

Методы исследования

УДК 577.175.522.523

УПРОЩЕННЫЙ МЕТОД ФЛУОРОМЕТРИЧЕСКОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАТЕХОЛАМИНОВ И ДОФА
В БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОБЕ

МАНУХИН Б. Н., СЕЛИВАНОВА Г. П.

Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова, Москва

Описан способ определения концентрации адреналина, норадреналина, дофамина и их предшественника ДОФА в одной биологической пробе, включающей получение флуорофоров аминов. Метод отличается простотой выполнения, обеспечиваемой осаждением белков гомогената 3 М раствором HClO_4 , что исключает дополнительную очистку и связанную с ней неизбежную потерю исследуемых веществ; получением флуорофоров всех четырех веществ одновременно в одной пробе; проведением их количественного определения в одной флуориметрической кювете путем последовательного измерения флуоресценции при оптимальных для каждого вещества длинах волны возбуждения и флуоресценции.

В литературе описано много вариантов метода спектрофлуориметрического определения биогенных моноаминов [1, 2]. Различные варианты основного метода дают хорошо воспроизводимые результаты и широко используются в экспериментальных и клинических исследованиях [3—6].

При изучении адренергической медиаторной системы часто возникает необходимость одновременного исследования всех медиаторов, а иногда и их предшественника 3,4-диоксифенилаланина (ДОФА), что возможно при использовании спектрофлуориметрических методов. Существенным недостатком последних является трудоемкость исполнения, ограничивающая возможность их применения для серийных рутинных исследований. Затруднения обусловлены необходимостью предварительной очистки биологических проб на адсорбентах или с помощью органических растворителей, а также раздельного получения и измерения флуорофоров норадреналина (НА), адреналина (А), дофамина (ДА) и ДОФА, что чревато неизбежными потерями исследуемых веществ.

В процессе работы с различными вариантами спектрофлуориметрического триоксинидольного метода определения биогенных моноаминов было замечено, что в надпочечниках и семявыносящем протоке катехоламины могут быть определены сразу после осаждения белков, без дополнительной очистки их на адсорбентах. В связи с этим возникло предположение о возможности измерения концент-

рации катехоламинов и в некоторых других тканях за счет улучшения предварительной очистки и дифференцировки флуоресценции исследуемых веществ. Настоящее исследование является экспериментальным доказательством высказанного предположения.

Результаты экспериментов

На рис. 1 и 2 представлены спектры флуоресценции А и НА, где пик возбуждения норадреналина λ 395 нм, флуоресценции— λ 485 нм, а адреналина— λ 420 и 500 нм соответственно. Различия в максимумах возбуждения 25 нм и флуоресценции 15 нм достаточны

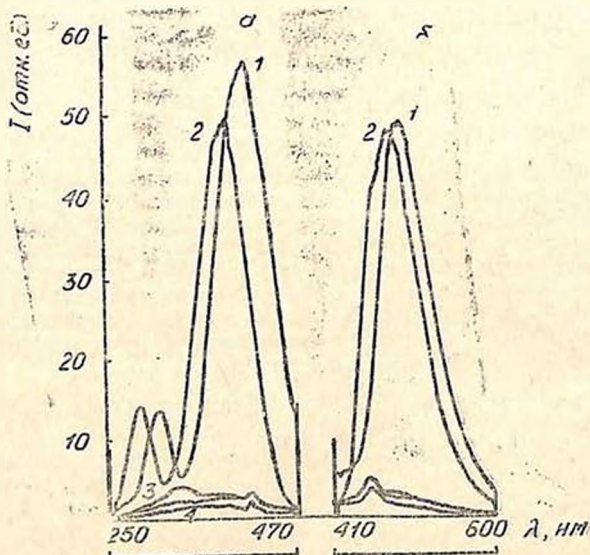


Рис. 1. Спектры волн возбуждения (а) и флуоресценции (б) катехоламинов и ДОФА. а—спектр волны возбуждения при постоянной длине волны флуоресценции 485 нм; б—спектр волны флуоресценции при постоянной длине волны возбуждения 395 нм. 1—норадреналин, 2—адреналин, 3—дофамин, 4—ДОФА (по 100 нг). Здесь и на рис. 2—4, по оси абсцисс—длина волны возбуждения (а) и флуоресценции (б) в нм, по оси ординат—интенсивность флуоресценции

для их дифференцировки при использовании длин волн возбуждения и флуоресценции, характерных для НА или А. В этих условиях пики флуоресценции ДОФА и ДА практически не отличаются от контроля.

Достоверно различаются также длины волн максимумов возбуждения и флуоресценции ДОФА и ДА (рис. 3, 4). Для ДОФА длина волны возбуждающего света λ 335 нм и флуоресценции 375 нм, ДА—323 и 358 нм соответственно. Различия между макси-

мумом возбуждения ДОФА и ДА—13 нм и флуоресценции—7 нм. В этих условиях флуоресценция А и НА незначительна.

