

# HPLC-ECD 法测定大鼠血浆中同型半胱氨酸的含量

宋文婷<sup>1,2</sup>, 李磊<sup>1</sup>, 林成仁<sup>1</sup>, 刘建勋<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院西苑医院实验研究中心, 北京 100091;

2. 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029)

[摘要] 目的: 建立检测大鼠血浆中同型半胱氨酸(Hcy)含量的 HPLC-ECD 测定方法。方法: 大鼠血浆中的 Hcy 经二巯苏糖醇还原, 色谱系统采用 ODS2 反相柱, 10% 甲醇流动相分离, 用电化学检测器测定其浓度。结果: Hcy 浓度在 0.1 ~100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内线性关系良好, 相关系数为 0.999 3 ( $n=7$ ); 样品加样回收率为 100.73%, RSD=2.628%; 精密度 RSD=2.3%, 日内稳定性 RSD=2.61%, 日间稳定性 RSD=5.62%。结论: HPLC-ECD 法测定血浆中 Hcy 的含量, 操作简便, 灵敏度高, 稳定性及重复性好, 可用于大鼠血浆中 Hcy 含量的研究。

[关键词] 同型半胱氨酸; 高效液相色谱-电化学检测法; 血浆

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)03-0116-03

## Determination of Homocysteine Level in Rats' Plasma by HPLC-ECD

SONG Wen-ting<sup>1,2</sup>, LI Lei<sup>1</sup>, LIN Cheng-ren<sup>1</sup>, LIU Jian-xun<sup>1\*</sup>

(1. Center for research, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China;

2. School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract] Objective:** To establish a method for assay of homocysteine in rats plasma with High Performance Liquid Chromatography and Electrochemical Detector. **Methods:** Plasma homocysteine was reduced by dithiothreitol, separated on reverse phase ODS2 column with 10% methanol mobile phase and detected on ESA 5600 electrochemical detector. **Results:** The method showed excellent linearity over the concentration range 0.1 ~ 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  of Hcy ( $r=0.9993$ ,  $n=7$ ). The recoveries of analytes were from 96.79% ~104.40%. The precisions, and the stability of the analytes meet the requirements. **Conclusion:** The established method show high sensitivity and good reproducibility, which make it suitable to determine Hcy level in rats plasma.

**[Key words]** Homocysteine; HPLC-ECD; plasma

同型半胱氨酸(Hcy), 又称高半胱氨酸, 是一种含硫氨基酸, 其血浆浓度与冠心病、脑血管疾病的发生密切相关, 是临床心脑血管疾病的预测和预防的重要依据, 也是检验医学的一个重要指标<sup>[1]</sup>。

测定同型半胱氨酸的方法较多, 有液相色谱法, 气相色谱法, 酶联免疫法, 酶学分析法<sup>[2]</sup>等, 其中液

相色谱和气相色谱又可和质谱联用<sup>[3]</sup>测定, 而液相色谱又可配合紫外、电化学、荧光检测器<sup>[4~6]</sup>进行检测。现有文献中, 对于 Hcy 含量的测定多见于临床病人的血浆 Hcy 水平检测。随着心脑血管病实验研究的不断深入, 对心脑血管病的动物模型血浆中 Hcy 的水平也需要准确分析和定量。本实验建立了测定大鼠血浆中 Hcy 含量的液相色谱-电化学检测法(HPLC-ECD 法), 为进一步测定和评价药物对动物模型血浆中 Hcy 水平的影响奠定了基础。

### 1 材料

**1.1 仪器** 16 通道 Coularray 库仑阵列电化学高效

[收稿日期] 2009-09-11

[基金项目] 国家十一五重大新药创制专项(2009ZX09502-017); 国家自然科学基金重点项目(30830118)

[通讯作者] \* 刘建勋, Tel: (010) 62835601; Fax: (010) 62874049; E-mail: liujx0324@sina.com

液相色谱仪及色谱工作站、5600A 电化学检测器、582 液相泵、542 自动进样器、6210 碳石墨电极、CTO-324 可控温元件箱, 美国 ESA 公司产品; 台式 MIKRO 22R 离心机, 德国 Hettich 公司产品; AG2245 分析天平和 TELTA 320 pH 计, 上海 Mettler Toledo 仪器公司产品; 低温冰箱, 法国 JOUAN 公司产品; 针筒式微孔滤膜: 水系 (0.22  $\mu\text{m}$ ), 天津腾达过滤器厂产品; Purelab Plus 纯水机, 美国 PALL 公司产品。

