

项目名称:	LC-MS 定量检测人血清中儿茶酚胺含量
方法开发人员	
方法起草人	
日期	2018.10.9

μ

No.	Assays	Subgroups	LOQ	Matrix	Sample Prep.	Instrument	Comments
01	Catecholamine	Epinephrine	0.1ng/mL	Serum	SPE	TSQ Endura	Inject 10uL
		Norepinephrine	0.05ng/mL				
		Dopamine	0.01ng/mL				
		Metanephrine	0.02ng/mL				
		Normetanephrine	0.02ng/mL				

简介：建立了使用Thermo Fisher Scientific Vanquish Flex超高效液相色谱仪与TSQ Endura™三重四极杆质谱仪联用技术测定人血清中儿茶酚胺类含量的检测方法。采用solam WCX SPE板对样品进行预处理，所得化合物的标准曲线、回收率与基质效应均符合临床检测要求，可准确、灵敏、快速定量检测人血清中儿茶酚胺类含量。

关键词：儿茶酚胺 血清 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪 Vanquish TSQ Endura

1. 临床意义（代谢机理、疾病诊断等）

儿茶酚胺是一种含有儿茶酚和胺基的神经类物质。主要包括肾上腺素(epinephrine, E)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、多巴胺(dopamine, DA)、甲氧基肾上腺素(metanephrine, MN)、甲氧基去甲肾上腺素(normetanephrine, NMN)。儿茶酚胺的主要生理作用是兴奋血管的α受体，使血管收缩；血浆里儿茶酚胺水平的变化显示不同的病态情形，通过测定其浓度可以起到辅助诊断的作用。涉及肾上腺髓质瘤，这些瘤结合大量的儿茶酚胺导致循环失常；涉及心血管系统，儿茶酚胺含量超标会引发高血压与心肌梗塞；含量过低时则通常导致低血压。因此，儿茶酚胺含量水平的不同和心脏猝死及冠状心脏病和心脏不充血等也有潜在联系。

正常参考值：
多巴胺（DA）

血浆：0.00~100.00ng/L
 尿液：0.00~600.00ug/24h
 去甲肾上腺素（NE）
 血浆：0.00~600.00ng/L
 尿液：0.00~90.00ug/24h
 肾上腺素（E）
 血浆：0.00~100.00ng/L
 尿液：0.00~20.00ug/24h

2.仪器、试剂耗材、标准物质

2.1仪器（名称、型号、来源、货号）

液相：Vanquish Flex（Thermo Fisher Scientific）

质谱：TSQ Endura（Thermo Fisher Scientific）

2.2 试剂等耗材

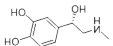
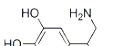
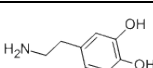
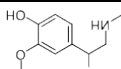
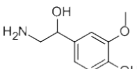
名称	纯度	来源	货号
甲醇	质谱纯	Thermo Fisher	A456-4
乙腈	质谱纯	Thermo Fisher	A955-4
异丙醇	色谱纯	Thermo Fisher	A451-4
甲酸	质谱纯	Thermo Fisher	A117-50
乙酸	≥99%	Sigma-Aldrich	A6283-500ML
乙酸铵	5M in H ₂ O	Sigma-Aldrich	09691-100ML

色谱柱（品牌、长度、直径、粒径、货号）：

Accucore PFP（Thermo Fisher，100*2.1mm, 2.6μm，Part No: 17426-102130）

SPE 小柱：SOLAμ WCX 2mg/ml 96 Well Plate(Thermo Fisher，Part No:60209-004)

2.3 标准物质

名称	CAS No.	分子量	分子式	结构式	来源	体积	原液浓度	货号	储存条件
Epinephrine	51-43-4	183.2	C ₉ H ₁₃ NO ₃		Cerilliant	-	-	E588580	-80℃
Norepinephrine	55-27-6	205.64	C ₈ H ₁₁ NO ₃ .HCl		Cerilliant	-	-	N674500	-80℃
Dopamine	62-31-7	189.64	C ₈ H ₁₁ NO ₂ .HCl		Cerilliant	-	-	-	-80℃
Metanephrine	881-95-8	233.69	C ₁₀ H ₁₅ NO ₃ .HCl		Cerilliant	-	-	M258760	-80℃
Normetanephrine	1011-74-1	219.67	C ₉ H ₁₃ NO ₃ .HCl		Cerilliant	-	-	N721500	-80℃
Epinephrine-d ₆	-	189.24	C ₉ H ₇ D ₆ NO ₃	-	Cerilliant	1mL	100ug/mL	E-077	-80℃

