

· 药物代谢 ·

LC-MS/MS 同时测定小鼠脑组织中 7 种神经递质含量

张蕾,孔令提,孙兰,叶林虎,肖冰心,曹方瑞,刘新民,常琪*
(中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所,北京 100193)

[摘要] 目的:建立一种同时测定小鼠脑组织中 7 种神经递质的 LC-MS/MS 分析方法。方法:小鼠脑组织加入 4 倍量冰冷的 0.2% 甲酸-水超声匀浆,匀浆液加入 0.2% 甲酸-乙腈沉淀蛋白,离心,取上清液,加入内标,混匀后进 LC-MS/MS 分析。采用 TSK Gel amide 80 (4.5 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱,柱温 35 ℃,流动相乙腈-6 mmol · L⁻¹ 甲酸铵水溶液 (pH 5.5) (67.5:32.5),流速 0.2 mL · min⁻¹,采用正离子多反应检测 (MRM) 模式进行扫描。通过动物试验验证 LC-MS/MS 的可靠性,并考察酸枣果肉对小鼠神经递质水平的影响。结果:多巴胺 (DA)、肾上腺素 (E)、去甲肾上腺素 (NE)、5-羟色胺 (5-HT)、乙酰胆碱 (Ach)、γ-氨基丁酸 (GABA)、谷氨酸 (Glu) 的最低检测限均 < 0.1 μg · L⁻¹,精密度 RSD 分别为 0.52%, 0.71%, 0.98%, 0.35%, 0.32%, 0.46%, 0.94%,准确度 RSD 分别为 0.67%, 0.46%, 0.53%, 0.72%, 0.48%, 0.59%, 0.82%,均符合生物样品的分析要求。动物试验显示与空白组相比,小鼠给予多奈哌齐后,海马和皮层中乙酰胆碱水平极显著升高;而东莨菪碱则作用相反,给药后会降低脑内乙酰胆碱含量,与空白组相比,具有极显著差异。小鼠口服酸枣果肉后,脑内多种神经递质明显发生改变,且变化规律与阳性药物舒乐安定相同。结论:建立的 LC-MS/MS 分析方法可应用于神经精神类药物的药理作用机制研究。

[关键词] 神经递质; LC-MS/MS; 脑组织; 酸枣仁; 阳性药物; 含量测定; 动物试验; 作用机制
[中图分类号] R945 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903 (2013) 20-0132-05
[doi] 10.11653/syfj2013200132

Simultaneous Determination of Seven Neurotransmitters in Mice Brain Tissue by LC-MS/MS

ZHANG Lei, KONG Ling-ti, SUN Lan, YE Lin-hu, XIAO Bing-xin,
CAO Fang-rui, LIU Xin-min, CHANG Qi*
(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of
Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

[Abstract] Objective: To establish a LC-MS/MS method for simultaneous determination of seven neurotransmitters in mice brain tissue. Method: Mice brain tissue was weighed and homogenized with 4 times the amount of ice-cold 0.2% aqueous formic acid, then homogenates mixed with 0.2% formic acid-acetonitrile for protein precipitation, centrifugation, the supernatant was collected and mixed with internal standard solution, then the mixture was injected into LC-MS/MS system for assay. Chromatographic separation was performed on a TSK Gel amide 80 column (4.5 mm × 150 mm, 5 μm), column temperature 35 ℃, mobile phase of acetonitrile-6 mmol · L⁻¹ ammonium formate solution (pH 5.50) (67.5:32.5), flow rate was 0.2 mL · min⁻¹, taking positive ion multiple reaction monitoring (MRM) mode for scanning. Reliability of LC-MS/MS was verified by

[收稿日期] 20130606(027)
[基金项目] 科技部对欧盟科技合作专项 (0901,1108);“重大新药创制”国家科技重大专项 (2012ZX09301002-001)
[第一作者] 张蕾,从事药代动力学研究,Tel:010-57833468,E-mail:zh10313@yahoo.cn
[通讯作者] * 常琪,研究员,博士生导师,从事中药活性成分分析和中药药代动力学研究,Tel:010-57833468,E-mail:qchang@implad.ac.cn

