

在临床研究中使用Xevo TQ Absolute分析血清中的游离睾酮

Stephen Balloch, Lisa J. Calton, Gareth Hammond

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

本文介绍了一种分析血清中游离睾酮的临床研究方法，该方法使用平衡透析和Xevo™ TQ Absolute质谱仪，提供了出色的分析灵敏度。

该临床研究方法使用少量血清，并在平衡透析后进行液-液萃取。采用ACQUITY™ UPLC™ I-Class PLUS FL系统和ACQUITY BEH™ C₁₈色谱柱分离睾酮，并在Xevo TQ Absolute质谱仪上使用多重反应监测(MRM)模式进行检测。所开发的方法只需使用200 µL血清，在1~500 pg/mL范围内表现出良好的分析灵敏度和选择性，整个范围内的精密度CV≤8.4%。

优势

- 仅用200 µL血清即可分析出游离睾酮(0.5 pg/mL)，具有出色的分析灵敏度
- 平衡透析时间短，只需两小时
- 制得的样品体积足够大，可在需要时重新分析

简介

过去，在临床研究中分析游离睾酮一直颇具挑战，主要是因为游离睾酮占睾酮总量的比例不到3%，给分析灵敏度带来了挑战，另外还因为平衡透析是一个复杂而耗时的过程。

不过，通过使用Xevo TQ Absolute和Thermo Scientific™的快速平衡透析(RED)插管和板，采用快速且受控的培养模式，这些挑战得以克服。本研究开发出一种具有高灵敏度、精密度和准确度的游离睾酮分析研究方法。

通过平衡透析程序将血清中的游离睾酮与结合睾酮分离，然后使用液-液萃取法将游离睾酮浓缩并净化到不同溶剂中。将最终提取物进样至ACQUITY UPLC I-Class PLUS FL系统，采用ACQUITY BEH C₁₈色谱柱分离游离睾酮，并使用Xevo TQ Absolute质谱仪进行检测（图1）。



图1. Waters™ Xevo TQ Absolute质谱仪

实验

样品描述

使用1.0 mg/mL睾酮有证标准物质(CRM) (Merck, 英国) 溶液和52.75 mM HEPES缓冲液 (由1 M储备液稀释制成, pH调节至7.4) 制备一系列校准品, 浓度范围为1~500 pg/mL。

内部质控样品(QC)使用MSG4000处理血清 (Golden West Biologicals, 美国)、未处理血清和个体男性血清样品 (BioIVT, 英国) 制备, 浓度约为2.79、8.80和134 pg/mL。

使用100 µg/mL睾酮-¹³C₃有证标准物质(CRM) (Merck, 英国) 溶液制备工作内标。

平衡透析

将RED装置的插管 (Thermo Scientific, 英国) 放入RED装置的可重复使用底板 (Thermo Scientific, 英国) 中。向基质腔室中加入200 µL血清, 并向缓冲液腔室中加入400 µL 52.75 mM HEPES缓冲液 (pH调节至7.40 ± 0.03)。用密封胶带 (Thermo Scientific, 英国) 密封板, 放入经过温度校准的37 °C定轨摇床中, 以800 rpm混合2 h。

液-液萃取

取出RED装置的插管, 使含有游离激素的透析液留在RED装置的可重复使用底板中。将300 µL透析液转移至2 mL微量离心管中, 然后加入30 µL 1000 pg/mL睾酮-¹³C₃的甲醇溶液。混合30秒 (使用多管涡旋混合器, 转速2500 rpm) 后, 加入1.5 mL甲基叔丁基醚, 盖上管盖, 振摇 (2500 rpm, 5 min), 然后以16,100 g的离心力离心2 min。取1.3 mL上清液转移至干净的沃特世2 mL 96孔样品收集板 (P/N: 186002482 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/vials-containers--collection-plates/186002482-96-well-sample-collection-plate-2-ml-square-well-50-pk.html>>) 中, 然后在40 °C下氮气吹干。最后加入70 µL 50/50 v/v流动相A:流动相B, 用沃特世方孔盖垫 (P/N: 186002484 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/vials-containers--collection-plates/186002484-polypropylene-cap-mat-square-well-for-96-well-plate.html>>) 密封板, 以2500 rpm振摇30 s, 随后用于分析。

