

## 邻苯二甲醛柱前衍生化法快速高效测定液体生物样品 L- 蛋氨酸含量

霍文艳<sup>1)</sup>, 张钰文<sup>2)</sup>, 徐天勇<sup>2)</sup>, 吴 怡<sup>2)</sup>, 田长富<sup>1)</sup>, 张华堂<sup>1)</sup>

(1) 昆明医科大学生物医学工程研究中心; 2) 昆明医科大学科研实验中心, 云南 昆明 650500)

**[摘要]** **目的** 拟建立一种快速、简单、灵敏的血浆等生物样品中 L- 蛋氨酸的含量测定方法. **方法** 用邻苯二甲醛 (OPA) 柱前衍生化法分离并定量 C57 小鼠血浆中 L- 蛋氨酸, 采用反向色谱柱 ODS (4.6 mm × 250 mm); pH 7.2 10 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (PB) 含 0.2% THF 和 PB- 甲醇-乙腈 (50: 35: 15) 为流动相梯度洗脱; 紫外检测器 340 nm 检测. **结果** 邻苯二甲醛柱前衍生化法的最低检出限浓度为 0.5 μmol/L, 8 min 内分离测定了血浆 L- 蛋氨酸的含量, 12 min 内血浆所有氨基酸全部洗脱; 在 0.5~100 μmol/L 进样浓度范围内, L- 蛋氨酸的峰面积与浓度呈现良好的线性关系, 相关系数 0.999 8, 对于 L- 蛋氨酸的标准加入回收率在 94.63% 和 97.99% 之间.

**结论** 邻苯二甲醛柱前衍生化法是一种快速简便的紫外检测液体生物样品中 L- 蛋氨酸含量的方法.

**[关键词]** 蛋氨酸; 邻苯二甲醛; OPA 柱前衍生; 紫外检测

**[中图分类号]** Q782 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 06 - 0012 - 04

## Fast and Convenient Method to Determine The L - methionine Content in Liquid Biological Samples with O-Phthaldialdehyde (OPA) Pre-column Derivation

HUO Wen - yan<sup>1)</sup>, ZHANG Yu - wen<sup>2)</sup>, XU TIAN - yong<sup>2)</sup>, WU Yi<sup>2)</sup>, TIAN Chang - fu<sup>1)</sup>, ZHANG Hua - tang<sup>1)</sup>

(1) Biomedical Engineering Rresearch Center of Kunming Medical University; 2) Experiment Center for Medical Science Research, Kunming Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a rapid, simple, sensitive method to determine L - methionine content in biological samples, such as blood plasma. **Method** The O-Phthaldialdehyde (OPA) Pre-column Derivation method was used to separate and quantify L-methionine in plasma of C57 mice, with reverse chromatographic column ODS (4.6 × 250 mm). The mobile phase of PH 7.2 10 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (PB) containing 0.2% THF and PB-methanol-acetonitrile (50:35:15) was used to gradiently elute; the results were tested under 340 nm with UV detector. **Results** The concentration of the minimum detection limit was 0.5 μmol/L. Separation and determine of the content of plasma L-methionine was finished within 8 minutes, all others amino acids in plasma were finished within 12 minutes. Between the range of 0.5-100 μmol/L sample concentration, peak area and concentration of L-methionine showed perfect linear relationship, the correlation coefficient was 0.9998. The recovery rate of the L-methionine was between 94.63% and 97.99%. **Conclusion** This study established a quick and easy ultraviolet detection method for liquid L-methionine content in biological samples.

**[Key words]** Methionine; O-Phthaldialdehyde; Derivative before the OPA column; UV detection

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (30760287); 云南省科技计划基金资助项目 (2009CC022); 云南省孔祥复院士工作站资助项目.

**[作者简介]** 霍文艳 (1987~), 女, 内蒙古通辽市人, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤的基因治疗. 张钰文和霍文艳对本文有同等贡献.

**[通讯作者]** 田长富. Email: tiancf@21cn.com.

蛋氨酸 (Met) 是构成人体的必需氨基酸之一, 参与蛋白质的合成和细胞的转甲基化反应<sup>[1]</sup>; 许多肿瘤对蛋氨酸具有很强的依赖性; 蛋氨酸  $\gamma$ -裂解酶 (蛋氨酸酶、L-Methionine- $\gamma$  Lyase) 可以特异地裂解细胞内外的蛋氨酸, 从而强烈地抑制肿瘤细胞的生长, 并诱发其凋亡, 但对正常细胞无影响, 从而发挥抗肿瘤的作用, 蛋氨酸酶是当前研究治疗蛋氨酸依赖性肿瘤一种重要手段<sup>[2]</sup>; 国内外关于沉淀物和水体中的水解氨基酸和游离氨基酸的测定很多, 但对较快速测定微量血浆等生物样品中 L- 蛋氨酸含量的研究很少.

