DOI:10.15933/j.cnki.1004-3268.2009.05.007
河南农业科学

RP-HPLC法检测大鼠海马中4种氨基酸类神经递质含量的研究

尹柏双[1,2], 高　利[1*], 张　帆[1]
(1.东北农业大学 动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;
2.吉林农业科技学院 动物医学学院, 吉林 吉林 132101)

摘要: 建立了RP-HPLC测定大鼠海马中4种氨基酸类神经递质含量的方法。以2,4-二硝基氟苯(DNFB)为衍生化试剂进行柱前衍生,色谱条件为Diamonsil C18(4.6mm×200mm,5μm)色谱柱,乙腈和醋酸钠缓冲液为流动相,采用二元梯度洗脱,UV 350nm检测。结果显示:在18min内,4种氨基酸分离完全,在0.01~100μg/mL范围内线性关系良好,天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、γ-氨基　酸(GABA)相关系数分别为0.9985、0.9976、0.9943、0.9924;日内变异系数分别为2.4%、3.8%、3.2%和3.5%;标准加入平均回收率分别为94.80%、93.93%、92.69%和96.74%。

关键词: 高效液相色谱法; 大鼠; 海马; 氨基酸
中图分类号: S865.1+2　　文献标识码: A　　文章编号: 1004-3268(2009)05-0119-04

Determination of 4 Amino Acids Neurotransmitters in Rat Hippocampi by RP-HPLC

YIN Bai-shuang[1,2], GAO Li[1*], ZHANG Fan[1]
(1. College of Animal Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;
2. Department of Animal Medicine, Jilin Agricultural Science and Technology College, Jilin 132101, China)

Abstract: In this paper, a method for the determination of 4 amino acids neurotransmitters in rat hippocampi by RP-HPLC was established. The samples were precolumn derivated with DNFB. The chromatogram condition is Diamonsil C18 column (4.6mm×200mm, 5μm). Acetonitrile/acetate buffer solution was used as mobile phase and the gradient elution was detected by UV at 350 nm. The results showed that 4 amino acids neurotransmitters were separated within 18 minutes. The linear relation was well in the range from 0.01 to 100μg/mL, and the correlation coefficients of Asp, Glu, Gly and GABA were 0.9985, 0.9976, 0.9943, and 0.9924, respectively. The coefficient of differentiations were 2.4%, 3.8%, 3.2% and 3.5%, and the average recoveries were 94.80%, 93.93%, 92.69% and 96.74%, respectively. This method is speediness, accurate, simple, high sensible and well repetition and provides a reference for the determination of amino acids neurotransmitter and related researches.

Key words: RP-HPLC; Rat; Hippocampi; Amino acids

海马组织中兴奋性神经递质如谷氨酸(Glu)和天冬氨酸(Asp),及抑制性神经递质如γ-氨基丁酸(GABA)和甘氨酸(Gly)含量的变化与麻醉密切相关。有关文献报道[1~4],动物在进行吸入麻醉、静脉

收稿日期: 2009-01-05
基金项目: 黑龙江省博士后科研启动金资助(LBH-Q07016)
作者简介: 尹柏双(1978-),男,黑龙江哈尔滨人,讲师,在读硕士研究生,主要从事动物外科疾病及动物麻醉方面的教学与研究工作。
通讯作者: 高　利(1972-),男,内蒙古包头人,副教授,博士,主要从事动物麻醉和大动物肢蹄病方面的研究。

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

麻醉和肌肉注射麻醉过程中，均引起海马组织中氨基酸类神经递质含量发生改变，其变化程度在一定范围内与用药浓度呈正(负)相关。据文献报道，测定方法多采用邻苯二甲醛(OPA)衍生剂柱前衍生法，利用氨基酸分析柱，结合荧光检测器测定，但此方法成本较高，试验过程复杂[5~7]。为探索一种操作简便且成本低的检测方法，参照文献[8]，采用2,4-二硝基氟苯(DNFB)柱前衍生，用 C18 色谱柱，建立了测定大鼠海马组织中 4 种氨基酸含量的 RP-HPLC方法，经多次试验，4 种氨基酸获得有效分离。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 仪器 美国 Waters 2695 高效液相色谱仪，自动进样器、UV 检测器及色谱数据处理系统；超低温冰箱、高速冷冻离心机(Japanese Beckman Company)等。

