

鼠脑组织中6-羟基-1-甲基-1,2,3,4-四氢-β-咔啉及其相关生物胺的高效液相色谱-电化学检测

毛 健, 苏 旸, 栾玉静, 陈薛钗, 邓玉林*

(北京理工大学生命科学与技术学院, 北京 100081)

摘要 :建立了大鼠脑组织中6-羟基-1-甲基-1,2,3,4-四氢-β-咔啉(6-OH-MTHβC)、5-羟色胺(5-HT)和5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)含量的高效液相色谱-库仑阵列电化学检测(HPLC-ECD)方法。采用的色谱柱为Discovery® HS F5柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为缓冲液(40 mmol/L柠檬酸 + 20 mmol/L磷酸氢二钠 + 0.3 mmol/L乙二胺四乙酸二钠, pH 4.0)-甲醇(体积比为78:22)混合液,流速为1 mL/min。6-OH-MTHβC、5-HT、5-HIAA在1.0 ~ 500.0 μg/L范围内线性关系良好($r > 0.9992$)。检出限分别为0.56, 0.26, 0.53 μg/L,日内和日间精密性(以相对标准偏差表示)均低于6.1%,回收率分别为87.1% ~ 98.2%, 87.0% ~ 95.3%, 90.1% ~ 97.7%。用该方法检测新生7 d的SD胎鼠脑内6-OH-MTHβC及5-HT、5-HIAA的含量,发现SD胎鼠在急性酒精中毒8 h后6-OH-MTHβC显著上升($P < 0.05$),而5-HT和5-HIAA的含量有所下降,但无显著性差异。该法简便、稳定、灵敏度高,适用于测定鼠脑组织中6-OH-MTHβC和5-HT、5-HIAA含量的相关研究。

关键词 :高效液相色谱; 电化学检测; 6-羟基-1-甲基-1,2,3,4-四氢-β-咔啉; 5-羟色胺; 5-羟吲哚乙酸; 鼠脑

中图分类号 :O658 **文献标识码** :A **文章编号** :1000-8713(2009)02-0216-04 **栏目类别** :研究论文

Determination of 6-hydroxy-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline, 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindole acetic acid in the neonatal rat brains using high performance liquid chromatography-electrochemical detection

MAO Jian, SU Yang, LUAN Yujing, CHEN Xuechai, DENG Yulin*

(School of Life Science and Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

Abstract : A simple method was developed for the analysis of 6-hydroxy-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline (6-OH-MTHβC), 5-hydroxytryptamine (5-HT) and 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) in rat brain by high performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ECD). The separation of the sample was performed on a Discovery® HS F5 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a mobile phase of the buffer (40 mmol/L citric acid + 20 mmol/L Na₂HPO₄ + 0.3 mmol/L EDTA₂Na, pH 4.0)-methanol (78:22, v/v) at a flow rate of 1.0 mL/min. The electrochemical detector was Coularray Detector-4. This method showed good linearity ($r > 0.9992$) for the quantification of 6-OH-MTHβC, 5-HT and 5-HIAA in the concentration range of 1.0 - 500.0 μg/L. The limits of detection were 0.56, 0.26 and 0.53 μg/L, respectively. The recoveries of 6-OH-MTHβC, 5-HT and 5-HIAA spiked in rat brain samples were 87.1% - 98.2%, 87.0% - 95.3%, 90.1% - 97.7%, respectively, and the relative standard deviations of intra-day and inter-day determinations were both less than 6.1%. In comparison with the control, the analysis of alcohol-exposed neonatal rat brain samples revealed a significant difference in the level of 6-OH-MTHβC ($P < 0.05$). The method was proved to be simple, highly sensitive, and could be applied in the analysis of 6-OH-MTHβC, 5-HT and 5-HIAA in the rat brain.

Key words : high performance liquid chromatography (HPLC); electrochemical detection (ECD); 6-hydroxy-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline; 5-hydroxytryptamine; 5-hydroxyindole acetic acid; rat brain

* 通讯联系人: 邓玉林, 博士, 教授, 博士生导师. Tel: (010) 68914607, E-mail: deng@bit.edu.cn.

基金项目: 北京市科技计划项目(20070639034).

