

使用 Agilent Bond Elut Plexa SPE 和 LC/MS/MS 测定血清中的激素

应用简报

生物分析，制药，临床研究

作者

Megan Juck 和 William Long
安捷伦科技有限公司

摘要

本研究开发出一种用于测定血清中的 13 种激素及其相应的内标的方法。首先使用 Agilent Bond Elut Plexa 固相萃取 (SPE) (30 mg, 1 mL) 小柱从血清中萃取激素。在 Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C8 色谱柱 (2.1 × 50 mm, 2.7 μm) 上将激素分离，随后通过液相色谱-串联质谱联用系统 (LC/MS/MS) 进行分析。在正负离子电喷雾电离 (ESI) 模式下使用 1 mM 氟化铵流动相分析激素，以改善两种模式下的激素响应。总体回收率在 80% 至 105% 范围内，相对标准偏差 (RSD) 介于 2.8% 和 5.8% 之间。本应用简报证明了 Bond Elut Plexa SPE 小柱能够简便且高效地测定血清中的激素。

前言

本研究开发出一种用聚合物固相萃取 (SPE) 测定血清中的类固醇激素的方法。表 1 列出了分析的 13 种激素的结构和化学式。Agilent Bond Elut Plexa 具有独特的聚合物架构，且有羟基化、无保留性、不含酰胺的表面。蛋白质和脂类极少结合到聚合物表面，使得样品更干净，并降低了基质干扰效应。非极性 PS-DVB 内核非常适合保留激素等小分子。本应用简报证明了 Bond Elut Plexa SPE 小柱的简便易用性和有效性。



Agilent Technologies

表 1. 所分析的 13 种激素的分子式和结构。包括同质量异构体对的信息

激素	分子式	结构	激素	分子式	结构
醛固酮	$C_{21}H_{28}O_5$		11-脱氧皮质酮	$C_{21}H_{30}O_3$	
皮质醇	$C_{21}H_{30}O_5$		雄烯二酮	$C_{19}H_{26}O_2$	
可的松	$C_{21}H_{28}O_5$		雌酮	$C_{18}H_{22}O_2$	
皮质酮	$C_{21}H_{30}O_4$		17α-羟基黄体酮	$C_{21}H_{30}O_3$	
11-脱氧皮质醇	$C_{21}H_{30}O_4$		二氢睾酮 (DHT)	$C_{19}H_{30}O_2$	
β-雌二醇	$C_{18}H_{24}O_2$		孕酮	$C_{21}H_{30}O_2$	
睾酮	$C_{19}H_{28}O_2$		<p>同质量异构体对: 醛固酮和可的松 11-脱氧皮质酮和 17α-羟基黄体酮 11-脱氧皮质醇和皮质酮</p>		

实验部分

试剂与化学品

所有试剂均为 HPLC 级或更高等级。甲醇购自 Honeywell (Muskegon, MI, USA)。水经由 EMD Millipore Milli-Q Integral 系统 (Darmstadt, Germany) 纯化。试剂级甲酸 (FA, 部件号 G2453-85060) 来自安捷伦科技公司。氟化铵购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。11-脱氧皮质酮 d7 购自 Toronto Research Chemicals (Toronto, Ontario, Canada)。所有其他激素和内标均购自 Sigma-Aldrich。血清 (DC Mass Spect Gold, MSG4000) 购自 Golden West Biologicals, Inc. (Temecula, CA, USA)。血清在使用前保存于 -70 °C 下。

仪器与材料

- Eppendorf 移液器和连续分液器
- 浓缩蒸发系统
- 涡旋器和多管涡旋器 (VWR, Radnor, PA, USA)
- Agilent Vac Elut SPS 24 多管装置, 配备可容纳 13 个 100 mm 试管的收集架 (部件号 12234022)
- Agilent Bond Elut Plexa, 30 mg, 1 mL 直管柱 (部件号 12109301)
- 安捷伦质谱分析用的棕色螺纹口玻璃样品瓶, 带书写签 (部件号 5182-0716)
- 安捷伦固定螺口盖, 带 PTFE/红色硅胶隔垫 (部件号 5190-7024)
- 安捷伦样品瓶内插管, 250 µL, 去活玻璃, 带聚合物支脚 (部件号 5181-8872)

仪器

采用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统进行分析, 其中包括:

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
- 配备 Agilent 1290 FC/ALS 温控装置 (G1330B) 的 Agilent 1290 Infinity 高性能自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)

将该液相色谱系统与配备安捷伦喷射流电喷雾离子化技术的 Agilent 6460A 三重四极杆 LC/MS/MS 系统联用。采用 Agilent MassHunter 工作站软件进行所有的数据采集和分析。

样品前处理

激素混标和激素内标混合物分别采用甲醇制备。表 2 列出了各种分析物及其相应内标的浓度。各种内标与其相应的分析物具有相同的浓度。例如, 激素混标中醛固酮的浓度为 50 ng/mL, 激素混合内标中醛固酮-d4 的浓度也是 50 ng/mL。