**1.2 试剂** 同型半胱氨酸 (DL-Homocysteine Hcy), 辛烷基磺酸钠 (OSA), 高氯酸 85% ( $\text{HClO}_4$ ), 乙二胺四乙酸二钠盐 ( $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$ ) 均为 HPLC 级, 美国 Sigma Aldrich 公司产品; 二硫苏糖醇 (DTT) AR 级, 德国 Merck 产品; 甲醇 (MeOH) HPLC 级, 美国 Fisher Scientific 公司产品; 焦亚硫酸钠 ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) 温州东升化工厂, 磷酸氢二钠 ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ) 北京化工试剂二厂产品, AR 级。

**1.3 实验动物** 雄性 SD 大鼠 240 ~ 260 g, 北京维通利华实验动物中心提供, 合格证号: SCXK(京) 2007-0001。

## 2 方法

**2.1 色谱条件** Waters Spherisorb ODS2 色谱柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相: 10 mM 磷酸氢二铵, 12 mM 辛烷基磺酸钠, 10% 甲醇, pH 值 2.33  $\pm$  0.01。

ESA 582 液相泵流速为 1 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>; 电势 +450, +800 mV; 柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ 。进样量 10  $\mu\text{L}$ 。

**2.2 高氯酸工作液的配制** 分别配制 0.3 和 0.15 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>  $\text{HClO}_4$  工作液, 内含 0.04%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  和 0.04% EDTA。4  $^{\circ}\text{C}$  保存, 2 周内使用。

**2.3 Hcy 储备液的配制** 精密称取 13.52 mg Hcy, 以 0.15 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>  $\text{HClO}_4$  工作液定容, 配制成浓度为 1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Hcy 储备液, 低温冰箱保存。

**2.4 Hcy 标准品溶液的配制** 精密吸取 1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Hcy 储备液 1 mL, 以 0.15 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>  $\text{HClO}_4$  工作液配制成浓度为 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Hcy 标准品溶液; 再分别精密吸取上述溶液 10, 50, 100, 500, 1 000 和 5 000 mL, 分别加入 0.15 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>  $\text{HClO}_4$  工作液定容至 10 mL, 制成浓度分别为 0.1, 0.5, 1, 5, 10 和 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Hcy 标准品溶液。

**2.5 大鼠血浆样品溶液的制备** 取大鼠全血 1 mL, 15  $\mu\text{L}$  EDTA  $\cdot$  2Na (7.5%) 抗凝, 20  $^{\circ}\text{C}$  离心 (2 500 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>) 20 min, 分离血浆。因同型半胱氨酸在血

浆中大部分以氧化和结合形态存在, 故测定前需先还原, 再测定。取 200  $\mu\text{L}$  血浆加 50  $\mu\text{L}$  新鲜配制的 0.05 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> DTT 溶液, 室温放置还原 20 min, 再加入 0.3 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>  $\text{HClO}_4$  工作液 800  $\mu\text{L}$  沉淀蛋白, 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 (15 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>) 20 min, 上清液以 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 即得大鼠血浆样品溶液。

