

# HPLC-FD 测定大鼠尿液中儿茶酚胺类化合物

夏国华<sup>1</sup>, 李子豪<sup>1</sup>, 陈晨<sup>2</sup>, 陈钧<sup>1</sup>, 杨欢<sup>1\*</sup>, 贾晓斌<sup>1,3\*</sup>

(1. 江苏大学药学院, 江苏镇江 212013; 2. 江苏大学京江学院, 江苏镇江 212013;  
3. 江苏省中医药研究院 国家中医药管理局中药口服制剂释药系统重点实验室, 南京 210028)

**[摘要]** 目的: 建立 HPLC-FD 测定大鼠尿液中儿茶酚胺类化合物(CAs)的含量, 为虚热证的药理学研究提供参考。方法: 采用酸性氧化铝吸附法制备大鼠尿样; 使用 HiQSil C<sub>18</sub> V 色谱柱, 流动相 0.02 mol·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 水溶液, 流速 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, 激发波长(E<sub>x</sub>)280 nm, 发射波长(E<sub>m</sub>)316 nm, 柱温 40 ℃。结果: 大鼠尿样供试液中的儿茶酚胺类化合物可以与各干扰组分达到基线分离; CAs 各组分线性、精密度和重复性良好; 该法制备的样品溶液在 16 h 内测定, RSD < 2%; CAs 的回收率在 65% ~ 71%, 试验中测得适应期后大鼠尿液中 CAs 含量稳定。结论: 该文采用的供试品溶液制备方法简便, 建立的色谱分析方法稳定、可靠, 适合于大鼠尿液中 CAs 的含量测定。

**[关键词]** 儿茶酚胺; 酸性氧化铝吸附法; 荧光高效液相色谱法

**[中图分类号]** R284.1; R946 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0125-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230125

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141027.1537.016.html>

**[网络出版时间]** 2014-10-27 15:37

## Determination of Catecholamines Excretion in Rats Urinary by HPLC-FD

XIA Guo-hua<sup>1</sup>, LI Zi-hao<sup>1</sup>, CHEN Chen<sup>2</sup>, CHEN Jun<sup>1</sup>, YANG Huan<sup>1\*</sup>, JIA Xiao-bin<sup>1,3\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. Jiangsu University Jingjiang College, Zhenjiang 212013, China;

3. Key Laboratory of Chinese Medicine Delivery System in State Administration of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

**[收稿日期]** 20140705(004)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81303174); 江苏省自然科学基金项目(BK2012290); 江苏省大学生创新创业训练计划项目(201413986009Y); 江苏大学学生科研立项项目(13A170)

**[第一作者]** 夏国华, 硕士, 实验师, 从事中药药效物质基础研究, Tel:0511-85038403, E-mail:xgh-78131@yeah.net

**[通讯作者]** \* 杨欢, 博士, 副教授, 从事中药药效物质基础研究, Tel:0511-85038451, E-mail:yanghuan1980@ujs.edu.cn;

\* 贾晓斌, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型开发研究, Tel:025-85608672, E-mail:jxiaobin2005@hotmail.com

[7] 廖沛球, 薛蓉, 吴亦洁, 等. 给药硝酸镉后大鼠尿液和血清的核磁共振代谢组学研究[J]. 分析化学, 2012, 40(9):1421.

[8] 尤蓉, 李冰, 徐振波, 等. 广东凉茶作用于大鼠的血清代谢组学研究[J]. 华南理工大学学报:自然科学版, 2012, 40(12):145.

[9] Peng Jiang, Weixing Dai, Shikai Yan, et al. Biomarkers in the early period of acute myocardial infarction in rat serum and effects of Shexiang Baixin Pill using a metabolomic method protective [J]. J Ethnopharmacol, 2011, (38):530.

[10] 喻喜华, 毕开顺, 李泽运, 等. UPLC 法同时测定山茱萸

萸生品与酒制品中 5 个组分的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(8):1463.

[11] 皮文霞, 蔡宝昌, 许惠琴, 等. 山茱萸环烯醚萜总苷对糖尿病血管并发症模型大鼠血清 SOD 的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(1):23.

[12] 汤久瑜. 丙酮酸补充对机体能量代谢的影响[D]. 武汉: 武汉体育学院, 2008.

