

# 凝胶过滤色谱法测定3种不同来源多肽的相对分子质量分布

蒋腾川<sup>1</sup>, 宋新波<sup>1,2,\*</sup>, 张丽娟<sup>1</sup>

(1.天津中医药大学研究生院, 天津 300193; 2.天津中一制药有限公司, 天津 300193)

**摘要:** 目的: 建立凝胶过滤色谱法测定多肽(如大豆肽、白蛋白多肽、羊胎盘多肽)的相对分子质量分布的方法。方法: 采用TSK-GEL G2000SWXL色谱柱(300 mm×7.8 mm, 5 μm)、流动相为乙腈-水-三氟乙酸(15:85:0.07, V/V)、流速0.6 mL/min、柱温30 ℃、进样体积10 μL、检测波长220 nm。结果: 在相对分子质量189.1~12 355之间, 相对分子质量对数与保留时间呈线性关系, 相关系数为0.995 6, 方法精密度、重复性、稳定性良好, 准确度高。结论: 本方法操作简便快速、灵敏度高、重复性好, 适用于多肽类物质相对分子质量分布的检测。

**关键词:** 凝胶过滤色谱法; 大豆; 白蛋白; 羊胎盘; 多肽; 相对分子质量

## Determination of Relative Molecular Weight Distribution of Polypeptides from Three Different Sources by Gel Filtration Chromatography

JIANG Teng-chuan<sup>1</sup>, SONG Xin-bo<sup>1,2,\*</sup>, ZHANG Li-juan<sup>1</sup>

(1. Graduate School, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. Tianjin Zhongyi Pharmaceutical Co. Ltd., Tianjin 300193, China)

**Abstract:** Objective: To establish a method to determine the relative molecular weight distribution of soy peptide, albumin polypeptide and sheep placenta polypeptide using gel filtration chromatography (GFC). Methods: TSK-GEL G2000SWXL (300 mm × 7.8 mm, 5 μm) column was equilibrated with a mobile phase composed of acetonitrile-water-trifluoroacetic acid (15:85:0.07, V/V) at a flow rate of 0.6 mL/min. The column temperature was 30 ℃ and the injection volume was 10 μL. The detection wavelength was 220 nm. Results: A linear relationship between the logarithm of relative molecular weight and retention time was achieved in the relative molecular weight range of 189.1–12 355 with a correlation coefficient of 0.995 6. The precision, repeatability, stability and accuracy of the GFC method were good. Conclusion: This method is simple, rapid, sensitive, and reproducible for the determination of the relative molecular weight distribution of polypeptides.

**Key words:** gel filtration chromatography; soybean; albumin; sheep placenta; polypeptides; relative molecular weight

中图分类号: O657.7

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)24-0312-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201424060

多肽是相对分子质量介于氨基酸与蛋白质之间的一类物质, 其吸收机制与游离氨基酸相比, 具有耗能低、转运速度快、载体不易饱和等优点, 是当今保健食品领域和生物医药领域的研究热点之一<sup>[1]</sup>。传统观点认为蛋白质在体内需经蛋白酶、肠内菌群等作用完全消化为氨基酸才可以被吸收。随着蛋白质多肽类物质消化吸收代谢的深入研究, 科学家们发现由蛋白质水解得到的小肽(一般认为是二肽、三肽)可被机体完整转运, 此后有研究<sup>[2-3]</sup>表明4个以上氨基酸残基组成的寡肽也能被机体直接吸收。吴冬梅等<sup>[4]</sup>对多种多肽在大鼠离体小肠中的吸收情况进行了研究, 认为被吸收肽的相对分子质量多在1 000以内。

多肽除了具有良好的吸收特性外, 还具有众多的生理活性, 如抗菌、抗氧化、抗疲劳、调节免疫、血管紧张素转换酶抑制作用<sup>[5-9]</sup>。多肽的相对分子质量与其生理活性密切相关<sup>[10]</sup>, 是多肽类产品质量控制的关键因素之一, 这就需要建立一种能有效测定多肽相对分子质量的方法。

