

# 使用 Agilent RapidFire 高通量质谱系统对人血清中的脂溶性维生素 A 和维生素 E 进行超快速定量分析

## 应用简报

临床研究

### 作者

Mohamed Youssef、Maxcy Stroman 和  
Vaughn P. Miller  
安捷伦科技有限公司  
Wakefield, MA

### 摘要

分析血清中的维生素 A 和维生素 E 时，临床研究实验室需要可靠的分析方法和准确的检测。对分析性能和通量的需求呈稳步上升趋势，这对传统分析技术提出了更高要求。我们已开发出一种使用 SPE/MS/MS 系统分析血清中维生素 A 和维生素 E 的分析方法，与传统检测方法相比，这种方法具有更短的样品分析周期，可得到相似的分析结果。经过简单的蛋白质解离、稀释，然后使用 Agilent RapidFire 高通量质谱系统进行分析，可以精准地测定人血清中的维生素 A 和维生素 E 分析物，线性范围分别为 0.1-5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.4-20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。RapidFire/MS/MS 系统每 15 秒分析一个样品，与传统方法相比，这种方法能够提供更高的通量。



**Agilent Technologies**

## 实验部分

### 分析物

### 前言

维生素 A (视黄醇) 和维生素 E ( $\alpha$ -生育酚) 是人体中储存的脂溶性维生素。采用色谱方法 (如 HPLC 和最新的 LC/MS/MS) 可对血清中的这些维生素 (图 1) 进行测量。某些分析方法会使用复杂的提取仪器或冗长繁琐的提取流程, 这会消耗大量的溶剂或生物液体。本应用简报的主要目的是开发高选择性、高灵敏度的快速在线 SPE/MS/MS 方法, 这种方法的提取流程简短, 提取仅消耗少量溶剂和生物液体, 且周转时间极短。我们开发出一种使用 Agilent RapidFire/MS/MS 系统分析血清中维生素 A 和维生素 E 的分析方法, 与传统检测方法相比, 这种方法具有更短的样品分析周期, 可得到相似的分析结果。

采用基于 96 孔板的提取系统 (稀释-上样) 可自动完成整个样品前处理方法, 从而提高了效率和实验通量。Agilent RapidFire 高通量质谱系统是一款超快速的 SPE/MS/MS 系统, 可在不足 15 秒的分析周期内实现样品分析。利用 RapidFire/MS/MS 系统, 这种方法能够快速精准地测量合理线性范围内的维生素 A 和维生素 E。

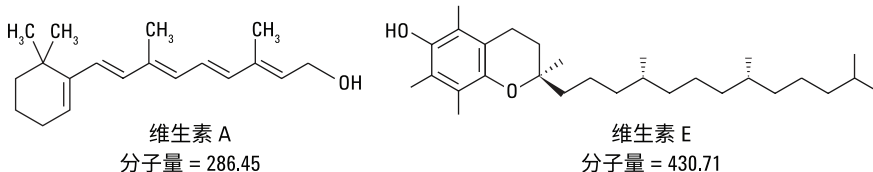


图 1. 维生素 A 和维生素 E 的化学结构

Agilent RapidFire/MS/MS 系统包括如下模块: Agilent RapidFire 365、配备 APCI 离子源的 Agilent 6460 三重四极杆质谱仪 (使用 Agilent MassHunter 三重四极杆采集软件 (B.06.01)、定性分析软件 (B.06.00) 和定量分析软件 (B.06.00)) 以及 Agilent RapidFire 采集软件。

样品分析速率为 15 秒/样品。在所有实验中, 对维生素 A 和维生素 E 的定量和定性离子以及维生素 A-D5 和维生素 E-D6 内标进行同时测定 (表 1)。Agilent MassHunter 定量分析软件可自动计算定性离子比。

