

液相色谱-质谱检测类固醇激素:方法学变革助力精准诊疗

郭玮

复旦大学附属中山医院检验科,上海 200032

通信作者:郭玮,Email:guo.wei@zs-hospital.sh.cn

【摘要】 类固醇激素的水平能够反映体内的内分泌功能,为内分泌疾病的诊疗提供精准的信息。液相色谱-质谱技术具有高特异、高灵敏度的特点,更优于传统免疫学方法,成为临床类固醇激素检测的重要手段。我们需要围绕临床需求,规范地应用这项技术,推动其良性发展。

【关键词】 类固醇; 液相色谱法; 质谱分析法; 内分泌系统疾病

基金项目:上海市卫生计生系统重要薄弱学科建设项目(2015ZB0201)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-8158.2019.06.002

Steroid hormone profiling by LC-MS:the change in methodology powering precision medicine

Guo Wei

Department of Laboratory Medicine,Zhongshan Hospital,Fudan University,Shanghai 200032, China

Corresponding author:Guo Wei,Email:guo.wei@zs-hospital.sh.cn

【Abstract】 Steroid hormone profiling reflects the functions of endocrine system, offering precise information for the diagnostics and treatment of endocrine diseases. Liquid chromatography-mass spectrometry technique is highly specific and sensitive, and is superior to traditional immunoassay and has become important in the clinical detection of steroid hormones. It should apply this technique and promote its growth according to the clinical requirements and guidelines.

【Key words】 Steroids; Liquid chromatography; Mass spectrometry; Endocrine diseases

Fund program: Key Developing Disciplines of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (2015ZB0201)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-8158.2019.06.002

近年来,利用液相色谱-质谱(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)技术检测类固醇激素普遍应用于国外医学检验实验室,是内分泌疾病精准诊疗的重要助力。国内医学检验实验室也开始了LC-MS检测技术的临床实践,但是如何将LC-MS技术用好,依然充满了挑战。本文分析了类固醇激素检测的发展历程,探讨LC-MS检测类固醇激素的挑战、临床应用与未来发展方向。

一、激素检测方法的演变

(一)传统免疫学激素检测

激素检测的历史就是一部方法学发展的历史。由于大部分激素表达水平低且缺少灵敏的定量检测方法,直到20世纪初期,人们还无法从体液中检测出具体的激素,临床上主要通过激素的生物功能来确定某种激素的存在,例如怀孕女性尿液中的人

绒毛膜促性腺激素能够诱导青蛙的排卵,所以向青蛙注射女性尿液被用于验孕^[1]。

20世纪50年代,免疫方法能够定量地检测到人类体液中的蛋白类激素。随后,具有更高灵敏度的放射免疫法更是将激素检测拓展到了生物小分子领域,使得部分类固醇的定量检测成为了可能。1976年蒙特利尔奥运会首次将放射免疫法用于类固醇类兴奋剂的筛查检测^[2]。

人体内类固醇激素水平的异常与一系列疾病的发生密切相关,包括肾上腺遗传性疾病、肾上腺肿瘤、高血压、多囊卵巢综合征、库欣综合征等,其定量检测在上述内分泌相关疾病的诊疗中具有重要的价值,已成为临床激素检测的重要组成。

但传统类固醇激素检测常用的放射免疫方法存在诸多缺陷,包括易受蛋白结合干扰、较长的孵

育时间、易受放射性物质非特异性结合的影响、易受嗜异性抗体和自身抗体的干扰、需要处理放射性物质^[3]。近年来,其他自动化免疫方法也会被用于类固醇激素检测,但是人体内种类繁多、结构近似的类固醇激素容易产生交叉干扰。例如,雌二醇和睾酮的结构极其相似,而在女性体内雌二醇含量是睾酮的数倍,即使只有一小部分的雌二醇和睾酮检测试剂产生交叉反应,也会使女性睾酮的免疫方法检测结果出现严重误差^[4]。

