

以D-樟脑- β -磺酸为离子对试剂反相高效液相色谱测定大鼠脑组织中生物胺及其代谢产物

徐修容、唐琴梅、姚一禾 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

摘要 本文报道以 D-樟脑- β -磺酸为离子对试剂用高效液相色谱-电化学检测测定大鼠脑纹状体, 海马, 下丘脑中儿茶酚胺, 5-羟色胺及其代谢产物。分析柱为 μ -Bondapak C₁₈, 洗脱液为氯乙酸-氢氧化钠缓冲液与甲醇混合液, 电化学检测电压为 0.7 V。样品浓度在 0.1-40 ng 之间生物胺及代谢产物浓度同峰高之间有良好线性关系, 最低检测量为 0.1 ng。

关键词 生物胺; 高压液相色谱法; 儿茶酚胺; 血清素; D-樟脑- β -磺酸

高效液相色谱与电化学检测联用测定生物胺具有灵敏度、专一性高的特点, 广泛用于组织, 体液中生物胺及其代谢产物的测定, 其中极性大的成分如去甲肾上腺素保留时间短, 与生物样本中非保留物质一起洗脱。影响测定结果, 在洗脱液中加入离子对试剂可改善分离效果, 常用的离子对试剂为烷基磺酸钠。作者以 D-樟脑- β -磺酸(CSA)为离子对试剂分离了儿茶酚胺(CA)、5-羟色胺(5-HT)及其代谢物(未发表资料), 证明其效果不亚于进口的烷基磺酸钠, 而其价格不到进口试剂的百分之一。本文报道用该试剂测定大鼠脑组织中 CA, 5-HT 及其代谢物。

材料和方 法

仪器 Waters M 6000 A 泵及 M 660 梯度控制器, U6K 进样阀, LC-4 B/17 型电化学检测器(Bioanalytical System Inc), XWT-164 台式自动平衡记录仪(上海自动化仪表二厂)。

试剂 高香草酸(HVA, E Merck), 3-甲氧-4-羟基扁桃酸(VMA, Carl Roth); 多巴胺

(DA), 去甲肾上腺素(NA), 3,4-二羟基苯乙酸(DOPAC), 5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA), 5-HT, 3-甲氧-4-羟基苯乙二醇(MHPG)为 Fluka 产品; 3,4-二羟基苯胺(DHBA, Sigma)。乙二胺四乙酸二钠(EDTA), CSA 及其它试剂均为国产 AR 或 CP 级试剂; 水为超纯水(上海测试技术所)。

色谱条件 色谱柱为 μ -Bondapak C₁₈, 30×0.5 cm ID, 颗粒度 10 μ m, 另加保护柱 5×0.5 cm ID, 填料 RP-18, 10 μ m, 洗脱液为 0.15 mol/L 氯乙酸-氢氧化钠缓冲液(含有 EDTA 0.83 mmol/L 和 CSA 9 mmol/L, pH 4.2)与甲醇的混合液(94:6), 使用前以 0.22 μ m 滤膜过滤并脱气, 起始流量为 1.5 ml/min 于 15 min 瞬间升至 2.0 ml/min, 电化学检测工作电压 0.7 V, 检测灵敏度为 5 nA。

标准液配制 NA, DA 和 DHBA 分别溶于 0.1 N HCl; VMA, DOPAC, MHPG, 5-HIAA, 5-HT 和 HVA 分别溶于超纯水, 浓度均为 1.0 mg/ml, 作为贮存液 I, 存放于 0℃, 每月配制一次, 上述溶液稀释 10 倍为贮存液 II, 每周配一次, 贮存液 II 稀释 100 倍为标准液, 每日配一次, 浓度为 1.0 ng/ μ l, 进样量为 4 μ l。

生物样本制备 ♂ 大鼠体重 200±SD 18 g, 断头后迅速取脑, 按 Glowinsky 法⁽¹⁾取出海马, 下丘脑和纹状体, 用干冰固化后称重, 重量分别为 68±14, 39±8 和 73±9 mg, 分别放入塑料管中, 每管加入 1.0 ml 冰冷的 HClO₄ 0.05 mol/L, 在冰冷却下以内切式组织匀浆器匀浆 1 min, 然后于 4℃ 以下 15 000×g 离心 30 min, 取出上清液贮存于 -60℃ 待用。

纹状体提取液进样 10 μ l, 海马 80 μ l, 下丘脑 50-70 μ l.

