

液相色谱-串联质谱技术在维生素检测中的应用

袁小芬 马金飞 杨青青 刘鹏云 沈凌晓 张前军 李义坤 刘华芬

杭州凯莱谱精准医疗检测技术有限公司,杭州 310000

通信作者:刘华芬,Email:liuhf1@dazd.cn

【摘要】 维生素分为脂溶系列包括 ADEK 和水溶系列维生素 B 族及维生素 C。目前只有对维生素 D、B₆、B₉ 及 B₁₂ 开发了传统的免疫学的检测方法,但免疫法无法区分亚型比如维生素 D₂ 及 D₃ 以及在婴儿中含量较高的 Epi 同分异构体,因此免疫学方法检测经常会出现假阳性或假阴性。质谱技术以其快速、高分辨率、高灵敏度、高特异性等优点成为生物样本内小分子分析的金标准方法,广泛应用于临床研究及诊断,也为减少样品采集量及一次进样同时检测多种维生素提供了高效方法。

【关键词】 维生素类; 色谱法,液相; 串联质谱法

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-8158.2019.06.015

Application of LC-MS/MS in the accurate assessment of vitamins

Yuan Xiaofen, Ma Jinfei, Yang Qingqing, Liu Pengyun, Shen Lingxiao, Zhang Qianjun, Li Yikun, Liu Huafen
Hangzhou Calibra Diagnostics Co., LTD., Hangzhou 310000, China

Corresponding author: Liu Huafen, Email: liuhf1@dazd.cn

【Abstract】 Vitamins are classified as either fat-soluble (vitamins A, D, E, K) or water-soluble (vitamins B and vitamin C). Traditional methods of immunoassay have only been developed for vitamins D, B₆, B₉ and B₁₂. However, they cannot distinguish between vitamin subtypes such as D₂, D₃ and associated epi isomers (which has higher levels in infants), giving false positive or negative results. Mass spectrometry has become a gold standard method for small molecule analysis in biological samples with its advantages in speed, resolution, sensitivity and specificity. It is widely used in clinical research and diagnosis and provides an efficient method for simultaneous detection of multivitamins in one injection using one low volume sample collection.

【Key words】 Vitamins; Chromatography, liquid; Tandem mass spectrometry

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-8158.2019.06.015

维生素又名维他命,是保持人体健康的重要活性物质,参与生物体正常的新陈代谢和细胞调节过程,是人体生长和发育所必需的^[1]。通过大量的研究发现,维生素的摄入不足或缺乏对人体的健康都会产生较大的影响^[2]。因此,合适的维生素含量引起了营养学家和临床医生的广泛关注,而精准检测结果可帮助他们准确评估人体维生素营养状态、吸收障碍或毒性水平。

一、维生素检测方法对比

维生素的检测方法有多种,主要有放射免疫法、化学发光法、高效液相色谱法和液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)等。不同的维生素具有不同的分子结构,化学性质和上千倍差异的生理浓度范围,准确检测维生素系列从样品处理及检测方法都存在不同的挑战。例如维生素 D 检测,化学发光法虽然可以实现快速和高通量,但是其特异性低,易与自身抗体、特异性抗体发生交叉反应。而且不同品牌试剂对目标化合物的捕获效率可能存在差异,不同平台的检测

结果可比性差,对于缺乏及婴幼儿人群,免疫学方法检测经常会出现假阳性或假阴性。高效液相或气相色谱法灵敏度低且需要较长时间的液相分离无法实现高通量,难以为常规临床检验所用。而液相色谱-串联质谱技术以其样品量小,快速、高灵敏度、高特异性及可以同时检测多种化合物等优点逐渐被临床检验的专家所关注。质谱是一种测量离子质荷比(质量-电荷比)的分析方法。在欧美国家,质谱技术作为医学行业协会公认的生物样本内小分子分析的金标准方法,已被国外权威检测机构包括 Mayo Clinic, Quest Diagnostics, Labcorp 等广泛应用于临床研究及诊断。

