

高效液相色谱-三重四级杆/复合线性离子阱质谱 测定鼠脑组织中神经甾体类化合物

刘佳¹ 张朦² 万有² 吴红海³ 侯艳宁³ 郑乐民^{* 1} 尹玉新^{* 1}

¹(北京大学系统生物医学研究所 北京 100191) ²(北京大学神经科学研究所 北京 100191)

³(中国人民解放军白求恩国际和平医院药学部 石家庄 050082)

摘 要 建立了高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)测定鼠脑组织中 6 种神经甾体类激素(别孕烯醇酮、孕烯醇酮、孕酮、脱氧皮质酮、四氢脱氧皮质酮、去氢表雄酮)的方法。采用 Agilent XDB-C₁₈ 色谱柱,以 5 mmol/L 乙酸铵-甲醇为流动相,梯度洗脱分离,在电喷雾正离子模式下,以多反应监测(MRM)扫描模式采集数据,基质匹配内标法定量。孕酮和脱氧皮质酮在 0.10 ~ 10 ng/mL 范围内呈良好的线性关系,别孕烯醇酮、孕烯醇酮、四氢脱氧皮质酮、去氢表雄酮在 0.50 ~ 10 ng/mL 范围内呈良好的线性关系,相关系数均大于 0.99;在 0.4, 4.0 和 8.0 ng/mL 加标水平下的平均回收率为 91.2% ~ 115.5%;相对标准偏差(RSD, $n=6$)为 0.87% ~ 8.8%;检出限为 0.04 ~ 0.20 ng/mL,定量限为 0.10 ~ 0.50 ng/mL。

关键词 神经甾体;液相串联质谱;多重反应监测;鼠脑

1 引言

神经甾体是指在神经系统中合成的甾体和经血脑屏障进入神经系统发挥作用的外周甾体及其代谢衍生物^[1]。这些神经甾体可以通过结合不同的神经受体(如 GABA_A, Sigma 受体)调控神经功能。神经甾体的行为与中枢神经系统正常功能的行使密切相关。研究表明,在不同的生理和病理条件下,神经甾体在各个脑区中的含量会显著变化^[2,3]。神经甾体还会参与焦虑和抑郁的调节过程。由于神经甾体在生物体内含量极低,基质干扰多,使得生物体内源性神经甾体的测定十分困难,因而开发快速、准确检测生物体内神经甾体含量的方法就显得尤为重要。

传统的神经甾体的检测方法有放射免疫标记法(RIA)和气相色谱质谱联用法(GC-MS)^[4],但放射免疫标记法特异性差,且存在安全隐患;气相色谱-质谱联用法虽然灵敏度高,但样品前处理步骤复杂,不能实现高通量分析。液相色谱-质谱联用技术由于其选择性好、灵敏度高、适用范围广等优点,近年被广泛应用到神经甾体检测领域^[5~8]。但这些工作有的需要复杂的衍生化过程^[9],有的使用多个同位素内标,增加了检测成本^[10];有的只检测 1 ~ 2 种待测物,缺乏全面性^[7,11]。

本研究以大鼠脑组织为基质,建立了高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)同时检测脑组织中别孕烯醇酮(AP)、孕烯醇酮(PREG)、孕酮(PROG)、脱氧皮质酮(DOC)、四氢脱氧皮质酮(THDOC)、去氢表雄酮(HEA) 6 种神经甾体类化合物的方法。本实验采用的高效液相色谱-三重四级杆/复合线性离子阱质谱是一种新型质谱仪,与普通的液相色谱-三重四级杆串联质谱相比,提高了 MS/MS 扫描能力。本研究以甲基睾酮为内标,较同位素标记物内标方便易得,内源性杂质不干扰测定,提高了方法的准确度和精密度^[12]。本方法无需衍生化,操作简便、快速,可同时测定大鼠不同脑区中神经甾体的含量,为建立其他生物样本中神经甾体的检测方法提供参考。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

