

微透析取样和微柱液相色谱电化学检测法 测定大鼠脑纹状体中的5-羟色胺

谢福明, 黄铁华, 彼得·基辛格

(Bioanalytical Systems, Inc., 2701 Kent Avenue, West Lafayette IN 47906, USA)

R 965.2

Microdialysis sampling and microbore liquid chromatography with electrochemical detection for determination of serotonin in rat brain striatum

XIE Fu-Ming, HUANG Tie-Hua,

Peter T KISSINGER

(Bioanalytical Systems, Inc., 2701 Kent Avenue, West Lafayette IN 47906, USA)

AIM: To develop a sensitive method for determination of serotonin in biological samples. **METHODS:** A combination of microdialysis sampling and microbore liquid chromatography with electrochemical detection (LCEC) was established. **RESULTS:** Changes of serotonin in fg or pg in microdialysates from brain striatum of the free moving rat were easily determined. **CONCLUSION:** This developed method was useful for living animal research. Serotonin level in corpus striatum healthy rats was quite stable.

KEY WORDS serotonin; microdialysis; liquid chromatography; electrochemistry; corpus striatum

目的: 建立一个测定生物样本中5-羟色胺的灵敏方法。 **方法:** 将微透析取样和微柱液相色谱电化学检测(LCEC)有机结合, 建立灵敏的分析方法。 **结果:** 很容易地测定了自由活动大鼠脑纹状体透析液中 fg-pg 的5-羟色胺变化。 **结论:** 本法对生物活体研究很有用。 健

康大鼠脑纹状体内 5-羟色胺水平是相当稳定的。

关键词 5-羟色胺; 微透析; 液相色谱; 电化学; 纹状体

5-羟色胺(serotonin, 5-HT)脑内浓度的变化与主观精神变化密切相关因此监测脑内5-HT的浓度有助于神经科学的研究及疾病的诊疗^[1-3]。通常测定动物脑内5-HT的浓度变化, 必须在设定的时间不断将动物处死, 取其脑组织进行匀浆, 然后测定。这不仅要处死大量的动物, 而且因为5-HT极易氧化分解, 在繁琐的提取纯化过程中, 很多人为的因素和产物被带进分析样品, 影响了分析结果的准确性和可靠性。由于动物已被处死, 无法在同一动物身上进行任何重复确证。随着新型微透析泵和微透析膜的研究开发, 微透析取样法迅速发展并被应用于活动物的体内取样, 取得了很好的效果^[4]。本文用此法从自由活动的大鼠脑纹状体中取样, 结合微柱液相色谱电化学检测(LCEC)测定其脑内5-HT的动态变化, 以期对5-HT的研究提供简便有效的手段和准确可靠的数据。

MATERIALS AND METHODS

药品 5-HT由 Research Biochemicals International (MA, USA)提供, 其他药品和试剂均为AR。

仪器 BAS480或BAS200A液相色谱电化学检测系统(Bioanalytical Systems, Inc., BAS, IN, USA)配有PM-80泵; SepStik微柱 ODS, 3 μm , 100 mm \times 1 mm ID 或 UniJet毛细管柱 ODS, 3 μm , 150 mm

· 0.32 mm ID; 用于内径1 mm 微柱分析系统的 Rheodyne 9125 micro-injector 或用于内径0.32 mm 的毛细管柱分析系统的 Rheodyne 7520 micro-injector 以及 LC-4C 控制的 UniJet 电化学检测器 (玻碳电极, 3 mm, BAS, IN, USA).

