

高效液相色谱荧光检测 血浆中的胆碱

No.LC-049

摘要：建立了高效液相色谱荧光检测血浆中胆碱的方法。样品经乙腈去蛋白，异氰酸萘酯衍生后，采用亲水作用色谱分离荧光检测器测定的方法，在5.0~30.0 $\mu\text{mol/L}$ 的范围内，线性关系良好，相关系数 r 大于0.999，回收率在83.7~95.1%之间。

关键词：乙酰胆碱 血浆 亲水作用色谱 荧光检测

乙酰胆碱(Ach)是重要的神经递质，在机体生命活动中起非常重要的作用。在基础医学研究中，衰老及Alzheimer's病、帕金森氏病等神经系统疾病的发生机理均与乙酰胆碱递质系统有关。胆碱是一种水溶性的、人体所必需的营养成分。它是卵磷脂和神经鞘磷脂的重要组成成分，同时它也是乙酰胆碱的前体，能帮助中枢神经传递资讯，是大脑思维、记忆等智力活动的必需物质。

由于胆碱没有发光基团，采用常规方法很难检测，本文以异氰酸萘酯为衍生试剂，采用荧光检测器测定其含量。另一方面，胆碱为季胺盐结构，在常规的反相柱上保留极弱。而亲水作用色谱(hydrophilic interaction chromatography, HILIC)是一种以极性固定相(如硅胶或键合硅胶等)及含高浓度极性有机溶剂和低浓度水溶液为流动相的色谱模式。它能为亲水化合物和强极性化合物提供合适的保留和分离选择性。

■ 实验部分

1、仪器

仪器：岛津Prominence LC-20A高效液相色谱仪系统。具体配置为LC-20AT(输液泵)(2台)，DGU-20A₃(在线脱气机)，SIL-20A(自动进样器)，CTO-10Asp(柱温箱)，RF-10A_{XL}(荧光检测器)，CBM-20Alite(控制器)和LCsolution(色谱工作站)。

2、分析条件

流动相：30mM醋酸铵(pH6.0)/乙腈 = 35/65 (v/v)

流速：1 mL/min

进样体积：20 μL

色谱柱：C₈-SO₃H-Silica (C₈: SO₃H=1:2)，4.6 mm I.D. × 150 mm L., 5 μm

柱温：40°C

激发波长：220 nm

发射波长：350 nm

3、标准品溶液的配制及样品前处理

储备液配制：精密称取0.2311g碘化胆碱于10mL的棕色容量瓶，以水稀释至刻度，配成浓度为0.1mol/L标准储备液，于冰箱4°C保存。

前处理步骤：在1.5mL的离心管中加入20 μL 标准溶液或血浆、1mL乙腈和80mg氧化镁，涡旋5min后加入25 μL 异氰酸萘酯于上述溶液中，涡旋，室温反应15min后以12000rpm离心15min。取400 μL 上清液经0.22 μm 有机微孔滤膜过滤后，加入60 μL 蒸馏水，涡旋混匀后进样。

结果与讨论

1、衍生反应

在弱的碱性条件下，胆碱与异氰酸萘酯进行衍生化反应，其反应路线如图1所示。由于衍生化试剂极易与水反应，因此在加入衍生化试剂之前需要加入一定量氧化镁除去样品中的水。除此之外，由于胆碱与异氰酸萘酯的反应表现为碱催化，生成的氢氧化镁还可以作为反应的催化剂。

