

LCMS-8045 检测血浆中 V_A 和 V_E 长期稳定性考察

LCMSMS-269

摘要： 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用，连续 30 天测定血浆中维生素 A 和维生素 E，分别考察了日内精密度和日间精密度。实验数据表明，在没有使用阀切换情况下，30 天内维生素 A 和维生素 E 的平均 RR 值稳定，相对偏差小于 10%，能够为临床诊断提供参考。

关键词： LCMS-8045 VA 和 VE 血浆 稳定性

维生素是人和动物为维持正常的生理功能而必须从食物中获得的一类微量有机物质，在人体生长、代谢、发育过程中发挥着重要的作用。维生素 A 能够促进发育、细胞生长发育和再生、维持免疫系统，是构成视觉细胞中感受弱光的视紫红质的组成成分。维生素 E 是天然的抗氧化剂，阻止细胞膜上的不饱和脂肪酸的过氧化反应，具有抗衰老、保护皮肤等作用。近年来的研究发现，维生素 A 和维生素 E 与儿童的生长发育及一些营养代谢疾病有密切关系。因此，能够及时、准确地掌握体内的维生素 A 和维生素 E 的水平对疾病的预防、诊断和治疗具有重要意义。

在临床检测中，维生素 A 和维生素 E 检测常用液相色谱法，但该方法存在灵敏度低、样品用量大、易被干扰等问题。液相色谱串联质谱法在分析中具有分析速度快、灵敏度高、定性定量准确度高、抗干扰能力强的优势，而被越来越多的应用于临床检测中。

为了验证液相色谱串联质谱法在临床检测中应对大量样品分析时的稳定性，本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用，连续 30 天测定血浆中维生素 A 和维生素 E 的 RR 值 (RR 值 = 目标峰面积 / 内标峰面积)，并计算连续 30 天的相对偏差。

实验部分

1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为：LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8045 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.86 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：C8(50 mm L×3.0 mm ID. , 5 μm)

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水；B 相 -0.1% 甲酸甲醇

流速：0.4 mL/min

柱温：25℃

进样量：2 μL

自动进样器温度：4℃

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 85%，
时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.20	Pumps	Pump B Conc.	85
0.21	Pumps	Pump B Conc.	95
2.00	Pumps	Pump B Conc.	95
2.01	Pumps	Pump B Conc.	85
4.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源: ESI (+)

雾化气流速: 2.5 L/min

加热气流速: 10.0 L/min

接口温度: 300°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

干燥气流速: 10.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 34 ms

MRM 参数: 见表 2

表2 MRM参数

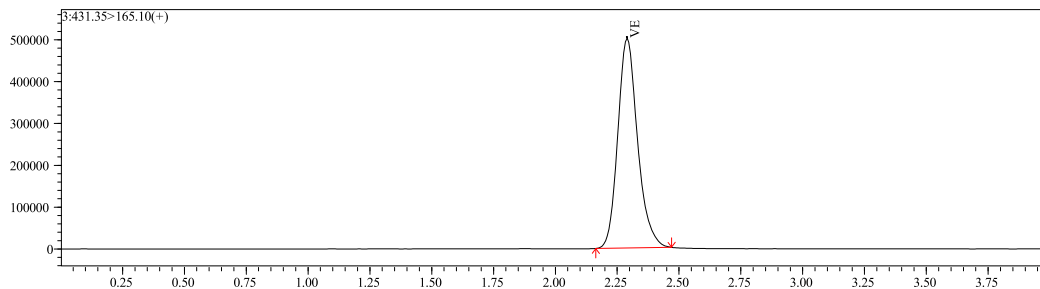
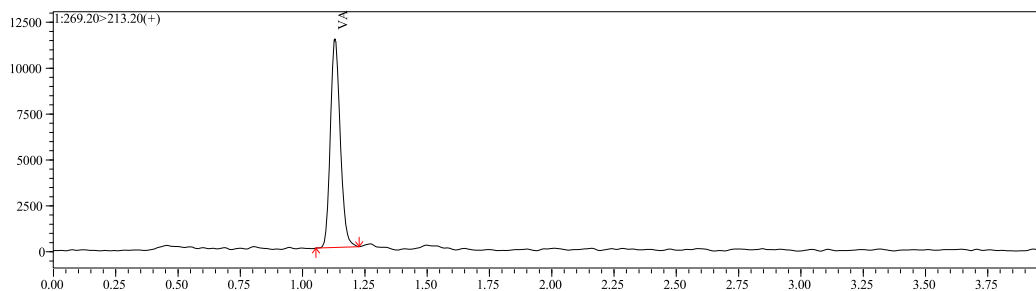
名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q ₁ Pre Bias (V)	CE (V)	Q ₃ Pre Bias (V)
V _A	68-26-8	269.20	213.20	-13.0	-13.0	-22.0
V _A IS	--	272.20	216.20	-13.0	-13.0	-22.0
V _E	10191-41-0	431.35	165.10	-21.0	-21.0	-17.0
V _E IS	--	437.35	171.10	-21.0	-21.0	-17.0

