

应用纪要

## 用于类固醇UPLC-MS/MS分析的 MetaboQuan-R方法

---

Billy J. Molloy, Robert Wardle, Dominic Foley, Robert S. Plumb

Waters Corporation



仅供研究使用，不适用于诊断。

---

## 摘要

本研究开发出一种快速、靶向的UPLC-MS/MS方法，可用于对人血浆/血清中的14种内源性类固醇进行半定量分析。该方法经证实适用于分析人血浆/血清中生理相关水平的分析物。MetaboQuan-R方法在同一套通用LC-MS平台上经过优化，该平台之前已用于分析各种化合物，包括胆汁酸、氨基酸、游离脂肪酸、胰蛋白酶肽、酰基肉碱、色氨酸代谢物和各种脂质。这种新的类固醇分析方法进一步扩展了MetaboQuan-R方法套件，能够在靶向多组学工作流程序列运行中分析更多的代谢物和脂质。

## 优势

- 可在10 min内通过单次运行同时分析14种类固醇
- 可分离主要同量异位化合物
- 高通量分析意味着可以对更多的样品组进行快速分析
- 一个无需衍生化的简易分析流程
- 利用灵活的LC-MS配置实现从一种化合物到另一种化合物的多功能切换

---

## 简介

类固醇激素及相关化合物是极其重要的生物活性分子，与无数种基本的生物学功能有关（图1）。这些分析物的分析非常棘手，因为其中许多化合物的化学结构极为相似，会产生多种同量异位物质干扰。由于这些干扰（同量异位）物质具有化学相似性，因此进行有效的色谱分离对于选择性分析至关重要。通常通过延长色谱运行时间、衍生化或使用多种靶向分析方法来实现分离。

本文将介绍一种高通量UPLC-MS/MS研究方法(MetaboQuan-R)，该方法无需借助衍生化即可对人血浆/血清样品中的14种类固醇进行半定量分析，并使用一款通用、灵活的LC-MS平台，该平台之前已用于多种其它内源性化合物类别。因此，可通过单次运行对多种代谢物类别进行高通量定量分析。

---

## 实验

## 人血浆样品制备

按照之前所述的方法制备人血浆/血清样品（图1）。简而言之，使用乙酸乙酯/己烷混合溶剂通过液/液萃取法制备样品。蒸发后，将所得残留物溶于甲醇/水混合液，然后进行UPLC-MS/MS分析。

