Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

在临床研究中采用UPLC-MS/MS结合新型固相萃取(SPE)吸附剂，Oasis PRiME HLB柱分析血浆17-羟孕酮、雄烯二酮和皮质醇

Jonathan P. Danaceau 和 Erin E. Chambers
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

应用优势

- 更快速、简单的样品制备工作流程
- 与蛋白质沉淀相比，可去除至少97%的磷脂质
- 无需蒸发或复溶
- 针对所有分析物均可获得良好线性、准确、精确的结果

沃特世解决方案

Oasis PRiME HLB µElution板
(部件号186008052)

ACQUITY® 96孔样品收集板，
700 µL圆孔(部件号186005837)

ACQUITY UPLC® HSS T3色谱柱100Å，
1.8 µm, 2.1 x 50 mm(部件号186003538)

ACQUITY UPLC® I-Class

Xevo® TQ-S质谱仪

关键词

雄烯二酮、皮质醇、17-α-OH孕酮、µElution、样品制备、SPE、类固醇、基质效应、磷脂质去除、LC-MS

简介

样品制备是临床研究中所有生物分析LC-MS/MS方法的重要考虑因素。沃特世开发了一种新型样品制备吸附剂 Oasis® PRiME HLB，其设计较传统SPE吸附剂具有一些关键优势。这些优势包括：无需进行吸附剂的预活化和平衡；与传统SPE产品相比，可实现更快的工作流程并且能够去除超过95%的磷脂，从而获得更纯净的萃取物，并可延长色谱柱使用寿命或降低MS离子源污染的风险。

本应用纪要将详细介绍使用Oasis PRiME HLB进行17α-羟孕酮(17-OHP)、雄烯二酮(Adione)和皮质醇的萃取和UPLC-MS/MS分析。通过免疫分析法检测这些化合物时，可能容易与化学相似性化合物的抗体发生交叉反应，免疫分析法还要求分别对每个化合物进行样品分离和独立分析。LC-MS/MS具有更强的区分能力和选择性，可以使用多重方法，实现多个化合物的同时检测。使用Oasis PRiME HLB分析的所有化合物均可获得一致、高重现性的回收率，并且基质效应极低。相比于蛋白质沉淀法，此检测方法能够去除几乎所有的磷脂。最后，可使用Waters®专利µElution板在板上浓缩样品，无需对样品进行蒸发和复溶。此操作将建立一套针对所有分析物的线性、准确和精确的分析方法，雄烯二酮和17-OHP的定量限为50 pg/mL。

实验

LC条件

LC系统:	ACQUITY UPLC I-Class
色谱柱:	ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱, 100Å, 1.8 µm, 2.1 x 50 mm
柱温:	40 °C
样品温度:	10 °C
流动相A (MPA):	0.1%甲酸的水溶液
流动相B (MPB):	含0.1%甲酸的乙腈
脱气溶剂:	25:25:50乙腈:甲醇:水
清洗溶液:	10%乙腈

梯度程序如表1所示。

时间 (min.)	流速 (mL/min.)	%A	%B
0	0.6	70	30
1.0	0.6	50	50
2.0	0.6	45	55
2.5	0.6	5	95
3.5	0.6	5	95
3.6	0.6	70	30
4.5	0.6	70	30

表1. 流动相梯度。流动相A和流动相B的组成列于方法中。

质谱分析

MS系统:	Xevo TQ-S质谱仪
电离模式:	ESI+
毛细管电压:	1.0 kV
锥孔电压:	针对每个分析物优化
脱溶剂气:	1000 L/h
锥孔气:	150 L/h
脱溶剂气温度:	500 °C
源温度:	150 °C

使用MassLynx®软件 (V4.1; SCN 876) 采集数据并进行分析。使用TargetLynx™定量。

方法

所有标准品和稳定同位素标记的内标物均购自Cerilliant (德克萨斯州圆石)。标准品混合储备液 (20 µg/mL皮质醇; 1 µg/mL雄烯二酮和17-OHP) 由25%甲醇配制。10 µg/mL皮质醇-d4和0.5 µg/mL雄烯二酮-^{13}C3和17-OHP-d8的储备液由甲醇配制。750 ng/mL皮质醇-d4和37.5 ng/mL雄烯二酮-^{13}C3和17-OHP-d8内标工作溶液由25%甲醇配制。单个校准品和质量控制标准品由25%甲醇每日现配。将25 µL的各工作校准品或QC标准品加入475 µL经双重活性炭处理过的人血浆 (Golden West生物, 特曼库拉, 加利福尼亚州) 制成标准曲线和QC样品。

