CMASS®
Science / Technology
用质谱发现医学之美

LC-MS/MS液质联用法
检测人血浆脂溶性维生素

上海谱芬生物科技有限公司

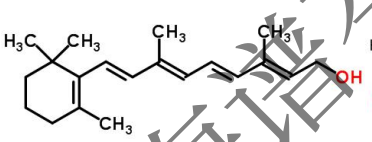
一、脂溶性维生素临床意义

脂溶性维生素包括维生素A，维生素E，维生素D和维生素K，在人体生长、代谢、发育过程中发挥着重要的作用。合理的维生素水平对维持人体健康十分重要，准确测定人体中脂溶性维生素的含量，可以指导人们科学合理的补充维生素，预防疾病，保持健康活力，提高生活质量。

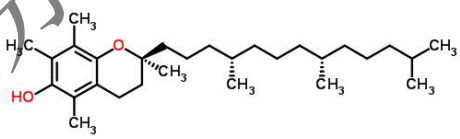
表1脂溶性维生素体内生理意义和病理相关症状

维生素名称	生理意义	体内浓度范围	缺乏症状	过多症状	主要来源
维生素 A	维持视力及皮肤功能、骨骼生长、生育和胚胎发育具有重要作用，还具有增强免疫的功能		夜盲症、干眼病、皮肤干燥粗糙、胎儿畸形	恶心、头痛、易激动、乏力等	鱼、鱼肝油、蛋类、牛奶等
25 羟维生素 D2 25 羟维生素 D3	与人体钙、磷代谢和骨骼钙化密切相关；与糖尿病、自身免疫性疾病，心血管疾病，癌症（乳腺癌、结肠癌和前列腺癌）发生也可能有关		儿童佝偻病、成年软骨症、骨质疏松	骨骼钙化、食欲降低、恶心呕吐	
维生素 E	提高生育能力、延缓衰老，改善血液循环、促进伤口愈合和预防近视等		生殖障碍、白内障、视网膜炎、贫血症	恶心呕吐、头痛、血压升高、口角炎	人体皮肤紫外照射下合成
维生素 K	参与凝血因子的合成和骨骼中钙磷代谢		凝血功能障碍、新生儿出血等	肝功损伤、血红蛋白尿、溶血性贫血	

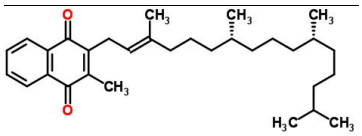
二、脂溶性维生素化合物基本信息



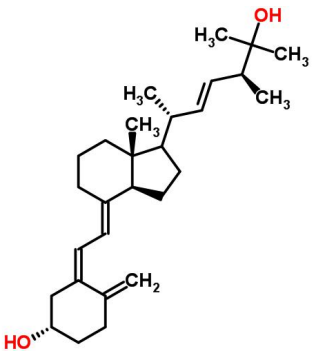
维生素 A



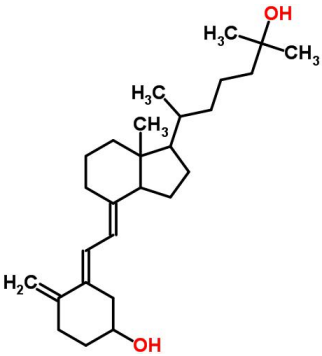
维生素 E



维生素 K1



25-羟维生素 D2



25-羟维生素 D3

上海谱芬生物科技有限公司

图 1 脂溶性维生素化学结构式

表 2 脂溶性维生素化合物基本信息

中文名	英文名	化学式	精确分子量	LogP	稳定性
维生素 A （视黄醇）	Vitamin A （VA）	C20H30O	286.22 Da	6.84	相对稳定，但对光和空气敏感，遇强酸和强氧化剂不稳定；溶解于乙醇、甲醇、三氯甲烷、乙醚等
25-羟维生素 D2 （25-羟麦角甾醇）	25-Hydroxyvitamin D2 （25-OHVD2，Ercalcidiol）	C28H44O2	412.33 Da	7.56	
25-羟维生素 D3 （骨化二醇）	25-Hydroxyvitamin D3 （25-OHVD3，Calcifediol）	C27H44O2	400.33 Da	7.53	溶于三氯甲烷、甲醇、乙醇，40mg/ml 水中
维生素 E （生育酚）	Vitamin E （VE，α-tocopherol）	C29H50O2	430.38 Da	11.90	易燃，可能对光和空气敏感，遇强氧化剂不稳定
维生素 K （叶绿醌）	Vitamin K1 （VK1，Phylloquinone）	C31H46O2	450.34 Da	12.25	

