

(3) T.Skaaden and T.Greibrokk, *J.Chromatogr.*, 247, 111 (1982).

(收稿日期: 1989年9月19日)

**Determination of Polyamines by High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection**  
*Zhuang Linghang, Tang Qinmei and Xu Xiurong, Shanghai Institute of Materia Medica, Academia Sinica, 200031*

A novel pre-column OPA derivatization (o-phthalaldehyde ethanethiol derivatization) LCEC method to assay polyamines is presented. The factors

which influenced the stability and separation of polyamine-OPA adducts were examined and the optimal conditions to separate spermine (SPM), spermidine (SPD), putrescine (PUT), Cadaverine (CAD) were proposed. The detection limits of polyamines were 2 pmol for SPM, while 1 pmol for SPD, PUT and CAD. The linear relationship between peak areas and concentrations of SPM was perfect within 5-100 pmol range, and the linear range of SPD, PUT and CAD was 1-100 pmol.

## 用高效液相色谱-固定化碱性磷酸酶柱 后水解分析三磷酸肌醇\*

叶惟冷 陈克樱 朱培因 李士云 袁中一

(中国科学院上海生理研究所, 200031)

(中国科学院上海生物化学研究所, 200031)

D-myosin-肌醇-1, 4, 5-三磷酸 (IP<sub>3</sub>) 是许多动物细胞内重要的第二信使之一。分离和检测 IP<sub>3</sub> 对研究多种递质或激素的作用机制和生理功能都有重要的意义<sup>(1, 2)</sup>。由于 IP<sub>3</sub> 是一种环醇碳水化合物, 没有生色团、荧光团或电活性基团, 因而不能直接用高效液相色谱 (HPLC) - 紫外、荧光或电化学检测法来分析。然而在一定条件下, IP<sub>3</sub> 可被碱性磷酸酶水解产生无机磷酸, 磷酸又迅速与酸性钼酸铵反应, 可在紫外-可见光波段检测其反应产物<sup>(3)</sup>。据此, 我们制作了固定化碱性磷酸酶柱, 尝试了在联机的情况下经阴离子交换色谱-碱性磷酸酶水解-酸性钼酸铵反应-在 380nm 检测 IP<sub>3</sub> 的方法。

### 材料和方法

(一) 试剂 固定化酶的载体——对氨基苯砒乙基 (ABSE) - 交联琼脂 (80目) 系自制<sup>(4)</sup>。碱性磷酸单脂酶, 规格 2000 单位 / 毫克蛋白, 1 单位定义是: 在

37°C、pH 10.25 Tris-buffer 中每分钟水解 1 μmol 对硝基酚磷酸二钠的酶量 (中科院东风生化试剂厂产)。标样 IP<sub>3</sub>, 异构纯, 西德柏林格尔曼海姆公司产; 5'-一磷酸腺苷 (5'-AMP) 和三磷酸腺苷 (ATP) 购自 Sigma 公司。其余试剂均为分析纯和优级纯。实验用超纯水购自上海测试技术研究所, 使用前再经双蒸处理。

(二) 固定化碱性磷酸酶柱的制备 按前述方法将酶偶联在 ABSE-交联琼脂载体上<sup>(5)</sup>, 固定化酶活力为 5 单位 / 克湿填料。用注射器将填料注入自制的聚四氟乙烯短柱, 30 × 2 mm (内径)。

(三) 配制酸性钼酸铵 每次实验按下列体积比, 10% 钼酸铵: 浓硝酸: 10% Triton X-100: 水 = 1: 1: 2: 16, 配制新鲜的酸性钼酸铵溶液。为去掉 Triton X-100 中的磷酸根, 每 100 ml 10% Triton X-100 加 5 g Dowex 1 × 8 树脂

