

# 反相高效液相色谱法分析结构相似酪啡肽

张源淑, 邹思湘

(南京农业大学 农业部动物生理生化重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

**摘要:**  $\beta$ -酪啡肽( $\beta$ -Casomorphin  $\beta$ -CM)是 $\beta$ -酪蛋白经过酶解所释放的一类小肽, 具有类似阿片肽的功能。本研究参考相关肽检测方法, 以乙腈:水(3:1)为流动相, 内含0.1%三氟乙酸为流动相酸性调节剂, 梯度洗脱, 反相 $C_8$ 柱分离, 215nm紫外检测。结果显示, 酪啡肽-7在21.45min出峰, 在0.125~1.0mg/ml范围内与峰面积呈良好的线性关系( $r=0.9989$ ),  $\beta$ -酪啡肽-7和 $\beta$ -酪啡肽-5纯度和迁移时间的RSD分别为7.29%和5.19%。应用本方法可快速准确分离分析酪啡肽, 尤其是结构相似的小分子肽。

**关键词:** 高效液相色谱; 酪啡肽; 肽

## Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatographic Analysis on Structurally Similar Casomorphins

ZHANG Yuan-shu, ZOU Si-xiang

(Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry, Ministry of Agriculture,  
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:**  $\beta$ -Casomorphin is a group of structurally similar small peptides produced by enzyme degradation of  $\beta$ -casein. It has the function similar to opioid. To develop a HPLC method for assaying similar peptides. A acetonitrile-H<sub>2</sub>O (3:1) was used as mobile phase and 0.1% phosphate acid used as acidic modifier. Gradient elution was adopted with Kromasil  $C_8$  column (5 $\mu$ m, 4.6mm  $\times$  200mm) with ultraviolet detector at 215nm. The retention of  $\beta$ -casomorphin-7 and  $\beta$ -casomorphin-5 were 21.45min and 11.474 min respectively. And a good linear relationship existed between peak area and casomorphin concentrations ranged from 0.125~1.0mg/ml( $r=0.9989$ ). The RSD of purity and migration time of  $\beta$ -casomorphin-7 and  $\beta$ -casomorphin-5 were 7.29% and 5.19% respectively. This method provided a simple and feasible way to analyze casomorphins especially those similar peptides.

**Key words:** HPLC; casomorphin; peptide

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)02-0172-03

$\beta$ -酪啡肽( $\beta$ -Casomorphin  $\beta$ -CM)是 $\beta$ -酪蛋白经过酶解所释放的一类小肽, 由酪蛋白经消化酶水解产生, 具有调节动物消化道运动和采食等功能, 并可能由肠粘膜转入外周血液对机体的代谢和免疫发生影响, 是一个有代表性的乳源外啡肽, 上世纪80年代中期至今酪啡肽的研究有很大发展<sup>[1,2]</sup>。但其水解肽的种类和数量太大, 一般是几种结构相似多肽的混合物, 对其混合物的分离分析及准确定量肽含量的方法尚不完善, 其分离、纯化及制备均较困难, 严重影响了酪啡肽的推广应用。本研究参考相关肽检测方法<sup>[3]</sup>, 建立操作简单、

灵敏度高、有好的线性和回归系数的反相高效液相色谱(RP-HPLC)测定酪啡肽(Casomorphin)方法, 为结构相似小分子生物活性肽的功能和开发研究提供方法。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器和试剂

30升旋片式真空泵, YQ02.30型 上海医疗器械厂;  
B1210E-MT EKA-9408型 Bransonic 超声清洗机 Branson  
Ultrasonics公司; 标准酪啡肽 $\beta$ -Casomorphin-3( $\beta$ -CM-3)(Try-Pro-Phe)纯度99%、 $\beta$ -Casomorphin-5( $\beta$ -CM-5)

收稿日期: 2004-02-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070565)

作者简介: 张源淑(1962-), 女, 副教授, 博士, 研究方向为乳源生物活性肽。

(Try-Pro-Phe-Pro-Gly) 纯度 99%、 $\beta$ -Casomorphin-7 ( $\beta$ -CM-7) (Try-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile) 纯度 99% Sigma 公司产品; 乙腈 Acetonitrile Sigma 公司; 色谱纯; 甲醇 南京化学试剂厂; 磷酸, 三氯乙酸等均为分析纯; 实验用水为去离子重蒸水。

1.2 样品处理

精确称取标准  $\beta$ -CM-3,  $\beta$ -CM-5 和  $\beta$ -CM-7 各 0.5mg, 分别用去离子重蒸水配制, 浓度为 1mg/ml。

