

# 高效液相-电化学法测定大鼠血浆中单胺类神经递质及其代谢产物

崔翰明\*, 白 鸽, 黄世敬, 张春光, 张秋燕  
(中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

**[摘要]** **目的:**建立高效液相色谱-库仑阵列电化学法测定大鼠血浆中的单胺类神经递质及其代谢产物含量的分析方法。**方法:**采用 Agilent 公司的 1200 型高效液相色谱仪和 ESA 公司库仑 2 通道电化学检测器,以 3,4 二羟基苯胺(DHBA)为内标,测定大鼠血浆中的肾上腺素(E)、去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)、高香草酸(HVA)和 5-羟色胺(5-HT)的含量。色谱柱: Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),加 EasyGuard 预柱;流动相:含一水合柠檬酸 80 mmol · L<sup>-1</sup>,柠檬酸三钠 73.4 mmol · L<sup>-1</sup>,1-辛烷磺酸钠 0.12 mmol · L<sup>-1</sup>,乙二胺四乙酸二钠 0.1 mmol · L<sup>-1</sup>,18% 甲醇的混合溶液,pH4.3;流速:1.0 mL · min<sup>-1</sup>;柱温:25 °C;进样量:10 μL;测定电极电势: -150 mv 和 400 mv。**结果:**NE、E、DA、HVA 和 5-HT 的最低检测浓度分别为 2.0,3.0,5.4,5.2,11.1 ng · mL<sup>-1</sup>;平均回收率分别为 99.72%、85.33%、83.15%、120.43%、103.56%;日内(n=6)和日间(n=3)精密密度 RSD 小于 9.12%。**结论:**本方法操作简便、准确、快速、灵敏度高。可用于大鼠血浆中相关单胺类神经递质的检测和研究的。

**[关键词]** 单胺类神经递质;高效液相色谱;库仑阵列电化学检测器;儿茶酚胺

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)01-0053-04

## Measurement of Monoamines Neurotransmitter and Their Metabolites in Rat Plasma by HPLC with Coularray Detection

CUI Han-ming\*, BAI Ge, HUANG Shi-jing, ZHANG Chun-guang, ZHANG Qiu-yan  
(Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a measurement method for determining the levels of monoamines neurotransmitter and their metabolites in rat plasma by HPLC with Coularray Detector-2. **Methods:** The levels of NE, E, DA, HVA and 5-HT in rat plasma were determined by Agilent 1200 HPLC with ESA Coularray Detector-2. Mobile phase consisted of 80 mmol · L<sup>-1</sup> Citric acid monohydrate, 73.4 mmol · L<sup>-1</sup> Citric acid trisodium salt, 0.12 mmol · L<sup>-1</sup> 1-Octanesulfonic acid sodium salt, 0.1 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA-Na<sub>2</sub> and 18% methanol mixture solution (pH4.3). Flow rate was 1.0 mL · min<sup>-1</sup>. The Column was Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(4.6 mm × 150 mm, 5 μm) and Easyguard guard column at 25 °C. The voltage of electrode was -150 mv and 400 mv. **Results:** The minimum measurement limit of NE, E, DA, HVA and 5-HT were 2.0, 3.0, 5.4, 5.2 and 11.1 ng · mL<sup>-1</sup> respectively. The average recoveries were 99.72%, 85.33%, 83.15%, 120.43% and 103.56%, respectively. The RSD of intra-day (n=6) and inter-day (n=3) were less than 9.12%. **Conclusion:** The method was easy to operate, rapid, accuracy and high in sensitivity, and could be applied in quantitative determination and study of monoamines neurotransmitters and their metabolites in rat plasma.

**[收稿日期]** 2009-07-03

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30672696)

**[通讯作者]** \* 崔翰明, Tel: (010)88001470; E-mail: Cui-yaoshi@163.com

[Key words] monoamines neurotransmitter; HPLC; Coularray ECD; catecholamines

动物体内的单胺类神经递质及代谢产物主要有肾上腺素(E)、去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)、高香草酸(HVA)、香草扁桃酸(VMA)、5-羟色胺(5-HT)和5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)等,其中结构为儿茶酚胺类的有E、NE、DA、HVA和VMA,结构为吲哚胺的有5-HT、5-HIAA。准确测定血浆中这些物质的浓度变化对于相关疾病的诊断和转归变化有重要意义。目前测定单胺类神经递质的方法通常有HPLC-ECD法、荧光法、放免分析法等。由于单胺类神经递质及代谢产物在体内含量很少且易氧化还原,同时血液样本成分复杂,干扰较多,适合于采用具有良好分离能力和测定灵敏度的高效液相色谱-电化学检测法<sup>[1-2]</sup>。本文采用HPLC-ECD法,建立了同时测定大鼠血浆中5种单胺类神经递质及代谢产物的含量测定方法。本方法具有快速简便、灵敏、准确的特点。

