

在临床研究中使用UPLC-MS/MS分析血清雌激素

Robert Wardle, Lisa J. Calton

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

本应用纪要介绍了一种使用Waters ACQUITY UPLC I-Class系统和CORTECS苯基柱从血清中萃取和分析E2和E1，然后使用Xevo TQ-XS质谱仪进行质谱检测的临床研究方法

优势

- 采用简单的液/液样品萃取方案，无需衍生化
- 优异的分析灵敏度，可以区分空白样品与1 pg/mL加标的经处理血清样品
- 所需样品量仅为250 μ L

简介

17 β -雌二醇(E2)和雌酮(E1)是非妊娠人体内的两种主要生物活性雌激素。E2主要由卵巢和睾丸通过睾酮芳香化生成，而E1主要通过雄烯二酮的衍生化生成。E2可以代谢为E1，E1也可以转化为E2，因此研究人员需要测定这两种

进样针:	30 μ L
色谱柱:	CORTECS苯基柱2.7 μ m, 2.1 \times 50 mm (部件号:186008319)
流动相A:	0.05 mM氯化铵水溶液
流动相B:	甲醇
进样针清洗溶剂:	80%甲醇水溶液
清除溶剂:	10%甲醇水溶液
柱温:	50 $^{\circ}$ C
进样体积:	20 μ L
流速:	0.3 mL/min
梯度:	见表1
运行时间:	4.75 min

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.3	90	10	初始
0.50	0.3	60	40	11
3.50	0.3	30	70	6
3.75	0.5	2	98	11
4.25	0.5	90	10	11
4.70	0.3	90	10	11

表1. 分离E2和E1的梯度表

质谱条件

系统	Xevo TQ-XS
分辨率	MS1 (0.7 FWHM) MS2 (0.7 FWHM)
采集模式:	多重反应监测(MRM) (详见表2)
极性	ESI -
毛细管	2.2 kV
离子源温度	150 °C
脱溶剂气温度	600 °C
驻留时间	0.05 s

数据管理

MassLynx软件4.2版自带的TargetLynx XS应用管理软件

初始条件下的操作背压约为3000 psi。

分析物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (kV)
E2 (定量离子)	271.2	145.0	40	38
E2 (定性离子)	271.2	183.0	40	38
[¹³ C ₃]-E2	274.2	148.0	40	38
E1 (定量离子)	269.2	145.0	40	38
E1 (定性离子)	269.2	183.0	40	38
[¹³ C ₃]-E1	272.2	148.0	40	38

表2. E2和E1定量离子、定性离子及其内标的MRM参数

样品前处理

E2和E1认证参比溶液及其稳定标记内标(¹³C₃)购自Cerilliant公司（美国德克萨斯州圆石）。使用购自Golden West Biologicals（美国加利福尼亚州特曼库拉）的替代基质MSG4000（处理血清）制备标曲溶液。E2的校准范围为3~1000 pg/mL（约11.1~3700 pmol/L），E1为2~1000 pg/mL（约7.4~3700 pmol/L）。使用购自Golden West Biologicals（美国加利福尼亚州特曼库拉）的替代基质MSG4000（处理人血清）制备QC样品，各QC样品的浓度约为10 pg/mL、75 pg/mL和750 pg/mL（约37 pmol/L、275 pmol/L和2750 pmol/L）。使用ELGA（High Wycombe, 英国）的水净化系统在实验室内部制备蒸馏水。甲醇和乙酸乙酯购自Honeywell（英国布拉克内尔）。氟化铵和正己烷购自Sigma-Aldrich（英国吉林汉姆）。

注：将E2数据乘以3.671，E1数据乘以3.699即可将传统的质量单位(pg/mL)转换为SI单位(pmol/L)。

样品提取

将20 μL内标（[¹³C₃]-E2和[¹³C₃]-E1约2 ng/mL）加入250 μL样品中，混匀。加入1 mL 85:15 (v:v)正己烷:乙酸乙酯，充分混合10 min以进行液/液萃取。将样品以4000 g离心5 min，然后取700 μL上层有机溶剂转移到带有1 mL玻璃内衬管的96孔板中（部件号：186000855）。将样品挥干并复溶于20 μL甲醇和30 μL蒸馏水中。

