

法, 它们都不能一法而胜任各种情况下蛋白定量测定的要求, 只能在某些特定的情况下, 才体现出各自的优点, 所以在进行蛋白测定之前, 应根据所测蛋白的种类及所处的溶液体系来选择合适的方法。

参 考 文 献

1 Lowry O H *et al.* *J Biol Chem*, 1951; 193: 256

2 Larson E *et al.* *Anal Biochem*, 1986; 155: 243  
 3 康建, 初俊杰. 生物化学与生物物理进展, 1988; 15(2): 147  
 4 Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976; 72: 248  
 5 胡卓逸, 孙承琦. 生物化学与生物物理进展, 1990; 7(1): 23

## 固氮作用色谱定量方法的改进

王梓壬 蔡玉奎

(中国科学院福建物质结构研究所, 福州 350002)

关键词 气相色谱, 半峰宽, 系数法

以乙炔还原为乙烯的反应计量固氮作用已是普遍采用的方法, 其优点是可以用气相色谱法快速测定。色谱定量主要有峰高法及峰面积法, 峰高法比较简便, 但误差比较大, 所以一般均采用峰面积法, 但测量手续繁琐。根据峰面积法的色谱专用计算机已比较成熟, 而价格尚比较贵, 国内还有大量色谱仪未配计算机。我们在进行化学模拟生物固氮的研究中, 以乙炔为底物, 模型物催化还原乙炔为乙烯外还有副产物乙烷, 为了快速测定体系中的甲烷、乙烷、乙烯、乙炔等四组分的含量, 我们采用系数法处理色谱数据, 使每日的数据测量工作简化。

### 1 系数法的理论根据和计算方法

当选择好色谱分离柱<sup>[1]</sup>及操作条件后, 所测定体系色谱分离较好, 峰形对称满足正态分布时(如图 1 所示), 用归一化法测定该四组分的百分含量为:

$$V_1\% = \frac{S_1}{S_1 + S_2 + S_3 + S_4}$$

$$= \frac{h_1 W_{\frac{1}{2}}^1}{h_1 W_{\frac{1}{2}}^1 + h_2 W_{\frac{1}{2}}^2 + h_3 W_{\frac{1}{2}}^3 + h_4 W_{\frac{1}{2}}^4} \quad (1)$$

式中  $S$  代表各峰面积,  $h$  代表各峰高,  $W_{\frac{1}{2}}$  代表各半峰宽。手工测量半峰宽是比较麻烦的, 需用读数显微镜或游标卡尺, 并且误差大, 是测定结果误差的主要来源。

根据 J. H. Purnell<sup>[2]</sup> 提出的色谱柱有效理论塔片公式:

$$N = 5.54 \left( \frac{t_k^1}{W_{\frac{1}{2}}} \right)^2 \quad (2)$$

式中  $N$  是有效理论塔片数,  $t_k^1$  是化合物的实际

保留时间,  $W_{\frac{1}{2}}$  是各化合物的半峰宽, 色谱条件固定后,  $N$  是常数。把 (2) 式开方并移项得:

$$W_{\frac{1}{2}} = \frac{1}{\sqrt{5.54}} t_k^1 \quad (3)$$

令

$$\frac{1}{\sqrt{5.54}} = K,$$

(3) 式可简化为:

$$W_{\frac{1}{2}} = K t_k^1 \quad (4)$$

由 (4) 式可知各化合物的半峰宽  $W_{\frac{1}{2}}$  与其实际保留时间  $t_k^1$  成正比, 也就是各化合物的半峰宽之比等于其实际保留时间之比:

$$\frac{W_{\frac{1}{2}}^1}{W_{\frac{1}{2}}^4} = \frac{t_1^1}{t_4^1}, \quad \frac{W_{\frac{1}{2}}^2}{W_{\frac{1}{2}}^4} = \frac{t_2^1}{t_4^1}, \quad \frac{W_{\frac{1}{2}}^3}{W_{\frac{1}{2}}^4} = \frac{t_3^1}{t_4^1} \quad (5)$$

我们定义

$$f_1 = \frac{W_{\frac{1}{2}}^1}{W_{\frac{1}{2}}^4}, \quad f_2 = \frac{W_{\frac{1}{2}}^2}{W_{\frac{1}{2}}^4}, \quad f_3 = \frac{W_{\frac{1}{2}}^3}{W_{\frac{1}{2}}^4}$$

