

# 同位素稀释超高效液相色谱-串联质谱法测定人血清中孕酮

薛晋美<sup>1</sup>, 孙光<sup>2</sup>, 李会强<sup>3</sup>, 那平<sup>1</sup>, 乔斌<sup>1\*</sup>

(1. 天津大学 化工学院, 天津 300350; 2. 天津市公安医院检验科, 天津 300042;  
3. 天津医科大学 检验学院, 天津 300203)

**摘要:**建立了超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)测定人血清中孕酮的分析方法。血清样品经乙酸乙酯、正己烷液液萃取(LLE)后,采用Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)进行梯度分离,色谱运行时间为5 min,采用电喷雾(ESI)正离子电离模式和多反应监测(MRM)扫描模式,同位素内标法定量。考察了两步萃取法对孕酮的提取效果,不同流动相的分离效果以及样品稳定性,结果表明以甲醇-0.1%氨水溶液为流动相时分离效果较好。优化条件下,孕酮在10~10 000 pg/mL范围内线性关系良好( $r^2 = 0.9998$ ),方法检出限和定量下限分别为5、10 pg/mL;平均加标回收率为91.5%~106%,日内相对标准偏差(RSD)为1.2%~8.2%,日间RSD为4.1%~9.1%。采用该方法对30个真实血清样品进行测定,孕酮质量浓度为0.050 2~1.363 5 ng/mL,均在正常生理范围内。该方法灵敏度高、准确可靠,可用于临床血清样品中孕酮生理水平的检测。

**关键词:**孕酮;同位素稀释;超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS);液液萃取(LLE);血清  
中图分类号:O657.7;R446.11 文献标识码:A 文章编号:1004-4957(2020)05-0652-05

## Determination of Progesterone in Human Serum Using Isotope Dilution Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

XUE Jin-mei<sup>1</sup>, SUN Guang<sup>2</sup>, LI Hui-qiang<sup>3</sup>, NA Ping<sup>1</sup>, QIAO Bin<sup>1\*</sup>

(1. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300350, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Tianjin Gong'an Hospital, Tianjin 300042, China; 3. School of Medical Laboratory, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China)

**Abstract:** An ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) with isotope dilution was developed for the analysis of progesterone in human serum. The serum samples were extracted by liquid-liquid extraction (LLE) with ethyl acetate and *n*-hexane, then separated on an Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) by gradient elution in 5 min, and finally analyzed by UPLC-MS/MS with electrospray ionization in positive ion mode under multiple reaction monitoring (MRM) mode and quantified by isotope internal standard. Impact of the two-step LLE extraction on progesterone was investigated. Higher separation performance was observed when methanol-water containing 0.1% aqueous ammonia was used as mobile phase. The stability of serum extracts was also investigated. Results showed that the calibration curves for progesterone were linear in the concentration range of 10-10 000 pg/mL with correlation coefficients ( $r^2$ ) of 0.9998. The limit of detection (LOD,  $S/N=3$ ) and limit of quantitation (LOQ,  $S/N=10$ ) were 5 pg/mL and 10 pg/mL, respectively. Recoveries for progesterone ranged from 91.5% to 106% with the intra-relative standard deviations (RSD) and inter-RSD of 1.2% - 8.2% and 4.1% - 9.1%, respectively. This method was applied in the determination of progesterone in serum samples from thirty individual donors with the progesterone concentrations ranging from 0.050 2 ng/mL to 1.363 5 ng/mL. With the characteristics of high sensitivity, good accuracy and reliability, this method could be used in the detection of progesterone in clinical serum samples.

