DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.01.030

高效液相色谱法测定生物样品中磷脂含量

技术方法

The determination of phospholipid in biological samples by HPLC

王凤君 赵 云 谢尔凡 尤忠义 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所)重庆,630038

磷脂是生物膜的重要组成成分,其含量的变化在一定程度上影响细胞功能,而且细胞的某些信号传导过程也与磷脂密切相关,如蛋白激酶C的激活必须有磷脂酰丝氨酸参与。此外,与肺功能密切相关的肺表面活性物质的主要成分也是磷脂,其磷脂组成的变化将直接关系到肺表面活性物质的质量。可见,测定磷脂含量具有十分重要的意义。目前,分离测定磷脂含量最常用薄层层析法,比较繁琐,且灵敏度与分辨率也相对较低。因此,我们建立了高效液相色谱法(HPLC)来测定生物样品中的磷脂含量。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 仪器 高效液相色谱系统(法国Gilson公司);色谱数据工作站(中科院大连化物所)。

1.1.2 试剂 (1)磷脂标准:磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰乙醇(PE)、磷脂酰胆碱(PC)均为Sigma公司产品。分别称取一定量的每种磷脂,用氯仿-甲醇液(2∶1,V/V)配制成1 mg/ml,置-20℃保存。(2)其它试剂:甲醇、乙腈均为色谱纯级,分别由上海吴泾化工厂和中科院上海脑研所生产;其它试剂均为市售分析纯级。

1.2 实验方法

1.2.1 磷脂提取方法 综合文献报道方法[1,2]加以改进,简述如下:取一定体积的组织匀浆或支气管肺灌洗液(BLCF)于刻度试管中,加入2倍体积的氯仿-甲醇提取液(2∶1,V/V),用振荡器强烈振荡1 min,2500× g 离心10 min。弃去上层液,但暂不弃去界面杂质。加入1/4下层液体积的甲醇-水提取液(1∶1,V/V),强烈振荡1 min,2500× g 离心10 min,弃去上层液及界面杂质。取一定体积的下层液并用氮气吹干,密封后于-20℃贮存待测,测定时用含20%氯仿的流动相溶解后进样。

1.2.2 色谱分析条件 色谱柱为μPorasil Silica,300×4 mm,粒径10 μm(中国科学院大连化物所)。流动相由乙腈-甲醇-85%磷酸(90∶3∶1,V/V)组成,混匀,过滤(0.2 μm)并脱气后使用。流速为0.80 ml/min,进样量20 μl,紫外检测波长203 nm,色谱数据工作站进行数据处理。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件与色谱图

根据文献报道[3],我们选用分离磷脂比较常用的硅胶柱作固定相。在选择流动相时,试用了包括恒溶剂洗脱和梯度洗脱在内的多种流动相组成,并对其色谱特性进行比较。发现乙腈-甲醇-85%磷酸(90∶3∶1,V/V)作流动相并采用恒溶剂洗脱时,磷脂分离效果最佳,基线漂移较小。图1、2分别是上述色谱条件下磷脂标准和组织磷脂提取样品的色谱图,PI、PS、PE和PC四种磷脂的保留时间(min)分别是4.40、8.16、11.60和19.30,分析时间仅为25 min,较文献报道的分析时间(90 min)[4]明显缩短。除PI受非保留组分(溶剂)的干扰,未达基线分离外,标准和样品中其它三种磷脂均达到基线分离。在分析样品时,发现PI和PS之间始终有两个未知峰存在,但并不干扰PI与PS的分离(图2)。我们推测这两个未知峰可能是其它磷脂,但因无其它磷脂标准而无法证实。

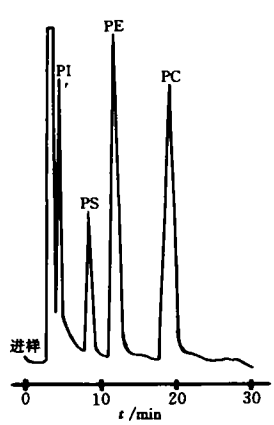


图1 磷脂标准色谱图

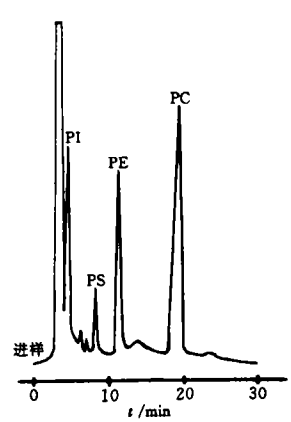


图2 提取的磷脂样品色谱图

2.2 线性关系与线性范围

在上述实验条件下用磷脂标准定体积进样,分别计算了每种被测磷脂组分的含量Y(μg)与峰面积X(μv.s)的直线回归方程与相关系数,结果见表1。可以看出,在各自的线性范围内,每种磷脂的含量均与峰面积呈非常显著的线性关系,且线性范围较宽。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表1 线性关系、线性范围与检测限

