

利用液质联用技术同时检测血清19种维生素的方法

林东子¹, 刁嘉茵², 雷春燕², 王威¹, 肖妮², 李玉美³, 林炳耀¹, 杨月明², 孙志豪⁴, 张召^{2, 5*}
(1. 佛山市第四人民医院, 广东佛山 528000; 2. 广州南芯医学检验实验室有限公司, 广东广州 524000;
3. 东莞市第六人民医院, 广东东莞 523008; 4. 广东省东莞市妇幼保健院, 广东东莞 523170; 5. 华南生物医药研究院, 广东广州 524000)

摘要:目的 建立测定人血清19种(13种水溶性和6种脂溶性)维生素质量浓度的高效液相串联质谱(LC-MS/MS)方法。方法 人血清样本中分别用亲水柱、T3反相柱提取水溶性、脂溶性维生素, 电喷雾正负离子模式下以多反应检测方式检测, 内标法定量。结果 19种维生素标准曲线的线性相关系数为0.994~0.999, 精密度RSD为0%~15%, 回收率RSD为85%~115%, 最低检出限为0.0005~21.42 µg/L。结论 该方法同时测定血清19种维生素, 具有重现性好、精确度高、通量高等优点。

关键词: 超高相液相串联质谱; 维生素; 定量检测

中图分类号: Q 56

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2020)04-0400-07

Simultaneous detection of serum levels of 19 vitamins based on LC-MS/MS

LIN Dong-zi¹, DIAO Jia-yin², LEI Chun-yan², WANG Wei¹, SHAO Ni², LI Yu-mei³, LIN Bing-yao¹, YANG Yue-ming², SUN Zhi-hao⁴, ZHANG Zhao^{2, 5*} (1. Foshan Fourth People's Hospital, Foshan 528000, China; 2. Guangzhou Nanxin Medical Laboratory Co. Ltd., Guangzhou 524000, China; 3. Dongguan Sixth People's Hospital, Dongguan 523008, China; 4. Dongguan Maternal and Child Health Hospital, Dongguan 523170, China; 5. Biomedicine Institute of South China, Guangzhou 524000, China)

Abstract: Objective To establish a high performance LC-MS/MS method for detecting serum contents of 19 (13 water- and 6 lipid-soluble) vitamins in humans. Methods Water- and lipid-soluble vitamins were extracted from serum samples using hydrophilic column and T3 reversed-phase column, respectively. Positive and negative electrospray ionization was performed by multiple reaction monitoring mode. The internal standard was used for quantification. Results The linear correlation coefficients of 19 vitamins were 0.994-0.999. The relative standard deviation (RSD) values of precision and recovery were 0-15% and 85%-115%, respectively. The minimum detection limits were 0.0005-21.42 µg/L. Conclusion The method is reproducible, accurate, and high-throughput for simultaneous detection of serum levels of 19 vitamins.

Key words: LC-MS/MS; Vitamin; quantitative detection

维生素是酶的辅基和酶的组成部分, 对生物体的新陈代谢起调节作用^[1], 是人体生长和发育不可

或缺的重要营养元素之一。如: 缺乏维生素B₆会导致贫血症、脂溢性皮炎^[2]; 缺乏维生素C易引发坏血病、抵抗力下降^[3]; 缺乏维生素A会导致夜盲症、干眼病、皮肤干燥等^[4]。故体内维生素含量的测定具有重要的临床意义。现有常用的维生素检测方法主要为毛细管电泳法^[5-6]、电化学分析法^[7-9]、高效液相色谱法^[10-12]、高效液相色谱质谱联用法等^[13]。其中电泳法、电化学法、高效液相色谱法存在一定的缺点, 如: 结果差异大、线性差、衍生化操作复杂、通量小等。而液相色谱质谱具有高灵敏度、高精度、高通量的特点, 因此, 研究出一种基于液相色谱质谱联用的方法测定体内维生素并将其应用于临床愈显重要。

基金项目: 广州市科技计划项目(No.202002030200), 广东省医学科研基金(No.B2018014), 东莞市社会科技发展项目(No.2018507150051657), 佛山市自筹经费类科技计划项目(医学类科技攻关), (No.1920001000648), 佛山市卫生健康局医学科研课题(No.20200224, No.20180138)

