

使用Waters MassTrak™类固醇血清套装2和套装3定量分析血清中的皮质类固醇和雄激素

Laura Moran, Dominic Foley, Niall Tobin, Norma Breen, Leanne Davey

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

本文介绍了一种使用UPLC-MS/MS技术定量分析人血清中7种内分泌类固醇激素的临床研究方法。

优势

- 色谱临床研究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样品通量的LC-MS/MS分析
- 睾酮、雄烯二酮、17-OHP、DHEAS、皮质醇、11-脱氧皮质醇和21-脱氧皮质醇的分析结果与EQA质谱法平均值和内部样品组平均值具有出色的一致性（±6%以内）
- 冻干标准曲线样品和QC样品可缩短样品前处理时间，有助于统一临床研究方法，并协助实验室按ISO 15189:2022要求进行计量学溯源。

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。参与类固醇生物合成途径的某些酶在这些代谢过程中发挥着关键作用。在临床研究中，通过准确测定类固醇激素，可以监测这些酶是否出现功能异常。

相较于传统的配体结合技术（例如免疫分析法），使用LC-MS/MS定量类固醇更有优势，因为该技术的分析灵敏度和选择性更高，还可以同时定量多种分析物。但是，许多LC-MS方法都不统一且未实现标准化。Waters MassTrak类固醇血清套装(IVD)以冻干血清为基质提供一系列类固醇激素，这些类固醇激素可进行计量学溯源，达到可用计量学溯源性的最高水平，有助于实验室满足ISO 15189要求，并让实验室对结果的准确度更有信心。

Waters MassTrak类固醇血清标准曲线样品套装2用于定量测定人血清中的雄激素和孕激素，协助监测生理标志物。MassTrak类固醇血清标准曲线样品套装3则用于定量测定人血清中的雄激素和糖皮质激素，协助监测生理标志物。

本文介绍了一种临床研究方法，该方法使用了Waters MassTrak类固醇血清套装2和3、标准曲线样品和QC样品，以及Waters Oasis™ PRiME HLB μElution板技术。其中，将Oasis™ PRiME HLB μElution板技术与Hamilton™ Microlab STAR液体处理器配合使用，以自动化的方式提取血清样品中的睾酮、雄烯二酮、17-羟孕酮(17-OHP)、脱氢表雄酮硫酸盐(DHEAS)、皮质醇、11-脱氧皮质醇和21-脱氧皮质醇。色谱分离使用配备ACQUITY UPLC HSS T3 Vanguard™保护柱和ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱的ACQUITY UPLC™ I-Class Plus (FL-I)系统，与Xevo™ TQ-S micro质谱仪联用（图1）。



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

实验

样品前处理

在本研究中，按说明书制备Waters MassTrak类固醇血清标准曲线样品套装2(186010563IVD)、MassTrak类固醇血清QC套装2(186010564IVD)、MassTrak类固醇血清标准曲线样品套装3(186010565IVD)和MassTrak类固醇血清QC套装3(186010566IVD)标准曲线样品和QC样品，以及MassTrak类固醇混合内标(186010567IVD)。

MassTrak类固醇血清标准曲线样品套装2和3、QC套装2和3包含浓度在一定范围内的下列分析物。

	化合物	标准曲线范围 (ng/mL)	QC范围 (ng/mL)
套装2	睾酮	0.01-20	0.03-9
	雄烯二酮	0.05-20	0.15-9
	17-OHP	0.1-100	0.3-80
	DHEAS	50-8000	150-5000
套装3	雄烯二酮	0.05-100	0.15-50
	17-OHP	0.3-300	0.5-150
	皮质醇	3-500	9-400
	11-脱氧皮质醇	0.1-100	0.3-70
	21-脱氧皮质醇	0.1-100	0.3-70

