

过氧化脂质硫代巴比妥酸分光光度法的改进

向荣 王鼎年

(重庆医科大学基础核医学教研室)

关键词 脂质过氧化物, 分光光度测定

脂质过氧化物(LPO)的测定方法较多^[1,2], 其中分光光度法在科研和临床上较为常用。本文主要根据大石诚子等^[3,4]的方法作了简化, 省去正丁醇吡啶抽提

步骤并对铁与本法的关系作了一定探讨。

现将原法与改良法示意如下:

原 法

10% 组织匀浆 0.1~0.2ml
 ↓ 8.1% SDS 0.2ml
 ↓ 20% 醋酸缓冲液(pH3.5)1.5ml
 ↓ 0.8% 硫代巴比妥酸(TBA)1.5ml
 ↓ 蒸馏水至 4ml

反 应 液

↓ 95℃ 水浴 1h, 冷却
 ↓ 蒸馏水 1ml
 ↓ 正丁醇-吡啶(15:1)5ml 抽提
 ↓ 3,000r/min 15min,

取正丁醇层在 532nm 处测 OD 值

改 良 法

10% 组织匀浆 0.1~0.2ml
 ↓ 8.1% SDS 0.2ml
 ↓ 20% 醋酸缓冲液(pH3.5)1.5ml
 ↓ 1% TBA 1.5ml
 ↓ 蒸馏水 1ml

反 应 液

↓ 80℃—95℃ 水浴 40 至 60min
 ↓ 冷却, 3000r/min 15min

取上清液在 532nm 处测 OD 值

标准管处理同上。用 10nmol/L 四乙氧基丙烷(TEP)0.2ml 代样品管。

用正丁醇吡啶抽提与不抽提结果见表 1。扫描见图 1。两法的相关系数为 0.9996。

表 1 原法与改良法结果比较

	原 法	改良法	P 值
肝微粒体	0.275±0.005	0.278±0.008	P>0.05
TEP 标准	0.152±0.002	0.151±0.001	P>0.05

按改良法以 50、100、200、300、400μl 10nmol/L TEP 测 OD 值, 结果线性关系良好 $r = 0.997$ (图 2)。回收实验分别为 110%、93%、91%、108%。每次取肝微粒体 10 份, 共测 4 次, 重复性为 0.304 ± 0.009 , $CV = 2.96\%$ 。将同一样品在 1/2、1、2、4、8、24h 测定, $\bar{X} \pm SD$ 为 0.283 ± 0.001 , 稳定性较好。

用含 0.1、0.5、1、1.5、2nmol/L 的 $FeCl_3$ 醋酸缓冲液按改良法测样品 LPO, 观察铁离子对 LPO 测定的影响, 结果见图 3。

用不含 Fe^{3+} 和含 1nmol/L Fe^{3+} 的醋酸缓冲液, 用改良法测定不同浓度(50、100、150、200、300、400μl)的正常和受 γ 线照射的微粒体样品, 结果见图 4。

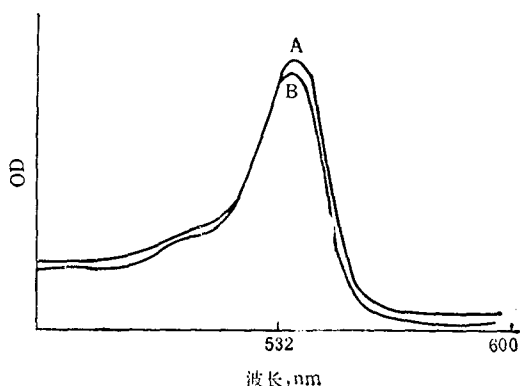


图 1 用正丁醇抽提(B)和不抽提(A)扫描图

取其中 200μl 样品管作扫描(图 5)。

改良法主要有如下优点: 简化测定步骤, 缩短近 1/3 操作时间; 克服冬季低气温时正丁醇层易变油而影响测定结果和需在 20~40℃ 水浴中保温测定的缺点; 避免正丁醇吡啶对呼吸道的刺激作用, 并可节省试剂。原法与改良法测定结果经统计处理无显著性差异, 故用正丁醇抽提是可以省略的。改良法也具有较好的线性、重复性和回收率。