1.3 色谱分析条件

日本岛津高效液相色谱仪: LC-6AD 液相流动泵, C-R6A 型数字处理机, SPD-10A 型紫外-可见检测器。

色谱柱: Kromasil C<sub>8</sub> 柱(100X S-445 80 Bohus, Sweden)。

流动相: A=0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 乙腈:水(3:1); B=0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>。

流动相均经真空泵和超声清洗机抽滤脱气。  
梯度洗脱程序如下表:

表1 HPLC 梯度洗脱程序  
Table 1 Gradient elution program of HPLC

T(min)	A(%)	B(%)
0	30	70
2	30	70
25	50	50
35	30	70
40	stop	

注: T 指梯度程序中的运行时间。  
Note: T represent operation time of gradient elution.

流速为 0.5ml/min, 紫外检测波长 215nm, 进样量 10  $\mu$ l。取手工进样进行色谱分析, 以保留时间定性, 峰面积内标法定量。

1.4 数据处理

实验数据用 Excel 统计分析软件处理, 数据表示平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{X} \pm SD$ )。

2 结果与分析

2.1 保留时间

标准品经高效液相色谱分析,  $\beta$ -CM-3,  $\beta$ -CM-5,  $\beta$ -CM-7 的保留时间分别为 11.474、9.483 和 21.45min(见图 1、2)

2.2 三种混合样品的 RT-HPLC 结果

$\beta$ -CM-3、 $\beta$ -CM-5、 $\beta$ -CM-7 三种标准品混合后有不同的保留时间, 均得到单一主峰。

2.3 标准曲线的测定

精密称量 0.5mg  $\beta$ -CM-5 和  $\beta$ -CM-7, 加 0.5ml ddH<sub>2</sub>O 溶解作为母液(1.0mg/ml), 再分别配制浓度 0.125~1.0mg/

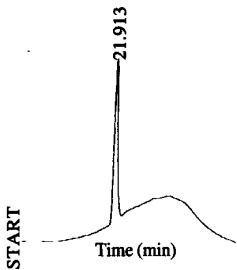


图1 标准  $\beta$ -酪啡肽-7 色谱图(215nm)  
Fig.1 Chromatogram of standard  $\beta$ -CM-7

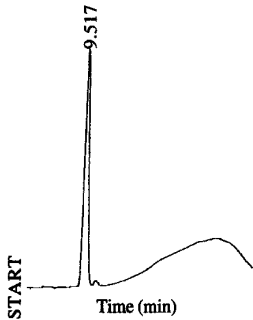


图2 标准  $\beta$ -酪啡肽-5 色谱图(215nm)  
Fig.2 Chromatogram of standard  $\beta$ -CM-5

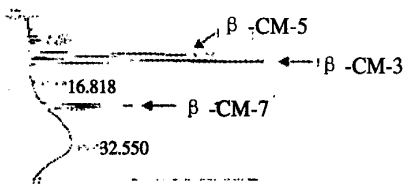


图3 标准酪啡肽色谱图  
Fig.3 Chromatogram of standard casomorphins

ml 浓度。结果显示, 在 0.125~1.0mg/ml 范围内与峰面积呈良好的线性关系, 以浓度(Y)对峰面积进行回归计算, 得回归方程:

$\beta$ -CM-5:  $y=5388.9x+76701$ , 回归系数  $r=0.9929$  ( $n=4$ )  
 $\beta$ -CM-7:  $y=5077.5x-58652$ , 回归系数  $r=0.9989$  ( $n=4$ )

2.4 稳定性实验

配制浓度为 0.25mg/ml ( $\beta$ -CM-5) 和 0.125mg/ml ( $\beta$ -CM-

表2  $\beta$ -酪啡肽-5 的稳定性  
Table 2 Stability experiment of  $\beta$ -CM-5

面积 Area	平均面积 Average area	日内精密密度 RSD
180026		
177240	182140 $\pm$ 13290.67	7.29%
170206		
201088		

7)溶液,连续进样4次,结果如表2和表3。

表3  $\beta$ -酪啡肽-7的稳定性

Table 3 Stability experiment of  $\beta$ -Casomorphin-7

面积 Area	平均面积 Average area	日内精密度 RSD
152624	141902±7373.128	5.19%
138278		
136139		
140567		

### 3 讨论

通过改进以往所建立的HPLC条件,在酪蛋白酶解液中检测到酪啡肽物质,与文献报道一致<sup>[4]</sup>。表明建立的RP-HPLC方法适合酪啡肽等小分子肽的研究。

