

大鼠肠黏膜组织中谷氨酰胺测定方法的建立及应用

贾珊珊¹, 李增宁^{1△}, 赵颖², 康维均² (河北医科大学: 1. 第一医院营养科;
2. 公共卫生学院, 石家庄 050031)

【摘要】 目的 建立一种准确、简便、快速的高效液相色谱法, 用于测定大鼠肠黏膜组织中谷氨酰胺的含量。**方法** 以异硫氰酸苯酯作柱前衍生剂, 反相 C18 柱为固定相, 以 50 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 6.05): 乙腈=94:6 为流动相进行洗脱, 在 254 nm 紫外波长处测定谷氨酰胺的含量。**结果** 在 0.03~2.50 mmol/L 之间线性关系良好 ($r=0.9965$), 回收率为 82.16%~115.22%。**结论** 该方法简便、准确, 适用于对肠黏膜组织中谷氨酰胺含量的测定分析。

【关键词】 肠黏膜; 谷氨酰胺; 高效液相色谱法; 大鼠;

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.01.007 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)01-0016-02

HPLC determination and application of glutamine content in rats intestines mucous membrane tissues JIA Shan-shan¹, LI Zeng-ning^{1△}, ZHAO Ying², KANG Wei-jun² (1. Department of Nutrition, First Hospital of Hebei Medical University; 2. Public Health College, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050031, China)

【Abstract】 Objective To establish one kind of accurate, simple and fast high performance liquid phase chromatography (HPLC) method to determine the glutamine content in rats intestines mucous membrane organization. **Methods** To take phenyl isothiocyanate (PITC) as the precolumn derivatization agent, the reverse phase C18 column as the fixed phase and 50 mmol/L sodium acetate buffer solution (pH 6.05): acetonitrile (94:6) as the mobile phase for carrying out elution. The glutamine content was determined at the ultraviolet wavelength of 254 nm. **Results**

The good linearity was in the range of 0.03—2.5 mmol/L ($r=0.9965$). The recovery rate was 82.16%—115.22%. **Conclusion** This method is simple and accurate, which is suitable for the glutamine content determination in intestines mucous membrane tissues.

【Key words】 intestinal mucosa; Glutamine; chromatography, high pressure liquid; rats

谷氨酰胺 (glutamine, Gln) 是血清中含量最丰富的氨基酸。肺和骨骼肌将 Gln 释放入血, 肠、肾和免疫细胞对 Gln 利用度最高^[1-2], 占总游离氨基酸的 61%, 其中 75% 存在于骨骼肌中。它又是一个组织特需氨基酸, 为生长迅速的细胞所特需, 肠黏膜细胞需要 Gln 作为其主要能量, 在调节细胞间紧密连接蛋白分布和维持肠黏膜完整性方面起着重要作用^[3]。Gln 在临床疾病中的应用十分广泛, 近来的研究证实, 在疾病和创伤阶段 Gln 作为非常关键的信号分子, 调节许多有关细胞防御与修复、代谢、信号转导等基因的表达, 激活胞内信号转导通路, 对细胞修复和免疫调节至关重要^[4]。因此, 本文旨在建立一种简便、迅速、准确测定肠黏膜组织中 Gln 的高效液相色谱分析方法, 为进一步研究 Gln 在营养代谢中的作用, 特别是对肠道功能影响的研究提供了条件。

1 材料与方法

1.1 材料 HITACHI 高效液相色谱仪 (日本)、C18 色谱柱 (大连依利特)、低速离心机 (北京医用离心机厂)、超声清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)、SHD-III 型循环水式多用真空泵 (保定高新区阳光科教仪器厂)、MTN-2800D 氮吹浓缩装置 (天津奥特塞恩斯仪器有限公司)、XW-80A 漩涡混合器 (上海医科大学仪器厂)、异硫氰酸苯酯 (phenyl isothiocyanate, PITC) (Sigma 公司)、三乙胺 (北京化学试剂公司, 分析纯)、无水乙醇 (安徽特级乙醇总厂, 分析纯)、乙腈 (美国 Honeywell international inc, 色谱纯)、Gln 标准品 (北京拜尔迪生物公司);

