

三重四极杆质谱测定尿液中的神经递质和褪黑激素

LCMSMS-122

摘要： 本文建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定尿液中 4 种单胺类神经递质和褪黑激素的方法。样品经冷冻离心，SPE 净化后，液相色谱三重四极杆质谱仪进行定量分析。5 种化合物分别在 1~500 ng/mL, 0.1~50 ng/mL 浓度范围内线性关系良好；对混合标准溶液连续 6 次进样，5 个化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.09~0.26% 和 2.49~4.76% 之间，仪器精密度良好；能同时分析尿液中的神经递质和褪黑激素。

关键词： 神经递质 褪黑激素 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

单胺类神经递质是调节神经生理功能的重要物质，包括儿茶酚类、吲哚胺类以及相关代谢产物。单胺类神经递质在生物体内分布广泛，且在中枢神经系统中参与脑缺血、镇痛和学习记忆等多种生理过程。临床研究还表明，单胺类神经递质与中枢神经系统紊乱，甚至多种疾病相关，如焦虑症、抑郁症、精神分裂症、帕金森病等。褪黑激素 (Melatonin, MLT) 是人脑部深处像松果般大小的“松果体”分泌的一种胺类激素，它是迄今发现的最强的内源性自由基清除剂。最新研究证明，MLT 是内分泌的总司令，它控制体内各种内分泌腺的活动。因此简单、准确、快速检测单胺类神经递质及褪黑激素的含量，对于疾病的诊断、药物治疗以及基础研究具有重要的意义。

目前，单胺类神经递质的检测方法主要包括荧光分光光度法、高效液相色谱-电化学检测法、高效液相色谱-荧光法及气相色谱-质谱法等。液相色谱串联质谱法虽然在生物样品分析方面具有灵敏度高、专属性强等优势，但鲜有报道使用该仪器用于神经递质类物质的分析。其主要原因是该类化合物极性较强，一般需要添加离子对试剂增强其在反相柱上的保留，而质谱一般不允许添加离子对试剂。

本文在流动相中添加少量的挥发性离子对试剂七氟丁酸 (PFHA)，建立了 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用同时测定尿液中神经递质和褪黑激素的方法，该方法具有操作简单、快速、可靠、准确等特点。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC

自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS
3.0 mm I.D. × 75 mm L., 2.2 μm

流动相：A - 1 mmol/L PFHA 水溶液；

B - 乙腈

流速：0.3 mL/min

进样体积：10 μL

柱温：40°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 10%，时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time	Module	Action	Value
5.00	Pumps	Pump B Conc.	50
7.00	Pumps	Pump B Conc.	80
9.00	Pumps	Pump B Conc.	80
9.01	Pumps	Pump B Conc.	10
12.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8040

离子源：ESI，正离子扫描

离子源接口电压：-3.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250°C

加热模块温度：450°C

驻留时间：100 ms

扫描模式：多反应监测（MRM）

MRM 参数：见表 2

表2 MRM参数

编号	英文名称	缩写	化合物名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE (V)	Q3 Pre Bais(V)
1	Dopamine	DA	多巴胺	51-61-6	154.2	137.1*	-18.0	-14.0	-25.0
						91.2	-18.0	-24.0	-18.0
2	Melatonin	MLT	褪黑激素	73-31-4	233.3	174.2*	-12.0	-13.0	-12.0
						159.2	-12.0	-26.0	-11.0
3	5-Hydroxyindole-3-acetic acid	5HIAA	5-羟吲哚乙酸	54-16-0	192.2	146.1*	-24.0	-15.0	-28.0
						91.1	-23.0	-37.0	-17.0
4	N-Acetyl-5-hydroxytryptamine	N-Ac-5-HT	N-乙酰基-5-羟色胺	17994-17-1	219.2	160.1*	-26.0	-14.0	-11.0
						115.2	-26.0	-33.0	-21.0
5	3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine	L-DOPA	3,4-二羟基-L-苯丙氨酸	59-92-7	198.2	152.3*	-19.0	-12.0	-10.0
						107.2	-19.0	-26.0	-19.0

*表示定量离子

1.3 样品前处理方法

收集健康者晨尿，冷冻保存。使用前 4°C 解冻，12000 r/min 冷冻离心（0~4°C）10 min，上清液用 0.45 μm 的滤膜过滤，滤液储存于棕色容量瓶中备用。取 1 mL 尿液，加 10% 高氯酸 10 μL，混匀，上样于事先用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化后的 MCX 小柱，1 mL 10% 甲醇 / 水清洗后，2 mL 甲醇洗脱。氮气吹干，1 mL 10% 乙腈 / 水溶解后注入 LC-MS/MS 分析。

