Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

使用针对临床研究的混合模式SPE和亲水作用色谱(HILIC)对尿液中的儿茶酚胺和变肾上腺素进行快速、同步分析

Jonathan P. Danaceau, Erin E. Chambers 和 Kenneth J. Fountain
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

应用优势

- 无需离子对试剂即可实现单胺神经递质与变肾上腺素的保留与基线分离
- 快速、同步定量尿液中的变肾上腺素和儿茶酚胺
- 可得到线性、准确、精密的结果，线性范围为0.5-500 ng/mL

沃特世解决方案

Oasis® WCX 30 mg 96孔板
(部件号186002503)

96孔样品收集板，800 µL圆孔
(部件号186002481)

ACQUITY UPLC® BEH Amide色谱柱，
1.7 µm, 2.1 x 100 mm
(部件号186004801)

ACQUITY UPLC I-Class系统

Xevo® TQD

MassLynx®软件

关键词

儿茶酚胺，变肾上腺素，HILIC，SPE，LC-MS/MS，样品制备

简介

临床研究者通常都很关注高浓度尿液中的儿茶酚胺及其O-甲基化代谢产物(变肾上腺素)的测定。但是，这些化合物(尤其是去甲肾上腺素、肾上腺素和多巴胺）由于极性较大，利用反相LC-MS/MS对其进行分析是一项巨大挑战。因此，许多研究实验室仍采用离子对试剂与电化学检测(ECD)分析这类物质。虽然反相LC-MS/MS已得到成功应用，但由于尿液基质组分发生离子抑制、保留作用不足和异丙肾上腺素与肾上腺素未完全分离，致使挑战仍然存在。

亲水作用色谱(HILIC)已逐渐成为分析极性化合物的首选[1-6]。通过对之前发表的方法进行扩展[6]，本应用纪要介绍了尿液中单胺神经递质与儿茶酚胺的提取与分析方法。采用沃特世(Waters®) ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱可实现基于HILIC的色谱分离。Waters Oasis WCX 96孔板可用来提取尿液中的这些化合物。将复合模式弱阳离子交换固相萃取(SPE)板，与用于HILIC色谱和Waters Xevo TQD质谱的色谱柱结合使用，可获得具有出色线性、准确度和精密度的快速、稳定方法，并且能最大限度减少基质效应。

实验

LC条件

LC系统:	ACQUITY UPLC I-Class
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱，1.7 µm, 2.1 x 100 mm
柱温:	30 °C
样品温度:	10 °C
流动相A (MPA):	95:5 水:乙腈，含有50 mM NH_4HCOO，pH 3.0
流动相B (MPB):	15:85 水:乙腈，含有30mM NH_4HCOO，pH 3.0
洗针液+:	强洗针液和弱洗针液同流动相B

梯度条件如表1所示，包含初始平衡条件，随后缓慢上升且流速增大，以重新平衡色谱柱。

MS条件

MS系统:	Xevo TQD
电离模式:	ESI+
毛细管电压:	0.5 kV
锥孔电压:	视化合物而定(见表2)
去溶剂气流速:	900 L/h
锥孔气流速:	0 L/h
去溶剂气温度:	350 °C
源温度:	150 °C

使用Waters MassLynx软件(4.1版；SCN 855)对数据进行采集和分析，并用TargetLynx进行定量。

表1.流动相梯度。流动相A和流动相B的组成在方法部分列出。

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B
0	0.6	0.0	100.0
1.0	0.6	0.0	100.0
2.0	0.6	10.0	90.0
2.1	1.0	10.0	90.0
2.5	1.0	30.0	70.0
2.6	1.0	0.0	100.0
3.9	1.0	0.0	100.0
4.0	0.6	0.0	100.0

用含有0.1%抗坏血酸的甲醇配制多巴胺(DA)、去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(EP)、3-甲氧酪胺(3-MT)、变肾上腺素(MTN)和异丙肾上腺素(NMT)的标准品混合储液(10 µg/mL)，以防止氧化。混标储液由10 µg/mL D3-变肾上腺素、D3-异丙肾上腺素、D4-多巴胺、D6-肾上腺素和D6-去甲肾上腺素组成，也使用含有0.1%抗坏血酸的甲醇配制。浓度为800 ng/mL的内标工作溶液应使用含有0.1%甲酸的5%甲醇当天配制。

