

尿液中香草苦杏仁酸、高香草酸和 5-羟基吲哚乙酸的 LC/MS/MS 分析法

采用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱和 6460 三重四极杆液质联用系统检测稀释样品

应用简报

临床研究

作者

Linda Côté
加拿大敏捷伦科技公司
St-Laurent, Québec, Canada

摘要

本研究中开发出了一种用于尿液中香草苦杏仁酸 (VMA)、高香草酸 (HVA) 和 5-羟基吲哚乙酸 (5-HIAA) 定量分析的高灵敏度、高特异性 LC/MS/MS 方法。这一分析方法采用简单稀释作为样品前处理过程即可达到所需功能灵敏度, 同时还能够对相当宽动态范围内的分析物进行定量分析。所有化合物均表现出良好的重现性 ($CV < 6\%$), 此外所有校准曲线都具有绝佳的线性 ($R^2 > 0.9998$)。

前言

液相色谱/三重四极杆质谱仪 (LC/MS/MS) 非常适用于多种分析物的快速分析。本研究开发出了一种用于尿液中 VMA、HVA 和 5-HIAA (图 1) 同时测定的简单样品前处理稀释流程。将不同浓度的每种分析物加标至洁净尿液中制得校准物。色谱系统中包括五氟苯基 (PFP) 色谱柱以及甲醇与含 0.2% 甲酸的水组成的流动相。研究中对定量和定性 MRM 离子对进行监测, 并加入了每种分析物的氘代内标以确保定量分析的准确性与重现性。

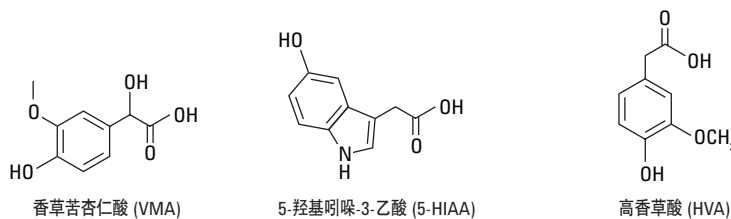


图 1. VMA、5-HIAA 和 HVA 的结构



Agilent Technologies

实验部分

液相色谱方法

液相色谱系统由 Agilent 1290 Infinity LC 二元泵、配备恒温箱的孔板进样器以及柱温箱组成。如果使用的液相色谱系统具有不同的延迟体积，则可能需要调节并验证梯度以使色谱分析结果具有可重现性。

质谱方法

Agilent MS/MS 系统由采用安捷伦喷射流技术的 Agilent 6460 三重四极杆 LC/MS 和 Agilent MassHunter 软件 B.06.00 组成。

化学品与试剂

校准物和内标均购自 Cerilliant (Round Rock, TX)。DC Mass Spect Gold 尿液 MSG5000 购自 Golden West Biologicals (Temecula, CA)。Lyphocheck 376 和 377 对照品购自 Bio-Rad 以及 Burdick & Jackson。LC/MS 级甲醇购自 VWR。质谱分析用甲酸购自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MO)。

样品前处理

通过将每种分析物加标至 DC Mass Spect Gold 尿液中制得标准校准物。通过连续稀释 DC Mass Spect Gold 尿液来获得其余标准校准物浓度。使用含内标的 0.2% 甲酸水溶液将校准物、对照品和尿样稀释十倍。样品应经过离心和/或过滤后再进样至 LC/MS/MS 系统中。

数据分析

Agilent MassHunter 定量分析软件 (B.06.00) 用于进行数据分析。在校准曲线的线性回归中采用 $1/x$ 作为加权因子。在 MassHunter 定量软件中，利用色谱峰面积与已知浓度内标的峰面积之比进行定量。

液相色谱方法参数

参数	值
色谱柱	Agilent Pursuit PFP 色谱柱, 2 × 150 mm, 3 μm (部件号 A3051150X020)
保护柱	Agilent Pursuit PFP MetaGuard 色谱柱, 200Å, 2 mm, 3 μm (3/包, 部件号 A3051MG2)
流动相	A) 0.2% 甲酸水溶液 B) 甲醇
柱温	40 °C
自动进样器温度	4 °C
进样量	20 μL
注射针清洗	1:1:1:1 甲醇:乙腈:异丙醇:水 + 0.1 % 甲酸 (冲洗进样口 10 s)
流速	0.3 mL/min
梯度	时间 (min) %B 0 15 0.5 15 2.5 60 3.0 95 6.0 95 6.1 15 9.0 15

