

LCMSMS 测定人血浆中 20 种激素含量

LCMSMS-594

摘要: 本文使用岛津超高效液相色谱仪与三重四极杆质谱仪联用建立了人血浆中 20 种激素同时测定的方法。结果显示该方法线性良好，标准曲线相关系数均大于 0.99，方法准确度及精密度均可满足临床日常检验需求，可为相关从业人员提供参考。

关键词: 三重四极杆液质联用仪 20 种激素 血浆

类固醇激素又称甾体激素，是内分泌细胞分泌的高效能生物化学物质，在维持生命、调节机体物质代谢、促进性器官发育和维持生育等方面起着重要作用。类固醇激素水平可作为多种疾病的诊断指标：包括先天性类固醇代谢紊乱和获得性类固醇代谢紊乱等，主要涉及到 8 个 Panel，包括肥胖组合、肾上腺皮质功能减退组合、原发性醛固酮增多症组合、库欣综合征组合、肾上腺增生组合、男性性功能减退组合、多囊卵巢综合征组合及地塞米松抑制实验组合，且一种疾病常伴有多种类固醇激素异常，如先天性肾上腺皮质增生症

(Congenital adrenal hyperplasia, CAH) 筛查时需要同时检测 17-羟孕酮 (17-OH-P)、雄烯二酮 (A4)、肾上腺皮质醇 (F)、11-脱氧皮质醇 (S) 和 21-脱氧皮质醇 (21-DOC) 等多种类固醇激素的水平。除此之外，外源性激素，如泼尼松、地塞米松、氟米龙、甲基泼尼松龙等在临床上作为抗炎类激素药物应用广泛，但这些药物的长期使用和过度使用会导致内分泌代谢混乱的临床表现，患者可能呈现库欣综合征的临床特征。因此，建立一种可同时测定多种内源性激素及外源性激素的方法，能够更好的契合临床需求。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津三重四极杆液质联用系统。具体配置为：

系统控制器：SCL-40 在线脱气机：DGU-405
 输液泵：LC-40B X3 质谱仪：LCMS-8045
 自动进样器：SIL-40C 色谱工作站：LabSolutions Version 5.99
 柱温箱：CTO-40C

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack Velox SP-C18 (100 mm x 2.1 mm I.D. , 2.7 μm, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-32003-03)

流动相：A 相 -0.05 mM/L 氟化铵水溶液，B 相 - 甲醇

流速：0.4 mL/min

柱温：45°C

进样体积：20 μL

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 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	泵	B.Conc	40
4.00	泵	B.Conc	50
6.00	泵	B.Conc	70
7.50	泵	B.Conc	95
8.50	泵	B.Conc	95
8.51	泵	B.Conc	35
10.00	控制器	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8045	DL 温度: 170°C
离子源: ESI(+/-)	加热模块温度: 400°C
雾化气流速: 3.0 L/min	接口温度: 400°C
加热气流速: 10.0 L/min	扫描模式: 多反应监测 (MRM)
干燥气流速: 10.0 L/min	MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

编号	名称	英文简写	前体离子	产物离子	CE(V)
15 种内源性激素					
1	褪黑素	Melatonin	233.10	174.10	-16
2	醛固酮	ALD	361.20	315.15	-19
3	可的松	COR	361.15	163.15	-24
4	皮质醇	F	363.20	121.15	-25
5	21- 脱氧皮质醇	21DOC	347.20	311.20	-16
6	皮质酮	CORT	347.20	121.10	-23
7	11- 脱氧皮质醇	S	347.20	97.10	-25
8	雄烯二酮	A4	287.15	97.10	-15
9	11- 脱氧皮质酮	DOC	331.20	109.05	-26
10	睾酮	T	289.20	109.10	-25
11	17 α - 羟孕酮	17 α -OH-P	331.20	109.05	-27
12	孕酮	P	315.20	109.10	-25
13	脱氢表雄酮硫酸酯	DHEAS	367.20	97.00	17
14	雌酮	E1	269.10	145.10	38
15	17- 羟基孕烯醇酮	17-OH-PS	331.20	287.25	20
5 种外源性激素					
16	泼尼松	Prednisone	359.20	341.15	-20
17	氟氢可的松	Fludrocortisone	381.20	239.15	-24
18	泼尼松龙	Prednisolone	361.20	343.15	-11
19	地塞米松	Dexamethasone	393.20	355.20	-13
20	氟米龙	Fluorometholone	377.20	279.15	-17