收稿日期: 2020-01-19; **修订日期:** 2020-04-15

作者简介: 林东子(1981-), 男, 硕士, 副主任技师

通信作者: 张召(1988-), 男, 博士, E-mail:

zhangzhao0402@163.com

1 资料和方法

1.1 仪器和试剂

岛津LC-30AD cL型液相色谱仪;岛津CL8050型质谱仪。

乙腈、正己烷、甲醇和甲酸(St. Louis, 美国)。去离子水(Millipore, MA, USA)。维生素A、维生素D₂、维生素D₃、维生素E、维生素K₁、维生素K₂、维生素B₁、维生素B₂、烟酸、烟酰胺、维生素B₅、吡哆胺、吡哆醛、吡哆醇、维生素B₇、维生素B₉、维生素B₁₂、维生素B₁₃、维生素C标准品均购买自Sigma-Aldrich、上海阿拉丁生化科技股份有限公司,纯度均大于98%。

维生素D₂-[6, 19, 19-D₃]、维生素D₃-[6,19,19-D₃]、维生素A-[12,13,20-¹³C₃]、维生素E-[¹³C₃]、维生素K₁-[¹³C₆]、维生素K₂-[¹³C₆]、维生素B₁-[¹³C₄]盐酸盐、维生素B₂-[¹³C₄, ¹⁵N₂]、维生素B₃烟酸-[D₄]、维生素B₃烟酰胺-2, 4, 5, 6-[D₄]、维生素B₅-[¹³C₆, ¹⁵N₂]、维生素B₆吡哆胺-[D₃]、维生素B₆吡哆醇-[D₃]、维生素B₆吡哆醛-[D₃]、维生素B₇-[D₂]、维生素B₉-[¹³C₅]、维生素B₁₃-[1, 3-¹⁵N₂]、维生素B₁₂-[¹³C₇]、维生素C-[1-¹³C]内标物均购买自CIL公司,纯度均大于98%。

1.2 方法

1.2.1 水溶性维生素色谱条件 色谱柱: WATERS ACQUITY UPLC @BEH Amide Column (100Å, 1.7 μm, 2.1 mm × 100 mm, 1/pkg)。流动相: A水: 乙腈(50: 50, 含有0.04%氨水+10 mmol/L乙酸铵); B乙腈: 水(95: 5, 含有0.04%氨水+10 mmol/L乙酸铵); 流速: 0.5 mL/min; 进样量: 10 μL; 柱温: 30 °C; 梯度为0~2.0 min 100% B, 2.0~12.0 min 100%~50% B, 12.0~13.0 min 50% B, 13.0~13.01 min 50%~100% B, 13.01~18.0 min 100% B。

1.2.2 脂溶性维生素色谱条件 色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3 Column (1.8 μm, 2.1 mm × 100 mm, 1/pkg)。流动相: A 0.1%甲酸水; B 0.1%甲酸甲醇; 流速: 0.5 mL/min; 进样量: 10 μL; 柱温: 40 °C; 梯度: 0~5 min 80% B, 5~5.01 min 80%~97% B, 5.01~7.5 min 97% B, 7.5~7.6 min 97%~100% B, 7.6~12.0 min 100% B, 12.0~12.01 min 100%~80% B, 12.01~15 min 80% B。

1.2.3 质谱条件 ESI源, MRM正负离子扫描模式, 雾化气流量为3 L/min, 加热气流量为10 L/min, 接口温度为300 °C, DL温度为250 °C, 加热块温度为400 °C, 干燥气流量为10 L/min。19种维生素及其内标最优的HPLC-MS/MS参数见表1。

