DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.07.035

扰。在溶液中加入掩蔽剂,可以减轻大多数干扰离子对该法产生的干扰,包括干扰最严重的Hg^{2+}、Ag^{+}等离子。综合比较3种掩蔽剂对严重干扰试纸显色的Mg^{2+}、Ca^{2+}、Hg^{2+}、Pb^{2+}、Fe^{3+}、Ag^{+}的掩蔽效果,掩蔽剂3掩蔽效果最好。

关键词:食品;镉;快速检测;方法
中图法分类号:R155.5 文献标识码:B

参考文献:

[1] 陈炳卿. 营养与食品卫生学[M]. 第4版. 北京:人民卫生出版社,2000. 213-214.
[2] Santos D Js, Barbosa F Jr, Tomazelli A G, *et al*. Determination of Cd and Pb in food slurries by GFAAS using cryogenic grinding for sample preparation[J]. Anal Biochem, 2002, 373(3): 183-189.
[3] Locatelli C, Torsi G. Heavy metal determination in aquatic species for food purposes[J]. Ann Chim, 2001, 91(1-2): 65-72.
[4] Jorhem L, Engman J. Determination of lead, cadmium, zinc, copper, and iron in foods by atomic absorption spectrometry after microwave digestion: NMKL Collaborative Study[J]. J AOAC Int, 2000, 83(5): 1189-1203.
[5] 但德忠,阮静纯. 微分电位溶出法连续测定饮料中的铜铅镉锌[J]. 分析试验室,2000,19(2):27-30.
[6] 陈 隽,杨志刚. 在线流动注射-巯基棉分离富集-ICP-AES测定粮食中铜、镉、铅的研究[J]. 分析试验室,2000,19(3):45-47.
[7] 杨惠芬,李明元,沈 文. 食品卫生理化检验标准手册[M]. 北京:中国标准出版社,1998. 133.

(编辑 陈聪连)

技术方法

文章编号:1000-5404(2004)07-0642-03

气相色谱-质谱联用测定大鼠血清中的神经甾体

Determination of neurosteroids in rat serum by gas chromatography-mass spectrometry

闫彩珍[1],侯艳宁[2],江 平[2] ([1]河北医科大学药理学教研室,石家庄 050017;[2]白求恩国际和平医院药剂科,石家庄 050082)

提 要:目的 建立气相色谱-质谱测定大鼠血清中神经甾体的方法。方法 本实验采用固相萃取方法对非结合型神经甾体和结合型神经甾体进行分离及纯化。经溶剂解后的结合型甾体和非结合型甾体分别与七氟丁酸酐进行衍生化,选择性离子检测模式进行气相色谱-质谱分析。结果 经初步研究雄性大鼠血清中非结合型神经甾体PREG、PROG和DHEA的含量分别为5.75×10^{-9}、1.28×10^{-8}、2.36×10^{-9} mol/L。结合型神经甾体PREGS和DHEAS的含量分别为4.8×10^{-9}、8.78×10^{-8} mol/L。每一种甾体都有好的线性关系和准确度。结论 本方法适合同时测定血清中结合型和非结合型神经甾体,为实验及临床研究与特异性神经甾体有关的精神疾病提供有效方法。

神经甾体是指在神经系统合成的甾体和经血脑屏障进入神经系统发挥作用的外周甾体及其代谢衍生物的总称。神经甾体包括孕烯醇酮(pregnenolone, PREG)、脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone, DHEA)及它们的硫酸酯(PREGS、DHEAS)、黄体酮(progesterone, PROG)、别孕烯醇酮(allopregnanolone, AP)、睾酮(testosterone, T)等。神经甾体作为神经和行为的内源性调节剂具有广泛的生理和药理作用,研究表明神经甾体不仅参与了生长、发育、成熟、衰老过程,也参与了焦虑、抑郁等情绪反应[1]。神经甾体PREGS和DHEAS可以通过负性调控GABAA受体和正性调控NMDA受体的功能而增强神经元的兴奋性和突触可塑性,增强神经元的点燃效应,促进动物觉醒、记忆获得和保持[2,3]。为了更好地了解神经甾体在不同的生理和药理状态下的变化,本实验建立了气相色谱-质谱测定大鼠血清中几种神经甾体的方法。

