

高效液相色谱串联质谱法测定血清非结合雌三醇的前处理研究^{*}

郑松柏, 张乔轩, 王建兵, 林海标, 曾瑞丽, 韩丽乔, 庄俊华, 黄宪章[△] (广州中医药大学附属第二医院, 广州 510120)

【摘要】 目的 优化高效液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)测定血清游离雌三醇(uE_3)的前处理方法。**方法** 以活性炭吸附血清为研究基质,通过加入已知量的雌三醇(E_3)标准品及 E_3 -2-3-4- $^{13}C_3$ 内标,在 LC-20AD XR 高效液相色谱系统和 API 5500 串联四级杆质谱仪上对 E_3 检测的色谱条件、质谱条件及萃取条件等进行优化。**结果** 色谱条件:选用菲罗门 Knetex 色谱柱(100.0 mm×2.1 mm, 2.6 μm);有机相为甲醇,水相为 0.1 mmol/L 氟化铵水溶液,8 min 梯度洗脱。质谱条件:选用电喷雾(ESI)负离子模式和多反应监测(MRM)模式分析,选择质荷比(m/z)287→ m/z 145 作为 E_3 的定量离子对, m/z 287→ m/z 171 作为定性监测离子对;选择 m/z 290→ m/z 148 作为内标的定量离子对, m/z 290→ m/z 174 作为定性监测的离子对。萃取条件:萃取剂为正己烷/乙酸乙酯(50/50, v/v),样品与萃取剂的比例为 1:2,萃取率可达 85.71%。**结论** E_3 检测的色谱条件、质谱条件、萃取条件已得到全面优化,为后续建立 LC-MS/MS 测定人血中 uE_3 的参考方法打下良好基础。

【关键词】 雌三醇; 高效液相色谱; 串联质谱

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.10.004 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)10-1347-03

Investigate the pretreat conditions of the determination of unconjugated estriol in human serum using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry^{*} ZHENG Song-bai, ZHANG Qiao-xuan, WANG Jian-bing, LIN Hai-biao, ZENG Rui-li, HAN Li-qiao, ZHUANG Jun-hua, HUANG Xian-zhang[△] (Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

【Abstract】 Objective To optimize the pretreat conditions of the determination of unconjugated estriol(uE_3) in human serum using isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry (ID-LC-MS/MS). **Methods** Estriol (purity>99.3%) and estriol-2-3-4- $^{13}C_3$ were the standard and the internal standard respectively. Activated carbon adsorption serum was used for the study of serum matrix. The liquid chromatography(LC)and mass spectrometry(MS) condition were optimized to increase the sensitivity of the detection by use of the the AB/Sciex API 5500 tandem mass spectrometer equipped with Shimadzu LC-20AD XR system. **Results** LC condition: Knetex 100×2.1 mm, 2.6 μm as the column, the mobile phase was fluoride (NH_4F) in water (buffer A) and methanol (buffer B). The analysis of uE_3 was accomplished within 8 min. MS condition: the samples were analyzed by ID-LC-MS/MS system in the negative electro-spray ionization (ESI) mode and multiple reaction monitor(MRM) mode. And the MRM transitions used for each analytes were: (m/z) 287→145 (quantitative) and m/z 287→171 (qualitative) for uE_3 , m/z 290→148 (quantitative) and m/z 290→174 (qualitative) for internal standard. Extraction: n-Hexane/ethyl acetate (50:50, v/v) was chosen to the extraction solvent, and the volume ratio of the serum sample to extraction solvent was 1:2. The mean extraction efficiency for the method was determined to be 85.71%. **Conclusion** This study successfully optimized the LC and MS conditions and the ideal condition was obtained of the determination of uE_3 in human serum using ID-LC-MS/MS. The applicable extract method was determined. This study was an important base of establish the candidate reference measurement procedure for the determination of uE_3 in human serum using ID-LC-MS/MS.

