

血浆中水溶性维生素及其代谢物的测定

应用及技术服务部

天津博纳艾杰尔科技有限公司, 天津开发区西区南大街179号, 300462

一、概述

水溶性维生素及其代谢产物作为辅酶参与人体细胞代谢, 以防止代谢紊乱。同时水溶性维生素也参与体内各项能量代谢, 例如磷酸化形式的硫胺素(Thiamine)在三羧酸循环中起着关键作用, 核黄素(Riboflavin)、烟酸(Nicotinic acid)、泛酸(Pantothenic acid)、吡哆醛(Pyridoxal)、叶酸(Folic acid)参与氧化、还原反应, 脂肪酸和神经递质合成以及碳代谢等。水溶性维生素的缺乏会影响人体正常生理功能, 因此临床亟待开发同时检测多种水溶性维生素方案并应用临床诊断。

目前, 水溶性维生素在血浆中的检测仍存在诸多难点, 如检测灵敏度差、提取回收率低、不稳定和基质干扰严重等。因此, 建立一种高通量、广覆盖、快速的分析方法实现血浆中多种水溶性维生素具有重要意义。

关键词

水溶性维生素及其代谢物; Cleanert PPT; Luna Omega Polar C18; LC-MS/MS

二、化合物信息

表1. 化合物信息

名称	英文名	分子量	结构式
硫胺素	B1	300.81	C ₁₂ H ₁₇ CIN ₄ O ₅
核黄素	B2	376.36	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆
烟酸	B3-COOH	123.11	C ₆ H ₅ NO ₂
烟酰胺	B3-NH ₃	122.12	C ₆ H ₆ N ₂ O
泛酸	B5	219.24	C ₉ H ₁₇ NO ₅
吡哆素	B6	169.18	C ₈ H ₁₁ NO ₃
4-吡哆酸	PA	183.16	C ₈ H ₉ NO ₄
5-磷酸吡哆醛	PLP	247.14	C ₈ H ₁₁ NO ₃
生物素	B7	244.31	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S
叶酸	B9	441.40	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆
5-甲基四氢叶酸	5-METHF	459.46	C ₂₀ H ₂₅ N ₇ O ₆
氰钴胺	B12	1355.37	C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P
同型半胱氨酸	HCY	135.18	C ₄ H ₉ NO ₂ S
甲基丙二酸	MMA	118.09	C ₄ H ₆ O ₄

三、实验部分

3.1 仪器、试剂与材料

3.1.1 主要仪器设备

液相色谱串联质谱仪(AB SCIEX Triple Quad™4500), 配有电喷雾离子源(ESI); 96孔正压装置(Agela Cleanert M96);

3.1.2 试剂材料

96孔板: Cleanert PPT, 2 mL/well;
屈臣氏蒸馏水, 甲醇、甲酸、乙腈均为色谱级。

3.1.3 样品基质

PBS缓冲液, 人血浆。

3.2 样品前处理方法

将Cleanert PPT与收集板放置在一起;

在PPT板中加入3倍样品体积的沉淀剂(300μL含抗氧化剂的甲醇);

加入100μL血浆样本(含有10μL内标溶液);

使用移液器反复吹打充分混匀样品, 沉淀蛋白;

正压收集滤液;

将收集板内液体氮吹干后, 加入50μL万分之一

甲酸水复溶, 待LC-MS/MS分析

3.3 质谱条件

离子源类型: 电喷雾离子源(ESI)

扫描方式: 多反应监测正负离子模式(MRM)

