

高效液相色谱法测定血小板释放的5-HT

王莉莉 郭治安¹ 赵德化 梅其炳

(第四军医大学药理学教研室¹ 西北大学化学系 西安 710032)

提 要 用HPLC/ECD法,采用国产10 cm C₁₈柱,测定激活因子诱导的血小板5-HT释放反应。日内变异系数为4.65%。线性范围为0.0025~1 mg/L。方法具有速度快、灵敏度高、特异性强、样品制备简便、所需样本量少、试剂成本低等优点,能准确反应血小板激活状况,可应用于其它生物样本。

关键词 高效液相色谱法,5-HT,血小板,角叉菜胶

分类号 O658

1 前言

5-羟色胺(5-HT)是广泛分布于人体多种组织的活性物质,对心血管及神经系统均具有重要的生理作用。作为一种弱血小板激活剂,能显著增强二磷酸腺苷(ADP)、血栓素A₂(TXA₂)、凝血酶、胶原等的血小板聚集作用。目前,对5-HT测定多采用荧光法,但其操作繁琐,特异性差^[1]。本文参考文献^[2],利用高效液相色谱系统,采用电化学检测器及国产10 cm C₁₈柱,建立了测定非聚集诱导剂引起血小板活化后上清液中5-HT的方法。

2 实验方法

2.1 仪器及试剂

日本岛津LC-6A高效液相色谱仪,L-ECD-6A电化学检测器(工作电极:玻璃碳糊精电极,参比电极:银/氯化银,辅助电极:SUS316),Spherisorb C₁₈柱(4.6 mm i. d. × 100 mm, 3 μm,中国科学院大连化学物理研究所)。C-R3A数据处理机。5-HT(Sigma),庚烷基磺酸钠(Sigma),乙腈(分析纯,西安化学试剂厂),角叉菜胶(Sigma),其余试剂均为分析纯。

2.2 色谱条件

流动相(1L):110 mL 乙腈,2.0 mmol/L 庚烷基磺酸钠,14.7 mmol/L NaH₂PO₄ · 2H₂O,30 mmol/L 柠檬酸钠,0.027 mmol/L EDTA · 2Na · 2H₂O,1 mL 二乙胺,用磷酸调整pH 3。流速0.6 mL/min,电化学检测器测电压+0.65 V,量程8 nA,标准响应值0.5 s,测试温度22℃。

2.3 标准品制备

准确称取5-HT标准品,用含1 mmol/L Ca²⁺ Tyrod's液和0.05 mmol/L EDTA(5:1)配制标准液,质量浓度依次为1,0.5,0.25,0.1,0.05,0.025,0.01,0.005,0.0025 mg/L,取标准液10 μL在上述

条件下进行分析,以对应的峰面积计算回归方程。

2.4 样品制备

柠檬酸-柠檬酸钠-葡萄糖(ACD)抗凝血,分离富含血小板血浆(PRP)。以20 mmol/L EDTA · 2Na洗PRP,将血小板置于无Ca²⁺的Tyrod's液中(37℃)20 min。然后离心保留血小板,用含1 mmol/L Ca²⁺ Tyrod's液悬浮并计数血小板10⁸/mL,取0.5 mL此悬浮液并加入角叉菜胶于37℃,孵育3 min。用100 μL 0.05 mmol/L EDTA终止反应,4℃下以15 000 r/min速率离心5 min,取上清液经0.22 μm滤膜过滤,-20℃下贮存。测定时上柱10 μL检测,以保留时间定性,峰面积定量分析。

3 结果

3.1 线性关系及灵敏度

以不同浓度标准品进样测定,色谱图见图1。以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标作图,计算出标准曲线回归方程为 $Y=197\ 895X-11\ 061$,相关系数为0.999 8。线性范围0.002 5~1 mg/L,说明在实验浓度范围内,浓度与峰面积呈良好线性关系。5-HT的最低检出量(按信噪比大于2计算)为0.004 ng,最低检出质量浓度为0.4 μg/L。