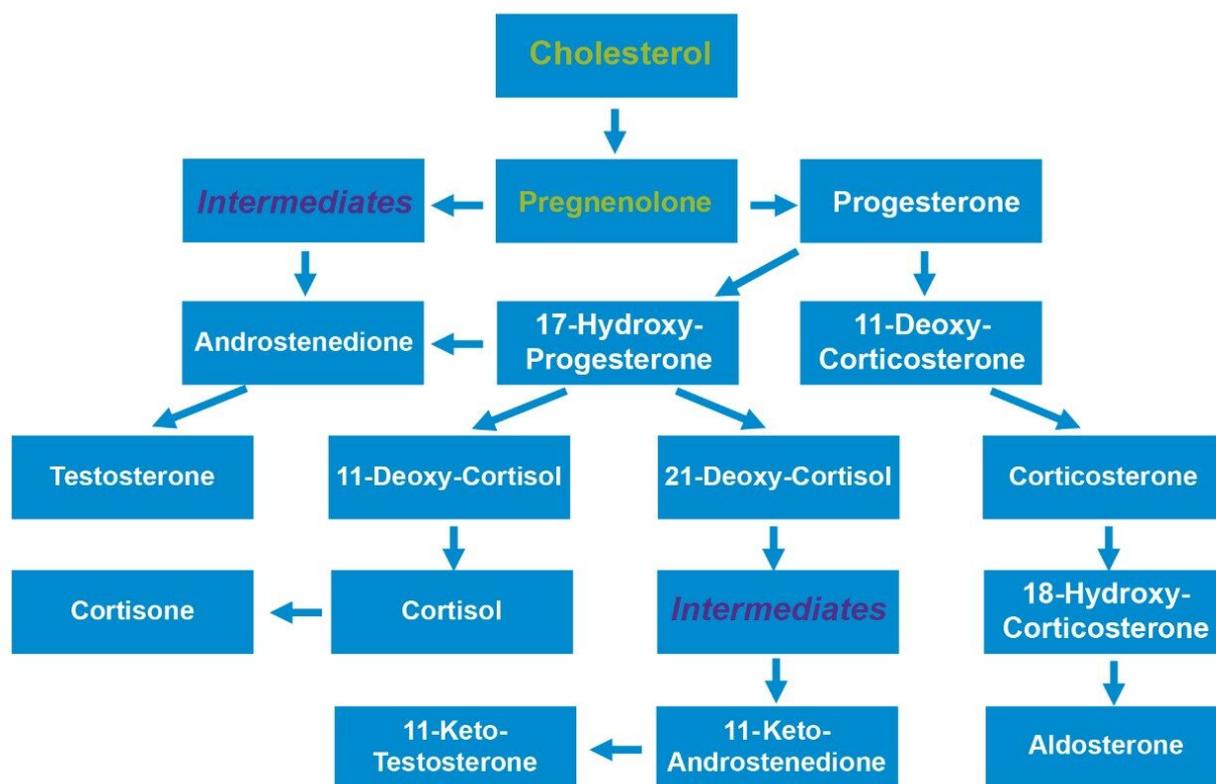


图1.使用MetaboQuan-R分析的类型固醇简化代谢途径（方法中包含的类型固醇显示为白色）

## UPLC条件

使用配备CORTECS T3 2.7  $\mu\text{m}$  (2.1  $\times$  30 mm)色谱柱（柱温维持在60  $^{\circ}\text{C}$ ）的ACQUITY UPLC I-Class系统（固定定量环）进行UPLC分离。将5  $\mu\text{L}$ 等分试样注入色谱柱中，在反相梯度条件下进行洗脱，其中流动相A为含0.2 mM甲酸铵的0.01%甲酸水溶液，流动相B为含0.01%甲酸和0.2 mM甲酸铵的50%异丙醇乙腈溶液。在初始2.7分钟保持15%流动相B后，在4.3分钟内以线性梯度将流动相B由15%增加至40%进行分离处理，再用98%流动相B以0.45 mL/min的流速清洗色谱柱1分钟。接下来重新平衡色谱柱，使其恢复初始条件。

## MS条件

使用Xevo TQ-S micro质谱仪进行多重反应监测(MRM)分析来检测类固醇。所有实验均在正离子电喷雾电离(ESI+)模式下进行。离子源温度和毛细管电压保持不变，分别设置为150  $^{\circ}\text{C}$ 和2.0 kV。锥孔气流速为50 L/h，

脱溶剂气温度为650 °C。所用的MRM通道详见表1。

| Steroid                   | MRM transitions | RT (mins) | Cone voltage (V) | Collision energy (eV) |
|---------------------------|-----------------|-----------|------------------|-----------------------|
| Androstenedione           | 287.20 > 97.00  | 4.8       | 40               | 22                    |
|                           | 287.20 > 109.00 |           | 40               | 22                    |
| Testosterone              | 289.20 > 97.00  | 5.0       | 40               | 22                    |
|                           | 289.20 > 109.00 |           | 40               | 26                    |
| 11-Keto-Androstenedione   | 301.20 > 109.00 | 2.0       | 40               | 26                    |
|                           | 301.20 > 121.00 |           | 40               | 24                    |
| 11-Keto-Testosterone      | 303.20 > 121.00 | 2.5       | 40               | 24                    |
|                           | 303.20 > 147.10 |           | 40               | 20                    |
| Aldosterone               | 361.20 > 97.00  | 1.2       | 40               | 30                    |
|                           | 361.20 > 109.00 |           | 40               | 30                    |
| 11-Deoxy-Cortisol         | 347.20 > 97.00  | 4.0       | 40               | 24                    |
|                           | 347.20 > 109.00 |           | 40               | 28                    |
| 21-Deoxy-Cortisol         | 347.20 > 97.00  | 3.3       | 40               | 24                    |
|                           | 347.20 > 109.00 |           | 40               | 28                    |
|                           | 347.20 > 121.00 |           | 40               | 24                    |
|                           | 347.20 > 175.00 |           | 40               | 18                    |
| Corticosterone            | 347.20 > 97.00  | 3.6       | 40               | 24                    |
|                           | 347.20 > 109.00 |           | 40               | 28                    |
|                           | 347.20 > 121.00 |           | 40               | 24                    |
|                           | 347.20 > 175.00 |           | 40               | 18                    |
| 11-Deoxy-Corticosterone   | 331.20 > 97.00  | 5.0       | 40               | 20                    |
|                           | 331.20 > 109.00 |           | 40               | 24                    |
| 17-Hydroxy-Progesterone   | 331.20 > 97.00  | 5.4       | 40               | 20                    |
|                           | 331.20 > 109.00 |           | 40               | 24                    |
| Progesterone              | 315.20 > 97.00  | 6.5       | 40               | 20                    |
|                           | 315.20 > 109.00 |           | 40               | 22                    |
| Cortisone                 | 361.20 > 121.00 | 1.6       | 40               | 28                    |
|                           | 361.20 > 163.10 |           | 40               | 22                    |
| 18-Hydroxy-Corticosterone | 363.20 > 97.00  | 1.4       | 40               | 22                    |
|                           | 363.20 > 121.00 |           | 40               | 22                    |
|                           | 363.20 > 269.20 |           | 40               | 16                    |
| Cortisol                  | 363.20 > 97.00  | 1.9       | 40               | 22                    |
|                           | 363.20 > 121.00 |           | 40               | 22                    |
|                           | 363.20 > 269.20 |           | 40               | 16                    |

