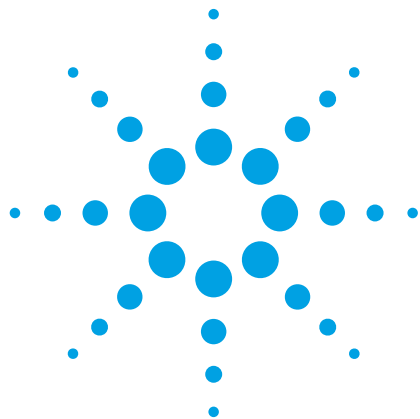




使用液相色谱/三重四极杆 MS/MS 联用系统分析血清中的睾酮

应用简报

作者

M.P. George
安捷伦科技公司
Santa Clara, CA USA

Andre Szczesniewski
安捷伦科技公司
Schaumburg, IL USA

本临床研究应用简报仅限研究使用。
不可用于诊断目的。

摘要

将 Agilent 1200 系列快速分离液相色谱 (RRLC) 系统与大气压化学电离 (APCI) 模式的 Agilent 6430 三重四极杆 LC/MS 联用，开发出可快速定量分析血清中总睾酮的方法。其中使用了二维液相色谱法，使基质干扰和离子抑制效应降至最低，同时缩短了分析时间。

结果表明该方法在 5 至 2000 ng/dL 范围内具有良好的定量线性 ($R^2 > 0.99$)，分析时间仅为 4.5 分钟，日间精度（相对标准偏差）低于 10%。在 5% 牛血清白蛋白中，检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 分别为 2 ng/dL 和 5 ng/dL。



Agilent Technologies

前言

睾酮在人体内同时发挥合成代谢和雄激素效应。其合成代谢作用的益处包括增加肌肉质量和力量，提高骨密度和强度，以及刺激线性生长和骨骼成熟。

本应用简报采用 Agilent 6430 三重四极杆 LC/MS 系统，以二维中心切割液相色谱和 APCI MS 模式，建立了一种可快速、灵敏、精确测定血清中总睾酮的方法。二维中心切割液相色谱可降低基质效应和离子抑制效应，在大量血清样品中均未观察到任何干扰，同时还缩短了临床研究中所需的分析时间。

实验部分

试剂和标样

以甲醇（赛默飞世尔科技）配制睾酮和 d3 氘代睾酮（分别购自西格玛奥德里奇公司和 Medical Isotopes 公司）的储备溶液，浓度为 10 µg/mL，并储存于 5°C 以下。以 5% 牛血清白蛋白稀释这些储备溶液得到校正标准溶液，浓度分别为 5、10、100、500、1000 和 2000 ng/dL。

仪器

本方法是基于 Agilent 1200 系列快速分离液相色谱 (RRLC) 系统与配有 APCI 源的 Agilent 6430 三重四极杆 LC/MS 联用系统开发的。仪器条件在表 1 中列出。

样品制备

采用沉淀法制备血清样品：

1. 向每个内含 0.1 mL 血清的试管中加入 0.1 mL 工作内标（d3 氘代睾酮），浓度为 100 ng/dL 的乙腈水溶液
2. 向每根试管中加入 0.4 mL 乙腈
3. 接着将样品在 3000 rpm 下离心 10 分钟
4. 将每个样品的上清液转移至第二根试管中
5. 在 50 °C 下蒸干溶剂（持续约 10 分钟）
6. 向每根试管中加入 0.1 mL 水:甲醇 (50:50) 溶液，涡旋振荡

表 1. 液相色谱和质谱条件

液相色谱运行条件				
色谱柱	上样色谱柱: ZORBAX SB C-8 色谱柱, 2.1 × 15 mm, 3.5 μm 粒径 (部件号 871700-906) 分析色谱柱: ZORBAX Eclipse Plus C-18 色谱柱, 2.1 × 50 mm, 1.8 μm 粒径 (部件号 959741-902)			
柱温	50°C			
进样体积	10 μL			
自动进样器温度	6°C			
针头清洗	冲洗孔 (50:25:25, 异丙醇:甲醇:水, 5 秒)			
流动相	A = 水 + 0.1% 甲酸 B = 甲醇 + 0.1% 甲酸			
分析时间	4.5 min			
流速	0.5 mL/min			
梯度泵	泵 1 (上样)		泵 2 (分析)	
	时间 (min)	%B	时间 (min)	%B
	0.0	45	0.0	45
	1.5	45	1.7	45
	2.2	80	1.9	80
	3.2	80	3.0	80
	3.5	45	3.7	45
			4.0	45
色谱柱阀切换时间	时间 (min)	位置		
	0.0	1		
	0.9	2		
	2.2	1		
质谱条件				
离子模式	正模式, APCI			
干燥气温度	300°C			
气化温度	300°C			
干燥气体流速	4 L/min			
雾化器压力	20 psi			
毛细管电压	4500 V			
电晕电流, 正模式	2 μA			
MRM 采集	Q1 和 Q2 峰宽分别为 1.4 m/z 和 0.7 m/z			
Delta EMV	500 V			