测定相对分子质量的方法有多种, 如超滤法<sup>[11]</sup>、凝胶电泳法<sup>[12]</sup>、凝胶过滤色谱法<sup>[13-14]</sup>、质谱法<sup>[15-16]</sup>等。其中超滤法只能较为粗略地测定相对分子质量分布, 在分离纯化部分应用较多; 凝胶电泳法存在操作繁琐、重现性差的缺点<sup>[17]</sup>, 且对小肽的相对分子质量测定有很大的局限性, 适用于蛋白质、多肽相对分子质量分布研究的初

收稿日期: 2012-11-20

作者简介: 蒋腾川(1989—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药研究与开发。E-mail: jiangtengchuan@163.com

\*通信作者: 宋新波(1964—), 男, 研究员, 学士, 主要从事中药研究与开发。E-mail: songxinbo@tjutc.edu.cn

期阶段;质谱法能较为精确地测定分子质量分布,但设备昂贵,不宜做常规分析手段<sup>[18]</sup>;凝胶过滤色谱法具有操作简便快速、重复性好、精确度高的特点<sup>[19-20]</sup>,已广泛应用于测定多肽、多糖等大分子物质的相对分子质量及其分布<sup>[21-23]</sup>。本实验采用凝胶过滤色谱法来测定大豆肽、白蛋白多肽、羊胎盘多肽的相对分子质量,旨在为同类产品的生产制备和质量控制提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

相对分子质量标准物质:细胞色素C( $M_r$  12 355)、胰蛋白酶抑制剂( $M_r$  6 511)、人血管紧张素II( $M_r$  1 045.5)、乙氨酰乙氨酰酪氨酰精氨酸( $M_r$  451.2)、乙氨酰乙氨酰乙氨酸( $M_r$  189.1) 中国计量科学研究院;大豆肽(编号:SS12204)、白蛋白多肽(编号:SS12265) 武汉天天好生物制品有限公司;羊胎盘多肽 实验室自制;乙腈(色谱纯) 赛默飞世尔科技(中国)有限公司;其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

LC-20AD高效液相色谱仪(配有SPD-10A紫外检测器、CTO-10A柱温箱) 日本岛津公司;TSK-GEL G2000SWXL色谱柱(300 mm×7.8 mm, 5 μm) 东曹(上海)生物科技有限公司;AL204型电子天平 瑞士Mettler-Toledo公司;Milli-Q超纯水系统仪 美国Millipore公司。

### 1.3 方 法

#### 1.3.1 相对分子质量标准物质溶液的配制

分别精密称取相对分子质量标准物质细胞色素C、胰蛋白酶抑制剂、人血管紧张素II、乙氨酰乙氨酰酪氨酰精氨酸、乙氨酰乙氨酰乙氨酸适量,加超纯水溶解配成2.5 mg/mL的溶液。按1:1(V/V)的比例将上述溶液混合后摇匀,制成0.5 mg/mL的标准物质溶液,用0.45 μm的滤膜过滤备用。

#### 1.3.2 供试品溶液的配制

分别精密称取各样品适量,加超纯水溶解配成5.0 mg/mL的溶液,用0.45 μm的滤膜过滤备用。

#### 1.3.3 色谱条件

色谱柱:TSK-GEL G2000SWXL(300 mm×7.8 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水-三氟乙酸(15:85:0.07, V/V);流速0.6 mL/min;柱温30℃;进样体积10 μL;检测波长220 nm。

### 1.4 统计分 析

采用SHIMADZU GPC数据处理软件分析色谱图。

### 1.5 数均相对分子质量和重均相对分子质量的计算<sup>[20]</sup>

$$\text{数均相对分子质量 } M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} \quad (1)$$