仅以维生素 D 检测为例。人体维生素 D 主要来源于经阳光和皮肤作用合成的维生素 D₃,另一种来源是食物(如经光照后的蘑菇、野生海鱼等)中的维生素 D₂,两者均需要在肝脏中单羟基化为 25-羟基维生素 D₂(25-OHD₂)和 25-羟基维生素 D₃(25-OHD₃),然后再经过肾脏两次羟基化才能转变为具有生物活性的微量(pg/ml)双羟基代谢产物 1,

25-(OH)₂D, 其中 25-OHD₂ 和 25-OHD₃ 是人体血清中 25-羟维生素 D(25-OHD) 主要的存在形式。同时人体中还存在着 25-OHD₃ 的差向异构体——3-epi 25-OHD₃^[3], 平均占 25-OHD 总的 4%, 在成人样本中偶尔可高达 22%, 在出生后前 3 个月的婴儿中, 3-epi-25(OH)D₃ 浓度较高, 占 25-OHD 总浓度的 60%^[4]。对于正常人群健康检测, 免疫法因为自动化程度高经常作为首选, 但目前传统的免疫学方法检测 25-OHD 无法区分亚型维生素 D₂、D₃ 及 3-epi 25(OH)D₃。因此, 液相质谱方法对于医生干预补充维生素 D₃ 的人群, 婴幼儿及肾功能异常的患者具有重要意义。不同的是, LC-MS/MS 法还可准确区分和定量 3-epi-25(OH)D₃, 可用于评价免疫法的交叉反应程度^[5]。此外, 由于维生素具有不同的化学结构, 免疫方法学需要不同的抗体及方法, 而液相质谱方法是分子水平的检测, 可以同时检测多种维生素及其相关活性代谢产物。

二、选择具有临床意义的维生素检测标志物

不同的维生素在体内具有不同的存在形式, 甚至大多数时候是由多种形式共存, 因此选择具有临床诊断意义的维生素检测标志物十分关键。对于维生素 D, 目前体内可检测到的维生素 D 的代谢物约有 40 多种, 常规检测是 ng/ml 血清浓度的单羟基 25-OHD₂ 和 25-OHD₃。值得一提的是, 1, 25-(OH)₂D 在正常肾功能的人中浓度为 20~60 pg/ml, 比我们常规检测的单羟基代谢产物低 1 000 倍左右。其半衰期只有 4 h, 检测的挑战性很大, 目前最好的办法就是免疫富集并液相质谱。对于肾功能异常的患者, 补充维生素 D 会造成患者钙化, 而应该直接补充 1, 25-(OH)₂D。

维生素 E 在人类肝脏中主要以 α-生育酚的形式存在, 并与 α-生育酚转移蛋白(α-TTP) 结合并掺入脂蛋白中, 通过血液循环将 α-生育酚递送至肝外组织^[6]。维生素 K 是参与激活凝血和骨代谢特定蛋白所必需的, 天然的维生素 K 包括维生素 K₁(叶绿醌) 和维生素 K₂(甲萘醌类)。其中, 维生素 K₁ 是在人体循环中惯常测量的指标, 具备较强的质控方案, 并可响应于膳食摄入的变化, 而只有当量摄入富含甲萘醌类的食物后, 甲萘醌类才能在体循环中被检测到^[8]。目前大多数研究涉及凝血系统, 但其他与临床相关的研究表明, 维生素 K₁ 或 K₂ 的表现可能不同, 尤其是在骨代谢和血管钙化方面^[9]。

水溶性维生素, 例如维生素 B₆, 又称吡哆素, 包括吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺三种亚型及其磷酸衍生物。血浆中的磷酸吡哆醛(pyridoxal 5'-phosphate, PLP) 主要是由肝脏产生, 占到维生素 B₆ 主要代谢物的 70%~90% 左右^[9], 是主要的活性形式, 也是氨基酸、糖类和脂类代谢过程中的重要辅酶, 参与上百种酶催化反应^[10], 是维持神经系统和免疫系统健康所必需的, 且在维持血液中同型半胱氨酸正常水平中扮演重要角色。此外, 血浆中还有少量吡哆酸, 是维生素 B₆ 排泄到尿液中的主要形式。因此, 血清中磷酸吡哆醛的检测更具有实际临床意义。

