

LC-MS/MS 检测尿液中香草扁桃酸和高香草酸含量

LCMSMS-707

摘要：本文建立了一种使用岛津临床质谱 LCMS-8045CL 测定人尿液中香草扁桃酸、高香草酸和肌酐的定量分析方法，使用同位素内标、标准样品及基质加标样品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性范围 VMA: 0.5~100 $\mu\text{g/mL}$, HVA: 0.8~160 $\mu\text{g/mL}$, Cr: 15~3000 $\mu\text{g/mL}$, 满足临床参考区间要求，标准曲线相关系数均大于 0.9999，质控品准确度偏差均在 -3.0%~13.7%，精密度 RSD 均 <11.2%，该方法采用柱后补偿技术，能显著提高分析结果的稳定性和待测物灵敏度，尿肌酐的联合检测方便了肌酐校正法的计算，可满足临床 24 小时尿液和随机尿液样本的检验需求。该方法分析速度快，单针分析时间：5 分钟，灵敏度高，专属性强，前处理简单，可为相关从业人员提供参考。

关键词：临床检测 LC-MS/MS 香草扁桃酸 高香草酸 肌酐

香草扁桃酸 (Vanillylmandelic Acid, VMA) 是人体内儿茶酚胺类物质肾上腺素和去甲肾上腺素的主要终末代谢产物。高香草酸 (Homovanillic Acid, HVA) 与 VMA 结构相似，是体内单胺类神经递质多巴胺的终末代谢产物。在儿茶酚胺代谢紊乱中，VMA 和 HVA 水平的升高与分泌儿茶酚胺相关的肿瘤（如神经母细胞瘤、嗜铬细胞瘤或其他神经嵴肿瘤）有关。

嗜铬细胞瘤是源于神经嵴的嗜铬细胞发生的肿瘤，阵发性或持续性高血压是其主要的临床症状，该病可以通过手术切除肿瘤而治愈，但由于临床症状不典型，往往导致误诊。

分泌儿茶酚胺是嗜铬细胞瘤的典型特征，患者体内过量的肾上腺素、去甲肾上腺素将最终转化为 VMA 经尿排出。VMA 相比其前体物质，其化学性质更加稳定，且于疾病早期或肿瘤复发前期即可升高。因此，检测尿中的 VMA 对嗜铬细胞瘤早期诊断及病情监测有着重要的临床意义。

神经母细胞瘤是好发于儿童的一种恶性肿瘤，极易发生转移且病情发展迅速，患儿病死率仅次于白血病。由于肿瘤原发部位不同，临床表现复杂多变，极易误诊误治。与嗜铬细胞瘤相似，神经母细胞瘤也有分泌儿茶酚胺的特点，但不同的是，神经母细胞瘤除分泌肾上腺素、去甲肾上腺素以外，还能分泌多巴胺，患儿体内过量的多巴胺最终转化为 HVA 随尿液排出。因此，尿中 VMA 和 HVA 含量同时升高是临床诊断神经母细胞瘤的重要指标。

临床上同时检测尿中 VMA、HVA 可以间接反映体内儿茶酚胺的排泌情况，对嗜铬细胞瘤、神经母细胞

瘤等中枢神经系统疾病的早期诊断及鉴别有重要的意义。目前检测尿液中 VMA、HVA 的方法主要有：重氮法、免疫分析法、高效液相色谱法，但尚无一种适用于临床常规开展。由于尿液成分的复杂性，VMA、HVA 的测定存在较多干扰，且健康人尿中 VMA、HVA 的浓度较低，需要较高的检测特异性和灵敏度来保证结果的准确性。近年来，随着 LC-MS/MS 技术的普及，尿液 VMA、HVA 检测方法正朝着简单快速，高准确度，高灵敏度的方向发展。

肌酐 (Creatinine, Cr)，是肌肉在人体内代谢的产物，主要由肾小球滤过排出体外，一般情况下人体每天从尿液中排出的肌酐量恒定，不受饮食、饮水和利尿剂影响，肌酐的浓度反映了整体尿液浓度。因此，对于随机尿中待测成分含量的测定通常采用肌酐校正法计算，利用 VMA、HVA 与 Cr 的比值定量可免去临床上留取 24 小时尿液的不便，提高检测效率。

