

LC-MS/MS法测定尿液中皮质醇和可的松

Determination of Cortisol and Cortisone in Urine with 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

前言

库欣综合征, 又称皮质醇增多症, 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的临床症候群。虽有典型的临床特征(如皮肤紫纹、满月脸、水牛背、向心性肥胖等), 其鉴别诊断仍需依靠实验室检查, 体内皮质醇升高是其最主要的生化诊断依据。

24 h尿游离皮质醇(UFC)反映24 h内皮质醇的整体分泌水平, 与血清皮质醇相比, 24h UFC不受昼夜节律或血清皮质醇结合蛋白的影响, 是诊断库欣综合征(CS)及其疗效监测的重要指标。可的松是皮质醇的代谢产物, 二者生理节律及化学结构相似。测定尿液中可的松浓度可用于判断外源性皮质醇(氢化可的松)污染所带来的假阳性结果。串联质谱法检测类固醇激素的敏感性和特异性好, 使用液相串联质谱法(LC-MS/MS)进行尿液中皮质醇和可的松的检测, 对CS的诊断具有重要意义。

1 实验部分

1.1 尿液样品前处理

样品采集: 使用集尿容器收集患者24 h尿。尽量保证样本存放低温环境。

样品处理: 取200 μ L尿液分别加入20 μ L 同位素内标混合工作液, 加入200 μ L水, 混匀后, 室温下离心5 min, 取上清液待上样。

固相萃取: 取上清液加至预先活化好的SPE萃取板中进行固相提取, 提取过程中流速控制在5~10滴/min, 避免流速过快, 导致目标物严重损失。随后依次用200 μ L水和10%甲醇以及正己烷淋洗, 最后采用甲醇:乙腈(1:9, v/v)洗脱, 洗脱液加水稀释后混匀待测。

注: 标曲/质控使用PBS为替代基质制备。

1.2 色谱条件

色谱柱为Kinetex C18。流动相采用0.1%甲酸水溶液和甲醇(0.1%甲酸), 柱温设定为40 $^{\circ}$ C。进样量为5 μ L。洗脱梯度表见表1。

表1. 洗脱梯度

时间 (min)	流速(mL/min)	A(%)	B(%)
1.20	0.45	52	48
2.00	0.45	5	95
3.00	0.45	5	95
3.10	0.45	52	48
4.50	0.45	52	48

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45 psi, 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	27
	cortisone	361.2	121	100	35
皮质醇	cortisol*	363.2	121	100	29
	cortisol	363.2	327.1	100	19
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

2 结果与讨论

2.1 回归方程及线性

在本实验条件下，皮质醇在0.025~100 ng/mL范围内线性良好，r值大于0.998（如图1）；可的松在0.125~500 ng/mL范围内线性良好，r值大于0.996（如图2）。

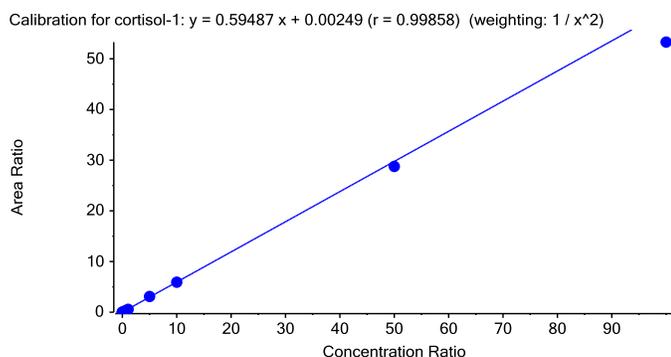


图 1. 皮质醇的标准曲线

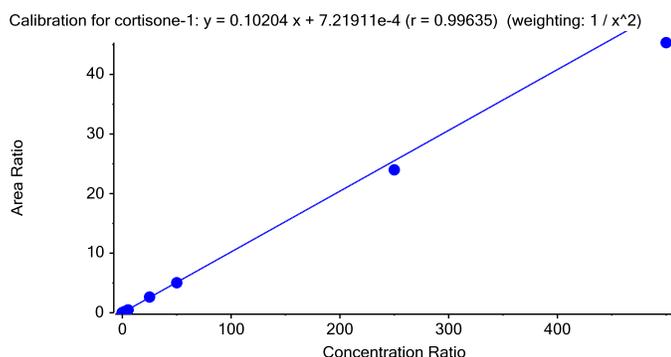


图 2. 可的松的标准曲线

皮质醇标准曲线上各浓度点的准确度在89.59%~106.26%范围内（如图3）。可的松标准曲线上各浓度点的准确度在88.87%~111.08%范围内（如图4）。

Sample Name	Sample Type	Component Name	Actual Concentration	Area	Calculated Concentration	Accuracy
DB	Unknown	cortisol-1	N/A	N/A	N/A	N/A
BL	Unknown	cortisol-1	N/A	N/A	N/A	N/A
STD-0.025/0.125	Standard	cortisol-1	0.025	6.215e3	0.025	98.12
STD-0.05/0.25	Standard	cortisol-1	0.050	1.237e4	0.051	101.79
STD-0.1/0.5	Standard	cortisol-1	0.100	2.479e4	0.103	102.90
STD-0.5/2.5	Standard	cortisol-1	0.500	1.189e5	0.510	101.99
STD-1/5	Standard	cortisol-1	1.000	2.473e5	1.063	106.26
STD-5/25	Standard	cortisol-1	5.000	1.148e6	5.124	102.49
STD-10/50	Standard	cortisol-1	10.000	2.065e6	10.008	100.08
STD-50/250	Standard	cortisol-1	50.000	9.019e6	48.392	96.78
STD-100/500	Standard	cortisol-1	100.000	1.522e7	89.591	89.59

