

改良 2, 4-二硝基苯肼法测定脑内源甲醛*

苏涛^{1, 2)} 魏艳¹⁾ 赫荣乔^{1)**}

(¹⁾中国科学院生物物理研究所, 脑与认知科学国家重点实验室, 北京 100101; (²⁾中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 内源甲醛代谢失衡所造成的脑慢性损伤被认为是衰老过程中记忆丢失的危险因素之一, 因此, 有必要准确测定脑内不同区域甲醛的含量为相关研究提供参考. 作者通过 2, 4-二硝基苯肼(2, 4-DNPH)偶联高效液相色谱(UV-HPLC), 测定了家猪脑额叶、顶叶、颞叶、枕叶、海马、小脑、脑干内源甲醛含量(75.5~83.4 $\mu\text{mol/kg}$). 采用 10%三氯乙酸处理脑组织匀浆(pH=1.0), 不但可以避免蛋白质及其他分子的干扰, 还可以省略现有方法中的萃取步骤, 且提高了测试的灵敏度($P < 0.05$). 该方法的回收率约 95.96%~102.04%, 相对标准偏差($n=5$)小于 10%. 结果表明, 改良 2, 4-DNPH 法用于脑内源甲醛的测定, 其操作简便、可信度高.

关键词 定量分析, 内源甲醛, 2, 4-二硝基苯肼, 高效液相色谱, 猪脑, 认知功能损伤

学科分类号 Q42, O65

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00407

甲醛(formaldehyde, FA)普遍存在于环境中. 当空气中含量达到约 0.1 mg/m^3 时, 就会引起人的不适; 达到约 30 mg/m^3 时, 就可能危及生命. 机体内也存在甲醛, 不同细胞中不同细胞器甲醛的含量不同^[1]. 甲醛来自于 DNA、组蛋白的脱甲基化^[2], 某些细胞器(线粒体、内质网、过氧化物体等)代谢过程^[3]. 甲胺、多胺等能通过氨基脒敏感性胺氧化酶(semicarbazidesensitive amine oxidase, SSAO)的作用生成甲醛^[4]. 脂质过氧化是体内产生甲醛的另一途径^[5]. 甲醛暴露可引起大鼠空间认知功能障碍^[6]. 内源甲醛异常升高, 可导致中枢神经系统等损伤, 表现为学习、记忆、情感等异常^[1, 7].

神经系统特定蛋白质(amyloid- β 、Tau 等)的异常修饰、错误折叠及其在脑内的聚积是神经退行性疾病共同的病理特征^[8-9], 如异常磷酸化^[10]、糖基化^[11-12], 硝基化^[13]等所导致的蛋白质聚积. 甲醛能够与蛋白质侧链 α -/ ϵ -氨基反应, 产生羟甲基化修饰物^[14-15], 导致蛋白质错误折叠和聚积^[16]. 近年来, 内源甲醛与老年认知功能损伤的关系受到越来越多的关注^[17-18]. 为了研究内源甲醛对认知功能的损伤, 就需要测定体内, 特别是脑内甲醛的含量^[19].

国内外同行已经建立了一些分析甲醛的方法^[20-21], 绝大多数用于环境中甲醛的测定. 其中, 比色法广泛用于空气中甲醛的检测^[22]. 气相色谱-

质谱联用可用于环境和生物样品中甲醛的测定^[23]. 到目前为止, 各脑区甲醛的含量测定尚未见报道.

虽然 2, 4-二硝基苯肼(2, 4-dinitrophenylhydrazine, 2, 4-DNPH)已经用于液态甲醛的测定^[24], 但对于含蛋白质及其他分子较高的脑组织, 该方法的使用需要进行优化, 即清除蛋白质及其他分子的干扰, 从而提高 2, 4-DNPH 与甲醛的反应效率和灵敏度. 现有 2, 4-DNPH 法萃取的步骤^[24], 即把甲醛与 2, 4-DNPH 的反应衍生物 2, 4-二硝基苯腙(2, 4-dinitrophenylhydrazone, FA-DNPH)从反应液中萃取出来, 以避免蛋白质及其他分子的干扰. 这一步骤虽然纯化了 FA-DNPH 衍生物, 但也造成了产物的损失, 导致灵敏度下降. 本文通过 10%三氯乙酸处理脑组织匀浆液(pH=1.0), 采用 2, 4-二硝基苯肼偶联高效液相色谱测定猪脑内源甲醛含量.

