

大鼠端脑中神经递质的 荧光衍生化高效液相色谱质谱联用法研究

赵先恩^{1,2} 索有瑞^{*1}

¹ (中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001) ² (中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 以 1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙基氯甲酸酯 (BCEOC) 作为柱前荧光衍生试剂, 在 Hypersil BDS C₁₈ (4.6 mm × 100 mm, 5 μm) 反相色谱柱上, 荧光检测波长为 390 nm (激发波长为 333 nm) 下, 采用梯度洗脱实现了 5 种神经递质标准品 (谷氨酸、氨基丁酸、多巴胺、5-羟色胺、5-羟吲哚乙酸) 衍生物的同时分离检测。5 种组分的线性范围为 24 fmol ~ 200 pmol, 线性回归系数均大于 0.9997; 检出限为 4.0 ~ 12.6 fmol (S/N = 3.1)。在柱后在线质谱电喷雾电离源 (ESI Source) 正离子模式下实现了各组分的快速质谱鉴定, 对其二级质谱裂解碎片峰进行了归属, 并以 5-羟色胺衍生物为例进行了质谱裂解机理解析。对 A、B 两组 (A: 安静对照组, B: 运动训练组) 4 种取样状态 (安静、运动 1 h、力竭即刻、力竭后恢复 12 h) 下的 64 只大鼠端脑组织中 5 种神经递质的定量测定结果表明, 长期中等强度的运动训练能够有效提高大鼠的运动能力及耐力运动后疲劳恢复能力。方法的灵敏度高、重现性好, 为大鼠端脑中氨基酸类和单胺类神经递质的同时测定建立了一种新方法。

关键词 大鼠端脑, 神经递质, 运动训练, 柱前衍生, 高效液相色谱质谱联用, 荧光检测

1 引言

神经递质广泛分布于哺乳动物的中枢神经系统、脑组织和体液中, 其痕量测定对神经生理学、运动生理学、病理学、临床医学及疾病诊断等具有重要意义^[1-3]。神经递质分为氨基酸和单胺两大类, 研究较多的有氨基酸类兴奋性的谷氨酸 (Glu) 及抑制性的氨基丁酸 (GABA), 单胺类的多巴胺 (DA)、5-羟色胺 (5-HT)、5-羟吲哚乙酸 (5-HIAA)。文献 [4] 报道脑中氨基酸神经递质的含量要比单胺类神经递质含量多 100 倍以上。研究发现, 长时间运动后, 脑中 Glu 与 GABA 含量的增加和 Glu/GABA 的比值的下降与运动性疲劳的发展相一致^[5]。动物实验表明, 大鼠运动疲劳的产生与脑内 5-HT 浓度的升高和 DA 浓度的降低有关^[6]。研究者认为, 5-HT 是运动性中枢疲劳产生的物质基础, 脑中 DA 增加可抑制 5-HT 的合成与代谢, 5-HT/DA 的比值升高则机体运动能力降低, 从而形成中枢疲劳。Davis 等^[1] 研究表明, 超长运动或力竭运动可引起大鼠整个大脑或部分脑区 5-HT 及其代谢产物 5-HIAA 含量发生变化, 用 5-HT/5-HIAA 比值来评价运动疲劳的产生与恢复更加准确。

神经递质的检测方法国内外报道较多的有高效液相色谱-电化学检测法^[7]、高效毛细管电泳-激光诱导荧光检测法^[8]和柱前衍生液相色谱检测法^[9]等, 但这些方法存在灵敏度欠佳、重现性不稳定、只能衍生一级胺而对二级胺无法衍生等缺点。1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙基氯甲酸酯 (BCEOC) 作为柱前衍生试剂已成功测定了牛血清白蛋白、瓜子、苔藓及大鼠血浆中的 20 种基本氨基酸^[10-12]。本研究采用 BCEOC 作为柱前衍生试剂, 实现了两种氨基酸类和 3 种单胺类神经递质的同时完全衍生与检测。对两组 (安静对照组和运动训练组) 4 种状态下大鼠端脑组织中神经递质的测定结果表明, 本方法灵敏度高, 重现性好, 简便易行, 能够为相关学科提供可靠数据。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

