

参 考 文 献

- (1) Health & Safety Executive. Guidance Note EA 15/80, "Threshold Limit Values 1980", H. M. Stationary Office, London.
- (2) D. J. David and H. B. Slaley, "Analytical Chemistry of The Polyurethanes", Wiley-Interscience, New York. p.361. 1969.
- (3) American Society for Testing and Materials, "ASTM D2615-70", Philadelphia PA, 1974.
- (4) P. McFadyen, J. Chromatogr., 123, 461 (1976).
- (5) 原燃化部涂料培训班编, 《涂料工艺 (第五分册)》, 化工出版社, 北京, p.211, 1982.
(收稿日期: 1987年1月3日)

Determination of Free Monomeric Toluene Diisocyanate in Polyurethane Prepolymers by High Performance Liquid Chromatography *Zhang Quanfu and*

Yong Ziqin, Paint and Coating Industry Research Institute of the Ministry of Chemical Industry, Lanzhou

A quantitative RP-HPLC procedure was developed to determine small amounts of free toluene diisocyanate monomer in polyurethane prepolymers. Before injection, the sample is treated with absolute methanol to convert the free monomer into methyl urethanes. The sample is then diluted according to the mobile phase ratio and chromatographed at 17°C on a lichrosorb RP-18 column using a 254-nm ultraviolet detector. Because some amount of methanol is substituted for mobile phase (MeOH/H₂O=60:40) before and after injecting sample a single run takes only about 10 minute without gradient elution. The detection limit appears to be about 0.13mg/dl monomer. It is satisfactory both in accuracy and reproducibility.

高效液相色谱法测定精氨酸催产素及其酶催化降解产物

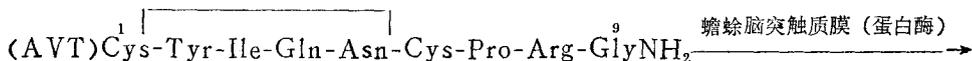
练鸿振 张文彬 王新昌 刘斌 郑集

(南京大学现代分析中心)

(南京大学生物化学系)

精氨酸催产素 (Arginine-Vasocotin, AVT) 广泛存在于最原始的脊椎动物脑垂体

中, 有调节水盐代谢和促进睡眠的作用, 是一种重要的神经垂体激素⁽¹⁻³⁾。AVT 经蟾蜍脑突触质膜催化发生下列反应:



药理研究所提供; 其它试剂均为国产分析纯。



(二) 步骤及方法

AVT 和 AVT₁₋₈ 在调节记忆过程中表现出很强的中枢活性⁽⁴⁾, 因此测定 AVT 和 AVT₁₋₈ 的含量对于研究 AVT 在低等脊椎动物中的生理意义具有重要的价值。

1. 酶催化反应

按文献^[5]的方法制备蛋白酶催化剂——蟾蜍脑突触质膜, 蟾蜍是南京地区的中华蟾蜍, 每只体重 90~100g。

实 验 部 分

(一) 仪器及试剂

美国 Varian 5060 高效液相色谱仪及 UV-100 检测器; 日本 Hitachi 835-50 氨基酸分析仪。

反应体系为 6ml 0.04mol/L 磷酸缓冲溶液, pH 7.0, 在该体系中准确加入一定量的标准 AVT 和新制备的酶催化剂, 使 AVT 的初始浓度 C₀ 为 3.00 × 10⁻⁶ mol/L, 酶催化剂的量为 2.5mg/ml, 恒温 37°C 进行反应。分别在反应时间 t (0, 30, 80, 160, 240 和 360 分钟) 取出 1ml 反应液, 加入 0.2ml 2.5mol/L 醋酸终止反应, 立即水浴煮沸 5 分钟离心, 取上

