

通过单次 LC/MS/MS 运行分析尿液中的儿茶酚胺类、变肾上腺素类和 3-甲氧酪胺

使用 Agilent Bond Elut Plexa SPE、Agilent 1290 Infinity 液相色谱和 6460 三重四极杆液质联用系统

应用简报

临床研究

作者

Linda Côté 与 Christophe Deckers
加拿大安捷伦科技公司
St-Laurent, Québec, Canada

摘要

本研究中开发出了一种用于尿液中儿茶酚胺（多巴胺、肾上腺素和去甲肾上腺素）、变肾上腺素、去甲变肾上腺素和 3-甲氧酪胺定量分析的高灵敏度、高特异性 LC/MS/MS 方法。该方法利用单步固相萃取流程简化样品前处理并对尿液中的一些干扰进行净化。此分析方法通过单次进样即可达到所需功能灵敏度，同时还能对相当宽动态范围内的分析物进行定量分析。所有化合物均表现出出色的重现性 ($CV < 6\%$)，且所有校准曲线都获得了绝佳的线性 ($R^2 > 0.9997$)。



Agilent Technologies

前言

本研究开发出的单步高效固相萃取 (SPE) 样品前处理流程适用于同时提取尿液中的多巴胺、肾上腺素、去甲肾上腺素、变肾上腺素、去甲变肾上腺素和 3-甲氧酪胺 (图 1)。将不同浓度的每种分析物加标至洁净尿液中制得校准物。液相色谱/三重四极杆质谱仪 (LC/MS/MS) 非常适用于像上述多种分析物的快速分析。色谱系统采用 Agilent Pursuit 五氟苯基 (PFP) 色谱柱以及甲醇与含 0.2% 甲酸的水组成的流动相。研究中对定量和定性 MRM 离子对进行了监测, 并对每种分析物均采用了氘代内标以确保定量分析的准确性与重现性。

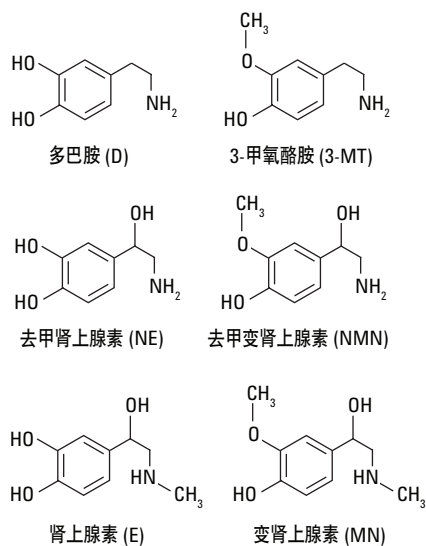


图 1. 儿茶酚胺类、变肾上腺素类和 3-甲氧酪胺的结构

实验部分

液相色谱方法

液相色谱系统由 Agilent 1290 Infinity LC 二元泵、配备恒温箱的孔板进样器以及柱温箱组成。如果使用的液相色谱系统具有不同的延迟体积, 则可能需要调节并验证梯度以使相同色谱分析结果具有可重现性。

质谱方法参数

| 参数 | 值 |
|---------------|----------|
| 离子模式 | AJS ESI+ |
| 干燥气温度 | 325 °C |
| 干燥气 (氮气) 流速 | 5 L/min |
| 雾化器气体 (氮气) 压力 | 35 psi |
| 鞘气 (氮气) 温度 | 375 °C |
| 鞘气流量 | 12 L/min |
| 毛细管电压 | 3000 V |
| 喷嘴电压 | 0 V |
| Q1/Q3 分辨率 | 0.7 unit |
| 驻留时间 | 20 ms |
| Delta EMV | 200 V |

