

应用纪要

值得信赖的校准品：类固醇激素LC-MS/MS分析用MassTrak内分泌类固醇校准品和质控套装

Dominic Foley, Lisa J. Calton

Waters Corporation

摘要

类固醇激素的代谢途径可能会影响性征、炎症和血压，执行常规分析对于了解这些代谢途径的功能至关重要。液质联用法(LC-MS)相比传统配体结合技术具有明显优势，正迅速成为一种受到追捧的类固醇分析技术。这些优势包括分析灵敏度和选择性的改善以及能够在单次运行中定量检测多种分析物。但是，许多LC-MS方法缺乏一致化与标准化。Waters MassTrak内分泌类固醇校准品和质控套装(IVD)包含量值可溯源的校准品，有助于实验室遵守ISO 15189，结合使用经验证的LC-MS方法可提高对结果准确度的信心。

使用ACQUITY UPLC I-Class PLUS与Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪联用系统和内部开发的LC-MS/MS方法证明了MassTrak内分泌类固醇校准品和质控套装的性能。

优势

- 量值可溯源的校准品和质控品(QC)有助于实验室遵守ISO 15189
- 对类固醇激素的分析准确度充满信心，并推进实验室方法一致化
- 冻干校准品和质控品(QC)可缩短样品前处理时间

简介

类固醇生物合成途径可能会影响性征、炎症和血压，分析类固醇激素对于了解这些途径的功能障碍至关重要。

类固醇激素的分析过去使用配体结合技术，这些技术具有分析灵敏度高和高度自动化的特点，可实现高通量样品分析。但是，该技术受限于无法检测分析物组合，并且易受所用试剂选择性的问题影响，该问题会影响结果可靠性，在类固醇激素浓度较低的情况下尤其如此。最近，LC-MS/MS已成为一种受到追捧的类固醇分析技术，该方法已被证实，在提供相似水平分析灵敏度的同时，还能够克服配体结合方法所存在的局限性。

临床实验室中的LC-MS/MS方法通常基于实验室开发测试(LDT)，并根据当地法规指南开展验证。这些指南不断发展，对临床方法的各方面遵守这些不断变化的法规提出了更高要求。例如，对用于生成和独立检查方法内校准准确度的校准品和质控品(QC)提出了要求。因此愈加需要量值可溯源的校准材料来代替内部自制材料，帮助遵守ISO 15189。

Waters MassTrak内分泌类固醇校准和质控套装(IVD) (图1) 的冻干血清中包含一系列类固醇激素，这些激素的来源可靠，因此具有高水平的计量学溯源性。为证明该产品中材

料的质量，我们使用固相萃取(SPE)技术，通过ACQUITY UPLC I-Class PLUS与Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪联用系统分离和检测样品，以概念论证的方式展示了这些材料的性能。



图1. Waters MassTrak内分泌类固醇校准和质控套装

实验

MassTrak内分泌类固醇校准品和质控套装的冻干血清中包含以下类固醇激素：硫酸脱氢表雄酮(DHEA-S)、皮质醇、21-脱氧皮质醇、皮质酮、11-脱氧皮质醇、雄烯二酮、11-脱氧皮质酮、睾酮、脱氢表雄酮(DHEA)、17-羟基孕酮(17-OHP)、二氢睾酮(DHT)和孕酮。校准范围及质控品(QC)的赋值浓度见表1。

类固醇激素	校准品范围 (nmol/L)	QC浓度 (nmol/L)
DHEA-S	61-29392	527, 4770, 19061
皮质醇	3-1388	30, 279, 931
21-脱氧皮质醇	0.14-141	0.64, 6.2, 94
皮质酮	0.14-141	0.65, 6.4, 93
11-脱氧皮质醇	0.15-144	0.64, 6.3, 94
雄烯二酮	0.17-169	0.74, 7.4, 114
11-脱氧皮质酮	0.03-59	0.11, 1.1, 40
睾酮	0.05-74	0.18, 1.7, 52
DHEA	0.90-224	2.9, 28, 110
17-OHP	0.15-293	0.66, 6.2, 207
DHT	0.10-8.2	0.35, 3.4, 5.8
孕酮	0.08-164	0.40, 3.6, 114

表1. MassTrak内分泌类固醇校准品和质控套装的浓度范围

执行样品前处理和分析之前，按照使用说明(IFU)复溶校准品和质控品(QC)。

样品描述

样品前处理过程依次采用蛋白沉淀法和固相萃取(SPE)。

蛋白沉淀法

向125 μ L血清样品中加入25 μ L内标(SIL)的50/50 (v/v)甲醇/水溶液，混合1 min。加入250 μ L甲醇，然后混合5 min。用550 μ L水稀释该样品，然后混合1 min，再以5000 g离心10 min。

