

血液中类固醇激素分析方法的研究进展

鹿倩¹, 杨莉^{1,2}, 王峥涛^{1,2*}

1. 上海中医药大学中药研究所 教育部中药标准化重点实验室 中药新资源与质量标准综合评价国家中医药管理局重点研究室, 上海 201203
2. 上海中药标准化研究中心, 上海 201203

摘要: 内源性类固醇激素作为内分泌系统重要的组成成分, 在机体发育、免疫调节及生育控制方面均起着不可或缺的作用。类固醇激素水平的准确测定对于临床内分泌疾病的预防、诊断及治疗十分重要。近年来生物体内源性类固醇激素的测定在临床应用中越来越广泛。主要针对 2013—2018 年最典型的血液中类固醇激素常用的分析方法进行归纳对比, 以期类固醇激素水平的准确测定提供更多的思路, 也为后期临床诊断治疗提供更加准确的依据。

关键词: 类固醇激素; 临床诊断; 分析方法; 血液; 蛋白沉淀法; 液液萃取法; 固相萃取法

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)15-3710-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.18.034

Research progress on analytical methods for blood steroid hormones

LU Qian¹, YANG Li^{1,2}, WANG Zheng-tao^{1,2}

1. Ministry of Education (MOE) Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines; State Administration of TCM (SATCM) Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China
2. Shanghai R & D Center for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai 201203, China

Abstract: Steroid hormone, the component of the endocrine system, plays an extremely important role in body development, immune regulation, and birth control. The accurate determination of steroid hormone is important for the prevention, diagnosis, and treatment of clinical endocrine diseases. In recent years, the determination of endogenous steroid hormones in biological samples has become increasingly widespread in clinical applications. In this article, the commonly used analysis methods of typical blood steroids from 2013 to 2018 were generalized and compared in order to provide more reference for the accurate determination of steroid hormone levels, and also provide more accurate basis for later clinical diagnosis and treatment.

Key words: steroid hormone; clinical diagnose; analytical method; protein precipitation; liquid-liquid extraction; solid-phase extraction

类固醇激素 (steroid hormone) 又称甾体激素, 是胆固醇经细胞色素 P450 (cytochrome P450) 酶催化形成的一类具有环戊烷多氢菲结构的化合物。类固醇激素主要分为 4 类: 孕激素、皮质激素、雌激素、雄激素 (图 1)。类固醇激素对人体新陈代谢、维持内环境稳定、生长、发育及生殖行为等方面起着重要的调节作用^[1-2]。类固醇激素分析方法是临床检测学、内分泌学以及其他交叉学科相关领域的重要研究内容之一。

类固醇激素在生物体内含量较低、结构相似、种类繁多, 所以准确定量类固醇激素对仪器的灵敏度及方法的准确度有较高的要求。目前检测激素的

样本主要有血样、毛发^[3-4]、尿液^[5-6]、唾液^[7-9]、子宫内膜^[10]等。由于种类较多, 本文主要选择最具有代表性的大鼠及人血样本的类固醇激素分析方法进行总结。分析方法的建立包括样本处理及分析方式的选择, 良好的样品前处理方法可以起到富集目标组分、消除或降低基质干扰、提高灵敏度的作用, 反之则会容易引入误差并延长分析时间。此外, 合理的分析方式能为实验研究提供更加精准的结果, 保证结果的可靠性。本文从样品处理方法和测定方法 2 方面, 对 2013—2018 年血液中类固醇激素的分析方法进行综述, 对比分析它们之间的优缺点。

收稿日期: 2018-04-13

作者简介: 鹿倩, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药活性成分与质量标准。Tel: 15002120385 E-mail: lucy_heb1314@163.com

