

# 使用 On-line SPE 液相色谱分析系统快速检测人血清中维生素 A 含量

LC-300

**摘要：** 本文使用岛津 On-line HPLC 生物样品分析系统 Co-Sense for BA，建立了快速检测人血清中维生素 A 含量的测定方法。该方法在 5 min 内即可完成血清预处理样品在线净化、富集及检测，维生素 A 采用内标法定量，检出限可达 1 ng/mL；在 10 - 1000 ng/mL 浓度范围内线性关系良好，相关系数  $r$  大于 0.9998；精密度实验结果显示保留时间 RSD 小于 0.1%，峰面积及测定浓度的 RSD 小于 0.9%，仪器精密度优异；低、中、高浓度加标样品回收率均在 95% - 105% 之间。实验结果表明，该方法能快速稳定准确地测定人血清中维生素 A 的含量。

**关键词：** On-line SPE Co-Sense for BA 血清 维生素 A 内标法

维生素 A 是维持人体正常代谢功能所必需的脂溶性维生素，其缺乏或过量均可导致相应疾病。近年来的研究发现，维生素 A 与儿童的生长发育及一些营养代谢疾病有密切关系。因此，建立测定人血中维生素 A 含量对于与维生素相关疾病的临床预防、诊断、治疗具有重要的意义。

维生素 A 常用的检测方法是 HPLC 法，其样品处理需采用蛋白沉淀结合液液萃取的方式进行，所需样品量大、前处理复杂耗时，成本较高，且难以实现样品前处理自动化。

岛津 On-line HPLC 生物样品分析系统 Co-Sense for BA 是一套采用在线除蛋白及分析物捕集 - 分离 - 定量检测的二维液相色谱系统。本文使用上述分析系统，建立了内标法快速检测人血清中维生素 A 含量的测定方法。该方法中，血清样品仅需蛋白沉淀后即可进样检测，在 5 min 内完成血清样品处理及检测，所需样品量少，样品预处理简单快速可自动化批量处理，成本低廉，操作简单，适用于临床大规模样品检测需求。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器、试剂与试剂

生物样品分析系统 Co-Sense for BA，配置信息及工作原理如下：

系统控制器：CBM-20A

输液泵：LC-20AT

检测器：SPD-20A

色谱工作站：Labsolutions Ver. 5.98

自动进样器：SIL-20A HT

脱气机：DGU-20A 3R

柱温箱：CTO-20A

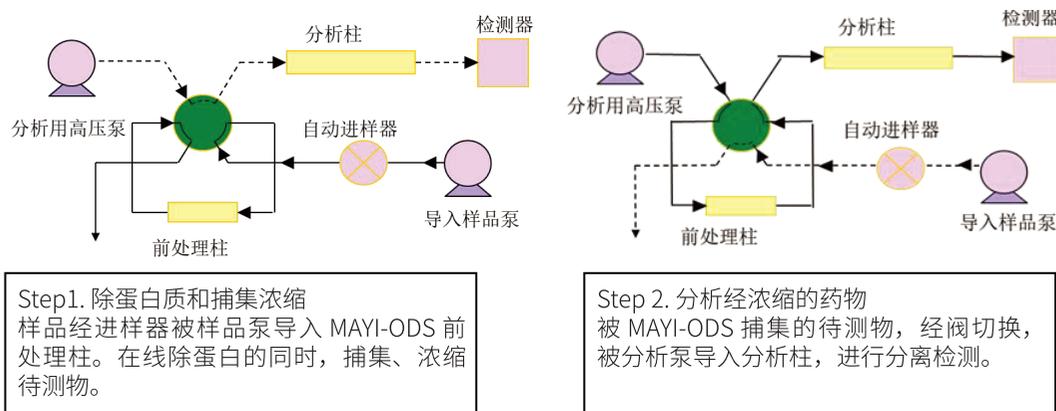


图 1 Co-Sense for BA 系统流路图及工作原理

## 1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack GIST (100 mm × 3 mm I.D., 3 μm)

(岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-30009-05)

SPE 前处理柱：Shim-pack MAYI-ODS (10 mm × 4.6 mm I.D., 50 μm)

(岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 228-40835-91)

