

超高效液相色谱三重四极杆质谱法定量检测血清中类固醇激素含量

LCMSMS-352

摘要： 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用，建立了血清中类固醇激素的定量检测方法，采用 SLE(固相支撑液液萃取)方法对样品进行预处理，可准确、灵敏、快速定量检测血清中类固醇激素含量。实验结果表明，该方法对血清中类固醇类激素的定量检测范围为 0.01-10 ng/mL(DHEA 和 Estrone 为 0.1-100 ng/mL, Aldosterone 为 0.05-10 ng/mL)，准确度范围为 84.0-113.8%。该方法分析速度快、稳定性和准确度高，适用于血清中类固醇激素的定量分析，能够为相关人员提供参考。

关键词： LCMS-8060 类固醇激素 血清 替代基质

类固醇激素，又称甾体激素，具有极重要的医药价值。在维持生命、调节性功能，对机体发展、免疫调节、皮肤疾病治疗及生育控制方面有明确的作用。类固醇激素药物的发现与发展是药物化学学科发展的重要阶段。

人体类固醇激素的升高或者降低与一些临床疾病如先天性肾上腺增生、多囊卵巢综合征、肾上腺皮质功能不全等相关。因此建立一种可以同时准确测定多种类固醇激素的分析方法对于临床疾病的诊断具有非常重要的指导意义。

目前测定类固醇激素常用的方法有放射免疫法、气相色谱-质谱联用法和高效液相色谱串联质谱法等。常规的免疫法操作简单，但是方法开发历时久、成本高，

而且存在交叉反应和基质干扰而导致其缺乏特异性，且灵敏度较低。质谱法则因灵敏度高和特异性强已成为复杂机体样本(如生物样本)检测的强有力工具，尤其是 LC-MS/MS，可以有效排除假阳性信号的干扰，检测结果更加准确可靠，目前已广泛应用于治疗药物监测、遗传代谢病筛查、毒理学诊断等临床应用领域。

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用，采用一系列氘代化合物作为内标，建立了血清中类固醇激素的定量分析方法，并结合临床检验相关指导原则，完成了方法的全验证，以供相关人员参考。

实验部分

1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为：LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.86 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack FC-ODS (2 mm I.D. ×75 mm L., 3 μm)

流动相：A 相 -5 mM 甲酸铵水溶液；
B 相 -5 mM 甲酸铵甲醇溶液

流速：0.3 mL/min

柱温：40℃

进样量：10 μL

自动进样器温度：10℃

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 35%，时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.5	Pump	B.Conc	35
4	Pump	B.Conc	45
12	Pump	B.Conc	80
12.01	Pump	B.Conc	95
15	Pump	B.Conc	95
15.01	Pump	B.Conc	35
18	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：ESI +/-

雾化气流速：3.0 L/min

加热气流速：13.0 L/min

接口温度：370°C

DL 温度：150°C

加热模块温度：450°C

干燥气流速：7.0 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：20 ms

MRM 参数：见表 3

1.3 样品制备

1.3.1 标准工作曲线配制

称取 2.0 g BSA 溶于 50 mL PBS，配制 4% BSA 溶液作为血清的替代基质溶液，用于配制标准工作曲线。用甲醇配制浓度为 100 µg/mL 的混合标准储备液，随后用甲醇将混合标准溶液逐级稀释成浓度为 1.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL、1 µg/mL、5 µg/mL、10 µg/mL 的标准工作液。取 10.0 µL 标准工作液加入 990 µL 替代基质溶液，依次配制成标准曲线。并用甲醇配制混合内标工作液 100 ng/mL。

1.3.2 样品前处理方法

取 100 µL 样品于 1.5 mL 离心管中，加入 1 µL 的内标溶液，再加入 300 µL 纯水，涡旋混匀，全部转移到 ISOLUTE®SLE+ 硅藻土板上；通过加正压导入。静置五分钟，被硅藻土吸收；在孔板中加入二氯甲烷 (900 µL×2) 进行洗脱。在进行五分钟自然下落后，通过加压进行洗脱；将洗脱液进行氮吹干燥，用 100 µL 溶剂 (65% 流动相 A，35% 流动相 B，v/v) 再溶解后，进行离心处理，取上清上机分析。

表2 类固醇激素及其内标基本信息

Name		CAS No.	ISTD group	Ret. Time(min)
17-OHP	17-羟孕酮	68-96-2	1	10.348
21-OHP	21-羟孕酮	64-85-7	1	9.834
Corticosterone	皮质酮	50-22-6	2	8.454
11-Deoxy cortisol	11-脱氧皮质醇	152-58-9	3	8.661
21-Deoxy cortisol	21-脱氧皮质醇	641-77-0	1	8.079
Testosterone	睾酮	58-22-0	1	10.093
DHEA	脱氢表雄酮	53-43-0	1	10.602
Progesterone	孕酮	57-83-0	4	11.963
Estrone	雌酮	53-16-7	1	9.663
Androstenedione	雄烯二酮	1963/5/8	5	9.465
Aldosterone	醛固酮	52-39-1	6	6.079
17-OHP-d8	17-羟孕酮-d8	850023-80-2	1	10.29
Corticosterone-d8	皮质酮-d8	1271728-07-4	2	8.384
11-Deoxy cortisol-d5	11-脱氧皮质醇-d5	1258063-56-7	3	8.622
Progesterone-d9	孕酮-d9	15775-74-3	4	11.88
Androstenedione-13C3	雄烯二酮-13C3	327048-86-2	5	9.456
Aldosterone-d7	醛固酮-d7	1261254-31-2	6	5.352

