

# 同位素编码衍生-分散液液微萃取/超高效液相色谱-串联质谱检测大鼠脑微透析液中儿茶酚胺

亓伟梅<sup>1</sup>, 赵先恩<sup>2\*</sup>, 亓永<sup>1</sup>, 孙志伟<sup>2</sup>, 陈光<sup>2</sup>, 尤进茂<sup>2,3\*</sup>, 索有瑞<sup>3</sup>

(1. 莱芜职业技术学院 化工教研室, 山东 莱芜 271100; 2. 山东省生命有机分析重点实验室, 山东省高校绿色天然产物与医药中间体开发重点实验室, 曲阜师范大学 化学与化工学院, 山东 曲阜 273165; 3. 中国科学院 西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001)

**摘要:** 为实现微量大鼠脑微透析液中3种儿茶酚胺化合物的高灵敏检测, 采用 $d_0/d_3$ -10-甲基-吲哚酮-2-磺酰氯( $d_0/d_3$ -MASC)为同位素编码衍生化试剂, 联合使用超声辅助分散液液微萃取技术, 建立了超高效液相色谱-串联质谱(UHPLC-MS/MS)快速测定多巴胺(DA)、肾上腺素(EP)和去甲肾上腺素(NE)的分析方法。分别以 $d_0$ -MASC和 $d_3$ -MASC衍生微透析液样品和对照品, 混合后采用分散液液微萃取技术富集净化, 再进行UHPLC-MS/MS检测, 以 $d_3$ -MASC衍生物作为相应 $d_0$ -MASC衍生物的内标物进行定量。结果表明, 在pH 10.8乙腈水溶液中于37℃衍生反应3 min, 即可实现待测物的完全分离与检测, 3种儿茶酚胺化合物的线性范围为0.02~10.0 nmol/L, 相关系数大于0.995, 检出限为0.005~0.010 nmol/L, 定量下限为0.018~0.040 nmol/L。该方法与已报道方法相比具有显著优势, 能够满足大鼠脑微透析液中儿茶酚胺的检测要求。

**关键词:** 活体微透析; 帕金森病; 多反应监测模式(MRM); 稳定同位素标记

中图分类号: O657.63; O623.732 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2015)09-1014-07

## Determination of Catecholamines in Rat Brain Microdialysate by Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Using Isotope-coded Derivatization Coupled with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction

QI Wei-mei<sup>1</sup>, ZHAO Xian-en<sup>2\*</sup>, QI Yong<sup>1</sup>, SUN Zhi-wei<sup>2</sup>, CHEN Guang<sup>2</sup>,  
YOU Jin-mao<sup>2,3\*</sup>, SUO You-rui<sup>3</sup>

(1. Chemical Department, Laiwu Vocational and Technical College, Laiwu 271100, China; 2. Shandong Provincial Key Laboratory of Life-organic Analysis, Key Laboratory of Pharmaceutical Intermediates and Analysis of Natural Medicine, College of Chemistry and Chemical Engineering, Qufu Normal University, Qufu 273165, China; 3. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

**Abstract:** To achieve sensitive detection of catecholamines in trace rat brain microdialysate samples, using  $d_0/d_3$ -10-methyl-acridone-2-sulfonyl chloride( $d_0/d_3$ -MASC) as isotope-coded derivatization, a novel ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(UHPLC-MS/MS) method was developed for the detection of dopamine(DA), norepinephrine(NE) and epinephrine(EP) by ultrasonic-assisted dispersive liquid-liquid microextraction(UA-DLLME).  $d_0$ -MASC(light form) and  $d_3$ -MASC(heavy form) were used as derivatization reagents for microdialysate samples and standards, respectively. The mixture of two solutions was enriched by dispersive liquid-liquid microextraction, and 3 catecholamines were detected by UHPLC-MS/MS with heavy derivatives as internal standards for corresponding light derivatives. The result indicated that the stable derivatives were obtained in pH 10.8 buffer/acetonitrile at 37℃ for 3.0 min, and then were separated within 3.0 min. Linearity ranges were obtained in the range of 0.02-10.0 nmol/L( $r > 0.995$ ) for three catecholamines, with LODs of 0.005-0.010 nmol/L and LOQs of 0.018-0.040 nmol/L.

收稿日期: 2015-03-31; 修回日期: 2015-05-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81303179)

\* 通讯作者: 赵先恩, 博士, 副教授, 研究方向: 质谱分析与药物筛选, Tel: 0537-4458501, E-mail: xianenzhao@163.com  
尤进茂, 博士, 教授, 研究方向: 有机分析及组学研究, Tel: 0537-4456305, E-mail: jmyou6304@163.com

Compared with the reported methods, the method is a convenient and validated method for the sensitive and accurate determination of catecholamines in trace rat brain microdialysates.

