DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.08.059

糖凝胶方法电泳鉴定,简单、高效、经济实用,并且能达到同用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳相同的实验结果。因此本方法在常规琼脂糖凝胶电泳的基础上所作的每一项改进均是为了避免RNA在电泳过程中被水解,比如对所有电泳器具彻底的清洗处理就是为了尽量清除器具上存在的RNase;在RNA样品中加入用DEPC水配制的50%甘油作为上样缓冲液,目的也是为了在RNA样品中避免加入其他试剂时造成RNase的污染。

在提取的真核细胞总RNA中核糖体RNA(rRNA)占总RNA的90%以上,它们主要由28 S、18 S、5.8 S、5 S组成,28S(约4.5 kb)、18S(约2.1 kb)、5.8 S(5 S)这三类rRNA的摩尔浓度大致相等,但他们的分子量相差较大,在紫外灯下的亮度依次为28 S> 18 S> 5.8 S(5 S)。在电泳后能观察到28 S、18 S、5.8 S(5 S),特别是28 S清晰的带型,通常认为所提取的RNA未被降解,可以用提取的RNA进行后续实验。我们实验室还提取过多种组织RNA如外周血淋巴细胞培养后的RNA、脂肪组织RNA、肝脏RNA等,经此方法鉴定的RNA的质量同分子克隆手册等参考书用变性琼脂糖凝胶鉴定的RNA完全无异,结果稳定可靠。

关键词:RNA;电泳;质量鉴定
中图法分类号:R394-33 文献标识码:B

参考文献

[1] J. 萨姆布鲁克, E. 弗里奇, T. 曼尼蒂斯 著. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京:科学出版社, 1992.366-369.
[2] 卢圣栋, 马清钧, 刘德培, 等 著. 现代分子生物学实验技术[M]. 第2版. 北京:中国协和医科大学出版社, 1999.88-90.

(编辑 薛国文)

文章编号:1000-5404(2002)08-0993-02

技术方法

反相高效液相色谱法测定小鼠血浆和组织中阿昔洛韦浓度

An improved RP-HPLC method for the determination of acyclovir concentration in plasma and tissues of mice

项贵明,汤建林,周世文,徐 颖,黄永平 (第三军医大学附属新桥医院临床药理基地,重庆 400037)

提 要:目的 改良HPLC用于测定小鼠血浆和组织中阿昔洛韦浓度。方法 使用Beckman Gold系列高效液相色谱仪,ODS柱,流动相为甲醇-水(5∶95,V/V),流速1.0 ml/min,检测波长254 nm,样品采用12%三氯醋酸去蛋白。结果 血浆和组织中阿昔洛韦浓度在0.05±20 mg/L范围内与峰面积呈良好线性关系,最低检测浓度分别为0.02,0.05 mg/L,天内及天间精密度均小于6%。结论 该方法灵敏、精确,可供药代动力学研究使用。

阿昔洛韦(Acyclovir,ACV)为核苷类抗病毒药,已成为治疗单纯疱疹和带状疱疹病毒感染尤其是重症感染的首选药。后经临床试验证实其对慢性乙肝也有治疗效果。其血中药物浓度的测定虽已有HPLC方法报道[1,2],但不理想且无法用于测定靶器官中的药物浓度。为此,对ACV的HPLC检测条件进行了较为系统的研究,改进后的方法用于测定血浆、肝、脾、肾组织中ACV浓度,获得了较好的结果。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

阿昔洛韦(纯度99.5%,上海第六制药厂),甲醇、三氯醋酸(国产分析纯),水为一级纯(电阻率> 15 MΩ/cm)

1.2 样品制备

昆明株小鼠,体重(30±2)g,雌雄各半,眼眶取血后断头处死。收集肝、肾、脾等组织,取血浆0.2 ml和组织匀浆0.2 g于离心管中,加12%三氯醋酸0.4 ml,旋涡振荡60 s,12 000 r/min离心5 min,吸取20 μl上清液进样。

1.3 色谱条件

Beckman Gold系列高效液相色谱仪(美国Beckman公司),ODS柱,流动相为甲醇-水(体积比5∶95),流速1.0 ml/min,检测波长254 nm,柱温为室温。

2 结果

2.1 色谱图

按本方法测得的色谱图见图1。在所检测的小鼠血浆及肝组织中,ACV与杂质峰完全分离。

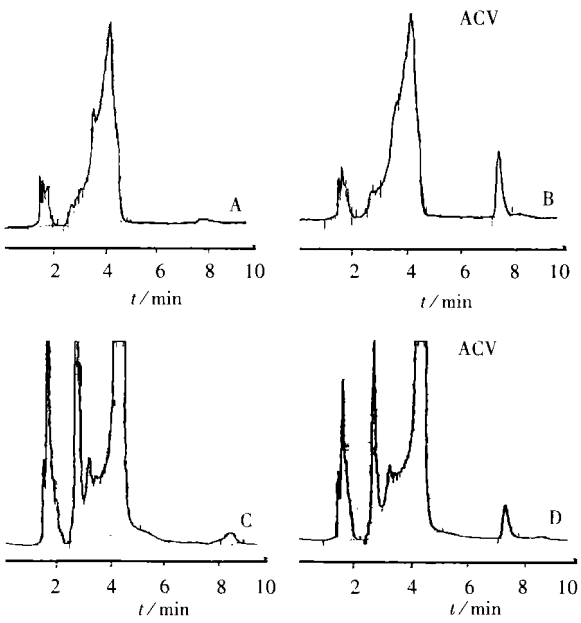
2.2 ACV出峰时间的确认

小鼠尾静脉注射ACV5 mg/kg后10 min的血浆及组织匀浆中加入一定量的ACV标准液后测得的色谱峰与相应的空白对照品完全重叠,且前者峰较高,不同组织中ACV的出峰时间基本一致(tR= 7.50 min),证明所分离的化合物为ACV。

