

螺旋槽圆盘柱高速逆流色谱及其在多肽和蛋白分离中的应用

胡光辉, 曹学丽

北京工商大学化学与环境工程学院 北京市植物资源研究开发重点实验室, 北京 100048

摘要: 本研究重点考察了实验室自行设计研制的 J 型螺旋槽圆盘柱逆流色谱系统对正丁醇-醋酸-水体系和聚乙二醇(PEG1000)-磷酸盐-水双水相体系的固定相保留能力, 并研究了流动相流速(F)、柱转速(w)和温度(T)等因素对固定相保留率(S_f)的影响。结果表明, 该新型分离柱可使两种溶剂体系在 L-I-T、U-O-H 和 L-I-H 三种洗脱模式下都可获得较高的 S_f , 即以下相为流动相, 采用由螺旋槽内端(I)向外端(O)的流通方式, 或以上相为流动相, 采用由螺旋槽外端(O)向内端(I)的流通方式可以获得较高的固定相保留。其保留能力较传统的螺旋管逆流色谱柱有显著提高。 S_f 随着 w 的增加而升高, 随着 F 的增加而降低, 且 S_f 与 $F^{1/2}/w$ 线性相关。20°C~45°C 之间温度对 S_f 影响不明显, 但低于 20°C 不利于双水相体系的保留。应用研究表明, 采用正丁醇-醋酸-水(4:1:5, V/V/V)和 PEG1000-磷酸钾盐-水(12.5:12.5:75, W/W/W)(pH 9.0)体系可以在较高的流动相流速和较高的固定相保留下分别实现对亮氨酸-酪氨酸(Leu-Tyr)和缬氨酸-酪氨酸(Val-Tyr)二肽混合物、细胞色素 C 与肌红蛋白混合物、肌红蛋白与溶菌酶混合物及鸡蛋清样品中蛋白成分的成功分离。

关键词: 高速逆流色谱, 螺旋槽圆盘柱, 多肽, 蛋白质, 分离纯化

Application of spiral disk column in high-speed counter-current chromatography for peptide and protein separation

Guanghui Hu, and Xueli Cao

Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, school of chemical and Environmental Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China

Abstract: In order to improve the stationary phase retention of polar solvent systems and aqueous two-phase systems (ATPSs), we designed a multiple spiral disk assembly for type-J high-speed counter-current chromatography (HSCCC). The stationary phase retention was studied under different elution modes by using two solvent systems that contained 1-butanol-acetic acid-water (4:1:5, V/V/V) and polyethylene glycol (PEG) 1000- K_2HPO_4 -water (12.5:12.5:75, W/W/W). The best retention was obtained in L-I-T, U-O-H, L-I-H three modes by pumping lower mobile phase from inner terminal (I) to outer terminal (O), and upper mobile phase from outer terminal (O) to inner terminal (I) at a relatively high flow rate. Meanwhile, the relationship between retention percentage of the stationary phase (S_f) and various parameters such as flow-rate (F), rotation speed (w) and column temperature (T) was also studied. S_f increased with the increase of w and decreased with the increase of F . Regression analysis showed a linear relationship

Received: November 20, 2008; **Accepted:** February 18, 2009

Supported by: Beijing Municipal Natural Science Foundation (No. 2042006).

Corresponding author: Xueli Cao. Tel/Fax: +86-10-68983116; E-mail: caoxl@th.btbu.edu.cn

北京市自然科学基金项目(No. 2042006)资助。

between S_f and $F^{1/2}/w$. The influence of T on S_f was not obvious between 20°C and 40°C, lower temperature than 20°C was not suitable for viscous ATPSs. Acceptable resolutions were achieved when it was applied for the separation of dipeptides including Leu-Tyr and Val-Tyr by using 1-butanol-acetic acid-water (4:1:5, V/V/V) solvent system. The proteins including cytochrome C and myoglobin, lysozyme and myoglobin, and fresh chicken egg-white proteins were well separated by 12.5% PEG1000-12.5% K_2HPO_4 -75% water (pH 9.0) and 16% PEG 1000-12.5% K_2HPO_4 -71.5% water (pH 8.0) system.

