



应用通讯 #704055

## 马血浆中克仑特罗检测的应用——全新EVOQ™液质联用三重四级杆质谱仪离子源优异的稳定性和高灵敏度研究

### 摘要

本文讨论了EVOQ LC-TQ在反复进样马血浆样品条件下可维持的高灵敏度。含有克仑特罗的马血浆样品，去除蛋白后，未通过分流阀直接注射到系统中（稀释并进样）。对四条标准曲线进行了分析：开始时一条，每隔100个样品做一条。结果显示，使用EVOQ LC-TQ测试，在连续两天时间分布在400个马血浆样品中的四条标准曲线，响应因子的相对标准偏差（%RSD）成功达到<10%的评判标准，响应因子的%RSD<5%。

### 前言

可维持的高灵敏度和高稳定性是实验室定量分析成功与否的决定性因素。本实验目的是测试EVOQ LC-TQ的离子源设计，对马血浆样品采取稀释后直接进样的方式，没有通过在线的分流阀。每一个样品进样，离子源都暴露在从柱子上洗脱出的所有基质中。因为在电喷雾过程中，流动相在加热的氮气辅助下雾化蒸发，盐、脂质、糖、蛋白质和其他污染物容易凝聚在离子源内，随着时间的推移导致灵敏度降低。如果仔细研究离子源内气体流体动力学，设计应避免凝聚区域和冷却点，并消除气体涡流。采用夹带排空系统（主动排空）可以显著提高离子源的稳定性，同时保持高灵敏度。通过简单的有机溶剂沉淀除去蛋白后的马血浆样品被用做基质，用于稀释后进样实验。

## 实验条件

### Sample Preparation

马血浆样品用冷的含酸乙腈沉淀 (3:1, v/v), 样品离心 10 min, 取上清液按体积比1:1用流动相A稀释。

### 色谱 (Advance™ HPLC)

- 色谱柱: C18, 3  $\mu$ , 100x2.1 mm (ACE®, 编号: 111-1002)
- 进样体积: 30  $\mu$ L
- 流速: 0.45 mL/min
- 流动相 A: 0.2% 甲酸水溶液
- 流动相 B: 0.2% 甲酸乙腈溶液
- 梯度:
  - 0.0min 10% B
  - 0.3min 10% B
  - 2.5min 95% B
  - 2.8min 10% B
  - 4.5min 10% B

### 质谱 (EVOQ Elite™)

- VIP-HESI 真空隔层加热电喷雾离子源的加热温度: 300 °C
- 加热气体流量: 68 unit
- 雾化气流量: 90 unit
- 锥孔气温度: 300 °C
- 锥孔气流量: 10 unit
- 喷雾电压: +3500 V
- 克伦特罗和克伦特罗D9标记物
  - m/z 277.1>168 (CE:25v)
  - m/z 286.1>204 (CE:12v)

## 结果和讨论

响应因子是在整个校正范围内, 校正品与内标物的峰面积比 (校正/IS) 除以浓度。这是严格的灵敏度检测方法, 因为它考虑到校正曲线上的每一个点。灵敏度的任何下降都将表现为响应因子较高的%RSD。离子源同时需要稳定性和持续高灵敏度, 从实用角度讲, 这一数据的重要性超过一系列高浓度进样的重复性, 而后者在供应商的市场营销文献中经常出现。

四条校正曲线的响应因子的%RSD小于5%, 很好的满足生物分析方法的验证标准。图1显示了第一和第四校正曲线的拟合情况, 两者差异微不足道, 并在整个校正范围内表现出高灵敏度。

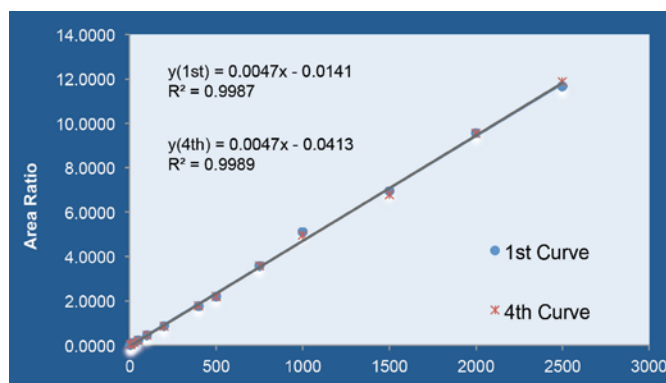


图1: 校正曲线1和4的叠加图, 表明了400次血浆注射过程中可维持的高灵敏度性能。

## 主动排空系统

主动排空系统在离子源内创造微弱的压力差, 从而引导并消除雾化气和污染物的涡流。广口排气通道确保迅速清空雾化气体, 保持前面离子取样锥孔的洁净。雾化气体被夹带在排气系统的气流中, 从LC-MS系统中清除。

