

# SCIEX液相色谱串联质谱法测定血清中30种内源性类固醇激素

## Determination of 30 Steroid Hormones in Human Serum by SCIEX Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

刘丹, 胡凤梅, 黄超, 赵祥龙, 郭立海

Liu Dan, Hu Fengmei, Huang Chao, Zhao Xianglong, Guo Lihai

SCIEX应用支持中心, 中国

SCIEX, China

### 前言

类固醇激素, 又称甾体激素, 是一类脂溶性小分子激素, 由胆固醇经一系列酶催化而来, 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、原发性醛固酮增多症、内分泌紊乱、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。

临床传统方法采用放射免疫或ELISA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, 尤其是对于同时检测的指标较多的情况下, 质谱一针进样同时检测多种指标的特点就有了更加显著的优势, 因此, 建立一种基于液相色谱串联质谱方法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, 在激素种类上做了更新, 增加了更多类固醇激素代谢通路当中的关键指标(如18-羟皮质醇、18-氧皮质醇等), 建立了一次分析, 可以同时准确检测人血清中30种类固醇激素的定量方法。

### 方案优势

本方案通过 SCIEX LC-MS/MS系统优化质谱检测参数, 对多种激素进行定量分析, 优势如下:

- 灵敏度高, 大多数指标定量下限可达到5~10 pg/mL;
- 检测指标多, 一针进样同时检测30中内源性类固醇激素;
- 分离度好, 多组异构体在本方法中实现很好的分离;
- 正负离子切换, Scheduled MRM™ 检测模式, 方法检测效率高;
- 方法稳定, 重现性好, 能满足临床分析需求。

## 1 实验部分

### 1.1 前处理方法

**提取:** 准确量取300 µL样品于1.5 mL塑料离心管中, 加入同位素内标混合工作液, 加入甲醇, 加入水, 涡旋1 min, 10000 rpm离心5 min, 取上层溶液待用。

**净化:** 取SPE柱, 依次用甲醇活化, 水平衡。取提取后上清液加载至SPE柱, 弃去滤液; 依次用乙腈水和正己烷淋洗, 弃去淋洗液; 加入洗脱溶剂进行洗脱, 收集洗脱液稀释, 混匀待测。

### 1.2 色谱条件

色谱柱为Kinetex C18。流动相采用氯化铵水溶液和甲醇, 柱温设定为40 °C。洗脱梯度见表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 °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 $\alpha$ -羟孕酮	17 $\alpha$ -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	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

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
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
18-氧-皮质醇	18-Oxocortisol	377	313	110	28
		377	341.2	110	27
18-羟基-11-脱氧皮质酮	18-Hydroxy-11-deoxycorticosterone	347	96.8	100	31
		347	109.1	100	35
		303.1	267	90	23
11 $\beta$ -羟-雄烯二酮	11 $\beta$ -Hydroxy androstenedione	303.1	144.9	90	33
		303.1	121	90	33
18-羟-皮质酮	18-Hydroxycorticosterone	362.9	269.2	100	24
		362.9	146.9	100	31
18-羟-皮质醇	18-Hydroxycortisol	379.1	267	100	28
		379.1	285	100	25
21-脱氧皮质酮	21-Deoxycorticosterone	331	120.9	80	28
		331	313.1	80	18
11-酮-雄烯二酮	11-Ketoandrostenedione	300.9	256.9	95	30
		300.9	120.9	95	33
11 $\beta$ -羟-睾酮	11 $\beta$ -Hydroxytestosterone	305.2	120.9	90	30
		305.2	269	90	21
11-酮-睾酮	11-Ketotestosterone	303	259	110	31
		303	120.9	110	33

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
褪黑素	Melatonin	233.1	174.1	80	20
		233.1	159.1	80	40
11-脱氧皮质酮	11-Deoxycorticosterone	331.1	96.9	110	35
		331.1	109.2	110	35
	IS-17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone	334.3	112.2	100	40
	IS- Corticosterone	351.3	121	120	35
	IS- Dihydrotestosterone	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-18-Hydroxycortisol	383.3	271.1	120	28
	IS-11 $\beta$ -Hydroxy androstenedione	310.3	147.1	100	32
	IS-11-Ketotestosterone	306.3	121	120	31
	IS-18-Hydroxycorticosterone	367.1	121	110	33
	IS-11 $\beta$ -Hydroxytestosterone	309.3	120.9	100	30
	IS-11-Deoxycorticosterone	338.2	99.8	120	30
		359.1	189.1*	-100	-24
醛固酮	Aldosterone	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
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
17 $\alpha$ -羟基孕烯醇酮	17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolone	331.1	303.3*	-70	-30
		331.1	313.2	-70	-30

