

CLAM-2000 与 LCMS-8050 联用测定人血清中 5 种雌激素含量

LCMSMS-409

摘要： 本文建立了一种使用岛津在线自动前处理仪 CLAM-2000 和超高效液相三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统检测人血清中 5 种雌激素的方法。该方法使用岛津在线自动前处理系统 CLAM-2000 处理血清样品，在 6 min 内完成 5 种雌激素的分离检测，所得各物质的校准相关系数良好，检出限在 0.17 ng/mL~0.33 ng/mL 之间。质控样品中各物质的测定值均在标示值允许偏差范围之内。此联用系统减少了人为误差，提高了分析的准确度，实现了多种雌激素的同时快速自动分析。

关键词： CLAM-2000 自动前处理 血清 雌激素

类固醇激素，又称甾体激素，对机体发展、免疫调节及生育控制方面有明确的作用。雌激素是一类重要的类固醇激素，主要有雌酮，雌二醇和雌三醇等，分析人体中雌激素的变化对于疾病的诊断和治疗都具有重要的参考意义。雌激素的检测方法一般有高效液相色谱法 (HPLC)、气相色谱法 (GC)、液相色谱 - 质谱法 (LC-MS)、气相色谱 - 质谱法 (GC-MS) 和酶联免疫吸附法 (ELISA) 等。由于雌激素的检测浓度比较低，一般需要衍生化处理，而衍生反应加热时间、放置时间和试剂用量的差异都会造成分析结果的重现性差。

岛津 CLAM-2000 是一款全自动前处理系统，只需简单放置采血管或其他样品管，系统就会自动完成

对血样或其他样品的前处理，然后自动输送至 LC-MS / MS 进行分析，实现前处理与上机分析的无缝集成，并且能够精密控制分析结果的重现性。CLAM-2000 系统能够最大限度地减少分析人员接触生物样本机会，降低生物感染的风险。

本文使用岛津全自动在线前处理设备 CLAM-2000 和 LC-MS/MS 联用系统建立了人血清中 5 种雌激素的定量分析方法，整个实验流程不涉及手动前处理操作，减少了人为误差，提高分析的准确度。该方法方便、快捷，实现了多种雌激素的同时快速分析，供相关工作人员参考使用。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津全自动在线前处理系统 CLAM-2000、超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为：在线自动前处理仪 CLAM-2000，CLAM-2000 Ver. 1.13 在线自动前处理仪工作站，LC-30AD×2 输液泵，DGL-20A5_R 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪配 ESI 离子源，LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。



图 1. 岛津 CLAM-2000 和 LCMS-8050 联用系统

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱: Shim-pack GIST (2.1 mm I.D. × 100 mmL, 2 μm)

流动相: A – 水; B – 甲醇 / 乙腈 = 1:1(v/v)

流速: 0.4 mL/min

柱温: 30°C

进样量: 5 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 40%, 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	55
3.20	泵	B.Conc	95
4.20	泵	B.Conc	100
4.30	泵	B.Conc	40
6.00	控制器	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8050

接口温度: 300°C

离子化模式: ESI(-)

DL 温度: 200°C

离子源接口电压: 3.5 kV

加热模块温度: 350°C

加热气: 空气 10.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

雾化气: 氮气 3.0 L/min

驻留时间: 35 ms

干燥气: 氮气 10.0 L/min

定量分析 MRM 参数: 见表 2

碰撞气: 氩气

表 2 MRM 参数

名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
雌三醇	50-27-1	287.20*	171.10	14	36	12
		287.20	145.10	14	41	10
17α-雌二醇	57-91-0	271.20*	145.10	13	44	21
		271.20	183.20	13	45	30
17β-雌二醇	50-28-2	271.20*	145.10	13	44	21
		271.20	183.20	13	45	30
雌酮	53-16-7	269.20*	145.10	30	41	25
		269.20	183.10	30	40	20
甲羟孕酮	520-85-4	343.15*	299.10	16	20	22
		343.20	137.20	24	30	28