表1. MassTrak类固醇血清标准曲线样品套装2和3，QC套装2和3中各分析物的浓度范围。

(如需将SI单位换算为nmol/L，请将睾酮浓度乘以3.470 (ng/mL换算为nmol/L)、将雄烯二酮浓度乘以3.494 (ng/mL换算为nmol/L)、将17-OHP浓度乘以3.028 (ng/mL换算为nmol/L)、将DHEAS浓度乘以2.716 (ng/mL换算为nmol/L)、将皮质醇浓度乘以2.761 (ng/mL换算为nmol/L)、将11-脱氧皮质醇和21-脱氧皮质醇浓度乘以2.889 (ng/mL换算为nmol/L))。

样品萃取

萃取前，建议先将所有样品以3000 x g的离心力离心5分钟。萃取操作由Hamilton Microlab Star液体处理器完成。将25 µL MassTrak类固醇混合内标加入每孔100 µL的样品中。（混合内标中含有2 ng/mL睾酮¹³C₃、4 ng/mL雄烯二酮¹³C₃、10 ng/mL 17-OHP ¹³C₃、3000 ng/mL DHEAS ²H₆、100 ng/mL皮质醇¹³C₃、4 ng/mL 11-脱氧皮质醇¹³C₃和10 ng/mL 21-脱氧皮质醇²H₄）。向每个孔中加入200 µL LC-MS级甲醇和550 µL LC-MS级水。每次添加试剂之后充分混合样品。然后以4000 x g将样品离心5 min。

从每份预处理过的样品中取600 µL上样至Oasis PRiME HLB µElution板（P/N: [186008052 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/sample-preparation--filtration/186008052-oasis-prime-hlb-96-well--elution-plate-3-mg-sorbent-per-well-1-p.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/sample-preparation--filtration/186008052-oasis-prime-hlb-96-well--elution-plate-3-mg-sorbent-per-well-1-p.html)）的各个孔中，然后在低真空条件下(100 mbar)缓慢抽滤样品。接下来，分别使用150 µL 0.1% (v/v)氨水的35% (v/v)甲醇水溶液、150 µL 0.1% (v/v)甲酸的35% (v/v)甲醇水溶液进行清洗，以减少潜在的离子干扰。然后，使用30 µL 85/15 (v/v)乙腈/甲醇将分析物洗脱至收集板中，接着加入70 µL水。

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC I Class Plus (FL-I)系统
色谱柱:	ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱(2.1 × 50 mm, 1.8 µm) (P/N: 186003538)
保护柱:	ACQUITY UPLC HSS T3 Van Guard保护柱 (P/N: 186003976)
柱温:	50 °C
样品温度:	10 °C
定量环规格:	50 µL
进样针:	20 µL
进样体积:	20 µL
进样模式:	PLNO

流速:	0.6 mL/min
流动相A:	水+ 2 mM醋酸铵+ 0.1%甲酸
流动相B:	甲醇+ 2 mM醋酸铵+ 0.1%甲酸
强洗针液:	100%甲醇
弱洗针液:	40%甲醇水溶液
运行时间:	4.7 min
梯度:	见表1

MS条件

质谱系统:	Xevo TQ-S micro
分辨率:	MS1 (0.75FWHM), MS2 (0.50FWHM)
采集模式:	多重反应监测(MRM)
毛细管电压:	1.0 kV
极性:	ESI +/-
离子源温度:	150 °C
脱溶剂气温度:	600 °C
脱溶剂气流速:	1000 (L/h)
锥孔气流速:	50 (L/h)

MS扫描间延迟时间:	0.01 s
通道间延迟时间:	0.02 s
极性/模式扫描间切换:	0.015 s

数据管理

色谱/MS软件: 带TargetLynx的MassLynx 4.1版软件

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.600	55	45	初始
1.0	0.600	55	45	6
3.5	0.600	35	65	6
3.51	0.600	2	98	11
4.0	0.600	55	45	11

