



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113686984 A

(43) 申请公布日 2021. 11. 23

(21) 申请号 202110901281.8

(22) 申请日 2021.08.06

(71) 申请人 珠海市人民医院

地址 519000 广东省珠海市香洲区康宁路
79号

(72) 发明人 孙涛平 占美晓 耿旭洋 邓瑶

(74) 专利代理机构 重庆信必达知识产权代理有
限公司 50286

代理人 刘竹

(51) Int. Cl.

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/06 (2006.01)

G01N 30/54 (2006.01)

G01N 30/72 (2006.01)

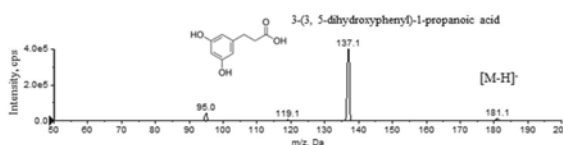
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种LC-MS/MS检测血浆烷基间苯二酚代谢
产物水平的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种LC-MS/MS检测血浆烷基间苯二酚代谢产物水平的方法,所述代谢产物为3-(3,5-二羟基苯基)-1-丙酸(DHPPA),属于生物标志物检测技术领域。样品采用蛋白沉淀法进行预处理,色谱分离采用BETASILPhenyl色谱柱(2.1×150mm,3 μm),以流动相0.1%乙酸水溶液和0.1%乙酸乙腈梯度洗脱;质谱采用电喷雾电离(ESI)和多反应监测模式(MRM)测定目标分析物。从专属性、标准曲线、线性范围和LL0Q、精密度和准确度、提取回收率和基质效应、稳定性试验等指标进行全面的方法学验证,结果均符合标准要求。本发明方法具有高灵敏度、高特异性和高通量的特点,可实现对血浆DHPPA准确、快速的定量分析;而且样本预处理简便,可满足人群研究大规模样本分析需求。



1. 一种LC-MS/MS检测血浆烷基间苯二酚代谢产物水平的方法,其特征在于:先对血浆样品进行预处理,然后,用LC-MS/MS法测定预处理后血浆样品中烷基间苯二酚代谢产物的浓度;

所述LC-MS/MS法的色谱条件:色谱柱为BETASIL Phenyl分析柱,2.1×150mm,3μm;进样体积5μL;进出口柱温30℃;流动相由0.1%乙酸水溶液的A相和0.1%乙酸乙腈的B相组成;流速为0.4mL/min;梯度洗脱;

所述LC-MS/MS法的质谱条件:电喷雾电离离子源(ESI),负离子模式,多反应监测(MRM)。

2. 根据权利要求1所述的一种LC-MS/MS检测血浆烷基间苯二酚代谢产物水平的方法,其特征在于,所述血浆样品预处理的操作步骤如下:

S1. 于室温下解冻并涡旋混匀血浆样品,取50μL血浆样品于1.5mL EP管中,加入同等体积的酶解缓冲液(β-葡萄糖醛酸酶),混匀后于恒温水浴锅中37℃孵育过夜;

S2. 向酶解后血浆样品加内标溶液,再加入蛋白沉淀剂乙腈,涡旋混匀,离心10min,转移上清液后再次加入乙腈,重复上述离心过程两次,然后合并上清液;

S3. 将步骤S2合并的上清液,置于45℃真空干燥箱内浓缩干燥,残余物用复溶液进行复溶,充分涡旋后离心5min,然后转移上清液至样品瓶内插管中。

3. 根据权利要求2所述的一种LC-MS/MS检测血浆烷基间苯二酚代谢产物水平的方法,其特征在于:所述内标溶液为100ng/mL的丁香酸乙腈溶液,所述内标溶液与血浆样品的体积比为2:5。

4. 根据权利要求2所述的一种LC-MS/MS检测血浆烷基间苯二酚代谢产物水平的方法,其特征在于:所述血浆样品与蛋白沉淀剂乙腈加入的体积比为1:4。

5. 根据权利要求2所述的一种LC-MS/MS检测血浆烷基间苯二酚代谢产物水平的方法,其特征在于:所述离心条件为:14000rpm,4℃。

6. 根据权利要求2所述的一种LC-MS/MS检测血浆烷基间苯二酚代谢产物水平的方法,其特征在于:所述复溶液由1:1的乙腈和水组成。

7. 根据权利要求1所述的一种LC-MS/MS检测血浆烷基间苯二酚代谢产物水平的方法,其特征在于:所述梯度洗脱的流程为:0-0.3min,5%A;0.3-1.5min,5%A→60%A;1.5-5min,60%A;5-5.5min,60%A→5%A;5.5-10min,5%A。

