

Detection of Dopamine and Serotonin by Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Su Min Namkung¹, Jeong Su Choi¹, Ji Hyang Park¹, Man Gil Yang², Min Woo Lee¹, Suhng Wook Kim¹¹Department of Integrated Biomedical and Life Sciences, Graduate School, Korea University, Seoul, Korea²Biomedical Research Institute, Seoul National University, Seoul, Korea

경쟁적 ELISA를 이용한 도파민과 세로토닌의 검출

남궁수민¹, 최정수¹, 박지향¹, 양만길², 이민우¹, 김성욱¹¹고려대학교 대학원 의생명융합학과, ²서울대학교병원 의생명연구원

Dopamine (DA) and serotonin (5-Hydroxytryptamine, 5-HT) are neurotransmitters and hormones that exist in small amounts but have important role in the body. Serum and 24-hour urine are used as specimens, and are usually examined by HPLC-MS. In this study, we tried to detect DA and 5-HT by competitive ELISA using antigen-antibody (Ab) reaction. After immobilizing 5 µg/mL BSA conjugate on a 96-well surface, hormone and primary Ab, which are respectively diluted to different concentrations, were treated. Then, HRP-conjugated secondary Ab and TMB were added to measure absorbance. The regression equation and R² value were calculated based on absorbance, and sensitivity of Ab to hormone as well as the correlation between hormone concentration and absorbance were determined. In DA ELISA, R², the correlation between the concentration of hormone and absorbance, was the highest by 0.91 when anti-dopamine Ab was diluted 6,000 times and 7,000 times. In 5-HT ELISA, R² was bigger than 0.90 in every concentration except 3,000 times and 6,000 times. Both DA and 5-HT were not effectively detected at low concentrations (less than 1.0×10^{-7} M); and because reference value of serum DA is lower than this, HPLC-MS was required to detect serum DA. However, competitive ELISA may be effective in detecting 24-hour urine DA, serum, and 24-hour 5-HT. Further studies are needed to detect hormones more accurately at lower concentrations.

Key words: Competitive ELISA, Dopamine, Serotonin

Corresponding author: Suhng Wook Kim
Department of Integrated Biomedical and Life Sciences, Graduate School, Korea University, 145 Anam-ro, Seongbuk-gu, Seoul 02841, Korea
Tel: 82-2-3290-5686
Fax: 82-2-940-2829
E-mail: swkimkorea@korea.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2017 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: July 31, 2017
Revised: August 21, 2017
Accepted: August 26, 2017

서론

도파민(dopamine, DA)과 세로토닌(serotonin, 5-Hydroxytryptamine, 5-HT)은 신경전달물질 및 호르몬으로서 체내에 미량 존재하지만 그 범위를 벗어날 경우 심각한 질병 상태를 초래할 수 있다. 도파민은 모노아민에 속하는 카테콜아민 계열 신경전달물질 중 하나로 전구체는 L-DOPA이고, 인간 뇌에서 노르에피네프린으로 생합성된다. 혈액뇌장벽(Blood-Brain Barrier,

BBB)을 통과하지 못 하기 때문에 뇌와 말초에서의 합성과 기능은 독립적이다[1]. 혈관 확장 및 심박수와 혈압 증가, 배뇨량 증가, 인슐린 생성 감소, 운동 조절, 동기부여, 보상기전 등의 기능을 하며[2] 운동 조절 중에서도 자발적인 움직임에 중요한 기능을 하기 때문에 부족할 경우 파킨슨병을 유발한다[3]. 도파민의 혈청 농도는 30 ng/L (0.195×10^{-9} M) 미만이며, 24시간 뇨에서의 농도는 26~480 µg/L ($170 \sim 3,319 \times 10^{-9}$ M)이다[4]. 혈청 농도가 매우 낮기 때문에 검사 시 혈청보다는 24시간 뇨 검체

를 주로 이용한다.

세로토닌은 모노아민 신경전달물질로 생화학적으로 트립토판에서 유도된다[5]. 인간을 포함한 동물의 위장관, 혈소판, 중추신경계에서 발견되며 그 중 대다수는 위장관에 분포하면서 장운동을 조절한다[6]. 또한 뇌의 광범위한 영역에 걸쳐 분포하며 기분, 기억, 수면 등을 담당한다[7]. 최종 대사산물은 5-Hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)이다. 세로토닌의 혈청 농도는 101~283 $\mu\text{g/L}$ ($0.57\sim 1.61\times 10^{-6}$ M)이며[8], 24시간 뇨에서의 농도는 178 $\mu\text{g/L}$ (1.01×10^{-6} M) 이하이다[9]. 세로토닌도 검사 시 24시간 뇨 검체를 주로 이용한다.

