

技术与方法

反相高效液相色谱法测定血清中 γ -氨基丁酸

沈佐君 王治国 李小鹏 胡翠华 杨树德

(卫生部北京医院临床检验中心, 北京 100730)

摘要 建立一种高灵敏度的氯甲酸苄甲酯柱前衍生荧光检测反相高效液相色谱法测定血清中 γ -氨基丁酸的方法. 内标为己氨酸, 固定相为 Shim-Pack CLC-ODS (M), 4.6 mm $\times$ 150 mm, 填充料为 5 μ m; 流动相采用二元梯度洗脱, A 相为 0.05 mol/L 醋酸钠缓冲液: 水: 四氢呋喃: 冰乙酸 (250: 100: 15: 2.2), B 相为 乙腈: 甲醇 (4: 1). 系统研究了 pH 值、反应时间、离子强度及衍生化试剂用量对衍生化反应的影响, 确定最佳反应条件和最佳色谱条件. 方法的精密度的批内变异系数 $< 4.6\%$, 批间变异系数 $< 6.1\%$; 最低检出限 (信噪比 = 2) 为 3.1 nmol/L; 线性范围为 50~ 1000 nmol/L, $r^2 = 0.9992$; 平均回收率为 97.1%.

关键词 γ -氨基丁酸, 反相高效液相色谱法, 氯甲酸苄甲酯

学科分类号 Q517

γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 是一种重要的抑制性神经递质, 广泛存在于脊椎动物脑内; 外周神经和其他组织含量很低. GABA 与神经突触后膜的特异性受体结合可改变膜对 Cl^- 、 K^+ 和 Ca^{2+} 的传导和膜电位, 从而产生神经元抑制效应, 对机体正常生理功能起着重要的调节作用. GABA 的测定对很多神经精神性疾病^[1~4]、遗传性疾病^[5]的诊断, 以及治疗方案的确定和疗效观察, 都具有一定的参考价值. 目前, 国外测定 GABA 的方法有: a. 放射受体法^[6]; b. 高效液相色谱法^[7]; c. 气相色谱-质谱联用法^[8]. 放射受体法不够稳定, 测定结果的重复性较差, 结果缺乏可比性. 气相色谱-质谱检测法因仪器昂贵, 其应用范围受到一定的限制. 高效液相色谱法在 GABA 的定量测定方面有一定的优势. 由于血液和脑脊液中 GABA 含量甚微, 约在 1×10^{-7} mol/L 的浓度范围内^[9], 故需足够高的检测灵敏度; 由于标本中大量存在的其他氨基酸等严重干扰测定准确度的物质, 因此, 从方法学角度来说, GABA 的测定比其他常见生理

氨基酸测定困难得多. 此外, 由于 GABA 本身不发射荧光, 因此, 在国外文献报道中, 将其与衍生化试剂氯甲酸苄甲酯 (FMOC-Cl)^[10]或邻苯二甲醛^[11]反应制备成能被检测器检测的衍生化产物进行测定. 本文利用 GABA 和己氨酸 (内标) 中的氨基在碱性缓冲液中与衍生化试剂 FMOC-Cl 反应生成具有较强荧光活性衍生化产物的原理, 采用柱前反相高效液相色谱法, 建立了测定血清中 GABA 含量的方法, 取得了较满意的结果, 检测灵敏度优于国外同类报道, 已在临床工作中实际应用.

1 材料与方法

1.1 仪器

日本岛津 LC-6A 液相色谱仪、CTO-6A 柱恒温箱、RF-551 荧光检测器.

1.2 试剂

GABA 标准液、己氨酸内标液 (IS)、FMOC-Cl 为 Sigma 公司生产; 甲醇、乙腈为

* 卫生部科研基金资助项目.

收稿日期: 1997-08-27, 修回日期: 1998-02-25

国产色谱纯; 余均为国产 AR 级.

1.3 实验方法

1.3.1 标本采集与处理: 取空腹静脉血1 ml, 低温 (4℃或加冰块) 离心分离出血清后立即在- 40℃冷冻保存. 分析时, 冷冻样品融解后取 100 μl 移入带盖的尖底小塑料管中, 加 IS 20μl, 用乙腈 200 μl 沉淀蛋白. 低温 (4℃或加冰块) 4 000 r/min 离心 15 min, 上清液用 0.4 μm 孔径滤膜过滤.

