

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.15.008

超高效液相色谱 - 质谱联用法测定人尿液中 5- 羟吲哚乙酸浓度 方法学验证

李熙拓^{1,2} 陈孝各² 邢 求² 王 彦¹ 闫 超^{1Δ}

(1 上海交通大学药学院 上海 200240; 2 科文斯医药研发(上海)有限公司 上海 201318)

摘要 目的:采用超高效液相色谱 - 质谱联用法(UPLC-MS/MS)建立人尿液中 5- 羟吲哚乙酸(5-HIAA)的检测方法。**方法:**采用人工尿液 UR-N-CONTROL LEVEL 2 NP 配制标准曲线,质控样品采用人工尿液和天然尿液配制而成,以 5-HIAA 的同位素氘标记物 5-HIAA-d5 为内标,尿液样品采用乙腈进行稀释处理后,采用 UPLC-MS/MS 检测。色谱柱为 Waters HSS T3 (100× 2.1 mm, 1.8 μm),流动相 A 为含 0.02 %乙酸的 2 mM 醋酸铵水溶液,B 相为:含 0.02 %乙酸的乙腈溶液,在 2.5 min 内使用 5 %的 B 相至 100 %的 B 相进行梯度洗脱,流速为 0.5 mL/min,进样量 3.0 μL,柱温 50 °C;采用电喷雾负离子模式电离,5-HIAA 和 5-HIAA-d5 内标的监测离子分别为 m/z 190.1→146.2 和 m/z 195.1→151.0。**结果:**该方法测定的 5-HIAA 在 0.0500 至 50.0 μg/mL 范围内线性良好, $r \geq 0.9948$,最低定量限(LLOQ)为 0.0500 μg/mL。5-HIAA 批内、批间准确度在 89.3 %~99.8 %之间,精密度(CV)≤ 8.4 %。平均回收率为 100.3 %~102.3 %。**结论:**该方法专属性强、灵敏度高,快速。人工尿液和天然尿液在定量分析时无差异,适合于人尿液中 5-HIAA 的浓度测定。

关键词:超高效液相色谱;三重四级杆质谱;5- 羟吲哚乙酸;人工尿液

中图分类号 O657.7;R917 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2018)15-2841-06

Method Validation for Determination of 5-Hydroxyindoleacetic Acid in Human Urine with Ultra-performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

LI Xi-tuo^{1,2}, CHEN Xiao-ge², XING Qiu², WANG Yan¹, YAN Chao^{1Δ}

(1 School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200240, China;

2 Covance Pharmaceutical R&D (Shanghai) Co., Ltd, Shanghai, 201318, China)

ABSTRACT Objective: An efficient analytical method for the quantitative determination of 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) in human urine by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) - tandem mass spectrometry (MS/MS) was developed. **Methods:** The artificial human urine UR-N-CONTROL LEVEL 2 NP was used for calibration curve preparation, artificial urine and natural urine were used for quality control samples preparation. 5-Hydroxyindoleacetic acid-d5 (5-HIAA-d5) was used as internal standard, urine samples were diluted with acetonitrile. The supernatants were detected by UPLC-MS/MS. Separation was carried out on a Waters HSS T3 analytical column (100× 2.1 mm, 1.8 μm). Mobile phase consisting A: 2 mM ammonium acetate (containing 0.02 % acetic acid) and B: acetonitrile (containing 0.02 % acetic acid). Gradient elution using the proportion of mobile phase B ranged from 5 % to 100 % in 2.5 min at a flow rate of 0.5 mL/min. The column temperature was 50 °C and the injection volume was 3.0 μL. The electrospray source and negative ion scan were used. 5-HIAA and the internal standard (5-HIAA-d5) were monitored at m/z 190.1 146.2 and m/z 195.1 151.0, respectively. **Results:** The linear calibration curve was observed in the concentration range from 0.0500 to 50.0 μg/mL, with the $r \geq 0.9948$. The lower limit of quantification was 0.0500 μg/mL. The accuracy (intra-assay and inter-assay) for 5-HIAA was between 89.3 % and 99.8 %, with the precision (CV) ≤ 8.4 %. The mean recoveries ranged from 100.3 % to 102.3 %. **Conclusions:** The method is proved to be highly selective, sensitive and rapid. Artificial urine and natural urine are no differences in quantitative analysis. They are suitable for determination of 5-HIAA in human urine.