收稿日期: 2008-07-08

四氢-β-咔啉类物质(tetrahydro-β-carboline, THβC)是哺乳动物体内痕量存在的一类生物碱,作为外源性神经毒素1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)的类似物,THβC在帕金森病、酒精成瘾等神经疾病的研究中得到了广泛的关注^[1-3]。6-羟基-1-甲基-1,2,3,4-四氢-β-咔啉(6-hydroxy-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline, 6-OH-MTHβC)存在于哺乳动物的脑组织和尿中,可由中枢神经递质5-羟色胺(5-HT)与乙醛发生缩合反应而形成(见图1)。进一步的实验表明,6-OH-

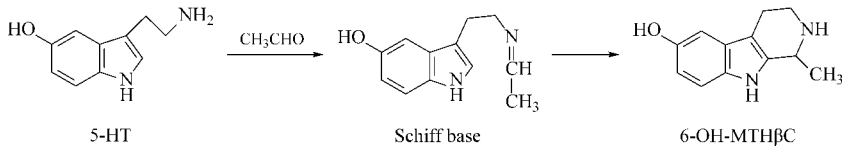


图1 6-OH-MTHβC的生物合成途径

Fig. 1 Synthesis of 6-OH-MTHβC with 5-HT and acetaldehyde

生物体内5-HT的测定方法已有多种^[7,8]。食品及哺乳动物体液中THβC的分离测定多采用气相色谱-质谱联用、高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)、高效液相色谱-荧光检测等方法^[9-11],但是存在费用较高、检测耗时等缺点。高效液相色谱-电化学检测(HPLC-ECD)由于其高选择性和高灵敏度,已广泛应用于单胺类神经递质等具有电化学生活性物质的检测^[12],但是目前应用HPLC-ECD检测脑组织中THβC的报道较少。

本实验以五氟苯基柱为分离柱,运用美国ESA公司的高效液相色谱-库仑阵列电化学检测器体系建立了检测鼠脑组织中6-OH-MTHβC及5-HT、5-HIAA的方法,并测定了正常胎鼠和酒精处理胎鼠脑组织中上述3种物质的含量,以了解急性酒精中毒后脑组织中6-OH-MTHβC的含量变化及5-HT的代谢情况。

1 实验部分

1.1 实验仪器

美国ESA公司高效液相色谱仪,包括582型恒压微流活泵、542型86孔自动进样器、ESA Model 6210四通道电极、5600A型库仑阵列检测器及配套色谱工作站;大连依利特公司在线脱气机(DG230-2型);美国Millipore公司Milli-Q纯水器等。

1.2 药品及试剂

5-HT、5-HIAA、2,3-二羟基苯甲酸(2,3-DHBA)标准品购自Sigma公司;柠檬酸、磷酸二氢钠、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、高氯酸、焦亚硫酸钠、无水乙醇、氯化钠等其他试剂均为分析纯,购自北京化学

MTHβC可能是一种神经毒性物质。它能抑制单胺氧化酶的活性,使大鼠处于过度兴奋状态^[4]。在慢性酒精中毒者的脑内,6-OH-MTHβC的含量明显升高,而且它的合成和代谢很可能会造成脑内5-HT的缺失和5-HT通路的退化^[5]。而体内5-HT的浓度及其代谢的异常,往往与一些神经精神疾病有关^[6]。因此,测定脑组织中6-OH-MTHβC及其前体5-HT以及5-HT代谢物5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)的含量可以为研究酒精的神经毒性机理提供科学依据。

试剂公司;甲醇为色谱纯,购自Fisher公司;实验用水为Milli-Q纯水器所制的三蒸水。

标准品6-OH-MTHβC的合成及提纯方法参照文献[4]进行,质谱鉴定结果与该文献相同。

1.3 色谱条件

分析柱:Discovery[®] HS F5柱(250 mm × 4.6 mm 5 μm);流动相:缓冲液-甲醇(体积比为78:22),其中缓冲液由40 mmol/L柠檬酸、20 mmol/L磷酸氢二钠、0.3 mmol/L EDTA组成,pH 4.0;流速:1 mL/min;柱温:30 °C;进样量:40 μL;检测电势:根据各标准物质的伏安曲线设置4通道工作电势,分别为-50,50,275,450 mV,以275 mV为检测电势主通道。