*通信作者 王峥涛, 男, 博士生导师, 研究方向为中药活性成分与质量标准。E-mail: ztwang@shutcm.edu.cn

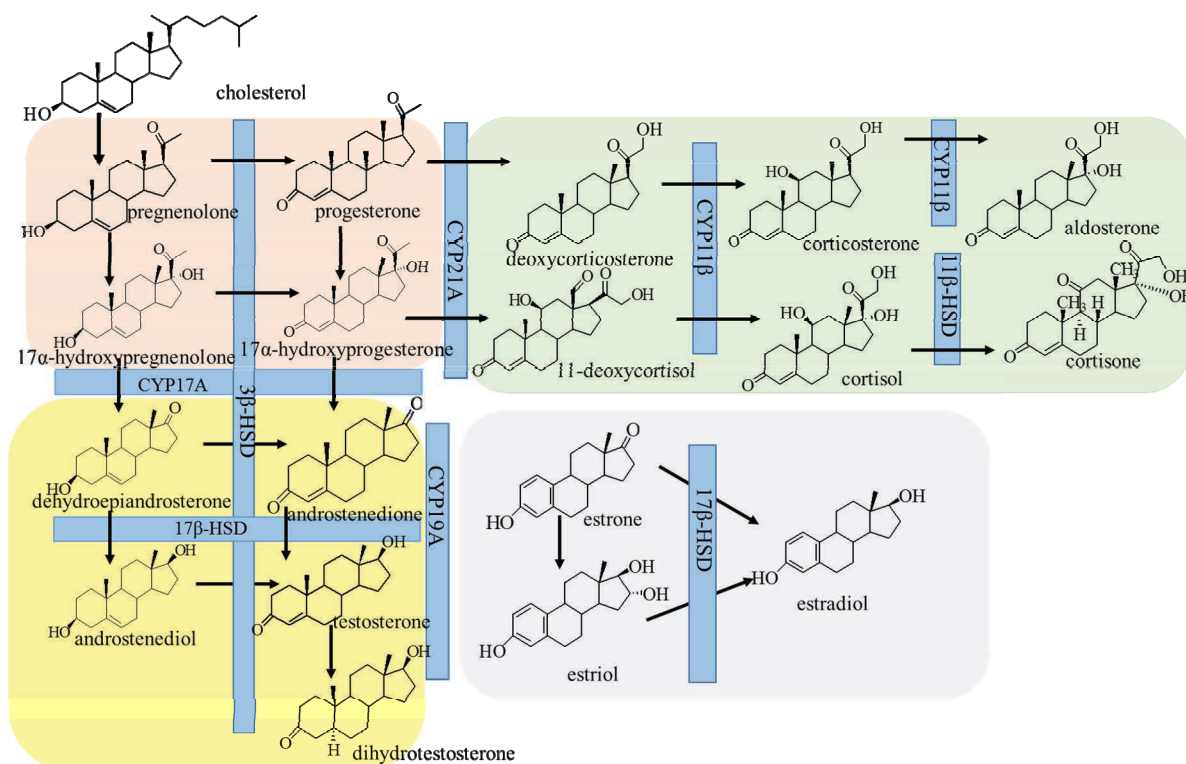


图 1 类固醇激素代谢通路

Fig. 1 Anabolic pathway of steroid hormones

1 样品处理方法

血液中类固醇激素的分析方法中样品的处理方式分为直接处理及借助衍生化方式处理。直接处理的方式主要有蛋白沉淀法 (protein precipitation, PP)、液液萃取法 (liquid-liquid extraction, LLE) 及固相萃取法 (solid-phase extraction, SPE)。衍生化方式主要针对如雌二醇、雌酮、孕烯醇酮属于比较难电离的化合物, 尤其针对检测要求高的临床特殊样本^[11]。目前多用于气相色谱或者气质联用检测, 液相色谱应用较少。

1.1 蛋白沉淀法

目前蛋白质沉淀常用的方法有盐析、等电点沉淀、有机溶剂沉淀、生物碱试剂与某些酸 (如三氯醋酸) 沉淀等, 其中应用较广的是盐析法和有机试剂沉淀法。盐析法主要用的试剂为 ZnSO_4 ^[12]、 CuSO_4 等; 有机试剂主要为甲醇、乙腈、异丙醇。影响蛋白质盐析的主要因素是无机盐的种类、浓度、温度和 pH 值。因此, 用前需要根据化合物的性质来选择相应的沉淀方式。如冰异丙醇沉淀蛋白, 涡旋 1 min, 室温孵育 30 min, 沉淀蛋白效果更佳^[13]。蛋白沉淀法能够最大程度地保留样品中的物质, 在检测血中类固醇激素代谢产物的时候, 一般采用此方

法进行处理。

1.2 液液萃取法

液液萃取法是利用物质在 2 种互不相溶 (或微溶) 的溶剂中利用溶解度或分配系数的不同, 使溶质从一种溶剂内转移到另外一种溶剂中的方法。目前文献报道常用的萃取试剂主要有醋酸乙酯^[14]、甲基叔丁基醚^[15-16]、乙醚、醋酸乙酯-己烷、二氯甲烷^[17]等。Keski-Rahkonen 等^[18]综合考察了甲基叔丁基醚 (MTBE)、二乙醚、正己烷以及 2-甲基丁烷对人血清样本中雄激素和孕激素的提取效率, 结果显示 MTBE 的提取效率较高, 7 种被测物的回收率均接近 100%, 二乙醚对于孕酮和孕烯醇酮的提取率为 85%~95%, 正己烷的提取效率较低, 因此近几年选择 MTBE 作为提取溶剂中小极性溶剂的报道较多^[19]。

1.3 固相萃取法

固相萃取法分为常规固相萃取法 (SPE) 和固相微萃取 (solid phase micro-extraction, SPME)。

1.3.1 SPE SPE 是近年发展起来的一种样品预处理技术, 由液固萃取和液相色谱技术相结合发展而来, 主要用于样品的分离、纯化和浓缩。与传统的液液萃取法相比能提高分析物的回收率, 减少样品

预处理过程,操作简单、省时、省力。常用的固体吸附剂有键和硅胶类(如十八烷基硅烷 C_{18})、键和氧化物硅胶(氧化铝修饰的硅胶)、有机聚合物系列(Oasis HLB、聚苯乙烯共聚物)等。目前类固醇激素检测中广泛使用的是 Oasis HLB 固相萃取柱。该柱子对类固醇激素的吸附容量大,可用于非极性和极性组分的萃取,回收率可达 67%~109%。SPE 操作步骤又分为在线 SPE 和离线 SPE^[20]。在线 SPE 可以直接跟仪器连接进样,避免溶剂反复转移带来的耗时及损失;离线 SPE 可以采用单独的小柱或 96 孔板来进行样品的预处理,并且不同的填充材料能够满足多种需求。血样中基质较多,且部分类固醇激素含量低,采用 SPE 能够富集血样中的激素,比较适合微量类固醇激素的检测。

1.3.2 SPME SPME 最初主要应用于环境(水、土壤、大气等)化学分析,随着研究的深入和方法本身的不断完善及装置的改进,该方法目前已逐步扩展到天然产物、医药卫生、生物化学、毒理和法学等诸多领域。SPME 克服了传统样品前处理技术的缺陷,集采样、萃取、浓缩、进样于一体,大大加快了分析检测的速度。该技术曾被运用于富集环境水体中的类固醇激素^[21],近几年在测定人体类固醇激素的应用方面也逐渐增多^[22]。SPME 能降低生物体的取血量,从而较大程度上减少对受试者的损伤。但是这项技术的涂层纤维价格昂贵且选择性差,暂时应用较少。

1.4 微量采样装置

微量采样器及定量滤纸作为特殊样本处理装置,最近几年逐渐被应用于血液类固醇激素分析的研究中。微量采样处理装置的原理主要是采用微量取样装置定量采集 10~20 μL 全血,室温干燥成血斑后置于一定体积的提取液中提取,然后直接进样分析。定量滤纸则利用全血直接滴加在滤纸上,吸附其余基质,借助特定仪器后直接进样分析。微量采样装置目前应用较多的是 Mitra TM 微量采样装置及血斑定量滤纸。这种处理方式的优点在于取样便捷、处理程序简单、生物样本消耗量少、定量准确,从而可以应用于幼儿取血或药动学研究的动物持续取血中^[23-24],最大程度地减少对适用对象的损害^[25]。

1.5 衍生化

色谱分离时,当被检测目标成分的理化性质不适合分离检测,经常采用衍生化方法来改变其理化

性状。部分类固醇类激素在生物体内含量极低,尤其是特殊临床样本,仪器本身灵敏度达不到,所以需要衍生化来达到检测要求。目前应用较多的衍生化方法是对含羰基的类固醇激素通过硅烷化、酯化、酰化等^[26-27]。此外,类固醇激素酮基衍生化技术也有相关应用,但是该技术还不够完善^[28]。通过衍生化处理,极大地提高了含量较低的类固醇激素如雌二醇、雌三醇等的检测灵敏度,部分检测限能够低至 1 pg。但是衍生化步骤繁琐,会产生较多副产物,同时测定多种类固醇激素时反应条件受限较多。衍生化前处理目前在液质联用方面的应用较少,在气相色谱及气质联用中使用较多。

