

双壳贝类血淋巴中儿茶酚胺的检测方法初步研究

高 菲^{1,2}, 杨红生¹, 许 强^{1,2}, 陈慕雁^{1,2}, 张 涛¹, 周 毅¹

(1.中国科学院 海洋研究所 海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2.中国科学院 研究生院, 北京 100049)

摘要:研究的目的是探索一种检测双壳贝类血淋巴中儿茶酚胺含量的方法。以栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 和长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 为实验对象, 研究了取样、抗氧化剂、氧化铝用量以及 Tris 缓冲液用量等对实验结果的影响。结果表明, 高效液相色谱电化学检测器法 (HPLC-ECD) 可以灵敏高效地对双壳贝类血淋巴中儿茶酚胺进行定性、定量检测。实验表明, 取样时间最长不超过 1.5 min; 还原性谷胱甘肽作抗氧化剂效果较好; 前处理各试剂与血样量的最适配比为血样量 1.5 mL, Tris 缓冲液 (1.5 mol/L, pH8.6) 1mL 和氧化铝 25 mg; 水洗后离心并尽可能吸干氧化铝中的水分。去甲肾上腺素、肾上腺素和多巴胺的回收率分别为 53%~69%、47%~73%和 48%~56%。

关键词: 双壳贝类; 血淋巴; 儿茶酚胺; 检测; HPLC-ECD

中图分类号: Q577 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2006)01-0028-06

儿茶酚胺 (Catecholamines, CA) 主要由去甲肾上腺 (norepinephrine, NE)、肾上腺素 (epinephrine, E) 和多巴胺 (dopamine, DA) 组成, 在双壳贝类繁殖、附着变态以及应激反应等生理过程中均起重要作用^[1~3], 是双壳贝类神经内分泌和免疫系统对环境胁迫响应的主要信号物质^[3]。

环境胁迫是导致栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 等贝类大规模死亡的重要诱因之一^[4]。目前有关环境胁迫对贝类生理生态学特征影响的报道很多^[5,6], 而环境胁迫对双壳贝类神经内分泌及免疫影响的研究较少^[7,8]。双壳贝类血淋巴中儿茶酚胺检测方法的建立, 为研究贝类神经内分泌-免疫系统对环境胁迫响应打下了基础, 进而为贝类大规模死亡机理研究等提供理论支持。

脊椎动物 (包括人) 体液及组织中 CA 的研究开展的较早, 检测血浆、尿液中的 CA 对于人类嗜铬细胞瘤、心血管系统疾病等的诊断具有重要意义, 检测方法包括荧光测定法、放射酶学法、高效液相色谱法、电化学分析法、色谱联用法、化学发光法以及传感器

检测法等^[9]。无脊椎动物体内儿茶酚胺含量变化的研究较少, 近年来有学者将儿茶酚胺作为研究贝类胁迫反应的重要指标^[3, 8]。作者参考脊椎动物血浆儿茶酚胺检测方法, 将高效液相色谱法应用于双壳贝类血淋巴中儿茶酚胺的研究, 探索出一种简便高效的双壳贝类血淋巴中儿茶酚胺含量的检测方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

栉孔扇贝及长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 取自山东荣成寻山养殖基地, 低温 (0~4℃) 运回, 在中国科学院海洋研究所实验室暂养 7~10 d 后取样。暂养期间充气并投喂螺旋藻粉, 每天换水 1 次。

收稿日期: 2005-01-28; 修回日期: 2005-06-09

基金项目: 国家重点基础研究 973 规划资助项目 (G1999012012)

作者简介: 高菲 (1981-) 女, 山东临朐人, 硕士, 主要从事养殖生态学研究, 电话: 0532-82898645, E-mail: gaofei@ms.qdio.ac.cn