1.1.2 试剂 Asp、Glu、Gly、GABA 标准品(美国 Sigma 公司)；2,4-二硝基氟苯(美国 Sigma 公司)；乙腈(色谱纯，德国 Merck 公司)；甲醇(色谱纯，德国 Merck 公司)；隆朋(东北农业大学外科教研室)；去离子水；其余试剂均为分析纯。

1.1.3 试验动物 成年 SD 大白鼠，体重(200±20)g(黑龙江省哈尔滨市汉方实验鼠类养殖所)。

1.2 试验方法

1.2.1 标准品储备液配制 精密称取 Glu、Asp、GABA、Gly 标准品各 5mg，置于 5mL 容量瓶中，用甲醇/水(V/V＝50 ∶50)溶解并稀释，配成浓度为 1mg/mL 的储备液。

1.2.2 衍生剂配制 DNFB 用乙腈配成 0.5%(V/V)的溶液，避光保存。

1.2.3 色谱条件 色谱柱：Diamonsil C18(4.6mm×200mm，5μm)；流动相：A 为 0.05mol/L 的醋酸钠缓冲液(pH＝6.0)，B 为乙腈/水(V/V＝50 ∶50)，进行梯度洗脱，流动相 B 的浓度由初始时 16%经 10min 增至 45%，18min 至 85%；流速 1mL/min；检测波长 350nm；柱温 28℃。取 20μL 进样分析，采用外标法定量。

1.2.4 样品预处理和衍生化 大鼠腹腔注射隆朋 50mg/kg 麻醉，在冰面上断头，取海马，称重，加入 9 倍体积的甲醇/水(V/V＝50 ∶50)，手动匀浆后将匀浆液注入 EP 管中；-4℃离心 30min(3000r/min)，上清液倒入另一个 EP 管中低温保存；取海马组织液 40μL，加入 40μL 乙腈，混匀，-4℃离心 10min(12000r/min)，取上清液加入 0.5mol/L $NaHCO_3$ 溶液 40μL，再加入 0.5%(V/V)2,4-二硝基氟苯 20μL，混匀，于恒温水浴锅中衍生 55min(水浴 65℃)，进样 20μL。

1.2.5 线性范围和相关系数 精密量取氨基酸混合标准储备液，用甲醇/水(V/V＝50 ∶50)将储备液分别稀释成 0.01、0.1、0.5、1、10、20、50、100μg/mL的对照液。衍生后各取 20μL 进样测定。

1.2.6 加样回收率测定 将已知浓度的海马组织样品分成 3 份，分别加入等体积 10μg/mL、20μg/mL、50μg/mL 的氨基酸混合标准液，分别进行样品预处理并分析，计算回收率。

1.2.7 精密度测定 ①日内差测定：同一浓度水平的混合标准溶液于 1d 内分别进行 4 次重复进样，测定峰高值和变异系数；②日间差测定：对同一浓度水平的混合标准溶液分 4d 4 次进样，测定峰高值和变异系数。

1.2.8 海马组织样品测定 大鼠海马组织按 1.2.4 方法处理后进样，采用外标法分析，测定 4 种氨基酸类神经递质含量。

2 结果与分析

2.1 4 种氨基酸分离效果

在 1.2.3 色谱条件下，4 种氨基酸得到有效分离，保留时间为：Asp 5.71 min，Glu 7.83min，Gly 14.45min，GABA 15.92min。各峰无干扰及拖尾现象。所得色谱图见图 1 和图 2。

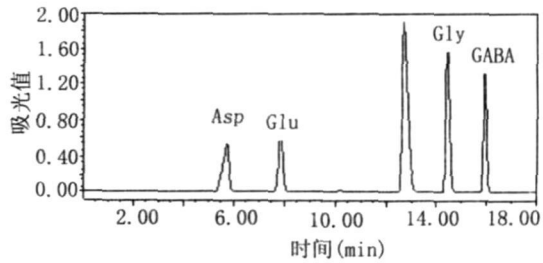

图 1 氨基酸标品色谱

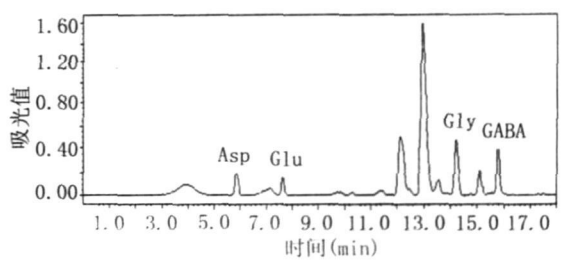

图 2 海马中氨基酸样品色谱

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

2.2 线性范围和相关系数

按1.2.5试验条件进样，以峰面积(Y)与标准品浓度(X)进行线性回归。结果表明，4种氨基酸在0.01～100μg/mL范围内线性关系良好，回归方程Y＝AX＋B，Y为面积，X为各氨基酸的浓度，求得相关系数。结果如表1。

