维普资讯 http://www.cqvip.com

肝病，色氨酸，高效液相色谱，血浆
193-195

高效液相色谱法测定肝病患者血浆游离色氨酸与总色氨酸的比值

人工肝研究室 王立钮振李宗明 R446.112

提 要 本文采用HPLC法测定血浆总色氨酸（T-Trp）及经平衡透析法分离的游离色氨酸（F—Trp）。肝硬化组及急性肝炎组的F-Trp和F/T-Trp值均呈显著性增高，对其常规肝功能正常者具有一定诊断价值。应用HPLC测定血浆Trp，方法较简捷可靠，灵敏度及重复性均好，可作为测定血浆色氨酸的一种良好方法

关键词 高效液相色谱；色氨酸；肝脏疾病

中图分类号 R446.112

血浆游离色氨酸（F-Trp）约占总色氨酸（T-Trp）的10～20%。前者具有临床生化意义，可通过血脑屏障，进入脑内合成抑制性神经递质5-羟色氨等而使吲哚类物质浓度增高，导致各种神经精神症状，为肝性脑病的致病因素之一[1]。国外近年来多采用高效液相色谱法(HPLC)测定其血浆值，认为敏感而可靠。国内尚未见报道，本文对肝病患者用此法进行测定，其结果报道如下。

材料和方法

1. 测定仪器 Waters高效液相色谱仪，440型紫外检测器，CDMCO-IB色谱数据处理机及恒温装置等。色谱条件：ODS柱（大连技术开发总公司），5μm，φ4×150min。流动相为0.02M磷酸缓冲液（pH5.9）和甲醇（A.R.，重庆东方红试剂厂）以80:20体积之比混合，脱气后即可应用。流速1ml/min；泵压2500psi左右；柱温28℃；记录纸速0.5cm/min。紫外检测波长λ为254nm。

2. 实验方法 据Rocchi方法[2]略加改进。标准液的制备：精确称取色氨酸（A.R.，上海生化研究所）15mg，用双蒸馏水配制成15、7.5、3.75、1.87及0.46μg/ml溶液，取10μl进样。每次测定标本均进标准液对照，以减少误差。样品的预处理：取30%三氯醋酸溶液0.2ml加入人血浆1ml内，2000转/min离心5min，吸取上清液再以17,000转/min离心20min。取上清液10μl进样测定T-Trp。F-Trp的测定：置血浆2ml（调节至pH7.4）于试管内，管内置入含6%右旋糖酐0.2ml的透析袋（Visking 8/32西德海登保公司制品）。于试管内在血浆面上迅速加入液体石蜡。4℃条件下孵化15h。取出透析袋，吸取袋内液体置于康氏试管内，用氮气吹干，取0.02M磷酸缓冲液0.2ml稀释。进样测定。

3. 观察对象 对照18例（男12女6例），平均年龄44.4岁（21～76岁）。均为其它病因住院的非肝病患者。肝功能正常，乙肝表面抗原阴性。肝硬化代偿组：13例（男12女1例），平均年龄39.4岁（29～62）。3例经肝组织活检证实诊断，余均据临床表现及辅助检查确诊，乙肝血清阳性者6例。肝硬化失代偿组：共13例（男11，女2例）。平均年龄42.9岁（23～75岁）。伴腹水6例，上消化道出血3例，脾亢3例，肝性昏迷1例。经活检证实者1例，乙肝血清阳性9例。急性肝炎组：诊断按1984年全国病毒性肝炎专题学术会议修订标准。共9例。平均年龄37.8岁（20～16岁）。经肝活检确诊者1例。

4. 统计学方法 实验数据以$\bar{X}\pm SD$表示，显著性检验采用方差分析，Bartla检验，Dunnet检验，Newman—Keuls检验以及F'检验。数据采用对数转换。

维普资讯 http://www.cqvip.com

结　果

1. HPLC的测定Trp的峰值

标准曲线　不同浓度的Trp标准液（从0.46μg/ml到15μg/ml）分别进样测定的峰面积（μV·Sec）用最小二乘方进行线性回归处理，得直线回归方程：$y=0.1218+0.9366\bar{X}$。相关函数为0.99997。

重复性测定　样品预处理后，在上述测定件条下，色谱图上 $t_R=3.70\pm0.06$min。进样重复性由0.046～15μg/ml的CV%分别为3.86，4.4，3.4，3.8及3.6%。又同一份血浆分为若干份，分别测定其Trp含量，F-Trp的CV为8.47%，T-Trp的CV为3.46%。