结果讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

1 ng/mL 标准样品的 MRM 色谱图如图 1 所示。

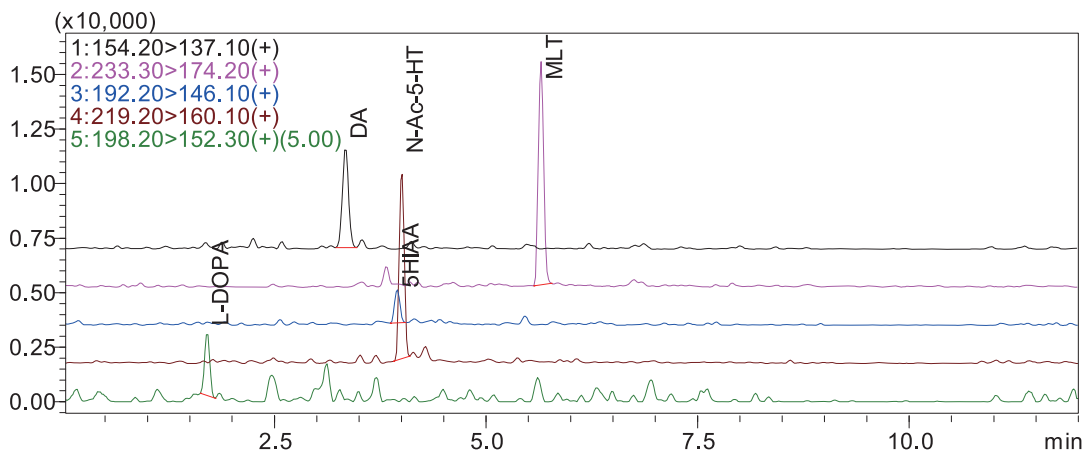


图1 标准样品的MRM图

2.2 线性关系

配制 7 个不同浓度的标准溶液，DA, 5HIAA, N-Ac-5-HT 和 L-DOPA 的浓度分别为 1, 5, 10, 50, 100, 200 和 500 ng/mL, MLT 的浓度为 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20 和 50 ng/mL，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标制作标准曲线。具体见图 2~6。5 个化合物在检测浓度范围内线性良好。线性方程、相关系数及由软件计算得检出限和定量限见表 3。

