

在临床研究中利用UPLC-QDa分析血清中的维生素A和E

Karl Lo, Fionn Quinlan, Mark Ritchie

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

本文介绍了一种利用单四极杆质谱检测器ACQUITY QDa同时分析血清中维生素A和E的临床研究方法。萃取方法为之前所用LC-MS/MS方法的改进版，使用HLB Prime进行样品制备。色谱分析采用ACQUITY UPLC HSS PFP色谱柱进行，结合SIR模式下的ACQUITY QDa检测，提供了一种准确、灵敏的方法来分析血清中的维生素A和E。进样周期仅5 min，对血清中维生素A和E的灵敏度分别达到100 ppb和1 ppm。

优势

- 使用单四极杆质谱检测器ACQUITY QDa和ACQUITY UPLC H-Class系统对血清中的维生素A和E进行分析的一种准确、灵敏的方法
- 样品制备方法相比LLE更为简单

简介

过去，大多数维生素A和E分析都是采用配备UV检测器的HPLC系统。即使采用LC-MS/MS方法分析维生素A和E，液-液萃取(LLE)等萃取方法仍需要很长的萃取时间，且溶剂消耗量大，分析时间长。之前，我们已经展示了一种基于LC-MS/MS的临床研究方法，该方法仅需要100 µL的样品体积，并缩短了分析时间¹。利用Oasis HLB PRiME

(SPE)去除磷脂是性能提升的关键因素。本技术简报将展示LC-MS如何对血清中的维生素A和E实现准确、灵敏地分析。

实验

将同位素标记的内标加入100 μ L血清中，然后添加乙醇进行蛋白沉淀。离心后，将上清液用乙醇/水(5:3)稀释，使乙醇/水的最终比例为2:3。将650 μ L所得溶液加载到Oasis HLB洗脱板上进行样品净化。用20%乙腈水溶液洗涤样品，然后用100%乙腈洗脱。将洗脱液用水进一步稀释至200 μ L（图1）。利用HLB PRiME可免去活化和蒸发步骤。将20 μ L所得提取物进样至LC-MS进行分析。

