

HPLC-FLD 测定不同脑区 3 种单胺神经递质及其代谢产物含量

邓祖跃^{1,2}, 许国峰³, 袁钰萍², 匡荣¹ (1.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004; 2.浙江工业大学药学院, 杭州 310014; 3.绍兴市现代医药公共服务中心, 绍兴 312366)

摘要: 目的 建立并优化测定脑组织中单胺类神经递质及其代谢产物含量的高效液相色谱-荧光检测方法。方法 采用 Inertsustain C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇和水, 其中水相中每升含柠檬酸 30 mmol、乙酸钠 40 mmol、EDTA-2Na 0.2 mmol、辛烷磺酸钠 0.4 mmol(pH=3.8), 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 荧光检测波长 λ_{ex}=280 nm, λ_{em}=330 nm。结果 重酒石酸去甲肾上腺素、盐酸多巴胺、盐酸 5-羟色胺、3-甲氧基-4-羟基苯乙胺、3,4-二羟基苯乙酸、高香草酸、5-羟吲哚乙酸 7 种成分在 45 min 内洗脱完全, 分离效果良好; 浓度 0.9~400.0 μg·L⁻¹ 内线性关系良好, 且相关系数>0.99, 平均回收率>80%。结论 本方法简便、准确、分离度高、重复性好, 适用于一般实验室脑组织中单胺类神经递质及其代谢产物的测定。

关键词: 大鼠脑组织; 单胺类神经递质; 高效液相色谱-荧光检测

中图分类号: R914.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)05-0522-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.05.002

引用本文: 邓祖跃, 许国峰, 袁钰萍, 等. HPLC-FLD 测定不同脑区 3 种单胺神经递质及其代谢产物含量[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(5): 522-525.

Content Determination of Three Kinds of Monoamine Neurotransmitters and Their Metabolites in Rat Different Brain Tissue by HPLC with Fluorescence Detection

DENG Zuyue^{1,2}, XU Guofeng³, YUAN Yuping², KUANG Rong¹ (1.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China; 2.College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 3.Shaoxing Modern Medical Public Service Center, Shaoxing 312366, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for determination of the monoamine neurotransmitters and their metabolites in brain tissues of the rats by HPLC with fluorescence detection. **METHODS** Inertsustain C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used, the mobile phase composed of methanol and water, included 30 mmol citric acid, 40 mmol NaAc, 0.2 mmol EDTA-2Na and 0.4 mmol 1-octanesulfonic acid sodium salt in 1 L water(pH=3.8), gradient elution, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, fluorometric detector wave length setting of excitation at 280 nm and emission at 330 nm. **RESULTS** Norepinephrine, dopamine, serotonin hydrochloride, 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethylamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid, 5-hydroxyindole-3-acetic acid were completely eluted and well separated in 45 min. Good linear response was obtained for the seven components within the range of 0.9~400.0 μg·L⁻¹ with correlation coefficients >0.99. The average recovery rate of these components was >80%. **CONCLUSION** The method is simple, accurate, high separation and good repeatability. It is suitable for measuring the monoamine neurotransmitters and their metabolites in cerebral tissue in common laboratory.

KEYWORDS: rat brain tissue; monoamine transmitters; HPLC-FLD

脑内单胺类神经递质水平与精神疾病密切相关, 如精神分裂症的多巴胺功能亢进和抑郁症的 5-羟色胺含量降低^[1]。为了更好地了解中枢神经系统疾病的发病原因, 需要掌握脑内神经递质的代谢变化情况, 所以建立一个可以稳定、准确测量这些神经递质的分析方法至关重要。目前, 高效液相色谱-电化学检测法是认可度比较高的测量脑内单胺类神经递质的方法, 但其稳定性较差, 且修饰电极的使用寿命短^[2]; 色谱-质谱联用法也是一种比较好的测量方法, 但仪器比较昂贵, 常规

实验室未配备^[3]; 高效液相色谱-荧光检测法(HPLC-FLD)被报道可同时测定多种单胺类神经递质^[4-7]。笔者对已报道的 HPLC-FLD 进行分析, 发现在分离各组分时, 样品中生物杂质的洗脱不够彻底, 一部分峰分离不佳; 另外, 选取的组分与常规 3 种单胺类神经递质相对应的代谢产物不一致, 这些结果限制了该方法在神经递质相关疾病检验和诊断工作中的应用。本次实验旨在改进现有的主要方法, 建立新的梯度洗脱系统, 测定常规 3 种单胺类神经递质及其相对应的代谢产物,