表3 MRM参数

名称	Precursor ion m/z	Product ion m/z	Q ₁ Pre Bias (V)	CE (V)	Q ₃ Pre Bias (V)
17-OHP	331.2	109.1	-10	-28	-20
		97.1	-10	-25	-18
21-OHP	331.2	109.1	-10	-26	-20
		97.1	-10	-24	-18
Corticosterone	347.25	329.15	-11	-16	-23
		121.0	-11	-26	-22
11-Deoxy cortisol	347.25	109.0	-11	-30	-20
		97.0	-10	-27	-18
21-Deoxy cortisol	347.25	311.15	-11	-17	-22
		121.0	-11	-27	-22
Testosterone	289.2	109.1	-10	-26	-19
		97.1	-10	-23	-17
DHEA	271.2	253.15	-11	-13	-28
		213.1	-10	-16	-23
Progesterone	315.25	109.05	-10	-26	-19
		97.05	-10	-23	-18
Estrone	271.2	253.05	-10	-14	-17
		133.05	-10	-23	-24
Androstenedione	287.2	97.1	-10	-23	-18
		109.05	-10	-25	-20
Aldosterone	361.15	343.1	-10	-18	-24
		315.15	-12	-19	-22
17-OHP-IS	339.2	100.05	-12	-27	-19
		113.05	-11	-30	-21
Corticosterone-IS	355.2	337.2	-12	-17	-24
		125.05	-12	-26	-23
11-Deoxy cortisol-IS	352.2	113.05	-12	-30	-21
		100.05	-12	-28	-18
Progesterone-IS	324.2	100.1	-11	-23	-18
		113.1	-11	-29	-21
Androstenedione-IS	290.15	100.1	-10	-23	-18
		112.1	-10	-25	-21
Aldosterone-IS	368.15	350.2	-10	-18	-25
		332.2	-10	-20	-24

