

基于SCIEX LC-MS/MS系统建立血浆中7-酮胆固醇的检测方法

Determination of 7-KC in plasma with SCIEX LC-MS/MS system

刘丹, 胡凤梅, 黄超, 赵祥龙, 郭立海

Liu Dan, Hu Fengmei, Huang Chao, Zhao Xianglong, Guo Lihai

SCIEX应用支持中心, 中国

SCIEX, China

Key words: 7-Ketocholesterol, human plasma, LC-MS/MS

前言

7-酮胆固醇 (7-Ketocholesterol, 7-KC) 是一种胆甾烷类化合物, 是7位带有氧取代基的胆固醇, 结构如图1。尼曼-皮克病是一种先天性糖脂代谢异常性疾病, 是一种罕见神经退行性疾病, 分为a型, b型和c型。该疾病会造成内脏和中枢神经系统中胆固醇和其他脂质的积聚。其中c型是由细胞胆固醇转运缺陷引起的, 该缺陷导致晚期患者体内溶酶体中未酯化胆固醇的累积。c型疾病的患者的血浆中7-酮胆固醇等胆固醇氧化产物在血浆中显著升高, 因此7-酮胆固醇被认为是诊断尼曼-皮克病的生物标志物。

目前尼曼-皮克病的诊断标准缺乏灵敏性和特异性, 甚至会造成该疾病的诊断延迟, 所以疾病早期的干预对于其诊断及预防有着非常重要的意义。因此, 本研究基于SCIEX液相色谱串联质谱系统, 开发了定量分析人体血液中7-酮胆固醇含量的检测方法, 只需简单的蛋白沉淀前处理, 即可对7-KC进行高灵敏度检测。对人体血浆中7-KC的含量进行准确定量对于诊断预防尼曼-皮克病具有重要的临床意义。

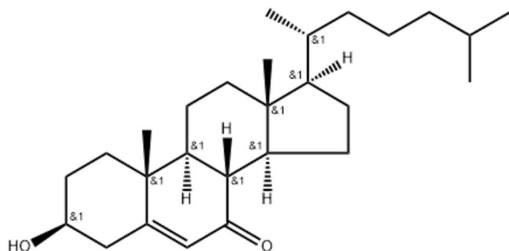


图1. 7-KC的结构

1 实验条件

1.1 血浆样品前处理

取25 μ L标准品/质控品/血浆样品, 分别加入内标, 涡旋混匀后, 离心10 min (13000 rpm), 取上清进样分析。

1.2 色谱条件

色谱柱为C18。流动相采用0.1%甲酸水溶液和甲醇 (含0.1%甲酸), 柱温设定为40 $^{\circ}$ C。进样量为10 μ L。洗脱梯度见表1。

1.3 质谱条件

采用电喷雾离子源 (Electrospray Ionization, ESI) 和多反应监测 (Multiple Reaction Monitoring, MRM) 模式进行质谱扫描。离子源参数: 加热气 (GS1) 和辅助加热气 (GS2) 分别为50 psi 和50 psi, 脱溶剂气温度为500 $^{\circ}$ C; 气帘气 (Curtain Gas, CUR) 为35 psi, 碰撞气 (Collision Gas, CAD) 为9; 喷雾针 (Ionspray, IS) 电压为5500 V。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), 目标物定量离子对、定性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1. 洗脱梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	B (%)
0.50	0.6	86
3.00	0.6	92
3.50	0.6	100
4.50	0.6	100
4.60	0.6	86
6.00	0.6	86

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	CE
7-酮基胆固醇-1	7-KC-1	401.400	81.000	190	64
7-酮基胆固醇-2	7-KC-2	401.400	95.100	190	60
7-酮基胆固醇-内标-1	7-KC-IS-1	408.300	81.000	190	60
7-酮基胆固醇-内标-2	7-KC-IS-2	408.300	95.000	190	61