基金项目: 浙江省科技计划项目(2014C37020)

作者简介: 邓祖跃, 男, 博士, 副主任药师

Tel: (0571)86461076

E-mail: dzy7317@sina.com

使各组分得到良好的分离,为生物体内单胺类神经递质测定方法的选择提供依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT 液相色谱系统(包括自动进样器、紫外检测器和工作站,日本岛津);X-22R Centrifuge 型高速低温离心机(美国 Beckman 公司);0320 酸度计(瑞士 Mettler Toledo 公司);IKA T10 匀浆机(德国艾卡公司)。

1.2 药品与试剂

对照品:重酒石酸去甲肾上腺素(norepinephrine, NE, 批号:100169-201103;纯度:95%)、盐酸多巴胺(dopamine, DA, 批号:100070-201006;纯度:100%)、盐酸 5-羟色胺(serotonin hydrochloride, 5-HT, 批号:111656-201101;纯度:100%)购自中国药品生物制品检定研究院;3-甲氧基-4-羟基苯乙胺[2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethylamine, 3-MT, 批号:BCBS7510W;纯度:99%]、3,4-二羟基苯乙酸(3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC, 批号:BCBL7919V;纯度:100%)、高香草酸(homovanillic acid, HVA, 批号:BCBT8083;纯度:98%)、5-羟吲哚乙酸(5-hydroxyindole-3-acetic acid, 5-HIAA, 批号:BCBS9227V;纯度:98%)购自美国 Sigma 公司;乙腈(德国 Merck)为色谱纯;高氯酸、柠檬酸、乙酸钠、辛烷磺酸钠醋酸及其他试剂均为国产分析纯,水为双蒸馏水。

1.3 动物

SPF 级 SD 大鼠,♂,20 只,体质量为(230±20)g,购自浙江省实验动物中心,许可证号:SCX(浙)2012-0003。实验在浙江省食品药品检验研究院进行,许可证号:SCX(浙)2012-0050。饲养房间温度 20~22℃,日温差<3℃,相对湿度 50%~70%。饲养密度为每笼 5 只,笼子更换频率为每周 3 次,饲料每天更换 1 次,自由饮用纯化水。

2 方法

2.1 溶液的配制

对照品储备液的配制 精密称取适量的 DA, NE, 5-HT, 3-MT, DOPAC, HVA 和 5-HIAA 对照品于烧杯中,用 0.1 mol·L⁻¹ 高氯酸溶解,转入 10 mL 量瓶中,用 0.1 mol·L⁻¹ 高氯酸定容至刻度,配成浓度为 1 mg·L⁻¹ 的储备液。贮存于-20℃ 冰箱内,分析时按需要用 0.1 mol·L⁻¹ 高氯酸稀释

成各种质量浓度的标准液。

2.2 样品处理

冰浴下分离大鼠脑皮质、海马、纹状体、小脑、下丘脑和延髓,精确称重后以 1:10 加入 0.1 mol·L⁻¹ 高氯酸,冰浴下超声裂解 30 s,14 000 r·min⁻¹ 4℃ 低温离心 30 min,取上清液用 0.22 μm 滤膜抽滤,滤液作为样品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Inertsustain C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相 A 为柠檬酸-乙酸钠-辛烷磺酸钠缓冲液缓冲液(含 30 mmol·L⁻¹ 柠檬酸、40 mmol·L⁻¹ 醋酸钠、0.2 mmol·L⁻¹ EDTA-2Na、0.4 mmol·L⁻¹ 辛烷磺酸钠, pH=3.8),流动相 B 为甲醇;流速 1.0 mL·min⁻¹;进样量 10 μL;荧光检测波长 λ_{ex}=280 nm, λ_{em}=330 nm;梯度洗脱,0~10 min, 95%→90%A;10.1~20 min, 90%→70%A;20.1~25 min, 70%A;25.1~26 min, 70→10%A;26.1~36 min, 10%A;36.1~37 min, 10%→95%A;37.1~45 min, 95%A。

2.4 统计学分析

以各有关成分对照品的峰面积和各自浓度作标准曲线,测定样品的待测有关成分峰面积,按外标法求出样品中成分含量。用 SPSS 17.0 统计软件进行 *t* 检验统计分析。