LC-20AD_{XR} 高效液相色谱(日本岛津公司);AB SCIEX QTRAP 6500 质谱仪(美国 AB 公司);固相萃

2015-02-17 收稿;2015-05-21 接受

本文系国家自然科学基金项目(No. 21305005)资助

* E-mail: zhengl@bjmu.edu.cn; yinyuxin@bjmu.edu.cn

取仪(美国 Supelco 公司);固相萃取柱 Strata C₁₈-E 50 mg/1 mL(美国菲罗门公司);离心浓缩仪(美国 Thermo 公司);0.22 μ m 聚丙烯(Polypropylene)膜过滤离心管(美国 Corning 公司);Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司)

标准品别孕烯醇酮(Allopregnanolone, AP, 纯度 98%)、孕烯醇酮(Pregnenolone, PREG, 纯度 98%)、孕酮(Progesterone, PROG, 纯度 99%)、脱氧皮质酮(11-Deoxycorticosterone, DOC, 纯度 97%)、四氢脱氧皮质酮(Allotetrahydrodoc, THDOC, 纯度 99.5%)、甲基睾酮(Methyltestosterone, MT, 纯度 99%)、去氢表雄酮(Dehydroepiandrosterone, DHEA, 纯度 99%)均为美国 Sigma 公司试剂。

甲醇(色谱纯,美国 Fisher 试剂);乙酸铵(纯度 99%,美国 Sigma 公司);甲酸(纯度 88%,美国 Fisher 公司);实验用水为 Milli-Q 超纯水(电阻率 18.2 M Ω cm)。

2.2 溶液配制

将各标准品用甲醇配制成质量浓度为 1 mg/mL 的标准储备液,并根据需要用甲醇-水(1:1, V/V)稀释成适当质量浓度的混合标准溶液, -20℃ 保存。

2.3 样品前处理

2.3.1 标准曲线的构建 配制 5% BSA-0.7% NaCl 溶液,加入不同浓度的 AP, PREG, DOC, THDOC, PROG, DHEA 标准品,浓度范围为 0.1 ~ 10 ng/mL,再加入相同浓度(0.3 pg/mL)的内标物 MT,振荡混匀后进行液液萃取。加入 1.2 mL 乙酸乙酯-正己烷(9:1, V/V),涡旋 5 min,于 12000 r/min 下离心 5 min,将上层有机相转入另一洁净离心管中。氮气吹干,100 μ L 甲醇-水(1:1, V/V, 0.1% 甲酸)复溶。12000 r/min 离心 15 min,上清液供 HPLC-MS/MS 分析。

2.3.2 鼠脑组织 大鼠采用异氟烷麻醉,断头取血,冰浴分离内侧前额叶皮层(mPFC)、海马(HF)和丘脑腹后核(VP),液氮保存,称重(准确称至 0.1 mg)。每份组织中加入 0.49 mL 超纯水,10 μ L 15 pg/mL MT,电动匀浆机匀浆,超声。采用液液萃取法(见 2.3.1 节)和固相萃取法(见 2.3.3 节)两种方法处理。

2.3.3 固相萃取方法 预先以 1 mL 甲醇、1 mL 水活化平衡 Strata C₁₈柱。将组织匀浆液于 12000 r/min 下离心 5 min,然后将上清液加入 Strata C₁₈柱中;以 1 mL 5% 甲醇作为淋洗液,淋洗 Strata C₁₈柱。抽至近干后,以 1 mL 甲醇洗脱。收集洗脱液,常温下用 N₂吹干。100 μ L 甲醇-水(1:1, V/V, 0.1% 甲酸)复溶。12000 r/min 离心 15 min,上清液供 UFLC-MS/MS 分析。

2.4 色谱条件

Agilent XDB-C₁₈ 色谱柱(50 mm×4.6 mm, 1.8 μ m, 美国安捷伦公司)。流动相:5 mmol/L 乙酸铵溶液(A)和甲醇(B);采用梯度洗脱模式:0 ~ 2.5 min, 60% B; 2.5 ~ 5.5 min, 60% ~ 95% B; 5.5 ~ 7.0 min, 95% B; 7.0 ~ 7.1 min, 95% ~ 60% B; 7.1 ~ 10.0 min, 60% B。流速 0.5 mL/min。进样体积 10 μ L;样品室温度为室温;柱温 45℃;采用内标法进行定量分析。

