

临床激素药物快速检测，看我的

吕辰 张婷岚 彭蜀莹 唐恺

赛默飞世尔科技

摘要:

本文在 Thermo Scientific™ 全新液相色谱串联质谱三重四极杆平台 Thermo Scientific™ TSQ™ Quantis 上针对国标 SN/T 2222-2008 中皮质激素、SN/T 2677-2010 中雄激素以及临床研究中常检的孕激素和雌激素共计 8 种激素类药物建立了快速液质检测方法。8 种激素类药物在其相应的浓度范围内线性关系良好 ($r^2 > 0.99$)，LOD 及 LOQ 均能满足国标对激素类药物残留的检测要求。本方法对激素药物的残留检测及临床检测具有指导意义。

关键词:

激素, TSQ Quantis, 液相色谱串联质谱

引言

激素类药物主要包括雄激素 (Androgens)、雌激素 (Estrogens)、孕激素 (Progestogens)、糖皮质激素 (Glucocorticoids) 等，因其具有影响动物性别分化，缩短生长周期，促进毛发生长及恢复皮肤弹性等作用，常被非法添加于各种动物源食品及化妆品中。研究表明，儿童性早熟、妇女子宫癌、卵巢癌等疾病发病率的上升均与滥用此类药物有关，因此 CEC、欧盟、国标、日本等均对动物源食品中激素类药物残留限量作出了严格要求。国标 SN/T 2222-2008 及 SN/T 2677-2010 也分别对进出口动物源性食品中糖皮质激素类兽药残留量及雄性激素类药物残留量检测方法做了相关规定。



激素作为由内分泌腺或内分泌细胞分泌的内源性生物活性物质，在体内作为信使传递信息，通过调节各种组织细胞的代谢活动从而影响人体的生理活动。虽然激素在人体内的含量很低，但却对人类健康有很大的影响，缺乏或过多都会引发各种疾病。因此，临床上检测人体多种激素的含量对于疾病的诊断具有重大意义。本文针对皮质激素、孕激素、雄激素、雌激素类共 8 种激素类药物建立了快速液相色谱串联质谱检测方法，既可为激素类药物残留量测定提供技术保障，亦可为激素的临床检测提供方法借鉴。

2. 实验部分

2.1. 仪器与试剂

Thermo Scientific™ Vanquish™ Binary Horizon 超高效液相色谱仪

TSQ Quantis 三重四极杆质谱仪

甲醇（色谱纯，美国 Thermo Fisher 公司）；实验用水为 Milli-Q 去离子水；NH₄OH（色谱纯，SIGMA）

2.2. 化合物信息及溶液配制

2.2.1 8 种激素类化合物及其对应内标物信息（见表 1）

2.2.2 取适量激素类化合物标准品混合储备液，稀释成浓度在 0.01 ng/mL - 500 ng/mL 范围的标准溶液，进液质联用仪器分析。

2.3. 色谱条件：

色谱柱：Thermo Scientific™ Accucore™ RP-MS
(2.6 μm, 100 × 2.1 mm)；

柱温：40℃；

进样量：5 μL；

流动相：A 为水（含 0.05% NH₄OH），B 为甲醇，梯度洗脱程序（见表 2）

表 2. 梯度洗脱程序
Table 2 Gradient Elution Program

时间	A 0.05%NH ₄ OH- 水	B 甲醇	流速
0.00	85	15	0.3
1.00	85	15	0.3
1.50	60	40	0.3
2.00	20	80	0.3
4.00	10	90	0.3
5.00	10	90	0.3
5.50	85	15	0.3
7.00	85	15	0.3

表 1. 8 种化合物及其对应内标物信息

Table 1 Information of 8 compounds and Internal Standards

类别	序号	简写	英文名	中文名	CAS	化学式	分子量
皮质激素	1	CORT	Corticosterone	皮质酮	50-22-6	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	346.46
		CORT-d8					
	2	COR	Cortisone	可的松	53-06-5	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	360.44
		COR-d7					
3	F	Cortisol	氢化可的松 / 皮质醇	50-23-7	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	362.46	
	F-d4						
4	ALD	Aldosterone	醛固酮	52-39-1	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	360.44	
	ALD-d7						
孕激素	5	P	Progesterone	孕酮	57-83-0	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.46
		P_C3					
雄激素	6	A2	Androstenedione	雄烯二酮	63-05-8	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	286.41
		A2-C3					
雌激素	7	E1	Estrone	雌酮	53-16-7	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270.37
		E1-D4					
	8	E2	Estradiol	雌二醇	50-28-2	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272.38
		E2-D3					

