

# Análise de Vitamina A e E no Soro como um Biomarcador de Distúrbios Clínicos:

## Quantificação de Vitamina A e E no Soro em 8 Segundos por Amostra Usando LDTD-MS/MS

Pierre Picard, Jean Lacoursière e Serge Auger

PhytroniX Technologies, Québec, Canadá

Palavras-chave: Alto rendimento, Vitamina, soro, LDTD-MS/MS

### Introdução

A vitamina A (Retinol) e E (Tocoferol) têm papéis importantes nas funções fisiológicas para manter uma boa saúde. Publicações científicas relatam sua potencial implicação em diferentes patologias causadas pelo estresse oxidativo. Seu papel como biomarcadores é avaliado. Para grandes estudos epidemiológicos, técnicas analíticas precisas e de alto rendimento são necessárias.

Nosso objetivo para esta nota de aplicação é utilizar um método automatizado de preparação de amostra para a quantificação de vitamina A e E no soro usando uma única operação em LDTD-MS/MS.

O LDTD-MS/MS oferece especificidade combinada com uma análise ultrarrápida para um método de quantificação incomparável. Para desenvolver esta aplicação, nos concentramos em realizar uma preparação de amostra rápida e simples. As vitaminas A e E foram analisadas e os resultados foram obtidos em menos de 8 segundos por amostra.

### Fonte de Ionização Luxon

O Luxon Ion Source® (Figura 1) é a segunda geração de introdução de amostra e fonte de ionização baseada na tecnologia LDTD® para espectrometria de massa. Luxon Ion Source® usa laser de diodo acoplado a fibra (Figura 2) para obter uniformidade térmica incomparável, proporcionando mais precisão, exatidão e velocidade. O processo começa com amostras secas que são rapidamente evaporadas usando calor indireto. As moléculas neutras termicamente dessorvidas são transportadas para uma região de descarga de corona. A protonação de alta eficiência e uma forte resistência à saturação iônica caracterizam esse tipo de ionização e é o resultado da ausência de solvente e fase móvel. Este processo de dessorção térmica produz sinal de íons moleculares de alta intensidade em menos de 1 segundo amostra a amostra e permite trabalhar com volumes muito pequenos.



Figura 1 - Luxon Ion Source®



Figura 2 - Esquema da Fonte de Ionização Luxon

### Método de Preparação da Amostra

#### Extração automatizada de amostras

Devido à instabilidade das vitaminas A e E, as soluções estoque foram preparadas em etanol (0,1% BHT). O soro agrupado foi exposto à luz ultravioleta por pelo menos 24 horas para fotodegradar a vitamina endógena. O soro exposto reunido foi então adicionado para gerar uma curva de calibração e CQs.

As amostras foram transferidas para tubos com código de barras, legíveis pelo sistema de extração Azeo. Cada frasco com código de barras foi escaneado pelo Azeo Liquid Handler e um arquivo de lote

automático foi criado. O sistema de extração Azeo (Figura 3) foi utilizado para extrair as amostras usando as seguintes condições:

- 5 µL de padrão interno (Retinol-d<sub>5</sub> e Tocoferol-d<sub>6</sub> a 10 µg/mL em EtOH (0,1% BHT)) foram adicionados a cada amostra
- 25 µL de amostra de soro foram transferidos dos frascos para uma placa de poços fundos colocada no Lumo Vortexer
  - Misturados por 30 segundos a 1000 rpm
- 25 µL de tampão de extração (0,25 mM NaOH em Isopropanol: Água / 3,5:7,5) foram adicionados a uma placa de poço fundo
  - Misturados por 30 segundos a 1000 rpm
- 300 µL de Hexano foram adicionados em uma placa de poço fundo
  - Misturados por 5 minutos a 1000 rpm
  - Houve uma pausa de 5 minutos para separação de fases
- Foram adicionados 6 µL da fase da camada superior em uma placa de 96 poços LazWell™
  - Secados por 1 minuto em temperatura ambiente com fluxo de ar.
- Foram adicionados 6 µL de hidroxitolueno butilado (BHT, 100 µg/mL em hexano) em uma placa de 96 poços LazWell™
  - Secados por 1 minuto em temperatura ambiente com fluxo de ar.



