

超高效液相色谱 - 串联质谱法同时快速检测微量血清中 6 种脂溶性维生素

李雪梅¹, 吴慧慧¹, 陈竞², 赵盼¹, 唐玉菲¹

1. 安徽省第二人民医院(安徽省职业病防治院)职业卫生实验室, 安徽 合肥 230041;
2. 中国疾病预防控制中心营养与健康所, 国家卫生健康委员会微量元素与营养重点实验室

摘要:目的 建立超高效液相色谱 - 串联质谱法(UPLC-MS/MS)同时快速检测微量血清中维生素 A、维生素 D(25-OH-VD₂、25-OH-VD₃)、维生素 E(α -、 β -和 γ -生育酚)的方法。方法 血清中脂溶性维生素经甲醇-乙腈(50:50, v/v)沉淀蛋白、正己烷萃取,以 Phenomenex Kinetex F5 色谱柱为分离柱,2.5 mmol/L 甲酸铵-0.1% 甲酸水溶液和甲醇为流动相,梯度洗脱,电喷雾电离(ESI⁺)、多反应监测(MRM)模式下检测,同位素内标法定量。结果 血清中 6 种脂溶性维生素线性范围内线性关系良好,相关系数 $r > 0.995$;6 种脂溶性维生素的检测限为 0.20 ~ 1.25 ng/ml,定量限为 0.39 ~ 3.88 ng/ml;加标回收率为 86.6% ~ 107.7%,日内精密密度 < 9.6%,日间精密密度 < 9.3%。NIST 标准参照品 SRM 968f 验证方法准确度,结果偏差均在 5% 以内。结论 本方法准确度高、重现性好、用量少,适于婴幼儿等采血困难者微量血样中多种脂溶性维生素的同时快速检测。

关键词:脂溶性维生素;血清;超高效液相色谱 - 串联质谱法(UPLC-MS/MS)

中图分类号:R115 文献标志码:A 文章编号:1003-8507(2022)07-1297-06

An ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous and rapid detection of six fat-soluble vitamins in small volumes of serum

LI Xue-mei*, WU Hui-hui, CHEN Jing, ZHAO Pan, TANG Yu-fei

* Occupational Health Laboratory, Anhui NO. 2 Provincial People's Hospital (Anhui Prevention and Treatment Center for Occupational Disease), Hefei, Anhui 230041, China

Abstract: Objective To establish an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the rapid and simultaneous detection of six fat-soluble vitamins including vitamin A (Retinol) and vitamin D (25-OH-VD₂, 25-OH-VD₃), vitamin E (α -tocopherol, β -tocopherol, and γ -tocopherol) in small volumes of serum. **Methods** The serum samples were precipitated with methanol-acetonitrile (50:50, v/v), extracted with n-hexane. The separation of the target analytes was performed on a Phenomenex Kinetex F5 column (100 mm \times 2.1 mm, 2.6 μ m) with methanol and 2.5 mmol/L ammonium formate-0.1% formic acid aqueous solution as mobile phases under gradient elution. The detection was in the multiple reaction monitoring (MRM) mode with electrospray ionization (ESI) under positive conditions. The quantifications were based on the isotope internal standard method. **Results** The method showed good linearity within the linear range, with the correlation coefficients (r) > 0.995. The detection limits and the quantification limits of the six fat-soluble vitamins were 0.20-1.25 ng/ml and 0.39-3.88 ng/ml, respectively. The recoveries of the method spiked at the three levels were 86.6%-107.7%, with the intraday precision less than 9.6% and inter-day precision less than 9.3%, respectively. The accuracy of the method was assessed using the standard reference material (NIST SRM 968f), with the deviations all less than 5%. **Conclusion** The method is accurate, reproducible, and sample-saving, and it applies to the simultaneous and rapid detection of 6 fat-soluble vitamins in the trace serum sample, especially for infants and young children who have difficulty in blood collection.

Keywords: Fat-soluble vitamins; Serum; Ultra Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS)

基金项目:卫生健康标准项目(WST20200601)