固相萃取

先后使用150 μ L甲醇和水活化和平衡Oasis MAX μ Elution板。取625 μ L上清液上样至SPE板，取10 μ L上清液（用于DHEA-S）直接转移至1 mL 96孔收集板中。依次使用150 μ L 1%甲酸的10%乙腈溶液和150 μ L 1%氨的10%乙腈溶液清洗。将样品用35 μ L 60%乙腈洗脱至1 mL 96孔收集板中，其中已包含10 μ L蛋白沉淀上清液。加入35 μ L 50 mM碳酸氢铵溶液（pH 7.4，含0.03%乙酸），混合1 min并密封

，然后进样至LC-MS/MS系统。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC I-Class PLUS FTN
进样针：	30 μ L
色谱柱：	CORTECS C ₈ , 90 $\text{\AA}$, 2.1 mm $\times$ 100 mm, 2.7 μ m
预柱：	CORTECS C ₈ VanGuard小柱, 2.1 mm $\times$ 5 mm, 2.7 μ m
柱温：	50 $^{\circ}$ C
样品温度：	8 $^{\circ}$ C
进样体积：	25 μ L
流速：	0.3 mL/min
流动相A：	0.1 mM氟化铵水 溶液
流动相B：	0.1 mM氟化铵的 甲醇溶液

运行时间：7.8 min

Gradient Table

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.300	60	40	初始
1.25	0.300	60	40	6
3.00	0.300	47.5	52.5	6
4.00	0.300	47.5	52.5	6
5.00	0.300	35	65	6
6.25	0.300	10	90	11
7.00	0.600	60	40	11
7.60	0.300	60	40	11

质谱条件

质谱系统：Xevo TQ-S
micro三重四极
杆质谱仪

电离模式：ESI+/ESI-

毛细管电压：2.5 kV

MRM Parameters

分析物	MRM		锥孔电压 (V)	碰撞电压 (V)	扫描窗口 (min)
DHEA-S	367.2>97.0	定量离子	40	30	1.00-2.00
	367.2>80.0	定性离子	40	80	
	373.2>98.0	SIL	40	30	
皮质醇	363.3>121.1	定量离子	40	24	2.50-4.70
	363.3>91.1	定性离子	40	24	
	366.3>124.1	SIL	40	24	
21-脱氧皮质醇	347.3>121.1	定量离子	40	24	2.50-4.70
	347.3>311.2	定性离子	40	14	
	351.3>121.1	SIL	40	24	
皮质酮	347.3>121.1	定量离子	40	24	2.50-4.70
	347.3>97.1	定性离子	40	24	
	351.3>121.1	SIL	40	24	
11-脱氧皮质醇	347.3>97.1	定量离子	40	24	2.50-4.70
	347.3>109.1	定性离子	40	24	
	350.3>100.1	SIL	40	24	
雄烯二酮	287.3>97.1	定量离子	70	24	4.71-5.80
	287.3>109.1	定性离子	70	24	
	290.3>100.1	SIL	70	24	
11-脱氧皮质酮	331.3>97.1	定量离子	70	22	4.71-5.80
	331.3>109.1	定性离子	70	22	
	334.3>100.1	SIL	70	22	
睾酮	289.3>97.1	定量离子	70	22	4.71-5.80
	289.3>109.1	定性离子	70	22	
	292.3>100.1	SIL	70	22	
DHEA	271.3>213.3	定量离子	40	14	4.71-5.80
	271.3>197.3	定性离子	40	16	
	274.3>216.3	SIL	40	14	
17-OHP	331.3>97.1	定量离子	70	22	4.71-5.80
	331.3>109.1	定性离子	70	22	
	334.3>100.1	SIL	70	22	
DHT	291.3>255.3	定量离子	40	14	5.80-6.80
	291.3>159.2	定性离子	40	18	
	294.3>258.3	SIL	40	14	
孕酮	315.3>97.1	定量离子	70	24	5.80-6.80
	315.3>109.1	定性离子	70	24	
	318.3>100.1	SIL	70	24	

Method Events

时间	事件	操作
0.01	液流状态	废液
1.01	液流状态	液相色谱
6.75	液流状态	废液

数据管理

质谱软件：带TargetLynx
XS的MassLynx
4.2版

结果与讨论

12种类固醇激素使用CORTECS C₈, 2.7 μm, 2.1 mm × 100 mm色谱柱实现了色谱分离，其中单独使用MRM无法区分的类固醇激素异构体获得了基线分离（图2），包括21-脱氧皮质醇、皮质酮和11-脱氧皮质醇的分离，以及11-脱氧皮质酮和17-OHP异构体对的分离。

