

在临床研究中使用UPLC-MS/MS分析血清中的二氢睾酮、脱氢表雄酮、睾酮、雄烯二酮、17-羟孕酮和孕酮

Dominic Foley, 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同时分析测定二氢睾酮(DHT)、脱氢表雄酮(DHEA)、睾酮、雄烯二酮、17-羟孕酮(17-OHP)和孕酮6种激素的临床研究方法，该方法使用Oasis MAX μ Elution板从血清中萃取目标分析物。

优势

- 色谱方法具有出色的分析选择性，可以分离同分异构体
- 利用多孔板自动化处理配置实现高通量的UPLC-MS/MS分析
- 该研究对睾酮、雄烯二酮、17-OHP、DHT的分析结果与EQA质谱法平均值具有良好的一致性

简介

类固醇激素是一大类小分子物质，在代谢过程中发挥着非常重要的作用，例如性别特征调节、血压调节和炎症反应调节等。当使用免疫分析法测定这类类固醇物质时，由于试剂中抗体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。而使用超高效液相串联质谱法(UPLC-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。

本文介绍了一种同时分析测定二氢睾酮(DHT)、脱氢表雄酮(DHEA)、睾酮、雄烯二酮、17-羟孕酮(17-OHP)和孕酮6种激素的临床研究方法。该方法使用Oasis MAX μ Elution板从血清中萃取目标分析物（固相萃取过程已采用Tecan Freedom EVO 100/4液体处理器实现了自动化），然后使用配备CORTECS UPLC C₁₈色谱柱的ACQUITY UPLC I-Class系统进行色谱分离，最后在Xevo TQ-S micro质谱仪上（图1）进行检测。此外，本研究还通过分析睾酮、雄烯二酮、17-OHP和DHT的室间质量评估(EQA)样品评估了该方法的偏差，以此判断该方法是否适合在临床研究中用于类固醇分析。



图1. Waters ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ-S micro液质联用系统。

实验

LC条件

系统：	ACQUITY UPLC I-Class (FTN) 带柱温箱(CH)
进样针：	30 μ L
色谱柱：	CORTECS UPLC C ₁₈ 1.6 μ m, 2.1 $\times$ 50 mm (P/N 186007093)
保护柱：	在线过滤器 (P/N 205000343)
流动相A：	0.05 mM氟化铵水溶液

流动相B:	甲醇
洗针液:	甲醇
清洗时间:	10 s
清除溶剂:	40%甲醇（水溶液）
柱温:	50 °C
进样体积:	20 µL
流速:	见表1
梯度:	见表1
运行时间:	6.3 min

MS条件

系统:	Xevo TQ-S micro
分辨率:	MS1 (0.75 FWHM), MS2 (0.5 FWHM)
采集模式:	多重反应监测(MRM) (详见表2)
极性:	ESI+
毛细管电压:	3.0 kV
离子源温度:	150 °C
脱溶剂气温度:	600 °C

扫描间隔延迟时间：自动

通道间隔延迟时间：自动

数据管理

带TargetLynx应用管理软件的MassLynx软件4.1版

样品制备

DHT、DHEA、睾酮、雄烯二酮、17-OHP和孕酮标准品溶液以及DHT、睾酮、雄烯二酮、17-OHP和孕酮的稳定同位素标记内标购自Sigma Aldrich（英国普尔）。DHEA的稳定同位素标记内标购自QMX Labs（英国萨克斯泰德）。

使用含1%牛血清白蛋白(BSA)的磷酸盐缓冲液(PBS)作为替代基质制备标准品和质控样品(QC)。制备浓度范围为0.09~34 nmol/L的DHT标曲溶液，以及浓度为0.17 nmol/L、3.4 nmol/L和26 nmol/L的QC样品。制备浓度范围为1.0~69 nmol/L的DHEA标曲溶液，以及浓度为3.1 nmol/L、6.9 nmol/L和52 nmol/L的QC样品。制备浓度范围为0.017~69 nmol/L的睾酮标曲溶液，以及浓度为0.052 nmol/L、3.5 nmol/L和52 nmol/L的QC样品。制备浓度范围为0.09~350 nmol/L的雄烯二酮标曲溶液，以及浓度为0.26 nmol/L、7.0 nmol/L和262 nmol/L的QC样品。制备浓度范围为0.08~303 nmol/L的17-OHP标曲溶液，以及浓度为0.23 nmol/L、6.1 nmol/L和227 nmol/L的QC样品。制备浓度范围为0.06~64 nmol/L的孕酮标曲溶液，以及浓度为0.19 nmol/L、3.2 nmol/L和48 nmol/L的QC样品。

