

LCMS-8050CL 定量分析人血清中的甲状腺激素 T3 和 T4 含量

LCMSMS-603

摘要： 本文建立了一种使用岛津临床质谱 LCMS-8050CL 测定人血清中三碘甲状腺原氨酸 (T3) 和四碘甲状腺原氨酸 (T4) 的定量分析方法。使用同位素内标、标准样品及基质加标样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范围 T3: 0.26~5.06 ng/mL, T4: 4~200 ng/mL, 满足临床参考区间要求, 标准曲线相关系数均大于 0.9990, 方法准确度及精密度均可满足临床日常检验需求。该方法分析速度快, 灵敏度高, 专属性强, 前处理简单, 可为相关从业人员提供参考。

关键词： 临床质谱 LCMSMS 甲状腺素

甲状腺主要合成和分泌甲状腺素 (T4) 和三碘甲状腺原氨酸 (T3) 两种激素, T3 的活性大约是 T4 的 5 倍, 但含量较低, 这两种激素的生理功能主要为促进糖、蛋白质、脂肪等营养物质代谢, 调节生长发育过程; 提高大多数组织的耗氧量, 促进能量代谢, 增加产热和提高基础代谢。甲状腺疾病类型多样, 主要包括甲亢、甲减、甲状腺炎症、甲状腺肿和甲状腺肿瘤等。

甲状腺疾病在诊断、治疗过程中都需要定期进行甲状腺功能检测, 其检测指标主要包括: 血清总三碘甲状腺原氨酸 (TT3)、血清总甲状腺素 (TT4)、血清游离三碘甲状腺原氨酸 (FT3)、血清游离甲状腺素 (FT4) 和促甲状腺激素 (TSH)。其中血清 TT4 和 TT3 是判断甲状腺功能最基本的筛选试验。血清 TT4 和 TT3 浓

度增高主要见于甲状腺功能亢进, 血清 TT4 和 TT3 浓度降低主要见于甲状腺功能低下。检测手段方面目前临床多用免疫学方法对人体中 TT3 和 TT4 进行定量, 该方法的准确性和重复性较差, 因此为了进一步提高检测结果的准确性和可靠性, 岛津开发了 TT4 和 TT3 的 LC-MS/MS 定量方法。

本文参考中国医师协会检验医师分会临床质谱检验医学专业委员会的《液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证》, 在岛津 LCMS-8050CL 平台上建立了一种简单高效的液相色谱质谱法同时测定人血清中 TT4 和 TT3 的定量分析方法。血清样本经蛋白沉淀和引入同位素内标后, 加水适当稀释后进样分析, 内标法定量人血清中 TT4 和 TT3 含量。供相关检测人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津临床质谱 LCMS-8050CL, 具体配置如下:

输液泵: LC-30A CL	在线脱气机: DGU-20A _{5R} CL
自动进样器: SIL-30AC _{MP} CL	柱温箱: CTO-30AC CL
系统控制器: CBM-20A CL	工作站软件: LabSolutions Version 5.87

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱: Shim-pack Velox PFPP(50 mm × 2.1 mm × 1.9 μm),
货号: 227-32019-02

流动相: A 相 -0.1% 甲酸水, B 相 -0.1% 甲酸甲醇

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 40%, 时间程序见表 1

流速: 0.4 mL/min 进样器温度: 15°C

柱温: 45°C 进样量: 30 μL

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.01	60	40
0.2	60	40
1.4	5	95
2.4	5	95
2.5	60	40
3.0	60	40

质谱条件:

离子化模式: ESI(+)	离子源温度: 300°C
加热气: 空气 10.0 L/min	DL 管温度: 150°C
雾化气: 氮气 3.0 L/min	加热模块温度: 400°C
干燥气: 氮气 10.0 L/min	扫描模式: 多反应监测 (MRM)
驻留时间: 47 ms	MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

化合物	前体离子 > 产物离子	Q1 Pre	CE	Q3 Pre
T4	777.80>731.75	-38	-31	-38
T3-13C6	657.95>611.95	-34	-21	-30
T4-13C6	783.80>737.85	-22	-26	-40
T3	651.80>478.85	-32	-33	-23