1.2 药品

标准品 NE 和 E 购自 Fluka 公司, DA、内标准品 DHBA(3,4-二羟基苯胺)和酸性氧化铝(super 1 级),均由 Sigma 公司提供; Vc 为分析纯, 购自上海亨达精细化工有限公司; GSH(还原性谷胱甘肽)为 BIB 公司提供; Tris(三羟甲基氨基甲烷)为优级纯, 由 DOW 公司提供, 焦亚硫酸钠为 ACS 级, 由 AMRESCO 公司提供; 高氯酸为 HPLC 级, 磷酸二氢钠、辛酸磺酸钠、EDTA、四氢呋喃为色谱纯, 均由天津科密欧公司提供; 甲醇、乙腈 HPLC 级, 购自美国 TEDIA 公司; 超纯水为 Millipore 公司的 Mili-Q 纯水器所制。

1.3 仪器

HP 1100 HPLC 系统, Agilent 1049 电化学检测器。

1.4 标准溶液

精确称量 NE、E、DA 和内标 DHBA (Sartorius

电子分析天平, 精确度为 0.000 01 g), 用 0.1 mol/L 高氯酸配置成 NE 0.995 6 g/L, E 1.048 g/L, DA 1.003 6 g/L 和 DHBA 1.016 g/L 的储备液, 避光储存于 -20 °C 备用。

1.5 样品采集

1.5.1 栉孔扇贝血淋巴样品采集

栉孔扇贝取样部位见图 1。取出扇贝, 去除海水, 刺激扇贝使两壳张开, 将注射器针头小心插入闭壳肌血窦中(注意倾斜针头且使针头向外), 缓慢后拉活塞, 抽取约 0.5 mL 血淋巴, 加入已预冷且加有 40 μ L GSH (0.05 mol/L) 和 40 μ L EDTA (0.3 mol/L) 的离心管中, 3~4 个扇贝的血淋巴集中为一个样品, 取样过程样品冰浴。离心 10 min (2 000 r/min, 4 °C), 取上清液, 直接进行前处理。

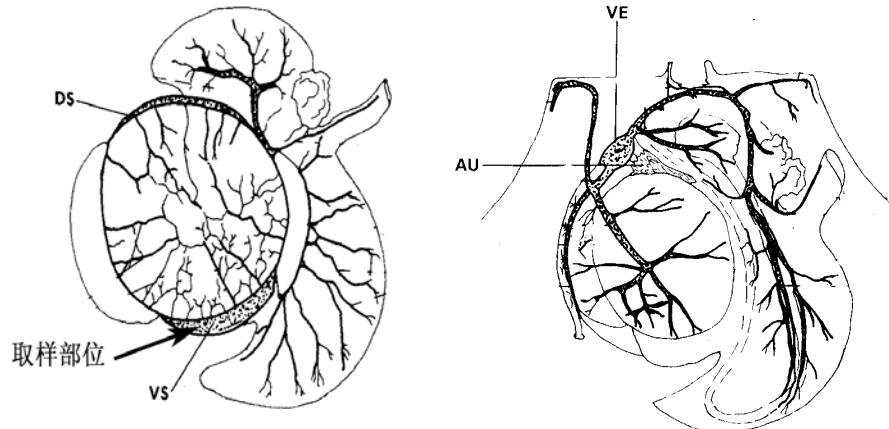


图 1 扇贝循环系统 (引自 Shumway S E, 1991)

Fig.1 Circulatory system of scallops

DS: 背侧血窦, VS: 腹侧血窦, AU: 心耳, VE: 心室

DS: dorsal sinus, VS: ventral sinus, AU: auricle, VE: ventricle

1.5.2 长牡蛎血淋巴样品采集

长牡蛎取样部位见图 2。牡蛎取出后, 迅速去掉右壳, 去除壳内多余海水, 暴露围心腔。用 1 mL 注射器小心取出约 0.3 mL 血淋巴, 加入已预冷且加有 40 μ L GSH (0.05 mol/L) 和 40 μ L EDTA (0.3 mol/L) 的离心管中, 5~6 个牡蛎的血淋巴集中为一个样品, 取样过程样品冰浴。离心 10 min (2 000 r/min, 4 °C),