结果和讨论

实验条件的优化 我们曾以含有 CSA 9 mmol/L 的氯乙酸-氢氧化钠缓冲液与甲醇的混合液(90:10)为洗脱液分离了 8 种标样(未发表资料), 本实验中又加入了 VMA, 为改善分离效果, 降低了甲醇含量, 以 6% 甲醇与缓冲

液的混合液为洗脱液, 流量 1.5 ml/min, 可使 9 种标样得到良好分离, VMA 和 NA 的保留时间分别为 3 和 5 min, 最后洗脱的 5-HT 的保留时间为 37 min, 改用流量梯度, 于 DA 出峰后 15 min 时流量瞬间增为 2.0 ml/min, 5-HT 的保留时间提前到 32 min(图 1), 生物样本分离效果也较好(图 2), 9 种样品浓度在 0.1-40 ng 之间同峰高有良好的线性关系, 相关系数为

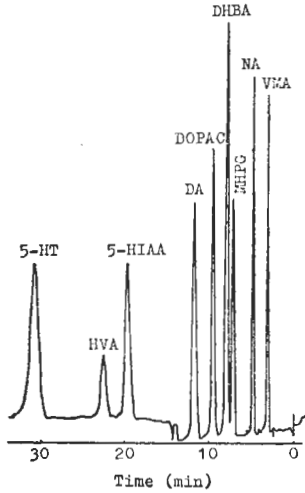


Fig 1. Chromatogram of a standard solution containing 9 biological amines and their metabolites, 4 ng in 4 μ l.

Tab 1. Reproducibility of peak height, each component 4 ng in 4 μ l standard solution, n=5. Peak height(mm).

	$\bar{x} \pm SD$	CV(%)
VMA	174.6 \pm 2.5	1.4
NA	183.4 \pm 3.7	2.0
MHPG	111.3 \pm 6.9	6.2
DOPAC	148.2 \pm 2.0	1.3
DA	119.6 \pm 4.2	3.5
5-HIAA	81.8 \pm 3.9	4.8
5-HT	81.1 \pm 0.7	0.9
HVA	34.3 \pm 2.0	5.8

VMA vanillylmandelic acid; NA noradrenaline; MHPG 3-methoxy-4-hydroxyphenyl glycol; DOPAC 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid; DA dopamine; 5-HIAA 5-hydroxyindole-3-acetic acid; 5-HT 5-hydroxytryptamine; HVA homovanillic acid; CV coefficient of variation.

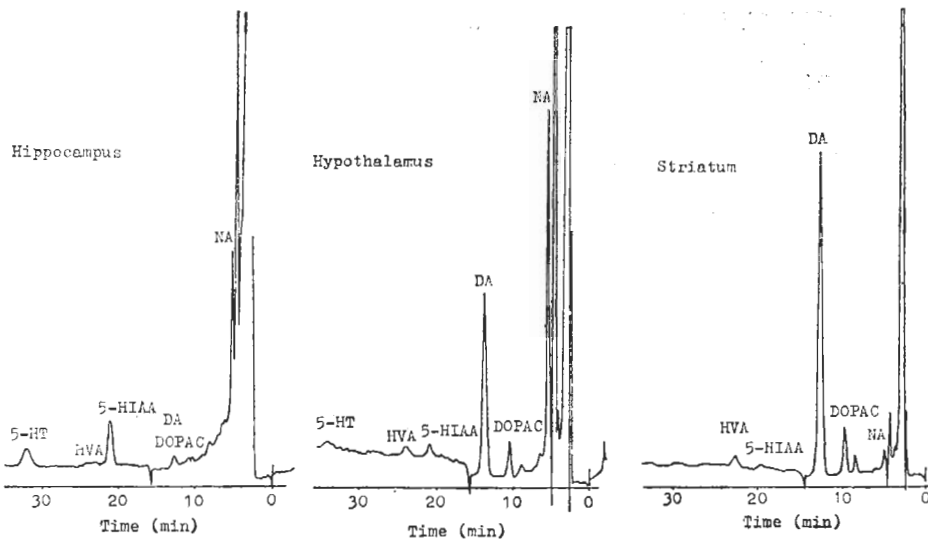


Fig 2. Chromatogram of extracts from rat brain. Samples injected, 80 μ l for hippocampus, 70 μ l for hypothalamus and 10 μ l for corpus striatum.

