

反相高效液相色谱法测定 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活力的方法

陈丁丁 戴德哉 刘 波

(中国药科大学药理学研究室, 南京 210009)

摘 要 应用反相 HPLC 方法测定了大鼠心肌 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活力。高效液相色谱条件: Waters-480 高效液相色谱仪, Waters C-18 高效反相色谱柱, 流动相为 0.0667 mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液 (pH 5.92), 流速 1.5 ml/min, 柱压 3000 Pa, 检测波长 254 nm。方法简便, 快速, 灵敏度高, 重复性好。

关键词 反相 HPLC; 钼蓝比色法; Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase

ATPase 活力测定方法主要有丙酮酸激酶-乳酸脱氢酶偶联酶法, $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP 同位素法和钼蓝比色法。后一方法采用酸性钼酸比色测定 ATP 水解产生的无机磷 (P_i)。在实验中, 酸性钼酸可催化 ATP 非酶促水解, 将严重干扰酶活性测定^[1]。虽可利用柠檬酸淬灭新生 P_i 的干扰, 但加柠檬酸的时机不易掌握, 对酶活力测定仍会产生一定的影响。而且该方法灵敏度较低, 试剂用量大, 耗时长。Reinila 应用高效液相色谱方法测定红细胞膜 ATPase 活力^[2], 简便, 快速且准确。本文参考上述工作, 并对色谱条件改进后, 建立了反相 HPLC 方法, 完成了对心肌 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活力的测试。同时与比色法作了比较。

1 材 料

动物 SD 大白鼠, 雌雄不拘, 6 只, 本校动物房提供。

仪器 高效液相色谱仪: Waters-480 和 20-cm Waters C-18 高效反相色谱柱。

试剂 咪唑 (Fluka 公司), ATP $\cdot \text{Na}_2$ (Sigma 公司), ouabain (Merck 公司), 其余均为国产分析纯试剂。匀浆缓冲液: 0.25 mol/L 蔗

糖, 10 mmol/L 咪唑-HCl 缓冲液 (pH 7.5)。空白缓冲液: 含 EDTA 0.125 mmol/L, MgCl_2 7.5 mmol/L, CaCl_2 0.375 mmol/L, ouabain 1.25 mmol/L 的 37.5 mmol/L 咪唑-HCl 缓冲液 (pH 7.4)。底物缓冲液: 含 ATP $\cdot \text{Na}_2$ 1.25 mmol/L, 其余同空白缓冲液, 所有试剂用水均采用高纯水 (亚沸重蒸水) 并经超声脱气处理。

2 方 法

2.1 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 的制备

大鼠断头处死后, 取心脏洗净, 吸干水份, 以 1:10 (重量体积比) 加入匀浆缓冲液匀浆, 2500 r/min 离心 10 min, 取上清备用。以上操作均在 4℃ 进行。

2.2 HPLC 测定 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活力

2.2.1 ATP 标准曲线 分别取底物缓冲液 8.0, 6.4, 4.8, 3.2, 1.6 ml, 以空白缓冲液稀释到 10 ml, 配成 ATP 浓度分别为 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 mmol/L 的标准品。各浓度的标准品每次进样 20 μl , 重复 2 次。以 ATP 峰高平均值对 ATP 浓度进行直线回归, 求得 ATP 标准曲线方程为 $Y = -0.0235 + 5.47 \times 10^{-3} X$, $r = 0.9998$ 。

收稿日期 1995-10-24

2.2.2 反相 HPLC 测定 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活力 取底物缓冲液 80 μl 加入酶液 20 μl (匀浆上清液) 开始反应, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 10 min 后, 加入 50 μl 1.2 mmol/L HClO_4 终止反应, 加 KHCO_3 100 mg 中和 HClO_4 并形成 KClO_4 沉淀, 经 2500 r/min 离心 10 min 后, 置冰浴中保存备用, 空白对照管在加酶液前加入 HClO_4 , 其余操作同上。取上述上清液 20 μl 进样, 254 nm 检测反应剩余 ATP。HPLC 条件: 流动相为 0.0667 mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液 (pH 5.92), 柱压 3000 Pa, 流速 1.5 ml/min。根据 ATP 标准曲线求出空白对照管中 ATP 微摩尔数 (即测定时加入的 ATP 总量) 和测定管中剩余的 ATP 微摩尔数, 两者之差为反应中 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 水解的 ATP 微摩尔数, 从而求出 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活力。样品蛋白质用 Bradford 法测定, 以牛血清白蛋白为标准品^[3]。 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活力定义为在上述实验条件下, 每小时每毫克蛋白水解 ATP 的微摩尔数 ($\mu\text{mol ATP mg protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)。用钼蓝比色法测定时, 取底物缓冲液 0.8 ml, 加入 0.2 ml 酶溶液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min, 加 1.2 mol/L HClO_4 0.5 ml 终止反应, 加 KHCO_3 100 mg 中和 HClO_4 并形成 KClO_4 和变性蛋白沉淀, 2500 r/min 离心 10 min, 取 1.0 ml 上清液用定磷试剂 (3 mol/L 硫酸-2.5% 钼酸铵-10% 抗坏血酸-水, 1:1:1:2, V/V) 测定 P_i 含量, 在加入定磷试剂 1 min 后, 加入 24% 柠檬酸钠。空白对照管设置为 0.2 ml 酶液, 先以 HClO_4 0.5 ml 失活, 然后再加入底物缓冲液, 其余同测定管。

