

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.09.11

液相色谱-串联质谱法检测唾液皮质醇和可的松进展及临床应用

陆优丽¹, 龚晓霖², 李水军¹ (1.上海市徐汇区中心医院 & 复旦大学附属中山医院徐汇医院中心实验室, 上海 200031; 2.上海市临床检验中心, 上海 200126)

摘要: 午夜唾液皮质醇检测作为库欣综合征的一线筛查指标,也可用于库欣综合征术后复发监控和药物替代治疗监测。可的松是皮质醇在唾液中的代谢物,同时亦是其干扰物,与皮质醇同时检测不仅能排除干扰,而且能鉴别外源性皮质醇污染导致的假阳性结果。液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)检测唾液皮质醇和可的松具有无创、简便、敏感性高、特异性强等特点。检测方法的核心在于通过样本浓缩和液相色谱分离技术实现皮质醇和可的松的分离及准确测定。因此,测定唾液皮质醇和可的松比传统的血清或者尿样更具优势,是血清或者尿样皮质醇/可的松检测的合适替代指标。鉴于目前国内相关的应用和研究报道较少,有必要开发和验证唾液皮质醇的 LC-MS/MS 检测方法,建立中国人群的健康参考值和疾病诊断值,为扩大这一技术的临床应用提供依据。

关键词: 皮质醇; 可的松; 唾液; 液相色谱-串联质谱法

中图分类号: R446

文献标志码: A

皮质醇作为肾上腺分泌的主要糖皮质激素,在调节情绪和健康、维持免疫细胞和炎症、血管和血压之间的联系,以及维护结缔组织等方面具有重要功能。根据临床诊断、科学研究、运动员兴奋剂筛查等检测目的不同,可对全血、血浆、血清、尿液、唾液、毛发等生物基质样本中的皮质醇进行检测,其中血清、尿液或唾液可用于评价下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)功能^[1-3]。皮质醇是亲脂性分子,经腺泡细胞被动扩散至唾液中,这一过程不受唾液分泌的影响^[4]。唾液皮质醇与血清游离皮质醇水平相关,可代表人体内生物活性的皮质醇水平^[5]。可的松是皮质醇在唾液中的代谢产物,由唾液腺中的 11 β -羟基类固醇脱氢酶 II 型(11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2, 11 β HSD2)催化而来,二者生理节律及化学结构相似。在唾液中可的松浓度高于皮质醇,且比值波动较小,因此,可的松不仅是干扰皮质醇检测的一个重要因素,同时可的松的检测也可用于判断外源性皮质醇(氢化可的松)污染所带来的假阳性结果^[6]。

唾液采集较血液采集的优势明显,如无创、简单、且不受样本采集时间和地点的限制,可以连续多次采集,更容易被患者所接受等,因此,唾液皮质醇是血液皮质醇合适的替代指标。液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)可准确检出唾液中较低浓度的皮质醇,可应用于相关疾病的临床诊断及科学研究。本文从唾液皮质醇的临床应用和 LC-MS/MS 检测技术进展两方面阐述国内外该领域的研究现状,并进行展望。

1 唾液皮质醇检测的临床应用

1.1 唾液检测的优势 采用唾液样本检测皮质醇,具有无创、可操作性强、适合于连续采样等优势,更重要的是,唾液皮质醇及可的松水平与血清皮质醇水平相关性好,即使皮质醇结合球蛋白(CBG)异常也不受干扰,反映体内生物活性部分的激素水平^[7]。近年来开展的唾液皮质醇相关的主要临床研究方向和进展均采用 LC-MS/MS 技术,其中不少研究都

