



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109030662 A

(43)申请公布日 2018.12.18

(21)申请号 201811073624.0

(22)申请日 2018.09.14

(71)申请人 广西医科大学第一附属医院

地址 530021 广西壮族自治区南宁市双拥路6号

申请人 广西医科大学

(72)发明人 吴原 雷丹青 曾春梅

(74)专利代理机构 北京轻创知识产权代理有限公司 11212

代理人 杨立 李航

(51)Int.Cl.

G01N 30/02(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

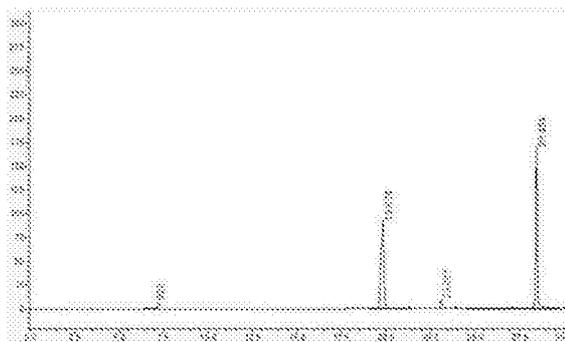
权利要求书2页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

检测致痫大鼠海马组织谷氨酸及r-氨基丁酸含量的方法

(57)摘要

本发明属于化学分析领域,提供了检测致痫大鼠海马组织谷氨酸及r-氨基丁酸含量的方法,取戊四唑致痫的大鼠海马组织,冰上匀浆,离心取上清液进行衍生处理,然后进行高效液相色谱检测谷氨酸及r-氨基丁酸,色谱条件为:采用反向C18柱,流动相包括流动相A和流动相B,流动相A为40-60mmol/L的乙酸钠溶液和四氢呋喃,流动相B为乙腈,采用梯度洗脱。本发明的检测方法步骤简单,结果精确,检测快速。



1. 检测致病大鼠海马组织谷氨酸及 γ -氨基丁酸含量的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 致病大鼠模型的建立:取SD大鼠,用剂量为80mg/kg的戊四唑进行皮下注射,观察大鼠行为,根据Racine分级标准,选择IV-V级致病大鼠作为致病大鼠模型;

(2) 将步骤(1)中得到的所述致病大鼠达到癫痫发作级别后30min时断头取海马组织,称取海马组织,冰上匀浆,取海马组织匀浆加入50vol%的甲醇溶液,按照每100mg加入1mL甲醇溶液计算,-4℃,12000rpm离心20-30min,取上清与乙腈1:1混合后,-4℃,12000rpm离心20-30min得到的上清液为样品,将样品进行衍生处理;

(3) 衍生后的样品通过高效液相色谱进行检测,测定样品中的谷氨酸及 γ -氨基丁酸含量,色谱条件如下:

色谱柱采用反向C18色谱柱;

流速:1.0mL/min;

柱温:30-35℃;

检测波长:265nm;

进样量:20 μ L;

流动相包括流动相A和流动相B,所述流动相A为40-60mmol/L乙酸钠溶液和四氢呋喃,二者体积比为99:1,所述乙酸钠溶液用冰醋酸调节pH至4.8,所述流动相B为乙腈;

采用如下梯度洗脱程序:

时间	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	80	20
5.00	80	20
20.00	60	40
25.00	40	60
30.00	40	60
30.01	30	70
35.00	30	70
40.00	80	20
45.00	80	20
45.01	Stop	Stop

2. 根据权利要求1所述的检测致病大鼠海马组织谷氨酸及 γ -氨基丁酸含量的方法,其特征在于,样品衍生处理的具体步骤为向样品中加入柱前衍生剂、乙腈、去离子水和硼酸-

硼砂缓冲液,加入的柱前衍生剂、乙腈、去离子水和硼酸-硼砂缓冲液与样品的体积比分别为7~9:10~12:8~10:7~9:4,所述硼酸-硼砂缓冲液的pH为8.6,放入40℃恒温水浴箱中反应5min,然后经0.22 μ m微孔滤膜过滤。

3.根据权利要求2所述的检测致病大鼠海马组织谷氨酸及r-氨基丁酸含量的方法,其特征在于,所述柱前衍生剂为9-芴甲基氯甲酸酯。

4.根据权利要求1所述的检测致病大鼠海马组织谷氨酸及r-氨基丁酸含量的方法,其特征在于,所述柱温为30-32℃。

检测致痫大鼠海马组织谷氨酸及 γ -氨基丁酸含量的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及化学分析领域,具体涉及检测致痫大鼠海马组织谷氨酸及 γ -氨基丁酸含量的方法。

