

高效液相色谱-柱后固定化酶反应器-电化学检测法 分析大鼠脑微透析液中的乙酰胆碱和胆碱*

叶惟冷 马晓峰 梅镇彤

(中国科学院上海生理研究所 上海 200031)

提 要 建立了用高效液相色谱分离-柱后固定化酶反应器酶解-电化学检测器检测酶解最终产物 H_2O_2 的方法,分析了麻醉和自由活动大鼠脑微透析液中乙酰胆碱(ACh)和胆碱(Ch)的含量。至少在 0.2~100 $\mu\text{mol/L}$ 范围内 ACh 和 Ch 的浓度与其响应的线性关系良好,它们的检测极限都可达 50 fmol。对高效液相色谱结合固定化酶反应器的分析方法作了简要的讨论。

关键词 液相色谱法,柱后固定化酶反应器,大鼠脑微透析液,乙酰胆碱和胆碱

分类号 O658/Q54

1 前言

乙酰胆碱(ACh)是人和哺乳类动物中枢及外周神经系统的一种重要神经递质^[1]。ACh 参与认知、睡眠和觉醒、痛与镇痛等许多生理功能的调节;老年痴呆症、有机磷农药中毒症、肌无力综合症、帕金森氏症等多种疾患均与 ACh 的代谢异常相关。由于 ACh 和胆碱(Ch, 它既是生物合成 ACh 的前体,也是 ACh 的代谢产物)的分子中都没有生色团、荧光团和电活性基团,因而对它们的分析检测很困难。近十年来,得益于高效液相色谱法(HPLC)分析中固定化酶反应器(IMER)技术的引入和不断改进^[2,3],学者们成功地分析了各种生物样本中的 ACh 和 Ch^[4-14]。我们在国内首次报道了用 HPLC-柱后 IMER-电化学检测法分析麻醉大鼠额叶皮层、海马和纹状体以及自由活动大鼠海马和额叶皮层微透析液中的 ACh 和 Ch,并对 HPLC 结合 IMER 的分析法作了简要的讨论。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

HPLC 仪为美国 BAS 公司 482 系列:PM-80 泵;Rheodyne 7125 六通进样阀,接 20 μL 进样环;LC-4C 安培型电化学检测器,白金(Pt)工作电极对 Ag/AgCl 参比电极的电位设置为 +0.50V,灵敏度

5nA FS。色谱图和数据的采集、储存、处理及激光打印均在色谱工作站(AS 486/66 电脑, BAS 公司提供的 Chem lab Version 3.0 色谱资料分析用软件)上进行。

ACh 盐酸盐、Ch 盐酸盐和新斯的明(Neostigmine, NEO)均购自 Sigma 公司,防腐剂 Kathon CG 溶液由 BAS 公司提供,其余试剂为国产分析纯。ACh 和 Ch 标样先用 0.05 mol/L 乙酸溶液(用 NaOH 调至 pH 5.5)配制成 2 mmol/L 贮液。在测试标样浓度与其响应(以峰面积计)之间的线性关系时,再用 Ringer 氏溶液稀释至所需浓度。

2.2 微透析液的采集

实验所用的无脉动微量注射泵、立体定位仪、大鼠脑定位图谱和自制的同心型微透析探头均同前文^[15,16]。灌流用的 Ringer 氏溶液的组分(mmol/L): NaCl 为 147, KCl 为 4.0, CaCl_2 为 2.2, 内含 NEO 10 $\mu\text{mol/L}$ (用于麻醉大鼠)或 1 $\mu\text{mol/L}$ (用于自由活动大鼠)。按每 100g 体重腹腔注射 20mg 三溴乙醇的剂量将体重为 250g 左右的雄性 SD 大鼠麻醉,固定在立体定位仪上。插入额叶皮层探头的坐标为:前囟前 1.5mm, 中线旁 2mm, 探头与水平线成 45 度角, 深度为 5.8mm; 插入纹状体的为: A 2.0mm, R 2.5mm, V 7.0mm; 插入海马的为: A 2.6mm, R 2.5mm, V 3.5mm。用于自由活动条件下测试的大鼠,在同样麻醉条件下,按相应的坐标(但深度浅

* 国家自然科学基金重点项目资助(批准号 39630140)