**Key words:** in vivo microdialysis; Parkinson's disease; multiple reaction monitoring (MRM); stable isotope label

多巴胺 (Dopamine, DA)、去甲肾上腺素 (Norepinephrine, NE) 和肾上腺素 (Epinephrine, EP) 属于儿茶酚胺类化合物 (Catecholamines, CATs)。CATs 在大脑和神经信号传导中起重要作用, 与人体健康和帕金森病等多种神经和精神疾病关系密切。通过活体动物脑微透析技术取样, 检测微透析液中 CATs 含量不仅对相关疾病的诊断和治疗具有重要的临床意义, 而且对神经科学、脑科学、药理学等基础研究也具有重要科学意义<sup>[1-5]</sup>。目前, CATs 的检测方法主要包括高效液相色谱法、荧光光度法、毛细管电泳法、化学发光法、电化学法、液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 等<sup>[1, 4, 6-7]</sup>。其中, LC-MS/MS 法因检测快速灵敏、准确度和特异性好等特点而成为一种优良的生化分析技术<sup>[8-9]</sup>。由于脑微透析液等生物样本中 CATs 含量低、基质复杂, 且其本身荧光或质谱检测响应信号不强, 而衍生化后的 LC-MS/MS 分析方法具有灵敏度高、选择性好、抗基质干扰能力强, 以及可多成分同时检测等特点, 是近年出现的一类行之有效的分析方法<sup>[1, 3-4, 10-13]</sup>。近年来, 经同位素衍生化后的 LC-MS/MS 分析方法相继被报道, 显示出较好的灵敏度和抗基质干扰能力<sup>[14-19]</sup>。同时, 超声辅助分散液液微萃取 (UA-DLLME) 结合衍生化的样品前处理技术已在分析检测中展现出良好的应用前景<sup>[20-22]</sup>, 具有灵敏、准确、快速、抗基质干扰等优势。本文采用自主合成的  $d_0/d_3$ -10-甲基-吡啶酮-2-磺酰氯 ( $d_0/d_3$ -MASC) 作为衍生化试剂<sup>[17]</sup>, 联合 UA-DLLME 技术, 建立了帕金森病大鼠脑微透析液中 3 种儿茶酚胺衍生物的 UHPLC-MS/MS 检测方法, 具有活体取样、灵敏、快速、准确等特点。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Waters Xevo-TQ 三重四极杆质谱仪 (美国 Waters 公司); 瑞典 CMA 微透析取样系统: CMA 402 双通道微透析泵, 动物五通道清醒活动装置 (美国 Instech 公司), MAB85 双通道冷却收集器, MAB6 脑探针及导引管; 动物手术使用设备: CMA450 动物恒温控制器, 美国 ASI SAS-4100 单臂脑立体定位仪, 颅钻 (深圳沃瑞德科技有限公司); BSI10S 分析天平 (北京赛多利斯有限公司); Milli-Q 超纯水仪 (Millipore 公司); Eppendorf 5810R 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); 超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司)。

DA, NE, EP (纯度 >98%, Sigma 公司); 乙腈、甲醇、甲酸 (色谱纯, Sigma 公司); 碳酸钠、碳酸氢钠 (分析纯, 天津广成试剂有限公司); 同位素衍生化试剂  $d_0/d_3$ -10-甲基-吡啶酮-2-磺酰氯 ( $d_0/d_3$ -MASC, 纯度 99%) 为本实验室合成<sup>[17]</sup>; 实验用水为 Milli-Q 制备的纯水。

### 1.2 溶液配制

称取适量  $d_0/d_3$ -MASC 衍生化试剂用乙腈配成  $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L 溶液。分别称取适量 3 种儿茶酚胺标准品, 用 50% 乙腈-水溶液配成 0.01 mol/L 标准储备液, 稀释得到系列工作液。碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液 (0.1 mol/L) 在 pH 计指示下用氢氧化钠溶液调至 pH 10.8。

