

高胆固醇血症血清内胆固醇的光谱学研究

兰秀风¹, 刘建刚¹, 刘莹^{1,2}, 骆晓森¹, 唐新国³, 卢是钊³, 倪晓武^{1,2*}

1. 南京理工大学信息物理与工程系, 江苏 南京 210094
2. 徐州师范大学物理系, 江苏 徐州 221009
3. 中国人民解放军第二军医大学南京军医学院, 江苏 南京 210099

摘要 应用光谱分析方法对高胆固醇血症血清中胆固醇的不同含量情形进行了研究, 给出了正常人血清和高胆固醇血症血清的吸收光谱和荧光光谱, 并分析了二者的谱线特征与差异。结果表明, 高胆固醇血症血清的吸收光谱和荧光光谱不同于正常人血清的吸收光谱和荧光光谱, 高胆固醇血症血清不仅是吸收率和荧光强度高于正常人血清的相应值, 而且还有新的吸收峰和荧光峰出现。研究表明, 通过比较待测血清的吸收光谱和荧光光谱可以初步判定血清中胆固醇的含量。这为发展一种新的血液胆固醇含量的检测方法提供了实验依据。

主题词 高胆固醇血症; 血清; 吸收光谱; 荧光光谱; 胆固醇检测

中图分类号: O433.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)03-0467-04

引言

随着人们生活水平的不断提高和饮食结构及生活方式的变化, 高血糖、高胆固醇以及高甘油三酯类的病例呈逐年上升趋势, 而这又通常会导致糖尿病、动脉硬化、心脑血管等疾病的发生^[1-3]。而血液中胆固醇水平的增高, 不仅有害于心脏和血管, 而且还可能导致认知障碍成为进行性老年痴呆(阿尔茨海默氏病)的先兆^[4,5]。2002年世界卫生组织(WHO)公布的人类健康十大危险因素中, 胆固醇过高疾患位居第八位, 据统计由于体内胆固醇过高导致440万人死亡, 并可使18%的人群诱发心血管疾病。因此, 展开对血液中的甘油三酯和胆固醇的分析研究具有十分重要且有实用意义的。传统的血液检测技术因其操作复杂、检测周期长、可视性差等缺陷, 已越来越跟不上时代的发展, 因此发展一种新的方便快捷的检测方法已成为一项十分迫切的任务(还参考了文献: Modern Hospital(现代医院), 2003, 3(2): 20)。

荧光分析法是利用某些物质被紫外光或可见光照射后所产生的、且能反映该物质特性的荧光并能对其进行定性和定量分析的一种分析方法, 是当前普遍使用并有发展前途的一种光谱分析技术^[6]。荧光光谱法还具有灵敏度高、选择性强、用样量少、方法简便等优点, 能够克服传统血液检测技术的种种缺陷, 因此, 有关学者为将荧光分析技术应用于血液检测中进行了研究^[7-9]。基于将荧光光谱分析技术应用于

血液中胆固醇含量分析的思路, 本文研究了高胆固醇血症血清的荧光光谱及其特性, 该研究结果有助于进一步研究血液中胆固醇的荧光特性, 进而为发展一种新的血液胆固醇含量的检测方法奠定基础。

1 实验材料与方法

1.1 样品制备

(1) 正常人血清样品: 由第二军医大学南京军医学院提供, 其血脂指标为: 总胆固醇 $4.84 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 甘油三酯 $1.23 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 高密度蛋白 $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

(2) 胆固醇: 北京海淀区微生物培养基制品厂生产的生化试剂。为白色针状结晶体, 技术指标为: 熔点 $146 \sim 149 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

胆固醇溶液 I: 称取 3.99 g 胆固醇加入 100 mL 的异丙醇溶液中, 搅拌使其充分溶解。该胆固醇溶液浓度为 $103.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

胆固醇溶液 II: 称取 6.40 g 胆固醇加到 100 mL 的异丙醇溶液中, 搅拌使其充分溶解。该胆固醇溶液浓度为 $165.44 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

(3) 高胆固醇血症的血清样品: 取适量的胆固醇溶液加到 1 mL 的正常人血清中, 得到胆固醇含量为 $19.44 \sim 53.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血清样品。