【Key words】 estriol; high performance liquid chromatography; tandem mass spectrometry

游离雌三醇(uE_3)的测定在孕妇孕期胎盘功能监测、唐氏综合征的筛查等方面发挥重要作用^[1-2]。孕妇血清 uE_3 浓度也可预示胎儿早产及先兆子痫的可能性^[3],也常用于非孕妇妇女肿瘤流行病学筛查、乳腺癌及宫颈癌的风险评估等^[4]。测定 uE_3 的方法主要有放射免疫分析(RIA)、酶免疫分析(EIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、时间分辨荧光分析(TRFIA)、化学发光

免疫分析(CLIA)等^[4-7],目前临床实验室的常规检测技术是 CLIA 法。然而以抗原-抗体免疫反应为基础的方法,不可避免地带来了非特异性反应的问题而使得测定结果有明显系统误差,同时各实验室使用不同生产厂家的试剂导致结果可比性差^[8]。免疫学方法在临床检测激素方面的不足势必要求建立新的检测方法,其中同位素稀释-高效液相色谱-串联质谱(ID-

^{*} 基金项目:科技部重大新药创制子项目(2012ZX09303009-003)。

作者简介:郑松柏,男,副主任检验师,博士,主要从事实验室质量管理研究。 [△] 通讯作者, E-mail: huangxz020@163.com。

LC-MS/MS)技术在内分泌疾病检测中快速发展和应用使这项技术在激素类物质检测中具有越来越突出的地位,与免疫学方法的特异性相比具有非常明显的优势^[9-10]。因此,将 ID-LC-MS/MS 技术应用于血清 uE₃ 的检测,并建立参考方法具有重要的研究意义。本研究对 uE₃ 的色谱条件、质谱条件、萃取条件进行全面摸索和系统的优化,以期为建立 uE₃ 的 ID-LC-MS/MS 参考方法打下良好的基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 主要仪器 LC-MS/MS 系统由 LC-20AD XR 高效液相色谱系统(日本岛津公司)和 API 5500 串联四级杆质谱仪(美国 AB SCIEX 公司)组成,分析软件为美国 AB SCIEX 公司的 Analyst1. 5. 2; 色谱柱:菲罗门 Knietex 色谱柱(2. 6 μm, 100. 0 mm×2. 1 mm),赛默飞世尔 Hypersil gold 色谱柱(5 μm, 50. 0 mm×2. 1 mm),日本岛津 Shim-park XR-ODS II 色谱柱(2. 2 μm, 75. 0 mm×2. 0 mm);离心机(美国 Thermo Scientific 公司);氮吹仪(中国天津 Agela Technologies 公司);Eppendorf Research 型加样枪;赛多利斯 CP225D 十万分之一分析天平;Millipore Simplicity UA 型超纯水机。

1.1.2 试剂 雌三醇(E₃)标准品(纯度大于 99. 3%)、E₃-2-3-4-¹³C₃、氟化铵等均购自美国 Sigma 公司。LC-MS 级甲醇、乙腈,高效液相色谱级正己烷购自德国 Merck 公司,LC-MS 级乙酸乙酯购自 J. T. Baker 公司,实验用水为本实验室自制高纯水。活性炭吸附血清为研究基质,检测前血清样品在-20℃条件下保存。

1.2 方法

1.2.1 质谱条件优化 对离子源、离子模式、离子对、气源参数、电压参数等进行了系统的优化。

1.2.2 色谱条件优化 比较 3 种色谱柱的分离效果及信号响应,比较乙腈、甲醇、乙腈/甲醇混合液(50 : 50, v/v)分别作为有机相时对信号响应的影响。以 E₃-2-3-4-¹³C₃ 作为内标,分别配置浓度为 2 ng/mL 的 E₃ 标准溶液和浓度为 1 ng/mL 的内标溶液作为标准样品,进样量为 20 μL,保持其他色谱、质谱条件一致,对水相缓冲盐进行了筛查,分别比较了纯水与甲酸铵(0. 1 mmol/L)、乙酸铵(0. 1 mmol/L)和氟化铵(0. 1 mmol/L)。确定了缓冲盐的种类后,对含有不同浓度缓冲盐的水相进行了响应信号的比较,优化色谱条件。

