

利用 LC/MS/MS 定量测定人血清中的一组内源性类固醇

使用安捷伦固相支持液液萃取 (SLE) Chem Elut S 板

作者

Limian Zhao
安捷伦科技有限公司

摘要

Agilent Chem Elut S 固相支持液液萃取 (Chem Elut S) 使用合成填料，比传统硅藻土具有更出色的一致性和更高的持水容量。本研究展示了采用 Chem Elut S 2 mL 96 孔板对人血清中的一组共 15 种内源性类固醇进行 LC/MS/MS 定量测定。使用固相支持液液萃取 (SLE) 对血清样品进行前处理，以提取目标分析物，并去除基质干扰物质，如盐、蛋白质和部分磷脂。整个样品处理在 96 孔板中作为一个批处理进行，首先将水溶液样品加载到 SLE 吸附剂上，然后使用与水不混溶的溶剂进行重力洗脱。与传统的液液萃取 (LLE) 相比，Chem Elut S 的板内工作流程可大大节省时间和人力。针对血清中目标类固醇浓度为 5–10000 pg/mL 的宽校准范围（雌二醇和睾酮的校准范围为 10–10000 pg/mL，氢化可的松、17-羟基孕烯醇酮和孕酮的校准范围为 20–10000 pg/mL），对建立的 SLE 方法进行验证，该方法表现出优异的方法分析物准确度 (80%–120%) 和重现性 (RSD < 15%)。还对方法选择性和交叉污染进行了评估，五种分析物定量限 (LOQ) 升高归因于方法在血清基质中的选择性。此外，在给定的样品萃取溶剂下，合成的 SLE 吸附剂与基于硅藻土的 SLE 以及传统 LLE 相比，能够更好地去除生物体液基质中的磷脂。

前言

传统 LLE 广泛用于萃取生物样品基质（如血清和血浆）中的内源性类固醇，在衍生化或未衍生化条件下进行类固醇分析^[1-3]。在这些方案中，通常将生物样品（如血清或血浆）等分试样加入单独的微量离心管中，随后加入萃取溶剂。样品在混合和离心后，将上层有机相转移到另一组样品管或 96 孔板中，进行后续样品处理。在实践中，该方案包括多个费力且耗时的步骤，例如管标记、样品混合、相分离和有机层转移，均是实现高通量样品前处理的限速步骤。

一种能克服这些缺点的 LLE 替代方法是 SLE。SLE 小柱的吸附剂为覆盖到其表面上的水溶液样品提供了化学惰性表面。经过平衡后，在重力、轻度真空或压力作用下，使用与水不混溶的溶剂洗脱目标分析物，同时水相保留在小柱中。由于 SLE 吸附剂提供了较大的水性表面积，因此目标分析物在流经填料时被高效萃取到有机溶剂中。图 1 显示了萃取过程。对于

SLE，无需混合步骤，可以有效防止形成乳浊液。此外，水相和有机相之间的紧密接触可实现高效分配，从而提供更高的分析物回收率。由于仅需上样和洗脱步骤，SLE 工作流程非常简单，大大减少了人力和时间要求。最后，96 孔板 SLE 特别适合自动化，可提高样品前处理通量。

传统上，用于 SLE 的吸附剂为高度纯化的硅藻土。然而，硅藻土是一种天然材料，由不规则的化石微生物组成，难以控

制吸附剂颗粒的批次间一致性。吸附剂差异性增加了产品制造和质量控制的难度，并导致产品性能不一致。此外，与合成填料相比，硅藻土持水容量更低且批次间不一致性更大。

Chem Elut S 合成吸附剂极大改善了持水容量、批次间一致性和性能一致性。本应用简报展示了采用 Chem Elut S 96 孔板对人血清中的一组共 15 种内源性类固醇（表 1）的定量测定。

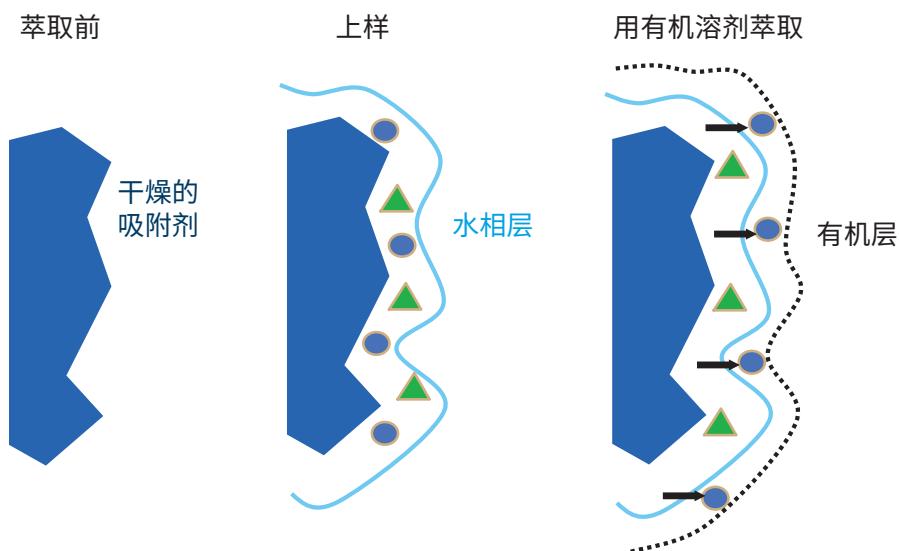


图 1. SLE 的过程和分析物萃取机制

表 1.15 种目标类固醇的分子式和结构

名称	Log P	分子式	结构
2-甲氧基雌二醇 (2-MeE1)	4	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	
雌三醇 (E2)	2.5	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	
2-甲氧基雌酮 (2-MeE1)	3.1	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	
孕酮 (PGT)	3.9	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	
17-羟基孕酮 (17-OH PGT)	3.2	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	
11-脱氧皮质醇 (11-DCTS)	2.5	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	
雌二醇 (E2)	4	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	
睾酮 (TTS)	3.4	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	

名称	Log P	分子式	结构
氢化可的松 (HCTS)	1.6	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	
雄烯二酮 (ASD)	2.7	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	
17-α-羟基孕烯醇酮 (17-OH PGN)	3.1	C ₂₁ H ₃₂ O ₃	
11-脱氧皮质酮 (11-DCCS)	2.9	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	
醛固酮	1.1	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	
雌酮 (E1)	3.1	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	
可的松 (CTS)	1.5	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	

实验部分

试剂与化学品

所有试剂和溶剂均为 HPLC 或分析纯级。

甲醇 (MeOH) 购自 Honeywell (Muskegon, MI, USA)，甲基叔丁基醚 (MTBE) 购自 VWR-BDH Chemicals (Radnor, PA, USA)，乙酸乙酯 (EtOAc) 购自 J.T. Baker

(Center Valley, PA, USA)。氟化铵、所有类固醇标准品和内标储备液 (1 mg/mL 的 MeOH 溶液或 100 µg/mL 的 MeOH 溶液) 购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。人血清 (DC Mass Spect Gold, MSG4000) 购自 Golden West Biologicals, Inc. (Temecula, CA, USA)。血清在使用前保存于 -70 °C 下。