AVT 标准样品由荷兰 Rudolf Magnus

层清液冷冻干燥后溶于 1.0ml 0.01mol/L 盐酸中，再离心，取上层清液全部进入色谱柱（图 1）。

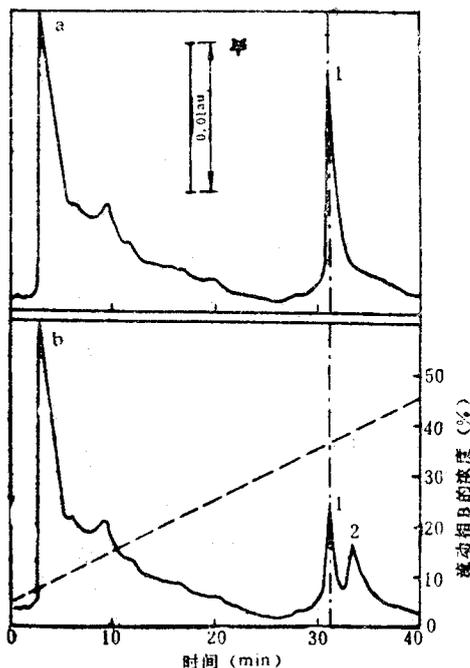


图 1 AVT, AVT₁₋₈ 色谱图

* 表示灵敏度，单位长度（峰高）代表 0.01 个吸收单位

2. 色谱分析条件

柱：4×300mm, Micropak MCH-10, 反相 ODS；流动相 A：0.01mol/L 醋酸铵溶液，pH4.15, B：醋酸(1.5ml)/甲醇(1000ml)；梯度：5% B → 45% B；流速：1.0ml/min；检测器波长：230nm。

3. 定性分析

反应液的色谱图如图 1—b，分别收集对应于峰 1 和峰 2 的柱后流出液进行氨基酸分析，结果表明，峰 1 为未降解掉的 AVT，峰 2 为 AVT₁₋₈。

4. 面积校正因子及最小检出浓度的测定。

反应初始(t=0)，AVT 的色谱峰如图 1—a，此时，AVT 未降解，可以将其作为标准，根据 AVT 的浓度 C₀ 和峰面积 A₀，算出 AVT 的面积校正因子 f_{AVT}，

$$f_{AVT} = C_0/A_0 = 3.00 \times 10^{-5}/114.8$$

$$= 2.62 \times 10^{-7} \text{mol/L}(\text{mm})^2$$

由于 AVT 与 AVT₁₋₈ 仅差一个 C 一端的甘氨酸酰胺，组成相似，因此，f_{AVT₁₋₈} = f_{AVT}。

当信噪比为 2 时，AVT 和 AVT₁₋₈ 的最小检出浓度为 1.00 × 10⁻⁶ mol/L。

(三) 结果

将不同反应时间反应体系中 AVT 及 AVT₁₋₈ 的浓度列入表 1，AVT 酶催化降解随反应时间的变化如图 2 所示。

表 1 不同反应时间 AVT, AVT₁₋₈ 的浓度

反应时间 t (min)	0	30	80	160	240	360
AVT 浓度 (× 10 ⁻⁵ mol/L)	3.00	2.03	0.66	0	0	0
AVT ₁₋₈ 浓度 (× 10 ⁻⁵ mol/L)	0	1.02	1.22	1.63	—	1.17

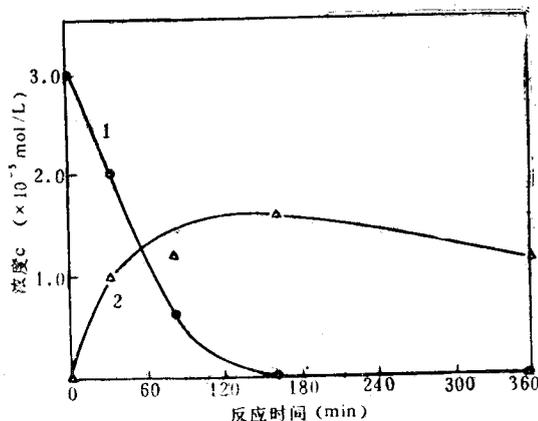


图 2 AVT 酶催化反应的 c-t 图
○: AVT, △: AVT₁₋₈

图 2 表明，反应初始 (t=0) AVT 浓度维持在 3.00 × 10⁻⁵ mol/L，尚无 AVT₁₋₈ 生成。随着反应进行，AVT 迅速降解，AVT₁₋₈ 逐渐生成。反应到 160 分钟，AVT 完全降解，AVT₁₋₈ 略呈下降趋势。蟾蜍脑突触质膜可能对 AVT₁₋₈ 也有催化降解作用，但在该实验条件下，AVT₁₋₈ 降解比 AVT 困难或缓慢。

