DOI:10.16016/j.1000-5404.1987.02.018

血浆肾上腺素与去甲肾上腺素的荧光测定法

尤忠义 唐成功（第一附属医院 烧伤中心）

血浆肾上腺素（E）与去甲肾上腺素(NE)含量较低，给测定带来很大困难。近年来大多应用放射酶法或高效液相层析结合电化学检测器测定血浆中微量的儿茶酚胺，前者同位素标记物与酶试剂不易获得，后者仪器较贵，两者方法目前均不易推广使用。本法在严格控制操作的条件下，仍不失为一种较好的测定方法。我室根据前人的经验[1]，结合本室具体条件，作了较大的改进和简化，提高了灵敏度和特异性，特别是减少了样品的用量，仅需1 ml血浆即可分别测定E与NE。

方 法

取全血3ml后立即注入抗凝管中（肝素抗凝），低温离心（4℃，15000rpm，15min）。取血浆1ml加4 N $HClO_4$液0.1ml，混匀后，高速冷冻离心（4℃，3000rpm，15min），然后将全部上清液加入层析柱中（用Sephadex G-10层析柱），用0.01 N甲酸洗脱，弃去前3ml，收集6.5ml洗脱液，作荧光测定。同时取混合标准液1 ml（含E 80mg，NE80ng）作内标准，与血浆同样处理。洗脱液按下表进行操作（表1、2）。

表1 去甲肾上腺素

	洗脱液(ml)	pH7.4 磷酸缓冲液(ml)	0.05% 高铁氰化钾(ml)	氧化时间	4% 巯基乙酸(ml)	重蒸水(ml)
洗脱液	1	0.3	0.5	2	0.5	0.5
空 白	1	0.3	—	分	0.5	1
内 标	1(80ng/ml)	0.3	0.5	钟	0.5	0.5
内 空	1(80ng/ml)	0.3	—		0.5	1

表2 肾上腺素

	洗脱液(ml)	pH3.0 醋酸缓冲液(ml)	0.25% 硫酸锌(ml)	0.05% 高铁氰化钾(ml)	氧化时间	0.2%V-C (ml)	重蒸水 (ml)
洗脱液	1	0.5	0.1	0.5	3	0.3	0.5
空 白	1	0.5	0.1	—	分	0.3	1
内 标	1(80ng/ml)	0.5	0.1	0.5	钟	0.3	0.5
内 空	1(80ng/ml)	0.5	0.1	—		0.3	1

注：1、4%巯基乙酸：用5N氢氧化钠液临用时配制。

2、0.2%V-C：10mgV-C溶于0.5ml重蒸水中，加10N NaOH液4.5ml混匀，临用时配制。

3、0.05%高铁氰化钾，用重蒸水临用时配制。

以上操作要求在冰浴下进行，用日立MPF-4型荧光分光光度计，分别测定E和NE荧光强度。波长：去甲肾上腺素506nm/396nm；肾上腺素520nm/400nm。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

计算：

$$\text{样品含量：}\frac{\text{样品荧光读数}-\text{样空荧光读数}}{\text{内标荧光读数}-\text{内空荧光读数}}\times\text{标准液含量（ng/ml）}=\text{ng/ml血浆}$$

结 果 与 讨 论

1. 分离与层析柱 儿茶酚胺的洗脱与层析柱的长短、流速有关，我们制作的层析柱，0.8×2.5cm，每柱装 Sephadex G-10 1g，流速 0.4～0.5ml/min，在此条件下洗脱峰在5、6、7ml处，头3ml含量很低，9ml以后已测不出E和NE。如果层析柱减短或流速加快，洗脱峰向前移，反之则后移。为了减少误差，每柱流速应尽量一致。

2. E和NE的分测 早期的测定方法只能测定其总量，因为E与NE不易分离。Head等[2]指出E与NE可利用不同的pH，不同的稳定剂，不同的稳定时间，以及不同的激发光与发射光波长，可以较好地将两者区别。我们采用上述方法，基本达到了E与NE的分测。但巯基乙酸同样对NE有较大的损耗作用，NE的荧光强度低于E，可能是原因之一。

3. 空白对照测定 试剂空白和非氧化空白的荧光强度很低，约为经氧化后的E或NE标准液荧光强度的2.3%左右，且两者相似。

试剂空白荧光强度的高低，与加入试剂的量及浓度有关，经试验，本法所加的试剂量及浓度，空白较低，而且样品与标准液的荧光强度较高，这样实际上提高了测定的灵敏度。

4. 标准浓度与荧光强度的关系 按上述测定荧光的方法，根据实验的需要，分别观察了各种不同浓度的荧光强度。肾上腺素为20～320ng/ml，去甲肾上腺素为10～160ng/ml。在此范围内，内标与外标的浓度与荧光强度均呈直线关系。

