

超速离心高效液相色谱准确测定血清脂蛋白(a)胆固醇

国汉邦¹, 董 军¹, 李红霞¹, 满 永¹, 王 抒¹, 陈文祥^{1,2}

(1. 卫生部北京医院, 北京老年医学研究所, 北京市 100730; 2. 卫生部北京医院, 卫生部临床检验中心, 北京市 100730)

[关键词] 生物化学; 脂蛋白; 胆固醇; 超速离心法; 高效液相; 色谱法; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 建立血清脂蛋白(a)胆固醇的准确测定方法。方法 血清与含脯氨酸的溴化钠溶液混合, 使背景密度为 1.044, 超速离心; 用含 2-巯基乙醇的溴化钠溶液将底部组分的密度调节至 1.040, 再次超速离心, 高效液相色谱测定顶部组分胆固醇即为脂蛋白(a)胆固醇。结果 用 2-巯基乙醇使脂蛋白(a)解离, 使成为不含载脂蛋白(a)的脂蛋白(a), 脂蛋白(a)解离前后存在明显密度分界区域, 使脂蛋白(a)的分离和测定成为可能。测定脂蛋白(a)胆固醇的批内和总变异系数分别为 1.84%~2.17% 和 2.85%~4.29%。结论 建立新的血清脂蛋白(a)胆固醇测定方法, 方法精密、可靠, 可望在脂蛋白(a)测定标准化中发挥作用。

[中图分类号] Q5

[文献标识码] A

Serum Lipoprotein (a) Cholesterol Determined by Ultracentrifugation and High Performance Liquid Chromatography

GUO Han Bang¹, DONG Jun¹, LI Hong-Xia¹, MAN Yong¹, WANG Shu¹, CHEN Wen Xiang^{1,2}

(1. Beijing Institute of Geriatrics, Beijing Hospital, Beijing 100730, China; 2. Beijing Hospital and National Center for Clinical Laboratories, Beijing 100730, China)

[KEY WORDS] Lipoproteins; Cholesterol; Ultracentrifugation; High Performance Liquid; Chromatography; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To develop a reliable method for the measurement of serum lipoprotein (a) cholesterol. **Methods**

Serum aliquots were centrifuged in the presence of proline at a density of 1.044 g/mL, the bottom fraction, which contains 95% of lipoprotein (a), was readjusted to density of 1.040 in the presence of mercaptoethanol and recentrifuged. Cholesterol levels in the ultracentrifugation top fractions [lipoprotein (a) cholesterol] were analyzed by high performance liquid chromatography.

Results Mercaptoethanol effectively dissociated lipoprotein (a) into apolipoprotein (a) and LDL-like lipoproteins [Lp(a)].

The dissociated Lp(a) showed a distinctive density distribution from that of the native lipoprotein (a). This finding enabled direct and reliable separation of lipoprotein (a) by ultracentrifugation. The within run and total CVs for the measurement of lipoprotein (a) cholesterol were 1.84%~2.17% and 2.85%~4.29%, respectively.

Conclusion A new method for the measurement of lipoprotein (a) cholesterol by ultracentrifugation and high performance liquid chromatography has been established. It is reliable and precise and may play an important role in standardization of lipoprotein (a) measurement.

脂蛋白(a)是由类似于低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的脂蛋白和载脂蛋白(a)组成的一种特殊脂蛋白^[1]。大量研究显示, 脂蛋白(a)升高是动脉粥样硬化性心血管病的重要危险因素^[2]。脂蛋白(a)胆固醇[Lp(a) cholesterol, Lp(a)-C]测定的困难在于没有简便、可靠的血清脂蛋白(a)的分离方法, 近年发展的方法有植物凝集素法、超速离心法和/或琼脂糖凝胶电泳法^[3,4]等, 其共同的缺点是操作

烦琐, 技术要求高, 精密度较差。鉴于上述情况, 本研究探索用超速离心分离脂蛋白(a), 用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)测定其胆固醇, 建立 Lp(a)-C 的准确测定方法。

1 材料和方法

1.1 仪器、试剂和血清样品

XL-90 超速离心机, CentriTube 离心管切割器 (Beckman Coulter, 美国), HP 1100 高效液相色谱仪 (Hewlett Packard, 德国), MicroLab 500 稀释器 (Hamilton, 美国) 和 7170A 型自动生化分析仪 (Hitachi, 日本)。用于配制标准溶液的胆固醇为本室研制的标准物质 GBW 09203a, 内标物豆甾醇和 2-巯基乙醇 (2-Mercaptoethanol, ME) 为美国 Sigma-Aldrich 产品, 色谱纯乙腈、异丙醇和正己烷为美国 Fisher Scientific

