

使用 Agilent 6490 三重四极杆液质联用系统高灵敏度测定人血清中的三种甲状腺激素

应用简报

作者

Rory Doyle 和 Kevin McCann
安捷伦科技公司
Santa Clara, CA USA

摘要

将 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统与配置安捷伦喷射流离子聚焦 (AJS) 技术的 Agilent 6490 三重四极杆液质联用系统联用，建立了血清中游离和总甲状腺激素的快速定量方法。游离甲状腺激素的样品前处理只需简单的过滤，而总甲状腺激素的前处理则采用液液萃取。本方法的分析时间仅需 6.5 分钟，且在 0.5 到 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围内线性良好。



Agilent Technologies

前言

许多临床研究实验室都非常关注甲状腺激素水平的测定。甲状腺素（3,5,3',5'-四碘甲状腺原氨酸，又称 T4）是甲状腺激素活性更强形式的三碘甲状腺原氨酸（3,3',5-三碘甲状腺原氨酸，又称 T3）的前体。反三碘甲状腺原氨酸（3,3',5'-三碘甲状腺原氨酸，又称 rT3）则是甲状腺激素的非活性形式（图 1）。在血液中循环的大多数甲状腺激素都与转运蛋白相结合。只有非常少量的循环甲状腺激素是游离（非结合）状态的，具有生物活性。因此，测定极低浓度的这三种游离甲状腺激素对了解其在人体中的作用非常重要。

本应用简报报导了将 1290 Infinity 液相色谱系统与配置 AJS 技术的 6490 三重四极杆液质联用系统联用，采用正离子电离模式建立了高灵敏度、准确测定血清中游离和总甲状腺激素的方法。该方法采用串联质谱 (MS/MS) 和多反应监测 (MRM)，在 0.5 到 1000 pg/mL 范围内线性良好，游离甲状腺激素的定量下限 (LLOQ) 范围为 1 到 5 pg/mL，总甲状腺激素为 0.5 到 2.5 pg/mL。

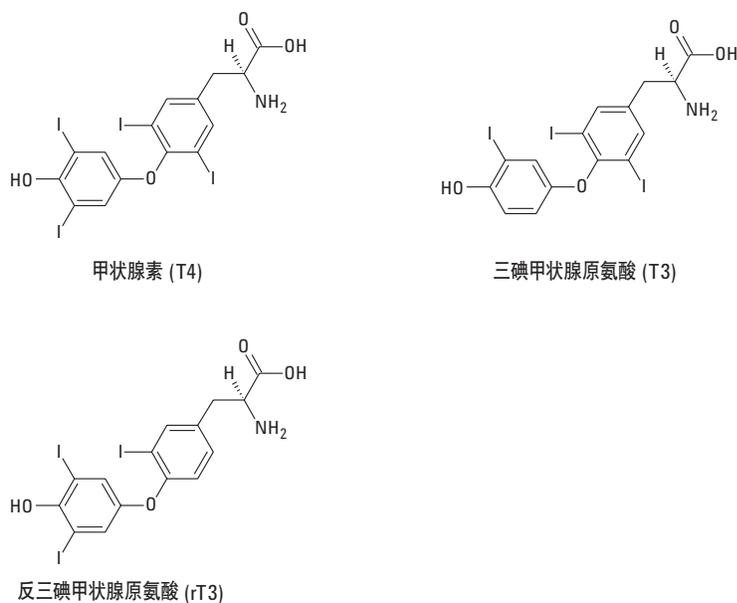


图 1. 人血清中存在的三种形式的甲状腺激素

实验部分

试剂和标样

用 50:50 甲醇:30% 氢氧化铵配制 T4、T3、rT3 及其 ^{13}C 标记的内标 (购自 IsoSciences) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 储备液。于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存。用甲醇稀释储备液来配制工作溶液。使用加入超低量激素和类固醇的血清 (购自 Golden West Biologics) 与不同量的储备液配制浓度范围 0.5 到 1000 pg/mL 的校正标准液。5 ng/mL 标记的内标混合液用甲醇配制。标准参比物 (SRM 971) 购自美国国家标准与技术研究院 (NIST)。

仪器

本方法采用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统与 Agilent 6490 三重四极杆液质联用系统建立, 后者配置 AJS, 采用正离子模式。表 1 列出了仪器条件, 6490 三重四极杆液质联用系统的采集参数见表 2。

