15.12%；E/T＝25 时为 31.95±15.22%；因此我们认为用^{3}H-TdR 释放法检测自然杀伤细胞活性时可采用 4h 孵育法。12 例肿瘤病人自然杀伤细胞活性在 E/T＝25 时为 13.25±7.65%，显著低于健康献血员相同效靶比的 NK 细胞活性(31.95±15.22)($P<0.01$)。此结果符合肿瘤病人免疫功能低下的一般规律。

关键词 杀伤细胞；天然；胸腺嘧啶核苷分析

参考文献

1. 黄晋生 刘为纹 晋华源。胃癌及慢性萎缩性胃炎患者自然杀伤细胞活性的观察。第三军医大学学报 1988；10(增刊)：109

(收稿：1991-09-11；修回：1992-01-18)

高效液相色谱—电化学检测法测定心肌组织中的儿茶酚胺

朱珠 陈兆珍 (第三军医大学训练部中心实验室) 630038

儿茶酚胺(CAs)包括肾上腺素(A)，去甲肾上腺素(NA)及多巴胺(DA)，是人体含量极微而又具有重要生理活性的激素和神经递质，为生理学及临床医学上重要研究对象。测定这些物质国内外曾有报道用高效液相色谱(HPLC)、气质联用、放射免疫和酶免疫等分析方法[1,2]，但这些方法分别存在操作手续麻烦，价格昂贵等缺点。近几年兴起的 HPLC—电化学检测分析法，具有快速、简便、灵敏、能同时测定 CAs 及其代谢产物的优点，是目前比较理想的检测方法[3]。本实验采用反相离子对色谱—电化学检测分析方法，以 D-樟脑-β-磺酸为离子对试剂[4]，生物样本处理简单，较好的测定了这类化合物。

1 材料与方法

1.1 仪器

Waters HPLC(810 系列)，配备 510 泵，U6K 进样器，460 电化学检测器。

1.2 试剂

去甲肾上腺素(NA)、肾上腺素(A)、多巴胺(DA)均由本校烧伤研究所提供。甲醇、乙腈为色谱纯，其余试剂为分析纯，实验用水为超纯水(经 Millipore 超纯水器净化)。

1.3 色谱条件

色谱柱：waters Bondpark C_{18}柱(3.9mm×30cm)。流动相：每 1000ml 流动相中含 D-樟脑-β—磺酸 10mmol/L，KH_2PO_4 0.05mol/L，Na_2.EDTA 0.1mmol/L，甲醇 100ml，乙腈 20ml。5mol/L NaOH 调 pH 为 3.5 左右。流量：1.0ml/min，检测灵敏度：10nAFS，进样体积：50μl，工作电压：+0.65V。

1.4 样本采集

麻醉条件下活体取狗心肌组织，加入 0.1mol/L 高氯酸冰浴中制成匀浆(1mg 组织加 20μl 左右)，在 18 000 转/min，4℃离心 20min，取上清液进样分析。

2 结果

2.1 实验色谱图：

图 1 为混合标样分离色谱图，从图中可以看出 NA、A、DA 都达到基线分离。

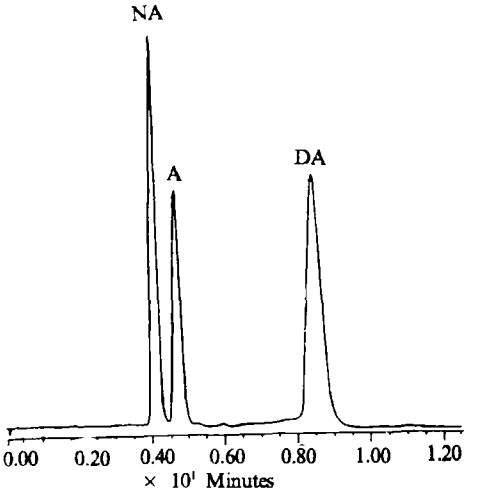


图 1 CAs 混合标准液色谱图

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 线性

本法线性范围 100pg—20ng(图 2)。

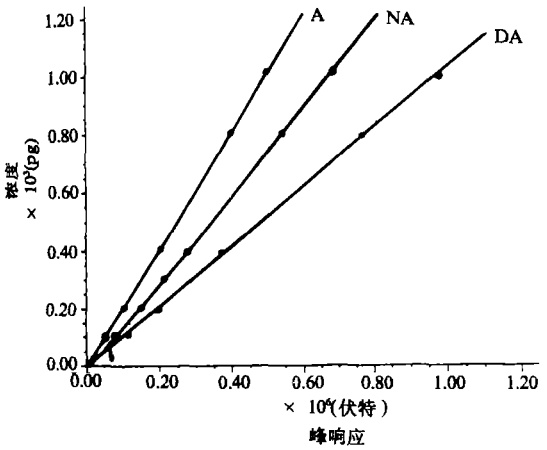


图 2 NA、A 及 DA 的标准曲线

NA:C=−14.3820+0.001481×R r =0.9998

A:C=−2.4781+0.002065×R r =0.9993

DA:C=−1.0859+0.001036×R r =0.9990

2.3 准确度及精密度试验

同一份样品在批内、批间的精密度见表 1。

表 1 NA.A.DA 的精密度

	CV(%) 批内	(n =5) 批间
NA	1.90	1.85
A	1.72	2.63
DA	4.38	4.05

取不同量的标准品加入到狗心肌组织中,按样品处理方法处理,计算其回收率,结果见表 2。

表 2 NA.A.DA 的回收率(n =3)

	NA		A		DA	
加入量 (pg)	回收量 (pg)	回收率 (%)	回收量 (pg)	回收率 (%)	回收量 (pg)	回收率 (%)
200	187.88	93.94	190.04	95.02	180.11	90.06
600	585.62	96.98	583.80	96.66	586.06	96.92
平均		95.72		96.47		92.84

2.4 正常值测定:

按照本文实验条件,我们测定了 40 份狗心肌组织生物样本中的 CAs 含量,结果分别为 NA:287.44±27.58、A:80.55±10.13、DA:9.99±1.07(ng/g)。

3 讨论

3.1 在初步试验中,我们发现心肌组织中 CAs 含量不很低,所以采用高氯酸沉淀蛋白,高速离心后取上清液作色谱分析,这对提高回收率和灵敏度,简化预处理步骤起到了有利作用。

3.2 流动相 pH 对色谱分离的好坏有较大影响。通过实验观察,我们认为分离检测 CAs 流动相最佳的 pH 在 3.5 左右,且通过实验证明,在这个 pH 下各化合物的分离响应良好,样品分析时间短(少于 15min)。

3.3 有关反相离子对色谱的原理和检测 CAs 常用的离子对试剂已有介绍[1,3]。从 Mefford[1] 等在不同色谱条件下测绘的伏-安图中,可查得 NA、A、DA 的氧化电极电位基本上都在+0.5～0.77V 范围内。我们曾分别使用过+0.60V、+0.65V、+0.70V 3 种工作电压,都得到较好响应。

关键词 色谱法高压液相;电化学;儿茶酚胺类

参考文献

1. Mefford IN. Application of high performance liquid chromatography with electrochemical detection tc neurochemical analysis: Measurement of catecholamines, serotonin and metabolites in rat brain. J Neurosci Meth 1981; 7(3):207
2. Tusell JM, Sunol C, Artigas F, et al. Neurochemical studies on catecholamines and indoleamines by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Chromatographia 1982; 20(16): 112
3. 张仁斌 徐修容。高效液相色谱—在医药研究中的应用。上海科学技术出版社 1983:119～133

(收稿:1991-11-01;修回:1992-02-25)

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net