论著·临床研究

高效液相色谱-串联质谱法检测人血浆中 5-羟色胺

张　杰[1]，郭海洋[1]，曹海微[1]，姜　义[2△]
（1. 吉林大学第一医院，吉林长春 130021；2. 吉林大学第二医院，吉林长春 130021）

摘　要：目的　建立高效、准确的高效液相色谱-串联质谱法（HPLC-MS/MS）测定人血浆中 5-羟色胺（5-HT）的方法，并应用于临床及科研的生物样本检测。**方法**　该方法采用奥卡西平作为内标，血浆样品经乙腈沉淀蛋白，用初始流动相稀释后经 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8 色谱柱进行分离，流动相为 0.2%甲酸水-乙腈，梯度洗脱。采用电喷雾离子源（ESI），正离子、多反应监测模式（MRM）进行监测，用于定量分析的离子为质荷比（m/z）177→160。**结果**　5-HT 在 10～800 ng/mL 范围内线性良好（r>0.999），定量下限为 10.0 ng/mL。待测物日内、日间相对标准偏差均小于 15%。符合生物样品分析要求。**结论**　本方法适合临床及科研的生物样本中 5-HT 的快速检测。

关键词：5-羟色胺；　血浆；　高效液相色谱；　质谱
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2018.22.005　　**中图法分类号：**R457.1＋4
文章编号：1673-4130(2018)22-2737-04　　**文献标识码：**A

Determination of 5-hydroxytryptamine in human plasma with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHANG Jie[1], *GUO Haiyang*[1], *CAO Haiwei*[1], *JIANG Yi*[2△]
(1. *Jilin University First Hospital*, *Changchun*, *Jilin* 130021, *China*;
2. *Jilin University Second Hospital*, *Changchun*, *Jilin* 130021, *China*)

Abstract: Objective　To establish an efficient and accurate high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for the determination of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in human plasma, and to apply it to the detection of biological samples in clinical and scientific research. **Methods**　Okasepin was used as the internal standard, the plasma samples were precipitated protein with acetonitrile, and then separated by Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8 chromatographic column. The mobile phase was 0.2% acetonitrile and gradient elution was used as elution condition. Electrospray ion source (ESI), positive ions and multi-reaction monitoring mode (MRM) were used for monitoring, and the ions used for quantitative analysis were m/z 177→160. **Results**　5-HT was well linear in the range of 10－1 000 ng/mL (r>0.999), and the lower limit of quantitation was 10.0 ng/mL, both relative standard deviation of intra-day and inter-day were less than 15%, which meet the requirements of biological sample analysis. **Conclusion**　This method may apply to large samples and rapid analysis.

Key words: 5-hydroxytryptamine;　plasma;　HPLC;　mass spectrometry

5-羟色胺（5-HT）亦称血清素，是色氨酸衍生出的一种生物胺，被血脑屏障分隔为中枢血清素和外周血清素[1-2]，人体内 90 %的 5-HT 存在于消化道黏膜，8%～10%存于血小板，1%～2%存在于中枢系统中，另有一部分存在于各组织的肥大细胞中[3-4]。由于其广泛的存在而参与多种病理和生理学过程，其含量测定对多种疾病的诊断及治疗具有重要意义[5-8]。

目前 5-HT 的检测方法繁多，包括酶联免疫法[9]、免疫荧光法[10]、高效液相色谱法[11]、高效液相色谱-电化学法[12]、高效液相色谱-荧光法[13]、高效液相色谱-程序波长紫外检测法[14]、超高效液相色谱-串联质谱法（HPLC-MS/MS）[15]等。本文建立了一种快速、准确的 HPLC-MS/MS 直接测定血浆中 5-HT，前处理简单，分析时间短，分析方法稳定，检测限低，适合临床及科研快速检测的需求。

1　材料与方法

1.1　仪器与试剂

1.1.1　仪器　AB 5500 QTRAP 型三重四极杆质谱仪，配有电喷雾离子源（ESI）和 Analyst1.5 数据处理软件（美国 AB 公司），LC-20A 型高效液相色谱议（日本岛津公司），Vortex-Genius 2 型涡旋混匀器（美国 Scientific Industries 公司），PICO 17 型离心机（美国

作者简介：张杰，女，主管药师，主要从事体内药物分析方面的研究。　△　**通信作者**，E-mail：jiangyi1025@yahoo.com。
本文引用格式：张杰，郭海洋，曹海微，等. 高效液相色谱-串联质谱法检测人血浆中 5-羟色胺[J]. 国际检验医学杂志，2018，39(22)：2737-2740.