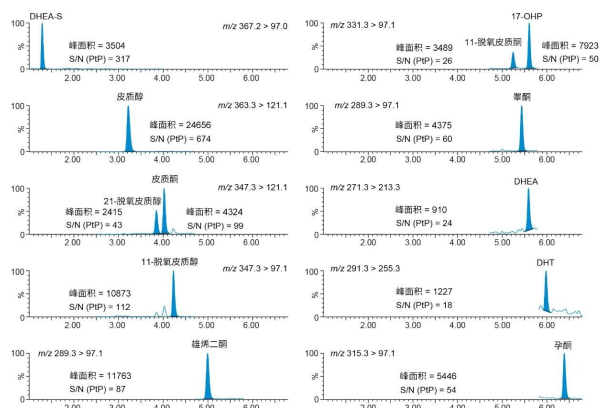


图2. 使用ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ-S micro IVD系统分析MassTrak内分泌类固醇校准品套装中C1校准品提取物的性能特征

12种类固醇激素的校准曲线平均 r^2 值高于0.994，证明在校准范围内呈线性。通过评估低浓度类固醇激素校准标样(C1)的信噪比(S/N)，确定该方法的分析灵敏度。在五次分析运行中，校准品1各浓度下的S/N (PtP)均高于10。结果汇总于表2中，低浓度校准品的S/N示例也可参见图2。

化合物	校准品范围 (nmol/L)	平均 r^2	校准品1下的平均 S/N (PtP)
DHEA-S	61-29392	0.994	186
皮质醇	3-1388	0.997	277
21-脱氧皮质醇	0.14-141	0.996	26
皮质酮	0.14-141	0.995	52
11-脱氧皮质醇	0.15-144	0.999	86
雄烯二酮	0.17-169	0.999	79
11-脱氧皮质酮	0.03-59	0.996	20
睾酮	0.05-74	0.995	59
DHEA	0.90-224	0.994	27
17-OHP	0.15-293	0.995	55
DHT	0.10-8.2	0.998	16
孕酮	0.08-164	0.998	42

表2. *MassTrak*内分泌类固醇校准品套装中类固醇激素的校准线性和分析灵敏度性能汇总

我们在五天内每天对三个浓度的质控品(QC)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密度和重现性。DHEA-S的低、中和高浓度分别为527、4770和19061 nmol/L；皮质醇的低、中和高浓度分别为30、279和931 nmol/L；21-脱氧皮质醇的低、中和高浓度分别为0.64、6.2和94 nmol/L；皮质酮的低、中和高浓度分别为0.65、6.4和93 nmol/L；11-脱氧皮质醇的低、中和高浓度分别为0.64、6.3和95 nmol/L；雄烯二酮的低、中和高浓度分别为0.74、7.4和114 nmol/L；11-脱氧皮质酮的低、中和高浓度分别为0.11、1.1、40 nmol/L；17-OHP的低、中和高浓度分别为0.66、6.2和207 nmol/L；DHEA的低、中和高浓度分别为2.9、28和110 nmol/L；DHT的低、中和高浓度分别为0.35、3.4和5.8 nmol/L；孕酮的低、中和高浓度分别为0.40、3.6和114 nmol/L。确定所有类固醇激素在三种QC浓度下的总精密度和重现性为 $CV \leq 7.7\%$ （图3）。

