

多囊卵巢综合征相关雄性激素的 液相色谱-串联质谱检测

曹正¹, 刘颖¹, 丛宇婷², 卢一凡¹, 董莹¹, 刘京瑞¹, 唐国栋^{1,3}, 翟燕红^{1*}

(1. 首都医科大学 附属北京妇产医院 检验科, 北京 100020; 2. 上海爱博才思分析仪器贸易有限公司, 上海 200050; 3. 北京市海淀区妇幼保健院 产前诊断中心, 北京 100080)

摘要: 建立了液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)检测血清中硫酸脱氢表雄酮(DHEAS)、雄烯二酮(A4)、睾酮(T)、17-羟基孕酮(17-OHP)、双氢睾酮(DHT)5种激素的分析方法。血清样本经蛋白沉淀后, 采用固相萃取, 经Agela Venusil MP C₁₈色谱柱(3.0 mm × 50 mm, 3 μm)分离, 以含0.1%甲酸的甲醇和含0.02%甲酸的水为流动相进行梯度洗脱。使用正-负离子多反应监测模式进行数据采集。结果表明, 5种激素在各自质量浓度范围内线性关系良好($r^2 > 0.995$), 回收率为96.0%~105%, 各激素的批内精密度和批间精密度的均小于10%, DHEAS、A4、T、17-OHP、DHT的定量下限(LOQ)分别为5.00、0.05、0.05、0.025、0.025 ng/mL。该方法快速、准确、灵敏, 适用于临床对多囊卵巢综合征(PCOS)患者血清雄性激素水平的检测。

关键词: 多囊卵巢综合征; 液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS); 硫酸脱氢表雄酮; 雄烯二酮; 睾酮; 17-羟基孕酮; 双氢睾酮

中图分类号: O657.63; Q548.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2020)01-0146-06

Determination of Androgens Related to Polycystic Ovary Syndrome by Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry

CAO Zheng¹, LIU Ying¹, CONG Yu-ting², LU Yi-fan¹, DONG Ying¹,
LIU Jing-rui¹, TANG Guo-dong^{1,3}, ZHAI Yan-hong^{1*}

(1. Department of Clinical Laboratory, Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China; 2. Shanghai AB Sciex Analytical Instrument Trading Co. Ltd, Shanghai 200050, China; 3. Prenatal Diagnosis Center, Beijing Haidian Maternal and Child Health Hospital, Beijing 100080, China)

Abstract: A liquid chromatography-tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) method was established for the determination of five androgens, i. e. dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), androstenedione (A4), testosterone (T), 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) and dihydrotestosterone (DHT), in serum. The serum samples were extracted by solid phase extraction after protein precipitation, then separated on an Agela Venusil MP C₁₈ column (3.0 mm × 50 mm, 3 μm) by gradient elution using methanol containing 0.1% formic acid and water with 0.02% formic acid as mobile phases, finally detected with electrospray ionization in positive or negative mode under multiple reaction monitoring (MRM) mode. As a result, there were good linear relationships for five androgens in their respective mass concentration ranges with correlation coefficients (r^2) more than 0.995, and the recoveries ranged from 96.0% to 105%. The intra- and inter-assay precision values for all androgens were less than 10%. The limits of quantitation for DHEAS, A4, T, 17-OHP and DHT were 5.00, 0.05, 0.05, 0.025, 0.025 ng/mL, respectively. The method is rapid, accurate and sensitive, and could satisfy the requirements for clinical determination of serum androgens in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS).

