

# 超高效液相色谱-高分辨质谱测定 大鼠血清中神经递质及其在电离辐射 脑损伤动物模型中的应用

孟宪双<sup>1,2</sup>, 白桦<sup>2</sup>, 马强<sup>2</sup>, 马宏<sup>1</sup>, 邓玉林<sup>1</sup>

(1. 北京理工大学生命学院, 北京 100081; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176)

**摘要:**建立了超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Orbitrap HRMS)法快速分析大鼠血清中10种神经递质。以0.1%甲酸-乙腈为沉淀剂,采用蛋白沉淀法进行血清中蛋白质大分子的沉淀和目标分析物的高效萃取。建立目标分析物的精确质量数据库(质荷比、保留时间、同位素峰分布及特征碎片离子)和二级质谱库进行精准匹配鉴定,外标法定量。结果表明,该方法的基质效应为62.4%~112.2%,相对标准偏差(RSD)为1.9%~10.1%;回收率为73.6%~104.2%,RSD为2.6%~10.6%;线性关系良好,相关系数( $R^2$ )均大于0.99,检出限及定量限分别为0.05~11.63 nmol/L和0.09~46.50 nmol/L;标准溶液、质控样本及血清样本的稳定性可满足生物样本的分析要求;稀释效应的准确度为5.1%~10.6%,精密密度为1.1%~5.3%,均在±15%范围之内;在高浓度样本连续进样3次后分析初始流动相,残留效应为0.4%~4.6%,符合生物样本的分析要求。此外,将本方法应用于电离辐射致脑损伤大鼠血清中神经递质代谢的研究,结果表明,电离辐射导致血清中神经递质代谢紊乱,该结果可为电离辐射损伤的生物标志物筛选提供依据。

**关键词:**神经递质;血清;超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱;电离辐射;生物标志物

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2021)03-0334-12

doi:10.7538/zpxb.2020.0045

## Analysis of Neurotransmitters in Rat Serum Using Ultra Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry and Its Application to Ionizing Radiation-Induced Brain Injury

MENG Xian-shuang<sup>1,2</sup>, BAI Hua<sup>2</sup>, MA Qiang<sup>2</sup>, MA Hong<sup>1</sup>, DENG Yu-lin<sup>1</sup>

(1. School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China;

2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China)

**Abstract:** A rapid analysis methodology for ten neurotransmitters in serum was devel-

收稿日期:2020-04-22;修回日期:2020-07-21

基金项目:重离子作用下神经免疫系统辐射损伤及相互作用分子机制研究(U1532264);模拟微重力下自噬在重组腺相关病毒神经感染活性增强中的机制研究(81741132)资助

作者简介:孟宪双(1986—),男(汉族),山东人,博士研究生,生物医学工程专业。E-mail: mxs0128@163.com

通信作者:邓玉林(1962—),男(汉族),安徽人,教授,从事生物医学工程研究。E-mail: deng@bit.edu.cn

马宏(1974—),女(汉族),黑龙江人,副教授,从事生物医学工程研究。E-mail: 04656@bit.edu.cn

oped using ultra performance liquid chromatography-quadrupole-Orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap HRMS). A typical protein precipitation (PPT) method was employed for removing protein macromolecular compounds and efficient extraction of the studied compounds. A home-made accurate mass database (mass-to-charge ( $m/z$ ), retention time, isotopic distribution and characteristic fragment ions) and MS/MS spectra library were used for accurate identification. Quantitative analysis was performed using the extracted  $m/z$  of full-scan MS and external standard method. Matrix effect was 62.4%-112.2% and the relative standard deviations (RSDs) were 1.9%-10.1%. The extracted recovery and RSDs were 73.6%-104.2% and 2.6%-10.6%, respectively. Experimental results indicated that good linearities ( $R^2 > 0.99$ ) were observed in the respective concentration ranges. The limits of detection (LODs) and limits of quantitation (LOQs) were in the range of 0.05-11.63 nmol/L and 0.09-46.50 nmol/L, respectively. Stability of standard solutions, quality control samples and serum samples can meet the requirements of biological samples analysis. Accuracy of the dilution effect (DE) was 5.1%-10.6% and the precision was 1.1%-5.3%, all within the range of  $\pm 15\%$ . Carry-over effect (COE) was 0.4%-4.6% through the analysis of initial mobile phase after three consecutive injections of samples of high concentration. Moreover, this method was applied to the research of neurotransmitters metabolism in the serum of rats with ionizing radiation-induced brain injury. Results demonstrated that ionizing radiation causes neurotransmitter metabolism in serum, and can provide important references for the screening of new biomarkers in serum.

**Key words:** neurotransmitters; serum; ultra performance liquid chromatography-quadrupole-Orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap HRMS); ionizing radiation; biomarker

神经递质 (neurotransmitter) 在机体信息传导和调控生理机能方面发挥着重要作用。乙酰胆碱是 20 世纪上半叶第一个被确定为神经递质的化学物质<sup>[1]</sup>。根据结构不同,现代生物学一般将神经递质分为单胺类、氨基酸类、肽类及其他类,其中单胺类和氨基酸类是主要的神经递质。单胺类神经递质包括儿茶酚胺和吲哚胺两大类,儿茶酚胺包括多巴胺、去甲肾上腺素和肾上腺素,吲哚胺主要指 5-羟色胺;氨基酸类神经递质包括  $\gamma$ -氨基丁酸、甘氨酸、谷氨酸、组胺及乙酰胆碱。有研究证实某些神经递质的失调或紊乱与多种神经性病理过程密切相关,如阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD)、帕金森氏病 (Parkinson's disease, PD) 以及成瘾 (addiction)、抑郁症 (depression) 和精神分裂 (schizophrenia) 等<sup>[2-4]</sup>。因此,高效测定生物样本中的神经递质浓度及其变化,在神经生理学研究、疾病的预测和诊断、药物质量控制

