

# 使用岛津 On-line HPLC 生物样品分析系统快速检测人血清中维生素 A 含量

LC-266

**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 内即可完成血清样品处理及检测，维生素 A 的检出限可达 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 0.9999。低、中、高三浓度加标样品精密度实验结果显示保留时间 RSD 小于 0.15%，峰面积及测定浓度的 RSD 小于 1.2%，三浓度样品加标回收率均在 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 HPLC Co-Sense for BA 血清 维生素 A

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，其样品前处理需采用蛋白沉淀结合液液萃取的方式进行样品处理，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

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

自动进样器：SIL-20A HT

输液泵：LC-20AT XR

脱气机：DGU-20A 3R

检测器：SPD-20A

柱温箱：CTO-20A

色谱工作站：Labsolutions Ver. 5.98

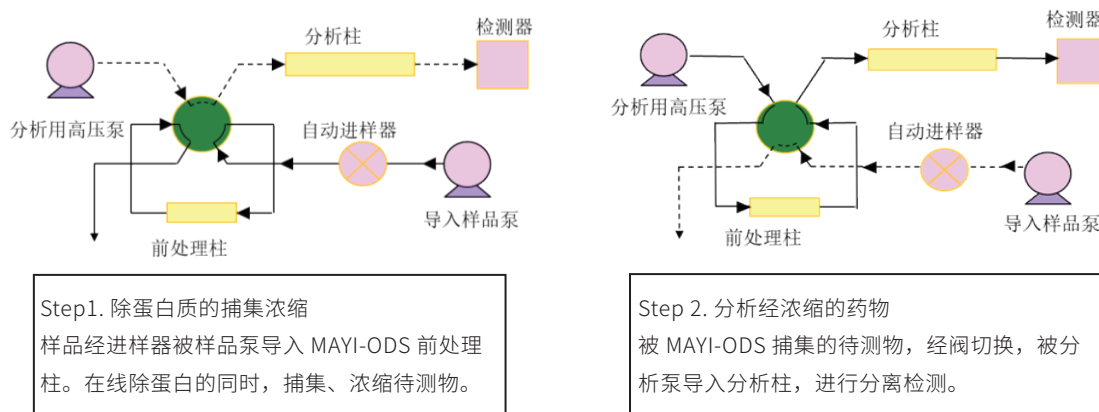


图 1 Co-Sense for BA 系统流路图及工作原理

## 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,

柱温：40°C

泵 B 0.8 mL/min

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，用甲醇稀释至 50 μg/mL，冻存备用。

校准曲线工作液制备：取上述中间液，用甲醇逐级稀释制备浓度为 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 ng/mL 校准曲线工作溶液，避光冷藏。

加标工作液制备：取上述中间液，用甲醇逐级稀释制备浓度为 1250, 2500, 5000 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

取血清样品，涡旋混匀，精密吸取 100 μL，置 1.5 mL 离心管中，加入 400 μL 甲醇，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。