样品制备

使用10%(体积比)1-N盐酸对尿样进行预处理，模拟此方法常用的酸化预处理过程。将50 µL内标工作溶液加入一份400 µL的酸化尿液中，随后加入1 mL 0.5 M的NH_4CH_3COO。将经过预处理的样品加载到经1 mL MeOH和1 mL H2O预处理的Oasis WCX板的各孔中。加载样品之后，依次使用1-mL NH_4CH_3COO (20 mM)和1 mL甲醇对孔进行清洗。然后将96孔板在真空条件下干燥30 s，以尽可能多地除去柱床中的甲醇。使用2份250 µL含有2%甲酸的85:15 ACN:H_2O，将目标化合物由板洗脱到800 µL的96孔样品收集板(部件号186002481)中。仅依靠重力使每份溶剂渗透进入孔内，以最大限度延长与吸附剂的接触时间。取10 µL洗脱液注入LC-MS/MS系统中。

结果与讨论

所有化合物的结构及其logP值如图1所示，可以看出，这些化合物多数具有较高极性。表2给出了每个化合物的保留时间和各自的MS参数，包括MRM跃迁、锥孔电压和碰撞能量。

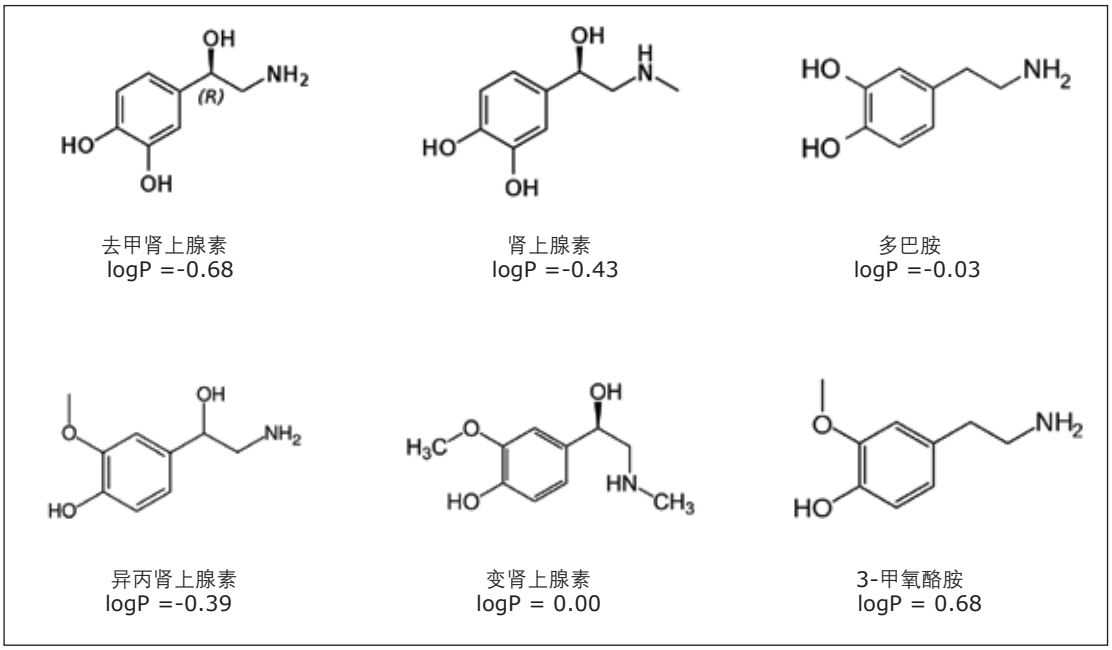

图1. 儿茶酚胺和变肾上腺素的名称、分子结构和logP值。

表2. 分析儿茶酚胺和变肾上腺素的质谱参数。

分析物	RT (min)	MRM跃迁 m/z	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
3-甲氧酪胺	0.83	168.1>91	22	24
		168.1>119	22	18
变肾上腺素	0.89	198.1>180	18	8
		198.1>165.1	18	18
异丙肾上腺素	1.16	184.1>166	20	8
		184.1>134.1	12	18
多巴胺	1.24	154.0>91	22	20
		154.0>119	22	18
肾上腺素	1.38	184.1>166	20	8
		184.1>107	20	20
去甲肾上腺素	1.93	170>152	14	6
		170>107	14	20