### 1.3 大鼠脑微透析取样

SD 雄性大鼠, 体重 200~220 g, 购自山东鲁抗医药股份有限公司实验动物中心, 随机分为正常组和帕金森病模型组 ( $n=6$ )。大鼠腹腔注射 1.0% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg), 麻醉状态下埋探针套管于纹状体 (A: +0.2 mm, L: +3 mm, V: 7.5 mm), 牙科水泥固定。帕金森病组大鼠向纹状体缓慢注射 0.2% 6-羟基多巴 (6-OHDA) 的生理盐水溶液 (32  $\mu$ g/kg, 1.1  $\mu$ L/min), 正常组腹腔注射等体积生理盐水。造模之后两组大鼠自由活动 6 d, 第 7 d 于大鼠清醒自由活动状态下插入脑探针进行微透析, 先用林格液灌流 (2.0  $\mu$ L/min), 平衡 60 min 后开始收集微透析液, 设置每 15 min 收集 1 管用于衍生化分析检测。动物手术、帕金森病大鼠造模按照王丹巧研究组<sup>[5]</sup>报道的方法严格执行, 未进行动物行为学方面的复制模型验证, 但 3 种 CATs 含量结果与该文献一致, 从生化分析角度验证了动物模型成功。

## 1.4 样品前处理

**同位素编码衍生:** 第一支 1.5 mL EP 管中加入 100  $\mu\text{L}$   $d_0$ -MASC 衍生试剂溶液、30  $\mu\text{L}$  混标溶液 (或大鼠脑微透析液)、100  $\mu\text{L}$  碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液 (pH 10.8), 封盖后涡旋混匀 10 s, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴中衍生反应 3 min, 加入 10  $\mu\text{L}$  25% 甲酸水溶液调至 pH 3.0~5.0; 取第二支 EP 管, 按同样步骤, 用  $d_3$ -MASC 衍生另一份标品或微透析液样品, 示意图如图 1。

**超声辅助分散液液微萃取:** 将上述两支 EP 管中衍生液合并于一支 10 mL 尖底离心管中, 加水至 8 mL, 加入 400  $\mu\text{L}$  甲醇作为分散剂, 160  $\mu\text{L}$  氯仿作为萃取剂, 室温下超声振荡萃取 3 min, 高速离心 3 min (10 000 r/min), 吸取下层有机相吹干, 流动相复溶后用于分析检测, 示意图如图 1。

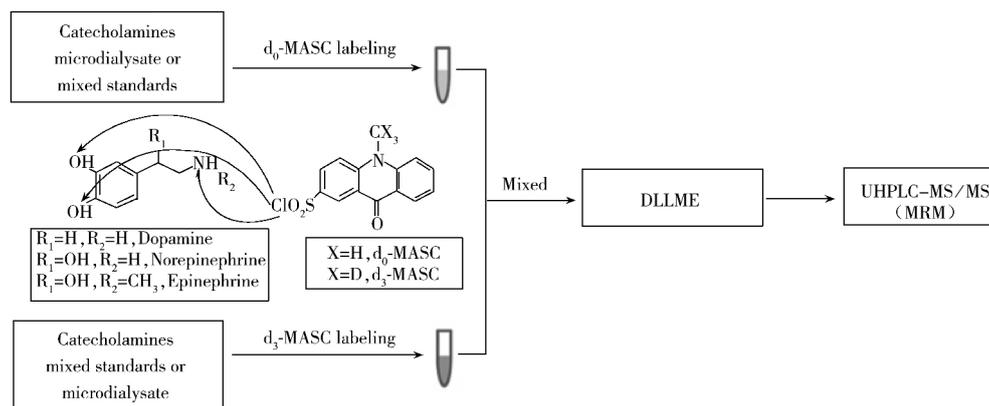


图 1 儿茶酚胺的同位素编码衍生和分散液液微萃取流程示意图

Fig. 1 The procedure schemes of isotope-coded derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction of catecholamines

## 1.5 色谱-质谱条件与定量方式

**色谱柱:** UPLC BEH Shield RP 18 (50 mm  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$  i. d., Waters, USA)。流动相: A 为甲醇, B 为 0.1% (体积分数) 甲酸水。梯度洗脱条件: 0~2 min: 50%~90% A; 2~3 min: 90%~100% A; 3~5 min: 100%~50% A。流速: 0.5 mL/min, 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$ , 进样量 5  $\mu\text{L}$ 。采用三重四极杆质谱的多反应监测 (MRM) 模式定量, 电喷雾电离源 (ESI), 正离子模式检测, 离子源温度 150  $^{\circ}\text{C}$ , 毛细管电压 3.0 kV, 脱溶剂气 (氮气) 流速 800 L/h, 脱溶剂气温度 350  $^{\circ}\text{C}$ , 锥孔气 (氮气) 流速 50 L/h, 碰撞气 (氮气) 流速 0.16 mL/min, 锥孔电压、碰撞能、定量和定性离子对参数见表 1。