Figura 3 - Sistema de extração automatizado

### Parâmetros LDTD®-MS/MS

#### LDTD

Modelo: Luxon S-960, PhytroniX

Gás carreador: 9 L/min (ar)

Padrão de laser:

- Rampa de 6 segundos para 65% de potência
- Espera de 2 segundos

#### MS/MS

Modelo MS: Sistema Q-Trap® 5500, Sciex

Tempo de escaneamento: 40 milissegundos

Cortina: 30

Tempo total de execução: 8 segundos por amostra

Ionização: APCI

Método de análise: Modo MRM positivo

Tabela 1 - Transições MRM para LDTD-MS/MS

	Transição	CE
Retinol	269,2 → 93,1	32
Retinol-d <sub>5</sub>	274,2 → 93,1	32
Tocoferol	431,2 → 165,1	25
Tocoferol-d <sub>6</sub>	437,2 → 171,1	25

## Resultados e Discussão

### Teste de Validação

Curvas de calibração variando de 191 a 2191 ng/mL para Retinol e de 3,1 a 43,1 µg/mL para Tocoferol foram preparadas em soro exposto à luz ultravioleta. Três amostras de soro humano foram usadas como CQ (os valores de concentração endógena foram avaliados com um método de referência e usados como valor nominal). Extrações replicadas foram depositadas em uma placa LazWell™ e secas antes da análise. A área do pico contra a razão do padrão interno (PI) foi usada para normalizar o sinal.

### Linearidade

As curvas de calibração foram traçadas usando a razão da área do pico e a concentração nominal dos padrões. Para o teste de linearidade, o seguinte critério de aceitação foi utilizado:

- A regressão linear ( $r^2$ ) deve ser  $\geq 0,995$

A **Tabela 2** mostra os coeficientes de correlação entre dias para o tocoferol. Valores maiores que 0,995 foram obtidos. A **Figura 4** mostra um resultado típico da curva de calibração para Tocoferol. Resultados semelhantes foram obtidos para Retinol.

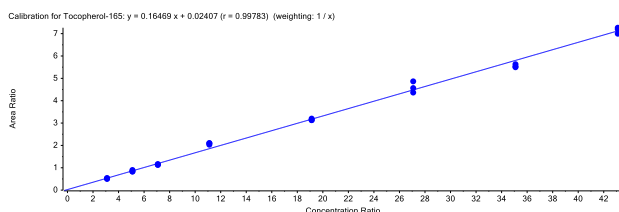


Figura 4 – Curva de calibração para o Tocoferol

Tabela 1 – Coeficientes de correlação da curva de calibração entre dias

	Tocoferol
Curva 1	0,99783
Curva 2	0,99576
Curva 3	0,99624
Curva 4	0,99665
Curva 5	0,99598

### Precisão e Exatidão

Para a avaliação da exatidão e precisão, foram utilizados os seguintes critérios de aceitação:

- Cada concentração não deveria exceder 15% CV.
- Cada concentração deveria estar dentro de  $100 \pm 15\%$  da concentração nominal.

Para o experimento de precisão e exatidão entre corridas, cada CQ foi analisado em triplicata, em cinco dias diferentes. As **Tabelas 3 e 4** mostram os resultados de precisão e exatidão entre corridas para Retinol e Tocoferol, respectivamente. O %CV obtido ficou abaixo de 15% e a exatidão ficou dentro de 15% do valor nominal.

Tabela 2 - Precisão e exatidão entre corridas do Retinol

Retinol	CQ-L	CQ-M	CQ-H
Conc (ng/ml)	391	991	1791
N	15	15	15
Média (ng/ml)	405,0	942,2	1755,5
SD	23,1	63,4	118,8
%CV	5,7	6,7	6,8
%Nom	103,6	95,1	98,0

Tabela 3 - Precisão e exatidão entre corridas do Tocoferol

Tocoferol	CQ-L	CQ-M	CQ-H
Conc (µg/ml)	7,1	19,1	35,1
N	15	15	15
Média (µg/ml)	7,7	19,6	33,3
SD	0,8	1,0	0,7
%CV	10,4	5,1	2,3
%Nom	108,4	102,5	94,9

