

快速蛋白沉淀法结合LC-MS/MS法测定血清中18种内源性类固醇激素

Determination of 18 Steroid Hormones in Human Serum Using Rapid Protein Precipitation Method in Couple With Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

刘丹, 胡凤梅, 黄超, 赵祥龙

Liu Dan, Hu Fengmei, Huang Chao, Zhao xianglong

SCIEX应用支持中心, 中国

SCIEX, China

前言

类固醇激素, 又称甾体激素, 在维持机体正常内分泌、调节性功能、免疫调节及生育控制方面有重要作用。类固醇激素是一大类激素, 可以按照分泌的不同部位分为糖皮质激素、盐皮质激素和性腺激素等; 糖皮质激素如皮质醇、可的松等与人体的压力系统、抗炎抗过敏等作用有关; 盐皮质激素如醛固酮等可调节机体水盐代谢等; 性激素如睾酮, 雌酮等可以促进性器官的发育, 维持第二性征等。人体某些临床疾病会与类固醇激素的升高或者降低相关, 如: 先天性肾上腺皮质增生、多囊卵巢综合症、库欣综合征等, 各类固醇激素在代谢通路中也会相互影响。因此, 同时测定多种类固醇激素能更好地掌握代谢上下游各激素的变化情况, 对临床疾病的确认、机体内分泌状态的监控等具有重要意义。

测定人血清样本中类固醇激素的方法有很多, 由于基质复杂, 且体内激素水平大多较低, 传统的生化免疫法检测可能会存在假阳性以及测不准的问题。液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)特异性强, 检测灵敏度高, 用于测定人血清样本中多种类固醇激素有很明显的优势。使用LC-MS/MS方法对血清样本中多种类固醇激素进行检测方法也有很多, 但前处理方法以液液萃取(LLE)及固相萃取(SPE)为主, 前处理过程复杂耗时, 样本处理通量低, 且耗材及前处理设备昂贵。本方法基于SCIEX液相色谱串联质谱系统, 采用快速蛋白沉淀的前处理方法, 建立了一次分析, 同时准确检测血清18种类固醇激素快速分析方法。

方案优势

本方案使用蛋白沉淀前处理方法进行样品净化处理, 通过SCIEX Triple Quad™ 6500+ LC-MS/MS优化质谱检测参数, 对多种激素进行定量分析, 定量下限为pg/mL级别, 优势如下:

- 样本用量少, 只需50 ul样品即可满足分析需求;
- 前处理蛋白沉淀法简单快速, 减少样本前处理耗时;
- 不需要购买SPE耗材及设备, 节约成本;
- 正负离子切换, Scheduled MRM™ 检测模式, 多种类固醇激素同时测定;
- 方法检测灵敏度高, 重现性好, 能满足临床分析需求。

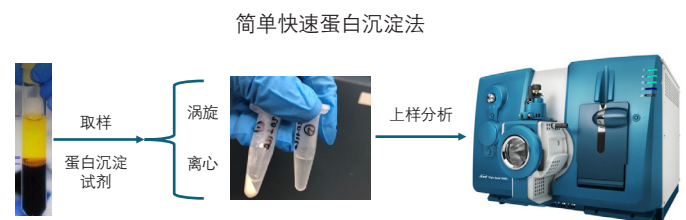


图 1. 快速蛋白沉淀法前处理过程

1 实验部分

1.1 前处理方法

向1.5 mL离心管里加入50 μ L 血清样品，并依次加入蛋白沉淀剂及混合内标，涡旋混匀，离心后取上清液稀释混合均匀，进行LC-MS/MS分析。

1.2 色谱条件

色谱柱为Kinetex C18。流动相采用氟化铵水溶液和甲醇，柱温设定为40 $^{\circ}$ C。洗脱梯度表见表1。

表1. 洗脱梯度

时间 (min)	A(%)	B(%)
0	50	50
4	40	60
6.5	25	75
7.8	10	90
10	10	90
10.1	50	50
12	50	50