背景技术

[0002] 癫痫是由于神经元异常放电引起的短暂性脑功能障碍,是一种常见的中枢神经系统综合征,癫痫持续状态(SE)是神经内科常见的危重急症,长时间癫痫发作若不及时控制,可因高热、循环衰竭或神经元兴奋毒性损伤,导致不可逆的脑损伤,致残率和病死率很高。SE与癫痫终止机制关系密切,因此,探索癫痫发作终止的相关机制,对改善SE患者预后及其重要。目前,有研究指出,抑制性神经递质及兴奋性神经递质失衡是介导SE的关键。 γ -氨基丁酸(GABA)与谷氨酸(GLU)分别为中枢神经系统中最为重要的抑制性及兴奋性神经递质,两者失衡是导致SE的重要原因之一。GLU对中枢神经系统有兴奋作用,与癫痫的发作起始关系密切,而其代谢产物:GABA,是中枢神经系统抑制性物质,可介导癫痫发作的终止。GLU、GABA的合成及释放与癫痫的终止关系密切。海马作为大脑边缘系统的一部分,与癫痫发作关系密切。因此,研究SE状态下海马内GLU、GABA含量及其比值变化,对癫痫持续状态的发生、发展及其终止有重要意义。

[0003] 常见的氨基酸检测方法有离子交换色谱法、气相色谱法、高效液相色谱法、毛细管电泳、色谱-质谱联用等。近年来,柱前衍生反相高效液相色谱法分析氨基酸的发展非常迅速,该方法具有灵敏度高、分析速度快、衍生试剂种类多样等优点,已经在许多领域得到应用。然而以前的色谱条件相对比较复杂、衍生产物存在不稳定、易降解等缺点,并且成本高。在本实验中我们摸索出了新的色谱条件,实现了脑内海马组织中GLU、GABA快捷、省时、低成本且准确度高的测定目的。

发明内容

[0004] 本发明目的在于提供一种低成本、方便快捷的检测致痫大鼠海马组织谷氨酸及 γ -氨基丁酸含量的方法。

[0005] 本发明解决上述技术问题的技术方案如下:检测致痫大鼠海马组织谷氨酸及 γ -氨基丁酸含量的方法,包括以下步骤:

[0006] (1) 致痫大鼠模型的建立:取SD大鼠,用剂量为80mg/kg的戊四唑进行皮下注射,观察大鼠行为,根据Racine分级标准,选择IV-V级致痫大鼠作为致痫大鼠模型;

[0007] (2) 将步骤(1)中得到的所述致痫大鼠达到癫痫发作级别后30min时断头取海马组织,称取海马组织,冰上匀浆,取海马组织匀浆加入50vol%的甲醇溶液,按照每100mg加入1mL甲醇溶液计算,-4℃,12000rpm离心20-30min,取上清与乙腈1:1混合后,-4℃,12000rpm离心20-30min得到的上清液为样品,并将样品进行衍生处理;

[0008] (3) 衍生后的样品通过高效液相色谱进行检测,测定样品中的谷氨酸及 γ -氨基丁酸含量,色谱条件如下:

- [0009] 色谱柱采用反向C18色谱柱；
 [0010] 流速：1.0mL/min；
 [0011] 柱温：30-35℃；
 [0012] 检测波长：265nm；
 [0013] 进样量：20uL；
 [0014] 流动相包括流动相A和流动相B，所述流动相A为40-60mmol/L乙酸钠溶液和四氢呋喃，二者体积比为99:1，所述乙酸钠溶液用冰醋酸调节pH至4.8，所述流动相B为乙腈；
 [0015] 采用如下梯度洗脱程序：
 [0016]

时间	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	80	20
5.00	80	20
20.00	60	40
25.00	40	60
30.00	40	60
30.01	30	70
35.00	30	70
40.00	80	20
45.00	80	20
45.01	Stop	Stop

[0017] 进一步，样品衍生处理的具体步骤为向样品中加入柱前衍生剂、乙腈、去离子水和硼酸-硼砂缓冲液，加入的柱前衍生剂、乙腈、去离子水和硼酸-硼砂缓冲液与样品的体积比分别为7~9:10~12:8~10:7~9:4，所述硼酸-硼砂缓冲液的pH为8.6，放入40℃恒温水浴箱中反应5min，然后经0.22μm微孔滤膜过滤。

