

醋酸-水流动相体系中硅胶键合相上 生物大分子保留行为的研究

张养军, 申烨华, 张启东, 耿信笃

(西北大学现代分离科学研究所 现代分离科学陕西省重点实验室, 陕西 西安 710069)

摘要 提出了以醋酸-水作为流动相的体系中,在 ODS 柱上分离生物大分子的反相高效液相色谱(RPLC)方法。实验结果表明,醋酸-水的洗脱能力强于甲醇-水-三氟醋酸体系,在一定程度上克服了色谱分离中一些蛋白质的不可逆吸附且具有便于冷冻干燥的优点。用参数 Z (1 mol 溶剂化溶质被溶剂化固定相吸附时从两者接触表面释放出置换剂的摩尔总数) $\log I$ (与 1 mol 溶质对固定相亲和势有关的常数)和 j (与 1 mol 溶剂对固定相亲和势有关的常数)对 9 种蛋白质在此流动相体系中的保留进行了表征。该流动相使在 RPLC 中用于分离生物大分子的三元流动相体系成为二元流动相体系,更适合于理论研究。同时得出结论:在醋酸-水体系中,蛋白质与固定相之间的作用力主要为非选择性作用力;蛋白质在醋酸-水和甲醇-水-三氟醋酸两种流动相体系中的分子构象变化不同。

关键词:反相高效液相色谱法;计量置换;生物大分子

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2000)06-0487-04

1 前言

反相高效液相色谱(RPLC)常用的流动相一般为水及与之互溶的有机溶剂体系。在分离生物大分子时,还要在流动相中加入离子对试剂,如三氟醋酸(TFA)等,以增强流动相的洗脱能力;强酸性流动相还可抑制硅胶键合相未被覆盖的硅羟基解离以减少对蛋白质的不可逆吸附。有机试剂除易燃、易爆,甚至对人体有害外,当其用于规模生产时,还需要特别的安全防护措施。此外,还因其冰点甚低,难以用冻干法获得固体蛋白,从而促使人们寻求 RPLC 中新的流动相。Welinder 等^[1]在聚合物基质的反相色谱柱上,用乙腈-水-乙酸和异丙醇-水-乙酸流动相对一些多肽、蛋白质和复杂的生物组织的乙酸提取物进行了有效的分离。由于聚合物基质遇到有机溶剂易溶胀且不如硅胶基质键合相应用广泛,因而使其应用受到限制。

近年来,色谱学家对溶质在 RPLC 上的保留行为进行了广泛而深入地研究,提出了许多保留模型,计量置换保留模型(stoichiometric displacement model for retention,简称 SDM-R)就是 4 个公认的对小分子溶质的理论模型之一^[2,3],同时也是描述生物大

分子的唯一的理论模型。SDM-R 的数学表达式为:

$$\log k' = \log I - Z \log a_D \quad (1)$$

式中 k' 为容量因子; a_D 为流动相中有机溶剂或置换剂的活度; Z 为 1 mol 溶剂化溶质被溶剂化固定相吸附时从两者接触表面释放出的有机溶剂或置换剂的摩尔总数; $\log I$ 表示一个与 1 mol 溶质对固定相亲和势有关的常数。因式(1)中 $\log I$ 和 Z 是一个常数,故式(1)为线性方程。

SDM-R 还可进一步演变为^[4]:

$$\log I = jZ + \log \varphi \quad (2)$$

式中 j 为与 1 mol 溶剂分子对固定相亲和势有关的常数,与溶质的性质无关; φ 为热力学方法定义的相比,即溶质在液-固两相分配系数等于 1 时的 k' 值或溶质的保留自由能变为零时的 k' 值。