表 2. 显示了激素和内标浓度。内标的加标浓度与母分析物浓度相同

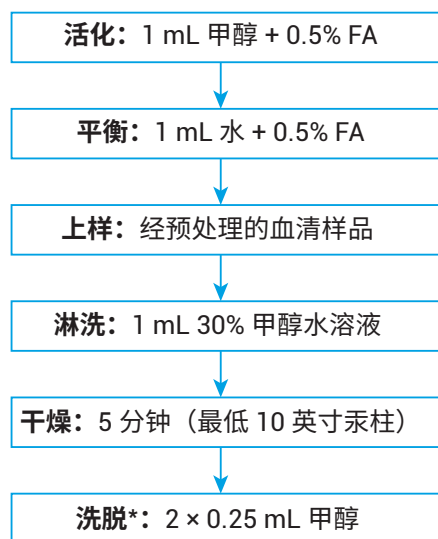
分析物/内标	标准品浓度, 各浓度 (ng/mL)
醛固酮/醛固酮 d4	50
皮质醇/皮质醇 d4	50
可的松/可的松 d8	50
皮质酮/皮质酮 d4	50
11-脱氧皮质醇/11-脱氧皮质醇 d5	50
β-雌二醇/β-雌二醇 d5	500
睾酮/睾酮 d3	50
11-脱氧皮质酮/11-脱氧皮质酮 d7	50
雄烯二酮/雄烯二酮 ¹³ C3	50
雌酮/雌酮 d3	500
17α-羟基黄体酮/17α-羟基黄体酮 d8	50
DHT/DHT d3	500
孕酮/孕酮 d9	50

样品预处理

在施用 SPE 方案之前，将 400 μL 0.5% 甲酸 (FA) 水溶液加入到 100 μL 血清中。向样品中添加 20 μL 激素混标和 20 μL 激素内标混合物。 β -雌二醇、 β -雌二醇 d5、雌酮、雌酮 d3、DHT 和 DHT d3 的最终浓度为 100 ng/mL。血清中的所有其他激素和内标的最终浓度均为 10 ng/mL。对样品进行涡旋混合和离心以除去所有血清颗粒。

SPE 之后，在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下将收集的洗脱液氮吹干，然后复溶于 100 μL 50/50 甲醇/水中。对样品进行涡旋混合，并将其转移至带玻璃内衬管的样品瓶中进行 LC/MS/MS 分析。

SPE 方案



* 执行重力洗脱。洗脱液流停止后施加低真空 (< 5 英寸汞柱, 3-5 秒)，收集所有洗脱液

图 1. 使用 Agilent Bond Elut Plexa 30 mg, 1 mL 小柱测定激素的 SPE 方案

仪器条件

参数	值
HPLC	
色谱柱:	Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C8, 2.1 mm \times 50 mm, 2.7 μm (部件号 699775-706)
保护柱:	Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C8, UHPLC 保护柱, 2.1 mm \times 5 mm, 2.7 μm (部件号 821725-922)
流动相:	A) 1 mM 氟化铵水溶液 B) 乙腈 (ACN)
流速:	0.4 mL/min
柱温:	40 $^{\circ}\text{C}$
自动进样器温度:	4 $^{\circ}\text{C}$
进样量:	10 μL
进样针清洗:	1:1:1:1 乙腈/甲醇/异丙醇/水, 含 0.2% 甲酸
梯度:	时间 (min) %B 0 20 8 50 9 95
停止时间:	10 分钟
后运行时间:	1 分钟
MS	
电喷雾电离 (ESI)	
干燥气温度:	250 $^{\circ}\text{C}$
干燥器流速:	11 L/min
雾化器压力:	35 psi
鞘气温度:	350 $^{\circ}\text{C}$
鞘气流速:	11 L/min
毛细管电压:	正离子模式, 3000 V; 负离子模式, 3500 V
喷嘴电压:	正离子模式, 0 V; 负离子模式, 1800 V
Delta EMV (+):	300 V
Delta EMV (-):	0 V

表 3. 目标分析物的 LC/MS/MS dMRM 参数和保留时间

分析物	RT (min)	母离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	子离子			CE (V)	电离模式
				定量离子 (m/z)	CE (V)	定性离子 (m/z)		
醛固酮	1.55	361.2	100	343.2	15	315.2	16	正离子
皮质醇	1.98	363.2	105	121.1	24	91.1	72	正离子
可的松	2.05	361.2	133	163.1	24	121	32	正离子
皮质酮	3.01	347.2	110	329.2	12	121	24	正离子
11-脱氧皮质醇	3.22	347.2	133	109.1	28	97.1	24	正离子
β -雌二醇	4.02	271.17	158	145.1	44	143	64	负离子
睾酮	4.17	289.2	104	109.1	24	97.1	24	正离子
11-脱氧皮质酮	4.51	331.2	133	109.1	28	97.1	24	正离子
雄烯二酮	4.70	287.2	84	109.1	24	97.1	20	正离子
雌酮	4.77	269.15	158	145.1	44	143	64	负离子
17 α -羟基黄体酮	5.01	331.2	133	109.1	28	97.1	24	正离子
DHT	5.34	291.2	158	255.1	8	77.1	80	正离子
孕酮	6.82	315.2	104	109.1	24	97.1	24	正离子

