

高效液相色谱串联质谱法与化学发光法在血清雌二醇水平检测中的效果分析

刘冰^{1*}, 韩雪²

(1. 通化市中心医院检验科, 通化 134001; 2. 通化市中心医院神经内科, 通化 134001)

摘要: **目的** 比较高效液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)与化学发光法(CLIA)测定血清雌二醇(E2)水平的结果。**方法** 选择2023年1月至2024年1月于医院门诊就诊及住院的患者100例作为研究对象,采集全部研究对象当天新鲜的血液标本,分别应用LC-MS/MS与CLIA测定血清E2水平。**结果** CLIA测定血清E2水平显著高于LC-MS/MS,具有统计学差异($P<0.05$); Pearson相关检验结果显示,LC-MS/MS与CLIA测定血清E2水平呈显著相关($r=0.866, P<0.05$); LC-MS/MS与CLIA测定血清E2水平呈线性相关,线性回归方程为: $Y=1.161X-6.574$ ($r=0.973, n=100$); Bland-Altman分析结果显示,LC-MS/MS与CLIA测定血清E2水平的差值平均为0.078 nmol/L (95% CI: 0.069~0.086 nmol/L),一致性界限范围为(-0.011, 0.143),存在5% (5/100)的点位于95%一致性界限范围之外,在95%一致性界限范围之内,LC-MS/MS与CLIA测定血清E2水平的差值最大为0.156 nmol/L, LC-MS/MS与CLIA测定血清E2水平的平均值为0.152 nmol/L,提示两种测定方法的一致性欠佳。**结论** 通过CLIA测定的血清E2水平较LC-MS/MS测定偏高,两种方法测定血清E2水平具有一定的相关性,但一致性欠佳,CLIA测定血清E2水平更适用于快速筛查,在需要准确进行临床诊断时,则需要应用LC-MS/MS测定血清E2水平。**关键词:** 雌二醇; 高效液相色谱串联质谱法; 化学发光法; 一致性

Effect analysis of high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and chemiluminescence in detection of serum estradiol levels

LIU Bing^{1*}, HAN Xue²

(1. Department of Laboratory Medicine, Tonghua Central Hospital, Tonghua 134001, China;
2. Department of Neurology, Tonghua Central Hospital, Tonghua 134001, China)

ABSTRACT: Objective To compare the results of high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and chemiluminescence immunoassay (CLIA) in the determination of serum estradiol (E2) level. **Methods** From January 2023 to January 2024, 100 patients who were treated in outpatient department and hospitalized in the hospital were selected as the research subjects. Fresh blood samples were collected from all study subjects on the same day, and serum E2 levels were measured by LC-MS/MS and CLIA respectively. **Results** Serum E2 level measured by CLIA was significantly higher than that of LC-MS/MS ($P<0.05$). Pearson correlation test results showed that LC-MS/MS was significantly correlated with CLIA in measuring serum E2 level ($r=0.866, P<0.05$). There was a linear correlation between serum E2 level measured by LC-MS/MS and CLIA, and the linear regression equation was manifested as $Y=1.161X-6.574$ ($r=0.973, n=100$). Bland-Altman analysis revealed that the average difference between LC-MS/MS and CLIA in measuring serum E2 level was 0.078 nmol/L (95% CI: 0.069~0.086 nmol/L), and the consistency limit range was (-0.011, 0.143). There were 5% (5/100) points outside the 95% consistency limit range, and within the 95% consistency limit range, and the maximum difference between LC-MS/MS and CLIA was 0.156 nmol/L. The average value of serum E2 level measured by LC-MS/MS and CLIA was 0.152 nmol/L, suggesting that the consistency of the two methods was poor. **Conclusion** Serum E2 level determined by CLIA is higher than that determined by LC-MS/MS. There is a certain correlation between the two methods for the determination of serum E2 level, but the consistency is not good. The determination of serum E2 level by CLIA is more suitable for rapid screening. When accurate clinical diagnosis is needed, it is necessary to apply LC-MS/MS to measure serum E2 level.