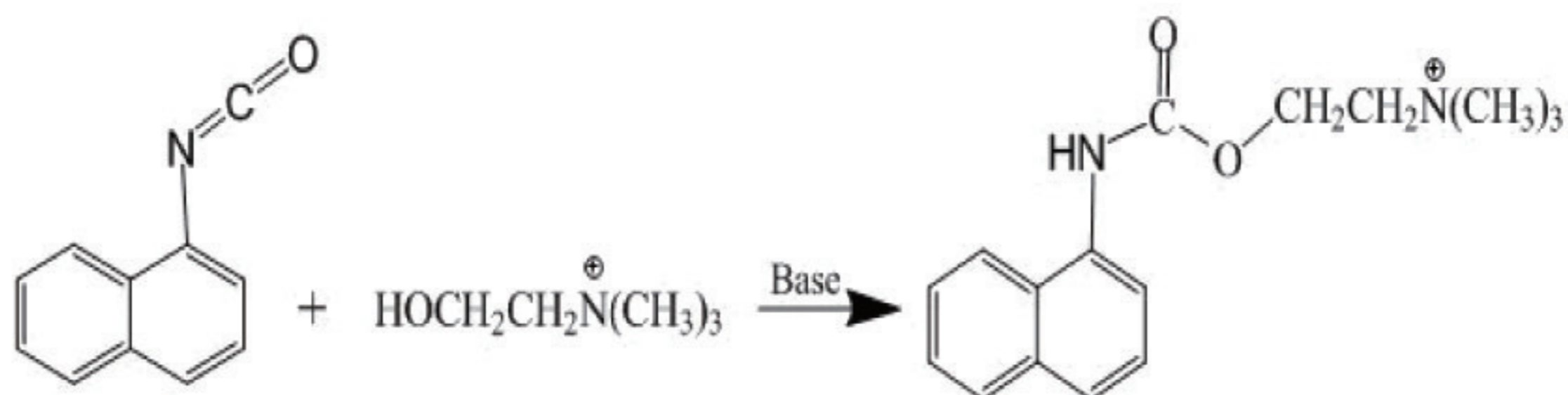


图1 衍生反应路线

2、胆碱色谱图

胆碱标准溶液经衍生后得到的色谱图如图2所示。

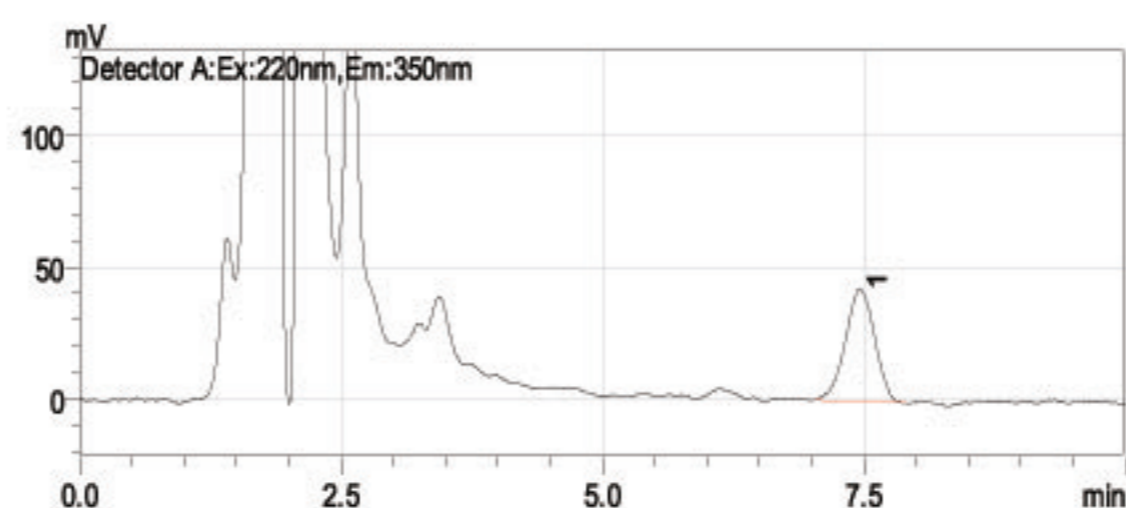


图2 乙酰胆碱标准品的色谱图 (20 μ mol/L)

3、线性范围

将胆碱储备液用流动相稀释，配成浓度为5, 10, 15, 20, 25, 30 μ mol/L的胆碱标准溶液。按照实验步骤衍生分析，得到的标准曲线 ($Y=1894X+269$, $R=0.9992$) 如下图3所示。