8. 根据权利要求1所述的一种LC-MS/MS检测血浆烷基间苯二酚代谢产物水平的方法,其特征在于:所述质谱条件还包括:目标分析物DHPPA和内标丁香酸的定量离子对质荷比(m/z)分别为181.1/95和196.9/121;离子源温度550℃,喷射电压-4500V,喷雾气(GS1)和辅助加热气(GS2)压力均为55psi;DHPPA和丁香酸的去簇电压(DP)分别为-46V和-45V,碰撞能(CE)分别为-38V和-22V,碰撞池出口电压(CXP)分别为-6V和-5V。

一种LC-MS/MS检测血浆烷基间苯二酚代谢产物水平的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物标志物检测技术领域,具体涉及一种LC-MS/MS检测血浆烷基间苯二酚代谢产物水平的方法。

背景技术

[0002] 烷基间苯二酚是一组酚类脂质,在小麦和黑麦的麦麸中含量丰富,而在精制小麦和黑麦以及其他常见谷物等中含量很低或没有。烷基间苯二酚在食品加工中具有热稳定性,约60%被人体吸收,其在人体内代谢途径与生育酚类似,主要在肝脏中通过细胞色素P450酶系统进行 β 氧化,产生的代谢产物3-(3,5-二羟基苯基)-1-丙酸(DHPPA)和3,5-二羟基苯甲酸(DHBA)能够在人血浆中被检测到。干预性和观察性研究均发现,机体烷基间苯二酚及其代谢产物的浓度显著受膳食全谷类小麦和黑麦摄入量的影响,并呈现出剂量-效应关系,能够反映全谷类食物摄入的中、长期暴露水平。因此,ARs及其代谢产物被提议作为全谷类食物摄入和谷物膳食纤维摄入的有效生物标志物,已被应用于流行病学研究中。药代动力学实验显示,血浆烷基间苯二酚的半衰期很短,约5h,而其代谢产物DHBA和DHPPA半衰期则要长很多,分别为10.1h和16.3h。考虑到流行病学研究中通常采集研究对象的空腹血液样本,且血浆DHPPA的生物半衰期较长(16.3h),DHPPA作为全谷类食物摄入和谷物膳食纤维摄入的有效生物标志物具有更大的优势,更适合应用于营养流行病学研究。

[0003] 全谷类食物摄入在健康促进与疾病预防方面越来越引起人们的关注。增加全谷类食物摄入可降低诸如糖尿病、心血管疾病、肥胖及某些癌症的发生风险。在营养流行病学研究中,通常采用膳食调查评估个体食物摄入量。鉴于膳食调查存在其固有缺陷,难以精确地评估个体全谷类食物摄入量,全谷类食物摄入生物标志物血浆DHPPA作为传统膳食调查方法的一种替代和补充,能够更为客观、精准地反映个体的全谷类食物摄入水平,在营养流行病学研究中显得意义重大。

[0004] 现有测定血浆烷基间苯二酚代谢产物DHPPA浓度的方法,如高效液相色谱-库伦点击阵列法(HPLC-CEAD)与气相色谱串联质谱法(GC-MS),上述方法均存在一定程度的局限性。HPLC-CEAD检测方法所需的样本量较大,定量下限只有15nmol/L,不仅浪费了宝贵的生物样本,而且无法满足全谷类食物摄入水平偏低的亚洲人群的生物样本检测需求。GC-MS检测方法同样有着明显的缺点,需要进行衍生化操作,样品预处理繁琐,仪器分析时间较长,不利于大规模样本的测试分析。因此,开发建立一种快速、灵敏、准确检测血浆烷基间苯二酚代谢产物的方法对于营养流行病学研究至关重要。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种LC-MS/MS检测血浆烷基间苯二酚代谢产物水平的方法,意在解决现有检测方法分析时间长、样品预处理繁琐的问题。

[0006] 一种LC-MS/MS检测血浆烷基间苯二酚代谢产物水平的方法,先对血浆样品进行预处理,然后,用LC-MS/MS法测定预处理后血浆样品中烷基间苯二酚代谢产物的浓度。

[0007] LC-MS/MS法的色谱条件:色谱柱为BETASIL Phenyl分析柱, $2.1 \times 150\text{mm}$, $3\mu\text{m}$; 进样体积 $5\mu\text{L}$; 进出口柱温 30°C ; 流动相由 0.1% 乙酸水溶液的A相和 0.1% 乙酸乙腈的B相组成; 流速为 0.4mL/min ; 梯度洗脱。