使用RP-HPLC法鉴定水解液中肽是目前国内外最常用的方法,已有大量的文献报道<sup>[5,6]</sup>,方法各异。国外最初采用制备HPLC结合其他方法已经从牛乳、人乳、水牛乳及奶酪的酶解产物中检测到酪啡肽样物质<sup>[7~9]</sup>,但因酪啡肽样物质均是以无活性的方式隐藏在蛋白质的多肽链中,必须通过适当酶解才能释放出来,而酶解的产物成分很复杂,难以控制其肽链大小和长短,其分离和纯化难度大,从其酶解产物中获得活性肽物质显得得不偿失,或还没有切实可行的方法。所以目前国外多使用人工合成的纯品进行有关的实验,回避纯化的问题。但因人工合成的纯品价格昂贵,严重的影响了活性肽的推广应用和进一步的研究。

由于酶解液中蛋白片段的种类多且粘度大,很难用一种方法达到纯化的目的。目前常用的纯化方法是反相高压液相色谱,以乙腈、三氟乙酸等作为流动相。三氟乙酸因具有纯度高、良好的助溶性、低的紫外吸收而成为应用最为广泛的流动相酸性调节剂。但乙腈、三氟乙酸均是有毒物质,又成本较高(色谱纯级),常规用于实验室分析有一定困难。建立快速、灵敏、适用的定量分析酪啡肽的方法很有必要。

实验室以往建立了RP-HPLC定性的方法对酪啡肽进行检测,选用C<sub>18</sub>柱,甲醇:水(1:1)非梯度洗脱<sup>[10]</sup>。为了使所建立的方法快速灵敏,简单易行,实验在以往定性检测方法的基础上,参照国内外有关方法<sup>[11]</sup>,改用C<sub>8</sub>柱,以乙腈作为流动相梯度洗脱,将价格昂贵的三氟乙酸改为磷酸(分析纯),使成本大大降低,其分离效果不变,有好的线形和回归系数,精密度良好。本方法快速、准确、重复性好。不仅为水解的多肽混合

物提供快速准确的分析方法,也为一般的多肽产品提供了一种常规的分析手段。

本实验对Sigma公司CM-3, CM-5, CM-7三种结构极为相似标准品测定结果均得到单一主峰,三者混合后有不同的保留时间,表明本法的分离效率较高,可快速准确分离分析结构相似的小分子多肽。

### 参考文献:

- [1] Geysen H M, Meloen R H, Barteling S J. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81: 3998.
- [2] Houghten R A. General method for the rapid solid-phase synthesis of large number of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82:5131.
- [3] Echler J, Beyermann M, Bienert M. Application of cellulose paper as support material in simultaneous solid-phase peptide synthesis[J]. Collect Czech Chem Commun, 1989, 54: 1746.
- [4] Stelios E Kaminarides. Comparatives study of the separation of casein from bovine, ovine and caprine milks using HPLC[J]. Journal of Dairy Research, 1993, 60: 495-504.
- [5] Victor Brantl, Hansjorg Teschemacher, Agnes Henschel, et al. Novel opioid peptides derived from casein ( $\beta$ -casomorphin) I isolation from bovine casein peptone, Hoppe-seyler's Z[J]. Physiol Chem, 1979 Bd 360S: 1211-1216;
- [6] Masaaki Yoshikawa, Fumito Tani, Tadaaki Ashikaga, et al. purification and characterization of an opioid antagonist from a peptic digest of bovine  $\kappa$ -casein[J]. Agri Biol Chem, 1986, 50(11): 2951-2954.
- [7] Hideo Chiba, Fumito Tani, Masaaki Yoshikawa(Japan). Opioid antagonist peptides derived from  $\kappa$ -casein[J]. J of Dairy Research, 1989, 56: 363-366.
- [8] Yasunori Nakamura, Naoyuki Yamamoto, Kumi Saka, et al. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibition from sour milk[J]. J Dairy Sci, 1995, 78: 777-783.
- [9] Muehlenkamp-M R, Warthesen-J J. Beta-Casomorphins: analysis in cheese and susceptibility to proteolytic enzymes from Lactococcus lactis ssp. cremoris[J]. Journal of Dairy Science, 1996, 79: 1, 20-26.
- [10] 张源淑, 邹思湘, 陈伟华. 用HPLC测定酪蛋白酶解产物中的 $\beta$ -Casomorphin-7[J]. 中国乳品工业, 1999, 27(1): 37-39.
- [11] 达世禄, 等. 色谱学导论[M]. 武汉大学出版社, 1988. 507-514.