注：睾酮数据除以3.47（nmol/L转换为ng/mL）、雄烯二酮数据除以3.49（nmol/L转换为ng/mL）、17-OHP数据除以3.03（nmol/L转换为ng/mL）、DHEA数据除以3.47（nmol/L转换为ng/mL）、孕酮数据除以3.18（nmol/L转换为ng/mL）、DHT数据除以3.45（nmol/L转换为ng/mL）可以将SI单位转换为传统的质量单位。

样品提取

使用自动化液体处理器进行样品的处理过程，处理样品前先将样品在4000 g转速下离心5 min。向100 μL样品中加入25 μL内标溶液（含34.5 nmol/L DHT-¹³C₃、34.7 nmol/L DHEA-¹³C₃、17.4 nmol/L睾酮-¹³C₃、35.0 nmol/L雄烯二酮-¹³C₃、76 nmol/L 17-OHP-¹³C₃和16 nmol/L孕酮-¹³C₃）、200 μL甲醇和450 μL水，每次添加试剂之后充分混合样品，最后将样品在4000 g转速下离心5 min。

先后使用150 μL甲醇和水活化和平衡Oasis MAX μElution板(P/N 186001829)。从每份预处理后的样品中取600 μL上样至Oasis MAX μElution板的板孔中，并在低真空度下使样品缓慢通过板孔。接下来，分别使用100 μL含1% (v/v)甲酸的15% (v/v)乙腈水溶液*、100 μL含1% (v/v)氨水的15% (v/v)乙腈水溶液*进行连续清洗，除去潜在的干扰物质。然后，使用35 μL 60%乙腈水溶液洗脱分析物，最后在洗脱样品中加入35 μL水并混

匀。

*每周配制

方法条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.25	60	40	初始
0.5	0.25	60	40	6
4.0	0.25	30	70	6
4.75	0.50	5	95	11
5.5	0.50	60	40	11
6.0	0.25	60	40	11

表1.用于分离类固醇激素的梯度表。初始条件下的操作背压约为5500 *psi*。

化合物	MRM	锥孔电压 (V)	碰撞电压 (V)
DHT	291.2>255.2 (159.1)	45	14 (16)
DHT- ¹³ C ₃	294.2>258.2	45	14
DHEA	271.2>213.2 (197.2)	45	12 (14)
DHEA- ¹³ C ₃	274.2>216.2	45	12
睾酮	289.2>97.1 (109.1)	45	20
睾酮- ¹³ C ₃	292.2>100.1	45	20
雄烯二酮	287.2>97.1 (109.1)	45	20
雄烯二酮- ¹³ C ₃	290.2>100.1	45	20
17-OHP	331.2>97.1 (109.1)	55	20
17-OHP- ¹³ C ₃	334.2>100.1	55	20
孕酮	315.2>97.1 (109.1)	45	22
孕酮- ¹³ C ₃	318.2>100.1	45	22

表2.DHT、DHEA、睾酮、雄烯二酮、17-OHP和孕酮及其稳定同位素标记内标的MRM参数。驻留时间设为自动，6 s峰采集20个数据点。括号内是定性离子条件。MS扫描窗口为3~5 min，此时间段之外，液流导入废液。

结果与讨论

单独分析DHT、DHEA、睾酮、雄烯二酮、17-OHP、孕酮与其它7种极性相似的结构类似物（21-羟基孕酮、DHEAS、雌酮、雌二醇、17-羟基孕烯醇酮和孕烯醇酮），在这些分析物的保留时间处未观察到干扰。分析其它内源性化合物（白蛋白、胆红素、尿酸、脂肪乳剂、甘油三酸酯和胆固醇）时，未见DHT、DHEA、睾酮、雄烯二酮、17-OHP和孕酮受到显著干扰（偏差在±15%范围内）。

