



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115015426 B

(45) 授权公告日 2024.01.19

(21) 申请号 202210680357.3

(22) 申请日 2022.06.15

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115015426 A

(43) 申请公布日 2022.09.06

(73) 专利权人 北京豪思生物科技股份有限公司
地址 102200 北京市昌平区回龙观镇科学园路7号院1号楼1层102-2
专利权人 江苏豪思睦可生物科技有限公司

(72) 发明人 苏营雪 张新星 栗琳 赵焯娜
丁沛瑜 郑佳 应洪波 丁亮
周立

(74) 专利代理机构 北京超凡宏宇知识产权代理有限公司 11463
专利代理师 张金铭

(51) Int. Cl.
G01N 30/02 (2006.01)
G01N 30/74 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 111175394 A, 2020.05.19
CN 114441665 A, 2022.05.06
KR 20210150672 A, 2021.12.13

闫亚娟等.液相色谱串联质谱法分析人体内儿茶酚胺及其代谢产物的研究进展.《临床医学进展》.2021,第11卷(第4期),第1571-1578页.

(54) 发明名称
尿液中儿茶酚胺代谢产物浓度的检测方法

(57) 摘要
本发明提供了一种尿液中儿茶酚胺代谢产物浓度的检测方法,涉及儿茶酚胺代谢产物检测技术领域.该检测方法用于检测尿液中儿茶酚胺代谢产物变肾上腺素(MN)、去甲变肾上腺素(NMN)和3-甲氧基酪胺(3-MT),检测方法包括先对样品固相萃取,复溶后进行高效液相色谱结合荧光检测分析;高效液相色谱结合荧光检测分析中采用的内标为香兰素胺盐酸盐.该检测方法具

Dawid Nieć等.Validation of an assay for quantification of free normetanephrine, metanephrine and methoxytyramine in plasma by high performance liquid chromatography with coulometric detection: Comparison of peak-area vs. peak-height measurements.《Journal of Chromatography B》.2015,第1002卷第63-70页.

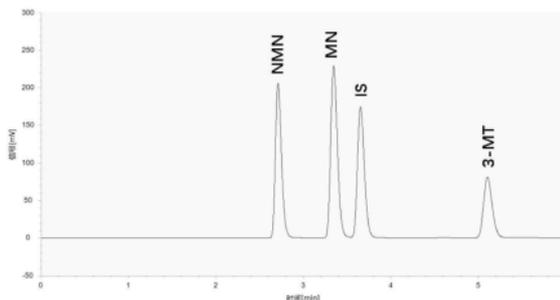
Yoko Hirano等.Rapid assay for catechol-O-methyltransferase activity by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection.《Journal of Chromatography B》.2005,第819卷第41-46页.

Hongyu Zeng等.Dual-Template Magnetic Molecularly Imprinted Polymer for Simultaneous Determination of Spot Urine Metanephrines and 3-Methoxytyramine for the Diagnosis of Pheochromocytomas and Paragangliomas.《Molecules》.2022,第27卷(第11期),第1-12页. (续)

审查员 潘迪

权利要求书2页 说明书12页 附图1页

有稳定性好,特异性强和灵敏度高的优点。



CN 115015426 B

[接上页]

(56) 对比文件

Robbert J. Slingerlan等.High-performance liquid chromatographic analysis of biogenic amines in cells and

in culture media using on-line dialysis and trace enrichment.《Journal of Chromatography B》.1998,第716卷第65-75页.

1. 尿液中儿茶酚胺代谢产物浓度的检测方法,其特征在于,所述代谢产物为去甲变肾上腺素NMN、变肾上腺素MN和3-甲氧基酪胺3-MT;

所述检测方法包括先对样品固相萃取,复溶后进行高效液相色谱结合荧光检测分析;高效液相色谱结合荧光检测分析中采用的内标为香兰素胺盐酸盐;

高效液相色谱的流动相A为含有 KH_2PO_4 和EDTA-2Na的水溶液,其中 KH_2PO_4 的浓度为10~30mmol,EDTA-2Na的浓度为0.1~0.5mmol;流动相B为甲醇;高效液相色谱采用色谱柱PFP 4.6*150mm,3.0 μm ;

洗脱程序为:

时间0.00min,流动相A 90%,流动相B10%;

时间1.00min,流动相A 90%,流动相B10%;

时间1.10min,流动相A 70%,流动相B 30%;

时间3.00min,流动相A 70%,流动相B 30%;

时间3.10min,流动相A 90%,流动相B10%;

时间6.00min,流动相A 90%,流动相B10%。

2. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述固相萃取包括:向活化过的SPE柱中加入预混有内标的样品,施加正压或负压抽滤后依次经淋洗液淋洗和洗脱液洗脱,然后氮吹复溶;

所述淋洗液为10~60mmol乙酸铵水溶液,所述洗脱液按照体积百分比计,含有90~98%的乙腈,1~5%的水和1~5%的甲酸。

3. 根据权利要求2所述的检测方法,其特征在于,所述淋洗液为20mmol乙酸铵水溶液。

4. 根据权利要求2所述的检测方法,其特征在于,所述洗脱液中乙腈、甲酸和水的体积比为98:2:2。

5. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述流动相A中 KH_2PO_4 的浓度为20mmol,EDTA-2Na的浓度为0.2mmol。

6. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,流动相的流速为1mL/min。

7. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,高效液相色谱采用色谱柱Agilent PFP 4.6*150mm,3.0 μm ,柱温为30~45 $^{\circ}\text{C}$ 。

