·医学工程·

液相色谱串联质谱检测血清中5种脂溶性维生素方法的验证研究

李明珠* 袁艺珊 龚晓雪 吴萍萍 苏良香 孙金

（上海迪安医学检验所有限公司，上海 200433）

【摘要】 目的 建立液相色谱串联质谱检测方法，同时检测血清中维生素A、维生素D［25-(OH)D_2、25-(OH)D_3］、维生素E、维生素K5种脂溶性维生素水平，并进行方法学验证。**方法** 样本经蛋白沉淀、离心处理后，取上清液体；采用 Phenomenex Kinetex C18（2.6 μm F5 100A，3.0 mm×50.0 mm）色谱柱，设置柱温为40 ℃，流动相A相为0.1%甲酸水溶液，流动相B相为0.1%甲酸甲醇溶液，以0.7 mL/min的流速进行梯度洗脱，进样量为25 μL。质谱采用正离子多反应监测（multiple reaction monitoring, MRM）模式，内标法定量，对方法的精密度、加标回收率、抗干扰能力等指标进行验证。**结果** 5种脂溶性维生素标准曲线线性关系良好，相关系数均大于0.998，日内精密度在1.71%～6.25%，日间精密度在2.71%～6.76%，加标回收率在89.65%～110.61%，血红蛋白、甘油三酯、胆红素等干扰物的影响偏差均小于10%，验证指标均符合要求。**结论** 本方法分析速度快、灵敏度高且抗干扰能力强，可快速准确测定血清中5种脂溶性维生素水平，适用于临床批量样本的常规检测。

【关键词】 脂溶性维生素；液相色谱串联质谱；验证；定量检测

【中图分类号】 R446.11 **【文献标识码】** A **【DOI】** 10.11876/mimt202601008

Validation study on the method for determination of 5 fat-soluble vitamins in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

*Li Mingzhu**, *Yuan Yishan*, *Gong Xiaoxue*, *Wu Pingping*, *Su Liangxiang*, *Sun Jin*

（*Shanghai Dian Medical Diagnostic Laboratory*, *Shanghai 200433*, *China*）

【Abstract】 Objective A method for the simultaneous determination of 5 fat-soluble vitamins［VA, 25-(OH)D_2, 25-(OH)D_3, VE, VK］in serum was established based on the liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and a systematic methodological validation was conducted. **Methods** After the samples were subjected to protein precipitation and centrifugation, the supernatant was collected. A Phenomenex Kinetex column C18 (2.6 μm F5 100A, 3.0 mm×50 mm) was used, with the column temperature set at 40 ℃. Mobile phase A was 0.1% formic acid aqueous solution, and mobile phase B was 0.1% formic acid methanol solution, with a flow rate of 0.7 mL/min and an injection volume of 25 μL. Positive ion mode with multiple reaction monitoring (MRM) was adopted, and quantification was performed using the internal standard method. Indicators such as the precision, spiked recovery rate, and anti-interference ability of the method were verified. **Results** The 5 fat-soluble vitamins showed good linear relationships within their respective concentration ranges, with correlation coefficients all greater than 0.998. The intra-day precisions were in the range of 1.71% ~ 6.25%, and inter-day precisions were in the range of 2.71% ~ 6.76%. The spiked recovery rates were in the range of 89.65% ~ 110.61%. The interference biases caused by substances such as hemoglobin, triglycerides, and bilirubin were all less than 10%. **Conclusion** This method is rapid in analysis, high in sensitivity, and strong in anti-interference ability. It can quickly and accurately determine the levels of 5 fat-soluble vitamins in serum, and is suitable for routine detection of clinical batch samples.

【Key words】 Fat-soluble vitamins; Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Validation; Quantitative detection

第一作者： 李明珠，女，硕士研究生，助理研究员，研究方向：临床质谱

脂溶性维生素是必须营养元素，具有清除自由基的特性。根据化学结构和生物学功能，脂溶性维生素分为维生素 A、维生素 D、维生素 E、维生素 K 4类，对人体的生长发育、代谢调节有至关重要的作用，在营养方面的重要性得到广泛认可[1–4]，缺乏或过量摄入脂溶性维生素，可能引发诸多健康问题[1, 5–9]。人体所需的维生素 D 约 80%是通过皮肤中的 7–脱氢胆固醇经太阳紫外线照射转化生成，维生素 K_2 主要由肠道菌群产生，人体无法完全合成这些维生素。维生素 A 和维生素 E 主要从饮食中获取，特定人群如孕妇、老年人、骨质疏松患者和儿童易出现这两种维生素缺乏[6]。过量和随意补充脂溶性维生素可能导致体内蓄积，脂溶性维生素水平失衡，会扰乱生理功能、代谢和细胞调节。对于患有吸收障碍、肝病、炎症性肠病的人群及生长迟缓的儿童，应定期监测脂溶性维生素水平[5]。