(二) 质谱技术进入类固醇激素临床检测

质谱是一种基于待测物离子质荷比实现鉴定和分析的技术,随着离子源和质量分析器技术的不断发展,衍生出多种原理的质谱仪^[5]。质谱检测的灵敏度和准确性也不断升级,其在类固醇类激素的检测中大有后来居上之势。1984 年洛杉矶奥运会正式将气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)置于放射免疫法之上,作为类固醇类激素检测的确认方法^[6]。

20 世纪 70 年代,随着革新的软电离技术出现^[7],具有更高分离性能的液相色谱被引入质谱检测,产生了具有高灵敏度、高分辨率、高准确性、宽检测范围的 LC-MS 技术。20 世纪 90 年代,LC-MS 技术趋于成熟,成为痕量物质定量检测的“金标准”,受到临床的极大关注。

进入 21 世纪,LC-MS 检测类固醇激素逐渐成为医学检验实验室的重要选择,展现出了优越的性能^[8]。首先,质谱方法灵敏度更高,更能满足类固醇激素检测需求。其次,质谱方法质谱方法的前处理通常会包含去除蛋白质的过程,不但可以完全去除激素结合蛋白,还可以去除杂质干扰,并且直接检测类固醇激素本身离子对,特异性显著提高。此外,越来越多的研究表明类固醇激素谱相比单个激素在疾病诊断时更具有临床应用价值,质谱方法可以同时检测多个类固醇激素,具有天然的优势。综上所述,LC-MS 正引领着临床类固醇激素检测的方法学变革。

二、质谱检测类固醇激素的挑战

(一) 方法开发前的挑战

类固醇激素的检测对质谱仪器的性能提出了很高的要求。正常人体液样本中的大部分类固醇激素水平极低,一般在 ng/ml 的水平,血浆 21-脱氧皮质醇甚至到了 pg/ml 水平,需要方法学的高灵敏性^[9]。多种激素同时检测也需要方法学的高选择性。以上因素要求仪器灵敏度高、噪音低、重复

性好。

技术人员的储备对于类固醇激素检测方法的开发至关重要。虽然类固醇激素均是环戊烷多氢菲衍生物,但是化学性质各有差异,设计检测方案时需要有所考量。例如,硫酸脱氢表雄酮是一种盐,极性远大于其他类固醇,需要相应的色谱分离条件,只能单独进行检测。由于携带基团的不同,不同的类固醇激素离子化模式并不相同,比如雌激素类和醛固酮(含有羟基,难以获得质子)多采用负离子模式,而其他激素大多采用正离子模式。鉴于上述类固醇方法开发的复杂性,医学检验实验室需要具有质谱相关专业背景和临床检测经验的技术人员。

医学检验实验室开发质谱类固醇激素谱检测方法时,标准品和同位素内标的购买也是一个需要考虑的问题,需要评估纯度、规格、性状、溯源性、货期等因素。只有在仪器、人员技术储备、标准品和内标完备的条件下,实验室才有可能顺利开发质谱类固醇检测方法^[10]。

(二) 方法开发中的困难

类固醇激素质谱检测的挑战之一在于前处理方法的选择。由于体内激素含量较低,前处理需要在保留、浓缩待测物的前提下去除尽可能多的杂质。对于临床检测,前处理方法的易行性也非常重要。临床常用的前处理方法包括蛋白沉淀、液液萃取、固相萃取。蛋白沉淀简单易行,但是杂质去除效果不佳,可能会影响后续质谱检测;液液萃取虽然成本较低,但是吹干复溶操作复杂,且存在有机溶剂的毒性问题;固相萃取方法可使用商品化的萃取板,操作相对简便安全。

类固醇激素的开发难点还在于色谱条件的选择。比如 21-羟基孕酮和 17-羟基孕酮以及 11-脱氧皮质醇、21-脱氧皮质醇和皮质酮,这两组化合物为同分异构体,其母离子和子离子均相同,单纯依靠质谱方法是无法区分和定量的。必须通过优化色谱条件,实现有效分离,后续的质谱检测才能够对其准确定量。