分析高浓度样品之后，在后续的空白进样中未观察到明显的系统残留污染。通过1:5稀释成功测定了高浓度样品，DHT、DHEA、睾酮、雄烯二酮、17-OHP和孕酮的平均准确度分别为108%、113%、107%、93%、96%和108%，RSD ≤ 10%。

将含有1% BSA的PBS作为替代基质，在五天内，每天使用此替代基质制备目标分析物浓度在线性范围浓度以下的样品（每个浓度水平n = 40）并进行分析，以此评估分析方法的灵敏度。该方法可以精确定量(RSD <

20%) 0.034 nmol/L的DHT、0.17 nmol/L的DHEA、0.007 nmol/L的睾酮、0.035 nmol/L的雄烯二酮、0.030 nmol/L的17-OHP和0.016 nmol/L的孕酮。在上述浓度下，雄烯二酮、17-OHP和孕酮的S/N (PtP) > 10，而DHT、DHEA和睾酮在0.09 nmol/L、0.35 nmol/L和0.017 nmol/L的浓度水平下可达到S/N > 10。

我们在五天内每天对三个浓度的QC样品进行一次萃取和定量分析（每个浓度五个重复样，n = 25），以此确定该方法的总精度。通过分析各QC水平的三个重复样评估方法的重现性。总精度和重现性如表3所示。各物质在低、中、高QC样本中的浓度分别为：DHT 0.17 nmol/L、3.4 nmol/L、26 nmol/L；DHEA 3.1 nmol/L、6.9 nmol/L、52 nmol/L；睾酮0.052 nmol/L、3.5 nmol/L、52 nmol/L；雄烯二酮0.26 nmol/L、7.0 nmol/L、262 nmol/L；17-OHP 0.23 nmol/L、6.1 nmol/L、227 nmol/L；孕酮0.19 nmol/L、3.2 nmol/L、48 nmol/L。

将高浓度和低浓度分析样品按不同比例混合，所得样品的分析结果表明，各分析物在如下的浓度范围内呈线性：DHT 0.09~35 nmol/L，DHEA 0.17~69 nmol/L，睾酮0.017~69 nmol/L，雄烯二酮0.035~350 nmol/L，17-OHP 0.03~303 nmol/L，孕酮0.016~32 nmol/L。此外，在所有分析中，使用含有1% BSA的PBS制备的标准品绘制的标准曲线均呈线性，且相关系数(r^2) > 0.99。

化合物	总QC精度			QC重现性		
	低	中	高	低	中	高
DHT	6.5%	4.3%	4.6%	6.4%	3.8%	3.9%
DHEA	4.7%	3.9%	4.3%	4.4%	3.9%	3.8%
睾酮	5.3%	2.9%	3.9%	4.0%	2.7%	3.2%
雄烯二酮	5.4%	3.5%	3.7%	3.7%	2.4%	3.5%
17-OHP	4.4%	3.7%	3.7%	4.0%	2.6%	3.7%
孕酮	4.5%	3.7%	4.0%	4.1%	3.7%	4.0%

表3.DHT、DHEA、睾酮、雄烯二酮、17-OHP和孕酮分析的总精度和重现性。

使用来自单个供体的血清样品研究DHT、DHEA、睾酮、雄烯二酮、17-OHP和孕酮的基质效应(n = 6)。基质因子计算结果如表4所示。基于分析物:内标响应比率计算归一化的基质因子，结果表明内标可以补偿观察到的所有离子抑制效应。

化合物	平均基质因子 (范围) 峰面积	RSD	平均基质因子 (范围) 响应比率	RSD
DHT	0.74 (0.69–0.81)	6.0%	0.95 (0.91–0.98)	3.2%
DHEA	0.80 (0.75–0.83)	4.0%	0.95 (0.93–0.98)	2.0%
睾酮	0.91 (0.87–0.94)	3.6%	0.98 (0.94–1.02)	3.4%
雄烯二酮	0.91 (0.85–0.96)	4.2%	0.98 (0.94–1.02)	3.4%
17-OHP	0.96 (0.93–0.99)	2.6%	0.98 (0.94–1.02)	3.4%
孕酮	0.63 (0.52–0.74)	13.7%	1.01 (0.98–1.05)	2.8%

