

# 凝胶色谱测定核桃肽分子量方法比较

任娇艳<sup>1</sup>, 卢韵君<sup>1</sup>, 廖文镇<sup>1</sup>, 罗维<sup>2</sup>, 曹弘熙<sup>1</sup>, 赵谋明<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 华南理工大学分析测试中心, 广东广州 510640)

**摘要:** 本文研究了核桃肽分子量的凝胶色谱检测方法, 对比两种测定肽类分子量大小常用的凝胶色谱柱: (1) 国家标准 GB/T 22492-2008《大豆肽粉》以及 GB/T 22729-2008《海洋鱼低聚肽粉》中推荐的 TSK-GEL G2000 SWXL 7.8 mm×300 mm 色谱柱; (2) 商务部行业标准 SB/T 10634-2011《淡水鱼胶原蛋白肽粉》中推荐的 Superdex Peptide HR 10/30 色谱柱。本文通过对四种单一标准品以及四种不同分子量大小的核桃肽样品在两种色谱条件中的结果对比分析, 得出以下结论: TSK-GEL G2000 SWXL 7.8 mm×300 mm 色谱柱推荐条件能在 30 min 内完成核桃肽的分离, 检测线性良好,  $R^2=0.97$ , 色谱图峰形良好清晰, 检测结果在 >10000 u 以及 <1000 u 区间上偏大; Superdex Peptide HR 10/30 色谱柱推荐条件在 80 min 内完成核桃分离, 检测线性较佳,  $R^2=0.99$ , 色谱图峰形出现裂峰与宽峰, 检测结果在 >10000 u 以及 <1000 u 区间上偏小。

**关键词:** 核桃肽; 超滤; 分子量分布; 凝胶渗透色谱法

文章编号: 1673-9078(2015)5-267-271

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.5.042

## Molecular Comparison of Gel-permeation Chromatography Methods to Determine the Weight of Walnut Peptides

REN Jiao-yan<sup>1</sup>, LU Yun-jun<sup>1</sup>, LIAO Wen-zhen<sup>1</sup>, LUO Wei<sup>2</sup>, CAO Hong-xi<sup>1</sup>, ZHAO Mou-ming<sup>1</sup>

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Analytical and Testing Center, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Methods involving gel-permeation chromatography used to determine the molecular weight of walnut peptides were studied by comparing two commonly used gel columns. These included a TSK-GEL G2000 SWXL 7.8 mm × 300 mm column, recommended by the national standard GB/T 22492-2008 *Soy Peptide Powder* and GB/T 22729-2008 *Oligopeptide Powder of Marine Fish*, and a Superdex Peptide HR 10/30 column, recommended by the industry standard SB/T 10634-2011 *Freshwater Fish Collagen Peptide Powder* by the Ministry of Commerce. Data were measured, analyzed, and compared for four pure standards and four walnut peptide samples with different molecular weights in each of the two chromatographic conditions. The results showed that for TSK-GEL G2000 SWXL 7.8 mm × 300 mm column, the separation of walnut peptides was achieved within 30 min under the recommended conditions. The results also showed a good linear relationship, with a correlation coefficient of 0.97 and a clear peak shape. The measured molecular weights were higher than the actual values in the regions of >10,000 u and <1,000 u. For the Superdex Peptide HR 10/30 column in comparison, the separation was achieved after 80 min, however the results showed a better linear relationship, with a correlation coefficient of 0.99; however, split peaks and broad peaks appeared in the chromatogram. Moreover, in this system, the measured molecular weights were lower than the actual values in the regions of >10,000 u and <1,000 u.

