

LC-MS/MS 分析人尿液中 5-羟吲哚乙酸含量

LCMSMS-547

摘要：本文建立了一种使用岛津高效液相色谱仪串联三重四极杆质谱仪测定人尿液中 5-羟吲哚乙酸含量的方法。结果表明：5-羟吲哚乙酸在 5~5000 ng/mL 浓度范围内线性关系良好，相关系数大于 0.998，各浓度准确度在 94.49~106.22 % 之间；重复性结果显示，峰面积 RSD 为 5.58 %；加标回收实验中，5-羟吲哚乙酸的回收率在 93.76~111.50 % 之间。该方法前处理简单、线性范围宽，可为临床检测尿液中 5-羟吲哚乙酸提供参考。

关键词：5-羟吲哚乙酸 类癌 LCMSMS

5-羟吲哚乙酸 (5-hydroxyindole acetic acid, 5-HIAA) 为吲哚乙酸的衍生物，由 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 在单胺氧化酶 (Monoamine oxidase, MAO) 作用下转化而来，是人体内重要的活性物质之一。5-HIAA 是哺乳动物尿中的正常组成成分，同时也存在于脑脊液、血小板等体液组织中，最终由尿排出。

临床上将 5-HIAA 的过度分泌作为类癌瘤最为特异性的生化指征。类癌 (carcinoid) 是一组发生于胃肠道和其他器官嗜铬细胞的神经内分泌肿瘤，由于类癌细胞释放大量的 5-HT，而 5-HT 进一步代谢生成 5-HIAA，因此类癌患者尿中的 5-HIAA 排泄量显著增高，有报道

可达正常量的 5 ~ 50 倍，甚至百倍以上。

尿液中 5-HIAA 的测定方法主要有比色法、荧光分析法、高效液相色谱法等；质谱法由于其样品前处理简单、不易受尿液中其他药物及代谢物的干扰、线性范围宽、因而能够更好地满足临床需求。

本文使用岛津高效液相色谱仪串联三重四极杆质谱仪建立了人尿液中 5-HIAA 的检查方法。该方法专属性好，灵敏、线性范围宽、回收率高，可供相关检测人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用高效液相色谱仪 Nexera X3 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统，具体配置为：

系统控制器：CBM-40

脱气机：DGU-405

输液泵：LC-40B X3

自动进样器：SIL-40C X3

柱温箱：CTO-40C

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.99

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack GISS (50 mm×2.1 mm I.D., 1.9 μm) ，
PN: 227-30048-01，岛津（上海）实验器材有限公司

流动相：A 相 -0.02 % FA 水溶液，B 相 - 甲醇

流速：0.35 mL/min

柱温：35°C

进样量：1 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 10 %，洗脱程序见表 1。

表 1 洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.80	Pumps	Pump B Conc.	10
2.00	Pumps	Pump B Conc.	95
3.00	Pumps	Pump B Conc.	95
3.01	Pumps	Pump B Conc.	10
6.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8045

离子源：ESI⁺

雾化气流速：3.0 L/min

加热气流速：10.0 L/min

干燥气流速：10.0 L/min

加热模块温度：300°C

DL 温度：250°C

离子源温度：400°C

扫描模式：多反应监测 (MRM)

MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

序号	化合物	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
1	5-HIAA	54-16-0	192.10	146.15*	-15.00	-15.00	-28.00
				117.15	-10.00	-38.00	-22.00

* 表示定量离子

1.3 样品处理

(1) 标准工作液：取 5-HIAA 对照品适量，精密称定，加甲醇溶解，作为标准储备液。精密量取标准储备液适量，加甲醇稀释制成 0.10、0.20、0.40、1.00、2.00、4.00、10.00、20.00、40.00、100.00 μg/mL 的标准工作液。

(2) 标准曲线样品：取纯水 95 μL，加入 5-HIAA 对照品工作液 5 μL，加入甲醇 500 μL，涡旋 2 min，于 12000 rpm 离心 10 min 后，取上层清液 1 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

(3) 尿液样本：取尿液 100 μL，加入甲醇 500 μL，涡旋 2 min，于 12000 rpm 离心 10 min 后，取上层清液 1 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

(4) 尿液加标回收率样本：在 EP 管中分别加入 0.15、5.00、10.00、40.00 μg/mL 工作液 50 μL，氮气流吹干后加入 6 个不同来源的尿液样本 0.5 mL，涡旋 2 min；取加标后尿液样本 100 μL，加入甲醇 500 μL，涡旋 2 min，于 12000 rpm 离心 10 min 后，取上层清液 1 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

