

Nexera Mikros-LCMS-8060 液质联用系统测定血清中 5 种糖皮质激素含量

LCMSMS-430

摘要： 本文利用岛津 Nexera Mikros 液质联用系统建立了血清中 5 种糖皮质激素的分析方法。血清样品经乙腈沉淀蛋白后上机分析，在 11 min 内完成 5 种糖皮质激素化合物的检测。本方法采用外标法定量，各化合物在 2~100 ng/mL 范围内线性良好，线性相关系数均在 0.996 以上，检出限在 0.61 ng/mL。连续 5 次进样，各化合物保留时间相对标准偏差小于 1.5%，峰面积的相对标准偏差小于 10.5%，系统精密度良好。5 种糖皮质激素化合物的加标回收率在 85.5% ~ 107.9% 之间。

关键词： Nexera Mikros 液质联用系统 血清 糖皮质激素

糖皮质激素 (Glucocorticoid, GC) 是由肾上腺皮质中束状带分泌的一类甾体激素，具有调节糖、脂肪和蛋白质的生物合成和代谢的作用，还具有抑制免疫应答、抗炎、抗毒、抗休克等作用。糖皮质激素类药物在临床上可应用于肾上腺皮质功能减退、活动性风湿病、类风湿性关节炎和全身性红斑狼疮等疾病。这些药物的药效迅速显著，所以应用较为广泛，但如果使用不当，副作用影响往往也不可小觑。因此，在使用糖皮质激素类药物进行治疗过程中，掌握用药后体内药物浓度的含量和分布情况，对合理用药，减少副作用意义重大。

岛津 Nexera Mikros 液质联用系统可对应从半微量流速 (100 μ L/min~500 μ L/min) 到微量流速 (1

μ L/min~10 μ L/min) 的宽流速范围，同时兼顾耐用性及易操作性。相比半微量流速 LC-MS 系统，Nexera Mikros 系统可以获得化合物更高的检测灵敏度；同时，还可有效应对纳米级流速 LC-MS 系统容易出现诸如堵塞、漏液、分析时间长等问题。

Nexera Mikros 液质联用系统采用了新型微流量送液泵及样品导入质谱的角度、位置均优化过的离子化接口，减少样品基质效应及质谱污染，实现较高的分析灵敏度。本文使用 Nexera Mikros 液质联用系统建立了血清中 5 种糖皮质激素的定量分析方法。该方法灵敏度高，重复性好，分析速度快，实现了多种糖皮质激素的同时分析，供相关工作人员参考使用。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津微流量液相色谱仪 Nexera Mikros 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-Mikros 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-40M 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。



图 1. Nexera Mikros-LCMS-8060 液质联用系统

1.2 分析条件

液相色谱条件:

色谱柱: Shim-pack MC-C18 (0.3 mm I.D. × 50 mm L., 1.9 μm)

流动相: A相 -0.1% 乙酸水溶液; B相 -0.1% 乙酸乙腈溶液

流速: 5 μL/min

柱温: 40°C

进样量: 0.5 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B相初始浓度为 26%, 时间程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

| Time(min) | Module | Command | Value |
|-----------|--------|---------|-------|
| 3.00 | 泵 | B.Conc | 26 |
| 5.50 | 泵 | B.Conc | 95 |
| 6.10 | 泵 | B.Conc | 95 |
| 6.20 | 泵 | B.Conc | 26 |
| 11.00 | 控制器 | Stop | |

质谱条件:

离子源 : ESI (+)

接口电压 : 1.5 kV

雾化气流速 : 2 L/min

加热模块温度 : 400°C

加热气流速 : 3 L/min

扫描模式 : 多反应监测 (MRM)

