

高效液相色谱(HPLC)对游离腺苷酸类的测定

马丽英 梁殿权 王孝铭 李国忱 胡丽君
(哈尔滨医科大学) (黑龙江省药检所)

腺苷酸类是参与遗传信息贮存、传递与表达的核酸“构件”分子,亦是生物氧化、能量代谢中的能源物质,ATP 又是临床治疗脑血管意外、冠心病及心肌梗塞等的药物^[1]。因此,对生物组织或体液中腺苷酸类的物质测定是重要的研究课题。

腺苷酸类的分析方法有电泳法,层析法、酶学方法、荧光素酶法等^[2]。这些方法,有的需要样品量大、方法复杂、测定时间长、准确度低,有的虽然灵敏、特异性好,但需特殊试剂及特殊仪器等。1967 年 Horvath 等^[3]在改善离子交换树脂分离速度的基础上,发展了一种薄膜或固体中心(Solidcore)填充剂。1970 年 Kirkland^[4]在此基础上又介绍了一些高效离子交换色谱的填充剂——薄壳型离子交换树脂。本文所使用的“Permaphase-AAX”即是一种薄壳型阴离子交换树脂(化学键合)。

我们应用这种树脂作高效液相色谱测定标准腺苷酸类化合物。同时对血液游离腺苷酸类作了回收率和重复性试验,认为这是一种值得推广的快速、灵敏的检测方法。

一、材料与方 法

1. 仪器 日本岛津 LC-1 型高效液相色谱仪; SPD-1 型紫外分光光度检测器; 不锈钢柱

(2.1mm × 500mm)。

2. 填充剂 薄壳型阴离子交换剂(化学键合型)“Permaphase-AAX”荷兰产品

3. 试剂 5'-腺苷-磷酸。(上海生化研究所产品), 5'-腺苷二磷酸二钠盐(西德产品) 5'-腺苷三磷酸二钠盐(上海生化研究所产品), 磷酸二氢钾(A. R, 天津市化学试剂二厂产品), 磷酸(G. R. 北京化工厂产品), 高氯酸(G. R. 上海桃浦化工厂产品)。

4. 健康人血液中游离腺苷酸类的制备 首先取一带塞离心管,加入 3% 高氯酸 1.5ml,并置于冰水中予冷备用。采血约 0.5ml,立即与此离心管内高氯酸充分混合,称重计算加入的血液量。然后用 CSF-1A 超声波细胞粉碎器,250mA 进行 3 分钟粉碎制成匀浆,3,000rpm 离心 10 分钟,上清液可直接用于分析^[5]。

5. 标准溶液 按表 1 制备五种不同含量的腺苷酸类标准溶液。

6. 色谱条件:

色谱柱 样品柱和参比柱均为 Permaphase AAX, 各长 100cm。

流动相 0.005M 磷酸二氢钾(pH3.0)和 0.5M 磷酸二氢钾(pH4.0)。0.5M 磷酸二氢钾液的起始浓度为 25%,每分钟以 3% 线性梯度速度洗脱,参比柱与样品柱中的流速分别是

表 1 腺苷酸标准液含量^[6]

标准品	水份	百分含量	(moles/5μl)				
			1	2	3	4	5
AMP	4.88%	93.5%	1.22×10^{-10}	2.44×10^{-10}	3.67×10^{-10}	4.89×10^{-10}	6.11×10^{-10}
ADP	5.00%	72.3%	1.90×10^{-10}	3.79×10^{-10}	5.69×10^{-10}	7.59×10^{-10}	9.48×10^{-10}
ATP	5.54%	87.4%	5.68×10^{-10}	11.4×10^{-10}	17.0×10^{-10}	22.7×10^{-10}	28.4×10^{-10}

0.76ml/分和 0.64ml/分。柱压 50kg/cm²；柱温为室温(27—29℃)；记录器纸速 10mm/分；检测器波长 257nm；检测灵敏度 0.08AUFs。

二、结 果

1. 柱的填充法及其理论塔板数 薄壳型阴离子交换树脂“Permaphase-AAX”，颗粒 >20 μm，采用干法填充^[7,8]。测得理论塔板数为1110/m。为检查自装柱效的质量，用日本购进“Permaphase AAX”填充柱进行比较，测得结果两者理论塔板数十分相近。