0.993-0.999, 检测极限为 0.1 ng。并计算了标样 5 d 的峰高变异系数(表 2)。标准差和变异系数均较小,说明方法的重现性较好。

生物样本处理多采用高氯酸沉淀蛋白,经离心后,上清液直接进行色谱分析,此法提取完全,简便,为防止生物胺氧化,可在高氯酸溶液中加入半胱氨酸或偏重亚硫酸钠等,但加入抗氧化剂后,色谱分析时往往出现较大的非保留物质峰,影响保留时间短的成分的测定。近来报道⁽²⁾处理生物样本可不加抗氧化剂,匀浆经离心后上清液置于-70℃贮存备用,我们将不含抗氧化剂和加抗氧化剂的高氯酸



Fig 3. Chromatograms of HClO_4 0.05 mol/L, containing 0.1% EDTA (A), and 0.1% EDTA + 0.1% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (B). Column, LiChrosorb RP-18, $5\mu\text{m}$ (15×0.5 cm, ID); mobile phase, KH_2PO_4 0.1 mol/L, EDTA 0.1 mmol/L, CSA 9 mmol/L (pH 3.5) and 6% CH_3OH .

0.05 mol/L 溶液的色谱图作了比较(图 3),不加抗氧化剂溶液的非保留物质峰明显减小,有利于保留时间短的成分如 NA, VMA 等的测定。实验结果也表明高氯酸提取液于-60℃贮存 1 wk 样本中各种成分变化不大,但冻融两次多种成分的含量有所下降(表 2)。

Tab 2. Influences of repeated freezings and thaws on the levels of biogenic amines and their metabolites in extracts of rat brains (ng/injection)

	Time	NA	DOPAC	DA	5-HIAA	5-HT	HVA
Hypo-thalamus	1 st	4.9	0.2	0.9	0.3	0.2	
	2 nd	4.2	0.2	0.8	0.3	0.1	
Hippo-campus	1 st	0.5	0.2	0.3	0.5	0.3	
	2 nd		0.1	0.2	0.2	0.2	
Striatum	1 st	0.2	0.8	7.3			1.4
	2 nd	0.1	0.7	6.2			1.1

大鼠纹状体下丘脑和海马中生物胺及代谢物的测定 两组共 10 只大鼠脑样本测定结果(表 3)表明两组之间多数成分测定的含量相近,几种主要成分如纹状体中的 DA, DOPAC 和下丘脑中的 NA 含量,我们测定的结果和文献报道的结果极为相近(表 4),表明此法效果良好。实验中也发现两组脑组织提取液中有些成分的含量在组与组之间或个体之间差别较大,如第一组中 5 个大鼠的纹状体中 4 个含有 5-HT,含量在 200-400 ng/g 组织之间,但第二组 4 个大鼠的纹状体中皆未测到 5-HT。又如下丘脑中的 DA 和 5-HT,海马中的 DA 和

Tab 3. Regional levels (ng/g tissue) of biogenic amines and their metabolites. $n=5$, except those indicated in parentheses. $\bar{x} \pm \text{SD}$

Group	NA	DOPAC	DA	5-HIAA	5-HT	HVA	
Hypothalamus	I	1566 ± 141	154 ± 106	510 ± 395	133 ± 54	81 ± 21	
	II	1927 ± 628	172 ± 78	1022 ± 739	224 ± 93	206 ± 83	
Hippocampus	I	243 ± 89	31 ± 16	50 ± 18	182 ± 38	89 ± 10	
	II	396 ± 165	31 ± 10	106 ± 94	79 ± 21	61 ± 15(3)	
Striatum	I	484 ± 316	1053 ± 223	9382 ± 1677		253 ± 110(4)	1459 ± 363
	II	535 ± 252	823 ± 195	7217 ± 1140			974 ± 184

