DOI:10.16016/j.1000-5404.1985.03.006

血浆儿茶酚胺荧光测定法氧化铝吸附葡聚糖凝胶G-10分离纯化

黄美莹 王大琛 金筠篝

（野战外科研究所）

提要 本文建立了用氧化铝-葡聚糖凝胶G-10分离纯化，然后氧化为三羟吲哚的血浆儿茶酚胺测定法。操作为：将血浆与氧化铝混合，震荡吸附，水洗后用过氯酸洗脱直接加于葡聚糖凝胶柱上，再用甲酸洗脱，用高铁氰化钾氧化为三羟吲哚，在岛津RF-520型分光光度计上以两组波长（395/495,410/510nm）分别读取读数。最后根据标准溶液的荧光读数计算出含量。

从标准、样品及空白的扫描图谱看来，分离效果满意。

标准曲线：从0～2000ng皆呈线性。

标准回收率：NA20ng时为84±2.20%（M±S.E.），C.V.=5.23%，n=4；A20ng时为82±2.41%，C.V.=5.87%，n=4。

添加回收率：血浆4ml加入NA10ng时为82±2.68%，C.V.=6.53%，n=4；加入A10ng时为80±2.28%，C.V.=5.7%，n=4。

血浆儿茶酚胺含量参考值：重庆地区30例（平均30岁）健康男女清晨空腹静卧时采血，含量为：NA：0.43±0.08ng/ml，A：0.16±0.029ng/ml，（M±S.E.）。

本文对分析中的有关条件进行了讨论，并结合临床及实验研究作了一些测定。

本法特点：简单，快速，分离满意，费用低。

关键词 儿茶酚胺；肾上腺素；去甲肾上腺素；氧化铝；葡聚糖凝胶G-10；三羟吲哚荧光测定法

由于儿茶酚胺既由肾上腺髓质所分泌，属于内分泌激素，也由交感神经末梢所释放，被认为是神经介质，对机体的物质代谢、血液动力学以及体温调节等多方面的生理和生化变化都具有重要作用，因此，在临床检验及基础医学研究中普遍受到重视。

以往儿茶酚胺含量的测定，多收集24小时尿样进行分析，虽对嗜铬细胞瘤及高血压的诊断有意义，但不能迅速反映体内儿茶酚胺的变化，且在基础医学研究动物实验中，尿量不易收集准确，对结果亦有影响，故有必要建立血中含量的测定方法。

本文建立了以Westerink[1]氧化铝及葡聚糖凝胶G10分离纯化的步骤，和对儿茶酚胺反应灵敏的三羟吲哚荧光法为基础的血浆儿茶酚胺测定方法。

测定方法

试剂及器材 试剂为1～2级纯，用全玻璃蒸馏器的重蒸水配制：10%EDTA-Na_2；2.8%肝素钠；50mM $NaHSO_3$；0.5N NaOH；0.5N HCOOH；0.01N NaOH；0.01N HCOOH；0.1M pH6.5磷酸盐缓冲液；0.1N $HClO_4$；0.5%$ZnSO_4$；0.25% $K_3Fe(CN)_6$；0.5M pH8.6 Tris缓冲液；碱性维生素C液；标准液：DL去甲肾上腺素（NA）及肾上腺素（A）储备液（100μg/ml）及应用液（1μg/ml）；氧化铝：经2N HCl酸化后120℃干燥1小时，200℃活化2小时备用；葡聚糖凝胶G10柱：取颗粒为40～120μ的葡聚糖凝胶G10，溶

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

胀后用0.5N NaOH浸泡，水漂洗至中性，再用0.5N HCOOH浸泡，水漂洗中性，装入7×200mm玻璃层析柱中，至凝胶层高度为80mm；岛津RF-520型荧光分光光度计。

血样采集 静脉采血2～7ml置于预冷的离心管中(加有2.8%肝素钠17.5μl，10% EDTA-Na_2 70μl及50mM $NaHSO_3$ 17.5μl)，0℃ 3000rpm分离血浆。

分离纯化： 取血浆1～3ml于具塞试管中，加10% EDTA-Na_2 70μl，50mM $NaHSO_3$ 17.5μl，水3ml，氧化铝100mg，Tris缓冲液1ml，振摇15分钟，吸弃上清液，用5ml水洗氧化铝共两次，将氧化铝悬浮液转移至4×80mm玻璃层析管中，待水滴完，插入葡聚糖凝胶层析柱的上端(预先用0.01N NH_4OH 3ml然后0.01N HCOOH 3ml洗柱)，在氧化铝柱中加入0.1N $HClO_4$ 1.0ml，任其洗脱液滴入葡聚糖凝胶柱中，滴完后，取掉氧化铝柱，用0.01N HCOOH对葡聚糖凝胶柱进行洗脱，根据实验室气温的变化，收集洗脱液的适当部分3ml（室温20℃时，收集0.01N HCOOH第5～7的3ml）。

