

高效液相色谱分离纯化多肽的研究进展

张艳华,李 影,巨 芳,李志洲

(陕西理工学院化学与环境科学学院,陕西 汉中 723001)

摘 要:简要介绍了多肽的性质及其应用,综述了高效液相色谱分离纯化多肽的研究进展,探讨了今后分离纯化活性多肽的研究方向。

关键词:多肽;高效液相色谱;分离纯化;进展

中图分类号:O 657.7*2 **文献标识码:**A **文章编号:**1007 - 7561(2009)05 - 0033 - 03

Research progress on separation and purification of polypeptide by high performance liquid chromatography

ZHANG Yan-hua, LI Ying, JU Fang, LI Zhi-zhou

(College of Chemistry & Environmental Science, Shaanxi Institute of Technology, Hanzhong Shaanxi 723001)

Abstract: The property and application of polypeptide were introduced briefly. The research progress of separating and purifying polypeptide by high performance liquid chromatography was summarized. The research trend in the future were discussed.

Key words: polypeptide; high performance liquid chromatography; separation and purification; progress

多肽广泛存在于自然界中,对多肽的研究和应用一直是科学研究的一个主要方向。生物活性多肽由于具有多种人体代谢和生理调节功能,且可作为药物或药物前体,食用安全性极高而广泛受到人们的关注,因此多肽的分离纯化也成了个研究热点。随着分离纯化技术的进展,大大加快了新活性多肽的发现和合成速度。在多肽合成中,许多杂质显示与产物类似的性质,随着肽链的增长,分离的难度也增大,因此纯化的方法和工艺显得异常重要。

近年来,随着生命科学研究的不断深入,用于多肽分离纯化的方法得到了很大发展,其中,高效液相色谱由于具有许多其他方法不可比拟的优势,正受到人们的关注。本文简要介绍了多肽的性质及其应用,综述了凝胶色谱 (gel chromatography, GC)、离子交换色谱 (ion exchange chromatography, IEC) 和反相高效液相色谱 ((Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC)) 高效液相色谱 (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) 等技术,在多肽分离与纯化中的研究进展,探讨了今后活性多肽的研究前景。

1 多肽的性质及其应用

1.1 多肽的性质

多肽是由蛋白质中 20 种天然氨基酸以不同组

成和排列方式通过肽键(也称酰胺键)相互连接形成的化合物的总称。肽具有多样性,这是因为组成肽的氨基酸残基的种类不同、数量不同,肽的化学性质与功能都有所不同。肽具有显色反应,存在双缩脲反应,在强碱条件下与 Cu^{2+} 形成紫色络合物,利用该特征反应,可广泛用于肽的含量测定^[1]。

近年来肽类制品已不仅仅应用于药品、食品还用来预防和阻止 SARS 病毒、艾滋病毒以及世界范围内蔓延的多种病毒,多肽的地位随之升值。目前人们还在不断的发现,并且分离、纯化以及合成多肽类活性物质。总之,多肽物质的开发应用吸引着越来越多的研究者从事这方面的工作^[2]。

1.2 活性多肽的应用

多肽是涉及生物体内多种细胞功能的生物活性物质。在自然界,所有细胞都能合成多肽物质,其细胞功能活动也受多肽的调节控制。随着现代蛋白质工程、生物酶工程技术迅速发展,大量具有特殊功能的生物活性肽被发现、开发出来,应用于食品配方、功能性食品、食品添加剂、药品、化妆品、无公害饲料添加剂等领域。在食品工业上活性多肽具有降低血清胆固醇、降血压、增强运动员肌肉、恢复疲劳和促进脂肪代谢等功能。另外,小肽还可以与微量元素形成配合盐,这些配合盐能借助小肽的吸收特点和机制以配合盐整体的形式通过小肠被主动吸收,从而促进微量元素的吸收,并增强体内酶的活性,提高蛋白质、脂肪和维生素的利用率,具有较高的生物学价

