



Original Article

Simultaneous Determination of Cortisol and Testosterone from Rat Serum by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Nguyen Van Khanh^{1,*}, Nguyen Thị Thanh Binh¹, Dang Kim Thu¹,
Dang Thao Linh¹, Vu Thi Ngoc Anh¹, Vu Thi Thu Giang², Seiji Honma³

¹VNU University of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

²Hanoi University of Pharmacy, 13-15 Le Thanh Tong, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam

³Kanazawa University, Kakumamachi, Kanazawa, Ishikawa 920-1192, Japan

Received 19 February 2022

Revised 23 February 2022; Accepted 5 March 2022

Abstract: A liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry in a positive mode (LC-ESI-MS/MS) was developed to determine simultaneously the levels of cortisol and testosterone in rat serum. The MRM (Multiple Reaction Monitoring) was used to optimize ion precursor, fragmentor voltage, ion product, and collision energy. Analytical samples were treated by solid-phase extraction with Bond Elut C18 cartridge. The method was validated according to FDA guidance for bioanalytical method validation. The results indicated that this method showed a wide linearity range (0.1-100 ng/mL for cortisol and 0.025-100 ng/mL for testosterone), good linearity ($r^2 > 0.999$), low limit of quantification (LLOQ values of cortisol and testosterone were 0.1 ng/mL and 0.025 ng/mL, respectively), good recovery (90.4% - 108.0%), suitable repeatability (CV values were in the range of 2.7% - 14.8%), good stability in different conditions. The validated method was applied to quantify cortisol and testosterone levels in several rat blood samples.

Keywords: LC-ESI-MS/MS, cortisol, testosterone, rat serum, solid-phase extraction.

* Corresponding author.

E-mail address: khanha7k64dkh@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4394>

Định lượng đồng thời cortisol và testosterone trong huyết thanh chuột bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối đầu dò khối phổ

Nguyễn Văn Khanh^{1*}, Nguyễn Thị Thanh Bình¹, Đặng Kim Thu¹,
Đặng Thảo Linh¹, Vũ Thị Ngọc Anh¹, Vũ Thị Thu Giang², Seijiro Honma³

¹Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Dược Hà Nội, 13-15 Lê Thánh Tông, Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

³Đại học Kanazawa, Kakumamachi, Kanazawa, Ishikawa 920-1192, Nhật Bản

Nhận ngày 19 tháng 02 năm 2022

Chỉnh sửa ngày 23 tháng 2 năm 2022; Chấp nhận đăng ngày 5 tháng 3 năm 2022

Tóm tắt: Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối đầu dò khối phổ với chế độ ion hóa phun điện tử dương (LC-ESI-MS/MS) được phát triển để định lượng đồng thời cortisol và testosterone trong huyết thanh chuột. Chế độ MRM (Multiple Reaction Monitoring) được sử dụng để tối ưu: m/z ion mẹ, thể phân mảnh, m/z ion con và năng lượng bắn phá tạo ion. Các mẫu phân tích được xử lý bằng phương pháp chiết xuất pha rắn với cột Bond Elut C18. Phương pháp phân tích được thẩm định theo hướng dẫn phân tích thuốc trong dịch sinh học của FDA. Kết quả cho thấy phương pháp phân tích có khoảng định lượng rộng (0,1– 100 ng/mL đối với cortisol và 0,025 – 100 ng/mL đối với testosterone), tính tuyến tính tốt ($r^2 > 0,999$), giới hạn định lượng thấp (LLOQ của cortisol và testosterone lần lượt là 0,1 ng/mL và 0,025 ng/mL), độ thu hồi cao (90,4% - 108,0%), đảm bảo độ lặp lại (với CV từ 2,7% - 14,8%), mẫu ổn định trong các điều kiện khác nhau. Phương pháp phân tích đã được ứng dụng để định lượng nồng độ cortisol và testosterone trong một số mẫu máu chuột thí nghiệm.

Từ khóa: LC-ESI-MS/MS, cortisol, testosterone, huyết thanh chuột, chiết xuất pha rắn.