标样和溶液

标准加标溶液在 1:1 MeOH/水中制得，浓度为 500 ng/mL，IS 加标溶液在 1:1 MeOH/水中制得，浓度为 50 ng/mL。类固醇化合物对玻璃表面敏感，尤其在低浓度下。因此，使用塑料瓶来配制和储存所有加标溶液非常重要。所有加标溶液在使用前保存于 -20 °C 下。

将 37.04 mg NH₄F 溶于 1 L Milli-Q 水和 MeOH 中，制得 1 mmol/L 氟化铵 (NH₄F) 的水溶液和 MeOH 溶液。分别用 Milli-Q 水和 MeOH 稀释 1 mmol/L 溶液，制得 0.2 mmol/L NH₄F 水溶液（流动相 A）和 0.2 mmol/L NH₄F MeOH 溶液（流动相 B）。

通过混合 100 mL MTBE 和 EtOAc，新鲜配制 1:1 MTBE/EtOAc 萃取溶剂，并在当天使用。在 SLE 之后，利用 1:1 MeOH/水溶液复溶干燥的样品。

设备与材料

用于样品前处理的设备包括：

- Centra CL3R 离心机 (Thermo IEC, MA, USA)
- 多管涡旋仪 (VWR, PA, USA)
- Eppendorf 移液管和重复用移液器
- SPE 干式 96 蒸发器
- 安捷伦正压 96 孔处理装置 (PPM-96, 部件号 5191-4116)
- ViaFlo 96 液体处理器 (Integra, Hudson, NH, USA)
- Agilent Chem Elut S 2 mL 96 孔板，200 μL (部件号 5610-2003)
- 安捷伦方形 96 孔 2 mL 收集板 (部件号 5133009)
- 安捷伦方形 96 孔密封盖 (部件号 5133005)

仪器条件

样品在 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统上运行，该液相色谱系统包括 Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)、Agilent 1290 Infinity 高性能自动进样器 (G4226A) 和 Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)。该 UHPLC 系统与配备安捷伦

喷射流 iFunnel 电喷雾离子源的 Agilent G6490 三重四极杆液质联用系统联用。采用 Agilent MassHunter 工作站软件进行数据采集和分析。

表 2 中列出了分析物参数，图 2 显示了血清中 1 ng/mL 类固醇的 LC/MS/MS 色谱图。

HPLC 条件			
色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 100 × 2.1 mm, 1.8 μm (部件号 959758-902) Agilent ZORBAX RRHD C18 保护柱, 5 × 2.1 mm, 1.8 μm (部件号 821725-901)		
流速	0.4 mL/min		
柱温	40 °C		
进样量	20 μL		
流动相	A) 0.2 mmol/L 氟化铵水溶液 B) 0.2 mmol/L 氟化铵的甲醇溶液		
进样针清洗	1:1:1 ACN/MeOH/IPA/H ₂ O (含 0.2% FA)		
梯度	时间 (min)	%B	流速 (mL/min)
	0	50	0.4
	3.0	60	0.4
	8.0	90	0.4
	8.5	100	0.4
停止时间	8.5 min		
后运行时间	2.5 min		
质谱条件			
气体温度	180 °C		
气体流速	11 L/min		
雾化器	20 psi		
鞘气温度	400 °C		
鞘气流速	10 L/min		
毛细管	3500 V (正离子模式) ; 3000 V (负离子模式)		
iFunnel 参数	高压 RF: 150 V (正离子和负离子模式) 低压 RF: 100 V (正离子和负离子模式)		
数据采集	dMRM		

表 2. 类固醇分析物、所用的内标、保留时间和 MRM 条件

分析物	所用的内标	保留时间 (min)	极性	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)			
					定量离子	CE (V)	定性离子	CE (V)
雌三醇	IS 1	2.04	负	287.2	171.0	45	143.1	73
醛固酮-D ₄ (IS1)		2.31	正	365.2	347.1	17	319.2	21
醛固酮	IS 1	2.32	正	361.2	343.2	17	91.1	80
可的松-D ₈ (IS2)		2.71	正	369.2	169.2	21	125.1	49
可的松	IS 2	2.75	正	361.2	163.2	25	91.0	73
氢化可的松	IS 2	3.24	正	363.2	121.1	25	91.1	73
17-羟基孕烯醇酮	IS 2	3.24	负	331.2	313.2	21	--	
11-脱氧皮质醇-D ₅ (IS3)		4.53	正	352.3	100.0	37	113.0	45
11-脱氧皮质醇	IS 3	4.58	正	347.2	109.0	41	97.0	41
雄烯二酮	IS 3	5.31	正	287.2	97.0	25	109.0	29
雌二醇-D ₅ (IS4)		5.39	负	276.2	147.0	45	187.0	49
雌酮- ¹³ C ₃ (IS5)		5.43	负	272.3	148.0	41	146.0	61
雌酮	IS 5	5.42	负	269.1	145.0	49	143.1	73
雌二醇	IS 4	5.45	负	271.2	145.1	49	183.0	49
11-脱氧皮质酮	IS 3	5.72	正	331.0	97.1	25	109.1	33
2-甲氧基雌酮	IS 5	5.85	负	299.2	284.1	25	--	--
睾酮	IS 6	5.86	正	289.3	97.1	23	109.1	25
2-甲氧基雌二醇	IS 4	6.01	负	301.2	286.2	25	--	--
17-羟基孕酮-D ₈ (IS6)		6.21	正	339.3	100.1	45	113.2	37
17-羟基孕酮	IS 6	6.26	正	331.2	109.1	33	97.1	29
孕酮-D ₉ (IS7)		7.39	正	324.3	100.1	29	113.0	25
孕酮	IS 7	7.44	正	315.2	97.1	25	108.9	37

