

用前沿色谱法测定蛋白质吸附等温线时增浓方式的研究

边六交 耿信笃*

(西北大学现代分离科学研究所 西安 710069)

摘要 用连续前沿色谱法和断续前沿色谱法测定了七种标准蛋白在疏水色谱填料上的吸附等温线,两种方法之间存在着一定的差别。从流出曲线突跃处斜率测定的不确定性、色谱过程中动力学因素和实验方法本身存在的问题等几个方面探讨了误差的来源,指出了可能解决这一问题的途径。

关键词 迎头色谱法,疏水色谱,蛋白质

1 前言

前沿色谱法是测定吸附等温线的最精密、准确、快速和经济的方法之一,并且与静态法测定结果一致^[1~5]。十几年来,人们已用这种方法研究了不同的小分子和生物大分子在不同色谱填料上的吸附行为^[6~11]。可是,严格来讲,前沿色谱法应当有两种增大流动相中组分浓度的方式:一种即文献报道的方法,在进行一个低浓度组分的前沿分析后,不必将吸附在吸附剂上的组分清洗干净,随之增大流动相中该组分浓度,我们称之为连续前沿色谱法(consecutive frontal chromatography,以 CFC 表示);另一种是在测定一指定浓度下某组分的前沿色谱图后,将色谱柱清洗干净,再作下一指定浓度下的前沿色谱图,我们称之为断续前沿色谱法(non-consecutive frontal chromatography,以 NCFC 表示)。本文旨在通过测定不同蛋白质在疏水色谱填料上的吸附等温线,来比较这两种方法测定结果的接近程度,从而就如何准确测定吸附等温线提出自己的看法。

2 实验部分

吸附等温线的测定是在 LC-94 型(Shimadzu)色谱仪上进行的,检测波长为 280nm。使用微型色谱柱(50×2.0mm),约装 0.3g 疏水填料(端基为 PEG-400)。柱中流动相体积、固定相体积和系统滞留体积分别为 126.6μL,30.5μL 和 615μL。流动相流速为 0.30mL/min。胰岛素(牛胰)、溶菌酶(鸡蛋白)、肌红蛋白(马心)、牛血清蛋白(牛血)和细胞色素-C(单胞菌)均为 Sigma 公司产品。 α -淀粉酶(枯草杆菌)和卵

清蛋白(鸡蛋白)为上海生物制品研究所生产。其余试剂为分析纯。每一种蛋白质的吸附等温线均在合适的盐浓度下测定。

3 结果与讨论

图 1 示出了细胞色素-C 在疏水色谱柱上分别用连续法和断续法所得的前沿色谱图谱。其中曲线 1 为用 CFC 法(B 液变化:0%B→10%B→20%B→30%B)所得的图谱,曲线 2 和 3 分别为用 NCFC 法所测定的在 B 液浓度分别为 20%和 30%条件下的图谱。比较图 1 中曲线 1,2 和 3,可以明鲜地看出:(1)无论是 CFC 还是 NCFC,只要流动相中蛋白质浓度相同,则最后所得图谱的平台是等高的。(2)在这两种前沿色谱洗脱法中,随着蛋白质浓度的增加,各平台的起始时间均变短,且曲线与水平线间的斜率变大。对于其它蛋白,也存在着类似情况。

3.1 吸附等温线的测量

传统上用前沿色谱法测定溶质的吸附量时,是用作流出曲线在拐点处切线的方法求得的。如图 2 中曲线 3 所示,它们分别与两条水平线相交于 A_3' 和 B_3 ,过 A_3' 作 z 轴的垂线 $A_3'C_3$,则 B_3C_3 的中点 D_3 ,即为溶质在柱上的流出时间。这种方法对 NCFC 和 CFC 法均适用。在图 2 的两种流出曲线中,同上法可以分别作出在 10%B,20%B 和 30%B 下细胞色素-C 在 CFC 的流出时间 D_1, D_2, D_3 。其中 O, O_2 和 O_3 分别表示起始时刻或进行下一指定蛋白质浓度前沿色谱的起始时刻。

* 通讯联系人

本文收稿日期:1994 年 7 月 7 日,修回日期:1994 年 10 月 27 日

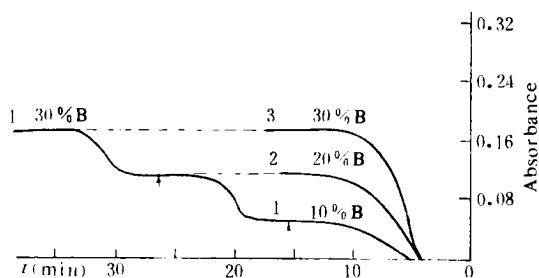


图1 细胞色素-C在连续和断续前沿色谱中的突破曲线
流动相 A 液: 2.91mol/L (NH₄)₂SO₄ + 20mmol/L KH₂PO₄, pH 7.0; 流动相 B 液: A 液+细胞色素-C (0.51mg/mL), pH 7.0.