组分	直线回归方程	相关系数	线性范围 (μg)	检测限 (μg)
PI	$Y=-0.374+2.551\times10^{-6}X$	0.9973	0.2～16	0.012
PS	$Y=-0.125+1.375\times10^{-6}X$	0.9991	0.2～16	0.014
PE	$Y=-0.218+6.707\times10^{-7}X$	0.9974	0.4～32	0.011
PC	$Y=-0.731+9.453\times10^{-7}X$	0.9988	0.8～64	0.031

2.3 检测限与灵敏度

在前述色谱条件下，由基线噪音计算信噪比(S/N)为2时各被测磷脂组分的检测限，结果见表1。检测限这一结果表明，本法的灵敏度是比较高的。将检测器灵敏度上调还可进一步提高本方法灵敏度，但从我们测定的数百份标本来看，这一灵敏度已足以满足生物样品测定要求。

2.4 精密度

取同一样品在1 d内重复进样5次，以计算日内变异系数。同时，对同一样品连续测定7 d，以计算日间变异系数，结果见表2。结果表明，日内及日间变异系数均小于5%，说明本法比较稳定、重复性好。

表2 变异系数与回收率

组分	日内CV (%，$n=5$)	日间CV (%，$n=7$)	回收率 (%，$n=5$)
PI	2.68	2.89	83.58±7.58
PS	2.41	2.82	87.83±6.25
PE	1.84	3.83	87.73±7.77
PC	1.32	2.82	96.67±5.93

2.5 回收率

生物体液或组织中的内源性物质的回收实验，是一较为复杂的问题，一般多采用标准加入法。我们也采用标准加入法，在同一肺组织样品中加入磷脂标准，PI、PS、PE和PC标准的加入量分别为20 μg、20 μg、40 μg和80 μg，然后按前述方法提取磷脂，计算每种磷脂的回收率，结果见表2。四种磷脂的平均回收率均在80%以上，说明本方法的准确性较高。

2.6 应用实例

我们采用本法测定了10只正常大鼠肺组织、BLCF、肝组织及肝细胞线粒体磷脂含量，结果见表3。任何生物样品只要经过磷脂提取这一预处理步骤，均可采用HPLC分离测定，且快速简便。

表3 正常大鼠肺组织、BLCF、肝细胞线粒体磷脂含量

	肺组织 (mg/g肺)	BLCF (mg/g肺)	肝细胞线粒体 (μg/mg蛋白)
PI	4.04±0.88	0.48±0.09	8.12±0.77
PS	3.26±0.87	0.32±0.16	4.27±0.63
PE	4.81±1.22	0.64±0.26	94.30±8.40
PC	38.95±6.93	6.77±1.79	106.85±9.63

关键词 磷脂类/分析；色谱法，高效液相

中图法分类号 Q545

参考文献

1 Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissues. J Biol Chem, 1957; 226: 497

2 穆魁敏，刘秉锟，燕 生等. 肺表面活性物质的检测. 北京医科大学学报，1990; 22(5): 397

3 Chen SS, Kou AY. Improved procedure for the separation of phospholipids by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr, 1982; 227(1): 25

4 汤习锋，康格非，曾成鸣. 高效液相色谱分析生物膜磷脂. 生物化学与生物物理进展，1993; 20(5): 399

(收稿：1995-05-04；修回：1996-01-04)

(编辑 刘 鹏)

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术的改良及其应用

An improved method for SDS-PAGE and its application

胡承香 张玉纯 李 磊 顾长国 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第一研究室) 重庆，630042

生物样品分子量的测定方法有多种，近年来，SDS-PAGE用于生物样品的分离、纯化和鉴定评价较高，其主要作用是分辨率高，设备简化，方法易行，时间短，用量少(1～5 μg)，其分离水平达10^{-9}～10^{-12}克级，凝胶透明易干燥保存[1]。我们在创伤血清免疫抑制物的分离中发现，SDS电泳制胶容易失败，为克服这

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net