8. 根据权利要求7所述的检测方法,其特征在于,柱温为35 $^{\circ}\text{C}$ 。

9. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述荧光检测分析的激发波长EX为286nm,发射波长EM为318nm。

10. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,以校准品浓度或校准品浓度与对应内标的浓度比为x,相应校准品和对应内标的峰面积的比值为y绘制校准曲线;

将待测样品和对应内标的峰面积的比值带入校准曲线,得到待测样品中NMN,MN和3-MT的浓度;或,将待测样品和对应内标的峰面积的比值带入校准曲线,得到待测样品与对应内标的浓度比,然后计算出待测样品中NMN,MN和3-MT的浓度。

11. 根据权利要求10所述的检测方法,其特征在于,校准品浓度按照如下设置:

校准品C1中NMN,MN和3-MT的浓度依次为20ng/mL、20ng/mL和8ng/mL;

校准品C2中NMN,MN和3-MT的浓度依次为50ng/mL、50ng/mL和20ng/mL;

校准品C3中NMN,MN和3-MT的浓度依次为200ng/mL、200ng/mL和80ng/mL;

校准品C4中NMN、MN和3-MT的浓度依次为500ng/mL、500ng/mL和200ng/mL；

校准品C5中NMN、MN和3-MT的浓度依次为2000ng/mL、2000ng/mL和800ng/mL；

校准品C6中NMN、MN和3-MT的浓度依次为5000ng/mL、5000ng/mL和2000ng/mL。

12. 根据权利要求10所述的检测方法,其特征在于,还包括检测质控品对检测结果进行质量控制;所述质控品包括低值质控品、中值质控品和高值质控品;所述质控品的浓度按照如下设置:

所述低值质控品中NMN、MN和3-MT的浓度依次为250ng/mL、250ng/mL和100ng/mL;

所述中值质控品中NMN、MN和3-MT的浓度依次为2500ng/mL、2500ng/mL和1000ng/mL;

所述高值质控品中NMN、MN和3-MT的浓度依次为4000ng/mL、4000ng/mL和1600ng/mL。

13. 根据权利要求12所述的检测方法,其特征在于,所述校准品的基质为人工尿液、生理盐水或缓冲液;

所述质控品的基质为人工尿液、生理盐水或缓冲液。

14. 根据权利要求13所述的检测方法,其特征在于,作为校准品基质的缓冲液或作为质控品基质的缓冲液为PBS缓冲液。

15. 根据权利要求13所述的检测方法,其特征在于,所述校准品的基质选自人工尿液。

尿液中儿茶酚胺代谢产物浓度的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及儿茶酚胺代谢产物检测技术领域,尤其是涉及一种尿液中儿茶酚胺代谢产物浓度的检测方法。

背景技术

[0002] 嗜铬细胞瘤和副神经节瘤(pheochromocytoma and paraganglioma,PPGL)是分别起源于肾上腺髓质或肾上腺外交感神经链的肿瘤,主要合成和分泌大量儿茶酚胺,引起患者血压升高等一系列临床症候群,并造成心、脑、肾等严重并发症。激素及代谢产物的测定是PPGL定性诊断的主要方法,包括测定血和尿去甲肾上腺素(Norepinephrine,NE)、肾上腺素(Epinephrine,E)、多巴胺(Dopamine,DA)及其中间代谢产物变肾上腺素(MN)、去甲变肾上腺素(NMN)、3-甲氧基酪胺(3-MT)和终末代谢产物香草扁桃酸(VMA)及高香草酸(HVA)浓度。MN、NMN及3-MT分别是E、NE及DA的中间代谢产物,它们仅在肾上腺髓质和PPGL瘤体内代谢生成并且以高浓度水平持续存在,故是PPGL的特异性标记物,找到一种能够快速检测这3种代谢产物的方法至关重要。

[0003] 近几年国内外都有儿茶酚胺类物质的分析方法的相关报道,这些方法包括荧光成像法、电化学法、质谱法、色谱法、光度分析法、非损伤成像技术等,由于许多分析方法在灵敏度、选择性及分析速度等方面达不到样品分析的要求,从而不能在临床上推广应用。所以发展高效样品预处理、高通量、高灵敏的分析方法是未来几年的必然趋势。因此,本发明针对现有儿茶酚胺代谢产物在尿液中的浓度检测存在的问题与不足,研究了一种快速检测尿液中儿茶酚胺代谢产物浓度的检测方法,该方法对于快速高通量的测定尿液中的儿茶酚胺代谢产物浓度具有重要的意义。

[0004] 有鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0005] 本发明目的在于提供一种尿液中儿茶酚胺代谢产物浓度的检测方法,该方法缓解了现有技术中缺乏一种特异性强,准确度高的儿茶酚胺代谢产物浓度的检测方法的问题。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明特采用如下技术方案:

[0007] 根据本发明的一个方面,本发明提供了一种尿液中儿茶酚胺代谢产物浓度的检测方法,所述代谢产物为NMN、MN和3-MT;

[0008] 所述检测方法包括先对样品固相萃取,复溶后进行高效液相色谱结合荧光检测分析;高效液相色谱结合荧光检测分析中采用的内标为香兰素胺盐酸盐。

[0009] 优选地,所述固相萃取包括:向活化过的SPE柱中加入预混有内标的样品,施加正压或负压抽滤后依次经淋洗液淋洗和洗脱液洗脱,然后氮吹复溶;

[0010] 所述淋洗液为10~60mmol乙酸铵水溶液,所述洗脱液按照体积百分比计,含有90~98%的乙腈,1~5%的水和1~5%的甲酸;

[0011] 优选地,所述淋洗液为20mmol乙酸铵水溶液;

