

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.01.014

高效液相色谱荧光及二极管阵列检测器检测血清中维生素 A、E 的方法学比较

贾永娟, 刘杏立, 雒琴, 王小兰, 倪君君[△]

北京和合医学诊断技术股份有限公司, 北京 100011

摘要:目的 研究高效液相色谱荧光检测器(FLD)和二极管阵列检测器(DAD)检测人血清中维生素 A 和维生素 E 方法学的差异性。方法 建立了 FLD 和 DAD 检测人血清中维生素 A 和维生素 E 水平的方法, 从线性关系、精密度、准确度等方面研究二者的差异, 并使用建立的方法对 16 份临床标本进行检测, 考察方法的一致性和相关性。结果 FLD 检测法的线性方程线性相关系数为 0.999 7~0.999 8, 精密度的相对标准偏差为 0.18%~1.19%, 回收率为 89.9%~104.7%; DAD 检测法的线性方程线性相关系数为 0.999 2~0.999 8, 精密度的相对标准偏差为 0.49%~0.91%, 回收率为 91.7%~103.2%; 16 份临床标本的检测结果显示: VA、VE 水平差值的 95% 在 $\bar{x} \pm 1.96s$ 的一致性界限内, $P=0.49 > 0.05$, 表明二者差异无统计学意义。结论 FLD 和 DAD 两种检测器检测人血清中维生素 A 和维生素 E, 均满足方法学要求, 二者对临床标本的检测结果无差异。

关键词: 维生素 A; 维生素 E; 荧光检测器; 二极管阵列检测器

中图分类号: R446.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)01-0052-04

Methodological comparison between high performance liquid chromatography fluorescence and diode array detector for determination of serum vitamin A and E

JIA Yongjuan, LIU Xingli, LUO Qin, WANG Xiaolan, NI Junjun[△]

Beijing Harmony Health Medical Diagnostics Co., Ltd., Beijing 100011, China

Abstract: Objective To study the differences in the methodologies between high performance liquid chromatography fluorescence (FLD) and diode array detector (DAD) for the determination of serum vitamin A and E. **Methods** The methods of high performance liquid chromatography FLD and DAD for the determination of serum vitamin A and E were established. The differences in the aspects of linear relation, precision and accuracy between the two methods were studied. Sixteen clinical samples were detected by the established methods. The consistency and correlation of the methods were investigated. **Results** The linear correlation coefficient of linear equation by the FLD detection method was 0.999 7—0.999 8, the relative standard deviation of precision was 0.18%—1.19%, the recovery rate was 89.9%—104.7%; the linear correlation coefficient of linear equation by the DAD detection method was 0.999 2—0.999 8, the relative standard deviation of precision was 0.49%—0.91%, and the recovery rate was 91.7%—103.2%; the detection results of 16 clinical samples showed that 95% of the difference value in vitamin A and E concentration were within the consistency limit of $\bar{x} \pm 1.96s$, $P=0.49 > 0.05$, indicating that the difference between the two methods had no statistical significance. **Conclusion** The two methods of FLD and DAD for detecting human serum vitamin A and E meet the methodological requirements, and there is no difference in the detection results of clinical samples.

Key words: vitamin A; vitamin E; fluorescence detector; diode array detector

维生素 A(VA)和维生素 E(VE)都属于脂溶性维生素,是维持人体正常生理功能所必需的营养物质,且不能在人体内合成,需从食物中获取^[1-2]。VA 具有促进生长发育、增强抵抗力、预防夜盲症以及癌症等作用,且对骨骼牙齿的发育和皮肤的光滑程度有着重要影响^[3]; VE 具有抗衰老、护肤以及抑制肿瘤等功

效,并对习惯性流产、动脉粥样硬化等起到预防作用^[4]。但是体内 VA、VE 水平过高或过低均不利于身体健康^[5-6]。因此,开发用于检测血清中 VA、VE 水平的快速、高效的方法对及时调节体内 VA、VE 水平是十分必要的。

近年来,VA、VE 的检测方法主要有分光光度

作者简介:贾永娟,女,硕士,主要从事临床检测的研究。 [△] 通信作者, E-mail: nijnun@labhh.com。

本文引用格式:贾永娟,刘杏立,雒琴,等. 高效液相色谱荧光及二极管阵列检测器检测血清中维生素 A、E 的方法学比较[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(1): 52-55.