1100 型高效液相色谱-质谱联用仪 (Agilent 公司), 配备四元梯度泵、在线真空脱气机、荧光检测器、

2007-07-03 收稿; 2007-08-24 接受

* E-mail: yrsuo@nwipb.ac.cn

100位自动进样器和电喷雾电离源(ESI Source)。

1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙基氯甲酸酯(自制,参见文献[10]);谷氨酸、氨基丁酸、5-羟色氨、5-羟吲哚乙酸(Sigma公司);多巴胺(Fluka公司)。Wistar雄性大鼠(山东鲁南制药集团有限公司实验动物中心,体重180~220 g,运动训练及端脑分离由曲阜师范大学体育学院运动生理学实验室刘洪珍教授完成);光谱纯乙腈(德国Merck公司)。其它试剂皆为分析纯,纯水由Milli-Q超纯水系统制备。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制 称取适量5种神经递质标准品,用 $V(\text{乙腈})/V(\text{H}_2\text{O})=1/1$, $V(\text{ACN})/V(\text{H}_2\text{O})=1/1$ 配成 1.0×10^{-2} mol/L的溶液;低浓度标准液(1.0×10^{-4} mol/L)以光谱纯乙腈稀释而成。称取32.6 mg BCEOC,用光谱纯乙腈定容至10 mL,浓度为10 mmol/L;低浓度的衍生试剂(1.0 mmol/L)用乙腈稀释而成。

2.2.2 标准品的衍生 向2 mL安培瓶中依次加入100 μL 乙腈,200 μL 硼酸钠缓冲溶液(pH 9.0),5种神经递质混合液(0.1 mmol/L)各50 μL ,150 μL 衍生试剂溶液(1.0 mmol/L),于40 $^\circ\text{C}$ 水浴中反应10 min后,加入50%乙酸水溶液5 μL ,调至pH 7.0后直接进样10 μL (100 pmol)分析。衍生反应概况可参考BCEOC对氨基化合物衍生的报道^[12]。

2.2.3 色谱与质谱条件 色谱柱: Hypersil BDS C_{18} 色谱柱(100 mm \times 4.6 mm, 5 μm , 大连化学物理研究所国家色谱中心)。流动相 A: 30%乙腈水溶液(含有30 mmol/L甲酸,用氨水调至pH 3.7); B: 100%的乙腈。流动相流速1.0 mL/min,进样量10 μL ,柱温30 $^\circ\text{C}$ 。荧光激发和发射波长分别为: $\lambda_{\text{ex}}=333$ nm, $\lambda_{\text{em}}=390$ nm。梯度洗脱程序: 15% B保持5 min,到15 min梯度到25%,到25 min梯度到100%,100% B再保持5 min。

电喷雾电离源(ESI Source),正离子模式,喷雾压力0.24 MPa,干燥气流量为9 L/min,干燥气温度350 $^\circ\text{C}$,毛细管电压3500 V^[13]。

2.2.4 大鼠分组及运动方案 大鼠适应性训练一星期后按体重随机分为A组(安静对照组)与B组(运动训练组),每组32只。B组大鼠采用国产电动鼠类跑台进行递增负荷训练8星期,每星期训练6 d,休息1 d。跑台速度由开始的10 m/min逐渐增加到第8星期20 m/min,运动时间由15 min/d逐渐增加到40 min/d。8星期后随机将两组大鼠分别分为4个亚组(a、b、c、d组),每个亚组8只,各组分别在安静(a亚组)、定量运动1 h(b亚组)、力竭即刻(c亚组,力竭判断标准:采用跑台方式,动物不能保持持续运动,腹部贴近跑台,四肢不能支撑躯体,刺激驱赶无效,从跑台取下大鼠,腹部朝上放置,大鼠不能翻身,精神呆滞,反应迟钝)、力竭后恢复12 h(d亚组)4种状态下进行取材。

2.2.5 大鼠端脑中神经递质的提取 按照大鼠分组和状态于相应时刻断头处死,立即开颅取出全脑,用冰生理盐水洗净,滤纸吸干,在冰玻璃板上分离端脑,称重(约0.1 g),加入1.2 mL 0.1 mol/L的高氯酸水溶液,冷环境中匀浆,低温4 $^\circ\text{C}$ 离心30 min(18000 r/min)去蛋白,取上层清液,-80 $^\circ\text{C}$ 低温保存待测。