- [0012] 优选地,所述洗脱液中乙腈、甲酸和水的体积比为98:2:2。
- [0013] 优选地,高效液相色谱的流动相A为含有 KH_2PO_4 和EDTA-2Na的水溶液,其中 KH_2PO_4 的浓度为10~30mmol,EDTA-2Na的浓度为0.1~0.5mmol;流动相B为甲醇;
- [0014] 优选地,所述流动相A中 KH_2PO_4 的浓度为20mmol,EDTA-2Na的浓度为0.2mmol。
- [0015] 优选地,洗脱程序为:
- [0016] 时间0.00min,流动相A 90%,流动相B10%;
- [0017] 时间1.00min,流动相A 90%,流动相B10%;
- [0018] 时间1.10min,流动相A 70%,流动相B 30%;
- [0019] 时间3.00min,流动相A 70%,流动相B 30%;
- [0020] 时间3.10min,流动相A 90%,流动相B10%;
- [0021] 时间6.00min,流动相A 90%,流动相B10%;
- [0022] 流速为1mL/min。
- [0023] 优选地,高效液相色谱采用色谱柱Agilent PFP 4.6*150mm,3.0 μm ,柱温为30~45 $^{\circ}\text{C}$;
- [0024] 优选地,柱温为35 $^{\circ}\text{C}$ 。
- [0025] 优选地,所述荧光检测分析的激发波长EX为286nm,发射波长EM为318nm。
- [0026] 优选地,以校准品浓度或校准品浓度与对应内标的浓度比为x,相应校准品和对应内标的峰面积的比值为y绘制校准曲线;
- [0027] 将待测样品和对应内标的峰面积的比值带入校准曲线,得到待测样品中NMN,MN和3-MT的浓度;或,将待测样品和对应内标的峰面积的比值带入校准曲线,得到待测样品与对应内标的浓度比,然后计算出待测样品中NMN,MN和3-MT的浓度。
- [0028] 优选地,校准品浓度按照如下设置:
- [0029] 校准品C1中NMN、MN和3-MT的浓度依次为20ng/mL、20ng/mL和8ng/mL;
- [0030] 校准品C2中NMN、MN和3-MT的浓度依次为50ng/mL、50ng/mL和20ng/mL;
- [0031] 校准品C3中NMN、MN和3-MT的浓度依次为200ng/mL、200ng/mL和80ng/mL;
- [0032] 校准品C4中NMN、MN和3-MT的浓度依次为500ng/mL、500ng/mL和200ng/mL;
- [0033] 校准品C5中NMN、MN和3-MT的浓度依次为2000ng/mL、2000ng/mL和800ng/mL;
- [0034] 校准品C6中NMN、MN和3-MT的浓度依次为5000ng/mL、5000ng/mL和2000ng/mL。
- [0035] 优选地,所述检测方法还包括检测质控品对检测结果进行质量控制;所述质控品包括低值质控品、中值质控品和高值质控品;所述质控品的浓度按照如下设置:
- [0036] 所述低值质控品中NMN、MN和3-MT的浓度依次为250ng/mL、250ng/mL和100ng/mL;
- [0037] 所述中值质控品中NMN、MN和3-MT的浓度依次为2500ng/mL、2500ng/mL和1000ng/mL;
- [0038] 所述高值质控品中NMN、MN和3-MT的浓度依次为4000ng/mL、4000ng/mL和1600ng/mL。
- [0039] 优选地,所述校准品和所述质控品的基质分别独立的为人工尿液、生理盐水或缓冲液;
- [0040] 优选地,所述缓冲液为PBS缓冲液;
- [0041] 优选地,所述校准品的基质选自人工尿液。

[0042] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0043] 本发明提供的尿液中儿茶酚胺代谢产物浓度的检测方法检测的儿茶酚胺代谢产物包括变肾上腺素(MN)、去甲变肾上腺素(NMN)和3-甲氧基酪胺(3-MT)。本发明通过高效液相色谱法结合荧光检测法检测样本,选用香兰素胺作为内标,该方法专属性好,特异性强,分析灵敏度高;线性最低浓度点的偏差均在 $\pm 20.0\%$ 以内,其余浓度点的偏差均在 $\pm 15.0\%$ 以内,线性回归拟合常数 r 大于0.990;准确度高,低、中、高浓度人的尿液加标样本的回收率均在85~115%以内;低值质控品重复性的变异系数(CV) $\leq 20\%$,高值质控品重复性的变异系数(CV) $\leq 15\%$;低值质控品的批间变异系数(CV) $\leq 20\%$,高值质控品的批间变异系数(CV) $\leq 15\%$,均满足接受标准。

附图说明

[0044] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0045] 图1为采用实施例1提供的尿液中儿茶酚胺代谢产物浓度的检测方法检测样本得到的色谱图。

具体实施方式

[0046] 下面将结合实施例对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0047] 根据本发明的一个方面,本发明提供了一种尿液中儿茶酚胺代谢产物浓度的检测方法,所述代谢产物为NMN、MN和3-MT。MN指的是变肾上腺素,NMN指的是去甲变肾上腺素,3-MT指的是3-甲氧基酪胺。所述检测方法包括先对样品固相萃取,复溶后进行高效液相色谱结合荧光检测分析。需要说明的是,本发明提供的尿液中儿茶酚胺代谢产物浓度的检测方法是而非诊断和治疗目的的。

[0048] 固相萃取优选使用SPE柱进行固相萃取,固相萃取优选包括向活化过的SPE柱中加入预混有内标的样品,施加正压或负压抽滤后依次经淋洗液淋洗和洗脱液洗脱,然后氮吹复溶。