法^[7]、气相色谱法^[8]、液相色谱法^[1,9-10]和质谱法^[11-12]等。其中,高效液相色谱法以灵敏度高、操作简单、设备便宜易推广的优势已成为检测 VA、VE 的主要方法。高效液相色谱法检测又分为二极管阵列检测器(DAD)检测法和荧光检测器(FLD)检测法,但是鲜有报道对两种方法进行详细对比。本研究分别用这两种检测器(DAD、FLD)对血清中的 VA、VE 进行检测,并在线性关系、精密度、准确度等方面进行比较,结果发现两种检测器均适用于检测人血清中 VA、VE 水平,检测结果无明显差异,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器 高效液相色谱仪、荧光检测器、二极管阵列检测器(日本岛津仪器有限公司),紫外分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司],多管涡旋混合器(北京踏锦科技有限公司),离心机(Sigma 公司),氮气吹扫仪(杭州奥盛仪器股份有限公司)。

1.2 试剂 VA、VE 标准品(Sigma 公司),VA、VE 乙酯(Sigma 公司),蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司),无水乙醇(天津市光复精细化工研究所),正己烷(北京颐丰天成科技有限公司),甲醇(默克股份有限公司)。

1.3 色谱条件 荧光检测器的色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8 (2.1 mm×50.0 mm, 5 μm),流动相为甲醇/水,流速 1 mL/min。荧光检测器检测 VA 和 VE 的激发和发射波长分别为 325、294 nm 和 470、328 nm。二极管检测器的色谱柱为 Waters SunFire™ C18 (2.1 mm×100.0 mm, 3.5 μm),流动相为甲醇/水,流速 0.3 mL/min,检测 VA 和 VE 的波长分别为 325 nm 和 292 nm。

1.4 血清标本预处理 将 100 μL 血清及其内标溶液置于 1.5 mL 的离心管中,加入 100 μL 蒸馏水稀释,涡旋;再依次加入无水乙醇、正己烷,涡旋,离心;取上清液并吹干,加入 100 μL 甲醇复溶,涡旋溶解;放入棕色瓶中备用。

1.5 方法学比较

1.5.1 线性关系 配制系列水平的 VA 和 VE 标准品溶液,分别用 FLD 和 DAD 进行色谱分析,建立标准曲线。

1.5.2 精密度 取适量配制好的供试品溶液,连续进样 6 次,再分别用 DAD 和 FLD 进行检测分析。

1.5.3 回收率 在血清标本中添加 3 种水平(VA 0.125、0.5、2.0 mg/L,VE 1.25、5.0、20.0 mg/L)的标准溶液(简称加标),按照血清标本预处理步骤进行回收试验,空白对照标本及每个水平加标标本重复 3 次,并分别用 FLD 和 DAD 进行检测。

1.5.4 残留 取高水平的供试品溶液,用 FLD 和 DAD 进行检测分析;分析结束后,再对一份空白溶剂(甲醇)进行检测。

1.5.5 DAD 和 FLD 的一致性和相关性 取正常 16

份血清进行预处理制备供试品溶液,并用 FLD 和 DAD 进行检测,采用 Medcalc18.5 统计学软件,使用 Bland-Altman 点图法分析 FLD、DAD 两种检测方法的一致性;Passing-Bablok 回归法分析相关性。

1.6 统计学处理 采用 Medcalc18.5 统计学软件,使用 Bland-Altman 点图法分析 FLD、DAD 两种检测方法的一致性;Passing-Bablok 回归法分析相关性。

2 结果

2.1 线性关系 建立的标准曲线结果如表 1 所示,线性相关系数(*r*)在 0.999 以上。

表 1 FLD 和 DAD 检测血清中 VA、VE 的线性方程

方法	分析物	线性方程	<i>r</i>	保留时间 (min)	线性范围 (mg/L)
FLD	VA	$Y=2.9200X-0.0004$	0.9998	0.546	0.056~3.600
	VE	$Y=2.41676X+0.1299$	0.9997	2.128	0.560~36.000
DAD	VA	$Y=11.1537X+0.0059$	0.9992	2.394	0.056~3.600
	VE	$Y=43.7860X+0.0019$	0.9998	8.879	0.560~36.000

2.2 精密度 供试品溶液连续进样 6 次,结果如表 2 所示:FLD、DAD 检测时,VA 的相对标准偏差(RSD)为 0.18%、0.91%;VE 的 RSD 为 1.19%、0.49%。

