

反相高效液相色谱荧光法测定血清中过氧化脂质

李克 胡心宝

(南京部队南京总医院, 南京 210002)

关键词 高效液相色谱, 荧光检测, 过氧化脂质, 硫代巴比妥酸, 丙二醛

脂质过氧化作用是在不饱和脂肪酸中发生的一系列自由基反应, 它一方面使脂质含量较高的生物膜酶受到损伤(或激活), 引起溶酶体颗粒崩溃, 造成细胞死亡。另一方面使膜失去作为区域化的功能, 导致按功能需要排列的酶紊乱^[1]。由于过氧化脂质(LPO)有毒性作用, 血清LPO的测定值可为某些疾患的病因和病情的解释提供线索^[2], 从而受到人们的重视, 成为一个有意义的临床检验项目。

血清成分复杂, 而LPO含量又很低微, 一些常用于测定油脂或组织匀浆中LPO的方法, 多因灵敏度低或需繁杂的分离纯化操作, 而难以适用于血标本的测定。目前广泛采用测定LPO的方法是硫代巴比妥酸(TBA)比色法。但近年研究发现, 该方法虽灵敏度尚好, 但反应选择性差, 除LPO外, 尚有许多其它物质亦有相同的显色反应^[3,4]。造成样品处理复杂, 回收率低^[5]。

在前文^[6]基础上, 以高效液相色谱的良好分离特性, 克服了共存物的干扰, 并利用LPO分解产物丙二醛与TBA反应后具有的高灵敏荧光特性, 建立了灵敏的高效液相色谱荧光检测法。此方法已应用于临床样品分析, 测定了血清中LPO正常参考值, 观察了烧伤患者在治疗过程初期二周内血清LPO的浓度变化情况。

1 材料和方法

1.1 仪器

WGP-6型微量高压平流泵(杭州之江科学仪器厂); HP1046A荧光检测器(中国惠普公司), 恒温水浴槽(上海医疗器械三厂); WH-851旋涡混合器(上海环宇仪器制造厂); 台式自动平衡记录仪(上海大华仪表厂); K501平面六通进样阀(上海生物工程科学仪器厂)。

1.2 主要试剂

a. TEP标准贮备液(1×10^{-4} mol/L): 称取0.1102g四乙氧基丙烷(TEP, 超纯试剂, 日本东化成株式会社产品), 以水稀释至50ml, 置4℃冰箱内保存, 工作液以贮备液稀释配制。

b. 硫代巴比妥酸溶液(0.5%): 称取0.5g硫代巴比妥酸, 加入约60ml水加热溶解后, 冷却至20℃, 以水配至100ml。

c. 磷酸溶液(0.15 mol/L): 取1ml H_3PO_4 (含量为85%), 以水稀释至100ml。

实验中所用试剂除注明外, 均为分析纯级试剂, 水溶液均以二次蒸馏水配制。

1.3 色谱条件

色谱柱: $\phi 4.6 \text{ mm} \times 200 \text{ mm}$ 7 μ Nucleosil C₁₈ 柱(大连色谱研究中心); 流动相: 甲醇+磷酸盐缓冲液(0.025 mol/L, pH6.5)+四丁基溴化铵(0.5 mol/L)=68:32:2(v/v), 使用前以0.45 μm 滤膜真空抽滤; 激发波长: 526 nm; 检测波长: 553 nm; 流量: 1.0 ml/min; 进样管体积: 30 μl 。

1.4 样品测定

取血清50 μl , 加入0.25 ml TBA溶液, 0.70 ml 磷酸溶液, 混匀后置95℃水浴中加热35 min。样品取出后水流冷却至室温, 再移出0.50 ml至另一试管内, 加入0.50 ml 甲醇, 混合30 s后离心(4000 r/min, 10 min), 取上清液进样测定。图1是血清中反应缩合物的色谱。

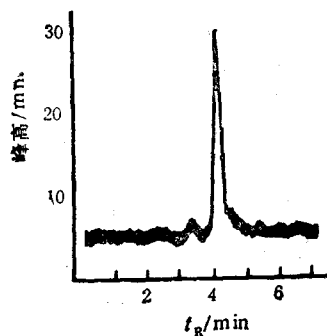


图1 丙二醛与硫代巴比妥酸缩合物色谱图

2 实验结果

2.1 线性关系

分别测定了含不同浓度标准品, 以及取不同量混

合血清时的色谱峰高。结果表明,TEP含量在15—600nmol/L范围内,峰高与浓度呈良好的线性关系。以浓度 x 对峰高 y 回归计算,其回归方程和相关系数分别为 $y = 146.1x + 0.4$, $r = 0.999$;当血清加入量在10—200 μ l范围时,测得峰高 y 与血清加入体积 x 亦呈线性变化关系,其回归方程和相关系数分别为 $y = 676.9x + 8.0$, $r = 0.994$ 。