[0049] 其中淋洗液为10~60mmol乙酸铵水溶液,乙酸铵浓度例如可以为但不限于为10、20、30、40、50或60mmol,更优选为20mmol乙酸铵水溶液。洗脱液按照体积百分比计,含有90~98%的乙腈,例如可以为但不限于为90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或98%;1~5%的水,例如可以为但不限于为1%、2%、3%、4%或5%;和1~5%的甲酸,例如可以为但不限于为1%、2%、3%、4%或5%。洗脱液中乙腈、甲酸和水的体积比优选为98:2:2。

[0050] 通过固相萃取的前处理方法可以去除尿液中的大部分干扰及杂质,氮吹复溶后,采用高效液相色谱法结合荧光检测法进行分析,能够得到更准确的结果。高效液相色谱分

析采用香兰素胺作为内标,人体内不含有香兰素胺因此可以排除内源性干扰,同时香兰素胺与三种待测物性质相似,在相同的前处理及色谱条件下具有一定的稳定性,与三种待测物保留时间接近但不重叠,因此可以作为内标物,在一定程度上消除了操作条件等的变化所引起的误差。高效液相色谱的色谱条件优选如下:

[0051] 流动相与洗脱程序的优选实施方式为:

[0052] 流动相A优选为含有 KH_2PO_4 和EDTA-2Na的水溶液,其中 KH_2PO_4 的浓度为10~30mmol,例如可以为但不限于为10、15、20、25或30mmol,优选为20mmol;EDTA-2Na的浓度为0.1~0.5mmol,例如可以为但不限于为0.1、0.2、0.3、0.4或0.5mmol,优选为0.2mmol。流动相B优选为甲醇。流速为1mL/min;

[0053] 洗脱程序优选为:

[0054] 时间0.00min,流动相A 90%,流动相B10%;

[0055] 时间1.00min,流动相A 90%,流动相B10%;

[0056] 时间1.10min,流动相A 70%,流动相B 30%;

[0057] 时间3.00min,流动相A 70%,流动相B 30%;

[0058] 时间3.10min,流动相A 90%,流动相B10%;

[0059] 时间6.00min,流动相A 90%,流动相B10%。

[0060] 高效液相色谱优选采用色谱柱Agilent PFP 4.6*150mm,3.0 μm ,柱温优选为30~45 $^{\circ}\text{C}$,例如可以为但不限于为30、35、40或45 $^{\circ}\text{C}$,优选为35 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0061] 荧光检测分析的激发波长EX优选为286nm,发射波长EM优选为318nm。

[0062] 使用高效液相色谱结合荧光检测分析样本时首先需要建立标准曲线,标准曲线是已知浓度的校准品中待测物质的含量与其色谱图特征值之间的函数关系,例如与峰面积或峰高之间的函数关系。然后将待测样本色谱图的特征值带入构建的标准曲线中,便可以得到待测样本中待测物质的含量。

[0063] 在一些优选的实施方式中,以校准品浓度为x,相应校准品和对应内标的峰面积的比值为y绘制校准曲线;将待测样品和对应内标的峰面积的比值带入校准曲线,得到待测样品中NMN,MN和3-MT的浓度;

[0064] 或者,以校准品浓度与对应内标的浓度比为x,相应校准品和对应内标的峰面积的比值为y绘制校准曲线;将待测样品和对应内标的峰面积的比值带入校准曲线,得到待测样品与对应内标的浓度比,然后计算出待测样品中NMN,MN和3-MT的浓度。

[0065] 校准品浓度优选按照如下设置:

[0066] 校准品C1中NMN、MN和3-MT的浓度依次为20ng/mL、20ng/mL和8ng/mL;

[0067] 校准品C2中NMN、MN和3-MT的浓度依次为50ng/mL、50ng/mL和20ng/mL;

[0068] 校准品C3中NMN、MN和3-MT的浓度依次为200ng/mL、200ng/mL和80ng/mL;

[0069] 校准品C4中NMN、MN和3-MT的浓度依次为500ng/mL、500ng/mL和200ng/mL;

[0070] 校准品C5中NMN、MN和3-MT的浓度依次为2000ng/mL、2000ng/mL和800ng/mL;

[0071] 校准品C6中NMN、MN和3-MT的浓度依次为5000ng/mL、5000ng/mL和2000ng/mL。

[0072] 在一些优选的实施方式中,尿液中儿茶酚胺代谢产物浓度的检测方法还包括检测质控品对检测结果进行质量控制;所述质控品包括低值质控品、中值质控品和高值质控品;所述质控品的浓度按照如下设置:

[0073] 低值质控品:NMN、MN和3-MT的浓度依次为250ng/mL、250ng/mL和100ng/mL;

[0074] 中值质控品:NMN、MN和3-MT的浓度依次为2500ng/mL、2500ng/mL和1000ng/mL;

[0075] 高值质控品:NMN、MN和3-MT的浓度依次为4000ng/mL、4000ng/mL和1600ng/mL。

[0076] 校准品和质控品的基质分别独立的优选自人工尿液、生理盐水或缓冲液,其中缓冲液优选为PBS缓冲液。所述基质优选为人工尿液,使用人工尿液作为人尿液样本的替代基质配制标准曲线的各个浓度点和/或各浓度水平的质控品,具有稳定性好又易于获得,以及方便保存的优点。

