

# 几种核苷的毛细管胶束电动色谱分离

明永飞, 王霞, 赵艳芳, 翟宗德, 张红丽, 陈立仁\*, 李永民

中国科学院兰州化学物理研究所, 兰州, 730000, chenlr@ns.lzb.ac.cn

中国科学院研究生院, 北京, 100039

## 1. 引言

核苷的分析测定已经被用于一些重大疾病以及代谢紊乱的诊断之中<sup>[1]</sup>。目前分离测定核苷的方法主要有利用梯度洗脱的反相高效液相色谱法<sup>[2-4]</sup>以及反相离子色谱法<sup>[5]</sup>等。毛细管电泳是新近发展起来的一种新的分离分析技术, 由于它分离效率高, 样品用量少, 分离时间短, 分析成本低等特点, 已经被广泛用于一些生物样品的分离分析。本文采用胶束电动色谱对五种核苷进行了分离分析, 考察并优化了电泳分离条件, 实现了五种核苷的快速基线分离。并对各自的定量线性范围、重现性以及检测限进行了考察。

## 2. 实验部分

### 2.1 仪器、试剂及实验方法

HP-3D 毛细管电泳仪 (美国 Agilent 公司) 毛细管总长 48.5cm, 有效柱长为 40cm, 内径为 50  $\mu$ m。胞苷 (Cytidine -C), 尿苷 (Uridine -U), 鸟苷 (Guanosine -G), 肌苷 (Inosine -I), 胸苷 (Thymidine -T) (美国 Sigma 公司)。其他试剂皆为分析纯。

在压力进样 50mbars, 254nmDAD 检测下对几种核苷的分离条件进行优化。实验前, 对缓冲溶液进行超声脱气 10 分钟, 每次进样前, 分别用 0.1M 的氢氧化钠、Milli-Q 超纯水、缓冲溶液冲洗毛细管柱 2 分钟; 更换缓冲液时, 需要分别冲洗 10 分钟。

## 3. 结果与讨论

### 3.1 缓冲溶液的浓度以及 pH 对分离的影响

实验中通过对磷酸盐和硼酸盐缓冲液比较, 发现采用硼酸盐缓冲液较为理想, 同时对硼酸盐缓冲溶液的浓度进行了优化。在 25~45mM 范围内, 随着缓冲溶液的浓度的增加, 核苷的分离效率也逐渐增大, 在 36mM 时核苷分离度和理论塔板数均达到最大。通过对缓冲溶液 pH 的考察发现当 pH 值为 9.0 时, 五种核苷分离度则达最大, 尽管迁移时间变大, 但是也不足 7min。实验中选择缓冲溶液的浓度为 36mM, pH 值为 9.0。

### 3.3 表面活性剂以及有机添加剂对分离的影响

在其他条件恒定的情况下, 考察了不同 SDS 的浓度 (28~40mM) 以及不同有机添加剂含量 (1%~6%) 对分离的影响。当乙腈含量为 4% 时, 除了肌苷分离度在 SDS 浓度为 32mM 时达到最大, 其余几种核苷的分离度均在 36mM 时达到最大, 实验中选择乙腈含量为 4%, SDS 浓度为 36mM。

### 3.5 温度及电压对分离的影响

温度和电压对分离度的影响不大, 但是对迁移时间的影响较大, 通过比较不同温度 (15~35  $^{\circ}$ C) 和电压 (17~25 kV) 对分离的影响, 实验中选择分离温度为 25  $^{\circ}$ C, 分离电压为 25kV。

### 3.6 核苷酸的分离

在分离电压 25kV、柱温 25  $^{\circ}$ C、硼酸盐浓度为 36mM (pH=9.0)、SDS 36mM 和 4% 的乙腈的条件下对核苷的快速基线分离见图 1。

