利用 HAMILTON MICROLAB® NIMBUS96® 和 LC-MS/MS 及枪头式分散固相萃取柱自动提取尿液中儿茶酚胺和代谢物

儿茶酚胺、肾上腺素、去甲肾上腺素和多巴胺是一种生物胺，在中枢和外周神经系统中作为神经递质起着不可或缺的作用。筛查儿茶酚胺及其o-甲基化代谢物，间甲肾上腺素和去甲变肾上腺素，是一种被广泛接受的诊断儿茶酚胺分泌肿瘤的方法，如嗜铬细胞瘤、神经母细胞瘤和副神经节瘤。儿茶酚胺的特征是一个带有两个邻酰基羟基（邻苯二酚）的单胺联苯环。肾上腺素是仲胺，而去甲肾上腺素和多巴胺是伯胺。在中性和碱性条件下，儿茶酚基团使儿茶酚胺容易被氧化为醌类。间甲肾上腺素缺乏邻苯二酚基团，在羟基附近有一个甲羟基，因此更稳定。这些化合物具有高度极性和亲水性，对数 D 和 log P 值为负。这些结构性质使样品的制备和分析变得很困难。

我们提出在使用枪头式分散固相萃取柱（DPX）提取之前，先将二苯硼酸（DPBA）与苯乙烯络合，以最大限度地减少氧化和最大限度地提高尿液中对分析物的回收率。洗脱后，络合反应被逆转，此时溶液可直接用于 LC-MS/MS 分析。使用 Hamilton NIMBUS96® 和 DPX 自动化提取方法，可在 15 分钟内提取 96 个样本，提高回收率。所述方法具有高重复性，为临床应用提供了必要的灵敏度。

工作流程

准备好每孔含有 300 ul 样品的多孔板，加入10 ul 内标。将孔板放入 Hamilton NIMBUS96® 载架上。储液槽中分别放入络合剂二苯基硼酸（0.2%（w/v），含有 5 g/L EDTA 的 2 M NH4Cl/NH4OH pH 8.5 缓冲液）、洗涤缓冲液（0.2 M NH4Cl/NH4OH pH 8.5）以及100%甲醇和1M甲酸（FA），将储液槽放到自动化平台的相应载架上。液体处理系统使用 CO-RE 1 mL tips 吸取 600 µL 络合剂添加到样品板中，吸取 500 µL 洗涤缓冲液放到第二个“洗涤”孔板中，吸取 270 µL 1M甲酸和 30 µL 甲醇放到第三块“洗脱”孔板中。Hamilton 机械系统丢弃 CO-RE tips 重装载 1 mL DPX 反相 (RP) tips。吸打两次 100% 甲醇进行平衡后，再用洗涤缓冲液进行平衡，然后在样品溶液中吸打 4 次，最后将洗脱孔板移到自动进样器中进行 LC-MS/MS 上样。

1 复合体分析物	尿液中加入 DPBA
2 平衡	100% 甲醇 0.2 M NH_4Cl pH 8.5
3 结合分析物	吸打样品
4 洗涤	0.2 M NH_4Cl pH 8.5
5 洗脱分析物	含 10% MeOH 的1 M FA

请注意，DPBA 的络合本质是定量的。重复吸入和分配样品溶液确保在苯乙烯二乙烯苯树脂上的络合和有效保留。用洗涤缓冲液冲洗 Tips 后，用 1M 甲酸/10% 甲醇溶液洗脱分析物。酸化逆转了二苯基硼酸盐配合物，而甲醇通过破坏反相相互作用来增强洗脱。低甲醇含量也有利于最小限度地去除保留的基质，从而提高选择性。

分析使用 Thermo TSQ 三四极杆质谱仪和安捷伦 1260 系列 HPLC，配备 Restek 3µm 超 PFPP 柱（100 mm×2.1 mm），柱温度保持在 40°C，注入体积为 10 µL。流动相由 0.1% 甲酸水(A)和 0.1% 甲酸甲醇(B)。对含有 M+H 离子的每种化合物最丰富的 m/z 含量进行了监测，肾上腺素（183.9）和多巴胺（153.8）和去甲肾上腺素（M+H-H2O）（151.8），去甲变肾上腺素（165.8）和间甲肾上腺素（180.0）。

APPLICATION NOTE

结果与讨论

结果包括准确性、运行内和运行间精密度（% CV）。方法验证采用ClinChek®冻干生物胺对照进行 (RECIPE, Munich, Germany)。该方法对于质量控制样品的定量非常准确，每个平均分析物浓度都在制造商的预期浓度范围内。Level 1 肾上腺素对照组平均运行内精密度显示最大 CV 为 6%，而 Level 2 间甲肾上腺素对照组运行间精密度显示最大为 7% (表 1)。