收稿日期: 2019-11-28; 修回日期: 2020-01-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(81772259)

\* 通讯作者: 乔斌, 高级工程师, 研究方向: 色谱分离及生物质谱, E-mail: jobin@tju.edu.cn

**Key words:** progesterone; isotope dilution; ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC – MS/MS); liquid – liquid extraction (LLE); serum

孕酮 (Progesterone) 又称黄体酮, 是一种具有重要生物活性的类固醇激素, 其在非孕期女性体内主要由卵巢黄体分泌, 孕期女性主要由胎盘分泌, 在内分泌、生殖、经期过程方面起关键调控作用。其在男性体内主要在促肾上腺皮质激素调控下由肾上腺分泌<sup>[1]</sup>。作为一种神经类固醇, 孕酮在大脑神经方面也有重要的信号调节功能<sup>[2]</sup>。成年女性血清中的孕酮浓度通常在 0.15 ~ 25 ng/mL 之间, 孕期约升高至 230 ng/mL<sup>[3]</sup>; 男性和更年期女性体内的孕酮浓度较低, 在 1 ~ 3 nmol/L 之间<sup>[2]</sup>。血清中的孕酮大多以蛋白结合形式存在, 游离孕酮占总孕酮浓度的比例在 2% ~ 10% 之间变化, 但在正常经期女性体内游离孕酮的比例保持恒定<sup>[3]</sup>。血清中孕酮的准确测定对于黄体功能、宫内妊娠、自然流产等的确认以及其它疾病的诊断具有重要的临床意义。

放射免疫测定 (RIAs) 和酶联免疫吸附测定 (ELISAs) 是最常用的激素测定方法<sup>[4]</sup>。免疫法的灵敏度高, 但由于抗体的交叉反应、基质干扰等因素会存在准确性差<sup>[5-7]</sup>、动态范围窄<sup>[8]</sup>等缺陷。此外, 孕酮等类固醇激素的检测方法还有气相色谱 – 质谱联用法 (GC – MS) 和液相色谱 – 质谱联用法 (LC – MS)<sup>[9-12]</sup>。人血清中孕酮的临床检测早期采用同位素稀释气相色谱 – 质谱法 (ID GC – MS), 但需进行复杂的衍生化且分析时间较长<sup>[13-14]</sup>。随着质谱技术的发展, 同位素稀释液相色谱 – 串联质谱法 (ID LC – MS/MS) 因具有灵敏度高、特异性强、样品处理简单等优点, 目前被认为是临床检测和研究的优选方法。LC – MS/MS 法已被开发用于血清中孕酮的分析<sup>[15-17]</sup>。美国国家标准研究院 (NIST) 建立了血清中孕酮的 ID LC – MS/MS 参考方法<sup>[3]</sup>, 该法准确可靠, 但 LC 梯度洗脱时间为 40 min, 分析时间大大加长。

本研究建立了一种利用同位素稀释超高效液相色谱 – 串联质谱 (ID UPLC – MS/MS) 检测血清中孕酮浓度的方法。采用两步萃取法, 提高了血清样品中孕酮的回收率; 使用简单的液相色谱分离, 运行时间短, 灵敏度高, 重现性好。该方法适用于同时检测大批量样品, 为临床血清中激素的检测提供了参考。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Acquity 超高效液相色谱仪、Xevo TQ – XS 三重四极杆串联质谱仪 (美国 Waters 公司); 涡旋混合仪 (MS 3 basic, 德国 IKA 公司); 离心机 (德国 Eppendorf 公司); 氮吹仪 (艾杰尔飞诺美公司); 分析天平 (十万分之一, 德国 Sartorius 公司); 可调量程移液器 (0.5 ~ 10  $\mu$ L、10 ~ 100  $\mu$ L、100 ~ 1 000  $\mu$ L, 德国 Eppendorf 公司); Milli-Q Reference 超纯水系统 (美国 Millipore 公司)。

孕酮标准品 (99.2%, 中国计量科学研究院); 孕酮 – D<sub>9</sub> 同位素标准品 (98%, 美国 CFW 实验室); 甲醇 (HPLC 级, 德国 Merck 公司); 正己烷、乙酸乙酯 (HPLC 级, 天津康科德科技有限公司); 30% 氨水 (LC – MS 级, 美国 Waters 公司); 乙酸铵、碳酸钠 (优级纯, 福晨化学试剂有限公司); 实验用水为 Milli-Q 超纯水。

