

血清羧甲基半胱氨酸 (CMCys) AccQ-Tag 测定法

王天成¹, 沈惠麒²

(1. 北京医科大学第三医院检验科, 北京 100083; 2. 北京医科大学公共卫生学院, 北京 100083)

摘要: 目的 建立血清羧甲基半胱氨酸 (CMCys) 含量的高效液相色谱测定法。方法 采用 6-氨基喹啉基-N-羟基琥珀酰亚胺氨基甲酸酯 (AQC) 为衍生剂, 与 CMCys 柱前定量衍生后, 以 Waters HPLC 分析仪, AQC-Tag™ C18 氨基酸分析柱, 140mmol/L 乙酸钠 (pH=5.8) 为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 水为流动相 C, 进行梯度洗脱, 荧光检测 ($\lambda_{ex}=250\text{nm}$, $\lambda_{em}=395\text{nm}$), CMCys 和其它 18 种氨基酸组分在 63min 内分析完成。结果 本方法测定 CMCys 在 10~600 $\mu\text{mol/L}$ 范围内线性关系良好, 相关系数 0.997 8, 批内和批间 CV% 分别为 3.7%~4.9% 和 4.5%~5.8%, 平均回收率为 91%~114%。结论 本方法有操作简单、稳定性好、敏感性和准确性高等特点, 适用于对血清 CMCys 的测定。

关键词: 羧甲基半胱氨酸; 1, 2-二氯乙烷; 6-氨基喹啉基-N-羟基琥珀酰亚胺氨基甲酸酯; 高效液相色谱
中图分类号: R446.11 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X (2000) 03-0146-03

Determination of carboxymethylcystein in serum with high performance liquid chromatography

WANG Tian-cheng¹, SHEN Hui-qi²

(1. Department of Laboratory Medicine Third Hospital of Beijing Medical University, Beijing 100083, China; 2. Public Health College, Beijing Medical University, Beijing 100083, China)

Abstract: **Objective** To establish a method to determine serum carboxymethylcystein (CMCys) with high performance liquid chromatography. **Methods** CMCys reacts with derivative agent, 6-amino-quinolyhydroxysuccinimidyl carbamate (AQC), quantitatively before added to an analytical column. The derivative was eluted in gradient using Waters high performance liquid chromatography apparatus with an analytical column of AQC-Tag™ C18 amino acid, the flowing phase A of 140 mmol/L sodium acetate (pH=5.8), the flowing phase B of acetonitrile and the flowing phase of water, and then determined by a fluorescence ($\lambda_{ex}=250\text{nm}$, $\lambda_{em}=395\text{nm}$) detector. Analysis for CMCys and other 18 amino acids components could be finished in 63 minutes. **Results** Determination of serum CMCys concentrations within 10 to 600 $\mu\text{mol/L}$ with this method showed a good linear pattern, with coefficient of correlation of 0.997 8, coefficients of variation of 3.2%~4.9% within the same batch of specimens and 4.5%~5.8% between different batches of specimens respectively, and with a rate of recovery of 91%~114%. **Conclusion** This method of determination showed characteristics of simple performance, stable for analysis and higher sensitivity and specificity, and suitable for serum CMCys determination.

Key words: Carboxymethylcystein; 6-amino-quinolyhydroxysuccinimidyl carbamate; High performance liquid chromatography

卤代烃化合物应用于塑料制造和工业溶剂等多种领域, 有关卤代烃化合物对机体影响的研究表明除了对肝、肾和脑有毒性作用以外, 尚有报道其具有一定的致癌和致胚胎毒性。近年来随着我国工业的发展, 卤代烃化合物的使用更为广泛, 因此有关其毒性问题再次引起关注。在使用卤代烃化合物相关作业工人的健康监护过程中, 有关的生物监测指标必将是首先要加以解决的问题之一, 羧甲基半胱氨酸 (Carboxymethylcysteine, CMCys) 是卤代烃类化合物在体内的主要代谢产物之一, 因此烷基化半胱氨酸的测定和研究就显得十分重要, 探讨卤代烃化合物的生物监测指标

