

薄层色谱法定量测定血清中游离胆固醇

李 克

(南京部队南京总医院中心仪器分析科, 南京 210002)

提 要

讨论了应用硅胶 G-CMCNa 薄层色谱分离测定血清中游离胆固醇的实验条件。采用石油醚-乙酸乙脂-冰醋酸(80:20:1)为展开体系, 硫酸香草醛为显色剂, 在选定的测定条件下, 胆固醇含量与峰面积在 80ng—700ng 范围内线性良好。板内, 板间变异系数分别为 2.4% 和 7.4%, 平均回收率为 101.6%。该方法准确, 快速, 经实验观察和临床应用获得较好结果。

关键词 薄层色谱法, 游离胆固醇测定

肝脏能合成卵磷脂胆固醇转酰基酶, 使血浆内卵磷脂分子上的脂肪酸与游离胆固醇结合成胆固醇酯。当肝脏有实质性病变时, 合成能力降低, 使血液中游离胆固醇含量升高。因此, 测定血清中游离胆固醇的浓度对肝病和黄疸的病理研究及临床诊断具有一定意义^[1]。

血清胆固醇测定方法以比色法^[2]较为实用, 但测定中干扰因素较多。毛地黄皂苷沉淀法^[3]测定游离胆固醇具有干扰较少, 准确度高的特点, 但测定步骤较繁, 分析技术要求高, 难以满足临床检验快速, 简便的需求。

本文推荐应用硅胶 G-CMC Na 薄层板分离血清中游离胆固醇, 分离斑点清晰, R_f 值适中, 经硫酸香草醛溶液喷雾显色后, 用瑞士 CAMAG II 薄层扫描仪直接定量, 准确、快速, 经实验观察和临床应用获得较好结果。

材 料 和 方 法

一、仪器

1. 瑞士 CAMAG II 薄层色谱扫描仪(IBM-KT 微机控制)。
2. 瑞士 CAMAG LINOMAT IV 点样仪。
3. 薄层自动铺板器(重庆新力实验电器

厂)。

二、主要试剂

1. 胆固醇标准贮备液 (1mg/ml): 精确称取胆固醇 100mg (75℃ 烘干 2h), 以无水乙醇溶解稀释至 100ml。
2. 硅胶 G(CP 级, 青岛海洋化工厂产品)。
3. 羧甲基纤维素钠(实验试剂)。
4. 展开剂: 石油醚: 乙酸乙脂: 冰醋酸 = 80:20:1(体积比)。
5. 显色剂: 1g 香草醛溶于 100ml 浓硫酸。

三、方法

1. 薄层板制备: 取硅胶 G 20g, 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液 60ml, 搅拌混匀后, 用铺板器铺板(玻板尺寸 20×10×0.2cm, 铺层厚度为 0.4mm), 水平放置阴干后 100℃ 下活化 1h, 置干燥器内备用。
2. 血清样品处理^[4]: 准确移取血清 0.2ml, 吹入无水乙醇 4.8ml, 使血清蛋白分散成微细的沉淀, 加塞充分振摇 1min, 室温下放置 10min 后再振摇混合, 离心, 取上清液点样 12 μ l。
3. 点样: 用 CAMAG LINOMAT IV 点样仪, 以氮气流喷射呈带状点样, 带宽 5mm, 间距 5mm。

4. 展开及显色: 将点样后薄层板置于层析缸内上行展开。展开距离约为 8cm (15min), 展开完毕后取出薄层板在通风柜内风干。用连有氮气流的喷雾器将显色剂喷雾在薄层板上, 85℃ 下加热 6min, 薄层板显紫红色单一斑点, 背景无色, R_f 值为 0.52, 与同块板上点样显色的胆固醇标准品一致。

