

药物分析：常用定量分析法与应用电泳法 PDF转换可能丢失
图片或格式，建议阅读原文

https://www.100test.com/kao_ti2020/18/2021_2022__E8_8D_AF_E7_89_A9_E5_88_86_E6_c23_18434.htm

由于电泳法具有灵敏度高、重现性好、检测范围广、操作简便并兼备分离、鉴定、分析等优点，故已成为生物技术及生化药物分析的重要手段之一。现就该方法基本原理，分类和应用概要介绍如下。（一）电泳法的基本原理和分类 在电解质溶液中，带电粒子或离子在电场作用下，以不同的速度向其所带电荷相反方向迁移的现象叫电泳。电泳分离是基于溶质在电场中的迁移速度不同而进行的。一个离子在电场中的移动速度为（公式）（式中解释）根据电泳的分离特点及工作方式，电泳可分为三大类：（1）自由界面电泳：在二根U形管里的溶液中，同种分子的构型及荷电情况基本一致，在电场影响下，它们逐渐密集而与其他电泳迁移率不同的物质之间形成明显的界面。

（2）区带电泳：在电泳过程中，应用各种不同的惰性支持介质，在电场作用下，使具有不同泳动速度的组分形成各自区带的电泳。根据所用的支持物不同可分为：纸电泳法、醋酸纤维素薄膜电泳法、聚丙烯酰胺凝胶电泳法和十二烷基硫酸钠（SDS）聚丙烯酰胺凝胶电泳法。（3）高效毛细管电泳：是在一根内径约50 μm 的毛细管中，在高压电场下进行样品分离分析的一种新型电泳技术。（二）常用电泳法的类型及其应用

1．纸电泳法 纸电泳法是用滤纸作为支持介质的一种电泳法，其操作要点如下：（1）缓冲液的选择：应根据供试品的理化特性，需要的电泳速度和分辨力，选择适宜的缓冲液、pH值和离子强度。（2）滤纸的裁剪：滤纸可按需要

裁成与电泳槽相当的长方形或长条形，样点的间距为2~3cm，滤纸长度视电源输出最高电压及所需的电场强度而定，电压恒定时，所需场强越大，滤纸裁得越短。（3）点样方法：分干点法与湿点法。干点法是将供试品溶液点于滤纸上，吹干，再点，反复数次直至点完规定量的供试品溶液，然后用喷雾器将滤纸喷湿，点样处最后喷湿。干点法能浓缩供试品，适用于稀的供试品溶液。湿点法是将滤纸全部浸入缓冲液中，湿润后，取出，用滤纸吸干多余的缓冲液，滤纸点样部分需用架子架起，点的次数不宜过多，稀的供试品溶液应预先浓缩。湿点法优点是可保持供试品的天然状态，点样后立即接通电源以免扩散。（4）电泳及区带显示：将点好的滤纸放电泳槽上。控制电压、电流和电泳时间。电泳后，滤纸从槽中取出，晾干或烘干。不同的供试品采用不同的显色方法，如核苷酸类药物可直接在紫外光灯下观察定位，而有些物质必须用显色剂显色。（5）定量测定：纸电泳的定量方法与纸色谱的定量方法一样，可以用洗脱法或光密度计扫描法进行。但目前光密度计扫描法已被醋酸纤维素薄膜电泳法取代。这是因为在纸电泳法中，支持物滤纸对蛋白质样品的吸附力较大，且滤纸本身为极性物，透明化步骤较烦，不利于光密度计扫描法定量测定。纸电泳法可用于蛋白质、核苷酸等生化药物的测定。如核苷酸，具有共轭双键的嘌呤或嘧啶碱基，在一定的pH条件下，具强紫外吸收，电泳后滤纸在紫外光灯下显示紫色，用铅笔定位，剪下相应的部位，进行洗脱，在特定波长下测定供试品的吸收度，按其吸收系数可计算出某一核苷酸的含量。三磷酸腺苷二钠（ATP）的含量测定即属于此类。ATP在生产中易带入ADP等杂质，储存