脂溶性维生素定量检测的传统方法有微生物法和液相色谱紫外法，微生物法在准确性、特异性和通量方面存在明显不足；液相色谱紫外法对低含量维生素灵敏度较低，且对复杂基质的选择性较差[4–5, 7]。液相色谱质谱法将色谱分离度与质谱精度相结合，可以解决灵敏度、选择性和准确性的问题，成为定量检测脂溶性维生素的首选方法，而且可以同时检测多种分析物，优势明显[5, 7, 10]。但是，该方法也面临所需样品量大、前处理复杂、仪器操作复杂等问题[7]。本研究建立了一种液相色谱串联质谱的方法，使用液液萃取加蛋白沉淀操作，具有前处理简单快速、液相方法时间短的特点，同时评价了血清中维生素 A、维生素 D_2、维生素 D_3、维生素 E、维生素 K 5种脂溶性维生素检测方法的校准曲线、精密度、加标回收率、定量下限、抗干扰能力等指标，验证了该方法可减少血液处理量、缩短总分析时间和提高灵敏度，从而在生理浓度和临床水平上对脂溶性维生素进行准确定量。

1 材料和方法

1.1 设备和材料

本研究所使用的仪器和试剂见表 1。所使用的血清样本为商业购买的匿名化残留样本。

表 1 仪器和试剂

序号	名称	型号或规格	生产厂家
1	高效液相色谱串联质谱检测系统	AB SCIEX Triple Quad™ 4500MD	AB SCIEX
2	涡旋仪	Vortex–5	上海沪析
3	高速冷冻离心机	BY–R16	北京白洋
4	超声波清洗器	KH–250DB	昆山禾创
5	多管涡旋混合仪	MS200	杭州瑞诚
6	移液器	100 ~ 1 000 μL；20 ~ 200 μL；10 ~ 100 μL	Thermo Scientific
7	超纯水机	GenPure Pro UV/UF	赛默飞
8	脂溶性维生素检测试剂盒	FV250120AH	杭州谱聚医疗科技有限公司
9	5种脂溶性维生素及其内标	FV250120AH	杭州谱聚医疗科技有限公司
10	甲酸	质谱级	Sigma–Aldrich
11	甲醇	色谱级	默克

1.2 方法

通过对样本中的脂溶性维生素进行沉淀蛋白、萃取、取上清等步骤，获取目标物及其内标的提取液，采用高效液相色谱串联质谱检测系统直接对样本中目标物进行检测。对检测方法进行校准曲线、精密度、加标回收率、定量下限、抗干扰能力等指标的评价分析。

1.2.1 试剂准备

将血清样本和试剂从低温环境中取出，放置在 18 ~ 25 ℃的常温下解冻，并混匀备用。按照检测试剂盒说明书要求，在室温下精确量取 600 μL的超纯水到脂溶性维生素校准品 S1 ~ S6 6个试剂瓶冻干粉中以及脂溶性维生素低、高质控品 2个试剂瓶冻干粉中，涡旋混匀 5 min至冻干粉完全溶解后备用。

1.2.2 样本处理

取各标准系列溶液、质控品、血清样本各100 μL分别加入1.5 mL离心管，加入300 μL同位素内标工作液，2 500 r/min振荡5 min，13 000 r/min离心5 min。取上清液200 μL滴加到96深孔孔板中，上机检测。

1.3 检测条件

1.3.1 色谱条件

采用Phenomenex Kinetex C 18（2.6 μm F5 100A，3.0 mm×50.0 mm）色谱柱，设置柱温为40 ℃，流动相A相为0.1%甲酸水溶液，流动相B相为0.1%甲酸甲醇溶液，流速为0.7 mL/min，进样量为25 μL，采用梯度模式洗脱，洗脱程序见表2。

表2 流动相的梯度洗脱程序

时间（min）	流速（mL/min）	流动相A相的体积（%）	流动相B相的体积（%）
0	0.7	60	40
0.4	0.7	60	40
1.2	0.7	25	75
3.0	0.7	2	98
4.3	0.7	0	100
4.4	0.7	60	40
5.4	0.7	60	40

