

• 论 著 •

ICP-MS 法测定人全血中 19 种微量元素的性能评价及临床应用*

李 悦,豆小文,纪 翔,熊 丹,王萌萌,宗曾艳,陈大洋,张秀明[△]

(深圳市罗湖医院集团医学检验实验室/深圳大学第三附属医院医学检验科,广东深圳 518001)

摘 要:目的 评价电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)检测人全血中 19 种微量元素[钙(Ca)、镁(Mg)、铁(Fe)、铜(Cu)、锌(Zn)、铬(Cr)、硒(Se)、钼(Mo)、锰(Mn)、锂(Li)、锶(Sr)、铅(Pb)、镉(Cd)、汞(Hg)、铋(Bi)、钒(V)、砷(As)、钴(Co)、铊(Tl)]的分析性能,并探讨该方法在检测孕妇 19 种微量元素中的临床应用价值。方法 对 ICP-MS 法检测人全血中 19 种微量元素的正确度、精密度、检出限、定量限、线性范围、稳定性进行验证,并与公认的质量指标或厂家声明的性能指标相比较。同时,对该院 2019—2020 年 358 例孕妇全血标本中微量元素的水平进行检测,采集肝素钠抗凝静脉血稀释 40 倍后利用 ICP-MS 测定,并比较非高龄组孕妇(<35 岁)、高龄组孕妇(≥35 岁)及妊娠早期组(<13 周)、妊娠中晚期组(≥13 周)孕妇的 19 种微量元素水平差异。结果 19 种微量元素的靶值在计算的验证区间内,正确度验证通过;批内和总变异系数(CV)均≤15%,表明该方法的精密度验证符合要求;定量限满足检测要求,相对偏倚及 CV 均≤15%;19 种微量元素水平与相对响应比值具有良好的线性关系($r \geq 0.995$);通过对标本稳定性的验证发现,检测微量元素的标本可在冷藏(2~8℃)存放 5 d、室温(20~26℃)存放 3 d 的条件下满足检测需求,与全血标本一般保存要求一致。利用该方法对临床标本研究发现,高龄组孕妇与非高龄组孕妇血液中 Mg、Tl 元素水平差异有统计学意义($P < 0.05$),妊娠早期组和妊娠中晚期组孕妇血液中的 Mg、Cu、Mn、Co 元素水平差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 ICP-MS 在检测人全血中 19 种微量元素时具有良好的分析性能,该检测方法具有精密度高、准确度好、线性范围宽,以及临床标本测定结果准确、可靠等优势,可用于临床多种微量元素高通量快速测定。年龄和孕周是导致孕妇体内部分微量元素水平产生差异的重要影响因素,因此,定期监测微量元素有助于临床了解并研究孕期女性的营养状况,辅助识别相关疾病,并且指导孕妇对微量元素进行合理的补充。

关键词:电感耦合等离子体质谱法; 微量元素; 性能评价

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.20.002 中图法分类号:R446.1

文章编号:1673-4130(2020)20-2438-08 文献标识码:A

Performance evaluation and clinical application of ICP-MS method for the determination of 19 trace elements in human blood*

LI Yue, DOU Xiaowen, JI Xiang, XIONG Dan, WANG Mengmeng, ZONG Zengyan, CHEN Dayang, ZHANG Xiuming[△]

(Medical Laboratory of Luohu Hospital Group/Department of Clinical Laboratory of Third Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518001, China)

Abstract: Objective To evaluate and verify the methodological performance of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) in the detection of 19 trace elements (Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Cr, Se, Mo, Mn, Li, Sr, Pb, Cd, Hg, Bi, V, As, Co, Tl) in whole blood. The clinical value of monitoring these 19 trace elements in pregnant women was also explored. **Methods** The detection accuracy, quantitative limit, precision, detection limit, linear range as well as stability of this method for these 19 trace elements were investigated, which were then compared with accepted quality indices and manufacturer-declared performance indices. Additionally, whole blood samples from 358 pregnant women from 2019 to 2020 were analyzed by this method to investigate its efficacy in practical work. These samples were collected in heparin sodium anticoagulant coated tube and diluted for 40 times to meet the requirement for ICP-MS detection. The levels of 19 trace elements in non elderly

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81772921);深圳市基础研究自由探索项目(JCYJ20180306172209668);深圳市卫生和计划生育委员会学科建设能力提升项目(SZXJ2017018);深圳市医疗卫生三名工程(SZSM201601062)。

作者简介:李悦,女,技师,主要从事临床生化检验与质谱分析方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: zxm0760@163.com。

本文引用格式:李悦,豆小文,纪翔,等. ICP-MS 法测定人全血中 19 种微量元素的性能评价及临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(20): 2438-2444.

group (lower than 35 years old), elderly group (higher than 35 years old), early pregnancy group (lower than 13 weeks) and late pregnancy group (higher than 13 weeks) were compared. **Results** The verification interval of 19 trace elements all included the target values, and the accuracy was verified. The intra-batch and intra-lab total CV were both lower than 15%, which means the precision of this method matched request. The limits of detection (LOD) also fulfilled the requirement of clinical testing and the Bias and CV of them were all lower than 15%. The concentration and the ratio of relative intensity existed a linear relationship for all 19 trace elements ($r \geq 0.995$). Whole blood samples for elemental analysis through ICP-MS could be stored for 5 days at 2—8 °C, and for 3 days at room temperature (20—26 °C), which was consistent with the routine practice. With this method, the Mg, Cu, Mn and Co levels in samples had statistical differences ($P < 0.05$) between the women in early and in late pregnancy group. Meanwhile, the levels of Mg and Tl were statistical different ($P < 0.05$) between the non elderly group and elderly group. **Conclusion** The ICP-MS method evaluated in this study displays excellent performance by its high precision, good accuracy, wide linear range, accurate and reliable clinical sample results. Age and gestational age are important factors that lead to the difference of some trace elements in pregnant women. By investigating the clinical samples using this method, the results indicate that the periodical element testing for pregnant women could help monitoring the nutritional status and studying the elemental related diseases in practice, and also have values in the guidance of nutritional supplementation.