**定量方式**参考许国旺研究组<sup>[18]</sup>和本研究组<sup>[19]</sup>的同位素编码标记定量法: 两份等浓度 CATs 标准品分别用  $d_0$ -MASC 和  $d_3$ -MASC 标记, 将两份衍生溶液分别按照体积比 1:10, 1:5, 1:2, 1:1, 2:1, 5:1, 10:1 混合后进行 UHPLC-MS/MS 分析, 以轻/重标记物质的谱峰面积之比对体积比值进行线性回归, 获得轻/重衍生物的相对响应因子。微透析液和适宜浓度的标准溶液经轻/重编码标记后, 按一定比例混合进行 UHPLC-MS/MS 分析, 利用相对响应因子计算微透析液中 CATs 的含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 UHPLC-MS/MS 条件的优化

因 CATs 的极性很强, 直接进行 LC-MS 分析时色谱保留弱、分离度差, 在本实验色谱洗脱条件下, 3 种 CATs 的保留时间均小于 0.6 min。通过 MASC 衍生化技术, 能够大大改善 CATs 在反相色谱柱上的保留。经对比优化不同色谱柱 (Agilent 公司的 Eclipse, Zorbax 系列的 50, 100 mm 长度的超高效色谱柱, 以及 Waters BEH 系列的 50 mm 超高效色谱柱) 和流动相条件 (包括甲醇、乙腈、水相是否有甲酸调节剂) 发现, 酸性的甲醇-水体系配合 Waters BEH Shield RP 18 超高效色谱柱的分离效果最好。在“1.5”所示的梯度洗脱程序下, 3 种 CATs 衍生物在 3.0 min 内实现了快速分离与检测, 具有良好的峰形和分离度, 保留时间见表 1 (介于 1.0~2.1 min 之间)。实验发现正离子模式的灵敏度显著高于负离子模式, 采用正离子模式优化, 发现毛细管电压在 1.0~3.0 kV 范围内的信号逐渐增强, 因此选用 3.0 kV 的电压。采用实验部分的质谱条件, 优化了 6 种衍生化产物的四极杆质谱 MRM 模式参数, 包括定

量和定性离子对、锥孔电压、碰撞能, 最佳质谱参数见表1。结果表明, 3种CATs衍生物均能特异性地产生208.10 Da(重标为211.10 Da)的产物离子, 用作定量离子通道, 代表性的 $d_0$ -MASC-多巴胺衍生物的二级质谱图及其特异性产物离子的裂解模式见图2。

表1 儿茶酚胺 $d_0/d_3$ -MASC衍生物的质谱采集条件  
Table 1 Conditions of  $d_0/d_3$ -MASC derivatives of 3 catecholamines in mass spectrometric analysis

Compound	Retention time (min)	Cone voltage (V)	Quantitation transition ( $m/z$ )	Collision energy (eV)	Confirmation transition ( $m/z$ )	Collision energy (eV)
$d_0$ -MASC - norepinephrine	1.036	58	983.35 > 208.10	55	983.35 > 224.25	56
$d_3$ -MASC - norepinephrine	1.038	58	992.35 > 211.10	55	992.35 > 227.25	56
$d_0$ -MASC - epinephrine	1.263	60	997.38 > 208.10	56	997.38 > 224.25	58
$d_3$ -MASC - epinephrine	1.261	60	1 006.38 > 211.10	56	1 006.38 > 227.25	58
$d_0$ -MASC - dopamine	2.048	56	967.34 > 208.10	52	967.34 > 224.25	54
$d_3$ -MASC - dopamine	2.046	56	976.34 > 211.10	52	976.34 > 227.25	54

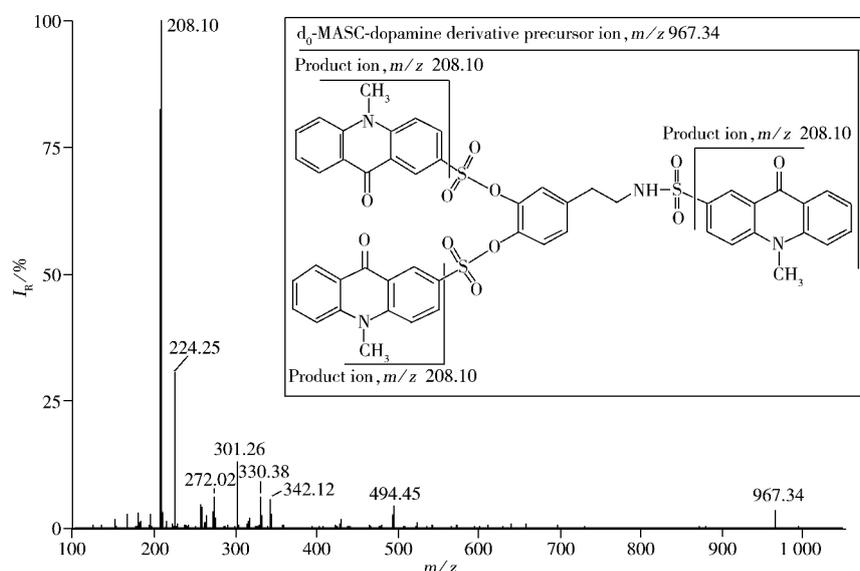


图2  $d_0$ -MASC-多巴胺衍生物的二级质谱图及其特异性产物离子的裂解模式

Fig. 2 MS/MS chromatogram and its specific fragmentation scheme of  $d_0$ -MASC - dopamine