■ 结果与讨论

2.1 专属性考察及标准样品 MRM 色谱图

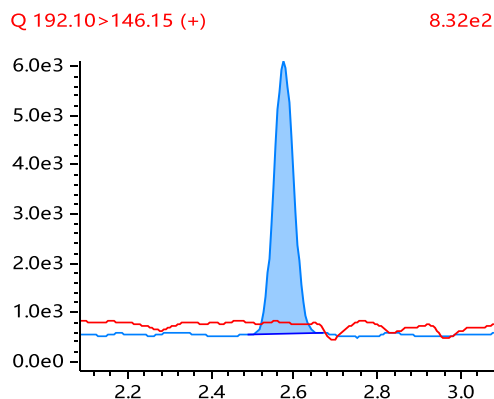


图1 5-HIAA 标准样品（蓝色，浓度 20 ng/mL）与空白溶剂（红色）MRM 色谱图

结果显示，空白溶剂对于定量离子监测无干扰。

2.2 线性范围

将浓度为 5、10、20、50、100、200、500、1000、2000、5000 ng/mL 标准工作液，按 1.2 中的分析条件上机分析，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法建立校准曲线，结果如图 2 所示。

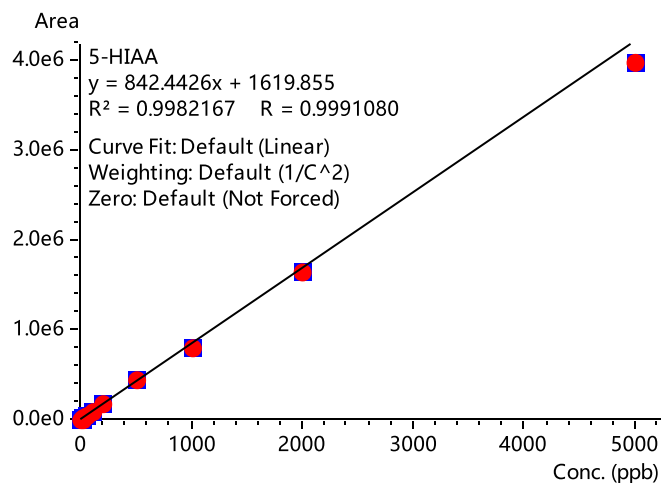


图2 校准曲线

2.3 精密度及准确度

对浓度为 5、10、1000、5000 ng/mL 的标准溶液连续测定 6 次，考察精密度及准确度，结果如表 3 所示。

表3 精密度及准确度

理论值	5 ng/mL	10 ng/mL	1000 ng/mL	5000 ng/mL
AVE	4.38±0.24	9.74±0.45	944.50±10.37	4503.86±9.73
Accuracy%	87.69	97.43	94.45	90.08
RSD(%)	5.58	4.62	1.10	0.22

2.4 样本测试结果

共测试 28 份尿液样本（28 位受试者，同一时间段内采集）结果如表 4 所示。

表 4 样本测试结果

样本编号	浓度 (ng/mL)	样本编号	浓度 (ng/mL)	样本编号	浓度 (ng/mL)	样本编号	浓度 (ng/mL)
1	1,998.70	8	1,989.42	15	3,438.03	22	3,079.30
2	2,444.92	9	860.46	16	2,443.36	23	2,705.67
3	2,495.36	10	1,068.72	17	2,025.58	24	2,581.69
4	2,160.24	11	8,289.96	18	2,153.51	25	1,876.40
5	3,798.54	12	2,396.86	19	945.883	26	1,209.75
6	2,593.18	13	34.22	20	6,159.31	27	4,013.42
7	4,740.53	14	7,956.87	21	4,008.66	28	8665.89

