

人体血清中3种脂溶性维生素的液相色谱-串联质谱分析方法研究

刘海培¹, 姜小梅¹, 韩文念², 许舒欣², 李艳², 汪 曩¹, 蒋学慧^{1*}

(1. 天津大学 精密仪器与光电子工程学院, 天津 300072; 2. 天津国科医工科技发展有限公司, 天津 300399)

摘要:以人体血清中3种脂溶性维生素检测为例,探讨了一种针对人体内源性代谢物的分析方法。采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)对人体血清中维生素A、维生素D₃和维生素E进行检测,分别通过混合人血清基质加入标准品及内标再扣除内源性物质本底的方法,以及与牛血清白蛋白(BSA)模拟基质加标的方法建立标准曲线进行定量分析。结果表明,采用混合人血清基质所建方法对维生素A、维生素D₃和维生素E的检出限分别为4.2、0.8、67.2 ng/mL,定量下限分别为13.7、2.6、221.9 ng/mL。两种方法的线性相关系数均大于0.996;对于实际样品在低、高两个加标浓度下的回收率为90.7%~112%,相对标准偏差(RSD)为1.0%~4.5%,具有良好的准确性和重现性。对40组未知样品的检测结果表明,两种方法无统计学差异。因此,对于人体内源性代谢物采用混合人血清基质扣除本底的方法,可以实现标准品与待测样品基质匹配的准确分析,有利于临床相关疾病的便捷诊断。

关键词:脂溶性维生素;液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS);内源性代谢物;人血清基质

中图分类号: O657.7; O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2019)06-0728-06

Study on Analysis Methods of Three Fat-soluble Vitamins in Human Serum by Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry

LIU Hai-pei¹, JIANG Xiao-mei¹, HAN Wen-nian², XU Shu-xin², LI Yan²,
WANG Yan¹, JIANG Xue-hui^{1*}

(1. School of Precision Instrument and Optoelectronics Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Tianjin Guoke Medical Engineering and Technology Development Company Limited, Tianjin 300399, China)

Abstract: Taking the detection of three fat-soluble vitamins in human serum as an example, an analytical method for human endogenous metabolites was explored. A mixed human serum matrix was prepared by adding standard substances and internal standards followed by background subtraction of endogenous substances, and another simulating matrix substrate was made of bovine serum albumin (BSA). They both were detected by liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC – MS/MS). Results showed that the limits of detection for vitamin A, D₃ and E in the mixed human serum matrix were 4.2, 0.8 and 67.2 ng/mL, while the limits of quantitation were 13.7, 2.6 and 221.9 ng/mL, respectively. There existed good linear relationships for the two methods with good accuracy and reproducibility, and their correlation coefficients were both above 0.996. The recoveries for the actual samples at low and high spiked concentrations were between 90.7% and 112%, with relative standard deviations (RSD) of 1.0% – 4.5%. There were no statistical differences between the two methods for 40 unknown samples. Therefore, for the endogenous metabolites from human body, the accurate analysis on the matrix matched between the standard sample and the sample to test could be achieved by adding the standard substance and deducting the background from the human serum matrix, which is beneficial to the convenient diagnosis on clinical related diseases.

Key words: fat-soluble vitamins; liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC – MS/MS); endogenous metabolite; human serum matrix

收稿日期: 2018-11-23; 修回日期: 2019-01-03

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2014AA022305)

* 通讯作者: 蒋学慧, 博士, 工程师, 研究方向: 质谱数据处理与信息挖掘, E-mail: jiangxuehui82@163.com

维生素是维持人体健康所必需的物质, 其缺乏或过量均会影响人体代谢平衡。其中, 维生素 A (VA)、维生素 D₃ (VD₃)、维生素 E (VE) 为脂溶性维生素, 具有促进机体生长发育, 调节生理机能, 增强免疫的作用^[1], 可在体内大量贮存, 属于人体内源性代谢物。通过检测维生素的含量可评估患者体内的营养状况, 目前的测定方法主要有酶免疫法^[2]、化学发光免疫法^[3]及质谱法等。其中, 液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法^[4-5]具有高精度、高灵敏度和可实时监测的优势, 对于维生素缺乏的临床判断、治疗管理具有辅助诊断的作用^[6-7]。