Norepinephrine-d6	1219803-04-9	211.68	C ₈ H ₆ D ₆ ClNO ₃	-	Cerilliant	-	-	N674502	-80°C
Dopamine-d4	203633-19-6	193.66	C ₈ H ₈ D ₄ ClNO ₂	-	Cerilliant	-	-	D533782	-80°C
Metanephrine-d3	1215507-88-2	236.71	C ₁₀ H ₁₃ D ₃ ClNO ₃	-	Cerilliant	-	-	M258762	-80°C
Normetanephrine-d3	1085333-97-6	222.68	C ₉ H ₁₁ D ₃ ClNO ₃	-	Cerilliant	-	-	N721502	-80°C

标准品母液制备：（包括溶解、稀释方法）

准确称取适量儿茶酚胺类标准品，分别用含 0.1%抗坏血酸的甲醇配制成浓度为 1.0mg/mL 的标准储备液。

备注：在配制肾上腺素及去甲肾上腺素母液时需加入少量 0.1mol/L HCl 进行溶解。

3.方法

3.1 前处理方法

取人血清样品稀释后，上样至活化平衡后的 SOLA μ WCX 96 well plate 中，淋洗，洗脱，收集洗脱液氮吹后复溶上 LCMSMS 检测。

3.2 液相色谱分析方法

液相色谱仪：Thermo Fisher Scientific Vanquish Flex

洗针液：乙腈：水：甲醇：异丙醇=1：1：1：1

色谱柱：Accucore PFP（Thermo Fisher，100*2.1mm, 2.6 μ m）

色谱柱温度：25°C

流动相 A：含 0.5%乙酸的水溶液（水相）

流动相 B：甲醇溶液（有机相）

进样量：10 μ L

梯度洗脱条件：

时间（min）	流速（mL/min）	%A	%B
0.00	0.25	98	2
1.00	0.25	98	2
2.00	0.25	80	20
3.50	0.25	2	98
4.50	0.25	2	98
4.60	0.25	98	2
6.00	0.25	98	2

3.3 质谱分析方法

质谱仪：TSQ Endura

离子源参数：（现场优化）

Ion Source Type: HESI II
 Spray voltage (V) : Positive 1000
 Sheath Gas (Arb) : 50 (5L/min)
 Aux Gas (Arb) : 10 (12L/min)
 Sweep Gas (Arb) : 0 (0L/min)
 Ion Transfer Tube Temp (°C) : 275
 Vaporizer Temp (°C) : 320

扫描参数:

Experiment Type: SRM
 Collision Gas Pressure (mTorr): 1.5
 Q1 Resolution (FWHM): 0.7
 Q3 Resolution (FWHM): 1.2

Compound	Precursor (m/z)	Product (m/z)	CE (V)	RF Lens (V)	Source Fragmentation (V)
E	166. 1	107. 1*	20	109	25
		135. 1	15		
		77. 1	36		
E-d6	172. 2	157. 1*	20	107	25
		111. 1	21		
NE	152. 1	107. 1*	18	99	0
		135. 1	13		
		77. 2	32		
NE-d6	158. 2	111. 1*	19	94	0
		139. 1	14		
DA	154. 1	91. 2	23	61	0
		119. 1	19		
		137. 1*	10		
DA-d4	158. 1	141. 1*	10	65	0
		94. 1	23		
MN	180. 1	148. 1	18	114	20
		165. 1*	17		
MN-d3	183. 2	151. 1*	19	109	20
		168. 1	17		
NMN	166. 1	121. 1*	17	94	0
		149. 1	13		
NMN-d3	169. 1	137. 1*	17	96	0

