度。

4. 统计学处理。采用 EXCEL 2013 数据处理软件进行数据分析。

结 果

1. 定量下限。VA、25(OH)D₂、25(OH)D₃、VE、VK1 的定量下限分别为: 25.00 μg/L、2.00 μg/L、2.00 μg/L、0.25 mg/L、0.10 μg/L。由于 VA 和 VE 在体内浓度较高, 故实际样本浓度偏高, 分别是: VA 为 86.80 μg/L, VE 为 4.95 mg/L。

2.线性范围。5 种维生素的标准曲线见表 2,各维生素在线性范围内的相关系数均>0.99。

表 2 ID-UPLC-MSMS 检测脂溶性维生素的线性范围

目标化合物	线性范围 ($\mu\text{g/L}$ 或 mg/L)	线性方程	相关系数 (r)
VA	25~2 500	$y = 1.276 x + 0.147$	0.998
25(OH)D ₂	2~200	$y = 1.203 x + 0.515$	0.992
25(OH)D ₃	2~200	$y = 0.022 x + 0.006$	0.991
VE	0.25~50 ^a	$y = 0.130 x + 0.237$	0.997
VK1	0.1~20	$y = 0.039 x + 0.008$	0.997

注:25(OH)D₂ 为 25-羟基维生素 D₂,25(OH)D₃ 为 25-羟基维生素 D₃,ID-UPLC-MSMS 为同位素稀释超高效液相色谱串联质谱,VA 为维生素 A,VE 为维生素 E,VK 为维生素 K;^a 单位为 mg/L

3.精密度实验。5 种维生素的批内精密度和批间精密度均在 $\pm 15\%$ 以内。

4.准确度实验。5 种维生素的回收率均在 80%~120%,能满足临床要求。

5.正确度验证。采用 NIST 有证标物 SRM972a 进行 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 的正确度验证,结果显示:25(OH)D₃ 的正确度为 96.44%~99.58%,25(OH)D₂ 的正确度为 102.37%,表明该方法测定 VD 具有较高的正确度(表 3)。

表 3 ID-UPLC-MSMS 法测定 25(OH)D₃ 和 25(OH)D₂ 的正确度验证

维生素 D	靶值 ($\mu\text{g/L}$)	平均值 ($\mu\text{g/L}$)	偏倚 (%)	正确度 (%)
25(OH)D ₃	30.61	29.52	3.69%	96.44
	19.80	19.41	2.01%	98.01
	55.40	55.17	0.42%	99.58
25(OH)D ₂	13.62	13.30	2.41%	102.37

讨 论

维生素在体内的浓度分布跨度较大,且不同种维生素之间存在协同或拮抗作用,因此同时监测多种维生素是非常必要的^[10-11]。ID-UPLC-MSMS 是近年来发展迅速的新兴技术,逐渐成为同时检测多种维生素的主流技术。禹松林等^[12]采用硫酸锌和甲醇沉淀蛋白质,用 ID-UPLC-MSMS 方法检测血清中 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃,定量限分别为 1.25 和 1 $\mu\text{g/L}$ 。贾妍等^[13]采用 ID-UPLC-MSMS 测定了血清中 VA 和 VE 的含量,检测限分别是 0.02 和 0.01 mg/L ,灵敏度较高。Mohr 等^[14]将 50 μl 血清/血浆分别与一定量的乙醇异辛烷/氯仿混合,有机层用于分析 6 种脂溶性维生素,但该方法使用的提取试剂较复杂且毒性较大,25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 的检出限较高,不能满

足临床需求。

本研究采用 ID-UPLC-MSMS 方法同时检测血清中 5 种脂溶性维生素的含量。由于人血清背景基质中均存在 5 种内源性的维生素,考虑操作的简易性,故选取甲醇作为标准曲线的背景基质溶液。为提高检测通量,本研究尝试将超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC)的洗脱时间降至 3.2 min,较文献^[15]报道的时间(4.8 min)更短,且连续进样 200 针不同的血清样本后,5 种维生素的保留时间偏移在 0.1 min 以内,稳定性较强。其次,本研究发现复溶剂对 VK1 的出峰影响较为关键,质量分数 70%甲醇作为复溶剂对 VK1 的出峰情况表现较好,故最终选择其为复溶剂。采用 NIST 有证标物对 VD 进行测定,结果显示该方法检测 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 的正确度较高。

综上,本研究建立了 ID-UPLC-MSMS 法同时测定血清中 5 种脂溶性维生素的方法,样本处理简单,测定灵敏、准确,适合临床样本分析。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] 关怀,尚丽新.妊娠期糖尿病流行现状[J].中国实用妇科与产科杂志,2015,31(1):91-94. DOI:10.7504/flk2014120120. Guan H, Shang LX. Prevalence of gestational diabetes mellitus [J]. Chin J Pract Gynecol Obst, 2015, 31(1): 91-94. DOI:10.7504/flk2014120120.
- [2] 钟天鹰.维生素检测方法的临床应用与新进展[J].中华检验医学杂志,2018,41(5):341-343. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2018.05.002. Zhong TY. Clinical application and development of vitamin detection[J]. Chin J Lab Med, 2018, 41(5): 341-343. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2018.05.002.
- [3] 谢志鹏,陈早明,汪敬武.维生素的分析方法研究进展[J].江西化工,2006(4):22-24. Xie ZP, Chen ZM, Wang JW. Progress in analytical methods of vitamins[J]. Jiangxi Chemical Industry, 2006(4): 22-24.
- [4] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP17-A2 Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation, approved guideline[S]. Wayne, PA: CLSI, 2004.
- [5] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP15-A2 User demonstration of performance for precision and accuracy, approved guideline[S]. Wayne, PA: CLSI, 2004.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2015:363-364. National Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 363-364.
- [7] 中华医学会检验医学分会,卫生计生委临床检验中心.液相色谱-质谱临床应用建议[J].中华检验医学杂志,2017,40(10):770-779. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2017.10.009. Laboratory Medicine Branch of Chinese Medical Association, Clinical Test Center of Health and Family Planning Commission. Sug-

