Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

采用CORTECS UPLC HILIC色谱柱开发一种能够对人脑脊液(CSF)中乙酰胆碱、组胺及其代谢产物同时进行定量分析的UPLC/MS/MS定量测定法，从而提高峰分离度、灵敏度和分析速度

Mary E. Lame、Erin E. Chambers和Kenneth J. Fountain
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

应用优势

- CORTECS™ UPLC® HILIC色谱柱的分离度可实现对ACh、HA及其代谢产物的同时定量
- 总运行时间仅2.5 min，符合高通量筛查需求
- 96孔板的应用简化了样品制备(小于15 min)
- 较之先前的报道方法，高灵敏度的Xevo® TQ-S MS允许所用样品体积更小，稀释倍数更高

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC®系统

Xevo TQ-S质谱仪

CORTECS UPLC HILIC色谱柱

ACQUITY®收集板

关键词

生物分析，生物标记物，脑脊液，定量，神经递质，乙酰胆碱，胆碱，组胺，*t*-甲基组胺，*t*-甲基咪唑醋酸，UPLC，HILIC，CORTECS

简介

在药物研发中，来自体液的生化标记物常被用作诊断疾病和评估药物疗效的有效方式。乙酰胆碱(Acetylcholine, ACh)和组胺(Histamine, HA)是强极性神经递质，存在于几乎所有哺乳动物组织中。它们在睡眠调节、记忆、学习和免疫反应中发挥着一定作用[1-3]。大脑中ACh水平下降会导致记忆功能障碍，尤其是阿尔茨海默氏症患者的ACh供应明显不足[1]。因此，在这类认知障碍的治疗中对于如何促进ACh的释放进行了广泛的研究。

组胺由组氨酸的脱羧作用生成。组胺或是被储存起来，或是被其主要的降解酶组胺-N-甲基转移酶或二胺氧化酶迅速灭活并代谢为两种主要代谢产物 *t*-甲基组胺(t-mHA)和 τ-甲基咪唑醋酸(t-MIAA)。脑内组胺参与广泛的生理功能，例如睡眠-觉醒周期调节、唤醒、食欲控制、认知、学习和记忆[2,3]。据了解，在精神分裂症患者脑脊液中组胺的代谢产物增多[4,5]。因此，脑脊液(CSF)中HA、t-mHA和t-MIAA的浓度可以作为脑组胺活性的指标。鉴于ACh、HA及其各自的代谢产物具