作者简介:李雪梅(1987—),女,硕士,中药师,研究方向:检测分析

通讯作者:唐玉菲, E-mail: tyfcindy@163.com

维生素在人体生长代谢过程中发挥着重要作用,是人体必须的微量营养素,缺乏或过量都会对人体健康产生不利影响。维生素 A、D、E 是脂溶性维生素,研究表明缺乏这些维生素会增加患夜盲症、骨质疏松、心血管疾病及免疫系统相关疾病的风险^[1],婴幼儿及未成年人缺乏其对生长发育的影响则更为明显^[2-4]。目前维生素检测的方法主要有高效液相色谱法^[5-7]、液相色谱-串联质谱法^[8-14]等,其中液相色谱-串联质谱法因其灵敏度高、重现性好、可同时快速检测多种维生素已成为很多临床实验室的首选方法。但是目前的液相色谱-串联质谱方法血液需求量较大^[10,13],检测项目单一^[8-9,14]或检测时间较长^[11],不能满足临床同时快速检测多个项目的需求,特别是婴幼儿采血困难采血量很难满足需求。虽然已有部分学者建立微量检测方法用于维生素检测,但是这些方法需要衍生化过程,前处理复杂耗时较长^[8-9,14]。因此,建立能够用微量血液同时快速检测多种维生素的方法满足临床不同年龄段的检测需求显得尤为必要。

此外,视黄醇,维生素 D 的代谢产物 25-OH-VD₂、25-OH-VD₃、 α -生育酚是脂溶性维生素维生素 A、D、E 在血液循环中的主要存在形式,常作为脂溶性维生素检测的首选指标^[15-18]。 γ -生育酚是维生素 E 主要的饮食摄入形式,但其与 α -生育酚转移蛋白(α -TTP)的亲和力较低,在体内含量较 α -生育酚低,但是,近年来文献报道其在人体健康活动中也扮演着重要角色^[19]。本文建立超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)同时快速检测微量血清中视黄醇,维生素 D(25-OH-VD₂、25-OH-VD₃) 和 α -、 β -、 γ -生育酚的方法,满足临床各年龄段尤其是对婴幼儿同时快速检测多种维生素的需求。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂 Acquity UPLC-TQD 液质联用仪(美国 Waters);高速冷冻离心机(中国湘仪);涡旋振荡仪(德国 IKA);超声波振荡器(中国杭州右宁);氮吹仪(中国博纳艾杰尔);紫外分光光度计(日本岛津)。

视黄醇、25-OH-VD₂、25-OH-VD₃、 α -生育酚、 β -生育酚、 γ -生育酚均购自美国 Sigma-Aldrich;视黄醇-d₆标准品购自上海谱芬生物;25-OH-VD₂-d₃购自美国 IsoSciences、25-OH-VD₃-d₆、 α -生育酚-d₆标准品购自加拿大 TRC;血清质控样品购自美国 NIST;收集安徽省第二人民医院近期健康体检正常儿童血液样本 17 份,避光保存。

LC-MS 级甲醇,色谱级乙腈、正己烷及甲酸均购

自美国 Fisher;甲酸铵、牛血清白蛋白(BSA)购自美国 Sigma-Aldrich;色谱级乙醇购自国药集团。实验用水由 Milipore 纯水仪(美国密理博)提供。

1.2 标准溶液和内标溶液的配制 用无水乙醇配制视黄醇标准品储备液 100 μ g/ml; α -生育酚、 β -生育酚、 γ -生育酚标准品储备液各 1 000 μ g/ml,并用紫外分光光度计对其浓度进行校正^[18,20]。用甲醇配制 25-OH-VD₂标准品储备液 25 μ g/ml 和 25-OH-VD₃标准品储备液 100 μ g/ml,视黄醇-d₆标准品储备液 100 μ g/ml,25-OH-VD₂-d₃标准品储备液 50 μ g/ml,25-OH-VD₃-d₆标准品储备液 50 μ g/ml, α -生育酚-d₆标准品储备液 1 000 μ g/ml。

将各目标化合物标准储备液用复溶液(初始流动相)稀释混匀,配制成混合标准溶液(视黄醇 2.50 μ g/ml、25-OH-VD₂ 0.20 μ g/ml、25-OH-VD₃ 0.40 μ g/ml、 α -生育酚 50.00 μ g/ml、 β -生育酚 5.00 μ g/ml、 γ -生育酚 5.00 μ g/ml);将各同位素标准品储备液用甲醇稀释混匀,配制成混合内标工作液(视黄醇-d₆ 2.00 μ g/ml、25-OH-VD₂-d₃ 0.10 μ g/ml、25-OH-VD₃-d₆ 0.20 μ g/ml、 α -生育酚-d₆ 20.0 μ g/ml)。取 4 g BSA 溶解于 100 ml 水中配成 4% BSA 溶液。