荧光测定 将洗脱液均分为两管，一为样品管，一为空白管。另取NA及A标准液各两管(1.0或5.0或10.0ng/0.01N HCOOH 1.5ml视样品中含量多少而定)，一为标准管，一为空白管，各管皆按下列顺序加入试剂，磷酸盐缓冲液0.75ml，0.5%$ZnSO_4$ 50μl，0.25%$K_3Fe(CN)_6$ 50μl(空白管不加)。在每个样品管及标准管加入$K_3Fe(CN)_6$液后开始计时，准确的5分钟后加入碱性维生素C液0.3ml，同时空白管也加入碱性维生素C液0.3ml。然后根据实验室气温，放置适当时间（见讨论），倾入光径1cm比色杯中，在RF-520型荧光分光光度计上，分别以395/495，410/510nm波长下读取读数。

计算： 根据下列联立方程式进行计算：

$$\begin{cases} m = Aa \cdot X + Na \cdot Y \\ n = Ab \cdot X + Nb \cdot Y \end{cases}$$

简化后，$Y = \left(m - \frac{Ab}{Aa} n\right) \div \left(Na\frac{Ab}{Aa} - Nb\right)$

$$X = (n - Nb \cdot Y) + Ab$$

m及n分别为395/495及410/510nm时样品管减空白管的荧光读数；Aa及Ab分别为395/495，410/510nm时肾上腺素（A）标准管减空白管的荧光读数，再除以标准管的浓度，得到的1ng肾上腺素的荧光读数。同样，Na及Nb分别为395/495，410/510nm时去甲肾上腺素（NA）每1ng的荧光读数。X及Y分别为1.5ml洗脱液中肾上腺素及去甲肾上腺素的含量ng。

$$\text{血浆NA含量 (ng/ml)} = Y \cdot \frac{3ml}{1.5ml} \cdot \frac{1}{\text{血浆用量ml}}$$

$$\text{血浆A含量(ng/ml)} = X \cdot \frac{3ml}{1.5ml} \cdot \frac{1}{\text{血浆用量ml}}$$

结　果

线性关系 曾分别作NA及A三组浓度，0～10，0～40，0～2000ng，皆呈线性。荧光强度与浓度的相关系数皆大于0.994，图1为0～10ng的标准曲线图。

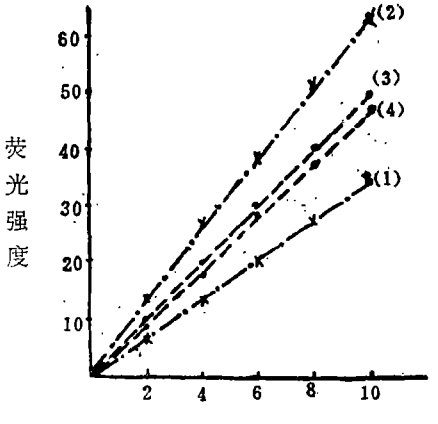


图1、标准曲线图

(1) A 395/495　(3) NA 395/495nm
(2) A 410/510　(4) NA 410/510nm

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

标准溶液回收率

(1)直接经葡聚糖凝胶柱：

NA20ng：91.5±2.79%(M±S.E，n＝6)

A20ng：89.8±3.05%(M±S.E，n＝4)

(2)经氧化铝、葡聚糖凝胶柱的总回收率：

NA20ng：84±2.20%(M±S.E.)，C.V.＝5.23%，n＝4

A20ng：82±2.41%(M±S.E.)，C.V.＝5.87%，n＝4

添加回收率 血浆4ml加入NA10ng的总回收率为82± 2.68% (M±S.E.)，C.V.＝6.5%，n＝4。加入A10ng时为80±2.28%(M±S.E.)，C.V.＝5.70%，n＝4。

血浆儿茶酚胺含量参考值：重庆地区30名（男14名女16名）18～58岁（平均30岁）健康人清晨空腹静卧采血。NA：0.43±0.08 ng/ml(M±S.E.)， A：0.16 ±0.029ng/ml (M±S.E.)。

