



利用 LC/MS/MS 定量分析血浆中的 变肾上腺素类化合物和 3-甲氧酪胺

使用 Agilent SimpliQ WCX 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变肾上腺素、去甲变肾上腺素和 3-甲氧酪胺定量的灵敏度高、特异性好的 LC/MS/MS 分析方法。该方法利用固相萃取 (SPE) 流程提取分析物并除去血浆干扰物，可实现所需的功能灵敏度，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 ($R^2 > 0.9996$)。



Agilent Technologies

前言

本研究开发出的高效固相萃取 (SPE) 样品前处理流程适用于同时提取血浆中的变肾上腺素、去甲变肾上腺素和 3-甲氧酪胺 (图 1)。将不同浓度的各种分析物加入至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 0.2% 甲酸水溶液组成的流动相。研究中对定量和定性 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 B0.07.00 组成。



图 1. 变肾上腺素类和 3-甲氧酪胺的结构

液相色谱条件

参数	值																																	
色谱柱	Agilent Pursuit PFP 柱, 2 × 150 mm, 3 μm (部件号 A3051150X020)																																	
保护柱	Agilent Pursuit PFP MetaGuard 柱, 200Å × 2 mm, 3 μm (3/包, 部件号 A3051MG2)																																	
流动相	A) 0.2% 甲酸水溶液 B) 0.2% 甲酸的甲醇溶液																																	
柱温	40 °C																																	
自动进样器温度	4 °C																																	
进样量	20 μL																																	
进样针清洗	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	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>%B</th><th>流速 (mL/min)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>2</td><td>0.3</td></tr><tr><td>0.5</td><td>2</td><td>0.3</td></tr><tr><td>1.5</td><td>60</td><td>0.3</td></tr><tr><td>4.0</td><td>60</td><td>0.3</td></tr><tr><td>4.01</td><td>95</td><td>0.3</td></tr><tr><td>6.0</td><td>95</td><td>0.3</td></tr><tr><td>6.1</td><td>95</td><td>0.5</td></tr><tr><td>7.5</td><td>95</td><td>0.5</td></tr><tr><td>7.6</td><td>2</td><td>0.3</td></tr><tr><td>10.5</td><td>2</td><td>0.3</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	%B	流速 (mL/min)	0	2	0.3	0.5	2	0.3	1.5	60	0.3	4.0	60	0.3	4.01	95	0.3	6.0	95	0.3	6.1	95	0.5	7.5	95	0.5	7.6	2	0.3	10.5	2	0.3
时间 (min)	%B	流速 (mL/min)																																
0	2	0.3																																
0.5	2	0.3																																
1.5	60	0.3																																
4.0	60	0.3																																
4.01	95	0.3																																
6.0	95	0.3																																
6.1	95	0.5																																
7.5	95	0.5																																
7.6	2	0.3																																
10.5	2	0.3																																

MS 条件

参数	值
电离模式	安捷伦喷射流 ESI+
干燥气温度	350 °C
干燥气 (氮气) 流速	5 L/min
雾化器气体 (氮气) 压力	40 psi
鞘气 (氮气) 温度	400 °C
鞘气流量	11 L/min
毛细管电压	3000 V
喷嘴电压	0 V
Q1/Q3 分辨率	0.7 个质量单位
驻留时间	40 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)。血浆内分泌物对照品 0010 和 0020 购自 ChromSystems。Burdick & Jackson LC/MS 级甲醇和试剂购自 VWR 和 Sigma-Aldrich。

将 575 mg $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 溶解于 500 mL 水中, 并使用 30% 的 NH_4OH 将其 pH 调节为 6.5, 制得 pH 6.5 的 10 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 缓冲液。

样品前处理

通过将每种分析物加标至 DC Mass Spect Gold 血浆中制得标准校准物。通过利用 DC Mass Spect Gold 血浆进行连续稀释来获得其余标准校准物浓度。SPE 流程如下:

1. 样品预处理: 向 0.5 mL 血浆中加入 50 μL 内标混合物和 0.5 mL 10 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 缓冲液 (pH 6.5)
2. 依次用 1 mL 甲醇和 1 mL 10 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 缓冲液 (pH 6.5) 活化固相萃取柱 (Agilent Simplic Q WCX, 30 mg, 1 mL, 部件号 5982-3513)
3. 加入经预处理的样品
4. 依次用 1 mL H_2O 、1 mL 甲醇和 1 mL 0.2% 甲酸的乙腈溶液清洗, 然后在真空下抽干 5 分钟
5. 用 250 μL 2% 甲酸的乙腈溶液洗脱两次, 然后在 5 英寸汞柱真空下抽干 60 秒
6. 滤液在氮气流下于 40 $^\circ\text{C}$ 蒸干
7. 用 100 μL 0.2% 甲酸水溶液复溶。将样品转移至自动进样器样品瓶中, 并进样至 LC/MS/MS 系统