Key words: polycystic ovary syndrome (PCOS); liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS); androstenedione (A4); testosterone

(T); 17-hydroxyprogesterone (17-OHP); dihydrotestosterone (DHT)

多囊卵巢综合征(PCOS)是一种常见的妇科内分泌疾病,起病多见于青春期,临床上多以月经不调为主要症状,可有不孕^[1]、多毛痤疮、肥胖、黑棘皮症等多种不同临床表现^[2]。一直以来,PCOS病因未明且缺乏统一的诊断标准^[3],给临床工作造成诸多不便。美国生殖医学学会与欧洲人类生殖和胚胎学会于2003年修订PCOS诊断标准^[4]:①稀发排卵或无排卵;②高雄性激素的临床或生化表现;③经超声提示单侧或双侧卵巢多囊性改变。凡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。

高雄性激素血症被普遍认为是PCOS关键的病理生理改变^[5],对雄性激素的检测是临床诊断PCOS的重要指标^[6]。在女性体内存在多种雄性激素,其中,睾酮(T)的血清水平高于其他雄性激素,是PCOS中主要的病源性雄性激素^[7]。目前,临床大多依靠检测睾酮血清水平判断患者是否存在高雄性激素血症^[5]。对睾酮的检测主要有总睾酮(TT)和游离睾酮(FT),其中在人体中发挥有效生物活性的是FT^[8]。美国近期的最佳实践总结中认为FT是诊断女性雄性激素过剩最敏感的指标^[7-9]。临床对FT的直接测定具有较多限制且结果的灵敏度和准确性较低。但可通过检测TT进而计算FT含量^[10]。此外,硫酸脱氢表雄酮(DHEAS)、雄烯二酮(A4)、17-羟基孕酮(17-OHP)、双氢睾酮(DHT)也是人体内重要的雄性激素类型,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^[7],可为PCOS的诊断提供参考。50%的PCOS病人会出现血清DHEAS水平的升高,其中5%的患者有且只有DHEAS这一种雄性激素特异性升高^[11],同时检测T和DHEAS可以提高PCOS的诊断率。A4是T的直接前体,因此往往在评估高雄性激素血症时会检测A4,据报道,雄性激素检测中如果加入A4,大约可以提高9%的PCOS检出率^[9];DHT是睾酮经过5 α -Reductase作用转化而来,其雄性激素活力最强,因此在睾酮水平正常的PCOS病人中,检测DHT能够帮助解释局部目标组织中雄性激素活性过高的现象^[9];17-OHP是类固醇合成通路中的中间物质,同时也是盐皮质激素和雄性激素的前体^[9],其血清水平在非典型肾上腺皮质增生(Non-classic CAH)病人中异常升高,因此17-OHP被许多相关专业学会推荐用于PCOS病患诊断,以排除Non-classic CAH^[7,9]。

临床实验室多采用自动化免疫法检测雄性激素,但其特异性差,易受温度、pH值、离子强度、试剂免疫活性、异嗜性抗体等因素干扰而造成假阳性或假阴性结果,特异性和准确性有待提高^[12-13]。近年来液相色谱-串联质谱技术(LC-MS/MS)开始应用于雄性激素的检测,其因所需样本量少,可同时检测多种物质,且精密度和准确性高,被认为是雄性激素检测的“金标准”^[14]。有指南建议,在PCOS诊断中,将LC-MS/MS应用于临床高雄性激素血症的检测,此前有将T和DHT、T和A4进行联合检测的报道,其研究结果表明联合检测能达到较好的特异性和精确性^[15-16],但目前对上述5种雄性激素进行联合检测的报道较少。本研究建立了液相色谱-串联质谱法联合检测DHEAS、A4、T、17-OHP、DHT 5种雄性激素的方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

AB SECIX TRIPLE QUAD™ 5500 三重四级杆串联质谱仪,配有电喷雾离子源(ESI)以及 Analyst 1.4.1 数据处理软件(美国 Applied Biosystem 公司);岛津高效液相色谱系统(日本)。96孔蛋白沉淀板(Agela Cleanert Protein Precipitation Plate, CAT#96CD2025-Q),96孔PEP板(Agela Cleanert PEP 96 Well Microplates, CAT#PE00501-MW)。