维生素 B₉, 又称叶酸, 其代谢物包括四氢叶酸(维生素的活化形式)、5-甲基四氢叶酸(血清和全血中的主要形式)、甲基四氢叶酸等^[11]。血液叶酸浓度包括血清(血浆)叶酸浓度和红细胞叶酸浓度。前者反映近期膳食叶酸摄入量, 而后者反映近 3 个月内的膳食叶酸摄入量^[12]。美国健康和营养调查(NHANES) 通过对比不同方法学和不同基质(血清、红细胞) 中主要叶酸存在形式的研究表明, 采用 LC-MS/MS 法测定血清中的 5-甲基四氢叶酸近年来均能保持较小的变异系数^[11]。

维生素 B₁₂, 又称钴胺素, 其生物标志物研究包括循环的维生素 B₁₂ 浓度指标[维生素 B₁₂ 及全反钴胺素(holo TC)] 和功能性的维生素 B₁₂ 状态指标[甲基丙二酸(MMA) 及总同型半胱氨酸(tHcy)]^[13]。前者会随着维生素 B₁₂ 摄入量的增加而升高, 反映了维生素 B₁₂ 的摄入量和状态水平变化, 但其缺乏诊断维生素 B₁₂ 缺乏的敏感度和特异度^[14]。后者对维生素 B₁₂ 的早期不足和临界摄入状态评估具有较高的敏感性, 但叶酸缺乏、核黄素和维生素 B₆ 缺乏或肾功能衰退、甲状腺功能减退时也会导致 tHcy 升高^[13-15]。而血清(或血浆) MMA 升高主要是由维生素 B₁₂ 的缺乏导致, 很少受其他因素影响^[15-16]。NHANES 建议: 在评估维生素 B₁₂ 时, 保留血清 B₁₂ 和血清(或血浆) MMA 检测以便同时提供维生素 B₁₂ 的循环和功能水平^[14]。

不同基质中多种维生素的准确、可靠的检测, 对于更精准的评估人体维生素水平、诊断以及合理使用维生素补充剂至关重要。对于一些特殊人群, 如孕妇, 高血压(尤其是 H 型高血压) 患者可选择同时检测多种指标来综合评估。另有研究表明, 维生素 B₁₂ 有助于提高体内活性叶酸水平, 同时降低同型半胱氨酸水平, 进而有利于降低 NTDs 的风险^[12]。常用的维生素分析项目和方法学见表 1。

三、LC-MS/MS 法检测维生素的难点与挑战

一次样品处理及检测多种脂溶性维生素测定的难点在于: 各待测物在人体血清中的含量差别较大, 如人体血清中维生素 A、E 的含量高达 μg/ml 级别, 维生素 D 的含量为 ng/ml 级别, 而维生素 K 的含量小于 2 ng/ml, 普通检测器很难满足同时对这几种化合物在线性范围进行检测并满足其高灵敏度的要求; 且各脂溶性维生素的极性差别较大, 维生素 A 的极性相对较强, 在液相质谱柱上容易被洗脱; 维生素 E 和 K 的极性较弱, 较难被洗脱。此外, 不同人体血清中的内源性物质对维生素 E 的检测存在严重的基质效应, 因此检测过程中需要使用同位素内标。

先进的 SPE 或 SLE 或萃取样品处理技术可以实现 LC-MS/MS 法同时检测维生素 A、D、E、K(图 1), 其优势在于: 前处理方法采用 96 孔板方法, 简化了实验步骤、大大缩短了前处理时间, 提高了检测通量; 采用梯度洗脱条件, 在缩短分析时间的同时获得了较好的去介质及分离效果, 一次 10 μl 进样可同时得到 VA、25-OHD₂、25-OHD₃、VE 和 VK 检测结果; 同时在前处理过程中添加同位素内标后, 消除了不同基质样本中内源性物质对检测物的影响, 大大提高了