等方面都有着重要意义。

生物样本基质复杂,而神经递质含量较低 (纳摩尔级),因此,内源性成分往往对其测定造成较大干扰,是生物医学分析领域的难题。近年来,有研究人员采用多种检测技术,如化学修饰电极直接检测<sup>[5-12]</sup>、高效液相色谱/毛细管电泳-电化学法<sup>[13-17]</sup>、荧光成像法<sup>[18-19]</sup>、液相色谱-质谱法<sup>[20-23]</sup>测定不同组织样本中的神经递质等物质。其中,电化学法的灵敏度低、稳定性不佳,且修饰电极的使用寿命较短;荧光成像技术中常用的荧光探针大多为有机染料分子,其光稳定性不强、灵敏度低,且存在光漂白等缺点,在一定程度上限制了荧光成像技术的发展;近红外荧光成像技术的灵敏度高,且可实时成像,但受检测深度的限制,仅能做表面或近表面分析;色谱-质谱技术因分离效率高、灵敏度高、特异性强等优点成为生物样本重要的检测手段。近年来,高分辨

质谱由于高选择性、可提供精确质量数、灵敏且数据可回溯等优势,已成为分析领域的重要检测技术。

本研究拟采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Orbitrap HRMS)技术,建立一种基于精确质量数据库和高分辨二级质谱库匹配的方法,用于快速、灵敏地分析血清中神经递质,以蛋白沉淀法进行大分子沉淀及目标成分的萃取,对方法的提取回收率、线性关系、精密度和准确度、稳定性、稀释效应及残留效应等进行考察,并将本方法初步应用于电离辐射致脑损伤大鼠血清中神经递质含量的测定及变化的研究。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、材料与试剂

UltiMate 3000 超高效液相色谱仪(配有二元泵、在线真空脱气机、自动进样器和柱温箱)、Q Exactive 静电场轨道阱高分辨质谱仪(配有ESI源);美国 Thermo Fisher 公司产品;XS105 分析天平;瑞士 Mettler Toledo 公司产品;MS2 涡旋振荡器;德国 IKA 公司产品;YM-080S 超声仪;深圳市方奥微电子有限公司产品;CR 21G 高速冷冻离心机;日本 Hitachi 公司产品。

多巴胺(CAS: 51-61-6)、5-羟色胺(CAS: 50-67-9)、肾上腺素(CAS: 51-43-4)、5-羟吲哚乙酸(CAS: 54-16-0)、乙酰胆碱(CAS: 51-84-3)、去甲肾上腺素(CAS: 51-41-2)、甘氨酸(CAS: 56-40-6)、天冬氨酸(CAS: 56-84-8)、谷氨酸(CAS: 56-86-0)、 $\gamma$ -氨基丁酸(CAS: 56-12-2)标准品:纯度均大于 99.0%,分别购自美国 Sigma-Aldrich 公司、德国 Dr. Ehrestorfer 公司和美国 AccuStandard 公司;甲醇、乙腈和甲酸:LC-MS 级,美国 Thermo Fisher 公司产品;超纯水:由美国 Millipore 公司生产的 MILLI-Q50 超纯水机制得。

### 1.2 标准溶液的配制

精密称取适量的每种神经递质标准品,用 65%乙腈-水溶解制得 100 mmol/L 的标准储备液;分别精密量取 1 mL 各标准储备液至 10 mL 容量瓶中,用初始流动相定容,配制成 10 mmol/L 混合标准溶液,置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存,分析前在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中自然解冻。

### 1.3 动物处理及血清采集

24 只雄性远交群(SD)大鼠(体重 200~250 g);购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,随机分为对照组(8 只)和辐照组(16 只),辐照组再平均分成 2 组,分别以 10 Gy 和 30 Gy 剂量进行  $\text{Co}60\text{-}\gamma$  射线脑部照射,剂量率为  $2.5194\text{ Gy/min}$ ,适应性饲养 30 天后处死。

将全部大鼠称重,并腹腔注射戊巴比妥钠( $60\text{ mg/1 kg}$  体重)进行麻醉;待麻醉后约 20 min,将大鼠以仰卧位固定于木板上,用环形钳夹住大鼠颈部及左右腹股沟,环形钳手柄套固定于铁钉,大鼠即固定好;打开胸腔,将心脏暴露,用注射器(实验前用 EDTA 溶液浸润)以心脏穿刺法进行取血。将血置于灭菌的离心管中,室温下凝固 1~2 h(如凝血效果不好,可放置  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中过夜,使血液充分凝固), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  下以  $3\ 500\text{ r/min}$  离心 10 min,吸取上清液,分装并标记好,在  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  黑暗条件下保存。

### 1.4 血清样本预处理

精密吸取  $100\text{ }\mu\text{L}$  样本至 1.5 mL EP 离心管中,加入  $400\text{ }\mu\text{L}$  蛋白沉淀剂工作溶液(0.1%甲酸-乙腈溶液,使用前在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  预冷 1 h),涡旋 30 s,冰水浴中超声 15 min, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  黑暗条件下沉淀过夜, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  下以  $12\ 000\text{ r/min}$  离心 15 min,取上清液,氮气吹干,用  $100\text{ }\mu\text{L}$  初始流动相复溶,待分析。

### 1.5 质量控制溶液的制备

精密量取 5 mL 磷酸盐缓冲溶液(PBS,  $10\times$ )于 50 mL 容量瓶中,加入超纯水,定容至刻度,配制成 PBS 溶液( $1\times$ ),然后加入 2.5 g 牛血清白蛋白(BSA),混匀,作为空白血清模拟液使用。分别稀释空白血清模拟液配制低(LQC)、中(MQC)、高(HQC)3 个浓度的质量控制(质控)样本,即分别为不高于定量限浓度 3 倍的低浓度质控样本,标准曲线范围中部附近的中浓度质控样本,以及标准曲线范围上限 75%~95%处的高浓度质控样本。处理方式同 1.4 节,用于提取回收率及基质效应等考察。

### 1.6 实验条件

**1.6.1 色谱条件** Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱( $2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}\times 1.8\text{ }\mu\text{m}$ );流动相:0.1%甲酸-水(A)和乙腈(B);进样量

2  $\mu\text{L}$ ;柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ ;流速 0.3 mL/min;梯度洗脱程序:0~1.5 min(5%B),1.5~4.0 min(5%~40%B),4.0~5.0 min(40%~95%B),5.0~6.0 min(95%B),6.0~6.1 min(95%~5%B),6.1~8.0 min(5%B)。