* 国家重点基础研究发展计划资助项目(2010CB912303), 国家重点基础研究发展计划(973)(2012CB911004), 中国科学院创新方向项目(CAS-KSCX2-YW-R-119)及创新预研项目(KSCX2-YW-R-256), 国家自然科学基金面上项目(30970695)和强生集团科技公司基金(GJHZ1131)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-64889876, E-mail: herq@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2011-11-08, 接受日期: 2011-11-24

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜成年健康猪脑(家猪, *Sus domesticus*, 9~10月龄)购于北京市大红门屠宰场(屠宰前经过检疫), 乙腈(液相色谱级纯, Fisher Scientific, 美国), 2,4-二硝基苯肼(分析纯, 北京化学试剂研究所), 甲醛(分析纯, 美国 Sigma-Aldrich 公司), 三氯乙酸(分析纯, 西陇化工股份有限公司), 二氯甲烷(分析纯, 北京化工厂), 氯化钠(分析纯, 西陇化工股份有限公司), 乙酸(分析纯, 西陇化工股份有限公司).

1.2 试剂

2,4-二硝基苯肼乙腈溶液(1.0 g/L): 称取 2,4-二硝基苯肼 100 mg, 溶于乙腈定容至 100 ml.

10%三氯乙酸溶液: 称取三氯乙酸 10 g, 用超纯水定容至 100 ml.

1.3 样品制备

脑样品的制备: 取不同部位脑组织各 1 g (图 1a, b, c), 加入 10%三氯乙酸溶液(10 ml), 组织匀浆、离心(13 000 r/min, 4℃, 30 min). 取 0.4 ml 上清、0.1 ml 2,4-二硝基苯肼(1 g/L)、0.5 ml 乙腈. 混匀后, 60℃保温 30 min. 离心(13 000 r/min, 4℃, 10 min), 取上清用于 HPLC 分析.

保留萃取步骤(对照): 加入 2 倍体积的二氯甲烷, vortex 涡旋振荡 1 min, 离心(3 000 r/min, 室温, 10 min), 取下层的萃取液, 置于具塞玻璃管中. 80℃水浴 1~2 h, 待萃取液全部蒸干后, 冷却到室温加入 1 ml 乙腈, vortex 涡旋振荡 1 min, 离心(3 000 r/min, 室温, 10 min), 取上清用于 HPLC 分析.

1.4 高效液相色谱条件

LC-20A 高效液相色谱仪 UV-HPLC, SPD-M20A 二极管阵列检测器(岛津公司, 日本). 色谱柱: LiChrospher 100 RP-18(250 mm × 4.6 mm × 5 μm) (Merck 公司, 德国); 流动相: 乙腈: 超纯水 = 65:35 (v/v), 超声脱气; 流速: 0.8 ml/min; 进样量: 20 μl; 检测波长: 355 nm; 柱温: 35℃.

1.5 最佳 pH 值的确定

为了提高 2,4-二硝基苯肼法的灵敏度, 配制 pH 1~5 的醋酸钠反应缓冲液, 在不同酸度条件下, 通过 HPLC 检测结果的优劣来确定反应的最适 pH 值.

1.6 标准曲线的绘制

标准品制备: 取 37% 甲醛溶液, 配制成 0.1 mol/L 甲醛母液, 用超纯水梯度稀释成 30 μmol/L、20 μmol/L、10 μmol/L、7.5 μmol/L、5.0 μmol/L、2.5 μmol/L 不同浓度甲醛溶液, 作为标准溶液备用 (每个浓度测试次数 $n = 5$). 取平均值. 以峰面积(y), 样品浓度(x)作为甲醛工作曲线外标方程: $y = 10654x - 10111$.

