

SCIEX液相色谱串联质谱结合一步蛋白沉淀法测定血浆中三种儿茶酚胺类化合物

Simultaneous Quantitation of 3 Catecholamines in Human Plasma Using Rapid Protein Precipitation by SCIEX Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

胡凤梅, 刘丹, 黄超, 赵祥龙

Hu Fengmei, Liu Dan, Huang Chao, Zhao Xianglong

引言

儿茶酚胺 (catecholamine, CA) 是一类含有儿茶酚和胺基的神经类物质, 是人体内重要的神经递质和激素。CA在儿茶酚-O-甲基转移酶 (COMT) 的作用下生成变肾上腺素类物质 (metanephrines, MNs), 主要包括甲氧基肾上腺素 (MN)、甲氧基去甲肾上腺素 (NMN, 中文括号) 和3-甲氧酪胺 (3-MT)。在《嗜铬细胞瘤和副神经节瘤诊断治疗的专家共识 (2020)》中, 推荐诊断嗜铬细胞瘤和副神经节瘤 (PPGL) 的实验室检查首选血浆游离或尿液甲氧基肾上腺素(MN)、甲氧基去甲肾上腺素 (NMN)浓度测定, 可同时检测血或尿代谢产物比如3-MT等化合物的浓度以帮助诊断。

本实验在SCIEX液质系统上, 建立了一种同时测定人血浆中甲氧基肾上腺素 (MN)、甲氧基去甲肾上腺素 (NMN) 及3-甲氧酪胺 (3-MT) 的方法。该方法的样本前处理脱离了传统固相萃取的净化手段, 创新的使用蛋白沉淀法对血浆中3种物质进行直接提取, 操作简单, 专一性强, 灵敏度高, 可以满足人血浆中NMN、MN和3-MT检测的需要。检测化合物相关信息见表1。

实验部分

样品前处理

样品前处理: 采用蛋白沉淀法对血浆样本进行处理。

具体操作过程: 准确移取血浆样本于1.5 mL离心管中, 加入同位素内标, 随后加入沉淀剂, 2000 rpm涡旋1 min, 然后4 °C、15000 rpm离心5 min, 取上清液进行LC-MS/MS分析。

表1. 待测化合物信息列表

中文名	英文名	缩写	CAS编号	分子式
甲氧基肾上腺素 (变肾上腺)	Metanephrine	MN	5001-33-2	C ₁₀ H ₁₅ NO ₃
甲氧基去甲肾上腺素 (去甲变肾上腺)	Normetanephrine	NMN	1011-74-1	C ₉ H ₁₃ NO ₃
3-甲氧酪胺	3-Methoxytyramine	3-MT	554-52-9	C ₉ H ₁₃ NO ₂

色谱条件

色谱柱: 亲水色谱柱, Phenomenex

流动相: A相: 含缓冲盐的水

B相: 含缓冲盐的乙腈-水

流速: 0.7 mL/min

柱温: 40 °C

进样体积: 30 µL

洗脱方式: 梯度洗脱, 见表2

质谱条件

采用正离子电喷雾离子源 (Electrospray Ionization, ESI) 和多反应监测 (Multiple Reaction Monitoring, MRM) 模式进行质谱检测。离子源参数: 喷雾针 (IonSpray Voltage, IS) 正模式电压

表2. 液相梯度洗脱条件

Time(min)	A(%)	B(%)
0	15	85
1.0	15	85
3.0	50	50
4.0	50	50
4.1	15	85
5.5	15	85

为1700V，辅助雾化气（GS1）和辅助加热气（GS2）分别为70 psi和60 psi，离子源温度为600 °C，气帘气（Curtain Gas, CUR）为25 psi，碰撞气（Collision Gas, CAD）为8。为了获取较好的稳定性和灵敏度，目标物离子对以及内标物监测离子对的去簇电压和碰撞电压等参数均经过系统优化，离子对信息见表3。

结果与讨论

本实验使用蛋白沉淀法样品前处理方式以及正离子质谱检测

模式同时对NMN、MN和3-MT进行定量分析，此实验不仅在操作流程上简单方便，省时省力的同时还能节省大量耗材，其色谱保留强、分离度好、灵敏度高、色谱峰也比较对称，典型的色谱图如图1。

表3. 待测组分及对应内标的MRM离子通道参数

Name	ID	Q1	Q3	DP	CE
Normetanephrine	NMN-1*	166.1	134.1	74	24
	NMN-2	166.1	121.1	74	24
Metanephrine	MN-1*	180.1	148.1	95	24
	MN-2	180.1	124.1	95	30
3-Methoxytyramine	3-MT-1*	151.1	91.0	103	28
	3-MT-2	151.1	119.1	103	21
Normetanephrine-d3	NMN-d3	169	137.1	52.0	23
Metanephrine-d3	MN-d3	183.1	151.1	60	24
3-Methoxytyramine-d4	3-MT-d4	155.0	95.1	70	29

