

生物样本中单胺类递质及其前体氨基酸和主要代谢产物的快速分析法——高效液相色谱-电化学检测法

杨煜 杨竞平 麦荫乔

(白求恩医科大学基础医学院, 长春, 130021)

近年兴起的高效液相色谱-电化学检测法(HPLC-ECD)测定生物样本中单胺类递质,除了具有灵敏、快速、简便等优点外,同时还可以一次性分析单胺类递质及其前体氨基酸和主要代谢产物^[1,2]。我们结合本室条件,用HPLC-ECD法,同时测定生物样本中单胺类递质:去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(E)、多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT),及其前体氨基酸:酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)和主要代谢产物:高香草酸(HVA)和5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)共八种化合物。生物样品处理简便,减少了样品组分损失,既可以分析单胺类递质的含量,也可以观察其更新状况。

实验部分

(一)仪器 高效液相色谱系统为BIO-RAD公司系列产品:高压泵(1350型),进样器(7125型),电化学检测器(1340型)和数据处理系统(700型)。所用分析柱为ODS柱,250×4mm i.d.,颗粒5μm,工作电极为玻璃电极,参比电极(Ag/AgCl)的电位为0.83V,柱温由配套柱温箱控制。

(二)试剂 NE、E、DA、5-HT、HVA、5-HIAA、Tyr和Trp八种标准品购自Sigma或Fluka公司。上述标准品用含有0.1mmol/L EDTA的0.1mol/L高氯酸(PCl₄)配成10μg/μl的储存液。分析时,用洗脱液稀释至200pg/μl,在测试样浓度与其响应峰面积的线性关系时,根据需要稀释成不同浓度。离子对试剂庚烷基磺酸钠(B₇)和甲醇均为色谱纯,其它试剂为优级纯或分析纯,实验用水均为三蒸超纯水。

(三)色谱分析条件 流动相为0.02mol/L乙酸钠-0.0125mol/L柠檬酸缓冲液,pH为4.0,含14%(V/V)甲醇,0.12%(V/V)B₇和0.1mmol/L EDTA。柱温为35℃,流速1ml/min,柱压为1569×10⁵Pa。

(四)生物样本的预处理 断头处死动物,快速在冰水浴中分出脑组织,称重,-70℃冻贮,测定前以0.1mol/L PCA制成10倍稀释的匀浆。用柠檬酸和EDTA抗凝,再取血浆,-70℃冻贮,一周内测完。分

析前,按四倍稀释加入0.1mol/L PCA(含0.1mol/L EDTA)混匀,18,000g、4℃离心20min,取上清液10—20μl进样。

(五)标准曲线、回收率和敏感性测定 分别选择1ng, 500pg, 250pg, 200pg, 100pg, 50pg六个浓度进行测定,观察线性关系。样品计算按保留时间与标准品保留时间对应的峰面积进行计算。将八个标样(均200pg)加入脑匀浆和血中,按同样方法提取、进样,进行回收率测定。按信号与噪声比>3测定敏感度,结果处理用配套微机进行。

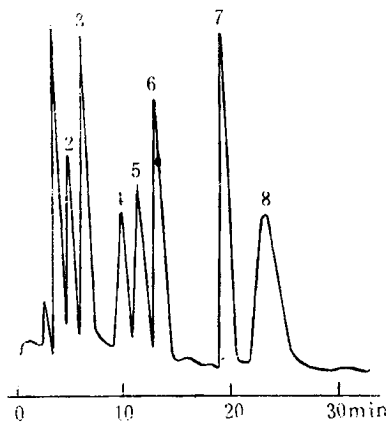


图1 八种标样色谱图

峰: 1. Tyr, 2. NE, 3. E, 4. DA, 5. Trp, 6. 5-HIAA, 7. HVA, 8. 5-HT.

