

一种利用UPLC-QDa分析血清中维生素C的快速简便的临床研究方法

Karl C.K. Lo, Fionn Quinlan, Mark Ritchie

Waters Corporation

摘要

本文介绍了一种使用ACQUITY UPLC H-Class PLUS和单四极杆质谱检测器ACQUITY QDa分析血清中维生素C的临床研究方法。利用三氯乙酸(TCA)进行简单的蛋白沉淀为UPLC-QDa分析维生素C提供了足够高的选择性和分析灵敏度。无论是脂溶性维生素¹还是水溶性维生素，UPLC QDa都适合在临床研究中作为维生素分析系统使用。

优势

- 只需200 µL血清
- 样品前处理过程简单
- 一种准确灵敏的血清维生素C分析方法，总分析时间仅6 min

简介

维生素C又称为L-抗坏血酸，是一种水溶性维生素，属于人体必需营养成分。目前已开发出血液维生素C含量分析的研究方法；通常建议将配备电化学检测器(ECD)或紫外检测器(UV)的HPLC方法作为血浆维生素C分析的优选方法

^{2,3}。电化学检测以其简单、易于小型化、分析灵敏度高、成本相对较低等固有优势，成为一种颇受欢迎的电活性物质检测方法¹。但是，ECD和UV检测方法都涉及到复杂的样品前处理和流动相，需要使用专用色谱柱，且分析时间长。QDa检测不仅能够提供出色的分析灵敏度和选择性，还能提供与UPLC兼容的分析速度以及质量数确认信息。

实验

移取200 µL样品（校准品、对照品或未知样品）加入干净的微量离心管中。加入600 µL工作内标（1.67 µg/mL维生素¹³C₆，溶于12% TCA (v/v)中）。盖上试管盖，放入多管涡旋器中以1000 rpm离心5 min，再以11000 rpm离心5 min。取400 µL上清液转移至最大回收样品瓶中进行LC-MS分析。使用搭载Atlantis Premier BEH C₁₈ AX色谱柱（1.7 µm, 2.1 x 100 mm，部件号：[186009368 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186009368-atlantis-premier-beh-c18-ax-column-17--m-21-x-100-mm-1-pk.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186009368-atlantis-premier-beh-c18-ax-column-17--m-21-x-100-mm-1-pk.html)）的ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统，用95%流动相A (MP A)降至5% MP A的梯度进行洗脱，以达到分离目的。进样时间间隔6 min。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC H-Class PLUS
样品瓶：	12 × 32 mm琥珀色螺纹颈口最大回收样品瓶，带瓶盖和预切割PTFE/硅胶隔垫（部件号：600000755CV）
色谱柱：	Atlantis Premier BEH C ₁₈ AX色谱柱, 2.1 × 100 mm, 1.7 µm（部件号：186009368）
柱温：	40 °C
样品温度：	10 °C

进样体积：3 μ L

流速：0.40 mL/min

流动相A：20 mM甲酸铵的水溶液

流动相B：20 mM甲酸铵的甲醇溶液

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.40	95	5	初始
2.00	0.40	25	75	4
2.50	0.40	5	95	6
3.50	0.40	5	95	6
4.00	0.40	95	5	6
6.00	0.40	95	5	6

质谱条件（QDa参数）

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, m/z	锥孔电压 (V)	时间
维生素C	175	20	0~2.5
	115	15	
维生素 $^{13}\text{C}_6$ (内标)	181	20	
	119	15	

数据管理

LC-MS软件：MassLynx 4.2

结果与讨论

图1显示了经处理的血清中0.5 $\mu\text{g/mL}$ 维生素C的色谱图。研究分析灵敏度的结果表明，该方法可以实现血清中0.5 $\mu\text{g/mL}$ 维生素C的定量分析（%RSD小于20%，偏差小于15%，S/N大于10）。图2显示了该方法的校准曲线。该方法在0.5 $\mu\text{g/mL}$ ~20 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内呈线性。相关系数(r^2)大于0.995，且所有校准品残差均小于15%。