2.2 重复性

对混合血清样品和浓度为150nmol/L TEP标准溶液的色谱峰高各进行了9次平行测定。结果显示,血清样品平均峰高为 31.5 ± 1.5 mm,变异系数4.8%;标准品平均峰高为 46.4 ± 2.6 mm,变异系数2.3%。

2.3 回收率

取已测知LPO含量的混合血清,分别加入不同量的标准品后各测定5次,按以下公式计算回收率:回收率 $= (A - B) / C \times 100\%$ 。式中 A 为加入标准品后测得总量; B 为样品本底含量; C 为加入标准品量。试验结果列于表1。

表1 回收率试验

样品含量 μ mol/L	加入量 μ mol/L	平均测出量 μ mol/L	平均回收 %
3.07	1.50	1.48	98.6
3.21	3.00	2.89	96.3
3.07	4.50	4.33	96.2

($n = 5$)

2.4 正常参考范围

选择正常人32例,抽血测定过氧化脂质,其平均浓度为 1.29 ± 0.4 μ mol/L,该结果与近年文献报道基本一致^[7,8]。

2.5 烧伤患者血清过氧化脂质测定

应用本方法测定了7例烧伤患者(烧伤面积为10—55%,其中深度烧伤5例)伤后二周内血清LPO浓度,其结果见图2。

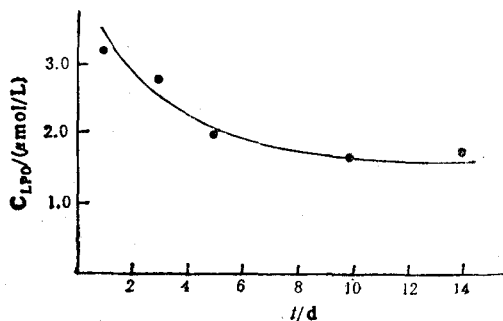


图2 烧伤后二周内血清LPO含量

3 讨论

3.1 本方法为外标法定量,为了减小加热温度和

时间变化对测定结果的影响,样品与标准品应同时处理为好。此外,受仪器条件限制,方法采用色谱峰高定量,为减小误差,以采用峰面积定量为好。

3.2 实验表明,增加流动相中甲醇的比例,可以改善色谱峰形,提高检测灵敏度。但是,随着甲醇比例的增加,待测物在色谱柱的保留时间也将缩短。通过加入四丁基溴化铵离子对试剂后,可以使得待测物在含较高甲醇比例的流动相中,仍能有一定的保留时间。同时,离子对试剂的加入,也有利于改善色谱峰形。

3.3 由于测定方法不同,受非特异反应的影响不一样,文献报道的正常参考值各有差异。因此,各实验室应结合各自的方法进行正常参考值调查。但随着人们对血中过氧化脂质测定方法的不断深入研究和改进,尤其是对共存干扰物质影响的排除,正常参考值的报道结果已呈逐渐降低趋势^[9]。

3.4 从图2可以看出,烧伤患者伤后初期血清LPO含量明显高于正常人,尤其以伤后5天内LPO升高更为显著。这说明伤后早期机体处于应激状态,烧伤皮肤由于体液的丢失,使血流灌注不良,为产生大量的氧自由基提供了条件,从而诱导脂质过氧化反应过程,引起皮肤LPO含量升高,进而回流入血液,使血清LPO含量升高,而其升高程度又与烧伤的严重程度有关。

参 考 文 献

- 1 周 玫,陈 媛. 脂质过氧化作用与疾病. 解放军医学杂志,1984;9: 145
- 2 陈 媛,周 玫. 脂过氧化作用及其对细胞成分的损伤. 中华医学杂志,1985;65: 704
- 3 Oikawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979; 95:351
- 4 Therasse J, Lemonnier F. Determination of plasma lipoperoxides by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr*, 1987; 413:237
- 5 陈顺志,金有余,李常淳等. 过氧化脂质 TBA 显色的三种方法学比较. 临床检验杂志,1984;2: 176
- 6 Li Ke. Determination of lipoperoxides in animal tissue by ion-pair reversed phase high performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr*, 1990; 4:189
- 7 董 伟,李新建. 血浆脂质过氧化物荧光测定. 基础医学与临床,1990;10: 241
- 8 Viinikka L, Uuori J. Lipid peroxides, prostacyclin and thromboxane A2 in runners during acute exercise. *Med Sci Sport Exerc*, 1984; 16:275
- 9 Steven H Y, Joseph A K, Sidney M H et al. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem*, 1987; 33: 214