

# DLPME-HPLC 同时测定微量人血清中的维生素 A 和 E

郑凤家<sup>1</sup> 别明江<sup>2</sup> 孙成均<sup>1\*</sup>

1. 四川大学华西公共卫生学院, 成都 610041;
2. 四川大学华西第四附属医院检验科, 成都, 610041

**摘要:** [目的]建立了人血清中维生素 A 和 E 的分散液相微萃取 (dispersive liquid phase microextraction, DLPME) - 高效液相色谱分析方法。[方法]取血清 20 $\mu$ l, 加入 50 $\mu$ l 甲醇, 漩涡震荡 10s 后加 50 $\mu$ l 三氯甲烷超声萃取, 高速离心后吸取下层三氯甲烷层供高效液相色谱分析, 标准曲线法定量。色谱分析条件为: 色谱柱为 Eclipse XDB - C<sub>8</sub> (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5 $\mu$ m); 流动相为甲醇-水 (96+4); 流速为 0.80 ml/min; 柱温为 25 $^{\circ}$ C; 紫外检测波长: 维生素 A 为 325nm, 维生素 E 为 292nm。[结果]维生素 A 和 E 标准曲线的相关系数均大于 0.999; 相对标准偏差均小于 5%。对于 20 $\mu$ l 血清, 本法的检出限维生素 A 为 0.035 $\mu$ g/ml; 维生素 E 为 0.09 $\mu$ g/ml。维生素 A 和 E 的加标回收率分别为 90.4%~103.2%和 81.0%~92.1%。[结论] 本法灵敏、准确、快速、简便, 节约有机溶剂, 适合于血清中维生素 A 和 E 的快速测定, 是环境友好型的绿色分析方法。

**关键词:** 分散液相微萃取; 维生素 A; 维生素 E; 高效液相色谱; 血清

## Simultaneous determination of vitamin A and E in microamount of human serum by dispersive liquid phase micro-extraction – high performance liquid chromatography

ZHENG Fengjia, BIE Mingjiang, SUN Chengjun\*

West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China

**Abstract:** [Objective] To establish a dispersive liquid phase microextraction - high performance liquid chromatography for simultaneous determination of vitamin A and E in microamount of human serum. [Method] Twenty microliter of human serum was taken and 50 $\mu$ l methanol added to precipitate the protein, and 50 $\mu$ l chloroform added to extract vitamin A and E ultrasonically. After centrifuged at 12000rpm for 5 min, the lower chloroform layer was taken and injected for HPLC analysis. The optimized chromatographic conditions were as follows: analytical column: (Eclipse XDB-C<sub>8</sub>, 150 mm  $\times$  4.6 mm, 5 $\mu$ m); mobile phase: methanol-water (96+4); flow rate: 0.80 ml/min; column temperature: 25 $^{\circ}$ C; detection wavelength: 325nm for vitamin A and 292nm for vitamin E, respectively. [Results] The correlation coefficients for the standard curves were greater than 0.999 for both vitamin A and E; the detection limits of the method were 0.035 $\mu$ g/ml for vitamin A and 0.09 $\mu$ g/ml for vitamin E. The recoveries of vitamin A and E in human serum ranged from 90.4%~103.2% and 81.0%~92.1%, respectively. [Conclusion] The method is sensitive, accurate, rapid, simple, and suitable for the determination of vitamins A and E in microamount of human serum.

**Key words :** Dispersive liquid phase microextraction; Vitamin A; Vitamin E; Human Serum; High performance liquid chromatography