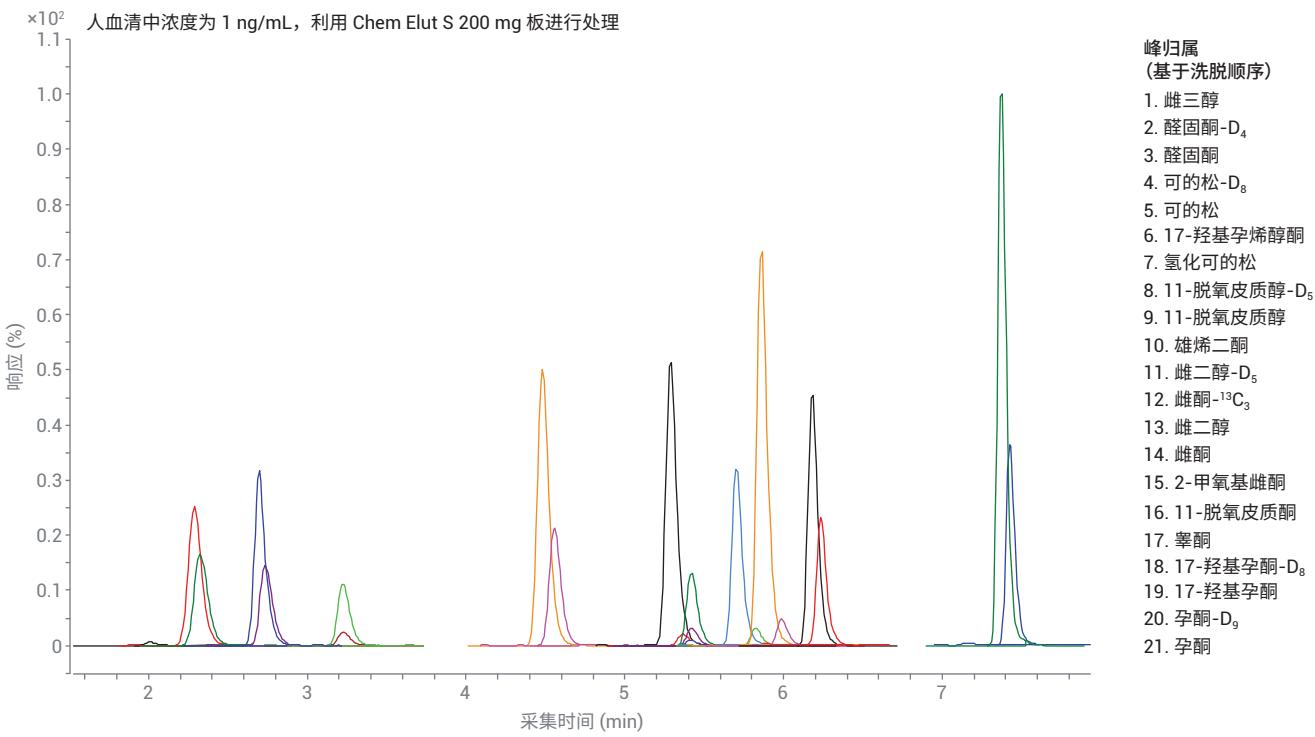


图 2. 使用 Agilent Chem Elut S 固相支持液液萃取方法前处理的血清中 1 ng/mL 类固醇的 LC/MS/MS 色谱图

校准标样和 QC 样品前处理

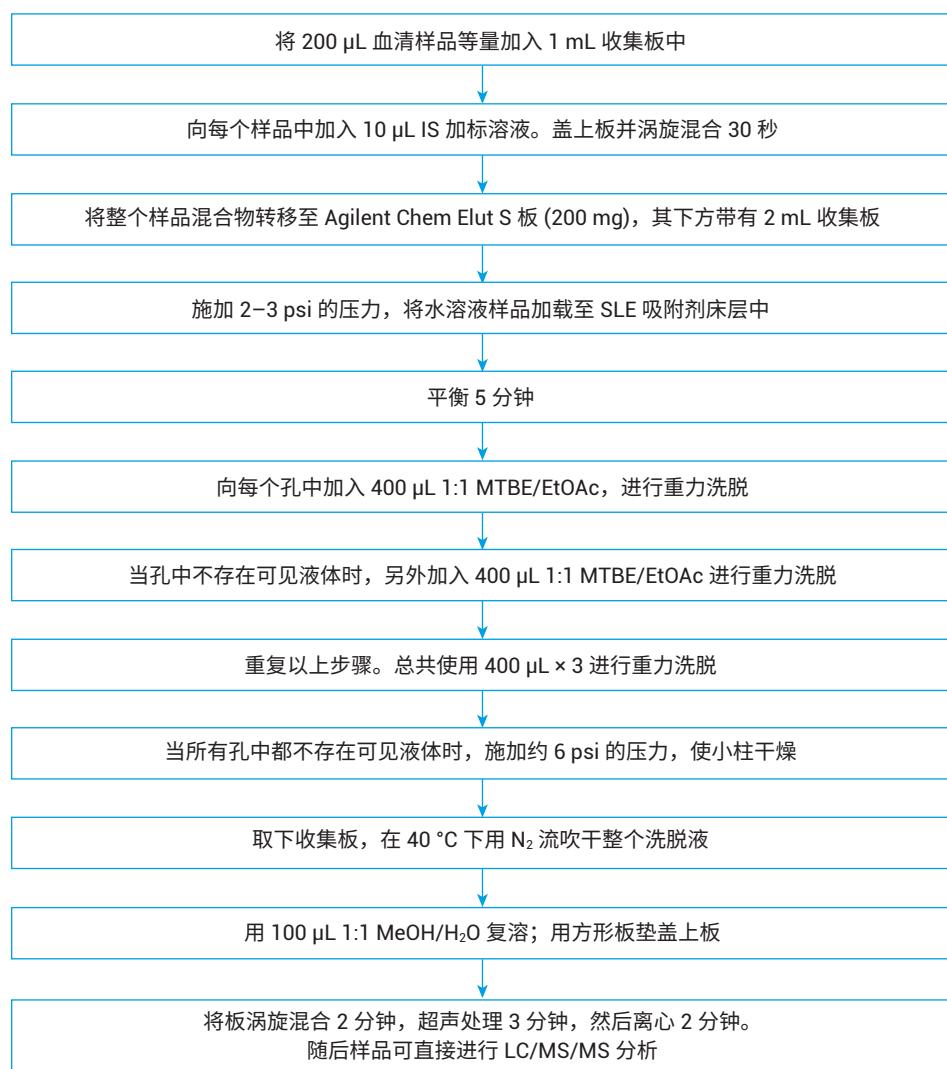
使用 500 ng/mL 标准加标溶液（溶于 1:1 MeOH/水中）配制血清中浓度为 50 ng/mL 的中间标准加标溶液。然后利用该中间标准加标溶液配制人血清中的校准曲线标样。将适当体积的中间标准加标溶液加入血清空白中，制得浓度为 5、10、20、50、100、500、1000、5000 和 10000 pg/mL 的校准标样。在准确度和精密度方法验证测试中，运行四个浓度的质量控制 (QC) 样品，包括浓度为定量下限 (LLOQ) 5(10/20) pg/mL 的 QC 样品、浓度为 100 pg/mL 的中等浓度 QC 样品、浓度为 1000 pg/mL 的高浓度 QC 样品以及浓度为定量上限 (HLOQ) 10000 pg/mL 的 QC 样品。这些 QC 样品通过加入合适体积的血清中间样品制得。所有校准标样和 QC 样品都在 2 mL 卡口盖管或 5 mL 塑料管中制得。然后将其等量加入 96 孔板中进行萃取。

样品萃取

SLE 萃取优化是基于对分析物回收率和基质净化度的考虑，包括溶剂的选择以及洗脱体积和时间。图 3 详细介绍了最佳样品前处理程序。整个方案包括四个主要部分：将等分试样加载到板上，与 IS 混合并转移至 SLE 板，在 SLE 板上进行样品萃取，以及在收集板上进行样品后处理。将血清样品等量加入 1 mL 收集板中，随后加入 IS 加标溶液。样品涡旋混合后，将整个样品混合物转移至 Chem Elut S