收稿日期: 2004-12-10, 修订日期: 2005-04-25

基金项目: 高等学校优秀青年教师教学科研奖励计划项目(2003-2008)资助

作者简介: 兰秀风, 女, 1976年生, 南京理工大学信息物理与工程系博士研究生 * 通讯联系人

1.2 实验仪器

(1) 吸收光谱仪: DU800 紫外-可见光谱仪。

(2) 荧光光谱仪: WGD-8 型多功能光栅光谱仪。其中分光元件为每毫米 1200 刻线的闪耀光栅, 光电转换器件为 Hamamatsu 公司生产的 C131 型光电倍增管。

(3) 荧光激发光源: 高亮度、窄波段的发光二极管(LED) 其中心波长及变化范围即 $\lambda \pm \Delta\lambda$ 为 (410 ± 8) nm, 输出功率约为 5 mW。

2 实验结果

2.1 吸收光谱

图 1 为利用 DU800 紫外-可见光谱仪获得的正常人血清 (Normal serum) 与高胆固醇血症的血清 (TC serum) 吸收光谱, 其中样品 *a* 为正常人血清, 样品 *b* 为高胆固醇血症的血清。由图 1 可知, 在可见光范围内, 正常人血清和高胆固醇血症者血清的吸收光谱有明显的不同。正常人血清主要吸收波段范围为 370~500 nm, 共有两个较强的吸收峰, 分别位于波长为 416 和 460 nm 处。高胆固醇血症者的血清的主要吸收波段范围为 375~600 nm, 其吸收率高于正常人血清的吸收率。其中最强的吸收峰位于波长为 416 nm 处, 其吸收率约为正常人血清相应位置吸收率的 2.2 倍; 波长为 440~515 nm 处为一肩峰, 其中心波长位于 460 nm 处; 此外, 高胆固醇血症的血清在波长为 542 和 578 nm 处还有两个较弱的吸收峰。

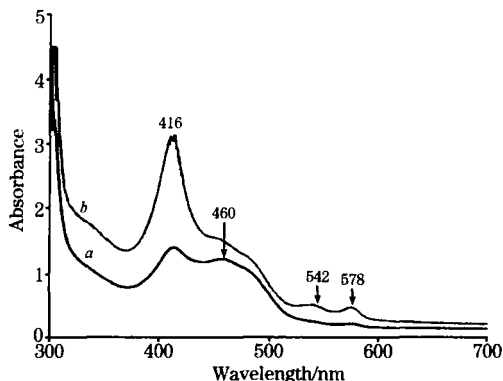


Fig 1 Absorption spectra of normal human serum and hypercholesterolemia serum

a, Normal serum; *b*, TC serum

2.2 荧光光谱

由吸收光谱图可知, 两种血清在波长为 416 nm 处均有较强的吸收, 因此我们选用中心波长接近该吸收峰的 LED 光 (中心波长为 410 nm) 为激发光源, 用 WGD-8 型多功能光栅光谱仪对正常人血清 (总胆固醇含量为 $4.84 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和高胆固醇血症的血清 (总胆固醇含量为 $13.86 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的荧光光谱进行了研究, 所获得的光谱图如图 2 所示。图 2 注释括弧内给出的数据为获得该光谱图时所用光电倍增管的增益和负高压数值。

由图 2 可知, 在波长为 410 nm 的紫色 LED 光激励下,

正常人血清和高胆固醇血症的血清均能发射较强的荧光, 且表现出不同的谱线特征。正常人血清的荧光光谱图主要有一个荧光峰, 其中心波长位于 518 nm 处。高胆固醇血症的血清不仅在强度上远高于正常人血清, 而且比正常人血清的荧光光谱多了三个荧光峰, 分别位于 560, 588 和 694 nm 处。尤其是中心波长为 560 和 588 nm 的荧光峰, 其荧光强度远高于正常人血清位于 518 nm 处的荧光峰。

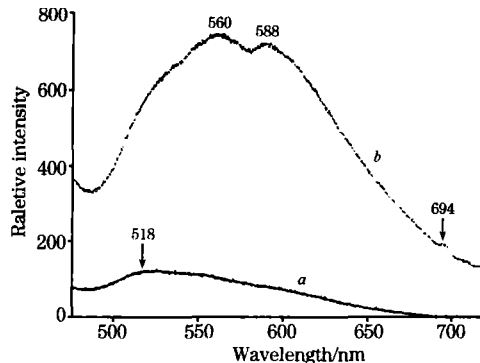


Fig 2 The fluorescence spectra of normal serum and hypercholesterolemia serum

a, Normal serum (3, 6); *b*, TC-13.80 (3, 6)