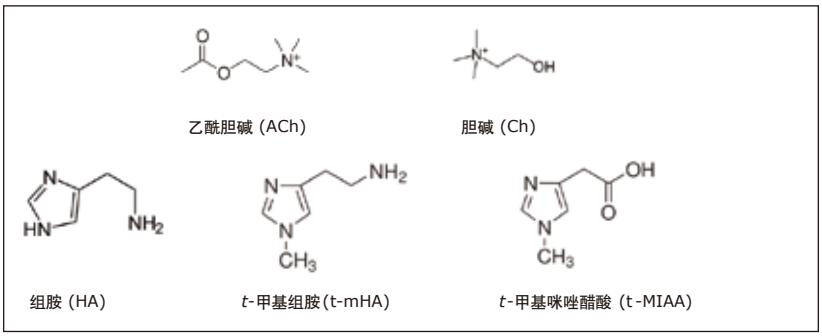

图1. ACh、HA及其各自代谢产物的结构式。

有重要的生理学作用，其生理浓度变化的测量可作为疾病进展或药物治疗的评估指标，这一功能使得这类物质成为药物研发中非常重要的生化标记物。

开发ACh、HA及其代谢产物的靶向分析方法是人们一直以来面临的挑战，因为它不仅需要具备高灵敏度和高选择性，还需要具有较快的样品分析速度。此外，ACh、HA及其各自代谢产物之间的内源性循环浓度存在极大差异，使得同时测定这些物质需要较宽的定量动态范围。虽然目前有多种用于定量这类分析物分析方法(GC/MS，HPLC-EC和LC/MS)[6-8]，但很少有方法能够同时测定啮齿动物脑微透析液或CSF基质中的ACh、HA及其各自代谢产物[9]。在含较高水相的洗脱条件下，分析物与基质抑制组分可能会共流出并且MS电离能力较差，使得反相(RP)液相色谱法结合MS检测的方法因灵敏度较低而受到限制[10]。亲水作用液相色谱(HILIC)能够提高极性物质的色谱保留性能，可与反相色谱进行正交实验用于极性和可电离化合物的分离，并能改善质谱响应，正日益成为应对这些极性分析物分离挑战的不二之选。

本文中介绍的方法展示了在96孔板中同时定量人CSF中的ACh、HA及其各自代谢产物。利用一步法样品制备技术制备样品，取20 µL样品进行稀释，再执行HILIC UPLC/MS/MS分析。采用亚2 µm颗粒的高效CORTECS UPLC HILIC色谱柱能够实现分析物与内源性基质的分离，提高分析灵敏度，分析时间只需2.5 min，因此本方法快速、灵敏、准确且选择性好，符合药物开发的高通量生物分析需求。

实验

样品制备

20 µL人工脑脊液(aCSF)标准品、aCSF质量控制(QC)样品或人脑脊液(含4 mM毒扁豆碱)将QC样品转移至1 mL的96孔板中。向样品中加入含有浓度分别为1 ng/mL的d4-乙酰胆碱、d4-组胺、d3-*t*-甲基组胺和d3-*t*-甲基咪唑醋酸(用作内标(ISTD))的乙腈100 µL。盖上96孔板，并进行涡旋混合。然后，将样品在4000 rpm下离心5 min，取10 µL样品进行UPLC/MS/MS分析。

UPLC条件

系统:	ACQUITY UPLC
色谱柱:	CORTECS UPLC HILIC 1.6 µm，2.1 mm X 100 mm(部件号186007106)
流动相A:	100 mM甲酸铵，pH 3
流动相B:	乙腈
梯度:	初始为90%的流动相B，在0.75min内线性增加至60%，保持0.25 min，然后在0.25 min内线性减少至30%，并保持0.65 min。最后在1.9 min内返回至初始条件。
流速:	0.5 mL/min
柱温:	45 ℃
样品温度:	6 ℃
进样体积:	10 µL
运行时间:	2.5 min
收集板:	Waters® ACQUITY 1 mL收集板

MS条件

质谱仪:	Xevo TQ-S
电离模式:	ESI+
毛细管电压:	3.0 kV
脱溶剂气温度:	550 ℃
锥孔气体流速:	150 L/h
脱溶剂气流速:	900 L/h
碰撞室压力:	3.58 X $10^{(-3)}$ mbar
碰撞能量:	按组分优化，见表1
锥孔电压:	按组分优化，见表1

数据管理

色谱分析:	MassLynx®软件
定量:	TargetLynx™软件

结果与讨论

质谱分析

利用沃特世Xevo TQ-S质谱仪在ESI-MS/MS正离子模式下对ACh、HA及其各自代谢产物进行检测和定量。使用MassLynx IntelliStart™软件自动优化针对ACh、HA及其各自代谢产物和相应的氘代稳定同位素标记形式(作为内标)所选择的多重反应监测(MRM)通道，如表1所示。每个MRM通道驻留时间短至25 ms，以及MS系统的快速扫描时间，使其能够同时采集所有化合物峰并达到每峰数据点>/= 10。

化合物	MRM 通道	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
乙酰胆碱	146.10 > 87.05	25	12
d4-乙酰胆碱	150.20 > 91.30	30	15
胆碱	104.20 > 60.10	30	15
组胺	112.20 > 95.12	25	15
d4-组胺	116.10 > 99.00	25	15
t -甲基组胺	126.10 > 109.20	25	12
d3-*t* -甲基组胺	128.80 > 112.20	25	12
t -甲基咪唑醋酸	141.09 > 95.05	25	12
d3 *t* -甲基咪唑醋酸	144.10 > 98.10	25	12