[收稿日期] 2007-05-18 [修回日期] 2007-10-16

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30471650), 国家科技支撑计划课题(2007BAI05B09)

[作者简介] 国汉邦, 副主任技师, 研究方向为脂代谢与动脉粥样硬化, 联系电话为 010-58115049; 李红霞, 学士, 主管技师, 研究方向为血脂测定标准化, 联系电话为 010-58115049; 通讯作者董军, 研究员, 研究方向为脂代谢与动脉粥样硬化, 联系电话为 010-65130302, E-mail 为 jun_dong@263.net。

产品,其他化学试剂均为国产分析纯试剂。所用血清样品为收集自北京医院和同仁医院检验科的新鲜血清标本和美国疾病控制预防中心(CDC)质控血清AQ18(冰冻)。新鲜血清分析前-80℃冰冻保存。

1.2 超速离心密度液配制

配制含0.2 mol/L 脯氨酸的溴化钠溶液,调节溴化钠浓度,使20℃密度为1.080(密度液iv),此密度液(0.4 mL)与0.4 mL血清混合,给出背景密度1.044 kg/L;配制含0.1 mol/L 2-巯基乙醇(2-Mercaptoethanol, ME)的溴化钠溶液,调节溴化钠浓度,使20℃密度为1.033(密度液⑤),此密度液(0.4 mL)与第一次超速离心后的0.4 mL底部组分(密度约为1.047)混合后给出背景密度1.040 kg/L。

1.3 标准溶液和内标溶液配制

配制胆固醇乙醇溶液,使浓度为0.323、0.646、1.293、2.586 mmol/L和5.172 mmol/L,用作第二次超速离心后顶部组分胆固醇(top fraction cholesterol, TFC)测定的标准溶液。配置豆甾醇乙醇溶液1.293 mmol/L,作为胆固醇测定的内标溶液。

1.4 超速离心分离脂蛋白(a)

超速离心采用Type 25转头和厚壁聚碳酸酯离心管(1 mL, 8 mm × 51 mm)。用校准过的加样器精密吸取0.4 mL血清到离心管中,加入0.4 mL密度液iv,混匀,在20℃和23 kr/min下离心18.5 h。用离心管切割器在离心管中液体的中间位置切割离心管,将离心管底部组分(bottom fraction, BF, 0.4 mL)转移到另一新离心管中,用0.4 mL密度液⑤洗涤底部离心管3次并全部转移到新离心管中,混匀,在20℃和23 kr/min下离心18.5 h。用离心管切割器在离心管中液体的中间位置切割离心管,测定顶部组分胆固醇。

1.5 顶部组分胆固醇测定

胆固醇测定参考文献[5,6]采用HPLC法。高效液相色谱分析采用Novar-Pak C18色谱柱(5 (m, 3.9 mm (150 mm),流动相为乙腈-异丙醇(90:10),流速1 mL/min,紫外(250 nm)检测。取上述样品,用0.2 mL流动相溶解,进样10 μL。将标准溶液浓度对胆固醇/内标峰高比进行线性回归,将样品顶部组分胆固醇/内标峰高比代入回归方程,计算样品胆固醇浓度。

1.6 其他分析

脂蛋白a质量测定用日本协和医药公司的免疫比浊法;采用试剂说明书中的样品-试剂比例、温育温度及时间和空白方式,在全自动生化分析仪上进行分析。

1.7 统计分析

用微软Excel程序进行统计分析。

2 结果

2.1 解离前后脂蛋白(a)在脂蛋白密度谱中的分布

血清的密度在1.006~1.181之间的33种背景密度下和不同条件下底部组分胆固醇分布见图1。结果发现,当密度<1.02或密度>1.11时,乙二醇存在时底部组分胆固醇与2-巯基乙醇存在时底部组分胆固醇基本相同,当密度为1.05左右时,BFEGC与BFMEC之差最大,提示解离后的不含载脂蛋白(a)的脂蛋白密度不完全与LDL重叠,可能与脂蛋白(a)存在密度分解点。