**1.6.2 质谱条件** 电喷雾离子源正离子模式(ESI<sup>+</sup>);喷雾电压 3.5 kV;毛细管温度 350  $^{\circ}\text{C}$ ;鞘气压力  $2.76 \times 10^5$  Pa;干燥气流速 0.66 L/min;干燥气温度 350  $^{\circ}\text{C}$ ;采集模式:数据依赖性全扫描(Full-scan MS/dd-MS<sup>2</sup>)。一级质谱参数如下:质量扫描范围  $m/z$  50~500;分辨率 70 000;自动增益控制(AGC target)  $1 \times 10^6$ ;离子最大注入时间(maximum IT) 100 ms。二级质谱参数如下:分辨率 17 500;归一化碰撞能量(normalized collision energy) 20,40,60 eV;自动增益控制  $1 \times 10^5$ ;离子最大注入时间 50 ms;动态排除(dynamic exclusion)时间 6 s;响应强度最高的离子数目(Top N)为 5。神经递质的保留时间及加合离子等信息列于表 1,提取离子流色谱图示于图 1。

### 1.7 精确质量数据库和二级质谱库的建立

按照 1.6 节条件进行神经递质标准品溶液的采集,记录保留时间并保存二级质谱图。将每种化合物的名称、分子式、分子质量、CAS 编号、离子化方式、一级精确质量数( $m/z$ )、1~2 个特征二级碎片离子、保留时间导入 TraceFinder 软件,建立精确质量数据库;将采集的每种化合物

的二级质谱图导入 mzVault 谱图管理软件,建立高分辨二级质谱库。

## 2 结果与讨论

### 2.1 空白血清模拟液的选择

由于待测神经递质均属于血清中内源性成分,很难找到空白血清样本。因此,本实验选择与血清 pH 值接近的磷酸盐缓冲液作为基质,加入牛血清白蛋白模拟血清中存在的蛋白质等大分子,其浓度设置参考文献[24]。

### 2.2 预处理方法的优化

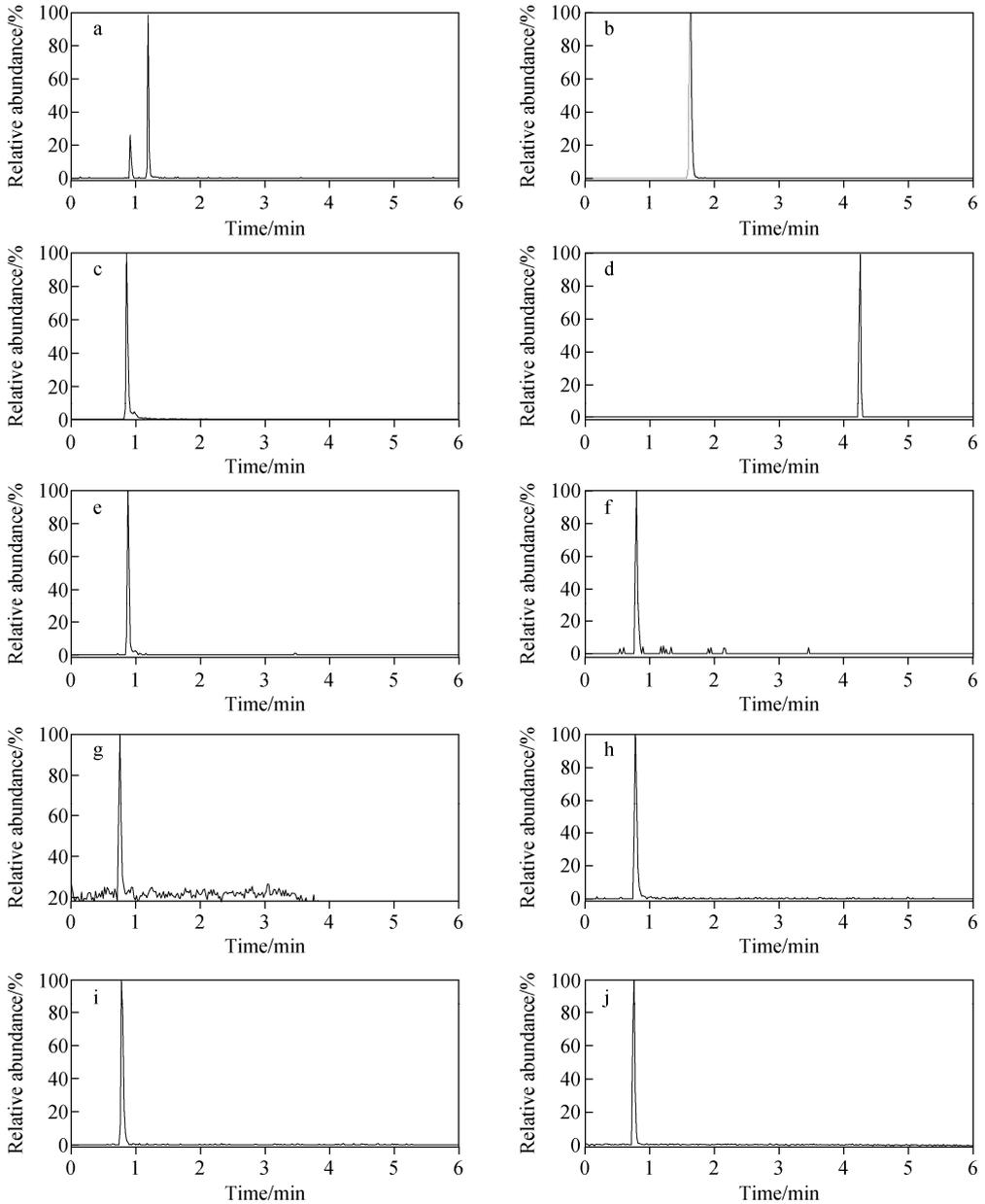
大鼠血清成分复杂,含丰富的蛋白质、磷脂等内源性物质,通常需要预处理。目前,血清的处理方法主要包括液-液萃取法(liquid-liquid extraction, LLE)、固相萃取法(solid phase extraction, SPE)和蛋白沉淀法(protein precipitation, PPT)。其中,LLE 法对血清样本具有一定的纯化能力,但提取效果易受取样位置高低的影响,对极性小分子的萃取效率较低;SPE 法需特殊装置,过程繁琐;PPT 法相对简单,快速高效,且容易实现高通量。