■ 结果与讨论

2.1 MRM 色谱图

使用以上液相和质谱分析条件对替代基质加标样品进行分析，色谱图如图 1 所示。

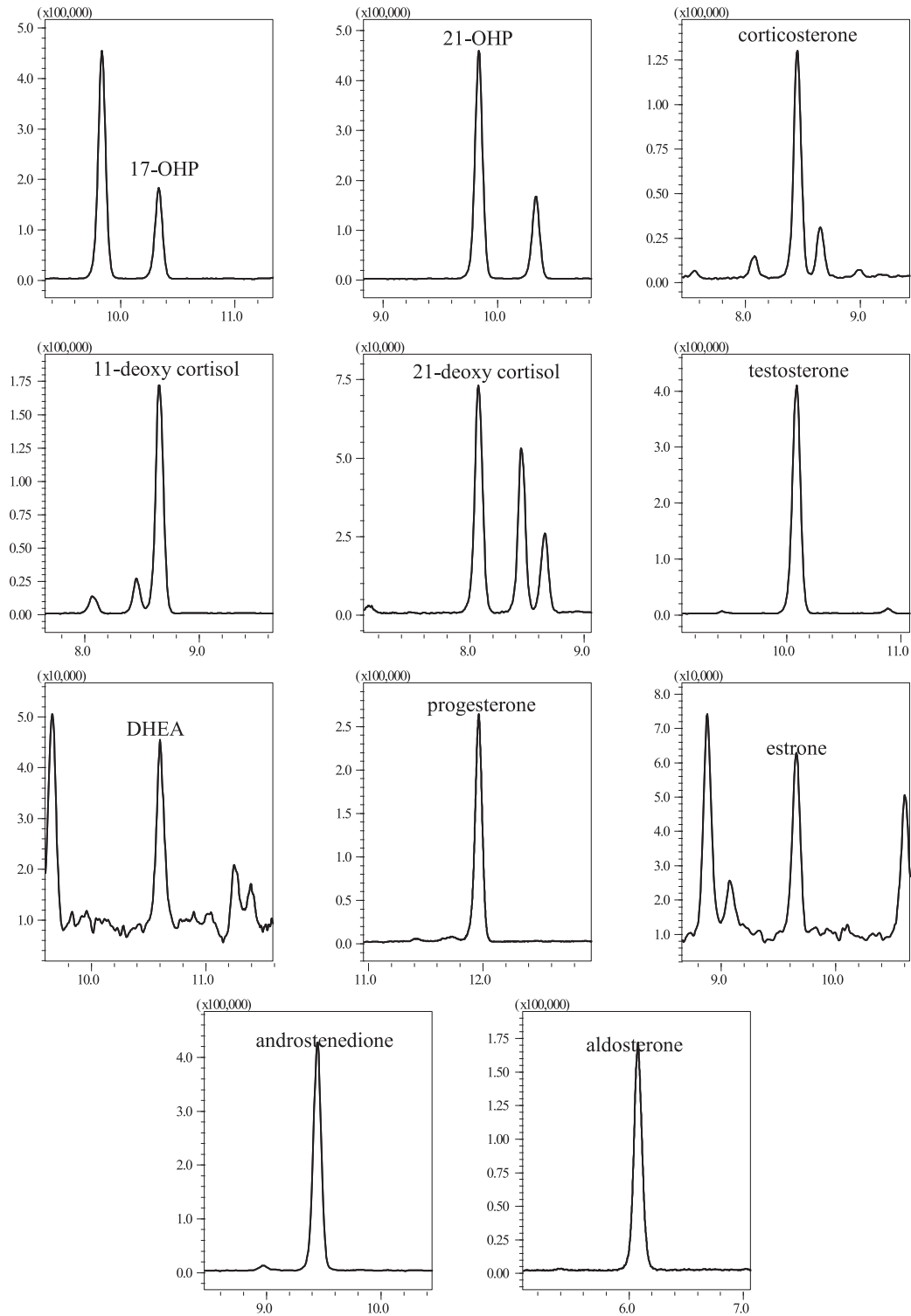


图1 类固醇激素(1.0 ng/mL,替代基质)的MRM色谱图

2.2 替代基质与血清基质一致性验证

考虑到正常人血清中含有一定量的类固醇激素，空白血清样品经处理分析后，检测到一定量的类固醇激素（如图2所示）。因此不宜使用空白血清配制类固醇激素标准曲线，可考虑用4% BSA 溶液（图3）作为血清的替代基质溶液。在此，需要对替代基质与血清基质进行一致性验证。