5. 特异性 用标准E与NE氧化后测定其激发光谱与发射光谱，它们的最大激发光波长分别为400与396nm，其最大发射光波长为520与506nm。血浆样品的激发光谱和发射光谱与标准极为相似，图1、2为肾上腺素激发光和发射光光谱图形。去甲肾上腺素的激发光和发射光光谱图形亦相似。

6. 回收率 内含80ng的E和NE作回收实验，回收率一般较高。E的回收率为89.99±5.89%，n=10；NE的回收率为90.58±3.86%，n=10。当把相同浓度的标准液加入血浆后，E的回收率为91.11±1.36%，n=8；NE的回收率为90.00±2.89%，n=8。此回收率高于文献报导值[3][4]。

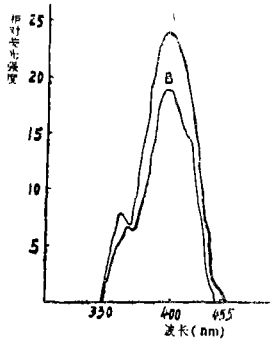


图1 肾上腺素激发光光谱

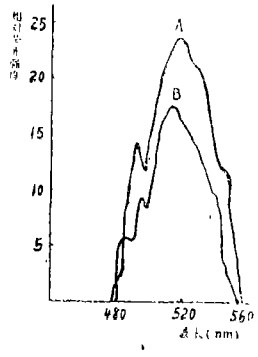


图2 肾上腺素发射光光谱

注：A：标准液；B：血浆样品

7. 样品的重复性和可靠性 我们用变异系数（RCV）作为检验方法的重复性和可靠性，一般来说变异系数不大于5%，则方法是可靠的，重复性是好的。我们分别作了标准液和犬血浆样品（呼吸道烧伤后的犬血浆）的测定，结果如表3：

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

表3 标准液和血浆样品的变异系数测定

项目	E+NE混合标准液(80ng/ml)		犬血浆样品(ng/ml)	
	E	NE	E	NE
n	12	10	11	9
均值	94.11	88.23	31.40	15.38
SD	1.47	2.27	0.76	0.85
RCV	1.56%	2.58%	2.4%	5.52%

8. 血浆肾上腺素与去甲肾上腺素的含量 我们对11只四川地区健康杂种犬在作呼吸道烟雾吸入伤实验时进行了伤前血浆E和NE的测定，动物经麻醉从股动脉导管取血，E的含量为22.16±6.49ng/ml，NE的含量为12.50±4.53ng/ml，明显高于Taborsky Jr等[5]的正常值。从E值大于NE值看，说明被测动物有明显的应激反应。在致伤后立即E值增高到35.31±9.74ng/ml，（$P<0.025$），NE值为20.30±10.54ng/ml，（$P<0.05$）。故本法能反应致伤后血浆E与NE的改变。

人静脉血浆（献血员）E的含量为0～3.5ng/ml（n=9，其中一例为0），NE含量为0～8ng/ml（n=10，其中4例为0），均较Buhler[6]与Van Loon等[7]的结果较高，说明本法的灵敏度不如放射酶法，一般来说荧光法只能测到ng水平，而放射酶法可测至pg水平。

（本实验承我校中心仪器室蒋俊同志协助，特此致谢）

参考文献

1. 姚丹帆，等。氢溴酸苦甘草碱对肾上腺髓质释放儿茶酚胺的影响。第二军医大学学报 1979; 3:5
2. Head RJ, et al Semiautomated catecholamine assay. Aust J Exp Biol Med Sci 1977; 55:213
3. Viktora JK, et al New automated fluorimatric methess for estimation of small amounts of adrenaline and noradrenaline. Analyt Biochem 1968; 23:513
4. Anton AH, et al. A study of the factors affecting the aluminium oxide trihydroxyindele procedure for the analysis of catecholamines. J Pharmacol Exp Ther 1962; 138:360
5. Taborsky Jr GJ, et al. Morphine: Dual effects on plasma catecholamines. J Endocrinol 1981; 109:319
6. Buhler HU, et al. Plasma adrealine, noradrenaline and dopamine in man and different animal species. J Physiol 1978; 276: 311
7. Van Loon GR, et al. Plasma dopamine responses to standing and exercise in man. Lif Sci 1979; 24:2273

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n