도파민은 주로 high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS)를 이용해 검출하며, limit of detection (LOD)은 6.5 $\mu\text{g/L}$ 이다. 세로토닌은 HPLC-MS, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) 등을 이용해 검출하며, LOD는 0.78 $\mu\text{g/L}$ 이다[10]. 저농도도 검출할 수 있기 때문에 민감도가 높은 정확한 측정 방법이라 할 수 있다. 하지만 HPLC는 장비가 매우 비싸고 검체 세척 시간이 필요하며 경우에 따라 특이도가 높지 않을 수 있다. 때문에 보다 간단하고 정확한 검사를 위해 전기화학적 방법 등 대안을 찾는 연구들이 존재한다[11-14]. ELISA는 간단하고 항원-항체반응을 이용하기 때문에 특이도가 높다는 장점이 있다. 따라서 본 연구에서는 ELISA를 이용해 도파민과 세로토닌을 검출하고 그 효과를 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시약

Dopamine hydrochloride와 serotonin hydrochloride는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Bovine serum albumin (BSA)은 Merck Millipore (Kankakee, Illinois, USA)에서 구입하였고, Pierce SnakeSkin pleated dialysis tubing 7,000 Da는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. 토끼의 도파민에 대한 polyclonal antibody (pAb) (ab8888), 세로토닌에 대한 pAb (ab8882), horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 당나귀의 토끼 IgG에 대한 pAb (ab6802)는 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였다. 또한 도파민과 세로토닌에 대한 토끼의 pAb를 AbClon (Seoul, Korea)에 의뢰하여 제작하였다. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate reagent set는 BD Biosciences (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다.

2. 측정기기

96 well immunoplate (SPL, Pocheon, Korea)에서 HRP와 TMB 반응까지 완료한 후 Chromate Microplate Reader (Awareness Technology, Palm City, FL, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. BSA conjugation

BSA와 신경전달물질을 결합시키기 위해 신경전달물질, BSA, 5% glutaraldehyde를 혼합하고 색이 약간 노란빛을 띠 때까지 10분 정도 기다린 후 20 mM BH_4 를 혼합하여 실온에서 60분간 반응시킨다. BSA는 carrier protein 역할을 하고, glutaraldehyde가 linker 역할을 하여 hapten인 신경전달물질과 BSA를 crosslinking시킨다. BH_4 는 crosslinking 과정에서 생성되는 Schiff base를 환원시켜서 link를 안정되게 한다. 결합하지 않은 신경전달물질과 glutaraldehyde를 제거하기 위해 dialysis tubing을 이용하여 24시간 동안 7,000 Da molecular weight cut-off (MWCO) dialysis를 한 후 -20°C 에서 보관한다. BSA-DA는 도파민 20 mg/mL stock solution 1 mL, BSA 30 mg/mL 1 mL, 5% glutaraldehyde 50 μL , 20 mM BH_4 1 mL를 혼합하여 만들고, BSA-serotonin은 세로토닌 10 mg/mL stock solution 100 μL , DW 900 μL , BSA 30 mg/mL 1 mL, 5% glutaraldehyde 100 μL , 20 mM BH_4 1 mL를 혼합하여 만든다 [15].

4. Competitive ELISA

96 well plate에서 진행하였다. 5 $\mu\text{g/mL}$ BSA conjugate를 coating buffer (50mM bicarbonate buffer, pH 9.6)로 1,000 배 희석하여 100 μL 분주한 후 실온에서 2시간 동안 shaking incubation하여 well 표면에 고정되도록 한다. 고정되지 않은 BSA conjugate는 wash buffer (10 mM PBS, pH 7.2, 0.05% Tween-20) 200 μL 를 3회 처리하여 제거한다. 그 후 비특이적인 결합을 막기 위해 blocking buffer (3%, w/v, 10 mM PBS에 BSA, pH 7.2) 200 μL 를 넣고 실온에서 30분 동안 shaking incubation시킨다. 신경전달물질을 assay buffer (10 mM PBS, pH 7.2, 0.01% Tween-20)로 10배씩 연속희석하여 1.0×10^{-2} M부터 1.0×10^{-9} M 농도로 준비한 후 well에 50 μL 분주한다. 1차 항체로 사용할 신경전달물질에 대한 토끼의 pAb를 assay buffer로 희석하여 50 μL 분주한다. Abcam 제품은 6,000배로 희석하였고, 제작한 항체는 적절한 농도를 찾기 위해 희석배수를 다르게 하였다. 도파민 항체는 1,000, 3,000,

