

# 串联质谱法用于先天性肾上腺皮质增生症筛查诊断应用研究

LCMSMS-555

**摘要:** 使用串联质谱及 21-羟化酶缺乏症五种相关激素测定试剂盒,建立了滤纸干血片中 17-羟孕酮 (17-OHP)、雄烯二酮 (A4)、11-脱氧皮质醇 (S)、21-脱氧皮质醇 (21-DOC)、皮质醇 (F) 含量测定方法。使用试剂盒的内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。该方法前处理简便,分析速度快,灵敏度高,专属性强,假阳性率低,可用于先天性肾上腺皮质增生症辅助筛查诊断。

**关键词:** 串联质谱 先天性肾上腺皮质增生症 滤纸干血片 筛查诊断

先天性肾上腺皮质增生症 (Congenital adrenal hyperplasia, CAH) 是一组由肾上腺皮质类固醇合成过程中各类催化酶的缺陷,引起以皮质类固醇合成障碍为主要特征的常染色体隐性遗传性疾病。CAH 按照酶缺陷类型的不同大致可分为六型,其中以 21-羟化酶缺乏症 (21-Hydroxylase deficiency, 21-OHD) 最常见,约占 90%~95%;其次为 11 $\beta$ -羟化酶缺乏症,约占 3%~5%。21-OHD 在新生儿中的发病率约为 1/20000~1/10000。在新生儿出生后开展 CAH 的早期筛查、尽早诊断、及时治疗,对降低新生儿死亡率、减少女婴外生殖器男性化而造成性别误判、改善生长发育具有重要意义。目前,我国已将 CAH 作为优先推荐筛查病种,常规筛查通过免疫法检测血中 17-羟孕

酮 (17-OHP) 水平实现 CAH 筛查,但该方法假阳性率较高,召回率较高。《先天性肾上腺皮质增生新生儿筛查共识》推荐使用 LC-MS/MS 法同时测定干血片中 17-羟孕酮 (17-OHP)、雄烯二酮 (A4)、11-脱氧皮质醇 (S)、21-脱氧皮质醇 (21-DOC)、皮质醇 (F),该方法具有较高的特异性及敏感性,假阳性率低。

本文使用超高效液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 及 21-羟化酶缺乏症五种相关激素测定试剂盒 (液相色谱-串联质谱法,北京华大吉比爱生物科技有限公司),建立了滤纸干血片中 17-OHP、A4、S、21-DOC、F 含量测定方法,该方法前处理简便,分析速度快,灵敏度高,专属性强,假阳性率低,可用于 CAH 辅助筛查诊断。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用超高效液相色谱与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为:

输液泵: LC-40D XR $\times$ 2

在线脱气机: DGU-405

自动进样器: SIL-40C XR

柱温箱: CTO-40C

系统控制器: CBM-40

### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱: Shim-pack Velox C18 50 mm $\times$ 2.1 mm  
I.D., 1.8  $\mu$ m; P/N: 227-32007-02; 岛津  
(上海) 实验器材有限公司

流动相: A: 0.1% 甲酸水 (含 2 mM 乙酸铵)

B: 0.1% 甲酸甲醇 (含 2 mM 乙酸铵)

进样量: 10  $\mu$ L

柱温: 45 $^{\circ}$ C

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 45%, 洗脱程序见表 1。

流速: 0.4 mL/min

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	B.Conc	45
3.00	Pumps	B.Conc	95
3.50	Pumps	B.Conc	95
3.60	Pumps	B.Conc	45
5.00	Controller	Stop	

质谱条件:

分析仪器: LCMS-8045 CL

离子源: ESI (+)

雾化气流速: 3.0 L/min

干燥气流速: 8.0 L/min

加热器流速: 12.0 L/min

DL 温度: 150°C

加热模块温度: 450°C

离子源温度: 300°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

名称	英文名	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
17- 羟孕酮	17-OHP	331.2	109.1	-16	-32	-20
		331.2	97.1	-10	-29	-16
17- 羟孕酮内标	17-OHP-IS	334.2	112.1	-16	-32	-20
雄烯二酮	A4	287.2	97.1	-13	-30	-22
		287.2	109.1	-15	-25	-16
雄烯二酮内标	A4-IS	290.2	100.1	-13	-30	-22
11- 脱氧皮质醇	S	347.2	109.1	-15	-28	-20
		347.2	97.1	-14	-25	-18
11- 脱氧皮质醇内标	S-IS	352.2	113.1	-15	-28	-20
21- 脱氧皮质醇	21-DOC	347.2	311.2	-16	-16	-20
		347.2	269.2	-16	-15	-29
21- 脱氧皮质醇内标	21-DOC-IS	355.3	319.2	-16	-16	-20
皮质醇	F	363.2	121.2	-15	-25	-21
		363.2	327.2	-20	-15	-25
皮质醇内标	F-IS	367.2	121.2	-15	-25	-21

