

三碘代-L-甲状腺原氨酸 (T3) 标准物质中结构相关杂质的分析



肖鹏^{1,2}, 宋丹^{1,2}, 李红梅^{1,2}

1. 中国计量科学研究院, 北京 100029

2. 国家市场监督管理总局重点实验室(营养与健康化学计量及应用), 北京 100029)

【摘要】 研制三碘代-L-甲状腺原氨酸(T3)纯度标准物质, 可为临床测量结果提供溯源源头, 为甲状腺疾病的精准诊断提供可靠依据。在质量平衡法定值过程中, 对候选物结构相关杂质进行化学结构鉴定与定量, 是降低主成分定值结果不确定度的有效方式。以核磁共振、高分辨质谱为化学分析工具, 首先确认了 T3 标准物质主成分的结构; 随后基于高效液相色谱、高分辨质谱、离子淌度等分析技术开发建立了结构相关杂质的分析方法, 对 T3 纯度标准物质中的有机杂质进行分离、分析、鉴定。结果表明, NIM-RM3239 标准物质中相对含量>0.1% 的结构类似杂质共 3 种, 分别为二碘代-L-甲状腺原氨酸、氯代三碘代-L-甲状腺原氨酸、L-甲状腺素, 对映异构体拆分结果表明 NIM-RM3239 中不含主成分的对映异构体。研究结果可作为质量平衡法定值依据, 用于研制纯度型 T3 国家一级有证标准物质。

【关键词】 计量学; 三碘代-L-甲状腺原氨酸; 标准物质; 结构相关杂质; 液相色谱; 高分辨质谱

【中图分类号】

【文献标识码】 A

【文章编号】 2096-9015(2024)00-0001-08

DOI: 10.12338/j.issn.2096-9015.2024.0134

【引用本文】 肖鹏, 宋丹, 李红梅. 三碘代-L-甲状腺原氨酸(T3)标准物质中结构相关杂质的分析 [J]. 计量科学与技术, 待出版.

Analysis of the Structural-related Impurities Involved in 3,3',5-Triiodo-L-thyronine (T3) Purity Reference Material

XIAO Peng^{1,2}, SONG Dan^{1,2}, LI Hongmei^{1,2}

1. National Institute of Metrology, Beijing 100029, China

2. Key Laboratory of Chemical Metrology and Applications on Nutrition and Health for State Market Regulation, Beijing 100029, China

【Abstract】 Research and development of 3,3',5-Triiodo-L-thyronine (T3) purity reference material is a way to establish the primary material for clinical measurement value traceability, which can provide more accurate and comparable evidence in thyroid disease diagnosis. In the mass balance quantitative approach, determining and analyzing those structural-related impurities is essential. Such investigation could also be an effective way to reduce the uncertainty of the standard value. First, nuclear magnetic resonance and high-resolution mass spectrometry analytical tools have been employed to validate the chemical structure of the reference material. Then, the structural-related impurities are separated and qualitatively analyzed by using reliable analytical technologies, including high-performance liquid chromatography, high-resolution mass spectrometry, and ion mobility spectrometry. The results indicated that there are three kinds of structural-related impurities involved in the T3 purity reference material (NIM-RM3239), which are Diiodo-L-thyronine, Chloro-diiodo-L-thyronine, and L-Thyroxine. The relative content of each impurity is greater than 0.1% in UV 220nm. Furthermore, the chiral isomer separation result indicated that no dextroisomer (D-T3) existed in NIM-RM3239. These analytical results can be utilized as the foundations in the mass balance approach, applied in developing T3 primary certified reference material.

收稿日期: 2024-04-19; 修回日期: 2024-06-13

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFF0710303); 国家科技基础条件平台(APT2302-1, APT2302-6)。

作者简介: 肖鹏(1982-), 中国计量科学研究院副研究员, 研究方向: 临床化学计量, 邮箱: xiaop@nim.ac.cn。

【Key words】 metrology, 3,3',5-Triiodo-L-thyronine, reference material, structural-related impurity, liquid chromatography, high-resolution mass spectrometry

0 引言

甲状腺作为人体最大的内分泌腺体,分泌的主要活性物质有三碘代-L-甲状腺原氨酸(T3)和 L-甲状腺素(T4)等,它们对于蛋白质合成、体温调节、能量产生和调节有着极为重要的作用^[1-2]。T3 在判断人体生理状况上扮演重要角色,检测血清中 T3 含量是临床评价和诊断甲状腺功能的重要依据^[3]。根据 ISO17511 对于体外诊断溯源性的描述^[4],研究建立完整的溯源体系可以保障临床测量结果溯源至 SI 国际单位,使得不同实验室间的测量结果具备可比性,从而减少重复测量、减少误差,提高临床诊断效率^[5-6]。