献血员空腹坐位采血18例，血浆中含量：NA为0.40±0.058ng/ml，A为0.23±0.04ng/ml (M±S.E.)。

少数病人及实验动物血浆儿茶酚胺含量见表1。

表1 各种情况血浆儿茶酚胺含量ng/ml

	情况		NA	A
病人	高血压待查病人	1	0.53	0.014
		2	0.49	0.375
		3.入院次日清晨	0.34	0.019
		4.治疗，出院前晨	0.16	0.25
	脑外伤病人1	术前	2.79	
		术后第一天	2.77	0.41
	脑外伤病人2	术前	5.48	2.0
		术后第五天	1.36	0.25
实验动物	狗脊髓压迫损伤，动脉采血		0.62	0.63
	狗钢珠致软组织贯通伤前n＝7		2.0	0.144
	〃 〃	后6°n＝7	3.13	0.142
	兔挤压伤前n＝7		1.22±0.30	0.19±0.18
	兔挤压，松开12°后，n＝7		3.25±1.13	0.90±0.32
	大鼠，断头后颈部采血n＝5		2.78	15.81

讨 论

1. 葡聚糖凝胶的纯化原理

葡聚糖凝胶是右旋糖苷的聚合物，具有分子筛的作用，葡聚糖凝胶G10适宜分离分子量小于700的化合物，另外，葡聚糖凝胶具有很弱的酸性，对芳香族和碱性物质有迟滞作用[2]，故能分离纯化分子量为180左右，并含芳香基团，具有碱性的去甲肾上腺素和肾上腺素。

2，纯化步骤 以往多采用一次性氧化铝吸附[3]或离子交换树脂[4]分离纯化。1977年Westerink应用葡聚糖凝胶G10分离组织中儿茶酚胺，1982年[1]报导氧化铝及葡聚糖凝胶G10联用分离尿中儿茶酚胺较单独用葡聚糖凝胶分离效果好。本文应用于血浆也比单独用氧化铝或单独用葡聚糖凝胶好。因荧光空白读数较低，说明具荧光的杂质去除较完全；也较单独用离子交换树脂好，并且操作简单快速，省力省时。具体优点是(1)分离血浆后不必制成血滤液，既省力省时又避免损失[5]；(2)纯化时加入定量Tris缓冲

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

液即可，不必用强碱调节酸碱度；（3）洗脱时任其自然流下，无需控制流速；（4）显荧光前无需再一次调节酸碱度；（5）显荧光时从未出现过混浊现象。

图2为家兔损伤后采血，经氧化铝及葡聚糖凝胶纯化，三羟吲哚荧光法的扫描图谱，可见血样的图谱与标准的图谱极为一致，说明纯化效果满意。

3．荧光显色时酸碱度的调整 据文献[6]报导，不同酸碱度时，NA及A的荧光强度不一样，酸碱度低时(如pH3.5)A的荧光强度较NA大，酸碱度高时（如pH6.5）NA的荧光强度较A大，故若显荧光的pH值选在6，则对NA的测定有利，最近金律[7]也提及A的回收率不如NA，考虑是否NA峰过高，而NA及A的吸收峰又极为靠近，是否因此影响A的回收率。特别是当测定A的含量大大低于NA含量的样品时。本文减少了pH6.5磷酸盐缓冲液的用量（但加入量确准），使显荧光时的pH值低于6，此时有一组波长(410/510 nm)A的荧光强度较NA荧光强度大(见图1)。

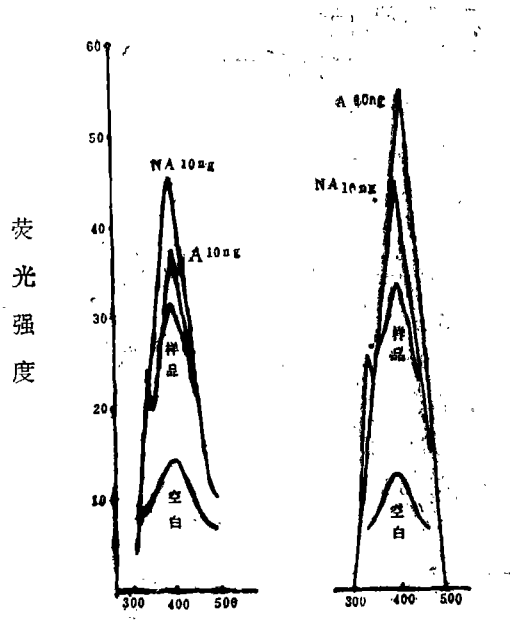


图2 NA、A样品及空白的光谱图

此时测定NA10ng及A3ng的混合标准溶液中NA及A的含量与实际含量基本一致，见表2。

表2 混合标准溶液中NA及A测定值及回收率

标准溶液	荧光强度		测定值ng		回收率%	
	395/495nm	410/510nm	NA	A	NA	A
NA 10ng	49.95	49.35				
A 10ng	37.2	63.15				
NA10ng+A3ng	61.5	69.3	10.16	2.89	102	96

