

Высокочувствительное обнаружение трех форм тиреоидных гормонов в плазме человека с использованием трехквадрупольной системы ВЭЖХ-МС Agilent 6490

Методическая информация

Клинические исследования

Авторы

Рори Дойль (Rory Doyle) и Кевин
Маккэнн (Kevin McCann)
Agilent Technologies, Inc.
Санта-Клара, Калифорния, США

Аннотация

Быстрый метод количественного определения уровня свободного и общего тиреоидных гормонов в плазме разработан с применением системы ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity, совмещенной с трехквадрупольной системой ВЭЖХ-МС Agilent 6490 с технологией Agilent Jet Stream (AJS). При подготовке проб применялась процедура простого фильтрования для определения концентраций свободного гормона и жидкость-жидкостная экстракция для определения концентраций общего гормона. В диапазоне концентраций 0,5–1 000 пг/мл при времени анализа всего лишь 6,5 мин наблюдалась превосходная линейность.



Agilent Technologies

Введение

Тироксин (3,5,3',5'-тетрайодтиронин или T4) является предшественником более активной формы тиреоидного гормона, трийодтиронина (3,3',5-трийодтиронина или T3). Обратный трийодтиронин (3,3',5'-трийодтиронин или rT3) представляет собой неактивную форму тиреоидного гормона (рис. 1). Большая часть тиреоидного гормона, циркулирующего в крови, связана с транспортными белками. Лишь очень небольшая фракция циркулирующего гормона находится в свободной (несвязанной) форме и является биологически активной. Таким образом, измерение очень низких концентраций трех форм свободных тиреоидных гормонов имеет важное значение для понимания их роли в организме человека.

В данной работе описана разработка аналитического метода высокочувствительного точного определения свободного и общего тиреоидных гормонов в плазме с применением системы ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity, совмещенной с трехквадрупольной системой ВЭЖХ-МС Agilent 6490 с технологией Agilent Jet Stream (AJS) в режиме положительной ионизации. Использование тандемной масс-спектрометрии (МС-МС) и мониторинга множественных реакций (MRM) позволяет получить линейную зависимость в диапазоне концентраций 0,5–1 000 пг/мл с низшими пределами количественного определения в диапазоне от 1 до 5 пг/мл для свободного и 0,5–2,5 пг/мл для общего тиреоидного гормона.

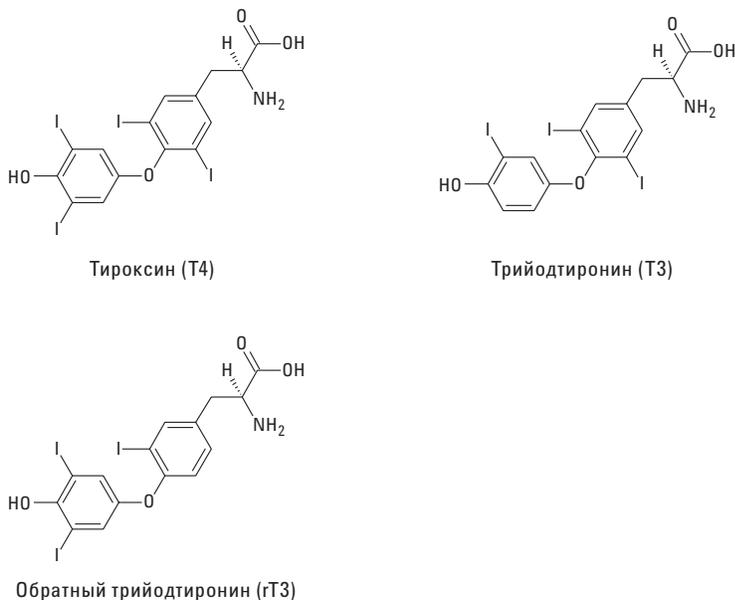


Рис. 1. Три формы тиреоидного гормона, обнаруженные в плазме

Экспериментальная часть

Реагенты и стандартные растворы

Основные стандартные растворы T4, T3, rT3 и соответствующие изотопно-меченые по углероду ^{13}C внутренние стандарты (IsoSciences) с концентрацией 10 мкг/мл готовились в смеси метанола и 30% гидроксида аммония (50:50) и хранились при температуре $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Рабочие растворы готовились путем разбавления базовых растворов метанолом. Растворы калибровочных стандартов с диапазоном концентраций 0,5–1 000 пг/мл готовились методом добавления плазмы со сверхнизким содержанием гормонов и стероидов (Golden West Biologics) к различным объемам основных стандартных растворов. В качестве меченого внутреннего стандарта использовалась смесь с концентрацией 5 нг/мл в метаноле. Стандартный эталонный материал (SRM 971) был приобретен в Национальном институте стандартов и технологий (NIST).

