



# 利用 LC/MS/MS 定量分析血浆中的儿茶酚胺类物质

使用 Agilent Captiva ND<sup>Lipids</sup>、BondElut PBA SPE、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血浆中去甲肾上腺素、肾上腺素和多巴胺定量的灵敏度高、特异性好的 LC/MS/MS 分析方法。采用 Agilent Captiva ND<sup>Lipids</sup> 过滤产品和选择性固相萃取流程对血浆进行净化。此分析方法可达到所需的实用灵敏度，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 < 5%)，且所有校准曲线都获得了绝佳的线性 ( $R^2 > 0.9997$ )。



Agilent Technologies

## 前言

本研究开发出的高效样品前处理流程适用于同时提取血浆中的去甲肾上腺素、肾上腺素和多巴胺（图 1）。将不同浓度的各种分析物加入洁净血浆中可制得校准物。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 1 mM 氯化铵水溶液组成的流动相。研究中对定量 MRM 离子对进行监测，并加入了每种分析物的氘代内标以确保定量分析的准确性与重现性。

## 实验部分

### 液相色谱方法

液相色谱系统由 Agilent 1290 Infinity 液相色谱二元泵、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重现出相同的色谱分析结果。

### 质谱方法

安捷伦 MS/MS 系统由采用安捷伦喷射流技术的 Agilent 6460 三重四极杆质谱仪和 Agilent MassHunter 软件 B.07.00 组成。

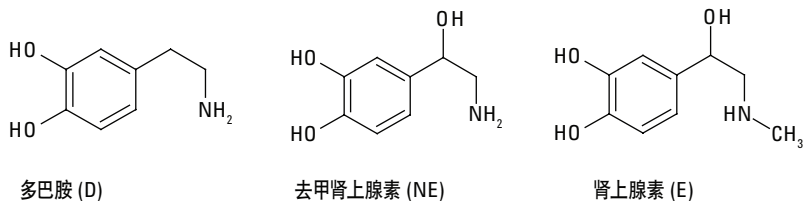


图 1. 所研究的儿茶酚胺类物质的结构

## LC 条件

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) 1 mM 氯化铵水溶液 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 3.8                0 4.0                95 10.0               95 10.1               0 13.0               0

## 质谱条件

参数	值
离子模式	安捷伦喷射流 ESI+
干燥气温度	300 °C
干燥气 (氮气) 流速	5 L/min
雾化器气体 (氮气) 压力	50 psi
鞘气 (氮气) 温度	400 °C
鞘气流量	12 L/min
毛细管电压	2500 V
喷嘴电压	0 V
Q1/Q3 分辨率	0.7 个质量单位
驻留时间	50 ms
Delta EMV	200 V

## 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 血浆 MSG3000 购自 Golden West Biologicals (Temecula, CA)。血浆内分泌激素对照品 0010 和 0020 购自 ChromSystems。Burdick & Jackson LC/MS 级甲醇和试剂购自 VWR 和 Sigma-Aldrich。

将 5.75 g  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  溶解于 500 mL 水中，并用 30% 的  $\text{NH}_4\text{OH}$  将其 pH 调节为 10，以制得 pH 为 10 的 100 mM  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  缓冲液。

## 样品前处理

校准物 (Cerilliant) 由洁净的血浆基质 (Golden West Biologicals) 制得。采用同位素标记的内标 (Cerilliant) 并对其浓度进行调节，使其响应处于所需校准曲线范围的中部。实验采用 ChromSystems 血浆对照品。**重要信息：**在样品分析之前，血浆应冷冻保存于  $-80^\circ\text{C}$  下。采用含 0.5 M EDTA 和 317 mg/mL 焦亚硫酸钠的稳定剂溶液确保血浆解冻后儿茶酚胺保持稳定。

表 1. MRM 离子对

化合物	母离子	子离子	碎裂电压 (V)	CE (V)	CAV (V)
去甲肾上腺素	152.1	107	115	16	5
去甲肾上腺素-D6	176.1	111.1	65	24	5
肾上腺素	184.1	151	70	20	5
肾上腺素-D6	190.1	172.1	70	8	5
多巴胺	154.1	119	75	16	3
多巴胺-D4	158.1	95.1	75	28	3