取上清液, 直接进行前处理。

1.6 样品前处理

采用氧化铝吸附法对样品进行前处理, 包括吸附、水洗和洗脱 3 个基本步骤, 具体如下:

在离心管中加入 1.5 mL 血淋巴、1 mL Tris 缓冲液 (1.5 mol/L, pH8.6) 25 mg 酸性氧化铝, 100 μ L (10 μ g/L) DHBA, 10 μ L 5 μ mol/L 焦亚硫酸钠,

旋涡混合 15 min, 离心 5 min (2 000 r/min, 4 °C), 吸出上清液; 加水至 3 mL, 旋涡混合 10 min, 离心 5 min (4 000 r/min, 4 °C), 吸出上清液, 重复 2 次; 离心 5 min (4 000 r/min, 4 °C), 小心吸出上清液; 在

氧化铝中加高氯酸 (0.1 mol/L, pH 1.5) 100 μ L, 旋涡混合 15 min, 离心 10 min (5 000 r/min, 4 °C), 取上清液 60 μ L, 直接进样或于-20 °C 保存备用, 进样量为 40 μ L。

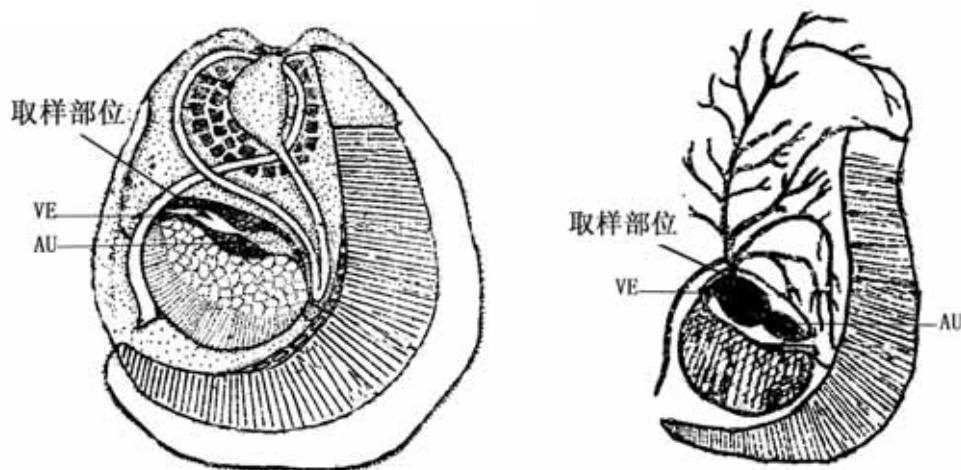


图 2 牡蛎循环系统 (引自张玺, 1959)

Fig.2 Circulatory system of oysters

AU: 心耳, VE: 心室

AU: auricle, VE: ventricle

1.7 色谱条件

ODS 柱 (4.6 mm $\times$ 15 cm), 柱温 25 °C, 电压 0.7 V, 流速 0.8 mL/min。流动相配方^[7]: 100 mmol/L 磷酸二氢钠, 0.7 mmol/L 辛酸磺酸, 10 μ mol/L EDTA, 8% 的甲醇, 3 % 的乙腈, 0.25% 的四氢呋喃。用 85% 的磷酸调 pH 到 3.95。流动相用超纯水配制, 真空抽滤 (0.45 μ m 孔径)。

1.8 数据分析

用 SPSS 11.0 软件分析有关数据, 差异性检验采用 LSD 检验法。

2 结果

2.1 抗氧化剂对检测结果的影响

以人工海水为基质, 用 NE、DA 和 DHBA 标准液配置混标样品, 各取 1.5 mL 分别加入抗氧化剂 GSH 或 Vc, 经与样品相同的前处理过程后进样, Vc 可被氧化铝吸附并被电化学检测器检出, 色谱图上出现明显的干扰峰, 影响 NE 和 E 的定性及定量; GSH 则未被电化学检测器检出, 可以作为抗氧化剂使用。