1 材料和方法

1.1 动物与试剂

雄性SD大鼠10只,体质量250~300 g(河北省实验动物中心提供,动物合格证号:医动字04084),断头取血,3 000 r/min离心10 min,将血清保存于-70 ℃备用。标准品PREG, DHEA, PREGS, DHEAS, AP, PROG为Sigma公司产品。衍生化试剂七氟丁酸酐(HFBA)为Pierce化学公司产品。牛血清白蛋白购自拜昂公司,使用前配制成6%水溶液。甲醇和已腈为色谱醇,其他有机溶剂为分析醇,使用前进一步纯化。

1.2 仪器

HEWLETT PACKARD 6890气相色谱-5973质谱检测器,色谱柱为HP-5MS交联毛细管柱(30 mm×0.25 mm),膜厚0.25 μm,安捷仑公司产品。固相萃取装置和反相C-18小柱(6 ml, 500 mg, Supelco)购自北京康林公司。

1.3 气相色谱-质谱分析条件

衍生化的样品(2 μl)或衍生化的标准品(1 μl)通过自动进

作者简介:闫彩珍(1969-),女,河北省石家庄市人,博士研究生,主要从事药物成瘾机制方面研究。电话:(0311)6266891
通信作者:侯艳宁,电话:(0311)7978503
收稿日期:2003-09-17;修回日期:2003-12-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

样器进入质谱系统。气相色谱以无分流方式运转, 柱温升温程序为50 ℃升至 150 ℃(30 ℃/min), 再升至 280 ℃(10 ℃/min)。载气(氦气)流速为 1 ml/min。气化室和界面的温度分别为 230 ℃ 和 280 ℃。

1.4　标准溶液配制

分别精密称取标准品 10 mg, 非结合型甾体 DHEA、PREG、PROG、AP 溶于甲醇, 结合型甾体 DHEAS 和 PREGS 溶于 90% 甲醇, 分别配成 1 mg/ml 的储备液, 分装后−70 ℃保存。使用前将储备液分别配制成浓度为 0.5, 1, 2, 5, 10, 50 ng/ml 的标准液。

1.5　样品处理

本实验采用固相分离和纯化的方法[4], 取待测血清 1 ml, 加入 2 ml 已睛, 旋涡混合 3 min, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 50 ℃水浴下氮气吹干。残渣溶于 1 ml 甲醇水溶液(甲醇/水, 50/50), 随后将样品转入预先依次用 5 ml 甲醇、5 ml 水、5 ml 50%甲醇/水溶液活化的 C-18 小柱, 甾体硫酸酯部分用 5 ml 50%甲醇/水溶液洗脱, 非结合型甾体部分用 90%甲醇/水溶液洗脱, 洗脱液分别在 50 ℃水浴下氮气吹干。甾体硫酸酯部分吹干后加入 1 ml 乙酸已酯和 2 μl 0.5 mol/L H_2SO_4 进行溶解, 常温放置 1 h, 然后用水冲洗后吹干。非结合型甾体和溶剂解后的甾体硫酸酯部分分别加入 200 μl 无水丙酮和 20 μl 七氟丁酸酐进行衍生化, 室温反应 30 min, 吹干后溶于 100 μl 正己烷。

1.6　统计学分析

进行回归方程分析。

2　结果

2.1　确定神经甾体

非结合型神经甾体与 HFBA 衍生化后分别形成 DHEA-HFB, AP-HFB, PREG-HFB 和 PROG-HFB。结合型甾体 DHEAS 和 PREGS 经溶剂解后与 HFBA 衍生化后形成 DHEA-HFB 和 PREG-HFB。质谱图显示 DHEA-HFB 和 PREG-HFB 主要是形成碎片离子峰, 特征性离子分别为 m/z 270 和 m/z 298, PROG-HFB 和 AP-HFB 主要是以分子离子形式存在, 特征性离子分别为 m/z 510 和 m/z 514。神经甾体重建后的 EI 全扫描质谱图见参考文献[5]。图 1 为甾体衍生化后的离子流色谱图, 在气相色谱条件中, PREG-HFB 和 PROG-HFB 保留时间相同, 但他们形成的特征碎片离子不同, 通过选择性离子检测, 二者无干扰。其他甾体可完全分开。