表 1. MRM 离子对

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	CE (V)	CAV (V)
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	106.1	105	20	3
去甲变肾上腺素	166.1	121.0	105	20	3
去甲变肾上腺素-D3	169.1	109.1	105	20	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

数据分析

利用 Agilent MassHunter 定量数据分析软件 (B0.07.00) 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 PFP 色谱柱实现了所有分析物的色谱分离 (图 2)。变肾上腺素与 3-甲氧酪胺之间的分离尤为关键, 因为这些化合物会产生相同的碎片。并且, 尽管未采用该方法进行测定, 肾上腺素与去甲变肾上腺素之间的分离因为同样的原因也同等重要。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 显示了这些化合物获得的分离结果。

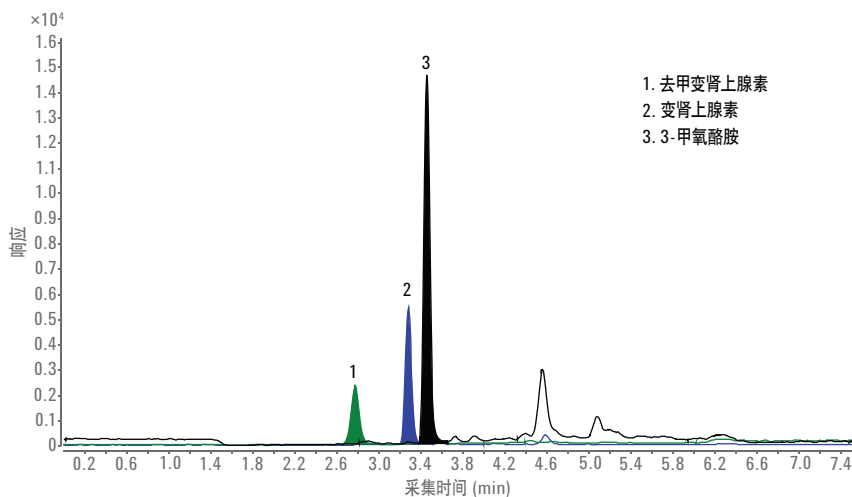


图 2. 变肾上腺素类和 3-甲氧酪胺的色谱图

为研究 SPE 萃取流程的基质效应和回收率, 本研究配制并分析了三组溶液 A、B 和 C。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。萃取溶液 B 中的洁净血浆, 然后进行加标 (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)。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)

基质效应介于 36% - 78% 之间, 而回收率介于 88% - 104% 之间 (表 2)。因此, 虽然在实验中观察到了基质效应, 但是通过内标补偿后获得了可接受的回收率, 如表 3 和表 4 所示。

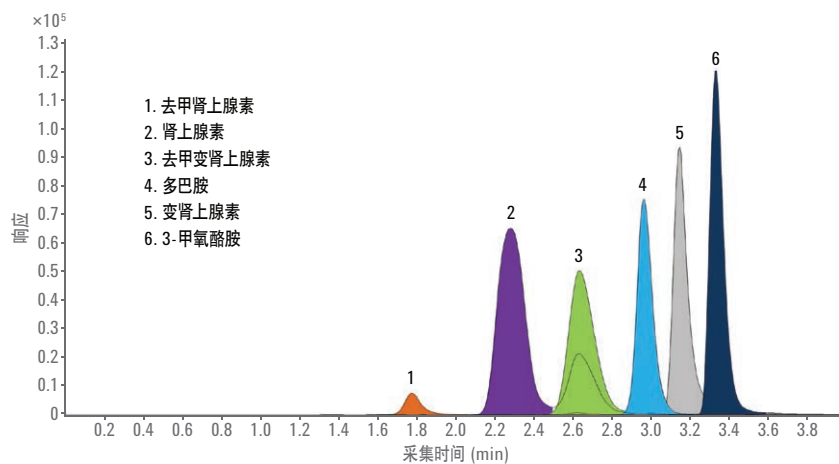


图 3. 儿茶酚胺类、变肾上腺素类和 3-甲氧酪胺的色谱图

表 2. SPE 流程的基质效应和回收率

化合物	基质效应% (n = 9)		回收率% (n = 9)	
	平均值	SD	平均值	SD
3-甲氧酪胺	78.3	7.2	99.1	16.9
去甲变肾上腺素	36.0	13.7	87.7	27.0
变肾上腺素	73.0	9.0	104.4	17.3