### 仪器条件

Agilent RapidFire/MS/MS 条件	
缓冲液 A	5 mM 甲酸铵的 LC/MS 级水溶液 + 0.1% 甲酸; 流速 1.5 mL/min
缓冲液 B 和 C	5 mM 甲酸铵的 LC/MS 级甲醇溶液 + 0.1% 甲酸; 流速 1.25 和 0.7 mL/min
水溶液清洗	HPLC 级水
有机溶液清洗	100% 甲醇或乙腈
SPE 柱	Agilent RapidFire E 类柱 (反相 C18 化学键合相, G9203-80105)
RF 状态 1	600 ms
RF 状态 2	2500 ms
RF 状态 3	0 ms
RF 状态 4	8000 ms
RF 状态 5	1000 ms
Agilent 6460 三重四极杆条件	
离子源	APCI
干燥气温度	325 °C
气化室温度	350 °C
干燥气流量	10 L/min
雾化器压力	40 psi
毛细管电压	4500 V
电晕电流	10 $\mu$

表 1. MRM 离子对

化合物	Q1	Q3	驻留时间	碎裂电压	CE	CAV
维生素 E-D6	437.5	171.1	20	114	21	2
维生素 E ( $\alpha$ -生育酚)	431.4	165.2	20	146	25	2
维生素 E ( $\alpha$ -生育酚)	431.4	137.2	20	146	49	2
维生素 A-D5	291.3	162.2	20	142	5	2
维生素 A (视黄醇)	269.4	105.1	20	114	33	2
维生素 A (视黄醇)	269.4	93	20	114	21	2

## 化学品与试剂

维生素 A 购自 Sigma-Aldrich；视黄醇-D5 购自圣克鲁斯生物技术公司。维生素 E 购自 Cerilliant, Round Rock, TX。维生素 E-D6 购自 Toronto Research Chemicals。质量控制和空白合成血清购自 UTAK Laboratories, Valencia, CA。所有其他溶剂和试剂均购自 Sigma-Aldrich。

## 样品前处理

采用以下步骤配制样品、校准品 (0.1、0.25、1.25、2.5 和 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的维生素 A, 0.4、1.0、5.0、10.0 和 20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的维生素 E) 和 QC 标样 (0.6 和 1.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的维生素 A, 6.0 和 28.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的维生素 E)。在 2.2 mL 的深孔收集盘中, 加入 200  $\mu\text{L}$  样品、5 点校准品、维生素 A 和维生素 E 的 2 点 QC 标样以及 25  $\mu\text{L}$  内标混合液 (分别含 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  维生素 A-D5 和 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  维生素 E-D6 的 LC/MS 级甲醇溶液) 进行混合, 再加入 10  $\mu\text{L}$  冰醋酸 (1:1)。加入 500  $\mu\text{L}$  乙腈并在 3500 rpm 的转速下离心 10 分钟, 对蛋白质进行解离。然后, 将 55  $\mu\text{L}$  样品上清液转移到黑色 96 孔板中的每个对应孔中。用 LC/MS 级水稀释 (1:10) 后, 用 Agilent PlateLoc 孔板热封膜机将板密封, 轻轻振摇混合后进行 RapidFire/MS/MS 分析。

建议在合成血清中添加 EDTA 和 BHT (抗氧化剂), 以提高维生素 A 的稳定性和结合特性。另外, 由于维生素 A 对光敏感, 建议用黑色或不透明板进行分析。

## 数据分析

使用 MassHunter 三重四极杆定量分析软件进行数据分析。在多重反应监测 (MRM) 模式下使用线性最小二乘回归建立校准曲线, 其中加权因子为  $1/X$ 。利用色谱峰面积与已知浓度内标的峰面积之比进行定量分析。

## 结果与讨论

将维生素 A、维生素 E 和内标加入合成血清中, 之后进行蛋白质解离, 再用水将上清液稀释 10 倍, 即制得样品。使用 RapidFire/MS/MS 系统和疏水性 C18 柱对样品进行 SPE/MS/MS 分析, 速率为 15 秒/样品 (图 2)。这一 RapidFire/MS/MS 方法的通量超过 240 个样品/小时, 提供高通量和高效的分析模式。