1.2.4 脂溶性维生素提取方法 取200 μL血清置于

表1 19种维生素及其内标最优的HPLC-MS/MS参数

指标	RT	Q1	Q2	CE	内标	Q1	Q2	CE
维生素B ₁	8.3	265.1	122.3	-20	维生素B ₁ -[¹³ C ₄]盐酸盐	269.1	122.2	-20
维生素B ₂	6.6	377.1	243.2	-23	维生素B ₂ -[¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₂]	383.1	249.3	-25
维生素B ₃ -烟酸	7.1	124.0	78.3	-22	维生素B ₃ -烟酸-[D ₄]	128.0	84.3	-22
维生素B ₃ -烟酰胺	0.9	123.0	80.3	-21	维生素B ₃ -烟酰胺-2,4,5,6-[D ₄]	127.1	83.3	-21
维生素B ₅	9.0	220.1	90.2	-14	维生素B ₅ -[¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂]	224.1	94.2	-14
维生素B ₆ -吡哆醇	1.8	170.1	134.3	-20	维生素B ₆ -吡哆醇-[d ₃]	173.1	155.3	-15
维生素B ₆ -吡哆醛	1.6	168.0	150.3	-15	维生素B ₆ -吡哆醛-[d ₃]	171.1	153.2	-15
维生素B ₆ -吡哆胺	7.1	169.1	134.3	-20	维生素B ₆ -吡哆胺-[d ₃]	172.1	155.3	-15
维生素B ₇	8.5	245.1	227.2	-15	维生素B ₇ -[d ₂]	247.1	229.2	-15
维生素B ₉	14.0	442.1	295.3	-17	维生素B ₉ -[¹³ C ₅]	447.1	295.3	-17
维生素B ₁₂	11.8	678.3	147.2	-41	维生素B ₁₂ -[¹³ C ₇]	682.1	457.4	-36
维生素B ₁₃	8.1	155.0	110.9	13	维生素B ₁₃ -[1,3- ¹⁵ N ₂]	156.9	112.9	13
维生素C	10.1	175.0	114.9	13	维生素C-[1- ¹³ C]	176.0	115.9	14
25-羟基维生素D ₂	6.9	413.3	395.5	-11	维生素D ₂ -[6,19,19-D ₃]	416.3	398.5	-11
25-羟基维生素D ₃	6.8	401.3	383.5	-10	维生素D ₃ -[6,19,19-D ₃]	404.3	386.5	-11
维生素A	6.8	269.4	93.3	-22	维生素A-[12,13,20- ¹³ C ₃]	272.2	96.2	-21
α-维生素E	10.1	431.4	165.3	-22	维生素E-[¹³ C ₃]	434.4	168.3	-26

(接上表)

指标	RT	Q1	Q2	CE	内标	Q1	Q2	CE
维生素K ₁	11.6	451.4	187.3	-23	维生素K ₁ -[¹³ C ₆]	457.4	193.3	-21
维生素K ₂	13.4	445.3	187.3	-22	维生素K ₂ -[¹³ C ₆]	655.5	193.2	-32

2.0 mL离心管中,加入400 μ L甲醇:乙腈(体积比1:1,含10 μ L内标工作液),震荡混匀30 s,加入1.2 mL正己烷,震荡混匀5 min。12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C,离心5 min,转移上清1 000 μ L至1.5 mL EP管中。将EP管置于室温下,氮气吹干(2 mL/min流量)。加入100 μ L甲醇复溶,震荡混匀1 min。将全部样品转移至96孔板中,覆上铝箔封膜,检测备用。

1.2.5 水溶性维生素提取方法 取500 μ L血清至2.0 mL离心管中,加入1 500 μ L甲醇:乙腈(体积比1:1,含20 μ L内标工作液),震荡混匀5 min,在4 $^{\circ}$ C内冰箱放置10 min沉淀蛋白。17 000 r/min离心10 min,转移上清1 600 μ L至2.0 mL EP管中,氮气吹干(2 mL/min流量)。加入100 μ L水:甲醇(体积比1:1)复溶。将全部液体转移至96孔板中,附上铝箔封膜,检测备用。

1.2.6 水溶性维生素标准液配制 水溶性维生素标准品用含0.1%甲酸和0.2 g/L DTT的甲醇:水(体积比1:1)溶液溶解,配置成标准品母液浓度为1 g/L的标准品母液,用乙腈:甲醇(体积比3:1)稀释不同倍数

后,混合成浓度如表2的维生素水溶性标准品混合工作液。水溶性色谱图见图1。

水溶性维生素内标用含0.1%甲酸和0.2 g/L DTT的甲醇:水(体积比1:1)溶液溶解,除维生素B₁₂-[¹³C₇]配置成内标母液质量浓度为1 mg/L外,其余内标配置成1 g/L的内标母液,用乙腈:甲醇(体积比1:1)稀释成最终浓度如表2的水溶性维生素内标工作液。

1.2.7 脂溶性维生素标准液配制 脂溶性维生素标准品用甲醇溶液溶解,除维生素A配置成标准品母液质量浓度为3 g/L、维生素E配置成标准品母液质量浓度为2 g/L外,其余配置成标准品母液质量浓度为1 g/L的标准品母液,用甲醇稀释不同倍数后,混合成浓度如表2的维生素脂溶性标准品混合工作液。脂溶性色谱图见图2。脂溶性维生素内标用甲醇溶解,除维生素内标D₂-[6,19,19-D₃]和D₃-[6,19,19-D₃]配置成内标母液浓度为0.1 g/L外,其余内标配置成质量浓度为1 g/L的内标母液,用甲醇稀释成最终浓度如表2的脂溶性维生素内标工作液。