- gestions for clinical application of liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Chin J Lab Med, 2017, 40(10): 770-779. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2017.10.009.
- [8] Albahrani AA, Rotarou V, Roche PJ, et al. A simultaneous quantitative method for vitamins A, D and E in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2016, 159: 41-53. DOI:10.1016/j.jsbmb.2016.02.019.
- [9] Wang X, Zhang T, Zhao X, et al. Quantification of folate metabolites in serum using ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014, 962: 9-13. DOI:10.1016/j.jchromb.2014.05.023.
- [10] Tesoriere L, Bongiorno A, Pintauro AM, et al. Synergistic interactions between vitamin A and vitamin E against lipid peroxidation in phosphatidylcholine liposomes[J]. Arch Biochem Biophys, 1996, 326(1): 57-63. DOI:10.1006/abbi.1996.0046.
- [11] Johansson S, Melhus H. Vitamin A antagonizes calcium response to vitamin D in man[J]. J Bone Miner Res, 2001, 16(10): 1899-1905. DOI:10.1359/jbmr.2001.16.10.1899.
- [12] 禹松林, 韩建华, 张江涛, 等. 同位素稀释超高效液相色谱串联质谱法快速测定血清 25-羟维生素 D₂ 和 25-羟维生素 D₃ 临床方法的建立[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(8): 617-622. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2014.08.014.
- Yu SL, Han JH, Zhang JT, et al. Establishment of an isotope dilution ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of serum 25-hydroxyvitamin D₂ and 25-hydroxyvitamin D₃ [J]. Chin J Lab Med, 2014, 37(8): 617-622. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2014.08.014.
- [13] 贾妍, 战思恩, 翟燕红, 等. 液相色谱串联质谱法测定血清维生素 A、E 含量[J]. 标记免疫分析与临床, 2018, 25(4): 574-579. DOI:10.11748/bjmy.issn.1006-1703.2018.04.033.
- Jia Y, Zhan SE, Zhai YH, et al. Determination of vitamin A and E in serum by liquid chromatography tandem-mass spectrometry[J]. Labeled Immunoassays & Clin Med, 2018, 25(4): 574-579. DOI:10.11748/bjmy.issn.1006-1703.2018.04.033.
- [14] Mohr SB, Gorham ED, Kim J, et al. Could vitamin D sufficiency improve the survival of colorectal cancer patients? [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2015, 148: 239-244. DOI:10.1016/j.jsbmb.2014.12.010.
- [15] 冯振, 景叶松, 弭兆元. 一种同时检测血液样品中多种脂溶性维生素的方法; 中国, 201510581956.X[P]. 2015-12-16.
- Feng Z, Jing YS, Mi ZY. A method for simultaneous determination of several fat soluble vitamins in blood samples; China, 201510581956.X[P]. 2015-12-16.

(收稿日期:2019-09-30)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

中华医学会系列杂志论文作者署名规范

为尊重作者的署名权,弘扬科学道德和学术诚信精神,中华医学会系列杂志论文作者署名应遵守以下规范。

一、作者署名

中华医学会系列杂志论文作者姓名在题名下按序排列,排序应在投稿前由全体作者共同讨论确定,投稿后不应再作改动,确需改动时必须出示单位证明以及所有作者亲笔签名的署名无异议书面证明。

作者应同时具备以下四项条件:(1)参与论文选题和设计,或参与资料分析与解释;(2)起草或修改论文中关键性理论或其他主要内容;(3)能按编辑部的修改意见进行核修,对学术问题进行解答,并最终同意论文发表;(4)除了负责本人的研究贡献外,同意对研究工作各方面的诚信问题负责。仅参与获得资金或收集资料者不能列为作者,仅对科研小组进行一般管理者也不宜列为作者。

二、通信作者

每篇论文均需确定一位能对该论文全面负责的通信作者。通信作者应在投稿时确定,如在来稿中未特殊标明,则视第一作者为通信作者。集体署名的论文应将对该文负责的关键人物列为通信作者。规范的多中心或多学科临床随机对照研究,如主要责任者确实超过一位的,可酌情增加通信作者。无论包含几位作者,均需标注通信作者,并注明其 Email 地址。

三、同等贡献作者

不建议著录同等贡献作者,需确定论文的主要责任者。确需著录同等贡献作者时,可在脚注作者项后另起一行著录“前×位作者对本文有同等贡献”,英文为“×× and ×× contributed equally to the article”。英文摘要中如同等贡献者为第一作者且属不同单位,均需注录其单位,以*、#、△、※等顺序标注。同一单位同一科室作者不宜著录同等贡献。作者申请著录同等贡献时需提供全部作者的贡献声明,期刊编辑委员会进行核查,必要时可将作者贡献声明刊登在论文结尾处。