

反相高效液相色谱同时检测人血浆(清)中 V_A 和 $\alpha-V_E$

赵鹏 何崇乐 李杰 陈俊玲

(河南省肿瘤研究所, 郑州)

维生素是人类和动物生存所必需的营养物质。流行病学的调查和实验研究表明, 血浆(清)中 V_A 水平与癌的发生呈负相关, V_A 对生癌有防护作用^(1,2)。 $\alpha-V_E$ 作为一种生物抗氧化剂, 对致癌物和药物致癌具有防护作用^(3,4)。因此, 检测人血浆(清)中 V_A 和 $\alpha-V_E$ 水平, 进行营养与癌的研究, 具有重要意义。

高效液相色谱是近年来发展起来的一种快速、高效的分析分离技术。运用这一现代色谱工具进行人血浆(清)中 V_A 和 $\alpha-V_E$ 的检测, 国外先后报道了分别测定^(5,6)和同时测定⁽⁷⁻⁹⁾的方法。在这些工作的基础上, 我们建立了自己的反相高效液相色谱同时检测人血浆(清)中 V_A 和 $\alpha-V_E$ 的方法。

实验方法

(一) 仪器 高效液相色谱仪(岛津 LC-4A型)及其必需的附件, 微处理机(岛津 CHROMATOPAC (CR-2AX), 真空脱气装置(日本 ERMA 光学工厂, ERC-3320型)。

(二) 试剂及配制 所用试剂, 用前均经 G5^{*} 玻砂漏斗过滤, 再经超声波脱气使用; 各标准物乙醇液的浓度, 用紫外一可见分光光度计(日立 200-20型) 据消光系数 $E_{1\%}^{1cm}$ 进行标定。

1. 贮备液 用无水乙醇(A R, 北京化工厂) 分别溶解 V_A 、 $\alpha-V_E$ 和 V_A 醋酸酯(均为美国 SIGMA 纯品) 1.0、10.0和1.0mg, 得相应各贮备液(0.1、1.0和0.1mg/ml)。

2. 工作液 临用前取贮备液加无水乙醇配得。终浓度: V_A 是20,40,80,160和200ng

/100ml; $\alpha-V_E$ 是400, 1000, 1600, 2200和2800ng/100 μ l; V_A 醋酸酯是25和50ng/100 μ l。(V_A 醋酸酯以下简称 V_A 酯)

以上六种溶液均于-20 $^{\circ}$ C 存放。

(三) 样品制备 由郑州血站采得献血者全血, 经离心, 分出血浆层, 混匀, 用微量加样器(法国 GILSON) 移取100 μ l, 分装于1.5ml 聚乙烯(PE) 带盖离心管中, -20 $^{\circ}$ C 存用。制样前将血浆解冻至室温, 加入100 μ l 无水乙醇, 旋混15秒钟沉淀蛋白, 再立即加入200 μ l 正己烷, 再旋混2分钟萃取 V_A 和 $\alpha-V_E$ 。接着以5000rpm 离心2分钟, 取上层己烷液100 μ l 移入另一PE管, 室温下以缓氮气流吹干, 加入含有25ng/100 μ l V_A 酯(内标物) 的乙醇液, 再旋混半分钟, 溶解管中残留物, 最后用微注射器吸10 μ l 注入色谱进样器进行分析。

(四) 色谱条件和结果处理

1. 色谱条件 色谱柱 ZORBAX ODS 粒径5 μ m, 4.6mm (ID) \times 25cm (美国 Du pont); 流动相: 甲醇(A R, 北京化工厂) 经5 μ m 吸滤器(岛津) 过滤并由 ERC-3320 脱气; 流速2 ml/min, 柱温50 $^{\circ}$ C, 洗脱时间6分钟; UV 检测波长: 前4分钟325nm, 后2分钟292nm。

2. 结果处理 我们用时间窗法及由样品的 V_A 和 $\alpha-V_E$ 与加入的 V_A 和 $\alpha-V_E$ 标准物的色谱峰迭加⁽⁹⁾来定性, 以峰面积比的内标法进行定量。