甲醇、乙腈(Optima@LC/MS, 4 L, 美国 Fisher Scientific 公司);标准品:T、A4、DHEAS、DHT、17-OHP均为1.0 mg/mL, 1 mL/支;睾酮内标(T-C3)、雄烯二酮内标(A4-C3)、硫酸脱氢表雄酮内标(DHEAS-D5)、双氢睾酮内标(DHT-C3)、17-羟基孕酮内标(17-OHP-C3)均为100 μ g/mL, 1 mL/支;上述标准品和内标均购自美国 Cerilliant 公司。

1.2 实验条件

1.2.1 色谱条件 色谱柱:Agela Venusil MP C₁₈ (3.0 mm \times 50 mm, 3 μ m), 流动相A:蒸馏水(含0.02%甲酸), 流动相B:甲醇(含0.1%甲酸), 采用梯度洗脱, 梯度洗脱程序为:0~0.5 min, 55%

B; 0.5~3.5 min, 55%~90% B; 3.5~4.5 min, 90% B; 4.5~4.6 min, 90%~55% B; 4.6~6.0 min, 55% B, 流速 0.6 mL/min, 柱温 40 °C, 进样量 10 μ L。

1.2.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子源(ESI), 检测方式为正-负离子多反应监测模式(MRM)。电喷雾电压(IS)为 5 500 V; 雾化温度(TEM)为 550 °C; 碰撞气(CAD)为 8 L/min; 气帘气(CUR)为 35 L/min。雾化气(GS1)为 80 L/min; 辅助加热气(GS2)为 70 L/min。5 种雄性激素的质谱参数见表 1, 选取 Q1 质量数为母离子, Q3 质量数为子离子进行定量分析。

表 1 5 种雄性激素的质谱参数
Table 1 Mass spectrometric parameters of five androgens

Analyte	Q1 Mass(Da)	Q3 Mass(Da)	DP(V)	CE(V)	CXP(V)
DHEAS	367.1	97.0	-30.0	-20.0	-8.0
DHEAS-D5	372.1	98.0	-170.0	-45.0	-8.0
A4	287.3	97.0	170.0	31.0	11.0
A4-C3	290.3	100.1	165.0	30.0	12.0
T	289.3	97.0	160.0	30.0	11.0
T-C3	292.3	97.1	160.0	31.0	10.0
17-OHP	331.3	97.1	170.0	31.0	11.0
17-OHP-C3	334.4	112.0	130.0	47.0	11.0
DHT	291.3	255.3	170.0	22.0	9.0
DHT-C3	294.3	258.3	190.0	22.0	13.0

* DP: declustering potential; CE: collision energy; CXP: collision cell exit potential

1.3 标准溶液的配制

取适量标准品, 用甲醇定容后, 用甲醇稀释成不同质量浓度的系列混合标准溶液。稀释后 A4 的质量浓度 0.10、0.20、0.40、1.20、6.00、12.00 ng/mL, T、DHT 和 17-OHP 为 0.05、0.10、0.20、0.60、3.00、6.00 ng/mL, DHEAS 为 10.00、20.00、40.00、120.00、600.00 和 1 200.00 g/mL, 上述即为标准曲线 C1~C6 标准溶液, 将标准溶液置于 -20 °C 保存, 使用前取出在室温下放置 0.5 h, 混匀后, 即可进样分析。DHEAS、A4、T、17-OHP 和 DHT 的内标用甲醇乙腈(1:1)分别稀释至 5.00、2.00、10.00、2.00、20.00 ng/mL。

1.4 样本前处理

取 50 μ L 血清样品, 加入 10 μ L 内标溶液和 150 μ L 甲醇, 振摇 2 min, 过蛋白沉淀板, 加入 150 μ L 水, 振摇 1 min。200 μ L 甲醇和 200 μ L 水活化 PEP 板, 加载样品, 分别经 200 μ L 的 20% 乙腈、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 上机检测。