2 mL 板，其下方有一个 2 mL 方形收集板。将萃取溶剂添加到 SLE 板时要谨慎操作，避免因溶剂飞溅而导致交叉污染。使用重力进行洗脱，最后进行吸附剂干燥

步骤，此时应缓慢引入压力或真空。由于使用挥发性溶剂 MTBE 和 EtOAc 进行萃取，因此在通风橱中执行萃取步骤非常重要。



方法验证

采用为期三天的准确度和精密度（A 和 P）运行来验证方法。由于每天的 A 和 P 运行使用三批不同的 SLE 板，因此为期三天的 A 和 P 方法验证也用于进行 SLE 板的批次间重现性测试。对校准标样和 QC 样品进行合适的预加标。按照以下顺序将样品等量加入收集板中：双基质空白、基质空白（加标 IS）、第一组校准标样、2–3 个基质空白、LLOQ ($n = 6$)、中等浓度 QC ($n = 6$)、高浓度 QC ($n = 6$)、HLOQ ($n = 6$)、2–3 个残留基质空白、双基质空白、基质空白、第二组校准标样、2–3 个基质空白。

方法和产品比较

将经验证的 SLE 方法与 LLE 以及基于硅藻土的 SLE 进行分析物回收率、重现性 (RSD)、基质效应和校准曲线线性比较。

比较血清中 1 ng/mL 的预加标和后加标 QC 样品之间的分析物仪器响应（峰面积），对分析物绝对回收率进行研究。将预加标的 QC 样品适当地直接加入血清中，并利用开发的方法对样品进行前处理。萃取后，将后加标的 QC 样品加标至基质空白中。具体来说，后加标发生在样品的复溶阶段，是使用适当的纯标准溶液复溶干燥的基质空白样品。比较后加标 QC 样品和试剂空白溶剂中制得的对应纯标样之间分析物的仪器响应（峰面积），对基质效应进行研究。

基质磷脂去除

通过监测磷脂谱图，对基质净化度进行考察。使用 Chem Elut S 板进行的血清样品萃取展示了部分磷脂去除。对处理后的血清与其他种类血浆的基质空白磷脂曲线进行了对比。使用 Chem Elut S 板和竞争对手对应的基于硅藻土的 SLE 板，进一步对比了使用不同萃取溶剂对磷脂去除的影响。

结果与讨论

本研究的重点是展示在临床研究应用中使用 Chem Elut S 板进行血清中类固醇的定量测定。

方法开发与优化

仪器方法和特别注意事项： 使用 ESI 或 APCI 离子源时，五种类固醇分析物（雌三醇、雌激素、雌二醇、2-甲氧基雌激素和 2-甲氧基雌二醇）非常难以电离。在常规条件下，即使在高浓度下，也很难观察到这些化合物的信号。可以选择对这些化合物进行衍生化，但是需要在样品前处理过程中增加额外步骤。对于衍生化和未经衍生化的类固醇，也很难执行联合样品前处理方法。据报道，使用氟化铵缓冲液有助于负离子模式下的电离^[4]，并能大大提高类固醇的分析灵敏度^[5]。基于这些认识，针对那些难以电离的类固醇化合物采用 1 mmol/L 氟化铵缓冲液作为流动相，使仪器分析灵敏度得以显著改善。对缓冲液浓度的进一步考察发现，更低的氟化铵浓度 (0.2 mmol/L) 可提供更出色的分析灵敏度。此外，流动相 A 和 B 中相同的盐浓度能提供更加一致的结果。然后将最佳条件确定为，以 0.2 mmol/L 氟化铵的水溶液和 MeOH 溶液分别作为流动相 A 和 B。

如之前所述^[5]，使用氟化铵缓冲液不仅能提高这些难以电离的类固醇化合物在负离子模式下的电离效率，还能提高其他化合物在正离子模式下的电离效率。对于整组 15 种类固醇分析物，基于该条件建立

了仪器方法。图 4 显示了血清中浓度为定量限 (LOQ) 5 pg/mL 的 E1 和 E2 色谱图，证明方法分析灵敏度得到改善。

需要重点注意的是，类固醇化合物对玻璃表面非常敏感，尤其在低浓度下。使用玻

璃样品瓶可能导致类固醇化合物发生显著变化和损失，在样品介质含水量较高时尤其如此。因此，在标样和样品制备及处理过程中，应避免使用玻璃样品瓶和样品管。

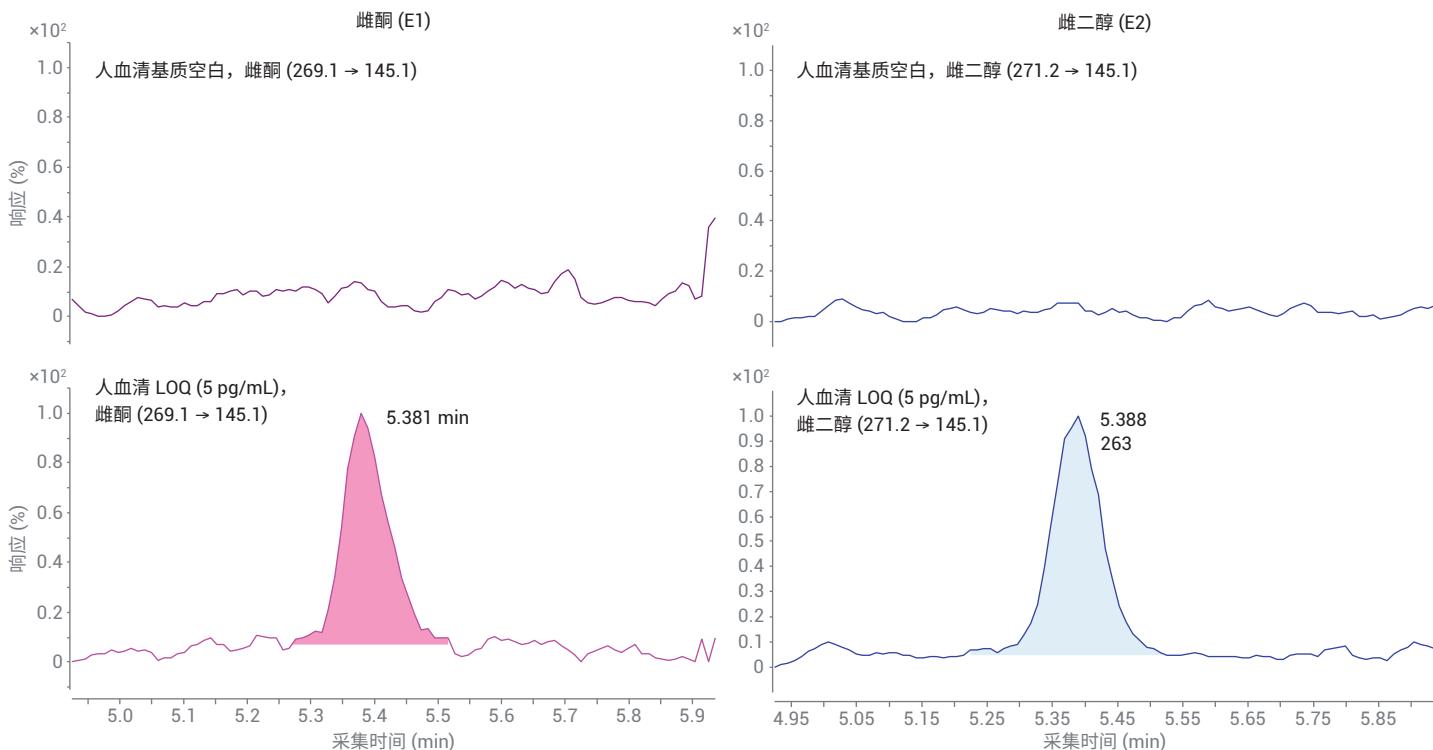


图 4. 血清空白以及血清中浓度为 LOQ 5 pg/mL 的雌激素 (E1) 和雌二醇 (E2) 的色谱图

SLE 方法优化：SLE 方法可基于现有的 LLE 方法进行开发，也可以直接在 SLE 小柱或样品板上开发。本研究参考目前已公开的 LLE 方法，直接在 SLE 板上优化 SLE 方法。SLE 方法优化包括溶剂、溶剂混合物和样品洗脱优化。优化基于对平均分析物回收率、RSD 和基质效应的组合评估，如图 5 所示。