1.3.2 质谱条件

采用大气压化学电离（atmospheric pressure chemical ionization, APCI）正离子、多反应监测（multiple reaction monitoring, MRM）模式扫描分析，气帘气（curtain gas, CUR）30 μL/min，离子化电压（ion spray voltage, IS）5 500 V，加热块温度（temperature, TEM）400 ℃，喷雾气（ion source gas 1, GS1）60 L/min，辅助加热气（ion source gas 2, GS2）0 L/min，碰撞气（collision gas, CAD）6 L/min。其他质谱参数见表3。

1.4 定量分析

1.4.1 标准曲线

根据试剂盒提供的系列浓度工作溶液，采用同位素稀释内标法进行标准曲线分析，使用AB SCIEX公司的MultiQuant MD 3.0.3软件输出原始数据，用加权最小二乘法进行线性回归分析。

表3 质谱参数设置

分析物及其内标	母离子（m/z）	子离子（m/z）	去簇电压（V）	碰撞能量（V）	驻留时间（ms）
维生素A	269.2	119.1	59	60	30
		93.0	66	55	20
25-(OH)D_2	395.3	209.2	65	37	30
		369.3	65	26	20
		227.3	65	28	20
25-(OH)D_3	383.5	365.4	65	16	30
		257.2	65	23	30
	401.2	257.2	65	22	20
维生素E	431.4	137.1	80	80	50
		165.1	80	70	50
维生素K	451.3	187.1	75	33	50
维生素A-d6	275.2	122.1	59	45	35
	275.3	96.0	68	45	20
25-(OH)D_2-d6	401.2	269.1	65	37	30
25-(OH)D_3-d6	389.3	263.2	65	23	30
	407.3	263.2	65	22	20
维生素E-d6	437.4	143.1	80	50	50
		171.0	80	61	50
维生素K-d6	458.4	194.2	75	33	50

1.4.2 精密度

取脂溶性维生素低、高质控品2个试剂瓶冻干粉，按照1.2.1和1.2.2所述步骤进行样本前处理，每个质量浓度同时检测5个样本，评价日内精密度。连续测定3天，分别测定低、高浓度的样品，每个质量浓度同时检测5个样本，评价日间精密度。

1.4.3 加标回收率

选取一个已知浓度的样本作为原始样本，分别向该样本中加入低（临界值的1/2）、中（临界值的2倍）、高（线性范围上限值的80%）3个浓度的标准溶液，制备出3个浓度的加标样本，每个浓度样本平行制备5份，充分涡旋混匀，通过加标浓度与加标实测浓度计算脂溶性维生素的回收率。

1.4.4 定量下限

定量下限是满足方法准确度和精密度要求的目标分析物最低值。本实验选择校准曲线最低值作为定量下限检测样本量，其中，维生素A 47.89 ng/mL，维生素D_2 1.76 ng/mL，维生素D_3 3.93 ng/mL，维生素E 382.99 ng/mL、维生素K 0.18 ng/mL，分为5份，每份样本重复测定3次，评估精密度（coefficient of variation, CV）及其浓度测定均值与理论浓度的

偏差。

1.4.5 抗干扰能力

样本基质的内源性物质、同分异构体等可能会对质谱分析产生干扰，本实验进行抗干扰能力测试，取 1 份已知浓度的样本，分成 2 份，一份加入潜在干扰物质血红蛋白、甘油三酯、胆红素内作为干扰组，另一份加入不含干扰物的同基质物质内作为对照组，每份样本重复测定 3 次，计算平均值，评价干扰组与对照组的相对偏差。

2 结果

2.1 标准曲线

5 种脂溶性维生素的标准曲线如图 1 所示，由图可知，标准曲线呈良好的线性关系，r 值均在 0.998 以上，因此该检测方法的线性范围分别为：维生素 A 50 ~ 2 500 ng/mL，维生素 D_2 1.7 ~ 85.0 ng/mL，维生素 D_3 4 ~ 180 ng/mL，维生素 E 380 ~ 20 000 ng/mL，维生素 K 0.18 ~ 10.00 ng/mL。