表4. 基于分析物峰面积和分析物:内标响应比率计算平均基质因子(范围)和%RSD。

通过分析英国NEQAS的EQA样品评估睾酮、雄烯二酮和17-OHP的分析准确度。将所得结果与这些样品的质谱法平均结果进行比较，并进行Deming回归分析（表5）。睾酮、雄烯二酮和17-OHP数据的Bland-Altman一致性分析结果显示，平均方法偏差在±5.6%范围内，表明该方法分析类固醇激素所得的结果与EQA质谱法平均结果相比，具有良好的一致性（图2A–C）。

化合物	Deming拟合	常值 (p-值)	比例 (p-值)
睾酮	0.98x + 0.01	0.948	0.257
雄烯二酮	1.00x + 0.01	0.932	0.998
17-OHP	0.98x - 0.21	0.131	0.043

表5.Deming回归分析，对比了采用Waters UPLC-MS/MS方法和EQA方案MS方法分析睾酮、雄烯二酮和17-OHP的结果。P 值 < 0.05表示统计学有显著差异。

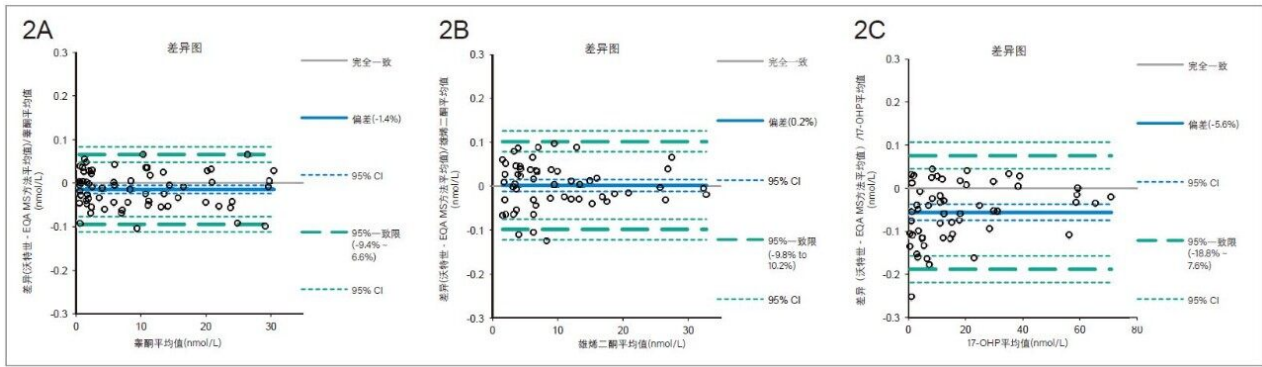


图2. Bland-Altman一致性分析，对比了采用Waters UPLC-MS/MS方法和EQA方案MS方法分析(a)睾酮、(b)雄烯二酮、(c)17-OHP的结果。

通过分析澳大利亚皇家病理学院质量保证计划(RCPA QAP)样品(n = 4)，评估该方法分析DHT的准确度。

Altman-Bland一致性分析显示，样品分析结果与目标值相比的平均偏差为4.9%（范围：-3%~18%），与所有实验室平均值(n ≥ 8)相比的平均偏差为1.1%（范围：-4%~7%）。

采用独立LC-MS/MS方法分析32个样品中的DHT，并将所得结果与沃特世方法的结果进行对比。Bland-Altman一致性分析表明，沃特世方法的结果与独立LC-MS/MS临床研究方法的结果相比，平均偏差为-6.6%，如图3所示。图4是在比较研究中分析血清中的低浓度类固醇激素得到的方法分析灵敏度示例。