首先考察萃取溶剂，对四种常用的 LLE 溶剂/溶剂混合物进行了评估：MTBE、乙醚 (DEE)、EtOAc 和 DCM/MTBE (1:4)。如图 5 中第一组用于溶剂选择的对

比（左图）所示，MTBE 萃取时平均基质效应最佳，表明基质最洁净，但是平均回收率较低。EtOAc 萃取时萃取效率最高，但是也导致了更强的基质离子抑制效应。DEE 和 DCM/MTBE 混合物萃取时均具有较低的分析物回收率，并且 DCM/MTBE 萃取的重现性较差。因此，进一步考察了 MTBE/EtOAc 的混合物，以找出分析物回收率与基质效应之间的最佳平衡。

在图 5 中用于溶剂混合物优化的第二组对比（中间图）中，将 MTBE 和 EtOAc 以 1:1、2:1 和 1:2 的比率混合并用于样

品萃取。图 5 表明，1:1 MTBE/EtOAc 混合物萃取在分析物回收率和基质效应之间实现了最佳平衡，因此被选为最佳萃取溶剂。这些研究基于使用 500 μL 溶剂进行两次萃取。使用 400 μL 最佳溶剂进行三次萃取，以进一步研究样品萃取情况。结果如图 5 中的第三组对比（右图）所示。使用 400 μL 的 1:1 MTBE/EtOAc 进行三次萃取实现了对 SLE 方法的优化。

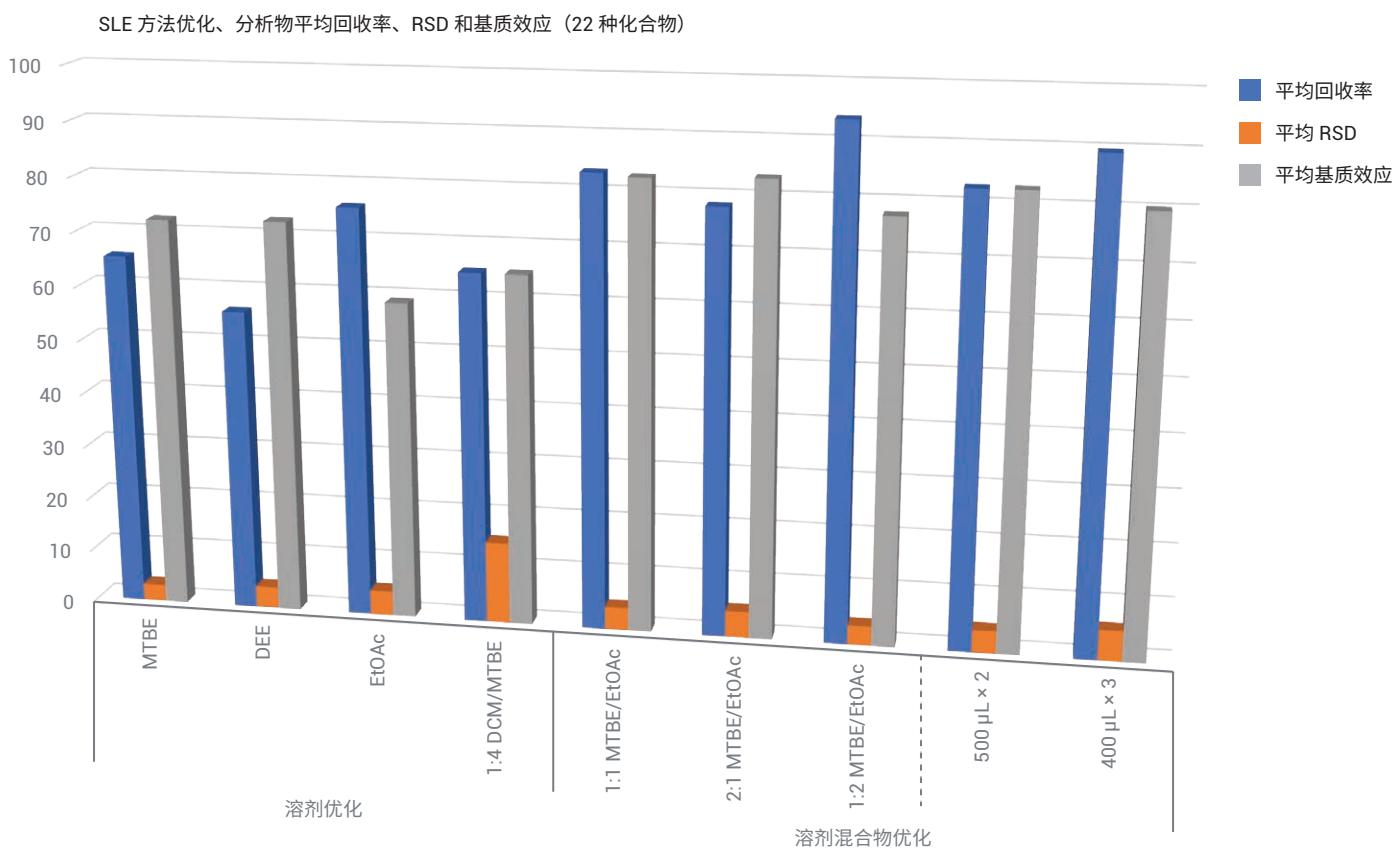


图 5. 针对溶剂选择和样品洗脱的 SLE 方法优化，优化基于对平均分析物回收率、RSD 和基质效应的组合评估

方法验证

通过为期三天的准确度和精密度运行收集完整的定量结果，对优化的方法进行验证。表 3 中显示的结果包括校准曲线数据和三天/批次准确度和精密度数据。使用线性回归和 $1/\chi^2$ 的权重生成所有分析物的校准曲线，它们的 R^2 均高于

0.99。大多数分析物在血清中的 LOQ 为 5 pg/mL，但由于基质干扰或基质空白中存在某些分析物，导致以下化合物除外：雌二醇和睾酮的 LOQ 为 10 pg/mL，孕酮、17-羟基孕烯醇酮和氢化可的松的 LOQ 为 20 pg/mL。为期三天的准确度和精密度运行不仅验证该方法能够实现可靠

的定量，而且由于使用三个不同生产批次的 SLE 板，还证明了 Chem Elut S 板具有良好的批次间重现性。图 6 显示了基于分析物准确度和精密度的 SLE 板批次间重现性汇总结果。