采用 CFC 时,其吸附量计算公式为:

$$q_{i+1} = q_i + (C_{i+1} - C_i)(V_D - V_0)/V_{sp} \quad (1)$$

其中 q_{i+1} 和 q_i 分别为流动相中溶质浓度分别为 C_{i+1} 和 C_i 时的吸附量(mg/mL), V_D 为溶质在柱上流出体积, V_0 为系统滞留体积, V_{sp} 为柱中固定相的体积。

在 NCFC 法中吸附量的计算公式为:

$$q = (V_D - V_0)C/C_{sp} \quad (2)$$

其中 q 为液相中溶质浓度为 C 时其在固定相的吸附量, V_D, V_0 和 V_{sp} 意义同式(1)。

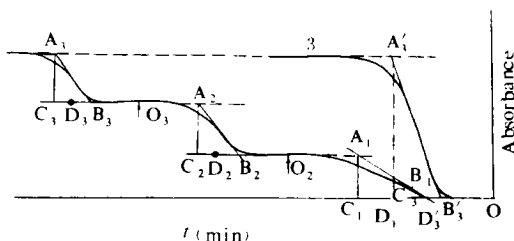


图2 前沿色谱中拐点处斜率测定示意图
色谱条件同图1。

3.2 两种方法所测吸附等温线的比较

图3分别表示了用CFC法(曲线1~7)和NCFC法(曲线1'~7')所测定的七种标准蛋白质在疏水色谱填料上的吸附等温线。比较两种方法所测定的吸附等温线,可以看出:(1)在所测定的浓度范围内,对牛血清蛋白、卵清蛋白、胰岛素、肌红蛋白和溶菌酶,用CFC法测定结果大于用NCFC法所测结果。对细胞色素-C,用CFC法测定结果小于NCFC法的测定结果。对 α -淀粉酶,在低浓度区用CFC法测定结果大于NCFC法的测定结果,而在高浓度区,情况似乎相反。(2)对溶菌酶和牛血清蛋白,用CFC法所测吸附等温线近似为直线型,而用NCFC法所测结果明显弯向于浓度轴。(3)对 α -淀粉酶,用

CFC法所测结果弯向于浓度轴,而用NCFC法测定结果在低浓度区弯向于浓度轴,在高浓度区背离浓度轴,呈现反S型吸附。(4)对细胞色素-C,用两种方法所测结果差别较小,而对其它蛋白,用两种方法所测结果差别较大,且随浓度增大,这两种方法的差别更趋明显。

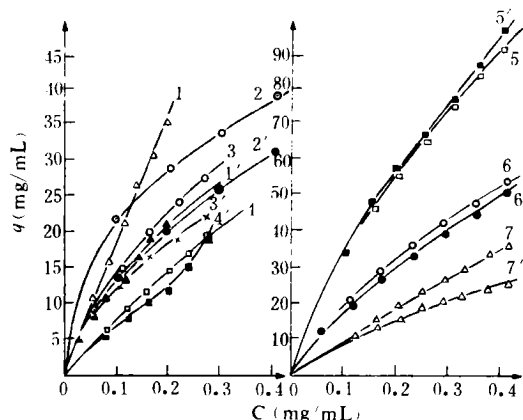


图3 用两种方法所测七种蛋白质吸附等温线的比较
蛋白质:牛血清蛋白(1,1'),卵清蛋白(2,2'),胰岛素(3,3'), α -淀粉酶(4,4'),细胞色素-C(5,5'),肌红蛋白(6,6'),溶菌酶(7,7')。

由以上比较可以看出,在相同实验条件下,不论是吸附量还是吸附等温线形状,用这两种方法所测结果存在着明显的差别,因此,有必要对引起这种差别的原因进行深入地讨论。

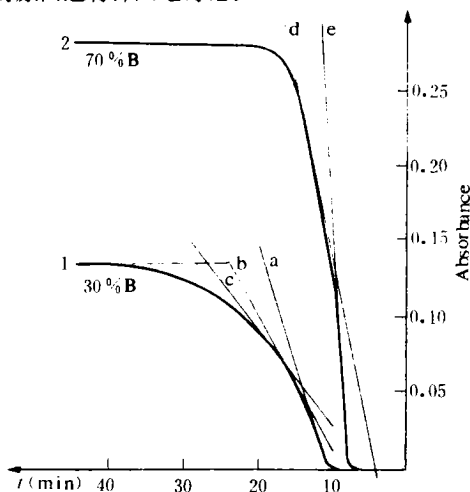


图4 断续前沿色谱中两种典型的突破曲线

1. 溶菌酶在30%B的突破曲线, A 液: 1.80mol/L (NH₄)₂SO₄ + 20mmol/L KH₂PO₄, pH 7.0; B 液: A 液+溶菌酶(2.117mg/mL), pH 7.0. 2. 牛血清蛋白70%B的突破曲线, A 液: 1.44mol/L (NH₄)₂SO₄ + 20mmol/L KH₂PO₄, pH 7.0; B 液: A 液+牛血清蛋白(0.413mg/mL), pH 7.0.