\* 本课题为国家自然科学基金资助项目。

(100-200) 目，充分搅拌后滤去树脂。

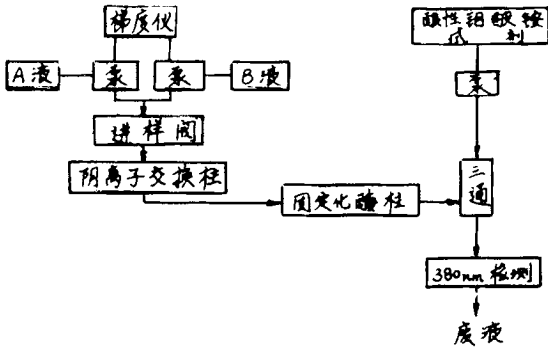


图 1. 分析示意图

(四) HPLC 分析  $IP_3$  HPLC 仪为 Waters 208 系列。用 M680 自动梯度程序仪控制二台 510 泵，U6K 进样阀，M730 数据处理仪，481 可调紫外-可见光检测器的检测波长为 380 nm。色谱柱为 Mono Q HR 5/5 (Pharmacia)。整个流程见示意图。流动相 A 液为 0.1 mol/L 硫酸锌、10 mol/L HEPES，B 液为 0.1 mol/L 硫酸锌、10 mol/L HEPES、0.5 mol/L 氯化钠，A 液和 B 液均用氢氧化钠调至 pH 7.4。线性梯度洗脱时各段 B 液的比例为：初始 5%；0-25 min，5-50%；25-40 min，50-5%；流量为 1.0 ml/min。用 M45 泵输送酸性钼酸铵溶液，流量为 0.3 ml/min。

### 结果和讨论

在不连接色谱柱和酶柱情况下，分别注射含量为 1、2.5、5、7.5、10、15、20 n mol 无机磷酸，含量与响应（峰面积）呈良好线性关系 ( $r=0.9994$ )。单连接酶柱，注射同样浓度无机磷酸的响应基本与上述的相同，说明固定化酶填料并不明显吸附无机磷酸。注射 5'-AMP，其含量与峰面积的线性关系同样良好 ( $r=0.9970$ )，然而它的响应平均为注射等量磷酸的  $83.2 \pm 0.7\%$  (均值  $\pm$  标准误差，下同)，表明酶解反应并不完全。其原因可能是酶柱是手工装填的，很容易产生

所谓的“通道效应”，即流动相不是均匀地通过酶柱，而是沿着装填相对疏松的“通道”流过；加之，流动相的 pH 并不是酶解反应的最适条件。可能是同样的原因，虽然  $IP_3$  浓度与其响应的线性关系尚好 ( $r=0.9016$ ,  $n=6$ )，但其响应值并不是 5'-AMP 的三倍，而是  $2.3 \pm 0.3$  倍。

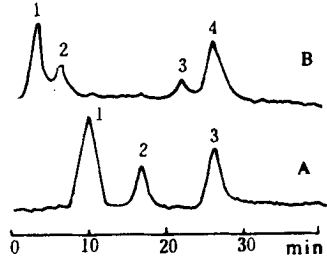


图 2 标样和从血影细胞制备的  $IP_3$  的色谱图

A. 标样的色谱图。峰：1. 5'-AMP, 2. ATP, 3.  $IP_3$ 。 B. 从血影细胞制备的  $IP_3$  色谱图，峰：1. 甲酸和甲酸铵, 2. 未鉴定, 3. 未鉴定, 4.  $IP_3$ 。

Kyaw<sup>(6)</sup> 等发现，过量的 Triton X-100 能很好溶解磷酸与酸性钼酸铵的反应产物——磷钼酸盐复合物，并能增加磷钼酸盐的光吸收。我们配制的浓度为 1%，结果表明，在该浓度下不但防止了浑浊的磷钼酸盐沉积在检测池壁，且可省去为延长反应时间而接在三通后面的盘曲螺旋管，避免了峰的展宽。Meek<sup>(3, 7)</sup> 首先建立了分析  $IP_3$  的方法，并结合微波灭酶技术（动物死后由于酶的作用， $IP_3$  含量会立即急剧升高）分析了某些脏器和脑区  $IP_3$  含量。我们用不同于上述方法的国产固定化酶载体及偶联酶的方法自制了固定化酶柱，并筛选了基本上不含无机磷酸盐的国产分析试剂作流动相，鉴定了从人血影细胞 (ghost cell) 中制得的  $IP_3$  (见图 2B)，检测极限达 1 n mol，基本达到 Meek<sup>(3)</sup> 报道的检测水平。ATP 是生物样本中干扰  $IP_3$  检测的主要物质<sup>(7)</sup> 本方法令人满意地将  $IP_3$  与 ATP 分离 (见图 2A)。本工作在提高每克固定化填料中固定化酶活力和克服“通道效应”等方面尚有待进一步改进，但要在细胞水平观察微量  $IP_3$  的