### Estabilidade úmida de extratos de amostra

Após a extração, os extratos de amostra foram mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  em recipientes fechados. Após 1 dia, os extratos de amostra foram colocados em uma placa LazWell™, secos e analisados. A precisão e exatidão das amostras de CQs do Tocoferol são relatadas na **Tabela 5**. Todos os resultados estão dentro do intervalo de critérios aceitáveis para 1 dia a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Estabilidade seca de amostras detectadas em LazWell™

As amostras extraídas foram colocadas em uma placa LazWell™, secas e mantidas em temperatura ambiente (TA) por 1 hora antes da análise. O tocoferol deve ser estabilizado com BHT para evitar a degradação do medicamento na placa LazWell™. Os resultados de precisão e exatidão das amostras de CQs do Tocoferol são relatados na **Tabela 5**. Todos os resultados estão dentro do intervalo de critérios aceitáveis para 1 hora em temperatura ambiente. Uma importante perda de sinal é observada após 1 hora. A análise dentro de 30 minutos após a evaporação da amostra é fortemente recomendada.

Tabela 4 - Estabilidade úmida e seca do Tocoferol

Parâmetros	Estabilidade seca (1hora/TA)			Estabilidade úmida (1 dia/-20°C)		
	CQL	CQM	CQH	CQL	CQM	CQH
Conc (µg/ml)	7,1	19,1	35,1	7,1	19,1	35,1
N	3	3	3	3	3	3
Média (µg/ml)	8,1	20,4	33,1	8,2	20,1	33,8
%CV	2,9	3,9	3,1	0,8	2,1	1,3
%Nom	114,5	106,7	94,4	115,0	105,0	96,3

### Estudo de validação cruzada

Amostras de soro de pacientes reais (N=6) foram testadas com este método para correlacionar com os resultados obtidos por LC-MS/MS tradicional. A porcentagem de diferença entre os valores foi avaliada. Obteve-se uma diferença inferior a 15%. Os resultados são relatados na **Tabela 6**.

Tabela 5 – Resultado de validação cruzada

	Vitamina A (retinol)			Vitamina E (tocoferol)		
	LC (ng/mL)	Luxon (ng/mL)	%Dif (%)	LC (µg/mL)	Luxon (µg/mL)	%Dif (%)
M1	479	449	-3,3	13,7	15,6	6,5
M2	411	423	1,4	10,0	11,1	5,3
M3	551	554	0,3	9,9	11,1	5,8
M4	581	538	-3,8	15,2	17,7	7,5
M5	820	701	-7,8	13,9	16,1	7,2
M6	553	609	4,7	10,8	12,2	6,0

### Conclusão

O Luxon Ion Source® combinado com o sistema de espectrometria de massa Sciex Q-Trap 5500 permite análises ultrarrápidas (**8 segundos por amostra**) de Vitamina A e E no soro.

### Legenda:

CQ: controle de qualidade  
APCI: ionização química de pressão atmosférica  
MRM: monitoramento de reações múltiplas  
CE: energia de colisão  
%Nom: % nominal

Conc: concentração  
N: número de amostras  
SD: desvio padrão  
%CV: % do coeficiente de variação

# Análise de Vitamina A e E no Soro como um Biomarcador de Distúrbios Clínicos:

## Quantificação de Vitamina A e E no Soro em 8 Segundos por Amostra Usando LDTD-MS/MS

Pierre Picard, Jean Lacoursière e Serge Auger

PhytroniX Technologies, Québec, Canadá

Palavras-chave: Alto rendimento, Vitamina, Soro, LDTD-MS/MS

### Introdução

A vitamina A (Retinol) e E (Tocoferol) têm papéis importantes nas funções fisiológicas para manter uma boa saúde. Publicações científicas relatam sua potencial implicação em diferentes patologias causadas pelo estresse oxidativo. Seu papel como biomarcadores é avaliado. Para grandes estudos epidemiológicos, técnicas analíticas precisas e de alto rendimento são necessárias.

Nosso objetivo para esta nota de aplicação é utilizar um método automatizado de preparação de amostra para a quantificação de vitamina A e E no soro usando uma única operação em LDTD-MS/MS.

