DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.04.040



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$2.32\times10^4$ 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

2.2　吸收曲线

取磷标液 2.0 ml，按实验方法测定其吸收曲线，实验表明，该显色体系的最大吸收波长为 800 nm。

2.3　显色条件

按试验方法，调节不同酸度进行测定，结果显示，在 0.25～0.35 mol/L 硫酸酸度范围内吸光度值大且稳定，本文选用 3 mol/L 硫酸溶液 1.0 ml。在不同温度、不同时间下显色，测定溶液吸光度，可知显色的最佳温度为 45℃，反应 20 min 后吸光度达到最大值，且保持 24 h 稳定不变。

2.4　工作曲线

配制一系列磷标准溶液，按实验方法测定吸光度并用最小二乘法处理得工作曲线，磷在 0～1.0 μg/ml 范围内符合比耳定律，其回归方程为 $A = 2.389 \times 10^{-3} C + 0.241$，$r = 0.9994$，表观摩尔吸光系数为 $2.32 \times 10^{4}$ $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$。

2.5　试样前处理方法的比较

为验证方法的准确性，本文进行了微波消解与湿法消化、干法消化处理方法的比较，结果见表 1。3 种前处理法结果吻合，说明本法的准确性。

**表 1　3 种前处理肺组织方法中磷含量对照(mg/g)**

| 样品 | 微波消解法 | 湿法消化法 | 干法消化法 |
|---|---|---|---|
| 1 | 0.332 | 0.337 | 0.331 |
| 2 | 0.359 | 0.345 | 0.360 |
| 3 | 0.336 | 0.344 | 0.332 |
| 4 | 0.371 | 0.361 | 0.367 |
| 5 | 0.324 | 0.354 | 0.328 |

2.6　试样分析

对 2 份肺组织样品按实验方法重复测定 6 次，计算方法精密度。在此试样中，加入磷标准液，重复测定 5 次，以平均值计算回收率，结果见表 2。

**表 2　肺组织中磷的测定结果($n = 6$)**

| 样品 | 磷加入量(mg/g) | 磷总量(mg/g) | 回收率(%) | RSD(%) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | - | 0.329 | - | 1.5 |
| | 0.500 | 0.836 | 101.4 | 1.4 |
| 2 | - | 0.371 | - | 1.6 |
| | 0.500 | 0.864 | 98.6 | 1.8 |

2.7　共存离子干扰

取磷标液 2 μg，按实验方法操作，当相对误差≤±5%时，可允许以下离子（以 mg 计）存在：$Na^{+}$、$K^{+}$（1.5）；$Ca^{2+}$、$Al^{3+}$、$Fe^{2+}$、$Bi^{3+}$、$Mg^{2+}$（1.0）；$Fe^{3+}$、$Cu^{2+}$、$Zn^{2+}$、$Ni^{2+}$、$Cr^{3+}$（0.2）；$SiO^{2-}$（0.1）；$NO^{-}$、$CO^{2-}$（200）。As（Ⅴ）的干扰较重，可加入适量 12% $Na_2S_2O_3$ 溶液消除。

关键词：微波消解；光度法；肺组织；磷
中图法分类号：R446.9　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 康格非．临床生物化学[M]．北京：人民卫生出版社，1989.86－95.
[2] 陈月莉，徐文强．密闭微波溶样方法的进展[J]．分析仪器，1997，4：12－14.
[3] 李攻科，何小青，熊国华，等．用微波消解气相色谱法测定鱼肉中的有机氯农药[J]．分析测试学报，1999，18(4)：5－8.

（编辑　谢义霞）

文章编号：1000-5404(2000)04-0395-03

技术方法

# 组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)新型突变体克隆载体的构建

# Construction of clone vector of tissue type plasminogen activator(t-PA) mutants

周　红[1]，王国力[2]，黄培堂[2]，黄翠芬[2]　([1]第三军医大学附属西南医院烧伤研究所，重庆　400038；[2]北京军事医学科学院八所三室，北京　100071)

提　要：目的　构建含有 K10Q、R30I、S165W 及 K10Q/R30I/S165W 4 种 t-PA 突变体。方法　采用 PCR 重叠延伸法进行突变体的构建。结果　成功地构建了上述 4 种 t-PA 突变体克隆质粒，测序结果表明构建完全正确。结论　PCR 重叠延伸法为构建突变体的可靠快捷的方法。

基金项目：总后"九五"重点课题
作者简介：周　红(1964－)，女，江苏省南京市人，博士，副研究员，主要从事烧伤感染方面的研究，发表论文 11 篇。电话：(023)68753780
收稿日期：1999-07-18；修回日期：2000-03-09

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