三、LC-MS/MS 液质联用检测方法

1、仪器设备及试剂耗材

仪器设备：SCIEX 4500MD 等（灵敏度相当或更高的串联四极杆质谱仪均可适用）。

色谱柱：Kinetex C18 50 x 3.0 mm，2.6 μm；

试剂：甲醇、乙腈、水、甲酸、正己烷（所有试剂均为色谱纯以上）；空白替代基质血浆或血清；质控品（可在方法开发完成并通过性能验证后再选择配备）；

标品及内标：维生素 A、25-羟基维生素 D2、25-羟基维生素 D3、维生素 E、维生素 K1 及同位素内标物维生素 A-d6、25-羟基维生素 D2-d6、25-羟基维生素 D3-d6、维生素 E-d6、维生素 K1-d7。

2、样品前处理

样品经过蛋白沉淀后进行液液萃取，取上清后氮吹复容。

5、仪器参数条件

1） 色谱条件

色谱柱：Kinetex C18 50 x 3.0 mm，2.6 μm

上海谱芬生物科技有限公司

水相/A 相：水（含 0.1%甲酸，v/v）

有机相/B 相：甲醇（含 0.1%甲酸，v/v）

柱温：40 摄氏度

进样量：20ul

2） 质谱条件

表 3 脂溶性维生素及其内标 MRM 离子对监测通道参数

Q1（Da）	Q3（Da）	ID	DP（Volts）	EP（Volts）	CE（Volts）	CXP（Volts）
395.4	269.1	25OHD2-1	50	10	23	14
395.4	209.1	25OHD2-2	50	10	33	11
383.4	257.3	25OHD3-1	70	10	23	13
383.4	229.4	25OHD3-2	70	10	25	11
451.4	187.1	VK1-1	60	10	30	10
451.4	199	VK1-2	60	10	34	12
269.2	93.1	VA-1	40	10	25	7
269.2	119.1	VA-2	40	10	23	9
431.3	165.2	VE-1	40	10	70	10
431.3	137	VE-2	40	10	58	9
389.3	263	Vd3-d6	70	10	23	13
401.4	269	Vd2-d6	76	10	28	14
275.2	96.1	VA-d6	40	10	25	7
437.3	171.2	VE-d6	40	10	25	10
458.4	194.1	VK1-d7	60	10	31	13

注：1-定量离子对；2-定性离子对

6、结果

1） 标准曲线方程及线性

采用以上前处理和仪器方法，得到的标准曲线回归方程见表 6.

表 6 线性回归方程

化合物	回归方程	权重	相关系数r	线性范围

上海谱芬生物科技有限公司

维生素A	Y=0.0069X+0.00565	1/x2	0.9981	10~2000ng/mL
25-羟基维生素D2	Y=0.0228X-0.000123	1/x2	0.9975	0.5~20ng/mL
25-羟基维生素D3	Y=0.0676X+0.00685	1/x2	0.9969	0.5~100 ng/mL
维生素E	Y=0.295X+0.0187	1/x2	0.9945	0.2~40ug/mL
维生素K1	Y=0.23X+0.0754	1/x2	0.9955	0.1~20ng/mL