1.4 标准溶液的制备

准确称量6-OH-MTHβC、5-HT、5-HIAA及内标2,3-DHBA各5 mg,用流动相溶解制成质量浓度为1 g/L的标准储备液,分装并保存于-20 °C冰箱中。在测定时取分装的标准储备液当日稀释成所需浓度,混合标准溶液的质量浓度梯度为500,100,50,10,5,1 μg/L,内标的质量浓度为20 μg/L。

1.5 胎鼠脑组织样品的处理

取出生后7 d的SD大鼠18只,分为酒精染毒组和盐水对照组,每组9只。酒精染毒组参照文献[13]按5 g/kg的剂量皮下注射20%的酒精,盐水对照组注射等体积的生理盐水。注射后8 h断头,迅速取出鼠脑并立即置于液氮中深冻,固化后称重,每100 mg脑组织中加入预冷的0.4 mol/L高氯酸0.4 mL(含内标20 μg/L,并含焦亚硫酸钠0.04%和EDTA 0.04%),冰浴下快速匀浆,4 °C下以17 000

r/min(15 000 g)速率离心 20 min。上清液用 0.22 μm 针头过滤器过滤,滤液分装后检测或避光贮存于 -80 °C 下待测。

2 结果与讨论

2.1 色谱行为

在本文的色谱条件下,混合标准溶液中的 4 种物质 5-HT、内标 2 β-DHBA、6-OH-MTHβC 及 5-

HIAA 都能达到基线分离,峰形对称,分离效果较好(见图 2-a)。5-HT、内标 2 β-DHBA、6-OH-MTHβC 及 5-HIAA 的保留时间约为 11.3,13.0,15.0 及 16.9 min 20 min 内即可完成一次样本的分离。由于鼠脑组织中存在待检测的 3 种物质,故没有空白样本。胎鼠脑样的色谱图见图 2-b,鼠脑组织中无内源性杂质干扰,表明本文所建立的方法能有效、快速地完成对目标物质的分离分析。

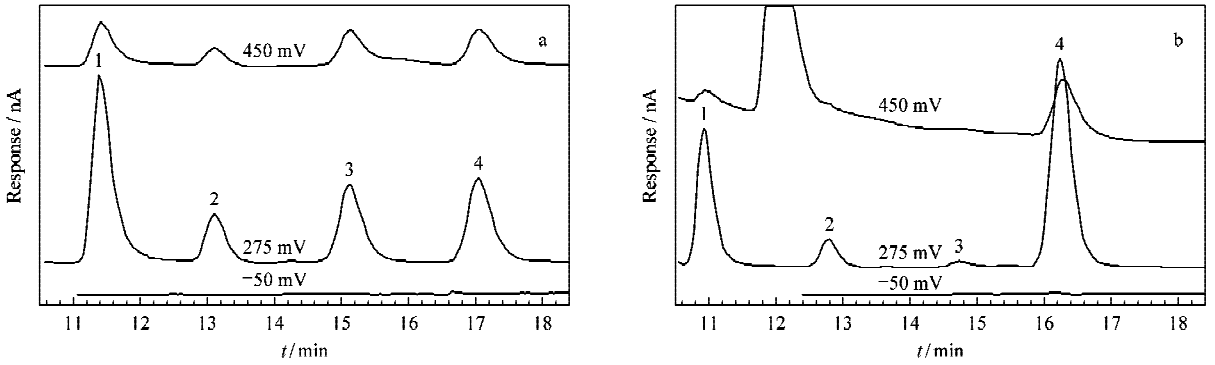


图 2 (a)混合标准溶液和(b)鼠脑组织样品的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of (a) mixed standard solution and (b) a neonatal rat brain sample

1. 5-HT; 2. 2 β-DHBA; 3. 6-OH-MTHβC; 4. 5-HIAA.

