

全新一代三重四极杆液质联用仪 TSQ Altis 在激素类化合物定量分析中的应用

张婷岚 吕辰 彭蜀莹 唐恺 徐牛生

赛默飞世尔科技（中国）有限公司色谱质谱部

摘要

本文在赛默飞全新液相色谱串联质谱的三重四极杆平台 TSQ Altis 上建立了快速液质检测方法，同时测定临床研究中常见的 9 种激素类化合物，其中包含 4 种皮质激素、3 种雌激素、1 种孕激素及 1 种雄激素。本文中涉及的 9 种激素类化合物在其相应的浓度范围内线性关系良好 ($r^2 > 0.99$)，LOD 及 LOQ 均能满足临床研究对于激素类化合物的检测要求，准确度与精密度结果显示该方法精密度相对标准偏差 $RSD \leq 7.72$ 。因此，本方法对激素类化合物的临床研究具有指导和参考意义。

关键词

激素，TSQ Altis，液相色谱串联质谱，临床

1、引言

类固醇激素是一类结构上具有环戊烷多氢菲结构的脂溶性激素，可以分为皮质激素和性激素。皮质激素包括盐皮质激素和糖皮质激素，具有调节糖代谢、水盐代谢、脂肪代谢、蛋白质代谢的生理作用。性激素是由性腺分泌的一类甾体激素，受下丘脑 - 垂体前叶 - 性腺轴的调控，包括雌激素、孕激素和雄激素。

激素类化合物由于在血液中含量的低且结构类似物众多，因此对方法的灵敏度和特异性要求很高。目前，激素定量分析方法包括免疫测定法、气相色谱质谱联用法和液相色谱质谱联用法等。免疫测定方法虽然通量高，但是存在专属性差，准确度低的缺点；气相质谱联用方法虽然选择性好和灵敏度高，但是由于激素的低挥发性，需要经过复杂的衍生化反应，不适宜高通量生物样品分析；而液相色谱质谱法专属、灵敏，可以实现快速高样品通量分析，现已成为激素类化合物生物样品定量分析的首选方法。

作为由内分泌细胞分泌的内源性生物活性物质，激素在体内通过调节各种组织细胞的代谢从而影响人体的生理活动，其指标含量对人体健康有重要诊断依据，缺乏或过量都会引发各种疾病。本文针对 9 种激素类化合物在全新的 TSQ Altis 三重四极杆液质联用平台上建立了一种灵敏度高、专属性强的定量检测方法。

2、实验部分

2.1 仪器与试剂

Thermo Fisher Vanquish Binary Flex 超高效液相色谱仪

Thermo Fisher TSQ Altis 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 9 种激素类化合物信息（表 1）

表 1. 9 种化合物信息

Table 1 Information of 9 compounds

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
	2	COR	Cortisone	可的松	53-06-5	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	360.44
	3	F	Cortisol	氢化可的松 / 皮质醇	50-23-7	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	362.46
	4	ALD	Aldosterone	醛固酮	52-39-1	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	360.44
孕激素	5	P	Progesterone	孕酮	57-83-0	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.46
雄激素	6	A2	Androstenedione	雄烯二酮	63-05-8	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	286.41
雌激素	7	E1	Estrone	雌酮	53-16-7	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270.37
	8	E2	Estradiol	雌二醇	50-28-2	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272.38
	9	E3	Estriol	雌三醇	50-27-1	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	288.38

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– 20 ng/mL 范围的标准溶液，上样分析。

2.3 色谱条件

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

柱温：40 °C；

进样量：5 μL；

流动相：A 为含 0.05% NH₄OH 的水，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 (min)	A% (含 0.05% NH ₄ OH 的水)	B% (甲醇)	流速 (mL/min)
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

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； 温度 380 °C；碰撞气压力 2 mTorr；选择反应监测离子对信息见表 3；
扫描方式 SRM；喷雾电压 (+/-) 3500/3200V；离子传输管 温度 350 °C；鞘气压力 25 arb；辅助气压力 8 arb；离子源

表 3. 9 种化合物及质谱采集参数

Table 3 MS/MS parameters of 9 compounds and Internal Standard

化合物	电离模式	母离子 (m/z)	RF Lens 电压 (V)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (V)
皮质酮	ESI(+)	347.16	55	293.15*	16
皮质酮	ESI(+)	347.16	55	311.17	16
皮质酮-D8	ESI(+)	355.16	55	337.23	16
可的松	ESI(+)	361.11	63	121*	30
可的松	ESI(+)	361.11	63	163.08	23
可的松-D7	ESI(+)	368.15	63	168.14	24
氢化可的松	ESI(+)	363.11	57	121	25
氢化可的松	ESI(+)	363.11	57	309.17*	17
氢化可的松-D4	ESI(+)	367.16	57	331.16	16
醛固酮	ESI(-)	359.11	58	331.14	15
醛固酮	ESI(-)	359.11	58	189.17*	17
醛固酮-D7	ESI(-)	366.16	62	338.17	15
孕酮	ESI(+)	315.16	53	97.05	22
孕酮	ESI(+)	315.16	53	109.07*	25
孕酮-C3	ESI(+)	318.15	54	112.05	25
雄烯二酮	ESI(+)	287.11	51	109.05	24
雄烯二酮	ESI(+)	287.11	51	97.05*	21
雄烯二酮-C3	ESI(+)	290.11	56	100.00	22
雌酮	ESI(-)	269.06	91	145*	37
雌酮	ESI(-)	269.06	91	182.98	37
雌酮-D4	ESI(-)	273.06	95	147.00	38
雌二醇	ESI(-)	271.04	91	183.04*	41
雌二醇	ESI(-)	271.04	91	145	37
雌二醇-D3	ESI(-)	274.05	95	185.10	42
雌三醇	ESI(-)	287.07	96	145.03*	42
雌三醇	ESI(-)	287.07	96	183.04	42
雌三醇-D3	ESI(-)	290.06	96	173.07	43