3.3 两种测定方法引起差别的原因

由以上实验可知,对同一体系,在其它条件相同时,用 CFC 法和 NCFC 法所测吸附结果存在着明显差别,而且这种差别程度对不同蛋白质是不同的。同时实验发现,在其它类型填料上也存在着同样问题。那么究竟是什么原因造成了这种差别呢?我们认为主要有以下几个方面的原因:

3.3.1 流出曲线拐点处斜率测定所引起的误差

如上所述,不论是 CFC 法,还是 NCFC 法,吸附等温线的测定均是基于流出曲线在拐点处切线的准确测定。它们的测定误差将明显影响最后吸附量的准确计算,而这又取决于以下几种因素:(1)某些流出曲线变化缓慢没有明显的突跃部分。图 4 中曲线 1 是用 NCFC 法测定的溶菌酶的前沿色谱图。这种图形的特点是:流出曲线变化缓慢而均匀,没有明显的“突跃”,因此,不能准确确定其拐点,给准确测定拐点处的斜率带来困难,在图 4 的曲线 1 中,似乎斜率 a, b 和 c 都可以。(2)一些曲线有多于一个明显的突跃部分,图 4 中曲线 2 所示的用 NCFC 法测定的牛血清蛋白的前沿色谱图即属于这种情况。从图中可以看出,曲线 2 存在着两个明显的突跃部分,而这两个突跃部分有着不同的拐点处的切线 d 和 e 。(3)无论是 CFC 法,还是 NCFC 法,当流动相中蛋白质浓度较低时,突跃都不太明显。另外,当蛋白质被色谱柱强烈吸附时,其流出曲线就会拖得很长。所有这些都影响拐点处斜率的准确测定。(4)在 CFC 法中,第一个点的准确测定是至关重要的,因为它不仅影响到它本身的准确度,而且也直接影响到以后各点的测定准确度。在 CFC 中,各点的吸附值是累积而成的,而这第一个点的准确测定实际上又是比较困难的。这一方面是由于在第一个点时浓度较低,突跃不太明显,另一方面也由于在第一点处不但流出时间拖后,而且其流出曲线也拖得较长。所有这些都影响到拐点处斜率的准确测定。

3.3.2 测定方法本身存在的问题

用测定拐点处斜率的方法来确定吸附量,不仅存在着上述的斜率难以准确测量的困难,而且这种方法本身也存在着一定的问题。因为用测定拐点处斜率的方法来确定吸附量的方法建立的基础是,流出曲线必须完全对称,如图 5a 所示。在图 5a 中,实际吸附量应为曲线 $CGBAOEDC$ 所围成的面积,若流出曲线完全对称,则以拐点处斜率的测定来确定吸附量的方法是可以代表实验结果的,这是因为曲线 $CGBDC$ 所围成的面积与曲线 $DEIFD$ 所围成的

面积相等。但是,若流出曲线不对称,如图 5b 所示,曲线 $C'G'BDC$ 所围成的面积与曲线 $DE'IF'D$ 所围成的面积不等,这样,用这种方法所测结果就会与实际吸附量有一定差别,并且,流出曲线愈不对称,产生的误差亦会愈大。

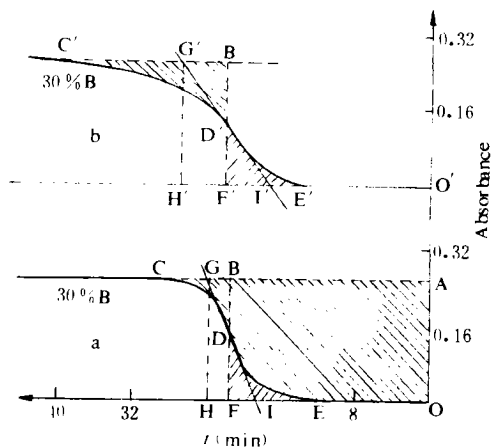


图 5 突破曲线对称性对卵清蛋白吸附量的影响

a. A 液: $0.90\text{mol/L } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 20\text{mmol/L } \text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.0; B 液: A 液 + 卵清蛋白 (1.0mg/mL), pH 7.0.
b. A 液: $1.80\text{mol/L } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 20\text{mmol/L } \text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.0; B 液: A 液 + 卵清蛋白 (1.0mg/mL), pH 7.0.

