DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.04.039



图1 mtDNA的琼脂糖凝胶电泳结果
1、2、3、4分别为鼠肝脏、脾脏、心脏、肌肉组织细胞mtDNA(各1例);5为人DNA/Hind Ⅲ标记

2.3 PCR产物分析

细胞总DNA样品既可扩增出mtDNA D环的1 100 bp片段,也可扩增出定位于核DNA上的脂蛋白脂酶基因534 bp片段。而本实验所获得的mtDNA样品,只能扩增出mtDNA D环的1 100 bp片段,见图2。



图2 PCR产物分析结果
1为mtDNA样品,引物P1-P2;2为总DNA样品,引物P3-P4;3为mtDNA样品,引物P1-P2加P3-P4;4为总DNA样品,引物P1-P2和P3-P4;5为DNA Marker

3 讨论

本方法是利用非离子型去污剂TritonX-100能溶解除核被膜以外的所有细胞膜的特点[2],通过适当离心,分离细胞核/细胞质,来获取mtDNA。其主要优点是不需要分离细胞的总DNA,也不需要分离和纯化细胞线粒体,而从完整细胞直接分离mtDNA。方法简单快速,对实验设备和试剂要求不高,一般实验室均可应用。mtDNA样品紫外吸收光谱分析结果表明,所得核酸样品纯度产率较高,方法重复性好。PCR方法检测结果证实所得样品为mtDNA,且该样品中无核DNA污染。由此可见,本方法制备mtDNA完全可以满足常规分子生物学和分子遗传学研究工作的需要,因此,值得推广应用。

关键词:mtDNA;制备方法
中图法分类号: R394.3 文献标识码:B

参考文献:

[1] 金冬雁,黎孟枫 译.分子克隆实验指南[M].第2版.北京:科学技术出版社,1992.464-466.
[2] Hymer W C, Kuff E L. Isolation of nuclei from mammalian tissues through the use of Triton X-100[J]. J Histo Chem Cytochem, 1994, 312(12): 359-360.

(编辑 汪勤俭)

技术方法

文章编号:1000-5404(2000)04-0392-03

HPLC法测定红豆杉皮粗提物中紫杉醇的含量

Determination of taxol in the crude extract of taxus bark by HPLC

刘松青,高振同,代 青,张春华 (第三军医大学附属西南医院药剂科,重庆 400038)

提 要:目的 建立测定红豆杉皮粗提物中紫杉醇含量的HPLC法。方法 以C_{18}柱为固定相,以甲醇-乙腈-水-四氢呋喃(体积比为15∶40∶40∶5)为流动相,检测波长254 nm,柱温(30±1)℃,流速1.2 ml/min,以峰高外标法定量。结果 标准曲线:C=0.1098+0.002613R,r=0.9996,样品中紫杉醇含量为12.61%,加样回收率102.1%,日内精密度RSD<2%(n=7)。结论 本法操作简便,灵敏度高,专属性强。

作者简介:刘松青(1964-),男,湖南省安乡县人,博士,主任药师,主要从事医院药学方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68754225
收稿日期:1999-03-20;修回日期:1999-08-13

紫杉醇(Taxol)是继阿霉素后最热点的新抗癌药,它主要从红豆杉属植物的茎皮中提取分离获得。紫杉醇对晚期卵巢癌,转移性乳腺癌和非细胞性肺癌等多种癌症有显著疗效。目前国内外紫杉醇的供药主要依

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

靠从植物中提取，因此涉及到如何分离并去掉与紫杉醇结构相似的其它紫杉烷类化合物。由于这些紫杉烷类化合物在化学结构和极性等方面与紫杉醇极为相似,因此给分离检测工作带来很大困难。另外,粗品中紫杉醇及其类似物的含量对采用何种分离手段有一定指导意义，因此了解红豆杉皮粗提物中紫杉醇含量十分必要。经过试验摸索,建立了一种 HPLC 法测定红豆杉粗提物中紫杉醇的方法，本法操作简便，灵敏度高,专属性强。

1　实验条件

1.1　仪器

Waters 810 液相色谱，包括 510 泵，484 可变波长紫外检测器，U6K 进样器，Baseline 810 计算机数据处理系统，Mill-Qplus 超纯水器(Millipore)。H66025 超声波清洗机。

1.2　色谱条件

μ-Bondapak C18 柱 (3.9 mm×300 mm，10 μm)；流动相为甲醇 - 乙腈 - 水 - 四氢呋喃(体积比 15 ∶40 ∶40 ∶5)(需超声脱气后使用)；流速为 1.2 ml/min，柱温(30±1) ℃，进样量 20 μl，检测波长 254 nm，灵敏度 0.005 AUFS。