2. 标准品及健康人血液腺苷酸类的分离 图 1 是混合标准腺苷酸类的分离色谱图，各组分的保留时间：AMP tr = 2 分 44 秒、ADP tr = 4 分 07 秒，ATP tr = 10 分 27 秒。由色谱图可以看出，三种标准腺苷酸分开较完全(R_s > 1.25)，整个分离时间仅需 13 分钟。

图 2 是分离健康人血液游离腺苷酸类的色谱图，各组分的保留时间：AMP tr = 2 分 46 秒，ADP tr = 3 分 31 秒，ATP tr = 10 分 52 秒，在 13 分钟内三种腺苷酸完全分开 (R_s >

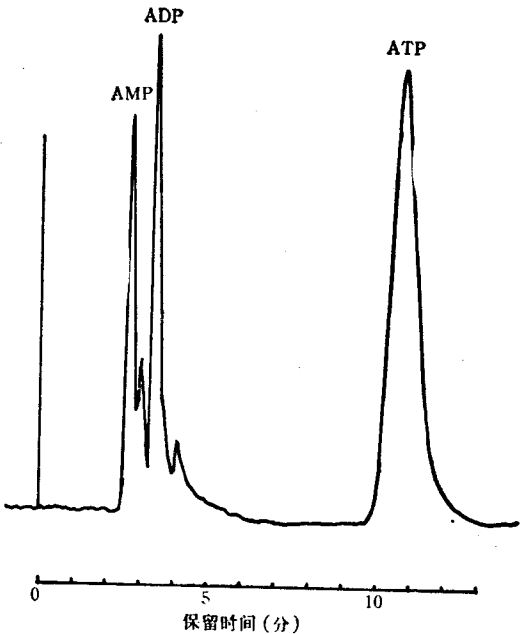


图 2 高效液相色谱对健康人血液游离腺苷酸类的分离色谱图

5μl 稀释血液液，相当全血 1.25μl 其他条件同图 1

1.25)。

3. 腺苷酸类的标准曲线 标准腺苷酸类的不同摩尔与相应的峰面积，按直线回归法制作标准曲线如图 3 (r > 0.991)。此结果作为腺苷酸类的定量标准。

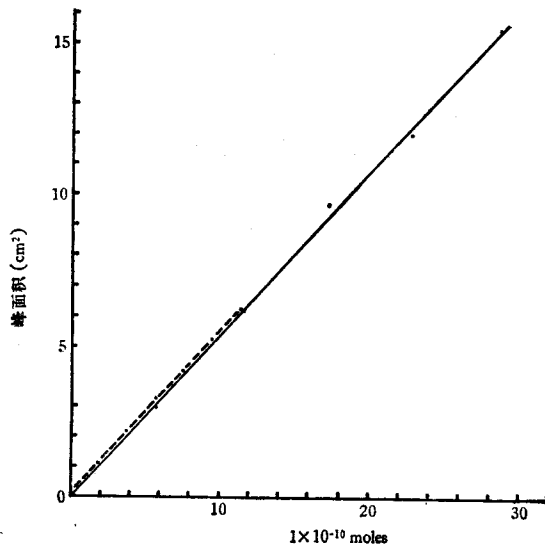


图 3 不同摩尔 ATP、ADP 及其峰面积的标准曲线 注样总体积 5μl

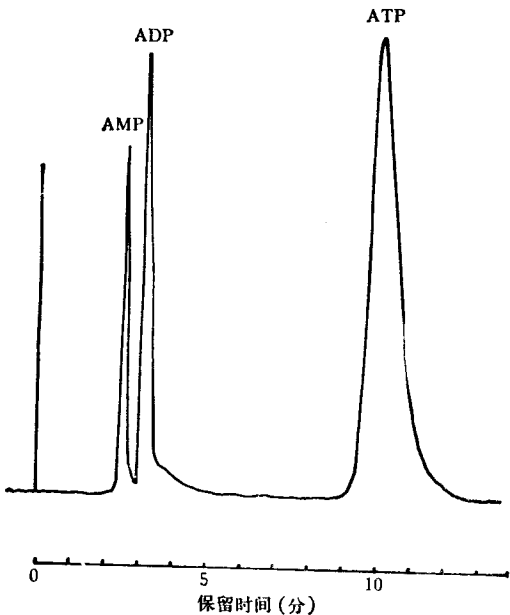


图 1 高效液相色谱对混合标准腺苷酸类的分离色谱图

5μl 混合标准品；AAX 柱，50kg/cm² 柱压，室温 (27—29℃)，257nm 波长，0.08AUFs。移动相：0.005MKH₂PO₄ (pH3.0) 与 0.5MKH₂PO₄ (pH4.0) 3%/线性梯度洗脱