液相色谱-质谱联用技术用于内源性代谢物的实际分析时, 真实的生物基质(Authentic matrix)中含有的待测物质会影响标准样品浓度, 从而影响定量结果的准确性^[8-9]。目前常采用牛血清白蛋白(BSA)等替代基质(Surrogate matrix)^[10-11]来模拟生物基质, 或采用活性炭吸附等前处理手段从真实生物基质中得到已去除内源性代谢物的剥离基质(Stripped matrix)^[12]。然而此方法成本高, 且可能破坏除内源性代谢物以外的基质成分或者内源性代谢物去除不完全, 影响样本原有信息, 从而导致基质效应问题^[13-14]。另外一些新开发的方法无法找到合适的空白基质, 给定量分析增加了难度。

本研究利用 LC-MS/MS 对人体血清中维生素 A、维生素 D₃ 和维生素 E 3 种脂溶性维生素进行同时检测, 以混合人血清基质中加入标准品并结合同位素内标法建立标准曲线进行定量, 通过对内源性代谢物本底扣除的方法, 解决了模拟基质下检测的标准品与待测基质不匹配的问题, 并与 BSA 模拟基质方法的检测结果进行对比。所建立的方法适用于人体内源性代谢物的快速准确分析, 可满足临床对于相关疾病的诊断需求。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC-20AX 液相色谱仪(岛津公司), API4000 三重四极杆质谱仪(AB SCIEX 公司), F1384690 离心机(Eppendorf 公司), VORTEX-5 旋涡混合器(其林贝尔仪器公司), 96 孔氮吹仪(VSD150-1A, 无锡沃信仪器制造有限公司), 微量移液器(N32901F、N46632F、P24390G、O47528F, Eppendorf 公司), 离心管(3810X, Eppendorf 公司)。

甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯, Fisher Chemical 公司); 正己烷(色谱纯, Sigma-Aldrich 公司); 牛血清白蛋白(Amresco 公司), 蒸馏水(屈臣氏集团有限公司)。

维生素 A (100 mg/L)、25-羟基维生素 D₃ 干粉试剂以及维生素 E (1 000 mg/L) 标准品均购于加拿大多伦多研究化学公司, 维生素 A 乙酸酯(VA-D6)、25-羟基维生素 D₃-D6 干粉试剂(VD₃-D6)、 α -生育酚 D6(VE-D6, 500 mg/L) 内标标准品均购于 Medical Isotopes 公司。

1.2 实验条件

色谱条件: 色谱柱为 Shim-pack GIST-HP C₁₈ (2.1 mm × 100 mm × 3 μm, 岛津公司), 流动相: A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为 0.1% 甲酸甲醇溶液, 梯度洗脱程序: 0~2.0 min, 70% B; 2.0~5.0 min, 70%~100% B; 5.0~5.1 min, 100% B; 5.1~6.5 min, 100%~70% B。流速为 0.5 mL/min, 柱温为 40 °C, 进样量为 10 μL。

质谱条件: 电喷雾离子源(ESI), 多反应监测(MRM)扫描模式, 气帘气(CUR)压力 103 kPa, 离子化电压(IS) 5 500 V, 温度(TEM)设为 350 °C, 喷雾气(GS1)压力 414 kPa, 辅助加热气(GS2)压力 448 kPa。3 种脂溶性维生素的质谱参数见表 1, 选取 Q1 质量数为母离子, Q3 质量数为子离子进行定量分析。

表 1 3 种脂溶性维生素的质谱参数
Table 1 Mass spectrometric parameters of three fat-soluble vitamins

Analyte	Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	EP (V)
VA	269.2	93.0	50.0	26.0	12.0	10.0
VA-D6	275.2	96.2	50.0	26.0	12.0	10.0
VD ₃	401.4	365.4	50.0	17.0	10.0	10.0
VD ₃ -D6	407.4	371.4	50.0	17.0	10.0	10.0
VE	431.6	165.3	60.0	25.0	12.0	10.0
VE-D6	437.6	171.3	60.0	25.0	12.0	10.0

* DP: declustering potential; CE: collision energy; CXP: collision cell exit potential; EP: entrance potential

