维普资讯 http://www.cqvip.com

194-197

第22卷 第3期 重庆医科大学学报 Vol.22 No.3
1997 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1997

荧光－高效液相色谱法测定血浆中儿茶酚胺类化合物的研究

中心实验室 张晓萍* 王国民 邱宗荫
基础医学院化学教研室 赵 华 李惠芝

提 要 血浆中儿茶酚胺类化合物(CAs)与二苯基硼酸－2－氨基乙酯在碱性条件下生成配合物，经液液提取后，与1,2—二苯基乙二胺(DPE)在适宜的条件下发生衍生化反应，生成相应的二苯基喹喔啉衍生物。这些衍生物在岛津Shim－Pack CLC－ODS柱上，用甲醇－0.50mol.L^{-1}Tris－HCl缓冲液等度洗脱，16min能完全分离；在Waters Nova－pack C_{18}柱上，用甲醇0.01 mol.L^{-1}Tris－HCl缓冲液等度洗脱，10min能完全分离；荧光检测波长：λex 350nm，λem 480nm。去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(E)和多巴胺(DA)的检测限分别为10fmol.100μl^{-1}.10 fmol.100μl^{-1}和12.5 fomol.100 μl^{-1}。本方法用于正常人及疾病患者血浆中CAs的测定，均得到满意结果。

关键词 儿茶酚胺；1,2—二苯基乙二胺；柱前衍生法；荧光高效液相色谱法
中图分类号 R446.1|2 .

儿茶酚胺类化合物 (catecholamines,CAs)[肾上腺素(Epinephrine,E)、去甲肾上腺素(Norepinephrine,NE)、多巴胺(Dopamine,DA)]在维持和调节神经系统、多种器官和组织的生理功能方面有十分重要的作用。检测体液中微量的CAs十分必要。分离和测定CAs方法中，高效液相色谱法占有重要的地位[1,2]。由于CAs在体液中的含量低，不稳定，因此，建立一种能同时分析E、NE和DA的灵敏而又具有高选择性的方法迄今仍受到人们的重视。1,2—二苯基乙二胺(1,2－Diphenylethylenediamine,DPE)在含有铁氰化钾的中性介质中，0—50°C时能够有选择性地与CAs反应，生成二苯基喹喔啉类衍生物[3,4]。用此法测定CA'的高效液相色谱法国内尚未见报道。本文探讨了DPE与E、NE、DA发生衍生化反应的最适条件，研究并改进了色谱分离条件及样品前处理方法，用于测定血浆中的CAs取得了满意的结果。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

岛津RF－540荧光分光光度计；岛津LC－6A液相色谱仪，配用RF－535荧光检测器和C－R3A数据处理系统，Shim－pack CLC－ODS柱(5μm,4.6×150mm)，Waters Nova－pack C_{18}柱(3μm,3.9×150mm)，保护柱为岛津Shim－pack G－ODS(4×10mm)；Beckman TJ－6冷冻离心机；Orion Model SA 720 pH计；Milli Q超纯水器。

DPE系按文献[5]的方法加以改进后自行合成并纯化，在正已烷中重结晶，得出白色晶体，MP119°C，与文献值相同。将DPE溶于乙腈—0.01mol.L^{-1}盐酸(1:1,v/v)，配成7.5 mmol.L^{-1}溶液使用。E、NE、DA标准品贮备液用0.01mol.L^{-1}盐酸溶液配制，浓度为1×10^{-3}mmol.L^{-1}，保存于－30°C；其工作液用0.01mol.L^{-1}盐酸稀释而成，浓度为0.5 nmol.L^{-1}。2.0mol.L^{-1}NH_3－NH_4Cl缓冲溶液(pH8.7，含0.2%二苯基硼酸－2－氨基乙酯和0.5%EDTA)。正庚烷溶液(含1%正辛醇和0.25%溴化四辛铵)。5mmol.L^{-1}铁氰化钾溶液。0.10mol.L^{-1}和0.50mol.L^{-1}Tris－HCl缓冲液(均以盐酸调pH为7.0)。实验用水为超纯水。

1.2 实验方法

1.2.1 衍生化反应 取样品溶液100μl，加入0.10mol.L^{-1}Tris－HCl缓冲液30μl、DPE溶液25μl、乙腈250μl、铁氰化钾溶液10μl、混匀后于37°C水浴保温40min。取反应液100μl进行色谱分析。

1.2.2 色谱分析 用Shim－pack CLC－ODS柱时，流动相采用甲醇－0.5mol.L^{-1}Tris－HCl缓冲液(60/40,v/v)。用Waters Nova－pack C_{18}柱时，流动相为甲醇－0.10mol.L^{-1}Tris－HCl缓冲液(55/45,v/v)。流速均为1.