表1. ACh、Ch、HA、t-mHA和t-MIAA及其各自的氘代稳定同位素标记内标的MS条件。

UPLC分离

ACh、Ch、HA、t-mHA和t-MIAA是以相对较低浓度存在的强极性小分子化合物，这使其难以通过常规的反相色谱进行检测。此外，由于共流出的相关分子(如盐类或其它低分子量内源性组分)的基质诱导干扰和离子抑制作用，导致对生物基质中的这些内源性分析物进行定量分析常常较为困难[9]。

在本应用纪要中，我们利用亚2 µm CORTECS UPLC HILIC色谱柱和ACQUITY UPLC系统实现了ACh、HA及其各自代谢产物的色谱分离。确定最适宜的甲酸铵浓度(流动相A)为100 mM (pH 3)，流动相B由乙腈组成。在最佳流速为0.5 mL/min、梯度为30%-90% B时，其在45 ℃的柱温下分析循环时间为2.5 min。

流动相添加剂的浓度对方法特异性、灵敏度以及将目标分析物与流动相和内源性基质进行色谱分离的能力具有重要影响。较高的缓冲液浓度100 mM(而不是20至50 mM)极大地改善了后洗脱分析物的峰宽。特别是高mM浓度的甲酸铵使t-MIAA的峰拖尾现象显著减少。定量下限控制标准品(LLQC)中的ACh、Ch及其各自代谢产物，色谱保留时间和性能如图2所示。ACh、Ch及其各自代谢产物和ACh的同分异构体Iso-ACh (3-羧丙基)三甲基铵在1.35至1.75 min内洗脱，基线峰宽小于3.7 s。

