

## HPLC-ECD에 의한 흰쥐 뇌 부위별 Catecholamine 및 대사산물의 신속정량법

魯 一 協

淑明女子大學校 藥學大學

(Received January 27, 1988)

### Determination of Catecholamines and Their Metabolites in Rat Brain by High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detector

Ihl-Hyeob Ro

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140, Korea

**Abstract**—A simple and sensitive method was studied for the simultaneous determination of catecholamine, indoleamine and their related metabolites by high performance liquid chromatography with electrochemical detector. Norepinephrine, dopamine, serotonin and their metabolites of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid, 5-indoleacetic acid were resolved from rat brain tissue homogenates by separation on reversed phase  $C_{18}$  column with mobile phase consisting of monochloroacetate buffer (pH2.47), 1.42mM sodium octyl sulfonate and 7% acetonitrile. Both catechols and indoles can be eluted in 15min. The sensitivities of this method are sufficient for determination of at least 100 pg of neurochemical amines in brain samples, for example, frontal cortex, olfactory bulb, striatum, septum, hippocampus, thalamus, hypothalamus, medulla & pons and cerebellum. The highest level of dopamine was observed in striatum whereas norepinephrine and serotonin were in hypothalamus.

근래 조울증, 정신분열증 등의 질병진단에 관련된 생리활성물질인 amine류를 측정하고자 하는 연구가 계속되고 있다. 이들 생리활성물질인 amine은 생체대사물질중에 극미량이 존재할 뿐 아니라 다른 생체물질에 의해 방해받을 수 있기 때문에 있어 분석에 있어 어려움을 겪어왔었다.

종래에 쓰여졌던 방사선효소분석법<sup>1,2)</sup>, ECD를 이용한 GC법<sup>3-7)</sup> 및 GC/MS법<sup>8,9)</sup> 등은 시료 처리 등의 문제 때문에 극미량 검출에 어려움이 있었으나 최근 형광검출기 및 열전도도 검출기가 연결된 HPLC의 도입에 의해 생체대사물질중 amine류 분석이 본격화 되고 있다.<sup>10-21)</sup>

형광검출법에 비해 비교적 조작이 간편하고 catecholamine에 대한 감도가 높은 EC검출기가 널리 사용되고 있으나 이동상의 pH, 유기용매량, ionpairing시약등 때문에 EC검출기도 분리능에 있어 개선되어야 한다.

따라서 본 실험에서는 이들을 검토하여 catecholamine분석에 적당한 새로운 시험법을 확립하였으며, 이 방법에 의해 전처리 과정없이 흰 쥐 뇌의 부위별 catecholamine, indoleamine 및 그 대사물을 측정하였기에 보고하고자 한다.

#### 실 험 방 법

**시약**—Dopamine (DA), norepinephrine (NE), serotonin (5-HT), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), sodium heptyl sulfonate 및 sodium octyl sulfonate는 Sigma사, 기타 monochloroacetic acid,  $Na_2EDTA$ , acetonitrile 및 그의 사용된 시약은 일제 특급이었다.

기기—HPLC는 Waters 모델 441에 EC검출기

를 연결하였고, 분리칼럼은  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>을 장착하였다.

표준액—표준품 5mg을 정밀히 달아 0.1M HClO<sub>4</sub>에 용해시켜 50 $\mu$ g/ml 용액으로 만들었다. 이를 각각 500ng/ml, 250ng/ml 및 50ng/ml의 농도로 희석하여 표준용액으로 하였으며, 냉동실에 보관하였다.

실험동물—체중 200g 내외의 건강한 음성 Sprague Dawley계 흰쥐를 고형사료와 물로 사육하여 사용하였다.

검량선의 작성—각 표준용액 50 $\mu$ l을 취해 섞고 그 10 $\mu$ l을 HPLC에 주입하여 얻은 chromatogram에서 면적비에 따라 검량선을 작성하였다.

뇌의 각 부위별 조직채취—흰쥐를 stress을 주지않고 단두하여 전두피질(frontal cortex), 후구(olfactory bulb), 선조체(striatum), 증격(septum), 해마(hippocampus), 시상(thalamus), 시상하부(hypothalamus), 연수와 교(medulla & pons) 및 소뇌(cerebellum)를 채취하였다.