表 1 维生素检测常用指标和方法学

维生素	常用分析项目	分子式	相对分子质量(g/mol)	样本类型	推荐方法学	说明
维生素 A	视黄醇	C ₂₀ H ₃₀ O	286.45	血清或血浆	LC-MS/MS	活性形式
维生素 D	25-羟基维生素 D ₂	C ₂₈ H ₄₄ O	396.65	血清、血浆或全血	LC-MS/MS	主要存在形式
	25-羟基维生素 D ₃	C ₂₇ H ₄₄ O	384.64	血清、血浆或全血	LC-MS/MS	主要存在形式
	1, 25-双羟基维生素 D	C ₂₇ H ₄₄ O ₃	416.64	血清	LC-MS/MS	适用于肾功能异常人群
维生素 E	3-epi-25-羟基维生素 D ₃	C ₂₇ H ₄₄ O ₂	400.64	血清	LC-MS/MS	25-OHD ₃ 的差向异构体
	α-生育酚	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430.71	血清或血浆	LC-MS/MS	主要存在形式
维生素 K	维生素 K ₁	C ₃₁ H ₄₆ O ₂	450.70	血清或血浆	LC-MS/MS	主要存在形式
维生素 B ₁	硫胺素	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS ⁺	265.35	全血	LC-MS/MS	临床评估身体储存状态
				血清或血浆	LC-MS/MS	营养和依从性评估
维生素 B ₂	核黄素	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	376.37	血浆	LC-MS/MS	无
维生素 B ₃	烟酸	C ₆ H ₅ NO ₂	123.11	血清或血浆	LC-MS/MS	烟酰胺是烟酸的代谢物
	烟酰胺	C ₆ H ₆ N ₂ O	122.13	血清或血浆	LC-MS/MS	烟酰胺是烟酸的代谢物
维生素 B ₅	泛酸	C ₉ H ₁₇ NO ₅	219.24	血清或血浆	LC-MS/MS	无
维生素 B ₆	磷酸吡哆醛	C ₈ H ₁₀ NO ₆ P	247.14	血浆	LC-MS/MS	活性形式
维生素 B ₇	生物素	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	244.31	血清或血浆	LC-MS/MS	无
维生素 B ₉	叶酸	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	441.40	血清	免疫法	近期膳食摄入水平评估
					或 LC-MS/MS	
维生素 B ₁₂	5-甲基四氢叶酸	C ₂₀ H ₂₅ N ₇ O ₆	459.46	血清	LC-MS/MS	主要存在形式
	钴胺素	C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P	1 355.39	血清	免疫法或 LC-MS/MS	营养膳食摄入水平评估
	甲基丙二酸	C ₄ H ₆ O ₄	118.09	血清或血浆	LC-MS/MS	临床细胞功能缺乏水平评估
维生素 C	抗坏血酸	C ₆ H ₈ O ₆	176.12	血浆	LC-MS/MS	主要存在形式

检测结果的准确性。

维生素 B 族化合物测定的难点在于:维生素 B 化合物大多以离子形态存在于水溶液中,在反相色谱柱上的保留能力较差,因此需要选择合适的色谱柱使其得到较好的保留。值得注意的是,PLP 在血清中与血清白蛋白有很强的结合,对样本进行强酸性处理及足够的孵育时间是前处理的关键步骤。而对于 MMA 检测,我们在实际样本检测中发现,其同分异构体丁二酸(SA)的含量远远高于 MMA 的含量,质谱碎裂行为一致,因此色谱方法学需要保证两者在液相上的分离以避免假阳性(图 2)。

近年随着液相色谱技术的发展,对于极性强的化合物,流动相中不再需要添加对色谱柱柱效及泵损害较大的离子对试剂,仅采用常规的流动相体系即可同时检测血清中的 B 族维生素;采用了同位素内标后,消除了不同基质样本中内源性物质对维生素 B 族化合物检测的影响,保证了检测结果的准确性。