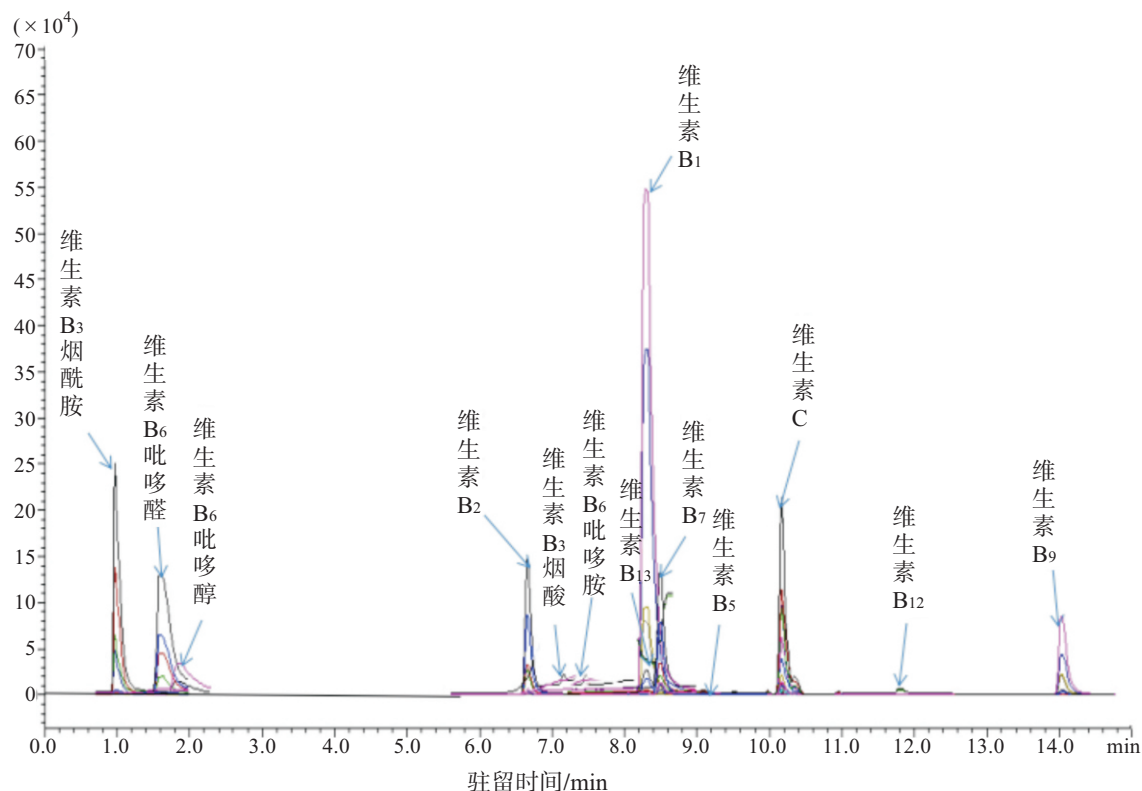


图1 水溶性标准品色谱图

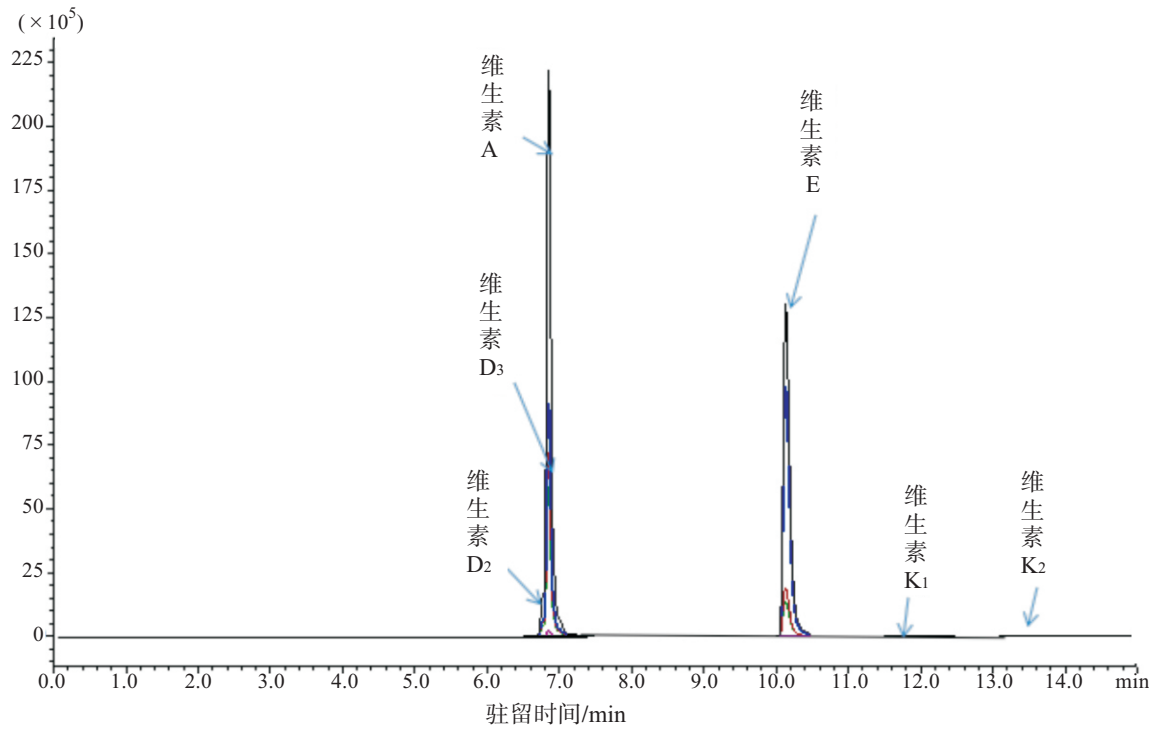


图2 脂溶性维生素标准品色谱图

表2 维生素标准品混合工作液和内标工作液的质量浓度

标准品	质量浓度/(μg/L)	内标	质量浓度/(μg/L)
维生素B ₁	0.75	维生素B ₁ -[¹³ C ₄]盐酸盐	9.09
维生素B ₂	568.18	维生素B ₂ -[¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₂]	2 272.72
维生素B ₃ -烟酸	9 090.90	维生素B ₃ -烟酸-[D ₄]	454.54
维生素B ₃ -烟酰胺	909.09	维生素B ₃ -烟酰胺-2,4,5,6-[D ₄]	1 515.15
维生素B ₅	9 090.90	维生素B ₅ -[¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂]	15 151.51
维生素B ₆ -吡哆醇	56.81	维生素B ₆ -吡哆醇-[d ₃]	0.0006
维生素B ₆ -吡哆醛	45.45	维生素B ₆ -吡哆醛-[d ₃]	45.45
维生素B ₆ -吡哆胺	45.45	维生素B ₆ -吡哆胺-[d ₃]	56.81