喷雾针电压: 5500 V/-4500V

离子源温度: 450 °C

加热器(GS1): 35 psi

辅助加热气(GS2): 50 psi

气帘气(CUR): 30 psi

碰撞气(CAD): 8

为获得较好的稳定和灵敏度, 各化合物监测离子对的去簇电压(DP)和碰撞电压(CE), 目标化合物定量离子对以及内标监测离子对等参



数均需经过系统优化。本案例参数仅供参考不具备法律效力。

表2. 化合物定性、定量离子和质谱分析参数

化合物	Q1	Q3	DP	CE
B1 1	265	122.1	30	25
B1 2	265	144.1	30	25
B2 1	377.2	243.2	80	34
B2 2	377.2	172.2	80	52
B3-COOH 1	124.1	78	55	31
B3-COOH 2	124.1	80.1	55	29
B3-NH3 1	123	78	50	32
B3-NH3 2	123	80.1	95	28
B5 1	220.1	202.1	26	17
B5 2	220.1	90	30	19
B6 1	170	152	90	28
B6 2	170	134	90	42
PA 1	184.1	166.3	70	19
PA 2	184.1	148	76	29
PLP 1	247.9	150.1	79	24
PLP 2	249.9	122.1	79	32
B7 1	245	227	85	22
B7 2	245	97	50	44
B7 3	245	123.1	50	36
B9 1	442.2	295.1	10	30
B9 2	442.2	176	10	50
5-MeTHF 1	460.2	313.2	65	30
5-MeTHF 2	460.2	194.1	65	47
5-MeTHF 3	460.2	180.1	65	54
B12 1	678.5	359.1	85	33
B12 2	678.5	147.1	85	80
VC 1	177.0	141.0	45	11
VC 2	177.0	95.0	45	17
HCY 1	136.1	90.0	38	16
HCY 2	136.1	56.1	38	27
MMA 1	117.1	73.0	-10	-13

表3. 液相梯度条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0.4	100	0
3.5	0.4	90	35
4	0.4	10	90
6	0.4	10	90
6.1	0.4	100	0
8	0.4	100	0

3.5 结果与讨论

3.5.1 灵敏度和线性

由于血浆和BSA基质均存在本底，因此该方法以PBS为替代基质配制混合标曲溶液，按照上述3.2操作步骤进行处理，制得标准工作曲线，如表3所示，14种水溶性维生素及其代谢物的线性范围均可做到0.5ng/mL~100ng/mL，且良好的线性， $R^2 \geq 0.995$ 。

表4. 线性实验结果

化合物	线性方程	线性范围	相关系数 ²
B1	$y = 9.7735e4 x + 9670.2499$	0.5~100ng	0.9992
B2	$y = 1.7e4 x + 1.6558e5$	0.5~100ng	0.9988
B3-COOH	$y = 1.3288e4 x + 7106.35$	0.5~100ng	0.9980
B3-NH3	$y = 1.0607e4 x + 4191.6$	0.5~100ng	0.9954
B5	$y = 6.3571e3 x + 638.14$	1~100ng	0.9987
B6	$y = 1.1646e4 x + 17334$	0.5~100ng	0.9970
PA	$y = 2.0777e4 x + 1313.68$	0.5~100ng	0.9976
PLP	$y = 1308.8 x + 47.422$	1~100ng	0.9972
B7	$y = 1.6329e4 x + 1.4538e4$	0.5~100ng	0.9987
B9	$y = 7764.8 x + 823.1$	0.5~100ng	0.9986
5-METHF	$y = 9427.7x + 1139.8$	0.5~100ng	0.9988
B12	$y = 1595.9x + 1.22509$	0.5~100ng	0.9950
HCY	$y = 9339.0 x + 2225.6$	0.5~100ng	0.9988
MMA	$y = 3574.0 x + 967.7$	0.5~100ng	0.9981

3.5.2 人血浆样本分析

实验后期采用人空白血浆样本和5ng/mL人血浆加标样本进行方法验证，考察检出限和基质干扰分离情况，如图2所示，在人血样本中，14种化合物与基质干扰物均可以分离，对人血浆样本中水溶性维生素及其代谢物能够准确定性。考虑到血浆与PBS基质效应差异，建议购买相应内标采用内标法去校准定量，本实验均外标法。