		109.2	20		
--	--	-------	----	--	--

注：标“*”代表定量离子，E、NE、DA、MN、NMN 分别选择 E-d6、NE-d6、DA-d4、MN-d3、NMN-d3 作为内标。

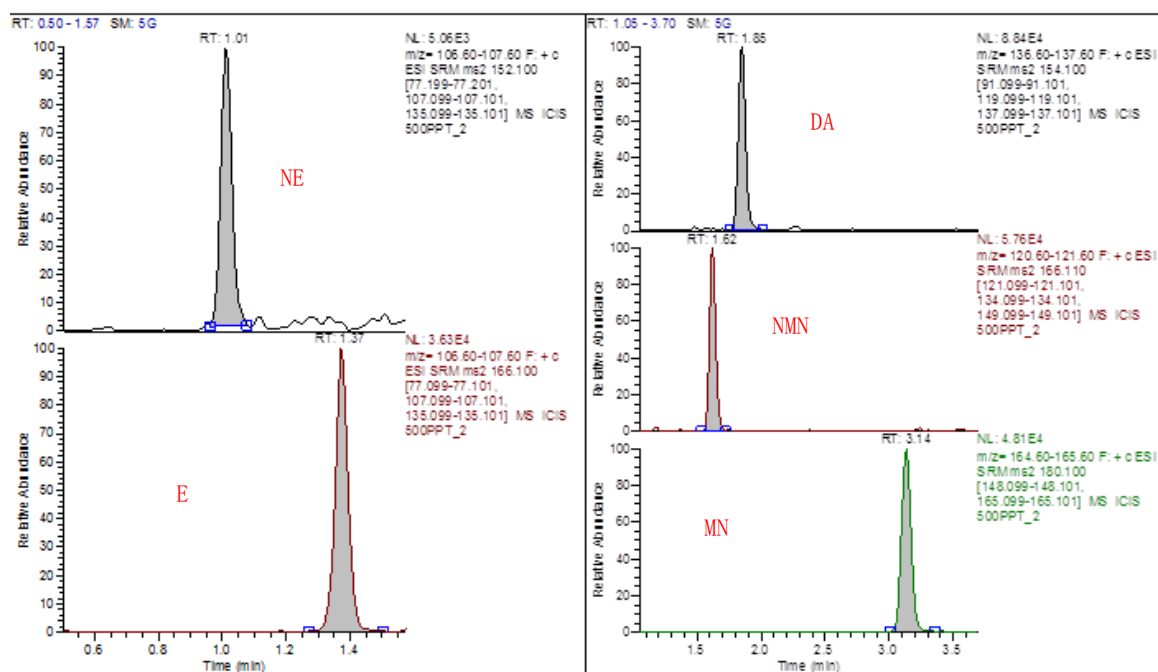
3.4 数据处理软件/方法

- 1) Xcalibur 4.1sp1
- 2) TraceFinder 4.1sp3

4. 方法学评价结果

谱图：

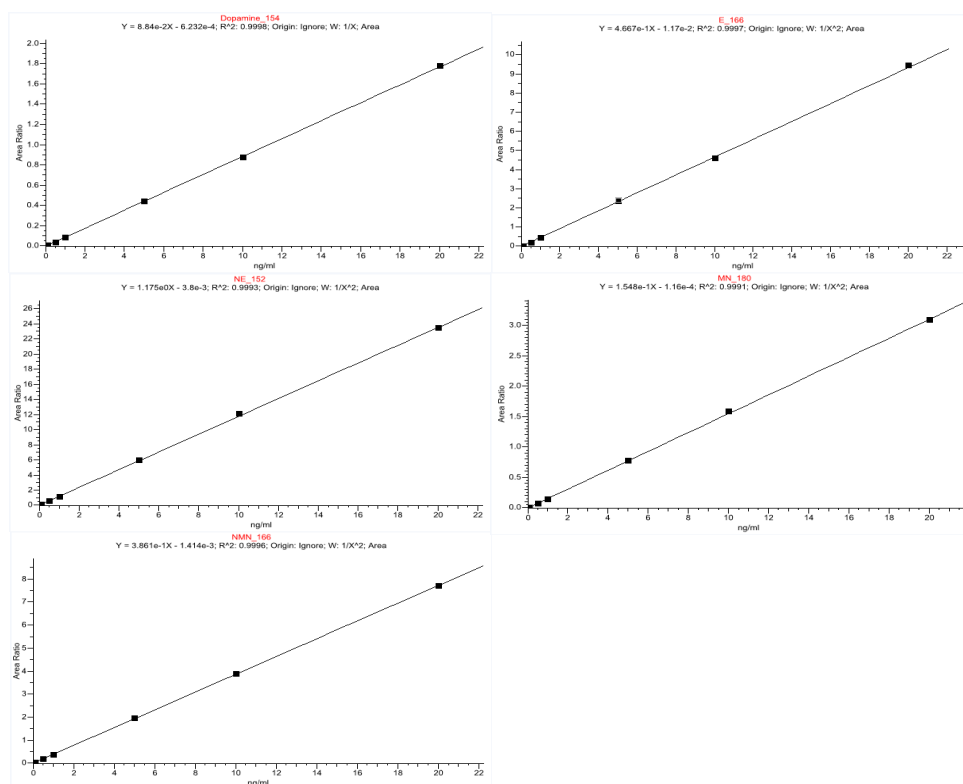
5 种儿茶酚胺 LCMSMS 血清基质谱图 (500pg/mL) 如下：



肾上腺素(epinephrine, E)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、多巴胺(dopamine, DA)、甲氧基肾上腺素(metanephrine, MN)、甲氧基去甲肾上腺素(normetanephrine, NMN)