* 通信作者: 刘冰, 副主任检验师, 研究方向为医学检验、免疫学。E-mail: jeanswest123@163.com

* Corresponding author: LIU Bing, Deputy Chief Inspector, Department of Laboratory Medicine, Tonghua Central Hospital, Tonghua 134001, China. E-mail: jeanswest123@163.com

KEY WORDS: estradiol; high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; chemiluminescence immunoassay; consistency

0 引言

雌二醇 (estradiol, E2) 是体内活性最强的雌激素之一, 在多种内分泌疾病的诊断中起到关键作用, 例如青春期相关问题、性功能减退和接受激素抑制治疗的乳腺癌女性患者的监测等, 准确测定血清中的 E2 水平对于上述疾病的精确诊断和有效管理至关重要^[1]。放射免疫分析法和酶联免疫吸附法均是测定 E2 水平的传统方法, 但二者均因无法实现自动化检测, 以致在临床应用中受到限制^[2]。相比之下, 化学发光法 (chemiluminescence immunoassay, CLIA) 因具有检测速度快、试剂来源稳定且价格合理的优势而备受青睐, 并且 CLIA 具备高度自动化的特点, 从而显著提升了工作效率, 但其在特异度和检测范围上存在一定的局限性^[3]。高效液相色谱串联质谱法 (liquid chromatography tandem-mass spectrometry, LC-MS/MS) 作为一种新兴的性激素检测手段, 不仅具有高通量、样本需求较少、分析时间较短等优点, 并且特异度、敏感度和自动化程度均较高, 但 LC-MS/MS 对操作者的技术要求较高, 且成本相对较高^[4]。本研究通过比较 LC-MS/MS 与 CLIA 两种方法测定血清 E2 水平的结果差异, 以进一步探讨两种方法的适用场景, 进而为临床诊疗提供更全面的参考根据。

1 资料与方法

1.1 标本来源

选择 2023 年 1 月至 2024 年 1 月于通化市中心医院门诊就诊及住院的患者 100 例作为研究对象, 采集全部研究对象当天新鲜的血液标本。

1.2 方法

CLIA 检测血清 E2 水平: 采用全自动化学发光免疫分析仪 (Cobas E601, 瑞士罗氏公司) 检测血清 E2 水平, 具体检测步骤为如下: (1) 样本采集与处理: 用含有适当抗凝剂的采血管抽取入组患者的空腹静脉血 3 mL, 立即将收集到的血液样本放置于离心机中进行离心 (3000 r/min, 10 分钟) 处理, 取上清液, 保存于 -80°C 超低温冰箱中, 备用; (2) 样本解冻与试剂准备: 取血清样本, 使其自然解冻至室温或按照仪器说明书建议的方法快速解冻, 置于全自动化学发光免疫分析仪中, 由同一位检验人员严格按照制造商提供的操作手册完成如下操作: 首先将 25 μ L 标本与两种生物素化的抗雌二醇单克隆抗体混匀, 形成抗原抗体复合物, 加入链霉亲和素包被的磁珠微粒和钐 (Ru) 标记的雌二醇衍生物。原本未被占用的生物素抗体位点被占用, 形成抗体-半抗原复合物, 然后整个复合物在生物素和链霉亲和素的相互作用下结合到固相载体上。将反应液吸入测量池中, 通过电磁作用将磁珠吸附在电极表面。未与磁珠结合的物质通过 ProCell/ProCell M 除去。 (3) 化学发光检测: 给电极加以一定的电压, 使免疫复合物产生化学发光现象, 并通过光电倍增器测量发光信号强度。利用全自动化学发光免疫分析仪内置软件读取并记录化学发光信号的强度, 根据标准曲线计算出样品中目标物质的具体浓度, 为保证实验结果的一致性和准确性, 需定期进行室内质控和室间质控。