2.4. 质谱条件:

可加热电喷雾电离源 (HESI), 正、负离子切换扫描模式; 源温度: 350°C; 碰撞气压力: 2 mTorr; 选择反应监测离子扫描方式: SRM; 喷雾电压 (+/-): 3500/2500V; 离子传输管温度: 350°C; 鞘气压力 30 arb; 辅助气压力 10 arb; 离子对信息见表 3。

表 3. 8 种化合物及质谱采集参数
Table 3 MS/MS parameters of 8 compounds and Internal Standard

化合物	电离模式	母离子 (m/z)	RFLens 电压 (V)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (V)
皮质酮	ESI(+)	347.15	138	293.15*	16
皮质酮	ESI(+)	347.15	138	311.15	16
皮质酮 -D8	ESI(+)	355.20	137	337.23	16
可的松	ESI(+)	361.16	161	121*	30
可的松	ESI(+)	361.16	161	163.12	24
可的松 -D7	ESI(+)	368.20	158	168.12	24
氢化可的松	ESI(+)	363.15	141	121.04	25
氢化可的松	ESI(+)	363.15	141	309.08*	17
氢化可的松 -D4	ESI(+)	367.20	144	331.16	16
醛固酮	ESI(-)	359.18	127	331.2	15
醛固酮	ESI(-)	359.18	127	189*	17
醛固酮 -D7	ESI(-)	366.20	130	338.2	15
孕酮	ESI(+)	315.11	136	96.97*	22
孕酮	ESI(+)	315.11	136	108.97	25
孕酮 -C3	ESI(+)	318.20	139	112	25
雄烯二酮	ESI(+)	287.20	130	109.00	24
雄烯二酮	ESI(+)	287.20	130	96.97*	21
雄烯二酮 -C3	ESI(+)	290.20	139	100.00	21
雌酮	ESI(-)	269	176	145.00*	37
雌酮	ESI(-)	269	176	183.00	37
雌酮 -D4	ESI(-)	273	164	147.00	37
雌二醇	ESI(-)	271	192	183.00*	40
雌二醇	ESI(-)	271	192	145	39
雌二醇 -D3	ESI(-)	274	181	185	40

注: 带 * 的为定量离子

3. 实验结果与讨论

3.1 灵敏度测试

采用上述仪器分析方法，8种激素类化合物及其内标物在7分钟内均可获得良好的色谱峰，图1为8种激素类化合物在LOQ处的选择离子流提取图，各化合物灵敏度测试结果见表4。

3.2 线性范围测试

采用上述仪器分析方法，对8种激素类化合物进行线性范围测试，线性相关系数 r^2 均 ≥ 0.99 ，线性关系良好。8种激素类化合物线性方程及线性相关系数结果见表4，选取部分化合物线性方程图见图2。

表4. 8种化合物的线性范围、线性方程及相关系数

Table 4 Linear Ranges, Linear equations and correlation coefficients of 8 compounds

化合物	线性范围 (ng/mL)	线性方程 (r^2)	相关系数	LOD (pg/mL)	LOQ (pg/mL)
皮质酮	0.05-10	$y=-940.681+73526.1*x$	0.9989	10	50
可的松	0.05-10	$y=2714.25+88018.3*x$	0.9991	10	50
氢化可的松	0.05-10	$y=-1921.51+64621.4*x$	0.9964	10	50
醛固酮	0.5-50	$y=796.593+10944.2*x$	0.9948	100	500
孕酮	0.05-10	$y=1245.64+430947*x$	0.9995	10	50
雄烯二酮	0.05-10	$y=-523.444+930850*x$	1.0000	10	50
雌酮	0.05-50	$y=-167.166+29794.7*x$	1.0000	10	50
雌二醇	0.1-50	$y=-245.945+6928.3*x$	0.9977	50	100