Key words: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry; trace element; performance evaluation

微量元素是人体生长代谢必不可少的重要组成部分,参与多种酶、激素、维生素和核酸等代谢过程,影响诸多疾病的发展和进程。了解人体内微量元素缺乏或蓄积中毒情况,可辅助临床制订诊疗方案,为特殊人群提供准确、快速的诊断依据。孕妇是最易发生微量元素缺乏的人群之一,主要由于胎儿需要从母体吸取更多的营养物质,因此微量元素的监测可作为评估孕妇营养状态的一项重要指标。CHOI 等^[1]通过研究发现,孕妇与一般人群相比,血液中的铜(Cu)和钴(Co)水平偏高,锌(Zn)、硒(Se)水平则偏低,并且 Cu 水平偏低与子痫前期患病率相关,维持 Cu 和 Zn 的最佳水平可降低自然流产率^[2]。Fe 和 Zn 水平降低合并有毒重金属元素存在时是先兆流产的重要诊断依据和预后评价指标^[3]。近年来有研究显示,妊娠早期血清低水平 Cu 元素可能导致妊娠高血压的患病风险升高^[4]。此外,孕妇体内微量元素的缺乏会引起免疫力下降、睡眠质量差、贫血等症状,甚至导致胎儿畸形等严重后果^[5],最终影响妊娠结局。因此,定期进行体内微量元素水平监测,有助于评估临床孕期女性的营养状况,辅助诊断与元素过量或缺乏相关的疾病,指导孕妇合理补充微量元素。

目前微量元素检测方法诸多,包括溶出伏安法^[6]、X 射线荧光法^[7]、中子活化分析法^[8]、原子吸收光谱法(AAS)^[9]、电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)^[10]等。其中 ICP-MS 将电感耦合等离子体的高温电离特性与四极杆的灵敏快速筛选扫描的优点相结合,具有超高灵敏度、多元素高通量检测等优势,可在几分钟内定量测定几十种元素,是现阶段研究人体元素含量最有效的工具之一,广泛应用于各类疾病的金属组学研究中。徐凤仙等^[11]研究妊娠期女性 5 种

微量元素在不同孕期的差异,曹清芸等^[12]采用大样本量对不同孕期和年龄的孕妇的 5 种微量元素进行统计分析,指出需要重视孕期合理补充微量元素。但目前关于孕妇血液中 19 种微量元素的研究则鲜有报道。本研究参考美国临床和实验室标准协会(CLSI) EP 系列文件和质谱应用共识对 ICP-MS 检测 19 种微量元素的性能进行评价^[13-14]。此外,为了解孕妇体内微量元素的代谢特征,本研究对 358 例孕妇的微量元素进行分析,比较孕妇不同年龄段和不同孕期 19 种微量元素结果的差异,为孕妇微量元素的监测提供重要依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019—2020 年在本院产科门诊或妇科门诊就诊的孕妇 358 例作为研究对象,排除心、肝、肺等器质性疾病。孕妇年龄 19~43 岁,中位年龄 30 岁。根据年龄分为非高龄组孕妇(< 35 岁)285 例和高龄组孕妇(≥ 35 岁)73 例;按照孕周分为妊娠早期组(< 13 周)276 例和中晚期组(≥ 13 周)82 例。分析不同组别孕妇 19 种微量元素[锂(Li)、镁(Mg)、钙(Ca)、铬(Cr)、锰(Mn)、铁(Fe)、Cu、Zn、Se、锶(Sr)、钼(Mo)、镉(Cd)、汞(Hg)、铅(Pb)、钒(V)、Co、砷(As)、铊(Tl)、铋(Bi)]水平的差异。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 ICP-MS 仪(美国安捷伦公司,Agilent 7900),超纯水机(法国威立雅公司,PURELAB Chorus 1),自动进样器(美国 Teledyne CETAC, ASX-560),多管漩涡混合仪(杭州奥盛仪器有限公司,MTV-100),高纯氩气($\text{Ar} > 99.999\%$)和氦气($\text{He} > 99.999\%$,深圳高发气体),超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司,AS7240A)。肝素钠专用微量

元素采血管(广州阳普医疗科技股份有限公司, 2 mL)。

1.2.2 试剂 65%硝酸(MERCK, LC-MS 级), 曲拉通 X-100 和金离子标准溶液(Macklin, 微量元素级别), 多种微量元素标本稀释液(含质控、标准曲线和内标, 杭州佰勤医疗器械有限公司), 调谐液(美国安捷伦公司), 实验用水由超纯水机制备(高纯水电阻率为 $18\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$)。

1.2.3 仪器工作条件 等离子体气体 15 L/min , 辅助气体 1 L/min , 雾化气 1 L/min , 补偿/稀释气体 1 L/min , 雾化室温度 $2\text{ }^{\circ}\text{C}$; IF/BK 真空度 $1.99\text{E}+2\text{ Pa}$, 射频功率 $1\,550\text{ W}$, 八级杆偏转电压为 -18 V , 采样深度 8 mm ; 校准方法采用标准加入模式, 分别选用钪(Sc)、钇(Y)、铑(Rh)、铟(In)、铽(Tb)为内标元素。

1.3 方法 采集孕妇静脉血 2 mL 至微量元素专用肝素钠抗凝采血管中, 标本稀释后即可进行 ICP-MS 分析。

1.3.1 标本测定 打开仪器, 待真空度达到要求, 用调谐液调谐仪器各项指标, 包括灵敏度、稳定性、背景、离子透镜调谐参数等, 确保仪器各方面指标达到要求, 再进行批处理前调谐, 使响应计数、相对标准偏差(RSD%)、氧化物、双电荷、分辨率等均达到要求, 将制备好的标液、质控、标本依次编号测定。取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 充分混匀的血样或质控品加入 $3\,900\text{ }\mu\text{L}$ 标本稀释液, $3\,000\text{ r/min}$ 振荡 10 min 后进行 ICP-MS 分析。