2 结果与讨论

2.1 实验条件的优化

2.1.1 前处理方法的优化 因雄性激素在体内的含量均较少, 因此对样本的前处理关系到实验结果的准确性。实验对比了蛋白沉淀法和固相萃取法, 其中前者快速、简便, 但处理的样品净化程度低, 对于体内含量较少的雄性激素并不是最优方法。本实验采用蛋白沉淀+固相萃取的方法对样本进行前处理, 将已经进行蛋白沉淀的样品通过萃取柱, 可有效去除样品基质中的干扰物, 浓缩目标分析物, 提高检测灵敏度, 减少基质效应, 适用于对雄性激素的检测。

2.1.2 色谱-质谱条件的优化 考察了甲醇、乙腈、甲醇-乙腈混合物分别与水、0.1% 甲酸、0.02% 甲酸组成的不同流动相对 5 种雄性激素的分离效果及色谱图峰形的影响。在对比了不同流动相以及加入甲酸前后的分离结果后, 最终选择甲醇与水为流动相体系, 并分别加入 0.1% 甲酸和 0.02% 甲酸, 以使目标分析物的响应强度得到明显提高, 且所得峰形良好。进一步考察了不同柱温下(35、40、45 °C)5 种雄性激素的响应强度及分离情况, 结果表明在柱温 40 °C 下, 可得到较理想的实验结果。

采用 ESI 正-负离子电离模式扫描分析, 在一级质谱分析确定母离子后, 进行二级质谱的子离子分析扫描, 对去簇电压(DP)、碰撞能量(CE)以及碰撞室出口电压(CXP)进行优化, 优化后的质谱条件见表 1。此时各雄性激素的检测信号高, 峰形良好。

在优化条件下, 5种雄性激素的色谱图见图1。从图中可观察到各雄性激素的色谱图清晰, 峰形良好, 在相关保留时间附近无干扰峰, DHEAS、A4、T、17-OHP和DHT的保留时间分别为2.47、3.15、3.49、3.63、4.08 min, 表明各雄性激素可在5 min内完成分离检测。

2.2 线性关系、定量下限及相对标准偏差

将标准溶液按照正常样本进行处理后进样分析, 考察各雄性激素的线性关系。以样品中待测物的质量浓度为横坐标(X , ng/mL), 待测物和内标物的峰面积比值作为纵坐标(Y), 用加权($1/X^2$)最小二乘法进行回归计算, 得到回归方程。结果显示(见表2), 5种雄性激素在一定质量浓度范围内线性关系良好, 相关系数(r^2)均大于0.995。以信噪比(S/N) = 10, 相对标准偏差(RSD)小于20%作为各成分的定量下限(LOQ), 计算得到5种雄性激素的LOQ为0.025~5.00 ng/mL, RSD均小于20%, 满足统计学要求。

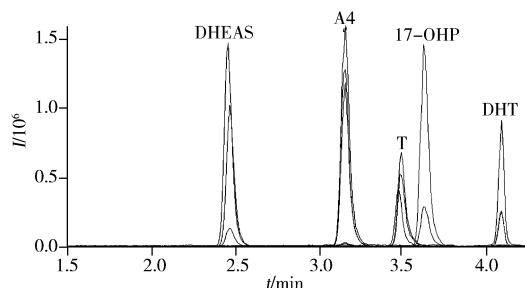


图1 5种雄性激素的色谱图
Fig. 1 Chromatogram of five androgens

表2 5种雄性激素的线性范围、相关系数、定量下限及相对标准偏差

Table 2 Linear ranges, correlation coefficients, LOQs and relative standard deviations (RSD) of five androgens

Analyte	Linear range (ng/mL)	Linear equation	r^2	LOQ (ng/mL)	RSD (%)
DHEAS	10.00 ~ 1 200.00	$y = 0.001 16x + 0.003 14$	0.999 4	5.00	15
A4	0.10 ~ 12.00	$y = 0.200 06x + 0.009 40$	0.999 0	0.05	6.0
T	0.05 ~ 6.00	$y = 0.577 71x + 0.002 80$	0.996 5	0.05	5.7
17-OHP	0.05 ~ 6.00	$y = 0.073 53x + 0.004 29$	0.998 8	0.025	8.0
DHT	0.05 ~ 6.00	$y = 1.172 19x + 0.010 15$	0.998 1	0.025	6.8

