

• 基础研究 •

 α -氨基丁酸为内标物高效液相法测定脑微透析液中氨基酸含量

张绍东 翟晶 张淑珍 罗芳

[摘要] 目的 研究以 α -氨基丁酸(AABA)为内标物,用高效液相色谱仪测定大鼠脑微透析液中的神经递质类氨基酸含量。方法 以 AABA 为内标,用高效液相色谱仪测定大鼠脑微透析液中的神经递质类氨基酸含量,采用 OPA 柱前衍生,ODS-C18 色谱柱,荧光检测器,AABA 作为内标,使用磷酸缓冲液和甲醇二元梯度洗脱方法,35 min 内完成。结果 氨基酸与内标在给定条件下分离良好,每种氨基酸的回收率为 88.2%—102.3%,线性回归相关系数平均为 0.998 ± 0.0015 ,每种氨基酸的检测限为 1.0—8.6 ppm。结论 本方法准确、灵敏,可用于微透析样品中氨基酸的测定。

[关键词] 氨基酸;高效液相(HPLC);微透析; α -氨基丁酸(AABA)

Amino acids in brain microdialysate tested by HPLC with α -aminobutyric acid as the internal standard ZHANG Shao-dong, ZHAI Jing, ZHANG Shu-zhen, et al. Department of Biochemistry, Beijing Neurosurgical Institute, Beijing 100050, China

[Abstract] Objective To study the effect of testing amino acids levels in brain microdialysate by method of high performance liquid chromatography (HPLC) with α -aminobutyric acid (AABA) as the internal standard. Methods Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), orthophthalaldehyde (OPA) precolumn derivatization method and fluorescence detector were used. The separation was performed using an ODS-C18 column. AABA, an isomeric compound of GABA, served as the internal standard, phosphate buffer solution and methanol as the mobile phase, gradient elution lasted in 35 min. Results 7 kinds of amino acids and internal standard were separated completely. The mean recovery of amino acid was 88.2%—102.3%. The mean correlation coefficient of the linear relationship was 0.998 ± 0.0015 . Limits of detection for amino acids were 1.0—8.6 ppm respectively. Conclusion The method mentioned above is simple and sensitive for operation, and can be used for determined levels of amino acids in microdialysate.

[Key words] amino acids; high performance liquid chromatography (HPLC); microdialysis; α -aminobutyric acid (AABA)

中图分类号: R331.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2004)08-0475-02

[本文著录格式] 张绍东,翟晶,张淑珍,等. α -氨基丁酸为内标物高效液相法测定脑微透析液中氨基酸含量[J].中国康复理论与实践,2004,10(8):475—476.

微透析技术(microdialysis)是一种将灌流取样和透析技术相结合的生物化学采样技术,可在几乎不损伤脑组织的情况下,准确、连续、动态地监测活体脑组织细胞外液中内源性物质,如神经递质(氨基酸类、单胺类或多肽类)的释放变化过程,因此,在神经科学的研究中被日益广泛应用^[1,2]。兴奋性氨基酸递质,如天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu);抑制性氨基酸递质,如甘氨酸(Gly)、牛磺酸(Tau)、 γ -氨基丁酸(GABA)等在脑缺血、脑外伤等神经系统损伤中的作用已得到确认。但由于微透析技术所获得的样品体积小,其中的递质浓度又很低,因此,对检测方法的要求很高,目前主要应用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)进行氨基酸类神经递质的测定,其中使用比较多的是反相 HPLC 结合柱前衍生技术,

衍生方法有邻苯二甲醛(orthophthalaldehyde, OPA)衍生法^[3]、ACCQ-Tag 衍生法等。本研究使用 GABA 的异构体 α -氨基丁酸(α -aminobutyric acid, AABA)作为内标物,进行氨基酸测定。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 实验仪器 高效液相色谱仪组成:泵为美国 BECKMAN 公司黄金系列 126 泵,双泵头;检测器为日本岛津公司 RF-530 荧光检测器;数据处理使用浙江大学直达信息工程有限公司的 N2000 色谱工作站;色谱柱为美国 Kromasil ODS-C18 柱,250 × 3.9 mm (i.d),粒径 5 μ m。分离在室温条件下进行。