[13] 朱惠莲, 许月初, 蒋卓勤, 等. 丙酮酸对肥胖大鼠体重和脂肪代谢的影响[J]. 营养学报, 2002, 24(3):229.

[责任编辑 聂淑琴]

**[ Abstract ] Objective:** To establish an HPLC-FD method for the determination of catecholamines excretion in rats urinary, and hence providing a reference for the pharmacological research of the hyperactivity of Yin deficiency and Huo exuberance. **Method:** Catecholamines was concentrated by acid alumina adsorption from rats urinary, followed by the analysis on a HiQ-Sil C<sub>18</sub>V column at 40 °C with the 0.02 mol·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> solution as mobile phases. FD excitation wavelength was set a 280 nm and emission wavelength was set a 316 nm, flow rate was 0.5 mL·min<sup>-1</sup> throughout the analysis. **Result:** Catecholamines could be satisfactorily separated from the interferential components in the sample. The linearity of the calibration curve, precision and repeatability was good with the average recovery reached 65% to 71%. In addition, the sample solution prepared was stable within 16 h (RSD < 2%). And, the catecholamines excretion in rats urinary after adjustment raise was stable. **Conclusion:** The method for sample solution preparation was convenient. Moreover, the HPLC-FD method developed in the study was stable and reliable, and hence can be used to determine the catecholamines excretion in rats urinary.

**[ Key words ]** catecholamines; acid alumina adsorption; HPLC-FD

儿茶酚胺类化合物(CAs)包括去甲肾上腺素(NE),肾上腺素(E)和多巴胺(DA),由肾上腺髓质嗜铬细胞和一些交感神经元分泌,是非常重要的神经递质和激素。虚热证为中医临床常见证,多年的临床观察和实验研究表明<sup>[1-2]</sup>,中医确诊为少阴病阴虚火旺证的患者,交感神经-肾上腺髓质功能活性处于亢盛状态,尿 CAs 排泄量均明显地高于正常人。因此,尿 CAs 作为虚热证辨识中最常用的检测指标之一<sup>[3-5]</sup>。

CAs 在尿液中含量极微,人体 NE, E 和 DA 排泄量的正常范围分别为 15~18, 0~20, 65~400 μg/24 h<sup>[6]</sup>,而且尿样中杂质干扰多,准确定量比较困难。目前 CAs 检测方法有荧光光度法、化学发光法、酶促放射法、化学修饰电极法、光谱电化学法、毛细管电泳法、传感器检测法、气相色谱法、色谱质谱联用法等<sup>[7-14]</sup>,但是存在专属性差、耗时长、检测成本高等缺点,不适合大批量的实验动物尿样检测,本实验建立 HPLC-FD 测定大鼠尿样中 CAs 的测定方法,为虚热证的药理学研究提供参考。

## 1 材料

**1.1 仪器** SK-1 型快速混匀器(江苏金坛医疗仪器厂),PHS-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂),AE240 型 1/10 万分析天平(美国, Mettler-Toledo),JASCO LC-1500 型高效液相色谱系统(配备 FP-1520 型荧光检测器、PU-1580 型高压泵、CO-1560 型柱温箱、LG-1580-04 型四通道梯度单元、LG-1580-54 型四通道在线脱气器,N2000 色谱工作站,日本分光工业株式会社)。

