

# 高效液相色谱法(荧光检测)分析人血浆中哌啶酸

叶惟冷 方 策 李海蓉

(中国科学院上海生理研究所 上海 200031)

**摘要** 本工作用丹磺酰氯柱前衍生化反相色谱(荧光检测)法分析了正常人和肝病患者血浆中哌啶酸-2的水平。样品用荧光胺提取法,除去血浆中的其他氨基酸和生物胺对检测的干扰。以哌啶酸-3为内标物,测得平均回收率为84%。至少在40pmol至2nmol范围内,浓度与响应的线性关系良好。两个哌啶酸的检测极限分别为2.0和2.5pmol。对操作中应予注意的几个步骤作了讨论。

**关键词** 高效液相色谱, 荧光检测器, 哌啶酸-2, 人血浆

## 1 前言

哌啶酸-2(pipelicolic acid, PA)是一种与赖氨酸代谢有关的亚胺酸(imino acid)<sup>[1]</sup>。高赖氨酸血症、脑肝肾综合症、甲状腺功能亢进、肝癌、肝硬化等疾病患者的生理体液中都发现 PA 含量明显高于正常人<sup>[1-3]</sup>。国外仅有少数实验室用高效液相色谱(HPLC)成功地分析了生物样本中 PA 含量<sup>[4-6]</sup>,而国内尚无有关 PA 测试的报道。我们参考前人的方法<sup>[4-6]</sup>,分析了正常人和肝病患者血浆中 PA 的水平,并对测试方法作了讨论。

## 2 材料和方法

### 2.1 仪器

HPLC 仪为美国 Waters 208系列,用 M680自动梯度控制仪控制2台510泵, M730数据处理仪, 420荧光检测器  $\lambda_r = 360\text{nm}$ ,  $\lambda_m = 495\text{nm}$ , 灵敏度32。色谱柱系中科院上海药物所组装的 LiChrosorb RP-18柱, 5mm i. d.  $\times$  250mm, 粒径5 $\mu\text{m}$ 。

### 2.2 标样和试剂

PA 和哌啶酸-3(nipelicotic acid, NA, 作内标用)购自 Sigma 公司;丹磺酰氯(DNS-Cl)和荧光胺系中科院上海东风生化试剂厂产品;酸化正丁醇为500mL 正丁醇中加入425 $\mu\text{L}$  浓盐酸配成;配制流动相和处理生物样本所用试剂均为分析纯;所有实验用水均系双蒸超纯水。

### 2.3 样本预处理

在上午抽取正常人和肝病患者(均需空腹)静脉血液,共65例。其中男41例、女24例,年龄26至71岁,平均50岁。分离得血浆, -25 $^{\circ}\text{C}$  保存,分析时在室温

解冻。取300 $\mu\text{L}$  血浆加至3mL 酸性正丁醇中,充分混匀,静置20分钟,加入5nmol NA, 在18000r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$  离心20min。移上清液至15mL 带塞试管中,加入6mL 正庚烷和200 $\mu\text{L}$  0.1mol/L 盐酸,机械振摇10min。再离心5min 使之分层,弃去上层有机相,下层水相用1mol/L 碳酸钠调至 pH 9~9.5,加入50 $\mu\text{L}$  0.5% 荧光胺丙酮溶液,振摇。静止5分钟,加入6mol/L 盐酸(至少1 $\mu\text{L}$ , pH 应降至4)终止反应。用500 $\mu\text{L}$  乙酸乙酯提取荧光产物,吸去上层乙酸乙酯相,下层残液用氮气流吹干,加200 $\mu\text{L}$  碳酸锂溶液(40mmol/L, pH 9.5)溶解残渣,溶液 pH 应在9~9.5。

### 2.4 衍生化反应

加入100 $\mu\text{L}$  DNS-Cl 乙腈溶液(1.5mg/mL)至200 $\mu\text{L}$  生物样本或标样(也用碳酸锂溶液配制)中,在室温条件下充分混合,避光静置2小时,再加入10 $\mu\text{L}$  2% 盐酸甲胺溶液终止反应。进样10~50 $\mu\text{L}$ 。

### 2.5 色谱条件

流动相溶剂 A 配比为缓冲液:乙腈 = 76:24 (V/V), 每升缓冲液中含 L-脯氨酸5mmol、硫酸铜2.5mmol、乙酸铵6.5mmol, 用1mol/L 氨水调至 pH 为7。溶剂 B 为纯甲醇。线性梯度洗脱如图1a 虚线所示。流量1mL/min, 色谱分析一次约需43分钟。