2.2.6 样品测定方法 采用外标法定量。通过方法优化建立标准品的衍生、色谱分离和质谱鉴定方法,得出5种神经递质的线性回归方程,以此对未知样品进行定量分析。依照最优化的方法,对各组大鼠端脑样品逐一测定,经线性方程计算得出各样品中神经递质的含量。

2.2.7 统计方法 所有统计学处理在SPSS统计软件上完成,实验结果以“平均数 \pm 标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本 t 检验,显著性差异水平为 $P < 0.05$ 。

3 结果与讨论

3.1 衍生条件优化

考察了缓冲溶液的pH值、衍生反应时间、衍生温度、衍生试剂用量对衍生化反应产率的影响。当pH < 7.0时,衍生反应几乎不进行;随pH值的增大衍生率逐渐上升。当pH = 9.0时,衍生率最大,再增大pH产率会因衍生产物的水解而降低,实验中选取缓冲溶液的pH = 9.0。衍生反应10 min内即可完成,延长衍生时间,衍生物的荧光强度未见增强。衍生试剂摩尔数达到5种神经

递质总摩尔数的 6 倍时,可以达到完全衍生化。进一步增加衍生试剂用量,衍生物的荧光强度并没有相应的增大。为了防止衍生物的水解,通常在衍生反应完成后,加入 5 μL 50% 乙酸水溶液,调节 pH 值到 5.0 ~ 7.0。缓冲溶液 pH 值及衍生试剂用量对衍生产率的影响见图 1。

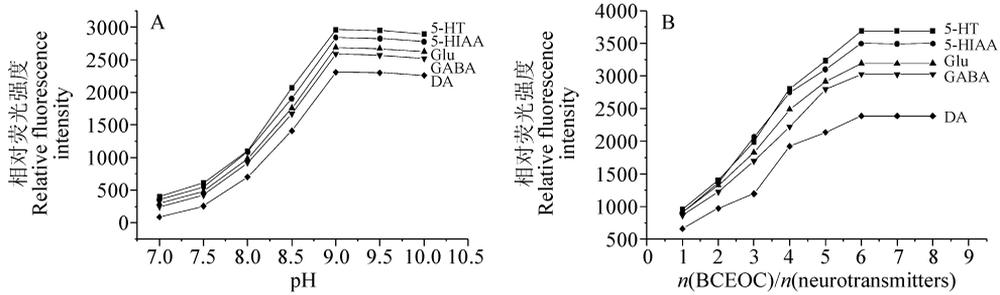


图 1 缓冲溶液 pH 值 (A) 及衍生试剂用量 (B) 对衍生产率的影响

Fig 1 Effect of pH of buffer(A) and excess reagent(B) on derivatization yields

Glu (谷氨酸 glutamic acid); GABA (氨基丁酸 γ -amino-butyrac acid); DA (多巴胺 dopamine); 5-HT (5 羟色胺 5-hydroxytryptamine); 5-HIAA (5 羟吲哚乙酸 5-hydroxyindole acetic acid)。

3.2 分离条件优化及稳定性与重现性考察

既要快速分离又要考虑使 5 种被测组分有足够的分离度,以避免端脑提取液中多种含氨基组衍生生物的干扰,通过调整梯度洗脱程序及流动相 A 的 pH 值,确定了最优化的分离。由于 BCEOC 荧光环中含一个弱碱性的氮原子,用 pH 3.7 的甲酸氨缓冲液控制流动相的 pH 值,不但能够实现快速洗脱,改善分离度,而且能够为柱后串联质谱鉴定的离子化提供氢质子,提高质谱检测灵敏度。

取新衍生的同一份标准品衍生液 (50 pmol),分别在室温放置 0、1、2、4、8、16、24 及 48 h 时进行色谱分析,计算得各时间点下各组衍生生物峰面积对 0 h 时的相对标准偏差值均小于 2.90% (见表 1),表明衍生物对于常规色谱分析稳定性良好。在相同洗脱条件下,对 50 pmol 的 5 种神经递质衍生物平行 6 次分析,保留时间和峰面积重现性见表 1,重现性良好。

表 1 5 种神经递质的线性回归方程、相关系数、检出限、质谱、稳定性与保留时间和峰面积的重现性 ($n = 6$)

Table 1 Linear regression equations, correlation coefficients, detection limits, MS, stability and reproducibility for retention time and peak area of 5 neurotransmitter derivatives ($n = 6$)

