维普资讯 http://www.cqvip.com

S－100蛋白、NSE阳性，而Desmin、Myoglobin和α－1 AT均为阴性。结果提示该瘤起源于雪旺细胞。

参 考 文 献

1.Fisher ER, et al. Cancer 1962;15:936
2.Garancis JC, et al. Cancer 1970;25:542
3.Armin A, et al. Am J Clin Pathol 1983;79:37
4.Nathrath WBJ, et al. Virchows Airchiv A 1986;408:421
5.纪小龙，等.临床与实验病理学杂志 1993;9:62
6.Abenoza P, et al. Ultrastructural Pathology 1987;11:19
7.Shimokama T, et al. Hum Pathol 1992;23:327
8.Buley ID, et al. Histopathology 1988;12:263

(收稿日期 1997－04－21)

Clinicopathologic Study of Granular Cell Tumor

Peng Zhennian, et al
Department of Pathology, College of Basic Medical Sciences

An investigation of 11 cases of granular cell tumor clinicopathologically was performed. Microscopically, the tumors were composed of large cells with abundant granular eosinophilic cytoplasm. The tumor cells had indistinct cell borders and were arranged in nests and cords. Under elcetron microscope, there were abundant autophagic vacuoles in the cytoplasm of tumor cells. Immunohistochemical staining showed that all cases were positive for S－100 protein and NSE, but negative for Desmin, Myoglobin and α－1 AT. The results indicated that the granular cell tumor orginated from Schwann cells.

KEY WORDS Granular çell tumor; Ultrastructure;Immunohistochemistry

302－304

测定K562细胞培养液中苦参碱浓度变化的反相离子对HPLC研究 * (6)

医学检验系 临床生化教研室 刘北忠 * * 蒋纪恺 钟 梁
张 彦 张丽萍 刘小珊

R286.0

提 要 本文建立了一种用于测定苦参碱含量的反相离子对高效液相色谱法(ion－pair HPLC)。该法比较准确、可靠，分离效果好，灵敏度高，可用于细胞培养液中苦参碱的分离测定及鉴定。结合样品前处理，作者运用此法对苦参碱在K562细胞培养液中的浓度变化情况进行了初步分析。发现在我们研究的实验条件下，K562细胞培养液中苦参碱的浓度先呈线性下降趋势，以后1－3天则浓度维持不变。

关键词 苦参碱；离子对高效液相色谱(ion－pair HPLC)；K562细胞 反相离子对
中图分类号 R286.02

苦参碱(matrine)为一种生物碱，来源来豆科苦参(sophora flavescens)、广豆根(s.subprostrata)及同属植物。可溶于水、甲醇、苯、氯仿、乙醚等。具有抗心律失常、抗炎、抗肿瘤、抗病毒及白血病细胞的诱导分化作用[1－7]。苦参碱含量的测定方法有薄层扫描法、旋光度法、分光光度法、毛细管气相色谱法及高效液相色谱法等[8,9]。笔者参照有关文献建立了一种反相离子对高效液相色谱法(ion－pair HPLC)用于测定苦参碱的含量。该法比较准确、可靠、分离效果好、灵敏度高，可用于细胞培

* 国家自然科学基金资助项目 编号:39670881
* * 男，1970－05出生，硕士生。

维普资讯 http://www.cqvip.com

养液中苦参碱的分离测定及鉴定。通过样品前处理，作者运用此法对K562细胞培养液中苦参碱的浓度变化情况进行了初步分析，发现苦参碱浓度在K562细胞培养液中，先呈线性下降趋势，以后1至3天苦参碱的浓度则保持不变。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 标准品苦参碱(99.9%)与氧化苦参碱(99.5%)均由日本大正制药提供。含10%小牛血清的PRMI 1640(GIBCO,USA)细胞培养液。乙腈为色谱纯，其余试剂均为分析纯，甲醇用前重蒸过滤，流动相配制好后过滤并于用前超声脱气。