维生素B ₇	454.54	维生素B ₇ -[d ₂]	1 136.36
维生素B ₉	909.09	维生素B ₉ -[¹³ C ₅]	909.09
维生素B ₁₂	151.51	维生素B ₁₂ -[¹³ C ₇]	63.63
维生素B ₁₃	5 681.81	维生素B ₁₃ -[1,3- ¹⁵ N ₂]	378.78
维生素C	363 636.36	维生素C-[1- ¹³ C]	90 909.09
维生素A	7 142.85	维生素A-[12,13,20- ¹³ C ₃]	22 222.22
α-维生素E	47 619.04	维生素E-[¹³ C ₃]	5 555.55
25-羟基维生素D ₂	9 523.80	维生素D ₂ -[6,19,19-D ₃]	3 333.33
25-羟基维生素D ₃	4 761.90	维生素D ₃ -[6,19,19-D ₃]	1 481.48
维生素K ₁	285.71	维生素K ₁ -[¹³ C ₆]	111.11
维生素K ₂	4 761.90	维生素K ₂ -[¹³ C ₆]	1 851.85

1.2.8 水溶性维生素标曲工作液配制方法 水溶性维生素标准品混合工作液用乙腈:甲醇(体积比3:1)按梯度稀释配置成系列浓度的标准曲线溶液,取上

述所配置对应的系列浓度标曲溶液20 μL与内标溶液20 μL,再加入460 μL含0.1%甲酸和0.2 g/L DTT的甲醇:水(体积比1:1)的提取液中,混合均匀后按照样