5. 定量扫描: 显色后薄层板置于 CAMAG II 薄层扫描仪进行反射吸收线性扫描。操作条件: 检测波长 525nm; 单色器带宽 10nm; 狭缝宽度 0.3mm; 狭缝长度 4mm; 扫描速度 6mm/s。由计算机采集数据处理后, 根据峰面积积分值外标法定量。

结果与讨论

一、展开体系的选择

在相同的条件下, 分别探讨了四种展开体系对血清游离胆固醇的展开情况。从表 1 看出, 选择石油醚-乙酸乙酯展开系统较为适宜。在展开剂中加入少量冰醋酸可抑制斑点的扩散。故展开体系选择为石油醚: 乙酸乙酯: 冰醋酸 = 80: 20: 1 ($R_f = 0.52$)。

表 1 胆固醇在不同展开剂的 R_f 值

体系组成	R_f
正己烷: 乙醚: 冰醋酸 (90: 10: 1)	0.14
石油醚: 乙酸乙酯 (8: 2)	0.49
石油醚: 乙醚: 冰醋酸 (90: 10: 1)	0.08
氯仿: 甲醇: 水 (65: 25: 4)	0.74

二、显色剂的选择

分别选用 H_3PO_4 - H_2SO_4 -乙醇, 磷钼酸-乙醇- $HClO_4$ 及香草醛- H_2SO_4 三种显色体系对

胆固醇作显色试验。结果表明, 其中香草醛- H_2SO_4 体系的显色灵敏度较高, 且无背景显色干扰。

三、显色稳定性试验

在不同时间下重复测定了同一薄层板上 5 条胆固醇斑点。由图 1 结果可以看出, 胆固醇斑点显色后在 20min 内是稳定的。

四、重复性

取 6 块薄层板, 每块板分别点 8 个含样品量为 $0.5\mu g$ 的斑点, 测定重复性。结果表明, 板内峰面积变异系数为 2.4%, 板间变异系数为 7.4%。

五、线性范围及检测限

在薄层板上分别点已知不同量的胆固醇, 经展开显色后测定各点的峰面积。结果表明, 每个斑点胆固醇含量在 80ng—700ng 范围内, 浓度与峰面积呈良好的线性关系。回归方程为: $Y = 36.8 + 2.67x$; 相关系数为 0.998, 方法检测限为 40ng (每个斑点)。

六、回收率试验

取 5 块薄层板, 平行在每块板上同时点血清提取样品, 及加入已知量胆固醇后的血清提取样品各 4 份, 测定方法的回收率。表 2 结果表明, 平均回收率为 $101.6 \pm 6.2\%$ 。

表 2 胆固醇回收试验

编号	样品含量 (mg/dl)	加入量 (mg/dl)	测出总量 (mg/dl)	平均回收率 ($\bar{X} \pm SD\%$)
1	36.9	50.0	86.7	99.7 ± 7.4
2	51.3	40.0	92.1	102.3 ± 4.9
3	48.2	60.0	109.9	102.8 ± 6.4

七、正常值测定

对 26 名健康人员空腹采血, 按 19—34 岁, 35—49 岁; 50 岁以上分成三个年龄组, 测定血清游离胆固醇。其结果为: 第一组 ($n = 10$) $\bar{X} \pm SD = 40.6 \pm 10.1\text{mg/dl}$; 第二组 ($n = 8$) $\bar{X} \pm SD = 45.2 \pm 6.9\text{mg/dl}$; 第三组 ($n = 8$) $\bar{X} \pm SD = 53.8 \pm 7.2\text{mg/dl}$ 。平均含量为 $46.1 \pm 9.8\text{mg/dl}$, 结果与文献[5, 6]报道值相一致。

(下转第 231 页)