1.3　试剂与药品

紫杉醇、三尖杉宁碱标准品由中科院昆明植物研究所提供；红豆杉皮粗提物由重庆赛诺制药公司提供。甲醇为色谱纯 (天津四友生物医学技术有限公司生产)，乙腈为色谱纯 (浙江黄岩化工试剂厂生产)，四氢呋喃为分析纯 (郑州化学试剂二厂生产)，水为去离子水。

2　实验方法和结果

2.1　色谱行为

在本文色谱条件下，红豆杉皮粗提物色谱图见图 1。图中可见紫杉醇与其主要干扰成分三尖杉宁碱分离良好。

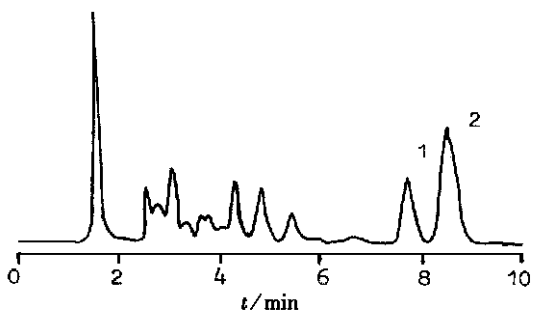


图 1　红豆杉皮粗提物色谱图

1. 三尖杉宁碱　2. 紫杉醇

2.2　紫杉醇标准曲线的制备

精密称取紫杉醇标准品 5 mg，溶于 10 ml 甲醇中，分别取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 ml 于 10 ml 容量瓶中，用流动相稀释至刻度，得不同浓度的标准液。取上述标准液 20 μl 分别进样，在本试验色谱条件下测定紫杉醇峰高，经回归得紫杉醇浓度 (C) 与峰高(R)的直线回归方程：C =0.1098+0.002631 R，r =0.9996。紫杉醇在 5 ~ 25 μg/ml 范围内有良好的线性关系。

2.3　日内精密度

取高中低 3 个浓度标准液于日内连续进样 7 次，结果见表 1。

表 1　精密度测定结果(n = 7)

浓度(ρ_B/μg·ml^{-1})	测定量(ρ_B/μg·ml^{-1})	RSD(%)
5	5.011	1.296
15	14.836	1.809
25	24.652	1.330

2.4　稳定性

取高中低 3 个浓度标准液每隔 24 h 测定 1 次，连续测定 3 次，结果显示标准液在 24 h 内基本稳定，48 h 后浓度显著降低。说明紫杉醇在溶液中不够稳定，测定应在 1 d 内完成。

2.5　加样回收率

取已知浓度样品溶液 4 ml 3 份(浓度为 17.15 μg/ml)，分别加入 50 μg/ml 的标准液 1、2、3 ml，用流动相定容至 10 ml，混匀；在上述条件下进行测定，分别得回收率为：102.7%、103.7%、100.0%，平均为 102.1%，RSD 为 1.87%。

2.6　红豆杉皮粗提物的含量测定

准确称取红豆杉皮粗提物约 12 mg，于 100 ml 容量瓶中，先加甲醇：乙腈(3 ∶8)混合溶剂 55 ml，充分振摇，使紫杉醇充分溶解，再用水：四氢呋喃(8 ∶1)混合溶剂稀释至刻度，取以上溶液适量，离心(130 000 r/min，5 min)，取上清液在本文色谱条件下进行测定，记录峰高，代入回归方程，求得红豆杉皮粗提物中紫杉醇含量，结果见表 2。

表 2　红豆杉粗提物的紫杉醇含量测定(n = 3)

样品	粗提物含量 (m/mg)	所测浓度 (ρ_B/μg·ml^{-1})	含量 (%)	平均含量 (%)
样品 1	12.16	15.20	12.50	
样品 2	12.05	15.09	12.52	12.61
样品 3	12.21	15.59	12.77	

3　讨论

在本试验中，曾出现溶剂与流动相不相匹配，造成出峰时间变化大等问题，影响测定结果。后采用流动相配制对照品及样品，消除了溶剂与流动相不匹配的问题。

在色谱条件的摸索中，流动相曾用甲醇 - 乙腈 - 水(体积比 12 ∶40 ∶48)，分离较好，但保留时间太长(t_R >20 min)。后选用甲醇 - 乙腈 - 水 - 四氢呋喃(体积比 15 ∶40 ∶40 ∶5) 此条件下分离较好，保留时间大大缩短。

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

关键词:红豆杉皮粗提物;紫杉醇;HPLC
中图法分类号:R914.3　　文献标识码:B

参考文献:

[1] 高山林, 朱丹妮, 周荣汉, 等. 东亚和北美产红豆杉属七种植物中紫杉醇及短叶醇的含量[J]. 中国药科大学学报, 1995, 26(1): 8－10.
[2] 刘光明, 朱旭祥. 抗癌新药紫杉醇的构效关系及药理和临床研究[J]. 大理医学院学报, 1996, 5(30): 47－49.
[3] 俞培忠, 李幼萍, 吴锦霞. 紫杉醇的提取分离和检测方法的研究进展[J]. 中国药学杂志, 1996, 31(7): 399－401.
[4] 熊　杰, 曾道刚, 邱　玲, 等. 云南红豆杉醇含量的 HPLC 测定[J]. 药物分析杂志, 1997, 17(2): 123－124.

（编辑　刘　鹏）

技术方法

文章编号:1000-5404(2000)04-0394-02

微波消解－光度法测定肺组织中磷含量

Study on the content of phosphorus in lung tissues with microwave digestion－photometric assay

熊　刚[1], 张　莉[2], 肖正华[2], 张世德[2]　(第三军医大学: [1] 附属西南医院胸心外科; [2] 医学检验系分析化学教研室; 重庆 400038)

提　要: 目的　研究肺组织中磷的分析方法。方法　利用微波处理试样, 并采用光度法测定消解液中的磷含量。结果　该法的测定结果与湿法消化、干法消化相当; 磷钼蓝的最大吸收波长为 800 nm, 表观摩尔吸光系数为 2.32×10^4 L·mol^{-1}·cm^{-1}, 磷在 0～1 μg/ml 内符合比尔定律。结论　本法具有快速, 灵敏度、准确度、精密度高的优点, 适用于生物试样中磷的测定。

肺组织中磷的研究对临床医学具有一定意义[1]。近年兴起的微波消解在试样前处理中以快速、分解完全、元素无挥发损失、酸耗量少等优点, 日益受到青睐[2]。本研究采用微波消解－光度法测定肺组织中磷, 大大缩短了样品处理时间, 方法的灵敏度、精密度及准确度高, 适用于生物样品的分析测定。

1　材料与方法

1.1　仪器和试剂

市售格兰仕微波炉; UV9501 紫外分光光度计（天津鲜一器械有限公司）; CS501 超级恒温器(重庆实验设备厂)。

磷标准储备液: 用 KH_2PO_4 配成含 PO^{3-}_4 10 μg/ml 的储备液, 用时逐级稀释成不同浓度的溶液。

Tris 缓冲液: pH 7.0

定磷试剂: 3 mol/L 硫酸溶液, 3%钼酸铵溶液, 20%抗坏血酸溶液, 临用时等体积混合。

以上试剂均为分析纯, 用二次蒸馏水配制。

1.2　实验方法

1.2.1　微波消解　称取试样 0.25 g 于微波消解罐中, 加入 4∶1 HNO_3-$HClO_4$ 的混合消解试剂 2.0 ml, 盖好密封内盖和外盖, 置于微波炉中, 高火消解 5 min。将消解罐取出后以空气或水冷却至常压, 先将消解液加热赶尽 NO_2, 再转移至 100 ml 容量瓶中, 定容。

1.2.2　定量测定　分别取试液 3.0 ml 和适量磷标液于刻度试管中, 加水补足各管溶液至 3.0 ml, 加入 Tris 缓冲液 3.0 ml, 摇匀后再加定磷试剂 3.0 ml, 将试管置于 45℃恒温水浴中反应 20 min, 取出冷却后, 以试剂空白作参比, 用 1 cm 比色皿, 在在 800 nm 波长处测定吸光度值。

2　结果与讨论

2.1　消解试剂的选择

为了获得好的消解效果, 提高回收率, 本法选用 HNO_3-$HClO_4$ 为微波消解剂, 并对其体积比为 1∶1, 2∶1, 3∶1, 4∶1 分别进行了标准加入回收实验, 结果表明, 随着高氯酸在消解混合液中的比例不断减少, 肺组织中磷的回收率逐渐提高。这主要是因为利用微波能在较高温度和压力下进行试样分解, 使高氯酸的氧化能力大大增强, 若消解混合液中其比例过高, 由于氧化能力过强, 反应过快, 易使样品发生碳化而使回收率降低[3], 同时因为分解反应为放热反应, 更增强了这种趋势。所以本法选用 4∶1 的 HNO_3-$HClO_4$ 混合液为消解试剂。

作者简介: 熊　刚(1969－), 男, 重庆市人, 医师。电话: (023) 68754000－73055

收稿日期: 1999-10-27; 修回日期: 1999-12-30

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