1.7 保留时间的确定

通过甲醛标准品与 2,4-DNPH 反应, 确定其反应产物 FA-DNPH 在 HPLC 洗脱过程中的保留时间, 从而判别脑组织样品中的甲醛洗脱峰.

2 结果

2.1 可靠性

不同酸度条件下测定 FA-DNPH 衍生物(355 nm)吸收的结果显示: 当 pH=1.0 时, 反应最完全, HPLC 测定的吸收峰最高(图 1d), 其甲醛的吸收峰值是 pH=3.0 条件下的 5 倍左右. 但当 pH < 1.0 时, 则出现 HPLC 洗脱基线不稳定. 因此, 选择 10% TCA(pH=1.0)作为反应条件, 进行标准曲线的绘制. 如图 1f 所示, FA-DNPH 衍生物的光吸收与甲醛浓度之间为线性相关($r^2=0.999$). 脑组织样品的反应衍生物 FA-DNPH 在 HPLC 分析过程中的保留时间与标准甲醛一致, 均为 6.8 min(图 1e). 在实验条件下, HPLC 可以清晰地分辨脑组织的内源甲醛(图 1g).

2.2 重复性

2.2.1 精密度. 取同一样品液, 按上述条件测定甲醛, 其测定结果有较好的重复性(表 1). 脑组织研磨液中甲醛浓度单位为 μmol/L, 1 g 脑组织用 10 ml TCA 溶液研磨, 即脑组织浓度为 0.1 kg/L. 表 1 将脑组织甲醛浓度单位均换算成 μmol/kg.

Table 1 The precision and accuracy of the assay of porcine brain formaldehyde

1	2	3	4	5	Mean ¹⁾	RSD/%
74.3 μmol/kg	75.1 μmol/kg	74.3 μmol/kg	74.6 μmol/kg	74.2 μmol/kg	74.5 μmol/kg	0.49

¹⁾ Formaldehyde concentration is in μmol per kilogram (μmol/kg) of fresh brain tissues. The concentration of formaldehyde from brain tissues measured with HPLC ($n = 5$). No significant difference among the values ($P > 0.05$).

2.2.2 日内差. 相同条件下, 取 5 份不同的脑提取液, 每隔 1 h, 检测一次. 检测间隙样品置于室温. 不同时间点的平均值见表 2. 结果显示, 此方法虽然取消了萃取步骤, 但在同一天内检测 FA-DNPH 衍生物的量基本稳定, 即该方法可以用于 8 h 内大量样品的检测.

Table 2 Concentrations of porcine brain formaldehyde at different time points

0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	Mean	RSD/%
84.2 μmol/kg	84.5 μmol/kg	85.2 μmol/kg	85.3 μmol/kg	85.5 μmol/kg	85.9 μmol/kg	85.8 μmol/kg	85.8 μmol/kg	85.3 μmol/kg	0.74

Data in means assayed at each time point (*n* = 5). No significant difference among the values on different hours (*P* > 0.05).

2.2.3 日间差. 按上述方法制备脑组织样品 FA-DNPH, 隔 24 h 检测. 检测间隙样品置于室温. 结果显示, 反应产物随放置的时间延长(天数增加), 其测定平均值有所上升(表 3), 但没有显著性差异. 提示: 采用 HPLC 测定脑内源甲醛时, 在 FA-DNPH 衍生物形成后, 24 h 内进行测定为佳.

Table 3 Changes in the concentrations of porcine brain formaldehyde at different days

1d	2d	3d	4d	Mean	RSD/%
86.3 μmol/kg	87.9 μmol/kg	90.4 μmol/kg	96.9 μmol/kg	90.4 μmol/kg	5.18

Data in means (*n* = 5). No significant difference among the values on different days (*P* > 0.05).

