分离。可利用这一光谱特征消除光谱重叠对鉴别地沟油与植物油的干扰。在 532 nm 激光光源的导数普通光谱中,虽然地沟油与植物油的反峰和正峰的峰位置完全相同,分别位于 2 944/cm 和 2 841/cm 处。但两者反峰和正峰强度的赋值方向截然不同。精炼地沟油的反峰与正峰的强度均为负值。而食用植物油的导数反峰的强度为负值,导数正峰的强度为正值。当在植物油中掺入精炼地沟油时,精炼地沟油将在使掺杂油样品反峰强度(绝对值)增加的同时,使之正峰强度减少,从而必然导致其两峰比值(绝对值)的显著提高。实验结果表明,各种掺杂植物油的反峰与正峰强度比值(绝对值)与精炼地沟油的掺入比例成正比。地沟油掺入比例越高,该比值越大。无论在何种食用植物油中掺入地沟油,当样品中地沟油的掺入量达到 10% 时,其两峰比值(绝对值)显著高于对应的食用植物油的本底值。利用这一特征可以测量和描述掺杂植物油中地沟油的掺入量。

综上所述,平滑包状拉曼谱带是普遍见于地沟油的指纹图谱。该指纹图谱在扩展光谱、导数扩展光谱及导数普通光谱中的表现可为鉴别地沟油与植物油、消除样品间谱带重叠干扰,以及检测植物油样品中地沟油的掺入量提供丰富的信息及适用的标志。

参考文献

[1] 李浩,邓平建,杨冬燕,等. 地沟油标准物质候选物研制[J]. 中国公共卫生,2014,30(3):361 - 363.

[2] 曹文明,孙禧华,陈凤香,等. 地沟油鉴别技术研究展望[J]. 中国油脂,2012,37(5):1 - 5.

[3] 沈雄,郑晓,何东平. 餐饮业废弃油脂鉴别检测方法研究进展[J]. 中国油脂,2011,36(11):49 - 51.

[4] 刘燕德,刘涛,孙旭东,等. 拉曼光谱技术在食品质量安全检测中的应用[J]. 光谱学与光谱分析,2010,30(11):3007 - 3012.

[5] 周秀军,戴连奎,李晟. 基于拉曼光谱的食用油快速鉴别[J]. 光谱学与光谱分析,2012,31(7):1829 - 1833.

[6] 韦娜,邹明强,齐小花,等. 拉曼光谱法检测掺兑地沟油的花生油[J]. 光谱学与光谱分析,2012,32(10):225 - 226.

收稿日期: 2014-08-04　(吴少慧编辑　张翠校对)

中国公共卫生 CPH

· 检验技术 ·

生物样品中酸性鞘磷脂酶活性测定*

罗磊,钟霞丽,肖芳,王安,曾明,何兴轩,钟才高

摘　要:目的　建立高效液相色谱测定生物样品中酸性鞘磷脂酶(ASM)活性的方法。**方法**　收集成年昆明种小鼠血、尿、肝组织匀浆等生物样品,以 BODIPY C_{12} - Spm 为荧光底物孵育 2 h,采用 ACQUITY BEH C18 色谱柱,流动相为甲醇:13 mmol/L 乙酸钠溶液 = 95∶5,流速 0.8 mL/min,进样量 10 μL,荧光检测器检测,激发波长 505 nm,发射波长 540 nm。**结果**　荧光产物 B_{12} - Cer 在反向色谱解析中,4 min 即可有效分离,在 40 ~ 5 000 nmol/L 范围内线性良好,相关系数为 0.998 8,方法检出限为 5.86 nmol/L;小鼠血、尿、肝细胞匀浆中 ASM 活性分别为(927.40 ± 189.62)、(122.88 ± 49.84)、(422.51 ± 65.81) nmol/(μL·h)。**结论**　基于荧光底物的高效液相色谱检测方法简便、稳定、灵敏度高,可用于微量生物样品中 ASM 活性检测。

关键词:高效液相色谱法;生物样品;酸性鞘磷脂酶(ASM)

中图分类号:R 181.2+4　**文献标志码:**A　**文章编号:**1001-0580(2015)04-0515-03　DOI:10.11847/zgggws2015-31-04-41

Determination of acid sphingomyelinase activity in biological samples with high performance liquid chromatographic assay

LUO Lei, ZHONG Xia-li, XIAO Fang, et al (*Department of Health Toxicology, School of Public Health, Central South University, Changsha, Hunan Province* 410078, China)