O LDTD-MS/MS oferece especificidade combinada com uma análise ultrarrápida para um método de quantificação incomparável. Para desenvolver esta aplicação, nos concentramos em realizar uma preparação de amostra rápida e simples. As vitaminas A e E foram analisadas e os resultados foram obtidos em menos de 8 segundos por amostra.

### Fonte de Ionização Luxon

O Luxon Ion Source® (Figura 1) é a segunda geração de introdução de amostra e fonte de ionização baseada na tecnologia LDTD® para espectrometria de massa. Luxon Ion Source® usa laser de diodo acoplado a fibra (Figura 2) para obter uniformidade térmica incomparável, proporcionando mais precisão, exatidão e velocidade. O processo começa com amostras secas que são rapidamente evaporadas usando calor indireto. As moléculas neutras termicamente desorvidas são transportadas para uma região de descarga de corona. A protonação de alta eficiência e uma forte resistência à saturação iônica caracterizam esse tipo de ionização e é o resultado da ausência de solvente e fase móvel. Este processo de desorção térmica produz sinal de íons moleculares de alta intensidade em menos de 1 segundo amostra a amostra e permite trabalhar com volumes muito pequenos.



Figura 1 - Luxon Ion Source®

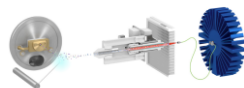


Figura 2 - Esquema da Fonte de Ionização Luxon

automático foi criado. O sistema de extração Azeo (Figura 3) foi utilizado para extrair as amostras usando as seguintes condições:

- 5 µL de padrão interno (Retinol-d5 e Tocoferol-d6 a 10 µg/mL em EtOH (0,1% BHT)) foram adicionados a cada amostra
- 25 µL de amostra de soro foram transferidos dos frascos para uma placa de poços fundos colocada no Lumo Vortexer
  - Misturados por 30 segundos a 1000 rpm
- 25 µL de tampão de extração (0,25 mM NaOH em Isopropanol: Água / 3,5:7,5) foram adicionados a uma placa de poço fundo
  - Misturados por 30 segundos a 1000 rpm
- 300 µL de Hexano foram adicionados em uma placa de poço fundo
  - Misturados por 5 minutos a 1000 rpm
  - Houve uma pausa de 5 minutos para separação de fases
- Foram adicionados 6 µL da fase da camada superior em uma placa de 96 poços LazWell™
  - Secados por 1 minuto em temperatura ambiente com fluxo de ar.
- Foram adicionados 6 µL de hidroxitolueno butilado (BHT, 100 µg/mL em hexano) em uma placa de 96 poços LazWell™
  - Secados por 1 minuto em temperatura ambiente com fluxo de ar.



Figura 3 - Sistema de extração automatizado

### Parâmetros LDTD®-MS/MS

#### LDTD

Modelo: Luxon SH-960, PhytroniX

Gás carreador: 9 L/min (ar)

Padrão de laser:

- Rampa de 6 segundos para 65% de potência
- Espera de 2 segundos

#### MS/MS

Modelo MS: LCMS-8060, Shimadzu

Tempo de escaneamento: 50 milissegundos

Tempo total de execução: 8 segundos por amostra

Ionização: APCI

Método de análise: Modo MRM positivo

### Método de Preparação da Amostra

#### Extração automatizada de amostras

Devido à instabilidade das vitaminas A e E, as soluções estoque foram preparadas em etanol (0,1% BHT). O soro agrupado foi exposto à luz ultravioleta por pelo menos 24 horas para fotodegradar a vitamina endógena. O soro exposto reunido foi então adicionado para gerar uma curva de calibração e CQs.

As amostras foram transferidas para tubos com código de barras, legíveis pelo sistema de extração Azeo. Cada frasco com código de barras foi escaneado pelo Azeo Liquid Handler e um arquivo de lote

Tabela 1 – Transições MRM para LDTD-MS/MS

	Transição	CE (eV)
Retinol	269,2 → 93,1	25
Retinol-d <sub>5</sub>	274,2 → 93,1	25
Tocoferol	431,2 → 165,1	20
Tocoferol-d <sub>6</sub>	437,2 → 171,1	20

## Resultados e Discussão

### Processo de preparação de dados

Espectrômetros de massa são sistemas de aquisição de dados que não foram projetados para lidar com poucos segundos de sinal por amostra. A sequência de sincronização adiciona de 6 a mais de 15 segundos entre cada amostra. Para contornar isso, todas as amostras são adquiridas em um único arquivo (Figura 4). Para permitir a análise desses dados, o software Cascade foi projetado para detectar, dividir e integrar cada pico de amostra adquirido em um único arquivo.

