

SCIEX液相色谱串联质谱法测定血浆中6种儿茶酚胺类物质

Determination of 6 Catecholamines in Human Plasma Samples by SCIEX Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

张元媛, 胡凤梅, 黄超, 崔敬文, 李国庆

Zhang Yuanyuan, Hu Fengmei, Huang Chao, Cui Jingwen, Li Guoqing

Keywords: Catecholamine, LC-MS/MS, Solid-phase extraction, Plasma

前言

嗜铬细胞瘤及副神经节瘤 (PPGL) 是一种能够引起内分泌性高血压的少见神经内分泌肿瘤, 在普通高血压门诊中患病率为 0.2% - 0.6%, 在儿童高血压患者中为 1.7%。PPGL 患者的主要临床表现为儿茶酚胺 (catecholamine, CA) 类物质分泌增多, 进一步导致高血压及心、脑、肾血管并发症和代谢性改变, 在经准确诊断后, 可通过手术治疗, 属于一种可治愈的继发性高血压。

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, 包括肾上腺素 (E)、去甲肾上腺素 (NE) 和多巴胺 (DA)。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) 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 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; 建议: 可同时检测血或尿 NE、E、DA 及其他代谢产物 3-MT 等浓度以帮助诊断。并且, 鉴于质谱法灵敏度高、专属性强、稳定性好等特点, 专家共识中推荐首选使用 LC-MS/MS 法测定 MNs。

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, 建立了一次处理, 同时准确检测血浆中 6 种儿茶酚胺类物质的定量方法。各化合物信息如下。

中文名	英文名	CAS编号	分子式
肾上腺素	Epinephrine (E)	51-43-4	C ₉ H ₁₃ NO ₃
去甲肾上腺素	Norepinephrine (NE)	329-56-6	C ₈ H ₁₁ NO ₃
多巴胺	Dopamine (DA)	51-61-6	C ₈ H ₁₁ NO ₂
变肾上腺素 (甲氧基肾上腺素)	Metanephrine (MN)	5001-33-2	C ₁₀ H ₁₅ NO ₃
去甲变肾上腺素 (甲氧基去甲肾上腺素)	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

实验部分

样品前处理

本实验采用 SPE 固相萃取法对血浆中 6 种儿茶酚胺类进行处理。

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: 0.4 mL/min;

柱温: 40 °C;

质谱条件

电离方式: 电喷雾离子源, 正离子;

检测方式: 多反应监测 (MRM);

离子源温度 (TEM): 500°C; 雾化气 (Gas1): 60 psi;
 辅助气 (Gas2): 40 psi; 气帘气 (Gurtain Gas): 30 psi;
 电喷雾电压: 1500V;
 对应MRM通道及参数见表1。

表1. 质谱参数

Q1	Q3	DWELL	ID	DP	CE
154.1	137.1	15	DA -1	50	15
154.1	119	15	DA -2	55	25
154.1	91	15	DA -3	55	31
166	107	15	E -1	95	26
166	135.1	15	E -2	95	20
184.1	166.1	15	E-3	50	15
152	135	15	NE -1	60	18
152.1	107	15	NE -2	80	24
166	134.1	15	NMN 166-1	85	22
166	121.1	15	NMN 166-2	85	23
180	148.1	15	MN 180-1	90	24
180	120.1	15	MN 180-2	90	26
168	119.1	15	3-MT 168-1	55	24
168	91	15	3-MT 168-2	55	33
158	141.1	15	DA-D4 158-1	50	16
158.1	139.1	15	NE-D6 158-1	90	19
190.1	172.2	15	E-D6 190-1	40	15
172	112.1	15	E-D6 172-2	90	28
183.1	151.1	15	MN-D3-1	80	25
183.1	123.1	15	MN-D3-2	80	25
169.1	137.1	15	NMN-D3-1	80	25
169.1	109.1	15	NMN-D3-2	45	19
172.1	123.1	15	3-MT-D4-1	55	26
172.1	95.1	15	3-MT-D4-1	55	35

标准曲线

以水为替代基质, 制作标准工作曲线。各待测物典型标准曲线结果如下表。

表2. 6种儿茶酚胺类化合物典型标准曲线

中文名	英文名	线性方程	相关系数	标曲范围*
肾上腺素	Epinephrine (E)	$Y=2.10E-4 x + 1.28E-3$	0.9965	0.02 - 10
去甲肾上腺素	Norepinephrine (NE)	$Y=3.54E-4 x + 1.94E-3$	0.9987	0.02 - 10
多巴胺	Dopamine (DA)	$Y=1.75E-4 x + 1.45E-3$	0.9977	0.02 - 10
变肾上腺素	Metanephrine (MN)	$Y=8.12E-5 x + 2.34E-4$	0.9970	0.02 - 10
去甲变肾上腺素	Normetanephrine (NMN)	$Y=1.45E-4 x + 1.57E-4$	0.9966	0.02 - 10
3-甲氧酪胺	3-Methoxytyramine (3-MT)	$Y=2.62E-4 x + 1.57E-3$	0.9979	0.02 - 10