样品制备

按照以下步骤进行样品制备: 在150 µL各校准品或QC样品中加入20 µL内标工作溶液。所有样品用300 µL的4:1甲醇:89 g/L ZnSO4溶液进行沉淀。多次抽吸样品确保沉淀完全, 然后以3220 rcf离心10分钟。将获得的300 µL上清液加入900 µL的4% H3PO4并抽吸使样品完全混合。预处理过的样品直接添加至Oasis PRiME HLB µElution板 (2份)。随后用200 µL 25%甲醇清洗SPE板的所有孔洞2次。样品用25 µL的90:10乙腈: 甲醇洗脱2次, 并用25 µL水稀释。取7.5 µL注入UPLC-MS/MS系统。样品萃取步骤汇总如图1所示。

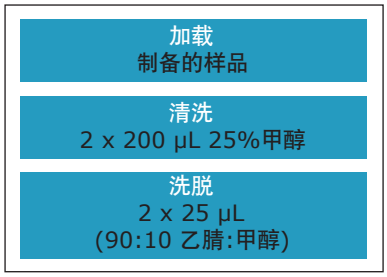

图1. 血浆皮质类固醇的Oasis PRiME HLB萃取方法。无需活化和平衡, 样品萃取简化为仅三个步骤。

结果与讨论

色谱

图2展示了来自萃取校准品的三种类固醇的色谱图。所有化合物在2分钟内完成洗脱。HSS T3色谱柱较常规C_{18}色谱柱具有显著优势。即使这些化合物属于非极性化合物，当进样的样品含较高浓度的有机溶剂时，T3色谱柱在增强保留的同时仍能够消除其他色谱柱会出现的溶剂效应。

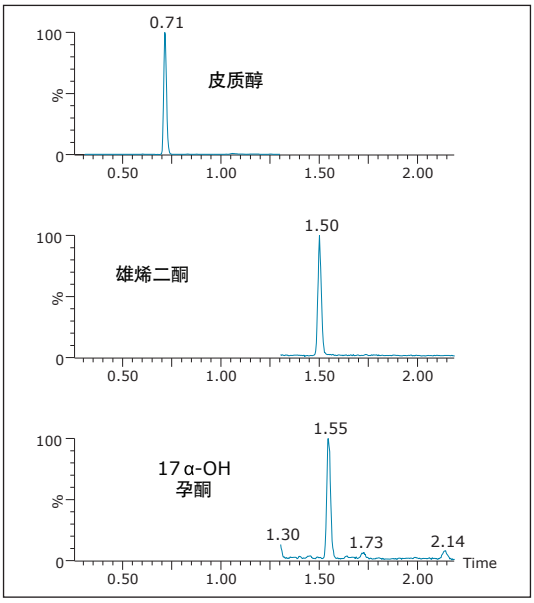

图2. 使用ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱(100Å, 1.8 µm; 2.1 x 50 mm)分析萃取血浆样品中皮质醇、雄烯二酮和17-OHP所得色谱图。皮质醇浓度为20 ng/mL，其他化合物的浓度为1 ng/mL。

表2列出了各类固醇及其稳定同位素标记内标物的保留时间和各自的MS参数，包括MRM通道、锥孔电压和碰撞能量。每个化合物均采用两个MRM通道，定性通道(列在第一行)和定量通道(列在第二行)。

分析物	RT (min)	MRM通道 (*m/z*)	锥孔电压 (V)	碰撞能量(eV)
皮质醇	0.72	336.17>121.06	42	22
		336.17>91.03	42	52
d4皮质醇(内标)	0.71	367.17>121.12	42	22
雄烯二酮	1.50	287.17>97.08	58	20
		287.17>109.04	58	26
^{13}雄烯二酮(内标)	1.50	290.17>100.07	58	20
17-OHP	1.55	331.17>97.08	58	26
		331.17>295.20	58	16
d8-17-OHP(内标)	1.53	339.23>100.07	58	26