1.3 质谱条件

采用电喷雾离子源 (Electrospray Ionization, ESI) 进行正负离子同时采集，并且设置分时间窗口 (scheduled) 的多反应监测 (Multiple Reaction Monitoring, MRM) 模式进行质谱扫描。离子源参数：加热气 (GS1) 和辅助加热气 (GS2) 分别为60 psi和60 psi，脱溶剂气温度为 600 $^{\circ}$ C；气帘气 (Curtain Gas, CUR) 为 35 psi，碰撞气 (Collision Gas, CAD) 为9；喷雾针 (Ionspray, IS) 电压为5500V (+) / -4500V (-)。为了获取较好的稳定性和灵敏度，各化合物

监测离子对的去簇电压 (Declustering Potential, DP) 和碰撞电压 (Collision Energy, CE)，目标物定量离子对、定性离子对以及内标物监测离子对等参数均经过系统优化，离子对信息见表2。

表2. 待测组分和内标物质的质谱参数

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	Dihydrotestosterone; DHT	291.3	159.1	110	32
		291.3	255.2*	110	24

表2. 待测组分和内标物质的质谱参数 (续)

中文名	英文名	Q1	Q3	DP	CE
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
睾酮	Testosterone	289.2	97.3*	100	31
		289.2	109.3	100	36
皮质醇	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
醛固酮	Aldosterone	361.3	343.1	120	24
		361.3	315.2*	120	28
		IS-17 α -Hydroxyprogesterone	334.3	112.2	100
	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-Testosterone	292	100	100	30
	IS- Cortisol	367	121	140	40
	IS- DHEA	277.2	259.3	140	22
	IS- Aldosterone	368.2	350.2	100	25
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
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- Estriol	290.2	173	-160
	IS-Estrone	273	147	-150	-50
	IS-DHEAS	373	98	-50	-50
	IS-Estradiol	274	145	-180	-55

2 结果与讨论

2.1 回归方程及线性

在本实验条件下，以PBS为替代基质，结和各激素的生理浓度范围制作标准工作曲线。各待测物标准曲线及线性范围结果如下表3，各化合物在其线性范围内线性良好，r 值大于0.995。

表3. 18种激素标准曲线及线性范围

中文名	英文名	线性范围	线性方程	相关系数
17 α -羟孕酮	17 α -Hydroxyprogesterone	0.05 - 50	Y=0.22269x+0.00533	0.9951
皮质酮	Corticosterone	0.1-100	Y=0.04669x+0.00644	0.9955
双氢睾酮	Dihydrotestosterone;DHT	0.02-20	Y=0.09402x+0.00029	0.998
孕烯醇酮	Pregnenolone	0.02-20	Y=0.04924x+0.00106	0.9987
孕酮	Progesterone	0.05-100	Y=0.87480x+0.02038	0.9975
11-脱氧皮质醇	11-Doxycortisol	0.01-20	Y=0.64005x+0.00247	0.9974
21-脱氧皮质醇	21-Doxycortisol	0.02-20	Y=3.81310x+0.02050	0.9973
21-羟基孕酮	21-Hydroxyprogesterone	0.02-20	Y=1.52072x+0.01628	0.9969
雄烯二酮	Androstenedione	0.01-20	Y=1.71114x+0.00899	0.9968
可的松	Cortisone	0.05-100	Y=3.33320x+0.12860	0.9981
睾酮	Testosterone	0.01-20	Y=1.51109x+0.00509	0.9967
皮质醇	Cortisol	0.05-100	Y=0.44718x+0.01197	0.9971
脱氢表雄酮	DHEA	0.25-100	Y=1.51278x-0.23593	0.9954
醛固酮	Aldosterone	0.01-20	Y=0.40852x-0.00197	0.9971
雌三醇	Estriol	0.02-20	Y=0.75346x+0.00389	0.997
雌酮	Estrone	0.02-20	Y=0.22695x+0.00025	0.9985
硫酸脱氢表雄酮	DHEAS	2.5-1000	Y=0.19739x+0.18901	0.9974
雌二醇	Estradiol	0.05-100	Y=0.87181x+0.00495	0.9952