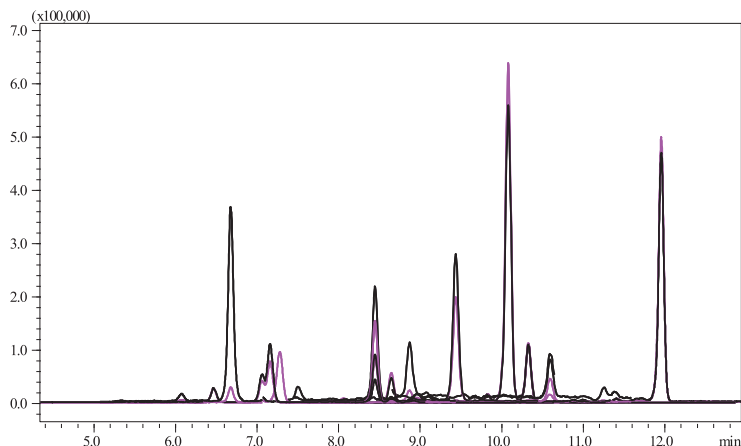


图2 空白血清样品分析结果

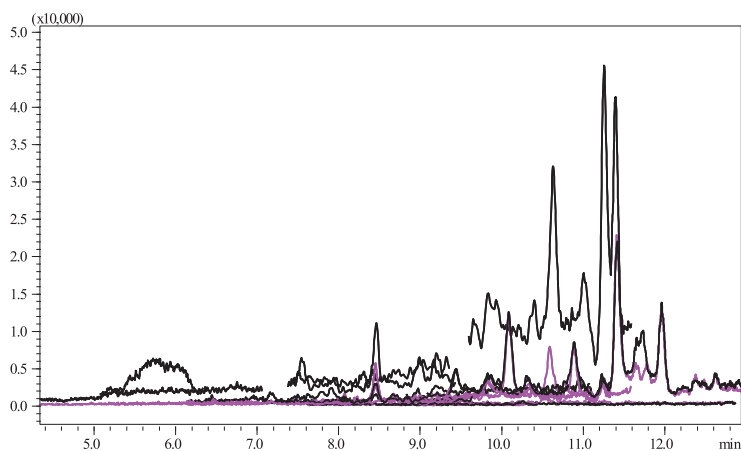


图3 空白替代基质分析结果

2.2.1 替代基质标曲和血清标曲的比较

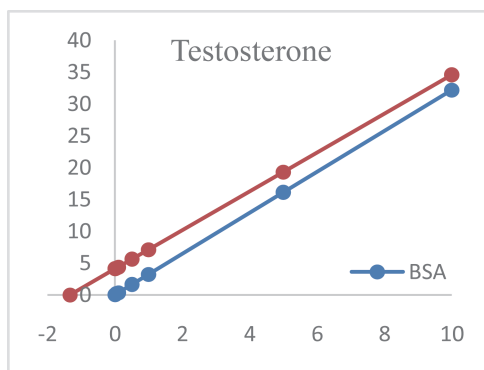
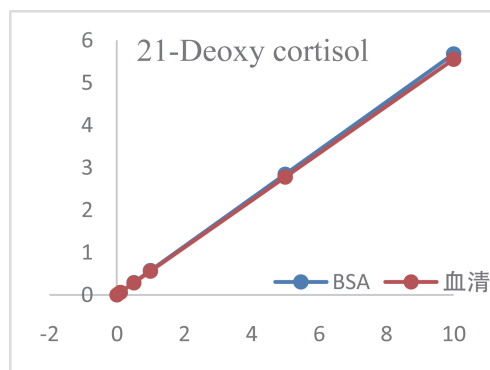
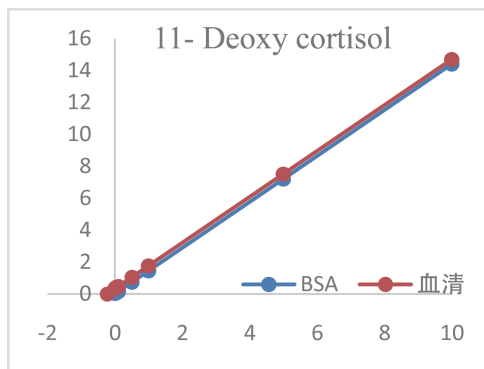
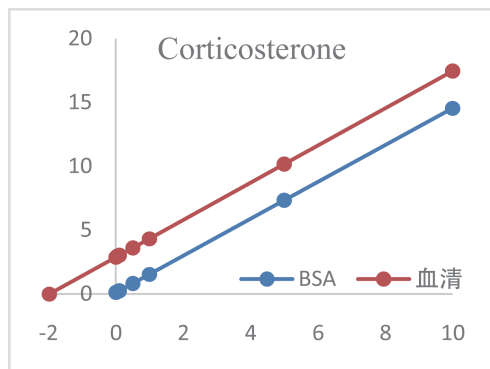
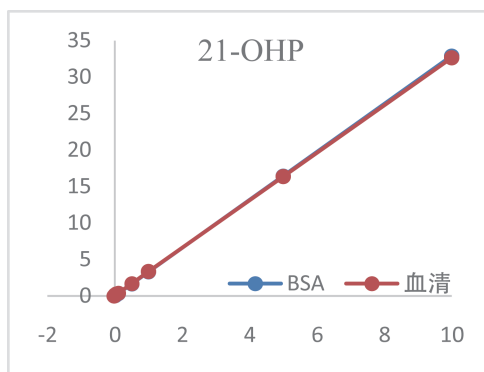
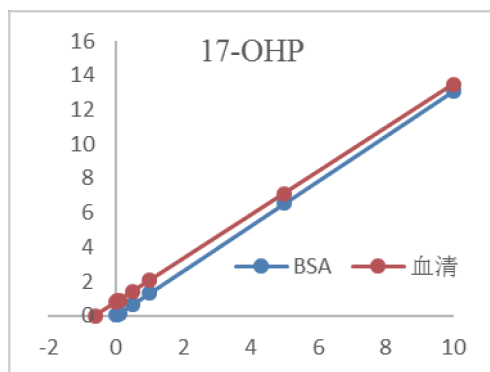
分别用血清和替代基质溶液依照“标准工作曲线配制”中的方法，配制标准曲线溶液，样品经过前处理后进样分析，分别绘制出替代基质标曲和血清基质标曲（如表4和5所示）。

表4 类固醇激素替代基质标准曲线相关参数(采用1/C²加权)

名称	校准曲线	相关系数 R	线性范围 (ng/mL)	准确度%
17-OHP	$Y = (1.30490)X + (0.0170905)$	0.9993	0.01~10	94.4~109.5
21-OHP	$Y = (3.28999)X + (0.0129247)$	0.9997	0.01~10	93.0~108.9
Corticosterone	$Y = (1.44564)X + (0.0954756)$	0.9995	0.01~10	96.0~102.3
11-Deoxy cortisol	$Y = (1.43924)X + (0.0114591)$	0.9985	0.01~10	90.9~107.0
21-Deoxy cortisol	$Y = (0.567380)X + (0.002302)$	0.9985	0.01~10	88.6~107.9
Testosterone	$Y = (3.21552)X + (0.0278648)$	0.9994	0.01~10	96.8~113.8
DHEA	$Y = (0.230511)X + (0.011386)$	0.9986	0.1~100	91.6~105.3
Progesterone	$Y = (0.854176)X + (0.0262510)$	0.9993	0.01~10	94.7~105.4
Estrone	$Y = (0.348118)X + (0.0183813)$	0.9983	0.1~10	89.2~103.2
Androstenedione	$Y = (1.19755)X + (0.00362078)$	0.9991	0.01~10	94.8~105.8
Aldosterone	$Y = (3.19875)X + (0.0354719)$	0.9990	0.05~10	95.3~105.0

表5 类固醇激素血清基质标准曲线相关参数(采用1/C²加权)

名称	校准曲线	相关系数 R	线性范围 (ng/mL)	准确度%
17-OHP	$Y = (1.26661)X + (0.787147)$	0.9996	0.01~10	94.1~103.5
21-OHP	$Y = (3.25665)X + (0.0658247)$	0.9994	0.01~10	89.8~107.2
Corticosterone	$Y = (1.45711)X + (2.87288)$	0.9990	0.01~10	92.0~113.0
11-Deoxy cortisol	$Y = (1.43735)X + (0.335956)$	0.9978	0.01~10	92.6~113.8
21-Deoxy cortisol	$Y = (0.554446)X + (0.002933)$	0.9974	0.01~10	86.4~108.9
Testosterone	$Y = (3.04658)X + (4.07787)$	0.9994	0.01~10	89.4~102.4
DHEA	$Y = (0.243697)X + (0.502122)$	0.9975	0.1~100	87.9~104.2
Progesterone	$Y = (0.793838)X + (1.63251)$	0.9990	0.01~10	84.0~106.9
Estrone	$Y = (0.324936)X + (0.002360)$	0.9973	0.1~10	88.8~105.2
Androstenedione	$Y = (1.13990)X + (0.766600)$	0.9992	0.01~10	93.0~104.5
Aldosterone	$Y = (3.14498)X + (0.201571)$	0.9984	0.05~10	94.3~107.6



