

## 胶束电动毛细管色谱法对三磷酸腺苷及其分解产物的分离分析

陈玉英 後藤正志<sup>1</sup> 江坂幸宏<sup>1</sup>

(分析化学教研室; <sup>1</sup> 岐阜药科大学, 日本岐阜市)

**摘要** 对 ATP (adenosine triphosphate) 及其分解产物 ADP (adenosine diphosphate)、AMP (adenosine monophosphate) 等采用胶束电动毛细管色谱法进行分离分析。电动色谱系统为: 毛细管柱 57 cm  $\times$  45  $\mu$ m (I. D), 石英毛细管, UV 紫外检测器 (波长 260 nm), 磷酸盐缓冲溶液 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 5 mmol/L, 十二烷基硫酸钠 (SDS) 50 mmol/L (pH=9.06)。获得了良好的分离, 为 ATP 的定量建立了良好的分析系统。

**关键词** 胶束电动毛细管色谱; 三磷酸腺苷; 腺嘌呤; 二磷酸腺苷; 一磷酸腺苷; 环磷酸腺苷

### 1 原理<sup>[1,2,6,7]</sup>

三磷酸腺苷 (ATP) 为一辅酶类药物, 是肌体代谢及肌肉收缩所必需的物质。中国药典作为治疗心肌炎、脑动脉硬化及急性、慢性肝炎的药物。但是 ATP 为不稳定物质, 容易失去磷酸根而成为二磷酸腺苷 (ADP)、一磷酸腺苷 (AMP), 从而影响疗效。腺嘌呤 (Adenine) 被用作治疗白血球减少症和预防药物。本文建立了对 ATP、ADP、AMP 及 Adenine 等物质的分离分析方法。

电动毛细管色谱是将离子型表面活性剂如十二烷基硫酸钠 (SDS), 加到缓冲溶液中, 当浓度到达临界浓度时, 该表面活性剂聚集在一起形成胶束。溶质即在胶束相与水相间进行分配, 其原理类似色谱法, 但其又与其它电泳法相似。由于毛细管壁一般带有负电荷, 故靠近管壁的缓冲溶液带正电荷且向阴极移动形成电渗流。另外因 SDS 胶束表面带有负电荷而以较大的淌度向阳极移动。不过, 一般情况下电渗流的速度大于胶束的淌度, 因此最终胶束仍以一定的速度流向阴极。由于各

组分在两相间具有不同的分配系数, 显示出不同的淌度而得到分离。

### 2 实验部分

#### 2.1 试剂与仪器

表面活性剂: SDS (和光纯药工业株式会社); 磷酸钠、磷酸氢钠 (A. R, 关东化学株式会社); ATP、ADP、AMP 等标准品 (东京化成贩卖株式会社)。

高压源: HCZE-30PNO 25-LDS; 检测器: UVIDEC-100-Ⅱ (日本分光工业株式会社); 石英毛细管柱: 全长 57 cm, 有效长度 37 cm, 45  $\mu$ m (I. D); 铂电极一对及电解槽。

#### 2.2 实验与方法

2.2.1 石英毛细管的预处理<sup>[4,5]</sup> 石英毛细管先用 0.1 mol/L HCl 抽洗约 2 min, 然后再用 0.1 mol/L NaOH 溶液抽洗约 2 min, 再用去离子水抽洗 2~3 min, 备用。

2.2.2 样品溶液的配制 分别称取 ATP、ADP、AMP 适量于量瓶中, 加去离子水适量, 超声振荡待溶解, 再加水到刻度定容, 配成约 0.5 mg/ml 的浓度, 备用。Adenine 及 cAMP 的

配制方法相同。

**混合溶液的配制** 分别称取上述标准品于同一量瓶中,加去离子水适量,用超声波振荡待完全溶解,再加去离子水稀释到刻度定容。若有微显混浊的感觉时,用微孔(0.45  $\mu\text{m}$ )滤球过滤后方能作进样溶液。

### 2.2.3 电泳条件的选择

**磷酸盐缓冲溶液的配制与选择** 称取磷酸盐适量,分别配制成 2.0 mmol/L、5.0 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L 溶液,分别加入 SDS,配成浓度为 50 mmol/L,再用 0.1 mol/L HCl 溶液调节各混合液  $\text{pH}=9.06$ ,进行实验。

#### SDS 溶液浓度的选择

取上述磷酸盐溶液(5 mmol/L)分别加入 SDS 适量,使各成为 50 mmol/L、20 mmol/L、10 mmol/L、5.0 mmol/L,各溶液均用 HCl 溶液(0.1 mol/L)调节  $\text{pH}=9.06$ 。

#### 磷酸盐缓冲溶液 pH 值的选择

将磷酸盐缓冲溶液(5 mmol/L)与 SDS(50 mmol/L)的混合溶液适量,调节溶液的 pH 分别为 9.06、6.00、3.00 进行试验。

上述各试验用磷酸盐缓冲溶液,均应该先用超声波脱气 10 min 左右,才能上机使用。

#### 高压源的工作电压选择

运用电压为 20 kV、15 kV、10 kV 分别在上述最佳浓度的磷酸盐缓冲溶液上进行试验,通过组合选择得出了下列最佳电泳系统。

### 2.2.4 最佳电泳系统

缓冲液中磷酸盐浓度 5 mmol/L、SDS 浓度为 50 mmol/L、 $\text{pH}=9.06$ ;电泳电压 15 kV;检测器  $\text{UV}_{\lambda}=260\text{ nm}$ ,F.S 0.32;进样方法:手动虹吸进样 10 cm 6 s;纸速:2.5 mm/min;石英毛细管:57 cm( $l=37\text{ cm}$ ) $\times 45\text{ }\mu\text{m}$ (I.D)。样品溶液均为标准品(浓度 0.5 mg/ml)水溶液,见图 1。