1.3 样本前处理 取血清样品 20 μ l 至 2 ml 离心管中,加入 10 μ l 同位素内标工作液,80 μ l 水,2 000 r/min 涡旋振荡 30 s 后加入 200 μ l 甲醇-乙腈(50:50, v/v),2 000 r/min 混匀 60 s;加入 800 μ l 正己烷,2 000 r/min,混匀 5 min,然后 4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 5 min;吸取 600 μ l 上清液至 1.5 ml 离心管中,室温下氮气吹干;加 100 μ l 初始流动相复溶,涡旋振荡 60 s,4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 5 min,上清液转移至进样瓶中待分析。

1.4 色谱-质谱条件 采用 Phenomenex Kinetex F5 (100 mm \times 2.1 mm,2.6 μ m) 色谱柱,柱温 35 $^{\circ}$ C,流动相 A 含 2.5 mmol/L 甲酸铵和 0.1% 甲酸的水溶液;流动相 B 含 2.5 mmol/L 甲酸铵和 0.1% 甲酸的甲醇溶液,梯度洗脱程序:0~2.0 min,70% B,2.0~2.5 min,70%~88% B,2.5~3.5 min,88% B,3.5~3.51 min,88%~81% B,3.51~11.0 min,81% B,11.0~12.0 min,81%~70% B,流速 0.5 ml/min。进样量:20 μ l。

采用多反应监测(MRM)、电喷雾正离子模式(ESI⁺),离子源温度 150 $^{\circ}$ C,脱溶剂温度 500 $^{\circ}$ C,毛细管电压 3 kV,脱溶剂气流速 1 000 L/h;6 种脂溶性维生素的 MRM 离子参数见表 1。

2 结果与讨论

2.1 前处理条件优化 对血清前处理过程中蛋白沉淀剂(甲醇、乙腈、乙醇)的选择及萃取溶剂正己烷的用量(400 μ l、600 μ l、800 μ l)进行了优化,结果表明,

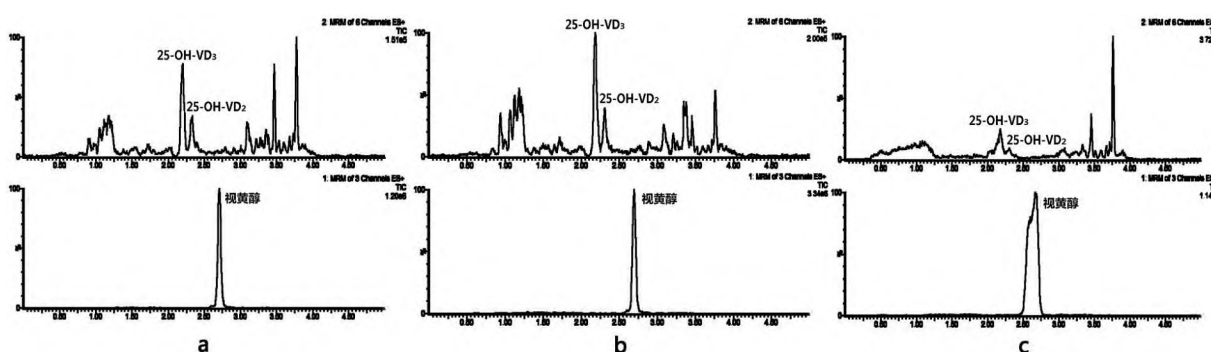
表 1 6 种脂溶性维生素的质谱参数表

Table 1 MS parameters for six fat-soluble vitamins

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能 (eV)
视黄醇	269.2	93.0	25	10
视黄醇-d ₆	275.2	93.1	25	10
25-OH-VD ₃	401.4	365.4	24	10
25-OH-VD ₃ -d ₆	407.2	371.4	24	10
25-OH-VD ₂	413.4	355.4	24	8
25-OH-VD ₂ -d ₃	416.4	358.4	24	8
α-生育酚	431.4	165.1	25	10
α-生育酚-d ₆	437.4	171.1	25	10
β、γ-生育酚	417.3	151.1	25	20

甲醇-乙腈 (50:50, v/v), 沉淀效果最好, 色谱图杂

峰明显减少; 正己烷用量较大时萃取更完全, 信号值更高。另外, 考察了不同复溶液体系: 甲醇-水 (50:50, v/v)、甲醇-水 (70:30, v/v)、甲醇均含 2.5 mmol/L 甲酸铵和 0.1% 甲酸对色谱分离的影响, 结果如图 1 所示, 使用 b 组复溶液即初始流动相时视黄醇响应值较 a 组增加 1 倍以上, c 组视黄醇峰宽变大且峰形不对称。同时 b 组中 25-OH-VD₃ 和 25-OH-VD₂ 响应值是 a 组的 2 倍、c 组的 4 倍以上, 且峰形明显改善有利于 25-OH-VD₃ 和 25-OH-VD₂ 的分离检测。最终, 采用血清样加水混匀后用 200 μl 沉淀剂 (甲醇: 乙腈 (50:50, v/v)) 沉淀蛋白, 800 μl 正己烷液液萃取, 取 600 μl 上清液氮吹, 初始流动相复溶进样。