在中国,卫健委临床检验中心于 2015 年研制并获批了四个表达水平的血清甲状腺素标准物质(GBW09127-GBW09130),在国内填补了基质型甲状腺素标准物质的空白。中国计量科学研究院在 2021 年研制了 T3 纯度标准物质(NIM-RM3239),目前正在国家一级标准物质升级过程中,是本文结构类似杂质研究时使用的对象。另外,中国检验检疫研究院也推出了 T3 冻干粉国家标准品,其中含有一定量的牛血清白蛋白和磷酸盐缓冲剂,属于基质型物质,其复溶后适用于免疫试剂的校准。国际上,欧洲健康、消费者和参考物质联合研究中心研制了 T3 纯度标准物质(IRMM-469),其证书中对含量较高的杂质进行了特别标准和说明。美国国家标准与技术研究院(NIST)同样也推出了含有 T3 成分量值的冰冻孕妇血清标准物质(SRM-1949)。

由此可见,建立我国自有的甲状腺素纯度国家标准物质、填补量值溯源源头的空白、与基质型标准物质形成不间断的溯源链、为体外诊断试剂和临床测量结果提供量值溯源,显得十分紧迫^[7-9]。T3 纯度标准物质(NIM-RM3239)定值过程中采用了定量核磁法和质量平衡法两种绝对定值策略。其中,质量平衡法需要对候选物中结构类似杂质进行分析,通过逐一定值并扣除,获取高准确度的主成分标准值^[10-11]。由此可见,对结构相关杂质开展分离与分析研究,将进一步提升标准物质标准值的准确性,进而提高下游应用的可靠性^[12-14]。

本研究首先使用了核磁共振技术,对 T3 主成分进行了结构确证^[15-16]。由于 T3 的合成源头为

L-酪氨酸^[17-19],一旦其中混有少量的 D-酪氨酸,产物将有一定概率生成微量的 T3 对映异构体(Dextroisomer T3, D-T3)。因此,本文也开发了相应的异构体拆分方法,用于考察和验证 T3 纯度标准物质中是否含有 D-T3。对于其他结构类似杂质,主要采用反相液相色谱串联高分辨质谱的方式进行分析 and 结构鉴定。结构相关杂质的鉴定结果将用于质量平衡法定值的重要依据,用于 T3 国家一级标准物质的研制^[20]。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

质谱级纯水,质谱级甲醇,色谱级正己烷,质谱级甲酸,质谱级三氟乙酸采购自美国 Thermo-Fisher 公司;NIM-RM3239(CAS: 6893-02-3)采购自中国计量科学研究院;氨水(25%)、氘代 DMSO 采购自 Sigma-Aldrich 公司;3,3',5-三碘-D-甲状腺原氨酸(D-T3, CAS: 5714-08-9)、3',5'-二碘-L-甲状腺原氨酸(CAS: 4192-14-7)采购自 LGC TRC 公司,3,5-二碘-L-甲状腺原氨酸(CAS: 1041-01-6)采购自源叶公司,3,3'-二碘-L-甲状腺原氨酸(CAS: 4604-41-5)采购自上海迈瑞尔公司。

核磁共振仪(AVANCE IIIITM 800,德国 Bruker 公司);超高效液相色谱仪(Vanquish,美国 ThermoFisher 公司);液相色谱串联飞行时间质谱仪(Synapt G2,美国 Waters 公司);色谱柱:Waters XBridge C18 柱(150 mm × 2.1 mm, 3.5 μm),Agilent Poroshell Chiral-CF 手性色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 2.7 μm)。

1.2 样品制备

称取约 5.0 mg(精确到 0.1 mg)T3 粉末于 15 mL 离心管中,加入 10 mL 0.5% 氨水溶液涡旋 2 min,制备浓度为 0.5 mg/mL T3 母液;使用移液器吸取 100 μL T3 母液,与 4.9 mL 0.5% 氨水混合,得到浓度为 10 μg/mL T3 工作液,用于结构相关杂质分析。母液、工作液在 4℃ 中保存。

1.3 核磁共振分析

样品处理:称取约 10 mg T3 标准物质,加 600 μL 氘代 DMSO 溶解,混匀后转移至 5 mm 核磁管中,测定该化合物的 ¹H 和 ¹³C 核磁共振谱图。

1.4 液相色谱条件

1.4.1 反向分离

基于十八烷基硅烷(C18)固定相(Waters BEH C18)色谱柱,以纯水(含0.1%甲酸, v/v)为A相、甲醇(含0.1%甲酸, v/v)为B相,柱温50℃,流速0.2 mL/min。紫外吸收波长220 nm。优化后有机相梯度在30min内由35%升高至55%。