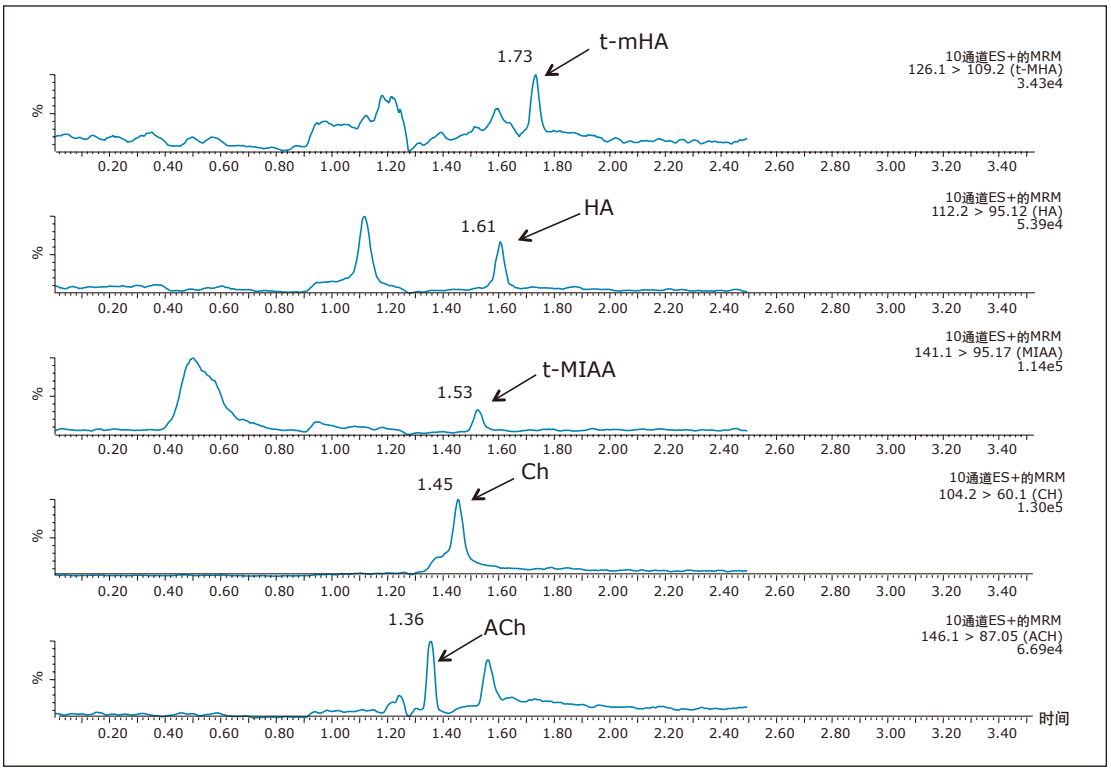

图2. aCSF中ACh、Ch、HA、t-mHA和t-MIAA在LLQC浓度(ACh/t-mHA 为 16 pg/mL，HA 为 62 pg/mL，t-MIAA 为 35 pg/mL和Ch 为 140 pg/mL)下的代表性色谱图。

由于Iso-ACh(3-羧丙基)三甲基铵在脑中以较高浓度存在，因此本研究对其进行了分析。据报道，它是肉毒碱生物合成中的酶(G-甜菜碱羟化酶)的底物[11]。ACh和Iso-ACh为同分异构体，在进行CSF中ACh的准确定量时确保二者的色谱分离度相当重要。在人CSF样品提取物中(图3)，突显了存在的高浓度内源性Iso-ACh。将ACh以1000 pg/mL的浓度加标至人CSF中，以展示ACh和Iso-ACh之间的色谱分离和浓度差异。

