

# 用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱和 LC/MS/MS 分离血浆中的胆固醇及相关固醇类物质

## 作者

Rongjie Fu 和 Zhiming Zhang  
安捷伦科技（上海）有限公司

Zhihui Lin, Winnie Hunag 和  
Jimmy Chan

安捷伦科技（中国）有限公司

Adam Bivens

安捷伦科技有限公司

## 摘要

用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 色谱柱和 LC/MS/MS 分离胆固醇及其代谢物以及多种植物甾醇。通过 12 种固醇类物质的分离情况对 InfinityLab Poroshell 120 的两种固定相 EC-C18 和 SB-C18 进行了比较。InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱对这些固醇类物质的选择性更好，并且分离度更高。另外还比较了两种不同粒径的 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 填料颗粒。粒径越小，分离度越高，尤其对于紧邻洗脱的异构体，例如 7-烯胆固醇和胆固醇。配备 APCI 的 LC/MS/MS 可提供出色的分析灵敏度。

## 前言

胆固醇及相关化合物（例如胆甾烯醇、 $\beta$ -谷甾醇、链甾醇和 7-烯胆甾烷醇）的分析可通过 GC 和 LC 实现。HPLC 技术在固醇类物质分析领域的应用越来越广泛，并且常与三重四级杆质谱仪联用进行定量分析，以提高灵敏度和选择性。同样，在离子化以及离子传输进入质谱仪方面的技术改进也提高了对生物基质中低浓度代谢物的检测能力。

基于 LC 技术的固醇类物质检测可配合 MS、UV 或蒸发光散射检测 (ELSD) 进行。检测器的选择与分离应用所需的灵敏度相关，其中 LC/MS/MS 具有极高的灵敏度。我们利用 Agilent 6460A 三重四级杆 LC/MS 和大气压化学电离 (APCI) 技术开发出一种正离子模式下的 MS 方法，用于分析表 1 中的固醇类物质。固醇类化合物的非极性特征使得 APCI 成为离子源的最佳选择，因为该技术在正离子模式下无需化合物衍生化即可实现良好的灵敏度。

许多固醇类物质为位置异构体，但由于 MS 无法区分同位异构体，因此色谱分离对上述物质的分析至关重要。7-烯胆甾烷醇和胆固醇是此类分离中最具挑战性的两个化合物，原因有二：一是难以实现色谱分离，二是它们为同位异构体。而且在血浆样品中，胆固醇的浓度远高于 7-烯胆甾烷醇，进一步增加了分析难度。

本方法采用 InfinityLab Poroshell 120 色谱柱，与全多孔颗粒填料色谱柱相比，其能在更低的反压条件下提供更高的柱效和通量。1.9  $\mu\text{m}$  InfinityLab Poroshell 120 色

谱柱的柱效最高。2.7  $\mu\text{m}$  InfinityLab Poroshell 120 色谱柱的反压低于 600 bar，具有出色的稳定性，并且配备了 2  $\mu\text{m}$  筛板，降低了被脏样品（例如血浆）堵塞的风险。

表 1. 本研究中的分析物

编号	化合物	分子量 (g/mol)	CAS 号	结构
1	25-羟基维生素 D3 (骨化二醇)	400.64	63283-36-3	
2	25-羟基维生素 D2	412.65	21343-40-8	
3	链甾醇	384.64	313-04-2	
4	7-脱氢胆固醇 (维生素原 D3)	384.64	434-16-2	
5	7-烯胆甾烷醇	386.65	80-99-9	
6	胆固醇	386.65	57-88-5	