Thermo 公司);KQ-1000KDB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),MilliQ Direct-Q16 超纯水仪(美国 MilliQ 公司),DENVER TB215D 分析天平(美国丹佛公司)。

1.1.2 试剂　5-HT(中国药品生物制品鉴定所,批号:100657-200401),奥卡西平(中国药品生物制品鉴定所,批号:111656-200401),病毒灭活冰冻血浆(吉林省血液中心),甲酸(国药集团化学试剂有限公司,批号 20170419),乙腈(美国 Sigma 公司,批号 WXBC5441V),实验用水为 Milli Q 超纯水。

1.2 色谱条件　色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8(4.6 mm×150 mm,5 μm);柱温:40 ℃;进样量:10.0 μL;流动相:A 为 0.2%甲酸水溶液,B 为乙腈,流动相梯度组成和流速如表 1 所示。

表 1　流动相梯度组成和流速

时间(min)	流速(mL/min)	A(0.2%甲酸水)	B(乙腈)
0.1	1.0	90	10
1.5	1.0	90	10
2.1	1.0	5.0	95
4.0	1.0	5.0	95
4.1	1.0	90	10
8.0	1.0	90	10

1.3 质谱条件　质谱分析采用电喷雾离子源(ESI);使用气体均为高纯氮气,纯度≥99.99%;扫描方式为正离子扫描;检测方式为多反应监测(MRM);电喷雾电压(IS):5 500 V;离子源温度(TEM):500 ℃;雾化气压力(Gas1):345 kPa;辅助气压力(Gas2):345 kPa;气帘气(CUR):207 kPa;碰撞气强度:中等;入口电压(EP):10 V;碰撞池出口电压(CXP):13.0 V;MRM 监测离子对、去簇电压(DP)及碰撞能量(CE)见表 2。

表 2　5-HT 和奥卡西平的质谱参数注

化合物	母离子 m/z	子离子 m/z	DP(V)	CE(eV)
5-HT	177	160	80	20
奥卡西平	253	208	70	26

1.4 标准溶液的制备　精密称取 5-HT 及奥卡西平对照品 10 mg 于 10 mL 容量瓶中,加乙腈-水(1/1,v/v)溶解并稀释至刻度,摇匀定容,配置成 1 mg/mL 的 5-HT 和奥卡西平储备液。分别取适量 1 mg/mL 的 5-HT 和奥卡西平储备液用乙腈-水(1/1,v/v)稀释成浓度分别为 10 μg/mL 和 100 ng/mL 的工作液。分别取适量的工作液,用空白血浆稀释至标准曲线所需的浓度,配制成相当于 5-HT 血浆浓度分别为 10.0、20.0、50.0、100.0、200.0、500.0、800.0 ng/mL 的标准系列溶液;分别取适量工作液,用空白血浆稀释至质控样本所需的浓度,配制成相当于 5-HT 血浆浓度分别为 20.0、100.0、500.0 ng/mL 的低、中、高质控溶液。

1.5 血浆样本的处理　取若干 1.5 mL EP 管,编号后精密吸取 30 μL 待测血浆样本,加入 30 μL 100 ng/mL 奥卡西平工溶液,加入 1 mL 乙腈,涡旋混合 1 min,室温放置 10 min,以 13 300 r/min 转速离心 5 min;取 100 μL 上清液于另一干净编号的 EP 管中,加入 400 μL 0.2%甲酸水-乙腈(10/90,v/v),涡混 30 s,吸取 10 μL 进行 HPLC-MS/MS 分析。

1.6 基质效应　取 30 μL 空白血浆,除不加内标外,按"1.5 血浆样本的处理"项下操作,取全部上清液,加入低、中、高浓度质控血浆溶液(5-HT 的质量浓度分别为 20.0、100.0、500.0 ng/mL)和内标溶液,按"1.5 血浆样本的处理"项下操作,每一浓度进行 6 个样本分析,获得相应的平均峰面积(A)。同时另取 30 μL 水代替空白血浆,同样方法操作,获得相应的平均峰面积(B),以 2 种处理方法的平均峰面积比值计算待测物的基质效应,计算公式为 $B/A\times100\%$。每一浓度基质效应相对标准偏差(RSD)≤15%,可忽略基质效应影响。