2.2 样本采集谱图

在本方法条件下，各化合物在各自出峰位置峰形对称，响应良好。其中的多对同分异构体，也可以实现基线分离（如图2），实际人血清样本中部分化合物的色谱图如图3，信噪比良好，峰形良好。

2.3 加标回收实验

取混合人血清样本，分为4组，向其中3组加入不同浓度的激素混合标准溶液，制备低、中、高三组血清加标样本，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。结果表明，各待测物在不同来源样本添加不同浓度水平溶液的加标回收率在86.8%~113.8%范围内，符合相关要求。（见表4）。

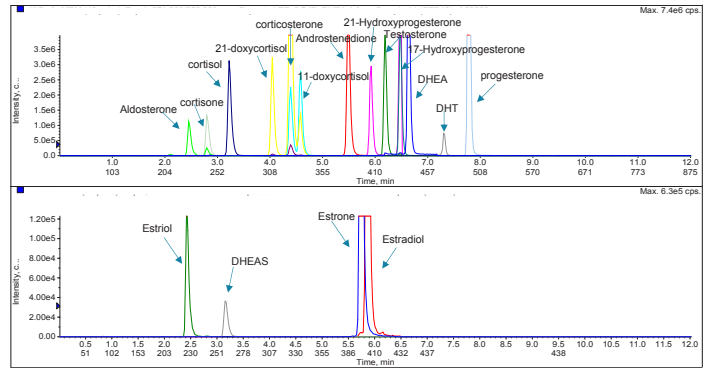


图2. 18种激素典型色谱图

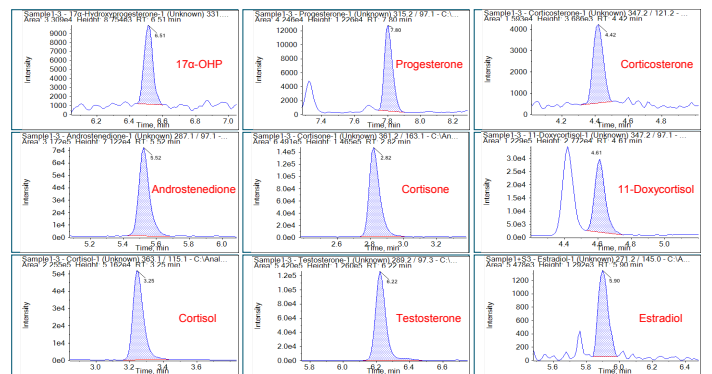


图3. 处理后人血清样品中分析物色谱图（部分）

表4. 18种激素各浓度加标回收率

Analyte	R-L	R-M	R-H
17 α -Hydroxyprogesterone	105.60%	102.70%	86.80%
Corticosterone	112.30%	96.90%	87.60%
Dihydrotestosterone	100.00%	104.70%	100.50%
Pregnenolone	100.00%	94.00%	105.00%
Progesterone	109.00%	95.80%	102.60%
11-Doxycortisol	106.30%	102.30%	100.40%
21-Doxycortisol	100.00%	104.50%	110.80%
21-Hydroxyprogesterone	94.70%	87.30%	86.80%
Androstenedione	104.10%	100.60%	98.30%
Cortisone	113.20%	88.50%	110.40%
Testosterone	100.60%	101.00%	97.70%
Cortisol	105.40%	105.80%	105.50%
DHEA	91.50%	106.80%	100.80%
Aldosterone	101.50%	94.10%	93.10%
Estriol	110.00%	90.00%	102.50%
Estrone	100.00%	103.40%	112.80%
DHEAS	113.80%	87.50%	107.70%
Estradiol	104.80%	90.50%	89.10%

总结

本方法是基于SCIEX液相色谱串联质谱系统开发，建立了可对18种激素进行准确性定量检测的液相色谱串联质谱方法，采用正负离子同时采集的Scheduled MRM™ 模式，采用简单快速的蛋白沉淀法进行样品前处理，方法稳定性好准确性高，满足相关临床要求。

仅限专业展会等使用、仅向专业人士提供的内部资料

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，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15295-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
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
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7201
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：[SCIEX-China](#)