神经递质 Neurotransmitters	线性回归方程 Linear regression equations $Y = AX + B^a$	相关系数 Correlation coefficients	检出限 Detection limits (fmol)	分子离子峰 [M + H] ⁺ Molecular ion MS	二级质谱裂解碎片峰 Fragment ions for MS/MS	稳定性 (峰面积 RSD) Stability (peak area RSD, %)	保留时间 RSD Retention time RSD (%)	峰面积 RSD Peak area RSD (%)
Glu	$Y = 61.85X + 13.52$	0.9998	6.9	437.1	418.9, 390.9, 264.1, 246.1, 218.1	2.68	0.42	0.74
GABA	$Y = 65.12X + 28.05$	0.9997	8.0	393.2	375.0, 264.1, 246.1, 218.1	2.32	0.46	0.78
DA	$Y = 37.59X + 6.764$	0.9998	12.6	443.1	424.2, 368.1, 307.1, 264.1, 246.1, 218.1	2.90	0.68	0.88
5-HIAA	$Y = 67.41X + 29.99$	0.9997	4.8	481.2	462.3, 434.9, 264.1, 246.1, 218.1	2.76	0.60	0.96
5-HT	$Y = 62.96X + 27.36$	0.9997	4.0	755.2	711.1, 536.0, 429.0, 264.1, 246.1, 218.1	2.85	0.64	0.86

a: X. 进样量 (injected amounts): (pmol); Y. 峰面积 (peak area)。Glu: 谷氨酸 (glutamic acid); GABA: 氨基丁酸 (γ -Amino-butyrac acid); DA: 多巴胺 (dopamine); 5-HIAA: 5 羟吲哚乙酸 (5-Hydroxyindole acetic acid); 5-HT: 5 羟色胺 (5-Hydroxytryptamine)。

3.3 标准品色谱分离及质谱鉴定

按前述优化条件,5 种神经递质衍生物的色谱分离见图 2。采用柱后在线质谱电喷雾电离源正离子模式进行质谱鉴定,各组分的分子离子质谱和二级质谱裂解碎片峰见表 1。以分子内具有一级胺和二级胺的 5 羟色胺 (5-HT) 为代表的质谱图见图 3,其质谱裂解机理解析见图 4。

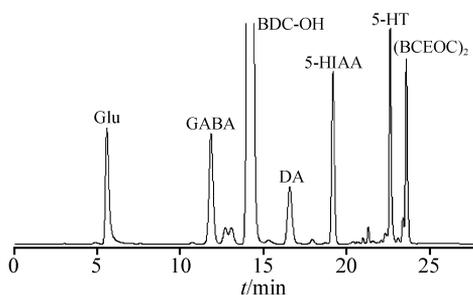


图 2 5 种神经递质衍生物色谱分离图 (100 pmol)

Fig 2 Chromatogram of 5 neurotransmitter derivatives (100 pmol)

BDC-OH: 1, 2-苯并-3, 4-二氢吡唑-9-羟乙基 (1, 2-benzo-3, 4-dihydrocarbazole-9-ethanol); (BCEOC)₂: 二-(1, 2-苯并-3, 4-二氢吡唑-9-乙基)碳酸酯 (bis-(1, 2-benzo-3, 4-dihydrocarbazole-9-ethyl) carbonate)。

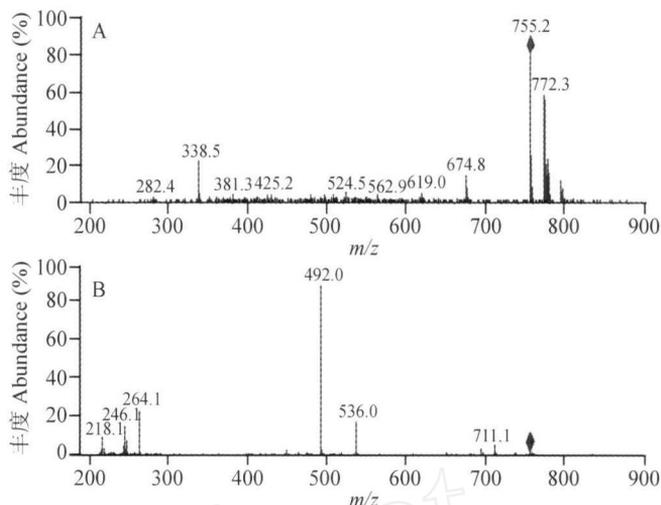


图 3 5 羟色胺 (5-HT) 衍生物的质谱图 (正离子模式)

