

# Nexera MX 平行液相色谱质谱联用系统 测定人血清中的 VA 和 VE 含量

LCMSMS-347

**摘要：** 本文使用岛津 Nexera MX 平行液相色谱质谱联用系统，建立了人血清中 VA 和 VE 含量测定方法。样品经液液萃取处理后，采用该系统在 3.5 min 内完成目标物分析。VA、VE 在  $0.05\sim 5.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和  $0.5\sim 50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度范围内线性良好，相关系数分别为 0.9992 和 0.9995。并通过 2 例实际血清样品，考察方法稳定性，检测结果 CV% 均小于 5.0%。该方法具有分析速度快、重复性好的特点，可为临床中人血清中 VA、VE 的快速筛查提供良好借鉴和参考。

**关键词：** Nexera MX 平行液相 三重四极杆质谱仪 血清 VA VE

维生素 A(VA) 和维生素 E(VE) 是一类脂溶性维生素，在人体内有着重要的生理功能。其中 VA 具有维持暗视觉作用、维持和增强免疫功能、抑制肿瘤细胞生长的作用；VE 则具有抗脂质过氧化、维持生殖机能等作用。VA 和 VE 的缺乏将导致代谢异常，严重影响机体健康。因此，准确测定血清中 VA、VE 的含量，对预防、诊断和治疗 VA、VE 缺乏有非常重要意义。

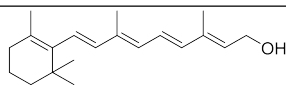
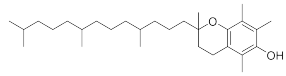
本文使用岛津 Nexera MX 平行液相色谱质谱联用系

统，建立了人血清中 VA 和 VE 含量测定方法。与常规液质联用方法相比，Nexera MX 系统在保证方法精密度与稳定性的基础上，通过交替平行进样分析，有效节省样品分析过程中冲洗系统、色谱柱平衡、自动进样器进样等分析时间，大大提升了 LCMS 处理速度与样品分析速率。通过 Nexera MX 平行液相色谱质谱联用系统开发的人血清中 VA 和 VE 含量测定方法，可实现 VA、VE 高通量快速筛查。