animal tests, and effect of jujube pulp on mice neurotransmitters levels was investigated. **Result:** The minimum detection limit of dopamine (DA), epinephrine (E), norepinephrine (NE), 5-hydroxytryptamine (5-HT), acetylcholine (Ach), γ -aminobutyric acid (GABA), glutamate (Glu) were less than $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, precision RSD of them were 0.52%, 0.71%, 0.98%, 0.35%, 0.32%, 0.46%, 0.94%, respectively; Accuracy RSD of them were 0.67%, 0.46%, 0.53%, 0.72%, 0.48%, 0.59%, 0.82%, respectively. Compared with the blank group animal, after mice were given donepezil, acetylcholine levels in hippocampus and cortex were significantly increased; While scopolamine had opposite effects after administrated, the content of acetylcholine significantly decreased by comparing with the blank group. After oral administration with jujube pulp, neurotransmitters in mice brain tissue significantly changed, and variation was the same with estazolam. **Conclusion:** This LC-MS/MS analysis method could be applied to pharmacological mechanisms study of neuropsychiatric drugs.

[**Key words**] neurotransmitters; LC-MS/MS; brain tissue; Ziziphi Spinosae Semen; positive drug; determination; animal tests; mechanisms

神经递质是指由突触前神经元合成并在末梢处释放,能特异性作用于突触后神经元或效应器细胞上的受体,并使突触后神经元或效应器细胞产生一定效应的信息传递物质,主要包括多巴胺(DA)、肾上腺素(E)、去甲肾上腺素(NE)、5-羟色胺(5-HT)等单胺类,乙酰胆碱(Ach)、胆碱等胆碱类, γ -氨基丁酸(GABA)、谷氨酸(Glu)等氨基酸类。在大脑中,神经递质的变化直接影响生物体的行为和活动,并与多种疾病密切相关^[1],通过脑内神经递质的测定,可以了解神经精神类药物的作用机制。

目前,单胺类神经递质的检测方法已有很多报道,其中高效液相色谱(HPLC)-电化学检测法较为常用^[2],另外还有HPLC-荧光法^[3]、放射酶学法^[4]、毛细管电泳法^[5]和化学发光法^[6]等。胆碱类递质的检测主要运用固相酶检测系统,采用HPLC-电化学检测^[7]。氨基酸类递质主要采用HPLC-荧光法^[8],但需对检测样品做柱前衍生化以使其产生荧光。三类神经递质均采用HPLC进行分析,但由于处理方法和检测系统不同,因此不能同时分析。本实验拟采用LC-MS/MS同时检测小鼠脑内7种神经递质(DA,E,NE,5-HT,Ach,GABA,Glu)的水平,为神经精神类药物的活性评价及机制研究提供可靠方法,并通过动物试验验证建立的LC-MS/MS分析方法的可靠性,同时将该方法应用于酸枣果肉的镇静催眠作用机制研究。

1 材料

1200型液相色谱系统(美国Agilent公司),Q-Trap 3200型串联四级杆-离子阱质谱分析仪(美国Applied Biosystems公司),Vibra-Cell型超声波破碎仪(美国Sonics公司)。

舒乐安定(艾司唑仑片,购自北京益民药业有限公司,批号0912002,用时将其研磨成均匀微粉,并均匀分散于0.5%羧甲基纤维素钠水溶液中);酸枣仁[采自河北邢台市,经中国医学科学院药用植物研究所张本刚教授鉴定为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的成熟果实];5-HT,Ach,GABA,3,4-二羟基苯胺(DHBA,内标)、东莨菪碱对照品均购自美国Sigma公司,批号分别为114K7028,123K2625,744617V,MKAA3430V,0703232;DA,E,NE,Glu对照品均购自中国食品药品检定研究院,批号分别为100070-201006,100154-200503,100169-21103,140690-201203;甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

雄性健康C/57小鼠,体重20~22g,由中国医学科学院实验动物研究所提供,许可证号SCXK(京)2009-0007。

2 方法与结果

2.1 LC-MS/MS条件 TSK Gel amide 80色谱柱(4.5 mm × 150 mm, 5 μm),柱温35 $^{\circ}\text{C}$,流动相乙腈-6 mmol · L⁻¹ 甲酸铵水溶液(pH 5.5)(67.5:32.5),流速0.2 mL · min⁻¹,进样器温度4 $^{\circ}\text{C}$,质谱检测器采用电喷雾电离方式进行离子化,以正离子多反应检测(MRM)模式进行扫描,离子源及其他相关参数优化为喷雾电压4 500 V,加热温度450 $^{\circ}\text{C}$,Gas1 50 Psi, Gas2 50 Psi,其他参数见表1。