本实验中,神经递质的辛醇-水分配系数(log $K_{ow}$ )均小于 1.5,极性较大。因此,精密吸取 100  $\mu\text{L}$  100 nmol/L 的质控样本,选择常见的极性溶剂,如乙腈(MeCN)、甲醇(MeOH)、0.1% 甲酸-乙腈(0.1% FA-MeCN)、0.1% 甲酸-甲醇(0.1% FA-MeOH)、甲醇-乙腈(50:50,

表 1 神经递质的实验参数

Table 1 Analysis parameters of neurotransmitters

神经递质 Neurotransmitter	保留时间 Retention time/min	加合方式 Adduct	加合离子 Adduct ion		质量偏差 Error/ $\times 10^{-6}$
			理论 Theoretical	实测 Measured	
多巴胺(DA)	1.19	[M+H] <sup>+</sup>	154.08626	154.08635	0.6
5-羟色胺(5-HT)	1.63	[M+H] <sup>+</sup>	177.10224	177.10242	1.0
肾上腺素(E)	0.86	[M+H] <sup>+</sup>	184.09682	184.09702	1.1
5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)	4.25	[M+H] <sup>+</sup>	192.06552	192.06569	0.9
乙酰胆碱(Ach)	0.88	[M+H] <sup>+</sup>	146.11755	146.11736	-1.3
去甲肾上腺素(NE)	0.79	[M+H] <sup>+</sup>	170.08117	170.08137	1.2
甘氨酸(Gly)	0.75	[M+H] <sup>+</sup>	76.03930	76.03965	4.6
天冬氨酸(Asp)	0.78	[M+H] <sup>+</sup>	134.04478	134.04491	1.0
谷氨酸(Glu)	0.82	[M+H] <sup>+</sup>	148.06043	148.06050	0.5
$\gamma$ -氨基丁酸(GABA)	0.76	[M+H] <sup>+</sup>	104.07061	104.07076	1.4



注:a. 多巴胺;b. 5-羟色胺;c. 肾上腺素;d. 5-羟吲哚乙酸;e. 乙酰胆碱;  
f. 去甲肾上腺素;g. 甘氨酸;h. 天冬氨酸;i. 谷氨酸;j.  $\gamma$ -氨基丁酸

图1 10种神经递质的提取离子流色谱图

Fig. 1 Extracted ion chromatograms of ten neurotransmitters

V/V)和甲醇-乙腈(25:75,V/V)进行PPT法处理比较,示于图2。结果表明,对多巴胺、5-羟色胺、肾上腺素、5-羟吲哚乙酸、去甲肾上腺素及谷氨酸的萃取效果,乙腈优于甲醇;对乙酰胆碱、甘氨酸、天冬氨酸及 $\gamma$ -氨基丁酸的萃取效果,乙腈和甲醇相差无几;不同体积比例混合的甲醇-乙腈体系的萃取效果不同,在乙腈中添加0.1%甲酸的萃取效果优于甲醇-乙腈体

系。综合考察,选择0.1%甲酸-乙腈作为蛋白沉淀剂。

### 2.3 数据库和谱库的快速精准鉴定

以血清中乙酰胆碱为例,首先,TraceFinder软件根据设置的参数,进行一级精确质量数( $m/z$  146.11755)提取,窗口为 $5 \times 10^{-6}$ ;第二,针对保留时间,如果误差在 $\pm 3SD$ 范围内,则认为该项匹配成功;第三,比较实验测得的同位

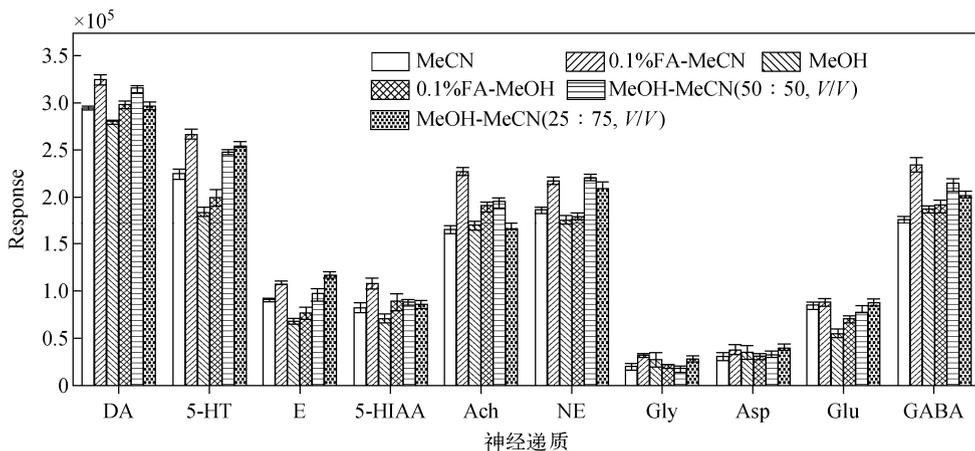


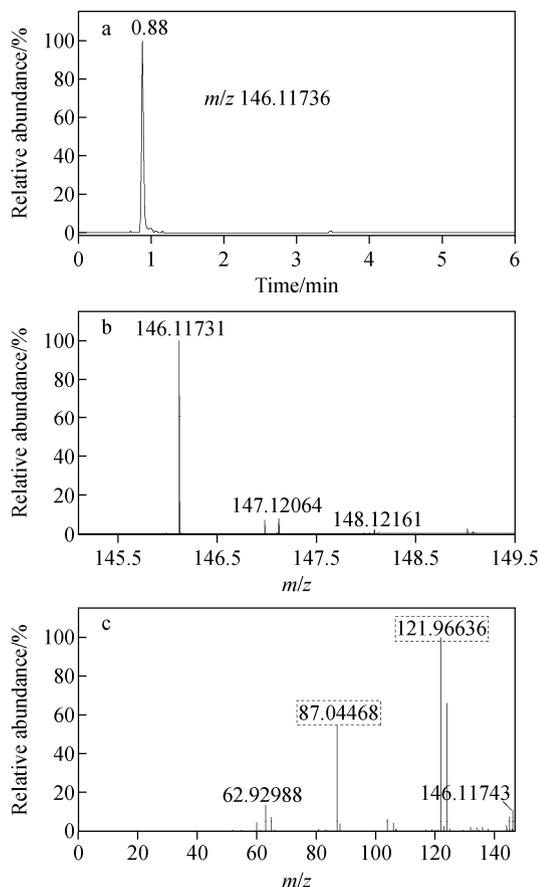
图2 血清中10种神经递质的沉淀剂考察结果( $n=6$ )