**Key words:** walnut peptides; ultrafiltration; molecular weight distribution; gel permeation chromatography

近年来, 生物活性肽由于具有易消化吸收性以及

收稿日期: 2014-07-11

基金项目: 广东省自然科学基金杰出青年基金项目(S2013050013954); 教育部新世纪人才支持计划项目(NCET-13-0213); 中央高校基本科研业务费重点项目(2013ZZ0061); 国家自然科学基金项目(31101221)

作者简介: 卢韵君(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物化学、食品营养与健康

通讯作者: 任娇艳(1980-), 女, 教授, 研究方向为食品生物化学、食品营养与健康

多种生物活性<sup>[1~2]</sup>, 如抗氧化<sup>[3]</sup>、抗肿瘤<sup>[4]</sup>、降血压<sup>[5]</sup>等逐渐成为研究的热点。多个研究表明活性肽的功能特性与其分子量大小有一定的相关性<sup>[6~8]</sup>。因此, 准确而快速地测定生物活性肽的分子量显得十分重要。分子量分布是活性肽产品的重要特性指标, 直接反映产品中不同分子量的大小肽类的构成特征。生物活性肽分子量测定方法主要有是测定肽链长度法(TNBS)、聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)以及电喷雾质谱

(ESI-MS)。肽链长度法只能概括单一地表示出样品中所有分子蛋白水解物的平均分子量,不能直观地反映出样品中蛋白水解物的详细分子量分布情况。而聚丙烯酰胺凝胶电泳虽然能快速便捷测定蛋白质分子及其亚基的分布,但较适合分离分子量范围为10000~200000 u的分子,对于分子量<10000 u的小分子活性肽则不适用。尽管MALDI-TOF-MS以及ESI-MS两种质谱法可以非常准确地测定物质的分子量,但是对于测定物质的纯度要求很高,活性肽成分复杂,需要进一步分离纯化才能进行检测,耗费的时间长,且质谱法测试费用高,不适合一般分析检测。

现行较有效便捷的测定物质分子量分布的方法是高效液相法,又叫凝胶色谱技术,是六十年代初发展起来的一种快速而又简单的分离分析技术。该方法的基本原理是分子筛效应:不同大小的分子,在凝胶床中的分布情况是不同的:分子较大的只能进入孔径较大的凝胶孔隙内,分子较小的可进入较多的凝胶孔隙内,使较大分子在凝胶床内移动距离较短,这样就利用不同分子量通过凝胶出来的时间不同,可将分子量不同的物质分离。

该方法准确性高、重现性好、自动化程度高,科学快速,能真实地表示出蛋白质和肽类的分子量分布,还可以分析鉴定产品的纯度<sup>[9]</sup>。目前较常用的两种凝胶色谱柱分别为:(1)国家标准GB/T 22729-2008《海洋鱼低聚肽粉》<sup>[10]</sup>以及GB/T 22492-2008《大豆肽粉》<sup>[11]</sup>中推荐的TSK-GEL G2000 SWXL 7.8 mm×300 mm色谱柱;(2)商务部行业标准SB/T 10634-2011《淡水鱼胶原蛋白肽粉》<sup>[12]</sup>中推荐的Superdex Peptide HR 10/30色谱柱。这两种分析条件都存在各自的缺点,用以检测分子量结果不够全面和准确。本文将对比TSK-GEL G2000 SWXL 7.8 mm×300 mm色谱柱推荐条件、Superdex Peptide HR 10/30色谱柱推荐条件测定核桃肽分子量结果的差异性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

核桃粕,购于云南;细胞色素C,纯度95%以上;抑肽酶,纯度99%以上;氧化型谷胱甘肽,纯度99%以上;甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸,纯度99%以上,以上标准品均购于美国西格玛奥德里奇公司;磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠、硫酸钠等化学试剂均为分析纯,均购于国药化学集团,试剂配制均采用去离子水。

### 1.2 仪器与设备

KQ-20D 5E型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;超滤装置,广州从源公司;色谱柱:TSK-GEL G2000 SWXL 7.8 mm×300 mm,东曹(上海)生物科技有限公司;Superdex Peptide HR 10/30,通用电气(中国)有限公司;高效液相系统:岛津LC-20A液相处理系统,岛津(中国)有限公司;ÄKTA purifier UP100蛋白质纯化仪,通用电气(中国)有限公司;