Как видно из рис. 1—4, максимумы возбуждения и флуоресценции у НА и А и ДОФА и дофамина близки, что позволяет проведение дифференцировки между парами этих веществ.

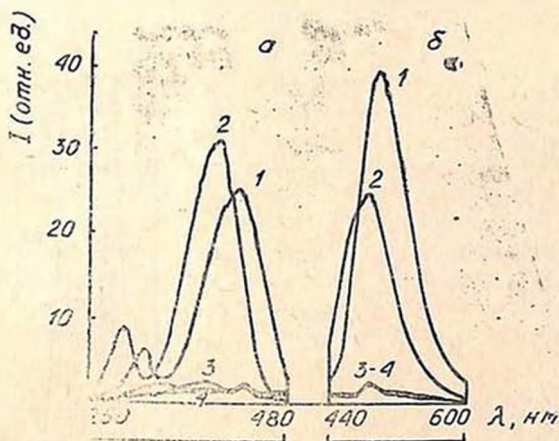


Рис. 2. Спектры волн возбуждения (а) и флуоресценции (б) катехоламинов и ДОФА. а—спектр волны возбуждения при постоянной длине волны флуоресценции 500 нм; б—спектр волны флуоресценции при постоянной длине волны возбуждения 420 нм. 1—адреналин, 2—норадреналин, 3—дофамин, 4—ДОФА (по 100 нг)

Для определения концентрации катехоламинов и ДОФА ткань гомогенизировали в 4 мл 3 М HClO_4 (на этом этапе гомогенат можно хранить в замороженном состоянии длительное время). Гомогенат центрифугировали, к супернатанту добавляли 1,0 мл этанола, смесь нейтрализовали Na_2CO_3 до pH 6,5 (по внешнему индикатору), разливали в пробирки по 1 мл, добавляли по 0,5 мл 25 мМ трис-буфера pH 6,5, затем 1 мл 20 мМ раствора I_2 в 0,3 М KCl , через 3 мин 0,5 мл щелочного сульфита (раствор 500 мг Na_2SO_3 в 5 М NaOH с 1% ЭДТА, готовится ex tempore), а через 5 мин 0,5 мл 8 М уксусной кислоты (до pH 4,5). Пробирки инкубировали в кипящей водяной бане в течение 20 мин, после охлаждения измеряли интенсивность флуоресценции их содержимого при длинах волн возбуждения и флуоресценции, характерных для исследуемых веществ.

При малых количествах ткани и низкой концентрации аминов содержание реагентов и соответственно объем пробы могут быть уменьшены с измерением флуоресценции в микрокубетах.

Количество НА и А в биологической пробе определяли в нг с помощью уравнений:

$$\text{НА} = \frac{F_1 \cdot a_1 - F_2 \cdot a_2}{a_1 \cdot a_1 - a_2 \cdot a_3} \quad \text{А} = \frac{F_2 \cdot a_1 - F_1 \cdot a_3}{a_1 \cdot a_4 - a_2 \cdot a_3} \quad \text{где}$$

F_1 —величина флуоресценции пробы при λ возбуждения 395 нм и λ флуоресценции 485 нм, F_2 —при λ возбуждения 420 нм и λ флуоресценции 500 нм, a —интенсивность флуоресценции 1 нг стандарта НА при флуоресценции (возбуждение 485) 395 нм, a_2 —то же для адреналина при 485/395 нм, a_3 —для норадrenalина при 500/420 нм, a_4 —для адреналина при 500/420 нм.