1.3 标准品配制

标准溶液制备: 取 20 种激素混标母液, 用甲醇稀释成相应浓度混标中间液, 再用纯水稀释成系列浓度的标准工作液。

1.4 样品制备

①样品溶液制备: 取 250 μ L 血浆, 加入 250 μ L 甲醇, 涡旋混匀, 加入 250 μ L 纯水, 涡旋混匀后于 13000 rpm 离心 5 min。②标准品及样品净化: 取样品上清液 600 μ L 至 HLB 型 96 孔固相萃取板中, 弃去废液; 使用 200 μ L 的 5% 甲醇水溶液清洗固相萃取板 2 次; 再使用 200 μ L 正己烷洗涤固相萃取板 1 次; 收集使用 50 μ L 乙腈洗脱液 (清洗两次), 将收集液于氮气流吹干, 加入 50 μ L 流动相复溶 (初始比例), 混匀 1 min 后上机测定。

■ 结果与讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

使用建立的分析条件，测定人血浆中 20 种激素，所得 MRM 色谱图见图 1。

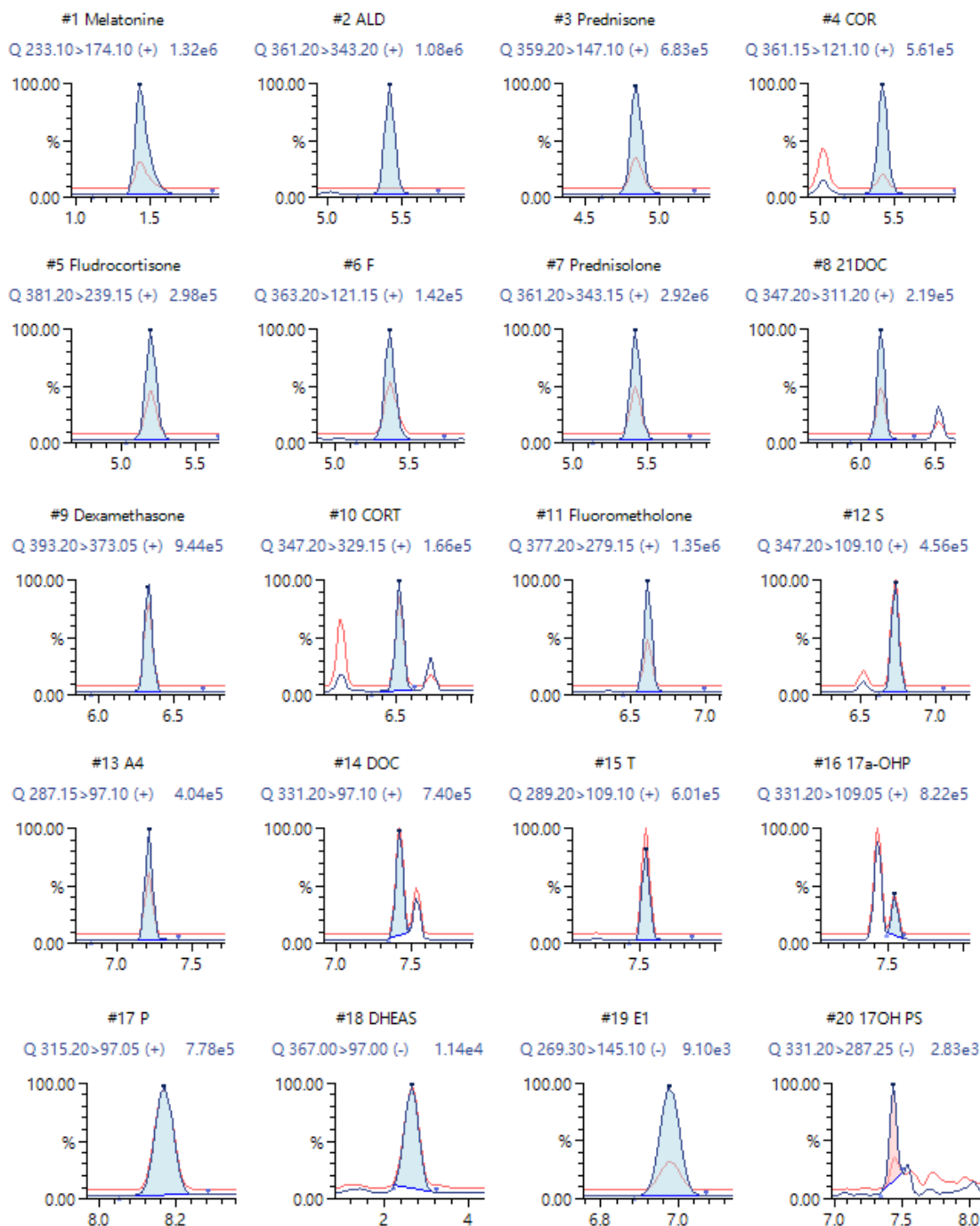


图 1 人血浆中 20 种激素 MRM 色谱图 (0.5 ng/mL)

2.2 标准曲线

按照 1.4 项下分析条件，对系列浓度的混合标准工作液进样分析，使用外标法制作标准曲线（加权方式 $1/C^2$ ），标准曲线信息见表 3。

表 3 标准曲线结果

编号	名称	线性方程	线性范围 (ng/mL)	相关系数	准确度 (%)
1	Melatonin	$Y = (4164220)X + (13709.2)$	0.02~2	0.9998	93.5~109.1
2	ALD	$Y = (2829840)X + (24095.3)$	0.02~4	0.9954	89.7~113.7
3	COR	$Y = (1435640)X + (5365.23)$	0.02~4	0.9959	88.3~113.9
4	F	$Y = (379314)X + (994.951)$	0.02~4	0.9981	87.5~112.6
5	21DOC	$Y = (448158)X + (40.7453)$	0.02~4	0.9955	87.0~111.4
6	CORT	$Y = (345786)X + (9223.24)$	0.02~4	0.9974	93.3~114.6
