



血浆中维生素 ADEK 的检测-Cleanert SLE

一 背景

维生素 A 对人体多种器官的发育以及人体正常生理机能的维护有不可或缺的作用，然而过量摄入维生素 A 会引发毒副作用；25-羟基维生素 D，简称 25-OH VD，包括 25-羟基维生素 D₂ (25-OH VD₂) 和 25-羟基维生素 D₃ (25-OH VD₃) 作为维生素 D 在体内的主要代谢形式之一，由于其半衰期长、存在形式稳定而被认为是维生素 D 营养水平的标志物；维生素 E 作为一种抗氧化剂在体内的主要功能是保护细胞的生物膜结构，最近发现维生素 E 也能调控基因表达，维生素 E 缺乏症虽少见，却与新生儿发育不良和遗传代谢病相关；维生素 K 又叫凝血维生素，具有防止新生婴儿出血疾病、预防内出血及痔疮、减少生理期大量出血、促进血液正常凝固的作用因此，准确测定人体内维生素 ADEK 具有重要意义。维生素 ADEK 由于化学性质活泼，易被氧化，对这类物质的准确定量具有很大的挑战。

本应用案例介绍一种液相色谱-串联质谱的方法，采用 Cleanert SLE 96 孔板净化血浆样品，从血浆样品中萃取富集维生素 ADEK 实验方法具有良好的稳定性及可靠性，可为 VA、VD、VE、VK 临床研究提供一种解决方案。

二 目标物信息

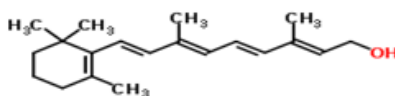


图 1 VA 结构图

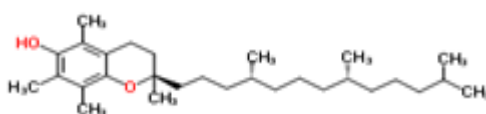


图 2 α-VE 结构图

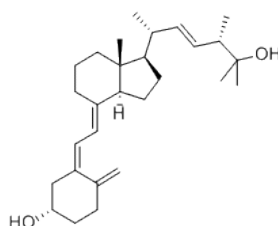


图 3 25OH-VD2 结构图

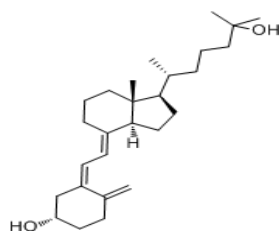


图 4 25OH-VD3 结构图

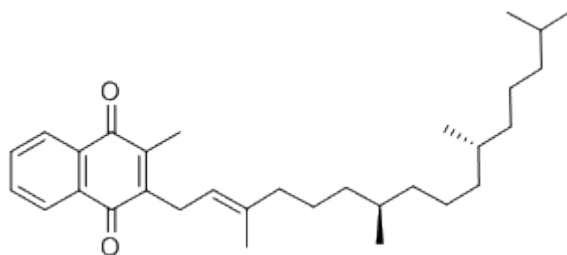


图 5 VK1 结构图

三 材料及仪器

Cleanert SLE 96 孔板, Cleanert M96 生物样品前处理仪, Cleanert V96 样品氮吹浓缩仪, 96 孔收集板, Kinetex C18 (3.0*50 mm, 2.6 μ m), 以上产品均为天津博纳艾杰尔科技有限公司产品; LC-MS/MS, API 4000+ (SCIEX); 甲醇; 甲酸; 水。

四 样品处理方法

4.1 样品预处理

取 140 μ L 血浆至洁净样品瓶中, 加入内标溶液, 再加入 300 μ L 乙醇溶液进行蛋白沉淀, 放入离心机中, 在 5000r/min 的条件下, 离心 5min, 取上清液, 带净化。

4.2 SLE 过程

上样: 将预混合好的溶液全部上样, 静置 5 min;

洗脱: 2.5 ml 环己烷洗脱, 每次加入 500 μ L, 分 5 次洗脱, 每次洗脱间隔 5 min, 合并洗脱液。

将洗脱液在室温下用 Cleanert V96 样品氮吹浓缩仪进行温和氮吹干, 再使用 100 μ L 0.1% 甲酸甲醇 (含 1 g/L BHT) 复溶, 进样检测。(复溶体积可根据仪器性能进行变动)

五 仪器检测条件



5.1 HPLC 条件

色谱柱: Kinetex C18 (3.0*50 mm, 2.6 μ m)

