

SCIEX液相色谱串联质谱法测定血清中20种类固醇激素

Determination of 20 Steroid Hormones in Human Serum Samples by SCIEX Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

张元媛¹, 丛宇婷¹, 张建柱², 张海明², 李国庆¹
Zhang Yuanyuan¹, Cong Yuting¹, Zhang Haiming², Zhang Jianzhu², Li Guoqing¹

¹ 上海爱博才思分析仪器贸易有限公司

² 天津博纳艾杰尔科技有限公司

Key Words: Steroid hormones, LC-MS/MS, determination, solid-phase extraction

前言

类固醇激素是一类脂溶性小分子激素，是由胆固醇经一系列酶催化而来，可分为肾上腺皮质激素和性激素两类，在维持机体正常内分泌，调节性功能、机体发展、免疫调节及生育控制方面有明确的作用。人体内类固醇激素的升高或者降低与一些临床疾病，如，先天肾上腺增生、多囊卵巢综合症、内分泌紊乱、肾上腺皮质功能及（3,17和21）羟化酶缺乏症等息息相关。各个类固醇激素作为代谢网络中的节点相互影响，如能详尽表征代谢网络上下游中各激素的含量变化情况，对临床疾病的确诊、机体内分泌状态的监控等具有种重要意义。

临床传统方法采用放射免疫或ELISA试剂盒方法进行激素检测，可能存在抗原抗体假阳性干扰，低浓度水平激素测定不准确等问题。且临床对于不同激素检测方式不同，多激素全面检测所需血液量较大，增加患者负担。液质联用法具有特异性强，检测灵敏度高，适合高通量测定等优点，因此，建立一种基于液质法的同时准确测定多种类固醇激素的分析方法，对于临床相关疾病的诊断具有重要的指导意义。

本方法基于SCIEX液相色谱串联质谱系统，采用同位素内标校正法，建立了一次分析，同时准确检测血清中20种类固醇激素的定量方法。20种类固醇激素相关信息如下。

中文名	英文名	CAS编号	分子式
17 α -羟孕酮	17 α -Hydroxyprogesterone	604-09-1	C ₂₁ H ₃₀ O ₃
皮质酮	Corticosterone	50-22-6	C ₂₁ H ₃₀ O ₄
双氢睾酮	Stanolone, DHT	521-18-6	C ₁₉ H ₃₀ O ₂
孕烯醇酮	Pregnenolone	145-13-1	C ₂₁ H ₃₂ O ₂
孕酮	Progesterone	57-83-0	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
11-脱氧皮质醇	11-Doxycortisol	152-58-9	C ₂₁ H ₃₀ O ₄
21-脱氧皮质醇	21-Doxycortisol	641-77-0	C ₂₁ H ₃₀ O ₄
21-羟基孕酮	21-Hydroxyprogesterone	64-85-7	C ₂₁ H ₃₀ O ₃
雄烯二酮	Androstenedione	63-05-8	C ₁₉ H ₂₆ O ₂
可的松	Cortisone	53-06-5	C ₂₁ H ₂₈ O ₅
褪黑素	Melatonin	73-31-4	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₂
睾酮	Testosterone	58-22-0	C ₁₉ H ₂₈ O ₂
氢化可的松	Cortisol	50-23-7	C ₂₁ H ₃₀ O ₅
脱氢表雄酮	DHEA	53-43-0	C ₁₉ H ₂₈ O ₂
醛固酮	Aldosterone	52-39-1	C ₂₁ H ₂₈ O ₅
雌三醇	Estriol	50-27-1	C ₁₈ H ₂₄ O ₃
雌酮	Estrone	53-16-7	C ₁₈ H ₂₂ O ₂
17-羟基孕烯醇酮	17 α -hydroxypregnenolone	387-79-1	C ₂₁ H ₃₂ O ₃
硫酸脱氢表雄酮	DHEAS	651-48-9	C ₁₉ H ₂₈ O ₅ S
雌二醇	Estradiol	50-28-2	C ₁₈ H ₂₄ O ₂

实验部分

样品前处理

本实验采用沉淀蛋白结合SPE固相萃取法对血清中20种激素进行处理，具体步骤如下。

提取：准确量取200 μ L样品于1.5 mL塑料离心管中，加入20 μ L同位素内标混合工作液，200 μ L甲醇，涡旋1 min，加入200 μ L水，涡旋1 min，10000 rpm离心5 min，取上层溶液待用。