1.1.2 试剂 氨基酸标样 Asp、Glu、天冬酰胺(Asn)、谷氨酰胺(Gln)、Gly、Tau、GABA,及内标高丝氨酸(Hse)、 β -氨基丁酸(BABA)、AABA 购自美国 Sigma 公司;邻苯二甲醛、 β -巯基乙醇和四氢呋喃购自美国 Fluka 公司;甲醇为国产色谱纯试剂,乙酸钠、磷酸氢二钠、硼酸等为国产分析纯试剂;超纯水为去离子水+双蒸水,再经超纯水系统(美国 EAST pure II)处理。

1.2 方法

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(No.7992021)。

作者单位:1. 100050 北京市,北京市神经外科研究所(张绍东、翟晶);2. 100050 北京市,首都医科大学附属天坛医院麻醉科(张淑珍、罗芳)。作者简介:张绍东(1964-),男,北京市人,副研究员,主要研究方向:神经生化。

1.2.1 标准品配制 称取适量标准品和内标,配成约 5 mmol/L 的储备液,再用人工脑脊液(138 mmol/L NaCl, 11 mmol/L Na₂HCO₃, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L NaH₂PO₄, pH 7.4) 稀释为 10 μmol/L 的工作液。

1.2.2 透析样品制备 透析探针固定于大鼠颅骨上,透析膜插入皮层,以人工脑脊液进行灌注,流速 2 μl/min,每 30 min 收集 1 管,体积 60 μl,加入 10 μl 浓度为 10 μmol/L 的内标,冷冻干燥,用 20 μl 超纯水复溶。

1.2.3 衍生方法 准确称取 5 mg OPA 溶于 120 μl 甲醇中,加入 10 μl β-巯基乙醇和 1 ml 0.2 M 硼酸缓冲液(pH = 9.2),混匀,存放于暗处。取 20 μl 氨基酸标准品,加入上述衍生试剂 10 μl,轻轻混匀,静置 120 s,全部吸入注射器,注入进样器,样品管容量为 20 μl。样品衍生方法相同。

1.2.4 样品分析 衍生氨基酸样品的 HPLC 分离采用二元线性梯度洗脱。A 液:缓冲液:甲醇:四氢呋喃 = 400:95:5(v:v:v);B 液:缓冲液:甲醇 = 120:380(v:v),缓冲液为 20 mmol/L 乙酸钠溶液(pH = 7.2)。梯度洗脱:0—2 min,0%B 液;2—8 min,0%—15%B 液;8—18 min,15%—70%B 液;18—25 min,70%—100%B 液;25—30 min,100%B 液;30—32 min,100%—0%B 液;32—35 min,0%B 液。

分离后的氨基酸衍生化合物用荧光检测器进行检测,激发波长:360 nm,发射波长 455 nm。

计算方法:采用 N2000 色谱工作站进行峰面积积分,用内标校正后计算样品中氨基酸浓度。

2 结果

2.1 色谱分析 3 种内标化合物(Hse、BABA、AABA)在上述色谱条件下与其他 7 种氨基酸标准均可获得很好分离(见彩页图 E1)。在考虑多种因素后,选择 AABA 作为内标。加入内标后的微透析样品色谱图显示,组织中的干扰峰与氨基酸可完全分离(见彩页图 E2)。

2.2 线性范围和相关系数 分别以不同浓度氨基酸(10 μmol/L,5 μmol/L,2 μmol/L,1 μmol/L,0.5 μmol/L)标准品进样,其浓度与峰面积呈良好线性关系,得到的回归方程式和线性系数 r 见表 1。

