

LCMS-8050 CL 测定人血浆中 17 种糖皮质激素含量

LCMSMS-495

摘要：本文使用岛津临床超高效液相色谱仪 LC-30A CL 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用建立了人血浆中 17 种糖皮质激素同时测定的方法。使用内标、标准样品及基质加标样品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性范围宽，标准曲线相关系数均大于 0.994，方法准确度及精密度均可满足临床日常检验需求。该方法分析速度快，灵敏度高，专属性强，前处理简单，可为相关从业人员提供参考。

关键词：LCMS-8050 CL 糖皮质激素 血浆

糖皮质激素 (Glucocorticoid, GCs) 是由肾上腺分泌的一类甾体激素，其对糖、脂肪和蛋白质等生物合成和代谢过程具有较强的调节作用，还具有抑制免疫应答、抗炎、抗毒、抗休克作用。人工合成糖皮质激素是常用的治疗药物之一，通过糖皮质激素受体介导发挥药效，同样具有抗炎、抗毒、抗肿瘤和免疫抑制作用。目前，临床上至少有 200-300 种疾病会应用糖皮质激素治疗，其不仅用于各种肾上腺皮质功能异常性疾病的替代治疗，而且也广泛地应用于治疗自身免疫性疾病、过敏性疾病、血液系统疾病、哮喘、器官移植、皮肤病、眼疾等。糖皮质激素广泛应用的同时，也相继出现了较多不合理应用的现象。如果不恰当或长期使用糖皮质激素会导致多种病源性疾病，并且会引发肾上腺功能减退症及库欣综合征等误诊。目前糖

皮质激素检测手段主要有免疫法、气相色谱法 (GC)、高效液相色谱法 (HPLC)、气相色谱质谱法 (GC-MS)、液相色谱质谱法 (LC-MS)。但免疫法、气相色谱法、高效液相色谱法、气相色谱质谱法在激素检测上或多或少均存在一些缺点，如对激素代谢的结构类似物不能区别检测，存在交叉反应；动态线性范围较窄；前处理复杂；对含量相对较低的激素检测的灵敏度不够；不能同时检测多种激素。而高效液相色谱质谱法因其高特异性、高灵敏度、一次可检测多种化合物等特点，被广泛应用于糖皮质激素测定。

本实验使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL，建立了人血浆中 17 种糖皮质激素含量测定方法，该方法分析速度快，灵敏度高，专属性强，前处理简单，可为相关从业人员提供参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

系统控制器：CBM-20A CL

输液泵：LC-30AD CL × 2

柱温箱：CTO-30A CL

质谱检测器：LCMS-8050 CL

脱气机：DGU-20A_{5R} CL

自动进样器：SIL-30AC_{MP} CL

检测器：SPD-M30A CL

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.98

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack Velox C18 (100 mm × 2.1 mm I.D., 1.8 μm)

流动相：A 相 - 水；B 相 - 乙腈

流速：0.45 mL/min

柱温：40°C

进样量：10 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 25%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	断裂伸长率 %
5.00	泵	B.Conc	25
7.00	泵	B.Conc	35
8.00	泵	B.Conc	95
9.00	泵	B.Conc	95
9.10	泵	B.Conc	25
11.00	控制器	Stop	

质谱条件:

分析仪器: LCMS-8050 CL

离子源: ESI (+)