2.5 质谱条件

电喷雾离子源(ESI),正离子扫描方式,多反应监测扫描(MRM)模式。离子化电压(IS):5500 V,气帘气(CUR):241.33 kPa,喷雾气(GS1):413.7 kPa,辅助加热气(GS2):413.7 kPa,碰撞器(CAD):Medium。由于 THDOC 的氢加合物物受热容易分解,离子源温度(TEM)设为 100℃。各物质离子对优化后参数见表 1。

3 结果与讨论

3.1 质谱条件的建立

神经甾体类化合物既可以用电喷雾离子源(ESI)电离,也可以用大气压化学电离源(APCI)分析^[10],本研究采用 ESI 正离子模式作为其离子化方式。取浓度为 1.0 mg/L 的各神经甾体标准溶液,采用微量蠕动泵连续进样,一级质谱全扫描,确定准分子离子。结果显示,6 种神经甾体均在正离子模式下获得准分子离子峰。对除 THDOC 外,其余 5 种神经甾体以母离子为准分子离子,对其进行二级质谱扫描,选丰度最高的两个特征碎片离子作为定性定量离子,并优化相应离子对的去簇电压(Declustering-potential, DP)、碰撞能量(Collision energy, CE)、碰撞室出口电压(Collision cell exit potential, CXP)和

表 1 目标化合物的多离子反应监测及质谱参数

Table 1 Mass spectrometric parameters for the target compounds

待测物 Analytes	母离子 Parent ion (<i>m/z</i>)	子离子 Product ion (<i>m/z</i>)	保留时间 Retention time (min)	去簇电压 Declustering potential (V)	碰撞能 Collision energy (eV)
去氢表雄酮 Dehydroepiandrosterone, DHEA	271.2	253.2	6.0	50	19.9
		213.1*			22.1
孕酮 Progesterone, PROG	315.5	109.1*	6.7	76	34.0
		97.0*			26.6
脱氧皮质酮 11-Deoxycorticosterone, DOC	331.5	109.0	5.6	79	26.0
		97.0*			27.0
甲基睾酮 Methyltestosterone, MT	303.5	109.1	6.2	66	37.8
		97.0			33.9
别孕烯醇酮 Allopregnanolone, AP	319.2	301.2*	7.4	25	13.5
		213.2			32.8
孕烯醇酮 Pregnenolone, PREG	317.2	281.2	7.0	36	16.4
		159.1*			30.8
四氢脱氧皮质酮 Allotetrahydrodoc, THDOC	352.2	317.2*	6.7	40	21.2
		335.2			27.4

* 定量离子(Quantitative ion)。

入口电压(Entrance potential, EP)。对于 THDOC, 选用 $[M+NH_4]^+$ 作为母离子, 同样优化上述参数。主要质谱参数见表 1。以 THDOC 为例, 图 1A 为一级全扫质谱图, 其中 m/z 279 和 282 是常见的杂质离子 m/z 352.3 是 THDOC 加氨的峰。图 1B 为 $[THDOC+NH_4]^+$ 的二级质谱图, 除 $[THDOC+H]^+$ 外还会产

