

# 高效液相色谱法测定酶转化液中胞苷三磷酸及其相关物质

肖明芳, 何明芳, 吕浩, 应汉杰

(南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009)

关键词: 高效液相色谱法( high performance liquid chromatography ); 胞苷三磷酸( cytidine triphosphate ); 胞苷二磷酸( cytidine diphosphate ); 胞苷一磷酸( cytidine monophosphate ); 酶转化液( liquid of enzymatical reaction )

中图分类号: O658 文献标识码: B 文章编号: 1000-8713( 2005 )05-0564-01

微生物多酶系统转化法<sup>[1]</sup>是在胞苷三磷酸( CTP )的制备方法中比较有产业化前景的技术, 即由胞嘧啶核苷酸( 即胞苷一磷酸, CMP )经微生物( 如啤酒酵母 )转化而得到 CTP, 但在其产物中可能还存在中间产物胞苷二磷酸( CDP )。有关核苷酸物质的高效液相色谱检测方法国外已有报道<sup>[2,3]</sup>, 我们在此基础上简化了色谱条件, 开发出一套适用于对酶转化液中 CMP, CDP 和 CTP 精确测定的方法。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

125/166/845 高效液相色谱仪及色谱工作站( Beckman 公司)。CMP, CDP, CTP 标准品购自 Sigma 公司( 纯度大于 98% ); 甲醇为国产色谱纯, 磷酸和三乙胺为国产分析纯。

### 1.2 色谱条件

色谱柱: 汉邦 Lichrospher C<sub>18</sub> 柱( 250 mm × 4.6 mm i. d. 5 μm ); 流动相: 甲醇-6%( 体积分数 )磷酸水溶液( 用三乙胺调节 pH 值至 6.6 )( 体积比为 11: 89 ); 流速 1.0 mL/min; 检测波长 271 nm; 柱温为室温; 进样体积 20 μL。

### 1.3 样品的处理

经过 10 h 的酵母酶系催化反应后, 取酵母转化液, 用盐酸调节其 pH 值至 2.0, 离心( 15 ℃, 4 000 r/min, 10 min )后取上清液, 用 Millipore Labscale TFF System 超滤器( 超滤膜的截留相对分子质量为 5 000 )超滤除去大分子物质, 得透明澄清浅黄色液体。再用流动相稀释定容, 过膜后待测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件的确立

3 种物质在 207 和 271 nm 处各有一个吸收峰, 由于流动相在 205 nm 处有吸收, 因此确定 271 nm 为检测波长。

在偏酸性的磷酸水溶液中, 核苷酸以负离子形式存在。加入适量三乙胺, 质子化的胺离子与核苷酸负离子结合形成离子对的复合物, 它容易被反相色谱柱的非极性表面所吸附。考察了流动相 pH 值及离子对试剂浓度变化对 CMP, CDP 和 CTP 色谱分离的影响。结果表明, 降低 pH 值、减小离子对试剂浓度都会使三者的保留时间明显减小, 而且 CMP 和 CDP 不能完全分离, CTP 的峰响应值也会减小。经过试验, 最终确立了“1.2”节中的色谱条件, 色谱图见图 1。

### 2.2 方法学考察

2.2.1 线性关系试验 CMP, CDP, CTP 的标准品经流动相稀释定容, 配制成 6 个水平的混合标准品溶液, 按选定的色谱条件进行分析, 以色谱峰面积  $Y$  对标准品质量浓度  $X$  ( mg/L ) 进行线性回归。CMP 在 9.42 ~ 94.16 mg/L 内的回

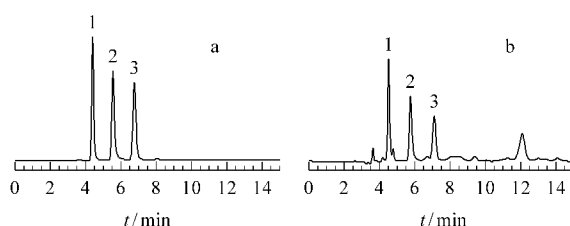


图 1 标准品混合物( a )和样品( b )的色谱图  
1. CMP; 2. CDP; 3. CTP.

归方程为  $Y = 23\ 108X + 37\ 808$  (  $r = 0.999\ 9$  ); CDP 在 11.20 ~ 112.00 mg/L 内的回归方程为  $Y = 17\ 668X + 33\ 267$  (  $r = 0.999\ 9$  ); CTP 在 10.33 ~ 103.30 mg/L 内的回归方程为  $Y = 13\ 267X + 13\ 177$  (  $r = 0.999\ 4$  )。其检出限(  $S/N = 3$  )依次为 35.3, 292.0, 350.4 μg/L。

2.2.2 精密度试验 取混合标准品溶液( CMP, CDP, CTP 的质量浓度分别为 94.16, 112.00, 103.30 mg/L ), 连续进样 5 次, CMP, CDP, CTP 峰面积的相对标准偏差( RSD )依次为 0.60%, 0.74%, 0.75%, 表明仪器的精密度良好。

2.2.3 重现性试验 精密吸取 1 mL 处理后的转化液 6 份, 分别用流动相稀释定容到 50 mL, 过膜进样, 按外标法以峰面积计算含量, CMP, CDP, CTP 含量的 RSD 依次为 0.98%, 0.83%, 1.64%, 表明该法重现性可以满足 CMP, CDP 和 CTP 定量分析的要求。

2.2.4 回收率试验 取处理后的转化液 9 份, 分别加入适量混合标准品溶液, 考察 3 个水平的回收率, 结果 CMP, CDP, CTP 的回收率分别为 99.1% ~ 102.2%, 98.8% ~ 102.2%, 99.2% ~ 102.2%; RSD 分别为 1.09%, 1.32%, 1.07%。

2.2.5 稳定性试验 取样品溶液于室温下放置, 在 6 h 内每隔 1 h 进样测定 1 次。结果表明, 样品溶液至少在 6 h 内稳定, CMP, CDP 和 CTP 峰面积的 RSD 分别为 0.97%, 1.28% 和 0.85%。将混合标准品溶液( 浓度同“2.2.2”节 ) 每日进样 1 次, 连续测定 5 d, 3 d 之后 CTP 就发生了明显降解。因此, 标准品和样品溶液不能放置太久。

## 参考文献:

- [ 1 ] Kitajima N, Watanabe S, Takeda I. Hakkō Kogaku Zasshi, 1970, 48( 12 ): 753
- [ 2 ] Daxecker H, Raab M, Cichna M, Markl P, Müller M M. Clin Chim Acta, 2001, 310( 1 ): 81
- [ 3 ] Tomiya N, Ailor E, Lawrence S M, Betenbaugh M J, Lee Y C. Anal Biochem, 2001, 293( 1 ): 129

收稿日期 2004-08-03

作者简介: 肖明芳, 女, 硕士研究生, E-mail: mingfang1981@sina.com.

通讯联系人: 应汉杰, 男, 教授, Tel ( 025 ) 83587329, E-mail: yinghanjie@njut.edu.cn.

基金项目: 教育部跨世纪优秀人才培养基金和江苏省新世纪学科带头人培养基金资助项目.