

## 基于SCIEX LC-MS/MS系统对血浆中游离睾酮检测

# Detection of free testosterone in plasma based on sciex LC-MS/MS system

裴旭哲, 刘瑞琛, 黄超, 赵祥龙, 郭立海

Pei Xuzhe, Liu Ruichen, Huang Chao, Zhao Xianglong, Guo Lihai

**Keywords:** Free Testosterone, plasma

### 引言

睾酮又称睾丸酮/睾甾酮, 是一种类固醇荷尔蒙, 由男性睾丸或女性卵巢分泌, 肾上腺亦分泌少量睾酮, 具有维持肌肉强度及质量、维持骨质密度及强度、提神及提升体能等作用。在血清中睾酮以两种形态存在, 即游离态和结合态(与性激素结合球蛋白相结合), 其中以游离状态存在的睾酮称为游离睾酮, 游离睾酮可进入细胞, 并激活相应的受体发挥其激素作用。

尽管游离睾酮的作用很多, 但其仅占总睾酮水平2-3%, 尤其女性、小孩含量在pg/ml级别, 游离睾酮的测定能克服睾酮结合蛋白浓度变化产生的影响, 直接反映具有生物学活性的游离睾酮水平, 对许多患有多毛症妇女或者性激素结合球蛋白率低的情况, 血清中的总睾酮往往处在正常范围内, 而测定游离睾酮水平, 90%以上存在明显增高现象, 表明游离睾酮比总睾酮能精准的反映相关疾病特征, 同时游离睾酮测定也是一种间接测量性激素结合球蛋白在血液中水平的方法因游离睾酮在血浆中含量较低, 浓度通常在pg/ml范围, 女性甚至低至1pg/ml, 因此游离睾酮检测面临着较大的挑战, 本方法可最低定量限可至1pg/ml, 无需衍生灵敏度高、检测限低。

## 一、实验部分

### 1. 样品前处理

#### 平衡透析法:

#### 前处理流程

1. 取适量的血浆样品放入平衡透析装置样品室, 取等量PBS溶液放入平衡装置缓冲室, 以37 °C平衡16 h;

2. 准确量取400  $\mu$ L缓冲室溶液于1.5 mL塑料离心管中, 加入20  $\mu$ L同位素内标混合工作液(200 pg/mL), 涡旋1 min;
3. 加入900  $\mu$ L甲基叔丁基醚不定时涡旋20 min, 15000 rpm离心10 min后取800  $\mu$ L上清液。
4. 氮吹至干加入50  $\mu$ L甲醇水(50%)涡旋超声10 min并以15000 rpm离心3 min, 取上清液进样。

## 2. 色谱质谱方法

### 色谱条件:

色谱柱: 飞诺美Kinetex® F5 (2.6  $\mu$ m, 2.1  $\times$  100 mm)

流速: 0.5 ml/min

流动相: A: 水溶液, B: 甲醇溶液

柱温: 40°C

梯度洗脱, 液相梯度见表1。

表1. 洗脱梯度

时间 ( min )	A(%)	B(%)
0	38	62
5	38	62
5.2	0	100
6	0	100
6.1	38	62
8.5	38	62

### 质谱条件:

采用正电喷雾离子源 (Electrospray Ionization, ESI) 和多反应监测 (Multiple Reaction Monitoring, MRM) 模式进行质谱检测。

离子源参数: 喷雾针 (Ionspray, IS) 正模式电压为+ 5500V, 加热气 (Gas1) 和辅助加热气 (Gas2) 分别为60 psi和70 psi, 脱溶剂气温度为600 °C; 气帘气 (Curtain Gas, CUR) 为30 psi, 碰撞气 (Collision Gas, CAD) 为Medium。为了获取较好的稳定性和灵敏度, 各化合物监测离子对的去簇电压 (Declustering Potential, DP) 和碰撞电压 (Collision Energy, CE), 目标物离子对以及内标物监测离子对等参数均经过系统优化, 离子对信息见表2:

表2. 离子对及电压参数

Q1	Q3	DWELL	ID	DP	CE
289.3	97.1	100	FT-1*	50	11
289.3	109.1	100	FT-2	50	12
292.4	109.1	100	FT-d3-1	50	10
292.4	97.1	100	FT-d3-2	50	11

备注: 化合物对于离子源气参数敏感, 且原型类和代谢物类的最优源气参数不同, 为保障灵敏度充分满足要求, 建议在实验仪器上进行柱上FIA源气参数优化, \*为定量离子对。

## 2. 结果与讨论

以PBS为模拟基质, 考察了游离睾酮灵敏度及峰形情况, 实验结果表明游离睾酮检测峰型良好, 如图1。

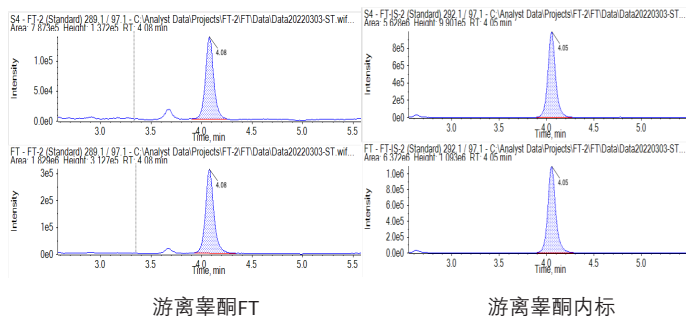


图1. 游离睾酮及内标图谱

以PBS为模拟基质, 配制混合标曲溶液, 按上述前处理步骤进行处理, 制作标准工作曲线 (浓度单位均为pg/mL)

表3. PBS基质标准曲线

系列	游离睾酮
STD1	1.00
STD2	2.00
STD3	5.00
STD4	10.00
STD5	20.00
STD6	100.00
STD7	200.00
线性方程	$Y=0.01746X+0.00256$
相关系数R	0.99942

游离睾酮 (加标量20 µl) 加标回收率为99~106.4%之间, RSD为3.6%, 精密度良好, 满足方法学要求。

化合物	加标浓度	未加标样品浓度	加标样品测试浓度	回收率 %	RSD %
Testosterone	1ng/ml	23.93	73.32	102.4	3.6%
	1ng/ml	21.55	73.63	106.4	
	1ng/ml	25.25	72.17	99.0%	

### 基质效应 ——考察替代基质的一致性

采用替代基质PBS, 配置三种溶液: A (用替代基质配置的校准点);

B (实际人群样本); C (分别将替代基质配置的校准点和实际人群样本1:1混合)。实测值=样本C的浓度, 理论值=样本A浓度×0.5+样本B浓度×0.5;

基质效应:  $= (\text{实测值}/\text{理论值}) \times 100\%$ 。

实际结果: A=53.85pg/ml; B=2608.96pg/ml; C=1241.77pg/ml。基质效应=93.27%, 符合要求。

### 3. 小结

针对现有技术中游离睾酮检测时所需样本体积大、样品需要衍生化处理、检测耗时长、检测精确度不高和检测下限难以突破的技术问题，本方法基于SCIEX Triple Quad™ 液相色谱串联质谱系统，结合平衡透析法建立血浆中游离睾酮检测，可对血浆中游离睾酮进行快速的定性和定量分析并具有特异性高、线性好、准确度高优点，可以满足临床检测需要。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15411-ZH-A



#### SCIEX中国

北京分公司  
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院  
1号楼5层  
电话：010-5808-1388  
传真：010-5808-1390

全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心  
上海市长宁区福泉北路518号  
1座502室  
电话：021-2419-7201  
传真：021-2419-7333

官网：[sciex.com.cn](http://sciex.com.cn)

广州办公室  
广州国际生物岛星岛环北路1号  
B2栋501、502单元  
电话：020-8842-4017

官方微信：[SCIEX-China](#)