2.2 氧化铝用量对检测结果的影响

氧化铝用量对检测结果影响见图 3。同 2.1 配置样品, 各取 1.5 mL 分别用 10, 25, 50 和 80 mg 酸性氧化铝在相同条件下吸附, 前处理后进样。用 25 mg 氧化铝处理过的样品, 其 NE, DA 和内标 DHBA 的峰高明显高于氧化铝用量为 10, 50 和 80 mg 的样品 ($P < 0.001$)。

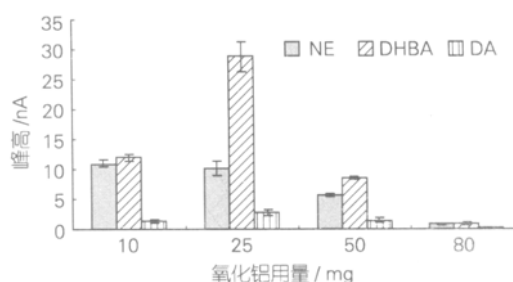


图 3 氧化铝的量与峰高的关系

Fig.3 Relationship between amounts of alumina and peak heights

2.3 缓冲液用量对检测结果的影响

缓冲液用量对检测结果影响见图4。同2.1配置样品, Tris缓冲液(1.5 mol/L, pH 8.6)用量分别为0.5、1.0、1.5和3 mL处理样品后进样, 缓冲液用量为1 mL和1.5 mL的样品, 其NE、DA和内标DHBA的峰高明显高于缓冲液用量为0.5 mL和3 mL时($P<0.001$) (图4)。

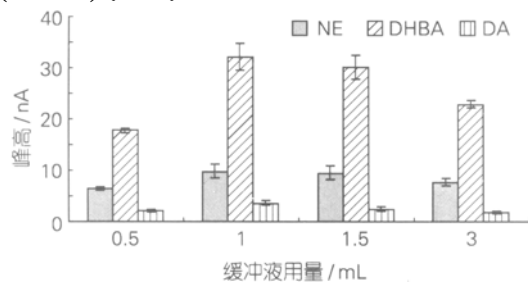


图4 缓冲液用量与峰高的关系

Fig.4 Relationship between volumes of Tris buffer and peak heights

2.4 回收率

以人工海水为基质, 用NE、DA和DHBA标准液配置样品, 前处理后测定其浓度。去甲肾上腺素、肾上腺素和多巴胺的回收率分别为53%~69%、47%~73%和48%~56%。

2.5 栉孔扇贝及长牡蛎血淋巴中儿茶酚胺检测结果

色谱图见图5。用此方法检测干露12h后栉孔扇贝和长牡蛎血淋巴中儿茶酚胺含量, 栉孔扇贝血淋巴中只检测到DA一种儿茶酚胺类激素, 其干露后的平均含量为 $0.7548 \mu\text{g/L} \pm 0.19 \mu\text{g/L}$; 长牡蛎血淋巴中只检测到NE和DA, NE平均为 $6.52 \mu\text{g/L} \pm 0.54 \mu\text{g/L}$, DA平均为 $25.63 \mu\text{g/L} \pm 3.33 \mu\text{g/L}$ 。

3 讨论

3.1 取样

儿茶酚胺是双壳贝类的主要应激激素, 取样时对动物刺激强度过大或时间过长都会引起其浓度的改变。多次实验结果表明取样时做到以下几点可减少动物的刺激: (1)据物种间解剖结构不同取样部位不同: 扇贝为血窦, 牡蛎为围心腔。(2)儿茶酚胺定量研究时, 每个实验动物仅能取样一次, 若围心腔膜堵塞针头则弃掉实验动物。(3)尽量选择小型号针头的注射器吸取血淋巴, 本实验注射器为1 mL, 针头规格为