本提取方法提取。

1.2.9 脂溶性维生素标准品混合工作液配制方法 脂溶性维生素标准品混合工作液按梯度稀释配置成系列浓度的标准曲线溶液,取上述所配置对应的系列浓度标准溶液20 μL与内标溶液10 μL,再加入470 μL甲醇:乙腈(体积比1:1)提取液中,混合均匀照样本提取方法提取。以外标与内标的峰面积比为y轴,对质量浓度x轴做线性方程: $y=ax+b$, 进行线性回归分析。

1.3 精密度

低、中、高浓度的质控样本分别在提取前和提取后加入内标,按样品处理方法进行样本提取与上机检测,分析方法的精密度描述分析物重复测定的接近程度。

1.4 回收率

同一样本平均分成6份,前3份每份按样本按提取方法提取后分别加入低、中、高浓度的内标作为组1质控样本进行上机检测。后3份,每份分别加入低、中、高浓度的内标按提取方法提取后作为组2的质控样本进行上机检测。

2 结果

2.1 标曲线性范围与检测限

按照LC-MS/MS条件对各维生素标品进行分析,各个维生素的线性范围、线性相关系数、检出限及回归方程如表3所示。由此可知,各维生素的线性相关系数为0.994~0.999,线性关系良好,最低检出限为0.0005~21.42 μg/L。

2.2 精密度与准确度

由表4可知,19种维生素精密度的RSD值为0~15%,精密度良好。回收率为85%~115%,回收率较高,说明方法的准确度良好。

2.3 样本检测结果

分别取儿童、孕妇和成人各100份样本,按样品处理方法处理后,分别测定脂溶性和水溶性维生素含量,结果范围如表5所示。

3 讨论

维生素作为生长和代谢所必须的微量营养物质,对维持人体健康有充分的科学依据。维生素保健品的市场占有份额不断增大,但由于缺乏科学的使用指导,维生素使用现状混乱,因此,通过检测人体内各种维生素的真实状态,针对性地调整所需维生素,更符合个性化治疗要求。目前,常用的维

表3 维生素的回归方程、相关系数及检出限

标准品	线性范围/(μg/L)	相关系数	回归方程	检出限/(μg/L)
A	64.28~6 428.57	0.999	$y=0.001x+0.13$	21.42
D ₂	1.07~8 571.42	0.998	$y=0.002x+0.33$	0.68
D ₃	1.07~4 285.71	0.999	$y=0.006x+1.59$	0.36
E	428.57~42 857.14	0.999	$y=0.003x-1.36$	15.30
K ₁	0.85~257.14	0.999	$y=0.11x-0.03$	0.03
K ₂	0.85~4 285.71	0.999	$y=2.22x+469.01$	0.05
C	581.81~290 909.09	0.997	$y=20.68x-81 904.50$	0.52
B ₁	0.0012~18.18	0.998	$y=15 633.40x+19 581.00$	0.0005
B ₂	0.90~454.54	0.999	$y=1 421.56x-9 294.75$	0.12
B ₃ -烟酸	7.27~7 272.72	0.999	$y=77.56x+4 727.25$	4.84
B ₃ -烟酰胺	1.45~727.27	0.999	$y=345.74x-754.56$	0.48
B ₅	7.27~7 272.72	0.998	$y=555.48x-51 217.20$	4.84
B ₆ -吡哆醛	0.09~45.45	0.996	$y=3 203.76x-3 817.68$	0.03
B ₆ -吡哆胺	0.07~36.36	0.998	$y=5 437x+29 480$	0.02
B ₆ -吡哆醇	0.07~36.36	0.999	$y=11 907.80x-4 375.52$	0.02
B ₇	0.07~363.63	0.994	$y=1 397.06x-17 383.80$	0.05
B ₉	1.45~727.27	0.998	$y=401.03x+4 311.23$	0.31
B ₁₂	0.12~121.21	0.999	$y=644.92x+3 010.35$	0.06
B ₁₃	4.54~4 545.45	0.999	$y=609.76x-13 580.80$	0.23