## 2.2 衍生化条件的优化

MASC标记CATs中氨基和酚羟基的衍生化反应的主要影响因素包括缓冲溶液pH值、温度、时间、衍生化试剂倍数, 参照文献[17]进行了衍生化条件的优化。考察了碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液pH值(pH 8.0~11.08)对衍生反应的影响, 发现pH 8.0~9.0时衍生反应非常不完全, 仪器信号极低。pH > 9.0时, 衍生物信号随pH值增大而显著增高, pH 10.8时达最大值, 此后继续增大pH值则信号下降, 这可能因为强碱性溶液导致了衍生试剂和衍生物的分解。因此, 实验选用pH 10.8的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液。同时, 考察了衍生试剂用量、衍生时间、温度对衍生反应的影响。结果显示, 随衍生试剂用量的增加, 衍生产物的信号逐渐增大, 当衍生试剂用量为3种CATs总摩尔量的8倍时衍生产物的信号最高。对衍生时间和温度的考察结果表明, 在37℃衍生3min时产物的信号最大。因此确定最佳衍生化条件为: pH 10.8的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液, 37℃恒温水浴中衍生反应3min, MASC过量倍数为8倍即可实现完全标记。

## 2.3 UA-DLLME条件的优化

萃取剂和分散剂的种类、用量是影响萃取效率最重要的因素。实验选取5种萃取剂(四氯化碳、氯仿、二氯甲烷、氯苯、二氯乙烷)和5种分散剂(甲醇、乙醇、乙腈、丙酮、乙酸乙酯)分别进行交叉组合考察。结果表明, 氯仿与甲醇组合时, 不但易于离心分离, 而且有机相中萃取物的仪器响应值最高, 且回收率稳定。因此, 选定氯仿作为萃取剂, 甲醇作为分散剂。进一步考察了萃取剂和分散剂用量的影响, 结果发现当氯仿为160  $\mu$ L、甲醇为400  $\mu$ L时, 萃取物的仪器响应值最高。在上述最佳条件

下优化了超声萃取时间,发现超声振荡 3 min 即可获得最高的检测响应值。按照上述的优化条件进行一次 UA - DLLME 后,吸净下层有机相,再对上层水相重复进行 1 次 UA - DLLME 和检测,未检出 3 种 CATs 衍生物。该结果表明,建立的 UA - DLLME 条件对 CATs 衍生物的萃取率满足要求。

## 2.4 分析方法评价

**2.4.1 线性、检出限及定量下限** 在上述优化的实验条件下,按“1.5”所述定量方式,以轻/重标记物质谱峰面积之比对体积比值进行线性回归,结果显示,在 0.02 ~ 10.0 nmol/L 浓度范围内,3 种 CATs 衍生物的线性系数均大于 0.995,表明在此范围内,3 种化合物具有良好的线性响应。分别按照信噪比  $S/N = 3$  和  $S/N = 10$  计算检出限(LODs)和定量下限(LOQs),得 3 种儿茶酚胺的 LOD 和 LOQ 分别为 0.005 ~ 0.010 nmol/L 和 0.018 ~ 0.040 nmol/L(见表 2)。

