

在临床研究中利用UPLC分离技术分析血清中的19种类固醇

Robert Wardle, Dominic Foley, Lisa J. Calton

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

本应用简报介绍了一种利用Xevo TQ-XS串联质谱仪成功开发的UPLC-MS/MS方法，这种方法能够定量19种低水平类固醇激素，同时分离同量异位的类固醇激素，大幅减少质谱检测受到的干扰。

优势

本研究成功开发出一种能够分析19种类固醇激素的方法，此法利用UPLC分离同量异位的类固醇激素，然后使用Xevo TQ-XS进行低水平定量，只需200 µL血清即可。

简介

类固醇激素在许多生化过程中起着核心作用，包括控制新陈代谢、炎症、免疫功能、盐水平衡、性征的发育以及抵抗疾病和伤害的能力。参与类固醇生物合成的某些酶类在这些代谢过程中非常关键，可以通过检测临床研究途

径中的类固醇激素，监测这些酶是否出现功能异常。

若使用免疫分析法测定这些类固醇激素，由于抗体分析会与结构相似的类固醇激素以及合成途径的衍生物发生交叉反应，因此分析极易受到干扰。而使用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)测定这些类固醇激素可以获得极高的灵敏度、准确度和精密度。



图1. Waters ACQUITY UPLC I-Class系统和Xevo TQ-XS质谱仪

结果与讨论

本文介绍了一种使用UPLC-MS/MS从血清中萃取并分析19种类固醇激素的临床研究方法。利用Waters ACQUITY UPLC BEH技术进行色谱分离，可以分离同量异位的类固醇激素，以便使用Xevo TQ-XS串联质谱仪在低水平上进行选择性定量。

样品前处理与分析

在使用乙酸乙酯/己烷溶液进行液/液萃取之前，向200 μ L标曲溶液、QC样品或样品中添加稳定标记的内标。

离心后，将上层有机溶剂转移至800 μ L圆孔收集板上蒸干。将样品重溶于100 μ L水/甲醇/氟化铵溶液中。

使用ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统、ACQUITY UPLC BEH C₈色谱柱（1.7 μ m, 2.1 x 50 mm，部件号：186002877）和ACQUITY UPLC BEH C₈ VanGuard保护柱（1.7 μ m, 2.1 x 5 mm，部件号：186003978）分离类固醇激素（包括同量异位物质），采用水、甲醇和氟化铵梯度，并在Waters Xevo TQ-XS质谱仪上进行分析

结果

按要求使用ACQUITY UPLC BEH C₈色谱柱技术分离所有同量异位的类固醇（如醛固酮、皮质醇和皮质醇，以及21-脱氧皮质醇、皮质酮和11-脱氧皮质醇）。图2所示为混合血清样品的示例色谱图，表明进样之间的运行时间<10 min。