1.3 样品配制

1.3.1 空白样品制备 取 90 μL 混合人血清, 加入 10 μL 甲醇和 10 μL 内标工作液得到空白基质样品, 取牛血清白蛋白(5% BSA)按相同步骤得到空白基质样品, 作为对照。

1.3.2 标准样品制备 称取标准样品, 采用甲醇逐级稀释得到标准工作溶液。分别精密吸取 90 μL 混合人血清和 5% BSA, 各加入标准工作溶液 10 μL , 配制各浓度的生物标准曲线样品, 加入 10 μL 内标工作液以及 200 μL 甲醇-乙腈(体积比 1:1)作为沉淀剂, 涡旋振荡 60 s; 再加入 600 μL 正己烷作为萃取剂, 剧烈振荡 120 s; 以 14 000 g 转速离心 5 min, 取上层有机层 500 μL , 室温下氮气吹干, 加入 50% 甲醇水溶液 100 μL 进行复溶, 充分混匀 30 s 后, 待 LC-MS/MS 分析。

1.4 数据处理方法

分别采用混合人血清基质和 BSA 基质配制已知浓度的标准样品与未知浓度的待测样品, 在相同实验条件下依次进行 LC-MS/MS 检测, 得到每组样品的信号色谱峰及其对应的内标峰面积。其中, 混合人血清基质作为空白基质样品, 平行进样 8 组, 确定空白背景的稳定性。计算得到混合人血清空白基质样品的色谱峰与其对应内标的峰面积比值, 在混合人血清基质下得到的标准样品色谱峰与其对应内标峰面积的比值减去空白样品比值的平均值, 即通过本底扣除的方法去除人体内源性代谢物引入的干扰。所得结果与传统 BSA 模拟基质样品的测定结果进行对比, 采用同位素内标法分别建立标准曲线, 对定量分析结果进行比较。

1.5 方法评价

1.5.1 线性范围与检出限 将配制的生物标准曲线样品经前处理后进样分析, 以目标分析物的质量浓度为横坐标(X), 其峰面积与对应内标峰面积的比值为纵坐标(Y), 建立标准曲线^[15]; 以 3 倍信噪比($S/N=3$), 且 3 次测定的相对标准偏差(RSD)小于 20% 作为各成分的检出限(LOD), 以 $S/N=10$ 且 RSD 小于 20% 作为各成分的定量下限(LOQ)。

1.5.2 准确度与精密度 通过比较混合人血清基质和 BSA 基质样品的加标回收率, 确定实验方法的准确性。对待测人血清样品加入低、高两个浓度的 3 种脂溶性维生素标准品, 分别带入混合人血清基质和 BSA 基质下建立的标准曲线, 计算样品回收率; 每天对加标样品测定 1 次, 连续检测 5 d, 通过计算 RSD 值验证两种方法的重现性。

此外, 对于混合人血清空白基质样品做 8 组平行样, 每个平行样重复进样 2 次求得平均值, 批间实验每组采用不同混合人血清, 以去除人员个体间差异的影响, 连续检测 5 d。通过计算 RSD 值确保混合人血清空白基质样品批内、批间的稳定性。

1.5.3 方法对比 对于 40 组未知浓度样本, 通过采用混合人血清基质和 BSA 模拟基质的方法分别进行 LC-MS/MS 检测, 利用两种方法建立的标准曲线分别计算得到 3 种待测维生素的浓度, 并进行对比和统计学分析。

2 结果与讨论

2.1 色谱-质谱条件的优化

考察了有机相溶剂(甲醇、乙腈、甲醇-乙腈混合溶剂)分别与超纯水、0.1% 甲酸、0.1% 氨水组成的流动相体系对于 3 种脂溶性维生素峰形及分离效果的影响, 结果表明, 以甲醇和超纯水为流动相体系, 并在两相中分别加入 0.1% 甲酸, 可增加分析物的响应强度, 且峰形良好。根据 3 种脂溶性维生素的疏水特性, 选择 C_{18} 柱, 考察了色谱柱温度(30、35、40、45 $^{\circ}\text{C}$)对分离效果和信号强度的影响, 最终采用“1.2”的梯度洗脱方式, 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 柱温下可得到较好的分离效果。