2.2 线性关系及检出限

测定当日配制的混合标准溶液,以目标组分的峰面积与内标峰面积的比值(Y)对目标组分的质量浓度(X, μg/L)进行线性回归,得到回归方程及相

关系数,结果见表 1。由表 1 可见 3 种物质在 1.0 ~ 500.0 μg/L 范围内均有很好的线性关系;以信噪比(S/N)为 3 计算检出限,6-OH-MTHβC、5-HT、5-HIAA 的检出限分别为 0.56, 0.26 和 0.53 μg/L。

表 1 3 种目标组分的线性范围、回归方程、相关系数及检出限

Table 1 Linear ranges, regression equations, correlation coefficients (r) and limits of detection of the three components

Component	Linear range/(μg/L)	Regression equation *	r	Limit of detection/(μg/L)
6-OH-MTHβC	1.0 - 500.0	$Y = 0.0391X + 0.0202$	0.9994	0.56
5-HT	1.0 - 500.0	$Y = 0.0797X - 0.0786$	0.9999	0.26
5-HIAA	1.0 - 500.0	$Y = 0.0374X + 0.0316$	0.9992	0.53

* Y: peak area ratio of target component and internal standard; X: mass concentration, μg/L.

2.3 精密度及回收率

配制 5, 10, 100 μg/L 低、中、高 3 个浓度水平的混合标准溶液,分别做方法的精密度考察。日内进行 5 组平行实验,计算日内精密度,每份样品连续测定 3 d,计算日间精密度,结果见表 2。

取鼠脑组织匀浆后的样品平行分配成两批,每批为 15 份。其中一批中加入 6-OH-MTHβC、5-HT、5-HIAA 混合标准溶液,另一批中不加标准溶液;按本文建立的方法进行提取和测定,计算加标回收率,结果见表 3。

表 2 方法的精密度

Table 2 Precisions of the method

Component	Spiked/(μg/L)	Found/(μg/L)			RSD/%	
		1 d	2 d	3 d	intra-day (n = 5)	inter-day (n = 3)
6-OH-MTHβC	5.0	4.93	4.87	4.60	4.8	5.6
	10.0	10.10	9.87	9.72	3.4	3.9
	100.0	97.59	96.89	94.66	4.7	5.2
5-HT	5.0	4.71	4.93	4.81	4.9	5.2
	10.0	10.18	9.93	9.71	3.5	4.3
	100.0	96.55	94.58	92.74	3.5	4.9
5-HIAA	5.0	5.07	5.10	4.56	4.6	6.1
	10.0	9.97	9.74	9.71	4.2	4.8
	100.0	99.71	97.37	97.19	4.3	5.7

表 3 鼠脑组织中添加的 3 种目标物的回收率 ($n=5$)
Table 3 Spiked recoveries of the three components spiked in a rat brain sample ($n=5$)

Component	Added/ ($\mu\text{g/L}$)	Found/ ($\mu\text{g/L}$)	Recovery/% (mean \pm SD)
6-OH-MTH β C	0	3.32	-
	5.0	7.89	91.2 \pm 4.1
	10.0	12.69	93.6 \pm 1.7
	100.0	98.83	95.5 \pm 2.7
5-HT	0	115.56	-
	5.0	120.07	90.3 \pm 3.3
	10.0	124.95	94.0 \pm 1.3
	100.0	208.76	93.2 \pm 1.5
5-HIAA	0	249.95	-
	5.0	254.58	92.6 \pm 2.5
	10.0	259.55	96.0 \pm 1.7
	100.0	344.60	94.7 \pm 1.6

2.4 胎鼠脑中 3 种物质含量的测定

新生 7 d 的 SD 胎鼠脑组织样品经处理后,采用本文方法测定其中的 6-OH-MTH β C、5-HT 及 5-HIAA 的含量。数据统计分析后的结果(见表 4)表明,与盐水对照组相比,酒精处理 8 h 后胎鼠脑内 5-HT 和 5-HIAA 的含量分别下降了 11.7% 和 6.9%,但并无显著性差异;而脑组织中 6-OH-MTH β C 的含量在酒精处理 8 h 后显著上升($P < 0.05$)。

表 4 胎鼠脑中 6-OH-MTH β C 及 5-HT、5-HIAA 的含量 ($n=9$)
Table 4 Concentrations of 6-OH-MTH β C, 5-HT and 5-HIAA in the brain of neonatal rat ($n=9$) ng/g

Group	6-OH-MTH β C (mean \pm SD)	5-HT (mean \pm SD)	5-HIAA (mean \pm SD)
Control	3.28 \pm 1.23	124.08 \pm 34.35	253.30 \pm 44.24
Ethanol-treated	5.85 \pm 1.83*	109.51 \pm 49.01	235.73 \pm 61.11

* $P < 0.05$, in comparison with the control.