5,000, 6,000, 7,000, 8,000배 희석하였고, 세로토닌 항체는 1,000, 3,000, 4,000, 5,000, 6,000, 7,000배 희석하였다. 실온에서 1시간 shaking incubation시킨 후 wash buffer 200 μ L를 3회 처리한다. 2차 항체로 토끼 IgG에 대한 당나귀의 pAb를 사용하는데, 이 항체는 HRP와 결합되어 있다. Assay buffer로 5,000배 희석하여 50 μ L 분주한 후 실온에서 30분 동안 shaking incubation시키고 wash buffer 200 μ L를 3회 처리한다. TMB substrate reagent를 100 μ L 분주한 후 10분간 반응시킨다. HRP와 TMB가 반응하면 색이 파래지는데, 이를 멈추기 위해 2 M H₂SO₄를 50 μ L 첨가하면 노랗게 된다. 색이 완전히 노랗게 되면 450 nm에서 흡광도를 측정한다[16].

5. 결과 처리

항체 희석배수별로 10회씩 반복실험한 후 신경전달물질의 농도에 따라 흡광도 값을 정리하였다. 농도별로 데이터의 상위 10%와 하위 10%를 제외한 나머지 값으로 평균을 냈고, 회귀선과 R² (coefficient of determination, 결정계수)을 통해 농도와 흡광도의 연관성을 확인하였다. R² \geq 0.65인 경우에만 연관성이 있는 것으로 고려하였다.

결 과

이 실험은 경쟁적 ELISA로, well 표면에 부착된 항원과 buffer에 희석된 항원이 경쟁적으로 1차 항체와 결합한다. 그 다음 단계에서 wash buffer를 처리할 때 well 부착 항원과 이에 결합한 항체만 남기고 나머지는 제거하기 때문에 앞서 희석했던 신경전달물질의 농도에 따라 남아있는 항체의 양이 달라지게 되며, HRP가 결합된 2차 항체를 처리하여 발색기질인 TMB와 반응시킨 후 흡광도를 측정하면 그 정도를 수치화하여 확인할 수 있다. 실험은 농도를 아는 표준시료를 항원으로 하여 진행하였으며, 실험 결과로 standard curve를 나타냈다.

흡광도가 신경전달물질의 농도에 의존적으로 분포하는 것이 가장 이상적인 결과이며, 시판되는 Abcam 제품(ab8888, ab8882)을 기준으로 삼아 제작한 항체의 성능을 보고자 하였다. 먼저 각 항원에 대한 항체의 특이성을 보기 위해 교차반응 실험을 3회 진행하였다. 항원은 같은 모노아민 신경전달물질인 히스타민, 도파민, 세로토닌, 에피네프린을 사용하였고, 항체는 도파민과 세로토닌에 대한 것을 사용하였다. 흡광도 측정 결과 목표 항원을 제외한 나머지 항원은 농도에 따른 차등적인 변화를 보이지 않았으며, 항체 희석 배수에 따른 변화 또한 보이지 않

Table 1. Absorbance of cross-reactivity test using anti-dopamine Ab

Concentration of Ag	Histamine	Dopamine	Serotonin	Epinephrine
1.0 \times 10 ⁻² M	0.67	0.73	0.50	0.39
1.0 \times 10 ⁻³ M	0.70	0.88	0.58	0.36
1.0 \times 10 ⁻⁴ M	0.59	1.05	0.53	0.37
1.0 \times 10 ⁻⁵ M	0.59	1.11	0.53	0.38
1.0 \times 10 ⁻⁶ M	0.73	1.32	0.46	0.37
1.0 \times 10 ⁻⁷ M	0.61	1.30	0.53	0.39
1.0 \times 10 ⁻⁸ M	0.69	1.40	0.56	0.35
1.0 \times 10 ⁻⁹ M	0.50	1.38	0.46	0.33

Absorbance of dopamine is result of 6,000 times diluted Ab. Other neurotransmitters had similar range of absorbance in every dilution factor.