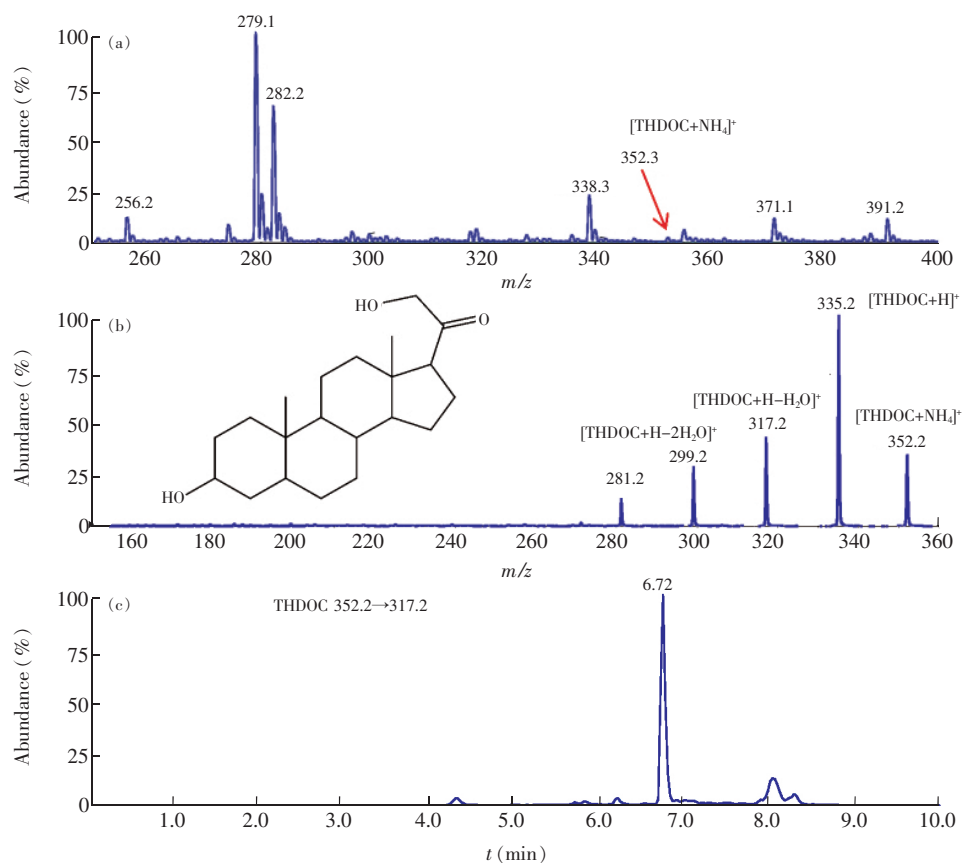


图 1 四氢脱氧皮质酮的一级质谱、二级碎片和 MRM 质谱离子流图

Fig. 1 Full MS, MS/MS spectra and MRM chromatograms of THDOC

生一系列脱水峰, THDOC 的羰基可能参与发生分子内重排形成羟基, 所以会有连续脱水的碎裂谱图。选择丰度较高的 m/z 317.2 作为子离子, 进行 THDOC 的定量分析^[13]。图 1C 为 THDOC 的 MRM 色谱图。

3.2 液相色谱条件的选择

3.2.1 色谱柱对分离的影响 6 种甾体类激素化学结构相似, 如别孕烯醇酮(AP) 与孕烯醇酮(PREG) 分子结构十分相近, 尽管 MRM 方式不要求所有峰都基线分离, 但分离不佳易引起共流出物之间的互相抑制。本研究分别比较了 Shim-pack XR-ODS(50 mm × 4.6 mm, 2.2 μm, 岛津公司)、Shim-pack XR-ODS(100 mm × 4.6 mm, 2.2 μm, 岛津公司)、XDB-C₁₈(50 mm × 4.6 mm, 1.8 μm, 安捷伦公司)、Synergi Hydro RP(150 mm × 2.0 mm, 4 μm, 菲罗门公司) 和 Venusil XBP C₁₈(150 mm × 2.1 mm, 5 μm, 安吉尔公司) 5 种色谱柱对 6 种甾体类化合物的分离效果。结果表明, XDB-C₁₈ 色谱柱对 6 种甾体类化合物的分离效果最好, 因此本研究以其为分离柱。6 种甾体类化合物的保留时间见表 1, 相应的结构式和 MRM 色谱图见图 2。

