

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2019.01.0104

· 短篇论著 ·

液相色谱-串联质谱法测定健康人唾液中睾酮和皮质醇的含量

顾伟锋¹, 梁凤英², 刘林菁², 高守红^{2*}

1. 海军上海舰艇岸勤部门门诊部, 上海 200083

2. 海军军医大学(第二军医大学)长征医院药学部, 上海 200003

[摘要] **目的** 建立一种方便、可靠和灵敏的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)方法用于检测健康人唾液中2种内源性激素(睾酮和皮质醇)的水平。**方法** 在Agilent 6410A串联质谱仪上采用正离子检测模式,以卡马西平为内标,唾液样品经OMGEA NANOSEP 10K超滤管21 912.8×g超滤10 min后,在Agilent ZORBAX SB-C₁₈(3.5 μm, 2.1 mm×100 mm)色谱柱上采用等度洗脱进行色谱分离。流动相为乙腈:0.1%甲酸水溶液(60:40);流速为0.3 mL/min;进样量为10 μL;柱温为25℃;每个样品的分析周期为3 min。**结果** 睾酮和皮质醇线性关系良好,其相关系数 $r > 0.990$,日内与日间精密度均 $< 15\%$ 。**结论** 该方法可以用于测定唾液中睾酮和皮质醇的含量,为迅速简便地检测体内激素水平提供参考。

[关键词] 液相色谱-串联质谱法;唾液;睾酮;皮质醇;内源性激素**[中图分类号]** R 917.794**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2019)01-0104-04

Determination of testosterone and cortisol in saliva of healthy human by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

GU Wei-feng¹, LIANG Feng-ying², LIU Lin-jing², GAO Shou-hong^{2*}

1. Department of Outpatient, Shanghai Naval Vessel Service Department, Shanghai 200083, China

2. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To establish a convenient, reliable and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of two kinds of endogenous hormones (testosterone, cortisol) in the saliva of healthy human. **Methods** A positive ion mode was performed on the Agilent 6410A mass spectrometer. Carbamazepine was used as the internal standard. The saliva samples were centrifuged at 21 912.8×g for 10 min with OMGEA NANOSEP 10K ultrafiltration tubes, and chromatographic separation was achieved on an Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column with isocratic elution. The mobile phase was acetonitrile : 0.1% formic acid awter solution (60 : 40); flow rate was 0.3 mL/min; injection volume was 10 μL; column temperature was 25 °C; and the analysis period of each sample was 3 min. **Results** Testosterone and cortisol had good linear relationship with correlation coefficient (r) being both > 0.990 . Inter- and intra-day precision was both less than 15%. **Conclusion** This method can be used to determine the contents of testosterone and cortisol in saliva, which provides a reference for rapid and simple detection of hormone levels *in vivo*.

[Key words] liquid chromatography-tandem mass spectrometry; saliva; testosterone; cortisol; endogenous hormones

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(1): 104-107]

美国心理学家詹姆斯和丹麦生理学家朗格分别在1890年和1885年独立提出了相似的学说,合称为詹姆斯-朗格学说^[1],认为内脏反应提供了情绪体验的信号,人体内的物质是某些行为产生的物质基础。睾酮是一种类固醇激素,由男性的睾丸或女性的卵巢分泌,肾上腺亦分泌少量睾酮,对健康有重要的影响,具有增强性欲、力量、免疫功

能、骨密度、神经兴奋和攻击性等作用,同时对人的心理亦有一定的影响^[2]。皮质醇(氢化可的松)是一种由肾上腺分泌的激素,对应激反应灵敏,在情绪紧张、受伤、疲劳、生病、训练负荷较高等情况下都可能升高,可用来评价生理应激和心理应激^[3-4]。因此,检测睾酮与皮质醇的水平对于了解机体情绪体验和心理应激状态具有重要意义。

[收稿日期] 2018-05-29 **[接受日期]** 2018-11-15**[基金项目]** 上海市临床药学重点专科建设项目(2016-40044-002),上海市卫生计生系统重要薄弱学科建设项目(2016ZB0303)。Supported by Key Special Project of Clinical Pharmacy of Shanghai (2016-40044-002) and Important Weak Subject Construction Project of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (2016ZB0303).**[作者简介]** 顾伟锋, 硕士, 主管药师。E-mail: 490216313@qq.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-60748763, E-mail: gaoshouhong@smmu.edu.cn

