

# DA、5-HT 及其代谢产物 HPLC-ECD 检测方法的研究

杨威 邓玉林 徐敏

(北京理工大学生命科学与技术学院 北京 100081)

Email: yw587587@bit.edu.cn

**摘要** 采用高效液相色谱结合库仑阵列多电极检测器体系(HPLC-ECD)建立了一套操作简便、高效、快速测定多巴胺(DA)、3,4-二羟基苯乙酸(DOPAC)、高香草酸(HVA)、5-羟色胺(5-HT)以及5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)的方法,并探究了检测的灵敏性,浓度和响应因子之间的线性关系,系统的稳定性等。DA、DOPAC、HVA、5-HT及5-HIAA的相关系数分别为0.9964、0.9999、1、0.9989、0.9999;HVA和5-HIAA的检测限都低于0.5ng/mL,DA、DOPAC及5-HT的检测限均低于0.1ng/mL,各种物质的方法回收率为85.6% - 107.4%。

**关键词** HPLC-ECD; 神经递质; 检测方法

中图分类号 0657.7+2

## A HPLC-ECD Method to Study DA, 5-HT and their Metabolite

Yang Wei, Deng Yulin, Xu Min

(Life Science Department, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

**Abstract** High performance liquid chromatography(HPLC-ECD)was used for measurement of the neurotransmitters. The method of measuring DA, DOPAC, HVA, 5-HT and 5-HIAA was established. Systematic investigations of various factors involved in contributing to the reliability and reproducibility of the neurotransmitters measurement were described. These factors includesensitivity of detection, limits of linear relationship between concentration and the response factor, stability of the system. The response factor of DA, DOPAC, HVA, 5-HT and 5-HIAA are respective 0.9964, 0.9999, 1, 0.9989 and 0.9999. The limits of detection of HVA and 5-HIAA are below 0.5ng/mL, and DA, DOPAC, 5-HT are below 0.1ng/mL.

**Key words** HPLC-ECD; neurotransmitter; test methods

## 1 引言

单胺类神经递质包括多巴胺、5-羟色胺及其相关化合物<sup>[1]</sup>,是人脑内神经元中普遍存在的、十分重要的神经递质。多巴胺、5-羟色胺及其代谢物的测定对研究很多神经系统疾病有着非常重要的意义<sup>[2,3]</sup>。但由于其在脑内、细胞内含量极低<sup>[4,5]</sup>,这给生物样品的检测带来了很大的困难。本研究建立了一种简便的、灵敏的高效液相色谱电化学检测器的方法,同时对多巴胺、5-羟色胺、高香草酸、5-羟吲哚乙酸及3,4-二羟基苯乙酸进行分离和检测。为今后生物样品中这些物质的检测提供了很有价值的信息。

## 2 实验部分

### 2.1 实验仪器

美国ESA公司高效液相色谱仪:包括两台582型恒压微流活泵、542型86孔自动进样器、5600A型八通

道库仑阵列检测器及配套色谱工作站。

### 2.2 药品及试剂

DA、DOPAC、HVA、5-HT及5-HIAA的标准品均购自Sigma公司;甲醇、乙腈均为色谱纯,购自Fisher公司;其他试剂均为分析纯,购自北京化学试剂公司;实验用水为18.2M 三蒸水。

### 2.3 色谱条件

色谱柱:Alltima C18(5 μm 150mm × 4.6mm);  
流动相:甲醇:乙腈:三蒸水=2.5:5:92.5;缓冲液中含有:36mM的柠檬酸、47mM的磷酸二氢钠、0.3mM的乙二胺四乙酸二钠以及0.35mM的庚烷基磺酸钠,pH调至为4.1,将配置好的流动相经过0.22 μm有机膜过滤,真空脱气30分钟待用。

检测条件:流速:1mL/min;柱温:30 ;检测电势:0 - 245mV(+35mV);进样量:40 μL;

### 2.4 标准样品的制备

精确称量DA、DOPAC、HVA、5-HT以及5-HIAA各a mg,溶解于a mL的三蒸水中制成1mg/mL的月母

收稿日期:2006-03-10

作者简介:杨威(1979-),博士生。

液；将月母液稀释 200 倍成周母液（5000ng/mL），将月母液、周母液保存于 -4 冰箱中（月母液的保存期一般不超过一个月；周母液的保存期一般不超过一周）。在测定时将周母液当日稀释成所需浓度即为日标准溶液，本实验中标准单样的浓度为 50ng/mL，标准混合样的浓度梯度为：100、50、20、10、5、2、1、0.5ng/mL。最后根据峰面积与浓度作直线回归，并求出相关系数。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 色谱条件的选择