Table 2. Absorbance of cross-reactivity test using anti-serotonin Ab

Concentration of Ag	Histamine	Dopamine	Serotonin	Epinephrine
1.0 \times 10 ⁻² M	0.80	0.65	1.25	0.67
1.0 \times 10 ⁻³ M	0.85	0.71	1.41	0.63
1.0 \times 10 ⁻⁴ M	0.80	0.71	1.65	0.64
1.0 \times 10 ⁻⁵ M	0.65	0.79	1.75	0.59
1.0 \times 10 ⁻⁶ M	0.73	0.57	1.95	0.66
1.0 \times 10 ⁻⁷ M	0.76	0.72	1.92	0.66
1.0 \times 10 ⁻⁸ M	0.80	0.75	2.21	0.61
1.0 \times 10 ⁻⁹ M	0.71	0.65	2.15	0.58

Absorbance of serotonin is result of 1,000 times diluted Ab. Other neurotransmitters had similar range of absorbance in every dilution factor.

았다(Table 1, 2). 따라서 교차반응 실험 결과 항체가 각 항원에 대한 특이도가 있다고 판단하고 연구를 진행하였다.

도파민의 경우 시판되는 제품을 6,000배 희석하여 사용했을 때 $R^2=0.96$ 으로 항원 농도와 흡광도의 상관관계가 높은 것을 확인할 수 있었다. 제작한 항체는 농도별로 희석하여 사용했는데, 1,000배 희석한 경우 $R^2=0.61$ 로 매우 낮은 것을 확인하였다. 회귀식과 R^2 값은 Table 3에 정리하였고, 흡광도 그래프는 Figure 1으로 정리하였다. 6,000배와 7,000배에서 높은 수준의 상관관계를 확인할 수 있었다. 또한 유의한 R^2 값을 갖는 모든 희석배수에서 제품보다 회귀선의 기울기의 절대값이 크게 나왔으므로 제작한 항체의 도파민에 대한 민감도가 제품보다 더 크다고 판단된다.

세로토닌의 경우 시판되는 제품을 6,000배 희석하여 사용했을 때 $R^2=0.73$ 으로 그다지 크지 않았다. 제작한 항체는 농도별로 희석하여 사용하였으며, 회귀식과 R^2 값은 Table 4에 정리하

였고, 흡광도 그래프는 Figure 2로 정리하였다. 3,000배와 6,000배를 제외한 모든 희석배수에서 높은 수준의 상관관계를 확인할 수 있었다. 또한 회귀선의 기울기의 절대값이 제품에 비해 매우 크게 나왔으므로 제작한 항체의 세로토닌에 대한 민감도가 더 크다고 판단된다.

Table 3. Results of ELISA for dopamine detection: regression equation, coefficient of determination

Dilution rate of primary antibody	Regression equation	R^2
Abcam product (1:6,000)	$y = -0.0622x + 0.2872$	0.96
1:1,000	$y = -0.0644x + 1.2048$	0.61
1:3,000	$y = -0.135x + 0.5788$	0.86
1:5,000	$y = -0.1029x + 0.6277$	0.89
1:6,000	$y = -0.0968x + 0.6127$	0.91
1:7,000	$y = -0.0878x + 0.6347$	0.91
1:8,000	$y = -0.0773x + 0.667$	0.83