微透析取样 Wistar 大白鼠, 重 250 ± 10 g, 由 BAS 动物室提供. 每12 h 光亮/黑暗交替, 自由取食和水的实验条件下, 饲养24 h 以上. 经腹腔注射 1 mL kg^{-1} 的 $10:1$ (vol/vol) 的 ketamine-xylazine (100 mg mL^{-1} 的混合物进行麻醉后, 通过外科手术将微透析探针植入大鼠脑纹状体. 微透析探针为 CMA 12 (4 mm, BAS/CMA), 灌注速度为 $2 \mu\text{L min}^{-1}$. 自动集样器将每 $100 \mu\text{L}$ 微透析样品收集在含 $10 \mu\text{L}$ 浓度为 0.1 mol L^{-1} 的高氯酸的收集管中, 自动集样器配有冷冻装置, 因此样品一经收集就被保持在 $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下备分析.

液相色谱电化学检测法 内径1 mm 的微柱和内径0.32 mm 的毛细管柱分别直接连接于 microinjector, 将它们的末端出口直接与 UniJet 电化学检测池相连接. 内径1 mm 微柱 LCEC 分析系统的样品进样量为 $5 \mu\text{L}$, 分别使用两种流动相进行分析. 一种是缓冲液 (二氢磷酸钠 25 mmol L^{-1} , 柠檬酸钠 50 mmol L^{-1} , 依地酸(edetic acid) 二钠盐 $27 \mu\text{mol L}^{-1}$, 盐酸二甲胺 10 mmol L^{-1} , 氯化钠 10 mmol L^{-1} 和 (-) 碳磺酸钠 2 mmol L^{-1} 用 85 % 磷酸调节缓冲液的 pH 值为 3.2) 和乙腈比率为 $1000:175$ (vol/vol) 的混合液; 另一种是缓冲液 (一氯乙酸 0.1 mol L^{-1} , 依地酸二钠盐 0.5 mmol L^{-1} , 辛磺酸钠 $650 \mu\text{mol L}^{-1}$ 和氯化钠 10 mmol L^{-1} , 用 85 % 磷酸调节缓冲液的 pH 值为 3.1) 和乙腈比率为 $10:1$ (vol/vol) 的混合液; 流速为 $100 \mu\text{L min}^{-1}$. UniJet 电化学检测器的检测电位为 $+0.55 \text{ V vs Ag/AgCl}$. 内径 0.32 mm 毛细管柱 LCEC 分析系统的样品进样量为 $0.5 \mu\text{L}$, 亦分别用两种流动相进行分析, 一种是缓冲液 (依地酸二钠盐 $540 \mu\text{mol L}^{-1}$, 氯化钠 10 mmol L^{-1} , 乙酸钠 90 mmol L^{-1} 和辛磺酸钠 1 mmol L^{-1} , 用乙酸调节缓冲液 pH 值为 5.0) 和乙腈比率为 $9:1$ (vol/vol) 的混合液; 另一种是缓冲液 (依地酸二钠盐 $540 \mu\text{mol L}^{-1}$, 氯化钠 10 mmol L^{-1} , 和乙酸钠 0.2 mol L^{-1} , 用乙酸调节缓冲液的 pH 值为 5.0) 和乙腈比率为 $98:2$ (vol/vol) 的混合液; 流速为 $9 \mu\text{L min}^{-1}$. UniJet 电化学检测器的检测电位亦为 $+0.55 \text{ V vs Ag/AgCl}$.

RESULTS

微透析取样 将微透析探针植入大鼠脑纹状体后, 立即进行灌注微透析取样. LCEC 检测的结果表明, 5-HT 的浓度剧烈不规则地变化 (数据未列出). 为此我们设定植入位透析探针24小时后, 待大鼠恢复正常活动, 再开始灌注进行微透析取样. 微透析液未作任何提取纯化的前处理, 直接进行 LCEC 分析, 既无任何内源性杂质影响 5-HT 的基线分离, 也无任何干扰峰影响 5-HT 的测定 (Fig 1 和 Fig 2).