本文参考中国医师协会检验医师分会临床质谱检验医学专业委员会的《液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证》，基于岛津 LCMS-8045 平台建立了一种简单高效的液相色谱质谱法同时测定尿液中 VMA、HVA 和 Cr 含量。

尿液样本经蛋白沉淀剂引入同位素内标并适当稀释后直接进样分析，内标法定量。该方法前处理过程方便快捷，1 针进样，5 分钟内完成分析，采用柱后补偿技术显著提高分析结果的稳定性和高灵敏度，尿肌酐的同步检测方便了肌酐校正法的计算，可满足临床 24 小时尿液或随机尿液样本的检验需求，供相关人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津临床质谱 LCMS-8045，具体配置如下：

输液泵：LC-40B X3，LC-30AD

检测器：LCMS-8045

自动进样器：SIL-40C X3

柱温箱：CTO-40S

系统控制器：SCL-40

工作站软件：LabSolutions Version 5.99

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack Velox Biphenyl (100 mm × 2.1 mm × 1.8 μm)，

P/N: 227-32013-03

流动相：A 相 -0.05% 甲酸水，B 相 - 甲醇

C 相 -0.5% 氨水（补偿泵）

洗脱方式：梯度洗脱，时间程序见表 1

流速：主泵：0.3 mL/min，补偿泵：0.4 mL/min

柱温：30°C

进样器温度：15°C

进样量：5 μL

质谱条件

离子化模式：ESI

离子源温度：350°C

加热气：空气 15.0 L/min

DL 管温 度：200°C

雾化气：氮气 3.0 L/min

加热模块温度：400°C

干燥气：氮气 5.0 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：22 ms

MRM 参数：见表 2

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.01	95	5
0.50	95	5
2.00	70	30
2.50	10	90
3.50	10	90
3.60	95	5
5.00	95	5

表 2 MRM 参数

#	电离模式	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre	CE	Q3 Pre
1	ESI(+)	Cr	114.2*	44.1*	-14	-35	-18
			114.2	86.3	-14	-15	-17
2	ESI(+)	Cr-d3	117.2	47.05	-13	-35	-19
			197.3*	137.2*	21	20	24
3	ESI(-)	VMA	197.3	138.25	22	12	24
			200.3	140.25	22	22	22
4	ESI(-)	VMA-d3	181.25*	137.3*	20	11	24
			181.25	122.05	12	16	20
5	ESI(-)	HVA	186.25	142.3	20	11	26

* 表示定量离子

1.3 样品制备和前处理

1.3.1 标准品 & 内标信息

表 3 标准品信息

#	中文名	英文简称	CAS/EC 号	MW
1	肌酐	Cr	60-27-5	113.12
2	肌酐 -d3	Cr-d3	143827-20-7	116.14
3	香草扁桃酸	VMA	55-10-7	198.17
4	香草扁桃酸 -d3	VMA-d3	200-659-6	201.19
5	高香草酸	HVA	306-08-1	182.17
6	高香草酸 -d5	HVA-d5	53587-32-9	187.20

1.3.2 样本制备

(1) 内标萃取液：分别移取内标储备液于 50 mL 容量瓶中，加入甲醇溶液定容得到内标萃取液（Cr-d3：50 µg/mL，VMA-d3：5 µg/mL，HVA-d3：10 µg/mL）；

(2) 校准品：分别移取标准品储备液于 2 mL 容量瓶中，加入纯水定容得到 6 个浓度的校准品（各化合物浓度如表 4 所示）；

(3) 质控品：分别移取标准品储备液于 2 mL 容量瓶中，加入正常人尿液定容得到 2 个浓度的人尿液基质质控品（各化合物浓度如表 4 所示）。

表 4 校准品 & 质控品浓度信息

#	名称	校准品 (µg/mL)						质控品 (µg/mL)	
		STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	LQC	HQC
1	肌酐	15	30	150	750	1500	3000	195	1620
2	香草扁桃酸	0.5	1	5	25	50	100	2.9	50.4
3	高香草酸	0.8	1.6	8	40	80	160	4.2	80.2