Приборы

Метод разработан с применением системы ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity, совмещенной с трехкврупольной системой ВЭЖХ-МС Agilent 6490 с технологией Agilent Jet Stream (AJS) в режиме положительной ионизации. В таблице 1 приведена конфигурация прибора, а в таблице 2 — параметры сбора данных ВЭЖХ-МС-МС для трехкврупольной системы Agilent 6490.

Таблица 1. Параметры приборов ВЭЖХ и МС

Условия ВЭЖХ	
Аналитическая колонка	Колонка Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3,0 × 100 мм × 2,7 мкм (кат. № 695975-302)
Температура колонки	20 °C
Объем ввода пробы	20 мкл
Подвижная фаза	A = 0,1% водный раствор уксусной кислоты, B = ацетонитрил
Градиент	30% B 0,0 минут 50% B 5,0 минут 98% B 5,1 минут 98% B 5,4 минут 30% B 5,5 минут
Время анализа	6,5 мин
Скорость потока	0,3 мл/мин
Время промывки колонки после анализа	1,5 мин
Условия МС	
Режим сбора данных	Agilent JetStream, положительная ионизация; MRM
Температура газа поддува	N_2 ; 225 °C
Скорость потока газа поддува	11 л/мин
Температура осушающего газа	N_2 ; 125°C
Скорость потока газа-осушителя	16 л/мин
Давление газа в распылителе	N_2 ; 3,8 бар
Напряжение насадки	2 000 В
Напряжение на входе в капилляр	4 000 В
Напряжение ускорителя ячейки	2 В
Напряжение умножителя	500 В
Разрешение квадруполя на полувысоте	0,7

Таблица 2. Время удерживания и параметры сбора данных для тиреоидных гормонов (ионы, по которым проводятся качественные расчеты/подтверждение)

Время удерживания (мин)	Соединение	Родительский ион (отношение массы к заряду)	Дочерний ион (отношение массы к заряду)	Время регистрации одного MRM-перехода (мс)	Энергия соударения (В)
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

Пробоподготовка

Для определения уровня свободных тиреоидных гормонов были приготовлены пробы калибровочных и стандартных эталонных материалов с использованием фильтровальных блоков центрифуги Amicon Centrifuge YM-30. В фильтр Amicon Centrifuge YM-30 помещали 500 мкл плазмы и центрифугировали при высоких оборотах в течение двух часов. 300 мкл фильтрата переносили в чистую микроцентрифужную пробирку с добавлением 30 мкл внутреннего стандарта и встряхивали. После добавления 300 мкл ацетонитрила пробирку встряхивали в течение одной минуты с последующим центрифугированием при высоких оборотах в течение 10 минут. Надосадочную жидкость перемещали в 96-луночную тарелку.

Для каждой из этих проб определяли также концентрации общего тиреоидного гормона с применением жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ) этилацетатом. Аликвота каждой пробы объемом 200 мкл переносили в пробирку, куда добавляли 20 мкл внутреннего стандарта и 400 мкл ацетонитрила, после чего пробирку встряхивали. К смеси добавляли 1,2 мл этилацетата, после чего смесь встряхивали в течение 60 секунд. Пробирку центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 10 минут, после чего органический слой переносили в чистую пробирку и выпаривали. Затем сухой остаток растворяли в 120 мкл смеси вода:ацетонитрил (75:25).

Результаты и обсуждение

Эффективность метода

Хроматографическое разделение Т3 и rТ3 имеет решающее значение по причине общих MRM-переходов. На рис. 2 показано разделение до базовой линии трех форм тиреоидного гормона, полученное в результате анализа свободного или общего тиреоидного гормона.

Были получены калибровочные кривые с превосходной линейностью и коэффициентами вариации ($R^2 \geq 0,990$ в диапазоне от 0,5 до 1 000 пг/мл. Значения R^2 были незначительно выше при определении свободного тиреоидного гормона по сравнению с общим тиреоидным гормоном (рис. 3).

