

malondialdehyde (MDA) forms complex with TBA. The methanol precipitation of serum proteins reduces non-specific interference. The fluorescence intensity of the MDA-TBA complex is measured at excitation wavelength 515 nm and emission wavelength 550 nm. The method is simple, rapid, accurate and steady. The fluores-

cence intensity is positively correlative to the LPO concentration in the range of 0 ~ 20  $\mu\text{mol/L}$ . The minimum detection limit is 0.16  $\mu\text{mol/L}$ . The average recovery rate is 105.08%. Precision (CV) is 4.23%.

**Key words** lipoperoxides, fluorescence, spectrophotometry

## 高效液相色谱测定微量胆固醇氧化产物

董 军 陈文祥 李健斋

(卫生部北京老年医学研究所, 北京 100730)

**摘要** 介绍一种高效液相色谱测定胆固醇氧化产物的方法, 以苯甲酰氯为衍生剂, 将胆固醇及其氧化产物衍生成苯甲酸酯, 反相高效液相色谱分离, 紫外检测, 内标法定量. 本法灵敏度高, 重现性好, 可应用于胆固醇纯度标准物质的杂质分析及血清中的胆固醇氧化产物测定.

**关键词** 胆固醇, 胆固醇氧化产物, 高效液相色谱

胆固醇遇光、热、氧等会发生自氧化(非酶氧化), 已报道的胆固醇氧化产物多达几十种, 其中最常见有 7-酮胆固醇、7 $\beta$ -羟基胆固醇、5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -二羟基胆固醇、5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -环氧胆固醇、25-羟基胆固醇和胆甾烯酮等<sup>[1]</sup>. 它们在胆固醇中的水平随胆固醇贮存条件和时间变化而变化. 血清胆固醇测定标准化需制备高纯度的胆固醇作血清胆固醇测定的原始标准(胆固醇纯度标准物质), 在此过程中, 胆固醇氧化产物是需除去的杂质. 原料选择, 纯度鉴定及稳定性考察时均需测定胆固醇氧化产物. 另外, 胆固醇氧化产物也存在于人体内, 且与胆固醇代谢与动脉粥样硬化(AS)有密切的关系<sup>[2]</sup>. 因此测定胆固醇氧化产物在 AS 的防治研究中也有重要应用价值. 国外报道的高效液相色谱(HPLC)方法中, 一般只能在较短波长检测具有弱紫外吸收的成分, 不能测定无紫外吸收的 5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -环氧胆固醇和 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -二羟基胆固醇<sup>[3,4]</sup>, 由于灵敏度低, 需要用薄层层析或柱层析进行预分离, 去除样品中的胆固醇, 浓缩胆固醇氧化产物, 不仅样品量大, 操作烦

琐, 特异性和回收率也受到影响. 同位素稀释-气相色谱-质谱法是一种较为理想的方法<sup>[5]</sup>, 但由于费用昂贵, 难以在国内应用. 我们用化学衍生法将胆固醇氧化产物衍生成具有较强紫外吸收的苯甲酸酯, 提高了检测灵敏度, 改善了分离条件, 直接测定几种常见的氧化产物, 效果良好.

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂

胆固醇氧化产物 7-酮胆固醇, 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -二羟基胆固醇, 5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -环氧胆固醇, 7 $\beta$ -羟基胆固醇和 25-羟基胆固醇为 Sigma 产品, 胆甾烯酮为本室制备, 内标 6-氯胆甾醇由胆甾醇合成<sup>[6]</sup>, 甲醇、乙腈为浙江黄岩化工实验厂色谱纯产品, 衍生剂苯甲酰氯及其他化学试剂均为分析纯产品.

#### 1.2 标本

胆固醇标本为卫生部老年医学研究所生化

室研制的胆固醇纯度标准物质 (纯度 99.8%  $\pm$  0.1%, 国家一级标准物质 GBW09203a),  $-20^{\circ}\text{C}$  保存时间分别为 1 a、2 a 和 3 a; 血清标本为临床实验室健康中老年人血清。

### 1.3 标准溶液及内标溶液的配制

用感量 0.1 mg 的天平精密称取各胆固醇氧化产物 4.0 mg, 溶于 200 ml 无水乙醇中, 用无水乙醇稀释, 制备浓度分别为 10.000、5.000、2.500、1.250、0.0625、0.0312 mg/L 的混合标准溶液,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存; 用无水乙醇将 6-氯豆甾醇配成 20 mg/L 的溶液作为内标溶液。