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 12.0 L/min

接口温度: 400°C

DL 温度: 150°C

加热模块温度: 450°C

干燥气流速: 8.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 PreBias (V)	CE(V)	Q1 PreBias (V)
曲安西龙	395.1	357.2	-17	-15	-16
	395.1	225.1	-20	-20	-23
泼尼松龙	361.1	343.2	-20	-11	-12
	361.1	147.1	-30	-23	-27
泼尼松	359.2	341.2	-11	-12	-16
	359.2	147.2	-20	-25	-14
甲基泼尼松龙	375.2	357.2	-11	-12	-25
	375.2	161.2	-15	-21	-16
倍他米松	393.2	373.2	-10	-9	-13
	393.2	355.2	-22	-13	-17
地塞米松	393.2	373.2	-12	-9	-18
	393.2	355.2	-16	-14	-13
曲安奈德	435.2	415.2	-18	-12	-29
	435.2	339.2	-22	-16	-23
曲安西龙双醋酸酯	479.1	441.1	-19	-12	-21
	479.1	321.2	-25	-18	-15
泼尼松龙醋酸酯	403.2	385.2	-16	-12	-18
	403.2	307.2	-21	-14	-21
氟米龙	377.2	279.3	-11	-18	-29
	377.2	321.3	-21	-14	-22

泼尼松醋酸酯	401.1	295.2	-16	-16	-14
	401.1	147.1	-21	-23	-15
甲基泼尼松 龙醋酸酯	417.2	399.2	-16	-12	-18
	417.2	253.3	-17	-21	-26
布地奈德	431.2	413.2	-18	-12	-14
	431.2	147.2	-23	-31	-15
布地奈德	419.2	279.2	-22	-18	-29
	419.2	321.2	-13	-14	-15
曲安奈德醋酸酯	477.2	457.2	-18	-11	-16
	477.2	339.1	-15	-15	-12
倍他米松双丙酸酯	505.2	411.2	-40	-12	-19
	505.2	319.2	-20	-16	-21
氟氢可的松	381.2	239.1	-12	-25	-16
	381.2	267.0	-21	-24	-28
氟米松 (内标)	411.1	253.2	-23	-17	-17
氟轻松 (内标)	453.1	121.2	-24	-31	-19
卤美他松 (内标)	445.1	155.1	-11	-32	-15
哈西奈德 (内标)	455.1	105.2	-19	-54	-19
安西奈德 (内标)	503.2	339.1	-40	-18	-22