LC-MS/MS 检测血清 E2 水平: 采用高效液相色谱串联质

谱仪 (Thermo TSQ Altis™ Plus 三重四级杆质谱仪) 检测血清 E2 水平, 具体检测步骤为如下: (1) 用含有适当抗凝剂的采血管抽取入组患者的空腹静脉血 3 mL, 立即将收集到的血液样本放置于离心机中进行离心 (3000 r/min, 10 分钟) 处理, 取上清液, 保存于 -80°C 超低温冰箱中, 备用; (2) 采用高效液相色谱-二极管阵列检测器 (HPLC-DAD), 使用 Reprosil 100 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×3 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈: 0.5% 磷酸液 (9:1), 进样体积为 3 μ L, 流速为 1.0 mL/min, 保留时间为 1.46 min, 将处理好的血清样本按设定条件注入仪器, 通过 HPLC-DAD 进行分离并由质谱仪检测; (3) 最终读取高效液相色谱串联质谱仪的检测结果, 同样, 为保证实验结果的一致性和准确性, 需定期进行室内质控和室间质控。

1.3 观察指标

(1) 比较 LC-MS/MS 与 CLIA 测定血清 E2 水平的结果差异; (2) 进行 LC-MS/MS 与 CLIA 测定血清 E2 水平的相关性以及回归分析; (3) 进行 LC-MS/MS 与 CLIA 测定血清 E2 水平的 Bland-Altman 一致性分析。

1.4 统计学分析

将所得数据录入 Excel 中, 应用统计软件 SPSS 26.0 分析及处理数据, LC-MS/MS 与 CLIA 测定的数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述, LC-MS/MS 与 CLIA 测定血清 E2 水平的相关性采用 Pearson 相关检验分析, LC-MS/MS 与 CLIA 测定血清 E2 水平之间的线性相关性采用线性回归方程分析, LC-MS/MS 与 CLIA 测定血清 E2 水平的一致性采用 Bland-Altman 分析。若是 $P < 0.05$, 则视作差异存在统计学意义。

2 结果与分析

2.1 LC-MS/MS 与 CLIA 测定血清 E2 水平的结果比较

CLIA 测定血清 E2 水平显著高于 LC-MS/MS, 具有统计学差异 ($P < 0.05$), 提示以上两种方法测定血清 E2 水平的结果存在一定差异。结果见表 1。

表 1 LC-MS/MS 与 CLIA 测定血清 E2 水平的结果比较
Table 1 Comparison of serum E2 level measured by LC-MS/MS and CLIA

检测方法	例数	E2(nmol/L)
LC-MS/MS	100	0.15 \pm 0.06
CLIA	100	0.22 \pm 0.09
<i>t</i> 值		6.472
<i>P</i> 值		<0.001

2.2 LC-MS/MS 与 CLIA 测定血清 E2 水平的相关性以及回归分析

Pearson 相关检验结果显示, LC-MS/MS 与 CLIA 测定血清 E2 水平呈显著相关 ($r=0.866$, $P < 0.05$), 表明以上两种方法测定血清 E2 水平具有较好的相关性。以 LC-MS/MS 测定的血清 E2 水平作为 X , 以 CLIA 测定的血清 E2 水平作为 Y , 进行线性回归, 得到获得线性回归方程为: $Y=1.161X-6.574$ ($r=0.973$, $n=100$), LC-MS/MS 与 CLIA 测定的血清 E2 水平呈线性相关, 其中斜率为 1.161 (95% CI: 1.058~1.293), 提示在较高水平时, CLIA 测定的血清 E2 水平较 LC-MS/MS 测定结果更高; 截距为 -6.574 (95% CI: -14.791~3.056), 提示在较低水平时, CLIA