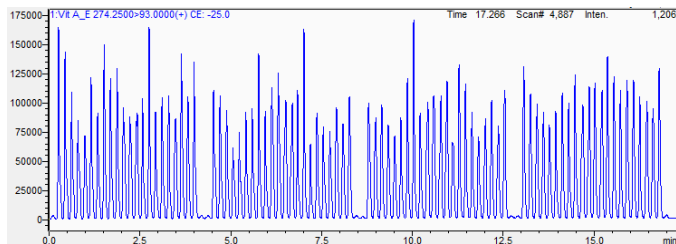


Figura 3 – Arquivo único de dados do espectrômetro de massa para 96 amostras. Transição retinol-d<sub>5</sub>.

### Teste de validação

Curvas de calibração variando de 191 a 2191 ng/mL para Retinol e de 3,1 a 43,1 µg/mL para Tocoferol foram preparadas em soro exposto à luz ultravioleta. Três amostras de soro humano foram usadas como CQ (os valores de concentração endógena foram avaliados com um método de referência e usados como valor nominal). Extrações replicadas foram depositadas em uma placa LazWell™ e secas antes da análise. A área do pico contra a razão do padrão interno (PI) foi usada para normalizar o sinal.

### Linearidade

As curvas de calibração foram traçadas usando a razão da área do pico e a concentração nominal dos padrões. Para o teste de linearidade, o seguinte critério de aceitação foi utilizado:

- A regressão linear ( $r^2$ ) deve ser  $\geq 0,99$

Figura 4 mostra um resultado típico da curva de calibração para Tocoferol. Resultados semelhantes foram obtidos para o Retinol.

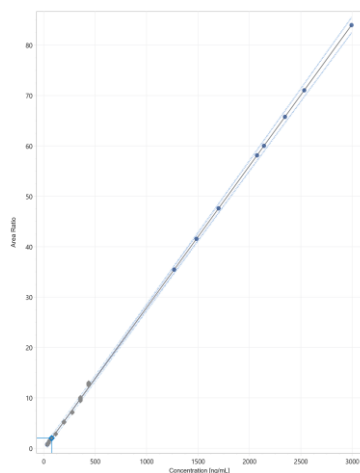


Figura 4 – Curva de calibração do Tocoferol

## Precisão e Exatidão

Para a avaliação da exatidão e precisão, foram utilizados os seguintes critérios de aceitação:

- Cada concentração não deveria exceder 15% CV.
- Cada concentração deveria estar dentro de  $100 \pm 15\%$  da concentração nominal.

Para o experimento de precisão e exatidão entre corridas, cada CQ foi analisado em triplicata, em cinco dias diferentes. As Error! Reference source not found. e 3 mostram os resultados de precisão e exatidão entre corridas para Retinol e Tocoferol, respectivamente. O %CV obtido ficou abaixo de 15% e a exatidão ficou dentro de 15% do valor nominal.

Tabela 1 – Precisão e exatidão entre corridas do retinol

Retinol	CQ-L	CQ-M	CQ-H
Conc (ng/ml)	391	991	1791
N	15	15	15
Média (ng/ml)	405,0	942,2	1755,5
SD	23,1	63,4	118,8
%CV	5,7	6,7	6,8
%Nom	103,6	95,1	98,0

Tabela 2 – Precisão e exatidão entre corridas do Tocoferol

Tocoferol	CQ-L	CQ-M	CQ-H
Conc (µg/ml)	7,1	19,1	35,1
N	15	15	15
Média (µg/ml)	7,7	19,6	33,3
SD	0,8	1,0	0,7
%CV	10,4	5,1	2,3
%Nom	108,4	102,5	94,9

## Estudo de validação cruzada

Amostras de soro de pacientes reais (N=6) foram testadas com este método para correlacionar com os resultados obtidos por LC-MS/MS tradicional. A porcentagem de diferença entre os valores foi avaliada. Obteve-se uma diferença inferior a 15%. Os resultados são relatados na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultado de validação cruzada