中也易分解成ADP，因而采用纸电泳分离ATP后的分光光度法进行测定。测定方法如下：取本品，精密称定，加水制成每1ml中约含10mg的溶液，照中国药典附录纸电泳法测定。电泳毕，取出吹干，置紫外光灯（254nm）下检视，用铅笔划出跑在滤纸最前面的紫色斑点，剪下供试品斑点和与斑点面积相近的空白滤纸并剪成细条，分别放入试管中，精密加入0.01mol/L盐酸液5ml，搅匀，放置1R，待纸纤维全部下沉，倾取上清液，照分光光度法，在257±1nm波长处测定吸收度，减去滤纸空白吸收度的平均值，按C的吸收系数（E）为263计算含量。

2. 醋酸纤维素薄膜电泳法 本法是用醋酸纤维素薄膜为支持物的一种电泳方法。醋酸纤维素薄膜是纤维素的羟基乙酰化形成的纤维素醋酸酯，将其溶于有机溶剂后，涂抹而成的均匀薄膜。醋酸纤维素薄膜电泳已应用于血清蛋白、脂蛋白等的分离和定量测定。

3. 聚丙烯酰胺电泳法 聚丙烯酰胺电泳法（简称PAGE）是以人工合成的聚丙烯酰胺作为惰性支持介质的电泳方法。其分离效果主要取决于分子所带电荷与分子大小的比例，也取决于与分子量大小有关的分子筛效应。PAGE依电泳槽和凝胶层中的缓冲液体系pH和凝胶孔径大小是否一致而加以区别，相同的为连续体系，不相同的为不连续体系。圆盘电泳属于后者。PAGE与其他电泳法比较具有如下优点：电泳区带狭窄不易扩散，供试品用量极微，电泳分离时间短，设备简单，分辨率高，重复性佳，已广泛用于酶、蛋白、聚核苷酸、多肽的分析鉴定和少量制备。凝胶是以单体-烯酰胺和交联剂，甲撑双丙烯酰胺聚合而成的纵链交错的且有“分子筛效应的三维网状结构”。其机械性能优良，对热稳定，无色透明，无杂质，不溶于

缓冲液，在280nm波长处无紫外吸收。电泳时无电渗和吸附作用，适于供试品的定量和精制。

4. SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳法（简称SDELPAGE）

SDSPAGE是测定蛋白和酶等大分子物质分子量的有效方法。其原理是根据大多数蛋白都能与阳离子表面活性剂十二烷基硫酸钠（SDS）按重量比结合成复合物，使蛋白分子所带的负电荷远远超过天然蛋白分子的负电荷，消除了不同蛋白分子的电荷效应，使蛋白分子相对迁移率（ R_i ）的大小完全取决于分子量的高低，可从已知分子量的标准蛋白的对数和相对迁移率所作的标准曲线中求出供试品的分子量。SDSPAGE的优点是设备简单、操作方便、试剂易得、误差较小、重复性好。该法可用常规染色法，亦可用紫外吸收扫描法进行分子量测定、电泳纯度检查和电泳成分百分含量测定。

5. 琼脂糖凝胶电泳法

琼脂糖凝胶电泳是以琼脂糖为基质的一种电泳方法。现简述如下：

- （1）制胶：取琼脂糖约0.2g，加水10ml置水浴加热使溶胀完全，然后加入温热的醋酸-盐缓冲液（pH3.0），混匀，趁热将胶液涂布于大小适宜（7.5cm × 2.5cm或9cm × 4cm）的玻璃板上，厚度约3mm，静置，待凝胶结成无气泡的均匀薄层，即得。
- （2）标准品溶液及供试品溶液的制备：照各药品项下规定配制。
- （3）点样与电泳：在电泳槽内加入醋酸·锂盐缓冲液（pH3.0），将凝胶板置于电泳槽架上，经滤纸桥浸入缓冲液。于凝胶板极端分别点样1 μ l，立即接通电源，在电压梯度约30V / cm，电流强度1 ~ 2mA/cm的条件下，电泳约20min，关闭电源。
- （4）染色与脱色：取下凝胶板，用甲苯胺蓝溶液（0.1%，W / V）染色，用水洗去多余的染色液至背景无色为止。
- （5）定量：选择适宜的检测方法如分光光度法等

，以标准晶对照法进行样品的含量测定。（6）应用：由于琼脂糖凝胶具有较大孔径，因此，琼脂糖凝胶电泳法特别适用于RNA、DNA等核糖核酸类及其衍生物类药物的分离。

100Test 下载频道开通，各类考试题目直接下载。详细请访问 www.100test.com