



中华人民共和国国家标准

GB/T 15356—94

化 学 试 剂 核 苷 酸 测 定 通 则

Chemical reagent
General rules for the determination of nucleotides

1994-12-22 发布

1995-10-01 实施

国 家 技 术 监 督 局 发 布

6 层析试验

层析试验用于检测核苷酸的纯度及定性鉴别。所有核苷酸均应以下列方法中选择一种方法进行测定。

6.1 纸层析

6.1.1 方法原理

纸层析法是以滤纸为惰性支持物的一种层析法。分离原理属分配层析的范畴,它利用不同溶质在静止的水相,亦即纸上所吸附的水为固定相和沿纸流动的有机相(即流动相)两相溶剂的不断分配而达分离的目的。核苷酸经层析后,常用比移值(R_f)来表示各组分在层析谱中的位置。(R_f)值按式(1)计算:

$$R_f = \frac{d_s}{d_m} \dots\dots\dots (1)$$

式中: R_f ——比移值;

d_s ——溶质迁移距离,cm;

d_m ——流动相迁移距离,cm。

在一定的条件下,同一核苷酸的 R_f 值是一定的。但由于影响 R_f 值的因素较多,一般都采用与对照样品对比,即根据样品与对照样品在层析谱中 R_f 值来进行鉴别,并可在 254 nm 的紫外灯下观察,以显示出杂质斑点的多少和色量来确定样品的纯度。也可剪下斑点,溶于特定溶剂,用紫外分光光度计测定吸光度,并计算样品的含量和杂质的含量。

6.1.2 试剂及材料

6.1.2.1 对照样品

纸层析和薄层层析所用的对照样品,主体含量不少于 98.0%。

6.1.2.2 层析用纸

层析用纸是指具有一定强度、质地均匀平整的纯棉浆制成的滤纸。纸的裁切方向应使流动相能顺着纹理方向移动。定性用的层析滤纸灰分须小于 0.1%,一般可选用新华一号层析滤纸。

6.1.2.3 展开剂

展开剂可参照附录 B(参考件)之规定,使用前制备。

必要时可选用其他展开剂。

6.1.2.4 展开室

可选用大小适宜的标本缸。

6.1.3 操作步骤

取新华一号层析滤纸,长 30 cm,离底边 2 cm 处用铅笔划一条直线,在直线两端 2 cm 处开始点样,点与点之间距离为 2 cm,点样扩散的直径不超过 0.5 cm。同一张层析纸上可点数个样品,纸的宽度取决于样品的数目,并留有点对照样品的位置。

称取 0.005 g 核苷酸样品,精确至 0.000 1 g,溶于 0.5 mL 水或盐酸溶液 [$c(\text{HCl})=0.01 \text{ mol/L}$],必要时稍微加热溶解。用微量进样器或微量吸管点样,每次点样后须用冷风吹干,点样量按检测要求不少于 5 μL ,即相当于 50 μg 样品。

核苷酸纸层析一般采用上行。将已吹干后的层析纸两边卷成圆筒状,用二根塑料丝上下固定。在一高为 36 cm 的标本缸内平放一培养皿,内盛高度为 0.5 cm 的展开剂,将层析纸置于缸内以展开剂的饱和蒸气平衡 2~4 h 后,将样品端朝下放入培养皿中,盖紧玻璃盖。展开 12~16 h,流动相前沿即可上升 26~28 cm,此时将层析纸取出晾干或在 50℃ 干燥。

6.1.4 观察吸收斑点

将除去展开剂后的层析纸,在 254 nm 的紫外灯下观察,即观察出紫外吸收斑点。

6.1.5 结果的确定

6.1.5.1 以 50 μg 点样量,按规定展开并在紫外灯下观察,只观察出一个紫外吸收斑点,且与对照样品的 R_f 值一致,即可确定其层析试验为合格。

6.1.5.2 以 50 μg 点样量,按规定展开并在紫外灯下观察,除显示出一个斑点外,其他核苷酸的斑点小于或等于按产品规格制备的杂质标准的斑点时,即可确定含其他核苷酸小于或等于标准。

6.2 薄层层析

6.2.1 方法原理

薄层层析是一种将吸附剂均匀地铺在一块玻璃板上形成一薄层,在此薄层上进行色层分离的一种层析法,按分离机理可以分为吸附、分配、离子交换、凝胶过滤等法。本标准主要使用吸附薄层层析法。

6.2.2 试剂及材料

6.2.2.1 对照样品

应符合 6.1.2.1 条之规定。

6.2.2.2 硅胶 GF

本品系白色均匀细粉及荧光粉,粒度平均在 10~40 μm 之间,含有约 13% 的半水合硫酸钙。本品应附合下列分离要求:各取 0.040 g 二甲基黄、苏丹 III、靛酚蓝,溶于 100 mL 苯中。取 2 μL ,点样于按 6.2.3.1 条之规定制备的硅胶 GF 板上,用苯展开 10 cm,色谱图应显示三个清晰的分离斑点,靛酚蓝斑点接近于起始点,二甲基黄在色谱图的中央,苏丹 III 介于二者之间。