表 1. 液相色谱和质谱仪器条件

液相色谱条件	
分析柱	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0 mm \times 100 mm \times 2.7 μm (部件号: 695975-302)
柱温	20 $^\circ\text{C}$
进样量	20 μL
流动相	A = 0.1 % 醋酸水溶液, B = 乙腈
梯度程序	30 % B 0.0 分钟 50 % B 5.0 分钟 98 % B 5.1 分钟 98 % B 5.4 分钟 30 % B 5.5 分钟
运行时间	6.5 分钟
流速	0.3 mL/min
后运行时间	1.5 分钟
质谱条件	
采集模式	安捷伦喷射流离子聚焦, 正离子电离, MRM
鞘气温度	N_2 , 225 $^\circ\text{C}$
鞘气流速	11 L/min
干燥气温度	N_2 , 125 $^\circ\text{C}$
干燥气流速	16 L/min
雾化器气体压力	N_2 , 55 psi
喷嘴电压	2000 V
毛细管电压	4000 V
碰撞池加速器电压	2 V
Delta EMV	500 V
四极杆 1/2 分辨率	0.7

表 2. 甲状腺激素化合物的保留时间和采集参数 (*离子对)

保留时间 (分钟)	化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时间 (毫秒)	碰撞能量 (V)
5.1	T4	777.7	731.7	50	21
5.1	T4*	777.7	604.9	50	39
5.1	T4- $^{13}\text{C}_6$	783.7	737.7	50	25
4.2	T3	651.8	478.9	50	39
4.2	T3*	651.8	605.8	50	20
4.2	T3- $^{13}\text{C}_6$	657.8	611.8	50	19
4.5	rT3	651.8	507.8	50	19
4.5	rT3*	651.8	605.8	50	20
4.5	rT3- $^{13}\text{C}_6$	657.8	611.8	50	19

样品前处理

测定游离甲状腺激素所用的校正溶液和标准参比物样品通过 Amicon Centrifuge YM-30 过滤器制得。将 500 μL 血清放入 Amicon Centrifuge YM-30 过滤器中，高转速下离心 2 小时。将 300 μL 滤液转移至干净的微量离心管中，加入 30 μL 内标，然后进行涡旋混合。加入 300 μL 乙腈，涡旋混合 1 分钟，然后高转速离心 10 分钟。将上清液转移至 96 孔板中。

对这些样品分别用醋酸乙酯进行液液萃取 (LLE) 测定总甲状腺激素。取 200 μL 样品置于试管中，加入 20 μL 内标和 400 μL 乙腈，然后进行涡旋混合。1.2 混合液中加入 1.2 mL 醋酸乙酯，涡旋混合 60 秒。以 13000 rpm 离心该试管 10 分钟，将有机相转移到干净试管中，然后进行蒸发。干燥后的样品用 120 μL 75:25 水:乙腈复溶。

结果与讨论

方法性能

由于 MRM transition 技术的普遍使用，T3 和 rT3 的色谱分离也就极为重要。图 2 显示游离甲状腺素或总甲状腺素分析得到的三种形式甲状腺激素均实现了基线分离。

校正曲线线性良好，在 0.5 到 1000 pg/mL 范围内的变异系数 (R^2) ≥ 0.990 。与总甲状腺素相比，游离甲状腺素的 R^2 值略高 (图 3)。