## 实验部分

### 1.1 化合物信息

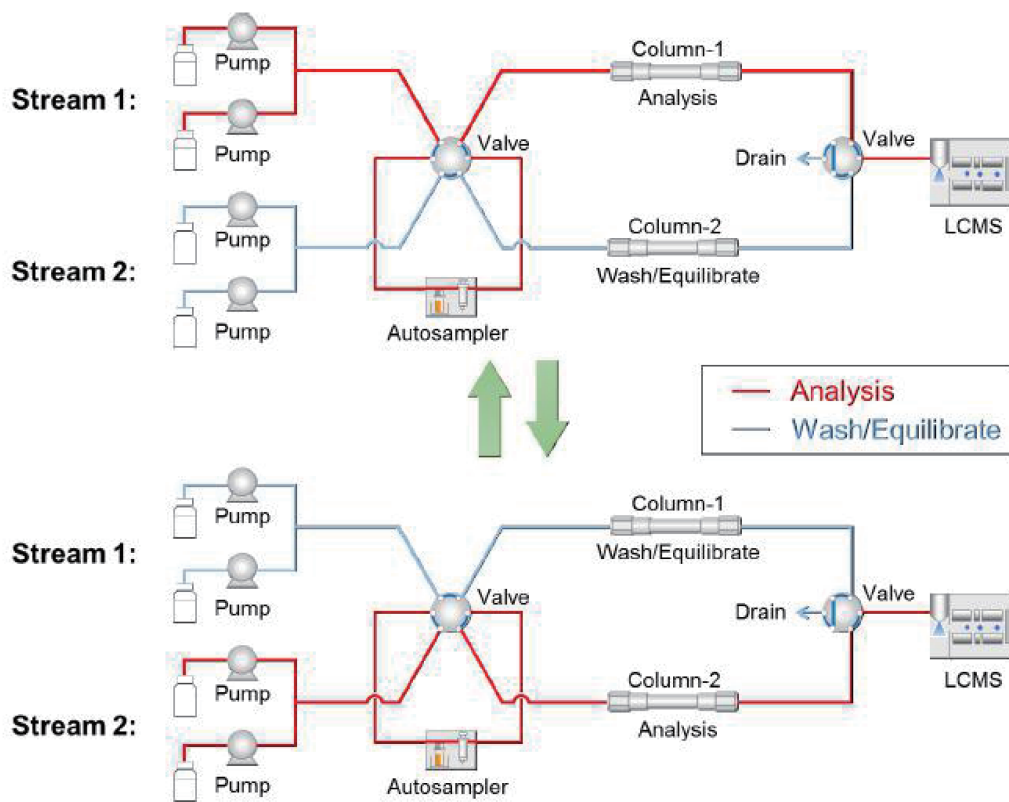
表1 化合物信息

化合物名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
VA	Vitamin A	68-26-8	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$	
VE	Vitamin E	10191-41-0	$\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$	
VA-d <sub>5</sub> (IS)	Vitamin A-d <sub>5</sub>	-	$\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{D}_5\text{O}$	
VE-d <sub>6</sub> (IS)	Vitamin E-d <sub>6</sub>	-	$\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{D}_6\text{O}_2$	

### 1.2 仪器

本实验使用岛津 Nexera MX 超高效平行液相与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×4 输液泵，DGU-20A<sub>SR</sub>×2 在线脱气机，SIL-30ACMP 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。

1.3 仪器结构及原理



1.4 分析条件

液相条件

色谱柱: Shim-pack GIST C18)2.1 mm I.D.  
×50 mm L.,2.0 μm)

流动相: A 相 - 水 (含 0.1% 甲酸)  
B 相 - 甲醇 (含 0.1% 甲酸)

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 1 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 88%, 洗脱程序见表 2、表 3。(表 4 为常规液相梯度洗脱程序, B 相初始浓度为 88%, 两系统液相梯度曲线图见图 1、图 2。)

表2 分析流路梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.00	Pumps	Pump B Conc.	88
0.60	Pumps	Pump B Conc.	88
0.61	Pumps	Pump B Conc.	98
3.50	Controller	Stop	

表3 冲洗平衡流路梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.00	Pumps	Pump B Conc.	88
2.50	Controller	Stop	

表4 常规液相梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.60	Pumps	Pump B Conc.	88
0.61	Pumps	Pump B Conc.	98
3.50	Pumps	Pump B Conc.	98
3.51	Pumps	Pump B Conc.	88
6.00	Controller	Stop	

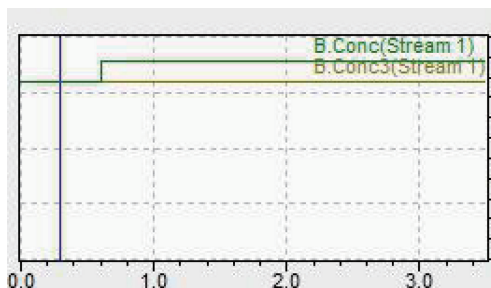


图1 MX系统液相梯度曲线图

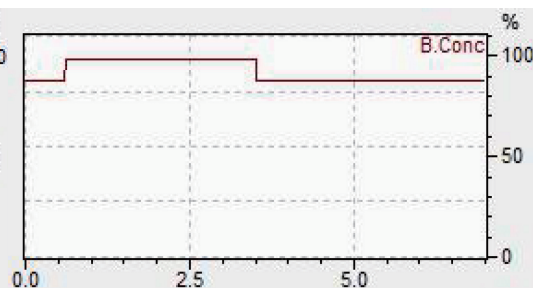


图2 常规液相梯度曲线图

质谱条件

分析仪器：LCMS-8060

离子化模式：ESI(+)

离子源接口电压：4.0 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

加热气：空气 10.0 L/min

干燥气：氮气 10.0 L/min

碰撞气：氩气

接口温度：300℃

DL 温度：250℃

加热模块温度：400℃

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：22 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 5