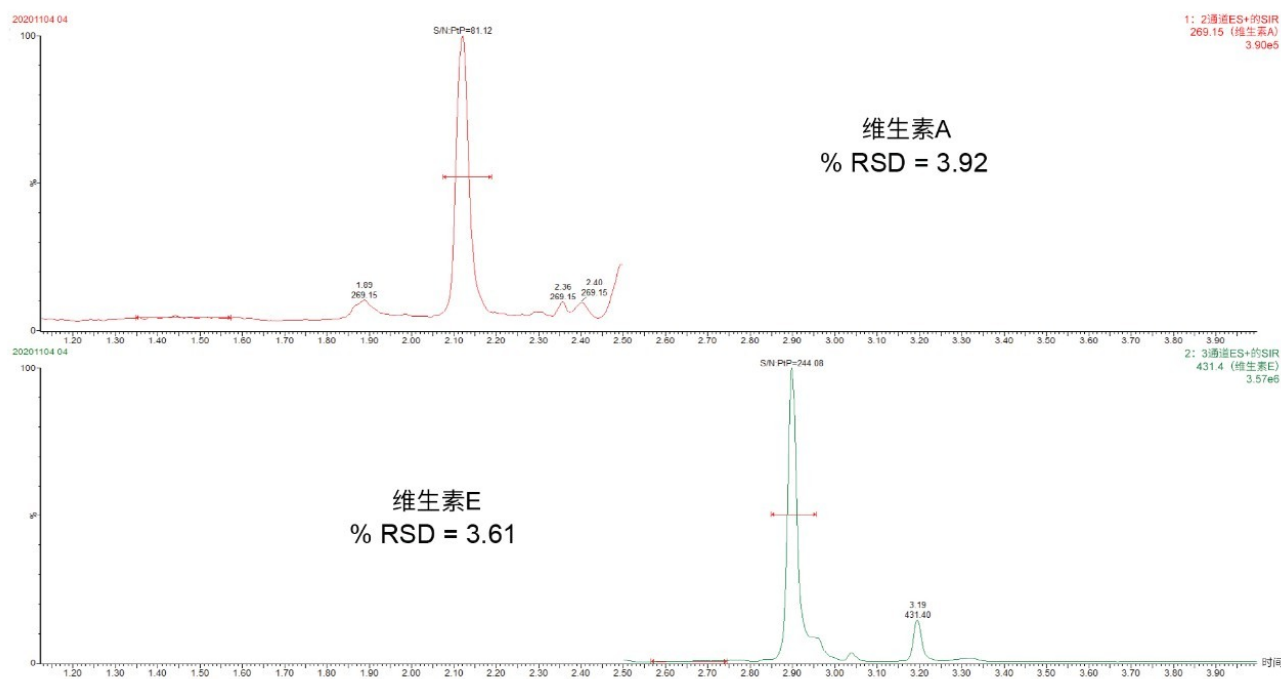


图1.血清中100 ppb维生素A和1 ppm维生素E的色谱图

使用装配ACQUITY HSS PFP色谱柱（1.8 μ m, 2.1 x 50 mm，部件号：[186005965](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186005965-acquity-uplc-hss-pfp-fluoro-phenyl-column-100a-18--m-21-mm-x-50-.html) <

<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186005965-acquity-uplc-hss-pfp-fluoro-phenyl-column-100a-18--m-21-mm-x-50-.html>>）的ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统，用65%流动相A（MP A）增加至100% MP A的梯度进行洗脱，以达到分离目的。利用ACQUITY QDa在ESI正离子和SIR模式下检测相应的质子化加合物。进样周期为5 min。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC H-Class参数
样品瓶：	包含1 mL内衬管的96孔收集板（部件号：18600081
色谱柱	ACQUITY UPLC HSS PFP色谱柱, 2.1 × 50 mm, 1.8 μm（部件号：186005965）
柱温：	40 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	20 μL
流速：	0.40 mL/min
流动相A：	水 + 2 mM醋酸铵 + 0.1%甲酸
流动相B：	甲醇 + 2 mM醋酸铵 + 0.1%甲酸

梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.40	35	65	初始
2.00	0.40	2	98	6
3.30	0.40	35	98	6
3.50	0.40	35	65	6
5.00	0.40	35	65	6

质谱条件

质谱系统：ACQUITY QDa

电离模式：ESI+

采集模式：SIR

毛细管电压：0.8 kV

锥孔电压：参见通道详情

	SIR, <i>m/z</i>	锥孔电压(V)	时间
维生素A	269.15	30	0~2.5
D6维生素A酸 (VA内标)	307.2	10	
维生素E	431.40	5	2.5~4
D6维生素E (VE内标)	437.4	5	

数据管理

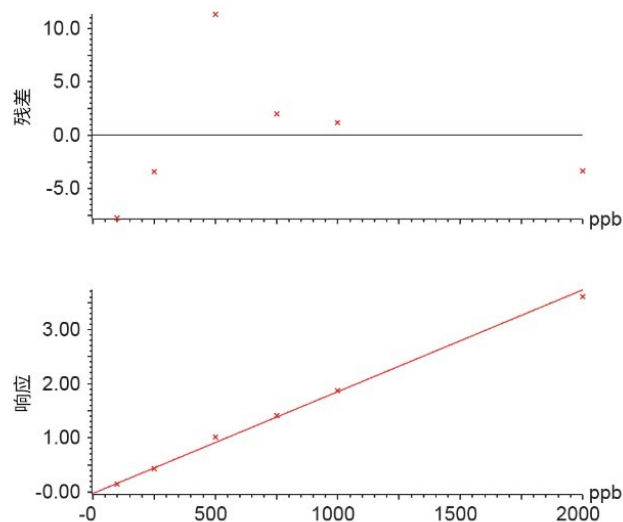
LC-MS软件：MassLynx 4.2版

结果与讨论

图2显示了经处理的血清(MSG2000)中100 ppb维生素A和1 ppm维生素E的色谱图。分析灵敏度研究表明，100 ppb维生素A和1 ppm维生素E均可实现定量分析（%RSD <20，偏差<15%，S/N >10）。对于维生素A，该方法在100 ppb至2000 ppb的范围内呈线性；对于维生素E，则在1 ppm至20 ppm的范围内呈线性。两种化合物在10次独立试验中得到的相关系数(r^2) >0.993。图2列举了一些标准曲线。

相关系数: $r = 0.998153$, $r^2 = 0.99609$
 标准曲线: $0.00187808 * x + -0.0252769$
 响应类型: 内标 (参比3), 峰面积* (内标浓度/内标峰面积)
 曲线类型: 线性, 原点: 排除, 权重: $1/x$, 轴转: 无