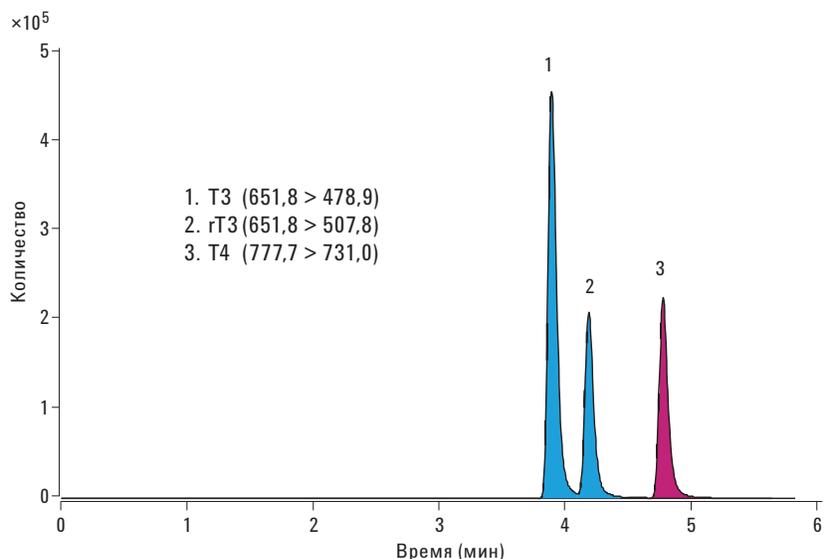


Рис. 2. Хроматографическое разделение трех форм тиреоидного гормона, извлеченного из образцов плазмы человека

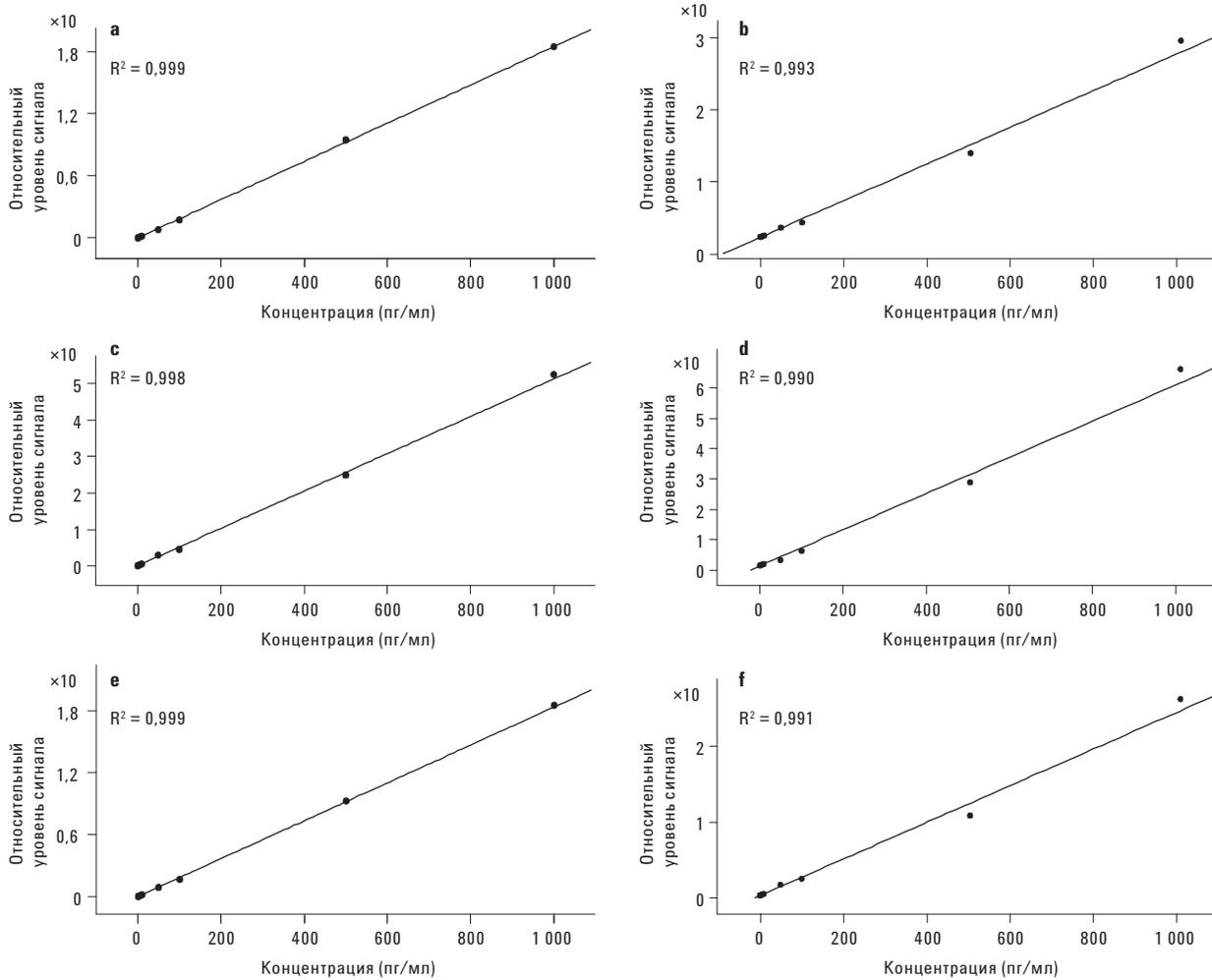


Рис. 3. Калибровочные кривые для свободного/общего Т4 (a,b), Т3 (c,d), rТ3 (e,f)