液相色谱方法参数

| 参数 | 值 |
|---------|--|
| 色谱柱 | Agilent Pursuit PFP 色谱柱, 2 × 150 mm, 3 μm (部件号 A3051150X020) |
| 保护柱 | Agilent Pursuit PFP MetaGuard 色谱柱, 200Å, 2 mm, 3 μm (3/包, 部件号 A3051MG2) |
| 流动相 | A) 0.2% 甲酸水溶液 B) 甲醇 |
| 柱温 | 40 °C |
| 自动进样器温度 | 4 °C |
| 进样量 | 20 μL |
| 注射针清洗 | 1:1:1:1 甲醇:乙腈:异丙醇:水 + 0.1 % 甲酸 (冲洗进样口 20 s) |
| 流速 | 0.3 mL/min |
| 梯度 | 时间 (min) %B 0 0 1.0 0 2.5 60 6.0 60 6.1 0 9.0 0 |

化学品与试剂

校准物购自 Cerilliant (Round Rock, TX)、剑桥同位素实验室 (Tewksbury, MA) 以及 Medical Isotopes 公司 (Pelham, NH)。DC Mass Spect Gold 尿液 MSG5000 购自 Golden West Biologicals (Temecula, CA)。Lyphocheck 376 和 377 对照品购自 Bio-Rad。Burdick & Jackson LC/MS 级甲醇和试剂购自 VWR。2-氨基乙基二苯基硼酸酯购自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MO)。

二苯基-硼酸酯络合剂的制备方法是 将 200 mL 2 M NH₄Cl/NH₄OH 缓冲液与 400 mg 二苯基硼酸乙醇胺酯 (2-氨基乙基二苯基硼酸酯) 以及 1 g EDTA 二钠混合。二苯基硼酸不易溶解, 需要缓慢搅拌过夜使其完全溶解。

2 M NH₄Cl/NH₄OH 缓冲液的制备方法是 将 107 g NH₄Cl 溶于 1 L 水并加入 30% NH₄OH 将 pH 调节至 8.5。

0.2 M NH₄Cl/NH₄OH 清洗缓冲液的制备方法是 将 50 mL 2 M NH₄Cl/NH₄OH 缓冲液加入 450 mL 水中, 然后再加入 20 mg EDTA 并用 30% NH₄OH 将 pH 调节至 8.5。

5% 甲醇清洗缓冲溶液的制备方法是 将 25 mL 甲醇加入 475 mL 清洗缓冲液中, 并如前所述, 仍用 30% NH₄OH 将 pH 调节至 8.5。

所有缓冲液和络合剂均于 4 °C 下储存, 使用前需分别核对 pH。

表 1. MRM 离子对

| 化合物 | 母离子 | 子离子 | 裂解电压 (V) | CE (V) | CAV (V) |
|------------|-------|-------|----------|--------|---------|
| 多巴胺* | 154.1 | 137.1 | 75 | 8 | 3 |
| 多巴胺 | 154.1 | 91.1 | 75 | 28 | 3 |
| 多巴胺-D4 | 158.1 | 141.1 | 75 | 8 | 3 |
| 去甲肾上腺素* | 152.1 | 107 | 116 | 16 | 5 |
| 去甲肾上腺素 | 152.1 | 77.1 | 116 | 30 | 5 |
| 去甲肾上腺素-D6 | 176.1 | 158.1 | 65 | 4 | 5 |
| 肾上腺素* | 184.1 | 166.1 | 70 | 8 | 5 |
| 肾上腺素 | 184.1 | 107.1 | 70 | 24 | 5 |
| 肾上腺素-D6 | 190.1 | 172.1 | 70 | 8 | 5 |
| 3-甲氧酪胺* | 151.1 | 91.1 | 135 | 20 | 3 |
| 3-甲氧酪胺 | 151.1 | 119 | 135 | 12 | 3 |
| 3-甲氧酪胺-D4 | 155.1 | 95.1 | 135 | 24 | 3 |
| 去甲变肾上腺素* | 166.1 | 134 | 105 | 16 | 3 |
| 去甲变肾上腺素 | 166.1 | 106.1 | 105 | 20 | 3 |
| 去甲变肾上腺素-D3 | 169.1 | 137.1 | 105 | 16 | 3 |
| 变肾上腺素* | 180.1 | 165.1 | 120 | 16 | 5 |
| 变肾上腺素 | 180.1 | 148.1 | 120 | 16 | 5 |
| 变肾上腺素-D3 | 183.1 | 168.1 | 120 | 16 | 5 |