Key word: Words performance liquid chromatography (HPLC); Triple quadrupole mass spectrometry; 5-Hydroxyindoleacetic acid; Artificial urine

Chinese Library Classification(CLC): O657.7; R917 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)15-2841-06

前言

5- 羟基吲哚乙酸 (5-HIAA) 是单胺类中枢神经递质的一

作者简介:李熙拓(1983-),学士,主要研究方向:药物分析,E-mail: lixituo@163.com

Δ 通讯作者:闫超,博士生导师,教授,主要研究方向:电动分析技术,代谢组学,E-mail: chaoyan@sjtu.edu.cn

(收稿日期:2017-12-27 接受日期:2018-01-23)

种,是 5-羟色胺(5-HT)生成的无活性的酸性代谢终产物,是脑内 5-HT 的主要代谢途径。5-HT 经 A 型单胺氧化酶(MAO)作用生成 5-羟吲哚乙醛,后者在醛脱氢酶的催化下生成 5-HIAA,从尿液中排出。5-HIAA 是人体内重要的神经递质代谢产物,增高或降低都会间接反映体内某些病理改变,如无先兆偏头疼、消化系统粘膜损伤、婴儿脑积水和妊娠高血压等^[1]。Page 等^[2]发现并证实转移性类癌患者尿液中 5-HIAA 的水平明显升高。检测 24 小时尿液中 5-HIAA 的含量可用于类癌综合征病情的监测及治疗疗效的评估。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。因此,快速有效地检测人尿液中的 5-HIAA 的含量对类癌综合征病情的评价有着重要的意义。

由于 5-HIAA 为生物体内源性物质,为了排除空白尿液本底对测定的干扰,本实验采用人工尿液 UR-N-CONTROL LEVEL 2 NP 进行标准曲线的配制。筛选天然基质中 5-HIAA 的浓度,并用天然尿液和人工尿液共同配制成质控样品以确认替代基质法的可行性。本实验建立了测定人尿液中 5-HIAA 的超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS/MS)的分析方法,并对此方法进行了确证。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

API5000 型三重四级杆串联质谱仪,配有电喷雾离子源以及 Analyst 1.6.2 数据处理软件(美国 Applied Biosystem 公司);Waters Acquity 超高效液相色谱系统(UPLC);梅特勒-托利多 MX5 分析天平。

5-羟吲哚乙酸标准品(纯度 98.0%)和内标 5-羟吲哚乙酸-d5(纯度 98.0%)均由 Toronto Research Chemicals Inc.(TRC)提供;人工尿液 UR-N-CONTROL LEVEL 2 NP 由 Sciteck 公司提供;实验用水为 Millipore 水处理系统产生的超纯水;实验中所使用的乙酸、乙腈和醋酸铵均为 HPLC 级或化

学纯级。

1.2 液相和质谱条件

色谱条件:Waters HSS T3 色谱柱(100× 2.1 mm, 1.8 μm);流动相 A 相为:含 0.02%乙酸的 2 mM 醋酸铵水溶液,B 相为:含 0.02%乙酸的乙腈溶液,梯度洗脱:0-2.5 min,5%B-100%B;流速:0.5 mL/min;柱温:50℃;进样量:3.0 μL。5-HIAA 和 5-HIAA-d5 的保留时间为 1.68 min。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI);离子喷射电压:-4500 V;温度 500℃;喷雾气(N₂)压力 55 psi;辅助气(N₂)压力 60 psi;帘气(N₂)压力:30 psi;负离子方式检测;扫描方式为多重反应检测(MRM);用于定量分析的离子反应分别为 m/z 190.1→146.2(5-HIAA)和 m/z 195.1→151.0(5-HIAA-d5)。

1.3 标准曲线和质量控制样品的配制

准确称量 10 mg 的 5-HIAA 标准品,按照纯度进行校正。溶解于 5 mL 的乙腈水溶液中得到浓度为 2000 μg/mL 的标准储备液,储存于 -20℃ 备用。

准确称量 1 mg 的 5-HIAA-d5 标准品,按照纯度进行校正。溶解于 10 mL 的乙腈水溶液中得到浓度为 100 μg/mL 的内标标准储备液,储存于 -20℃ 备用。

使用标准储备液经乙腈水稀释后配制浓度为 1.00、2.00、6.00、20.0、60.0 和 200 μg/mL 的标准曲线中间工作液和浓度为 1.00、3.00 和 30.0 μg/mL 的质控样品中间工作液。

使用人工尿液和标准曲线中间工作液(或标准储备液)配制浓度为:0.0500、0.100、0.300、1.00、3.00、10.0、45.0 和 50.0 μg/mL 的标准曲线。并用人工尿液和质控样品中间工作液(或标准储备液)配制浓度为 0.150、2.50 和 40.0 μg/mL 的人工尿液质控样品,用于天然空白尿液基质的筛选分析测试。从筛选出来的天然尿液空白基质中选取本底浓度适当的空白基质,在方法学验证分析中直接用做中浓度质控样品(MQC),筛选结果见表 1。

表 1 天然人空白尿液本底浓度测定筛选结果(n=6)

Table 1 The screening results for nature blank human urine concentration determination (n=6)

Lot Number	1	2	3	4	5	6
Mean Concentration (μg/mL)	0.754	2.24	1.09	5.42	2.12	1.38
SD	0.0196	0.0527	0.0763	0.143	0.0652	0.0207
RSD (%)	2.6	2.4	7.0	2.6	3.1	1.5

Note: Lot 2 blank urine sample was used as the MQC sample, concentration is 2.24 μg/mL.