标准品的配制需要合适的替代基质。甲醇等纯溶剂无法模拟人类血浆的复杂成分,可能存在明显的基质效应。如果使用胎牛血清,其中的固有激素会产生干扰。最理想的替代基质是去除激素的人类血浆,有文献报道使用活性炭吸附后的血浆可以满足检测要求,目前也有市售的商品化无激素血浆^[11-12]。

LC-MS 检测方法开发是一个复杂的过程,应当遵照标准化的指南进行规范。目前美国临床和实验室标准协会颁布了 C50-A 和 C62-A 文件来规范管理美国质谱方法的开发^[13-14]。我国尚缺乏针对质谱相关的临床实践指南,以致各医学检验实验室一直采用自我管理模式。自我管理参差不齐为内部质量管理和外部标准化带来巨大挑战,一定程度上束缚了质谱的临床实践和发展。针对这一现象,中华医学会检验医学分会、卫生计生委临床检验中心共同起草《液相色谱-质谱临床应用建议》,旨在为实验室管理和操作人员以及监管机构提供检测方法建立、性能确认和质量管理等方面的参考^[14]。

(三)方法开发后的评价

在方法开发成功后,推向临床之前,参考区间设定的问题是首先需要考虑的。目前,临床现行疾病诊疗指南中的临床决策切点大都依据常规检测方法的结果设立。质谱技术与常规生化、免疫方法的检测原理截然不同,检测值也会有所差异,因此质谱类固醇检测技术应用于临床前需重新建立表面健康人群参考区间和适宜人群的医学决定水平,而非直接转化常规检测的标准。质谱类固醇激素参考区间的设定还应该充分考虑性别、年龄、女性生理期等因素^[15]。

质量控制是确保临床检验结果有效性不可或缺的环节。对于质谱检测类固醇激素方法的质量控制,其浓度范围、质控频率、质控规则均可以按照《液相色谱-质谱临床应用建议》中的要求实施。医学检验实验室往往会面临缺乏适用于质谱方法的商品化质控品的问题,可以按照应用建议的要求由本实验室具有丰富工作经验的操作人员配制质控品,并采用盲法按照性能要求进行评价。

三、国内外类固醇激素谱的临床应用

在欧美国家,LC-MS 检测类固醇激素已经是医学检验实验室的重要检测项目。对于儿科内分泌学,LC-MS 技术可以检测小体积单一样本(如 100 μl 的血浆)中的多种类固醇激素,是一大优势^[16]。对于成人内分泌学,在单一标志物无法诊断疾病时,类固醇激素谱的检测提供了联合使用多种类固醇激素来诊断和鉴别诊断疾病的解决方案^[17]。此外,LC-MS 技术高特异性的特点,拓展了类固醇激素的检测种类,大量之前免疫方法无法检测的类固醇激素可以利用 LC-MS 技术检测。越来越多的研究开始关注类固醇激素谱质谱检测的临床应用。

Taylor 等^[17]的研究建立了一种 LC-MS 检测 13 种血浆类固醇激素谱的方法,并对肾上腺皮质瘤的患者进行了检测,发现在这 13 种类固醇中,11-脱氧皮质醇和 17-羟基孕烯醇酮可以最好的区分肾上腺皮质瘤和非肾上腺皮质瘤的结节。Hines 等^[18]的研究建立了检测尿液中的 26 种类固醇激素的 LC-MS 方法,用于鉴别诊断肾上腺皮质瘤和肾上腺结节、肾上腺和垂体性库欣综合征,以及诊断先天性肾上腺皮质增生症。Methlie 等^[19]建立了检测 9 种血浆类固醇激素的 LC-MS 方法,并对艾迪生病的患者进行了检测,发现艾迪生病患者的睾酮和雄烯二酮不足表面健康人群激素水平的一半。其检测激素谱中纳入了外源性类固醇激素——地塞米松、泼尼松、氢化泼尼松,地塞米松浓度监测可以排除因胃吸收减少导致的小剂量地塞米松抑制实验的假阳性,泼尼松和氢化泼尼松检测可以作为艾迪生病泼尼松替代治疗时药物浓度监测。