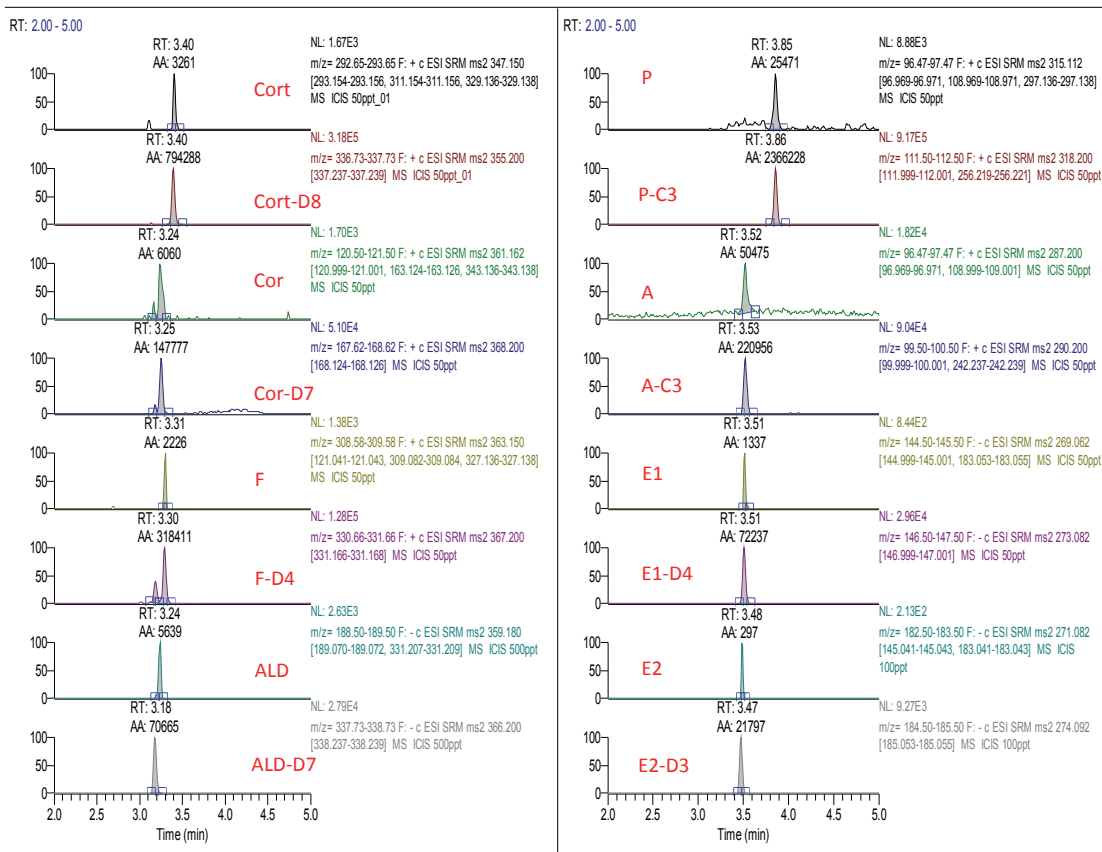


图1. 八种化合物及其内标物的色谱图 (LOQ)

Fig.1 EIC Chromatogram of 8 Compounds and Internal Standards (LOQ)

3.3. 仪器相对标准偏差 RSD 性能展示

采用上述仪器分析方法，对 8 种激素类化合物进行相对标准偏差测试 (n=6) 实验结果证明 8 种化合物相对标准偏差

RSD% 均 ≤ 5% 其中，雄烯二酮 50 pg/mL (n=6) RSD% 为 3.39%；100 pg/mL (n=6) RSD% 为 1.04% (图 3)