[0018] 进一步，所述柱前衍生剂为9-芴甲基氯甲酸酯。

[0019] 进一步，所述柱温为30-32℃。

[0020] 本发明的有益效果是：本发明的检测方法步骤简单，结果精确，检测快速。

附图说明

[0021] 图1为本发明谷氨酸标准曲线，浓度单位为μg/mL；

[0022] 图2为本发明r-氨基丁酸标准曲线，浓度单位为μg/mL；

[0023] 图3为本发明谷氨酸标准品和r-氨基丁酸标准品高效液相色谱图；

[0024] 图4为本发明实施例中对照组海马组织样品的高效液相色谱图；

[0025] 图5为本发明实施例中药物组致痫大鼠海马组织样品的高效液相色谱图。

具体实施方式

[0026] 以下结合附图及具体实施例对本发明的原理和特征进行描述,所举实例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。

[0027] 本发明提供了一种低成本、方便快捷的检测致痫大鼠海马组织谷氨酸及r-氨基丁酸含量的方法。

[0028] 实验中用到的试剂及动物如下:

[0029] 戊四唑 (PTZ):购自上海源叶生物科技有限公司,用生理盐水配制成10mg/mL备用;

[0030] SD成年雄性大鼠:体重约160-200g,由广西医科大学动物实验中心提供;

[0031] L-谷氨酸标准品:购自上海源叶生物科技有限公司,其纯度>99%;

[0032] r-氨基丁酸标准品:购自北京普天同创生物科技有限公司,其纯度>98%;

[0033] 具体的实验过程如下:

[0034] (1) 致痫大鼠模型建立及海马组织处理

[0035] 将SD大鼠随机分为药物组和对照组两组,药物组取16只大鼠,对照组10只,药物组大鼠用剂量80mg/kg的戊四唑 (PTZ) 进行皮下注射,对照组予以等量的生理盐水进行皮下注射,给药后观察并记录大鼠行为,药物组按照Racine分级标准选择IV-V级致痫大鼠作为癫痫动物模型组,药物组中有13只大鼠达到该级别,达到癫痫发作级别30min时将实验组的癫痫动物模型组的13只大鼠以及对照组的10只大鼠分别断头取海马组织,称取少量海马组织,冰上匀浆,取海马组织匀浆加入50vol%的甲醇溶液,按照每100mg加入1mL甲醇溶液计算,-4℃,12000rpm离心20-30min,取上清与乙腈1:1混合后,-4℃,12000rpm离心20-30min得到的上清液为样品,取40μL样品加入120μL乙腈、80μL9-芴甲基氯甲酸酯、90μL去离子水和80μL pH为8.6的硼酸-硼砂缓冲液,混匀,放入40℃恒温水浴箱中反应5min进行衍生,然后用0.22μm微孔滤膜过滤,得到衍生后的样品。

[0036] (2) 将衍生后的样品通过高效液相色谱进行检测

[0037] 使用的仪器为LC-20AB高效液相色谱仪,色谱柱为RedClassicalAQ-C18 (5um, 250*4.8mm),检测波长为265nm,流动相包括流动相A和流动相B,流动相A为乙酸钠溶液+四氢呋喃,取用冰醋酸调节pH至4.8的50mmol/L的乙酸钠溶液410mL、去离子水85mL和四氢呋喃5mL混合均匀得到流动相A,流动相B为乙腈,流动相的流速为1.0mL/min,柱温为30-35℃,进样量为20uL,梯度洗脱程序如下:

[0038]

时间	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	80	20
5.00	80	20
20.00	60	40
25.00	40	60
30.00	40	60
30.01	30	70
35.00	30	70
40.00	80	20
45.00	80	20

[0039]

45.01	Stop	Stop
-------	------	------

[0040] 采用HPLC按照上述色谱条件测定不同浓度梯度下(20 μ g/mL、80 μ g/mL、100 μ g/mL、150 μ g/mL、200 μ g/mL)的谷氨酸及r-氨基丁酸标准品的峰面积,以峰面积为横坐标,浓度为纵坐标,绘制标准曲线,如图1和图2所示,谷氨酸的回归方程为 $y = 1.489681e-004x - 1.107063$, $R^2 = 0.9992$,r-氨基丁酸的回归方程为 $y = 1.096515e-004x - 2.731902$, $R^2 = 0.9992$,在上述色谱条件下,谷氨酸以及r-氨基丁酸标准品的HPLC图如图3所示,谷氨酸的保留时间为19.824min,r-氨基丁酸的保留时间为28.454min,两者峰形良好,其杂质对样品测定无干扰。