1.3.2 衍生化方法: 取尖底带塞玻管, 加 0.5 mol/L 硼酸钠缓冲液 100 μl, 丙酮 100 μl, 摇匀, 加入样品或标准液 50 μl, 0.01 mol/L FMOG-Cl 50 μl, 震荡 30 s; 置室温 10 min 后加入提取剂 (正己烷: 乙酸乙酯= 1: 1) 1 ml, 震荡 30 s, 除去过剩的衍生化试剂.

1.3.3 色谱条件: 试验确定分离柱为 Shim-Pack CLC-ODS (M), 4.6 mm × 150 mm, 5 μm, 保护柱 Micro Pack, 4 mm × 40 mm, 5 μm 填料. 流动相 A 为 0.05 mol/L 醋酸钠: 水: 四氢呋喃: 冰乙酸= 250: 100: 15: 2.2. 流动相 B 为乙腈: 甲醇= 4: 1. 其梯度洗脱程序为:

t/min	0	30	35	43	45	47	48
A 相/%	69	66	61	58	0	0	69
B 相/%	31	34	39	42	100	100	31

激发波长 254 nm, 发射波长 315 nm, 灵敏度高档, 流速 1.2 ml/min, 柱温 35℃.

1.3.4 标准曲线的制作及结果计算: 按上述衍生化操作方法分别测定 GABA 标准液为 50、

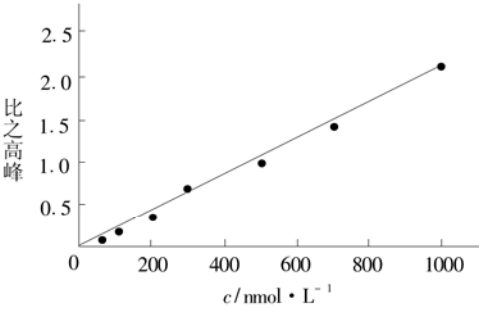


图1 标准曲线
 $y = 0.002x + 0.017$

100、200、300、500、700、1 000 nmol/L 7 个浓度 (加内标 20 μl), 以两者峰高之比为纵坐标, GABA 浓度为横坐标, 绘图即得标准曲线 (图 1). 由待测样品峰高查标准曲线即得测定结果.

2 实验结果

2.1 衍生化条件的优化

2.1.1 pH 值对 GABA、IS 衍生化的影响: 将 0.5 mol/L 的硼酸分别调节至 pH 为 2、4、6、8、10、12 的 6 种缓冲液, 每管中加入 100 nmol/L 的 GABA 和 IS 50μl, 按上述衍生化方法操作, 进样 10 μl. 分别以 GABA 和 IS 峰高 (mm) 为纵坐标, pH 为横坐标, 作图 (图 2). 由图 2 可知, pH10 左右, GABA 与 IS 反应的衍生物有最大的荧光强度.

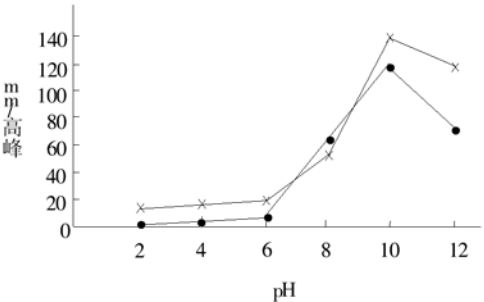


图2 pH 对 GABA 和 IS 衍生化的影响
●—●: GABA; ×—×: IS.

2.1.2 反应时间与衍生化的关系: 同上操作, 唯采用 pH 9.8 的缓冲液, 分别置室温下 2、5、10、20、30 min 后测定 (图 3). 由图 3 可见, 10 min 时反应已趋完全.

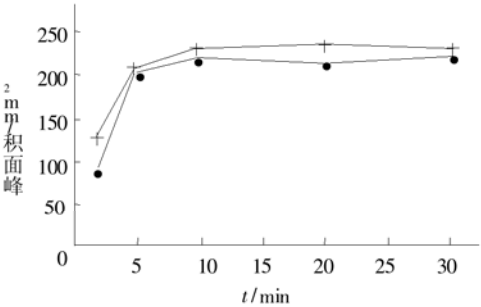


图3 反应时间对衍生化反应的影响
●—●: GABA; ×—×: IS.