抗坏血酸(AA)是全血和血浆中维生素 C 的主要形式, Karlsen 等^[17]对全血和血浆中的抗坏血酸稳定性进行的研究表明:采样后,AA 在血浆和全血中迅速降解,样品采集后应立即离心和酸化血浆。为避免样品处理过程中的进一步降解,样品应立即在 -70 °C 下保存。因此,对生物样品中可靠和准确的 AA 状态评估高度依赖于样品处理期间的初始条件是否受到控制,在今后的实验研究和临床实践中,建立

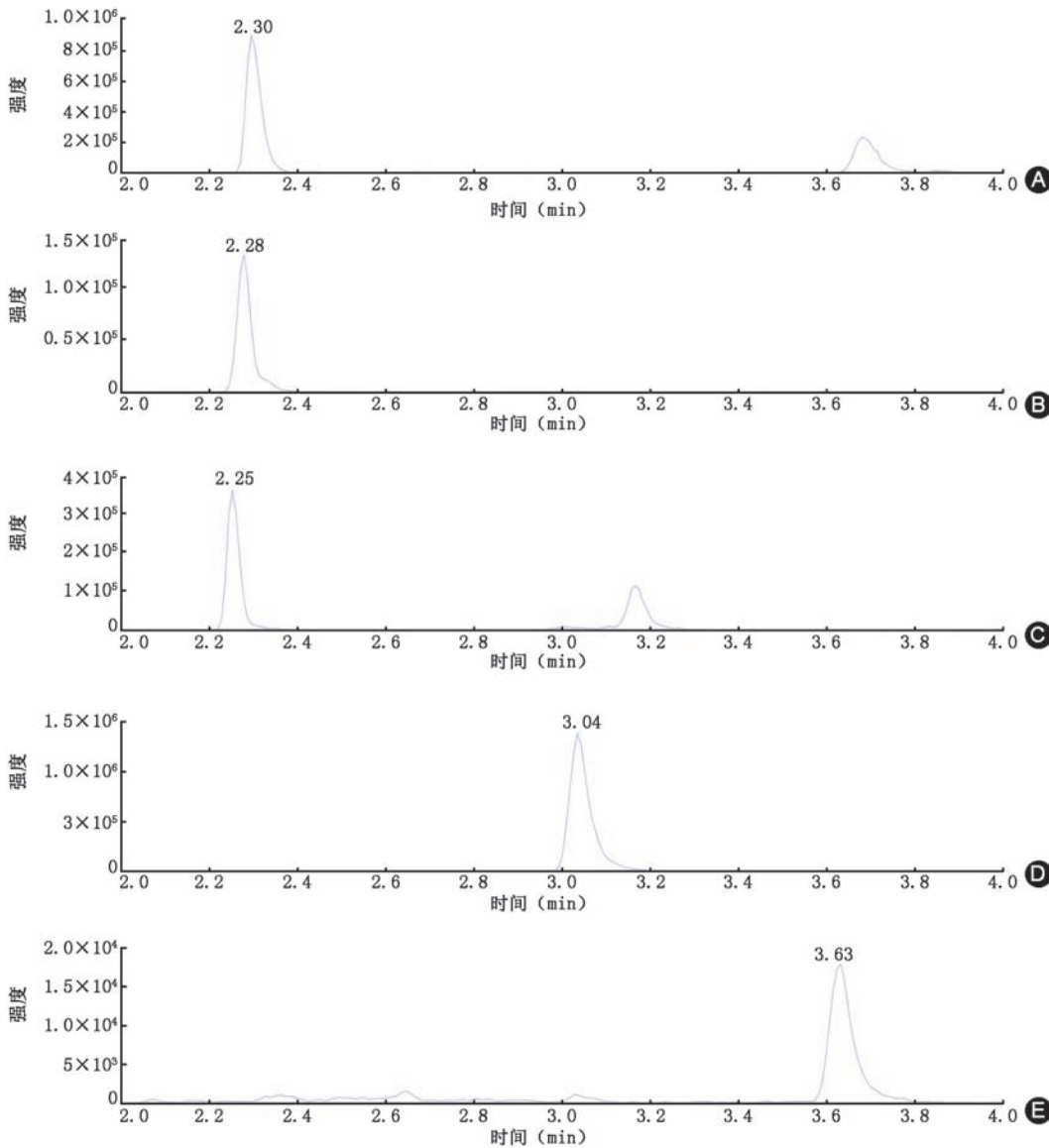
标准化 AA 的预处理和分析方法容易实现,但达到准确检测的关键是化合物的稳定性,这将是主要的挑战。

