

凝胶过滤色谱法测定蛋白胨中多肽的 相对分子质量分布

吕娟^{1#}, 周刚^{2#}, 李振莲¹, 杜艳¹, 朱叶青^{1*}

(1. 呼和浩特市食品检验所, 呼和浩特 010090; 2. 内蒙古自治区药品检验研究院, 呼和浩特 010010)

摘要: **目的** 建立凝胶过滤色谱法测定蛋白胨中多肽相对分子质量的方法。**方法** 样品以水作为提取剂, 磷酸二氢钠与磷酸氢二钠溶液作为流动相(pH 6.8), 流速 0.8 mL/min, 用 BioSeP 5 μ m SEC-s2000 柱进行分离, 由 GPC 软件通过线性关系计算得出样品的具体相对分子质量。**结果** 相对分子质量在 451~150000 之间时, 相对分子质量的对数与保留时间呈曲线关系, 相关系数为 0.9971, 方法的精密性、重复性、准确性、稳定性的相对标准偏差均在 3%之内。**结论** 该方法操作简单、灵敏度高, 适用于多肽类物质相对分子质量分布区间的确定。

关键词: 凝胶过滤色谱法; 相对分子质量; 蛋白胨; 多肽

Determination of relative molecular mass distribution of polypeptides in peptone by gel filtration chromatography

LV Juan^{1#}, Zhou Gang^{2#}, LI Zhen-Lian¹, DU Yan¹, ZHU Ye-Qing^{1*}

(1. Institute of Hohhot Food Inspection, Hohhot 010090, China; 2. Inner Mongolia Autonomous Region Drug Testing Institute, Hohhot 010010, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination relative molecular mass of polypeptides in peptone by gel filtration chromatography. **Methods** The sample was separated by BioSeP 5 μ m SEC-S2000 column at a flow rate of 0.8 mL/min using water as the extraction agent, sodium dihydrogen phosphate and sodium disodium phosphate solution as the mobile phase (pH 6.8). The specific relative molecular weight of the sample was calculated by GPC software through linear relationship. **Results** When the relative molecular mass was between 451 and 150000, the logarithm of the relative molecular mass is curving with the retention time, and the correlation coefficient was 0.9971. The relative standard deviation of the precision, repeatability, accuracy and stability of the method were all within 3%. **Conclusion** The method is simple, sensitive and suitable for determining the distribution interval of relative molecular weight of peptides.

KEY WORDS: gel filtration chromatography; relative molecular mass; peptone; polypeptide

基金项目: 科技部“食品安全关键技术研发”重点专项项目(2017YFC1601400)

Fund: Supported by the Key Projects of Ministry of Science and Technology of China (2017YFC1601400)

#吕娟和周刚为共同第一作者。

#LV Juan and ZHOU Gang are the co-first authors.

*通讯作者: 朱叶青, 主任药师, 主要研究方向为食品、药品检测。E-mail: hhhtzyq@sina.com

*Corresponding author: ZHU Ye-Qing, Chief Pharmacist, Hohhot Food Inspection Institute, Horqin South Road, Hohhot International Student Pioneer Park, Hohhot 010090, China. E-mail: hhhtzyq@sina.com

1 引言

蛋白胨(peptone),是将肉、酪素或明胶用酸或蛋白酶水解后干燥而成的外观呈淡黄色的粉剂,具有肉香的特殊气息。蛋白胨作为微生物培养基的主要原料,在抗生素、医药工业、发酵工业、生化制品及微生物学科研等领域中的用量均很大。不同的生物体需要特定的氨基酸和多肽,因此存在着多种蛋白胨。研究蛋白胨中多肽的组成,可以为蛋白胨生产规模的扩大、生产工艺的完善、技术水平的提高给与一定的理论依据。

多肽的分子量较小,结构比蛋白质简单,是一类由 2~16 个氨基端通过肽键连接的化合物,具有调节机体生理功能和为机体提供营养的双重功效^[1]。生物活性肽(bioactive peptides)是蛋白质经过特征酶或生物降解后产生的具有显著的生物学活性且由数个至数十个氨基酸组成的肽类混合物即蛋白水解产物(protein hydrolysates)^[2]。生物活性肽的生理功效明显、来源丰富、安全性高,可被开发为功能食品、医药及化妆品等具有高附加值的生物制品。蛋白胨中多肽来源丰富,原料组成复杂,它的分离、纯化是多肽深入研究的良好基质。