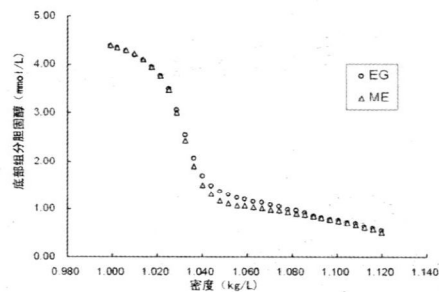


图1. 2-巯基乙醇和乙二醇存在下,血清在不同背景密度超速离心底部组分胆固醇比较

2.2 解离后的脂蛋白(a)在密度1.05附近的分布

实验不含载脂蛋白(a)的脂蛋白在其分界密度1.05附近的分布情况^[7],取脂蛋白(a)>300 mg/L的混合血清一份,在1.052的密度下超速离心,制备底部组分[含大部分脂蛋白(a)],将底部组分用含2-巯基乙醇和不含2-巯基乙醇的密度液分别调节背景密度至1.032、1.034、1.036、1.038、1.040、1.042、1.044、1.048和1.050,再次进行超速离心,测定顶部组分胆固醇。2-巯基乙醇存在时TFC(TFME(+))C与2-巯基乙醇不存在时TFC(TFME(-))C及两者之差在1.036~1.048密度范围内基本保持不变,超出此范围则出现降低,提示不含载脂蛋白(a)的脂蛋白密度一般小于1.036^[7]。

2.3 超速离心分离脂蛋白(a)和高效液相色谱测定脂蛋白(a)胆固醇方法的建立

不含载脂蛋白(a)的脂蛋白和脂蛋白(a)之间有明显的密度分界区域,在此区域内基本上既无不含载脂蛋白(a)的脂蛋白,也无脂蛋白(a),由此可实现脂蛋白(a)的超速离心分离,建立超速离心HPLC测

定 Lp(a)-C 的方法。血清脂蛋白(a) 解离前后的密度分布示意图见图 2。

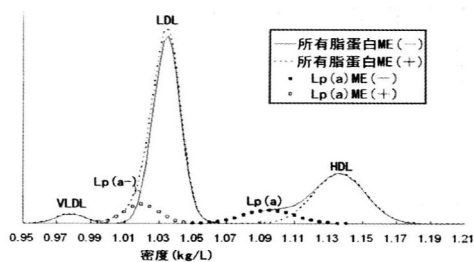


图 2. 血清脂蛋白(a) 解离前后的密度分布示意图。

2.4 方法的精密度试验

取 3 种不同血脂水平的混合血清试验所建方法的精密度。每种血清测定 Lp(a)-C 3 次, 每次每种血清重复分析 3 份, 结果见表 1。测定 Lp(a)-C 的批内 CV 1.84% ~ 2.17%, 总 CV 2.85% ~ 4.29%。

表 1. 超速离心高效液相法测定血清脂蛋白(a) 胆固醇的精密度

样品	平均值(mmol/L)	平均批内 CV(%)	总 CV(%)
血清 1	0.198	1.90	3.67
血清 2	0.264	1.84	2.85
血清 3	0.338	2.17	4.29

2.5 本方法与一次超速离心测定脂蛋白(a) 胆固醇方法比较

为将本法与之前建立的一次超速离心测定 Lp(a)-C 的方法(在 1.044 的背景密度及 2-巯基乙醇存在和不存在下超速离心, 计算两者胆固醇之差)^[7] 进行比较, 取 26 份来自不同个体的血清, 分别用本法和一次超速离心的方法测定 Lp(a)-C, 两种方法测定结果高度相关($r = 0.954$, $P < 0.05$; 图 3)。

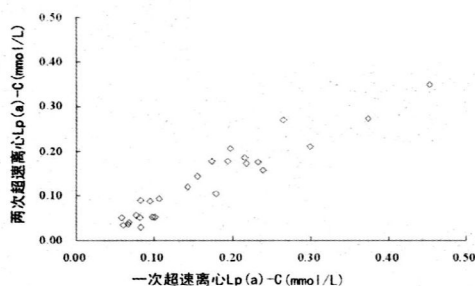


图 3. 本方法与一次超速离心法测定脂蛋白(a) 胆固醇结果比较

2.6 本方法测定 Lp(a)-C 与免疫比浊法测定脂蛋白(a) 质量的相关性

取 70 份来自不同个体的血清, 用本法测定 Lp(a)-C, 免疫比浊法测定脂蛋白(a) 质量, 结果 Lp(a)-C 与脂蛋白(a) 质量高度相关($r = 0.9095$, 图 4)。将 70 份血清的 Lp(a)-C 与脂蛋白(a) 质量比较, 结果 Lp(a)-C 平均为脂蛋白(a) 质量的 24%。