理论与实践已证明,SDM-R 中的线性参数可很好地用于在限定条件下表征溶质的种类、大小和空间效应以及流动相中置换剂的强度和固定相的特性,如 Z 值可用于生物大分子构象的表征^[5,6]。此外,通过考察 $\log I$ 和 Z 值之间是否存在线性关系^[7],可以判断生物大分子与固定相之间相互作用力的性质和色谱类型。 j 又可用于判断流动相中置换剂参与计量置换过程的程度以及溶剂的洗脱能

收稿日期 2000-02-28,修回日期 2000-04-21

基金项目 国家自然科学基金资助课题(29675017,39880003)

作者简介 张养军(1963-),男,博士,高级工程师。

通讯联系人 耿信笃,男,教授,电话(029)8303817,E-mail:xdgeng@nwu.edu.cn。

力^[4], j 值越小, 表明流动相的洗脱能力越强。本文对醋酸-水流动相在十八烷基键合相(ODS)上的应用及理论两方面进行了深入研究; 用 SDM-R 理论中的各项参数对醋酸-水体系中硅胶键合相上生物大分子的保留行为进行了表征。

2 实验部分

2.1 仪器及材料

高效液相色谱仪(分析型 LC-6A, 岛津公司)包括双泵、梯度洗脱体系、主机控制系统、数据处理系统、手动进样阀; 可变波长紫外-可见光检测器和记录仪(上海大华仪器厂)。色谱柱为 100 mm × 4.0 mm i. d. 不锈钢管柱, 用匀浆法装柱, ODS 填料(Vy-dac, 7 μm, 30 nm, 本所合成)。市售二次蒸馏水。

2.2 试剂

甲醇、醋酸(分析纯, 西安化学试剂厂); 三氟醋酸(TFA)(MERK, Schuchardt)。细胞色素-C(Cyt-C)、肌红蛋白(Myo)、核糖核酸酶(RNase)、溶菌酶(Lys)、牛血清白蛋白(BSA)、胰岛素(Ins)、碳酸酐酶(CA)、α-淀粉酶(α-Amy)、β-乳球蛋白(β-Lact)和大豆胰蛋白酶抑制剂(Trp)(Sigma 公司); 鸡白蛋白(Ova)(上海生化所)。

标准蛋白溶液 称取标准蛋白质并用 pH 7.0 的磷酸钠缓冲溶液配成质量浓度为 5.0 g/L 的标准蛋白溶液, 置于 4 °C 冰箱中备用。

2.3 实验方法

2.3.1 7 种标准蛋白质的色谱分离 分别在线性梯度甲醇-水-TFA 体系[体积分数为 40% 的 CH₃OH + 体积分数为 0.1% 的 TFA (A 液) → 体积分数为 100% 的 CH₃OH + 体积分数为 0.1% 的 TFA (B 液)] 和醋酸-水体系[体积分数为 40% 的 CH₃COOH 水溶液(A 液) → 体积分数为 100% 的 CH₃COOH (B 液)], 梯度时间皆为 30 min, 流速为 0.8 mL/min 和检测波长为 280 nm 的条件下对 7 种标准蛋白质进行色谱分离。进样体积为 10 μL ~ 50 μL。

2.3.2 Z 值和 log I 值的测定 测定这两个参数值所需的等浓度由溶剂程序控制系统控制 A 液和 B 液得到。每改变一次流动相浓度, 先用 20 倍柱体积的流动相平衡, 然后测定不同蛋白液的保留时间。死时间用蛋白质不保留时的时间表示。