磷酸氢二钠、磷酸、醋酸钠、醋酸等其他试剂均为分析纯; 实验用水均为双蒸水。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 50 mmol/L 醋酸钠缓冲溶液 (pH 6.05): 乙腈=94:6, 流速 1.0 mL/min; 柱温: 室温; 紫外检测波长: 254 nm; 灵敏度 0.08; 进样量 20 μL; 全程 24 min。醋酸钠缓冲液经 0.45 μm 滤膜过滤。

1.2.2 样品处理 Wistar 大鼠, 来自河北医科大学动物中心, 肠黏膜组织样品: 取组织 0.5 g, 加生理盐水 0.5 mL, 置于匀浆器匀浆 (4℃), 然后取 0.5 mL 匀浆液, 加等量乙腈, 离心 20 min (4℃ 2 500 r/min), 取上清液衍生后进样。血样品: 去全血 2 mL, 置于抗凝管中, 离心 20 min (4℃ 2 500 r/min), 取血浆 0.5 mL, 加等量乙腈, 离心 20 min, (4℃ 2 500 r/min), 取上清液衍生后进样。

1.2.3 衍生 (1) 衍生剂配制: 取异硫氰酸苯酯 40 μL, 分别加入超纯水 40 μL、三乙胺 40 μL 和无水乙醇 280 μL, 混匀, 临用前配制。样品稀释液: 准确取磷酸氢二钠 355 mg, 加超纯水 450 mL 溶解, 用 10% 磷酸-乙腈 (95:5) 混合液调 pH 至 7.40, 加水至 500 mL, 混匀, 4℃ 保存备用。(2) 衍生: 分别取处理过的样品及标准品 20 μL, 加 20 μL 衍生试剂, 室温反应 20 min, 氮气吹干, 加 100 μL 样品稀释液, 充分复溶后, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 取 20 μL 进样。

2 结 果

2.1 色谱图 Gln 标准品、大鼠血清及组织中 Gln 图谱分别见图 1~4, Gln 的保留时间为 10.38 min。

2.2 标准曲线及检出限 Gln 标准品的浓度与峰面积在 0.03~2.50 mmol/L 时线性关系良好, 工作曲线方程为 $Y=72529X+4214.6$, $r=0.9965$ 。经计算, 本法的最低检出浓度为 0.011 mmol/L。

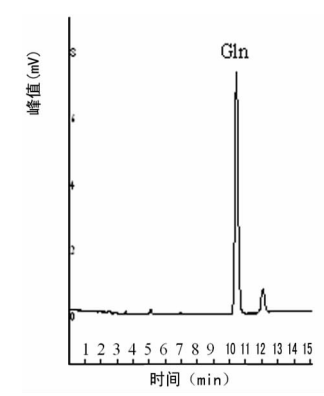


图 1 Gln 标准品衍生色谱图

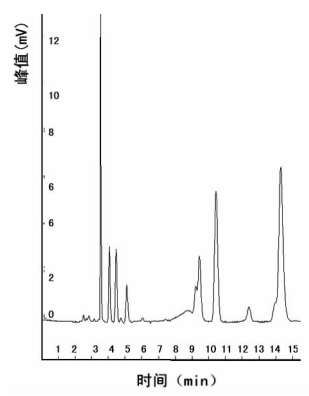


图 2 大鼠肌肉组织衍生色谱图

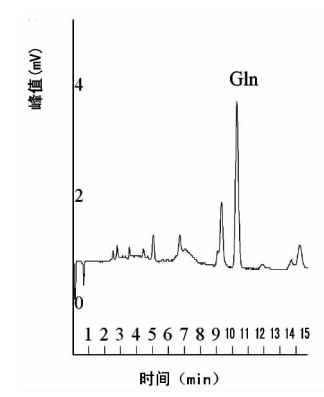


图 3 大鼠血清衍生色谱图

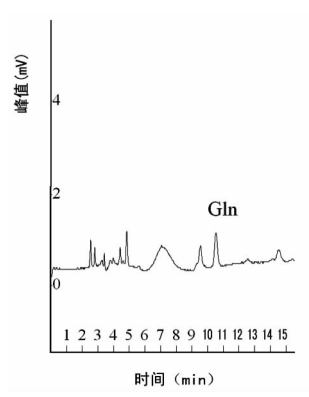


图 4 大鼠肠黏膜组织衍生色谱图

2.3 加标回收率、精密度 在 3 种样品中加入已知浓度 (0.300、0.625、1.000 mmol/L) 的 Gln 标准品进样检测, 回收率 82.16%~115.22%。取同一标准品重复测定 5 次, 变异系