2.2 对照品溶液的配制 精密称取7种神经递质对照品各5 mg,分别用含0.2%甲酸的甲醇-水(1:1,下同)溶解配制成1 g · L⁻¹的对照品储备液,于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。同法配制0.3 g · L⁻¹的DHBA

表 1 神经递质检测离子对及质谱离子化条件

检测递质	$Q1\rightarrow Q3(m/z)$	去簇电压(DP) /V	出口电压(EP) /V	碰撞能(CE) /eV	碰撞池入口电压 (CEP)/V	碰撞池出口电压 (CXP)/V
DA	154.2→137.1	31	7.0	15	12	4
E	184.4→166.2	21	7.5	10	13	4
NE	170.3→152.2	16	3.5	11	10	4
5-HT	177.2→160.0	16	9.5	15	12	4
Ach	146.1→87.1	31	5.5	10	17	4
GABA	104.1→87.1	26	9.5	15	10	4
Glu	148.0→84.3	26	5.0	21	12	4
DHBA	140.1→123.1	10	10	17	10	4

内标溶液。分别精密吸取 7 种神经递质对照品储备液各 40 μL,加含 0.2% 甲酸的甲醇-水至 2 mL,混匀配制成 20 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液,分别用含 0.2% 甲酸的甲醇-水稀释至 500,200,100,50,20,10,5,2,1,0.5,0.2,0.1 μg·L⁻¹ 的系列混合液。另以同样方法配制含 5,50,500 μg·L⁻¹ 的各神经递质混合对照品溶液作为低、中、高 3 种不同质量浓度的质控对照品溶液。对照品溶液均在每次用前新鲜配制。

2.3 脑样品的处理 小鼠颈椎脱臼处死后,在冰浴中取全脑(根据需要可进一步分离海马和皮层),精密称重,加入 4 倍量冰冷的 0.2% 甲酸-水,在冰浴中超声匀浆得脑匀浆液。取脑匀浆液 0.2 mL,加入冰冷的 0.2% 甲酸-乙腈 0.4 mL,混匀后于 4 ℃ 放置 30 min,于 4 ℃ 离心(12 000 r·min⁻¹)3 min,取上清液,每 200 μL 上清液中加入内标液(0.3 g·L⁻¹ DHBA) 20 μL,混匀后精密吸取 50 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

2.4 方法学考察

2.4.1 方法专属性 精密量取 2.2 项下 100 μg·L⁻¹ 混合对照品溶液、7 种被测神经递质对照品溶液和 DHBA 内标溶液适量,按 2.1 项下色谱条件进行检测,见图 1,各色谱峰的保留时间 4~6 min,无杂质干扰,峰型良好。

2.4.2 线性范围与最低检测限 取 2.2 项下系列混合对照品溶液 200 μL,分别加入 0.3 g·L⁻¹ 内标液 20 μL,混匀后取 50 μL 进行 LC-MS/MS 分析,以各神经递质的质量浓度为横坐标,被测物与内标峰面积比为纵坐标,进行线性回归,结果见表 2。按 2.2 项下方法配制 100 μg·L⁻¹ 的混合对照品溶液,用含 0.2% 甲酸的甲醇-水不断稀释,直至信噪比(S/N)3:1,发现各递质样品的最低检测限均 <0.1