**1.2 试药** 重酒石酸去甲肾上腺素对照品(批号 0169-9402,中国食品药品检定研究院),肾上腺素重酒石酸盐(批号 073K2517),盐酸多巴胺对照品(批

号 033K2511),Sigma-Aldrich。

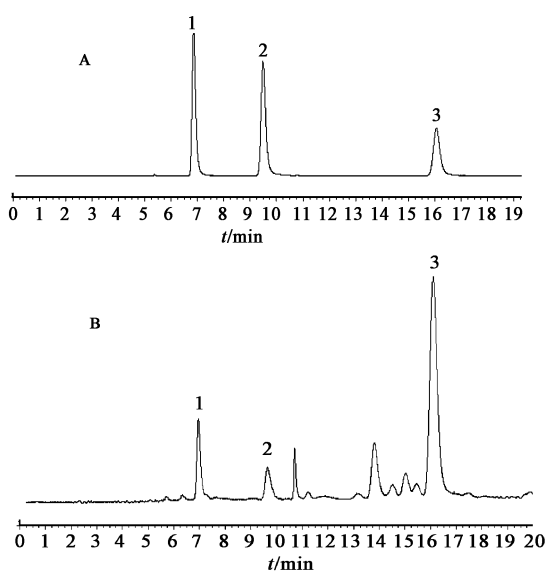
磷酸二氢钾、浓盐酸、醋酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、液体石蜡(分析纯),色谱用氧化铝(100~200 目),甲醇(色谱纯),以上均购自国药集团化学试剂有限公司;双蒸水为本实验室自制。

## 2 方法与结果

**2.1 氧化铝活化<sup>[15]</sup>** 市售氧化铝中因混有碳酸钠等成分而略带碱性,用盐酸处理氧化铝,可以中和氧化铝中含有的碱性杂质:称取色谱用氧化铝 100 g,倒入 1 000 mL 烧杯中,加入 2 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸 500 mL,90 °C 下加热搅拌 45 min,冷却至室温,倾出上清液;加入 2 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸 250 mL,70 °C 下加热搅拌 10 min,冷却后倾出上清液,重复操作 1 次;再次加入 2 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸 500 mL,50 °C 下加热搅拌 10 min,冷却后倾出上清液;用蒸馏水洗涤数次至 pH 3.4;将氧化铝转移到蒸发皿,120 °C 下烘烤 1 h,200 °C 下烘烤 2 h,冷却至室温后取出,放入干燥器贮存。

**2.2 大鼠尿样供试液的制备** 采用酸性氧化铝吸附法<sup>[16]</sup>。准确吸取大鼠尿液 2.0 mL,加入 2 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲溶液 800 μL 和酸性氧化铝 40 mg,涡旋 15 min,弃去上层混浊液;用 0.2 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲溶液 800 μL 涡旋洗涤沉淀 1 min,双蒸水 1 600 μL 涡旋洗涤 2 次;滴加 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸水溶液 200 μL,涡旋 5 min 洗脱吸附于氧化铝上的儿茶酚胺,4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,吸出上清液,0.22 μm 水膜滤过,得尿样供试液。

**2.3 色谱条件** HiQSil C<sub>18</sub>V 色谱柱,流动相 0.02 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾水溶液,柱温 40 °C,流速 0.5 mL·min<sup>-1</sup>,激发波长(E<sub>X</sub>)280 nm,发射波长(E<sub>M</sub>)316 nm,进样量 20 μL。对照品及供试品色谱见图 1。



A. 空白尿样中混合对照品; B. 大鼠尿样供试品;  
1. NE; 2. E; 3. DA

图1 大鼠尿样供试液 HPLC

**2.4 线性关系考察** 精密称取 NE 9.88 mg, E 9.71 mg, DA 5.70 mg, 用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸分别溶解后配制成 23.43, 23.30, 24.05  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的混合对照品溶液; 分别吸取 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15  $\mu\text{L}$  进样。以峰面积 ( $A$ ) 为纵坐标, 对照品进样量 ( $C$ ) 为横坐标, 绘制标准曲线。结果:  $A_{\text{NE}} = 16217C - 19711$  ( $r = 0.9996$ ), 线性范围为 7.90 ~ 118.54 ng;  $A_{\text{E}} = 16658C - 10844$  ( $r = 0.9991$ ), 线性范围为 7.77 ~ 116.50 ng;  $A_{\text{DA}} = 16430C - 2092$  ( $r = 0.9992$ ), 线性范围为 4.56 ~ 68.40 ng, 线性关系均良好。

**2.5 精密度试验** 吸取 2.2 项下所得供试液 20  $\mu\text{L}$ , 连续进样 6 次, 按照 2.3 项下色谱条件测定 NE, E, DA 的峰面积, 结果峰面积 RSD 分别为 1.8%, 1.7%, 1.9%, 表明仪器精密度良好。

