

反相高效液相色谱测定 人体红细胞内腺嘌呤和吡啶核苷酸

刘斯奇 聂洪勇* 卢义钦

(湖南医学院生化教研室, 长沙)

成熟红细胞除了细胞膜外缺乏全部细胞器, 代谢过程较为简单。在该细胞内几乎没有嘧啶核苷酸。嘌呤核苷酸主要以腺苷酸(ATP、ADP、AMP)形式存在。一般认为, 腺苷酸池(ATP + ADP + AMP)水平是描述红细胞代谢的重要参数之一。Atkinson 指出, 各腺苷酸浓度间的平衡对那些参与能代谢的物质可能是一种调节因素^[1]。红细胞内还存在着一定量的吡啶核苷酸(NAD 和 NADP), 它们都是参与代谢的辅酶, 对于糖酵解或磷酸戊糖旁路的通畅程度影响甚大^[2]。

红细胞内核苷酸水平的经典测定方法是酶法和荧光素酶法^[3]。这两种方法所需酶试剂种类多, 实验费用昂贵而且操作麻烦。高效液相色谱(HPLC)为核苷酸的分析提供了方便^[4]。近年来, 已有利用反相高效液相色谱(rHPLC)分析红细胞内核苷酸的报道^[5,6]。我们采用国产色谱柱和填料在这方面工作进行了初步的研究, 获得了满意的结果。

实 验 部 分

一、仪器

日本岛津 LC-4A 型高效液相色谱仪, SPD-2AS 型可变波长紫外检测器, CR-2AX 型积分记录仪, SIL-1A 不停流进样器; 日本日立 056 型记录仪; 澳大利亚 S. G. E 型 10 μ l 加样器。

二、试剂

5'-ATP 钠盐、5'-GTP 钠盐、ATP 测定药盒(美国 Sigma), 5'-ADP 钠盐(西德 Merck),

5'-AMP 钠盐、NAD、NADP(上海生化所东风试剂厂)。

本实验一般试剂均为国产分析纯。水经去离子重蒸处理。

三、洗脱液

配 0.1M KH_2PO_4 和 0.1M K_2HPO_4 。将两种溶液按不同比例混合(见图 1), 配成离子强度不等的洗脱液 A。用浓 H_3PO_4 和 KOH 调节溶液的 pH 值。

首先采用单液洗脱分离 ATP、ADP、AMP, 选择一个最佳的洗脱液 A 的组分比例, 然后按这一比例配成含甲醇 10% 的洗脱液 B。使用前, 所有洗脱液均经 0.65 μ m 滤膜过滤。

四、装柱

柱填料为天津试剂二厂生产的十八烷基键合固定相(YWG-C₁₈H₃₇, 10 μ m)。用 6751 型液相色谱匀浆装柱机(北京分析仪器厂)装柱, 装柱压力 500kg/cm², 二氧六环-四氯化碳(1+2)为匀浆液。

五、色谱条件

流动相 洗脱液 A 为磷酸二氢钾与磷酸氢二钾的混合水溶液; 洗脱液 B 为磷酸二氢钾、磷酸氢二钾和 10% 甲醇的混合水溶液。

色谱柱 15cm $\times$ 4.6 mm (Id) 不锈钢色谱柱(北京分析仪器厂)。

柱温 22—25 $^{\circ}\text{C}$;

柱压 110—135kg/cm²;

流速 1.4ml/min;

* 湖南商检局中心测试室

检测波长 254nm;
量 程 0.04aufS;
进样量 20 μ l;
梯度程序 见图 3

六、样品制备

1. 标准样品 准确称量后,用洗脱液 A 为溶剂将各核苷酸分别配成 $10^{-4}M$ 标准液,贮于冰箱中待用。

2. 血样 采用 Beutler 法^[3],稍作修改。

A 法 取健康人静脉血 0.5ml,加入 0.5ml 10% $HClO_4$,剧烈摇荡,3000rpm 离心十分钟,收集上清,加入 0.05ml 3.3N K_2CO_3 中和。离心同上,弃去 $KClO_4$ 沉淀,加重蒸水将上清定容至 1ml。所有操作在 0—4℃ 下进行。

B 法 取健康人静脉血 0.2ml,加入 1ml 0.01M Tris-HCl (pH7.40),摇荡溶血,置入沸水浴中五分钟,取出后迅速放入冰浴中,冷却后离心同上。取上清用于 HPLC 分析。

加样前,处理后的血样均用 0.45 μ m 滤膜过滤。

新鲜血样用肝素抗凝,0—4℃ 保存,一天之内进行处理并分析。

七、计算

按直线回归法作出不同摩尔数的标准核苷酸与其相应的峰面积之间的直线关系式,以此作为红细胞内核苷酸定量的标准。

结果与讨论

一、样品的处理与保存

由表 1 可见两种处理血样的方法测出的

表 1 两种血样处理方法的 HPLC 分析结果(μ mol/gHb)

	ATP	ADP	AMP	ATP ADP	ATP AMP	NADP	NAD
A 法	3.880	0.738	0.127	5.26	30.55	0.191	0.271
B 法	2.716	1.210	0.480	2.24	5.66	0.193	0.311