接口温度 : 100°C

干燥气流速 : 见表 2

DL 温度 : 250°C

表 2. MRM 参数

| No. | 名称 | CAS | 前体离子 | 产物离子 | Q1 Pre Bias(V) | CE(V) | Q3 Pre Bias(V) |
|-----|-------|------------|--------|---------|----------------|-------|----------------|
| 1 | 氢化可的松 | 50-23-7 | 363.25 | 121.10* | -28 | -25 | -12 |
| | | | 363.25 | 327.25 | -28 | -19 | -22 |
| 2 | 氟尼缩松 | 3385-03-3 | 435.20 | 321.25* | -18 | -16 | -22 |
| | | | 435.20 | 339.25 | -18 | -16 | -24 |
| 3 | 去羟米松 | 382-67-2 | 377.25 | 339.25* | -28 | -14 | -16 |
| | | | 377.25 | 357.25 | -28 | -11 | -26 |
| 4 | 布地奈德 | 51333-22-3 | 431.30 | 323.20* | -34 | -16 | -22 |
| | | | 431.30 | 173.20 | -34 | -25 | -22 |
| 5 | 瑞美松龙 | 49697-38-3 | 371.30 | 295.25* | -28 | -14 | -20 |
| | | | 371.30 | 121.15 | -28 | -32 | -12 |

注: * 表示定量离子

1.3 标准溶液的配制

标准物质: 共 5 种, 分别为氢化可的松、氟尼缩松、去羟米松、布地奈德和瑞美松龙。标准工作溶液配制: 称取 0.4 g BSA, 溶于 10 mL PBS, 配制成 4% BSA 溶液作为血清的替代基质溶液。用于配制成 2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、75 ng/mL 和 100 ng/mL 不同浓度的基质标准曲线溶液。

1.4 样品前处理方法

取 100 μL 样品于 1.5 mL 离心管中，加入 200 μL 乙腈，涡旋 60 s，静置 5 min，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下，15000 r/min 离心 20 min，取上清液 100 μL 于 EP 管中，再加入 100 μL 纯水，涡旋混匀，直接上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 标准溶液的 MRM 色谱图

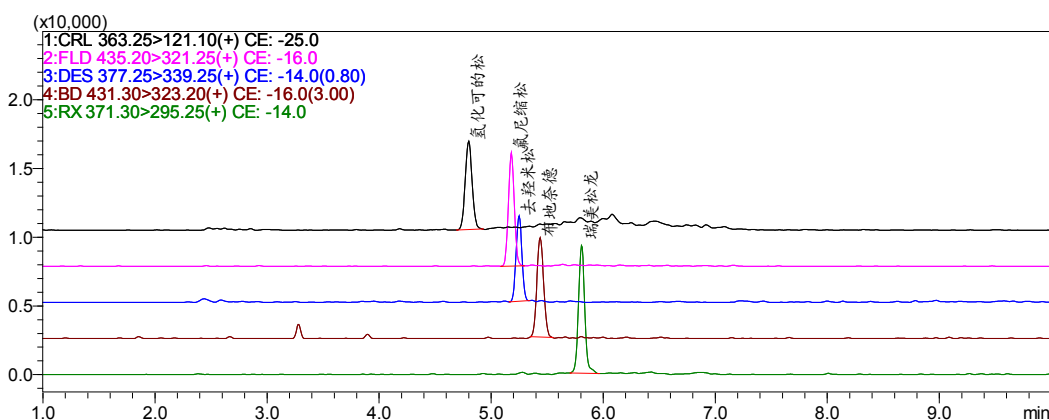


图 2. 标准品 MRM 色谱图 (10 ng/mL)

2.2 线性范围

将不同浓度的血清基质标准曲线溶液，按照 1.4 样品前处理方法操作，1.2 分析条件上机测试。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线；所得标准曲线线性关系良好，线性方程，相关系数及检出限见表 3。