1.4.2 手性拆分

基于衍生化环果聚糖(CF6)固定相(Agilent Poroshell Chiral-CF)色谱柱,以正己烷(含0.05%三氟乙酸, v/v)为A相、甲醇(含0.05%三氟乙酸, v/v)为B相,柱温40℃,流速0.5 mL/min。紫外吸收波长220 nm。在A相比例40%、70%、90%下开展条件优化,以对映异构体分离程度为流动相优化依据。

1.5 质谱条件

1.5.1 离子源与飞行时间检测器

电喷雾离子源(ESI)为正离子模式,毛细管电压2.5kV,取样电压(Sampling voltage)25V,萃取电压(Extraction voltage)4V,离子源温度100℃,脱溶剂气(氮气)温度300℃,离子源锥孔气(氮气)流速50 L/h,脱溶剂气(氮气)流速300 L/h。

1.5.2 淌度分离条件

Synapt G2 离子淌度质谱仪使用氦气作为离子漂移管缓冲气,使用氮气作为淌度分离载气。缓冲氮气流速为90 L/h,载气流速180 L/h,行波波速300 m/s,行波波高40 V。

2 结果与讨论

2.1 主成分结构鉴定-核磁法

标准物质研制过程中,主成分结构的确认必不可少,通常可采用红外光谱、紫外光谱、核磁共振谱、质谱四种方式进行。本文采用了核磁法和质谱法两种方法对T3主成分进行了结构鉴定。核磁共振可采集到主成分的氢谱(^1H)、碳谱(^{13}C),通过原子归属对主成分进行结构确证。质谱定性通常采集主成分质荷比(m/z),通过与化合物理论值进行对比确认结构的正确性。如图1所示,首先对T3分子中的碳、氢原子进行了位置归属,且化学位移与AIST数据库收录谱图一致,表明该被测物的主成分为T3。

2.2 主成分结构鉴定-质谱法

高分辨质谱分析结果可以直观反映出被测物的质荷比,通过所带电荷数对其分子量进行计算;同时也可以使用二级质谱采集目标物的碎片,从而对其

结构进行更为细致的分析。因此,高分辨质谱是公认的高可靠性的化合物定性手段。

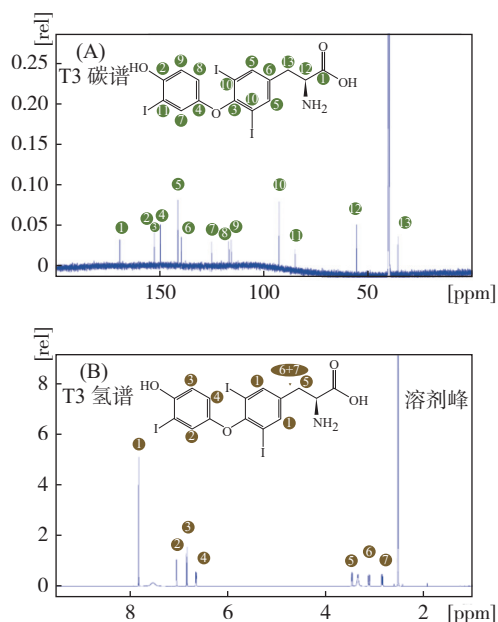


图1 T3标准物质在氘代DMSO中的核磁共振碳谱与氢谱

Fig.1 Carbon and proton nuclear magnetic resonance spectra of T3 reference material in deuterated DMSO

图2(A)中保留时间19.4 min的色谱峰对应了T3主成分;根据其同位素峰分布,如图2(B),即651.78和652.78可知,两者相差一个质量数,离子化形式即为 $[\text{M}+\text{H}]^+$,即分子量的实验值为650.8Da,与T3的理论分子量值一致。

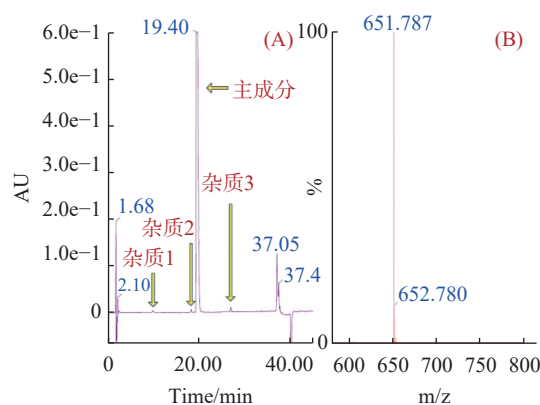


图2 高效液相色谱串联高分辨质谱分析T3标准物质 (A) 紫外吸收色谱图; (B) 主成分质谱图

Fig.2 Impurities analysis of T3 reference material using UPLC coupled high-resolution MS. (A) UV spectrometry; (B) Mass spectra of main peak