3.4 色谱条件

色谱柱： Luna Omega Polar C18 (2.1×100 mm, 3 μm)； P/N: 00D-4760-AN

流动相A相： 0.1%甲酸水溶液；

流动相B相： 0.1%甲酸乙腈溶液；

流速： 0.4 mL/min；

柱温： 40 °C；

进样量： 3 μL；

梯度程序见表3：



3.6 实验谱图

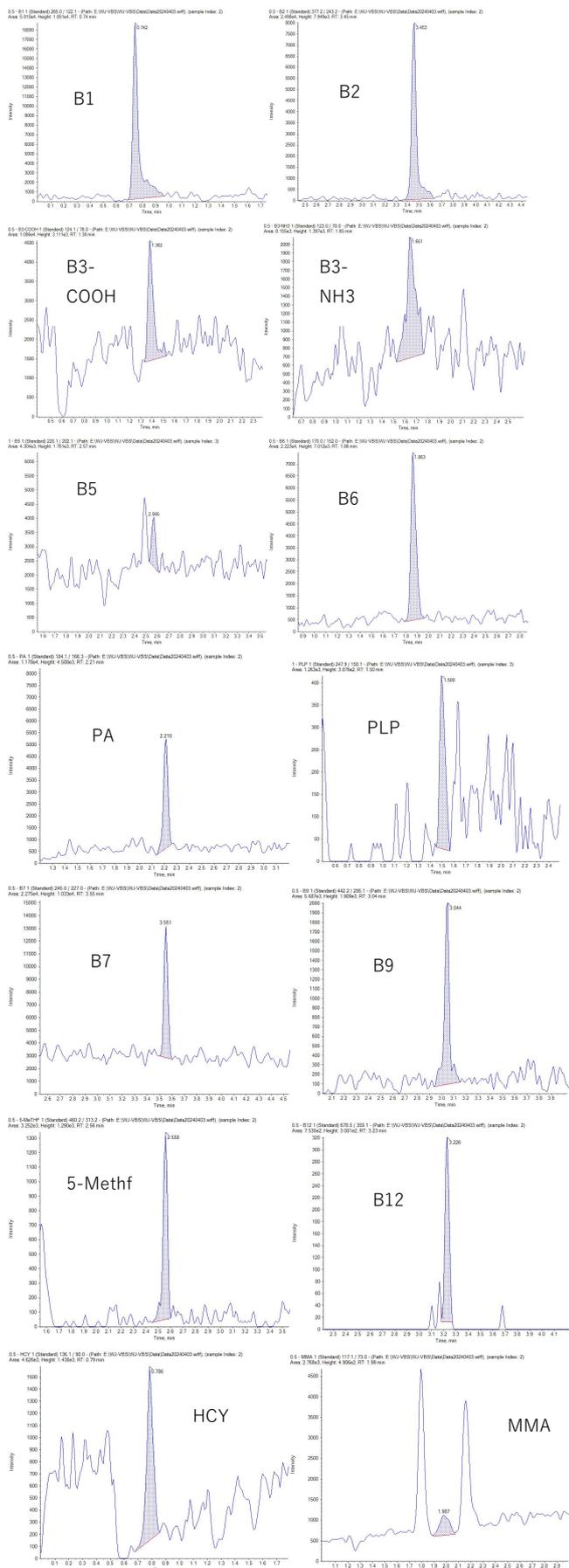


图1.线性最低点定量离子色谱图

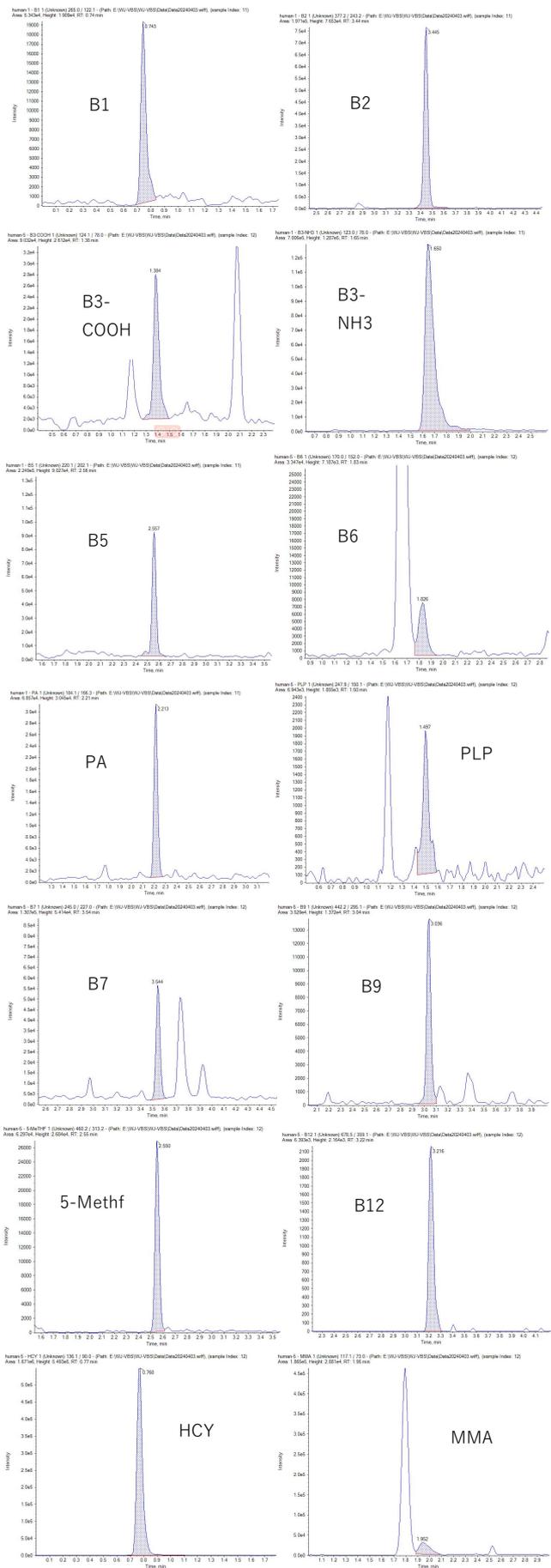


图2. 5ng/mL人血浆加标定量离子色谱图

如果您对于本方法的执行有任何问题,或想要了解更多信息,请拨打400-606-8099 联系我们的技术专家,我们很乐意为您提供帮助!



结论

本方案经过对多款色谱柱的筛选比对，采用Luna Omega Polar C18建立了一种对血浆中14种水溶性维生素及其代谢物含量测定的LC-MS/MS方法。该方法使用Cleanert PPT蛋白沉淀板，对样本进行简单便捷的处理后上机测试；流动相中采用酸化水和酸化乙腈，无需加盐的方式，提高了正模式下化合物的灵敏度的同时，在8 min内也实现了同时检测14种水溶性维生素及其代谢物且对基质干扰物的分离，方法具有高通量、高灵敏度的特点。该方案可为临床相关疾病辅助诊断提供精准水溶性维生素的浓度水平信息。



Xccelerator 加速服务

探索分离，使命加速

Mission to Accelerate Separation

在新药、仿制药研发和科学研究过程中，抢占先机越来越多被大家提及，同时在食品、环境、临床等行业的客户也都面临着项目周期压缩的压力。基于此，我们成立了上海和天津两个方法开发服务中心，为客户加快项目进度提供支持。

Xccelerator 以客户为中心，以色谱技术为中心，为药物研发和科学研究提供全方位加速服务。

三大研发中心

中国天津

地址：天津市开发区西区南大街179号

电话：400-606-8099

邮箱：cninfo@phenomenex.com

中国上海

地址：上海市长宁区福泉北路518号1号楼1层

电话：400-606-8099

邮箱：cninfo@phenomenex.com

美国总部

地址：411 Madrid Avenue Torrance, CA 90501-1430, USA

Tel: +1 (310) 212-0555

Fax: +1 (310) 328-7768

Email: cninfo@phenomenex.com

仅用于研究目的，不可用于临床诊断程序。

© 2022 天津博纳艾杰尔科技有限公司保留所有权利。



如果您对于本方法的执行有任何问题，或想要了解更多信息，请拨打400-606-8099 联系我们的技术专家，我们很乐意为您提供帮助！

phenomenex®