2.1.3 硼酸钠缓冲液浓度对衍生化反应的影响: 分别配制 0.01、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 mol/L 6 种浓度的硼酸钠溶液, 调节 pH 至 9.8. 并以其为缓冲液分别测定之. 结果见图 4. 由图 4 可知, 缓冲液浓度以 0.5 mol/L 为最佳.

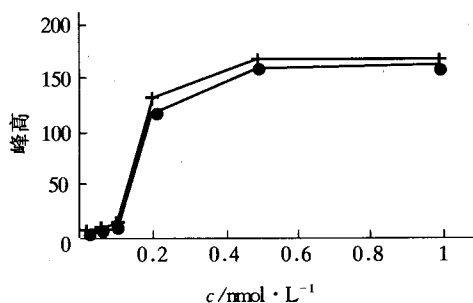


图 4 硼酸钠缓冲液浓度对衍生化反应的影响
●—●: GABA; ×—×: IS.

2.1.4 FMOC-Cl 浓度对衍生化反应的影响: 配 0.001、0.005、0.01、0.02、0.05 mol/L 5 个不同浓度 FMOC-Cl, 其余操作不变. 图 5 结果表明, FMOC-Cl 在 0.005 mol/L 反应已近完全. 为使充分反应, 选用了 0.01 mol/L.

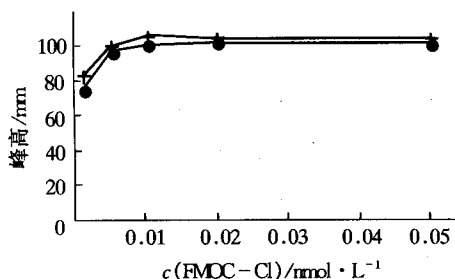


图 5 FMOC-Cl 浓度对衍生化反应的影响
●—●: GABA; ×—×: IS.

2.2 血清中 GABA 的色谱分离

图 6 和图 7 分别为标准溶液和病人标本在本文给定条件下的色谱图.

2.3 线性范围

GABA 在 50~1 000 nmol/L 范围内线性关系良好, 经线性回归计算, γ^2 为 0.9992, 线性方程为 $Y=0.002X+0.017$.

2.4 精密度

取 3 份不同浓度血清标本 (分别为 76.2、128.7 和 513.4 nmol/L) 作批内和批间误差测

定. 批内各测 12 次, 变异系数为 4.6%、3.6% 和 2.7%; 批间各测 10 次, 变异系数为 6.1%、4.9% 和 3.8%.

2.5 检测限

最低检出限由基线噪音相应于信噪比为 2 时 ($S/N=2$) 的浓度计算, 为 3.1 nmol/L.

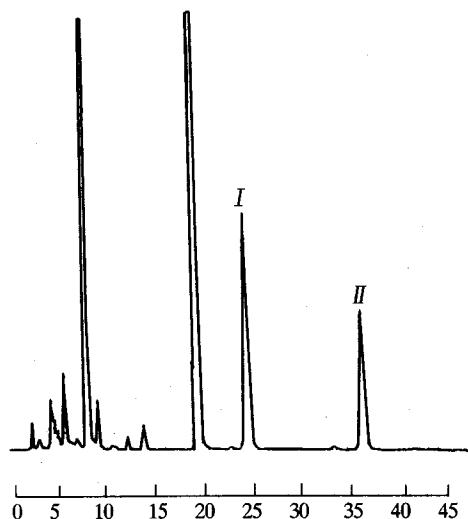


图 6 GABA 与 IS 标准品的色谱图
I: GABA 标准品; II: IS (己氨酸内标).

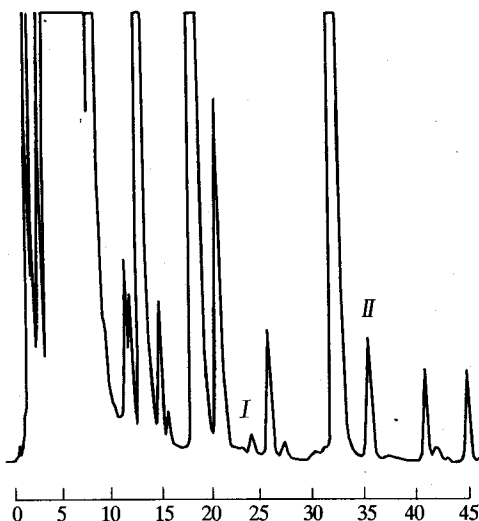


图 7 病人血清标本中的 GABA 与 IS 的色谱图
I: GABA 标准品; II: IS (己氨酸内标).