* 定量离子对

样品前处理

通过将每种儿茶酚胺和变肾上腺素分析物加标至 DC Mass Spect Gold 尿液中制得标准校准物。通过利用 DC Mass Spect Gold 尿液进行连续稀释来获得其余标准校准物浓度。进行总量测定时, 采用 25 μL 6 N HCl 对样品 (500 μL) 进行水解, 随后将样品混合并置于 90 °C 温育 15 min, 再冷却至室温。进行游离测定时需保持样品未经任何处理。SPE 流程如下:

1. 预处理样品: 向 0.5 mL 尿液中加入 40 μL 内标物混合物与 0.8 mL 二苯基-硼酸酯络合剂; 用 NH₄OH 将 pH 调节至 7.5 - 9.5
2. 用 1 mL 甲醇和 1 mL 水性清洗缓冲液 (0.2 M NH₄Cl/NH₄OH) 活化 SPE 小柱 (Agilent Bond Elut Plexa, 30 mg, 3 mL, 部件号 12109303)

3. 加入经预处理的样品
4. 用 1 mL 5% 甲醇清洗缓冲液清洗, 随后在全真空下干燥 5 min
5. 用 1 mL 5% 甲酸水溶液洗脱, 并对样品施加 5 英寸汞柱真空 30 s
6. 将样品转移至自动进样器样品瓶中, 并进样至 LC/MS/MS 系统

数据分析

Agilent MassHunter 定量数据分析软件 (B.06.00) 用于进行数据分析。在校准曲线的线性回归中采用 1/x 作为加权因子。在 MassHunter 定量软件中, 利用色谱峰面积与已知浓度内标的峰面积之比进行定量。

结果与讨论

通过安捷伦五氟苯基 (PFP) 色谱柱实现了所有分析物的色谱分离 (图 2)。肾上腺素与去甲肾上腺素, 以及变肾上腺素与 3-甲氧酪胺之间的分离尤为关键, 因为这些化合物通常产生相同碎片。如果不根据保留时间进行适当分离, 这些化合物的碎片将对彼此产生干扰, 从而产生不准确的定量结果。

为研究 SPE 萃取流程的回收率, 研究中将 9 个不同浓度的全部 6 种分析物添加到含 0.1% 甲酸的水中。这一混合物中也含有 6 种内标。随后对 9 种混合物进行 SPE 萃取, 然后分析。另外还使用未经 SPE 处理的样品进行平行进样。经计算每种内标的绝对回收率介于 53% - 112% 之间 (表 2)。而使用内标峰面积比校正 (相对回收率) 计算经 SPE