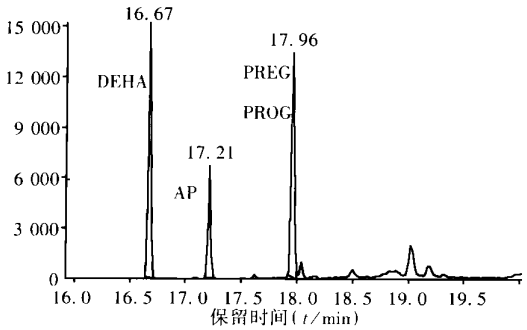


图 1　标准甾体重建后的全扫描离子流图

2.2　灵敏度

根据甾体质谱图, 把 m/z 270 和 m/z 298 的离子分别作为 DHEA-HFB 和 PREG-HFB 的检测离子。并且分别再检测 m/z 255 和 m/z 283 离子以进一步确定 DHEA-HFB 和 PREG-HFB。这两种离子是 m/z 270 和 m/z 298 的离子分别脱甲基形成。把 m/z 510 和 m/z 514 的离子分别作为 PROG-HFB 和 AP-HFB 的检测离子, 并且再分别选择检测 m/z 495 和 m/z 496 离子以进一步确定这两种甾体。DHEA 和 DHEAS 的检测限为 1 pg/μl, PREG 和 PREGS 的检测限为 2 pg/μl, PROG 和 AP 的检测限分别为 2 pg/μl 和 5 pg/μl。

2.3　线性范围

以峰面积(y)对其进样量(x, ng)作图, 几种神经甾体在 1 ~ 50 ng 范围内有良好的线性关系(图 2), 相关系数分别为 PREG ($y = 944.22x - 276.48$, $r = 0.999\ 3$), DHEA ($y = 2\ 025.7x + 472.83$, $r = 0.998\ 5$), PROG ($y = 597.14x + 199.52$, $r = 0.999\ 6$), AP ($y = 428.33x - 36.29$, $r = 0.999\ 2$)。

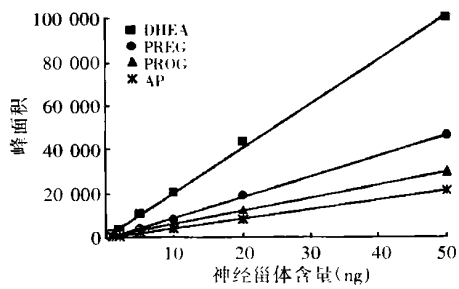


图 2　几种神经甾体的标准曲线图

2.4　回收率实验

在空白基质中加入标准非结合甾体(1, 5, 10 ng)和结合型甾体(1, 5, 50 ng), 经过上述方法处理后测得非结合型甾体和结合型甾体的绝对回吸收率均高于 50%。PREG, DHEA, PROG 和 AP 的方法回吸收率分别为 94.6% ~ 108.6%, 91.8% ~ 96.4%, 97.2% ~ 110.8%和 97.4% ~ 106%。

2.5　精密度实验

按回吸收率实验项下, 同一样品提取物在 5 d 内重复进样, 测得 PREG, DHEA, PROG, AP 的日间精密度均小于 15%。

2.6　正常大鼠血清神经甾体含量

分别取 8 只雄性大鼠血清, 按上述方法处理, 测得雄性大鼠血清中非结合型神经甾体 PREG, PROG, DHEA 的含量分别为$(5.75\times 10^{-9}\pm 1.06\times 10^{-9})$ mol/L, $(1.28\times 10^{-8}\pm 0.34\times 10^{-8})$ mol/L, $(2.36\times 10^{-9}\pm 0.3\times 10^{-9})$ mol/L。结合型神经甾体 PREGS 和 DHEAS 的含量分别为$(4.8\times 10^{-9}\pm 1.3\times 10^{-9})$ mol/L 和$(8.78\times 10^{-8}\pm 2.2\times 10^{-8})$ mol/L。未检测到非结合型甾体别孕烯醇酮。PREGS 和 PROG 的含量与其它采用 RIA[6] 或 GC-MS[7] 方法测定的结果接近。PREG 的含量为 5.75×10^{-9} mol/L, 而以前报道的 RIA 方法测定的雄性大鼠血浆中 PREG 的含量为 11.7×10^{-9} mol/L[8]。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

甾体的羟基结构是选择衍生化的基础，三氟醋酸酐、五氟丙醛酐、七氟丁酸酐是此类化合物最常用的衍生试剂。甾体衍生化后可以降低极性，提高挥发性和热稳定性，这些条件对于气相色谱至关重要。本实验以七氟丁酸酐作为衍生试剂，采用EI检测模式，通过这类衍生化，EI质谱可以获得丰富的高质量的离子质谱。

由于大鼠和人血清中均含有待测定神经甾体，因此不适合作为空白对照。牛血清白蛋白不含有待测定神经甾体，同时白蛋白是血清中主要的蛋白及甾体结合蛋白，因此以6%牛血清白蛋白水溶液作为空白对照，此方法在以前的气相色谱/质谱测定血清神经甾体时亦有报道[6]。