表2.用于分离类固醇激素的梯度表。初始条件下的操作反压约为9000~10000 *psi*。

结果与讨论

11-脱氧皮质醇和21-脱氧皮质醇这两种互为同分异构体的类固醇实现了基线分离，证明实验所用的色谱柱具有出色的选择性（请参阅2017年的应用纪要《分析血清中7种类固醇激素的临床研究》(720005999ZH <<https://www.waters.com/nextgen/global/library/application-notes/2017/analysis-of-corticosteroids-and-androgens-in-serum.html>>)，这篇应用纪要证明17-OHP和21-OHP以及睾酮和表睾酮可以实现分离)。单

独查看睾酮、雄烯二酮、17-OHP、DHEAS、皮质醇、11-脱氧皮质醇和21-脱氧皮质醇的分离结果，未在其保留时间处观察到明显干扰。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。使用每个套装中低浓度标准曲线样品(C1)的信噪比(S/N)来评估分析灵敏度，在多次分析运行中，每个标准曲线样品1的浓度下，信噪比均大于10:1。

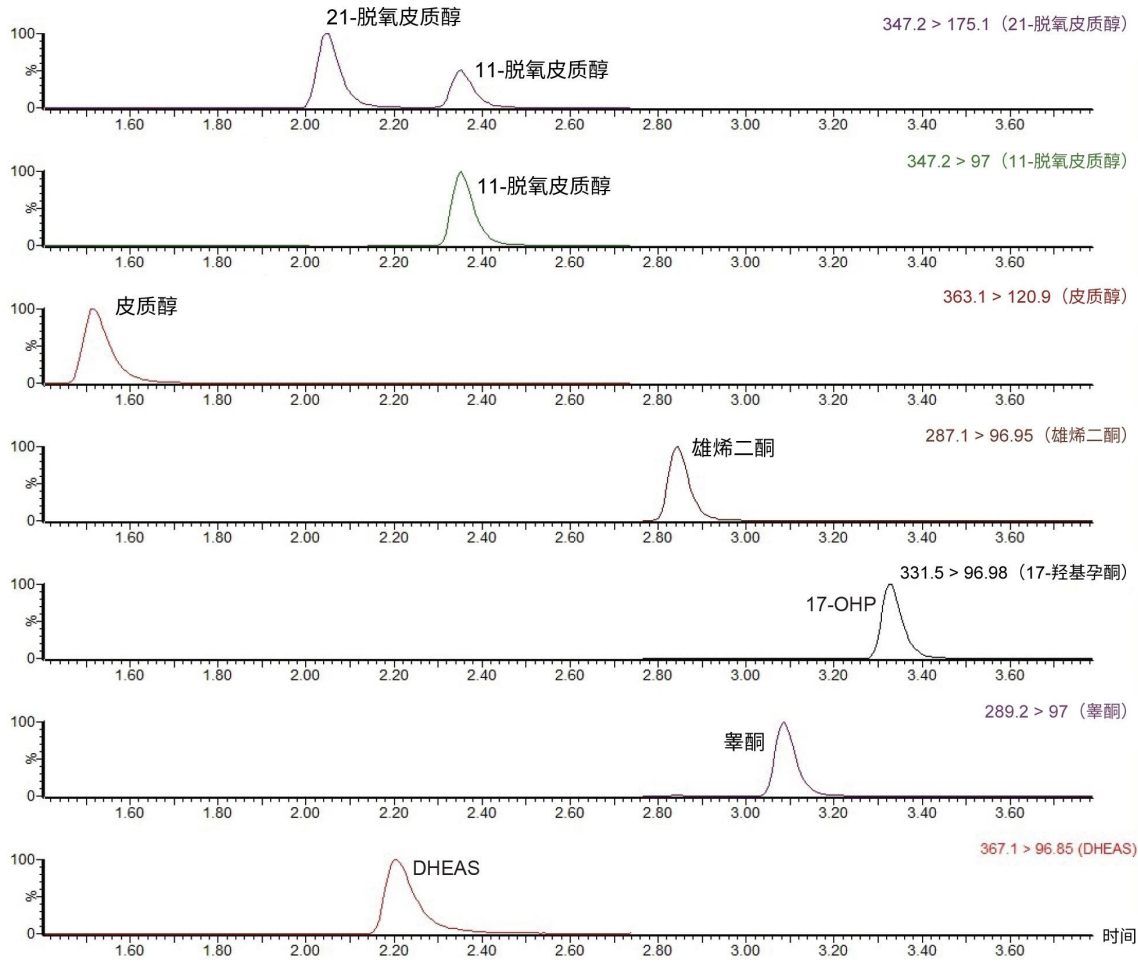


图2.ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱分离一系列类固醇激素的色谱选择性。

这种临床研究方法能够精确定量所有低浓度分析物。本研究在五天内每天在各个QC浓度萃取并定量两个重复样，以此确定该方法的总精密密度。在单次分析运行中，每个QC浓度分析四个重复样，以评估方法的重复性。所有分析物的所有结果<10%CV，大多数结果<5%CV。

套装	化合物	总精密度(%CV)				重复性(%CV)			
		QC 1	QC 2	QC 3	QC 4	QC 1	QC 2	QC 3	QC 4
套装2	睾酮	6.3	2.8	2.6	2.1	3.1	1.8	1.3	0.4
	雄烯二酮	2.5	2.3	3.2	3.9	1.5	1.8	1.00	0.8
	17-OHP	2.1	6.9	3.1	5.1	2.2	1.1	1.3	1.0
	DHEAS	3.3	2.7	2.7	3.3	4.8	4.4	2.5	2.0
套装3	雄烯二酮	1.6	1.9	1.7	1.2	0.8	0.8	0.4	1.2
	17-OHP	3.2	1.9	3.4	1.6	1.1	1.5	1.1	0.8
