

使用 LC-MS/MS 检测人血浆中儿茶酚胺及其代谢物

LCMSMS-951

摘要：本文使用岛津液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 建立了人血浆中儿茶酚胺及其代谢物的测定方法。采用固相萃取对样品进行前处理，内标法定量分析。分别对该方法的线性、精密度和准确度进行了考察。结果显示方法的专属性良好，线性相关系数均大于 0.999，准确度在 85.13~115.93% 之间；对低中高浓度进行了回收率考察，回收率在 80.87 ~ 111.54% 之间，该方法操作简捷、特异性好、分析速度快，可以为临床人血浆中儿茶酚胺类物质的检测提供很好的借鉴和参考。

关键词：儿茶酚胺 LCMS-8045 固相萃取

技术特点：

❖ 采用固相萃取前处理，方法简单易操作、通量大，适合临床样本分析。

儿茶酚胺 (CAs) 类物质主要包括肾上腺素 (E 或 Ad)、去甲肾上腺素 (NE 或 NA) 和多巴胺 (DA)。CAs 是由肾上腺髓质、肾上腺神经元以及肾上腺外嗜铬体合成与分泌的单胺类神经递质，是具有较强的生理学活性的内源性物质，在大脑和神经信号传导中起着重要的作用。血浆和尿液中 CAs 及其代谢物水平与人体多种生理、病理现象有密切关系，不仅对人体的心血管系统、神经系统、内分泌系统、肾脏、平滑肌组织等的生理活动起着广泛的调节作用，还同时影响人体的代谢。检测生物样本中的 CAs 水平不仅对于嗜铬细胞瘤、副神经节瘤、神经母细胞瘤、

高血压、心肌梗塞、肾上腺髓质增生等疾病的诊断和治疗具有重要的临床意义，并且有助于甲状腺功能异常、充血性心力衰竭、糖尿病、肾脏功能不全等疾病的诊断。同时，对于神经电生理等基础医学研究也具有重要的意义。

因此本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪与三重四极杆质谱仪联用检测人血浆中儿茶酚胺及其代谢物的方法，该方法操作简捷、特异性好、灵敏度高、分析速度快，适用临床检测的需要，供相关检测人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-8045 超高效液相色谱四极杆质谱联用仪，具体配置为：

系统控制器：	CBM-20A	脱气机：	DGU-20A _{SR}
输液泵：	LC-30AD×2	柱温箱：	CTO-20AC
自动进样器：	SIL-30AC	质谱仪：	LCMS-8045
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.118		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：	Discovery HS F5-3 (150 mm×2.1 mm I.D, 3 μm)		
流动相：	A: 0.2 mM 氟化铵水溶液 (含 0.1% 甲酸)；B: 乙腈		
进样体积：	30 μL	柱温：	40°C
流速：	0.4 mL/min		
洗脱方式：	梯度洗脱，初始浓度为 B 相 5%，时间程序见表 1。		

表 1 液相梯度时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	泵	B.Conc	5
4.50	泵	B.Conc	20
5.50	泵	B.Conc	98
7.50	泵	B.Conc	98
7.60	泵	B.Conc	5
11.00	控制器	Stop	

质谱条件:

分析仪器 : LCMS-8045

D L 温度 : 150°C

离子源 : ESI (+)

加热模块温度 : 450°C

雾化气流速 : 3.0 L/min

干燥气流速 : 5.0 L/min

加热气流速 : 15.0 L/min

扫描模式 : 多反应监测 (MRM)

接口温度 : 400°C

MRM 参数 : 见表 2

表 2 MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
NE	152.10	107.10	-26	-17	-17
NE-IS	157.90	111.05	-23	-18	-19
E	183.90	107.00	-20	-12	-11
E-IS	189.90	112.20	-20	-12	-11
NMN	165.90	134.10	-29	-18	-12
NMN-IS	168.90	137.10	-12	-18	-12
DA	153.90	91.10	-16	-25	-15
DA-IS	158.10	95.10	-28	-27	-16
MN	198.15	148.15	-20	-19	-14
MN-IS	201.10	151.10	-20	-19	-14
3-MT	167.90	91.10	-12	-25	-15
3-MT-IS	172.00	95.10	-12	-26	-15