2.3 相对标准偏差与加标回收率

以5个患者血清混合作为本底, 取40 μ L 混合人血清与一定量的雄性激素标准溶液混合, 制成低、高浓度的质控血清(具体浓度见表3)。在1天内分别对低、高2个浓度水平的质控血清进行10次重复处理, 检测5种雄性激素含量, 计算批内相对标准偏差(Intra-RSD); 对低、高2个浓度水平的质控血清测定5次, 连续测定5 d ($n = 25$), 检测5种雄性激素含量, 计算批间RSD(Inter-RSD), 观察精密度, 同时计算加标回收率。结果显示, 5种雄性激素的批内RSD为3.7%~8.7%, 批间RSD为4.1%~8.2%, 加标回收率为96.0%~105%, 表明本方法对不同质量浓度标本检测均具有较好的精密度和准确度。

2.4 样本的稳定性

取未处理血清样本, 在4 $^{\circ}$ C下保存3 d, 分别于第0、1、3 d按本方法检测雄性激素的含量; 将第0 d处理后的样本于15 $^{\circ}$ C下放置3天, 分别于第0、1、3 d检测雄性激素含量, 将检测值与第0 d的结果作比较, 观察样本稳定性。检测结果显示(见表4), 按本方法处理后的雄性激素样本, 在4 $^{\circ}$ C与15 $^{\circ}$ C下的稳定性均在80%~120%范围内, 说明本方法的稳定性良好。

表3 5种雄性激素的批内相对标准偏差、批间相对标准偏差及回收率

Table 3 Intra-RSDs, inter-RSDs and recoveries of five androgens

Analyte	Concentration (ng/mL)	Intra-RSD (%)	Inter-RSD (%)	Recovery (%)
DHEAS	20.00	5.2	6.5	99.3
	960.00	5.1	5.9	105
A4	0.20	8.5	8.1	97.5
	9.60	4.8	5.2	98.9
T	0.10	8.0	6.8	103
	4.80	4.1	5.7	97.6
17-OHP	0.10	5.4	7.6	96.0
	4.80	3.7	4.1	102
DHT	0.10	8.7	8.2	101
	4.80	6.2	5.3	99.7

表4 5种雄性激素的稳定性

Table 4 Stability of five androgens

(%)

Temperature	DHEAS	A4	T	17-OHP	DHT
4 $^{\circ}$ C	92.3 ~ 92.6	103 ~ 105	117 ~ 117	104 ~ 107	97.2 ~ 105
15 $^{\circ}$ C	92.4 ~ 92.8	108 ~ 112	103 ~ 106	98.4 ~ 103	103 ~ 113

2.5 临床样本的检测

3 组不同临床血清样本(PCOS 病人 - 血清型高雄性激素、PCOS 病人 - 临床型高雄性激素、非 PCOS - 正常女性) 各 20 例, 采用上述方法进行样本前处理, 并对血清中 DHEAS、A4、T、17-OHP、DHT 进行联合检测, 以观察此方法在临床中的实际应用价值。结果显示, 对 PCOS 病人中血清型高雄性激素及临床型高雄性激素患者的检出率均大于 90%, 与单纯检测一种雄性激素相比, 检测的精确度与准确性大大提升, 在一定程度上解决了女性体内雄性激素水平低、检测难的问题(见表 5)。研究结果表明, 利用本方法进行上述 5 种雄性激素的联合检测, 对临床诊断高雄性激素血症及 PCOS 病人具有较高的应用价值。

表 5 3 组不同临床样本中 5 种雄性激素的检测结果
Table 5 Detection results of five androgens from three clinical groups $\rho/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$