1. Mở đầu

Hormone steroid đóng vai trò quan trọng trong việc kiểm soát các hành vi và sự phát triển ở động vật. Ví dụ, glucocorticoid giúp tích lũy năng lượng dự trữ và đáp ứng thích nghi với các yếu tố căng thẳng do môi trường và xã hội gây ra. Androgen, chẳng hạn như testosterone, hormone sinh dục nam thúc đẩy sản xuất tinh trùng, phát triển đặc điểm sinh dục và cạnh tranh sinh sản nam. Sự thay đổi nồng độ hormone

testosterone và cortisol có liên quan tới một số bệnh lý như sự già hóa, stress,... [1]. Có rất nhiều phương pháp định lượng hormone steroid như xét nghiệm miễn dịch (IAs), xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme (ELISA). Tuy nhiên, các kỹ thuật này có một số nhược điểm như: có phản ứng chéo với các chất phân tích tương tự, vấn đề tiêu chuẩn hóa giữa các phòng thí nghiệm và các vấn đề về độ nhạy [2-4]. Các nhà khoa học chỉ ra rằng, nếu chỉ xét về mặt hiệu suất, một số kỹ thuật miễn dịch có thể là tối ưu,

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: khanha7k64dkh@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4394>

nhưng xét về tổng thể, phương pháp LC-MS/MS được khuyến cáo để thay thế cho các kỹ thuật miễn dịch trong định lượng nồng độ các hormone steroid [5], [6]. Hiện nay, chưa có công bố nào về phương pháp định lượng testosterone và cortisol trong huyết thanh chuột ở Việt Nam bằng kỹ thuật LC-MS/MS. Do vậy, phương pháp định lượng đồng thời hormone cortisol và testosterone trong huyết thanh chuột bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối đầu dò khối phổ được phát triển trong nghiên cứu này. Việc xây dựng thành công phương pháp phân tích cortisol và testosterone sẽ giúp chẩn đoán một số bệnh lý liên quan tới sự thay đổi nồng độ testosterone và cortisol trong máu động vật và con người.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Dung môi, hóa chất và chất chuẩn

Chuẩn testosterone và cortisol (Steroid Company, Hoa Kỳ $\geq 98\%$), chuẩn nội testosterone- $^{13}\text{C}_3$ và cortisol- $^2\text{H}_4$ (Otuka Company, Nhật Bản $\geq 98\%$).

Nước tinh khiết, acetonitrile đạt chuẩn tinh khiết dùng cho LC-MS. Methanol, acid formic, ethyl acetat đều đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích.

2.2. Thiết bị và dụng cụ phân tích

Hệ thống máy sắc ký lỏng hiệu năng cao kết nối đầu dò khối phổ LC-MS/MS 6420 Triple Quad (Agilent Technologies), cân phân tích Sartorius QUINTIX224 – 1S (Đức), máy siêu âm Elmasonic S100H (Đức), hệ thống cô quay ly tâm CVE-3110 (Eyela, Nhật Bản), máy ly tâm Biocen 22R (Tây Ban Nha), máy ly tâm HSCEN-204 (MRC, Israel), máy Vortex (IKA, Đức), cột chiết xuất pha rắn Bond Elut C18 3 mL (Agilent Technologies) và các dụng cụ khác: ống nghiệm, bình định mức, micropipet, đầu côn, cốc có mỏ, ống đong có độ chính xác phù hợp.

2.3. Đối tượng nghiên cứu

Các mẫu huyết thanh được thu thập từ chuột cống trắng, giống đực, chủng Sprague-Dawley

khỏe mạnh. Động vật thí nghiệm được cung cấp bởi Học viện Quân Y, Việt Nam.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Quy trình phân tích

Điều kiện sắc ký: Cột Poroshell C18 2,7 μm ; 2,1 \times 100 mm, nhiệt độ cột: 50 °C. Pha động: 0,1% acid formic (A) và acetonitrile (B), chế độ gradient như sau: 0-2 phút (50 - 55% B), 2-3 phút (55 - 75% B), 3-3,8 phút (75 - 95% B), 3,8-4,5 phút (95 - 100% B), 4,5-5,2 phút (100% B), 5,2-5,21 phút (100 - 35% B), 5,21-6,5 phút (35% B), 6,5-8 phút (35 - 50% B). Tốc độ dòng: 0,5 mL/phút. Thể tích tiêm mẫu: 10 μL .

Điều kiện khối phổ: Nguồn ion ESI: ion hóa tia điện (+). Thế ion hóa: 4000 V. Áp suất khí phun: 30 psi. Tốc độ dòng khí nitơ: 11 L/phút. Nhiệt độ nguồn: 300 °C. Chế độ chạy: MRM (Multiple Reaction Monitoring).

2.4.2. Phương pháp thu thập mẫu huyết thanh chuột

Chuột cống trắng, giống đực, chủng Sprague-Dawley khỏe mạnh được lấy máu tĩnh mạch đùi vào ống chống đông chứa EDTA, ly tâm lạnh ở 5 °C với tốc độ 18000 vòng/phút, lấy phần chất lỏng bên trên thu được mẫu huyết thanh chuột, bảo quản ở -70 °C cho tới khi phân tích.