** 用立体定位仪定位, 先需调好三维空间的零点。从零点往前用 A 表示, 往后用 P 表示, 往右用 R 表示, 往左用 L 表示; 沿 Z 轴往下插入脑内时, 用 H 或 V 表示。

本文收稿日期: 1997-11-09, 修回日期: 1997-12-26

3mm), 将外径为 0.8mm、内径为 0.6mm 的引导管埋植在海马和额叶皮层, 术后至少恢复 2d 才开始采样。实验时将外径为 0.22mm 的探头插入引导管的中孔至海马。实验结束后作常规的组织切片, 核实探头插入的部位。灌流速度为 1 μ L/min, 每 20min 收集一管, 至少平衡 60min 后开始收集样本。我们测试了基础条件、高钾(K⁺浓度为 100mmol/L, 相应降低 Na⁺浓度以维持等渗)灌流 10min 和深度麻醉造成大鼠窒息死亡后上述三个脑区透析液中 ACh 和 Ch 的水平。实验所用探头的有效长度都是 3mm, 使用前将探头尖端浸没在含 ACh 和 Ch 均为 10 μ mol/L 的混合标样溶液中, 在相同流速和室温条件下收集透析液, 测试其体外回收率。

2.3 色谱分析

ACh/Ch 分析柱(100mm \times 4mm i.d.) 及含有乙酰胆碱酯酶(AChE)和胆碱氧化酶(ChO)的 IMER (40mm \times 4mm i.d.) 均由 BAS 公司提供(分析柱和 IMER 都是用多聚材料 polymer gel 作为载体)。样本中的 ACh 和 Ch 经分析柱分离后, 在 IMER 中 ACh 被 AChE 水解成 Ch 和乙酸, 水解产生的 Ch 和样本中原有的 Ch 先后被 ChO 氧化, 生成过氧化氢 H₂O₂。H₂O₂ 在检测池被检测, 用外标法定量。等比洗脱的流动相的组成为含有 5g/L Kathon CG 的 50mmol/L Na₂HPO₄ 溶液, 用磷酸调 pH 至 8.5, 流速为 0.8mL/min。色谱分析在室温下进行。

3 结果和讨论

有关 HPLC-柱后 IMER-电化学检测法分析 ACh 和 Ch 详细的机理, 以及用该方法分析 ACh 和

Ch 优于生物分析法、气相色谱-质谱法和放射免疫分析法的理由均已报道^[2,3,8,10-12]。图 1 是标样及生物样本中 ACh 和 Ch 被分离和检测的色谱图。酶作用的专一性大大提高了检测复杂体系中微量化合物的选择性^[2,3]。图中除了非保留峰外, 几乎没有其它杂峰的干扰。图 2 展示了随着流动相中 Na₂HPO₄ 浓度的升高, ACh 和 Ch 的保留时间随之下降的趋势, 估计这是由于随着 Na⁺浓度的升高, 增强了相同离子的抑制效应, 从而削弱了 ACh 和 Ch 分子中的 N⁺R₄ 在分析柱上的保留。在本色谱条件中, 流动相的离子强度对 ACh 和 Ch 的保留影响最大。降低流速能增加溶质在 IMER 中的滞留时间, 从而增强了酶的催化效果, 有利于得到良好的响应, 并且能略增大 ACh 和 Ch 之间保留时间的差值, 但也使溶质的色谱峰展宽。由于 IMER 中两个酶的活力都高达 60 个酶单位, 即使稍低于酶促反应的最适温度, ACh 和 Ch 也能得到良好的响应, 所以本分析可在室温下进行。如果 IMER 已接近失效期, 则需将分析柱和 IMER 恒温于 35~37 $^{\circ}$ C 才能得到合适的响应^[4-9]。凡用多聚材料作为分析柱和 IMER 的载体^[3], 流动相的 pH 值都应调节为 8.0~8.5^[4-11], 即 IMER 酶促反应合适的 pH 值范围。本实验所用的色谱条件就是综合考虑了流速、温度、流动相的离子强度和 pH 值这 4 个方面的因素而确定的。在此条件下, 至少在 0.2~100 μ mol/L 范围内, ACh 和 Ch 的浓度与其响应的线性关系良好, 相关系数分别为 0.9988 和 0.9985; 两个化合物的检测极限都可达 50fmol(以进样 20 μ L、信噪比为 2 计)。

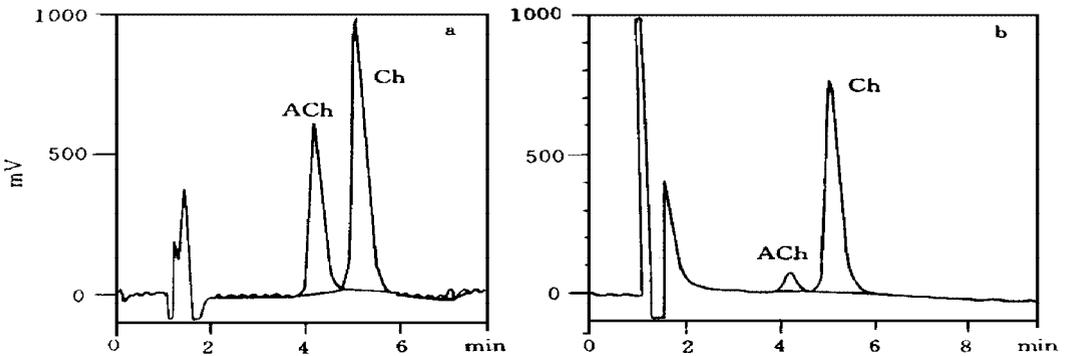


图 1 乙酰胆碱和胆碱的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of acetylcholine and choline