2.3 灵敏度与回收率

吸取已测定过甲醛的脑抽提液, 分别加入甲醛标准品(100 μmol、200 μmol、300 μmol), 进行甲醛的测定. 计算公式: 回收率 = (测出量-本底)/ 标准加入量(表 4). 结果显示, 本方法样品损失小, 经过 10%三氯乙酸处理的样品, 并省略萃取步骤的改良方法, 其灵敏度较现有的 2, 4-DNPH 法有显著提高(*P* < 0.05, 图 1h).

Table 4 Recoveries in the assay of porcine brain formaldehyde with modified 2, 4-DNPH with HPLC

Method	Absorption area	Input/(μmol•kg ⁻¹)	Mean/(μmol•kg ⁻¹)	Recoveries/%	RSD/%
Without extraction ¹⁾	92 122.1	100	95.9	95.96	2.47
	199 862.6	200	197.1	98.54	4.47
	315 154	300	305.3	101.77	5.71
Extraction ¹⁾	88 608.5	100	100.9	100.85	3.00
	177 138	200	204.1	102.04	6.65
	258 968.5	300	299.5	99.83	5.43

¹⁾Data in means assayed with different methods (*n* = 5). Significant difference was shown between the two methods with and without extraction (**P* < 0.05).

2.4 不同脑区内源甲醛浓度

分别取家猪脑(*n* = 5)顶叶、额叶、颞叶、枕叶、海马、小脑及脑干(图 1a, b, c), 检测其甲醛含量(表 5). 健康家猪脑内不同区域的内源甲醛平均含量较为相近.

Table 5 Concentrations of formaldehyde in different regions of porcine brain

Brain region	Mean/(μmol•kg ⁻¹)	<i>n</i>	RSD/%
Parietal lobe	83.4	5	7.55
Frontal lobe	78.2	5	3.84
Temporal lobe	75.5	5	6.89
Occipital lobe	79.6	5	4.77
Hippocampus	79.0	5	3.16
Cerebellum	81.1	5	4.69
Brainstem	79.9	5	9.01

Data in means assayed with the regions of porcine brain (*n* = 5). No significant difference among the values on seven regions of porcine brain (*P* > 0.05).

