

高效液相色谱分析生物膜磷脂*

汤习锋** 康格非 曾成鸣

(重庆医科大学检验系, 重庆 630046)

关键词 高效液相色谱, 膜磷脂, 线粒体

生物膜磷脂分析一般采用正相吸附或离子交换层析技术。通常使用的薄层层析(TLC)除操作繁琐, 技术条件苛刻外, 多不饱和脂肪酸易发生氧化变性, 且不易获得一定量的高纯度单一磷脂组分。而HPLC具备高速、高效、高灵敏度等优点, 其系统密闭能避免不饱和脂肪酸氧化, 有利于制备。近年国外许多文章报道采用HPLC代替TLC, 用以分离、纯化、定量中等极性的磷脂, 包括从反相柱分析磷脂分子种类(molecular species)到正相柱等度和梯度淋洗分析主要磷脂(major classes)。对主组分磷脂的分析, 各种淋洗系统各有优缺点, 氯仿-甲醇-水能迅速分离各组分, 但由于氯仿在195—215nm有较高的吸收, 难以得到与之匹配的检测器; 乙腈-甲醇-水能有效快速分离PC和SPH, 但其他组分的磷脂难以有效分离, 且基线欠稳^[1]; 而正己烷-异丙醇-水是目前能较好展示生物膜磷脂全貌的有效方法, 缺陷是洗脱时间较长, 仅能部分分离PC和SPH。比较上述系统所用国产试剂的透光性能以及色谱性能后, 我们选择了G. M. Patton^[2]等的正己烷-异丙醇-乙醇-磷酸盐-冰乙酸系统并作适当改进, 用以分离和定量肝细胞线粒体膜磷脂组分。作适当调整可用作制备手段。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

岛津LC-6A液相色谱仪配有: 可调波长紫外检测器(SPD-2AM), C-R3A色谱数据处理系统, CTO-6A柱恒温箱等。MILIPORE溶剂过滤系统, 超声清洗器(上海超声波仪器厂), 旋转混匀器(江西医疗器械厂), 日立55P-72超速冷冻离心机(转头RP-50-2-751), 岛津UV-265双光路紫外-可见分光光度计, 电动式可调匀浆器(Potter-Elvehjem型)等。

磷脂标准品: dipalmitoyl L- α -phosphatidylcholine, L- α -phosphatidylethanolamine, L- α -phosphatidylserine, sphingomyelin (均系Sigma产品), 正己烷(杭州炼油厂, 优级纯), 异丙醇、乙醇、甲醇、氯

仿等均为国产分析纯。

1.2 试剂配制

试剂纯化处理 正己烷重蒸馏后过酸式活性氧化铝层析柱, 紫外扫描206nm处的透光度可提高至13.48% (增3.37%); 异丙醇经重蒸馏后透光度可提高至7.95% (增0.21%); 蒸馏水经三蒸处理。

提取液: 氯仿: 甲醇: 盐酸 (2:1:0.01, V/V)

流动相 正己烷: 异丙醇: 乙醇: 25mmol/L K_2HPO_4 : 冰乙酸 (376:485:100:56.2:0.1, V/V), 混匀后静置过夜, 以便析出超饱和磷酸盐颗粒, 上液经超滤、脱气及充入 N_2 等处理。

标准液 磷脂标准品溶于稀释液正己烷: 异丙醇 (6:8, V/V) 中 (2mg/ml)。

1.3 样品预处理

按Kathi^[3]法略作改进后制备鼠肝线粒体悬液。采用Folch法的改进方法^[4]提取线粒体膜中除神经节苷脂和缩醛磷脂外的所有磷脂: 线粒体悬液(蛋白量10—30mg/ml)与提取液(1:10, V/V)混匀, 静置15min, 离心去蛋白; 上清液加入1/5体积0.05mol/L的 $CaCl_2$ 后旋转混匀, 静置、离心(3000r/min), 取尽下层液在40—50℃温育下用 N_2 吹至溶剂刚挥发殆尽, 准确加入稀释液。密封、避光, -20℃储存待行HPLC。除温育外全过程均在4℃冰浴中进行, 同时避光和隔绝空气。

1.4 色谱分析条件

色谱柱 岛津 Shim-Pack CLC-SIL 6mm ID×15cm (用二氧化硅(5 μ m)填装, 其微孔直径100Å)。

保护柱 Guard-PAK™预柱(RCSS Silica, Waters Associates)。

淋洗条件 0.5ml/min 30min, 改1ml/min 至

* 本文系省卫生厅(川)科研基金课题; 省教委科研基金课题及与美国 St. Louis Medical School 合作研究及培养研究生获 NIH 资助项目。

** 重庆医科大学检验系博士研究生。

收稿日期: 1992-07-14 修回日期: 1992-09-30

90min. 柱温 25℃, 记录纸速 1mm/min, 检测波长 206nm, 满量程吸光度是 0.04, 衰减值 (atten) 为 2.