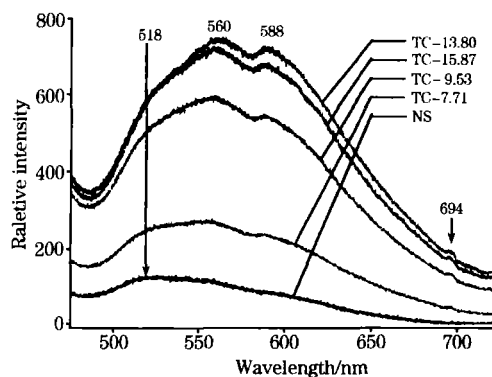


Fig 3 The fluorescence spectra of serum with different concentration of cholesterol

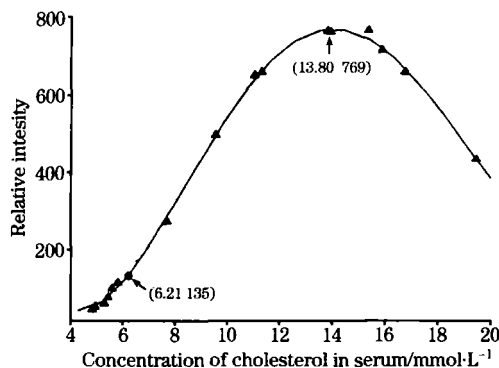


Fig 4 The relationship between fluorescence intensity and the concentration of cholesterol in serum ($\lambda = 560 \text{ nm}$)

▲, Experimental data; —, Polynomial

为了进一步了解胆固醇含量对血清荧光光谱的影响,我们检测了胆固醇含量由 $5.30 \sim 19.44 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血清样品的荧光光谱,结果表明,胆固醇含量对高胆固醇血症血清的光谱形状影响较小,但对荧光强度影响较大,如图3所示。

图4给出的波长为 560 nm 处的荧光强度和胆固醇含量的关系。其中圆点(6.21, 135)给出的是血清中胆固醇含量达到临床医学所规定的正常人血清胆固醇含量的上限即 $6.21 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时所检测到的波长为 560 nm 处的血清荧光强度。由图4可知:随着胆固醇含量的增加,血清样品的荧光强度先是增加,当胆固醇含量达到 $13.80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,荧光强度达到最大,而后随着胆固醇含量的增加,荧光强度逐渐降低。

3 讨论

(1) 由图1给出的正常人血清与高胆固醇血症的血清吸收光谱可见,胆固醇血症的血清在整个光谱范围内的吸收率都大于正常人血清,尤其是在波长为 416 nm 的吸收峰处,其吸收率约是正常人血清在相同波长处吸收率的2.2倍。此外,高胆固醇血症的血清在波长为 542 和 578 nm 处还有两个较弱的吸收峰,这两个小的吸收峰是正常人血清的吸收图中所没有的。因此,根据吸收光谱可以初步判定血清中胆固醇含量是否异常。

(2) 分析图2中的荧光光谱可知,正常人血清和高胆固醇血症的血清在波长为 518 nm 处都有较强的荧光,高胆固醇血症的血清除了荧光强度远远高于正常人血清外,还在中心波长分别位于 560 , 588 和 694 nm 处存在3个荧光特征峰。由于血清中胆红素的荧光峰位于 515 nm 附近^[10],可以认为波长为 518 nm 处的荧光峰应来自于血清中的胆红素。我们认为此时血清中胆固醇对胆红素起荧光增强剂的作用,因而当血清中胆固醇含量增加时,所获得的荧光强度就将增大。中心波长为 694 nm 处的小峰为血清中微量的卟啉类物质的荧光峰^[11]。中心波长分别位于 560 , 588 nm 的荧光峰是

高胆固醇血症的血清所特有的,它们可能是来自于血清中游离胆固醇和游离胆固醇酯化成的胆固醇酯。因此,可以根据荧光光谱图中是否出现了中心波长分别位于 560 , 588 nm 的特征荧光峰来初步判定血清中胆固醇含量是否异常。同时,波长为 518 nm 处的荧光峰的强度也是判断是否存在胆固醇含量异常的辅助手段。

(3) 由临床医学知识可知,当人血清中总胆固醇含量超过 $6.21 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,就可称为高胆固醇血症^[12]。由图4可知,随着血清中胆固醇含量的增多,中心波长为 560 nm 的荧光强度呈先增后减的趋势,但总胆固醇含量在 $6.21 \sim 20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内的血清在中心波长为 560 nm 的荧光强度都明显高于总胆固醇含量为 $6.21 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血清在该处的荧光强度(如图4圆点所示),而总胆固醇高达 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血清在临床上已经罕见。因此,可以通过观测待测样品荧光峰中心波长为 560 nm 的强度是否高于 $6.21 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血清在该处的荧光强度的统计值来进一步判定血清中胆固醇含量是否异常。