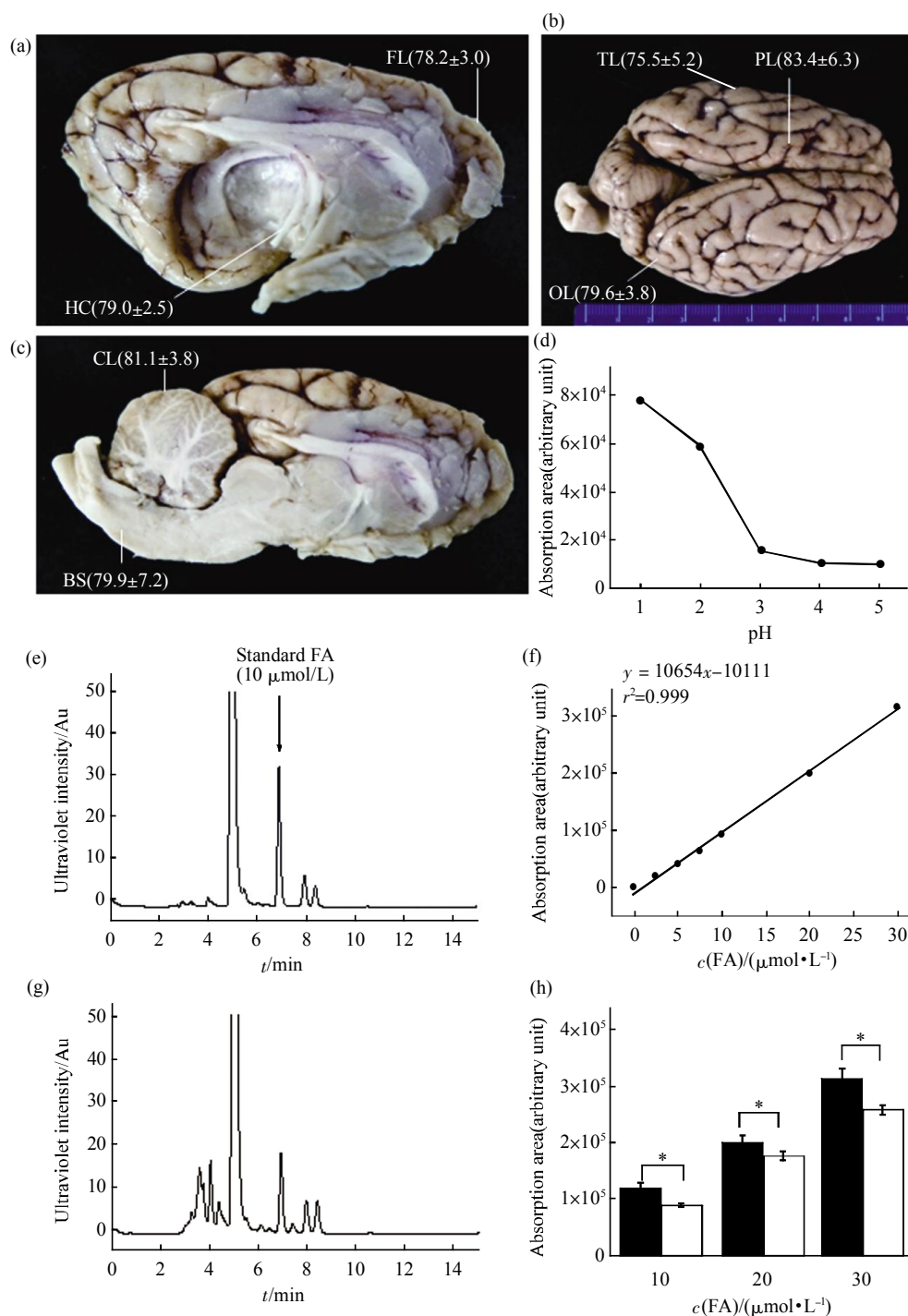


Fig. 1 Assays of endogenous formaldehyde in the porcine brain with 2, 4-DNPH through UV-HPLC

The brain tissues ($n=5$), parietal lobe (PL), frontal lobe (FL), temporal lobe (TL), occipital lobe (OL), hippocampus (HC), cerebellum (CL) and brainstem (BS), were employed for measurements of endogenous formaldehyde (FA), as indicated (a, b, c, FA concentration was in μmol per kilogram of fresh brain tissues). Changes in the absorbance of FA-DNPH at different pH values (d). The tissues were homogenized in the presence of 10% trichloroacetic acid and centrifuged (13 000 r/min, 4°C , 30 min). 1.0 g/L DNPH were added to the supernatants (0.4 ml) individually and the samples were incubated at 60°C for 30 min. Aliquots (20 μl) were taken for measurements of the brain formaldehyde (e) through a C18-column on a UV-HPLC. The ordinate represents the absorbance of FA-DNPH (absorbance unit). Pure formaldehyde was used as control (g) to make the standard curve for the formaldehyde concentration ($r^2=0.999$, f). Methodological sensitivities without extraction of different formaldehyde concentrations are significantly higher than that with extraction (h). * $P < 0.05$. ■: Without extraction; □: Extraction.

3 讨 论

甲醛不但广泛存在于人类生活的环境中, 也存在并产生于我们的体内. 最近研究显示, 随着衰老 (大于 65 岁), 人体内甲醛的水平逐渐升高^[7], 并与认知功能损伤的程度呈正相关^[9]. 老年痴呆的致病因素十分复杂^[25], 国内外学者在相关领域开展了广泛的研究^[26-27], 从不同角度探索痴呆的发病机制, 如淀粉样蛋白聚集^[28-30]、氧化应激^[31-33]、胶质细胞功能异常^[34-35]、离子通道代谢失调^[36-37]等. 在神经退行性疾病的检测方面, 已经有报道测定脑脊液等异常磷酸化 Tau 蛋白^[29]以及一些小分子定量分析^[24]. 对住院病人的调查表明, 约有 30%~40%老年痴呆病人伴有尿甲醛的异常升高^[38]. 因此, 在研究神经退行性疾病过程中, 需要重视观察内源甲醛浓度的变化. 在采用模型动物进行研究的同时, 测定其脑内甲醛水平, 有助于我们理解其认知功能损伤的原因和机制. 本文通过改良 2, 4-DNPH 法, 测定了成年健康猪脑内源甲醛含量, 结果显示, 成年健康猪脑内源甲醛的平均含量为 75.5~83.4 $\mu\text{mol/kg}$, 不同脑区甲醛的平均含量未见显著性差异.