3 结果与讨论

3.1 醋酸-水流动相与甲醇-水-TFA 流动相对蛋白质分离的比较

图 1 给出了 7 种蛋白质在本所合成的 C₁₈ 硅胶键合相上于两种流动相体系中的色谱分离图。由图 1 可见, 两种流动相体系均能将 7 种蛋白质分开。从保留时间长短看, 醋酸-水体系的洗脱能力强于甲醇-水-TFA 体系, 但其分离效果略差于甲醇-水-TFA 体系。两种流动相的分离能力的主要区别在于 RNase 和 Myo 的分离效果不同。在甲醇-水-TFA 流动相中, RNase 有两个峰, 这是由于在室温条件下, RNase 的天然结构与变性体之间存在一个可逆的、缓慢的平衡, 导致峰形变宽且出现两个峰。如果提高分离温度至 37 °C, RNase 则呈现单一尖峰。此时 RNase 是以单一的分子构象存在^[8]。而在醋酸-水流动相中, RNase 是以一个很窄的色谱峰被洗脱下来, 此时, 它在醋酸-水流动相中是以单一的分子构象存在。Myo 与 RNase 的情况类似, 在甲醇-水-TFA 体系中被完全分为两个峰, 这是由于 Myo 在甲醇-水-TFA 体系中也是以两种分子构象存在, 而在醋酸-水体系中则以单一的分子构象存在所致。

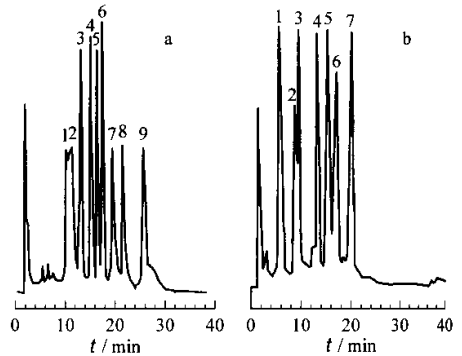


图 1 标准蛋白在甲醇-水-TFA 体系(a)和醋酸-水体系(b)中的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of standard proteins by methanol-water trifluoroacetic acid mobile phase(a) and acetic acid-water mobile phase(b)

- a. 1, 2. RNase; 3. Ins; 4. Cyt-C; 5, 7. Myo; 6. Lys; 8. BSA; 9. Ova.
- b. 1. RNase; 2. Ins; 3. Cyt-C; 4. Lys; 5. Myo; 6. BSA; 7. Ova.

3.2 醋酸-水体系中 α-Amy 的保留行为

醋酸-水体系与甲醇-水-TFA 体系对 α-Amy 的保留行为有很大的不同。如图 2 和图 3 所示, 以甲醇-水-TFA 作流动相时, α-Amy 在 ODS 柱上有很强的非特异性吸附。在连续进样 3 次, 每次进样量高达 100 μg 时, 到第 3 次进样才有 α-Amy 的色谱峰出现。而且在梯度洗脱完成后, 连续进行 3 次空白梯

度洗脱,如图2中的曲线3所示,仍不能将 α -Amy完全洗脱下来。然而,在醋酸-水体系中, α -Amy仅做一次进样且进样量只有50 μ g,就会有一个如曲线2所示的峰形对称且高得多的色谱峰出现,然后仅用一次空白梯度洗脱,色谱图3中的色谱洗脱曲线3与该图中的色谱洗脱曲线1所示的进样前的空白梯度没有明显的区别。由此可见,醋酸-水流动相有可能解决生物大分子在反相色谱中存在的洗脱不完全的问题。图2和图3的不同,可解释为高浓度的醋酸(pH为1.5~2)较甲醇-水-TFA体系中的低浓度的TFA更能有效地抑制硅羟基的离解,减少了蛋白质与固定相之间的非特异性吸附,并且与甲醇-水-TFA体系中的TFA功能一样,醋酸与 α -Amy形成了变性产物,有利于蛋白质从固定相上洗脱下来而进入流动相中。

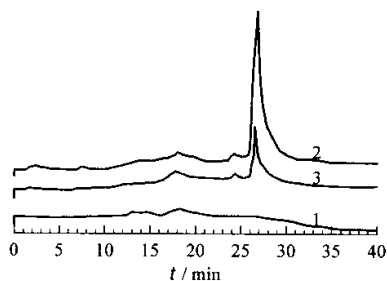


图2 甲醇-水-TFA体系对 α -Amy的分离

Fig.2 Chromatogram of α -Amylase with methanol-water-TFA

1. 空白; 2. α -Amy 样品; 3. 洗脱完成后空白。
1. blank ; 2. α -Amylase sample ; 3. blank after elution.

