

利用3200MD系统检测人体尿液中的儿茶酚胺及其代谢物

Determination of catecholamines and their metabolites in human urine using 3200MD LC-MS/MS

黄超 张元媛 李国庆

Huang Chao, Zhang Yuanyuan, Li Guoqing

SCIEX中国

Key Words: Catecholamines, Urine, 3200MD

Abstract

This application technical note is about the simultaneous determination of catecholamines and their metabolites from human urine using the solid phase extraction plate prior to LC-MS/MS analysis.

Catecholamines are monoamines with a catechol structure and play important roles as neurotransmitters and hormones. The measurement of catecholamines and their metabolites is used for disease diagnosis, such as pheochromocytomas and neuroblastomas which will result in elevated levels of catecholamines. The amounts of catecholamines in biological fluids such as urine are very low, so there is demand for highly sensitive and selective analytical methods for the determination of catecholamines.

前言

肾上腺素、去甲肾上腺素和多巴胺为儿茶酚胺类物质，作为神经递质和激素起着重要的生理作用，而变肾上腺素、去甲变肾上腺素、甲氧酪胺、高香草酸和香草扁桃酸作为它们的代谢产物，亦与人的健康和疾病密切相关。本文使用固相萃取材料及样品稀释法，针对8种儿茶酚胺及其代谢产物建立了稳定可靠的前处理和LC-MS/MS检测方法。

1 实验部分

1.1 尿液样品预处理

尿液样品在处理前，建议离心取上清后，做后续处理。

游离儿茶六项（DA, E, NE, 3-MT, NMN, MN）：取300 μ L尿液加入450 μ L 缓冲盐，20 μ L内标和15 μ L的甲酸甲醇溶液，涡旋混匀1 min。请确保体系pH适合上样，待净化。

使用SPE进行尿液儿茶六项的净化：

- （1）活化：先用300 μ L甲醇活化，之后使用300 μ L 20 mM的醋酸铵平衡。
- （2）上样：把预处理的样品上样，施加正压全部压下，控制流速3-5s/滴。
- （3）淋洗1：向每孔加入700 μ L 水，正压压下，控制流速3-5s/滴，弃去。
- （4）淋洗2：向每孔加入700 μ L甲醇：异丙醇，正压压下，控制流速3-5s/滴，弃去。
- （4-1）淋洗3可选：在上述体系中加入700 μ L 二氯甲烷，正压压下，后大气流吹干。
- （5）洗脱：向每孔中加入200 μ L洗脱试剂，正压压下，控制流速3-5s/滴，收集。
- （6）氮吹复溶：将收集的洗脱液在室温下氮吹干，然后用120 μ L复溶液复溶，涡旋30 s，盖上硅胶垫进样检测尿儿茶六项。

使用直接稀释法进行儿茶两项HVA和VMA的净化:

取20 μL尿液样本加入400 μL 0.5% 乙酸的水溶液, 加入20 μL 内标溶液, 涡旋混匀后, 12000 rpm, 离心5 min, 进行分析。

注: 如需测定尿总儿茶酚胺: 请取400 μL经酸化后尿液于1.5 mL EP管中, 100 °C 处理30 min, 离心后操作参考游离儿茶酚胺。

1.2 色谱条件

尿儿茶六项:

色谱柱为Kinetex F5。流动相采用甲酸水溶液和甲醇, 柱温设定为40 °C。进样量为8 μL。梯度洗脱, 具体见表1。

表1. 洗脱梯度

时间 (min)	流速(mL/min)	0.1%FA H ₂ O (%)	甲醇 (%)
0.0	0.35	98	2
1.8	0.35	98	2
2.0	0.35	1	99
4.3	0.35	1	99
4.4	0.35	98	2
6.0	0.35	98	2

尿儿茶HVA和VMA两项:

色谱柱为F5。流动相采用0.02% FA+1 mM氯化铵和甲醇, 柱温设定为40 °C。进样量为12 μL。梯度洗脱, 具体见表2。

表2. 洗脱梯度

时间 (min)	流速(mL/min)	0.02% FA+1mM NH ₄ F (%)	甲醇/%
0.0	0.40	70	30
0.5	0.40	70	30
1.5	0.40	5	95
2.6	0.40	5	95
2.7	0.40	70	30
4.0	0.40	70	30

1.3 质谱条件

尿儿茶六项:

电离模式: 电喷雾电离正模式;

检测方式: MRM;

电喷雾电压: 2000V; 气帘气 (curtain gas): 25;

CAD: 9; 雾化气 (gas 1): 60;

辅助气 (gas 2): 40; 离子源温度 (TEM): 600°C。

EP, CEP, CXP请根据具体条件进行优化。

表3. 参数信息-尿儿茶六项

Q1	Q3	ID	DP	CE
154.1	137.1	DA-1	24	14
154.1	119	DA-2	24	25
154.1	91	DA-3	24	41
166	107	E-1	45	26
166	135.1	E-2	45	20
184.1	166.1	E-3	24	15
152	135	NE-1	39	11
152.1	107	NE-2	40	15
166	134.1	NMN 166-1	34	22
166	121.1	NMN 166-2	38	23
180	148.1	MN 180-1	37	24
180	120.1	MN 180-2	44	26
168	119.1	3-MT 168-1	24	24
168	91	3-MT 168-2	24	33
158	141.1	DA-D4 158-1	24	16
190.1	172.2	E-D6 190-1	40	15
172	112.1	E-D6 172-2	40	28
158.1	139.1	NE-D6 158-1	40	19
183.1	151.1	MN-D3-1	40	25
183.1	123.1	MN-D3-2	40	25
169.1	137.1	NMN-D3-1	40	25
169.1	109.1	NMN-D3-2	30	19
172.1	123.1	3-MT-D4-1	24	26
172.1	95.1	3-MT-D4-2	24	35

