

# 高效液相色谱法检测大鼠 子宫内游游离氨基酸

张 玮      程治平

(哈尔滨医科大学生理教研室, 哈尔滨 150086)

**摘要** 本文采用邻苯二甲醛(OPA)和 $\beta$ -巯基乙醇柱前衍生, 荧光检测分析大鼠子宫内游游离氨基酸。50分钟分析18种氨基酸, 以TEGD缓冲液[10mmol/L三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCl), 1.5mmol/L乙二胺四乙酸(EDTA)3mmol/L叠氮钠( $\text{NaN}_3$ ), 30%甘油 1mmol/L二硫苏糖醇(DTT)pH为7.4]提取氨基酸, 平均回收率94.0 $\pm$ 5%。各氨基酸保留时间变异系数平均为1.25 $\pm$ 0.1%(均值 $\pm$ 标准差), 峰面积变异系数平均为3.1 $\pm$ 0.9%, 各氨基酸浓度在10pmol—1.5nmol范围内, 线性相关系数为0.979 $\pm$ 0.08(均值 $\pm$ 标准差)。同时还讨论了影响氨基酸检测的某些色谱条件。

用高效液相色谱法检测生理体液、组织与细胞内游离氨基酸的含量, 有快速、准确、简便等优点, 其最低检测极限可达38fmol<sup>[2]</sup>。本文采用邻苯二甲醛柱前衍生, 反相梯度洗脱、荧光检测的方法分析大鼠子宫内游游离氨基酸的含量, 以研究氨基酸与子宫功能活动的关系。

## 材料与方 法

**仪器** 高效液相色谱仪为岛津LC-6A型、C-R3A数据处理机、RF-535荧光检测器及BACKMAN超速离心机L<sub>8</sub>-60M型。

**试剂** 18种氨基酸均为SIGMA公司产品、邻苯二甲醛MERCK公司产品, 其余试剂为优级纯或分析纯。

**色谱条件** 色谱柱: Shim-pack CLC-C<sub>8</sub>; 150x6.0mm $\varnothing$ ; 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流速: ml/毫升; 进样量: 10 $\mu$ l; 检测波长: 激发光为345nm, 发射光为450nm; 流动相“A”为甲醇/0.025mol/L柠檬酸钠(V/V=20/80), pH为7; 流动相“B”为甲醇/0.01mol/L醋酸钠(V/V=80/20), pH为7。使用前过滤并超声脱气。梯度洗脱方式, 各段B液比例为: 0—16分, 0%—22%; 16.01—25分, 22%—25%; 25.01—30分, 25%—

45%; 30.01—50分, 45%—70%。

**标准溶液的配制** 准确称取一定量的氨基酸、用0.1mol/L的盐酸配制成浓度为3.5微摩尔的氨基酸标准溶液, 储存在-20 $^{\circ}$ C冰箱中, 分析时根据需要进一步稀释。

**衍生化反应** 准确称取40mg邻苯二甲醛, 溶于0.5毫升甲醇, 加入30 $\mu$ l $\beta$ -巯基乙醇, 以0.4mol/L硼酸缓冲液(pH为10.0)加至5毫升, 此试剂在使用前至少“老化”24小时, 并应每3天加 $\beta$ -巯基乙醇20微升, 以维持试剂的作用强度。

**样品制备** 选用WISTAR雌性大鼠, 体重180—250克, 用阴道涂片法确定性周期时相, 分为情前期、情期、情后期和间情期。选择情后期大鼠断头处死, 迅速取出双侧子宫, 置冰盒中, 清除周围其它组织, 沿纵线切开子宫, 冷盐水冲洗数次后滤纸吸干, 收集内膜组织, 加入一定量的TEGD缓冲液。在玻璃匀浆器内制成匀浆, 摄氏0 $^{\circ}$ C 105 000 $\times$ g离心50分钟, 上清液一部分去蛋白后检测氨基酸<sup>[2]</sup>, 一部分测蛋白含量<sup>[3]</sup>, 其余部分用于雌、孕激素受体分析。

## 结果与讨论

在本实验条件下,标准氨基酸溶液色谱图(见图1),其中每种氨基酸的含量均为400pmol 子宫内膜游离氨基酸图谱(见图2)。由图1及图2可见大部分氨基酸分离达到基线分离。特别是神经递质天门冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、 $\gamma$ -氨基丁酸,以及与生殖功能有关的酪、丝、苏氨酸的分离是良好的。