1.3 样品制备和前处理

1.3.1 标准品

表 3 标准品信息

名称	CAS	品牌	MW
四碘甲腺原氨酸	51-48-9	LGC	776.87
四碘甲腺原氨酸- ¹³ C ₆	720710-30-5	Cerilliant	782.83
三碘甲状腺原氨酸	6893-02-3	Sigma	650.97
三碘甲状腺原氨酸- ¹³ C ₆	1213431-76-5	Cerilliant	656.93

1.3.2 样本制备

(1) 混标工作液: 分别称取 1 mg T3 和 T4 标准品于 10 mL 容量瓶, 用含 1% 甲酸的甲醇溶液定容得 0.1 mg/mL 浓度储备液, 之后取 10 μL T3 储备液和 400 μL T4 储备液于 10 mL 容量瓶, 用甲醇定容得含 0.1 μg/mL T3 和 4 μg/mL T4 混标工作液;

(2) 内标工作液: 分别移取 T3-¹³C₆ 和 T4-¹³C₆ 标准品于试剂瓶中加入含 0.1% 甲酸的甲醇溶液得到内标工作液 (T3-¹³C₆ 为 1.5 ng/mL, T4-¹³C₆ 为 50 ng/mL);

(2) 校准品: 将 T3&T4 混标工作液加入到含 1%BSA 的 1xPBS 溶液得到 6 个系列浓度的校准品;

(3) 质控品: 将 T3&T4 混标工作液加入到混合人血清中得到 3 个系列浓度的质控品。

1.3.3 样本前处理

(1) 移取 50 μL 校准品 / 质控品 / 待测血清样本于 1.5 mL 离心管;

(2) 加入 200 μL 内标工作液于 2000 rpm 涡旋混合 1 min;

(3) 10000 rpm 4°C 离心 5min;

(4) 取 100 μL 上清于进样小瓶并加入 200μL 纯水混匀;

(5) 上机后自动进样器以 30 μL 进样分析。

实验结果

2.1 临床参考区间

表 4 临床参考区间 (免疫发光法)

检测指标	摩尔浓度	质量浓度
血清总 T3	1.01~2.48 nmol/L	0.65~1.60 ng/mL
血清总 T4	69.97~152.52 nmol/L	54.6~118.97 ng/mL