## 1 材料和方法

**1.1 仪器** 美国Agilent公司的1200型高效液相色谱仪;ESA公司2通道库仑电化学检测器(Model 5300A Coularray Detector-2),电极:ESA Model 5011A高灵敏分析电极和5020保护电极;软件:Agilent公司Chem Station B.03.01 Version;CF15D2型低温高速离心机;MILLIPORE超纯水器;SY7200DH超声波发生器;FA2104电子分析天平等。

**1.2 试剂** E、NE、DA、HVA、VMA、5-HT、5-HIAA、DHBA、1-辛烷磺酸钠、一水合柠檬酸、柠檬酸三钠、乙二胺四乙酸二钠均为Sigma产品;甲醇为Merck公司产品;高氯酸及其他试剂均为国产AR级;实验用水为超纯水。

**1.3 色谱条件** 色谱柱:Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(4.6 mm×150 mm, 5 μm),预柱:EasyGuard保护柱(Dikma公司);流动相:含一水合柠檬酸80 mmol·L<sup>-1</sup>,柠檬酸三钠73.4 mmol·L<sup>-1</sup>,1-辛烷磺酸钠0.12 mmol·L<sup>-1</sup>,乙二胺四乙酸二钠0.1 mmol·L<sup>-1</sup>,含18%甲醇的混合溶液,pH4.3;流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>;柱温:25℃;进样器温度:4℃;进样量:10 μL;测定电极电势:-150 mv和400 mv。

## 1.4 标准液的配制

**1.4.1 标品母液的配制** 精密称取VMA、NE、E、DHBA、DA、HVA、5-HT的标准品各约1 mg,分别溶

于1 mL蒸馏水中,得浓度约为1 000 μg·mL<sup>-1</sup>的母液。-80℃避光保存。母液浓度分别为:VMA:1.20 mg·mL<sup>-1</sup>,DHBA:1.24 mg·mL<sup>-1</sup>,E:1.13 mg·mL<sup>-1</sup>,NE:1.09 mg·mL<sup>-1</sup>,5-HT:1.26 mg·mL<sup>-1</sup>,DA:1.04 mg·mL<sup>-1</sup>,HVA:1.34 mg·mL<sup>-1</sup>。

**1.4.2 标品储备液和混合标品储备液的配制** 取标品母液各10 μL,分别加入990 μL蒸馏水,即得浓度约为10 μg·mL<sup>-1</sup>的标品储备液。取标品母液各10 μL充分混合,加入930 μL蒸馏水混匀,即得浓度约为10 μg·mL<sup>-1</sup>的混合标品储备液。-20℃避光保存。两周内使用。

**1.4.3 标准品溶液的配制** 精密量取适量标品储备液,分别用流动相稀释,配制成浓度分别约为1,5,10,50,100,500 ng·mL<sup>-1</sup>的标准品溶液,置4℃避光保存。

**1.5 血浆样品的前处理:** 体重200~300 g雄性SD大鼠,采用玻璃毛细管自眼眶采血或自股动脉抽血,置于肝素抗凝的EP管中,迅速4℃条件下12 000×g低温离心15 min,吸取血浆-80℃冻存储备用。取冻存血浆,室温解冻,精密吸取100 μL,加6.2 ng·μL<sup>-1</sup>的DHBA内标液2 μL,再加0.1 M高氯酸100 μL,混匀,再加浓高氯酸8 μL,4℃条件下12 000×g低温离心10 min,上清液直接进样。

## 2 实验结果

**2.1 色谱行为** 在上述色谱条件下,标品和血浆中的各峰型对称,无内源性杂质干扰峰,各峰分离效果较好。整个色谱可在12 min完成,VMA、NE、E、DHBA、DA、HVA、5-HT保留时间分别见图1~2。

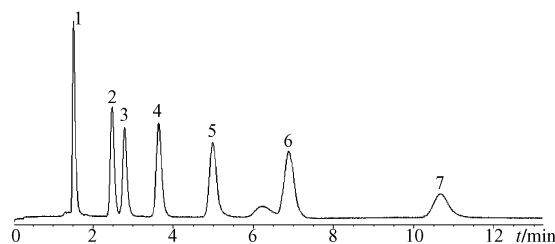


图1 混合标准品色谱图

(1-7 分别为 VMA、NE、E、DHBA、DA、HVA、5-HT)