1.3.3 样本前处理

- (1) 移取 30 µL 校准品 / 质控品 / 待测尿液样本于 1.5 mL 离心管；
- (2) 加入 300 µL 内标萃取液于 2000 rpm 涡旋混合 1 min；
- (3) 10000 rpm 4°C 离心 5 min；
- (4) 取 50 µL 上清于进样小瓶并加入 250 µL 1% 甲酸水混匀；
- (5) 上机后自动进样器以 5 µL 进样分析。

■ 实验结果

2.1 临床参考区间

表 5 临床参考区间

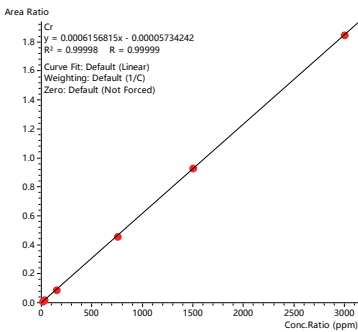
#	名称	年龄 / 性别	浓度范围
1	肌酐（随机尿）	男性	20-320 mg / dL
		女性	20-275 mg / dL
2	香草扁桃酸（随机尿）	<15 岁	<8.0~25.0 mg/g creatinine
		15 岁以上	<7.0 mg/g creatinine
3	香草扁桃酸（24 h 尿）	<15 岁	<8.0~25.0 mg/g creatinine
		15 岁以上	<8.0 mg/24 hours

4	高香草酸（随机尿）	<15 岁 15 岁以上	<9.0~35.0 mg/g creatinine <8.0 mg/g creatinine
3	高香草酸（24 h 尿）	<15 岁 15 岁以上	<9~35.0 mg/g creatinine <8.0 mg/24 hours

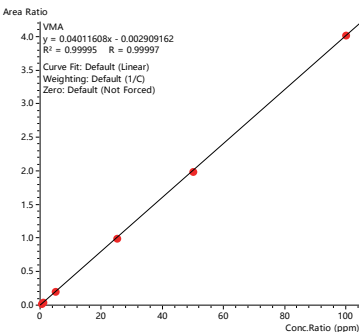
注：数据来源于 SelfDecode 和 MayoClinicLabs。

2.2 线性关系

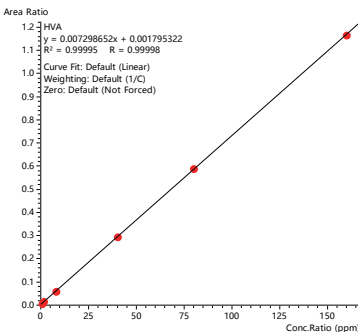
将 6 个标准浓度的校准品按 1.3.3 中前处理条件进行分析测定，以浓度比为横坐标，面积比为纵坐标，内标法制作校准曲线，线性相关系数、范围和校准品准确度见表 6。



No1 肌酐标准曲线



No2 香草扁桃酸标准曲线



No3 高香草酸标准曲线

表 6 标准曲线参数 (1/C 加权)

#	名称	相关系数	范围 (μg/mL)	准确度 (%)
1	肌酐	0.9999	15~3000	98.2~101.9
2	香草扁桃酸	0.9999	0.5~100	96.6~102.6
3	高香草酸	0.9999	0.8~160	96.8~104.9