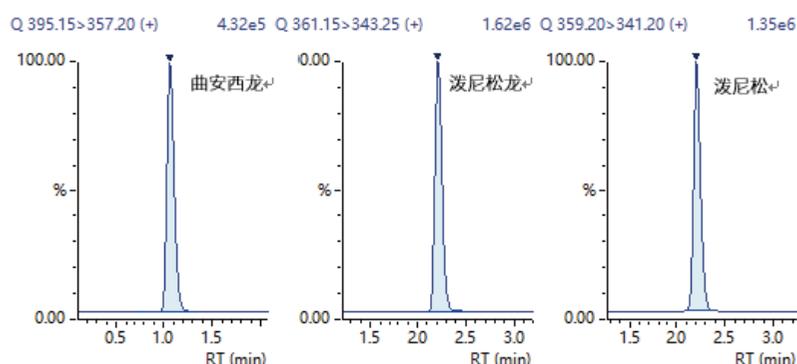
1.3 标准品及样品制备

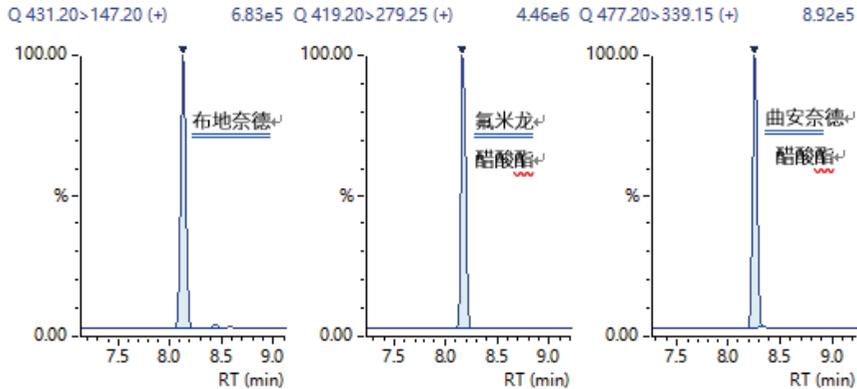
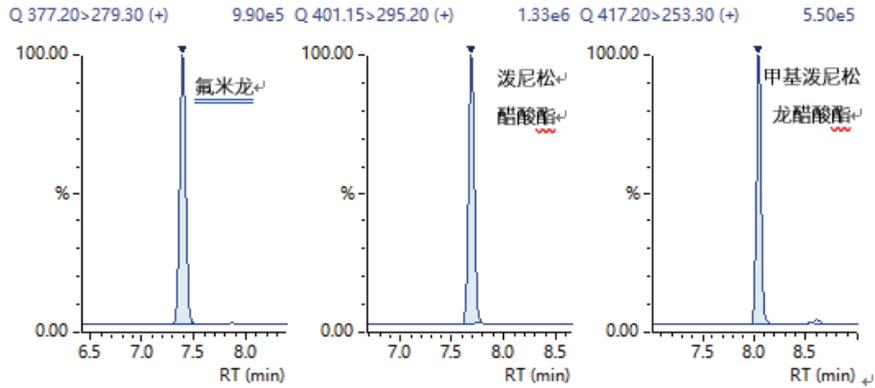
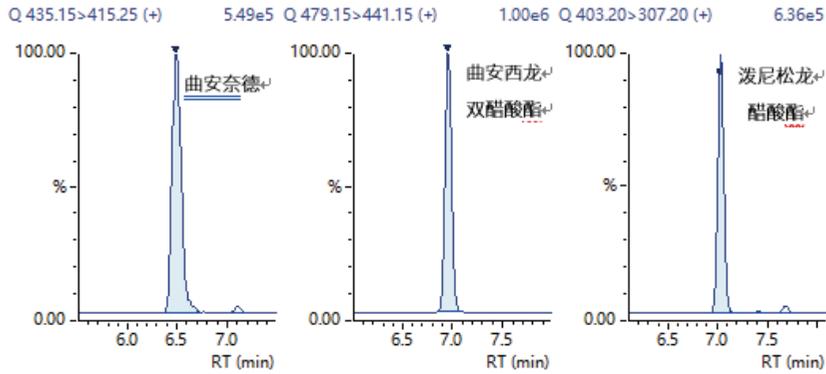
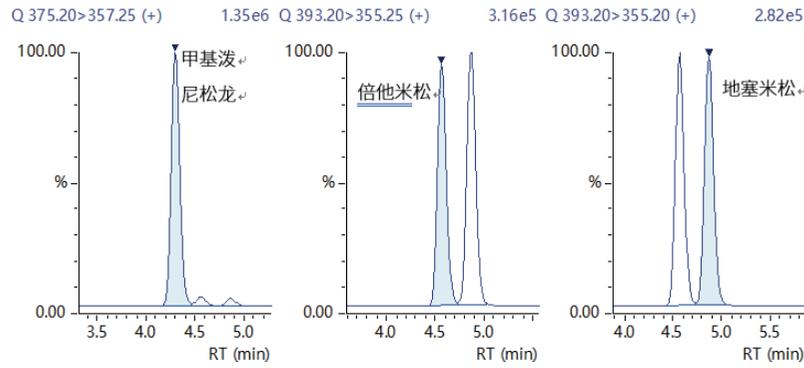
标准溶液制备：取 17 种糖皮质激素混标母液，用甲醇稀释成相应浓度混标液。内标溶液使用甲醇配置成内标工作液。取 200 μL 空白血浆，20 μL 混标液，涡旋混匀 10 s，得基质标准溶液，混标基质标曲浓度 L1~L7 分别为 0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、100 ng/mL，加入 20 μL 内标溶液，涡旋混匀 10 s，加入 1 mL 乙酸乙酯，涡旋混匀 1 min，13000 rpm 离心 5 min，取 850 μL 上清液至 1 mL 96 孔板中，室温氮气吹干，向 96 孔板中加入 100 μL 40% 乙腈，振荡混匀 5 min，上机测定。