萃取的溶液浓度时, 则得到了明显较出色的校正结果。相对回收率介于 94% - 104% 之间 (表 2), 确认了内标法可对 SPE 萃取偏差进行校正。

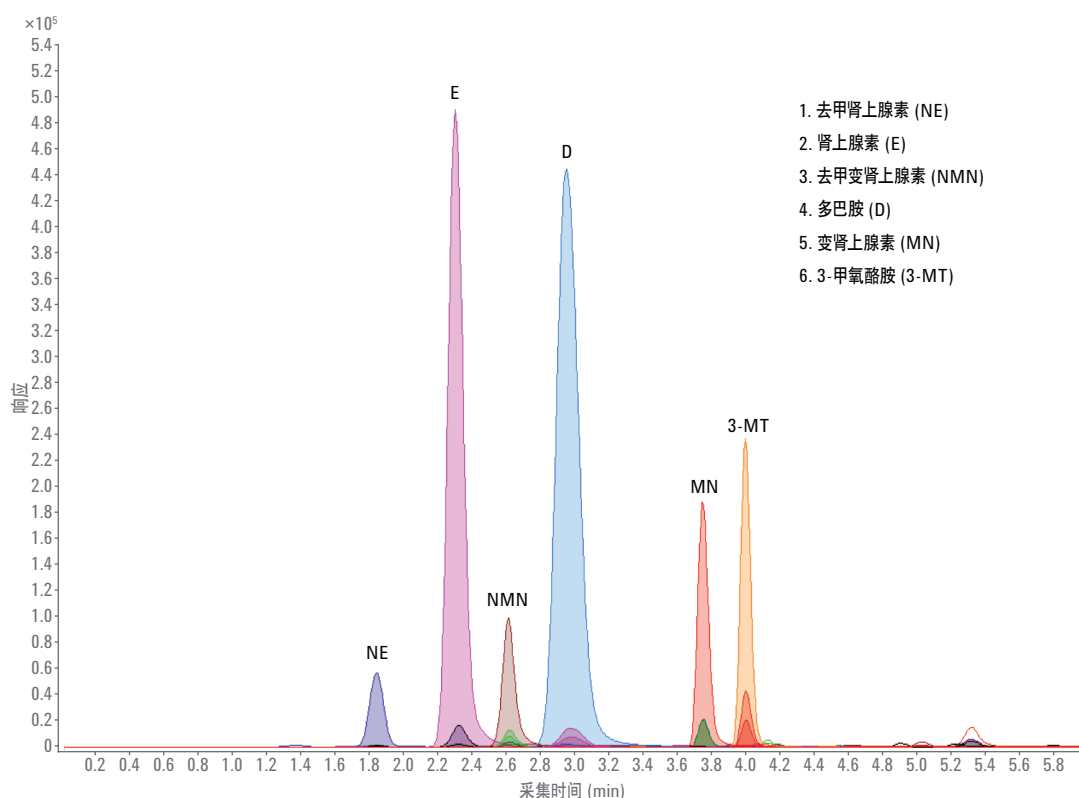


图 2. 儿茶酚胺、变肾上腺素和 3-甲氧酪胺的色谱图

表 2. SPE 流程的绝对和相对回收率

| 化合物 | 绝对回收率 (%) (n = 9) | | 经内标校正的相对回收率 (%) (n = 9) | | |
|---------|-------------------|-----|-------------------------|-------|-----|
| | 平均值 | SD | 范围 | 平均值 | SD |
| 多巴胺 | 73.5 | 2.4 | 95.0 - 103.4 | 100.0 | 2.5 |
| 去甲肾上腺素 | 112.5 | 4.9 | 99.0 - 102.4 | 100.0 | 1.0 |
| 肾上腺素 | 90.3 | 3.6 | 94.5 - 104.4 | 100.0 | 2.9 |
| 3-甲氧酪胺 | 53.2 | 3.6 | 94.4 - 102.5 | 100.0 | 3.0 |
| 去甲变肾上腺素 | 88.7 | 7.5 | 97.3 - 102.0 | 100.0 | 2.0 |
| 变肾上腺素 | 93.9 | 3.6 | 97.2 - 103.9 | 100.0 | 2.2 |

分别于连续三天以及一天中三次萃取校准标样和 Bio-Rad Lyphocheck 对照品, 以便确定日内和日间的精密度和准确度。全部 6 种分析物的日内和日间准确度均在 8% 内, 且线性范围内所有浓度的变异系数均小于 6% (表 3 - 6)。该分析方法在儿茶酚胺类浓度为 1.56 - 1000 ng/mL 的测定范围内具有出色的线性, R^2 值均大于 0.9997 (图 3)。变肾上腺素类和 3-甲氧酪胺在 4.69 - 3000 ng/mL 的测定范围内 R^2 值均大于 0.9999 (图 3)。

结论

本研究中我们开发出一种用于尿液中儿茶酚胺类、变肾上腺素类和 3-甲氧酪胺定量分析的可靠分析方法。离线固相萃取在用于同时提取尿液中全部 6 种分析物时可实现出色的回收率。研究中还开发出了与 LC/MS/MS 条件兼容的分析物色谱分离方法。典型方法的性能结果均符合可接受标准。