和进一步为其中毒机制的研究服务, 建立快速、准确的 CMCys 测定方法已成为当务之急, 为此我们进行了血清 CMCys 高效液相色谱荧光检测法的研究。

1 材料

1.1 仪器

Waters 高效液相色谱分析仪 (包括 510 型泵, 7725i 进样器, 420AC 荧光检测器, 680 梯度控制器, TCM 柱温控制器和柱箱, PC800 色谱工作站)。Millipore-Q 纯水器。

1.2 试剂

CMCys 为广州白云山制药厂产品; AccQ-Tag 荧光衍生试剂为 Waters 公司试剂盒, 其中包括分析柱、荧光衍生试剂 (6-氨基喹啉基-N-羟基琥珀酰亚胺氨基甲酸酯, AQC), 缓冲液, 水解氨基酸标准 (Standard H, 含有 2.5mmol/L 的 18 种标准氨基酸); 乙腈、三水醋酸

收稿日期: 1999-07-04; 修回日期: 1999-08-27

作者简介: 王天成 (1959—), 男, 满族, 北京人, 硕士, 副教授、副主任医师, 目前主要从事临床分析化学和免疫学等方面的研究工作。

钠、冰醋酸、磷酸、磷酸氢二钠、EDTA 为国产试剂分析纯或优级纯, 三乙胺为美国 Sigma 产品。

2 方法

2.1 流动相

A: 140mmol/L NaAC, 6.9mmol/L 三乙胺, 1ml EDTA (1mg/ml) 以体积分数 5%~10% 磷酸调 pH=5.8; B: 乙腈; C: 超纯水。

2.2 标准溶液

CMCys 标准液: 精取 CMCys 0.25mmol 至 100ml 容量瓶内, 以 0.1mmol/L 的 HCl 完全溶解, 配制成 CMCys 浓度为 2.5mmol/L 的标准液。

精取水解氨基酸标准 10 μ l, CMCys 储备液 10 μ l, 加 0.1mmol/L HCl 100 μ l 混匀。

2.3 样品制备和衍生反应

血清样品要先以离心超滤管超滤, 然后再衍生。衍生方法是以微量注射器精密吸取样品 10 μ l 于规格为 0.4cm \times 5cm 的玻璃管中, 精确加入 pH 为 8.8 的硼酸缓冲液 70 μ l, 再加入荧光衍生试剂 (AQC) 20 μ l, 以封口膜将管口严密封好, 置 55 $^{\circ}$ C 烘箱中 10min 后取出, 冷却, 以备进样。

2.4 色谱条件

色谱柱: AccQ-Tag 氨基酸分析专用柱 (4.6mm \times 150mm, Waters 公司产品), 柱温为 37 $^{\circ}$ C, 荧光检测器激发波长为 250nm, 发射波长为 359nm, 进样量 10 μ l, 按以下梯度表进行洗脱 (见表 1), 分析时间 63min。

表 1 CMCys 洗脱梯度表

时间 (min)	流速 (ml/min)	%A	%B	%C	曲线
初始	1.0	100	0	0	*
1.0	1.0	99	1	0	11
16	1.0	97	3	0	6
25	1.0	94	6	0	6
35	1.0	86	14	0	6
40	1.0	86	14	0	6
50	1.0	82	18	0	6
51	1.0	0	60	40	11
54	1.0	100	0	0	11