质谱方法参数

参数	值
离子模式	AJS ESI-
干燥气温度	325 °C
干燥气 (氮气) 流速	10 L/min
雾化器气体 (氮气) 压力	50 psi
鞘气 (氮气) 温度	300 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	3500 V
喷嘴电压	1500 V
Q1/Q3 分辨率	0.7 unit
驻留时间	20 ms
Delta EMV	200 V

表 1. MS 离子对

化合物	母离子	子离子	裂解电压 (V)	CE (V)	CAV (V)
HVA*	181.1	137	70	4	2
HVA	181.1	122	70	16	2
HVA-D5	186.1	142.1	70	4	2
VMA*	197	137	100	24	2
VMA	197	138	100	10	2
VMA-D3	200.1	140	100	24	2
5-HIAA*	190.1	146.1	70	6	2
5-HIAA	190.1	144	70	24	2
5-HIAA-D5	195.1	151.1	70	8	2

* = 定量离子对

结果与讨论

采用安捷伦五氟苯基 (PFP) 色谱柱实现了所有分析物的色谱分离 (图 2)。对尿液中存在的 HVA 与 5-HIAA 干扰进行分离显得尤为重要。如果不根据保留时间进行适当分离, 这些化合物将相互干扰, 导致不准确的定量结果。

为研究基质效应, 将 10 种不同浓度的所有分析物加标至含 0.2% 甲酸的水中。另一组样品将分析物加入空白尿液中, 制备方法与上述相同。研究中利用内标溶液对所有混合物进行稀释后对其进行分析。随后根据计算得知, 两种溶液中每种分析物的峰面积比均介于 91% - 93% 之间 (表 2)。而使用内标峰面积比校正计算浓度时, 则得到了出色校正结果, 结果介于 93% - 115% 之间 (表 2)。这一结果确认了内标对偏差进行了校正。

分别于连续三天以及一天中三次制备校准标样和 Bio-Rad Lyphocheck 对照品, 以便确定日内和日间的精密度和准确度。三种分析物的日内和日间准确度均在 10% 内, 且线性范围内所有浓度的变异系数均小于 6% (表 3 和表 4)。该分析方法在浓度为 0.078 - 100 mg/L 的测定范围内具有出色的线性, R^2 值均大于 0.9998 (图 3)。

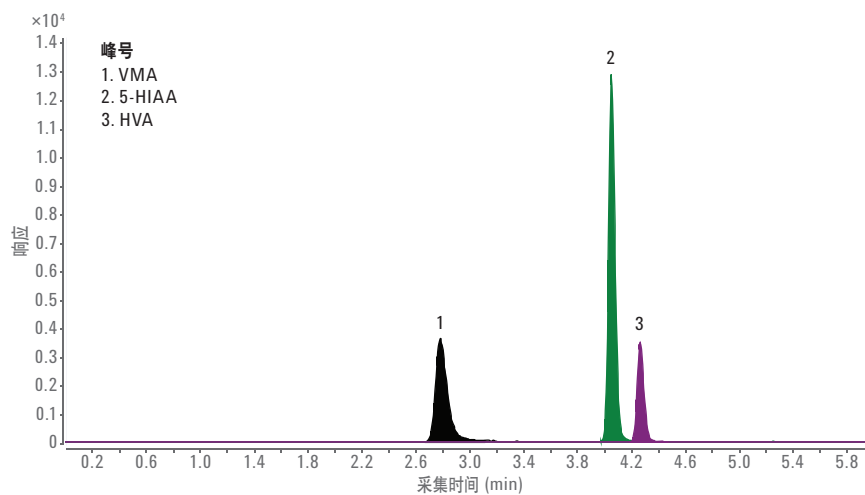


图 2. VMA、5-HIAA 和 HVA 的色谱图

表 2. 0.078 - 100 mg/L 范围内 10 种不同浓度的基质效应测定结果

化合物	基质效应 %*(n = 10)		经内标校正的准确度 %**(n = 10)		
	平均值	SD	范围	平均值	SD
VMA	91.5	6.4	95.6 - 108.3	100.0	3.9
5-HIAA	93.2	3.3	94.6 - 115.2	100.0	5.8
HVA	91.3	1.5	92.9 - 103.9	100.0	3.1