1.2.3 萃取条件优化 选择二氯甲烷、乙醚、正己烷/乙酸乙酯混合液等多种萃取剂进行萃取条件的优化。操作方法:在 15 mL 离心管中加入 1 mL 含有 E₃ 和内标样本和 2 mL 萃取液,漩涡混匀 10 min 后离心机高速离心 10 min (13 000 r/min),取上层(二氯甲烷取下层)于另一 15 mL 离心管中,再次加入 2 mL 萃取液重复萃取,两次萃取后的混合液在 50℃条件下氮气吹干,加入 1 mL 甲醇水复溶,漩涡混匀 5 min 后高速离心 5 min(13 000 r/min)取上清液(应吹干后用统一体积的流动相溶液溶解后进样,如果直接用萃取液进样,可能产生较大的溶剂峰)进样测定。确定了萃取剂的种类之后,对萃取剂的量和萃取次数进行了优化。准备两组样品,A 组萃取前在血清中加入已知量的 E₃(2 ng/mL)和等量内标,B 组在萃取前加 2 ng/mL E₃,在萃取之后加内标。样品的绝对回收率就是使用该萃取剂的萃取率,绝对回收率由两组样品中 E₃ 与内标的浓度比值来计算。考察了样品与萃取剂体积比分别为 1 : 1、1 : 2、1 : 3、1 : 4 时的萃取率。

1.3 统计学处理 所有数据统计处理均在 Microsoft Office Excel 2007 上进行。

2 结果

2.1 质谱条件优化 在正离子模式下无信号响应。电喷雾电离源(ESI)负离子模式的响应优于大气压化学电离源(APCI)负离子模式。喷雾气(Gas1)、雾化辅助加热气(Gas2)、气帘气(CUR)和碰撞气(CAD)均为氮气,进气压力分别为 65 psi、65 psi、30 psi 和 7 psi,Gas2 的加热温度为 650℃,喷雾电压(IS)为-4 500 V。优化后,对应离子对的去簇电压(DP)、碰撞电压(CE)、出口电压(CXP),见表 1。选择质荷比(m/z)287→m/z 145 作为 E₃ 的定量离子对,m/z 287→m/z 171 作为定性监测的离子对;选择 m/z 290→m/z 148 作为内标的定量离子对,m/z 290→m/z 174 作为定性监测的离子对。

表 1 质谱优化参数

离子对	采集时间 (ms)	标记	DP(V)	CE(V)	CXP(V)
m/z 287→m/z 145	30	E ₃ -1	-100	-53	-16
m/z 287→m/z 171	30	E ₃ -2	-100	-48	-16
m/z 290→m/z 148	30	内标-1	-160	-55	-16
m/z 290→m/z 174	30	内标-2	-160	-50	-16

2.2 液相条件优化 菲罗门 Knietex 色谱柱(2. 6 μm, 100. 0 mm×2. 1 mm)在分析 E₃ 时柱效和响应均最好。甲醇作为有机相,峰形好,响应最高。水相加入甲酸铵出现离子抑制,响应降低,适当浓度氟化铵可提高其离子化效率。不同氟化铵浓度下,出峰的响应值和信噪比(S/N)结果见表 2。当氟化铵的浓度为 0. 10 mmol/L 时,其响应值和 S/N 均最大。优化后的色谱条件为:以甲醇作为有机相,0. 10 mmol/L 氟化铵水溶液作为水相,洗脱梯度设置:0 min, 30%有机相;1 min, 30%有机相;3. 5 min, 95%有机相;5 min, 95%有机相;5. 1 min, 30%有机相;8 min, 30%有机相,流动相流速 300 μL/min,进样量 20 μL。在优化后的质谱条件和色谱条件下,以 20 μL 2 ng/mL E₃ 标准溶液进样,其保留时间为 4. 28 min,柱效及 E₃ 与杂质峰的分度度均良好。