1.6 多种前处理方法结合

将蛋白沉淀法、液液萃取法及固相萃取法 3 种处理方法结合起来,可以降低基质效应,并能显著提高灵敏度,如蛋白沉淀法与固相萃取法结合^[29],液液萃取法、固相萃取法与衍生化结合,以及液液萃取法、固相萃取法与蛋白沉淀法结合^[30]。通过将各种样品前处理方法相结合,彼此取长补短,克服不必要的损失,获得最终需要的结果。这样能够最大程度去除血液中的杂质,但是步骤会增多。在样品数量不多的时候,可以考虑采用。

血液中类固醇激素检测中各样品处理方式优缺点如表 1 所示,可以根据所检测的类固醇激素来选择相应的处理方式,从而获得更佳的效果。

2 检测方法

部分类固醇类激素在血液中的含量较低,所以需要借助灵敏度高的分析手段,目前常用的检测方法主要为生物技术和化学法。

2.1 生物技术法

生物技术法主要分为放射免疫法(radio-immunoassay, RIA)和酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。

2.1.1 ELISA ELISA 的原理主要是采用试剂盒内加入与酶反应的底物,底物被酶催化为有色产物,根据产物的量与标本中受检物质的量的相关性,根据颜色反应的深浅来进行定性或定量分析。该方法在临床测定中应用十分普遍。ELISA 法样品制备复杂、选择性差、影响因素多且一次只能分析一种激素。

2.1.2 RIA RIA 是一种体外超微量分析方法,利用同位素标记的与未标记的抗原,同抗体发生竞争性抑制反应,研究机体对抗原物质反应的发生、发展和转化规律。传统 RIA 法检测类固醇激素需要

表 1 血液中类固醇激素检测中样本前处理方法对比

Table 1 Comparison on sample pretreatment methods in blood steroid hormone testing

样品处理方式	优点	缺点
蛋白沉淀法	步骤简便，能最大程度保留样本中的待测成分，尤其适用于血中未知代谢物鉴定	对于生物基质如蛋白、脂肪不能有效去除；灵敏度较低，不适合检测要求高的激素测定
液液萃取法	能够只萃取待测成分，避免其余基质的干扰；成本较低，应用广泛	同时提取多种成分时，需要挑选最合适的萃取剂，摸索萃取比例及次数；萃取剂气味较重
在线 SPE	能够实现全自动化处理样本，对人工消耗较少，节约时间	对分析检测的仪器要求高，前期方法建立耗时长，装置成本高；容易造成样品浓度偏高，峰形较差
离线 SPE	针对不同化合物采用不同材料的 SPE 柱，能最大程度实现样品的富集，样品回收率较高；有机溶剂用量少	成本较高，处理步骤较复杂；活化柱子耗时较长
SPME	操作简单，无溶剂或溶剂用量小，污染少，适用于各种分析方法	成本高，对于一些复杂基体的样品，SPME 萃取会存在基体干扰问题
衍生化	能够显著提高检测灵敏度，满足检测要求高的待测成分	可能产生多种衍生化产物，给色谱分离带来困难；衍生步骤耗时较长且操作复杂
微取样装置	减少样本消耗量，操作简单	成本较高，大批量样本处理耗时较长；样本只能检测 1 次，不能实现样本的重现性

净化步骤，除去大量潜在的干扰代谢物；类固醇结合蛋白变性后可以释放出它们所结合类固醇激素如雌二醇、睾酮等；1 份血清样本可以测定多种激素（通常是 5 种）。但是该方法比较繁琐耗时，需要较大的样品体积，尤其是类固醇含量较低的样品^[31-33]，虽然可以在一份血清样品中检测多种类固醇激素，但是需要耗费更多的时间。

2.1.3 小结 在传统测定类固醇激素方法中，RIA 和 ELISA 通常是分析类固醇激素的首选，但它们现在正被与质谱联用的色谱方法所取代^[34]。虽然目前很多常规检测仍会采用生物技术法^[35-36]，但是对于临床中需要同时检测多种类固醇激素时，以上 2 种方法并不能满足需要。尤其是针对采血量少的儿童血液样本，以及体内雌激素含量偏低的绝经妇女血液样本，均要求分析方法灵敏度较高。

除了上述 2 种普通的生物技术法，目前临床应用的还有生物技术与化学技术相结合的化学发光免疫法（chemiluminescence immunoassay, CLIA）。

CLIA 是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合，用于激素、酶、维生素和药物等检测的分析技术。CLIA 曾以其灵敏度高（可达 1×10^{-18} mol）、检测速度快、操作简便、所用试剂对人体无危害的优点，成为非放射性免疫分析技术中最具有发展前途的方法之一^[37-38]。2013

年后国内外有关 CLIA 的报道较多^[39-41]，其被广泛用于多种激素的测定及临床疾病的诊断^[42-43]。

2.2 化学分析法

化学分析法主要有比色法、色谱法及色谱联用法。比色法目前在激素的测定方面应用很少，只有个别激素的测定会采用此方法^[44]。由于比色法近几年在甾体激素的检测方面应用越来越少，本文不做详细介绍，主要对色谱法进行总结。目前最常用的色谱法主要有薄层色谱法（thin-layer chromatography, TLC）、高效液相色谱法（high performance liquid chromatography, HPLC）。

2.2.1 TLC TLC 是快速分离和定性分析少量物质的一种重要的实验技术，常用于外源性类固醇激素的测定^[45-46]，近 5 年该方法用于人血样本中激素测定的报道较少，应用于外源性激素或者其余生物样本的测定较多。

2.2.2 HPLC HPLC 是 20 世纪 60 年代在经典色谱的基础上发展起来的一种新分离方法，目前 80% 以上的有机物都可以运用 HPLC 进行测量，目前已经广泛用于代谢组学领域^[47]。HPLC 是一种非破坏性的分析手段，常用于沸点高、稳定性差和相对分子质量大的有机化合物的定性、定量分析，但其选择性差、灵敏度低、样本用量多，很多时候达不到检测目的，对于体内含量低的类固醇激素，HPLC 达