Abstract: Objective　To develop a simple, precise and accurate high performance liquid chromatographic method for quantitative determination of acid sphingomyelinase activity in biological samples. **Methods**　The biological samples of blood, urine and liver homogenate were collected from adult Kunming mice and incubated with fluorescent substrate BODIPY C_{12}-Spm for 2 hours. The samples were detected using ACQUITY BEH C18 chromatographic column with mobile phase containing methanol and 13 mM sodium acetate (95∶5, v/v) at a flow rate of 0.8 ml/min, with the injection volume of 10 μL. The eluent was monitored with a fluorescence detector set to excitation and emission wavelengths of

* **基金项目:** 国家自然科学基金(81172701)
作者单位: 中南大学公共卫生学院卫生毒理学系,湖南 长沙 410078
作者简介: 罗磊(1981 -),男,河南许昌人,博士在读,研究方向:生化与分子毒理学。
通讯作者: 钟才高,E-mail:zcg54@syxm.net
数字出版日期:2015 - 2 - 15 10:25
数字出版网址:http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20150215.1025.034.html

505 nm and 540 nm, respectively. **Results** Fluorescent product B_{12}-Cer in reverse analytical chromatography was effectively separated in 4 min, and the linearity of the method was good in a range of 40 – 5 000 nm, with a correlation coefficient of 0.9988. The detection limit of the method was 5.86 nmol/L. The mean of acid sphingomyelinase activity in blood, urine and liver homogenate of the mice was 927.40 ± 189.62, 122.88 ± 49.84, and 422.51 ± 65.81 nmol/μl/h, respectively. **Conclusion** The high performance liquid chromatographic method based on fluorescent substrate is a simple, stable and high sensitive technique to determine the activity of acidic pahospholipase in trace biological samples effectively.

Key words: high performance liquid chromatography; biological sample; ASM activity

酸性鞘磷脂酶(acid sphingomyelinase, ASM)是一类可作用于磷酸二酯键的溶酶体酶,水解细胞膜表面或溶酶体中的鞘磷脂生成神经酰胺(ceramide)和磷酰胆碱,而神经酰胺作为第二信使与细胞凋亡、分化、增殖、自噬、衰老等多种生物学进程密切相关[1-2]。国内外对生物样品中 ASM 活性检测已有相关报道[3-5]。以^{3}H 标记的鞘磷脂为反应底物,通过测定水解产物的放射活性,间接推算 ASM 活性[3],还可采用试剂盒测定 ASM 活性,以 Amplex Red 染料进行荧光标记后相对定量测量[4],此方法成本较高、荧光易淬灭,不适合进行大批量样品的测量。本研究以荧光标记衍生物为检测对象,建立一套反向颗粒填充柱分离、荧光检测器检测的分析方法,并对测试条件和仪器各项参数指标进行优化,结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　*实验动物*　选取健康 SPF 级昆明小鼠 12 只,体重为 18 ~ 22 g(长沙市开福区东创实验动物科技服务中心),实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2009 – 0012 号。喂养条件,温度 25 ℃、湿度 50%、自由饮食饮水、14 h 光照和 10 h 黑夜,实验前观察 2 周。

1.2　*主要试剂与仪器*　BODIPY® FLC_{12} – Sphingomyelin(美国 Invitrogen 公司);B_{12} – Ceramide(美国 Cayman Chemical 公司);Igepal – 630(美国 Sigma 公司);甲醇、乙醇(色谱纯,美国 Tedia 公司);氯化锌、乙酸铵、磷酸(分析纯,天津科密欧公司)。高效液相色谱仪(日本岛津公司);Milli – Q 超纯水机(美国 Millipore 公司);Q5000 型高精度超微量紫外分光光度计(美国 Quawell 公司);电动玻璃匀浆机(宁波新芝公司);低温高速离心机(上海力康公司)。

1.3　*色谱分析条件*　高效液相色谱仪,配 SIL – 20A 型自动进样器、LC – 20AT 泵、RF – 20A 荧光检测器;色谱柱参数,ACQUITY BEH C_{18} 柱(1.7 μm, 2.1 mm × 30 mm);1.5 mL 自动进样瓶(带内插管);荧光检测器设置,激发波长 505 nm,发射波长 540 nm;流动相配制,甲醇:13 mmol/L 乙酸钠溶液($V:V$) = 95:5;流速 0.8 mL/min;进样量为 10 μL。