### 1.2 样品来源

血清样品来自天津市公安医院门诊及住院患者, 样本的收集及使用已取得医院许可并符合相关规定, 患者血清样本共 30 例, 外观澄清, 无溶血、黄疸及脂血, 于 -80  $^{\circ}$ C 冷冻保存。

### 1.3 标准溶液的配制

分别准确称取适量 (精确至 10.00 mg) 的孕酮和孕酮 – D<sub>9</sub> 标准物质, 用甲醇配制成质量浓度为 1.0  $\mu$ g/mL 的标准储备液和内标储备液, -20  $^{\circ}$ C 保存。

准确移取适量内标储备液, 用甲醇稀释成 10 ng/mL 的同位素内标工作溶液, -20  $^{\circ}$ C 保存。

准确移取适量孕酮标准储备液, 用甲醇稀释成质量浓度分别为 10、25、50、100、250、500、1 000、2 500、5 000、10 000 pg/mL 的系列标准工作溶液; 将 10  $\mu$ L 同位素内标工作溶液加入 100  $\mu$ L 各系列标准工作溶液中, -20  $^{\circ}$ C 保存。

## 1.4 样品制备

移取 10  $\mu\text{L}$  孕酮 -  $\text{D}_9$  内标工作溶液至 1.5 mL 离心管中, 用氮气将溶剂吹干, 在离心管中分别加入 100  $\mu\text{L}$  血清样品和 100  $\mu\text{L}$  乙酸铵(0.5 mol/L), 并在室温下平衡 1 h; 用 500  $\mu\text{L}$  乙酸乙酯 - 正己烷(体积比 3 : 2)进行液液萃取(LLE), 涡旋振荡 10 min, 13 000 r/min 离心 2 min 后, 取上清液以 40  $^{\circ}\text{C}$  氮气吹干; 向离心管中加入 200  $\mu\text{L}$  碳酸钠(0.2 mol/L), 再依次加入 500  $\mu\text{L}$  正己烷萃取 2 次, 13 000 r/min 离心 5 min 后, 合并两次提取上清液, 以 40  $^{\circ}\text{C}$  氮气吹干, 加 100  $\mu\text{L}$  甲醇进行复溶, 待上机分析。

## 1.5 UPLC - MS/MS 测定条件

**1.5.1 色谱条件** Acquity UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  色谱柱(2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ; 美国 Waters 公司); 流动相: A 为 0.1% (体积分数) 氨水溶液, B 为甲醇。梯度洗脱程序: 0 ~ 0.5 min, 40% B; 0.5 ~ 2.5 min, 40% ~ 10% B; 2.5 ~ 3.5 min, 10% B; 3.5 ~ 3.6 min, 10% ~ 40% B; 3.6 ~ 5.0 min, 40% B。流速: 0.4 mL/min, 柱温: 45  $^{\circ}\text{C}$ ; 自动进样器温度: 4  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 5  $\mu\text{L}$ 。

**1.5.2 质谱条件** 电喷雾(ESI)离子源, 正离子模式; 多反应监测(MRM)扫描模式; 毛细管电压为 3.0 kV; 离子源温度为 150  $^{\circ}\text{C}$ ; 脱溶剂气(高纯  $\text{N}_2$ ): 温度为 500  $^{\circ}\text{C}$ , 流量为 1 000 L/h; 锥孔反吹气(高纯  $\text{N}_2$ )流量为 150 L/h; 碰撞气为高纯 Ar。目标物的监测离子对( $m/z$ )、锥孔电压、碰撞电压等质谱参数见表 1。

表 1 孕酮及其同位素的质谱分析条件  
Table 1 Optimized MS/MS parameters for progesterone and progesterone -  $\text{D}_9$

