

高效液相色谱法测定多巴胺- β -羟化酶活性

阮国洪^{1,2} 邬春华¹ 郑力行¹ 吴强恩¹ 顾锡安¹ 周志俊^{1 Δ}

(¹复旦大学公共卫生学院劳动卫生教研室 上海 200032; ²福建医科大学公共卫生学院营养与保健医学系 福州 350004)

【摘要】 目的 建立一种通过高效液相色谱法测定酶促反应的产物真蛎胺(Octopamine)的量来确定大鼠血清及脑组织中多巴胺- β -羟化酶活性的方法。方法 采用 ODS 柱,流动相为缓冲液(0.02 mol/L 柠檬酸三钠和 0.05 mol/L 磷酸氢二钠):甲醇 = 85:15 的溶液,流速 1.0 mL/min。结果 待测物真蛎胺标准溶液的保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.29~0.67 之间和 0.09~0.36 之间,重现性好;回收率在 85.3%~95.4% 之间,检测限 1.58 pmol/mL;真蛎胺的线性范围在 10~160 pmol/mL 之间,相关系数为 0.999 6。结论 该方法为神经毒理学、药理学等研究提供了一个简单灵敏、稳定可靠的方法。

【关键词】 高效液相色谱; 电化学检测; 多巴胺- β -羟化酶; 活性; 大鼠

【中图分类号】 TQ 460.7⁺2 **【文献标志码】** A

Determination of dopamine- β -hydroxylase in rat serum and brain tissue by high performance liquid chromatography with electrochemical detector

RUAN Guo-hong^{1,2}, WU Chun-hua¹, ZHENG Li-xing¹, WU Qiang-en¹,
GU Xi-an¹, ZHOU Zhi-jun^{1 Δ}

(¹Department of Occupational Health, School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China;

²Department of Nutrition and Health Care, School of Public Health, Fujian

Medical University, Fuzhou 350004, Fujian Province, China)

【Abstract】 **Objective** To develop a rapid, reliable and simple method detecting dopamine- β -hydroxylase in rat serum and brain tissue by high performance liquid chromatography with electrochemical detector. **Methods** An ODS column was selected as separation column at room temperature, and the mobile phase (pH4.50) consisted of 0.02 mol/L trisodium citrate and 0.05 mol/L disodium phosphate containing 15% methanol (volume ratio) in distilled water. The mobile phase was pumped at a flow rate of 1.0 mL/min and the oxidation potential was set at +0.75 V. Octopamine in the brain tissue (striatum) and serum was separated and determined under the above conditions. **Results** RSD% of the retention time and peak area of standard sample was in a range of 0.29 - 0.67 and 0.09 - 0.36, respectively. The recovery of the analyte was over 85%. The detection limit of 1.58 pmol/mL for octopamine was achieved with standard solutions. The linearity was over a range of 10 - 160 pmol/mL for octopamine, and the linearity relation coefficient was 0.999 6. **Conclusions** The assay has been applied successfully to measure the cortex and serum concentrations of dopamine- β -hydroxylases in rats.

【Key words】 HPLC; electrochemical detection; dopamine- β -hydroxylases; activity; rat

多巴胺- β -羟化酶(dopamine- β -hydroxylases, D β H)是多巴胺脱羧转变成去甲肾上腺素(NE)过程

的合成限速酶^[1]。D β H 活性的测定在精神疾病和神经疾病研究方面具有非常重要的意义。免疫组织

化学和免疫细胞化学方法只能是半定量检测^[2,3], 自从 Nagatsu 等^[4]介绍用紫外分光光度法测定人血清中 D β H 的活性以来, 国内外许多学者都做了大量的研究工作^[5,6], 但由于该方法中所需的 Dowex50 + 树脂不易得到, 而且没有突破灵敏度较低的紫外分光光度法, 故使该方法的应用受到了限制。尤其是在动物实验中, 特别是鼠血清中 D β H 活性非常低, 因此该方法未能在科研中广泛应用。本实验采用高效液相色谱电化学检测方法测定多巴胺- β -羟化酶反应产物真蛸胺的量来确定多巴胺- β -羟化酶的活性。

材料和方法

仪器 LC-10A 型高效液相色谱仪(日本 SHIMADZU), Waters460 电化学检测器(美国 Waters 公司)和 SrAdv 色谱工作站(上海军锐信息技术有限公司)。MicroMax RF 高速离心机(北京医用离心机厂), LXJ-II B 低速离心机(北京医用离心机厂)。