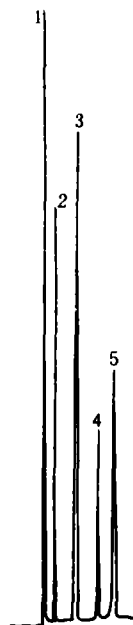


Fig 1. Test of electrokinetic system. Capillary, 45  $\mu\text{m}\times 57\text{ cm}$ ; buffer, 5 mmol/L  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ +SDS 50 mmol/L; applied volt, 15 kV; injection, siphon effect(10 cm 6s); detection, 260 nm.  
1. Adenine; 2. cAMP; 3. AMP; 4. ADP; 5. ATP

## 3 结果与讨论

3.1 在上述各实验条件中以最佳电泳系统得到的分离最好。即分离度为完全基线分离,峰形基本对称,理论塔板数  $N$  为 10121/m 以组分 ADP 为基准。当 SDS 浓度小于 50 mmol/L 时得到的色谱峰的峰形及分离度有一定影响,对保留时间无显著改变。

3.2 工作电压对保留时间  $t_R$  影响的见表 1。

Tab 1.  $t_R$  of compounds(min)

Applied volt	Adenine	cAMP	AMP	ADP	ATP
15 kV	5	6	9	12	14
20 kV	4	5	7	10.5	12

3.3 改变载液的 pH 值,组分间分离度不能达到基线分离。见图 2。

3.4 毛细管的处理应用 HCl 溶液(0.1 mol/L)及 NaOH 溶液(0.1 mol/L),可以除去管壁表面的金属离子或粘着管壁的有机物,从而改善分离效果,提高柱效。

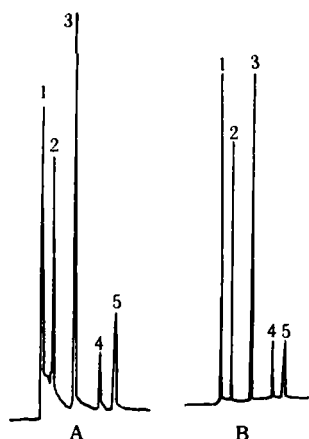


Fig 2. Experiment of change pH. A: pH = 6.00; B: pH = 9.06; Other condition according to Fig 1.

1. Adenine; 2. cAMP; 3. AMP; 4. ADP; 5. ATP

## 参考文献

- 1 寺部 茂, キヤピラリー電気泳動. ぶんせき, 1991; 8, 49
- 2 Werner G, Kuhr. *Capillary Electrophoresis*, 1990; 62: 403R
- 3 大塚 浩二, 寺部 茂. キヤピラリー電気泳動および動電クロマトグラフィーによるキラル分離. *Jasco Report*, 1991; 33(1): 1
- 4 Lnx JA, Yin HF and Schmeberg G. Construction Evaluation and Analytical operation of a Modular Capillary Electrophoresis Instrument. *Chromatographia*, 1990; 30: 7
- 5 Kobayashi S, Veda H, Kikumoto M. Photodiode Array Detection in High- Performance Capillary Electrophoresis. *J Chromatogr.* 1989; 480: 179
- 6 陈 义, 常理文等. 高效毛细管电泳在药物分析中的应用. 第二届全国生物医药色谱学术会议论文集. 南京, 1990; 274
- 7 齐 莉, 朱一川等. 毛细管等速电泳仪在 ATP 分析中的应用. 第二届全国生物医药色谱学术会议论文集. 南京, 1990; 283

## Analysis of Adenine, ATP, ADP, AMP and cAMP by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography

Chen Yuying, Masashi GOTO<sup>1</sup>, asaka KOKO<sup>1</sup>

Department of Analytical Chemistry; <sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Analytical Chemistry, Gifu Pharmaceutical University, Japan

Adenine, ATP, ADP, AMP and cAMP were separated by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography (MECC) with UV detection at 260 nm on a 57 cm × 45 μm ID capillary column, using an electrokinetic system of phosphate buffer 5 mmol/L (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) and SDS 50 mmol/L (pH = 9.06).

**Key words** Micellar electrokinetic capillary chromatography; Adenine; ATP; ADP; AMP; cAMP

**【文摘 026】聚硅氧烷压敏胶——噻吗洛尔系统释药性能的研究** 平其能, 翟红莲, 董 杰. 中国医药工业杂志, 1993; 24(5): 206

采用聚二甲基硅氧烷与硅树脂缩合而成的聚硅氧烷压敏胶为载体, 将噻吗洛尔及其它辅料混合涂布成单层或多层经皮给药系统, 研究了压敏胶对噻吗洛尔释药性能的影响。结果表明, 聚硅氧烷压敏胶中的药物释放极慢, 加入 Tween 80, PVPK<sub>25</sub>, 乳

糖或 PEG6000 等水溶性致孔剂可以不同程度地加速释放。

**【文摘 027】正常人口服阿米诺利片剂的药动力学** 柳晓泉, 叶晓镭, 黄圣凯. 中国医药工业杂志, 1993; 24(5): 215

应用英国产阿米洛利片剂, 研究其在正常中国人体内的药动力学, 为国内临床合理使用提供依据。