在方法学验证时,使用 MQC 加样配制浓度为 40.0 μg/mL 的高浓度质控样品(HQC),用人工尿液稀释 MQC 样品配制浓度为 0.150 μg/mL 的低浓度质控样品(LQC),并且用人工尿液和质控样品中间工作液配制浓度为 0.0500 μg/mL 的最低定量限质控样品(LLOQ QC)。

1.4 样品处理

取 50.0 μL 的标准曲线和质控样品,加入 50.0 μL 的内标工作液(2.0 μg/mL)和 150 μL 的乙腈,涡旋混合 5 min,于 4000 rpm 转速离心 5 min。移取 50.0 μL 上清液加入 350 μL 超纯水,涡旋混合 1 分钟后进样分析。

1.5 统计学分析方法

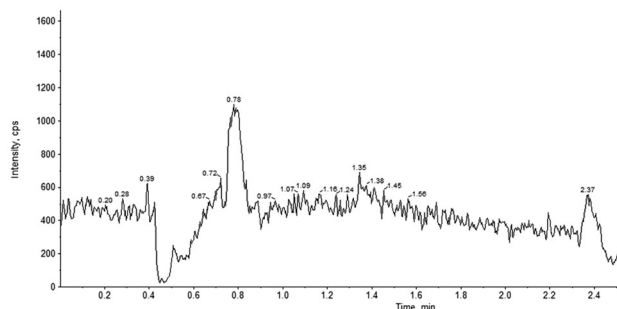
本文所有色谱图均由 Analyst® 软件 1.6.2 版本采集积分产生。标准曲线由 Watson LIMSTM 软件 7.4.1 版本采用加权(1/x²)最小二乘法线性回归得到。对检测到的标准曲线和 QC 样品的浓度进行描述性统计计算。准确度和偏差可交换使用,准确度要求在 85.0%至 115.0%(LLOQ 在 80.0%至 120.0%)之间,偏差可表示为在± 15.0%(LLOQ 为± 20.0%)范围内。浓度数据和 SD 值汇报 3 位有效数字,准确度和精密度均汇报 1 位小数。本文依照 FDA 生物分析方法验证指导原则^[3]以及 2015 版中国药典^[4]进行方法学验证。

2 方法学验证及结果

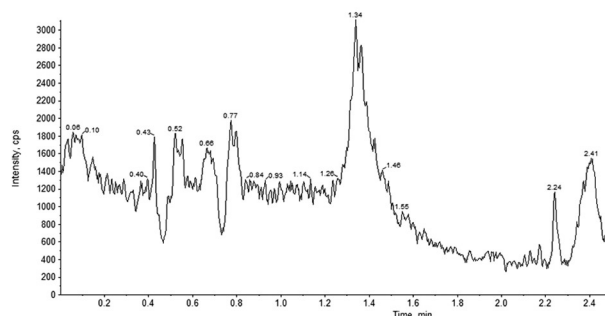
2.1 选择性和个体基质评价

为了评价潜在的影响分析物或内标的干扰情况,本试验对空白人工尿液样品、仅含内标的空白人工尿液样品和仅含

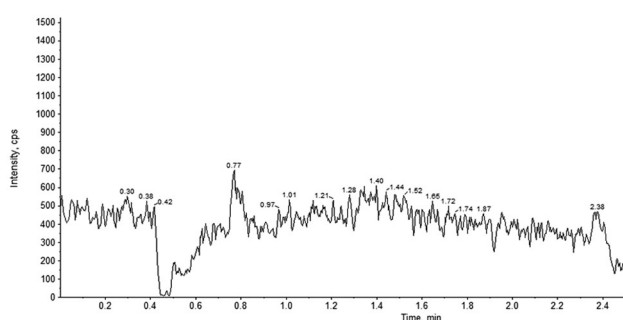
5-HIAA 最高定量限(ULOQ)浓度的人工尿液样品(不含内标)进行了检测。在所有样品中未发现对 5-HIAA 或内标有潜在的干扰(见图 1)。



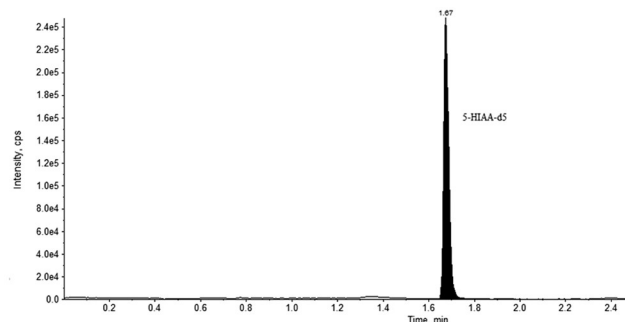
A1 Chromatogram of 5-HIAA detection channel in blank artificial urine sample



