

(ASTMD3606-1996)。从图中可以看出,只要更换色谱柱,系统可以用于任何需要反吹的分析方法。系统的主要特点是:

(1) 使用的部件是气相色谱仪实验室的常备器件。

(2) 虽然使用了六通阀,但无需将阀放在柱箱中,反吹时虽和部分样品接触,但不影响被分析组分的测定。

(3) 通过调节针形阀 1 的开度,可实现反吹速

度的改变。

(4) 通过调节针形阀 2,可实现分析速度或分离度的调整。

(5) 操作和有阀切换一样,不必改变一般的操作习惯。

(6) 改装成本低,易于实现。

收稿日期:2002-05-31

庞增义,男,高级工程师,主要从事气相色谱仪的研制工作。

仪器分析

反相高效液相制备色谱分离酪蛋白磷酸肽

周杏琴¹ 王博诚¹ 冯凤琴²

(1. 核医学国家重点实验室 江苏省原子医学研究所,无锡,214063; 2. 无锡轻工大学食品工程系)

摘要 介绍了用反相 C₁₈液相制备色谱柱分离生物活性肽酪蛋白磷酸肽的方法。经过两次不同梯度的洗脱,得到了 4 种不同组分的酪蛋白磷酸肽。经过氨基酸分析仪测定,确定了其中 3 种的分子结构,分别为 s₁(62-79)、s₁(43-79)、(7-24)。

关键词 反相高效液相制备色谱 酪蛋白磷酸肽

1 前言

酪蛋白磷酸肽(casein phosphopeptides, CPP)是一种含有磷酸丝氨酸基的肽,能促进大肠内钙的吸收和利用^[1,2],可用作食品、饮料及营养保健品的添加剂,预防各种缺钙症^[3]。但不同结构的 CPP 对钙的结合能力不同^[4]。要进一步研究 CPP 的组成及其分子结构和功能性质,必须得到肽链较短的 CPP。

CPP 的生产过程分为酪蛋白的酶水解和 CPP 分离两步。曾有文献报道^[5],用胰蛋白酶在较高温度下反应,采用较高的 E/S,反应较长时间,可以得到 s₁(59-79)和(2-25)。本实验采用反相 C₁₈高效液相制备色谱柱,分离不同结构的 CPP,得到了肽链较短的 CPP。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Bio-Rad 5000 HPLC, 7125 手动进样器, Bio-Dimension 二极管阵列检测器。乙腈为 HPLC 级,三氟乙酸、乙酸铵为分析纯,水为超纯水。所有溶剂都经过 0.45 μm 的过滤器过滤并脱气。

2.2 色谱条件

色谱柱: Hi-PORE RP-318, 250 × 21.5 mm, 孔径 30 nm, 粒度 10 ~ 15 nm, LOOP 管 1 mL。检测波长 215 nm, 检测灵敏度 0.05 AUFS, 流速 3.0 mL/min, 柱压 16 kg/cm²。

第一步,流动相采用含三氟乙酸的水溶液与含三氟乙酸的乙腈溶液,梯度洗脱;第二步,流动相采用含乙酸铵的水溶液与含乙酸铵的乙腈溶液,梯度

洗脱。

2.3 样品制备

用选择沉淀法在酶解液中加入一定浓度的钙离子和乙醇,离心,过滤,上清液经冷冻干燥得到 CPP 的复杂混合物。经过阴离子交换树脂(DOWEX 2 × 8)处理,除去非磷酸肽,得到含有一定 CPP 的粗制品。再经过凝胶过滤柱(Sephadex G-25),得到不同分子量分布的两大组分 CPPA、CPPB。根据其分子量分布的不同状况,取 CPPA 用于高效液相制备色谱分离。