色谱

采用二维液相色谱法执行中心切割，其中上样色谱柱位于分析色谱柱之前。泵 1 通过自动液体进样器 (ALS) 将样品载入 C-8 上样色谱柱中，阀位于位置 1 (图 1A)。上样色谱柱将睾酮从众多潜在的干扰物质中分离出来。在将睾酮从上样色谱柱中洗脱之前，将阀切换至位置 2，然后利用 C-18 分析柱使睾酮与干扰物质进一步分离 (图 1B)。在将睾酮峰载入分析色谱柱后，将阀切换回位置 1 (图 1C)。上样色谱柱中的所有剩余成分均洗脱入废液中，在色谱柱平衡后载入下一个样品。分析柱中的睾酮在洗脱后进入三重四极杆 LC/MS，然后平衡色谱柱准备进行下一次分析。流动相、各台泵的梯度以及阀位置切换时间如表 1 中所示。

分析参数

睾酮及氘代内标 (IS) 的分析参数如表 2 中所示。

图 1. 二维中心切割液相色谱

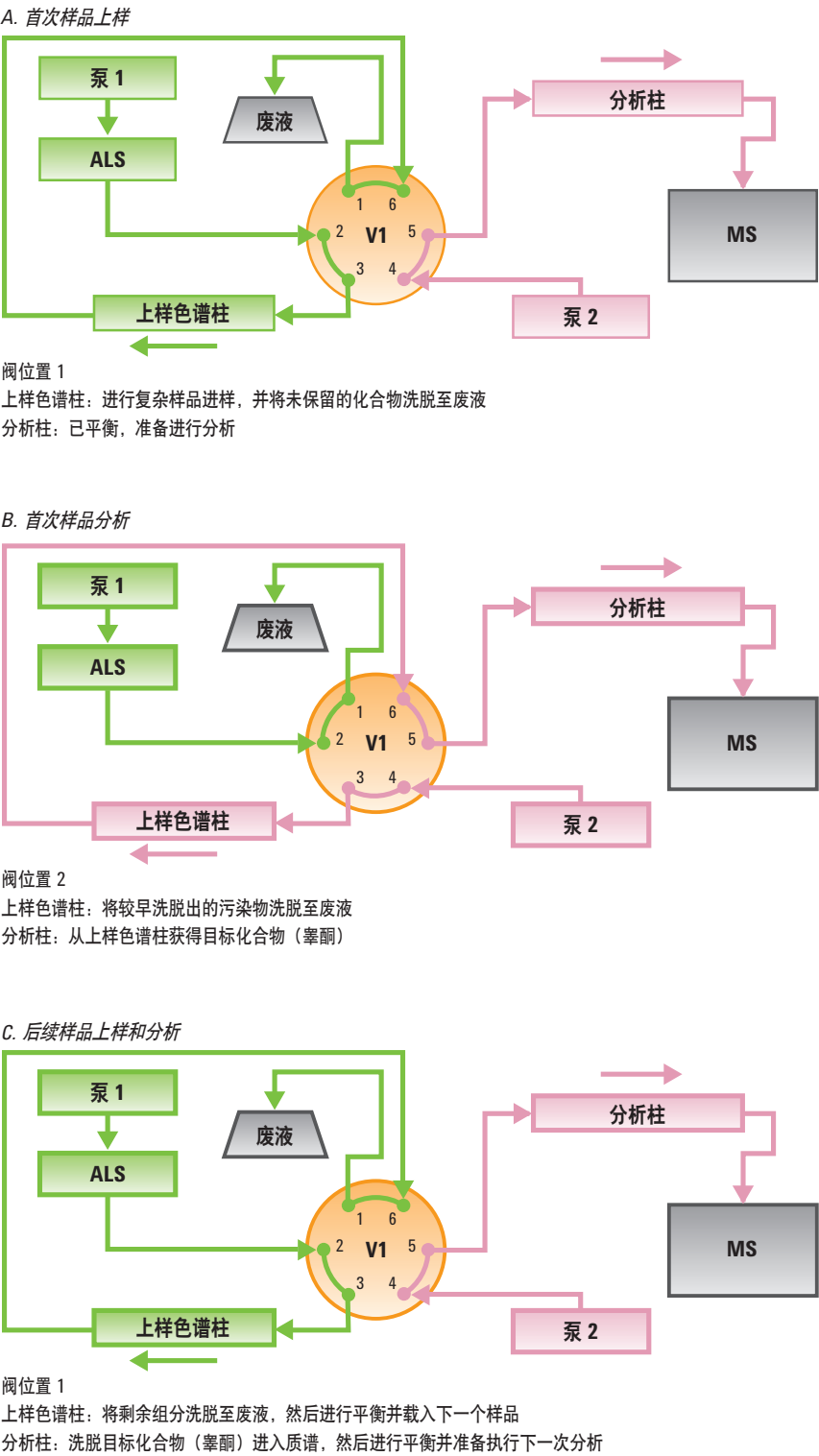


图 1. 睾酮二维中心切割分析的阀配置。该色谱方法的配置中包括两台泵、一个切换阀以及两根色谱柱，可从干扰物质中快速、高效地分离睾酮。上样色谱柱用于第一维分离，分析色谱柱用于第二维分离