1.3.2 方法学评价 实验操作人员必须经过专业的仪器和项目培训, 熟练掌握仪器的使用、维护, 熟悉仪器各方面性能指标, 按照《ISO15189:2012 医学实验室质量和能力认可准则》的要求建立质量管理体系, 对仪器进行定期校准、调谐和维护, 规范工作流程, 做好实验室各环节的质量控制, 保证结果准确可靠。

1.3.3 正确度 参考 EP15-A3 文件^[13], 采用回收试验评价方法的正确度, 根据厂商提供的质控物, 选取 19 种微量元素低水平和高水平质控品混合血液标本, 每个水平标本平行测定 2 次, 连续分析 5 批($n=5$), 将制备好的样品由蠕动泵导入质谱仪, 按照文件中 1.3 和 1.4 项下条件测定, 计算高低水平 10 次结果的平均值($\bar{x}$)、标准差(s)和根据实验数据计算出的验证区间, 若厂家提供的靶值在验证区间内, 说明正确度验证通过, 若靶值不在验证区间内, 则正确度结果不能通过验证。

1.3.4 精密度 依据 EP15-A3 文件^[13], 选取高低两个质控水平平行测定 4 次($n=4$), 连续测定 5 d, 计算 19 种微量元素的 $\bar{x}$ 、批内变异系数(CV)、实验室内不精密度(S)和总 CV。批内 CV 和总 CV $\leq$ 厂家声明的要求(15%)为精密度满足要求。

1.3.5 检出限和定量限 依据质谱应用共识和 JJF 1159-2006 四极杆电感耦合等离子体质谱仪校准规范^[14-15], 吸取 21 份 4 mL 超纯水分别于 5 mL 的 Ep

管中。将第 1 份超纯水空白经 ICP-MS 测定后作为背景响应, 其余 20 份空白标本扣除第 1 份超纯水背景本底响应后, 计算 20 份超纯水测定结果的 3 倍标准偏差作为检出限(LOD)。定量限(LOQ)是以 10 倍的标准偏差和线性水平最低点进行评估, 而实际临床工作中结合临床参考范围, 为满足正确度和精密度要求, 将线性范围下限作为预估的定量限。将微量元素 LOQ 水平平行测定 10 次($n=10$), 计算 19 种微量元素的 LOQ 相对偏倚(Bias)和 CV。定量限的 Bias 在 $\pm 15\%$ 内, CV $\leq 15\%$ 为满足要求, 在此条件下, 计算 19 种微量元素的 LOD。

1.3.6 线性范围 选取多种微量元素基底液(L0)、标准曲线 L1~L6 标液(由低水平到高水平 6 个水平点)从 $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境取出恢复至室温, $2\,000\text{ r/min}$ 离心, 10 min 后直接进行 ICP-MS 分析, 以标准溶液中各化合物的峰面积与内标化合物的峰面积的比值(相对响应比率)为纵坐标, 以标准溶液中各化合物相应的水平为横坐标进行线性回归, 获得各元素的线性回归方程和相关系数。若相关系数 $r\geq 0.995$, 说明 19 种微量元素的水平与相对响应比率线性关系良好。

1.3.7 稳定性 稳定性对检测结果的可重复性、可靠性产生影响, 可采用高、低水平考察 19 种微量元素不同储存条件下的稳定性。根据临床血液标本水平和标准物质添加法制备高、低水平微量元素混合血液标本, 分别将低水平和高水平标本分装成 30 份, 每份 $100\text{ }\mu\text{L}$ 。将混合血液标本分别放置冷藏($2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 d)和室温($20\sim 26\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 d), 每种条件下每次分别取出 6 份($n=6$), 测定 19 种微量元素的低、高水平血液标本在冷藏条件下 1、3、5 d 和室温条件下 1、3 d 的结果, 将第 1 天测试的结果作为初始测定值, 计算 19 种微量元素的平均值, 与初始测定值比较, Bias $\leq 15\%$ 为符合要求。

1.4 统计学处理 采用 SPSS23.0 软件对数据进行分析, 正态分布计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验; 不符合正态分布计量资料采用中位数和四分位数间距 $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示, 组间比较采用非参数检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 正确度 19 种微量元素的正确度结果见表 1, 根据试验数据计算得出微量元素的验证区间, 结果显示厂家提供的靶值在验证区间内, 因此 ICP-MS 测定 19 种微量元素的正确度得到了验证, 结果符合要求。

2.2 精密度 ICP-MS 检测 19 种微量元素高、低两水平的批内 CV、实验室内 CV、S 和总 CV 结果见表 2, 批内和实验室内 CV $\leq 7.72\%$, 符合试剂盒厂商验证要求。

2.3 LOD 与 LOQ ICP-MS 测定 19 种微量元素的 LOD 与 LOQ 结果见表 3, LOQ 的 Bias $\leq 15\%$, CV $\leq$

13.46%, LOQ 结果满足要求, 在此条件下, 19 种微量元素 元素的 LOD 见表 3。

表 1 ICP-MS 检测 19 种微量元素的正确度结果 (n=5)