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
	IS- Aldosterone	363.2	301.2	-120	-22
	IS- Estriol	290.2	173	-160	-54
	IS-Estrone	273	147	-150	-50
	IS-DHEAS	373	98	-50	-50
	IS-Estradiol	274	145	-180	-55
	IS-17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolone	274	145	-180	-55

## 2 结果与讨论

### 2.1 线性及保留时间

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。各待测物线性范围、相关系数及保留时间结果如下表3所示, 各化合物在其线性范围内线性良好, r值大于0.995。

表3. 30种激素标准曲线及线性范围

中文名	英文名	线性范围	相关系数	保留时间
17 $\alpha$ -羟孕酮	17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone	0.02 - 100	0.9954	8.38
皮质酮	Corticosterone	0.005 - 50	0.9988	5.33
双氢睾酮	Dihydrotestosterone	0.005 - 50	0.9987	9.81
孕烯醇酮	Pregnenolone	0.02-100	0.9970	8.37
孕酮	Progesterone	0.005 - 50	0.9969	10.53
11-脱氧皮质醇	11-Doxycortisol	0.005 - 100	0.9988	5.62
21-脱氧皮质醇	21-Doxycortisol	0.005-50	0.9979	4.85
21-羟基孕酮	21-Hydroxyprogesterone	0.01-100	0.9969	5.93
雄烯二酮	Androstenedione	0.005-50	0.9957	6.85
可的松	Cortisone	0.005-50	0.9966	3.28
睾酮	Testosterone	0.005-10	0.9979	7.97
皮质醇	Cortisol	0.02-200	0.9980	3.81
脱氢表雄酮	DHEA	0.02-200	0.9957	7.26
18-氧-皮质醇	18-Oxocortisol	0.010-100	0.9967	2.21
18-羟基-11-脱氧皮质酮	18-Hydroxy-11-deoxycorticosterone	0.005-100	0.9967	4.85
11 $\beta$ -羟-雄烯二酮	11 $\beta$ -Hydroxyandrostenedione	0.005-10	0.9959	4.57
18-羟-皮质酮	18-Hydroxycorticosterone	0.005-100	0.9975	3.34
18-羟-皮质醇	18-Hydroxycortisol	0.005-100	0.9957	2.48

表3. 30种激素标准曲线及线性范围

中文名	英文名	线性范围	相关系数	保留时间
21-脱氧皮质酮	21-Deoxycorticosterone	0.02-100	0.9969	7.77
11-脱氧皮质酮	11-Deoxycorticosterone	0.005-50	0.9979	7.54
11-酮-雄烯二酮	11-Ketoandrostenedione	0.005-50	0.9958	3.49
11β-羟-睾酮	11β-Hydroxytestosterone	0.01-50	0.9969	5.22
11-酮-睾酮	11-Ketotestosterone	0.005-100	0.9981	4.08
褪黑素	Melatonin	0.005-10	0.9978	1.79
醛固酮	Aldosterone	0.005-50	0.9982	2.88
雌三醇	Estriol	0.005-50	0.9987	2.9
雌酮	Estrone	0.01-100	0.9980	7.26
硫酸脱氢表雄酮	DHEAS	1-1000	0.9987	2.36
雌二醇	Estradiol	0.01-100	0.9985	7.56
17α-羟基孕烯醇酮	17α-Hydroxypregnenolone	0.10-100	0.9969	6.74