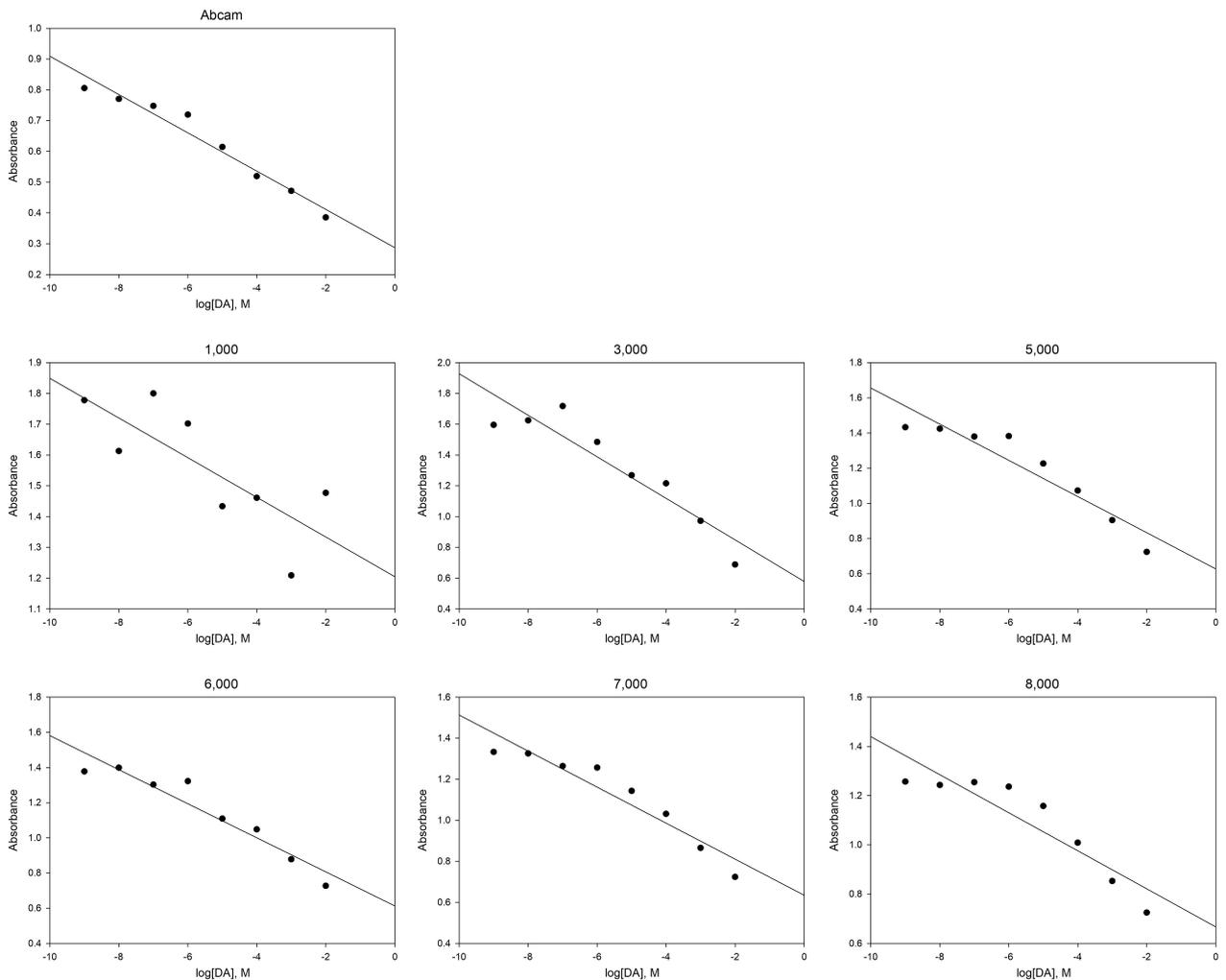


Figure 1. Absorbance graphs of ELISA for dopamine detection.

고찰

경쟁적 ELISA를 통해 신경전달물질의 농도 변화에 따른 흡광도 차이를 확인할 수 있었다. 항체 희석배수에 따라 연관성의 정도는 다르게 나타났지만 도파민과 세로토닌 모두 전반적으로

0.8~0.9 범위의 높은 결정계수를 나타냈으며, 회귀선을 통해 항원에 대한 민감도를 확인하고 교차반응 실험을 통해 특이도를 확인하였다.

도파민의 경우 1차 항체를 1,000배 희석했을 때 $R^2=0.61$ 이었으므로 신경전달물질 농도와 흡광도 간에 연관성이 없다고 판단하였다. 항원-항체반응에 있어서 prozone에 해당하는 경우로 생각된다. 1차 항체를 6,000배와 7,000배로 희석했을 때 $R^2=0.91$ 로 신경전달물질 농도와 흡광도의 상관관계가 가장 컸다. 또한 회귀선의 기울기의 절댓값이 시판 제품은 0.06인 것에 반해 제작 항체는 최대 0.1029로 훨씬 큰 값이 나왔으므로 시판 제품보다 제작 항체가 항원인 도파민에 대해 더 높은 민감도를 갖고 있다고 판단하였다. 그러나 전반적으로 1.0×10^{-7} M 이하의 저농도에서 유의한 정도로 농도 의존적인 흡광도가 나오지 않았기 때문에 검출에 한계가 있는 것으로 보인다. 저농도의 항원을 효과적으로 검출하지 못하는 것으로 인해 모든 항체 희석