	Vitamina A (retinol)			Vitamina E (tocoferol)		
	LC (ng/mL)	Luxon (ng/mL)	%Dif (%)	LC (µg/mL)	Luxon (µg/mL)	%Dif (%)
M1	479	449	-3,3	13,7	15,6	6,5
M2	411	423	1,4	10,0	11,1	5,3
M3	551	554	0,3	9,9	11,1	5,8
M4	581	538	-3,8	15,2	17,7	7,5
M5	820	701	-7,8	13,9	16,1	7,2
M6	553	609	4,7	10,8	12,2	6,0

## Conclusão

O Luxon Ion Source® combinado com o sistema de espectrometria de massa Shimadzu LCMS-8060 permite análises ultrarrápidas (8 segundos por amostra) de Vitamina A e E no soro.

### Legenda:

CQ: controle de qualidade  
APCI: ionização química de pressão atmosférica  
MRM: monitoramento de reações múltiplas  
CE: energia de colisão  
Conc: concentração  
N: número de amostras  
SD: desvio padrão  
%CV: % do coeficiente de variação  
%Nom: % nominal

# Análise de Vitamina A e E no Soro como um Biomarcador de Distúrbios Clínicos:

## Quantificação de Vitamina A e E no Soro em 8 Segundos por Amostra Usando LDTD-MS/MS

Pierre Picard, Jean Lacoursière e Serge Auger

Phytronix Technologies, Québec, Canadá

Palavras-chave: Alto rendimento, Vitamina, Soro, LDTD-MS/MS

### Introdução

A vitamina A (Retinol) e E (Tocoferol) têm papéis importantes nas funções fisiológicas para manter uma boa saúde. Publicações científicas relatam sua potencial implicação em diferentes patologias causadas pelo estresse oxidativo. Seu papel como biomarcadores é avaliado. Para grandes estudos epidemiológicos, técnicas analíticas precisas e de alto rendimento são necessárias.

Nosso objetivo para esta nota de aplicação é utilizar um método automatizado de preparação de amostra para a quantificação de vitamina A e E no soro usando uma única operação em LDTD-MS/MS. O LDTD-MS/MS oferece especificidade combinada com uma análise ultrarrápida para um método de quantificação incomparável. Para desenvolver esta aplicação, nos concentramos em realizar uma preparação de amostra rápida e simples. As vitaminas A e E foram analisadas e os resultados foram obtidos em menos de 8 segundos por amostra.

### Fonte de Ionização Luxon

O Luxon Ion Source® (Figura 1) é a segunda geração de introdução de amostra e fonte de ionização baseada na tecnologia LDTD® para espectrometria de massa. Luxon Ion Source® usa laser de diodo acoplado a fibra (Figura 2) para obter uniformidade térmica incomparável, proporcionando mais precisão, exatidão e velocidade. O processo começa com amostras secas que são rapidamente evaporadas usando calor indireto. As moléculas neutras termicamente desorvidas são transportadas para uma região de descarga de corona. A protonação de alta eficiência e uma forte resistência à saturação iônica caracterizam esse tipo de ionização e é o resultado da ausência de solvente e fase móvel. Este processo de desorção térmica produz sinal de íons moleculares de alta intensidade em menos de 1 segundo amostra a amostra e permite trabalhar com volumes muito pequenos.



Figura 1 - Luxon Ion Source®



Figura 2 - Esquema da Fonte de Ionização Luxon

### Método de Preparação da Amostra

#### Extração automatizada de amostras

Devido à instabilidade das vitaminas A e E, as soluções estoque foram preparadas em etanol (0,1% BHT). Solução de soroalbumina bovina (BSA, 40 mg/mL) foi utilizada como matriz negativa. A matriz BSA foi então adicionada para gerar uma curva de calibração e CQs.

