

表2 样品测定结果

批号	940433	940439	940447	950568
吗啡含量 (标示量%)	107.3	106.2	107.1	107.0

4 结论

用固相萃取方法处理复方甘草片, 简便快速。样品处理时间约为 25 分钟, 而《中国药典》1995 版二部提供的方法约需 4~5 小时, 本法所需时间仅为其 10%, 省工省时, 节约了大量有机溶剂。本法准确可靠, 可作为药品生产质量控制标准。

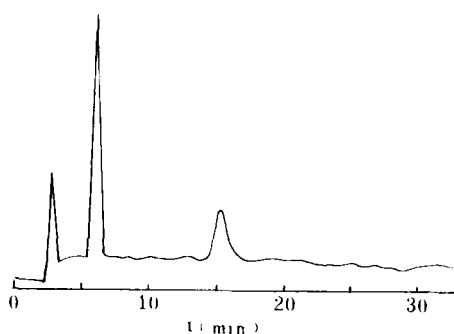


图3 复方甘草片固相萃取液相色谱图
1. 溶剂, 2. 吗啡

参考文献

- [1] 朱霁虹, 朱维华, 李永庆. 复方甘草片中微量吗啡的分离及高效液相色谱法测定. 药物分析杂志, 1990, 10 (4) : 237
- [2] 韩家荣 毕森林 刘旭中等. 复方甘草片质量控制探讨. 中成药研究, 1987, (2) : 10
- [3] 徐友宣 逯晓燕. 复方甘草片中吗啡的气质联用分析. 中草药, 1991, 22 (8) : 347
- [4] 沈晓英 郑望. 复方甘草片含量测定的样品前处理方法改进. 中国药科大学学报, 1996, 27 (1) : 58
- [5] Wu CY, Wittick JJ. Separation of five major alkaloids in gum opium and quantitation of morphine, codeine, and thebaine by isocratic reverse phase high performance liquid chromatography. Anal. Chem., 1977, 49 (3) : 359
- [6] Wu Z, Huang Z, Li H. Identification of several kinds of basic narcotics in human urine. Chin. J. Forensic Med., 1991, (6) : 157

反相高效液相色谱分离分析蛋白质研究*

阮源萍 刘文远 张长弓** 黄 征

(厦门大学化学系 国家教委分析科学开放实验室, 厦门 361005)

反相高效液相色谱已广泛应用于有机物分析^[1,2], 在无机物分析方面也有不少应用^[1,3-5]。在反相色谱中 C₁₈ 柱应用最多。如能研究扩大 C₁₈ 的应用范围, 则一台 HPLC 仪配用一支 C₁₈ 柱, 便可分析各式各样样品中的各种成分, 最大限度发挥仪器的使用效率。

本文利用 C₁₈ 柱进行蛋白质和肽的分离分析研究, 以扩大反相高效液相色谱在生命物质分析中的应用。由于蛋白质分离的特殊性^[6-8], 如分子量大, 填料孔径对分离有一定的影响, 为此我们选用孔径为 125 Å 的 μ-Bondapak C₁₈ 反相柱进行实验。根据蛋白质分离过程中可能变性或失活, 我们采用二元有机溶剂作流动相, 降低有机溶剂总浓度, 因此蛋白质在反相柱上得到较好的分离。此外, 本研究还为高效液相色谱和等速电泳联用分离分析生命物质打下基础。

* 国家自然科学基金课题

** 抗癌研究中心

1. 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 510 型泵 (美国) 与 YBS-2 型平流泵 (中科院上海分院仪器厂) 组成梯度洗脱装置; Waters 486 型检测器 (美国); U6K 进样阀 (美国); SSC-922 型色谱数据处理机 (上海三方仪器厂); μ -Bondapak C₁₈ 色谱柱, I. D. 4mm × 200mm, 粒度 10 μ m, 孔径 125 Å (中科院大连化物所)。

