

SCIEX液相色谱串联质谱法同时测定人血浆中多巴胺，肾上腺素和去甲肾上腺素

Quantification of Dopamine, Epinephrine, Norepinephrine in Human Plasma by SCIEX Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

胡凤梅, 张元媛, 黄超, 李国庆

Hu Fengmei, Zhang Yuanyuan, Huang Chao, Li Guoqing

SCIEX中国, 临床事业部

SCIEX China, Clinical Buessiness Unit

Keywords: Dopamine, Epinephrine, Norepinephrine, Catecholamine, LC-MS/MS, Solid-phase extraction

前言

儿茶酚胺 (Catecholamine, CA) 是一种含有儿茶酚和胺基的神经类物质。儿茶酚胺包括去甲肾上腺素 (NA或NE)、肾上腺素 (E) 和多巴胺 (DA)。儿茶酚胺在体内调节基本生理功能, 传递生理信号, 是正常生理过程中重要的信号介质, 同时在病理过程中也出现其含量的相应变化。儿茶酚胺的含量与肾上腺髓质瘤密切相关, 这些肾上腺髓质瘤会结合大量儿茶酚胺导致循环失常; 儿茶酚胺含量过高会引发高血压和心肌梗塞, 含量过低则通常导致低血压; 另外儿茶酚胺含量水平的不同与心脏猝死、冠状心脏病和心脏不充血等也有潜在联系。准确检测体内儿茶酚胺的含量, 在临床上可以用于辅助诊断高血压、甲亢、嗜铬细胞瘤和神经母细胞瘤等内分泌相关疾病。

液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS) 以其卓越的特异性, 极高的检测灵敏度和高通量样本测定等优点, 受到广大检测人员的青睐。多巴胺、肾上腺素和去甲肾上腺素的检测方法也多为液相色谱串联质谱法, 本实验采用非衍生化方法进行样品前处理, 步骤较简单, 实验耗时较短, 可以满足临床检测样品的需求。

表1. 待测化合物信息列表。

中文名	英文名	CAS编号	分子式
多巴胺	Dopamine	51-61-6	C ₈ H ₁₁ NO _{2w}
肾上腺素	Epinephrine	51-43-4	C ₉ H ₁₃ NO ₃
去甲肾上腺素	Norepinephrine	51-41-2	C ₈ H ₁₁ NO ₃

本方法基于SCIEX液相色谱串联质谱系统, 采用同位素内标校正法, 建立了一次分析, 同时准确检测血浆中多巴胺、肾上腺素和去甲肾上腺素的定量方法。检测化合物相关信息如下。

实验部分

样品前处理

本实验采用SPE固相萃取法对血浆进行处理, 具体步骤如下。

血浆稀释: 准确量取400 μL样品于1.5 mL塑料离心管中, 加入20 μL同位素内标混合工作液, 200 μL含甲酸的水溶液, 涡旋1 min, 4°C, 15000 rpm离心5 min, 上层样品待用。

净化: 取SPE柱, 依次用500 μL甲醇活化, 500 μL醋酸铵水溶液平衡。取离心后样品, 加载至SPE柱, 弃去滤液; 依次用500 μL醋酸铵水溶液和500 μL异丙醇进行淋洗, 弃去淋洗液; 加入100 μL洗脱溶剂进行洗脱, 收集洗脱液, 上机检测。

色谱条件

色谱柱: Kinetex F5 (2.6 μm, 3.0 × 100 mm);

流动相: A含甲酸的水溶液, B含甲酸的甲醇, 梯度洗脱;

流速: 0.5 mL/min;

柱温: 40 °C;

进样体积: 25 μL。

质谱条件

电离方式: 电喷雾离子源, 正离子模式;

检测方式: 分时间窗口 (schedule), 多反应监测 (MRM);

离子源温度 (TEM): 600°C; 雾化气 (Gas1): 70 psi;
 辅助气 (Gas2): 70 psi; 气帘气 (Gurtain Gas): 30psi;
 电喷雾电压: 5500V;
 对应MRM通道及参数见表2。

表2. 待测组分和内标物质的质谱参数 (正离子模式)。

中文名	英文名	名称缩写	Q1	Q3	DP	CE	CXP
多巴胺	Dopamine	DA	154	119*	55	26	11
			154	91	55	32	8
肾上腺素	Epinephrine	E	184	166*	50	15	13
			166	107	95	26	10
去甲肾上腺素	Norepinephrine	NE	152	107*	90	25	10
			152	135	90	16	10
多巴胺-d4	Dopamine-d4	DA-d4	158.2	141.1	55	15	12
肾上腺素-d6	Epinephrine-d6	E-d6	190.1	172.1	50	15	13
去甲肾上腺素-d6	Norepinephrine-d6	NE-d6	158.1	111.1	90	25	10

* 定量离子

结果与讨论

多巴胺、肾上腺素和去甲肾上腺素在各自出峰位置峰形对称, 响应良好。在本方法条件下, 三种化合物的色谱行为完全分开, 不存在互相干扰; 且在实际样本中与代谢物类成分完全分开。典型色谱图如图1。