[0008] 与现有技术使用的甲醇相比, 采用乙腈和水作为流动相具有更低的背景信号和更高的灵敏度; 与改性剂甲酸相比, 在流动相中加入 0.1% 乙酸可降低仪器背景信号, 并且避免拖尾现象获得最佳的色谱峰型。另外, 本方法对C18色谱柱 ($2.1 \times 150\text{mm}$, $3.5\mu\text{m}$) 和Phenyl色谱柱 ($2.1\text{mm} \times 150\text{mm}$, $3\mu\text{m}$) 两种常用类型分析柱进行了对比, 发现采用苯基柱具有更低的背景信号和更佳的保留效果。

[0009] LC-MS/MS法的质谱条件: 电喷雾电离离子源 (ESI), 负离子模式, 多反应监测 (MRM)。

[0010] 与正离子模式相比, 在负离子模式下DHPPA和丁香酸的检测信号丰度更高。

[0011] 进一步, 血浆样品预处理的操作步骤如下:

[0012] S1. 于室温下解冻并涡旋混匀血浆样品, 取 $50\mu\text{L}$ 血浆样品于 1.5mL EP管中, 加入同等体积的酶解缓冲液 (β -葡萄糖醛酸酶), 混匀后于恒温水浴锅中 37°C 孵育过夜;

[0013] S2. 向酶解后血浆样品加内标溶液, 再加入乙腈, 涡旋混匀, 离心 10min , 转移上清液后再次加入乙腈, 重复上述离心过程两次, 然后合并上清液;

[0014] S3. 将步骤S2合并的上清液, 置于 45°C 真空干燥箱内浓缩干燥, 残余物用复溶液进行复溶, 充分涡旋后离心 5min , 然后转移上清液至样品瓶内插管中。

[0015] 初始阶段采用乙酸乙酯作为萃取剂对血浆样本进行液液萃取, 但回收率并不理想。蛋白沉淀法因操作简单、耗时少等特点被本方法采纳, 以甲醇和乙腈作为蛋白沉淀剂进行比较, 发现以乙腈作为沉淀剂进行样品预处理有着最佳的提取回收率, 且色谱分析不存在明显的杂质干扰。

[0016] 进一步, 内标溶液为 100ng/mL 的丁香酸溶液, 内标溶液与血浆样品的体积比为2:5。

[0017] 进一步, 血浆样品与乙腈加入的体积比为1:4。

[0018] 进一步, 离心条件为: 14000rpm , 4°C 。

[0019] 进一步, 复溶液由1:1的乙腈和水组成。

[0020] 进一步, 梯度洗脱的流程为: $0-0.3\text{min}$, $5\%A$; $0.3-1.5\text{min}$, $5\%A \rightarrow 60\%A$; $1.5-5\text{min}$, $60\%A$; $5-5.5\text{min}$, $60\%A \rightarrow 5\%A$; $5.5-10\text{min}$, $5\%A$ 。

[0021] 这种洗脱模式可获得最佳的色谱条件, 同时避免色谱柱内干扰物累积, 并能延长色谱柱的使用寿命。

[0022] 进一步, 质谱条件还包括: 目标分析物DHPPA和内标丁香酸的定量离子对质荷比 (m/z) 分别为 $181.1/95$ 和 $196.9/121$; 离子源温度 550°C , 喷射电压 -4500V , 喷雾气 (GS1) 和辅助加热气 (GS2) 压力均为 55psi ; DHPPA和丁香酸的去簇电压 (DP) 分别为 -46V 和 -45V , 碰撞能 (CE) 分别为 -38V 和 -22V , 碰撞池出口电压 (CXP) 分别为 -6V 和 -5V 。

[0023] 质谱参数经优化后可获得更佳、更稳定的检测信号。

[0024] 与现有技术相比, 本发明的有益效果是:

[0025] 1、本发明方法样品预处理操作简便, 简化并缩短了样本预处理的步骤和时间, 可满足人群研究大规模样本分析需求。

[0026] 2、本发明方法优化并确定了最佳的质谱条件和色谱条件,具有高通量、高灵敏度和高特异性优势,可满足全谷物摄入水平低下的人群检测需求。

[0027] 3、本发明方法采用梯度洗脱方式,确保良好的色谱分离效果,同时减少了色谱柱内杂质蓄积,延长了色谱柱的使用寿命。

附图说明

[0028] 图1为本发明DHPPA的子离子扫描质谱图;