2.3 结构类似杂质分布

结构相关杂质通常在合成、纯化等过程中产

生,属于工艺杂质,如异构体、聚合体等^[21-22];也有一部分是由于保存条件不当而引发,如经常与空气接触而产生的氧化型杂质等。反相色谱分离是最为常用且有效的杂质分析技术。通过优化流动相组成、色谱洗脱梯度、柱温等条件,在弱极性的 C18 反相色谱作用下, T3 标准物质中的主成分与结构相关杂质可发生分离,以不同保留时间按顺序进入后端检测器。

在图 2(A)中可观察到主成分附近出现 3 个具有良好分离度的色谱峰,三者对应的质荷比(m/z)分别为 525.89(杂质 1, $[M+H]^+$)、559.86(杂质 2, $[M+H]^+$)、777.69(杂质 3, $[M+H]^+$)。为解析 3 种结构相关杂质的分子结构,分别开展了二级质谱分析。但需要注意的是,由于杂质相对含量通常较低(每种的面积归一化占比 $<1\%$),通常需增加进样体积或浓度后,才能得到足够强度的一级和二级质谱信号用于结构鉴定。在成倍增加化合物进样量时,需通过六通阀切换的方式,仅允许杂质进入质谱仪,而将含量很高的主成分排出至废液,从而达到保护质谱的目的。在碰撞诱导解离能量(CID)为 35V 时,获取其子离子质谱图,如图 3 所示。由图 3 可知,高质量端($m/z>500$)可见各自母离子信号,分别对应了 3 种杂质(777.7、559.9、525.9)和主成分(651.8)。低质量端($m/z<500$)分布了母离子碎裂后的子离子。通过观察发现虽然主成分及杂质组成不同,但碎裂后产生的子离子分布基本一致。结构解析结果表明,低质量端丰度最高的 355.1 离子对应了 T3 脱羧、脱碘后离子,这也表明杂质中均含有这一基本单元。对于 m/z 777.7 和 m/z 525.9 杂质来说,分别对应了 L-甲状腺素(四碘, T4)和二碘甲腺原氨酸。对于 m/z 559.9 杂质来说,需从原料合成工艺着手。L-酪氨酸在 NaI/NaIO₃ 作用下发生碘化反应,生成 3,5-二碘-L-酪氨酸;随后加入乙醇、乙酸酐等对其氨基、羧基进行保护,在自身耦联反应下生成 N-乙酰基-3,5-二碘-L-酪氨酸乙酯(中间体),使用盐酸进一步对其进行水解反应,最终获得 T3 目标物。在这一过程中,盐酸中的氯元素有机会对苯环上的 H 进行取代,形成氯代甲状腺素。基于此,推断 m/z 559.9 杂质为氯代二碘甲腺原氨酸,其理论质量与质谱检测结果相一致。最终,杂质的鉴定结果如表 1 所示。

为了对杂质鉴定结果进行验证,课题组采购了市场中可购买到的相应化合物,但氯代 T3(杂质 2)目前无法获取。同时,由于杂质 1 的脱碘位置很难

通过二级质谱进行预测,因此将三种形式的脱碘化合物全部进行了分析。如图 4 所示,根据保留时间和质荷比的信息,最终确定 T3 标准物质中杂质 1 为 3,5-二碘甲腺原氨酸;在图 5 中,通过对比杂质 3 与 L-甲状腺素的保留时间与质荷比,其结构鉴定结果也得到了验证。

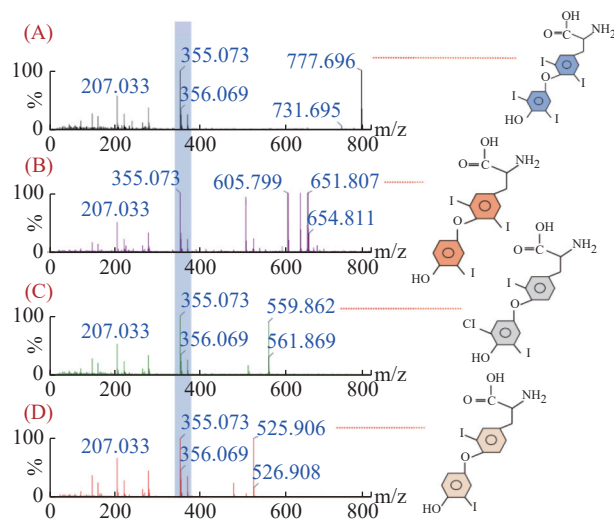


图 3 主成分及结构类似杂质二级质谱图 (A) 杂质 3; (B) 主成分; (C) 杂质 2; (D) 杂质 1
Fig.3 The tandem product ions distribution for main compound and the structural-related impurities (A) Impurity 3; (B) Main compound; (C) Impurity 2; (D) Impurity 1

表 1 T3 纯度标准物质中主要结构近似杂质分布
Tab.1 The main impurities involved in T3 reference material