净化：取SPE柱（Cleanert PEP 96 Well Microplates；2 mg），依次用200 μ L甲醇活化，200 μ L水平衡。取提取后上清液350 μ L，加载至SPE柱，弃去滤液；依次用200 μ L 10 %乙腈水溶液和200 μ L正己烷进行淋洗，弃去淋洗液；加入30 μ L洗脱溶剂进行洗脱，收集洗脱液，用10 %乙腈水溶液稀释至200 μ L，混匀待测。

色谱条件

色谱柱：Kinetex® C18（2.6 μ m，3.0 $\times$ 100 mm）；

流动相：A为0.5 mM氟化铵水溶液

B为甲醇，洗脱流程如表1；

流速：0.6 mL/min；

柱温：40 $^{\circ}$ C；

进样体积：20 μ L。

表1. 洗脱梯度。

时间（min）	A(%)	B(%)
0	50	50
4	40	60
6.5	25	75
7.2	10	90
10	10	90
10.2	50	50
12	50	50

质谱条件

电离方式：电喷雾离子源，正负离子同时采集；

检测方式：分时间窗口 (schedule)，多反应监测 (MRM)；

离子源温度 (TEM): 600 $^{\circ}$ C；

雾化气 (Gas1): 60 psi；

辅助气 (Gas2): 60 psi；

气帘气 (Gurtain Gas): 35 psi；

电喷雾电压：5500V (+) / -4500V (-)；

对应MRM通道及参数见表2，表3。

表2. 待测组分和内标物质的质谱参数（正离子模式）。

中文名	英文名	Q1	Q3	DP	CE
17 α -羟孕酮	17 α -Hydroxyprogesterone	331.4	109.2*	100	40
		331.4	97.1	100	35
皮质酮	Corticosterone	347.2	91.3	80	80
		347.2	121.2*	80	33
双氢睾酮	Stanolone；DHT	291.3	159.1	110	32
		291.3	255.2*	110	24
孕烯醇酮	Pregnenolone	299	159.3*	140	34
		299	133.1	140	35
孕酮	Progesterone	315.2	97.1*	160	27
		315.2	109.2	160	15
11-脱氧皮质醇	11-Doxycortisol	347.2	97.1*	100	33
		347.2	109.1	100	45
		347.2	311.1	100	25
21-脱氧皮质醇	21-Doxycortisol	347.2	311.2*	70	25
		347.2	121.1	70	40
		347.2	269.2	70	28
21-羟基孕酮	21-Hydroxyprogesterone	331.2	97.1*	100	30
		331.2	109.1	100	33
雄烯二酮	Androstenedione	287.1	97.1*	80	30
		287.1	109.1	80	30
可的松	Cortisone	361.2	163.1*	140	15
		361.2	121.2	140	40
褪黑素	Melatonin	233.1	174.1*	80	20
		233.1	159.1	80	40
睾酮	Testosterone	289.2	97.3*	100	31
		289.2	109.3	100	36
皮质醇； 氢化可的松	Cortisol	363.1	121	280	15
		363.1	115.1*	200	80
脱氢表雄酮	DHEA	271.2	253.3*	60	18
		271.2	196.9	60	25
	IS-17 α -Hydroxyprogesterone	334.3	112.2	100	40
	IS- Corticosterone	351.3	121	120	35
	IS-DHT	294.3	258	100	24
	IS-Pregnenolone	303.3	163.2	140	47
	IS-Progesterone	324	100	160	30
	IS-11-Doxycortisol	352.2	100	100	35
	IS-21-Doxycortisol	355.3	319.3	70	30
	IS-21-Hydroxyprogesterone	338	100	100	30
	IS-Androstenedione	290	100	80	30
	IS-Cortisone	369	169	100	40
	IS- Melatonin	237	178	80	20
	IS-Testosterone	292	100	100	30
	IS- Cortisol	367	121	140	40
	IS- DHEA	277.2	259.3	140	22