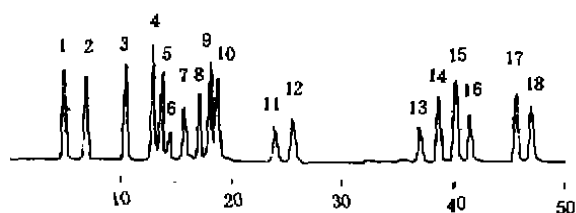


图1 标准氨基酸溶液色谱图

色谱峰,1.天门冬氨酸;2.谷氨酸;3.天门冬酰胺;4.丝氨酸;5.谷氨酰胺;6.组氨酸;7.瓜氨酸;8.精氨酸;9.甘氨酸;10.苏氨酸;11.酪氨酸;12. $\gamma$ -氨基酸;13.色氨酸;14.蛋氨酸;15.缬氨酸;16.苯丙氨酸;17.异亮氨酸;18.亮氨酸。

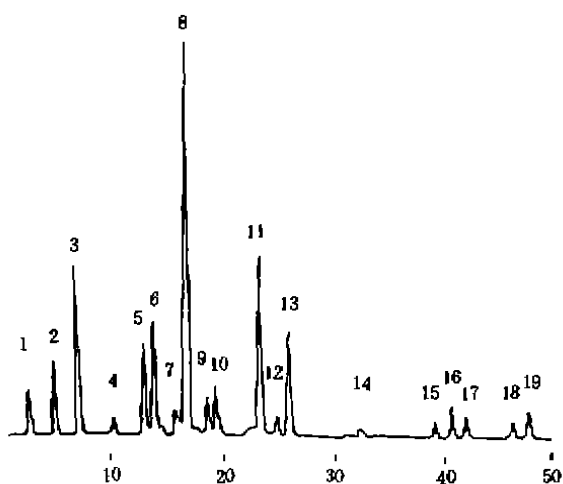


图2 子宫内膜游离氨基酸色谱图

色谱峰:1.未知峰;2.天门冬氨酸;3.谷氨酸;4.天门冬酰胺;5.丝氨酸;6.谷氨酰胺;7.瓜氨酸;8.精氨酸;9.甘氨酸;10.苏氨酸;11.未知峰;12.酪氨酸;13. $\gamma$ -氨基丁酸;14.未知峰;15.蛋氨酸;16.缬氨酸;17.苯丙氨酸;18.异亮氨酸;19.亮氨酸。

重复性实验结果表明18种氨基酸峰面积变异系数平均为 $3.1 \pm 0.9$  ( $n=8$ )。保留时间变异系数平均为 $1.25 \pm 0.28$  ( $n=8$ ) (见表1)。

表1 各氨基酸保留时间 单位:分钟

序号	氨基酸种类	时间	CV%
1	天门冬氨酸	$5.327 \pm 0.1$	1.42
2	谷氨酸	$7.391 \pm 0.08$	0.97
3	天门冬酰胺	$10.908 \pm 0.15$	1.20
4	丝氨酸	$13.871 \pm 0.16$	2.60
5	谷氨酰胺	$14.568 \pm 0.30$	1.95
6	组氨酸	$15.001 \pm 0.21$	1.32
7	瓜氨酸	$16.253 \pm 0.22$	1.53
8	精氨酸	$17.125 \pm 0.32$	1.26
9	甘氨酸	$18.820 \pm 0.24$	0.33
10	苏氨酸	$19.455 \pm 0.26$	1.20
11	酪氨酸	$24.803 \pm 0.18$	1.18
12	$\gamma$ -氨基丁酸	$37.138 \pm 0.06$	0.90
13	色氨酸	$37.138 \pm 0.06$	0.90
14	蛋氨酸	$38.772 \pm 0.17$	1.30
15	缬氨酸	$40.701 \pm 0.08$	0.96
16	苯丙氨酸	$41.752 \pm 0.07$	0.97
17	异亮氨酸	$46.30 \pm 0.09$	1.08
18	亮氨酸	$47.577 \pm 0.10$	1.01

线性关系 据报道各氨基酸标样浓度与其响应线性范围最低值为5pmol,低于5pmol大多数衍生物偏离线性范围,特别是丝氨酸、甘氨酸和丙氨酸<sup>[4]</sup>。对大多数生理体液5—10pmol的灵敏度是合适的<sup>[5]</sup>。根据实验需要从10pmol—1.5nmol,线性关系是良好的。相关系数平均为 $0.979 \pm 0.08$  (均值 $\pm$ 标准差)。在此范围内可进行准确的定量分析。

回收率 取子宫样品,加入一定量的TEGD缓冲液,再分别加入和不加入一定量标准氨基酸溶液。匀浆并离心后,测定氨基酸回收率,其结果和子宫内膜中各种氨基酸含量(见表2)。可以看出,TEGD缓冲液提取组织中游离氨基酸回收率是好的。其中含有Tris-

HCl, Tris-HCl 液提取氨基酸曾有报道<sup>[6]</sup>。应注意去蛋白方法可影响回收率造成某些氨基酸含量变异<sup>[7]</sup>。上述结果表明,本实验各氨基酸分离效果,重复性,线性关系,回收率是良好的,以此条件对子宫内膜氨基酸进行检测,表 2 示实验结果。

