

# 高效液相色谱法定量分析人胎肝细胞上清液及 细胞裂解液中7-酮基胆固醇\*

张庆林 吴祖泽 曹菊荣 薛惠华

(北京放射医学研究所 北京 100850)

**提 要** 用高效液相色谱法定量分析了7-酮基胆固醇在胎肝细胞上清液及细胞裂解液中的含量。色谱柱为 $\mu$ -Porasil SiO<sub>2</sub>柱,流动相为正己烷:异丙醇(91:9, V/V)。方法回收率高、色谱重复性好、分析速度快。  
**关键词** 高效液相色谱法, 7-酮基胆固醇, 人胎肝细胞上清液, 人胎肝细胞裂解液  
**分类号** O658/Q54

## 1 前言

7-酮基胆固醇(7-ketocholesterol, 7-KC)是主要的胆固醇自氧化产物,存在于人及动物的多种组织中,并具有多种生物学作用<sup>[1]</sup>,如细胞毒性、抑制胆固醇合成酶等。国外已报道7-KC在人血浆、动物组织中的含量测定<sup>[2]</sup>。我们过去的工作证明,在胎儿组织中存在一类体内外具有抑制肿瘤细胞生长的低分子抑瘤物<sup>[3]</sup>,从胎肝细胞悬液中提取、分离得到一体外对多种瘤株细胞具有选择性抑制活性物质,经结构鉴定为7-KC(另文报道)。本文用高效液相色谱法定量分析该化合物在胎肝细胞上清液及细胞裂解液中的含量,以反映该物在细胞内外的含量分布。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器和试剂

Waters液相色谱仪,包括600泵、996二极管阵列检测器、2010 Millennium色谱管理系统、7725进样器。7-KC标准品为Sigma产品,纯度约90%,经中压液相色谱分离,纯度达99.2%。异丙醇、正己烷为分析纯,经重蒸。

### 2.2 色谱条件

色谱柱: $\mu$ -Porasil SiO<sub>2</sub> 10 $\mu$ m, 4.6mm  $\times$  300mm (国家色谱研究分析中心,大连)。

流动相为正己烷:异丙醇=91:9(V/V),流速1.0mL/min。

二极管阵列检测器,设定波长范围205~260nm,7-KC最大吸收峰为233nm,选取该波长色谱图做定量分析。标准品及样品的色谱图见图1。

### 2.3 胎肝细胞上清液及细胞裂解液的制备<sup>[4]</sup>

从水囊引产的4~6个月的胎儿体内取出肝脏,用生理盐水制成单细胞悬液,有核细胞浓度为 $1 \times$

$10^7$ 个/mL。取10.0mL该细胞悬液经1500r/min离心后分离收集上清液,称为胎肝细胞上清液(FLS)。在沉淀细胞中加入10.0mL蒸馏水,置4℃冰箱放置24h,经3500r/min离心后分离收集上清液,称为胎肝细胞裂解液(FLL)。

### 2.4 胎肝细胞上清液及裂解液中7-KC的提取

按文献<sup>[2]</sup>方法(略加改进)提取。吸取1.0mL胎肝细胞上清液和裂解液分别加入10mL具塞离心管中,加入4.0mL氯仿-甲醇混合液(2:1, V/V),振荡3min后,4000r/min离心10min,样品分为两层,仔细吸取有机层(下层)。上层溶液再加3.0mL提取液提取一次,合并有机层,吸取1.0mL蒸馏水加入有机层,振荡,离心,吸取下清液,放入尖底瓶中,N<sub>2</sub>吹干。分析时用50 $\mu$ L或100 $\mu$ L异丙醇溶解样品,进样20 $\mu$ L。

## 3 结果与讨论

### 3.1 7-KC的分离及定性

在上述色谱条件下,7-KC能够与其它脂类物质如胆固醇良好分离,见图1。色谱重现性好,二极管阵列检测器检测7-KC峰纯度良好。对7-KC的定性采用下列方法:外加标准品,样品中的7-KC与标准品的保留时间一致,二极管阵列检测器的实时紫外光谱与标准品一致。定量分析采用外标法。

### 3.2 标准曲线、线性范围及最小检测量

7-KC的标准曲线在20ng至1440ng范围内呈良好的线性关系。曲线方程 $Y = 54386X + 133.64$ ,  $r = 0.9997$ 。最小检测量为1ng水平。