本实验拟建立一种快速、简单、灵敏的血浆等生物样品中 L- 蛋氨酸的含量方法, 邻苯二甲醛柱前衍生化法, 高效液相色谱紫外检测器 340 nm 检测并定量. 检测结果显示: 18 种氨基酸洗脱时间是 12 min 和 L- 蛋氨酸出峰时间 7.5 ~ 8 min, 都与以往相关文献报道的最好水平相一致, 而本实验采用的是紫外检测方法, 以往文献报道的是荧光检测, 荧光检测方法复杂, 仪器设备不常用, 容易受到实验条件的限制, 本实验集合了荧光检测的灵敏性和和紫外检测的简单方便性, 适用于 C57 小鼠血浆、DMEM 细胞培养基以及其他生物样品 L- 蛋氨酸的快速含量测定.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要仪器** 日立 (HITACHI L 2000) 高效液相色谱仪, 色谱柱 (Allsphere ODS-25u, 4.6 mm  $\times$  250 mm)

**1.1.2 药品及试剂**  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、邻苯二甲醛 (OPA, sigma 公司)、3- 巯基丙酸、硼酸、蛋氨酸标准品均为分析纯, 18 种混合氨基酸标准 H (Sigma 公司); 甲醇, 乙腈, 四氢呋喃 (THF) 为色谱纯.

### 1.2 方法

**1.2.1 实验主要试剂配制** OPA 衍生化试剂: 称取 0.06 g OPA 粉末, 加 500  $\mu\text{L}$  无水乙醇溶解, 加入 0.5 mol/L 硼酸盐缓冲溶液 4.5 mL, 再加 50  $\mu\text{L}$  3- 巯基丙酸混匀,  $-4^\circ\text{C}$  保存.

**1.2.2 仪器工作条件** 流动相 A: pH 7.2 10 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{NaH}_2\text{PO}_4$  (PB) 含 0.2% THF, 流动相 B: PB- 甲醇 - 乙腈 (50:35:15), 紫外检测波长 340 nm, 流速 1 mL/min, 柱温  $40^\circ\text{C}$ , 梯度洗脱条件见表 1.

表 1 梯度洗脱条件

Tab. 1 Gradient elution conditions

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)
0	1	55	45
1	1	74	26
3	1	70	30
5	1	40	60
6	1	0	100
10	1	55	45
15	1	55	45

**1.2.3 样品提取游离氨基酸** C57 小鼠血样经肝素抗凝后于 20 000 r/min 离心 15 min; 取上清 10  $\mu\text{L}$  血浆或者 DMEM 细胞培养基样品加上 3 倍于样品体积的乙腈溶液, 在旋转混合器上充分混匀, 离心 13 000 r/min, 5 min, 取上清液备用.  $4^\circ\text{C}$  冰箱保存.

**1.2.4 衍生化反应及 HPLC 分析** 量取 20  $\mu\text{L}$  游离氨基酸样品溶液, 加上 20  $\mu\text{L}$  内参溶液 (超纯水或者 10  $\mu\text{mol/L}$  蛋氨酸标准品溶液), 充分混合后加上 10  $\mu\text{L}$  OPA 衍生化试剂, 衍生化反应 2 min, 立即用实验前准备的无水乙醇和硼酸盐缓冲溶液 1:9 混合溶液稀释至 100  $\mu\text{L}$ , 取 50  $\mu\text{L}$  进样分析.

## 2 结果

### 2.1 洗脱时间

对氨基酸标准 H 和乙腈处理后样品进行衍生化反应, 进样分析, 氨基酸洗脱时间为 12 min, Met 出峰时间为 7.3 ~ 8 min (见图 1), 与以往文献报道<sup>[3]</sup>的最短氨基酸洗脱时间 15 min 和 Met 出峰时间 7.5 ~ 8 min 相比, 有一定改进.

### 2.2 Met 定量限

取 3 种不同浓度的标准工作液 0.25  $\mu\text{mol/L}$ 、0.5  $\mu\text{mol/L}$  和 1  $\mu\text{mol/L}$  的进样浓度分别进行衍生化反应, 进样 50  $\mu\text{L}$  分析, 每种样品重复 3 次, 此种方法定量限是进样浓度 0.5  $\mu\text{mol/L}$ , 与以往的相关文献报道<sup>[3]</sup>的最低定量限保持一致.