乙醇, 异丙醇, 丁醇为分析纯试剂, 经过重蒸馏处理。实验用水为二次去离子水经重蒸馏处理。核糖核酸酶 (RNase A)、溶菌酶 (Lys)、(鸡) 白蛋白 (OVA) 均为上海丽珠东风生化技术公司产品; 牛血清白蛋白 (BSA), 电泳纯, 中国医学科学院血液研究所; 羊免疫球蛋白 (IgG), 厦门大学抗癌研究中心纯化物; 谷胱甘肽 (还原型) (Glu), 生化试剂, 上海生化研究所。所有蛋白质样品液均为 2.5mg/mL 水溶液, 置于冰箱 -4℃ 保存。

1.2 实验方法

采用二台泵组装成低压梯度装置。在梯度洗脱过程中手动控制副泵 (B 溶剂) 流量来调整 A 和 B 流动相比比例。主泵控制流动相流速为 1.0-1.5mL/min, 检测波长为 225nm, 进样体积为 25 μ l。所有实验均在室温 (25℃) 下进行。

2. 结果与讨论

2.1 蛋白质在乙醇/丁醇和异丙醇/丁醇体系中的色谱保留

流动相中有机溶剂的组成对蛋白质分离有重要的影响。表 1 给出不同实验体系中核糖核酸酶、溶菌酶、牛血清白蛋白和白蛋白在 C₁₈ 反相柱上的分离情况。从表 1 中的 1-4 组实验的保留数据可以看出: A 溶剂的溶剂强度不能太大, 如超过 20% 有机溶剂, 则核糖核酸酶不易在柱上保留。而 B 溶剂要保持足够的溶剂强度, 应不低于 50% 有机溶剂, 否则白蛋白峰明显变小, 甚至不出峰。从实验 5 得知, 单用 60% 乙醇不足以将白蛋白洗脱。若采用二元有机溶剂作淋洗剂, 则可增加洗脱能力以改善分离。从 6-8 组实验的结果得知, 增加丁醇比例有利于蛋白质的洗脱, 但柱压和基线吸收也相应增大。采用乙醇/丁醇体系未能将核糖核酸酶和溶菌酶分离开。因此实验进一步采用异丙醇代替乙醇, 降低了总有机溶剂的含量, 分离也得到进一步的改善。图 1 和图 2 给出几种蛋白质的分离谱图。

2.2 流动相 pH 值对蛋白质分离的影响

蛋白质在反相柱上的保留取决于它们的疏水性, 而流动相 pH 值大小可能会影响到蛋白质功能团的离子化以及它们的立体结构, 从而改变它们在色谱柱上的保留性能。经过试验我们观察到 B 溶剂不含 HCl 对蛋白质的分离几乎没有影响。流动相的 pH 值主要由 A 溶剂控制。当 A 溶剂不加 HCl 时, pH 约为 6, 这时所有蛋白质难于从柱上洗脱。当 A 溶剂加入适量的 HCl, 蛋白质分离得到明显改善。低 pH 的流动相有利于改善蛋白质的分离, 这可能是高浓度的氢离子抑制了蛋白质羧基氢的离解, 同时也降低了硅醇基的离解, 减少了对蛋白质二次作用的影响, 蛋白质峰形较好, 灵敏度提高。当流动相的 pH > 3 时, 有些蛋白质, 如白蛋白出峰较小, 这可能与它在柱上被吸附有关。若 A 溶剂加入 0.1mol/L H₃PO₄, pH 为 1.67, 蛋白质虽然可以分离, 但基线不够平稳。考虑到反相柱的使用条件, 本文选定 A 溶液加入一定量的 HCl, pH 控制在 2.2-2.6 之间分离蛋白质。