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 核桃肽制备

核桃粕加水后调节pH值至7.4,按照蛋白含量比加入1%的胰酶,充分混合后,于50℃水浴中振荡反应22 h。反应结束后于沸水中保温10 min,冷却至室温后,以8000 r/min离心分离20 min,取上清液,即为核桃肽原液W。

#### 1.3.2 核桃肽超滤处理

把部分样品原液用10000 u分子量的超滤膜进行超滤,得到>10000 u以及<10000 u两个区间的组分,再把<10000 u的组分用3000 u分子量的超滤膜进行超滤,就可得到>10000 u (W1)、3000~10000 u(W2)和<3000 u(W3)共三个区间的组分。

#### 1.3.3 分子量检测

本文选择两个色谱柱进行研究,分别是TSK-GEL G2000 SWXL 7.8 mm×300 mm,以及Superdex Peptide HR 10/30。根据两个色谱柱自身的推荐条件,对比分析不同分子量区间的核桃肽分子量大小。

按照一定的比例配制各色谱条件的流动相,配制后流动相需经过0.45 μm的微孔滤膜过滤以除去流动相中不溶性杂质,检测前对流动相进行超声处理以去除流动相中的气体。

表1 色谱测定条件

	条件 a	条件 b
色谱柱	TSK-GEL G2000 SWXL 7.8 mm ×300 mm	Superdex Peptide HR 10/30
液相系统	岛津 LC-20A	ÄKTA purifier UP100
流动相	0.1 mol/L PBS+0.1 mol/L Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH6.7)	0.02 mol/L PBS+0.25 mol/L NaCl (pH7.2)
检测波长	214 nm	214 nm
流速	0.5 mL/min	0.5 mL/min
进样体积	20 μL	100 μL

检测时,每个条件对四个标准品,核桃原液以及三个区间的组分都进行测定,固体样品用流动相溶解后,进入色谱柱之前经0.22 μm的微孔滤膜过滤。具体测定的条件如下:1) TSK-GEL G2000 SWXL 7.8

mm×300 mm 色谱柱推荐条件(以下简称为条件 a); 2) Superdex Peptide HR 10/30 色谱柱推荐条件(以下简称为条件 b)。

### 1.3.4 数据分析

液相结果由计算机采集, 岛津 LC-20A 系统使用 LC-solution 软件处理, ÄKTA purifier UP100 系统使用 UNICORN 软件处理数据。

## 2 结果与讨论

### 2.1 标准品检测结果

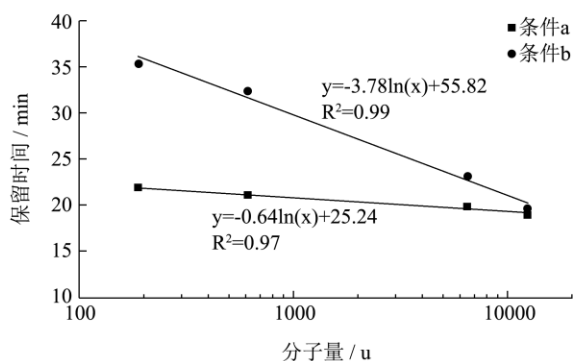


图 1 分子量测定标准曲线及回归方程

Fig.1 Standard curve and regression equation of molecular weight determination

图 1 为两个色谱条件的标准曲线及回归方程。条件 a 相关系数为 0.97, 条件 b 的相关系数为 0.99, 可以看出条件 b 的相关系数比条件 a 高, 说明条件 b 的标准曲线拟合效果较好, 分子量对数值与保留时间的线性关系较为显著和准确。

