DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.052
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

文章编号:1000-5404(2002)01-0117-02

技术方法

偏二甲基肼在大鼠灌流肝中代谢产物的SPE-HPLC分离法

SPE-HPLC method of separating 1,1-dimethylhydrazine metabolites in perfused liver of Wistar rat

胡 冉[1],潘 峰[2],彭俊华[1],高 宁[1] (第三军医大学:[1]预防医学系环境卫生学教研室;[2]高原军事医学系中心实验室,重庆 400038)

提 要:目的 建立偏二甲基肼在大鼠灌流肝中代谢产物的SPE-HPLC分离法。方法 以大鼠原位肝脏灌流为实验模型,收集染毒前后的灌流液做自身对照,用固相萃取法进行样品预处理,HPLC做梯度洗脱分析。结果 采用目前建立的SPE-HPLC法分离偏二甲基肼在大鼠灌流肝中代谢产物的效果良好。结论 建立了偏二甲基肼在大鼠灌流肝中代谢产物的SPE-HPLC分离法。

偏二甲基肼(Unsymetrical dimethylhydrazine,UDMH)是我国液体火箭推进剂的主要成分之一,在化工、医药和农业生产等领域也有广泛的应用。其沸点低(63 ℃),易挥发,因泄漏等原因发生急性中毒事件。其急性中毒机制目前还不十分明确[1,2],实际应用的救治措施疗效也不理想,且毒副作用较大[3,4]。我室与本校中心实验室理化组合作,在大鼠原位肝脏灌流实验模型上收集染毒前后的灌流液做对比分析,建立了UDMH在大鼠灌流肝中代谢产物的SPE-HPLC分离法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 Wistar雄性大鼠,体重250~280 g,150只,自由饮食进水。

1.1.2 主要试剂 UDMH由西昌卫星发射中心提供。甲醇为光谱纯。其他试剂均为分析纯。

1.1.3 主要仪器 国产DL-Ⅰ型固相萃取器。Waters公司产810系列HPLC系统。肝脏灌流仪(本室自配)。

1.2 方法

1.2.1 肝脏灌流 采用以无血红蛋白的Kerbs-Henseleit缓冲液作为灌流液的肝脏原位灌流法,主要方法参见文献[5]。

1.2.2 代谢产物提取[6,7] 将固相萃取小柱用5 ml甲醇活化,5 ml纯净水平衡。将样品pH值调为2.05±0.02后,以2 ml/min的速度过柱,样品量为200 ml。样品过柱后,用7 ml甲醇洗脱,收集洗脱液用氮气吹干,置-30 ℃冰箱保存。进样前用甲醇(100 μl/样)溶解,进样量10 μl。

1.2.3 HPLC分析

1.2.3.1 方法 考虑到灌流液中的成分复杂,不仅含有其本身的组成成分和UDMH及其代谢产物,还含有肝脏内的各种成分,为了加快样品内各种组份的分离速度、改善峰形、缩短样品的分析时间,采用了两种不同成分的磷酸盐缓冲液所组成的二元体系进行梯度洗脱,即在不同的时间内用这两种磷酸盐缓冲液含量不同的混合溶液作为流动相进行洗脱。表1所示的梯度程序即是计算机控制下的在不同时间范围内两种磷酸盐缓冲液的混合比例(体积比),以百分数表示。

1.2.3.2 流动相 由A、B两种磷酸盐缓冲液组成。

A液:2 mmol KH_2PO_4+0.25%三乙胺,pH=3.42。

B液:甲醇:10 mmol KH_2PO_4=3:1(体积比),pH=3.42

1.2.3.3 紫外检测波长 λ=280 nm,灵敏度为0.01。

表1 梯度洗脱程序表

时间(min)	0	6.0	15	30	35	40
A液(%)	100	100	45	20	80	100
B液(%)	0	0	55	80	20	0
流速(ml/min)	1.6	2.0	2.0	2.0	2.0	1.6

