

# SCIEX液相色谱串联质谱法测定血清中20种类固醇激素

## Determination of 20 Steroid Hormones in Human Serum Samples by SCIEX Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

张元媛<sup>1</sup>, 丛宇婷<sup>1</sup>, 张建柱<sup>2</sup>, 张海明<sup>2</sup>, 李国庆<sup>1</sup>  
Zhang Yuanyuan<sup>1</sup>, Cong Yuting<sup>1</sup>, Zhang Jianzhu<sup>2</sup>, Zhang Haiming<sup>2</sup>, Li Guoqing<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 上海爱博才思分析仪器贸易有限公司

<sup>2</sup> 天津博纳艾杰尔科技有限公司

**Key Words:** Steroid hormones, LC-MS/MS, Determination, Solid-phase extraction

### 前言

类固醇激素是一类脂溶性小分子激素，是由胆固醇经一系列酶催化而来，可分为肾上腺皮质激素和性激素两类，在维持机体正常内分泌，调节性功能、机体发展、免疫调节及生育控制方面有明确的作用。人体内类固醇激素的升高或者降低与一些临床疾病，如，先天肾上腺增生、多囊卵巢综合症、内分泌紊乱、肾上腺皮质功能及（3,17和21）羟化酶缺乏症等息息相关。各个类固醇激素作为代谢网络中的节点相互影响，如能详尽表征代谢网络上下游中各激素的含量变化情况，对临床疾病的确诊、机体内分泌状态的监控等具有种重要意义。

临床传统方法采用放射免疫或ELISA试剂盒方法进行激素检测，可能存在抗原抗体假阳性干扰，低浓度水平激素测定不准确等问题。且临床对于不同激素检测方式不同，多激素全面检测所需血液量较大，增加患者负担。液质联用法具有特异性强，检测灵敏度高，适合高通量测定等优点，因此，建立一种基于液质法的同时准确测定多种类固醇激素的分析方法，对于临床相关疾病的诊断具有重要的指导意义。

本方法基于SCIEX液相色谱串联质谱系统，采用同位素内标校正法，建立了一次分析，同时准确检测血清中20种类固醇激素的定量方法。20种类固醇激素相关信息如下。

| 中文名              | 英文名                              | CAS编号    | 分子式   |
|------------------|----------------------------------|----------|---|
| 17 $\alpha$ -羟孕酮 | 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone | 604-09-1 | C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>                |
| 皮质酮              | Corticosterone                   | 50-22-6  | C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>                |
| 双氢睾酮             | Stanolone, DHT                   | 521-18-6 | C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>                |
| 孕烯醇酮             | Pregnenolone                     | 145-13-1 | C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>                |
| 孕酮               | Progesterone                     | 57-83-0  | C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>                |
| 11-脱氧皮质醇         | 11-Doxycortisol                  | 152-58-9 | C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>                |
| 21-脱氧皮质醇         | 21-Doxycortisol                  | 641-77-0 | C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>                |
| 21-羟基孕酮          | 21-Hydroxyprogesterone           | 64-85-7  | C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>                |
| 雄烯二酮             | Androstenedione                  | 1963/5/8 | C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>                |
| 可的松              | Cortisone                        | 1953/6/5 | C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>                |
| 褪黑素              | Melatonin                        | 73-31-4  | C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
| 睾酮               | Testosterone                     | 58-22-0  | C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>                |
| 氢化可的松            | Cortisol                         | 50-23-7  | C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>                |
| 脱氢表雄酮            | DHEA                             | 53-43-0  | C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>                |
| 醛固酮              | Aldosterone                      | 52-39-1  | C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>                |
| 雌三醇              | Estriol                          | 50-27-1  | C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>                |
| 雌酮               | Estrone                          | 53-16-7  | C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>                |
| 17-羟基孕烯醇酮        | 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone | 387-79-1 | C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>                |
| 硫酸脱氢表雄酮          | DHEAS                            | 651-48-9 | C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub> S              |
| 雌二醇              | Estradiol                        | 50-28-2  | C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>                |

## 实验部分

### 样品前处理

本实验采用沉淀蛋白结合SPE固相萃取法对血清中20种激素进行处理。

### 色谱条件

色谱柱: Kinetex® C18 (2.6 μm, 3.0 × 100 mm) ;

流动相: A为0.5 mM氟化铵水溶液, B为甲醇, 梯度洗脱;

流速: 0.6 mL/min;

柱温: 40 °C;

### 质谱条件

电离方式: 电喷雾离子源, 正负离子同时采集;

检测方式: 分时间窗口 (schedule), 多反应监测 (MRM);

离子源温度 (TEM): 600°C;

雾化气 (Gas1): 60 psi;