1.3 样品制备

血浆样品经液液萃取后, 取上清液吹干, 保存于 -20°C 下, 备用。上机测试前取出, 用甲醇复溶 (10 倍稀释), 混匀, 离心 (12000 rpm, 5 min), 溶液转移至样品瓶, 上机测试。

日内精密度考察: 同一天的不同时间取 3 份吹干样本, 复溶后上机测试, 每份样本重复进样 15 针, 统计每个样本平均 RR 值 (RR 值 = 目标峰面积 / 内标峰面积)。

日间精密度考察: 每天取 1 份吹干的样本, 经复溶后上机测试, 每份样本重复进样 15 针, 统计每个样本平均 RR 值 (RR 值 = 目标峰面积 / 内标峰面积), 以第一天样本的 V_A 和 V_E 的 RR 值为基准, 计算每天的相对偏差; 连续考察 30 天。

结果讨论
2.1 MRM 色谱图


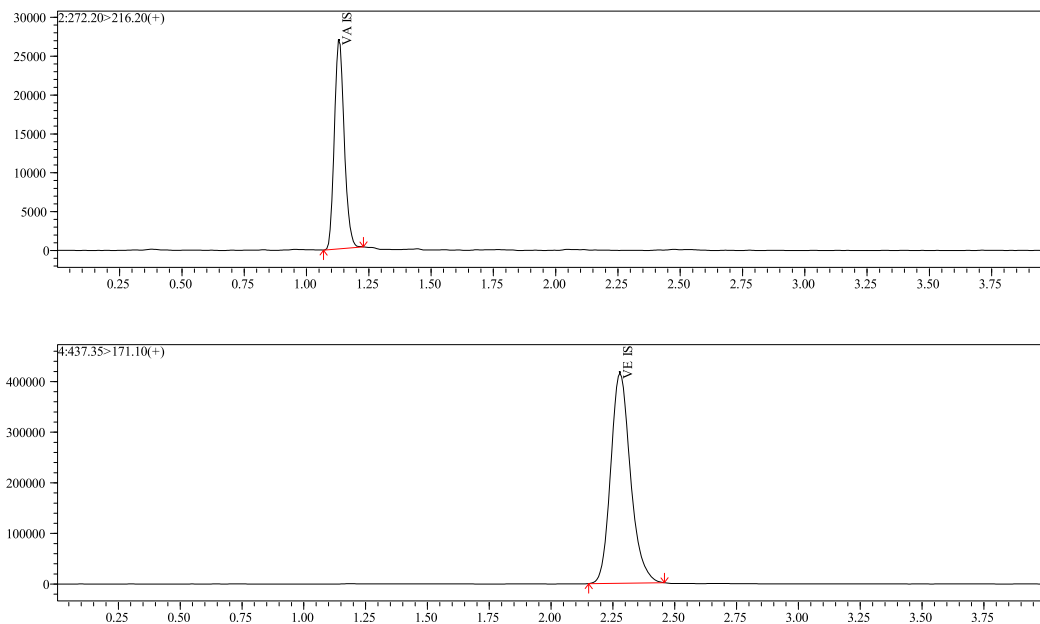


图1 V_A和V_E及其内标物的MRM色谱图

2.2 灵敏度考察

健康人群血浆中维生素 A 的浓度为 300-360 μg/L，维生素 E 的浓度为 5~20 mg/L[1, 2]。复溶后的样本用甲醇稀释 40 倍时，连续进样 10 次，V_A 的平均信噪比为 19.39，峰面积和峰高的 RSD 均小于 10%；复溶后的样本用甲醇稀释 4000 倍时，V_E 的平均信噪比为 52.75，连续进样 10 次，峰面积和峰高的 RSD 均小于 10%。具体结果如表 3，结果表明 LCMS-8045 完全能够满足样品检测要求。

表3 V_A和V_E的连续10针进样统计结果 (n=10)

项目	V _A		V _E	
	平均值	RSD/%	平均值	RSD/%
保留时间	1.125	0.39	2.295	0.33
峰面积	1432	7.60	2846	4.44
峰高	595	8.05	544	6.35