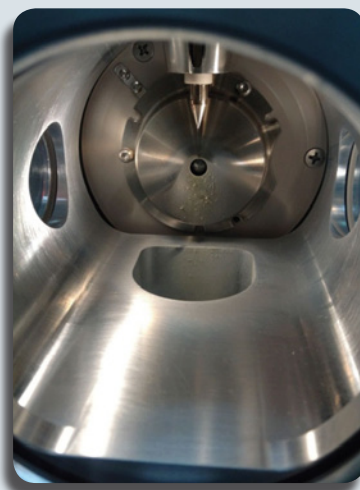


表1. 1号校正曲线				表2. 4号校正曲线			
Sample ID	Concentration (pg/mL)	Area Ratio	Response Factor	Sample ID	Concentration (pg/mL)	Area Ratio	Response Factor
Plasma C1	5	0.0229	0.00459	Plasma C1	5	0.0227	0.0045
Plasma C2	10	0.0468	0.00468	Plasma C2	10	0.0477	0.0048
Plasma C3	25	0.1130	0.00452	Plasma C3	25	0.1117	0.0045
Plasma C4	50	0.2162	0.00432	Plasma C4	50	0.2144	0.0043
Plasma C5	100	0.4556	0.00456	Plasma C5	100	0.4462	0.0045
Plasma C6	200	0.8706	0.00435	Plasma C6	200	0.8549	0.0043
Plasma C7	400	1.7639	0.00441	Plasma C7	400	1.7819	0.0045
Plasma C8	500	2.2001	0.00440	Plasma C8	500	2.1869	0.0044
Plasma C9	750	3.5731	0.00476	Plasma C9	750	3.5756	0.0048
Plasma C10	1000	5.0905	0.00509	Plasma C10	1000	4.9443	0.0049
Plasma C11	1500	6.9408	0.00463	Plasma C11	1500	6.7704	0.0045
Plasma C12	2000	9.5574	0.00478	Plasma C12	2000	9.5426	0.0048
Plasma C13	2500	11.6480	0.00466	Plasma C13	2500	11.8610	0.0047
			Average				Average
			Std. Dev				Std. Dev
			<b>4.58%</b>				<b>4.62%</b>

响应因子 %RSD      **4.58%**

响应因子 %RSD      **4.62%**

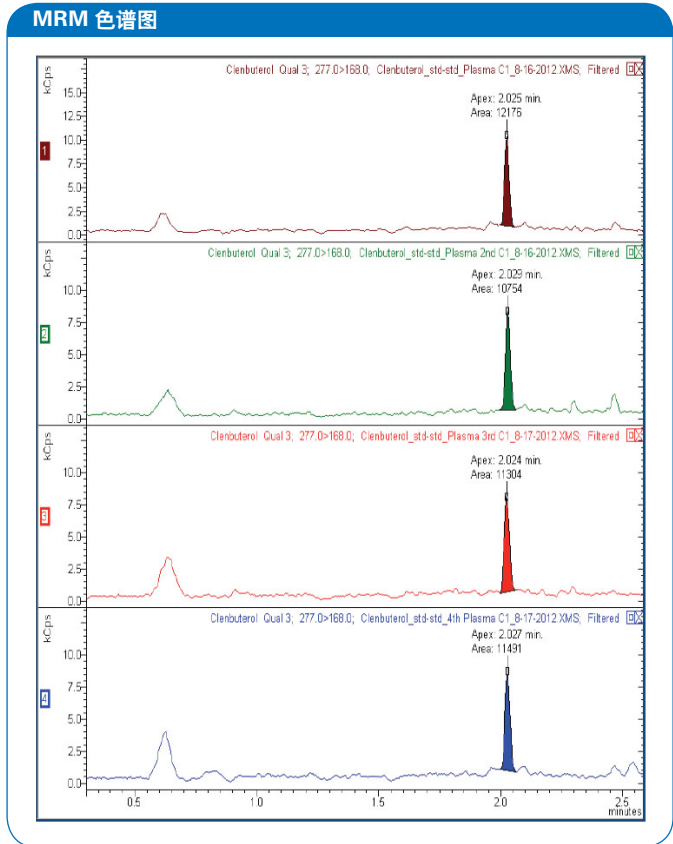


图3: 马血浆中浓度为5 ppt的克伦特罗代表性的MRM离子流图 (柱上150 fg), 自上而下分别为1-4校正曲线。显示了一致的峰面积和响应因子。

表1和2表明, 在反复进样血浆样品后, 离子源可维持的高灵敏度性能, 这是一个常规生化实验室恶劣环境下的关键需求。图3显示了所有四条校正曲线中, 第一校正水平样品的色谱图。

### 结论

本实验结果表明, EVOQ LC-TQ连续运行超过48小时 (周末), 并成功地分析了五个96孔板的样品, 其灵敏度损失微不足道。主动排空设计使得EVOQ LC-TQ离子源尽管反复暴露于基质中, 仍能保持最高的灵敏度水平, 确保在条件苛刻的定量分析实验室仍能保持稳定的状态。

## 作者

Zicheng Yang

## 致谢

感谢加州大学Davis分校 Scott Stanley教授  
制备马血浆样本

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.  
本产品仅用于研究, 不能用于诊断过程

### ● **Bruker Daltonik GmbH**

Bremen · Germany  
Phone +49 (0)421-2205-0  
Fax +49 (0)421-2205-103  
sales@bdal.de

[www.bruker.com/ms](http://www.bruker.com/ms)

### **Bruker Daltonics Inc.**

Billerica, MA · USA  
Phone +1 (978) 663-3660  
Fax +1 (978) 667-5993  
ms-sales@bdal.com

### **Bruker Daltonics Inc.**

Fremont, CA · USA  
Phone +1 (510) 683-4300  
Fax +1 (510) 490-6586  
ms-sales@bdal.com