[0077] 需要说明的是,上述校准品浓度和质控品浓度的设置方式,表达的是在制备校准品和质控品时,对其目标浓度的期望,而非校准品和质控品的实际浓度。在实际操作中,校准品和质控品的配制由于操作、仪器以及容器等因素会产生误差,校准品和质控品的实际浓度与预配制的理论浓度会产生偏差。在实际操作中通常会使用更高一级的校准品对用于建立标准曲线的校准品和用于质控的质控品进行校正与赋值,经更高一级的校准品赋值后的校准品和质控品的标示浓度可能会与上述校准品和质控品设置的浓度点的值产生偏差,这种偏差是本领域可接受的,经高一级的校准品赋值后的校准品和质控品呈现出的校准品浓度和质控品浓度也属于上述校准品和质控品浓度的设置方式,属于本发明的保护范围。

[0078] 本申请提供的尿液中儿茶酚胺代谢产物浓度的检测方法专属性好,特异性强,分析灵敏度高;线性最低浓度点的偏差均在 $\pm 20.0\%$ 以内,其余浓度点的偏差均在 $\pm 15.0\%$ 以内,线性回归拟合常数 r 大于0.990;准确度高,低、中、高浓度人的尿液加标样本的回收率均在85~115%以内;低值质控品重复性的变异系数(CV) $\leq 20\%$,高值质控品重复性的变异系数(CV) $\leq 15\%$;低值质控品的批间变异系数(CV) $\leq 20\%$,高值质控品的批间变异系数(CV) $\leq 15\%$,均满足接受标准。

[0079] 下面结合优选实施例进一步说明本发明的技术方案和有益效果。

[0080] 下述实施例使用的材料和试剂如表1和表2所示。

[0081] 表1主要试剂

[0082]

类型	品名	货号	制造商
标准品	变肾上腺素盐酸盐(MN)	M258760	TRC
	去甲变肾上腺素盐酸盐(NMN)	RH89013	BioRuler
	3-甲氧基酪胺盐酸盐	913916	百灵威
内标	香兰素胺盐酸盐	H36605	sigma
试剂	磷酸二氢钾	P113045	阿拉丁
	乙二醇四乙酸二钠盐	CFEQ-4-120095-0100	CNW
	人工尿液	A6660	Solarbio
	甲醇	34885	Merck
	甲酸	F0507	sigma
	水	DH00480	屈臣氏
重要耗材	普通 96 孔板	N/A	N/A
	SPE 96 孔板	PWCX	艾杰尔

[0083] 表2设备和仪器

仪器名称	型号	品牌
液相色谱分析仪	LC 2300	睦仪
荧光检测器	RF-20A _{xs}	岛津
旋涡混匀仪	G560E	VORT
高速冷冻离心机	D3024R	大龙兴创
正压固相萃取装置	SPE-M96	艾杰尔
氮吹仪	NV96-G-8	Agela
96孔板振荡器	MB100-4A	杭州奥盛
100 μ L移液器	10-100 μ L	eppendorf
200 μ L移液器	20-200 μ L	eppendorf
1000 μ L移液器	100-1000 μ L	eppendorf

[0085] 实施例1

[0086] (一) 化合物储备液及次级储备液的配制

[0087] 1. 分别精密称量购买的NMN、MN及3-MT标准品,用0.05M盐酸水作稀释液,容量瓶定容,在实际称量时需要为标准物质的纯度、所带的结晶水或者盐进行折算,分别得到浓度为1000 μ g/mL的NMN、MN及3-MT的储备液,置于-20 $^{\circ}$ C冰箱中贮存。

[0088] 2. 分别精密量取上一步骤得到的三种储备液适量,用0.05M盐酸水稀释,配制成三种代谢产物的终浓度分别为NMN:100 μ g/mL, MN:100 μ g/mL, 3-MT:40 μ g/mL的混合次级储备液。以配制10.00mL次级储备液为例:

[0089] 表3次级储备液的配制

名称	终浓度 (μ g/mL)	溶液来源	来源浓度 (μ g/mL)	移取体积 (μ L)	稀释溶液	定容体积 (mL)
[0090] 次级储备液	NMN: 100	NMN 储备液	1000	1000	0.05M 盐酸水溶液	10
	MN: 100	MN 储备液	1000	1000		
	3-MT: 40	3-MT 储备液	1000	400		

[0091] (二) 校准品的配制

[0092] 1. 校准品C6、空白液H0配制

[0093] 以配制50.00mL校准品C6,空白液H0为例:

[0094] 精密移取步骤(一)中的次级储备液2.5mL,再加入人工尿液定容至50mL,上下颠倒至少10次,混合均匀。

[0095] 表4校准品C6配制

名称	终浓度 (ng/mL)	溶液来源	移取体积 (mL)	稀释溶液	定容体积 (mL)
[0096] 校准品 C6	NMN: 5000 MN: 5000 3-MT: 2500	次级储备液	2.5	人工尿液	50

[0097] 表5空白液H0配制

	名称	溶液来源	移取体积 (mL)	稀释溶液	定容体积(mL)
[0098]	空白液 H0	0.05M 盐酸 水溶液	2.5	人工尿液	50

[0099] 2. 校准品C1 ~ C5的配制

[0100] 以配制50.00mL C1 ~ C5为例,校准品C1 ~ C5的配制是分别将校准品C6与空白液H0稀释后得到,稀释比例见下表:

[0101] 表6校准品C1 ~ C5配制

	样本名称	校准品 C1	校准品 C2	校准品 C3	校准品 C4	校准品 C5	校准品 C6
[0102]	空白液 H0 (mL)	49.8	49.5	48.0	45.0	30.0	0
	校准品 C6 (mL)	0.2	0.5	2.0	5.0	20.0	50.0
	总体积 (mL)	50.0	50	50.0	50.0	50.0	50.0
	终浓度 (ng/mL)	NMN: 20 MN: 20 3-MT: 8	NMN: 50 MN: 50 3-MT: 20	NMN: 200 MN: 200 3-MT: 80	NMN: 500 MN: 500 3-MT: 200	NMN: 2000 MN: 2000 3-MT: 800	NMN: 5000 MN: 5000 3-MT: 2000

[0103] (三) 质控品配制

[0104] 以配制50.00mL质控品LQC, MQC, HQC为例, LQC, MQC, HQC的配制是分别将校准品C6与空白液H0稀释后得到,稀释比例见下表:

[0105] 表7质控品LQC, MQC, HQC配制

	样本名称	LQC	MQC	HQC
[0106]	空白液 H0 (mL)	47.5	25.0	10.0
	校准品 C6 (mL)	2.5	25.0	40.0
	总体积 (mL)	50.0	50.0	50.0
	终浓度 (ng/mL)	NMN: 250 MN: 250 3-MT: 100	NMN: 2500 MN: 2500 3-MT: 1000	NMN: 4000 MN: 4000 3-MT: 1600

[0107] (四) 内标储备液及内标工作液的配制

[0108] 1. 精密称量购买的香兰素胺盐酸盐,用纯化水作稀释液,在实际称量时需要对标物质的纯度、所带的结晶水或者盐进行折算,得到浓度为1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的香兰素胺储备液,即为内标储备液,置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中贮存。

[0109] 2. 精密量取内标储备液适量,用纯化水稀释,配制成终浓度为4000ng/mL的内标工作液。

[0110] (五) 样本前处理方法

[0111] 1. 试剂准备:

[0112] 内标工作液:浓度为4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的香兰素胺水溶液;

[0113] 淋洗液:浓度为20mmol的乙酸铵水溶液;

[0114] 洗脱液:体积比为98:2:2的乙腈:甲酸:水的溶液。

[0115] 2. 前处理步骤:

[0116] 1) 样本预处理:所有校准品、质控品及尿液样本各取100 μL 至96孔板中,分别加入50 μL 内标工作液,封膜后振荡混合5分钟,以4000rpm 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心5分钟,备用。

[0117] 2) 活化:向新的SPE96孔板每孔加入200 μL 甲醇,使用正压固相萃取装置或负压装置施加压力压下去,弃去;然后每孔加入200 μL 纯化水;施加压力压下去,弃去,控制流速3-

5s/滴。

[0118] 3) 上样:向活化过的SPE96孔板加入全部步骤1处理过的样本,施加压力压下去,弃去,控制流速3-5s/滴。

[0119] 4) 淋洗:每孔加入200 μ L的淋洗液(20mmol乙酸铵水溶液),施加压力压下去,弃去;然后每孔加入200 μ L甲醇,施加压力压下去,弃去,控制流速3-5s/滴。

[0120] 5) 洗脱:每孔加入200 μ L的洗脱液(乙腈:甲酸:水=98:2:2),施加压力压下去,收集至新的96孔收集板,控制流速3-5s/滴。

[0121] 6) 氮吹复溶:将收集的洗脱液在35 $^{\circ}$ C下N₂吹干,然后用200 μ L纯化水复溶,封膜后振荡混合5分钟后,以4000rpm 4 $^{\circ}$ C条件下离心5分钟,用于液相色谱仪分析。

[0122] 7) 上机分析:根据荧光响应强度,调整进样体积为5~10 μ L。

[0123] (六) 高效液相色谱-荧光检测分析条件

[0124] 1. 高效液相色谱-荧光检测分析条件如表8所示:

[0125] 表8高效液相色谱-荧光检测分析条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	A%	B%
0.00	1.0	90	10
1.00	1.0	90	10
1.10	1.0	70	30
3.00	1.0	70	30
3.10	1.0	90	10
6.00	1.0	90	10
[0126] 洗针液	60%甲醇水		
色谱柱	Agilent PFP 4.6*150mm,3.0 μ m		
柱温	35 $^{\circ}$ C		
进样量	5-10 μ L		
流动相 A	20 mM KH ₂ PO ₄ , 0.2 mM EDTA-2Na 水溶液		
流动相 B	甲醇		
激发波长 EX	286nm		
发射波长 EM	318nm		

[0127] 采用上述检测方法检测样本,得到的色谱图如图1所示,色谱图中NMN为去甲变肾上腺素;MN为变肾上腺素;3-MT为3-甲氧基酪胺;IS为内标。

[0128] 实施例2线性

[0129] 1. 线性范围

[0130] 1) 验证方法:验证方法:用线性范围上限附近的高浓度样本和接近线性范围下限附近的低浓度样本,按比例混合成7个稀释浓度(X_i),每个稀释浓度检测3次,分别求出检测结果的均值(\bar{y})。以稀释浓度为自变量,以检测结果均值为因变量求出线性回归方程,按下列公式或数据分析软件计算线性回归的相关系数r,结果应符合相关系数r应 ≥ 0.990 。

$$[0131] \quad r = \frac{\sum [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

[0132] r:线性回归相关系数;

[0133] x_i :稀释浓度的理论值;

[0134] y_i :检测结果的测量值。

[0135] 2) 接受标准:在线性范围内NMN, MN, 3-MT的线性回归的相关系数r均 ≥ 0.990 。

[0136] 2. 实验结果:在线性范围 (NMN:20ng/mL ~ 5000ng/mL, MN:20ng/mL ~ 5000ng/mL, 3-MT:8ng/mL ~ 2000ng/mL) 内, NMN, MN, 3-MT的线性回归的相关系数r均 ≥ 0.990 。