## 样品预处理

向血浆样品、校准物和对照品中加入 2% v/v 的稳定剂溶液。

样品前处理包括两个步骤：

### 步骤 1 — 蛋白质沉淀和脂质去除

1. 向 Agilent Captiva ND<sup>Lipids</sup> 小柱 (3 mL, 部件号 A5300635) 中加入 1.5 mL 0.5% 甲酸的乙腈低温溶液
2. 加入 50  $\mu\text{L}$  内标混合溶液
3. 加入 750  $\mu\text{L}$  预处理后的样品
4. 用 1.5 mL 空移液枪头混合 3 - 5 次
5. 等待 5 分钟
6. 在真空度为 7" Hg 的条件下抽滤 2 分钟，然后置于 15" Hg 下抽滤，使其充分干燥
7. 采用滤液执行步骤 2

### 步骤 2 — 固相萃取 (SPE)

1. 使用得自步骤 1 的滤液
2. 加入 2 mL 100 mM  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  缓冲液 (pH 10)
3. 用下列溶剂/溶液按次序活化 SPE 小柱 (Agilent BondElut PBA, 100 mg, 3 mL, 部件号 12102127) :
  - 1 mL 乙腈
  - 1 mL 5% 甲酸的甲醇溶液
  - 1 mL 100 mM  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  缓冲液 (pH 10)
4. 加入样品
5. 用下列溶液按次序进行冲洗:
  - 2 mL 溶于 95% 甲醇的 1%  $\text{NH}_4\text{OH}$
  - 2 mL 溶于 95% 乙腈的 1%  $\text{NH}_4\text{OH}$
  - 2 mL 溶于 30% 乙腈的 1%  $\text{NH}_4\text{OH}$
  - 在全真空下抽干 5 分钟
6. 用 3  $\times$  500  $\mu\text{L}$  5% 甲酸的甲醇溶液进行淋洗  
最后，在 5" Hg 的真空下抽滤 60 秒
7. 于 35  $^\circ\text{C}$  在氮气流下吹干
8. 用 100  $\mu\text{L}$  0.1% 甲酸水溶液复溶

说明：推荐使用硅烷化玻璃器皿以获得最佳回收率。

## 数据分析

Agilent MassHunter 定量数据分析软件 (B0.07.00) 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 PFP 色谱柱实现了所有分析物的色谱分离 (图 2)。在每次运行结束时进行额外的清洗以获得卓越的重现性。尽管未采用此方法进行测定，但肾上腺素与去甲肾上腺素之间的分离以及以及变肾上腺素与 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，这些化合物将相互干扰，导致不准确的定量结果。图 3 显示了这些化合物的分离结果。

为研究 SPE 萃取流程的基质效应和回收率，实验中配制并分析了 A、B、C 三组溶液。这些混合物中包含 9 个不同浓度的全部三种分析物及其内标。将溶液 A 加标至 0.2% 甲酸水溶液中，并进样分析。对溶液 B 中的洁净血浆进行萃取后对其进行加标 (萃取后)。对溶液 C 中的洁净血浆进行加标后对其进行萃取 (萃取前)。