表5 MRM优化参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
VA	269.15	213.15*	-13.0	-14.0	-20.0
		93.10	-13.0	-22.0	-15.0
VE	431.20	165.10*	-21.0	-21.0	-15.0
		137.05	-21.0	-41.0	-11.0
VA-d <sub>5</sub>	274.15	218.20	-13.0	-14.0	-22.0
VE-d <sub>6</sub>	437.20	171.20	-21.0	-22.0	-15.0

\*表示定量离子对

## 1.5 标准曲线及样品制备

80% 甲醇溶液配制 VA/VE 混标工作溶液，浓度依次分别为 100/1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、40/400  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、20/200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、10/100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、4/40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、2/20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、1/10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。80% 甲醇溶液配制 VA-d<sub>5</sub>/VE-d<sub>6</sub> 混标工作溶液，浓度为 0.5/20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。称取 4.0 g 牛血清白蛋白 (BSA)，溶于 100 mL PBS 中，得到 4% BSA 溶液。

分别取 20  $\mu\text{L}$  VA/VE 混标工作溶液溶于 180  $\mu\text{L}$  4% BSA 溶液中，得到 VA/VE 替代基质标准曲线，浓度分别为 5/50、2/20、1/10、0.5/5、0.2/2、0.1/1、0.05/0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

样品前处理方法：超纯水 10 倍稀释样品 (4% BSA 溶液或血清)，取 100  $\mu\text{L}$  稀释后样品于 2 mL 离心管中，加入 10  $\mu\text{L}$  内标工作液及 200  $\mu\text{L}$  甲醇，涡旋混匀后 10000 g 离心 10 min。加入 1 mL 正己烷，充分涡旋萃取后，10000 g 离心 10 min，取出 900  $\mu\text{L}$  正己烷于 2 mL 离心管中。氮吹挥干正己烷，加入 100  $\mu\text{L}$  80% 甲醇溶液复溶后，直接进样分析。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 标准样品的 MRM 色谱图

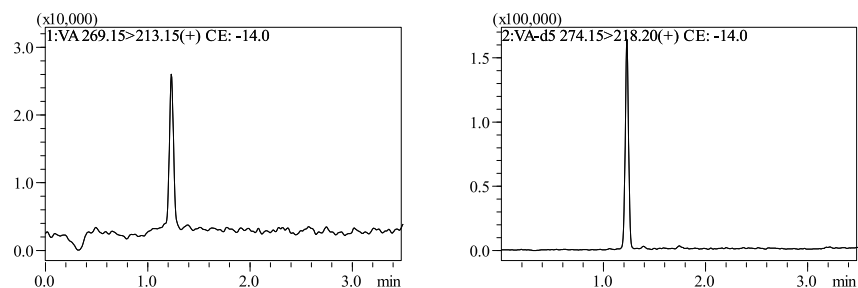


图3 VA标准样品(0.05  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )MRM色谱图(左)及VA-d<sub>5</sub>内标(0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )MRM色谱图(右)

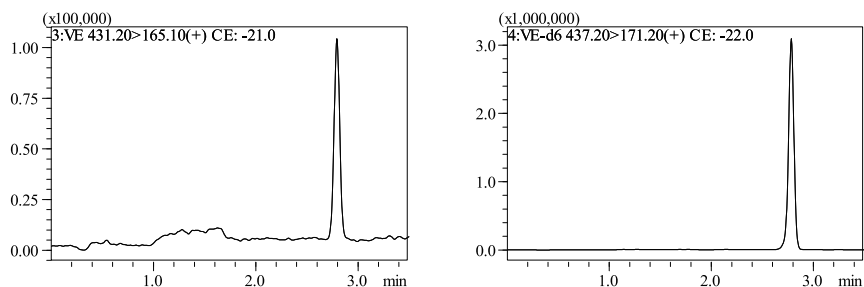


图4 VE标准样品(0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )MRM色谱图(左)及VE-d<sub>6</sub>内标(20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )MRM色谱图(右)