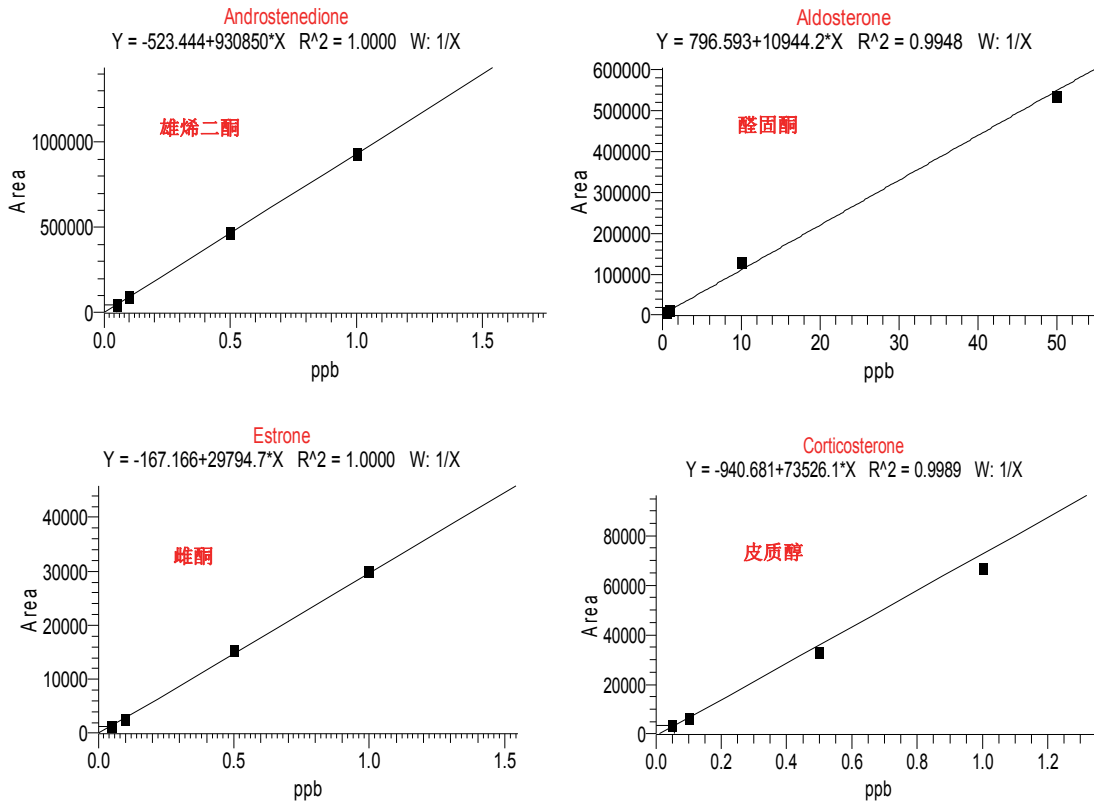


图 2. 部分化合物线性方程图

Fig.2 Linear Ranges, Linear equations and correlation coefficients

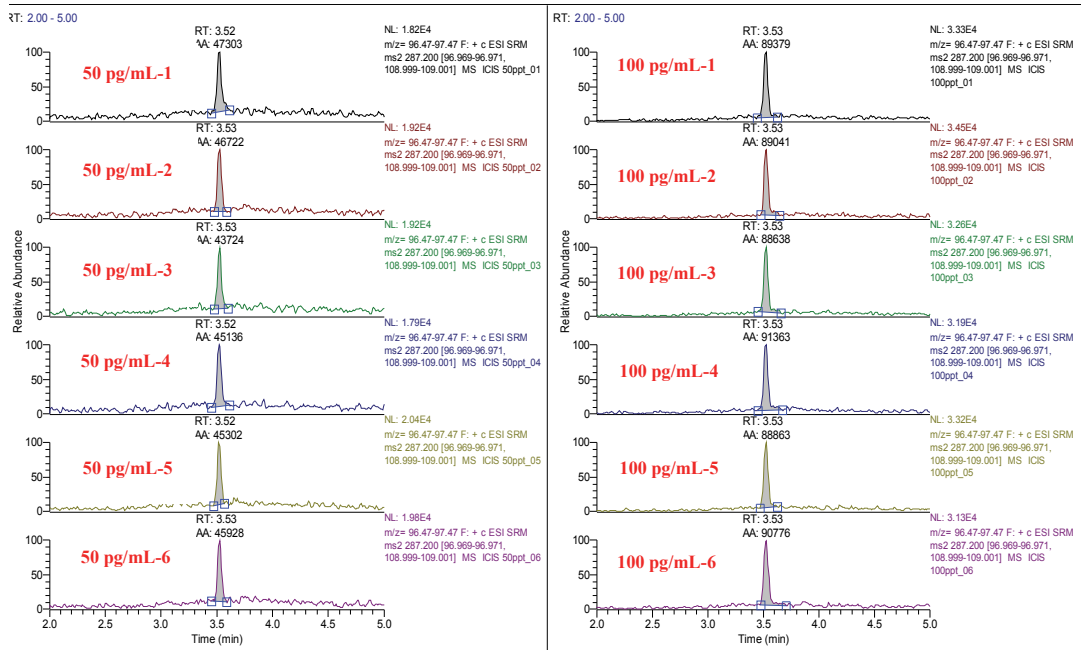


图 3. 雄烯二酮选择离子流提取图 n=6

Fig.3 EIC Chromatogram of Androstenedione n=6

4. 实验结果与讨论

本文建立了三重四极杆液质联用仪 (TSQ Quantis) 分析 8 种激素类药物的检测方法。由实验结果可以看出, 基于 TSQ Quantis 建立的检测方法不仅具有优异的灵敏度和线性范围同时具备优异的重现性, 本方法可用于激素类药物的日常分析检测。



赛默飞
官方微信



赛默飞色谱
与质谱中国

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com