DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.02.024

反相高效液相色谱法测定血浆和组织中的谷氨酸及谷氨酰胺

The determination of Glu and Gln in plasma and tissue by RP-HPLC

尤忠义 余斌 雷政宏 赵云 (第三军医大学西南医院烧伤研究所) 630038

近年来,随着肠道营养研究的不断深入,人们发现谷氨酰胺(Gln)在肠道营养中的作用愈来愈受到人们的重视[1]。因此,测定体液和组织内谷氨酸(Glu)和谷氨酰胺的确切含量有很大的现实意义。在室温下Gln极易被分解,因而,以往用氨基酸分析仪测定Gln含量重现性差、费时,且往往较实际含量低,而且大部份氨基酸分析仪缺乏Gln标准,而不能测定。我们用反相高效液相色谱法测定,既快速、准确、又简便。为进一步开展和研究Gln在创伤和烧伤营养代谢中的作用,特别对肠道本身结构和功能影响的研究,提供了方便。并可根据酶学分析原理[2],进一步计算出谷氨酰胺合成酶及分解酶的活力。

1 实验部份

1.1 仪器和试剂

吉尔森(GILSON)高效液相色谱系统,谷氨酸、谷氨酰胺、二巯基丙醇、EDTA(SIGMA),磷苯二甲醛(Fluka),甲醇为色谱纯(上海吴泾化工厂),其他试剂为分析纯。

1.2 色谱分析

色谱柱 μ Bondapak,C18,φ 250×4.6 mm,10 μm(大连国家色谱中心);流动相:10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH6.85):甲醇;检测器:UV,GILSON116型,340 nm,0.005 AUFS,进样量20 μl,全程15 min(见表1)。

表1 浓度和流速梯度洗脱

时间(min)	磷酸缓冲液(%)	甲醇(%)	流速(ml/min)
0.00	83	17	1.200
3.00	62	38	1.200
3.20	60	40	1.000
12.00	60	40	1.000
13.00	83	17	1.200
15.00	83	17	1.200

1.3 样品处理

血样品:取全血2 ml,置肝素抗凝管中,离心10 min(4℃ 2500× g),血浆0.5 ml,加等量0.2 mol/L 高氯酸,离心20 min(4℃ 1200× g),取上清液衍生后进样。组织样品:取组织0.5 g,加生理盐水0.5 ml,置匀浆器匀浆(4℃),然后取0.5 ml匀浆液(剩余部份作蛋白定量测定),加0.2 mol/L 高氯酸0.5 ml,离心20 min(4℃ 1200× g),取上清液衍生后进样。

1.4 衍生

取20 μl去蛋白的血浆或组织匀浆液,加100 μl OPA液(13.5 mg OPA,1 ml 甲醇,9.0 ml 40 mmol/L 硼酸缓冲液,pH9.5和0.2 ml 二巯基乙醇),混匀后在室温下反应90 s,取20 μl进样。

2 结果和讨论

2.1 流动相

流动相中甲醇浓度比例与组份的出峰及次序有很大关系,特别是Gln。我们曾参照 Francis M[3]等人的恒速、恒溶剂洗脱的方法进行洗脱,结果发现Gln与杂峰不能完全分离,且出峰时间较长。采用本法浓度和流速梯度洗脱,分离效果好,样品分析时间短,见色谱图1。

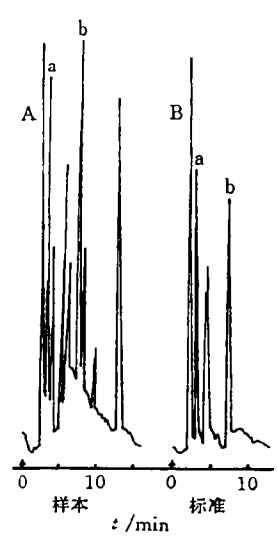


图1 色谱图

A.血样本;B.标准液;a.谷氨酸(Glu);b.谷氨酰胺(Gln)