* 女,1949－07出生，实验师

维普资讯 http://www.cqvip.com

0ml.min^{-1}。荧光检测器λex 350 nm，λem 480 nm。柱温:室温。

1.3 样品收集与处理

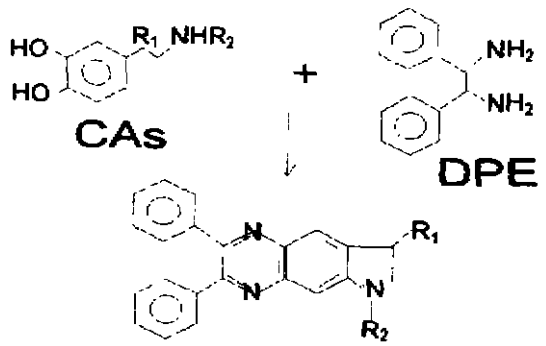
样品收集 采静脉血4ml，加肝素抗凝，及时在4°C下离心(2000g/10min)，分出血浆。加入5%偏重亚硫酸钠20μl。若需保存，贮于-70°C备用。

分析时，取血浆1.5ml，加1ml NH_4Cl-NH_3缓冲液，4.5ml正庚烷溶液，混旋振荡5min，离心(2000g/5min,4°C)。取3.5ml有机相于另一具塞试管内，加2ml正辛醇，200μl0.08mol.L^{-1}乙酸，混旋振荡5min，离心(2000g/5min,4°C)，弃去有机相，取100μl水相进行衍生化反应。

2 结果

2.1 衍生化反应条件

DPE-CAs反应，生成二苯基喹喔类衍生物。此类化合物能发出强的荧光。DPE与CAs的反应式如下:



R_1=-OH(E.NE);-H(DA)
R_2=-CH_3(E); -H(NE.DA)

本文探讨了影响此反应的多种因素。研究衍生反应的实验步骤为:工作液0.1 ml+DPE2.0 ml+乙腈2.0 ml+铁氰化钾0.1 ml，混匀，37°C保温40min。然后用RF-540荧光分光光度计测定荧光强度。

2.1.1 DPE浓度 最适浓度范围为5 mmo-l.L^{-1}～12.5mmol.L^{-1}。

2.1.2 铁氰化钾的影响 若反应体系中不加铁氰化钾，荧光强度几乎为零。但是，铁氰化钾浓度过高，会产生内滤现象，吸收荧光。本实验确定最适浓度范围为2mmol.L^{-1}～15mmol.L^{-1}。

2.1.3 pH值 反应混合物的最适pH 值为6.0～7.5。

2.1.4 乙腈的量 乙腈对衍生化反应有较大影响。衍生物荧光强度随反应混合物中乙腈含量的增加而增加。但乙腈含量高于60%以后，荧光强度增加比较缓慢，甚至有所下降。

2.1.5 反应时间及衍生化产物的荧光稳定性 反应混合物在37℃水浴保温30min，荧光强度已基本稳定。为保证反应进行完全，本文确定保温时间为40min。反应后立即进样和8小时内不同时间分别进样，荧光强度基本不变。避光放置30小时后进样，其荧光强度下降程度为:NE,12.8%;E,18.2%;DA,0.39%。说明CAs同DPE生成的衍生物稳定性较好。

2.2 色谱分离条件

2.2.1 固定相的影响 本文考察了Waters Nova-packC_{18}柱和Shim-pack CLC-ODS柱的分离效果，CAs同DPE的衍生物分别在10min和16min内完全达到基线分离。图1为CAs标准品的DPE衍生物在岛津柱上分离的色谱图。在这两种柱上，出峰顺序依次为NE、DA和E的DPE衍生物。本文作定量测定时使用岛津柱。