日本岛津LC-6A高效液相色谱仪，配以SPD-6AV紫外检测器及C-R3A数据处理装置。二氧化碳培养孵箱(Shel.Lab,USA)。

1.2 色谱条件[5-11] C_{18}反相色谱柱(150×4.6mmID,粒径5μm)，流动相为0.05M磷酸二氢钠(磷酸2ml/L)-乙腈-甲醇-过氯酸钠(940:50:10:20)，PH2.0，流速1.5ml/min，柱温40°C，检测波长220nm。

1.3 标准溶液的制备与处理 精密称取苦参碱标准品，配成标准储备液(10mg/ml)。各取2、6、10、14、18μl加入1ml1640培养液中，配成20、60、100、140、180μg/ml的标准溶液。然后按下述样品前处理的方法同样处理，20μl进样分析。

1.4 细胞培养[4,6,7] 取对数生长期的K562细胞，PRMI1640细胞培养液(含10%小牛血清)调整细胞浓度为1×10^6个/ml，加入苦参碱的标准储备液，使终浓度为100μg/ml，分装到8个细胞培养瓶中，每瓶3ml，置37°C，5%CO_2孵箱中分别培养0h、1h、3h、5h、7h、24h、48h、72h。取出进行HPLC分析。

1.5 样品前处理[10] 分别将各瓶K562细胞培养液取到离心管中，离心500rpm5min，准确取上清液200μl加20%NaOH50μl，混匀。加3ml乙醚，振荡0.5min，离心4000rpm5min，全取乙醚层，45°C水浴蒸干。测定前加重蒸甲醇0.4ml，振荡溶解，20μl进样分析。

2 结果与讨论

2.1 HPLC条件的选择[11] 根据苦参碱为脂溶性样品，且在PH较低的条件下为阳离子，故采用C_{18}反相离子对色谱法。反离子为阴离子型的过氯酸根。以磷酸二氢钠和磷酸构成缓冲液维持流动相的PH值。

按本文所述色谱条件，苦参碱与氧化苦参碱(Oxymatrine)的保留时间分别约为14min和21min，可有效分离。色谱图见图1。

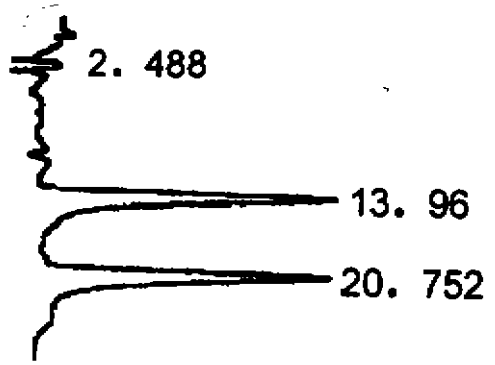


图1 苦参碱与氧化苦参碱色谱图

苦参碱与氧化苦参碱均为常用中药——苦参中的主要生物碱，二者结构极为相似，且对K562细胞都有诱导分化作用[7]。能有效分离二者，一方面反映了本法分离效果好，另一方面也为苦参碱与氧化苦参碱的含量测定和研究提供了一个行之有效的方法。

本文所述流动相，PH等于2.0，经过长时间的实践证明对C_{18}反相柱没有影响。C_{18}反相柱在PH较低的环境中可正常使用，不影响分离效果。

2.2 标准曲线的制备 各标准溶液按前述色谱条件与方法，分别进样分析，测定结果。以苦参碱浓度对其峰高值作线性回归分析，得回归方程为：峰高(cm)=-0.02+0.037×苦参碱浓度(μg/ml)，$r\approx0.9999$($P<0.001$，总体相关系数的95%可信区间为0.9984～1.0000)，线性相关好。反映苦参碱浓度在20～180μg/ml的范围内与峰高值呈线性相关。

2.3 细胞培养液中苦参碱含量测定 按前述方法，样品测定结果见表1。以时间对苦参碱浓度作图(见图2)。反映苦参碱在K562细胞培养过程中的浓度变化情况。

从图上看，前7h苦参碱浓度随细胞培养时间变化呈线性减小的趋势。以时间(0、1、3、5、7h)对苦参碱浓度(100.00、97.84、94.32、89.73、86.22μg/ml)作线性回归分析，得回归方程为：苦参碱浓度(μg/ml)=99.96-1.98×时间(h)，$r\approx-0.9991$($P<0.001$，总体相关系数的95%可信区间为-0.9857～-0.9999)，线性相关好。从回归方程