结果与讨论

人血清样品中E2和E1的色谱图如图2所示。

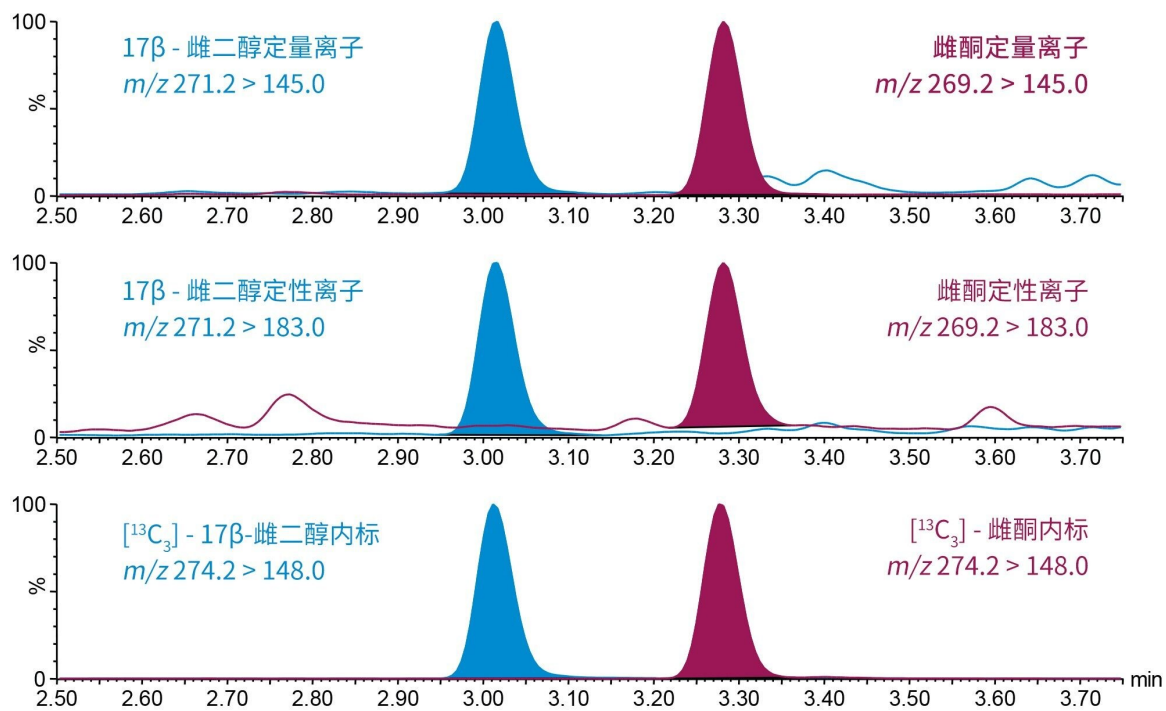


图2. E2和E1浓度分别为47.5 pg/mL (174.2 pmol/L)和37.3 pg/mL (137.9 pmol/L)时的典型色谱图

在五天内萃取并测定五个重复样品以评估精密度。E2和E1浓度为10~750 pg/mL (37~2775 pmol/L)时，总精密度和重复性为 $\leq 4.8\%$ CV (表3)。

	17 β - 雌二醇		雌酮	
	重复性 (%CV)	合计 (%CV)	重复性 (%CV)	合计 (%CV)
QC L - 10 pg/mL	4.5	4.5	3.5	3.5
QC M - 75 pg/mL	3.0	3.6	2.7	3.8
QC H - 750 pg/mL	2.5	4.2	2.6	4.8

表3. E2和E1的分析精密度汇总

在5天内提取并定量分析使用处理血清制备的5个含低浓度E2和E1的样品，以此评估分析灵敏度。LLOQ为精密度（重复性） $\leq 20\%$ CV且S:N(ptp) $\geq 10:1$ 时的最低可测定浓度，此外，在2000 pg/mL下未观察到明显残留。E2的LLOQ定为3 pg/mL (11 pmol/L)（表4和图3），E1的LLOQ为2 pg/mL (7.4 pmol/L)。

	17 β - 雌二醇		雌酮	
	精密度 (%CV)	S:N (ptp)	精密度 (%CV)	S:N (ptp)
混合样品A - 0.75 pg/mL	25.2	6.1	21.0	20.3
混合样品B - 1 pg/mL	15.1	7.6	10.4	25.8
混合样品C - 2 pg/mL	11.2	11.3	5.4	40.6
混合样品D - 3 pg/mL	7.8	19.2	5.8	59.3
混合样品E - 5 pg/mL	6.5	29.9	3.8	103.0

表4. E2和E1的分析灵敏度汇总

图3为空白样品以及含低浓度E2的样品的典型色谱图。尽管LLOQ没有达到1 pg/mL (3.7 pmol/L)，但是空白的经处理血清样品可以与处理血清中添加1 pg/mL (3.7 pmol/L) E2的样品区分开来。图3还显示了确保E1与E2实现色谱分离的重要性，由图可见，在E2的MRM通道中可以观察到E1的同位素。

