

研究简报

反相高效液相色谱法分离蛋白质的研究*

张 华 王俊德¹ 钟虹敏 罗丽梅

(大连理工大学染料、表面活性剂精细化工国家重点实验室 大连 116012)

¹(中国科学院大连化学物理研究所 大连 116012)

提 要 采用反相高效液相色谱法考察了几种大孔硅胶烷基键合固定相等度淋洗条件下进行蛋白质分离的色谱性能。研究了冲洗剂中有机溶剂异丙醇的浓度、离子对酸(TFA)浓度对蛋白质保留时间的影响。探讨了蛋白质在RP-HPLC中的保留机理。结果表明,大孔硅胶(20~30nm)短链(C₄和C₈)烷基键合固定相适合蛋白质的分离。

关键词 反相高效液相色谱法,蛋白质分离,大孔硅胶烷基键合固定相

分类号 O658/Q51

1 前言

用反相高效液相色谱法分离蛋白质通常采用低离子强度酸性有机冲洗液和烷基硅胶键合固定相^[1,2]。影响分离的因素主要有流动相组成、洗脱温度、洗脱液 pH 值、离子对试剂和流速等。有利于蛋白质分离的条件于1970年首次提出,即低 pH 值流动相、室温或较高的温度及使用乙腈或异丙醇作为有机部分^[2]。三氟乙酸(TFA)对于蛋白质反相色谱已经被公认是一种较好的流动相添加剂^[3]。

蛋白质的保留性质和选择性还与键合固定相的性质有关。这些性质包括孔径、键合基类型、键合密

度和硅胶残余羟基等。采用大孔硅胶和短链烷基键合固定相在蛋白质分离中具有优势^[4]。Stadalius^[5]认为平均孔径15nm的填料适合20 000(daltons)以下蛋白质的分离,而30~50nm孔径的填料适合大分子量蛋白质的分离。Witting^[4]指出相对短链且不具有支链的键合固定相(如C₄和C₈烷基键合固定相)适合蛋白质的分离。本研究采用几种大孔硅胶短链烷基键合固定相(见表1),考察了几种蛋白质在反相高效液相色谱中的保留性质和不同洗脱条件下蛋白质色谱性质的变化。初步探讨了蛋白质在大孔硅胶烷基键合固定相反相高效液相色谱中的保留机理。

表1 硅胶烷基键合固定相数据
Table 1 Data for silica alkyl-bonded phase

键合固定相 Bonded phase	孔径(nm) Pore size	表面积(m ² /g) Surface area	粒度(μm) Size	键合基 Bonded group	来 源 Source
G80-C ₈	21	44	5	- C ₈ H ₁₇	自己合成(self-synthesis)
SIL300A-C ₄	25	100	10	- C ₄ H ₉	自己合成(self-synthesis)
ES-C ₄	30	—	5	- C ₄ H ₉	ES industris

2 实验部分

2.1 仪器和色谱条件

BHB-II 型恒流泵(大连化学物理研究所仪器厂),7125进样阀(Rheodyne)和UVIDEC-100-IV紫外检测器(JASC)。

所用色谱柱(5mm i.d. × 150mm)为大连化学物理研究所仪器厂产品。以水和异丙醇作为流动相,

在流动相中加入TFA作为离子对试剂,等度淋洗。流速1mL/min,室温,检测波长280nm。

2.2 试剂

蛋白质:胰岛素(insulin, Serva),核糖核酸酶(ribonuclease Cryst., 上海生化所),溶菌酶(lysozyme, Serva),α-球蛋白(α-globulin, Serva)。TFA(EGA-CHEMIE),其它试剂均为分析纯。

* 本项目为国家自然科学基金资助项目
本文收稿日期:1997-01-24,修回日期:1997-05-24

3 结果与讨论

3.1 异丙醇浓度对蛋白质保留时间的影响

图1是流动相中有机溶剂浓度与蛋白质保留时间的关系曲线图。可以看出,大部分蛋白质随着冲洗剂中有机成分的增加,保留值呈U型曲线变化。实验结果与文献报道一致^[6]。这是因为蛋白质保留在有机溶剂为低浓度时是疏水作用的结果;而在有机溶剂高浓度时是极性作用的结果。烷基键合固定相具有非极性有机配体和极性残余羟基,非极性溶质和非极性固定相之间作用力很弱,其分离选择性取决于溶剂效应。溶质与这两种基团的作用,不仅取决于溶质本身的结构,而且与流动相的组成和性质有关,因而随着流动相中有机溶剂浓度的变化,保留值也发生变化。

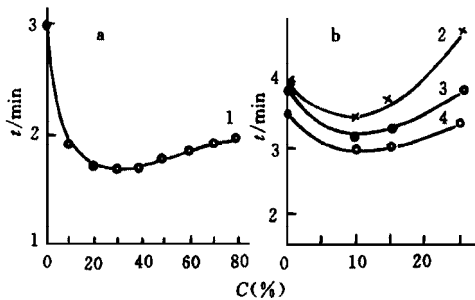


图1 蛋白质保留时间与异丙醇浓度的关系曲线

Fig. 1 Plots of protein retention time vs. 2-propanol concentration

色谱柱 (column): a. G80-C₈, b. SIL300A-C₄; 流动相 (mobile phase): 水 (water) + 异丙醇 (2-propanol) + 0.1% TFA。1. 核糖核酸酶 (ribonuclease), 2. α -球蛋白 (α -globulin), 3. 细胞色素 C (cytochrome C), 4. 溶菌酶 (lysozyme)。