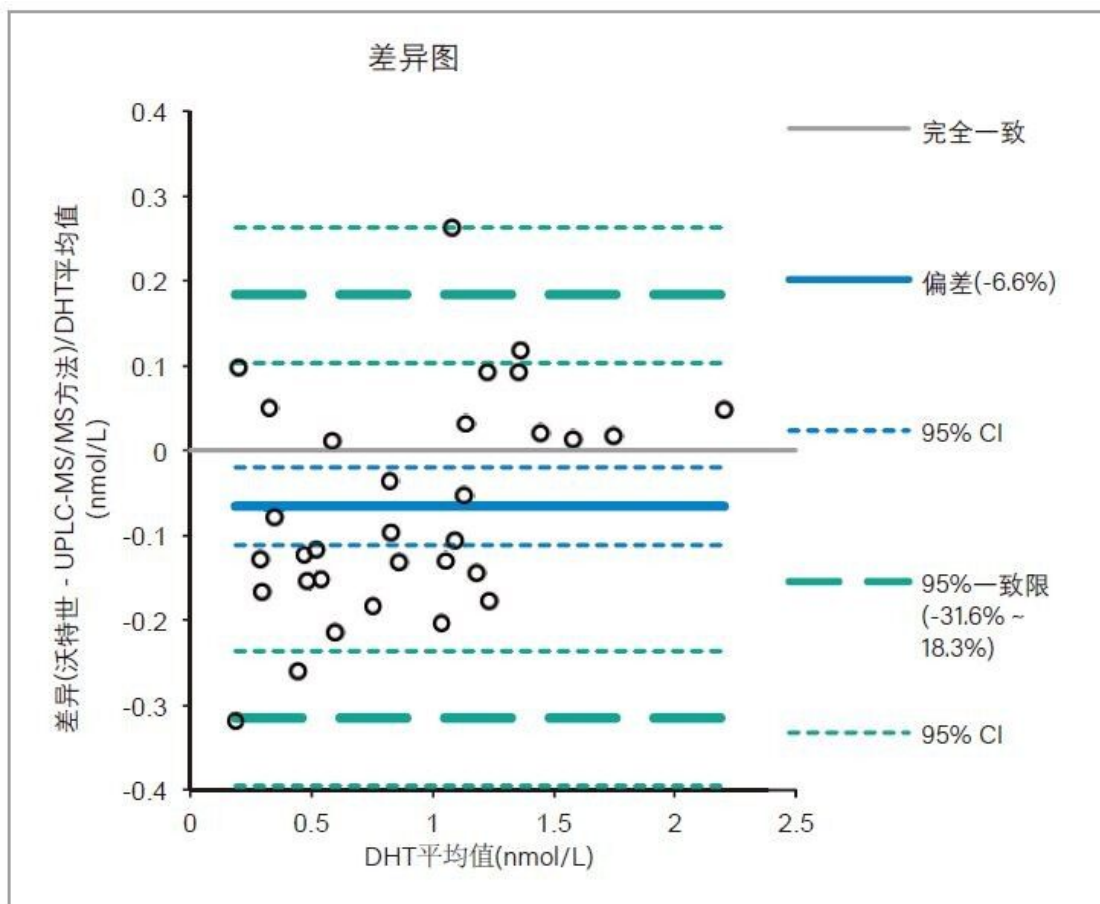


图3. Bland-Altman一致性分析，比较了Waters UPLC-MS/MS方法与独立LC-MS/MS临床研究方法分析DHT所得的结果。

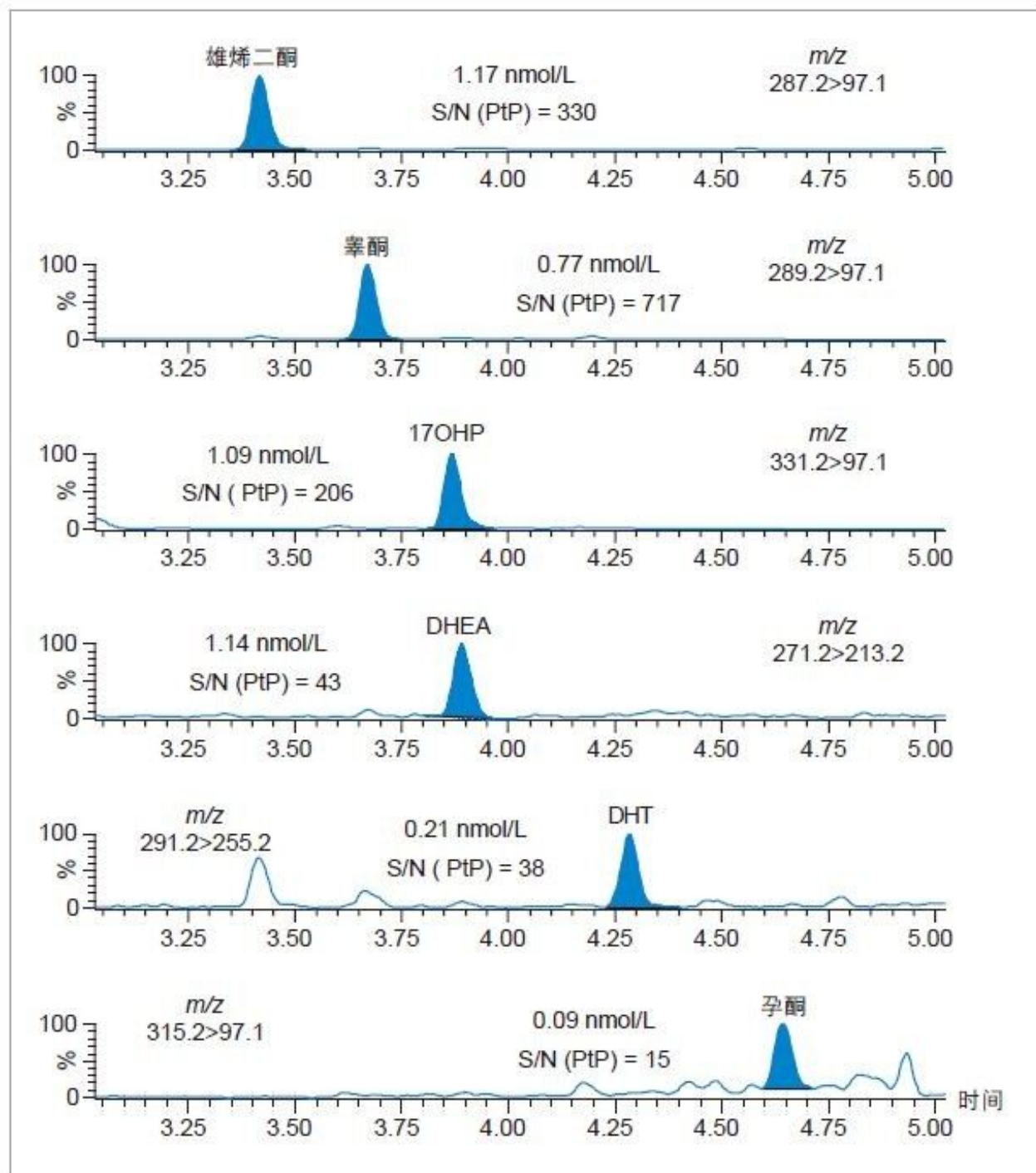


图4. 血清中的低浓度类固醇激素，包括睾酮、雄烯二酮、17-OHP、DHEA、DHT和孕酮。

结论

本研究使用Xevo TQ-S micro为临床研究开发了一种分析方法，该方法能以极高的灵敏度和选择性分析血清样品中的DHT、DHEA、睾酮、雄烯二酮、17-OHP和孕酮。

Xevo TQ-S micro为该方法提供了足够的分析灵敏度，仅使用100 µL样品即可测定低浓度的DHT、DHEA、睾酮、雄烯二酮、17-OHP和孕酮。该方法在线性范围内表现出良好的精度。EQA样品的准确度评估结果表明，该方法分析睾酮、雄烯二酮、17-OHP和DHT的结果与参比值具有良好的一致性。利用Tecan文件转换器和MassLynx LIMS Interface，可以将方法自动化的优势与液体处理器的样品追踪功能相结合，从而改进实验室工作流程并减少样品处理工作量，有效避免潜在的操作人员失误。

致谢

感谢英国南曼彻斯特大学医院(UHSM)的Brian Keevil教授及其同事为本研究的比较分析提供样品。

特色产品

Oasis样品萃取产品 <<https://www.waters.com/513209>>

Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134798856>>

MassLynx质谱软件 <<https://www.waters.com/513164>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720006320ZH，2019年11月