a. 标样(standard), b. 麻醉大鼠纹状体微透析液(microdialysate from the striatum of anesthetized rat).

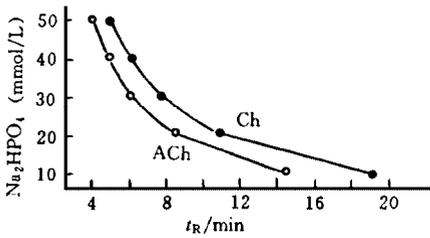


图 2 流动相中 Na₂HPO₄ 的浓度对 ACh 和 Ch 保留时间的影响

Fig. 2 Effect of Na₂HPO₄ concentration

in mobile phase on the retention times of ACh and Ch

色谱条件: 室温, 流速 0.8 mL/min, 流动相 pH 8.50.

chromatographic conditions: room temperature;

flow rate, 0.8 mL/min; mobile phase pH 8.50.

ACh 从神经末梢释放后迅速被生物体内的 AChE 水解^[1], 所以微透析液中 ACh 的基础水平是很低的。为了便于观察, 有些生物医药实验应在灌流液中加入适量的可逆性 AChE 抑制剂, 如加入等于或小于 10 μmol/L 的 NEO(过量了会影响 IMER 的功能), 以提高 ACh 的基础水平^[4-8, 11]。但这样处理

会对系统的生理功能产生一定的影响, 解释实验结果时应予以注意^[4, 5, 8, 17]。在整个分析过程中, 要始终注意防止细菌的生长, 以免因细菌繁殖而影响检测^[3, 4]。我们在体外室温条件下, 测得有效长度为 3.0 mm 的探头对 ACh 和 Ch 的回收率分别是 23.2% ± 1.4% 和 34.3% ± 3.2%。麻醉大鼠 3 个脑区以及自由活动大鼠海马和额叶皮层微透析液中 ACh 和 Ch 的测试结果见表 1, 表中给出的数据均系未经回收率校正的值。在分析同一脑区微透析液内 ACh 和 Ch 含量的生物医药实验中, 由于各个实验室所用 AChE 抑制剂的种类和剂量, 探头的型号和有效长度以及灌流的速度均不完全相同, 因而所测得的 ACh 和 Ch 的基础水平值也不尽一致。在本实验条件下测得的 ACh 和 Ch 的基础水平值, 与前人在相近条件下所得的结果^[11, 14, 17-20]基本接近或无数量级上的差异。动物在自由活动状态下, 海马和皮层微透析液中 ACh 的基础水平明显高于麻醉状态下的水平以及高 K⁺ 灌流能引起 ACh 释放增加的结果(见表 1), 均与前人报道^[11, 18]的一致。

表 1 麻醉大鼠 3 个脑区和自由活动大鼠海马和额叶皮层微透析液 (n=5) 中 ACh 和 Ch 的含量(均值 ± 标准差, nmol/L)

Table 1 The contents(mean ± SD, nmol/L) of acetylcholine and choline in microdialysates(n=5) from three brain areas of anesthetized rats and from hippocampus and frontal cortex of freely moving rats

	纹状体		海马		海马*		额叶皮层		额叶皮层*	
	Striatum		Hippocampus		Hippocampus		Frontal cortex		Frontal cortex	
	ACh	Ch	ACh	Ch	ACh	Ch	ACh	Ch	ACh	Ch
基础水平 Basal level	212 ± 28	1266 ± 234	A	1780 ± 315	26 ± 4	1547 ± 138	22 ± 4	2970 ± 435	83 ± 7	2052 ± 172
高 K ⁺ (100 mmol/L) 灌液 Perfusion of high K ⁺	515 ± 57	830 ± 173	A	1295 ± 288	47 ± 6	1724 ± 178	63 ± 11	2531 ± 284	179 ± 10	2483 ± 243
死后 Postmortem	414 ± 51	120 ± 30	A	1220 ± 270	B	B	B	B	B	B

* 自由活动大鼠的分析结果 (the assay results of freely moving rats)。A 为低于检测限(A is below the detection limit), B 为没有测定(B is not measured)。

