

# 高效液相色谱-电化学检测法同时测定 血浆中5-羟色胺和5-羟吲哚乙酸

唐爱国 吴 袁 高洁生 杨锡兰

(湖南医科大学附属第二医院中心实验室 长沙 410011)

## 1 前言

测定血液中的5-羟色胺(5-HT)和5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)可为多种疾病的诊断和治疗以及精神疾病的机理研究提供依据<sup>[1,2]</sup>。目前国内报道的可同时测定这两种物质的方法主要有荧光法、高效液相色谱-荧光分析法及高效液相色谱-电化学分析法(HPLC-EC)<sup>[3~5]</sup>,但均有不足,如标本预处理复杂、流动相组分多、需采用梯度洗脱、操作繁琐费时等。本文介绍一种操作简便、分析速度较快、分析结果可靠且同时测定5-HT和5-HIAA的HPLC-EC法。

## 2 材料和方法

### 2.1 仪器

美国 Waters 公司 HPLC 仪,510 高压泵,460 电化学检测器,U6K 通用进样阀,840 数据处理机。TGLL-18 台式高速离心机(江苏太仓医疗器械厂)。

### 2.2 试剂

5-HT 和 5-HIAA 标准品为 Sigma 公司产品,甲醇为优级纯,其余试剂为分析纯。

(1) 5-HT 应用标准液(113.5nmol/L,即20 $\mu$ g/L):先精确称取5-羟色胺硫酸肌酐21.98mg,溶于10mL 0.1mol/L HCl 溶液中配成贮存标准液(5.675mmol/L,即1g/L),分份贮于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中。临用时取此液用0.1mol/L HCl 稀释50000倍即可。

(2) 5-HIAA 应用标准液(104.6nmol/L,即20 $\mu$ g/L):先精确称取5-HIAA 10mg,溶于10mL 0.1mol/L HCl 溶液中配成贮存标准液(5.23mmol/L,即1g/L),分份贮于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中。临用前取此液用0.1mol/L HCl 稀释50000倍即可。

### 2.3 色谱条件

$\mu$ Bondapak C<sub>18</sub>(5 $\mu$ m) 300 $\times$ 3.9mm i. d. 不锈钢柱(Waters);以玻璃碳电极为工作电极,Ag/AgCl 电极为参比电极,工作电压+0.60V;流动相为

0.1mol/L 乙酸钠溶液(内含0.1mmol/L EDTA-Na<sub>2</sub>),用冰乙酸调至pH 5.3后,取此液90份,加甲醇10份混合,过滤,超声脱气;流速为1mL/min,进样量100 $\mu$ L,外标法定量。

### 2.4 血浆标本处理

静脉抽血肝素抗凝以3000r/min 转速离心分离血浆,取等体积0.4mol/L 高氯酸溶液与血浆混合摇匀,数分钟后,以15000r/min 在4 $^{\circ}$ C 下离心10min,取上清液作色谱分析。

## 3 结果和讨论

### 3.1 标准曲线

5-HT 在2.84~5680nmol/L 范围内呈线性关系: $\hat{Y} = 676155 + 14512X$ ( $X$ 为浓度,nmol/L; $\hat{Y}$ 为峰面积), $\gamma = 0.9996$ ;5-HIAA 在2.62~5240nmol/L 范围内呈线性关系: $\hat{Y} = 930255 + 18925X$ , $\gamma = 0.9995$ 。5-HT 的最低检测限为1.42nmol/L,5-HIAA 为1.31nmol/L。

### 3.2 色谱分离及保留时间

标准液和血浆标本中的5-HT 和5-HIAA 峰分离良好,血浆标本中的其他杂峰在8min 内洗脱完毕,对结果无干扰,色谱图见图1。5-HIAA 的保留时间( $t_R$ )为12.12min( $S = 0.2$ min, $CV = 1.77\%$ , $n = 8$ ),5-HT 的  $t_R$  为14.93min( $S = 0.33$ min, $CV = 2.37\%$ , $n = 8$ )。

### 3.3 测定的精密性

混合标准液连续进样测定6次,5-HIAA 的峰面积  $CV = 0.84\%$ ,5-HT 为1.15%。

### 3.4 回收率测定

将混合标准品定量地加入血浆中,按2.4项处理后进样测定,5-HT 的回收率为89.95%~93.93%( $\bar{X} = 91.31\%$ , $CV = 2.5\%$ , $n = 8$ ),5-HIAA 为88.2%~102.2%( $\bar{X} = 94.21\%$ , $CV = 5.6\%$ , $n = 8$ )。