注: 复溶液: a: 甲醇-水 (50:50, v/v) 含 2.5 mmol/L 甲酸铵和 0.1% 甲酸; b: 甲醇-水 (70:30, v/v) 含 2.5 mmol/L 甲酸铵和 0.1% 甲酸; c: 甲醇含 2.5 mmol/L 甲酸铵和 0.1% 甲酸

图 1 采用不同复溶液时 25-OH-VD₃、25-OH-VD₂ 和视黄醇的总离子流色谱图Fig. 1 Total ion chromatograms of 25-OH-VD₃, 25-OH-VD₂ and Retinol with different reconstitution fluid

2.2 液相色谱条件优化 比较了 ACQUITY UPLCBEH C18 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱、ACQUITY UPLCHSS PFP (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱、ACQUITY UPLC Fluoro-Phenyl (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱和 Phenomenex Kinetex F5 (100 mm × 2.1 mm, 2.6 μm) 色谱柱对多种脂溶性维生素的分离效果, 前三种色谱柱均能实现视黄醇、25-OH-VD₂、25-OH-VD₃ 和 α-生育酚的分离且分离时间较短, 但是不能分离同分异构体 β-生育酚和 γ-生育酚。Kinetex F5 色谱柱可以实现所有组分包括 β、γ-生育酚的分离。此外, 25-OH-VD₃ 同分异构体 3-epi-25-OH-VD₃ 在婴幼儿体内含量较高, 对维生素 D 含量测定影响较大^[21], 该色谱柱可以实现 25-OH-VD₃ 和 3-epi-25-OH-VD₃ 的分离, 减少 3-epi-25-OH-VD₃ 对检测结果的影响。故采用 Kinetex F5 色谱柱进行所有组分的分离 (见图 2)。研究发现在流动相中加入甲酸铵后其促进目标化合物离子化的效果较加入乙酸铵好, 响应值增加明显, 故

在水相和有机相中均加入 2.5 mmol/L 甲酸铵。

2.3 线性范围、检出限和定量限 将混合标准溶液用复溶液逐级稀释, 得到一系列标准工作液, 各取 20 μl, 分别加入 10 μl 内标工作液和 80 μl 4% BSA 溶液, 其余操作同样本前处理。由于人血中存在内源性脂溶性维生素, 故在标曲制作中加入 4% BSA。以各目标化合物的色谱峰与其相对应的同位素内标色谱峰的峰面积比值-浓度比值作图, 得到各目标化合物的标准系列工作溶液的直线拟合方程, 并计算相应的线性相关系数。6 种脂溶性维生素的标准曲线和线性范围见表 2。结果表明, 6 种脂溶性维生素在对应的浓度范围内线性关系良好, 相关系数 > 0.995, 标准溶液色谱图如图 3 所示。每个浓度重复检测 6 次, 满足相对标准偏差 < 20% 且信噪比 S/N ≥ 3 的最低浓度值定为检测限, 满足相对标准偏差 < 20% 且信噪比 S/N ≥ 10 的最低浓度值定为定量限。6 种脂溶性维生素检测限为 0.20 ~ 1.25 ng/ml, 定量限为 0.39 ~ 3.88 ng/ml (见表 2)。

