

LC-MS/MS法测定血浆中反三碘甲状腺原氨酸(rT3, 反T3)

Determination of reverse tri-iodothyronine (rT3) in plasma with LC-MS/MS system

刘丹 李国庆

Liu Dan, Li Guoqing

SCIEX应用支持中心, 中国

SCIEX, China

前言

甲状腺激素对于调节人类和动物的发育和生长至关重要。甲状腺产生甲状腺素(T4)和三碘甲状腺素(T3),并迅速将这些化合物释放到循环系统中。循环中T4的浓度是T3的50-60倍,这些分子大部分与血液蛋白结合。游离的T3和T4是激素的活性形式,仅占甲状腺激素总量的一小部分(不到1%)。准确而灵敏地测量低pg/mL游离激素水平对于评估和诊断人体甲状腺功能是必要的。反三碘甲状腺原氨酸(rT3)是T4生物转化的一种非活性形式。由于rT3是甲状腺激素分泌的反馈抑制剂,rT3的测定可作为一个重要的诊断指标,具有临床意义。

1 实验部分

1.1 血浆样品前处理

样品采集: 使用EDTA抗凝真空管采集患者静脉血。尽快(2 h内)离心分离血浆。

样品处理: 取400 μ L血浆分别加入20 μ L rT3的IS溶液,加入200 μ L水,混匀后,室温下离心10 min。

固相萃取: 取上清550 μ L加载至预先活化好的SPE萃取板中进行固相提取,提取过程中流速控制在5~10滴/min,避免流速过快,导致目标物严重损失。随后依次用200 μ L水和200 μ L甲醇淋洗,最后采用100 μ L甲醇(含5%甲酸)洗脱,洗脱液在N₂流下吹干之后,80 μ L流动相复溶,即可进样分析。

1.2 色谱条件

色谱柱为Kinetex C18。流动相采用0.1%甲酸水溶液和乙腈

(0.1%甲酸),柱温设定为40°C。进样量为3 μ L。洗脱梯度见表1。

表1. 洗脱梯度

时间 (min)	流速(mL/min)	A(%)	B(%)
0.60	0.5	60	40
1.40	0.5	40	60
2.90	0.5	35	65
3.00	0.5	5	95
3.90	0.5	5	95
4.00	0.5	60	40
5.00	0.5	60	40

1.3 质谱条件

采用电喷雾离子源(Electrospray Ionization, ESI)和多反应监测(Multiple Reaction Monitoring, MRM)模式进行质谱扫描。离子源参数:加热气(GS1)和辅助加热气(GS2)分别为40 psi和40 psi,脱溶剂气温度为600°C;气帘气(Curtain Gas, CUR)为30 psi,碰撞气(Collision Gas, CAD)为9 psi;喷雾针(Ionspray, IS)电压为4500 V。为了获取较好的稳定性和灵敏度,各化合物监测离子对的去簇电压(Declustering Potential, DP)和碰撞电压(Collision Energy, CE),目标物定量离子对、定性离子对以及内标物监测离子对等参数均经过系统优化,离子对信息见表2。

表2. 待测组分和内标物质的质谱参数

名称	Q1	Q3	DP	CE
rT3-1*	651.900	605.900	100	33
rT3-2	651.900	508.000	100	33
rT3内标-1*	657.900	611.900	100	33
rT3内标-2	657.900	513.900	100	32

* 定量离子

2 结果与讨论

2.1 回归方程及线性

在本实验条件下，rT3在0.05~10 ng/mL范围内线性良好，r值大于0.996（如图1）；各标曲点准确度在90.7%~108.5%以内（如表3）。

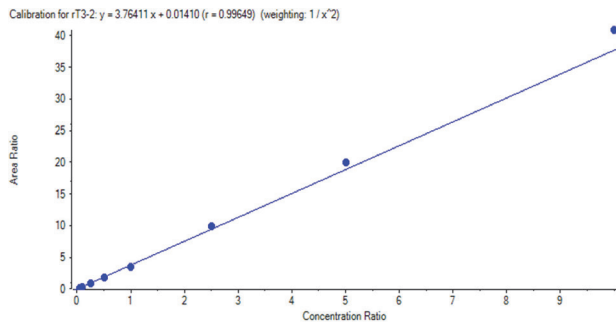


图1. rT3的标准曲线

表3. rT3 标曲各点的准确度

Actual Concentration	Calculated Concentration	Accuracy(%)
0.050	0.053	106.6
0.100	0.091	90.7
0.250	0.229	91.6
0.500	0.489	97.8
1.000	0.940	94.0
2.500	2.618	104.7
5.000	5.300	106.0
10.000	10.852	108.5

2.2 样本采集谱图

标准曲线定量下限样品及实际人血浆样品中rT3的色谱图能将内源性干扰物同目标物分离，峰形和灵敏度良好（见图2）。

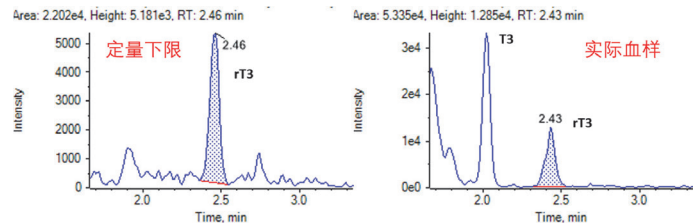


图2. 标准曲线定量下限样品及实际人血浆样品中rT3的色谱图。
（左）定量下限样品中rT3；（右）人血浆样品中rT3

2.3 性能验证参数

采用低、中、高三个浓度水平的质控品，每个浓度平行测定3次，得到准确度在94.9%~110.4%范围内，精密度RSD均小于5.7%（见表4）。

表4. rT3的精密度与准确度

	Actual Concentration	Calculated Concentration	Accuracy (%)	RSD (%)
LQC	0.125	0.119	94.9	4.5%
	0.125	0.129	103.4	
	0.125	0.120	96.0	
MQC	0.750	0.764	101.9	4.3%
	0.750	0.828	110.4	
	0.750	0.777	103.6	
HQC	4.000	4.381	109.5	5.7%
	4.000	4.082	102.1	
	4.000	3.921	98.0	

在两个来源空白血浆中分别添加两个浓度水平的rT3，得到两个添加浓度在两个来源血浆的回收率在102.3%~108.6%范围内，不同来源血浆的不同浓度加标回收率RSD值小于4.2%（见表5）。

表 5. rT3的加标回收率

	Calculated Concentration	Mean	RE	RSD
SAMPLE	0.125	0.1485	-	4.2%
SAMPLE	0.172			
SAMPLE+L	0.332	0.297	108.6%	
SAMPLE+L	0.262			
SAMPLE+H	0.94	0.9195	102.3%	
SAMPLE+H	0.899			

总结

本方法是基于SCIEX液相色谱串联质谱系统开发，建立了可对rT3进行准确定性定量检测的液相色谱串联质谱方法。rT3在0.05~10 ng/mL的动态范围内，低、中、高三个水平质控的日内和日间准确度在94.9%~110.4%之间，精密度RSD小于5.7%。本方法能够很好的排除内源性干扰，且灵敏度满足要求，方法稳定性好准确性高，能满足实际检测需求。这种LC-MS/MS方法有助于更好地了解甲状腺代谢组分在健康和疾病中的作用，并有助于临床识别特定患者类别的甲状腺疾病。

仅限专业展会等使用、仅向专业人士提供的内部资料

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-12835-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：SCIEX-China