

经验交流

## 高效液相色谱法测定生物样品中的磷酸肌酸

刘忆湘 张中兴

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京)

磷酸肌酸(CP)是肌肉中重要的能量贮存形式, 以往报道的CP测定方法(1—4)复杂且准确性有限。1980年Juengling等建立了用离子对反相高效液相色谱法测定心肌组织提取物中的肌酸(Cr)和CP含量的方法(5)。但国内尚未有以高效液相色谱(HPLC)方法分离测定CP的报道。我们参考Juengling等人的方法, 经过改进, 应用国产试剂及分离柱, 对大鼠骨骼肌组织及线粒体中的CP进行了分离和测定。

### 实验部分

(一) 仪器与试剂 仪器: Waters高效液相色谱仪ALC/244型; 分离柱: 30×0.4cm YWG C<sub>18</sub> 不锈钢柱, 天津试剂二厂填装; 标准品: CP为E.Merk公司产品。

(二) 色谱分离条件 流动相: 磷酸二氢钾0.2%, 四丁基氢氧化铵0.1%, pH3.0; 流速1.0ml/min; 检测器用UV-450型, 波长210nm。

(三) 样品制备 取大鼠右腿腓肠肌2g放入0℃的分离介质, 以Max(6)的方法提取线粒体; 另取胫前肌0.5g立即放入5ml 0.03mol/L的过氯酸溶液中, 剪碎匀浆, 低温离心, 取上清液2ml用

6mol/L的氢氧化钾中和至pH7.0, 再离心去除沉淀, 通过微孔滤膜(Waters 0.45 $\mu$ )。

测定线粒体CP生成量时, 室温条件下使线粒体反应介质中Cr达饱和浓度, 反应步骤用Max(6)的报道, 只是在底物后加入560nmol的ATP, 2分钟后以1ml 1.6mol/L过氯酸终止反应。离心中和等步骤同上。

(四) 定量方法 采用外标峰高定量法。

### 结果与讨论

(一) 标准CP的检测及标准曲线: 取CP标准液注入HPLC系统, 在“实验部分(二)”中所述条件下可得检测峰, 保留时间为7'58"。以峰高(mm)对进样量(nmol)制标准曲线。其直线相关系数为0.99997, 最佳定量范围为0.29—0.57nmol。

(二) 样品分离: 分别取肌肉组织和线粒体的样品5 $\mu$ l和10 $\mu$ l注入HPLC系统。然后再各加CP标准液于样品中, 以增强的峰高定性。结果见图1和图3。

用Juengling等人的原流动相不能使线粒体反应系统中的CP与杂质峰完全分离(见图2)我们分别试验了改变缓冲液pH值、浓度和流速及增大

(上接248页)

- Entomol., 59, 1082(1966).
- (2) C. R. Harris. J. Econ. Entomol., 62, 1437 (1969).
  - (3) J. H. O'Bannon et al., Plant Dis. Rept., 51, 995 (1967).
  - (4) M. C. Bowman et al., J. Agr. Food Chem., 19, 342(1971).
  - (5) I. H. Williams et al., J. Agr. Food Chem., 20, 1219(1972).
  - (6) 中国科学院南京土壤研究所, 《土壤理化分析》, 上海科学技术出版社, 上海, 1978.
  - (7) A. Bevenue et al., In "Analytical Methods for Pesticides and Plant Growth Regulators", G. Zweig, et al. Eds.; Vol. VI. P. 93, Academic Press, New York. 1972.

(收稿日期: 1987年5月27日)

### Determination of Fensulfothion Residues in Soil Wu Liejun and Liu Aiguo, Shandong Institute of Chemistry, Jinan

The effect of moisture in sandy gravelly soil on Soxhlet extraction of Fensulfothion residues has been studied. It was found that the optimum recoveries were obtained when untreated air-dried sandy gravelly soil was extracted directly. The more the moisture in the soil, the less the average recovery. GLC determination of fensulfothion residues in the soil was performed. Fensulfothion and its sulfone residues in field-treated soil in which peanuts grew were detected by this method. Confirming residue identity is described.