1 韩济生, 任民峰, 汤健等编著. 中枢神经介质概论. 北京: 科学出版社, 1980. 57~92
 2 史坚, 都恒华. 色谱, 1992, 10(4): 204~206
 3 Tyrefors N, Carlsson A. J Chromatogr, 1990, 502: 337-349
 4 Greaney M D, Marshall D L, Bailey B A et al. J Chromatogr, 1993, 622: 125-135
 5 Messamore E, Warpmann U, Ogane N et al. Neuropharmacology, 1993, 32(8): 745-750
 6 Tang Y, Aigner T G. Neuro Report, 1996, 7(13): 2231-2235
 7 Florin S M, Kuczenski R, Segal D S. Brain Res, 1992, 581: 53-58

8 Huang T, Yang L, Gitzen J et al. J Chromatogr B, 1995, 670: 323-327
 9 Tsai T R, Cham T M, Chen K C et al. J Chromatogr B, 1996, 678: 151-155
 10 Fujiki Y, Ikeda Y, Okuyama S et al. J Liq Chromatogr, 1990, 13(2): 239-251
 11 Marrosu F, Portas C, Mascia M S et al. Brain Res, 1995, 671: 329-332
 12 Okuyama S, Ikeda Y. J Chromatogr, 1988, 431: 389-394
 13 Ikarashi Y, Blank C L, Suda Y et al. J Chromatogr A, 1995, 718: 267-272

- 14 Xu M, Nakamura Y, Yamamoto T et al. *Neurosci Lett*, 1991, 123: 179-185
- 15 叶惟冷, 尹萍波. 色谱, 1996, 14(1): 14~ 17
- 16 叶惟冷, 尹萍波, 梅镇彤. 色谱, 1997, 15(3): 185~ 188
- 17 Vinson P N, Justice J B. *J Neurosci Meth*, 1997, 73: 61-67
- 18 Giovannelli L, Casamenti C, Scali C et al. *Neuroscience*, 1995, 66(4): 781-790
- 19 Rada P, Mark G P, Vitek M P et al. *Brain Res*, 1991, 550: 287-290
- 20 Moore H, Sarter M, Bruno J P. *Brain Res*, 1992, 596: 17-29

Determination of Acetylcholine and Choline in Microdialysates from Rat Brain by High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection Combined with a Post-Column Immobilized Enzyme Reactor

Ye Weiling, Ma Xiaofeng and Mei Zhentong

(Shanghai Institute of Physiology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 200031)

Abstract In the present work, acetylcholine(ACh) and choline(Ch) in the microdialysates from three brain areas of anesthetized rats and from hippocampus and frontal cortex of freely moving rats were simultaneously measured by high performance liquid chromatography(HPLC) with electrochemical detection combined with a post-column immobilized enzyme reactor(IMER). This assay was based on the separation of ACh and Ch on a polymer gel column followed by passage of the effluent through an IMER, on which the separated ACh and Ch reacted respectively to give each stoichiometric yield of hydrogen peroxide, which was detected electrochemically at a platinum electrode (potential+ 0.5V versus Ag/AgCl). The tip of concentric dialysis probe was made of the semipermeable dialysis membrane of 0.22mm in outside diameter, and the effective length inserted into rat brain was 3.0mm. The probe was perfused at a rate of 1 μ L/m in with Ringer's solution which contained 10 μ mol/L (for anesthetized rats) or 1 μ mol/L (for freely moving rats) neostigmine, a reversible cholinesterase inhibitor, to elevate ACh level in microdialysate. Before the experiment, the recovery of the probe in vitro was measured at room temperature, and the position of the probe was checked by histological procedure at the end of the experiment.

In the range of 0.2-100 μ mol/L, the relation between the amounts and the peak areas was linear ($r = 0.9988$ for ACh and $r = 0.9985$ for Ch). The detection limit for ACh and Ch, at a S/N ratio of two, was found to be 50fmol per injection. The probe recoveries(%) for ACh and for Ch were 23.2 ± 1.4 and 34.3 ± 3.2 (mean \pm SD) respectively. The basal levels of ACh in the microdialysates from striatum and frontal cortex of anesthetized rats as well as from hippocampus and frontal cortex of freely moving rats were 212 ± 28 and 22 ± 4 as well as 26 ± 4 and 83 ± 7 (nmol/L, mean \pm SD, not corrected according to probe recovery) respectively. The perfusion of high concentration K^+ (100mmol/L) through the dialysis probe induced a large increase of ACh in the microdialysates. The critical points for HPLC analysis combined with IMER were briefly discussed.

Key words liquid chromatography, post-column immobilized enzyme reactor, microdialysate from rat brain, acetylcholine and choline