## 3 结果

**3.1 Hcy 测定条件的特异性** 在建立的高效液相测定条件下, Hcy 能与其它色谱峰良好分离, 基线平直, 峰形对称, 表明该色谱条件对 Hcy 的分离有良好的特异性。见图 1。

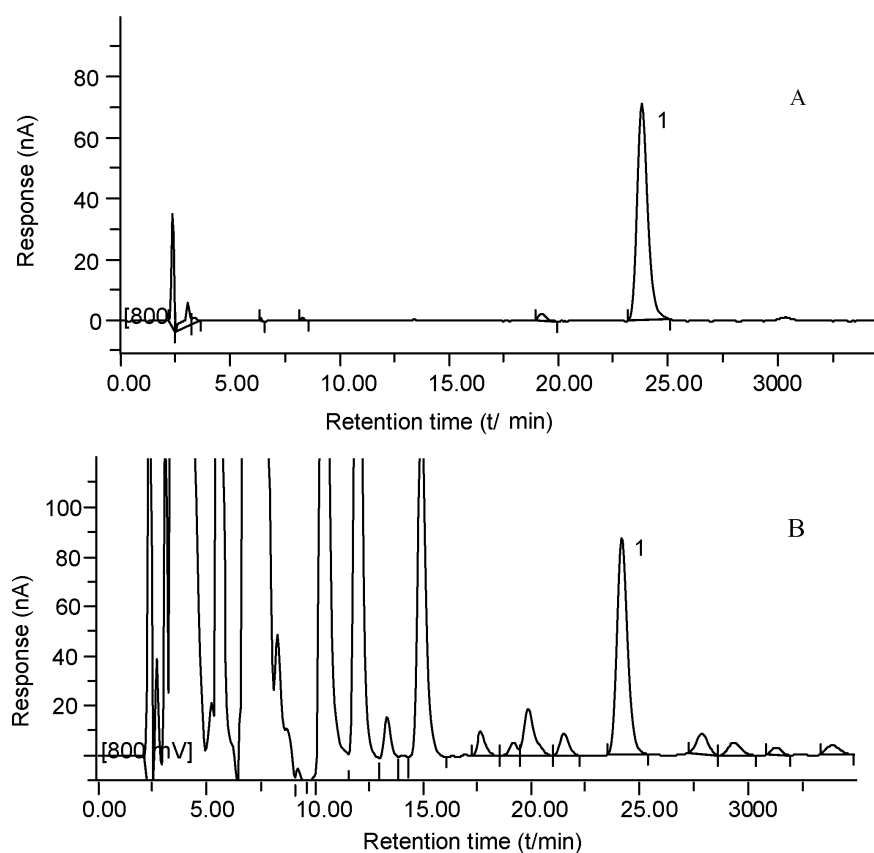


图 1 Hcy 标准品与大鼠混合血浆样品的色谱图

A. Hcy 标准品色谱图; B. 大鼠混合血浆样品色谱图 (1. Hcy)

**3.2 Hcy 线性关系考察** 按 2.4 项制备浓度为 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Hcy 标准品溶液, 进样量均为 10  $\mu\text{L}$ , 以峰面积值对浓度进行回归, 回归方程为:  $Y = 0.5585 X + 0.001325$ ,  $r = 0.9993$  ( $n = 7$ )。表明 Hcy 浓度 0.1 ~ 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  与峰面积线性关系良好。

**3.3 精密度实验** 按 2.5 项制备大鼠混合血浆 1 份, 连续进样 6 次, 测得样品中 Hcy 的含量, RSD = 2.30%, 表明精密度良好。结果见表 1。

### 3.4 稳定性实验

**3.4.1 日内稳定性实验** 按 2.5 项制备大鼠混合血浆 1 份, 于 0, 2, 6, 12, 24 h 分别测定样品中 Hcy 的含量, RSD = 2.61%, 表明同一个 Hcy 样品在 24 h 内稳定。

表 1 精密度测定结果

序号	Hcy 浓度( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	均值	RSD( % )
1	9.980		
2	9.848		
3	9.449		
4	9.426	9.660	2.30
5	9.561		
6	9.691		

**3.4.2 日间稳定性实验** 按 2.5 项制备大鼠混合血浆 1 份, 连续 3 d 测定 Hcy 的含量, 分析样品的日间稳定性, 结果分别为 3.122, 2.787, 3.015  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , RSD = 5.62%。

**3.5 重复性试验** 按 2.5 项制备大鼠混合血浆 6 份, 测得样品中 Hcy 的平均含量为 4.076  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , RSD = 1.43%。说明含量测定方法稳定, 重复性好。结果见表 2。

表 2 Hcy 重复性试验

序号	Hcy 浓度( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	均值( $\mu\text{mol}(\text{L}^{-1})$ )	RSD( % )
1	3.970		
2	4.060		
3	4.077		
4	4.136	4.076	1.43
5	4.105		
6	4.108		