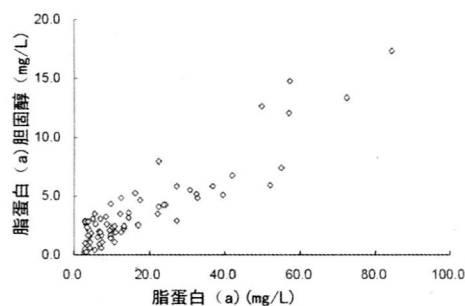


图 4. 脂蛋白(a) 质量与脂蛋白(a) 胆固醇的相关关系

2.7 脂蛋白(a) 胆固醇的检测灵敏度

Lp(a)-C 测定的平均标准差为 0.0058, 最低检测限以 5 倍标准差计为 0.03 mmol/L (12 mg/L)。

3 讨论

测定 Lp(a)-C 需首先分离脂蛋白(a), 超速离心法是各类脂蛋白的定义方法, 在分析化学上可能也是最可靠的脂蛋白分离方法, 是一种物理分离方法, 影响因素最少。但由于脂蛋白(a) 在较大密度范围内均有分布, 与 HDL 和 LDL 都有重叠, 很难进行直接分离。Nauck 等^[4] 报道的方法只是用超速离心去除极低密度脂蛋白或其他前- β 脂蛋白, 然后用电泳法分离脂蛋白(a), 密度测定法测定 Lp(a)-C, 未能实现脂蛋白(a) 的超速离心分离。

一般认为, 脂蛋白(a) 的密度分布在 1.050 ~ 1.110 之间, 但部分脂蛋白(a) 或 apo(a) 与 β 脂蛋白以非共价键结合存在于较低的(密度 < 1.05) 的密度范围内, 脯氨酸可以解除这种结合, 降低此区域内的脂蛋白(a)^[7,8]。在脯氨酸存在下, 密度 = 1.044 的背景密度超速离心, > 95% 的脂蛋白(a) 存在于底部组分。

为考察脂蛋白(a) 和不含载脂蛋白(a) 的脂蛋白在脂蛋白密度谱中的分布, 取脂蛋白(a) 水平较高的新鲜混合血清, 分别在 2-巯基乙醇和乙二醇存在下, 33 种不同的背景密度进行超速离心, 测定底部组分胆固醇。结果显示, 当密度 < 1.02 或密度 > 1.11

时,乙二醇存在时底部组分胆固醇与 2-巯基乙醇存在时底部组分胆固醇基本相同,说明有和无 2-巯基乙醇存在时超速离心后不含载脂蛋白(a)的脂蛋白和脂蛋白(a)在离心管中的分布相同,即同时分布在离心管的上部或下部;当密度为 1.05 左右时,两者之差最大,说明有和无 2-巯基乙醇存在时,不含载脂蛋白(a)的脂蛋白和脂蛋白(a)在离心管中的分布不同,即分别分布在离心管的上部或下部。根据脂蛋白(a)的性质和以前的研究结果,作者认为,无论有无 2-巯基乙醇,当密度 < 1.02 时,脂蛋白(a)/不含载脂蛋白(a)的脂蛋白分布在下部组分,当密度 > 1.10 时,脂蛋白(a)/不含载脂蛋白(a)的脂蛋白分布在上部组分;当密度 = 1.05 左右时,无 2-巯基乙醇存在时,脂蛋白(a)分布在下部组分;有 2-巯基乙醇存在时,脂蛋白(a)发生解离,解离后的不含载脂蛋白(a)的脂蛋白分布在上部组分。由此推测,脂蛋白(a)和不含载脂蛋白(a)的脂蛋白可能存在密度分界点。

用序列超速离心的方法进一步观察不含载脂蛋白(a)的脂蛋白在脂蛋白(a)密度分界点附近的分布,结果显示不含载脂蛋白(a)的脂蛋白密度一般小于 1.036。

根据以上结果,首先建立了较为简便的脂蛋白(a)分离和测定方法^[7]:将血清溶液在 1.044 背景密度及有和无 2-巯基乙醇存在下超速离心,底部组分胆固醇之差(BF 1.044 C 和 BF 1.044 MEC)即为 Lp(a)-C。但这种方法不是直接测定 Lp(a)-C,其测定误差为 BF 1.044 C 和 BF 1.044 MEC 测定的误差之和,测定背景高,灵敏度(最低检测限)较差。由于大多数个体的脂蛋白(a)水平较低,或接近于零,难以准确测定。为了减小误差,提高分析的灵敏度,作者设计了两次超速离心直接分离和测定 Lp(a)-C 的方法,首先血清溶液在脯氨酸存在下,1.044 的背景密度超速离心,> 95% 的 Lp(a)分布在离心管的底部;然后用含 2-巯基乙醇的密度液将底部组分调节密度至 1.040,再次超速离心,则解离后的不含载脂蛋白(a)的脂蛋白在顶部组分,HPLC 测定顶部组分胆固醇即为 Lp(a)-C。第二次超速离心的密度设为 1.040,不仅保证不含载脂蛋白(a)的脂蛋白(密度 < 1.036)全部漂浮到离心管的顶部,也有效避免了小而密 LDL(密度 > 1.044)对顶部组分的污染,大大提高了 Lp(a)-C 测定的灵敏度和特异性。