对比四个标准品在两个色谱条件下的保留时间, 发现两个色谱条件中 >10000 u 的标准品的保留时间非常接近, 而分子量 <1000 u 的标准品在条件 b 下的保留时间比条件 a 长。表明分子量 <1000 u 的分子在条件 b 中洗脱速度较慢, 不同分子量分子保留时间之间跨度较大, 一定程度上说明条件 b 对不同分子量的分子尤其是小分子的分离效果较好。同一标准品在两个条件中保留时间的差异与两根色谱柱的特性有关, Superdex Peptide HR 10/30 的柱体积远远大于 TSK-GEL G2000 SWXL 7.8 mm×300 mm, 在相同流速下, 柱体积越大流动相流过一个柱体积所需要的时间越多, 因此 Superdex Peptide HR 10/30 分析小分子物质的保留时间比 TSK-GEL G2000 SWXL 7.8 mm×300 mm 长。对于单一标准品, Superdex Peptide HR 10/30 表现出更好的分离效果。

### 2.2 样品检测结果

#### 2.2.1 相同色谱条件下不同分子量区间样品色谱图的对比分析

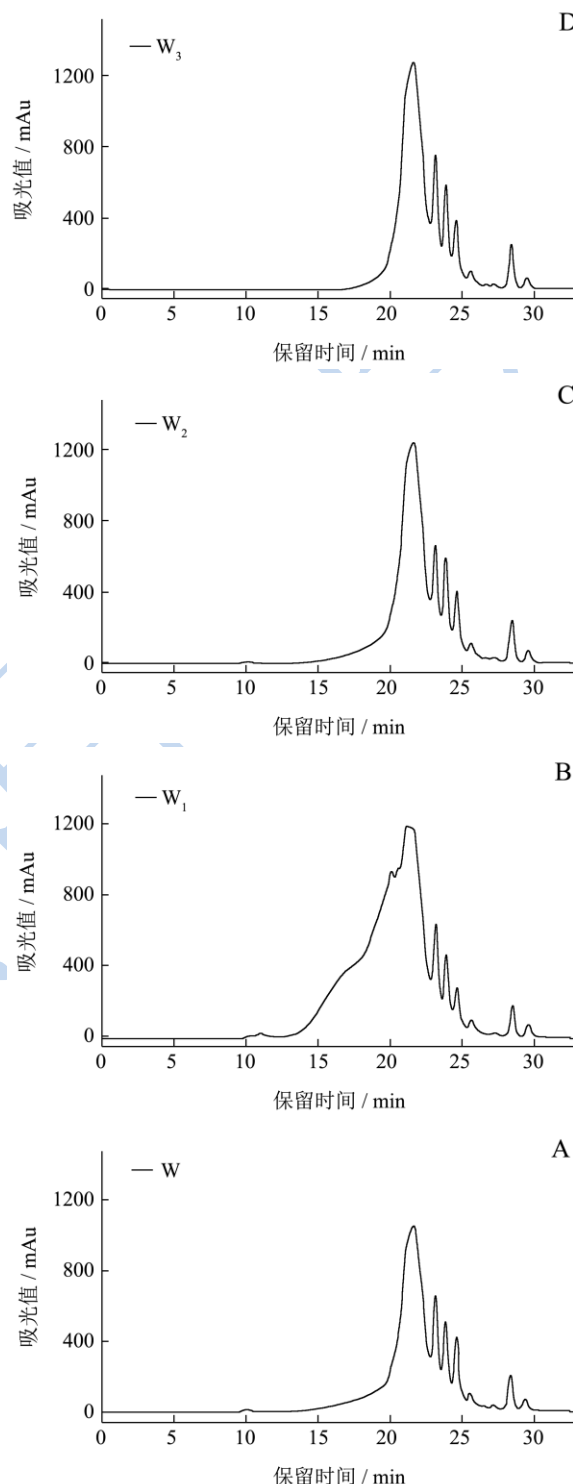


图 2 条件 a 下核桃肽分子量色谱图

Fig.2 Molecular weight chromatograms of walnut peptides under Condition A

条件 a: 从图 2 可以看出核桃原液 W, 核桃肽 3000~10000 u 组分 W<sub>2</sub> 以及核桃肽 <3000 u 组分 W<sub>3</sub> 三个样品的峰型基本相同, 而核桃肽 >10000 u 组分 W<sub>1</sub> 的峰型与其他三个组分相比差异较大。可以看出, W<sub>1</sub>