不同原料,不同的制备条件,获得的同一活性的肽具有相似的分子量,如抗氧化肽、降血压肽、抗癌肽和免疫调节肽的分子量一般较小,而抗菌肽主要是大分子量的肽,在矿物质结合活性肽中既有小分子量(<1000)的肽,也有大分子量(>1000)的肽^[3]。可见肽功能的研究需要建立一种能测定多肽相对分子质量的方法,以满足多肽的各方面研究。

目前多肽类物质的开发研究还处于初级阶段,很大程度上限制了多肽类物质的有效利用,根据多肽物质性质不同采用适当方法分离纯化多肽物质是生物技术实现产业化的关键^[4]。目前,多肽的纯化方法主要有:凝胶过滤色谱^[5]、超滤法^[6]、离子交换色谱^[7]、高效液相色谱^[8]、气相色谱^[9]、亲和色谱^[10]、薄层层析^[11]等。其中凝胶过滤色谱法、超滤法最为常见。凝胶过滤色谱法是一种简便而有效的液相柱层析技术。它利用某些化学惰性的多孔网状结构的物质为填料,通过洗脱液的连续洗脱,使混合物中的各种物质按其分子大小不同而得到分离^[12]。凝胶过滤法分离条件温和、产品回收率高、生物活性好、工作范围广、分离分子量的覆盖面大,可分离百至数万分子量的分子^[13]。但目前针对蛋白胨中多肽的研究较少,而蛋白胨的规模化生产,需要清楚了解蛋白胨中多肽的分布。

鉴于此,本研究采用凝胶色谱法测定蛋白胨中几种多肽相对分子质量,旨在为类似含肽产品的生产制备及相关研究提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

U3000 液相色谱(配 DAD 检测器,美国 Thermo Fisher 公司);BioSeP SEC-s2000(300 mm×7.8 mm, 5 μm, 美国 phenomenex 公司);ME 204E 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);MS 3 涡旋振荡器(德国 IKA 公司)。

标准品:甘氨酸-甘氨酸-酪氨酸-精氨酸(97%, Mr:451, 美国 Sigma-Aldrich 公司);抑肽酶(6000 U/mg, Mr:6511)、细胞色素 C(95%, Mr:12355)、转铁蛋白(98%, Mr:78000)、牛免疫球蛋白(90%, Mr:15000)(上海源叶生物科技有限公司);其他试剂均为国药集团生产的分析纯。

蛋白胨为市售普通产品。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制

多肽标准储备液:精密称取甘氨酸-甘氨酸-酪氨酸-精氨酸、抑肽酶、细胞色素 C、转铁蛋白、牛免疫球蛋白分别为 0.02003、0.02054、0.02027、0.02398、0.02107 g,加超纯水定容于 10.0 mL 容量瓶,置于 4 °C 密封可贮藏一个月。

多肽标准混合液:准确吸取 500 μL 多肽标准储备液,再加入 1500 μL 水溶解稀释,混匀,浓度为 0.5 mg/mL,用 0.22 μm 的滤膜过滤备用。

试样的制备:称取均质后的样品 0.1 g(0.0001 g),用 40 mL 超纯水溶解,涡旋振荡 1 min。配制成 2.5 mg/mL 的样品溶液,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤后,待测。

2.2.2 色谱条件

色谱柱:BioSeP SEC-s2000(300 mm×7.8 mm, 5 μm)。

流动相:68.3 mmol/L 磷酸二氢钠与 81.7 mmol/L 磷酸氢二钠溶液, pH = 6.8;流速:0.8 mL/min;柱温:25 °C;进样量:5 μL;检测波长:280 nm。

2.2.3 数据分析

利用 Chromeleon 7 GPC 数据处理软件分析色谱图。

数均相对分子质量和重均相对分子质量的计算^[14]

$$\text{数均相对分子质量 } M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} \quad (1)$$