**2.6 重复性试验** 取大鼠 24 h 尿液 6 份, 按 2.2 项下方法制备供试液, 按照 2.3 项下色谱条件测定 NE, E, DA 的峰面积, 结果含量的 RSD 分别为 3.9%,

4.6%, 4.3%, 表明方法重复性良好。

**2.7 稳定性试验** 按照 2.2 项下方法制备尿样供试液 1 份, 放置在温度为  $(20 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ , 有自然光照的房间。分别在 0, 4, 8, 12, 16, 24, 48 h, 按照 2.3 项下色谱条件测定 NE, E, DA 的峰面积。测试结果表明 16 h 内, 峰面积变化不大, RSD 均  $< 2\%$ , 尿样供试液室温下在 16 h 内测定是稳定的。

**2.8 回收率试验** 精密吸取 2 mL 大鼠 24 h 尿液 9 份, 分别精密加入 1, 2, 3  $\mu\text{L}$  2.4 项下所得混合对照品溶液, 涡旋混匀, 按 2.2 项下方法制备得到尿样供试液, 吸取 20  $\mu\text{L}$  进样分析, 并计算回收率, 见表 1。由表可知, 在低、中、高 3 个加样水平下, CAs 的回收率处于 65% ~ 71%。

表1 大鼠尿液中 3 种成分的加样回收率考察 ( $n = 3$ )

指标	空白量 /ng	加入量 /ng	实测量 /ng	R /%	平均值 /%	RSD /%
NE	15.42	7.90	20.64	66.1	66.4	5.0
		15.80	26.45	69.8		
		23.70	30.40	63.2		
E	8.46	7.77	13.45	64.2	65.0	5.1
		15.54	19.12	68.6		
		23.31	22.94	62.1		
DA	29.48	4.56	32.59	68.2	71.0	3.6
		9.12	36.16	73.2		
		13.68	39.29	71.7		

**2.9 样品测定** 将 36 只 SD 大鼠随机单独放入代谢笼, 自然光照, 温度  $(25 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ , 自由饮水、进食, 适应性饲养 5 d, 称重, 收集适应期第 3 天到第 5 天的 24 h 尿液 (事先在容器内加入 0.1 mL 浓盐酸和 1 滴液体石蜡), 计量大鼠的 24 h 尿液总量  $V$ , 按 2.2 项下方法制备供试液, 以 2.3 项下色谱条件测定 NE, E, DA 的含量, 见表 2。由表 2 可见, 大鼠适应性饲养 5 d 后, CAs 的排泄量趋于稳定, 可以用作指标检测物。

表2 大鼠在适应期的 CAs 排泄量 ( $\bar{x} \pm s, n = 36$ )

天数	体重/g	尿液量/mL	NE/ng·24 h <sup>-1</sup>	E/ng·24 h <sup>-1</sup>	DA/ng·24 h <sup>-1</sup>
3	206 ± 14	7.5 ± 3.4	95.80 ± 18.26	47.31 ± 10.14	365.63 ± 82.71
4	209 ± 16	9.9 ± 4.1	94.67 ± 19.11	45.73 ± 8.89	361.28 ± 86.40
5	215 ± 17	9.5 ± 4.6	94.22 ± 18.82	46.81 ± 8.95	364.48 ± 89.37

### 3 讨论

收集 24 h 大鼠尿液, 需要事先加入 0.1 mL 浓盐酸防止尿液腐败并与其中以游离状态存在的 CAs 结

合成盐以保持其稳定, 再加入 1 滴液体石蜡在尿液液面上形成薄膜以隔绝空气, 防止 CAs 被氧化破坏<sup>[17-18]</sup>; 酸性氧化铝在偏碱 (pH 8.2 ~ 8.6) 环境下更

易于吸附 CAs, 而 CAs 在该条件下则容易遭到破坏, 因此滴加 Tris-HCl 缓冲液后应迅速地加入氧化铝, 及时处理完尿液。

采用酸性氧化铝吸附法富集 CAs 加样回收率较低, 与文献报道一致<sup>[19]</sup>, 这与 CAs 不稳定及吸附不完全有关。由于该方法的样品预处理步骤简单, 处理后的供试液能较长时间地稳定, 方法重复性良好, 成本低廉, 因此比较适于对大量样品的分析。

阴虚内热证以阴液亏虚, 虚热内生为主。近年随着中医微观辨证学的迅猛发展, 一些学者采用先进的现代医学技术对虚热证的本质进行研究。对应中医虚热证舌象观察显示舌质偏红、舌面苍老, 舌苔上皮增殖加快, 代谢旺盛等临床诊断依据, 动物模型在神经内分泌方面表现出明显的改变, 其中 CAs 含量为普遍采用的虚热证辨识指标<sup>[6]</sup>。

### [参考文献]

[1] Nozaki O, Kawamoto H, Moriyama H. Total free catecholamines assay by identification of its two functional groups and micro-flow injection chemiluminescence [J]. *Luminescence*, 1999, 14(6):369.