表1.使用MetaboQuan-R分析类固醇所用的MS/MS条件以及保留时间列表

## 信息学软件

利用MassLynx中的Quanpedia功能将方法信息导入LC-MS系统。这款可拓展且可搜索的数据库不仅可以生成LC和MS方法，还能生成在TargetLynx中用于化合物定量分析的处理方法。

## LC条件

|       |  |
|-------|--|
| LC系统: | ACQUITY UPLC I-ClassFL   |
| 检测器:  | Xevo TQ-S micro  |
| 色谱柱:  | CORTECS T3 2.7 $\mu\text{m}$ (2.1 x 30 mm)   |
| 柱温:   | 60 °C  |
| 样品温度: | 6 °C   |
| 进样体积: | 5 $\mu\text{L}$  |
| 流速:   | 0.45 mL/min  |
| 流动相A: | 含0.2 mM甲酸铵的0.01%甲酸水溶液  |
| 流动相B: | 含0.01%甲酸和0.2 mM甲酸铵的50%异丙醇乙腈溶液  |
| 梯度:   | 在初始2.7分钟保持15%流动相B后, 在4.3分钟内以线性梯度将流动相B由15%增加至40%, 再用98%流动相B清洗色谱柱1分钟, 接下来重新平衡色谱柱, 使其恢复初始条件 |

## MS条件

|        |                 |
|--------|-----------------|
| MS系统:  | Xevo TQ-S micro |
| 电离模式:  | ESI+            |
| 毛细管电压: | 2.0 kV          |

---

## 结果与讨论

使用文中所述UPLC-MS/MS平台和提取方案提取、分离并检测出14种类固醇，如表1所示。该列表中包含14种化合物，其中5组化合物（如下列所示）由于结构相似，为同量异位化合物，在质谱仪中会相互干扰。

A组 – 睾酮和雄烯二酮

B组 – 11-酮基睾酮和11-酮基雄烯二酮

C组 – 醛固酮、可的松、18-羟基皮质酮和皮质醇

D组 – 皮质酮、11-脱氧皮质醇和21-脱氧皮质醇

E组 – 11-脱氧皮质酮和17-羟孕酮

为实现所有类固醇的选择性分析，必须对这些同量异位类固醇组进行色谱分离。使用MetaboQuan-R平台开发的UPLC分离方法成功地将这5组类固醇彼此分离，从而对所有分析物实现特异性分析。图2显示了14种类固醇的UPLC分离结果，其中包括这5组主要同量异位类固醇的分离结果。

