

# 四种神经肽的反相高效液相色谱法分离

刘雪松 田津斌 方明 许伟 韩济生

(北京医科大学神经科学研究中心, 北京 100083)

**摘要** 以反相高效液相色谱法(RP-HPLC)分离甲硫脑啡肽(MEK)、亮脑啡肽(Leu-ENK)、强啡肽A<sub>1-17</sub>(DynA<sub>1-17</sub>)、胆囊收缩素(CCK-8s)。色谱柱为 ZORBAX C<sub>18</sub>(2.1mm D × 150mm); 流动相: 乙腈/水/三氟乙酸(TFA), 梯度洗脱, 紫外检测器检测: UV 215nm。上述条件下, 四种神经肽在微克水平得到较好分离。

**关键词** 反相高效液相色谱法; 甲硫脑啡肽; 亮脑啡肽; 强啡肽A<sub>1-17</sub>; 胆囊收缩素

在 HPLC 中, 分离纯化肽最常用的是 RP-HPLC, 回收率较高, 分离效果好<sup>[1-2]</sup>, 但某些场合不太适用, 例如用放射免疫方法对神经肽进行定量分析时, 如果用缓冲盐作为流动相, 放免分析前要对样品进行脱盐预处理, 导致样品损失。本方法对四种与镇痛及抗镇痛有关的神经肽进行了分离并获得了比较满意的效果。

## 1 仪器与试剂

岛津 LC-6A (U-1) 型高效液相色谱仪, 7125 手控进样器, 岛津 SPD-6AV 紫外检测器和 C-R3A 色谱数据处理机。MEK、Leu-ENK、DynA<sub>1-17</sub>、CCK-8s, (Sigma 公司); 乙腈(色谱纯; 中科院上海脑研所上海脑海生物科技有限公司); 三氟乙酸(TFA, Fluka 公司); 超纯水为 Millipore 处理后的去离子水。

## 2 色谱条件

色谱柱为 ZORBAX C<sub>18</sub>反相柱(2.1mm D × 150mm, 填料粒径 5μm、孔径 300Å); 保护柱(5mm × 150mm, 填料为 C<sub>18</sub>, 10μm)。梯度洗脱神经肽所用的流动相: A 液为含 0.1% TFA 的纯水, B 液为含 0.1% TFA 的乙腈, 在 0~30min 内流动相中 B 液的终浓度从 15% 上升

到 45%。紫外检测器检测波长为 215nm, 检测灵敏度 0.16AUFS, 输出信号由 CR-3A 数据处理机处理。

## 3 标准液配制

MEK、Leu-ENK、DynA<sub>1-17</sub>、CCK-8s 分别溶于流动相 A 液中, 浓度均为 1μg/μl, 进样体积 2μL。

## 4 样品制备

大鼠脊髓灌流液、脑脊液分别经 Sep-pak 柱进行脱盐预处理, 冻干复溶后, 各溶于流动相 A 液 100μL 中, 进样体积 80μL。

## 5 结果和讨论

**5.1 反离子对试剂的选择** 在神经肽的反相高效液相色谱分离中, 离子对色谱法的使用最为广泛。这是因为神经肽是两性电解质, 其表面带电基团的电荷解离将影响其保留行为和分离效果。加入反离子试剂就可以抑制其电荷解离。常用的反离子对试剂有 TFA、七氟丁酸、甲酸、醋酸和磷酸等<sup>[3]</sup>。本文选择了 TFA, 因为 TFA 是挥发性酸, 冻干时易除去, 获得神经肽纯品。

**5.2 流动相的 pH 值对肽保留性质的影响** 不同酸度下, 肽的极性、与固定相的相互作用以

及随流动相的洗脱快慢等都有所变化。试验证明,当 pH 2 时,神经肽易溶解和洗脱。因为此时肽分子的酸性基团处于“电离抑制”状态,而带正电荷的碱性基团与在流动相中加入的负离子形成“离子对”化合物,由此可以改善分离效果。

**5.3 洗脱液中,乙腈浓度的影响** 乙腈浓度过高会影响组分分离,过低又使整个分析时间延长。在 40min 内,当流动相 B% 从 25% 到 60%,

采用检测灵敏度为 0.32 AUFS 条件进行分析时,发现出峰时间很快,对于 DynA<sub>1-17</sub> 和 CCK-8s,进行测定的保留时间非常接近,分离效果不佳,如图 1a。为了缩短分析时间,降低了乙腈的初始浓度,在 30min 内以 B% 从 15% 到 45%,流速 0.3mL/min,灵敏度 0.16AUFS 为条件进行测定,结果不仅四种肽保留时间明显缩短,而且分离效果也有改善,如图 1b。它们保留时间的重现性很好,其相对标准偏差较小。