表 2 FLD 和 DAD 检测血清中 VA、VE 的精密度

方法	分析物	测定值(mg/L)	RSD(%)
FLD	VA	0.573,0.574,0.575,0.572,0.573,0.573	0.18
	VE	13.623,13.566,13.907,13.618,13.879,13.910	1.19
DAD	VA	0.600,0.610,0.610,0.610,0.600,0.600	0.91
	VE	14.830,14.780,14.710,14.790,14.690,14.640	0.49

2.3 回收率 空白标本和 3 种加标水平标本的检测结果如表 3 所示:FLD 检测法的回收率为 89.9%~104.7%,RSD≤3.60%;DAD 检测法的回收率为 91.7%~103.2%,RSD≤2.91%。

表 3 FLD 和 DAD 检测 VA、VE 的加标回收分析

方法	分析物	加标水平 (mg/L)	测定水平 (mg/L)	回收率 (%)	RSD(%) (n=3)
FLD	VA	0	0.108	—	—
		0.125	0.220	89.9	2.36
		0.5	0.604	99.1	1.72
	VE	2.0	2.112	100.2	1.77
		0	2.540	—	—
		1.25	3.796	100.5	0.60
DAD	VA	5.0	7.665	102.5	0.67
		20.0	23.480	104.7	3.60
		0	0.098	—	—
	VE	0.125	0.213	91.7	1.33
		0.5	0.594	99.2	1.71
		2.0	2.104	100.3	1.71

续表 3 FLD 和 DAD 检测 VA、VE 的加标回收分析结果

方法	分析物	加标水平 (mg/L)	测定水平 (mg/L)	回收率 (%)	RSD (%) (n=3)
	VE	0	2.530	—	—
		1.25	3.786	100.5	0.60
		5.0	7.425	97.9	0.62
		20.0	23.170	103.2	2.91

注：—表示无数据。

2.4 残留 残留的考察结果显示,目标分析物在色谱图的相应保留时间处均未出现目标峰。

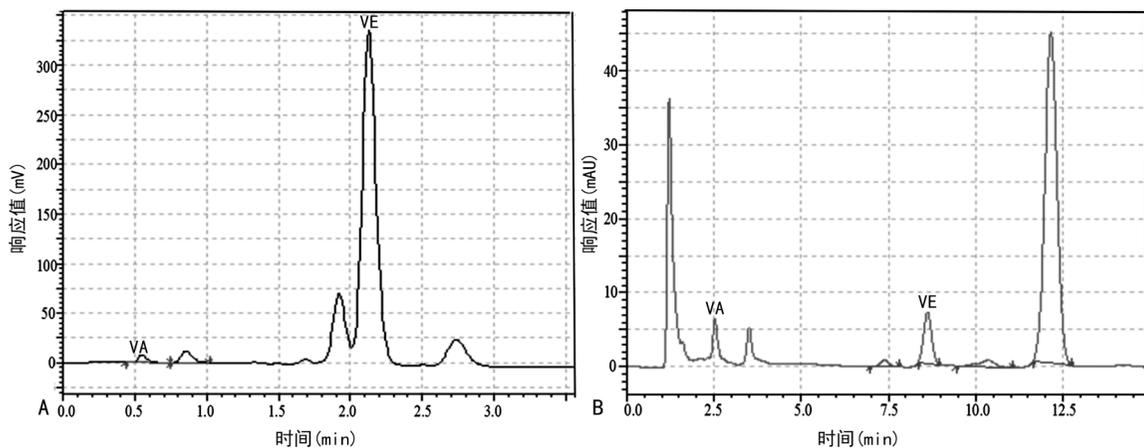
2.5 DAD 和 FLD 的一致性和相关性 FLD 和 DAD 检测 16 份血清中 VA、VE 水平的实验数据见表 4,色谱图见图 1。Bland-Altman 点图法分析结果如图 2 和图 3 所示,VA、VE 水平差值的 95% 分别在差值的 $\bar{x} \pm 1.96s$ 的一致性界限内。

Passing-Bablok 回归法分析结果如图 2 和图 3: VA 的回归直线方程为 $Y = -0.006723 + 0.9702X$,斜率 B 为 0.9702 (95% CI: 0.9135 ~ 1.0453),截距 A 为 -0.006723 (95% CI: -0.04205 ~ 0.02616), $P = 0.49$ 。VE 的回归直线方程为 $Y = -0.4896 + 0.9924X$,斜率 B 为 0.9924 (95% CI: 0.9401 ~ 1.0495),截距 A 为 -0.4896

(95% CI: -1.3295 ~ 0.2031), $P = 0.49$ 。由此结果可得:VA、VE 回归直线的斜率 95% CI 均包含 1,截距的 95% CI 均包含 0, $P > 0.05$ 。