一般认为高含水流动相反相色谱的保留机理是疏溶剂理论。假设溶质与溶剂的疏水作用促使溶质受非极性配体的束缚形成一个缔合物或络合物,则溶质保留不是因为溶质与配体之间的非极性作用,主要是溶质受极性溶剂的排斥力促使键合烷基和溶质发生疏溶剂化缔合。然而键合烷基在硅胶表面不可能很均匀,在采用含水量不同的流动相时,表面残余羟基的极性作用对极性溶质的保留起主导作用。微酸性的硅羟基能与阳离子或氢键基团相互作用,这种作用称为亲硅醇基效应。因而溶质的保留除疏水作用外还有亲硅醇基作用,这种双保留的机理决定了溶质的保留。由于蛋白质分子中所含 -NH₂和

-COOH 等基团的极性和氢键作用都很强,因而流动相中的有机溶剂浓度增大时,蛋白质就会呈现亲硅醇基效应,促使蛋白质的保留值也增加。当有机溶剂浓度小时,蛋白质的保留由疏水作用决定。可见本研究的结果完全符合这种双保留机理。

3.2 反相高效液相色谱分离蛋白质的实验结果

表2是 SIL300A-C₄柱流动相中 TFA 浓度变化与蛋白质保留时间的关系。结果表明, TFA 浓度为 0.1% 时,两种蛋白质均呈现最大保留值。小于或大于这个浓度时,保留值都小。加入 TFA 不仅仅是因为它的低 pH 值,而且还因为它能够起到离子对酸的作用。TFA 能够与蛋白质形成中性络合物,此络合物便可在非极性反相固定相表面疏水缔合而保留。TFA 浓度增加到一定值后,可能由于 TFA 聚集在蛋白质分子周围而增加了络合物在流动相中的溶解度,使蛋白质的保留值减小。

表2 SIL300A-C₄柱流动相中 TFA 浓度与蛋白质保留时间的关系

Table 2 Protein retention time vs. TFA concentration of water mobile phase on SIL300A-C₄ column

TFA (%)	<i>t_R</i> / min	
	Lys	Cyt
0	3.00	3.57
0.05	3.35	3.77
0.10	3.45	3.90
0.20	3.10	3.50

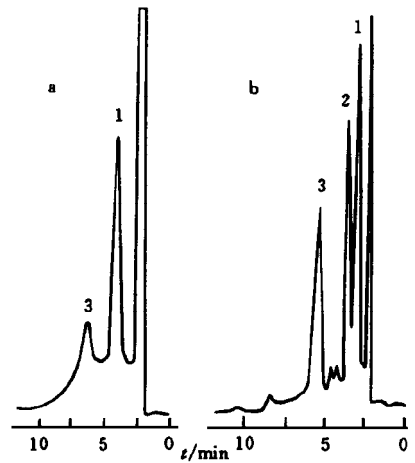


图2 蛋白质色谱分离图

Fig. 2 Chromatograms of proteins

色谱柱 (column): a. G80-C₈ (5 mm × 150 mm), b. ES-C₄ (5 mm × 150 mm); 流动相 (mobile phase): 水 (water) + 0.1% TFA; 流速 (flow rate): 1 mL/min。1. 核糖核酸酶 (ribonuclease), 2. 胰岛素 (insulin), 3. 溶菌酶 (lysozyme)。

图2是两种键合固定相分离蛋白质的色谱图。几种蛋白质在大孔硅胶短链烷基键合固定相上得到良好的分离。相同的蛋白质在两种色谱柱上呈现相近的保留时间。由此可见,大孔硅胶(20~30nm)短链烷基(C₄和C₈)键合固定相适合蛋白质的分离。

参 考 文 献

- 1 Unger K K, Jilge G. J Chrom atogr, 1986, 359: 61-72
- 2 William K, Fred E R. J Chrom atogr, 1986, 358: 119-

128

- 3 Burton W G, Nagent K D, Slattery T K. J Chrom atogr, 1988, 443: 363-379
- 4 Witting L A, Gisch D J, Ludwig L et al. J Chrom atogr, 1984, 296: 97-105
- 5 Stadalius M A, Gold H S, Snyder L R. J Chrom atogr, 1986, 327: 27-45
- 6 Moore R M, Walters R R. J Chrom atogr, 1984, 317: 119-128

Study of Protein Separation by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

Zhang Hua, Wang Junde¹, Zhong Hongmin and Luo Limei

(The State Key Laboratory of Dye and Surfactant Fine Chemicals, Dalian University of Technology, Dalian, 116012)

¹(Dalian Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Dalian, 116012)

Abstract Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) of protein on large pore silica (20-30nm) *n*-alkyl-bonded(C₄ and C₈) phase columns was studied using a trifluoroacetic acid (TFA)/2-propanol mobile phase system. The influence of concentration of organic modifier (2-propanol) and ion-pairing acid(TFA) on the protein retention time was examined. The results showed that the plot of the retention time vs. 2-propanol concentration in mobile phase was U-shaped. The mechanism of protein in reversed-phase high performance liquid chromatography is also discussed.

Key words reversed-phase high performance liquid chromatography, separation of protien, large pore silica alkyl-bonded phase

中国科学院大连化学物理研究所
国家色谱研究分析中心

向您提供气体产品及设备

高效脱氧管

高效脱氧管可在室温下直接除掉 N₂, H₂, Ar, He, CO₂ 和 CO 等气体中的 O₂, H₂O, 从而获得各种超高纯气体。

气体纯化设备

可从多种工艺气体中除掉微量的 O₂, H₂O 及 CO₂ 等, 达到用户满意的纯度。

氮分解制气设备

可产生高纯氮氢混合气, 广泛应用于冶金行业中作热处理保护气及一切需用氢气(氮气存在无影响的情况下)作氢气源或还原性保护气的场合。

电话: 0411-3693411, 传真: 0411-3693407, 联系人: 毕东江、孙凤颖