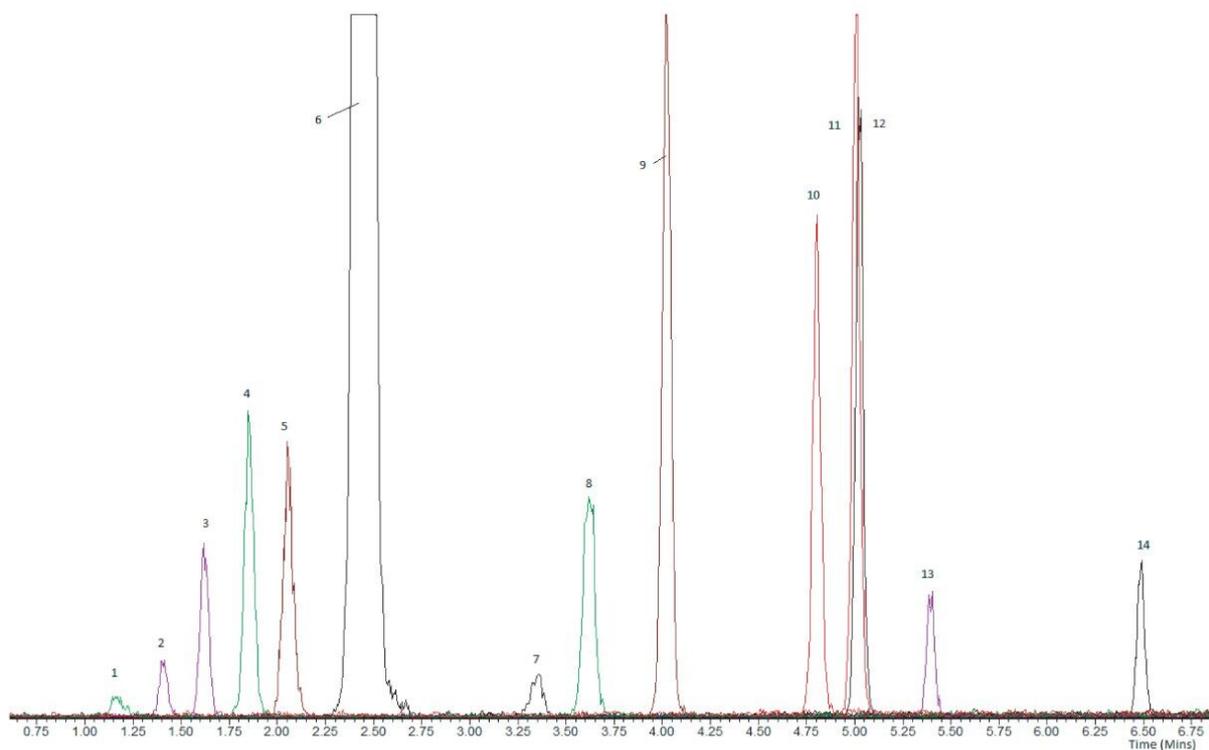


图2.使用MetaboQuan-R平台得到的14种类固醇的UPLC分离结果，其中包括5组同量异位类固醇A-E（1.醛固酮 2.18-羟基皮质酮 3.可的松 4.皮质醇 5.11-酮基雄烯二酮 6.11-酮基睾酮 7.21-脱氧皮质醇 8.皮质酮 9.11-脱氧皮质醇 10.雄烯二酮 11.睾酮 12.11-脱氧皮质酮 13.17-羟孕酮 14.孕酮）。

图3所示的色谱图显示了两种类固醇17-羟孕酮与11-脱氧皮质酮之间的同量异位物质干扰。我们可以清楚地看到，两种类固醇具有相同的母离子和子离子（MRM通道331.2 > 97.0）。图3中最上方色谱图来自提取的混合人血浆样品，其中显示了17-羟孕酮峰以及其它背景峰，说明类固醇分析需要良好的色谱分离度。该MetaboQuan-R色谱方法不仅能够成功将17-羟孕酮峰与另一种目标干扰类固醇11-脱氧皮质酮分离，还可以将其与至少6种其它未知的内源同量异位物质分离。