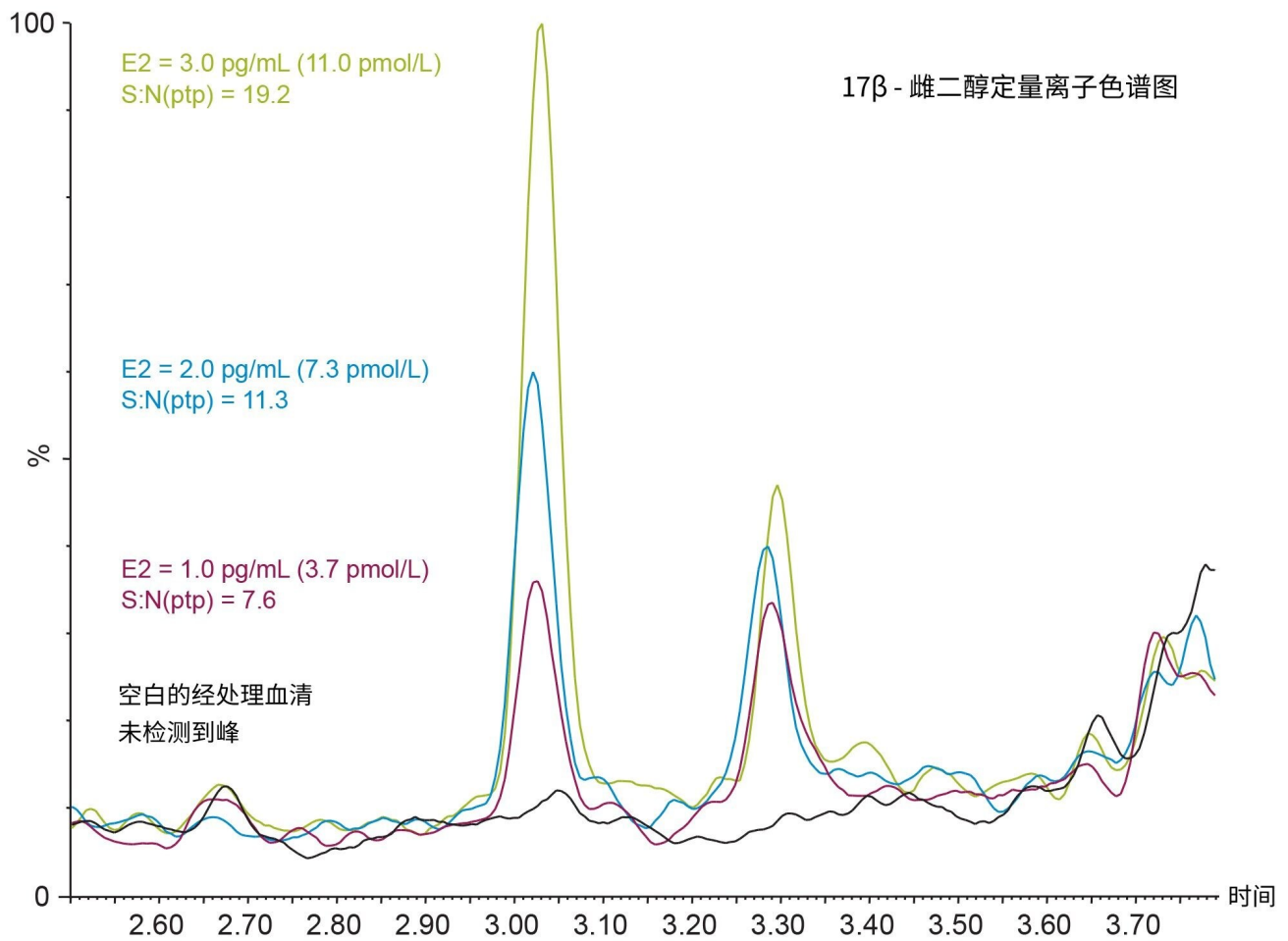


图3. 空白的经处理血清样品以及含低浓度E2的处理血清样品的色谱图

对于E2，该方法在0.434~1117 pg/mL (1.59~4099 pmol/L)范围内呈线性相关，对于E1，该方法在0.647~1113 pg/mL (2.39~4118 pmol/L)范围内呈线性相关，该结果是通过将低浓度和高浓度混合样品以已知比例混合，得到上述浓度范围内10个样品之后测定而得。加标处理血清样品得到的所有校准线都是线性的，测定十个不同样品中E2和E1时的确定系数(r^2) > 0.998。

本研究测定了典型的内源性干扰物（白蛋白、胆红素、胆固醇、脂肪乳剂、甘油三酯和尿酸），与对照品相比得到的测试样品回收率(%)都在±15%以内。使用来自六个供体的血清样品研究基质效应。单独定量内源性干扰物的峰面积，使用平均峰面积调整低浓度和高浓度萃取后加标样品的结果，以便与溶剂加标样品的结果进行比较。虽然通过峰面积可以观察到基质因子有所变化，但这些变化可通过内标进行补偿（表5）。