3 结果与讨论

3.1 波长的选择

用 200~300nm 的波长对 CPPA 进行扫描,最大吸收波长为 215nm,故选择 215nm 作为检测波长。

3.2 进样量

从凝胶过滤柱上得到的样品中含有一定量的 NaCl, CPPA 浓度约为 150mg/mL。取不同体积的样品进行试验,考察进样量对于分离的影响。当进样量为 200~300μL 时,样品能达到较好的分离。

3.3 洗脱条件试验

采用分离肽通常使用的缓冲体系,在水及乙腈中分别加入 TFA,配制两种不同的缓冲液(A 0.1% TFA-H₂O; B 0.1% TFA-CNCH₃),按不同的梯度洗脱条件试验。最后选择的洗脱条件为 0~2min, 0%B; 2~70min, 0~70%B; 70~80min, 70%~0%B。得到三个主要的峰,色谱图见图 1。

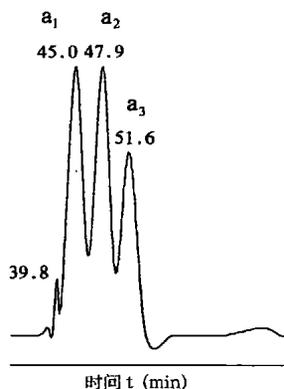


图1 CPPA 第一次分离的反相制备色谱图

分别收集图 1 中的三个主要组分 a₁、a₂、a₃,冷冻干燥后,用电泳分析其纯度,发现 a₁、a₂、a₃ 均不是单一组分,而是含有 2 个或 3 个组分,因此,必须对 a₁、

a₂、a₃ 进一步分离。采用选择性更高的乙酸铵洗脱液代替三氟乙酸洗脱液,对 a₁、a₂、a₃ 收集液再进行第二次分离。配制的缓冲液为,A: 25mmol/L 乙酸铵溶液,pH6.0; B 50mmol/L 乙酸铵溶液+60%乙腈(v/v),pH6.0。当梯度条件选择为 0~1min, 0~2%B, 1~40min, 2%~100%B, 40~42min, 100%B, 42~43min, 100%~0%B 时,分离较好。同时考察了不同 pH 值对分离的影响。当 pH 为 6.0 时,分离效果较好。分别收集 a₁、a₂、a₃,分离后得到 4 个组分,色谱图见图 2。

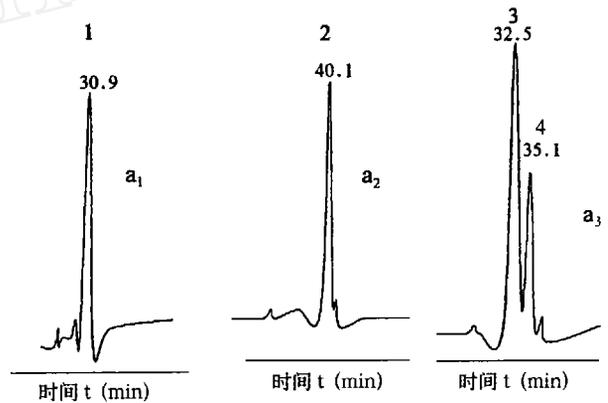


图2 a₁、a₂和 a₃ 的反相制备色谱图

3.4 氨基酸分析结果

将 a₁、a₂、a₃ 分离所得的 4 个组分进行氨基酸分析,所得结果见表 1。由表可见,4 个组分中只确定了 3 个组分的结构,组分 2 的结构不能确定。

表1 氨基酸分析结果

氨基酸	组分 1	组分 2	组分 3	组分 4
Asp	1.737	1.336	5.250	1.889
The	—	0.944	2.204	1.236
Ser	6.035	2.850	4.925	4.707
Gu	9.450	6.441	12.281	6.598
Gly	-	-	1.455	1.058
Ala	1.525	-	1.832	-
Val	2.608	1.478	1.813	2.399
Met	-	-	0.250	-
Ile	2.560	1.389	3.685	2.342
Leu	-	-	-	1.301
Lys	1.169	0.758	2.141	-
Pro	0.566	-	0.918	0.817
N 末端序列	Gu-Ala-Gu	-	Asp-Ile-Gly-	Asn-Val
分子结构	s ₁ (61-79)		s ₁ (43-79)	(7-24)