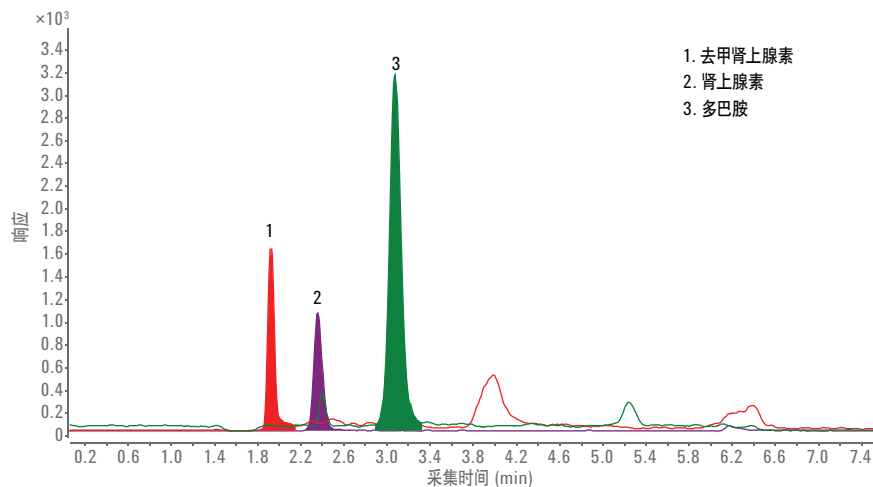


图 2. 儿茶酚胺类物质的色谱图

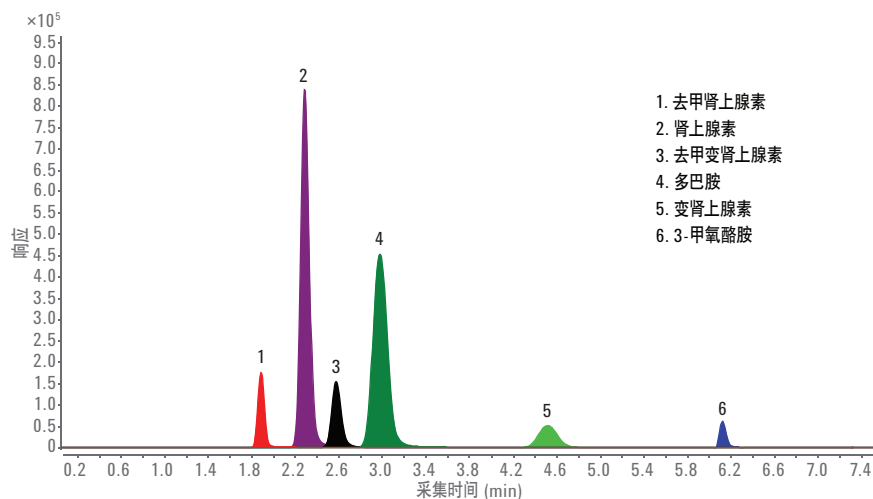


图 3. 儿茶酚胺类、变肾上腺素类和 3-甲氧酪胺的色谱图

基质效应和回收率的计算公式如下：

$$\text{基质效应}\% = B/A \times 100$$

$$\text{回收率}\% = C/B \times 100$$

A = 净标准溶液

B = 萃取后加标的血浆（萃取后）

C = 加标后萃取的血浆（萃取前）

三种被分析物的基质效应介于 42% - 119% 之间，而回收率介于 56% - 59% 之间（表 2）。因此，虽然在结果观察到了基质效应，但通过内标补偿后仍获得了可接受的回收率，如表 3 和表 4 所示。

连续三天对校准标准样进行萃取，以确定日间精密度和准确度。全部三种分析物均得到了可接受的准确度，且线性范围内所有浓度的变异系数均小于 5%（表 3）。分别于连续三天以及一天中三次对 ChromSystems 对照品进行萃取以确定日间和日内的变异系数，所得到的变异系数均小于 4%（表 4）。该方法在浓度为 5 - 2500 pg/mL 的测定范围内具有出色的线性，R<sup>2</sup> 值均大于 0.9997（图 4）。

表 2. SPE 流程的基质效应和回收率

化合物	基质效应% (n = 3)		回收率% (n = 3)	
	平均值	SD	平均值	SD
去甲肾上腺素	42.3	1.9	56.3	6.3
肾上腺素	70.1	6.6	56.5	2.4
多巴胺	118.5	21.5	58.7	4.3

表 3. 分析物的分析性能汇总

化合物	R <sup>2</sup> (n = 3)	浓度 (pg/mL)	浓度 (nmol/L)	准确度% (n = 3)	日间 CV% (n = 3)
去甲肾上腺素	0.9999	5	0.03	107.6	4.7
		20	0.12	95.4	1.2
		250	1.5	98.6	1.4
		2500	14.8	100.2	0.3
肾上腺素	0.9998	5	0.03	108.4	2.1
		20	0.11	96.5	1.1
		250	1.4	97.5	1.6
		2500	13.6	100.6	0.3
多巴胺	0.9997	5	0.03	108.7	3.2
		20	0.13	98.8	2.6
		250	1.6	98.1	0.9
		2500	16.3	99.6	1.1