式(1)中: N_i 为第 i 种分子的物质的量; M_i 为第 i 种分子的分子质量。

$$\text{重均相对分子质量 } M_w = \frac{\sum W_i M_i}{\sum W_i} \quad (2)$$

式(2)中: W_i 为第 i 种分子的物质的量; M_i 为第 i 种分子的分子质量。

3 结果与分析

3.1 色谱条件优化

流动相选择乙腈-水(15:85, V/V)时,色谱峰结果不理

想, 峰型差(如图 1)。更换流动相为甲醇: 水(15:85, V/V), 改善不明显。通过调节三氟乙酸的体积分数来改善混合标准物质的分离度, 结果是混合标准物质的分离度随三氟乙酸的体积分数增大而增大^[15]。三氟乙酸的体积分数为 0.035% 时, 混合标准物质的分离以及峰型均较好, 但低于色谱柱的最低耐受; 三氟乙酸的体积分数为 0.02% 时, 分子量差别低于一个数量级时, 峰分不开。

考虑色谱柱耐受性 pH 为 2.5 ~ 7.5, 改用磷酸盐作为流动相。先用 pH 为 6.2 的 0.1 mmol/L 磷酸二氢钠作为流动相, 峰型改善明显, 经过进一步调节最终调得磷酸二氢钠与磷酸氢二钠混合溶液的比例使 pH 为 6.8 时, 分离效果最理想(见图 2)。

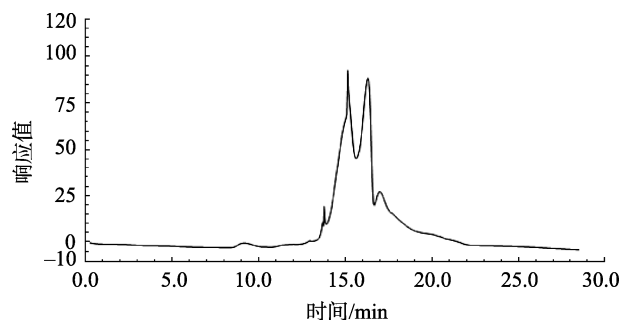


图 1 以乙腈-水(15:85, V/V)为流动相的色谱图
Fig.1 Chromatogram with acetonitrile-water (15:85, V/V) as mobile phase

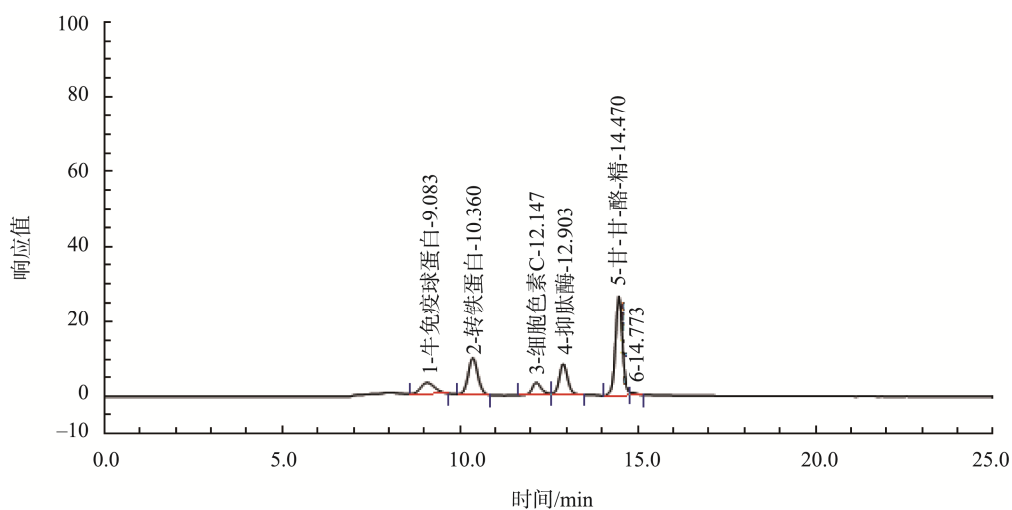


图 2 以 pH 为 6.8 磷酸盐混合溶液为流动相的色谱图
Fig.2 Chromatogram with pH 6.8 phosphate mixed solution as mobile phase

3.2 样品前处理优化

蛋白胨样品中含有丰富的蛋白质、多肽、氨基酸、维生素、微量元素等物质, 这些物质如果引入色谱分离体系, 不仅易造成色谱柱污染、柱效下降, 还会干扰对目标物质的分析。因此在提取多肽的同时, 应该选择有效的方法将这些杂质去除。

分别使用乙醇、乙腈、丙酮等对样品净化, 结果与用水直接溶解检测结果无明显区别, 多肽分子量较大, 其他小分子的干扰显示不明显。结合色谱柱孔径以及分析物质易溶于水的性质, 确定上机样品浓度为 2.5 mg/mL 的水样液(见图 3)。浓度高可能会导致色谱柱堵塞, 为了延长色谱柱的使用寿命, 故增加了预保护柱。