表 4. 内标的 LC/MS/MS dMRM 参数和保留时间

分析物	RT (min)	母离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	子离子		电离模式
				定量离子 (m/z)	CE (V)	
醛固酮 d4	1.54	365.4	100	347.2	15	正离子
皮质醇 d4	1.97	367.24	104	121	24	正离子
可的松 d8	2.02	369.25	143	169.1	24	正离子
皮质酮 d4	3.01	363.2	105	121	24	正离子
11-脱氧皮质醇 d5	3.20	352.26	133	100.0	24	正离子
β -雌二醇 d5	4.02	276.2	150	147.1	35	负离子
睾酮 d3	4.13	292.2	104	97.1	24	正离子
11-脱氧皮质酮 d7	4.51	338.27	84	100.1	20	正离子
雄烯二酮 ¹³ C3	4.70	290.4	104	100.1	20	正离子
雌酮 d3	4.77	272.19	158	148.1	40	负离子
17 α -羟基黄体酮 d8	4.96	339.28	138	100.1	28	正离子
DHT d3	5.31	294.25	120	258.2	12	正离子
孕酮 d9	6.75	324.29	104	100.1	24	正离子

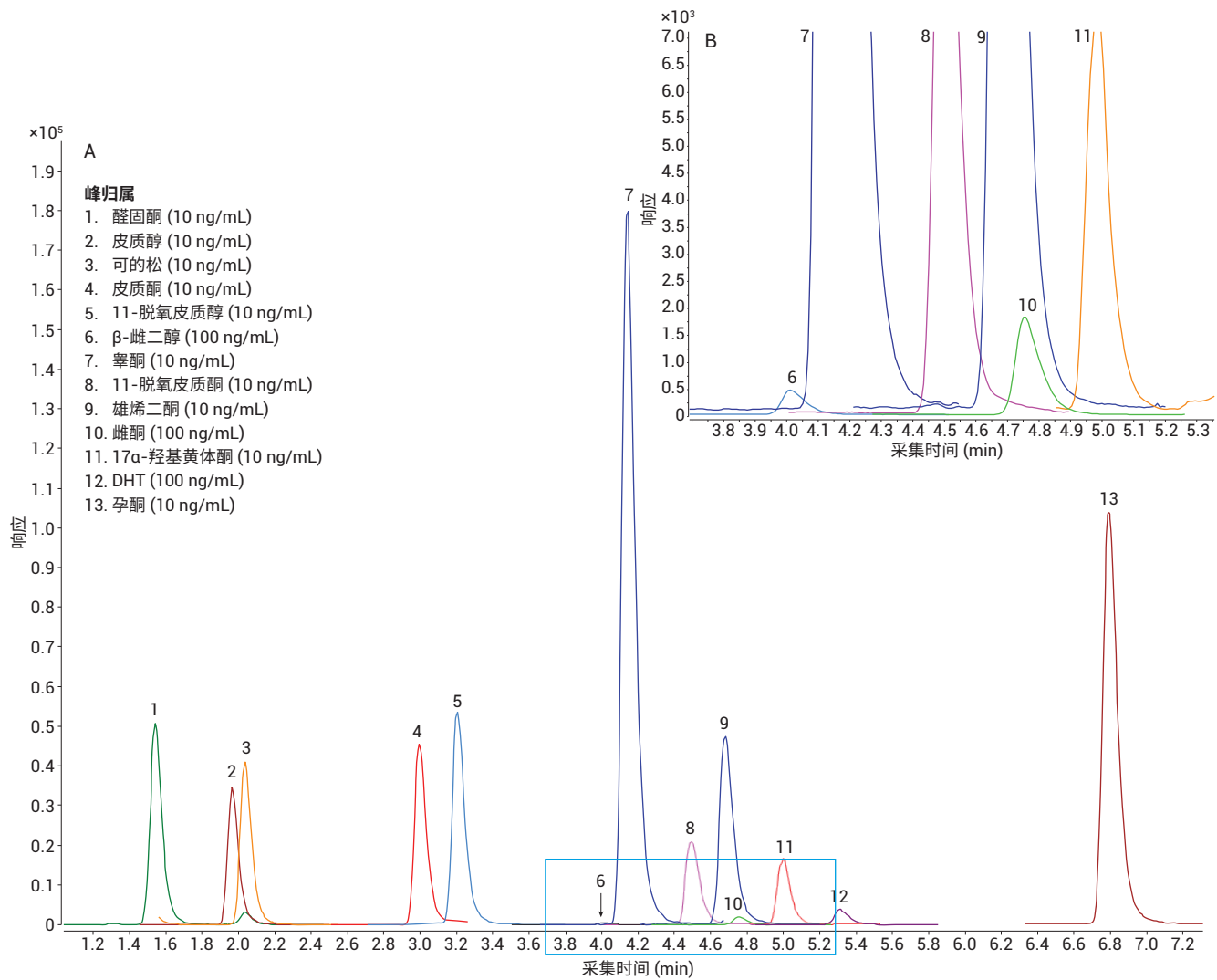


图 2. 所分析的血清中 13 种激素的最终 dMRM 色谱图 (A)，其中放大图 (B) 显示 β -雌二醇和雌酮。浓度列于图例中

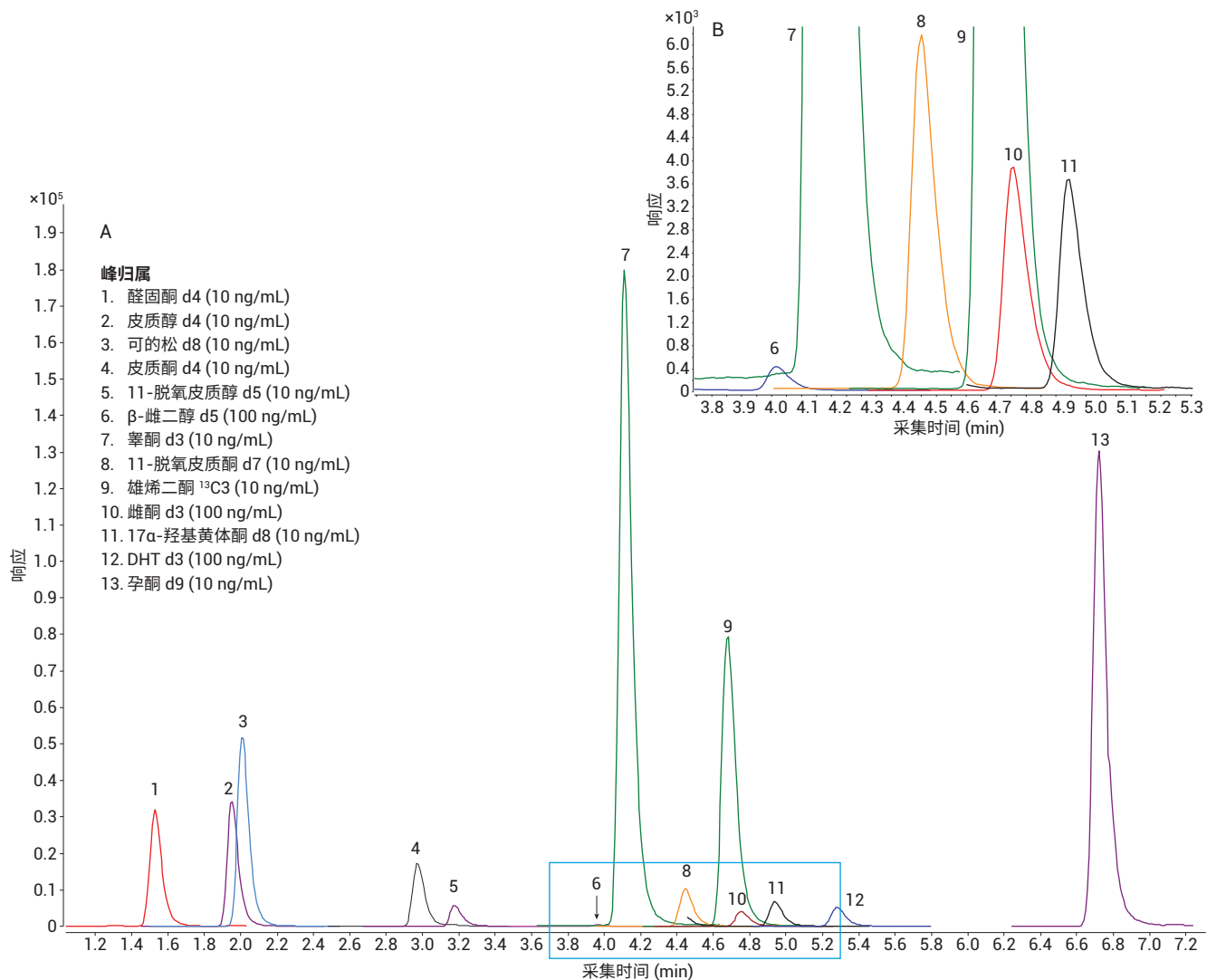


图 3. 所分析的血清中的 13 种激素内标的最终 dMRM 色谱图 (A)，其中放大图 (B) 显示 β -雌二醇 d5 和雌酮 d3。浓度列于图例中

结果与讨论

SPE 优化

在开发 SPE 方法时，重要的是使用足够强的清洗溶剂去除基质干扰物，同时确保目标分析物仍然保留在小柱上。通过收集并分析由各种候选清洗溶剂（100% 水、10% 甲醇水溶液、20% 甲醇水溶液等）得到的清洗洗脱液，可测定激素损失。经过评估后，选择 30% 甲醇水溶液作为本方案的最佳清洗溶剂。