2.4.3. Quy trình xử lý mẫu

Tham khảo các tài liệu [7-9], phương pháp xử lý mẫu như sau: 0,2 ml huyết thanh chuột đã được rã đông ở nhiệt độ phòng hoặc dung dịch chuẩn được thêm 0,1 ml hỗn hợp chuẩn nội testosterone- $^{13}\text{C}_3$ và cortisol- $^2\text{H}_4$ đều có nồng độ 10 ng/ml, 0,1 mL methanol, 1 mL nước tinh khiết và 2,5 ml ethyl acetat, vortex khoảng 1 phút, ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 5 phút, lấy phần dịch trên, cô quay ly tâm chân không ở 40 °C tới cạn. Cặn được hòa tan trong 0,5 mL methanol, 2 mL nước, vortex khoảng 1 phút. Dịch được nạp vào cột chiết xuất pha rắn Bond Elut C18 đã được hoạt hóa bởi 3 ml methanol và 3 ml nước tinh khiết, rửa giải loại tạp bằng 3 mL hỗn hợp methanol/nước tinh khiết (30:70), sau đó rửa giải thu lấy dịch phân tích bằng 1,5 mL hỗn hợp acetonitrile/nước tinh khiết

(80:20). Dịch rửa giải được cô quay ly tâm chân không ở 60 °C tới cạn, thêm 0,1 mL hỗn hợp acetonitrile/nước tinh khiết/acid formic (60:40:1), ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 5 phút. Dịch được chuyển vào ống insert 100 uL rồi tiêm vào hệ thống LC-ESI-MS/MS.

2.4.4. Thẩm định phương pháp phân tích

Tiến hành thẩm định phương pháp dựa theo hướng dẫn về phân tích thuốc trong dịch sinh học của FDA [10] về khoảng định lượng và tính tuyến tính; độ đặc hiệu, chọn lọc; giới hạn định lượng; độ thu hồi và độ lặp lại; độ ổn định.

Khoảng định lượng và tính tuyến tính

0,1 ml hỗn hợp chuẩn nội testosterone-¹³C₃ và cortisol-²H₄ đều có nồng độ 10 ng/ml trong methanol được thêm vào lần lượt 0,1 mL các dung dịch chuẩn testosterone (nồng độ 100, 10, 5, 1, 0,25 và 0,025 ng/mL) và dung dịch chuẩn cortisol (nồng độ 100, 10, 5, 1, và 0,1 ng/mL) thêm 1 mL nước tinh khiết và 2,5 mL ethyl acetat, vortex khoảng 1 phút, ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 5 phút, lấy phần dịch trên, cô quay ly tâm chân không ở 40 °C tới cạn. Sau đó mẫu được xử lý và tiêm vào hệ thống LC-MS/MS như mô tả trong mục 2.4.3.

Xác định sự tương quan giữa nồng độ (x) với tỷ lệ diện tích pic giữa chuẩn và chuẩn nội (y) bằng phương pháp hồi quy tuyến tính, sử dụng hệ số tỷ trọng (1/x).

Độ đặc hiệu, độ chọn lọc

Các mẫu huyết thanh chuột (0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL, 0,4 mL) được thêm một lượng đã biết nồng độ testosterone và cortisol) được thêm 0,1 mL hỗn hợp chuẩn nội testosterone-¹³C₃ và cortisol-²H₄ đều có nồng độ 10 ng/mL. Các mẫu

sau đó được xử lý như mô tả trong mục 2.4.3. Sự tương quan tuyến tính giữa thể tích huyết tương và nồng độ testosterone và cortisol được xác định. Bên cạnh đó, tính toán tỷ lệ thu hồi hoạt chất của mẫu thử thêm chuẩn đồng thời so sánh thời gian lưu của các chất cần phân tích trong mẫu thử với mẫu chuẩn.

Giới hạn định lượng dưới

Tiến hành xác định giới hạn định lượng dưới (LLOQ) của phương pháp bằng cách pha loãng nồng độ các chuẩn testosterone và cortisol, sau đó xử lý mẫu tương tự như mục 2.4.3. LLOQ của phương pháp là nồng độ có độ đúng nằm trong khoảng từ 80% - 120% với hệ số biến thiên (CV) của độ lặp lại ≤ 20% và giá trị tín hiệu/nhiều đường nền (S/N) ít nhất phải lớn hơn hoặc bằng 5.

Độ thu hồi và độ lặp lại

Để xác định độ thu hồi, độ lặp lại trong ngày và khác ngày, 0,2 mL huyết thanh chuột được thêm vào 0,1 mL các dung dịch chuẩn testosterone và cortisol đã biết nồng độ (LLOQ, LQC, MQC, HQC) và 0,1 mL hỗn hợp chuẩn nội testosterone-¹³C₃ và cortisol-²H₄ đều có nồng độ 10 ng/mL. Sau đó mẫu được xử lý tương tự như trong mục 2.4.3. Tỷ lệ thu hồi chất cần phân tích của các mẫu và giá trị CV được xác định.