分别用两种超速离心方法测定 26 份样本的 Lp(a)-C,两者相关密切($r = 0.954$)。脂蛋白(a)的精

密度结果显示,本法测定 Lp(a)的总 CV 为 2.85%-4.29%,优于一次超速离心、用(BFC1.044-BFC 1.044 ME)计算 Lp(a)-C 的精密度。

本研究中,超速离心 HPLC 法测定 Lp(a)-C 与免疫比浊法测定 Lp(a)质量结果高度相关($r = 0.9095$),Lp(a)-C 平均约占脂蛋白(a)质量的 24%,与大多数文献报道的胆固醇占脂蛋白(a)质量的 25%~34% 接近^[3]。本方法可以测定 Lp(a)-C 的低限约为 0.03 mmol/L (12 mg/L),约相当于脂蛋白(a)质量 50 mg/L,检测灵敏度也高于用(BF 1.044 C-BF 1.044 MEC)计算 Lp(a)-C 的方法(0.06 mmol/L)。血清 Lp(a)浓度的个体差异很大(从 < 1 mg/L 到 > 1000 mg/L),但脂蛋白(a)质量 > 300 mg/L 被认为是动脉粥样硬化的危险因素,没有证据表明更低的脂蛋白(a)水平具有临床意义^[9]。虽然本法有可能不能有效检测部分个体的 Lp(a)-C,但对于心血管病危险因素分析具有足够的灵敏度。

总之,本研究建立 Lp(a)-C 的准确测定方法。用超速离心直接分离脂蛋白(a),HPLC 精密测定 Lp(a)-C。Lp(a)-C 测定背景低,方法特异,精密度好,可望在心血管病危险因素研究及脂蛋白(a)测定标准化中发挥作用。

[参考文献]

- [1] Albers JJ, Kenedy H, Marcovina SM. Evidence that Lp(a) contains one molecule of apo(a) and one molecule of apoB: evaluation of amino acid analysis data [J]. *J Lipid Res*, 1996, **37** (1): 192-196.
- [2] Marcovina SM, Koschinsky ML, Albers JJ, Skarlatos S. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute workshop on lipoprotein (a) and cardiovascular disease: recent advances and future directions [J]. *Clin Chem*, 2003, **49** (11): 1785-796.
- [3] Seman LJ, Jenner JL, McNamara JR, Schaefer EJ. Quantification of lipoprotein (a) in plasma by assaying cholesterol in lectin-bound plasma fraction [J]. *Clin Chem*, 1994, **40** (3): 400-403.
- [4] Nauck M, Winkler K, Wittmann C. Direct determination of lipoprotein (a) cholesterol by ultracentrifugation and agarose gel electrophoresis with enzymatic staining for cholesterol [J]. *Clin Chem*, 1995, **41** (5): 731-738.
- [5] 陈文祥,李培瑛,王抒,董军,李健斋. 高效液相色谱法测定血清胆固醇的研究[J]. *中华医学检验杂志*, 1993, **16** (6): 146-151.
- [6] 张江涛,董军,李红霞,国汉邦,满咏,王抒,等. 高效液相色谱检测全血贮存对血清总胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇的影响[J]. *中华检验医学杂志*, 2005, **28** (4): 349-353.
- [7] 董军,国汉邦,李红霞,满咏,王抒,张江涛,等. 超速离心 HPLC 测定血清脂蛋白亚类和脂蛋白(a)胆固醇[J]. *中华检验医学杂志*, 2007, **30** (2): 191-195.
- [8] 董军,国汉邦,李红霞,满咏,王抒,张江涛,等. 超速离心-高效液相色谱测定血清高密度脂蛋白和低密度脂蛋白胆固醇[J]. *中华检验医学杂志*, 2006, **29** (8): 742-746.
- [9] Seman LJ, DeLuca C, Jenner JL, Cupples LA, McNamara JR, Wilson PW, et al. Lipoprotein (a)-cholesterol and coronary heart disease in the Framingham Heart Study [J]. *Clin Chem*, 1999, **45** (7): 1039-046.

(此文编辑 李小玲)