四、建立严格的方法学验证标准

任何一种质谱方法在被应用于临床检测前都需要经过严格的方法学验证。如果方法发生显著变化则要求重新优化并重复方法学验证。实验室可参照中华医学会检验医学分会和卫生计生委临床检验中心在 2017 年联合发布的《液相色谱-质谱临床应用建议》建立标准的方法学验证标准,包括定量下限与检测限、线性、精密性、准确性、干扰、稀释一致性、稳定性等^[18]。维生素是人体内源性物质,建立标准曲线进行定量时存在一个较大的难点:空白基质不易获得,实验室一般采用替代基质,如 pH 7.4 的磷酸缓冲盐溶液(PBS)及适量的蛋白。但是,在采用液相色谱-串联质谱进行定量检测时,同一化合物在不同基质中的溶解度及离子化响应可能会有差别。因此,为减小这种差异,在方法验证时可采用加样回收率来确保实验方法的可靠性,要求所验证的加样回收率结果在允许的范围内。如实验室可通过添加低、中、高三个不同浓度的标准品至样本中,每个浓度每个分析批至少检测 6 次,接受标准为:回收率在 85%~115% 之间。

五、临床质谱实验室的质量体系要求及质控要求初探

质谱在医学检验领域中,可参考的行业标准和规范较少,为了确保质谱法检测维生素化合物的结果准确、可靠,我们需要完善并符合临床检验要求与规范,同时兼顾质谱



注:图A~E分别是维生素A、25-羟基维生素D₂、25-羟基维生素D₃、维生素E、维生素K₁的提取离子流色谱图

图1 同时检测脂溶性维生素群的提取离子流色谱图

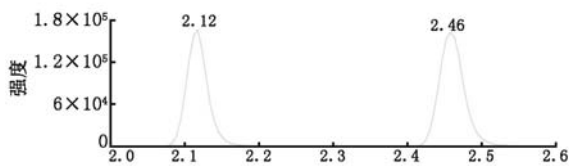


图2 人血清样本中SA和MMA的提取离子流色谱图

特色的质量管理体系来确保整个检测系统的稳定性和可靠性。

但是,目前国内可用于临床质谱检测的商业试剂盒较少,一类试剂缺少统一并具有可溯源的校准品等。因此,实验室需采取一系列严格的措施来确保实验室质量的稳定可靠,如方法学的确认、标准曲线及关键供应品(包括耗材和试剂等)的换批比对。以维生素D项目为例,可参照《液相色谱-质谱临床应用建议》和 CLSI C62-A 进行方法学确认。

当进行 25-OHD₂ 和 25-OHD₃ 的不同批次间标准曲线更换时,实验室应同时使用新旧标准曲线分别对同一组(至少 20 例)样本进行测定,两组测定值做线性回归方程,其斜率应在 0.95~1.05 之间,同时观察临床医学决定点是否 < 1/3Tea (允许总误差)。

除了上述影响因素会对检测结果产生一定的影响外,设备和样本同样也是影响检测结果准确性的原因之一。对于 LC-MS/MS, 为确保其稳定运行,实验室可参照 JJF 1317-2011 《液相色谱-质谱联用仪校准规范》及仪器生产厂家的建议进行定期维护保养及校准。对于分析前的样本,应根据不同分析项目的性质进行样本的采集、保存和运输,例如对光不稳定的化合物,如维生素 A、维生素 B₆ 的检测,要求实验室整个环节(包括样本配送、前处理、上机等)的样本应避免长时间暴露于人工灯光或阳光下,可采用铝箔包裹、棕色样本容器^[19]。各种维生素相关标志物在样本基质中的稳定性及避光要求见表 2。