1.3 标准品、质控品及样品制备

1.3.1 标准工作曲线配置

用甲醇 (含 0.1% 抗坏血酸) 配制浓度均为 100 µg/mL 单标对照品储备液, 随后用纯水将标准储备溶液配制为一定浓度的混合对照品溶液, 再稀释成对应浓度的标准工作液; 用甲醇 (含 0.1% 抗坏血酸) 配制浓度均为 100 µg/mL 内标对照品储备液, 随后用纯水将标准储备溶液配置为一定浓度的混合内标溶液, 备用。

1.3.2 标准品及样品溶液配置

取 450 µL 对照品或血浆样品于 1.5 mL 离心管中, 加入 50 µL 内标混合溶液, 涡旋 10 s 充分混匀。将经过预处理的样品 400 µL 加载到经 200 µL 甲醇和 200 µL 20 mM 乙酸铵溶液预处理的 WCX 96 孔板中。加载样品

之后，依次使用 200 μL 10% 甲醇和 200 μL 异丙醇对 96 孔板进行清洗。然后将 96 孔板在正压条件下干燥 30 s。使用 4 份 50 μL 含有 5% 甲酸的甲醇，将目标化合物由板洗脱到 200 μL 的 96 孔样品收集板中。40 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干后，用 100 μL 纯水溶解，混匀。

1.3.3 质控样品配置

分别取浓度为 500、2000 和 10000 pg/mL 的标准品溶液各 100 μL ，加入 900 μL 空白血浆，涡旋混匀 5 min，得低中高浓度质控品溶液；分别取低中高浓度质控品溶液 LQC, MQC, HQC 各 450 μL ，加入 50 μL 内标混合溶液，涡旋 10 s 充分混匀后按 1.3.2 方法进行前处理。