4．层析温度与洗脱 加温可减少被分离的组分在层析柱中的保留体积是各种层析的共性。本文观察到将经过氧化铝的过氯酸1 ml加在葡聚糖凝胶柱上，用0.01N HCOOH洗脱时，室温降低，其洗脱曲线也随之后移(见图3)。故在层析管无恒温外套或实验室无恒温设备时，应根据室温的变化来确定收集洗脱液的适当部分。

5．读取荧光强度的最佳时间 文献报导温度对荧光的强弱有影响。本文还观察到温度对达到最大荧光强度所需时间也有影响，见表3。

6．血浆用量 当测定生理浓度血样时，应为3～4 ml，高于生理浓度时，可减少为2～3 ml，应激时血样，可仅用1ml。

7．血浆儿茶酚胺参考值 据文献

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

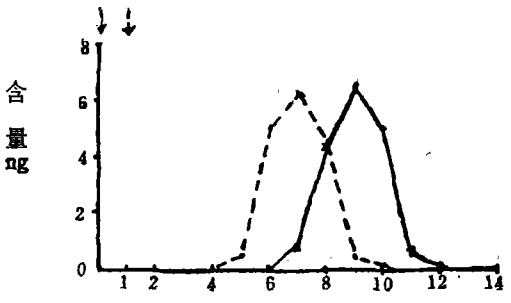


图3、洗脱曲线

Vendsalu[8]、Martin[9]、Diamant[5]用三羟吲哚荧光法测定健康人血浆NA及A的含量分别为0.39，0.17；0.57，0.16；0.38±0.03，0.09±0.0075ng/ml（M±S.E.）。本文所得结果为0.43±0.08，0.16±0.029 ng/ml（M±S.E.），与之基本一致。

表3 读取荧光强度最佳时间表

室温（℃）	26	20	12	7
最佳时间* （分钟）	6～16	10～20	15～25	20～30

注* 从加入$K_3Fe(CN)_6$溶液开始计算。

参考文献

1. Ben HC Westerink, et al: Use of alumina, sephadex G-10 and ionexchange columns to purify samples for determination of epinephrine, norepinephrine, dopamine, hemovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid in urine. Clin Chem:1982;28 (8):1745

2. 南京药学院药物分析教研室编：药物分析。江苏科学技术出版社 1981年，第20页

3. Anton AH: A study of the factors affecting, The aluminium oxide-trihydroxyindole procedure for the analyse of catecholamine. J Pharmaco Exp Therapeutic 1962; p138,360

4. Viktora JA, et al: New automated methods for estimation of small amounts of adrenaline and noradrenaline. Anal Biochem 1968; p 23, 513

5. Diamant J, et al: A precise catecholamine assay for small plasma samples. J Labor Clin Med 1975;85(4):678

6. Merrills KJ, et al: A semiautomatic method for determinaton of catecholamine. Anal Biochem 1963; p6, 272

7. 金 律等：改良荧光法测定血浆去甲肾上腺素及肾上腺素。中国药理学报1984；5(2):89

8. Vendsalu, et al: Studies on adrenaline and noradrenaline in human plasma. Acta Physiol Scand 1980; 49 (sappl): 173

9. Martin LE, et al: An automated method for determination of NA and A in tissues and biological fluids. Anal Biochem 1968; p23, 529

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

Method for Determination of Plasma Catecholamine

Huang Meiying, et al

(Research Institute of Surgery, Third Military Medical College)

This paper is to introduce a new method for the determination of the plasma level of catecholamine. The method consists of two steps. Firstly, catecholamine is seperated and purified with aluminium oxide and sephadex G-10. Secondly, the purified catecholamine is oxidized into trihydrooxyindole and the amount is determined by fluorimetry.

This method is rather simple and can be handled easily. It can be used either in research or in clinical work. The procedures of the method and the relevant factors to the accuracy of the method were discussed in detail and the data obtained from experimental animals, normal persons and different patients were presented.

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