元素	低水平				高水平			
	$\bar{x}$	s	靶值	验证区间	$\bar{x}$	s	靶值	验证区间
Li($\mu\text{g/L}$)	21.64	1.25	21.85	15.83~27.45	44.48	3.33	46.58	30.87~58.10
Mg(mmol/L)	1.02	0.02	0.99	0.80~1.24	2.09	0.09	2.07	1.59~2.60
Ca(mmol/L)	0.92	0.03	0.93	0.71~1.13	1.97	0.08	1.96	1.49~2.44
Cr($\mu\text{g/L}$)	16.01	0.79	20.74	11.09~20.94	22.53	1.88	26.03	14.88~30.17
Mn($\mu\text{g/L}$)	18.28	0.47	19.53	13.91~22.62	38.27	1.70	38.77	28.76~47.78
Fe(mmol/L)	5.05	0.09	5.17	3.93~6.17	8.02	0.34	8.65	5.96~10.09
Cu($\mu\text{mol/L}$)	8.21	0.19	8.68	6.30~10.13	27.30	0.21	27.94	21.35~33.24
Zn($\mu\text{mol/L}$)	44.43	1.10	45.76	34.27~54.59	88.99	1.96	86.83	69.81~108.18
Se($\mu\text{g/L}$)	99.95	3.24	97.74	77.34~122.57	219.70	4.32	249.64	165.49~273.91
Sr($\mu\text{g/L}$)	27.54	0.90	27.47	21.19~33.88	54.38	0.90	55.48	42.37~66.39
Mo($\mu\text{g/L}$)	7.84	0.20	8.55	13.94~22.62	14.28	0.15	15.39	11.00~17.57
Cd($\mu\text{g/L}$)	10.09	0.30	10.20	7.78~12.41	16.95	0.45	17.39	13.06~20.85
Hg($\mu\text{g/L}$)	7.20	0.37	7.84	5.24~9.17	10.47	0.42	12.15	7.63~13.30
Pb($\mu\text{g/L}$)	45.87	1.58	50.81	34.24~57.51	97.67	2.11	117.36	72.14~123.20
V($\mu\text{g/L}$)	9.59	0.30	10.06	7.29~11.88	15.73	0.82	15.88	11.65~19.81
Co($\mu\text{g/L}$)	9.89	0.16	10.41	7.64~12.14	19.87	0.92	20.35	14.84~24.89
As($\mu\text{g/L}$)	16.67	0.82	17.17	12.37~20.98	24.34	0.46	28.42	18.19~30.49
Tl($\mu\text{g/L}$)	9.54	0.21	9.99	7.35~11.73	17.00	0.46	17.86	13.00~20.99
Bi($\mu\text{g/L}$)	9.09	0.24	10.00	6.87~11.30	12.69	0.38	15.37	9.27~16.12

表 2 ICP-MS 检测 19 种微量元素的精密度结果 (n=4)

元素	低水平			高水平		
	批内 CV(%)	总 CV(%)	S	批内 CV(%)	总 CV(%)	S
Li	6.07	5.87	1.25 $\mu\text{g/L}$	3.38	5.77	2.51 $\mu\text{g/L}$
Mg	1.75	1.76	0.02 mmol/L	1.72	4.01	0.08 mmol/L
Ca	1.55	2.4	0.02 mmol/L	1.7	4.27	0.08 mmol/L
Cr	3.9	7.72	1.24 $\mu\text{g/L}$	3.94	6.67	1.44 $\mu\text{g/L}$
Mn	3.44	4.58	0.84 $\mu\text{g/L}$	1.77	4.97	1.86 $\mu\text{g/L}$
Fe	1.13	1.83	0.09 mmol/L	2	4.6	0.36 mmol/L
Cu	1.56	1.92	0.16 $\mu\text{mol/L}$	2.65	4.72	1.30 $\mu\text{mol/L}$
Zn	1.33	1.93	0.83 $\mu\text{mol/L}$	2.7	3.94	3.53 $\mu\text{mol/L}$
Se	2.62	3.33	3.39 $\mu\text{g/L}$	2.42	4.85	11.14 $\mu\text{g/L}$
Sr	2.05	2.3	0.64 $\mu\text{g/L}$	1.38	3.56	1.96 $\mu\text{g/L}$
Mo	1.99	5.67	0.46 $\mu\text{g/L}$	3.06	6.13	0.92 $\mu\text{g/L}$
Cd	1.47	2.48	0.25 $\mu\text{g/L}$	1.99	4.74	0.81 $\mu\text{g/L}$
Hg	7.08	7.03	0.54 $\mu\text{g/L}$	2.96	5.34	0.57 $\mu\text{g/L}$
Pb	2.05	1.93	0.87 $\mu\text{g/L}$	3.05	4.49	4.41 $\mu\text{g/L}$
V	2.15	2.19	0.21 $\mu\text{g/L}$	2.47	4.73	0.74 $\mu\text{g/L}$
Co	2.58	3.26	0.32 $\mu\text{g/L}$	1.59	4.72	0.92 $\mu\text{g/L}$
As	2.6	2.73	0.46 $\mu\text{g/L}$	2.69	4.55	1.14 $\mu\text{g/L}$
Tl	2.74	2.82	0.26 $\mu\text{g/L}$	1.32	4.94	0.82 $\mu\text{g/L}$
Bi	2.5	2.3	0.21 $\mu\text{g/L}$	2.82	3.88	0.50 $\mu\text{g/L}$

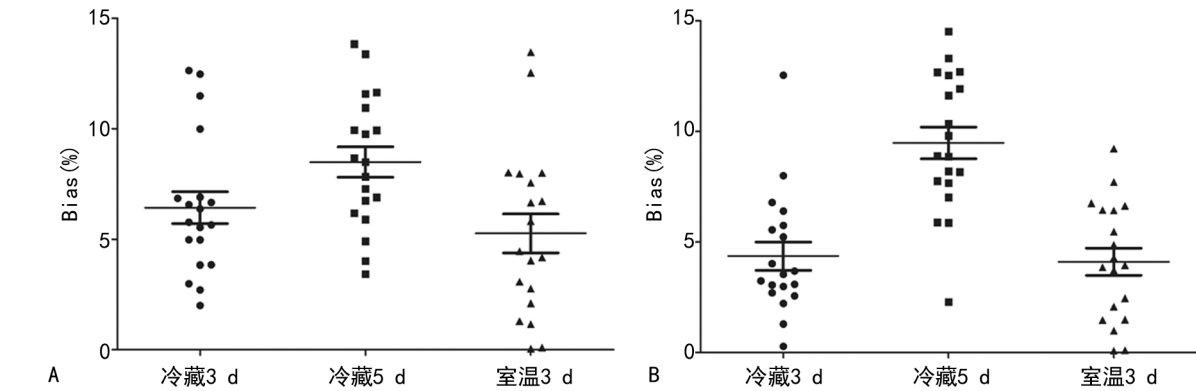
表 3 ICP-MS 测定 19 种微量元素的线性范围、LOD 和 LOQ 结果 (n=10)