表 3. 标准曲线和检出限信息

| 化合物名称 | 线性方程 | 线性范围 (ng/mL) | 相关系数 r | 准确度 (%) | 检出限 (ng/mL) |
|-------|-------------------------------|-----------------|--------|------------|----------------|
| 氢化可的松 | $Y = (2990.61)X + (-2408.78)$ | 2-100 | 0.9984 | 90.8~104.6 | 0.61 |
| 氟尼缩松 | $Y = (3137.80)X + (-564.188)$ | 2-100 | 0.9967 | 86.9~107.9 | 0.61 |
| 去羟米松 | $Y = (3075.73)X + (-1523.47)$ | 2-100 | 0.9962 | 85.5~106.2 | 0.61 |
| 布地奈德 | $Y = (993.371)X + (-221.233)$ | 2-100 | 0.9984 | 89.9~104.0 | 0.61 |
| 瑞美松龙 | $Y = (3373.06)X + (538.323)$ | 2-100 | 0.9977 | 90.3~106.2 | 0.61 |

2.3 精密度实验

按照 1.2 分析条件，配制低、中、高不同浓度的血清基质混合标准溶液，连续进样 5 次，考察保留时间和峰面积的重复性，结果如下表 4 所示。5 种糖皮质激素化合物的保留时间的 RSD 均小于 1.5%，峰面积的 RSD 均小于 10.5%，表明系统精密度良好。

表 4. 标准曲线和检出限信息

| Name | 10 ng/mL | | 50 ng/mL | | 75 ng/mL | |
|-------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| | R. T. RSD/% | Aera RSD/% | R. T. RSD/% | Aera RSD/% | R. T. RSD/% | Aera RSD/% |
| 氢化可的松 | 0.7 | 6.6 | 1.5 | 9.3 | 0.3 | 4.4 |
| 氟尼缩松 | 0.3 | 8.6 | 0.4 | 3.6 | 0.2 | 4.7 |
| 去羟米松 | 0.2 | 7.4 | 0.3 | 10.5 | 0.1 | 7.0 |
| 布地奈德 | 0.2 | 7.0 | 0.2 | 5.7 | 0.1 | 3.9 |
| 瑞美松龙 | 0.2 | 8.7 | 0.2 | 0.9 | 0.1 | 6.4 |

2.4 加标回收实验

使用空白血清配制成低、中、高三个不同浓度水平的加标样品，按照 1.4 中的前处理方法处理加标样品，上机测试，结果如下表 5 所示，测试结果显示：5 种糖皮质激素化合物的加标回收率在 85.5% ~ 107.9% 之间。

表 5. 加标回收率结果

| 化合物 | 加标 1 | | 加标 2 | | 加标 3 | |
|-------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|
| | 加标浓度 (ng/mL) | 回收率 % | 加标浓度 (ng/mL) | 回收率 % | 加标浓度 (ng/mL) | 回收率 % |
| 氢化可的松 | 5 | 90.8 | 25 | 96.5 | 75 | 102.7 |
| 氟尼缩松 | 5 | 86.9 | 25 | 97.2 | 75 | 107.9 |
| 去羟米松 | 5 | 85.5 | 25 | 97.5 | 75 | 106.6 |
| 布地奈德 | 5 | 89.9 | 25 | 103.7 | 75 | 100.0 |
| 瑞美松龙 | 5 | 104.0 | 25 | 106.2 | 75 | 95.4 |

■ 结论

本文利用岛津 Nexera Mikros 液质联用系统建立了血清中 5 种糖皮质激素的分析方法。血清样品经乙腈沉淀蛋白后上机分析，在 11 min 内完成 5 种糖皮质激素化合物的检测。采用外标法定量，各化合物在 2~100 ng/mL 范围内线性良好，线性相关系数均在 0.996 以上。连续 5 次进样，各化合物保留时间和峰面积的相对标准偏差分别小于 1.5% 和 10.5%，表明系统精密度良好。5 种糖皮质激素化合物的加标回收率在 85.5% ~ 107.9% 之间。该方法样品前处理简单，灵敏度高，分析速度快，可实现血清中多种糖皮质激素的同时分析。

岛津应用云