3 结果

3.1 色谱结果

对照品及组织匀浆中 7 种待测物质在 45 min 内得以很好地分离,组织中的干扰峰与生物胺可完全分离。各生物胺的保留时间分别为 DA 3.191 min、NE 5.365 min、5-HT 10.874 min、3-MT 12.062 min、DOPAC 14.220 min、HVA 19.270 min 和 5-HIAA 23.486 min。结果见图 1。

3.2 线性范围和相关系数

用 0.1 mol·L⁻¹ 高氯酸配制 0.1~400.0 μg·L⁻¹ 的标准工作液,按“2.3”项下色谱条件,进样,记录色谱图,以对照品峰面积为纵坐标(*Y*),相应对照品质量浓度为横坐标(*X*, μg·L⁻¹),绘制标准曲线,得相应对照品的回归方程和线性范围。结果见表 1。

3.3 仪器精密度试验

取 6 份同一样本脑组织,分别加入含有一定量 7 种单胺类神经递质的混合对照品溶液,按“2.2”项下方法处理后进行分析,各色谱峰的保留时间波

动<0.1 min, 峰面积的 RSD 为 0.22%~2.7%。

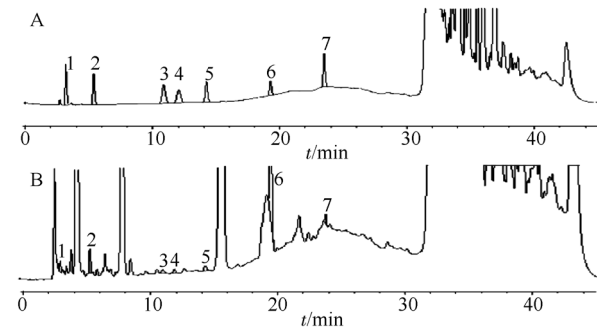


图 1 高效液相色谱图

A-混合对照品; B-大鼠脑组织样品; 1-NE; 2-DA; 3-5-HT; 4-3-MT; 5-DOPAC; 6-HVA; 7-5-HIAA。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-mixed standard substances; B-sample of rat brain tissue; 1-NE; 2-DA; 3-5-HT; 4-3-MT; 5-DOPAC; 6-HVA; 7-5-HIAA.

表 1 HPLC-FLD 测量 7 种物质的回归方程及其相关系数

Tab. 1 Regression equations and correlation coefficients of the 7 substances determined by HPLC-FLD

对照品	回归方程	相关系数	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	检测限/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
NE	$Y=519.34X+657.94$	0.999 1	6.9~110.0	2.3
DA	$Y=786.36X+642.75$	0.999 8	5.0~80.0	1.6
5-HT	$Y=4\ 688.60X-905.16$	0.992 6	0.9~12.5	0.3
3-MT	$Y=937.04X+112.33$	0.999 8	3.8~60.0	1.3
DOPAC	$Y=162.68X+48.96$	0.999 3	25.0~400.0	8.0
HVA	$Y=162.47X-665.71$	0.999 6	25.0~400.0	8.0
5-HIAA	$Y=2\ 059.90X+1\ 717$	0.999 9	1.3~100.0	0.4

3.4 稳定性试验

在脑组织匀浆液中分别加入含有一定量 7 种单胺类神经递质的混合对照品溶液, 按“2.2”项下方法进行处理, 分别在 0, 24, 48, 72 h 时取样进行测定, 结果表明各峰面积 RSD 范围为 1.45%~4.51%, 说明制备好的样品溶液在 3 d 内检测稳定性良好。

3.5 回收率试验

取 10 份大鼠脑皮层混合样品匀浆液, 分成 A、

B、C、D 4 组, 共 70 份, A 组不加对照品但加入等量体积的生理盐水, B 组加线性范围的 10%对照品, C 组加线性范围的 50%对照品, D 组加线性范围的 100%对照品, 按“2.3”项下色谱条件进样测定, 计算 3 种含量对照品的回收率。结果显示, 7 种生物胺加入 10%对照品的回收率为 82.82%~100.22%, 加入 50%对照品的回收率为 84.31%~99.86%, 加入 100%对照品的回收率为 80.39%~100.77%。结果见表 2。

表 2 样品回收实验结果($n=3$)