数为 2.46%。

3 讨 论

目前氨基酸测定中应用最广泛的一种衍生剂是邻苯二甲醛^[5], 虽然其衍生时间短, 但衍生物极不稳定, 而本文用异硫氰酸苯酯作为衍生剂, 虽然衍生时间长, 但是衍生物稳定, 在常温下可保存 6 h^[6]。

本文采用了等度洗脱的方法进行色谱分析, 发现 Gln 能与杂峰完全分离, 简化了实验方法。实验结果测得 Gln 的浓度在肌肉组织中为最高, 血浆中次之, 而在肠黏膜组织中其浓度明显低于血浆, 这与大量文献报道相一致^[7-8]。加标回收率证实本方法准确可靠, 表明本研究建立的方法简便、准确, 适用于血清及组织中 Gln 含量的分析。为更好地研究 Gln 在营养代谢中的作用及对患者 Gln 的临床监测提供了技术支持。

参考文献

[1] 耿桂启, 朱也森. 谷氨酰胺的肠道保护作用研究进展[J]. 医学理论与实践, 2007, 20(12): 1393-1395.
[2] Lacey JM, Wilmore DW. Is glutamine a conditionally essential nutrient? [J]. Nutr Rev, 1990, 48: 297-302.
[3] Li N, Lewis P, Samuelson D, et al. Glutamine regulates Caco-2 cell tight junction proteins[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004, 287: 726-733.
[4] Curi R, Newsholme P, Procopio J, et al. Glutamine, gene expression, and cell function[J]. Front Bio Sci, 2007, 12: 344-357.
[5] 梁建伟, 陈蕾, 曹丽萍, 等. 反相高效液相色谱法测定烧伤患者血浆中谷氨酰胺的含量[J]. 河北医药, 2003, 25(8): 566-567.
[6] Steven A, Daniel J. Amino acid analysis utilizing phenylisothiocyanate derivatives[J]. Anal Biochem, 1998, 174: 1-16.
[7] 刘艳丽, 李春雷, 牟瑜瑜. 谷氨酰胺在临床疾病中的应用[J]. 中国医疗前沿, 2010, 5(7): 18-20.
[8] 白顺滢, 彭艳, 高采平, 等. 酒精性肝损伤大鼠肠道屏障功能改变及谷氨酰胺的保护作用观察[J]. 实用肝脏病杂志, 2009, 12(2): 87-90.

(收稿日期: 2010-08-30)

(上接第 15 页)

[5] Friedman AN, Hunsicker LG, Selhub J, et al. Proteinuria as a predictor of total plasma homocystein levels in type 2 diabetic nephropathy[J]. Diabetes Care, 2002, 25(11): 2037-2041.
[6] 杨丽娟, 母义明. 2 型糖尿病与炎症及抗炎疗法[J]. 实用糖尿病杂志, 2006, 2(2): 4-7.
[7] Barzilay JI, Abraham L, Heckbert SR, et al. The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the cardiovascular health study [J]. Diabetes, 2001, 50(10): 2384-2389.
[8] Lateiza F, Price P, Scolt G, et al. Cystatin C: and im-

proved estimator of glomerular filtration rate[J]. J Clin Chem, 2003, 52: 699-707.
[9] 何冰, 韩萍, 吕先科. 2 型糖尿病患者急性时相蛋白与糖尿病肾病的关系[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2003, 19(4): 260-262.
[10] 涂良水, 詹爱霞. 糖尿病肾病患者血清胱抑素 C 及同型半胱氨酸的变化及相关性研究[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(8): 1262-1263.

(收稿日期: 2010-08-12)