6.2.2.3 展开剂

通常选用正丁醇+丙酮+冰乙酸+5%氨水+水=7+5+3+3+2(体积比)。必要时可选用其他展开剂。可参照附录 B(参考件)或其他文献。

6.2.3 操作步骤

6.2.3.1 制板

制备薄层板所用的玻璃板必需表面光滑,清洁,其大小可根据需要选择。小的可用载玻片,大的可裁成 20 cm×20 cm 的玻璃片。

取一定量的吸附剂(硅胶 GF 可按 25~30 g 加 60~65 mL 水)在研钵中加水调成糊状,按玻璃板的尺寸取一定量的吸附剂糊均匀地铺成一厚度为 0.2~0.3 mm 的薄层。若使用涂铺器可按制造厂商推荐的方法涂铺。铺成的薄层须置于水平台上室温干燥过夜。硅胶 GF 制板的时间从调成糊状到铺板不应超过 1.5 min。

市售的预制板经 6.2.2.2 条试验,符合分离要求的,亦可使用。

6.2.3.2 点样和展层

取薄层板一块,距底边 1.5 cm 处为基线点样,点与点之间的距离为 1.5 cm,点样扩散的直径不超过 0.2 cm,点与点之间距离可视斑点扩散情况以不影响检出为宜。

称取 0.004 g 核苷酸样品,精确至 0.000 1 g,溶于 0.2 mL 水或盐酸溶液 [$c(\text{HCl})=0.01 \text{ mol/L}$],必要时稍微加热溶解,用微量进样器或微量吸管点样,如要多次点样时,可用冷风将前一次点样吹干后,再点下一次样,点样量按检测要求不少于 2 μL ,即相当于 20 μg 样品,点样时必须注意勿损伤薄层表面。

薄层层析可选用大小适宜的标本缸,将已点样的薄层板平衡后,将样品端朝下放入培养皿中,薄层板浸入展开剂的深度不超过 0.5 cm,上行至流动相前沿离顶端 0.5~1.0 cm 处(展开距离一般在 15~20 cm)取出晾干,在 50℃ 干燥除去溶剂。

6.2.4 观察吸收斑点

应符合 6.1.4 条之规定。

6.2.5 结果的确定

应符合 6.1.5.1 及 6.1.5.2 条之规定。

7 含量的测定

按 GB/T 9721 之规定,其中:

7.1 测定条件

波长:用样品所需的最大吸收波长;

吸收池厚度:1 cm;

参比溶液:水或盐酸溶液 [$c(\text{HCl})=0.1 \text{ mol/L}$] 或盐酸溶液 [$c(\text{HCl})=0.01 \text{ mol/L}$]。

7.2 测定方法

称取 10 mg 样品,精确至 0.000 01 g,用盐酸标准溶液 [$c(\text{HCl})=0.1 \text{ mol/L}$] 或盐酸标准溶液 [$c(\text{HCl})=0.01 \text{ mol/L}$] 溶解,转移至 1 000 mL 容量瓶中,稀释至刻度,摇匀。按测定条件 7.1 条之规定,测定吸光度。

7.3 结果的计算

核苷酸的含量按式(2)计算:

$$x = \frac{A/\epsilon \cdot M \cdot 1\,000}{b \times C} \times 100 \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中: x ——核苷酸的质量百分含量, %;

A ——核苷酸样品在最大吸收波长处的吸光度;

ϵ ——核苷酸样品的摩尔吸收系数, $\text{L/cm} \cdot \text{mol}$;

M ——核苷酸样品的相对分子质量;

b ——吸收池厚度, cm;

C ——溶液浓度, mg/L ;

1 000——换算系数。

8 干燥失重

称取 0.1 g 样品,精确至 0.000 1 g。置于已在 $105 \pm 2^\circ\text{C}$ 干燥至恒重的称量瓶中,于 $105 \pm 2^\circ\text{C}$ 的电烘箱中干燥至恒重。

干燥失重按式(3)计算:

$$x = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中: x ——干燥失重, %;

m_1 ——恒重前样品的质量, g;

m_2 ——恒重后样品的质量, g。

附 录 A
部分核苷酸的比旋光度、熔点和摩尔吸收系数
(参考件)