表 2 血液游离腺苷酸类的回收率

组分	含 量 (mg/dl)				回收率
	血液	标准液	测定值	计算回收值	
ADP	4.33	11.5	15.2	10.9	94.8%
ATP	24.3	37.7	58.6	34.3	91.0%

4. 回收试验和重复性试验 回收试验, 其结果见表 2。同一份血样的游离腺苷酸类进行七次重复性测定, 计算其均值($\bar{x}$), 标准差(SD)

和变异系数 cv% 如表 3。

表 3 血液游离腺苷酸类的重复性

组分	$\bar{x}$	SD	c.v%
ADP	6.23	0.37	5.9%
ATP	22.5	0.56	2.5%

5. 血液游离腺苷酸类含量 我们测三例健康成人血液样品的游离腺苷酸类含量。其结果见表 4。

表 4 血液游离腺苷酸类含量

作 者	方 法	ATP (mg/dl)	ADP (mg/dl)	AMP (mg/dl)	ATP/ADP + ATP
本 文	HPLC 法	23.5±4.6	5.5±1.6	2.8±1.4	0.81
堀川秀男 ^[9]	酶 法	21.8±4.0			
中野昭一 ^[10]	酶 法	20.7—35.5			

三、讨 论

1. 流动相的选择 在 Permaphase AAX 上分离 5'-腺苷酸类, 用 0.002M KH_2PO_4 (pH3.3) 恒定浓度流动相洗脱, 先出现 ADP 峰、后出现 AMP 峰。当流动相浓度改为 0.005M KH_2PO_4 (pH3.0) 时, AMP 与 ADP 不能分开, ATP 也不能被洗脱。

如用 0.38M KH_2PO_4 (pH3.8) 流动相洗脱, AMP 与 ADP 的分离度较差 (R_s 为 0.8—1.0), 而 ADP 与 ATP 分离度较好 ($R_s > 1.5$)。分离时间 10 分钟。因此用恒定浓度 KH_2PO_4 作流动相适于 ATP 单独分离定量。

既要考虑各组分的分离度, 又要缩短分析时间, 故选用 KH_2PO_4 线性梯度洗脱。在此条件下, AMP, ADP 和 ATP 保留时间相差较大, 分离度大于 1.25。13 分钟即可将血液样品或标准混合腺苷酸类全部分离。

如果梯度变化速度增大到 6%/分, 由于离子强度增加太快, 虽分离速度加快但分离度反而降低。所以梯度速度以 3%/分较好。

2. 检出量 仪器检测敏度放在最大即 0.01

AUFS 时, 可检出浓度 2.6ng/1 μl 的腺苷酸。这相当于 1 μl 注样量中含腺苷酸 5.5×10^{-12} moles。本实验所用仪器检测灵敏度是 0.08AUFS, 可检出各种标准腺苷酸相当 10^{-11} moles, 此检测水平与 Iida, Y. 0.04AUFS 标准样品浓度基本一致^[5]。

3. 根据标准 ADP、ATP 摩尔与峰面积之间的线性关系 ($r > 0.991$) 按其直线回归方程分别绘制标准曲线, 由图 3 可见实测数据散点图与所绘制的标准曲线基本一致, 说明本实验方法准确, 可靠。

4. 我们测定健康成人血液中 ATP 含量与其它酶学法^[9,10]测定结果报道一致。并在 Bergmeyer, H.V.^[11]报道的正常范围之内(10—54mg/dl)。