表 4. 利用 LC/MS/MS 得到的 ChromSystems 对照品结果

化合物	QC 水平	测定值日内 (n = 3)			测定值日间 (n = 3)		日间 CV% (n = 3)
		pg/mL	nmol/L	日内 CV% (n = 3)	pg/mL	nmol/L	
去甲肾上腺素	0010	240	1.42	3.6	242	1.43	3.0
	0020	1756	10.4	0.7	1767	10.4	0.8
肾上腺素	0010	93.4	0.51	1.6	92.3	0.50	1.2
	0020	451	2.46	0.7	449	2.45	0.4
多巴胺	0010	164	1.07	0.9	162	1.06	0.8
	0020	595	3.88	0.5	597	3.90	0.9

## 结论

本研究中开发出了一种用于血浆中肾上腺素、去甲肾上腺素和多巴胺的稳定定量分析方法。利用 Agilent Captiva ND<sup>Lipids</sup> 过滤和固相萃取产品同时提取出全部三种分析物，并获得了良好的回收率。研究中还开发出与 LC/MS/MS 条件兼容的分析物的色谱分离方法。

## 参考文献

1. Whiting, M. J. Simultaneous measurement of urinary metanephrines and catecholamines by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Ann. Clin. Biochem.* **2009**, *46*, 129–136
2. Phenylboronic Acid (PBA) Solid Phase Extraction Mechanisms and Applications (苯硼酸 (PBA) 固相萃取机理和应用), 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 SI-02442, **2010**

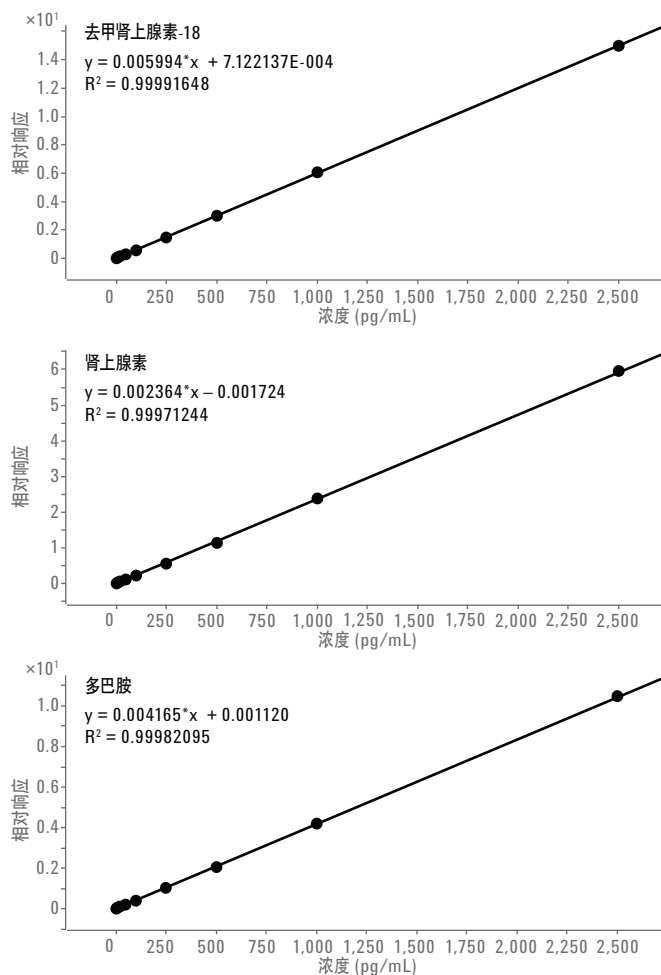


图 4. 儿茶酚胺类物质的校准曲线

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com/chem/clinicalresearch](http://www.agilent.com/chem/clinicalresearch)

仅限研究使用。不可用作诊断方法。

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, 2016  
2016 年 1 月 15 日, 中国出版  
5991-6530CHCN



Agilent Technologies