图2A显示了采用ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱，从50 ng/mL校准标准品中得到的所有化合物的色谱图。之前的研究结果[6]已经表明，MPB中30 mM NH_4HCOO和15%的水实现了离子强度和溶解度的完美平衡，得到的分离度和峰形如图2A所示。该分离作用的一个重要特点体现在NMT和EP之间的分离度中。这两种化合物具有相同的分子量，如果未充分分离可能会彼此干扰。在反相色谱条件下，HILIC模式中，这两种化合物之间可达到的最佳分离度为0.05 min (3 s)和0.22 min (13.2 s)的分离。HILIC模式可实现更稳定的分离，确保以上两种化合物可进行明确的定性与定量。图2B显示出未加标尿样的HILIC色谱图，表明HILIC具备校正内源性3-MT、MTN、NMT、DA、EP和NE (分别为21.6、10.6、17.8、6.0、0.0和4.1 ng/mL) 的能力。未能检出EP的最大可能因素是此尿样在未进行酸化保护的情况下储存过长时间。

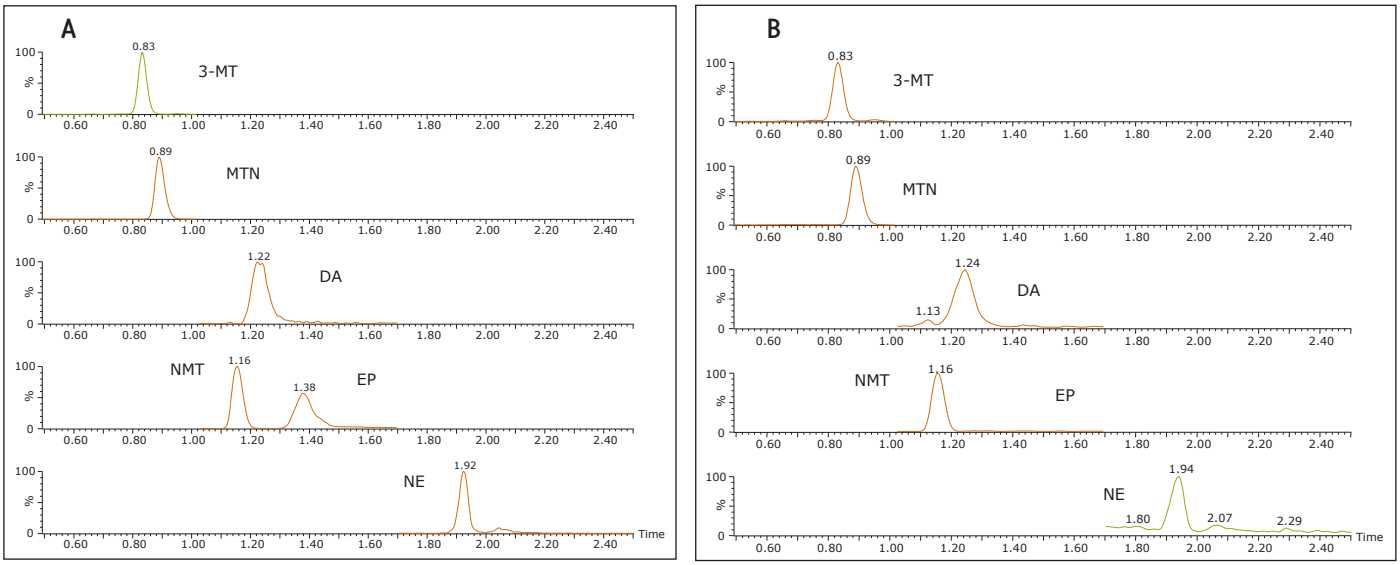

图2.儿茶酚胺和变肾上腺素在ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱 (1.7 µm，2.1 x 100 mm) 上得到的色谱图。
A. 50 ng/mL的代表性校准标准品。
B. 显示内源性儿茶酚胺和变肾上腺素色谱图的未加标的尿样。在方法部分详细介绍了色谱条件。

回收率和基质效应

提取回收率和基质效应如图3所示。回收率范围介于36% (NE)到98.5% (3-MT)之间。重现性良好，所有化合物的变异系数均在5%以下。基质效应范围为0%(NE)到-35%的最大值(多巴胺)。然而多数基质效应≤-10%，揭示出HILIC方法的另一个优势。采用相同的提取方法，在反相色谱条件下NE和EP的基质效应明显更大(约为-60%)。由于以上两种化合物的内源性浓度较低，因而这是一项重要的改进。