### 2.3 标准曲线的制备

取不同浓度标准工作液分别进行衍生化反应, 反应 2 min 后被稀释 1 倍, 以便补充足够的进样体积, 所以实际标准品进样分析时浓度为标准工作液浓度的一半, 通过日立色谱管理系统对色谱峰进行分析, 得不同进样浓度的蛋氨酸峰面积, 以各浓度对应的峰面积为纵坐标, 以进样浓度为横坐标绘制标准曲线, 重复 3 次实验, 得叠加后线

性回归方程  $Y = 77\,589X - 29\,642$  及  $R^2 = 0.999\,8$ 。

#### 2.4 Met 线性范围

对不同浓度的蛋氨酸标准品进行了衍生化反应并 HPLC 分析, 此实验重复 3 次, 建立了 3 个蛋氨酸标准品线性回归方程, 3 条标准曲线相关系数  $R^2$  在 0.999 4 到 1 之间, 在蛋氨酸进样浓度 0.5 ~ 100  $\mu\text{mol/L}$  之间线性范围很好, 同时 3 次连续进样结果也表明此方法的重现性很好。

#### 2.5 Met 精密度考察

对不同浓度的蛋氨酸标准品进行了衍生化反应后进样分析, 对峰面积和保留时间计算 RSD ( $n=3$ ), 分别为 1.27% ~ 6.34% 与 1.53% ~ 3.55% 之间, 具体见表 2。

#### 2.6 Met 回收实验及方法验证

对血浆样品 (Met 含量未知, 样品加标前后都是此方法测定浓度) 和细胞培养基 DMEM (Met 含量 200  $\mu\text{mol/L}$ ) 样品分别加入一定量的 10  $\mu\text{mol/L}$  蛋氨酸标准品 20  $\mu\text{L}$ , 相当于 2  $\mu\text{mol/L}$ , 然后对其衍生化并进样分析, 各重复实验 2 次, 计算回收率分别在 94.63% ~ 96.97% 之间, 通过对未知 Met 浓度的血浆样品含量测定, 进一步说明此方法可以应用于小鼠血浆 Met 的含量测定, 实验得出正常 C57 小鼠血浆平均蛋氨酸浓度为 31.6  $\mu\text{mol/L}$ , DMEM 培养基说明书标注蛋氨酸含量 200  $\mu\text{mol/L}$ , 实验测得 DMEM 培养基平均蛋氨酸含量 194  $\mu\text{mol/L}$ , 见表 3。

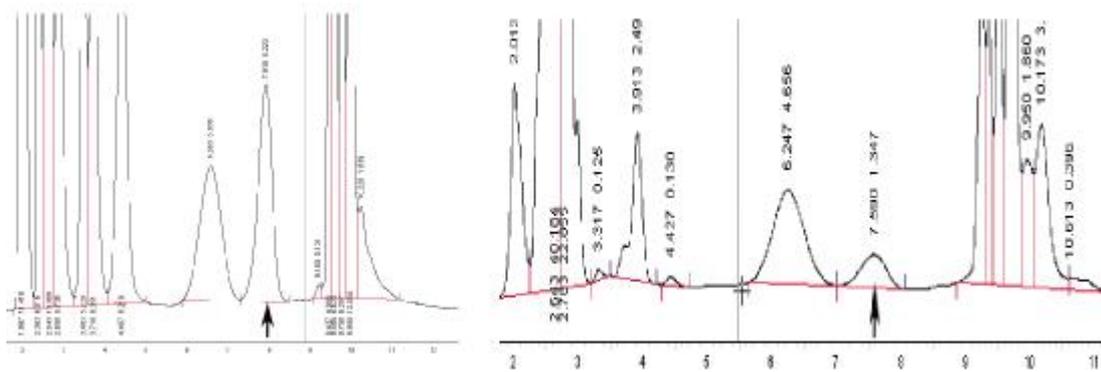


图 1 左: 18 种氨基酸标准品 HPLC 色谱图, 箭头所指为 Met 所对应的色谱峰; 右: 小鼠血浆游离氨基酸 HPLC 色谱, 箭头所指为 Met 所对应的色谱峰

Fig. 1 Left: 18 kinds of amino acids of standard HPLC chromatograms; Right: HPLC chromatography in plasma free amino acids, figure note: arrow for the corresponding chromatographic peak will be Met

表 2 峰面积和保留时间 (%)

Tab. 2 RSD % peak area and retention time (%)

Met 不同进样浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	检测进样浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	峰面积	峰面积RSD (%)	保留时间RSD (%)
0.5	0.68	23 105	3.28	3.55
5	5.20	374 406	1.27	3.07
50	48.99	3 772 192	3.16	1.56
100	100.50	7 767 099	6.34	1.53

表 3 Met 加样回收率 ( $\mu\text{mol/L}$ )

Tab. 3 Met recovery rate ( $\mu\text{mol/L}$ )

样品	已知浓度	加标前检测	加标后 (Met) 检测	加标量	回收率 (%)
血浆样品 1		1.49	3.42	2	97.99
血浆样品 2		1.66	3.47	2	94.81
DMEM 1	2	1.96	3.84	2	96.97
DMEM 2	2	1.91	3.70	2	94.63

