维普资讯 http://www.cqvip.com

105~108 高效液相色谱法分析生物膜磷脂

生物分析化学教研究 曾成鸣 秦阳君 康格非

Q545

提 要 本文报道了利用乙腈-甲醇-磷酸流动相体系分析生物膜磷脂的高效液相色谱法。所用色谱柱为Shim PAK CLC—SIL柱(150×6mm,5u),检测波长205nm。该法可在45min之内分析8种膜磷脂组分,并可在12min之内使4种主要的红细胞膜磷脂得到完全分离。该法的线性范围宽,色谱的重复性较好,是一种简便、快速、实用性强的生物膜磷脂分析方法。

关键词 高效液相色谱法; 膜磷脂 磷脂
中图分类号 Q545; Q652.63

生物膜中各类磷脂的组成分析在膜功能的研究中占有极其重要的地位。高效液相色谱法是测定生物膜磷脂的最有效的方法。前文[1]我们报道了利用正己烷—异丙醇—乙醇流动相体系测定线粒体膜磷脂的高效液相色谱法,方法具有稳定,基线较好,检测限较低等优点,但该体系的最大缺陷是分析时间长,且对某些磷脂组分分离不完全。本文利用乙腈—甲醇—磷酸流动相体系对生物膜磷脂进行高效液相色谱分析,并对该色谱体系的性能及其实用性进行全面的评价。

材料和方法

1.试剂

各磷脂纯品磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine PC)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine PE)、磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol PI)、心磷脂(cardiolipin CL)、磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine PS)、鞘磷脂(sphingo myelin SM)、溶血卵磷脂(lyso—phosphatidylcholine LPC)和溶血磷脂酰乙醇胺(lyso—phosphatidylethanolamine LPE)皆为Sigma产品。乙腈为HPLC纯,上海青浦合成试剂厂生产。其它试剂为国产分析纯试剂,所用其它有机溶剂均经重蒸纯化后使用。

2.仪器与色谱条件

日本岛津LC—9A高效液相色谱仪,SPD—6A紫外检测器,GR3A数据处理系统。色谱柱:Shim PAK CLC—SIL(150×6mm,5u),保护柱:Waters CO.Guard—PAK(RCSS silica),流动相为乙腈—甲醇—85%磷酸体系,经过滤脱气后使用。流动相流速1ml/min。紫外检测波长205mm。柱温:室温。

四川省教委资助项目

维普资讯 http://www.cqvip.com

3.标准曲线的制作

LPC和LPE用氯仿—甲醇混合溶液溶解，其余磷脂用氯仿溶解，然后用正己烷/异丙醇(3：1，v/v)稀释至所需浓度，进样10ul，以峰面积定量，制作标准曲线，并确定其线性范围及检测限。

4.生物膜磷脂的提取

红细胞由采自健康献血员的血分离获得，根据文献[2]的方法制备红细胞膜，膜脂质的提取参照Higgins的方法[1]进行：取膜悬液0.5ml(线粒体可取0.2ml)，加入氯仿：甲醇：盐酸(2：1：0.01，v/v)混合液5ml，振摇，静置，加入0.05mol/L $CaCl_2$溶液，振摇，2000rpm离心10min，取下层清液，40～50℃水浴下N_2气吹干后，加入正己烷：异丙醇(3：1，v/v)0.2ml，充氮，密闭，低温保存待测。

5.膜磷脂组分的定性方法

改变流动相各组分的比例，在不同的洗脱条件下，对样品中各膜磷脂组分的保留时间与纯品的保留时间反复进行对比确认。

6.色谱重复性实验

利用红细胞膜脂质提取物进行色谱重复性实验，同一标本进样5次，每次10ul，观察磷脂的保留时间和峰面积的变异情况。

结果及讨论

1.流动相的选择及其性能

利用乙腈—甲醇—磷酸流动相体系分离膜磷脂，快速是其主要的特点，该体系可在较短的时间内将膜磷脂组分完全分离。如果只考虑几种主要的膜磷脂PC、PE、SM、PS，则可通过适当改变磷酸和甲醇的比例，使磷脂的全分析在12min之内完成。(图1)但要使PI、CL达到比较好的分离，则需要45min左右(图2、图3)。尽管这样，其分析时间仍比正己烷—异丙醇—乙醇体系要短得多。

在该流动相体系中，磷酸可以增强体系的洗脱能力。增加磷酸的比例可使各磷脂组分的保留时间缩短。增大甲醇的比例也可使多数组分的保留时间减小，但减小的幅度不大。某些组分在改变流动相比例时会出现峰顺序交错的现象，如PC的双峰、LPC峰与SM峰的相对位置就可以发生变化。