备注：*为定量离子对

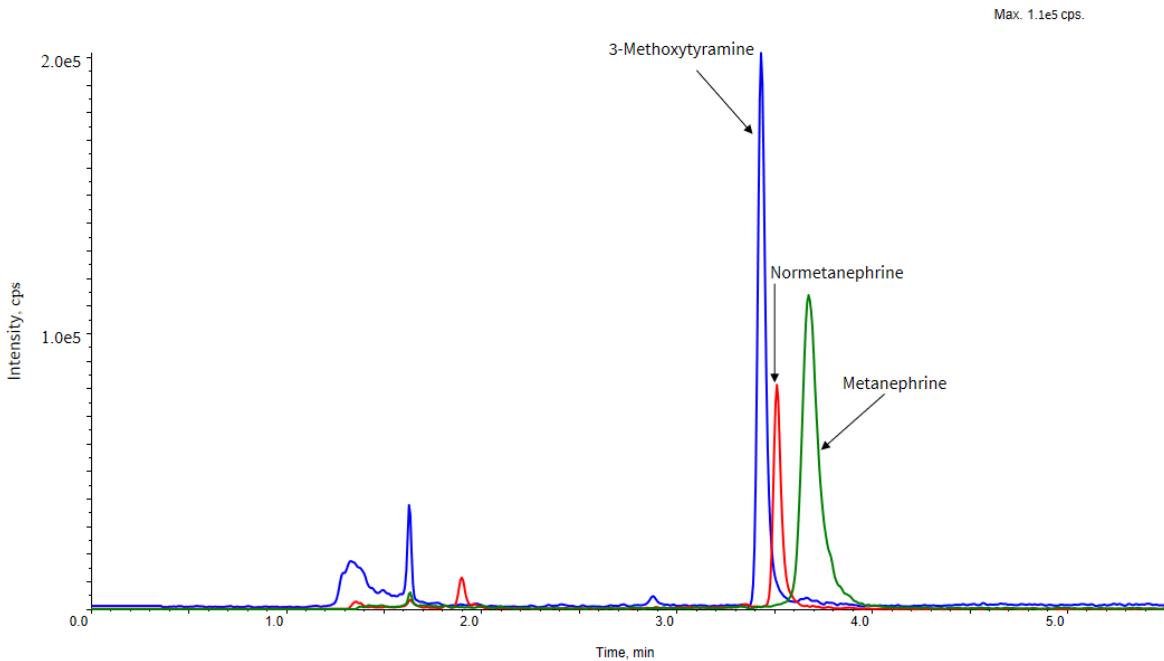


图1. NMN、MN和3-MT的典型色谱图

本实验中使用含VC的50%乙腈-水作为替代基质制作标准曲线，NMN、MN和3-MT的线性范围以及相关系数见表4，r均大于0.995，各化合物在其相应的浓度范围内线性良好。

表4. NMN、MN和3-MT标曲及线性范围

中文名	英文名	线性范围 (pg/mL)	相关系数
甲氧基去甲肾上腺素	Normetanephrine	5-1000	0.99584
甲氧基肾上腺素	Metanephrine	5-1000	0.99554
3-甲氧酪胺	3-Methoxytyramine	5-1000	0.99814

以混合实际人血浆添加标液的形式制备质控样本，对NMN、MN和3-MT的加标回收率进行验证。从表5可以看出，不同浓度质控样本的准确度均在85.0~115.0%之内，满足临床检测相关法规要求。

表5. NMN、MN和3-MT的加标回收率

中文名	英文名	加标回收率		
		L	M	H
甲氧基去甲肾上腺素	Normetanephrine	90.5%	96.9%	100.0%
甲氧基肾上腺素	Metanephrine	106.1%	93.8%	107.5%
3-甲氧酪胺	3-Methoxytyramine	94.0%	111.8%	88.6%

方案优势

本方案具有以下优势：

- 简单快速，整个前处理过程仅需一步蛋白沉淀操作，无需衍生，非常易于样本的大批量处理以及对于方法自动化的转化；
- 降本增效，对比常用儿茶酚胺类化合物的固相萃取和磁萃取流程，此方案无需特殊仪器和耗材，节省大量的耗材成本；
- 准确度高，采用稳定的同位素作为内标，对整个样本分析过程进行校正，保证了检测结果的可靠性。

总结

本方法采用ESI电喷雾离子源搭配正离子采集模式和MRM多反应监测模式，可对人血浆中甲氧基肾上腺素（MN，一样的，用中文模式）、甲氧基去甲肾上腺素（NMN）及3-甲氧酪胺（3-MT）进行快速的定量分析。该方法具有操作简单、特异性高、线性良好、准确度高等优点，可以满足临床检测相关儿茶酚胺类化合物的需要。

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。

© 2025 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-36123-A