Fig 3 MS chromatogram of representative 5-HT derivative (positive ion mode)

A: 分子离子质谱 (molecular ion MS); B: MS/MS

3.4 线性回归方程及检出限

进样量在 200.0 pmol~24.41 fmol 范围内,依据峰面积和实际进样量进行线性回归,所得各组分线性回归方程、相关系数和检出限见表 1。线性相关系数在 0.9997~0.9999 之间;检出限在 3.98~12.58 fmol 之间 ($S/N = 3$)。Dawson 等^[14]报道的 Glu 和 GABA 经 NDA 衍生化的检出限 ($S/N = 3$) 分别为 90 nmol/L (本研究 0.687 nmol/L) 和 3 nmol/L (本研究 0.799 nmol/L), Zhang 等报道的 DA、5-HT^[15] 和 5-HIAA^[16] 的检出限 ($S/N = 3$) 分别为 2.5×10^{-9} mol/L (本研究 1.258×10^{-9} mol/L)、 1.0×10^{-9} mol/L (本研究 3.98×10^{-10} mol/L) 和 6.0×10^{-10} mol/L (本研究 4.83×10^{-10} mol/L), 由此可见,本方法具有更高的灵敏度。

3.5 样品分析与讨论

3.5.1 样品测定 取出低温保存的提取液解冻后,先用 20 μ L 6 mol/L NaOH 水溶液将其从酸性调至 pH 8~9,以符合最优化的衍生条件。衍生和色谱分析按前述优化的条件进行,各组分借助标准品色谱保留时间和柱后在线质谱鉴定双重定性。代表性大鼠端脑样品中神经递质衍生物的色谱分离见图 5,峰标注与图 2 相同。两组 4 种状态下神经递质含量见表 2。各组不同状态下相关神经递质含量的比值见表 3。

3.5.2 加标回收率 取同批次购买并相同环境饲喂的大鼠于安静状态断头后分离端脑,每只大鼠的端脑组织匀浆液同时分为两等份,其中一份加入 10 μ L 浓度为 1.0×10^{-4} mol/L 5 种神经递质标准品,表 2 不同状态下两组大鼠端脑中 5 种神经递质的含量 (均 $\pm S$, $n = 8$, μ g/g)

Table 2 Contents of neurotransmitters in rat telencephalon of two groups at different states (均 $\pm S$, $n = 8$, μ g/g)

神经递质 Neurotransmitters	组别 Group	安静状态 Quiet state	运动 1 h 1 h After exercise	力竭即刻 Exercising exhaust	力竭后恢复 12 h 12 h After exercising exhaust
5-HT	A	4.39 \pm 0.56	5.02 \pm 0.62	5.37 \pm 0.68	5.94 \pm 1.06
	B	4.83 \pm 0.45	4.39 \pm 0.49 ^a	4.57 \pm 0.99 ^a	4.77 \pm 0.96 ^a
5-HIAA	A	3.72 \pm 0.58	4.21 \pm 0.63	4.03 \pm 0.67	4.32 \pm 0.80
	B	3.39 \pm 0.44	4.24 \pm 0.54	4.09 \pm 0.64	4.05 \pm 0.53
DA	A	20.24 \pm 1.8	21.4 \pm 2.4	19.9 \pm 2.4	18.7 \pm 2.4
	B	19.72 \pm 3.1	22.4 \pm 3.1	19.4 \pm 2.1	17.1 \pm 1.6
GLU	A	532 \pm 54	611 \pm 54	606 \pm 43	586 \pm 59
	B	525 \pm 36	547 \pm 49	624 \pm 48	597 \pm 49
GABA	A	317 \pm 13	331 \pm 44	321 \pm 24	281 \pm 49
	B	311 \pm 28	320 \pm 68	295 \pm 41 ^a	251 \pm 22

a. 与 A 组同种状态比较 $P < 0.05$, 具有显著性 (compared with the same state of Group A with significant differences ($P < 0.05$))。