代号	质荷比	分子式
杂质1	525.89	C ₁₅ H ₁₃ I ₂ NO ₄
杂质2	559.86	C ₁₅ H ₁₁ ClI ₂ NO ₄
杂质3	777.69	C ₁₅ H ₁₁ I ₄ NO ₄

2.4 对映异构体拆分

对映体具有相同的熔点、沸点、溶解度、折射率、酸性、密度等物理性质,以及热力学性质和化学性质^[23]。但在手性环境(如手性试剂,手性溶剂)中有可能表现出差异,从而进行分离分析^[24]。在临床标志物或药物标准物质研制时,要充分考虑到对映体的存在,因为其生物活性通常具有差异,需要格外关注。根据公开的合成路径,L-酪氨酸是 T3 合成和修饰的源头物质之一。如果源头物质中含有其对映异构体,即 D-酪氨酸,那么终产物很可能也具有对映异构体杂质。

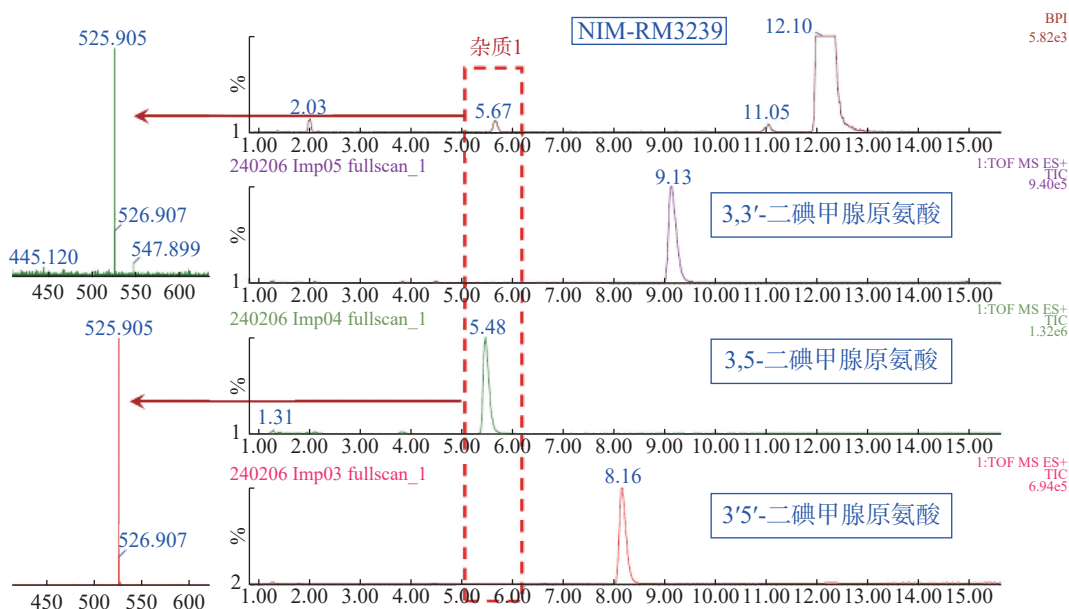


图 4 杂质 1 鉴定结果验证:不同脱碘位置的二碘甲状腺原氨酸色谱与质谱对比

Fig.4 Validation of impurity 1 identification: The LC chromatography and MS spectrum comparison between impurity 1 and three kinds of diiodothyroxines