3.2 精密度测定

取出置于4℃冰箱中相同浓度的标准品,每天重复5次测定5-HT,日内变异系数为4.65%。

3.3 回收率实验

在以上色谱条件下,在血小板悬浮液中加入标准品进行回收率实验,重复5个样品测定5-HT回收率为(83.5±6.3)%,可见本品回收率尚可。

3.4 样品测定

本法对角叉菜胶诱导血小板释放的5-HT进行了测定,不同剂量诱导剂所诱导的5-HT释放量见表1。

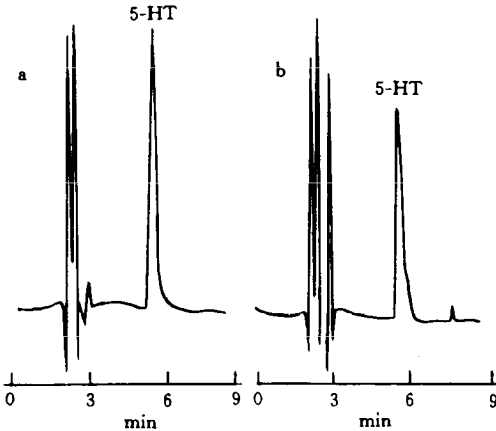


图 1 5-HT 标准(a)和血小板释放 5-HT(b)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of 5-HT standards (a) and 5-HT in platelet sample (b)

表 1 角叉菜胶诱导的血小板 5-HT 释放

Table 1 secretion of 5-HT from platelet induced by carrageenan

诱导剂质量浓度 Inductor mass conc. (mg/L)	5-HT 释放量 5-HT secretion (ng/10 ⁸ Plt)
0	179.86 ± 17.08
5	274.80 ± 19.11
15	407.68 ± 52.68
45	534.70 ± 138.5

($\bar{X} \pm S$), $n=6$, 相关系数 $r=0.957$, Plt: 血小板 (platelet)。

4 讨论

5-HT 是血小板被激活时高密度颗粒释放的活性物质,其释放量代表着血小板被激活的程度^[3]。角叉菜胶是药理学研究中广泛应用的一种致炎因子^[4],并可用来制备实验性大鼠及小鼠血栓模型^[5],但它对血小板的作用尚不明确。本实验采用国产反相柱,用电化学法测定角叉菜胶诱导血小板释放 5-HT,具有速度快、灵敏度高、特异性强、样品制备简便、所需样品量少、试剂成本低等优点,并能准确反映血小板被激活状况。同时,该法亦可用于血液、体液等生物样本 5-HT 的测定。

参 考 文 献

- 1 Paul M, Vanhoutte M D. Serotonin and the cardiovascular system. New York: Paven Press, 1985. 2-8
- 2 Tsai T H, Tsai W T, Chow C T et al. Throm Res, 1995,78(3):265-270
- 3 Paul M, Vanhoutte M D. Serotonin and the cardiovascular system. New York: Paven Press, 1985. 77
- 4 Rose M D. J Pharm Pharmac, 1972,24:89-102
- 5 胡三觉,田巧莲,顾建文等. 中华血液学杂志,1993,14(10):541~542

Determination of 5-Hydroxytryptamine (5-HT) Secretion from Activated Platelets by High Performance Liquid Chromatography/Electrochemical Detector

Wang Lili, Guo Zhi'an¹, Zhao Dehua and Mei Qibing

(Department of Pharmacology of Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032;

¹Department of Chemistry of Northwest University, Xi'an, 710069)

Abstract A method of determination of 5-HT secretion from activated platelets by HPLC/ECD was established. Spherisorb C₁₈ column of 4.6 mm i.d. × 100 mm was used in this experiment. The CV was 4.65%. The linear range was 0.002 5-1 mg/L. This method has the advantages of high speed, high sensitivity; specificity, of requiring a minimum of preparation of samples and of relatively low cost for instrumentation and reagents. It could reflect the activated situation of platelet induced by weak activator and be used in other biological sample.

Key words high performance liquid chromatography, 5-hydroxytryptamine, carrageenin, platelet