### 1.4 样品制备

取 100  $\mu\text{l}$  血清 (胆固醇溶液和标准溶液吹干后直接衍生), 加入内标溶液 100  $\mu\text{l}$ , 无水乙醇 1 ml, 8.9 mol/L 氢氧化钾溶液 120  $\mu\text{l}$ , 混匀,  $50^{\circ}\text{C}$  皂化 1 h, 取出后加入蒸馏水 1 ml, 正己烷 2 ml, 涡旋混合三次, 每次 10 s, 静止分层, 取出正己烷层, 用  $\text{N}_2$  吹干, 残渣用 70  $\mu\text{l}$  吡啶溶解后, 加入 10  $\mu\text{l}$  苯甲酰氯, 混匀,  $50^{\circ}\text{C}$  水浴放置 15 min, 加入甲醇 100  $\mu\text{l}$ , 乙腈: 水 (3:1) 2 ml, 正己烷 2 ml, 涡旋混合三次, 每次 10 s, 静止分层, 取正己烷层 1 ml, 用  $\text{N}_2$  吹干, 二氧六环: 甲醇 (1:1) 100  $\mu\text{l}$  溶解后备 HPLC 分析用。

### 1.5 HPLC 分离测定胆固醇氧化产物

本实验采用 Waters 公司的 HPLC, 由 510 型泵, U6K 进样器, 490 型紫外检测器及 740 型记录/积分仪组成。色谱柱为 PICO-TAG 柱 (3.9 mm  $\times$  150 mm, Waters), 流动相为甲醇: 乙腈: 乙醇/75: 15: 10, 流速为 1 ml/min, 检测波长 235 nm, 检测器满刻度吸收值 (AUFS) 为 0.1, 积分仪衰减 128 mV, 标准中各氧化产物与内标的峰面积比对氧化产物的浓度作线性回归, 将样品的峰面积比代入回归方程计算各氧化产物的浓度。

## 2 实验结果

### 2.1 常见胆固醇氧化产物的色谱分离

由图 1a 所示, 几种胆固醇氧化产物在

15 min 内达到完全分离。由图 1b、c 还可看出, 这几种氧化产物是市售胆固醇和血清中的主要胆固醇氧化产物。除此之外, 还可见一些性质相近的未知物。由于胆固醇氧化产物是一组非常复杂的化合物, 有些结构和性质还不是十分清楚, 文献报道也只是较常见的几种, 难以得到更多的对照品, 所以尚不能对某些未知物定性。另外, 以保留时间稍长的 6-氯豆甾醇