表 3. 儿茶酚胺分析性能汇总

| 化合物 | R^2 | 浓度 (ng/mL) | 浓度 (nmol/L) | 准确度 (%) n = 3 | 日内 CV (%) n = 3 | 日间 CV (%) n = 5 |
|--------|--------|------------|-------------|---------------|-----------------|-----------------|
| 多巴胺 | 0.9997 | 1.56 | 10.2 | 107.5 | 1.0 | 2.7 |
| | | 62.5 | 408.0 | 99.1 | 1.7 | 2.0 |
| | | 1000 | 6528.3 | 101.3 | 0.1 | 0.3 |
| 去甲肾上腺素 | 0.9999 | 1.56 | 9.2 | 102.9 | 0.9 | 5.4 |
| | | 62.5 | 369.4 | 101.1 | 3.5 | 4.0 |
| | | 1000 | 5910.9 | 101.1 | 0.6 | 0.6 |
| 肾上腺素 | 0.9998 | 1.56 | 8.5 | 101.6 | 4.3 | 2.7 |
| | | 62.5 | 341.2 | 100.9 | 2.5 | 2.0 |
| | | 1000 | 5458.4 | 100.3 | 0.4 | 0.3 |

表 4. 变肾上腺素类和 3-甲氧酪胺的分析性能汇总

| 化合物 | R^2 | 浓度 (ng/mL) | 浓度 (nmol/L) | 准确度 (%) n = 3 | 日内 CV (%) n = 3 | 日间 CV (%) n = 5 |
|---------|--------|------------|-------------|---------------|-----------------|-----------------|
| 3-甲氧酪胺 | 0.9999 | 4.69 | 28 | 95.7 | 1.1 | 3.6 |
| | | 187.5 | 1121.4 | 102.9 | 0.9 | 2.0 |
| | | 3000 | 17942.1 | 100.0 | 0.2 | 0.3 |
| 去甲变肾上腺素 | 0.9999 | 4.69 | 25.6 | 100.1 | 1.5 | 3.2 |
| | | 187.5 | 1023.45 | 102.0 | 1.1 | 2.5 |
| | | 3000 | 16375.2 | 100.7 | 0.2 | 0.2 |
| 变肾上腺素 | 0.9999 | 4.69 | 23.8 | 100.5 | 0.3 | 2.8 |
| | | 187.5 | 950.7 | 102.0 | 0.5 | 2.2 |
| | | 3000 | 15210.6 | 100.8 | 0.1 | 0.2 |

表 5. 由 LC/MS/MS 获得的 Bio-Rad QC 运行结果 (利用 HPLC 由 Bio-Rad 确定检测范围)。所有测定结果均以 ng/mL 表示

| 化合物 | 游离/总 | 浓度 1 | | | 浓度 2 | | |
|---------|------|-------------|-------------|--------|-------------|-------------|--------|
| | | 范围 (HPLC) | 测定值 (ng/mL) | CV (%) | 范围 (HPLC) | 测定值 (ng/mL) | CV (%) |
| 多巴胺 | 游离 | 44.4 - 75.0 | 61.4 | 3.4 | 377 - 629 | 509 | 2.8 |
| 去甲肾上腺素 | 游离 | 31.3 - 51.6 | 38.4 | 5.8 | 156 - 239 | 192 | 4.8 |
| 肾上腺素 | 游离 | 9.62 - 19.1 | 14.3 | 5.3 | 67.8 - 104 | 86.7 | 2 |
| 3-甲氧酪胺 | 总 | 28.6 - 48.7 | 44.7 | 3.8 | 381 - 572 | 557.7 | 2.2 |
| 去甲变肾上腺素 | 总 | 220 - 366 | 300.7 | 2.4 | 1084 - 1630 | 1379.2 | 2.8 |
| 变肾上腺素 | 总 | 69.0 - 116 | 91.2 | 2 | 434 - 655 | 612 | 2.5 |