表1 线性方程和相关系数

氨基酸	线性方程	相关系数
Asp	Y＝0.7364X-0.7283	0.9985
Glu	Y＝0.6661X-0.5323	0.9976
Gly	Y＝0.3827X-0.5562	0.9943
GABA	Y＝4.2800X-0.0729	0.9924

2.3 加样回收率

由表2可知，Asp、Glu、Gly和GABA的平均回收率分别为94.80%、93.93%、92.69%和96.74%。其回收率均在90%以上，表明上述色谱条件可靠、检出率较高。

表2 加样回收率测定结果

氨基酸	样品含量(μg/mL)	加入量(μg/mL)	测定量(μg/mL)	回收率(%)
Asp	16.28	10	25.45	96.84
		20	33.86	93.32
		50	62.46	94.23
Glu	20.26	10	28.14	92.99
		20	37.46	93.05
		50	67.28	95.76
Gly	55.38	10	60.47	92.49
		20	69.18	91.78
		50	98.84	93.79
GABA	42.30	10	50.82	97.17
		20	60.02	96.34
		50	89.25	96.70

2.4 精密度

按1.2.7内容进行。结果表明，Asp、Glu、Gly和GABA 4种氨基酸的日内差变异系数分别为2.4%、3.8%、3.2%、3.5%；日间差变异系数2.7%、3.4%、2.9%、3.7%。变异系数均在4.0%以下，表明该检测方法稳定、重现性好。

2.5 海马组织样品测定结果

大鼠海马中4种氨基酸类神经递质含量差别显著，Gly含量最高，Asp含量最低。结果见表3。

表3 大鼠海马中4种氨基酸类神经递质的含量

(x±s，n＝6)

氨基酸	含量(μg/mL)
Asp	15.84±1.34
Glu	20.22±1.73
Gly	55.05±3.66
GABA	42.05±3.20

3 讨论

3.1 流动相的配制

本试验选用醋酸钠缓冲液配制流动相，其浓度为0.05mol/L，如果浓度过高会破坏键合相的稳定性，对色谱柱的损害较大。另外，缓冲液长期不用容易析出结晶，导致细菌繁殖，pH值发生改变，直接影响检测的准确性。所以一定要用低浓度的缓冲液，临用前现配。

3.2 衍生化试剂

本试验采用DNFB作衍生剂，与常规采用OPA作为衍生化试剂相比，操作简便，衍生产物稳定，不需要氨基酸专用色谱柱，采用紫外检测器即可对4种氨基酸类神经递质进行检测。

3.3 衍生反应

在衍生过程中，衍生时间、pH值及衍生剂的比例、水浴温度都会影响测定的结果。衍生时间过长，会导致氨基酸的水解；衍生剂比例过高，会造成衍生峰过大，影响样品的测定。经过多次试验比较，最终确定衍生时间为55min，衍生剂浓度为0.5%(V/V)，水浴65℃时4种氨基酸得到完全分离，衍生产物稳定。

3.4 样品处理

为避免活性下降，采集海马组织时应快速准确，提取、匀浆、离心、取样都要在0～4℃进行，样品-80℃冻存。本试验在海马组织处理过程参照文献[9]的方法，采用3000r/min离心30min和12000r/min离心10min，2次离心使海马组织中的小分子蛋白或肽分离出去，避免杂质残留，影响柱效。

试验建立了大鼠海马组织中4种氨基酸类神经递质RT-HPLC方法，梯度洗脱18min内即可完成分离，洗脱时间稳定，重复性好。方法具有准确、简单、灵敏度高、重现性好、分析时间短等优点，为氨基酸类神经递质的临床检测及相关研究提供了依据。

(下转第124页)