### 2.2 线性关系

使用 4% BSA 溶液配制标准曲线，按上述前处理方法和分析条件，采用内标法建立标准曲线。如图 5 所示，VA、VE 分别在 0.05-5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和 0.5-50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的线性浓度范围内，线性相关性良好，相关系数  $r$  分别为 0.9992 和 0.9995，准确度范围分别为 94.3-104.0% 和 96.2-103.6%。

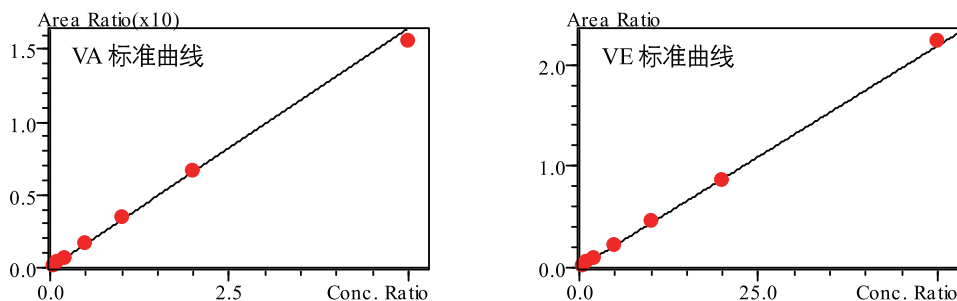


图5 VA、VE标准曲线

表6 VA、VE标准曲线参数(线性回归, 权重系数为 $Y=1/C^2$ )

化合物	校准曲线	线性范围 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	准确度(%)	相关系数 r
VA	$Y = (3.29013)X + (0.00878511)$	0.05-5	94.3-104.0	0.9992
VE	$Y = (0.0436573)X + (0.00257555)$	0.5-50	96.2-103.6	0.9995

### 2.3 方法对比

为验证 Nexera MX 平行液相系统对目标物检测分析的高效性, 实验另外采用常规超高效液相 LC-30A 对样品进行检测。在相同的洗脱程序下, 将常规液质联用系统与 MX 液质联用系统所得色谱图进行对比, MX 液质联用系统检测所需的时间比常规液质联用系统检测缩短约 40%。