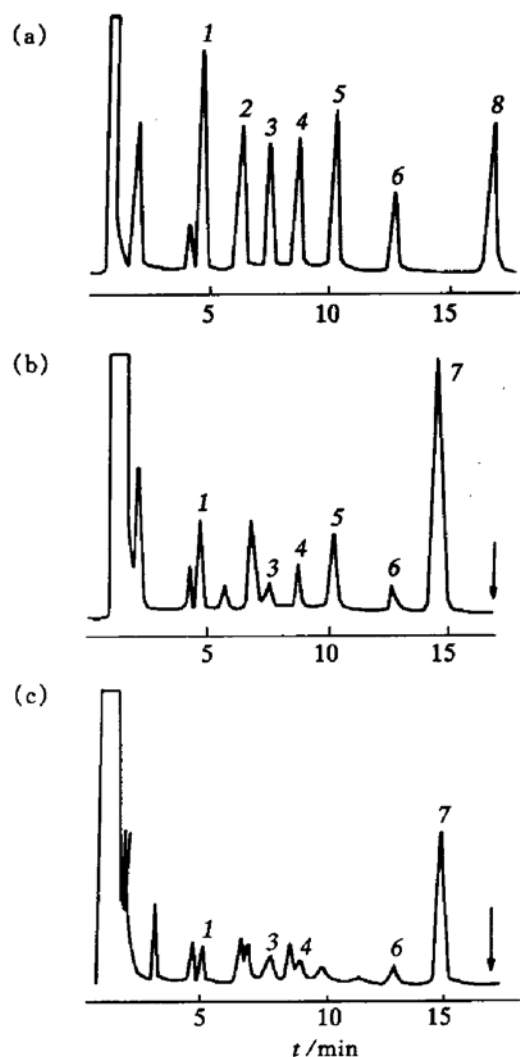


图 1 几种常见胆固醇氧化产物 (a) 及市售胆固醇溶液 (b)、血清提取物 (c) 的色谱图

1: 7-酮胆固醇; 2: 胆甾烯酮; 3: 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -二羟基胆固醇; 4: 5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -环氧胆固醇; 5: 7 $\beta$ -羟基胆固醇; 6: 25-羟基胆固醇; 7: 24-脱氢胆固醇 (胆固醇代谢过程的中间固醇, 非氧化产物); 8: 6-氯豆甾醇 (箭头指示内标位置)。

醇作内标,可以避免样品中可能出现的其他胆固醇氧化产物的干扰.

## 2.2 线性

表1为6次线性测定结果,可见胆固醇氧化产物与内标的峰面积比与胆固醇氧化产物的浓度(0.312~10.000 mg/L)的线性相关系数在0.9990以上.

表1 HPLC测定胆固醇氧化产物的线性

| 氧化产物                          | 斜率(均值) | CV/% | 相关系数 $r$ |
|-------------------------------|--------|------|----------|
| 7-酮胆固醇                        | 2.0856 | 1.82 | 0.9999   |
| 胆甾烯酮                          | 0.6754 | 2.45 | 0.9992   |
| 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -二羟基胆固醇 | 0.6237 | 2.23 | 0.9996   |
| 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -环氧胆固醇 | 0.5869 | 3.50 | 0.9996   |
| 7 $\beta$ -羟基胆固醇              | 1.2043 | 1.59 | 0.9999   |
| 25-羟基胆固醇                      | 0.5304 | 4.10 | 0.9993   |

注:  $n=6$ .

## 2.3 精密度

将市售胆固醇(广州910318)配制成2 g/L的乙醇溶液,取100  $\mu$ l衍生提取后测胆固醇氧化产物,每次6份,共测4次,结果见表2.

表2 HPLC测定胆固醇氧化产物的精密度

| 氧化产物                          | $\bar{x}$<br>/mg·g <sup>-1</sup> | 批内<br>CV/% | 批间<br>CV/% |
|-------------------------------|----------------------------------|------------|------------|
| 7-酮胆固醇                        | 3.20                             | 1.40       | 3.10       |
| 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -环氧胆固醇 | 1.21                             | 2.66       | 2.37       |
| 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -二羟基胆固醇 | 0.78                             | 2.17       | 3.61       |
| 7 $\beta$ -羟基胆固醇              | 1.66                             | 1.23       | 2.15       |
| 25-羟基胆固醇                      | 1.15                             | 3.70       | 5.40       |

## 2.4 贮存中胆固醇氧化产物的测定

研制胆固醇纯度标准物质是血清胆固醇测定标准化研究的重要内容之一.制备此标准物质应选择杂质含量较小的胆固醇作原料,用适当的方法进行纯化,纯化后的胆固醇还必须进行纯度鉴定和稳定性考察<sup>[7]</sup>,此法用于卫生部老年医学研究所生化室胆固醇纯度标准物质研制的结果见表3,可见纯化过程基本除去市售胆固醇中的主要氧化产物,但纯化后胆固醇随着贮存时间的延长,又出现新的氧化产物,其含量的变化与贮存温度有关,-20℃下贮存2 a只有极微量的氧化产物出现,而80℃ 2 d即产生明显的氧化产物.

表3 HPLC测定市售胆固醇及自制胆固醇纯度标准物质中胆固醇氧化产物

|           | mg·g <sup>-1</sup> |                               |                               |                  |          |
|-----------|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|----------|
| 胆固醇       | 7-酮胆固醇             | 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -二羟基胆固醇 | 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -环氧胆固醇 | 7 $\beta$ -羟基胆固醇 | 25-羟基胆固醇 |
| 市售胆固醇     | 3.20               | 0.78                          | 1.21                          | 1.66             | 1.15     |
| 提纯后       | —                  | —                             | —                             | —                | —        |
| -20℃贮存1 a | 0.02               | —                             | 0.03                          | —                | —        |
| -20℃贮存2 a | 0.06               | —                             | —                             | —                | 0.08     |
| -20℃贮存3 a | 0.09               | —                             | 0.09                          | 0.12             | 0.17     |
| 80℃烘烤2 d  | 7.55               | 2.34                          | 1.82                          | 3.16             | 2.15     |