7	S	$Y = (871247)X + (-753.799)$	0.02~4	0.9967	95.5~112.4
8	A4	$Y = (760524)X + (3202.02)$	0.02~4	0.9984	92.1~107.3
9	DOC	$Y = (1299340)X + (786.959)$	0.02~4	0.9953	89.3~102.9
10	T	$Y = (1150440)X + (4445.11)$	0.02~4	0.9979	94.7~111.8
11	17a-OH-P	$Y = (523724)X + (-1051.37)$	0.02~4	0.9975	91.3~108.4
12	P	$Y = (1277910)X + (6559.30)$	0.02~4	0.9956	85.5~109.2
13	DHEAS	$Y = (171883)X + (-19271.3)$	0.25~4	0.9959	90.8~108.1
14	E1	$Y = (17253.3)X + (-2134.02)$	0.25~4	0.9960	92.8~111.7
15	17-OH-PS	$Y = (8322.75)X + (-736.094)$	0.25~4	0.9967	91.7~107.0
16	Prednisone	$Y = (2058980)X + (10413.7)$	0.02~4	0.9976	87.7~112.4
17	Fludrocortisone	$Y = (851727)X + (-1149.78)$	0.02~4	0.9979	88.6~113.8
18	Prednisolone	$Y = (7809970)X + (45777.4)$	0.02~4	0.9955	89.4~114.2
19	Dexamethasone	$Y = (205280)X + (29136.2)$	0.02~4	0.9951	85.7~112.3
20	Fluorometholone	$Y = (2857130)X + (1548.2)$	0.02~4	0.9969	90.8~112.4

2.3 重复性

按照 1.4 项下分析条件, 对低、高浓度的质控样品进样分析 (n=6), 所得结果见表 4。由结果可知, 20 种激素的回算浓度均在理论浓度 $\pm 15\%$ 以内, 回算浓度 RSD% 均在 13.6% 以内。表明该方法重复性良好。