表 6. 由 LC/MS/MS 获得的 Bio-Rad QC 运行结果 (利用 HPLC 由 Bio-Rad 确定检测范围)。所有测定结果均以 nmol/L 表示

| 化合物 | 游离/总 | 浓度 1 | | | 浓度 2 | | |
|---------|------|-------------|-------------|--------|-------------|-------------|--------|
| | | 范围 (HPLC) | 测定值 (ng/mL) | CV (%) | 范围 (HPLC) | 测定值 (ng/mL) | CV (%) |
| 多巴胺 | 游离 | 290 - 490 | 401 | 3.4 | 2465 - 4105 | 3323 | 2.8 |
| 去甲肾上腺素 | 游离 | 185 - 305 | 227 | 5.8 | 920 - 1410 | 1135 | 4.8 |
| 肾上腺素 | 游离 | 52.5 - 104 | 78 | 5.3 | 370 - 570 | 473 | 2 |
| 3-甲氧酪胺 | 总 | 171 - 291 | 267 | 3.8 | 2280 - 3420 | 3335 | 2.2 |
| 去甲变肾上腺素 | 总 | 1200 - 2000 | 1641 | 2.4 | 5920 - 8900 | 7528 | 2.8 |
| 变肾上腺素 | 总 | 350 - 590 | 462 | 2 | 2200 - 3320 | 3103 | 2.5 |

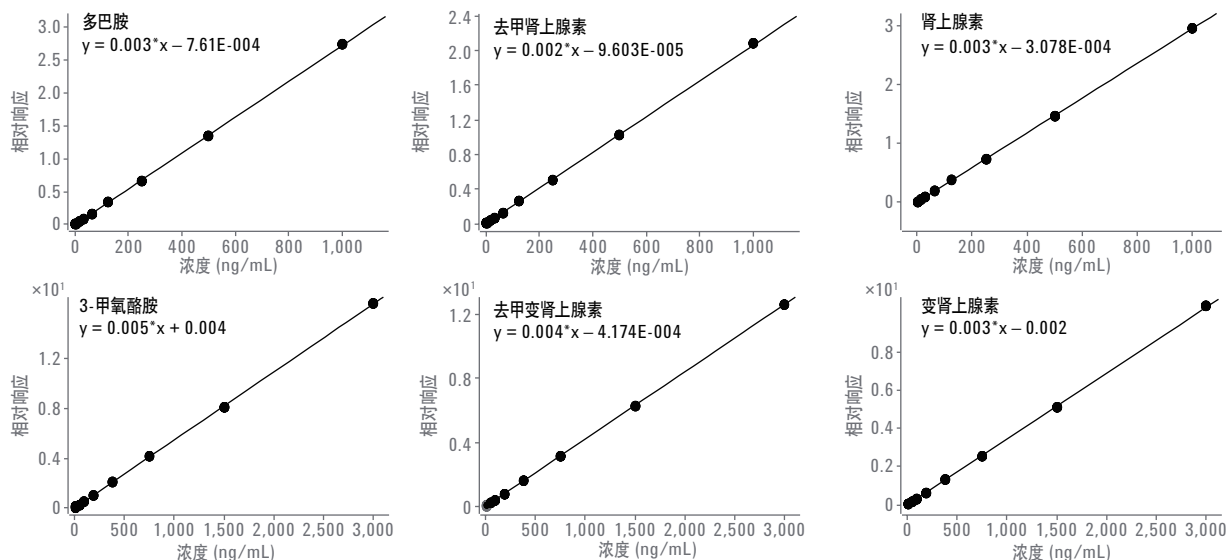


图 3. 儿茶酚胺类、变肾上腺素类和 3-甲氧酪胺的校准曲线

参考文献

- Whiting, M. J. Simultaneous measurement of urinary metanephrines and catecholamines by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Ann. Clin. Biochem.* **2009**, *46*, pp 129-136.
- Talwar, D.; *et al.* Extraction and separation of urinary catecholamines as their diphenyl boronate complexes using C solid-phase extraction 18 sorbent and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatog. B* **2002**, *769*, pp 341-349.
- Anon. Extraction of Catecholamines from Urine, AN1071A; Dr. Wéber Consulting KFT, Göd-Felsőöd, Hungary. www.weber.hu/PDFs/SPE/AN1071S_CatecholaminesUrine.pdf

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com/chem/clinicalresearch

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2015
2015年9月28日, 中国出版
5991-6194CHCN



Agilent Technologies