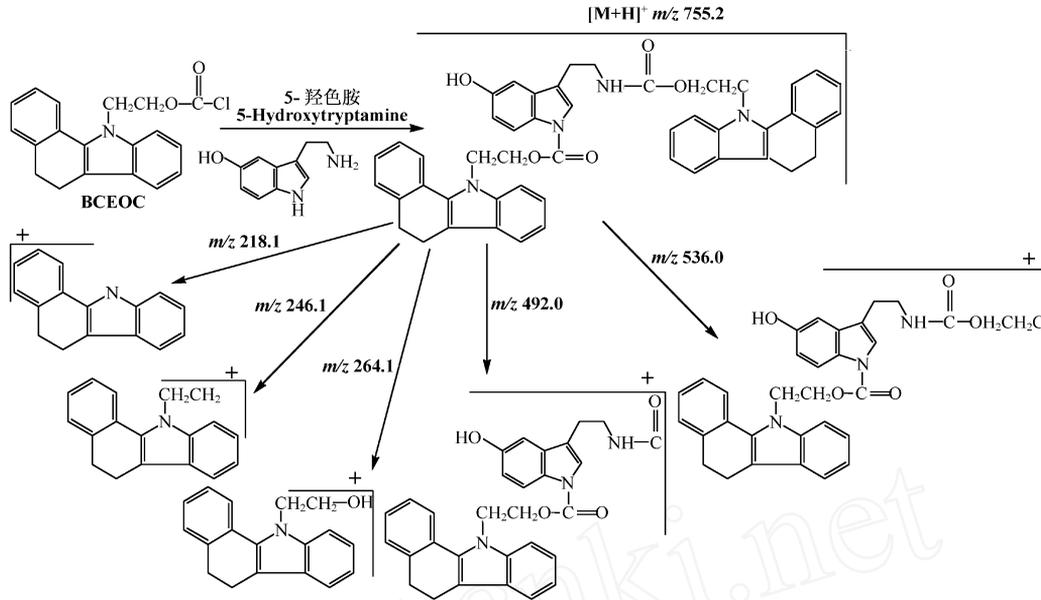


图 4 5 羟色胺 (5-HT) 衍生物的质谱裂解机理解析 (正离子模式)

Fig. 4 MS cleavage mode of 5-HT derivative (positive ion mode)

表 3 不同状态下两组大鼠端脑中相应神经递质含量的比值

Table 3 Ratios of corresponding neurotransmitters in rat telencephalon of two groups at different states

神经递质 Neurotransmitters	组别 Group	安静状态 Quiet state	运动 1 h 1 h After exercise	力竭即刻 At exercising exhaust	力竭后恢复 12 h 12 h After exercising exhaust
5-HT/5-HIAA	A	1.21 ± 0.30	1.22 ± 0.31	1.38 ± 0.35	1.39 ± 0.21
	B	1.45 ± 0.22	1.05 ± 0.19	1.14 ± 0.30	1.21 ± 0.34
DA/5-HT	A	4.66 ± 0.59	4.36 ± 0.97	3.76 ± 0.75	3.19 ± 0.43
	B	4.08 ± 0.53	5.13 ± 0.63	4.43 ± 1.02	3.73 ± 0.88 ^a
GLU/GABA	A	1.68 ± 0.16	1.88 ± 0.34	1.90 ± 0.24	2.03 ± 0.39
	B	1.65 ± 0.23	1.71 ± 0.17	2.16 ± 0.42	2.40 ± 0.33 ^a

a 与 A 组同种状态比较 $P < 0.05$, 具有显著性 (compared with the same state of Group A with significant differences ($P < 0.05$)).

另一份不加标准品。两份组织匀浆液按照前述方法提取后进行衍生和测定, 采用标准品色谱保留时间对照与在线质谱鉴定对 5 种组分进行双重定性, 每次 3 只重复 3 次, 扣除端脑组织中原有的神经递质含量计算回收率, 分析结果见表 4。在图 5 中, 3 种单胺类神经递质峰高明显低于两种氨基酸, 这与文献报道的脑中氨基酸神经递质的含量要比单胺类神经递质高约 100 倍以上相吻合^[4]; 对未加标的实际样品通过浓缩以增加组分浓度和加大进样量的方法进行质谱鉴定, 证明 3 种峰低的单胺定性正确。

