

血浆中脂溶性维生素A₁的检测——Cleanert ODS C8

应用及技术服务部

天津博纳艾杰尔科技有限公司, 天津开发区西区南大街179号, 300462

化合物信息

表1. 化合物信息

名称	CAS号	结构式
VA	68-26-8	C20H30O
25OH-VD2	21343-40-8	C28H44O2
25OH-VD3	19356-17-3	C27H44O2
VE	59-02-9	C29H50O2
VK1	84-80-0	C31H46O2

实验部分

3.1 仪器、试剂与材料

3.1.1 主要仪器设备

液相色谱串联质谱仪(AB SCIEX Triple Quad™4500), 大气压化学电离(APCI);
正压装置(Agela Cleanert M96);
氮吹浓缩仪(Agela Cleanert V96)。

3.1.2 试剂材料

Cleanert ODS C8 96孔板: S080502-W
屈臣氏蒸馏水, 甲醇、甲酸、乙醇均为色谱级。

3.1.3 样品基质

5%BSA代替基质, 人体血浆质控样本。

3.2 样品前处理方法

预处理: 200 μL血浆加入400 μL乙醇内标溶液(0.1%BHT)涡旋, 10000g/5min 离心取上清, 再加入200μL纯水, 待净化;
活化: 96孔板依次使用 1mL甲醇、1mL水活化;
上样: 加载预处理后的血浆至活化后孔板;
淋洗: 使用1mL水淋洗孔板;
洗脱: 用1 mL乙醇洗脱1次;
浓缩: 37°C氮吹干, 100μL甲醇复溶, 上机。

3.3 仪器检测条件

3.3.1 色谱条件

色谱柱: Kinetex C18 (3.0×50 mm, 2.6 μm, 100 Å) ; P/N: 00B-4462-Y0
流动相A相: 0.1%甲酸水溶液;
流动相B相: 0.1%甲酸甲醇溶液;
流速: 0.6 mL/min;
柱温: 40 °C;
进样量: 20 μL;
梯度程序见表2:

表2. 梯度条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	B (%)
0	0.6	20
0.5	0.6	20
1.5	0.6	100
3.8	0.6	100
4.2	0.6	20
6.0	0.6	20

3.3.2 质谱条件

离子源类型: 大气压化学电离 (APCI)
扫描方式: 多反应监测正负离子模式 (MRM)
喷雾针电压: 5500 V
离子源温度: 500 °C
加热器 (GS1): 60 psi
辅助加热气 (GS2): 60 psi
气帘气 (CUR): 40 psi
碰撞气 (CAD): 10 psi
为获得较好的稳定性和灵敏度, 各化合物监测离子对的去簇电压 (DP) 和碰撞电压 (CE), 目标化合物定量离子对以及内标监测离子对等参数均需经过系统优化。
本案例参数仅供参考不具备法律效力。



表3. 化合物定性、定量离子和质谱分析参数

化合物	Q1	Q3	DP/V	CE/V
VA	269.2	93	58	34
	269.2	157.2	58	29
VD2	413.4	355.4	60	13
	413.4	377.3	55	13
VD3	401.4	365.4	70	17
	401.4	257.4	55	18
VE	431.4	165.1	62	25
	431.4	137.1	55	57
VK1	451.4	187.1	50	35
	451.4	199.2	50	42
d6-VA	275.4	122.2	48	23
d3-VD2	416.5	358.5	60	13
d6-VD3	407.5	371.5	70	17
d6-a-VE	437.4	171.1	66	26
d7-k1	458.4	194	50	35

3.4 结果与讨论

3.4.1 标准曲线范围

用5%BSA作为空白代替基质，配制线性浓度点，按照上述3.2前处理方法同等操作，得到标准曲线结果如下表。

表4. 脂溶性维生素标准曲线

化合物	线性方程	相关系数	曲线范围ng/mL
VA	$Y=0.02721x+0.73250$	0.9946	40-1500
VD2	$Y=2335.57x+826.155$	0.9966	2-100
VD3	$Y=0.00646x+0.00008$	0.9997	5-250
VE	$Y=0.000126x+0.01870$	0.9992	500-25000
VK1	$Y=0.19394x+0.05386$	0.9997	0.1-5

3.4.2 回收率情况

C8板对于溶液中的5种脂溶性维生素的提取效率均可达到60%以上，但在人体血浆中VE和VK1具有明显的基质抑制效应。

表5. 加标回收实验结果

化合物	C8 固相萃取结果	
	空白溶液绝对回收率	血浆样本基质效应
VA	82.3%	112.5%
VD2	63.1%	80.4%
VD3	61.2%	83.8%
VE	89.0%	59.7%
VK1	66.5%	59.4%