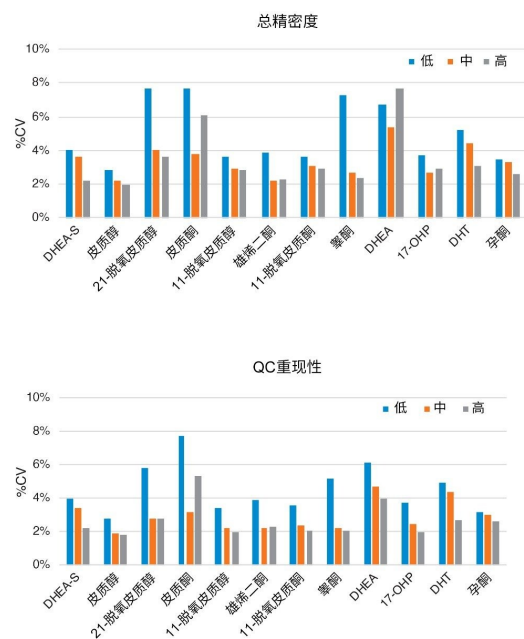


图3.MassTrak内分泌类固醇质控套装中12种类固醇激素分析的总精密度和重现性

此外，我们评估了五次分析运行中质控品(QC)与校准品相比的准确度。三种浓度下12种类固醇激素的质控品(QC)平均准确度范围为91.0%~112.4%（表3）。

分析物	QC准确度		
	Q1	Q2	Q3
DHEAS	91%	102%	112%
皮质醇	102%	106%	98%
21-脱氧皮质醇	99%	100%	109%
皮质酮	102%	96%	108%
11-脱氧皮质醇	103%	100%	103%
雄烯二酮	100%	97%	103%
11-脱氧皮质酮	104%	98%	103%
睾酮	106%	107%	99%
DHEA	102%	100%	100%
17-OHP	105%	101%	99%
DHT	109%	108%	111%
孕酮	102%	105%	97%

表3.MassTrak内分泌类固醇质控套装
在五次分析运行中以三种浓度重复分
析五次的准确度

通过分析英国NEQAS的EQA样品评估DHEA-S、皮质醇、雄烯二酮、睾酮、17-OHP和孕酮的分析准确度。然后将所得数据与样品的质谱法平均值（孕酮为ALTM，因为其LC-MS值不可得）进行比较，并对数据集进行Altman-Bland一致性分析。DHEA-S、皮质醇、雄烯二酮、睾酮、17-OHP和孕酮数据的Altman-Bland一致性分析显示，平均方法偏差在 $\pm 7.8\%$ 范围内，表明该方法分析类固醇激素所得的结果与EQA方法所得到的值相比，具有良好的一致性（图4a-f）。

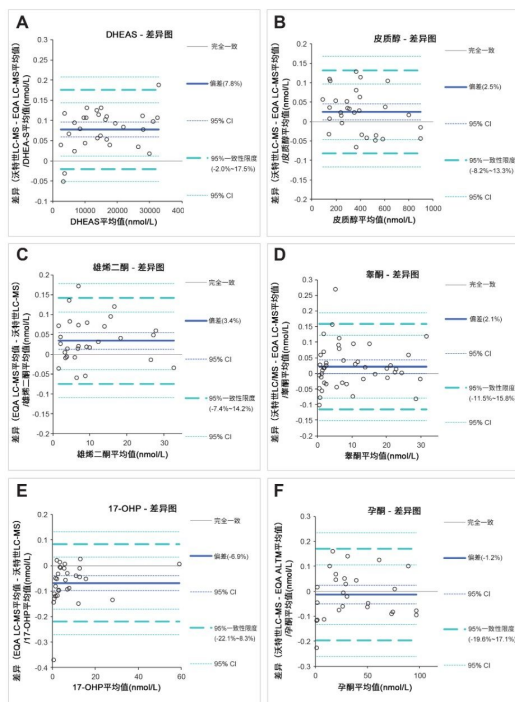


图4.Altman-Bland一致性分析，对比了沃特世LC-MS/MS方法结果与EQA方案MS方法平均结果：(a) DHEA-S、(b)皮质醇、(c)雄烯二酮、(d)睾酮、(e) 17-OHP和(f)孕酮（ALTM平均值）。

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一致性分析结果表明，与所有实验室平均值(n ≥ 8)相比，平均偏差为6.6%（范围为-1%~13%）。

结论

本性能论证评估表明，MassTrak内分泌类固醇校准品和质控套装(IVD)能够对血清中12种类固醇激素的定量提供优异的

分析精密度和准确度。

ACQUITY UPLC I-Class PLUS与Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪联用系统能够提供足够高的分析灵敏度，只需使用125 µL样品即可分析该套装中的低含量类固醇激素。经证明，该套装在整个校准范围内具有优异的精密度水平，总精密度和重现性为 $CV \leq 7.7\%$ 。此外，QC套装的准确度范围为91.0%~112.4%。还通过与EQA样品的一致性分析展示了计量学溯源性，该方法与来自EQA（DHEA-S、皮质醇、雄烯二酮、睾酮、17-OHP和孕酮）和RCPA（DHT）的样品具有良好的一致性，与方案的方法平均值相比，平均方法偏差在 $\pm 7.8\%$ 范围内。

免责声明

该方法是本文所述仪器、软件和消耗品的一个应用示例。该方法尚未经任何监管实体许可用于诊断目的。最终用户须自行完成方法开发和验证。*MassTrak*内分泌类固醇校准品和质控套装仅在部分国家/地区销售。详细订购信息请咨询您当地的销售代表。

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <

<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <

<https://www.waters.com/134798856>>

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

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

720007401ZH, 2021年10月

© 2023 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](#)