

基于SCIEX LC-MS/MS系统对血清中3种雌激素定量检测

Quantitative Analysis of 3 Estrogens in Plasma by SCIEX LC-MS/MS

贺琳娟, 黄超, 赵祥龙, 郭立海

He Linjuan, Huang Chao, Zhao Xianglong, Guo Lihai

关键词: Estrogen, Plasma

引言

雌性激素(estrogen), 又称女性激素, 是一类主要的女性荷尔蒙。它分为两大类, 即雌激素和孕激素, 均属于类固醇激素, 其主要作用是产生并维持女性的第二性征^[1]。在人体中, 雌激素主要包括雌酮(Estrone, E1)、雌二醇(Estradiol, E2)和雌三醇(Estriol, E3)。其中雌二醇的活性最强, 有着较为重要的生理作用。此外, 雌激素的含量变化会影响人体正常生理功能, 甚至会诱导产生相关疾病。因此开发雌激素检测方案对临床诊断具有重要意义。

然而, 雌激素在人体中的含量极低, 属pg/mL级别, 传统方法难以精确地监测其含量。目前, 检测雌激素的方法主要有放射免疫法、酶联免疫法等免疫分析法和气相色谱-质谱联用法、液相色谱串联质谱法等; 而免疫分析法较易对人体体液和组织样本产生假阳性结果^[2]。因此, 临床上需要建立一种高灵敏度、高精度的分析方法, 准确测定血清中雌激素的含量。

基于上述问题, 本文采用SCIEX液相色谱串联质谱系统, 建立了3种雌激素LC-MS/MS检测方法, 采用液液萃取法作为前处理对血清中3种雌激素进行精准定量分析。该方案前处理简单, 样本用量少, 分析时间短, 并且经过系统地方法学验证, 具有良好的精密度和准确性。

实验部分

1. 样品前处理

将20 μ L内标工作液加入250 μ L血清样本中, 用正己烷:乙酸乙酯(85:15, v/v) 1 mL, 涡旋混合10 min, 4000 g离心5 min。取700 μ L上清液至离心管中, 将样品挥干并用初始比例流动相复溶, 待上机分析。

2. 液相条件

色谱柱: Phenomenon Kinetex Phenyl-Hexyl (2.6 μ m, 2.1 \times 100 mm), 流动相: A: 0.1 mmol/L氟化铵水溶液, B: 0.1 mmol/L氟化铵甲醇溶液, 柱温: 40 $^{\circ}$ C, 进样量: 20 μ L, 流速: 0.3 mL/min。梯度洗脱, 液相梯度见表1。

表1. 液相梯度洗脱条件

时间 (min)	A(%)	B(%)
0.0	90	10
4.0	15	85
4.5	0	100
6	0	100
6.1	90	10
8.0	90	10

3. 质谱条件

质谱条件: ESI源, 负离子模式

气帘气 CUR: 20 psi 碰撞气 CAD: 9 psi

雾化气 GS1: 70 psi 辅助气 GS2: 65 psi

IS电压: -4500 V 源温度 TEM: 650 $^{\circ}$ C

质谱参数见表2。

结果与讨论

1. 三种雌激素MRM典型色谱图

表2. 目标组分和同位素内标物质的质谱参数

分析物	Q1	Q3	ID	去簇电压DP	碰撞能量CE
雌酮(Estrone)	269.0	145.1	E1-1*	-120	-50
	269.0	159	E1-2	-120	-48
雌二醇(Estradiol)	270.9	145.2	E2-1*	-130	-50
	270.9	183.2	E2-2	-130	-50
雌三醇(Estriol)	286.9	171.1	E3-1*	-80	-50
	286.9	145.1	E3-2	-80	-54
雌酮-D4(Estrone-D4)	273.0	161	E1 D4	-130	-46
雌二醇-2,4-D2 (Estradiol-2,4-D2)	273.1	146.9	E2 D2	-130	-55
雌三醇-D3(Estriol-D3)	290.1	145.2	E3 D3	-120	-60