3.4.3 实际样本测试情况

对客户提供的两个浓度的人血浆质控样本进行测试验证，测试结果如下，该测试结果基本上与客户提供的理论浓度一致，对比结果如下表6。

表6. 质控样本测试结果

化合物	质控样本浓度 ng/mL	测试结果 ng/mL
VA	300	270
	600	626
VD2	2	1.74
	4	3.83
VD3	20	16.96
	40	34.37
VE	6000	6442
	12000	12226
VK1	2	2.65
	4	5.24

3.5 实验谱图

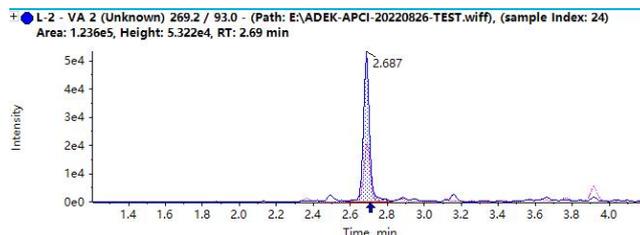


图1. 人血浆中VA 300ng/ml加标回收色谱图

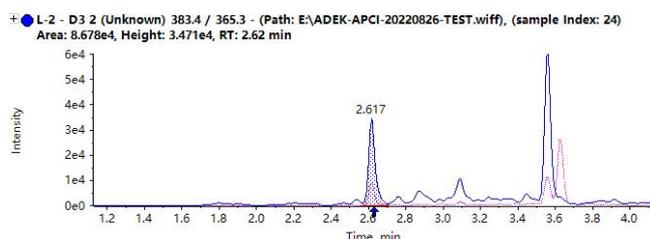


图2. 人血浆中25OH-VD3 20ng/ml加标回收色谱图

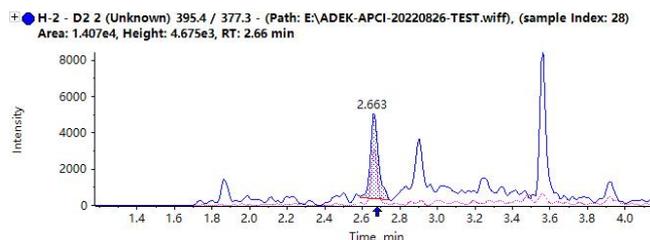


图3. 人血浆中25OH-VD2 2ng/ml加标回收色谱图



L-2 - VE-1 (Unknown) 431.3 / 109.2 - (Path: E:\ADEK-APCI-20220826-TEST.wiff), (sample Index: 24)
Area: 2.850e4, Height: 1.324e4, RT: 3.59 min

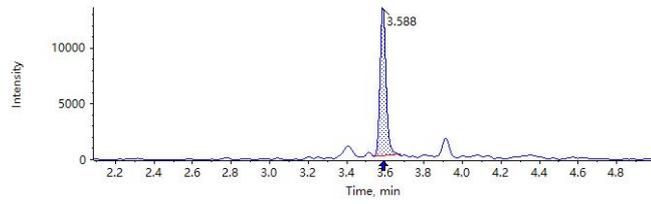


图4. 人血浆中VE 6000ng/ml加标回收色谱图

L-2 - VK -1 (Unknown) 451.4 / 187.1 - (Path: E:\ADEK-APCI-20220826-TEST.wiff), (sample Index: 24)
Area: 2.695e3, Height: 1.140e3, RT: 3.91 min

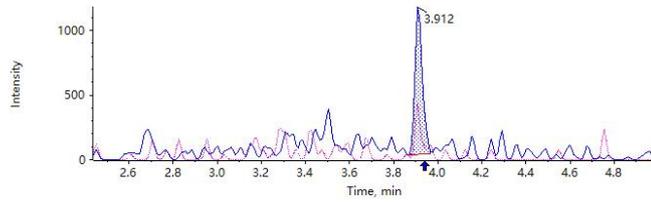


图5. 人血浆中VK1 2ng/ml加标回收色谱图





Xccelerator 加速服务

探索分离, 使命加速

Mission to Accelerate Separation

在新药、仿制药研发和科学研究过程中, 抢占先机越来越多被大家提及, 同时在食品、环境、临床等行业的客户也都面临着项目周期压缩的压力。基于此, 我们成立了上海和天津两个方法开发服务中心, 为客户加快项目进度提供支持。

Xccelerator 以客户为中心, 以色谱技术为中心, 为药物研发和科学研究提供全方位加速服务。

三大研发中心

中国天津

地址: 天津市开发区西区南大街179号

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

中国上海

地址: 上海市长宁区福泉北路518号1号楼1层

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

美国总部

地址: 411 Madrid Avenue Torrance, CA 90501-1430, USA

Tel: +1 (310) 212-0555

Fax: +1 (310) 328-7768

Email: cninfo@phenomenex.com

仅用于研究目的, 不可用于临床诊断程序。

© 2022 天津博纳艾杰尔科技有限公司保留所有权利。



如果您对于本方法的执行有任何问题, 或想要了解更多信息, 请拨打400-606-8099 联系我们的技术专家, 我们很乐意为您提供帮助!

phenomenex®