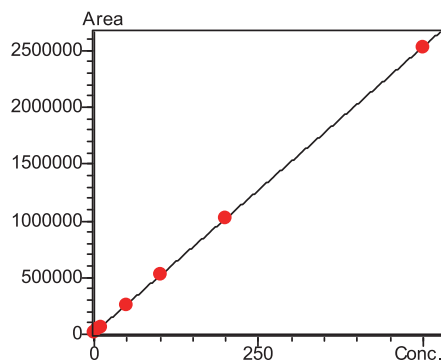


图2 DA的标准工作曲线

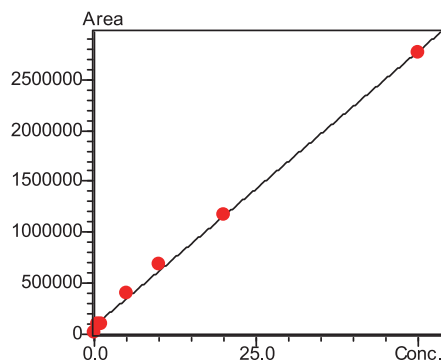


图3 MLT的标准工作曲线

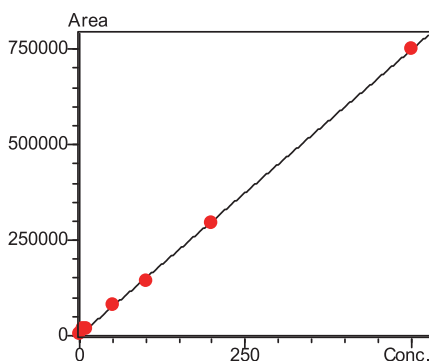


图4 5HIAA的标准工作曲线

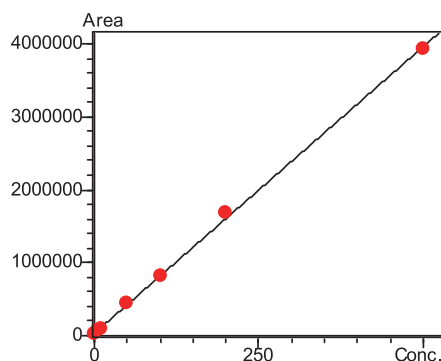


图5 N-Ac-5-HT的标准工作曲线

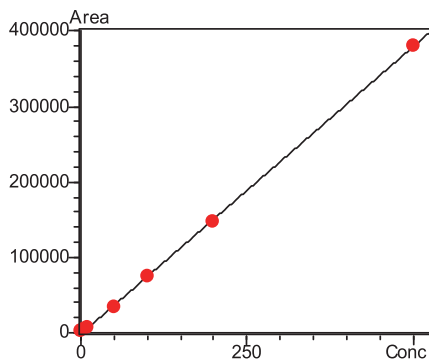


图6 L-DOPA的标准工作曲线

表3 5种化合物的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数r	检出限(ng/mL)	定量限(ng/mL)
1	DA	$Y = (5038.5)X + (13213.8)$	0.9999	0.15	0.47
2	MLT	$Y = (54006.6)X + (82979.8)$	0.9988	0.003	0.01
3	5HIAA	$Y = (1492.0)X + (1714.6)$	0.9997	0.84	2.54
4	N-Ac-5-HT	$Y = (7854.7)X + (33477.0)$	0.9997	0.11	0.32
5	L-DOPA	$Y = (761.6)X + (-1700.6)$	0.9998	1.24	3.74

2.3 精密度实验

对混合标准溶液 (DA, 5HIAA, N-Ac-5-HT 和 L-DOPA 的浓度为 100 ng/mL, MLT 浓度为 10 ng/mL) 连续 6 次进样, 5 个化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.09~0.26% 和 2.49~4.76% 之间, 仪器精密度良好。

表4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=3)

	DA		MLT		5HIAA		N-Ac-5-HT		L-DOPA	
	Ret.T	Area	Ret.T	Area	Ret.T	Area	Ret.T	Area	Ret.T	Area
1	3.334	537,968	5.645	858,746	3.948	148,721	3.998	802,674	1.691	70,023
2	3.333	539,887	5.645	848,953	3.948	153,987	3.999	855,286	1.694	68,761
3	3.337	560,338	5.651	788,501	3.953	139,826	4.003	905,943	1.692	73,880
4	3.337	573,514	5.644	842,876	3.950	140,118	4.000	871,574	1.696	74,100
5	3.349	543,778	5.656	807,448	3.963	143,257	4.012	805,133	1.699	73,009
6	3.349	554,655	5.654	782,864	3.961	147,328	4.008	868,227	1.702	69,861
AVE	3.340	551,690	5.649	821,565	3.954	145,539	4.003	851,473	1.696	71,606
RSD%	0.21	2.49	0.09	3.99	0.163	3.79	0.14	4.76	0.26	3.25

2.4 回收率考察

在空白尿样中加入标准溶液，DA，5HIAA，N-Ac-5-HT 和 L-DOPA 的加标浓度为 10 ng/mL，MLT 的加标浓度为 1 ng/mL，按 1.3 前处理方法进行处理，得到空白尿液及加标样品色谱图如图 7~8 所示。DA，MLT，5HIAA，N-Ac-5-HT 和 L-DOPA 加标回收率分别为 71.8%，75.3%，85.6% 84.4% 和 119.1%。

