

人血中水溶性维生素的检测

一．临床意义

所有水溶性维生素都参与催化功能，B 族维生素是许多种辅酶的组成成分，这些辅酶担负着氢、电子或基团的转移。它们参与由酶催化的糖、脂肪、蛋白质及核苷酸等的代谢，维生素 C 参与许多羟化反应。

二．实验目的

建立水溶性维生素的固相萃取技术搭配 LC-MS/MS 的检测方法，满足临床检测的基本需求

三．前处理过程

固相萃取产品：水溶性维生素专用板

标准品配置过程：标准样品配置方法：预备 1 mg/mL 的各个水溶性维生素标准储备水溶液。对于维生素 B2、B7 和 B9，加入 200 μ L 1 N NaOH 进行溶解。将维生素 C 溶解在低 pH 的醋酸盐缓冲液中以提高其稳定性。使用这些单独的储液制成混合储液，具体操作为加入 1.25 mL 维生素 C 储液以及其他储液各 0.025 mL，然后用水稀释至 25 mL。将此混合储液（50 ppm 维生素 C，1 ppm 其他分析物）进一步稀释，得到表 2 所列出的 11 种校准标准品。（维生素 C 不稳定，需要当天使用当天配置）

样品制备过程：用移液枪准确吸取 100 μ L 血清样本于 2ml 离心管中，加入 600 μ L 甲醇、10 μ L 抗氧化剂涡旋混合 1min，8000r/min 离心 5min，取上清液待净化。

取水溶性维生素专用板，加入待净化上清液，用正压装置将板中的样品压下，流速控制在 2~3 秒/滴，待液滴流尽后继续保持 1min。

浓缩：在 37°C 条件下，氮气吹干，用初始比例的流动相复溶，待检测。

四．检测条件

1. HPLC 条件

色谱柱: Venusil MP C18 (3.0*50 mm, 3 μm, 100 Å)

流速: 600 μL/min

柱温: 30 °C

进样量: 10 μL

表 1 液相条件

Step	Total Time(min)	10mM 乙酸铵 0.75%甲酸 水 (%)	10 mM 乙酸铵 0.75%甲酸甲醇 (%)
0	0	100	0
1	2.5	55	45
2	3.5	5	95
3	5	5	95
4	5.10	100	0
5	8	100	0

2 质谱条件

LC-MS/MS: Sciex 4000+

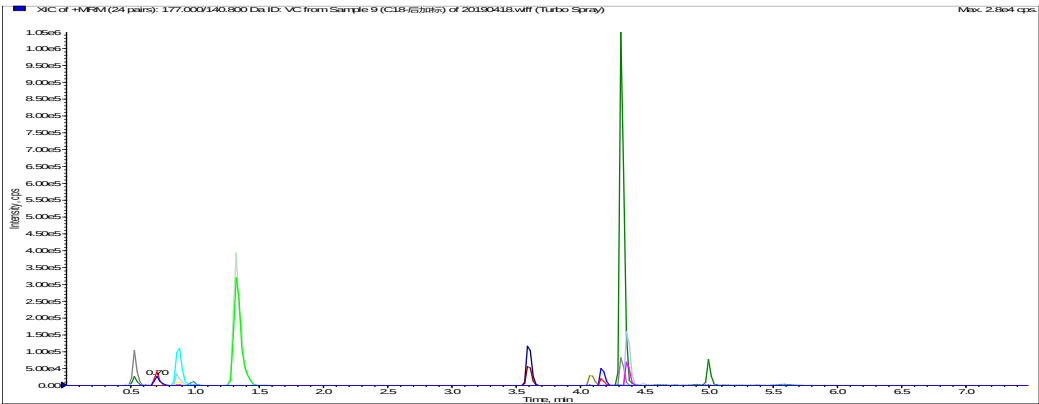
扫描模式: 电喷雾电离正模式

采集模式: 多反应监测 (MRM)

Cur Gas: 25; Gas 1: 45; Gas 2: 45; T: 550°C

表 2 参数信息

化合物	保留时间/min	Q1	Q3	DP	CE
Vc	0.70	177	140.8	65	10
			95	65	18
B1-硫酸铵	1.01	265.2	143.8	50	17
			121.9	50	20
B3-烟酸	1.10	124	80.2	66	27
			105.8	100	23
B6-吡哆醛	1.50	168	150.0	66	19
			94	66	32
B6-吡哆素	1.95	170	152.0	66	21
			134	66	31
B3-烟酸胺	3.11	123	80	66	32
			52.6	66	41
B5-泛酸钙	3.94	220.1	90	48	19
			201.8	48	15
B12 氰钴胺	4.31	678.6	147.5	80	60
			358.5	80	33
B9-叶酸	4.34	442.2	295.1	64	26
			175.9	64	56
B7-生物素	4.53	245.1	227	70	20
			97	70	45
B2-核黄素	4.57	377.2	243.1	80	30
			172.1	80	60



血药浓度 200ng/ml 水溶性维生素出峰谱图

五 . 实验结果

化合物	加标回收率
Vc-维生素 C	80.9%
B1-硫酸铵	69.4%
B3-烟酸	87.5%
B3-烟酸胺	80.2%
B6-吡哆醛	45.2%
B6-吡哆素	69.2%
B5-泛酸钙	64.8%
B12-氰钴胺	70%
B9-叶酸	52.8%
B7-生物素	68.2%
B2-核黄素	57.3%

六 . 实验结论

使用水溶性维生素专用板能够实现一步完成样品的制备过程，且回收率良好，该方法灵敏度高、特异性强，可以满足人血中多种水溶性维生素的检出要求。