液相色谱电化学检测法 在充分考察流动相中的缓冲液的种类, 组成, pH, 离子对的种类和浓度以及有机溶剂的种类和含量等因素对 5-HT 的分离的影响的基础上, 各种流动相分别被选用于内径1 mm 微柱 LCEC 分析系统和内径0.32 mm 毛细管柱 LCEC 分析系统, 两个系统都在5分钟以内基线分离了 5-HT 标准品和纹状体内透析液样品 (Fig 2 和 Fig 3).

基于对 5-HT 的循环伏安图和动态伏安图的研究, $+0.55 \text{ V vs Ag/AgCl}$ 被选作为 UniJet 电化学检测法的检测电位, 获得了高度的检测灵敏度, 内径0.32 mm 毛细管柱 LCEC 分析系统的检测限度是 50 fg , 而内径 1 mm 微柱 LCEC 分析系统的检测限度是 250 fg (Fig 2 和 Fig 3). 当两种流动相分别用于同一大鼠脑纹状体透析液样品的分析时, 使用标准品的 5-HT 作对照, 进一步确证了微透析样品中的 5-HT. 内径1 mm 微柱 LCEC 分析系统测定 5-HT 的电流响应与浓度之间关系的标准曲线表明, 5-HT 在 $0.5-10 \text{ pg}$ 间浓度与电流响应呈线性关系, 线性系数为 0.9999 (Fig 3).

大白鼠脑纹状体内 5-HT 的浓度变化 从内径1 mm 微柱 LCEC 分析系统测定所得到的大鼠脑纹状体内 5-HT 的浓度在微透析液中的含量一直界于 $0.8 \text{ fmol L}^{-1}-2.8 \text{ fmol L}^{-1}$ 之

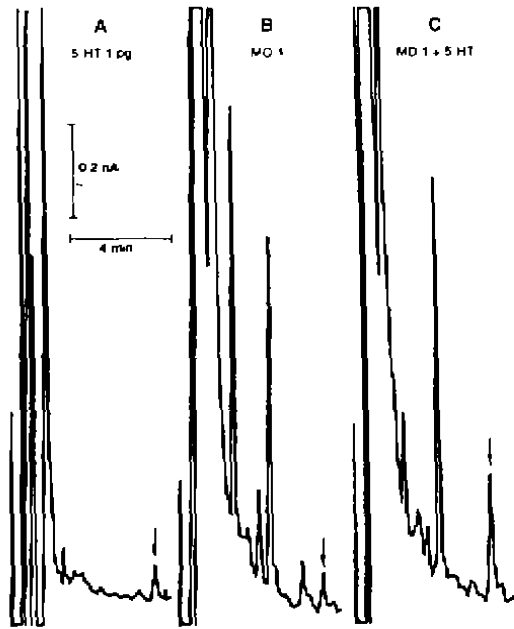


Fig 1. Chromatograms of serotonin standard (1 pg) (A), microdialysate from rat striatum (B), and a mixture of A and B (C) using LCEC system with 1 mm ID microbore column. Microdialysis probe, CMA/12, 4 mm member probe; perfusion, Ringer's solution at flow rate $2 \mu\text{L min}^{-1}$, each $5 \mu\text{L}$ of microdialysate was injected; column, SepStik, $100 \text{ mm} \times 1 \text{ mm ID}$ (ODS, $3 \mu\text{m}$ particle); mobile phase, buffer (NaH_2PO_4 25 mmol L^{-1} , sodium citrate 50 mmol L^{-1} , disodium-EDTA $27 \mu\text{mol L}^{-1}$, diethylamine-HCl 10 mmol L^{-1} , NaCl 10 mmol L^{-1} , 1-decanesulfonic acid 2 mmol L^{-1} , adjusted to pH 3.2 with 85% H_3PO_4); acetonitrile (1000:175, vol/vol); flow rate $100 \mu\text{L min}^{-1}$; detection, UniJet electrochemical detector, potential $+0.55 \text{ V vs Ag/AgCl}$.

间 (Fig 4).

