

# SCIEX液相色谱串联质谱系统助力PCOS及CAH相关类固醇激素的快速检测

## SCIEX liquid chromatography-tandem mass spectrometry system facilitates the ultrafast detection of PCOS and CAH related steroid hormones

刘丹, 胡凤梅, 黄超, 赵祥龙, 郭立海

Liu Dan, Hu Fengmei, Huang Chao, Zhao Xianglong, Guo Lihai

SCIEX应用支持中心, 中国

SCIEX, China

### 前言

多囊卵巢综合征 (Polycystic ovarian syndrome, PCOS) 是目前世界上育龄妇女中最常见的代谢及内分泌紊乱疾病, 也是导致女性不孕的主要因素。PCOS病理生理的主要问题是高雄激素血症。高雄激素的临床表现包括: 月经异常、不排卵、不孕、复发性流产、多毛、痤疮、脱发和男性化体征等; 生化检测指标主要为睾酮、脱氢表雄酮、硫酸脱氢表雄酮、4-雄烯二酮。《多囊卵巢综合征雄激素质谱检测专家共识》建议使用LC-MS/MS同时检测多种雄激素水平, 以准确判断雄激素来源, 为后续诊疗提供更全面的高雄激素血症评估信息<sup>[1]</sup>。

先天性肾上腺皮质增生症 (congenital adrenal hyperplasia, CAH) 即是一组因类固醇激素合成途径中酶缺陷引起的常染色体隐性遗传病, 由于类固醇激素合成酶 (如21-羟化酶、11 $\beta$ -羟化酶、3 $\beta$ -羟类固醇脱氢酶等) 的先天性缺陷, 导致肾上腺皮质功能减退, 部分患儿伴有电解质紊乱及性腺发育异常。21-羟化酶缺乏为最常见类型。由于21-羟化酶缺乏, 导致皮质醇和醛固酮合成不足, 前体物质17-羟孕酮增高, 传统的生化方法通过检测17-羟孕酮水平进行CAH筛查。2016年《先天性肾上腺皮质增生症新生儿筛查共识》中明确指出: 单纯采用17-羟孕酮浓度进行CAH筛查的假阳性率高, 阳性预测值低<sup>[2]</sup>。结合类固醇激素代谢通路, 同时监测17-羟孕酮上下游相关激素进行CAH的筛查是非常有必要的。

液相色谱-串联质谱技术 (LC-MS/MS) 具有一次可检测多种物质、快速、特异度和灵敏度高等优点。近几年, 一些研究已将LC-MS/MS应用到PCOS和CAH临床检验领域<sup>[3-4]</sup>。使用LC-MS/MS方法对血清样本中类固醇激素进行检测方法也有很多, 但由于血清基质复杂, 大部分的前处理方法还是以液液萃取 (LLE) 及固相萃取 (SPE) 为主, 前处理过程复杂耗时, 样本处理通量低, 且耗材及前处理设备昂贵。本方法基于SCIEX液相色谱串联质谱系统, 开发了快速简便的方法, 采用快速蛋白沉淀的前处理方法进行样本处理, 不需要复杂的操作步骤及昂贵的前处理设备, 结合对应的快速梯度, 实现了PCOS及CAH相关激素的快速检测。

### 1 实验部分

#### 1.1 样品前处理

样品处理: 准确量取100  $\mu$ L样品于1.5 mL塑料离心管中, 加入沉淀剂, 涡旋混匀, 再加入同位素内标混合溶液, 涡旋1 min, 13000 rpm离心10 min, 取上层溶液稀释, 混匀待测。

#### 1.2 色谱条件

色谱柱为C18。流动相采用A为NH<sub>4</sub>F水溶液, B为甲醇, 柱温设定为40 $^{\circ}$ C。进样量为15  $\mu$ L。洗脱梯度见表1和表2。

