

经验交流

高效液相色谱法测定超滤后
血浆中的谷氨酰胺

刘放南 盛学勤 陈永明

(南京军区总医院全军普通外科研究所, 南京 210002)

摘要 用高效液相色谱法测定超滤后血浆中的谷氨酰胺, 平均回收率为 96.75%, 在 130 ~ 1300 $\mu\text{mol/L}$ 范围内呈线性关系 ($r = 0.9906$), 健康人正常值男性为 $(694.97 \pm 102.31) \mu\text{mol/L}$, 女性为 $(623.79 \pm 99.27) \mu\text{mol/L}$, 男女间值有显著差别 ($P < 0.05$). 该分析方法简单、迅速, 可用于外科肠道内营养的监测和对肠粘膜结构与功能的研究.

关键词 高效液相色谱, 超滤, 谷氨酰胺

谷氨酰胺 (Gln) 是一种生糖氨基酸, 组织在摄取肠内食物及循环血中的谷氨酰胺时, 用其碳源作为能量, Gln 氧化可产生大量的 ATP, 因此, 它是一种高效能的能量物质, 它作为机体中最丰富的氨基酸而被组织大量利用. 近几年来, 对 Gln 作为肠粘膜细胞等快速生长和分化细胞的主要能源, 用于维持肠粘膜的结构和功能而日益受到重视. 因而, 临床上测定血液内 Gln 确切含量有很大的现实意义. 目前大部分氨基酸自动分析仪无法测定 Gln, 即使有些氨基酸自动分析仪能测定, 也会因样品处理繁琐、分析时间较长而导致 Gln 值偏低 (因为 Gln 极易分解), 我们将血浆及时经超滤后用反相高效液相色谱法测定, 方法简便, 结果可靠, 为外科肠道内营养支持的病人提供了一个准确的监测指标.

1 材料与方法

1.1 仪器

美国 Waters: 510 溶剂传递泵 A 和 B, 680 梯度控制器, 486 紫外检测器, U6K 手动进样器, 超滤管 (UFC3 TGC00), 微形离心机 (XX42 CF250), 北京东西电子技术研究

所: A4700 色谱数据工作站

1.2 试剂

Gln 标准、二巯基乙醇 (Sigma), 磷苯二甲醛 (Fluka), 甲醇 (江苏淮阴化工研究所, 色谱纯), 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、硼酸 (南京化学厂、分析纯).

1.3 样品预处理及衍生

采集静脉血 2 ml (加肝素抗凝), 离心后取血浆 0.4 ml, 加入超滤管中离心 10 000 r/min, 15 min, 再取滤液 20 μl , 加 100 ml 磷苯二甲醛液 (OPA), (13.5 mg OPA, 1 ml 甲醇, 9.0 ml 100 mmol/L 硼酸缓冲液 (pH 9.5) 和 0.2 ml 二巯基乙醇, 振荡混匀后于室温下反应 1 min, 进样 20 μl).

1.4 色谱条件

色谱柱 u Bondapak, C18, 250 mm $\times$ 4.6 mm, 10 nm (大连国家色谱中心), 柱温 20 $^{\circ}\text{C}$, 流动相 A: 10 mmol/L 磷酸缓冲液, (pH 6.85), 流动相 B: 甲醇, 0.45 μm 滤膜过滤, 上机前超声脱气, 紫外检测波长 340 nm, 灵敏度 0.05 AUFS, 进样量 10 μl , 全程 18 min. 参照 Martin 等^[1] 的洗脱法, 采用

如下梯度 (表 1).

表 1 浓度和流速梯度洗脱

时间 /min	W (磷酸缓冲液) / %	W (甲醇) / %	流速 /ml·min ⁻¹
0.00	83	17	1.2
3.00	62	38	1.2
3.20	60	40	1.2
12.00	60	40	1.2
14.00	83	17	1.2
18.00	83	17	1.2

2 实验结果

2.1 分析谱图

Gln 的标准品及超滤后血浆的分析见图 1 和图 2.

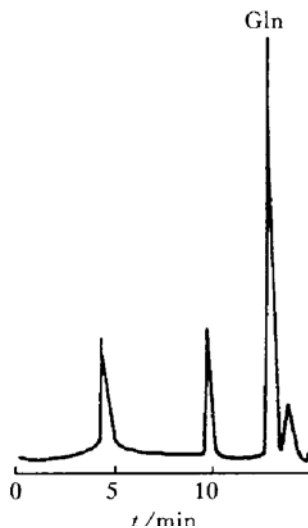


图 1 标准品峰图

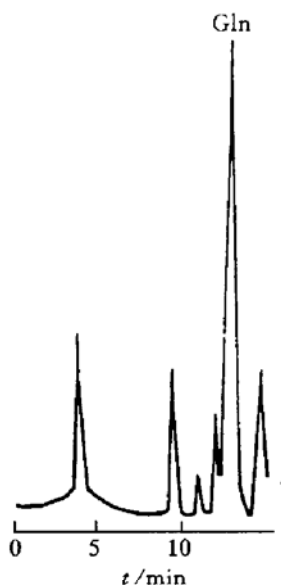


图 2 血浆样品峰图

2.2 精密度实验

取标准液 20 μ l, 重复进样 5 次进行色谱分析, 平均 Gln 峰面积 $131\,219 \pm 5523.87$, 变异系数 4.21% (表 2).