3.3 方法验证

3.3.1 标准曲线与线性关系

混合标准物质溶液的色谱图如图 2 所示, 5 种多肽的保留时间和相对分子质量对数的关系如图 4 所示。以标准

物质相对分子质量对数对保留时间做曲线拟合方程, 得到拟合方程为:

$$Y = -0.0023X^3 + 0.0244X^2 - 0.0796X + 5.5964$$
, 相关系数 $r^2 = 0.9971$, 表明相对分子质量在 451~150000 范围内, 5 种标准物质相对分子质量对数与保留时间呈良好的曲线关系。

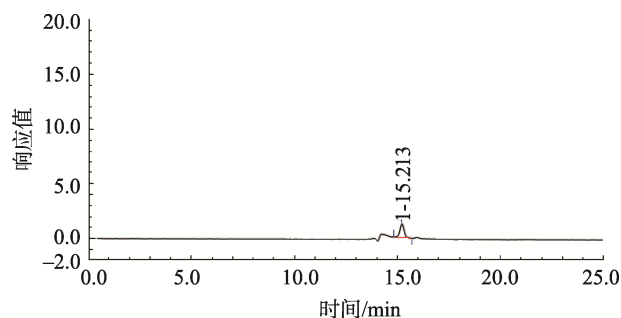


图 3 实际样品色谱图
Fig.3 Chromatogram of actual sample

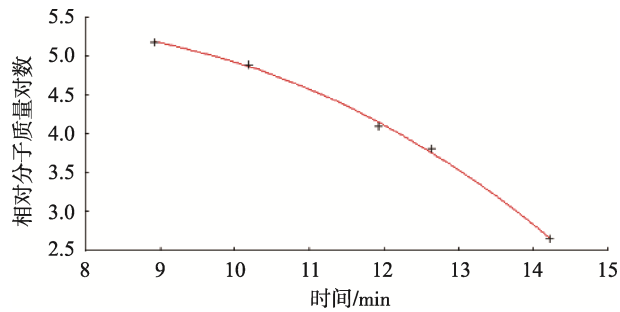


图 4 5 种多肽的保留时间和相对分子质量对数的关系

Fig.4 Relationship between retention time and logarithm of molecular mass of 5 polypeptides

3.3.2 重复性

精确称取蛋白胨样品 6 份, 进行测定, 测定保留时间为 15.22 min 左右色谱峰的保留时间、重均相对分子量、数均相对分子量, 计算其相对标准偏差 (relative standard

deviation, RSD)分别为 0.049%、1.831%、1.671%, 表明方法的重复性良好, 见表 1。

3.3.3 精密性

其中一份样品连续进样 6 次, 测定保留时间为 15.22 左右的色谱峰的保留时间、重均相对分子量、数均相对分子量, 计算其相对标准偏差分别为 0.034%、0.667%、0.731%, 表明精密性良好。

3.3.4 准确度

精密称取蛋白胨样品 6 份, 进行 5 种多肽的加标实验, 测得的相对分子质量与标准物质已知相对分子质量对照, 相对误差 < 2.5%, 见表 2。

3.3.5 稳定性

多肽标准工作液分别于配置后 0、2、4、6、8、10 h 进样, 测定 5 种多肽的保留时间、重均相对分子量, 计算其相对标准偏差在 3%以内, 表明方法的稳定性良好, 见表 3。

表 1 样品重复性测定结果
Table 1 Sample repeatability measurement results

样品编号	保留时间	重均相对分子量(M_w)	数均相对分子量(M_n)
Y1-1	15.21	65	59
Y1-2	15.22	65	59
Y1-3	15.22	64	60
Y1-4	15.23	63	59
Y1-5	15.22	64	59
Y1-6	15.23	62	57
相对标准偏差	0.049	1.831	1.671

表 2 测得的相对分子质量与标准物质已知相对分子质量对照表
Table 2 Comparison of measured relative molecular mass with known relative molecular mass of standard material

峰号	1	2	3	4	5
测得相对分子质量	150190	79138	12061	6429	444
标准物质相对分子质量	150000	78000	12355	6511	451
相对误差/%	0.13	1.46	2.38	1.26	1.55