A.) 首次样品上样
B.) 首次样品分析
C.) 后续样品上样和分析

表 2. MS/MS 分析参数

化合物	保留时间 (min)	MRM 离子对	碎裂电压	驻留时间 (ms)	碰撞能量 (EV)
睾酮	3.11	289.2 > 109 289.2 > 97	155	250	30
内标睾酮-d3	3.10	292.2 > 97	155	250	30

结果与讨论

二维中心切割液相色谱

中心切割配置中采用两根色谱柱，可降低基质效应和离子抑制效应，同时缩短了分析时间。在睾酮峰从上样色谱柱（第一维）中洗脱后，洗脱时间的中心点临近之前，阀将切换至分析柱。睾酮峰在分析色谱柱（第二维）中进一步分离以去除剩余的干扰物质（图 1）。最终可得到一张非常清晰的色谱图，其中只有睾酮一种主要成分（图 2）。

在干扰和基质效应最小化条件下分析睾酮

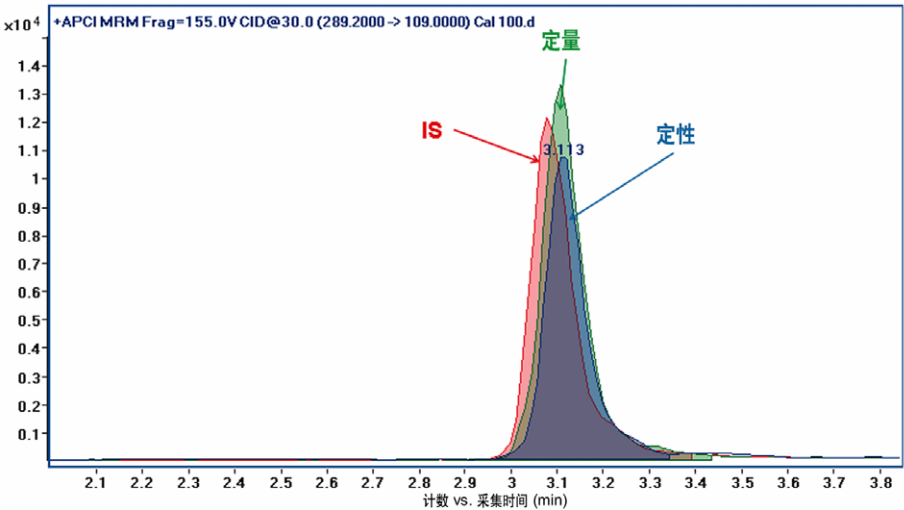


图 2. 含有睾酮和内标（浓度均为 100 ng/dL）的代表性血清样品的提取离子色谱图。图中展示了内标 (IS) (97 m/z)、定量离子 (97 m/z) 和定性离子 (109 m/z) 的叠加图

定量精确度及重现性

在 5% 牛血清白蛋白中加入浓度分别为 5、10、100、500、1000 和 2000 ng/dL 的睾酮，每个浓度平行测定三次，以建立睾酮的校准曲线。图 3 中展示出该方法在宽动态范围（2.4 个数量级）内具有良好的线性， R^2 值为 0.999。检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 分别为 2 ng/dL 和 5 ng/dL。LOD 定义为对一组五个独立样品进行分

析，每个样品平行分析三次，五个测得值的信噪比皆大于等于 10 时睾酮的最低可检测浓度。LOQ 定义为对一组五个独立样品进行分析，每个样品平行分析三次，五个所测值均在目标浓度 $\pm 20\%$ 范围内的最低可检测睾酮浓度。校正标准品的定量日间（组间）变异系数 (CV) 结果良好，最低为 0.7%，不超过 10%（表 3）。