表 4 质控样品精密度结果 (n=6)

No.	化合物	LQC			HQC		
		理论值 (ng/mL)	回算均值 (ng/mL)	标准偏差 (RSD%)	理论值 (ng/mL)	回算均值 (ng/mL)	标准偏差 (RSD%)
1	Melatonin	0.05	0.047	2.9	2.00	1.88	7.0
2	ALD	0.05	0.055	5.3	4.00	3.55	5.1
3	COR	0.05	0.053	6.3	4.00	4.50	2.0
4	F	0.05	0.049	4.7	4.00	3.84	4.1
5	21DOC	0.05	0.056	3.9	4.00	3.77	3.6
6	CORT	0.05	0.051	8.6	4.00	3.69	4.3
7	S	0.05	0.053	6.4	4.00	4.16	4.2
8	A4	0.05	0.046	4.9	4.00	4.00	6.1
9	DOC	0.05	0.044	9.7	4.00	4.08	5.2
10	T	0.05	0.051	6.9	4.00	3.62	3.3
11	17a-OH-P	0.05	0.055	11.0	4.00	4.24	6.2
12	P	0.05	0.047	9.4	4.00	3.92	5.2

13	DHEAS	0.50	0.44	10.3	4.00	4.33	8.9
14	E1	0.50	0.45	12.1	4.00	4.41	7.8
15	17-OH-PS	0.50	0.47	13.6	4.00	3.66	5.2
16	Prednisone	0.05	0.055	7.2	4.00	4.17	2.7
17	Fludrocortisone	0.05	0.053	5.1	4.00	3.89	3.5
18	Prednisolone	0.05	0.047	4.3	4.00	3.47	5.7
19	Dexamethasone	0.05	0.051	9.5	4.00	3.79	5.0
20	Fluorometholone	0.05	0.047	8.1	4.00	4.31	3.7

2.4 回收率

按 1.4 中的前处理方法对空白血浆添加低高浓度标准品作为低高浓度质控品，每个样品平行制备 3 份，结果显示质控品测准确度均在理论值的 83.7%~110.1% 之间，满足临床测定需求。（如表 5 所示）

表 5 回收率考察结果 (n=3)

No	名称	LQC			HQC		
		添加浓度 (ng/mL)	回收率 (%)	RSD (%)	添加浓度 (ng/mL)	回收率 (%)	RSD (%)
1	Melatonin	0.05	92.6	5.4	2.00	88.7	6.1
2	ALD	0.05	95.1	6.9	4.00	92.0	3.9
3	COR	0.05	93.3	4.8	4.00	87.3	5.6
4	F	0.05	105.7	7.9	4.00	91.9	7.4
5	21DOC	0.05	109.3	5.6	4.00	90.3	8.1
6	CORT	0.05	96.6	4.6	4.00	90.4	5.5
7	S	0.05	104.1	7.3	4.00	100.4	3.6
8	A4	0.05	95.3	5.9	4.00	91.5	7.7
9	DOC	0.05	105.2	8.7	4.00	92.6	10.6
10	T	0.05	95.8	6.2	4.00	89.7	3.1
11	17a-OH-P	0.05	94.2	11.4	4.00	90.1	7.1
12	P	0.05	90.7	3.9	4.00	92.9	5.6
13	DHEAS	0.50	91.5	13.1	4.00	84.1	5.2
14	E1	0.50	87.6	10.5	4.00	83.7	4.2
15	17-OH-PS	0.50	90.7	12.2	4.00	89.4	3.7
16	Prednisone	0.05	93.9	8.7	4.00	87.9	3.7
17	Fludrocortisone	0.05	89.7	5.1	4.00	90.5	4.1
18	Prednisolone	0.05	107.6	4.2	4.00	88.2	5.9
19	Dexamethasone	0.05	110.1	6.7	4.00	87.2	7.8
20	Fluorometholone	0.05	103.9	1.5	4.00	93.6	4.0

■ 结论

实验使用岛津三重四极杆液相色谱质谱联用仪建立了同时测定人血浆中 20 种激素含量的方法。该方法灵敏度、分离度、重复性良好，可用于临床相关的课题研究。

岛津应用云