μg·L⁻¹,达到了测定脑内神经递质的要求。

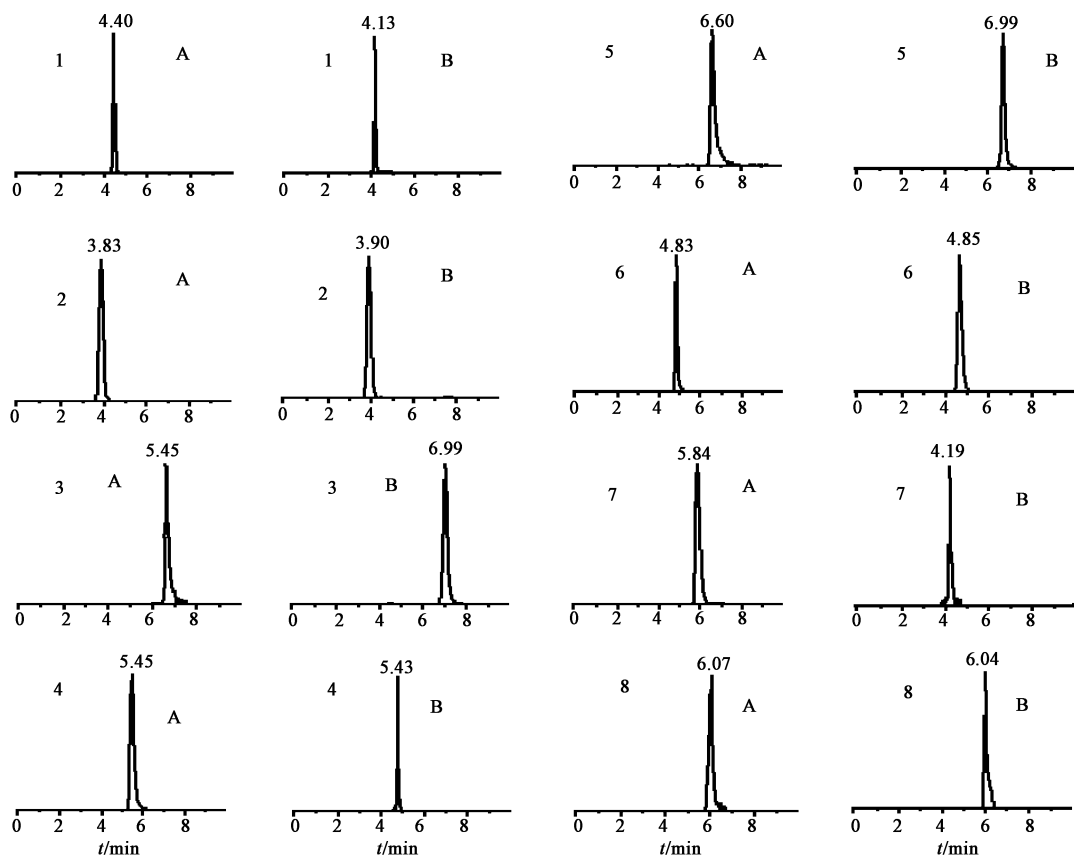
表 2 各神经递质的标准曲线及最低检测限

化合物	线性范围 /μg·L ⁻¹	线性公式	R^2	最低检测限 /μg·L ⁻¹
DA	2~100	$Y=0.027X-0.054$	0.999 4	0.05
E	0.2~10	$Y=0.043X+0.001$	0.996 9	0.05
NE	10~500	$Y=0.004X+0.030$	0.997 2	0.02
5-HT	1~20	$Y=0.037X+0.035$	0.995 9	0.05
Ach	5~100	$Y=0.438X+5.623$	0.995 6	0.01
GABA	10~200	$Y=0.018X-0.052$	0.995 1	0.01
Glu	10~500	$Y=0.002X+0.049$	0.998 1	0.02

2.4.3 精密度和准确度试验 量取 2.2 项下高、中、低 3 个质量浓度的混合对照品溶液各 5 份,分别精密吸取 50 μL 进行 LC-MS/MS 分析,每个样品重复进样 6 次,结果 DA,E,NE,5-HT,Ach,GABA,Glu 峰面积的精密度 RSD 分别为 0.52%,0.71%,0.98%,0.35%,0.32%,0.46%,0.94%,准确度 RSD 分别为 0.67%,0.46%,0.53%,0.72%,0.48%,0.59%,0.82%,均符合生物样品的分析要求。

2.4.4 稳定性试验 取 2.2 项下配制的 100 μg·L⁻¹ 混合对照品溶液,于 4 ℃ 保存,分别在 0,6,12,24 h 进样分析,结果表明于 4 ℃ 条件下 24 h 内稳定性较好。取 2.3 项下脑样品 3 份,于 -80 ℃ 保存,每天测定 1 份,比较各个神经递质在不同时间点的含量变化,表明脑样品于 4 ℃ 条件下在 24 h 内较好,存于 -80 ℃ 的样品较稳定,在 3 周内无明显降解。