*单位: ng/ml; 本实验条件下, 统一配置标准曲线范围如表所示, 具体曲线范围可根据真实需求调整。

加标回收率

取混合人血浆样本, 分为4组, 向其中三组加入不同浓度的6种儿茶酚胺混合标准溶液, 制备低、中、高三组血浆加标样本, 以随行标曲测定4组血浆样本中各化合物浓度。按下述公式计算加标回收率。

加标回收率=(实测加标后样本浓度-实测加标前样本浓度)/理论加标浓度

各化合物在各自加标水平下加标回收率结果如下图所示。各待测物的加标回收率在92.2%-112.1%之间, 符合相关要求。

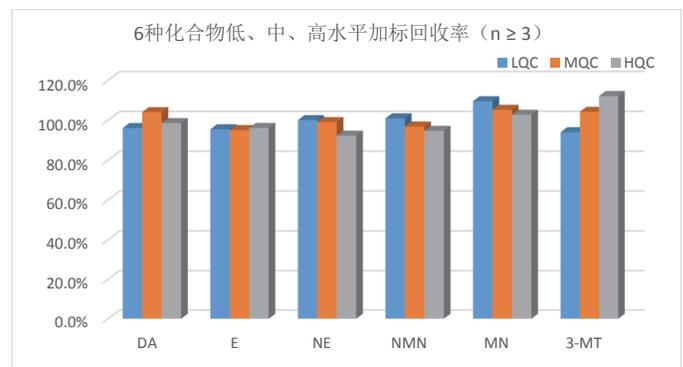


表2. 6种儿茶酚胺类化合物典型标准曲线

结果与讨论

在本实验条件下, 各化合物得到有效分离, 典型色谱图如图1。

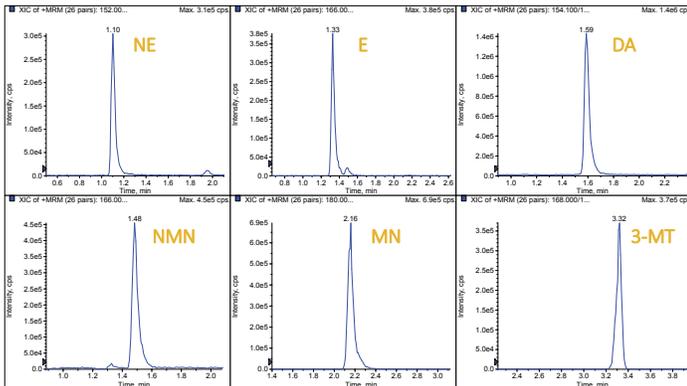


图1. 6种儿茶酚胺类化合物典型色谱图

精密度

取混合人血浆样本，分为3组，向其中加入不同浓度的6种儿茶酚胺混合标准溶液，制备低、中、高三组血浆加标样本（QC）。各浓度4样本分析，连续测定3天。根据当日的标准曲线，计算QC样本浓度。根据QC的RSD%对方法的日内与日间精密度进行考察。结果如下图所示。各化合物的日内和日间精密度分别为0.7-6.0%和2.9-9.4%，符合相关相关要求。

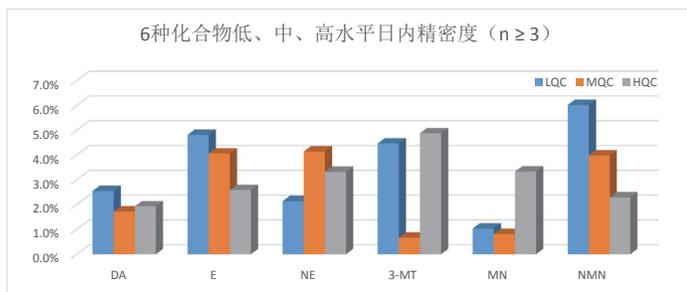


图3. 6种儿茶酚胺类物质低、中、高浓度水平日内精密度

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. 或在美利和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-13152-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](https://www.sciex.com.cn)

6种化合物低、中、高水平日间精密度 (n ≥ 3)

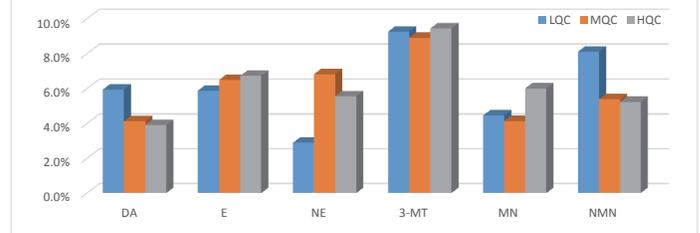


图4. 6种儿茶酚胺类物质低、中、高浓度水平日间精密度

总结

本实验在SCIEX液质连用平台上，搭建了一针进样，6种儿茶酚胺类化合物同时定量检测方法。实验采用SPE法进行样本前处理，同位素内标校准，对血浆中6种儿茶酚胺类化合物定量分析。方法线性良好，加标回收，日内、日间精密度满足相关要求。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