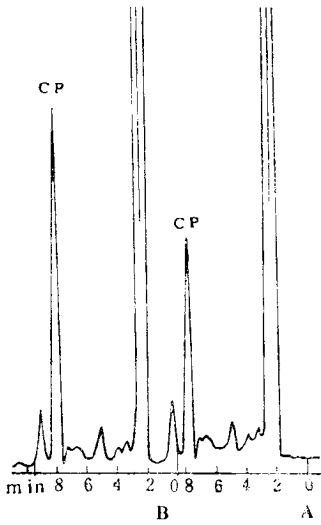


图 1 大鼠肌肉样品中CP分离及加强定性的HPLC图

A: 样品, B: 样品加标准增强. 条件见“实验部分(二)”。

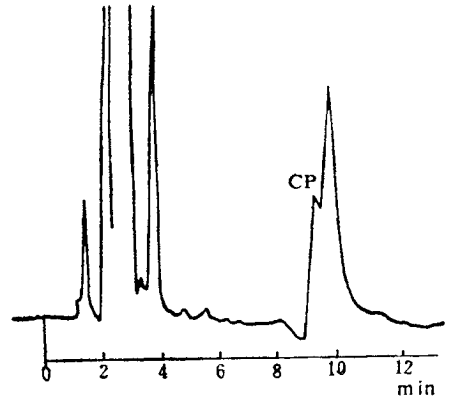
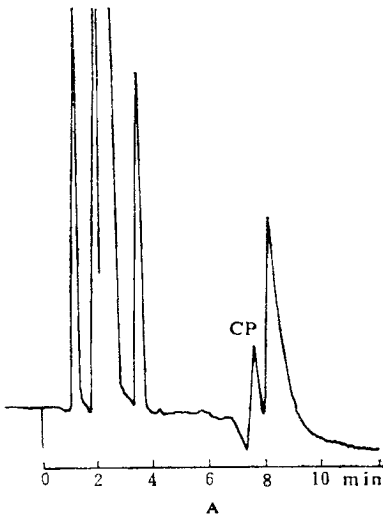


图 2 用Juengling 原流动相分离线粒体反应系统中CP的HPLC图

条件: 流动相用0.2%磷酸二氢钾和0.08%四丁基磷酸铵缓冲液(pH3.0); 流速2.0ml/min; 其它同图1。

图 3 大鼠骨骼肌线粒体反应系统中CP分离及加强定性的HPLC图

A: 样品, B: 样品加标准增强。

流动相极性等方法, 结果表明, 将其中四丁基磷酸铵的浓度由 0.08% 提高到 0.1%, 流速由 2.0ml/min 减至 1.0ml/min 后, 可使 CP 较好分离, 准确定量。

(三) 回收率的测定及重复性实验: 平均回收率在 95.8%—101.5% 之间, 变异系数为 1.5—4.7%。

(四) 正常大鼠肌肉组织的 CP 含量及线粒体的 CP 生成量: 对 82 只正常大鼠测定所得资料经统计为正偏态分布。骨骼肌组织中 CP 含量的 95% 的正常值范围是 13.67~204.50 微克分子/克干重; 线粒体 CP 生成量的 95% 正常值范围是 6.83—268.50 毫克分子/毫克蛋白/2 分钟。(均用百分位数法求

得)。

### 参 考 文 献

- (1) M. L. Tanzer et al., J. Biol. Chem., 234, 3201 (1959).
- (2) Walther Lamprecht et al., "Methods of Enzymatic Analysis (H. U. Bergmeyer)" Academic Press, N. Y., P.610. 1963,
- (3) G.G. 吉尔伯特, 廖辉南译, 《酶法分析》, 科学出版社, 北京, P.174, 1977.
- (4) L. Noda et al., Methods Enzymol, 2, 605

- (1965).
- (5) E. Juengling et al., *Analytical Biochemistry*, 102, 358 (1980).
- (6) S. R. Max et al., *Analytical Biochemistry*, 46, 576 (1972).
- (7) E. Harmson et al., *J. Chromatogr.*, 230, 131 (1982).
- (8) G. K. Bedford et al., *J. Chromatogr.*, 305, 183 (1984).