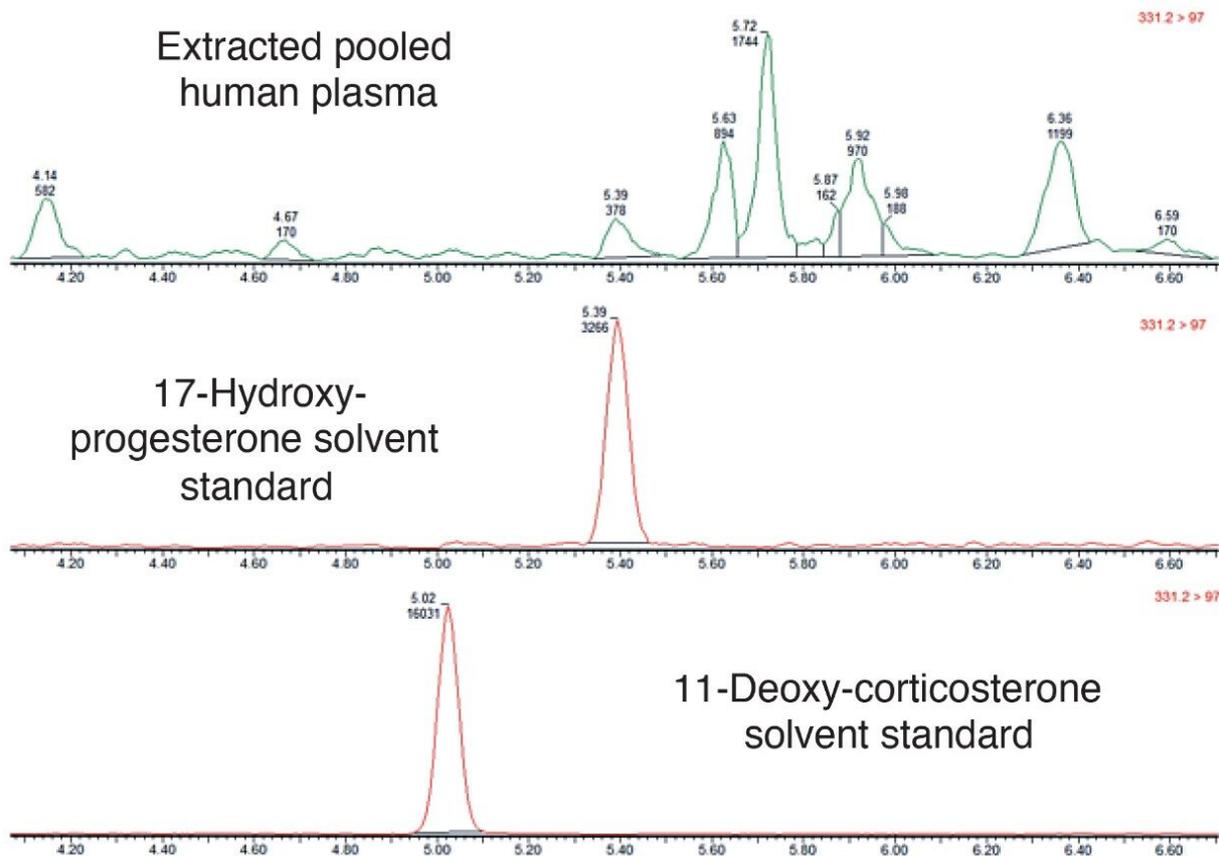


图3.使用MRM通道331.2 > 97.0时提取的人血浆以及2种同量异位类固醇17-羟孕酮和11-脱氧皮质酮溶剂标准品的UPLC色谱图

## 结论

本研究开发出一种快速UPLC-MS/MS方法用于对人血浆/血清中的14种内源性类固醇进行研究分析。该方法经证实适用于分析人血浆和血清中生理相关水平的类固醇。该方法利用灵活的反相UPLC-MS/MS平台，可应用于多种化合物类别（包括胆汁酸、游离脂肪酸、氨基酸、胰蛋白酶肽、酰基肉碱和脂质）；因此，该方法可以应用于靶向多组学工作流程中后续运行的部分分析，从而分析多种化合物。

---

## 参考文献

1. Utilizing UPLC Separation to Enable the Analysis of 19 Steroid Hormones in Serum for Clinical Research (Waters Technical Note Number [720006872EN](#) <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006832en.pdf>> , Wardle *et.al*).

---

## 特色产品

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

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

[MassLynx MS软件](https://www.waters.com/513662) <<https://www.waters.com/513662>>

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

[Quanpedia](https://www.waters.com/10148049) <<https://www.waters.com/10148049>>

720006936ZH, 2020年6月