[0041] 采用HPLC在上述色谱条件下测定药物组和对照组衍生后的样品中谷氨酸和r-氨基丁酸的含量,对照组和药物组的HPLC图分别如图4和图5所示,对照组中谷氨酸的保留时间为19.801min,r-氨基丁酸的保留时间为28.519min,两者峰形良好,杂质峰对样品峰无干扰,根据标准曲线得到对照组海马组织中谷氨酸和r-氨基丁酸的浓度分别为 $162.61 \pm 20.74 \mu\text{g/mL}$ 和 $36.74 \pm 7.11 \mu\text{g/mL}$,药物组中谷氨酸的保留时间为19.715min,r-氨基丁酸的保留时间为28.421min,两者峰形良好,其杂质对样品峰无干扰,根据标准曲线得到药物组大鼠海马组织中谷氨酸和r-氨基丁酸的浓度分别为 $163.52 \pm 1.44 \mu\text{g/mL}$ 和 $40.05 \pm 6.67 \mu\text{g/mL}$,在PTZ致痫的药物组大鼠海马组织内谷氨酸和r-氨基丁酸的含量与对照组相比,无显著差别,两组大鼠海马内谷氨酸和r-氨基丁酸的比值(分别为 4.50 ± 0.58 和 4.13 ± 0.42)亦无明显差别,提示达到SE发作30分钟后SD大鼠脑内海马组织中的谷氨酸和r-氨基丁酸含量已经基本恢复至正常水平,谷氨酸与r-氨基丁酸的比值未见失衡。