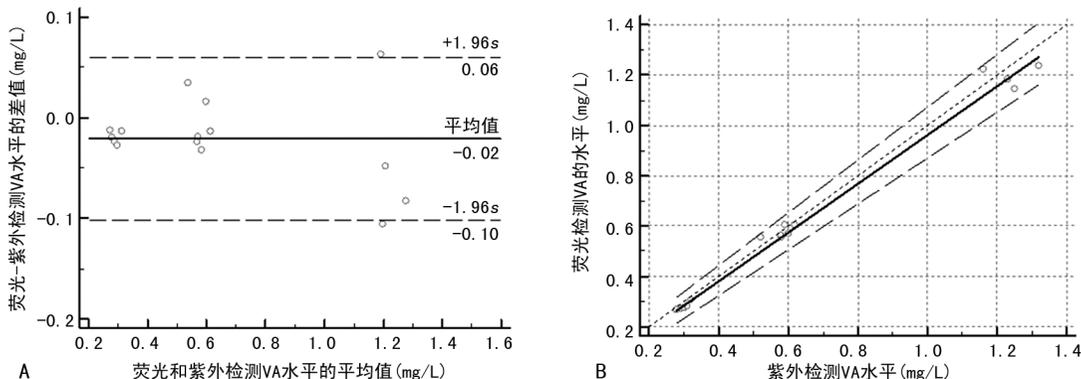
表 4 FLD 和 DAD 检测 16 份血清中 VA、VE 水平的实验数据 (mg/L)

项目	FLD		DAD	
	VA	VE	VA	VE
样品 1	0.270	8.438	0.290	8.980
样品 2	0.306	8.938	0.320	9.980
样品 3	0.276	9.706	0.300	9.390
样品 4	0.282	8.671	0.310	9.750
样品 5	0.267	8.387	0.280	8.920
样品 6	0.606	14.352	0.590	14.830
样品 7	0.556	13.220	0.580	13.790
样品 8	0.606	14.043	0.620	14.960
样品 9	0.561	13.533	0.580	14.130
样品 10	0.554	13.692	0.520	14.990
样品 11	0.568	13.825	0.600	14.490
样品 12	1.182	29.848	1.230	29.440
样品 13	1.144	28.724	1.250	29.620
样品 14	1.237	29.988	1.320	31.820
样品 15	1.223	29.010	1.160	29.420
样品 16	0.270	8.438	0.290	8.980



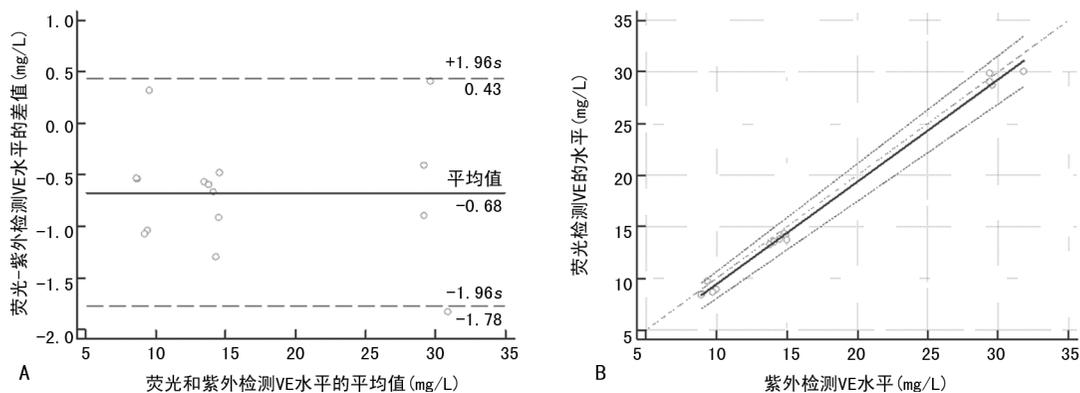
注:A 为 FLD 图,B 为 DAD 图。

图 1 FLD 和 DAD 检测 VA、VE 水平色谱图



注:A 为 Bland Altman 点图,B 为 Passing-Bablok 图。

图 2 FLD 和 DAD 检测血清中 VA 的一致性和相关性分析图



注:A为Bland Altman点图,B为Passing-Bablok图。

图3 FLD和DAD检测血清中VE的一致性和相关性分析图

3 讨 论

VA、VE作为重要的脂溶性维生素,是人体所必需的微量营养物质。正常情况下,健康人群血清中VA水平为0.30~0.36 mg/L,VE水平为5.0~20.0 mg/L,儿童血清中的VE水平稍低,平均为(5.3±1.3)mg/L^[4]。近年来,越来越多的研究表明,VA的缺乏和水平降低会增加婴幼儿常见哮喘性疾病发生的风险^[13];VA、VE水平对孕妇和胎儿的健康起着至关重要的影响^[14]。因此,人体内VA、VE水平的检测对预防婴幼儿疾病以及孕妇的营养指导等具有一定的临床意义。

