

# SCIEX液相色谱串联质谱联合磁珠法样本制备同时测定人血清儿茶酚胺代谢物

## Simultaneous Determination of Catecholamine Metabolites in Human Plasma by Magnetic Beads Extraction combined with SCIEX Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

胡凤梅, 刘丹, 黄超,

Hu Fengmei, Liu Dan, Huang Chao

**Keywords:** Metanephrine ; Normetanephrine ;  
3-Methoxytyramine ; LC-MS/MS ; Magnetic Beads Extraction

### 引言

嗜铬细胞瘤和副神经节瘤是一种由于嗜铬细胞分泌大量儿茶酚胺, 引发患者内分泌性高血压的神经内分泌肿瘤, 严重的患者甚至危及生命。中华医学会内分泌学分会肾上腺学组在中华内分泌代谢杂志发表的《嗜铬细胞瘤和副神经节瘤诊断治疗的专家共识》中推荐诊断 PPGL 的生物分子为血浆游离变肾上腺素 (MN) 和去甲变肾上腺素 (NMN), 另外, 据报道3-甲氧酪胺 (3-MT) 的升高可以预测PPGL转移及是否恶性的作用, 所以同时检测变肾上腺素 (MN)、去甲变肾上腺素 (NMN) 和3-甲氧酪胺 (3-MT) 对PPGL的诊断具有重要意义。

液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS) 以其卓越的特异性, 极高的检测灵敏度和高通量样本测定等优点, 受到广大检测人员的青睐。但是变肾上腺素 (MN)、去甲变肾上腺素 (NMN) 和3-甲氧酪胺 (3-MT) 在患者体内血浆中的含量极低, 一般需要使用SPE方法对患者血浆样品进行预处理, 但是传统的SPE方法操作相对比较繁琐, 需要手动进行固相萃取柱的活化、平衡、上样、淋洗和洗脱等多个步骤, 难以实现批量样本的快速处理。

本方法基于SCIEX液相色谱串联质谱系统, 采用同位素内标校正法, 建立了一次分析, 同时准确检测血浆中MN, NMN和3-MT的定量方法。本实验同时采用磁珠法对血浆样品进行前处理, 自动化程度较高, 步骤较简单, 实验耗时较短, 可以满足临床检测样品的需求。检测化合物相关信息如下。

表1 待测化合物信息列表

中文名	英文名	缩写	CAS编号	分子式
变肾上腺素	Metanephrine	MN	5001-33-2	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>
去甲变肾上腺素	Normetanephrine	NMN	1011-74-1	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>
3-甲氧酪胺	3-Methoxytyramine	3-MT	554-52-9	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>

### 实验部分

#### 样品前处理

本实验采用磁珠法对血浆样本进行处理, 步骤如下:

血浆稀释: 准确量取400 μL样品于1.5 mL塑料离心管中, 加入20 μL同位素内标混合工作液, 400 μL含20 mM甲酸铵的水溶液, 涡流混匀, 样品待用。

按照磁珠法操作规程, 依次放入活化溶液甲醇300 μL、平衡溶液20mM甲酸铵300 μL、稀释好的血浆样本溶液、淋洗溶液水300 μL、淋洗溶液乙腈300 μL, 洗脱溶液含2%甲酸的乙腈300 μL。设定好操作程序, 启动自动化磁珠提取仪器。程序完成后, 将洗脱液转移至进样板中, 上机分析。

#### 色谱条件

色谱柱: Luna NH<sub>2</sub> 3 μm, 2×100 mm;

流动相: A相为含甲酸的甲酸铵的水溶液

B相为含甲酸的90%乙腈-甲酸铵水溶液;

流速: 0.6 mL/min;

柱温：40 °C；

进样体积：15.00 µL。

洗脱方式：梯度洗脱，见表2；

表2. 液相梯度洗脱条件

时间 ( min )	A(%)	B(%)
0.0	0	100
0.5	0	100
1.5	15	85
2.5	15	85
2.6	50	50
3.0	50	50
3.1	0	100
5.5	0	100

## 质谱条件

质谱平台：AB SCIEX Triple Quad™ 4500MD

电离方式：电喷雾离子源，正离子模式；

检测方式：多反应监测 (MRM)；

离子源温度 (TEM): 500°C； 雾化气 (Gas1): 60 psi；

辅助气 (Gas2): 60 psi； 气帘气 (Gurtain Gas): 30psi；

电喷雾电压：1500V；

对应MRM通道及参数见表3。

## 结果与讨论

变肾上腺素、去甲变肾上腺素和3-甲氧酪胺在各自出峰位置峰形对称，响应良好。在本方法条件下，三种化合物不存在互相干扰。典型液相色谱图如图1 ( MN浓度为500 pg/mL；NMN浓度为500 pg/mL；3-MT浓度为500 pg/mL )。

