

高效液相色谱法分析胎盘制剂中脂溶性维生素

王玉梅 王善莲* 高子仪**

(中国科学院生物物理研究所)

准确地分析和定量胎盘制剂中脂溶性维生素,对了解其生化和药物性质是十分必要的。

用高效液相色谱法分析与定量脂溶性维生素已有报道^[1-4]。这种方法快速、简便,回收率可达 95% 以上,优于目前常用的其他方法。

本文采用反相高效液相色谱法对胎盘制剂中四种脂溶性维生素进行了分离及定量测定。

一、方 法

仪器: 日立 635 A 高效液相色谱仪,检测器——单波长紫外分光光度计;记录器——日立 056;分离柱为内径 4 毫米,长 250 毫米不锈钢柱,填料为无定形硅胶键合十八烷基 (YWG

C₁₈H₃₇), 粒度 10±2 微米,填充压力为 350 公斤/厘米²,柱效为 1 万理论塔板数/米(苯)。

试剂: 维生素 A (英 Koch-Ligh 公司产品), 维生素 D. E. K (德国 E. Merck 产品), 其余试剂均为国产分析纯。

人胎盘粉试样由北京生物制品研究所提供。牛胎盘粉由天津杏林生物药厂提供。

样品前处理: 取适量试样经皂化反应和石油醚-乙醚 (1:1) 提取处理, 然而进行色谱测定。

色谱条件: 色谱柱为 $\phi 4 \times 250$ mm, YWG-

* 北京第三制药厂 ** 北京生物制品研究所

同一份血标本, 平均测定三个样品的 EFR 值, 其变化在 20% 左右。同一正常人间隔一段时间两次取样测定 EFR 值, 变化小于 15%。

表 2 变硬红细胞含量对 EFR 的影响

变硬红细胞数 (%)	100	1.0	0.5	0.1	0.01	0.005	0
EFR (毫升红细胞/分)	<0.001	<0.01	0.013	0.22	0.22	0.26	0.27

五、正常人与脑血栓形成病人的 EFR 值的比较

根据测定正常人和脑血栓病人的 EFR 值 (表 3) 可见, 后者的红细胞可滤过性明显低于前者, 从而证明脑血栓形成与红细胞变形性减小有关。

上述装置和方法有可能成为一种临床观察手段, 还可用来研究血流不畅、血栓形成机理、微循环障碍等的病因和药物疗效, 及活血化痰

中草药的作用机理等。

表 3 正常人和脑血栓形成病人 EFR 值的比较

	正常人 (n = 30)	脑血栓形成病人 (n = 20)
PCV	0.086±0.010	0.077±0.007
FR (毫升/分)	2.43±0.06	0.93±0.53
EFR (毫升红血球/分)	0.21±0.04	0.07±0.04

参 考 文 献

- [1] Reid, H. L. et al: *Journal of Clinical pathology*, **29**(2), 855, 1976.
- [2] Buchan, P. C.: *British Journal of Haematology*, **45**, 97, 1980.
- [3] 会村敏治 et al.: 《日本血液会杂志》, **45**(2), 245, 昭和 57 年。
- [4] 前田俊秀 et al.: 《日本血液会杂志》, **45**(2), 245, 昭和 57 年。
- [5] Usami, S. et al.: *J. Lab. Clin. Med.*, **86** (2), 274, 1975.
- [6] 崔浣华等: 《核技术》, **1**, 67, 1982.
- [7] 王世成: 《膜分离科学与技术》, **3**(4), 71, 1983.

[本文于 1985 年 2 月 18 日收到]

C₁₈H₃₇ (10±2 μm), 柱温: 20℃, 柱压: 70 kg/cm², 流动相: 甲醇/异丙醇/1M 醋酸铵溶液, 用醋酸调 pH 至 5.8 (87.5/12/0.5v/v); 流速: 1.2 ml/min; 检测器: UV 254nm × 0.02 A. U. F. S.; 纸速: 2.5 mm/min。

二、结果与讨论

本文用国产 YWG-C₁₈H₃₇ 作为固定相, 经不同比例的甲醇流动相实验, 找出最佳比例是:

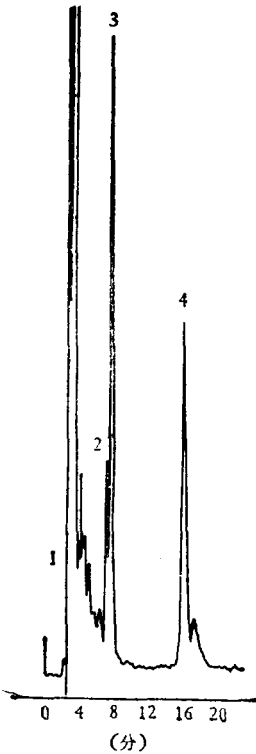


图 1 人胎盘粉中维生素 A. D. E. K 的色谱分离图
峰号: 1. 维生素 A; 2. 维生素 D; 3. 维生素 E; 4. 维生素 K



图 2 牛胎盘粉中维生素 A. D. E. K 的色谱分离图
峰号: 1. 维生素 A; 2. 维生素 D; 3. 维生素 E; 4. 维生素 K

甲醇/异丙醇/1 M 醋酸盐缓冲液 pH 5.8 (87.5/12/0.5 v/v)。四种脂溶性维生素 A. D. E. K 的定量分析可在 16 分钟内完成。流动相中加入少量的无机盐和酸的缓冲液, 将 pH 调至微酸性, 利于四种脂溶性维生素的分离, 能增加分辨率, 改善峰形, 减少拖尾现象(图 1, 2)。