样品溶液制备：取 200 μL 血浆样本，加入 20 μL 内标溶液，涡旋混匀 10 s，加入 1 mL 乙酸乙酯，涡旋混匀 1 min，13000 rpm 离心 5 min，取 850 μL 上清液至 1 mL 96 孔板中，室温氮气吹干，向 96 孔板中加入 100 μL 40% 乙腈，振荡混匀 5 min，上机测定。

结果与结论

2.1 MRM 色谱图





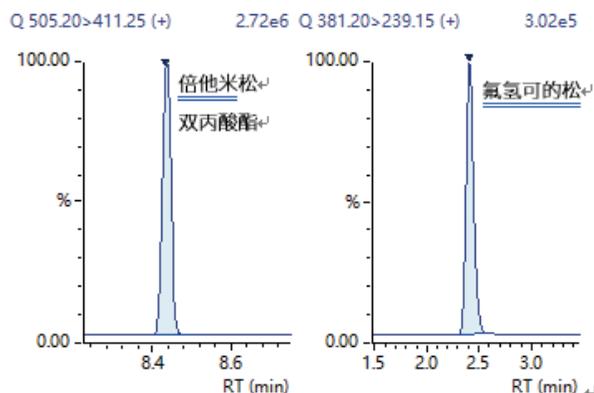


图 1 糖皮质激素标准品谱图

2.2 线性测定结果

对标准品按 1.2 中的分析条件进行分析，内标法制作标准曲线。标准曲线结果见表 3，17 种糖皮质激素在标准曲线浓度范围内线性相关系数均大于 0.994，准确度在 85.6%~112.4% 之间，满足测定需求。

表 3 标准曲线结果

编号	名称	线性方程	相关系数	准确度 (%)
1	曲安西龙	$Y = (0.0816708)X + (0.0013143)$	0.998	91.1~108.0
2	泼尼松龙	$Y = (0.202297)X + (0.00212863)$	0.998	88.1~107.6
3	泼尼松	$Y = (0.293945)X + (0.00393414)$	0.998	90.4~110.4
4	甲基泼尼松龙	$Y = (0.339069)X + (0.00399323)$	0.999	94.9~110.2
5	倍他米松	$Y = (0.0754136)X + (0.0013019)$	0.999	94.2~110.4
6	地塞米松	$Y = (0.0724102)X + (0.0130596)$	0.999	95.6~108.1
7	曲安奈德	$Y = (0.315300)X + (0.00748315)$	0.994	86.7~111.7
8	曲安西龙双醋酸酯	$Y = (0.180955)X + (0.0107927)$	0.996	91.2~109.1
9	泼尼松龙醋酸酯	$Y = (0.100233)X + (0.00292863)$	0.997	90.5~108.9
10	氟米龙	$Y = (0.156072)X + (-0.0005509)$	0.997	93.0~109.3
11	泼尼松醋酸酯	$Y = (0.19418)X + (9.9127e-005)$	0.996	86.9~111.9
12	甲基泼尼松龙醋酸酯	$Y = (0.0679925)X + (0.0079558)$	0.994	92.3~111.8
13	布地奈德	$Y = (0.0909746)X + (0.0014738)$	0.996	85.6~110.4
14	氟米龙醋酸酯	$Y = (0.549688)X + (0.0308288)$	0.996	95.5~109.6
15	曲安奈德醋酸酯	$Y = (0.373039)X + (0.0642917)$	0.996	89.9~112.4
16	倍他米松双丙酸酯	$Y = (0.202822)X + (0.00434718)$	0.998	94.1~108.2
17	氟氢可的松	$Y = (0.0601693)X + (0.0008994)$	0.998	92.2~107.7