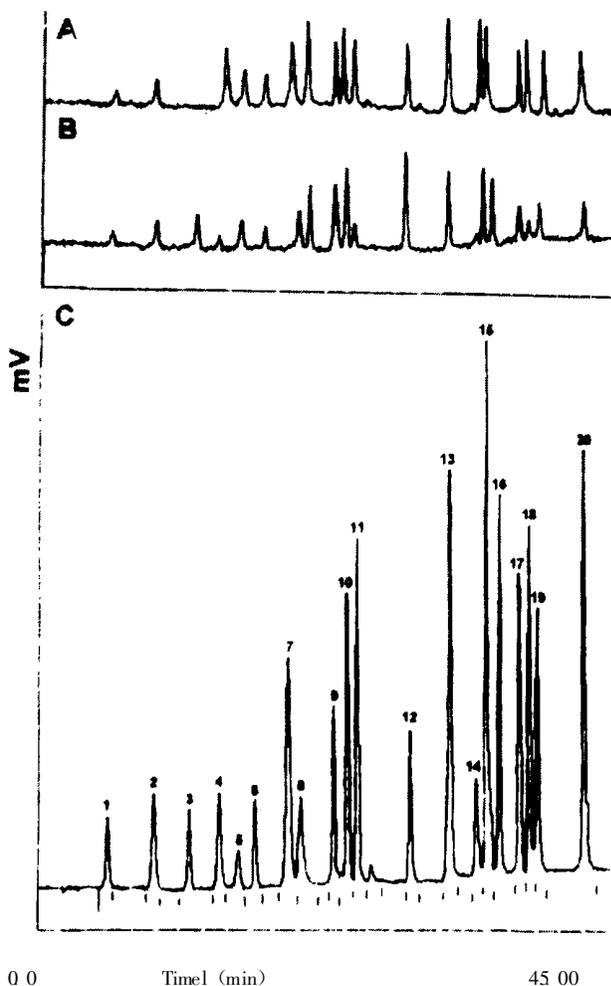
3 结果

3.1 色谱图 (图 1)

CMCys+ 水解氨基酸标准色谱图 (图 C), 空白血清色谱图 (图 A)。

3.2 线性范围和检测限

以 0.1mmol/L HCl 将 CMCys 标准分别稀释为 10、20、60、160、600 μ mol/L 的 5 个浓度, 以 CMCys 浓度



- 1. Asp 2. Glu 3. CMCys 4. Ser 5. AMQ 6. Glu 7. His 8. NH₃
- 9. Thr 10. Arg 11. Ala 12. Pro 13. Tyr 14. Cys 15. Val 16. Met
- 17. Tle 18. Leu 19. Lys 20. Phe

- A. 大鼠空白血清色谱图
- B. 1, 2-DEC 染毒大鼠血清色谱图
- C. CMCys+ 水解氨基酸标准色谱图

图 1 色谱图

为横坐标, 色谱响应值 (mV) 为纵坐标作图并计算回归方程, 结果表明 CMCys 在 10~600 μ mol/L 之间线性关系良好, 方程 $Y=23.6415X+11.6926$, 相关系数为 0.997 8。

检测限: 按大于基线噪音的 3 倍计算, CMCys 的检测限为 3 μ mol/L。

3.3 方法重现性

3.3.1 以 2 个浓度的 CMCys 分别进行批内和批间试验, 结果见表 2。

3.3.2 加标回收试验 取样品分别再加入高低两个浓度的 CMCys, 结果见表 3。

表2 CMCys 精密度测定结果

CMCys	均值 ($\mu\text{mol/L}$)	标准差	CV 值 (%)
批内变异 ($n=8$)	20.8	0.77	3.7
	164.2	8.05	4.9
批间变异 ($n=6$)	64.7	2.91	4.5
	392.8	22.78	5.8

表3 CMCys 回收试验 ($n=6$)

CMCys ($\mu\text{mol/L}$)	加入值 ($\mu\text{mol/L}$)	测定值 ($\mu\text{mol/L}$)	回收值 ($\mu\text{mol/L}$)	回收率 (%)
60	20	78.5	18.5	92.5
	60	124.3	64.3	107.2
160	20	182.8	22.8	114.0
	60	214.6	54.6	91.0

3.4 CMCys 的 AccQ-Tag 衍生物稳定性实验

取 10^4mol/L 和 20^4mol/L 的 CMCys 样品各 3 个分别衍生后室温下保存, 分别于当天、第二天和第三天分析, 其测定结果无明显差异, 见表 4。

表4 CMCys 样品测定的生物稳定性

时间	测定值 ($\bar{x} \pm s, n=3$)	
	样品 1 (10^4mol/L)	样品 2 (20^4mol/L)
第 1 天	10.36 \pm 0.63	20.53 \pm 0.96
第 2 天	10.28 \pm 0.65	19.96 \pm 0.92
第 3 天	9.64 \pm 0.71	20.26 \pm 0.87