## 2.5 血清胆固醇氧化产物测定

我们用此法分析了35份健康人(男20人,女15人,年龄29~68岁)血清胆固醇氧化产物,酶法测定每份的胆固醇水平.因未见性别和年龄对氧化产物有明显影响,故合并统

计.血清7-酮胆固醇,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -二羟基胆固醇和25-羟基胆固醇的含量分别为(86.3 $\pm$ 17.4  $\mu$ g/L,(189.2 $\pm$ 53.3)  $\mu$ g/L和(454.1 $\pm$ 35.0)  $\mu$ g/L,其中25-羟基胆固醇,7-酮胆固醇与胆固醇之间存在明显正相关( $r$ 分别为

0.35 和 0.42,  $P < 0.05$ ), 25-羟基胆固醇与 7-酮胆固醇也存在明显正相关 ( $r = 0.47$ ,  $P < 0.01$ ),  $5\alpha$ ,  $6\beta$ -二羟基胆固醇与胆固醇之间及其与 7-酮胆固醇和 25-羟基胆固醇之间未见明显相关性。

将新鲜血清在  $4^\circ\text{C}$  存放 1~7 d 后其主要胆固醇氧化产物含量未见明显变化, 说明用于胆固醇氧化产物测定的血清标本在  $4^\circ\text{C}$  至少稳定一周。

由于胆固醇氧化产物结构非常相近, 含量极低, 在常用的检测波长下没有紫外吸收, 只在短紫外波长 (210 nm 以下) 有弱吸收, 所以用 HPLC 分离和测定都比较困难, 要在不与胆固醇进行预分离的情况下同时、直接进行分离测定, 必须进行化学衍生, 提高检测灵敏度。本室在以前的胆固醇及微量甾醇测定中, 应用异氰酸苯酯作衍生剂<sup>[6,8]</sup>, 而在本实验中, 异氰酸苯酯的衍生物用多种  $\text{C}_{18}$  柱和流动相体系都无法得到有效分离, 其中 7-酮胆固醇和  $5\alpha$ ,  $6\beta$ -二羟基胆固醇的分离相当困难, 后来改用苯甲酰氯衍生, 以甲醇:乙腈:乙醇/75:15:10 为流动相, 在 PICO-TAG 柱上得到理想分离, 可见化学衍生不仅可以改变化合物特性, 提高对样品的检测灵敏度, 同时也是改善混合物分离效果的手段之一。

样品处理过程中有否新的氧化产物产生将直接影响分析方法的可靠性, 为此我们用不同皂化时间 (1~2 h) (血清胆固醇氧化产物测定) 及衍生时间 (10~60 min) 处理样品, 结果未见明显差异, 说明本方法的样品处理过程没有明显的胆固醇氧化产物产生, 与 Koopman<sup>[9]</sup> 报告的结果一致。

本法直接衍生、分析样品, 无须预分离及富集胆固醇氧化产物, 因而简便、省时, 分析几种主要胆固醇氧化产物的线性和精密度良好, 用于胆固醇纯度标准物质的研制取得满意的结果。

血清胆固醇氧化产物测定的报告不多<sup>[5,9-11]</sup>, 且有的只测个别氧化产物<sup>[9,10]</sup>, 各报告的结果也有较大差异, 本法用于血清胆

固醇氧化产物的测定结果比 Bernert<sup>[11]</sup> 报告的结果低, 但比其他报告的结果高, 影响血清胆固醇氧化产物水平的因素可能很多, 除血清样品的贮存条件和时间外, 研究对象的年龄、生理病理状况等也将影响血清胆固醇氧化产物水平。有报道 II 型高胆固醇血症的病人, 血清  $5\alpha$ ,  $6\alpha$ -环氧胆固醇的水平为正常人的几百至几千倍<sup>[2]</sup>; 动物实验中, 家兔高血压/高血脂的严重程度与血清胆固醇氧化产物相关比前者与血清胆固醇的相关更为明显<sup>[12]</sup>, 对此做进一步研究将具有非常重要的意义。