	皮质醇	1.6	1.1	2.2	1.3	0.3	0.5	1.7	0.9
	11-脱氧皮质醇	2.2	2.2	2.1	2.1	1.7	1.2	1.4	1.1
	21-脱氧皮质醇	9.9	9.0	3.8	3.8	5.7	2.2	3.1	1.7

表4.通过测定MassTrak类固醇血清标准曲线样品套装2和3的QC样品得出的MassTrak类固醇血清标准曲线样品套装2和3的总精密度和重复性。

分析以不同比例混合的低浓度和高浓度分析物混合样品得到的结果表明，在表1所列的标准曲线范围内，这种临床研究方法分析所有分析物时均呈线性。此外，本研究在5天内每天使用套装2和3创建标准曲线，结果显示标准曲线均呈线性，且所有分析物的决定系数(r^2)均大于0.999。

套装	化合物	线性决定系数(r^2)				
		第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
套装2	睾酮	1.0000	0.9998	0.9995	0.9997	0.9999
	雄烯二酮	0.9999	0.9999	0.9999	0.9997	0.9980
	17-OHP	1.0000	0.9997	0.9993	0.9994	0.9995
	DHEAS	0.9979	0.9996	0.9978	0.9985	0.9993
套装3	雄烯二酮	0.9998	0.9999	0.9996	0.9999	0.9999
	17-OHP	0.9991	0.9997	0.9988	0.9990	0.9994
	皮质醇	0.9993	0.9999	0.9992	0.9998	0.9998
	11-脱氧皮质醇	0.9986	0.9993	0.9997	0.9992	0.9999
	21-脱氧皮质醇	0.9999	0.9999	0.9993	0.9996	0.9998

表5.五天内每个套装中每种分析物的线性决定系数。

通过分析EQA样品评估睾酮、雄烯二酮、17-OHP、DHEAS和皮质醇的分析准确度。将四天内测得的数据与各EQA样品的质谱方法平均值比较，并将测定值相较于目标值的平均偏差百分比制成表格（表6）。本研究在每个MassTrak类固醇血清套装标准曲线的低、中和高浓度评估了所有分析物的分析准确度，在这整个范围内都得到了优异的结果($\pm 10\%$)。由于缺少可用的11-脱氧皮质醇和21-脱氧皮质醇EQA样品，本研究使用内部样品组评估了这两种化合物在低浓度和中等浓度范围内的分析准确度。本研究还执行了Deming回归分析和线性回归分析（表