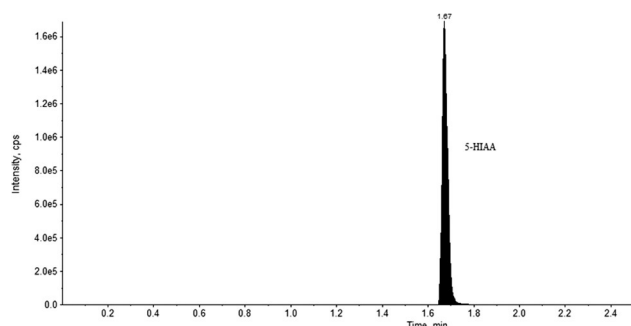
A2 Chromatogram of 5-HIAA-d5 detection channel in blank artificial urine sample



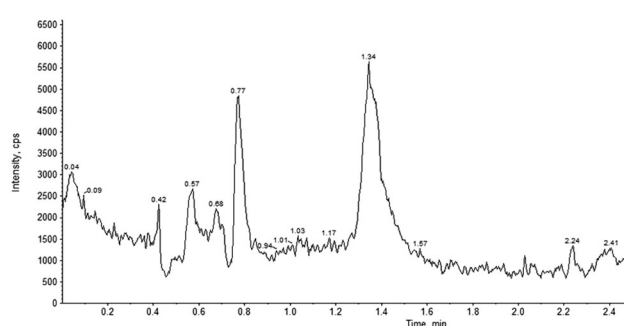
B1 Chromatogram of 5-HIAA detection channel in blank artificial urine sample with internal standard only



B2 Chromatogram of 5-HIAA-d5 detection channel in blank artificial urine sample with internal standard only



C1 Chromatogram of 5-HIAA detection channel in artificial urine sample with ULOQ concentration no internal standard



C2 Chromatogram of 5-HIAA-d5 detection channel in artificial urine sample with ULOQ concentration no internal standard

图 1 选择性评价样品色谱图: (A1)空白人工尿液样品中 5-HIAA 色谱图, (A2)空白人工尿液样品中 5-HIAA-d5

色谱图, (B1)仅含内标的空白人工尿液样品中 5-HIAA 色谱图, (B2)仅含内标的空白人工尿液样品中 5-HIAA-d5 色谱图, (C1)仅含 5-HIAA ULOQ 浓度(不含内标)的人工尿液样品中 5-HIAA 色谱图, (C2)仅含 5-HIAA ULOQ 浓度(不含内标)的人工尿液样品中 5-HIAA-d5 色谱图

Fig.1 Chromatograms of selectivity evaluation. (A1) 5-HIAA chromatogram in blank artificial urine; (A2) 5-HIAA-d5 chromatogram in blank artificial urine; (B1) 5-HIAA chromatogram in blank artificial urine with internal standard; (B2) 5-HIAA-d5 chromatogram in blank artificial urine with internal standard; (C1) 5-HIAA chromatogram in blank artificial urine spiked with 5-HIAA at the ULOQ without internal standard; (C2) 5-HIAA-d5 chromatogram in blank artificial urine spiked with 5-HIAA at the ULOQ without internal standard.

2.2 线性范围

标准曲线浓度范围从 0.0500 至 50.0 $\mu\text{g/mL}$, 包括 8 个非零校正标样,以 5-HIAA 浓度为横坐标,5-HIAA 与内标的峰面积比值为纵坐标,用加权($W=1/x^2$)最小二乘法进行线性回归运算(应用 Watson LIMSTM v7.4.1 软件进行回归运算),每个分析批包括一条标准曲线,每个浓度水平 2 个重复。

当校正标样回算准确度在 $\pm 15.0\%$ 偏差范围内(LLOQ

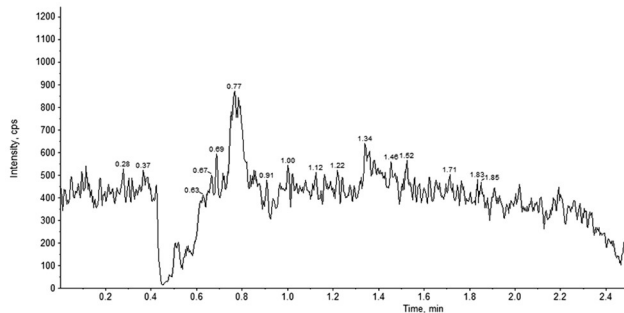
为 $\pm 20.0\%$ 偏差),该点才可纳入标准曲线内。

本试验结果表明,5-HIAA 在浓度为 0.0500 至 50.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,浓度与峰面积比有良好的线性关系,LLOQ 为 0.0500 $\mu\text{g/mL}$ 。回归方程为: $Y=0.135X+6.86 \times 10^{-4}$ ($r=0.9948$)。