2.5 动物样品验证试验 多奈哌齐是目前常用的第二代胆碱酯酶的抑制剂,能特异性地抑制胆碱酯酶对乙酰胆碱的水解,从而使小鼠脑内乙酰胆碱含



A. 对照品;B. 脑样品;1. γ -氨基丁酸;2. 乙酰胆碱;3. 谷氨酸;4. 多巴胺;
5. 去甲肾上腺素;6. 5-羟色胺;7. 肾上腺素;8. 3,4-二羟苄胺(内标)

图1 各神经递质对照品与脑样品的 LC-MS/MS

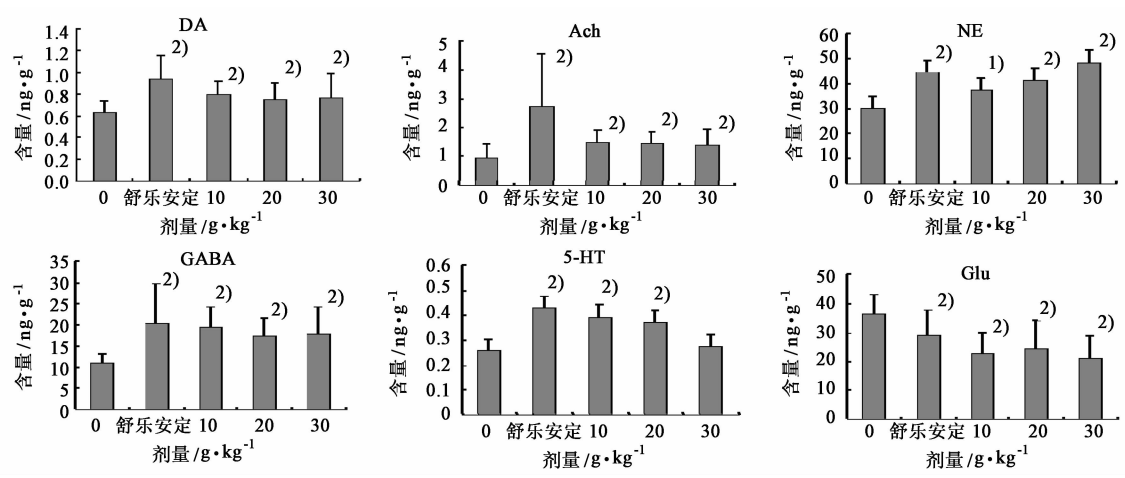
量增高^[9]。东莨菪碱是乙酰胆碱受体的特异性拮抗剂,可使小鼠脑内乙酰胆碱的含量降低^[10],故选用多奈哌齐和东莨菪碱作为阳性药物,以验证所建立的 LC-MS/MS 分析方法的可靠性。

小鼠适应性喂养 48 h 后随机分为 3 组,每组 10 只,3 组分别为东莨菪碱组($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、多奈哌齐组($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和空白对照组,腹腔注射给药或给予等体积生理盐水。给药 30 min 后将小鼠颈椎脱臼处死,冰浴取脑,分离海马和皮层并精密称重。按 2.3 项下方法处理和分析样品,计算脑组织中神经递质含量,结果各组海马中乙酰胆碱质量分数分别为 $0.011, 0.079, 0.028\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,皮层中则依次为 $0.08, 0.037, 0.013\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,由于所选阳性药物特异性作用于乙酰胆碱,其余神经递质的含量虽有微小变化,但未在本研究中列出。与空白组相比,小鼠给予多奈哌齐后,海马和皮层中乙酰胆碱水平极显著升高($P<0.01$);而东莨菪碱则作用相反,给药后会降低脑内乙酰胆碱含量,与空白组相比,具有极显著差异($P<0.01$)。

2.6 酸枣果肉对小鼠脑内神经递质的影响^[11] 小鼠适应性喂养 48 h 后随机分为 5 组,每组 13 只,分别为空白对照组、阳性对照组和 3 个不同剂量的酸枣果肉 80% 乙醇提取物组($10, 20, 30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,以生药量计)。小鼠每天灌胃给予生理盐水(阳性对照组和空白对照组)或酸枣果肉提取物 1 次,连续 14 d。于第 15 d,阳性对照组小鼠灌胃给予舒乐安定($6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),其余组小鼠同前,给药 30 min 后颈椎脱臼处死,取全脑,按 2.3 项下方法处理和分析样品,计算脑组织中神经递质的含量,见图 2,结果发现口服给予小鼠酸枣果肉后,小鼠脑内多种神经递质明显发生改变(E 未检出),且变化规律与阳性药物舒乐安定相同。