流速: 0.9mL/min

柱温: 30 $^{\circ}$ C

进样量: 30 μ L

流动相条件:

step	时间	A 相:0.1%甲酸 水	B 相: 0.1%甲酸 甲醇
1	0	20	80
2	0.5	20	80
3	0.7	0	100
4	3.5	0	100
5	3.51	20	80
6	5.5	20	80

5.2 质谱条件

扫描模式: 大气压化学电离正模式

采集模式: 多反应监测 (MRM)

表 1 参数信息

Q1	Q3	化合物	DP	CE
269.2	93	vitamin A	58	34
269.2	157.2	vitamin A	58	29
431.4	165.1	a-VE	62	25
431.4	137.1	a-VE	55	57
451.4	187.1	vitamin K1	50	35
451.4	199.2	vitamin K1	50	42
275.4	122.2	VA-D6	48	23
275.4	96.2	VA-D6	48	31



413.4	355.4	25OH-VD2	60	13
413.4	377.3	25OH-VD2	55	13
401.4	365.4	25OH-VD3	70	17
401.4	257.4	25OH-VD3	55	18
407.5	263.4	d6-VD3	55	18
407.5	371.5	d6-VD3	70	17
416.5	358.5	d3-VD2	60	13
416.5	328.4	d3-VD2	55	13
437.4	171.1	a-VE-d6	66	26
437.4	110.9	a-VE-d6	55	26
458.4	136	k1-d7	50	35
458.4	199.2	k1-d7	50	42

六 结果

6.1 线性范围与灵敏度

根据目标物在人体内的含量范围确定标准曲线浓度范围，试验中使用不含目标物的血浆样品配制 6 个不同浓度的校准曲线点，VA 的浓度分别为：40、80、160、400、800、1600ng/mL； α -VE 的浓度分别为：500、1000、2000、5000、10000、20000 ng/mL；25OH-VD2 的浓度分别为：2、4、8、20、40、80 ng/mL；25OH-VD3 的浓度分别为 5、10、20、50、100、200ng/mL；VK 的浓度分别为 0.5、1、2、5、10、20ng/mL；所得样品采用上述样品前处理方法净化样品并进行检测，获得结果见表 3。

表 2 线性范围及灵敏度

化合物	回归方程	相关系数 (r^2)
VA	$y = 0.0287x + 2.44$	0.9930
α -VE	$y = 0.000494x + 0.0111$	0.9908
25OH-VD2	$y = 0.118x + 0.0699$	0.9934
25OH-VD3	$y = 0.0146x + 0.00237$	0.9952
VK1	$y = 0.358x + 0.0412$	0.9959

6.2 方法精密度与准确度

为考察方法精密度与准确度，取低、高 2 个浓度的样本，每个浓度平行处理 3 个样，获



得数据见表 3.

表 3 精密度与准确度

化合物	加标浓度 ng/mL	平均回收率 (n=3)
VA	80	126.3%
	800	127.0%
α -VE	50	95.8%
	500	113.2%
250H-VD2	4	82.9%
	40	89.6%
250H-VD3	10	78.8%
	100	101.2%
VK1	1	81.5%
	10	110.7%

6.3 色谱图

将经 Cleanert SLE 净化的样品按上述 LC-MS/MS 测试条件进行测试，获得谱图见图 4-图 8.

血样中大量存在的磷脂是造成液质联用基质效应的主要原因，为考察 Cleanert SLE 技术去除磷脂的能力，特取磷脂两对特征离子对进行考察：496/184，524/184，获得谱图见图 9.