## 3 结果与讨论

经上述步骤处理后,样品和标样的色谱图见图1,其分离效果是令人满意的。但 NA 和 PA 是理化性质非常接近的同分异构体,只有在柱效高、分离度好的条件下才能达到基线分离。加入生物样本中内标物 NA 的平均回收率为84.0 $\pm$ 11.2%, 用内标法定量 PA。至少在40pmol~2nmol 范围内, 标样 NA 和

PA 的浓度与它们响应(峰面积)的线性关系良好,相关系数  $\gamma$  分别为 0.9997 和 0.9995 ( $n = 8$ )。以信噪比为 2 计,NA 和 PA 的最小检测量分别为 2.5 和 2.0 pmol。

分析血浆 PA 的关键是除去血浆中其他氨基酸和生物胺的干扰。用本法在酸性条件下提取 PA 时,除 PA 外,其他氨基酸和生物胺同时被提取,而这些化合物在血浆中的浓度要比 PA 高 10~1000 倍<sup>[7]</sup>。荧光胺能特异地与一级氨基酸和生物胺反应,其衍生物能用乙酸乙酯提取去除<sup>[8]</sup>。PA 等亚胺酸也能与荧光胺反应,但不产生荧光化合物,且该反应在酸性条件下是可逆的<sup>[4,6]</sup>,这样就去除了其他氨基酸和生物胺的干扰。如果干扰仍较大,可再次重复这一步骤。其次,在生物样本提取过程中 pH 的调节和用纯甲醇冲柱 10 分钟,都需认真掌握好,这对求得 PA 良好的响应和重复性是很重要的。

本实验测得正常人和肝病者血浆 PA 含量见表 1。由表可见,肝炎、肝癌和肝硬化病人血浆 PA 的

含量都非常明显高于正常人 ( $P < 0.01$ )。这一结果与前人的报道<sup>[1-6]</sup>是吻合的。

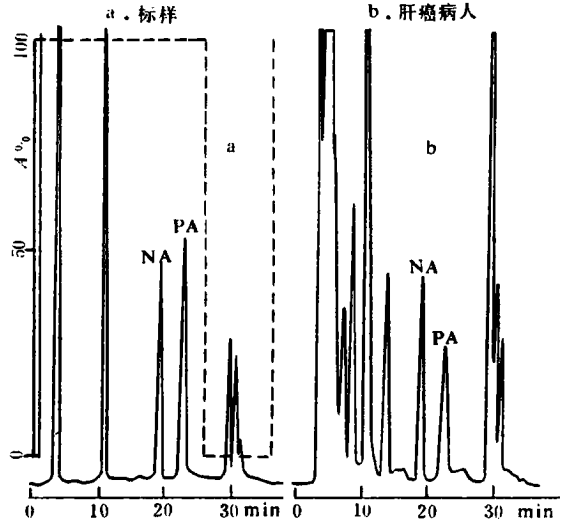


图1 标样和人血浆 PA 色谱图 (a. 标样, b. 肝癌病人。)

表1 正常人和肝病者血浆 PA 含量 (pmol/mL)

	正常人(19例)	肝炎(13例)	肝癌(19例)	肝硬化(14例)
均值±标准差	1065±261	2289±867 *	2362±670 *	6012±1377 *

\* 与正常人相比  $P < 0.01$

参考文献

1 Giacobini E *et al.* Cell Mol Biol, 1980; 26: 135  
 2 Woody N C *et al.* Pediat Res, 1970; 4: 85  
 3 Danks D M *et al.* J Pediat, 1975; 86: 382

4 Nishio H *et al.* Anal Biochem, 1983; 135: 312  
 5 Hutzler J *et al.* Clin Chem Acta, 1983; 128: 75  
 6 Nishio H *et al.* Clin Chem Acta, 1984; 143: 57  
 7 Gitlitz P H *et al.* Clin Chem, 1974; 20: 1305  
 8 Udenfriend S *et al.* Science, 1972; 178: 872

## Determination of Pipecolic Acid in Human Plasma by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection

Ye Weiling, Fang Ce and Li Hairong

(Shanghai Institute of Physiology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 200031)

In the present work, pipecolic acid PA in human plasma was measured with dansyl chloride precolumn derivatization, reversed-phase gradient elution and fluorescence detection. The interference of amino acid and bioamines was eliminated by reaction with fluorescamine and by extraction with ethyl acetate, Nipecotic acid (NA), isomer of PA, was used as internal standard. The mean recovery was 84%. In the range of 40 pmol to 2 nmol, at least, the amounts were linearly related with the peak areas ( $\gamma = 0.9997$  for NA and  $\gamma = 0.9995$  for PA,  $n = 8$ ). The limits of detection for NA and PA were 2.5 pmol and 2.0 pmol respectively. The analytical conditions performed in the present experiment were briefly discussed.

**Key words** high performance liquid chromatography, fluorescence detector, pipecolic acid, human plasma