

高压液相色谱法在生物化学中的应用

王友京

(中医研究院针灸研究所生化研究室)

近十年来,高压液相色谱法在生物化学各个领域中的应用十分广泛。本文就这方面情况作一简单介绍。

一、生物胺神经介质及其代谢产物的分析

神经介质是调节机体生理功能的重要物质基础,其中多巴胺,去甲肾上腺素和 5-羟色胺等是较重要的几种,它们在生物组织中含量极低。一般说来,用荧光分光光度分析,气相色谱和放射化学等定量测定技术虽有足够的灵敏度,但还存在一定的缺点,如荧光分光光度法测定生物胺需要某些措施以避免可能产生的荧光干扰;气相色谱法需要预先将样品衍生使之可挥发;放射化学法不但需要用纯净的酶制剂,而且测定步骤繁多。使用高压液相色谱法(简称 HPLC)测定可以避免上述某些弊病,并具有良好的选择性、操作简便,又省时间。因此, HPLC 已经越来越普遍地用来测定脑脊液、血液、脑组织和尿液等生物样品中超微量的生物胺及其代谢产物。通常将脑组织中的儿茶酚胺转变为荧光胺、邻苯二甲醛或三羟吲哚的衍生物后再进行测定或直接测定其天然荧光。测定三羟吲哚和邻苯二甲醛衍生物的灵敏度分别为 20—30pg 和 50—100pg,比测定荧光胺衍生物的灵敏度(大约 100pg)高,而测定天然荧光的灵敏度(100—500pg)反而低。Mell 等人(1980)用反相 HPLC 测定组织中的罂胺,先用过氯酸将它从组织匀浆中提取出来,然后用邻苯二甲醛衍生,以 μ Bondapak C18 为固定相,甲醇/乙酸为流动相,然后进行分离测定。

脑组织中各种吲哚化合物的测定,可以直接将脑组织匀浆离心后的上清液注进 HPLC^[1],

然后检测其天然荧光,或通过邻苯二甲醛反应,测定其荧光复合物。Lyness 等人(1980)利用弱阳离子交换树脂柱和电化学检测器检测,测定大鼠黑质的 5-羟色胺和 5-羟吲哚乙酸。如局部注射 5, 7-双羟色胺使两者含量明显下降,或使用优降宁增加 5-羟色胺而降低 5-羟吲哚乙酸的水平均可测定。当用丙磺舒选择性增加 5-羟吲哚乙酸,还可测定伏隔核、纹状体头部 5-羟吲哚乙酸的含量。这个方法的灵敏度很高,足以测定大鼠脑内不同核团 5-羟色胺的转换速率。

人和其他灵长类动物脑内单胺主要代谢产物 3-甲氧基-4-羟基苯乙二醇, 3, 4-二羟基苯乙酸、高香草酸和 5-羟吲哚乙酸,经酸性溶液提取后,用 C18 反相柱,磷酸缓冲液为流动相进行分离,再用荧光检测器和化学检测器同时进行测定^[2]。

脑脊液中的 5-羟吲哚乙酸、高香草酸、吲哚乙酸和吲哚丙酸也常用 HPLC 测定。人脑脊液中 5-羟吲哚乙酸的正常水平为 25 毫微克/毫升,以荧光检测器检测只需 10 微升脑脊液便可进行定量测定;而大鼠脑脊液中 5-羟吲哚乙酸水平大约为 125 毫微克/毫升,因此定量测定大鼠脑脊液中 5-羟吲哚乙酸只需 1 微升样品。

血浆中多巴胺和去甲肾上腺素通常利用柱后反应形成三羟吲哚衍生物,以荧光检测器检测^[3],这种方法仅需 1—2 毫升血浆。Watson (1981) 和 Mefford (1981) 等人报告,血浆中的去甲肾上腺素、肾上腺素、多巴胺以及多巴胺的代谢产物 3, 4-二羟基苯乙酸可以同时用 HPLC 分离测定,该法简单、迅速,回收率高。Cross 等人^[2]用邻苯二甲醛衍生以反相柱进行测定全血或血浆中的 5-羟色胺、吲哚乙酸和吲哚