7)。未观察到有化合物存在显著的统计学偏差，套装2和3的平均方法偏差分别为±1.3%和±1.0%。

化合物		低	中	高	N=	相较于目标值的平均偏差百分比	
套装2	睾酮	106%	93%	93%	52	96%	EQA样品
	雄烯二酮	98%	95%	98%	56	95%	
	17-OHP	93%	107%	110%	56	102%	
	DHEAS	103%	94%	107%	54	101%	
套装3	雄烯二酮	94%	97%	101%	56	98%	内部样品组
	17-OHP	97%	107%	110%	48	102%	
	皮质醇	107%	104%	101%	42	104%	
	11-脱氧皮质醇	98%	106%	n/a	54	102%	
	21-脱氧皮质醇	101%	99%	n/a	51	100%	

表6.准确度汇总表，EQA样品 - 沃特世实测浓度与LCMS法EQA平均目标浓度之间的偏差百分比。由于缺少可用的11-脱氧皮质醇和21-脱氧皮质醇EQA样品，本研究使用内部样品组评估了这两种化合物在低浓度和中等浓度范围内的分析准确度。

化合物		样品	Deming回归方程	平均偏差	线性拟合(r)
套装2	睾酮	54	$y=0.061 + 0.922x$	-3.93%	1.000
	雄烯二酮	58	$y=0.064 + 0.984x$	-3.52%	0.999
	17-OHP	56	$y=-0.298 + 1.109x$	1.50%	0.999
	DHEAS	54	$y=-116.9 + 1.080x$	0.63%	0.999
套装3	雄烯二酮	56	$y=-0.113 + 1.019x$	-2.38%	0.999
	17-OHP	48	$y=-0.210 + 1.102x$	2.13%	1.000
	皮质醇	42	$y=4.028 + 0.995x$	3.49%	0.999
	11-脱氧皮质醇	54	$y=-0.027 + 1.063x$	1.73%	1.000
	21-脱氧皮质醇	51	$y=-0.003 + 0.994x$	0.05%	0.999

表7.Deming回归分析，对比了采用沃特世LC-MS/MS方法和EQA方案MS方法分析睾酮、雄烯二酮、17-OHP、DHEAS和皮质醇的结果。11-脱氧皮质醇和21-脱氧皮质醇与低浓度和中等浓度范围的内部分样品组比较。

结论

本性能论证评估表明，MassTrak类固醇血清标准曲线样品和质控套装2和3 (IVD)能够精准定量血清中的类固醇激素。本研究使用Waters Xevo TQ-S micro (FL)开发了一种高灵敏度、高选择性的临床研究方法，适用于分析血清样品中的睾酮、雄烯二酮、17-OHP、DHEAS、皮质醇、11-脱氧皮质醇和21-脱氧皮质醇。

Xevo TQ-S micro质谱仪赋予了这种临床研究方法足够高的分析灵敏度，仅使用100 µL样品即可测定低浓度的睾酮、雄烯二酮、17-OHP、DHEAS、皮质醇、11-脱氧皮质醇和21-脱氧皮质醇。

通过与EQA LC-MS/MS平均值以及内部样品组和QC样品比较，本研究确认了该方法分析睾酮、雄烯二酮、17-OHP、DHEAS、皮质醇、11-脱氧皮质醇和21-脱氧皮质醇的准确度(±6%)和精密度(±10%)。自动化装置或液体处理器的加入（具体而言，本研究使用的是Hamilton Microlab STAR）改进了实验室工作流程，有助于避免操作人员失误。

免责声明

该临床研究方法是本文所述仪器、软件和消耗品的一个应用示例。该临床研究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内分泌类固醇标准曲线样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。

参考资料

Foley D, Calton L. 分析血清中7种类固醇激素的临床研究。沃特世应用纪要，[72005999ZH](#)，2017年5月。

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质谱软件 <https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)

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

72008138ZH，2023年12月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)
[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)