对照品	B		C		D	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
NE	95.25	0.62	84.31	1.09	80.53	0.41
DA	100.22	0.60	85.63	1.62	80.39	0.53
5-HT	80.84	0.25	93.60	0.46	90.12	1.11
3-MT	95.22	1.15	90.07	2.89	93.79	1.45
DOPAC	88.36	2.43	86.48	1.70	88.68	1.00
HVA	82.82	0.93	99.86	0.35	100.77	0.76
5-HIAA	92.34	0.42	89.90	0.32	85.73	0.39

3.6 HPLC 测定大鼠不同脑区生物胺的含量

取 5 只 SD 大鼠, 取脑, 迅速在冰盘上分离皮质、海马、纹状体、小脑、下丘脑和延髓, 放入 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待用。按“2.3”项下色谱条件检测各分区匀浆液中 7 种待测生物胺的含量。结果显示, NE 在小脑含量较低, 在皮质和纹状体含量较高; DA 在小脑含量较低, 在海马、纹状体和延髓含量较高; 5-HT 含量均偏低, 其中在大脑皮层、纹状体和下丘脑含量较高, 在小脑和延髓含量较低; 3-MT 在小脑含量未测出, 其中纹状体含量相对较高; DOPAC 在小脑和海马的含量未测出, 其中纹状体含量相对较高; HVA 在小脑、海马和延髓的含量未测出, 其中纹状体含量相对较高; 5-HIAA 在小脑含量较低, 在下丘脑和纹状体含量较高。结果见表 3。

表 3 HPLC-FLD 测定 SD 大鼠不同脑区单胺神经递质含量($\bar{x}\pm s, n=5$)

神经递质种类	皮质	海马	纹状体	小脑	下丘脑	延髓
NE	11.14 $\pm$ 1.58	8.32 $\pm$ 1.72	15.34 $\pm$ 1.66	4.65 $\pm$ 1.28	7.58 $\pm$ 1.23	6.73 $\pm$ 3.27
DA	19.35 $\pm$ 2.21	28.14 $\pm$ 2.34	29.08 $\pm$ 2.56	1.35 $\pm$ 3.82	12.07 $\pm$ 1.21	25.50 $\pm$ 5.84
5-HT	1.13 $\pm$ 0.23	0.48 $\pm$ 0.11	0.86 $\pm$ 0.13	0.15 $\pm$ 0.13	1.09 $\pm$ 0.11	0.15 $\pm$ 0.06
3-MT	3.37 $\pm$ 0.36	3.48 $\pm$ 1.49	9.97 $\pm$ 1.12	—	4.36 $\pm$ 0.70	1.16 $\pm$ 0.46
DOPAC	37.66 $\pm$ 3.36	—	213.52 $\pm$ 23.29	—	26.38 $\pm$ 2.63	7.82 $\pm$ 1.28
HVA	44.90 $\pm$ 3.18	—	143.19 $\pm$ 14.28	—	27.80 $\pm$ 2.38	—
5-HIAA	59.58 $\pm$ 4.89	41.83 $\pm$ 3.73	78.25 $\pm$ 5.87	8.72 $\pm$ 1.36	96.96 $\pm$ 6.54	20.96 $\pm$ 3.19

4 讨论

林凌云等^[4]报道 HPLC-FLD 能同时测定 7 种单胺类神经递质及其相关物质,但只有 5 种与本研究相同。赵燕燕等^[6]和徐鹏等^[7]报道 HPLC-FLD 能同时测定 8 种单胺类神经递质,但测定的组分与常规 3 种单胺类神经递质相对应的代谢产物也不一致。进一步分析这些方法,发现这些方法对样品中生物杂质的洗脱不够彻底,容易有杂质带入下一次样品分析,从而影响结果。本实验建立了同时检测生物体内最常见的 7 种单胺类神经递质含量的 HPLC-FLD,使其在梯度洗脱条件下得到良好的分离,并且排除了内源性物质对下一个样品分析的干扰,为生物体内单胺类神经递质测定方法的选择提供了依据。该方法回收率高,检出限低,分离度好,结果准确、可靠,适用于生物体内 7 种单胺类神经递质含量的检测分析,可为疾病的诊断、药物治疗以及基础研究提供参考。