* 定量离子

表3. 待测组分和内标物质的质谱参数（负离子模式）。

中文名	英文名	Q1	Q3	DP/V	CE/V
醛固酮	Aldosterone	359.1	189.1*	-100	-24
		359.1	331.3	-100	-24
		359.1	297.3	-100	-20
雌三醇	Estriol	287.2	171*	-160	-51
		287.2	145.2	-160	-54
雌酮	Estrone	269.1	145.2*	-150	-50
		269.1	159.1	-150	-50
17-羟基孕烯醇酮	17 α -hydroxypregnenolone	331.1	287.3	-70	-30
		331.1	303.3*	-70	-30
		331.1	313.2	-70	-30
硫酸脱氢表雄酮	DHEAS	367.1	97	-280	-30
		367.1	80*	-280	-80
雌二醇	Estradiol	271.2	183.1	-120	-50
		271.2	145*	-120	-50
	IS- Aldosterone	363.2	301.2	-120	-22
	IS- Estriol	290.2	173	-160	-54
	IS-Estrone	273	147	-150	-50
	IS-17-hydroxypregnenolone	335.1	316.4	-80	-27
	IS-DHEAS	373	98	-50	-50
	IS-Estradiol	274	145	-180	-55

* 定量离子

结果与讨论

各化合物在各自出峰位置峰形对称，响应良好。在20种激素中，17 α 羟基孕酮和21羟基孕酮；11-脱氧皮质醇，21-脱氧皮质醇和皮质酮为两组同分异构体，在本方法条件下，同分异构体间可以实现基线分离。典型色谱图如图1。

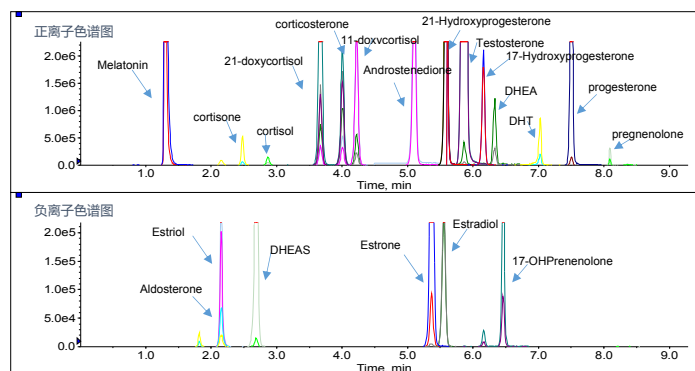


图1. 20种激素典型色谱图。

标准曲线

以PBS为替代基质，制作标准工作曲线。各待测物典型标准曲线结果如下表。

表4. 20种激素典型标准曲线。

中文名	英文名	线性方程	相关系数	标曲范围*
17 α -羟基孕酮	17 α -Hydroxyprogesterone	$Y=1.65094x+0.01073$	0.9979	0.05 - 50
皮质酮	Corticosterone	$Y=1.23450x+0.01042$	0.9991	0.1 - 50
双氢睾酮	Stanalone; DHT	$Y=1.68540x+0.00372$	0.9976	0.01 - 20
孕烯醇酮	Pregnenolone	$Y=0.47991x+0.00383$	0.9971	0.05 - 20
孕酮	Progesterone	$Y=0.09829x+0.00444$	0.9974	0.5 - 100
11-脱氧皮质醇	11-Doxycortisol	$Y=1.69897x+0.00158$	0.9981	0.01 - 20
21-脱氧皮质醇	21-Doxycortisol	$Y=4.67089x+0.00262$	0.9967	0.01 - 10
21-羟基孕酮	21-Hydroxyprogesterone	$Y=2.44405x+0.00441$	0.9984	0.01 - 10
雄烯二酮	Androstenedione	$Y=1.39500x+0.00776$	0.9967	0.05 - 20
可的松	Cortisone	$Y=0.04064x+0.00142$	0.9993	0.5 - 100
褪黑素	Melatonin	$Y=0.97131x+4.73878e-4$	0.9991	0.01 - 10
睾酮	Testosterone	$Y=0.99457x+0.01098$	0.9997	0.1 - 20
皮质醇；氢化可的松	Cortisol	$Y=0.04354x+0.00365$	0.9988	1 - 500
脱氢表雄酮	DHEA	$Y=0.78036x+0.00384$	0.9982	0.1 - 50
醛固酮	Aldosterone	$Y=0.11711x+0.00207$	0.9994	0.05 - 20
雌三醇	Estriol	$Y=1.74570x+0.00495$	0.9988	0.05 - 20
雌酮	Estrone	$Y=1.40195x+0.00163$	0.9995	0.05 - 20
17 α -羟基孕烯醇酮	17 α -hydroxypregnenolone	$Y=4.33931x+0.08583$	0.9974	0.1 - 20
硫酸脱氢表雄酮	DHEAS	$Y=0.01471x+0.00690$	0.9992	1 - 1000
雌二醇	Estradiol	$Y=1.96585x+0.01268$	0.9989	0.05 - 50