### 1.3 材料与amp;方法

#### 1.3.1 材料

8 个浓度标准品干血片: 试剂盒提供

高低质控干血片: 试剂盒提供

内标准品: 试剂盒提供

#### 1.3.2 方法

内标准品溶液制备: 向内标准品瓶中加入 500  $\mu$ L 甲醇, 涡旋 30 s, 得到内标储备液; 使用时, 将内标储备液与甲醇按照 1:99 稀释, 混匀, 得到内标工作液。

标准品及样本前处理方法：用打孔器将标准品，质控品及样品干血片打出血点，放入 96 孔板中，每孔打入 2 个血点；之后向每孔中加入 200  $\mu$ L 内标工作液，将 96 孔板封膜，在 25 $^{\circ}$ C，500 rpm 下，混匀 30 min；静置后，每孔取 150  $\mu$ L 上清液于另一 96 孔板中，氮气吹干；每孔中加入 75  $\mu$ L 45% 甲醇复溶，覆膜后涡旋混匀 3 min，上机测定。

## ■ 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图

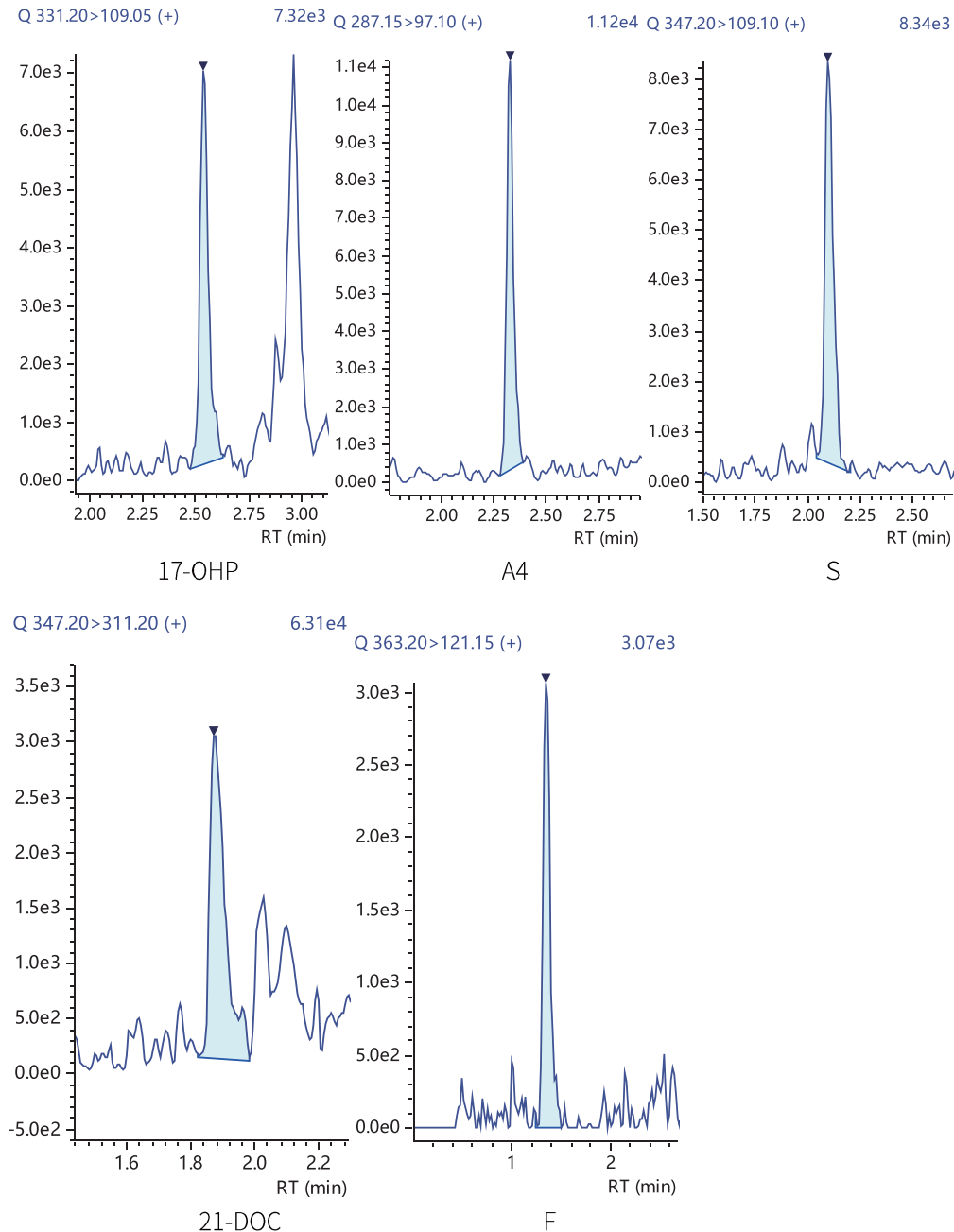


图1 标准曲线最低点谱图

### 2.2 线性测定结果

对标准品按 1.2 中的分析条件进行分析，内标法制作标准曲线。标准曲线结果见表 3，5 种激素在标准曲线浓度范围内线性相关系数均大于 0.994，准确度在 86.8%~113.8% 之间，满足测定需求。

表 3 标准曲线结果

编号	名称	线性方程	线性范围 (ng/mL)	相关系数	准确度 (%)
1	17-OHP	$Y = (0.0214767)X + (0.0127906)$	1.5~400	0.9945	86.8~111.4
2	A4	$Y = (0.0276090)X + (0.00192108)$	1.5~400	0.9970	90.5~110.7
3	S	$Y = (0.0281403)X + (0.00568528)$	1.5~400	0.9967	93.0~113.8
4	21-DOC	$Y = (0.0355860)X + (0.0208844)$	1.5~400	0.9971	92.3~113.5
5	F	$Y = (0.0268318)X + (0.0262039)$	1.5~400	0.9968	89.8~109.0