表4 维生素的精密度测试与回收率实验

指标	浓度	准确度	精密度RSD%		指标	浓度	准确度	精密度RSD%	
		回收率%	提取前	提取后			回收率%	提取前	提取后
维生素D ₂ -[6,19,19-D ₃]	低	96.53	3.60	0.83	维生素B ₃ 烟酰胺-2,4,5,6-[D ₄]	低	95.24	0.80	0.73
	中	95.68	5.04	1.46		中	109.51	0.79	1.55
	高	99.54	2.19	0.96		高	98.5	0.19	0.33
维生素D ₃ -[6,19,19-D ₃]	低	95.44	1.23	2.43	维生素B ₅ -[¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂]	低	100.67	3.12	0.36
	中	103.01	0.27	0.83		中	101.86	0.40	1.20
	高	98.34	1.01	0.41		高	105.9	2.39	0.28
维生素A-[12,13,20- ¹³ C ₃]	低	96.15	2.10	1.76	维生素B ₆ 吡哆胺-[D ₃]	低	94.55	0.73	0.82
	中	98.14	0.87	0.16		中	92.98	0.73	0.49
	高	103.86	0.85	1.60		高	93.58	0.87	1.20
维生素E-[¹³ C ₃]	低	100.88	1.05	0.43	维生素B ₆ 吡哆醇-[D ₃]	低	88.51	0.59	0.57
	中	93.05	1.05	0.59		中	94.60	1.21	0.34
	高	104.02	1.29	2.00		高	87.70	0.87	0.64
维生素K ₁ -[¹³ C ₆]	低	110.45	1.51	1.25	维生素B ₆ 吡哆醛-[D ₃]	低	102.36	0.15	0.29
	中	108.12	1.33	0.34		中	105.37	0.10	0.19
	高	99.71	0.35	0.33		高	97.46	0.19	0.08
维生素K ₂ -[¹³ C ₆]	低	109.25	0.42	0.78	维生素B ₇ -[D ₂]	低	122.17	0.03	0.15
	中	106.41	2.52	0.46		中	114.22	0.02	0.08
	高	110.09	0.62	0.11		高	104.55	0.09	0.05
维生素B ₁ -[¹³ C ₄]盐酸盐	低	91.83	1.13	4.45	维生素B ₉ -[¹³ C ₅]	低	101.42	1.02	0.58
	中	111.94	1.02	3.27		中	95.12	1.30	0.64
	高	91.17	4.47	2.21		高	97.81	0.59	0.58
维生素B ₂ -[¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₂]	低	58.63	0.65	0.30	维生素B ₁₃ -[1,3- ¹⁵ N ₂]	低	97.66	0.89	0.87
	中	84.26	0.67	3.05		中	101.70	0.74	0.85
	高	100.43	1.14	0.84		高	97.37	1.29	1.45
维生素B ₃ 烟酸-[D ₄]	低	107.39	0.51	1.47					
	中	110.37	7.07	0.3					
	高	107.65	1.51	1.25					

表5 实际样品测试范围

检测指标	检测值/(μg/L)	检测指标	检测值/(μg/L)
维生素C	473.937~8 294.785	维生素B ₇	0.011~1.852
维生素B ₁	0.047~0.879	维生素B ₁₂	0.138~0.279
维生素B ₂	0.304~19.431	维生素B ₁₃	0.689~15.438
维生素B ₃ -烟酸	2.514~39.005	维生素25-OH D ₂	0.189~4.128
维生素B ₃ -烟酰胺	2.393~22.140	维生素25-OH D ₃	1.008~42.591
维生素B ₅	0.980~59.189	维生素A	91.524~796.737
维生素B ₆ -吡哆醛	0.005~4.847	维生素E	998.233~2794.925
维生素B ₆ -吡哆胺	0.409~10.101	维生素K ₁	0.104~1.318
维生素B ₆ -吡哆醇	0.434~4.879	维生素K ₂	<0.05
维生素B ₉	3.748~37.172		

生素检测方法如酶联免疫分析法、化学免疫发光法,结果差异较大,特异性较差,应用于临床的可靠性不高;而高效液相色谱法由于检测限有限,难以检测样本中含量较低的维生素。由于血清成分复杂,为降低基质效应,在使用高效液相色谱-质谱进行定量分析时,通常只针对一种或几种维生素做分析,增加了检测时间、成本和血量需求,因此,开发一种能够同时检测血清中多种维生素的方法迫在眉睫。

