鱼皮胶原蛋白水解液中小分子寡肽的分子量分布测定

陈爱瑛，贾建萍，叶小弟，程敏，缪云萍，周彦刚，郑高利*(浙江省医学科学院药物研究所，杭州 310013)

摘要：目的 建立测定鱼皮胶原蛋白水解液中小分子寡肽相对分子量分布的方法。**方法** 采用高效凝胶排阻色谱法用 3 根 TSK-GEL G2000SWXL 色谱柱(300 mm×7.8 mm，5 μm)串联，室温；流动相为乙腈-0.1%三氟乙酸溶液(15∶85)，流速 0.6 mL·min^{-1}，检测波长 220 nm。**结果** 在相对分子量 149~2 490 Da 内，寡肽相对分子量的对数与其保留时间具有良好的线性关系(r=0.995 6)；精密度和重复性 RSD 均<0.1%。**结论** 本方法简便准确，重复性好，可作为测定小分子寡肽分子量分布的方法。

关键词：寡肽；分子量分布；测定方法

中图分类号：R977.6　　**文献标志码：**B　　**文章编号：**1007-7693(2011)02-0160-03

Determination of the Molecular Weight Distribution of Small Molecule Oligopeptide in Fish Skin Collagen Hydrolyzate

CHEN Aiying, JIA Jianping, YE Xiaodi, CHENG Min, MIAO Yunping, ZHOU Yangang, ZHENG Gaoli*(*Institute of Medica Materia, Zhejing Academy of Medicine, Hangzhou 310013, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for determining the molecular weight distribution of small molecule oligopeptide in fish skin collagen hydrolyzate. **METHODS** The molecular weight distribution was determined using three TSK-GEL G 2000SWXL columns (300 mm×7.8 mm, 5 μm) in series at room temperature with the mobile phase of acetonitrile-0.1% trifluoracetic acid solution (15∶85) at the flow rate of 0.6 mL·min^{-1}. The detection wavelength was 220 nm. **RESULTS** In the molecular weight range of 149–2 490 Da, there was a good linear relationship between the logarithm of molecular weight of oligopeptide and the retention time(r=0.995 6). The RSD of precision and repeatability were both less than 0.1%. **CONCLUSION** The method is simple, accurate and reproducible for the determination of the molecular weight distribution of small molecule oligopeptide.

KEY WORDS: oligopeptide; molecular weight distribution; determination

许多生理必需的调节因子都是很小的肽类，其活性很大程度上取决于其分子量的大小，生物技术的发展也促进了大量小分子基因工程肽类药物的出现，使得小分子肽的测定及鉴定技术日趋重要。对于蛋白质大分子量分布及其测定有多种方法，如渗透压法、光散射法、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、单柱高效液相色谱以及电喷雾离子化质谱等[1-2]，但未见有小分子寡肽(150~2 500 Da)的分子量分布测定方法的报道。本试验使用供试品鱼皮胶原蛋白水解液是三文鱼经不完全酶解后生产的，采用三根凝胶色谱柱串联，用 HPGPC 测定，结果显示本方法专属性强，重复性好。

1　仪器与试药

WATERS 高效液相色谱仪，510 泵，484 紫外检测器；7125 型手动进样器；N2000 色谱工作站(浙江大学)。成骨生长肽对照品(Mr 1 523 Da，上海新生源生物科技有限公司，批号：60903，纯度>95%)；*L*-甲硫氨基酸(Mr 149 Da，Sigma 公司，批号：78-04-29)；氨基酸序列为 Lys-Leu-Pro-Ser-Thr-Glu-Val-Lys-Glu-Asp-Ser-Ala-Tyr-Gly-Ser-Gln-Ser-Val-Glu-Gln-Arg-Arg 的寡肽(Mr 2 495 Da，批号：319416)、Val-Ser-Lle 的寡肽(Mr 317 Da，批号：315873)及胸腺 5 肽(Mr 680 Da，批号：P00114)均购于杭州中肽生物有限公司(纯度均>95%)。乙腈为色谱纯(进口分装)；三氟醋酸为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)；水为重蒸馏水。供试品(鱼皮胶原蛋白水解液)由本院保健所提供。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

凝胶排阻色谱法：色谱柱：TSK-GEL G2000 SWXL(300 mm×7.8 mm，5 μm)3 根串联，柱温：室温；流动相：乙腈-0.1%三氟乙酸溶液(15∶85)；

基金项目：浙江省科技厅重大专项(2007F10031)；科技厅大仪办(2008F70021)

作者简介：陈爱瑛，女，高级实验师　Tel: (0571) 88215620　E-mail: chay-01@163.com　***通信作者：**郑高利，男，博士，研究员，硕导　Tel: (0571)88215620　E-mail: gaoli-z@163.com

