

HPLC 法测定高原鼠兔血清中的硝酸盐

杨晓林^{1,2}, 郭松长¹, 赵新全^{* 1}

(1 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘 要: 建立了高原鼠兔血清中硝酸盐 (NO_3^-) 含量测定的 HPLC 方法, 这是除离子色谱法之外, 为研究动物血清内 NO_3^- 含量提供的另一种方法。采用 SymmetryRR C₁₈ (5Lm, 4.0mm @250mm) 色谱柱; V (10mmol/L 的四乙基硫酸氢铵溶液, PH = 8.4); V (乙腈) = 90B10 为流动相; 检测波长 210 nm; 流速 0.8mL/min, NO_3^- 在 0.3125~10mg/L 的范围内有很好的线性关系 ($R = 0.9998$)。结果表明, 采集于青藏高原地区昆仑山和果洛区域的高原鼠兔血清内 NO_3^- 总含量在 72.0mg/L ~ 192mg/L。

关键词: HPLC; 高原鼠兔; 硝酸盐

一氧化氮 (nitric oxide, NO) 是一种重要的舒血管因子, 低浓度 NO 可以使支气管平滑肌和肺血管舒张, 它的有效释放对平原动物进入高海拔地区的低氧适应、对高海拔土著动物维持正常的血管压力都起着重要的作用^[1]。NO 化学性质非常活泼, 在体内的半衰期仅为 3-5s, 极易被氧化, 在动物体内主要以硝酸盐 (NO_3^-)、亚硝酸盐 (NO_2^-) 的形式存在。可以通过分别测定血清 NO_3^- 和 NO_2^- 的含量来反映动物体内 NO 含量。

高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 是一种典型的低氧适应动物, 鼠兔科鼠兔属, 世居在青藏高原海拔 3200m 以上的高寒草甸、高寒草原上^[2], 未出现动脉压偏高等高原病症状, 研究其血清中 NO 含量即 NO_3^- 和 NO_2^- 的含量对了解其低氧适应机理有着重要的作用。

目前, NO_3^- 的测定一般是通过硝酸还原酶法^[3]、离子色谱法^[4]等来完成的, 然而血液中复杂的成分常常干扰实验结果。崔秀玉等^[5]用高效液相色谱法 (HPLC) 测过体液中的硝酸盐, 但至今未发现用 HPLC 法测定高原鼠兔血液内 NO_3^- 含量的文献报道, 本实验建立了 HPLC 测定高原鼠兔血液 NO_3^- 含量的方法, 并做定量比较。

1 材料与试剂

1.1 仪器与试剂

天美 LC 2050 高效液相色谱仪; LC 2130 泵; LC2030 紫外检测器; T2000 P 色谱工作站 V1.10 数据处理系统; 3KD 超滤离心管。

试剂: 去离子水; 分析纯级别的磷酸二氢钠、氢氧化钠、硝酸钾; 色谱纯级别的四乙基硫酸氢铵、乙腈。

1.2 色谱条件

色谱柱为: SymmetryRRC₁₈ (5Lm, 4.6 mm @ 250 mm); 流动相: V (10mmol/L 的四乙基硫酸氢铵溶液): V (乙腈) = 90B10; PH = 8.4; 流速 0.8mL/min; 柱温为 24℃; 检测波长 210nm; 上样量 10LJ。

1.3 标准对照品溶液及阴性对照品溶液的制备

精密称取 10mg 的硝酸钾晶体, 置 1L 容量瓶中, 加去离子水 1000mL 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 NO_3^- 浓度为 10 mg/L 的标准对照品储备液。

取 10mL 容量瓶, 直接加入去离子水 10mL 定容, 即为阴性对照品溶液。

1.4 样品处理

高原鼠兔腹主动脉采血, 4000r/min 离心 20min, 取上清经 3KD 超滤离心管 14 000 g 过滤 30 min 除去蛋白后, 置于 4℃ 冰箱待测。离心均在 4℃ 条件下进行。

2 结果与讨论

2.1 线性关系

作者简介: 杨晓林 (1983-), 女, 硕士研究生; E-mail: yangxiaolin01@126.com

将已配标准浓度的 NO_3^- 溶液对照品按照 2、4 & 16、32 倍逐级稀释后, 跟阴性对照品溶液进样, 按上述色谱条件测定峰面积, 以峰面积积分值为纵坐标, 相应 NO_3^- 浓度为横坐标, 作回归曲线, 得回归曲线方程: $Y = 8258X + 786.92 (R = 0.9998)$ 。对照品和样品的药物峰均在 10.2 min 左右出现, 且样品中 NO_3^- 峰与其他峰分离效果好, 不影响对主峰的测定。峰情况如图 1(a-c) 所示。