虽然以前对甾体的测定多采用RIA方法，但研究证实RIA方法有一定的局限性，缺乏抗体特异性且不能同时测定几种神经甾体。GC-MS方法敏感度高，特异性强，此方法已成为目前同时定量几种神经甾体的最好方法之一[9]。本方法可以同时测定血清中非结合型神经甾体及结合型神经甾体，且处理方法简单，样品测定前不需要进行HPLC纯化。线性范围、准确度、精密度实验显示本方法本方法适合同时测定血清中神经甾体的含量，为实验研究和临床检测生理或病理情况下神经甾体的变化提供帮助。

关键词：神经甾体；气相色谱-质谱；大鼠；血清
中图法分类号：R446.11 文献标识码：B

参考文献：

[1] Mensah-Nyagan A G, Do-Rego J L, Beaujean D, *et al*. Neurosteroids: Expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1999, 51(1): 63—81.
[2] Zwain I H, Yen S S C. Dehydroepiandrosterone: Biosynthesis and metabolism in the brain[J]. Endocrinology, 1999, 140(2): 880—887.
[3] Flood J F, Morley J E, Roberts E. Pregnenolone sulfate enhances post-training memory processes when injected in very low doses into limbic system structures: The amygdala is by far the most sensitive[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(23): 10806—10810.
[4] Liere P, Akwa Y, Weill-Engerer S, *et al*. Validation of an analytical procedure to measure trace amounts of neurosteroids in brain tissue by gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 2000, 739(2): 301—312.
[5] Yan C Z, Hou Y N. Determination of neurosteroids in rat brain by gas chromatography/mass spectrometry[J]. Chinese J Chromatogr, 2004, 22(1): 12—15.
[6] Kimoto T, Tsurugizawa T, Ohta Y, *et al*. Neurosteroid synthesis by cytochrome P450-containing systems localized in the rat brain hippocampal neurons: N-Methyl-D-aspartate and calcium-dependent synthesis[J]. Endocrinology, 2001, 142(8): 3578—3589.
[7] Corpéchot C, Young J, Calvel M, *et al*. Neurosteroids: 3α—hydroxy-5α-pregnan-20-one and its precursors in the brain, plasma, and steroidogenic glands of male and female rats[J]. Endocrinology, 1993, 133(3): 1003—1009.
[8] Concas A, Porcu P, Sogliano C, *et al*. Caffeine-induced increases in the brain and plasma concentrations of neuroactive steroids in the rat[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2000, 66(1): 39—45.
[9] Appelblad P, Irgum K. Separation and detection of neuroactive steroids from biological matrices[J]. J Chromatogr A, 2002, 955(2): 151—182.

（编辑 刘洪娥）

技术方法

文章编号：1000-5404(2004)07-0644-03

成年大鼠心室肌细胞的分离、培养与鉴定

Isolation, culture and identification of adult rat ventricular myocytes

李 洪，肖颖彬 （第三军医大学新桥医院心血管外科，重庆 400037）

提 要：目的 探讨成年大鼠心肌细胞的分离、培养方法。方法 麻醉后取成年Wistar大鼠心脏连接于Langendorff装置上进行0.1%胶原酶+0.1%透明质酸酶灌注消化分离心肌细胞，纯化后培养于DMEM培养基。用免疫荧光染色方法鉴定心肌细胞，并在倒置显微镜、电镜下观察细胞的形态结构。结果 本方法分离、培养的心肌细胞纯度为98%，细胞活性为92%，杆状细胞率为82%。结论 该方法简单有效，为深入研究成年心肌细胞打下了基础。

基金项目：国家自然科学基金资助项目(30200089)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200089)
作者简介：李 洪(1970—)，男，重庆市人，博士研究生，主治医师，讲师，主要从事心肌保护、麻醉学临床与基础等方面的研究，发表论文10篇。
电话：(023)68755607；E-mail：lihong881@vip.sina.com
收稿日期：2003-07-30；修回日期：2003-12-15

培养的成熟心肌细胞已成为一种非常有用的实验标本，是在体心肌模型的重要补充。由于在心肌细胞的发育过程中，离子通道和收缩蛋白异型体的表达可能发生变化。所以，很难将胚胎期和新生期心肌细胞培养的研究结果应用到完全分化的成熟心肌细胞，因

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net