Group	DHEAS	A4	T	17-OHP	DHT
PCOS - serotype hyperandrogens	1 613. 21	2. 07 *	0. 68	2. 77 *	0. 37 *
	519. 31	0. 34	0. 45	0. 11	0. 41 *
	1 531. 62	0. 83	1. 32	0. 31	0. 10
	2 061. 59	1. 30	1. 33	0. 69	0. 70 *
	1 657. 03	2. 24 *	1. 82	8. 20 *	0. 75 *
	1 422. 60	2. 88 *	1. 68	6. 33 *	0. 50 *
	2 918. 06 *	2. 21 *	2. 37	2. 50 *	0. 72 *
	1 133. 94	1. 21	2. 29	0. 83	0. 47 *
	1 840. 35	1. 34	1. 69	11. 58 *	0. 08
	1 622. 81	0. 82	0. 69	2. 98 *	0. 94 *
	1 480. 17	1. 15	1. 15	4. 10 *	0. 23
	2 039. 78	1. 47	1. 10	6. 40 *	0. 54 *
	677. 10	0. 83	1. 00	0. 47	0. 41 *
	1 326. 18	0. 93	0. 95	3. 45 *	0. 16
	1 191. 69	2. 12 *	1. 57	0. 66	0. 12
	1 645. 56	1. 62	1. 25	5. 26 *	0. 32 *
	1 987. 04	2. 09 *	0. 99	4. 46 *	0. 22
	1 730. 51	0. 82	0. 37	0. 23	0. 15
	876. 94	0. 98	0. 80	2. 73 *	0. 17
	1 401. 04	1. 49	1. 30	0. 51	0. 50 *
PCOS - clinical hyperandrogens	780. 53	0. 76	1. 37	0. 31	0. 12
	1 847. 33	2. 23 *	1. 52	4. 42 *	0. 37 *
	1 382. 81	1. 35	1. 43	7. 20 *	0. 36 *
	2 404. 72	0. 99	0. 99	0. 21	0. 38 *
	2 694. 97 *	1. 04	1. 99	8. 99 *	0. 62 *
	1 156. 58	1. 61	1. 37	0. 51	0. 29
	1 272. 25	0. 85	0. 71	0. 22	0. 32 *
	2 188. 19	1. 06	1. 34	6. 03 *	0. 30
	728. 78	0. 62	0. 43	2. 26 *	0. 36 *
	1 357. 51	1. 24	1. 01	4. 27 *	0. 37 *
	1 134. 22	1. 02	0. 75	0. 44 *	0. 44 *
	1 171. 54	0. 90	1. 53	10. 25 *	0. 33 *
	1 099. 76	1. 09	1. 92	1. 37	0. 22
	1 813. 03	1. 05	1. 44	6. 49 *	0. 35 *
	1 284. 89	1. 04	0. 79	3. 76 *	0. 16
	1 107. 42	1. 04	0. 94	4. 03 *	0. 22
	1 506. 03	0. 80	1. 03	4. 44 *	0. 41 *
	306. 79	0. 48	0. 90	3. 87 *	0. 18
	1 829. 82	0. 78	0. 45	2. 23 *	0. 41 *
	678. 27	0. 39	0. 35	1. 60	0. 15
Normal	1 172. 81	1. 36	0. 84	0. 56	0. 28
	1 730. 51	0. 82	0. 37	0. 23	0. 15
	1 841. 10	1. 59	0. 71	1. 82	0. 12
	1 062. 45	0. 66	1. 14	0. 23	0. 22
	1 855. 12	1. 19	0. 86	2. 54 *	0. 11
	1 480. 17	1. 15	1. 15	4. 10 *	0. 23
	1 142. 20	0. 76	0. 25	0. 32	0. 31 *

(续表5)