试剂 真蛸胺(Octopamine, 5.0 mmol/L 标准储备液)、过氧化氢酶(Catalase, $\geq 500\ 000$ U/mL), 酪胺(Tyramine, 0.4 mol/L)和乙烷基顺丁烯二酰亚胺(N-ethyl-maleimide, 0.2 mol/L), 巴吉林(Pargyline, 20 mmol/L)5 种试剂均购自 Fluka 公司。NaAc(1.0 mol/L)、抗坏血酸(ascorbate acid, 0.2 mol/L, 新鲜配制)、延胡索酸(Fumarate, 0.2 mol/L), 三氯乙酸(3 mol/L), 柠檬酸三钠, 磷酸氢二钠, 购自国药集团化学试剂有限公司(AR 级)。甲醇、乙腈(HPLC Grade, 迪马公司)。

色谱条件 色谱柱(Hypersil ODS-3 250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m, 日本 GL 公司), 保护柱(10 mm \times 4.6 mm, DIKMA 公司)。流动相为缓冲液(0.02 mol/L 柠檬酸三钠和 0.05 mol/L 磷酸氢二钠): 甲醇 = 85:15 的溶液, 流速为 1.0 mL/min。电化学检测玻碳电极为工作电极, Ag/AgCl 电极为参比电极, 设定电压为 +0.75 V。实验在室温下进行, 真蛸胺和酪胺完全分离; 杂质峰不干扰测定。

实验原理与酶活性定义 以酪胺为酶促反应底物, 在 D β H 催化下, 酪胺可转变成真蛸胺, 如图 1。用高效液相色谱电化学检测法(HPLC-ECD)直接检测真蛸胺的含量, 外标法定量, 通过反应产物真蛸胺的量来确定多巴胺- β -羟化酶的活性。脑组织和血清中 D β H 活性定义为在标准条件下, 每毫克湿重脑组织或每毫升血清每小时产生的真蛸胺摩尔数, 以 pmol \cdot mg⁻¹ \cdot h⁻¹ 和 pmol \cdot mL⁻¹ \cdot h⁻¹ 表示, 均

简称活性单位 U。

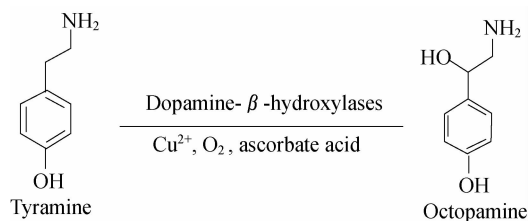


图 1 酪胺酶促反应式

Fig 1 The reaction equation of tyramine under conditions of dopamine- β -hydroxylases

样品的制备 雄性 SD 大鼠, 体重(200 \pm 10)g, 由复旦大学动物部提供。实验动物经断头处死。收集血液置于离心管中, 并分离脑组织纹状体。血液 4 $^{\circ}$ C 静置 2 h 后, 12 000 r/min 离心 10 min, 取血清待测。纹状体称重, 加入 0.5 mL 生理盐水匀浆待测。

D β H 酶活性测定步骤 取 25.0 μ L 脑组织匀浆液、血清加入 2.0 mL 离心塑料管中。每管加入重蒸水, 总体积为 400 μ L。各管分别加入 NaAc 200 μ L, 抗坏血酸 50 μ L, Catalase 3.0 μ L, Tyramine 50 μ L, Pargyline 50 μ L; Fumarate 50 μ L, N-ethyl-maleimide 150 μ L, 混匀。95 $^{\circ}$ C 煮 5 min 的样品作空白对照。将反应体系暴露于空气中。37 $^{\circ}$ C 水浴震荡 60 min。各管加入三氯乙酸 200 μ L 终止反应。混合物 2 000 r/min 离心 5 min。吸取上清液 20.0 μ L 直接进样。

标准曲线的制备 用 5.0 mmol/L 真蛸胺储存液, 倍比稀释, 制备浓度分别为 10.0、20.0、40.0、80.0 和 160.0 pmol/mL 的标准系列溶液, 经前述 D β H 活性测定步骤, 测定 3 次, 以峰面积对浓度计算标准曲线的回归方程。

结 果

线性范围和检测限 真蛸胺的线性范围在 10.0 ~ 160.0 pmol/mL 之间, 回归方程为 $Y = 9\ 302X + 5\ 163$, 相关系数为 0.999 6。使用三倍噪声峰面积所对应的浓度(S/N=3)计算检测限。真蛸胺的检测限是 1.58 pmol/mL, 灵敏度高。