与清洗步骤一样，也可以对洗脱溶剂进行优化。洗脱步骤的目标是选择一种最佳溶剂，该溶剂极性强到足以洗脱所有目标分析物，同时又不会洗脱在 SPE 过程中可能保留在吸附剂上的基质干扰物。本应用简报对 80% 甲醇水溶液、90% 甲醇水溶液、100% 甲醇和 50/50 甲醇/乙腈洗脱溶剂进行了评估。使用 100% 甲醇洗脱溶剂得到的激素回收率最高，因此将其用于本应用中。

条件

流动相 A: 水 + 0.1% 甲酸
流动相 B: 甲醇 + 0.1% 甲酸
梯度程序: 0–8 min: 流动相 B 由 40% 增至 55%
8.1 min: 95% 流动相 B, 保持

LC/MS/MS 优化

在初始 LC/MS/MS 方法开发过程中，分析了 11 种激素：醛固酮、皮质醇、可的松、皮质酮、11-脱氧皮质醇、雄烯二酮、11-脱氧皮质酮、睾酮、17 α -羟基黄体酮、DHT（负离子模式）和黄体酮。随后将两种负离子模式分析物（ β -雌二醇和雌酮）加入该方法中，但它们不包括在方法开发的色谱图中。

对 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 色谱柱 (2.1 \times 50 mm, 2.7 μ m) 与 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱 (2.1 \times 50 mm, 2.7 μ m) 进行比较 (图 4)。EC-C8 所具有的较短的烷基链为激素提供了稍短的保留时间，同时仍可分离所有同质量异构体对。

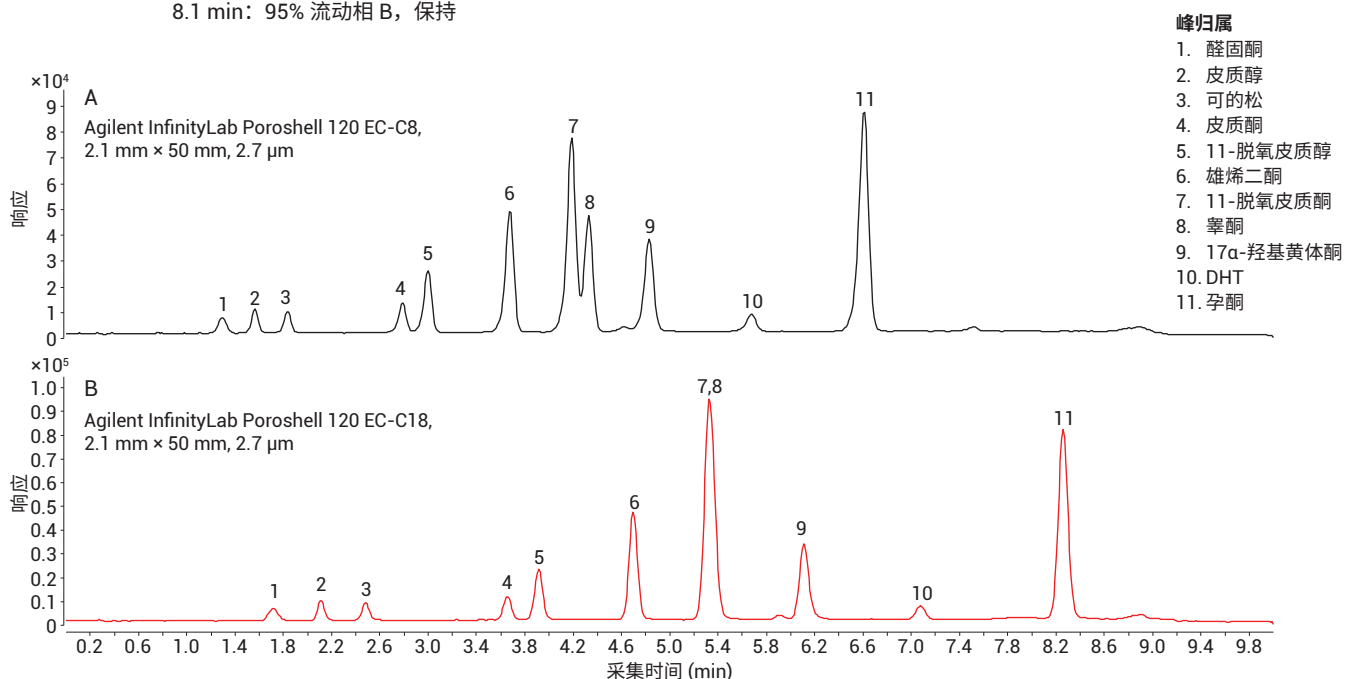


图 4. 使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 和 EC-C18 色谱柱得到的 11 种激素 (100 ng/mL) 的分离和保留时间的比较。在生成该色谱图后将 β -雌二醇和雌酮加入最终方法中，因此这两种化合物不包括在此色谱图中