1.4　*标准曲线制备*　分别取 B_{12} – Cer 标准应用液(浓度为 10 μmol/L)0、40、80、120、160、640、1 280、2 500、5 000 μL,置于 10 mL 容量瓶中,甲醇定容,使终浓度为 0、40、80、120、160、640、1 280、2 500、5 000 nmol/L。每个标准品重复进样 3 次,以峰面积为 Y 轴,B_{12} – Cer 含量为 X 轴绘制标准曲线。

1.5　*生物样品前处理*　小鼠颌下静脉丛取全血约 500 μL,肝素钠抗凝,4 000 g 离心 5 min,取上清,置于 – 20 ℃待测;使用代谢笼收集小鼠 24 h 尿,4 ℃保存待测;小鼠禁食过夜,4% 水合氯醛麻醉后,U 型切口剪开小鼠腹腔,取约 1 g 肝组织,用生理盐水漂洗 2 遍,拭干称重后剪碎,冰浴制成 10% 肝组织匀浆,4 000 r/min 离心 5 min,取上清置于 – 20 ℃待测。

1.6　*荧光底物孵育与样品检测*　取 3 μL 组织匀浆放入干净的 0.5 mL 离心管中,加入 3 μL 已配制好的 ASM 反应底物(100 μmol/L B_{12} – Spm、0.2 mmol/L $ZnCl_2$、0.2% Igepal CA – 630、0.2 mol/L 乙酸钠, pH = 5.0),充分混匀,37 ℃孵育 2 h。待反应结束后,取 5 μL 孵育液加入 95 μL 乙醇中,终止反应。混匀,12 000 g 离心 5 min,取上清液,置于 1.5 mL 带内插管的自动进样瓶,上机测试。

2　结　果

2.1　*B_{12} – Spm 和 B_{12} – Cer 标准峰出峰时间和色谱图(图 1)*　B_{12} – Spm 在 ASM 激活水解作用下,生成带有荧光基团的 B_{12} – Cer,底物(B_{12} – Spm)和产物(B_{12} – Cer)的保留时间分别为 1.711 和 0.948 min。

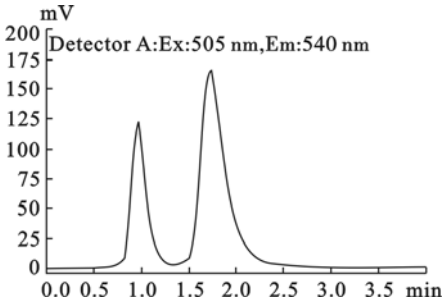

图 1　B_{12} – Spm 和 B_{12} – Cer 的标准色谱图

2.2　*孵育温度和时间对 ASM 活性影响*　选取不同荧光底物孵育时间 0.5、1、2、4、8、12 h,选取不同

荧光底物孵育温度 4、37、70 ℃，测定肝组织匀浆的 ASM 活性。结果显示，荧光孵育 2 h 内 B_{12} – Cer 检出量上升最快，之后达到平台期，而 37 ℃孵育效果优于 4 ℃和 70 ℃。最终确定本方法最优孵育时间为 2 h，孵育温度为 37 ℃。

2.3　标准曲线、检出限和最低检出浓度　B_{12} – Cer 响应灵敏，基线噪声低，线性关系好。标准曲线为 $y = 536.76x + 18\ 559$，$R^2 = 0.998\ 8$，根据色谱条件和仪器参数，结合相关文献[6]分析，以 3 倍信噪比确定方法检出限为 5.86 nmol/L（S/N = 3），以 10 倍信噪比确定方法定量限为 19.53 nmol/L（S/N = 10）。

2.4　方法精密度、稳定性与准确性试验　测定 3 个浓度 120、2 500、5 000 nmol/L 的重现峰，重复测量 6 次。峰面积相对标准偏差（relative standard deviation，RSD）为 2.2% ~4.7%。将浓度为 2 500 nmol/L B_{12} – Cer 标准液于室温避光放置 6、12、24、48、72 h 后检测，荧光信号强度在 24 h 之前只有 1% 衰减，72 h 达 3%。分别取小鼠 3 μL 血浆、尿液和肝组织匀浆各 2 份，其中 1 份加入 120 nmol/L 的 B_{12} – Cer 标准液，测定样品回收率，结果显示小鼠血浆、尿液和组织匀浆的加标回收率分别为 87.3%、78.4%、83.6%。

