

• 检验技术与方法 •

反相高效液相色谱法测定原发性肝癌患者血浆中苏氨酸、丙氨酸对映体

王毓彬¹, 谢 靓²

(开县人民医院:1. 普外科;2. 检验科, 重庆 405400)

摘要:目的 用反相高效液相色谱法探讨原发性肝癌患者 L-苏氨酸(L-threonine, L-Thr)、D-苏氨酸(D-threonine, D-Thr)、L-丙氨酸(L-alanine, L-Ala)和 D-丙氨酸(D-alanine, D-Ala)水平的变化。方法 采用邻苯二甲醛和 N-乙酰-L-半胱氨酸柱前衍生用反相色谱柱进行分离, 流动相为 20 mmol/L 磷酸二氢钠溶液、乙腈梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 激发波长 350 nm, 发射波长 450 nm。结果 该方法可以同时分离测定血液中苏氨酸、丙氨酸氨基酸对映体, 回归方程线性相关性良好, 检测线分别为 11.4 pg/mL、9.77 pg/mL、4.11 pg/mL 和 3.50 pg/mL, 回收率为 90.22%~105.7%, 日间、日内相对标准偏差(RSD)为 1.04%~4.11%。结论 该方法准确、灵敏、适用于临床和科研。

关键词:高效液相色谱法; 血浆; 氨基酸对映体**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2014.15.041**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2014)15-2063-02

Simultaneous determination of plasma threonine and alanine enantiomers in patients with primary hepatocellular carcinoma by RP-HPLC

Wang Yubin¹, Xie Jing²

(1. Department of General Surgery; 2. Department of Clinical Laboratory, Kai County People's Hospital, Chongqing 405400, China)

Abstract: Objective To investigate the change of plasma L-threonine (L-Thr), D-threonine (D-Thr), L-alanine (L-Ala) and D-alanine (D-Ala) in the patients with primary hepatocellular carcinoma (HCC) by using the reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). **Methods** The o-phthalodialdehyde (OPA) and N-acetyl-L-cysteine (NAC) column with pre-column derivatization was adopted to perform the separation. The mobile phase was 20 mmol/L sodium dihydrogen phosphate solution and acetonitrile with a programmed gradient elution and the flow rate of 1.0 mL/min. The excitation wavelength was set at 350 nm and the emission wavelength was set at 450 nm. **Results** The threonine and alanine enantiomers could be simultaneously determined by this method. The regression equation showed the good linear correlation. The limits of detection (LOD) for L-Thr, D-Thr, L-Ala and D-Ala were 11.4 pg/mL, 9.77 pg/mL, 4.11 pg/mL and 3.50 pg/mL respectively. The recovery rate was 90.22%~105.7%. Within-day and between-day RSD was 1.04%~4.11%. **Conclusion** The threonine and alanine enantiomers could be simultaneously determined by this method. The regression equation showed the good linear correlation. The limits of detection (LOD) for L-Thr, D-Thr, L-Ala and D-Ala were 11.4 pg/mL, 9.77 pg/mL, 4.11 pg/mL and 3.50 pg/mL respectively. The recovery rate was 90.22%~105.7%. Within-day and between-day RSD was 1.04%~4.11%.

Key words:high performance liquid chromatography; plasma; amino acid enantiomers

人们很早已经认识到 L-氨基酸是哺乳动物体内氨基酸存在的主要形式。近年来, 随着生物分析技术突飞猛进的发展、各种高灵敏度分析方法的应用, 越来越多的 D-氨基酸被发现存在各种动物体内, 同时这些 D-氨基酸的分布、生理作用以及与疾病的关系受到了广泛的关注^[1-2]。研究发现, D-氨基酸浓度的异常改变与阿尔茨海默氏病^[3]、抑郁症^[4]、帕金森^[5]以及精神分裂症^[6]等疾病的的发生和发展有直接和间接的关系。同时, 还有研究表明, 给予癌症患者 D-氨基酸营养支持治疗对纠正肝癌患者氨基酸代谢紊乱的重要意义, 表明 D-氨基酸可能参与了肿瘤的发生和发展过程^[7-8]。因此, 测定原发性肝癌患者血浆中氨基酸对映体含量的改变具有重要的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集重庆医科大学附属第一医院原发性肝癌患者血浆样本 23 例(原发性肝癌患者组), 有明确的影像学以及组织病理学诊断, 无其他器官系统慢性疾病; 收集重庆医科大学附属第一医院健康志愿者血浆样本 20 例(正常对照组); 两组有相同的性别和年龄组成比。

