

HPLC 测定大鼠海马中谷氨酸、 γ -氨基丁酸的含量

朱玲英, 孔铭, 彭蕴茹, 王佩娟(江苏省中医药研究院, 江苏省现代中药制剂工程技术研究中心, 南京 210028)

摘要: 目的 建立了邻苯二甲醛(OPA)柱前衍生高效液相荧光色谱法检测大鼠海马中谷氨酸(GLU)、 γ -氨基丁酸(GABA)含量的方法。方法 采用 Alltima C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 流动相为 50 mmol·L⁻¹ 乙酸钠(pH 6.8)、甲醇、四氢呋喃梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹。激发波长(λ_{Ex})338 nm, 发射波长(λ_{Em})425 nm。结果 GLU、GABA 线性范围分别为 1.03~20.6 μ g·mL⁻¹ ($r=0.999\ 2$)和 1.13~22.6 μ g·mL⁻¹ ($r=0.999\ 7$); 当信噪比为 3 时, GLU 和 GABA 的检出限分别为 5.27×10^{-4} μ g·mL⁻¹ 和 7.35×10^{-4} μ g·mL⁻¹; 测得精密度 RSD 分别为 3.4%和 3.5%; 加样回收率分别为 90%~96%, 85%~91%。结论 本方法简便、准确、灵敏, 特异性强, 重复性好, 适用于海马中 GLU 和 GABA 的含量测定。

关键词: 谷氨酸; γ -氨基丁酸; 邻苯二甲醛; 高效液相色谱法; 大鼠海马

中图分类号: R927.2; R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2009)08-0654-03

Study on the Determination of Glutamic Acid and γ -Aminobutyric Acid in Hippocampus of Rat by HPLC

ZHU Lingying, KONG Ming, PENG Yingru, WANG Peijuan (Jiangsu Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the content of glutamic acid and γ -aminobutyric acid in hippocampus of rat by O-phthalaldehyde(OPA) pre-column derivatization high performance liquid chromatograph-fluorescence (HPLC-FLU). **METHODS** The separation and determination were carried out by linear gradient elution under following conditions: Alltima C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μ m)column, 50 mmol·L⁻¹ acetic acid solution (pH 6.8), methanol and trifluorofuran as mobile phase, flow-rate was 1.0 mL·min⁻¹. The fluorescence excitation and emission wavelengths were set at λ_{Ex} 338 and λ_{Em} 425 nm, respectively. **RESULTS** The linear range of the method was 1.03-20.6 μ g·mL⁻¹ ($r=0.999\ 2$) for glutamic acid(Glu) and 1.13-22.6 μ g·mL⁻¹ ($r=0.999\ 7$) for γ -aminobutyric acid(GABA). The detection limits of GLU and GABA were 5.27×10^{-4} μ g·mL⁻¹, and 7.35×10^{-4} μ g·mL⁻¹, respectively, when the ratio of signal to noise was 3. The inter-assay precisions were 3.4% and 3.5%, respectively. The recoveries were in the range of 90%-96% and 85%-91%. **CONCLUSION** The method is simple, sensitive, reliable and has strong specificity and good repetition. It is suitable for the content determination of GLU, GABA in hippocampus of rat by HPLC.

KEY WORDS: glutamic acid; γ -aminobutyric acid; O-phthalaldehyde; HPLC; hippocampus of rat

中枢神经递质是调节机体生理活动的重要物质基础,特别是中枢神经系统中的兴奋性氨基酸(谷氨酸, GLU)和抑制性氨基酸(γ -氨基丁酸, GABA)均广泛存在于脊椎动物脑内,在外周神经和其他组织中含量很低,其对机体正常生理功能起着重要的调节作用^[1-3]。因此定量测定 GLU、GABA 含量对研究神经精神疾病、遗传性疾病、脑血管病以及发病机制的研究具有重要的价值。测定 GLU、GABA 方法有:高效液相色谱法、薄层扫描法、气相色谱-质谱联用法、其中高效液相色谱法是最常用的方法^[4]。本实验采用 GLU、GABA 与邻苯二甲醛(OPA)柱前衍生产生较强荧光活性衍生化产物利用高效液相荧