### 3.7 定量方法研究

3.7.1 线性及检测限 在优化电泳条件下核苷的线性回归方程以及检测限 (信噪比为 3) 见表 1。

3.7.2 重现性 在优化的电泳条件下, 对方法的重现性进行了考察, 结果发现连续进样 6 次, 迁移时间和峰面积的重现性 (结果见表 2) 分别小于 0.89% 和 5%。

该项目为中国科学院“百人计划”资助项目

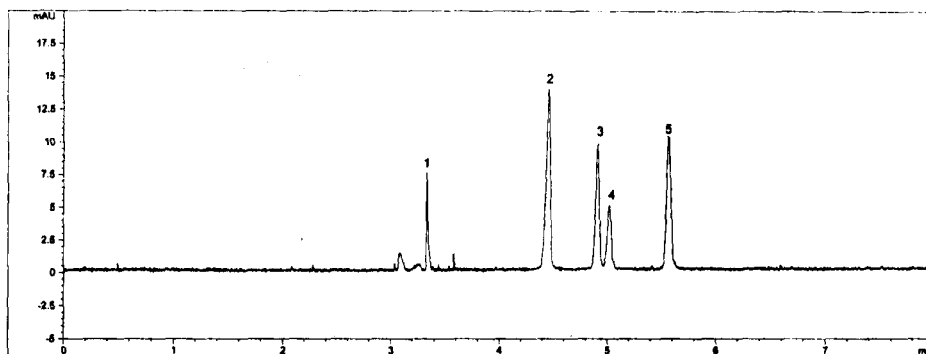


图 1 5种核苷的 CE 分离图  
峰: 1- T, 2-U, 3- C, 4- G, 5-I

表 1 核苷的线性回归方程、相关系数和线性范围

核苷	回归方程	R	线性范围 M	检测限 $\mu$ M
T	$Y = 30123.8790 X + 0.0029$	0.9997	$2.5 \times 10^{-3} - 7.8125 \times 10^{-5}$	25.8060
U	$Y = 48404.3463 X + 3.4586$	0.9956	$2.5 \times 10^{-3} - 3.91 \times 10^{-5}$	11.3734
C	$Y = 123191.7283 X - 0.2208$	0.9996	$1.25 \times 10^{-3} - 1.953 \times 10^{-5}$	6.4449
G	$Y = 130741.8101 X + 8.0332$	0.9906	$1.25 \times 10^{-3} - 1.953 \times 10^{-5}$	35.19
I	$Y = 91480.0148 X + 0.1084$	0.9995	$1.25 \times 10^{-3} - 1.953 \times 10^{-5}$	14.8728

表 2 核苷迁移时间和面积的重现性

RSD(%)	T	U	C	G	I
Migration time	0.5387	0.5268	0.7539	0.7826	0.8827
Peak area	2.1359	4.7229	2.9787	4.5948	4.8155

#### 4. 结论

采用毛细管胶束电动色谱在不足 6 min 内实现了五种核苷完全基线分离, 分离用的缓冲溶液对环境友好。通过电泳条件的优化, 得出最佳分离条件。在选定的条件下, 考察了 5 种核苷的线性、检测限和方法的重现性, 结果表明, 线性范围宽, 检测限低, 方法的重现性好, 分析时间短。

**关键词** 毛细管电泳, 胶束电动色谱, 核苷, 分离

**参考文献**

1. A. Werner, *Chromatographia* 31 (1991) 401.
2. H. M. Liebich, C. Di Stefano, A. Wixforth, *J. Chromatogr. A* 763 (1997) 193.
3. F. Pane, M. Intrieri, G. Calcagno, E. Izzo, A. Ligberti, F. Salvatore, L. Sacchetti, *J. Liq. Chromatogr.* 16 (1993) 1229
4. W. Fürst, S. Hallatröm, *J. Chromatogr.* 578 (1992) 39.
5. F. Childs, X. H. Ning, S. F. Bolling, *J. Chromatogr. B* 678 (1996) 181