뇌 각 부위별 생리활성 amine 측정—각 부위별 조직은 정밀히 칭량한 후 0.4M HClO<sub>4</sub>(0.5w/v % Na<sub>2</sub>EDTA)로 homogenize 한후 15,000g에서 원심분리하여 상정액을 HPLC 검체로 하였다.

기기의 측정조건 HPLC—Waters Associates Model 441 with 6000A pump injector, column;  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>, detector; LC-4B/LC-17 using TL-5 glassy carbon working electrode (Bioanalytical Systems), applied potential +0.8V vs. Ag/AgCl, mobile phase; 0.15M sodium monochloracetate buffer(0.67mM Na<sub>2</sub>EDTA &

1.42mM sodium octyl sulfonate included) (pH 2.47) : acetonitrile=93 : 7

### 결과 및 고찰

EC검출기에 의한 catecholamine, indoleamine 등을 분석 할때 이동상의 pH, 유기용매량 및 ion pairing시약에 의한 유지시간 변화는 Table I과 같다.

pH에 의한 영향은 amine류, acid metabolite에 관계없이 pH가 낮아짐에 따라 유지시간이 짧아졌는데 이는 Mefford<sup>20)</sup> 및 Krstulovic<sup>1)</sup>의 보고와는 달리 본 실험이 낮은 pH범위(pH 2~3)에서만 실험을 실시했기 때문으로 생각된다. 또한 유기용매의 양에 의한 변화는 첨가량의 증가에 따라 유지시간이 단축되었으며, 같은 조건하에서 sodium heptyl sulfonate가 sodium octyl sulfonate보다 유지시간이 길어 신속분리에는 적당치 않은것으로 생각되었다. 그러므로 본 실험에서는 pH 2.47의 monochloracetate 완충용액에 2.68mM의 sodium octyl sulfonate와 7% acetonitrile을 가한 이동상을 사용하였으며 이조건에서 분리된 표준품과 흰쥐의 뇌 선조체중 생리활성 amine의 chromatogram은 Fig. 1, 2와 같다.

이와 같은 조건에서 DA 및 이의 대사물인 DOPAC, HVA와 5-HT 및 그대사물인 5-HIAA, 그리고 NE의 절대검량선법에 의한 검량선은 Fig. 3과 같고 이들의 상관관계는 0.9841~0.9964로 직선성이었다.

이 방법에 따라 흰쥐 뇌의 각 조직을 채취하

Table I—Retention times of the catecholamines investigated on different conditions

	pH			Organic solvent(%)			ion-pairing reagent	
	2.71	2.61	2.47	9	7	4	B7	B8
DA	9.0	7.8	6.3	4.7	6.3	9.1	7.1	6.3
DOPAC	7.5	6.8	5.6	3.8	5.6	7.4	6.5	5.6
HVA	16.9	13.8	11.3	7.6	11.3	14.4	14.0	11.3
5-HT	23.0	17.1	13.1	8.6	13.1	24.4	16.1	13.1
5-HIAA	13.4	10.6	8.9	6.2	8.9	11.8	11.7	8.9

Abbreviation: NE; norepinephrine, DA; dopamine, DOPAC; 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, HVA; homovanillic acid, 5-HT; serotonin, 5-HIAA; 5-hydroxyindoleacetic acid