流动相为含有甲醇、乙腈的柠檬酸 - 磷酸盐缓冲溶液（pH4.1），改变甲醇和乙腈的量可以影响分离、分析效果。经过多次实验的摸索，确定甲醇和乙腈的体积百分比分别为 2.5% 和 5% 时样品有较好的保留时间以及分离效果。在确定有机相配比后，利用 NaOH 调节流动相的 pH 值，以求得到较好的分离效果。本实验中尝试了一系列的 pH 梯度，最后确定 pH 为 4.1。根据各种标准样品的伏安曲线确定其最佳电势（图 1）。各种标准样品的最佳电势分别为：DA：100mV；DOPAC：175mV；HVA：250mV；5-HT：140mV；5-HIAA：175mV。

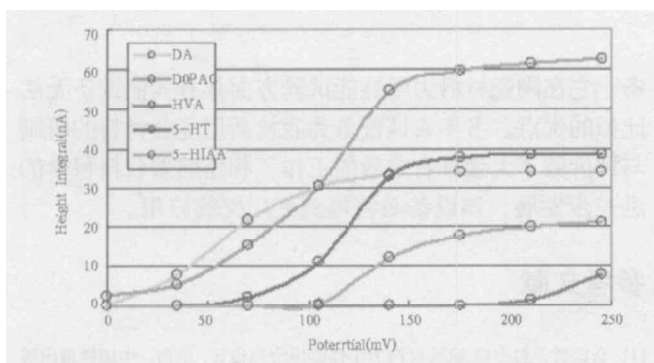


图1 各种标准样品的伏安曲线

#### 3.2 标准混合样的分离效果

采用前面所述的流动相及检测方法，所得到的 HPLC 色谱图清晰，由图 2 可以看出 DA、DOPAC、HVA、5-HT 以及 5-HIAA 达到基线分离。

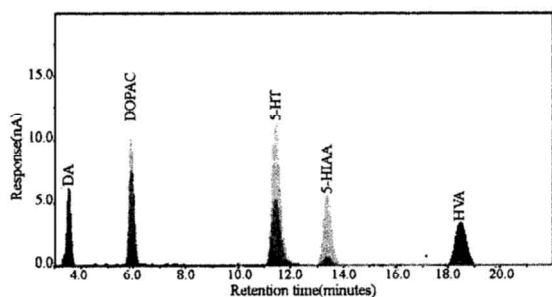


图2 五种标准样品的分离色谱图

#### 3.3 线性范围和检测限

本系统对于 DA、5-HT 及其代谢产物在 0.5 - 100ng/mL 有着良好的线性关系。在系统稳定的情况下，各种物质的检测限均在 0.5ng/mL 以下，结果如表 1 所示。

#### 3.4 样品的标准曲线及相关系数

将标准混合样配成浓度梯度，具体浓度为：100、50、20、10、5、2、1、0.5ng/mL。各种物质的标准曲线如图 3 所示。

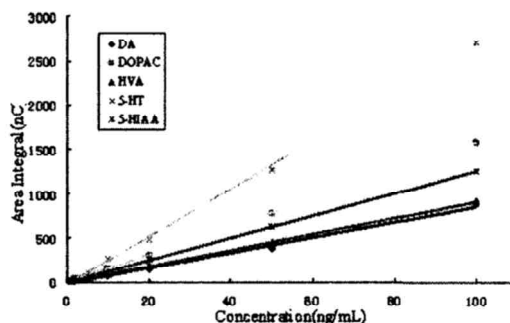


图3 各种标准样品的标准曲线

各种标准样品的峰面积与浓度进行线性回归，得到回归方程及相关系数如表 1 所示。

表 1 各种标准样品的回归方程、线性范围、相关系数及其最低检出限

分析物	线性范围 (ng/mL)	线性回归方程	相关系数	检出限 (ng/mL)
DA	0.5 - 100	$y = 8.6717x - 14.617$	0.9964	<0.1
DOPAC	0.5 - 100	$y = 15.783x - 4.5856$	0.9999	<0.1
HVA	0.5 - 100	$y = 9.1313x - 1.2606$	1	<0.5
5-HT	0.5 - 100	$y = 26.971x - 21.502$	0.9989	<0.1
5-HIAA	0.5 - 100	$y = 12.506x - 2.2143$	0.9999	<0.5

表 2 各种标准样品的日内精密度

分析物	浓度 (ng/mL)	保留时间 (min)		峰面积 (nC)	
		mean ± SD (n=5)	% CV	mean ± SD (n=5)	% CV
DA	20	3.55 ± 0.027	0.75	124.5 ± 15.4	12.4
DOPAC	20	5.96 ± 0.063	1.06	301.8 ± 2.68	0.89
HVA	20	18.58 ± 0.21	1.13	194.8 ± 8.11	4.16
5-HT	20	11.49 ± 0.16	1.62	487.8 ± 14.3	2.93
5-HIAA	20	13.49 ± 0.19	1.93	242.6 ± 6.43	2.65