实验室分析的日常质控使用主要遵循 Westgard 规则,即 12S、22S、13S 来判断是否失控,41S、10X 来监测是否存在系统误差并及时采取措施,以确保实验数据的准确无误。外部质量控制一般通过参加国家卫生部临检中心室间质评、各省临检中心室间质评、各实验室间项目比对以及国外其他机构组织的能力验证计划(如 CAP PT)。值得高兴的是,从 2019 年开始,卫生部室间质评计划中专门设立了临床质谱检测生化项目,使各质谱实验室间的结果具有可比性,促进了我国临床质谱检测的标准化发展。

实验室分析的日常质控使用主要遵循 Westgard 规则,即 12S、22S、13S 来判断是否失控,41S、10X 来监测是否存在系统误差并及时采取措施,以确保实验数据的准确无误。外部质量控制一般通过参加国家卫生部临检中心室间质评、各省临检中心室间质评、各实验室间项目比对以及国外其他机构组织的能力验证计划(如 CAP PT)。值得高兴的是,从 2019 年开始,卫生部室间质评计划中专门设立了临床质谱检测生化项目,使各质谱实验室间的结果具有可比性,促进了我国临床质谱检测的标准化发展。

表 2 各种维生素相关标志物的稳定性及避光要求

分类	样本类型	建议保存时间(d)		是否避光
		2~8℃	-20℃	
维生素 A ^a	血清	7	15	是
25-羟基维生素 D ₂ ^a	血清	7	15	否
25-羟基维生素 D ₃ ^a	血清	7	15	否
维生素 E	血清	7	15	是
维生素 K ₁	血清	7	15	否
维生素 B ₁ ^a	血清	7	15	是
维生素 B ₂ ^a	血清	7	15	是
烟酸 ^b	血浆	2	56	是
烟酰胺 ^a	血清	7	15	是
维生素 B ₅ ^a	血清	7	15	是
PLP ^b	血浆	7	15	是
维生素 B ₇ ^c	血清	3	14	是
维生素 B ₉ ^b	血清	7	90	是
5-MTHF ^a	血清	7	15	是
维生素 B ₁₂ ^b	血清	7	90	是
MMA ^b	血清或血浆	48	48	是
维生素 C ^d	血清或血浆	不稳定	不稳定	是

注:^a来源于杭州凯莱谱精准医疗检测技术有限公司,稳定性研究参照《全国临床检验操作规程》(第四版)中原始样品的保存要求及同时兼顾整个分析过程的周转时间;^b来源于 Mayo Clinic Laboratories;^c来源于 Labcorp;^d来源于 Quest Diagnostics

总之,维生素作为常规检测项目,只有确保整个检测系统(包括人员、设备、环境、物料等)均受到严格的管控,同时对方法学控制,才能保障检测方法和结果满足临床要求。

六、展望

随着检测技术的发展,维生素检测广泛应用于儿童生长,健康管理,运动恢复,疾病诊断。虽然常规的免疫学方法因其单项成本低、自动化程度高等优势一度成为单一维生素指标的临床检测的首选方法,但是随着精准医疗时代的到来,临床质谱技术具有高灵敏度、高特异及准确性等特点,可通过微量样品同时检测多种相关的化合物及相关代谢产物,正逐步发展成维生素临床检测的首选方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Zhang Y,Zhou WE,Yan JQ,et al. A Review of the Extraction and Determination Methods of Thirteen Essential Vitamins to the Human Body:An Update from 2010[J]. *Molecules*,2018, 23(06),1484.DOI:10.3390/molecules23061484.
- [2] Eggersdorfer M,Laudert D,Létiouis U,et al. One hundred years of vitamins-a success story of the natural sciences[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*,2012,51(05):12960-12990. DOI:10.1002/anie.201205886.
- [3] 禹松林,方慧玲,张瑞苹,等. 改良超高效液相色谱串联质谱法测定 25-羟基维生素 D₂ 和 25-羟基维生素 D₃[J]. *检验医学*,2015,30(10):1021-1026. DOI:10.3969/j.issn.1673-8640.