准确度 分别加入 10.0 pmol/mL、20.0 pmol/mL、100.0 pmol/mL 3 种剂量的标准溶液到血清和脑组织中, 每个浓度平行做 3 份, 测定 3 次并计算回收率。真蛸胺回收率在 85.3% ~ 95.4% 之间, 回收率较好。

精密性 天内精密性: 对 3 种 Octopamine 浓度为 10.0 pmol/mL、20.0 pmol/mL 和 100.0 pmol/mL 的标准溶液, 经样品处理过程各测定 10 次, 计

算变异系数。3个浓度水平的真蛎胺 RSD(经样品处理过程)在 0.39~0.97 之间,重现性良好。日间精密度:对待测物 Octopamine 浓度在 100.0 pmol/mL 水平经样品处理过程,且为不同天数的 10 天测定结果。RSD 为 0.9,显示出良好的重复性。

色谱结果 本试验条件下,真蛎胺和酪胺在 20 min 内得到良好分离。真蛎胺和酪胺的标准品色谱图,如图 2。大鼠脑组织纹状体色谱图如图 3。

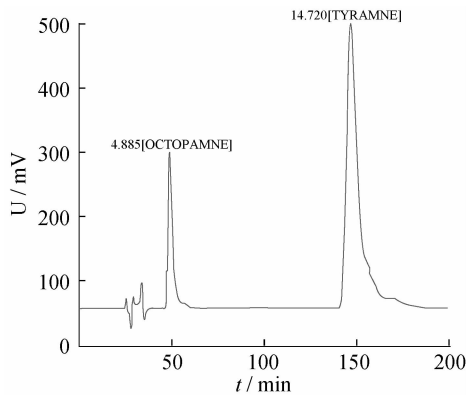


图 2 Octopamine 和 tyramine 标准品色谱图
Fig 2 Chromatogram of a standard mixture of octopamine and tyramine

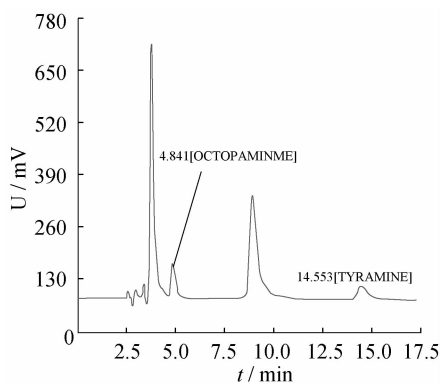


图 3 大鼠脑组织纹状体色谱图
Fig 3 Chromatogram of the octopamine and tyramine in rat brain tissue

样品测定结果 8 只大鼠脑组织样品按照前述方法测定,外标法定量,并计算出活性单位 U,结果见表 1。

表 1 大鼠脑组织纹状体和血清 D β H 活性(U)

Sample	1	2	3	4	5	6	7	8
Cortex	132	126	118	128	159	113	143	151
Serum	533	515	511	524	582	495	563	576

讨 论

分析条件优化:(1)流动相的优化。本实验对

流动相的组成、配比和 pH 进行实验研究,结果发现柠檬酸三钠、磷酸氢二钠和甲醇为最佳组合,流速 1.0 mL/min。研究发现,甲醇的体积分数,真蛎胺和酪胺的保留时间减小,反之则增加,这说明被分离组分的分离度和分析时间受流动相中甲醇配比影响较大,但不改变出峰的次序。实验研究还发现流动相 pH 增加,真蛎胺和酪胺的分离度随之增大,pH 4.50 时为最佳。所以本实验流动相最佳组成为 pH 4.50,甲醇的体积分数为 15%。(2)检测电压的设定。分别用 0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.65、0.70、0.75、0.90 V 检测电压进行优化分析,检测电压太高,干扰峰太多,检测电压太低,灵敏度不够,通过比较分析,选择 0.75 V 作为检测电压。(3)pH 值等条件优化。在 D β H 活性测定过程中,酶促反应体系的 pH 值非常重要,pH 值太高和太低都会降低 D β H 活性,通过实验得知最佳 pH 值在 5.0,在 pH 值 4.50~5.50 也可以接受,pH 值超出此范围,D β H 活性会显著下降。