表2. 所有分析物和内标物的质谱参数。

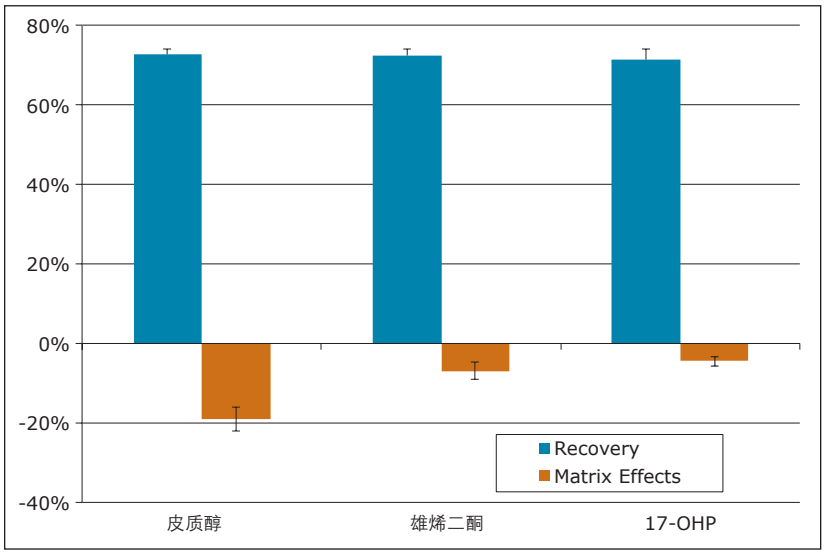

图3. 使用Oasis PRiME HLB µElution板萃取后皮质醇、雄烯二酮和17-OHP的回收率和基质效应。所用化合物萃取回收率的%RSD小于5%。皮质醇的基质效应为-19%，小于另两种类固醇的10%。

回收率和基质效应

萃取回收率结果十分一致。如图3所示，所有化合物的回收率为72–73%，%RSD小于5%，展示了Oasis PRiME的重现性。

所有化合物的基质效应均较低。皮质醇的基质效应为-1.9%，表明离子抑制作用较小，小于其他几种化合物。所有化合物的平均基质效应为-10.1%。较低的标准偏差值(3.1%或更低)再次证明Oasis PRiME具有良好的萃取和纯化一致性。所有回收率和基质效应数据汇总于表3中。

	回收率			基质效应	
	平均值	标准偏差	%RSD	平均值	标准偏差
皮质醇	72.7%	3.1%	4.2%	-19.0%	3.1%
雄烯二酮	72.5%	1.9%	2.7%	-6.9%	2.2%
17-OHP	71.5%	1.9%	2.6%	-4.5%	1.3%
			平均值	-10.1%	

表3. 回收率和基质效应(所有检测中，N=4)。

定量结果

校准和质量控制样品范围按照前述材料和方法部分中所列的说明进行制备。皮质醇的校准曲线范围是1–500 ng/mL，其余化合物为0.05–25 ng/mL，对应血浆中这些化合物的预期浓度。质量控制样品配制为与校准范围对应的低、中和高浓度。

	R^2	偏差%平均值
皮质醇	0.996	8.39
雄烯二酮	0.989	8.03
17-OHP	0.993	9.72

表4. 校准曲线汇总。所有化合物均采用1/x加权线性拟合。

所有化合物在整个校准范围内均有线性响应，1/x拟合的R^2值大于或等于0.99。表4汇总了校准曲线的数据。皮质醇的定量下限(LLOQ)为1.0 ng/mL，雄烯二酮和17-OHP为0.05 ng/mL。所有检测均遵守了FDA针对验证方法准确度、精密度和分析灵敏度的所有建议[1]。

	准确度					
	雄烯二酮			17α-OH孕酮		
QC 浓度 (ng/mL)	平均值	标准偏差	%CV	平均值	标准偏差	%CV
0.15	94.3%	5.4%	5.7%	93.7%	6.1%	6.5%
1.5	95.0%	3.4%	3.6%	92.3%	4.7%	5.6%
15	95.4%	5.3%	5.5%	93.7%	6.1%	6.5%
平均值	94.9%			92.6%		

质量控制样品达到准确度、精密度的要求，所有结果都在预期值的10%范围内，并且%CV不大于7%(N=6)。数据列于表5中。出色的准确度和精密度显示出此吸附剂具有良好的一致性和稳定性。

	准确度		
	皮质醇		
QC 浓度(ng/mL)	平均值	标准偏差	%CV
3	92.3%	4.9%	5.4%
30	94.8%	2.9%	3.0%
300	94.9%	5.7%	6.0%
平均值	94.0%		