还对含甲酸 (0.1%)、氢氧化铵 (0.02%, pH 10.5) 和氟化铵 (pH 6.2) 的流动相进行了评估 (图 5-7)。含氢氧化铵 (0.02%) 的高 pH 流动相被证明能够提高负离子模式下分析的激素的电离 [1]。氟化铵被证明能够改善正负离子模式下的响应 [2,3]。

大多数硅胶基液相色谱柱都不建议使用 pH 高于 8 或 9 的流动相, 因此本研究使用 Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C8 色谱柱进行评估。该色谱柱能够在 pH 高达 11 的条件下保持稳定, 还具有与 InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 色谱柱非常相似的选择性。因此, 利用 InfinityLab Poroshell HPH-C8 色谱柱对氢氧化铵和氟化铵这两种类型的流动相进行方法优化, 并选为最终的分析方法。氟化铵 (1 mM) 流动相可得到最高的分析物响应, 因此将其用于最终色谱方法中。

条件

流动相 A: 0.1% 甲酸水溶液或 0.02% 氢氧化铵水溶液
 流动相 B: 甲醇
 梯度程序: 0-9 min: 流动相 B 由 40% 增至 60%
 9-11 min: 流动相 B 由 60% 增至 95%
 总运行时间: 12 min + 1 min 后运行时间
 流速: 0.4 mL/min
 进样量: 10 μ L

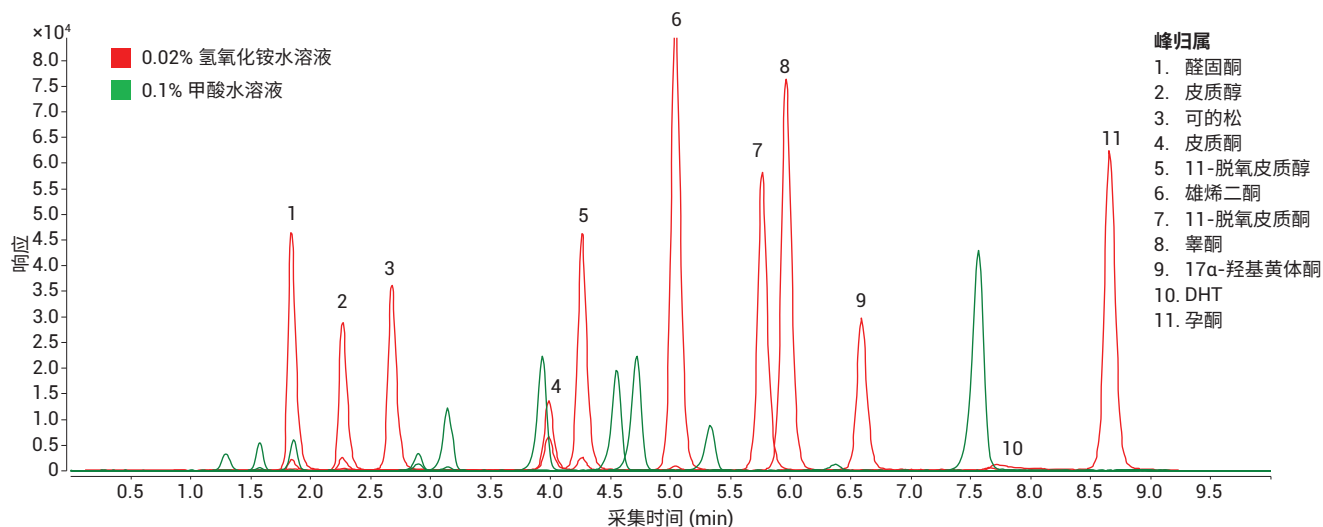


图 5. 使用 Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C8, 2.1 mm \times 50 mm, 2.7 μ m 色谱柱并以 0.1% 甲酸水溶液 (绿色迹线) 和 0.02% 氢氧化铵水溶液 (红色迹线) 作为流动相得到的 100 ng/mL 激素样品的色谱图。为便于对比, 采用相同的 LC/MS/MS 梯度。生成这些色谱图后加入 β -雌二醇和雌酮, 因此这两种化合物不包括在该色谱图中