使用了唾液皮质醇和可的松同时检测的方法。

1.2 作为库欣综合征的一线筛查指标 库欣综合征,又称皮质醇增多症,是由于多种原因引起的肾上腺皮质长期分泌过多的糖皮质激素所产生的临床症候群。虽有典型的临床特征,其鉴别诊断仍需依靠实验室检查,体内皮质醇升高是其最主要的生化诊断依据。经过多年的临床研究,午夜唾液皮质醇水平作为库欣综合征的实验室一线筛查指标已得到国际认可,其诊断的特异性和敏感性均优于血液和尿液中皮质醇的检测^[8,9]。可的松作为排除干扰和外源性污染的辅助诊断方法,也已得到了多数研究者的认可。唾液中的皮质醇和可的松存在昼夜节律,一般早晨达峰值(皮质醇:3.0~21.0 nmol/L,可的松:10.4~42.2 nmol/L,皮质醇/可的松比值:0.17~0.57),随后逐渐下降,至午夜可降至最低(皮质醇:0.5~2.5 nmol/L,可的松:1.5~13.0 nmol/L,皮质醇/可的松比值:0.09~0.037)^[6]。

此外,亚临床库欣综合征被定义为无典型临床症状的皮质醇增多症,这类患者比典型患者的发病率更高,也更容易被忽视。研究认为,临床需结合午夜唾液皮质醇水平和 1 mg 地塞米松抑制试验确诊这类患者^[10]。

1.3 肾上腺疾病的诊断和治疗评价 除了库欣综合征的术后复发监测,唾液皮质醇也可用于肾上腺皮质功能减退症(又称艾迪森病,简称 AI)患者的诊断及治疗监测^[11-13]。该病由各种原因引起的皮质醇分泌减少所致,一般通过检测体内皮质醇水平的减少从而进行生化诊断。研究显示,当 AI 患者进行静脉注射或口服氢化可的松(即皮质醇)替代治疗时,唾液可的松与血清游离皮质醇水平的相关性更高,可能作为简便、经济的 AI 治疗监测手段^[14]。例如使用米托坦治疗肾上腺皮质癌时也可出现 AI 症状,血清皮质类固醇载体蛋白(CBG)升高,皮质醇水平被抑制,需使用氢化可的松替代治疗。采用免疫法检测血清皮质醇水平无法正确估算激素替代治疗的剂量,而利用 LC-MS/MS 技术检测唾液皮质醇和可的松水平,在排除干扰的同时,还可检测生物活性的皮

作者简介: 陆优丽,1983 年生,女,副主任技师,博士,主要从事临床质谱研究。

通信作者: 龚晓霖, E-mail: shyy_gxl@126.com; 李水军, E-mail: sjli@serc.ac.cn。

质醇水平,能真正有效指导临床用药^[15]。

唾液皮质醇还可用于 HPA 轴功能的评价,一项功能评价研究发现,患者行二十四肽促皮质素刺激试验(SST)后,HPA 轴功能正常的患者唾液皮质醇水平升高较血清皮质醇更显著,二者呈现指数关系^[16],唾液皮质醇检测 HPA 轴功能异常的特异性和敏感性均为 100%。

尽管唾液皮质醇在相关疾病领域的研究已得到众多专家的肯定,仍有一些报道认为唾液皮质醇和可的松用于 AI 的诊断和激素替代治疗的相关性证据不足^[17]。激素替代治疗组中皮质醇和可的松波动以及个体间差异均较大,到底是指标的特异性较差,还是存在患者依从性等不可控因素,仍有待进一步研究。

1.4 其他疾病和研究的应用 皮质醇作为应激激素,参与机体的多种生理调节,并与情绪、认知等有关。研究表明,抑郁症患者早晨唾液皮质醇水平较健康人升高,唾液皮质醇检测可能有助于抑郁症的诊断或病情观察^[18]。有学者认为皮质醇水平也可在一定程度上反映人体的疲劳状况,例如慢性疲劳综合征患者唾液皮质醇和可的松水平较健康对照人群显著降低^[19]。