流动相 A：50% 甲醇水

流动相 B：95% 甲醇水

流速：泵 A 2 mL/min, 泵 B 0.8 mL/min

柱温：40°C

进样体积：50 μL

检测波长：325 nm

洗脱方式：等度洗脱，切换阀初始值为 0，时间程序如表 1 所示。

表 1 阀切换时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值	操作状态
Initial	柱温箱	切换阀	0	除蛋白、捕集
1.00	柱温箱	切换阀	1	样品分析
4.00	柱温箱	切换阀	0	再平衡
5.00	控制器	Stop		

## 1.3 标准品溶液及加标血清样品配制

标准品中间液制备：取 2000 μg/mL 维生素 A 母液，用乙腈稀释至 50 μg/mL，然后用乙腈逐级稀释制备浓度为 50, 125, 250, 500, 1250, 2500, 5000 ng/mL 的标准曲线中间溶液，避光冷藏。

内标工作液制备：取 2000 μg/mL 维生素 A 醋酸酯母液，用乙腈逐级稀释至 200 ng/mL，避光冷藏。

校准曲线工作液制备：取上述标准曲线中间液 100 μL，加 400 μL 内标工作液，涡旋混匀，制备浓度为 10, 25, 50, 125, 250, 500, 1000 ng/mL 校准曲线工作溶液，避光冷藏。

加标工作液制备：取 2000 μg/mL 维生素 A 母液，用乙腈逐级稀释制备浓度为 2500, 5000, 10000 ng/mL 的加标工作溶液，避光冷藏。

加标血清样品制备：取 100 μL 血清样品，各取上述加标工作液 10 μL，涡旋 2 min 即得，冷藏备用。

## 1.4 样品前处理方法

取血清及加标血清样品，涡旋混匀，精密吸取 100 μL，置 1.5 mL 离心管中，加入 400 μL 内标工作液，涡旋混匀 2 min，静置 1 min 后，14000 rpm 离心 5 分钟，取上清液进样分析。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 检出限

配制 1 ng/mL 标准品溶液，进样检测，其色谱图如图 2 所示，以 ASTM 方式计算得到的 S/N 为 7.76，以此数据计算得到的检出限为 0.5 ng/mL。