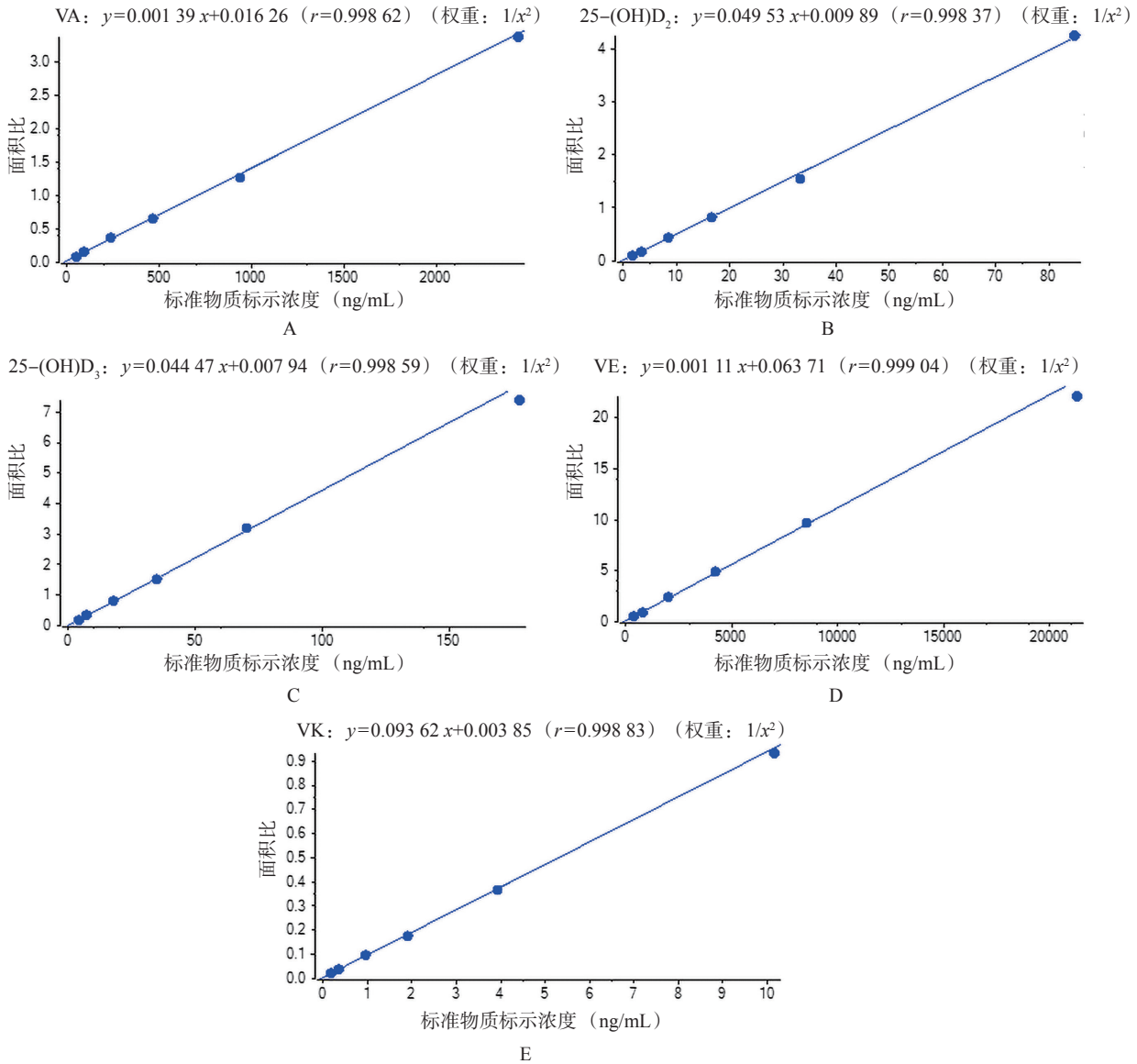


图 1 5 种脂溶性维生素的标准曲线 A 为维生素 A；B 为维生素 D_2；C 为维生素 D_3；D 为维生素 E；E 为维生素 K

2.2 精密度

日内精密度和日间精密度如表 4 所示，日内精密度在 1.71% ~ 6.25%，日间精密度在 2.71% ~ 6.76%。

2.3 加标回收率

加标回收率测定结果如表 5 所示，结果显示在 89.65% ~ 110.61% 之间。

表4 脂溶性维生素低、高浓度样品日内精密度和日间精密度测定结果（n=5）

分析物	日内检测结果（ng/mL）	日内精密度（%）	日间检测结果（ng/mL）	日间精密度（%）
维生素A	145.32 ± 6.52	3.19	147.60 ± 10.30	4.52
	689.50 ± 17.60	1.71	694.55 ± 45.85	2.71
25-(OH)D_2	5.03 ± 0.44	5.66	5.22 ± 0.54	5.60
	24.71 ± 1.42	4.29	25.12 ± 1.84	3.77
25-(OH)D_3	11.26 ± 0.99	6.25	11.15 ± 0.98	4.81
	51.76 ± 3.84	4.75	53.34 ± 4.45	5.10
维生素E	1 228.80 ± 116.20	5.71	1 257.87 ± 171.13	6.76
	6 488.80 ± 279.80	3.61	6 439.40 ± 1 090.40	6.64
维生素K	0.56 ± 0.04	4.42	0.57 ± 0.05	4.75
	2.97 ± 0.08	1.75	2.95 ± 0.31	4.13

表5 脂溶性维生素低、中、高浓度样品加标回收率测定结果（n=5）

分析物	本底值（ng/mL）	加标值（ng/mL）	检测值（ng/mL）	回收率（%）
维生素A	359.36	120.00	485.68 ± 12.12	105.27
		300.00	666.00 ± 33.90	102.21
		900.00	1 248.60 ± 46.60	98.80
25-(OH)D_2	4.63	4.00	8.44 ± 0.34	95.04
		10.00	14.41 ± 0.88	97.77
		30.00	31.73 ± 1.41	90.31
25-(OH)D_3	17.22	8.00	25.84 ± 0.88	107.83
		20.00	38.22 ± 2.27	105.01
		60.00	77.07 ± 1.74	99.76