收稿日期:2009-05-26

作者简介:张艳华(1986-),女,河南许昌人,大学本科生。

值。

目前,多肽的分离纯化越来越受国内外学者的高度重视,开发和利用生物活性肽作为功能食品和饲料添加剂以及新的治疗药剂的前景是非常广阔的。

2 高效液相色谱分离纯化多肽的研究进展

近年来有关多肽的分离纯化方法很多,常见的有高效液相色谱法(HPLC)、超滤法、高效毛细管电泳法(HPCE)等,其中高效液相色谱法应用较为广泛,其分离效果好,速度快,样品容量大,回收率高,已成为生物多肽的主要分离纯化方法之一^[3]。[O]HPLC根据样品在固定相和流动相分离过程的物理化学原理不同可分为离子交换色谱、凝胶过滤色谱和反相高效液相色谱等。

2.1 离子交换色谱

离子交换色谱是以离子交换剂作为固定相,交换剂由固定离子基团及可交换的平衡离子组成。当流动相带着组分离子通过离子交换柱时,组分离子与可交换的离子进行可逆交换,最后达到交换平衡。离子交换色谱法的原理就是根据不同组分离子对固定离子基团的亲和力的差别而达到分离的目的。离子交换色谱又可分为阳离子交换色谱和阴离子交换色谱。

离子交换色谱可在近中性条件下利用多肽带电性的不同进行分离纯化。刘璇等^[4]利用凝胶过滤层析 Sephadex G-75,通过强阳离子交换色谱 SP-650M,从苦瓜籽中分离纯化出一种具有双功能作用的活性多肽。

在多肽类物质的分离分析研究中,对多肽的性质、洗脱剂、洗脱条件的研究较多,不同的多肽分离条件有所不同,特别是洗脱剂的离子强度、盐浓度等对纯化影响较大。皮钰珍等^[5]分别采用 DEAE52 柱与 Q-Sepharose Fast Flow 柱作为离子交换色谱的离子交换柱对鹿胎盘多肽进行了分离,结果表明,与 Q-Sepharose Fast Flow 柱相比较,DEAE52 柱流速慢,柱填料再生处理比较烦琐,每次再生过程中胶的损失量较大,因此 Q-Sepharose Fast Flow 柱更适合此多肽的分离。

可以看出,对于不同的多肽提取,所选用的离子交换剂不同,因此环境条件及洗脱条件的确定非常重要,一旦条件选取不当,分离纯化效果将会很差。故而,对于各种多肽,研究其最适离子交换剂及其对应最适条件以不断提高提取效果是研究工作者的研究方向。

2.2 凝胶色谱法

凝胶色谱法是一种简便而有效的液相柱层色谱技术。它利用某些化学惰性的多孔网状结构的物质为填料,通过洗脱液的连续洗脱,使混合物中的各种物质按其分子大小不同得到分离。凝胶过滤层析所需设备简单,具有操作方便、分离迅速,以及不影响

样品的生物活性等优点,广泛应用于大分子物质的分离纯化^[6]。

董转年等^[7]通过对天麻初提液两次超滤、凝胶过滤和快速蛋白液相色谱(FPLC)分离纯化,来研究生物多肽对生物机体生命活动的生理作用。孙培龙等^[8]通过 Superose-12 凝胶层析、DEAE Sepharose F.F.离子交换层析等手段,对油菜花粉中 60%~80%硫酸铵盐析出物进行分离纯化研究,得到一个分子量为 36.3kD 纯度很高的多肽。

凝胶色谱也被科研工作者广泛应用于抗氧化性多肽及其他新型多肽的开发上,如周媛媛等^[9]对水解制得的大豆多肽进行超滤膜过滤后,对得到的相对分子质量 6000 以下的多肽用葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 进行凝胶色谱分离纯化,经研究表明抗氧化性最好的组分 a 和组分 b 的相对分子质量分别约为 630 和 310。

凝胶色谱法在分离纯化多肽中应用广泛,但由于色谱柱峰容量有限,分离度较低,不宜用于分子大小及组成相似或相差很小组分的分离,因此通常可作为一种初步分离复杂混合物的手段,使下一步的纯化达到更好的效果,往往需要与其他技术联用,得到高纯度的分离纯化结果。