1.5 分析方法

定性分析用与 PC, PE, PS, SPH 等标准品在相同条件下的保留时间来识别, 其余峰的识别参照文献出峰顺序, 结果与 George M. Patton 等^[2]的报道基本吻合. 定量分析以峰面积积分值记录、以峰面积积分值/蛋白质之比表示线粒体膜各磷脂组分的相对含量.

2 结果与讨论

2.1 色谱的性能

本法全过程操作简便, 稳定可靠. 该正相等度淋洗系统 90min 完成 7 种磷脂组分的分离, 展示如图 1. 对 PE, PA, PI, PS, CL 的分离较完全, 但对 PC 与 SPH 只能部分分离^[2]; PC 的 2 个不完全分离峰可能系 PC 的同系物 (或异构体). 使用 5-micron 硅胶柱时, CL 随使用时间延长洗脱加快, 逐渐与 PI 峰重叠, 可在流动相中酌减乙酸的量 (<1%) 并在每天进样前用乙醇冲洗 (30ml). 加以校正. 色谱基线平稳, 条件易控制, 在工作样本量下 PE, PI, CL, PS, PC 等组分保持稳定的分离度和峰形. 柱易再生、复活、平衡, 经 200 次分析后仍维持良好的柱效. 流动相的溶解范围、化学稳定性、粘度等性能较佳, 可依不同的分析目的灵活地调整 pH, 乙酸量及极性, 进一步提高分析速度和效率. 为缩减分析时间, 我们也试验了 J. R. Yandrasits^[5]的梯度淋洗法, 但基线漂移较严重, 用于定量分析需进一步摸索. 本系统稍加调整尤适于制备高纯度, 保持化学结构和物理性状完整的磷脂各单一组分^[6].

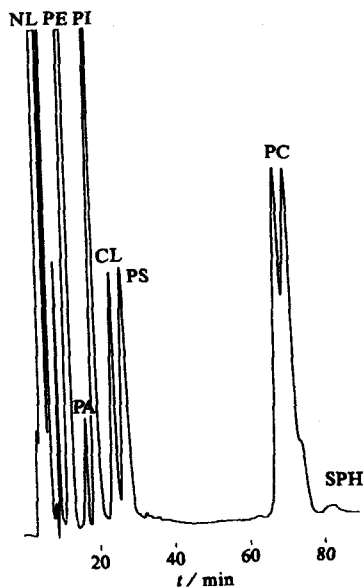


图1 肝细胞线粒体膜磷脂的 HPLC 谱图

进样量 10 μ l, 磷脂量相当于提自
0.64mg 线粒体蛋白

2.2 关于定量分析

2.2.1 色谱的重复性试验 从 0.2ml 样品中 (提取自 10.5mg 蛋白线粒体) 取 10 μ l 进样, 重复 8 次, 各色谱峰保留时间和峰面积的变异较小, 结果如表 1. SPH 的较大变异可能与 PC 分离不完全以及微量组分易受基线噪音干扰有关.

表1 磷脂的色谱重复性

		PE	PA	PI	CL	PS	PC		SPH
							(1)	(2)	
t_R	$\bar{X} \pm s/\text{min}$	13.34 $\pm$ 0.21	17.92 $\pm$ 0.22	20.12 $\pm$ 0.23	25.27 $\pm$ 0.29	28.14 $\pm$ 0.33	69.53 $\pm$ 0.25	72.20 $\pm$ 0.24	82.90 $\pm$ 0.38
	CV/%	1.57	1.23	1.24	1.15	1.17	0.36	0.33	0.46
A	$\bar{X} \pm s$ (10 ⁵ integral counts)	6.88 $\pm$ 0.28	0.48 $\pm$ 0.02	3.14 $\pm$ 0.11	1.08 $\pm$ 0.04	1.72 $\pm$ 0.03	6.42 $\pm$ 0.14		0.11 $\pm$ 0.01
	CV/%	4.07	4.16	3.50	3.70	1.74	2.18		9.09

t_R 表示保留时间, A 表示峰面积

2.2.2 肝线粒体膜磷脂测定的线性范围 把 0.2ml (提取自 27.76mg 线粒体蛋白) 样品作系列稀释后, 各取 10 μ l 重复 3 次进样. 以峰面积的平均值对相应

