

高效毛细管电泳法同时测定多种神经肽物质的研究*

傅世江 才丽平 李艳杰*

(中国医科大学呼吸病研究所·化学检测中心 沈阳 110001)

提 要 用0.1 mol/L pH 2.7磷酸缓冲液,在50 μ m \times 60cm 熔融石英毛细管柱中,12kV 电位下对 SP、NKA、NT、SS 及 SP-片段等神经肽物质进行分离测定,对缓冲液及其 pH 值的选择进行研究。结果表明,高效毛细管电泳法 是分析肽物质较为理想的方法。

关键词 高效毛细管电泳法, P 物质, 生长激素释放的抑制因子, 神经激肽, 神经紧张肽

分类号 O658/Q5

1 前言

近年来,人们发现呼吸道内存在多种神经肽类物质,如 P 物质(substance P, SP)、神经激肽(neurokinin, NKA)、神经紧张肽(neurotensin, NT)及生长激素释放的抑制因子(somatostatin, SS)等,它们在哮喘发病中起着重要作用。对于神经肽物质的测定主要是用高效液相色谱法(HPLC)^[1]、放射免疫法(RIA)^[2],由于它们的灵敏度及分离度等因素,使这些方法在定量分析准确性上受到限制。

高效毛细管电泳(HPCE)是80年代后期迅速发展起来的一项新技术,由于它具有高分辨率、高灵敏度、重复性好、自动化程度高等特点,在短短几年里就已成为蛋白质、多肽、核酸及其它生物分子分离和分析的一项重要技术。用 HPCE 测定神经肽已有过报道^[3,4],但其检测限及分离度都不够理想。本文以 0.1 mol/L pH 2.7磷酸缓冲液作流动相,在50 μ m \times 60cm 石英毛细管柱上施加12kV 电压,使 SP、NKA、NT、SS 在35 min 内得到很好的分离。

2 实验部分

2.1 仪器

Waters 公司 Quanta-4000E 毛细管电泳仪, 50 μ m \times 60cm 熔融石英毛细管柱, NEC 433微机。

2.2 试剂

SP、NKA、NT、SS、SP-片段均购自 Sigma 公司,磷酸、磷酸二氢钠均为分析纯。

2.3 实验条件

0.1 mol/L pH 2.7磷酸缓冲液,施加电压12kV、紫外检测214nm,重力法进样,进样时间30s。在此条件下用2010色谱工作站得到各肽物质色谱图(见图1)及积分数据。

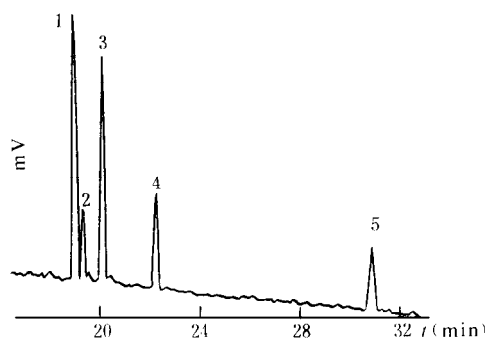


图1 pH 2.7时混合肽标准品的 HPCE 谱图

Fig. 1 Electropherogram of the peptide mixture with buffer pH at 2.7

1. SP, 2. NKA, 3. SS, 4. NT, 5. SP-片段(SP-fragment)。

3 结果与讨论

3.1 实验结果

在上述实验条件下,对该方法的线性、重现性及灵敏度进行实验研究,结果见表1。

3.2 缓冲液对分离测定的影响

我们曾采用 Lee 及 Idei^[3,4]所报道的20 mmol/L pH 2.5甲酸铵为缓冲液进行实验,结果表明其灵敏度低、分离度低、基线不稳定,而用0.1 mol/L pH 2.5磷酸缓冲液则在这几方面远远好于甲酸铵缓冲液。

* 本文收稿日期:1996-01-17,修回日期:1996-03-25

表1 线性方程、变异系数及检测限

Table 1 Results of quantitative analysis

肽 Peptide	回归方程 [*] (1~100mg/L) Regression equation	$\bar{X} \pm SD (n = 6)$	重现性(CV, %) Reproducibility	检测限(mg/L) Limit of detection
SP	$Y = 2.32X - 2.30 (r = 0.998)$	15.14 ± 0.25	1.7	0.6
NKA	$Y = 0.57X + 0.28 (r = 0.999)$	3.59 ± 0.01	0.2	1.0
NT	$Y = 1.17X - 0.81 (r = 0.998)$	12.40 ± 0.10	0.8	0.9
SS	$Y = 1.91X - 0.60 (r = 0.998)$	12.34 ± 0.03	0.2	0.7
SP-片段(SP-fragment)	$Y = 0.98X - 1.89 (r = 0.996)$	8.04 ± 0.03	0.3	1.0

* X: 浓度(concentration, mg/L), Y: 积分面积(integrated area).

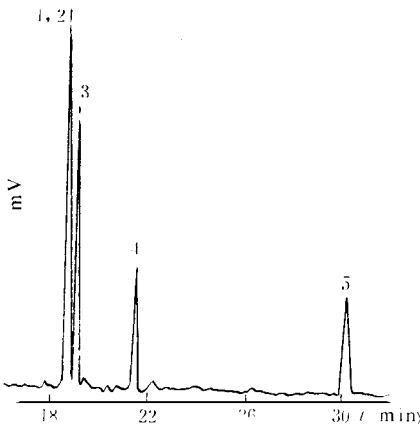


图2 pH 2.5时混合肽标准品的HPCE谱图

Fig. 2 Electropherogram of peptide mixture with buffer pH at 2.5

峰序同图1(Peak No. as in Fig. 1).

3.3 pH 值对分离的影响

对各种肽物质的分离测定,文献报道多用 pH 2.5缓冲液,本文用0.1mol/L pH 2.5缓冲液试验,结果 SP 同 NKA 未分开(见图2)。随着 pH 值的增大,各峰保留时间变大,在 pH 2.7时,SP 同 NKA 得到较好的分离,分离度 R_s 达到 0.8(见图1)。

参 考 文 献

- 1 Lovelace J L, Kusmierz J J, Desiderio D M. J Chromatogr, 1991; 562: 573
- 2 Lee H G, Desiderio D M. J Chromatogr, 1994; 666: 271
- 3 Lee H G, Desiderio D M. J Chromatogr, 1994; 655: 9
- 4 Idei M, Mezo I, Vadasz Z *et al.* J Chromatogr, 1993; 648: 251

The Simultaneous Analysis of Substance P, Somatostatin, Neurokinin and Neurotensin by Capillary Zone Electrophoresis

Fu Shijiang, Cai Liping and Li Yanjie^{*}

(Respiratory Disease Research Institute, Centre of Chemical Detection^{*},
China Medical University, Shenyang, 110001)

Abstract Neuropeptides play an important part in several different areas of neurochemistry. Recently, capillary electrophoresis(CE) was developed for analysis of neuropeptides. This paper reports a capillary zone electrophoretic method for the simultaneous separation and quantitative determination of the substance P (SP), somatostatin(SS), neurokinin(NKA) and neurotensin(NT). The separation was performed on a 50 μ m \times 60cm fused-silica capillary using 0.1mol/L at pH 2.7 phosphate as buffer. The eluted fractions were detected at 214nm.

Key words high performance capillary zone electrophoresis, substance P, somatostatin, neurokinin, neurotensin