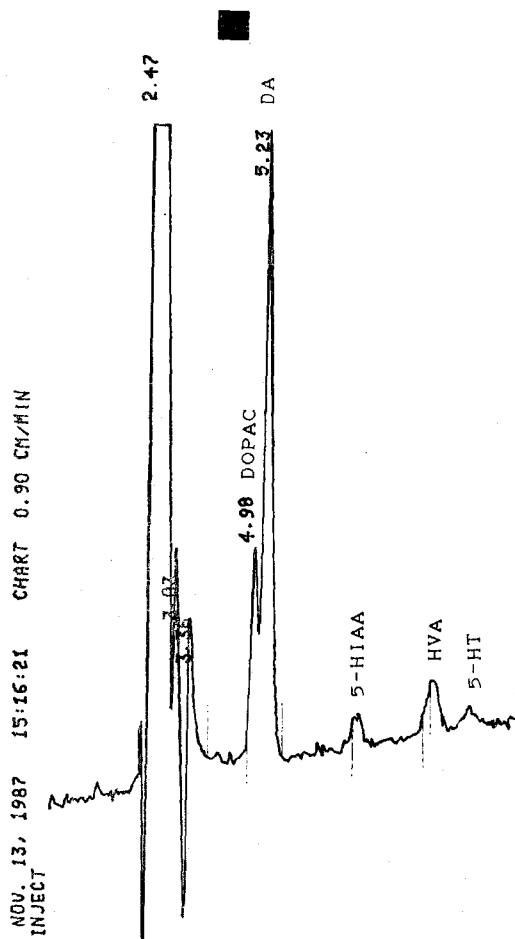


Fig. 1—Chromatogram of monoamines and their metabolites. Column,  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>; flow rate, 1.2ml/min. Mobile phase, 0.1M monochloroacetate buffer-1.42mM sodium octyl sulfonate, containing 7% acetonitrile; pH adjusted to 2.47. Detector set at 0.8V vs. an Ag/AgCl reference electrode

여 측정된 NE, DA, DOPAC, HVA, 5-HT 및 5-HIAA의 부위별 함량은 Table II와 같다.

뇌, plasma, urine 등 생체산물에 대한 catecholamine, indole amine류의 정제, 분리에는 alumina 흡착법<sup>13,18,20</sup> amberliteGC칼럼법<sup>14,16</sup> 및 ethylacetate추출법<sup>11</sup> 등이 이용되고 있다. 그러나 이들방법에 비해 Mefford<sup>20</sup> 및 Mayer<sup>19</sup>의 방법에 따라 직접 HPLC에 주입하는 방법이 보다 신속하게 정량할 수 있었으므로 본 실험에서는 직접

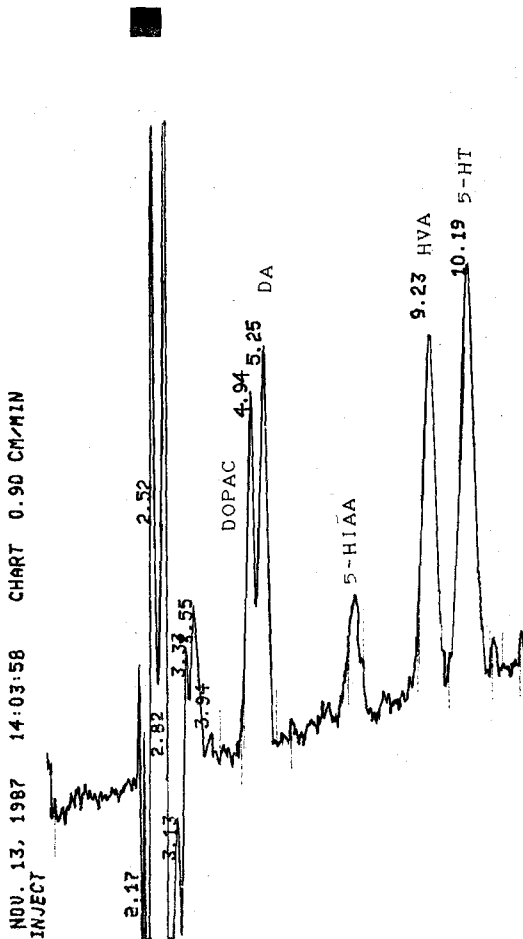


Fig. 2—Chromatogram of monoamines and their metabolites in striatum of rat brain. Abbreviation: NE; norepinephrine, DA; dopamine, DOPAC; 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, HVA; homovanillic acid, 5-HT; serotonin, 5-HIAA; indoleacetic acid.

주입법을 택하였다.

뇌 각 조직을 채취한 후 HClO<sub>4</sub>로 추출, 원심분리후 상정액을 HPLC에 주입시 15분이내에 NE, DA, DOPAC, HVA, 5-HT 및 5-HIAA를 분리할 수 있었다.