Độ ổn định

Nghiên cứu độ ổn định của testosterone và cortisol trong mẫu huyết thanh ở các điều kiện sau: -70 °C ở trong 1 tháng, điều kiện thường trong 12 giờ và 3 chu kỳ đông - rã đông. Mẫu được xử lý như mô tả trong mục 2.4.3. Độ ổn định được đánh giá bằng cách so sánh nồng độ testosterone và cortisol trong mẫu huyết thanh sau thời gian bảo quản so với thời điểm ban đầu.

Bảng 1. Một số thông số MS cho chất phân tích

Chất phân tích	m/z ion mẹ	Thế phân mảnh (V)	m/z ion con	Năng lượng bắn phá tạo ion (V)
Cortisol	363,22	130	121,2	26
Cortisol- ² H ₄	367,30	130	122,2	26
Testosterone	289,22	125	97,0	26
Testosterone- ¹³ C ₃	292,30	125	100,1	26

Bảng 2. Khoảng định lượng và tính tuyến tính của cortisol và testosterone

Chất phân tích	Khoảng tuyến tính (ng/mL)	Phương trình hồi quy	Bình phương hệ số tương quan (r ²)
Cortisol	0,1 - 100	y = 0,6896x + 0,3888	0,9997
Testosterone	0,025 - 100	y = 0,0859x + 0,0187	0,9999

3. Kết quả nghiên cứu và bàn luận

3.1. Tối ưu hóa điều kiện khối phổ

Chế độ MRM được sử dụng để tối ưu một số thông số MS cho testosterone và cortisol. Kết quả được trình bày ở Bảng 1.

3.2. Thẩm định phương pháp phân tích

3.2.1. Khoảng định lượng và tính tuyến tính

Kết quả xác định mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ (x) với tỷ lệ diện tích pic giữa chuẩn và chuẩn nội (y) được trình bày như trong Bảng 2.

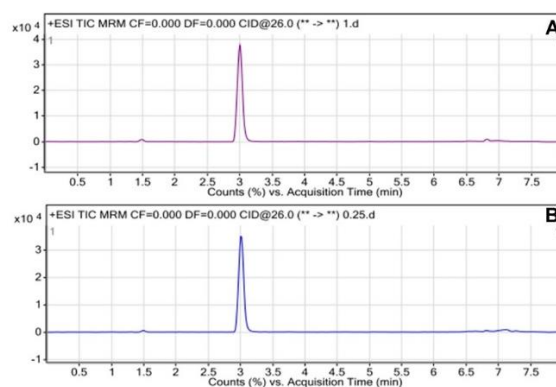
Kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ từ 0,1 ng/mL đến 100 ng/mL đối với cortisol và từ 0,025 ng/mL đến 100 ng/mL đối với testosterone có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ chất cần phân tích (x) với tỷ lệ diện tích pic giữa chuẩn và chuẩn nội (y) với bình phương hệ số tương quan r² > 0,999.

3.2.2. Độ đặc hiệu, độ chọn lọc

Trên sắc ký đồ cho thấy thời gian lưu của cortisol và testosterone trong mẫu thử trùng với thời gian lưu của cortisol và testosterone trong mẫu

chuẩn. Khi thêm chuẩn vào các mẫu thử thì diện tích pic của cortisol và testosterone đều tăng lên.

Kết quả Bảng 4 cho thấy có sự tương quan tuyến tính giữa thể tích huyết thanh với hàm lượng cortisol và testosterone trong mẫu huyết thanh với bình phương hệ số tương quan r² > 0,995. Độ thu hồi của cortisol và testosterone đều nằm trong khoảng 85-115%. Như vậy phương pháp có độ đặc hiệu và chọn lọc đối với hai chất cần phân tích.