不到检测要求,所以目前在激素的应用中需要与质谱串联来达到检测要求。

2.2.3 气相色谱-质谱联用法 (GC-MS) GC-MS 具有灵敏度高、选择性好、能效高、速度快等特点^[48-49]。其可以实现对类固醇激素的高分辨检测,并且能够快速提供且可重现的结果,因此被广泛用于类固醇激素的分析,目前已成为检测类固醇激素的主要方法,并为大规模临床研究提供了基础^[50]。

但是由于类固醇激素本身不能挥发,所以采用 GC-MS/MS 分析时,一般需要进行衍生化处理^[51-52],这样可以增加类固醇激素的挥发性和热稳定性。特殊情况下,如测定细胞培养基中的睾酮含量及废水中雌激素时,不需要进行衍生化^[53]。衍生化反应通过改变化合物的官能团,来改变物质的化学结构和性质,这样也能显著提升待测物的响应值,达到更高的灵敏度^[49,54]。但是血液样本所含的生物基质较多、成分复杂,为 GC-MS/MS 分析带来了难度。此外衍生化反应前的准备工作往往耗时,衍生化步骤比较繁琐,尽管做了充分的样品制备,但同时分析十几种激素需要长达 26.5~37 min 的时间来保证分析物的分离,这也为 GC-MS 的应用带来了局限^[55-56]。GC-MS/MS 获得的色谱分辨率(包括差向异构体的分离)好,因此分析的目标物类别及数量较少时,优先选择 GC-MS/MS。但是相对于 HPLC-MS/MS,简化样本准备程序是 GC-MS/MS 需要进一步优化的方向。

2.2.4 高效液相色谱-质谱联用法 (HPLC-MS/MS) HPLC-MS/MS 是一种功能强大的分析技术,通过将 HPLC 与 MS 相结合,发挥两者的优势,从而能够提供卓越的选择性。优化后的 HPLC-MS/MS,可以为难以用其他方法在浓度范围内定量的各种待测物提供准确和精确的结果。其凭借对高沸点、难挥发和热不稳定化合物的分离和测定的极大优势成为近年来发展很快的一种分析检测技术^[17,57-58]。

目前,随着超高液相色谱技术 (UPLC) 和三重四级杆质谱技术的发展,大幅度地改善了生物体中微量类固醇激素分析的分离度、灵敏度和准确性,备受科研工作者的青睐,并且比 GC-MS/MS 的应用更加广泛。HPLC-MS/MS 目前常规应用除采用单纯的三重四级杆外,还会采用混合型线性离子阱-三重四级杆 (QTrap)、飞行时间 (TOF) 质谱。离子阱在三重四级杆上的串联质谱对类固醇激素分析的敏感度略高,目前应用较多,可以满足特殊样本中含

量极低的类固醇激素的测定。混合型线性离子阱-三重四级杆 (QTrap) 可以对内源性化合物的结构进行分析并且可以对代谢物进行检测。自 2000 年以来,HPLC-MS/MS 法已不需要样本衍生化处理测定类固醇激素。最近,随着质谱仪结合 UPLC 的出现,HPLC-MS/MS 已成为用于类固醇激素测定的一种优势技术。HPLC-MS/MS 用于内源性类固醇激素的检测程序,大大降低了样品和试剂的消耗及前处理的时间,也避免了衍生化步骤带来的副反应及反应过程中的损失。但是对于一些极难离子化的激素,要满足含量极低的样本的测定,也会需要借助转换离子源或者采用特殊的色谱柱及 SPE 柱富集浓缩,达到检测要求。

3 近 5 年血液中类固醇激素分析方法的归纳及分析

血液中类固醇激素各种检测方法的相关信息见表 2。从色谱柱、样品前处理方式、检测方法与分析时间等方面总结了近 5 年血液中类固醇激素的分析方法,见表 3。由此可以看出,前处理方法中应用较多的主要为液液萃取,检测方法中最常用的主要为 HPLC-MS/MS 和 GC-MS。在检测方法方面,对于单一激素的测定,传统的生物技术可以满足检测要求。但是同时测定多种激素,则需要借助 HPLC 或者质谱串联色谱来完成测定。GC-MS 能够很好地分离结构差异小的被测物如同分异构体,但是,检测时间较长,不能挥发的被测物质如类固醇激素需要衍生化。HPLC-MS/MS 能在 1 次色谱分离过程同时定量分析大量被测物质,被测物如类固醇激素的比例关系也可以用于判定和诊断不同机能状态下内分泌的变化。HPLC-MS/MS 分析的高效性和高通量特点,使其更适合于研究机构和临床检测机构类固醇激素的定量分析。

近年来血液中类固醇激素水平的检测主要采用的样本为血清及血浆,以全血为研究对象的报道较少,尤其是同时测定多种激素。采用全血作为检测样本,生物样本消耗量少、处理程序简单,但是由于全血对采样及处理装置要求较高,导致目前临床应用较少。随着技术进一步提升,直接采用全血测定类固醇激素将会更广泛地应用于临床。