辅助气 (Gas2): 60 psi;

气帘气 (Gurtain Gas): 35 psi;

电喷雾电压: 5500V (+) / -4500V (-);

对应MRM通道及参数见表1, 表2。

## 结果与讨论

各化合物在各自出峰位置峰形对称, 响应良好。在20种激素中, 17α-羟孕酮和21-羟基孕酮; 11-脱氧皮质醇, 21-脱氧皮质醇和皮质酮为两组同分异构体, 在本方法条件下, 同分异构体间可以实现基线分离。典型色谱图如图1。

### 标准曲线

以PBS为替代基质, 制作标准工作曲线。各待测物典型标准曲线结果如下表 (表3)。

表1. 待测组分和内标物质的质谱参数 (正离子模式)。

| 中文名           | 英文名                        | Q1    | Q3     | DP  | CE |
|---------------|----------------------------|-------|--------|-----|----|
| 17α-羟孕酮       | 17α-Hydroxyprogesterone    | 331.4 | 109.2* | 100 | 40 |
|               |                            | 331.4 | 97.1   | 100 | 35 |
| 皮质酮           | Corticosterone             | 347.2 | 91.3   | 80  | 80 |
|               |                            | 347.2 | 121.2* | 80  | 33 |
| 双氢睾酮          | Stanolone; DHT             | 291.3 | 159.1  | 110 | 32 |
|               |                            | 291.3 | 255.2* | 110 | 24 |
| 孕烯醇酮          | Pregnenolone               | 299   | 159.3* | 140 | 34 |
|               |                            | 299   | 133.1  | 140 | 35 |
| 孕酮            | Progesterone               | 315.2 | 97.1*  | 160 | 27 |
|               |                            | 315.2 | 109.2  | 160 | 15 |
| 11-脱氧皮质醇      | 11-Doxycortisol            | 347.2 | 97.1*  | 100 | 33 |
|               |                            | 347.2 | 109.1  | 100 | 45 |
|               |                            | 347.2 | 311.1  | 100 | 25 |
| 21-脱氧皮质醇      | 21-Doxycortisol            | 347.2 | 311.2* | 70  | 25 |
|               |                            | 347.2 | 121.1  | 70  | 40 |
|               |                            | 347.2 | 269.2  | 70  | 28 |
| 21-羟基孕酮       | 21-Hydroxyprogesterone     | 331.2 | 97.1*  | 100 | 30 |
|               |                            | 331.2 | 109.1  | 100 | 33 |
| 雄烯二酮          | Androstenedione            | 287.1 | 97.1*  | 80  | 30 |
|               |                            | 287.1 | 109.1  | 80  | 30 |
| 可的松           | Cortisone                  | 361.2 | 163.1* | 140 | 15 |
|               |                            | 361.2 | 121.2  | 140 | 40 |
| 褪黑素           | Melatonin                  | 233.1 | 174.1* | 80  | 20 |
|               |                            | 233.1 | 159.1  | 80  | 40 |
| 睾酮            | Testosterone               | 289.2 | 97.3*  | 100 | 31 |
|               |                            | 289.2 | 109.3  | 100 | 36 |
| 皮质醇;<br>氢化可的松 | Cortisol                   | 363.1 | 121    | 280 | 15 |
|               |                            | 363.1 | 115.1* | 200 | 80 |
| 脱氢表雄酮         | DHEA                       | 271.2 | 253.3* | 60  | 18 |
|               |                            | 271.2 | 196.9  | 60  | 25 |
|               | IS-17α-Hydroxyprogesterone | 334.3 | 112.2  | 100 | 40 |
|               | IS-Corticosterone          | 351.3 | 121    | 120 | 35 |
|               | IS-DHT                     | 294.3 | 258    | 100 | 24 |
|               | IS-Pregnenolone            | 303.3 | 163.2  | 140 | 47 |
|               | IS-Progesterone            | 324   | 100    | 160 | 30 |
|               | IS-11-Doxycortisol         | 352.2 | 100    | 100 | 35 |
|               | IS-21-Doxycortisol         | 355.3 | 319.3  | 70  | 30 |
|               | IS-21-Hydroxyprogesterone  | 338   | 100    | 100 | 30 |
|               | IS-Androstenedione         | 290   | 100    | 80  | 30 |
|               | IS-Cortisone               | 369   | 169    | 100 | 40 |
|               | IS-Melatonin               | 237   | 178    | 80  | 20 |
|               | IS-Testosterone            | 292   | 100    | 100 | 30 |
|               | IS-Cortisol                | 367   | 121    | 140 | 40 |
|               | IS-DHEA                    | 277.2 | 259.3  | 140 | 22 |