(收稿日期: 1987年4月8日)

**HPLC Determination of Phosphorylcreatine in Biological Samples** Liu Yixiang and Zhang Zhongxing, *Institute of Basic Medical Sciences Academy of Military Medical Sciences, Beijing*

Phosphorylcreatine (CP) is an important

store form of energy in muscle, Quantitation of CP is helpful in studying the effect of various factors on energy metabolism.

In this paper, the determination of CP in skeletal muscle tissue and mitochondrial reactive system of rat by a modified HPLC method with in 8 minutes is presented. Both reagents and column used are made in China. The precision and accuracy of the method are satisfactory. 82 rats are used for determination. Range of 95% normal value: CP in muscle tissue is 13.67—201.50 nmol/g(dry weight) and that in mitochondrial reactive system is 6.83—268.50 nmol/mg protein/2min.

## 用纸色谱法测定岩石及矿物中金、锑、硒、砷、铊、(铋)

马国中

(河南师范大学化学系, 新乡)

文献(1)报道了用纸色谱法测定岩石及矿物中铜、铅、锌等十二种元素的研究, 并对其影响因素也作了探讨(2)。而金、锑、硒、砷、铊、(铋)在 4mol/L 饱和正丁醇展开剂中用纸色谱法进行分离文献(3)已有介绍, 但利用此方法在岩石及矿物中对它们进行测定却未见报道。本文在此基础上, 利用新华大张定性滤纸 (50×60cm) 作载体展开后, 将谱带分别剪下进行测定。经实验表明, 这种方法既简单、又快速还能解决干扰问题, 若和文献(1)结合起来, 对于研究成矿规律及指导找矿是大有帮助的。

### 分析方法

#### (一) 分析前的准备

1. 层析滤纸 将新华大张定性滤纸裁成如文献(1)P61的形状。2. 层析剂 用 4mol/L HCl 饱和的正丁醇。3. 硫脲+碘化钾混合显色剂的配制: 在 5% 硫脲中加入一定量固体碘化钾, 它们之间的比例是 V (体积) : W (重量) = 10 : 0.5。4. 柠檬-ED 混合液 称 10 克柠檬酸铵和 10 克 EDTA 二钠盐溶于 100ml 水中。

#### (二) 分析手续

称取 0.25g 试样置于 10ml 离心管中, 加 1ml 王水 (1+1), 加热半小时后取出, 澄清后用 0.1ml 吸

量管吸取 0.02ml 于层析滤纸下端 1.5cm 处, 烘干, 放入盛有 10ml 层析剂烧杯中, 盖上表面皿进行层析, 待前沿上升到离滤纸上端 1cm 时取出彻底烘干后, 喷以硫脲+碘化钾混合显色剂, 显出黄色色带分别为锑 (0.91)、铋 (0.71)、硒 (0.70)、砷 (0.47)。将锑带上方剪下用王水 (1+3) 溶解后, 取一份溶液按文献(4)测定金; 取另一份溶液按文献(5)测定铊、硒, 因显色晾干后颜色褪去, 此时应将色带剪下, 加 5% HCl 5ml + 5 滴 HNO<sub>3</sub> (1+1) 在水浴上加热溶解后蒸发至干, 取下, 加 10% 甲酸 2ml, 加柠檬-ED 混合液 2ml, 摇匀后转移到 10ml 比色管里, 加 0.2% 硒试剂 1ml (此试剂不稳定, 应现用现配, 过滤后使用) 放置半小时后, 加氨水 (2+1) 1ml, 加甲苯 1ml, 振荡后若有机层显黄色或黄棕色示有硒存在。

### 问题讨论

(一) 本方法是以滤纸为载体, 在同--展开剂中将金、锑、硒、砷、铊、(铋) 等离子展开, 其色谱图如图 1 所示。然后根据它们的 R<sub>r</sub> 值不同 (见表 1) 分别剪下而进行测定, 其优点是, 方法简单、无干扰、能在大量干扰组分存在时进行某元素的测定。

(二) 众所周知, 与热液成矿有关的那些岩石与矿物都有铁的存在。虽然 Fe<sup>3+</sup> 的 R<sub>r</sub> 值为 0.50,