表1. PCOS洗脱梯度

时间 ( min )	流速 ( ml/min )	B(%)
0.30	0.27	62
3.90	0.27	69
4.00	0.27	95
4.70	0.27	95
4.75	0.27	62
6.00	0.27	62

表2. CAH洗脱梯度

时间 ( min )	流速 ( ml/min )	B(%)
0.00	0.4	48
0.60	0.4	50
3.40	0.4	65
3.60	0.4	95
5.00	0.4	98
5.10	0.4	48
6.00	0.4	48

### 1.3 质谱条件

采用电喷雾离子源 ( Electrospray Ionization, ESI ) 和多反应监测 ( Multiple Reaction Monitoring, MRM ) 模式进行正负离子切换扫描。离子源参数: 加热气 ( GS1 ) 和辅助加热气 ( GS2 ) 分别为60 psi和55 psi, 脱溶剂气温度为 500°C; 气帘气 ( Curtain Gas, CUR ) 为 30 psi, 碰撞气 ( Collision Gas, CAD ) 为8; 喷雾针 ( Ionspray, IS ) 电压为5500/-4500 V。为了获取较好的稳定性和灵敏度, 各化合物监测离子对的去簇电压 ( Declustering Potential, DP ) 和碰撞电压 ( Collision Energy, CE ), 目标物定量离子对、定性离子对以及内标物监测离子对等参数均经过系统优化, 离子对信息见表3。

表3. 待测组分和内标物质的质谱参数

Q1	Q3	Name	DP	CE
331.2	97.1	17-Hydroxyprogesterone; 17OHP	130	32
331.2	109.1		130	38
287.2	97.1	Androstenedione; A4	130	28
287.2	109.1		130	31
289.2	97.1	Testosterone; T	155	28
289.2	109.1		155	35
291.2	255.2	Dihydrotestosteron; DHT	91	22
291.2	159.2		91	30
291.2	215.2		91	27
339.2	100.1	IS-17OHP	100	32
290.2	100.1	IS-A4	80	28
294.3	258.2	IS-DHT	100	23
292.3	97.1	IS-T	100	31
347.2	121.2	Corticosterone; CORT	80	80
347.2	91.3		80	33
315.2	97.1	Progesterone; P	160	27
315.2	109.2		160	20
347.2	97.1	11-Doxycortisol; 11-DOX	100	33
347.2	109.1		100	45
347.2	311.2	21-Doxycortisol; 21-DOX	70	25
347.2	121.1		70	40
363.1	115.1	Cortisol; F	120	35
363.1	121.0		120	35
324.0	100.0	IS-P	160	29
351.3	121.0	IS-CORT	80	35
367.0	121.0	IS-F	100	30
352.2	100.0	IS-11-DOX	100	35
355.3	319.3	IS-21-DOX	70	30
367.1	97.0	Dehydroepiandrosterone sulfate ;	-120	-20
367.1	80.0	DHEAS	-120	-65
372.1	98.0	IS-DHEAS	-120	-45

## 2 结果与讨论

### 2.1 回归方程及线性

在本实验条件下，以PBS为替代基质，结和各激素的生理浓度范围制作标准工作曲线。CAH相关8种激素线性范围为：0.1~100ng/ml(17-OHP/CORT/P/F)，0.02~20ng/ml(11-DOX/21-DOX/A4/T)，在各自范围内线性良好，r值大于0.996（如图1）；PCOS相关5种激素线性范围为：0.05~50ng/ml（17-OHP/A4/T/DHT）；1.25~1250ng/ml（DHEAS），在各自范围内线性良好，r值大于0.996（如图2）。