---

\*通讯联系人: 孙成均, 教授。E-mail: sunchj2005@yahoo.com.cn

维生素 A 和维生素 E 是维持机体正常生长的必需脂溶性维生素。目前, 国内外测定血清<sup>[1]</sup> 和全血<sup>[2]</sup> 中维生素 A 和 E 的方法很多。这些方法中的前处理技术有液-液萃取<sup>[1]</sup>、固相萃取<sup>[3]</sup>、浊点萃取<sup>[4]</sup> 等等。这些前处理技术有的繁琐耗时、需要较多有机溶剂, 且血清量需要量较大。整个样品分析过程中, 前处理过程所需的时间占整个分析时间的 2/3, 并可能产生 1/3 以上的误差<sup>[5]</sup>。分散液相微萃取 (dispersive liquid phase microextraction, DLPME) 技术首先见于 Rezaee 等<sup>[6-7]</sup> 的报道, 该法集萃取和浓缩于一体, 是一种操作简单、快速、成本低且对环境友好的样品前处理新技术。现在分散液相微萃取技术对生物样品和环境样品中的农药<sup>[8-10]</sup>、重金属<sup>[11-12]</sup> 等的提取报道很多, 但在血清中维生素 A 和 E 的测定中尚未见报道。

本文将该技术应用于萃取浓缩微量人血清中的维生素 A 和 E, 大大缩短了分析时间, 减少了样品和有机溶剂的用量, 降低了分析成本, 为分析人微量血清中维生素 A 和 E 的含量提供了快速、简便、准确、灵敏的方法, 在人群血清维生素 A 和 E 的快速检测中有很好的应用价值。

## 1. 实验部分

1.1. 仪器与试剂 高效液相色谱仪 (EX1600, 上海伍丰科学仪器有限公司), 带紫外检测器 (EX1600UV); C<sub>8</sub> 柱 (Eclipse XDB-C<sub>8</sub>, 4.6 mm × 15 cm, 5.0 μm), 同类型保护柱; WH-1 微型漩涡混合仪; 台式高速离心机 (Anke TGL-16B); 超声波清洗器 (KQ-250 型)。维生素 A (视黄醇) 标准品 (FLUKA, >99%); 维生素 E 标准品 (Sigma, >95%); 三氯甲烷 (色谱纯); 甲醇 (色谱纯); 维生素 A 标准储备液 (1mg/ml): 甲醇配制, 于 -20℃ 冰箱冷藏保存; 维生素 E 标准储备液 (2mg/ml): 甲醇配制, 于 -20℃ 冰箱冷藏保存; 维生素 A 和 E 混合标准应用液 (VA 1 μg/ml, VE 5 μg/ml): 测定前, 按文献<sup>[13]</sup> 方法对维生素 A 和维生素 E 标准储备液浓度进行标定, 再以其实际浓度用甲醇稀释成混合液。实验用水为 Millipore 超纯水 (18.2 MΩ·cm)。

## 1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件 流动相为甲醇-水 (96+4), 超声波脱气后使用; 流速: 0.8 ml/min; 柱温: 25℃; 波长切换程序: 0~5.0min, 325 nm, 5.0~10min, 292 nm。

1.2.2 标准曲线的绘制 在高效液相色谱仪基线达平直后, 分别进样 VA 和 VE

混合标准应用液 2.00、5.00、10.0、20.0 $\mu$ l (相当于 VA 2, 5, 10, 20ng, VE 10, 25, 50, 100 ng), 以保留时间定性, 记录各自峰面积。分别以 VA 和 VE 含量 (ng) 对峰面积线性回归。维生素 A 和 E 标准色谱图见图 1。

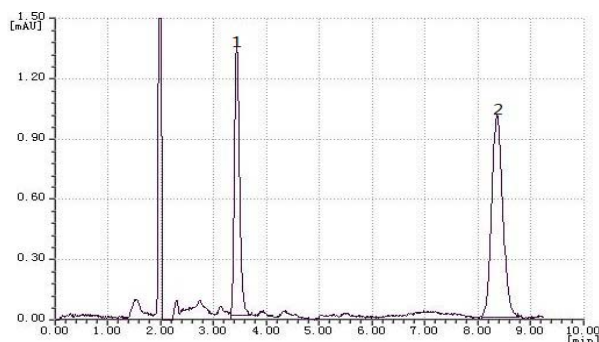


图 1 维生素 A 和 E 混合标准色谱图

Fig 1 The chromatogram of vitamins A and E standard solution

1. 维生素 A (Vitamin A, 3.8min) 2. 维生素 E (Vitamin E, 8.4min)