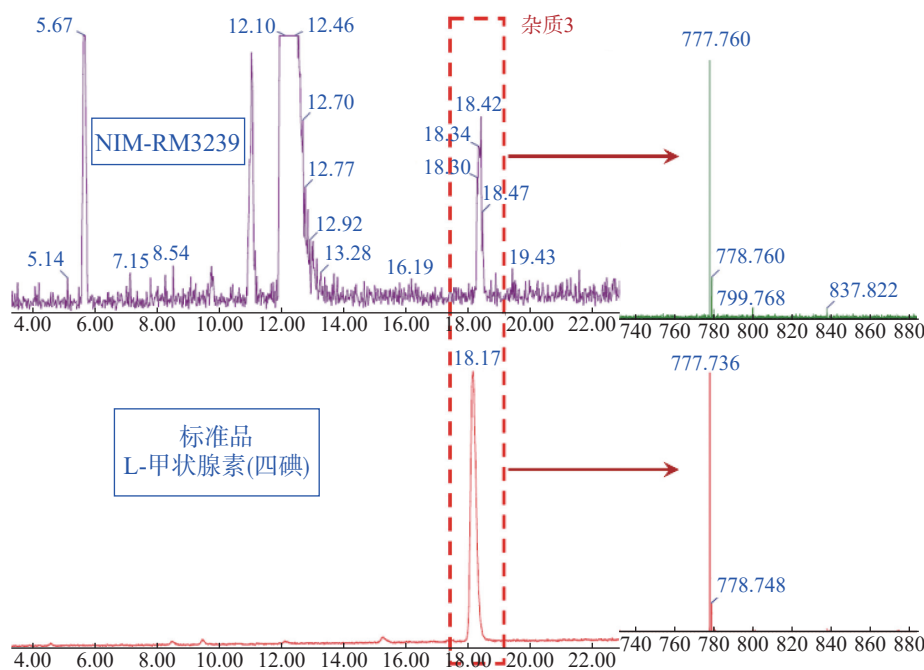


图 5 杂质 3 鉴定结果验证: 杂质 3 与 L-甲状腺素色谱与质谱对比

Fig.5 Validation of impurity 3 identification: the LC chromatography and MS spectrum comparison between impurity 3 and L-Thyronine.

本研究中使用了两种方式,对潜在异构体进行了分析和确认。

2.4.1 行波离子淌度质谱分析

离子淌度技术作为一种结构分析技术,拓展了质谱分析的维度。该技术可通过异构体离子不同的

碰撞横截面积,在逆向载气作用下发生快速分离,通常在毫秒级范围^[25]。通常来说横截面积相差越大、分离效率越高,因此配有离子淌度功能的质谱也被称为二维质谱,蛋白等大分子有机物成为了离子淌度分析的主要目标^[26-27]。对于手性异构体^[28]、顺

反式异构体^[29],以及其他小分子有机物,该技术同样具有良好的分析能力。为了验证 T3 标准物质中是否含有对映异构体,本研究首先采用了 Synapt G2 自带的行波离子淌度技术,对 D-T3 进行分析,考察两种对映异构体离子在淌度模块中的漂移情况。如图 6 所示,虽然离子淌度具有分离速度快、无需衍生化、无需额外配置手性色谱柱等优点,但对于 T3 来说,在采用不同行波波速情况下(300 m/s、900 m/s、1 200 m/s),L-、D-型 T3 离子均表现出相同的漂移时间(1.84 ms、6.05 ms、3.24 ms),这表明对映异构体无法在行波离子淌度漂移管中发生分离。因此,需要使用其他方法进行对映异构体的拆分。

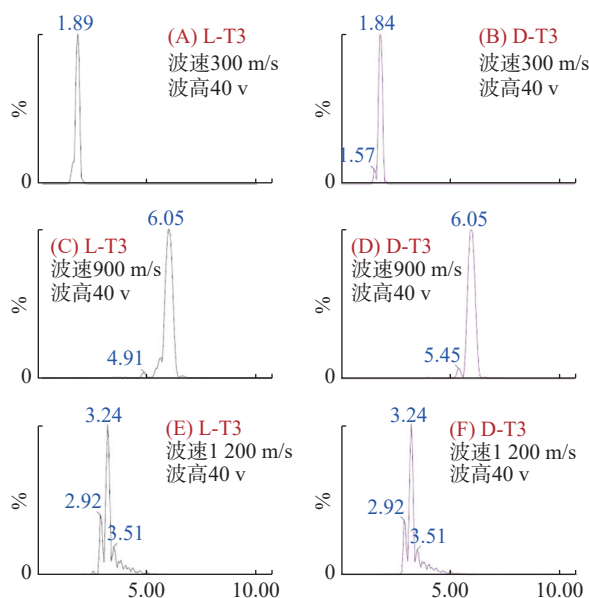


图 6 L-/D-T3 的离子淌度质谱图 (A,B) 波速 300 m/s、波高 40v 下淌度谱图; (C,D) 波速 900 m/s、波高 40v 下淌度谱图; (E,F) 波速 1 200 m/s、波高 40v 下淌度谱图

Fig.6 Ion mobility spectrometry of L-/D-T3 solution under (A,B) wave velocity 300 m/s, wave height 40v; (C,D) wave velocity 900 m/s, wave height 40v, and (E,F) wave velocity 1 200 m/s, wave height 40v, respectively

2.4.2 衍生化环果聚糖 (CF6) 色谱分析

手性固定相法,是通过样品与手性选择剂形成非对映体时产生的能量或稳定性差异,从而达到手性分离的方法^[30],该过程无需通过衍生化反应形成非对映体,属于直接拆分法。目前常用的固定性包含了环糊精类、多糖类、蛋白类等物质^[31]。根据已发表的研究结果可知,多糖类固定性有可能对 T3 进行有效分离^[32]。本研究采用了固定相为衍生化环果聚糖(CF6)的色谱柱为分离介质,对 L-、D-型

T3 建立了分析方法。通过优化流动相中正己烷比例,最终实现了 T3 对映异构体的拆分。如图 7 所示,当正己烷比例为 70%时,等度洗脱下的 L-T3 (RT=30.42 min)相比于 D-T3 (RT=32.13 min)具有更短的保留时间。随后以该方法对 T3 纯度标准物质进行了分析,未发现 D-T3 的色谱峰。