元素	线性范围	r	LOD	预估 LOQ	测定均值	Bias(%)	CV(%)
Ca	0.003 125~0.125 mmol/L	0.999 8	0.000 2 mmol/L	0.003 1	0.003 2 mmol/L	2.26	6.44
Mg	0.002 075~0.083 mmol/L	0.999 9	0.000 1 mmol/L	0.002 1	0.002 2 mmol/L	4.03	5.43
Fe	0.013 4~0.535 7 mmol/L	1.000 0	0.006 2 mmol/L	0.013 4	0.014 5 mmol/L	8.22	4.95
Cu	0.078 75~3.150 μmol/L	0.999 3	0.002 9 μmol/L	0.078 8	0.088 6 μmol/L	12.51	3.68
Zn	0.152 7~6.106 9 μmol/L	0.999 4	0.061 0 μmol/L	0.152 7	0.171 7 μmol/L	12.46	5.89
Cr	0.5~20.0 μg/L	1.000 0	0.010 7 μg/L	0.500 0	0.541 9 μg/L	8.38	6.00
Se	1.25~50.00 μg/L	0.999 8	0.229 5 μg/L	1.250 0	1.319 0 μg/L	5.52	5.03
Mo	0.25~10.00 μg/L	1.000 0	0.016 7 μg/L	0.250 0	0.250 2 μg/L	0.09	4.49
Mn	0.5~20.0 μg/L	1.000 0	0.002 5 μg/L	0.500 0	0.518 0 μg/L	3.59	5.27
Li	0.5~20.0 μg/L	0.999 9	0.051 0 μg/L	0.500 0	0.562 0 μg/L	12.39	13.46
Sr	0.5~20.0 μg/L	0.999 9	0.013 6 μg/L	0.500 0	0.508 7 μg/L	1.74	4.35
Pb	0.5~20.0 μg/L	1.000 0	0.010 7 μg/L	0.500 0	0.530 6 μg/L	6.12	4.21
Cd	0.5~20.0 μg/L	1.000 0	0.089 9 μg/L	0.500 0	0.529 6 μg/L	5.91	4.87
Hg	0.25~10.00 μg/L	1.000 0	0.129 3 μg/L	0.250 0	0.240 1 μg/L	10.19	10.19
V	0.5~20.0 μg/L	1.000 0	0.011 3 μg/L	0.500 0	0.527 8 μg/L	5.56	4.98
Co	0.5~20.0 μg/L	0.999 9	0.009 1 μg/L	0.500 0	0.563 2 μg/L	12.64	4.96
As	0.5~20.0 μg/L	1.000 0	0.097 5 μg/L	0.500 0	0.514 5 μg/L	2.90	3.99
Tl	0.25~10.00 μg/L	1.000 0	0.012 0 μg/L	0.250 0	0.266 4 μg/L	6.58	4.31
Bi	0.5~20.0 μg/L	1.000 0	0.068 7 μg/L	0.500 0	0.515 8 μg/L	3.16	3.64

2.4 线性范围 ICP-MS 测定多种元素的线性范围结果见表 3,19 种微量元素的水平与相对响应比率具有良好的线性关系, $r\geqslant 0.995$ 。

2.5 稳定性 ICP-MS 测定 19 种微量元素的稳定性

结果见图 1,图中可见 19 种微量元素的 Bias $\leqslant 15\%$,因此检测微量元素的标本可冷藏保存 5 d、室温保存 3 d,水平未发生显著改变,满足实验室标本一般保存要求。



注:A 为低水平血液标本;B 为高水平血液标本。

图 1 ICP-MS 测定 19 种微量元素的稳定性 (n=6)

表 4 ICP-MS 测定 358 例孕妇 19 种微量元素水平的比较

组别	n	Ca[mmol/L, M(P ₂₅ ,P ₇₅)]	Mg(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	Fe[mmol/L, M(P ₂₅ ,P ₇₅)]	Cu[μmol/L, M(P ₂₅ ,P ₇₅)]	Zn[μmol/L, M(P ₂₅ ,P ₇₅)]	Cr[μg/L, M(P ₂₅ ,P ₇₅)]
非高龄组	285	1.58(1.51,1.64)	1.53±0.15	6.75(6.37,7.18)	21.10(19.02,22.97)	92.48(85.44,102.22)	0.33(0.00,0.86)
高龄组	73	1.58(1.52,1.64)	1.57±0.13	6.89(6.55,7.28)	21.14(18.49,23.41)	95.91(87.13,102.41)	0.32(0.00,0.85)
P		0.933	0.036	0.165	0.731	0.130	0.969
妊娠早期组	276	1.58(1.51,1.64)	1.56±0.15	6.80(6.50,7.23)	20.58(18.05,22.39)	94.59(85.94,102.84)	0.29(0.00,0.80)
妊娠中晚期组	82	1.57(1.51,1.63)	1.48±0.13	6.70(6.17,7.09)	22.29(20.62,24.41)	91.28(84.57,99.63)	0.49(0.00,1.02)
P		0.975	<0.001	0.091	<0.001	0.095	0.216