Fig. 2 Optimization results of the precipitants for 10 neurotransmitters in serum ( $n=6$ )

素峰分布图与理论图谱(由输入的分子式计算得出),得分超过90则认为匹配较好;第四,将输入数据库中的2个特征碎片离子与实验采集获得的2个碎片离子进行比对,如果实验值与数据库中碎片离子的精确质量数偏差不超过 $5 \times 10^{-6}$ ,则认为匹配成功;第五,将采集的二级质谱图与谱库进行比对,得分大于50则认为匹配程度较高。当上述5项关键参数全部比对成功,则可认定目标物检出,结果示于图3。

## 2.4 方法学考察

**2.4.1 基质效应及提取回收率** 采用空白血清模拟液分别配制6批次低、中、高浓度的神经递质溶液,按1.4节方法处理,记录各神经递质的仪器响应强度A,用来模拟空白血清经标准添加和预处理后的神经递质响应值;将空白血清模拟液按照1.4节方法处理后,标准添加神经递质,配制6批次低、中、高浓度(浓度与前者相同)的溶液,记录每种待测物的质谱响应强度B,用来模拟空白血清经预处理,再经标准添加的神经递质响应值;分别采用65%乙腈水配制6批次低、中、高浓度(浓度与前者相同)的神经递质溶液,记录每种待测物的响应强度C,代表纯溶剂中待测物的响应值。本实验提取回收率(extraction recovery, ER)和基质效应(matrix effect, ME)的计算方法为: $ER = A/B \times 100\%$ ,  $ME = B/C \times 100\%$ ,实验结果列于表2。可见,提取回收率在73.6%~104.2%之间,相对标准偏差(RSD)为2.6%~10.6%,满足生物样本的分析要求;基质效应为62.4%~



注:a.精确质量数和保留时间;b.同位素峰分布;c.二级质谱图和特征碎片离子;虚线框代表特征碎片离子

图3 乙酰胆碱的精确质量数据库和二级质谱库的鉴定

Fig. 3 Identification of acetylcholine using the home-made accurate mass database and MS/MS spectra library

112.2%, RSD为1.9%~10.1%,表明该方法存在基质效应,且对多数神经递质存在基质抑制效应。为补偿基质效应,本实验采用空白血清模拟液基质匹配标准曲线进行定量分析。

**2.4.2 线性关系、检出限及定量限** 采用至少7个浓度水平的神经递质溶液进行线性回归,以色谱峰面积为纵坐标( $y$ ),样品浓度为横坐

标( $x$ )进行加权最小二乘法回归计算,权重系数为 $1/x^2$ 。结果表明,在各自线性范围内,每种神经递质均表现出良好的线性关系,相关系数( $R^2$ )均大于0.99;检出限及定量限分别为0.07~12.81 nmol/L和0.12~25.61 nmol/L,列于表3。该方法的线性范围宽、灵敏度高,能够满足生物样本的分析要求。

表2 提取回收率及基质效应考察结果( $n=6$ )

Table 2 Experiment results of extraction recovery and matrix effect ( $n=6$ )

神经递质 Neurotransmitter	浓度 Concentration/ (nmol/L)	提取回收率 Extraction recovery		基质效应 Matrix effect	
		平均值 Average/%	相对标准偏差 RSD/%	平均值 Average/%	相对标准偏差 RSD/%
		多巴胺	0.1,200,400	76.2,89.2,88.6	4.9,2.6,3.9
5-羟色胺	0.5,200,400	93.2,98.7,81.9	5.6,10.1,4.5	90.6,89.6,101.1	6.3,4.1,4.3
肾上腺素	3,150,300	90.1,82.1,83.9	6.2,5.9,3.7	74.9,86.6,88.2	7.4,5.1,6.1
5-羟吲哚乙酸	5,350,700	98.1,90.5,95.1	10.6,7.8,5.6	66.1,62.4,78.2	7.9,5.9,9.8
乙酰胆碱	1,20,35	78.1,90.5,79.9	8.5,5.1,3.2	112.2,81.6,96.0	8.5,10.1,6.5
去甲肾上腺素	1,200,400	86.7,94.6,99.7	7.4,5.1,6.2	86.7,72.3,78.6	5.5,6.0,3.7
甘氨酸	50,1500,300	73.6,98.1,104.2	8.6,4.9,3.3	94.1,89.1,90.1	8.2,9.0,6.6
天冬氨酸	20,1500,2500	90.9,81.8,75.2	8.1,6.2,3.7	92.0,83.2,81.3	5.1,2.9,3.1
谷氨酸	5,400,750	83.6,98.9,101.1	10.0,6.2,4.1	87.1,94.6,90.0	8.8,4.6,6.2
$\gamma$ -氨基丁酸	1,1500,2500	78.3,91.6,86.0	9.8,5.1,6.0	77.0,86.6,79.1	8.1,6.7,3.3

表3 标准工作曲线、线性范围、检出限及定量限结果

Table 3 Results of standard working curve, linear range, limits of detection (LODs) and limits of quantitation (LOQs)

神经递质 Neurotransmitter	线性范围 Linear range/ (nmol/L)	相关系数 Correlation coefficient ( $R^2$ )	检出限 LOD/ (nmol/L)	定量限 LOQ/ (nmol/L)
多巴胺	0.12~500	0.9999	0.07	0.12
5-羟色胺	0.22~500	0.9999	0.11	0.22
肾上腺素	1.57~350	0.9957	0.79	1.57
5-羟吲哚乙酸	2.86~750	0.9992	1.43	2.86
乙酰胆碱	0.44~40	0.9998	0.23	0.44
去甲肾上腺素	0.91~500	1.0000	0.45	0.91
甘氨酸	25.61~3500	0.9998	12.81	25.61
天冬氨酸	12.17~3000	0.9995	6.08	12.17
谷氨酸	3.22~800	0.9992	1.60	3.22
$\gamma$ -氨基丁酸	1.04~3000	0.9997	0.51	1.04

