

高效液相色谱法固相酶检测系统测定人体液 结合型胆汁酸的研究

李炳源 芮理 陈玉泉 沈洪薰

(南通医学院)

人体液中胆汁酸水平异常能灵敏地反映出消化系统病变。胆汁酸测定对于肝、胆病变诊断、治疗及基础医学研究有重要价值^(1,2)。

本法用反相色谱分离胆汁酸，柱后串接3 α -羟基类固醇脱氢酶(3 α -HSD)固相酶柱，胆汁酸在酶催化下，将底物辅酶I(NAD)定量转换成NADH，荧光检测NADH，从而定量测定胆汁酸。方法特异性强，灵敏度高，样品处理简便，分析速度快。该法国外已有报道⁽³⁻⁵⁾，国内尚未见。

实验部分

(一) 仪器 高效液相色谱仪(A.A.)型，Resolve C₁₈ 色谱柱(5 μ m, ϕ 3.9 \times 150mm)，SEP-PAK C₁₈ 样品预处理柱。美国Waters公司产。

(二) 试剂 苏二糖醇(DTT)，NAD，3 α -HSD，美国Sigma Co.产。氨基基受控多孔玻璃珠200—400目，51.5nm(AP-CPG)，美国Electro-nucleonics Co.产。自制甘氨酸熊脱氧胆酸(GUDCA)，牛磺熊脱氧胆酸(TUDCA)，甘氨酸胆酸(GDCA)，牛磺胆酸(TDCA)，甘氨酸鹅胆酸(GCDCA)，牛磺鹅胆酸(TCDCA)，甘氨酸胆酸(GCA)，牛磺胆酸(TCA)，纯度大于99%。

流动相：A液100ml乙腈与317ml、0.005mol/L K₂HPO₄液混合；B液100ml乙腈与270ml、0.005mol/L K₂HPO₄混合，分别用磷酸调pH7.0，脱气备用。

反应液：1L0.5mol/L NaCl液中加入K₂HPO₄1.36g，EDTA·2Na300mg，NAD250mg，DTT25mg，溶解，用6mol/L NaOH液调pH8.0，备用。

(三) 固相酶柱制备 400mgAP-CPG与3ml2.5%戊二醛混合，25℃脱气30min，常压放置1小时，在砂芯漏斗上以纯水洗净、抽干。与含50单位3 α -HSD的pH7.2，0.01mol/L K₂HPO₄液1.5ml混合，0℃脱气30min，倒入装柱罐，用0.5mol/L NaCl液将其压入 ϕ 3 \times 50mm钢柱，2ml/min，30min，即可。

(四) 样品制备 人胆汁：精确吸取25 μ l胆汁，与2mlpH7.0的0.5mol/L磷酸缓冲液混合，并以注射器推入SEP-PAK柱，然后分别用10ml纯水、3ml10%丙酮、10ml纯水洗柱，3ml甲醇洗脱胆汁酸，真空干燥洗脱液，用2ml流动相溶解，0.22 μ m膜过滤，收集滤液，备用。

人胃液：胃镜直视下收取胃液，离心2000g 10min，吸取上层液2ml。其余处理同上。

(五) 色谱条件 荧光检测E_x340nm，E_m460nm；梯度洗脱：流速0.4ml/min，0—1minA液，1—15minB液，15min后A液。分析周期30min，详见图1—3。

结果与讨论

(一) 固相酶柱使用及保存 酶柱使用时应防止反应液停泵，流动相单独流入，停机后应存放于0.5mol/L NaCl液4℃冷藏(表1)。酶反应最适条件为柱温25℃，反应液

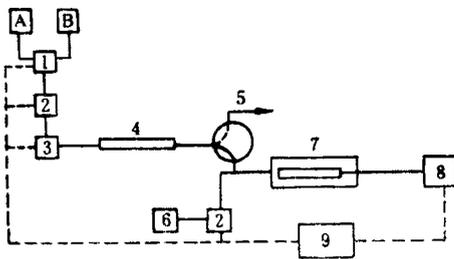


图 1 胆汁酸HPLC全自动分析系统

1. 阀, 2. 泵, 3. 自动进样器, 4. 色谱柱, 5. 切换阀, 6. 反应液, 7. 3α-HSD酶柱, 8. 荧光检测器, 9. 微机。

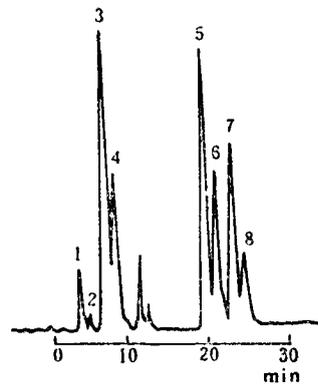


图 3 胃液胆汁酸色谱图
峰号顺序同图 2。

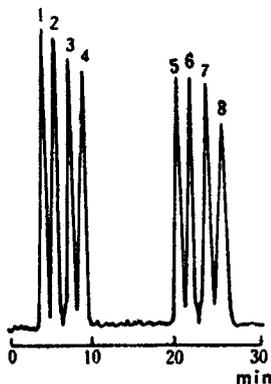


图 2 胆汁酸标准色谱图

峰号1. GUDCA, 2. TUDCA, 3. GCA, 4. TCA, 5. GCDCA, 6. TCDC A, 7. GDCA, 8. TDCA.

NAD 含量 250mg/L, pH8.0, 流速0.8ml/min.