续表 4 ICP-MS 测定例孕妇 19 种微量元素水平的比较

组别	<i>n</i>	Se[μg/L, <i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅)]	Mo[μg/L, <i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅)]	Mn[μg/L, <i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅)]	Li[μg/L, <i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅)]	Sr[μg/L, <i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅)]	Pb[μg/L, <i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅)]
非高龄组	285	176.56(159.58,199.72)	0.93(0.76,1.14)	12.19(10.25,15.39)	0.40(0.65,0.75)	16.64(13.68,20.49)	9.69(7.74,12.90)
高龄组	73	179.69(161.50,201.64)	0.86(0.76,1.04)	12.45(10.10,14.30)	0.39(0.03,0.62)	15.11(12.91,19.06)	10.22(8.09,15.89)
<i>P</i>		0.306	0.132	0.968	0.597	0.059	0.294
妊娠早期组	276	178.58(160.90,200.67)	0.91(0.76,1.12)	11.83(10.04,14.40)	0.40(0.04,0.75)	15.85(13.22,20.07)	9.77(7.90,12.95)
妊娠中晚期组	82	172.83(157.88,197.01)	0.92(0.75,1.10)	13.75(10.97,16.36)	0.39(0.08,0.71)	17.81(14.00,22.65)	9.79(7.28,12.99)
<i>P</i>		0.092	0.691	0.001	0.975	0.060	0.619

组别	<i>n</i>	Hg[μg/L, <i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅)]	V[μg/L, <i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅)]	Co[μg/L, <i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅)]	As[μg/L, <i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅)]	Tl[μg/L, <i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅)]	Bi[μg/L, <i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅)]	Cd[μg/L, <i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅)]
非高龄组	285	1.67(1.20,2.57)	0.00(0.00,0.06)	0.10(0.07,0.17)	1.70(1.01,3.90)	0.05(0.04,0.08)	0.00(0.00,0.01)	1.03(0.80,1.33)
高龄组	73	1.73(1.07,2.82)	0.00(0.00,0.07)	0.10(0.06,0.17)	1.41(0.92,2.64)	0.05(0.03,0.06)	0.00(0.00,0.00)	0.93(0.72,1.23)
<i>P</i>		0.754	0.265	0.942	0.125	0.043	0.326	0.147
妊娠早期组	276	1.71(1.18,2.74)	0.00(0.00,0.06)	0.09(0.06,0.16)	1.55(1.01,3.21)	0.05(0.03,0.07)	0.00(0.00,0.01)	1.01(0.78,1.30)
妊娠中晚期组	82	1.59(1.13,2.26)	0.00(0.00,0.08)	0.13(0.09,0.26)	1.75(0.95,4.14)	0.05(0.04,0.08)	0.00(0.00,0.01)	0.99(0.80,1.32)
<i>P</i>		0.209	0.488	<0.001	0.600	0.051	0.778	0.963

2.6 临床标本分析 结果显示,非高龄组和高龄组 Mg、Tl 水平差异有统计学意义($P<0.05$),妊娠早期组和妊娠中晚期组 Mg、Cu、Mn、Co 水平差异有统计学意义($P<0.05$),其他元素在年龄和孕周分组间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

3 讨 论

本研究参考 ISO15189 和 CLSI EP 文件中关于检测方法性能验证的相关内容对 ICP-MS 测定 19 种微量元素的分析性能进行系统性的评价。19 种微量元素水平与相对响应比率在检测范围内具有良好的线性关系($r\geq 0.995$)。通过该方法正确度和精密度考察发现符合验证要求,在满足临床标本检测范围的前提下,LOQ 符合要求,ICP-MS 采用的标本冷藏和室温保存方法对 19 种微量元素标本进行检测具有良好的稳定性。此外,本研究以 Sc、Y、Rh、In、Tb 5 种元素作为内标,在标本处理中采用直接稀释法可满足简便、快速测定微量元素的要求,可有效避免复杂前处理可能带来的标本损失和引入污染^[16]。试验中所采用的标本量仅 100 μL,在 2 min 内即可实现临床标本中 19 种微量元素的高通量准确测定。

在研究过程中发现,由于部分微量元素在人体内水平较低,易受多种因素影响,因此做好分析前、中、后的质量控制对于保证检测结果真实、可靠至关重要。有研究证实,采血管的选取对微量元素结果影响很大,主要是由采血管材质、抗凝剂、采血管帽中元素的残留等造成的^[17]。有研究发现,检测前对实验室采血管进行本底值检测利于降低污染率^[18],若采血管中残留的目标元素低于血液微量元素最小值的 10%或低于 LOD 则符合使用要求。在对实际临床标本进行

检测的过程中还发现,Cr、Mo 及 Hg 3 种元素在检测中易残留,需采取措施来降低残留污染。本研究中采用的方法为在含有硝酸的洗针液中加入少量的金溶液和曲拉通,这有助于降低微量元素在清洗过程后的残留。试验过程发现 Cr 和 Mo 元素易受到外界环境干扰,本底空白的响应值增高可能影响质控和临床标本结果准确性,因此对这两种元素在临床标本中的含量进行测定时需要保证实验环境的洁净和无尘,并注意防潮,尽量避免引入外源性污染^[10]。

为了拓展 ICP-MS 在临床检测中的应用,本研究采用该方法对收集到本院的孕妇全血标本进行检测,通过对不同年龄段和不同孕期孕妇研究发现血液中 Mg 元素水平差异有统计学意义($P<0.05$)。高龄孕妇由于年龄较大,代谢速度有不同程度的降低,可能导致不同年龄段 Mg 元素的水平不同。从检测结果中可看出,处于妊娠中晚期的孕妇血液中 Mg 元素水平比妊娠早期略有降低,这可能是由于在妊娠中晚期胎儿在成熟过程中对 Mg 元素的需要量增加造成的,因此在妊娠中晚期需要适量增加一些富含 Mg 元素的食物,如蔬菜、坚果、谷类等的摄入。Tl 元素是人体非必需微量元素,传统的检测方法难以监测,本研究利用 ICP-MS 检测发现该元素在高龄组与非高龄组血液中的水平差异有统计学意义($P<0.05$),这种差异可能为不同年龄段孕妇体内的激素和代谢水平不同,或与环境接触污染及累积效应有关。有相关研究显示,随着工业的发展和人口的急剧增长,环境污染造成的体内重金属元素富集愈加严重,孕妇应避免接触重金属污染的环境,尤其是 As、Mn、Pb、Cd 等污染的地区^[19-20],因此对包括 Tl 在内的多种重金属元素