2 实验结果

2.1 回归方程及线性

在本实验条件下，7-KC在5~1000ng/mL范围内线性良好，r值0.9994（如图2）；各标曲点准确度在95%~106%之间（如图3）。

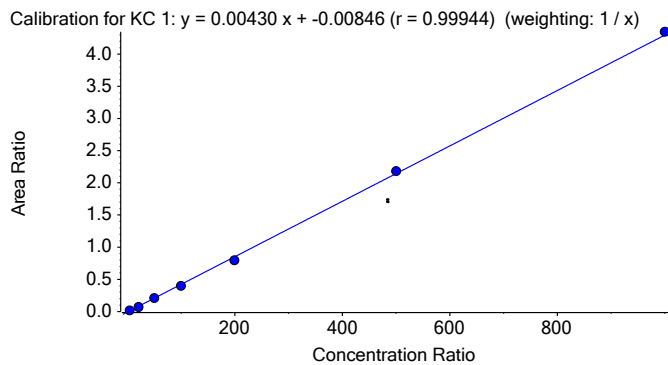


图2. 7-KC的标准曲线

Sample Name	Sample Type	Component Name	IS Name	Actual Concentr.	Area	Calculated Concentr.	Accuracy
DB	Unknown	KC 1	d7-KC 1	N/A	N/A	N/A	N/A
BLANK	Unknown	KC 1	d7-KC 1	N/A	N/A	N/A	N/A
5	Standard	KC 1	d7-KC 1	5.00	7.948e2	5.07	101.49
20	Standard	KC 1	d7-KC 1	20.00	3.427e3	19.05	95.23
50	Standard	KC 1	d7-KC 1	50.00	9.470e3	49.47	98.94
100	Standard	KC 1	d7-KC 1	100.00	1.843e4	95.83	95.83
200	Standard	KC 1	d7-KC 1	200.00	3.743e4	193.95	96.97
500	Standard	KC 1	d7-KC 1	500.00	1.011e5	530.25	106.05
1000	Standard	KC 1	d7-KC 1	1000.00	1.922e5	1054.75	105.48
DB	Unknown	KC 1	d7-KC 1	N/A	N/A	N/A	N/A

图3. 7-KC的标曲各点的准确度

2.2 样本采集谱图

标准曲线定量下限样品及实际人血浆样品中7-KC和IS-7-KC的色谱图如图4展示，该方法能将内源性干扰物同目标物完全分离，定量下限样品及人血浆样品中色谱信号明显，色谱峰峰形良好。

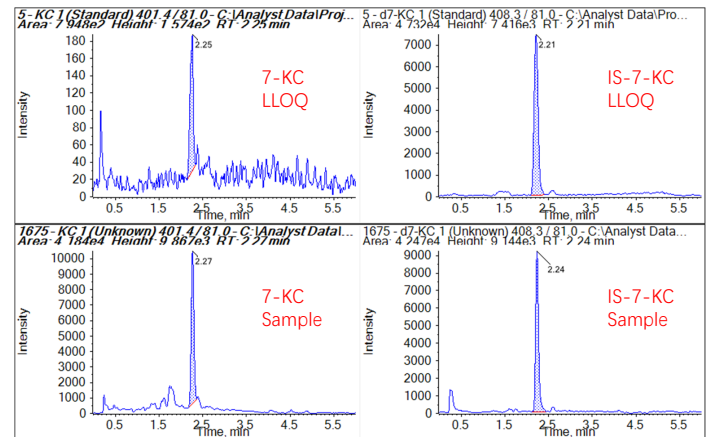


图4. 定量下限样品及实际人血浆样品中7-KC和IS-7-KC的色谱图

2.3 性能验证

采用低、高两个浓度水平的质控品，每个浓度平行测定4次，得到批内精密性RSD在2.5%~11.9%范围内。符合方法学分析要求。

表3. 7-KC的精密性及准确度

质控浓度	测定浓度 (ng/mL)	平均浓度 (ng/mL)	CV (%)	Accuracy (%)
LQC	87.9	88.8	6.2	104.5
	96.5			
	83.4			
	87.6			
HQC	238.4	240.1	4.1	104.4
	253.9			
	237.8			
	230.3			
	230.3			

总结

7-酮基胆固醇 (7-KC) 作为c型尼曼-皮克病疾病诊断的生物标志物, 常规的检测方法存在检测干扰, 特异性差, 很难对其准确定量。本方法是基于SCIEX质谱平台开发, 建立了可对人血浆中7-KC进行精确定性定量检测的液相色谱串联质谱方法。能够很好的排除内源性干扰, 且灵敏度满足要求, 方法稳定性好准确性高, 能满足实际检测需求。

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. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15462-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

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](#)