\* 定量离子

表2. 待测组分和内标物质的质谱参数（负离子模式）。

| 中文名       | 英文名                              | Q1    | Q3     | DP/V | CE/V |
|-----------|----------------------------------|-------|--------|------|------|
| 醛固酮       | Aldosterone                      | 359.1 | 189.1* | -100 | -24  |
|           |                                  | 359.1 | 331.3  | -100 | -24  |
|           |                                  | 359.1 | 297.3  | -100 | -20  |
| 雌三醇       | Estriol                          | 287.2 | 171*   | -160 | -51  |
|           |                                  | 287.2 | 145.2  | -160 | -54  |
| 雌酮        | Estrone                          | 269.1 | 145.2* | -150 | -50  |
|           |                                  | 269.1 | 159.1  | -150 | -50  |
| 17-羟基孕烯醇酮 | 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone | 331.1 | 287.3  | -70  | -30  |
|           |                                  | 331.1 | 303.3* | -70  | -30  |
|           |                                  | 331.1 | 313.2  | -70  | -30  |
| 硫酸脱氢表雄酮   | DHEAS                            | 367.1 | 97     | -280 | -30  |
|           |                                  | 367.1 | 80*    | -280 | -80  |
| 雌二醇       | Estradiol                        | 271.2 | 183.1  | -120 | -50  |
|           |                                  | 271.2 | 145*   | -120 | -50  |
|           | IS- Aldosterone                  | 363.2 | 301.2  | -120 | -22  |
|           | IS- Estriol                      | 290.2 | 173    | -160 | -54  |
|           | IS-Estrone                       | 273   | 147    | -150 | -50  |
|           | IS-17- hydroxypregnenolone       | 335.1 | 316.4  | -80  | -27  |
|           | IS-DHEAS                         | 373   | 98     | -50  | -50  |
|           | IS-Estradiol                     | 274   | 145    | -180 | -55  |

\* 定量离子

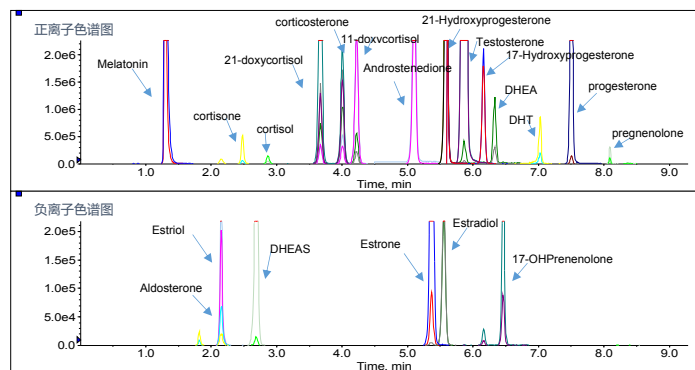


图1. 20种激素典型色谱图。

### 加标回收率

取混合人血清样本，分为4组，向其中三组加入不同浓度的20种激素混合标准溶液，制备低、中、高三组血清加标样本，以随行标曲测定4组血清样本中各激素浓度（各组内3样本分析）。计算加标回收率。各激素在各自加标水平下加标回收率结果如图2所示。结果表明，各待测物的加标回收率在86.6%-111.3%之间，符合相关要求。