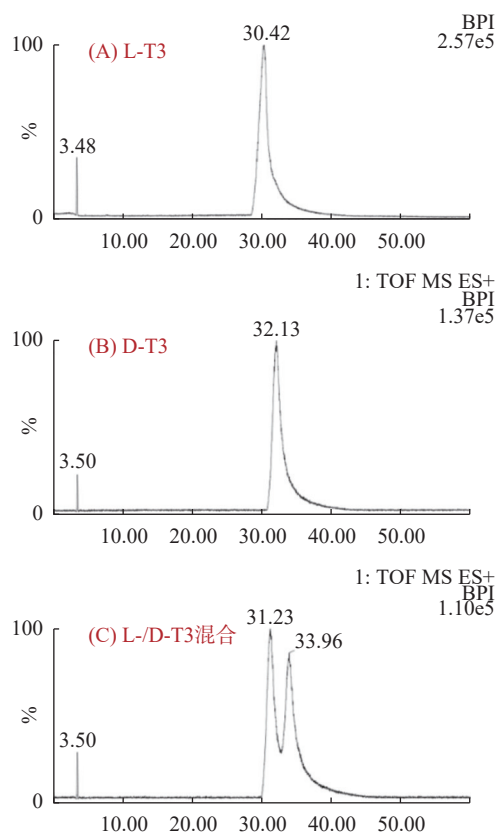


图 7 基于环果聚糖色谱柱拆分 L 型、D 型 T3 (A) L-T3 基峰色谱图; (B) D-T3 基峰色谱图; (C) L-/D-型 T3 混合样本

Fig.7 Separation of L-T3 and D-T3 using derivatized cyclofructan liquid chromatography. (A) Base peak ion chromatogram of L-T3; (B) Base peak ion chromatogram of D-T3; (C) Base peak ion chromatogram of L-/D-T3 mixture

3 结论

本研究针对三碘代-L-甲状腺原氨酸纯度标准物质建立了核磁、色谱、质谱、离子淌度等分析方法,对其中包含的结构相关杂质进行了分析与验证。核磁共振谱图以及质谱图表明,该标准物质主成分结构正确。根据反相液相色谱分离结果可知,该标准物质中含有 3 种结构相关杂质,通过多种手段的分析、鉴定、验证,杂质分别被确认为 3,5-二碘甲状腺原氨酸、氯代二碘甲状腺原氨酸、L-甲状腺素,

在 220 nm 紫外波长下 3 种杂质的相对含量均大于 0.1%。为验证是否存在 D 型 T3 杂质,本研究同时建立了离子淌度及液相色谱法,对潜在的对映异构体拆进行拆分,结果表明该标准物质中不存在对映异构体。建立结构相似杂质的结构鉴定方法,是 T3 纯度标准物质研制的关键环节,为质量平衡法赋值提供了可靠依据。