**2.4.3 稳定性考察** 本实验采用低、中、高浓度溶液进行稳定性考察,主要包括以下方面:标准品储备溶液的稳定性(4℃黑暗条件下放置1个月,测定3次)、冻融循环稳定性(质控样品经3个冻融循环)、短期稳定性(处理后的血清样本在自动进样器中15℃条件下放置

24 h)以及长期稳定性(血清样本于-80℃放置3个月)。采用准确度(REC)表示实测结果与真实浓度值之间的差异,以RSD表示同一份样本多次分析测定结果间的接近程度,结果列于表4。可见,低、中、高浓度的溶液在4℃条件下放置1个月的准确度为-3.8%~

表4 血清中神经递质的稳定性考察结果

Table 4 Results of stability for neurotransmitters in serum

神经递质 Neurotransmitter	浓度 Concentration/ (nmol/L)	标准溶液 4℃ Standard at 4℃		冻融循环 Freeze-thaw cycle		短期 Short term		长期 Long term	
		准确度 REC/%	精密度 RSD/%	准确度 REC/%	精密度 RSD/%	准确度 REC/%	精密度 RSD/%	准确度 REC/%	精密度 RSD/%
		多巴胺	0.1	-3.8	1.6	8.4	7.0	-8.2	2.6
	200	-1.5	5.0	3.8	4.5	-2.9	3.4	-3.9	4.2
	400	5.4	0.2	2.6	1.7	-6.5	5.6	-8.6	3.3
5-羟色胺	0.5	6.2	0.1	1.3	2.7	4.6	1.7	9.8	7.4
	200	4.1	2.7	2.6	4.8	-0.9	1.0	2.7	6.1
	400	2.5	5.2	0.7	3.2	1.3	0.7	3.3	8.5
肾上腺素	3	9.5	6.5	3.6	1.3	3.9	5.9	-6.0	1.6
	150	4.1	1.5	2.5	1.3	-3.7	4.7	-4.3	4.2
	300	4.6	3.7	5.0	3.3	-4.9	5.8	-6.4	4.0
5-羟吲哚乙酸	5	8.2	0.7	4.0	2.5	4.1	2.0	3.4	5.8
	350	4.4	3.0	2.5	2.2	2.4	3.0	4.5	6.2
	700	5.8	0.9	9.7	8.1	4.1	1.5	1.5	5.2
乙酰胆碱	1	-2.2	2.0	3.2	1.8	-2.6	1.0	-4.3	7.1
	20	2.7	2.9	1.3	1.7	5.4	1.8	-3.0	6.1
	35	-2.5	5.3	2.2	1.1	-3.3	0.3	-2.4	8.3
去甲肾上腺素	1	2.3	3.3	5.4	3.3	2.3	6.1	-6.7	9.9
	200	3.8	4.5	5.9	2.9	-1.6	2.5	-3.6	8.6
	400	4.9	2.8	3.2	2.9	9.2	2.5	-7.5	4.9
甘氨酸	50	2.6	2.6	2.3	1.1	0.1	1.4	5.1	1.1
	1500	0.7	4.2	2.8	0.1	1.8	3.1	4.3	4.6
	3000	2.1	8.1	1.0	8.5	1.7	3.2	4.2	7.0
天冬氨酸	20	3.3	4.5	1.3	2.2	0.7	1.3	3.0	3.7
	1500	1.3	5.1	0.4	1.5	1.7	0.7	0.8	7.1
	2500	2.6	2.7	0.4	4.5	0.7	2.3	1.9	6.2
谷氨酸	5	2.0	5.1	4.7	3.5	5.6	7.5	-2.3	7.1
	400	-2.2	3.8	0.3	1.0	1.1	6.9	-2.6	4.7
	750	-3.1	3.6	4.7	1.3	3.7	1.6	-1.4	6.6
γ-氨基丁酸	1	1.1	2.9	0.7	2.7	2.0	2.1	4.4	6.8
	1500	1.3	5.3	2.0	1.2	4.5	0.8	2.0	4.1
	2500	3.3	2.7	1.6	1.7	-3.0	4.1	2.4	1.7

9.5%，测定精密度 RSD 为 0.1%~8.1%；3 次冻融循环的 REC 值为 0.3%~9.7%，RSD 为 0.1%~8.5%；处理后的血清样品在自动进样器中 15 °C 条件下放置 24 h 的 REC 值为 -8.2%~9.2%，RSD 为 0.3%~7.5%；血清样品于 -80 °C 条件下放置 3 个月的 REC 值为 -8.6%~9.8%，RSD 为 1.1%~9.9%。以上结果表明，标准溶液、质控样品及血清样

本的稳定性可满足生物样品的分析要求。

**2.4.4 稀释效应和残留效应** 稀释效应 (dilution effect) 指将确定高浓度的生物样本进行一定倍数稀释后，测定浓度与理论浓度比较后的准确度和精密度，二者应在 ±15% 范围内才能确保稀释的可靠性，其结果列于表 5。经 10 倍稀释后，准确度为 5.1%~10.6%，精密度 RSD 值为 1.1%~5.3%，均在 ±15% 范围内。