大鼠脑内 5-HT 的浓度在手术后 d 2 就趋于稳定, 但 d 7 及 d 8 却略有升高及波动, 不过 5-HT 的浓度仍在同一数量级的范围内, 并未出现剧烈的变化. 用内径 0.32 mm 毛细管柱 LCEC 分析系统测定另一组大鼠脑纹状体中微透析样品, 得到了极为相似的浓度-时间变化曲线, 仍在相同浓度范围内.

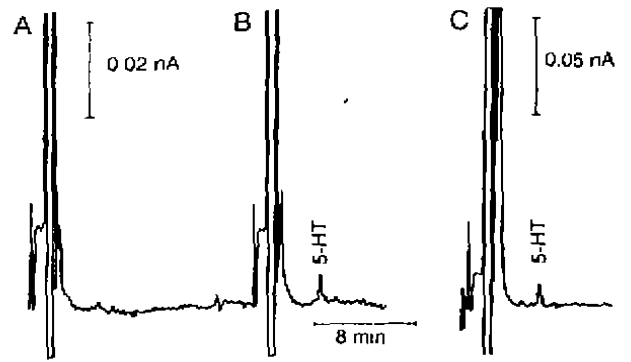


Fig 2. Chromatograms of Ringer's solution (A), serotonin standard (85 fg) (B) and microdialysate from rat striatum (C) using LCEC system with 0.32 mm ID capillary column. Microdialysis probe, CMA/12, 4 mm member probe; perfusion, Ringer's solution at flow rate $2 \mu\text{L min}^{-1}$, each $0.5 \mu\text{L}$ of microdialysate was injected; column, UniJet, $150 \text{ mm} \times 0.32 \text{ mm ID}$ (ODS, $3 \mu\text{m}$ particle); mobile phase, buffer (disodium-EDTA $540 \mu\text{mol L}^{-1}$, NaCl 10 mmol L^{-1} , NaAc 90 mmol L^{-1} , sodium octyl sulfate 1 mmol L^{-1} , adjusted to pH 5.0 with HAc); acetonitrile (9:1, vol/vol); flow rate $9 \mu\text{L min}^{-1}$; detection, UniJet electrochemical detector, potential $+0.55 \text{ V vs Ag/AgCl}$.

DISCUSSION

我们将微透析法应用于自由活动的大鼠的脑内 5-HT 浓度测定的研究, 既能多次连续取样, 避免了动物个体差异, 便于在同一动物身上进行确证实验; 又因为微透析取样时, 已将待测的 5-HT 与共存的大分子物质如蛋白质、酶等分开, 简化了样品的前处理. 微透析法采得的样品在封闭的管道中流动, 不与外界接触, 减少了样品的氧化分解, 流失和污染, 因此提高了分析结果的准确性和再现性.

微柱液相色谱法具有流动相消耗少, 样品需求量微和检测灵敏度高的特点, 因此最适用于采集样品量少且因灌流液的稀释导致 5-HT 浓度降低的微透析样品的分析^(5,6). 微柱被直接连接于进样阀之后, 而新型的 UniJet 电