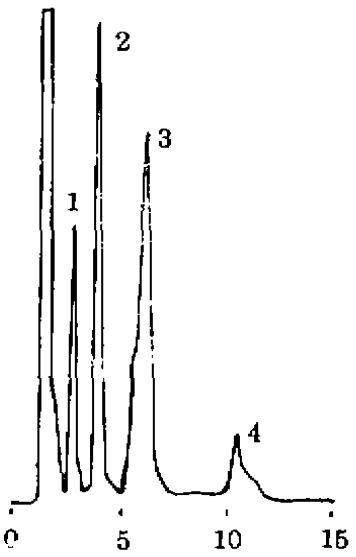


Fig.1 Chromatogram showing the rapid separation of four major constituents of phospholipids in human erythrocyte ghost membrane.Mobile phase:MeCN:MeOH:H_3PO_4(85%)=100：10：1.8(v/v).1 PS;2 PE:3 PC;4 SM.

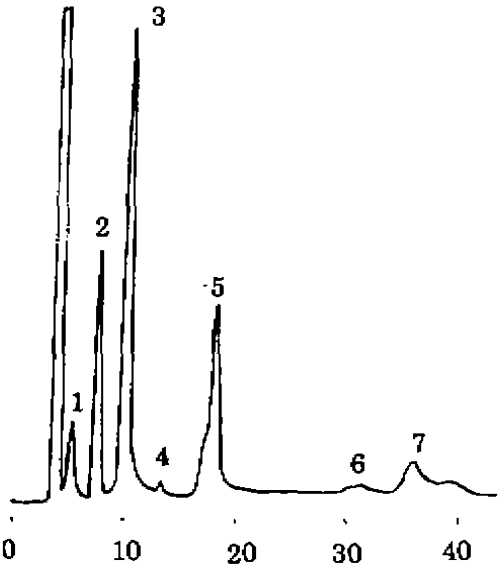
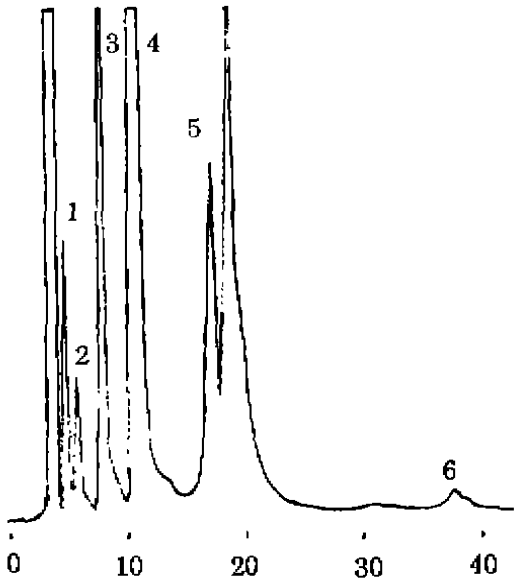


Fig.2 Chromatogram showing complete separation of phospholipids extracted from human erythrocyte ghost membrane.Mobile phase:MeCN:MeOH:H_3PO_4(85%)=180：5：1.5(v/v).1 PI;2 PS;3 PE;4 LPE;5 PC;6 LPC;7 SM.

Fig.3 Chromatogram showing complete separation of phospholipids from a extract of rat brain tissue mitochondria membrane.Mobile phase:MeCN:MeOH:H_3PO_4(85%)=160：10

维普资讯 http://www.cqvip.com

：1(v/v).1 CL;2 PI;3 PS;4 PE;5 PC;6 LPC.



由于流动相中甲醇和磷酸的比例都很小，其构成比的微小变化都将明显地影响流动相的洗脱性能。所以在配制流动相时应准确操作，以确保整个分析过程期间流动相洗脱性能的一致性。

流动相在使用过程中，有时会因放置而使其洗脱性质发生改变，各磷脂组分的保留时间也会因之发生变化，这种现象在重复使用流动相进行分析时尤为突出。比较而言，该流动相的洗脱性能不及正己烷—异丙醇—乙醇体系稳定。

2.各磷脂组分的标准曲线

表1列出了8种磷脂组分的标准曲线的线性回归方程。这些标准曲线的线性范围包含了红细胞膜和线粒体膜中各磷脂组分含量的变化范围，在这些范围内，各磷脂组分的量与其色谱峰面积间具有良好的线性关系。