表4 MN、NMN和3-MT的标准曲线

化合物	斜率	截距	r <sup>2</sup>	LLOQ pg/mL	ULOQ pg/mL	拟合方程
MN	0.00134	0.00065	0.99645	2.00	500	y=0.00134x+0.00065
NMN	0.00151	-8.43E-04	0.99749	10.00	500	y=0.00151x-8.43e-4
3-MT	0.00249	0.01973	0.99763	10.00	500	y=0.00249x+0.01973

表3 待测组分和内标物质的质谱参数 ( 正离子模式 )

中文名	英文名	Q1	Q3	DP	CE
变肾上腺素	Metanephrine	180	148.1*	90	24
		180	120.1	90	26
去甲变肾上腺素	Normetanephrine	166	134.1*	85	22
		166	121.1	85	23
3-甲氧酪胺	3-Methoxytyramine	168	119.1*	55	24
		168	91	55	33
变肾上腺素-d3	Metanephrine-d3	183.1	151.1	80	25
去甲变肾上腺素-d3	Normetanephrine-d3	169.1	137.1	80	25
3-甲氧酪胺-d4	3-Methoxytyramine-d4	172.1	123.1	55	26

\*为定量离子对

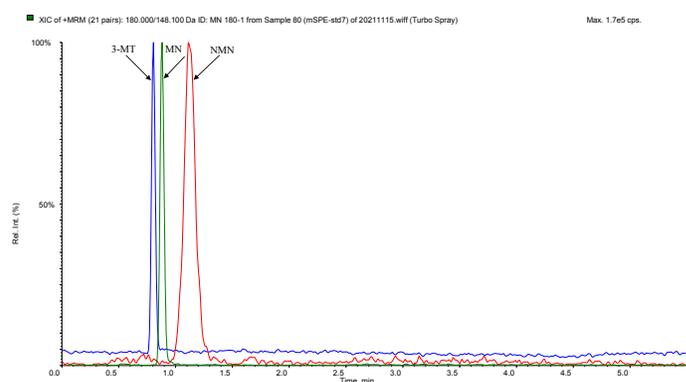


图1 MN、NMN和3-MT典型液相色谱图

## 标准曲线

以50%甲醇水为替代基质，配制标准工作曲线。各待测物在各自的曲线范围内线性良好，r<sup>2</sup> > 0.99，符合生物样本检测的通用要求。具体结果见表4。

## 加标回收率

向实际血浆样本中分别添加低、高两个浓度的混标溶液，得到低、高两个添加浓度的加标样品。数据表明MN、NMN和3-MT三个化合物血浆的平均回收率均在85%~115%范围内，符合生物样本检测要求。具体结果见表5。

表5 MN、NMN和3-MT的平均加标回收率

MN		NMN		3-MT	
加标1	加标2	加标1	加标2	加标1	加标2
101.85%	98.91%	103.72%	103.43%	86.72%	92.06%

## 总结

本实验在SCIEX液质联用平台上，实现了变肾上腺素（MN）、去甲变肾上腺素（NMN）和3-甲氧酪胺（3-MT）同时检测。采用磁珠法对血浆样本进行前处理，并加入同位素内标进行校准，对血浆中变肾上腺素（MN）、去甲变肾上腺素（NMN）和3-甲氧酪胺（3-MT）进行定量，该前处理方法较为快捷方便，可以大大缩减工作人员的样本处理时间。方法线性良好，加标回收率、精密准确度均满足相关文件要求。可用于临床实际样本的检测。

仅限专业展会等使用、仅向专业人士提供的内部资料

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14865-ZH-A



### SCIEX中国

北京分公司  
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院  
1号楼5层  
电话：010-5808-1388  
传真：010-5808-1390  
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心  
上海市长宁区福泉北路518号  
1座502室  
电话：021-2419-7200  
传真：021-2419-7333  
官网：[sciex.com.cn](http://sciex.com.cn)

广州分公司  
广州市天河区珠江西路15号  
珠江城1907室  
电话：020-8510-0200  
传真：020-3876-0835  
官方微信：SCIEX-China