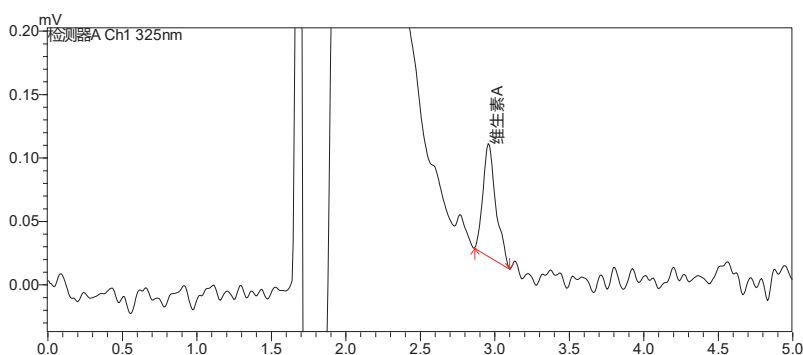


图 2 1 ng/mL 标准品溶液色谱图

## 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，得到如下色谱图，结果显示，维生素 A 无系统残留。

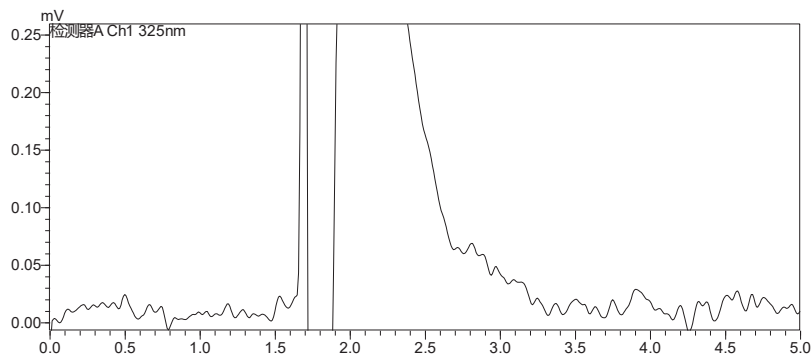


图 3 甲醇溶剂色谱图

## 2.3 线性关系

进样检测 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 ng/mL 校准曲线溶液，结果如下所示。

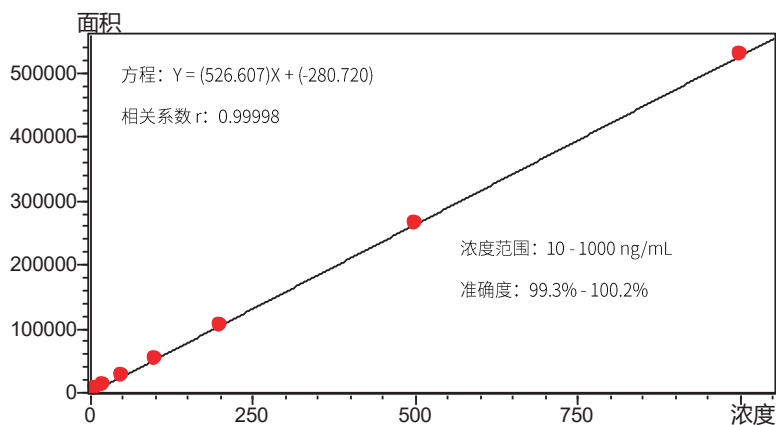


图 4 标准曲线

## 2.4 精密度考察

使用配制的低、中、高浓度加标血清样品，进行精密度实验，其结果如下表所示。

表 2 加标血清样品精密度实验结果 (n=5)

序号	25 ng/mL		50 ng/mL		100 ng/mL	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	2.967	66,969	2.961	79,296	2.957	103,357
2	2.960	67,280	2.966	80,031	2.962	103,201
3	2.955	66,932	2.958	79,495	2.968	103,015
4	2.960	67,490	2.959	79,662	2.965	102,965
5	2.957	67,136	2.965	79,849	2.960	102,912
平均值	2.960	67161	2.962	79667	2.962	103090
RSD(%)	0.15%	0.34%	0.12%	0.36%	0.14%	0.18%

## 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，各平行制备 2 份上机样品，进行加标回收率实验，其结果如下表所示。

表 3 加标回收率实验结果

	血清		加标 25 ng/mL		加标 50 ng/mL		加标 100 ng/mL	
	1 号样	2 号样	1 号样	2 号样	1 号样	2 号样	1 号样	2 号样
浓度 (ng/mL)	104.043	104.542	131.253	128.797	155.316	157.142	203.735	205.449
平均值 (ng/mL)	104.293		130.025		156.229		204.592	
回收率	-		102.9%		103.9%		100.3%	

## 2.6 样品测定

取人血清样品，按照 1.4 中样品前处理方法平行处理 3 份样品，上机检测，结果如下。

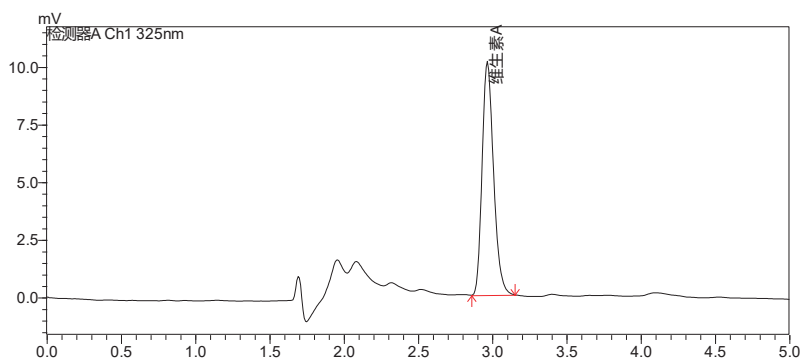


图 5 血清样品维生素 A 色谱图

表 4 血清样品维生素 A 检测结果

	血样 1	血样 2	血样 3	$\bar{x} \pm s$
浓度 (ng/mL)	106.243	105.503	105.043	105.596 ± 0.605

## ■ 结论

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

