

## 组织中去甲肾上腺素的荧光测定法

熊忠 索有瑞

中国科学院西北高原生物研究所, 810001 西宁

**摘要** 本文研究了去甲肾上腺素荧光分光光度测定方法。测定范围在10~100 ng 则与荧光值呈良好线性关系,  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 410 \text{ nm}/505 \text{ nm}$ , 回收率为 91.68% ~ 96.64%, 标准偏差平均为 6.1% ( $n = 10$ )。本法具有准确、简便、快速等特点。

**关键词** 去甲肾上腺素, 荧光方法

去甲肾上腺素 (Norepinephrine, 简称NE) 是儿茶酚胺类激素之一, 动物体内NE 含量变化反映了机体植物神经系统交感神经的活动状况, 因而其测定在临床和基础研究中有其重要作用。荧光分析是一种灵敏而特效的方法。本文研究了直接采用  $\text{Al}_2\text{O}_3$  吸附后洗脱氧化法, 省去装填层析柱等手续。

### 1 原理

组织中的去甲肾上腺素经中性  $\text{Al}_2\text{O}_3$  吸附后, 采用 0.3 mol/L 醋酸浸提, 中和后用  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  氧化, 氧化产物在碱性溶液中生成三羟基吲哚类的荧光化合物, 该化合物经本实验条件确定激发波长 410 nm, 发射波长 505 nm, 根据荧光强度与 NE 含量成正比, 用标准曲线法定量测定组织中 NE 含量。

### 2 仪器、试剂和材料

#### 2.1 仪器

RF-540型荧光分光光度计。

#### 2.2 试剂

标准溶液 (1 ng/ $\mu\text{L}$  NE): 准确称取 10 mg NE 溶于 0.1 mol/L 盐酸中, 作为贮备液, 使用时, 从中取 1 mL 加到 99 mL 0.01 mol/L 盐酸中即成标准溶液; 中性  $\text{Al}_2\text{O}_3$  颗粒 [层析纯]; 1.84 mol/L 三氯乙酸溶液; 0.3 mol/L 醋酸溶液; 1 mol/L NaOH 溶液; 0.5%  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  溶液; 10% EDTA; Tris-HCl 缓冲液 (0.05 mol/L, pH 8.6); Vc-NaOH 溶液: 称取 60 mg 维生素 C (分析纯) 溶于 30 mL NaOH (10 mol/L) 溶液中, 即成 Vc-NaOH 溶液。

#### 2.3 材料

组织制备: 将大鼠迅速断头, 取所需组织块, 称重, 置冰箱-30 冷冻贮藏。

### 3 测定方法

#### 3.1 样品测定

1. 组织中 NE 含量测定: 首先准确称取 0.5 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  与

4 mL Tris-HCl 缓冲液混和若干份; 第二步, 将一定量的组织用 1.84 mol/L 三氯乙酸 0.1 mL 和 1 mL 0.01 mol/L 盐酸研磨, 3 000  $\times$  g 离心 10 min, 取上清液倒入事先准备的缓冲液和  $\text{Al}_2\text{O}_3$  中, 再加入 1 mL EDTA 溶液, 搅拌后, 让  $\text{Al}_2\text{O}_3$  颗粒自然沉淀, 10 min 后, 弃上清液。沉淀用 8 mL 蒸馏水洗一遍, 同样弃上清液。洗脱所吸附的物质用 0.3 mol/L 醋酸 2 mL, 搅拌浸泡 15 min, 3 000  $\times$  g 离心 3 min, 测定时取 1.5 mL 上清液。

在 1.5 mL 上清液中加入 1 mol/L NaOH 0.3 mL 中和, 再加 1 mL 蒸馏水, 氧化时采用 0.5%  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  溶液 0.03 mL, 反应 90 s 后, 加入 Vc-NaOH 终止反应。静置 10 min 即可用荧光分光光度计进行测定。条件为  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 410 \text{ nm}/505 \text{ nm}$ , 狭缝均为 10 nm。

2. 标准曲线制作: 将含量为 15、30、40、50、60 和 70 ng NE 的溶液分别加入三氯乙酸后用  $\text{Al}_2\text{O}_3$  吸附, 整个操作均按样品分析步骤进行。结果绘制标准曲线。

### 4 实验结果

#### 4.1 荧光物质的光谱特性

标准 NE 和组织中 NE 经氧化反应后形成的荧光物质显示出一致的光谱特性, 即  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 410 \text{ nm}/505 \text{ nm}$ 。当标准品或样品浓度变化时, 荧光光谱峰位不变, 仅改变峰高。

#### 4.2 线性范围

NE 含量在 10~100 ng 之间与荧光值呈现良好的线性关系, 回归方程  $Y = 0.878x - 9.38$ ,  $r = 0.9964$ 。

#### 4.3 方法精密度

取 NE 标准品在不同时间重复测定 10 次, 其结果见表 1。

表1 方法的精密度

标准品含量/ng	n	平均值/ng	SD	RSD (%)
15.00	10	13.81	1.22	8.8
35.00	10	36.74	1.90	5.1
60.00	10	57.42	2.48	4.3

#### 4.4 标准品加入回收

将大鼠组织匀浆后离心取上清液1.00、1.50和2.00 mL各2份,其中一半各加入标准品,进行标准回收实验,结果见表2。

表2 标准加入回收实验

组织上清液/mL	加入标准品/ng	测得值/ng	回收率(%)
1.00	0	30.42	/
1.00	25.00	54.31	95.56
1.50	0	47.89	/
1.50	25.00	72.05	96.64
2.00	0	58.77	/
2.00	25.00	81.69	91.68

## 5 讨论

利用本方法测得一些大鼠器官的基础值,例脑组织中,大

脑皮层NE含量为250~300 ng/g湿组织,下丘脑为1.8~2.0  $\mu\text{g/g}$ 湿组织,海马为300~400 ng/g湿组织,小脑为120~150 ng/g湿组织,脾脏中为3~4  $\mu\text{g/g}$ 等等,数据均与采用不同荧光法测得的文献值<sup>[1]</sup>以及与采用HPLC法<sup>[2]</sup>一致。

经典的荧光法中<sup>[3]</sup>采用A1O<sub>3</sub>吸附均需经历操作繁杂的装填层析柱过程,吸附、洗脱,耗时费力,使实验时间延长。本研究操作直接在试管中,A1O<sub>3</sub>吸附NE,洗脱亦在同一试管中,最后实验完毕还可回收A1O<sub>3</sub>,因此方法经济实用,值得在研究及临床检验中运用。

## 参 考 文 献

- 匡培根等. 军医进修学院学报, 1982; 3(2): 181
- 叶惟冷. 生理学报, 1987; 39(4): 412
- 金 律等. 中国药理学报, 1984; 5(2): 89

## A Fluorometric Method for the Determination of Norepinephrine in Tissue

Zhong X DNG and Yourui SUO

Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, 810001 Xining

**Abstract** This paper reported the determination of norepinephrine (NE) by spectrofluorometry in tissue. The linear relationship between the fluorescence intensity and the content of NE was in the range of 10—100 ng ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 410 \text{ nm}/505 \text{ nm}$ ). The rate of recovery is 91.68%—96.64% and RSD ( $n = 10$ ) is 6.1%. This method is simple, rapid and sensitive.

**Keywords** Norepinephrine, Fluorometric method

(Received Dec 5, 1996; accepted May 6, 1997)