图 3. 皮质醇标准曲线各浓度点准确度

Sample Name	Sample Type	Component Name	Actual Concentration	Area	Calculated Concentration	Accuracy
DB	Unknown	cortisone-1	N/A	N/A	N/A	N/A
BL	Unknown	cortisone-1	N/A	N/A	N/A	N/A
STD-0.025/0.125	Standard	cortisone-1	0.125	4.146e3	0.115	91.81
STD-0.05/0.25	Standard	cortisone-1	0.250	9.735e3	0.278	111.08
STD-0.1/0.5	Standard	cortisone-1	0.500	2.009e4	0.547	109.48
STD-0.5/2.5	Standard	cortisone-1	2.500	9.403e4	2.608	104.31
STD-1/5	Standard	cortisone-1	5.000	1.864e5	5.140	102.79
STD-5/25	Standard	cortisone-1	25.000	8.966e5	25.019	100.08
STD-10/50	Standard	cortisone-1	50.000	1.611e6	48.872	97.74
STD-50/250	Standard	cortisone-1	250.000	7.546e6	234.575	93.83
STD-100/500	Standard	cortisone-1	500.000	1.329e7	444.348	88.87

图 4. 可的松标准曲线各浓度点准确度

2.2 样本采集谱图

空白基质样品，标准曲线定量下限（LLOQ）样品及实际人尿液样品中皮质醇和可的松的色谱图如图5，空白当中无干扰，内源性干扰物同目标物分离较好，峰形和灵敏度良好。

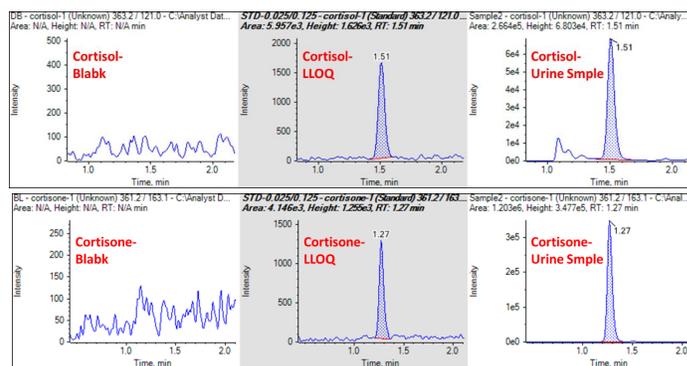


图 5. 空白样品、LLOQ及实际人尿液样品中皮质醇和可的松的色谱图。

2.3 加标回收实验

取6个不同来源的尿液样本，分成2份，一份用于测定样本浓度，另外一份分别加入低、中、高3个不同浓度水平的皮质醇以及可的松溶液，用于测定添加后浓度，根据测定结果，分别计算得到皮质醇和可的松在6个不同来源尿液的回收率。皮质醇6个不同来源样本添加3个浓度水平溶液后的加标回收率在96.9%~109.8%范围内，不同来源尿液的不同浓度加标回收率RSD值4.5%，小于15%（见表3）。可的松6个不同来源样本添加3个浓度水平溶液后的加标回收率在96.3%~107.1%范围内，不同来源尿液的不同浓度加标回收率RSD值3.5%，小于15%（见表4）。

总结

本方法是基于SCIEX液相色谱串联质谱系统开发，建立了可对皮质醇和可的松进行准确定量检测的液相色谱串联质谱方法。本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，能满足实际尿液样本的检测需求。基于LC-MS/MS方法的高灵敏度和高特异性的特点，本方法的建立有助于更准确的检测尿液中的皮质醇水平，尤其是对早期皮质醇轻微升高的亚临床CS患者进行早筛查、早诊断、早治疗，避免其进一步发展为典型的临床CS病程，从而减少患者的其他发病率以及死亡率。

仅限专业展会等使用、仅向专业人士提供的内部资料

表 3. 加标回收率-皮质醇(浓度: ng/mL)

不同来源样本	样本浓度	添加浓度	测定值	加标回收率	RSD
Sample1	0.4	0.5	0.9	109.8%	4.5%
Sample2	5.0	0.5	5.4	99.7%	
Sample3	0.2	5.0	5.3	102.2%	
Sample4	1.9	5.0	7.1	102.8%	
Sample5	2.3	50.0	50.7	96.9%	
Sample6	0.1	50.0	49.3	98.5%	

表 4. 加标回收率-可的松(浓度: ng/mL)

不同来源样本	样本浓度	添加浓度	测定值	加标回收率	RSD
Sample1	22.2	2.5	24.8	100.2%	3.5%
Sample2	74.2	2.5	79.1	103.1%	
Sample3	2.4	25	27.6	100.5%	
Sample4	69.2	25	100.9	107.1%	
Sample5	62.0	250	316.1	101.3%	
Sample6	2.6	250	243.3	96.3%	

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. 或在和美国/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14636-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](https://www.sciex.com.cn)