国内医学检验实验室也已经逐渐意识到免疫方法检测类固醇激素存在的问题,开始寻求质谱技术的帮助,陆续开展了实验室自建方法的 LC-MS 类固醇激素检测项目,也积累了一定的经验。

其中,复旦大学附属中山医院检验科根据类固醇激素的合成代谢通路和临床常用的类固醇药物,选取了血液中 19 种主要的类固醇激素和 1 种外源性类固醇药物——地塞米松,开发了相应的 LC-MS 检测方法,能够在单次检测中同时检测 20 项类固醇激素。该检测谱检测能够准确定量女性睾酮和雄烯二酮等雄激素,与临床影像学信息结合可以准确诊断多囊卵巢综合征。而在库欣综合征患者中,该激素谱检测结合促肾上腺皮质激素检测可以成功鉴别诊断中枢性和肾上腺性的库欣综合征。对于先天性肾上腺皮质增生症的患者,完整的类固醇激素谱检测可以判断合成酶的缺陷种类,有助于这类疾病的鉴别诊断和进一步治疗决策的制定。但是相比于欧美国家,总体上来说国内对于类固醇激素谱质谱检测的研究较为匮乏。

四、质谱检测类固醇激素的现状思考

类固醇激素质谱检测在我国医学检验实验室的应用仍然处于起步阶段,这远远无法满足临床日益增长的精准化医疗的需求。因此,在现阶段鼓励发展质谱检测的临床应用是重于监管需求的。医疗机构和相关管理部门需要同心协力,建立发展为主、注重规范的科学监管模式,全面推动类固醇激素质谱检测临床应用的高效、规范发展。

人才是发展的源动力,专业人才的培养是发展类固醇激素质谱检测的基础。不同于常规的临床检测,质谱检测需要的是具有多样化、分层化专业背景的复合型人才:检测方法的研发和检测系统性能优化需要分析化学的专业背景;临床沟通、类固醇激素谱的确定、检测结果审核、报告解读需要专业的基础和临床医学知识;而实验项目的流程管理则对工作人员的综合管理能力提出了极高的要求。目前国内此类人才十分缺乏,医学检验实验室在计划开展类固醇激素质谱检测项目前,应充分做好人才培养工作。

医学检验实验室要始终围绕临床需求进行充分沟通,直到充分满足临床应用需求。中山医院检验科在建立了 20 项类固醇激素 LC-MS 检测项目以后,继续积极与临床沟通,基于每个实际案例和临床共同探讨这些检测项目的临床诊断特性。经过反复讨论,我们将 20 项类固醇激素谱进一步定制化,根据不同的内分泌疾病诊疗需求,设立了八项激素组合报告,有助于临床医生更有针对性地诊断,同时也为患者节约了检测费用。可见只有围绕临床需求开发优化临床检测的新技术新项目,才能更好地发挥检验科的作用,最终使患者获益。