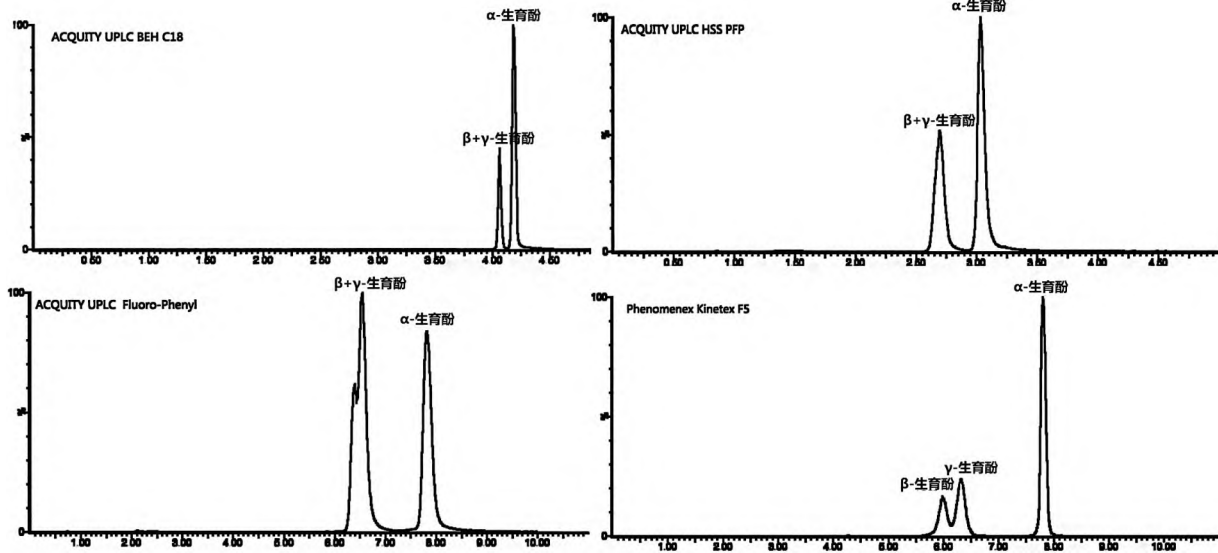


图 2 采用不同色谱柱时 α-生育酚、β-生育酚和 γ-生育酚的总离子流色谱图

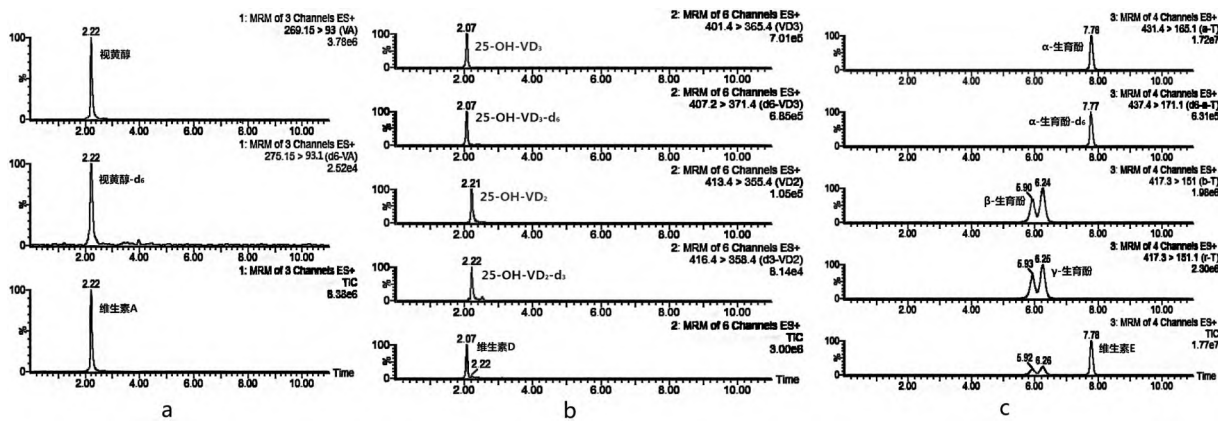
Fig. 2 Total ion chromatograms of α-Tocopherol, β-Tocopherol and γ-Tocopherol with different columns

表 2 方法的线性范围、线性方程、相关系数、检测限和定量限

Table 2 Linear range, linear equation, correlation coefficients, limits of detection and limits of quantification of the method

化合物	线性范围/ (μg/ml 或 ng/ml)	线性方程	相关系数 (r)	检测限/ (ng/ml)	定量限/ (ng/ml)
视黄醇	0.01 ~ 2.50 ^a	y = 71.3317x + 0.3259	0.998 5	0.62	1.20
α-生育酚	0.20 ~ 50.00 ^a	y = 1.2819x - 0.0301	0.999 4	1.25	3.88
β-生育酚	0.02 ~ 5.00 ^a	y = 8.1632x - 0.0050	0.998 1	0.62	1.86
γ-生育酚	0.02 ~ 5.00 ^a	y = 11.6072x + 0.0131	0.999 7	0.62	1.86
25-OH-VD ₂	1.56 ~ 200.00 ^b	y = 0.0352x + 0.0156	0.998 9	0.30	0.60
25-OH-VD ₃	3.12 ~ 400.00 ^b	y = 0.0138x + 0.0280	0.998 9	0.20	0.39

注: a: μg/ml; b: ng/ml; y: 待测物峰面积与内标峰面积比值; x: 待测物浓度, μg/ml 或 ng/ml。



注: a: 维生素 A (视黄醇) 及内标视黄醇-d₆ 色谱图; b: 维生素 D (25-OH-VD₂, 25-OH-VD₃) 及其内标 25-OH-VD₂-d₃, 25-OH-VD₃-d₆ 色谱图; c: 维生素 E (α-生育酚、β-生育酚、γ-生育酚) 及其内标 α-生育酚-d₆ 色谱图。

