

• 实验技术 •

一种测定家兔主动脉壁 L-精氨酸水平的新方法

王 佐^① 刘易林^② 姜志胜^①(衡阳医学院^①心血管病研究所, ^②第二附属医院心内科, 衡阳 421001)

A New Method to Measure the level of L-arginine of Aortic Wall in Rabbits

WANG Zuo¹, LIU Yi-Lin² and JIANG Zhi-Sheng¹(¹Institute of Cardiovascular Diseases, ²the Second Affiliated Hospital, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT In this paper, the method of Pico-TagTM amino acid analysis was introduced to measure the level of L-arginine in aortic wall of rabbits. Firstly, the sample (isolated arterial ring of rabbits) was extracted with trichloroacetic acid and water-saturated ether. The crude product was further assayed by Pico-TagTM amino acid analysis. The peak area of L-arginine's was corrected by 991 purity analysis disk, the L-arginine level was determined by comparing with standard L-arginine peak area. Three groups of samples were assayed. The statistical L-arginine level of the three groups is valuable.

KEY WORDS Pico-TagTM amino acid analysis; L-arginine level; Peak area

摘要 本文用 Pico-TagTM (美国 WATERS 公司商标名) 氨基酸分析法测定了家兔主动脉壁 L-精氨酸含量。样品 (动脉环) 先用三氯乙酸和水饱和醚抽提, 把所得粗提干粉作 Pico-TagTM 氨基酸分析。样品 L-精氨酸的峰面积经 991 纯度分析软件校正后, 再与标准 L-精氨酸的峰面积相比较计算出样品中 L-精氨酸的含量。实验共分为三组, 统计学处理的各组 L-精氨酸的含量具有一定的参考价值。

关键词 Pico-TagTM 氨基酸分析法; L-精氨酸含量; 峰面积

形成^[1], 测定动脉壁 L-精氨酸的含量有十分重要的意义。传统的测定方法^[2]步骤较多, 容易造成损失和出现误差, 我们所采用的 Pico-TagTM 氨基酸分析法具有简单、快速且较为准确的优点。Pico-TagTM 氨基酸分析法是一种柱前衍生的氨基酸分析法, 它根据不同苯氨基硫甲酰氨基酸 (phenylthiocarbamyl amino acid, PTC-AA) 的疏水性不同, 采用疏水柱 (一般用 C₁₈ 硅胶作填料), 以乙腈进行梯度洗脱而加以分离。在色谱条件比较固定的情况下, 各 PTC-AA 的保留时间 (保留值) 是比较稳定的, 各种氨基酸可以根据其保留时间加以认定。

1 材料与方法

1.1 材料

991 型高效液相色谱仪 (美国 WATERS 公司), Pico-TagTM 氨基酸分析柱 (150 × 39 mm), pH 计 (美国 BECKMAN 公司), 异硫氰酸苯酯 (PITC, sequence grade), 乙腈 (上海吴泾化工厂, 色谱纯); 家兔主动脉, 无菌取材。

1.2 方法

1.2.1 动脉材料处理 无菌取得家兔主动脉, 放置于冰冷的 Hanks 液中, 在无菌条件下, 小心去除外层的结缔组织和血管内皮, 剪出十六个重量各约为 2 mg 的动脉环。将动脉环分为三组进行以下实验: 第一组的六个动脉环放在含有 2.25% 的 L-精氨酸和 2% 的胆固醇的 Hanks 液中; 第二组的七个动脉环放在含有 2% 的胆固醇的 Hanks 液中; 第三组的三个动脉环放在 Hanks 液中作为对照。全部样品都在 37℃ 的条件下温育 30 min。

1.2.2 L-精氨酸的粗提 参照 Gold^[3] 的方法。把每一个动脉环分别放在 1 ml 6% 三氯乙酸中匀浆, 静止放置 30 min 后, 10 r/min 离心 15 min, 其上清液用水饱和和二乙醚抽提, 去掉醚层, 真空冷冻干燥后的白色粉

L-精氨酸可明显抑制动脉粥样硬化斑块的

沫即为 L-精氨酸的粗提物。

1.2.3 样品粗提物的 Pico-Tag™ 氨基酸分析

1.2.3.1 样品的衍生 把粗提干粉用 100 μ l 的双蒸水稀释,混匀后,10 kr/min 离心 5 min,取上清液 25 μ l 冻干,在冻干后的样品中加 20 μ l 氨基酸衍生剂(乙醇:三乙胺:水:异硫氰酸苯酯=7:1:1:1),混匀,室温放置 30 min,然后真空冷冻 3 h。标准 L-精氨酸的衍生和标准 L-精氨酸与样品粗提干粉的混和物的衍生与以上完全相同,并同时进行分析。