## 实验部分

### 试剂与化学品

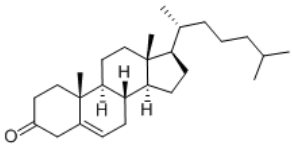
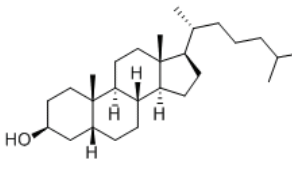
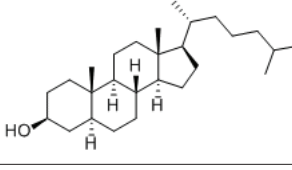
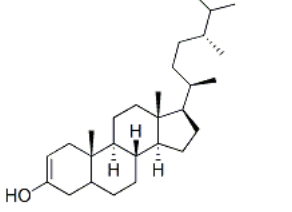
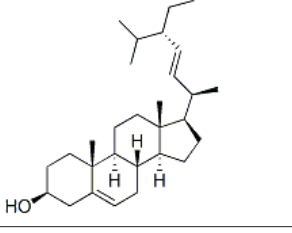
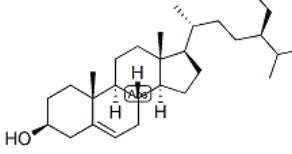
所有试剂均为 HPLC 级或更高等级。HPLC 级乙腈和甲醇购自 J. T. Baker (Center Valley, PA, USA)。水经由 ELGA PURELAB Chorus 系统 (High Wycombe, UK) 纯化。标准品购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。

### 仪器与材料

- 色谱柱入口: Agilent InfinityLab Quick Connect 快速连接液相色谱接头 (部件号 5067-5965)
- 色谱柱出口: Agilent InfinityLab Quick Turn 液相色谱接头 (部件号 5067-5966)
- Agilent Captiva 经济型过滤器, PTFE 膜, 直径 13 mm, 孔径 0.2  $\mu\text{m}$  (部件号 5190-5265)
- 安捷伦样品瓶, 螺口盖, 棕色, 带书写签, 经认证, 2 mL (部件号 5182-0716)
- 安捷伦固定螺口盖, 蓝色, 带 PTFE/红色硅胶隔垫 (部件号 5190-7024)
- Agilent InfinityLab 溶剂瓶, 棕色, 1000 mL (部件号 9301-6526)
- Agilent InfinityLab Stay Safe 溶剂瓶安全盖, GL45, 3 个插口, 1 个放空阀 (部件号 5043-1219)
- Eppendorf 移液管和重复用移液器
- 超声仪 (VWR, Radnor, PA, USA)

### 仪器

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II multisampler (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)

编号	化合物	分子量 (g/mol)	CAS 号	结构
7	5-胆甾烯-3-酮	384.64	601-54-7	
8	粪甾醇	388.67	360-68-9	
9	胆甾烷醇	388.67	80-97-7	
10	菜油甾醇	400.68	474-62-4	
11	豆甾醇	412.69	83-48-7	
12	谷甾醇	414.71	64997-52-0	

- Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统 (G6460A)

### 软件

- Agilent MassHunter LC/MS 数据采集软件, 版本 B.08.00
- Agilent MassHunter 定性分析软件, 版本 B.07.00

HPLC 条件	
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695975-302) Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 3.0 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 685975-302) Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 100 mm, 1.9 μm (部件号 695675-302)
流动相 A	水
流动相 B	甲醇
梯度	0–10 分钟: 92%–96% B 10–12 分钟: 96% B 12–16 分钟: 96%–100% B 停止时间: 20 分钟 后运行时间: 2 分钟
流速	0.60 mL/min
柱温	15 °C
进样量	20 μL

质谱条件	
离子模式	APCI, 正离子
干燥气温度	325 °C
气化室温度	350 °C
干燥气流速	4 L/min
雾化器压力	30 psi
毛细管电压 (+)	2000 V
MRM 条件	ΔEMV, 500