丙酸。

反相柱和荧光检测器相结合可以测定 200 微升尿液中的 5-羟吲哚乙酸和吲哚乙酸^[4]。尿液中儿茶酚胺测定采用柱前或柱后荧光反应。测定尿液中去甲肾上腺素、肾上腺素和多巴胺的方法,灵敏度为 100—500pg^[5]。

二、多肽的分析

许多化学合成的多肽和组织提取的多肽及其衍生物,可以用 HPLC 纯化。目前在具有阿片样活性的内源性肽——甲啡肽和亮啡肽生物合成途径的研究中, Lewis 和他的同事 (1980) 将牛肾上腺髓质嗜铬颗粒提取液,用 Sephadex G-75 柱层析初步分离后,再用 HPLC 分离纯化,得到一系列不同分子量的含甲啡肽和亮啡肽的多肽,其中有甲啡肽-精⁶、甲啡肽-赖⁶、甲啡肽-精⁶-精⁷、甲啡肽-精⁶-苯丙⁷和亮啡肽-精⁶。其他研究者也分别用 HPLC 从不同组织中分离出其它含甲啡肽的多肽以及含亮啡肽的多肽—— α -新-内啡肽和强啡肽等这些多肽分别被认为是甲啡肽和亮啡肽生物合成的前体。由于 HPLC 的应用,脑啡肽生物合成的研究正取得了新的进展,可望不久的将来它们的生物合成途径可得到彻底阐明。

HPLC 在分析其他神经肽也有很大优点。Gruber 等人 (1976) 用它定量测定大鼠垂体后叶催产素和加压素,因 8-精催产素不存在于垂体,可用它作内标物,这种方法可以避免放射免疫测定或生物测定存在的交叉反应,提高了结果的准确性。

许多激素,包括生长激素释放抑制因子^[6]、黑素细胞生长素和血管紧张肽^[7]、胰岛素^[8]和一些内啡肽^[9]以及 P 物质^[10]在各种不同的高压液相色谱条件下,可以进行分离。Nice 等人 (1979) 报告,用 HPLC 可以同时分离促肾上腺皮质激素、 β -内啡肽和脑啡肽,而且不破坏它们的免疫和生物学活性。垂体 β -内啡肽代谢产物的测定^[11]以及甲啡肽代谢分解的研究^[12]也广泛采用 HPLC,从而说明了 HPLC 对制备和分析研究多肽有很大的用途。

三、神经化学上重要酶的分析

目前,对酪氨酸代谢途径上的酶的活性,包括酪氨酸羟化酶、多巴胺脱羟酶、苯乙胺-N-甲基转移酶、多巴胺- β -羟化酶和儿茶酚-O-甲基转移酶,都成功地用 HPLC 进行测定。

在 L-芳香氨基酸脱羧酶的作用下, L-5-羟色氨酸和 L-多巴分别脱羧成 5-羟色胺和多巴胺,因此用 L-多巴和 L-5-羟色氨酸作底物,用 HPLC 测定酶促反应产物 5-羟色胺和多巴胺,该法可以用来分析大鼠、豚鼠、猴和小鼠血清中的 L-芳香氨基酸脱羧酶的活性^[13]。

Hui 等人 (1981) 分别以甲啡肽和亮啡肽作底物,用反相柱 Radial-PAK C18, 流动相乙腈/邻酸缓冲液,紫外光检测器,测定大鼠不同脑区、血浆、肝、肾、肾上腺等组织中脑啡肽降解酶的活性。Guyon 等人用这种技术研究小鼠纹状体细胞可溶性部分和膜结合部分脑啡肽降解酶的活性。

Tsukada 等人 (1980) 报道用 HPLC 测定脑内微量 2', 3'-环核苷酸-3'-磷酸二酯酶的活性。这些酶活性的测定在神经化学和神经药理学上具有重要的意义。

四、核酸成分的分析

多年来,由于缺乏足够灵敏的分析技术,核酸研究受到一定的阻碍。核酸成分的分析通常用柱层析,尽管薄层层析分析速度较快,但不能得到很好的分离,也不能测定其浓度的微小变化。由于热不稳定性 and 低挥发性以及多数核酸片段的极性,尚不能直接用气相色谱进行分析。HPLC 的发展,使得可以精确、迅速地分析小量组织样品中低分子量的核酸成分,且具有高分辨率。例如,血清和尿中游离核苷和碱基的 HPLC 测定,可用来研究机体的生理调节过程以及用作诊断疾病的指标和了解疾病的治疗过程^[14]。