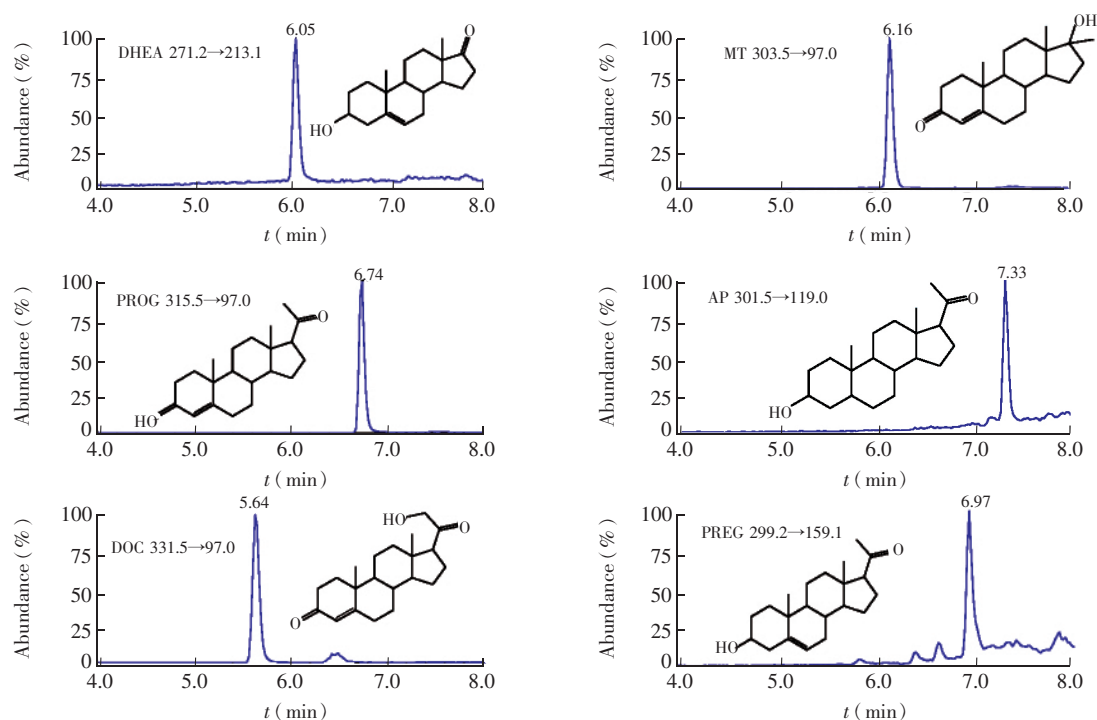


图2 去氢表雄酮、孕酮、脱氧皮质酮、甲基睾酮、别孕烯醇酮及孕烯醇酮的 MRM 质谱离子流图

Fig.2 MRM chromatograms of DHEA, PROG, DOC, MT, AP and PREG

3.2.2 流动相对分离的影响 以 XDB-C₁₈ 为色谱柱, 考察不同流动相对 6 种甾体类化合物分离的影响。分别对比了在 A 相和 B 相中加入酸或缓冲盐时的检测结果。结果表明, A 相为纯水时对甾体类化合物色谱峰分离信号响应, 优于酸化纯水(0.1% 甲酸), 可能因为甲酸改变了流动相的 pH 值, 进而影响了待测物在分析柱上的保留。在水中添加挥发性缓冲盐乙酸铵, 比较添加前后对甾体类物质的保留时间、分离度、色谱峰形、灵敏度等的影响情况。结果表明, A 相为 5 mmol/L 乙酸铵溶液, B 相为纯甲醇时, 分离效果最佳。

3.2.3 柱温对的影响 考察了柱温箱温度为 35℃ 和 45℃ 时对信号的影响。样品是 1 ng/mL 混合标样。柱温在 45℃ 时待测物保留时间会缩短。对于 AP, 当柱温为 35℃ 时, 其响应淹没于本底噪音中; 当柱温为 45℃ 时, 可以看到明显的 AP 峰。由于神经甾体在组织中浓度很低, 仪器灵敏度是优先考虑的问题, 因此柱温选择为 45℃。

3.3 生物样品前处理条件的优化

3.3.1 液液萃取(LLE) 和固相萃取(SPE) 的比较 液液萃取和固相萃取是生物样品常用的两种样品前处理技术, 两者均有其各自的优势与特点。液液萃取简单、廉价, 但背景干扰高于固相萃取。本研究

以 THDOC 为例,比较了两种萃取方法对于提取鼠脑组织中的神经甾体的效果。结果表明,液液萃取的效果明显优于固相萃取。而且液液萃取 1 次后,THDOC 的响应高于液液萃取 3 次,这可能是由于萃取的次数过多导致脑组织中的杂质也进入到萃取液中。图 3 展示了不同萃取条件下,海马组织中 THDOC 的响应情况。