[2] Zhao H, Zhang Y, Yuan Z. Electrochemical determination of dopamine using a poly(2-picolinic acid) modified glassy carbon electrode [J]. *Analyst*, 2001, 126(3):358.

[3] 叶南章, 赵伟康. 滋阴泻火药对促肾上腺皮质激素模型大鼠儿茶酚胺的影响[J]. *中西医结合杂志*, 1990(增刊):4.

[4] 施天华, 许宏, 任红, 等. 虚热证大鼠用滋阴及清热泻火药治疗后神经内分泌变化[J]. *中药药理与临床*, 1995, 11(6):19.

[5] 刘亚梅. 中医实热证、虚热证实验研究新探[J]. *中医药学报*, 2006, 34(2):58.

[6] 刘明杰, 朱业湘. 儿茶酚胺类神经递质检测技术及其研究进展[J]. *中国卫生检验杂志*, 2002, 12(4):501.

[7] 汤涛, 程永福, 徐卓华. 利用光谱差异的荧光法同步测定儿茶酚胺肾上腺素和去甲肾上腺素[J]. *安徽医学*, 1990, 11(5):9.

[8] 庞志功, 汪宝琪, 汪从莹, 等. 柱层析-化学发光法测定

兔血浆中儿茶酚胺类物质[J]. *分析科学学报*, 1994, 10(1):53.

[9] Nozaki O, Kawamoto H, Moriyama H. Total free catecholamines assay by identification of its two functional groups and micro-flow injection chemiluminescence [J]. *Luminescence*, 1999, 14(6):369.

[10] Zhao H, Zhang Y, Yuan Z. Electrochemical determination of dopamine using a poly(2-picolinic acid) modified glassy carbon electrode [J]. *Analyst*, 2001, 126(3):358.

[11] 朱英, 陈义. 径向电场调制毛细管电泳法用于神经递质分离[J]. *分析化学*, 2001, 29(6):661.

[12] Zhu Y X, Ran Y, Xu S Q, et al. Fiber-optic evanescent wave biosensor of catecholamine neurotransmitter [M]. Wuhan: International Conference on Sensor Telechnology (ISTC), 2001:137.

[13] Lindsay M Nelson, Fiona A Bubb, Pauline M Lax, et al. An improved method for the differential assay of 3-O-methylated catecholamines in human urine using ion-pair extraction and gas chromatography electron capture detection [J]. *Clinica Chimica Acta*, 1979, 92(2):235.

[14] Kuhlenbeck Debra L, O' Neill Timothy P, Mack Catherine E, et al. Determination of norepinephrine in small volume plasma samples by stable-isotope dilution gas chromatography - tandem mass spectrometry with negative ion chemical ionization [J]. *J Chromatography B*, 2000, 738(2):319.

[15] 廖瑛, 单济川, 余斌杰. HPLC-ECD 检测尿儿茶酚胺方法的优化[J]. *中山医科大学学报*, 1994, 15(3):227.

[16] Brandsteterova E, Kubalec P, Skacani I, et al. HPLC-ED determination of catecholamines and their metabolites in urine [J]. *Neoplasma*, 1994, 41(4):205.

[17] 高佩增. 正确尿液样本的采集和保存方法[J]. *中国误诊学杂志*, 2002, 2(1):138.

[18] Nalini K, Karanth K S, Rao A, et al. Effects of *Celastrus paniculatus* on passive avoidance performance and biogenic amine turnover in albino rats [J]. *J Ethno-Pharmacology*, 1995, 47(2):101.

[19] 董军, 陈文祥, 李健斋. 血浆儿茶酚胺的溶剂萃取与高效液相色谱分析法[J]. *中华医学检验杂志*, 1992, 15(6):336.

[责任编辑 顾雪竹]