[0042] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和

原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

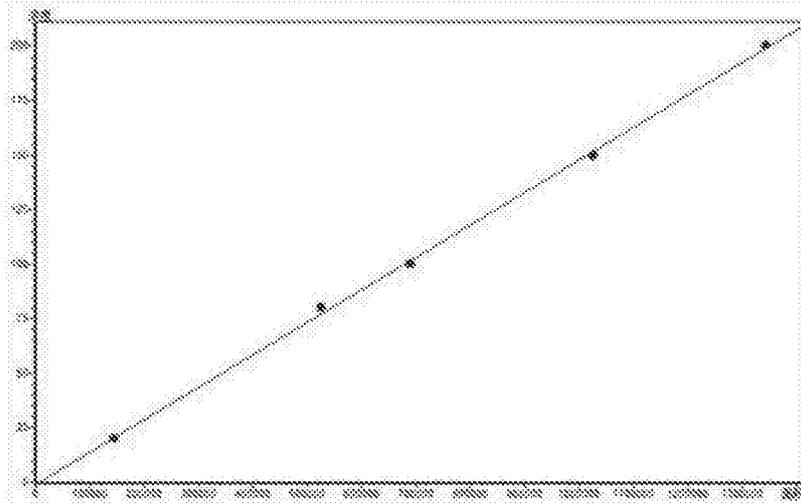


图1

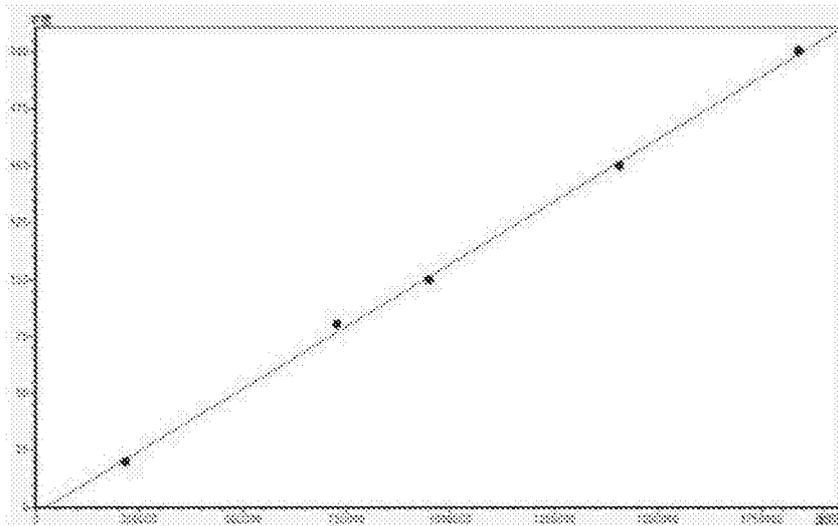


图2

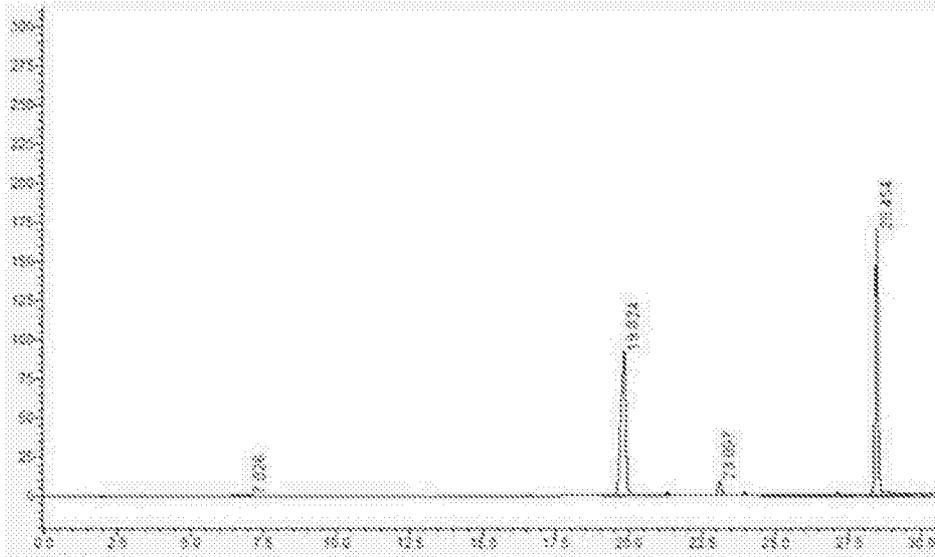


图3

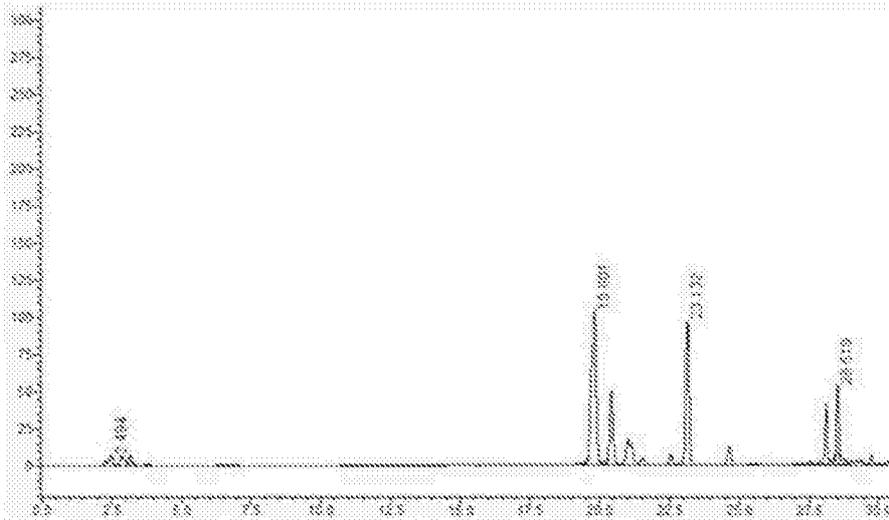


图4

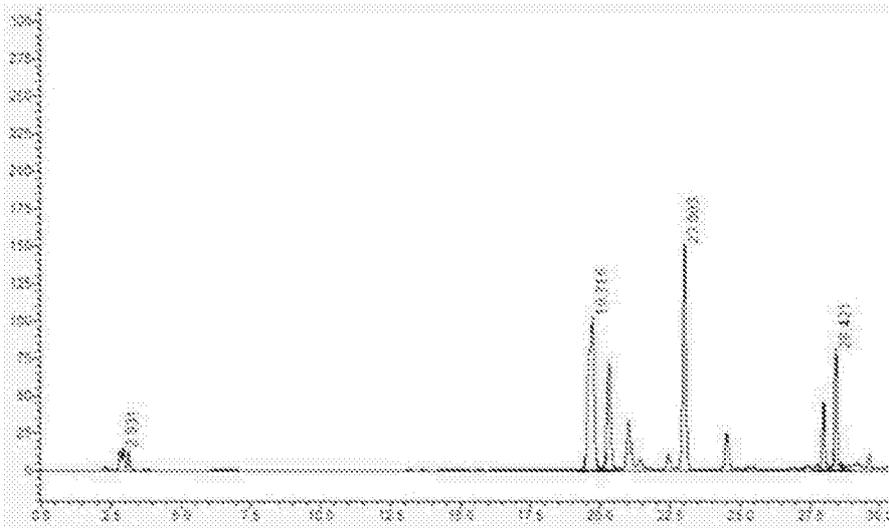


图5