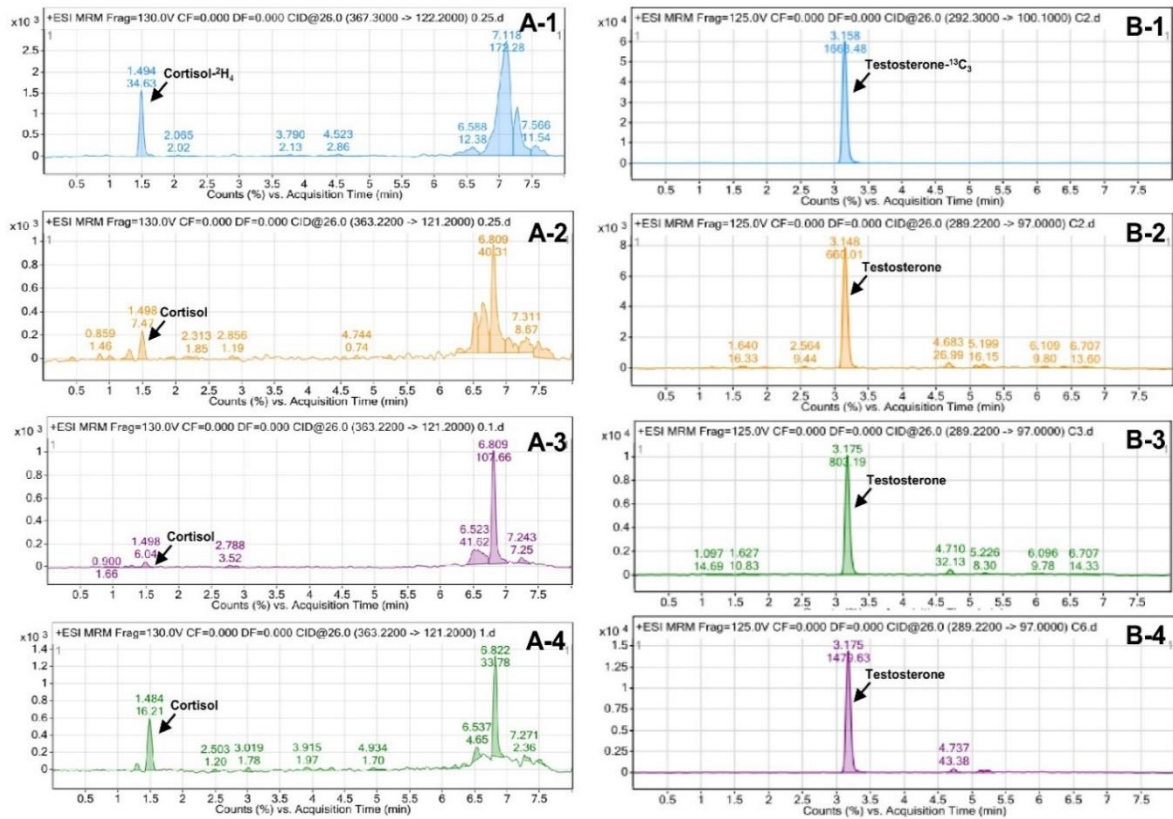
Hình 1. Sắc ký đồ HPLC của mẫu phân tích. A: Mẫu chuẩn hỗn hợp gồm cortisol và testosterone nồng độ 1 ng/ml. B: Mẫu thử huyết thanh chuột.

Bảng 3. Nồng độ cortisol và testosterone trong các mẫu huyết thanh chuột

Mẫu	Thể tích (mL)	Cortisol			Testosterone		
		Thêm vào (ng)	Hàm lượng (ng)	Độ thu hồi (%)	Thêm vào (ng)	Hàm lượng (ng)	Độ thu hồi (%)
Huyết thanh	0,2	0	0,046	92,0	0	0,724	92,4
	0,3	0	0,067		0	1,060	
	0,4	0	0,089		0	1,435	
	0,4	0,05	0,135		1	2,359	

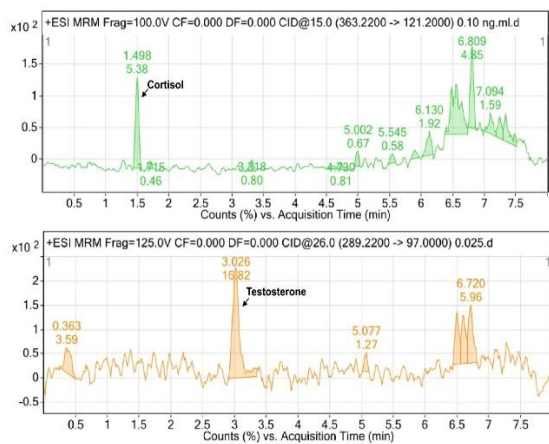
Bảng 4. Mối tương quan tuyến tính giữa thể tích huyết thanh với hàm lượng cortisol và testosterone

Chất phân tích	Phương trình hồi quy	Bình phương hệ số tương quan (r ²)
Cortisol	y = 0,235x - 0,0045	0,9986
Testosterone	y = 3,555x + 0,0065	0,9990



Hình 2. Sắc ký đồ các mẫu phân tích.

