

在线固相萃取-柱间衍生-高效液相色谱法直接测定血浆中的雌性激素

(1.PromoChrom Technologies Ltd 2.北京绿绵科技有限公司)

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，介绍一种使用 SPE-04 在线固相萃取仪串联高效液相色谱仪直接分析血浆中雌性激素的方法。样品经在线固相萃取净化和在线衍生后直接进入 HPLC 分析，样品制备和仪器分析全部自动完成。

关键词：血浆，雌激素，SPE-04 在线固相萃取仪，高效液相色谱

1、仪器配置与原理

1.1 仪器配置



高效液相色谱仪：Agilent 1100，配置 G1354A 四元梯度泵及 G1314A 紫外检测器。

在线固相萃取仪：SPE-04 多功能 Online SPE, PromoChrom Technologies。

两套仪器通过遥控信号实现同步。

2、分析方法

血浆样品经离心去蛋白后取 2 毫升，用水稀释至 4 毫升。

2.1 在线固相萃取及在线衍生

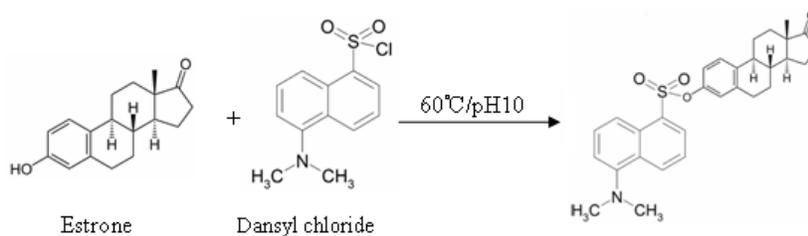
固相萃取柱：PromSil C18, 500mg/3mL, PromoChrom Technologies;

注射泵流速：10ml/min;

衍生试剂：0.2ml 丹磺酰氯+0.4ml 碳酸氢钠溶液 (pH=10)

衍生温度：60℃, 5min;

处理步骤：4ml 甲醇活化萃取柱，4ml 水预淋洗，上样 2ml，4ml 水洗去杂质，1ml 甲醇洗脱，洗脱液全部衍生，衍生完成后自动进样并触发液相色谱分析。



2.2 HPLC-UV 检测

色谱柱：PromSil C18 柱, 250mm×4.6 mm, 5μm, PromoChrom Technologies;

流动相：A 为 乙氰, B 为 0.1% 三氟醋酸

梯度洗脱：起始为 30% A, 8min 内 A 增加到 90%, 保持 4min 后 A 降回 0%

流速：1.2 mL/min;

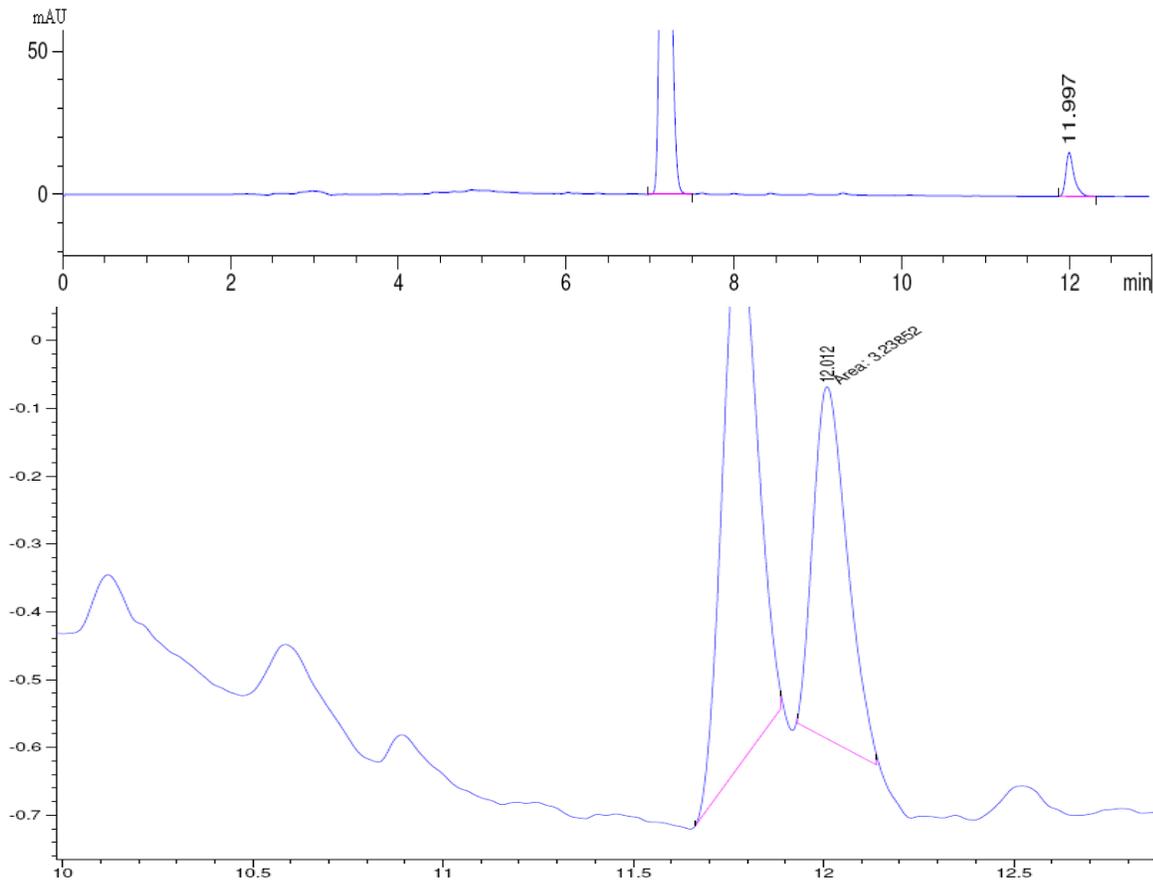
波长：360 nm;

进样量：20 μL

3、分析结果

3.1 方法灵敏度

血浆样品分别添加 2 和 20 ppm 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。使用该方法，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

3.2 方法重复性

血浆中添加 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，但 SPE-04 的样品制备自动化功能有效的保证了很好的重现性。特别是衍生温度和时间的精确控制，可以有效消除分析反应条件造成的差异。