

等速电泳法测定三磷酸腺苷的含量

李 竹 丁锡申 徐康森

(卫生部药品生物制品检定所, 北京)

等速电泳法是继气相色谱法和液相色谱法之后的又一重要的分离分析技术。它的优点是分辨力高、用样量少、分析速度快。等速电泳法问世不到十年, 但它的应用范围日趋广泛。它不但可以分离分析氨基酸, 核苷酸, 有机酸、金属离子等小分子物质, 而且也可以分析蛋白质等生物大分子。

应用等速电泳法测定核苷酸及其衍生物, 已有不少报道。Everaerts^[1] 应用盐酸组氨酸为先行离子, 吗啉乙基磺酸为结尾离子, pH 6.0, 分析了一磷酸腺苷(AMP)、二磷酸腺苷(ADP)和三磷酸腺苷(ATP)的混合液, 结果区带界线明显, 图谱清晰。Hjalmarsson^[2] 测定了 ATP 的含量(254nm 监测), 结果证明区带的宽度(mm)和 ATP 含量的毫克分子数呈线性关系。本文采用 Shimadzu^[4] 方法以 0.01M 组氨酸盐酸为先行离子, 0.01 M 正己酸为结尾离子, 测定了 ATP 的含量, 并与经典的纸电泳法比较, 结果表明等速电泳法重现性好, 分析速度快。

一、材料与方 法

1. 材料

① ATP 精制品(作标准用)、市售 ATP 粉末(北京五星啤酒厂出品、批号: 24[#]、27[#]、28[#]、37[#])。

② 试剂: 先行离子: M/100 组氨酸液, 用浓盐酸调 pH 至 6.04。结尾离子: M/100 正己酸液, pH 3.48。纸型电泳缓冲液: M/20 柠檬酸盐缓冲液, pH3.0。

③ 仪器设备: IP-2A 型等速电泳仪, 日本岛津制作所。普通平板电泳仪、Whatman 1 号滤纸。

2. 方法

① 等速电泳法: 按 IP-2A 型等速电泳仪使用说明操作。毛细管长 4cm, 毛细管恒温槽温度 15℃, 迁移电流: $200\mu A(3') \rightarrow 100\mu A$ 。电位梯度微分记录衰减 4; 电位梯度记录衰减 32。记录仪走纸速度 10mm/min。

② 纸型电泳法: 取 Whatman 1 号层析滤纸, 经 1M 甲酸浸泡处理, 然后按一般平板纸型电泳方法操作^[5]。电极缓冲液用 M/20 柠檬酸盐液, pH3.0。点样 $10\mu l(10mg/ml)$, 电压梯度 20 伏/cm。电泳时间约 2 小时。在 257nm 波长处的吸收系数($E_{cm}^{1\%}$)按 267 计算。

二、结果与讨论

1. ATP 含量与区带宽度的线性关系

精确配制 ATP 精制品 1mg/ml 溶液, 分别取 $5\mu l$ 、 $7.5\mu l$ 、 $10\mu l$ 、 $12.5\mu l$ 、 $15\mu l$ 进行等速电泳以 ATP 含量为横坐标, 区带宽度为纵坐标做图(见图 1)。结果表明: ATP 含量与区带宽度的线性关系良好。未知含量的 ATP 溶液,

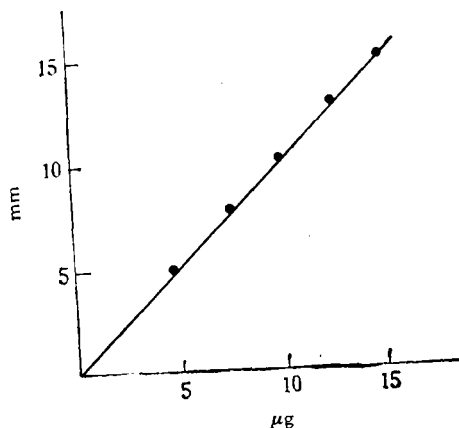


图 1 ATP 含量与区带宽度的标准曲线

经等速电泳后,可根据区带宽度,用标准曲线计算出 ATP 的含量。

2. 定量测定的结果和实验误差

为了判定本法测定的实验误差,曾用市售的四批 ATP 粉末为测量材料,进行等速电泳,图谱见图 2,每批重复 7 次。实验结果经统计处理,求得标准差、变异系数和可信限。

表 1 结果表明:四批粉末的变异系数均小于±3%。可见结果较为准确,重复性好。若把纪录仪走纸速度加大一倍(20mm/min),以减小测量误差,实验误差将更小。

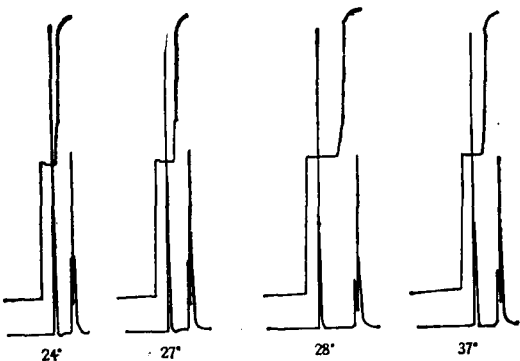


图 2 四批 ATP 粉末的等速电泳图

表 1 等速电泳法测定 ATP

批 号	实验次数	平均含量 mg/ml	标准差(±)	变异系数%	可 信 限 (P = 0.05)	理论值 mg/ml
24#	7	0.930	0.0153	1.65	0.930±0.014	1.0
27#	7	0.939	0.0147	1.57	0.939±0.014	1.0
28#	7	0.947	0.0258	2.73	0.947±0.024	1.0
37#	7	0.940	0.0256	2.73	0.940±0.024	1.0

表 2 纸型电泳法测定 ATP 的结果和实验误差

批 号	实验次数	平均含量 mg/ml	标准差(±)	变异系数%	可 信 限 (P = 0.05)	理论值 mg/ml
24#	7	9.19	0.163	1.78	9.19±0.15	10
27#	7	9.21	0.179	1.95	9.21±0.17	10
28#	7	9.40	0.390	4.15	9.40±0.36	10
37#	7	9.05	0.344	3.80	9.05±0.32	10

3. 纸型电泳法测定的结果和实验误差

为了进一步考察等速电泳法测定的可靠性,又将四批粉末用经典的平板纸型电泳法测定,再与等速电泳法比较。结果见表 2

由表 2 看出四批的变异系数均大于等速电泳法,且有二批已超过 3%,各批含量测定结果亦较等速电泳法更偏离理论值。纸电泳实验过程约需 4—6 小时,而等速电泳不到半小时。等速电泳的用样量是纸电泳的十分之一。等速电泳法之优越性由此可见。

本文承徐璐生主任审阅,并提出宝贵意见;北京五星啤酒厂提供样品,杨小克同志参加部分工作,一并致谢。

参 考 文 献

[1] Everaerts, F. M., et al.: *Isotachopheresis*, Amsterdam, 1976.
[2] Hjalmarsson, S. G.: *CRC Critical Rev. Anal. Chem.*, 11, 261, 1981.
[3] 竺安:《化学通报》, 11, 665, 1980。
[4] Shimadzu: *Application Data*, 1, Shimadzu Seisakusho LTD, Tokyo, Japan.

[本文于1983年7月2日收到]