脂溶性维生素 A. D. K 在紫外 254 nm 处都有一个强的吸收, 而维生素 E 在该波长的吸收较低, 四种脂溶性维生素在紫外检测器上的线性响应范围 (在 5 ml 异丙醇中): 维生素 A

表 1 HPLC 法对胎盘制剂中脂溶性维生素的分析

试 样	组分 含量*	维生素 A			维生素 D			维生素 E			维生素 K		
		含量 μg/g	标准偏 差	变异系 数%	含量 μg/g	标准偏 差	变异系 数%	含量 μg/g	标准偏 差	变异系 数%	含量 μg/g	标准偏 差	变异系 数%
人胎盘粉		5.5	±0.2	2.7	9.9	±0.4	4.4	45.5	±2.1	4.5	101.5	±1.7	1.7
牛胎盘粉		2.5	±0.2	6.3	9.6	±1.0	10.0	737.4	±9.8	1.3	171.8	±9.2	5.4

* 表示五次测定的平均值。

在 DNA 序列上寻找蛋白质基因的计算机程序

何东明 陈农安

(中国科学院上海生物化学研究所)

测定 DNA 分子的核苷酸排列顺序的快速方法已经出现,在一个 DNA 分子的序列被阐明后,如何尽快地搞清分子上哪些区域是蛋白质的编码区将是一个重要的问题。近年内,Staden 在这方面做了一些工作^[1,2]。

程 序 介 绍

我们在 TRS-80 I 型微计算机上实现了一组从 DNA 分子的核苷酸顺序出发来预测蛋白质基因区的计算机程序。程序是用 Basic 语言写的,它能够把计算结果在 WX 4671 型绘图仪上输出,绘制出使人一目了然的基因分布图。

下面简单地介绍一下程序的原理及其作用:

程序 GENE 1 在组成蛋白质的 20 种氨基酸中,18 种氨基酸具有简并密码子,其简并密码子中的各个密码子在不同生物种类的

DNA 分子中出现的频率是不一样的^[3];并已发现,属于同一生物种类的 DNA 分子中的蛋白质基因区在使用简并密码子时具有一致的偏爱性,而在其它区域却未发现这种现象。

GENE 1 就是基于这种偏爱性,并根据用户提出的一个标准基因的位置,采用 Bayes 方法进行统计分析来确定其它蛋白质基因的位置。

GENE 1 首先统计出 64 个密码子中的每一个在标准基因中出现的频率 f_{abc} ,然后取其自然对数 $F_{abc} = \ln f_{abc}$,当 $f_{abc} = 0$ 时,取 $F_{abc} = \ln (1/25)$ 。一个 DNA 序列有三个三联体链 (frame),我们取 25 个三联体作为一个窗口,每一次窗口向前移动一个三联体,对窗口所在的每一位置,对三个三联体链求值:

$$(1) H_1 = \sum_{abc} F_{abc}, H_2 = \sum_{bca} F_{bca},$$

和 D 均为 0.05—0.5 mg,维生素 E 为 0.5—5.00 mg,维生素 K 是 0.10—1.00 mg,在此范围内用微量注射器吸取不同量注入柱内,所得四种维生素峰强度与浓度间均呈线性关系,试样的测定按外标法计算 (见表 1)。

表 1 说明人胎盘制剂中维生素 A 的含量为 5.5 微克/克,高于牛胎盘制剂 (2.5 微克/克),两者相差约一倍。维生素 D 在人胎盘制剂中是 9.9 微克/克,在牛胎盘制剂中含 9.6 微克/克,两者差别不大,而维生素 E 和维生素 K 与上述情况相反,牛胎盘制剂中 E 比人胎盘制剂的 E 几乎高 16 倍, K 高约 1 倍。

回收率实验。维生素 A 取量 4.8 微克,回收率 (五次实验平均值;下同)为 97.1% ± 4.7%;

维生素 D 取量 3.2 微克,回收率为 100.2% ± 2.2%;维生素 E 取量 23.2 微克,回收率为 96.5% ± 2.5%;维生素 K 取量 24.0 微克,回收率为 95.4 ± 6.8%。

天津杏林生物药厂傅一心教授对本工作大力支持谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] DoLan, J. W. et al.: *J. Chromatogr. Sci.*, 16, 616 (1976).
- [2] Huguette Cohen et al.: *J. Agric. Chem.*, 26 (5), 1210, 1978.
- [3] T. Van De Weerdhof et al.: *J. Chromatogr.*, 83, 455, 1973.
- [4] Pellerin, F. et D. Dumitrescu.: *Talanta*, 27 (3), 243, 1980.

[本文于 1984 年 5 月 29 日收到]