A-1: Chuẩn nội cortisol-²H₄ 10 ng/mL; A-2: Cortisol chuẩn 0,2 ng/mL; A-3: Cortisol trong mẫu huyết thanh chuột; A-4: Mẫu huyết thanh chuột thêm chuẩn cortisol 0,2 ng/mL; B-1: Chuẩn nội testosterone-¹³C₃ 10 ng/mL; B-2: Testosterone chuẩn 2 ng/mL; B-3: Testosterone trong mẫu huyết thanh chuột; B-4: Mẫu huyết thanh chuột thêm chuẩn testosterone 2 ng/mL.



Hình 3. LLOQ của cortisol (0,1 ng/mL) và testosterone (0,025 ng/mL).

3.2.3. Giới hạn định lượng dưới (LLOQ)

Phân tích các mẫu chuẩn cortisol có nồng độ 0,1 ng/mL và testosterone có nồng độ 0,025 ng/mL. Kết quả thể hiện như trong Hình 3 và Bảng 5.

Kết quả Bảng 5 cho thấy các mẫu cortisol 0,1 ng/mL và testosterone 0,025 ng/mL đều có tỷ số S/N lớn hơn 5, tỷ lệ phần trăm giữa nồng độ cortisol và testosterone xác định được từ đường chuẩn so với nồng độ thực có trong mẫu phân tích (tỷ lệ phục hồi) đều nằm trong khoảng từ 80 – 120% và giá trị CV nhỏ hơn 15%, đáp ứng yêu cầu về thẩm định LLOQ trong phân tích dịch sinh học theo hướng dẫn của FDA. Như vậy LLOQ của cortisol và testosterone lần lượt tương ứng là 0,1 ng/mL và 0,025 ng/mL.

Bảng 5. Kết quả xác định giá trị LLOQ của cortisol và testosterone

Cortisol				Testosterone			
LLOQ (ng)	Nồng độ thực nghiệm (ng/mL)	Tỷ lệ phục hồi (%)	Tỷ số S/N	LLOQ (ng)	Nồng độ thực nghiệm (ng/mL)	Tỷ lệ phục hồi (%)	Tỷ số S/N
0,1	0,102	102,0	> 5	0,025	0,022	88,0	> 5
0,1	0,093	93,0	> 5	0,025	0,023	92,0	> 5
0,1	0,088	88,0	> 5	0,025	0,022	88,0	> 5
0,1	0,096	96,0	> 5	0,025	0,025	100,0	> 5
0,1	0,092	92,0	> 5	0,025	0,024	96,0	> 5
0,1	0,097	97,0	> 5	0,025	0,023	92,0	> 5
Trung bình (%)		94,7		Trung bình (%)		92,7	
CV (%)		4,80		CV (%)		4,68	

Bảng 6. Độ thu hồi và độ lặp lại của phương pháp

Dung dịch thêm vào mẫu thử	Cortisol				Testosterone			
	Nồng độ dung dịch thêm vào (ng/mL)	Nồng độ tìm lại (ng/mL)	Độ thu hồi (%)	CV (%)	Nồng độ dung dịch thêm vào (ng/mL)	Nồng độ tìm lại (ng/mL)	Độ thu hồi (%)	CV (%)
<i>Trong ngày (n=5)</i>								
LLOQ	0,1	0,093±0,006	93,0	6,5	0,025	0,027±0,004	108,0	14,8
LQC	0,5	0,483±0,047	96,6	9,7	0,2	0,186± 0,011	93,0	5,9
MQC	20	20,754±1,432	103,8	6,9	20	19,754±1,276	98,8	6,5
HQC	80	78,652±3,472	98,3	4,4	80	77,965±2,863	97,5	3,7
<i>Khác ngày (n=5)</i>								
LLOQ	0,1	0,113± 0,008	113,0	7,1	0,025	0,023±0,003	92,0	13,0
LQC	0,5	0,452±0,051	90,4	11,3	0,2	0,213±0,017	106,5	8,0
MQC	20	18,864±1,285	94,3	6,8	20	20,853±1,654	104,3	7,9
HQC	80	79,652±2,651	99,6	3,3	80	78,851±2,162	98,6	2,7

Bảng 7. Độ ổn định của cortisol và testosterone trong các điều kiện khác nhau

Mẫu	Nhiệt độ	Thời gian	Chu kỳ đông - rã đông	Độ ổn định (%)	
				Cortisol	Testosterone
Huyết thanh chuột (n=5)	Phòng	12 giờ	-	95,6 ± 8,3	102,3 ± 7,5
	-70 °C	1 tháng	-	97,2 ± 5,1	95,9 ± 8,9
	-	-	3	93,9 ± 4,9	97,2 ± 6,2

3.2.4. Độ thu hồi và độ lặp lại

Kết quả Bảng 6 cho thấy phương pháp có độ thu hồi tại LLOQ, LQC, MQC, HQC đạt trong khoảng từ 85% đến 115% và độ lặp lại có giá trị CV < 15%. Kết quả này cho thấy phương pháp phân tích đồng thời cortisol và testosterone trong

huyết thanh chuột đạt yêu cầu theo hướng dẫn của FDA về độ thu hồi và độ lặp lại.