液相色谱条件

色谱柱：	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 色谱柱, 130 Å, 2.1 mm x 100 mm, 1.7 µm (P/N: 186002352)
柱温：	50 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	25 µL
进样模式：	不充满定量环
针大小：	20 µL
样品注射器：	250 µL
样品定量环：	50 µL
流速：	参见梯度表
流动相A：	0.2 mM氟化铵水溶液
流动相B：	0.2 mM氟化铵的甲醇溶液
弱清洗液：	5% (v/v) 甲醇的水溶液
强清洗液：	25/25/25/25 (v/v/v/v)乙腈/甲醇/ IPA/水
运行时间：	4.5 min

质谱条件

质谱系统：Xevo TQ Absolute质谱仪

电离模式：ESI+

毛细管电压：1.2kV

脱溶剂气温度：650 °C

离子源温度：150 °C

脱溶剂气流速：1000 L/h

锥孔气流速：150 L/h

MS1分辨率：单位(0.7 Da)

MS2分辨率：单位(0.7 Da)

方法事件

时间	事件	操作
0.00	液流停止	开
0.00	溶剂延迟	开始
1.99	溶剂延迟	结束
2.00	液流状态	LC
3.99	液流状态	废液
4.00	溶剂延迟	开始

数据管理

质谱软件：MassLynx™ v4.2软件(SCN 1042)

信息学软件：TargetLynx™ XS v4.2应用软件

结果与讨论

使用ACQUITY UPLC BEH C₁₈, 130 Å, 2.1 mm x 100 mm, 1.7 µm色谱柱，实现了游离睾酮及其内标在背景噪音相对较低区域内的色谱保留。进样间的运行时间为5.3 min，相当于每小时分析11个样品。使用含25 pg/mL睾酮的50/50 v/v流动相A/流动相B溶液进行系统适应性测试，评估系统的分析灵敏度，并在分析之前确认色谱基线噪音较低。

在所有分析运行中，本临床研究方法均在0.5~650 ng/mL的范围内呈线性， $r^2 \geq 0.995$ 。未在空白样品中观察到来自500 pg/mL样品的明显残留。最终提取物可在样品管理器中于10 °C下稳定24 h。

将低浓度睾酮（0.20、0.25、0.30、0.40、0.50、0.75和1.00 pg/mL，溶于52.75 mM HEPES，pH调节至7.4）在五个分析批中重复进样十次(n=50)，进行分析灵敏度研究。研究结果表明，该方法的定量检测下限(LLMI)，即精密度≤20%且偏差≤15%时的浓度为0.5 pg/mL。结果见表1。

睾酮浓度 (pg/mL)	精密度 (% CV)	偏差 (%)
0.20	55.5	30.0
0.25	45.2	28.0
0.30	35.6	26.7
0.40	21.8	10.0
0.50	17.6	0.0
0.75	14.1	-1.3
1.00	11.1	1.0

表1.LLMI总结

图2显示了空白52.75 mM HEPES缓冲液提取物、0.50 pg/mL提取物（代表LLMI）、1.00 pg/mL提取物（校准品1浓度）和5.00 pg/mL提取物的代表性色谱图，展示了