荧光偶联 HPLC 测定脑内源甲醛的浓度, 其所得数值较 2, 4-DNPH 显色法测得的结果偏高, 不同方法对生物样品内含物的分析出现不同的结果, 是临床检验中经常见到的现象. 尽管荧光偶联 HPLC 的灵敏度较高, 但受样品背景荧光的干扰较大, 这可能是荧光偶联 HPLC 法所测定甲醛浓度值较高的原因.

现有 2, 4-DNPH 显色法用于甲醛测定的分辨率较低, 直接用于脑组织内甲醛的测定误差较大. 本文介绍的改良 2, 4-DNPH 偶联 HPLC 的方法, 可以准确测定脑组织中的甲醛. 如图 1 所示, 在确定了最适 pH=1.0 的条件下, 采用三氯乙酸处理脑组织中的蛋白质及其他生物分子的同时, 为甲醛与 2, 4-DNPH 的衍生化提供了一个较高的酸性环境. 在该条件下, 355 nm 的 FA-DNPH 衍生物吸收峰较 pH=3.0 的吸收峰提高 5 倍左右. 实验表明, 如果再降低反应液的 pH 值, 则 UV-HPLC 测试基线出现不稳的情况, 如果调高 pH 值 (如传统 2, 4-DNPH 法, pH=2~3), 导致甲醛与 2, 4-DNPH 之间反应不完全, 吸收峰值小, 系统分辨率低.

采用 10%三氯乙酸处理脑样品提高 FA-DNPH 衍生物的分辨率的原因, 可能是由于在强酸处理后, 能够有效避免脑组织中蛋白质及其他分子的干

扰, 同时在操作中省略了“萃取步骤”, 减少了原有萃取过程所损失的 FA-DNPH 衍生物, 从而提高了测定的灵敏度.

致谢 感谢卢静博士对改良方法的技术建议.

参 考 文 献

- [1] 童志前, 万 有, 罗文鸿, 等. 内源性甲醛及其相关人类重大疾病. 自然科学进展, 2008, **18**(11): 1201-1210
Tong Z Q, Wan Y, Luo W H, *et al.* Prog Natural Science, 2008, **18**(11): 1201-1210
- [2] Kalasz H. Biological role of formaldehyde, and cycles related to methylation, demethylation, and formaldehyde production. Mini Rev Med Chem, 2003, **3**(3): 175-192
- [3] Denk H, Moldeus P W, Schulz R A, *et al.* Hepatic organelle interaction. IV. Mechanism of succinate enhancement of formaldehyde accumulation from endoplasmic reticulum N-dealkylations. J Cell Biol, 1976, **69**(3): 589-598
- [4] Lyles G A. Mammalian plasma and tissue-bound semicarbazide-sensitive amine oxidases: biochemical, pharmacological and toxicological aspects. Int J Biochem Cell Biol, 1996, **28**(3): 259-274
- [5] Gulec M, Songur A, Sahin S, *et al.* Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation products in heart tissue of subacute and subchronic formaldehyde-exposed rats: a preliminary study. Toxicol Ind Health, 2006, **22**(3): 117-124
- [6] Tong Z, Zhang J, Luo W, *et al.* Urine formaldehyde level is inversely correlated to mini mental state examination scores in senile dementia. Neurobiol Aging, 2011, **32**(1): 31-41
- [7] 童志前, 韩婵帅, 苗君叶, 等. 内源性甲醛异常蓄积与记忆衰退. 生物化学与生物物理进展, 2011, **38**(06): 575-579
Tong Z Q, Han C S, Miao J Y, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2011, **38**(06): 575-579
- [8] Stefani M, Dobson C M. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. J Mol Med, 2003, **81**(11): 678-699
- [9] Zhou J. Recent progress in neurodegenerative disorder research in China. Sci China Life Sci, **53**(3): 348-355
- [10] Geschwind D H. Tau phosphorylation, tangles, and neurodegeneration: the chicken or the egg?. Neuron, 2003, **40**(3): 457-460
- [11] Chen L, Wei Y, Wang X, *et al.* D-Ribosylated Tau forms globular aggregates with high cytotoxicity. Cell Mol Life Sci, 2009, **66**(15): 2559-2571
- [12] Chen L, Wei Y, Wang X, *et al.* Ribosylation rapidly induces alpha-synuclein to form highly cytotoxic molten globules of advanced glycation end products in molten globules with high cytotoxicity. PLoS One, 2010, **5**(2): e9052
- [13] Yanying Liu, Min Qiang, Wei Y, *et al.* A novel molecular mechanism for nitrated α -synuclein-induced cell death. J Mol Cell Biol, 2010, **3**(4): 239-249
- [14] Nie C L, Zhang W, Zhang D, *et al.* Changes in conformation of