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

3 讨论

Ghrelin 主要由胃的内分泌细胞分泌，随后的研究发现，它在很多方面通过不同的机制发挥作用[3~5]。有报道Ghrelin 在脾、淋巴结等免疫器官或淋巴细胞有表达，通过抑制炎性因子的产生而起免疫调节作用[5,6,8]。但至于胸腺中 Ghrelin 阳性细胞分布情况，是否参与胸腺微环境来对胸腺 T 淋巴细胞发育分化产生影响以及在胸腺的增龄退化过程中起到的作用及其作用机制等一系列问题都有待解决。试验中发现，Ghrelin 在小鼠胸腺中尤其是在胸腺上皮细胞中表达，而胸腺上皮细胞是胸腺微环境最重要的成分，它们通过分泌可溶性分子以及细胞与细胞之间的相互作用，对胸腺 T 淋巴细胞发育分化产生重要的影响。这提示 Ghrelin 作为胸腺微环境的组成部分，参与影响胸腺 T 淋巴细胞的发育和分化。Dixit 报道，Ghrelin 是通过特有的配体－受体模式促进胸腺细胞发育、分化[9]。试验中还发现，不同表型的胸腺上皮细胞的着色程度不同，说明 Ghrelin 在不同表型的胸腺上皮细胞的表达量有差异。胸腺上皮细胞在胸腺中为一个动态的细胞群体，其上皮细胞亚型的生物学特性与泛宿主性调节有关，其功能也有差异[10]。由此推测，胸腺上皮细胞中 Ghrelin 表达量也会影响到胸腺细胞发育分化的能力，但其影响途径有待于进一步研究。

参考文献：

[1] Mukamoto M, Okada T, Kodama H, *et al*. Effects of chicken thymic stromal cells on the growth and differentiation of thymocytes *in vitro*[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1999, 68: 25－37.

[2] Dixit V D, Taub D D. Ghrelin and immunity: a young player in an old field[J]. Experimental Gerontology, 2005, 40: 900－910.

[3] Kojima M, Hosoda H, Date Y, *et al*. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach[J]. Nature, 1999, 402: 656－660.

[4] Ueno H, Yamaguchi H, Kangawa K, *et al*. Ghrelin: a gastric peptide that regulates food intake and energy homeostasis[J]. Regulatory Peptides, 2005, 126: 11－19.

[5] Dixit V D, Schaffer E M, Pyle R S, *et al*. Ghrelin inhibits leptin-and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells[J]. J Clin Invest, 2004, 114: 57－66.

[6] Xia Q, Pang W, Pan H, *et al*. Effects of ghrelin on the proliferation and secretion of splenic T lymphocytes in mice[J]. Regulatory Peptides, 2004, 122: 173－178.

[7] 陈培忠，孙红琰，云中杰，等. 氟对小鼠胸腺及上皮细胞形态与功能的影响[J]. 中国地方病学杂志，2005，24(1)：21－24.

[8] Hattori N, Saito T, Yagyu T, *et al*. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86: 4284－4291.

[9] Dixit V D, Yang H, Sun Y, *et al*. Ghrelin promotes thymopoiesis during aging[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2007, 117: 2778－2790.

[10] Manley N R. Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation [J]. Semin Immuno, 2000, 12(5): 421－428.

（上接第 121 页）

参考文献：

[1] Fang Xu, Paolo Sarti, Jin Zhang, *et al*. Halothane and isoflurane alter calcium dynamics in rat cerebroeortical synaptosomes[J]. Anesthesia & Analgesia, 1998, 87: 701－710.

[2] Lingamaneni R, Birch M L, Hemmings H C. Widespread inhibition of sodium channel-dependent glutamate release from isoluted nerve terminals by isoflurane and propofol[J]. Anesthesiology, 2001, 95(6): 1460－1466.

[3] Martine C, Daniel L, Andre P. Neurochemical characterization of dopaminergic neurons in human striatum[J]. Parkinsonism Relat Disord, 2005, 11(5): 277－286.

[4] 张惠，徐礼鲜，计根林，等. 异丙酚麻醉时对人脑内氨基酸递质水平的变化[J]. 华南国防医学杂志，2005，19(2)：1－3.

[5] 哈里逊. 哈里逊内科学[M]. 赵华月，译. 北京：人民卫生出版社，1994.

[6] 王铁华. 血液中氨基酸的 RP-HPLC 测定[J]. 安徽医药，2001，5(3)：216－217.

[7] 郭燕舞，蔡颖谦，张世忠，等. HPLC 法检测 PVS 患者脑脊液中氨基酸类神经递质[J]. 中华神经医学杂志，2004，3(4)：251－253.

[8] 刘鸿洲，尤瑞琛. 2，4-二硝基氟苯柱前衍生法测定氨基酸的改进[J]. 亚热带植物通讯，1999，28(1)：47－50.

[9] 刘焕奇. 犬用复合麻醉剂——QMB 的实验研究[D]. 哈尔滨：东北农业大学，2001.

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