Compound	Quantitative ion ( $m/z$ )	Qualitative ion ( $m/z$ )	Cone voltage (V)	Collision voltage (eV)
Progesterone	315.1 > 97.2	315.1 > 109.2, 315.1 > 97.2	30, 30	25, 19
Progesterone - $\text{D}_9$	324.4 > 100.2	324.4 > 113.2, 324.4 > 100.2	30, 30	25, 23

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品处理方法的优化

血清样品常用的前处理方法包括蛋白沉淀、固相萃取(SPE)、LLE 萃取等。孕酮的质谱检测文献中, 大多采用正己烷对样品进行 LLE 萃取<sup>[3,15-16]</sup>。为有效去除脂质干扰, 本实验采用两步 LLE 萃取对样品进行净化, 第一步使用乙酸乙酯 - 正己烷(3 : 2)对孕酮进行提取; 第二步加入碳酸钠去除样品中的极性脂质物质, 再用正己烷反复萃取 2 次。该净化步骤有效降低了杂质干扰, 提高了血清样品中孕酮的回收率。同时, 由于用甲醇作溶剂, 内标溶液的加入会使血清蛋白局部产生沉淀, 为消除沉淀的影响, 本实验在加样前用氮气将溶剂吹干。以乙酸铵作解离剂能将孕酮与结合蛋白完全解离, 同时避免了内标物与蛋白的结合, 消除内标物与分析物回收率的不完全平衡, 从而使分析物的回收率趋于一致, 提高检测的精密度。优化后的处理方法, 可使样品的绝对回收率达到 80%。

### 2.2 流动相的选择

首先考察了甲醇和乙腈作为流动相时的分离效果和响应信号, 结果显示采用乙腈为流动相时, 孕酮和孕酮 -  $\text{D}_9$  的峰形较差, 保留时间靠前; 甲醇为流动相时的背景干扰小, 孕酮和孕酮 -  $\text{D}_9$  均能获得理想的峰形, 且响应信号明显较乙腈作为流动相时高, 这可能是由于甲醇作为流动相时待测物的离子化效率更高, 因此选择甲醇 - 水作为流动相。另比较了 0.1% 氨水溶液和 10 mmol/L 乙酸铵溶液两种水相溶液与甲醇组合的流动相体系的分离效果和灵敏度, 发现以 0.1% 氨水溶液作水相时, 孕酮的响应值较高, 分离效果和灵敏度较好。因此, 流动相确定为 0.1% 氨水溶液和甲醇。在“1.5”条件下, 孕酮和同位素标准品的 MRM 色谱图见图 1。

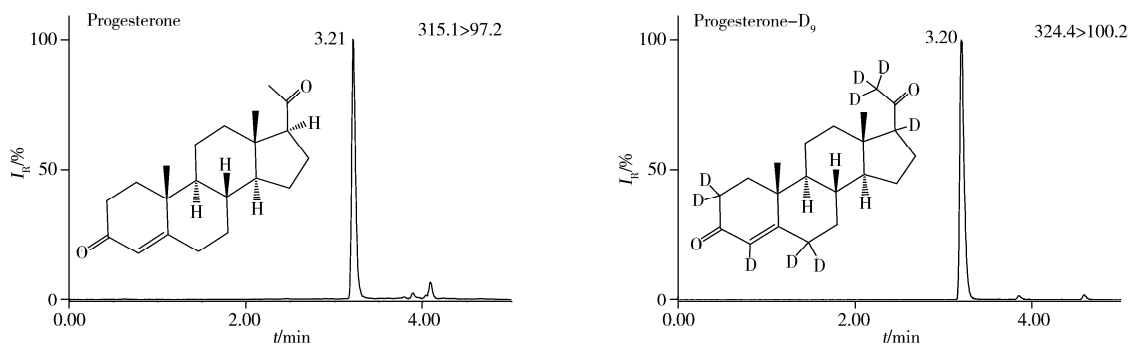


图1 孕酮及同位素标准品的MRM色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of progesterone and progesterone - D<sub>9</sub> standards