3.2.5. Độ ổn định

Kết quả Bảng 7 cho thấy cortisol và testosterone trong huyết thanh ổn định ở các

điều kiện: điều kiện thường trong 12 giờ, ở - 70 °C trong 1 tháng và sau 3 chu kỳ đông - rã đông.

3.3. Ứng dụng phân tích một số mẫu huyết thanh chuột

Ứng dụng phương pháp định lượng đồng thời cortisol và testosterone trong huyết thanh chuột khỏe mạnh bằng phương pháp LC-ESI-MS/MS vào phân tích nồng độ các chất này trong một số mẫu huyết thanh chuột. Mẫu huyết thanh

chuột khỏe mạnh được xử lý như mô tả trong mục 2.4.3. Kết quả như trong Bảng 8.

Bảng 8. Nồng độ cortisol và testosterone trong huyết thanh chuột

Hormone	Số lượng mẫu	Nồng độ (ng/mL)
Cortisol	10	0,253 ± 0,128
Testosterone	10	3,864 ± 2,125

Bảng 9. Nồng độ cortisol và testosterone trong một số dịch sinh học khác nhau

Đối tượng	Dịch sinh học	Nồng độ cortisol (ng/ml)	Nồng độ testosterone (ng/ml)	TLTK
Chuột cống	Máu	0,52	-	[11]
Chuột cống đực	Máu	-	0,6 - 13,8	[12]
Trẻ em	Máu	5,5 - 286	0,03 - 1,64	[13]
Trẻ em gái	Máu	-	0,03 - 0,21	[14]
Trẻ em trai	Máu	-	0,03 - 1,64	[14]
Người lớn	Máu	5,5 - 286	-	[13]
Nam giới trưởng thành	Máu	-	3,4 - 6,0	[15]
Nữ giới trưởng thành	Máu	-	0,62 - 0,66	[15]
Người lớn	Nước bọt	2,2 - 27,3	-	[16]
Nam giới trưởng thành	Nước bọt	-	0,065	[17]
Nam giới trưởng thành	Nước tiểu	-	0,04 - 65,0	[18]

Kết quả từ Bảng 8 cho thấy nồng độ cortisol và testosterone trong máu chuột khỏe mạnh tương ứng là 0,253 ng/ml và 3,864 ng/ml. Bảng 9 cho thấy nồng độ cortisol và testosterone trong các dịch sinh học khác nhau như máu, nước bọt và nước tiểu ở chuột và người trong các nghiên cứu trước đều cao hơn so với giới hạn định lượng dưới (LLOQ) của cortisol và testosterone, Do đó phương pháp này có thể ứng dụng để định lượng đồng thời cortisol và testosterone trong một số dịch sinh học ở người nhằm phát hiện hoặc chuẩn đoán một số bệnh có liên quan tới sự thay đổi nồng độ hormone trong cơ thể.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp sắc kí lỏng khối phổ (LC-ESI-MS/MS) để định lượng đồng thời 2 hormone steroid là cortisol và

testosterone trong huyết thanh chuột theo hướng dẫn của FDA. Phương pháp có độ đặc hiệu và chọn lọc cao, giới hạn định lượng thấp (LLOQ của cortisol và testosterone lần lượt là 0,1 ng/mL và 0,025 ng/mL). Trong khoảng định lượng (0,1– 100 ng/mL đối với cortisol và 0,025 – 100 ng/mL đối với testosterone), phương pháp có tính tuyến tính tốt với $r^2 > 0,999$, độ thu hồi cao (90,4% - 108,0%), đảm bảo độ lặp lại (CV trong khoản 2,7% - 14,8%). Mẫu phân tích ổn định trong các điều kiện khác nhau. Sau khi xây dựng và thẩm định, phương pháp đã được ứng dụng để định lượng nồng độ cortisol và testosterone trên một số mẫu máu chuột thí nghiệm.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Hà Nội thuộc đề tài cấp ĐHQGHN

“Nghiên cứu ảnh hưởng của saponin chi *Panax* đến nồng độ một số hormone trên động vật thí nghiệm”, mã số: QG.20.61.