2) 实验谱图见图 2 和图 3 所示

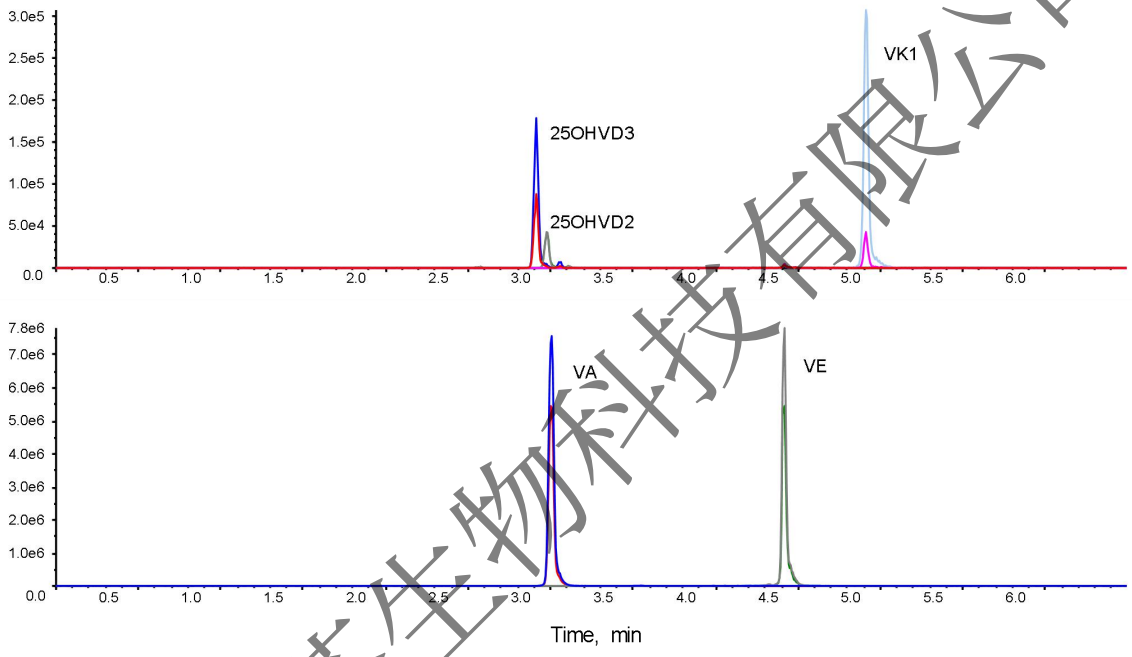


图 2 标准曲线样离子流色谱图

上海谱芬生物科技有限公司

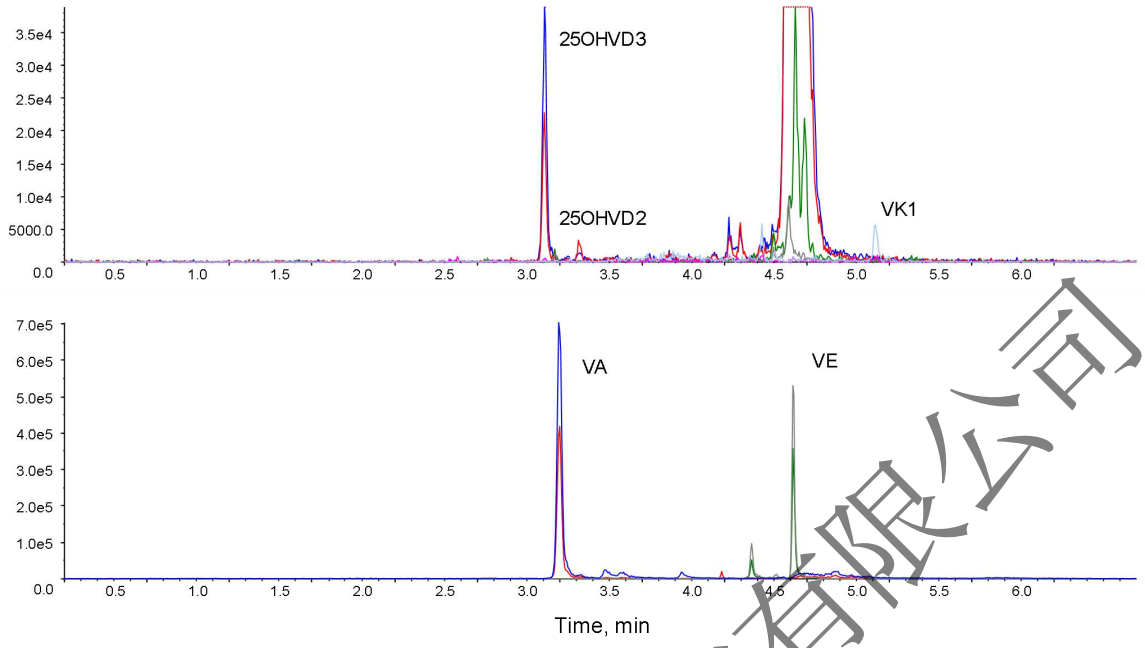


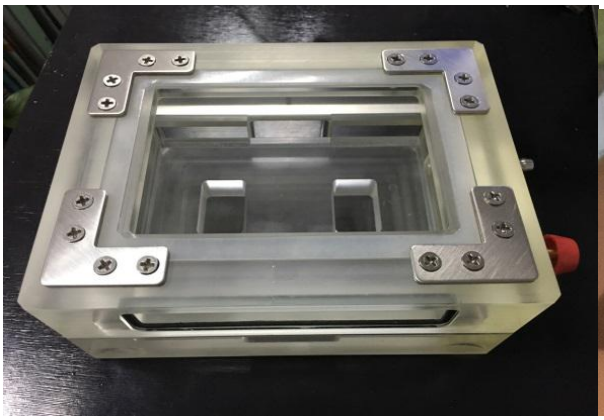
图 3 实际血液样本离子流色谱图

7、特别声明

本试验是在特定的实验环境下进行的，由于不同实验室条件和环境差异大，且实验效果受仪器厂家、仪器型号、仪器状态、试剂、实验操作人员操作手法等多种因素影响。因此，不同实验室实验结果有差异性也属正常现象，以上检测方法仅供分析实验室人员参考，不能保证方法重现。实验室操作人员可根据自身情况进行方法优化调整，以期达到较理想的分析效果。同时有条件的实验室亦可引入商品化质控来验证自己的实验方案。

注：以上内容仅供科研参考使用，不可用于临床诊断依据。

上海谱芬生物科技有限公司



96 孔固相萃取仪（负压萃取装置）96 孔固相萃取板

96 孔样品收集板　　96 孔板封膜

相关前处理设备和试剂耗材信息

名称	规格	货号
96 孔样品收集板	1.0ml	CMS-D-96WP-RU-V1.0
96 孔板封膜	100/张	CMS-D-96WC-ALF
色谱柱	Kinetex C18 50 x 3.0 mm，2.6 µm	
质控品	5*1，5*1,2*5*1	CMS-CH0036/ CH0037/ CH0032