Keywords: high-speed counter-current chromatography, spiral disk assembly, peptide, protein, separation and purification

高速逆流色谱 (High-speed counter-current chromatography, HSCCC) 作为一种新型连续的液液分配色谱分离技术, 近年来已广泛应用于天然产物和生物制品的分离纯化, 尤其在小分子活性成分的分离制备方面优势显著^[1,2]。目前, 国内外商业化的高速逆流色谱仪, 都采用 J 型多层盘绕的聚四氟乙烯螺旋管柱系统(图 1)。它利用螺旋管柱在离心力场中的同步行星式运动而产生的切向阿基米德螺旋力和径向离心力, 使两相溶剂体系在螺旋管内建立起一种特殊的单向性流体动力学平衡, 从而实现液态固定相的高效保留。对于分离小分子物质的两相溶剂体系的固定相保留率可达到 70% 以上。但是这些溶剂体系大都含有有机相, 不适合用于蛋白质等生物大分子的分离。

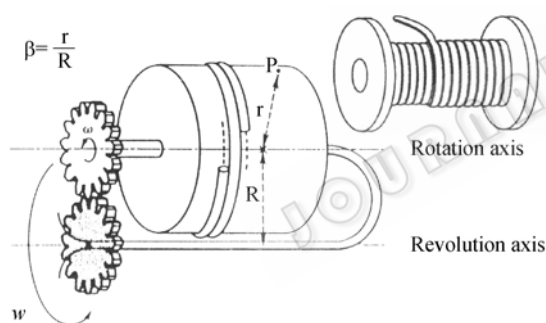


图 1 行星式多层螺旋管逆流色谱柱组件示意图
Fig. 1 Design principle of the multilayer coil planet centrifuge.

对于分离蛋白质等生物大分子所必需的高粘度、低界面张力两相溶剂体系, 如双水相聚合物体系, 由于其粘度大, 扩散系数小, 两相密度差也很小, 分层时间长, 在柱内有出现乳化的倾向。此时由螺旋管柱的同步行星式运动产生的综合力场已不足以使两相聚合物体系建立起良好的单向性流体动力平衡, 使得常用的聚合物体系在普通 HSCCC 仪上固定相保留值低于 10%, 因而限制了高速逆流色谱技术在分离生物大分子物质方面的应用。

国内外学者从 HSCCC 仪器分离系统的改进、

分离工艺参数的优化等多方面进行了大量探索。正交轴型逆流色谱仪, 由于增加了一个横向的振荡力场, 有效地降低了传质阻力, 使得聚合物体系的固定相保留率得到了很大的提高, 曾应用于多种蛋白质、酶类、糖蛋白以及多糖的分离^[3-7]。但是由于固定相保留率一般都在 50% 以下, 导致蛋白质的分离效果仍不够理想。且其仪器设备结构较为复杂, 使其推广应用受到限制。Shinomiya 等^[7,8]还曾设计了 2 种螺线型盘绕管柱组件, 并试用于细胞色素 C、肌红蛋白及溶菌酶 3 种标准蛋白质的分离。实验结果表明, 3 种蛋白质的分离度和所用双水相体系固定相的保留能力都没有得到明显提高。

近年来, ITO 教授提出一种螺线型圆盘柱(Spiral disk assembly)的柱体设计^[9-11], 通过螺距的快速增长实现径向离心力的快速梯度增长。以此代替 HSCCC 的螺旋管柱, 可以使含有机相的极性溶剂体系和双水相聚合物体系都能达到良好的固定相保留, 尤其是对双水相聚合物体系的保留有了显著的提高, 可以从原来的 10% 提高到 70% 以上, 有望发展成为一种既适用于天然小分子物质又适用于大分子物质分离的新型逆流色谱仪器, 解决极性小分子成分以及水溶性大分子成分的分离纯化问题。