线粒体蛋白的量作曲线, 各磷脂组分的直线相关及回归结果反映于图 2. 在 0.07—0.98mg 蛋白 (所容磷脂) 范围内 PI, CL, PS, PC 相关良好, 但 PE 的结果并不

理想。实验表明当样本量增至相当0.42mg 蛋白后, PE 在磷脂色谱中构成比明显下降, 提示有部分 PE 超前洗出。可增大柱负荷、减少样本量(如用7—10 μ m 硅胶柱), 或减慢淋洗速度, 或定期用乙醇淋洗以提高柱效。对于 PA, SPH 及 2-Lyso-PC 等超微量组分, 本系统也能较好地分离, 但因所用紫外检测手段灵敏度较低、流动相的本底吸收较高及仪器的一定噪音, 尚不能满足这一检量范围内该类磷脂的准确定量要求, 有待进一步改进。

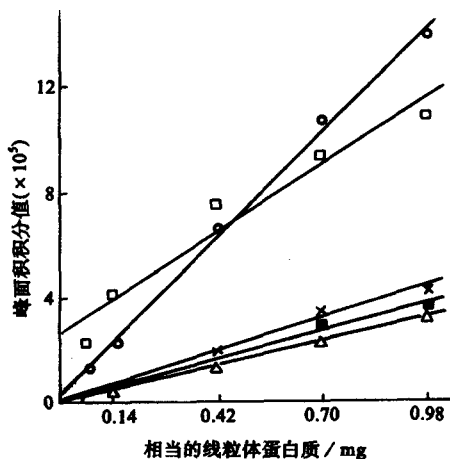


图2 线粒体膜磷脂的浓度稀释曲线

—●— PC: $\hat{Y} = 14.10\hat{X} + 0.40$, $r = 0.9986$;

□—□ PE: $\hat{Y} = 9.17\hat{X} + 2.63$, $r = 0.9744$;

+—+ PI: $\hat{Y} = 4.38\hat{X} + 0.14$, $r = 0.9939$;

■—■ CL: $\hat{Y} = 3.75\hat{X} + 0.05$, $r = 0.9953$;

△—△ PS: $\hat{Y} = 3.32\hat{X} + 0.01$, $r = 0.9997$

通常 HPLC 检测磷脂是利用 $\begin{array}{c} | & & | \\ -C & = & C- \\ | & & | \end{array}$ 的紫外吸收。但不同来源的同一种磷脂中脂肪酸不饱和度各不相同, 因而如何选用标准物一直存有争议^[7]。实验中我们直接用响应值与线粒体蛋白量之比表示线粒体膜

磷脂的相对含量, 可敏感地反映各种生物膜磷脂的病理、生理改变^[8]。

总之, 本系统仍有分析时间略长、灵敏度不够等缺陷, 但新近这方面的问题已有改进^[9]。毫无疑问使用 HPLC 分析生物膜磷脂, 比用 TLC 具有明显的优越性。

参 考 文 献

- 1 Seewald M, Eichinger H M. Separation of major phospholipid classes by HPLC and subsequent analysis of phospholipid-bound fatty acids using G C. *J Chromatogr*, 1989; **469**:271
- 2 Patton G M, Fasulo J M, Robins S J. Separation of phospholipids and individual molecular species by HPLC. *J Lipid Res*, 1982; **23**:190
- 3 Kathi A G, Myers C E. Membrane-bound glutathion peroxidaselike activity in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 1980; **96**:85
- 4 Higgins J A. Separation and analysis of membrane lipid components. In: Findlay J B C ed, *Biological membrane a practical approach*, Oxford, Washinton D C: IRC Press, 1987:103
- 5 Yandrasitz J R, Berry G, Segal S. HPLC of phospholipids with UV detection; Optimization of separations on silica. *J Chromatogr*, 1981; **225**:319
- 6 Ellingson J S, Zimmerman R L. Rapid separation of gram quantities of phospholipids from biological membranes by preparative HPLC. *J Lipid Res*, 1987; **28**:1016
- 7 Nissen H P, Kreysel H N. Analysis of phospholipids in human semen by HPLC. *J Chromatogr*, 1983; **276**:29
- 8 汤习锋, 康格非. 内毒素致肝细胞损伤的生化机制——线粒体膜磷脂降解与脂质过氧化. 第二届全国医学生化学术会议论文摘要汇编, 广州, 1991:445
- 9 Kuksis A, Myher J J. *Chromatography of lipids in biomedical research and clinical diagnosis*. Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo: Elsevier Press, 1987:1