[0029] 图2为本发明内标丁香酸的子离子扫描质谱图;

[0030] 图3为本发明LC-MS/MS典型色谱图;

[0031] 图4为本发明的标准曲线图。

具体实施方式

[0032] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细的说明,除非特殊说明,本发明中所用的技术手段和科学用语均为本领域技术人员所公知的:

[0033] 试剂:3-(3,5-二羟苯基)-1-丙酸(DHPPA,HPLC级,纯度 $\geq 95.0\%$,CAS号:26539-01-5,美国Sigma-Aldrich公司);丁香酸内标(HPLC级,纯度 $\geq 98.0\%$,CAS号:530-57-4,美国Sigma-Aldrich公司)

[0034] 一种LC-MS/MS检测血浆烷基间苯二酚代谢产物水平的方法,先对血浆样品进行预处理,然后,用LC-MS/MS法测定预处理后血浆样品中烷基间苯二酚代谢产物的浓度;

[0035] LC-MS/MS法的色谱条件:进样体积 $5\mu\text{L}$;进出口柱温 30°C ;流动相由 0.1% 乙酸水溶液的A相和 0.1% 乙酸乙腈的B相组成;流动相的流速为 $0.4\text{mL}/\text{min}$;梯度洗脱,分析时间为 10min ;

[0036] LC-MS/MS法的质谱条件:离子源,电喷雾电离(ESI);检测模式,负离子;离子源温度, 550°C ;扫描方式,多反应监测。

[0037] 血浆样品预处理的操作步骤如下:

[0038] S1.于室温下解冻并涡旋混匀血浆样品,取 $50\mu\text{L}$ 血浆样品于 1.5mL EP管中,加入同等体积的酶解缓冲液(β -葡萄糖醛酸酶),混匀后于恒温水浴锅中 37°C 孵育过夜;

[0039] S2.向酶解后血浆样品加内标溶液,再加入乙腈,涡旋混匀,离心 10min ,转移上清液后再次加入乙腈,重复上述离心过程两次,然后合并上清液;

[0040] S3.将步骤S2合并的上清液,置于 45°C 真空干燥箱内浓缩干燥,残余物用复溶液进行复溶,充分涡旋后离心 5min ,然后转移上清液至样品瓶内插管中。

[0041] 内标溶液为 $100\text{ng}/\text{mL}$ 的丁香酸溶液,内标溶液与血浆样品的体积比为2:5。

[0042] 血浆样品与蛋白沉淀剂乙腈加入的体积比为1:4。

[0043] 离心条件为: 14000rpm , 4°C 。

[0044] 复溶液由1:1的乙腈和水组成。

[0045] 梯度洗脱的流程为: $0-0.3\text{min}$, $5\%\text{A}$; $0.3-1.5\text{min}$, $5\%\text{A}\rightarrow 60\%\text{A}$; $1.5-5\text{min}$, $60\%\text{A}$; $5-5.5\text{min}$, $60\%\text{A}\rightarrow 5\%\text{A}$; $5.5-10\text{min}$, $5\%\text{A}$ 。

[0046] 质谱条件还包括:目标分析物DHPPA和内标丁香酸的定量离子对质荷比(m/z)分别为 $181.1/95$ 和 $196.9/121$;离子源温度 550°C ,喷射电压 -4500V ,喷雾气(GS1)和辅助加热气

(GS2) 压力均为55psi;DHPPA和丁香酸的去簇电压(DP)分别为-46V和-45V,碰撞能(CE)分别为-38V和-22V,碰撞池出口电压(CXP)分别为-6V和-5V。

[0047] 实施例一

[0048] LC-MS/MS测定血浆中烷基间苯二酚代谢产物的浓度

[0049] 1. 血浆样品预处理:

[0050] a. 血浆样品于室温下解冻并涡旋混匀后,用微量加样器准确吸取50 μ L血浆样品于1.5mL EP管中,加入同等体积的酶解缓冲液(0.2mol/mL乙酸铵缓冲溶液, β -葡萄糖醛酸酶 ≥ 200 U/mL,pH=5.0),混匀后于恒温水浴锅中37 $^{\circ}$ C孵育过夜。

[0051] b. 取50.0 μ L酶解后的血浆样品于1.5mL EP管,加入20 μ L内标工作液(丁香酸浓度为100ng/mL),200 μ L乙腈。

[0052] c. 涡旋1min,离心10min(14000rpm,4 $^{\circ}$ C),转移离心管上清液后再次加入200 μ L乙腈,重复上述离心过程两次,然后合并两次转移的上清液。