在较短的保留时间区间(12~18 min)内峰面积比其他样品明显增加,  $W_1$  是过 10000 u 超滤膜之后的样品, 分子量是四个组分中最大的, 说明条件 a 对于 >10000 u 的分子量差异检测的效果比较显著。

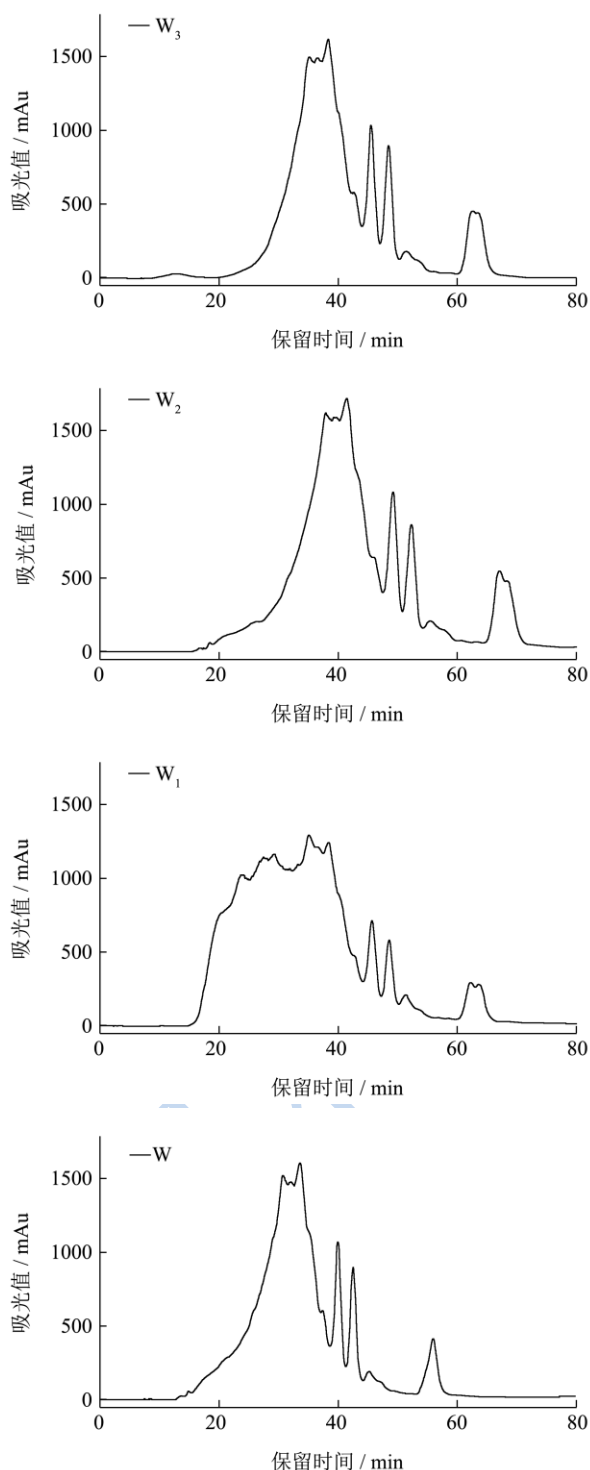


图3 条件b 核桃肽分子量色谱图

Fig3 Molecular weight chromatograms of walnut peptides under Condition B

另外组分  $W_3$  的出峰时间比起组分 W 和  $W_2$  延后 5~6 min,  $W_3$  是通过 3000 u 超滤膜之后的样品, 其分

子量在四个组分中是最小的, 说明条件 a 也能够检测出 <3000 u 中分子量的差异。

条件 b: 从图 3 可以看出 W、 $W_2$ 、 $W_3$  三个组分峰型差异不大, 且出峰时间也基本一致,  $W_2$  和  $W_3$  两个组分之间的差异较条件 a 而言不明显。与条件 a 相同,  $W_1$  的峰型比其它组分有明显差异。可以看出,  $W_1$  的色谱图在较短保留时间区间(15~30 min)内峰面积明显增加, 而 30 min 之后出现的峰形与 W、 $W_2$  和  $W_3$  组分十分接近。说明, 条件 b 对于 >10000 u 的分子量差异检测的效果比较显著, 而对分子量 >3000 u 的分子检测无明显优势。

### 2.2.2 不同色谱条件下同一样品色谱图的对比分析

由于两个色谱条件中 W、 $W_2$  以及  $W_3$  三个样品的峰型都相差不大, 故此处仅以 W 以及  $W_1$  样品的色谱图作比较分析。由图 2 图 3 可看出, 条件 a 下所有组分保留时间在 12~32 min, 条件 b 的保留时间在 15~70 min。条件 b 的出峰时间和保留时间区间明显长于条件 a, 这与标准品的分析结果一致。