

利用 LCMS-8050 CL 定量分析血清中类固醇激素

LCMSMS-460

摘要： 本文使用岛津临床质谱仪 LCMS-8050 CL，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 0.05-100 ng/mL，准确度范围为 89.6-115%。该方法分析速度快、稳定性和准确度好，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-8050 CL 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。

本文使用岛津临床质谱仪 LCMS-8050 CL，采用一系列 H² 和 C¹³ 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

本实验使用岛津临床质谱仪 LCMS-8050 CL（国械注进 20182400195）。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack FC-ODS (75 mm × 2 mm I.D., 3 μm); P/N: 228-40511-94

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°C

进样量：10 μL

自动进样器温度：10°C

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

离子化模式: 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

■ 标曲制备和样品前处理

2.1. 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。

2.2. 样品前处理

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

英文名	中文名	CAS No.	内标组	保留时间 (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
Progesterone	孕酮	57-83-0	4	11.963
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

化合物名	前体离子 m/z	产物离子 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

3.1 替代基质标曲色谱图

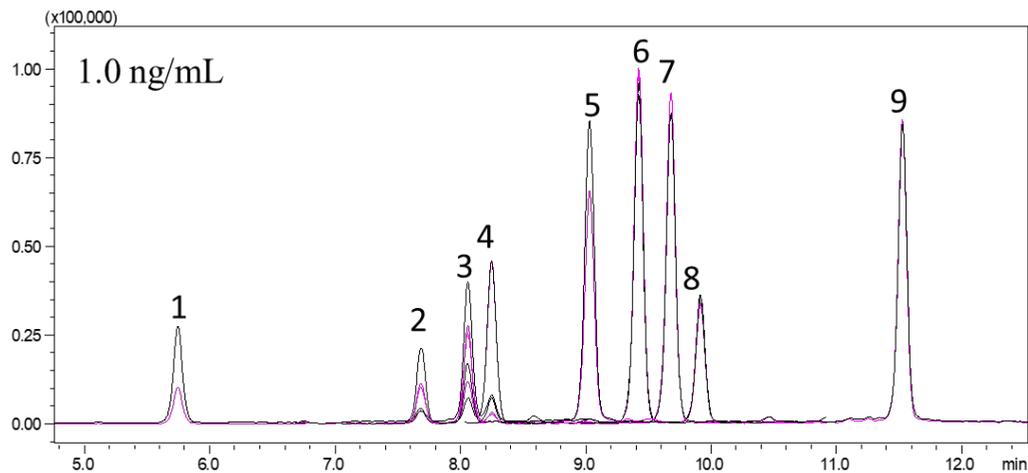


图 1 替代基质标曲色谱图

(1.Aldosterone; 2. 21-Deoxy cortisol; 3. Corticosterone; 4. 11-Deoxy cortisol;
5. Androstenedione; 6. 21-OHP; 7. Testosterone; 8. 17-OHP; 9. Progesterone)

3.2 替代基质标曲相关信息

关于替代基质一致性验证相关实验请参看应用报告“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)”。用替代基质溶液依照“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，绘制出替代基质标曲（如表 4 示）。

表 4 类固醇激素替代基质标准曲线相关参数 (采用 $1/C^2$ 加权)

名称	校准曲线	相关系数 R	线性范围 (ng/mL)	准确度 %
17-OHP	$Y = (1.33976)X + (0.0263079)$	0.9967	0.05~100	94.4~109.5
21-OHP	$Y = (3.25155)X + (0.00920560)$	0.9977	0.05~100	89.6~113.9
Corticosterone	$Y = (2.75822)X + (0.147017)$	0.9937	0.05~100	86.0~115.0
11-Deoxy cortisol	$Y = (2.02838)X + (0.0167366)$	0.9953	0.05~100	90.6~107.0
21-Deoxy cortisol	$Y = (0.648124)X + (0.0027461)$	0.9949	0.05~100	88.6~107.9
Testosterone	$Y = (3.11985)X + (0.0654195)$	0.9973	0.05~100	94.5~110.5
Progesterone	$Y = (1.03998)X + (0.0566223)$	0.9988	0.05~100	93.3~109.4
Androstenedione	$Y = (1.02551)X + (0.00835938)$	0.9984	0.05~100	93.9~108.4
Aldosterone	$Y = (3.26450)X + (0.00444036)$	0.9984	0.05~100	92.0~107.7

3.3 精密度测定

用替代基质配制低、中、高三个浓度的样品，即 0.05 ng/mL、1 ng/mL 和 50 ng/mL。数据统计分析得到连续 6 针的精密度测定结果（如表 5 所示），浓度为 0.05 ng/mL 的样品中各化合物峰面积精密度小于 11.5%，浓度为 1 ng/mL 的样品中各化合物峰面积精密度小于 4.2%，浓度为 50 ng/mL 的样品中各化合物峰面积精密度小于 2.2%。

表 5 替代基质中类固醇激素精密度测定结果

化合物	RSD% (50 pg/mL)		RSD% (1 ng/mL)		RSD% (50 ng/mL)	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
Aldosterone	0.182	9.850	0.077	1.705	0.055	1.112
21-Deoxy cortisol	0.074	9.276	0.058	4.156	0.035	1.893
Corticosterone	0.061	11.199	0.039	1.279	0.035	1.367
11-Deoxy cortisol	0.095	7.842	0.055	1.641	0.031	1.203
Androstenedione	0.078	10.955	0.043	1.928	0.035	2.101
21-OHP	0.101	5.083	0.041	1.900	0.029	1.728
Testosterone	0.084	4.766	0.037	1.772	0.030	2.298
17-OHP	0.082	6.930	0.036	1.603	0.026	1.813
Progesterone	0.170	11.543	0.023	1.081	0.026	2.246

3.4 实际样本测定结果

利用以上方法对某血清样本进行定量分析，结果如下表所示。

表 6 体检人血清临床样品检测结果 (ng/mL)

化合物名称	浓度 (ng/mL)	化合物名称	浓度 (ng/mL)
Aldosterone	0.32	21-OHP	0.14
21-Deoxy cortisol	0.35	Testosterone	0.58
Corticosterone	6.90	17-OHP	3.77
11-Deoxy cortisol	0.93	Progesterone	61.86
Androstenedione	1.93		

■ 结论

本文使用岛津临床质谱仪 LCMS-8050 CL，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 0.05-100 ng/mL，准确度范围为 89.6-115%，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。

岛津应用云