[0137] 表9

名称	标示浓度 (ng/mL)	测得值 1 (ng/mL)	测得值 2 (ng/mL)	测得值 3 (ng/mL)	mean	r	判定标准	判定
NMN	L1	17	16.365	15.318	16.543	1.0000	$r \geq 0.990$	合格
	L2	20	18.798	19.145	18.787			
	L3	50	50.633	50.359	50.775			
	L4	200	201.02	202.535	202.662			
	L5	500	507.708	508.167	505.934			
	L6	2000	2012.888	2028.183	2015.331			
	L7	5500	5466.366	5509.509	5507.015			
MN	L1	17	17.632	16.565	16.169	1.0000	$r \geq 0.990$	合格
	L2	20	18.283	18.159	18.338			
	L3	50	49.419	49.761	49.852			
	L4	200	200.224	201.782	202.463			
	L5	500	509.448	510.62	507.39			
	L6	2000	2031.108	2049.105	2035.39			
	L7	5500	5632.746	5660.725	5637.332			
3-MT	L1	7	6.006	6.003	6.348	1.0000	$r \geq 0.990$	合格
	L2	8	7.743	7.659	7.346			
	L3	20	20.688	19.887	20.133			
	L4	80	78.74	79.633	80.015			
	L5	200	201.207	199.972	198.615			
[0139]	L6	800	795.164	800.548	792.634			
	L7	2200	2192.602	2202.54	2192.359			

[0140] 3. 结论:NMN, MN及3-MT的线性回归的相关系数r均 ≥ 0.990 , 满足接受标准。

[0141] 实施例3方法准确度(加标回收率)

[0142] 1. 方法准确度(加标回收率)

[0143] 1) 验证方法:将已知浓度的高水平待测物(A液, 包含NMN, MN和3-MT三种化合物, A液可以直接选用合适的高浓度参考物质, 若无参考物质, 也可用与被测量一致的纯品进行配制, 配制时应采用重量法, 以减小配制过程中的不确定度), 加入到人的尿液样本B液中, 配制成至少3个不同浓度的回收样本, 所加待测物A与人的尿液样本B之间的体积比例不大于1:9, 各重复检测3次, 取平均值, 计算回收率, 各样本各化合物的回收率(R)应在85% - 115%范围内。

$$[0144] \quad R = (C_{\text{实测值}} - C_{\text{本底值}}) / C_{\text{理论值}} \times 100\%$$

[0145] R:回收率;

[0146] $C_{\text{实测值}}$:根据线性拟合计算出的测量值的平均值;

[0147] $C_{\text{本底值}}$:人的尿液样本的本底值;

[0148] $C_{\text{理论值}}$:配制后的样本的理论浓度。

[0149] 2) 接受标准:NMN,NM及3-MT的回收率(R)应在85%-115%范围内。

[0150] 2. 实验结果:如表10所示。

[0151] 表10

名称		实测 1# (ng/mL)	实测 2# (ng/mL)	实测 3# (ng/mL)	Mean (ng/mL)	理论值 (ng/mL)	本底值 (ng/mL)	回收率 (%)	standard	判定
[0152] NMN	样本 1	111.389	106.889	108.254	108.844	100	10.305	98.54%	85~115%	合格
	样本 2	2427.121	2430.604	2424.89	2427.538	2500		96.69%		
	样本 3	3923.534	3932.228	4075.815	3977.192	4000		99.17%		
MN	样本 1	107.927	104.948	105.711	106.195	100	9.509	96.69%	85~115%	合格
	样本 2	2502.961	2514.427	2547.714	2521.701	2500		100.49%		

[0153] 3-MT	样本 3	3972.389	3984.076	4097.457	4017.974	4000	5.319	100.21%	85~115%	合格
	样本 1	42.697	42.523	43.387	42.869	40		93.88%		
	样本 2	994.64	985.263	1051.421	1010.441	1000		100.51%		
	样本 3	1597.735	1584.236	1650.261	1610.744	1600		100.34%		

[0154] 3. 结论:准确度高,NMN,MN,3-MT的低、中、高浓度样本回收率均在85~115%以内。

[0155] 实施例4重复性

[0156] 1. 重复性

[0157] 1) 验证方法:在重复性条件下,按照本专利的检测方法,对于高、低浓度的质控品重复测试10次。按照下列公式计算重复性的变异系数(CV),低值质控品 $CV \leq 20\%$,高值质控品 $CV \leq 15\%$ 。

[0158] $CV = S / \bar{X} \times 100\%$

[0159] CV:重复性的变异系数;

[0160] \bar{X} :10次测量结果的平均值;

[0161] S:10次测量结果的标准差。

[0162] 2) 接受标准:低值质控品的变异系数 $CV \leq 20\%$,高值质控品的变异系数 $CV \leq 15\%$ 。

[0163] 2. 实验结果如表11所示。

[0164] 表11

序号	NMN		MN		3-MT	
	LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC
1	244.661	4082.379	247.226	4149.493	103.754	1732.743
2	241.678	4113.524	244.811	4190.015	103.4	1759.75
3	240.459	4098.784	242.893	4165.135	103.258	1738.501
4	241.086	4070.507	244.257	4142.986	100.922	1726.1
5	241.821	4031.686	244.999	4097.524	103.315	1707.396
6	245.935	3945.561	248.306	4013.14	104.208	1667.012
7	246.287	3931.637	248.565	4007.859	103.763	1665.251
8	246.843	3948.452	248.392	4014.85	105.517	1678.3
9	247.335	3940.434	248.766	4020.478	104.411	1674.543
10	245.75	3938.156	248.247	4019.571	104.678	1669.981
Mean	244.186	4010.112	246.646	4082.105	103.723	1701.958
SD	2.635	76.050	2.180	74.180	1.210	35.179

