DOI:10.16016/j.1000-5404.1990.02.013

技术与方法

血清纤维蛋白肽的高效液相色谱定量测定

安 静 黎 蓝 杨宗城 王凤君 尤忠义（西南医院 烧伤研究所）

纤维蛋白肽A与B（FPA、FPB）是纤维蛋白原在凝血酶的作用下，从α链和β链的N末端释放出来的分别含16和14个氨基酸的低分子肽。具有许多生物活性，可能在急慢性炎症反应的发生发展中起重要作用。因而检测其在血液中的生成量，不仅能较确切地反映凝血酶的活性，而且对于揭示FPA、FPB在某些疾病中的作用，阐明疾病的发生机制，可能具有重要意义。

自1966年，Blamback[1]等第1次报告了纤维蛋白肽的分离方法后，陆续出现了纤维蛋白肽测定方法的报告。本文在Kehl[2][3]等人的方法的基础上加以改进所建立的高效液相色谱法(HPLC法)，简化了实验步骤，比较实用，能够直接检测血清FPA、FPB的含量，可广泛地应用于基础和临床医学的研究。

1 材料和方法

1.1 血清标本的处理

取血分离血清后，按1:5（血清:氯仿）的比例加入氯仿，充分混合后离心 10min（3000 rpm）。将上清移至另一试管，以双蒸水稀释1～2倍，置100℃水浴中煮沸 3～5 min，离心10min（3000 rpm）、取出上清，加入适量的甲醇，混合后静置1 h，离心15～20min（3000rpm），上清液经样品过滤器（0.2μm）过滤后收集在小试管内，置真空干燥器内干燥，用一定的流动相溶解后上柱分析。标准品FPA、FPB 经上述程序处理，以检验处理过程对待测物有无破坏作用。

1.2 实验仪器

Gilson高效液相色谱系统；M-116双波长紫外检测器：使用波长为210和230nm。AUFS为0.03。ODS C-18反相柱：10μm（4.6×250mm）。

1.3 试剂

FPA、FPB：人工合成，美国Sigma公司生产。凝血酶：上海生物制品研究所生产。其它试剂均为国产，分析纯。

1.4 色谱条件

流动相：为含0.05mol/L三乙胺的0.1mol/L磷酸，pH3.0。用前按39:61（v/v）的比例将甲醇和磷酸液混合，以0.2μm的微孔滤膜过滤并脱气后应用。流速：1 ml/min，压力120～130bar，室温 23～25℃。

1.5 色谱峰的定性与定量

本实验根据以下4个条件确认FPA、FPB的色谱峰：①根据标准品FPA、FPB的保留时间，找出待测样品中保留时间相同的峰。②向待测样品中加入少许标准品，观察标准品与待测样品的峰是否叠加。③将同一待测血液分为两份，一份加少许凝血酶，另一份不加凝血酶，观察加入凝血酶的待测样品吸收峰是否较未加者高。④检测待测样品FPA、FPB在波长210和230nm处的吸收率的比值是否与标准品一致。

1.6 本方法浓度与峰高呈良好的线性关系

FPA、FPB的相关系数均大0.99。本法的回收率FPA为78.14%，FPB为66.78%。日内变异系数FPA为5.34%，FPB为5.63%。日间变异系数FPA为7.82%，FPB为6.39%。

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

2 结果

本方法血清处理过程对待测物FPA、FPB无破坏作用。标准品FPA、FPB和血清FPA、FPB的色谱图1、2所示。在上述色谱条件下，FPB较FPA在柱上保留为强，故在FPA之后被洗出。环境温度为23℃

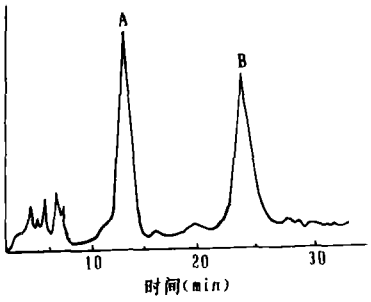


图1 标准品FPA-B色谱图

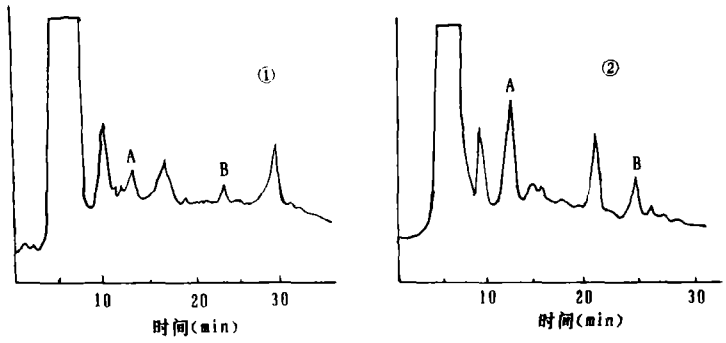


图2 血清FPA-B色谱图
①未加凝血酶 ②加凝血酶

时，FPA、FPB的保留时间分别是12.9和24.5min，如将甲醇的比例降为35%，保留时间明显延长，且有拖尾现象。如甲醇的比例为41%，保留时间缩短，血清中FPA、FPB的峰与其它未知峰重叠，分离度小于1.0。故甲醇比例为39%较合适。