4 结论

为了将荧光分析技术应用于血液检测,发展一种操作简单、分析快捷、可视化程度高的血液胆固醇含量的检测方法,本文首先研究了正常人血清与高胆固醇血症血清的光谱学特性,结果表明正常人血清与高胆固醇血症血清的吸收光谱和荧光光谱皆存在较大的差异,这不仅表现在高胆固醇血症血清的吸收率和荧光强度均高于正常人血清的相应值,而且表现在高胆固醇血症血清存在着不同于正常人血清的吸收峰和荧光峰。因此可以通过比较待测血清的吸收光谱和荧光光谱来初步判定血清中胆固醇的含量是否异常。

当然,光激发血液及其组分的荧光分析及应用研究是一崭新的研究课题,目前尚处于初步研究阶段,但随着光谱技术和信号检测技术的发展,相信一定会成为一种新的血液检测手段。

参 考 文 献

- [1] JIN Yong juan, LI Hong mei, ZHU Weirun, et al(金永娟, 李宏妹, 朱文云, 等). J. of Chinese Microcirculation(中国微循环), 2002, 6(1): 22.
- [2] NA Kaixian, YU Ping(那开究, 余平). Chinese Clinician(中国临床医生), 2003, 31(5): 23.
- [3] XU Duarmin, YAN Churrying, CHEN Chang, et al(许端敏, 闫纯英, 陈畅, 等). J. of Shantou University Medical College(汕头大学医学院学报), 2003, 16(1): 24.
- [4] ZI Yu(梓雨). Foreign Medical Information(国外医学情报), 2003, 24(4): 45.
- [5] WANG Zhi(汪治). Biotechnology Bulletin(生物技术通报), 2003, (2): 25.
- [6] WANG Yajji, SONG Zengfu(王彦吉, 宋增福). Spectroanalysis and Chromatographic Analysis(光谱分析与色谱分析). Beijing: Peking University Press(北京: 北京大学出版社), 1995.
- [7] Gao Shumei, Luo Xiaosen, Lan Xiufeng, et al. Chinese Journal of Lasers, 2002, B11(4): 315.
- [8] ZHAO Zhimin, CHEN Yuming, YU Xiaolei(赵志敏, 陈玉明, 余晓磊). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(5): 922.
- [9] Lan Xiufeng, Gao Shumei, Peng Changde, et al. SPIE, 2003, 5254: 336.
- [10] Chen R F. Arch. Biochem. and Biophys., 1974, 160: 106.
- [11] Niemz Markolf H. Laser-Tissue Interactions Fundamentals and Applications. Berlin: Springer Verlag Heidelberg, 1996, 51.
- [12] ZHOU Hong, XU Weirui(周虹, 徐文弟). Advanced Course of Biochemistry and Molecular Biology(生物化学与分子生物学高级教程). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 2002. 260.

Spectroscopy Research on Cholesterol in Hypercholesterolemia Serum

LAN Xiufeng¹, LIU Jianguang¹, LIU Ying^{1, 2}, LUO Xiaosen¹, TANG Xirguo³, LU Shiyue³, NI Xiaowu^{1, 2*}

1. Department of Information Physics and Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China

2. Physics Department of Xuzhou Normal University, Xuzhou 221009, China

3. Nanjing Medical College, Second Military Medical University of PLA, Nanjing 210099, China

Abstract The cholesterol with different concentration in hypercholesterolemia serum was studied by the method of spectroscopy technology. The absorption and fluorescence spectra of normal human serum and hypercholesterolemia serum were obtained respectively; the spectral characteristic of each sample and the difference between two kinds of samples were discussed too. The results indicate that the absorption and fluorescence spectra of hypercholesterolemia serum are different from those of normal human serum. The absorptivity and the fluorescence intensity of hypercholesterolemia serum are both higher than those of normal human serum. Besides, there are new absorptive peaks and new fluorescence peaks in the spectrogram. Thus, the abnormalism of cholesterol in serum can be judged by comparing the absorption and fluorescence spectra. The researches in the present paper provide an experimental foundation for the diagnosis of cholesterol in blood.

Keywords Hypercholesterolemia; Serum; Absorption spectra; Fluorescence spectra; Cholesterol determination

(Received Dec. 10, 2004; accepted Apr. 25, 2005)

* Corresponding author