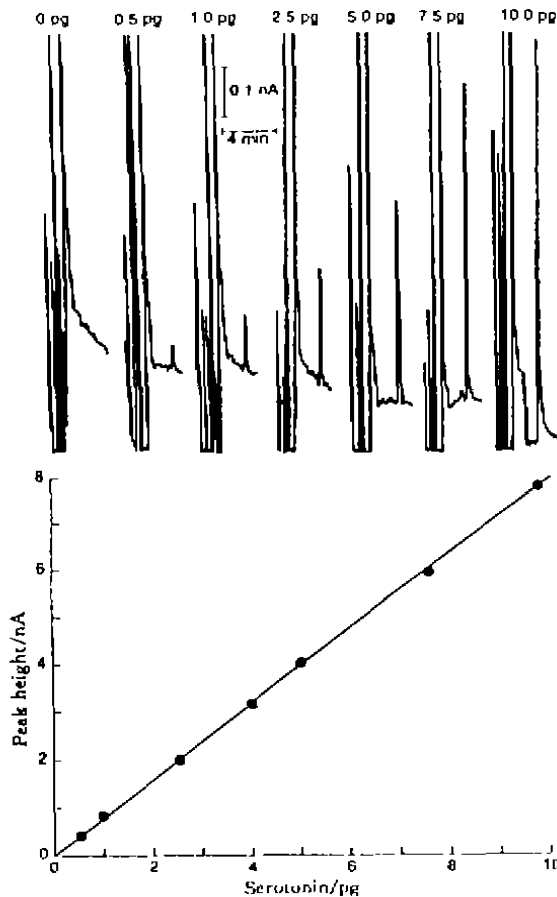


Fig 3. Calibration curve of serotonin. LCEC conditions were same as in Fig 1.

化学检测池 (Fig 5) 能直接连接于微柱之后, 这样就杜绝了柱前及柱后的死体积。自微柱洗脱出来的 5-HT 以中心对称式直接快速地喷向工作电极, 然后在工作电极表面呈放射状减速向周围流出, 这就大大地增加了 5-HT 与电极表面的接触和氧化还原反应的时间, 因此进一步提高了电化学检测 5-HT 的灵敏度^[7]。我们使用两种分析系统对大鼠脑内 5-HT 浓度变化的研究结果都表明, 在正常生理条件下, 健康的大鼠脑内 5-HT 的浓度是相当稳定的。手术植入微透析探针等会导致脑内 5-HT 浓度的不规则变化, 可能因为外科手术对动物脑部的强刺激而导致了 5-HT 的不规则产生, 或者

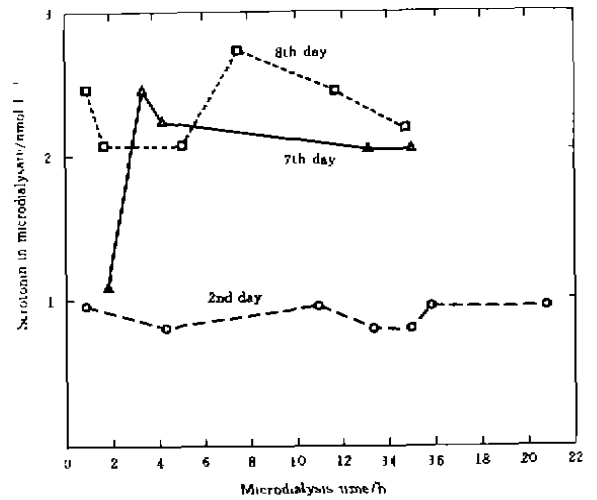


Fig 4. Serotonin in microdialysates from rat brain striatum. LCEC conditions were same as in Fig 1.

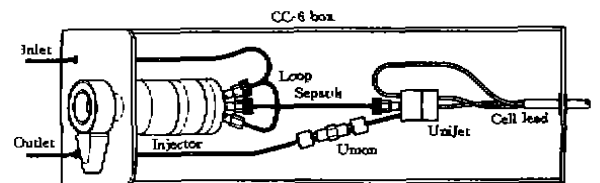


Fig 5. The UniJet detector cell in CC-6 cabinet with a special PEEK-backed injection valve.

因为手术造成的内源性物质紊乱引起了 5-HT 的不规则变化。大鼠脑内 5-HT 的浓度在手术植入微透析探针后 d 7 和 d 8 出现的升高和波动, 可能由于微透析探针在脑内较长时间对脑组织的刺激所致。两种分析系统所得到的分析结果的一致性, 证实了这两种分析系统均可快速、灵敏和准确地测定大鼠脑内 5-HT 的动态变化。

REFERENCES

1 Aghajanian GK, Sprouse JS, Rasmussen K. Physiology of the midbrain serotonin system. In: Meltzer HY, editor. Psychopharmacology; the third generation of

progress. In association with the American College of neuropsychopharmacology. New York: Raven Press, 1987; 141-9.

