

高效液相色谱法测定全血中骨碱性磷酸酶的活力

张咏梅¹, 白秀珍¹, 陈占文², 张春先³

(1. 锦州医学院, 辽宁 锦州 121001; 2. 锦州妇幼保健院, 辽宁 锦州 121000; 3. 锦州工学院, 辽宁 锦州 121000)

摘要:建立了测定全血中骨碱性磷酸酶(BALP)的高效液相色谱法(HPLC)。色谱柱为 Spectra Physics ODS 反相柱, 以 $V(0.01 \text{ mol/L}$ 乙酸, $\text{pH} 4.8) : V(\text{甲醇}) = 70 : 30$ 的溶液为流动相, 流速为 0.8 mL/min , 检测波长为 275 nm 。当 BALP 的质量浓度为 $8 \sim 200 \text{ mg/L}$ 时, 其活性对峰面积呈良好的线性关系 ($r = 0.996$), 检测限为 3 ng 。该方法简便、快速、可靠, 可用于临床测定全血中的 BALP。

关键词: 高效液相色谱法; 骨碱性磷酸酶; 全血

中图分类号: O652.63; Q55

文献标识码: B

文章编号: 1000-8713(2000)03-0235-02

1 前言

碱性磷酸酶(ALP)是广泛存在于肌体内的一组水解酶类, 特别是在骨骼、肝、肾、胎盘、胆汁中含量较高^[1]。肝、胆疾患, 甲状腺、甲状旁腺机能亢进及某些肿瘤都可导致血清 ALP 升高, 因此 ALP 常被作为临床早期较敏感的理化指标之一^[2,3]。通常测得的血清 ALP 是各型 ALP 的总活性。由于各型 ALP 对外界影响因素反应不同, 因而其同工酶的变化对鉴别诊断更具有特异性。血清 ALP 活性升高多见于属于 ALP 次级同工酶的肝型和骨型 ALP (L/BALP)^[4], 其氨基酸顺序相同, 仅糖化程度略有差别, 因此 ALP 次级同工酶理化性质又有所差别。鉴别 BALP 的电泳法和非电泳法虽可将 BALP 与 LALP 完全分开, 但不便于临床常规测定。国外有人^[5,6]用离子交换色谱、亲和色谱等分离和测定 ALP 同工酶, 而国内尚未见报道。本实验结合免疫浓缩技术, 采用 HPLC 法分析 BALP 活性。本法不需梯度洗脱, 且不受肝、胆、肠等非骨型 ALP 同工酶干扰, 适用于血清 BALP 的定量分析。

2 材料与方法

仪器 美国光谱物理公司 HPLC 系统, 包括 IBM personal system/2 model 55SX 色谱站, SP8450 检测器, SP8800/8810 高压输液泵。

药品 甲醇、磷酸苯二钠、磷酸均为分析纯。BALP 试条、稀释液 (10 mmol/L , $\text{pH} 7.4$ 的磷酸缓冲液)均由北京协和医药科技开发总公司研制。

苯酚标准液 苯酚(上海试剂三厂)蒸馏后称取 1.5 g 溶于 0.1 mol/L HCl 至 1000 mL 。取上述苯酚溶液 25 mL 用碘量法标定, 得到溶液中苯酚的质量

浓度为 1.323 g/L 。将上述溶液用棕色瓶存于冰箱中, 作为苯酚标准储备液。

测定原理 全血在 BALP 试条内经血浆分离、转运、预处理, 到达反应膜上, 与固相亲和素发生亲和反应后被特异结合在膜上。用 HPLC 测其活性。

实验动物 2 月龄的 SD 大鼠, 体重 (100 ± 15) g , 本院动物中心提供。

样本处理 大鼠剪断尾梢, 弃去第一滴血, 取全血 $30 \mu\text{L}$ 加到 BALP 试条的加样孔里, 待血液全部渗入后, 加 1 滴稀释液 (约 $25 \mu\text{L}$), 间隔 30 s , 再加 2 滴稀释液, 于低温下放在一个有浸水纱布的铝饭盒中密封, 4 h 后以试条反面吸附垫有淡黄色血浆渗出为度, 剥去试条上保护膜, 在蒸馏水中轻轻摆动清洗, 显露出中间反应膜, 在滤纸上吸干水分, 剪下反应孔, 加入 $10 \mu\text{L}$ 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液 ($\text{pH} 10.2$), $10 \mu\text{L}$ 0.1 mol/L 的磷酸苯二钠试剂及 $80 \mu\text{L}$ 双蒸水, 混匀, 于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中准确保温 5 min , 立即加入 $50 \mu\text{L}$ 体积分数为 25% 的三氯醋酸溶液, 终止上述酶促反应, 冰浴 10 min 后离心 (8000 r/min) 10 min , 吸取上清液 $10 \mu\text{L}$ 备用。