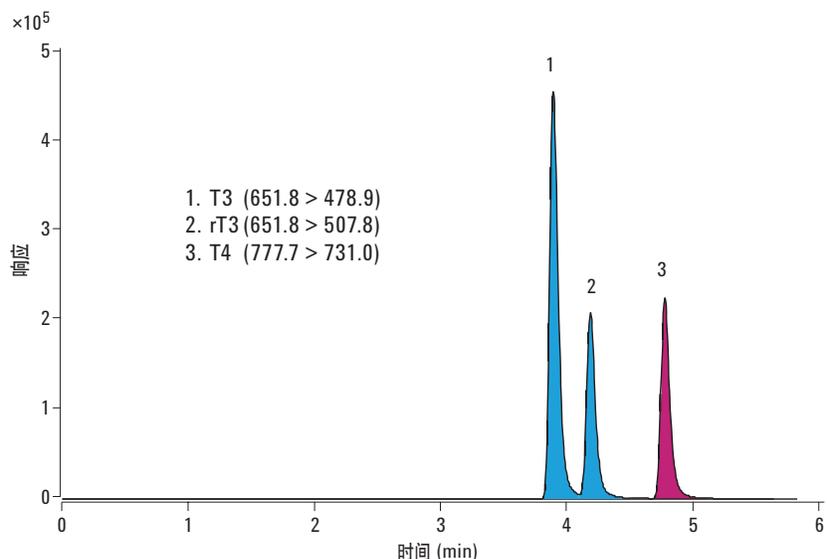


图 2. 对从人血清样品中提取的三种甲状腺激素的色谱分离

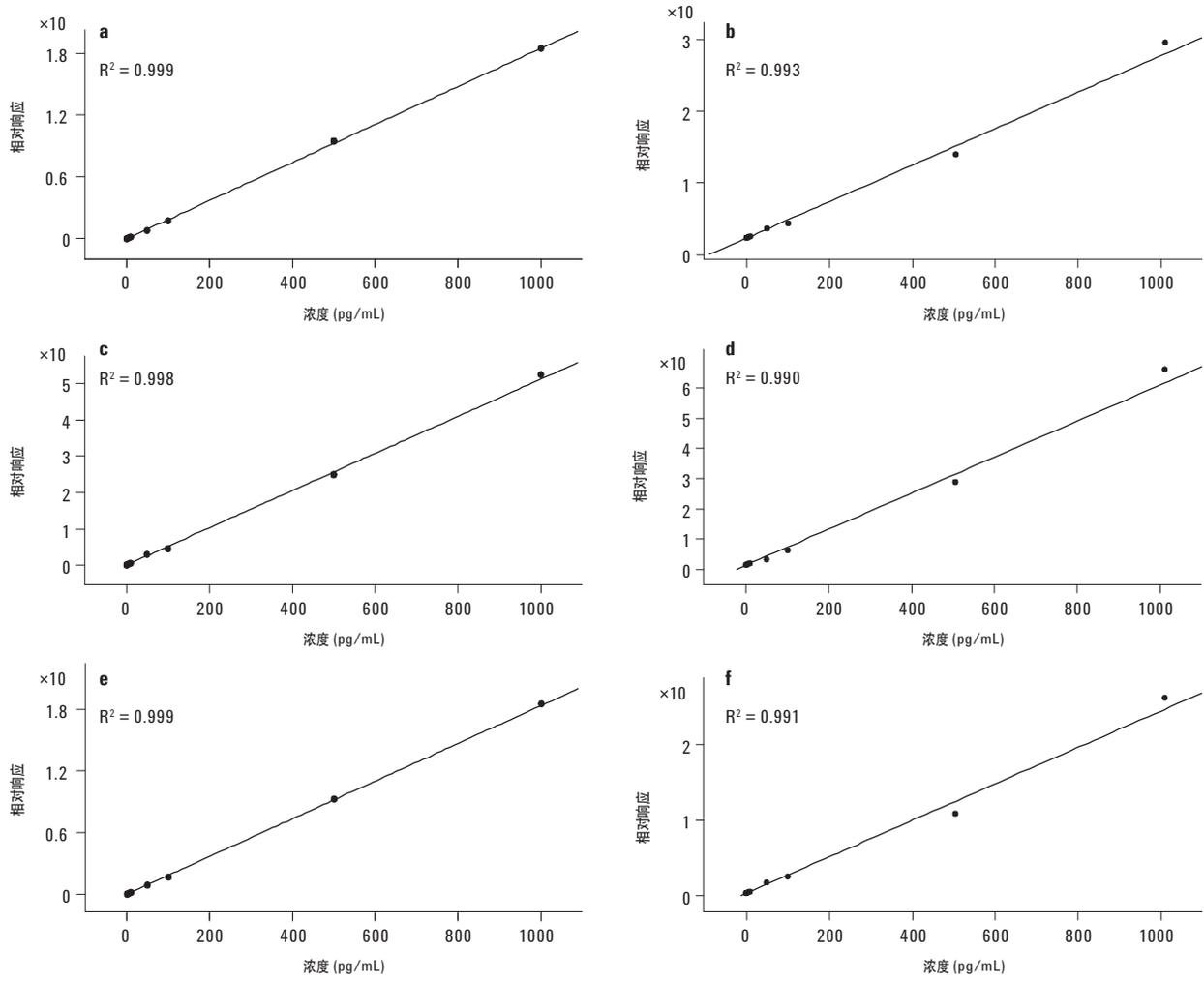


图 3. 游离/总 T4 (a,b)、T3 (c,d)、rT3 (e,f) 的校正曲线

方法灵敏度高，游离激素的 LLOQ 范围为 1 到 5 pg/mL，总甲状腺素为 0.5 到 2.5 pg/mL（表 3）。游离和总甲状腺素的色谱图表明，可以对极低浓度的分析物进行定量测定（图 4）。

结论

建立了同时分析血清中甲状腺素 (T4)、3,3',5-三碘甲状腺原氨酸 (T3) 和 3,3',5'-三碘甲状腺原氨酸 (rT3) 的高灵敏度而特异的 LC/MS/MS 方法。测定低 pg/mL