2.3 进样残留评价

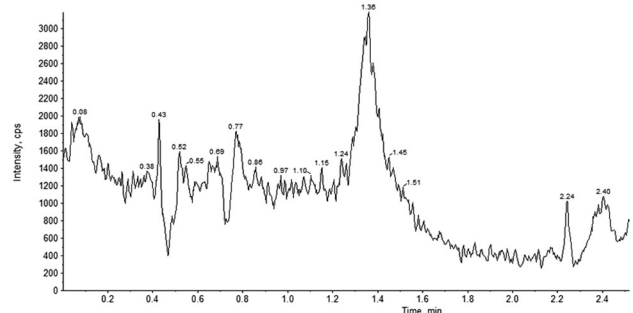
在最高浓度校正标样进样结束后立即进一针空白样品以考察前一针样品是否对后一针样品存在残留污染。若 5-HIAA

保留时间处的响应不大于 LLOQ 响应的 20.0 %,并且内标保留时间处的响应不大于仅含内标的空白基质中内标响应的 5.0 %,则认为无进样残留。



Carryover evaluation sample chromatogram after injection of 5-HIAA

本实验结果表明,无论是内标还是 5-HIAA 均不存在明显的进样残留,见图 2。



Carryover evaluation sample chromatogram after injection of 5-HIAA-d5

图 2 进样残留评价色谱图

Fig.2 Chromatograms of carryover blank sample

2.4 批内、批间准确度和精密度

配制浓度分别为 0.0500、0.150 和 40.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 LLOQ QC、LQC 和 HQC 样品,使用筛选浓度为 2.24 $\mu\text{g/mL}$ 的天然空白基质作为 MQC 样品。在这四个浓度水平的质控样品中,LLOQ QC 样品完全由人工尿液配制而成,LQC 样品为人工尿液与天然尿液混合配制而成,MQC 和 HQC 样品完全由天然尿

液配制,每个浓度水平 QC 样品平行配制 6 份,测定 3 个分析批。本试验批内和批间分析结果表明 QC 样本的 CV 8.4 %且平均准确度在 89.3 % 至 99.8 % 范围内,表明该分析方法具有良好的精密度和准确度,人工尿液可替代天然尿液进行 5-HIAA 标准曲线和质控样品的制备。结果见表 2。

表 2 人尿液中 5-HIAA 质控样品的精密度和准确度

Table 2 Precision and accuracy of 5-HIAA QC samples in human urine

Analyte	Theoretical Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-run Mean Calculated Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-run CV%	Intra-run Accuracy%	Inter-run Mean Calculated Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Inter-run CV%	Inter-run Accuracy%
5-HIAA	0.0500	0.0467	1.9	93.4	0.0499	5.6	99.8
	0.150	0.134	8.4	89.3	0.136	7.0	90.7
	2.24	2.18	2.0	97.3	2.10	4.0	93.8
	40.0	38.5	7.3	96.3	38.5	4.4	96.3

2.5 基质效应

由于 5-HIAA 为内源性化合物,其稳定同位素标记内标与其具有非常相似的结构和性质,且为非内源性物质,可通过评估 5-HIAA-d5 的基质效应来达到评价 5-HIAA 基质效应的目的。本试验在 6 个个体空白基质提取物中加入内标,假定回收率为 100 %。另外配制三份相同内标浓度的纯溶液,回收率同样假定为 100 %,按照基质效应因子 = 含基质的样品平均峰面积 / 纯溶液样品的平均峰面积的算法,计算得出的 5-HIAA 平均基质效应因子为 1.12。

2.6 回收率

分别提取 LQC、MQC 和 HQC 样品,每个浓度水平 3 个重复,提取时不加内标。在提取后的样品中加入与 5-HIAA 浓度相等的内标,假定内标的回收率为 100 %。

按照回收率% = (5-HIAA 的平均峰面积 / 内标的平均峰面积) $\times$ 100 % 的公式计算 5-HIAA 的提取回收率。求得尿液中 5-HIAA 低、中、高浓度的回收率分别为 102.3 % $\pm$ 1.1 %、100.3 % $\pm$ 0.7 % 和 101.1 % $\pm$ 0.2 %。

3 讨论

神经内分泌肿瘤(Neuroendocrine neoplasms, NENs)是一类起源于干细胞且具有神经内分泌标记物、能够产生生物活性胺或多肽激素的肿瘤。弥散分布于神经内分泌系统。在消化系统瘤中,他的发病率仅次于结肠癌,居于第 2 位^[5]。根据 SEER (Surveillance Epidemiology and End Results)数据,美国在 1973 年到 2004 年 30 年间,登记的神经内分泌肿瘤(NENs)的发病率增长了 500 %。NENs 自然病程较长,5 年生存率相对其他瘤种高,因此,处于长期带瘤生存的患者人数众多,根据 SEER 数据估计在 2004 年美国的神经内分泌肿瘤患者 (Prevalence)多达 103,312 人,甚至高于胃癌、胰腺癌、食管癌、肝胆肿瘤的当年患病人数^[5]。NENs 可发生于全身多种器官和组织,非胰腺神经内分泌肿瘤是起源于胰腺以外的器官或组织来源的神经内分泌肿瘤,其中胃肠道来源的神经内分泌肿瘤最为常见,占有所有 NENs 的 50.6 %^[5]。近 20 年来,肿瘤分析靶向治疗技术逐渐成熟并取得良好疗效。作用于多个靶点的酪氨酸激酶抑制剂舒尼替尼及索拉菲尼已经在晚期胰腺 NENs 中完成了 III 期临床试验,结果证实与安慰剂比较能显著延长晚期高分化胰腺 NENs 的无进展生存期^[6]。另外,吉非替尼及沙利度胺等在治疗