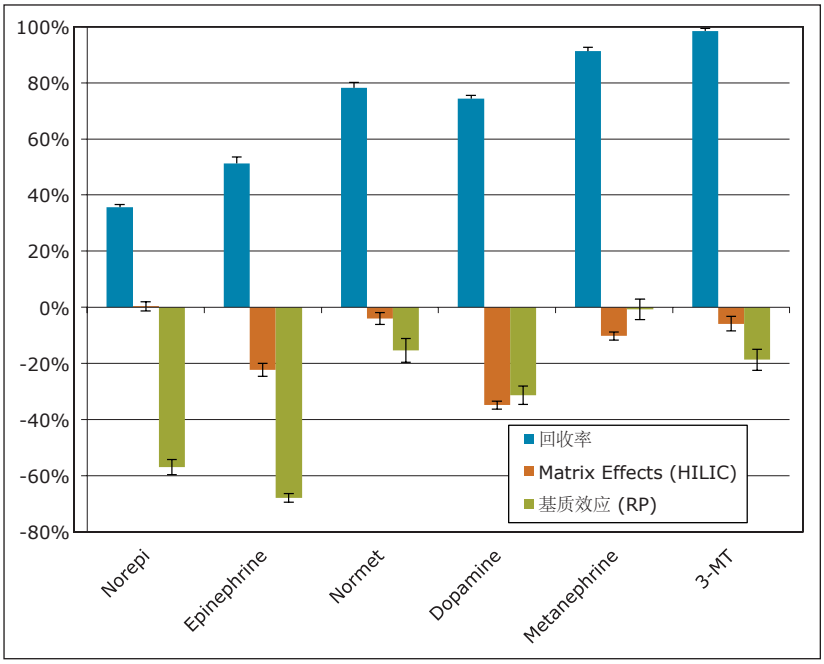

图3. 采用Oasis WCX 30 mg 96孔板(N=4)从尿液中提取儿茶酚胺和变肾上腺素的回收率和基质效应。绿色条柱代表反相色谱分析的基质效应。

定量结果

通过将已知浓度分析物加标至真实尿样中制备校准曲线和质量控制样品。进行数据处理之后，可由得出的校准曲线外推出内源性浓度。将这些数据用于校正实际浓度。例如，确定用于校准的尿样含有6.0 ng/mL DA，因此将校准浓度由0.5–500.0改为6.5–506.0 ng/mL。得出的校准曲线显示出良好线性，所有化合物的R^2值均达到0.992或更高。图4显示出NMT和EP的代表性校准曲线，两者的R^2值均为0.999。内源性的浓度已经包含在实验浓度数据中。3-MT、MTN和DA的R^2值分别为0.998、0.999和0.992。以1.6、8.0、80和400 ng/mL加标的质量控制样品(N=4)准确精密(见表3)。所有QC值均在其各自目标值10%的范围以内，绝大部分在5%以内。此外，仅有三个变异系数大于10%，其余所有变异系数均小于10%。这证明了该方法在包含正常样品与病理升高样品的整个预期值范围的校准范围中,可得到线性、准确、精密的结果。