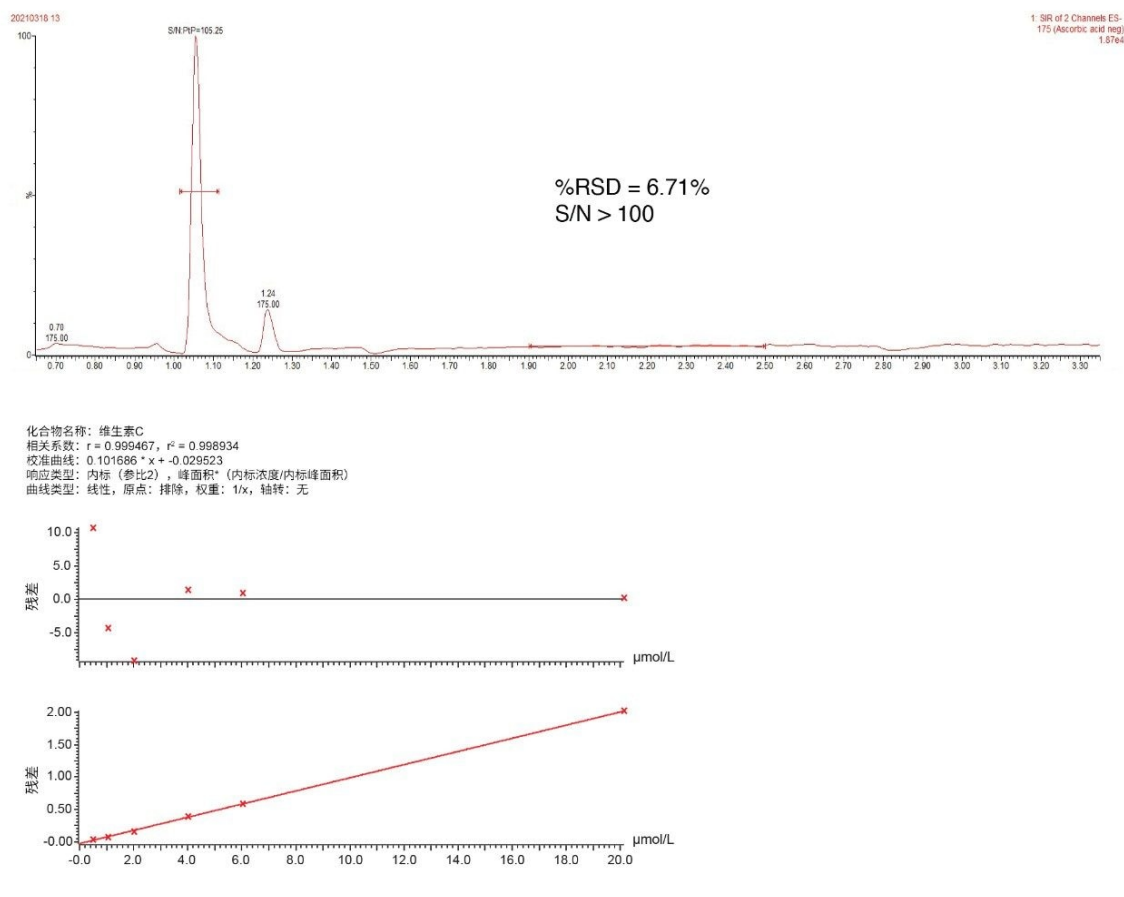


图1.血清中0.5 μg/mL维生素C的色谱图以及维生素C的校准曲线示例

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。所有检测浓度水平下的重复性和总精密度均 $\leq 6\%$ 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百分比回收率计算值均在 $\pm 15\%$ 以内。

维生素C	总QC精密度(%RSD)			QC重复性(%RSD)		
	QC1 (低)	QC2 (中)	QC3 (高)	QC1 (低)	QC2 (中)	QC3 (高)
	4.05	4.70	4.83	4.96	5.51	5.80

表1.QC的总精密度和重复性。QC1: 0.80 μg/mL; QC2: 3.02 μg/mL; QC3: 15.11 μg/mL。

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±15%范围内（表2）。观察到维生素C受到基质造成的显著信号增强影响，但加入内标后得到补偿（调整后的基质因子接近1）。

化合物	加标浓度	基质因子 - 绝对峰面积 (范围)	基质因子 - 调整后浓度 (范围)
维生素C	1 µmol/L	3.507 (3.393–4.609)	1.059 (0.959–1.065)
	15 µmol/L	1.992 (1.684–2.176)	0.975 (0.959–0.978)

表2. 基质研究结果

结论

我们探索了UPLC单四极杆质谱系统（ACQUITY QDa质谱检测器）在涵盖脂溶性维生素至水溶性维生素的临床研究中的应用。样品前处理过程简单，运行时间短，与传统的HPLC方法相比具有显著优势。结果很好地证明了UPLC-QDa适合在临床研究中作为维生素分析系统使用。

参考资料

1. 在临床研究中利用UPLC-QDa分析血清中的维生素A和E. 沃特世公司, 2021
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720007164en.pdf> <
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720007164en.pdf>> .
2. Gazdik, Z.; Zitka, O.; Petrlova J.; Adam, V.; Zehnalek, J.; Horna, A.; Reznicek V.; Beklova, M.; Kizek, R. Determination of Vitamin C (Ascorbic Acid) Using High Performance Liquid Chromatography Coupled with Electrochemical Detection. *Sensors*, 2008, 8, 7097–7112.
3. Robitaille, L; Hoffer, L, J. A Simple Method for Plasma Total Vitamin C Analysis Suitable for Routine

Clinical Laboratory Use. *Nutrition Journal*, 2016, 15:40.

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/10138533>>

ACQUITY QDa质谱检测器 <<https://www.waters.com/134761404>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

720007322ZH, 2021年10月修订

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号