表 3. 组间定量精度（变异系数）

浓度 (ng/dL)	变异系数 (%)
5	9.2
10	7.3
100	3.1
1000	0.7

可在 5 到 2000 ng/dL 范围内精确定量睾酮

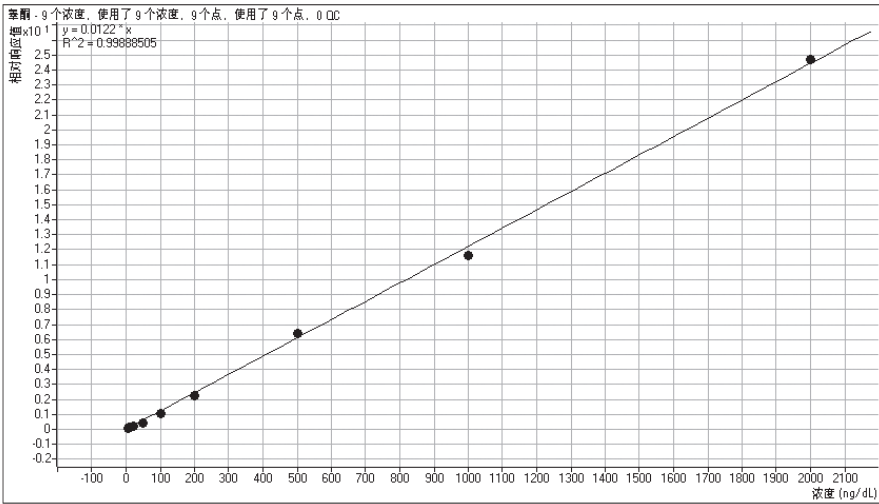


图 3. 正常血清中睾酮的校正曲线。用于定量的离子对为 289>97

实际样品验证

使用一组 50 个血清样品进行方法验证，之前已采用其它 LC/MS/MS 程序对这些样品进行了定量。该方法与参比实验室方法的定量相关性良好，R² 值为 0.978（图 4），

且所有 50 个样品中均未观测到任何干扰。需要注意的是该应用简报中描述的方法并不能作为诊断方法进行睾酮测试。使用血清样品进行方法验证后，证实了该方法具有优越的睾酮检测和定量性能。

与参比实验室方法具有良好的相关性

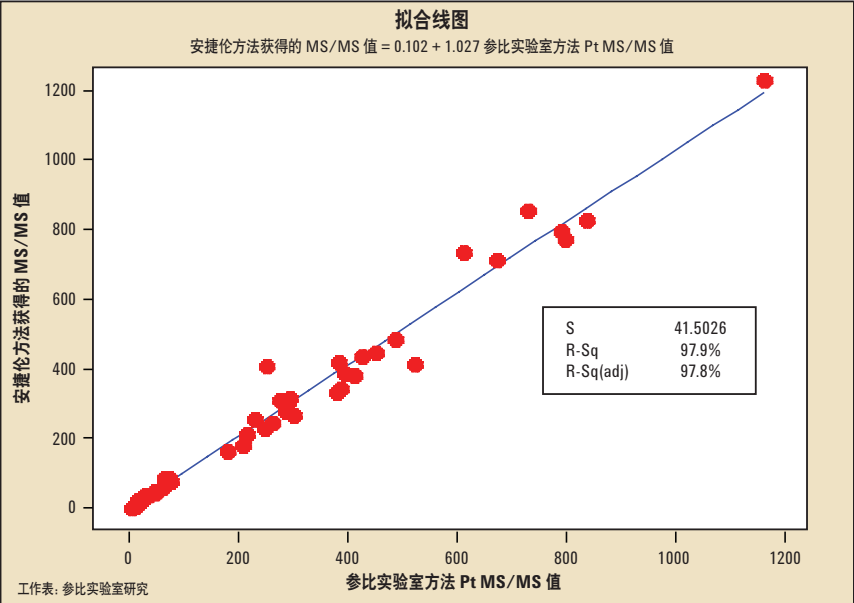


图 4. 安捷伦方法与参比实验室方法测得的 50 个血清样品中睾酮水平的相关性

结论

本文中使用的二维中心切割液相色谱与三重四极杆 LC/MS 联用系统，开发并验证了一个准确、可重现且动态范围相当宽的血清中睾酮的检测方法。检测限为 2 ng/dL，定量限为 5 ng/dL。二维中心切割液相色谱可使基质干扰和离子抑制效应降至最低，这类效应主要由血清中存在的脂质和其他生物化合物引起。分析时间小于 5 分钟。

致谢

作者非常感谢明尼苏达州罗彻斯特市梅约诊所的 Frank Crow、David Barnidge 和 Ravinder Singh 在物资方面所提供的帮助，为我们提供了 50 例血清样品用于方法验证。

参考文献

1. S. Bolour and G. Braunstein, "Testosterone Therapy in Women: A Review," *Int J Impot Res.* 17:399-408, 2005.

www.agilent.com/chem/qqq

本文仅限研究使用。不可用作诊断方法。本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

安捷伦科技公司对本文中出现的错误或由于提供、展示或使用本文所造成的间接损失不承担任何责任。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2010
中国出版，2010 年 3 月 30 日
5990-5228CHCN



Agilent Technologies