本实验室根据植物活性成分分离的具体要求, 自行设计研制了一台螺线型流通槽圆盘柱高速逆流色谱仪, 并已申请国家专利^[12]。本研究重点考察了该仪器对分离多肽等常用的正丁醇-醋酸-水体系和分离蛋白质常用的聚乙二醇(PEG)-磷酸盐体系的保留规律及最佳保留能力, 以及流速、转速、温度对固定相保留率的影响, 并将其初步应用于一些蛋白质和多肽的分离。

1 材料与方法

1.1 仪器

本实验所研制的 J 型螺线型流通槽圆盘柱高速逆流色谱仪, 其分离柱的结构如图 2 所示。

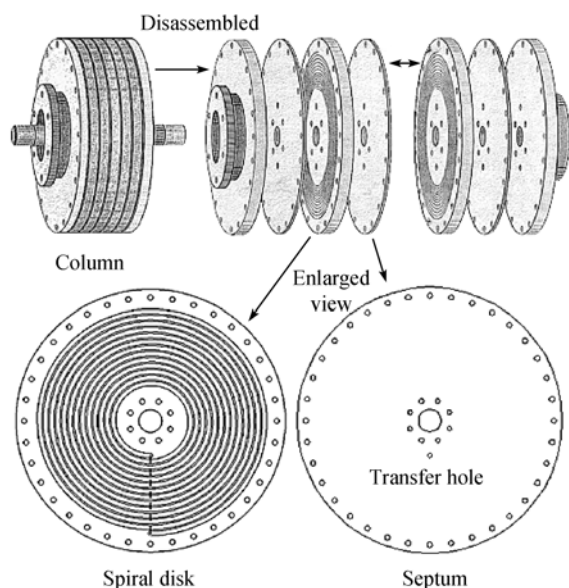


图2 螺线型流通槽逆流色谱分离柱及其分解和放大图
Fig. 2 Exploded view of the multiple spiral disks column.

该分离柱由5个刻蚀有单螺旋槽的聚一氯三氟乙烯圆盘和6个带有导流孔的聚四氟乙烯隔板间隔层叠组成,并经2个不锈钢法兰盘及其内外圈设置的多个不锈钢螺钉均匀固定压紧在一起,构成柱体积为74 mL的分离柱。该分离柱与另一个重量相同的配重体平衡设置在J型高速逆流色谱行星架的两边,公转半径9.7 cm。整个旋转体装置在恒温夹套内,通过外接循环水浴控制分离柱温度。进样环容积为10 mL。主机的转速范围为50~900 r/min,无极变频控制。

该分离柱与传统的螺旋管柱相比在结构上有很大的不同。传统的螺旋管柱采取在支持件上缠绕多层螺旋管的方式,每层螺旋管之间螺距的增长只相当于一个螺旋管的外径。而螺旋槽分离柱则采取在圆盘上刻蚀螺旋槽的方式,螺旋槽的螺距可以根据需要来设计。将刻槽的圆盘通过隔板密封成一条矩形螺旋槽,多条这样的螺旋槽串联起来就构成了一个分离柱。这种设计最大的特点是由于螺距的增长,使其中液体所受的离心力呈快速的梯度增长,可以大大提高其对液体固定相的保留能力。本研究所述的螺旋槽圆盘柱在每个圆盘上刻蚀有一条单螺旋槽,螺距为4 mm,其 β 值从0.24增加到0.78。必要时,可在一个圆盘上同时刻蚀多螺旋槽体,如四螺旋槽体,其螺距可以提高4倍。对固定相的保留能力可以进一步提高。

其他外围设备包括:S-1007 恒流泵(北京圣益通技术开发有限责任公司)、8823B 紫外检测仪(北京市新技术应用研究所)、HX-1050 循环水浴(北京博医康实验仪器有限公司)、N2000 色谱工作站(浙江大学智达信息工程有限公司)、BSZ-100 自动部分收集器(上海沪西分析仪器厂)等。

1.2 试剂

磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、正丁醇、冰醋酸均为分析纯,购自北京化学试剂公司。水为蒸馏水。