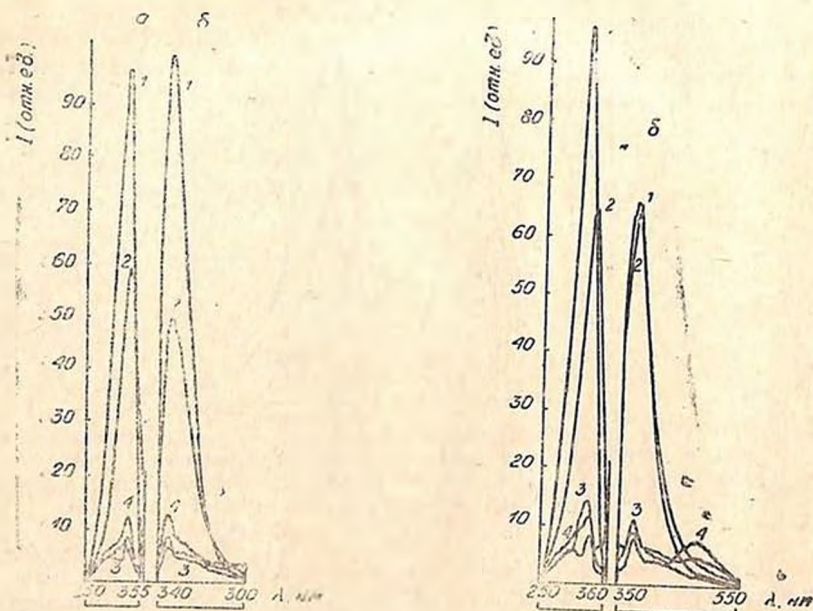


Рис. 3. Спектры волн возбуждения (а) и флуоресценции (б) катехоламинов и ДОФА: а—спектр волны возбуждения при постоянной длине волны флуоресценции 368 нм; б—спектр волны флуоресценции при постоянной длине волны возбуждения 323 нм. 1—дофамин, 2—ДОФА, 3—норадrenalин, 4—адrenalин (по 100 нг)

Рис. 4. Спектры волн возбуждения (а) и флуоресценции (б) катехоламинов и ДОФА. а—спектр волны возбуждения при постоянной длине волны флуоресценции 375 нм; б—спектр волны флуоресценции при постоянной длине волны возбуждения 335 нм. 1—ДОФА, 2—дофамин, 3—норадrenalин, 4—адrenalин (по 100 нг)

Количество ДА и ДОФА (в нг) в биологической пробе определяется с помощью следующих уравнений:

$$\text{ДА} = \frac{F_3 \cdot b_1 - F_4 \cdot b_2}{b_1 \cdot b_1 - b_2 \cdot b_3} \quad \text{ДОФА} = \frac{F_4 \cdot b_1 - F_3 \cdot b_2}{b_1 \cdot b_4 - b_2 \cdot b_3}, \text{ где}$$

F_3 —интенсивность флуоресценции пробы при λ возбуждения 323 нм и λ флуоресценции 368 нм, F_4 —при λ возбуждения 335 нм и λ флуоресценции 375 нм, b_1 —интенсивность флуоресценции 1 нг стан-

дарт DA при λ флуоресценции возбуждения 368/323 нм, b_2 —то же для ДОФА при 368/323 нм, b_3 —для DA при 375/335 нм, b_4 —для ДОФА при 375/335 нм. При отсутствии в исследуемых тканях А и ДОФА расчет концентрации аминов в пробе значительно упрощается: $HA = F_1/a_1$, $DA = F_3/b_1$.

В статье описан способ определения концентрации биогенных мономеров: А, НА, ДА и их предшественника ДОФА в одной биологической пробе, а также получение флуорофоров аминов. В отличие от известных методов разработанный нами способ позволяет с целью упрощения и ускорения процедуры проводить: а) осаждение белков гомогената 3 М раствором $HClO_4$, чем исключается необходимость дополнительной очистки аминов и устраняются потери катехоламинов на этом этапе; б) одновременное получение флуорофоров всех четырех веществ в одной пробирке; в) количественное определение исследуемых веществ в одной флуориметрической кювете путем последовательного измерения интенсивности флуоресценции при оптимальных условиях для каждого вещества длинах волн возбуждения и флуоресценции.

A RAPID, SIMPLE FLUOROMETRIC METHOD FOR SIMULTANEOUS ASSAY OF CATECHOLAMINES AND DOPA IN THE SAME BIOLOGICAL SAMPLE

MANUKHIN B. N., SELIVANOVA G. P.

N. K. Koltzov Institute of the Developmental Biology, Moscow

A method for the epinephrine, norepinephrine, dopamine and their precursor 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) concentration measurement in the same biological sample that includes the obtaining of amine fluorophores is described. This method differs from the other by: 1) a precipitation of homogenate proteins with 3 M $HClO_4$ excludes the additional purification procedure and the loss of the substances examined; 2) a simultaneous obtaining of fluorophores of all four substances in the same test-tube; 3) a quantitative determination of these substances in the same fluorimetric cuvette by a consecutive fluorescence measurement at the wave lengths of excitation and fluorescence measurement at the wave lengths of excitation and fluorescence optimal for each substance investigated.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Laverly R., Taylor K. M. *Analyt. Biochem.*, v. 22, № 2, p. 289—279, 1968.
2. Atack C. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 451, 99, p. 1977.
3. Манухин Б. Н., Бердышева Л. В., Волина Е. В. *Вопр. мед. химии*, т. 21, № 3, с. 317—321, 1975.
4. Козак Б. М., Печенов Н. В. *Лаб. дело*, № 5, с. 301—303, 1979.
5. Shellenberger M. K., Gordon J. H. *Analyt. Biochem.*, v. 39, p. 356—372, 1971.
6. Manukhin B. N., Volina E. V., Markova L. N., Rakic L., Buznikov G. A. *Devel. Biol. Neurosc.*, v. 4, p. 322—328, 1981.

Поступила 29. VII. 1991