图 3 6 种脂溶性维生素标准溶液及其相对应的内标色谱图

Fig. 3 Chromatograms of six fat-soluble vitamins standard solutions and their corresponding internal standard

2.4 方法精密度 将低、中、高三个浓度标准品溶液加入 4% BSA 混合血清样本经本法处理后进行检测, 每个浓度重复 6 次, 连续检测三天, 计算日内精密度为 0.9% ~ 9.6%, 日间精密度为 3.0% ~ 9.3% (见表

3)。该方法同时测定 6 种脂溶性维生素的日内精密度和日间精密度均在 15% 以内, 方法精密度满足检测需求。

表 3 方法的精密度($n=6$)
Table 3 Precision of the method($n=6$)

化合物	日内精密度						日间精密度	
	第一天		第二天		第三天		均值±标准差 ($\mu\text{g/ml}$ 或 ng/ml)	RSD (%)
	均值±标准差 ($\mu\text{g/ml}$ 或 ng/ml)	RSD (%)	均值±标准差 ($\mu\text{g/ml}$ 或 ng/ml)	RSD (%)	均值±标准差 ($\mu\text{g/ml}$ 或 ng/ml)	RSD (%)		
视黄醇 ^a	0.05 ± 0.004	7.7	0.05 ± 0.002	4.5	0.05 ± 0.002	4.7	0.05 ± 0.003	6.5
	0.37 ± 0.02	6.1	0.41 ± 0.01	3.2	0.42 ± 0.03	6.8	0.40 ± 0.03	7.5
	1.56 ± 0.11	7.3	1.58 ± 0.08	5.3	1.52 ± 0.08	5.2	1.55 ± 0.09	5.8
25-OH-VD ₂ ^b	3.39 ± 0.24	6.9	3.38 ± 0.32	9.4	3.70 ± 0.18	4.9	3.49 ± 0.28	8.1
	28.85 ± 0.27	0.9	28.86 ± 1.75	6.1	28.99 ± 1.45	5.0	28.90 ± 1.24	4.3
	111.73 ± 3.87	3.5	105.75 ± 7.15	6.8	107.37 ± 5.90	5.5	108.28 ± 6.04	5.6
25-OH-VD ₃ ^b	6.14 ± 0.53	8.7	6.00 ± 0.38	6.4	6.67 ± 0.35	5.3	6.27 ± 0.50	8.0
	54.41 ± 3.16	5.8	48.33 ± 1.16	2.4	47.75 ± 1.26	2.6	50.16 ± 3.66	7.3
	202.89 ± 7.38	3.6	195.44 ± 4.41	2.3	193.11 ± 4.02	2.1	197.15 ± 6.70	3.4
α -生育酚 ^a	0.26 ± 0.01	2.7	0.30 ± 0.01	2.5	0.24 ± 0.02	8.8	0.27 ± 0.02	9.3
	3.84 ± 0.12	3.1	4.02 ± 0.05	1.2	4.09 ± 0.37	9.0	3.98 ± 0.24	6.0
	11.56 ± 0.59	5.1	10.14 ± 0.59	5.8	11.62 ± 0.19	1.6	11.10 ± 0.84	7.6
β -生育酚 ^a	0.06 ± 0.003	5.3	0.06 ± 0.001	2.0	0.07 ± 0.001	1.7	0.06 ± 0.002	3.0
	0.37 ± 0.02	5.4	0.39 ± 0.01	2.6	0.39 ± 0.02	5.4	0.38 ± 0.02	4.7
	1.35 ± 0.05	3.4	1.29 ± 0.05	3.6	1.47 ± 0.06	3.8	1.37 ± 0.09	6.5
γ -生育酚 ^a	0.06 ± 0.004	7.0	0.06 ± 0.006	9.6	0.06 ± 0.004	7.0	0.06 ± 0.004	7.6
	0.35 ± 0.01	2.2	0.40 ± 0.01	2.1	0.39 ± 0.02	4.8	0.38 ± 0.02	6.4
	1.32 ± 0.03	2.5	1.23 ± 0.02	1.6	1.47 ± 0.01	0.9	1.34 ± 0.11	8.0

