

高效液相色谱法测定棉籽中的ATP, ADP, AMP

杨伟华 邱 竞

(中国农业科学院棉花研究所, 安阳, 455112)

测定生物组织中腺苷三磷酸(ATP)、腺苷二磷酸(ADP)和腺苷一磷酸(AMP)的含量, 在研究生物的一些生理生化现象中有重要意义。利用不同方法定量分析这三种腺苷酸的报道已有很多(1,2)。本文所述是用反相高效液相色谱法, 对棉籽中的 ATP、ADP和AMP进行测定。

实验部分

(一) 仪器 美国 Waters 公司液相色谱仪, 包括M510 输液泵, U6K 进样器, M490紫外检测器和M730数据处理机。

(二) 试剂 ATP钠盐标样(美国Sigma公司产品); ADP钠盐标样、AMP 钠盐标样(中国科学院上海生化所产品); KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 (分析纯); 高纯水(电导率 0.5×10^{-6} 欧姆 $^{-1}$ ·厘米 $^{-1}$)。

(三) 样品制备 每个处理10粒棉籽, 在30℃恒温条件下用蒸馏水浸种, 毛籽24小时, 光籽12小时。剥壳后将种胚切成4—6块放入试管, 加入少量95%乙醇, 然后在水浴上蒸干。定量加入高纯水, 在水浴中提取5—10min, 放入冰箱待用。测定时取少量上清液, 用0.45 μm 滤膜过滤后, 吸取10—25 μl 进样。

(四) 色谱条件 色谱柱: Waters $\mu\text{Bondapak C}_{18}$ 不锈钢柱(3.9mm \times 30cm); 柱温: 室温(25 \pm 2℃); 流动相: (0.02mol/L KH_2PO_4 -0.03mol/L K_2HPO_4 磷酸缓冲液, pH7; 流速1ml/min; 检测波长254nm; 灵敏度 0.02AUFS; 记录纸速1cm/min。

结果与讨论

图1是棉籽提取液的色谱图。三个组分峰的保留时间与标样几乎完全一样。

按外标法定量。在 1×10^{-7} — 1×10^{-1} mol/ml的范围内, ATP的进样量与记录仪对峰的积分面积的线性关系良好, 线性系数 $r > 0.999$ 。将 1.00×10^{-3}

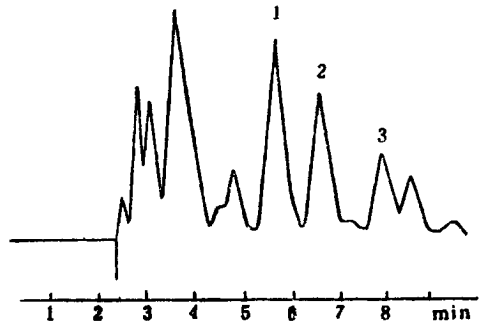


图1 棉籽提取液的色谱图
1.ATP, 2.ADP, 3.AMP.

mol/mlATP, 0.85×10^{-6} mol/mlADP, 1.00×10^{-3} mol/mlAMP的混合溶液进样十次所得结果的标准方差和变异系数分别为0.013, 0.011, 0.011和1.30%、1.29%、1.09%。ATP、ADP、AMP 三个组分的回收率依次为98.5%、92.7%、101.1%。

流动相的浓度、pH 和流速对分离效果与速度均有影响。在本文所选条件下, 各组分峰既能较好地分开, 而且比较紧凑, 试样中的未知物对所分析组分的干扰最小。另外, 我们还对小麦、玉米种子中的ATP、ADP和AMP含量进行了测试, 也获得了较好的结果。

参考文献

- (1) 刘存德等, 植物生理学通讯, 5,26(1982).
- (2) 马丽英等, 生物化学与生物物理学进展, 5, 64(1988).

(收稿日期: 1988年10月10日)

Determination of ATP, ADP and AMP in Cotton Seeds by Using HPLC Yang Weihua and Qiu Jing. Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Anyang, Henan
ATP, ADP and AMP extracted from cotton seeds were determined by HPLC with $\mu\text{Bondapak C}_{18}$ as the stationary phase and phosphate buffer as the mobile phase. This method has the advantages of simple sample preparation, low cost, less interference, high sensitivity, rapidity and automatic data processing. The linearity, reproducibility and recovery are all satisfactory.