光色谱法检测,本试验建立了 GLU、GABA 稳定、快速、灵敏的含量测定方法并用于大鼠海马组织中该类物质的测定,为疾病的发病机制研究和新药研发提供依据。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

美国 Waters 高效液相色谱仪(510 泵, 474 荧光检测器,717控稳自动进样器及柱温控箱等);Empower 色谱数据工作站;瑞士 Mettler 万分之一、十万分之一及百万分之一电子天平;美国 Milli-Q 纯水器;三洋 MDF-382E 超低温冰箱;Backman 21R 高速冷冻离心机;上海金达生化仪器厂 XUF-1 高速分散器。

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2007174)

作者简介: 朱玲英,女,副主任技师 Tel: (025)85639640

E-mail: zhuly818@163.com

谷氨酸(GLU)对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号:140690-200401,纯度:99%); γ -氨基丁酸(GABA)对照品(美国 Sigma 公司,批号:1290512 52107081,纯度:99.5%);甲醇为江苏汉邦科技有限公司的色谱纯甲醇;2-巯基乙醇(040D0504, Amresco 分装),其他试剂均为分析纯。

1.2 色谱条件

色谱柱: Alltima C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μ m), 流动相: 50 mmol·L⁻¹ 乙酸钠(pH 6.8)-甲醇-四氢呋喃(A: 82:17:1; B: 22:77:1), 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 梯度洗脱见表 1。 λ_{Ex} : 338 nm; λ_{Em} : 425 nm; 柱温 30 $^{\circ}$ C。

表 1 梯度洗脱程序表

Tab 1 The gradient of mobile phase

时间/min	A/%	B/%
1	99	1
2	99	1
15	89	11
16	60	40
28	30	70
29	30	70
37	20	80
40	40	60
42	99	1
57	99	1

1.3 溶液配制

1.3.1 对照品溶液的配制 精密称取 GLU 对照品适量,以流动相制成 0.206 mg·mL⁻¹的对照品贮备液,精密吸取贮备液适量用流动相分别制成 20.6, 10.3, 5.15, 3.03, 1.03 μ g·mL⁻¹的 1~5 号对照品溶液;精密称取 GABA 对照品适量,以超纯水制成 0.226 mg·mL⁻¹的对照品贮备液,精密吸取贮备液适量用流动相分别制成 22.6, 11.3, 5.65, 3.39, 1.13 μ g·mL⁻¹的 1~5 号对照品溶液。

1.3.2 海马脑组织匀浆样品的制备 取大鼠海马组织,称湿重,以 1:10 的比例加入 0.4 mol·L⁻¹的高氯酸(即每 100 mg 脑组织加 1.0 mL 0.4 mol·L⁻¹的高氯酸)。冰浴下充分匀浆,冰浴沉淀 30 min,于 4 $^{\circ}$ C、10 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上清液,每 1 mL 上清液加 0.75 mL 4%的碳酸氢钠溶液,混匀后,于 4 $^{\circ}$ C、3 000 r·min⁻¹离心 5 min,取上清液,过 0.45 μ m 滤膜,分装,于-80 $^{\circ}$ C 保存待用。

1.4 衍生反应

1.4.1 对照品溶液衍生 称取 OPA 27 mg,加 0.5 mL 的甲醇溶解后,加入 20 μ L 的 2-巯基乙醇和四硼酸钠缓冲液(pH 9.18)稀释并定容至 5 mL 作为衍生试剂,低温避光保存,可稳定使用 2 d。取 GLU 对照品溶液 32 μ L, GABA 对照品溶液 20 μ L,于进样瓶中加入衍生试剂 26 μ L,四硼酸钠缓冲液(pH 9.18)520 μ L 混匀,温度控制在 20 $^{\circ}$ C 下静置 3 min 后进样。