注：带 * 的为定量离子

3、实验结果与讨论

3.1 专属性

采用上述仪器分析方法，9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9种激素类化合物在1 ng/mL浓度下的选择离子流提取图，各化合物保留时间见图示。

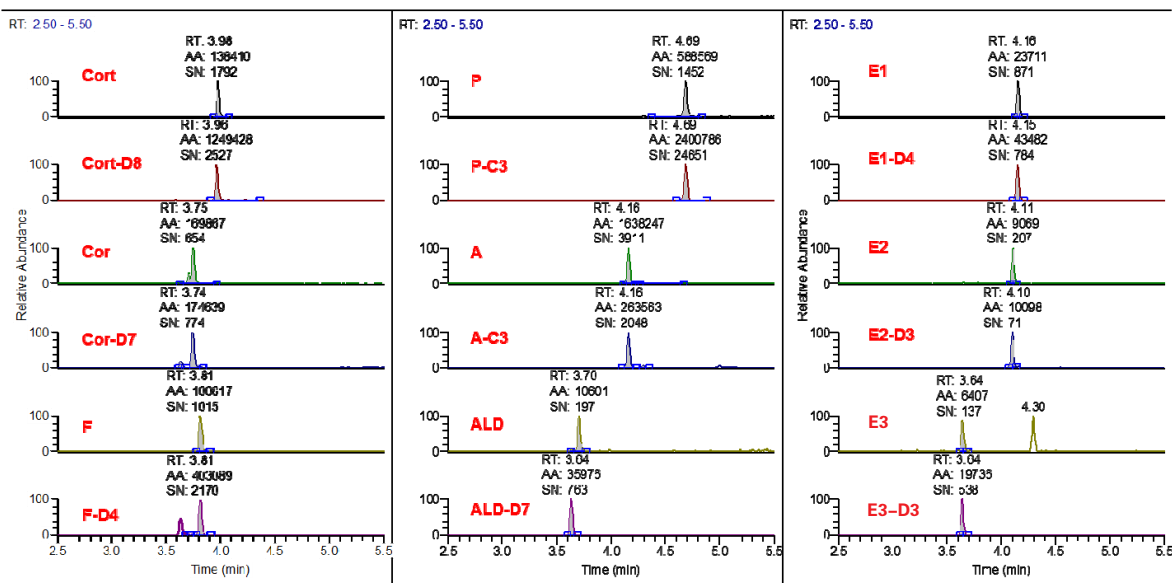


图 1. 9 种化合物及其内标物的色谱图

Fig.1 EIC Chromatogram of 9 Compounds and Internal Standards

3.2 线性范围及灵敏度测试

采用上述仪器分析方法，对9种激素类化合物进行线性范围测试，采用加权(1/x)计算线性相关系数 r^2 均大于等于0.999，结果显示线性关系良好。9种激素类化合物线性方程及线性相关系数结果见表4。

表 4. 9 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 9 compounds

化合物	线性范围 (ng/mL)	线性方程	相关系数 (r^2)	LOQ (pg/mL)
皮质酮	(ng/mL)	$y=2776.54+137358x$	0.9995	10
可的松	0.01-20	$y=3680.3+379327x$	0.9996	10
氢化可的松	0.01-20	$y=1002.68+103718x$	0.9994	10
醛固酮	0.05-20	$y=57.3627+9887.38x$	0.9999	50
孕酮	0.005-20	$y=1761.03+622511x$	0.9997	5
雄烯二酮	0.005-20	$y=6295.64+1307790x$	0.9991	5
雌酮	0.01-20	$y=27.2107+25733.1x$	1.0000	10
雌二醇	0.05-20	$y=55.1613+7025.29x$	0.9998	50
雌三醇	0.01-10	$y=54.3333+76107.4x$	0.9998	10

3.3 精密度测试

采用上述仪器分析方法，对 9 种激素类化合物在低浓度水平下进行日内精密度测试（n=6）。实验结果证明，9 种化合物相对标准偏差 RSD% 均 ≤ 7.72%。

表 5. 9 种化合物的精密度测试数据（n=6）

Table 5 Precision for the determination of 9 compounds (n=6)

峰面积 序号	皮质酮	可的松	氢化可的松	醛固酮	孕酮	雄烯二酮	雌酮	雌二醇	雌三醇
1	8722	21489	5373	4560	30861	16908	1348	793	4172
2	8931	22107	6271	4629	32497	15310	1205	694	3835
3	9965	20942	6181	4612	32247	15394	1366	757	3691
4	8669	20100	5642	4349	29068	17942	1429	799	3682
5	9228	20940	6107	4473	32955	16569	1422	737	3532
6	8391	21921	5628	4997	31731	18481	1423	734	4116
Average	8984.3	21249.8	5867.0	4603.3	31559.8	16767.3	1365.5	752.3	3838.0
SD	555.7	742.3	366.4	218.8	1415.9	1295.0	85.6	39.6	256.3
RSD	6.2%	3.5%	6.2%	4.8%	4.5%	7.7%	6.3%	5.3%	6.7%

实验结果与讨论

本文在赛默飞全新三重四极杆液质联用仪 TSQ Altis 平台上建立了同时定量检测 9 种激素类化合物的液质联用方法。由实验结果可以看出，该检测方法不仅具有优异的专属性、

灵敏度和线性范围，而且通过对日内精密度的测试也反映了仪器及方法的稳定性良好，使用本方法进行激素类化合物的分析可以保证数据的可靠性。



赛默飞
官方微信



赛默飞色谱
和质谱中国

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

ThermoFisher
SCIENTIFIC