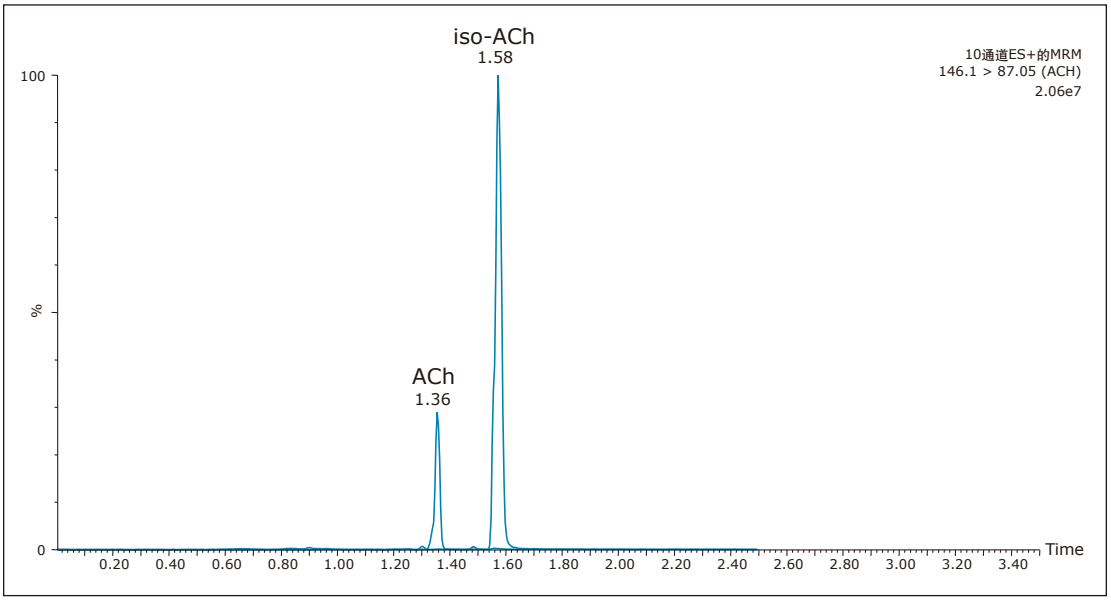

图3. 人CSF中ACh和Iso-ACH的代表性色谱图(ACh加标浓度为1000 pg/mL)。

样品制备

选择人工CSF(aCSF)作为替代基质用于制备标准曲线，以对所有分析物进行定量。aCSF较容易获得，且花费不像人CSF那样高昂，因此，将其作为替代基质更为实际。为了确保aCSF可作为合适的基质用于所有分析物的准确定量，我们制备了ACh、HA和t-mHA的加标人CSF QC样品，以及Ch和t-MIAA的aCSF QC样品。Ch和t-MIAA的QC样品由aCSF配制，是因为人CSF中内源性基底水平的ng/mL浓度较高，使得难以通过标准品加入法在适用于其它分析物测定的线性范围内进行定量，因此需使用aCSF制备Ch和t-MIAA的QC样品。此外，人CSF中Ch的ng/mL浓度较高，因此需要采用aCSF对样品进行稀释以便在动态检测范围内进行准确定量。

如Zhang、Tingley、Tseng等人所述，所有人CSF QC样品和人CSF样品均含有最终浓度为4 mM的稳定剂毒扁豆碱，用于阻止ACh经酶转化为Ch和醋酸盐。标准曲线、人CSF QC样品、aCSF QC样品和样品均采用1mL 96孔板制备。通过加入含实验部分所述内标的乙腈，进行一步法样品稀释(样品量：乙腈量 1：5)。使用96孔板可以在15 min内完成样品制备，满足了开发定量分析方法所需的高通量分析要求。

线性、精度和准确度

使用ACh、HA、t-mHA和t-MIAA的氘代稳定同位素标记标准品(ISTD)进行定量分析。用d4 ACh 内标进行Ch定量。ACh、Ch、HA、t-mHA和t-MIAA的标准曲线(1/x加权)在定量动态范围内呈线性(>0.99)。各分析物的动态范围、线性、平均QC准确度和定量下限(LLOQ)如表2所示。ACh的代表性校准曲线示于图4中。

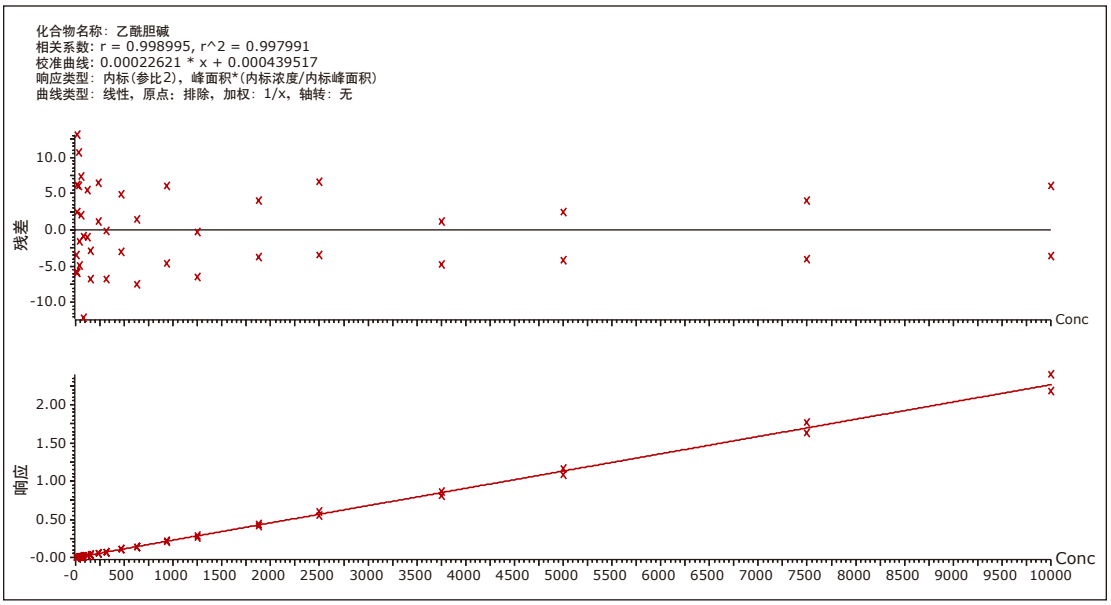

图4. aCSF样品中ACh的代表性标准曲线。

化合物	动态范围 (pg/mL)	线性 (1/x)	LLQC* (pg/mL)	平均QC 准确度
乙酰胆碱	10 to 10,000	0.998	16	102.2
胆碱	100 to 30,000	0.999	140	103.3
组胺	50 to 10,000	0.998	62	105.8
t -甲基组胺	10 to 10,000	0.999	16	102.2
t -甲基咪唑醋酸	20 to 30,000	0.999	35	97.6