1.4.2 供试液衍生 取“1.3.2”项下方法处理的脑匀浆样品溶液 12 μ L,于进样瓶中加入衍生试剂 6 μ L,四硼酸钠缓冲液(pH 9.18)480 μ L,混匀,温度控制在 20 $^{\circ}$ C 下静置 3 min 后进样。

2 结果

2.1 对照品液和样品液的色谱分离图

在选定的色谱条件下,分别按“1.4”项下方法处理的对照品液和样品液色谱图见图 1,从图中可知, GLU, GABA 分别在 12, 31 min 出峰,峰形好,无杂质峰干扰。

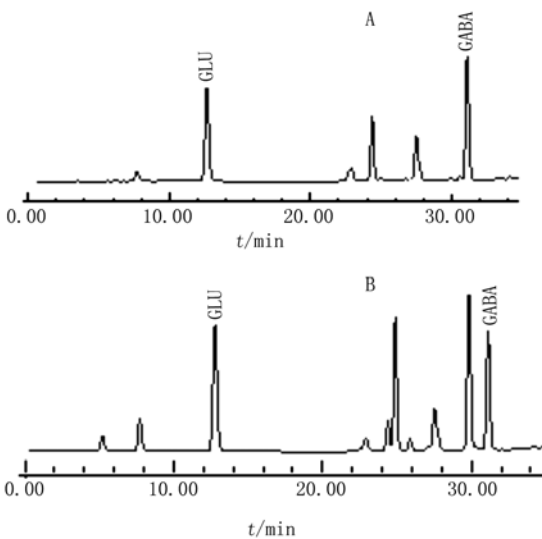


图 1 GLU、GABA 衍生化后高效液相色谱图

A-对照品液; B-大鼠海马样品液

Fig 1 HPLC Chromatograms of GLU and GABA

A-standard; B-sample

2.2 线性范围、检出限

分别取 GLU、GABA 对照品溶液(1~5 号),按“1.4.1”项下方法处理,在上述色谱条件下各进样 10 μ L,以峰面积 Y 为纵坐标、以进样浓度 $X(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 为横坐标作图,检测线性范围,峰面积与进样浓度成良好的线性关系;以信噪比为 3 时,计算检出限,结果见表 2。

表 2 线性范围、回归方程、相关系数及检出限

Tab 2 Parameters of quantitative analysis

氨基酸	线性范围 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	线性回归方程	相关系数	检出限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
GLU	1.03~20.6	$Y=2.72\times 10^5X-1.89\times 10^5$	0.999 2	5.27×10^{-4}
GABA	1.13~22.6	$Y=2.58\times 10^5X-1.61\times 10^5$	0.999 7	7.35×10^{-4}

2.3 仪器精密度及重复性试验

在上述色谱条件下,取浓度为 $10.3\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 GLU、 $11.3\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 GABA 对照品液按“1.4.1”项下方法处理,连续测定 5 次,测得精密度 RSD 分别为 3.4 %和 3.5 %,表明仪器精密度良好。

取同一样品 5 份,按“1.4.2”项下方法处理,进样,考察样品在衍生化后的 GLU 和 GABA 峰面积的日内精密度,结果表明, GLU、GABA 衍生物的峰面积相对标准偏差(RSD)分别为 4.2%和 5.4%,表明试验方法具有良好的重复性。

2.4 回收率试验

分别取浓度为 $20.5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 GLU 对照品溶液 12, 14, 20 μL ; 浓度为 $10.8\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 GABA 对照品溶液 8, 10, 15 μL 加入 6 份脑匀浆液样品中(平行 5 份),按“1.4.2”项下方法处理,样品控制总体积测定 GLU、GABA 含量,以计算方法回收率,结果见表 3。

表 3 回收率测定结果($n=5$)

Tab 3 Results of recovery test($n=5$)