条件

流动相 A: 1 mM 氟化铵水溶液或 0.02% 氢氧化铵水溶液

流动相 B: 甲醇

梯度程序: 0-9 min: 流动相 B 由 40% 增至 60%
9-11 min: 流动相 B 由 60% 增至 95%

总运行时间: 12 min + 1 min 后运行时间

流速: 0.4 mL/min

进样量: 10 μ L

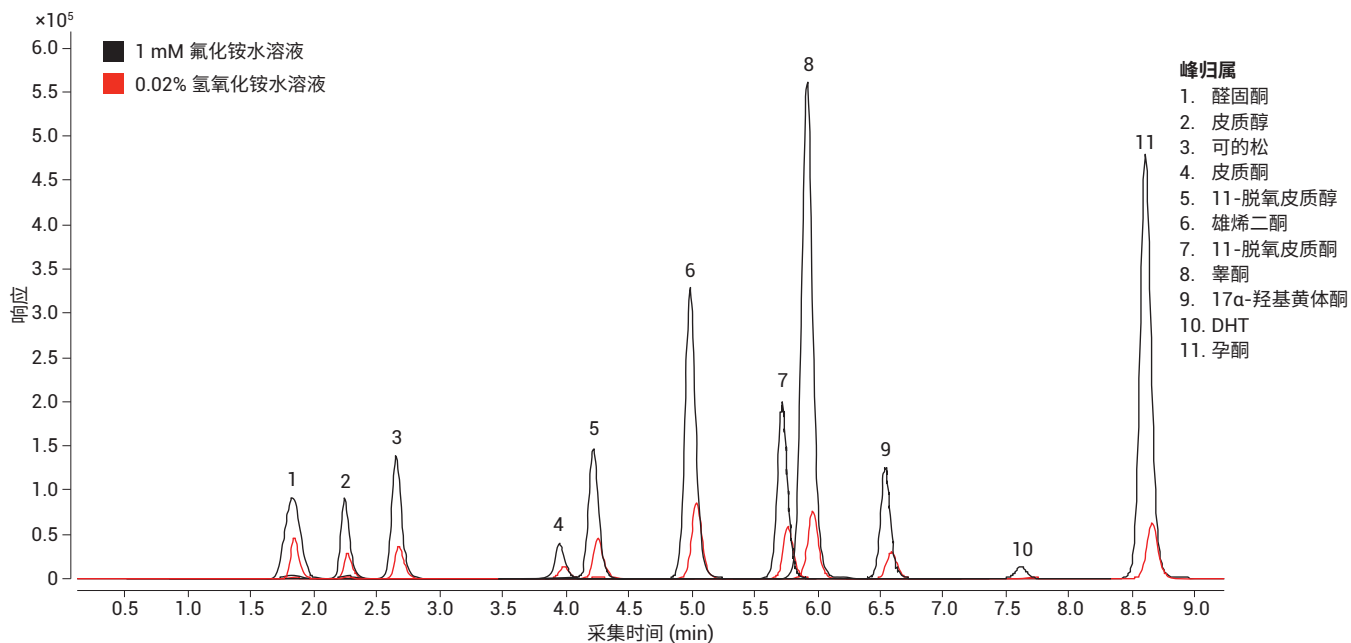


图 6. 使用 1 mM 氟化铵水溶液（黑色迹线）和 0.02% 氢氧化铵水溶液（红色迹线）得到的 100 ng/mL 激素样品的总离子流色谱图。使用 Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C8, 2.1 mm \times 50 mm, 2.7 μ m。为便于对比，采用相同的 LC/MS/MS 梯度。生成这些色谱图后加入 β -雌二醇和雌酮，因此这两种化合物不包括在该色谱图中