*LLQC：定量下限控制

表2. ACh、Ch、HA、t-mHA和t-MIAA的UPLC/MS/MS检测分析性能。

以人CSF和aCSF的混合物为基质制备QC样品，用于评估样品内精度和重现性。通过分析未加标的人CSF，测定ACh、HA和t-mHA的基底水平。通过从CSF源中扣除平均基底水平浓度得出相应的QC水平，从而测得QC浓度。ACh、HA和t-mHA的加标人CSF QC样品分析，以及Ch和t-MIAA的加标aCSF QC样品分析的代表性结果如表3和4所示。aCSF和人CSF校准定量完成后，利用aCSF标准曲线测定人CSF中各分析物的内源性基底浓度。ACh、Ch、HA、t-mHA和t-MIAA的基底水平平均测定值汇总于表5中。准确度和精度值符合FDA关于LC/MS/MS检测的法规标准[12,13]。

ACh 加标浓度 (pg/mL)	最终 ACh QC 浓度 (pg/mL)	ACh浓度平均(N=4) 计算值 (pg/mL)	SD	变异系数 (%)	平均(N=4) 准确度
16	20	21.7	0.5	2.4	108.5
125	130	133.7	6.9	5.1	102.8
1000	1004	1004.9	6.3	0.6	100.1
4000	4004	3893.1	75.7	1.9	97.2

HA 加标浓度 (pg/mL)	最终 HA QC 浓度 (pg/mL)	HA浓度平均(N=4) 计算值 (pg/mL)	SD	变异系数 (%)	平均(N=4) 准确度
62	272	268.9	11.2	4.1	98.9
250	460	487.0	18.1	3.7	105.9
1000	1210	1377.1	40.3	2.9	113.8
4000	4210	4470.3	146.4	3.3	104.4

t-mHA 加标浓度 (pg/mL)	t-mHA QC 浓度 (pg/mL)	平均(N=4) 计算浓度 (pg/mL)	SD	变异系数 (%)	平均(N=4) 准确度
16	577	592.9	14.9	2.5	102.8
250	811	848.3	11.3	1.3	104.6
1000	1561	1623.7	5.4	0.3	104.0
4000	4561	4447.8	55.0	1.2	97.5

表3. 人CSF QC样品分析所得的代表性ACh、HA和t-mHA结果。

t-MIAA aCSF QC 浓度 (ng/mL)	t-MIAA浓度平均 (N=4)计算值 (ng/mL)	SD	变异系数 (%)	平均(N=4) 准确度
0.035	0.034	0.003	10.1	97.9
0.28	0.266	0.003	1.3	96.0
1.12	1.114	0.032	2.9	100.0
4.5	4.255	0.146	3.4	96.3

Ch aCSF QC 浓度 (ng/mL)	Ch浓度平均(N=4) 计算值 (ng/mL)	SD	变异系数 (%)	平均(N=4) 准确度
0.14	0.149	0.009	6.1	105.0
0.56	0.571	0.025	4.3	103.6
2.15	2.182	0.061	2.8	100.7
9.00	9.063	0.175	1.9	103.8

表4. aCSF QC样品分析所得的代表性t-MIAA和Ch结果。

化合物	平均(N=4) 计算浓度	单位	SD	变异系数 %
ACh	4.1*	pg/mL	0.2	4.9
Ch	530.0**	ng/mL	16.1	3.0
HA	204.1	pg/mL	8.3	4.0
t-mHA	556.6	pg/mL	8.2	1.5
t-MIAA	20.5	ng/mL	0.0	0.1