**3.6 加样回收率试验** 取测定重复性的混合血浆, 加入 50  $\mu\text{L}$  新鲜配制的 0.05  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT 溶液, 室温放置还原 20 min, 加入 Hcy 浓度分别为 3.5, 4.75, 6  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 0.3  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{HClO}_4$  工作液各 800  $\mu\text{L}$ , 其余步骤同 2.5 项, 制得回收率测定样品。结果见表 3。加样平均回收率为 100.73%, RSD = 2.628%。认为该方法稳定可行, 可以用于准确的测定大鼠血浆中 Hcy 的含量。

表 3 Hcy 加样回收率试验

序号	样品中 Hcy 的量( nmol )	加入 Hcy 的量( nmol )	测得值( nmol )	回收率( % )	平均回收率( % )	RSD( % )
1	4.2798	2.8	6.990	96.79		
2	4.2798	2.8	7.203	104.40		
3	4.2798	2.8	7.007	97.40		
4	4.2798	3.8	8.137	101.51		
5	4.2798	3.8	8.150	101.85	100.73	2.628
6	4.2798	3.8	8.099	100.51		
7	4.2798	4.8	9.066	99.71		
8	4.2798	4.8	9.087	100.15		
9	4.2798	4.8	9.286	104.30		

#### 4 讨论

吕伟标等<sup>[7]</sup>比较了多种测定 Hcy 含量的方法, 认为 HPLC 法是灵敏度和精密度高且广泛应用的一

种方法。由于电化学检测器的使用, 使得方法的灵敏度比紫外和荧光检测法大大提高, 用于低含量样品的测定更加准确, 并且电化学检测无需柱前衍生化, 避免了衍生反应过程中引入的误差, 也减少了因衍生物不稳定而引入的误差。因血浆中的大部分同型半胱氨酸以氧化型存在并与蛋白结合或自身形成二聚体, 在电化学检测前需先进行还原, 使同型半胱氨酸成为具有电化学活性的还原型再进行测定。本实验采用的还原剂是二硫苏糖醇, 该试剂易于得到, 便于保存; 该还原反应简单、易操作, 误差小, 重复性好。

HPLC-ECD 法测定大鼠血浆中 Hcy 的方法具有良好的专属性、宽广的线性范围及精密稳定的特点; 本实验可检测的 Hcy 浓度最低可达 0.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 最高可达 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 比王旗等<sup>[8]</sup>建立的方法灵敏度更高; 不仅能测定低浓度的 Hcy, 而且在大鼠造成代谢失调的模型后血浆中 Hcy 浓度升高情况下仍可准确检测其含量, 是可以广泛应用的检测手段。

综上所述, HPLC-ECD 法测定大鼠血浆中 Hcy 的含量, 方法精密、稳定, 重复性好, 可用于大鼠血浆中 Hcy 水平的检测, 也为监测药物对大鼠血浆中 Hcy 水平的影响奠定了基础。

#### [参考文献]

- [1] 宋清扬, 孙佳, 王红. 同型半胱氨酸与心脑血管疾病[J]. 山东医药, 2008, 48(4): 112.
- [2] 陈继中, 唐吉斌, 姜开明. 循环酶法测定血浆同型半胱氨酸的方法学评价[J]. 实用医技杂志, 2001, 33(14): 4545.
- [3] 刘罡一, 余琛, 杜向阳, 等. 用液相色谱-串联质谱法测定血浆总同型半胱氨酸[J]. 药学服务与研究, 2003, 3(4): 224.
- [4] 蔡东联, 陈小莉. 高效液相测定同型半胱氨酸方法的建立[J]. 氨基酸与生物资源 2001, 23(1): 48.
- [5] Atul F. Kamath, Anil K. Chauhan, Janka Kisucka, et al. Elevated levels of homocysteine compromise blood-brain barrier integrity in mice[J]. Blood, 2006, 107(15): 591.
- [6] Wojciech Sawula, Zyta Banecka-Majkutewicz, Leszek Kadzinski, et al. Improved HPLC method for total plasma homocysteine detection and quantification[J]. Acta Biochemica Polonica, 2008, 55(1): 119.
- [7] 吕伟标, 罗玲. 检测同型半胱氨酸的方法学进展和评价[J]. 临床和实验医学杂志, 2008, 7(7): 175.
- [8] 王旗, 宋洋, 李潭. 高效液相色谱电化学检测法测定血浆中同型半胱氨酸[J]. 中华预防医学杂志, 2004, 38(3): 204.