## 2.3 方法学评价

**2.3.1 基质效应** 基质效应 (ME) 是指样品中的背景杂质对目标物质谱信号的影响 (增强或抑制), 通常通过比较目标物在基质和空白溶剂中的响应信号进行评价<sup>[16]</sup>。用空白溶剂 (甲醇) 分别配制低、中、高质量浓度 (0.05、0.5、5.0 ng/mL) 的标准溶液并添加内标工作溶液, 提取制得标准溶液 a; 取真实血清样品, 分别添加低、中、高质量浓度水平的孕酮标准溶液及 10 μL 内标工作溶液 (10 ng/mL), 提取制得基质样品 b; 取相同的血清样品添加内标工作溶液, 提取制得基质对照样品 c。对样品和标准溶液进行质谱测定, 参照 Botelho 方法<sup>[18]</sup> 进行计算,  $ME\% = (R_b - R_c) / R_a \times 100\%$ , 其中 R 为样品或标准溶液中孕酮和内标响应信号的比值。一般认为, 当 ME 值接近 100% 时, 表明不存在基质效应的影响。结果显示本方法的 ME 平均值为 95.20%, 表明样品基质对孕酮的质谱响应无明显影响。

**2.3.2 线性关系、检出限与定量下限** 采用同位素内标法进行定量, 取 “1.3” 系列标准工作溶液各 100 μL, 加入 10 μL 孕酮 - D<sub>9</sub> 内标工作溶液, 在优化条件下进行测定, 以标准溶液定量离子峰面积与内标物定量离子峰面积的比值 (y) 为纵坐标, 标准溶液的质量浓度 (x, pg/mL) 为横坐标进行线性回归, 并计算血清中待测物的浓度。结果显示, 孕酮在 10 ~ 10 000 pg/mL 质量浓度范围内线性关系良好 ( $r^2 = 0.9998$ ), 回归方程为  $y = 1.104x + 34.013$ ; 系列标准溶液中内标物定量离子的峰面积稳定, RSD 为 7.9%。按信噪比 (S/N) 为 3 的质量浓度确定检出限 (LOD) 为 5 pg/mL, S/N 为 10 的质量浓度确定定量下限 (LOQ) 为 10 pg/mL。

**2.3.3 回收率与相对标准偏差** 取 10 μL 内标工作溶液于 1.5 mL 离心管中, 加入 0.1 mL 空白血清基质, 分别配制低、中、高 3 种质量浓度 (0.05、0.5、5.0 ng/mL) 的质量控制 (QC) 样品。每个浓度平行制备 6 份, 按照本方法进行提取与测定, 并计算平均回收率和日内 RSD; 连续测定 3 d, 计算日间 RSD。结果表明, 孕酮的平均回收率为 91.5% ~ 106%, 日内 RSD 和日间 RSD 均在 10% 以内 (表 2), 符合生物样品分析要求。

表2 血清中孕酮的回收率及精密度

Table 2 Recoveries and precisions of progesterone in serum

No.	Added (ng/mL)	Detected (ng/mL)	Recovery (%)	RSD (%)	
				Intra-day (n = 6)	Inter-day (n = 18)
1	0.05	0.040 ± 0.017	91.5	8.2	9.1
2	0.5	0.515 ± 0.062	98.5	1.2	5.2
3	5.0	5.302 ± 0.789	106	1.3	4.1

**2.3.4 样品稳定性** 制备低、中、高 3 种质量浓度水平 (0.378、4.510、5.872 ng/mL) 的血清样品, 分别考察了其在室温下放置 4 h、样品提取后提取物于 4 °C 储存 24 h、3 个冻融循环后的稳定性。以 6 次测定的平均值为样品实际浓度, 结果显示孕酮的响应值变化低于 15%, 表明样品在以上 3 种条件下均可稳定储存。