2.3 反相高效液相色谱

反相高效液相色谱是利用非极性的反相介质为固定相,极性有机溶剂或其水溶液作为流动相,根据溶质疏水性的差别进行分离纯化的洗脱色谱法^[10]。RP-HPLC 主要用于分子量低于 5000 的多肽的分离纯化,因其具有分离效果好、分辨率高、重复性好、分析速度快等优点,在多肽的分离纯化和制备中得到广泛应用。

随着研究工作者的不断努力,近年来 RP-HPLC 在研究上取得了很大的进步。在分离奥曲肽方面,随着更多研究工作的深入,纯化的纯度越来越高。徐仲等^[11]使用逐步增长肽合成战略及碘氧化法对线性奥曲肽进行环化,通过反向高效液相色谱纯化,合成纯度达 70.26%。王欣^[12]使用反相高效液相色谱对三种小肽:奥曲肽、Phe-Leu-Glu-Glu-Lue 及 C₁₅H₃₁-CO-LyS-Thr-Thr-Lys-Ser 进行了分离纯化,经过纯度检测,奥曲肽的纯度为 97.8%。

此外,Li B 等^[13]利用反相高效液相色谱等色谱法从猪胶原蛋白酶解物中分离纯化了四种不同的具有很强抗氧化活性的多肽序并对其进行了研究,结果表明其中一种抗氧化肽 QGAR 并不含有可以作为强质子供体的氨基酸。

反相高效液相色谱由于操作简单,色谱过程稳定,加之分离技术灵活多变性,已成为高效液相色谱中应用最广泛的一个分支。然而反相高效液相色谱虽具有高选择性却不具有毛细管电泳的高柱效性,且费时,价高,因此研究其与其他分离纯化方法的联用技术具有现实意义,成为近年来的一个研究热点。

2.4 高效液相色谱与其他分离纯化方法联用

多肽的种类很多且大多具有相似性,使用单一的分离纯化手段已经不能达到理想的分离纯化效果。HPLC有可以进行大规模制备等优点,但存在费时、价高等缺点,因此高效液相色谱与其他分离纯化方法联用技术在多肽分离纯化中已显示出巨大的优越性。

近年来,国内外科研者都非常注重利用联用技术开发并研究活性多肽。如任娇艳^[13]集成超滤、离子交换色谱、逆流色谱及凝胶色谱等多种分离技术对草鱼蛋白肽进行逐级纯化。国外 Park PJ 等^[14]运用超滤法从脱卵磷脂卵黄酶解物中分离多肽,又利用高效液相色谱法进一步分离纯化了两种不同的具有很强抗氧化活性的多肽并用毛细管电泳对分离的多肽进行鉴定,结果显示很高的纯度。

此外 Je JY 等^[15]利用连续色谱和串联电喷雾质谱成功的对金枪鱼骨架蛋白酶解物中抗氧化肽进行了分离纯化,并对其进行了研究,结果表明金枪鱼骨架蛋白的抗氧化活性肽在亚油酸体系中表现出很高的抗氧化性。Blanca 等^[16]利用 HPLC-MS 技术从 β -乳球蛋白中分离纯化到 42 个抗氧化肽,经研究表明 WYSLAMAASDI 抗氧化活性低于等摩尔氨基酸混合物,而 YVEEL 抗氧化活性却高于等摩尔氨基酸混合物,从而提出肽键或肽构象对混合氨基酸的抗氧化活性既有拮抗作用又有协同效应的观点。