1.7 提取回收率　采用人空白血浆配制低、中、高 3 种浓度(5-HT 加入浓度分别为 20.0、100.0、500.0 ng/mL)的样品,按"1.5 血浆样本的处理"项下操作,每一浓度进行 6 个样本分析。同时另取人空白血浆 30 μL,除不加内标溶液外,按"1.5 血浆样本的处理"项下操作,取全部上清液加入相应浓度对照溶液(5-HT 加入浓度分别为 20、100、500 ng/mL)和内标溶液,按"1.5"项下操作,每一浓度进行 6 个样本分析,以每一浓度 2 种处理方法的峰面积比值计算提取回收率。

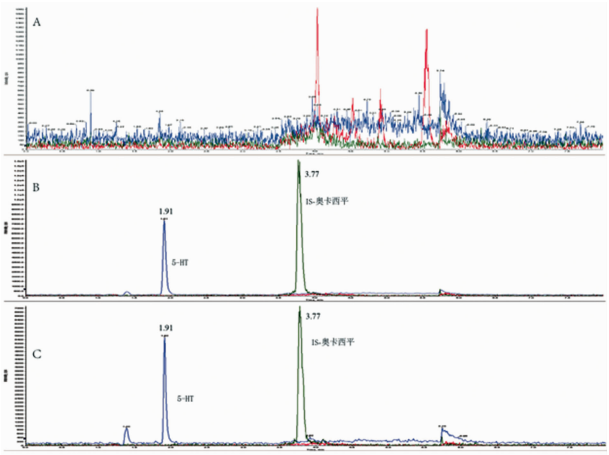
1.8 精密度和准确度　按"1.4 标准溶液的制备"项下的方法配制低、中、高 3 个浓度的质控(QC)样品(5-HT 的血浆浓度分别为 20.0、100.0、500.0 ng/mL),按"1.5 血浆样本的处理"项下操作,每一浓度进行 6 个样本分析,分别在 3 d 内测试,根据当日标准曲线计算 QC 样品的测得浓度,根据 QC 样品结果计算本法的日内、日间精密度与准确度。

1.9 稳定性　本研究考察了 5-HT 血浆样本室温放置 3 h、经处理后室温放置 24 h、5-HT 血浆样品经历 3 次冷冻-解冻循环,以及−80 ℃冷冻放置 50 d 的稳定性。按"1.4 标准溶液的制备"项下的方法配制低、高 2 个浓度的样品(5-HT 的血浆浓度分别为 20.0、500.0 ng/mL),按"1.5 血浆样本的处理"项下操作,每一浓度进行 3 个样本分析。

2　结　　果

2.1 方法的特异性　5-HT 和奥卡西平在正离子模式下,主要生成 m/z 177 和 m/z 253 的$[M+H]^+$峰。选择性对$[M+H]^+$峰进行二级质谱扫描分析,最终要选择噪音干扰小,丰度比相对较高产物离子,因此

5-HT 和奥卡西平的产物离子分别为 m/z 160 和 m/z 208。在此离子对的基础上，分别得到空白血浆、空白血浆添加标准溶液以及人的血浆样本的色谱图，见图 1。5-HT 及奥卡西平的保留时间分别为 1.91、3.77 min，峰形良好，无内源性物质干扰。



注：A 为空白血样；B 为空白血浆加 5-H 对照品(100 ng/mL)和内标(100 ng/mL)；C 为人血浆样品

图 1　人血浆中 5-HT 及奥卡西平的典型色谱图

2.2　标准曲线及定量下限　得到 10.0、20.0、50.0、100.0、200.0、500.0、800.0 ng/mL 的系列浓度血浆溶液的 5-HT 及内标的峰面积，以血浆中 5-HT 的浓度为横坐标(X)，待测物质峰与内标峰面积比值为纵坐标(Y)，用加权($w=1/x^2$)最小二乘法进行回归运算，得到回归方程和标准曲线的相关系数为：$Y=0.004\ 13X+0.005\ 27$，$r=0.999\ 6$。结果表明血浆中 5-HT 浓度在 10.0～800.0 ng/mL 范围内，线性关系良好，定量下限为 10.0 ng/mL，检测的精确度高。

2.3　基质效应　5-HT 在低、中、高 3 个浓度的基质效应分别为 96.5%、99.0%和 102.0%，相对标准差分别为 4.8%、3.5%和 1.9%。内标奥卡西平的基质效应为 93.7%，相对标准差为 6.4%。结果表明，待测物及其内标在本实验选择的色谱和质谱条件下，可忽略基质效应的影响。