表 5 稀释效应及残留效应考察结果

Table 5 Results of dilution effect and carry-over effect

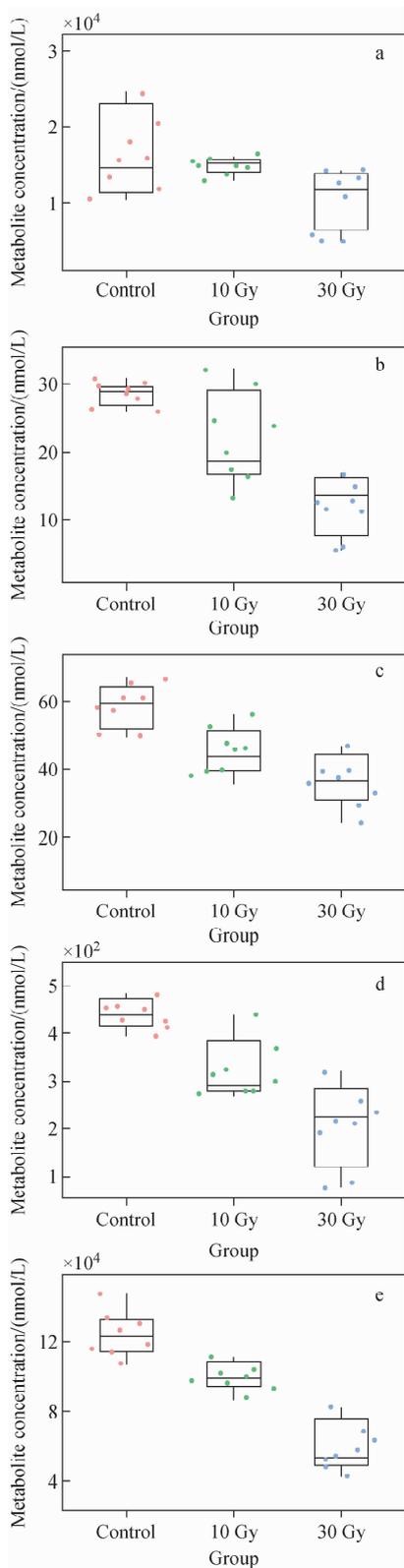
神经递质 Neurotransmitter	10 倍稀释 Ten-fold dilution (n=3)				
	稀释前浓度 Original concentration/ (nmol/L)	测定浓度 Measured concentration/ (nmol/L)	准确度 REC/%	精密度 RSD/%	残留效应 COE
多巴胺	3000	320.4±6.1	6.8	1.9	0.4
5-羟色胺	3000	321.9±15.1	7.3	4.7	0.8
肾上腺素	3000	319.2±3.5	6.4	1.1	1.1
5-羟吲哚乙酸	3000	329.7±10.6	9.9	3.2	0.6
乙酰胆碱	300	31.7±1.0	5.5	3.3	0.8
去甲肾上腺素	3000	322.5±15.5	7.5	4.8	0.9
甘氨酸	20000	2201.0±116.8	10.2	5.3	2.5
天冬氨酸	20000	2122.0±70.0	6.1	3.3	4.6
谷氨酸	3000	315.3±8.2	5.1	2.6	1.4
γ-氨基丁酸	20000	2212.0±46.5	10.6	2.1	1.0

在生物样品分析方法评价中，当线性范围的最高浓度样品溶液连续进样后，须分析空白溶剂或空白样品以评估残留效应 (carry-over effect, COE)，其可允许接受的范围应不超过定量限的 20%。本实验通过连续 3 次进样每种物质线性范围最高浓度的质量控制样本，然后进样分析空白溶剂 (初始流动相)，评估本方法的残留效应。在高浓度样品连续 3 次进样后分析初始流动相，残留神经递质的峰面积与其在定量限浓度样本中的峰面积比值在 0.4%~4.6% 之间，符合分析方法评价要求。

## 2.5 在电离辐射致脑损伤大鼠血清中的应用

将建立的分析方法初步应用于 Co60-γ

射线电离辐射致脑损伤大鼠血清中神经递质含量变化的研究。根据本课题组前期工作的基础<sup>[25]</sup>，本实验综合考察 0~50 Gy 剂量对大鼠的影响，结果表明，大鼠在 10、30 Gy 两个剂量辐照下 30 天时，胸腺和脾脏的脏器指数均发生了明显变化，故以此作为本实验的大鼠辐照剂量。辐照后，大鼠血清中天冬氨酸、乙酰胆碱、去甲肾上腺素、肾上腺素和甘氨酸的含量变化示于图 4。5 种神经递质均表现出不同程度的下降，说明经电离辐射致脑损伤后，某些神经递质可能作为潜在的生物标志物。本工作还需深入开展研究，如加大样本数量、考察辐射剂量率及不同饲养时间等。



注:a. 天冬氨酸;b. 乙酰胆碱;c. 去甲肾上腺素;  
d. 肾上腺素;e. 甘氨酸

图4 大鼠血清中5种神经递质经辐照后的变化情况

Fig. 4 Changes of five neurotransmitters in rat serum after irradiation

### 3 结论

本研究采用 UPLC-HRMS 结合精确质量数据库和二级质谱库,建立了血清中 10 种神经递质的快速测定方法,采用蛋白沉淀法高效萃取目标化合物。使用空白血清模拟液(PBS+BSA)基质匹配的标准工作曲线进行定量分析,补偿基质效应。方法经提取回收率、线性关系、检出限、定量限、稳定性、稀释效应及残留效应等方面考察,满足生物样本的分析要求。此外,基于本方法的 Co60- $\gamma$  射线辐照动物模型的研究结果为筛选急性电离辐射致脑损伤血清中生物标志物提供了实验依据。

### 参考文献:

- [1] ZEE EAVD, LUITEN P G M. Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory [J]. *Prog Neurobiol*, 1999, 58(5): 409-471.
- [2] OWENS M J, NEMEROFF C B. Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter[J]. *Clin Chem*, 1994, 40(2): 288-295.
- [3] BERKE J D, HYMAN S E. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory [J]. *Neuron*, 2000, 25(3): 515-532.
- [4] LOTHARIUS J, BRUNDIN P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2002, 3(12): 932-942.
- [5] 张雷,林祥钦. 单分子层  $\gamma$ -氨基丁酸共价修饰玻碳电极同时测定多巴胺、尿酸和抗坏血酸[J]. *高等学校化学学报*, 2003, 24(4): 591-594. ZHANG Lei, LIN Xiangqin. A novel  $\gamma$ -aminobutyric acid monolayer modified glassy carbon electrode for simultaneous determination of dopamine, uric acid and ascorbic acid [J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2003, 24(4): 591-594 (in Chinese).
- [6] ZHANG L, LIN X Q, SUN Y G. Separation of anodic peaks of ascorbic acid and dopamine at an  $\alpha$ -alanine covalently modified glassy carbon electrode [J]. *Analyst*, 2001, 126(10): 1760-1763.
- [7] ZHANG H M, LI N Q. The direct electrochemistry of myoglobin at a *dl*-homocysteine self-assembled gold electrode [J]. *Bioelectrochemis-*