化合物	加标浓度 (pg/mL)	基于峰面积的基质因子 (范围)	基于浓度的基质因子 (范围)
17β - 雌二醇	15	1.147 (0.940–1.317)	0.952 (0.868–1.020)
	350	1.115 (1.037–1.190)	1.003 (0.991–1.010)
雌酮	15	1.358 (1.116–1.770)	0.998 (0.853–1.091)
	350	1.273 (1.015–1.427)	1.002 (0.995–1.010)

表5. E2和E1的基质因子汇总

分析并计算40个CDC E2 Phase 1样品和53个UK NEQAS E2样品的浓度，与赋值比较，以评估准确度。表6和图4中可以看到E2的相关性，所得结果与两种EQA方案具有良好的一致性。对浓度分别为31、188和365 pg/mL (114、690和1340 pmol/L) 的BCR认证参比物质样品进行萃取并分析，每个浓度一式三份，E2的所有测量值都在赋值±4.9%范围内。

项目	Deming回归分析			线性拟合(r)	Altman bland偏差
	方程	比例偏差?	常值偏差?		
CDC E2 Phase 1	$y=1.07x-0.51$	Y (p=0.0050)	N (p=0.8719)	0.9982	7.0%
UK NEQAS	$y=0.99x+4.66$	N (p=0.4267)	N (p=0.0715)	0.9979	1.7%

表6. E2和E1的精密度汇总

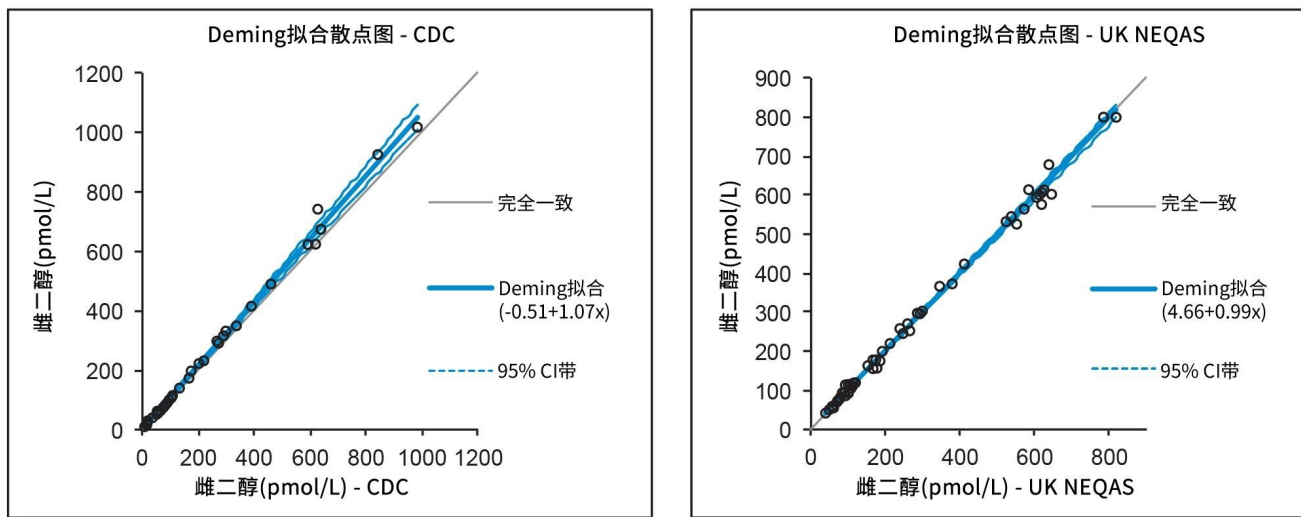


图4. CDC E2 Phase 1值或UK NEQAS MS实验室修正后的平均值与Waters UPLC-MS/MS方法所得结果的Deming回归分析图比较

结论

本文介绍了一种使用UPLC-MS/MS分析血清中E2和E1的临床研究方法，该方法具有良好的分析灵敏度。其样品用量仅为250 μ L血清，可以区分空白的经处理血清样品与相同基质中加标1 pg/mL E2的样品，并且无需衍生化。

该分析在五天的分批测定中表现出良好的精密度，并且在整个测定范围内表现出良好的准确度和线性，观察到的基质效应极低，测定的内源性化合物未造成显著干扰。

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>>

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

[TargetLynx <https://www.waters.com/513791>](https://www.waters.com/513791)

720006315ZH, 2018年6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