5. 高效液谱测定游离腺苷酸类一次需血量相当 0.0013ml, 而酶法测定^[10], ATP 需血量 0.1ml, ADP 与 AMP 则需 2ml。

上述定量分析测定的结果表明, 应用高效液相色谱法对游离腺苷酸类代谢过程的研究是一较简便、快速、灵敏的方法。

参 考 文 献

- [1] 上海第一医学院主编《医用生物化学》(下册) 1085 页, 1979 年。
[2] William D. Bostick et al.: *Anal. Biochem.*, **88**, 78, 1978.
[3] Horvath C. G. et al.: *Anal. Chem.*, **39**, 1422, 1967.
[4] Kirkland J. J. *J. Chromatog. Sci.*, **8**, 72, 1970.
[5] Iida, Y. *Japanese Journal of Hygiene*, **33**, 2,

- 410, 1978.
[6] 《上海市药品标准》, 1980 年版(上册) p 25。
[7] L. R. 斯泰德, J. J. 柯克兰著, 杨明彪等译《现代液相色谱法导论》**9**, 150, 1980。
[8] Kirkland J. J. *Anal. Chem.*, **43**, 36A, 1971.
[9] 堀川秀男: 《临床检查》**19**, 2, 188, 1975。
[10] 中野昭一: 《诊断与治疗》**59**, 2, 366, 1971 年。
[11] Bergmeyer. H. U. *Method of Enzymatic Analysis*, **4**, 1974.

[本文于 1983 年 1 月 15 日收到]

低速离心法制备人红细胞影泡的探讨

秦德安 何学民 左大珏 鲁心安*

(华东师范大学生物系)

关于人红细胞影泡的制备和性质, Schwoch 和 Passow (1973) 已有评述^[1]。分离红细胞质膜的一般方法是低渗溶血和高速离心分离, 即将人^[2]或哺乳动物^[3]红细胞在低渗溶液中溶血, 释放出血红蛋白, 然后反复洗去残留的血红蛋白, 所得红细胞膜即所谓红细胞“影泡”(ghosts)。

由于高速离心机设备目前国内尚未普及, 我们尝试在低速离心 (4°C , $1200 \times g$, 45 分钟) 条件下进行人红细胞影泡制备。并与高速法 (4°C , $20,000 \times g$, 40 分钟) 制得的影泡进行比较, 结果看到在形态和膜蛋白电泳图谱等方面都是相同的, 但膜蛋白产率较低, 约为高速离心法的 63%。

一、材料与方 法

1. 材料 柠檬酸钠抗凝的新鲜健康成人静脉血(由上海中心血站提供), 药品均为化学纯, 缓冲液用重蒸水配制, pH 经 pH S-3 型酸度计测定。

2. 制备方法

(1) 制备人红细胞悬浮液 7 毫升抗凝血在 4°C $1200 \times g$ 离心 10 分钟, 吸去上清液并完全去除覆盖在红细胞沉淀上的一层白色绒毛状物质 (buffy coat), 这可避免其他细胞的

混入。然后用 0.9% NaCl 溶液洗涤红细胞二次, 最后一次洗涤的离心时间为 20 分钟。得压积红细胞 3 毫升, 悬浮在等体积的 0.9% NaCl 溶液中, 即 1:1 的人红细胞悬浮液。

(2) 低速离心法制备红细胞影泡 除离心速度不同外, 基本按 Dodge (1963) 方法^[2]进行。具体操作步骤是: 各取 2 毫升 1:1 红细胞悬浮液滴加到盛有 28 毫升 (4°C 冷却的) 5mM, pH8 的磷酸缓冲液 (简称 5P8), 10mM pH7.4 磷酸缓冲液 (简称 10P7.4) 和重蒸水 (pH6) 中, 待溶血后 (在 4°C 冰箱内放置 1 小时), 在日立冷冻离心机 4°C , $1,200 \times g$, 离心 45 分钟。仔细吸去上清液, 然后将沉淀分别悬浮在上述三种低渗液中 (约 40 毫升), 再在 4°C , $1200 \times g$ 离心 45 分钟, 以便洗去影泡中的血红蛋白。

如此洗涤三次后, 用 5P8 及 10P7.4 溶液所得的影泡样品接近乳白色, 重蒸水制备的影泡呈红色。

将上述三种影泡样品分别用原来溶血用的低渗溶液稀释到 10 毫升, 为 1:10 影泡稀释液, 供分析用。

(3) 高速离心法制备红细胞影泡 除离心条件是 4°C , $20,000 \times g$, 40 分钟外, 其他条件均与上述低速法相同。

* 汪志和、叶介明、谢维勤等同志曾参加部分测定工作。