表3. DA、E和NE三批标准曲线。

化合物	检测批次	斜率	截距	相关系数	LLOQ (pg/mL)	ULOQ (pg/mL)	拟合方程
DA	1	2.01e-04	6.67724e-4	0.99938	20.0	1000	$y=0.000200942x+6.67724e-4$
	2	1.88e-04	9.205e-4	0.99998	20.0	1000	$y=0.00018785x+9.205e-4$
	3	2.01e-04	0.00116	0.99946	20.0	1000	$y=0.000201243x+0.00116$
E	1	0.00440	-0.00681	0.99946	20.0	1000	$y=0.0044x-0.00681$
	2	0.00313	0.00260	0.99960	20.0	1000	$y=0.00313x+0.00260$
	3	0.00321	-0.01006	0.99919	20.0	1000	$y=0.00321x-0.01006$
NE	1	0.00116	0.00589	0.9994	40.0	1000	$y=0.00116x+0.00589$
	2	0.00114	0.00146	0.99983	40.0	1000	$y=0.00114x+0.00146$
	3	0.00117	0.00216	0.99908	40.0	1000	$y=0.00117x+0.00216$

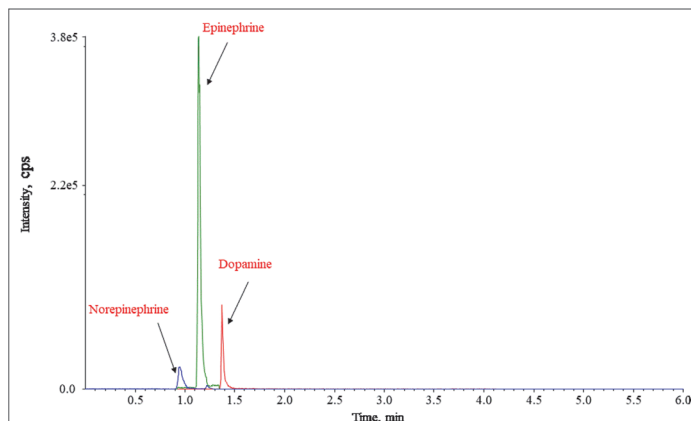


图1. DA, E和NE典型色谱图。

标准曲线

以经48h紫外照射后的血浆为基质 (血浆中本底化合物已被除去), 配制标准工作曲线和质控样品。进行三天精密度和准确度实验, 考察标准曲线、日内和日间精密度准确度, 具体结果见表3, 表4。

加标回收率

取两个来源的血浆, 向两个来源血浆中分别添加低、高两个浓度的混标溶液, 得到低、高两个添加浓度的加标样品。数据表明DA、E、NE三个化合物血浆的回收率分别在94.6%~111.8%、98.0%~105.3%和100.1%~105.6%范围内, 具体结果见表4。

提取回收率

取紫外照射过的混合人血浆样本，向血浆中加入不同体积的混合标液，制备低、高两组血浆加标样本，按照前处理方式处理两组血浆样本（低、高浓度各3样本分析），得到的化合物峰面积设为A；另取未加标空白血浆，同样按照前处理方式样本后加入一定体积的标液制备理论浓度上的低、高浓度样本（低、高浓度各3样本分析），得到的峰面积设为B；进样分析，计算回收率（回收率%=A/B*100）。各化合物在各自加标水平下回收率结果如表6所示。结果表明，本方法中各待测物的回收率良好。

表4. DA、E和NE的批内、批间精密度和准确度。

化合物	化合物浓度 pg/mL	批内准确度 Accuracy%	批间准确度 Accuracy%	批内精密度 CV%	批间精密度 CV%
DA	60	94.4		4.3	
		101.3	97.2	4.0	4.7
		96.0		3.5	
	800	97.7		2.7	
		103.8	99.7	2.3	3.6
E	60	97.5		0.7	
		96.1		7.4	
		102.3	98.2	1.3	7.1
	800	96.2		10.7	
		105.6	100.2	3.1	5.6
NE	60	100.5		4.4	
		102.1		7.9	
		100.8	99.8	1.6	5.4
	800	99.8		5.2	
		95.3		3.7	
	100.6	98.4	2.8	4.1	
	98.4		4.7		

表5. DA、E和NE的加标回收率。

血浆来源	DA		E		NE	
	加标1	加标2	加标1	加标2	加标1	加标2
血浆1	94.6%	105.0%	105.3%	98.4%	102.9%	100.7%
血浆2	111.8%	102.5%	98.0%	102.8%	100.1%	105.6%

表6. DA、E和NE低、高浓度水平提取回收率。

化合物	低浓度		高浓度	
	回收率%	CV%	回收率%	CV%
DA	75.5	2.7	76.2	5.7
E	81.0	3.2	79.8	1.7
NE	71.0	7.5	78.8	6.1

总结

本实验在SCIEX液质联用平台上，实现了多巴胺（DA）、肾上腺素（E）和去甲肾上腺素（NE）同时检测。采用SPE法对样本进行前处理，并加入同位素内标进行校准，对血浆中多巴胺（DA）、肾上腺素（E）和去甲肾上腺素（NE）进行定量。方法线性良好，加标回收率、提取回收率及精密度准确度均满足相关文件要求。可用于临床实际样本的检测。

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。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-12071-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：ABSciex-China