Quantitative Results View ID# 1 VA							
Data#	Data Filename	Sample	Level	Ret. Time	Area	Height	S/N
1	18#_40倍稀释_016.lcd	Unknown	0	1.127	1,529	576	17.74
2	18#_40倍稀释_017.lcd	Unknown	0	1.123	1,494	549	18.20
3	18#_40倍稀释_018.lcd	Unknown	0	1.125	1,598	589	21.81
4	18#_40倍稀释_019.lcd	Unknown	0	1.118	1,473	599	17.64
5	18#_40倍稀释_020.lcd	Unknown	0	1.129	1,508	495	13.36
6	18#_40倍稀释_021.lcd	Unknown	0	1.128	1,219	620	22.17
7	18#_40倍稀释_022.lcd	Unknown	0	1.125	1,372	637	23.20
8	18#_40倍稀释_023.lcd	Unknown	0	1.127	1,371	646	17.77
9	18#_40倍稀释_024.lcd	Unknown	0	1.117	1,371	636	19.94
10	18#_40倍稀释_025.lcd	Unknown	0	1.131	1,384	623	22.11

Data#	Data Filename	Sample	Leve	Ret. Time	Area	Height	S/N
1	VE_18#_4000倍稀释_002	Unknown	0	2.292	2,772	573	56.06
2	VE_18#_4000倍稀释_003	Unknown	0	2.303	2,635	582	47.62
3	VE_18#_4000倍稀释_004	Unknown	0	2.296	2,790	560	41.26
4	VE_18#_4000倍稀释_005	Unknown	0	2.307	2,904	542	42.15
5	VE_18#_4000倍稀释_006	Unknown	0	2.295	3,088	573	54.66
6	VE_18#_4000倍稀释_007	Unknown	0	2.292	3,204	584	69.25
7	VE_18#_4000倍稀释_008	Unknown	0	2.293	3,208	590	55.47
8	VE_18#_4000倍稀释_009	Unknown	0	2.299	3,043	458	52.04
9	VE_18#_4000倍稀释_010	Unknown	0	2.279	2,947	513	60.53
10	VE_18#_4000倍稀释_011	Unknown	0	2.293	2,767	537	56.33

 图2 V_A 和 V_E 连续10针进样信息统计

2.3 日内精密度

同一天的不同时间取 3 份样本，每份样本重复进样 15 针，统计每个样本平均 RR 值 (RR 值 = 目标峰面积 / 内标峰面积)，具体见下表 4。

表4 日内精密度样本平均RR值统计 (n=15)

序号	V_A 的 RR 值	V_E 的 RR 值
1	0.4218	1.2424
2	0.4249	1.1920
3	0.4404	1.2396

2.4 日间精密度

每天取 1 份样本，用甲醇复溶，每份样本重复进样 15 针，统计每个样本平均 RR 值 (RR 值 = 目标峰面积 / 内标峰面积)，以第一天样本的 V_A 和 V_E 的 RR 值为基准，计算相对偏差，具体结果见表 5， V_A 和 V_E 的 RR 值在 30 天内的相对偏差小于 10%。

表5 日间精密度样本平均RR值统计 (n=15)

序号	V _A		V _E	
	RR 值	相对偏差/%	RR 值	相对偏差/%
1	0.4254	--	1.2021	--
2	0.4289	0.82	1.2001	-0.17
3	0.4218	-0.85	1.2424	3.35
4	0.4258	0.09	1.2387	3.04
5	0.4343	2.09	1.2414	3.27
6	0.4343	2.09	1.2675	5.44
7	0.4454	4.70	1.3011	8.24
8	0.406	-4.56	1.1865	-1.30
9	0.3961	-6.89	1.1549	-3.93
10	0.4262	0.19	1.2270	2.07
11	0.4099	-3.64	1.2204	1.52
12	0.4425	4.02	1.2404	3.19
13	0.4356	2.40	1.2833	6.75
14	0.4391	3.22	1.2581	4.66
15	0.4068	-4.37	1.1276	-6.20
16	0.3967	-6.75	1.1281	-6.16
17	0.3974	-6.58	1.1303	-5.97
18	0.3924	-7.76	1.1572	-3.74
19	0.3932	-7.57	1.1656	-3.04
20	0.3938	-7.43	1.1646	-3.12
21	0.3930	-7.62	1.1540	-4.00
22	0.4021	-5.48	1.2129	0.90
23	0.4131	-2.89	1.2308	2.39
24	0.4085	-3.97	1.2103	0.68
25	0.3944	-7.29	1.1642	-3.15
26	0.3985	-6.32	1.1946	-0.62
27	0.3914	-7.99	1.1464	-4.63
28	0.4045	-4.91	1.2546	4.37
29	0.4219	-0.82	1.2746	6.03
30	0.4232	-0.52	1.2077	0.47

相对偏差=,为第一天 V_A 和 V_E 的平均 RR 值

结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用, 连续 30 天测定血浆中维生素 A 和维生素 E, 实验中分别考察了日内精密度和日间精密度。实验数据表明, 在没有使用阀切换情况下, 维生素 A 和维生素 E 不仅日内精密度良好, 而且 30 天内的平均 RR 值稳定, 且相对偏差小于 10%, 能够为临床诊断提供参考, 由此可见 LCMS-8045 能够应对复杂生物样本的大量分析。