

SCIEX Triple Quad™液相色谱串联质谱系统助力多囊卵巢综合征相关雄性激素的检测

The power of SCIEX Triple Quad™ liquid chromatography tandem mass spectrometry to detect polycystic ovarian syndrome related androgen

丛宇婷, 张元媛, 黄超, 李国庆

Cong Yuting, Zhang Yuanyuan, Huang Chao, Li Guoqing

SCIEX 临床事业部, 中国

SCIEX Clinical BU, China

首都医科大学附属北京妇产医院检验科合作项目

Keywords: Polycystic ovarian syndrome (PCOS); Serum; Testosterone (T); Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS); Androstenedione (A4); 17-hydroxyprogesterone (17-OHP); Dihydrotestosterone (DHT)

引言

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^[1]。临床表现多样, 包括不同程度的月经异常、不排卵、不孕、复发性流产、多毛、痤疮、肥胖等^[2]。目前, PCOS尚缺乏统一的诊断标准, 但主要参照鹿特丹诊断标准^[3]: (1) 稀发排卵或无排卵; (2) 临床或生化表现高雄激素血症; (3) 超声显示卵巢多囊性改变。符合上述三条标准中的两条, 并排除其他疾病导致的类似临床表现即可诊断为PCOS。

高雄激素血症是多囊卵巢综合征最常见、最突出的诊断因素, 通过观察临床表现或生化指标或两者结合进行评估。其生化指标主要通过检测血清中睾酮水平进行评估。此外, 硫酸脱氢表雄酮 (DHEAS)、雄烯二酮 (A4)、17-羟孕酮 (17-OHP)、双氢睾酮 (DHT) 也是人体内重要的雄激素, 一些研究表明, 这些激素的血清水平在PCOS患者与正常人群中存在差别, 可为PCOS的诊断提供参考^[4]。

本方法采用沉淀蛋白结合固相萃取的前处理方法, 使用SCIEX液相色谱串联质谱系统, 以待测物的同位素标记物为内标, 同时测定人血清中的睾酮、硫酸脱氢表雄酮、雄烯二酮、17-羟孕酮和双氢睾酮。

实验部分

样品前处理: 取50 μ L血清样品, 加入10 μ L内标溶液和150 μ L甲醇, 震荡2 min, 过蛋白沉淀板, 加入150 μ L水, 震荡1 min。200 μ L甲醇和200 μ L水活化PEP板, 加载样品, 经过200 μ L 20%乙腈和200 μ L正己烷淋洗后, 用50 μ L甲醇洗脱, 在洗脱液中加入50 μ L水涡旋混匀, 取10 μ L即可上机检测。各待测物线性范围及所用内标浓度见表1。

表1. 各待测物线性范围及内标浓度。

待测物名称	线性范围 (ng/mL)	内标浓度 (ng/mL)
睾酮	0.05-6.00	2.00
硫酸脱氢表雄酮	10.00-1200.00	20.00
雄烯二酮	0.10-12.00	5.00
17-羟孕酮	0.05-6.00	2.00
双氢睾酮	0.50-60.00	100.00

色谱条件: 色谱柱采用Venusil MP C18 (3.0mm × 50mm, 3 μm, Agela), 流动相A相为水 (含0.02%甲酸), 流动相B相为甲醇 (含0.1%甲酸)。柱温为40℃, 进样10 μL。采用梯度洗脱, 液相梯度见表2。

表2. 梯度条件。

时间 (min)	流速 (mL/min)	A相 (%)	B相 (%)
0.00	0.60	45	55
0.50	0.60	45	55
3.50	0.60	10	90
4.50	0.60	10	90
4.60	0.60	45	55
6.00	0.60	45	55

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) 模式进行质谱扫描。离子源参数: 加热气 (GS1) 和辅助加热气 (GS2) 分别为60和70 psi, 脱溶剂气温度为550℃; 气帘气 (Curtain Gas, CUR) 为30 psi, 碰撞气 (Collision Gas, CAD) 设为Medium; 喷雾针 (Ionspray, IS) 电压为5500V (-4500V)。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. 各激素及内标物MRM离子通道参数。

化合物	Q1 Mass(Da)	Q3 Mass(Da)	DP(V)	CE(V)
DHEAS	367.1	97.0a	-30.0	-20.0
	367.1	80.0b	-30.0	-30.0
DHEAS-D5	372.1	98.0	-170.0	-45.0
	287.3	97.0 a	170.0	31.0
A4	287.3	109.0 b	170.0	31.0
	290.3	100.1	165.0	30.0
T	289.3	97.0 a	160.0	30.0
	289.3	109.0 b	160.0	34.0
T-C3	292.3	97.1	160.0	31.0
	331.3	97.1 a	170.0	31.0
17-OHP	331.3	109.1 b	170.0	35.0
	334.4	112.0	130.0	47.0
17-OHP-C3	291.3	255.3 a	170.0	22.0
	291.3	159.1 b	170.0	32.0
DHT	291.3	255.3 a	170.0	22.0
	294.3	258.3	190.0	22.0

结果与讨论

1. 线性关系

图1为睾酮、硫酸脱氢表雄酮、雄烯二酮、17-羟孕酮和双氢睾酮五种激素及其同位素内标的典型色谱图。睾酮、硫酸脱氢表雄酮、雄烯二酮、17-羟孕酮和双氢睾酮标准曲线及线性回归方程见图2。五种激素在相应的浓度范围内线性良好, r 均大于0.995。