PEG1000 和细胞色素 C(Cytochrome C)、肌红蛋白(Myoglobin)、溶菌酶(Lysozyme)、卵白蛋白(Albumin)、转铁蛋白(Conalbumin)、亮氨酸-酪氨酸(Leu-Tyr)、缬氨酸-酪氨酸(Val-Tyr)等标准样品均购于Sigma 公司(USA)。

1.3 溶剂体系及样品的配制

本研究所采用的溶剂体系有正丁醇-醋酸-水体系(4:1:5, V/V/V),聚乙二醇(PEG1000)-磷酸盐-水(12.5:12.5:75, W/W/W) (pH 9.0)和(16:12.5:71.5, W/W/W) (pH 8.0)等体系。根据溶剂体系的组成,在分液漏斗中配制并充分混合,室温静置平衡分层,使用前分离。

标准样品混合溶液的配制:称取一定量的不同种类的标准样品(二肽或蛋白)溶解于一定体积的上相或下相流动相中,制得混合样品。

鸡蛋清样品^[13]:取一定体积的鲜蛋清,用2倍体积的含0.4 mol/L NaCl和10 mmol/L β -巯基乙醇的0.05 mol/L Tris-HCl(pH 9.0)缓冲液稀释,轻微搅拌过夜。取一定量处理后的鸡蛋清样品作为溶剂,计算需加入的PEG1000和磷酸盐的量,使配成的溶液组成与所用分离体系相同,轻微搅拌至所有固体完全溶解,取5.0 g 进样。

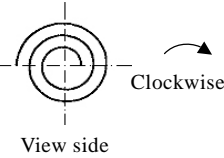
1.4 高速逆流色谱洗脱模式

在采用高速逆流色谱进行分离时,其分离模式可用3个参数进行描述,包括色谱柱转向、流动相的选择及流动相在螺旋槽中的流动方向,即每一种溶剂体系可有 $8(2^3)$ 种不同的分离洗脱模式供选择。对一个两端封闭的分离柱而言,无论转动方向如何,流通槽中互不相溶的两相溶剂都趋于向同一端流动,该端定义为首端(H),另一端为尾端(T),首尾端的位置会随着转动方向的不同而不同。同时对于同一溶剂体系,可选择上相(U)或者下相(L)作为流动相。对

于螺旋槽圆盘柱而言，其进口端和出口端可以是螺旋槽的内端(I)，也可以是螺旋槽的外端(O)，实验过程中可选择流动相从内向外(I→O)或者从外向内(O→I)。但是该内外两端根据柱体转动方向的不同可以是首端也可以是尾端。本实验中 8 种分离洗脱模式的表示及其意义如表 1 所示。

表 1 8 种分离洗脱模式的表示及其意义

Table 1 Description of eight elution modes

Elution mode	Meaning			Defining of the rotation direction
	Rotation	Mobile phase	Flow	
L-I-T*	Clockwise	L	I→O	Viewing the spiral disk from the opposite side of the disk grooved with channels as follows: 
U-I-T		U	I→O	
L-O-H		L	O→I	
U-O-H		U	O→I	
L-I-H	Counter Clockwise	L	I→O	View side
U-I-H		U	I→O	
L-O-T		L	O→I	
U-O-T		U	O→I	

1.5 逆流色谱分离过程及固定相保留率(S_f)测定

将预先平衡好的两相溶剂体系分离，选择其中一相为固定相，另一相为流动相。先用固定相充满整个管路(体积记为 V_t)，然后调节仪器到一定转速，将流动相以一定流速(F)泵入柱体内(柱体积为 V_c)，用量筒收集出口端推出的固定相(达到平衡时的体积记为 V_e)。固定相保留率计算为： $S_f = (V_t - V_e)/V_c \times 100\%$ 。将待分离样品进样即可进行分离。

1.6 电泳分析

对分离后的蛋白级分进行透析(48 h)和浓缩后，采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行定性检测。所用分离胶浓度为 15.0%，浓缩胶浓度为 4.0%，考马斯亮蓝(R-250)染色。