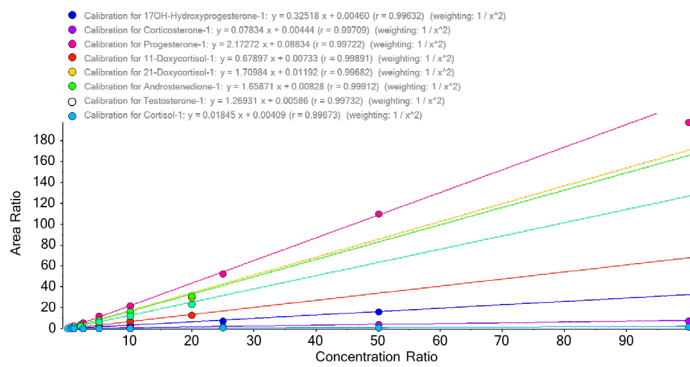


图1. CAH的标准曲线

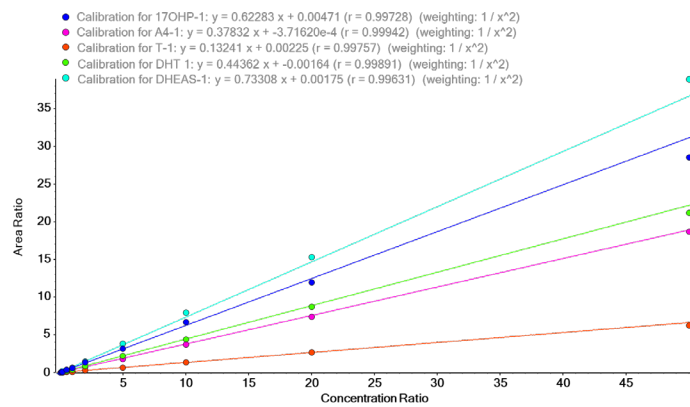


图2. PCOS的标准曲线

### 2.2 样本采集谱图

在本方法条件下，如下图3和图4所示，CAH和PCOS相关激素各化合物在各自出峰位置峰形对称，响应良好。包括其中的多对同分异构体如：11-DOX、21-DOX和 Corticosterone，都实现了很好的分离。

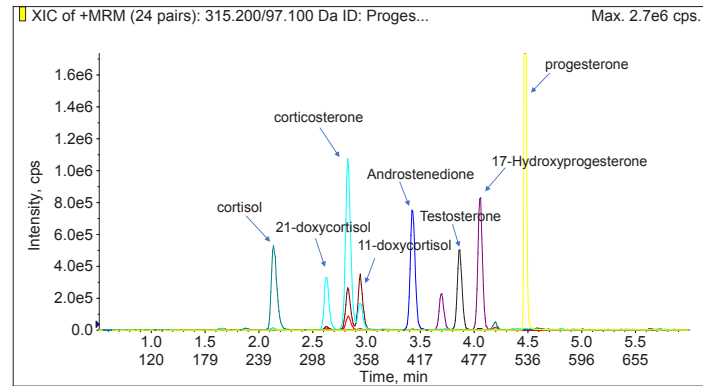


图3. CAH相关激素典型色谱图

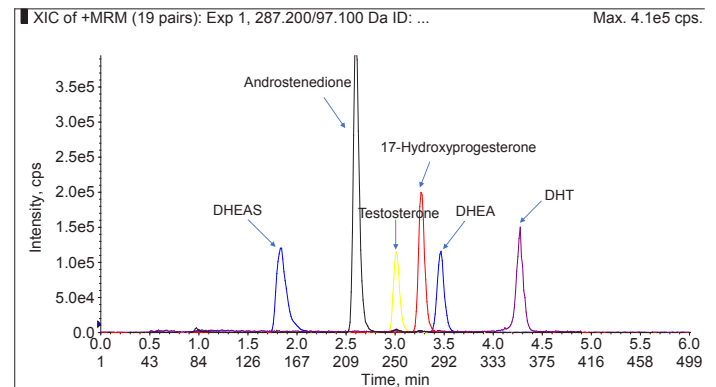


图4. PCOS相关激素典型色谱图

### 2.3 精密度验证

取混合人血清样本，制备低、中、高三组血清加标样本（QC）。各浓度水平3样本分析。根据标准曲线，计算QC样本浓度。根据QC的RSD%对方法的精密度进行考察。结果如表4和表5所示。CAH相关激素的精密度RSD%在0.1%~6.4%；PCOS相关激素的精密度RSD%在0.4%~8.9%；符合相关要求。