2 结果

在经过多次反复试验以后,确定了目前的萃取条件和HPLC分离条件。采用本方法分离UDMH在大鼠灌流肝中的代谢产物,获得了良好的效果。图1为对照组(即染毒前)色谱图,图2为染毒组(即染毒后)色谱图。图2中明显的比图1中多出了3个峰,图中标记为Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ。

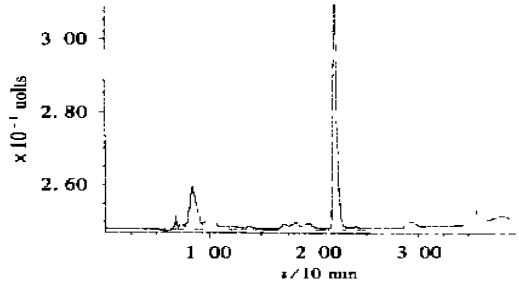


图1 对照组色谱图

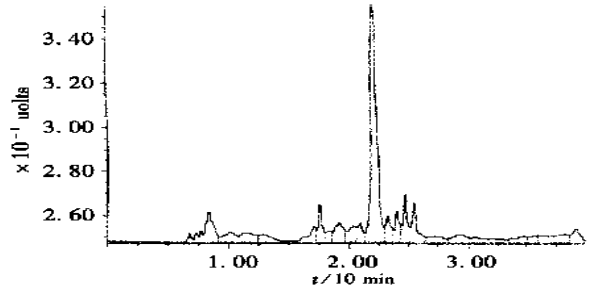


图2 染毒组色谱图

3 讨论

本研究所建立的方法是依照我室完成的国家"七五"重点攻关课题——"叶枯灵的代谢研究"的方法提出的。我们认为,在严格控制实验条件和给与适当的染毒剂量(不影响肝脏的正常生理活动)的情况下,利

作者简介:胡 冉(1970-),男,安徽省芜湖市人,博士研究生,讲师,主要从事环境毒理方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68752293
收稿日期:2000-11-20;修回日期:2001-09-05

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

用染毒前后所收集的灌流液样品作自身对照，完全可以分离得到染毒物在肝脏中的代谢产物。考虑到 UDMH 的极性较大，其代谢产物的极性可能也较大，在水中的溶解度可能很高，用液液萃取法很可能回收率不高；另外，液液萃取法溶剂消耗量大、耗时长，不利于自动化操作，因此我们选择了固相萃取法(Solid-phase extration，SPE)。SPE 是目前发展得比较成熟的一种样品预处理法[6,7]，具有回收率高、重现性好、溶剂消耗量小、易于实现自动化操作的特点，被广泛应用于生物样品的预处理中。

肝脏灌流是目前发展得较为成熟的一种体外实验技术，与其他体外实验方法如组织切片、组织匀浆和细胞培养等相比，它的方法特点是肝脏的组织结构和门脉系统、肝血窦及肝淋巴间隙等参与物质转运的结构均不受影响，保留着细胞结构和功能上的完整性，并可在一定时间内动态地观察受试物进入肝脏所发生的变化。另外，大鼠缺乏胆囊，可以连续地收集胆汁，而且大鼠肝脏大小适中，不需要高的灌流速度既可维持灌流，价格经济。因此，大鼠肝脏灌流方法已广泛地应用于各个领域的研究。通常情况下，外来化合物都是在肝脏中进行代谢转化，因而在体外条件下研究外来化合物的代谢转化过程时，大鼠肝脏灌流是首选方法。

我们经过大量的筛选实验，最终确定了目前的 SPE-HPLC 分离条件。从图中可以看出，染毒组中明显的比对照组多出了 3 个峰，分离的情况也比较良好，基本达到了基线分离。我们认为：这 3 个峰即是 UDMH 的代谢产物峰，采用质谱法定性为二甲亚硝胺、5-磷酸吡哆醛偏二甲基肼腙和葡萄糖醛酸偏二甲基肼腙(另文介绍)。这种 SPE-HPLC 分离法的建立，为以后的研究工作奠定了基础。