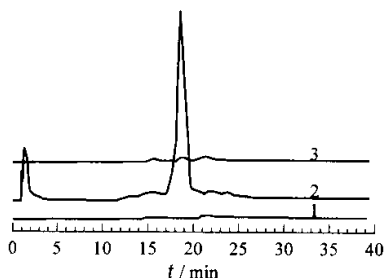


图3 醋酸-水体系对 α -Amy的分离

Fig.3 Chromatogram of α -Amylase with acetic acid-water

1. 空白; 2. α -Amy 样品; 3. 洗脱完成后空白。
1. blank ; 2. α -Amylase sample ; 3. blank after elution.

3.3 用 $Z \log I$ 和 j 值对蛋白质在醋酸-水分离体系中保留行为的表征

为进一步研究醋酸-水流动相用于理论研究的

可能性,选用9种标准蛋白质测定其在醋酸-水体系中的 k' 值,并以 k' 的对数对不同醋酸浓度作图求得 $Z \log I$ 和线性相关系数 r (见表1)。

表1 醋酸-水体系中9种标准蛋白质的 $Z \log I$ 和 r 值

Table 1 The values of $Z \log I$ and r of nine proteins with mobile phase of acetic acid-water

溶质 Solute	Z	$\log I$	r
RNase	7.62	7.09	0.997 5
Myo	8.81	9.82	0.994 0
Cyt-C	16.28	16.30	0.995 3
Ins	17.51	17.06	0.997 3
Lys	26.63	28.05	0.999 2
β -Lact	33.40	36.91	0.994 2
α -Amy	41.37	44.37	0.998 2
CA	40.44	44.81	0.999 9
Trp	46.22	49.56	0.993 4

从表1中的线性相关系数 r 值均大于0.99可知,用公式(1)求得的 Z 和 $\log I$ 值是准确的。为了研究醋酸-水体系中不同蛋白与反相固定相的作用力类型,用表1中的数据,以 $\log I$ 对 Z 作图求得公式(2)中的 j 值为1.11,线性相关系数 r 为0.9986,显示出 $\log I$ 与 Z 之间具有良好的线性关系,而且,由于求得的 j 值(1.11)与醋酸-水体系中 j 的理论值(1.24)接近,表明SDM-R模型可以成功地用于该体系的研究,并可确定在该流动相中所选蛋白与固定相的作用力主要为非选择性的疏水相互作用力。此外, $j_{\text{醋酸}}$ 的理论值(1.24)小于 $j_{\text{甲醇}}$ 的理论值(1.39),这一结果进一步证实了醋酸-水体系的洗脱能力强于甲醇-水-TFA体系的洗脱能力。

3.4 甲醇-水-TFA体系和醋酸-水体系中 Z 和 $\log I$ 值的比较

为了更深入地研究这两种流动相体系,将耿信笃^[2]的有关Ins、Cyt-C和Lys3种蛋白质在甲醇-水-TFA流动相体系中的 Z 和 $\log I$ 值列于表2中。从表1和表2看出,Ins、Cyt-C和Lys在醋酸-水体系中的 Z 和 $\log I$ 值皆小于甲醇-水-TFA体系中的 Z 和 $\log I$ 值,再次证明醋酸-水体系的洗脱能力强于甲醇-水-TFA体系的洗脱能力。另外,以醋酸-水体系中这3种蛋白质的 Z 值对甲醇-水-TFA体系中这3种蛋白质的 Z 值作图并不呈现线性关系,这表明蛋白质在醋酸-水流动相体系中的构象变化不同于其在甲醇-水-TFA流动相体系中的构象变化^[9]。

表 2 3 种蛋白质在甲醇-水-TFA 体系中的
 Z 和 $\log I$ 值^[2]