在孕妇体内的水平进行检测,对保证孕期女性和胎儿的健康至关重要。本研究同时发现,妊娠中晚期组体内 Cu 元素水平高于妊娠早期组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。有研究表明,妊娠期女性血液中的 Cu 元素水平明显高于非孕期,可能与妊娠期雌激素增高刺激肝脏合成铜蓝蛋白有关,或由于妊娠期典型的激素变化而导致胆道对 Cu 排泄减少^[21]。此外,本研究发现处于妊娠早期和中晚期的两组孕妇血液中 Mn 元素水平差异有统计学意义($P < 0.05$)。有文献报道孕妇处于临近分娩时体内的 Mn 水平明显高于妊娠早期^[22],这与本研究的数据一致。由于 Mn 是人体必需微量元素,主要来源于食物、环境等,负责碳水化合物、氨基酸和胆固醇的正常代谢,孕期母体 Mn 元素的缺乏会导致新生儿发生支气管哮喘、软骨发育不良等后果,而过量的 Mn 元素则可能导致孕妇头晕、乏力等症状,因此定期监测 Mn 元素是否存在缺乏或过量对孕妇的健康至关重要。本研究发现,妊娠早期与妊娠中晚期的女性体内的 Co 元素水平差异有统计学意义($P < 0.05$),妊娠中晚期高于妊娠早期,这与文献报道的结果一致^[1]。Co 是维生素 B₁₂ 的重要组成部分,能通过影响肾脏释放促红细胞生成素,刺激红细胞生成,是一种独特的营养物质,与体内激素和代谢物质有关,Co 的过量摄入会导致呼吸困难、全身疲倦等。此外,孕妇在妊娠期不同阶段对微量元素的需求有所不同,这就需要通过精准、快速、准确的微量元素检测结果作为依据,从而为孕妇提供个性化的微量元素摄入指导,提示孕产妇应对自身营养进行合理补充,必要时进行药物干预。

4 结 论

综上所述,ICP-MS 在检测人全血中 19 种微量元素时具有良好的分析性能,具有精密度高、准确度好、线性范围宽,以及临床标本结果测定准确、可靠等优势,可用于大批量临床标本的检测。本研究发现年龄和孕周是导致孕妇体内部分微量元素水平产生差异的重要影响因素,探讨孕妇微量元素的水平变化有利于指导合理、及时补充微量元素,避免微量元素缺乏或过量中毒,降低妊娠期疾病和胎儿不良结局的发生率,对产前诊断具有重要价值。本研究中孕期女性微量元素水平检测的对象主要来自深圳市罗湖区,虽然对不同孕期和年龄的研究对象进行了研究但仍具有一定区域局限性,并计划在后期扩大样本量进行深入研究,进一步有针对性地评估孕妇营养情况、血清水平和妊娠结局之间的关系。

参考文献

- [1] CHOI R, SUN J, YOO H, et al. A Prospective Study of Serum Trace Elements in Healthy Korean Pregnant Women[J]. *Nutrients*, 2016, 8(11): 749-753.
- [2] THAKER R, OZA H, SHAIKH I, et al. Correlation of

- Copper and Zinc in Spontaneous Abortion[J]. *Int J Fertil Steril*, 2019, 13(2): 97-101.
- [3] TURAN K, ARSLAN A, UÇKAN K, et al. Change of the levels of trace elements and heavy metals in threatened abortion[J]. *J Chin Med Assoc*, 2019, 82(7): 554-557.
- [4] LEWANDOWSKA M, SAJDAK S, MARCINIAK W, et al. First Trimester Serum Copper or Zinc Levels, and Risk of Pregnancy-Induced Hypertension[J]. *Nutrients*, 2019, 11(10): 2479-2483.
- [5] LEWICKA I, KOCYŁOWSKI R, GRZESIAK M, et al. Selected trace elements concentrations in pregnancy and their possible role-literature review [J]. *Ginekol Pol*, 2017, 88(9): 509-514.
- [6] 崔光文, 何润合, 药健, 等. 全固态锌离子选择性电极的制备与表征[J]. *分析化学*, 2018, 46(10): 1669-1676.
- [7] 冯超, 杜彩霞, 鲍希波. X 射线荧光光谱法铬、硅、锰和同时测定铬铁中磷的含量[J]. *理化检验-化学分册*, 2019, 55(6): 715-718.
- [8] 李娇. 中子活化分析法在茶叶中微量元素测量中的应用研究[D]. 上海: 上海大学, 2004.
- [9] JAAFARI-ASHKAVANDI Z, KHADEMI B, MALEKZADEH M, et al. Serum Levels of Zinc, Copper and Ferritin in Patients with Salivary Gland Tumors[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2019, 20(2): 545-548.
- [10] HONG Y S, CHOI J Y, NHO E Y, et al. Determination of macro, micro and trace elements in citrus fruits by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES), ICP-mass spectrometry and direct mercury analyzer[J]. *J Sci Food Agric*, 2019, 99(4): 1870-1879.
- [11] 徐凤仙, 于嘉屏, 吴娟娟. ICP-MS 测定全血中 5 种微量元素及其参考区间的建立[J]. *检验医学*, 2018, 33(2): 127-131.
- [12] 曹清芸, 王兵, 徐旭. 6 620 例早、中期妊娠妇女不同年龄段全血微量元素分析[J]. *中国计划生育学杂志*, 2019, 27(7): 952-954.
- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute. User verification of precision and estimation of bias; approved guideline-third edition; EP15-A3[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2014.
- [14] 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. 质谱技术在临床微量元素检测中的应用共识[J]. *检验医学*, 2019, 34(8): 677-681.
- [15] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. 四极杆电感耦合等离子体质谱仪校准规范: JJF1159-2006 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [16] KOPP J F, MÜLLER S M, POHL G, et al. A quick and simple method for the determination of six trace elements in mammalian serum samples using ICP-MS/MS[J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2019, 54: 221-225.
- [17] 阳文辉, 李伟平, 宁乐平, 等. 微量采血管对 Cu Zn Ca Mg Fe 元素检测的影响[J]. *中国临床新医学*, 2018, 11(3): 224-226.
- [18] 贺葵阳, 万本愿. 全血微量元素检测的质量控制[J]. *实验与检验医学*, 2011, 29(2): 145-146. (下转第 2449 页)