[0053] d. 将合并的上清液置于45 $^{\circ}$ C真空干燥箱中进行浓缩干燥,剩余残余物用50 μ L复溶液(乙腈/水,1/1)进行复溶。

[0054] e. 复溶液充分涡旋后,再次高速离心5min(14000rpm,4 $^{\circ}$ C)。

[0055] 2. 工作溶液的配制

[0056] 2.1 储备液及标准系列溶液的配制

[0057] 准确称取DHPPA粉末20.0mg,用乙腈溶解并定容至20mL容量瓶中,配制成浓度为1.0mg/mL的储备液1,再用乙腈以10倍稀释法依次稀释得到浓度为1.0 μ g/mL的储备液2。最后用储备液2逐级稀释配制成浓度为0.4、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、40.0和50.0ng/mL的标准系列溶液。配制完成后,标准系列溶液置于4 $^{\circ}$ C冰箱中保存。

[0058] 2.2 内标溶液的配制

[0059] 准确称取丁香酸粉末20.0mg,乙腈溶解后并定容至20mL容量瓶,配制成浓度为1.0mg/mL的丁香酸内标储备液,并用乙腈以10倍稀释法依次稀释配制成浓度为100.0ng/mL的丁香酸内标工作液。内标储备液置于-20 $^{\circ}$ C冰箱中长期保存备用,内标工作液置于4 $^{\circ}$ C冰箱中保存备用。

[0060] 2.3 以人空白血浆稀释标准系列溶液配制标准系列样品

[0061] 取人空白血浆样品50 μ L,分别加入50 μ L DHPPA系列标准溶液和20 μ L内标工作液,根据预处理步骤最后制得浓度为0.4、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、40.0和50.0ng/mL的系列标准血浆样品溶液。

[0062] 2.4 QC和LLOQ样品的配制

[0063] 质控血浆(QC)样品制备过程同标准血浆样品,于空白血浆中分别加入定量下限(LLOQ)和低、中、高四种浓度的DHPPA标准溶液,经血浆样品预处理过程后配制四种不同浓度的QC样品(DHPPA浓度分别为0.4、2.0、20.0、40.0ng/mL)。配制完成后,QC和LLOQ系列溶液置于4 $^{\circ}$ C冰箱中保存。术语说明:LQC:低浓度质控;MQC:中浓度质控;HQC:高浓度质控;LLOQ:定量下限。

[0064] 3. LC-MS/MS分析

[0065] 色谱条件:应用Shimadzu20A高效液相色谱系统串联AB Sciex 4500离子阱质谱仪对血浆DHPPA进行靶向定量检测分析,色谱柱为BETASIL Phenyl分析柱(2.1mm $\times$ 150mm,3 μ

m), 色谱柱进出口柱温为30℃; 0.1%乙酸水溶液为A相, 0.1%乙酸乙腈为B相; 梯度洗脱10min, 流速为0.4mL/min, 进样体积为5μL。

[0066] 质谱条件: 质谱离子源采用ESI; 负离子检测模式; 扫描模式为多反应监测; 离子源温度设定550℃; 喷射电压为-4500V; 喷雾气(GS1)和辅助加热气(GS2)的压力均为55psi。对质谱参数诸如去簇电压(DP)、碰撞能(CE)、碰撞室出口电压(CXP)等进行实验优化, 优化结果见表1。

[0067] DHPPA和丁香酸的准分子离子分别为181.1和196.9, 其子离子扫描质谱图如图1和图2所示, 质谱图显示DHPPA裂解产生的碎片离子(m/z)有两个, 丰度最高的为137.1, 其次是95。在样本测试分析过程中, 我们发现离子对181.1/137.1所对应的色谱峰因存在严重的干扰而无法进行准确的定量分析, 最终确定DHPPA和丁香酸用于定量检测的离子对(m/z)分别为181.1/95和196.9/121。

[0068] 表1 3-(3,5-二羟基苯基)-1-丙酸和内标丁香酸的质谱参数

标准品	离子对	DP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
DHPPA	181.1→95	-46	-38	-6
SyrA	196.9→121	-45	-22	-5