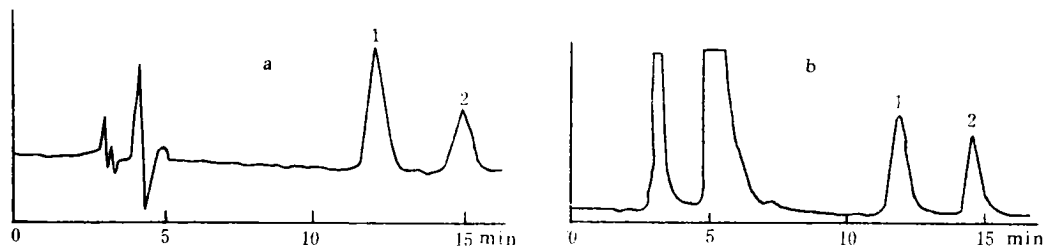


图1 标准品和血浆标本色谱图

a. 标准品, b. 血浆标本. 峰: 1. 5-HIAA, 2. 5-HT.

### 3.5 工作电位的选择

经过试验,本文的工作电位选用+0.60V,此时既可较灵敏精确地检测血浆标本中的5-HT和5-HIAA,亦可减少噪音及杂质的干扰。

### 3.6 用高氯酸或三氯乙酸作蛋白沉淀剂

用高氯酸沉淀蛋白,低温高速或常温常速离心后取上清液进样分析,提取较完全,操作快速简便。但过量的高氯酸可损害分析柱,为此有人提出用钾盐溶液进行中和处理<sup>(5)</sup>,但本文作者发现因血浆中5-HT和5-HIAA含量较低,采用中和处理不利于测定。而经常用蒸馏水和甲醇及时冲洗分析柱,使用数月测定了近200份标本仍未见柱效明显下降。

### 3.7 初步临床应用

测定了健康成人、高血压患者和哮喘患儿血浆中5-HT和5-HIAA值(见表1),发现健康人中男女的5-HT和5-HIAA值之间的差别均无显著性(均  $p > 0.20$ );高血压患者的5-HT和5-HIAA值均高于健康人组( $p < 0.001$ )。本文测得健康人5-HT值较廖卫平<sup>(6)</sup>的低,与Tagaril等<sup>(7)</sup>的相近,测得的健康

人5-HIAA和5-HT值均高于刘冰怀等<sup>(3)</sup>的报道。

表1 血浆中5-HT和5-HIAA测定结果

组别	例数	5-HT ( $\bar{X} \pm S, \text{nmol/L}$ )	5-HIAA ( $\bar{X} \pm S, \text{nmol/L}$ )
健康人	24	52.1 ± 46.8	42.7 ± 35.6
高血压患者	20	311.8 ± 228.1	123.9 ± 73.0
哮喘患儿	9	303 ± 196	85.9 ± 62.2

关键词 高效液相色谱法,电化学检测,5-羟色胺,5-羟吲哚乙酸,血浆

### 参 考 文 献

- 1 许 澍,陈华粹,陈 莉等. 中华医学杂志,1982;62:94
- 2 左成业. 国外医学精神病学分册,1990;17:193
- 3 刘冰怀,朱舜丽,陈金珠. 临床检验杂志,1987;5:64
- 4 张利平,杨永彰,刘厚钰等. 中华医学检验杂志,1987;10:321
- 5 张林魁,钮 懿,徐端明等. 药学报,1987;22:591
- 6 廖卫平,陆雪芬. 色谱,1992;10:118
- 7 Tagaril P C, Boullin D J, Davies C L. Clin Chem, 1984; 30:131

## Simultaneous Measurement of Serotonin and 5-Hydroxyindoleacetic Acid in Plasma Using High Performance Liquid Chromatographic Method with Electrochemical Detection

Tang Aiguo, Wu Hong, Gao Jiesheng and Yang Xilan

(Central Research Lab., Second Affiliated Hospital of Hunan Medical University, Changsha, 410011)

A simple and sensitive method for the simultaneous measurement of serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) in plasma is described. Plasma samples, only deproteinated, without further extraction, were directly injected into and high performance liquid chromatographic column and detected electrochemically. Within 18 min, the total separation was achieved. The recovery reached over 90%. The coefficient of variation in retention time was less than 2.5% and in peak area was less than 1.2%. The linear range was 2.62~5240nmol/L for 5-HIAA, 2.84~5680nmol/L for 5-HT.

Key words high performance liquid chromatography, electrochemical detection, serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, plasma