维普资讯 http://www.cqvip.com

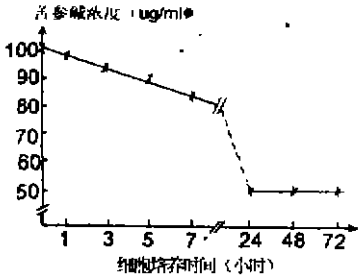
表1 K562细胞培养液中苦参碱含量测定结果

管号	细胞培养时间(h)	峰高(cm)	苦参碱浓度(μg/ml)
1	0	3.68	100.00
2	1	3.60	97.84
3	3	3.47	94.32
4	5	3.30	89.73
5	7	3.17	86.22
6	24	2.02	55.14
7	48	2.02	55.14
8	72	2.02	55.14

看，可知苦参碱浓度每小时减小1.98μg/ml。苦参碱浓度在细胞培养7h内呈线性减小。若按此回归方程外推，可得24h的苦参碱浓度为52.43μg/ml，这与我们测得的苦参碱在24h的浓度55.14μg/ml十分接近。以后1至3天其浓度不再减小，而维持55.14μg/ml不变。我们前期苦参碱对K562细胞的诱导分化研究发现，追加苦参碱优于一次加药方式的诱导分化效果。以上结果为研究苦参碱诱导分化K562细胞的加药方式提供了依据，为进一步研究其诱导分化机理提供了信息。由于苦参碱浓度不同，对K562细胞的诱导分化作用大小也不同，提示我们在研究用某一浓度的苦参碱对K562细胞的诱导分化作用时，应及时追加药物，保证苦参碱浓度维持在一个相对恒定的范围内，以正确反映苦参碱浓度与K562细胞的诱导分化作用大小的关系，进一步寻找诱导分化的最适浓度。同时由于追加药物的量与时间间隔对K562细胞诱导分化作用亦有影响，因此确定苦参碱浓度在细胞培养液中的变化情况并探明原因，将为制订追加药物的方式提供科学依据。

本文建立了一种比较准确、可靠、分离效果好、灵敏度高的测定K562细胞培养液中苦参碱浓度的方法，并初步分析了苦参碱在K562细胞培养液中的浓度变化情况。实验方法与测定结果对科研及临床具有指导与应用价值。

（参加本课题的尚有本课题组成员许相儒、何于娟、朱旦、舒朝忠、戴碧涛、秦建平、司维柯、冯文莉、刘岳凤等同志。）



苦参碱浓度(μg/ml)

细胞培养时间(h)

图2 苦参碱浓度随细胞培养时间变化曲线

参 考 文 献

1.陶上秉，等.中国药学杂志 1992;27:201
2.张宝恒，等.中国药理学报 1990;11:253
3.巫善明，等.中西医结合肝病杂志 1993;3(4):18
4.蒋纪恺，等.第三届亚洲临床肿瘤学会国际学术讨论会论文摘要 1996;pp45
5.张 彦，等.国外医学临床生物化学与检验学分册 1996;17(5):229
6.秦建平，等.重庆医科大学学报 1994;19(2):151
7.张 彦，等.第三届亚洲临床肿瘤学会国际学术讨论会论文摘要 1996;79
8.山本惠一，等.Natural Medicines 1994;48(3):180
9.平山念良，等.Natural Medicines 1995;49(3):317
10.王平全，等.药学学报 1994;29(5):326
11.L.R.斯奈德，等.《现代液相色谱法导论》第二版

（收稿日期 1997－04－01）

Research for determining the concentration of matrine in K562 culture－medium by reversed phase ion－pair HPLC

Liu Beizhong, et al
Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Laboratory Medicine

A reversed phase ion－pair high performance liquid chromatographic method was established for determining the concentration of matrine. The method was accurate and reliable with fine resolution and high sensitivity.Matrine in medium can be seperated,determined and identified by this method. After extracted from the medium,the matrine was analysed preliminarily. We found that the concentration of matrine had a linear decline in the first day and was invariable during two days after that.

KEY WORDS Matrine;Ion－pair HPLC;K562 cell