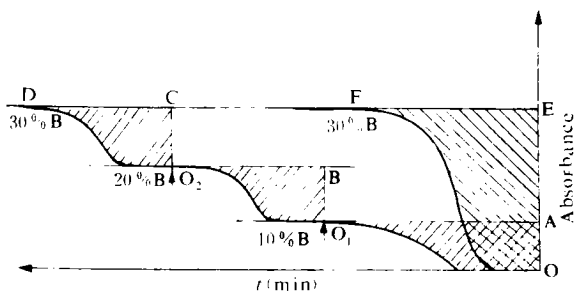


图 6 连续和断续前沿色谱中实际吸附量的比较示意图
色谱条件同图 1。

一般认为,造成流出曲线不对称的原因是由于装柱不均造成的^[3,9]。这一论点是值得怀疑的,因为在同一根色谱柱上,有些蛋白流出曲线是比较对称的,而另一些则明显不对称。另外,对同一蛋白,当流动相中盐浓度不同时,曲线的对称程度亦有较大差别。如卵清蛋白,在 $0.9\text{mol/L } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 下的流出曲线比较对称,而在 $2.1\text{mol/L } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 下有严重的拖滞现象,流出曲线非常不对称。

3.3.3 由动力学差别所造成的差别

在理论上,若色谱体系建立了完全的热力学平衡,则用 CFC 法和 NCFC 法所测结果应当是相同

的,即在图 6 中,由 OAO_1O 、 $O_1BO_2O_1$ 和 O_2CDO_2 三个曲线所围成的面积之和应与由曲线 $OAEFO$ 所围成的面积完全相等。这是因为,若体系完全是可逆的且达到了热力学平衡,则从已经达到吸附平衡的平台 O_1A 或 O_2B 上,再进行吸附从而达到平台 O_2B 或 DC ,与一次性从开始吸附达到最终的吸附平衡是完全等效的,仅与状态的始末有关,而与状态的过程无关。但是,由于受到诸多因素限制,很难使这种吸附过程达到完全的热力学平衡,而且这种不平衡在不同条件下的表现又有可能不一样(如流速增大,可能引起不平衡程度的增加),所以就必然引起这两种方法之间的差别。

另外,还有一种测量方法,就是以溶质在前沿色谱中流出曲线平台的半高与前沿色谱图交点处的时间作为溶质的流出时间,这种方法尽管不存在拐点处斜率的测定问题,但是它同样面临上述 3.3.2 和 3.3.3 所述的问题。

综上所述,用连续前沿色谱法和断续前沿色谱法所测得的吸附等温线的差别,可能来自于测量流出曲线拐点处斜率的不确定性,可能来自于测量方法本身存在的问题,也可能来自于色谱过程中未完全达到热力学平衡等原因。这些问题,有些可以通过改变色谱条件加以解决,而有些则是这种方法本身

所固有的。所以,要彻底解决吸附等温线的准确测量问题,唯一的出路就是要能够解决前沿色谱的流出曲线方程,也只有在获得准确的前沿色谱方程后,才能从理论和实践上彻底解决吸附等温线的准确测量问题。目前,我们正在深入讨论和解决这一问题。

参 考 文 献

- 1 Wang H L *et al.* J Colloid and Interface Sci, 1978;66: 153
- 2 Eltekov Yu A *et al.* Chromatographia, 1985;20:525
- 3 Huang Junxiong, Horvath Cs. J Chromatogr, 1987; 406:285
- 4 de Jong A W J *et al.* J Chromatogr, 1980;193:181
- 5 Jacobson J M *et al.* J Chromatogr, 1984;316:53
- 6 Jacobson J M, Frenz J. J Chromatogr, 1990;499:5
- 7 Ellekov Yu A, Kazakevitch Yu V. J Chromatogr, 1987;395:473
- 8 Huang J X, Guiochon G, J Colloid and Interf Sci, 1989;128:577
- 9 Huang J X, Horvath Cs. J Chromatogr, 1987;406:275
- 10 Low C K C, Batley G E. J Chromatogr, 1986;355: 177
- 11 Koster F, Fndenegg G H. Chromatographia, 1982; 15:743

Studies on the Methods of Increasing Solute Concentration in Determination of Adsorption Isotherms of Proteins with Frontal Chromatography

Bian Liujiao and Geng Xindu

(*Institute of Modern Separation Science, Northwest University, Xi'an, 710069*)

Adsorption isotherms of proteins on the surface of the hydrophobic sorbents were measured by consecutive and non-consecutive frontal chromatography. It was found that significant difference exists between the above two methods. The difference is attributed to the unreliability in the determination of the slope of the inflexion point curve in frontal chromatography, the kinetic factors in chromatographic process and the problems that intrinsically exist in the two methods. A suggestion which is possible to solve this problem is also raised.

Key words frontal chromatography, hydrophobic interaction chromatography, proteins