## 2.4 临床血清样品的检测

采用本文建立的分析方法, 对采集的 30 例真实血清样品进行检测。结果显示, 所有样品均检出孕酮, 质量浓度为 0.050 2 ~ 1.363 5 ng/mL, 均在正常生理范围内, 表明所测血清样品的来源个体生理表

现健康。

### 3 结 论

本文建立了检测人血清中孕酮的 UPLC - MS/MS 法, 对于基质极其复杂的血清样品采用两步液液萃取法, 增加了提取效率, 极大提高了方法灵敏度。该方法无需衍生化, 样品制备简单; 且以同位素为内标, 提高了方法准确度, 具有较高的实用性, 可用于临床血清样品检测。

参考文献:

- [1] Melcangi R C, Giatti S, Calabrese D, Pesaresi M, Cermenati G, Mitro N, Viviani B, Garcia - Segura L M, Caruso D. *Prog. Neurobiol.*, **2014**, (113): 56 - 69.
- [2] Schumacher M, Mattern C, Ghoumari A, Oudinet J P, Liere P, Labombarda F, Sitruk - Ware R, De Nicola A F, Guennoun R. *Prog. Neurobiol.*, **2014**, (113): 6 - 39.
- [3] Tai S S C, Xu B, Welch M J. *Anal. Chem.*, **2006**, 78(18): 6628 - 6633.
- [4] Stanczyk F Z, Clarke N J. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2010**, 121(3/5): 491 - 495.
- [5] Nelson R E, Grebe S K, O'Kane D J, Singh R J. *Clin. Chem.*, **2004**, 50(2): 373 - 384.
- [6] Taieb J, Mathian B, Millot F, Patricot M C, Mathieu E, Queyrel N, Lacroix I, Claude S D, Boudou P. *Clin. Chem.*, **2003**, 49(8): 1381 - 1395.
- [7] Bock J L. *Am. J. Clin. Pathol.*, **2000**, 113(5): 628 - 646.
- [8] Etter M L, Eichhorst J, Lehotay D C. *J. Chromatogr. B*, **2006**, 840(1): 69 - 74.
- [9] Mi X X, Li S C, Wang K Q, Zhu D, Li Y H, Chen G. *J. Instrum. Anal.* (米晓霞, 李思聪, 王凯强, 朱丹, 李艳华, 陈刚. 分析测试学报), **2014**, 33(8): 873 - 880.
- [10] Ma Y N, Gui W J, Cheng J L, Zhu G N. *J. Instrum. Anal.* (马有宁, 桂文君, 程敬丽, 朱国念. 分析测试学报), **2016**, 35(4): 460 - 465.
- [11] Shackleton C. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2010**, 121(3/5): 481 - 490.
- [12] Krone N, Hughes B A, Lavery G G, Stewart P M, Arlt W, Shackleton C H L. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2010**, 121(3/5): 496 - 504.
- [13] Thienpont L, Siekmann L, Lawson A, Colinet E, De L A. *Clin. Chem.*, **1991**, 37(4): 540 - 546.
- [14] Thienpont L M, De Brabandere V I, Stockl D, De Leenheer A P. *Anal. Chem.*, **1994**, 66(22): 4116 - 4119.
- [15] Lee H, Park C J, Lee G. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 396(5): 1713 - 1719.
- [16] Wang Y F, Zhang T J, Zhao H J, Zhou W Y, Zhen J, Zhang J T, Zhang C B, Chen W X. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2019**, 411(11): 2363 - 2371.
- [17] Fanelli F, Belluomo I, Di Lallo V D, Cuomo G, De Iasio R, Baccini M, Casadio E, Casetta B, Vicennati V, Gambineri A, Grossi G, Pasquali R, Pagotto U. *Steroids*, **2011**, 76(3): 244 - 253.
- [18] Botelho J C, Shacklady C, Cooper H C, Tai S S C, Uytendanghe K V, Thienpont L M, Vesper H W. *Clin. Chem.*, **2013**, 59(2): 372 - 380.

(责任编辑: 丁 岩)