0.45 mm。(4)取样动作要快, 本实验从开壳到取样完毕, 整个取样过程在1.5 min之内完成, 超时则弃之不用。

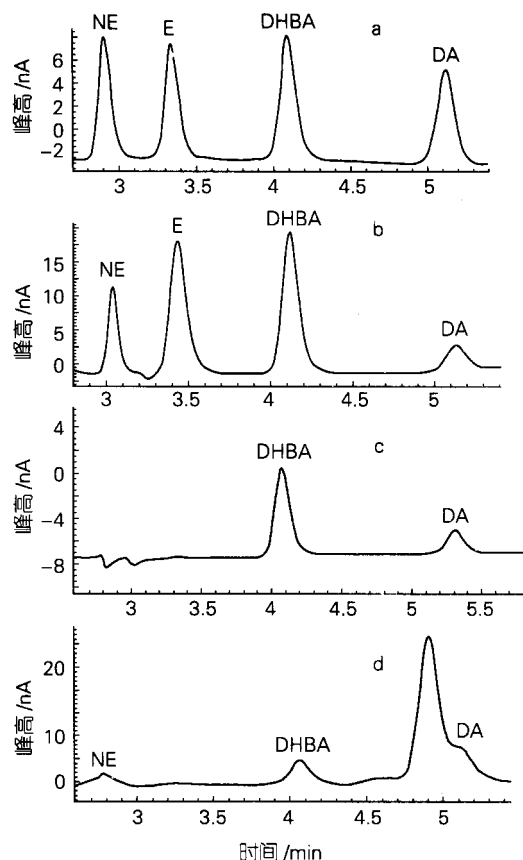


图5 色谱图

Fig.5 Chromatograms

- a. 标准品色谱图 b. 标准品前处理后色谱图
c. 栉孔扇贝血淋巴样品色谱图 d. 长牡蛎血淋巴样品色谱图
a. Chromatogram of standard sample
b. Chromatogram of standard sample after extraction
c. Chromatogram of *Chlamys farreri* sample after extraction
d. Chromatogram of *Crassostrea gigas* sample after extraction

3.2 抗氧化剂的选择

儿茶酚胺结构相似, 均有两个邻位酚羟基, 很容易降解, 且氧化剂、热、光都会加速其氧化反应。整个实验过程在避热避光条件下进行, 血淋巴中加入抗氧化剂。所选抗氧化剂既要有抗氧化作用又不能干扰

CA 的检测。本实验对比两种常用抗氧化剂 GSH 和 Vc, 前者效果明显优于后者, 因为 Vc 可被氧化铝吸附并被电化学检测器检出, 其峰往往能掩盖 NE 和 E 的峰, 而 GSH 对这几种激素的检出没有影响, 因此建议选择 GSH 作为抗氧化剂。

3.3 前处理方法的选择

血淋巴成分复杂, 不能直接进样检测, 进样前必须经过净化或浓缩的前处理。前处理方法除氧化铝吸附法^[7,12]外, 也有学者采用对血淋巴去蛋白后直接进样的方法^[13]。前者的优点是选择性高、有浓缩效果, 适合于低含量样品的检测, 缺点是回收率低且操作较复杂, 本研究儿茶酚胺的回收率为 48%~73%。后者的优点是回收率较高且操作简便, 缺点是不能达到浓缩效果, 且去蛋白血样中组分仍较复杂, 若直接进样经常会损坏仪器。鉴于双壳贝类血淋巴成分复杂且儿茶酚胺含量很低的特点建议选择氧化铝吸附法。

3.4 前处理过程

氧化铝吸附法对样品进行前处理, 主要包括氧化铝吸附、水洗和洗脱 3 个步骤。样品量、缓冲液及氧化铝用量须达到最佳配比才能达到较高的回收率。作者经多次优化实验, 综合实验结果得出血样量 1.5 mL、缓冲液 1 mL 和氧化铝 25 mg 的配比能得到较大回收率。儿茶酚胺洗脱所需 pH 值范围为 1.0~2.0, 水洗可去掉氧化铝中 Tris 缓冲液, 保证洗脱液在适宜 pH 范围内^[14]。同时多余的水分不仅会改变洗脱液的 pH 且降低终样品中儿茶酚胺的浓度, 因此水洗后离心, 用移液器将水吸干。