■ 结果与讨论

2.1 MRM 色谱图

NE、E 定量下限为 20 pg/mL ，其他分析物均为 10 pg/mL ，定量限浓度点对应色谱图如下所示。

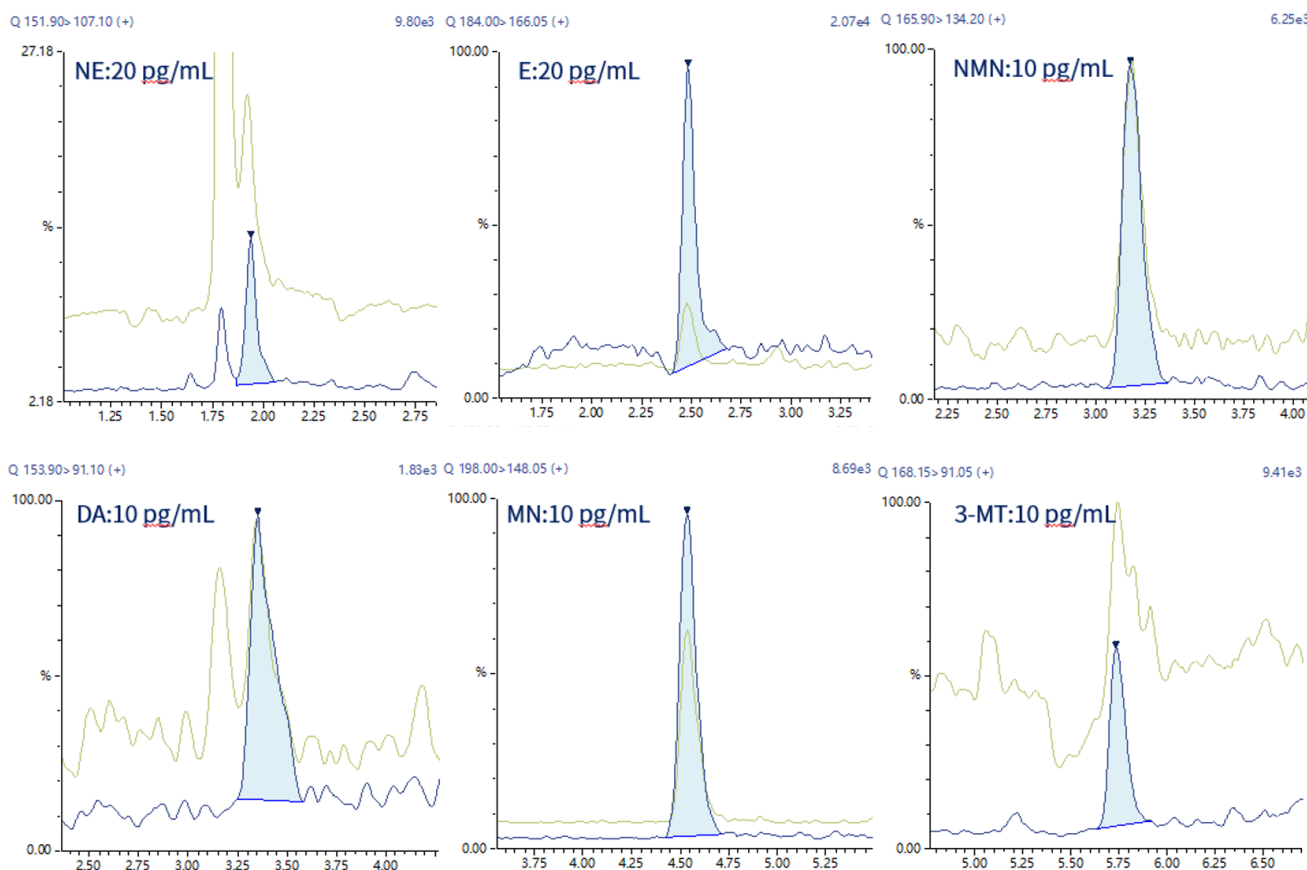


图 1 标准曲线最低点 MRM 色谱图

2.2 校准曲线

采用内标法建立标准曲线，3 种儿茶酚胺及其 3 种代谢物在线性浓度范围内线性良好，相关系数均在 0.999 以上，准确度在 85.13~115.93% 之间。

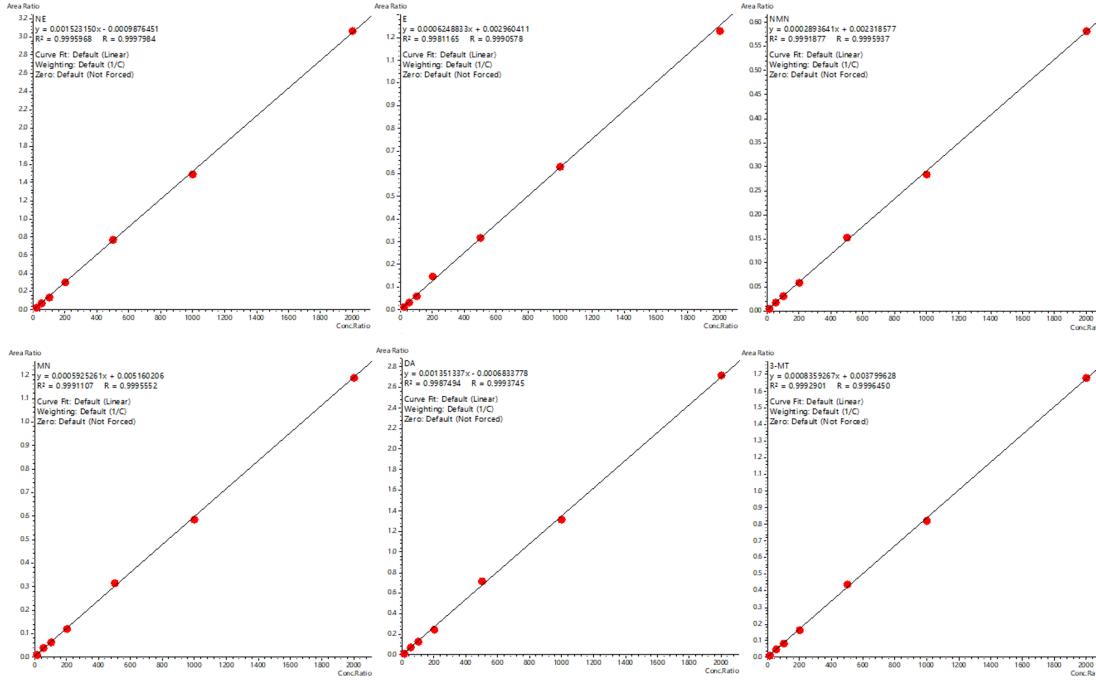


图 2 标准曲线结果

表 3 校准曲线结果

No.	目标物	线性范围 (pg/mL)	相关系数 (r)	精密度 (%)
1	NE	20 ~ 2000	0.9997	94.02 ~ 106.57
2	E	20 ~ 2000	0.9990	90.14 ~ 115.93
3	NMN	10 ~ 2000	0.9995	85.45 ~ 114.54
4	DA	10 ~ 2000	0.9993	96.85 ~ 110.89
5	MN	10 ~ 2000	0.9995	85.13 ~ 115.12
6	3-MT	10 ~ 2000	0.9996	94.65 ~ 110.54