在图 2 中曲线 1 上选择若干点，作 t ~ 1/c 图，得一直线（图 3），可以确定 AVT 的降解近似二级反应，直线斜率的倒数即为

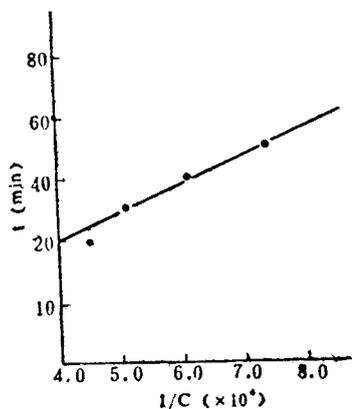


图 3 AVT 降解反应的 t 与 $\frac{1}{c}$ 关系图

反应速度常数 k_2 ⁽⁶⁾, $k_2 = 1.2 \times 10^3 (\text{mol/L})^{-1} \cdot (\text{min})^{-1}$, 其速率方程可写成:

$$\frac{1}{c} = 1.2 \times 10^3 t + 3.3 \times 10^4 \quad (\text{积分式})$$

或 $-\frac{dc}{dt} = 1.2 \times 10^3 c^2$ (微分式)。

AVT₁₋₈ 的生成反应基本上也符合这个动力学方程式, 但 AVT₁₋₈ 再降解的机制尚不清楚。

讨 论

1. 我们用HPLC同时测定了在蟾蜍脑突触质膜催化下, AVT 降解反应体系中不同反应时间AVT和AVT₁₋₈的浓度。实验中总结出来的 AVT 酶催化降解机制为研究 AVT 在低等脊椎动物环境适应性方面的生理意义提供了重要依据⁽⁷⁾。

2. 神经多肽与动物乃至人类的生命活动紧密相连, 生命科学对体内各种神经多肽的测定提出了很高的要求。HPLC法简单易行, 定量准确, 在许多方面弥补了放射免疫法操作复杂费时的不足, 是一种极其有效的研究手段。

3. 在研究化学动力学时, 测定浓度的方法有物理法和化学法, HPLC法的报道尚

不多见。本文提出了HPLC在动力学研究中的应用实例, 不象化学法手续繁琐, 也不象物理法需要多种物理常数测定仪, 所以是一种可行的方法。

4. 酶催化反应是一类重要的特殊的复杂反应, 反应体系中成分复杂, 有些性质很相似, 一般的方法不能完美地解决浓度测定这个关键, HPLC法可以直接测定酶催化反应体系中组分的浓度, 这就大大简化了分离手段。用HPLC研究这类反应的动力学机制, 前景令人乐观。

参 考 文 献

- (1) D.W. Rurak, A.M. Perks, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 29, 301(1976).
- (2) S. Pavel. *Brain. Res. Bull.*, 4,731(1979).
- (3) W. Il. Sawyer, *Fed. Proc.*, 36. 1842(1977).
- (4) D. De Wied, B. Bohus, "Maturation of The Nervous System, Progress in Brain Research", Etsevier, Amsterdam, Vol. 48. p.327. 1978.
- (5) J.P.H. Burbach, J. L. M. Lebouille, *J. Biol. Chem.*, 258, 1487(1983).
- (6) 天津大学物理化学教研室, 《物理化学》(下册), 人民教育出版社, 北京, p. 292, 1979.*
- (7) 王新昌、练鸿振, *生物化学杂志*, 2(3). 29 (1986).

(收稿日期: 1987年1月10日)

Determination of Arginine-Vasotocin (AVT) and the AVT₁₋₈ Flaoment from Digestion of AVT by High Performance Liquid Chromatograpy Lian H. ngaken, Zhang Wenlin *Centor of Materials Analysis. Nanjing University, Wang Xinchang, Lin Bin and Zheag Ji, Dip ar tment of Biochemistry, Nanjing University*

This paper presents the determination of Arginine-Vasotocin (AVT) and the AVT₁₋₈ fragment obtained from digestion of AVT by toad brain synaptic membranes with HPLC, and the proteolytic conversion of AVT. AVT and AVT₁₋₈ are separated on a reversed phase ODS column with NH₄Ac and HAc in CH₃OH as mobile phase, detected by UV monitor at 230nm. This method is simple and efficient for the research or proteolytic conversion mechanism of active peptide, as well as for general kinetics studies on other chmical reaction.