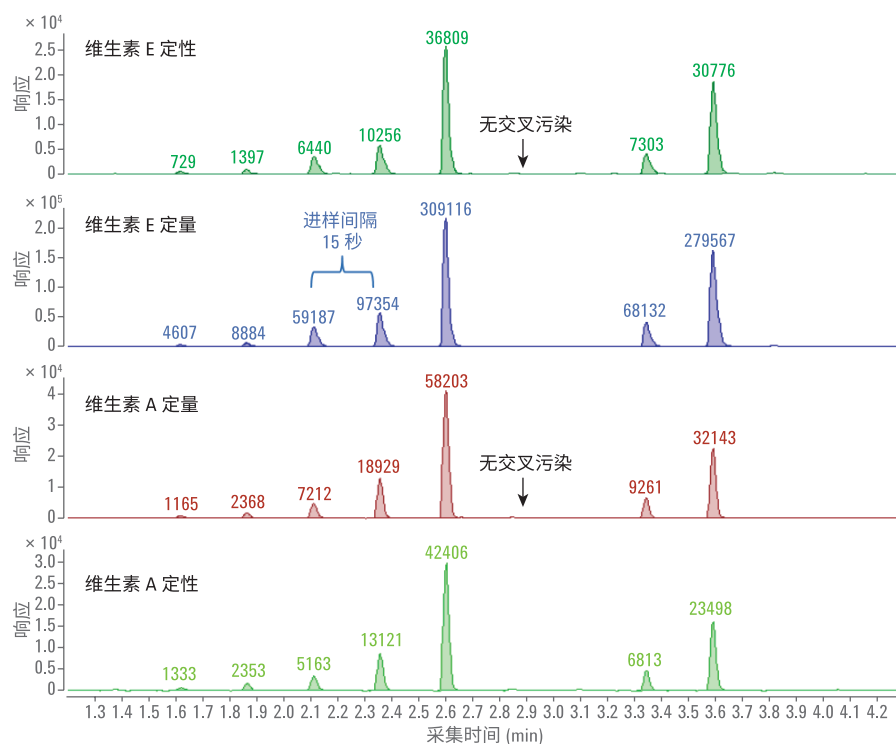


图 2. 每个分析物的典型校准曲线数据, 显示进样间隔为 15 秒。进样最高浓度样品后再进样基质空白, 未发现明显的交叉污染

血清中的维生素 A 和维生素 E 分别在 0.1-5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.4-20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的测量范围内呈现出出色的线性关系， $R^2$  值均高于 0.995（图 3）。通过 QC 标样获得日内和日间准确度和精密度数据。日内和日间准确度的测定结果在 10% 以内，且测量范围内的浓度变异系数均小于 10%（表 2）。通过分析基质空白的 AUC（分别计算与维生素 A 和维生素 E 0.1 和 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  样品的平均峰面积百分比）评估交叉污染程度。所有分析物均未观察到明显的交叉污染（图 2）。