结果与讨论

图1为标样分离的色谱图。八种组分基本达到了基线分离,并且所给的六个浓度与其响应峰面积间呈良好的线性关系,见图2。

以间脑为例,测定回收率,八种组分的范围在88.5—119.3%之间,平均为102.1%±8.9%(平均值±标准偏差,n=6)。以信号与噪声比为3计算,每种样品的最小检测限在20—50pg之间,反复进同一浓度的标准品,八种标准品响应的变异系数都小于

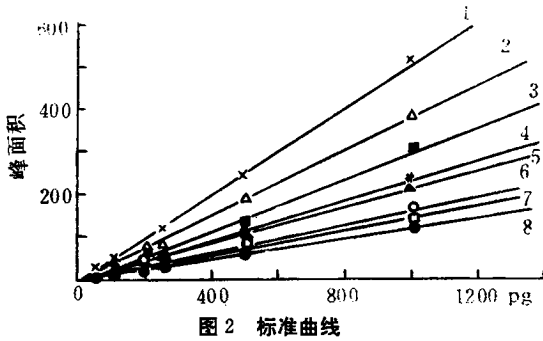


图2 标准曲线

1. 5-HT, 2. HVA, 3. E, 4. Tyr, 5. 5-HIAA, 6. DA, 7. Trp, 8. NE.

5.8%, 见表1。

表1 HPLC-ECD法测定标样的回收率、变异系数和最小检测限

标样	回收率% (n=6)	CV% (n=6)	最小检测限 pg
Tyr	100.9	1.3	40
NE	102.1	1.2	20
E	102.6	4.0	50
DA	119.3	4.3	40
Trp	90.9	5.8	30
5-HIAA	107.9	3.2	20
HVA	88.5	2.4	40
5-HT	104.4	1.4	40

以上结果表明,本方法的重复性和线性关系都是良好的。其最小检测限<50pg,一般的生物样品均可以直接用于测定。

在我们采用的仪器体系和所给定的条件下,可以同时一次性分析NE、E、DA、5-HT和它们的前体氨基酸及主要代谢产物共八种成分,一次分析在25分钟内就可以完成,而且因该方法精确度高,回收率好,故不需要加内标就可以进行测定。流动相的选择主要按文献^[2]进行,流速为1ml/min, pH为4.0,观察B_r和甲醇比例对分析样品的影响。B_r可以影响生物胺的保留时间,而甲醇可以影响所有组分的保留时间,它们的浓度,特别是两者比例只有在适当条件下,才能在尽量短的时间内使所分析样品达到较好分离。

我们摸索在B_r为0.12%,甲醇为14%的条件下,八种组分能够达到良好分离。另外,所选择柱填料的颗粒大小对分辨率也有影响,曾以颗粒为10μm的等长度柱子做过实验,反复摸索,但Tyr不能与前面的溶剂峰分开。在一定范围内提高柱温可以缩短分析时间,且不影响分辨率。

总之,采用上述体系和给定的实验条件,在25分钟内,就可以对单胺类递质及其前体氨基酸和主要代谢产物共八种成分进行分离检测,不失为良好的分析手段。若对流动相条件进一步改进,可以同时测定更多相关成分。由于样品处理的简化,使非组分峰增大,干扰先被洗脱成分分析的准确性,有待进一步改进与完善。

参考文献

[1] 叶惟冷,生理学报,39(4),412(1987).
 [2] S. Murai et al., J. Neurochem., 50(2), 473(1988).
 (收稿日期:1990年6月29日)

A Rapid Simultaneous Determination of Monoamine Neurotransmitters, Their Precursor Amino Acids and Main Metabolites by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Electrochemical Detection
 Yang Yu, Yang Jingping and Man Yingqiao, Norman Bethune University of Medical Science, Changcun, 130021

A rapid and simple procedure for simultaneous determination of monoamine neurotransmitters (NE, E, DA, 5-HT) and their precursor amino acids (Tyr, Trp) as well as main metabolites (HVA, 5-HIAA) in biological samples by HPLC is described. Because of simple pretreatment of sample the average recovery is over 90%. Within-run CV of peak areas is less than 5.8% and detection limit is between 20—50pg. The linearity of peak area response vs. concentration appears very good ($\gamma = 0.9997$). The conditions of chromatography are discussed.

自动变换波长反相高效液相色谱法同时定量测定
 生物样品中磷酸肌酸和腺嘌呤核苷酸

闵庆旺

(国防科工委后勤部军事医学研究所,北京,100101)

张振清 阮金秀

(军事医学科学院毒物药物研究所,北京,100850)

腺嘌呤核苷酸(ATP, ADP和AMP)及磷酸肌酸

(CP)是生物能量转换的主要成分。测定这些成分将