Tài liệu tham khảo

- [1] A. V. Rincon et al., Measuring Urinary Cortisol and Testosterone Levels in Male Barbary Macaques: A Comparison of EIA and LC-MS, *General and Comparative Endocrinology*, Vol. 281, 2019, pp. 117-125, <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.05.017>.
- [2] D. French, *Advances in Bioanalytical Techniques to Measure Steroid Hormones in Serum*, *Bioanalysis*, Vol. 8, No. 11, 2016, pp. 1203-1219, <https://doi.org/10.4155/bio-2015-0025>.
- [3] M. Kaleta et al., *Analytical Methods for the Determination of Neuroactive Steroids*, *Biomolecules*, Vol. 11, No. 4, 2021, pp. 1-23, <https://doi.org/10.3390/biom11040553>.
- [4] M. Závada, K. Šafarčík, O. Topolčan, *Some Problems of Radioimmunoassay Control*, *Journal of Radioanalytical Chemistry*, Vol. 46, No. 1, 1978, pp. 57-66.
- [5] K. S. Leung, B. M. Fong, *LC-MS/MS in the Routine Clinical Laboratory: has its time come?*, *Anal Bioanal Chem*, Vol. 406, No. 9-10, 2014, pp. 2289-2301, <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7542-5>.
- [6] C. Shackleton, *Clinical Steroid Mass Spectrometry: a 45-year History Culminating in HPLC-MS/MS Becoming an Essential Tool for Patient Diagnosis*, *J Steroid Biochem Mol Biol*, Vol. 121, No. 3-5, 2010, pp. 481-490, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.02.017>.
- [7] K. Yamashita et al., *Development of Sensitive Derivatization Method for Aldosterone in Liquid Chromatography–Electrospray Ionization tandem Mass Spectrometry of Corticosteroids*, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1200, No. 2, 2008, pp. 114-121, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.034>.
- [8] K. Yamashita et al., *Highly Sensitive Determination of Estrone and Estradiol in Human Serum by Liquid Chromatography–Electrospray Ionization tandem Mass Spectrometry*, *Steroids*, Vol. 72, No. 11-12, 2007, pp. 819-827, <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2007.07.003>.
- [9] K. Yamashita et al., *Development of Highly Sensitive Quantification Method for Testosterone and Dihydrotestosterone in Human Serum and Prostate Tissue by Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry*, *Steroids*, Vol. 74, No. 12, 2009, pp. 920-926, <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2009.06.007>.
- [10] U. S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, *Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Bioanalytical Method Validation - Guidance for Industry*, 2018.
- [11] M. Toukh, S. P. Gordon, M. Othman, *Construction Noise Induces Hypercoagulability and Elevated Plasma Corticosteroids in Rats*, *Clin Appl Thromb Hemost*, Vol. 20, No.7, 2014, pp. 710-715, <https://doi.org/10.1177/1076029613483168>.
- [12] L. H. Heywood, *Testosterone Levels in the Male Laboratory Rat: Variation under Experimental Conditions*, *Int J Androl*, Vol. 3, No. 5, 1980, pp. 519-529, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1980.tb00140.x>.
- [13] L. J. Mentzel, G. Wiedemann, *Establishment of Reference Ranges for Cortisol in Neonates, Infants, Children and Adolescents*, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem*, Vol 31, No. 8, 1993, pp. 525-529, <https://doi.org/10.1515/cclm.1993.31.8.525>.
- [14] A. E. Kulle et al., *A Novel Ultrapressure Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Determination of Androstenedione, Testosterone, and Dihydrotestosterone in Pediatric Blood Samples: Age- and Sex-specific Reference Data*, *J Clin Endocrinol Metab*, Vol. 95, No. 5, 2010, pp. 2399-2409, <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1670>.
- [15] A. L. Southren et al., *Plasma Production Rates of Testosterone in Normal Adult Men and Women and in Patients with the Syndrome of Feminizing Testes*, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Vol. 25, No. 11, 1965, pp. 1441-1450, <https://doi.org/10.1210/jcem-25-11-1441>.
- [16] P. Pearlmutter et al., *Sweat and Saliva Cortisol Response to Stress and Nutrition Factors*, *Scientific Reports*, 2020, pp. 1-11, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75871-3>.
- [17] S. Clifton et al., *Salivary Testosterone Levels and Health Status in Men and Women in the British General Population: Findings from the Third National Survey of Sexual Attitudes and Lifestyles (Natsal-3)*, *J Clin Endo Metab*, Vol. 101, No. 11, pp. 3939-51, <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1669>.
- [18] J. Y. Moon et al., *Reference Ranges for Urinary Levels of Testosterone and Epitestosterone, Which may Reveal Gonadal Function, in a Korean Male Population*, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 140, 2014, pp. 100-105, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.12.001>.