2.5　生物样品中 ASM 活性测定结果（图 2）　正常成年昆明小鼠血浆中 ASM 活性为（927.40 ± 189.62）nmol/（μL·h），24 h 尿液中 ASM 活性为（122.88 ± 49.84）nmol/（μL·h），10% 肝细胞匀浆中 ASM 活性为（422.51 ± 65.81）nmol/（μL·h）。

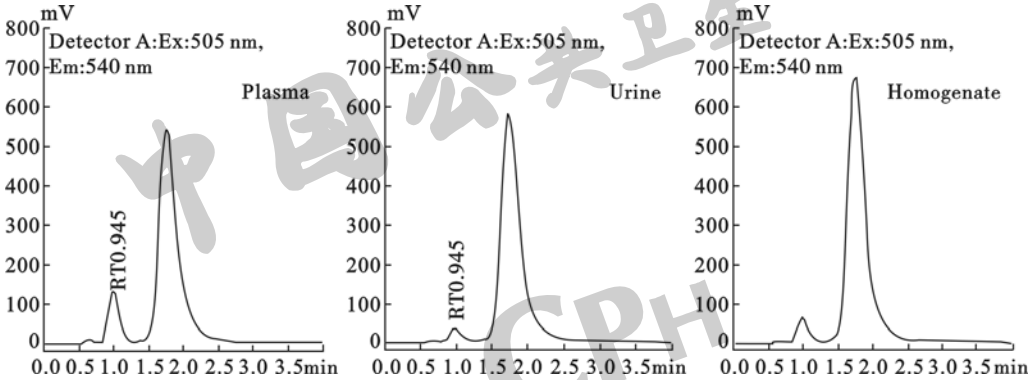

图 2　成年小鼠血浆、尿液和肝组织匀浆中 ASM 活性高效液相色谱图

3　讨　论

本方法最大优点是 4 min 即可完全分离 B_{12} – Cer 和 B_{12} – Spm，且使用自动进样器提高了检测效率。既往的 ASM 活性测定方法耗时较长，单个样品通常要 >6 h，而本方法有效的避免了人力和时间的浪费，可用于大规模人群普查。方法检出限可精确测量到纳摩尔级别，检出率高。稳定性检测结果显示，孵育荧光底物 24 h 内上机测试，产物荧光强度衰减很少。取同样体积（3 μL）生物样品，ASM 活性在血浆中更易检出，而尿中则较低，这可能与正常生理状态下，ASM 不易透过肾小管过滤有关。近年来生物医学领域的研究不再局限于核酸、蛋白水平，对于小分子脂类的研究越来越深入，同时更多的关注蛋白表达后对酶活性的功能改变[7]。高效液相色谱法，对仪器设备要求不高，操作流程快、简便，结果准确、可靠，用于检测生物样品中 ASM 活性效率高、成本低，可适用于大规模的人群筛查、生物标志物的开发等。

参考文献

[1]　Truman JP, Al Gadban MM, Smith KJ, et al. Acid sphingomyelinase in macrophage biology[J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(20): 3293 – 3305.

[2]　Hou Q, Jin J, Zhou H, et al. Mitochondrially targeted ceramides preferentially promote autophagy, retard cell growth, and induce apoptosis[J]. J Lipid Res, 2011, 52(2): 278 – 288.

[3]　董悦生，杨峻山，张华，等. 微生物来源酸性鞘磷脂酶抑制剂 NF-0265A 的研究[J]. 中国药学杂志，2005，40(22): 1752 – 1754.

[4]　Zhang L, Xu SC, Zhang GB, et al. Roles of acid sphingomyelinase activation in neuronal cells apoptosis induced by microwave irradiation[J]. J Radiat Res Radiat Process, 2009, 27(6): 354 – 359.

[5]　He X, Chen F, Dagan A, et al. A fluorescence-based, high-performance liquid chromatographic assay to determine acid sphingomyelinase activity and diagnose types A and B Niemann-Pick disease[J]. Anal Biochem, 2003, 314(1): 116 – 120.

[6]　匡莹，仇峰，杨美华. 枸杞果酒中赭曲霉毒素 A 液相质谱串联法测定[J]. 中国公共卫生，2012，28(11): 1520 – 1522.

[7]　郑玉建，吴军，夏荣香，等. 染砷大鼠肝脏砷形态与甲基转移酶关系[J]. 中国公共卫生，2013，29(3): 361 – 363.

收稿日期： 2013–12–26　（解学魁编辑　周欣琳校对）