胆固醇氧化产物是一类非常复杂的化合物, 目前对它们的认识还不十分清楚, 我们在本法中虽然分析了几种主要化合物, 但无论是在胆固醇中还是血清中均可发现较明显的未知物, 由于它们的含量很低, 目前尚不能澄清其结构。

## 参 考 文 献

- 1 Smith L L. Cholesterol autoxidation. New York: Plenum Press, 1981; 52~55
- 2 Gray M F, Lawrie T D V. Lipids, 1971; 6: 836
- 3 Csallany A S, Kindom S E, Addis P B *et al.* Lipids, 1989; 24 (7): 645
- 4 Csiky S. J Chromatogr, 1982; 241: 381
- 5 Breuer O, Bjorkhem I. Steroids, 1990; 55: 185
- 6 Chen W X, Li P Y, Wang S *et al.* Clin Chem, 1993; 39 (8): 1602
- 7 陈文祥, 董 军, 李培瑛等. 中华医学检验杂志, 1994; 17 (4): 211
- 8 陈文祥, 李培瑛, 王 抒等. 生物化学与生物物理学报, 1994; 26 (1): 37
- 9 Koopman B J, Vander J C, Wolthers B G. J Chromatogr, 1987; 416: 1
- 10 Bjorkhem I. Anal Biochem, 1986; 154: 497
- 11 Bernert J T, Ahins J R, Cooper G R *et al.* Clin Chem, 1991; 37 (12): 2053
- 12 Jacobson M S, Nair P P, Naseem S M *et al.* Pediatr Res, 1981; 15: 535

**Determination of Several Cholesterol Autoxidation Products by High Performance Liquid Chromatography.** Dong Jun, Chen Wenxiang, Li Jianzhai (*Beijing Institute of Geriatrics, Beijing 100730, China*).

(下转第 190 页, Continued on page 190)

- 2 Adan J, Bernstein L H, Babb J. Clin Chem, 1986; 32: 624
- 3 Sirahase Y, Watazu Y, Kaneda N *et al.* Clin Chem, 1992; 38 (11): 2193
- 4 Wassarman P M, Burger J W. J Mol Biol, 1972; 67: 537
- 5 Leung F Y, Henderson A R. Clin Chem, 1979; 25: 209
- 6 Onigbinde T A, Wu A H B, Jonson M *et al.* Clin Chem, 1990; 36: 1134

**Studies on the Measurement of Lactate Dehydrogenase Isoenzyme I Activities by Using Automatic Analyzer.** Li Guojun, Tian Yaping, Dong Zhennan (*Department of Clinical Biochemistry, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China*).

**Abstract** A very simple method to determine the activity of LD isoenzyme I by using  $\alpha$ -chymotrypsin and guanidine has been developed. LD-3 ~ LD-5 can be completely inactivated and

LD-2 can be partially inactivated by  $\alpha$ -chymotrypsin. Guanidine can further completely inactivate LD-2. This method has been used in automatic analyzer. The coefficient of variation of the proteolytic method is among 2.7% ~ 4.4%. Results obtained by the present method correlates with those by the electrophoresis method ( $r = 0.992$ ,  $y = 0.967x - 1.957$ ). In the present assay system, the reference value for LD-1 activity in healthy people ranges from 29.78 ~ 59.26 U/L. The study showed that the selective measurement of LD-1 isoenzyme method is rapid and accurate. It has great clinical significance.

**Key words** lactate dehydrogenase isoenzyme I, guanidine inhibitor,  $\alpha$ -chymotrypsin, automatic analyzer

(上接第 182 页, Continued from page 182)

**Abstract** A sensitive and precise method for simultaneous determination of some major cholesterol autoxidation products (COPs) was described. The method was based on high performance liquid chromatography (HPLC) with 6-chlorostigmasterol as internal standard. After saponification and extraction, the COPs were derivatized into benzoates for measurement by HPLC with ultraviolet detection. Each product

gave a linear response ( $r > 0.9990$ ) over a concentration range of 0.312 ~ 10.000 mg/L. The intra- and inter- assay co-efficients of variation was 2.15% ~ 5.40% and 1.23% ~ 3.70%, respectively. This method was successfully applied to the determination of COPs in cholesterol standard reference material and in human serum.

**Key words** cholesterol, cholesterol autoxidation products, HPLC