表 2. APCI 采集参数和离子对

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时间	碎裂电压	碰撞能量	碰撞池 加速器电压	极性
维生素原 D3	367.3	159.2	18	130	13	4	正
维生素原 D3	367.3	145.1	18	130	17	4	正
链甾醇	367.3	95	18	100	22	4	正
链甾醇	367.3	161.1	18	100	17	4	正
胆固醇	369.4	161.2	18	166	10	4	正
胆固醇	369.4	95.2	18	166	38	4	正
7-烯胆固醇	369.4	95.1	18	112	29	4	正
7-烯胆固醇	369.4	81.1	18	112	40	4	正
粪甾醇	371.4	221.2	18	140	21	4	正
粪甾醇	371.4	95.1	18	140	21	4	正
胆甾醇	371.4	149	18	150	15	4	正
胆甾醇	371.4	95	18	150	30	4	正
骨化二醇	383.3	211.2	18	144	25	4	正
骨化二醇	383.3	107.1	18	144	25	4	正
菜油甾醇	383.4	161.2	18	142	16	4	正
菜油甾醇	383.4	95	18	142	30	4	正
5-胆甾烯-3-酮	385.4	109.1	18	128	40	4	正
5-胆甾烯-3-酮	385.4	97	18	128	21	4	正
25-羟基维生素 D2	395.3	377.4	18	166	9	4	正
25-羟基维生素 D2	395.3	269.2	18	166	9	4	正
豆甾醇	395.4	83.1	18	148	17	4	正
豆甾醇	395.4	81.1	18	148	37	4	正
谷甾醇	397.4	161	18	125	18	4	正
谷甾醇	397.4	135.2	18	125	12	4	正

## 结果与讨论

总体而言，使用 LC-MS/MS 在 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 和 SB-C18 色谱柱上实现了对 12 种固醇类物质的分离。分离过程采用由水/甲醇组成的梯度流动相，并在较低的温度 (15 °C) 下进行以提

高分离度。在之前的实验中，使用乙腈流动相可轻松分离关键物质对，但是会严重抑制 APCI 信号。图 1 的上、中两幅色谱图展示的是 EC-C18 与 SB-C18 两种化学键合相之间的选择性差异。对于难分离的同质异位化合物 7-烯胆甾烷醇 (峰 5) 和胆固醇 (峰 6)，InfinityLab Poroshell 120

EC-C18 色谱柱实现了分离，而 InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 色谱柱未实现分离。图 1 底部的色谱图展示的是使用 1.9  $\mu\text{m}$  InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱时的分离结果，其对部分异构体 (例如 7-烯胆甾烷醇与胆固醇) 具有出色的分离度。

