Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

应用纪要：对人血中的乙炔雌二醇进行超灵敏生物分析方法开发的挑战与应对

完整的实验细节，请登录 www.waters.com 参考应用资料 720004295EN。

介绍：

因为人血中不计其数的其他甾体激素类干扰物和大量的同分异构体的存在，使得超高灵敏度的 LC/MS/MS 方法来定量类固醇类化合物非常困难，一部分化合物例如乙炔雌二醇（Ethinylestradiol, EE）所需要的检测限（LOD）是 1pg/mL，这个挑战就变得更加大。只能也是唯一可以使用的就是具有最高灵敏度的 MS 系统，同时 LC 和样品前处理的部分也必须非常仔细才能获得最佳的灵敏度。

仪器和消耗品

LC 条件：

仪器： ACQUITY UPLC®
色谱柱： ACQUITY UPLC HSS C_{18} SB，2.1 × 100mm，1.8µm
货号： 186004119
流动相 A： 0.1 % 甲酸水溶液
流动相 B： 0.1 % 甲酸溶解在 80/20 ACN/IPA（v/v）

初始的流动相条件是 80% 的流动相 B。运行一分钟后，流动相 B 在 4 分钟内升高到 90%，流速为 0.4 mL/min。进样体积为 35 µL。

样品制备条件：

人血样品使用 75/25 的正己烷 / 乙酸乙酯（v/v）萃取，使用丹磺酰氯衍生，然后衍生产物使用 Oasis® MCX µElution 板（货号：186001830BA）清洁。

质谱条件：

仪器： Xevo® TQ-S
离子源： ESI+

结果 / 讨论

图 1 展示了获得高灵敏度的 EE 分析方法的过程中多步清洁的重要性。如果只进行液液萃取（LLE），我们可以从红色的质谱扫描图中清晰的看到大量的干扰物残留。这个干扰物的峰不仅仅会同 EE 共流出，而且会污染检测器。这些干扰物是影响达到所需要的检测限的一个因素。只进行 LLE 会有高浓度的磷脂存在于干扰物中。如 LLE 后再使用复合模式的吸附剂清洁（Oasis MCX- 绿线），这些干扰物几乎都可以清除掉，具备了一个可达到检测限的条件。

色谱图 2 展示了一个可以容易达到人血中 1pg/mL 检测限的条件，通道 A 的响应是空白血液样品（通道 B）的 3 倍多。为了评估准确性和精确度，制作从 0.001 至 1 ng/mL 范围的标准曲线。分别制备低、中、高浓度：0.003, 0.075 和 0.75 ng/mL 的质量控制（QC）样品。通过统计学方法分析，得到标准曲线的 r^2 值为 0.999，平均百分数为 99%，QC 样品的准确度为 96%。

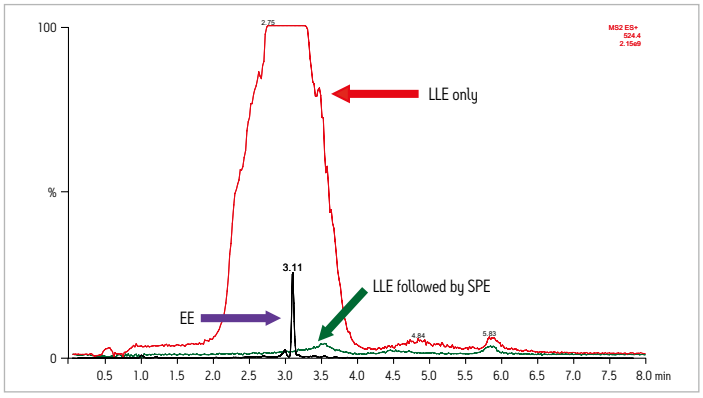

图 1. 人血样品单独使用 LLE 萃取（红线）和 LLE 后再使用复合模式 SPE 清洁（绿线）的质谱扫描图。由紫色谱线表示的是 EE 的保留时间。

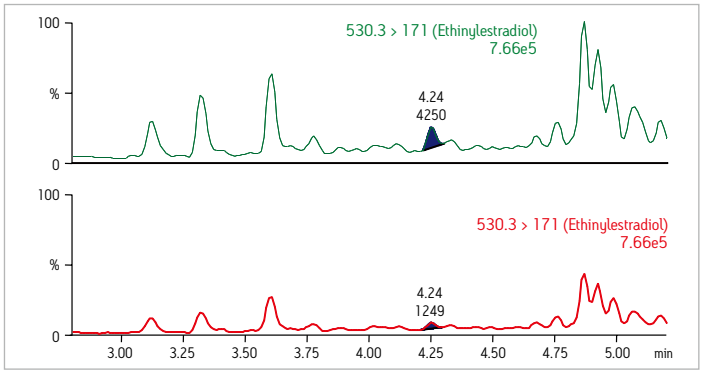

图 2. 通道 A 是人血萃取物中含有 1pg/mL 的 EE，通道 B 为空白的血液提取物。

结论

结合优化的样品前处理方法和色谱连接高灵敏度的质谱系统开发出了可以满足人血中乙炔雌二醇 1pg/mL 的检测限的生物分析的方法。

订货信息

本纪要中所使用产品	货号
ACQUITY UPLC HSS C_{18} SB, 2.1 x 100 mm, 1.8 µm	186004119
Oasis MCX 96-well µElution Plate, 2 mg Sorbent perWell, 30 µm Particle Size, 1/pk	186001830BA

沃特斯中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com

© 2012 沃特世公司。Waters、ACQUITY UPLC、Oasis、Xevo 及 The Science of What's Possible 是沃特世公司的商标。