结果与讨论

(一) 人的血浆萃取物加已知量的内标物的典型色谱如图1。

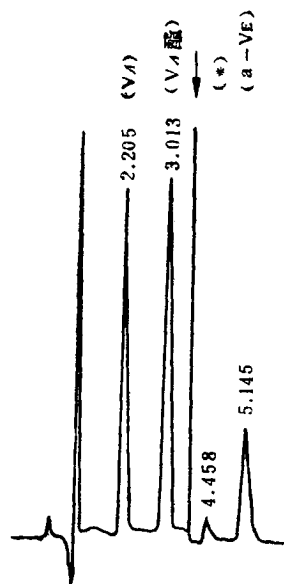


图1 一个正常人血浆萃取物加入VA酯(内标物)后的HPLC图

色谱条件见正文; 箭头示在4分钟时改变波长。(*处: 可能是β, α-VE)

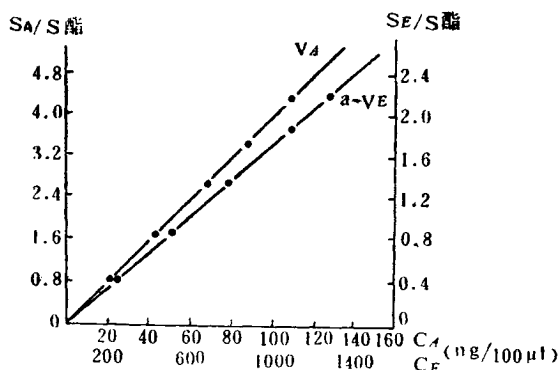


图2 人血浆中VA和α-VE水平测定的标准曲线

(二) 标准曲线 用VA或α-VE积分峰面积与VA酯峰面积之比, 对VA或α-VE标准物工作液浓度在直角坐标上作图, 是线性的, 见图2。经用最小二乘法作线性回归分析得回归方程:

$$VA \text{ 标准曲线 } y = 0.03930x + 0.00673, \\ r = 0.999992;$$

$$\alpha\text{-VE 标准曲线 } y = 0.00174x + 0.00006, \\ r = 0.999999$$

重复实验, 结果一致。

(三) 灵敏度 在本实验条件下, VA和α-VE的最小检出量分别是 0.14ng/100μl 和 3.15ng/100μl。

(四) 回收率 历经制样全过程, 得加至血浆中已知量的 VA和α-VE的平均回收率

分别是90.54±2.81%和97.02±2.87%, 变异系数分别为3.10%和2.98%。

(五) 重现性 天内的(同一份血浆一天作10次双样分析) 变异系数CV, 对VA的均值42.39是2.17%, 对α-VE的均值486.77是3.29%。天间的(同一血浆于-20℃存放, 连作10天分析; 每天多个样品, 每个样品作双样检测) 变异系数CV, 对VA(均值42.70)是1.41%, 对α-VE(均值482.14)是2.21%。此外, 内标物配制的重现性也很好。两个月两次配制贮备液, 十次配工作液, 平均1ng内标液相当于701.2面积单位, 而CV是0.85%, SD是0.609。

(六) 稳定性 实验表明: 于-20℃存放时, VA和α-VE贮备液存放近5个月, 色谱峰无变化, 这趋于与Driskell的结果(9)一致。而VA酯贮备液至少可在-20℃时存放一个月。在-20℃时, VA酯工作液至少一周是稳定的, 这与Bieri的结论(7)一致。而VA和α-VE工作液在-20℃时, 两周后无大变化, 甚至70天后也仍稳定。此外, -20℃时血浆存放的时间和融冻周期, 对血浆中VA和α-VE水平似无什么影响(均无显著性差异)。

血浆萃取物-20℃存放的稳定性允许在制样后过几日再作色谱分析。萃取后立即制备、定量的结果与萃取后存放数天、两周的结果无显著性差异(P>0.05)。

(七) 柱效 文献(9)报道了用于此实验的色谱柱的寿命几乎是无限的; 一根柱子经700余次进样, 结果无明显影响(仅保护柱换一次树脂)。我们未用保护柱; 进样逾千次, 柱效仅稍有下降。

(八) 反相HPLC-UV检测法的优越性 文献报道 HPLC-UV法与经典的测VA的三氟醋酸(TFA)显色法相比, 定量结果无显著差异(7); 与测α-VE的先TLC、后Emmerie-Engel显色法相比, 结果一致(7,10)。而HPLC-UV法快速(从制样到色谱定量总耗时15分