2.3 梯度变化对蛋白质分离的影响

反相液相色谱分离蛋白质的分离机理不同于一般的小分子,通常需要采用梯度洗脱方式,

表 1 不同实验条件下蛋白质的色谱保留值

实验 编号	A 溶剂组成	B 溶 剂 组 成	梯度* 型式	保留时间, min			
				RNase	Lys	BSA	OVA
1	9.6mmol/L HCl	60%EtOH/BuOH (4:1) + 9.6mmol/L HCl	a	12.93	13.50	14.23	16.90
2	5%EtOH/BuOH+ 9.6mmol/L HCl	55%EtOH/BuOH (4:1) + 9.6mmol/L HCl	a	12.70	12.80	13.74	17.14**
3	5%EtOH/BuOH+ 9.6mmol/LHCl	50%EtOH/BuOH (4:1) + 9.6mmol/L HCl	a	13.53	13.92	15.05	18.65**
4	5%EtOH/BuOH+ 9.6mmol/L HCl	60%EtOH/BuOH (4:1) + 9.6mmol/L HCl	a	1.79	11.38	12.71	14.78
5	9.6mmol/L HCl	60%EtOH+ 9.6mmol/L HCl	b	14.66	17.83	18.56	未出峰
6	9.6mmol/L HCl	60%EtOH/BuOH (4:1) + 9.6mmol/L HCl	b	13.21	13.35	14.62	19.22
7	9.6mmol/L HCl	60%EtOH/BuOH (3:1) + 9.6mmol/L HCl	b	12.50	12.91	14.08	17.56
8	9.6mmol/L HCl	60%EtOH/BuOH (2:1) + 9.6mmol/L HCl	b	11.60	11.90	13.16	16.63
9	9.6mmol/L HCl	45%IPA/BuOH (2:1) + 9.6mmol/L HCl	c	11.64	11.93	13.36	16.09
10	5%IPA/BuOH (2:1) + 9.6mmol/L HCl	34%IPA/BuOH (2:1) + 9.6mmol/L HCl	c	16.40	17.82	20.35	25.25

* a. 流速为 1mL/min, 梯度变化 B 溶剂 0~100%, 10 分钟。

b. 流速为 1.5mL/min, 梯度变化 B 溶剂 0~100%, 15 分钟。

c. 流速为 1.5mL/min, 梯度变化 B 溶剂 0~67%, 25 分钟。

** 峰明显变小。

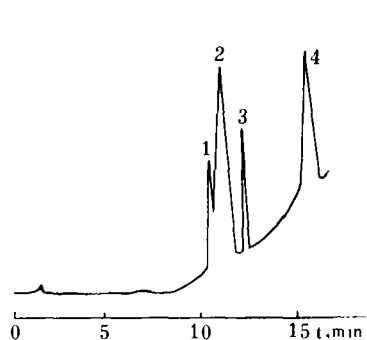


图 1 标准蛋白质的分离色谱图

μ -Bondapak C₁₈ (4.0×200) 流动相 A. 9.6mmol/L HCl 流动相 B. 60%EtOH/BuOH (3:1) + H₂O 梯度 15min
B: 0~100% 流速 1mL/min 225nm 检测
1. RNaseA 2. Lys 3. BSA 4. OVA

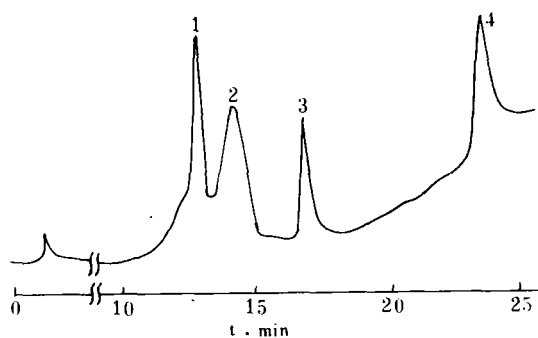


图 2 标准蛋白质的分离色谱图

μ -Bondapak C₁₈ (4.0×200) 流动相 A. 5%IPA/BuOH+9.6mmol/L HCl 流动相 B. 50% IPA/BuOH (2:1) + H₂O 梯度 15min
流动相 B: 0~67% 流速 1.5mL/min 225nm 检测
1. RNaseA 2. Lys 3. BSA 4. OVA