2 唾液皮质醇检测技术

2.1 传统检测技术 免疫法、电化学法、荧光法等技术是目

前唾液皮质醇临床研究的主要检测手段^[20-22],然而,这些方法的特异性较差,无法区分内源性和外源性糖皮质激素的交叉干扰。此外,检测技术标准化的缺乏使得不同实验室间的检测结果无法直接比对^[23-24]。导致这些技术存在明显缺陷的原因是,11 β HSD2 的表达使得唾液腺中可的松/皮质醇的比值明显高于血清,免疫法无法区分结构相似的皮质醇和可的松。此外,皮质醇作为节律变化的应激激素,一天中正常节律为午夜最低,午夜是灵敏诊断疾病的最佳时间点。但对于免疫法来说,由于午夜唾液皮质醇水平较低,检测准确性是一个极大的挑战^[25]。

2.2 LC-MS/MS 检测技术 LC-MS/MS 是通过化合物的极性、质荷比及其结构所包含的特征碎片的不同将目标化合物与其干扰成分相互分离,最终实现精准定量的一项技术,其作为检测小分子激素的金标准,常被用于建立激素的参考方法^[26]。表 1 列举了近年来使用 LC-MS/MS 技术的唾液皮质醇检测方法^[6-7,27-38]。为了满足唾液中低水平皮质醇的检出,上述方法多使用了样品浓缩技术,包括液液提取法^[7,28-29],沉淀后蒸发法^[27,30],固相萃取法^[6,31-33],蛋白质加热变性后在线毛细管固相微萃取法^[34-35]等,其中固相萃取又分为在线和离线技术,离线法处理步骤复杂,耗时较多,在线法样品处理简单,自动化水平较高。与之类似的还有 Turboflow 技术^[36],同样只需简单的样品预处理。

表 1 唾液皮质醇 LC-MS/MS 检测方法

分析物	样本量 (μ L)	处理方法	流动相组成	线性范围	进样时间 (min)	回收率 (%)	参考文献
皮质醇	100/200	加热变性蛋白后在线毛细管固相微萃取	1% 乙酸水: 甲醇 (体积比:50:50)	0.05~2 ng/mL	5	>95	[34]
皮质醇	250	蛋白质沉淀后浓缩离心	分别含 0.5% 乙酸的水和甲醇溶液	1~20 ng/mL	6.637 [#]	NA	[30]
皮质醇	100	二氯甲烷液液提取	甲醇和水	0.5~20 nmol/L	10	95~106	[28]
皮质醇/ 可的松	100	在线固相萃取	含 0.1% 甲酸-2 mmol/L 醋酸铵的甲醇和水溶液	皮质醇:0.39~400 nmol/L, 可的松:0.78~200 nmol/L	5	96~114	[31]
皮质醇	200	在线固相萃取	含 0.1% 甲酸-2 mmol/L 醋酸铵的甲醇和水溶液	2~300 nmol/L	4	97~104	[32]
皮质醇/ 可的松	1 000	离线固相萃取	甲醇和水	皮质醇:0.2~25 ng/mL, 可的松:1~50 ng/mL	10	66.5~102.5	[33]
皮质醇	250	乙酸乙酯液液提取	含 0.1% 甲酸-2 mmol/L 醋酸铵的甲醇和水溶液	0.27 nmol/L*	6.5	132	[29]
皮质醇/ 可的松	50	Turboflow	含 0.1% 甲酸-1.5 mmol/L 醋酸铵的甲醇和水溶液	皮质醇:0.55~28 nmol/L, 可的松:5.5~277 nmol/L	13	94~99	[36]
皮质醇	100	稀释后在线毛细管固相微萃取	0.2% 甲酸-60% 乙腈水溶液	0.02~5 ng/mL	8	102.4~105.5	[35]
皮质醇/ 可的松	300	在线固相萃取	含 0.1% 甲酸的甲醇和水溶液	皮质醇:0.51~55.4 nmol/L, 可的松:0.55~51 nmol/L	7	90~111	[6]
皮质醇	200	流动相 1:4 稀释	甲醇和水	0.5~100 ng/mL	3.5	NA	[37]
皮质醇/ 可的松	50	二氯甲烷液液提取	甲醇和水	皮质醇:0.107 9~110.4 nmol/L, 可的松:0.108 2~110.8 nmol/L	7.5	68.2~97.9	[7]
皮质醇	500	蛋白质沉淀后浓缩离心	含 0.05% 甲酸-水溶液和乙腈	0.02~5 ng/mL	4	89.6~98.6	[27]
皮质醇	400	超滤后稀释	乙腈和 0.1% 甲酸水溶液	0.1~10 ng/mL	3	NA	[38]