维生素A



相关系数: $r = 0.999497$, $r^2 = 0.998995$
 标准曲线: $0.432241 * x + -0.883944$
 响应类型: 内标 (参比4), 峰面积* (内标浓度/内标峰面积)
 曲线类型: 线性, 原点: 排除, 权重: $1/x$, 轴转: 无

维生素E

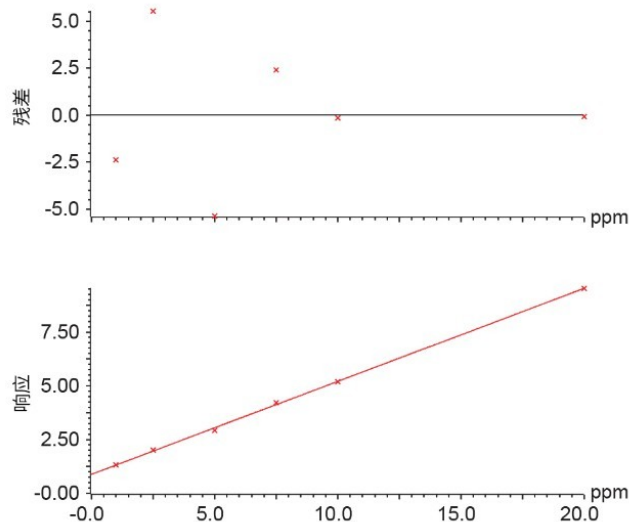


图2.维生素A和E的标准曲线示例

通过在5天内提取并分析经处理的血清中低浓度到高浓度的5个重复样品($n = 25$), 评估方法精密度。维生素A和E在所有检测浓度下的重复性和总精密度均 $\leq 8\%$ CV, 结果汇总于表1中。测试样品与对照样品相比, 检测的典型内源性干扰物质的所有%回收率计算值均在 $\pm 15\%$ 以内。

化合物	总QC精密度(RSD)			QC重复性(RSD)		
	QC1 (低浓度)	QC2 (中浓度)	QC3 (高浓度)	QC1 (低浓度)	QC2 (中浓度)	QC3 (高浓度)
维生素A	7.2	7.6	7.3	3.4	3.6	4.4
维生素E	7.4	4.6	3.4	5.4	2.2	2.0

使用内标进行补偿后, 来自六个供体的测试样品与对照样品之间的基质因子结果在 $\pm 15\%$ 范围内(表2)。在维生素E中观察到基质抑制作用(平均值=0.653和0.730), 但得到内标补偿(平均值=0.977和0.939)。

化合物	加标浓度	基质因子 - 绝对峰面积 (范围)	基质因子 - 调整后的浓度 (范围)
维生素A	300 ppb	0.932 (0.885 – 0.982)	0.945 (0.913 – 0.965)
	1600 ppb	0.919(0.875 – 0.971)	0.948 (0.916 – 0.992)
维生素E	3 ppm	0.653 (0.607 – 0.723)	0.977 (0.917 – 1.045)
	16 ppm	0.730 (0.6510 – 0.802)	0.939 (0.925 – 0.969)

结论

本文探讨了UPLC单四极杆质谱系统ACQUITY UPLC-ACQUITY QDa在脂溶性维生素临床研究分析中的应用。结果表明，即使在复杂基质中，该方法也具有良好的准确度和分析灵敏度。与LLE相比，样品制备相对简单，运行时间相比传统的HPLC-UV方法大大缩短。

参考资料

1. Simultaneous Analysis of Vitamin A and E in Serum by UPLC-MS/MS for Clinical Research. Waters Corporation, UK, 2019. Waters Application Note [720006642EN](https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/simultaneous-analysis-vitaminsa-%20e-serum-uplc-ms-ms-clinical-research.html). <
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/simultaneous-analysis-vitaminsa-%20e-serum-uplc-ms-ms-clinical-research.html>> <
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/simultaneous-analysis-vitamins-a-e-serum-uplc-ms-ms-clinical-research.html>>

特色产品

- [ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统](https://www.waters.com/10138533) <<https://www.waters.com/10138533>>
- [ACQUITY QDa质谱检测器](https://www.waters.com/134761404) <<https://www.waters.com/134761404>>
- [MassLynx MS软件](https://www.waters.com/513662) <<https://www.waters.com/513662>>
- [TargetLynx](https://www.waters.com/513791) <<https://www.waters.com/513791>>

720007164ZH, 2021年2月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.