在200～210nm范围内检测磷脂的主要依据是磷脂分子中不饱和脂肪酸链的吸收，溶血磷脂LPC和LPE由于缺少一个不饱和脂肪酸链，其吸光能力大大降低，其工作曲线的斜率比较小。与正己烷—异丙醇—乙醇流动相体系比较，该流动相体系的基线相对较差，致使对LPE和LPC的检测限偏高，特别是LPC，达到0.5ug，这将直接影响一些标本中溶血磷脂的检测。

3.色谱的重复性

表2列出了几种主要磷脂组分的保留时间和积分面积的重复性实验结果，从表中可以看出，磷脂的保留时间的重复性较好，其变异系数最大不超过0.64%，积分面积的精密度也基本上符合色谱分析的要求。

4.样品测定结果

表3列出了正常人红细胞膜磷脂的测定结果。如表所示，正常人红细胞膜中各磷脂组分所占质量比由大到小次序为PC＞PE-＞SM＞PS＞LPC＞PI＞LPE，其中4种主要磷脂组分PC、PE、SM和PS占总磷脂的95%以上。

生物膜脂质提取物中的磷脂对环境极为敏感，稳定性差，所以在提取膜磷脂后及时地进行分析是确保其分析结果可靠性的关键。用正己烷—异丙醇—乙醇流动相体系进行分析，分离时间太长，不适于大量的标本分析，而利用乙腈—甲醇—磷酸流动相体系对生物膜磷脂进行分析，可在较短的时间内完成，还呆以根据不同的分析目的，在较大的范围内改变流动相的洗脱性能，缩短分析时间，为大量的标本分析提供了可能性。该方法线性范围较宽，各磷脂组分的保留时间和峰面积的重复性都比较好，是一种简便、快速、适应性广，且较为准确可靠的膜磷脂分析方法。

本文所用线粒体膜脂质提取物由第三军医大学汪青树同志提供，谨致谢意。

参 考 文 献

1 汤习锋，等.生物化学与生物物理进展 1993;20(5):399.

2 张龙翔.生化实验方法与技术 北京人民教育出版社，1981;21.

3 Higgins JA, in "Biological Membranes:A Practical Approach" 1987;103, edited by Findlay JB.IRL Press.

(收稿日期 1994—01—20)

维普资讯 http://www.cqvip.com

Table 1 Relations between phospholipids and their chromatographic peak area counts

phospholipid	Straight line equation ($\times10^4$)	Contents range (ug)	Correlation coefficient (r)	Detection limit (ng)
CL	y=14.77x−1.16	0.1～3	0.9973	20
PI	y=30.63x+0.86	0.1～3	0.9984	5
PS	y=24.98x+1.23	1～30	0.9934	5
PE	y=27.92x+0.95	2～50	0.9990	5
PC	y=24.48x+0.58	2～50	0.9968	5
SM	y=18.32x+1.18	1～30	0.9925	10
LPE	y=6.87x+0.49	0.1～3	0.9967	50
LPC	y=0.48x+0.04	2～50	0.9942	500

Table 2 Chromatographic repeatabilities of some phospholipids(n=5)

	PI	PS	PE	PC (1)	PC (2)
Retention time (min)	5.223±0.033	9.144±0.038	13.492±0.050	23.083±0.028	25.813±0.031
CV(%)	0.64	0.42	0.37	0.12	0.12
Peak area counts ($\times10^5$)	0.47±0.02	11.28±0.40	26.16±0.71	23.04±0.82	
CV(%)	4.25	3.52	2.71	3.56	

Table 3 Contents of phospholipids in normal human erythrocyte ghost membranes(n=12)

	PI	PS	PE	LPE	PC	LPC	SM
Contents (ug/mg protein)	6.90±0.45	85.42±4.70	153.5±6.4	2.82±0.18	175.2±8.94	11.59±0.68	148.2±6.8
Composition (%)	1.18±0.08	14.63±0.80	26.30±1.10	0.48±0.03	30.02±1.53	2.01±0.12	25.38±1.17

ANALYSIS OF MAJOR PHOSPHOLIPID CLASSES IN BIOMEMBRANE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Zeng Chengmin, et al

Dept. of Bio—analytical Chemistry

A novel high performance liquid chromatographic method for analysis of phospholipids in biomembrane is described.The separation was performed on a CLC-SIL column with the mobile phase system of acetonitril-methanol—85%phosphoric acid, using isocratic elution and UV detection at 205nm.completed separation of eight constituents of membrane phospholipids was achieved within 45 min, and four major constituents of phospholipids in erythrocyte ghost membrane could be separated completely within 12 min.This method is rapid, reliable, producible and practical for determination of biomembrane phospholipids.

KEY WORDS: High; performance liquid chromatography; Phospholipids