Метод показал высокую чувствительность с нижними пределами количественного определения в диапазоне от 1 до 5 пг/мл при определении свободных гормонов и от 0,5 до 2,5 пг/мл при определении общего тиреоидного гормона (таблица 3). Хроматограммы для свободного и связанного тиреоидных гормонов демонстрируют возможность количественного анализа этих определяемых веществ при очень низких концентрациях (рис. 4).

Выводы

Разработан высокочувствительный и специфичный метод ВЭЖХ-МС-МС для одновременного анализа тироксина (Т4), 3,3',5-трийодтиронина (Т3) и 3,3',5'-трийодтиронина (rТ3) в плазме. Пробоподготовка

с применением простой фильтрации для свободных тиреоидных гормонов щитовидной железы и жидкостно-жидкостной экстракции для общих тиреоидных гормонов позволяет быстро определить уровень тиреоидных гормонов даже при низких концентрациях (пг/мл).

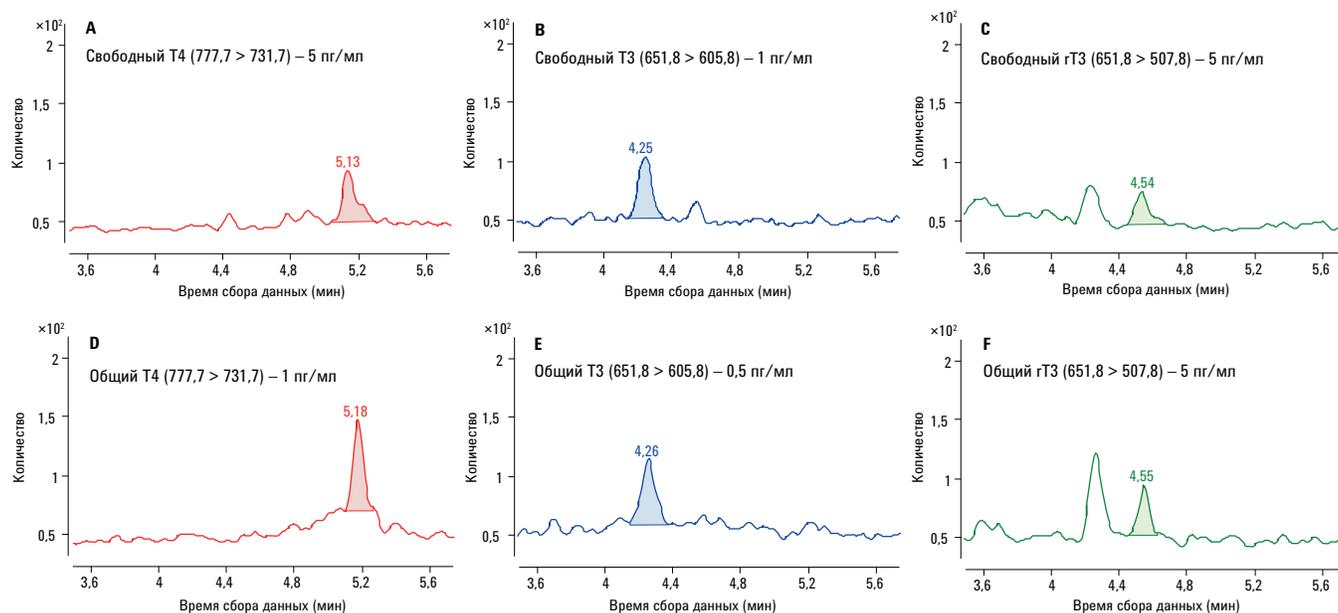


Рис. 4. MRM-переходы для концентраций, соответствующих нижним пределам количественного определения свободных и общих тиреоидных гормонов

Таблица 3. Предел количественного определения тиреоидных гормонов в плазме человека.

Аналит	Нижний предел количественного определения свободного тиреоидного гормона (пг/мл)	Нижний предел количественного определения общего тиреоидного гормона (пг/мл)
T4	5	1
T3	1	0,5
rT3	5	2,5

www.agilent.com/chem/QQQ

Только для ознакомительных целей. Не для использования при диагностических процедурах.

Информация в этом документе может быть изменена без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2014
Напечатано в США 21 июля 2014 г.
5991-2017RU