

试样中分别加入 0.24—0.48mg 甲基丙烯酸甲酯,测定结果见表 2。

(三) 回流时间对结果的影响

固定回流温度,回流时间从 0.5 小时至 2.5 小时,设 5 个点,在 1.5 小时,峰高比(待测物和内标峰高比)不再变化,结果稳定,低于 1 小时,结果偏低。

(四) 溶剂选择

Horna 等^[3]报道 GC 法测定聚甲基丙烯酸甲酯乳液中残余单体,用四氯乙烯作萃取剂,溶剂在最后一出峰,结果的精密度较好,作者试验了四氯乙烯、二氯甲烷作萃取剂,其结果相差不大,考虑较低温度萃取及萃取剂易得,选用二氯甲烷作萃取剂。

表 2 回收率测定

样品号	1	2	3	4	5
含量(mg)	0.08				
加入量(mg)	0.48	0.42	0.36	0.30	0.24
测得值(mg)	0.52	0.47	0.42	0.35	0.29
回收率(%)	91.7	92.9	94.4	90	87.5
平均回收率(%)	91.3				

(五) 样品和原材分析结果比较

原材、半成品(机械切削成型,未精加工)和成品,各经重复 5 次测定,三种试样中的残余单体平均值分别为 0.41%,0.42%和 0.40%;三种试样的残余

单体无显著差别,说明原材在机械加工过程中,虽受热、力等因素的影响,但不至于使残余单体含量发生变化。

参考文献

- [1] K. Aitzemueller, W. R. Eckert, J. Chromatogr., 155 (1), 203(1978).
- [2] T. V. Chirila, I. J. Constable, A. V. Russo et al., J. Cataract. Debractive Surg, 15(3), 283(1989).
- [3] A. Horna, J. Churacek, J. Chromatogr., 389, 293 (1987).

(收稿日期:1991 年 1 月 19 日)

Determination of Residual Monomers in Artificial Intraocular Lenses by Gas Chromatography
Ding Yuanchen Department of Chemistry, Suzhou University, 215006

A gas chromatographic method has been described for the determination of residual monomers (methyl methacrylate) in intraocular lenses. The monomers can be extracted with CH_2Cl_2 , and determined after distillation. The standard deviation was less than 0.03 in the range of 0.25—1.5mg/ml for methyl methacrylate, and the recovery and CV were about 91.3% and 6.9%, respectively.

高效液相色谱测定经 PT-系列氧化铝小柱预处理后狗血清中儿茶酚胺

唐琴梅 徐修容

(中国科学院上海药物研究所,200031)

氧化铝吸附法提取生物样本中的儿茶酚胺已被广泛地应用^[1-3],但在操作上需反复洗涤、离心,比较麻烦,本文探讨了用国产 PT-系列酸性氧化铝小柱进行预处理的条件,用内标法测定了肺动脉高压情况下的狗血清中去甲肾上腺素(NE)和肾上腺素(E)含量的变化,得到较为满意的结果。

实验部分

(一) 仪器和试剂 6000A 泵, U6K 进样阀, M660 梯度控制仪(Waters), LC-4B/17 型电化学检测器(Bioanalytical System Inc.)。NE 和 E 为 Fluka 产品;内标:异丙基肾上腺素(IP),上海第十七制药厂;PT-系列酸性氧化铝小柱,河北省津杨滤材厂产

品;DL-樟脑磺酸,上海东进科技公司,其余均为国产分析纯试剂。

(二) 色谱条件 分析柱 $15 \times 0.5\text{cm}$ i. d., 填料为 LiChrosorb RP-18($5\mu\text{m}$, 由本所装填), 洗脱液为含 6% 甲醇的 0.15mol/L 氯乙酸氢氧化钠缓冲液(pH4.20, 含 0.0001mol/L EDTA-2Na, 0.015mol/L 离子对试剂 DL-樟脑磺酸);流量梯度, 起始流量 1.5ml/min, 至 8min 时瞬间升为 2.0ml/min, 并保持直至分析完毕, 检测器工作电压 0.70V, 灵敏度 5nA。

结果与讨论

(一) 离子对试剂浓度的选择 NE 和 E 保留时

间短,极易受血清样品中非保留物的干扰,我们在流动相中分别加入浓度为 0.009, 0.012, 0.015mol/L 的 DL-樟脑磺酸进行试验,发现 0.015mol/L 浓度的分离效果最佳,可将 NE 及 E 与干扰峰得到完全分离(见图 1)。