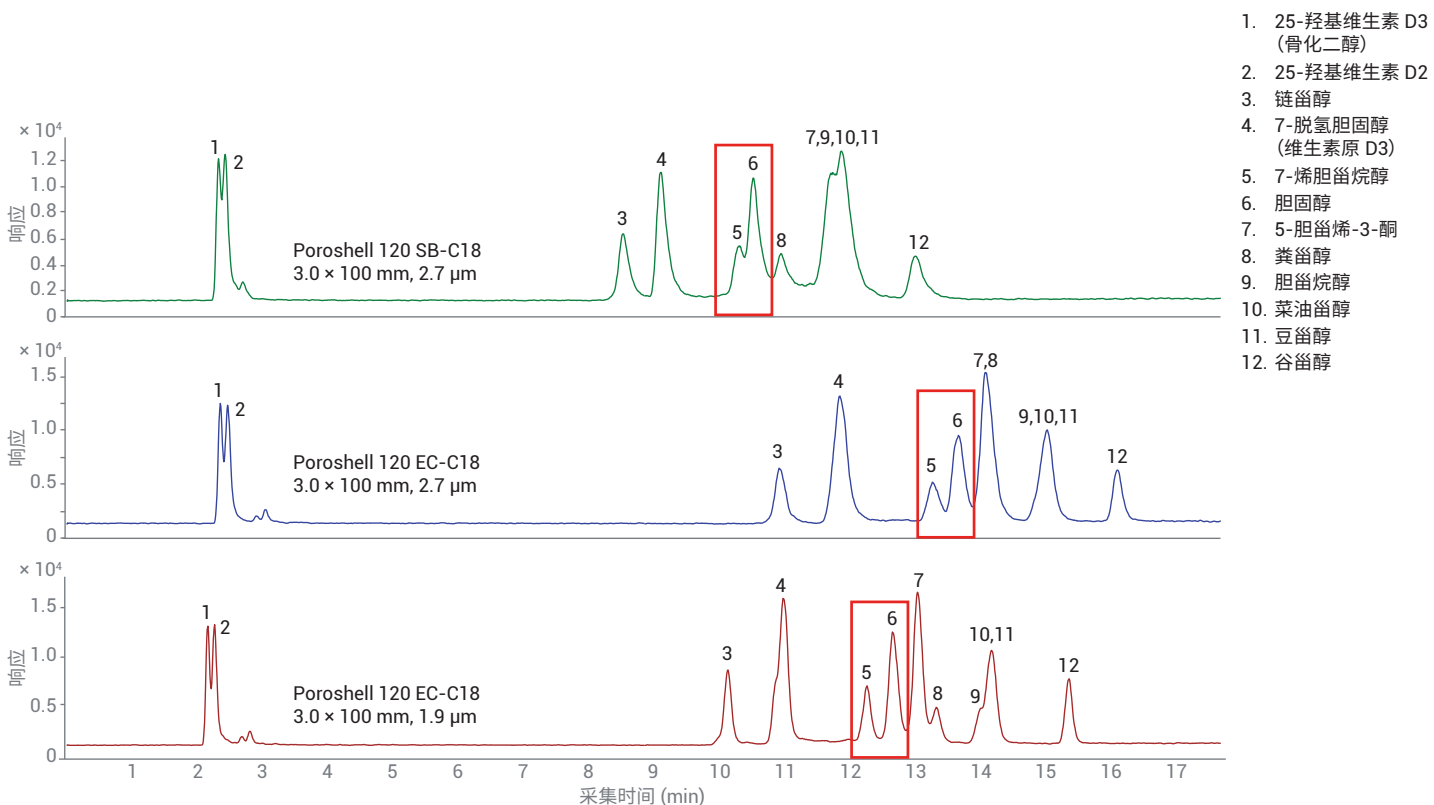


图 1. 使用 InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 和 EC-C18 固定相色谱柱分离 12 种固醇类物质得到的 TIC 色谱图

为提高分析灵敏度，对 APCI 参数（包括毛细管电压、干燥气流速和雾化器压力）进行了优化。优化后的方法采用 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 100 mm, 1.9 μm 色谱柱。图 2 中 12 种固醇类物质的 MRM 色谱图表明，该方法能够对 10 ppb 的分析物实现完全分离。

研究发现，毛细管电压对信号至关重要。较高的毛细管电压（例如 4000 V）会严重抑制 APCI 信号，并导致信号不稳定。本应用简报中优化后的毛细管电压为 2000 V。对 100 ppb 标样进行 10 次进样得到的叠加图（图 3）表明本方法具有良好的重现性。