2 结果与讨论

2.1 不同分离洗脱模式下的固定相保留率

通过对 8 种洗脱模式不同流速下 S_f 的测定结果表明，2 种溶剂体系：正丁醇-醋酸-水体系(B-A-W) (4:1:5, V/V/V)和 PEG1000-磷酸盐-水体系(PEG-Kpi-W)(12.5:12.5:75, W/W/W)的固定相保留率 S_f 呈现相似的变化趋势。在 8 种分离洗脱模式中，仅有 L-I-T、U-O-H 和 L-I-H 三种模式下固定相保留较为理想，如图 3 所示。其他模式下，固定相都几乎没有保留。

该变化趋势与 Ito 的单螺旋盘实验结果相似^[10]。这表明就该螺旋槽圆盘柱而言，对于上述强极性 & 双水相体系，当采用下相为流动相时，采取由内端向外端(I→O)洗脱模式可以获得较好的固定相保留，而无论其哪端为首端或尾端；而当采用上相为流动相时，采取由外端向内端(O→I)洗脱模式，且其首端位于外端，可以获得较好的固定相保留。

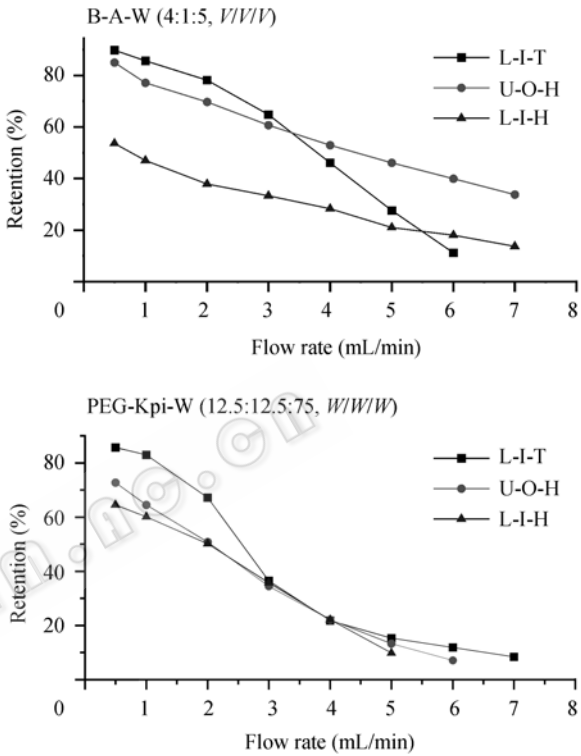


图 3 两种溶剂体系不同洗脱模式不同流速下的固定相保留率
Fig. 3 Stationary phase retention of the two solvent systems under different elution modes and different flow-rates.

同时可以看出该螺旋槽圆盘柱对上述 2 种体系的固定相保留能力较传统的螺旋管逆流色谱柱有显著的提高。对正丁醇-醋酸-水(4:1:5, V/V/V)体系，在 L-I-T 和 U-O-H 模式下，当流速低于 3 mL/min 时，其固定相保留率可以达到 60% 以上；在流速低于 1 mL/min 时，其保留率可以达到近 80% 以上，提高幅度更加显著。对于 PEG1000-磷酸盐-水体系(12.5:12.5:75, W/W/W)，在 3 种模式下，当流速低于 2 mL/min 时，其固定相保留率可以达到 50% 以上；在流速低于 1 mL/min 时，其保留率可以达到 60% 以上，在 L-I-T 模式下甚至可以达到 80% 以上。这些都是螺旋管逆流色谱柱所不曾达到的。

2.2 流动相流速对固定相保留率的影响

由图 3 可以看出, 上述 2 种体系在不同的分离模式下, 随着流动相流速的提高, 固定相保留率都呈现不同程度的下降趋势。对固定相保留率 S_f 与流速的平方根 $F^{1/2}$ 和转速 w 的比值进行一元线性回归分析, 如图 4(A、C)所示。2 种溶剂体系在 3 种模式(L-I-H、U-O-H 和 L-I-T)下 S_f 与 $F^{1/2}/w$ 都呈线性比例关系, PEG1000 双水相体系相关系数依次为 0.9489、0.9919 和 0.9217; 正丁醇-醋酸-水体系相关系数依次为 0.9958、0.9934 和 0.8334。这与文献报道的螺旋管逆流色谱分离柱中 S_f 与 $F^{1/2}/w$ 的保留规律相一致^[14]。