3.5.3 讨论 结合表 2 和表 3 及相关神经递质比值反映的客观规律^[1,5,6], 对具有显著性的数据简要分析如下: (1) 运动 1 h 状态, 5-HT 含量 B 组显著低于 A 组 ($P < 0.05$), 5-HIAA 有升高的趋势, 5-HT/5-HIAA 比值 B 组低于 A 组, 说明 8 星期运动训练提高了大鼠运动应激的耐受性。在相同的运动时间下, 机体疲劳产生的较晚; 力竭即刻状态, 5-HT 含量 B 组显著低于 A 组 ($P < 0.05$), 5-HIAA 略高于 A 组, 5-HT/5-HIAA 比值 B 组明显低于 A 组, 可能是长期运动训练使机体适应了运动应激, 增强了代谢能力; 力竭恢复 12 h 状态, 两组 5-HT 含量均较组内力竭即刻状态时升高, 但 B 组显著低于 A 组 ($P < 0.05$)。

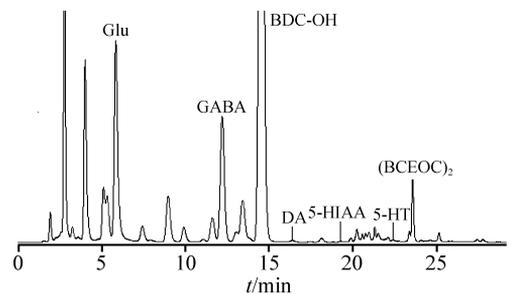


图 5 大鼠端脑中神经递质衍生物色谱分离图
Fig. 5 Chromatogram of neurotransmitter derivatives of telencephalon
峰标注与图 2 相同 (peaks are same as in Fig. 2).

表 4 加标回收率结果

Table 4 Results of recovery

神经递质 Neurotransmitters	加入量 Added ($\mu\text{g/g}$)	检出量 Found ($\mu\text{g/g}$)	峰面积 RSD Peak area RSD (% , $n=9$)	回收率 Recovery (%)
5-HT	0	4.34	2.23	97.7
	3.52	7.78	2.45	
5-HIAA	0	3.76	1.96	88.5
	3.82	7.14	2.08	
DA	0	20.20	2.38	94.4
	3.06	23.09	2.52	
GLU	0	531.65	2.44	101.4
	2.94	534.63	2.60	
GABA	0	317.82	2.37	103.4
	2.06	319.95	2.65	

5-HT是带来中枢疲劳的典型神经递质,其运动后的含量变化与疲劳恢复密切相关。A组在力竭恢复12h状态下较力竭即刻状态增加明显,而B组增加不明显且力竭恢复12h状态更接近于安静状态,并且5-HIAA含量及5-HT/5-HIAA比值B组低于A组,说明长期中等强度的跑台训练能够促进5-HT的转化,并能显著提高耐力运动后大鼠疲劳恢复能力;(2)两组内DA含量在力竭恢复12h状态比力竭即刻状态均降低,B组略低于A组。DA/5-HT比值B组显著高于A组($P < 0.05$),且更接近安静状态,可能是运动训练使大鼠适应了运动应激,力竭运动后端脑中DA水平恢复速度B组比A组明显;(3)力竭即刻状态,GABA含量B组显著低于A组($P < 0.05$),GLU含量及GLU/GABA比值B组高于A组,说明长期中等强度运动训练可以提高大鼠运动能力,在运动至力竭过程中,端脑仍保持一定的兴奋状态以维持运动强度;力竭恢复12h状态,GLU含量B组高于A组。GABA含量相反,GLU/GABA比值B组显著高于A组($P < 0.05$),说明B组力竭恢复12h后,大鼠端脑神经元仍处于兴奋状态,其原因可能是长期运动训练的大鼠运动能力虽然提高,但中枢保护性的抑制能力降低,GLU和GABA水平恢复到安静状态较缓慢。