[0166]	CV	1.08%	1.90%	0.88%	1.82%	1.17%	2.07%
	standard	≤20%	≤15%	≤20%	≤15%	≤20%	≤15%
	判定	合格	合格	合格	合格	合格	合格

[0167] 3. 结论: 低值质控品的变异系数 $CV \leq 20\%$, 高值质控品的变异系数 $CV \leq 15\%$, 满足接受标准。

[0168] 实施例5批间差

[0169] 1. 批间差

[0170] 1) 验证方法: 按照实施例1的检验方法测试三批高、低浓度质控品, 分别测试10次, 共30次。按照下列公式计算重复性的变异系数(CV), 低值质控品 $CV \leq 20\%$, 高值质控品 $CV \leq 15\%$ 。

[0171] $CV = S / \bar{X} \times 100\%$

[0172] CV: 重复性的变异系数;

[0173] \bar{X} : 30次测量结果的平均值;

[0174] S: 30次测量结果的标准差。

[0175] 2. 接受标准: 低值质控品的变异系数 $CV \leq 20\%$, 高值质控品的变异系数 $CV \leq 15\%$ 。

[0176] 2. 实验结果如表12所示:

[0177] 表12

批号	序号	NMN		MN		3-MT	
		LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC
[0178] 20210920	1	244.661	4082.379	247.226	4149.493	103.754	1732.743
	2	241.678	4113.524	244.811	4190.015	103.4	1759.75
	3	240.459	4098.784	242.893	4165.135	103.258	1738.501
	4	241.086	4070.507	244.257	4142.986	100.922	1726.1
	5	241.821	4031.686	244.999	4097.524	103.315	1707.396
	6	245.935	3945.561	248.306	4013.14	104.208	1667.012
	7	246.287	3931.637	248.565	4007.859	103.763	1665.251
	8	246.843	3948.452	248.392	4014.85	105.517	1678.3
	9	247.335	3940.434	248.766	4020.478	104.411	1674.543
	10	245.75	3938.156	248.247	4019.571	104.678	1669.981
20210922	11	243.172	3922.173	237.591	3827.421	109.543	1730.438

[0179]

	12	241.437	3929.132	237.339	3830.459	108.564	1737.374
	13	240.899	3922.497	236.371	3828.777	106.448	1740.791
	14	240.447	3924.959	235.551	3833.437	105.381	1736.791
	15	241.416	3930.244	236.683	3830.726	105.205	1737.941
	16	239.458	3859.083	235.197	3771.24	107.205	1717.543
	17	239.926	3865.724	234.435	3775.214	106.865	1746.779
	18	238.784	3877.884	233.913	3767.473	107.905	1755.593
	19	238.763	3862.498	233.801	3770.113	107.055	1759.302
	20	237.998	3866.995	234.073	3771.636	105.633	1734.239
	21	244.23	4052.315	252.127	4165.108	102.428	1664.319
	22	245.304	4054.813	248.651	4169.737	103.778	1674.101
	23	247.575	4050.284	250.854	4160.749	101.459	1668.452
	24	247.884	4052.315	250.554	4165.108	101.589	1664.319
	25	248.118	4054.813	250.442	4169.737	101.206	1674.101
	26	246.839	4050.284	249.169	4160.749	100.68	1668.452
	27	249.756	4007.798	255.878	4119.392	106.566	1646.024
	28	247.431	4054.813	253.346	4169.737	100.898	1674.101
	29	248.769	4050.284	253.299	4160.749	100.861	1668.452
	30	246.434	4054.813	251.389	4169.737	100.367	1674.101
	mean	243.883	3984.828	244.571	4014.612	104.229	1703.093
	SD	3.497	80.577	7.096	163.816	2.572	36.707
	CV	1.43%	2.02%	2.90%	4.08%	2.47%	2.16%
	standard	≤20%	≤15%	≤20%	≤15%	≤20%	≤15%
	判定	合格	合格	合格	合格	合格	合格

[0180] 3. 结论: 低值质控品的变异系数 $CV \leq 20\%$, 高值质控品的变异系数 $CV \leq 15\%$, 满足接受标准。

[0181] 最后应说明的是: 以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案, 而非对其限制; 尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明, 本领域的普通技术人员应当理解: 其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改, 或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换; 而这些修改或者替换, 并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

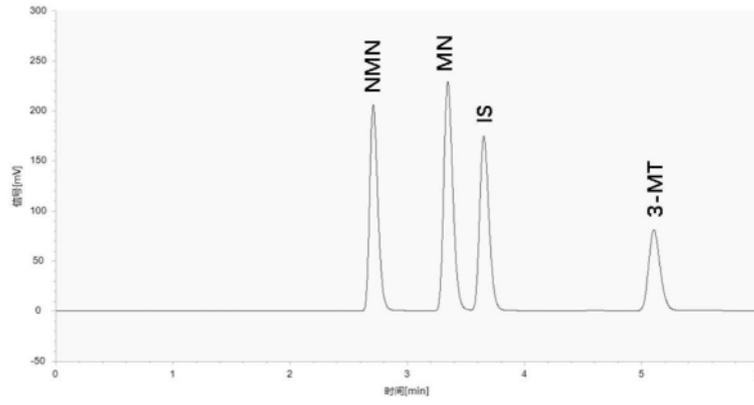


图1