### 2.3 准确度测定结果

按 1.3 中的前处理方法对低高浓度质控品前处理, 按 1.2 中的分析条件对质控品进行分析, 质控品的准确度结果如表 4 所示, 结果显示质控品测定准确度结果与理论值接近, 均在赋值范围内, 满足临床测定需求。

表 4 质控准确度考察结果 (ng/mL)

质控	LQC			HQC		
	理论浓度	测定浓度	赋值范围	理论浓度	测定浓度	赋值范围
17-OHP	20.4	21.3	17.1~23.7	299.7	283.2	256.2~343.2
A4	3.7	3.9	2.9~4.4	296.4	270.1	250.9~341.9
S	19.2	18.5	15.9~22.4	312.6	198.3	255.6~369.7
21-DOC	5.0	5.2	4.1~5.9	303.2	292.4	252.0~354.4
F	17.9	17.7	13.4~22.5	311.0	301.9	259.8~362.1

### 2.4 精密度测定结果

取低浓度质控品溶液, 连续进样 6 针, 考察仪器精密度, 具体峰面积精密度见表 5, 结果显示, 5 种激素在测定浓度下峰面积精密度在 1.2%~4.8% 之间, LCMS-8045 测定 5 种激素精密度良好。

表 5 精密度测定结果 (ng/mL)

Name	平均峰面积	RSD%
17-OHP	196883	2.1
A4	80656	1.2
S	275174	2.6
21-DOC	33705	4.8
F	108649	1.9

## ■ 结论

使用超高效液相色谱仪三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统及 21-羟化酶缺乏症五种相关激素测定试剂盒 (液相色谱 - 串联质谱法, 北京华大吉比爱生物科技有限公司), 建立了滤纸干血片中 17-羟孕酮 (17-OHP)、雄烯二酮 (A4)、11-脱氧皮质醇 (S)、21-脱氧皮质醇 (21-DOC)、皮质醇 (F) 含量测定方法。使用试剂盒的内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性良好, 标准曲线相关系数均大于 0.994, 准确度及精密度均满足试剂盒要求。该方法对先天性肾上腺皮质增生症的筛查诊断具有重要参考意义。

岛津应用云