* 加标尿样的峰面积与加标 0.2% 甲酸水溶液的峰面积之比。

** 内标校正加标尿样的浓度计算结果与理论浓度之比。

表 3. VMA、5-HIAA 和 HVA 的分析性能汇总

化合物	R^2	浓度 (mg/L)		准确度 (%) n = 3	日内 CV (%) n = 3	日间 CV (%) n = 5
		浓度 (mg/L)	浓度 (μ M/L)			
VMA	0.9999	0.078	0.39	106.8	3.9	3.9
		12.5	63.1	100.1	1.3	1.7
		100	504.6	100.5	0.6	0.5
5-HIAA	0.9998	0.078	0.41	109.7	3.4	3.4
		12.5	65.4	99.1	2.2	1.7
		100	523.1	100.8	0.1	0.1
HVA	0.9999	0.078	0.43	102.2	4.2	3.2
		12.5	68.6	99.9	1.7	1.3
		100	548.9	100.5	0.4	0.3

表 4. 由 LC/MS/MS 获得的 Bio-Rad QC 分析结果 (利用 HPLC 由 Bio-Rad 确定检测范围) 所有测定结果单位均为 mg/L (n = 5, 3 天内)

化合物	范围 (HPLC)	浓度 1		浓度 2		
		测定值	CV (%)	范围 (HPLC)	测定值	CV (%)
VMA	2.1-3.1	2.5	2.3	11.2-16.8	14.6	2.4
5-HIAA	2.2-3.4	2.8	2.0	20.8-31.2	27.6	2.8
HVA	1.0-1.4	1.3	5.8	13.0-19.6	15.8	3.9

结论

本研究开发了一种用于定量尿液中香草苦杏仁酸 (VMA)、高香草酸 (HVA) 和 5-羟基吲哚乙酸 (5-HIAA) 的分析方法。该方法通过简单的稀释步骤实现了全部三种分析物的同时测定, 具有出色的回收率、重现性和准确性。

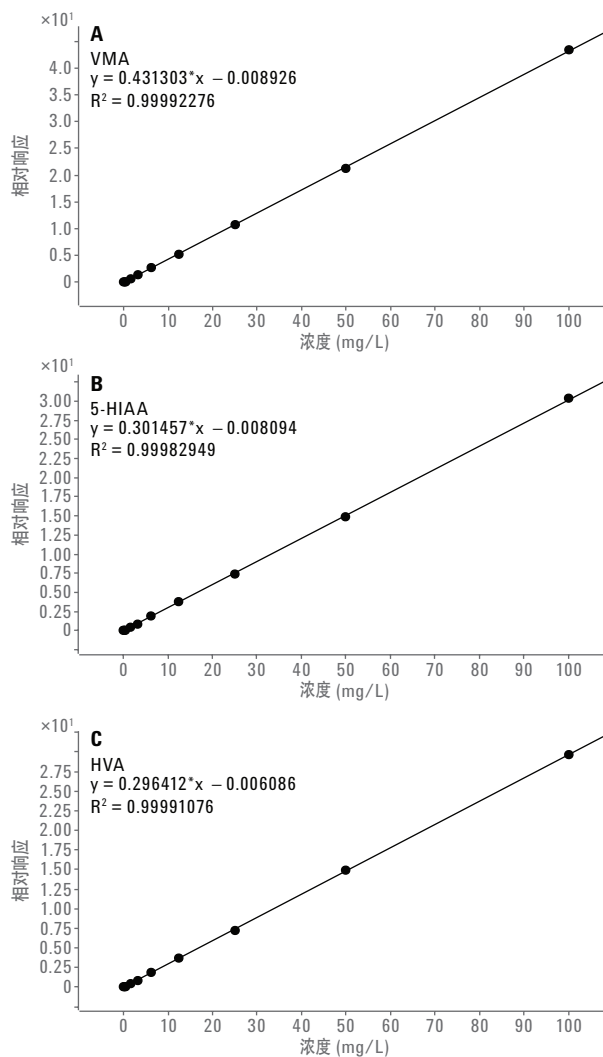


图 3. (A) VMA、(B) 5-HIAA 和 (C) HVA 的校准曲线

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2015

2015 年 9 月 28 日, 中国出版

5991-6053CHCN



Agilent Technologies