As amostras foram transferidas para tubos com código de barras, legíveis pelo sistema de extração Azeo. Cada frasco com código de barras foi escaneado pelo Azeo Liquid Handler e um arquivo de lote automático foi criado. O sistema de extração Azeo (Figura 3) foi utilizado para extrair as amostras usando as seguintes condições:

- 5 µL de padrão interno (Retinol-d<sub>5</sub> e Tocoferol-d<sub>6</sub> a 10 µg/mL em EtOH (0,1% BHT)) foram adicionados a cada amostra
- 25 µL de amostra de soro foram transferidos dos frascos para uma placa de poços fundos colocada no Lumo Vortexer
  - Misturados por 30 segundos a 1000 rpm
- 25 µL de tampão de extração (0,25 mM NaOH em Isopropanol: Água / 3,5:7,5) foram adicionados a uma placa de poço fundo
  - Misturados por 30 segundos a 1000 rpm
- 300 µL de Hexano foram adicionados em uma placa de poço fundo
  - Misturados por 5 minutos a 1000 rpm
  - Houve uma pausa de 5 minutos para separação de fases
- Foram adicionados 6 µL da fase da camada superior em uma placa de 96 poços LazWell™
  - Secados por 1 minuto em temperatura ambiente com fluxo de ar.
- Foram adicionados 6 µL de hidroxitolueno butilado (BHT, 100 µg/mL em hexano) em uma placa de 96 poços LazWell™
  - Secados por 1 minuto em temperatura ambiente com fluxo de ar.



Figura 3 - Sistema de extração automatizado

### Parâmetros LDTD®-MS/MS

#### LDTD

Modelo: Luxon T-960, Phytronix

Gás carreador: 9 L/min (ar)

Padrão de laser:

- Rampa de 6 segundos para 65% de potência

#### MS/MS

Modelo MS: Thermo Vantage, Thermo Fisher Scientific

Tempo de escaneamento: 50 milissegundos

Tempo total de execução: 8 segundos por amostra

Ionização: APCl

Método de análise: Modo MRM positivo

Tabela 1 - Transições MRM para Luxon-MS/MS

	Transição	CE
Retinol	269,2 → 93,1	25
Retinol-d <sub>5</sub>	274,2 → 93,1	25
Tocoferol	431,2 → 165,1	20
Tocoferol-d <sub>6</sub>	437,2 → 171,1	20

## Resultados e Discussão

### Teste de validação

Curvas de calibração variando de 200 a 4000 ng/mL para Retinol e de 1,5 a 30 µg/mL para Tocoferol foram preparadas em BSA (40 mg/mL). Três CQs foram preparados na mesma matriz negativa. Extrações replicadas foram depositadas em uma placa LazWell™ e secas antes da análise. A área do pico contra a razão do padrão interno (PI) foi utilizada para normalizar o sinal.

### Linearidade

As curvas de calibração foram traçadas usando a razão da área do pico e a concentração nominal dos padrões. Para o teste de linearidade, o seguinte critério de aceitação foi utilizado:

- A regressão linear ( $r^2$ ) deve ser  $\geq 0,99$

**Tabela 2** mostra os coeficientes de correlação entre dias para Retinol e Tocoferol. Valores maiores que 0,995 foram obtidos. A **Figura 4** mostra um resultado típico da curva de calibração para Tocoferol. Resultados semelhantes foram obtidos para o Retinol.

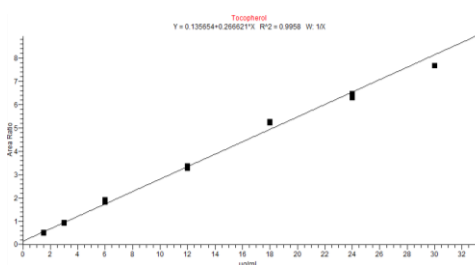


Figura 4 – Curva de calibração do Tocoferol

Tabela 2 – Coeficientes de correlação da curva de calibração entre dias

	Retinol	Tocoferol
Curva 1	0,9974	0,9958
Curva 2	0,9976	0,9972
Curva 3	0,9981	0,9954
Curva 4	0,9977	0,9953
Curva 5	0,9981	0,9950

### Precisão e Exatidão

Para a avaliação da exatidão e precisão, foram utilizados os seguintes critérios de aceitação:

- Cada concentração não deveria exceder 15% CV.
- Cada concentração deveria estar dentro de  $100 \pm 15\%$  da concentração nominal.