3.3.2 内标物的选择 本研究为了体现方法的通用性和简便性,没有采用昂贵的同位素内标,而是选择甲基睾酮(MT)作为内标,其结构式见图 2。MT 较同位素内标更为方便易得,内源性杂质不干扰测定,内标与样品的提取回收率相近,提高了方法的精密度和准确度^[12]。

3.4 方法验证

3.4.1 线性范围检出限定量限 由于存在基质效应,标准品在甲醇/水溶液中的质谱响应与其在生物基质中的响应不同,所以应将不同浓度的标准品加入到空白基质中,以制作工作曲线。而神经甾体属于内源性物质,无法得到空白基质,于是选用 5% BSA-0.7% NaCl 作为空白基质^[7]。配制浓度为 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 510 ng/mL 的 6 种神经甾体类化合物的溶液,按 2.3 节的方法处理并测定,平行测定 3 次。以目标组分峰面积/内标峰面积为纵坐标,响应的添加含量为横坐标,绘制标准曲线。依据特征离子 MRM 色谱峰的信噪比大于 3 为检出限,信噪比大于 10 为定量限,结果见表 2。6 种神经甾体激素的 LODs 为 0.04 ~ 0.20 ng/mL,定量限 LOQs 确定为 0.10 ~ 0.50 ng/mL。DOC 和 PROG 在 0.1 ~ 10 ng/mL 范围内呈良好的线性关系, PREG, THDOC, AP 和 DHEA 在 0.5 ~ 10 ng/mL 范围内呈良好的线性关系。

表 2 6 种神经甾体类化合物的线性方程、相关系数、检出限和定量限

Table 2 Linear equation, correlation coefficient, linear range, LOD, LOQ of 6 neurosteroids

待测物 Analytes	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient (ng/mL)	线性范围 Linear range (ng/mL)	检出限 LOD (ng/mL)	定量限 LOQ (ng/mL)
去氢表雄酮 DHEA	$y=0.0106x+0.00746$	0.9977	0.50 ~ 10	0.20	0.50
孕酮 PROG	$y=0.644x+0.0369$	0.9987	0.10 ~ 10	0.04	0.10
脱氧皮质酮 DOC	$y=0.402x+0.000474$	0.9947	0.10 ~ 10	0.04	0.10
别孕烯醇酮 AP	$y=0.365x+0.0935$	0.9993	0.50 ~ 10	0.10	0.50
孕烯醇酮 PREG	$y=0.0406x+0.00665$	0.9910	0.50 ~ 10	0.10	0.50
四氢脱氧皮质酮 THDOC	$y=0.236x-0.0139$	0.9993	0.50 ~ 10	0.20	0.50

以 5% BSA-0.7% NaCl 作为空白基质,考察方法的可靠性^[14]。即在鼠脑组织中加入不同浓度的标准品,比较以鼠脑组织作为基质和溶液作为空白基质时工作曲线的斜率,发现两者基本一致。实验表明,以 5% BSA-0.7% NaCl 溶液作为空白基质测定神经甾体是可靠的。