表 1 不同样品的回归方程式和线性系数 r

样品	回归方程 (Y=)	线性系数 (r)	样品	回归方程 (Y=)	线性系数 (r)
Asp	177.3 X - 0.525	0.9951	GLY	173.2 X + 0.368	0.9999
Glu	182.3 X - 0.1312	0.9996	Tau	124.5 X + 0.995	0.9982
Asn	32.3 X + 0.438	0.9972	GABA	140.3 X + 0.501	0.9988
Gln	167.3 X + 0.103	0.9995	BABA	149.0 X - 0.652	0.9994
Hse	199.5 X - 0.788	0.9996	AABA	180.6 X - 7.58	0.9994

平均相关系数 = 0.998 ± 0.0015,氨基酸检测灵敏度 1.0—8.6 ppb。

用混合透析液平行进样 5 次,所得结果的平均变异系数 < 3.1%。所有样品回收率均在 88.2%—102.3%之间,显示方法稳定可靠。

3 讨论

OPA 衍生法产生于 1971 年,可能是目前最常用的氨基酸柱前衍生方法。使用 OPA 衍生法测定组织中和微透析样品中氨基酸含量的报道较多^[4-6],定量方法也不尽相同,有的用外标法^[3],有的用内标法,使用的内标物包括乙醇胺^[7]、高丝氨酸^[8]、多巴胺^[9]等。微透析样品由于样品量本身的限制,样品浓度低。为使衍生后的样品进样体积不会变得较大,我们在样品处理过程中,对样品进行浓缩、冻干和复溶操作,此时如使用外标法定量,将会产生较大误差,而内标法可减小误差。

在我们试验的 3 种内标物中,AABA 的出峰时间在所测 7 种氨基酸之后,与保留时间最长的 GABA 相差 2.2 min,呈完全分离;透析液样品中加入 AABA 后的谱图也显示,其位置附近无干扰峰出现,AABA 可与组织中的干扰物质完全分离,故可选择 AABA 作内标。此外,本方法的检测限也可满足试验要求。所以,此方法可以用于微透析样品氨基酸类的测定。

[参考文献]

- [1] Westerink BH. Analysis of biogenic amines in microdialysates of the brain[J]. J Chromatogr B Biomed Sci, 2000, 747(1—2): 21—32.
- [2] Siddiqui MM, Shuaib A. Intracerebral microdialysis and its clinical application: a review[J]. Methods, 2001, 23(1): 83—94.
- [3] 顾拥军,倪文,包维丽,等.反相高效液相色谱荧光法测定氨基酸类神经递质[J].上海医科大学学报,1995,22(3): 210—212.
- [4] 叶维玲,阴萍波.高效液相色谱法测定动物脑和脊髓内微透析样品中的递质氨基酸和单胺类递质及其代谢产物[J].色谱,1996,14(1): 14—17.
- [5] Mena FV, Baab PJ, Zielke CL, et al. In vivo glutamine hydrolysis in the formation of extracellular glutamate in the injured rat brain[J]. J Neurosci Res, 2000, 60(5): 632—641.
- [6] Matsushita Y, Shima K, Nawashiro H, et al. Real time monitoring of glutamate following fluid percussion brain injury with hypoxia in the rat[J]. Acta Neurochir Suppl, 2000, 76: 207—212.
- [7] 舒鸿钧,韩慧婉,刘国诠.鼠脑微透析液中游离氨基酸的高效液相色谱分析[J].化学通报电子版,1996,1: 99001.
- [8] 王伟,刘朝,江卫国,等.HPLC 测定脑组织和脑脊液中 4 种氨基酸类神经递质含量的方法改良研究[J].同济医科大学学报,1999,28(2): 92—93.
- [9] 张伟,戴永键,乔善磊.高效液相色谱法测定大鼠脑氨基酸[J].南京医学院学报,2000,22(4): 226—228.

(收稿日期:2004-02-24 修回日期:2004-03-31)