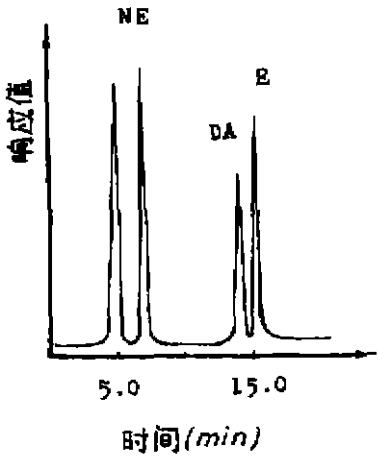


图1 分离CAs—DPE衍生物的色谱图
柱:Shim-pack CLC-ODS C_{18}柱;
流动相:甲醇—0.5mol.L^{-1}Tris-HCl缓冲液(pH7.0)(60/40,v/v);
流速:1.0ml.min^{-1}; 柱温:室温;
检测波长:λex 350 nm，λem 480 nm.

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2.2 流动相的影响 本文采用甲醇－缓冲液体系的流动相，得到很好的分离效果。若仅用甲醇－水作流动相，在两种柱上都不能将CAs的DPE衍生物分离。Tris－HCl缓冲液的加入，不仅能起到调节流动相pH的作用，而且能改变流动相的离子强度，对分离产生影响。特别是对于没有封尾或封尾不完全的色谱柱，加入Tris的效果更为明显。

2.3 血浆中CAs的测定

2.3.1 血浆样品的前处理

由于血浆成分复杂，且CAs含量很低易于氧化，因此以CAs测定为目的的样品处理在很大程度上影响检测的结果。本文采用液液提取技术，即:利用二苯基硼酸酯在适宜条件(碱性NH_4Cl－NH_3缓冲液)下与CAs中的3,4－二羟基形成络合物，用正庚烷提取，使之与其它极性杂质成份分离。然后在酸性条件下反提取到水溶液中，再进行HPLC分析。这种处理技术得到比较高的回收率，如表1所示。

表1 二苯基硼酸－2－氨基乙酯液液提取法的平均回收率

样品名称	n	平均回收率(%)	相对标准偏差%
NE	12	93.20	1.75
E	12	91.06	1.98
DA	12	89.75	2.52

2.3.2 线性范围

本文用外标法建立定量关系，测定结果的线性回归分析列于表2。

表2 定量测定CAs的有关参数*

样品名称	线性范围	k	b	r
NE	0.60pmol·ml^{-1}—30.00pmol·ml^{-1}	0.4771	0.045	0.9980
E	0.60pmol·ml^{-1}—26.00pmol·ml^{-1}	0.6969	0.037	0.9975
DA	0.80pmol·ml^{-1}—26.00pmol·ml^{-1}	0.1219	0.075	0.9965

* 线性回归方程式为:$y=kx+b$
y=CAs的含量(pmol·ml^{-1}), x=峰面积
r=相关系数

分别加20pmol.ml^{-1}的标准品NE、E、DA至同一份血浆样品，重复测定6次，其相对标准偏差为:NE2.26%，E2.53%，DA 2.29%。

2.3.3 色谱体系最低检测限

CAs标准品经衍生化后进样，色谱分离，得到CAs各物质的最低检测限为:NE,10 fmol.100 μl^{-1};E,10 fmol.100 μl^{-1};DA,12.5 fmol.100μl^{-1}。

2.3.4 方法应用

用本文建立的方法对11名急性心肌梗塞患者血浆中的CAs进行了测定，NE为28.67±8.22 pmol.ml^{-1}，E为13.05±2.4pmol.ml^{-1}，DA为5.22±1.44 pmol.ml^{-1}。本方法测定结果与文献[6]一致。

3 讨论

高效液相色谱法测定生物样品中的CAs主要有荧光检测法(HPLC－FD法)和电化学检测法(HPLC－ED法)两大类。目前使用较广的HPLC－ED法具有检测灵敏度高的优点。但是，该法对生理血浆中的NE测定不够灵敏，在色谱图的DA峰位时有干扰峰出现。本文所建立的测定血浆中CAs的柱前衍生化荧光高效液相色谱法具有灵敏度高、选择性和重复性较好的特点，与HPLC—ED相比操作简单，为生理及病理血浆中CAs的测定提供了一种实用的方法。