**2.2 标准曲线** 由于血浆样本中均存在以上内源性生物胺,故无空白标本。本实验用NE、E、DHBA、DA、HVA、5-HT标准液稀释成500,100,50,10,5,1 ng·mL<sup>-1</sup>的6个不同浓度,依次测定后以对照品峰

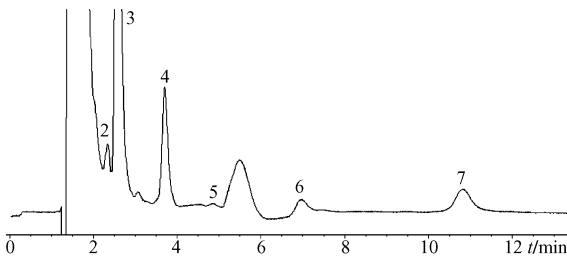


图 2 大鼠血浆样品中 NE、E、DHBA、DA、HVA、5-HT 色谱图

面积比内标峰面积,对浓度进行线性回归并计算相关系数  $r$ 。各回归方程分别为:NE:  $Y = 790.54X + 1.5969$ ,  $r = 0.9997$ ; E:  $Y = 712.89X + 0.8929$ ,  $r = 0.9999$ ; DA:  $Y = 1078.6X + 1.7465$ ,  $r = 0.9999$ ; HVA:  $Y = 1005.1X + 0.8325$ ,  $r = 0.9999$ ; 5-HT:  $Y = 586.46X + 1.1751$ ,  $r = 0.9999$ 。结果表明,NE、E、DA、HVA、5-HT 在  $1 \sim 500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的浓度范围内线性良好。

**2.3 血浆样品加样回收率** 取同 1 只大鼠血浆 7 份,其中 6 份血浆分别加入约  $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品标准液,分别按 1.5 血浆样品的前处理方法处理,按照 1.3 色谱条件测定,将加入标准液后测得的峰面积与内标峰面积的比值减去空白血浆样品测得的峰面积与内标的比值,根据标准曲线分别计算血浆中加入的 NE、E、DA、HVA 和 5-HT 的量,与实际加入量比较,计算各物质的回收率和 RSD(%),结果见表 1。

表 1 加样回收试验 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

被测物	样品含量 ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	测得量 ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	加样回 收率(%)	RSD (%)
NE	54.5	$54.35 \pm 0.25$	99.72	0.45
E	56.5	$48.21 \pm 0.52$	85.33	1.09
DA	52	$43.24 \pm 0.86$	83.15	1.99
HVA	67	$80.69 \pm 1.12$	120.43	1.39
5-HT	63	$65.24 \pm 0.32$	103.56	0.49

**2.4 精密度** 配制低、高两种不同浓度的混合标准液,NE、E、DHBA、DA、HVA、5-HT 为  $10、50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。分装后贮存于  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱内。日内连续测 6 次,计算日内精密度;每份样本连续测定 3 天,计算日间精密度。结果见表 2。

表 2 精密度 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$  或 3)

被测物	浓度 ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	日内精密度		日间精密度	
		回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)

NE	10.9	$10.69 \pm 0.25$	98.07	2.34	$10.53 \pm 0.32$	96.61	3.04
	54.5	$53.65 \pm 1.66$	98.44	3.09	$53.05 \pm 1.78$	98.88	3.36
E	11.3	$11.06 \pm 0.51$	97.88	4.61	$10.68 \pm 0.97$	94.51	9.08
	56.5	$54.53 \pm 2.23$	96.51	4.09	$52.22 \pm 3.18$	92.42	6.09
DA	10.4	$11.25 \pm 0.48$	108.17	4.27	$11.48 \pm 0.55$	110.38	4.79
	52	$54.48 \pm 2.68$	104.77	4.92	$54.52 \pm 2.86$	104.85	5.25
HVA	13.4	$13.71 \pm 1.25$	102.31	9.12	$13.77 \pm 0.98$	102.76	7.12
	67	$69.53 \pm 2.30$	103.78	3.31	$68.79 \pm 2.45$	102.67	3.56
5-HT	12.6	$11.29 \pm 0.91$	89.6	8.06	$11.21 \pm 0.97$	88.97	8.65
	63	$64.71 \pm 1.06$	102.71	1.64	$67.76 \pm 2.50$	107.56	3.69