表 2 本研究与已报道方法的比较  
Table 2 Comparisons of this method with the reported methods

Method	Reagent	Derivatization-LC separation			LOD( nmol/L)			LOQ( nmol/L)			Matrix effect (%)			Reference
		temperature (°C)	time (min)	time (min)	DA	NE	EP	DA	NE	EP	DA	NE	EP	
Isotope - labeled derivatization HPLC - MS/MS	<sup>12</sup> C/ <sup>13</sup> C Benzoyl chloride	-	-	8.0	0.03	0.20	-	-	-	-	-	-	-	[3]
Isotope - labeled derivatization HPLC - MS/MS	d <sub>0</sub> /d <sub>4</sub> -Acetaldehyde	37	25	2.7	0.033	0.030	-	0.065	0.059	-	-	-	-	[12]
Derivatization HPLC - MS/MS	Dansyl chloride	35	30	20	0.40	0.36	-	1.33	1.20	-	-	-	-	[23]
Isotope - labeled derivatization UHPLC - MS/MS	<sup>12</sup> C/ <sup>13</sup> C Benzoyl chloride	-	-	13.0	0.131	0.296	-	0.979	1.182	-	-	-	-	[14]
Derivatization-UHPLC - MS/MS	(5-N-Succinimidoxypentyl) triphenyl phosphonium bromide	50	10	3.0	0.007	0.013	-	0.030	0.030	-	-	-	-	[13]
Derivatization - UA - DLLME/ UHPLC - MS/MS	d <sub>0</sub> -MASC	37	3.0	3.0	0.005	0.010	0.008	0.018	0.040	0.030	108.6	92.1	87.9	In this work <sup>a</sup>
Isotope - labeled - UA - DLLME/ UHPLC - MS/MS	d <sub>0</sub> /d <sub>3</sub> -MASC	37	3.0	3.0	0.005	0.010	0.008	0.018	0.040	0.030	103.3	96.1	98.4	This work

-: no reported; a: only d<sub>0</sub>-MASC derivatization for the comparison of matrix effects with d<sub>0</sub>/d<sub>3</sub>-MASC isotope - labeled - UA - DLLME method by UHPLC - MS/MS

**2.4.2 精密度与准确度** 向脑微透析液样品中分别添加 0.10, 5.0 nmol/L 的 CATs 混标,按照本方法进行衍生和微萃取,计算 3 种 CATs 分析物峰面积和保留时间的相对标准偏差(RSD)。其中,日内精密度是同一日内对同一样品测定 5 次的结果;日间精密度是连续 6 d 对同一样品的测定结果。实验结果表明,3 种 CATs 分析物峰面积的日内 RSD( $n = 5$ )为 3.2% ~ 8.6%,保留时间的 RSD 为 1.6% ~ 3.3%;峰面积的日间( $n = 6$ )RSD 为 3.4% ~ 9.2%,保留时间的 RSD 为 2.1% ~ 3.6%,精密度良好。

向脑微透析液样品中分别添加 0.10, 5.0 nmol/L 的 CATs 混标,按照本方法进行衍生和微萃取,计算回收率。3 种 CATs 的回收率分别为 90.9% ~ 105.4% 和 92.4% ~ 105.8%,表明准确度良好。

**2.4.3 基质效应** 分别添加 0.10, 5.0 nmol/L 两个浓度水平的 CATs 混标于脑微透析液和等体积纯水中,按照本方法进行前处理和质谱检测( $n = 3$ ),按照“基质效应(%) = (微透析液中添加的某分析物的峰面积 / 纯水中该分析物的峰面积) × 100%”计算基质效应,两个浓度水平的基质效应分别为 95.3% ~ 102.8% 和 96.1% ~ 103.3%,表明本方法的抗基质干扰能力良好。

**2.4.4 稳定性** 将 CATs 加标水平为 5.0 nmol/L 的脑微透析液,按照实验步骤制备待测液,分别放置

在室温和 4 °C ( $n=3$ ) 条件下, 于 0, 1, 4, 16, 24, 48, 96, 120 h 测定峰面积, 计算得其 RSD 分别为 3.6%~9.2% 和 3.0%~8.5%, 表明 CATs 的 MASC 衍生化产物稳定性较好, 完全能够满足日常的分析检测要求。

## 2.5 与已报道方法的比较

将本方法与 CATs 成分的衍生化质谱分析领域的研究结果<sup>[3, 12-14, 23]</sup> 进行比较, 结果见表 2。本方法实现了 EP 与 DA, NE 的同时衍生化质谱检测。方法灵敏度方面, 本法的 LODs 值比文献 [3, 12, 14, 23] 低 3~80 倍, LOQs 值比文献 [3, 14, 23] 低 3~73 倍(除 NE 比文献 [12] 低 1.5 倍之外)。文献 [13] 的 LODs 和 LOQs 值与本法结果的比值在 0.75~1.6 之间, 二者相当, 这是因为该研究使用了含有季磷正电荷的衍生试剂, 从而带来了质谱增敏。衍生化条件和分离速度方面, 本法的衍生化反应温度适合生物样品, 衍生化时间缩短了 8~10 倍, 色谱分离时间与文献 [12-13] 相当, 比其他方法的分离速度快 3~6 倍。基质效应方面, 本方法与不使用同位素编码技术的  $d_0$ -MASC 衍生化方法进行对比(即只使用  $d_0$ -MASC 衍生, UA-DLME 步骤与本文方法相同, 质谱检测定量方式参考文献 [21] 的外标法进行), 如表 2 所列, 本方法基质效应的平均值为 99.3%, 标准偏差为 3.7%, 显著优于只用  $d_0$ -MASC 衍生的结果(平均值 96.2%, 标准偏差 10.9%), 这说明同位素编码衍生化技术能够显著降低基质干扰。总之, 本方法实现了 3 种 CATs 的同时同位素编码衍生化及质谱检测, 衍生化条件更适合生物样品, 分离快速、高效, 灵敏度和基质效应得到显著改善, 具有一定优势。本方法的缺点是同位素衍生试剂不是商品化试剂, 需自主合成。