4 结语

对于类固醇激素分析方法的研究国内外均有相关报道^[78-80],但是对于血液样本中类固醇类激素分析方法的研究报道相对较少。此外,很多文献对于

表 2 血液中类固醇激素检测方法对比

Table 2 Comparison on detection methods of steroid hormone in blood

检测方法	优点	缺点	适用范围	定量下限
RIA	特异性强, 可以去除大量潜在干扰的代谢物; 1 份血清样本可以测定多种激素	繁琐耗时, 需要较大的样品体积, 尤其是类固醇含量较低的样品; 会存在交叉反应的干扰; 放射物对环境污染	类固醇激素数量 < 5	10~500 pg
ELISA	成本较低, 对于单组分检测灵敏度高; 实验结果更加直观	制备复杂、选择性差、影响因素多, 1 次只能分析 1 种物质, 不能进行定性、定量分析	单组分分析, 多用于血清	0.8~500 pg
CLIA	灵敏度高, 特异性强, 试剂价格低廉、稳定且有效期长, 方法稳定快速, 检测范围宽	仪器成本高, 对于检测浓度低的样本需要借助特殊仪器联合使用	多组分激素	10 pg~5 ng
TLC	操作步骤简单, 显色方便, 适合定性观察	不适合浓度低的生物样本及多种结构相近的激素的同时测定, 准确度相对较低	激素含量高的样本如细胞、组织	5~500 ng
HPLC	操作步骤简单, 实用性强, 适合对激素的定性	选择性差, 灵敏度低, 样本消耗大, 适合外源性类固醇激素的测定	外源性类固醇激素, 激素含量高的样本	30~80 ng
GC-MS/MS	进样体积小, 色谱分辨率高, 分离效果好, 适用范围广, 尤其适合对类固醇代谢产物的鉴定, 能够更易表征化学结构	衍生化步骤繁琐, 耗时较长; 更多用于尿液中的激素分析, 对于血样本处理要求较高, 对样本前期纯化和浓缩要求高	代谢物鉴定, 多组分分析, 热稳定化合物	1 pg~5 ng
LC-MS/MS	应用范围广, 分析时间短, 样本消耗少, 特异性强, 可同时多组分样本分析	对于检测要求高的样本, 前期方法建立耗时较长; 仪器成本较高	多组分分析, 内源性、外源性均可, 尤其含量低的样本	2 pg~5 ng

表 3 近 5 年血液中类固醇激素分析方法的归纳

Table 3 Conclusion of analysis methods of steroid hormone in blood in recent five years

实验样本	所测组分	检测方法	样本处理方法	衍生化	分析时间/min	色谱柱	定量限/(pg·mL ⁻¹)	参考文献
血清	Ald	2D-LC/MS	LLE (甲基叔丁基醚)	否	4.4	Poroshell 120 EC C ₁₈	100	16
血清	Ald	LC-MS/MS	SLE	否	15	Luna C ₁₈	416	59
血清	AD	LC-MS/MS	LLE (甲基叔丁基醚)	否	5.3	Kinetex TM Biphenyl column	60	60
	T						60	
	CORT						400	
	11-DC						90	
	C						1 900	
	C-sone						20	
	17-OHP						200	
血清	AD	LC-MS/MS	PP (甲醇)	否	9.01	C ₁₈ column	126.1	61
	T						123.8	
	DHEA						625.0	
血清	E2	LC-MS/MS	LLE (醋酸乙酯-己烷)	否	9	Phenyl C ₁₈	126	62
血清	E2	LC-MS/MS	LLE (醋酸乙酯-己烷)	酰化	7	X Bridge C ₁₈	123	63
血清	E1	LC-MS/MS	LLE (二氯甲烷+乙醚+正己烷+醋酸乙酯)	否	8	C ₁₈	5	64
	E2						10	
	E3						10	

续表 3

实验 样本	所测 组分	检测方法	样本处理方法	衍生化	分析时 间/min	色谱柱	定量限/ (pg·mL ⁻¹)	参考 文献
血清	E2	ECLIA	—	否	—	—	208	65
血清	E2	LC-MS/MS	SLE	否	8.3	Raptor2.7 μmBiphenyl	20	66
	P							
血清	E1	LC-MS/MS	LLE (甲基叔丁基醚)	酰化	11	Kinetex C ₁₈ column	10.5	67
	E2						11.9	
	E3						11.0	
血浆	C	WAC-MS	—	否	6	silica based WAC column	1 000	68
血浆	C	LC-MS/MS	online SPE	否	4	Luna Phenyl-Hexyl	1 810	69
血清	C	LC-MS/MS	online SPE	否	16	Capcell Pak ADME column	1 500	70
血清	P	LC-MS/MS (Qtrap)	LLE (氯代丁烷/MTBE-己烷)	否	7	Poroshell 120 EC-C ₁₈	12.5	71
血清	P	TF-LC-MS/MS	PP (0.3 mol/L 硫酸锌-甲醇 20 : 80)	否	10	Cyclone-P TurboFlow column, Hypersil Gold Aq column	—	72
	17OHP							
	AD							
	T							
	C							
	CORT							
	11-DC							
血清	Ald	IA/LC-MS/MS	PP+SPE	否	11.5	BEH C ₁₈ column	15	36
	C						50	
	P						50	
	AD						30	
血清	T	CLIA/LC-MS/MS	—	否	—	—	10	39
全血	AD	LC-MS/MS	LLE (甲醇+庚烷)	否	13.5	Hypersil Gold Thermo	5 000	73
	DHT						5 000	
血清	T	LC-MS/MS	SPME	否	8	Poroshell 120 EC-C ₁₈	1 000	22
	DHT						1 000	
	Ald						1 000	
血清	T	RIA/CLIA/LC-MS/MS	LLE (乙醚)	否	8.5	HSS T3 column	347.00	74
	AD						42.30	
	17-OHP						25.70	
	E1						9.45	
	E2						66.10	
	P						286.20	
血清	T	LC-MS/MS	LLE+衍生化+SPE	酰化	62	UltiMate 3 Kinetex C ₁₈	1.0	75
	AD-L						2.5	
	DHEA						2.5	
	AD						2.5	
	DHT						2.5	
血清	DHEA	LC-MS/MS	LLE (氯代丁烷)	新烷基 化	15	Poroshell 120 EC-C ₁₈	10	76
全血	DHEA	LC-MS/MS	PP (乙腈-甲酸)	否	11.7	Luna 3 μm C ₈	90	77
血清	DHEA	GC-MS/MS	LLE (三氯甲烷)	烷基化	11	HP-5 ms column	30	49
	Preg						40	
	T						20	
	DHT						60	

T-睾酮 DHEA-脱氢表雄酮 DHT-二氢睾酮 AD-雄烯二酮 AD-L-雄烯二醇 17α-OHP-17α-羟基孕酮 P-孕酮 C-皮质醇 Ald-醛固酮
DOC-脱氧皮质醇 E1-雌酮 E2-雌二醇 E3-雌三醇 CORT-肾上腺酮 MISPE-分子印迹固相萃取 TF-LC-MS/MS-湍流色谱串联质谱
ECLIA-电化学发光免疫 MP-1-氨基-4-甲基哌嗪
T-testosterone DHEA-dehydroepiandrosterone DHT-dihydrotestosterone AD-androstendione AD-L-androstenediol 17α-OHP-17α-hydroxyl
progesterone P-progesterone C-cortisol Ald-aldosterone DOC-deoxycortisol E1-estrone E2-estradiol E3-estriol CORT-corticosterone
MISPE-molecularly imprinted solid-phase extraction TF-LC-MS/MS-turbulent flow chromatography ECLIA-electro chemiluminescence
immunoassay MP-1-amino-4-methylpiperazine

