

液相色谱-串联质谱法同时测定血液中的 18-甲基炔诺酮和孕酮含量

吴筑平 张超 杨成对 张新荣 刘密新
(清华大学化学系 北京 100084)

孕酮是人体内具有重要生理功能的一种激素,对妊娠妇女维持正常的妊娠过程起着重要的作用。18-甲基炔诺酮属高效孕激素类药物,是目前应用最广泛的避孕药之一。对服用避孕药后体内雌性激素的变化情况及药物在血液中代谢后浓度的同时监测,对于临床内分泌研究具有极其重要的意义。本文建立了液相色谱-质谱-质谱联用同时测定血液中孕酮及 18-甲基炔诺酮含量,线性范围均为 0.2~50ng/mL,最低定量限为 0.2ng/mL。该方法灵敏度高,检出限低,简单、快速。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂: API3000 三级四极串联质谱仪 (PE SCIEX 公司), PE200 Series 注射泵 (PERKIN ELMER 公司), 甲醇 (色谱纯, Fisher 公司), 炔诺酮 (中国药品生物制品检定所), 18-甲基炔诺酮, 孕酮 (Sigma 公司)。整个实验过程中使二次重蒸水。

1.2 色谱条件: C_{18} 色谱柱 4.6×150mm (phenomenex 公司); 流速: 1.0mL/min; 流动相: 甲醇:水 (含 0.5%甲酸) 为 80:20。

1.3 质谱条件: 离子源: 大气压化学电离源, 温度: 450℃, 放电电流: 2 μ A。扫描模式: 正离子 MRM m/z 315/97 (孕酮), m/z 313/245 (18-甲基炔诺酮), m/z 295/109 (炔诺酮, 内标)

1.4 样品处理: 本实验所用血样由国家计划生育委员会科学研究所提供并处理。

2 结果和讨论

2.1 质谱条件优化 在初步实验中对 ESI 和 APCI 两种离子源进行了考察。发现使用 APCI 源能使灵敏度显著提高, 因此本实验采用 APCI 源。通过 Q1 扫描得到孕酮及 18-甲基炔诺酮的[M+H]⁺峰 m/z 315 和 m/z 313, 将其作为母离子经过碰撞活化解离 (CAD), 通过 Q3 扫描各自得到一组子离子峰, 在空白血样无干扰的情况下选择强度最大的子离子峰 m/z 97 (孕酮) 和 m/z 245 (18-甲基炔诺酮), 用多反应监测 (MRM) 检测 m/z 315/97 和 m/z 313/245 离子对, 正离子扫描, 优化各项质谱条件, 使离子强度达到最大, 从而获得质谱最佳参数。

2.2 色谱条件优化 对常用流动相甲醇/水和乙腈/水进行了考察, 实验结果表明使用甲醇/水比乙腈/水作流动相时离子强度略高。实验中研究了将 0.1%~1%的甲酸溶液加入到流动相中对灵敏度的影响, 结果表明流动相中含有 0.5%的甲酸时离子强度最大, 同时色谱峰的峰形最好。因此本文采用甲醇/水 80:20 (含有 0.5%的甲酸溶液) 为流动相。

2.3 标准曲线 将孕酮和18-甲基炔诺酮各2mg分别用甲醇溶解于10mL容量瓶中,得到200 μ g/mL的标准储备液,取200 μ g/mL孕酮和18-甲基炔诺酮标准储备液各100 μ L,用甲醇稀释得到含有2 μ g/mL孕酮和18-甲基炔诺酮工作储备液。将此工作储备液逐级稀释得到的浓度为50, 10, 5, 2, 1, 0.8, 0.5, 0.2ng/mL的系列标准溶液。标准系列溶液中含有2.5ng/mL内标化合物炔诺酮。以溶液浓度(C)对分析物与内标化合物峰面积的比值(R)作图得到标准曲线。

2.4 标准曲线 18-甲基炔诺酮和孕酮标准曲线范围均为0.2ng~50ng/mL, 回归方程: 18-甲基炔诺酮: $R = 0.359 C + 0.093$, $r^2 = 0.995$, $n = 8$; 孕酮: $R = 1.424 C + 0.114$, $r^2 = 0.995$, $n = 8$

2.5 最低定量限, 回收率, 日内、日间精密度

最低定量限定义为标准曲线上最低定量浓度的准确度和精密度都在20%之内。本方法和孕酮标准曲线的最低定量限均为0.2ng/mL。孕酮和18-甲基炔诺酮的回收率分别为80.4-93.5%, 78.5-92.1%。对浓度为0.5, 0.8, 2, 5, 25ng/mL的标准溶液的精密进行了考察。18-甲基炔诺酮日内变异系数不超过10%, 日间日内变异系数不超过8%; 孕酮的日内变异系数不超过9%, 日间不变异系数超过9%

2.6 本方法所测样品与放免法比较, 结果一致。

Simultaneous Quantitative Determination of Norgestrel and Progesterone in Human Serum by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with Atmospheric Pressure Chemical Ionization

Wu Zhuping, Zhang Chao, Yang Chengdui, Zhang Xinrong, Liu Mixin
(Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract

A selective, reliable and rapid method for the simultaneous determination of progesterone and norgestrel concentration in human serum after taking oral contraceptive tablet has been developed using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS-MS) with atmospheric pressure chemical ionization (APCI) interface. The norethisterone was used as the internal standard. Selected transitions of m/z 313/245 for norgestrel, m/z 315/97 for progesterone and m/z 299/109 for norgestrel were monitored using multiple reaction monitoring (MRM) mode for quantitation. The assay was linear over the concentration range of 0.2-50ng/mL for norgestrel and progesterone. The lower level of quantitation in human serum was obtained at 0.2ng/mL for both norgestrel and progesterone using optimum tuning parameters. Serum concentrations of norgestrel and progesterone were determined following oral administration of norgestrel to female volunteers.