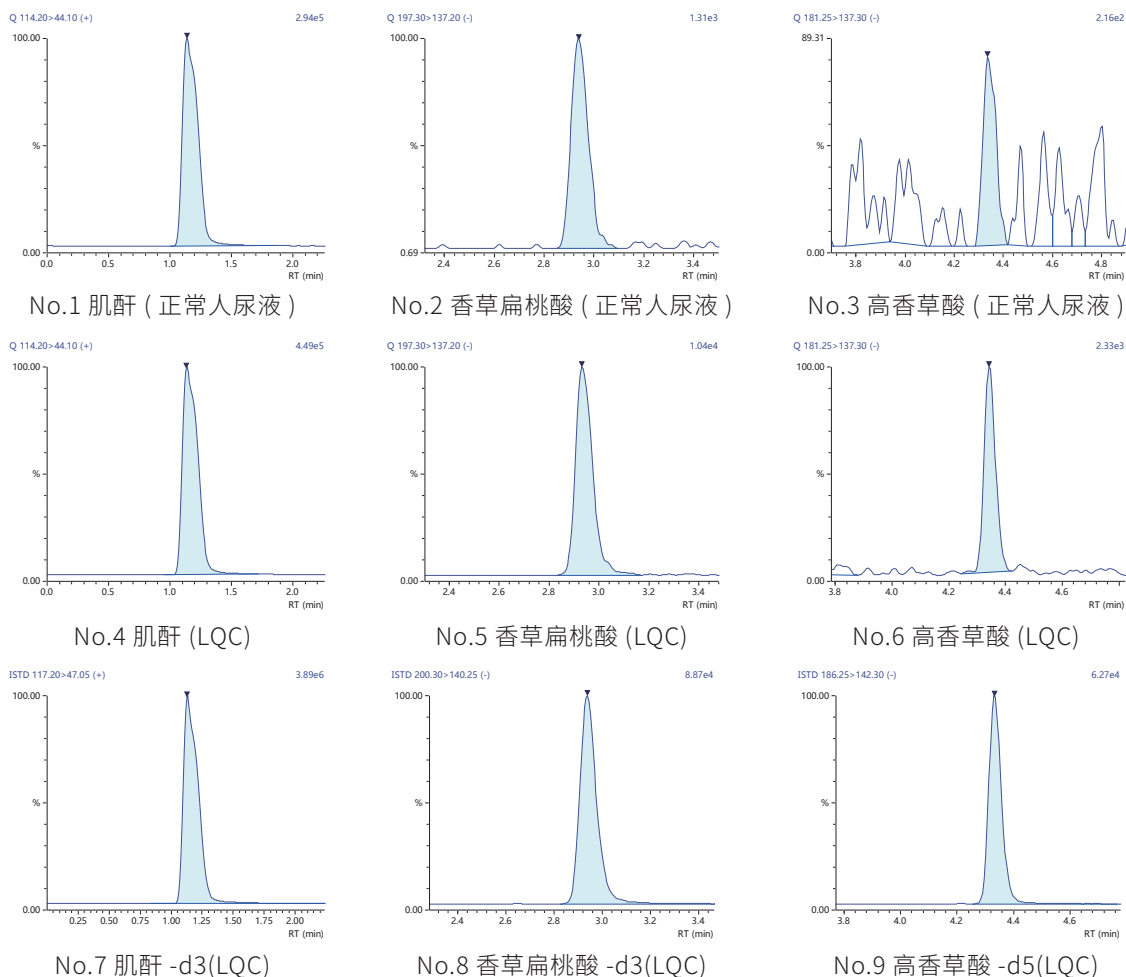
2.3 精密度 & 准确度实验

本实验分别对低浓度和高浓度的正常人尿液基质加标样（质控品）进行 6 次重复测定，3 个待测物精密度相对标准偏差范围 LQC<11.2%，HQC<3.7%，准确度偏差范围 LQC: -1.4%~13.7%，HQC: -3.0%~-0.1%(HQC)，满足临床检测要求，数据结果见附录表 7。

表 7 精密度 & 准确度结果 (n=6)

质控	名称	均值 (μg/mL)	%CV	理论值 (μg/mL)	% 偏倚
LQC	肌酐	192.18	0.8	195	-1.4
	香草扁桃酸	2.88	3.7	2.9	-0.7
	高香草酸	4.77	11.2	4.2	13.7
HQC	肌酐	1572.17	3.7	1620	-3.0
	香草扁桃酸	48.95	4.0	50.4	-2.9
	高香草酸	80.09	3.4	80.2	-0.1

2.4 正常人尿液样本和低浓度质控品色谱图



结论

建立了一种使用岛津质谱 LCMS-8045 测定人尿液中香草扁桃酸、高香草酸和肌酐的定量分析方法。利用蛋白沉淀的前处理方法，以内标法建立标准曲线，线性范围涵盖临床参考区间，分别考察了方法的线性、准确度和精密度性能。通过柱后补偿技术的应用既增强了酸性化合物在色谱柱上的保留也增强了化合物在负离子模式下的响应，保证了结果的稳定性和分析物的灵敏度。结果显示各分析物线性范围内标准曲线相关系数均大于 0.9999，质控品准确度偏差均在 -3.0%~13.7%，精密度 RSD 均 <11.2%，可满足临床日常检验需求。

岛津应用云