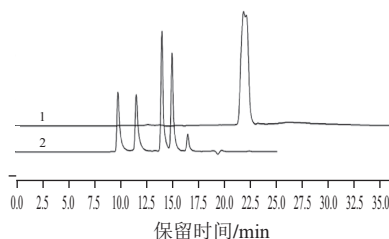
式(1)中: $N_i$ 为第*i*种分子的物质的量; $M_i$ 为第*i*种分子的分子质量。

$$\text{重均相对分子质量 } M_w = \frac{\sum W_i M_i}{\sum W_i} \quad (2)$$

式(2)中: $W_i$ 为第*i*种分子的质量; $M_i$ 为第*i*种分子的分子质量。

## 2 结果与分 析

### 2.1 色谱柱的考察



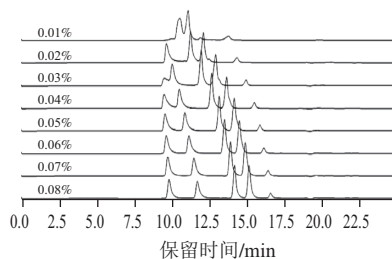
1.普通批次凝胶色谱柱的分离效果;2.特殊批次凝胶色谱柱的分离效果。

图1 凝胶色谱柱对混合标准物质的分离

Fig.1 Selection of column for GFC analysis

考察TSK-GEL G2000SWXL凝胶柱(普通批次)和TSK-GEL G2000SWXL凝胶柱(特殊批次)对混合标准物质分离度的影响,结果显示:采用TSKGEL G2000SWXL凝胶柱(普通批次)时混合标准物质不能实现有效分离,如图1中1号色谱图所示,而采用TSKGEL G2000SWXL凝胶柱(特殊批次)时混合标准物质得到有效分离,如图1中2号色谱图所示,其中最小分离度2.75,最小理论塔板数10 248.8,最大理论塔板数32 146.3。故最后选择TSKGEL G2000SWXL凝胶柱(特殊批次)测定大豆肽、白蛋白多肽、羊胎盘多肽相对分子质量及其分布。

### 2.2 流动相的考察



0.01%~0.08%分别代表流动相中三氟乙酸的体积分数。

图2 流动相的考察

Fig.2 Optimization of the mobile phase

在流动相中乙腈-水为15:85 (V/V) 的前提下, 通过调节流动相中三氟乙酸的体积分数(0.01%~0.08%), 考察三氟乙酸对混合标准物质分离度的影响, 结果显示(图2)混合标准物质分离度随三氟乙酸的体积分数增大而增大, 但考虑到该色谱柱的pH值适用范围为2.5~7.5, 三氟乙酸体积分数过大会对色谱柱造成损伤, 最后将三氟乙酸的体积分数定为0.07%。

2.3 标准曲线的绘制

取混合标准物质溶液, 进样10  $\mu$ L, 记录色谱图, 如图3所示。

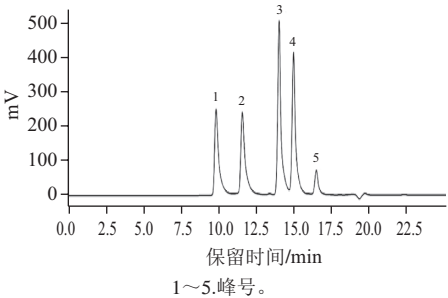


图3 混合标准物质凝胶过滤色谱图  
Fig.3 GFC chromatogram of mixed standards

5种标准物质的保留时间、相对分子质量和相对分子质量对数的关系见表1。

表1 5种标准物质的保留时间和相对分子质量的对应关系  
Table 1 Relationships of retention time with relative molecular weights of five standards

| 峰号 | 相对分子质量<br>标准物质 | 保留<br>时间/min | 相对分子质量  | 相对分子质量<br>对数 (lgM) |
|----|----------------|--------------|---------|--------------------|
| 1  | 细胞色素C          | 9.634        | 12 355  | 4.092              |
| 2  | 胰蛋白酶抑制剂        | 11.292       | 6 511   | 3.814              |
| 3  | 人血管紧张素II       | 13.749       | 1 045.5 | 3.019              |
| 4  | 乙酰乙酰酪氨酸精氨酸     | 14.838       | 451.2   | 2.654              |
| 5  | 乙酰乙酰酪氨酸        | 16.204       | 189.1   | 2.277              |

以标准物质相对分子质量对数lgM对保留时间t做线性回归, 得回归方程为 $\lg M = -0.286t + 6.939$ , 相关系数 $r = 0.9956$ , 说明在相对分子质量189.1~12 355范围内, 5种标准物质相对分子质量对数与保留时间呈良好的线性关系。