维生素E	11 266.80	1 000.00	12 324.00 ± 556.00	105.72
		2 500.00	14 032.00 ± 312.00	110.61
		7 500.00	18 310.00 ± 500.00	93.91
维生素K	0.96	0.60	1.56 ± 0.12	99.97
		1.50	2.30 ± 0.06	89.65
		4.50	5.44 ± 0.10	99.58

2.4 定量下限

5种脂溶性维生素测试值和理论值的偏差均在15%以内，测试的平行标本相对标准偏差（relative standard deviation，RSD）在10%以内，见表6。

表6 定量下限标本测试结果（n=15）

分析物	检测结果（ng/mL）	准确度（%）	RSD（%）
维生素A	47.24 ± 4.88	98.65 ± 10.18	6.0
25-(OH)D_2	1.68 ± 0.31	95.69 ± 17.38	8.8
25-(OH)D_3	383.61 ± 49.49	98.07 ± 16.18	8.5
维生素E	383.61 ± 49.49	100.16 ± 14.54	8.4
维生素K	0.17 ± 0.02	92.50 ± 18.26	6.2

注：RSD为相对标准偏差。

2.5 抗干扰能力

含干扰物质血红蛋白、甘油三酯、胆红素的相对偏差均在10%以内，见表7。

表7 抗干扰能力测试结果（n=3）

化合物	未加干扰物浓度（ng/mL）	干扰物	检测值（ng/mL）	相对偏差（%）
维生素A	367.20	血红蛋白	383.37 ± 1.37	4.4
		甘油三酯	364.80 ± 19.80	−0.7
		胆红素	387.87 ± 15.27	5.6
25-(OH)D_2	5.52	血红蛋白	5.68 ± 0.20	3.0
		甘油三酯	5.45 ± 0.22	−1.2
		胆红素	5.40 ± 0.22	−2.2
25-(OH)D_3	18.93	血红蛋白	19.07 ± 0.51	0.7
		甘油三酯	19.79 ± 0.62	4.5
		胆红素	18.24 ± 0.93	−3.7
维生素E	11 553.33	血红蛋白	12 063.33 ± 696.67	4.4
		甘油三酯	11 230.00 ± 450.00	−2.8
		胆红素	11 216.67 ± 733.33	−2.9
维生素K	1.10	血红蛋白	1.16 ± 0.05	6.4
		甘油三酯	1.08 ± 0.06	−1.7
		胆红素	1.10 ± 0.03	−0.2