当流速大于 4.0 mL/min 时, 过低的固定相保留已经不适合进行分离实验。对于常用的 L-I-T 模式, 在 1.0~4.0 mL/min 范围内采用 $S_f = A - BF^{1/2}/w$ 进行拟合(图 4 B、D), 相关系数分别提高到 0.9939 和 0.9566, A 值分别为 126.6% 和 106.1%。

对于理想的单向性流体动力学平衡体系, 即平衡时一相占据首端而另外一相占据尾端的体系, 截距(A)约为 100%。由于 ATPSs 体系界面张力小, 两相密度差小, 粘度大, 两相分层较为困难, 使得实际计算的 A 值与理想情况有偏差。

2.3 温度和转速对固定相保留率的影响

考虑到上述 2 种溶剂体系都有较高的粘度, 两

相界面张力较小, 分层时间较长, 本实验考察了温度对其固定相保留率的影响。通过循环水浴控制色谱柱温度, 设定转速 800 r/min, 在 L-I-T 模式 1.0 mL/min 流速下, 测定 2 种溶剂体系在不同温度时的 S_f , 结果如图 5 所示。

从图 5 可以看出, 在 5°C~45°C 范围内, 温度对正丁醇-醋酸-水体系的固定相保留影响不大, 但 30°C 以上 S_f 略有降低, 这可能与有机溶剂的挥发有关。而温度对 PEG1000-磷酸盐-水双水相溶剂体系 S_f 影响很大。在 20°C 以下, 由于两相体系的粘度较高, 导致其分层困难, 固定相保留率较低, 在 20°C 以上时曲线趋于平直。因此, 在采用双水相体系时应使柱温保持在 20°C 以上。

同时, 还考察了温度为 25°C, 在 L-I-T 模式 1.0 mL/min 流速下, 不同转速对 2 种溶剂体系时的固定相保留率的影响, 结果如图 6 所示。2 种溶剂体系的 S_f 随着转速的增加而升高, 转速低于 600 r/min 时对 S_f 影响较大, 600 r/min 以上时曲线趋于平缓。转速范围是仪器的性能参数, 为了获得更高的保留率, 实验中一般采用尽可能高的转速。同时, 在较高的转速下, 分离柱内两相混合的频率更高, 有利于两相间传质, 提高分离效率。