Nagatsu 等^[4]介绍用紫外分光光度计法测定人血清中 D β H 的活性方法非常烦琐,灵敏度又低。本文经过多次实验,将 Nagatsu 的方法加以改进,首次用高效液相色谱电化学检测法(HPLC-ECD)直接检测 D β H 的酶促反应底物酪胺转变成真蛎胺的含量(pmol/mL),而且酶促反应底物酪胺含量下降也能同时测定,今后将深入一步进行实验,探讨是否可直接测定真蛎胺与酪胺的比值来确定 D β H 的酶活性。本实验无需 Dowex50 + 树脂及以后的试剂和步骤,与紫外分光光度法(nmol/mL)相比,由于灵敏度提高 1 000 倍以上,水浴时间可以减少一半,使 D β H 活性测定更加灵敏和准确,而且快速可靠。酶促反应体系中抗坏血酸等浓度太高会干扰测定,需加以精确控制。D β H 是将多巴胺脱羧转变成去甲肾上腺素过程的合成限速酶。一般来说,D β H 活性在个体内是相对稳定的,不受饮食、活动、外来刺激、昼夜节律和季节的影响^[7]。

实验建立了一种快速准确测定大鼠血清及脑组织中多巴胺- β -羟化酶活性的高效液相色谱电化学检测方法。通过线性试验、回收试验、精密度试验以及样品的测定,验证了方法的可行性,为神经毒理学、药理学、精神病学等研究提供了一个简单灵敏、稳定可靠的方法。

参 考 文 献

- [1] Garcia GB, Konjuh C, Duffard RO, *et al.* Dopamine-beta-hydroxylase immunohistochemical study in the locus coeruleus

- of neonate rats exposed to 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid through mother's milk[J]. *Drug Chem Toxicol*, 2006, 29(4): 435 - 442.
- [2] Oropeza VC, Mackie K, Van Bockstaele EJ. Cannabinoid receptors are localized to noradrenergic axon terminals in the rat frontal cortex[J]. *Brain Res*, 2007, 7(1): 36 - 44.
- [3] Tang YL, Buxbaum SG, Waldman I, et al. A single nucleotide polymorphism at DBH, possibly associated with attention-deficit/hyperactivity disorder, associates with lower plasma dopamine beta-hydroxylase activity and is in linkage disequilibrium with two putative functional single nucleotide polymorphisms[J]. *Biol Psychiatry*, 2006, 60(10): 1 034 - 1 038.
- [4] Nagatsu T, Udenfriend S. Photometric assay of dopamine-beta-hydroxylase activity in human blood[J]. *Clin Chem*, 1972, 18(9): 980 - 984.
- [5] 刘林林, 孙宝胜, 杨巍, 等. 改良的紫外分光光度计法检测小鼠血清中多巴胺羟化酶活性的方法[J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2003, 29(3): 370 - 371.
- [6] Deinum J, Steenbergen-Spanjers GCH, Jansen M, et al. DβH gene variants that cause low plasma dopamine-β-hydroxylase with or without a severe orthostatic syndrome[J]. *J Med Genet*, 2004, 41: 38 - 42.
- [7] Zhang WY, Wang L, Liu LL. The study of levels of norepinephrine and dopamine-β-hydroxylase in patients with pregnancy-induced hypertension[J]. *Chin Med J (Taipei)*, 2001, 64(6): 351 - 355.

(收稿日期: 2008 - 11 - 03; 编辑: 王蔚)

(上接第 341 页)

- [6] 余丹阳, 刘又宁. 多药耐药阴沟肠杆菌临床株 ampC 基因的克隆和表达[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2007, 6(5): 329 - 333.
- [7] 吴伟元, 陈民钧. 阴沟肠杆菌 ampD 基因突变与去阻遏持续高产 ampC 酶[J]. *中国抗感染化疗杂志*, 2001, 1(2): 65 - 69.
- [8] 张嵘, 郑芳, 金亚平, 等. 肠杆菌科细菌去阻遏持续高产 ampC 酶的检测与 ampD 基因突变的研究[J]. *临床检验杂志*, 2003, 121(14): 199 - 202.
- [9] 顾怡明, 张杰, 俞云松, 等. ampD-ampR 调节基因与阴沟肠杆菌 ampC 酶表达关系的研究[J]. *首都医科大学学报*, 2004, 25(1): 44 - 48.
- [10] Ehrhardt AF, Sanders CC, Romero JR, et al. Sequencing and analysis of four new enterobacter ampD alleles[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40(8): 1 953 - 1 956.
- [11] Stapleton P, Shannon K, Phillips I. DNA sequence differences of ampD mutants of citrobacter freundii[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(11): 2 494 - 2 498.
- [12] Bennett PM, Chopra I. Molecular basis of β-lactamase induction in bacteria[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993, 37(2): 153 - 158.

(收稿日期: 2008 - 11 - 17; 编辑: 王蔚)