3 讨论

脂溶性维生素在人类骨骼健康、视力和免疫力等许多方面发挥重要作用[11]。脂溶性维生素水平检测常应用于临床诊断、代谢组学、个性化营养和药物研究，人血清中不同维生素的含量差异很大，维生素 A 和维生素 E 是 μg级别，维生素 D 是 ng级别，因此，对于低灵敏度质谱仪来说，实现多种维生素同时检测是一项挑战[12]。维生素 A 极性较强，易被洗脱下来，以往的方法有保留时间长、样品用量大、缺乏稳定同位素标记的内部参照等局限性，且操作具有一定的复杂性，很难准确测量脂溶性维生素在人体内的水平，对于临床测试应用推广较为困难[1]。本研究选择常规色谱柱分离样本待测分析物，选择 0.1%甲酸优化色谱图峰形，调节流动相梯度，缩短液相色谱分离时间至 5.4 min，同时简化前处理操作流程、减少样品用量，该方法可以更好地适应临床需求。最后经过标准曲线线性程度、精密度、加标回收率、抗干扰能力等方法学验证，建立了临床实验室质谱检测脂溶性维生素的方法。质谱检测结果显示，标准曲线浓度范围内线性程度良好，日内精密度和日间精密度符合要求，证明本方法对于目标物在提取、检测过程中损失小，前处理效率高，测定结果准确度高，且方法灵敏度高、检出能力强。血样中血红蛋白、甘油三酯、胆红素类物质对目标物测试结果影响不大，说明方法抗干扰能力较强，可满足临床需求。

综上所述，本研究建立并评价了一种液相色谱串联质谱快速测定血清中 5 种脂溶性维生素含量的方法，操作简单，定量准确，可满足临床检测的要求，适合临床血清样本检测。该方法提高了动态营养评估能力，可以为临床医生的医学诊断提供真实、可靠的体内脂溶性维生素水平数据，为人群营养状况和维生素水平调查提供技术储备和支撑，有助于早期发现和管理与维生素缺乏或过量相关的疾病。

[参 考 文 献]

[1] Wen J, Wen Y, Wang Z, et al. Quantifcation of fat-soluble vitamins in human serum by LC–MS/MS [J]. Discover Chemistry, 2025, 2: 21.

[2] Zhao H. Simultaneous detection and quantitation of 14 fat–soluble vitamins and carotenoids by LC/MS/MS triple–quadrupole [EB/OL]. (2022–07–20) [2025–11–13]. https://www.agilent.com.cn/cs/library/applications/an–fat–soluble–carotenoid–infinityII–6470a–poroshell–5994–5064en–agilent.pdf.

[3] 陈曦, 宫照龙, 沈菡. 超高效液相色谱–三重四级杆串联质谱法测定血清中维生素 A 和维生素 E [J]. 卫生研究, 2021(2): 301–307.

[4] 权帆, 詹珍旋, 赵宁, 等. 超高效液相色谱–串联质谱法同时测定干血斑中维生素 A 和维生素 E [J]. 化学分析计量, 2024, 33(12): 17–22.

[5] Arachchige G R P, Thorstensen E B, Coe M, et al. LC–MS/MS quantification of fat soluble vitamers: a systematic review [J]. Analytical Biochemistry, 2021, 163: 113980.

[6] Tölgyesi A, Girincsi E, Hermann V, et al. Determination of fat–soluble vitamins A, D_2, D_3, E and K_3 by isotope dilution and LC–MS/MS instrument assembly [J]. Journal of Food Investigation, 2022, 68(3): 3994–4005.

[7] 于鹏, 周传贵, 楚士颖, 等. 建立 LC–MS/MS 检测血清中 5 种脂溶性维生素的方法及临床验证 [J]. 检验医学与临床, 2024, 21(6): 721–725, 732.

[8] 黄和飞, 李佳兴, 谷叶, 等. 溶血对液相色谱串联质谱检测血清中维生素 A、E、D、K 的影响 [J]. 当代医学, 2021, 27(4): 1–5.

[9] 李冰玲, 程雅婷, 赵蓓蓓, 等. LC–MS/MS 检测血清 25–羟基维生素 D 替代校准品基质的选择与评价 [J]. 检验医学, 2021, 36(2): 213–218.

[10] 何宇龙. 基于 LC–MS/MS 建立同时测定人血清 4 种脂溶性维生素的分析方法及应用 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2021.

[11] Andrès E, Lorenzo–Villalba N, Terrade J E, et al. Fat–soluble vitamins A, D, E, and K: review of the literature and points of interest for the clinician [J]. J Clin Med, 2024, 13(13): 3641.

[12] 钱婧雨, 金芳, 宋文琪, 等. 液相色谱–串联质谱法检测维生素 A、25 羟维生素 D_3 和维生素 E 方法的建立 [J]. 中国医学装备, 2024, 21(4): 34–39.