维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)04－0485－02

高效液相色谱法测定心肌腺苷酸含量

陈建斌[1]，饶邦复[1]，周远大[2]，何海霞[2]

(1.重庆医科大学临床学院内科;2.重庆医科大学临床学院临床药理研究室,重庆 400016)

【摘 要】目的:用改良高效液相色谱法测定小鼠心肌腺苷酸含量。方法:ODS C_{18}柱,检测波长 254nm。甲醇－50mmol/L 磷酸盐(1:99)缓冲液(pH6.07)为流动相。结果:心肌 ATP、ADP 和 AMP 平均回收率分别为 101.1%±9.3%、94.8%±10.6%及 98.3%±5.7%;日内 RSD 分别为 3.5%、6.9%和 4.8%;日间 RSD 分别为 6.4%、8.6%及 8.2%。结论:该方法简便、快速、灵敏。采用该法发现病毒性心肌炎小鼠心肌 ATP、ADP 和 AMP 含量降低。

【关键词】高效液相色谱法;腺苷酸

【中国图书分类法分类号】R927.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2002－10－22

HPLC determination of adenosine phosphates in mouse myocardium

CHEN Jianbin, et al

(*Department of Internal Medicine, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: A method for the quantitative determination of adenosine phosphates of mouse myocardium by HPLC is described. *Methods*: A ODS C_{18} column and a mobile phase of methol－50mmol·L^{-1} phosphate (1:99)buffer solution (pH 6.07), with UV detector at 254nm were used. *Results*: The average recovery rates of ATP, ADP and AMP were 101.7%±9.3%, 94.8%±10.6% and 98.3%±5.7% respectively; the RSDs of within－day were 3.5%, 6.8% and 4.8%, and the RSDs of between－days were 6.4%, 8.6% and 8.2%, respectively. *Conclusion*: The method is simple, rapid and senstive and can be used to analyse the adenosine phosphates in myocardium. The myocardial contents of ATP, ADP as well as AMP decline notably in mice with viral myocarditis.

【Key words】High performance liquid chromatography(HPLC); Adenosine phosphate

心肌组织腺苷酸含量测定可直接反映心肌能量代谢状况。电泳层析及酶学等方法测定腺苷酸,操作繁琐、费时、灵敏度低,故近年来国内外多采用高效液相色谱法[1~5]。本文改进了一些色谱条件和操作步骤,并对样品的保存和处理进行了探索,达到快速、简便易行的目的。

1 材料与方法

1.1 仪器

Bio－Rad 高效液相色谱仪系统、UV1306 型检测器。

1.2 试剂

ATP、ADP 和 AMP 标准品购自 Sigma 公司,其他试剂均为国产分析纯。实验用水为重蒸去离子水。

1.3 色谱条件

色谱柱:中国科学院大连生物物理研究所生产的 ODS C_{18}柱(7μm, 250mm×4.6m),柱温 25℃;流动相:甲醇－50mmol/L 磷酸盐(1:99)缓冲液(pH 6.07),实验当天用微孔滤膜(0.45μm)抽滤,流速 1ml/min;检测波长 254nm。样品进样体积 20μl;实验采用外标法。

1.4 样品处理

成年健康昆明小鼠 22 只,体重 23.4±3.2g,断头处死,迅速取出心脏,剖开心腔,去净血液,称重,置液氮冷冻贮存。实验当日剪碎心肌组织,加入预冷(4℃)的 0.1mmol/L 高氯酸液(每 mg 心肌加 20μl),冰浴中磨成匀浆,低温(4℃)30000×g 离心 20min,取上清液作色谱分析。

2 结 果

2.1 色谱行为

图为标准品 ATP、ADP 及 AMP 混合液(A)与小鼠心肌上清液中 ATP、ADP 及 AMP(B)分离色谱图。

2.2 标准曲线

分别称取 ATP、ADP 和 AMP 标准品,用 0.1

作者介绍:陈建斌(1965－),男,副教授,博士,主要研究方向:心肌疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

mmol/L 高氯酸液配制成下列浓度(μg/ml)。

ATP:7.5,15,30,60,120,240,480

ADP:6.5,13,26,52,104,208,416

AMP:3.5,7,14,28,56,112,224

进样分析每一标准品液,以峰高和相应的浓度进行回归分析,三者的回归方程和相关系数分别为:

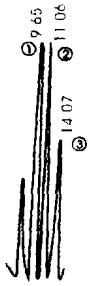
ATP:$Y = 280X + 391$, $r = 0.9991$

ADP:$Y = 383X + 2497$, $r = 0.9977$

AMP:$Y = 1669X + 2191$, $r = 0.9995$



图Ⅰ 标准品混合液



图Ⅱ 心肌组织上清液

①ATP ②ADP ③AMP

2.3 回收率

在心肌上清液中加入标准品 ATP、ADP 和 AMP,使标准品 ATP、ADP 及 AMP 的浓度均为 60 μg/ml,进样分析;同时进样分析以 0.1 mmol/L 高氯酸配制的相同浓度的 ATP、ADP 和 AMP 标准品混合液。重复 5 次,求得三者的平均回收率分别为:101.7%±9.3%、94.8%±10.6%及 98.3%±5.7%。

2.4 精密度

同日内将加入了 ATP、ADP 和 AMP 标准品的心肌上清液(标准品浓度均为 60μg/ml)进样分析 5 次,其日内 RSD 分别为 3.5%、6.9%和 4.8%。上述样品分装,置 −20℃保存,不同日进样分析,重复 5 次,ATP、ADP 及 AMP 日间 RSD 分别为 6.4%、8.6%和 5.2%。

2.5 灵敏度

将心肌上清液用 0.1mmol/L 高氯酸稀释,结果显示心肌中 ATP、ADP 及 AMP 最低检测限可达 10μg/g 湿组织重。

2.6 昆明小鼠心肌腺苷酸含量

经液氮贮存 2 周、4 周后健康昆明小鼠心肌 ATP、ADP 和 AMP 含量与新鲜心肌各相应值比较均无显著性差异($P > 0.05$,表 1)。

表 1 健康昆明小鼠心肌腺苷酸含量

($\mu g \cdot g^{-1}$湿组织重, $n = 7$, $\bar{x} \pm s$)

	ATP	ADP	AMP
新鲜标本	154.4±6.6	104.2±6.1	49.3±3.6
液氮 2 周	157.6±4.9	106.6±5.7	47.9±7.0
液氮 4 周	152.5±8.6	101.5±7.8	48.6±9.3

2.7 病毒性心肌炎小鼠心肌腺苷酸含量

6~8 周龄近交系雄性 Balb/c 小鼠随机分为柯萨奇 B_3 病毒感染组和对照组。感染组每只小鼠腹腔接种含 CVB_3 的 MEM Eagle 液 0.1ml($TCID_{50}$ 10^7)。对照组每只小鼠腹腔接种不含 CVB_3 的 MEM Eagle 液 0.1ml。感染组和对照组各时相点结束时速取心肌组织,按本实验建立的方法测定心肌腺苷酸含量。与对照组比较,感染组心肌 ATP,ADP 和 AMP 含量第 3 天无明显变化,第 14 天明显降低,第 30 天较第 14 天升高(表 2)。

表 2 病毒性心肌炎小鼠心肌 ATP,ADP 和 AMP 含量(μg/g 湿组织重, $n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

	时间(d)	ATP	ADP	AMP
对照组	30	169.08±28.56	110.64±14.47	47.87±13.29
感染组	3	161.94±25.55	106.26±35.14	46.39±12.77
	14	97.69±22.66**◆◆	65.43±14.46**◆◆	24.19±7.02**◆◆
	30	114.79±15.58**☆	79.15±20.85**☆	29.39±6.82**

注:感染组与对照组比较,** $P < 0.01$;感染组第 14 天与第 3 天比较,◆◆ $P < 0.01$;感染组第 30 天与第 14 天比较,☆ $P < 0.05$。

3 讨 论

流动相的组成和比例直接影响样品的分离。本实验发现以甲醇 − 50mmol/L 磷酸盐(1:99)缓冲液(pH = 6.07)为流动相,心肌 ATP、ADP 和 AMP 均能达到较满意分离。分析一个样品能在 15min 内完成,较文献报道的时间明显缩短[2,3]。本法 ATP、ADP 和 AMP 的最低检测限为 10μg/g 湿组织重,因而能满足测定心肌腺苷酸含量的要求。(下转第 490 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