回收率测定　在血浆中分别加不同量Trp。1，2，4，6μg/ml的平均回收率为91.93%。

2. 观察对象测定结果

附表所见各种肝病组血浆F-Trp和F/T-rp均呈显著增高（$P<0.05\sim0.01$）。肝硬化代偿组和急性肝炎组的F-Trp增高程度不如肝硬化失代偿组明显。各组F/T-Trp比值均增高，且均有显著性，$P<0.01$，组间均无显著性差异（$P>0.05$）。各肝病组T-Trp略有增高，但组间以及与对照组比较均无显著性差异（$P<0.05$）。

各组色氨酸的测定结果比较（$\bar{X}\pm SD$）

	n	F-Trp μg/ml	F-Trp μM/l	T-Trp μg/ml	T-Trp μM/l	F/T-Trp
对照组	18	0.84±0.33	4.11±1.66	7.72±2.27	37.80±11.11	0.11±0.05
肝硬化代偿组	13	1.93±0.49	9.45±2.29$^{**}_{\triangle}$	9.00±2.39	44.07±11.70	0.23±0.07**
肝硬化失代偿组	13	3.14±1.53	15.37±7.49**	8.51±2.22	41.67±10.87	0.38±0.17**
急性肝炎组	9	2.26±1.55	11.07±7.59*$^{\triangle}$	8.32±2.16	40.29±10.58	0.30±0.24**

与对照组比较　*$p<0.05$　　**$p<0.01$
与肝硬化失代偿组比较　$^{\triangle}p<0.05$

讨　论

有关HPLC测定Trp的条件：应用HPLC测定血浆Trp标准曲线误差小，在常用的0.46～15μg/ml值范围内有很好的线性关系，符合应用需要，在缺乏内标条件下亦可用外标法测定。重复性、变异系数等结果亦均符合要求。关于流动相的选择，利用Nucleosil ODS柱，即使改变甲醇与水的各种比例，或改变流动相的流速均不易将Trp与杂质分离开。改用甲醇—磷酸缓冲液后则易将Trp与杂质峰分离。流动相中甲醇浓度可使用5%～30%的范围，但以20%为好。其pH以选用5.9为佳。关于柱温的选择，为延长色谱柱使用寿命同时又不影响柱效，选择柱温在28℃左右较为适宜。有关血浆样品的预处理，因血浆F-Trp颇受pH影响，在一定范围内随着血浆pH增高，Trp与血浆白蛋白的结合力增强，pH7.2时结合力则很低，因此，我们认为血浆标本调至生理性pH 7.4为宜。应用HPLC测定血浆Trp，在掌握好样品预处理方法后，其测定方法简捷可靠，灵敏度及重复性均好。透析法有待进一步改进之处，如标本量尚偏大，透析所需时间较长，在临床应用时受一定程度的影响。

色氨酸测定对肝病的临床意义：血浆Trp常随肝脏受损而增高，或认为与肝性脑病发病机制有关。1973年Curzon等[3]发现实验性肝昏迷动物脑内Trp增高，并伴有血浆F-Trp增高。Yoshida等[4]发现慢活肝，

维普资讯 http://www.cqvip.com

肝硬化，原发性胆管细胞癌及肝昏迷患者血浆F-Trp均增高而T-Trp变化不大，认为可据血浆F-Trp值推测肝实质功能不全的程度。本文结果证实，肝硬化不论代偿组或失代偿组，以及急性肝炎组的F-Trp均显著增高，T-Trp有所增高，但不具有显著性差异，与国外报道相一致。F-Trp以及F/T-Trp的测定结果对于诊断肝病患者的肝功能不全程度具有一定价值，为常规肝功能试验所不易反映。

（本文实验操作承杨苏同志指导。谨此致谢）

参 考 文 献

[1] One J, et al. Gastroenterology 1978; 74:196

[2] Rocchi E, et al. J Chromatogr 1986; 380:128

[3] Curzon G, et al. J Neurochem 1973; 21:137

[4] Yoshida K, et al. Clin Chim Acta 1980; 101:235

（收稿日期1990—11—08）

DETERMINATION OF FREE AND TOTAL SERUM TRYPTOPHAN IN PATIENTS WITH LIVER DISEASES BY HIGH-PERFORMANCE LIQUIDCHROMATOGRAPHY

Wang Li, et al

Artificial Liver Research Laboratory

In this paper, the determination of T-Trp and F-Trp after equilibrium dialysis in serum by HPLC was reported. Both the serum F-Trp and F/T-Trp ratio were remarkably increased in the patients with cirrhosis and acute viral hepatitis. It was suggested that the determination was valuable in the diagnosis of various liver diseases with normal conventional hepatic function. The analysis of Trp by this method is rather simple with good sensitivity and reproducibility

KEY WORDS High-performance liquid chromatography, Liver disease, Tryptophan