3.5 1, 2-DEC 染毒大鼠血清色谱分析

动物: Wistar 大鼠, 雄性, 体质量 200g (北京医科大学实验动物中心提供)。

染毒: 1, 2-DEC 200mg/kg 体质量灌胃, 3 天后断头取血, 离心取血清。

以超滤方法去蛋白 (离心超滤管为美国 Millipore 公司产品), 按以上色谱条件分析。1, 2-DEC 染毒大鼠血清色谱图见图 1 中图 B。

4 讨论

CMCys 可能为卤代烃化合物染毒后在血中的主要代谢产物之一, 检测其水平可相对反应出卤代烃化合物的接触情况, 因此 CMCys 在卤代烃化合物的生物监测中可能具有重要的价值。有关 CMCys 检测方法的报道比较少, 目前国内尚没有比较成熟的检测方法, 国外有以色谱-质谱联用法检测 CMCys 的报道^[1], 虽然具有准确、敏感的特点, 但因要求设备条件较

高, 因此不能适应我国生物监测的要求; 我们参考血清氨基酸分析方法^[2,3], 建立了 CMCys 的柱前衍生高效液相色谱 AccQ-Tag 荧光检测分析法, 它具有操作简单、相对敏感和准确、稳定性好的特点, 除能分析 CMCys 以外, 尚能分析其它 18 种氨基酸, 本实验结果表明此法完全可达到规范要求。

CMCys 做为卤代烃化合物染毒后的主要代谢产物主要经肾排出, 但因尿中其它代谢产物较多, 在一定程度上对 CMCys 分析产生干扰, 因此必须对尿液进行预处理 (如以 Sep-Pak 小柱处理), 以去除干扰分析的物质; 此外尿中 CMCys 的水平尚受到尿液浓度的影响, 为了准确定量, 一般要同时分析尿肌酐, 而尿肌酐测定还受饮食和运动等多种因素的影响, 因此准确分析尿中 CMCys 受到多种条件的制约, 而血中的 CMCys 水平相对比较稳定, 干扰分析物质的水平也较低, 此外在急性卤代烃化合物染毒的生物监测也以血样较为适宜。

在实验中有些因素可能影响 CMCys 的准确分析, 如要精确调整流动相的 pH 值 (小数点第二位), 因流动相的 pH 值的变化可影响样品峰的洗脱顺序、分离度和重现性; 血清样品以超滤方法去蛋白为好, 因以沉淀法去蛋白时一则无法将样品中的蛋白去除完全, 从而影响柱效和分析柱寿命, 二则沉淀剂对氨基酸类组分有一定的破坏作用, 加之有部分氨基酸类组分随沉淀物一起被沉淀, 因此对分析的稳定性、敏感性、准确性均有很大影响, 而采用超滤方法去蛋白则可不受以上因素的影响。

因本方法尚没有应用于生物监测实践, 因此有待于今后进一步验证。

参考文献:

- [1] R. Anacardio, M. G. Gantolini, F. De Angelis, et al. Quantification of S-carboxymethyl-(R)-cysteine in human plasma by high-performance ion-exchange liquid chromatography/atmosphere pressure ionization mass spectrometry [J]. J of Mass Spectrometry, 1997, 32: 388~394
- [2] 唐志毅, 许维佳, 杨振华, 等. 体液游离氨基酸反相高效液相色谱测定法 [J]. 中华医学检验杂志, 1994, 17(3): 140~143.
- [3] 王桂珍, 廖文斌. AccQ-Tag 法测定复方氨基酸注射液中的氨基酸含量 [J]. 中国药科大学学报, 1996, 27(1): 29~31.

(上接 145 页)

- [2] 彭英, 黄如训, 王映红, 等. ET、CGRP 水平在高血压及局部脑缺血后下丘脑和血浆中的动态变化 [J]. 脑与神经病杂志, 1996, 4(3): 129~132.
- [3] Toibana N, Kanazuka M, Shigekiyo T. High level plasma thrombomodulin concentration and correlation with endothelin-1 in vibration-exposed

- patients [J]. Cent Eur J Public Health, 1995, 3 suppl: 40~42.
- [4] Harada N. Autonomic nerves of hand-arm vibration syndrome patients [J]. Nagoya J Med Sci, 1994, 57: 77~85.
- [5] Kondo F. Functions of the sympathetic-adrenomedullary system and adrenocortical in patients with vibration syndrome [J]. Jpn J Ind Health, 1998, 30: 263~271.