在神经活动中,最常见的单胺类神经递质主要是 NE、DA、5-HT,它们的相关主要代谢产物分别是 NE 代谢产物 3-MT,DA 代谢产物 DOPAC 和 HVA,5-HT 代谢产物 5-HIAA。这些神经递质和代谢产物量的变化可以评估这 3 类神经递质的代谢情况。单胺类神经递质及其相关代谢产物也可统称生物胺。本次研究中,分析了皮质、海马、纹状体、小脑、下丘脑和延髓中 7 种生物胺的含量,发现不同生物胺在脑的同一部位含量是不同的,并且同一生物胺在脑的不同部位含量也有很大差异,这些结果提示生物胺的变化和脑的不同功能相关,许多研究也证实了这个想法。有研究表明,大鼠大脑皮质中的 NE 与 5-HT 水平与递增负荷运动呈显著正相关^[8];癫痫患者脑病灶内 DA 含量较周围组织显著降低^[9]。Cheng 等^[10]研究表明,生物胺及其代谢产物与常见的抑郁症、精神分裂症、幼儿孤独症和帕金森病等神经精神疾病有关。Perry 等^[11]认为,单胺类神经递质及其相关代谢产物含量与人体健康密切相关,在中枢神经系统、外周植物神经系统和内分泌活动中起着极其重要的作用。因此,研究脑组织中生物胺的含量变化为了解脑的功能和神经精神系统疾患(如癫痫、帕金森综合征、脑损伤及抑郁等疾病)的发病机制以及相关药物的作用机制提供物质基础。

总之,本次实验建立了一个分离度高、稳定性好,可同时测定 7 种生物胺的方法,并用该方法检测了脑内 6 个部位的生物胺含量,证实了脑内生物胺分布的差异。本实验为中枢神经系统的研究提供了一种有效的研究工具,同时为脑内生物胺的分析提供了数据参考。

REFERENCES

- [1] CROW T J, CROSS A J, COOPER S J, et al. Neurotransmitter receptors and monoamine metabolites in the brains of patients with Alzheimer-type dementia and depression, and suicides [J]. *Neuropharmacology*, 1984, 23(12B): 1561-1569.
- [2] HUBBARD K E, WELLS A, OWENS T S, et al. Determination of dopamine, serotonin, and their metabolites in pediatric cerebrospinal fluid by isocratic high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection [J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24(6): 626-631.
- [3] HUANG X, LI S P, ZHANG Y, et al. Simultaneous determination of bioamine and amino acid neurochemicals in rat hippocampus and cerebral cortex by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem(分析化学)*, 2016, 44(11): 1652-1658.
- [4] LIN L Y, LI H, XU C T. Determination of monoamine transmitters and related compounds in rat brain tissues by HPLC with fluorometric detection [J]. *West Chin J Pharm Sci(华西药科学杂志)*, 2007, 22(5): 557-559.
- [5] HAI P. Effect of the Tibethn medicine Rannasangpei(RNSP) on monoamine neurotransmitter in brain injury rats [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药科学)*, 2002, 19(2): 91-92.
- [6] ZHAO Y Y, LIU L Y, HAN Y Y, et al. Simultaneous detection of 8 monoamine neurotransmitters in the different sections of mouse brains by high performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *Chin J Chromatogr(色谱)*, 2011, 29(2): 146-151.
- [7] XU P, BAI Y P, YANG H S, et al. A high-performance liquid chromatography with fluorescence detection method for the simultaneous quantitation of monoamine neurotransmitters and their metabolites in subregions of rat brain [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2015, 24(7): 458-466.
- [8] YANG P P. Dynamic changes of norepinephrine and 5-hydroxytryptamine in cerebral cortex neuron and cerebrospinal fluid of rats after movement with increasing loads [J]. *J Clin Rehabil Tiss Eng Res(中国组织工程研究与临床康复)*, 2011, 15(37): 6972-6976.
- [9] WU Y Y, JIANG Y L, SHAO X M, et al. Comparisons of 5-hydroxytryptamine expression at different levels of dorsal raphe nucleus in rats with pain-depression dyad [J]. *Acta Anatomica Sinica(解剖学报)*, 2015, 46(2): 170-174.
- [10] CHENG F C, KUO J S. High-performance liquid chromatographic analysis with electrochemical detection of biogenic amines using microbore columns [J]. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1995, 665(1): 1-13.
- [11] PERRY M, LI Q, KENNEDY R T. Review of recent advances in analytical techniques for the determination of neurotransmitters [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 653(1): 1-22.

收稿日期: 2018-04-28

(本文责编: 沈倩)