血浆加入凝血酶孵育后，FPA、FPB的色谱峰明显高于未加凝血酶的同一血清标本（图2）。根据紫外扫描光谱得知：FPA、FPB在波长210nm处吸收率远远大于230nm处，其峰高比值FPA为10.45，FPB为10.60（附表）。向血清中加入一定量的标准品，发现标准品的峰与待测血清FPA、FPB的峰叠加。

附表 标准品与待测血清FPA、B在波长210和230nm处峰高比

	标准品	待测血清
FPA	10.45	10.39
FPB	10.60	10.56

3 讨论

有关FPA、FPB的测定方法，70年代以来，应用最多的是放射免疫法。该法比较敏感，但需制备放免药盒，操作复杂，人力物力消耗较大。80年代初，Kehl[2][4]等人报告了FPA、FPB测定的新方法—HPLC法。该法首先分离纤维蛋白原，然后加入凝血酶使其分解，检测分解物中的FPA、FPB的量。这种方法不仅操作复杂，且所测得的FPA和FPB含量不能直接反应血清FPA、FPB的实际浓度。本实验所建立的HPLC法，具有下述优点：① 不需预先纯化纤维蛋白原，血清处理过程简便。② 本方法未用凝血酶处理血液标本，所得结果受纤维蛋白原浓度影响较小，比较确切地反映了血液中FPA、FPB的实际含量。因而本方法可广泛地应用于基础和临床医学的研究，如检测某种病理条件下，使液FPA、PB含量的动态变与疾化病的关系等。

根据色谱理论[5]，同一物质在相同条件下，其保留时间一致，且在不同波长吸收率的

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

比值保持不变。本实验中不仅血清FPA、FPB的保留时间与标准品一致，且在波长210和230 nm处的吸收率比值亦与标准品十分接近。向待测物中加入标准品，标准品的峰与待测物中所确认的峰叠加，加入凝血酶孵育的血浆的FPA、FPB峰明显高于未加入者，说明在凝血酶的作用下，FPA、FPB从纤维蛋白原中释放出来。上述分析表明：我们所确认的峰为FPA、FPB的色谱峰。

参 考 文 献

1. Blamback K,et al. Human fibrinopeptides isolation characterization and structure. Biochem Biophy Acta 1966; 115:371
2. Kehl M, et al. Analysis of human fibrinopeptides by high-performance liquid chromatography. Hoppe-seyler's Z Physiol Chem 1981; 362:1661
3. Southan C, et al. Direct analysis of plasma fibrinogen-derved fibrinopeptides by high-performance liquid chromatography. Thromb Res 1986; 43:195
4. William F, et al. A simple one-step HPLC procedure for the purification of the NH_2-therminal plasmin derived Bβ1～42 peptide of human fibrinogen. Thromb Res 1986; 41:161
5. Krstulovic AM, et al.Identification of nucleosides and bases in serum and plasma sample by reversephase high-performance liquid chromatography. Anal Chem 1977; 49:2237

（收稿：1989.09.01；修回：1989.10.20）

气体色分析呼吸气体O_2及CO_2的含量

宋新明 蒋耀光（大坪医院 胸外科）

苟 俊（训练部 中心实验室）

自气相色谱问世以来，国外不少作者[1][2][3][4][5]利用气相色谱对呼吸气体进行分析，为临床上一些疾病的诊断提供了有效的手段。但国内此项工作开展较少。在探讨连枷胸“摆动气体”问题时，我们用家犬实验。利用气相色谱对气管，左、右主支气管内吸气相和呼气相O_2、CO_2的含量进行了分析。本文主要对其方法学问题加以讨论。

1 仪器及操作条件

日本岛津公司生产的GC-TAG 型气相色谱仪。操作条件：① 检测器为热导检测器。②色谱柱：选用3.2mmΦ×2.0m 的玻璃柱，内填GDX-104 分子筛（天津化学试剂二厂） 60～80目。③载气：N_2（四川分析化学九厂）99.9999%，尾气50ml/min。④温度：进样池温90℃，柱温50℃，检测器温度50℃。（5其它：桥流100mA，衰减：AT＝16，低速5 mm/min。

2 操作过程

2.1 气体样品的采集：用戊巴比妥钠30mg/kg静脉麻醉家犬，在气管镜的直视下分别于左、右主支气管插入细塑料管(L:50cm, 1d1.5mm)，末端置气管隆凸上5 cm处。用自制同步抽气架固定注射器作为气体

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