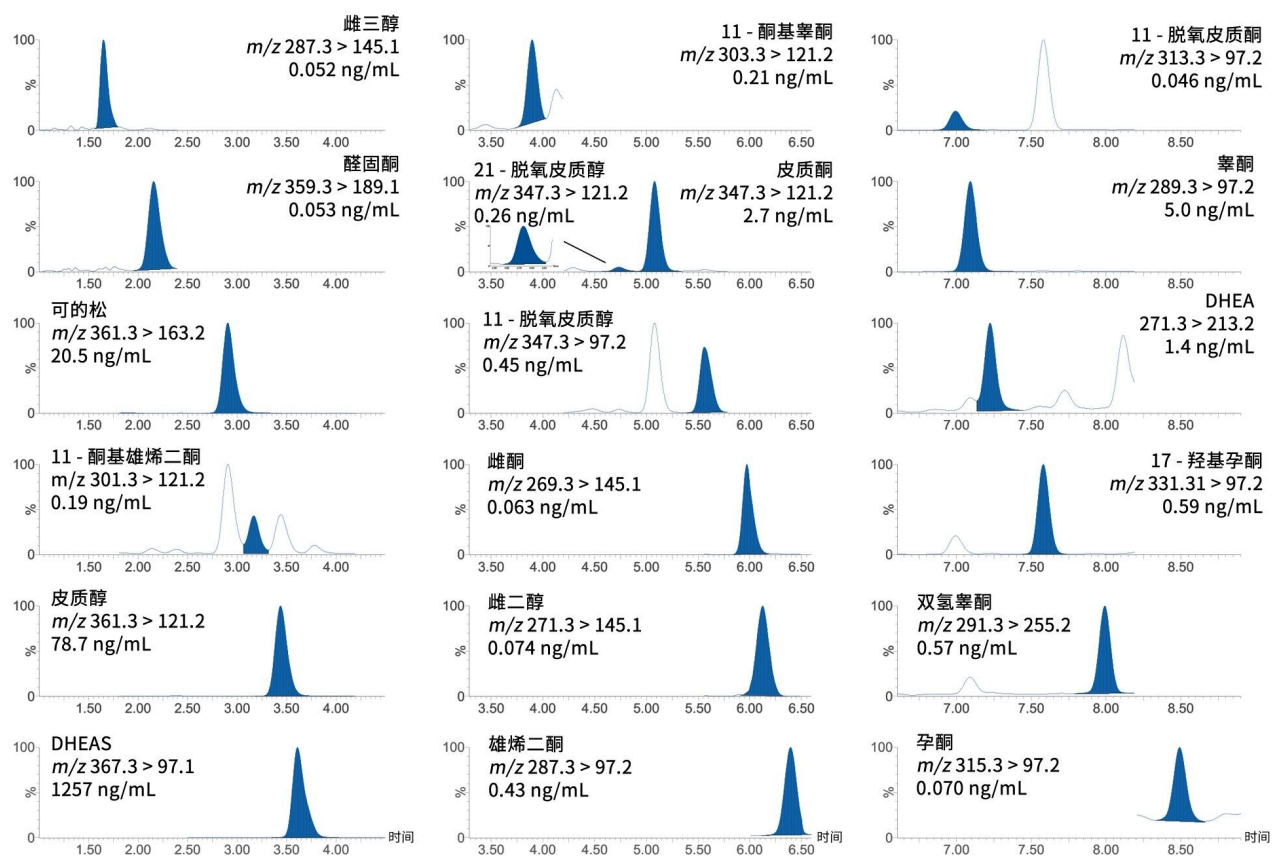


图2.补充了组中所有低浓度类固醇激素的提取混合血清样品的色谱图（色谱峰以蓝色突出显示）。色谱图例包括MRM通道和计算浓度。

五天内，表1所示浓度范围内所有类固醇激素校准曲线的相关系数(r^2)均>0.99。

类固醇激素	校准 (ng/mL)	精密度		分析灵敏度			提取回收率	
		范围 (ng/mL)	%CV	浓度 (ng/mL)	%CV	S:N (ptp)	范围 (ng/mL)	(%)
雌三醇	0.010–50.0	0.030–37.4	≤7.7	0.011	13.3	20.4	0.050–35.0	≥69.3
醛固酮	0.010–2.5	0.016–1.1	≤12.8	0.011	13.1	12.5	0.024–1.1	≥59.7
可的松	1.0–500	3.2–382	≤2.9	0.056	9.6	81.4	5.3–387	≥75.8
11 - 酮基雄烯二酮	0.050–10.0	0.036–28.7	≤18.4	0.017	14.2	8.2	0.063–30.1	≥74.2
皮质醇	0.10–100	0.32–79.5	≤2.6	0.027	6.4	13.9	0.52–79.6	≥63.1
DHEAS	10.0–10,000	33.4–7772	≤4.7	5.9	4.5	14.4	56.0–7154	≥0.3
11 - 酮基睾酮	0.010–10.0	0.031–43.2	≤6.4	0.011	12.8	8.7	0.047–40.5	≥71.8
21 - 脱氧皮质醇	0.050–50.0	0.16–35.4	≤10.7	0.031	6.3	11.2	0.27–37.0	≥75.4
皮质酮	0.10–100	0.33–77.6	≤6.1	0.021	13.9	11.0	0.52–78.3	≥73.4
11 - 脱氧皮质醇	0.050–50.0	0.16–36.4	≤4.9	0.014	7.4	59.0	0.027–37.1	≥70.7
雌酮	0.010–2.5	0.016–1.1	≤10.7	0.010	13.1	12.9	0.026–1.1	≥66.4
雌二醇	0.010–2.5	0.016–1.3	≤11.1	0.011	17.5	13.6	0.025–1.3	≥67.0
雄烯二酮	0.010–50.0	0.030–36.4	≤6.6	0.007	8.4	13.3	0.059–37.7	≥67.6
11 - 脱氧皮质酮	0.005–2.5	0.016–1.2	≤2.8	0.003	8.8	15.2	0.028–1.2	≥76.1
睾酮	0.010–50.0	0.030–35.2	≤8.6	0.010	9.7	12.4	0.051–35.6	≥65.7
DHEA	0.10–50.0	0.12–37.4	≤15.2	0.010	8.7	14.1	0.56–36.3	≥70.4
17 - 羟基孕酮	0.010–50.0	0.030–34.2	≤8.1	0.011	13.8	16.9	0.054–33.7	≥68.9
5α - 二氢睾酮	0.010–2.5	0.71–1.1	≤9.6	0.012	8.0	11.1	0.11–1.1	≥71.1
孕酮	0.2–50.0	0.030–34.6	≤8.1	0.010	13.4	13.5	0.10–38.9	≥67.3

表1.血清中19种类固醇激素的性能测试数据。

连续五天萃取低、中、高浓度的经处理血清样品（每个浓度制备五个强化的重复样，n=25）并进行定量分析，评估方法的总精密度和重复性。还以低浓度补充了血清混合样品，并在五天内对五个重复样品进行定量分析(n=25)。所有结果如表1所示。

分三天在经处理血清样品中加标低、中、高浓度的分析物并进行样品萃取（每个浓度制备10个重复样，n=30），根据分析结果评估分析灵敏度。在表1中列出的浓度下，精密度<20 %CV。

在萃取前后，使用中、高浓度加标且经过处理的血清样品来评估萃取回收率，并对结果进行比较。

结论

本研究成功开发出一种选择性UPLC-MS/MS临床研究方法用于分析19种血清类固醇激素。利用Waters ACQUITY UPLC BEH技术进行色谱分离，可以在10分钟内分离组中所有同量异位的类固醇激素，然后使用Xevo TQ-XS串联质谱仪在低水平上进行选择性定量，只需200 μ L血清即可。

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134889751>>

720006872ZH, 2020年5月

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号