

反相高效液相色谱法同时测定血清中维生素 A, D₃, E

邵裕坤, 徐军, 王珏 (浙江大学医学院附属儿童医院, 浙江 杭州 310003)

摘要:目的 建立 RP-HPLC 法测定血清中脂溶性维生素 A, D₃, E 的含量。方法 血清经甲醇沉淀蛋白后, 以正己烷提取, 经氮气吹干, 甲醇定容后进样分析。色谱柱: Hypersil ODS 5 μ m, 250 $\times$ 4.0mm; 流动相: 甲醇-异丙醇 (95:5, v/v); 流速: 1mL/min; 检测波长: 维生素 A 325nm, 维生素 D₃ 265nm, 维生素 E 292nm; 柱温: 25 $^{\circ}$ C。结果 三种维生素的提取回收率均大于 85%, 方法回收率均大于 90%; 日内、日间相对标准偏差均小于 7%。线性范围: 维生素 A 0.2~2.0 μ g/mL ($r=0.9987$), 维生素 D₃ 40~400ng/mL ($r=0.9994$), 维生素 E 4.0~30.0 μ g/mL ($r=0.9988$)。结论 本法操作快速、灵敏、简便易行。

关键词: 维生素 A; 维生素 D₃; 维生素 E; 高效液相色谱法; 血清

中图分类号: R917.793.1

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2005)06-0503-03

Simultaneous determination of retinol, cholecalciferol and α -tocopherol concentration in human serum by RP-HPLC

SHAO Yu-kun, XU Jun, WANG Jue (*The Children's Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an RP-HPLC assay for the determination of retinol, cholecalciferol and α -tocopherol in human serum. **METHODS** The serum sample was extracted with n-hexane after being deproteinized with methanol. The n-hexane solution was evaporated to dryness under a flow of nitrogen at room temperature. The residue was redissolved in methanol, and the solution was determined by RP-HPLC. Retinol, cholecalciferol and α -tocopherol was separated on Hypersil ODS 5 μ m, 250 $\times$ 4.0mm column and detected at 325nm, 265nm and 292nm by using methanol:isopropanol (95:5, v/v) as mobile phase when the column temperature was 25 $^{\circ}$ C. **RESULTS** The ranges of calibration curves of retinol, cholecalciferol and α -tocopherol were 0.2~2.0 μ g/mL ($r=0.9987$), 40~400ng/mL ($r=0.9994$) and 4.0~30.0 μ g/mL ($r=0.9988$) respectively. The extracted recovery of retinol, cholecalciferol and α -tocopherol were more than 85%, and the method recovery were more than 90%. RSD of intra-day and inter-day were less than 7%.

CONCLUSION The method is simple, rapid and sensitive.

KEY WORDS: retinol; cholecalciferol; α -tocopherol; HPLC; serum

维生素 A, D, E 是机体维持正常代谢和机能所必需的脂溶性维生素, 对儿童生长发育尤为重要。近年来, 临床上对其营养价值的评价愈来愈受到重视, 并研究其与某些疾病的关系^[1-3], 故测定其在血中的浓度具有现实意义。近年国内有报道采用 RP-HPLC 法同时测定血中维生素 A, E^[3,4]; 维生素 A, D^[5]; 维生素 A, E, β -胡萝卜素^[6]。国外报道^[7,8]的方法设备要求较高, 采用同一波长测定使得非最大吸收且含量较低的组分检测信号不强; 而同时测定血中维生素 A, D₃, E 的方法, 国内外尚未见报道。笔者参照文献, 根据实验室的条件建立了 RP-HPLC 法测定血中脂溶性维生素 A, D₃, E 含量的方法, 为流行病学研究、临床诊断、合理用药及某些疾病的相关性研究提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

HP1100 系列高效液相色谱仪, 包括四元梯度泵, 智能温控柱室, 二极管阵列检测器。H-84 微型混合器 (江苏水泗实验设备厂)。

1.2 对照品

维生素 A (all trans-retinol, R-7632, Sigma), 维生素 D₃ (cholecalciferol, C-9756, Sigma), 维生素 E (α -tocopherol, T-3634, Sigma)。

1.3 试剂

甲醇 (HPLC, LOT901032, Tedia company, Inc.), 异丙醇 (HPLC, 990330, 上海化学试剂研究所), 正己烷 (AR, 990302, 杭州炼油厂), 氯仿 (AR, 981015, 浙江迪尔药业有限公司), 氮气纯度 99.99%。