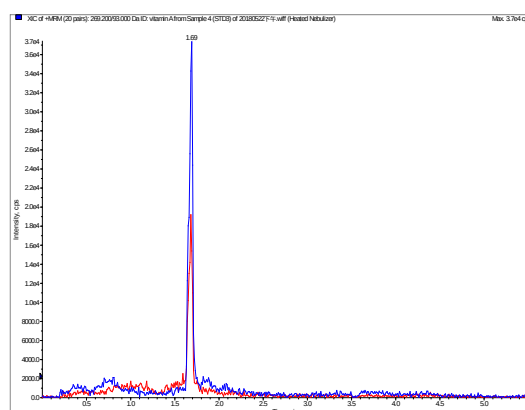


图 4 VA 血浆加标色谱图（浓度为 80ng/mL）

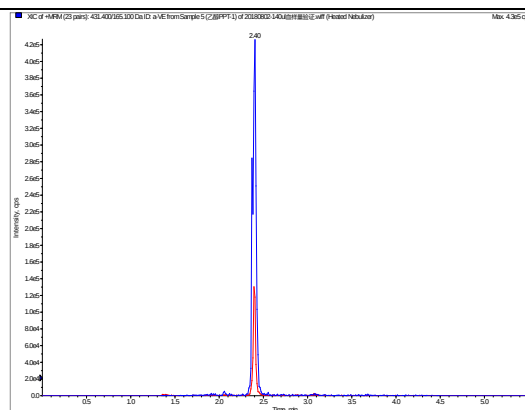


图 5 α -VE 血浆加标色谱图（浓度为 50ng/mL）

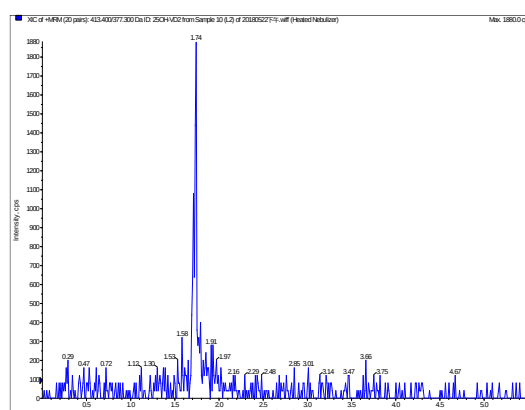


图 6 25OH-VD2 血浆加标色谱图（浓度为 4ng/mL）

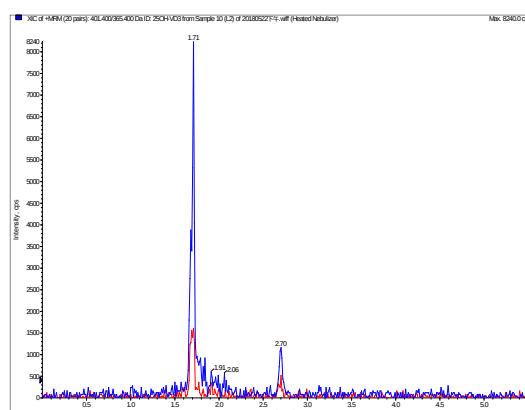


图 7 25OH-VD3 血浆加标色谱图（浓度为 10ng/mL）

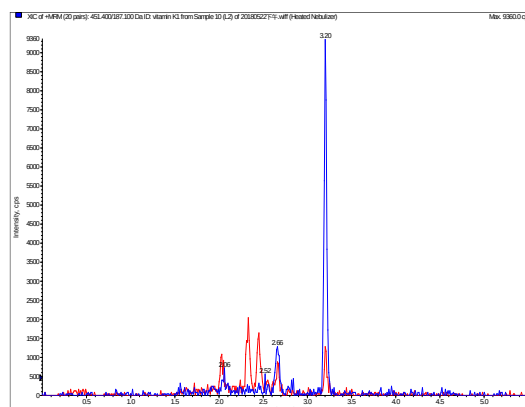




图 8 VK1 血浆加标色谱图（浓度为 1ng/mL）

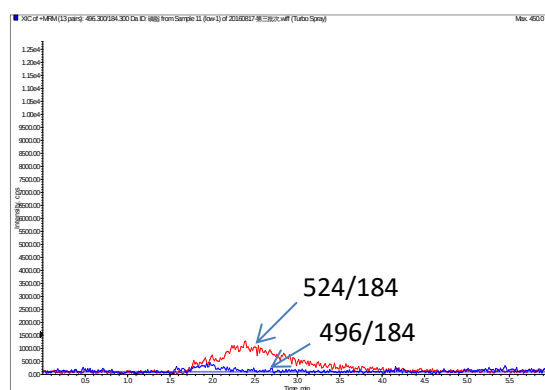


图 9 血浆加标样磷脂色谱图

七 订货信息表

产品名称	规格/包装	订货号
Cleanert SLE 96 孔板	96 孔板, 500mg/well	HC5003SQ-9W
Cleanert M96 生物样品前处理仪	与 96 孔板匹配	SPE-M96
Cleanert V96 样品氮吹浓缩仪	与 96 孔板匹配	NV-96G
96 孔收集板	2mL/well, 与 96 孔板匹配	96SP2036-Y
Kinetex C18	2.1*50mm, 2.6μm	OOB-4462-AN
甲醇	LC-MS 级, 4*2.5L	LC230
水	LC-MS 级, 4*2.5L/箱	LC365
1.5mL 棕色进样样品瓶	100 只/盒	1109-0520
进样样品瓶瓶盖	100 只/包	0915-1819