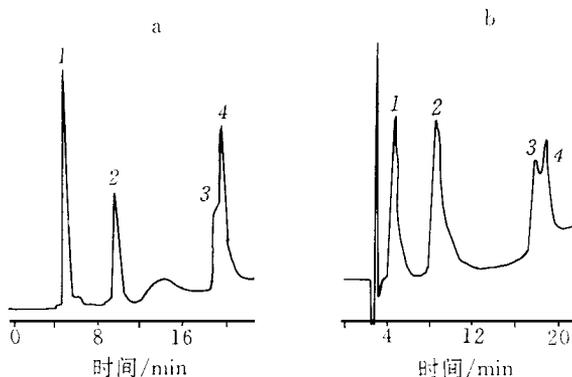


图 1 四种神经肽的色谱图

a 流动相: A. 0.1% TFA 纯水; B. 0.1% TFA 乙腈 25% ~ 60% (40min); 灵敏度: 0.32AUFS  
1——甲硫脑啡肽 (MEK); 2——亮脑啡肽 (Leu-ENK);  
3——强啡肽 A<sub>1-17</sub> (DynA<sub>1-17</sub>); 4——八肽胆囊收缩素 (CCK-8)

b 流动相: A. 0.1% TFA 纯水; B. 0.1% TFA 乙腈, 15% ~ 45% (30min); 灵敏度: 0.16AUFS  
1——甲硫脑啡肽 (MEK); 2——亮脑啡肽 (Leu-ENK);  
3——强啡肽 A<sub>1-17</sub> (DynA<sub>1-17</sub>); 4——八肽胆囊收缩素 (CCK-8)

**5.4 小内径柱的分离效果** 本实验探讨了用细内径柱分离神经肽。细内径柱的特点是不仅节约流动相(流速 0.3mL/min),而且改善分离效果。

**5.5 保护柱的效果** 无保护柱对神经肽的分离效果,如图 2 所示,与图 1 对比,分离程度和检测灵敏度都大为提高。

反相高效液相色谱使用乙腈/水/TFA 为流动相及细内径 C<sub>18</sub> 柱可将 MEK、Leu-ENK、

CCK-8s 和 DynA<sub>1-17</sub> 较完全分离,但检测极限仅为  $\mu\text{g}$  水平。放射免疫方法虽然可以在 pg 水平,但对神经肽的前体及代谢产物都可能有交叉反应,导致结果不准确;而 HPLC 分离神经肽的特点恰好弥补了这一缺陷<sup>[4]</sup>。作者对大鼠脊髓灌流液用放免的方法进行定量分析,一次只能测定一种肽,现用该法,就可将灌流液中不同组分分离收集,冷冻干燥使乙腈和 TFA 挥发后再用放免的方法测定。可以在一个灌流液标本中同时观察四种神经肽的释放变化。

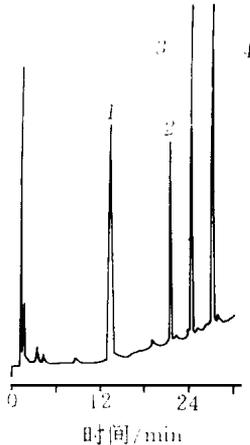


图 2 四种神经肽无保护柱的色谱图

色谱条件同图 1; 1——甲硫脑啡肽 (MEK); 2——亮脑啡肽 (Leu-ENK); 3——强啡肽 A<sub>1-17</sub> (Dyn A<sub>1-17</sub>); 4——八肽胆囊收缩素 (CCK-8)

## 6 参考文献

- 1 River J and McCintock R. In: The use of HPLC in receptor biochemistry, Alan R. Liss, Inc, 1989: 77
- 2 Browne CA, Bennett HPJ and Solomon S. In: High-Performance Liquid Chromatography of Proteins and Peptides Academic Press, Inc, New York, 1982: 65
- 3 Dass C, Mahalakshmi P, Grandberry D. J Chromatog, 1994, 678: 249

matog, 1994, 678: 249

- 4 Davis T P. In: Stress, Neuropeptides and Systemic Disease Academic Press, Inc, New York, 1991: 149

**Separation of Four Neuropeptides by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography** Liu Xuesong, Tian Jinbin, Fang Ming, Xu Wei and Han Jisheng (Neuroscience Research Center, Beijing Medical University, Beijing 100083), Fenxi Shiyanshi, 1997, 16(6): 64~66

Here we report the separation of met-enkephalin, leu-enkephalin, dynorphin A<sub>1-17</sub> and CCK-8s by reverse phase high performance liquid chromatography. Experimental conditions: ZORBAX C<sub>18</sub> reverse phase column, acetonitrile/H<sub>2</sub>O/TFA mobile phase, linear gradient elution, UV detector (UV 215nm). Under these conditions the four neuropeptides can be separated completely.

**Keywords** RP-HPLC; Met-enkephalin, Leu-Enkephalin, Dynorphin A<sub>1-17</sub>; CCK-8s

收稿日期: 1996 年 10 月 24 日

刘雪松: 女, 44 岁, 高级工程师