参考文献

1. Kagedal B,et al. J.Chromatogr., Biomedical Applications 1988;429:177
2. Nyyssonen K,et al.Sciences 1989;27(3):211
3. Mitsui A,et al.J.Chromatogr., Biomedical Applications 1985;344:61
4. Hoorn F.A.J., et al.J.Chromatogr.,Biomedical Applications1989;487:7
5. Irving M, N, H, et al. J. Inorg. Nucl. Chem. 1965;27:270
6. 冯清平，等.中华医学检验杂志 1988;11:3

(收稿日期 1997－01－22)

维普资讯 http://www.cqvip.com

Determination of catecholamines in plasma by high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection

Zhang Xiaoping, et al

Department. of Central Laboratory, The College of Sciencese Medicine Chongqing

A sensitive fluorimetric method for the determination of catecholamines in human plasma was described. After liquid－liquid extraction with diphenylboric acid 2－aminoethyl ester, the catecholamines in plasma are converted into the corresponding fluorescent compounds by reaction with 1,2－diphenylethylenediamine in aqueous acetonitrile. After being isocraticly eluted by a methanol buffer solution, these compounds could completely be separated with 16 minutes on Shim－pack CLC－ODS column, and with 10 minutes on Waters Nova－pack C^{18} column. The limits of detection were 10 fmol for norepinephrine, 10 fmol for epinephrine and 12.5 fmol for dopamine respectively.

KEY WORDS Catecholamines, 1,2－Diphenylethylenediamine(DPE), Precolumn derivatization, High performance liquid Chromatography－Fluorescence detection (HPLC－FD)

197-199

ADM对LNNA诱导的高血压心肌肥大的作用及机制探讨

基础医学院病理生理教研室 周 兰*
广东医学院解剖教研室 叶 赤
北京医科大学心血管研究所 常英姿 唐朝枢
中心实验室 邱宗荫

提 要 本工作在LNNA经慢性NO封闭诱导的大鼠高血压心肌肥大模型上研究了ADM对其心肌肥大和MSLV钠－钙交换功能损伤的作用。结果:一、较之对照组,LNNA组MAP和LVI分别增加57.4%和18.0%($P<0.01$),其MSLV经钠－钙交换蛋白的钙摄取则明显降低($P<0.01$或0.05);二、ADM组的MAP和LVI则分别较LNNA组降低19.6%和11.3%,而其MSLV的钙摄取则高于LNNA组($P<0.05$);三、对照组、LNNA组和ADM组钠－钙交换蛋白摄取钙的Km值分别为7.51、7.04和7.57μM,而Vmax则分别为6.38、4.32和5.45nmol/-mg pr/min。表明:ADM能拮抗LNNA诱导的高血压心肌肥大和减轻其MSLV钠－钙交换功能的损伤,并且后者可能是ADM拮抗心肌肥大的机制之一。提示内源性ADM的诱导和外源性给予ADM可能有预防和/或延缓高血压心肌肥大发生发展的作用。

关键词 肾上腺髓质素; 高血压心肌肥大; 心肌浆膜囊泡; 钠－钙交换(蛋白)
中图分类号 R365
R544.106 R542.202

细胞内长期Ca^{2+}超负荷是心肌肥大的重要发病机制之一[1];由于胞内Na^+的浓度远低于胞外,因此心肌浆膜钠－钙交换蛋白可以较高速率将胞外Na^+转运至胞内,同时将胞内Ca^{2+}转运至胞外,这对于细胞内钙稳态的维持至关重要。我们对左旋硝基精氨酸 (N^G－nitro－L－arginine,LNNA)经慢性NO封闭诱导的大鼠高血压心肌肥大模型的研究表明,其心肌肌浆膜钠－钙交换功能受损,这种损伤引起的胞内Ca^{2+}排出的减少可能是心肌细胞内钙超载和心肌肥大的发生

* 女,1963－01出生,讲师