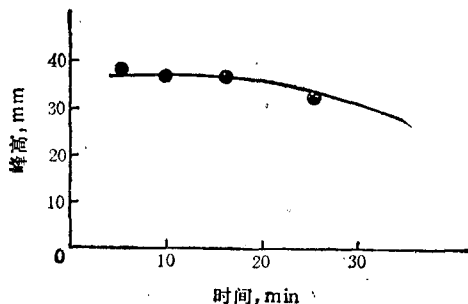


图 1 胆固醇显色稳定性

生长状况、数量与表达有一定关系。以 b_3 克隆为例, 当在 $0.60 \mu\text{mol/L}$ 压力下细胞生长较差, 存活细胞只占 30% 时, 表达也随之降低。从表 3 中看出 a_3 、 b_2 、 b_3 细胞克隆早期表达很理想, 为什么突然降低, 分析有以下几方面原因: ① 拷贝数的迅速丢失。Kaufman, R.J. 等人报告^[1], 外源基因转染往往也只有 1—5 个拷贝整合染色体, 这为数不多的拷贝在无 MTX 的作用下会很快丢失。只有在 MTX 的压力下才能稳定存在逐渐增加, 以此推断早加 MTX 对以后的稳定表达可能起一定的作用。 a_3 、 b_2 、 b_3 克隆是在转染后第 62 天才开始加压。② 细胞生长状况: 细胞生长的好坏直接关系到 IFN β 的转录、翻译及分泌功能, 因刚加 MTX, 细胞不适应, 约 1/3 的细胞被淘汰, 细胞处在生长低落期, 故也影响其表达。③ 暂时性表达: 这种可能不大, 暂时性表达只限于 80h 内。④ IFN β 本身就不太稳定, β 干扰素多肽一级结构第 17 位的半胱氨酸 (Cys) 影响其分子稳定, 对干扰素的活性发挥有一定的影响, 如将其位点的 Cys 换成 Ser (丝氨酸), 可使分子稳定^[4], 而不影响其生物活性。我们也发现将放置一周后 (4℃) 的 IFN β 表达样品与放置 (4℃) 48h 的样品进行检测, 放置一周的 IFN β 活性明显低于 48h

的, 不知这是否与分子稳定性有关。

我们将二种不同构型的 IFN β 重组质粒转染 CHO-dhfr⁻ 细胞进行比较, 87106 质粒与 8801 质粒在 IFN β 编码序列的 5' 端构建上完全相同, 均由 SV α 早期启动子调控, 所不同的是 87106 保留了 3' 端全部序列, 而 8801 则去除了 3' 端非编码区全部序列。Kruys. V. 等人报道了 3' 端的非翻译区 (untranslated regions UTRs) 对表达有抑制效应^[5]。从上述的表达情况看 8801 似乎比 87106 略好些, 但不甚理想。总之, 基因表达是受诸方面因素影响, 有许多问题还需继续研究, 尤其是表达的稳定性尚需深入探讨。

参 考 文 献

- 1 王晓鸣等. 遗传学报, 1989; 16(4): 312
- 2 于曼等. 生物化学与生物物理进展, 1989; 16(3): 215
- 3 Kaufman R J *et al.* *Molecular and Cellular Biology*, 1983; 3(4):699
- 4 Mark D F *et al.* *PNAS*, 1984; 81: 5662
- 5 Kruys V *et al.*, *PNAS* 1987; 84: 6023

[本文于 1990 年 3 月 9 日收到,

6 月 21 日修回]

(上接第 223 页)

参 考 文 献

- 1 Chang L, Clifton P, Barter P *et al.* *Hepatology*, 1986; 6:46
- 2 Vanzetti G. *Clin Chim Acta*, 1964; 10: 389
- 3 Sahagian B, Levinet V E. *Clin Chem*, 1964; 10:

116

- 4 上海市医学化验所. 临床生化检验(上册). (上海: 上海科学技术出版社, 1979: 183
- 5 Richmond W. *Clin Chem*, 1976; 22:1579
- 6 Yao T, Sato M, Kobayashi Y *et al.* *Anal Biochem*, 1985; 149:387

[本文于 1990 年 1 月 16 日收到, 3 月 9 日修回]