表4. CAH相关激素精密度

RSD %	17-OHP	CORT	P	11-DOX	21-DOX	AND	T	F
LQC	0.5%	3.3%	3.3%	0.8%	0.7%	5.7%	0.5%	3.3%
MQC	2.5%	2.4%	4.5%	0.9%	6.4%	0.9%	1.3%	0.9%
HQC	0.4%	3.0%	1.3%	0.1%	5.5%	2.0%	2.3%	0.5%

表5. PCOS相关激素精密度

RSD %	17-OHP	A4	T	DHT	DHEAS
LQC	6.5%	7.8%	7.2%	3.1%	8.9%
MQC	2.8%	1.9%	2.5%	3.7%	3.9%
HQC	3.7%	3.4%	3.9%	4.3%	0.4%

## 2.4 加标回收实验

取混合来源的血清样本，分成4份，1份用于测定样本浓度，另外3份分别加入低、中、高3个不同浓度水平的待测溶液，用于测定添加后浓度，根据测定结果，分别计算各化合物的血清加标回收率。CAH相关激素的加标回收率在87.9%~110.0%（表6）；PCOS相关激素的精密度RSD%在96.0%~112.4%（表7）；符合相关要求。

表6. CAH相关激素加标回收率

	17-OHP	CORT	P	11-DOX	21-DOX	AND	T	F
RE-L	109.3%	102.1%	107.3%	109.0%	110.0%	92.2%	108.0%	87.9%
RE-M	93.2%	98.9%	95.3%	103.9%	103.0%	96.2%	104.6%	97.3%
RE-H	88.3%	104.5%	100.5%	101.0%	109.5%	100.2%	106.3%	97.0%

表7. PCOS相关激素加标回收率

	17-OHP	A4	T	DHT	DHEAS
RE-L	98.7%	100.9%	97.7%	109.1%	109.7%
RE-M	102.2%	104.9%	108.4%	112.4%	96.0%
RE-H	99.9%	99.4%	102.3%	106.7%	99.1%

## 总结

本方法是基于SCIEX液相色谱串联质谱系统开发，建立了可对CAH及PCOS相关类固醇激素进行准确定量检测的液相色谱串联质谱方法。前处理方法采用快速蛋白沉淀法，简化前处理步骤利于实现自动化，方法稳定性好，准确性高，可以为CAH和PCOS的快速准确筛查提供参考。

## 参考文献

- [1] 多囊卵巢综合征雄激素质谱检测专家共识. 检验医学, 2023,38(3): 203-208.
- [2] 先天性肾上腺皮质增生症新生儿筛查共识. 中华儿科杂志, 2016,54(6): 404-409.
- [3] ZHENG C, YIFAN L, YUTING C, et al. Simultaneous quantitation of four androgens and 17-hydroxyprogesterone in polycystic ovarian syndrome patients by LC-MS/MS, J Clin Lab Anal, 2020, 00: e23539.
- [4] RAUH M. Steroid measurement with LC-MS/MS. Application examples in pediatrics. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010, 121 (3-5): 520-527.

仅限专业展会等使用、仅向专业人士提供的内部资料

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-28046-A



### SCIEX中国

北京分公司  
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院  
1号楼5层  
电话: 010-5808-1388  
传真: 010-5808-1390  
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心  
上海市长宁区福泉北路518号  
1座502室  
电话: 021-2419-7201  
传真: 021-2419-7333  
官网: [sciex.com.cn](http://sciex.com.cn)

广州办公室  
广州国际生物岛星岛环北路1号  
B2栋501、502单元  
电话: 020-8842-4017

官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)