DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.053

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)68752349
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

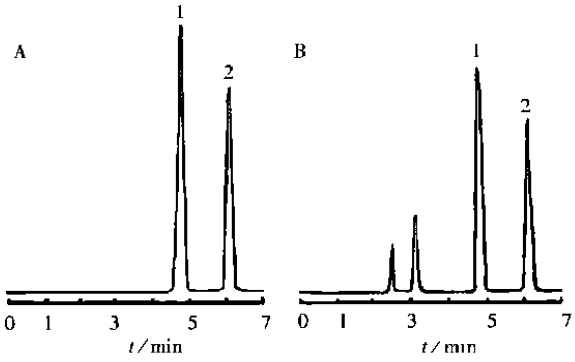
1.2　色谱条件

色谱柱: Hypersil BDS C_{18} (5 μm, 250 mm × 4.0 mm); 流动相: 甲醇∶50 mmol/L 磷酸钠缓冲液 = 7∶93 (v/v), 缓冲液含有: 6 mmol/L D-樟脑-β 磺酸, 0.2 mmol/L EDTA·Na_2, NaOH 调 pH 至 3.501。流速: 1.0 ml/min, 柱温: 20 ℃, 电极工作电压: 0.70 V, 检测灵敏度: 10 nA。

1.3　样品收集及提取

按一定密度接种 PC12 细胞, 置入培养瓶中, 常规条件下培养。每 3 d 换液, 收集等量细胞培养液。微囊化 PC12 细胞的制作见文献[1]; 取 20 个/ml, 置入培养瓶, 在相同条件下培养, 在 4、12、24、36 d 收集培养液, −20 ℃冰箱保存。

氧化铝吸附, 提取细胞培养液中的儿茶酚胺, 还未见报道。由于细胞培养液成分复杂, 儿茶酚胺的浓度低, 选择提取方法特别重要。用活化的氧化铝, 吸附 PC12 细胞分泌的 DA 和 DOPAC[5,6]。加 200 μl 0.1 mol/L 高氯酸解吸 DA 和 DOPAC, 离心, 上清液 10 μl 进样, 作色谱分析。其色谱图见图 1。



1: 多巴胺; 2: 3,4-二羟基苯乙酸

图 1　标准(A), 样品(B) 色谱图

2　结果

2.1　标准曲线

取空白培养液 12 ml, 平均分成 6 份, 分别加入 DA 和 DOPAC 标准品, 使其浓度依次为 2.50、5.00、2.00 × 10^1、1.00 × 10^2、5.00 × 10^2、1.00 × 10^3 ng/ml, 按样品提取方法, 10 μl 进样。峰面积 A 与浓度 C 进行线性回归, 其回归方程是:

$C_{DA} = 1.021 \times 10^{-3} \cdot A - 5.062$　　$r = 0.999\,7$

$C_{DOPAC} = 1.157 \times 10^{-3} \cdot A - 7.453$　　$r = 0.999\,8$

2.2　回收率及 CV

取空白培养液 6 ml, 平均分 3 份, 分别加入不同浓度的标准品。按样品处理方法, 测 DA 和 DOPAC, 计算加标回收率。结果见表 1。将样品连续 6 次进样, 求得 DA 和 DOPAC 的变异系数(CV%)分别是 2.7%和 3.4%。

表 1　加标回收率

样名	加入量(ng/ml)	测得量(ng/ml)	回收率(%)	平均回收率(%)
DA	50.00	41.45	82.9	
	100.00	84.50	84.5	84.5
	150.00	129.2	86.1	
	50.00	40.15	80.3	
DOPAC	100.00	79.60	79.6	80.9
	50.00	124.05	82.7	

2.3　样品分析

经提取, HPLC-电化学测定结果分别是: 3、6、12、24 d 的 PC12 细胞培养液的 DA: 51.36、61.40、94.58、119.73 ng/ml, DOPAC: 20.94、26.38、32.32、42.57 ng/ml; 4、12、24、36 d 微囊化的 PC12 细胞液的 DA: 207.63、390.79、765.43、421.25 ng/ml, DOPAC: 71.66、147.24、243.11、150.69 ng/ml。

3　讨论

3.1　流动相的选择

儿茶酚胺是亲水性物质, 在反相柱上无保留。在酸性条件下, 儿茶酚胺质子化, 易与离子对试剂磺酸根离子结合形成络合物, 改变儿茶酚胺的极性, 亲水性减弱, 分配系数增大, 从而增加了在反相色谱柱上的保留, 改善分离效果。在本实验过程中, 流动相加 6 mmol/L D-樟脑-β 磺酸离子对试剂, 在 pH = 3.501 的条件下, DA 和 DOPAC 与其线分离, 无杂峰干扰。

3.2　氧化铝的作用

氧化铝在 200 ℃的烤箱中, 至少烤 8 h, 氧化铝被活化, 其表面上的铝羟基才具有较高的活性。在碱性条件下, 与儿茶酚胺的儿茶酚基相互作用, 吸附到氧化铝表面, 达到富集、浓缩、纯化的目的。在酸性条件下, 氧化铝被酸化, 儿茶酚胺类物质从氧化铝表面解离, 释放到酸性解离液中, 便于高效液相色谱分析。

3.3　样品结果分析

从测得结果看, 培养 24 d, PC12 细胞和微囊化的 PC12 细胞分泌的 DA 和 DOPAC 最高。说明在相同条件下培养, PC12 细胞与微囊化的 PC12 细胞, 具有分泌 DA 和 DOPAC 的功能, 且在相同的时间达到最大值。在 PD 动物模型, 微囊化的 PC12 细胞移植到动物纹状体, 纹状体附近的脑组织的 DA 和 DOPAC 升高。动物靠体内分泌的 DA 缓解或消除 PD 症状[1], 对治疗 PD 是一种新的偿试。

关键词: PC12 细胞; 微囊化的 PC12 细胞; HPLC-电化学
中图法分类号: R446　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 吕胜青, 张可成, 石　军, 等. 微囊化 PC12 细胞移植治疗帕金森病的实验研究[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 1999, 6(4): 229−233.

[2] 朱　珠. 胎儿脑组织中单胺类递质及其代谢产物的高效液相色谱分析[J]. 第三军医大学学报, 1992, 14(6): 589−591.

[3] Hollenbach E, Schulz C, Lehnett H. Rapid and sensitive determination of catecholamines and the metabolite 3-methoxy-4-hydroxyphen-ethyleneglycol using HPLC Following novel extraction procedures[J]. Life Sci, 1998, 63(9): 737−750.

[4] Dutton J, Hodgkinson A J, Hutchinson G. Evaluation of a new method for the analysis of free catecholamines in plasma using automated sample trace enrichment with dialysis and HPLC[J]. Clin Chem, 1999, 45(3): 394−399.

[5] Wu A H B, Gornet T G. Preparation of urine samples for liquid chromatographic determination of catecholamines: bonded phase phenylboronic acid, cation-exchange resin, and alumina absorbents compared[J]. Clin Chem, 1985, 31(2): 298−302.

[6] 杨世杰, 张　伟, 岳海涛, 等. HPLC 与荧光分光光度计联机测定尿中儿茶酚胺类物质在嗜铬细胞瘤诊断中的应用[J]. 白求恩医科大学学报, 1995, 21(4): 434−436.

(编辑　薛国文)

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