2.5 讨论

实验中所用的库仑阵列电化学检测器拥有多通道电极,可通过使用多通道电势来排除干扰,协助分析^[14],因此该方法具有选择性好、灵敏度高的优点。以往对单胺类递质的分离多采用反相离子对色谱方法,但是常出现保留时间不稳、气泡干扰检测及影响分析柱寿命的问题。本文采用五氟苯基柱分离目标物质,可以避免在流动相中添加离子对试剂,使得每次分离都具有较好的重复性。流动相及样品蛋白沉淀液中加入适量的乙二胺四乙酸二钠,能够配合痕量的金属离子,起到了稳定基线及降低噪声的作用。同时,在高氯酸中加入适量的焦亚硫酸钠,可以避免待测组分在样品处理时被氧化的问题;另外,本文方法可免除样品的纯化富集过程,使得预处理过程简单快速,提高了回收率。

乙醇很容易透过血脑屏障、胎盘屏障,是常见的

神经毒性物质。在脑组织中,乙醇的代谢产物乙醛或其他醛类能与儿茶酚胺、吲哚胺发生非酶或酶催化反应,生成四氢异喹啉、四氢- β -吡啶等生物碱。这些生物碱的生成和代谢可能与帕金森症、酒精中毒等神经疾病的发病有关^[15-18]。在胎鼠急性酒精中毒数小时内,其脑组织中的乙醛浓度升高,使得 6-OH-MTH β C 的生成显著增强。该过程可能干扰了 5-HT 的正常代谢并引起 5-HT 的部分缺失。6-OH-MTH β C 在胎鼠脑内的积累和进一步的代谢,是否会损伤发育中的 5-HT 能神经元,还有待于进一步的研究。

3 结论

采用本文所述的条件,建立了一套能快速测定大鼠脑组织样本中 6-OH-MTH β C 及 5-HT、5-HIAA 含量的 HPLC-ECD 方法。通过线性关系、精密度、回收率的考察及胎鼠脑组织的测定,证明该方法简便稳定,灵敏度高,选择性好,为研究脑组织中 6-OH-MTH β C 的生成与代谢情况提供了良好的基础。

参考文献:

- [1] Herraiz T, Chaparro C. J Chromatogr A, 2006, 1120: 237
- [2] Herraiz T, Guillen H, Galisteo J. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 356: 118
- [3] Collins M A. Parkinsonism & Related Disorders, 2002, 8(6): 417
- [4] Zhang F, Goyal R N, Blank C L, et al. J Med Chem, 1992, 35(1): 82
- [5] Han Q P, Dryhurst G. J Med Chem, 1996, 39(7): 1494
- [6] Wang Q. Foreign Medical Sciences: Section of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine (王强. 国外医学: 临床生物化学与检验学分册), 2004, 25(2): 149
- [7] Guo Y Z, Yu L, Ma Z, et al. Chinese Journal of Chromatography (郭云珍, 于莉, 马郑, 等. 色谱), 2007, 25(2): 211
- [8] Zhang L, Lu Y J, Deng T L, et al. Chinese Journal of Chromatography (张雷, 卢英俊, 邓同乐, 等. 色谱), 2005, 23(1): 76
- [9] Tsuchiya H. J Chromatogr A, 2004, 1031: 325
- [10] Gutsche B, Herderich M. J Chromatogr A, 1997, 767: 101
- [11] Herraiz T. J Chromatogr A, 2000, 881: 483
- [12] Ye W L. Chinese Journal of Chromatography (叶惟冷. 色谱), 1990, 8(3): 159
- [13] Ikonomidou C, Bittigau P, Masahiko J I, et al. Science, 2000, 287: 1056
- [14] Zhang X H, Liu J, Su L Y. Journal of Clinical Research (张向晖, 刘军, 苏林雁. 医学临床研究), 2007, 24(1): 1
- [15] Mravec B. Physiol Res, 2006, 55: 353
- [16] Rojkovicova T, Mechref Y, Starkey J A, et al. J Chromatogr B, 2008, 863: 206
- [17] Collins M A. NeuroToxicology, 2004, 25: 117
- [18] Wrona M Z, Waskiewicz J, Han Q P, et al. Alcohol, 1997, 14(3): 213