2 Åsberg M, Thoren P, Traskman L, Bertilsson L, Ringberger V. Serotonin Depression: a biochemical subgroup within the affective disorders. Science 1976; **191**: 478-80.

3 Roy A, De Jong J, Linnoila M. Cerebrospinal fluid monoamine metabolites and suicidal behavior in depressed patients. Arch Gen Psychiatry 1989; **46**: 609-12.

4 Di Chiara G. Brain dialysis of monoamines. In: Robinson TE, Justice JB Jr, editors.

Microdialysis in the neurosciences. Amsterdam: Elsevier Science Publ, 1991; 175-87.

5 Xie F, Huang T, Kissinger PT. The application of microbore column in life sciences. Proc Biomed Chromatogr 1994; **2**: 13-16.

6 Kissinger PT, Shoup RE. Optimization of LC apparatus for determinations in neurochemistry with an emphasis on microdialysis samples. J Neurosci Methods 1990; **34**: 3-10.

7 Bohs CE, Linhares MC, Kissinger PT. The UnJet, a new electrochemical detector for microbore liquid chromatography. Current Sep 1994; **12**: 181-6.

477-480
BIBLID: ISSN 0253-9756

Acta Pharmacologica Sinica 中国药理学报 1995 Sep; 16 (5); 477-480

异丙肾上腺素
尼可地尔 心肌 钙

29

尼可地尔对体外培养乳鼠心肌细胞自发性搏动及动作电位的影响

王洪新, 王维信 (锦州医学院药理教研室, 锦州 121004, 中国)

Effects of nicorandil on spontaneous beating and action potentials of cultured myocardial cells of neonatal rats

WANG Hong-Xin, WANG Wei-Xin
(Department of Pharmacology, Jinzhou Medical College, Jinzhou 121004, China)

AIM: To study the anti-arrhythmic mechanism of nicorandil (Nic). **METHODS:** The myocardial cells of neonatal rats were cultured and effects of Nic on spontaneous beating and action potential of cultured myocardial cells were observed. **RESULTS:** Nic $32 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $160 \mu\text{mol L}^{-1}$ decreased the spontaneous beating rates of cultured myocardial cells of neonatal rats. Nic $64 \mu\text{mol L}^{-1}$ prevented the beating rats induced by CaCl_2 1 mmol L^{-1} and isoproterenol $2 \mu\text{mol L}^{-1}$. Nic 32 and $160 \mu\text{mol L}^{-1}$ reduced the amplitude, maximal rate of rise, and shortened APD_{50} and APD_{90} re-

R 965.2
larization. Nic prolonged the spontaneous sinus cycle length. **CONCLUSION:** The anti-arrhythmic mechanism of Nic is related to its direct effects on the myocardial cells.

KEY WORDS nicorandil; cultured cells; myocardium; calcium; isoproterenol; action potentials

A目的: 为了研究尼可地尔(nicorandil, Nic)抗心律失常的作用机制. 方法: 体外培养乳鼠心肌细胞并观察 Nic 对培养心肌细胞自发性搏动频率及动作电位的影响. 结果: Nic 能使体外培养乳鼠心肌细胞自发性搏动频率下降. Nic $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ 对 CaCl_2 1 mmol L^{-1} 及异丙肾上腺素 $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ 增加的细胞搏动率有抑制作用. Nic 32 和 $160 \mu\text{mol L}^{-1}$ 能使动作电位幅度 (APA)及最大上升速率 (V_{max})明显下降, 使动作电位时程 (APD_{50} , APD_{90})缩短, 搏动周期 (SCL)显著延长. 结论: Nic 的抗心律失常机制与其对心肌细胞的直接作用有关.

Received 1993-03-29

Accepted 1994-11-19