- human neuronal tau during denaturation in formaldehyde solution. *Protein Pept Lett*, 2005, **12**(1): 75-78
- [15] Nie C L, Wei Y, Chen X, *et al.* Formaldehyde at low concentration induces protein tau into globular amyloid-like aggregates *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One*, 2007, **2**(7): e629
- [16] Nie C L, Wang X S, Liu Y, *et al.* Amyloid-like aggregates of neuronal tau induced by formaldehyde promote apoptosis of neuronal cells. *BMC Neurosci*, 2007, **8**(9)
- [17] He R, Lu J, Miao J. Formaldehyde stress. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(12): 1399-1404
- [18] Naqvi S H, 王维山, 苗君叶, 等. 甲醛诱导 Tau 蛋白形成“孔道样”聚集结构. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(11): 1195-1203
- Naqvi S H, Wang W S, Miao J Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37**(11): 1195-1203
- [19] 李芳序, 卢静, 许亚杰, 等. 老年性痴呆发病过程中内源性甲醛慢性损伤机制. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(04): 393-400
- Li F X, Lu J, Xu Y J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35**(04): 393-400
- [20] Kaminski J, Atwal A S, Mahadevan S. Determination of formaldehyde in fresh and retail milk by liquid column chromatography. *J AOAC Int*, 1993, **76**(5): 1010-1013
- [21] Sardi E, Tyihak E. Simple determination of formaldehyde in dimedone adduct form in biological samples by high performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr*, 1994, **8**(6): 313-314
- [22] Lazrus A L, Fong K L, Lind J A. Automated fluorometric determination of formaldehyde in air. *Anal Chem*, 1988, **60**(10): 1074-1078
- [23] Heck H D, White E L, Casanova-Schmitz M. Determination of formaldehyde in biological tissues by gas chromatography/mass spectrometry. *Biomed Mass Spectrom*, 1982, **9**(8): 347-353
- [24] Shara M A, Dickson P H, Bagchi D, *et al.* Excretion of formaldehyde, malondialdehyde, acetaldehyde and acetone in the urine of rats in response to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, paraquat, endrin and carbon tetrachloride. *J Chromatogr*, 1992, **576**(2): 221-233
- [25] Zhou J. Recent progress in neurodegenerative disorder research in China. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(3): 348-355
- [26] Goedert M, Jakes R, Spillantini M G, *et al.* Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature*, 1996, **383**(6600): 550-553
- [27] Zhang M, Zhao Z, He L, *et al.* A meta-analysis of oxidative stress markers in schizophrenia. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(1): 112-124
- [28] Lansbury P T, Lashuel H A. A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic. *Nature*, 2006, **443**(7113): 774-779
- [29] Zheng Y, He J, Hong T. Biomarkers of Alzheimer's disease in body fluids. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(4): 490-496
- [30] Lu L, Gu L, Liang Y, *et al.* Dual effects of alpha-synuclein on neurotoxicity induced by low dosage of rotenone are dependent on exposure time in dopaminergic neuroblastoma cells. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(5): 590-597
- [31] Andersen J K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?. *Nat Med*, 2004, **10** Suppl(S18-25)
- [32] Sun P, Zhang Q, Han J, *et al.* TLR4 signaling induced TLR2 expression in the process of mimic cerebral ischemia/reperfusion *in vitro*. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(2): 223-228
- [33] Yan B, A J, Hao H, *et al.* Metabonomic phenotype and identification of "heart blood stasis obstruction pattern" and "qi and yin deficiency pattern" of myocardial ischemia rat models. *Sci China C Life Sci*, 2009, **52**(11): 1081-1090
- [34] Miller D W, Cookson M R, Dickson D W. Glial cell inclusions and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neuron Glia Biol*, 2004, **1**(1): 13-21
- [35] Duan S. Progress in glial cell studies in some laboratories in China. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(3): 330-337
- [36] Ehling P, Bittner S, Budde T, *et al.* Ion channels in autoimmune neurodegeneration. *FEBS Lett*, 2011, (doi:10.1016/j.febslet.2011.03.065)
- [37] Wang Y, Xu T. Ion channels in neuronal survival. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(3): 342-347
- [38] 王维山, 郝智慧, 张力, 等. 正常老年人与阿尔茨海默病患者尿甲醛浓度的研究. *中华老年心脑血管病杂志*, 2010, **12**(8): 721-722
- Wang W S, Hao Z H, Zhang L, *et al.* *Chin J Geriatr Heart BrainVessel Dis*, 2010, **12**(8): 721-722