- [4] van den Ouweland JM,Beijers AM,van Daal H. Overestimation of 25-hydroxyvitamin D₃ by increased ionization efficiency of 3-epi-25-hydroxyvitamin D₃ in LC-MS / MS methods not separating both metabolites as determined by an LC-MS/MS method for separate quantification of 25-hydroxyvitamin D₃, 3-epi-25-hydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₂ in human serum[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, 967(18): 195-202. DOI: 10.1016 / j. jchromb.2014.07.021.
- [5] van den Ouweland JM, Beijers AM, van Daal H, et al. Evaluation of 3-epi-25-hydroxyvitamin D₃ cross-reactivity in the Roche Elecsys Vitamin D Total protein binding assay [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2014, 52(3): 373-380. DOI: 10.1515 / cclm-2013-0702.
- [6] Traber MG. Vitamin E[J]. *Adv Nutr*,2012,3(3):330-331. DOI: 10.3945/an.112.002139.
- [7] Shea MK, Booth SL. Concepts and Controversies in Evaluating Vitamin K Status in Population-Based Studies[J]. *Nutrients*. 2016, 8(1):1-25. DOI: 10.3390/nu8010008.
- [8] Fusaro M, Gallieni M, Rizzo MA. Vitamin K plasma levels determination in human health[J]. *ClinChem Lab Med*. 2017, 55(6):789-799. DOI: 10.1515/cclm-2016-0783.
- [9] Ueland PM,Ulvik A,Rios-Avila L,et al. Direct and Functional Biomarkers of Vitamin B₆ Status[J]. *Annu Rev Nutr*,2015,35 (1):33-70. DOI:10.1146/annurev-nutr-071714-034330.
- [10] McCormick DB. Two interconnected B vitamins:riboflavin and pyridoxine[J]. *Physiol Rev*, 1989, 69(4): 1170-1198. DOI: 10.1152 / physrev.1989.69.4.1170.
- [11] Yetley EA,Pfeiffer CM,Phinney KW,et al. Biomarkers of folate status in NHANES:a roundtable summary[J]. *Am J Clin Nutr*, 2011,94(1):303S-312S. DOI:10.3945/ajcn.111.013011.
- [12] 围受孕期增补叶酸预防神经管缺陷指南工作组. 围受孕期增补叶酸预防神经管缺陷指南[J]. *中国健康生育杂志*, 2017, 28(5): 401-410. DOI: 10.3969 / j. issn. 1671-878X.2017.05.001.
- [13] Yetley EA, Pfeiffer CM, Phinney KW, et al. Biomarkers of vitamin B-12 status in NHANES:a roundtable summary[J]. *Am J Clin Nutr*, 2011, 94(1): 313S-321S. DOI: 10.3945 / ajcn.111.013243.
- [14] Allen LH,Miller JW,de Groot L,et al. Biomarkers of Nutrition for Development (BOND): Vitamin B-12 Review[J]. *J Nutr*, 2018,148(suppl_4):1995S-2027S. DOI:10.1093/jn/nxy201.
- [15] Benoist BD. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies[J]. *Food Nutr Bull*, 2008, 29(2 Suppl): S238-S244. DOI: 10.1177 / 15648265080292S129.
- [16] Bolann BJ,Solli JD,Schneede J,et al. Evaluation of indicators of cobalamin deficiency defined as cobalamin-induced reduction in increased serum methylmalonic acid[J]. *ClinChem*,2000,46(11):1744-1750.
- [17] Karlsen A,Blomhoff R,Gundersen TE. Stability of whole blood and plasma ascorbic acid[J]. *Eur J Clin Nutr*, 2007, 61(10): 1233-1236. DOI:10.1038/sj.ejcn.1602655.
- [18] 中华医学会检验医学分会,卫生计生委临床检验中心. 液相色谱-质谱临床应用建议[J]. *中华检验医学杂志*,2017,40 (10): 770-779. DOI: 10.3760 / cma. j. issn. 1009-9158. 2017. 10.009.
- [19] 王治国. 临床检验质量控制技术[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2019.

(收稿日期:2019-03-25)

(本文编辑:唐栋)