关键词：偏二甲基肼；固相萃取；高效液相色谱；肝脏灌流
中图法分类号：R595　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 夏亚东. 火箭推进剂毒理学研究概况及展望[J]. 解放军医学情报，1994，8(5)：253－255.
[2] 陈书恒，杨彦林，吕振英，等. 推进剂中毒的临床分型及分级治疗探讨[J]. 解放军医学情报，1994，8(5)：276.
[3] 俞天骥. 超量维生素 B6 的不良反应[J]. 国外医学：药物学分册，1993，20(5)：131－134.
[4] 吕振英，张天成，刘天运，等. 维生素 B6 救治偏二甲基肼中毒的体会[J]. 解放军医学情报，1994，8(5)：277.
[5] 高　宁，孙棉龄，朱振华. 一过式大鼠在位灌流肝生活力的观察[J]. 环境与健康杂志，1990，7(5)：216－216.
[6] 高立勤，刘文英. 固相萃取技术及其在生物样本分析中的应用与进展[J]. 药学进展，1997，21(1)：8－11.
[7] 吴何坚，黄仲杰，沈　敏. 固相萃取技术在系统药、毒物分析中的应用[J]. 法医学杂志，1998，14(2)：79－82.

（编辑　薛国文）

技术方法

文章编号：1000-5404(2002)01-0118-02

HPLC-电化学法检测细胞培养液中的多巴胺及其代谢产物

Determination of dopamine and its metabolite in cells suspension with HPLC-electrochemincal detection

潘　峰[1]，孙　玮[1]，吕胜青[2]，张正治[1]　（第三军医大学：[1] 高原军事医学系中心实验室，重庆 400038；[2] 附属新桥医院神经外科，重庆 400037）

提　要：目的　对低含量儿茶酚胺检测方法的探索，以测定 PC12 细胞及微囊化 PC12 细胞培养液中多巴胺及其代谢产物的分泌量。方法　常规条件下，培养 PC12 细胞及微囊化的 PC12 细胞，在不同时间收集细胞培养液。氧化铝吸附、提取其分泌多巴胺及其代谢产物 3，4-二羟基苯乙酸，HPLC-电化学测定其分泌量。结果　多巴胺及其代谢产物 3，4-二羟基苯乙酸完全与基线分离，不受杂峰干扰。平均回收率大于 80.9%，变异系数小于 3.4%。培养到 24 d，PC12 细胞及微囊化 PC12 细胞分泌儿茶酚胺的量达到最大值。结论　HPLC-电化学能准确、灵敏地分析 PC12 细胞分泌的多巴胺及其代谢产物 3，4-二羟基苯乙酸。

PC12 细胞是大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤(Rat adrenal pheochromocytoma)细胞，分泌多巴胺(Dopamine，DA)等神经递质。利用这一特性，将 PC12 细胞微囊化，移植到纹状体，治疗帕金森病(Parkinson's disease，PD)[1]。现主要采用高灵敏度、高特异性的 HPLC-电化学检测儿茶酚胺[2~4]。PC12 细胞及微囊化的 PC12 细胞分泌的 DA 及其代谢产物 3，4-二羟基苯乙酸(3，4-dihydroxyphenylacetic acid，DOPAC)的含量较低，不能直接检测。并且，培养液含有多种细胞营养成分及代谢产物，这些成分对 DA 有干扰，对电极及色谱柱有损害。氧化铝吸附、提取细胞液中的 DA 和 DOPAC，HPLC-电化学检测。此方法经济，易操作、灵敏、重现性好，适于儿茶酚胺含量较低的组织、体液及培养液的检测。

1　材料与方法

1.1　仪器及试剂

Waters 公司高效液相色谱仪，510 泵，U_{6k} 进样器，460 电化学检测器，玻璃碳电极，Ag/AgCl 参比电极，Baseline 810 色谱工作站。

标准品：多巴胺(DA)、3，4-二羟基苯乙酸(DOPAC)均购自 Sigma 公司。甲醇为色谱纯，其它试剂为分析纯。实验用水为超纯水。PC12 细胞，购自上海细胞所。

作者简介：潘　峰(1964－)，男，重庆开县人，实验师，主要从事高效液相色谱在生物医学应用的实验研究。电话：(023)6875234
收稿日期：2001-09-01；修回日期：2001-12-24

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