唾液样本容易采集, 常作为无创检测的重要标本来源^[5]。唾液睾酮与血液睾酮相关性极好, 血浆游离睾酮向唾液睾酮转运相当迅速, 且唾液流出速率对游离睾酮浓度无影响^[6]。唾液皮质醇水平在室温下也相对稳定, 不受皮质类固醇结合球蛋白和唾液流量的影响^[7]。早期多采用放射免疫分析法和酶免疫分析法检测体内睾酮和皮质醇水平, 其缺点是与其它类固醇的交叉反应太多、缺乏标准化等; 气相色谱-质谱联用法灵敏度较好, 但生物样品预处理比较复杂^[8]; 高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 虽然能够提供更高的特异性, 却没有足够的灵敏度。采用液相色谱-串联质谱 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 法检测皮质醇和睾酮的含量, 特异性和灵敏性都较高^[9-12]。由于唾液是比较干净的样品基质, 样品可以是经初步提取的, 也可以稀释后再进样。本研究拟建立一种简便、高效、快捷的 LC-MS/MS 方法, 用于从唾液中检测睾酮和皮质醇的含量。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 Agilent 6410A 型三重四极杆串联质谱仪, 包括 Agilent 1200 G1311A 四元泵、G1322A 真空脱气机、G1329A 自动进样器、G1316A 柱温箱, 使用 MassHunter 软件控制系统及数据处理 (美国 Agilent 公司); VORTEX MIXER 旋涡

混合器 (美国 Labnet 公司); Centrifuge 5810R 台式冷冻高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); CPA225D 电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); 科导 SK7200H 超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司); VARIAN Bond Elut Plexa 固相萃取小柱 (美国 Varian 公司)。

1.2 药品、试剂与样品采集 皮质醇 (上海源叶生物科技有限公司, B21001-20 mg), 睾酮 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 164410050), 卡马西平 (内标, 大连美仑生物技术有限公司, M1001AS-100 mg), 甲醇、乙腈、甲酸为 HPLC 级 (美国默沙东公司)。本实验取样对象来自 10 位健康受试者, 男女各半。

1.3 仪器分析条件

1.3.1 液相色谱检测 使用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (3.5 μm, 2.1 mm × 100 mm) 色谱柱, 采用乙腈:0.1% 甲酸水溶液 (60:40) 的流动相, 流速为 0.3 mL/min, 进样量为 10 μL, 柱温为 25 °C, 每个样品的分析周期为 3 min。

1.3.2 质谱检测 采用电喷雾离子源 (electron spray ionization, ESI), 正离子多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式。氮气作为雾化气和干燥气; 高纯氮气为碰撞气, 压力是 0.1 MPa; 雾化气压力为 40 psi (1 psi = 6 894.8 Pa), 干燥气温度为 350 °C, 干燥气流速为 10.0 L/min; 毛细管电压为 40 V (表 1)。

表 1 睾酮、皮质醇和内标的质谱检测参数

目标化合物	母离子 m/z	子离子 m/z	碰撞诱导解离能量 (V)	碰撞能量 Q/eV
睾酮	289.2	109.1	170	16
皮质醇	363.2	147.2	150	22
卡马西平	237.1	194.0	100	18

1.4 溶液的制备

1.4.1 对照品溶液的制备 精密称取睾酮、皮质醇适量 (约 2.0 mg), 分别置于 2 mL 的容量瓶中, 用纯甲醇溶解, 制得质量浓度为 1.06 mg/mL 的标准储备液, 将储备液分装, 放置在 -20 °C 冰箱冷冻保存。

1.4.2 内标溶液的制备 精密称取卡马西平标准品约 2.0 mg, 置于 2 mL 的容量瓶中, 用纯甲醇溶解, 制得质量浓度为 1 mg/mL 的内标储备液, 用纯甲醇稀释至质量浓度为 1 ng/mL 的内标溶液。