2.4 精密度实验

取羊胎盘多肽供试品溶液10  $\mu$ L, 按1.3.3节色谱条件连续进样6次, 测定保留时间为14.8 min左右的主色谱峰的保留时间和峰面积, 计算其相对标准偏差分别为0.040%、0.037%, 表明方法的精密度良好。

2.5 重复性实验

精密称取羊胎盘多肽供试品6份, 每份25 mg, 按1.3.2节制备供试品溶液, 按1.3.3节色谱条件分别进样, 测定保留时间为14.8 min左右的主色谱峰的保留时间和峰面积, 计算其相对标准偏差分别为0.033%、0.273%, 表明方法的重复性良好。

2.6 稳定性实验

取羊胎盘多肽供试品溶液10  $\mu$ L, 按1.3.3节色谱条件分别于取样后0、2、4、6、8、18、24 h进样, 测定保留时间为14.8 min左右的主色谱峰的保留时间和峰面积, 计算其相对标准偏差分别为0.147%、0.255%, 表明方法的稳定性良好。

2.7 准确度实验

精密称取相对分子质量标准物质人血管紧张素II 6份, 加超纯水溶解配成0.5 mg/mL的溶液。按1.3.3节色谱条件分别进样分析, 通过凝胶过滤色谱法得到的相对分子质量与标准物质已知相对分子质量相对照, 基本吻合(表2)。

表2 准确度实验结果  
Table 2 Results of accuracy tests

| 标准物质序号   | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 测得相对分子质量 | 1 021 | 1 021 | 1 029 | 1 025 | 1 020 | 1 030 |
| 已知相对分子质量 | 1 045 | 1 045 | 1 045 | 1 045 | 1 045 | 1 045 |
| 相对误差/%   | -2.30 | -2.30 | -1.53 | -1.91 | -2.39 | -1.44 |

2.8 样品测定

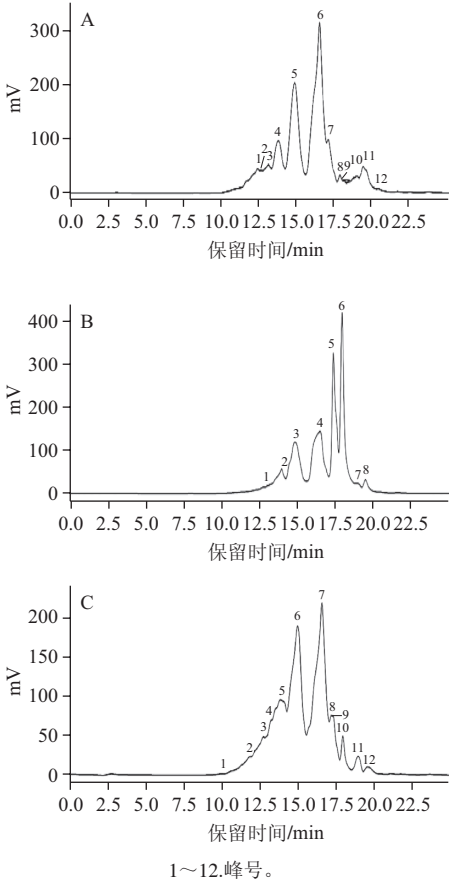


图4 大豆肽(A)、白蛋白多肽(B)、羊胎盘多肽(C)  
凝胶过滤色谱图

Fig.4 GFC chromatograms of soy peptide (A), albumin polypeptide (B), and sheep placenta polypeptide (C)

按1.3.3节色谱条件分别对大豆肽、白蛋白多肽、羊胎盘多肽进样测定,记录色谱图,如图4所示。采用SHIMADZU GPC数据处理软件分别对以上色谱图进行处理。各样品中一些主要色谱峰的保留时间、重均相对分子质量( $M_w$ )、数均相对分子质量( $M_n$ )、多分散系数 $d(M_w/M_n)$ 的基本情况如表3所示。