表 3. 定量测定人血清中的 15 种类固醇化合物的方法验证结果

分析物	LOQ (pg/mL)	校准范围 (pg/mL)	QC 加标浓度 (pg/mL)	准确度和精密度					
				第 1 天 (SLE 批次 1)		第 2 天 (SLE 批次 2)		第 3 天 (SLE 批次 3)	
				准确度% (n = 6)	RSD% (n = 6)	准确度% (n = 6)	RSD% (n = 6)	准确度% (n = 6)	RSD% (n = 6)
雌三醇	5	5–10000	5	95	18.0	97	6.9	103	11.6
			100	102	6.5	97	8.3	107	5.2
			1000	98	2.8	92	1.2	92	4.6
			10000	107	5.9	92	5.6	101	4.2
醛固酮	5	5–10000	5	106	4.7	103	12.4	100	9.4
			100	96	9.3	101	12.8	97	3.0
			1000	111	2.5	103	4.2	98	1.9
			10000	113	2.4	95	7.5	107	4.2
可的松	5	5–10000	5	104	9.8	92	10.1	99	7.6
			100	93	7.0	93	9.2	97	7.6
			1000	104	3.5	94	3.7	100	2.4
			10000	106	5.6	95	7.8	106	5.5
氢化可的松	20	20–10000	20	89	6.5	97	13.6	86	12.6
			100	96	18.2	90	6.7	96	9.5
			1000	96	4.4	93	2.4	93	4.1
			10000	95	6.3	92	4.1	97	6.8
17-羟基孕烯醇酮	20	20–10000	20	109	1.8	99	18.9	91	8.1
			100	94	19.2	91	8.2	103	15.4
			1000	94	6.0	91	2.1	100	5.2
			10000	93	3.6	97	3.8	106	9.3
11-脱氧皮质醇	5	5–10000	5	99	8.3	95	10.7	95	16.2
			100	94	6.5	89	10.4	97	9.1
			1000	105	1.5	87	3.8	99	1.7
			10000	110	2.7	92	7.2	104	4.5
雄烯二酮	5	5–10000	5	99	11.4	102	9.5	110	11.2
			100	88	8.2	89	8.8	106	10.7
			1000	104	2.1	90	3.7	91	1.6
			10000	109	5.5	101	5.7	108	7.6
雌酮	5	5–10000	5	95	8.7	92	11.3	102	8.9
			100	98	10.1	95	7.5	99	4.3
			1000	104	2.8	95	2.8	96	3.0
			10000	105	6.2	94	3.3	98	4.3

分析物	LOQ (pg/mL)	校准范围 (pg/mL)	QC 加标浓度 (pg/mL)	准确度和精密度					
				第 1 天 (SLE 批次 1)		第 2 天 (SLE 批次 2)		第 3 天 (SLE 批次 3)	
				准确度% (n = 6)	RSD% (n = 6)	准确度% (n = 6)	RSD% (n = 6)	准确度% (n = 6)	RSD% (n = 6)
雌二醇	10	10–10000	10	105	10.2	101	19.3	100	9.7
			100	97	11.4	96	10.2	102	10.2
			1000	99	3.0	102	5.1	95	2.4
			10000	101	2.9	102	2.1	100	4.3
11-脱氧皮质酮	5	5–10000	5	108	12.3	101	13.5	113	6.5
			100	94	7.6	94	9.8	104	13.3
			1000	108	4.8	105	5.2	103	4.7
			10000	109	5.8	108	5.7	115	5.3
2-甲氧基雌酮	5	5–10000	5	109	9.0	111	4.8	100	7.8
			100	93	3.7	94	7.7	95	7.2
			1000	106	2.9	93	4.1	91	4.7
			10000	111	3.2	101	7.2	104	2.6
睾酮	10	10–10000	10	100	9.0	95	8.9	94	10.9
			100	94	3.7	91	6.6	100	8.5
			1000	102	2.9	89	4.7	97	6.2
			10000	104	3.2	106	6.3	102	5.0
2-甲氧基雌二醇	5	5–10000	5	92	9.1	109	7.4	94	10.1
			100	96	6.2	103	7.9	98	7.2
			1000	99	1.9	94	1.9	93	4.5
			10000	106	3.1	99	2.5	105	2.9
17-羟基孕酮	5	5–10000	5	98	14.9	103	9.1	95	10.8
			100	89	5.2	93	9.2	98	7.2
			1000	105	4.8	89	4.2	100	3.3
			10000	106	4.5	103	4.9	100	2.2
孕酮	20	20–10000	20	108	4.8	97	11.0	89	4.0
			100	97	6.7	91	12.1	101	5.2
			1000	119	6.7	91	3.3	95	2.5
			10000	112	6.8	99	7.3	104	4.2