仪器与试剂 高效液相色谱仪: 安捷伦 1100 型附荧光检测器; Millipore 超纯水过滤装置(美国 Millipore 公司);

KQ3200DB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); FA1004 电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司)。

1.2 仪器与试剂 高效液相色谱仪: 安捷伦 1100 型附荧光检测器; Millipore 超纯水过滤装置(美国 Millipore 公司); KQ3200DB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); FA1004 电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司)。乙腈和甲醇为色谱纯, 购于美国 Tedia 公司; L-Thr、D-Thr、L-Ala、D-Ala、邻苯二甲醛(O-phthalodialdehyde, OPA)和 N-乙酰-L-半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)均购于美国 Sigma 公司; 磷酸二氢钠、硼酸钠、氢氧化钠为国产分析纯, 购于四川成都市科龙化工试剂厂; 实验用水均为超纯水。

1.3 标准溶液的配置 准确分别称取 L-Thr、D-Thr、L-Ala 和 D-Ala 标准品 0.005 g, 用超纯水溶解配成浓度为 500 ng/mL 的标准溶液, 在 4 ℃ 条件下保存备用。准确分别称取 OPA 和 NAC 标准品 0.02 g, 配成浓度为 2 mg/mL 的衍生化试剂(pH 9.80), 在 4 ℃ 条件下保存备用。

1.4 色谱条件 色谱柱: 菲罗门 Gemini C18 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 m); 流动相, A, 20 mmol/L 磷酸二氢钠(pH 9.80), B, 乙腈, 梯度洗脱程序为: 0 min(12.0% B) → 13 min

(18.0% B)→23 min(26.0% B)→30 min(26.0% B); 检测器: 荧光检测器; 检测波长: 激发波长 350 nm, 发射波长 450 nm。

1.5 样本处理 取上述标本 EDTA 抗凝血浆 100 μL, 加入 2 000 μL 甲醇(v:v 为 20:1) 涡旋振荡沉淀蛋白, 离心取上清液 1 000 μL 在氮吹仪微气流下慢慢吹干, 然后加入 20 μL 衍生化试剂衍生反应 2 min, 离心取上清液 10 μL 进样分析。

1.6 统计学处理 数据采用 SAS 9.2 统计学软件处理, 应用样本均数 *t* 检验分析组间差异性, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 对血浆稳定性的考察 本研究中对氨基酸对映体稳定性的考察, 研究者对配置的标准溶液做了稳定性评估, 即将标准溶液放 4 ℃ 冰箱, 相同浓度的氨基酸标准液在 3 个月内衍生化以后其峰面积基本保持不变, 说明本研究测得的氨基酸对映体比较稳定; 而本研究测定的临床样本, 经样本前处理步骤之后将其放 -20 ℃ 冰箱, 有研究报道, 在 -20 ℃ 条件下, 血浆样本中的氨基酸对映体至少能够在 6 个月内能够稳定存在, 即完全满足本实验测定要求。

2.2 色谱峰的确定 本方法对 L-Thr、D-Thr、L-Ala 和 D-Ala 的分离效果良好, 结果见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”), 其中图 1a 是标准溶液的色谱峰, 1b 是血浆样本氨基酸对映体的色谱峰。

2.3 线性范围与检出限 别将 4 种氨基酸对映体的标准溶液稀释成一系列浓度的标准工作液, 以浓度(ng/mL)为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线。4 种氨基酸对映体的浓度与峰面积呈良好的线性关系, 相关系数均可达到 0.99 以上, 以 3 倍的噪音所对应的检测物浓度作为方法的检出限, 以 10 倍的噪音所对应的检测物浓度作为方法的定量限, 结果见表 1。

表 1 氨基酸对映体的线性关系和检出限

氨基酸对映体	线性方程	<i>r</i> ²	线性范围(ng/mL)	检出限(pg/mL)	定量限(pg/mL)
L-Thr	$Y=413.99X+823.56$	0.9969	0.050 0~250	11.4	38.00
D-Thr	$Y=446.74X+444.22$	0.9991	0.050 0~125	9.77	32.57
L-Ala	$Y=717.78X+100.04$	0.9999	0.025 0~250	4.11	13.70
D-Ala	$Y=671.61X+366.48$	0.9992	0.025 0~125	3.50	11.67