目前,VA、VE的检测方法已有10余种。比色法:通过显色反应定量,简单、快速,但显色不稳定且干扰大,现已不常用;分光光度法:作为过去常用的方法,成本低、设备简单、易推广,但只能测定总含量,不能定量各同分异构体及其同系物,选择性差;荧光法:根据荧光强度定量,特异性强、干扰少、灵敏快速简单,但测定值与总VE值有偏差,更适用于检测以 α -VE为主体的标本;电化学法、色谱法:快速、灵敏、高效,现已成为常用的分析手段。而色谱法中的高效液相色谱法已成为VA、VE检测的主流,其突出特点:(1)快速、高效,可同时分离包括同分异构体在内的多种化合物;(2)灵敏、特异性强,可用FLD、DAD等;(3)操作简单、快速。

因此,本文建立了高效液相色谱法对血清中的VA、VE水平进行检测,并将高效液相色谱法的FLD和DAD进行了对比,结果显示:在考察范围内,FLD和DAD的检测结果均呈现出良好的线性关系,且表现出良好的精密度以及良好的相关性和一致性。所以两种高效液相色谱法均适用于检测血清中VA、VE水平。然而,从检测色谱图中可以看出,FLD比DAD分析时间短、专属性强、基质干扰较少。因此,FLD更能满足临床标本周期短、批量检测的要求,且节能、高效。

参考文献

[1] 张小敏,王洁,王淑静,等. DLPME-HPLC法同时测定人

血清中维生素A和维生素E含量[J]. 医学信息,2019,32(20):161-163.

[2] 王雪,闫素梅. 维生素A对动物脂类代谢的调节作用与机制[J]. 动物营养学报,2017,29(5):1462-1468.

[3] 王世龙. 高效液相色谱-多波长荧光检测法同时检测多维生素片中维生素A和维生素E的含量[J]. 食品与药品,2018,20(6):55-58.

[4] 刁娟娟,田兰,孙炜,等. 高效液相色谱法测定人血清中维生素A、E、C的含量[J]. 化学通报,2010,73(9):826-831.

[5] 李东,蒋淑梅,汪静,等. 血脂代谢指标及血清维生素A、E水平与子痫前期的相关性分析[J]. 现代生物医学进展,2018,18(17):3332-3335.

[6] 马为民,林小虎,马卫东,等. 色谱法在国内维生素E测定中的应用研究进展[J]. 图书情报导刊,2009,19(4):157-160.

[7] 祝海珍. 三氯化铋分光光度法测定动物肝脏中维生素A含量[J]. 现代食品,2017(19):77-81.

[8] 宫旭,冯有龙,曹玲. 气相色谱法测定维生素EC咀嚼片中维生素E含量的不确定度[J]. 中南药学,2019,17(10):1681-1684.

[9] MORTEZA H G, KATRIN B, STEPHANE E, et al. Technical note: rapid field test for the quantification of vitamin E, β -carotene, and vitamin A in whole blood and plasma of dairy cattle[J]. J Dairy Sci, 2019, 102(12):11744-11750.

[10] FATEMEH S, ALI S, HADI V, et al. A fast and simple method for determination of vitamin E in infant formula by dispersive liquid-liquid microextraction combined with HPLC-UV[J]. Food Anal Method, 2019, 12(1):23-31.

[11] 李金蓉,阮亮亮,杨文初. 液质联用定量血清中维生素D、A、E的方法[J]. 国际检验医学杂志,2019,40(7):876-881.

[12] 刘海培,姜小梅,韩文念,等. 人体血清中3种脂溶性维生素的液相色谱-串联质谱分析方法研究[J]. 分析测试学报,2019,38(6):728-733.

[13] 黄从付,李秀云,熊升华,等. 婴幼儿常见喘息性疾病与维生素A、E的关系探讨[J]. 现代医院,2019,19(1):74-76.

[14] 贾军恒. 不同孕期妇女血清维生素A、维生素E水平的临床观察[J]. 中国妇幼保健,2019,34(3):509-511.