## 2.2 样本采集谱图

在本方法条件下，化合物在各自出峰位置峰形对称，响应良好。多对同分异构体，也可以实现基线分离（如图1），部分化合物的提取离子色谱图如图2，信噪比良好，峰形良好。

## 2.3 方法验证

取混合人血清样本，分为3组，向其中2组加入不同浓度的激素混合标准溶液，制备低、高两组血清加标样本，测定3组血清样

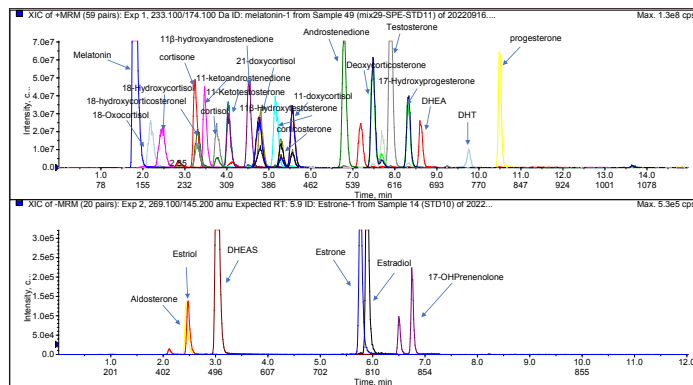


图1. 30种激素典型色谱图

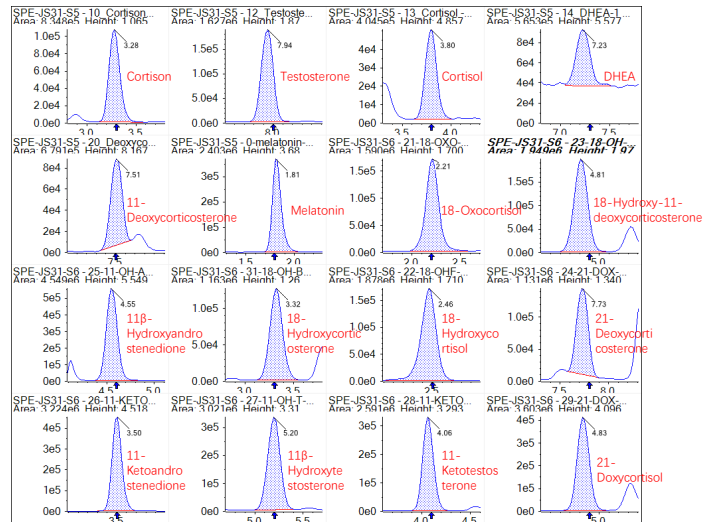


图2. 标准曲线样品中分析物的提取离子色谱图（部分）

本中各激素浓度（各组内样本平行3份分析），计算加标回收率及方法精密度。结果表明，30种类固醇激素化合物在样本添加不同浓度水平溶液的加标回收率在85.8%~113.8%范围内，精密度CV值在1.2%~14.1%范围内，符合相关要求。（见表4）。

表4. 30种激素各浓度加标回收率及精密度

Analyte	Recovery		Precision	
	L	H	LQC	HQC
17α-Hydroxyprogesterone	112.10%	107.50%	3.3%	3.1%
Corticosterone	97.10%	89.50%	14.1%	10.6%
Dihydrotestosterone;DHT	102.0%	96.8%	2.1%	4.3%
Pregnenolone	86.0%	89.8%	7.1%	4.5%
Progesterone	97.6%	92.9%	5.5%	7.4%
11-Doxycortisol	112.0%	108.3%	4.1%	2.0%
21-Doxycortisol	107.00%	108.50%	6.1%	2.9%
21-Hydroxyprogesterone	93.00%	106.10%	7.2%	3.5%
Androstenedione	98.60%	96.10%	1.8%	1.5%
Cortisone	104.60%	104.10%	1.4%	2.4%
Testosterone	94.8%	89.9%	13.0%	7.9%
Cortisol	100.30%	99.30%	6.2%	2.7%
DHEA	110.20%	106.00%	10.3%	7.8%
18-Oxocortisol	106.90%	86.90%	8.40%	12.5%
18-Hydroxy-11-deoxycorticosterone	113.80%	112.30%	12.1%	3.2%
11β-Hydroxy androstenedione	93.50%	100.10%	6.4%	1.5%

表4. 30种激素各浓度加标回收率及精密度 (续)

Analyte	Recovery		Precision	
	L	H	LQC	HQC
18-Hydroxycorticosterone	98.9%	108.0%	6.8%	6.5%
18-Hydroxycortisol	92.4%	96.90%	13.7%	6.2%
21-Deoxycorticosterone	85.80%	87.50%	13.1%	7.7%
11-Deoxycorticosterone	108.70%	108.20%	4.8%	2.4%
11-Ketoandrostenedione	110.10%	108.3%	6.2%	5.6%
11 $\beta$ -Hydroxytestosterone	103.80%	96.30%	9.4%	7.0%
11-Ketotestosterone	101.80%	87.50%	1.3%	7.0%
Melatonin	96.40%	88.8%	6.9%	9.1%
Aldosterone	96.00%	105.10%	1.7%	9.2%
Estriol	91.50%	86.30%	7.3%	2.9%
Estrone	106.00%	93.40%	10.5%	13.6%
DHEAS	104.00%	89.00%	1.2%	4.3%
Estradiol	86.90%	87.8%	6.7%	3.1%
17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolone	92.80%	113.6%	13.5%	10.2%

## 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30种激素进行准确定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，同时对类固醇激素代谢通路中的多种激素进行SPE前处理后进行分析，方法稳定性好，准确度高，灵敏度好，满足相关方法要求，可以作为类固醇激素检测的有效方法。

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。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15470-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](http://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](#)