氨基酸	加入量 / ng	平均测得量 / ng	平均回收率 /%	RSD /%
GLU	246	568.7	90.30 ± 3.7	4.06
	287	621.2	95.69 ± 2.5	2.62
	410	733.66	94.40 ± 2.9	3.10
GABA	86.4	219.68	85.05 ± 4.0	4.70
	108	235.98	83.13 ± 4.8	5.75
	162	295.04	91.88 ± 6.4	6.94

2.5 样品测定结果

用本法测定 20 份大鼠海马组织中 GLU、GABA 含量,样品均能基线分离,测定结果见表 4。

表 4 样品测定结果($n=20$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Results of sample determination($n=20$, $\bar{x}\pm s$)

氨基酸	含量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$
GLU	2.53 ± 0.33
GABA	5.46 ± 0.22

3 讨论

3.1 衍生条件的优化

本实验建立了适用于检测大鼠海马中 GLU、GABA 物质的高效液相-荧光色谱检测方法。在探索

该样品测定方法时,笔者观察了样品提取 2 次,第 2 次提取未检测到 GLU 和 GABA 成分,因此样品制备只提取 1 次。在进行海马组织样品处理时要快,待测样品要保存在 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱内,衍生化各步所用的时间要严格掌握,这对得到良好的分析结果至关重要。OPA 能与伯胺类以及大多数 α -氨基酸产生灵敏的荧光产物^[5],其衍生步骤简单,反应速度快,剩余试剂不干扰测定,因此在柱前衍生试剂中以 OPA 的应用最为广泛。但 OPA 浓度过高,易引起其他氨基酸杂峰高而多。本实验观察的是生物样品,为选择样品与衍生剂的合适条件,笔者在控制衍生化反应温度在 $20\ ^\circ\text{C}$ 的条件下比较了样品:衍生剂的不同比例,观察了 1:1、2:1 和 3:1,发现比例为 2:1 时反应效果最好。以 2:1 为例分别比较 1, 2, 3, 4 min 不同的衍生时间,经比较衍生 3 min 后进样为宜,时间过长易引起其他杂峰很快出现且严重影响 GLU 和 GABA 的分离效果,从图 1 可见 GLU、GABA 达到基线分离,不受其他峰干扰。2-巯基乙醇能加强荧光吸收^[6],故本实验衍生剂中加入该试剂,以利于提高检测灵敏度。

3.2 流动相条件的选择

在选择流动相时,比较了 $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸钠 (pH 6.8)、甲醇和四氢呋喃,不同的有机溶剂比例、采用恒速和梯度洗脱,结果以本实验所述的流动相比例并以梯度洗脱,使各成分均能基线分离与杂峰没有干扰,由此确定为本实验分离条件。

REFERENCES

- [1] HUANG X, HUANG L F, GUO F Q, et al. The determination of γ -aminobutyric acid in human plasma and cerebrospinal fluid by high performance liquid chromatography [J]. J Anal Sci(分析科学学报), 2006, 22(1): 13-16.
- [2] CHENG X X, LI D, LV J X, et al. Determination of γ -aminobutyric acid and glutamic acid in human cerebrospinal fluid by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Chromatogr(色谱), 1997, 15(3): 237-239.
- [3] CHAO J P, CHUI Y, GAO Y. Determination of aspartic acid, glutamic acid, glycine and γ -aminobutyric acid in human blood serum by RP-HPLC [J]. J Dalian Med Univ (大连医科大学学报), 2007, 29(4): 410-411.
- [4] LU X, LU J, LIU C W, et al. Determination of D-aspartic acid and d-glutamic acid in midbrain of parkinsons disease mouse by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2007, 35(8): 1151-1154.
- [5] SUN Y Q, HU Y Z. Analytical Chemistry (分析化学) [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2006: 293.
- [6] GU Y J, NI W, BAO W L, et al. Determination of amino acids neurotransmitters by reversed phase high performance liquid chromatography with fluorescence analysis [J]. J Shanghai Med Univ(上海医科大学学报), 1995, 22(3): 210-212.

收稿日期: 2008-10-16