参考文献

- [1] STERLING K, BRENNER M A, SAKURADA T. Rapid effect of triiodothyronine on the mitochondrial pathway in rat liver in vivo[J]. *Science*, 1980, 210(4467): 340-2.
- [2] KAHALY G J, DILLMANN W H. Thyroid hormone action in the heart[J]. *Endocr Rev*, 2005, 26(5): 704-28.
- [3] DAVIS P J, GOGLIA F, LEONARD J L. Nongenomic actions of thyroid hormone[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12(2): 111-21.
- [4] International Organization for Standardization. ISO 17511: 2020 In vitro diagnostic medical devices — Requirements for establishing metrological traceability of values assigned to calibrators, trueness control materials and human samples [S]. 2nd Edition. Switzerland: ISO, 2020.
- [5] GUZMAN D A, SOLARI G S. Traceability and harmonization in clinical laboratory[J]. *Rev Med Chil*, 2009, 137(5): 713-5.
- [6] JONES G R D, DELATOUR V, BADRICK T. Metrological traceability and clinical traceability of laboratory results - the role of commutability in External Quality Assurance[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2022, 60(5): 669-74.
- [7] 丁敏. 临床检验标准物质现状及研制方法 [J]. 上海计量测试. 2021, 48(6): 2-5.
- [8] 杨振华. 建设我国检验医学参考体系任重道远 [J]. 临床检验杂志. 2012, 30(10): 734-6.
- [9] 焦慧, 李红梅, 阚莹, 等. 化学计量国际体系及发展趋势 [J]. 计量科学与技术. 2021, 65(6): 65-70.
- [10] WESTWOOD S, CHOTEAU T, DAIREAUX A, *et al.* Mass balance method for the SI value assignment of the purity of organic compounds[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(6): 3118-26.
- [11] 涂梦灵, 杨冰鑫, 朱云霄, 等. 新烟碱类农药有证标准物质研究进展 [J]. 计量科学与技术. 2023, 67(3): 65-71.
- [12] XIAO P, CHEN J, WU P, *et al.* Development of an SI-traceable N-terminal pro-B-type natriuretic peptide certified reference material using structure-based impurity-corrected isotope dilution mass spectrometry approaches[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2024, 416(14): 3447-58.
- [13] JOSEPHS R D, LI M, SONG D, *et al.* Key comparison study on peptide purity—synthetic human C-peptide[J]. *Metrologia*, 2017, 54(1A): 08007.
- [14] JOSEPHS R D, LI M, DAIREAUX A, *et al.* Key comparison study on peptide purity - synthetic oxytocin[J]. *Metrologia*, 2020, 57(1A): 08014.
- [15] 黄挺, 张伟, 全灿, 等. 定量核磁共振新方法在纯度定值的应用 [J]. 计量技术. 2018(9): 8-9.
- [16] 黄挺, 王静羽, 万康妮. 去除杂质干扰的定量核磁共振法进展综述 [J]. 计量科学与技术. 2022, 66(6): 26-30.
- [17] JACQUEMIN C, MICHEL R, NUNEZ J, *et al.* Catalytic tritiation of iodized phenols. Preparation of tritiated estradiol, tyrosine and thyronine[J]. *C R Hebd Seances Acad Sci*, 1959, 249: 1904-6.
- [18] LISSITZKY S, ROQUES M. Oxidation of tyrosine, thyronine, and their iodo derivatives. I. Actions of the ascorbic acid-ferrous ion-oxygen system[J]. *Bull Soc Chim Biol (Paris)*, 1957, 39(5-6): 521-37.
- [19] LISSITZKY S, BOUCHILLOUX S. Oxidation of tyrosine, thyronine & their iodinated derivatives. II. Effect of polyphenol oxidase on halogenated tyrosines & iodothyronines[J]. *Bull Soc Chim Biol (Paris)*, 1957, 39(11): 1215-25.
- [20] 阚莹, 卢晓华, 孟凡敏, 等. JJF1343-2012《标准物质定值的通用原则及统计学原理》的使用 [J]. 中国计量. 2012(11): 122-4.
- [21] PIEHL S, HEBERER T, BALISZ G, *et al.* Development of a validated liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the distinction of thyronine and thyronamine constitutional isomers and for the identification of new deiodinase substrates[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22(20): 3286-96.
- [22] RUGGENTHALER M, GRASS J, SCHUH W, *et al.* Impurity profiling of liothyronine sodium by means of reversed phase HPLC, high resolution mass spectrometry, on-line H/D exchange and UV/Vis absorption[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 143: 147-58.
- [23] MAIER N M, FRANCO P, LINDNER W. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives[J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, 906(1): 3-33.
- [24] SHEN J, OKAMOTO Y. Efficient Separation of Enantiomers Using Stereoregular Chiral Polymers[J]. *Chemical Reviews*, 2016, 116(3): 1094-138.
- [25] SANTOS L F, IGLESIAS A H, PILAU E J, *et al.* Traveling-wave ion mobility mass spectrometry analysis of isomeric modified peptides arising from chemical cross-linking[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2010, 21(12): 2062-9.
- [26] EYERS C E, VONDERACH M, FERRIES S, *et al.* Understanding protein-drug interactions using ion mobility-mass spectrometry[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2018, 42: 167-76.
- [27] LALLI P M, IGLESIAS B A, TOMA H E, *et al.* Protomers: formation, separation and characterization via travelling wave ion mobility mass spectrometry[J]. *J Mass Spectrom*, 2012, 47(6): 712-9.
- [28] PHILLIPS S T, DODDS J N, ELLIS B M, *et al.* Chiral separation of diastereomers of the cyclic nonapeptides vasopressin and desmopressin by uniform field ion mobility mass spectrometry[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2018, 54(68): 9398-401.
- [29] XIAO P, LI H-M, LI M, *et al.* Structural characterization and thermally induced isomerization investigation of cis- and trans-vitamin K1 using ion mobility mass spectrometry[J]. *Analytical Methods*, 2015, 7(19): 8432-8.

- [30] CHANKVETADZE B. Recent developments on polysaccharide-based chiral stationary phases for liquid-phase separation of enantiomers[J]. [Journal of Chromatography A](#), 2012, 1269: 26-51.
- [31] 李依璠, 刘龙婵, 李林楠, 等. 手性分离方法及在中药手性成分研究中的应用 [J]. [药学学报](#). 2023, 58(6): 1566-76.
- [32] LEE J, ADHIKARI S, LEE W, *et al.* Development of Ultra High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for Enantiomer Resolution of Thyroxine on a Chiral Crown Ether Derived Chiral Stationary Phase[J]. [Chromatographia](#), 2023, 86(1): 13-20.

本文编辑: 江迪