通过观察样品色谱图的峰型, 同一样品在两种色谱条件下的峰形较一致, 这是由于两个条件的流动相均为磷酸盐缓冲液, 且 pH 值较接近。相比之下, 条件 a 中的峰型比较清晰完整, 对于分析组分的分布以及判断样品纯度有一定帮助。条件 b 中有几个明显清晰的峰, 但同时最高峰处出现了裂峰和宽峰, 分离的效果比较一般, 不利于判断产品纯度。

### 2.2.3 样品分子量分布数据的比较分析

四个组分在两种色谱条件的分子量分布数据如图 4, 分别进行对比分析。

条件 a: 四个样品在每个分子量区间上均有所分布, 未出现十分极端的分布。分别对每个样品进行分析,  $W_1$  样品与 W 相比, >10000 u、5000~10000 u、3000~5000 u 三个区间内的含量都有明显增多而 <1000 u 区间组分的含量则明显减少, 这也符合样品本身的性质。 $W_2$  样品的分布则基本与 W 相同, 说明所制备核桃肽的分子量分布与  $W_2$  组分相似。 $W_3$  样品则在 >10000 u 的区间出现减少, 在 <1000 u 的区间明显增加, 在数值上与  $W_2$  组分有明显的差异, 说明条件 a 对于检测不同样品的分子量差异方面有显著效果。

条件 b: 总体上看, 条件 b 检测出在 >10000 u 以及 <1000 u 的区间上的分布都明显小于条件 a, 而 <3000 u 的比例基本上是相同的, 推断条件 b 对总体的分子量测定结果偏小。再分别对条件 b 中每个样品进行分析,  $W_1$  样品与 W 相比, >10000 u, 5000~10000 u, 3000~5000 u, 1000~3000 u 四个区间内的含量都有



所增多,其中>10000 u 的比例增多尤其明显,而<1000 u 的比例则明显减少。W<sub>2</sub> 组分的分布则基本与 W 相同。W<sub>3</sub> 组分则在>10000 u 的范围的比例减少, <1000 u 的比例明显增加,此结果与条件 a 检测一致。说明条件 b 对于不同样品的分子量差异也有比较显著的效果,但显著性不及条件 a。