Assay of Brain Endogenous Formaldehyde With 2, 4-Dinitrophenylhydrazine Through UV-HPLC*

SU Tao^{1,2)}, WEI Yan¹⁾, HE Rong-Qiao^{1)**}

⁽¹⁾ State Key Laboratory of Brain and Cognitive Sciences, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁽²⁾ Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Chronic impairments of brain caused by accumulation of endogenous formaldehyde as ageing is thought as one of the risk factors for sporadic age-related dementia. Thus, it is necessary to determine the endogenous concentration of formaldehyde in brain. Using 2, 4-dinitrophenylhydrazine (2, 4-DNPH) in the assay, the concentrations of formaldehyde in parietal lobe, frontal lobe, temporal lobe, occipital lobe, hippocampus, cerebellum and brainstem of porcine brain ($n=5$) were measured through UV-HPLC. Homogenizing brain tissues with 10% trichloroacetic acid (pH=1.0) not only avoided the disturbance from contaminated protein and other compounds, but also eliminated the step extraction of FA-DNPH derivative (2, 4-dinitrophenylhydrazone) and improve the methodological sensitivity ($P < 0.05$). The porcine brain formaldehyde was $75.5 \sim 83.4 \mu\text{mol/kg}$ fresh brain tissues measured by this improved method. Recoveries of spiked formaldehyde at low and high level were $95.96\% \sim 102.04\%$ with relative standard deviations less than 10%. This suggests that the modified 2, 4-DNPH method is effective enough to measure the endogenous formaldehyde in brain tissues.

Key words quantitative analysis, endogenous formaldehyde, high performance liquid chromatography, porcine brain, 2,4-dinitrophenylhydrazine, cognitive impairment

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00407

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2010CB912303), The National Basic Research Program of China (2012CB911004), Knowledge Innovation Project of CAS (KSCX2-YW-R-256 and CAS-KSCX2-YW-R-119), The National Natural Science Foundation of China (30970695) and Johnson & Johnson Corporate Office of Science & Technology (GJHZ1131).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64889876, E-mail: rongqiaohe@gmail.com

Received: November 8, 2011 Accepted: November 24, 2011