

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=6.616×10⁻⁶X+2.87×10⁻³。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:

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

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

结果与讨论

(一)实验条件

我们测得苯酚的最大吸收波长为 275nm,这与文献报道一致^[4]。测得该酶的最适温度为 37℃,AKP 的最适 pH 为 10.2,ACP 的为 pH4.8。苯酚的时间保留值是 5 分钟,HPLC 图谱如图 1 所示。

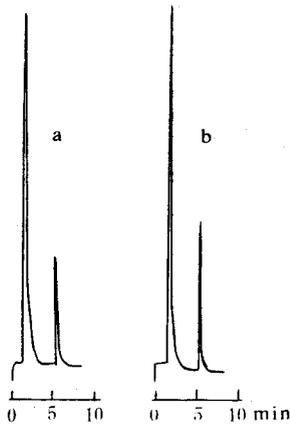


图 1 AKP 的 HPLC 谱图

a. 正常成年人, b. 肿瘤患者.

(二)肿瘤患者血浆中磷酸酶活性的变化

根据上述方法我们测定了 96 例正常成年人及 82 例肿瘤患者血浆中 AKP 及 ACP 的活性,并作了统计分析及 t 检验,取 95% 正常区间的上限为界值,规定高于此界值为阳性,结果如表 1 及表 2 所示。从表中可以看出 ACP 的活性除鼻咽癌患者血浆中增高外(阳性率为 37.5%),在其余所测肿瘤患者中无明显变化。而 AKP 活性在六种肿瘤血浆中都明显升高,与文献报道一致^[5-7]。这说明,HPLC 测定磷酸酶活性指标,可用于肿瘤的辅助诊断。

表 1 人血浆 ACP 活性比较

类别	例数	$\bar{x} \pm SD(u/L)$	P 值
正常男性	48	12.8 ± 4.1	
正常女性	48	11.7 ± 2.1	
乳腺癌	11	11.4 ± 3.0	>0.05
宫颈癌	19	10.2 ± 2.1	>0.05
肺癌	20	9.1 ± 1.1	<0.05
食道癌	19	13.8 ± 4.1	>0.05
鼻咽癌	8	18.9 ± 4.9	<0.05
恶性淋巴瘤	5	12.6 ± 3.1	>0.05

表 2 人血浆 AKP 活性比较

类别	例数	$\bar{x} \pm SD(u/L)$	阳性率(%)	P 值
正常男性	48	59.3 ± 9.2		
正常女性	48	57.1 ± 13.2		
乳腺癌	11	81.2 ± 17.1	54.55	<0.005
宫颈癌	19	78.6 ± 16.5	62.50	<0.001
肺癌	20	91.3 ± 31.5	60.00	<0.005
食道癌	19	73.0 ± 17.3	44.44	<0.001
鼻咽癌	8	92.6 ± 55.6	62.50	<0.001
恶性淋巴瘤	5	85.4 ± 25.1	60.00	<0.001

(三)回收率、重复性和灵敏度

我们取一份正常成年人血浆,再加一定量的苯酚,重复测定五次,其平均实验回收率为 96.7%。取一份血浆连续测定 7 次,所得结果的变异系数为 1.56%,说明重复性好。磷酸酶的比色分析血浆用量为 100—200 μ l^[3],而本法只用 1 μ l 血浆,苯酚的最低检出量为 3ng。

本文说明,用 HPLC 法测定血浆中磷酸酶活性是一灵敏可靠的方法。

参考文献

- [1] A. Togari, J. Chromatogr., 417, 41(1987).
- [2] M. J. Paroiainern, J. H. Galloway, Clin. Chem., 34(12), 2406(1988).
- [3] Plumer(吴翠等译),《实用生物化学导论》,科学出版社,北京, P. 249, 1985.
- [4] 邢其毅,《基础有机化学》,人民教育出版社,北京, P. 397, 1981.
- [5] R. C. Coombes et al., Lancet, 1, 596(1980).
- [6] L. J. Emrich et al., Cancer Res., 45, 5173(1985).
- [7] H. Nishio et al., Cancer, 57, 1815(1986).

(收稿日期:1990年11月26日)

Determination of Phosphatase Activity in Plasma of the Patients with Tumor by High Performance Liquid Chromatography Han Yuewu & Li Kangzong, Lanzhou Medical College, 730000; Zuo Wei, Lanzhou University, 730000

A method for the determination of phosphatase activity with HPLC was established. The alkaline and acid phosphatase in plasma of the patients with tumor was measured by the method. It was found that the alkaline phosphatase activity in plasma increased for the cancer patients. The method is sensitive and reliable.