2.6 回收率

取一 GABA 含量低的血清标本 (76.2 nmol/L) 分别加入 25、50、100、300、

500 nmol/L 的 GABA, 测得回收率为 89.2%、98.4%、102.1%、96.3%、99.4%, 平均 97.1%.

2.7 健康儿童 GABA 参考值调查

由于本方法建立的主要目的之一是研究儿童智力障碍与 GABA 的关系^[12], 故对健康儿童 GABA 参考值进行了调查. 其中男性 20 名 (年龄 3~ 11 岁), 女性 20 名 (年龄 3~ 14 岁), 血清 GABA 含量见表 1. 结果用统计软件 (SAS) 进行了均数的 *t* 检验, 发现男女不同性别间 GABA 含量无显著性差异, *P* > 0.05.

表 1 健康儿童血清中 GABA 参考值

性别	例数	<i>c</i> (GABA) / nmol·L ⁻¹	<i>s</i>
男	20	108	11
女	20	122	12
合计	40	116	15

3 讨 论

HPLC 测定氨基酸现已得到广泛应用, 并在很大程度上取代了氨基酸分析仪. 但需指出, 在国内外有关报道的方法中, 均不包括 GABA, 因其在血液和脑脊液中含量很低, 仅为其他常量氨基酸的千分之几, 一般方法难以检测. 为提高检测灵敏度, 我们以 FMOC-Cl 作为衍生化试剂, 其特点是灵敏度高, 反应快, 产物稳定.

氨基酸测定的色谱柱通常采用离子交换柱, 氨基酸专用柱即为此类. 其缺点是分离费时, 价格昂贵, 且只作氨基酸分析. 本法采用常用的 ODS 反相柱, 不仅适用于氨基酸分析, 而且可用于其他物质的分析, 价格亦较便宜.

GABA 在体内有游离型和结合型两种形式, 其中以结合型为主. 后者在常温下易分解为游离型^[11]. 为此, 静脉取血后应尽快分离血清并分析, 否则应立即置- 40℃ 保存, 以防止结合型 GABA 分解.

国外学者曾比较了 8 种标本预处理方法,

发现以超滤、乙腈或苦味酸沉淀蛋白, 三种方法的回收最为理想 (96%~ 106%). 超滤法回收率高、去蛋白质干净, 标本没有稀释, 但是需超速冷冻离心机, 成本高, 在常规工作中难以接受. 本法以乙腈作为蛋白质沉淀剂, 继用 0.4 μm 滤膜手工过滤, 既节约了成本, 也获得了满意的效果, 经三百余次进样分析后未见柱效有明显变化.

目前, 国内外报道的体液中氨基酸测定方法大多数是外标法, 其缺点是对操作的要求高且方法的重复性不够理想. 本方法采用内标法, 其回收率、线性、精密度等性能指标优于外标法. 但内标的加入并要使之与其他相邻组分达到基线分离, 则对本来已在大量高浓度其他组分存在下检测含量极低的 GABA 的困难程度进一步加大. 为此, 我们对色谱条件, 特别是流动相组成及梯度洗脱的方案进行了系统的研究. 其中, 流动相 A 中加入 20% 的甲醇, 目的是使内标能达到与其相邻色谱峰基线分离. 流动相 B 中加入四氢呋喃, 在不影响其分离效果的前提下可使洗脱过程相对缩短.

参考文献

1 Kuroda H, Ogawa N, Yamawaki Y, *et al.* Cerebrospinal fluid GABA levels in various neurological and psychiatric diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1982, **45**: 257~ 260

2 Manyam B V, Ferraro T N, Hare T A. Cerebrospinal fluid amino compounds in Parkinson's disease. *Arch Neurol*, 1988, **45** (Jan): 48~ 50

3 Satzinger G. Antiepileptics from gamma-aminobutyric acid. *Arzneim Forsch/Drug Res*, 1994, **44** (1), Nr. 3: 261~ 266

4 Petty F, Kramer G L, Fulto M, *et al.* Low plasma GABA is a trait-like marker for bipolar illness. *Neuropsychopharmacology*, 1993, **9**: 125~ 132