2 方法与结果

2.1 标准溶液的配制

储备液: 精确称取对照品维生素 A, D₃ 适量, 用甲醇溶解使浓度分别为 2.1mg/mL, 维生素 E 适量用氯仿溶解使浓度为 2mg/mL, 储存于冰箱中 ($<0^{\circ}$ C)。工作液: 用甲醇稀释维生素 A、D₃、E 储备液, 使浓度分别为 20, 5, 200 μ g/mL。混合对照液: 测定前精密吸取一定量的上述三种工作液, 混合, 并用甲醇稀释, 使浓度分别为维生素 A: 0.125, 0.250, 0.500, 0.750, 1.000, 1.250, 1.875 μ g/mL; 维生素 D₃: 12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 150.0, 200.0, 250.0ng/mL; 维生素 E: 1.25,

2.50,5.00,7.50,10.00,12.50,18.75μg/mL。

2.2 色谱条件

色谱柱: Hypersil ODS 5μm, 250mm × 4mm; 保护柱: Li-chrospher 100 RP-18 5μm, 4mm × 4mm; 流动相: 甲醇-异丙醇 (95: 5, v/v); 流速: 1mL/min; 检测波长: 维生素 A 325nm, 维生素 D₃ 265nm, 维生素 E 292nm; 柱温: 25℃。进样量 20μL。

2.3 测定方法

取血清 0.5mL 置试管中, 加入甲醇 0.8mL, 正己烷 1.0 mL, 旋涡振荡 1min, 2 500r/min 离心 3min, 吸取正己烷液, 用氮气吹干, 残渣加甲醇 0.2mL 溶解, 取 20μL 按上述色谱条件进样分析, 血中杂质不干扰检测; 维生素 A, 维生素 D₃, 维生素 E 的保留时间分别为 3.1, 5.7, 6.3min; 理论塔板数分别为 7 826, 8 716, 8 565。

2.4 线性范围和灵敏度试验

取混合血清 0.5mL, 加入上述不同浓度的混合对照液 0.8mL, 按“2.3 测定方法”项下操作, 并以混合血清 0.5mL 作本底同法操作, 用外标法按峰面积定量, 以浓度对峰面积进行线性回归。线性范围: 维生素 A 0.2 ~ 2.0μg/mL ($r = 0.9987$), 维生素 D₃ 40 ~ 400ng/mL ($r = 0.9994$), 维生素 E 4.0 ~ 30.0μg/mL ($r = 0.9988$)。维生素 A、D₃ 和 E 的最低检测量分别为 0.2, 0.2, 4.0ng ($S/N \geq 5$)。

表2 重复性试验结果 (n = 5)

Tab 2 The results of repeatability test (n = 5)

对照品加入量 (mL ⁻¹)		日 内		日 间	
		$\bar{x} \pm s$	RSD (%)	$\bar{x} \pm s$	RSD (%)
Vit A (μg)	0.4	0.3928 ± 0.0144	3.7	0.3948 ± 0.0256	6.5
	1.2	1.1880 ± 0.0420	3.5	1.1796 ± 0.0492	4.2
	2.0	2.0362 ± 0.0577	2.8	1.9960 ± 0.0804	4.0
Vit D ₃ (ng)	40.0	37.1203 ± 1.9205	5.2	36.2812 ± 2.0043	5.5
	160.0	162.8816 ± 2.7217	1.7	160.1617 ± 7.0405	4.4
	320.0	311.6821 ± 9.9204	3.2	311.3622 ± 10.5616	3.4
Vit E (μg)	4.0	4.0634 ± 0.1726	4.2	4.0014 ± 0.1962	4.9
	12.0	11.7642 ± 0.2757	2.3	11.9520 ± 0.4561	3.8
	20.0	19.9236 ± 0.4813	2.4	20.1803 ± 0.8815	4.4

2.6 样本测定结果

按“2.3 测定方法”项下操作, 共测定了 30 个样本, 结果分别为维生素 A (0.77 ± 0.11) μg/mL, 维生素 D₃ (25.26 ± 15.34) ng/mL, 维生素 E (7.12 ± 1.69) μg/mL。

3 讨论

3.1 流动相的选择

实验过程中先后用甲醇、水、乙腈和异丙醇以不同组合及不同配比进行了多次试验, 最终确定以甲醇-异丙醇 (95: 5, V/V) 作为流动相; 结果表明, 该流动相对各组分的分离及排除杂质干扰等均较理想。