测试的 28 例尿液样本，其 5-羟吲哚乙酸含量大多在 1000~4000 ng/mL 之间（见图 3）；

尿液中5-HIAA含量

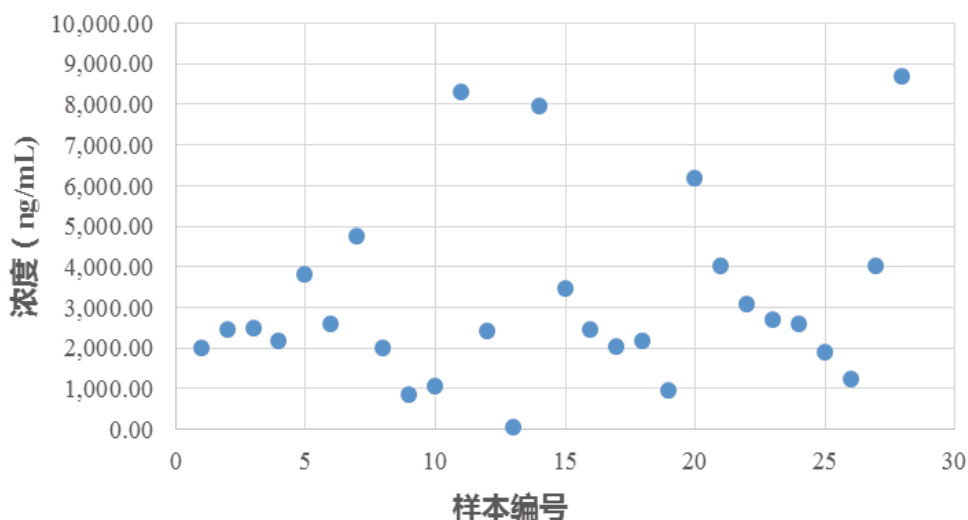


图 3 样本检测结果

2.5 加标回收率

取 6 个不同来源的尿液样本，按 1.2 项下（4）处理方式考察加标回收率，结果如表 5。

表 5 加标回收率

样本	* 样本含量 ng/mL	加标量 ng/mL	加标理论值 ng/mL	实测值 ng/mL	平均回收率 (%)
1	34.22±5.52	15	49.22	50.81±4.90	103.24
2	860.46±42.06	500	1360.46	1349.63±84.19	99.20
3	1209.75±24.24	500	1709.75	1782.34±10.02	104.25
4	1989.42±16.56	1000	2989.42	2965.62±113.20	99.20
5	2025.58±25.16	1000	3025.58	3118.72±4.55	103.08
6#	8665.89±396.58	4000	12665.89	12083.01±293.65	95.40

* 样本含量为同一尿液样本重复进样测定 3 次的平均值。

#6 号样本含量超出标准曲线范围，因此样本稀释 5 倍后进样。此处（8665.889 ng/mL）为稀释后样本 x 稀释因子 -5 的回算浓度；实测值为样本加标后稀释 5 倍，此处浓度为稀释后样本 x 稀释因子 5 的回算浓度。

2.6 样本处理后稳定性

尿液样本于处理后、处理后放置 72H 后进样（10 °C），检测结果如表 6。

表 6 样本处理后稳定性 (n=3)

编号 / 项目	0H	72H	计算浓度比值 Ratio
	实测值 (ng/mL)	实测值 (ng/mL)	
Average	34.22±4.21	32.37±0.86	0.95
RSD%	12.31	2.65	
Average	860.46±71.03	851.26±13.80	0.99
RSD%	8.25	1.62	
Average	2025.58±35.84	2104.42±23.08	1.04
RSD%	1.77	1.10	

2.7 残留考察

在浓度为 5000 ng/mL 的标准溶液进样后进空白溶剂，考察系统残留，结果如图 4。

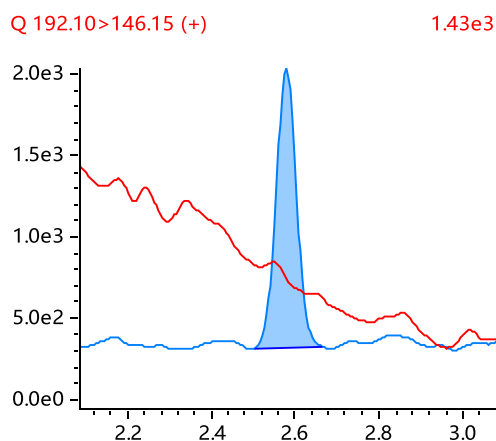


图 4 5-HIAA 标准样品（蓝色，LLOQ 浓度 5 ng/mL）与残留（红色）MRM 色谱图

结果显示，系统无明显残留。

■ 结论

本文建立了一种使用岛津高效液相色谱仪串联三重四极杆质谱仪测定人尿液中 5-羟吲哚乙酸含量的方法。结果表明：5-羟吲哚乙酸在 5~5000 ng/mL 浓度范围内线性关系良好，重复性和回收率满足生物样本测定的一般要求。该方法前处理简单、线性范围宽，可为临床检测尿液中 5-羟吲哚乙酸提供参考。

岛津应用云