3.4.2 方法的回收率与精密度 在线性范围内选择 3 个添加水平,分别为 0.4, 4.0 和 8.0 ng/mL,按照

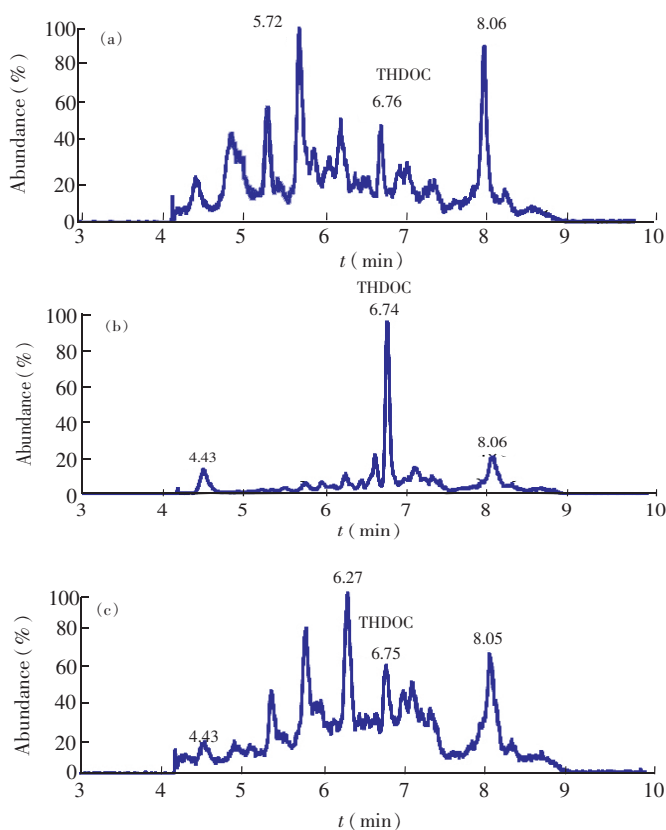


图 3 海马组织中 THDOC 的 MRM 质谱离子流图。(a) 固相萃取 (b) 液液萃取 1 次 (c) 液液萃取 3 次。

Fig. 3 MRM chromatograms of THDOC in hippocampus treated with (a) SPE, (b) LLE (liquid-liquid extraction) for 1 time, and (c) LLE for 3 times

2.3 ~ 2.5 节方法平行测定 6 次 ,各化合物的平均回收率为 91.2% ~ 115.5% ,RSD 为 0.9% ~ 8.8% ,具体数据见表 3。

表 3 BSA 空白基质中神经甾体类激素加标回收率和精密度(*n* = 6)
Table 3 Recoveries and accuracies of 6 neurosteroids in spiked BSA blank matrix (*n* = 6)

待测物 Analytes	加标浓度 Spiked (ng/mL)	平均回收率 Mean recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)	待测物 Analytes	加标浓度 Spiked (ng/mL)	平均回收率 Mean recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)
去氢表雄酮 DHEA	0.4	111.3	8.8	别孕烯醇酮 AP	0.4	109.7	7.6
	4	100.5	6.2		4	107.3	4.7
	8	110.8	2.2		8	105.0	5.3
孕酮 PROG	0.4	115.5	4.2	孕烯醇酮 PRE	0.4	112.5	6.6
	4	97.8	1.3		4	107.0	7.5
	8	103.0	0.89		8	109.8	4.6
脱氧皮质酮 DOC	0.4	113.7	1.7	四氢脱氧皮质酮 THDOC	0.4	101.1	4.1
	4	104.0	1.6		4	101.2	2.0
	8	91.2	1.4		8	104.5	1.8

3.5 实际样品分析

利用本方法测定了成年大鼠脑组织不同分区中的 6 种神经甾体的浓度 结果见表 4。

表 4 实际样品的检测结果
Table 4 Detection results of real samples

待测物 Analytes	内侧额叶皮层 Medial prefrontal cortex , mPFC (ng/g)	丘脑腹后核 Ventral posterior thalamus , VP (ng/g)	海马 Hippocampus , HF (ng/g)
去氢表雄酮 DHEA	ND*	ND*	ND*
孕酮 PROG	13.0	7.9	4.2
脱氧皮质酮 DOC	12.0	12.9	4.2
别孕烯醇酮 AP	27.0	19.5	22.0
孕烯醇酮 PREG	20.0	5.2	12.0
四氢脱氧皮质酮 THDOC	4.0	5.4	1.6

* 未检出(Not detected , ND)

4 结 论

本研究建立了高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS) 测定鼠脑组织中 6 种神经甾体类激素的检测方法。在样品前处理过程中 ,发现乙酸乙酯-正己烷萃取 1 次效果良好; 优化了高效液相色谱-串联质谱法同时检测多种内源性神经甾体类激素的仪器条件; 采用内标法同时对 6 种激素进行定量分析 ,均获得了较好的效果。该方法样品前处理简单、灵敏度高、选择性好 ,有望广泛地应用于生物组织中痕量甾体类激素的检测。