高效液相色谱与其他分离纯化方法的联用技术,集中了各种方法的优势,弥补了各技术的不足,在多肽及其他大分子分离纯化的研究上,越来越备受国内外科研者的重视。

3 现状与展望

近年来,有关各种活性多肽的化学合成有了很大的发展,但产物成分比较复杂,一般是以目标多肽为主的几种结构相似的多肽混合物,因此,对这一混合物的分离纯化一直是一个重要的研究课题,对其分离纯化的最优化研究也就显得尤为重要。目前,高效液相色谱已成为分离纯化多肽行之有效的方法之一,与经典分离纯化方法相比,高效液相色谱分离具有效果好、速度快、分辨率高、灵敏度高等优点,有较强的适用性。其次,高效液相色谱在适宜的色谱条件下不仅可以在短时间内完成对多肽的分离目的,更重要的是该法能在制备规模上生产具有生物活性的多肽。然而,目前高效液相色谱分离纯化工艺尚不完全成熟,成本较高且费时,有待于科研工作者进一步优化其条件或找到一种较适于分离纯化多肽的方法。由于多肽具有多样性,因此在用高效液相色谱分离纯化不同种类多肽时,如何保持多肽活性、如何选择固定相材料、洗脱液种类也是需要研究的重要内容。

如何将分离纯化的各种技术方法和现代设备有机结合起来,建立一套系统完整的分离研究体系,是

今后科研工作者的研究方向。目前,在综合高效液相色谱和毛细管电泳的优势而发展起来的毛细管电色谱技术,以及近年来发展起来的毛细管电色谱与质谱的联用技术,这些方法的结合使用必将表现出一定的优势,在多肽物质的分离纯化及复杂生物样品的分析中发挥重要作用。此外,高效液相色谱技术的深入研究对推动我国多肽类保健食品、药品的产业化具有重要意义。相信随着对高效液相色谱分离机理研究的逐步深入、分离体系的不断完善及各种检测手段如质谱技术的快速发展,高效液相色谱必将在多肽研究领域得到更加广泛的应用。

参考文献:

- [1] 王欣.多肽的合成、分离纯化及巯基氧化反应研究[D].西北大学,2005.
- [2] 张小燕.胶原蛋白肽生物功能材料的研究与开发[D].西北工业大学,2006.
- [3] 张纯丽,马美湖.活性多肽提取分离方法研究进展[J].农产品加工,2006,(3):27-32.
- [4] 刘璇,时祥柱,叶秀云.苦瓜籽中一种抗胰蛋白肽的分离及抗真菌作用观察[J].福州大学学报(自然科学版),2008,36(1):148-151.
- [5] 皮钰珍,刘长江,王淑琴,等.利用层析法纯化鹿胎盘多肽的研究[J].食品与发酵工业,2008,34(6):58-61.
- [6] 王立晖,袁永俊,孙勇民,等.生物活性多肽分离与检测的研究进展[J].农产品加工,2008,(6):21-27.
- [7] 董转年,龚秀会,彭波,等.天麻多肽的分离纯化研究[J].生物技术,2007,17(6):56-58.
- [8] 孙培龙,张奕敏,何荣军,等.蜂花粉多肽分离纯化及免疫活性研究[J].食品科学,2008,29(3):450-452.
- [9] 周媛媛,周瑞宝.大豆多肽的分离纯化与抗氧化活性研究[J].中国油脂,2008,33(5):34-36.
- [10] Smith D D, Saha S, Fang G, et al. Modifications to the N-terminus but not the C-terminus of calcitonin gene-related peptide (8-37) produce antagonists with increased affinity [J]. Med Chem, 2003, 46(12): 2427-2435.
- [11] 徐仲,李宁,刘卓,等.奥曲肽固相合成及环化的研究[J].哈尔滨工业大学学报,2008,40(2):292-295.
- [12] Li B, Chen F, Wang X, et al. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry [J]. Food Chem, 2007, 102: 1135-1143.
- [13] 任娇艳.草鱼蛋白源抗疲劳生物活性肽的制备分离及鉴定技术研究[D].华南理工大学,2008.
- [14] Park PJ, Jung WK, Nam KS, et al. Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk [J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2001, 78: 651-656.
- [15] Je JY, Qian Z J, Byun HG, et al. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis [J]. Proc Biochem, 2007, 42: 840-846.
- [16] Blanca HL, Alberto A, Alberto D, et al. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin identification of active peptides by HPLC-MS/MS [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53: 588-593. 完