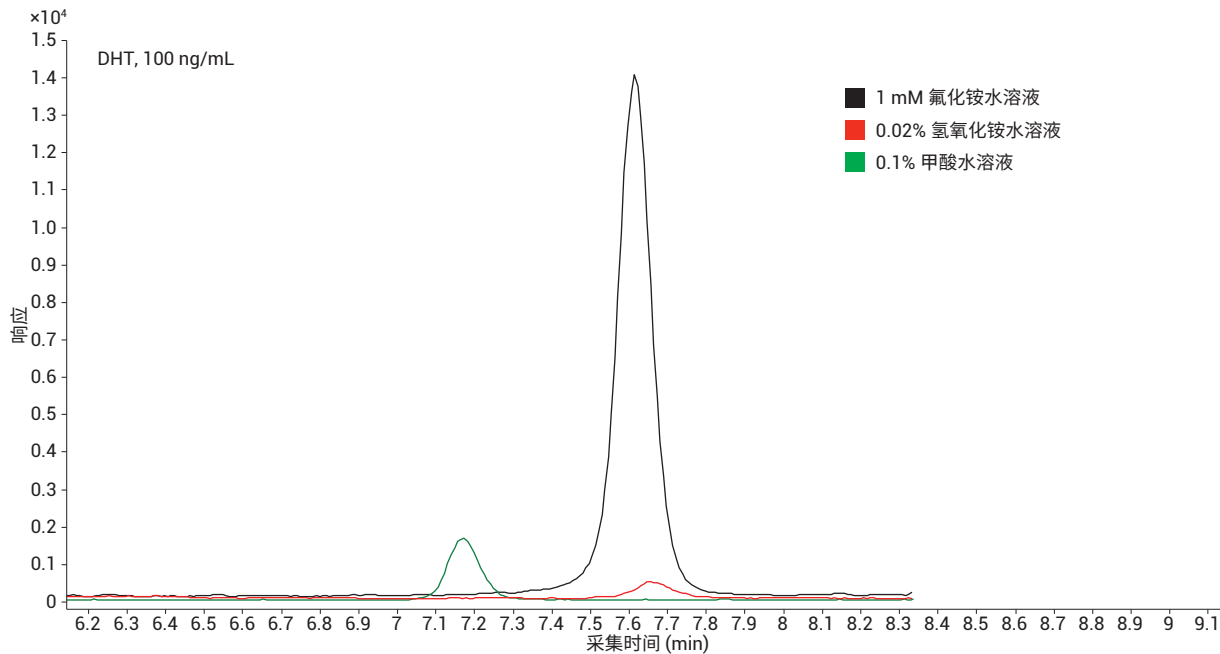


图 7. 利用以下三种流动相得到的 DHT (100 ng/mL; 负离子模式) 的 MRM 叠加色谱图: 1 mM 氟化铵水溶液 (黑色), 0.02% 氢氧化铵水溶液 (红色) 和 0.1% 甲酸水溶液 (绿色)。使用 Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C8, 2.1 mm × 50 mm, 2.7 μm。梯度条件列于图 5 和图 6 的说明中

回收率与重现性

使用上述 SPE 方案萃取预加标血清样品和空白样品, 评估回收率和重现性。在血清样品中预加标浓度为 100 ng/mL 的 β-雌二醇、雌酮和 DHT。其余 10 种激素的预加标浓度为 10 ng/mL。使用 SPE 方案对空白样品和加标血清样品进行萃取。在最终吹干之后, 在空白样品中后加标浓度为 10 和 100 ng/mL 的标准品, 如前文所述。比较预加标样品和后加标样品 (n = 5) 的平均峰面积, 测定百分回收率和 RSD 值。

表 5. 列出了百分回收率和 RSD 值 (在括号内示出), n = 5

分析物	加标浓度 (ng/mL)	%回收率 (RSD)
醛固酮	10	94 (5.8)
皮质醇	10	102 (5.4)
可的松	10	99 (5.7)
皮质酮	10	97 (5.1)
11-脱氧皮质醇	10	97 (3.9)
β-雌二醇	100	81 (5.3)
睾酮	10	86 (3.3)
11-脱氧皮质酮	10	91 (4.6)
雄烯二酮	10	92 (4.7)
雌酮	100	80 (3.9)
17α-羟基黄体酮	10	105 (4.2)
DHT	100	88 (2.8)
孕酮	10	90 (4.0)

结论

本研究开发出一种使用 Agilent Bond Elut Plexa SPE 小柱测定血清中的 13 种激素及其相应内标的方法。通过加入 1 mM 氯化铵，在 Agilent 6460 三重四极杆 LC/MS/MS 的正负离子模式下，分析物的响应均获得很大增加。采用 Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C8 (2.1 mm × 50 mm, 2.7 μm) 色谱柱可快速完成分析，使三对同质量异构体得到基线分离，获得更高重现性的积分和定量。此外，该色谱柱适用的 pH 范围较宽，是方法开发的理想色谱柱。本文所述的方法提供了优异的回收率 (80%-105%) 和较低的 RSD 值 (2.8%-5.8%)。Agilent Bond Elut Plexa SPE 产品几乎无需方法开发，且简便易用，因此是生物分析的理想选择。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

参考文献

1. Fu, R.; Zhai, A. *Determination of Hormones in Drinking Water by LC/MS/MS Using an Agilent InfinityLab Poroshell HPH Column (EPA 539)* (使用 Agilent InfinityLab Poroshell HPH 色谱柱和 LC/MS/MS 测定饮用水中的激素 (EPA 539)); 应用简报, 安捷伦科技公司, 出版号 5991-6995EN, **2016**
2. Hindle, R. *Improved Analysis of Trace Hormones in Drinking Water by LC/MS/MS (EPA 539) using the Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS* (使用 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统和 LC/MS/MS 改善饮用水中痕量激素的分析 (EPA 539)); 应用简报, 安捷伦科技公司, 出版号 5991-2473EN, **2013**
3. Fiers, T.; Casetta, B.; Bernaert, B.; Vandersypt, E.; Debock, M.; Kaufman, J. Development of a highly sensitive method for the quantification of estrone and estradiol in serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry without derivatization. *Journal of Chromatography B*. **2012**, 893-894, 57-62

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2017

2017 年 5 月 2 日, 中国印刷

5991-8042ZHCN



Agilent Technologies