3 结 果

用钼蓝比色法测定 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 比活力比反相 HPLC 测定的结果高 36%, HPLC 方法灵敏度比钼蓝比色法提高 10 倍, 耗时减少一半, 样品及试剂用量减少 10 倍, 见表 1。

Tab 1. Comparison of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity measurement methods ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Subjects	Colorimetry	HPLC
Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity	3.25 ± 0.19 (U_1)	2.39 ± 0.28 (U_2)
Sensitivity (nmol/ml)	20	0.8
Time (min)	60	30
Total volume of reaction system (ml)	1.5	0.15

U_1 : $\mu\text{mol P}_i \text{ mg protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; U_2 : $\mu\text{mol ATP mg protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

4 讨 论

实验结果表明, 用钼蓝比色法所测 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活力显著高于 HPLC 方法。钼蓝比色法是通过测定产物之一 P_i 来测定 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活力的, 但干扰多, 显色不太稳定, 故其所测结果偏高。

HPLC 是通过直接测定酶活力, 因此, 用 HPLC 方法测定的 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活力更为准确。而且, HPLC 方法比钼蓝比色法简便, 快速, 干扰少, 灵敏度高, 因而是一种理想的 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活力测定方法。本方法亦可推广应用于测定其它 ATPase 活力。对于组织量很少的样品 (如眼球晶状体) ATPase 的活力测定尤为适合。

本方法与 Reinila 的相比, 色谱条件已基本改变, 在我们的条件下, 酶反应液中 ATP, ADP 和 AMP 的保留时间相距较大, 分别为 11, 29 和 49 s, 保证了本方法测定结果的准确性。不足之处为每次只能测定一个样品, 当样品数量较多时, 耗时将与钼蓝比色法接近, 而且需要高效液相色谱仪, 一般实验室条件可能难以满足。

参 考 文 献

- 1 Lanzetta PA. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem*, 1979, 100(1):95
- 2 Reinila M. Standardized method for the determination of human erythrocyte membrane adenosine triphosphatases. *Anal Biochem*, 1982, 124(1):19
- 3 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1-2):248

RP-HPLC Method for Determination of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase Activity

Chen Dingding, Dai Dezai, Liu Bo
Research Division of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract The rat myocardium Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity was measured with RP-HPLC method. The method is convenient, rapid, sensitive, precise and reproducible for ATPase assay. The conditions of HPLC were as follows: 0.0667 mol/L KH_2PO_4 - K_2HPO_4 buffer (pH 5.92) was as mobile phase solution, elution rate was 1.5 ml/min, column pressure was 3000 Pa and detection wavelength was 254 nm.

Key words RP-HPLC; Molybdate blue colorimetry; Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase

【文摘 022】 乙吗噻嗪胃内滞留漂浮型缓释片的研究 BM Regmi, 刘建平, 屠锡德. 药学学报, 1996, 31(1):54

研制了乙吗噻嗪胃内滞留漂浮型缓释片剂(E-HBS)。实验结果表明:本品的体外溶出符合一级动力学过程($K_r=0.2436\text{ h}^{-1}$);人体胃内 γ -闪烁照像显示 E-HBS 在胃内滞留时间长达 6 h 以上,明显长于市售普通片(ECT 1~1.5 h);血药浓度经时曲线平缓持久,达到良好的缓释效果;体内外实验数据有显著的相关性($P<0.01$)。

【文摘 023】 7-(香豆素-3-甲酰胺)-3-[1-(取代)吡啶基甲基]头孢菌素的合成 徐 谦,段廷汉,李明华. 中国药理学杂志,1996,31(1):41

目的:探讨 3'-乙酰氧基被 *N*-亲核试剂取代的反应条件、分离精制方法和新头孢菌素的体外抗菌活性。方法:7-(香豆素-3-甲酰胺)头孢菌素在 NaI 或 KSCN 的存在下与吡啶和 β -甲基吡啶反应,产物用大孔吸附树脂及葡聚糖凝胶柱层析分离。结果:合成的二个新头孢菌素化合物,由红外光谱、元素分析和核

磁共振谱确证其化学结构。体外抗菌试验表明,对某些革兰阴性菌有一定的抑菌作用。结论:该反应中加入大量的 NaI 可缩短反应时间并减少杂质。大孔吸附树脂可有效地将头孢菌素与无机盐分离。

【文摘 024】 异波帕胺与哇巴因的正性肌力作用的动力学比较 黄 璐,戴 茜,仇怡堂等. 中国药理学报,1996,17(1):66

目的:比较异波帕胺(Ibo)与哇巴因(Oua)正性肌力作用药效的动力学。方法:以离体猫右心室乳头状肌递增药浓观察正肌效应。最大反应是药物递增到发生自发收缩前的反应。以 $\lg[E/(E_{\max}-E)]$ 对 $\lg C$ 得 Hill 方程。结果:Hill 方程中 *S* 值:Ibo 及 Oua 分别为 1.16 与 1.97, Ibo 的 *S* 值小于 Oua,使 C_{95}/C_5 (产生 95%及 5%最大药效的药浓) Ibo(264)是 Oua(22.9)的 11 倍。与 Oua 相比: Ibo 起效浓度低,斜率小及最大药效的浓度高。药浓下降时, Ibo 的药效-药浓曲线呈现逆时针滞后滞,比 Oua 更明显。结论:在药浓增加及下降时, Ibo 的正肌效应的变化比 Oua 为小。