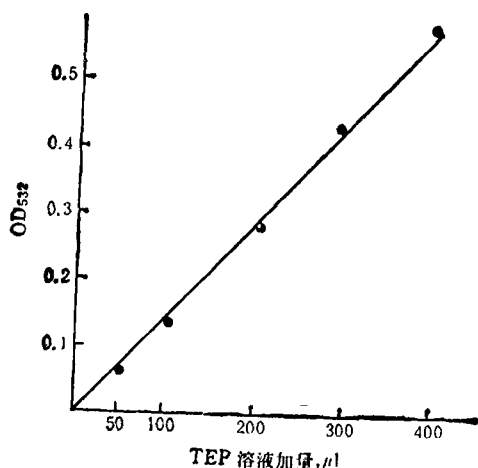


图2 不同浓度 TEP 在 532nm 处的 OD 值

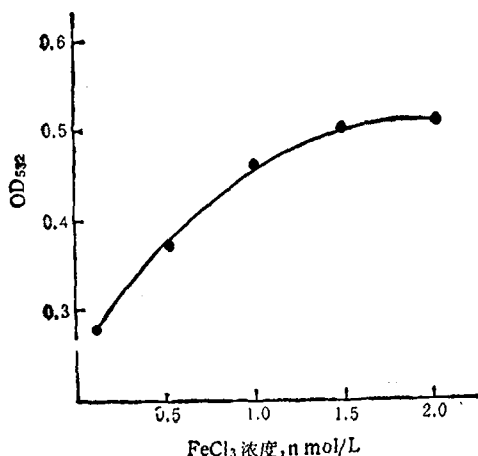


图3 不同浓度 Fe^{3+} 对 532nm 处 OD 值影响

Wills^[5] 报道在待测样品中加入除铁以外的金属离子均不增加 532nm 处的吸光值。其机理不太清楚^[5,6,7]。有学者认为铁催化其中间产物转化为终产物,即加铁后所测得的 LPO 代表了 LPO 的实际含量;有人则认为铁促使不饱和脂肪酸生成 LPO 干扰测定。从本文可见 Fe^{3+} 增加 532nm 处 OD 值,扫描也证实吸收峰在 532nm 处。正常和受照微粒体(LPO 值高)加铁后均在原有基础上升高,正常与异常差别不因为加铁而改变。因此, LPO 测定中应注意铁离子污染,但当 LPO 含量较低时,为提高其灵敏度,从方法学上考虑,加入 0.5ml 1mmol/L Fe^{3+} 是可取的。

测定时加热温度常用 95℃—100℃,如反应液中含有较多糖时,有报道改用 80℃ 加热干扰最小^[8]。EDTA

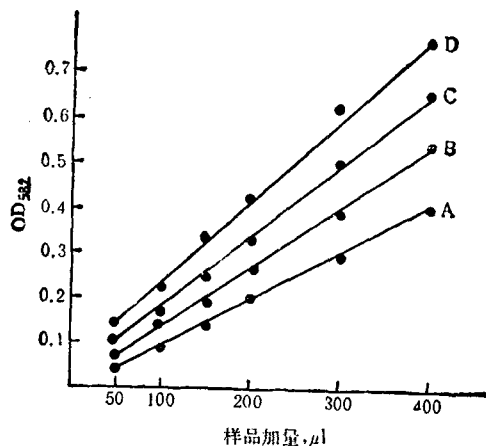


图4 正常与受 γ 照射的微粒体加 Fe^{3+} 与无 Fe^{3+} 比较

A. 正常微粒体 B. 正常微粒体加 1mmol/L Fe^{3+}
C. 受 γ 照射微粒体 D. 受 γ 照射加入 1mmol/L Fe^{3+}

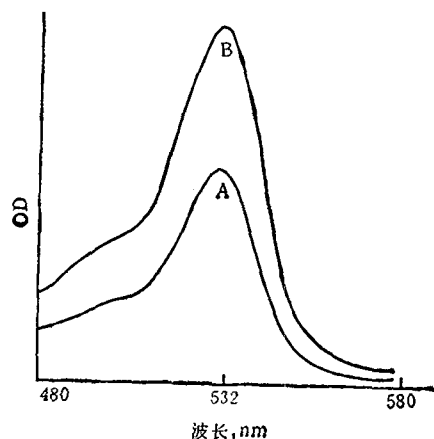


图5 加 1mmol/L Fe^{3+} (B) 和无 Fe^{3+} (A) 的样品扫描图

抑制显色物的生成^[9],使 OD 值降低,测定中应注意。本法在血浆样品中的应用正在研究中。

参 考 文 献

- 1 Smith M T. *Biochem Pharma*, 1982; 31(1):19
- 2 孙淑芬. 第四军医大学学报, 1985; 6(3): 261
- 3 大石诚子. 最新医学, 1978; 33(4): 660
- 4 岛崎弘幸. 日本临床, 1981; 37: 397 夏季增刊
- 5 Wills E D. *Biochem Biophys Acta*, 1964; 34: 475
- 6 Poli G. *Free radical in liver injury*. IRL Press, 1985: 29—48
- 7 Wills E D. *Radia Res*, 1987; 31: 732
- 8 Fortney S R. *Arch Biochem Biophys*, 1964; 104: 241
- 9 Barber A A. *Radia Res*, 1963; 3(Suppl): 33

[本文于 1989 年 4 月 24 日收到]