*根据各激素在实际样本中参考范围，不同激素选择不同浓度范围建立标准曲线

加标回收率

取混合人血清样本，分为4组，向其中三组加入不同浓度的20种激素混合标准溶液，制备低、中、高三组血清加标样本，以随行标曲测定4组血清样本中各激素浓度（各组内3样本分析）。计算加标回收率。各激素在各自加标水平下加标回收率结果如图2所示。结果表明，各待测物的加标回收率在86.6%-111.3%之间，符合相关要求。

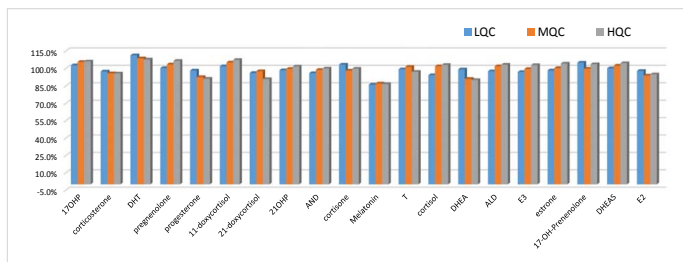


图2. 20种激素低、中、高浓度水平加标回收率。

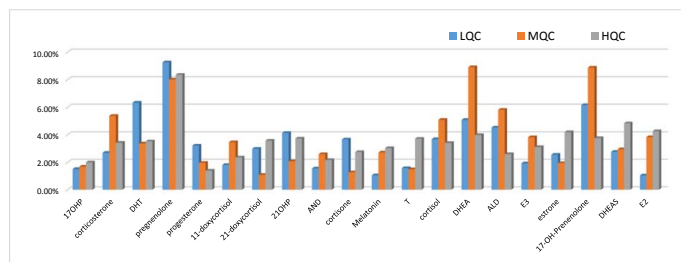


图3. 20种激素低、中、高浓度水平日内精密密度。

精密密度

取混合人血清样本，制备低、中、高三组血清加标样本（QC）。各浓度水平5样本分析，连续测定5天。根据当日的标准曲线，计算QC样本浓度。根据QC的RSD%对方法的日内与日间精密密度进行考察。结果如图3和图4所示。20种激素的日内和日间精密密度分别为1.0-9.2%和14.0%和2.1-11.9%，符合相关相关要求。

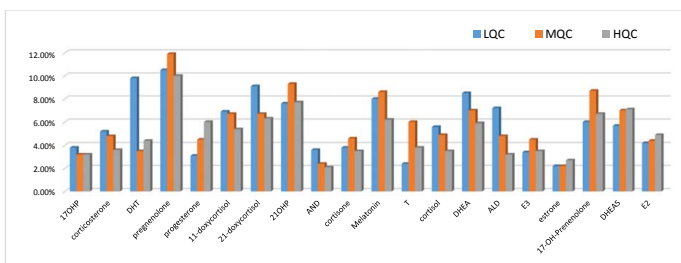


图4. 20种激素低、中、高浓度水平日间精密密度。

总结

本实验在SCIEX液质连用平台上，搭建了一针进样，正负离子同时采集的Scheduled MRM™方法，实现20种激素的同步检测。实验采用SPE法进行样本前处理，同位素内标校准，对血清中20种激素进行定量。方法线性良好，加标回收，精密密度满足相关要求。可用于临床实际样本的检测。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。

获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。

本文提及的商标和/或注册商标的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在英国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。AB SCIEX™ 商标经许可使用。

© 2019 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-10571-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司
地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808 1388
传真：010-5808 1390

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及中国区应用支持中心
地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419 7200
传真：021-2419 7333

网址：sciex.com.cn

广州分公司
地址：广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510 0200
传真：020-3876 0835

官方微信：ABSciex-China