1.2.3.2 Pico-Tag™ 氨基酸分析 在冻干好的衍生样品中加入 100 μ l 样品稀释液(pH 7.4, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液),10 kr/min 离心 5 min,取上清液,每次进样 10 μ l,以乙腈的线性梯度(10 min 时,乙腈达 60%)洗脱,254 nm 检测,记录其色谱图和峰面积,每个样品进三针,取其峰面积的平均值。

1.2.4 从样品中寻找 PTC-精氨酸

1.2.4.1 先进一针标准的 PTC-精氨酸,记录其色谱图,注意它的保留时间。然后再进一针粗提干粉衍生样品,记录其色谱图,从中找出与标准 PTC-精氨酸保留时间接近的峰,初步确定其中哪几个峰有可能是 PTC-精氨酸;以同样的色谱条件进一针标准 L-精氨酸和粗提干粉混和物的衍生物,记录其色谱图。

1.2.4.2 在前述初步确定样品中可能是 PTC-精氨酸的那几个峰中,看哪一个峰发生了明显的变化(如峰高、峰面积),我们可基本判定,那个发生了较大变化的峰就是样品中的 PTC-精氨酸。

1.2.4.3 用 991 纯度分析软件,进一步对已基本判定的样品中的 PTC-精氨酸峰进行波谱分析,记录其波谱图,再与标准 PTC-精氨酸的波谱图进行比较,对前述判定结果进行检验。

1.2.5 样品中的 L-精氨酸含量的计算 按以下公式计算其含量:

$$\text{L-精氨酸含量(g/L)} = \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} \cdot \frac{V_{\text{标}}}{V_{\text{样}}} \cdot \frac{1000}{W} \cdot M \cdot 10^{-6}$$

其中, $A_{\text{标}}$ = 15 651 微伏秒 ($A_{\text{标}}$ 为 1 nmol 标准 L-精氨酸的峰面积), $A_{\text{样}}$ 为样品中 L-精氨酸的峰面积; $V_{\text{标}}$ = 100 μ l; $V_{\text{样}}$ = 25 μ l; W = 2 mg; M = 174.21 Da。

2 结果

2.1 样品中的 PTC-精氨酸寻找结果见 Figure 1~3。

Figure 1 和 Figure 2 所示两个峰的保留时间几乎一样(5.67 min、5.66 min),故 Figure 2 的“X”峰有可能是样品中的 PTC-精氨酸峰;比

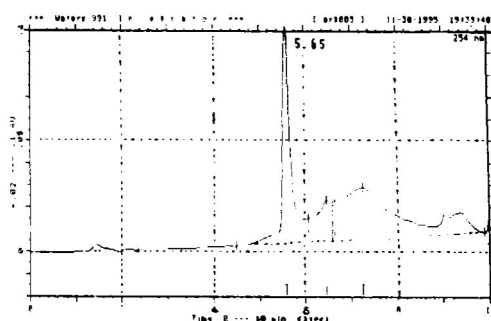


Figure 1. Reverse-phase high performance liquid chromatography of standard PTC-arginine on C18 column. Chromatogram condition: a linear gradient of 100% buffer A to B over 10 minutes; column temperature 50°C; flow rate 0.7 ml/min; detector wavelength 254 nm. Buffer A: pH 6.4, 0.139 mol/L sodium acetate (contained 6% acetonitrile). Buffer B: 60% acetonitrile.

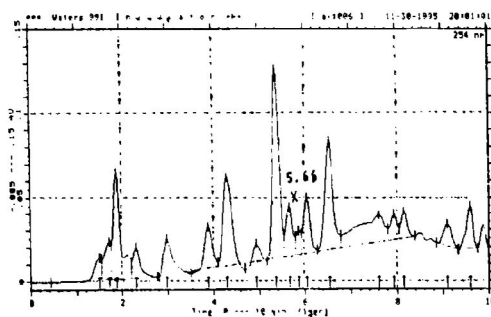


Figure 2. Pico-Tag™ amino acid analysis of the crude powder. Chromatogram condition is the same with Figure 1.

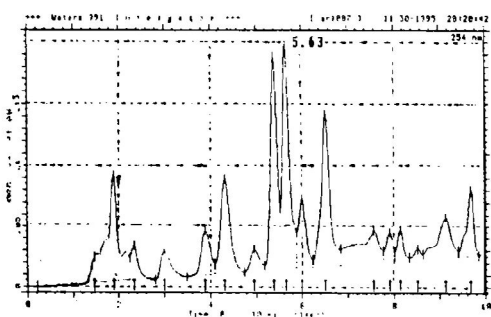


Figure 3. Pico-Tag™ amino acid analysis on the mixture of standard L-arginine and the crude powder. Chromatogram condition is the same with Figure 1.