References

- Robel P , Baulieu E E. *Trends Endocrinol. Metab.* , **1994** , 5(1) : 1-8
- Luchetti S , Huitinga I , Swaab D F. *Neuroscience* , **2011** , 191: 6-21
- Reddy D S , Rogawski M A. *J. Neurosci.* , **2002** , 22(9) : 3795-3805
- Liere P , Akwa Y , Weill-Engerer S , Eychenne B , Pianos A , Robel P , Sjoval J , Schumacher M , Baulieu E E. *J. Chromatogr. B* , **2000** , 739(2) : 301-312
- Caruso D , Scurati S , Maschi O , de Angelis L , Roglio I , Giatti S , Garcia-Segura L M , Melcangi R C. *Neurochem. Int.* , **2008** , 52(4-5) : 560-568
- Keevil B G. *Best Pract. Res. Clin. Endoc. Metab.* , **2013** , 27(5) : 663-674
- Rustichelli C , Pinetti D , Lucchi C , Ravazzini F , Puia G. *J. Chromatogr. B* , **2013** , 930: 62-69
- Wang Y Q , Karu K , Griffiths W J. *Biochimie* , **2007** , 89(2) : 182-191

- 9 Ahonen L , Keski-Rahkonen P , Saarelainen T , Paviola J , Ketola R A , Auriola S , Poutanen M , Kostianen R. *Anal. Chim. Acta* , **2012** , 721: 115–121
- 10 Galuska C E , Hartmann M F , Sanchez-Guijo A , Bakhaus K , Geyer J , Schuler G , Zimmer K P , Wudy S A. *Analyst* , **2013** , 138(13) : 3792–3801
- 11 Keski-Rahkonen P , Huhtinen K , Desai R , Harwood D T , Handelsman D J , Poutanen M , Auriola S. *J. Mass Spectrom.* , **2013** , 48(9) : 1050–1058
- 12 REN Jin-Min , HOU Yan-Ning. *Acta Pharmaceutica Sinica* , **2005** , 40(3) : 262–266
任进民, 侯艳宁. *药学报* , **2005** , 40(3) : 262–266
- 13 Jantti S E , Tammimäki A , Raattamaa H , Piepponen P , Kostianen R , Ketola R A. *Anal. Chem.* , **2010** , 82(8) : 3168–3175
- 14 Minkler P E , Stoll M S K , Ingalls S T , Yang S M , Kerner J , Hoppel C L. *Clin. Chem.* , **2008** , 54(9) : 1451–1462

Simultaneous Determination of Six Neurosteroids Hormones in Rat Brain Tissues by High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry

LIU Jia¹ , ZHANG Meng² , WAN You² , WU Hong-Hai³ , HOU Yan-Ning³ , ZHENG Le-Min^{* 1} , YIN Yu-Xin^{* 1}

¹(*Institute of Systems Biomedicine , Peking University Health Science Center , Beijing 100191 , China*)

²(*Neuroscience Research Institute , Peking University , Beijing 100191 , China*)

³(*Bethune International Peace Hospital , Shijiazhuang 050082 , China*)

Abstract An analytical method based on high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry was developed for the simultaneous determination of 6 neurosteroids in rat brain tissues. The neurosteroids were separated on an Agilent XDB-C₁₈ column (50 mm×4.6 mm , 1.8 μm) , using methanol-5 mmol/L ammonium acetate as the mobile phase. A gradient elution program with a cycle time of 10 min was used. The neurosteroids were detected by electrospray ionization mass spectrometry in positive mode with multiple reaction monitoring (MRM) scan mode. For 11-deoxycorticosterone (DOC) and progesterone (PROG) , the linear range of calibration curve was from 0.10 ng/mL to 10 ng/mL , and for allopregnanolone (AP) , pregnenolone (PREG) , dehydroepiandrosterone (DHEA) and allotetrahydrodoc (THDOC) , the linear range calibration curve was from 0.50 ng/mL to 10 ng/mL , both with the correlation coefficient more than 0.99. The mean recoveries at spiked levels of 0.4 , 4.0 and 8.0 ng/mL were in the range of 91.2%–115.5% , and the RSDs were 0.9%–8.8% (*n*=6) . The limits of detection and quantification were 0.04–0.20 ng/mL and 0.10–0.50 ng/mL , respectively.

Keywords Neurosteroids; Liquid chromatography–tandem mass spectrometry; Multiple reaction monitoring; Rat brain

(Received 17 February 2015; accepted 21 May 2015)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21305005)