NADP 和 NAD 值较一致,但 A 法测得的 ATP 值远大于 B 法,ADP 和 AMP 又均小于 B 法。表 2 还表明两法测得的腺苷酸池水平接近。无

论是用加酸还是加热的方法,都能使红细胞内各种酶迅速灭活。我们的实验提示 A 法优于 B 法。这可能由于血样置于沸水浴的最初阶段 ATP 迅速地水解,造成 ATP 量减少,ADP 和 AMP 量升高。

处理好的血样应尽快进行分析,如置入冰箱中冷冻保存,时间也不宜过长(见表 2)。

表 2 样品保存时间对腺苷酸含量的影响 (μ mol/gHb)

保存时间	当 天	2 天	4 天	15 天
ATP	4.000	4.071	3.880	3.246
ADP	0.663	0.680	0.898	1.039
AMP	0.110	0.117	0.184	0.992
ATP ADP	6.03	5.99	4.32	3.12
ATP AMP	30.96	34.79	21.09	3.52
ATP + ADP + AMP	4.773	4.867	4.962	5.207

二、洗脱液对分离效果的影响

在反相 HPLC 中,非极性固定相与待测组分之间的作用力相当弱。大体上说来,样品的保留值随其极性的减小而增加^[7]。由核苷酸的 pK' 值可知,ATP、ADP 和 AMP 的极性比 NADP 和 NAD 要大,因此,它们的保留时间相对短一些。我们首先在单液洗脱条件下,寻找

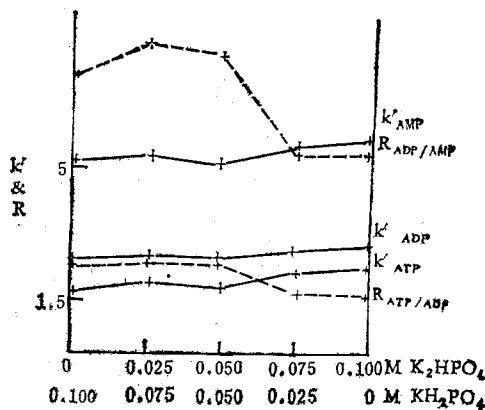


图 1 洗脱液组分变化对 k' 和 R 值的影响

k' 为容量比, R 为分辨率

最佳的洗脱液 A 的配比将 ATP、ADP 和 AMP 完全分离, 然后用线性梯度法加入适量洗脱液 B 使 AMP、NADP 和 NAD 完全分离。

洗脱液中 K_2HPO_4 占的比例愈大, 则洗脱液离子强度愈大。图 1 表明, 随离子强度增加, ATP、ADP 和 AMP 的 k' 值均有升高, 但幅度甚小。该结果与 Crescentini 等人报道的基本一致^[6]。按照 Debye-Hückel 学说, 离子强度增加可减少溶质分子之间的静电排斥, 增大洗脱液的表面张力, 延长了溶质分子的保留时间^[7]。图 1 还表明, 虽然 R 值随离子强度的变化而略有变化, 但总是大于 1.5。这意味着反相 HPLC 分析核苷酸时, 洗脱液组成变化的允许范围较宽。洗脱液浓度在 0.05M 磷酸盐缓冲液时, ATP 与 ADP 分离最佳。

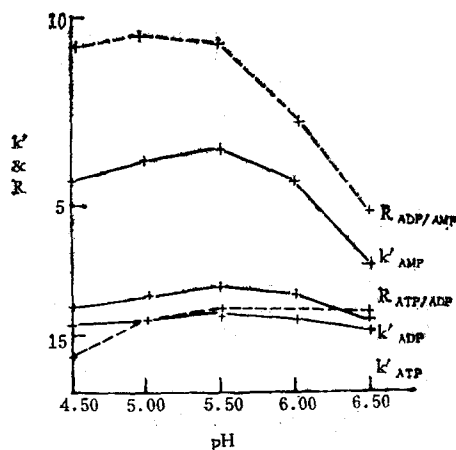


图 2 洗脱液 pH 值对 k' 和 R 值的影响

洗脱液的 pH 对腺苷酸的分离影响较大。图 2 表明, pH 5.50—6.50 范围内, ATP 与 ADP 的分离较好。Zakoria 等认为在不同 pH 条件下, 核苷酸在反相柱上的分离机制是不同的^[8]。pH 较高时, 磷酸基团进一步离子化, 核苷酸所带电荷增加; 其分离机制遵循疏溶剂化模型, pH 较低时, 则可能存在亲硅化和疏溶剂化两种机制的综合作用^[9]。图 2 中 k' 值变化可能是由于腺苷酸在反相柱上分离机制变化所致。