注:皮质醇/可的松浓度换算 nmol/L=2.76 \times ng/mL, *,最低检测限;#,保留时间;NA,无数据。

2.3 LC-MS/MS 法检测优势 LC-MS/MS 技术检测唾液皮质醇的一个突出优势在于其敏感性高,这使得准确检测低浓度的唾液皮质醇成为现实。相较于免疫法,LC-MS/MS 方法

的线性更宽,定量限更低,最低可达 0.05 ng/mL^[34],特别是在低浓度样本检测时显著优于免疫法。LC-MS/MS 技术的另一大优势在于抗干扰能力强、特异性好,液相色谱法可使

得皮质醇与可的松、 6β -羟基可的松、21-脱氧皮质醇、皮质酮等在免疫法中产生干扰的甾体激素获得色谱的基线分离,因此 LC-MS/MS 技术是目前抗干扰能力最强的检测方法^[15]。唾液较血清相比,成分简单,皮质醇和可的松从唾液中的提取相对简便,提取回收率可达 60% 以上,且无明显的基质效应(表 1)。二者不仅可以区分结构,也可以实现皮质醇和可的松的同时检测,并且二者之间无相互干扰。可的松作为唾液腺中 11 β HSD2 催化皮质醇的代谢物,可以排除外源性糖皮质激素污染所带来的假阳性结果^[39]。当患者使用糖皮质激素进行替代治疗时,可的松与血清皮质醇的相关性优于唾液皮质醇,可用于疗效的监测^[40-41]。

3 应用前景与挑战

检测唾液中皮质醇和可的松是一项无创、采样简便的技术,不受时间地点的限制,患者的依从性好。相较于免疫法,LC-MS/MS 法检测唾液皮质醇的准确性和特异性更高,线性范围、敏感性和抗干扰能力更强。这项技术在国外已被广泛应用于临床诊断和科学研究中,在国内近年来也逐步得到发展和应用。在库欣综合征术后监测和激素替代治疗方面,唾液皮质醇和可的松的检测具有血清、尿液无法比拟的优势,在健康筛查、大规模人群研究中也比较适用。由于国内临床 LC-MS/MS 技术起步较晚,目前缺乏基于我国人群的健康参考区间数据。因此,开发和验证唾液皮质醇的 LC-MS/MS 检测方法,建立国内人群的健康参考区间和疾病判断值是亟需解决的首要问题。在此基础上开展相关的临床研究和应用探索,将会让临床医生更加了解唾液皮质醇的临床价值和适用范围,从而使 LC-MS/MS 技术和唾液皮质醇检测项目更好地服务于临床。

4 参考文献

[1] Nieman LK, Biller BMK, Findling JW, *et al.* The diagnosis of Cushing's syndrome: an endocrine society clinical practice guideline[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(5): 1526-1540.

[2] Bornstein SR, Allolio B, Arlt W, *et al.* Diagnosis and treatment of primary adrenal insufficiency: an endocrine society clinical practice guideline[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 101(2): 364-389.

[3] Bancos I, Hahner S, Tomlinson J, *et al.* Diagnosis and management of adrenal insufficiency[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2015, 3(3): 216-226.

[4] Vining RF, McGinley RA, Symons RG. Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation[J]. *Clin Chem*, 1983, 29(10): 1752-1756.