2.4　回收率　采用沉淀蛋白法处理血浆样品，5-HT 在低、中、高 3 个浓度的回收率分别为 89.5%、97.3%和 101.2%。提取回收率均大于 85%，具有较好的提取回收率。

2.5　准确度与精密度　根据 QC 样品计算本实验的准确度和精密度，结果表明，待测物 QC 样品测试结果均符合生物样品测定有关要求，具体数据见表 3。每一浓度水平的 QC 样品的日内 RSD 小于 3.6%，日间 RSD 小于 2.5%，相对误差(RE)在 0.5～8.0%。

2.6　稳定性　高、低 2 个浓度的样本在室温放置 3 h、处理后室温放置 24 h、3 次解冻循环，以及－80 ℃冰箱储存的 50 d 的长期放置等条件下的稳定性测定结果表明，5-HT 血浆样品在上述条件下均稳定，具体数据见表 4。

表 3　不同血浆浓度 5-HT 的准确度和精密度

项目	20 μg/mL	100 μg/mL	500 μg/mL
平均值(μg/mL)	20.1	108.0	510.0
SD	2.3	7.0	28.4
RE(%)	0.5	8.0	2.0
日内 *RSD*(%)	3.6	3.6	4.2
日间 *RSD*(%)	10.3	2.5	5.2

表 4　血浆中 5-HT 在不同存储条件下的稳定性($n=3$)

5-HT 血浆浓度(ng/mL)	室温放置 3 h		处理放置 24 h		3 次冷冻循环		－80 ℃放置 50 d	
	20.0	500.0	20.0	500.0	20.0	500.0	20.0	500.0
平均值(μg/mL)	19.4	489.7	20.6	490.1	20.2	510.3	20.1	492.2
SD	2.4	29.1	3.0	27.4	1.9	28.1	2.8	30.3
RE(%)	－3.0	－2.1	3.0	－2.0	1.0	2.1	0.5	－1.6
RSD(%)	3.9	2.1	6.7	4.4	2.5	6.9	7.4	3.6

3　讨　论

检测 5-HT 的需求很多，样品种类包括血液(血浆、血小板)、脑组织、胃肠道组织、肾上腺组织等，开发出的检测方法也很多，但这些方法大多需要衍生化或浓缩样本，需要进行复杂的前处理和较长的分析时间，本实验采用沉淀蛋白前处理方式，避免了液液萃取和柱前衍生化的复杂步骤，分析时间短，适合临床大样本的快速检测需求。

笔者对色谱条件进行了优化，5-HT 是高极性分子，尝试使用 Waters 公司的 Hilic 亲水性色谱柱进行分析，但与谢天发等[16]研究结果不同的是，在此色谱柱上不能获得良好的峰形用于定量，因此本实验转而采用传统的 C8 色谱柱，优化梯度洗脱，避开了柱前沿的出峰时间而获得良好的保留及优异的峰形用于准确定量。在流动相的选择上，可应用离子对试剂来调整 5-HT 的保留时间，但离子对试剂容易带来色谱柱平衡缓慢、峰形较差、流动相配置繁琐等弊端，而且离子对试剂抑制质谱的负离子响应信号而影响仪器的后续检测。笔者通过优化梯度洗脱获得了良好的峰形。采用 0.2%甲酸水作为水相，较0.1%的甲酸水更

能改善峰形。当沉淀蛋白后直接进样时，标准曲线相关系数低于 0.99，怀疑为待分析物与内标的基质效应不同造成，故使用初始流动相稀释处理后的样本，以降低基质效应的影响，当稀释倍数为 5 倍时可达到合适的信噪比，并且标准曲线相关系数良好。

本方法根据生物样本分析的要求进行了周密的验证，结果显示本方法灵敏，准确，可进行可靠的高敏感性和高选择性的分析。

4　结　　论

本实验利用高效液相色谱-三重四极杆质谱联用技术的优势，对检测的 5-HT 的质谱参数进行了优化，建立了一种简单、高效、准确的直接检测 5-HT 的方法，经方法学验证可以满足生物样本定量检测的要求，适用于临床及科研样本的快速检测。

参考文献

[1] GAMOH S, HISA H, YAMAMOTO R. 5-hydroxytryptamine receptors as targets for drug therapies of vascular-related diseases[J]. Biol Pharm Bull, 2013, 36(9): 1410-1415.