## 2.6 帕金森病大鼠脑微透析液检测

按照王丹巧等<sup>[5]</sup> 关于探针回收率的测定及动物实验的步骤, 将采集到的正常组和帕金森病模型组大鼠脑微透析液样品按照本方法进行计算, 结果见表 3。加标的 3 种 CATs 衍生物的 UHPLC-MS/MS(MRM) 检测图见图 3。结果表明, 帕金森病大鼠脑纹状体部位 3 种 CATs 的含量比正常组大鼠显著降低( $p < 0.05$  或  $p < 0.01$ ), 该结果与文献 [5] 一致, 表明本研究中动物模型和分析方法合理。

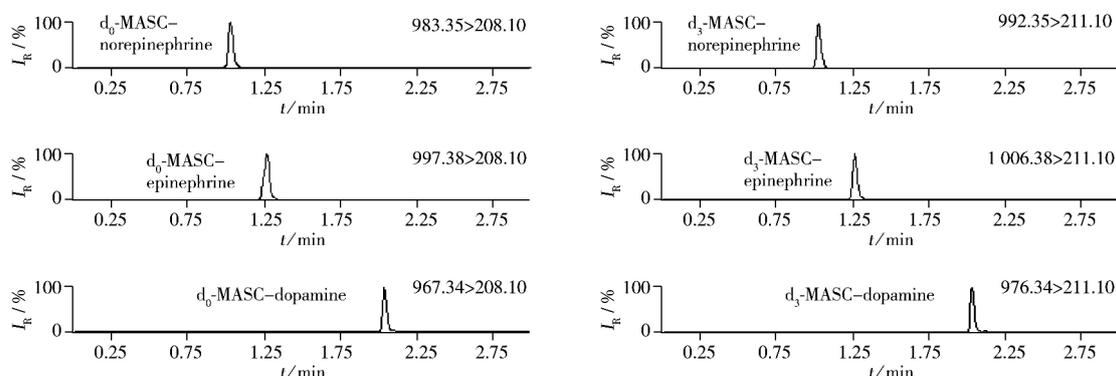


图 3 大鼠脑微透析液中 3 种儿茶酚胺  $d_0/d_3$ -MASC 衍生物的 UHPLC-MS/MS(MRM) 图谱

Fig. 3 UHPLC-MS/MS(MRM) chromatograms of three catecholamines derivatives of  $d_0/d_3$ -MASC in spiked rat brain microdialysate

表 3 正常组和帕金森病模型组大鼠脑微透析液中儿茶酚胺的含量

Table 3 Contents of 3 catecholamines in rat brain microdialysate of normal and Parkinson's disease groups

Compound	Normal group( nmol/L)				Parkinson's disease group( nmol/L)			
	15 min	30 min	45 min	60 min	15 min	30 min	45 min	60 min
Norepinephrine	0.192 ± 0.040	0.182 ± 0.036	0.186 ± 0.065	0.180 ± 0.050	0.100 ± 0.019*	0.090 ± 0.019*	0.112 ± 0.024*	0.102 ± 0.028*
Epinephrine	0.164 ± 0.032	0.172 ± 0.043	0.160 ± 0.046	0.150 ± 0.038	0.080 ± 0.014*	0.070 ± 0.016*	0.074 ± 0.016*	0.066 ± 0.014*
Dopamine	0.306 ± 0.054	0.302 ± 0.067	0.288 ± 0.067	0.312 ± 0.054	0.076 ± 0.015**	0.080 ± 0.015**	0.074 ± 0.015**	0.078 ± 0.016**

\*  $p < 0.05$  vs the normal group; \*\*  $p < 0.01$  vs the normal group

## 3 结论

本文建立了同时测定 3 种儿茶酚胺的同位素编码衍生-分散液液微萃取/UHPLC-MS/MS 检验方法, 该法具有良好的灵敏度和抗基质干扰能力, 方法准确、快速、专属性强, 能有效检测正常组和帕

金森病大鼠脑微透析液中儿茶酚胺的含量, 可为帕金森病相关的医学检验和药物筛选提供一种良好的技术手段。

参考文献:

- [1] Yang X T, Hu Y F, Li G K. *J. Instrum. Anal.* (杨晓婷, 胡玉斐, 李攻科. 分析测试学报), **2013**, 32(11): 1394 – 1400.
- [2] Wang J Q, Zhang H Y. *Med. Recapitulate*(王杰琼, 张惠云. 医学综述), **2011**, 17(7): 1052 – 1055.
- [3] Song P, Mabrouk O S, Hershey N D, Kennedy R T. *Anal. Chem.*, **2012**, 84: 412 – 419.
- [4] Perry M, Li Q, Kennedy R T. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 653: 1 – 22.
- [5] Niu X H, Wang D Q, Sun X F, Wu Z E, Li P, Wang W. *Chin. J. Exp. Tradit. Med. Formulae*(牛晓红, 王丹巧, 孙晓芳, 吴兆恩, 李鹏, 王巍. 中国实验方剂学杂志), **2013**, 19(3): 155 – 159.
- [6] Song Y Q, Li F Y, Li W, Xia L L, Ni J J. *Chin. J. Health Lab. Technol.* (宋彦强, 李凤云, 李玮, 夏黎黎, 倪君君. 中国卫生检验杂志), **2013**, 23(5): 1339 – 1441.
- [7] Gu Q, Shi X Z, Xu G W. *Chin. J. Chromatogr.* (顾群, 石先哲, 许国旺. 色谱), **2007**, 25(4): 457 – 462.
- [8] Zhu X, Li W, Liu Y C, Duan J M. *J. Instrum. Anal.* (朱翔, 李伟, 刘玉灿, 段晋明. 分析测试学报), **2014**, 33(8): 866 – 872.
- [9] Wu Y L, Zhao J, Ye Y F, Zhu Y, Sun Y M. *J. Instrum. Anal.* (吴银良, 赵健, 叶宇飞, 朱勇, 孙亚米. 分析测试学报), **2014**, 33(8): 905 – 910.
- [10] Zhao X E, Suo Y R. *Talanta*, **2008**, 76: 690 – 697.
- [11] Zhao X E, Suo Y R. *Chin. J. Anal. Chem.* (赵先恩, 索有瑞. 分析化学), **2008**, 36(1): 12 – 18.
- [12] Ji C J, Li W L, Ren X D, El – Kattan A F, Kozak R, Fountain S, Lepsy C. *Anal. Chem.*, **2008**, 80: 9195 – 9203.
- [13] Grecoa S, Danysz W, Zivkovic A, Gross R, Stark H. *Anal. Chim. Acta*, **2013**, 771: 65 – 72.
- [14] Kovac A, Somikova Z, Zilka N, Novak M. *Talanta*, **2014**, 119: 284 – 290.
- [15] Liu P, Huang Y Q, Cai W J, Yuan B F, Feng Y Q. *Anal. Chem.*, **2014**, 86: 9765 – 9773.
- [16] Leng J P, Wang H Y, Zhang L, Zhang J, Wang H, Guo Y L. *Anal. Chim. Acta*, **2013**, 758: 114 – 121.
- [17] Zhang S J, You J M, Ning S J, Song C H, Suo Y R. *J. Chromatogr. A*, **2013**, 1280: 84 – 91.
- [18] Dai W D, Huang Q, Yin P Y, Li J, Zhou J, Kong H W, Zhao C X, Lu X, Xu G W. *Anal. Chem.*, **2012**, 84: 10245 – 10251.
- [19] Cai Y P, Sun Z W, Wang X Y, Suo Y R, You J M. *Chin. J. Anal. Chem.* (蔡轶平, 孙志伟, 王小艳, 索有瑞, 尤进茂. 分析化学), **2015**, 43(3): 419 – 423.
- [20] Yuan K, Kang H N, Yue Z F, Yang L H, Lin L, Wang X W, Luan T G. *Anal. Chim. Acta*, **2015**, 866: 41 – 47.
- [21] Zhao X E, Lü T, Wei N, Zhu S Y, You J M. *Chin. J. Anal. Chem.* (赵先恩, 吕涛, 魏娜, 朱树芸, 尤进茂. 分析化学), **2014**, 42(11): 1629 – 1633.
- [22] Wang X Y, Qi W M, Zhao X E, Lü T, Wang X Y, Zheng L F, Yan Y H, You J M. *Chin. J. Chromatogr.* (王晓燕, 元伟梅, 赵先恩, 吕涛, 王西亚, 郑龙芳, 闫业浩, 尤进茂. 色谱), **2014**, 32(6): 623 – 628.
- [23] Cai H L, Zhu R H, Li H D, Zhang J, Li L F. *J. Chromatogr. B*, **2011**, 879: 1993 – 1999.