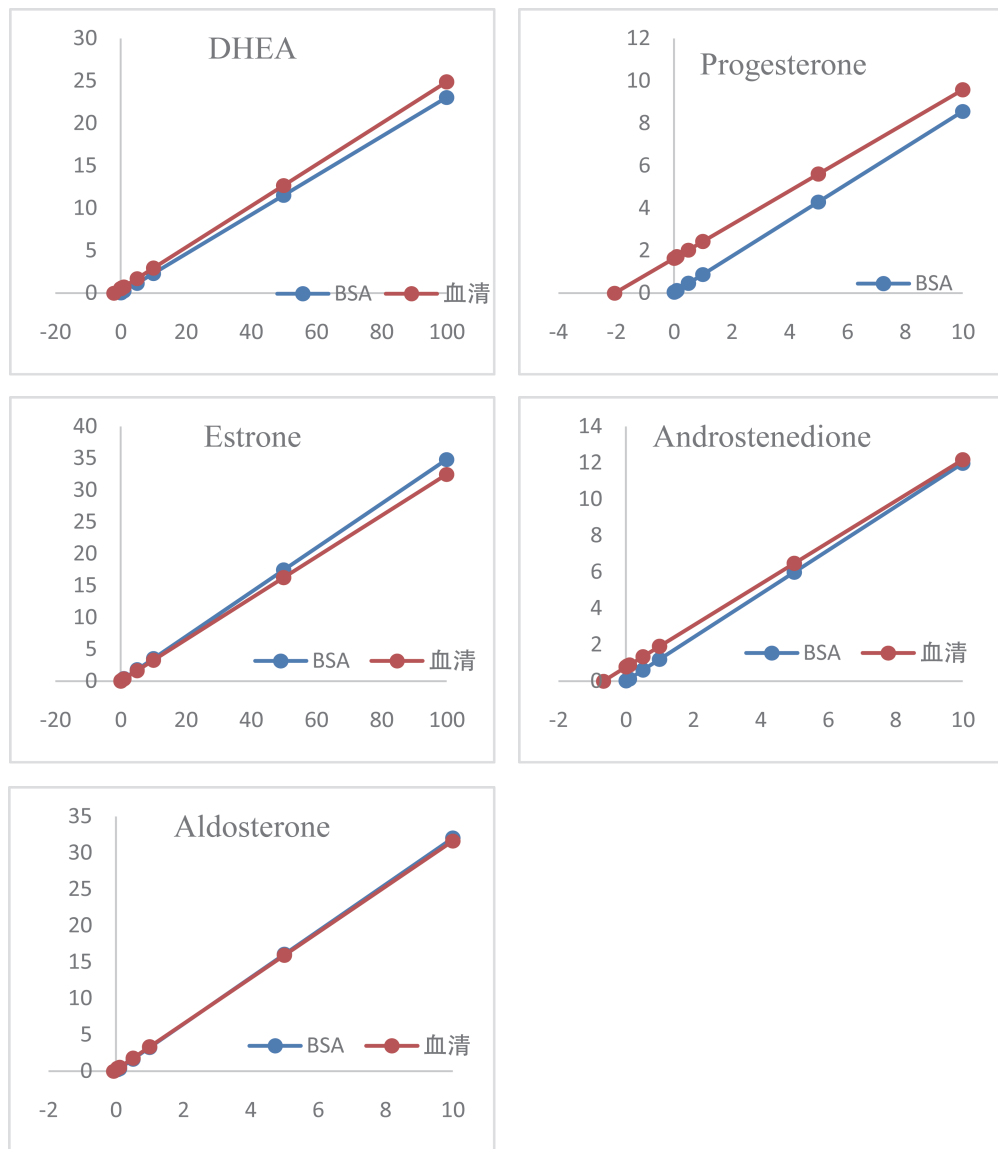


图4 替代基质标曲和血清标曲比较

从图4可看出，替代基质标曲和血清基质标曲相比，曲线斜率基本相当。依据标准加入法外推得到X轴负截距，可以计算出血清基质中各个类固醇激素含量，具见表5。

2.2.2 替代基质标曲测定血清样品中类固醇激素含量

依照上述前处理方法平行处理6份血清样品，进样分析后根据替代基质标曲计算目标物浓度，结果如表6所示，表6中理论值为血清标曲外延至Y=0所得到的X负截距值。

表6 血清样品中类固醇激素含量测定结果

名称	理论值 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	相对误差 (%)	精密度 (%)
17-OHP	0.62146	0.6796	9.36	4.23
21-OHP	0.02021	0.018	-10.94	6.22
Corticosterone	1.97163	1.874	-4.95	5.19
11-Deoxy cortisol	0.23373	0.214	-8.44	3.40
21-Deoxy cortisol	-	-	-	-
Testosterone	1.3385	1.105	-9.97	4.18
DHEA	2.0604	2.004	-2.74	4.90
Progesterone	2.05648	1.712	-11.89	2.82
Estrone	-	-	-	-
Androstenedione	0.67251	0.56	-12.27	5.33
Aldosterone	0.06409	0.056	-12.62	5.80