Table. Initial peak area, corrected peak area, retention time and L-arginine content of the three group. ($\bar{x} \pm s$).

Groups	initial peak area ($\mu V \cdot s$)	corrected peak area ($\mu V \cdot s$)	retention time (min)	content (mg/L)
I	8033.17 $\pm$ 763.09	6336 $\pm$ 335.82	5.653 $\pm$ 0.008	141.367 $\pm$ 214.24*
II	3947.57 $\pm$ 1079.01	3112.28 $\pm$ 1149.84	5.658 $\pm$ 0.012	69.437 $\pm$ 25.668**
III	4188 $\pm$ 307.08	3405.67 $\pm$ 303.08	5.66 $\pm$ 0.020	76.002 $\pm$ 15.572

I: 2.25% L-arginine+2% cholesterol; II: 2% cholesterol; III: control. *: $P < 0.001$, **: $P > 0.05$ compared with control group.

较 Figure 2 和 Figure 3 保留时间在 5.6 min 左右的峰,只有 Figure 2 中的“X”峰发生了较大的变化,故可基本判定“X”峰即为样品的 PTC-精氨酸。波谱分析显示:Figure 1~3 的保留时间为 5.67 min、5.66 min、5.64 min 三个峰的波谱(200 nm~800 nm)形状完全一致,故可认定 Figure 2 所标“X”峰为样品中的 PTC-精氨酸峰。

2.2 3 组样品 L-精氨酸检测结果见 Table。

我们通过每次进样不同浓度的标准 PTC-精氨酸,发现其浓度的大小与其峰面积的大小有较好的线性关系,其相关系数为 0.9983,故可根据样品中 PTC-精氨酸与标准 PTC-精氨酸峰面积相比较而计算其含量。由于峰面积与基线和分离度有较大的关系,我们通过 991 纯度分析软件算出其校正的峰面积,计算出样品中 L-精氨酸较为精确的含量。

t 检验显示这三组样品之间,除组 III 与组 I 之间无显著性差别外,其余都有较为显著的差别。这可能与组 III 取样较少和动脉环温育时间较短有关。

3 讨论

以往测定家兔动脉壁 L-精氨酸的含量,首先是用三氯乙酸、水饱和醚抽提得其粗提物,再通过阳离子交换柱纯化,然后用坂口反应检测其含量。其缺点是在进行阳离子交换柱纯化 L-精氨酸时,与 L-精氨酸相似的一些成份也可以挂到柱子上去,并随同 L-精氨酸一起洗下来,干扰以后的坂口反应;而且,有一部分 L-精氨酸挂不上去,造成损失;另外,坂口反应本身也可能出现一些误差。

我们所采用的 Pico-Tag™ 氨基酸分析法,在粗提以后就可直接进行,不需进一步的分离纯化,不必担心样品的损失,且其不受杂质的干扰。其不足之处是,它的含量的计算是以峰面积和物质的分离度为基础的,受这两者的影响较大,但在一般分离度的情况下,可通过 991 纯度分析软件对其峰面积加以校正,从而大大地减少了误差。

所谓 991 纯度分析软件的纯度分析,指的是通过对所分离的色谱图(分离曲线)的每一条曲线在 200 nm~800 nm 之间进行光谱分析,并把每一点的波谱图型存入数据库中,由于每种 PTC-AA 在通过色谱柱分离后,有其独特的波谱图型,故可以之作为纯度分析的依据。两点的波谱形状如完全一致,该软件就认为这两点是同一种物质。

一般作 Pico-Tag™ 氨基酸分析时需作酸水解(如盐酸水解和甲磺酸水解),本文之所以不作酸水解,是因为作酸水解时样品中一些残余的蛋白成份水解释放出游离的 L-精氨酸,从而造成干扰。

参考文献

- 1 Cooke JP, Singer AH, Tsao P, et al. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest*, 1992, **90**: 1168~172.
- 2 Gold ME, Wood KS, Byrns GM, et al. L-arginine-dependent vascular smooth muscle relaxation and cGMP formation. *Am J Physiol*, 1990, **259**: H1813~821.
- 3 Gold ME, Bush PA, Igarro LJ. Depletion of arterial L-arginine causes reversible tolerance to endothelium dependent relaxation. *Biochem Res Commun*, 1989, **164**: 714~721.

(1995-12-20 收到, 1996-03-02 修回)