作者简介:项贵明(1974-),男,湖北省武穴市人,硕士,主治医师,主要从事肝靶向药物的研究。电话:(023)68755114-74890

收稿日期:2000-11-15;修回日期:2001-03-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



A: 血浆空白; B: 血浆 ACV 标准; C: 肝脏空白; D: 肝脏 ACV 标准

图 1 小鼠组织空白及标准品的色谱图

2.3 标准曲线

在 0.2 ml 血浆和 0.2 g 组织匀浆中分别加入 50 μl 不同浓度的 ACV 标准液, 使其终浓度分别为 20.0、10.0、5.0、2.0、1.0、0.5、0.2、0.1、0.05 mg/L, 按上述方法提取测定。以峰面积 Y 对浓度 C 作线性回归, 得回归方程分别为:

血浆 $Y=1.078C+0.957$ $r=0.995$, 肝 $Y=0.975C+0.385$ $r=0.998$

肾 $Y=0.994C+0.551$ $r=0.999$, 脾 $Y=0.993C+0.738$ $r=0.998$

2.4 检测限

以色谱峰信噪比 S/N=3 为标准, 血浆和组织中 ACV 的检测限分别为 0.02 mg/L 和 0.05 mg/L。

2.5 精密度

在 0.2 ml 血浆和 0.2 g 组织匀浆中分别加入 50 μl 不同浓度的 ACV 标准液, 配成 0.5、2.0、10.0 mg/L 三个浓度, 按样品处理的方法提取测定。1 d 内重复测定 5 次求得天内精密度; 每天 2 次, 重复测定 5 d 求得天间精密度。

表 1 ACV 测定方法精密度试验结果(RSD, %, $n=5$)

配制浓度 (mg/L)	血浆		肝脏		肾脏		脾脏	
	天内	天间	天内	天间	天内	天间	天内	天间
0.5	4.2	5.1	3.2	4.3	2.1	4.6	2.4	5.5
2.0	2.8	3.0	2.6	1.9	1.4	2.9	1.8	3.7
10.0	1.1	2.3	1.7	2.5	0.8	1.3	0.7	1.6

2.6 回收率

在血浆和组织匀浆中分别加入一定量的 ACV, 提取测定, 测得的峰面积根据标准曲线回归方程计算测得量, 比较测得量与加入量, 结果见表 2。

表 2 ACV 测定方法回收率试验结果($n=5$)

样品	加入浓度(mg/L)	测得浓度*(mg/L)	回收率(%)	平均回收率(%)
血浆	0.50	0.48±0.07	95.96	
	2.00	1.96±0.12	98.27	98.31
	10.00	10.07±0.17	100.70	
肝	0.50	0.50±0.01	102.09	
	2.00	2.03±0.30	101.60	101.93
	10.00	10.13±0.46	102.10	
肾	0.50	0.49±0.04	99.21	
	2.00	2.02±0.29	101.16	100.88
	10.00	10.05±0.57	102.26	
脾	0.50	0.51±0.02	100.96	100.29
	2.00	1.96±0.11	98.56	
	10.00	10.21±0.55	101.35	

*: 为 5 次测量平均值 $\bar{x}\pm s$

3 讨论

国内外文献报道多用 HPLC 法测定 ACV 在血浆中的浓度[3,4]。内标法、外标法均有应用, 所用内标物为对乙酰氨基酚, 本方法采用外标法定量, 避免了由于内标物加入所带来的误差。样品处理采用沉淀蛋白后直接进样的方法, 三氯醋酸、高氯酸、乙腈、甲醇等都可以用于沉淀蛋白。其中乙腈的沉淀效果较好, 但 ACV 在乙腈中的溶解性很差导致样品处理过程中部分 ACV 沉淀损失, 引起高浓度样品峰面积偏低, 线性较差; 甲醇、三氯醋酸、高氯酸沉淀蛋白所需用量均较大, 其中 ACV 在三氯醋酸、高氯酸中溶解性良好, 但高氯酸处理样品后杂质峰多且对 ACV 的测定有干扰。经多次试验, 我们用 12%的三氯醋酸去蛋白, 不仅效果良好, 避免了繁琐的样品处理过程, 而且可用于肝、肾、脾等组织。流动相以往报道多用甲醇-水体系, 但还需加入磷酸盐缓冲液或其它盐类。经试验, 流动相用甲醇-水(5∶95)时峰型好, ACV 的 $t_R=7.50$ min 加缓冲盐后 ACV 的峰型无改善, 且盐易结晶析出, 损害柱子。方法学探索说明本法为测定血浆和组织中 ACV 浓度的简便、灵敏、可行的分析方法。

关键词: 阿昔洛韦浓度; HPLC

中图法分类号: R446.1; R978.7 文献标识码: B

参考文献:

[1] Peh K K, Yuen K H. Simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of acyclovir in human plasma using fluorescence detection[J]. J Chromatogr Biomed Sci Appl, 1997, 693(1): 241-244.

[2] 石 晶, 宋洪杰, 李珍, 等. 阿昔洛韦片的人体相对生物利用度[J]. 中国临床药学杂志, 1999, 8(5): 287-290.

[3] 张宏伟, 潘家祜, 吴 超, 等. HPLC 测定血清中阿昔洛韦浓度的方法改进[J]. 药物分析杂志, 1998, 18(2): 90-92.

[4] Caamano M M, Garcia L V, Elorza B, et al. Improved RPLC determination of acyclovir using hexylamine as silanol masking agent[J]. J Pharm Biomed Anal, 1999, 21(3): 619-624.

(编辑 郭建秀)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net