

# 反相高效液相色谱法测定 $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -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; 铬蓝比色法;  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -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,  $\gamma$ -<sup>32</sup>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( $\text{P}_i$ )。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<sup>[1]</sup>。虽可利用柠檬酸猝灭新生  $\text{P}_i$  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<sup>[2]</sup>, 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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -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** 钼蓝(Fluka 公司), ATP·Na<sub>2</sub>(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,  $\text{MgCl}_2$  7.5 mmol/L,  $\text{CaCl}_2$  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·Na<sub>2</sub> 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 $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 的制备

大鼠断头处死后, 取心脏洗净, 吸干水分, 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 $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -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  $\mu\text{l}$ , 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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活力 取底物缓冲液 80  $\mu\text{l}$  加入酶液 20  $\mu\text{l}$  (匀浆上清液)开始反应, 37℃水浴保温 10 min 后, 加入 50  $\mu\text{l}$  1.2 mmol/L  $\text{HClO}_4$  终止反应, 加  $\text{KHCO}_3$  100 mg 中和  $\text{HClO}_4$  并形成  $\text{KClO}_4$  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先加入  $\text{HClO}_4$ , 其余操作同上。取上述上清液 20  $\mu\text{l}$  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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 水解的 ATP 微摩尔数, 从而求出  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活力。样品蛋白质用 Bradford 法测定, 以牛血清白蛋白为标准品<sup>[3]</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -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℃ 反应 10 min, 加 1.2 mol/L  $\text{HClO}_4$  0.5 ml 终止反应, 加  $\text{KHCO}_3$  100 mg 中和  $\text{HClO}_4$  并形成  $\text{KClO}_4$  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  $\text{P}_i$  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  $\text{HClO}_4$  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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity measurement methods ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Subjects	Colorimetry	HPLC
$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity	$3.25 \pm 0.19$ ( $U_1$ )	$2.39 \pm 0.28$ ( $U_2$ )
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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活力显著高于 HPLC 方法。钼蓝比色法是通过测定产物之一  $\text{P}_i$  来测定  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活力测定方法。本方法亦可推广应用到测定其它 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 $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase Activity

Chen Dingding, Dai Dezai, Liu Bo

Research Division of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

**Abstract** The rat myocardium  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$  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;  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -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 $\gamma$ -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 镛, 段廷汉, 李明华. 中国药学杂志, 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 $\beta$ -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 瑶, 戴 苗, 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环,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。