* 定量离子

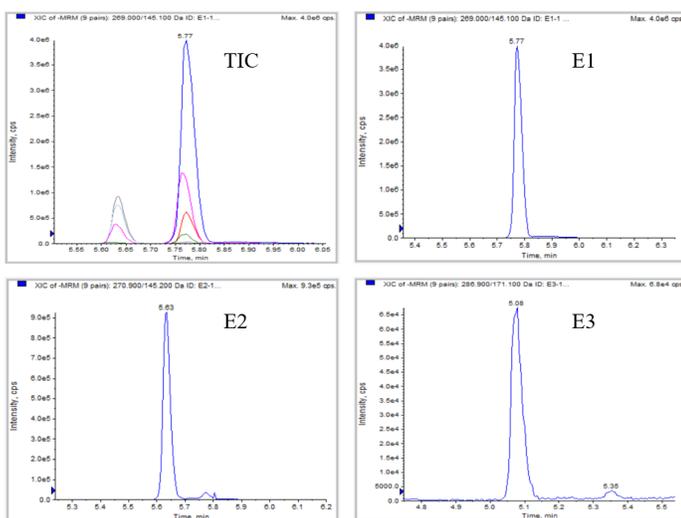


图1. 3种雌激素色谱图（左上为总离子流图（TIC），右上为雌酮（E1）提取离子流图，左下为雌二醇（E2）提取离子流图，右下为雌三醇（E3）提取离子流图）。

2. 线性范围

以PBS为替代基质，配制混合标曲工作溶液，按照上述前处理步骤处理，制作标准工作曲线。雌酮、雌二醇和雌三醇在相应的浓度范围内线性良好，回归系数r均大于0.995，结果见表3。

表3. 回归方程和线性范围

分析物	回归方程	权重	相关系数r	线性范围
雌酮	$Y=0.02950x+0.00546$	1/x ²	r = 0.99672	0.5~850 pg/mL
雌二醇	$Y=0.00300x+0.00694$	1/x ²	r = 0.99816	0.5~850 pg/mL
雌三醇	$Y=0.00337x+0.003543$	1/x ²	r = 0.99518	5~850 pg/mL

3. 准确度和精密度

为考察方法的重现性及准确度，分别对雌酮、雌二醇和雌三醇的精密度和准确度进行方法验证。制备低（2 pg/mL）、中-1（20 pg/mL）、中-2（325 pg/mL）、高（625 pg/mL）四个浓度的质控样本，按上述前处理步骤平行处理6个样本，从表4可以看出，各浓度水平下三种雌激素的精密度（CV）均在10%以内，准确度均在91%~103%之间，表明方法重现性及准确度良好。

表4. 准确度及精密度结果

分析物	理论浓度 (pg/mL)	实测值 (pg/mL)	准确度/%	精密度/%
雌酮	2	1.96	98.16	4.41
	20	20.06	100.33	3.88
	325	309.86	95.34	6.09
	650	596.23	91.73	1.69
雌二醇	2	1.93	96.44	8.86
	20	19.93	99.63	3.60
	325	305.87	94.11	3.83
雌三醇	650	607.36	93.44	1.98
	20	20.86	102.91	7.31
	325	318.78	98.09	4.45
	650	620.66	95.49	3.19

4. 实际样本测定

为保证实际样本测定的有效性，在方法验证阶段测定了血清样本，以考察方法的可靠性，图2即为实际样本测定的色谱图，雌酮和雌二醇无基质干扰或干扰峰，雌三醇的基质基线较高，但不影响检测，检测结果良好。

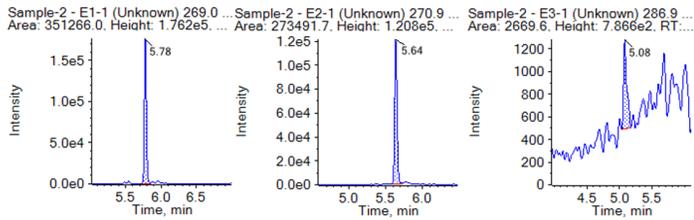


图2. 实际样本提取离子色谱图（左为雌酮，中为雌二醇，右为雌三醇）。

总结

本方案基于SCIEX LC-MS/MS系统，建立了人体血清中3种雌激素含量测定LC-MS/MS检测方案。该方法通过简便快捷的液液萃取法，在8 min内实现同时检测3种雌激素，具有高灵敏度、高稳定性的特点。对于临床相关疾病诊断提供精准的雌激素浓度水平信息。

参考文献

- [1] 高瑞芳, 李翔, 赵倩茹, 孟雅萍, 李祥胜. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定化妆品中29种雌性激素[J]. 香料香精化妆品, 2022(2): 49-53,70.
- [2] 郝志翔, 钟雅男, 徐吟雪, 印晓星, 张蓓, 周雪妍. 乳腺癌患者血清雌激素及其代谢产物的液相色谱串联质谱检测方法的建立及应用[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(10): 1739-1753.

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-02-15483-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](https://www.sciex.com.cn)