校准品	5*1	CMS-CH34004
空白替代基质 (祛除维生素 A、维生素 D、维生素 E、维生素 K)	100ml/300ml/1L	CMS-G-MSG1500/ CMS-G-MSG1000 /CMS-G MSG1600 /CMS-G MSG1700
甲酸		

上海谱芬生物科技有限公司

维生素 A	25mg/100mg/250mg/500mg/1g/10g	CMS-TRR252000
25-羟基维生素 D2	250ug/500ug/1mg/2mg/5mg/10mg	CMSTR-TRH995820
25-羟基维生素 D3	1mg/5mg/10mg/25mg/100mg/250mg	CMS-TRC125700
维生素 E	1g/5g/10g	CMS-TRT526125
维生素 K1	10mg/100mg/1g/5g/10g	CMS-TRV676080
维生素 A 醋酸盐-d6	10mg	CMS-DLM-3828
25-羟基维生素 D2-d6	50ug/ml；100ug/ml；250ug/ml	CMS-A00014-d6
25-羟基维生素 D3-d6	50ug/ml；100ug/ml；250ug/ml	CMS-A00016-d6
维生素 E-d6	50ug/ml；100ug/ml；250ug/m	CMS-A00019
维生素 K1-d7	50ug/ml；100ug/ml；250ug/m	CMS-A00021
96 位氮吹仪		CMS-2000

上海谱芬生物科技有限公司