色谱条件 色谱柱为 Spectra Physics ODS 反相柱 ($22 \text{ cm} \times 4.6 \text{ mm i. d.}$); 检测器灵敏度 0.05 AU/mV , 检测波长 275 nm ; 流动相为 $V(0.01 \text{ mol/L}$ 乙酸, $\text{pH} 4.8) : V(\text{甲醇}) = 70 : 30$ 的溶液, 流速 0.8 mL/min ; Spectra-Focus HPLC 软件。

计算 根据酶活力单位定义, $1 \mu\text{L}$ 大鼠全血在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} 10.2$ 的条件下反应 1 min , 催化底物生成 $1 \mu\text{L}$ 产物(苯酚)所需要的酶量为一个酶活力单位。血浆中酶活力计算公式为酶活力 (U/L) =

$\frac{\rho(C_6H_5OH)}{5 \times 30}$, 式中 $\rho(C_6H_5OH)$ 可根据标准苯酚的质量浓度 (g/L) 与峰面积的关系得到。酶反应时间为 5 min, 每份标本全血 30 μ L。

3 结果

3.1 线性范围与检测限

取空白血样 30 μ L, 加入一定量标准苯酚溶液, 稀释成不同浓度的标准苯酚液, 依次进行 HPLC 分析。在标准苯酚质量浓度为 8~200 mg/L 范围内, 以其质量浓度 Y (mg/L) 对平均峰面积 X 进行回归分析, 得回归方程: $Y = 1.83 \times 10^{-7}X + 8.35 \times 10^{-3}$, $r = 0.996$ 。信噪比为 2:1 时, 测得最低检测限为 3 ng。

3.2 样品分离效果

按前述色谱条件分离全血样品(见图 1)。苯酚出峰时间为 9.80 min, 峰形陡尖, 杂质不干扰测定。

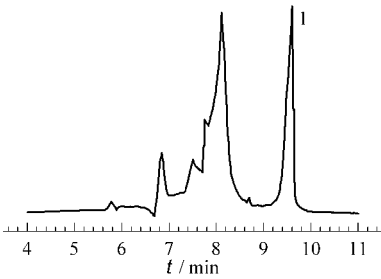


图 1 血清 BALP 活力(峰 1)色谱图
Fig.1 Chromatogram of BALP activity (peak 1) in serum

3.3 回收率与精密度试验

按“3.1”方法, 在 144, 388, 480, 528, 960 μ g/L 添加浓度下做回收试验, 每个试验平行做 5 次, 平均回收率为 97.9%~98.6%。精密度测试结果见表 1。

表 1 精密度试验 ($n=6$)

测定序号 No. of test	酶活力 Activity of enzyme (U/L)	平均 RSD Aver. RSD (%)
1	3.87 ± 0.019	0.49
2	3.57 ± 0.030	0.84
3	3.96 ± 0.012	0.30
均值 Average	3.80 ± 0.020	0.5

参 考 文 献

- 1 Ferguson M A, Williams A F. Science, 1988, 239(4): 268-275
- 2 Byers D A, Fernly H N, Walker P G et al. Eur J Biochem, 1972(29): 197-204
- 3 Wen Qing-cheng(文庆成). China J Med Test(中华医学检验杂志), 1982(5): 221-223
- 4 Li Gui-fang, Tang Cheng-qing(李桂芳, 唐澄清). Chin J Clin Test(临床检验杂志), 1988, 6(3): 148-149
- 5 Schoenau E, Herzog K H, Boehles H J. Clin Chem, 1986, 32(5): 816-818
- 6 Davld J, Anderson D W, Earl K S et al. Clin Chem, 1990, 36(2): 240-246

Determination of Activity of Bone Alkaline Phosphatase in Whole Serum by High Performance Liquid Chromatography

ZHANG Yong-mei¹, BAI Xiu-zhen¹, CHEN Zhan-wen², ZHANG Chun-xian³

(1. Jinzhou Medical College, Jinzhou 121001, China; 2. Jinzhou Woman and Child Health Station, Jinzhou 121000, China; 3. Jinzhou Industry University, Jinzhou 121000, China)

Abstract: An analytical method has been established for the determination of bone alkaline phosphatase (BALP) activity using high performance liquid chromatography (HPLC). The stainless steel column was 22 cm × 4.6 mm i. d. packed with totally porous, spherical silica particles. A solution of methanol and 0.01 mol/L CH₃COOH (30/70, V/V) adjusted to pH 4.8 was employed as the mobile phase. The flow rate was 0.8 mL/min. Chromatography was performed with ultraviolet detector at 275 nm. Linear calibration curve for BALP was measured within the range of 8-200 mg/L with correlation coefficient of 0.996. The lowest detection limit was 3 ng. The HPLC method described is simple, rapid and reliable and suitable for clinical monitoring.

Key words: high performance liquid chromatography; bone alkaline phosphatase; whole blood