3.5 讨论

(1) 因为实验条件的限制,采用手工收集,在收集过程中极容易混入少量相邻组分。因此在收集时要控制好时间,尽量收集峰的主要部位。

(2) 对4个组分,氨基酸分析结果只确定了3个组分的结构,组分2的结构暂时不能确定。

(3) 一次分离大约需要60min,2h能处理大约30~40mg CPP样品,最后回收得到的 s_1 (62-79)量较多,(7-24)量较少,仅为前者的五分之一。与文献相比,高效液相制备色谱采用两种不同的缓冲体系分离酪蛋白磷酸肽,得到的肽链较短,分离时间也大大缩短,能为进一步研究CPP的功能提供足够的

样品。

参考文献

- 1 Reeves R E, Latour N G. Science, 1958, 128: 472 - 478
- 2 Mykkanen H M, Wasserman R H. J Nutr, 1980, 110: 2141 - 2148
- 3 Mellander O. Acta Soc Med Upsale, 1950, 55: 247 - 255
- 4 Meisel H, Behrens S, Schlimme E. Kieler Milchwirtsch Forschungsber, 1991, 43(3): 199 - 212
- 5 Adamson N J, Reynolds E C. Biotech Bioengi, 1995, 45: 196 - 204

收稿日期: 2001 - 10 - 23

周杏琴,女,副主任技师,主要从事液相色谱、气相色谱-红外光谱联用、毛细管电泳等仪器分析工作。

Separation of casein phosphopeptides by reversed phase preparative liquid chromatography. Zhou Xingqing¹, Wang Bocheng¹, Feng Fengqing (1. National Key Laboratory of Nuclear Medicine, Jiangsu Institute of Atomic Medicine, Wuxi, 214063; 2. Department of Food Engineering, Wuxi Light Industry University)

A method is presented for separation of biologically active casein phosphopeptides on reversed-phase C₁₈ preparative liquid chromatographic column. After two steps of elution with different gradients (first with trifluoroacetic acid-water and trifluoroacetic acid-acetonitrile, then with ammonium acetate-water and ammonium acetate-acetonitrile), four different casein phosphopeptides were obtained. They were further analyzed by amino acid analyzer, but only three of them were identified and the molecular constructions are s_1 (62-79), s_1 (43-79) and (7-24), respectively.

罗丹明 6G 流动注射荧光法测定蛋白质^{*}

方光荣 宋功武 刘立明 蔡朝霞

(湖北大学分析测试中心,武汉,430062)

摘要 以荧光染料单体和二聚体平衡转化为基础,提出了用罗丹明 6G 荧光染料作为生物探针测定蛋白质的方法。罗丹明 6G 在十二烷基磺酸钠存在下形成二聚体,蛋白质的定量加入可以使二聚体解聚,调节单体和二聚体的平衡转化,采用流动注射法进行分析。该法线性范围宽,灵敏度高,反应速度快,准确度高,抗干扰能力强。

关键词 荧光染料 罗丹明 6G 表面活性剂 蛋白质 流动注射分析

1 引言

测定血清蛋白量和质的改变,能为疾病诊断、疗效观察提供有价值的信息。荧光应用于蛋白质定量测定是近年来逐渐兴起的分析方法^[1-5]。由于这种方法干扰少,速度快,灵敏度和准确度高,具有较大

的实用性,因而受到广泛关注。罗丹明 6G 在十二烷基磺酸钠存在下能形成二聚体,而蛋白质的定量加入可以调节单体和二聚体的平衡转化。本文利用这一特点,采用流动注射法测定蛋白质,线性范围宽,灵敏度高,反应速度快,准确度高,抗干扰能力强,对实际样品的测定结果令人满意。

* 中国分析测试基金资助课题(99 - 11)