五、结语

LC-MS 技术为类固醇激素的检测带来了革命性的影响,准确定量人体内的类固醇激素不再是梦想,而是触手可及的现实。但是只有直面新技术带来了一系列挑战,在相应导则的指引下将规范化、标准化贯穿于整个方法开发过程,我们才能将新技术的优势充分发挥出来,为临床内分泌疾病的诊疗提供重要的助力。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Wort AJ, Varde KN, Fairweather DV, Green CA. A critical study of immunological methods for pregnancy diagnosis[J]. *J Clin Pathol*, 1963, 16:590-592.
- [2] Bowem LD. Analytical advances in detection of performance-enhancing compounds[J]. *Clin Chem*, 1997, 43(7): 1299-1304.
- [3] Matsumoto AM, Bremner WJ. Serum testosterone assays: accuracy matters[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(2): 520-524. DOI:10.1210/jc.2003-032175.
- [4] Pizzolo F, Corgnati A, Guarini P, et al. Plasma aldosterone assays: comparison between chemiluminescence-based and RIA methods[J]. *Clin Chem*, 2006, 52(7): 1431-1432. DOI: 10.1373/clinchem.2005.061184.
- [5] Wu AH, French D. Implementation of liquid chromatography/mass spectrometry into the clinical laboratory[J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 420:4-10. DOI:10.1016/j.cca.2012.10.026.
- [6] Trout GJ, Kazlanskas R. Sports drug testing—an analyst's perspective[J]. *Chem Soc Rev*, 2004, 33(1): 1-13. DOI: 10.1039/b201476a.
- [7] Vidova V, Spacil Z. A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: Targeted and data independent acquisition[J]. *Anal Chim Acta*, 2017, 964:7-23. DOI:10.1016/j.aca.2017.01.059.
- [8] Guo T, Taylor RL, Singh RJ, et al. Simultaneous determination of 12 steroids by isotope dilution liquid chromatography-photospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 372(1-2): 76-82. DOI: 10.1016/j.cca.2006.03.034.
- [9] Stanczyk FZ, Clarke NJ. Advantages and challenges of mass spectrometry assays for steroid hormones[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 121(3-5): 491-495. DOI: 10.1016 / j.jsbmb.2010.05.001.
- [10] Vogeser M, Seger C. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory--Goals for further developments[J]. *Clin Biochem*, 2008, 41(9): 649-662. DOI: 10.1016 / j.clinbiochem.2008.02.017.
- [11] Sarafoglou K, Himes JH, Lacey JM, et al. Comparison of multiple steroid concentrations in serum and dried blood spots throughout the day of patients with congenital adrenal hyperplasia[J]. *Horm Res Paediatr*, 2011, 75(1): 19-25. DOI: 10.1159/000315910.
- [12] Keevil BG. The analysis of dried blood spot samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Clin Biochem*, 2011, 44(1): 110-118. DOI: 10.1016 / j.clinbiochem.2010.06.014.
- [13] Lynch KL. CLSI C62-A: A New Standard for Clinical Mass Spectrometry[J]. *Clin Chem*, 2016, 62(1): 24-29. DOI: 10.1373/clinchem.2015.238626.
- [14] 王蓓丽,郭玮,潘柏申. 国外医学检验实验室自建检测方法监管现状[J]. *中华检验医学杂志*, 2016, 39(1): 55-59. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2016.01.014.
- [15] Fanelli F, Belluomo I, Di Lallo VD, et al. Serum steroid profiling by isotopic dilution-liquid chromatography-mass spectrometry: Comparison with current immunoassays and reference intervals in healthy adults[J]. *Steroids*, 2011, 76(3): 244-253. DOI:10.1016/j.steroids.2010.11.005.
- [16] Rauh M. Steroid measurement with LC-MS/MS in pediatric endocrinology[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 301(1-2): 272-281. DOI:10.1016/j.mce.2008.10.007.
- [17] Taylor DR, Ghataore L, Couchman L, et al. A 13-Steroid Serum Panel Based on LC-MS/MS: Use in Detection of Adrenocortical Carcinoma[J]. *Clin Chem*, 2017, 63(2): 1836-1846. DOI: 10.1373/clinchem.2017.277624.
- [18] Hines JM, Bancos I, Bancos C, et al. High-Resolution, Accurate-Mass (HRAM) Mass Spectrometry Urine Steroid Profiling in the Diagnosis of Adrenal Disorders[J]. *Clin Chem*, 2017, 63(12): 1824-1835. DOI: 10.1373 / clinchem.2017.271106.
- [19] Methlie P, Hustad S, Kellman R, et al. Multisteroid LC-MS/MS assay for glucocorticoids and androgens and its application in Addison's disease[J]. *Endocr Connect*, 2013, 2(3): 125-136. DOI:10.1530/EC-13-0023.

(收稿日期:2019-03-29)

(本文编辑:唐栋)