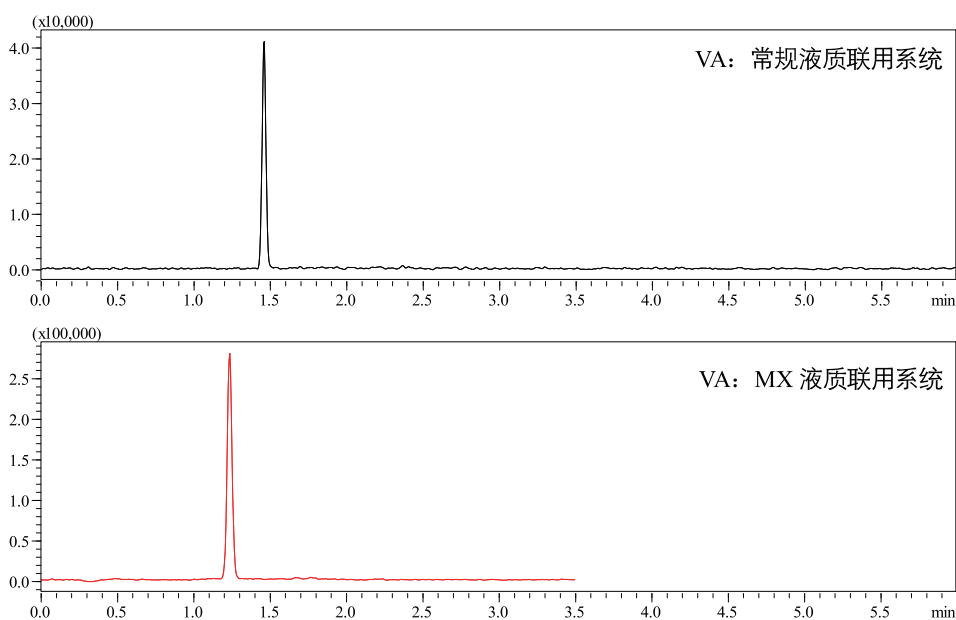


图6 常规液质联用系统(上)与MX液质联用系统(下)检测VA样品色谱图对比

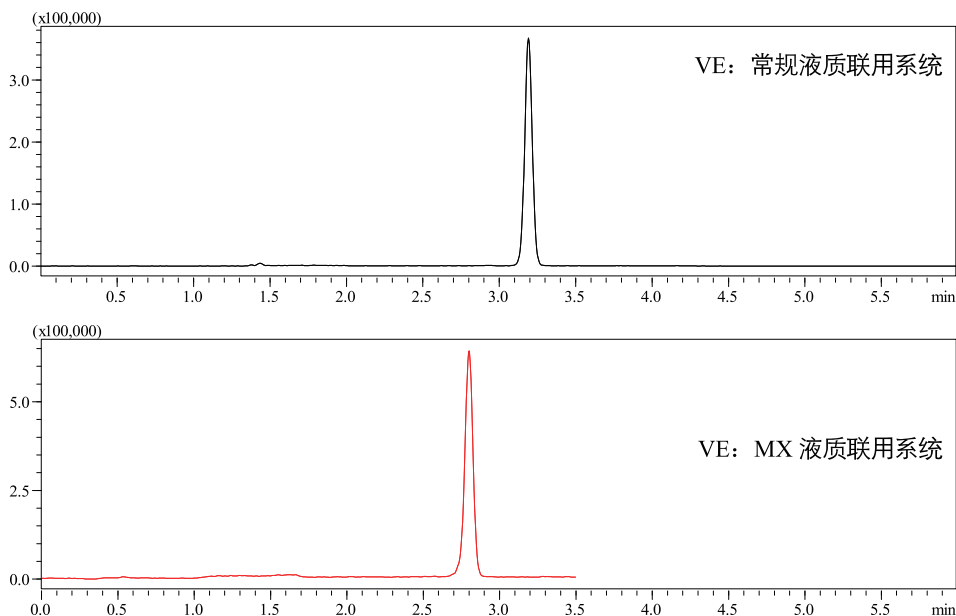


图7 常规液质联用系统(上)与MX液质联用系统(下)检测VE样品色谱图对比

## 2.4 残留

在高浓度样品 (VA/VE = 5/50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 后进样分析空白溶剂, 考察 VA、VE 及其内标的残留情况, 结果如图 8 所示。结果表明, 高浓度样品进样分析后 VA、VE 及其内标均无明显残留现象。