表3 大豆肽、白蛋白多肽、羊胎盘多肽相对分子质量及其分布的测定结果

Table 3 Relative molecular weights and distribution of soy peptide, albumin polypeptide and sheep placenta polypeptide

| 样品名称  | 峰号 | 保留时间/min | 重均相对分子质量 | 数均相对分子质量 | 多分散系数 |
|-------|----|----------|----------|----------|-------|
| 大豆肽   | 4  | 13.864   | 935      | 913      | 1.02  |
|       | 5  | 14.948   | 459      | 441      | 1.04  |
|       | 6  | 16.598   | 169      | 162      | 1.04  |
|       | 7  | 17.177   | 94       | 93       | 1.01  |
|       | 总计 |          | 604      | 125      | 4.81  |
| 白蛋白多肽 | 3  | 14.857   | 479      | 459      | 1.04  |
|       | 4  | 16.518   | 180      | 172      | 1.05  |
|       | 5  | 17.39    | 87       | 86       | 1.01  |
|       | 6  | 17.959   | 58       | 57       | 1.02  |
|       | 总计 |          | 328      | 100      | 3.27  |
| 羊胎盘多肽 | 5  | 13.846   | 986      | 955      | 1.03  |
|       | 6  | 14.969   | 483      | 462      | 1.04  |
|       | 7  | 16.564   | 180      | 170      | 1.06  |
|       | 总计 |          | 730      | 202      | 3.61  |

从表3可知,大豆肽、羊胎盘多肽、白蛋白多肽的重均相对分子质量都在1 000以下,其中大豆肽的重均相对分子质量主要集中在169~935之间、羊胎盘多肽的重均相对分子质量主要集中在180~986之间,而白蛋白多肽的重均相对分子质量相对较小。

### 3 讨论

根据凝胶过滤原理,同一类型化合物的保留时间与组分的相对分子质量有关,大分子保留时间短,小分子保留时间长,根据标准物质的保留时间与相对分子质量的线性关系便可推算出未知组分的相对分子质量。利用此法测定肽类物质的相对分子质量及其分布具有较高的精密度,而且操作简单、结果可靠,适用于各种来源多肽的相对分子质量及其分布的测定。

蛋白质、多肽类产品的分子质量具有多分散性,所以其分子质量只具有统计平均的意义。用实验方法测定的相对分子质量只是统计平均值,若要确切描述多肽的相对分子质量,除了知道统计平均值外,还应明确多肽的相对分子质量分布。数均相对分子质量( $M_n$ )是根据样品中不同相对分子质量分子的数目统计的平均相对分子质量;重均相对分子质量( $M_w$ )是根据样品中不同相对分子质量分子的质量统计的平均相对分子质量;多分散系数 $d$ 为重均相对分子质量与数均相对分子质量的比值,用以表征样品分子质量的分散程度。 $d$ 值越大,说明分子质量越分散, $d$ 值为1时,说明分子质量呈单分散<sup>[20]</sup>。

在采用酶法水解蛋白质制备多肽的过程中,水解过度会产生苦味肽和大量氨基酸,水解不全将得不到理想的多肽。有报道<sup>[24]</sup>称鸡肉在酶解过程中,其呈味成分会随着水解程度的改变而改变。此外,水解度与酶解产物的乳化性、起泡性、溶解性、稳定性等也具有一定的关系<sup>[25-26]</sup>。因此,在水解过程中必须严格控制蛋白质的水解度。多肽的相对分子质量分布与蛋白质水解度密切相关,可直接客观地反映出水解程度。采用凝胶过滤色谱法测定多肽的相对分子质量分布,对多肽的生产制备和质量控制都具有重要的指导意义。