人体中水溶性维生素大多以酶蛋白或活性物质的辅酶(辅基)形式存在,从肠道吸收后,通过循环到机体需要的组织中,多余的部分大多由尿排出,在体内储存甚少,血清半衰期很短,因此血清中水溶性维生素的含量较低。脂溶性维生素血液中维生素K优先被肝脏利用,血液中维生素K浓度较低。25羟基维生素D₂、D₃在人体内主要与血清蛋白结合,而人体内存在大量的高亲和蛋白会增加检测中基质干扰,影响定量结果的准确性。根据维生素的极性,本研究分别采用亲水柱和T3反相柱对人体血清中水溶性和脂溶性维生素进行检测,结合同位素内标法建立标准曲线进行定量,增强了检测方法的特异性。水溶性维生素对光、热、酶和溶液pH等敏感而极易被氧化分解。因此,实验过程加入抗氧化剂二硫苏糖醇DTT并全部避光操作。水溶性维生素流动相中加入10 mmol/L乙酸铵,脂溶性维生素流动相中加入0.1%甲酸,可降低血清杂质干扰,增强分析物的响应,改善峰形。脂溶性与水溶性维生素精密度的RSD均在15%范围之内,证明该维生素检测方法的重复性良好。为简化样本处理程序,脂溶性样本采用甲醇直接沉淀蛋白,其提取回收率均在85%~115%范围内,证明该提取方法准确度良好。水溶性样本采用乙腈:甲醇(体积比1:1)沉淀蛋白,从回收率结果可以看出,水溶性维生素B₂、B₇部分低、中浓度样本值超出85%~115%,高浓度样本则均在范围内,表明低、中浓度的维生素B₂、B₇指标受该提取方法的影响较大,高浓度则相反。因人体血样本中的水溶性维生素B₂、B₇含量较高,故该指标在本提取方法中稳定。其余水溶性维生素指标的提取回收率均在范围值内,证明该方法准确度良好。维生素K主要由维生素K₁、K₂组成,动物体内一方面可将膳食摄入的维生素K₁转化为维生素K₂并得以储存;一方面可通过共生菌合成一定的维生素K₂,测定大多数患者维生素K状态的最实用方法是

测定血清维生素K₁浓度,故实际样本的维生素K₂较难检测时,该检测方法仍满足常规检测要求。

本研究建立了同时检测血清中19项维生素的高效液相色谱质谱联用法。该方法通量高、精确度高,同时样品处理简便、耗时短,具有较高的回收率与准确性。对儿童,孕妇,成人血清脂溶性及水溶性浓度测定结果显示,该方法可满足维生素常规测定要求,但其普适性有待进一步的研究确定。

参考文献:

- [1] 薛爱芳,李胜清,韦明元,等. 高效液相色谱法测定蔡扑维眼液中的维生素B12[J]. 分析化学学报, 2005, 21(6): 701-702.
- [2] CHIANG E P, SMITH D E, SELHUB J, et al. Inflammation causes tissuespecific depletion of vitamin B6 [J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(6): R1254-R1262.
- [3] 丁文轩. 维生素C的结构、性质与功效[J]. 当代化工研究, 2017(7): 125-126.
- [4] 王朝宗,张洪峰,王乐,等. 维生素A生理功能研究现状[J]. 临床医药文献电子杂志, 2015, 2(1): 196-197.
- [5] MARIA S P, CLAUDINEI A S, MARINA M T, et al. Determination of folic acid in tablets by microemulsion electrokinetic chromatography[J]. J Chromatogra A, 2004, 1051(1-2): 291-296.
- [6] 黄劲松,陈建兵,杜先锋,等. 毛细管电泳测定蘑菇中多种水溶性维生素[J]. 食品科学, 2008, 29(5): 344-346.
- [7] 刘俊杰. 人血清水溶性维生素B₁、B₂、B₆和B₉电化学法与HPLC-MS/MS法测定及相关性研究[D]. 济南山东大学, 2017.
- [8] 张俊霞. 电化学快速检测食品中维生素C研究[D]. 郑洲: 河南工业大学, 2017.
- [9] 彭杨. 电化学对食品中维生素C的快速检测[J]. 粮食科技与经济, 2019, 44(8): 68-69.
- [10] 肖志雯,曹云,周子荣. 高效液相色谱法测定人血清中维生素A的方法研究[J]. 现代预防医学, 2015, 42(4): 623-626, 630.
- [11] 蒋晔,刘红菊,郝晓花. 反相高效液相色谱法同时测定9种水溶性维生素[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(3): 339-341.
- [12] 黄睿. 高效液相色谱法测定饮料中B族维生素分析[J]. 现代食品, 2019(9): 166-168, 172.
- [13] 王一红,冯家力,潘振球,等. 液相色谱-串联质谱法分析10种水溶性维生素[J]. 中国卫生检验杂志, 2007(7): 1160-1162.