注：“-”表示未检出/低于检出限

从结果上看，使用替代基质标曲测定各组样品，其检测均值和理论值相对误差均 <15%，精密度 <10%，均在可接受范围之内。

2.2.3 替代基质标曲测定 3 个浓度血清加标样品中类固醇激素含量

依照上述前处理方法平行处理 6 份血清加标样品，加标量分别为 0.1 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL(DHEA 和 Estrone 高点加标为 50 ng/mL)，进样分析后根据替代基质标曲计算目标物浓度，结果如表 7-9 所示。

表7 血清基质加标0.1 ng/mL类固醇激素含量测定结果

名称	理论值 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	相对误差 (%)	精密度 (%)
17-OHP	0.721	0.614	-14.89	3.15
21-OHP	0.120	0.107	-10.99	4.33
Corticosterone	2.072	1.908	-7.90	2.17
11-Deoxy cortisol	0.334	0.306	-8.31	3.24
21-Deoxy cortisol	0.100	0.090	-10.00	4.77
Testosterone	1.439	1.230	-14.49	3.20
DHEA	2.160	1.920	-11.13	3.10
Progesterone	2.156	1.957	-9.25	2.09
Estrone	0.100	0.110	10.00	5.32
Androstenedione	0.773	0.695	-10.03	4.14
Aldosterone	0.164	0.172	4.82	4.08

表8 血清基质加标1 ng/mL类固醇激素含量测定结果

名称	理论值 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	相对误差 (%)	精密度 (%)
17-OHP	1.621	1.391	-14.21	2.54
21-OHP	1.020	0.903	-11.49	3.12
Corticosterone	2.972	2.694	-9.34	1.03
11-Deoxy cortisol	1.234	1.088	-11.81	3.01
21-Deoxy cortisol	1.000	0.887	-11.30	3.19
Testosterone	2.339	2.272	-2.84	2.11
DHEA	3.060	2.85	-6.87	4.01
Progesterone	3.056	2.791	-8.69	2.14
Estrone	1.000	1.143	14.30	3.31
Androstenedione	1.673	1.435	-14.20	4.02
Aldosterone	1.064	0.983	-7.62	3.28

表9 血清基质加标5 ng/mL类固醇激素含量测定结果

名称	理论值 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	相对误差 (%)	精密度 (%)
17-OHP	5.621	4.856	-13.61	3.07
21-OHP	5.020	5.003	-0.35	3.55
Corticosterone	6.972	5.997	-13.98	3.08
11-Deoxy cortisol	5.234	4.619	-11.75	2.11
21-Deoxy cortisol	5.000	4.386	-12.27	3.08
Testosterone	6.339	5.793	-8.60	3.22
DHEA	52.060	54.007	-13.34	2.17
Progesterone	7.056	6.170	-12.56	1.00
Estrone	50.000	50.247	0.49	2.56
Androstenedione	5.673	5.884	3.72	2.16
Aldosterone	5.064	4.547	-10.22	3.42

从以上结果可看出, 使用替代基质标曲测定低、中、高三组加标样品, 其检测均值和理论值相对误差均 <15%, 精密度 <10%, 均在可接受范围之内。

2.2.4 替代基质稀释血清基质

采用替代基质稀释血清基质, 分别测定不同稀释倍数下得到的空白基质中内源性类固醇激素的浓度, 该浓度与理论值的偏差在接受范围内 (相对误差均 <15%, 精密度 <10%), 结果如表 10-12 所示。

表10 稀释倍数为1.25时血清中类固醇激素含量测定结果

名称	理论值 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	相对误差 (%)	精密度 (%)
17-OHP	0.497	0.458	-7.847	4.71
21-OHP	0.016	0.016	0.000	6.70
Corticosterone	1.577	1.267	-13.316	4.33
11-Deoxy cortisol	0.187	0.187	0.000	4.40
21-Deoxy cortisol	-	-	-	-
Testosterone	1.070	0.869	-9.439	5.00
DHEA	1.648	2.018	10.316	2.91
Progesterone	1.645	1.428	-13.191	3.02
Estrone	-	-	-	-
Androstenedione	0.538	0.479	-10.967	4.88
Aldosterone	0.051	0.045	-11.765	6.11

注：“-”表示未检出/低于检出限

表11 稀释倍数为2.5时血清中类固醇激素含量测定结果

名称	理论值 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	相对误差 (%)	精密度 (%)
17-OHP	0.249	0.231	-7.074	5.18
21-OHP	0.008	0.007	-13.409	7.22
Corticosterone	0.789	0.690	-12.509	4.95
11-Deoxy cortisol	0.093	0.086	-8.014	5.40
21-Deoxy cortisol	-	-	-	-
Testosterone	0.535	0.462	-13.709	4.15
DHEA	0.824	0.743	-9.848	3.44
Progesterone	0.823	0.749	-8.946	2.99
Estrone	-	-	-	-
Androstenedione	0.269	0.259	-3.719	2.78
Aldosterone	0.026	0.025	-2.481	6.89