Table 2 The values of Z and $\log I$ of three proteins
with mobile phase of methanol-water-TFA

溶质 Solute	Z	$\log I$
Ins	24.4	27.9
Lys	47.0	56.3
Cyt-C	51.2	59.8

4 结论

(1) 提出了在 ODS 柱上用醋酸-水作流动相分离生物大分子的色谱方法,该方法克服了有机溶剂所具有的易燃、易爆、有毒的缺点,便于制备和工业化中冷冻干燥,而且使三元流动相体系变为二元流动相体系,更易于进行理论研究。

(2) 醋酸-水流动相体系比常用的甲醇-水-TFA 流动相体系的洗脱能力强,并通过二者 Z 和 $\log I$ 值的比较,以及 j 的理论与实验值的大小对此进行了说明,为该新流动相用于理论研究提供了依据。

(3) $\log I$ 对 Z 值之间作图所得的良好线性表明,在醋酸-水流动相体系中蛋白质与固定相之间的作用力为非选择性的疏水作用力。

(4) 用醋酸-水及甲醇-三氟醋酸-水中所得的 Z 值作图,发现二者不具有线性关系,说明蛋白质在两种体系中的构象变化不同。

参考文献:

- [1] Welinder B S, Sorensen H H. *J Chromatogr*, 1991, 537: 181-127
- [2] Geng X, Regnier F E. *J Chromatogr*, 1984, 296: 15-30
- [3] Valko K, Snyder L R, Glajch J L. *J Chromatogr*, 1993, 656: 501-511
- [4] GENG Xin-du(耿信笃). *Science in China, Series B(中国科学. B 辑)*, 1995, 25(4): 364-371
- [5] SHI Ya-li, GENG Xin-du(时亚丽, 耿信笃). *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)*, 1994, 22(5): 453-456
- [6] WEI Yin-mao, CHANG Xiao-qing, GENG Xin-du(卫引茂, 常晓青, 耿信笃). *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)*, 1997, 25(4): 396-399
- [7] SONG Zheng-hua, GENG Xin-du(宋正华, 耿信笃). *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 1990, 48: 237-241
- [8] Hancock W S, Sparrow J T. *High performance liquid chromatography*. Orlando, Florida: Acad Press Inc, 1983. 49-50
- [9] Chang J, Guo L, Geng X. *Chromatographia*, 1992, 34(11/12): 589-596

Studies on Retention Behaviour of Biopolymers on Silica-Based Binding Stationary Phase in the Mobile Phase of Acetic Acid-Water

ZHANG Yang-jun, SHEN Ye-hua, ZHANG Qi-dong, GENG Xin-du

(Shaanxi Provincial Key Laboratory of Modern Separation Science, Institute of Modern Separation Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: The reversed-phase chromatographic method consisting of acetic acid-water as a new mobile phase for separating biopolymers on ODS column is presented. The new mobile phase may overcome the weak points of irreversible adsorption in chromatographic separation to some degree and difficulty in concentrating proteins with lyophilization and reduce the three-component (organic solvent, ion-pairing agent and water) of typical mobile phase to two component system. Based on the retention and Z (the number of solvent molecules involving in the displacement from stationary-phase surface), $\log I$ (a constant relating to the affinity of 1 mol of solute to the bonded stationary phase), and j (a constant relating to the affinity of 1 mol of solvent to the bonded stationary phase), the elution strength of acetic acid-water mobile phase was found to be stronger than that of methanol-water-TFA. From a good linear relationship between $\log I$ and Z , it can be concluded that the interaction force between proteins and RPLC stationary phase with acetic acid-water as mobile phase is non-selective hydrophobic interaction forces. In addition, the molecular conformations of protein in acetic acid-water and methanol-trifluoroacetic acid-water were found to be different.

Key words: reversed-phase high performance liquid chromatography; stoichiometric displacement; biopolymer