表 3 各种标准样品的日间精密度

分析物	浓度 (ng/mL)	保留时间 (min)		峰面积 (nC)	
		mean ± SD (n=6)	% CV	mean ± SD (n=6)	% CV
DA	20	3.66 ± 0.10	2.76	130.5 ± 13.7	10.5
DOPAC	20	6.14 ± 0.16	2.61	293.7 ± 14.0	4.78
HVA	20	19.15 ± 0.51	2.68	213.0 ± 19.2	9.02
5-HT	20	11.98 ± 0.44	3.67	450.0 ± 38.2	8.49
5-HIAA	20	13.98 ± 0.45	3.23	237.8 ± 21.9	9.22

#### 3.5 精密度与回收率

从标准曲线上取三个浓度点分别做日内和日间精密度，日内进行 5 组平行实验、日间进行 6 组平行实验，取最好的一个浓度点得到各种组分的日内及日间精密度，

结果如表2、3所示；再对这三个浓度点进行5组平行实验，同样选取一个最好的浓度点，根据各组分的标准曲线计算出各个组分的方法回收率，结果如表4所示。

表4 各种标准样品的方法回收率

分析物	加入标准品浓度(ng/mL)	方法回收率(n=5)	
		mean ± SD(%)	% C V
DA	5	85.6±8.74	10.2
DOPAC	20	97.1±0.85	0.88
HVA	20	107.4±4.44	4.13
5-HT	10	101.3±3.54	3.49
5-HIAA	10	99.6±3.78	3.79

## 4 小结

综上所述，该色谱方法灵敏、快速、且分离效果好，全部5种物质同时分离，其测定时间不到20分钟，方法有着很好的重现性和较高的回收率，且最低检测限低于0.1ng/mL，对生物样品痕量检测提供了一种很好的方法。根据实验的需要，单测一种或某几种物质，这就使其应用范围更广、更灵活。

(上接第43页)

## 5 在陶瓷动态力学性能评价中的应用

作为结构件使用的陶瓷材料，其寿命与可靠性是一个重要的性能指标。陶瓷材料的疲劳破坏机理与金属有很大区别，陶瓷疲劳的含义与金属也有所不同。金属疲劳主要是指在长期交变载荷作用下材料耐用应力下降及破坏行为。而陶瓷的疲劳包含两个含义：静疲劳是指构件或试样受到一个恒定载荷经过一段时间而发生断裂或失效的过程；动疲劳是指疲劳载荷随时间而变化的疲劳形式，是常加载速率的疲劳形式，即载荷以恒定的速率增加直至发生断裂。疲劳试验主要有三种形式，即静疲劳、动疲劳和循环疲劳。静疲劳试验大多在高温下进行，加载方式一般为三点或四点弯曲，循环疲劳以压-压疲劳研究较多。MTS810陶瓷试验系统是电液伺服试验系统，对于无论哪种方式的高温或常温疲劳都可以很好地满足要求。

## 6 结语

MTS810陶瓷试验系统作为国内不多的专门用于陶瓷材料各种常温及高温动、静态力学性能测试的专用设

## 参考文献

- [1] 薛启昊. 神经系统的生理和病理化学[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992, 180-218
- [2] Spencer JP, Jenner P, Daniel SE, et al. Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species [J]. J Neurochem, 1998, 71: 2112-2122
- [3] Liu H, Iacono RP, Schooneberg T, et al. A comparative study on neurochemistry of cerebrospinal fluid in advanced Parkinson's disease [J]. Neurobiol Dis, 1999, 6: 35-42
- [4] Duine JM, Floch F, Cann-Moisan C, et al. Simultaneous measurement of monoamines, their metabolites and 2,3- and 2,5-dihydroxybenzoates by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. Application to rat brain dialysates [J]. chromatogr B Biomed Sci Appl, 1998,25: 350
- [5] Huang W, Chen Y, Shohami E, et al. Neuroprotective effect of rasagiline, a selective monoamine oxidase-B inhibitor, against closed head injury in the mouse [J]. Eur J Pharmacol, 1999, 366:127

备，它在陶瓷材料力学性能试验方面具有其他设备无法比拟的优点。多年来该设备为我校新型复合材料的研制与评价做了大量卓有成效的工作，相信随着材料科学的进一步发展，该设备必将得到更广泛的应用。

## 参考文献

- [1] 金宗哲, 包亦望. 脆性材料力学性能评价与设计. 北京: 中国铁道出版社, 1996
- [2] 来亭荣 施剑林 朱国强. 脆性材料强度评价. 现代技术陶瓷, 1998, 4
- [3] 詹国栋 张以增 周洋. 陶瓷与陶瓷基复合材料的疲劳研究进展. 力学进展, Vol.24 No.3 Aug. 25, 1994
- [4] 孙立, 包亦望. 工程陶瓷的断裂特性与评价. 现代技术陶瓷, 1999, 4
- [5] GB6569-86 工程陶瓷弯曲性能试验方法. 中华人民共和国国家标准 国家标准局 发布
- [6] GB10700-89 工程陶瓷弹性模量试验方法. 中华人民共和国国家标准 国家标准局 发布