Table 4. Results of ELISA for serotonin detection: regression equation, coefficient of determination

Dilution rate of primary antibody	Regression equation	R ²
Abcam product (1:6,000)	$y = -0.0145x + 0.359$	0.73
1:1,000	$y = -0.1359x + 1.0387$	0.95
1:3,000	$y = -0.1277x + 0.6456$	0.82
1:4,000	$y = -0.1054x + 0.7178$	0.91
1:5,000	$y = -0.0814x + 0.6227$	0.90
1:6,000	$y = -0.0721x + 0.7252$	0.71
1:7,000	$y = -0.0745x + 0.6299$	0.90

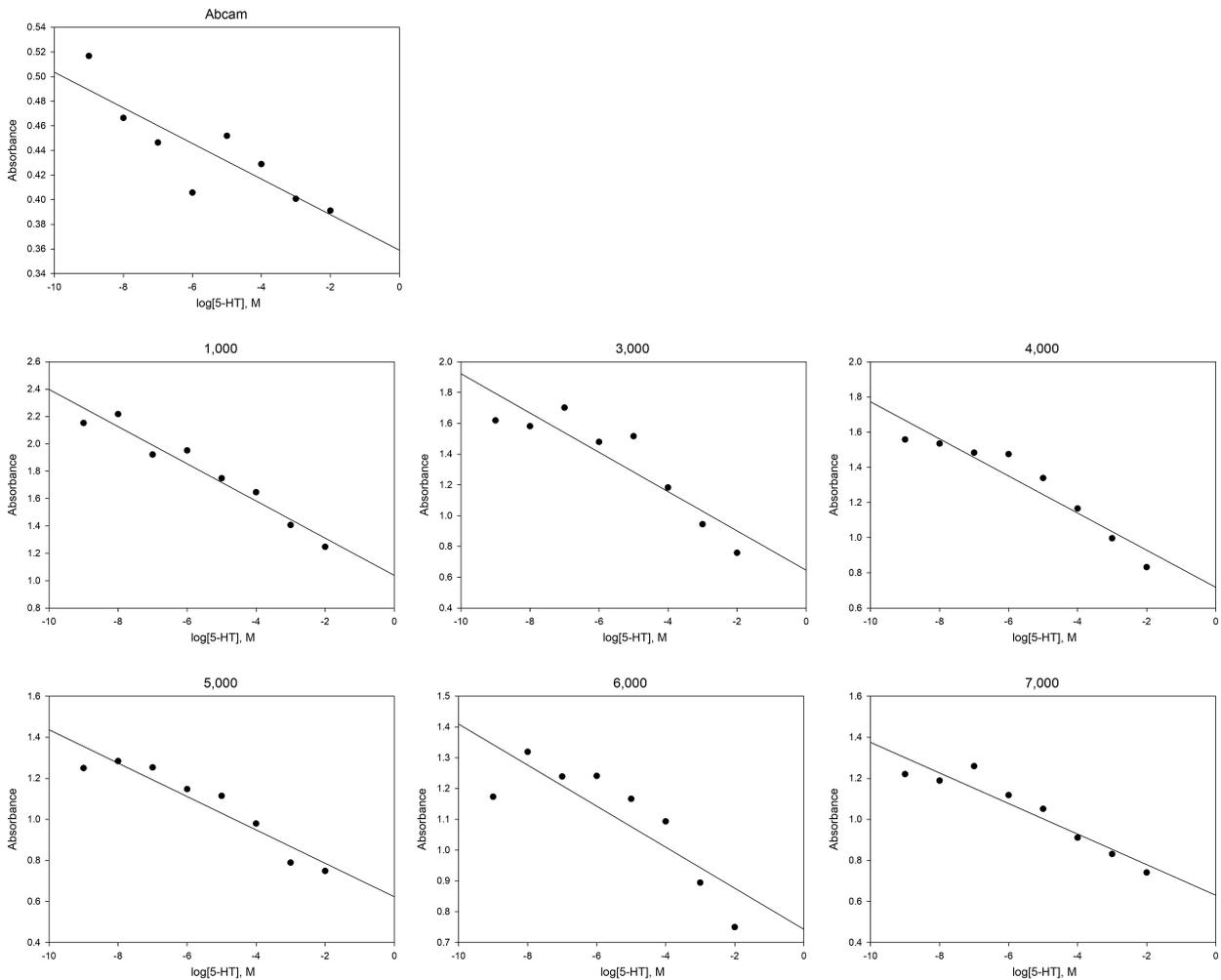


Figure 2. Absorbance graphs of ELISA for serotonin detection.