3.5 检测器的选择

双壳贝类血淋巴中儿茶酚胺生理水平很低, 正常生理含量在皮克级。本实验曾尝试用荧光检测器检测, 因荧光检测器的选择性差、最低检测限太高, 而难以应用于双壳贝类血淋巴中儿茶酚胺的定性定量研究。因此建议采用灵敏度高且选择性较好的电化学检测器进行检测。

参考文献:

- [1] 张涛, 阙华勇, 杨红生, 等. 海湾扇贝幼虫变态过程中体内神经递质含量的变化 [J]. 海洋与湖沼, 2002, 33 (5): 239–244.
- [2] 王建辰, 章孝荣. 动物生殖调控 [M]. 合肥: 安徽科技

术出版社, 1997, 21–33.

- [3] Malham S K, Lacoste A, Gélébart F, *et al.* A first insight into stress-induced neuroendocrine and immune changes in the octopus *Eledone cirrhosa* [J]. *Aquat Living Resour*, 2002, 15: 187–192.
- [4] 张福绥, 杨红生. 山东沿岸夏季栉孔扇贝大规模死亡原因的分析 [J]. 海洋科学, 1999, 1: 44–47.
- [5] 周毅, 杨红生, 张福绥. 四十里湾栉孔扇贝的生长余力和 C、N、P 元素收支 [J]. 中国水产科学, 2002, 9(2): 161–165.
- [6] 周毅, 毛玉泽, 杨红生, 等. 四十里湾栉孔扇贝清滤率、摄食率和吸收效率的现场研究 [J]. 生态学报, 2002, 22 (9): 1455–1462.
- [7] Lacoste A, Malham S K, Cueff A, *et al.* Stress-induced catecholamine changes in the hemolymph of the oyster *Crassostrea gigas* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2001, 122: 181–188.
- [8] Lacoste A, Malham S K, Gélébart F, *et al.* Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2001, 26: 1–9.
- [9] 刘明杰, 朱业湘. 儿茶酚胺类神经递质检测技术及其研究进展 [J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(4): 501–503.
- [10] Shumway S E. Scallop: biology, ecology and aquaculture [M]. Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo: ELSEVIER, 1991.161.
- [11] 张玺, 楼子康. 牡蛎 [M]. 北京: 科学出版社, 1959.28–67.
- [12] Pani A K, Croll R P. Catechol concentration in the hemolymph of the scallop, *Placopecten magellanicus* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1999, 118: 48–56.
- [13] 黄新华, 陈本美, 陈新. 高效液相色谱法测定生物样品中儿茶酚胺及其代谢产物 [J]. 湖南医科大学学报, 2002, 27(5): 471–473.
- [14] Ganhaio M F, Hattingh J, Hurwitz M L, *et al.* Evaluation of a simple plasma catecholamine extraction procedure prior to high-performance liquid chromatography and electrochemical detection [J]. *Journal of Chromatography*, 1991, 564: 55–66.

Preliminary study of the detection of catecholamines in the hemolymph of the bivalves

GAO Fei^{1,2}, YANG Hong-sheng¹, XU Qiang^{1,2}, CHEN Mu-yan^{1,2}, ZHANG Tao¹, ZHOU Yi¹

(1.Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2.Graduate School, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Jan., 28,2005

Key words: bivalve; hemolymph; catecholamines; detection; HPLC-ECD

Abstract : The study is intended to establish a method for the detection of catecholamines in the hemolymph of bivalves, *Chlamys farreri* and *Crassostrea gigas*. Different procedures and reagent matching in sample preparation are examined to acquire maximum recovery rate. The results are as follows: (1) the collection time of hemolymph can't exceed 1.5 minutes; (2) the optimum reagent matching during the extraction process is: 1.5ml hemolymph, 25mg alumina and 1ml Tris buffer; (3) glutathione(GSH) proves to be an effective antioxidant; (4) high-performance liquid chromatography with the electrochemical detector is a sensitive instrument for catecholamines detection. The recovery rates of norepinephrine, epinephrine and dopamine in the study are 53%~69%, 47%~73% and 48%~56% respectively.

(本文编辑:张培新)