Logistic 回归进行分析,结果显示,CK-MB/CK 是乳腺癌淋巴结转移的独立危险因素,关于 CK-MB 及 CK 调控乳腺癌淋巴结转移的具体机制有待进一步研究。

4 结 论

综上所述,CK-MB/CK 和 TBIL 是乳腺癌淋巴结转移的独立危险因素,提示 CK-MB/CK 和 TBIL 可能是诊断乳腺癌淋巴结转移简便、快捷的生物学指标,临床应该重视乳腺癌患者外周血生化指标的检测结果,可为乳腺癌患者手术方式的选择及预后等诊疗过程提供参考。

参考文献

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAAD P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66 (2): 115-132.
- [2] WEIGELT B, PETERSE J L, VEER L J. Breast cancer metastasis: markers and models [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5 (8): 591-602.
- [3] 王玲,汪苗,周丽华. 乳腺癌腋窝淋巴结清扫术后上肢淋巴水肿相关症状研究[J/CD]. 中华乳腺病杂志(电子版), 2017, 11 (2): 87-91.
- [4] CAVALLI L R. Molecular markers of breast axillary lymph node metastasis [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2009, 9 (5): 441-454.
- [5] 王晓英,张卫卫,施先君,等. 乳腺癌组织中 VEGF、EGFR 和 Smad4 的表达及其与淋巴结转移的关系分析[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38 (23): 3300-3302.
- [6] HWA H L, KUO W H, CHANG L Y, et al. Prediction of breast cancer and lymph node metastatic status with tumour markers using logistic regression models [J]. J Eval Clin Pract, 2008, 14 (2): 275-280.
- [7] HEO D S, CHOI H, YEOM M Y, et al. Serum levels of matrix metalloproteinase-9 predict lymph node metastasis in breast cancer patients [J]. Oncol Rep, 2014, 31 (4): 1567-1572.
- [8] LEE J H, JEONG H, CHOI J W, et al. Liquid biopsy pre-

diction of axillary lymph node metastasis, cancer recurrence, and patient survival in breast cancer: a meta-analysis [J]. Medicine, 2018, 97 (42): e12862.

- [9] FUJIWARA R, HAAG M, SCHAEFFELER E, et al. Systemic regulation of bilirubin homeostasis: potential benefits of hyperbilirubinemia [J]. Hepatology, 2018, 67 (4): 1609-1619.
- [10] WYLD L, GUTTERIDGE E, PINDER S, et al. Prognostic factors for patients with hepatic metastases from breast cancer [J]. Br J Cancer, 2003, 89 (2): 284-290.
- [11] CAO R, WANG L P. Serological diagnosis of liver metastasis in patients with breast cancer [J]. Cancer Biol Med, 2012, 9 (1): 57-62.
- [12] SUN H, HE B, NIE Z, et al. A nomogram based on serum bilirubin and albumin levels predicts survival in gastric cancer patients [J]. Oncotarget, 2017, 8 (25): 41305-41318.
- [13] LIU X, MENG Q H, YE Y, et al. Prognostic significance of pretreatment serum levels of albumin, LDH and total bilirubin in patients with non-metastatic breast cancer [J]. Carcinogenesis, 2014, 36 (2): 243-248.
- [14] GAO C, FANG L, LI J T, et al. Significance and prognostic value of increased serum direct bilirubin level for lymph node metastasis in Chinese rectal cancer patients [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22 (8): 2576-2584.
- [15] QIAN X L, LI Y Q, GU F, et al. Overexpression of ubiquitous mitochondrial creatine kinase (uMtCK) accelerates tumor growth by inhibiting apoptosis of breast cancer cells and is associated with a poor prognosis in breast cancer patients [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 427 (1): 60-66.
- [16] CHANG C C, LIOU C B, SU M J, et al. Creatine kinase (CK)-MB-to-Total-CK ratio: a laboratory indicator for primary cancer screening [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16 (15): 6599-6603.

(收稿日期:2020-01-02 修回日期:2020-04-15)

(上接第 2444 页)

- [19] ZHOU C, ZHANG R, CAI X, et al. Trace elements profiles of maternal blood, umbilical cord blood, and placenta in Beijing, China [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2019, 32 (11): 1755-1761.
- [20] GUY M, ACCROMBESSI M, FIEVET N, et al. Toxics (Pb, Cd) and trace elements (Zn, Cu, Mn) in women during pregnancy and at delivery, South Benin, 2014—2015 [J]. Environ Res, 2018, 167: 198-206.
- [21] LIU X, ZHANG Y, PIAO J, et al. Reference Values of 14

Serum Trace Elements for Pregnant Chinese Women: A Cross-Sectional Study in the China Nutrition and Health Survey 2010—2012 [J]. Nutrients, 2017, 9 (3): 309-314.

- [22] TAKSER L, LAFOND J, BOUCHARD M, et al. Manganese levels during pregnancy and at birth: relation to environmental factors and smoking in a Southwest Quebec population [J]. Environ Res, 2004, 95 (2): 119-125.

(收稿日期:2020-02-24 修回日期:2020-06-20)