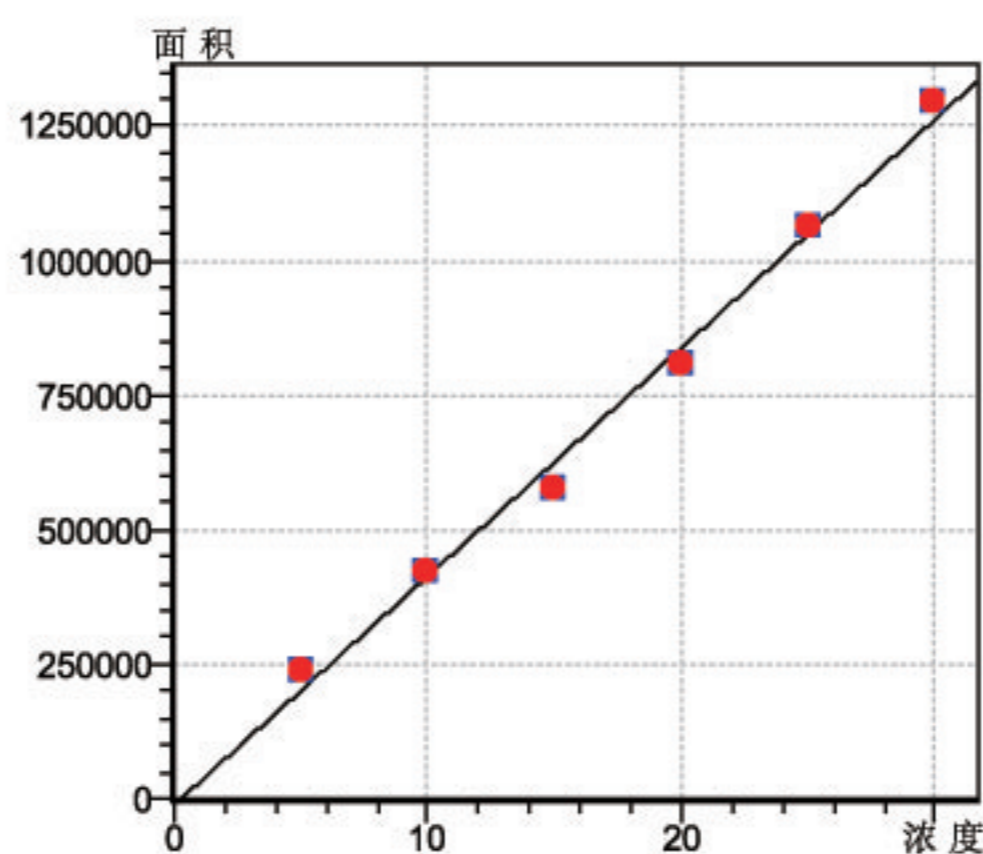


图3 乙酰胆碱标准曲线

4、灵敏度实验

将浓度为5, 10, 15, 20, 25, 30 μ mol/L的胆碱标准溶液按照实验步骤衍生分析，方法的检测限 ($S/N=3$) 为2 μ mol/L，定量限 ($S/N=10$) 为6.6 μ mol/L。

5、方法的准确度及精密度

分别测定健康人血浆和添加15 $\mu\text{mol/L}$ 胆碱的健康人血浆中胆碱的含量。每份平行测定5次。计算实际样品-血浆样品的精密度和回收率（表1）。结果表明，方法的相对标准偏差小于10%，回收率在83.7~95.1之间。图4为血浆样品加标色谱图。

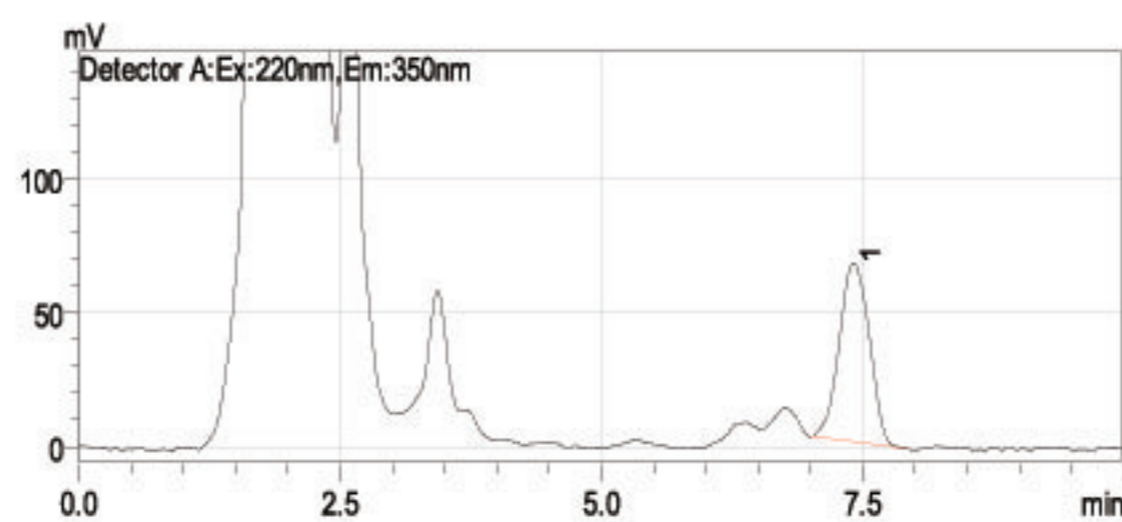


图4 血浆样品加标色谱图

表1 乙酰胆碱的精密度及回收率

No.	空白血浆		空白血浆加标		
	平均值 ($\mu\text{mol/L}$)	精密度 (RSD, n=5)	平均值 ($\mu\text{mol/L}$)	精密度 (RSD, n=5)	回收率 (%)
1	12.1	1.55	26.1	7.74	92.8
2	12.5	1.55	26.7	2.33	95.1
3	11.3	2.11	23.8	1.05	83.7
4	11.1	1.51	24.8	1.56	91.8

■ 结论

本文用异氰酸萘酯与胆碱反应，结合高效液相色谱荧光检测，成功分析了血浆中胆碱的含量。线性试验、回收试验、精密度试验以及实际血浆的测定结果表明，该方法具有检测限低、重现性好、回收率高、样品用量少等特点。该方法为胆碱的神经生理学、药理学研究，疾病诊断等方面提供了一个简单灵敏、稳定可靠的分析手段。