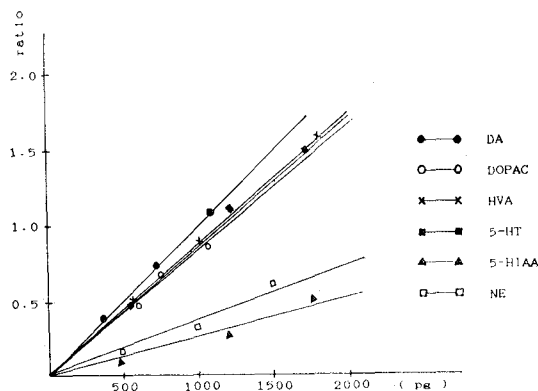
따라서 본 실험방법을 plasma, serum, urine 중의 catecholamine 분석에 적용함으로써 정신병 등의 진단에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

**Table II**—The contents of catecholamine, indoleamine and their metabolites in rat regional brain (unit: ng/mg)

	NE	DA	DCPAC	HVA	5-HT	5-HIAA
Frontal cortex	0.31±0.07	N. D.	N. D.	N. D.	0.76±0.13	1.92±0.12
Olfactory bulb	0.86±0.33	N. D.	N. D.	N. D.	0.84±0.02	2.52±0.14
Striatum	0.14±0.01	12.2±1.18	5.00±0.49	1.38±0.14	0.56±0.17	2.61±0.37
Septum	0.73±0.07	0.96±0.07	0.53±0.10	N. D.	0.98±0.13	2.77±0.27
Hippocampus	0.47±0.05	N. D.	N. D.	N. D.	0.35±0.04	2.02±0.11
Thalamus	0.43±0.05	N. D.	N. D.	N. D.	0.82±0.09	3.42±0.22
Hypothalamus	1.29±0.15	0.37±0.04	0.28±0.11	N. D.	1.46±0.11	4.54±0.23
Medulla & Pons	0.68±0.07	N. D.	N. D.	N. D.	1.13±0.09	2.82±0.19
Cerebellum	0.38±0.06	N. D.	N. D.	N. D.	0.28±0.02	0.66±0.12

Values are expressed as the mean±S.E. (n=8)

Abbreviation; NE; norepinephrine, DA; dopamine, DOPAC; 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, 5-HT; serotonin, 5-HIAA; 5-indoleacetic acid. N.D.; not detected



**Fig. 3**—Calibration curves of standard catecholamines and indoleamines

### 결 론

1. 이동상의 pH가 2.47, 1.42mM의 ion pairing시약 및 7% acetonitrile의 첨가로 NE, DA, DOPAC, HVA, 5-HT 및 5-HIAA가 잘 분리되었다.

2. 직접 시료를 HPLC에 주입하여 6개성분을 15분 이내에 검출하므로써 분석시간을 단축할수 있었다.

3. 흰쥐 뇌부위별 DA의 함량은 선조체가 가장 많았고 5-HT 및 NE은 시상하부에서 가장 많이 검출되었다.

### 감사의 말씀

이 논문은 1987년도 문교부 학술연구 조성비 지원에 의하여 이루어졌음을 밝히며 이에 감사 드리는 바입니다.

### 참 고 문 헌

1. Krstulovic, A.M.: Investigation of catecholamine metabolism using high performance liquid chromatography *J. Chro.* **229**, 1 (1982).
2. Kremer, R., Crawhall, J.C. and Kolanitch, R.: Rapid and reliable estimation of urinary free catecholamines in patients with pheochromocytoma: comparison with plasma catecholamines and vanillylmandelic acid excretion *J. Chro.* **344**, 313 (1985).
3. Brooks, C.J. and Horning, E.C.: Gas chromatographic studies of catecholamines, tryptamines, and other biological amines *Anal. Chem.* **36**, 1540 (1964).
4. Anggard, E. and Sedvan, G. Gas chromatography of catecholamine metabolites using electron capture detection and mass spectrometry *Anal. Chem.* **41**, 1250 (1969).
5. Martin, I.L. and Ansell, G.B.: A sensitive gas chromatographic procedure for the estimation of