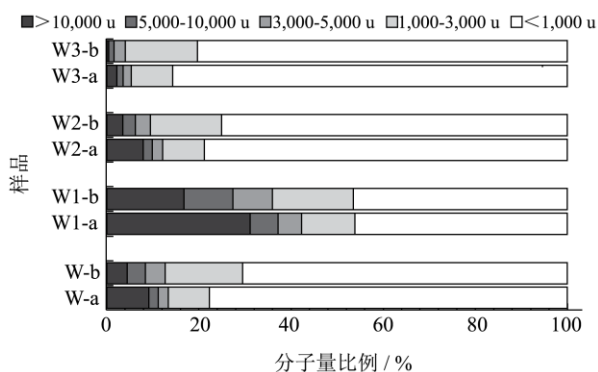


图 4 核桃肽及其组分分子量分布图

Fig.4 Molecular weight distribution of walnut peptides and their components

### 3 结论

本文选用高效凝胶色谱法作为测定活性肽分子量的基本方法,测定的条件选用 TSK-GEL G2000 SWXL 7.8 mm×300 mm 色谱柱推荐条件和 Superdex Peptide HR 10/30 色谱柱推荐条件两种。TSK-GEL G2000 SWXL 7.8 mm×300 mm 色谱柱推荐条件,线性拟合效果尚可,分离度较低,峰型比较完整清晰,从测定结果看,对于检测超滤后样品的分子量差异有较显著的效果,对>10000 u 及<1000 u 两个区间检测结果偏大。Superdex Peptide HR 10/30 色谱柱推荐条件线性拟合效果最好,分离度较高,峰型会出现裂分峰和宽峰,从测试结果来看,>10000 u 及<1000 u 两个区间上分布结果相对偏低,对于检测经过超滤核桃肽样品的分子量差异的效果不及 TSK-GEL G2000 SWXL 7.8 mm×300 mm 色谱柱推荐条件。

### 参考文献

[1] 王竹清,李八方.生物活性肽及其研究进展[J].中国海洋药物,2010,2:60-68  
WANG Zhu-qing, LI Ba-fang. Bioactive peptides and their progress [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2010, 2: 60-68

[2] Singh B P, Viji S, Hati S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean [J]. Peptides, 2014, 54: 171-179

[3] Lee S J, Cheong S H, Kim Y S, et al. Antioxidant activity of a novel synthetic hexa-peptide derived from an enzymatic hydrolysate of duck skin by-products [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 62: 276-280

[4] Umayaparvathi S, Arumugam M, Meenakshi S, et al. Purification and characterization of antioxidant peptides from oyster (*Saccostrea cucullata*) hydrolysate and the anticancer activity of hydrolysate on human colon cancer cell lines [J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2014, 20(2): 231-243

[5] 胡松青,张婷婷,郭莎莎,等.鱼鳞明胶 ACE 抑制肽的制备及其活性研究[J].现代食品科技,2012,11:1491-1494  
HU Song-qing, ZHANG Ting-ting, GUO Sha-sha, et al. Preparation and properties of ace-inhibitory peptides from fish scale gelatin [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 11: 1491-1494

[6] Chen M, Li B. The effect of molecular weights on the survivability of casein-derived antioxidant peptides after the simulated gastrointestinal digestion [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2012, 16: 341-348

[7] Ogasawara M, Katsumata T, Egi M. Taste properties of maillard-reaction products prepared from 1000 to 5000Da peptide [J]. Food Chemistry, 2006, 99(3): 600-604

[8] Su G, Zheng L, Cui C, et al. Characterization of antioxidant activity and volatile compounds of maillard reaction products derived from different peptide fractions of peanut hydrolysate [J]. Food Research International, 2011, 44(10): 3250-3258

[9] 林霖.乌骨鸡多肽产品质量指标及其黑色素提取和含量测定研究[D].南昌:南昌大学,2007  
LIN Lin. Research in polypeptide product quality and melanin extracting and content determination from black-bone silky fowl [D]. Nanchang: Nanchang University, 2007

[10] GBT 22729-2008,海洋鱼低聚肽粉[S]  
GBT 22729-2008, Oligopeptides powder of marine fish [S]

[11] GB/T 22492-2008,大豆肽粉[S]  
GB/T 22492-2008, Soy peptides powder [S]

[12] SB/T 10634-2011,淡水鱼胶原蛋白肽粉[S]  
SB/T 10634-2011, Freshwater fish collagen peptides powder [S]