表 2 不同浓度氟化铵对 E₃ 检测的响应值和 S/N

氟化铵浓度(mmol/L)	响应值	S/N
0. 02	3. 80×10 ⁵	1 041
0. 05	4. 30×10 ⁵	1 058
0. 10	5. 50×10 ⁵	1 274
0. 50	4. 20×10 ⁵	702

2.3 萃取条件的优化 二氯甲烷萃取率不到 10%,不宜采用。乙醚萃取能力强,但是毒性很强,对工作人员的毒害大,尽量考虑使用其他替代的萃取剂。正己烷及乙酸乙酯毒性比乙醚小,在 50℃左右都能气化。选择样品与萃取剂的体积比为 1 : 2,采用一次萃取的方法,在优化好的色谱、质谱条件下对不同比例的正己烷/乙酸乙酯的萃取率进行了比较,最后选择正己烷/乙酸乙酯(50/50, v/v)作为萃取剂。确定了萃取剂的种类之后,对萃取剂的量和萃取次数进行了优化。准备 A、B 两组样品,考察了样品与萃取剂体积比分别为 1 : 1、1 : 2、1 : 3、1 : 4 时,2 次萃取后的萃取率分别为 40. 97%、85. 71%、

87.63%, 88.96%, 综合考虑萃取效率、经济、环保等因素, 最后选择加入萃取剂体积为样品体积的 2 倍。

3 讨 论

已有文献报道, 气相色谱-质谱联用方法测定血清 uE_3 等甾体激素, 这些方法都有很好的特异性, 但是往往反应通量很低, 需要较大体积的血清样本。目前, 也有利用同位素稀释液质联用法 (ID-LC-MS/MS) 检测血清中的 uE_3 , 但是实验中采用了衍生的步骤, 而衍生实验对于实验人员的专业要求较高, 不利于各个实验室的普及。本研究采用液液萃取后直接进行 LC-MS/MS 测定的方法, 以 $E_3-2-3-4-^{13}C_3$ 作为内标加入血清样本中, 混合均匀后进行液液萃取, 用 C18 反相色谱柱分离, 分析时间为 8 min, 定量用 ESI 负离子模式选择离子监控模式, E_3 的离子对为 $m/z\ 287 \rightarrow m/z\ 145$ (定量), $m/z\ 287 \rightarrow m/z\ 171$ (定性)。对应的内标离子对为 $m/z\ 290 \rightarrow m/z\ 148$ (定量), $m/z\ 290 \rightarrow m/z\ 174$ (定性)。

LC-MS/MS 与高效液相色谱分析 (HPLC) 在流动相缓冲液的选择和有机相的选择方面有显著差异。因为 LC-MS/MS 在选择流动相缓冲盐时要考虑缓冲盐的挥发性及其对分析物形成带电离子的影响。因此, 对 LC-MS/MS 流动相缓冲盐的种类进行优化, 对色谱峰的峰形具有重要意义。缓冲盐的浓度对提高离子响应, 增加检测灵敏度也有很大影响。梯度和进样量的优化, 可以选择适合的保留时间, 使得色谱分离结果满足定量检测的要求。

从前期利用 ID-LC-MS/MS 技术建立 E_3 常规检测方法的经验和文献报道分析^[2], 前处理中可能出现萃取效率较低的问题, 该文献采用乙醚进行萃取, 其萃取率仅为 45%。虽然使用了内标, 萃取率对方法的准确性几乎没有影响^[11-13]。但萃取率太低会直接影响仪器的检测限和定量限。本研究选用二氯甲烷、乙醚、正己烷/乙酸乙酯混合液等多种萃取剂进行萃取条件的优化。正己烷对 E_3 的一次萃取效率在 3% 以下。纯乙酸乙酯萃取效率较高, 但乙酸乙酯萃取时易发生乳化现象, 会影响萃取重复性及延长吹干时间, 故应减少乙酸乙酯用量。因此, 本研究最终选择正己烷/乙酸乙酯混合液作为萃取剂。考虑到不同的组成比例对萃取率的影响, 本研究考察了不同比例的正己烷/乙酸乙酯的萃取率, 当乙酸乙酯的体积浓度大于或等于 50% 时, 该混合萃取剂具有良好的萃取率。因此, 本研究选择正己烷/乙酸乙酯 (50/50, v/v) 作为萃取剂。不同萃取剂量对血清 uE_3 的萃取率也有显著影响。综合考虑到实验的效率, 减少氮气吹干的时间和节约萃取剂, 综合考虑萃取效率、经济、环保等因素, 本研究选择样品与萃取剂的体积比为 1:2, 2 次萃取进行后续研究。