- noradrenaline, dopamine and 5-hydroxytryptamine in rat brain *Biochem. Pharm.* **22**, 521 (1972).
6. Lhuguenot, J.C. and Maume, B.F.: Improvements in quantitative gas phase analysis of catecholamines in the picomole range by electron-capture detection and mass fragmentography of their pentafluorobenzylimine-trimethylsilyl derivatives *J. Chro. Sci.* **12**, 411 (1974).
  7. De Jong, E.B.M., Horsten, B.P.M. and Goldschmidt, H.M.J.: Determination of nine catecholamine metabolites and 5-hydroxyindoleacetic acid in urine by capillary gas chromatography *J. Chro.* **279**, 563 (1983).
  8. Bertilsson, L. and Palmer, L.: Indole-3-acetic acid in human cerebrospinal fluid: identification and quantification by mass fragmentography *Science* **177** 74 (1972).
  9. Bertilsson, L., Atkinson, A.J., Althaus J.R., Harfast, A., Lindgren, J.E. and Holmstedt, B.: Quantitative determination of 5-hydroxyindole-3-acetic acid in cerebrospinal fluid by gas chromatography-mass spectrometry *Anal. Chem.* **44**, 1434 (1972).
  10. Gagner, J.P.: Estimation of adrenal catecholamines by elevated-temperature liquid chromatography with amperometric detection *J. Chro.* **342**, 363 (1985).
  11. Karege, F.: Method for total 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol extraction from urine, plasma and brain tissue using bonded-phase materials: comparison with the ethyl acetate extraction method *J. Chro.* **311**, 361 (1984).
  12. Iriyama, K., Iwamoto, T. and Yoshimura, M.: Electrochemically treated glassy carbon electrode for amperometric detection in high-performance liquid chromatography *J. Chro.* **400**, 263 (1987).
  13. Goldstein, D.S.: Modified sample preparation for high-performance liquid chromatographic electrochemical assay of urinary catecholamines *J. Chro.* **275**, 174 (1983).
  14. Warsh, J.J., Chiu, A. and Godse, D.D.: Simultaneous determination of norepinephrine, dopamine and serotonin in rat brain regions by ino-pair liquid amperometric detection *J. Chro.* **228**, 131 (1982).
  15. Gregory, V.M.: Simplified determination of the brain catecholamines norepinephrine, 5-hydroxyindoleacetic acid, dopamine and 5-hydroxytryptamine by high-performance liquid chromatography using electrochemical detection *J. Chro.* **345**, 140 (1985).
  16. Koch, D.D. and Kissinger, P.T.: Determination of serotonin and plasma by liquid chromatography with precolumn sample enrichment and electrochemical detection *Anal. Chem.* **52**, 27 (1980).
  17. Sesa, S. and Blank, C.L.: Determination of serotonin and dopamine in mouse brain tissue by high performance liquid chromatography with electrochemical detection *Anal. Chem.* **49**, 354 (1977).
  18. Kim, J.Q., Kim, K.D. and Jung, H.S.: An optimized assay of plasma catecholamine using high performance liquid chromatography with electrochemical detection *Clinical Pathology and Quality Control* **7**, (1985).
  19. Mayer, G.S. and Shoup, R.E.: Simultaneous multiple electrode liquid chromatographic electrochemical assay for catecholamines, indoleamines and their metabolites in brain tissue *J. Chro.* **225**, 533 (1983).
  20. Mefford, I.N.: Application of high performance liquid chromatography with electrochemical detection to neurochemical analysis: measurement of catecholamines, serotonin and metabolites in rat brain *J. Neuroscience Methods* **3**, 207 (1981).
  21. Endo, T., Tatebayashi, A., Kano, S. and Hayashi, Y.: Role of neurotransmitter in forensic medicine (report I) A simple and sensitive analysis of biogenic amines and metabolites in tissues by high performance liquid chromatography with electrochemical detection *Jpn. J. Legal Med.* **39**, 260 (1985).