2.4 精密度和回收率 分别取含高、中、低浓度的氨基酸对映体的血浆样本进行精密度和回收率的测定, 计算相对标准偏差 RSD, RSD 在 1.04%~4.11%, 回收率在 90.22%~105.7% , 结果见表 2。

表 2 氨基酸对映体的回收率和精密度

氨基酸对映体	回收率(%)	精密度(RSD, %)	
		日内	日间
L-Thr	105.7±0.57	2.29	1.04
D-Thr	96.90±0.23	2.12	2.17
L-Ala	90.22±3.42	3.14	4.11
D-Ala	100.30±2.89	2.45	3.67

2.5 实际样本的测定 本研究测定了原发性肝癌患者和健康人血浆中的 L-Thr、D-Thr、L-Ala 和 D-Ala 的含量, 目标氨基酸对映体在两测定组中的含量用 SAS 9.2 进行统计学分析做样本均数差别的 *t* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。结果见

表 3。

表 3 原发性肝癌血浆和正常血浆中氨基酸对映体的水平(±s)

氨基酸对映体	血浆浓度/(ng/mL)		<i>t</i>	<i>P</i>
	正常对照组	原发性肝癌患者组		
L-Thr	577.12±90.16	439.20±83.68*	-3.08	0.0040
D-Thr	35.78±4.00	25.25±3.79*	-2.97	0.0050
L-Ala	402.17±50.85	243.88±52.24*	-5.52	<0.0001
D-Ala	111.29±50.80	30.66±5.40*	-5.52	<0.0001

3 讨 论

原发性肝癌在细胞增殖及生长过程中, 需消耗某些氨基酸以供各种异常代谢需要, 有可能通过纠正氨基酸代谢紊乱来抑制肝癌的代谢, 其引起氨基酸代谢紊乱, 已有很多报道^[9-10], 而在原发性肝癌患者血浆中氨基酸对映体水平的变化未见报道。

本研究建立了柱前衍生反相高效液相色谱荧光检测的方法同时测定原发性患者血浆中 L-Thr、D-Thr、L-Ala 和 D-Ala 的水平, 探讨了各个氨基酸对映体水平的变化。研究结果显示, 在原发性肝癌患者血浆中 L-Thr、D-Thr、L-Ala 和 D-Ala 的水平均有显著性降低(*P*<0.05), 可能为临床诊断以及选用不同配比混合氨基酸对映体治疗肝损伤提供一定的依据。该方法仪器操作简便, 线性关系良好, 重复性好, 灵敏度高, 适用于临床研究与科研。

参考文献

- Friedman M. Origin, microbiology, nutrition, and pharmacology of D-amino acids[J]. Chem Biodivers, 2010, 7(6):1491-1530.
- Hamase K, Miyoshi Y, Ueno K, et al. Simultaneous determination of hydrophilic amino acid enantiomers in mammalian tissues and physiological fluids applying a fully automated micro-two-dimensional high-performance liquid chromatographic concept [J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(7):1056-1062.
- Samakashvili S, Ibáñez C, Simó C, et al. Analysis of chiral amino acids in cerebrospinal fluid samples linked to different stages of Alzheimer disease[J]. Electrophoresis, 2011, 32(19):2757-2764.
- Detera-Wadleigh SD, McMahon FJ. G72/G30 in schizophrenia and bipolar disorder: review and meta-analysis[J]. Biol Psychiatry, 2006, 60(2):106-114.
- Kawazoe T, Park HK, Iwana S, et al. Human D-amino acid oxidase: an update and review[J]. Chem Rec, 2007, 7(5):305-315.
- Ferraris DV, Tsukamoto T. Recent advances in the discovery of D-amino acid oxidase inhibitors and their therapeutic utility in schizophrenia[J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(2):103-111.
- Ishikawa T. Branched-chain amino acids to tyrosine ratio value as a potential prognostic factor for hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(17):2005-2008.
- Mizuguchi T, Kawamoto M, Meguro M, et al. Prognostic impact of preoperative the branched-chain amino acid to the tyrosine ratio in hepatocellular carcinoma patients after initial hepatectomy[J]. J Gastrointest Surg, 2011, 15(8):1433-1439.
- Lai HS, Lee JC, Lee PH, et al. Plasma free amino acid profile in cancer patients[J]. Semin Cancer Biol, 2005, 15(4):267-276.
- Choudry HA, Pan M, Karinch AM, et al. Branched-chain amino acid-enriched nutritional support in surgical and cancer patients [J]. J Nutr, 2006, 136(1):314-318.

(收稿日期: 2014-03-03)