**2.5 最低检测限和定量限** 本方法最低检测浓度 ( $S/N \geq 3$ ) 和最低定量限浓度 ( $S/N \geq 10$ ) 结果见表 3。

表 3 最低检测浓度 ( $S/N \geq 3$ ) 和最低定量限浓度 ( $S/N \geq 10$ )

被检测物质	最低检测浓度( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	最低定量浓度( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
NE	2.0	6.9
E	3.0	10.4
DA	5.4	9.5
HVA	5.2	15.2
5-HT	11.1	32.0

### 3 讨论

本实验所用库仑阵列电化学检测器,具有穿透型多孔石墨电极,电极的理论效率可达 100%,远高于安培检测器。因其电极穿透式设计,其所得信号与流速无关,通过使用多道电势可提高测定选择性和灵敏度。经伏安曲线测定,所有被测的儿茶酚胺及吲哚胺类化合物在  $-150 \text{ mV}$  电势电极下均能被还原;同时在  $400 \text{ mV}$  的电势下均可以出峰,且峰面积较大,峰形较好,因此本实验采用  $400 \text{ mV}$  的电势电极氧化,因此将测定电极的电势定为  $-150 \text{ mV}$  和  $400 \text{ mV}$ 。

实验中分别详细考察了流动相中有机相的比例 ( $10\% \sim 12\%$  乙腈或  $15\% \sim 18\%$  甲醇) 和水相中柠檬酸和柠檬酸三钠的量,发现选择含  $18\%$  甲醇,  $80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  一水合柠檬酸和  $73.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  柠檬酸三钠,  $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  辛酸磺酸钠的流动相可将上述 6 种物质有效分离;考察离子对试剂发现 1-辛酸磺酸钠优于 1-庚烷磺酸钠和十二烷基磺酸钠,而  $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的浓度较好。

E、NE、DA 和 5-HT 属碱性化合物,而 HAV、VMA 和 5-HIAA 为酸性化合物,在不同流动相 pH 值下,出峰时间和顺序会发生很大变化,过高或过低的

pH 值都不利于分离检测,因此选择适宜的 pH 值十分重要。经优选后,本方法流动相 pH 值 4.3,可得到较好的分离检测结果。

E 和 NE、DA、5-HT 经单胺氧化酶途径分别代谢为 VMA、HVA 和 5-HIAA。试验中原本计划同时测定 VMA 和 5-HIAA,但因 VMA 出峰较早,与其他杂质峰互相干扰,而 5-HIAA 与 DA 峰互相干扰,经多次调节流动相和电极电势,均无法有效测定 VMA 和 5-HIAA。但实验中发现,如采用 4 通道以上设备,可通过调节电极电势,将上述 7 种单胺类神经递质一次测定。

试验中发现 DA 峰附近总有未知峰出现,而且保留时间不固定,每次新配流动相或流动相放置较长时间后,其保留时间均会有些偏差,在 4.5 ~ 6.0 min 之间。经更换辛酸磺酸钠,钝化仪器,调节水醇比例,进样纯溶剂等,该峰一直存在,目前无法消除,该峰偶尔会干扰多巴胺的定量,需注意。

生物胺及其代谢产物很容易氧化,在操作过程中应尽量避光,在冰盐浴中低温下操作。样品经预处理后应分装立即检测或保存在 -80 ℃ 冰箱中待测。测试样品应在 4 ℃ 以下(可调节进样器控温模

块至 4 ℃)及时测定。血浆样品处理后对色谱峰的影响主要是蛋白质,本实验采用高氯酸沉淀蛋白,可较好消除蛋白干扰。

本方法与 ESA 推荐方法和文献方法<sup>[3-4]</sup>比较,样品预处理方法更简单,可以免除样品的浓缩富集和固相萃取等复杂过程;其测定灵敏度也基本达到高效液相电化学分析法检测单胺类神经递质所达到的最低检测限。

### [参考文献]

- [1] 顾群,石先哲,许国旺. 生物样品中儿茶酚胺类物质分析方法的研究进展[J]. 色谱, 2007, 25(4): 457-462.
- [2] 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): 501-503.
- [3] 吴燕川,冯秀丽,何士大,等. 样品固相萃取及高效液相色谱法测定血浆中去甲肾上腺素[J]. 首都医科大学学报, 2005, 26(6): 760-761.
- [4] 刘文第,齐伟,祁元明,等. 高效液相色谱法同时测定血浆中组织胺和去甲肾上腺素[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 1999, 35(2): 111-114.