维普资讯 http://www.cqvip.com

用反相高效液相色谱法分析黄疸血清中胆红素组分的初步临床应用

实验诊断教研室 胥文春 罗春丽 陈宏础

提 要 用我们建立的用于血清胆红素组分分析的反相高效液相色谱(RP—HPLC)法分析了一组黄疸血清标本，发现在高结合胆红素血症血清中胆红素的四个组分均存在，而在高未结合胆红素血症中只有胆红素双酯(B_1)、胆红素单酯(B_2)及未结合胆红素(B_4)存在，未测出与白蛋白共价结合胆红素(B_3)，并且发现在病毒性肝炎的恢复期，B_1/TB比值升高，提示预后良好。

关键词 高效液相色谱法；胆红素；血液；黄疸
中图分类号 R446.1 O657.72

目前临床上常用的测定胆红素的方法是重氮法，它不能分别测定每一种胆红素组分，并且结合胆红素的测定尚无参考方法，常受反应时间、温度、介质等影响，可比性较差[1]。高效液相色谱法的建立弥补了重氮法的不足，该法准确、快速，更能反应疾病的情况。特别是δ胆红素的测定有更重要的应用价值。现将我们的实验结果报告如下。

材料与方法

1. 试剂

未结合胆红素(Sigma公司)，三氟乙酸(TFAA，Merck公司)，异丙醇、抗坏血酸及二甲基亚砜均为国产分析纯。

2. 仪器

日本岛津LC-6A高效液相色谱仪，岛津SPD-6AV紫外可见检测器，岛津C-R3A数据处理装置。色谱柱为C_4(150mm×4.6mmI.D.)，粒径5μm，孔径3μm，进口Nucleosil填料，中科院大连化物所装填。

3. 标本预处理

用含0.6%抗坏血酸和2%二甲基亚砜的稀释液将血清稀释20—80倍后高速离心，取上清液50μl直接进样。

4. 色谱条件

流动相A:0.5%TFAA，用浓氨水调pH至2.0。流动相B:80%异丙醇，用流动相A稀释。进样后进行线性梯度洗脱，初始流动相为100%(V/V)的流动相A，13分钟后流动相A与流动相B之比为55:45(V/V)，维持至22分钟，然后回到初始流动相。流动相流速为1.0ml/min，测定波长为436mm[2]，柱温45°C。

5. 定性及定量标准

用样品保留时间进行定性分析。用峰面积进行定量分析。由于只有B_4有标准品，所以其它几个组分以B_4为标准进行定量计算。

结 果

1. 四种胆红素的分离

一个典型的肝性黄疸血清可以分离得到四个峰，经鉴定依次为γ、β、δ及α胆红素，其保

维普资讯 http://www.cqvip.com

留时间分别为14.2、15.7、17.8及19.1min，如图1。

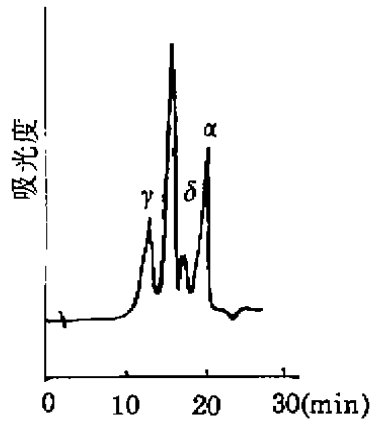


图1 HPLC分离胆红素组分色谱图

2. 不同疾病胆红素的组成

共分析了取自41个黄疸病人的54份血清标本，其中，病毒性肝炎24例，肝硬化8例，胆结石3例，妊娠胆淤、壶腹氏癌各1例，新生儿黄疸2例，溶贫2例。发现新生儿黄疸、溶贫这类高未结合胆红素血症血清中，只有B_γ、B_β及B_α，而未测到B_δ。而在肝炎、胆结石这类高结合胆红素血症血清中，四种组分均可测得。

3. 病毒性肝炎不同阶段胆红素各组分的变化

对一例乙型病毒性肝炎病人连续观察，得到如图2所示结果。图A表明在总胆红素浓度升高时，结合胆红素中以B_β升高为主；随着总胆红素的降低，胆红素各组分也逐渐降低，但B_δ降低缓慢。图B中可见随着病情的好转。B_α、B_β、B_γ与TB的比值都是逐渐下降，而B_δ/TB却逐渐升高。