表 3. 分析物的分析性能汇总

化合物	R ² (n = 3)	浓度 (µg/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	0.9997	15.63	0.09	115.4	2.4	1.9
		78.13	0.47	97.6	1.8	1.6
		1250	7.5	100.4	1.1	1.8
		10000	59.8	100.0	0.4	1.0
去甲变肾上腺素	0.9996	15.63	0.09	117.3	2.7	4.9
		78.13	0.43	100.0	2.4	2.5
		1250	6.8	97.1	2.5	1.8
		10000	54.6	100.4	0.4	0.8
变肾上腺素	0.9998	15.63	0.08	116.6	1.7	1.9
		78.13	0.40	96.5	2.5	2.2
		1250	6.3	100.2	1.1	0.9
		10000	50.7	100.3	0.6	0.6

分别于连续三天以及一天中三次萃取校准标样，以确定日间和日内的精密度和准确度。三种分析物均得到可接受的日内准确度，并且线性范围内所有浓度的日间和日内变异系数均小于 5%（表 3）。连续三天萃取 ChromSystems 对照样品，所得到的变异系数均小于 6%（表 4）。该方法在浓度为 15.63 - 10000 pg/mL 的测定范围内具有出色的线性，R² 值均大于 0.9996（图 4）。

结论

本研究中开发出了一种用于血浆中变肾上腺素类、去甲变肾上腺素和 3-甲氧酪胺定量分析的稳定方法。离线固相萃取在用于同时提取血浆中全部三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 条件兼容的分析物的色谱分离方法。典型方法的性能结果均符合可接受标准。

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

化合物	浓度 1 (n = 3)		浓度 2 (n = 3)	
	测定值 (pg/mL)	CV %	测定值 (pg/mL)	CV %
3-甲氧酪胺	-	-	1768.9	0.8
去甲变肾上腺素	95.9	5.1	7369.9	3.0
变肾上腺素	85.0	2.2	1620.8	3.2

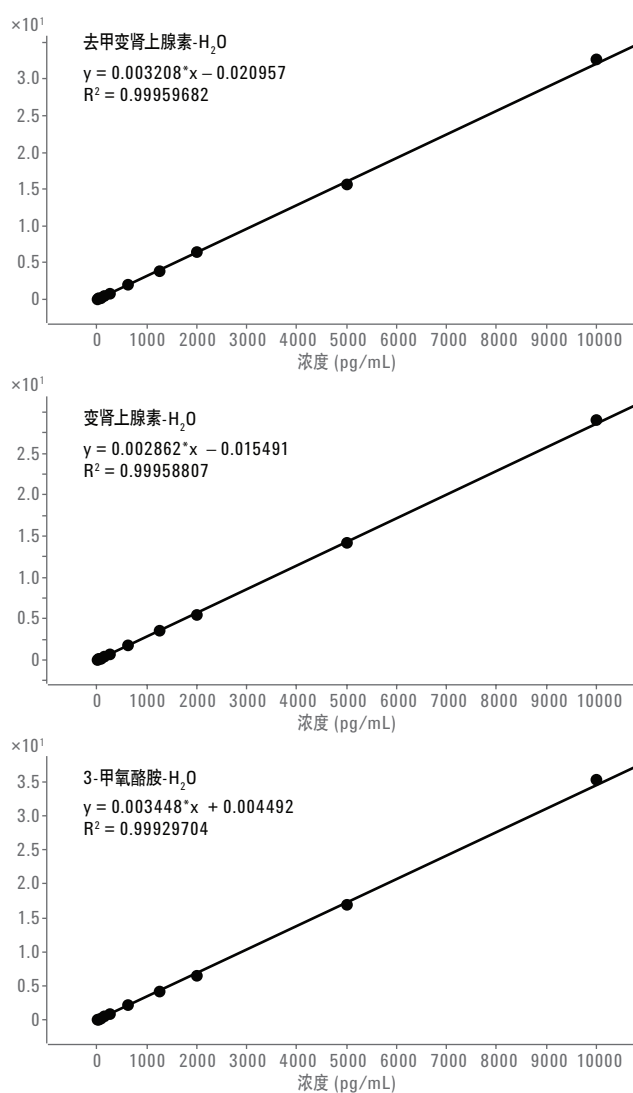


图 4. 变肾上腺素类和 3-甲氧酪胺的校准曲线

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. Gabler, J. A sensitive and interference-free liquid chromatography tandem mass spectrometry method for measuring metanephrines in plasma. *J. Chromatograph. Separat. Techniq.* **2012**, S2

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
5991-6531CHCN



Agilent Technologies