最新的前处理方法未做详细说明, 本文通过样本前处理及分析技术结合起来分析, 对比各种处理方式及分析方法的优缺点, 从而为后期的临床检测提供更准确的信息。综合对比, HPLC-MS/MS 在类固醇激素的分析检测中占据很重要的位置, 省时省力, 同时最大程度地提升检测物的响应值, 满足检测要求。尤其在条件允许的情况下, 采用在线 SPE 技术结合 HPLC-MS/MS 能够显著提高效率。该技术前景广阔, 不仅可以更广泛地应用到各项内源性激素的检测中, 还为疾病诊断提供了依据; 而且可以为外源性类固醇激素的检测提供更好的指引方向。虽然目前技术取得较大进步, 但是面临的挑战还很大, 还要不断地改进优化。通过对血液中类固醇激素分析方法的对比总结, 希望为后期多种激素样本的高通量测定提供更多的选择。此外, 随着未来分析技术的发展及样本处理方式的优化, 能够实现样本高效、精准、简易的检测, 从而更加准确反映生物体生理过程的变化, 对于临床研究具有重大意义。

参考文献

- [1] 王彩云, 潘 登, 张召议, 等. 类固醇激素合成调节因子在小鼠下丘脑和卵巢上的分布 [J]. 中国兽医杂志, 2017(2): 29-32.
- [2] 王卫庆. 糖皮质激素在内分泌疾病诊治中的应用 [J]. 中国实用内科杂志, 2013, 33(10): 760-763.
- [3] Gaudl A, Kratzsch J, Bae Y J, *et al.* Liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry for quantitative steroid hormone analysis in plasma, urine, saliva and hair [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1464: 64-71.
- [4] Lee C, Kim C H, Kim S, *et al.* Simultaneous determination of bisphenol A and estrogens in hair samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2017, 1058: 8-13.
- [5] Devries L V, Dejong W H A, Touw D J, *et al.* Twenty-four hour urinary cortisol excretion and the metabolic syndrome in prednisolone-treated renal transplant recipients [J]. *Steroids*, 2017, 127(Pt B): 31-39.
- [6] Zhai X, Chen F, Zhu C, *et al.* A simple LC-MS/MS method for the determination of cortisol, cortisone and tetrahydro-metabolites in human urine: Assay development, validation and application in depression patients [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 107(4): 450-455.
- [7] Mezzullo M, Fazzini A, Gambineri A, *et al.* Parallel diurnal fluctuation of testosterone, androstenedione, dehydroepiandrosterone and 17OH progesterone as assessed in serum and saliva: Validation of a novel liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for salivary steroid profiling [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2017, 55(9): 1315-1323.
- [8] Li X S, Li S, Kellermann G. Simultaneous determination of three estrogens in human saliva without derivatization or liquid-liquid extraction for routine testing via miniaturized solid phase extraction with LC-MS/MS detection [J]. *Talanta*, 2018, 178: 464-472.
- [9] Liu J, Qiu X, Wang D, *et al.* Quantification of 10 steroid hormones in human saliva from Chinese adult volunteers [J]. *J Int Med Resh*, 2018, 46(4): 1414-1427.
- [10] Hakkinen M R, Heinosalo T, Saarinen N, *et al.* Analysis by LC-MS/MS of endogenous steroids from human serum, plasma, endometrium and endometriotic tissue [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 152: 165-172.
- [11] Ke Y, Gonthier R, Labrie F. A sensitive and accurate LC-MS/MS assay with the derivatization of 1-amino-4-methylpiperazine applied to serum allopregnanolone, pregnenolone and androsterone in pre-and postmenopausal women [J]. *Steroids*, 2017, 118(Pt B): 25-31.
- [12] Owen L J, Adaway J E, Davies S, *et al.* Development of a rapid assay for the analysis of serum cortisol and its implementation into a routine service laboratory [J]. *Annals Clin Biochem*, 2013, 50(4): 345-352.
- [13] Sarafian M H, Gaudin M, Lewis M R, *et al.* Objective set of criteria for optimization of sample preparation procedures for ultra-high throughput untargeted blood plasma lipid profiling by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2014, 86(12): 5766-5774.
- [14] Lee S, Lim H S, Shin H J, *et al.* Simultaneous determination of cortisol and cortisone from human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Anal Methods Chem*, 2014, 2014: 787483.
- [15] Methlie P, Hustad S S, Kellmann R, *et al.* Multisteroid LC-MS/MS assay for glucocorticoids and androgens, and its application in Addison's disease [J]. *Endocrine Connect*, 2013, 2(3): 125-136.
- [16] Ray J A, Kushnir M M, Palmer J, *et al.* Enhancement of specificity of aldosterone measurement in human serum and plasma using 2D-LC-MS/MS and comparison with commercial immunoassays [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 970(4): 102-107.