(二)内标准的选择 在儿茶酚胺的测定中常用 3,4-二羟基苯胺(DHBA)作为内标,我们在用狗血清进行方法探讨时,发现个别狗血清中添加的 DHBA 回收率高达 160%及 200%,当这两管血清不加 DHBA 进行测试时,色谱图中与 DHBA 相同保留时间位置上有一未知峰,故而出现回收率偏高的现象,为避免在定量测定中的干扰,改用异丙基肾上腺素作为内标,虽然保留时间稍长,但在样品测试过程中未发现干扰峰,保证了定量测定的可靠性。

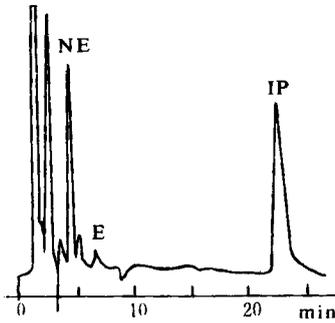


图1 狗血清色谱图

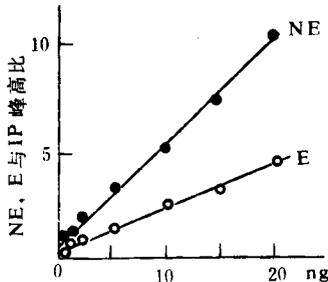


图2 标准曲线图

(三)标准曲线的线性 NE 和 E 的标准曲线见图 2,NE 和 E 的浓度在 0.5—20ng 之间有良好的线性关系,相关系数(γ)NE 为 0.998,E 为 0.997。

(四)样品预处理 1ml 狗血清加 250 μ l Tris 缓冲液(1mol/L, pH 8.60),10 μ l 内标(10ng/ μ l)充分混合后注入氧化铝小柱,收集流出液,再注入同一小柱(反复三次),流干后小柱用 10ml 超纯水洗涤,用 500 μ l 0.15mol/L 氯乙酸缓冲液(pH 2.90)将儿茶酚胺洗脱,100 μ l 用于 HPLC 测定。

(五)空白血清的制备 在正常狗血清中含有

NE 和 E,给回收率测定带来诸多不便,因此需将血清中 NE 及 E 除去,制备成空白血清,取 10ml 狗血清加 150mg 酸性氧化铝及 2.5ml Tris 溶液(1mol/L, pH 8.60),激烈振荡 10min,离心,上清液经 HPLC 测定不含 NE 和 E,即为空白血清。

(六)回收率的测定 在 1ml 空白血清中加入 10ng NE 及 E,按样品预处理后进行 HPLC 测定,进样量 100 μ l,相当于 2ng NE 和 E,回收率($X\% \pm SD, n=3$)分别为 NE:57.33 \pm 1.15,E:53.67 \pm 4.72。

(七)回收率曲线 在每 ml 空白血清中分别加入不同浓度的 NE、E 和 100ng 内标,经样品预处理后测定其峰高,以样品浓度为横坐标,样品与内标峰高比为纵坐标,得回收率曲线图(见图 3),相关系数 NE 为 0.998,E 为 0.997,表明血清中 NE 的含量在 1—30ng/ml,E 在 2—60ng/ml 之间回收率线性关系良好。

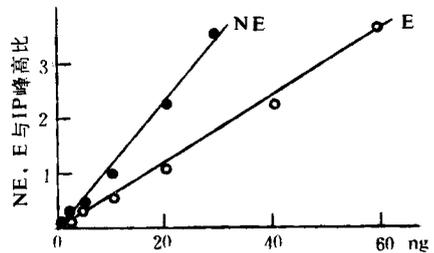


图3 回收率曲线

表1 狗血清中 NE 和 E 的含量(mg/ml 血清)

对照组		实验组	
NE	E	NE	E
11.15	11.15	27.40	40.15
3.50	未测到	36.50	16.50
16.50	1.40	21.15	3.25
15.70	9.50	24.80	3.65
4.50	未测到	19.20	未测到
\bar{X} 10.17		25.81	
$\pm SD$ 6.21		6.77	

(八)血清样品的测定 实验狗分为两组,呼吸 100%氧气的为对照组,呼吸 15%氧气的为实验组,造成肺动脉高压,采集之血清于 -50 $^{\circ}$ C 贮存(不超过一周),分析时解冻经样品预处理后用 HPLC 测定 NE 和 E 的浓度,实验结果见表 1.E 在有些样本中未检测到,以 NE 的数据经统计学处理二者有显著性差异($p < 0.05$)。

上述结果表明 PT-系列氧化铝小柱可作 HPLC 测定作儿茶酚胺时样品预处理用。

致谢 狗血清由上海医科大学中山医院麻醉科

方琰提供。

参考文献

- [1] M. A. Proll et al., *Life Sic.*, 30,11(1982).
- [2] G. Eisenhofer et al., *Clin. Chem.*, 32,2030(1986).
- [3] T. Iwamoto et al., *J. Liq. Chromatogr.*, 10,1217 (1987).

