

SCIEX 液相色谱串联质谱系统检测唾液中皮质醇和可的松

Determination of Cortisol and Cortisone in Saliva by SCIEX LC-MS/MS

刘丹 胡凤梅 黄超

Liu Dan, Hu Fengmei, Huang Chao

SCIEX应用支持中心, 中国

SCIEX, China

皮质醇作为肾上腺分泌的主要糖皮质激素, 在调节情绪和健康、维持免疫细胞和炎症、血管和血压之间的联系等方面具有重要功能。对血清、尿液或唾液中的皮质醇进行检测可用于评价下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA) 功能。可的松是皮质醇代谢物, 二者生理节律及化学结构相似。

库欣综合征, 是由于多种原因引起的肾上腺皮质长期分泌过多的糖皮质激素所产生。体内皮质醇升高是其最主要的生化诊断依据。午夜唾液皮质醇水平作为库欣综合征的实验室一线筛查指标已得到国际认可, 具有优异的诊断特异性和敏感性。除了库欣综合征, 唾液皮质醇也可用于肾上腺皮质功能减退症患者的诊断及治疗监测。

唾液采集有很多优点, 如无创、简单、且不受样本采集时间和地点的限制等, 更容易被患者所接受。液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 可准确检出唾液中较低浓度的皮质醇, 可应用于相关疾病的临床诊断及科学研究。

实验部分

1、样品前处理

准确量取200 μ L唾液样品于塑料离心管中, 加入10 μ L同位素内标混合标准工作液和200 μ L乙腈, 涡旋混匀1 min, 14000 r/min离心5 min, 取上清液再加入100 μ L 0.3%甲酸溶液混匀, 待LC-MS/MS分析。

2、检测方法

色谱条件: 使用Kinetex C18进行分离, 流动相选用0.1%甲酸水

溶液作为A相, 0.1%甲酸甲醇作为B相, 柱温设为40 $^{\circ}$ C, 进样量20 μ L, 进行梯度洗脱, 液相梯度见表1。

表1. 液相梯度洗脱条件

Time(min)	Flow rate(mL/min)	A%	B%
0.2	0.35	90	10
1	0.35	45	55
2	0.35	25	75
3	0.35	10	90
3.5	0.35	10	90
3.51	0.35	90	10
4.5	0.35	90	10

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 (GS1) 和辅助加热气 (GS2) 分别为50和45psi, 脱溶剂气温度为500 $^{\circ}$ C; 气帘气 (Curtain Gas, CUR) 为30 psi, 碰撞气 (Collision Gas, CAD) 为8。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. 待测组分和内标物质的质谱参数

中文名	英文名	Q1	Q3	DP/V	CE/V
可的松	cortisone*	361.2	163.1	100	32
	cortisone	361.2	121	100	40
皮质醇	cortisol*	363.2	121	100	34
	cortisol	363.2	327.1	100	24
可的松-d8	cortisone-d8	369.2	169.1	100	32
皮质醇-d4	cortisol-d4	367.1	121.1	100	34

* 定量离子

结果与讨论

以PBS为模拟基质，考察了皮质醇和可的松在定量下限0.125 ng/ml的出峰和响应情况，结果表明化合物峰型良好，S/N > 10，符合定量要求。具体色谱图见图1。

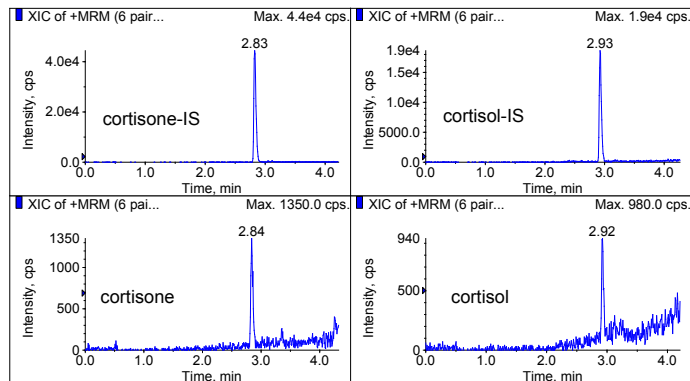


图1. PBS为基质0.125 ng/ml (LLOQ) 中皮质醇和可的松及内标提取色谱图

以PBS为替代基质，加入皮质醇和可的松混合对照溶液分别制成0.125 ng/mL~20 ng/mL的溶液，按上述前处理步骤进行处理，制作标准工作曲线。结果表明，各待测物在各自的标曲范围内线性良好，r > 0.998，满足生物样本分析相关要求。

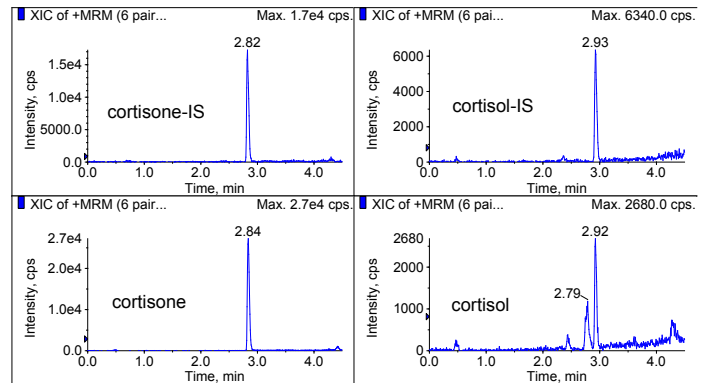


图2. 人唾液样本中皮质醇和可的松及其内标提取色谱图

表3. 典型PBS基质标准曲线

中文名	英文名	线性方程	相关系数	标曲范围*
皮质醇	Cortisol	Y=0.47345x-0.01825	0.99868	0.125 – 20 ng/mL
可的松	Cortisone	Y=0.36290x-0.01549	0.99837	0.125 – 20 ng/mL

皮质醇和可的松不同浓度水平的批内准确度为97.17~102.88%，RSD为2.13~4.31%，精密度良好，满足方法学要求；批间准确度为106.09%~106.75%，RSD为3.81%~6.09%，精密度良好，满足方法学要求。

表4. 皮质醇和可的松准确度和精密度实验结果 (n=4)

化合物名称	理论浓度 ng/ml	批内			批间		
		Mean	RSD%	准确度%	Mean	RSD%	准确度%
可的松	0.4	0.407	3.52	101.73	0.43	3.81%	106.28%
	16	16.02	2.13	100.13	16.97	4.39%	106.09%
皮质醇	0.4	0.412	3.11	102.88	0.43	3.86%	106.75%
	16	15.547	4.31	97.17	17.08	6.09%	106.72%

总结

唾液样本采集是相对无创、无痛苦、方便的采样方法，更易被样本收集者接受。本实验在AB SCIEX Triple Quad™ 4500MD平台上建立了一种LC-MS/MS检测唾液中皮质醇和可的松浓度的方法，本方法采用ESI+电喷雾离子源和MRM多反应监测模式，可对唾液中皮质醇和可的松进行快速的定性和定量分析。该方法简单快速、特异性高、准确度高等优点，可以满足临床监测的需要，辅助临床医生对疾病的快速、精准诊断和筛查。

仅限专业展会等使用、仅向专业人士提供的内部资料。

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. 或在英国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14635-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：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：SCIEX-China