Vandenbergh 等人^[15]利用阴离子交换树脂柱的 HpLc 定量测定低聚核苷酸和核糖体 RNA

的碱基成分和假尿嘧啶核苷酸。

此外,合成的环核苷酸混合物以及鼠脑提取液中的 cGMP 和 cAMP 也可以用 HPLC 分离^[16]。

五、氨基酸及其它生物 活性物质的分析

近 20 年来,生物样品中氨基酸的测定大多使用氨基酸分析仪,这种仪器操作麻烦。最近报道,用反相 HPLC 分离和定量测定游离氨基酸,具有简单迅速、灵敏度高等优点。Fernstrom 等人^[17]用 HPLC 测定血清和脑脊液中游离氨基酸,首先把提取液中的氨基酸与邻苯二甲醛反应衍生,然后在 C18 反相柱同时进行分离,并用荧光检测器检测出谷氨酸、天门冬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、色氨酸、缬氨酸和苏氨酸等 16 种氨基酸,灵敏度可达 10 微微克分子。

HPLC 测定脂肪酸酯^[18]、前列腺素^[19]、卟啉^[20]、尿酸^[21]、多胺^[22]、脂质^[23]、蛋白质、类固醇、碳水化合物、抗生素等也屡见报道。

此外,在生物测定或放射免疫测定之前也常用 HPLC 迅速部分提纯样品,以除去干扰物质、提高测定结果的准确性。

总之,在生物化学各个领域 HPLC 的应用越来越广泛,而且还将继续得到迅速的发展。

参 考 文 献

- [1] Flatmark, T et al.: *Anal. Biochem.*, **107**, 71, 1980.
- [2] Cross, A. J. et al.: *Life Sci.*, **28**, 499, 1981.
- [3] Hamaji, M. et al.: *J. Chromatogr.*, **163**, 329, 1979.
- [4] Beek, O, et al.: *Clin. Chim. Acta*, **79**, 149, 1977.
- [5] Jackman, G. P.: *Clin. Chem.*, **26**, 1623, 1980.
- [6] Martin, C. et al.: *J. Endocrinol.*, **77**, 67, 1978.
- [7] Molnar, I. et al.: *J. Chromatogr.*, **142**, 623, 1977.
- [8] Hancock, W. S, et al.: *Science*, **200**, 1168, 1978.
- [9] Ling, N.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 248, 1977.
- [10] Akagi, H, et al.: *Neuroscience Letters*, **20**, 259, 1980.
- [11] Loeber, J. G, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **86**, 1288, 1979.
- [12] Graves, F. R, et al.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **206**, 492, 1978.
- [13] Rahman, M. D. K. et al.: *Life Sci.*, **28**, 485, 1981.
- [14] Brown, P. R. et al.: *Anal. Biochem.*, **99**, 1, 1979.
- [15] Vandenberghe, A. et al.: *Anal. Biochem.*, **107**, 369, 1980.
- [16] Krstulovic, A. M. et al.: *Clin. Chem.*, **25**, 235, 1979.
- [17] Fernstrom, M. H. et al.: *Life Sci.*, **29**, 2119, 1981.
- [18] Scholfield, C. R. et al.: *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **52**, 36, 1975.
- [19] Fitzpatrick, F. A, et al.: *Anal. Chem.*, **49**, 1032, 1977.
- [20] Evans, N. et al.: *J. Chromatogr.*, **125**, 345, 1976.
- [21] Molnar, I. et al.: *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, **143**, 391, 1977.
- [22] Adler, H. et al.: *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, **143**, 125, 1977.
- [23] Jungawala, F. B, et al.: *Biochem. J.* **155**, 55, 1976.

[本文于1982年3月29日收到]

基 因 组 结 构 分 析

——DNA 复性动力学的应用

沈 建 华

(中国科学院上海生物化学研究所)

DNA 双螺旋结构互补链之间的氢链在一定条件下可被破坏,形成单链,是为变性过程。

这些拆开的单链在另一些条件下,互补的碱基间又可重新建立起氢链联系。双螺旋结构得恢