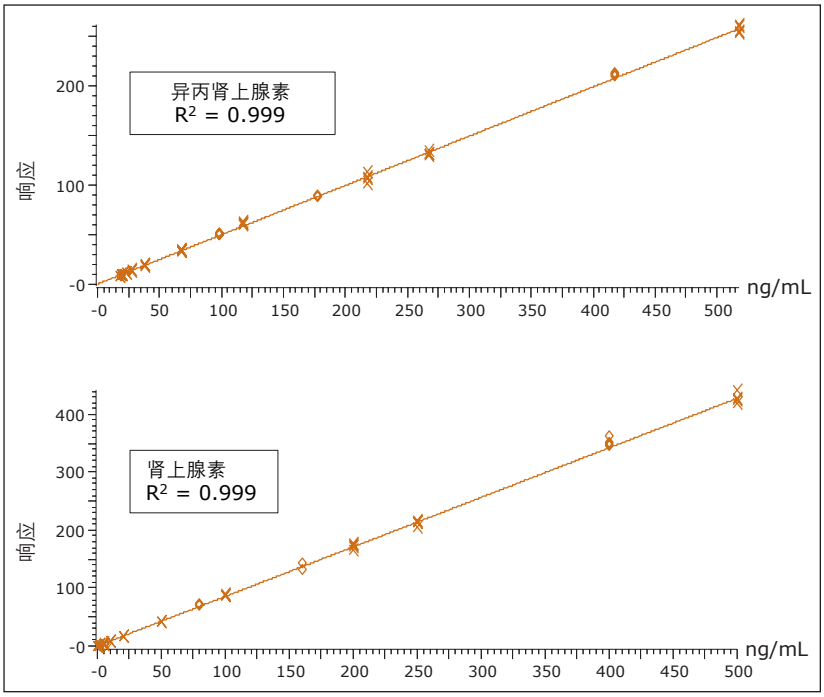

图4. 由加标尿样中提取的异丙肾上腺素(NMT)和肾上腺素(EP)的校准曲线。采用1/x加权线性拟合对数据进行拟合。NMT和EP的基底浓度分别为17.8和0 ng/mL。

表3. 尿液中儿茶酚胺和变肾上腺素的质量控制结果。浓度参考加标浓度。通过对比尿样中加标浓度与内源性计算值的加和结果，计算出准确度。

QC 加标浓度	3-MT			变肾上腺			异丙肾上腺素		
	准确度	偏差	%CV	准确度	偏差	%CV	准确度	偏差	%CV
1.6	94.4%	-5.6%	-2.6%	98.9%	-1.1%	-2.9%	98.8%	-1.2%	-3.9%
8	95.9%	-4.1%	-3.0%	100.5%	0.5%	-1.7%	101.0%	1.0%	-4.2%
80	101.8%	1.8%	-4.3%	104.0%	4.0%	-0.9%	103.4%	3.4%	-1.6%
400	109.8%	9.8%	-5.0%	101.9%	1.9%	-2.1%	100.8%	0.8%	-0.5%
Mean	100.5%			101.3%			101.0%		

QC 加标浓度	多巴胺			肾上腺素			去甲肾上腺素		
	准确度	偏差	%CV	准确度	偏差	%CV	准确度	偏差	%CV
1.6	92.1%	-7.9%	-9.5%	95.6%	-4.4%	-6.2%	94.0%	-6.0%	-7.2%
8	96.5%	-3.5%	-11.0%	95.4%	-4.6%	-3.2%	98.7%	-1.3%	-3.3%
80	102.8%	2.8%	-2.0%	103.4%	3.4%	-1.5%	99.2%	-0.8%	-14.8%
400	103.4%	3.4%	-2.4%	103.0%	3.0%	-1.9%	98.3%	-1.7%	-12.9%
Mean	98.7%			99.4%			97.5%		

结论

本文详细描述了采用Oasis复合模式弱阳离子交换(WCX)板和ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱在HILIC模式下对尿液中儿茶酚胺和变肾上腺素的提取和分析过程。采用Oasis WCX板进行提取，可实现所有化合物较低的基质效应和一致的回收率，并能够得到较好的精密度。与经过优化的反相分离相比，HILIC分离降低了NE和EP的基质效应，并改善了EP和NMT之间的分离度。定量结果十分出色，在0.5-500.0 ng/mL的范围内具有线性响应，并表现出出色的准确度和分析精度。

仅供研究使用。不适用于诊断。

参考文献

1. Cubbon S[1], Antonio C, Wilson J, Thomas-Oates J. Metabolomic applications of HILIC-LC-MS. *Mass Spectrom Rev.* 2010 Sep-Oct;29(5):671–84.
2. Jian W[1], Edom RW, Xu Y, Weng N. Recent advances in application of hydrophilic interaction chromatography for quantitative bioanalysis. *J Sep Sci.* 2010 Mar;33(6–7):681–97.
3. Xu RN[1], Rieser MJ, El-Shourbagy TA. Bioanalytical hydrophilic interaction chromatography: recent challenges, solutions and applications. *Bioanalysis*. 2009 Apr;1(1):239–53.
4. Jian W[1], Xu Y, Edom RW, Weng N. Analysis of polar metabolites by hydrophilic interaction chromatography–MS/MS. *Bioanalysis*. 2011 Apr;3(8):899–912.
5. Hemström P[1],, Irgum K. Hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci.* 2006 Aug;29(12):1784–821.
6. Danaceau JP[1], Chambers EE, Fountain KJ. Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) for LC-MS/MS analysis of monoamine neurotransmitters. *Bioanalysis*. 2012 Apr;4(7):783–94.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, Oasis, ACQUITY UPLC, Xevo, MassLynx, The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。
其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2014沃特世公司 印制于中国 2014年7月 720005093ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 5999
成都：028 - 6578 4990
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com