2.3 精密度考察

分别取低中高浓度点样品，连续进样 6 针考察精密度，结果如表 4 所示。

表 4 峰面积精密度结果 (n=6)

浓度	编号	NE	E	NMN	DA	MN	3-MT
50 pg/mL	1	53549	219930	58946	27900	76178	52165
	2	53677	215301	52582	24124	79296	54542
	3	51561	201571	59414	25805	81236	58921
	4	53491	207887	55886	28031	71713	51467
	5	53339	209666	53421	25145	77278	53672
	6	53821	214093	54539	24170	81311	57178
	平均值	53240	211408	55798	25863	77835	54657
CV(%)	1.57	3.04	5.11	6.76	4.68	5.30	

200 pg/mL	1	231868	947465	199813	112426	292224	280099
	2	234962	959855	209001	116886	296843	291630
	3	230233	972601	197109	120990	290157	288088
	4	239350	989607	213623	124058	303042	294812
	5	233190	983723	208337	121685	308223	305524
	6	223282	964868	200154	120971	303088	305997
	平均值	232147	969686	204673	119502	298929	294358
	CV(%)	2.31	1.61	3.19	3.49	2.35	3.43
1000 pg/mL	1	1236608	5401615	1010501	670220	1492199	1667338
	2	1264332	5453911	1015789	668582	1474416	1680704
	3	1258599	5444680	1014262	693796	1461957	1688987
	4	1280461	5554709	1019556	661527	1450274	1708153
	5	1282553	5595848	1023814	663668	1461899	1664351
	6	1291020	5623452	1013896	679939	1467318	1705896
	平均值	1268929	5512369	1016303	672955	1468011	1685905
	CV(%)	1.57	1.65	0.46	1.79	0.97	1.11

2.4 加标回收结果

按 1.3 中前处理方法对低中高浓度质控品进行前处理，每个浓度质控品重复制备 3 份，按 1.2 中的分析条件对质控品进行分析，质控品的准确度如表 5 所示。

表 5 质控品分析结果

项目	NE		E		NMN	
	测定值 (pg/mL)	准确度 (%)	测定值 (pg/mL)	准确度 (%)	测定值 (pg/mL)	准确度 (%)
LQC	46.53	93.06	45.15	90.30	41.98	83.95
	44.88	89.75	43.38	86.76	40.53	81.06
	53.98	107.97	43.22	86.44	40.83	81.67
MQC	205.90	102.95	206.94	103.47	190.75	95.38
	195.88	97.94	204.48	102.24	195.16	97.58
	210.68	105.34	203.20	101.60	187.87	93.94
HQC	985.68	98.57	808.73	80.87	981.99	98.20
	959.80	95.98	815.57	81.56	1029.91	102.99
	984.84	98.48	812.53	81.25	972.26	97.23
项目	DA		MN		3-MT	
	测定值 (pg/mL)	准确度 (%)	测定值 (pg/mL)	准确度 (%)	测定值 (pg/mL)	准确度 (%)
LQC	42.72	85.45	47.38	94.75	50.44	100.89
	43.25	86.51	50.85	101.70	52.27	104.54
	43.26	86.51	43.55	87.11	54.72	109.43

MQC	180.34	90.17	183.28	91.64	220.28	110.14
	177.77	88.88	197.83	98.91	223.08	111.54
	174.91	87.45	199.25	99.62	217.72	108.86
HQC	898.49	89.85	927.63	92.76	1043.82	104.38
	881.50	88.15	925.70	92.57	1032.48	103.25
	876.61	87.66	920.69	92.07	1018.55	101.86

■ 结论

本文使用岛津液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 建立了人血浆中儿茶酚胺及其代谢物的测定方法。使用固相萃取法进行前处理，内标法定量，分别对方法的线性、精密度和准确度进行了考察。六个目标物在线性浓度范围内线性均良好，相关系数均大于 0.999；在三个浓度水平考察了质控品的准确度，质控品的准确度在 80.87 ~ 111.54% 之间；在三个浓度水平考察了仪器的精密度，其面积精密度在 0.46 ~ 6.76% 之间。该方法操作简捷、特异性好、灵敏度高、分析速度快，适用临床检测的需要，供相关检测人员参考。

岛津应用云