3 讨论

建立了可同时测定脑组织样品中 7 种神经递质的 LC-MS/MS 分析,包括 DA, E, NE, 5-HT, Ach, Glu, GABA, 实现了 3 类神经递质的同时测定,且样品需要量小、操作简单。由于此 7 种神经递质均为强极性化合物,反相色谱柱对此类化合物几乎无保



与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$
图 2 口服给予酸枣果肉后小鼠脑内神经递质的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 13$)

留,使得测定易受脑样品中杂质干扰而无法获得很好的实验结果,故选用正相色谱柱,使色谱峰保留值推后至 4~6 min,获得了较好的分离效果,避免了杂质的干扰。流动相的酸度对各神经递质的峰型和保留时间有较大的影响,尤其是 DA, E, NE, 5-HT, 选用含缓冲盐的乙腈-水(含 6 mmol·L⁻¹甲酸铵)为洗脱系统,比较不同 pH(4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0)条件下的分离效果及峰型,最终选择了 pH 5.5。

在选择蛋白沉淀剂时,比较了乙腈、0.2% 甲酸-乙腈、甲醇、0.2% 甲酸-甲醇、高氯酸等,发现乙腈沉淀蛋白后色谱峰变宽,出现拖尾现象;甲醇的沉淀能力不如乙腈;高氯酸处理后样品色谱峰出现开叉现象,可能与其酸性过强有关,最终选用含 0.2% 甲酸的乙腈作为沉淀剂,不但沉淀效果好,色谱行为亦不受影响。由于神经递质的不稳定性,整个操作过程均须在冰浴条件下进行,且尽量缩短操作时间以保证实验结果的准确可靠。

5-HT 是与睡眠密切相关的一种抑制性神经递质,试验中酸枣果肉按 10, 20 g·kg⁻¹ 给药剂量组与空白组相比,5-HT 含量均明显升高,与文献报道相符^[12]。其余各神经递质给药组与空白组相比也均有显著性差异,说明酸枣果肉可能通过引起多种神经递质的含量变化达到镇静催眠的效果,具体作用机制有待确定。

[参考文献]

[1] 李永生, 阎学安, 邵福源. 中枢神经递质与学习记忆

的相关性研究进展[J]. 实用医药杂志, 2006, 23 (7):864.

[3] 赵燕燕, 刘丽艳, 韩媛媛, 等. 高效液相色谱-荧光检测法同时测定大鼠不同脑区中的 8 种单胺类神经递质[J]. 色谱, 2011, 29(2):146.

[4] 石一鸣. 儿茶酚胺酶促放射测定法[J]. 第二军医大学学报, 1989, 10(6):567.

[5] 付敏, 张东明, 马万云, 等. 多巴胺和 5-羟色胺的毛细管电泳测定[J]. 分析测试学报, 2002, 21(2):1.

[6] 陈福南, 张迎雪, 章竹君, 等. 高效液相色谱化学发光检测人体血清及尿样中的盐酸肾上腺素[J]. 分析化学, 2005, 33(12):1771.

[7] 李炳源, 曹蓓蓓, 黄彦, 等. 高效液相色谱法固相酶检测系统测试生物样本中胆碱与乙酰胆碱的研究[J]. 南通大学学报:医学版, 2006, 26(6):429.

[8] 桂莉, 田洪, 郑健, 等. 高效液相色谱荧光法同时测定小鼠脑组织中 4 种氨基酸类神经递质[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(8):675.

[9] 杨荣军, 万琪, 耿晓英, 等. 多奈哌齐上调海马神经元 β_2 烟碱型乙酰胆碱受体的表达[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2006, 13(4):209.

[10] 叶翠飞, 张丽, 张兰, 等. 参乌胶囊对东莨菪碱模型大鼠学习记忆能力和脑内胆碱能系统的影响[J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(9):661.

[11] 张蕾, 何晓曦, 徐淑萍, 等. 酸枣果肉的镇静催眠作用[J]. 中药材, 2011, 34(8):1263.

[12] 黄维, 金邦荃, 程光宇, 等. 酸枣仁功效成分测定及改善睡眠保健功能的研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19 (15):1173.

[责任编辑 全燕]