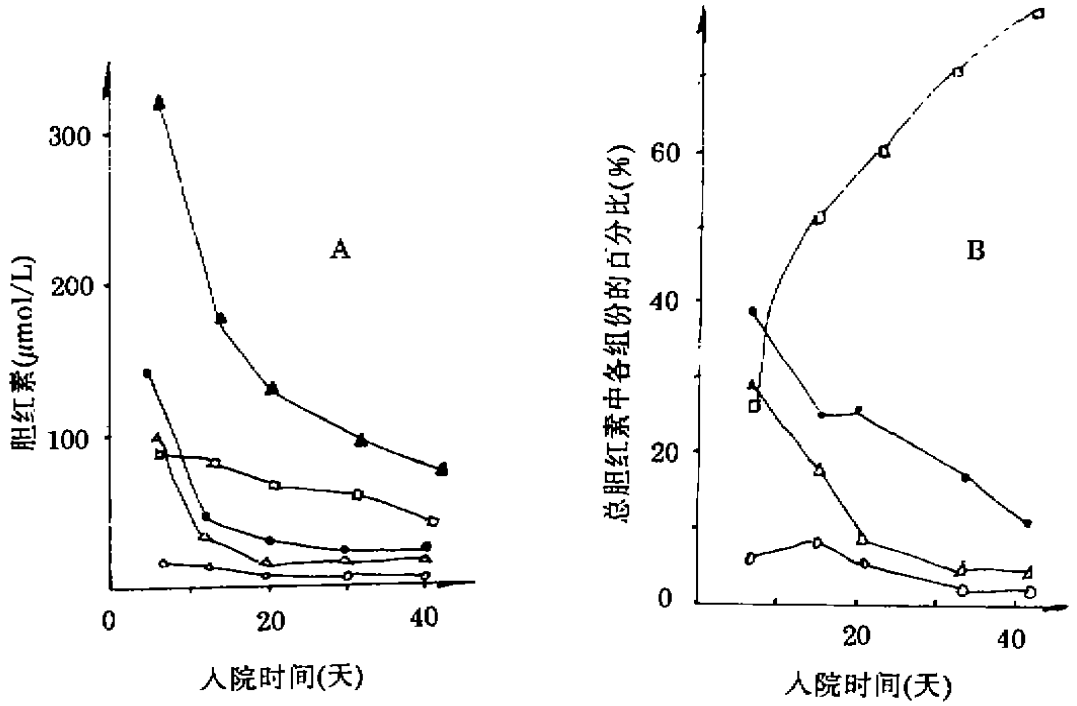


图2 病人血清中胆红素各组分随时间的变化情况

注：TB(▲)、B_α(•)、B_β(Δ)、B_δ(□)、B_γ(O)

维普资讯 http://www.cqvip.com

讨　论

1．从结果中我们发现在高未结合胆红素血症中，胆红素的升高以B_u为主，在高结合胆红素血症中，各个胆红素组分均升高，但在三种结合胆红素中，以B_d升高为主，这可能与它的形成机理有关。

2．Weiss等[3]发现在高结合胆红素血症血清中存在着不同浓度的B_δ，而在高未结合胆红素血症中检测不到B_δ，正常人血中也无B_δ。我们除了未做正常人血清外，从黄疸血清中得到同样结果，因此我们认为B_δ可以用来作为区别高结合胆红素血症和高未结合胆红素血症的指标。

3．通过对病例的连续观察，发现随着病情的好转，B_1/TB、B_u/TB、B_δ/TB均逐渐下降，而B_δ/TB却逐渐升高，Lauff等[2]、Weiss等[3]及Adachi等[4]均得到这样的结果，我们的实验也得到同样的结果，这可能与B_δ分子中白蛋白的半衰期长有关。另外，Weiss等[3]在他们的实验中还发现2例肝功能衰竭病人的B_δ/TB不但未升高反而进行性下降，直至病人死亡。因此B_δ/TB对判断肝胆疾病的预后有重要意义。

参　考　文　献

1　Singh J. et al. J Chromatogr,1986;380：321
2　Lauff JJ, et al. Clin Chem,1983;29：800
3　Weiss Js, et al. N Engl J Med, 1983;309,147
4　Adach, Y, et al. Gastroenterol Jpn,1987;22：633

(收稿日期1994－01－20)

(上接156页)

1　陈英佑，等．中国输血杂志1990;3(2)：88
2　余国定，等．中华血液学杂志1982;3(2)：111
3　韦延勇，等．中华医学检验杂志1991;14(5)：296
4　韦延勇，等．中国输血杂志1991;4(4)：201
5　华玲琳，等．输血与血库专业知识问答
　　辽宁科学技术出版社　1989;41

(收稿日期　1994－01－20)

(上接151页)

3．不同浓度苦参作用K562细胞二天后计数，结果如下：

苦参mg/ml	0	4	8	12	16
细胞数10^5($n=2$)	4.625	1.875	1.815	1.413	1.112

结果与MTT法一致，反映细胞增殖能力下降。

讨　论

实验结果表明，苦参可以诱导分化K562细胞，在形态学上变化明显，并有抑制细胞增殖的能力。有报告沸波酯(TPA)对K562有分化作用，维甲酸可分化HL—60细胞，而对K562无作用，说明二株细胞分化机理有差异。但已有报告苦参对HL—60有较强诱导分化作用[1,3—5]，本文又提示苦参对K562也有明显诱导分化作用，给我们今后的研究提出了新课题。另外从苦参中可分离出苦参碱，氧化苦参碱等17种生物碱，复杂的组分也给研究工作带来困难。有报告血液肿瘤中乳酸脱氢酶(LDH)活性呈上升趋势，在我们工作中，经苦参诱导K562细胞内LDH活性呈下降趋势。这是由合成减少，还是细胞增殖数量减少所致有待探讨。诱导分化肿瘤细胞，使其逆转向正常细胞分化，是新近开展起来的非杀伤性治疗肿瘤的有前途的方法之一。

参　考　文　献

1　徐建国，等．中国中药杂志　1990;15(10)：49
2　李登华，等．癌症，1991;10(3)：226
3　姜绪荣，等．大连医学院学报　1991;13(4)：22
4　陈惠黎．生命的化学，1992;12(4)：7
5　陈子兴，吴伟林．中华肿瘤杂志　1991;13(1)：26

(收稿日期　1994－01－20)