变化,估计必需与同位素技术相结合,以期较大幅度提高检测灵敏度。

### 参考文献

- (1) R.H.Michell, *Biochim. Biophys. Acta*, 415, 81 (1984).
- (2) M.J.Berridge, *Biochem. J.*, 220, 345 (1984).
- (3) J.L.Meek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83, 4162 (1986).
- (4) 袁中一, 钱雪明, 虞安乐, 刘树煌, 马凤竹, *生物化学与生物物理学报*, 13, 291 (1981).
- (5) 袁中一, 钱雪明, *科学通报*, 26, 749 (1981).
- (6) A.Kyaw, U.K.Maung, T.Toe, *Anal. Biochem.*, 145, 230 (1985).
- (7) J.L.Meek, *J.Chromatogr.*, 351, 303 (1986).

(收稿日期: 1989年10月5日)

**Assay of Inositol Triphosphate by HPLC Using an Immobilized Alkaline Phosphatase-Loaded Post-Column Reactor.** Ye Weiling, Cheng Keying and Zhu Peihong, *Shanghai Institute of Physiology, Academia Sinica, 200031*; Li Shiyun and Yuan Zhongyi, *Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, 200031.*

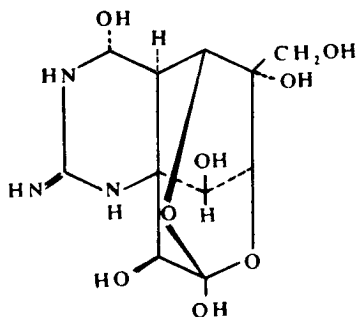
The D-myoinositol-1, 4, 5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) in standard solution and extract of human ghost cell was assayed. The procedure involved anion-exchange chromatography, on-line enzymatic hydrolysis of the phosphate esters, and detection of the inorganic phosphate formed. In the range of 1 to 20 n mol, the linear relation between the IP<sub>3</sub> amounts and the peak areas was good ( $r=0.9016$ ,  $n=6$ ), and the limit of detection was about 1 n mol.

## 河豚毒素的薄层色谱扫描法测定

林乐明 敖丽娟\* 张 军

(中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116012)

河豚毒素 (Tetrodotoxin, 简称 TTX) 是存在于河豚鱼类卵巢和肝脏等组织的一种天然剧毒物质。其化学结果如下:



河豚毒素是一种选择性极高的钠通道阻断剂。它能阻止钠离子进入动物体细胞内,质神经细胞和肌细胞的兴奋和传导受到抑制。因而,它对动物和人致毒迅速、症状剧烈、死亡率很高。另一方面,河豚

毒素已被证明可作为高效镇痛剂,并且对某些肿瘤有抑制作用。因此,对河豚毒素的纯度检验、含量测定、毒代动力学、以及临床药代动力学研究,均要求建立灵敏、可靠的分析方法。生物法<sup>[1]</sup>是较早所采用的方法。此法勿需特殊设备、简单易行,但由个体差异引起的误差大。荧光法<sup>[2]</sup>、气相色谱法<sup>[3]</sup>均要求事先样品衍生化。高效液相色谱法也曾被用于河豚毒素及其衍生物的纯化和分析。<sup>[4, 5]</sup>。竞争置换法检验<sup>[6]</sup>具有很高的灵敏度(1 ng/mL),但较复杂。薄层色谱法早已被用于河豚毒素及有关化合物分离、纯化和鉴定<sup>[7-10]</sup>。但用于定量尚不多见。本文研究了采用板上碱反应/薄层色谱荧光扫描法定量测定河豚毒素,取得了较满意的

\* 现在工作单位: 抚顺石油学院。