5 Jakobs C, Jaeken J, Gibson M. Inherited disorders of GABA metabolism. *J Inher Metab Dis*, 1993, **16**: 704~ 715

6 Mousah H, Jacqmin P, Lesne M. The quantification of gamma-aminobutyric acid in the cerebrospinal fluid by a radioreceptor assay. *Clin Chim Acta*, 1987, **170**: 151~ 160

7 Naini A B, Vontzidou E, Côté L J. Isocratic HPLC assay with electrochemical detection of free γ-aminobutyric acid in cerebrospinal fluid. *Clin Chem*, 1993, **39** (2): 247~ 250

8 Suñol C, Artigas F, Tusell J M, *et al.* High-performance

- liquid chromatography-fluorescence detection method for endogenous γ -aminobutyric acid validated by mass spectrometric and gas chromatographic techniques. *Anal Chem*, 1988, **60**: 649~ 651
- 9 Petty F. Plasma concentrations of γ -aminobutyric acid (GABA) and mood disorders: a blood test for manic depressive disease. *Clin Chem*, 1994, **40** (2): 296~ 302
 - 10 Paul A H, David S, Jeffrey K, *et al.* Amino acid analysis using derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high performance liquid chromatography. *J chromatogr*, 1991, **540**: 177~ 185
 - 11 Grossman M H, Hare T A, Manyam N V B, *et al.* The stability of GABA levels in CSF under various conditions of storage. *Brain Res*, 1980, **182**: 99~ 106
 - 12 Shen Z-J, Dong Y-H, Yang S-D. Determination of γ -aminobutyric acid in serum and its application in diagnosis and treatment for child mental retardation. 7th Asian-Pacific Congress of Clinical Biochemistry, Thailand: Bangkok, 1995. PS3-22: 210

Determination of γ -aminobutyric Acid in Serum by Reverse-phase High Performance Liquid Chromatography. SHEN Zu-Jun, WANG Zhi-Guo, LI Xiao-Peng, HU Cu-Hua, YANG Shu-De (*National Center for Clinical Laboratory, Beijing Hospital Compound, Ministry of Public Health, Beijing 100730, China*).

Abstract A new highly sensitive HPLC method for determination γ -aminobutyric acid (GABA) in serum was developed by precolumn derivatiza-

tion of GABA with 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOG-Cl) using ϵ -aminocaproic acid as an internal standard. The column used was Shim-Pack CLC-ODS (M), 4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μ m. Mobile phase A consisted of sodium acetate buffer (0.05 mol/L, pH 3.65) / water / tetrahydrofuran / glacial acetic acid (250/100/15/2.2). Mobile phase B was acetonitrile / methanol (4/1). The conditions of derivatization and chromatography were studied to find a optimal procedure, which included pH value, reaction time, ionic strength and amount of derivatizing reagent. The coefficient of variance of the method was less than 4.6% for within runs, 6.1% for between runs, respectively. The minimal detection limit ($S/N = 2$) was 3.1 nmol/L. The linearity was observed from 10 to 1 000 nmol/L, and the coefficient of determination was 0.9992. The average recovery was 97.1%.

Key words γ -aminobutyric acid (GABA), reversed-phase high performance liquid chromatography, 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOG-Cl)

高分辨电泳分离短串联重复序列 DNA 片段*

郭大玮 郎海丽 徐晓莉

(山西医科大学法医系, 太原 030001)

J. C. J. EIKENBOOM, R. M. BERTINA

(莱顿大学医院血液学系出血与血栓研究中心, 荷兰)

摘要 采用多相缓冲系统, 在成层胶 $T = 5\%$, $C = 2.6\%$, 分离胶 $T = 8\%$, $C = 5\%$ 的条件下用聚丙烯酰胺凝胶电泳对人类短串联重复序列 (STR) DNA 片段进行分离. 其中, 成层胶内主要缓冲成分为 2-二羟乙基亚胺-三羟甲基甲烷 (Bis-tris)、 H_2SO_4 及 N-N'-2 (羟乙基) 甘氨酸 (Bicine); 而分离胶以 Tris、 H_2SO_4 及 2-二羟乙基亚胺-三羟甲基甲烷 (Bis-tris) 为主, 构成多相缓冲系统. DNA 片段在成层胶中被有效地压缩, 在分离胶内又可完全解压缩, 使其按片段大小分离; 从而达到提高分辨率的目的.

* 山西省青年自然科技基金及山西省教委青年学科带头人培养对象基金资助.

收稿日期: 1997-08-12, 修回日期: 1998-01-07