表 3 多肽测定稳定性实验
Table 3 Stability test of polypeptide determination

峰号	放置时间/h	0	2	4	6	8	10	RSD/%
1	保留时间/min	9.08	9.09	9.08	9.08	9.08	9.09	0.06
	重均相对分子量(M_w)	150000	149857	150143	150000	150143	149857	0.09
2	保留时间/min	10.36	10.36	10.36	10.36	10.36	10.36	0.00
	重均相对分子量(M_w)	79328	79138	79138	79138	79138	79328	0.12
3	保留时间/min	12.15	12.15	12.15	12.14	12.15	12.15	0.03
	重均相对分子量(M_w)	12070	11958	12014	12127	12070	12014	0.49
4	保留时间/min	12.9	12.91	12.92	12.93	12.93	12.93	0.10
	重均相对分子量(M_w)	6582	6511	6441	6417	6394	6370	1.24
5	保留时间/min	14.47	14.48	14.49	14.49	14.50	14.50	0.08
	重均相对分子量(M_w)	469	458	447	444	437	434	2.95

3.3.6 样品测定

取不同厂家提供的多种动物源与植物源蛋白胨进行测定,部分样品色谱峰的保留时间、重均相对分子质量 M_w 、数均相对分子质量 M_n 、多分散系数 $d(M_w/M_n)$ 的关系如表 4 所示,蛋白胨含有的多肽种类甚广,重均相对分子质量由几百到几万均有分布,重均相对分子质量在

一千以下的占比较高,给多肽的研究提供了更多的可能性。同一源蛋白胨多肽的重均相对分子质量并不相近,其下限有的低于 400,上限 7~8 万也有分布。不同厂家提供的蛋白胨也有极大差距,具体品类均需要精准测定得出结论,并不能以单次测定涵盖整个样品类型的分布情况。

表 4 动物源与植物源蛋白胨多肽相对分子质量测定结果
Table 4 Results of determination of relative molecular mass of animal-derived and plant-derived peptone polypeptides

样品类型	保留时间/min	重均相对分子质量	数均相对分子质量	分散系数
动物源 C	13.61	4007	2946	1.36
	14.26	478	327	1.46
	15.07	14	0	/
植物源 B	10.26	77400	75897	1.02
	13.80	1082	845	1.28
	14.28	166	121	1.38

4 结 论

采用凝胶色谱法测定蛋白胨中多肽相对分子质量方法适用可行,多肽的保留时间与相对分子质量的对数成良好的曲线相关,按分子质量由大到小的顺序先后出峰,通过标准物质的保留时间可以得到未知物质的相对分子质量。但对于分子质量差在一个数量级的物质分离度差,达不到理想的效果。后续研究还需要有针对性的锁定特定多肽区域选择合适的排阻范围的色谱柱进行详尽的研究。同时,合适的分离度还需建立在优化后的流动相条件下,通过调节磷酸二氢钠与磷酸氢二钠混合溶液的比例使 pH 为 6.8 时分离效果最好。

该方法可以快速、简单的锁定不同物质所含多肽的相对分子质量所落区间,选择不同排阻范围的色谱柱可实现特定范围内多肽的精细检测,满足生产和制备初步的方法确立,为日后深入研究蛋白胨中多肽的组成以及定量提供了最基础的保障。

参考文献

- [1] 高威芳,何魁芳,朱鹏,等. 活性多肽序列结构分析鉴定技术的研究进展[J]. 生物技术, 2016, 26(2): 199-204.
Gao WF, He KF, Zhu P, *et al.* Recent advances in the technologies progress of bioactive polypeptides identification [J]. Biotechnology, 2016, 26(2): 199-204.
- [2] 陈新,陈庆森,庞广昌. 酶解玉米蛋白生产生物活性多肽的研究现状及开发趋势[J]. 食品科学, 2004, (7): 202-205.
Chen X, Chen QS, Pang GC. Research status and development trend of enzymatic hydrolysis of corn protein to produce bioactive polypeptides [J]. Food Sci, 2004, (7): 202-205.
- [3] 林善婷,胡晓,李来好,等. 水产蛋白源生物活性肽的研究进展[J/OL].

大连海洋大学学报: 1-11. [2020-03-17]. <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-266>.

Lin ST, Hu X, Li LH, *et al.* Research progress of bioactive peptides derived from aquatic proteins [J/OL]. J Dalian Ocean Univ: 1-11. [2020-03-17]. <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-266>.