钟),方法灵敏度高,血浆用量少(仅100μl)(5,8,9),精密度高,重现性好,操作简便,试剂的毒性小,且几乎无干扰物存在,因而更宜于人群普查和临床应用。我们选用V_A醋酸酯一种内标物,而Bieri选用了两种(7),De Leenheer选用的一种是Tocol(8)。正如Driskell指出的那样,一种内标物可节省洗脱时间,减少处理的峰数,而精密度和准确度不变(9)。我们选用V_A和α-V_E乙醇液的UV最佳吸收波长325和292nm检测,比单独用280nm(7)、290nm(9)及用292nm(8)检测更灵敏,且比文献(7-9)减少了内标物的用量。此外,制样时不经皂化处理也同样得到满意的回收率(5)。最后,与采用峰高比定量的方法(8,9)相比较,我们采用的峰面积比定量法应当有更高一些的准确性。

我们以此法对食管癌高发区林县正常人进行了V_A和α-V_E的抽样分析,结果表明个体间V_A和α-V_E水平差异较大,说明饮食状况和生活水平不一;这些个体血浆的V_A和α-V_E水平的均值比欧美人的(8,9)低,说明其营养较差。林县人血浆中V_A和α-V_E水平较低是否与食管癌高发正相关,尚待进一步作人群调查。

致谢: 本工作所用标准物均由中国医科院肿瘤所病困室馈赠。实验初期,王天丁、秦裕民同志参加了技术工作,特此一并致谢。

参 考 文 献

(1) E.Bjelke, *Int. J. Cancer*, 15,561 (1975).

(2) D.Jeremy et al., *J.N.C.I.*, 66(1),7 (1981).
 (3) N. Wald et al., *Nutr. & Cancer*, 1(3),68 (1979).
 (4) M.G. Cook et al., *Cancer Reseach*, 40(4), 1329 (1980).
 (5) L.J.Hetam et al., *J.Lipid Reseach*, 20,639 (1979).
 (6) B.J.Zaspel et al., *Anal. Biochem*, 130(1),146 (1983).
 (7) J.G. Bieri et al., *Am. J. Clin. Nutr.*, 32, 2143 (1979).
 (8) A.P.De Leenheer et al., *J.Chromatogr.*, 162, 408 (1979).
 (9) W.J.Driskell et al., *J.Chromatogr.*, 231,439 (1982).
 (10) J.G.Bieri et al., *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, 120, 554,1965.

(收稿日期: 1985年6月)

Determination of V_A and α-V_E in Human Plasma (Serum) by Reversed-Phase HPLC Zhao Peng, He Chongle, Li Jie and Chen Junling, *Henan Tumor Institute, Zhengzhou*

This paper describes a rapid, sensitive and reproducible procedure for the simultaneous determination of retinol (V_A) and α-tocopherol (α-V_E) in human plasma (serum) by high performance liquid chromatography (HPLC) and UV detection. 100μl of plasma (serum) were pretreated, including deproteinization, extraction, evaporation and drying. The residue redissolved in EtOH containing the internal standard of retinyl acetate and then analysed by HPLC with a ZORBAX ODS column and a mobile phase of 100% MeOH. Detection wavelengths were at 325nm and 292nm for V_A and V_E, respectively. The recovery for V_A and α-V_E using this method are 90.54±2.81% and 97.02±2.87%, respectively. The minimum detectable limits are 0.14ng/100μl for V_A and 3.15ng/100μl for α-V_E. The lifetime of the HPLC column used in this work is over 1000 runs. This method proved useful in clinical and epidemiological work.

鬼臼脂素及其木质素的高效液相色谱分析

段志兴 李景新 田 暄 陈耀祖

(兰州大学化学系)

桃儿七 (*Podophyllum emodi* Wall. Var *Chinensis* Sprague)(1)根茎中分离得到的鬼臼脂素是一种具有很大毒性的抗癌天然产物(2),是抗癌新药VP16-213和VM26等

的半合成原料(3,4,5)。

早期文献报道,鬼臼脂素定量分析用薄层色谱—洗脱分光光度法(6,7),该法步骤多、费时、斑点定位困难,因而误差较大;