

LC-MS/MSを用いた 甲状腺ホルモンの分析及び絶食による ラット血清中チロキシンの影響

○前田 尚之, 矢部 薫, 古城 加奈子, 奥村 佳奈子, 松浦 正男
株式会社化合物安全性研究所

目的

経済協力開発機構(OECD)の化学物質の試験に関するガイドラインTG421及びTG422の改定に伴い、甲状腺ホルモンであるチロキシン(T_4)の測定が必要となるが、 T_4 の測定は一般に血液内濃度をELISA法やRIA法を用いて行なわれている。近年、組織内の濃度を正確に定量するLC-MS/MSを用いることでより微量成分を測定することが可能となった。そこで我々は、より簡易に測定できる方法を開発すると共に背景データの獲得を目的として T_4 濃度を測定した。また、LC-MS法とELISA法による定量値の比較検討を行った。

材料及び方法

T_4 とトリヨードチロニン(T_3)及び T_3 の構造異性体であるリバーズ T_3 (rT_3)を同時に分析するLC-MS/MS(UPLC-Xevo TQ-S micro, Waters)を用いた方法を確立した。次にSD系雄ラット15-16週齢から対照群と絶食を16-19時間実施した群(各 $n=35$)を用いて、同時間に同様の手法で採血して得られた血清を用いてLC-MS/MS分析を実施した。ELISA法はRodent T4 ELISA kit (Endocrine Technologies Inc.)を用いて実施した。

抽出方法

ラット血清50 μ Lを採取
IS($T_3^{13}C_6$)を50 μ L添加
30%アセトニトリル50 μ L添加
ヘキサン150 μ L添加
遠心分離(13200 \times g, 3min)
中層をLC-MS/MS分析

LC-MS/MS分析条件

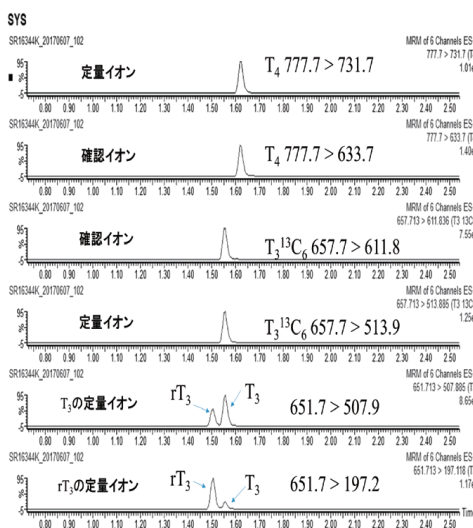
LC条件

カラム: Unison UK-C18, 3 μ m, 50 \times 3 mm, Imtakt
移動相A: 0.1% 硝酸
移動相B: 0.1% 硝酸含有アセトニトリル
B: 0min 5%, 1.0min 40%, 2.0min 95%,
2.2min 95%, 2.21min 5%, and 2.8min 5%
流量: 0.8mL/min
カラム温度: 40 $^{\circ}$ C
注入量: 10 μ L
オートサンブラ温度: 10 $^{\circ}$ C

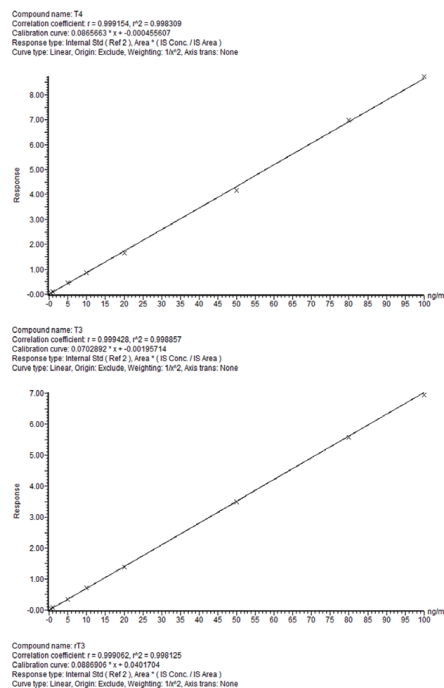
MS条件

Compound	m/z (Q1 Q3)	Cone Voltage (CV)	Collision energy (CE)
T_3	651.7 197.1	52 V	72 V
T_3	651.7 507.9	52 V	18 V
T_4	777.7 633.7	62 V	20 V
T_4	777.7 731.7	62 V	30 V
$T_3^{13}C_6$	657.7 513.9	40 V	20 V
$T_3^{13}C_6$	657.7 611.8	40 V	12 V

結果および考察



検量線 (0.5~100 ng/mL)



バリデーション

溶液内安定性(メタノール): 1年間
長期安定性(-80 $^{\circ}$ C): 74日間
短期安定性(室温): 24時間
前処理後試料安定性(10 $^{\circ}$ C): 24時間
凍結融解安定性: 3回
定量下限値: 0.5ng/mL