Para o experimento de precisão e exatidão entre corridas, cada CQ foi analisado em triplicata, em cinco dias diferentes. As **Tabelas 3 e 4** mostram os resultados de precisão e exatidão entre corridas para Retinol e Tocoferol, respectivamente. O %CV obtido ficou abaixo de 15% e a exatidão ficou dentro de 15% do valor nominal.

Tabela 3 - Precisão e exatidão entre corridas do retinol

Retinol	CQ-L	CQ-M	CQ-H
Conc (ng/ml)	600	2000	3000
N	15	15	15
Média (ng/ml)	658,6	1940,0	3018,8
SD	32,1	193,0	253,0
%CV	4,9	9,9	8,4
%Nom	109,8	97,0	100,6

Tabela 4 - Precisão e exatidão entre corridas de tocoferol

Tocoferol	CQ-L	CQ-M	CQ-H
Conc (µg/ml)	4,5	15	22,5
N	15	15	15
Média (µg/ml)	4,7	15,1	21,6
SD	0,1	1,1	1,9

%CV	2,8	7,4	8,6
%Nom	103,8	100,6	96,0

### Estabilidade úmida de extratos de amostra

Após a extração, os extratos de amostra foram mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  em recipientes fechados. Após 1 dia, os extratos de amostra foram colocados em uma placa LazWell™, secos e analisados. A precisão e exatidão das amostras de CQs do Tocoferol são relatadas na **Tabela 5**. Resultados semelhantes foram obtidos para Retinol. Todos os resultados estão dentro do intervalo de critérios aceitáveis para 1 dia a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Estabilidade seca de amostras detectadas em LazWell™

As amostras extraídas foram colocadas em uma placa LazWell™, secas e mantidas em temperatura ambiente (TA) por 1 hora antes da análise. O tocoferol e o retinol devem ser estabilizados com BHT para evitar a degradação do medicamento na placa LazWell™. Os resultados de precisão e exatidão das amostras de CQs do Tocoferol são relatados na **Tabela 5**. Todos os resultados estão dentro do intervalo de critérios aceitáveis para 1 hora em temperatura ambiente. Resultados semelhantes foram obtidos para Retinol. Uma importante perda de sinal é observada após 1 hora. A análise dentro de 30 minutos após a evaporação da amostra é fortemente recomendada.

Tabela 5 - Estabilidade úmida e seca do Tocoferol

Parâmetros	Estabilidade seca (1 hora / TA)			Estabilidade úmida (1dia / $-20^{\circ}\text{C}$ )		
	CQL	CQM	CQH	CQL	CQM	CQH
Conc (µg/ml)	4,5	15	22,5	4,5	15	22,5
N	3	3	3	3	3	3
Média (µg/ml)	4,6	15,4	21,9	4,7	15,2	22,5
%CV	2,0	9,6	8,3	3,2	6,6	10,4
%Nom	102,9	102,8	97,1	105,3	101,3	100,0

### Estudo de validação cruzada

Amostras de soro de pacientes reais (N=6) foram testadas com este método para correlacionar com os resultados obtidos por LC-MS/MS tradicional. A porcentagem de diferença entre os valores foi avaliada. Obteve-se uma diferença inferior a 15%. Os resultados são relatados na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Resultado de validação cruzada

	Vitamina A (retinol)			Vitamina E (tocoferol)		
	LC (ng/mL)	Luxon (ng/mL)	%Dif (%)	LC (µg/mL)	Luxon (µg/mL)	%Dif (%)
M1	405,4	375,8	7,6	7,8	7,4	6,2
M2	421,9	390,7	7,7	8,8	8,2	7,4
M3	539,7	521,5	3,4	9,0	7,9	13,2
M4	600,1	596,5	0,6	13,9	12,6	10,2
M5	759,1	787,7	-3,7	10,7	10,1	5,7
M6	496,2	553,6	-10,9	9,8	9,1	6,8

### Conclusão

O Luxon Ion Source® combinado com o sistema de espectrometria de massa Thermo Vantage permite análises ultrarrápidas (8 segundos por amostra) de Vitamina A e E no soro.

### Legenda:

CQ: controle de qualidade  
APCI: ionização química de pressão atmosférica  
MRM: monitoramento de reações múltiplas  
CE: energia de colisão  
Conc: concentração

N: número de amostras  
SD: desvio padrão  
%CV: % do coeficiente de variação  
%Nom: % nominal