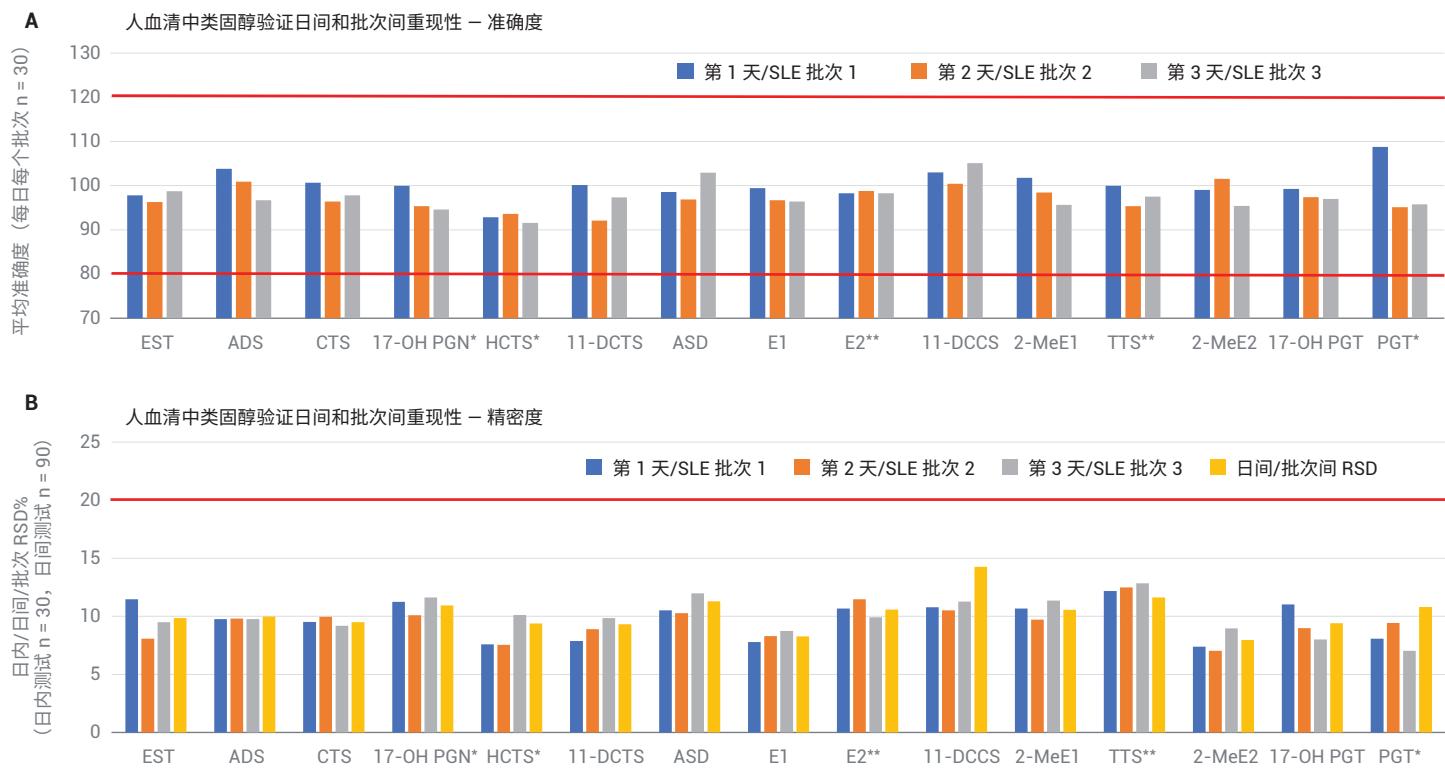


图 6. 基于准确度和精密度的 Agilent Chem Elut S 方法的日间验证与板批次间性能重现性汇总

方法和产品比较

基于分析物回收率、重现性、基质效应和校准曲线线性，对开发的 Chem Elut S 方法与传统的 LLE 和竞争对手的硅藻土 SLE 进行了方法性能比较。

SLE 与 LLE 相比可明显节省人力和时间。SLE 工作流程节省了样品混合、相分离和有机相上清液转移等关键步骤所需的人力和时间，从而显著提高了样品前处理效率。省去这些步骤后，根据样品数量不同，SLE 方法能够轻松节省 50% 或更多

的时间。除节省时间和人力外，SLE 程序还可防止形成乳浊液，提高方法可靠性。

图 7 显示了基于分析物回收率 (7A) 和重现性 (7B) 的方法性能比较。SLE 方案实现了水相和有机相之间的紧密接触，可实现高效分配，从而提高分析物回收率。与 LLE 方法相比，使用 SLE 方法时分析物的整体回收率增加了 10% 至 20%。更高的分析物回收率可提高分析物响应，从而获得更出色的方法分析灵敏度。

使用基于硅藻土的 SLE 实现了相当或稍高的回收率，然而观察到明显的孔间差异性，尤其对于极性较强的分析物。其原因可能在于硅藻土吸附剂和持水容量不一致。由于 Chem Elut S 板提供了良好的孔间重现性和方法分析灵敏度，因此校准曲线线性也得到了改善。所有这些改善使定量方法更可靠、更一致。

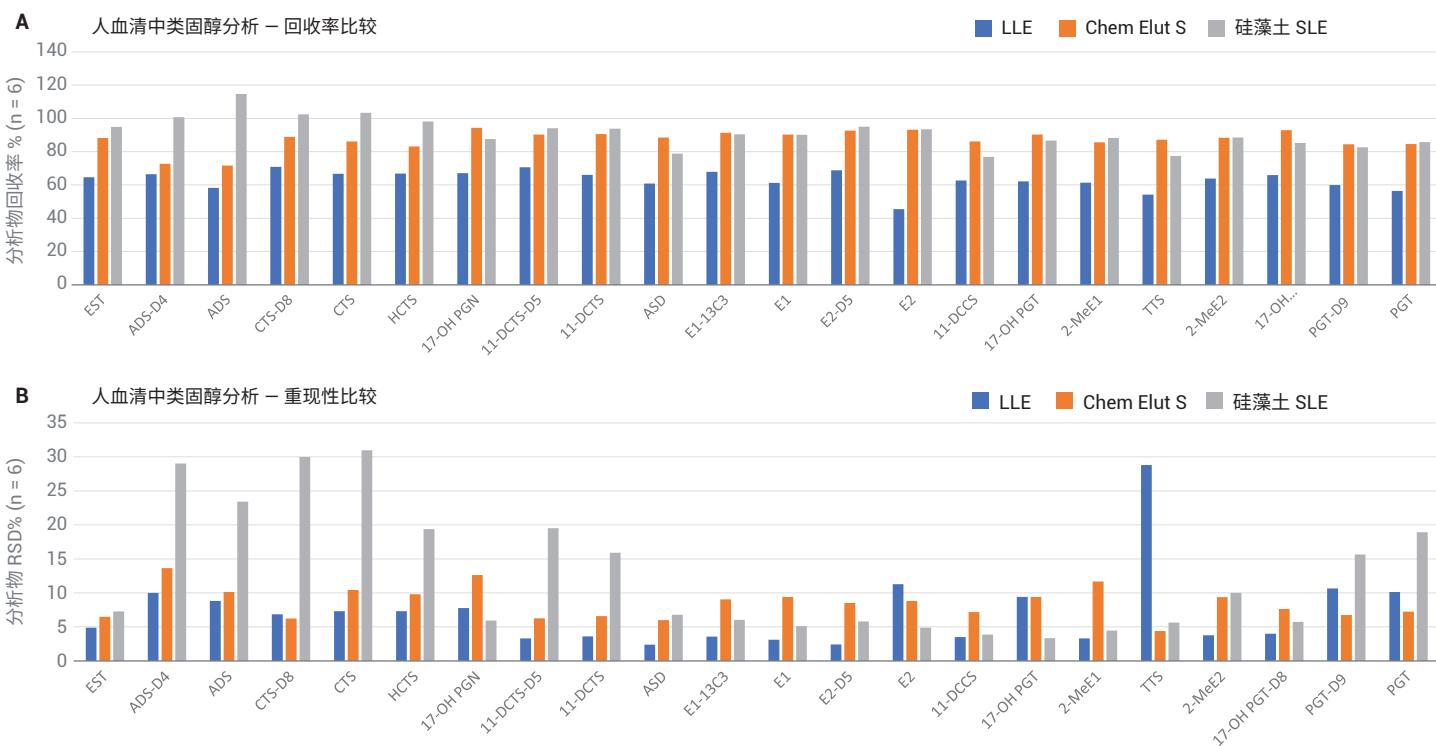


图 7. LLE、Agilent Chem Elut S 和硅藻土 SLE 的方法和产品性能比较

基质磷脂去除

使用 Chem Elut S 板进行生物体液前处理也可以去除部分磷脂。

本研究使用去除了激素的血清，以便在目标类固醇的极低定量限下实现良好的基质选择性。然而，经处理的血清也去除了磷脂，对于其他应用测试可能并不需要。为考察磷脂去除，使用标准 LLE、Chem Elut S 和竞争对手的硅藻土 SLE 方法对未经处理的血浆基质中的磷脂进行分析。图 8A 中的曲线对比结果显示，使用 MTBE 溶剂的 Chem Elut S 方法的磷脂去除率比竞争对手的硅藻土 SLE 方法高 99%，比基于 MTBE 的 LLE 方法高 30%。