1.2.3 样品处理与测定 取新鲜人血清 20 $\mu$ l 于 200 $\mu$ l EP 管中, 加入 50 $\mu$ l 甲醇漩涡混匀 10s, 然后加入 50 $\mu$ l 三氯甲烷, 超声萃取 3min 后, 以 12000 r/min 离心 5min。用微量进样针伸入 EP 管底部取 10 $\mu$ l 萃取液进样分析, 样品图谱见图 2。

1.2.4 结果计算 根据样品图谱维生素 A 和 E 的峰面积, 通过回归方程计算进样液中维生素 A 和 E 的含量 (ng), 按下式计算血清中维生素 A 和 E 的浓度 ( $\mu$ g/ml)。

$$c = \frac{5a}{20} = \frac{a}{4}$$

式中:  $c$  为维生素 A 和 E 的浓度 ( $\mu$ g/ml),  $a$  为由回归方程计算的进样液中维生素 A 或 E 的含量 (ng)。

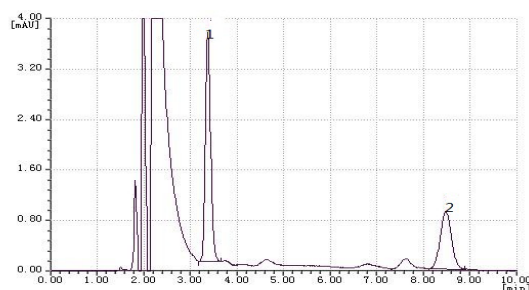


图 2 样品萃取后维生素 A 和 E 的色谱图

Fig 2 The chromatogram of a human serum sample

1. 维生素 A (Vitamin A, 3.8min) 2. 维生素 E (Vitamin E, 8.4min)

## 2 结果与讨论

### 2.1 液相微萃取条件的优化

2.1.1 液相萃取剂的选择 实验选取了三氯甲烷、二氯甲烷、正己烷3种有机溶剂进行萃取条件试验。试验结果表明,在相同条件下,三氯甲烷的萃取效率及其稳定性要高于二氯甲烷和正己烷,二氯甲烷尽管萃取效率高,但易挥发,结果不稳定,故本法选三氯甲烷作为液相微萃取剂。

2.1.2 三氯甲烷萃取剂体积的选择 实验选择了20 $\mu$ l、40 $\mu$ l、50 $\mu$ l在相同条件下萃取样品,当萃取剂体积为20和40 $\mu$ l时,萃取效率偏低,且不稳定,当萃取剂量达到50 $\mu$ l时,萃取效率达到分析要求,且实验结果稳定性好,因此选择三氯甲烷萃取剂的体积为50 $\mu$ l。

2.1.3 超声萃取时间的选择 分散液相微萃取是一个样品的富集平衡过程,需要一定的时间。实验研究了1min、3min、5min这三个时间点的超声萃取效果,3min时效果最佳,而1min时萃取效率过低,这可能与超声时间过短,尚未达到富集平衡有关。5min时实验结果不稳定,这可能和超声时间过长,萃取剂挥发损失以及维生素A和E部分分解有关。所以,本法选择超声萃取时间为3min。

### 2.2 方法性能指标

2.2.1 标准曲线和工作曲线 本法实验条件下,维生素A和E的线性范围远大于实验范围,考虑到本法主要用于微量血清中维生素A和E的测定,故未测定线性范围上限。在本实验线性范围内,维生素A的标准曲线方程为:  $A=677.8m+23.95$ , 相关系数 $r=0.9991$ ; 维生素E的标准曲线方程为:  $A=32.85m+70.5$ , 相关系数 $r=0.9999$ 。为了检验分散液相微萃取过程对标准系列的影响,在样品微萃取条件下对标准系列进行处理后再测定,结果所得维生素A的工作曲线方程为:  $A=605.31m+18.85$ , 相关系数 $r=0.9990$ ; 维生素E的工作曲线方程为:  $A=35.96m+60.8$ , 相关系数 $r=0.9990$ 。分别对维生素A和E的标准曲线和工作曲线的斜率进行t检验,得 $p>0.05$ ,即标准曲线和工作曲线的斜率无显著性差异,所以本法采用标准曲线法来计算样品中的维生素A和E的含量。