*低于定量限
**样品用aCSF稀释80倍

表5. 人CSF中ACh、Ch、HA、t-mHA和t-MIAA各自的内源性基底水平的平均测定值汇总。

结论

- 这种快速、简单、灵敏且高选择性的UPLC分析方法能够对人CSF中的ACh、HA及其各自代谢产物进行分离和同时定量。
- 使用96孔板可以在15 min内完成样品制备，提供了研发阶段分析方法所需的高分析通量。
- CORTECS UPLC HILIC色谱柱的分离度和灵敏度改善了内源性基质组分的分离和分离度，所用分析时间仅为2.5min。
- Xevo TQ-S MS的高灵敏度使得只需少量样品(20 µL)和5倍的稀释，即可达到低至10 pg/mL的检测限，并具有宽的定量动态范围10-30000 pg/mL。
- 所有分析物的QC样品分析结果均符合FDA法规标准，变异系数为0.3%-10.1%，准确度范围为94.7%-113.7%，表明本方法的重现性和准确度良好。
- 本文所介绍的方法展示出在药物开发的研发阶段对多种神经性生物标记物进行高选择性和高灵敏度定量的潜力。

参考文献

1. Jia JP, *et al*. Differential acetylcholine and choline concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Chin Med J (Engl)*. 2004; 117(8): 1161-4.
2. Vohora D, Bhowmik M. Histamine H3 receptor antagonists/inverse agonists on cognitive and motor processes: relevance to Alzheimer's disease, ADHD, schizophrenia, and drug abuse. *Front Syst Neurosci.* 2012; 6: 72.
3. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Histamine and histamine receptors in pathogenesis and treatment of multiple sclerosis. *Neuropharmacology*. 2010; 59(3): 180-9.
4. Ito C. The role of the central histaminergic system on schizophrenia. *Drug News Perspect*. 2004; 17(6): 383-7.
5. Alvarez EO. The role of histamine on cognition. *Behav Brain Res*. 2009; 199(2): 183-9.
6. Prell GD, Green JP. Measurement of histamine metabolites in brain and cerebrospinal fluid provides insights into histaminergic activity. *Agents Actions*. 1994; 41: C5-8.
7. Huang T, *et al*. Detection of basal acetylcholine in rat brain microdialysate. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1995; 670(2): 323-7.
8. Bourgogne E, *et al*. Simultaneous quantitation of histamine and its major metabolite 1-methylhistamine in brain dialysates by using precolumn derivatization prior to HILIC-MS/MS analysis. *Anal Bioanal Chem.* 2012; 402(1): 449-59.
9. Zhang Y, *et al.* Development and validation of a sample stabilization strategy and a UPLC-MS/MS method for the simultaneous quantitation of acetylcholine (ACh), histamine (HA), and its metabolites in rat cerebrospinal fluid (CSF). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011; 879(22): 2023-33.
10. Grumbach ES, Diehl DM, Neue UD. The application of novel 1.7 microm ethylene bridged hybrid particles for hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci.* 2008; 31(9): 1511-8.
11. Zhu Y, *et al.* In vivo microdialysis and reverse phase ion pair liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination and identification of acetylcholine and related compounds in rat brain. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2000; 14(18): 1695-700.
12. Viswanathan CT, *et al.* Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. *Pharm Res*. 2007; 24(10): 1962-73.
13. Bansal S, DeStefano A. Key elements of bioanalytical method validation for small molecules. *AAPS J.* 2007; 9(1): E109-14.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters、ACQUITY、UPLC、Xevo、ACQUITY UPLC、MassLynx和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。CORTECS、TargetLynx、IntelliStart是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

© 2013 年沃特世公司。印制于中国

2013 年 6 月 720004722ZH LL-PDF

沃特世科技（上海）有限公司
北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999

沃特斯中国有限公司
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com