Tab 4. Comparisons of the levels(ng/g tissue) of NA, DA and DOPAC obtained from various laboratories, $\bar{x} \pm SD$

NA (Hypothalamus)	DA (Striatum)	DOPAC (Striatum)	Ref
1414 ± 185 (n = 3)	7342 ± 618 (n = 3)	1313 ± 227 (n = 3)	(3)
1528 (n = 3)	10620 (n = 3)	1288 (n = 3)	(4)
1170 ± 171 (n = 6)	8300 ± 1260 (n = 9)	840 ± 210 (n = 9)	(5)
1586 ± 141 (n = 5)	9382 ± 1677 (n = 5)	1053 ± 223 (n = 5)	This work
1927 ± 628 (n = 5)	7217 ± 1140 (n = 5)	823 ± 195 (n = 5)	

5-HIAA 等的含量, 两组之间的差别在一倍以上。第一组大鼠在制备脑组织样本时外界温度为 29°C, 第二组为 18°C, 温度相差 11°C, 环境温度不同可能影响大鼠脑组织中生物胺及其代谢物的水平。此外大鼠个体之间的差异使得同一实验组内相同组织中约有一半的成分之间含量可相差 1 至数倍, 如海马中 DA 的含量最少为 53.2 ng/g 组织, 最多可达 302.5 ng/g 组织。相差 4.7 倍。文献报道不同作者即使使用相同方法测定的结果并不完全一致, 某些成分的含量也可相差 1 至数倍, SD 也较大。

参 考 文 献

- 1 Glowinsky J, Iversen LL. Regional studies of catecholamines in the rat brain-I. The disposition of [³H]norepinephrine, [³H]dopamine and [³H]dopa in various regions of the brain. *J Neurochem* 1966; 13 : 655
- 2 Mayer GS, Shoup RE. Simultaneous multiple electrode liquid chromatographic-electrochemi-

- cal assay for catecholamines, indoleamines and metabolites in brain tissue. *J Chromatogr* 1983; 255 : 533
- 3 Wagner J, Vitali P, Palfreyman MG, Zraika M, Hout S. Simultaneous determination of 3, 4-dihydroxyphenylalanine, 5-hydroxytryptophan, dopamine, 4-hydroxy-3-methoxyphenylalanine, norepinephrine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid, serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in rat cerebrospinal fluid and brain by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Neurochem* 1982; 38 : 1241
 - 4 Joseph MH. Alkyl boronates as catechol-specific mobile phase pairing agents. Application to high performance liquid chromatographic analysis of amines, precursors and metabolites in brain tissue. *J Chromatogr* 1985; 342 : 370
 - 5 Westerink BH, Korf J. Rapid concurrent auto-mated fluorimetric assay of noradrenaline, dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid and 3-methoxytyramine in milligram amounts of nervous tissue after isolation on Sephadex G₁₀. *J Neurochem* 1977; 29 : 697

Acta Pharmacologica Sinica 1987 Mar, 8 (2) : 113-117

D-Camphor-β-sulfonic acid as an ion-pair reagent for determination of biogenic amine and their metabolites in rat brain by reverse phase high performance liquid chromatography

XU Xiu-Rong, TANG Qin-Mei, YAO Yi-He

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT D-Camphor-β-sulfonic acid has been proved by us to be a new ion-pair

reagent for the determination of catecholamines. Catecholamines, 5-hydroxytrypt-

amine and their metabolites in hypothalamus, hippocampus and corpus striatum of rat were determined by ion-pair reversed phase HPLC with electrochemical detection. The separation of biological amines and their metabolites was performed on a μ -Bondapak C₁₈ column with an eluting system containing chloroacetic acid-NaOH buffer and methanol as the organic modifier. A good linear relationship was found between

the concentrations and peak heights of the biogenic amines and their metabolites from 0.1 - 40 ng. The correlation coefficients ranged from 0.993 to 0.999. The detection limit was 100 pg.

KEY WORDS amines; high pressure liquid chromatography; catecholamines; serotonin; D-camphor- β -sulfonic acid

* * * * *