배수에서 시판 제품($R^2=0.96$)보다 낮은 결정계수를 나타냈으며, 1.0×10^{-7} M 이하 농도에서의 흡광도를 제외하면 민감도가 증가하며 $R^2 \geq 0.98$ 로 매우 높은 상관관계를 나타낸다. 따라서 항원-항체반응을 이용한 ELISA는 도파민이 0.195×10^{-9} M 미만으로 존재하는 혈청보다는 $170 \sim 3,319 \times 10^{-9}$ M의 농도로 존재하는 24시간 뇨에서의 도파민 검출에 적합할 것으로 사료된다.

세로토닌의 경우 시판 제품은 $R^2=0.73$ 으로 낮았던 것에 반해 제작 항체는 6,000배를 제외한 모든 희석배수에서 $R^2 \geq 0.8$ 로 상관관계가 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한 세로토닌에서도 회귀선의 기울기의 절댓값이 큰 차이를 보였는데, 시판 제품은 0.0145로 매우 작았고 제작 항체는 0.0721~0.1359 범위로 나왔으므로, 시판 제품보다 제작 항체가 항원인 세로토닌에 대해 훨씬 높은 민감도를 갖고 있다고 판단하였다. 도파민과 마찬가지로 1.0×10^{-7} M 이하의 저농도에서는 세로토닌을 효과적으로 검출하지 못하였고, 해당 농도에서의 흡광도를 제외하면 민감도가 증가하며 $0.95 \leq R^2 \leq 0.99$ 로 매우 높은 상관관계를 나타낸다. 그러나 세로토닌은 혈청에서 1.305×10^{-6} M 이하, 24시간 뇨에서 1.191×10^{-6} M 이하의 농도로 존재하기 때문에 혈청과 24시간 뇨 검체 모두에서 검출이 가능할 것으로 사료된다.

도파민과 세로토닌 모두 ELISA보다 HPLC의 LOD가 훨씬 낮다. 다른 모노아민 신경전달물질인 히스타민을 대상으로 하는 경우에도 같은 결과를 확인하였다[17]. 하지만 시간과 비용 면에서 ELISA의 장점이 명확하며 24시간 뇨 검체의 참고치보다 낮은 LOD를 갖기 때문에 검사에 이용할 수 있으므로, 현재 신경전달물질의 검사에 사용되는 HPLC-MS의 장점인 정확성을 갖출다면 ELISA를 이용한 검사 방법을 이용하는 것이 효과적인 것이라 사료된다. 이를 위해 보다 낮은 농도를 검출하기 위한 방법은 추후 연구가 필요하다.

요약

도파민과 세로토닌은 신경전달물질 및 호르몬으로서 미량이지만 체내에서 중요한 기능을 한다. 검체는 혈청과 24시간 뇨를 쓰며, 주로 HPLC-MS를 이용하여 검사한다. 본 연구에서는 항원-항체반응을 이용한 경쟁적 ELISA를 통해 도파민과 세로토닌을 검출하고자 하였다. $5 \mu\text{g/mL}$ BSA conjugate를 96 well 표면에 고정시킨 뒤 각각 농도를 다르게 한 신경전달물질과 1차 항체를 넣어 반응시키고 HRP가 결합된 2차 항체와 TMB를 처리하여 흡광도를 측정하였다. 측정 결과를 토대로 회귀식과 R^2 값을 구하여 신경전달물질에 대한 항체의 민감도와 신경전달물