根据目标分析物的电离情况, 选用正离子监测模式进行一级质谱分析, 确定母离子后再进行二级质谱的子离子扫描分析, 选择强度较高的 1 个碎片离子作为定量分析的子离子, 并对去簇电压(DP)、碰撞能(CE)以及碰撞室出口电压(CXP)等参数进行优化。最终确定优化的质谱条件如“1.2”所示, 此时检测信号响应强度高, 谱峰峰形良好且稳定。

在优化实验条件下, 得到 3 种脂溶性维生素在混合人血清基质下的谱峰及其内标峰的色谱图(见图 1), 其中维生素 A、维生素 D_3 、维生素 E 及对应内标的保留时间分别为 3.45、3.33、4.65 min, 可在

5 min 内完成分离检测, 谱峰峰形良好。

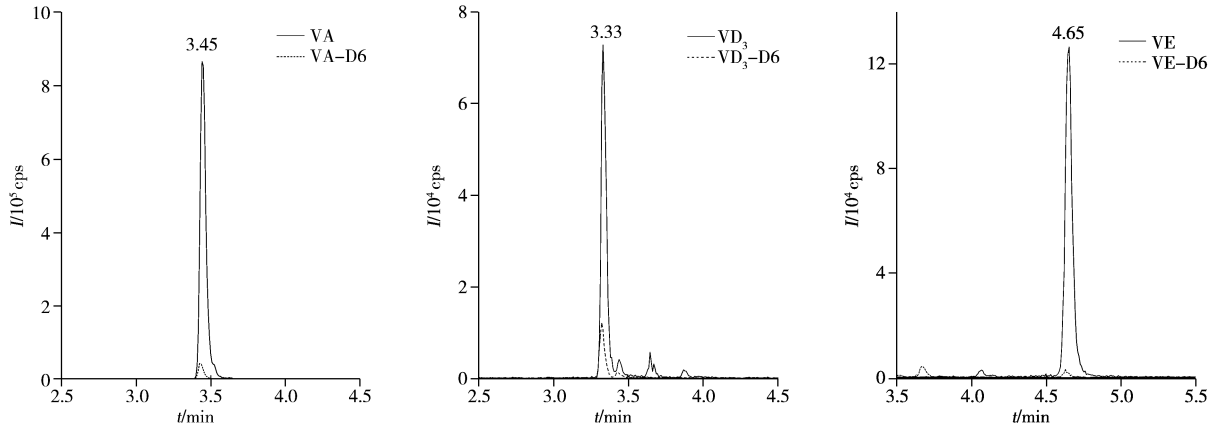


图1 维生素A、维生素D₃、维生素E及其内标的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of vitamin A, vitamin D₃, vitamin E and their internal standards concentrations of VA, VD₃ and VE are 400, 40, 8 μg/mL, respectively

2.2 本底稳定性

按照“1.5.2”方法对混合人血清空白基质样品进行日内、日间精密度的测试, 对待测维生素的峰面积及其内标的峰面积进行提取, 计算两者的比值, 每天做8组平行样品, 得到3种脂溶性维生素的日内RSD均不大于8.4%; 每天采用不同20份混合人血清空白基质进行测定, 连续检测5d, 得到3种脂溶性维生素的日间RSD均在15%以内, 表明混合人血清空白基质样品稳定, 可对混合人血清基质的实际样品本底进行背景扣除。

2.3 线性范围、检出限及定量下限

按照“1.5.1”进行曲线拟合, 结果显示, 采用混合人血清经背景扣除后建立的标准曲线与BSA基质建立的标准曲线, 对于3种脂溶性维生素的相关系数(r)均在0.996以上, 维生素A、维生素D₃和维生素E分别在0.05~2 μg/mL、5~200 ng/mL、1~40 μg/mL范围内具有良好线性。采用混合人血清基质所建方法对维生素A、维生素D₃和维生素E的LOD分别为4.2、0.8、67.2 ng/mL, LOQ分别为13.7、2.6、221.9 ng/mL; 采用BSA基质所建方法对维生素A、维生素D₃和维生素E的LOD分别为5.6、1.1、75.0 ng/mL, LOQ分别为18.7、3.7、250.0 ng/mL。两种方法对3种脂溶性维生素的标准曲线对比见图2, 结果显示, 两种方法的拟合效果显著接近。