注: * 表示定量离子

1.3 CLAM-2000 前处理程序

在 CLAM-2000 工作站界面 KIT.Cond 菜单的子菜单 Protocol 项下，编辑样品自动前处理程序，具体步骤为：（1）、在过滤管中加入 20 μ L 甲醇活化过滤管，准备上样；（2）、吸取血清样品 20 μ L 上样；（3）、吸取甲醇 60 μ L；（4）、设置转速为 2200 rpm 震摇 90 s；（5）、使用 -50~-60 kPa 的负压抽滤过滤管 120 s；（6）接收管转移至液相自动进样器，进样 5 μ L 上机 LC-MS/MS 分析（见图 2）。

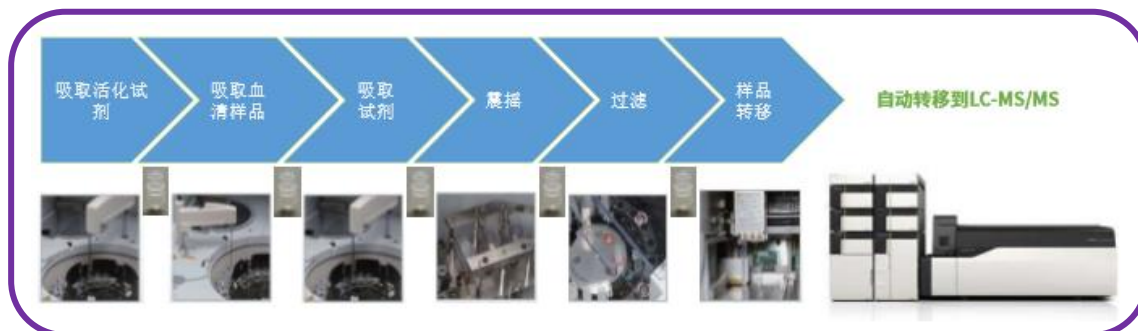


图 2 CLAM-2000 自动前处理流程

■ 结果与讨论

岛津 CLAM-2000 自动前处理程序一般包括吸取过滤管活化试剂、吸取样品、吸取蛋白沉淀剂、震摇和过滤等步骤。在 LC-MS/MS 进行分析的同时，样品自动前处理程序继续进行，并且 CLAM-2000 会根据前处理流程设置同时处理 2-3 个样品，即有的样品在进行样品吸取，有的样品在进行震摇，有的样品在进行抽滤等。这种交叉处理样本的操作使得每个样品的平均前处理时间明显缩短。