2.3 精密度测定结果

取混合对照品溶液（浓度为 1 ng/mL），连续进样 6 针，考察仪器精密度，具体测定浓度及峰面积精密度见表 4，结果显示，17 种激素在测定浓度下峰面积精密度在 1.7%~4.2% 之间，LCMS-8050 CL 测定 17 种糖皮质激素精密度良好。

表 4 精密度实验结果 (n=6, ng/mL)

名称	平均峰面积	RSD%	名称	平均峰面积	RSD%
曲安西龙	37,566	1.8	氟米龙	91478	4.2
泼尼松龙	246,633	2.4	泼尼松醋酸酯	173297	2.3
泼尼松	303,986	2.8	甲基泼尼松龙醋酸酯	186803	2.9
甲基泼尼松龙	231939	1.7	布地奈德	178925	3.5
倍他米松	73317	3.7	氟米龙醋酸酯	435556	3.6
地塞米松	74124	3.0	曲安奈德醋酸酯	97309	3.0
曲安奈德	183079	2.1	倍他米松双丙酸酯	57929	3.3
曲安西龙双醋酸酯	91747	3.0	氟氢可的松	42942	2.2
泼尼松龙醋酸酯	145041	1.9			

2.4 准确度测定结果

按 1.3 中的前处理方法对空白血浆添加低中高浓度标准品作为低中高浓度质控品（添加浓度分别为 0.2 ng/mL, 5 ng/mL, 50 ng/mL），按 1.2 中的分析条件对质控品进行分析，每个样品平行制备 3 份，质控品的准确度结果如表 5 所示，结果显示质控品测定准确度结果与理论值接近，低中高浓度质控品准确度分别在 87.8%~113.1%、93.9%~114.2%、87.9%~112.5% 之间，满足临床测定需求。样品平行制备 3 份进样分析，低中高浓度质控品测定结果 RSD 分别在 1.4%~5.7%、1.1%~5.4%、1.1%~5.4% 之间，满足临床测定需求。

表 5 质控准确度考察结果 (n=3)

名称	LQC		MQC		HQC	
	回收率 (%)	RSD(%)	回收率 (%)	RSD(%)	回收率 (%)	RSD(%)
曲安西龙	101.4	3.5	97.1	3.2	103.1	3.2
泼尼松龙	104.5	4.4	103.3	4.1	96.9	4.1
泼尼松	98.2	2.1	104.1	1.8	94.2	1.8
甲基泼尼松龙	95.8	4.2	101.0	3.9	97.9	3.9
倍他米松	98.2	1.9	100.1	1.6	97.8	1.6
地塞米松	96.2	3.1	101.0	2.8	97.6	2.8
曲安奈德	106.3	3.7	104.2	3.4	96.4	3.4
曲安西龙双醋酸酯	93.3	5.7	105.0	5.4	100.7	5.4
泼尼松龙醋酸酯	98.5	4.1	99.8	3.8	104.6	3.8
氟米龙	113.1	3.7	98.6	3.4	96.3	3.4
泼尼松醋酸酯	90.2	2.5	101.2	2.2	100.7	2.2
甲基泼尼松龙醋酸酯	96.4	2.9	93.9	2.6	97.6	2.6
布地奈德	93.0	1.4	100.1	1.1	112.5	1.1
氟米龙醋酸酯	96.9	2.1	95.1	1.8	109.2	1.8
曲安奈德醋酸酯	87.8	2.7	114.2	2.4	98.5	2.4
倍他米松双丙酸酯	96.5	2.4	105.6	2.1	87.9	2.1
氟氢可的松	107.7	2.3	102.8	2.0	96.7	2.0

■ 结论

使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30A CL 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用建立了人血浆中 17 种糖皮质激素同时测定的方法。使用内标、标准样品及基质加标样品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性范围宽，标准曲线相关系数均大于 0.994，方法准确度及精密度均可满足临床日常检验需求。该方法可以为临床人血浆中外源性激素同时检测提供很好的借鉴和参考。

岛津应用云