注:a: $\mu\text{g/ml}$, b: ng/ml ;RSD:相对标准偏差。

2.5 方法准确度 将低、中、高浓度的标准品溶液加入混合血清样本中按本法进行前处理后进行检测,每个浓度重复 6 次,计算加标回收率,3 个水平的加标

回收率为 86.6% ~ 107.7%,相对标准偏差(RSD)为 1.46% ~ 9.39% (见表 4)。该方法加标回收率均在 80% ~ 120% 以内,方法准确度高满足检测需求。

表 4 方法的准确度($n=6$)
Table 4 Accuracy of the method($n=6$)

化合物	本底值 ($\mu\text{g/ml}$ 或 ng/ml)	加标量 ($\mu\text{g/ml}$ 或 ng/ml)	检测值 ($\mu\text{g/ml}$ 或 ng/ml)	回收率 (%)	RSD (%)
视黄醇 ^a	0.32 ± 0.01	0.20	0.51 ± 0.02	97.0	3.4
		0.40	0.67 ± 0.03	86.6	4.3
		0.60	0.87 ± 0.06	91.0	6.7
25-OH-VD ₂ ^b	-	14.00	13.91 ± 0.79	99.4	5.7
		28.00	26.95 ± 2.53	96.3	9.4
		42.00	44.03 ± 1.00	104.8	2.3
25-OH-VD ₃ ^b	31.67 ± 0.84	25.00	57.31 ± 2.01	102.5	3.5
		50.00	82.12 ± 4.88	100.9	5.9
		80.00	113.61 ± 5.03	102.4	4.4
α -生育酚 ^a	12.75 ± 0.60	8.00	19.97 ± 0.67	90.3	3.4
		12.00	24.46 ± 1.33	97.5	5.4
		24.00	35.53 ± 0.84	94.9	2.4
β -生育酚 ^a	0.15 ± 0.01	0.20	0.35 ± 0.01	98.3	3.9
		0.40	0.51 ± 0.02	90.9	4.3
		0.60	0.72 ± 0.01	95.1	1.5
γ -生育酚 ^a	1.18 ± 0.11	0.20	1.36 ± 0.05	88.1	4.0
		0.40	1.61 ± 0.15	107.7	9.2
		0.60	1.80 ± 0.09	104.1	4.8

注:a: $\mu\text{g/ml}$, b: ng/ml ;RSD:相对标准偏差;“-”表示未检出。

2.6 方法验证 采用建立的 UPLC-MS/MS 方法对美国国家标准技术研究所(NIST)制定的标准参照品 SRM 968f 进行检测,每个水平重复 2 次取平均值,验

证方法准确度。结果表明,除 25-OH-VD₂ 含量较低未能检出外,其它检测结果与靶值偏差均在 5% 以内,该方法检测结果准确可靠(表 5)。

表 5 NIST 标准参照品 SRM 968f 分析结果

Table 5 Results of analysis of NIST standard reference material 968f

化合物	视黄醇 ($\mu\text{g/ml}$)		25-OH-VD ₂ (ng/ml)		25-OH-VD ₃ (ng/ml)		α -生育酚 ($\mu\text{g/ml}$)		$\beta + \gamma$ -生育酚 ($\mu\text{g/ml}$)	
	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2
靶值	0.327	0.658	0.849	0.167	12.318	15.640	5.15	11.95	1.094	2.63
检测值	0.330	0.657	-	-	12.384	15.576	5.19	12.36	1.141	2.58
偏差 (%)	0.920	0.150	-	-	0.540	0.410	0.78	3.43	4.200	1.90

注：“-”表示未检出。

2.7 实际样品测定 使用本方法对 17 份健康儿童血液样本进行检测,其中视黄醇含量为 0.22 ~ 0.43 $\mu\text{g/ml}$,25-OH-VD₂ 含量为未检出 ~ 5.19 ng/ml,25-OH-VD₃ 含量为 6.83 ~ 49.21 ng/ml, α -生育酚含量为 5.63 ~ 12.73 $\mu\text{g/ml}$, β -生育酚含量为 0.03 ~ 1.37 $\mu\text{g/ml}$, γ -生育酚含量为 0.11 ~ 1.68 $\mu\text{g/ml}$ 。本法适用于微量临床血液样本 6 种脂溶性维生素的同时快速检测。

3 结论

本研究建立了超高效液相色谱串联质谱法同时测定微量血清样本中多种脂溶性维生素的方法,并对前处理过程中的蛋白沉淀试剂、萃取液用量,复溶液等进行了优化,以减少色谱图中噪音干扰,改善色谱峰形,提高检测灵敏度。并比较了不同色谱柱对多种脂溶性维生素尤其是不同类型维生素 E 的分离效果,最终选择 Phenomenex Kinetex F5 色谱柱,该色谱柱可以实现 β -生育酚和 γ -生育酚的有效分离。本研究中只需 20 μl 血清就能够快速完成 6 种脂溶性维生素的测定。该方法测定样本需求量少、操作简单、检测结果准确快速可实现大量临床样本的同时检测,尤其对采血较为困难的婴幼儿可以实现少量血液样本检测多数项目的需求。