2.2.2 方法的检出限 以仪器基线的3倍噪声所对应的待测物在进样液的浓度为方法的检出限,以20 $\mu$ l血清,最终稀释至50 $\mu$ l,取10 $\mu$ l进样,计算出样品中维生素A和E的最低检出浓度为0.035 $\mu$ g/ml和0.09 $\mu$ g/ml。完全可满足实际样品测定

的要求。

2.2.3 方法的精密度 取6份同一血清,各20 $\mu$ l,按样品处理方法提取和测定,计算方法的精密度(表1)。由表1可见,本法维生素A和E测定值的相对标准偏差分别为7.78%和5.43%。

表 1 方法精密度实验结果 (n=6)

维生素	含量范围 (ng)	均值 (ng)	SD (ng)	RSD(%)
Vitamin A	1.84~2.11	1.93	0.15	7.78
Vitamin E	21.0~23.1	21.91	1.19	5.43

2.2.4 方法准确度实验 在3份相同样品中,分别加入不同量的标准溶液,再按本法处理和测定,根据加标前后测定值计算加标回收率,实验结果见表2。由表2可见,本法维生素A和E的加标回收率分别为90.4%~103.2%(平均为94.9%)和81.0%~92.1%(平均为86.6%)。

表 2 方法加标回收率

维生素	背景值 (ng)	加标量 (ng)	测定值 (ng)	回收率 (%)
Vitamin A	1.80	0.63	2.37	90.4
		1.26	3.10	103.2
		2.52	4.10	91.2
Vitamin E	21.0	8.77	28.1	81.0
		21.9	40.0	86.8
		43.8	61.3	92.1

2.2.5 样品测定 用本法测定了15名健康成人的血清,所测维生素A的含量范围为(0.56 $\pm$ 0.05) $\mu$ g/ml。维生素E的含量范围为(8.46 $\pm$ 0.57) $\mu$ g/ml,与相关文献的报道值一致。

3 结论 本文建立了分散液相微萃取-高效液相色谱法分析维生素A和E的方法,该法操作简便,大大缩短了分析时间,节约了试剂,是环境友好型的分析方法,在维生素A和E的快速检验中有着很好的推广应用价值。

### 参考文献

- [1] 徐军, 张慧芬, 邵裕坤, 等. 高效液相色谱法测定人血中脂溶性维生素的含量 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41 (2): 147-149
- [2] 胡艳, 王希希, 孙成均. 高效液相色谱法同时测定微量全血中维生素A和E [J]. 现

- 代预防医学, 2009, 36 (1) : 120-122
- [3] Chatzimichalakis P F, Samanidou V F, Papadoyannis I N. *Journal of Chromatography B*, 2004, 805 (2) : 289-296
- [4] Sirimanne S R, Patterson D G, Ma L, et al. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1998, 716 (1-2) : 129-137
- [5] 李攻科, 胡玉玲, 阮贵华. 样品前处理仪器与装置[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007
- [6] Rezaee M, Assadi Y, Milani Hosseini M R, et al. *Chromatography A*, 2006, 1116 (1-2) : 1
- [7] Li H, Lee H K. *Journal of Chromatography A*, 2002, 976(1~2): 377
- [8] Berijani S, Assadi Y, Anbia M, et al. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1123(1) : 1-9
- [9] Nagaraju D, Huang S D. *Journal of chromatography A*, 2007, 1161(1~2): 89-97
- [10] Zhou Q X, Bai H H, Xie G H, etc. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1177(1): 43-49
- [11] Jiang H M, Qin Y C, Hu B. *Talanta*, 2008, 74 (5) : 1160-1165
- [12] Farajzadeh M A, Bahram M, Mehr B G, et al. *Talanta*, 2008, 75 (3) : 832-840
- [13] GB / T5009.82-2003. 食品中维生素A 和维生素E 的测定.