流速：0.6 mL·min^{-1}；进样量：20 μL。检测波长：220 nm。理论板数以成骨生长肽计为 40 000，对照品各峰分离度均>1.2。

2.2 对照溶液的制备

分别精密称取成骨生长肽(Mr 1 523 Da)、胸腺5肽(Mr 680 Da)、*L*-甲硫氨基酸(Mr 149 Da)及氨基酸序列 Lys-Leu-Pro-Ser-Thr-Glu-Val-Lys-Glu-Asp-Ser-Ala-Tyr-Gly-Ser-Gln-Ser-Val-Glu-Gln-Arg-Arg的寡肽(Mr 2 495 Da)、Val-Ser-Lle 的寡肽(Mr 317 Da)对照品各约 2 mg 于 2 mL 量瓶中，用水稀释至刻度摇匀，配成浓度各为 1 mg·mL^{-1} 混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取鱼皮胶原蛋白水解液 10 mL，于 9 000 r·min^{-1} 离心 10 min，取上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤即可。

2.4 专属性试验

取空白溶剂、对照品溶液及供试品溶液各20 μL进样，结果溶剂对测定无干扰，见图1。

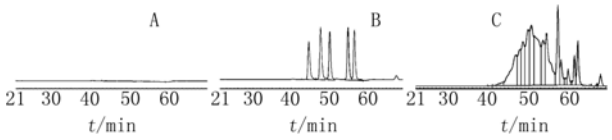

图 1 高效液相色谱图

A–空白溶剂；B–对照品；C–供试品

Fig 1 HPLC chromatograms

A–blank contrast; B–control; C–sample

2.5 标准曲线的绘制

取混合对照品溶液，进样20 μL，记录色谱图，以对照品分子量对数LogMr对保留时间t_R线性回归，得回归方程为LogMr=–0.097 3t_R+7.762 8，r=0.995 6。说明5种对照品分子量对数与保留时间呈良好的线性关系。

2.6 仪器精密度试验

取混合对照品溶液，连续进样5针，各标准物质出峰时间RSD平均值<0.1%，说明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验

取鱼皮胶原蛋白水解液 5 份，按“2.3”项下方法处理，进样测定，将样品中各峰的保留时间代入标准曲线，求出样品中各峰对应的分子量即为测定结果，并计算其平均值及 RSD，结果各峰 RSD 均<0.1%。

2.8 样品测定

取供试品溶液，进样测定，记录色谱图，把保留时间代入标准曲线，结果见表 1。从表中可知Mr>1 500 Da 只占到 11%左右，<150 Da 约为 10%，得出本鱼皮胶原蛋白液水解液分子量为 130~1 500 Da 的寡肽(2~12 个氨基酸)占到 80%左右。

表 1 样品分子量分布结果

Tab 1 Molecular weight distribution in sample

编号	保留时间/min	Mr/Da	峰面积	峰面积百分比/%
1	43.432	>2 500	1 956 253	0.77
2	46.753	1 637	25 233 850	10.01
3	47.803	1 294	13 362 854	5.30
4	48.562	1 092	18 286 412	7.26
5	49.865	815	25 577 754	10.15
6	50.650	684	28 352 124	11.25
7	51.500	565	35 579 688	14.12
8	53.552	357	19 303 974	7.66
9	54.403	295	31 304 702	12.43
10	57.203	157	21 608 644	8.58
11	58.000	131	7 186 064	2.85
12	59.765	<100	3 985 760	1.58
13	61.307	<100	6 278 138	2.49
14	62.175	<100	10 730 050	4.25
15	67.812	<100	3 170 142	1.25

3 讨论

本试验参考文献[3-5]，考察了0.1%三氟乙酸溶液-乙腈不同比例(乙腈-0.1%三氟乙酸溶液分别为45∶55，10∶90，15∶85)对色谱特征的影响。试验结果表明，调整乙腈比例，样品的出峰时间提前，但对分离度没有影响；笔者还考察了三氟乙酸浓度变化，结果显示对样品重复性有较大的影响，初步考虑可能和肽长链状分子结构及柱的球形分子筛孔径及蛋白质的带电荷性有关，具体原理有待进一步研究；又由于柱子填料在有机相中材质容易引起变形，综合考虑最终选择乙腈-0.1%三氟乙酸溶液(15∶85)作为流动相，但在样品测定结束后需用大量0.05%叠氮钠冲洗，以保证柱子使用寿命。

色谱柱的选择，分别以Waters Ultrahydragel^{TM} 120凝胶柱、TSK G2000 SWXL (300 mm×7.8 mm，5 μm)两种不同厂家的色谱柱进行测定。试验结果表明，TSK G2000 SWXL凝胶色谱柱优于Wters Ultrahydragel^{TM}120凝胶柱。为获得图谱更高的分辨率、分离效率和准确性，用3根柱串联，获得了很好的分离度。

REFERENCES

[1] KONG Y, WU W T, WU R J. Comparision of methods used for determination of molecular weight of a newly found

protein [J]. Anal Instrum(分析仪器), 2003(2): 44-46.
[2] SHI L, JI Y P, YING J P, et al. Acid effects on protein molecular weight determination [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2002, 8(30): 938-941.
[3] YANG S P, LIU H J, LIAO H M, et al. The research of thymic peptide and praeparatum quality criteria [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2002, 22(2): 144-145.
[4] WS1-XG-042-2000, Sate Drug Administration(国家药品监督管理局国家药品标准) [S]. 2000: 2.
[5] QB/T 2653-2004, People's Republic of China Light Industry Standard(中华人民共和国轻工业行业标准) [S]. 2004: 4.
收稿日期：2010-03-22