为各化合物的相关系数。如果暂时不考虑各化合物在氢火焰检测器上的响应因子, 只要测定各化合物的实际保留时间, 就可以求出这些相关系数, 代入 (1) 式即得简化的计算公式:

$$V_1\% = \frac{f_1 h_1}{f_1 h_1 + f_2 h_2 + f_3 h_3 + f_4 h_4} \quad (6)$$

固定色谱条件后, 只要一次求出各相关系数  $f_1, f_2, f_3,$

$f$ , 测量各组分的峰高  $h_1, h_2, h_3, h_4$ , 就可直接求出各化合物的百分含量。

表1 测定各化合物的实际保留时间求得的相关系数

组 分	CH <sub>4</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
实际保留时间 $t_k$ (s)	68	169	196	276
相关系数 $f$	0.24	0.61	0.71	1
实际保留时间 $t_k$ (s)	66	165	192	272
相关系数 $f$	0.24	0.60	0.70	1

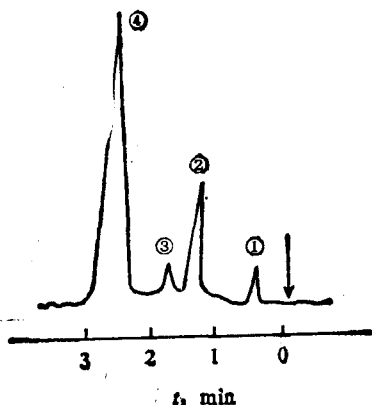


图1 气相色谱分离图

固定相: Porapak-N 柱尺寸: 2m × 3mm  
柱温: 75°C 检测器: 氢火焰  
组分: ①甲烷 ②乙烯 ③乙烷 ④乙炔

除了如上所述测定各化合物的保留时间  $t_k$  计算相关系数外, 也可以直接从色谱图上测量各化合物的半峰宽求得, 具体做法是在测定前注标准样品到色谱柱, 并适当放大纸速, 使所记录的峰形均匀对称, 半峰宽足以减少测量误差, 由测量的各半峰宽比值也同样

表2 用测量半峰宽  $W_{1/2}$  的方法求得的相关系数

组 分	CH <sub>4</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
半峰宽 $W_{1/2}$ (mm)	1.1	2.7	3.0	4.3
相关系数 $f$	0.25	0.62	0.70	1
半峰宽 $W_{1/2}$ (mm)	1.1	2.6	3.0	4.3
相关系数 $f$	0.25	0.60	0.70	1

求出各相关系数。

## 2 结果讨论

2.1 经大量的实验应用表明, 该方法的相对误差约在 5% 以内, 与峰面积法的误差相当。该方法实际衍生于峰面积法, 具有峰面积法的精密度和准确度, 又排除了面积法半峰宽难以测定, 偶然误差大的缺点; 在测量计算上又有峰高法的简便, 而峰高法在实际测定中的误差可达 40%。

2.2 该方法的误差, 在固氮活性测试中是完全允许的, 因为固氮活性测定的是一个动态平衡点, 计算单位时间内每克分子酶或模型物的催化还原能力, 允许的误差在 10% 左右。

2.3 该方法是色谱仪没有配用计算机的情况下可以推广的方法, 例如工厂的某一生产流程



测定该反应的转化率时, 采用这样的计算方法, 可节省大量繁杂的测量工作。

## 参 考 文 献

- 1 蔡玉奎. 生物化学与生物物理进展, 1984;(3): 58
- 2 Purnell J H. *J Chem Soc*, 1960; (3): 1268

## 《基因的分子生物学》出版

由第一军医大学生物化学教研室徐钤教授主编的《基因的分子生物学》一书, 目前正在中国科技出版社出版, 将于 1992 年 8 月发行。

本书系统而简明地阐述了基因的分子生物学的理论和技术, 及其在医学科学领域中的应用。全书约 40 万字, 另有 304 幅图。内容共分十三章: 一、核酸的分子结构; 二、遗传物质的复制; 三、RNA 的合成; 四、蛋白质生物合成过程中的 RNA; 五、蛋白质的生物合成; 六、

DNA 损伤与修复; 七、基因组的结构与功能; 八、基因重组的分子机制; 九、基因表达的调控; 十、肿瘤病毒与癌基因; 十一、免疫球蛋白基因结构及其表达调节; 十二、珠蛋白基因的分子遗传学; 十三、基因工程。该书可作为高等医学院校及理工科大学生物科学专业学生(本科生、硕士和博士研究生)的教科书, 以及从事分子生物学的教师和科研人员参考。

(第一军医大学生化教研室彭朝辉, 广州 510515)