2.2 衍生时间

衍生剂中OPA浓度不宜过高,不然其他氨基酸

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

杂峰高而多，而衍生时间的控制非常重要，谷氨酰胺和谷氨酸与OPA的衍生反应比其它氨基酸快，时间以1～2 min为宜，2 min以后其它氨基酸的杂峰很快出现；由于谷氨酰胺极易分解，衍生时间超过10 min，不仅谷氨酰胺峰降低，而且其它氨基酸杂峰高而多，严重影响Gln的分离效果。

2.3 线性范围、重复性和回收率

谷氨酸和谷氨酰胺浓度在0.075～1.2 μmol/L之间，呈良好的线关系，最低检测量75 nmol/L(见图2)。取0.5 ml血浆(或肠粘膜匀浆液)，加不同量的标准液，按本方法处理，经OPA衍生后进样检测，谷氨酰胺和谷氨酸回收率分别为95.3%和98.2%变异系数(cv)批内分别为2.9%和2.5%，批间分别为3.9%和3.3%。

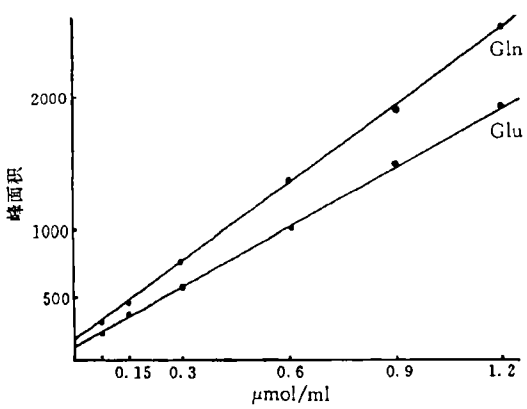


图2 标准曲线

2.4 贵州小型香猪血浆和组织内谷氨酰胺、谷氨酸的含量(见表2)

表2 血浆和组织中谷氨酸胺、谷氨酸含量

	(μmol/L)	
	谷氨酰胺	谷氨酸
血浆	633.70± 36.72	453.84±75.43
腓肠肌	1800.01±230.50	875.38±97.46
小肠淋巴结	427.81± 21.42	577.37±73.03
肠粘膜	216.47± 33.03	525.64±55.36

谷氨酰胺的浓度在肌肉组织中为最高，血浆中次之，而在肠粘膜组织中其浓度明显低于血浆，这与大量的文献报道相一致[4,5]。

关键词 色谱法，高压液相；谷氨酰胺

中图法分类号 R446.1

参考文献

1 Ardawi MS. Skeletal muscle glutamine production in thermally injured rat. Clin Sci, 1988; 74(2): 165～172

2 缪辉南，陈石根. 酶法分析手册. 上海：上海科学技术出版社，1983：5

3 Francis Martin, Akiva Suzuki, Bertran Hirel. A new high-performance liquid chromatography assay for glutamine synthetase and glutamate synthase in plant tissue. Analytical Biochemistry, 1982; 125: 24～29

4 Bergstron J, fürst P, Noree LO et al. Intracellular free amino acids concentration in human muscle tissue. J Applied Physiol, 1974; 36(6): 693～697

5 Souba WW, Robert S, Smith Douglas WW et al. Glutamine metabolism by the intestinal tract. JPEN, 1985; 9(5): 608～617

(收稿：1994-03-29；修回：1994-07-24)

茎突X线摄影方法的改进

The improvement of radiography for processus styloideus

席道友 (第三军医大学新桥医院放射科) 630037

颞骨茎突位于茎乳孔前方，自上而下向内前延伸，呈针状，根部略粗，远端逐渐变细，两侧常不对称，长度差异较大，一般约为2.5～3 cm，国内有文献报道，左侧平均为3 cm，右侧平均为1.8 cm。如果超过平均值时，可诊断为茎突过长[1,2]。当临床疑为茎突过长症时，常规作X线摄影来了解其长度、形状和位置的情况以达到诊断之目的。但是，如何将茎突的X线片拍摄的更清楚，是达到诊断要求的关键。茎突摄影方法，有许多学者介绍过并取得了一定的效果，但因方法较为复杂，应用的不够广泛。在现实工作中，我们采用双侧茎突一

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