测定的血清 E2 水平较 LC-MS/MS 测定结果更低。

2.3 LC-MS/MS 与 CLIA 测定血清 E2 水平的 Bland-Altman 一致性分析

Bland-Altman 一致性分析结果显示, LC-MS/MS 与 CLIA 测定血清 E2 水平的差值平均为 0.078 nmol/L (95% CI: 0.069~0.086 nmol/L), 一致性界限范围为 (-0.011, 0.143), 存在 5% (5/100) 的点位于 95% 一致性界限范围之外, 在 95% 一致性界限范围之内, LC-MS/MS 与 CLIA 测定血清 E2 水平的差值最大为 0.156 nmol/L, LC-MS/MS 与 CLIA 测定血清 E2 水平的平均值为 0.152 nmol/L, 提示两种测定方法的一致性欠佳, 因此建议在临床实践中使用 LC-MS/MS 与 CLIA 测定血清 E2 水平时需要考虑进行校准或其他验证措施来确保结果的一致性。

3 讨论与结论

E2 主要由卵巢颗粒细胞释放, 对于女性的生殖健康至关重要。测定血清 E2 水平不仅有助于诊断先兆流产、监测卵巢治疗效果, 还对不孕不育等妇科疾病的诊疗具有重要意义^[5-7]。因此, 选择一种准确可靠的 E2 检测方法对于确保正确诊断和有效治疗极为关键。本研究通过采用 LC-MS/MS 与 CLIA 测定血清 E2 水平, 结果显示, 使用 CLIA 测定的血清 E2 水平显著高于使用 LC-MS/MS 测定的结果, 表明 LC-MS/MS 测定的血清 E2 水平的敏感度较 CLIA 更高。这可能是由于性激素之间的化学结构高度相似, 使用基于抗体的检测方法 CLIA 可能会发生免疫交叉反应, 导致无法特异性地区分 E2 与其他性激素, 尤其是在测定较低水平的 E2 时, CLIA 测定血清 E2 水平的敏感度和特异度较低, 从而导致所测定的结果出现较高的假阳性^[8]。与 CLIA 测定相比, LC-MS/MS 测定能够直接根据分子质量进行识别, 从而克服以上问题, 避免发生免疫交叉反应, 提供更高的特异度和准确度^[9]。并且, LC-MS/MS 测定的血清 E2 水平的范围较 CLIA 测定的血清 E2 水平更小, 提示 LC-MS/MS 测定的血清 E2 水平数据波动幅度较小, 稳定性较高。

本研究中, Pearson 相关性检验结果显示, LC-MS/MS 与 CLIA 测定血清 E2 水平呈显著相关, 同时 LC-MS/MS 与 CLIA 测定血清 E2 水平呈线性相关, 其中斜率为正数, 提示在较高水平时, CLIA 测定的血清 E2 水平较 LC-MS/MS 测定结果更高, 这可能是因为 CLIA 方法在高浓度范围内更容易受到交叉反应的影响, 导致检测值偏高; 同时截距为负数, 提示在较低水平时, CLIA 测定的血清 E2 水平较 LC-MS/MS 测定结果更低, 这可能是由于 CLIA 方法在低浓度范围内的灵敏度和特异性不足, 导致检测值偏低。以上结果表明, LC-MS/MS 与 CLIA 测定血清 E2 水平表现出一定的相关性, 但两种方法在测定较高和较低水平的血清 E2 时存在差异, CLIA 测定血清 E2 水平因其简便快捷、成本效益高而更加适合于需要快速、大量筛查的情况, 对于需要准确进行临床诊断, 尤其是在测定极低血清 E2 水平时, LC-MS/MS 仍然是首选方法。具体分析原由, CLIA 测定血清 E2 水平的原理是基于抗体识别技术, 容易受到交叉反应的影响, 尤其是在低浓度范围内, 可能导致非特异性结合增加, 从而影响检测结果的准确性。LC-MS/MS 测定血清性激素水平的原理为在样品处理过程中加入稳定同位素标记的内标, 通过 LC 技术将血清中结构相似或者为同分异构体的化合物分离出来, 进而有效地去除干扰物质, 避免交叉反应, 加之 MS 技术能够检测目标化合物特有的分子量及其碎片离子, 从而实现对