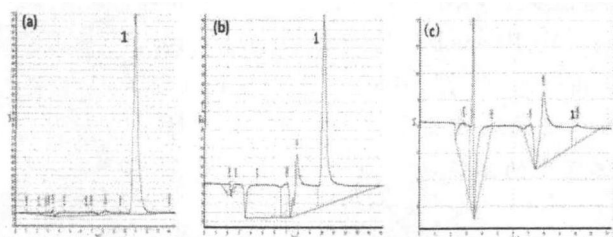


图 1 HPLC 色谱图
a) 对照品; b) 样品; c) 阴性对照品

2.2 精密度实验

精密吸取对照品原液 10 μL 重复进样 5 次, 测定其面积, 测得平均积分面积为 830143, 计算 RSD 分别为 1.41%。

2.3 重复性实验

平行吸取同一样品 5 份, 按样品处理方法制得

待测溶液, 将其稀释到 2:1 线性范围内后, 依照样品测定方法进样, 分别测定样品中的 NO_3^- 平均含量, 测得样品的含量为 174.24 mg/L, RSD 为 1.97%。

2.4 回收率实验

取 1 mL 阴性对照样品 9 份, 分成 3 组, 每组分别加入 1.3 倍浓度为 10 mg/L 的对照品溶液各 1.15、2 mL (依次编号为 1、2、3), 处理后进样 10 μL, 测定峰面积, 按下式计算回收率, 公式: 回收率 = (测定 NO_3^- 总量 - 样品中总 NO_3^- 量) / 添加 NO_3^- 总量 @100%, 结果见表 1。

表 1 回收率试验测定结果

序号	添加量 / μg	平均检测量 / μg	回收率 / %	RSD / %
1	10	9.79	97.9	1.34
2	15	14.31	95.4	1.63
3	20	19.14	95.7	1.75

2.5 高原鼠兔血清样品 NO_3^- 含量测定

按正文拟定的含量测定方法对青藏高原不同地区的高原鼠兔血清 NO_3^- 含量测定, 为使结果准确, 样品倍比稀释到 2:1 线性关系范围内再测。稀释后的样品色谱图见图 1(b); 含量结果见表 2。

表 2 高原鼠兔血清 NO_3^- 部分测定结果

样品编号	采样地点	地理位置	海拔高度 / m	NO_3^- 含量 (mg/L)
K125				125.34
K128	昆仑山	35°29' 43.2"N, 93°53' 41.8"E	4571	168.18
K1216				143.4
GL26				75.66
GL211	果洛	34°24' 04.4"N, 100°24' 03.7"E	3941	82.62
GL214				75.96

3 讨论

本法在流动相选择上, 不同于 2002 年崔秀玉等^[5]报道的 HPLC 法用 0.03 mol/L 的 KH_2PO_4 、 H_3PO_4 (pH = 3.3) 缓冲液, 而采用 10 mmol/L 的四乙基硫酸氢铵-乙腈溶液 (V: V = 90:10, pH = 8.4) 做流动相。相比, 本法测定 NO_3^- 的灵敏度更高, 在 0.3125~10 ng 范围内有良好的线性关系, 最低检测限更低, 结果更准确。

在对血样的处理上, 采取了 3K 超滤管直接过

滤离心的方法, 而不用正丁醇、乙腈或甲醇沉淀法^[6], 有效地减少了背景干扰。

由各项检测指标结果可以看出, 本法可以完全分离血样里 NO_3^- 和其它成分, 分离效果明显。与测定 NO_3^- 的离子色谱法比, 此法不用昂贵的离子色谱仪测定, 节省了科研成本; 而常用的 Griess 试剂显色法是根据还原反应生成红色化合物时的颜色深度来定量的, 准确度较低^[7]; 相比测一个样品要 2 h 的硝酸还原酶法来说, 本法可以自动进样,

在 10 2m in 时即可得知含量, 更为方便快捷。本实验方法的精密度、准确性和重复性较好, 可以广泛应用于血清 NO_3^- 的测定。经本法测定, 采集于青藏高原地区果洛和昆仑山处的高原鼠兔血清中 NO_3^- 的含量在 72. 0~ 192mg/L。

参考文献

- [1] Umans JG, Levi R. *Annu Rev Physiol* 1995, 57: 771
- [2] 冯祚建, 郑昌琳. *兽类学报*, 1985. 04(005): 11
- [3] 汪义军. *医学临床生物化学与检验学分册*. 1997, 18 (1): 7
- [4] Blanco D. *J Liquid Chromatogr* 1995, 18(212): 2445
- [5] 崔秀玉, 李凌, 吕国蔚. *Chin J Appl Physiol*, 2002, 18 (4): 394
- [6] 李恩民, 许丽艳, 欧阳一冰等. *分析化学*, 1997, 25 (3): 369
- [7] 杨文萍, 李钧敏, 王锦文. *江西医学检验*, 2002, 20 (3): 147