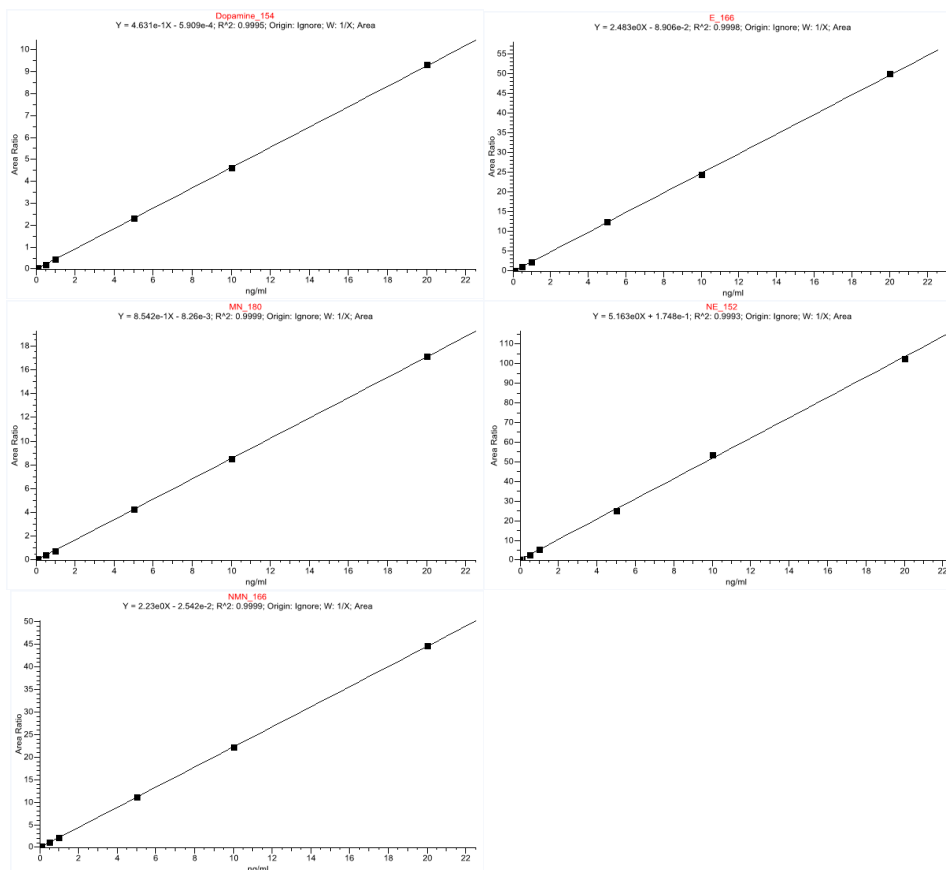
4.1 线性：测试前后分别走溶剂标曲和基质标曲样本各 1 次，要求线性相关系数 $R^2 > 0.995$ （或 $R^2 > 0.99$ ），各浓度点偏差值 $< 15\%$ ，空白无干扰峰。

1) 溶剂标曲: DA、NE、NMN、MN 线性范围为 0.01~20ng/mL, E 线性范围为 0.1~20ng/mL, 线性关系良好, 相关系数 $R^2 > 0.995$, 各浓度点偏差小于 15% (最低浓度点 < 20%), 满足要求, 具体数据如下:



溶剂标曲	LOQ (ng/mL)	Calibration Range	R ²	Max %Diff
DA	0.01	0.01~20	0.9998	17.33(最低点)
NE	0.01	0.01~20	0.9993	-3.48
E	0.1	0.1~20	0.9997	-2.4
NMN	0.01	0.01~20	0.9996	-4.28
MN	0.01	0.01~20	0.9991	-5.69

2) 基质标曲: DA、NE、E、NMN、MN 线性范围分别为 0.01~20, 0.05~20, 0.1~20, 0.02~20, 0.02~20ng/mL, 相关系数 $R^2 > 0.995$, 各浓度点偏差小于 15%, 满足要求, 具体数据如下:



基质标曲	LOQ (ng/mL)	Calibration Range	R^2	Max %Diff
DA	0.01	0.01~20	0.9995	15.8 (最低点)
NE	0.05	0.05~20	0.9993	-8.7
E	0.1	0.1~20	0.9998	9.24
NMN	0.02	0.02~20	0.9999	11.31
MN	0.02	0.02~20	0.9999	8.6

4.2 回收率:

回收率(血清基质加标 200pg/mL):

计算公式: 回收率% = 加标后萃取的血清/萃取后加标的血清 $\times$ 100

化合物	DA	NE	E	NMN	MN
回收率(%)	79.8	50.5	84.0	91.4	86.5