表5. 萃取的血浆样品质量控制结果(全部三个浓度下，每个化合物的N=6)。

磷脂去除

Oasis PRiME HLB与其他反相SPE吸附剂或液-液萃取法相比，具有一个重要特点——更强的磷脂去除能力。磷脂是产生基质效应的主要来源[2,3]，会在分析色谱柱上积聚，可能会污染MS离子源，需要进行频繁的清洗。通常，我们会分析萃取物中一些最常见的磷脂，并与只进行了蛋白质沉淀的样品进行数据比较，以此评估磷脂的去除率。图4对相同血浆样品经过上述乙醚萃取和仅通过蛋白质沉淀步骤后所得的色谱图进行了比较。Oasis PRiME HLB萃取样品中的总磷脂面积是蛋白质沉淀样品的3%。真实的去除率甚至会超过97%，因为蛋白质沉淀样品尚未浓缩。将浓缩因素考虑进来(大约6倍)后，所得去除率将超过99%。

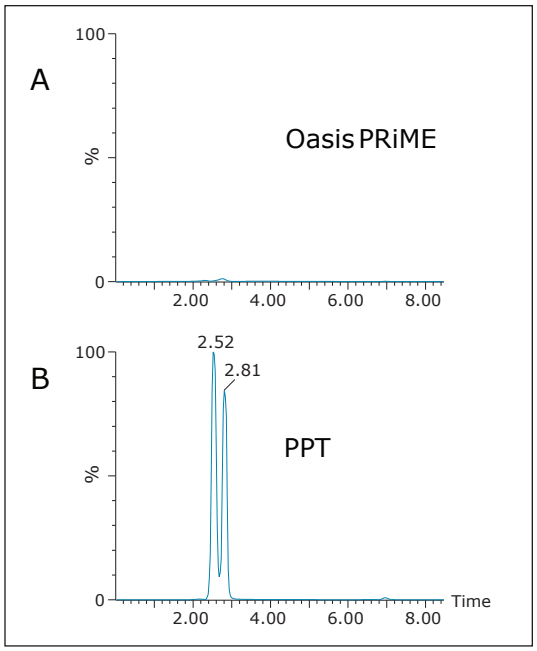

图4. Oasis PRiME与蛋白质沉淀的磷脂去除对比。A.使用Oasis PRiME HLB制备血浆样品的磷脂累加色谱图。B.相同血浆样品通过蛋白质沉淀制备的磷脂累加色谱图。色谱图比例一致。

结论

本应用纪要详细介绍了在µElution板中使用新型SPE吸附剂Oasis PRiME HLB萃取血浆样品中的皮质醇、雄烯二酮和17-OHP，用于临床研究。该吸附剂独特的属性能够省略活化和平衡步骤，简化萃取步骤，加快样品制备流程。此外，与蛋白质沉淀法相比，此吸附剂能够去除几乎所有的残留磷脂。采用µElution板时无需蒸发或复溶，可直接进样进行分析。

所有化合物的回收率十分一致，皮质醇的基质效应低于-20%，其他化合物低于-10%。对于所有化合物，此方法的线性、准确度、精密度和分析灵敏度都非常出色。QC样品的所有准确度数据均在目标浓度的8%范围内，所有%CV均小于7%，证明此吸附剂具有高重现性。

仅供研究使用。不适用于诊断。

参考文献

1. Bansal, S., DeStefano A: Key elements of bioanalytical method validation for small molecules. *The AAPS Journal* 9(1), E109-E114 (2007).

2. Chambers, E., Wagrowski-Diehl D.M., Lu, Z, Mazzeo, J.R.: Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Journal of Chromatography B* 852(1–2), 22–34 (2007).

3. Xia, Y.-Q., Jemal, M: Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis: comparison of three tandem mass spectrometric techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on phospholipids elution and the association of phospholipids with matrix effects. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23(14), 2125–2138 (2009).

扫一扫，关注沃特世微信

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, The Science of What's Possible, UPLC, Xevo, MassLynx, Oasis, ACQUITY UPLC和ACQUITY是沃特世公司的注册商标。TargetLynx是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2015年 沃特世公司。印制于中国。2015年5月 720005416ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 5999
成都：028 - 6578 4990
香港：852 - 2964 1800

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