### 3 讨论

#### 3.1 衍生化试剂的选择

邻苯二甲醛柱前衍生化法, 邻苯二甲醛(OPA) 优点: (1) OPA 本身没有紫外吸收, 不会形成干扰峰; (2) OPA 与巯基丙酸连用与一级氨基酸反应迅速, 2min 即可完成; (3) 衍生化后衍生产物出峰时间和峰形都很稳定. 同时 OPA 试剂自身也存在一些不足<sup>[4]</sup>: OPA 试剂本身容易氧化降解, 不能长期保存, OPA 不稳定主要是因为它容易被空气中的氧气所氧化, 从而发生降解, 衍生化试剂配制中向 OPA 试剂中加有抗氧化剂 3- 巯基丙酸, 预实验发现, 实验用衍生化试剂可存放 1 个月, 4℃ 暗处保存. 对于衍生化反应产物不稳定的解决方法是: 加入硼酸盐缓冲液, 控制衍生化操作到进样的时间, JDH Cooper<sup>[5]</sup>在文献中提到过硼酸盐缓冲液浓度对衍生化产物的稳定性影响不大, 但是其 pH 值的作用却是显著的. pH 10.4 的硼酸盐缓冲液可延长衍生化操作时间到 15 min, 保持衍生化产物的稳定. 由此衍生化产物的不稳定性, 对实验结果的影响几乎可以忽略不计.

#### 3.2 流动相的选择

$\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7.2 磷酸盐缓冲溶液作为流动相 A 是非常合适的, 牟德海<sup>[6]</sup>在文献中提到四氢呋喃加入比例是 0.3%, 而本实验发现 0.2% 的四氢呋喃更有易于蛋氨酸的基线分离, 流动相 B 相不是纯有机相, 其中 50% 是  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7.2 磷酸盐缓冲溶液, 目的是降低有机相的浓度, 避免仪器运作时 A、B 相混合盐析造成色谱柱堵塞, 此方法还有节省有机相用量的特点, 从而节省资金投入.

#### 3.3 样品处理问题

小鼠血浆样品来自 C57 小鼠尾静脉采血, 采血困难, 样品量很少, 本实验所用的样品均为原血浆样品稀释 20 倍, 如果血浆样品充足, 可不用稀释, 以提高含量测定的灵敏度.

#### 3.4 方法优缺点

本方法具有方便、快速分离 L- 蛋氨酸高效液

相色谱峰, 测定微量血浆样品中 L- 蛋氨酸含量的优点, 现有文献报道的高效液相色谱法测氨基酸含量有 2 种检测方法, 分别是荧光检测和紫外检测方法, 荧光检测复杂, 仪器设备不常用, 本实验采用的是紫外检测, 蛋氨酸出峰时间 7.5 ~ 8 min, 检测极限是 0.5  $\mu\text{mol/L}$ , 结果显示, 与采用荧光检测最快速的文献报道<sup>[3]</sup>的检测灵敏度和洗脱时间几乎保持一致, 因此本方法集合了荧光检测的灵敏性和紫外检测的方便性, 对于仪器设备不具备荧光检测条件, 要求较快速测定生物样品蛋氨酸含量的科研实验, 是可以作为参考使用的方法. 同时, 本实验方法证明稳定性重复性都很好, 无杂质氨基酸的干扰, 可以准确测量微量血浆样品中的蛋氨酸含量; 另外本实验方法也有其局限性, 仅适用于专门测液体生物样品中的蛋氨酸含量.

#### [参考文献]

- [1] CAVUOTO P, FENECH M F. A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension [J]. *Cancer Threat Rev*, 2012, 38(6):726 - 36.
- [2] FU WEI TIAN, CHANGFU. Research Development of Tumor Treatment with Methionine  $\gamma$ -lyase [J]. *Journal of Biomedical Engineering*, 2001, 28(4):839 - 842.
- [3] XING HUA SUN, YU YING TAN. A Rapid HPLC method for the measurement of ultra-low plasma methionine concentrations applicable to methionine depletion therapy [J]. *Anticancer Research*, 2005, 24(A1):59 - 62.
- [4] BHUSHAN R, BRUCKNER H. Marfey's reagent for chiral amino acid analysis: a review [J]. *Amino Acids*, 2004, 27(3/4):231 - 247.
- [5] JDH COOPER, OGDEN G, MCINTOSH J, et al. the Stability of the o-Phthalaldehyde/2-mercaptoethanol Derivatives of Amino Acids: An Investigation Using High-Pressure Liquid Chromatography with a precolumn Derivatization Technique [J]. *Analytical Biochemistry*, 1984, 142(1): 98 - 102.
- [6] 牟德海. OPA柱前衍生反相高效液相色谱法测定氨基酸含量[J]. *色谱*, 1997, 1(4):320.  
(2013-11-10 收稿)