胃肠神经内分泌肿瘤研究中发挥了一定的效果^[7]。

5-HIAA 是 5-HT 的主要代谢产物,对于神经内分泌瘤尤其是肠肿瘤患者,其 24 小时尿液中的 5-HIAA 与临床症状密切相关,被广泛用于监测疾病的进展及治疗疗效的评估^[8],其检测类癌综合征的灵敏度为 100%,特异性为 85%-90%。对于诊断空回肠 NENs 的灵敏度为 70%-75%,特异性为 100%^[9,10]。

目前 5-HIAA 常用的分析方法有化学显色法、气相色谱法^[11]、毛细管电泳法^[12]、伏安法^[13]、免疫分析法^[14]、表面辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(SALDI-TOFMS)检测法^[15]等。常用的检测器有荧光检测器^[16]、紫外检测器^[17]、电化学检测器^[18]和质谱检测器。在众多的分离和检测方法中,液相色谱和质谱联用法^[19]具有分析方法耐用性好、操作简单(无需衍生化)、分辨率高、灵敏度好和快速等优点,逐渐成为生物基质中 5-HIAA 的主流检测方法。目前高效液相色谱-质谱联用法已应用于人血清^[19]、人尿液^[20]和动物脑组织^[21]等生物基质中 5-HIAA 的检测。

由于 5-HIAA 广泛存在于不同的生物基质中,如尿液、血浆、血清和脑脊液。如果需要对这些生物样本进行分析,则需要对这些生物样本进行前处理,除掉生物基质中大部分的杂质和干扰物,避免基质效应对分析物定量分析的干扰。目前,固相萃取法(SPE)^[22]和固相微萃取法^[11]已用于生物基质中 5-HIAA 的分离,这些方法中使用的纳米粒子由于其拥有巨大的吸附表面积,可以处理一些体积稀少的样品(如脑脊液)。许多有机和无机的纳米材料可以用于生物分析中的样品前处理^[23]。Maria Teresa García-Valverde^[24]等人采用碳包覆氧化钛纳米管(TiO₂-NT)结合分散微固相萃取(D μ -SPE)的方法对健康人尿液样品进行前处理,并用 LC-MS/MS 检测,检测限为 155.8 μ g/L。该方法虽然准确度高、精密度好、重现性好,但是样品提取过程过于繁琐,包括预洗、结合、清洗和洗脱。而且样品提取所使用的耗材成本较高,不太适用于普通实验室进行大量样品分析。段虹飞^[19]等人建立了人血清中 5-HIAA 的 UPLC-MS/MS 检测方法,在方法学验证过程中,使用空白人血清配制标准曲线和质控样品。由于 5-HIAA 存在于天然人血清中,为了定量的准确性,标准曲线样品中 5-HIAA 与内标的峰面积比值需扣除空白本底中的峰面积比值后,再对 5-HIAA 的血药浓度作最小二乘加权回归分析,计算得出回归方程。质控样品采用相同的方法在扣除空白本底峰面积比后代入回归方程计算出实际浓度。该方法虽然在扣除了天然人血清中的本底浓度后可准确定量样品中的浓度,但是对于大量血清样品浓度的检测来说,人工计算浓度数值会给实验数据引入人为误差,不适用于工业界大批量的样品检测。本文采用人工尿液(UR-N-CONTROL LEVEL 2 NP)代替天然尿液进行标准曲线的配制,分别用人工尿液、天然尿液和两者的混合液配制成质控样品进行方法学验证。经过三个批内和批间的精密度和准确度的考察,所有质控样品的结果良好。说明在质控样品中,不论人工尿液和天然尿液占比多少,质控样品均有良好的精密度和准确度,线性范围在 0.0500 至 50.0 μ g/mL 之间。人工尿液和天然尿液在该分析方法中一致性良好,人工尿液可替代天然尿液进行内源性物质的定量分析。除了人工尿液的使用外,目前生物基质内源性物质的检测方法中,磷酸盐缓冲液也作为血浆的替代基质用于血浆内源性物质的检测。Suqimoto H^[25]等人使用磷酸盐缓冲液作

为人血浆的替代基质进行标准曲线和质控样品的配制,建立了测定人血浆中类异戊二烯焦磷酸法尼酯(FPP)的 LC-MS/MS 和 LC-Q-Orbi-MS 的检测方法。