图 1 和图 2 都说明 AMP 容易与 ADP 完

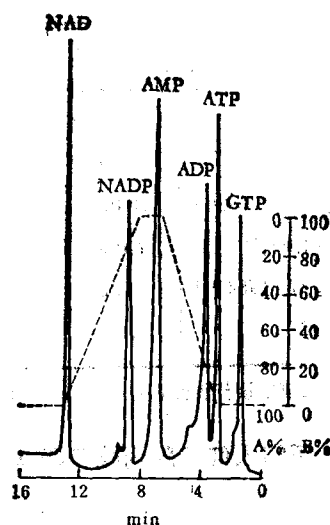


图 3 标准核苷酸 HPLC 图谱

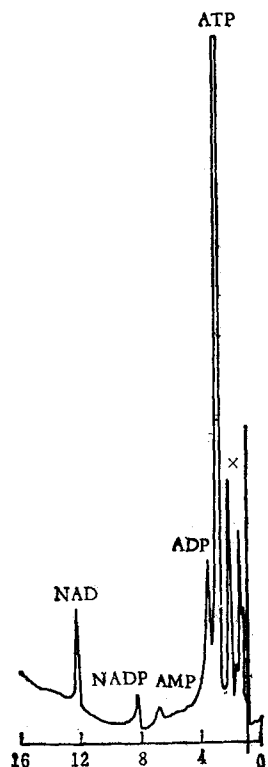


图 4 正常人红细胞内核苷酸 HPLC 图谱

全分开, 关键在于选择适当的色谱条件使 ATP 与 ADP 完全分离, 同时又避免被测组分保留时间过长。我们认为洗脱液 A 的组分为 0.05M 磷酸盐缓冲液, pH 6.00 为适。

表 3 人体红细胞内腺嘌呤和嘧啶核苷酸含量 ($\mu\text{mol/gHb}$)

作 者	方 法	例数	ATP	ADP	AMP	NADP	NAD
Beutler, E(1975) ^[3]	酶 法		4.050 ± 0.380	0.589 ± 0.079	0.079 ± 0.013		
Dean, B, M(1978) ^[10]	HPLC	9	3.872 ± 0.385	0.345 ± 0.072	0.030 ± 0.009	0.145 ± 0.036	
Schweinsberg, P, D(1980) ^[5]	rHPLC		4.364	0.682	0.106		
Ericson, A(1983) ^[11]	HPLC		4.700 ± 0.383	0.484 ± 0.042	0.042 ± 0.009		0.178 ± 0.021
Crescentini, G, (1984) ^[6]	rHPLC	5	3.364 ± 0.182	0.321 ± 0.136	0.030 ± 0.006	0.103 ± 0.012	0.167 ± 0.021
本 法 (1986)	rHPLC	18	4.084 ± 0.383	0.653 ± 0.101	0.100 ± 0.035	0.147 ± 0.027	0.250 ± 0.105

注: 凡文献中核苷酸含量以 $\mu\text{mol/ml RBC}$ 表示者, 均按 330 mgHb/mlRBC 转换成 $\mu\text{mol/gHb}$ 表示。

三、正常人红细胞内核苷酸 HPLC 图谱与测定值

图 3 与图 4 表明样品中各组分得到良好的分离, 值得指出的是, 在几十例血样测定中均发现 2.1 分钟处有一个完全分离的色谱峰 (x), 该峰尚未见文献报道。我们测定了 24 位再生障碍性贫血患者血样, 发现再障患者的 x 峰含量异常高 (另文报道)。该峰究竟为何物有待研究。

我们采用 Sigma 公司生产的 ATP 测定药盒与 HPLC 法平行测定了 18 位正常人红细胞内 ATP 含量。酶法结果为 4.194 ± 0.596 ($\mu\text{molATP/gHb}$), HPLC 结果为 4.084 ± 0.383 ($\mu\text{molATP/gHb}$), 两均数 t 检验表明二者差别无显著性。HPLC 法测得的结果标准差较小, 说明均数代表性较好。

表 3 列出了本法测定结果与其他一些作者报道值的比较。本法测定的 ATP 值与大多数作者相符, 但是各作者所测定的 AMP 值差别

较大, 这可能与样品处理方法不同有关, AMP 在红细胞内含量甚低, ATP 或 ADP 稍有水解便可能引起其水平发生较大的波动。

参 考 文 献

- [1] Atkinson, D. E. et al.: *Biochem.*, 7(11), 4030, 1968.
- [2] Gross, R. T. et al.: *J. Clin. Invest.*, 45, 249, 1966.
- [3] Beutler, E.: *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods* Grune & Stratton, New York, 1970.
- [4] Zakaria, M. et al.: *J. Chrom.*, 226, 267, 1981.
- [5] Schwinsberg, P. D. et al.: *J. Chrom.*, 181, 103, 1980.
- [6] Crescentini, G. et al.: *J. Chrom.*, 290, 393, 1984.
- [7] Krsulovic, A. M. et al.: *Rever-Phase High Performance Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, New York, 1982.
- [8] Zakaria, M. et al.: *Anal. Chem.*, 55, 457, 1982.
- [9] Van Hoastert, D. et al.: *J. Chrom.*, 210, 229, 1981.
- [10] Dean, B. M. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80, 147, 1978.
- [11] Ericson, A. et al.: *Clin. Chim. Acta*, 127, 47, 1983.

[本文于 1986 年 5 月 6 日收到]