- [4] 韩婧师,李波,陈旭东. 高效液相色谱法分离多肽类物质的研究进展[J]. 饲料与畜牧, 2015, (2): 64-66.
Han JS, Li B, Chen XD. Advances in the separation of polypeptides by high performance liquid chromatography [J]. Feed Husb, 2015, (2): 64-66.
- [5] 唐宁,庄红. 玉米抗氧化肽 Leu-Pro-Phe 抗氧化稳定性研究[J]. 中国食品学报, 2015, 15(2): 49-55.
Tang N, Zhuang H. Antioxidant stability of maize antioxidant peptide Leu-Pro-Phe [J]. J Chin Inst Food Sci Tech, 2015, 15(2): 49-55.
- [6] 于国才,何慧,曹汝鸽,等. 超滤法制备高活性醒酒玉米肽以及 pH 值对超滤的影响[J]. 中国粮油学报, 2010, (8): 98-103.
Yu GC, He H, Cao RG, *et al.* Preparation of highly active soaking corn peptides by ultrafiltration and effect of pH value on ultrafiltration [J]. J Chin Cere Oils Assoc, 2010, (8): 98-103.
- [7] 李昊阳. 挤压膨化预处理辅助亚临界水法提取玉米皮多糖的研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2017.
Li HY. Study on extraction of polysaccharide from corn husk by extrusion puff pretreatment with subcritical water method [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2017.
- [8] 杨翠,卓婷焯,李祖明,等. 玉米谷蛋白抗氧化肽的分离纯化与活性研究[J]. 粮食与油脂, 2018, 31(3): 45-48.
Yang C, Zhuo TY, Li ZM, *et al.* Purification and activity of corn glutenin antioxidant peptides [J]. Cere Oil, 2018, 31(3): 45-48.
- [9] 李聪,相恒绪,敬思群,等. 玉米蛋白粉制备羊肉风味味料的工艺研究及风味成分分析[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(9): 146-152.
Li C, Xiang HX, Jing SQ, *et al.* Process research and flavor composition analysis of maize protein flavor prepared with corn protein powder [J]. Food Ferment Ind, 2018, 44(9): 146-152.
- [10] 柴成梁,常晓娇,王楠希,等. 玉米赤霉烯酮降解酶基因 mbZHD 的

- 原核表达及其降解毒素初步研究[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(8): 29-33.
- Chai CL, Chang XJ, Wang NX, *et al.* Preliminary study on prokaryotic expression and degradation toxin of zearalenone degrading enzyme gene mbZHD [J]. J Chin Cere Oils Assoc, 2017, 32(8): 29-33.
- [11] 张强. 玉米抗氧化肽的分离制备及其体外抗氧化活性的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2005.
- Zhang Q. Preparation and antioxidant activity of antioxidant peptides from maize [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2005.
- [12] 张玉奎, 张维冰. 分析化学手册—液相色谱分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- Zhang YK, Zhang WB. Handbook of analytical chemistry-liquid chromatographic analysis [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000.
- [13] 韩香, 顾军. 高效液相色谱法在合成多肽分离与纯化中的应用 [J]. 天津药学, 2003, 1(16): 42-44.
- Han X, Gu J. Application of high performance liquid chromatography in the separation and purification of synthetic peptides [J]. Tianjin Pharm, 2003, 1(16): 42-44.
- [14] 贾建萍, 周彦钢, 鲁健章, 等. 凝胶渗透色谱法测定胶原肽分子量及其分布[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(5): 968-969, 973.
- Jia JP, Zhou YG, Lu JZ, *et al.* The molecular mass and distribution of collagen peptide were determined by gel permeation chromatography [J]. Chin J Health Lab Technol, 2010, 20(5): 968-969, 973.
- [15] 蒋腾川, 宋新波, 张丽娟. 凝胶过滤色谱法测定3种不同来源多肽的相对分子量分布[J]. 食品科学, 2014, 35(24): 312-315.
- Jiang TC, Song XB, Zhang LJ. Determination of relative molecular weight distribution of polypeptides from three different sources by gel filtration chromatography [J]. Food Sci, 2014, 35(24): 312-315.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



吕娟, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: 715870810@qq.com



朱叶青, 主任药师, 主要研究方向为食品、药品检测。

E-mail: hhhtzyq@sina.com