综上所述, 本研究对 ID-LC-MS/MS 测定血清 uE_3 的方法进行了系统研究, 在此基础上, 对质谱、色谱条件和前处理方法进行了优化, 减少了衍生化步骤, 得到了较好的结果。在后续的研究中, 将以优化的 LC-MS/MS 方法为参考进行样品的前处理, 进而建立人血中 uE_3 检测的参考方法。

参考文献

[1] Bestwick JP, Huttly WJ, Wald NJ. Unconjugated estriol values between 14 and 22 weeks of gestation in relation to prenatal screening for Down syndrome[J]. Prenat Diagn,

2012, 32(3):299-301.

- [2] Huang X, Spink DC, Schneider E, et al. Measurement of unconjugated estriol in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and assessment of the accuracy of chemiluminescent immunoassays[J]. Clin Chem, 2014, 60(1):260-268.
- [3] Olsen RN, Dunsmoor-Su R, Capurro D, et al. Correlation between spontaneous preterm birth and mid-trimester maternal serum estriol[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2014, 27(4):376-380.
- [4] Faupel-Badger JM, Fuhrman BJ, Xu X, et al. Comparison of liquid chromatography-tandem mass spectrometry, RIA, and ELISA methods for measurement of urinary estrogens[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010, 19(1):292-300.
- [5] Wolford ST, Argoudelis CJ. Measurement of estrogens in cow's milk, human milk, and dairy products[J]. J Dairy Sci, 1979, 62(9):1458-1463.
- [6] Weissbach A, Freymann E, Hubl W, et al. Enzymeimmunoassay of unconjugated estriol in serum and saliva during pregnancy[J]. Exp Clin Endocrinol, 1985, 86(2):178-184.
- [7] Ghosh M, Dhar TK, Ali E, et al. Homogeneous enzyme immunoassay of estriol in pictogram amounts[J]. Clin Chim Acta, 1983, 128(2/3):223-231.
- [8] Benn PA, Makowski GS, Egan JF, et al. Reproducibility of risk figures in 2nd-trimester maternal serum screening for down syndrome: comparison of 2 laboratories[J]. Clin Chem, 2006, 52(11):2087-2094.
- [9] 韩丽乔, 庄俊华, 黄宪章. 质谱技术及其在临床检验中的应用[J]. 检验医学, 2013, 28(3):252-256.
- [10] Gust M, Vulliet E, Giroud B, et al. Development, validation and comparison of LC-MS/MS and RIA methods for quantification of vertebrates-like sex-steroids in prosobranchmolluscs[J]. J Chromatogr B, 2010, 878(19):1487-1492.
- [11] Karapitta CD, Xenakis A, Papadimitriou A, et al. A new homogeneous enzyme immunoassay for thyroxine using glycogen phosphorylase b-thyroxine conjugates[J]. Clin Chim Acta, 308(1/2):99-106.
- [12] Xu X, Roman JM, Issaq HJ, et al. Quantitative measurement of endogenous estrogens and estrogen metabolites in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2007, 79(20):7813-7821.
- [13] Oikonomakos NG, Tsitsanou KE, Zographos SE, et al. Allosteric inhibition of glycogen phosphorylase a by the potential antidiabetic drug 3-isopropyl 4-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydro-1-ethyl-2-methyl-pyridine-3,5,6-tricarboxylate[J]. Protein Sci, 1999, 8(10):1930-1945.