汁反流胃炎的疗效及胃内胆汁的影响[J]. 中华消化杂志,2000;20:105－107.
[5] 潘中允,主编. 简明核医学[M]. 第 2 版,北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1994;83.
[6] 全国西沙必利多中心临床试验协作组. 西沙必利治疗功能性消化不良的多中心临床疗效观察[J]. 中华内科杂志,1995;3:180－184.
[7] Marzio L, Pifelice F, Laico MG, et al. Gallbladder hypokinesia and normal gastric emptying of liquids in patients with dyspeptic symptoms[J]. Dig Dis Sci, 1992;37:262－267.
[8] 于长久. 香砂养胃丸、西沙必利治疗功能性消化不良的疗效研究[J]. 实用中西医结合杂志,1998;11:855.
[9] Caballero－Plasencia AM, Valenzuela－Barranco M, Martin Ruiz JL, et al. Are there changes in gastric emptying during the menstrual cycle? [J]Scan J Gastroenterol, 1999;34:772－776.
[10] Mathias JR, Clench MH. Relationship of reproductive hormones and neuromuscular disease of the gastrointestinal tract [J]. Dig Dis, 1998;16:3－13.
[11] Palacios S. Tibolone: What does tissue specific activity mean[J]? Maturitas, 2001;37:159－165.
[12] 李大金. 中药复方对更年期综合征妇女生殖内分泌－免疫功能调节[J]. 上海免疫杂志,1995;15:257－260.
[13] Hirokawak, Utsuyamak, Kurashimac, et al. Aging and immunity[J]. Acta Pathol Jpn, 1992;42:537－548.
[14] 俞 瑾,李超荆. 更年春治疗更年期综合征的临床和药理研究－对神经生殖内分泌免疫网络的调节[J]. 生殖医学杂志,2000;9:270－271.
[15] 薛加强,林守清,魏 扬,等. 激素替代治疗对绝经期妇女血清 E_2、阴道及子宫内膜的影响[J]. 江苏医药,1998;24:309－312.
[16] William R, Hutson, Richard L, et al. Influence of gender and menopause on gastric emptying and motility[J]. Gastroenterology, 1989;96:1－17.
[17] Doren Ⅲ, Rubig A, Coelingh Bennink HJ, et al. Differential effects on the androgen status of postmenopausal women treatment with tibolone and continuous combined estradiol and norethindrone acetate replacement therapy[J]. Fertil Steril, 2001;75:554－559.
[18] 顾振纶,卞春甫,张银娣,主编. 医学药理学[M]. 第 2 版,北京:科学出版社,1998;315.
[19] Rivier C. In vivo CRH－induced secretion of ACTH, β－EP and corticosterone[J]. Endocrinclogy, 1982;110:272－278.

(上接第 486 页)

作者用本法动态测定了病毒性心肌炎小鼠心肌腺苷酸含量。结果发现 CVB_3 感染早期(第 3 天)ATP、ADP 和 AMP 含量无明显变化,急性期(第 14 天)明显降低,急性期后(第 30 天)心肌 ATP、ADP 和 AMP 含量仍明显低于健康对照组。从而证实病毒性心肌炎心肌存在能量生成障碍。

腺苷酸是生物材料中一种不稳定化合物,容易分解,所以在处理样品时应力求迅速。作者尝试将心肌组织贮存于液态氮,结果显示在 1 月内能有效地保存心肌腺苷酸含量。液氮贮存不仅有利于将不同时间的心肌组织集中成批进行分析、节约时间、降低实验成本,而且还可以减少日间 RSD。冰浴中匀浆,低温离心,上清液直接进样分析,避免高温煮沸等措施均有益于避免腺苷酸分解、保证测定结果的准确性。

参 考 文 献

[1] Juengling E, Kammermeier H. Rapid assay of adenine nucleotides or creatine compounds in extracts tissue by paired－ion reverse－phase high performance liquid chromatography[J]. Anal Biochem, 1980;102:358－360.
[2] 王洛四. 高效液相色谱法分析腺苷酸[J]. 军事科学院院刊,1998;13(3):203－205.
[3] Jones DP. Determination of pyridine dinucleotides in cell extracts by high performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr, 1981;225:446－449.
[4] Werner A, Grune J, Siems W, et al. Nucleotides and aldehyde analysis by HPLC for determination of radical induced damage[J]. Chromatographia, 1989;28:65－69.
[5] 张新明. 一种简便、灵敏测定腺苷酸的高效液相色谱法[J]. 分析仪器,1991;4:45－47.
[6] 顾建国,荣 沛,王义明,等. 反相 HPLC 法测定大鼠梗塞心肌组织中 ATP、ADP 与 AMP[J]. 中国药科大学学报,1989;20(2):103－106.