表 2 方法的精密度

进样次数	1	2	3	4	5
峰面积	131 975	137 403	123 391	128 379	134 946

2.3 线性范围及最低检测限

取不同浓度的标准溶液, 其浓度分别为 130、260、520、780、1040 和 1300 μ mol/L, 按上述方法分析, 峰面积与浓度成良好的线性关系, $y = 383\,376x - 28\,801.4$, $r = 0.9906$, 最低检测限达 40 nmol/L.

2.4 回收率实验

测得空白血中的 Gln 含量, 再加入已知含量的标准品, 混合后测得含量按以下公式计算回收率: 回收浓度 = 试验样品浓度 - 基础血样浓度; 回收率 = $\frac{\text{回收浓度}}{\text{加入标准量浓度}} \times 100\%$.

表 3 Gln 的回收率

血浆含量 / μ mol·L ⁻¹	加标量 / μ mol·L ⁻¹	试验样品浓度 / μ mol·L ⁻¹	回收率 / %
640	800	1480	105
640	500	1150	102
640	400	1000	90
640	100	730	90

注: $x \pm s = 96.75 \pm 7.89$.

2.5 正常人 Gln 值

各年龄组健康人 60 例, 年龄 16~59 岁, 分析结果表明 Gln 值男女间有显著差别 (表 4).

表 4 Gln 正常值男女间比较

性别	样本数	$(x \pm s) / \mu$ mol·L ⁻¹	P
男	32	688.906 ± 106.151	
女	28	630.714 ± 99.325	< 0.05

3 讨 论

在本分析方法中采用超滤法制备样品^[2], 超滤管内的超滤膜可截留相对分子质量 10 000 以下的蛋白质与蛋白污染物, 可免去采用酸或有机溶剂沉淀法, 是样品衍生前净化的一种快速、简便的方法。

血液内 Gln 极易在室温下衰减, 因此, 采取后的血浆超滤后即存放在 -80°C 低温冰箱, 一月内无改变。

衍生剂邻苯二甲醛是最广泛而适用的柱前衍生剂^[3], 但浓度不宜高, 衍生时间不宜超过 3 min, 否则其他氨基酸杂峰过多, 影响 Gln 的分离效果, 硼酸缓冲液平时应放在 37°C 恒温箱内保存, 否则缓冲液内硼砂易有结晶沉淀。

参 考 文 献

- 1 Martin F, Suzudi A, Hirel B. *Analytical Biochemistry*, 1982; **125**: 24
- 2 仲 宁, 李永田, 张金辉. 色谱, 1994, **5**: 369
- 3 Roth M. *Anal Chem.* 1971; **43**: 880

Determination of Plasma Glutamine by High Performance Liquid Chromatography. Liu Fangnan, Sheng Xueqin, Chen Yongming (*Laboratory of General Surgery, Nanjing General Hospital of PLA, Nanjing 210002, China*).

Abstract Plasma glutamine was measured, following ultrafiltration by high performance liquid chromatography with a mean recovery of 96.75%, linearity of the measurement was in the range of 130 to 1300 $\mu\text{mol/L}$ ($r=0.9906$). Normal values in healthy adults was (694.97 ± 102.31) $\mu\text{mol/L}$ in male and (623.79 ± 99.27) $\mu\text{mol/L}$ in female with a significant difference ($P < 0.05$). The method is simple, efficient in performance and can be applied in the study of bowel structure and function and in routine measurements in nutritional support.

Key words high performance liquid chromatography, ultrafiltration, glutamine

一种构建重组杆状病毒的简易方法

李迎秋 施先宗¹⁾ 吴文言 龙繁新 王珣章

(中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510275)

摘要 对传统构建重组杆状病毒的方法作了如下改进: 先用磷酸钙共沉淀法单独将质粒 DNA 转进昆虫 Sf 细胞中, 其中重组质粒采用聚乙二醇沉淀法纯化, 12~24 h 后再用低剂量的病毒攻击细胞。改进后的方法简便、省时、经济、重组率高, 适于一般实验室使用。

关键词 重组杆状病毒, 磷酸钙共沉淀, 感染复数, 聚乙二醇沉淀法

构建重组杆状病毒的传统方法是通过共转染, 即用磷酸钙共沉淀法将质粒 DNA 与病毒 DNA 同时导入昆虫细胞, 两种 DNA 在转染细胞内发生等位基因交换, 5~10 d 后可得到重组毒株。其中, 高质量的 DNA 是有效转染的

关键^[1]。采用 CsCl-溴化乙锭密度梯度离心法纯化载体质粒及提取完整的病毒 DNA 需要有一定的经验, 且操作繁琐, 费时。尽管这种共

¹⁾ 华中师范大学昆虫学研究所, 武汉 430070.

收稿日期: 1995-11-17, 修回日期: 1996-03-13