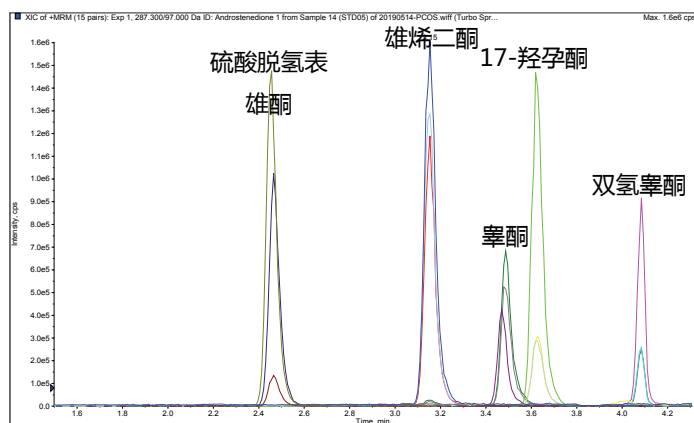


图1. 睾酮、硫酸脱氢表雄酮、雄烯二酮、17-羟孕酮和双氢睾酮五种激素及其同位素内标的典型色谱图。

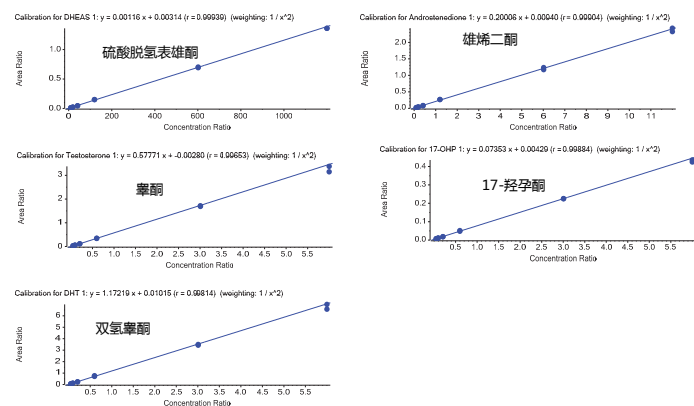


图2. 睾酮、硫酸脱氢表雄酮、雄烯二酮、17-羟孕酮和双氢睾酮五种激素标准曲线。

2. 重现性与准确性

为了考察各方法的重现性及准确性, 分别进行睾酮、硫酸脱氢表雄酮、雄烯二酮、17-羟孕酮和双氢睾酮各激素的精密度和准确度方法验证。从表4可以看出, 各激素低、中、高浓度的精密度 (RSD) 均在3.23%-8.67%以内, 准确度在96.29%-109.52%之内, 见表4。

表4. 精密度和准确度。

化合物名称	实际浓度 (ng/mL)	检测浓度 (ng/mL)	精密度 (%)	准确度 (%)
睾酮	0.10	0.10	7.99%	103.95%
	0.60	0.63	4.99%	104.28%
	4.80	4.69	4.14%	97.64%
硫酸脱氢表雄酮	20	19.86	5.17%	99.31%
	120	131.42	4.13%	109.52%
	960	1011.33	5.12%	105.35%
雄烯二酮	0.20	0.20	8.46%	97.67%
	1.20	1.24	4.10%	103.59%
	9.60	9.49	4.76%	98.88%
17-羟孕酮	0.10	0.10	5.38%	96.29%
	0.60	0.66	3.23%	109.38%
	4.80	4.91	3.66%	102.21%
双氢睾酮	1.00	1.01	8.67%	100.39%
	6.00	6.19	3.77%	103.08%
	48.00	4.79	6.25%	99.66%

结论

本方法使用SCIEX 高灵敏度和高稳定性的三重四极杆质谱系统，实现了同时检测人血清中睾酮、硫酸脱氢表雄酮、雄烯二酮、17-羟孕酮和双氢睾酮5种多囊卵巢综合征相关雄性激素。本方法采用电喷雾离子源正-负同时采集和MRM多反应监测模式，可对血清中的五种雄激素实现快速、准确的定量分析。各化合物在浓度范围内线性良好 $r>0.995$ ；准确度（96.29%-109.52%）和精密度（3.23%-8.67%）满足方法学要求。

参考文献

1. Wang FF, Pan JX, Wu Y, et al. American, European, and Chinese practice guidelines or consensuses of polycystic ovary syndrome: a comparative analysis. J Zhejiang Univ Sci B. 2018;19(5):354-363.
2. Goodman NF, Cobin RH, Futterweit W, et al. American association of clinical endocrinologists, American college of endocrinology, and androgen excess and PCOS society disease state clinical review: guide to the best practices in the evaluation and treatment of polycystic ovary syndrome--part 1. Endocr Pract. 2015;21(11):1291-1300.
3. Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group. Fertil Steril, 2004, 81(1): 19-25.
4. 曹正,刘颖,丛宇婷,卢一凡,董莹,刘京瑞,唐国栋,翟燕红.多囊卵巢综合征相关雄性激素的液相色谱-串联质谱检测[J].分析测试学报,2020,39(01):146-151.

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。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-12026-ZH-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：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：[ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)