- [17] Ke Y, Bertin J, Gonthier R, *et al.* A sensitive, simple and robust LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of seven androgen-and estrogen-related steroids in postmenopausal serum [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, 144(Pt B): 523-534.
- [18] Keski-Rahkonen P, Huhtinen K, Poutanen M, *et al.* Fast and sensitive liquid chromatography-mass spectrometry assay for seven androgenic and progestagenic steroids in human serum [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2011, 127(8): 396-404.
- [19] Ray J A, Kushnir M M, Yost R A, *et al.* Performance enhancement in the measurement of 5 endogenous steroids by LC-MS/MS combined with differential ion mobility spectrometry [J]. *Clin Chim Acta: Int J Clin Chem*, 2015, 438: 330-336.
- [20] Weissir J J, Hansen C H, Poulsen R, *et al.* Two simple cleanup methods combined with LC-MS/MS for quantification of steroid hormones *in vivo* and *in vitro* assays [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(18): 4883-4895.
- [21] Zhang Z, Duan H, Zhang L, *et al.* Direct determination of anabolic steroids in pig urine by a new SPME-GC-MS method [J]. *Talanta*, 2009, 78(3): 1083-1089.
- [22] Konieczna L, Belka M, Okonska M, *et al.* New 3D-printed sorbent for extraction of steroids from human plasma preceding LC-MS analysis [J]. *J Chromatogr A*, 2018, 1545(10): 1-11.
- [23] Nys G, Gallez A, Kok M G M, *et al.* Whole blood microsampling for the quantitation of estetrol without derivatization by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 140: 258-265.
- [24] Nys G, Cobraville G, Kok M G M, *et al.* Comparison of nanofluidic and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for high sensitive pharmacokinetic studies of estrogens starting from whole blood microsampling [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1524: 160-168.
- [25] Heussner K, Rauh M, Cordasic N, *et al.* Adhesive blood microsampling systems for steroid measurement via LC-MS/MS in the rat [J]. *Steroids*, 2017, 120(Pt B): 1-6.
- [26] Higashi T, Ogawa S. Chemical derivatization for enhancing sensitivity during LC/ESI-MS/MS quantification of steroids in biological samples: A review [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2016, 162: 57-69.
- [27] Santa T. Derivatization in liquid chromatography for mass spectrometric detection [J]. *Drug Discov Therap*, 2013, 7(1): 9-17.
- [28] 毋 丹, 王漪璇, 钱 隽. 衍生化技术用于生物基质中性激素 LC-MSⁿ 检测的进展 [J]. *药物分析杂志*, 2014, (10): 1718-1726.
- [29] Kawaguchi M, Eyama S, Takatsu A. Automated isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry with on-line dilution and solid phase extraction for the measurement of cortisol in human serum sample [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 96(15): 220-223.
- [30] Fiers T, Casetta B, Barnaert B, *et al.* Development of a highly sensitive method for the quantification of estrone and estradiol in serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry without derivatization [J]. *J Chromatogr B*, 2012, 893/894: 57-62.
- [31] 章玉玲, 杨 涛, 倪 维. 抗苗勒管激素、IL-21 联合性激素检测在预测卵巢早衰中的诊断价值 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2017, 37(10): 1110-1112.
- [32] 俞 臻, 李毓敏. 女性绝经后雌激素水平与糖尿病视网膜病变的相关性分析 [J]. *中华眼底病杂志*, 2017, 33(3): 249-251.
- [33] 王燮斌, 徐晓勋, 兰 香, 等. 综合心理疏导对围绝经期综合征患者激素水平及心理状态的影响 [J]. *健康研究*, 2017, 37(5): 577-578.
- [34] Shackleton C. Clinical steroid mass spectrometry: A 45-year history culminating in HPLC-MS/MS becoming an essential tool for patient diagnosis [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 121(3/5): 481-90.
- [35] Roli L, Santi D, Belli S, *et al.* The steroid response to human chorionic gonadotropin (hCG) stimulation in men with Klinefelter syndrome does not change using immunoassay or mass spectrometry [J]. *J Endocrinol Investig*, 2017, 40(8): 841-850.
- [36] Travers S, Martinerie L, Bouvatier C, *et al.* Multiplexed steroid profiling of gluco- and mineralocorticoids pathways using a liquid chromatography tandem mass spectrometry method [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017, 165(Pt B): 202-211.
- [37] Xin T B, Liang S X, Wang X, *et al.* Determination of estradiol in human serum using magnetic particles-based chemiluminescence immunoassay [J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 627(2): 277-284.
- [38] Lee H, Park C J, Lee G. Measurement of progesterone in human serum by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry and comparison with the commercial chemiluminescence immunoassay [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396(5): 1713-1719.
- [39] Morphte J, Comas I, Ferrer R, *et al.* Accuracy of serum

- luteinizing hormone and serum testosterone measurements to assess the efficacy of medical castration in prostate cancer patients [J]. *J Biomed Sci*, 2017, 24(1): 81.
- [40] 艾斯科尔·沙地克, 帕丽旦·库尔班. 化学发光免疫法检测女性血清性腺激素的临床意义分析 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2016, 4(2): 165-166.
- [41] 盛晓光, 常红叶, 齐力, 等. 电化学发光免疫法和放射免疫法检测血清甲状腺激素的对比分析 [J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(8): 1349-1350.
- [42] 李彬彬. 化学发光免疫法检测性腺激素的应用价值和意义 [J]. 世界最新医学信息文摘: 连续型电子期刊, 2014, 14(33): 1671-3141.
- [43] 邓小艳, 邓艳芹, 胡雅君, 等. 联合LC-MS和化学发光免疫法分析不同类型PCOS的雄激素水平 [J]. 现代妇产科进展, 2017, 26(1): 29-32.
- [44] Kim M I, Cho D, Park H G. Colorimetric quantification of glucose and cholesterol in human blood using a nanocomposite entrapping magnetic nanoparticles and oxidases [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2015, 15(10): 7955-7961.
- [45] 高卫东, 吴立蓉, 江珊. 薄层色谱法快速鉴别抗风湿类中成药的多种糖皮质激素 [J]. 海峡药学, 2016, 28(4): 90-91.
- [46] 沙祯炜, 苏静, 徐昱婷. 薄层色谱法快速鉴别中药制剂中非法添加9种口服糖皮质激素 [A] // 中国药学会第四届药物检测质量管理学术研讨会 [C]. 厦门: 中国药学会, 2017.
- [47] Hu Y, Zhang M, Tong C, *et al*. Enrichment of steroid hormones in water with porous and hydrophobic polymer-based SPE followed by HPLC-UV determination [J]. *J Separ Sci*, 2013, 36(20): 3321-3329.
- [48] Choi M H, Chung B C. Bringing GC-MS profiling of steroids into clinical applications [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2015, 34(2): 219-236.
- [49] Matysik S, Schmitz G. Determination of steroid hormones in human plasma by GC-triple quadrupole MS [J]. *Steroids*, 2015, 99(Pt B): 151-154.
- [50] Chrisarkoudi S, Cowan D A, Taylor N F. Steroids excreted in urine by neonates with 21-hydroxylase deficiency. 3. Characterization, using GC-MS and GC-MS/MS, of androstanes and androstenes [J]. *Steroids*, 2012, 77(13): 1487-1501.
- [51] Casals G, Marcos J, Pozo J, *et al*. Gas chromatography-mass spectrometry profiling of steroids in urine of patients with acute intermittent porphyria [J]. *Clin Biochem*, 2013, 46(9): 819-824.
- [52] Casals G, Marcos J, Pozo J, *et al*. Microwave-assisted derivatization: Application to steroid profiling by gas chromatography/mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 960(6): 8-13.
- [53] Hernando M D, Mezcua M, Gomez M J, *et al*. Comparative study of analytical methods involving gas chromatography-mass spectrometry after derivatization and gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of selected endocrine disrupting compounds in wastewaters [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1047(1): 129-135.
- [54] Kanceva R, Starka L, Kancheva L, *et al*. Increased serum levels of C21 steroids in female patients with multiple sclerosis [J]. *Physiol Res*, 2015, 64(Suppl 2): 247-254.
- [55] Rimmacova L, Husek P, Simek P. A new method for immediate derivatization of hydroxyl groups by fluoroalkyl chloroformates and its application for the determination of sterols and tocopherols in human serum and amniotic fluid by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1339(8): 154-167.
- [56] Lu C, Wang M, Mu J, *et al*. Simultaneous determination of eighteen steroid hormones in antler velvet by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2013, 141(3): 1796-1806.
- [57] Ketha H, Kaur S, Grebe S K, *et al*. Clinical applications of LC-MS sex steroid assays: Evolution of methodologies in the 21st century [J]. *Curr Opinion Endocrinol Diab Obesity*, 2014, 21(3): 217-226.
- [58] Keevil B G. Novel liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) methods for measuring steroids [J]. *Best Practice Res Clin Endocrinol Metab*, 2013, 27(5): 663-674.
- [59] Meunier C, Blondoelle D, Faure P, *et al*. Development and validation of a method using supported liquid extraction for aldosterone determination in human plasma by LC-MS/MS [J]. *Clin Chim Acta: Int J Clin Chem*, 2015, 447: 8-15.
- [60] Matysik S, Liebisch G. Quantification of steroid hormones in human serum by liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1526: 112-128.
- [61] Xu W, Li H, Guan Q, *et al*. A rapid and simple liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the measurement of testosterone, androstenedione, and dehydroepiandrosterone in human serum [J]. *J Clin Lab Anal*, 2016, 46(6): 645-653.
- [62] Zhou H, Wang Y, Gatcombe M, *et al*. Simultaneous measurement of total estradiol and testosterone in human serum by isotope dilution liquid chromatography tandem

- mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(25): 5943-5954.
- [63] Ferreira M S, Arruda A M M, Pepi G T, *et al.* High sensitivity method validated to quantify estradiol in human plasma by LC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1064: 109-114.
- [64] Zhang Q, Han L, Wang J, *et al.* Simultaneous quantitation of endogenous estrone, 17 β -estradiol, and estriol in human serum by isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry for clinical laboratory applications [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(10): 2627-2638.
- [65] Hosokawa M, Shibata H, Ishii T, *et al.* A case of mature teratoma with a falsely high serum estradiol value measured with an immunoassay [J]. *J Pediatric Endocrinol Metab*, 2016, 29(6): 737-739.
- [66] Blue S W, Winchiell A J, Kaucher A V, *et al.* Simultaneous quantitation of multiple contraceptive hormones in human serum by LC-MS/MS [J]. *Contraception*, 2018, 97(4): 363-369.
- [67] Kolatorova S L, Chlupacova T, Vitku J, *et al.* Determination of selected bisphenols, parabens and estrogens in human plasma using LC-MS/MS [J]. *Talanta*, 2017, 174: 21-28.
- [68] Ohlson S, Kaur J, Raida M, *et al.* Direct analysis-no sample preparation-of bioavailable cortisol in human plasma by weak affinity chromatography (WAC) [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1061/1062: 438-444.
- [69] Van Faassen M, Bischoff R, Kema I P. Relationship between plasma and salivary melatonin and cortisol investigated by LC-MS/MS [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2017, 55(9): 1340-1348.
- [70] Li H, Ai L, Fan S, *et al.* Rapid determination of 18 glucocorticoids in serum using reusable on-line SPE polymeric monolithic column coupled with LC-quadrupole/orbitrap high-resolution mass spectrometer [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1065/1066: 79-86.
- [71] Ke Y, Gonthier R, Labrie F. Impact of sample extraction on the accurate measurement of progesterone in human serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1052: 110-120.
- [72] Soeborg T, Frederiksen H, Johannsen T H, *et al.* Isotope-dilution Turboflow-LC-MS/MS method for simultaneous quantification of ten steroid metabolites in serum [J]. *Clin Chim Acta: Int J Clin Chem*, 2017, 468: 180-186.
- [73] Fabresse N, Grassin-Delyle S, Etting I, *et al.* Detection and quantification of 12 anabolic steroids and analogs in human whole blood and 20 in hair using LC-HRMS/MS: application to real cases [J]. *Int J Legal Med*, 2017, 131(4): 989-999.
- [74] Menet M C, Hebert-Schuster M L, Lahlou N, *et al.* rFSH in medically assisted procreation: Evidence for ovarian follicular hyperplasia and interest of mass spectrometry to measure 17-hydroxyprogesterone and delta4-androstenedione in serum [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 450: 105-112.
- [75] Zang T, Tamae D, Mesaros C, *et al.* Simultaneous quantitation of nine hydroxy-androgens and their conjugates in human serum by stable isotope dilution liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017, 165(Pt B): 342-355.
- [76] Ke Y, Gonthier R, Simard J N, *et al.* A validated LC-MS/MS method for the sensitive quantitation of serum 7 α hydroxy-7 β hydroxy- and 7keto-dehydroepiandrosterone using a novel derivatization reagent [J]. *Steroids*, 2016, 108(4): 112-117.
- [77] Camip B, Frascarelli S, PietriE, *et al.* Quantification of dehydroepiandrosterone in human serum on a routine basis: Development and validation of a tandem mass spectrometry method based on a surrogate analyte [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(2): 407-416.
- [78] Wudy S A, Choi M H. Steroid LC-MS has come of age [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2016, 162: 1-3.
- [79] Tavitan N, Greaves R F. Systematic review of serum steroid reference intervals developed using mass spectrometry [J]. *Clin Biochem*, 2017, 50(18): 1260-1274.
- [80] 胡秋菊, 杨建云, 肖炳坤, 等. 衍生化技术用于生物基质中类固醇类激素分析的研究进展 [J]. *医药导报*, 2017, 36(5): 532-537.