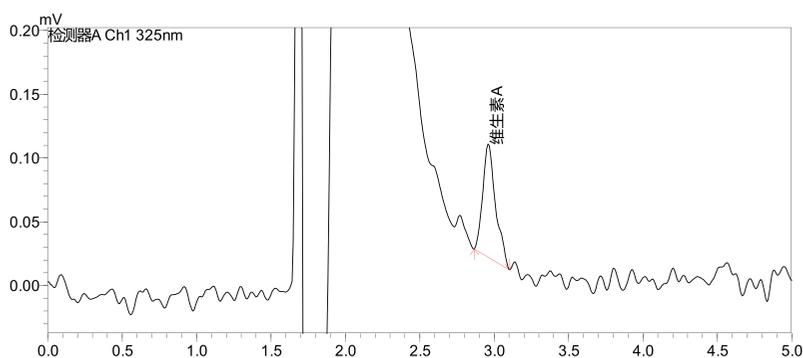


图 2 1 ng/mL 标准品溶液色谱图

## 2.2 系统残留

进样 1000 ng/mL 标准品溶液后，进样空白甲醇溶剂，考察系统残留。结果显示，维生素 A 无明显系统残留。

图 3 为甲醇溶剂与最低浓度校准品 (10 ng/mL) 对比图。

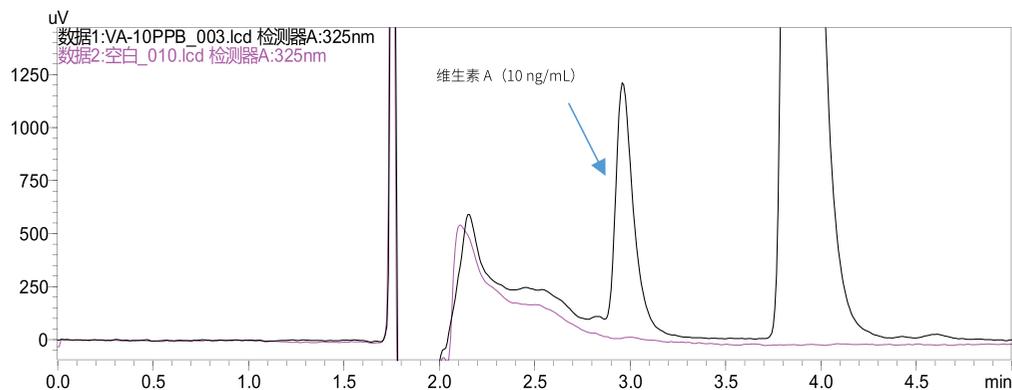


图 3 甲醇溶剂与最低浓度校准品 (10 ng/mL) 对比图

## 2.3 线性关系

进样检测 10, 25, 50, 125, 250, 500, 1000 ng/mL 校准曲线溶液，结果如下所示。

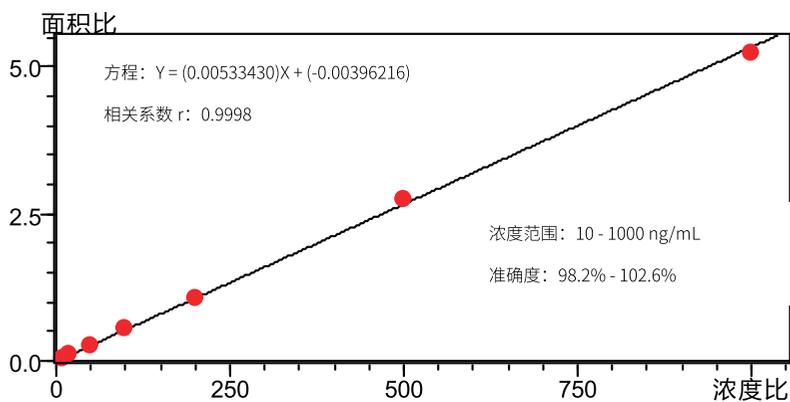


图 4 标准曲线

## 2.4 精密度考察

使用血清样品，经前处理后，取上清液，重复进样 6 次，其结果如下表所示。

表 2 血清样品精密度实验结果 (n=6)

#	R.T.(min)	Area	Conc. (ng/mL)
1	2.956	63025	95.350
2	2.954	62873	95.762
3	2.953	62881	96.250
4	2.953	62193	94.310
5	2.954	61798	94.861
6	2.949	61821	95.337
平均值	2.953	62432	95.312
RSD(%)	0.08	0.90	0.71

## 2.5 加标回收率

使用血清样品及用其配制的低、中、高浓度加标血清样品，经前处理后取上清液，重复进样 3 次，取平均值计算加标回收率，其结果如下表所示。

表 3 加标回收率实验结果

	#	血清	加标 50 ng/mL	加标 100 ng/mL	加标 200 ng/mL
测定浓度 (ng/mL)	1	95.350	146.029	199.743	298.969
	2	95.762	146.567	200.598	300.130
	3	96.250	147.316	201.524	301.554
平均值 (ng/mL)		95.787	146.637	200.622	300.218
回收率 (%)		-	101.7	104.8	102.2
RSD (%)		0.47	0.44	0.44	0.43

## 2.6 样品测定

取人血清样品，按照 1.4 中样品前处理方法处理 6 份样品，上机检测，结果如下。

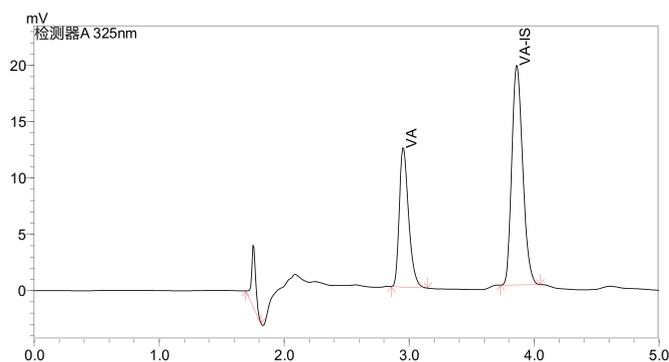


图 5 血清样品维生素 A 及内标色谱图

表 4 血清样品维生素 A 检测结果

样品	血样 1	血样 2	血样 3	血样 4	血样 5	血样 6	$\bar{x} \pm s$
含量 (ng/mL)	95.350	95.762	96.250	94.310	94.8610	95.3370	95.312±0.677

## ■ 结论

本文使用 On-line HPLC 生物样品分析系统 Co-Sense for BA，建立了内标法快速检测人血清中维生素 A 含量的测定方法。该方法在 5 min 内即可完成血清样品处理及检测，方法验证结果表明，该方法灵敏度高、稳定性好，可以简便快速准确地测定人血清中维生素 A 的含量，可满足自动快速高通量检测的临床实际需求，适用于大规模临床样本的检测。

岛津应用云