[0070] DHPPA, 3-(3,5-二羟基苯基)-1-丙酸; SyrA, 丁香酸; DP, 去簇电压; CE, 碰撞能; CXP, 碰撞室出口电压。

[0071] 方法学验证

[0072] 1. 专属性

[0073] 空白血浆样品、加标空白血浆样品以及正常健康人血浆样品测试分析的典型色谱图如图3所示, 空白血浆样本(A, DHPPA; A', SyrA), 加标空白血浆样本(B, DHPPA; B', SyrA), 健康受试者血浆样本(C, DHPPA; C', SyrA); SyrA, 丁香酸。由图3可知, 分析物DHPPA和内标丁香酸的色谱峰型良好, 其保留时间分别为2.60min和2.67min。空白血浆样品在DHPPA和丁香酸各自的保留时间点上未出现明显的内源性干扰。

[0074] 2. 标准曲线、线性范围和LLOQ

[0075] 本方法根据部分健康人群血浆DHPPA的浓度范围确定了标准曲线的上限, 定为50ng/mL, 标曲下限则定为本方法对应的LLOQ浓度, 即0.4ng/mL。本方法共测定了5个批次的系列浓度标准血浆样品, 每个系列设定8个点, 配制浓度分别为0.4、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、40.0和50.0ng/mL, 最后计算得到的5条标准曲线, 如图4所示, 标准曲线的相关系数 r^2 均大于0.999 (权重为 $1/x^2$), 在0.4-50ng/mL范围内线性表现良好。

[0076] 3. 精密度和精确度

[0077] LLOQ、低、中、高四个浓度水平的QC样品中, DHPPA的精密度和精确度见表2。DHPPA的日内精密度和日间精密度的分别为1.7%-4.03%和2.04%-3.92%, 日内精确度和日间精确度分别为-6.90%-3.00%和0.88%-8.00%, 四个浓度水平的精密度和精确度均在合理的范围内。

[0078] 表2血浆DHPPA的精密度和精确度

标准品	加标浓度 (ng/mL)	日内 (n=6)			日间 (n=6)		
		实测浓度 (mean±SD)	RSD (%)	RE (%)	实测浓度 (mean±SD)	RSD (%)	RE (%)
[0079] DHPPA	0.4	0.41±0.01	1.70	3.00	0.43±0.01	2.55	8.00
	2	1.86±0.08	4.03	-6.90	1.91±0.04	2.04	4.55
	20	20.21±0.62	3.09	1.04	19.82±0.71	3.60	0.88
[0080]	40	40.52±1.41	3.49	1.31	40.66±1.59	3.92	1.64

[0081] RSD, 相对标准偏差; RE, 相对误差。

[0082] 4. 提取回收率和基质效应

[0083] 本方法血浆样品的提取回收率和基质效应结果见表3。血浆样品预处理后, 在低、中、高三个浓度水平, DHPPA的平均提取回收率分别为88.26%、94.19%和87.95%, 经内标校正后的基质效应分别为102.88%、103.69%和108.84%。由此可见, 本方法以乙腈为沉淀剂进行蛋白沉淀的样本处理方式对分析物DHPPA造成的丢失在理想范围内, 内标校正后没有观察到明显的基质效应。

[0084] 表3血浆DHPPA的提取回收率和基质效应

标准品	加标浓度 (ng/mL)	提取回收率 (mean±SD)	基质效应 (mean±SD)
[0085] DHPPA	2	88.26±3.64	102.88±4.92
	20	94.19±8.13	103.69±7.01
	40	87.95±2.31	108.84±1.48

[0086] 5. 稳定性试验

[0087] 稳定性试验考察了血浆样品在室温放置24h、反复冻融3次和-80℃放置1年时间三种条件下DHPPA的稳定性, 结果见表3, 在三种条件下所有QC样品实测值的RSD均小于10%, 实测值与理论值之间的差异均在±15%以内。由此可见, 血浆样品短暂室温放置、长期低温冻存和反复冻融对血浆DHPPA的稳定性影响不明显。

[0088] 表4血浆DHPPA的稳定性 (n=5)

分析物	加标 浓度 ng/mL	室温放置 24h		反复冻融三次		-80℃放置一年	
		精密度 RSD, %	准确度 RE, %	精密度 RSD, %	准确度 RE, %	精密度 RSD, %	准确度 RE, %
[0089] DHPPA	2	2.05	-3.4	2.46	5.00	6.43	-2.40
	20	2.73	-10.7	3.72	4.2	4.81	4.69

[0090]		40	7.59	-10.3	4.11	-1.03	2.68	-0.47
--------	--	----	------	-------	------	-------	------	-------