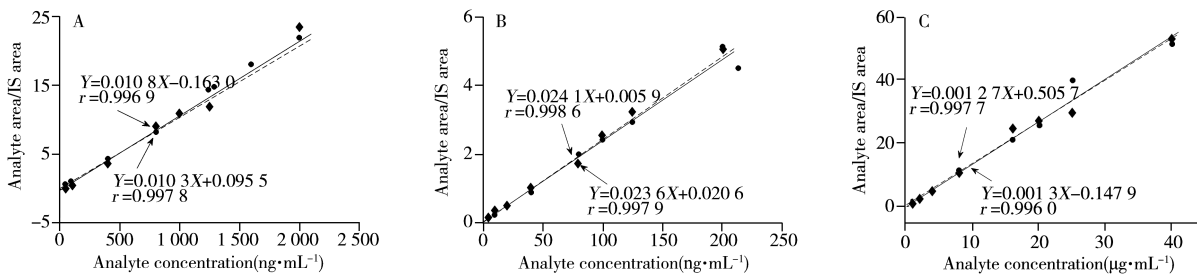


图2 维生素A(A)、维生素D₃(B)、维生素E(C)的标准曲线对比

Fig. 2 Comparison of standard curve of vitamin A(A), vitamin D₃(B) and vitamin E(C)

—●— BSA matrix; —○— mixed human serum matrix

2.4 加标回收实验

按照“1.5.2”方法对待测人血清样品进行加标回收实验, 每个浓度水平重复5次, 两种方法计算得到维生素A、维生素D₃和维生素E的回收率为90.7%~112%, RSD均为1.0%~4.5%(见表2), 表明两种方法均具有较好的准确度和精密度。连续5d对低、高两个浓度的加标样品进行测定, 两种方法下3种脂溶性维生素在低浓度水平的加标回收率偏差均在±20%以内, 高浓度水平的加标回收率偏差在±15%以内, 满足方法学评定要求。

表 2 维生素 A、维生素 D₃ 和维生素 E 的加标回收率及相对标准偏差Table 2 Recoveries and relative standard deviations of vitamin A, vitamin D₃ and vitamin E

Matrix	Analyte	Original (ng/mL)	Added (ng/mL)	Found (ng/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
BSA	Vitamin A	539.17	100.00, 1 250.00	641.02, 1 681.76	102, 91.4	1.0, 1.2
	Vitamin D ₃	16.97	10.00, 125.00	26.04, 156.89	90.7, 112	4.2, 3.9
	Vitamin E	11 652.23	8 000.00, 20 000.00	19 806.08, 30 806.08	102, 95.8	2.0, 3.0
Mixed human serum	Vitamin A	540.24	100.00, 1 250.00	647.04, 1 738.30	107, 95.8	1.1, 1.2
	Vitamin D ₃	19.16	10.00, 125.00	29.11, 151.29	99.5, 106	4.5, 4.1
	Vitamin E	11 412.83	8 000.00, 20 000.00	19 759.29, 31 019.13	104, 98.0	2.0, 3.1

2.5 方法学比较

对 40 份健康志愿者的血清样本进行 LC-MS/MS 测定, 分别采用混合人血清空白基质加标和 BSA 空白基质加标的方法建立标准曲线, 样本年龄在 29~86 岁, 其中 16 名男性, 24 名女性。对两种方法的测定结果进行比较, 如图 3 所示, 经过 T 检验分析, 维生素 A、维生素 D₃ 和维生素 E 的 *P* 值分别为 0.92、0.78、0.93 (均大于 0.7), 说明两种方法的计算结果无显著差异。结果表明, 40 份健康志愿者血清中维生素 A、维生素 D₃ 和维生素 E 的质量浓度分别为 280~1 000 ng/mL、5~28 ng/mL、5~28 μg/mL, 且采用混合人血清基质对实际样品中 3 种脂溶性维生素的检测方法与 BSA 模拟基质的检测结果基本重合, 进一步验证了本方法的可行性。