表 2 各氨基酸的平均回收率和子宫内膜中各氨基酸含量

氨基酸种类	回收率% ± 标准差		含量
天门冬氨酸	95	7	6.65 ± 0.23
谷氨酸	100	9	9.97 ± 0.27
天门冬酰胺	91	5	0.70 ± 0.06
丝氨酸	96	6	6.06 ± 0.35
谷氨酰胺	94	9	4.62 ± 0.15
组氨酸	89	7	微量
瓜氨酸	92	8	0.95 ± 0.08
精氨酸	90	9	32.53 ± 4.01
甘氨酸	95	6	8.30 ± 0.31
苏氨酸	97	6	3.33 ± 0.29
酪氨酸	94	6	2.32 ± 0.22
γ-氨基丁酸	98	10	11.76 ± 0.26
色氨酸	94	10	无
蛋氨酸	93	8	1.34 ± 0.16
缬氨酸	96	5	2.58 ± 0.17
苯丙氨酸	100	9	1.44 ± 0.15
异亮氨酸	92	7	0.95 ± 0.09
亮氨酸	93	8	1.97 ± 0.13

n=7, 平均回收率 94.0 ± 0.70 (均值 ± 标准差); 含量, n=8, 均值 ± 标准差, 单位, nmol/毫克蛋白。

下面就本实验所选择的实验条件加以讨论:

(一) 流动相 实验选用了醋酸钠-柠檬酸钠缓冲液, 以甲醇作为有机改性剂, 实验表明其分离效果优于磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液。缓冲液离子浓度范围为 0.01-0.14 mol/L, 我们选择较低 0.025 mol/L 的浓度即达到了较好分离, 如浓度增大到 0.05 mol/L 容量因子明显增加, 精氨酸峰将移至苏氨酸峰之后。文献报道, 离子强度增大可减少分子间的静电排斥力, 增大洗脱液的表面张力, 延长溶质的保留时间。

流动相 pH 不同对氨基酸容量因子影响不大<sup>[1]</sup>, 降低流动相 pH 可使氨基酸衍生物荧光强度有不同程度减弱, 而且 pH 可影响峰的分离<sup>[7]</sup>。本实验观察到 pH 为 7.5 时, 色氨酸与蛋氨酸不能分离, 当 pH 为 7 时即可达基线分离, 可能由于 pH 影响了氨基酸衍生物的疏水性。

(二) 固定相 比较了键合烷基链长度不同的固定相的色谱柱 C<sub>8</sub> 和 C<sub>18</sub>, 在相同实验条件下, 发现 C<sub>8</sub> 柱保留时间比 C<sub>18</sub> 短大约 23%。另一点不同是 C<sub>8</sub> 柱在没有四氢呋喃的情况下, 甘、苏氨酸分离良好, 而 C<sub>18</sub> 柱往往需要加入一定量的四氢呋喃以增加甘、苏氨酸的分离。

(三) 检测器波长 本文对氨基酸的 OPA 衍生物进行荧光扫描, 发现最大激发光波长为 345 nm, 荧光光谱表明 450 nm 处有一最大峰, 文献报道, 激发光波长常用范围为 229-360 nm, 发射光 418-470 nm<sup>[5]</sup>。但激发光波长在 229 nm 处检测生物样品时易受外界干扰<sup>[4]</sup>。

用 TEGD 缓冲液提取, OPA 衍生化、梯度洗脱检测子宫内游离氨基酸, 是较为理想的方法, 可进一步研究生理、病理情况下氨基酸动态变化及可能的功能调节作用。

### 参 考 文 献

- 1 刘华等 1984 高效液相色谱法反相梯度洗脱荧光检测分析血浆氨基酸色谱 1(2), 83-87.
- 2 Turnell D. C and J. D Cooper 1982 Rapid assay for amino acids in serum or urine by precolumn derivatization and reversed phase liquid chromatography. *Clin Chem* 28(3), 527-531.
- 3 Bradford M. M 1977 A rapid and sensitive method for utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 74, 248-256.
- 4 Barry N. J. Svante P. and S. Stein 1981 Amino acid analysis and enzymatic sequence determination of peptides by improved o-phthaldialdehyde precolumn labeling procedure. *J. Liquid Chromatography* 4(4), 565-586.

(下转第 47 页)

(上接第 31 页)

- 5 Fernstrom M. H and J. D Fernstrom 1981 Rapid measurement of free amino acids in serum and CSF using high-performance liquid chromatography. *Life Sciences*. 29, 2119 — 2130.
- 6 Martin R. R 1981 R-aminobutyric acid system in rat oviduct. *J. Biological Chemistry*. 258(19), 9816—9819.
- 7 Goldsmith R. F Earl J. W and A. M Cunningham 1987 Determination of L-aminobutyric acid and other amino acids cerebrospinal fluid of pediatric patients by reversed-phase liquid chromatography. *Clin Chem*. 33(10), 1736—1740.