3.2 血样处理方法的选择

3.2.1 固相提取方法操作简便, 选择合适的洗脱剂可有效地去除不同极性的杂质, 因此实验中曾试用固相提取来处理血样。由于目标组分在 SPE 柱上保留很少, 提取回收率太低, 对低浓度组分的检出无法达到预期结果; 最后选择了用正己烷进行液-液萃取, 血中杂质不影响被测组分的检出, 同

2.5 回收试验和重复性试验

取混合血清 0.5mL 作为本底, 加入不同浓度的混合对照液 0.8mL, 按“2.3 测定方法”项下操作。另取混合血清 0.5 mL, 加入不同浓度的混合对照液 0.8mL, 相对于混合血清中维生素 A 增量为 0, 0.4, 1.2, 2.0μg/mL, 维生素 D₃ 增量为 0, 40.0, 160.0, 320.0ng/mL, 维生素 E 增量为 0, 4.0, 12.0, 20.0 μg/mL, 每种浓度 5 份, 按“2.3 测定方法”项下操作; 三种维生素各个浓度的提取回收率均大于 85%, 方法回收率均大于 90%, 结果见表 1, 表 2。

表1 提取回收率与方法回收率试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab 1 The extract recovery and assay recovery ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

对照品加入量 (mL ⁻¹)	提取回收率 (%)	方法回收率 (%)
Vit A (μg)	0.4 85.8 ± 4.5	98.2 ± 3.6
	1.2 93.2 ± 2.6	99.0 ± 3.5
	2.0 93.2 ± 2.3	101.8 ± 2.9
Vit D ₃ (ng)	40.0 87.6 ± 4.2	92.8 ± 4.8
	160.0 101.4 ± 3.0	101.8 ± 1.7
	320.0 101.0 ± 3.0	97.4 ± 3.1
Vit E (μg)	4.0 97.5 ± 1.3	101.5 ± 4.3
	12.0 100.2 ± 5.9	98.0 ± 2.3
	20.0 100.9 ± 4.4	99.6 ± 2.4

时获得了较高且稳定的提取回收率。

3.2.2 蛋白沉淀剂的选择 实验中采用 10% 三氯乙酸溶液和甲醇进行对比, 结果表明 10% 三氯乙酸溶液在最大程度沉淀蛋白的同时也对目标组分产生较大的干扰和破坏, 使测定值明显偏低, 而甲醇能取得满意效果。

3.3 维生素 D₃, E 的提取回收率偏高, 可能与旋涡振荡较剧烈, 导致非专一性生物成分也被提取, 引起分析信号增强有关。维生素 A, E 易被氧化, 操作中应避光; 正己烷提取液用氮气吹干后所测样本值明显比空气吹干的要高, 且较稳定。

3.4 维生素 A, D₃, E 的最大吸收波长分别在 325, 265, 292nm; 因此本实验采用三组分各自的最大吸收波长同时检测, 快速灵敏, 操作简便, 相互间不产生干扰。

参考文献

[1] 李荣, 赵正言. 维生素 A 对铁代谢和免疫功能的影响[J]. 浙江预防医学, 2001, 13(3): 49.

- [2] 段秀芳,耿银,唐君. 小儿反复呼吸道感染与维生素 D 缺乏亚临床状态的关系[J]. 山东医药,2001,41(24):40.
- [3] 郑兴华,彭维林. 幼儿腹泻血清维生素 A、维生素 E 含量研究[J]. 福建医药杂志,2001,23(4):18.
- [4] 侯晓清,曾红,何宏妹,等. RP-HPLC 同时测定人血清中维生素 A 和维生素 E[J]. 中国药学杂志,1997,32(1):28.
- [5] 涂文升,刘宗河. 儿童血清中维生素 A、D 的高效液相色谱测定[J]. 广西预防医学,2000,6(6):365.
- [6] 仲齐庆,季宏高,吴杰. 反向高效液相色谱法同时测定人血中脂溶性维生素[J]. 南通医学院学报,1997,17(4):574.
- [7] Miller KW, Lorr NA, Yang CS. Simultaneous determination of plasma retinol, α -tocopherol, lycopene, α -carotene and β -carotene by high-performance liquid chromatography[J]. Analytical Biochemistry, 1984, 138:340.
- [8] Ortiz-Boyer F, Fernandez-Romero JM, Luque-de-Castro, MD, *et al.* Determination of vitamin D₂, D₃, K₁ and K₃ and some hydroxy metabolites of vitamin D₃ in plasma using a continuous clean-up-preconcentration procedure coupled on-line with liquid chromatography-UV detection[J]. Analyst, 1999, 124(3):401.

收稿日期:2004-07-08