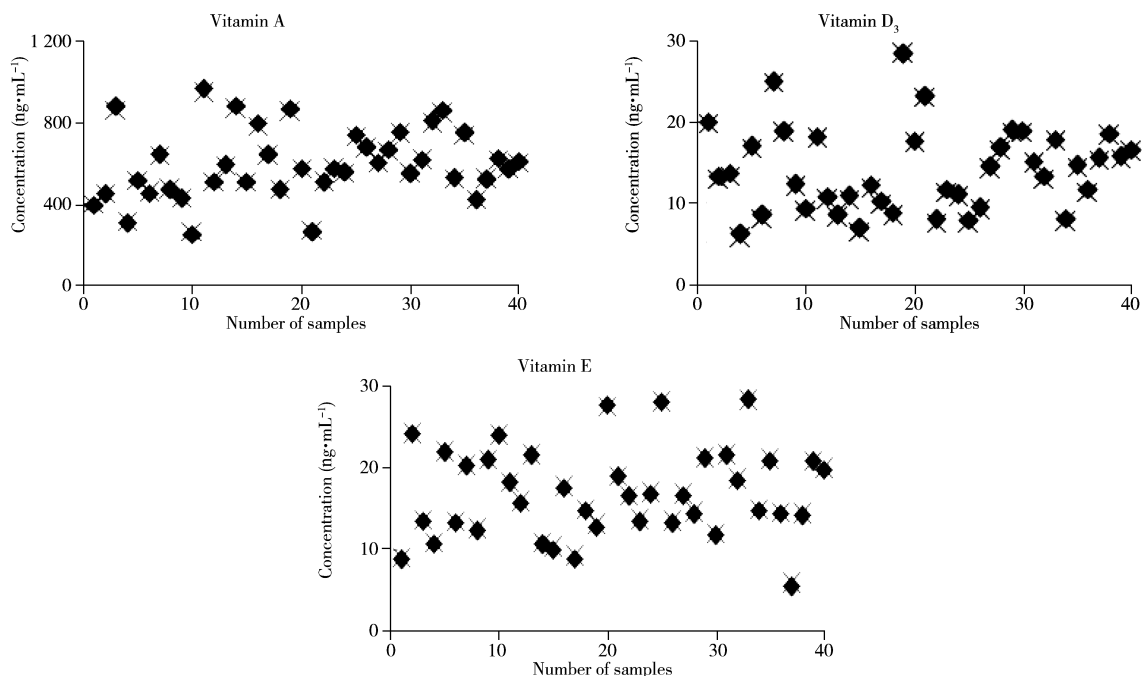


图 3 两种方法检测浓度对比

Fig. 3 Detecting concentration comparison of two methods

◆ mixed human serum matrix; × BSA matrix

3 结论

本研究以人体血清中 3 种脂溶性维生素检测为例, 探讨了一种分析人体内源性代谢物的新方法, 采用以混合人血清作为空白基质加入标准品及同位素内标物再对内源性物质扣除本底的方法, 可以实现标准曲线样品与实际待测样品基质匹配, 减少基质效应的干扰且更加便捷。通过实验证明, 此方法与采用 BSA 模拟基质加入标准品及同位素内标物检测的方法均满足方法学评定标准, 具有良好的准确性与重现性。因此, 针对某些内源性化合物无法获得纯净空白基质, 以及由于模拟基质下检测的标准品与待测样品基质不匹配引起的基质效应问题, 可以采用直接混合人血清扣除本底的方法, 实现对人体内源性代谢物的定量分析。研究结果对于临床分析检测具有重要意义。

参考文献:

- [1] Cheng Y T, Dong H, Liang X C, Zhao B B. *Chin. J. Clin.* (程雅婷, 董衡, 梁晓翠, 赵蓓蓓. 中华临床医师杂志), **2013**, 7(14): 6535 - 6537.
- [2] Furr H C. *J. Nutr.*, **2004**, 134(1): 281S.
- [3] Zhang X, Zhao Z M, Yang H M. *Int. J. Lab. Med.* (张旋, 赵志敏, 阳红梅. 国际检验医学杂志), **2017**, 38(6): 846 - 848.
- [4] Hopfgartner G, Varesio E, Tschäppät V, Grivet C, Bourgogne E, Leuthold L A. *J. Mass. Spectrom.*, **2004**, 39(8): 845 - 855.
- [5] Josef V H, Ralf W. *Clin. Chem.*, **2015**, 53(5): 761 - 770.
- [6] Albahrani A A, Greaves R F. *Clin. Biochem.*, **2016**, 37(1): 27.
- [7] Liu J, Fang F, Chen T, Duan H L, Gong Z B. *J. Instrum. Anal.* (刘珺, 方芳, 陈婷, 段华玲, 弓振斌. 分析测试学报), **2011**, 30(10): 1100 - 1106.
- [8] Li P, Cai W, Shao X. *J. Chemom.*, **2015**, 29(5): 300 - 308.
- [9] Karażniewicz - Bada M, Głowska A. *J. Sep. Sci.*, **2016**, 39(1): 132 - 148.
- [10] Ursula T, Ulla H, Ulf - H Kan S. *Clin. Chem.*, **2003**, 49(9): 1521.
- [11] Keevil B G, Susan T. *Clin. Chem.*, **2006**, 52(12): 2296 - 2299.
- [12] Zhang X, Xie X Q, Liu T L, Song D M. *Chin. J. New Drug* (张焯, 谢小青, 刘婷立, 宋冬梅. 中国新药杂志), **2011**, 20(22): 2221 - 2228.
- [13] Yao M K, Ma B L, Ma Y M. *J. Pharm. Anal.* (姚梦侃, 马秉亮, 马越鸣. 药物分析杂志), **2010**, 30(12): 2436 - 2440.
- [14] Taylor P J. *Clin. Biochem.*, **2005**, 38(4): 328 - 334.
- [15] Bi R F, Zhang F L. *Metrology & Measurement Technique* (毕瑞峰, 张发玲. 计量与测试技术), **2016**, 43(2): 67 - 68.

(责任编辑: 丁 岩)

(上接第727页)

- [11] Tang J, Ying Y, Yu C, Yu S, Zhang N H, Ma B J. *Chin. J. Health Lab. Technol.* (汤鋆, 应英, 于村, 俞莎, 张念华, 马冰洁. 中国卫生检验杂志), **2008**, 18(7): 1333 - 1338.
- [12] Xiao Y B, Wu Y H, Zhang M, Xu H, Zheng W J. *J. Instrum. Anal.* (肖亚兵, 吴延晖, 张曼, 许泓, 郑文杰. 分析测试学报), **2007**, 26(2): 235 - 238.
- [13] Lu J S, Xu J J, Tian J Y, Shen L, Hou B B, Wu T W. *Chin. J. Appl. Chem.* (卢菊生, 徐佳佳, 田久英, 沈莉, 侯彬彬, 吴体薇. 应用化学), **2010**, 27(10): 1230 - 1234.
- [14] Yu R P, Hu Z Y, Ye M L, Che J S, Zhang P C. *Chin. J. Chromatogr.* (虞锐鹏, 胡忠阳, 叶明立, 车金水, 张鹏程. 色谱), **2012**, 30(4): 409 - 413.
- [15] Huang W Y, Zhang Y. *Chin. J. Food Hyg.* (黄文耀, 张颖. 中国食品卫生杂志), **2014**, 26(6): 566 - 569.
- [16] Wu C M, Wang Y, Zhang C L, Wang D, Zhang L L, Zhang Y. *J. Dairy Sci. Technol.* (吴春敏, 王岩, 张春林, 王东, 张雷雷, 张岩. 乳业科学与技术), **2017**, 40(6): 29 - 32.
- [17] Hu Y J, Qin Y L, Lai Y D. *Mod. Food Sci. Technol.* (胡玉军, 覃毅磊, 赖毅东. 现代食品科技), **2014**, 30(4): 301 - 305.
- [18] Ni Z L, Tang F B, Qu M H, Mo R H. *Chin. J. Chromatogr.* (倪张林, 汤富彬, 屈明华, 莫润宏. 色谱), **2014**, 32(2): 174 - 178.

(责任编辑: 丁 岩)