질 농도와 흡광도 사이의 상관관계를 판단하였다. 도파민은 1차 항체를 6,000배, 7,000배로 희석했을 때 $R^2=0.91$ 로 신경전달물질 농도와 흡광도의 상관관계가 가장 높게 나타났고, 세로토닌은 3,000배와 6,000배를 제외한 모든 희석배수에서 $R^2 \geq 0.90$ 의 높은 상관관계를 나타냈다. 도파민과 세로토닌 모두 1.0×10^{-7} M 이하의 저농도에서는 효과적으로 검출되지 않았기 때문에 참고치가 이보다 낮은 혈청 도파민 검출은 HPLC-MS 이용이 필요해 보이지만, 24시간 뇨 도파민과 혈청 및 24시간 뇨 세로토닌의 검출에는 competitive ELISA가 효과적인 것이라 사료된다. 보다 낮은 농도의 신경전달물질도 정확하게 검출하기 위해서는 추가 연구가 필요하다.

Acknowledgements: None

Funding: None

Conflict of interest: None

REFERENCES

1. The National Collaborating Centre for Chronic Conditions. Parkinson's Disease. 1st ed. London: Royal College of Physicians; 2006. p59-100.
2. Goldberg L. Cardiovascular and renal actions of dopamine: Potential clinical applications. *Pharmacol Rev.* 1972;24(1):1-29.
3. Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci.* 1973;20(4):415-455.
4. Gardner D, Shoback D, et al. Greenspan's Basic & clinical endocrinology. 9th ed. New York City: The McGraw-Hill Companies; 2011. Appendix.
5. González-Flores D, Velardo B, Garrido M, González- Gómez D, Lozano M, Ayuso M, et al. Ingestion of Japanese plums (*Prunus salicina* Lindl. cv. Crimson Globe) increases the urinary 6-sulfatoxymelatonin and total antioxidant capacity levels in young, middle-aged and elderly humans: Nutritional and functional characterization of their content. *J Food Nutr Res.* 2011; 50(4):229-236.
6. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med.* 2009;60:355-366.
7. Neumeister A, Young T, Stastny J. Implications of genetic research on the role of the serotonin in depression: emphasis on the serotonin type 1A receptor and the serotonin transporter. *Psychopharmacology.* 2004;174(4):512-524.
8. Siddiqi HA, Salwen MJ, et al. Laboratory diagnosis of gastrointestinal and pancreatic disorders. In: McPherson RA, Pincus MR, editors. *Henry's Clinical diagnosis and management by laboratory methods.* 23rd ed. St Louis, MO: Elsevier; 2017. Chap 22.
9. Pussard E, Guigueno N, Adam O, Giudicelli JF. Validation of

- HPLC-amperometric detection to measure serotonin in plasma, platelets, whole blood, and urine. *Clin Chem.* 1996;42(7):1086-1091.
10. Carrera V, Sabater E, Vilanova E, Sogorb MA. A simple and rapid HPLC-MS method for the simultaneous determination of epinephrine, norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine: Application to the secretion of bovine chromaffin cell cultures. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2007;847(2):88-94.
 11. Ramesh P, Suresh GS, Sampath S. Selective determination of dopamine using unmodified, exfoliated graphite electrodes. *J Electroanal Chem.* 2004;561(Suppl 1):173-180.
 12. Safavi A, Maleki N, Moradlou O, Tajabadi F. Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid, and uric acid using carbon ionic liquid electrode. *Anal Biochem.* 2006;359(2):224-229.
 13. Raof JB, Ojani R, Rashid-Nadimi S. Voltammetric determination of ascorbic acid and dopamine in the same sample at the surface of a carbon paste electrode modified with polypyrrole/ferrocyanide films. *Electrochim Acta.* 2005;50(24):4694-4698.
 14. Belin GK, Seeger S. Rapid analysis of serotonin and propranolol using miniaturized CE with deep-UV fluorescence detector. *Electrophoresis.* 2009;30(14):2565-2571.
 15. Huisman H, Wynveen P, Setter PW. Studies on the immune response and preparation of antibodies against a large panel of conjugated neurotransmitters and biogenic amines: Specific polyclonal antibody response and tolerance. *J Neurochem.* 2010;112(3):829-841.
 16. Kim JS, Jeon MS, Paeng KJ, Paeng IS. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of catecholamine, dopamine in serum. *Anal Chim Acta.* 2008;619(1):87-93.
 17. Lee IH, Kim YH. Comparison of Methods for Measuring Histamine by ELISA and HPLC-MS Assay In Vitro. *Korean J Clin Lab Sci.* 2015;47(4):306-312.