参考文献

- [1] Stevens SL. Fat - Soluble vitamins [J]. The Nursing Clinics of North America, 2021, 56(1): 33 - 45.
- [2] 金飞燕,吴正祥. 维生素 D 在儿童生长发育中的作用效果探析 [J]. 中国妇幼健康研究,2017,28(S4):498 - 499.
- [3] 赵洪霞,时锋. 补充维生素 A 复合其他微量营养素对学龄前儿童生长发育及营养状况的影响 [J]. 临床医学,2021,41(9):88 - 90.
- [4] 朱琳,魏琳. 儿童补充钙、锌、维生素 A 促进其生长发育的研究 [J]. 临床医学研究与实践,2019,4(36):106 - 108.
- [5] 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.
- [6] 赵莹,胡佳薇,赵静琨,等. 高效液相色谱 - 多波长荧光检测法同时测定血清中维生素 A 和维生素 E 的含量 [J]. 卫生研究,2020,49(4):585 - 590.
- [7] 徐凤梅,于美丽,苏瑞,等. HPLC 法测定维生素 A 在健康受试者及肝硬化患者体内的血药浓度 [J]. 中国药房,2016,27(35):4927 - 4929, 4930.
- [8] 张敏,解晓露,黄小兰,等. 高效液相色谱 - 串联质谱法测定儿童末梢全血干血点中的维生素 D [J]. 现代预防医学,2019,46(1):106 - 110, 120.
- [9] 李强,金玉娥,汪国权. 超高效液相色谱 - 串联质谱法测定干血点中 25 - 羟基维生素 D [J]. 现代预防医学,2017,44(11):2050 - 2055.
- [10] 王睿,付志成,胡怡椿,等. 超高效液相色谱——串联质谱法同时测定血清中维生素 A、维生素 E [J]. 中国食物与营养,2020,26(9):40 - 44.
- [11] 陈曦,宫照龙,沈施. 超高效液相色谱 - 三重四级杆串联质谱法测定血清中维生素 A 和维生素 E [J]. 卫生研究,2021,50(2):301 - 307.
- [12] Hrvolová B, Martínez - Huélamo M, Colmán - Martínez M, et al. Development of an advanced HPLC - MS/MS method for the determination of carotenoids and Fat - Soluble vitamins in human plasma [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(10): 1719.
- [13] 易婉婉,史秋园,陈从艳,等. 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 [J]. 中华核医学与分子影像杂志,2020,40(10):599 - 602.
- [14] 张新杰,蔡凤英,徐晓薇,等. 微量血清中 25 - 羟基维生素 D 的柱前衍生 - 高效液相色谱 - 串联质谱法的建立及其临床应用 [J]. 现代预防医学,2019,46(23):4351 - 4354, 4367.
- [15] Zhang Y, Bala V, Mao Z, et al. Quantification of fat - soluble vitamins and their metabolites in biological matrices: an updated review [J]. Bioanalysis, 2020, 12(9): 625 - 640.
- [16] Heaney RP. Serum 25 - hydroxyvitamin D is a reliable indicator of vitamin D status [J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2011, 94(2): 619 - 620, 620.
- [17] Mustacich DJ, Bruno RS, Traher MG. Vitamin E [J]. Vitamins and Hormones, 2007, 76(3): 1 - 21. [18] Craft NE. Encyclopedia of food and health [M] // Cabellero B, Finglas PM, Toldrá F. Tocopherols: Properties and determination. Kluwer: Elsevier Ltd, 2016.
- [19] Thompson MD, Cooney RV. The potential physiological role of γ - Tocopherol in human health: a qualitative review [J]. Nutrition and Cancer, 2020, 72(5): 808 - 825.
- [20] 国家卫生和计划生育委员会. WS/T 553 - 2017 人群维生素 A 缺乏筛查方法 [S]. 北京:中国标准出版社,2017.
- [21] Ooms N, Van Daal H, Beijers AM, et al. Time - course analysis of 3 - epi - 25 - hydroxyvitamin D - 3 shows markedly elevated levels in early Life, particularly from vitamin D supplementation in preterm infants [J]. Pediatric Research, 2016, 79(4): 647 - 653.

收稿日期:2021-11-24