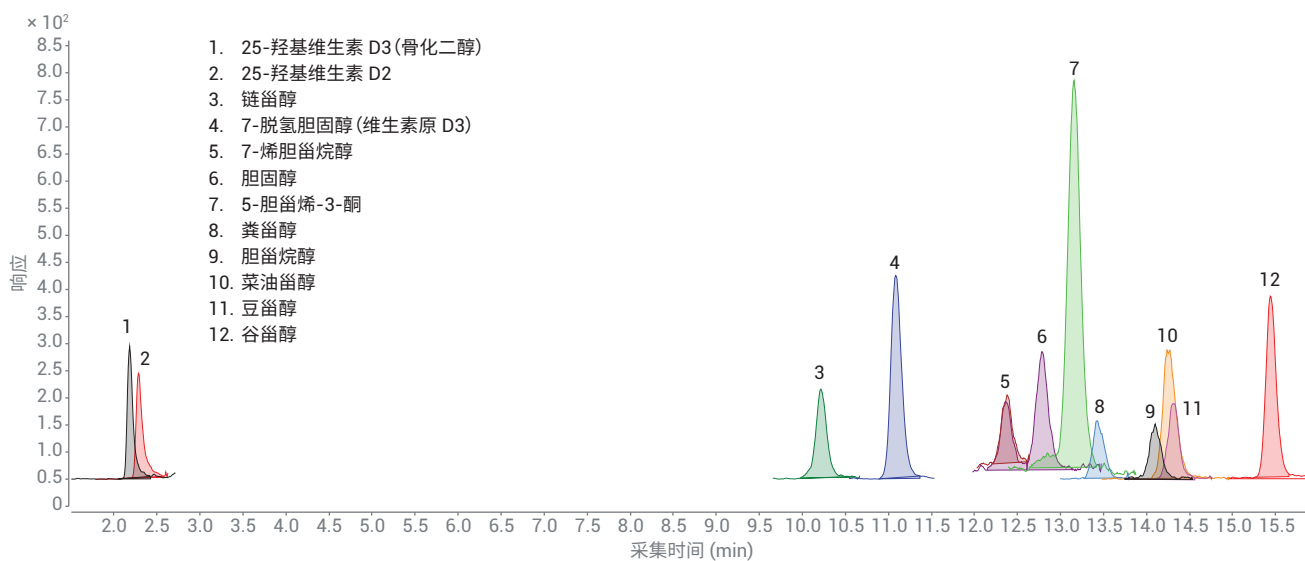


图 2. 使用 InfinityLab Poroshell EC-C18, 3.0 × 100 mm, 1.9 μm 色谱柱分离浓度为 10 ppb 的 12 种固醇类物质得到的 MRM 色谱图

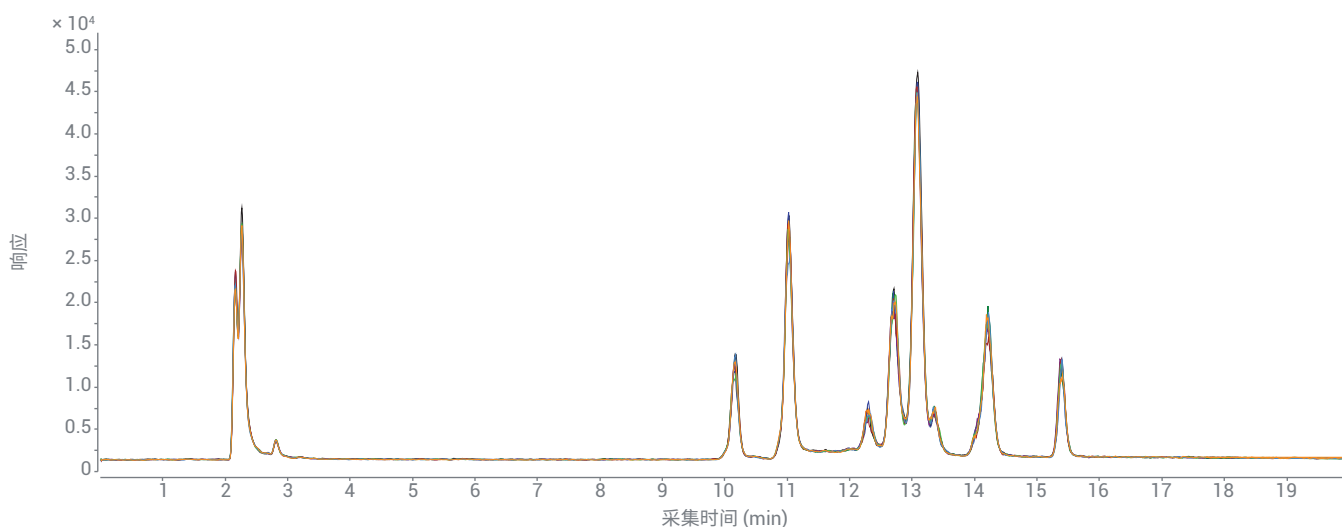


图 3. 使用 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3 × 100 mm, 1.9 μm 色谱柱，对 100 ppb 标样进行 10 次进样得到的叠加图

在实际血浆样品中，胆固醇的浓度远高于其他固醇类物质。血浆样品中胆固醇与 7-烯胆甾烷醇的比值接近 2000:1，因此要将 7-烯胆甾烷醇与高浓度胆固醇分离非常困难。图 4 展示的是加标 12 种固醇类物质 (10 ppb) 前后的血浆样品的色谱图。