校准得出的平均测定系数（R^2）值分别为：去甲肾上腺素 0.9992，肾上腺素 0.9996，多巴胺 0.9996，去甲变肾上腺素 0.9998，间甲肾上腺素 0.9982。检测极限(LOD) 是通过 y 型截距估计标准偏差 (S_y) 和校准平均斜率 (Avg_m) 来计算：$LOD=(3.3\ S_y)/Avg_m$。定量极限（LOQ）的计算方法采用：$(10\ S_y)/Avg_m$。计算结果见表 2。

肾上腺素、多巴胺、去甲变肾上腺素和间甲肾上腺素的基质效应相对较低，离子抑制范围为 1-14%。去甲肾上腺素表现出更高的基质效应，离子抑制为 39%，可能因为它是极性最大的化合物，在 PFPP 柱上几乎没有保留。除多巴胺外，所有分析物的提取效率均大于 96%，回收率为 81%（图 1）。

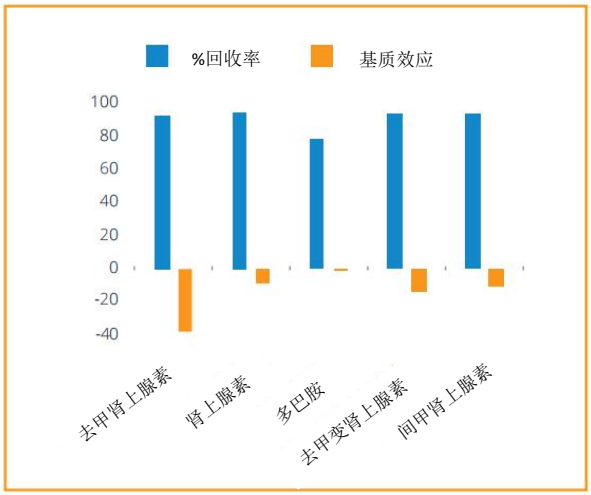


图 1. 使用 DPX 自动提取的儿茶酚胺和间甲肾上腺素的回收率和基质效应

表 1. 方法的准确性和精密度基于两级的外部质量控制

Analyte	Expected Range	Mean	Within-Run, CV	Between-Run,CV
Level 1				
去甲肾上腺素	51.2–76.8	62.8	5%	5%
肾上腺素	16.0–24.0	19.6	6%	5%
多巴胺	155–233	186.2	3%	6%
去甲变肾上腺素	260–390	264.5	5%	5%
间甲肾上腺素	138–206	166.6	5%	7%
Level 2				
去甲肾上腺素	139–209	168.3	3%	5%
肾上腺素	31.8–47.8	39.7	2%	2%
多巴胺	234–352	284.3	4%	5%
去甲变肾上腺素	1254–1882	1493.7	4%	4%
间甲肾上腺素	814–1220	1056.8	3%	4%

表 2. y 型截距估计标准偏差(S_y)、平均斜率 (Avg_m, n=5)、检测极限 (LOD) 单位为 ng/mL，定量极限 (LOQ)单位为 ng/mL，平均测定系数 (R^2, n=5)。

Compound	S_y	Avg_m	LOD	LOQ	Avg R^2
去甲肾上腺素	0.0037	0.068	0.18	0.53	0.9992
肾上腺素	0.0058	0.088	0.22	0.65	0.9996
多巴胺	0.0055	0.12	0.15	0.46	0.9996
去甲变肾上腺素	0.00019	0.19	0.003	0.01	0.9998
间甲肾上腺素	0.0016	0.17	0.03	0.09	0.9982

结论

我们报告了一种快速和稳健的分析方法，该方法可实现对尿液中游离的儿茶酚胺和间甲肾上腺素的 LC-MS/MS 高灵敏分析。枪头式分散微萃取柱使得 SPE 可与 Hamilton Microlab® NIMBUS96® 无缝集成，在不到 15 分钟内从尿液中提取 DPBA 络合儿茶酚胺和间甲肾上腺素。这种方法提供了必要的分析灵敏度，而不需要额外的溶剂蒸发步骤。校准呈线性关系（$R^2 > 0.998$），浓度范围超过 4 个数量级为 0.5-1000 ng/mL。对两种不同水平的合成尿液对照组的重复分析显示，CV 值小于 8%。该方法操作简便、稳定性高、通过增强样品洗涤效果提高灵敏度、高通量--LC-MS/MS 运行时间仅为 5.5 分钟，是一种对现有方法极好的替代方法。