References

- Davis J M. *American Journal of Clinical Nutrition*, **2000**, 72(2): 573 ~ 578
- Takashi Y, Kaoru F. *Analytical Biochemistry*, **2003**, 312: 125 ~ 133
- Zhang Wen (张文), Zhu Wei (朱伟), Xu Hai-Hong (徐海红). *Science in China Series B Chemistry* (中国科学 B 辑:化学), **2005**, 35(2): 151 ~ 158
- Hokfelt T, Johansson O. *Nature*, **1980**, 284: 515 ~ 521
- Zhong Xing-Ming (钟兴明), Yao Hong-En (姚鸿恩). *Chinese Journal of Sports Medicine* (中国运动医学杂志), **2000**, 19(4): 404 ~ 405
- Davis J M, Bailey S P. *Med Sci Sports Exerc*, **1997**, 29: 45 ~ 57
- Sumabe A, Kubota M. *Brain Res*, **2000**, 858: 393 ~ 401
- Li H, Wang H, Chen J H. *J. Chromatogr B*, **2003**, 788: 93 ~ 101
- Dobashi Y, Santa T, Nakagomi K, Inai K. *Analyst*, **2002**, 127: 54 ~ 59
- You J M, Ming Y F, Shi Y W, Zhao X E, Suo Y R. *Talanta*, **2005**, 68: 448 ~ 458
- Shi Yun-Wei (石运伟), Ming Yong-Fei (明永飞), Wang Cai-Ping (王彩萍), Zhao Xian-En (赵先恩), Zhang Rui (张蕊), You Jin-Mao (尤进茂). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2006**, 34(4): 503 ~ 507
- Zhao Xian-En (赵先恩), You Jin-Mao (尤进茂), Liu Hong-Zhen (刘洪珍), Suo You-Rui (索有瑞). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 35(7): 938 ~ 944
- Simonetta F, Sang-Woon C, Gregory G. *Anal. Chem.*, **2002**, 74: 4526 ~ 4531
- Dawson L A, Organ A J, Winter P. *J. Chromatogr B*, **2004**, 807: 235 ~ 241
- Zhang W, Cao X N, Xie Y F. *J. Chromatogr B*, **2003**, 785: 327 ~ 336
- Zhang W, Wan F L, Xie Y F. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 512: 207 ~ 214

Determination of Neurotransmitters in Rat Telencephalon Using Pre-column Fluorescence Derivatization with High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry

Zhao Xian-En^{1,2}, Suo You-Rui^{*1}

¹ (Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001)

² (Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract A sensitive method has been developed for the simultaneous determination of 5 neurotransmitters (glutamic acid, γ -amino-butyric acid, dopamine, 5-hydroxytryptamine, 5-hydroxyindole acetic acid) with 1, 2-benzo-3, 4-dihydrocarbazole-9-ethyl chloroformate (BCEOC) as derivatization reagent on a reversed-phase Hypersil BDS C₁₈ column (100 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) with a gradient elution followed by high performance liquid chromatography (HPLC) via fluorescence detection at 390 nm (excitation wavelength 333 nm) and online mass spectrometric identification. The linear range of 5 neurotransmitters was 24 fmol - 200 pmol, all the correlation coefficients were >0.9997, the detection limit was 4.0 - 12.6 fmol (at a signal to noise ratio of 3:1). The MS identification of 5 neurotransmitter derivatives was carried out by post-column online mass spectrometry with electrospray ion source, the MS/MS fragment ions of them were listed, and the MS/MS cleavage mode of representative 5-hydroxytryptamine derivative was analyzed. Under all the above optimum experimental conditions, the contents of 5 neurotransmitters in telencephalon of 64 rat (classified as 2 groups, A Group: quiet contrast group, B Group: training group) at 4 states (a: quiet state, b: 1 h after exercise, c: at exercising exhaust, d: 12 h after exercising exhaust) were determined. It is indicated that a long period of time medium intensity training can effectively improve mice exercise capacity and obviously promote to restore central fatigue after resistance exercise. The established method exhibits high sensitivity and excellent reproducibility, and provides a new technology for the simultaneous determination of monoamine and amino acid neurotransmitters in rat telencephalon.

Keywords Rat telencephalon, neurotransmitter, exercise, pre-column derivatization, high performance liquid chromatography-mass spectrometry, fluorescence detection

(Received 3 July 2007; accepted 24 August 2007)

《室温磷光分析法原理与应用》

室温磷光分析法经过 30 余年的发展,经历了从固体基质室温磷光体系到各种流体室温磷光体系,从有序介质到无保护的自由溶液室温磷光体系的发展过程。该方法在无机元素分析、有机药物分析、环境污染分析,以及生物大分子构象变化及其动力学、临床医学等研究领域都得到广泛的应用,成为重要的发光分析方法之一。该书阐述了磷光发射的光物理学基础、磷光测量的仪器装置、室温磷光的分类和室温磷光技术近年来在环境化学、生物化学、医学等领域的应用和研究的新进展。

该书由朱若华、晋卫军编著,科学出版社出版,定价 50.00 元。