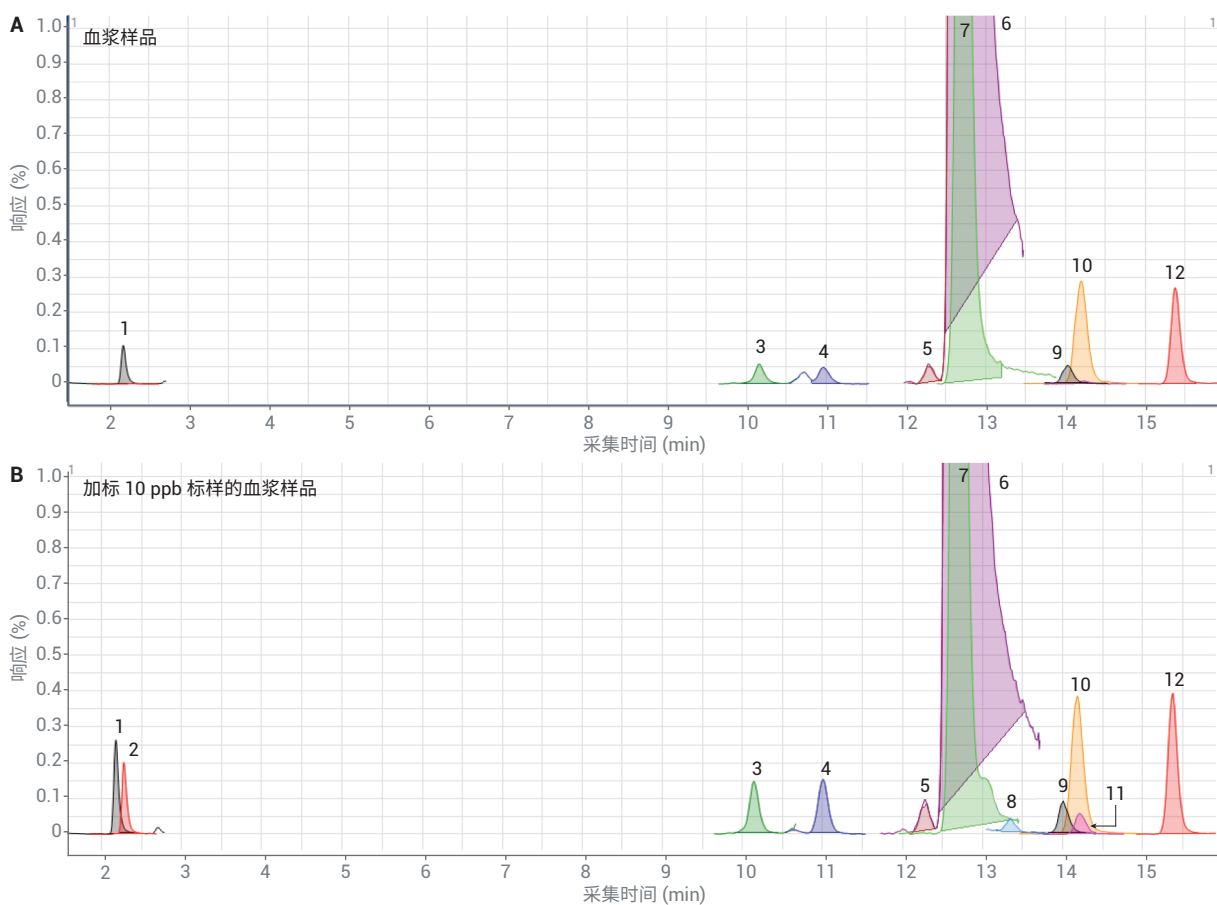


图 4. 使用 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3 × 100 mm, 1.9 μm 色谱柱分离空白血浆样品和 10 ppb 加标样品得到的 MRM 色谱图

## 结论

使用 6460A 三重四极杆 LC/MS 在正离子模式下配合 APCI 检测和 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 100 mm, 1.9 μm 色谱柱实现了对胆固醇及其部分代谢物以及其他植物甾醇的最佳分离分析。该色谱柱实现了关键物质对（胆固醇与 7-烯胆固醇）的基线分离，即使二者的浓度比达到了 2000:1。这一点非常重要，因为这两种化合物具有相同的分子量，只有在达到一定分离度后才能对这两种化合物进行有效的定量分析。

## 参考文献

1. McDonald, J. G.; *et al.*  
A comprehensive method for extraction and quantitative analysis of sterols and secosteroids from human plasma. *J. Lipid Res.* **2012**, 53(7), 1399-1409

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2019  
2019 年 3 月 7 日，中国出版  
5994-0793ZHCN