- try, 2001, 53(1): 97-101.
- [8] ZHANG H M, LI N Q, ZHU Z W. Electro-catalytic response of dopamine at a *dl*-homocysteine self-assembled gold electrode[J]. 2000, 64(3): 277-282.
- [9] YE B, PING X, LIN L. Determination of the neurotransmitter-norepinephrine in the presence of ascorbic acid using carbon fiber microelectrodes activated by potentiostat[J]. Microchemical Journal, 2000, 64(2): 125-130.
- [10] 孙延一, 吴康兵, 胡胜水. 多壁碳纳米管-Nafion 化学修饰电极在高浓度抗坏血酸和尿酸体系中选择性测定多巴胺[J]. 高等学校化学学报, 2002, 23(11): 2 067-2 069.
- SUN Yanyi, WU Kangbing, HU Shengshui. Selective determination of dopamine in the presence of high concentration ascorbic acid and uric acid using carbon nanotube modified glassy carbon electrode[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2002, 23(11): 2 067-2 069 (in Chinese).
- [11] 王宗花, 刘军, 颜流水, 王义明, 罗国安. 羧基化碳纳米管嵌入石墨修饰电极对多巴胺和抗坏血酸的电催化[J]. 分析化学, 2002, 30(9): 1 053-1 057.
- WANG Zonghua, LIU Jun, YAN Liushui, WANG Yiming, LUO Guoan. Electrocatalytic oxidation of dopamine and ascorbic acid at carboxylic carbon nanotube-intercalated graphite electrode[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2002, 30(9): 1 053-1 057 (in Chinese).
- [12] 王歌云, 王宗花, 肖素芳, 王义明, 罗国安. 碳纳米管修饰电极对多巴胺和肾上腺素的电分离及同时测定[J]. 分析化学, 2003, 31(11): 1 281-1 285.
- WANG Geyun, WANG Zonghua, XIAO Sufang, WANG Yiming, LUO Guoan. Electrocatalytic separation for dopamine and epinephrine at multi-wall carbon nanotube modified electrode and simultaneous determination[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2003, 31(11): 1 281-1 285 (in Chinese).
- [13] ZHANG W, XIE Y F, AI S Y, WAN F L, WANG J, JIN L T, JIN J Y. Liquid chromatography with amperometric detection using functionalized multi-wall carbon nanotube modified electrode for the determination of monoamine neurotransmitters and their metabolites[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003, 791(1): 217-225.
- [14] JIN G P, LIN X Q, GONG J M. Novel choline and acetylcholine modified glassy carbon electrodes for simultaneous determination of dopamine, serotonin and ascorbic acid[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2004, 569(1): 135-142.
- [15] ZARE H R, NASIRIZADEH N, ARDAKANI M M. Electrochemical properties of a tetrabromo-*p*-benzoquinone modified carbon paste electrode. Application to the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2005, 577(1): 25-33.
- [16] LIN L, QIU P H, YANG L Z, CAO X N, JIN L T. Determination of dopamine in rat striatum by microdialysis and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection on a functionalized multi-wall carbon nanotube electrode[J]. Anal Bioanal Chem, 2006, 384(6): 1 308-1 313.
- [17] 郑一宁, 莫金垣, 赖璐. 多巴胺的大环钴络合物-Nafion膜修饰电极毛细管电泳电化学检测法[J]. 分析测试学报, 2003, 22(2): 12-15.
- ZHENG Yining, MO Jinyuan, LAI Rong. Determination of dopamine by capillary electrophoresis-electrochemical detection with cobalt macrocyclic complex-nafion membrane modified electrode[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2003, 22(2): 12-15 (in Chinese).
- [18] MULLER A, JOSEPH V, SLESINGER P A, KLEINFELD D. Cell-based reporters reveal *in vivo* dynamics of dopamine and norepinephrine release in murine cortex[J]. Nat Methods, 2014, 11(12): 1 245-1 252.
- [19] REIMER J, MCGINLEY M J, LIU Y, RODENKIRCH C, WANG Q, AMCCORMICK D, TOLIAS A S. Pupil fluctuations track rapid changes in adrenergic and cholinergic activity in cortex[J]. Nat Commun, 2016, 7: 13 289.
- [20] CAI H L, ZHU R H, LI H D. Determination of dansylated monoamine and amino acid neurotransmitters and their metabolites in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Anal Bio-

chem, 2010, 396(1): 103-111.

- [21] YANG Z L, LI H, WANG B, LIU S Y. An optimized method for neurotransmitters and their metabolites analysis in mouse hypothalamus by high performance liquid chromatography-Q exactive hybrid quadrupole-orbitrap high-resolution accurate mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016, 1 012/1 013: 79-88.
- [22] 赵芳,李强,梁梅丽,闫艳,邢婕,秦雪梅,高晓霞. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定大鼠血清中 8 种神经递质[J]. 分析化学, 2018, 46(1): 121-128.  
ZHAO Fang, LI Qiang, LIANG Meili, YAN Yan, XING Jie, QIN Xuemei, GAO Xiaoxia. Simultaneous determination of eight kinds of neurotransmitters in rat blood serum by ultra-high performance liquid chromatograph-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2018, 46(1): 121-128(in Chinese).
- [23] 李鹏飞,陶蓓蓓,张绪得,安卓玲,张茜,李悦,郝倩倩,刘丽宏. 高效液相色谱-串联质谱法测定人体内 30 种氨基酸[J]. 分析化学, 2013, 41(9): 1 347-1 352.  
LI Pengfei, TAO Beibei, ZHANG Xude, AN Zhuoling, ZHANG Qian, LI Yue, HAO Qianqian, LIU Lihong. High-flux detection of 30 kinds amino acids with isotope-labeled internal standard by LC-MS/MS[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2013, 41(9): 1 347-1 352 (in Chinese).
- [24] MERBEL N. Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2008, 27(10): 924-933.
- [25] ZHANG P, CHEN Y, ZHU H Y, YAN L B, SUN C L, PEI S Z, LODHI A F, REN H, GAO Y N, MANZOOR R, LI B, DENG Y L, MA H. The effect of gamma-ray-induced central nervous system injury on peripheral immune response: an *in vitro* and *in vivo* study[J]. Radiat Res, 2019, 192(4): 440-450.