[2] HERR N, BODE C, DUERSCHMIED D. The effects of serotonin in immune cells[J]. Front Cardiovasc Med, 2017, 4(20): 48.

[3] WALTHER D J, BADER M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform[J]. Biochem Pharm, 2003, 66(9): 1673-1680.

[4] KURANO M, DOHI T, NOJIRI T, et al. Blood levels of serotonin are specifically correlated with plasma lysophosphatidylserine among the glycero-lysophospholipids[J]. BBA Clin, 2015, 4(C): 92-98.

[5] GRAEFF F G. Translational approach to the pathophysiology of panic disorder: Focus on serotonin and endogenous opioids[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2017, 76(Pt A): 48-55.

[6] FITZGERALD P J. A neurotransmitter system theory of sexual orientation[J]. J Sex Med, 2008, 5(3): 746-748.

[7] OPERE C A, FORD K, ZHAO MIN, et al. Regulation of neurotransmitter release from ocular tissues by isoprostanes[J]. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2008, 30(9): 697-701.

[8] LENG G, LUDWIG M. Neurotransmitters and peptides: whispered secrets and public announcements[J]. J Physiol, 2008, 586(Pt 23): 5625-5632.

[9] 袁学刚，王战国，邹亮，等. 连栀矾溶液促进大鼠肛周脓肿创面愈合作用研究[J]. 成都中医药大学学报，2016，58(1)：39-43.

[10] 杨春敏，周吕，张航，等. 5-羟色胺和胃动素在狗小肠移行性复合运动调控中的作用[J]. 生理学报，1998，50(4)：431-438.

[11] 刘向宇，曲海强，李想. 应用高效液相色谱法(HPLC)测定母猪血清多巴胺和五羟色胺的含量[J]. 黑龙江畜牧兽医，2016，48(3)：251-254.

[12] 曹阳，程巧鸳，卢红阳，等. 高效液相色谱电化学法分析伊立替康对大鼠脑内组胺、5-羟色胺的影响[J]. 海峡药学，2013，25(1)：31-33.

[13] 金鸣，高子淳，王继峰. 羟基红花黄色素 A 抑制 PAF 诱发的家兔血小板活化的研究[J]. 北京中医药大学学报，2004，27(5)：32-35.

[14] 甄乾娜，黄小兰，张晓清，等. 高效液相色谱-程序波长紫外检测法同时测定血浆中的色氨酸及其代谢物[J]. 色谱，2011，29(5)：435-438.

[15] 王泽民，王玉文，伊晶，等. 高效液相色谱-串联质谱联用法测定人血清中去甲肾上腺素、多巴胺和 5-羟色胺含量[J]. 中国卫生检验杂志，2015，25(17)：2863-2865.

[16] 谢天发，刘长安，刘健. HPLC-MS/MS 检测小鼠脑部组胺和 5-羟色胺[J]. 合肥工业大学学报，2018，41(1)：124-128.

(收稿日期：2018-06-12　修回日期：2018-08-18)

(上接第 2736 页)

a sensitive and selective chiral LC-MS/MS assay[J]. Biomed Chromatogr, 2017, 31(12): e4027.

[11] STOCKIS A, GENGLER C, GOETHALS F, et al. Single oral dose pharmacokinetic interaction study of manidipine and delapril in healthy volunteers[J]. Arzneimittelforschung, 2003, 53(9): 627-634.

[12] DEROUBAIX X, LINS R L, LENS S, et al. Single dose pharmacokinetics of manidipine in hepatic impaired patients and healthy controls[J]. Int J Clin Pharmacol Ther, 1998, 36(7): 386-391.

[13] RAGNO G, AIELLO F, GAROFALO A, et al. Multivariate least squares regression applied to the spectrophotometric analysis of manidipine and its main photoproduct [J]. Farmaco, 2003, 58(9): 909-915.

[14] MIYABAYASHI T, YAMASHITA K, AOKI I, et al. Determination of manidipine and its pyridine metabolite in human serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and column switching[J]. J Chromatogr, 1989, 494: 209-217.

[15] OHKUBO T, UNO T, SUGAWARA K. Liquid chromatographic determination of manidipine in serum with electrochemical detection[J]. J Chromatogr B Biomed Appl, 1996, 687(2): 413-418.

(收稿日期：2018-05-22　修回日期：2018-07-26)