1.5 样品预处理 取 400 μL 唾液, 21 912.8 × g 离心 10 min, 将上清液唾液样品经 OMGEA NANOSEP 10K 超滤管 21 912.8 × g 超滤 10 min 后, 取上清液 200 μL, 加入 20 μL 内标溶液 (卡马西平, 1 ng/mL) 混合, 再加 200 μL 流动相混合,

取 10 μL 进样, 用峰面积内标法定量分析。

1.6 方法学考察

1.6.1 专属性考察 将按 1.5 项方法处理好的 6 个来自不同个体的空白基质和标准添加样品进样, 比较标准添加样品和唾液的色谱图, 比较睾酮、皮质醇和内标的出峰时间, 考察唾液中的杂质成分是否存在干扰。

1.6.2 标准曲线和最低定量限 (lowest limit of quantification, LLOQ) 因睾酮和皮质醇是内源性激素, 体内本身就有, 所以空白唾液很难获得, 查文献也无可靠有效的空白唾液替代物, 通过实验比较选择用水代替空白唾液制备标准曲线。精确吸取各标准储备液适量于 1.5 mL 离心管中, 在空白基质中加入各对照品适量, 睾酮和皮质醇在 0.1~10.0 ng/mL 的线性范围内 (0.1、0.2、0.5、

1.0、2.0、5.0、10.0 ng/mL)。取 LLOQ 浓度方法学样品进行定量下限考察,连续测定 3 d,每天测定 6 批,LLOQ 的响应值应为空白基质干扰物响应值的 10 倍以上(信噪比 ≥ 10),且精密度表示为相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)应 $\leq 20\%$,准确度应在 $-20\% \sim 20\%$ 范围内。

1.6.3 精密度考察 按 1.5 项下的方法制备 0.2、1、5 ng/mL 质量浓度的水标样品,按 1.3 项下条件分析,计算日内和日间精密度。

1.6.4 稳定性考察 本研究分别考察了 0.2、1、5 ng/mL 质量浓度的水标样品,经样品预处理后分

别在 0 h 和 12 h 后取样分析,考察其在室温下的稳定性;将样品放置在 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中,反复冻融 3 次后按 1.3 项下条件测定其质量浓度,考察其冻融稳定性。

2 结果

2.1 方法专属性 睾酮、皮质醇和内标卡马西平峰形良好,睾酮保留时间约为 2.2 min,皮质醇保留时间约为 1.2 min,内标卡马西平保留时间约为 1.3 min(图 1),唾液中内源物和杂质均不干扰药物的测定。