[5] Vining RF, McGinley RA, Maksvytis JJ, *et al.* Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol[J]. *Ann Clin Biochem*, 1983, 20(6): 329-335.

[6] Antonelli G, Ceccato F, Artusi C, *et al.* Salivary cortisol and cortisone by LC-MS/MS: validation, reference intervals and diagnostic accuracy in Cushing's syndrome[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 451: 247-251.

[7] Mezzullo M, Fanelli F, Fazzini A, *et al.* Validation of an LC-MS/MS salivary assay for glucocorticoid status assessment: Evaluation of the diurnal fluctuation of cortisol and cortisone and of their association within and between serum and saliva[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2016, 163: 103-112.

[8] Raff H. Cushing syndrome: update on testing[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2015, 44(1): 43-50.

[9] Sturmer LR, Dodd D, Chao CS, *et al.* Clinical utility of an ultrasensitive late night salivary cortisol assay by tandem mass spectrometry[J]. *Steroids*, 2018, 129: 35-40.

[10] Palmieri S, Morelli V, Polledri E, *et al.* The role of salivary cortisol measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the diagnosis of subclinical hypercortisolism[J]. *Eur J Endocrinol*, 2013, 168(3): 289-296.

[11] Mak IYF, Au Yeung BYT, Ng YW, *et al.* Salivary cortisol and cortisone after low-dose corticotropin stimulation in the diagnosis of adrenal insufficiency[J]. *J Endocr Soc*, 2017, 1(2): 96-108.

[12] Langelaan MLP, Kisters JMH, Oosterwerff MM, *et al.* Salivary cortisol in the diagnosis of adrenal insufficiency: cost efficient and patient friendly[J]. *Endocr Connect*, 2018, 7(4): 560-566.

[13] Ceccato F, Selmin E, Sabbadin C, *et al.* Improved salivary cortisol rhythm with dual-release hydrocortisone[J]. *Endocr Connect*, 2018, 7(9): 965-974.

[14] Raff H. Measurement of salivary cortisone to assess the adequacy of hydrocortisone replacement[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101(4): 1350-1352.

[15] Carrozza C, Lapolla R, Gervasoni J, *et al.* Assessment of salivary free cortisol levels by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in patients treated with mitotane[J]. *Hormones (Athens)*, 2012, 11(3): 344-349.

[16] Perogamvros I, Owen LJ, Keevil BG, *et al.* Measurement of salivary cortisol with liquid chromatography-tandem mass spectrometry in patients undergoing dynamic endocrine testing[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2010, 72(1): 17-21.

[17] Ross IL, Lacerda M, Pillay TS, *et al.* Salivary cortisol and cortisone do not appear to be useful biomarkers for monitoring hydrocortisone replacement in Addison's disease[J]. *Horm Metab Res*, 2016, 48(12): 814-821.

[18] 汪道文, 徐恩, 何健. 唾液皮质醇检测在抑郁症诊断中的应用探讨[J]. *标记免疫分析与临床*, 2009, 16(5): 280-283.

[19] Jerjes WK, Cleare AJ, Wessely S, *et al.* Diurnal patterns of salivary cortisol and cortisone output in chronic fatigue syndrome[J]. *J Affect Disord*, 2005, 87(2): 299-304.

[20] Nieman LK, Biller BMK, Findling JW, *et al.* The diagnosis of Cushing's syndrome: an endocrine society clinical practice guideline[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(5): 1526-1540.

[21] 施绍瑞, 邓智勇, 余霆, 等. 电化学发光免疫分析法与酶免疫分析法检测唾液皮质醇对比研究[J]. *检验医学*, 2010, 25(7): 542-542, 546.

[22] Rosmalen JGM, Oldehinkel AJ, Ormel J, *et al.* Determinants of salivary cortisol levels in 10-12 year old children; a population-based study of individual differences[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2005, 30(5): 483-495.