### 参考文献:

- [1] 曹文红,章超桦.生物活性肽的吸收机制[J].药物生物技术,2006,13(5):384-388.
- [2] 李勇.生物活性肽研究现状和进展[J].食品与发酵工业,2007,33(1):3-9.
- [3] SHIMIZU M, TSUNOGAI M, ARAI S. Transepithelial transport of oligopeptides in the human intestinal cell, Caco-2[J]. Peptides, 1997, 18(5): 681-687.
- [4] 吴冬梅,唐良艳,黄志玲,等.几种多肽在大鼠离体小肠中的吸收[J].药物生物技术,2007,14(5):356-360.
- [5] YANG Xiaohong, XIA Jiangnan, YU Zhijun, et al. Characterization of diverse antimicrobial peptides in skin secretions of Chungan torrent frog *Amolops chunganensis*[J]. Peptides, 2012, 38(1): 41-53.
- [6] SARMADI B H, ISMAIL A. Antioxidative peptides from food proteins: a review[J]. Peptides, 2010, 31(10): 1949-1956.
- [7] BO Yu, LU Zhaoxin, BIE Xiaomei, et al. Scavenging and anti-fatigue activity of fermented defatted soybean peptides[J]. European Food Research and Technology, 2008, 226(3): 415-421.
- [8] 姜红,施用晖,乐国伟,等.木瓜蛋白酶水解马鹿茸制备免疫活性肽的研究[J].氨基酸和生物资源,2008,30(1):72-76.
- [9] 王桂春,吕兵.分步酶解酪蛋白制备小分子ACE抑制肽[J].食品科学,2011,32(21):152-155.
- [10] 陈园园,施用晖,乐国伟.不同分子量大豆低聚糖抗氧化活性与抗疲劳关系研究[J].氨基酸和生物资源,2008,30(2):59-62.
- [11] 张根生,徐倩,费英敏,等.鸡蛋蛋白质水解多肽分子量分布的研究[J].哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2002,18(5):554-555.
- [12] 王旭,何冰芳,李霜,等. Tricine-SDS-PAGE电泳分析小分子多肽[J].南京工业大学学报:自然科学版,2003,25(2):79-81.
- [13] 丁丹华,彭光华,何东平. HPLC法测定油茶籽多肽相对分子质量分布及氨基酸组成[J].中国油脂,2010,35(11):68-71.
- [14] XIE Yanli, LIANG Xinhong, WEI Min, et al. Optimization of glutamine peptide production from soybean meal and analysis of molecular weight distribution of hydrolysates[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(6): 7483-7495.
- [15] TURILLAZZI S, MASTROBUONI G, DANI F, et al. Dominulin A and B: two new antibacterial peptides identified on the cuticle and in the venom of the social paper wasp *Polistes dominulus* using MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF, and ESI-ion trap[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2006, 17(3): 376-383.
- [16] TRAUGER S A, WEBB W, SIUZDAK G. Peptide and protein analysis with mass spectrometry[J]. Spectroscopy, 2002, 16(1): 15-28.
- [17] 谭和平,王彧婕,邹燕,等.蛋白质分子量测试方法概述[J].中国测试,2011,37(2):34-37.
- [18] 孔毅,吴梧桐,吴如金.蛋白质分子量测定方法比较研究[J].分析仪器,2003(2):44-47.
- [19] 汪冰,肖新月,程显隆,等.凝胶排阻色谱法研究阿胶中蛋白质及多肽相对分子质量分布规律[J].药物分析杂志,2009,29(11):1886-1891.
- [20] 贾建萍,周彦钢,鲁健章,等.凝胶渗透色谱法测定胶原肽分子质量及其分布[J].中国卫生检验杂志,2010,20(5):968-973.
- [21] 易剑平,叶晓,钟儒刚.高效凝胶渗透色谱法测定枸杞多糖的相对分子质量[J].中草药,2006,37(2):214-215.
- [22] 陈爱瑛,贾建萍,叶小弟,等.鱼皮胶原蛋白水解液中小分子寡肽的分子量分布测定[J].中国现代应用药学,2011,28(2):160-162.
- [23] 刘妍妍,张丽萍.牛乳酪蛋白源降血压肽的分离及其分子量分布研究[J].中国乳品工业,2006,34(5):26-27.
- [24] 赵谋明,周雪松,林伟锋.鸡肉酶解过程中呈味成分变化规律研究[J].食品科学,2006,27(5):68-72.
- [25] 李玉珍,肖怀秋.大豆分离蛋白不同酶解方式水解度与乳化性和起泡性关系[J].氨基酸和生物资源,2009,31(2):30-32.
- [26] 王洪涛.海参肽的酶法制备工艺及抗疲劳活性研究[D].烟台:烟台大学,2007:2-3.