Group	DHEAS	A4	T	17-OHP	DHT
	1 474.17	0.46	0.66	0.24	0.23
	1 692.61	0.80	1.15	0.42	0.38*
	1 613.25	0.90	0.60	1.24	0.72*
	1 357.51	1.24	1.01	4.27*	0.37*
	1 622.81	0.82	0.69	2.98*	0.94*
	1 326.18	0.93	0.95	3.45*	0.16
	702.87	0.96	0.53	2.07*	0.21
	1 758.83	0.91	2.04	1.97	0.26
	2 966.60*	1.06	1.10	0.45	0.25
	1 461.49	1.06	0.54	1.94	0.08
	1 132.42	0.59	0.83	4.31*	0.11
	876.94	0.98	0.80	2.73*	0.17
	1 151.22	1.15	0.79	3.04*	0.23

reference interval: DHEAS: 280.00 ~ 2 500.00 ng/mL, A4: 0.30 ~ 2.00 ng/mL, T: 0.08 ~ 6.00 ng/mL, 17-OHP: < 2.00 ng/mL, DHT: < 0.3 ng/mL

3 结 论

本研究建立了 LC-MS/MS 联合检测血清中 DHEAS、A4、T、17-OHP、DHT 的分析方法, 讨论了 LC-MS/MS 法在临床中高雄性激素血症诊断中的应用价值, 从而为 PCOS 的诊疗提供依据。实验结果表明, 本方法快速简便, 具有较高的精确性和准确性, 可保证在血清浓度较低条件下获得较为理想的检测结果, 满足临床大量检测的需求, 对临床高雄性激素血症和 PCOS 的诊断具有重要意义。

参考文献:

- [1] Escobar - Morreale H F. *Nat. Rev. Endocrinol.*, **2018**, 14(5): 270 - 284.
- [2] Xie X, Kong B H, Duan T. *Obstetrics and Gynecology*. 9 th ed. Beijing: People's Medical Publishing House(谢幸, 孔北华, 段涛. 妇产科学. 9 版. 北京: 人民卫生出版社), **2018**; 348 - 351.
- [3] Belenkaia L V, Lazareva L M, Walker W, Lizneva D V, Suturina L V. *Minerva Ginecol.*, **2019**, 71(3): 211 - 223.
- [4] Rotterdam ESHRE/ASRM - Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. *Fertil. Steril.*, **2004**, 81(1): 19 - 25.
- [5] Luque - Ramirez M, Escobar - Morreale H F. *Expert Opin. Ther. Targets*, **2015**, 19(11): 1545 - 1560.
- [6] Landay M, Huang A, Azziz R. *Fertil. Steril.*, **2009**, 92(2): 643 - 647.
- [7] Goodman N F, Cobin R H, Futterweit W, Glueck J S, Legro R S, Carmina E. *Endocr. Pract.*, **2015**, 21(11): 1291 - 1300.
- [8] Bui H N, Sluss P M, Hayes F J, Blincko S, Knol D L, Blankenstein M A, Heijboer A C. *Clin. Chim. Acta*, **2015**, 450: 227 - 232.
- [9] Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti - Kandarakis E, Escobar - Morreale H F, Futterweit W, Janssen O E, Legro R S, Norman R J, Taylor A E, Witchel S F. *Fertil. Steril.*, **2009**, 91(2): 456 - 488.
- [10] Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman J M. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **1999**, 84(10): 3666 - 3672.
- [11] Carmina E. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2006**, 1092: 130 - 137.
- [12] Zhang Q X, Han L Q, Huang X Z. *Chin. J. Clin. Lab. Mgt. : Electron. Ed.* (张乔轩, 韩丽乔, 黄宪章. 中华临床实验室管理电子杂志), **2016**, 4(3): 173 - 178.
- [13] Stanczyk F Z, Jurow J, Hsing A W. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **2010**, 19(4): 903 - 906.
- [14] McDonald J G, Matthew S, Auchus R J. *Horm Cancer*, **2011**, 2(6): 324 - 332.
- [15] Shiraiishi S, Lee P W, Leung A, Goh V H, Swerdloff R S, Wang C. *Clin. Chem.*, **2008**, 54(11): 1855 - 1863.
- [16] Gallagher L M, Owen L J, Keevil B G. *Ann. Clin. Biochem.*, **2007**, 44(1): 48 - 56.

(责任编辑: 龙秀芬)