目标化合物的高度特异性识别, 最终提高检测的敏感度和特异度, 尤其在低水平性激素检测时尤为重要^[10]。本研究结果还发现, LC-MS/MS 与 CLIA 测定血清 E2 水平的一致性欠佳, 因此建议在临床实践中使用 LC-MS/MS 与 CLIA 测定血清 E2 水平时需要考虑进行校准或其他验证措施来确保结果的一致性。对于需要精确测量 E2 水平的情况, LC-MS/MS 可能是一个更优的选择, 但 LC-MS/MS 也存在成本相对较高、技术要求较高等局限性。因此, 临床上在实际应用时还需要考虑患者具体情况、实验室条件以及医疗资源等因素进行综合评估, 从而选择最合适的检测方法。例如, 对于常规监测或初步筛查, 可以优先考虑 CLIA; 而对于复杂病例或需要精准治疗方案制定的情况, 则应倾向于使用 LC-MS/MS。未来的研究可以进一步探索如何优化 LC-MS/MS 的操作流程, 降低其成本, 提高其实用性, 以便于更广泛地应用于临床实践。

通过 CLIA 测定的血清 E2 水平较 LC-MS/MS 测定偏高, 两种方法测定血清 E2 水平具有一定的相关性, 但一致性欠佳, CLIA 测定血清 E2 水平更适用于快速筛查, 在需要准确进行临床诊断时, 则需要应用 LC-MS/MS 测定血清 E2 水平, 能够为临床实践提供科学根据。

参考文献

- [1] FREDERIKSEN H, JOHANNSEN TH, ANDERSEN SE, *et al.* Sex-specific Estrogen Levels and Reference Intervals from Infancy to Late Adulthood Determined by LC-MS/MS[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2020, 105(03): 754-768.
- [2] 冯泓琳, 邓钊, 张红星, 等. 贝克曼库尔特 DXI800 全自动化学发光分析仪检测雌二醇的性能验证[J]. *检验医学与临床*, 2021, (21): 3188-3191.
- [3] 贺敏, 吕东川, 徐菲. 高灵敏度血清雌二醇化学发光免疫分析方法的建立[J]. *标记免疫分析与临床*, 2023, 30(09): 1566-1570.
- [4] 李京萌, 张咏梅. 用 UPLC-MS/MS 法测定人血浆中雌二醇及雌酮的浓度[J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(16): 2392-2395.
- [5] 张伟娟, 江雅平, 陈永传, 等. 电化学发光免疫分析法检测血清雌二醇的性能验证[J]. *检验医学与临床*, 2021, 18(06): 785-788.
- [6] 李森. 血清人绒毛膜促性腺激素、孕酮、雌二醇及糖类抗原 125 在多囊卵巢综合征伴先兆流产患者中的检测意义[J]. *中国卫生检验杂志*, 2023, 33(07): 842-845.
- [7] 陈颖, 于月新, 张倩, 等. 体外受精胚胎移植不同时间点雌二醇水平及其日上升率与助孕结局的关系[J]. *中国医科大学学报*, 2021, 50(10): 920-924.
- [8] 葛佳佳, 杨娜, 张潇莉, 等. 化学发光法与液相色谱串联质谱法测定多囊卵巢综合征女性体内性激素的比较分析[J]. *中南药学*, 2022, 20(03): 561-564.
- [9] 李敏, 孙江漫, 孟祥兆, 等. 不同检测系统雌二醇测定结果一致性评价及临床应用[J]. *安徽医药*, 2024, 28(06): 1112-1115.
- [10] 李凯俊, 张燊, 何帆. 基于液相色谱-串联质谱的激素测定平台助力多囊卵巢综合征的精准诊疗[J]. *西南医科大学学报*, 2024, 47(03): 221-225.

作者简介

刘冰, 副主任检验师, 研究方向为医学检验、免疫学。