(收稿日期:1990年12月29日)

Determination of Catecholamines in Dog Serum after Treated with PT Series Al₂O₃ Cartridge Tang Qinmei and Xu Xiurong, *Shanghai Institute of Materia Medica, Academia Sinica*, 200031

A high performance liquid chromatographic method with electrochemical detection for measuring

noradrenaline (NE) and adrenaline (E) in the serum of dog is presented. NE and E were extracted with PT series Al₂O₃ cartridge, and chromatography was performed on a reversed phase column using DL-camphorsulfonic acid as ion pair reagent. The recoveries of NE and E were 57.33±1.15 and 53.67±4.72%, respectively. The recovery curves were linear within the range of 1—30 ng/ml for NE and 2—60 ng/ml for E. The results showed that the elevation of NE in serum of dog which suffered from high intrapulmonic pressure was significant in comparison with the controls.

高效液相色谱法测定肿瘤患者血浆中磷酸酶的活性

韩跃武 李亢宗

(兰州医学院, 730000)

左伟

(兰州大学, 730000)

对磷酸酶根据其作用的最适 pH 不同分为碱性磷酸酶 (AKP) 和酸性磷酸酶 (ACP) 两种。对血浆中磷酸酶的测定, 已进行了广泛而深入的研究, 证明血中酶活性的变化与一些恶性肿瘤的发生发展有一定关系, 故作为肿瘤酶学诊断指标之一。近年来, 由于高效液相色谱 (HPLC) 技术的发展, 特别是各种高效能色谱柱的出现以及检测器的发展, 国外已有人将这种技术应用于磷酸酶及其同工酶的分离及定量测定^[1,2], 而国内尚未见到这方面的报道。本文在 Togari 等人工作的基础上, 建立了用 HPLC 测定磷酸酶活性的方法, 并测定了 96 例正常人和 82 例肿瘤患者血浆中磷酸酶活性。这说明用高效液相色谱法测定磷酸酶是一灵敏可靠的方法。

实验部分

(一) 试剂及血样

苯酚: 分析纯, 上海试剂总厂产品。苯磷酸二钠: 分析纯, 西德 SERVA 产品; 其他试剂均为分析纯。正常人血液采自甘肃省中心血站献血员, 肿瘤患者血液采自兰州医学院第一附属医院肿瘤科病人。

(二) 仪器及色谱条件

高效液相色谱系统由 Varian HPLC-5000, Varian CDS 401 数据处理机, UV-100 可变紫外检测器及 SPC 18-5 (15cm × 4—6mm i. d.) 分析柱构成。流动相为 10mmol/L, pH4.8 甲醇-乙酸 (35 : 65, V/

V) 缓冲液, 流速 1.0ml/min, 纸速 0.2cm/min, 柱温 25℃, 灵敏度 0.05AU/mV, λ_{max} 275 nm。

(三) 酶活性测定

根据 Togari 法进行改进^[1]。碱性磷酸酶的测定是在小离心管中加入 10μl 血浆, 10μl 100mmol/LpH 10.2 的碳酸盐缓冲液, 80μl 去离子水, 10μl 100mmol/L 的苯磷酸二钠试剂, 在 37℃ 下反应 30 分钟, 立即加入 50μl 25% 的三氯醋酸终止反应, 冰浴几分钟后离心 (10000r/min) 10 分钟, 吸取上清液 10μl 进行 HPLC 分析。酸性磷酸酶的测定除了以 pH4.8 的柠檬酸盐缓冲液代替碳酸盐缓冲液外, 其他同碱性磷酸酶的测定。

酶活性计算: 准确配制一定浓度 (0.092mg/ml) 的标准苯酚液, 并将其稀释成八个不同浓度, 依次进行 HPLC 分析, 所取得数据经直线回归得直线回归方程: $Y = 6.616 \times 10^{-6}X + 2.87 \times 10^{-3}$ 。γ = 0.999。

酶活性单位规定^[3], 在特定反应条件下, 每分钟催化底物 (苯磷酸二钠) 生成 1μmol/L 产物 (苯酚) 所需要的酶量为一个酶活性单位。每毫升血浆酶活性单位计算公式为:

$$U/L = \frac{100Y}{30 \times 94.11} \times 10^3$$

$$= 35.4(6.616 \times 10^{-6}X + 2.87 \times 10^{-3})$$