[0091] 以上所述的仅是本发明的实施例,方法中公知的具体结构及特性等常识在此未作过多描述。应当指出,对于本领域的技术人员来说,在不脱离本发明结构的前提下,还可以作出若干变形和改进,这些也应该视为本发明的保护范围,这些都不会影响本发明实施的效果和专利的实用性。本申请要求的保护范围应当以其权利要求的内容为准,说明书中的具体实施方式等记载可以用于解释权利要求的内容。

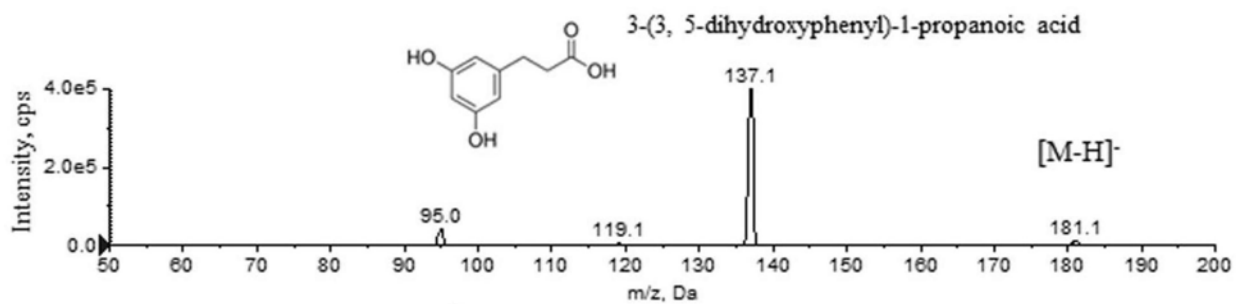


图1

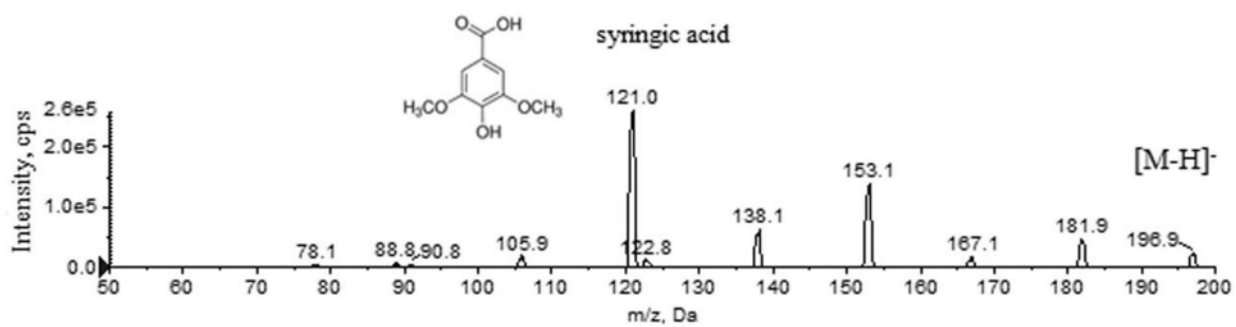


图2

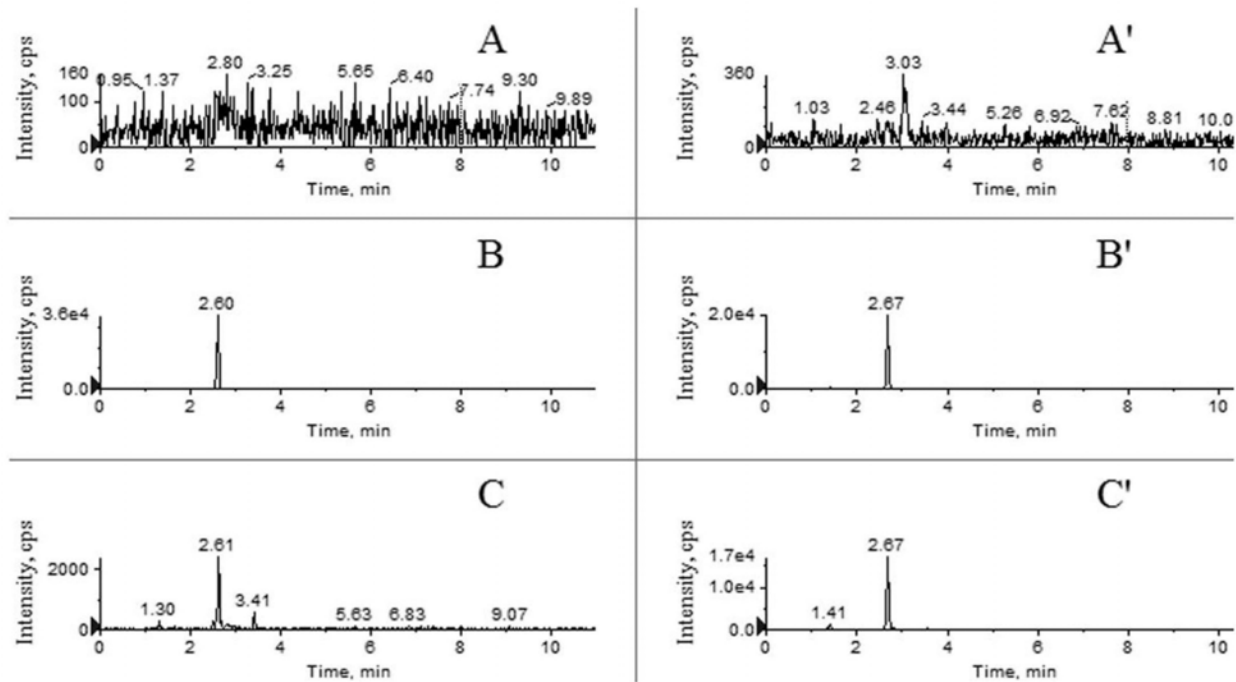


图3

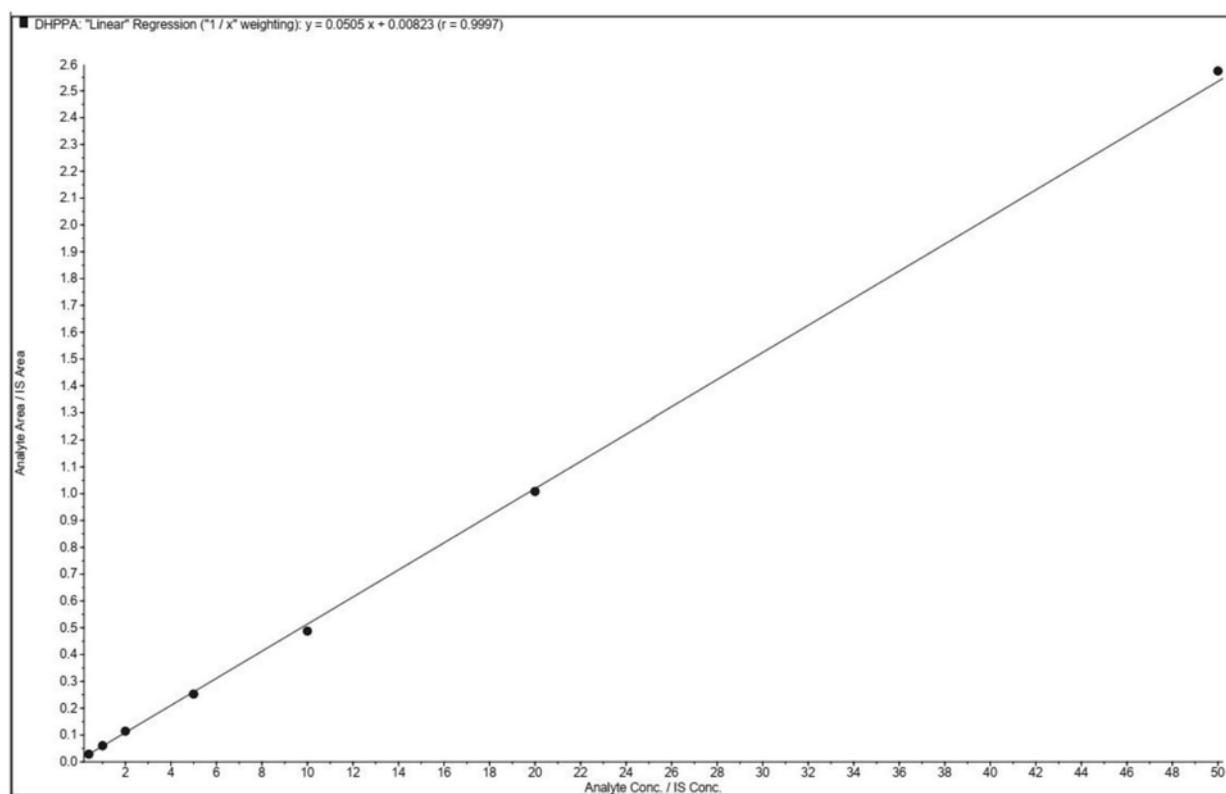


图4