尿儿茶两项：

电离模式：电喷雾电离负模式；

检测方式：MRM；

电喷雾电压：-4500V； 气帘气 (curtain gas)：30；

CAD：8； 雾化气 (gas 1)：50；

辅助气 (gas 2)：60； 离子源温度 (TEM)：600°C。

表4. 参数信息-HVA和VMA

Q1	Q3	ID	DP	CE
196.9	138	VMA 1	-26	-14
196.9	137	VMA 2	-30	-30
200	137	VMA D3 1	-30	-33
200	138	VMA D3 2	-30	-18
181	122	HVA 1	-30	-21
181	137	HVA 2	-35	-10
181	105	HVA 3	-30	-21
184	121.9	HVA D3 1	-30	-22
184	139.9	HVA D3 2	-35	-11
184	105.1	HVA D3 3	-35	-22

2 结果与讨论

2.1 样本采集图谱

人尿液中E, NE, DA, 3-MT, NMN, MN的实际样品图谱见图1，各化合物峰型良好，E和NMN分离良好，通道间无干扰。

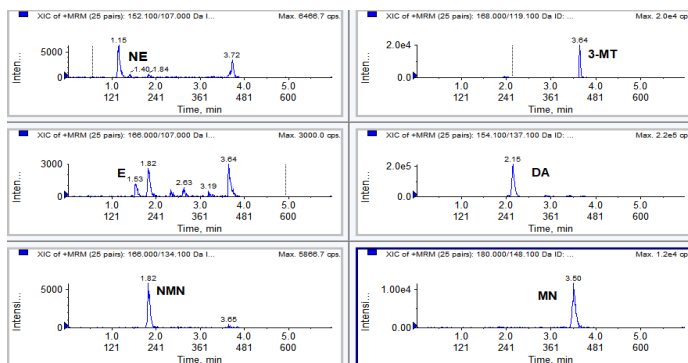


图1. 人尿液中儿茶六项图谱

使用直接稀释法测定HVA, VMA，具体图谱如图2所示。数据表明，HVA与HVA分离良好，无干扰。

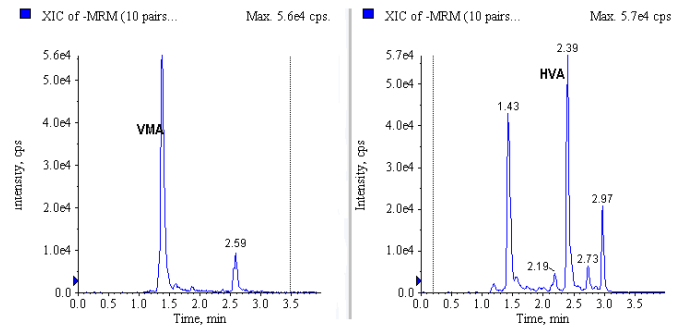


图2. 人尿液中HVA和VMA图谱

2.2 回归方程及线性

使用0.01 M的PBS作为替代基质进行试验，结合生理浓度确定的最终线性范围如表5所示。

表5. 儿茶8项各化合物的线性范围

化合物	线性回归方程	相关系数	线性范围
NE	$Y = 0.05964 X + 0.18308$	0.99887	10-1600 ng/mL
E	$Y = 0.00725 X + 0.00122$	0.99073	2-80 ng/mL
DA	$Y = 0.04633 X + 0.10339$	0.99902	10-1600 ng/mL
NMN	$Y = 0.20815 X + 0.04246$	0.99754	10-160 ng/mL
MN	$Y = 0.12068 X + 0.00634$	0.99761	10-80 ng/mL
3-MT	$Y = 0.38216 X + 0.08132$	0.99717	10-160 ng/mL
HVA	$Y = 0.12349 X - 0.00395$	0.99979	0.5-25 µg/mL
VMA	$Y = 0.08261 X + 0.00746$	0.99766	0.5-25 µg/mL

2.3 添加回收率结果分析

通过外添加回收率试验，考察方法的准确度，结果见表6。各化合物在两个浓度添加水平的添加回收率在91.40%至113.21%之间，结果良好。

表6. 不同浓度样品的加标回收率结果

化合物	本底	添加1	回收率	添加2	回收率
NE	18.20	50 ng/mL	97.71%	400 ng/mL	91.40%
E	3.41	2.5 ng/mL	113.21%	25 ng/mL	95.15%
DA	91.73	50 ng/mL	91.51%	400 ng/mL	108.96%
NMN	13.60	5 ng/mL	106.32%	40 ng/mL	94.41%
MN	14.41	2.5 ng/mL	104.87%	20 ng/mL	98.54%
3-MT	18.30	5 ng/mL	99.99%	40 ng/mL	97.36%
HVA	2.19	2 µg/mL	101.15%	10 ug/mL	98.86%
VMA	2.90	2 µg/mL	109.90%	10 ug/mL	99.31%

3 总结

本方案采用固相萃取技术和直接稀释法来进行样品前处理，无需复杂的净化提纯步骤，可以实现在3200MD上一针进样同时分析尿儿茶酚胺及其代谢物。

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-02-13295-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