对不同类型的血浆使用不同的萃取溶剂，进一步比较研究 Chem Elut S 和硅藻土 SLE 的方法性能，结果如图 8B 所示。基于丰度对磷脂总响应进行归一化。研究结果表明：

- 不同类型的血浆具有不同的磷脂丰度，其中脂性血浆中磷脂最为丰富
- 不同溶剂可实现不同程度的磷脂萃取，其中 EtOAc 和 DCM 比 MTBE 和 DEE 能萃取更多磷脂
- 与竞争对手的硅藻土 SLE 相比，Chem Elut S 可实现更高效的磷脂去除

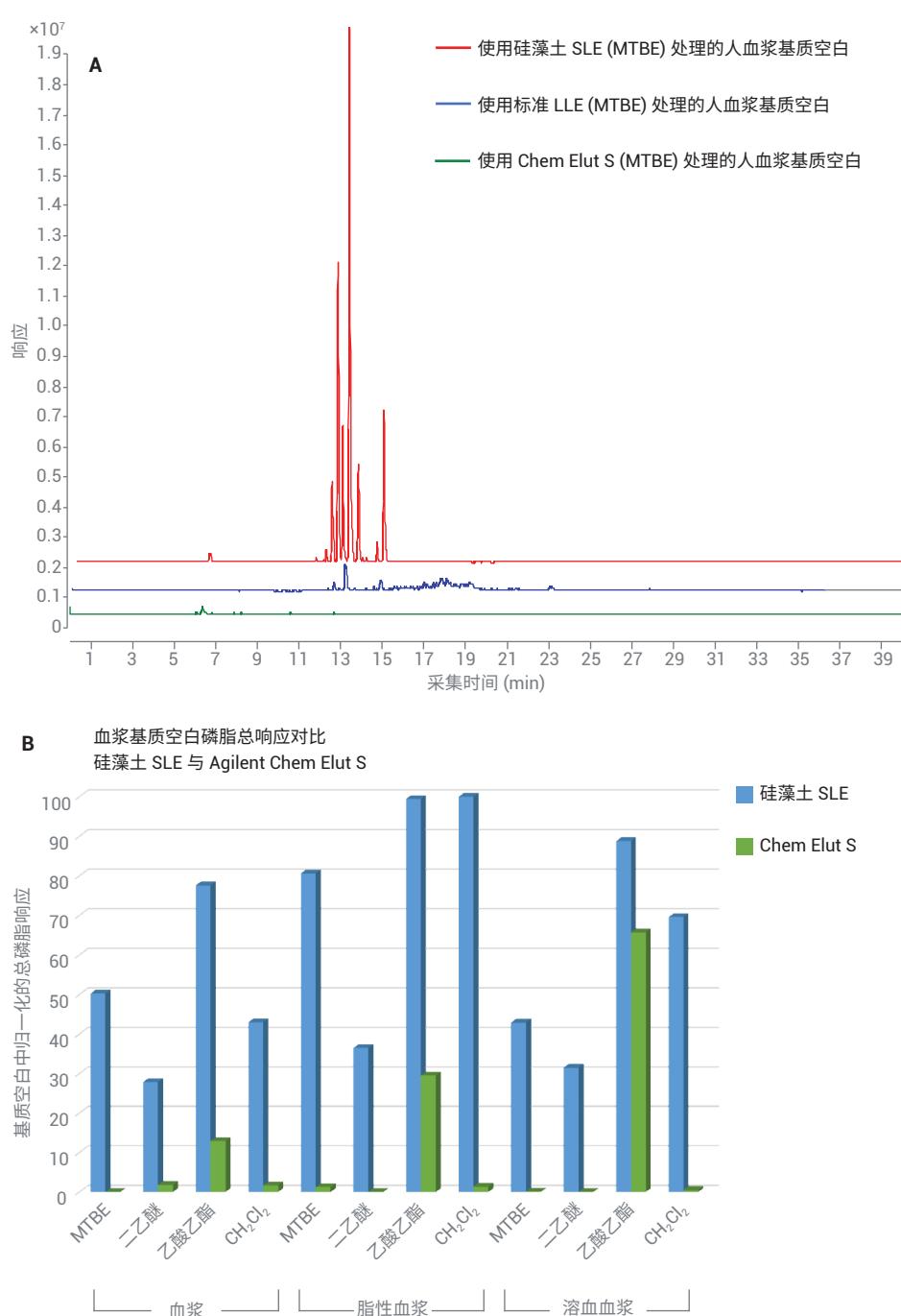


图 8. 使用不同溶剂得到的 Agilent Chem Elut S、硅藻土 SLE 与 LLE 对血浆中的磷脂去除比较

结论

开发出一种使用 Agilent Chem Elut S 2 mL 板的样品前处理方法，并验证了该方法对人血清中一组共 15 种类固醇化合物的定量测定。基于分析物回收率、方法重现性和基质效应，对 SLE 方法的所用溶剂和样品洗脱进行了优化。为期三天的准确度和精密度运行证实，该方法具有可接受的校准曲线线性、卓越的日内和日间准确度和精密度、优异的分析物回收率和方法重现性。与标准 LLE 和硅藻土 SLE 相比，Chem Elut S 方法比标准 LLE 提供了更高的总体分析物回收率，并且比硅藻土 SLE 具有更出色的吸附剂一致性和孔间小柱重现性。它还为生物体液基质（如血浆和血清）提供了高效的磷脂去除。在 96 孔板形式上开发的方案非常适合高通量实验室中的快速自动化样品前处理需求。便捷的上样和洗脱程序还简化了液体萃取工作流程，从而大大节省人力和时间。Chem Elut S 具有高于硅藻土吸附剂的样品保持能力，可提供高效的样品吸附并降低样品穿透的可能性。新型板设计提供了：

- 用于样品和洗脱液的较大顶空区域
- 方形上部滤芯，可在施加压力或真空之前保持样品
- 全裙板，以实现良好的硬件兼容性
- 快速、一致的洗脱

参考文献

1. Anari, M. R.; et al. Derivatization of Ethinylestradiol with Dansyl Chloride to Enhance Electrospray Ionization: Application in Trace Analysis of Ethinylestradiol in Rhesus Monkey Plasma. *Analytical Chemistry* **2002**, 74, 4136–4144
2. Lee, J. S.; et al. Comparison of methods to measure low serum estradiol levels in postmenopausal women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **2006**, 91, 3791–3797
3. Kushnir, M. M.; et al. High-Sensitivity Tandem Mass Spectrometry Assay for Serum Estrone and Estradiol. *Clinical Chemistry* **2008**, 129, 530–539
4. Wang, W.; Cole, R. B.; Enhanced Collision-Induced Decomposition Efficiency and Unraveling of Fragmentation Pathways for Anionic Adducts of Brevetoxins in Negative Ion Electrospray Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2009**, 81, 8826–8838
5. Hindle, R. Improved Analysis of Trace Hormones in Drinking Water by LC/MS/MS (EPA 539) using the Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS (使用 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统通过 LC/MS/MS 改善饮用水中痕量激素的分析 (EPA 539))，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-2473EN, **2013**

查找当地的安捷伦客户中心：

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

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

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5月15日, 中国出版
5994-0949ZHCN