才能有效地分离蛋白质。梯度洗脱中有机溶剂的改变速率对蛋白质的分辨率有较大的影响。为此,本文采用流动相组成为:A溶剂,5%IPA/BuOH(2:1)+9.6mmol/LHCl;B溶剂,50%IPA/BuOH(2:1)+H₂O,考察梯度变化对蛋白质分离的影响。实验表明,梯度速度放慢,色谱峰变宽,但分辨率增大。当梯度时间为38分钟,B溶剂从0变到67%,核糖核酸酶和溶菌酶几乎达到基线分离。梯度速度加快,色谱峰变窄,灵敏度提高,但分辨率降低。流速虽然对分离影响不大,但影响到分析时间和柱压降。

2.4 保留时间和峰高的精密度

表2 保留时间和峰高的精密度 (n=6)

蛋白质	保留时间, min		峰高, mm	
	平均值	标准偏差	平均值	标准偏差
RNaseA	13.27	0.11	53.8	7.7
Lys	14.75	0.23	30.6	3.1
BSA	17.81	0.21	30.9	3.3
OVA	24.58	0.26	32.3	2.2

反相液相色谱分离蛋白质的文献大多报道定性分离,我们进一步考察了蛋白质在反相柱上的保留时间和峰高的精密度情况。如表2所示,四种蛋白质的保留时间都具有较好的精密度。但峰高的相对偏差较大,这可能与蛋白质的特殊保留机理有关。若进一步改进实验梯度装置,提高梯度洗脱的再现性,和采用背景吸收小的有机溶剂作流动相,可以改善峰高的精密度,以利于准确定量测定。

上述实验条件试验表明,采用C₁₈反相柱可以较好地分离蛋白质。为了进一步考察扩展这一色谱系统的使用范围,我们做了小分子肽和免疫球蛋白的分离试验。如图3所示,谷胱甘肽(还原型)在柱上略有保留,而羊免疫球蛋白在反相柱上有较好的保留。溶菌酶、白蛋白、牛血清白蛋白和免疫球蛋白的分子量分别是1.4万、4.5万、6.8万和16万,但它们对应出峰时间分别是15.3、20.3、18.1和18.9分钟,而溶菌酶的峰宽明显大于牛血清白蛋白的峰宽。这些说明蛋白质在反相柱上的保留机理并非单一机理,分子的立体结构可能会影响到它们的疏水性,从而影响到它们在柱上的保留时间。

参考文献

- [1] 波多野博行监修,《液体クロマトグライ-ラタ集》,1983
- [2] J.L. R. Snyder, J. J. Kirkland. Introduction Modern Liquid Chromatography, 1979
- [3] 黄建化,刘文远. 分析化学, 1989; 17: 55
- [4] 刘文远,程广强,福建分析测试, 1994; 3(3): 106
- [5] 阮源萍,刘文远,田小强,赵红. 厦门大学学报(自然版), 1995; 34(4): 582
- [6] 华家桢,色谱, 1991; 9(2): 34
- [7] A. Henschen, WK-P. Hupe et al. HPLC in Biochemistry, 1985
- [8] J. P. Chang, W. R. Melander and C. Horvath. J. Chromatogr. 1985, 318: 11

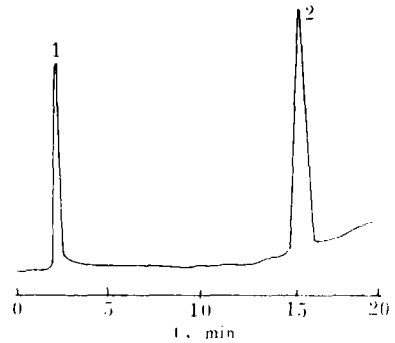


图3 肽和羊免疫球蛋白的分离图

μ -Bondapak C₁₈ (4.0×200) 流动相
A. 5% IPA/BuOH + 9.6mmol/LHCl 流动相
B. 50%IPA/BuOH (2:1) + H₂O 梯度
17.5min B: 0--70%流速 1mL/min 225nm
检测
1. 谷胱甘肽(还原型) 2. 羊免疫球蛋白