注：“-”表示未检出/低于检出限

表12 稀释倍数为5时血清中类固醇激素含量测定结果

名称	理论值 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	相对误差 (%)	精密度 (%)
17-OHP	0.124	0.113	-9.085	4.27
21-OHP	0.004	-	-	-
Corticosterone	0.394	0.398	0.932	5.13
11-Deoxy cortisol	0.047	0.043	-8.014	6.42
21-Deoxy cortisol	-	-	-	-
Testosterone	0.268	0.240	-10.347	4.00
DHEA	0.412	0.383	-7.057	2.65
Progesterone	0.411	0.361	-12.229	2.90
Estrone	-	-	-	-
Androstenedione	0.135	0.132	-1.860	4.90
Aldosterone	0.013	0.011	-14.183	7.03

注：“-”表示未检出/低于检出限

综上所述，在血清中类固醇激素的检测实验中，4% BSA 溶液和血清配制的标准曲线，二者斜率基本一致。替代基质标曲测定血清，检测结果与理论值偏差在可接受范围内。此外，采用替代基质稀释血清，对不同稀释倍数下的样品测定结果具有良好的准确度和精密度。因此，4% BSA PBS 溶液作为血清替代基质，用于配制类固醇激素标准曲线。

2.3 精密度测定

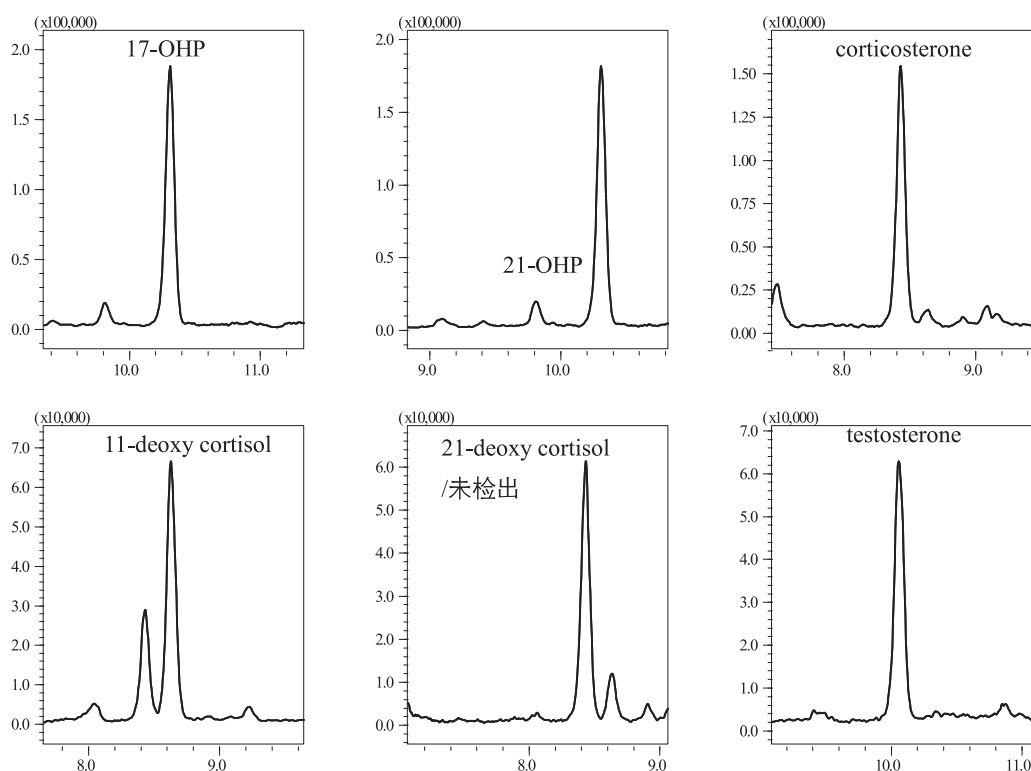
用替代基质配制低、中、高三个浓度的样品，即 LQC(0.1 ng/mL)、MQC(1 ng/mL) 和 HQC(8 ng/mL)，DHEA 和 Estrone 的 HQC 浓度为 80 ng/mL。数据统计分析得到精密度和准确度，结果如表 13 所示。

表13 替代基质中类固醇激素精密度和准确测定结果

名称	LQC		MQC		HQC	
	精密度%	准确度%	精密度%	准确度%	精密度%	准确度%
17-OHP	1.46	97.3~103.2	1.15	96.8~104.3	1.63	98.2~102.3
21-OHP	3.68	93.2~106.4	0.55	96.7~105.0	0.47	96.7~108.9
Corticosterone	1.71	91.5~103.9	0.28	96.8~102.1	0.69	93.3~99.9
11-Deoxy cortisol	2.08	94.5~106.1	0.72	95.3~104.5	1.40	95.3~103.0
21-Deoxy cortisol	3.66	96.6~102.8	0.35	96.9~105.2	0.50	98.6~108.1
Testosterone	1.75	98.1~103.2	1.13	97.3~103.5	0.39	97.8~101.4
DHEA	4.84	98.8~102.6	2.04	94.9~102.5	0.44	94.5~99.1
Progesterone	2.03	97.9~106.4	0.54	92.4~104.1	0.45	96.1~103.9
Estrone	4.38	98.2~105.4	2.53	99.3~107.1	0.57	92.1~110.1
Androstenedione	3.17	94.8~102.1	0.62	94.5~104.0	1.34	93.4~100.7
Aldosterone	1.10	96.4~103.4	1.91	92.2~103.8	2.38	95.0~108.0