替代基质法比以往使用天然基质加样再扣除空白本底^[26]的定量方法减少了人工计算引入的误差,能够更高效地进行结果定量。另外,使用 SPE 柱处理或者活性炭吸附的方法也可除去天然空白基质中的内源性物质,但该方法实验步骤繁琐,实验成本较高,特异性吸附效果有待考察。而使用替代基质可以很好地模拟天然基质且不受内源性物质的干扰。除了替代基质法外,稳定同位素标记内标作为替代分析物也应用于生物样本中内源性物质的检测,如:大鼠脑内环核苷酸的检测^[27]和人血浆中肌酸酐的检测^[28]。

另外,5-HIAA 可受某些食物和药物的影响,如食用牛油果、哈密瓜、甜瓜、菠萝、李子、梅子、核桃、香蕉、车前草、枣子、猕猴桃、葡萄柚、西红柿、茄子、菠菜、西兰花、椰菜花和无花果等,尿液中 5-HIAA 水平会升高,遂在进行 5-HIAA 尿液收集前 2 天应嘱咐患者尽量避免食用上述水果和食物^[29,30]。另外服用一些药物如退热冰、非那西丁、利血平、格利西力(多种咳嗽糖浆的常见成分)或美索巴莫等也可能导致 5-HIAA 水平升高;而服用氯普鲁马嗪、肝素、丙咪嗪、异烟肼、左旋多巴、单胺氧化酶抑制剂、乌洛托品、甲基多巴、吩噻嗪、普鲁米近或三环抗抑郁剂等可能会降低 5-HIAA 水平^[30]。检测时应尽量控制饮食,或在允许的情况下暂停上述药物,以防出现假阳性及假阴性的情况^[8]。另外,Adaway JE^[31]等人通过测定神经内分泌肿瘤患者和健康人血浆、血清和尿液中的 5-HIAA 的浓度,发现血浆或血清中的 5-HIAA 和尿液中的 5-HIAA 有非常相似的诊断灵敏度和特异性,认为血浆或血清的检测可以替代传统的尿液检测。若血液检测最终能代替 24 小时尿液检测,这不仅提高了临床检测的可操作性又避免了尿液中其他药物及其代谢物的干扰。

参考文献(References)

- [1] 李影,穆萨,唐爱国.5-羟基吲哚乙酸的研究进展[J]. 实用预防医学, 2010, 17(10): 2131-2134
Li Ying, Mu Sa, Tang Ai-guo. Research progress of 5-hydroxyindoleacetic acid [J]. Practical Preventive Medicine, 2010, 17 (10): 2131-2134
- [2] Page IH, Corcoran AC, Udenfriend S, et al. Argentaffinoma as endocrine tumor[J]. J Biol Chem, 1955, 216(2): 499-505
- [3] FDA. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, CDER and CVM, May 2001
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典 9012. 生物样品定量分析方法验证指导原则[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015
The State Pharmacopoeia Commission, The People's Republic of China Pharmacopoeia 9012. Biological samples quantitative analysis method validation guidelines [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2015
- [5] Yao JC, Hassan M, Phan A, et al. One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35, 825 cases in the United States [J]. J Clin Oncol 2008, 26: 3063-3027
- [6] Karamelas IN, Syrigos KN, Saif MW. Targeted agents in treatment of