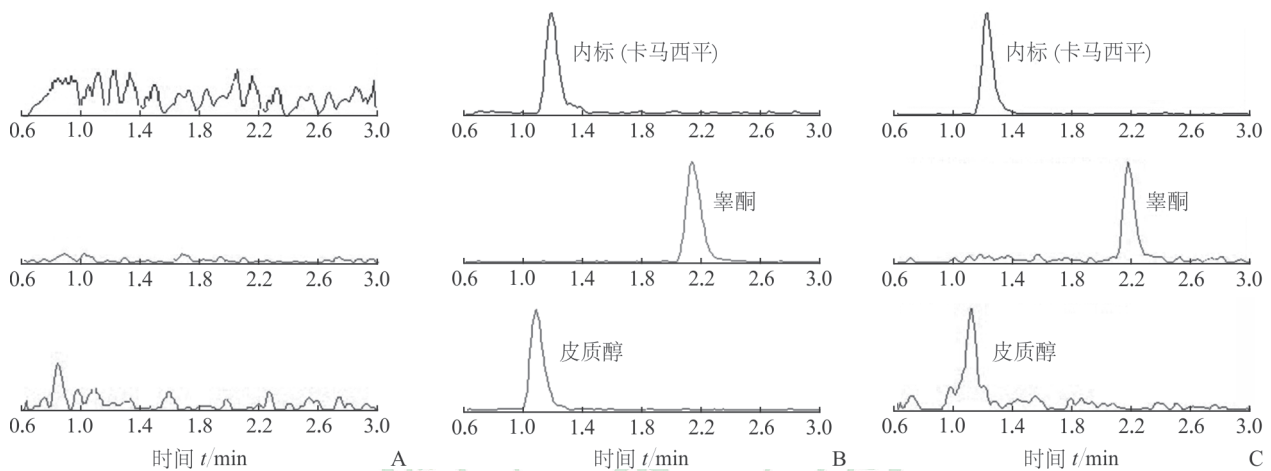


图 1 睾酮和皮质醇的液相色谱-串联质谱图

A: 空白基质; B: 空白基质添加内标卡马西平(1 ng/mL)、睾酮和皮质醇; C: 实测样品

2.2 标准曲线考察和 LLOQ 睾酮和皮质醇的线性范围为 0.1~10 ng/mL,线性回归采用 $1/\chi^2$ 加权最小二乘法来进行处理,其相关系数 r 分别为 0.996 1 和 0.993 6,均大于 0.990。两者的标准曲线分别为 $Y=0.2048X+0.1853$ 和 $Y=0.0952X+0.0515$,在线性浓度范围内线性关系良好。按信噪

比 ≥ 10 计算,LLOQ 为 0.1 ng/mL,批内、批间精密度 RSD 均 $< 15\%$,准确度在 $-20\% \sim 20\%$ 范围内,符合相关要求。

2.3 精密度考察 睾酮和皮质醇的日内与日间精密度均 $< 15\%$,结果见表 2。符合分析生物样品的检测要求。

表 2 睾酮和皮质醇唾液样品测定的精密度

$n=5$

分析物	实际值 $\rho_B/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	日间精密度		日内精密度	
		测得值 $\rho_B/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}), \bar{x} \pm s$	RSD (%)	测得值 $\rho_B/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}), \bar{x} \pm s$	RSD (%)
睾酮	0.2	0.21 ± 0.02	7.2	0.22 ± 0.01	2.7
	1	0.92 ± 0.06	6.9	0.90 ± 0.02	2.5
	5	5.14 ± 0.42	8.1	4.96 ± 0.37	7.5
皮质醇	0.2	0.21 ± 0.02	8.3	0.21 ± 0.02	10.3
	1	0.95 ± 0.09	9.0	0.99 ± 0.06	6.2
	5	4.87 ± 0.31	6.3	4.87 ± 0.31	6.5

RSD: 相对标准偏差

2.4 稳定性考察 睾酮和皮质醇在水中的稳定性符合生物样品的分析要求,结果见表 3。

2.5 样品测定 将 10 例健康人唾液样品按 1.5 项

下条件预处理,按 1.3 项下条件测定,测得值代入当日标准曲线,计算睾酮皮质醇浓度,结果如表 4 所示。

表 3 睾酮、皮质醇在唾液中的稳定性

n=3

分析物	实际值 $\rho_B/(ng \cdot mL^{-1})$	3 次冻融		室温放置 12 h	
		测得值 $\rho_B/(ng \cdot mL^{-1}), \bar{x} \pm s$	RSD (%)	测得值 $\rho_B/(ng \cdot mL^{-1}), \bar{x} \pm s$	RSD (%)
睾酮	0.2	0.20±0.01	6.7	0.20±0.01	6.75
	1.0	0.89±0.05	5.2	0.94±0.06	6.22
	5.0	5.12±0.17	3.4	5.30±0.42	7.89
皮质醇	0.2	0.21±0.01	6.1	0.21±0.02	9.54
	1.0	0.99±0.11	11.1	0.99±0.02	2.42
	5.0	4.97±0.23	4.6	4.77±0.20	4.21

RSD: 相对标准偏差

表 4 睾酮和皮质醇在健康受试者唾液中的质量浓度

样本编号	$\rho_B/(ng \cdot mL^{-1})$	
	睾酮	皮质醇
1	0.13	0.10
2	0.15	0.14
3	1.48	0.57
4	0.16	0.26
5	0.13	0.24
6	0.11	0.19
7	0.12	0.46
8	0.15	0.32
9	0.17	0.21
10	0.16	0.38

西平作为内标, 该药物与睾酮、皮质醇出峰时间相近而且响应很好, 并且在唾液中未被检测到, 符合作为内标的条件。

本研究建立了一种快速、灵敏、简便的 LC-MS/MS 测定唾液中睾酮和皮质醇含量的方法, 采用离心法和过滤法结合处理唾液样品简单、快速且经济; 2 种内源性物质和内标能够实现基线分离, 其测定不受唾液中内源性物质的干扰, 具有很好的专属性; 方法学验证表明睾酮和皮质醇的线性、精密度和稳定性均符合分析的要求。样品的前处理十分便捷、经济, 适用于批量样本的测定。