2.4 临床样品测定结果

共获取体检人血清临床样品 10 个，经前处理后分别进行测定，色谱图见图 5，结果如表 14 所示。



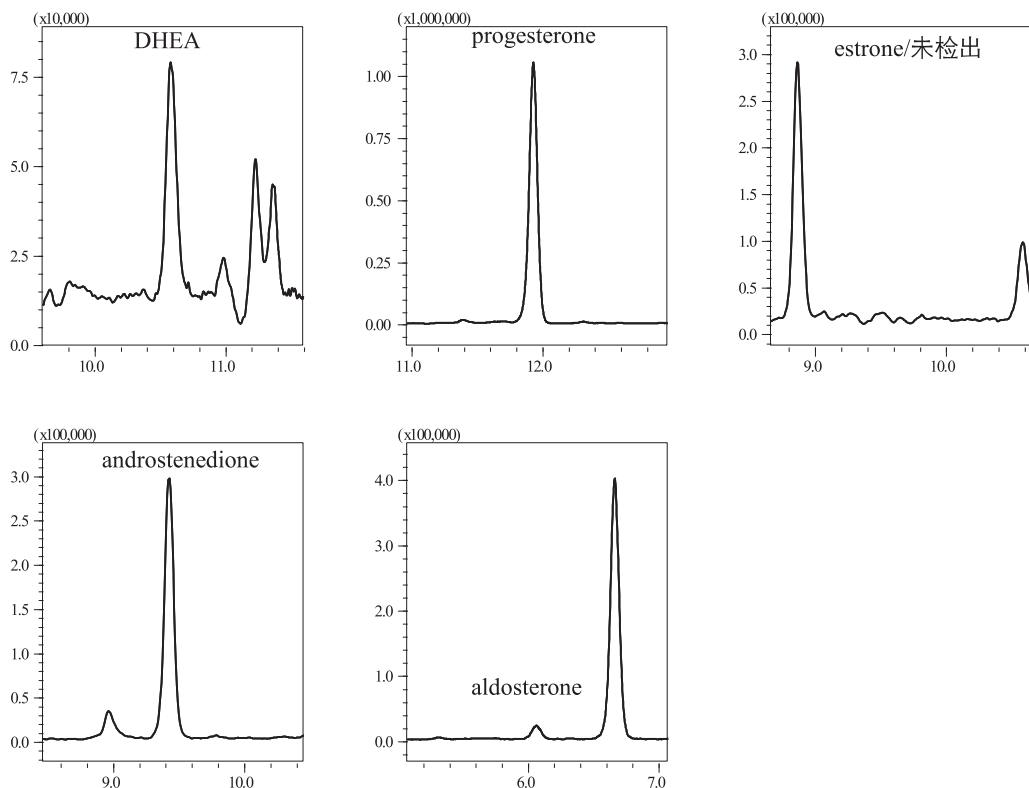


图5 吗啡体检人血清临床样品No.7的MRM色谱图

表14 体检人血清临床样品检测结果(ng/mL)

化合物	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10
17-OHP	0.189	1.206	0.366	0.658	0.377	0.212	0.794	0.314	0.099	0.094
21-OHP	-	-	-	0.010	0.021	0.011	0.021	0.017	-	-
Corticosterone	0.158	0.402	4.683	1.846	2.968	0.834	0.974	3.056	0.264	0.262
11-Deoxy cortisol	0.161	0.044	0.723	0.290	0.400	0.119	0.322	0.262	0.123	0.044
21-Deoxy cortisol	-	0.014	0.029	-	0.043	-	-	0.027	-	-
Testosterone	0.181	3.154	0.188	0.328	0.226	0.118	0.101	0.217	0.114	0.087
DHEA	1.230	-	2.971	2.039	1.687	1.677	0.561	3.570	-	-
Progesterone	0.066	0.07	0.029	0.026	0.033	0.061	3.523	0.027	0.126	-
Estrone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Androstenedione	0.744	0.865	0.841	1.807	0.67	0.697	0.605	1.265	0.382	0.523
Aldosterone	-	-	0.076	0.100	-	0.076	0.092	0.095	-	-

注：“-”表示未检出/低于检出限

结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用, 通过替代基质配制标曲, 结合 SLE(固相支撑液液萃取) 前处理方法, 建立了血清中类固醇激素的定量分析方法。实验结果表明, 该方法的标曲定量范围为 0.01-10 ng/mL(DHEA 和 Estrone 为 0.1-100 ng/mL, Aldosterone 为 0.05-10 ng/mL), 准确度范围为 84.0-113.8%, 该方法分析速度快、稳定性和准确度好, 可为临床类固醇激素的检测提供参考。