- neuroendocrine tumors of pancreas[J]. JOP 2014, 15: 351-353
- [7] 刘青国. 胃肠胰神经内分泌肿瘤分类及药物治疗进展[J]. 世界医学信息(电子版), 2017, 17(41): 134-134
- Liu Qing-guo. Gastrointestinal pancreatic neuroendocrine tumor classification and drug treatment progress [J]. World Latest Medicine Information (Electronic Version), 2017, 17(41): 134-134
- [8] O'Toole D, Grossman A, Gross D, et al. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: Biochemical Markers [J]. Neuroendocrinology, 2009, 90 (2): 194-202
- [9] Ardill JE, Eriksson B. The importance of the measurement of circulating markers in patients with neuroendocrine tumours of the pancreas and gut[J]. Endocr Relat Cancer, 2003, 10(4): 459-462
- [10] Feldman JM, O'Dorisio TM. Role of neuropeptides and serotonin in the diagnosis of carcinoid tumors[J]. Am J Med, 1986, 81(6B): 41-48
- [11] Monteleone M, Naccarato A, Sindona G, et al. A reliable and simple method for the assay of neuroendocrine tumor markers in human urine by solid-phase microextraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry[J]. Anal Chim Acta, 2013, 759: 66-73
- [12] Zhang L, Zhao Y, Huang J, et al. Simultaneous quantification of 5-hydroxyindoleacetic acid and 5-hydroxytryptamine by capillary electrophoresis with quantum dot and horseradish peroxidase enhanced chemiluminescence detection [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014, 967: 190-194
- [13] Goyal R, Oyama M, Gupta V, et al. Sensors for 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindole acetic acid based on nanomaterial modified electrodes. Sensor[J]. Actuat B-Chem, 2008, 134(2): 816-821
- [14] Menten O, Eryilmaz M, Harlak A, et al. The importance of urine 5-hydroxyindoleacetic acid levels in the early diagnosis of acute appendicitis[J]. Am J Emerg Med, 2009, 27(4): 409-412
- [15] Kuo T, Chen J, Chiu Y, et al. Quantitative analysis of multiple urinary biomarkers of carcinoid tumors through gold-nanoparticle-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2011, 699: 81-86
- [16] Van der Horst-Schrivers A, Post W, Kema I, et al. Persistent low urinary excretion of 5-HIAA is a marker for favorable survival during follow-up in patients with disseminated midgut carcinoid tumors[J]. Eur. J. Cancer, 2007, 43(18): 2651-2657
- [17] Lu X, Wang Y, Liu C, et al. Depressive disorder and gastrointestinal dysfunction after myocardial infarct are associated with abnormal tryptophan-5-hydroxytryptamine metabolism in rats [J]. PLoS ONE, 2017, 12(2): e0172339
- [18] Xu H, Zhang W, Wang D, et al. Simultaneous determination of 5-hydroxyindoleacetic acid and 5-hydroxytryptamine in urine samples from patients with acute appendicitis by liquid chromatography using poly(bromophenol blue) film modified electrode[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007, 846(1-2): 14-19
- [19] 段虹飞, 李巧艳, 董玲芳. UPLC-MS/MS 法测定人血清中的神经内分泌肿瘤标志物 5-羟基吲哚乙酸 [J]. 华西药理学杂志, 2015, 30(4): 481-483
- Duan Hong-fei, Li Qiao-yan, Dong Ling-fang. Determination of 5-hydroxyindoleacetic acid in serum as neuroendocrine tumor marker by UPLC-MS/MS[J]. WCJ·PS, 2015, 30(4): 481-483
- [20] Bosak Versic A, Glavan N, Bukvic N, et al. Does elevated urinary 5-hydroxyindole acetic acid level predict acute appendicitis in children?[J]. Emerg Med J, 2016, 33(12): 848-852
- [21] Bergh MS, Bogen IL, Lundanes E, et al. Validated methods for determination of neurotransmitters and metabolites in rodent brain tissue and extracellular fluid by reversed phase UHPLC-MS/MS[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016, 1028: 120-129
- [22] Moriarty M, Lehan M, O'Connell B, et al. Development of a nano-electrospray MSn method for the analysis of serotonin and related compounds in urine using a LTQ-orbitrap mass spectrometer[J]. Talanta, 2012, 90: 1-11
- [23] Lasarte-Aragón S, Lucena R, Cárdenas S, et al. Describes the huge potential of nanoparticles in bioanalytical sample preparation Nanoparticle-based microextraction techniques in bioanalysis[J]. Bioanalysis, 2011, 3(22): 2533-2548
- [24] García-Valverde MT, Lucena R, Cárdenas S, et al. Determination of urinary 5-hydroxyindoleacetic acid by combining D_μ-SPE using carbon coated TiO₂ nanotubes and LC-MS/MS [J]. Bioanalysis, 2015, 7 (22), 2857-2867
- [25] Sugimoto H, Iguchi M, Jinno F. Bioanalysis of farnesyl pyrophosphate in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry and hybrid quadrupole Orbitrap high-resolution mass spectrometry [J]. Anal Bioanal Chem, 2017, 409(14): 3551-3560
- [26] Yang Y, Zhong Q, Mo C, et al. Determination of endogenous inflammation-related lipid mediators in ischemic stroke rats using background subtracting calibration curves by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Anal Bioanal Chem, 2017, 409 (28): 6537-6547
- [27] Chen J, Tabatabaei A, Zook D, et al. A surrogate analyte-based liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of endogenous cyclic nucleotides in rat brain [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017 Nov 30, 146: 361-368
- [28] Zhao Y, Liu G, Angeles A, et al. A validated LC-MS/MS method for the quantitative measurement of creatinine as an endogenous biomarker in human plasma[J]. Bioanalysis, 2016, 8(19): 1997-2005
- [29] National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology[M]. Neuroendocrine tumors, Version.1.2015
- [30] 徐建明, 梁后杰, 秦叔逵, 等. 中国胃肠胰神经内分泌肿瘤专家共识 (2016 年版)[J]. 临床肿瘤学杂志, 2016, 21(10): 927-946
- Xu Jian-ming, Liang Hou-jie, Qin Shu-kui, et al. Consensus of experts on the neuroendocrine tumor of gastrointestinal pancreas in China (version 2016)[J]. Chinese Clinical Oncology, 2016, 21(10): 927-946
- [31] Adaway JE, Dobson R, Walsh J, et al. Serum and plasma 5-hydroxyindoleacetic acid as an alternative to 24-h urine 5-hydroxyindoleacetic acid measurement [J]. Ann Clin Biochem, 2015 (5): 554-560