

## 使用在线固相萃取和柱间衍生直接分析血浆中的雌性激素

PromoChrom Technologies Ltd.

雌激素是一类甾体化合物，主要有雌酮 (estrone, E1)，雌二醇 (estradiol, E2)，和雌三醇 (estriol, E3) 等。雌激素的分析对于疾病的诊断具有重要的意义。

雌激素的分析通常是使用 HPLC 或 LC-MS。由于检测的浓度比较低，而紫外和质谱检测器对这类化合物的灵敏度又不是很理想，在分析前通常需要衍生化。衍生化通常是在手动的条件下进行。反应的加热时间，放置时间，和试剂用量的差异都会影响分析结果的重复性。此外，衍生化试剂是直接加入到未经净化的样品中，样品成分的变化也会影响衍生反应的进行。

本文以雌酮为例，介绍一种血浆中雌性激素的直接分析方法。样品经在线固相萃取净化和在线衍生后直接用 HPLC 分析，样品制备和仪器分析全部自动完成。

### 材料和方法

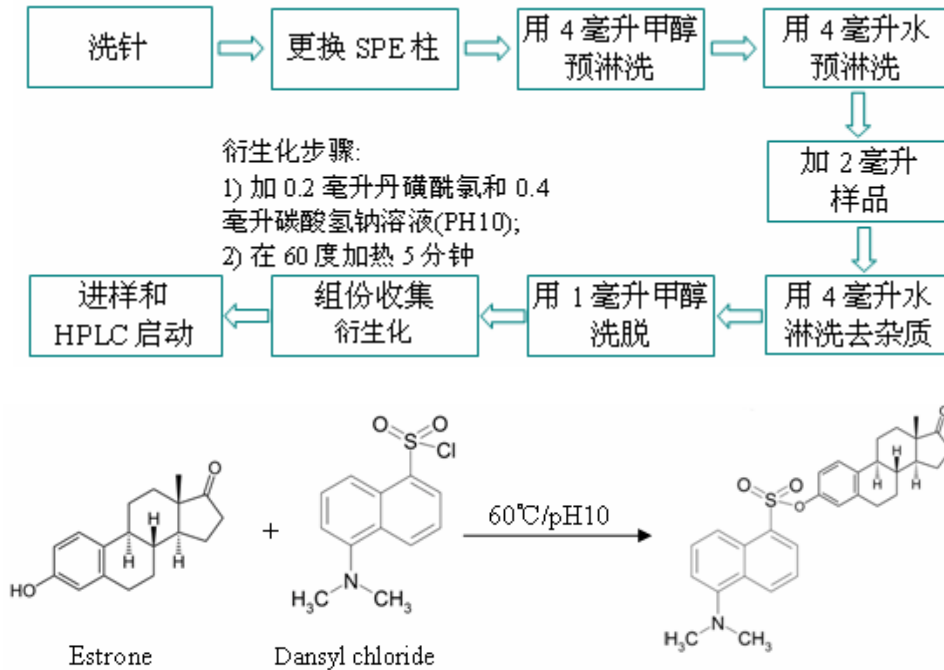
#### 仪器

仪器包括一台 SPE-04 多功能样品制备仪和安捷伦 1100 液相色谱仪 (含四元泵和紫外检测器)。两套仪器通过遥控信号实现同步。



## 方法

下面两张图描述 SPE-04 的自动运行步骤和有关的衍生化反应:



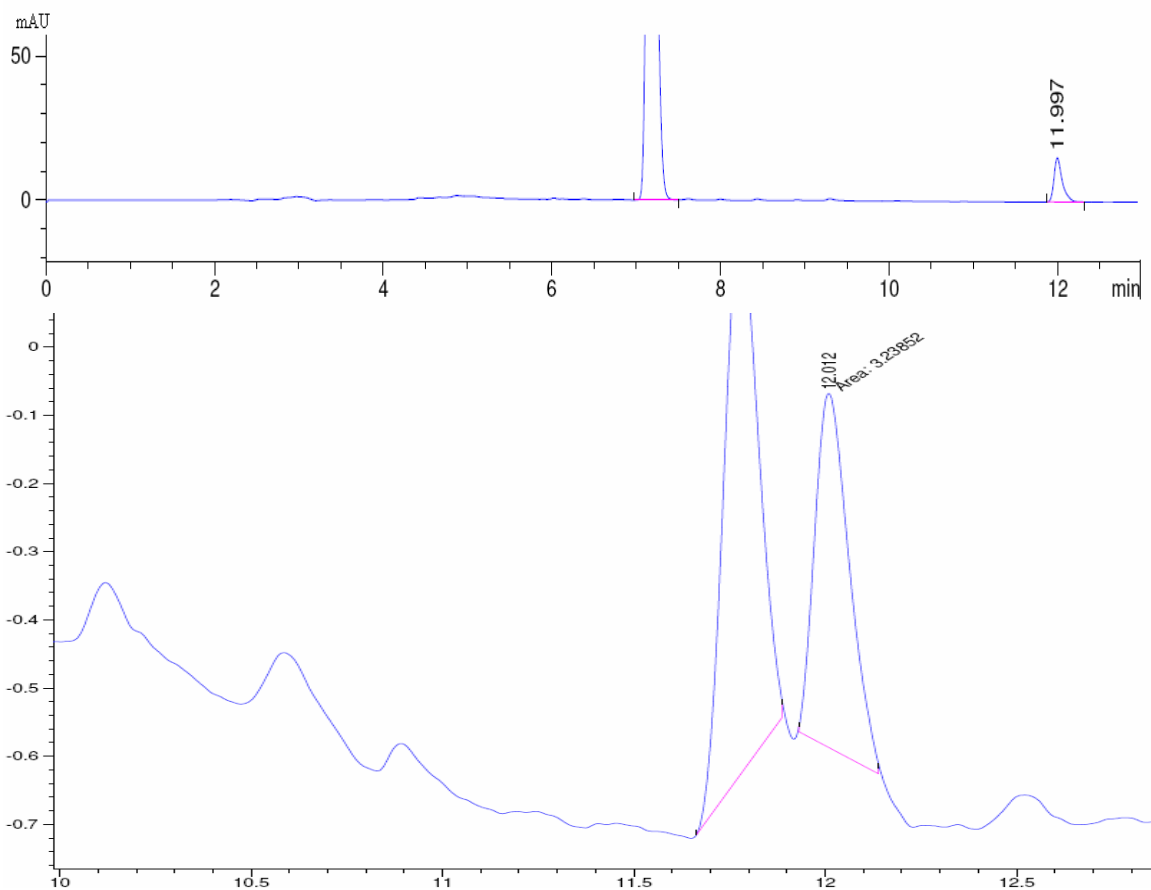
所用固相萃柱为 PromSil C18, 规格为 500-mg/3-mL. SPE-04 可以使用普通的固相萃柱, 不需要使用特别的接头或盖子。

HPLC 条件: 色谱柱, PCTsil-C18 (4.6X250 毫米); 流速, 1.2 毫升/分钟; 淋洗梯度, A 为乙氰, B 为 0.1% 三氟醋酸, 开始为 30%A, 8 分钟内 A 增加到 90%, 维持 4 分钟后 A 又降回 0%; 检测波长, 360 纳米; 进样体积, 20 微升。雌酮衍生物在此条件下的保留时间为 12.0 分钟。

## 结果

### 1. 灵敏度

血浆样品分别添加 2 和 20PPM 雌酮, 用水稀释一倍, 然后用上述方法分析。由下图可见, 所用的在线 SPE 净化可以有效去除样品的干扰。衍生后可以使用较长的检测波长, 也有助于降低基线噪音。根据下图估算, 雌酮在血浆样品中的最低检测浓度在 0.5PPM 以下。要进一步提高灵敏度, 可以使用荧光或质谱检测器。



上图：添加 20 ppm 雌酮的血浆样品

下图：添加 2 ppm 雌酮的血浆样品

## 2. 重现性

水中添加 20 ppm 雌酮后重复分析四次。所得结果见下表:

重复	峰面积(s.mAU)
1	131.6
2	135.3
3	138.0
4	133.9
平均	134.7
CV%	2.0

虽然雌酮的分析涉及较多的样品处理步骤，还是获得了很好的重现性。这首先要归功于样品制备的自动化。特别是衍生步骤的温度和时间的精确控制，可以有效消除各次分析反应条件造成的差异。

## SPE-04 多功能样品制备仪

SPE-04 多功能样品制备仪具有以下四种功能：1) 离线固相萃取；2) 在线固相萃取；3) 在线衍生；4) HPLC 自动进样。

当使用在线模式时，净化后的组份直接进入液相色谱仪，不需要浓缩和样品转移等步骤，既可以提高效率 and 重复性，又可以减轻操作人员的劳动强度。

仪器控制软件和大多数 HPLC 软件相容，安装和使用都非常方便。

仪器软件的设计和安杰伦的化学工作站很相似，也是使用方法和序列列表。熟悉 HPLC 操作的人员可以很快掌握样品处理仪的软件操作。仪器还具有在线衍生的功能。目标化合物经 SPE 净化后，可以自动和一或二种衍生化试剂混合。在控温的条件下(30~80°C)反应后，引入 HPLC。虽然一些高档的 HPLC 自动进样器也有柱前衍生的功能，但是只能在室温下进行，既限制了衍生化试剂的选择范围，又有可能因为温度波动或净化不好增加误差。