表 A1

中文名称	英文名称 (缩写)	相对 分子质量	熔点, °C ⁽¹⁾	比旋光度 [α] _D ²⁰	摩尔吸收系数, L/cm · mol		
					pH	$\lambda_{\max}$, nm	$\beta_{\max} \times 10^3$
腺嘌呤核苷-5'-磷酸 (5'-腺苷酸)	adenosine-5'-monophosphate (5'-AMP)	347.22	196~200	-46°~-48° C=5, 1N NaOH	2	257	15.1
鸟嘌呤核苷-5'-磷酸 (5'-鸟苷酸)	guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP)	363.24	190~200 d		1	256	12.2
胞嘧啶核苷-5'-磷酸 (5'-胞苷酸)	cytidine-5'-monophosphate (5'-CMP)	323.20	233 d	+27.1° C=0.5, H ₂ O	2	280	13.2
尿嘧啶核苷-5'-磷酸 (5'-尿苷酸)	uridine-5'-monophosphate (5'-UMP)	324.19	198.5		2	262	10.0
腺嘌呤核苷-5'-二磷酸 (5'-腺苷二磷酸)	adenosine-5'-diphosphate (5'-ADP)	427.21			2	257	15.0
腺嘌呤核苷-5'-三磷酸 (5'-腺苷三磷酸)	adenosine-5'-triphosphate (5'-ATP)	507.19			2	257	14.7
腺嘌呤脱氧核苷-5'-磷酸 (5'-腺嘌呤脱氧核苷酸)	adenine deoxyribose-5'-phosphate (5'-dAMP)	331.22		-38.0° C=0.2, H ₂ O	2	258	14.8
鸟嘌呤脱氧核苷-5'-磷酸 (5'-鸟嘌呤脱氧核苷酸)	guanine deoxyribose-5'-phosphate (5'-dGMP)	347.23		-31.0° C=0.4, H ₂ O	1	255	11.8
胞嘧啶脱氧核苷-5'-磷酸 (5'-胞嘧啶脱氧核苷酸)	cytosine deoxyribose-5'-phosphate (5'-dCMP)	307.20	183~184	+38.5° C=1.2, H ₂ O	1.5	279	13.0
胸腺嘧啶脱氧核苷-5'-磷酸 (5'-胸腺嘧啶脱氧核苷酸)	thymidine-5'-phosphate (5'-dTTP)	322.21	175	-4.4° C=4, H ₂ O	7	267	9.6
鸟嘌呤核苷-5'-二磷酸 (5'-鸟苷二磷酸)	guanosine-5'-diphosphate (5'-GDP)	443.21			1	256	12.3

续表 A1

中文名称	英文名称 (缩写)	相对 分子质量	熔点, °C ⁽¹⁾	比旋光度 [α] _D ²⁰	摩尔吸收系数, L/cm·mol		
					pH	λ _{max} , nm	ε _{max} × 10 ³
鸟嘌呤核苷-5'-三磷酸 (5'-鸟苷三磷酸)	guanosine-5'- triphosphate (5'- GTP)	523.19			1	256	12.4
胞嘧啶核苷-5'-二磷酸 (5'-胞苷二磷酸)	cytidine-5'- diphosphate (5'- CDP)	403.18			2	280	12.8
胞嘧啶核苷-5'-三磷酸 (5'-胞苷三磷酸)	cytidine-5'- triphosphate (5'- CTP)	483.16			2	280	12.8
尿嘧啶核苷-5'-二磷酸 (5'-尿苷二磷酸)	uridine-5'- diphosphate (5'- UDP)	404.17			2	262	10.0
尿嘧啶核苷-5'-三磷酸 (5'-尿苷三磷酸)	uridine-5'- triphosphate (5'- UTP)	484.15			2	262	10.0
腺嘌呤核苷-3', 5'-环式 一磷酸	adenosine-3', 5'- cyclic- monophosphate	329.21			2	256	14.5

注: (1) d 代表达到熔点后分解。

附 录 B
常用核苷酸展开剂的组成和配比表
(参考件)

表 B1

展 开 剂	配 比 (体积比)	说 明
异丁酸+0.5 mol/L 氨水	5+3	纸层析常用展开剂
异丙醇+浓氨水+水	7+1+2	纸层析常用展开剂
95%乙醇+1 mol/L 乙酸钠	7+3	纸层析常用展开剂
用氨水将水调节 pH 至 pH10		纸层析常用展开剂
正丁醇+冰乙酸+水	5+2+3	薄层层析常用展开剂
正丁醇+丙酮+冰乙酸+5%氨水+水	7+5+3+3+2	薄层层析常用展开剂

附加说明：

本标准由中华人民共和国化学工业部提出。

本标准由北京化学试剂总厂归口。

本标准由上海丽珠东风生物技术有限公司负责起草。

本标准主要起草人何光珍、金承德。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
化 学 试 剂
核 苷 酸 测 定 通 则
GB/T 15356—94

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

电 话:8522112

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售
版权专有 不得翻印

*

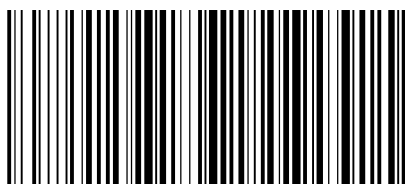
开本 880×1230 1/16 印张 3/4 字数 13 千字
1995年11月第一版 1995年11月第一次印刷
印数 1—2 000

*

书号: 155066·1-11975 定价 10.00 元

*

标 目 274—18



GB/T 15356-1994