表3. 20种激素典型标准曲线。

| 中文名                 | 英文名                              | 线性方程                    | 相关系数   | 标曲范围*     |
|---------------------|----------------------------------|-------------------------|--------|-----------|
| 17 $\alpha$ -羟孕酮    | 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone | $Y=1.65094x+0.01073$    | 0.9979 | 0.05 - 50 |
| 皮质酮                 | Corticosterone                   | $Y=1.23450x+0.01042$    | 0.9991 | 0.1 - 50  |
| 双氢睾酮                | Stanolone; DHT                   | $Y=1.68540x+0.00372$    | 0.9976 | 0.01 - 20 |
| 孕烯醇酮                | Pregnenolone                     | $Y=0.47991x+0.00383$    | 0.9971 | 0.05 - 20 |
| 孕酮                  | Progesterone                     | $Y=0.09829x+0.00444$    | 0.9974 | 0.5 - 100 |
| 11-脱氧皮质醇            | 11-Doxycortisol                  | $Y=1.69897x+0.00158$    | 0.9981 | 0.01 - 20 |
| 21-脱氧皮质醇            | 21-Doxycortisol                  | $Y=4.67089x+0.00262$    | 0.9967 | 0.01 - 10 |
| 21-羟基孕酮             | 21-Hydroxyprogesterone           | $Y=2.44405x+0.00441$    | 0.9984 | 0.01 - 10 |
| 雄烯二酮                | Androstenedione                  | $Y=1.39500x+0.00776$    | 0.9967 | 0.05 - 20 |
| 可的松                 | Cortisone                        | $Y=0.04064x+0.00142$    | 0.9993 | 0.5 - 100 |
| 褪黑素                 | Melatonin                        | $Y=0.97131x+4.73878e-4$ | 0.9991 | 0.01 - 10 |
| 睾酮                  | Testosterone                     | $Y=0.99457x+0.01098$    | 0.9997 | 0.1 - 20  |
| 皮质醇;<br>氢化可的松       | Cortisol                         | $Y=0.04354x+0.00365$    | 0.9988 | 1 - 500   |
| 脱氢表雄酮               | DHEA                             | $Y=0.78036x+0.00384$    | 0.9982 | 0.1 - 50  |
| 醛固酮                 | Aldosterone                      | $Y=0.11711x+0.00207$    | 0.9994 | 0.05 - 20 |
| 雌三醇                 | Estriol                          | $Y=1.74570x+0.00495$    | 0.9988 | 0.05 - 20 |
| 雌酮                  | Estrone                          | $Y=1.40195x+0.00163$    | 0.9995 | 0.05 - 20 |
| 17 $\alpha$ -羟基孕烯醇酮 | 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone | $Y=4.33931x+0.08583$    | 0.9974 | 0.1 - 20  |
| 硫酸脱氢表雄酮             | DHEAS                            | $Y=0.01471x+0.00690$    | 0.9992 | 1 - 1000  |
| 雌二醇                 | Estradiol                        | $Y=1.96585x+0.01268$    | 0.9989 | 0.05 - 50 |

\* 根据各激素在实际样本中参考范围，不同激素选择不同浓度范围建立标准曲线。

### 精密度

取混合人血清样本，制备低、中、高三组血清加标样本（QC）。各浓度水平5样本分析，连续测定5天。根据当日的标准曲线，计算QC样本浓度。根据QC的RSD%对方法的日内与日间精密度进行考察。结果如图3和图4所示。20种激素的日内和日间精密度分别为1.0-9.2%和2.1-11.9%，符合相关要求。

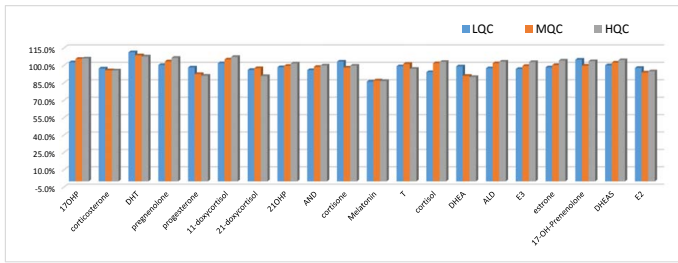


图2. 20种激素低、中、高浓度水平加标回收率。

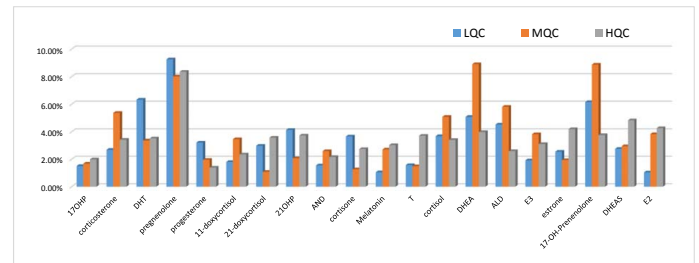


图3. 20种激素低、中、高浓度水平日内精密密度。

## 总结

本实验在SCIEX液质连用平台上，搭建了一针进样，正负离子同时采集的Scheduled MRM™方法，实现20种激素的同步检测。实验采用SPE法进行样本前处理，同位素内标校准，对血清中20种激素进行定量。方法线性良好，加标回收，精密密度满足相关要求。可用于临床实际样本的检测。

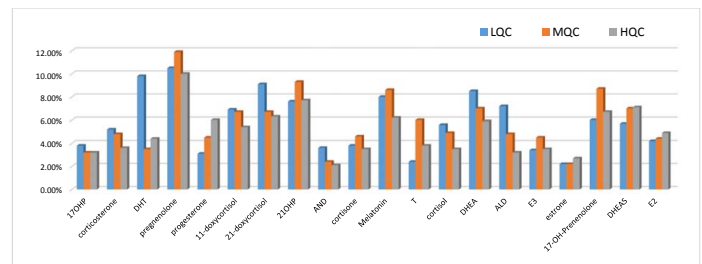


图4. 20种激素低、中、高浓度水平日间精密密度。

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/或注册商标的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在和美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。AB SCIEX™ 商标经许可使用。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-10571-ZH-B



### 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](http://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: [ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)