### 3.3 精密度

对9号试液(0.102 $\mu$ g)日间6次测定的结果( $\bar{X} \pm SD$ )为 $0.0977 \pm 0.0021$ ,变异系数 $CV = 2.15\%$ 。

\* 国家自然科学基金资助项目(92051030)  
本文收稿日期:1995-08-03,修回日期:1995-10-12

3.4 回收率试验

结果见表 1, 平均回收率为 94.2% ~ 103.4%。

3.5 胎肝细胞上清液及裂解液中 7-KC 含量测定

结果见表 1。胎肝细胞上清液中 7-KC 的含量明

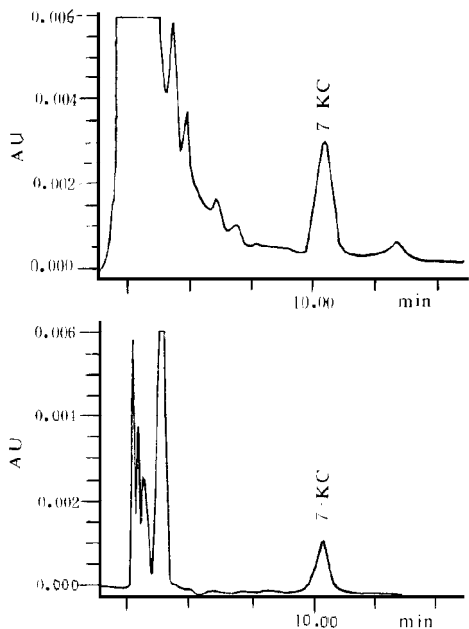


图 1 7-KC 分离色谱图

Fig. 1 Chromatogram of 7-ketocholesterol

上图: 人肝细胞悬液样品, 下图: 标准品。

Upper part: 7-KC in human fetal liver cell supernatant; Lower part: 7-KC standard.

显高于胎肝细胞裂解液, 反映了细胞内外 7-KC 含量的差异。

表 1 各样品外加 100mg 后 7-KC(9 号试样)的回收率结果

Table 1 Recovery of 7-KC(100mg) from human fetal liver cell supernatant and lysate

样 品 Sam ple	7-KC 测定值( $X \pm SD$ ) 7-KC amounts (kg/L)	平均回收率 Average recovery
细胞上清液 Cell supernatant	0.221 ± 0.0180	
细胞上清液+ 7-KC Cell supernatant+ 7-KC (n= 4)	0.322 ± 0.013	101%
细胞裂解液 Cell lysate	0.070 ± 0.012	
细胞裂解液+ 7-KC Cell lysate+ 7-KC (n= 4)	0.162 ± 0.005	92%

利用本法测定 7-KC 含量, 样品处理操作方便, 回收率高, 色谱重复性好, 分析速度快, 并可用于其它液体样品如血清中 7-KC 含量的测定。

参 考 文 献

- 1 Smith L L, Johnson B H. Free Radical Biol Med, 1989; 7: 285-332
- 2 Csallany A S, Kindom S E, Addis P B *et al.* Lipid, 1989; 24: 645
- 3 Wu C T, Pei X T, Cong P J. Exp Hem atol, 1989; 17: 304
- 4 Wu C T, Wang Y Z, Pei X T. Leuke Res, 1989; 13 (9): 825-831

## Quantitative Determination of 7-Ketocholesterol in Human Fetal Liver Cell Supernatant and Lysate by High Performance Liquid Chromatography

Zhang Qinglin, Wu Chutse, Cao Jurong and Xue Huihua

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing, 100850)

**Abstract** 7-Ketocholesterol(7-KC), which is a major oxidation product of cholesterol and is selective cytotoxic to tumour cells, was isolated from human fetal liver. A fast, sensitive method of high performance liquid chromatography for the quantitation of 7-KC has been developed and applied to the determination of 7-KC in human fetal liver cell suspension. In this procedure a mixture of 2: 1 chloroform-methanol (V/V) was used as extraction solvent. The extract was washed with distilled water and then evaporated to dryness under N<sub>2</sub>. An adsorption liquid chromatographic system used included  $\mu$ -Porasil SiO<sub>2</sub> column, hexane: iso-propanol (91: 9) mobile phase and UV detector at 233nm. It was found that the level of 7-KC in human fetal liver cell supernatant was higher than in liver lysate.

**Key words** high performance liquid chromatography, 7-ketocholesterol, human fetal liver cell supernatant, human fetal liver cell lysate