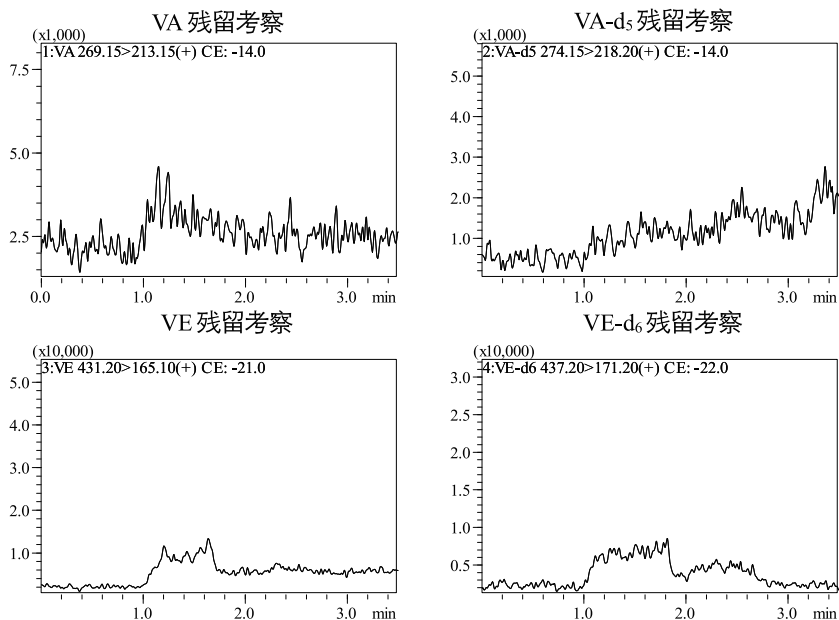


图8 残留考察

## 2.5 方法稳定性

取 2 例血清样品, 按 1.5 中的前处理方法处理样品, 每个样品平行处理 6 份后进样分析, 考察方法稳定性。结果如图 9-10 及表 7 所示, 检测结果 CV% 小于 5.0%, 表明该方法稳定性良好。

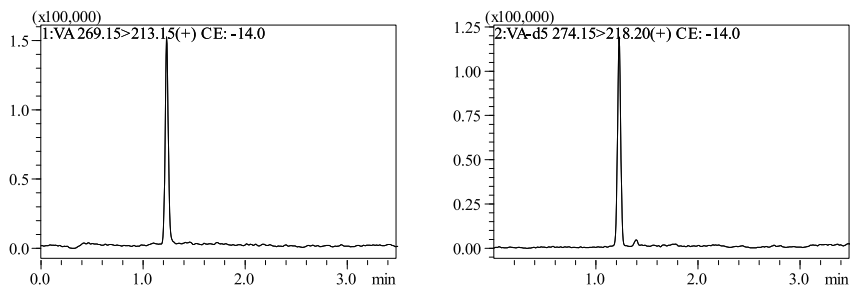


图9 血清样品1中VA MRM色谱图(左)及VA-d<sub>5</sub>内标(0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )MRM色谱图(右)

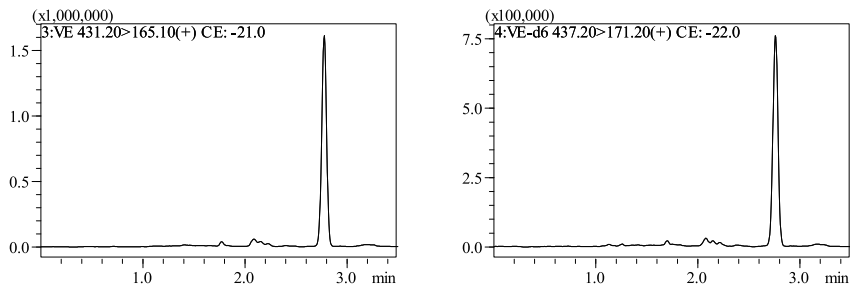


图10 血清样品1中VE MRM色谱图(左)及VA-d<sub>6</sub>内标(20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )MRM色谱图(右)

表7 方法稳定性考察结果

项目	VA ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )		VE ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	
	样品 1	样品 2	样品 1	样品 2
1	0.38	0.51	46.5	39.1
2	0.39	0.50	47.8	38.6
3	0.38	0.51	46.3	38.2
4	0.38	0.50	46.7	37.3
5	0.38	0.51	47.0	38.4
6	0.38	0.46	47.5	38.7
均值 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	0.38	0.50	47.0	38.4
CV (%)	1.5	3.6	1.1	1.5

## 结论

本文使用岛津 Nexera MX 平行液相色谱质谱和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统，建立了人血清中 VA 和 VE 含量测定方法。该方法在 3.5 min 内完成血清中 VA、VE 含量的检测分析，采用同位素内标法定量，VA、VE 在  $0.05\sim 5.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和  $0.5\sim 50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度范围内线性良好，相关系数分别为 0.9992 和 0.9995。通过 2 例实际血清样品，考察方法稳定性，检测结果 CV% 均小于 5.0%，表明方法稳定性良好。

与常规液质联用方法相比，Nexera MX 系统充分利用系统冲洗、色谱柱平衡、自动进样器进样等分析时间，有效提升 LCMS 处理速度与分析能力，显著缩短分析时间，提高生物样品检测速率，适用于大样本分析的超高通量检测，可为临床中人血清中 VA、VE 的快速筛查提供良好借鉴和参考。