该临床研究方法所达到的分析灵敏度。

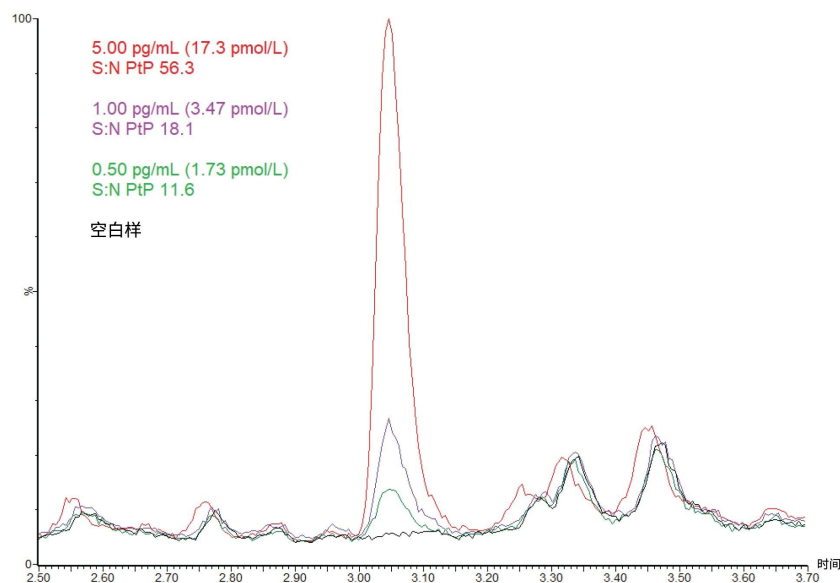


图2.pH 7.4 52.75 mM HEPES缓冲液空白（黑色）、0.50 pg/mL LLM1提取物（绿色）、1.00 pg/mL校准品1提取物（紫色）和5.00 pg/mL提取物（红色）的代表性叠加色谱图，图中显示了使用峰到峰方法计算的信噪比(S:N PtP)。

通过三次重复萃取MSG4000处理血清，并在样品中加入低浓度和高浓度睾酮，利用加标后的样品定量评估基质效应。使用52.75 mM HEPES缓冲液（pH调节至7.4）以相同方式制备对照品。基于峰面积计算的基质效应在96%~102%范围内，RSD≤2.4%，表明既没有离子增强也没有抑制作用。

使用一系列高浓度内源性化合物（白蛋白、胆红素、胆固醇、肌酐、甘油三酯和尿酸）进行干扰测试。在一个游离睾酮浓度约为25 pg/mL的混合血清样品中，对供试品和对照品分别进行了三次重复分析。未观察到明显干扰，回收率在87.3%~114.5%范围内。结果汇总见表2。

测试项	补充浓度 (mg/mL)	回收率 (%)
白蛋白	52	114.5
胆红素	0.15	99.2
胆固醇	2.2	87.3
肌酐	0.02	103.9
甘油三酯	2.5	89.9
尿酸	0.07	108.4

表2.干扰测试总结

使用五个分析批，每种浓度重复测定五次(n=25)，评估该方法在低、中、高（2.79、8.80、134 pg/mL）血清游离睾酮QC浓度下的总精密度和重复性。总重现性和重复性为RSD≤8.4%。图3展示了这些精密度实验的结果。

为评估方法性能，本研究分析了购自英国NEQAS的45份男性血清样品，浓度范围为50.1~268.6 pg/mL，并将分析结果与所有实验室截尾均值(ALTm)进行了比较。同时对数据集应用Passing-Bablok回归和Bland-Altman一致性分析，以评估相较于ALTm值得到的性能。Passing-Bablok回归显示的方程为 $y = -2.869 + 0.947x$ ，Bland-Altman一致性分析（图4）表现出-7.6%的小幅负平均偏差，总体一致性很强。

结论

我们开发了一种LC-MS/MS临床研究方法，使用平衡透析、ACQUITY UPLC I-Class PLUS FL系统和Xevo TQ Absolute质谱仪测定血清中的游离睾酮。该方法从200 µL血清中检出浓度低至0.5 pg/mL的游离睾酮，在需要时还可以对样品进行重新分析。

- 该方法表现出良好的线性，无明显残留、干扰或基质效应

- 该方法的总体重现性和重复性为RSD≤8.4%
- 该方法与英国NEQAS外部质量保证方案高度一致

最后，该方法快速高效，因为平衡透析步骤仅耗时2小时，且48个样品的全板制备时间不超过5小时。

特色产品

ACQUITY™ UPLC™ I-Class PLUS FL系统 <

<https://www.waters.com/nextgen/global/products/chromatography/chromatography-systems/acquity-uplc-i-class-plus-system.html>>

Xevo TQ Absolute三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry-systems/xevo-tq-absolute.html>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

MassLynx定量应用程序 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/products/informatics-and-software/mass-spectrometry-software/masslynx-mass-spectrometry-software/masslynx-quantitation-applications.html>>

720008237ZH, 2024年2月



© 2025 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私策略](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号