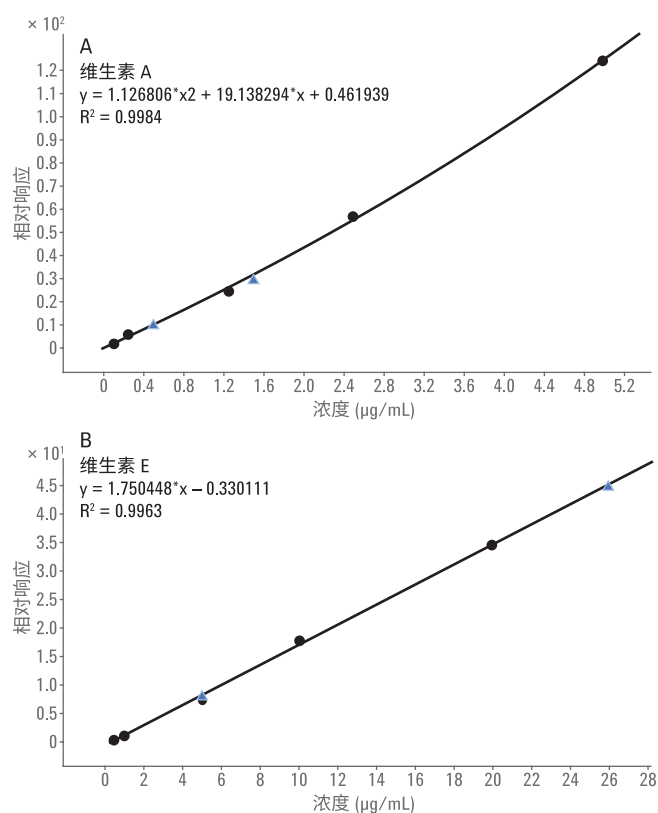


图 3. 典型校准曲线，显示维生素 A 和维生素 E 的线性范围分别为 0.1-5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.4-20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。黑色圆圈代表校准品，蓝色三角形代表 QC 样品

表 2. QC 标样的日内和日间准确度和精密度数据

维生素 A 浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	日内准确度% (n = 6)	日内精密度% (n = 6)	日间准确度% (n = 6)	日间精密度% (n = 6)
0.6	98.6	7.2	104.6	9.2
1.8	95.4	7.9	107.7	4.4
维生素 E 浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	日内准确度% (n = 6)	日内精密度% (n = 6)	日间准确度% (n = 6)	日间精密度% (n = 6)
6.0	97.5	9.2	102.1	6.8
28	102.6	3.2	102.5	5.3

对空白人血清中加入的两种分析物连续进样 2000 次以上，所得测定结果用于评估分析方法的重现性。两种分析物的仪器响应稳定，变异系数分别为 9.0% 和 8.0%，表明了 RapidFire 系统的稳定性、SPE 柱的长寿命，以及样品组中分析物定量分析的一致性。例如，图 4 中显示了维生素 E 的数据，变异系数为 8.0%。

## 结论

使用简单的蛋白质解离和 Agilent RapidFire/MS/MS 系统稀释方法，能够快速精准地测定人血清中的脂溶性维生素 A 和维生素 E。样品分析的进样间周期仅为 15 秒，这为分析物提供了高通量的分析方法。这种方法能够达到 240 样品/小时的通量，产生的结果与 LC/MS/MS 相当，而速度和效率则可达到 LC/MS/MS 的 10 倍以上。

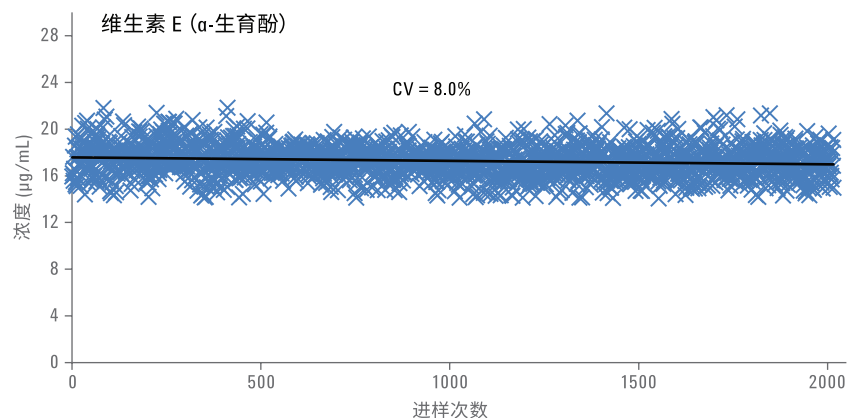


图 4. 维生素 E 连续进样重现性评估

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2014

2014年11月7日，中国出版

5991-5293CHCN



**Agilent Technologies**