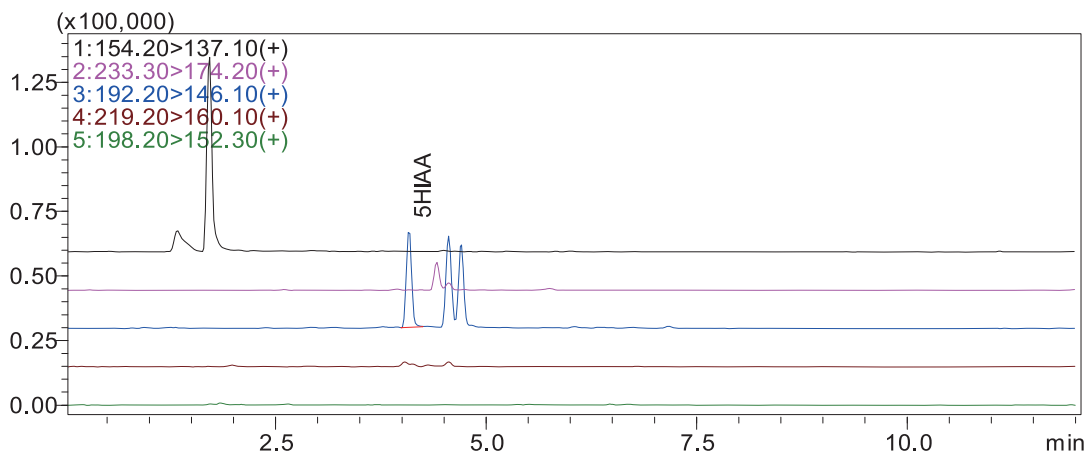


图7 空白尿样MRM图

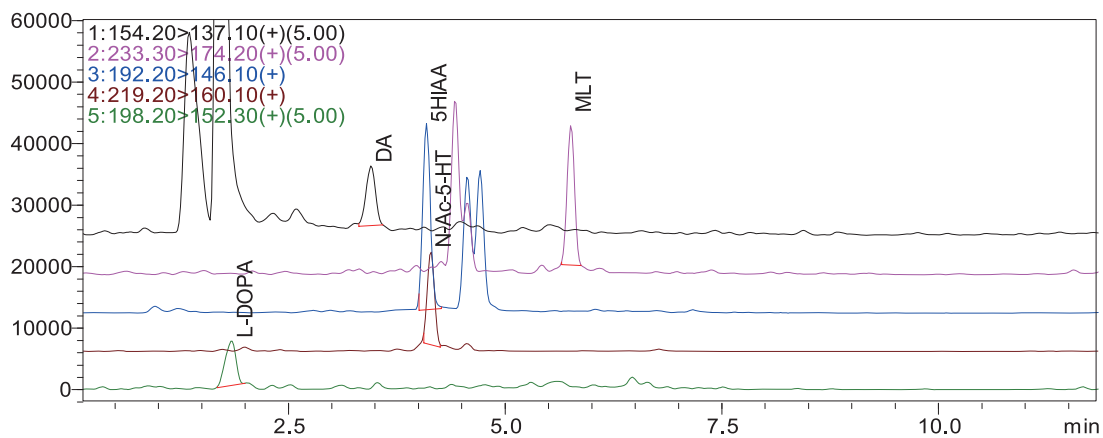


图8 空白尿样加标MRM图

(加标浓度: DA, 5HIAA, N-Ac-5-HT和 L-DOPA 10 ng/mL, MLT 1 ng/mL)

2.5 尿液样品分析

分析健康人尿样样品，检出 5HIAA 的浓度为 110.0 ng/mL，N-Ac-5-HT 为 0.1 ng/mL(检出限附近)，其它物质未检出。得到的样品色谱图见图 9。

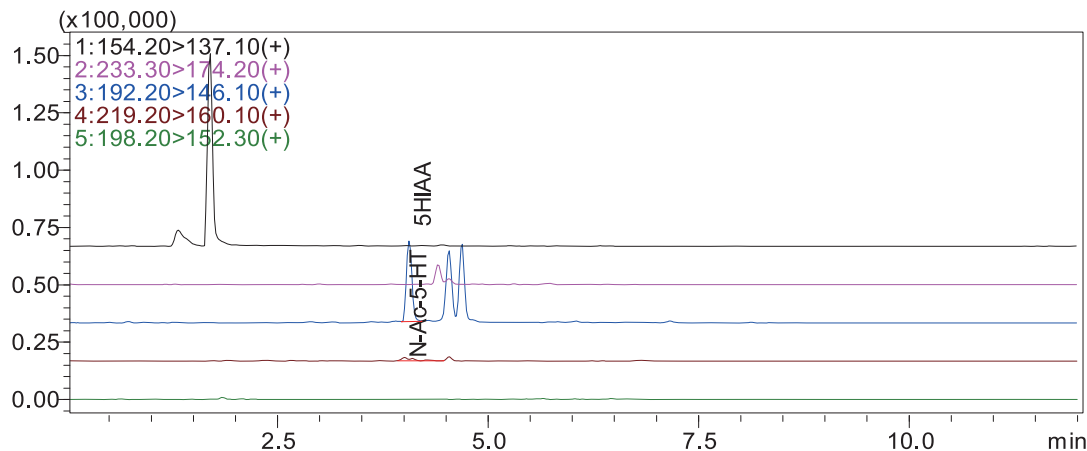


图9 某尿液样品的MRM图

结论

建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定尿液中神经递质和褪黑激素的方法。5 种化合物分别在 1~500 ng/mL, 0.1~50 ng/mL 浓度范围内线性关系良好; 对混合标准溶液连续 6 次进样, 5 个化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.09~0.26% 和 2.49~4.76% 之间, 仪器精密度良好; 可用于尿液中神经递质和褪黑激素的检测。