[23] Raff H, Homar PJ, Burns EA. Comparison of two methods for measuring salivary cortisol[J]. *Clin Chem*, 2002, 48(1): 207-208.

[24] Miller R, Plessow F, Rauh M, *et al.* Comparison of salivary cortisol as measured by different immunoassays and tandem mass spectrometry[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2013, 38(1): 50-57.

[25] Bae YJ, Gaudl A, Jaeger S, *et al.* Immunoassay or LC-MS/MS for the measurement of salivary cortisol in children? [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2016, 54(5): 811-822.

[26] Zhang TJ, Zhao HJ, Li M, *et al.* Development and validation of a

- candidate reference method for serum cortisol by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with dextran sulfate-Mg²⁺ precipitation[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2020, 412(6): 1325-1333.
- [27] 刘晓东, 乔荷, 孟祥娟, 等. 唾液中皮质醇测定的液相色谱-质谱法[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2019, 37(2): 143-146.
- [28] Turpeinen U, Välimäki MJ, Härmäläinen ESA. Determination of salivary cortisol by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2009, 69(5): 592-597.
- [29] Jensen MA, Hansen AM, Abrahamsson P, *et al.* Development and evaluation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of salivary melatonin, cortisol and testosterone[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2011, 879(25): 2527-2532.
- [30] Nelson EA, Palombo EA, Knowles SR. Comparison of evaporation techniques for the preparation of salivary cortisol for analysis by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry[J]. *Clin Biochem*, 2008, 41(16): 1413-1416.
- [31] Perogamvros I, Owen LJ, Newell-Price J, *et al.* Simultaneous measurement of cortisol and cortisone in human saliva using liquid chromatography-tandem mass spectrometry; application in basal and stimulated conditions [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(29): 3771-3775.
- [32] Owen LJ, Haslam S, Adaway JE, *et al.* A simplified liquid chromatography tandem mass spectrometry assay, using on-line solid-phase extraction, for the quantitation of cortisol in saliva and comparison with a routine DELFIA method[J]. *Ann Clin Biochem*, 2010, 47(2): 131-136.
- [33] Lee SH, Kwon SH, Shin HJ, *et al.* Simultaneous quantitative analysis of salivary cortisol and cortisone in Korean adults using LC-MS/MS[J]. *BMB Rep*, 2010, 43(7): 506-511.
- [34] Kataoka H, Matsuura E, Mitani K. Determination of cortisol in human saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(1): 160-165.
- [35] Kataoka H, Ehara K, Yasuhara R, *et al.* Simultaneous determination of testosterone, cortisol, and dehydroepiandrosterone in saliva by stable isotope dilution on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(1): 331-340.
- [36] Fustinoni S, Polledri E, Mercadante R. High-throughput determination of cortisol, cortisone, and melatonin in oral fluid by on-line turbulent flow liquid chromatography interfaced with liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2013, 27(13): 1450-1460.
- [37] Zhang YV. Quantitative analysis of salivary cortisol using LC-MS/MS [J]. *Methods Mol Biol*, 2016: 71-79.
- [38] 顾伟锋, 梁凤英, 刘林菁, 等. 液相色谱-串联质谱法测定健康人唾液中睾酮和皮质醇的含量[J]. *第二军医大学学报*, 2019, 40(1): 104-107.
- [39] Raff H, Singh RJ. Measurement of late-night salivary cortisol and cortisone by LC-MS/MS to assess preanalytical sample contamination with topical hydrocortisone [J]. *Clin Chem*, 2012, 58(5): 947-948.
- [40] Blair J, Adaway J, Keevil B, *et al.* Salivary cortisol and cortisone in the clinical setting[J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2017, 24(3): 161-168.
- [41] Perogamvros I, Keevil BG, Ray DW, *et al.* Salivary cortisone is a potential biomarker for serum free cortisol [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(11): 4951-4958.

(收稿日期:2020-04-11)

(本文编辑:许晓蒙)