[参考文献]

3 讨论

3.1 质谱条件的优化 本实验运用 ESI 正离子模式检测睾酮和皮质醇含量, 通过优化电离使碎片离子呈规律的峰, 便于质谱测定内源性物质的含量。采用串联质谱作为检测器的优势在于可以根据特定物质的母离子、子离子选择性地检测几种化合物, 故液相质谱联用的选择性相对很高, 对色谱柱的分离要求不是很高, 使得检测快速、准确。本实验对碰撞能量进行了优化, MRM 模式下条件为: 睾酮 289.2→109.1 (CE16), 皮质醇 363.2→147.2 (CE22), 卡马西平 237.1→194.0 (CE18)。

3.2 色谱条件的优化 调节流动相中有机相和水相的组分和比例, 先后尝试在流动相中加入 0.1% 甲酸水溶液和乙腈在不同比例 (5:5, 4:6, 3:7, 2:8) 下进行摸索, 结果显示用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (3.5 μ m, 2.1 mm×100 mm) 色谱柱、流动相 0.1% 甲酸水溶液和乙腈比例为 4:6, 可以得到较好的峰面积和更好的保留时间。

3.3 唾液样品前处理的优化 尝试了多种样品前处理方法, 如加入乙酸乙酯的溶剂萃取、固相萃取、选用不同的蛋白沉淀剂、加入活性炭的吸附处理等, 最终考虑到成本、处理干净和效率, 选择了低温高速离心和超滤相结合的方式, 减少唾液中的杂质及其他内源性物质对化合物检测的影响。

3.4 内标的选择 尝试了双氢睾酮、可的松、地塞米松、6-羟基睾酮和卡马西平等, 最后优选卡马

- [1] CANNON W B. The James-Lange theory of emotions: a critical examination and an alternative theory. By Walter B. Cannon, 1927[J]. Am J Psychol, 1987, 100(3/4): 567-586.
- [2] 王林, 张云丽. 低氧训练对睾酮、皮质醇影响的研究进展[J]. 辽宁体育科技, 2004, 26: 46-47.
- [3] 干伟, 张林, 安振梅. 唾液皮质醇的研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13: 1304-1306.
- [4] KOBAN L, POURTOIS G. Brain systems underlying the affective and social monitoring of actions: an integrative review[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2014, 46(Pt 1): 71-84.
- [5] 周志芳, 夏运成. 唾液分析的临床应用价值及研究进展[J]. 实用预防医学, 2010, 17: 413-416.
- [6] 张东春. 唾液类固醇激素检测的临床意义[J]. 中国保健营养, 2013(4): 980-981.
- [7] 姚剑婷, 许红峰, 吴梦如. 唾液皮质醇分泌节律影响因素研究进展[J]. 新疆中医药, 2017, 35: 78-81.
- [8] 金伟, 黄斌, 王彬, 王道玮, 赵世民, 潘学军. 气相色谱/质谱法测定水和沉积物中雄激素与孕激素[J]. 分析化学, 2013, 41: 205-209.
- [9] 刘齐, 张华琚, 郭洁, 孙亮, 马长华. HPLC-MS/MS 法同时测定育发液中的 9 种禁用物质[J]. 药物分析杂志, 2016, 36: 1660-1666.
- [10] 黄河花, 刘东阳, 胡蓓, 江骥. 高效液相色谱串联质谱法同时定量测定人血清中脱氢表雄酮、睾酮及雄酮[J]. 药物分析杂志, 2012, 32: 210-216.
- [11] 马晓斐, 吕品, 李挥, 张岩. 液相色谱-串联质谱法同时测定人血清中皮质酮与皮质醇[J]. 分析测试学报, 2013, 32: 886-889.
- [12] 张彤杰, 王建跃, 张乾通, 王恒. 婴儿尿液中睾酮和雄烯二酮的超高效液相色谱-串联质谱法测定[J]. 浙江预防医学, 2015, 27: 646-648.

[本文编辑] 尹 茶