2.1 标准品色谱图

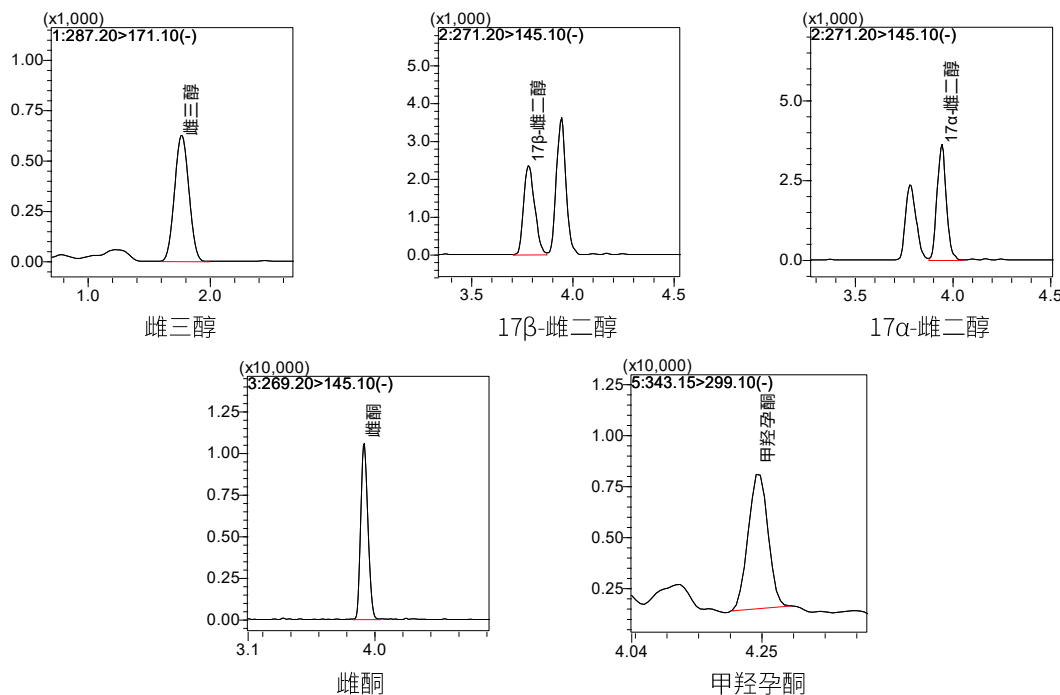


图 3 血清中 5 种雌激素的提取离子流图谱 (10 ng/mL)

2.2 线性范围和检出限

配制 0.5 ng/mL~ 100 ng/mL 的血清基质标准工作溶液，按照 1.2 中的分析条件和 1.3 的 CLAM-2000 自动前处理程序进行测定，使用外标法定量。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)
雌三醇	$Y = (526.786)X + (-105.382)$	1.0-100	0.9998	93.9~109.3	0.33
17 α -雌二醇	$Y = (1371.84)X + (-334.279)$	0.5-100	0.9995	95.3~106.7	0.17
17 β -雌二醇	$Y = (839.418)X + (-121.002)$	1.0-100	0.9998	89.3~106.8	0.33
雌酮	$Y = (4416.36)X + (-1412.76)$	0.5-100	0.9994	88.5~118.2	0.17
甲羟孕酮	$Y = (1674.57)X + (-317.683)$	1.0-100	0.9997	85.4~116.0	0.33

2.3. 质控样品检测结果

以 5 种雌激素浓度均为 10.0 ng/mL 和 20.0 ng/mL 两个浓度水平的人血清样品作为质控样品，按照 1.2 中的分析条件和 1.3 的 CLAM-2000 自动前处理程序上机测定。质控样品测试结果如表 4 所示，结果显示，测定结果与标示浓度值接近，均在 $\pm 15\%$ 允许偏差范围之内。

表 4 质控样品检测结果

化合物	标示浓度 (ng/mL)		参考区间 (ng/mL)		实测浓度 (ng/mL)	
	1	2	1	2	1	2
雌三醇	10.0	20.0	8.5~11.5	17.0~23.0	9.7	19.9
17 α -雌二醇	10.0	20.0	8.5~11.5	17.0~23.0	8.9	21.0
17 β -雌二醇	10.0	20.0	8.5~11.5	17.0~23.0	10.4	18.2
雌酮	10.0	20.0	8.5~11.5	17.0~23.0	8.7	20.2
甲羟孕酮	10.0	20.0	8.5~11.5	17.0~23.0	8.7	22.8

结论

本文使用岛津全自动在线前处理设备 CLAM-2000 和 LC-MS/MS 在线联用系统，建立了人血清中 5 种雌激素的定量分析方法。17 α -雌二醇和雌酮的线性范围在 0.5~100 ng/mL 之间，其余各雌激素的线性范围在 1.0~100 ng/mL 之间，标准曲线相关系数良好，各雌激素检出限在 0.17 ng/mL~0.33 ng/mL。质控样品中雌激素的测定值均在标示值允许偏差范围之内。该系统只需放置样品管，可自动完成对血清样品的前处理，自动输送至 LC-MS/MS 进行分析，实现前处理与上机分析的无缝集成。CLAM-2000 系统能够最大限度地减少人为误差和样品前处理的差异，减少分析人员接触生物样本机会，降低生物感染的风险。