(二) 本法检测线性范围 检测线性范围为0—500ng, 回收率等试验见表 2。

(三) 临床应用 测定35例胃液标本, 结果统计见表 3。

表 1 酶柱存放不同溶剂酶活力损失情况

存放溶剂	200ngGCA峰高mm(n=5)					
	1月	2月	3月	4月	5月	6月
KH ₂ PO ₄ pH:7.0 0.01mol/L	102	98	88	63	41	32
超纯水	105	96	85	56	34	28
NaCl 0.5mol/L	103	102	100	94	92	90

表 2 方法回收率、重复性、线性关系、最低检知量

胆汁酸	回收率 (%)	重复性 CV% (n=9)	线性方程 相关系数	最低检知量 (ng)
GUDCA	93.28	2.1	0.9990	11.9
TUDCA	98.87	2.2	0.9990	14.9
GCA	93.67	2.1	0.9975	14.3
TCA	93.77	3.4	0.9946	14.9
GCDCA	89.31	1.2	0.9910	14.1
TCDC A	87.76	1.8	0.9932	14.6
GDCA	89.74	3.7	0.9967	16.3
TDCA	94.97	3.1	0.9871	23.4

表 3

35例胃液胆汁酸测定结果统计表 μmol/dL

胆汁酸	胃癌组 n=9 X;SD	胃溃疡组 n=9 X;SD	慢性胃炎组 n=9 X;SD	正常组 n=8 X;SD
TUDCA	1.184 0.2480	0.5033 1.125	0.8822 2.264	0.0088 0.02489
GUDCA	1.173 1.715	0.6692 0.8433	0.6430 0.9484	0.0396 0.0734
GCA	13.48 11.33	6.025 4.975 ₂	8.372 10.65	0.9890 0.9847
TCA	4.482 3.263	1.978 1.915	2.408 3.293	0.4943 0.9140
GCDCA	13.86 11.66	5.166 3.333	4.908 6.129	0.5184 0.7703
TCDC A	6.065 3.948	1.944 1.327	1.830 2.152	0.2093 0.4270
GDCA	5.714 10.13	2.678 1.479	2.132 3.349	0.1852 0.2156
TDCA	1.123 1.589	0.7766 1.193	0.7609 1.133	0.0917 0.2592

参 考 文 献

- (1) L.M. Demers et al., *J. Gastroenterology*, 68, 881(1975).
 (2) S. Barnes et al., *J. Clin. Path.*, 28,506(1975).
 (3) Toyohide Takeuchi et al., *J. Chromatogr.*, 258, 125(1983).
 (4) S.Hasegawa et al., *J. Liq. Chromatogr.*, 7(11), 2267(1984).
 (5) Morimasa Hayashi, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 338,195(1985).

(收稿日期: 1988年3月30日)

Studies on High Performance Liquid Chromatographic Quantitation of Conjugated Bile Acids in Human Body Fluid with Immobilized Enzyme Detection System

Li Bingyuan, Rui Li, Chen Yuquan and Sheng Hongyun, Nanjing Medical College, Jiangsu

Using reversed-phase HPLC with post-column immobilized enzymatic reaction technique, we established a highly sensitive and specific quantitating method for the bile acids in human body fluid. Meanwhile, the best conditions for the enzymatic reaction and enzymatic activity protection were studied. The recovery, reproducibility, detectable limit and detection linear range were 88—99%, 1.2—3.7% (n=9), 12—28ng and 0—500ng, respectively. The enzymatic column activity can last for at least six months under these conditions. With this method, bile acids of gastric fluid from 35 patients were determined.

丙烯腈微生物转化产物的反相高效液相色谱分析

李文忠 张鸿翼

(中国科学院微生物研究所, 北京)

丙烯腈(Acrylonitrile, 简称AN)及其微生物转化产物丙烯酰胺(Acrylamide, 简称AM)和丙烯酸(Acrylic Acid, 简称AA)的混合样品, 通常采用气相色谱法(GC)分析(1—3)。GC法要求分析系统保持恒定高温, 且需将水样进行特殊的预处理。用HPLC分析此类化合物, 国内尚未见报道。我们用高效液相色谱法(HPLC)在常温下对丙烯腈及其微生物转化产物直接进行了分离分析, 重现性好, 周期短, 适用于批量样品的连续测定。

实 验 部 分

(一) 仪器与试剂 201型高效液相色谱仪(WATERS, LTD, Japan); DU-7HS紫外分光光度计(BECKMAN, USA)。AN, AM, AA和甲醇(CH₃OH)均为国产分析纯试剂。

(二) 标准溶液的配制 AN 20mmol/L, AM及AA均为15mmol/L, 配制与上述相同浓度的AN, AM和AA的混合标液。

(三) AN的微生物转化产物的制

备 将丙烯腈转化菌接入含AN的牛肉汁细菌培养基中, 于28℃振荡(170r/min)培养三天, 离心取上清液进行测定。

(四) 色谱条件

1. 分离柱及流动相: 由分子结构推断, 化合物极性顺序为AA>AM>AN。因此, 可采用非极性分离柱反相分配色谱进行分离分析。在室温条件下选用C₁₈径向加压柱(RADIAL-PAK CARTRIDGE MICROBONDAPAK C₁₈), 以甲醇—水混合液做流动相。

2. UV检测波长: 用DU-7HS分光光度计在205—300nm波长范围对AN, AA和AM的标液扫描(图1), 按其对应的 λ_{max}

(分别为214.0, 221.0和239.0nm)计算, 克分子吸光度分别为119.8, 205.5和219.3。为均衡分析灵敏度, 选用214.0nm为UV检测器使用波长。

3. 流动相及流速: 固定流动相流速, 改变甲醇和水的百分比率, 注入等量混合标液, 采用外标面积定量法, 由M730数据处理机自动完成相应色谱峰的定性和定量分