2.2 线性关系

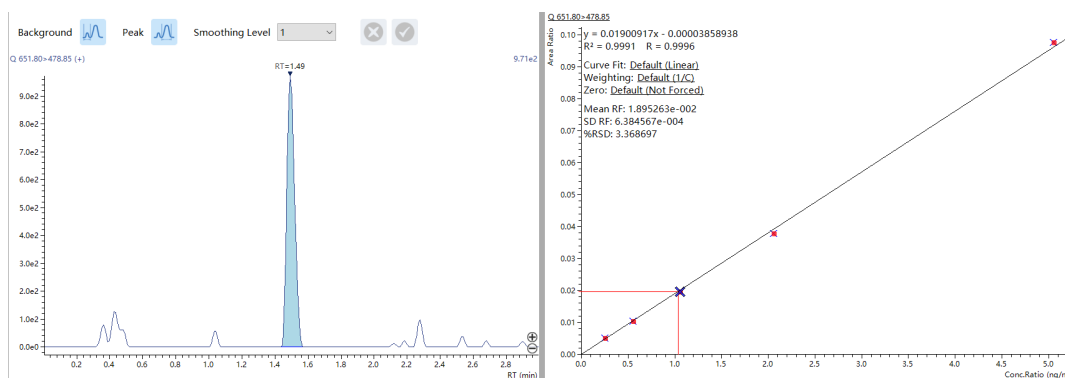


图 1 T3 STD-3 色谱图 & T3 标准曲线

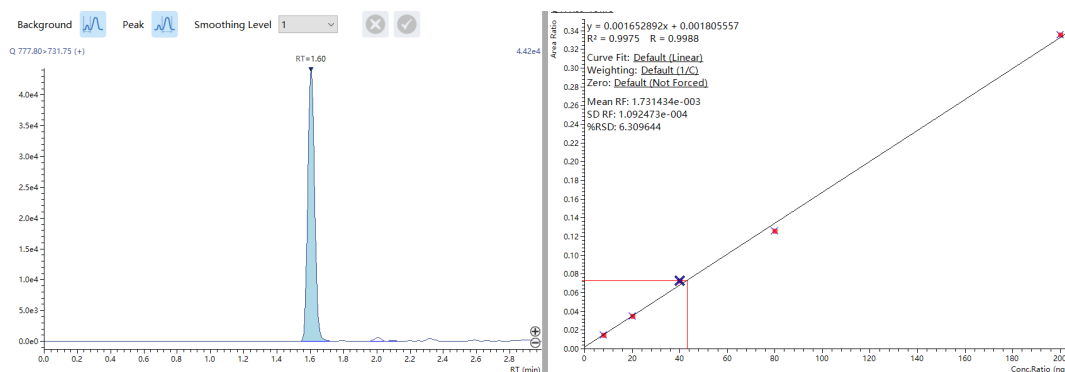


图 2 T4 STD-3 色谱图 & T4 标准曲线

标准浓度校准品 (T3 为 0.26、0.56、1.06、2.06 和 5.06 ng/mL; T4 为 4、20、40、80 和 200 ng/mL) 按 1.3.3 中前处理条件进行分析测定, 以浓度比为横坐标, 面积比为纵坐标, 内标法制作校准曲线得到的线性方程、相关系数及线性范围见表 5。

表 5 标准曲线参数

#	名称	线性方程	相关系数	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)
1	T3	$f(x)=0.01900917*x-0.00003858938$	$r=0.9996$	0.26-5.06	96.8~105.5
2	T4	$f(x)=0.001653930*x+0.001723166$	$r=0.9990$	4-200	93.8~107.8

2.3 精密度 & 准确度实验

本实验分别对低、中、高三个浓度的 T3 和 T4 正常人血清基质加标样 (质控品) 进行 5 次重复测定, 精密度相对标准偏差范围分别在 6.6%~13.0% (T3) 和 0.8%~5.6% (T4) 之间, 准确度度相对标准偏差范围分别在 8.0%~14.2% (T3) 和 -0.4%~-8.0% (T4) 之间, 满足临床检测要求, 数据结果见附录表 6 和表 7。

表 6 T3 精密度 & 准确度结果 (n=5)

Sample	Mean(ng/mL)	%RSD	Target(ng/mL)	%Dev
LQC	0.74	13.0	0.69	8.0
MQC	1.15	7.8	1.02	12.4
HQC	4.47	6.6	3.91	14.2

表 7 T4 精密度 & 准确度结果 (n=5)

Sample	Mean(ng/mL)	%RSD	Target(ng/mL)	%Dev
LQC	49.23	5.6	53.53	-8.0
MQC	67.40	3.3	70.97	-5.0
HQC	198.40	0.8	199.14	-0.4

2.4 定量限色谱图

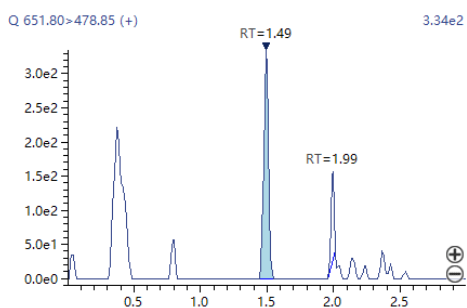


图 3 0.26 ng/mL T3 色谱图 (1%BSA 基质)

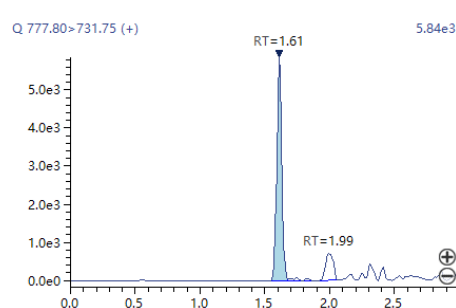


图 4 4 ng/mL T4 色谱图 (1%BSA 基质)

■ 结论

使用岛津临床质谱 LCMS-8050CL 建立了检测人血清中三碘甲腺原氨酸 (T3) 和四碘甲腺原氨酸 (T4) 的定量分析方法。方法线性范围 T3: 0.26~5.06 ng/mL, T4: 4~200 ng/mL, 涵盖临床参考区间, 线性宽度高于免疫方法, 标准曲线的相关系数均大于 0.9990。对 T3 和 T4 低、中、高不同浓度的质控品进行精密度和准确度实验, 结果表明 T3 和 T4 精密度相对标准偏差均在 $\pm 13.0\%$ 以内, 准确度相对标准偏均在 14.2% 以内, 满足临床检测要求。

岛津应用云