水平的游离甲状腺激素需要进行简单的过滤前处理，而测定总甲状腺需要进行液液萃取。

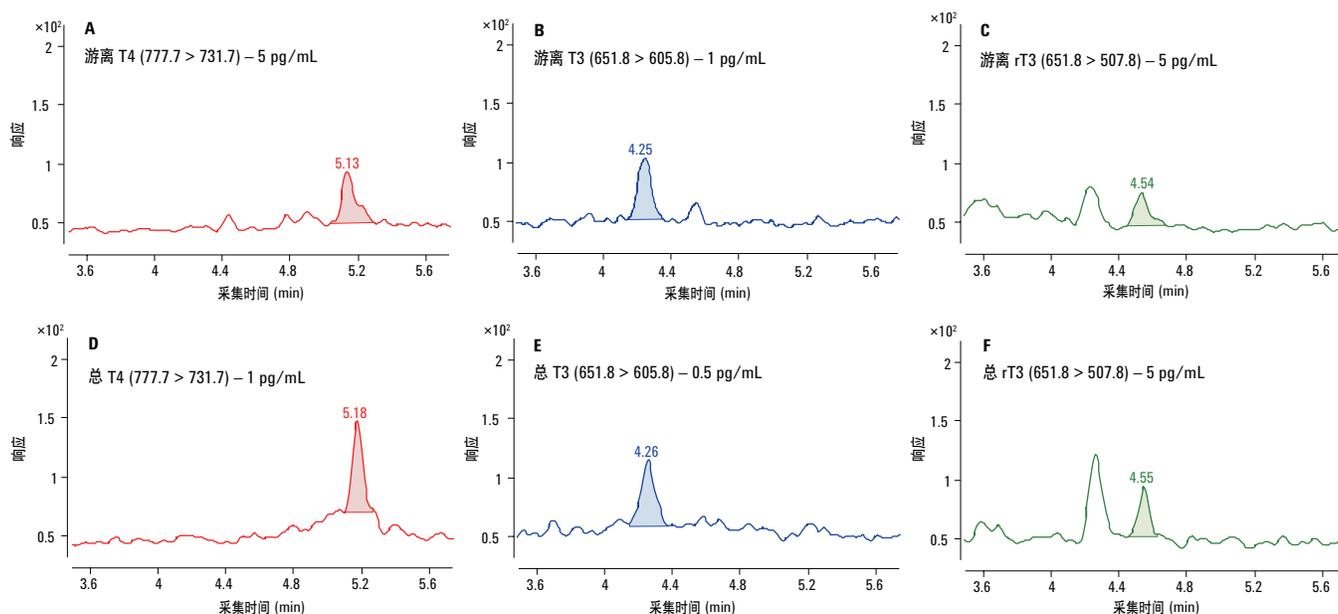


图 4. LLOQ 浓度的游离和总甲状腺素的 MRM 图谱

表 3. 人血清甲状腺激素的 LLOQ

分析物	游离 LLOQ (pg/mL)	总 LLOQ (pg/mL)
T4	5	1
T3	1	0.5
rT3	5	2.5

www.agilent.com/chem/Q00

本资料仅限研究使用，不可用于诊断目的。

© 安捷伦科技公司, 2013
2013 年 3 月 29 日, 中国印刷
5991-2017CHCN