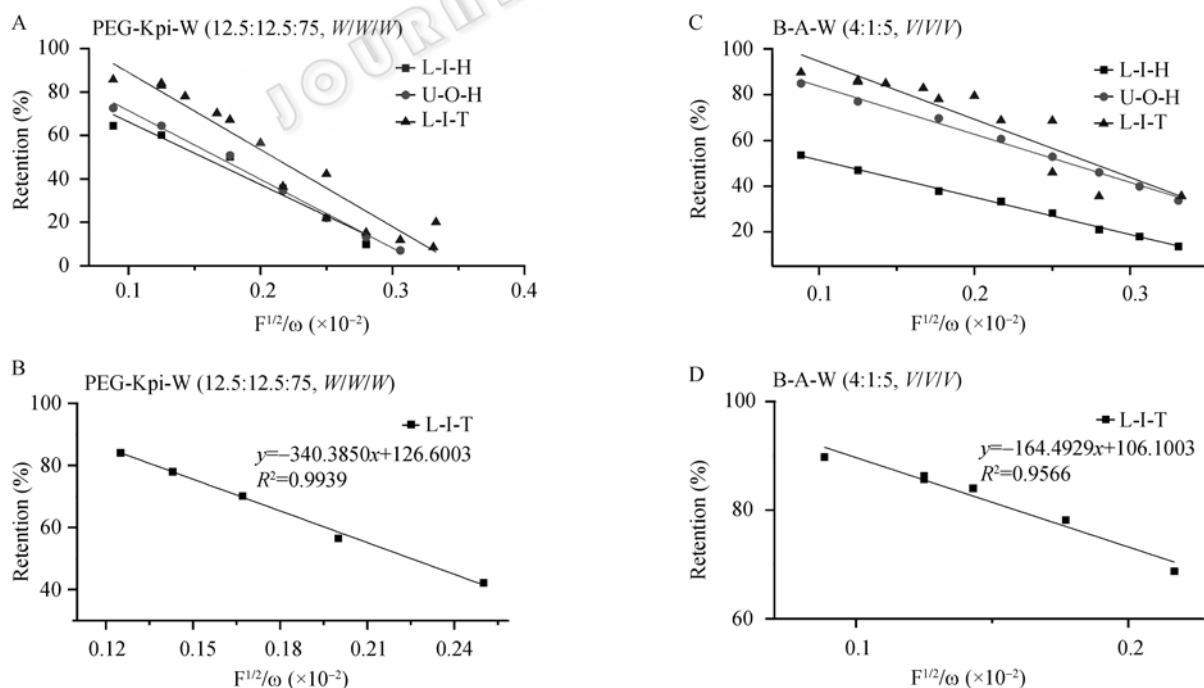


图 4 对 S_f 与 $F^{1/2}/w$ 回归分析

Fig. 4 Regression analysis between S_f and $F^{1/2}/w$.

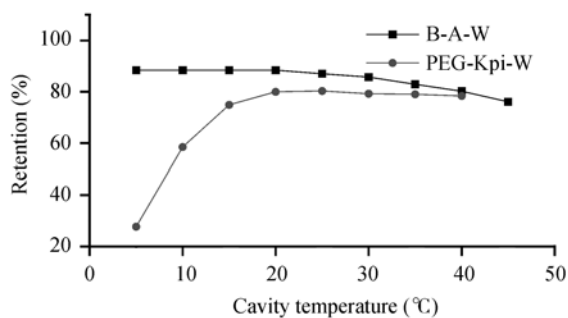


图 5 温度对固定相保留率的影响

Fig. 5 Retention of the stationary phase at various column temperatures.

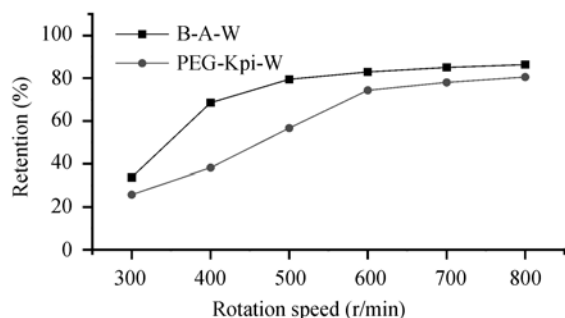


图 6 转速对固定相保留率的影响

Fig. 6 Retention of the stationary phase at various revolution speeds.

2.4 样品的分离

2.4.1 标准二肽混合物的分离

采用上述螺旋型圆盘柱逆流色谱仪, 正丁醇-醋酸-水(4:1:5, V/V/V)体系进行二肽混合物的分离, 如图 7 所示。分配系数($K = C_L / C_U$)较小的 Leu-Tyr($K = 1.18$)在 Val-Tyr($K = 1.89$)之前被洗脱出来。其中分配系数的值参见文献[9]。流速为 2.0 mL/min 时二者可在 75 min 内实现基线分离, 分离度为 0.9。相同洗脱模式下, 当流速提高为 4.0 mL/min 时, 固定相保留率仍可达到 50.5%, 2 种二肽标准品的分离度基本不变, 而分离时间缩短为 36 min。分离时间随着流速的提高成倍降低, 极大地提高了分离效率。

2.4.2 标准蛋白混合物的分离

本研究采用文献报道^[3,9]的 PEG1000-磷酸盐-水(12.5:12.5:75, W/W/W)体系试验对标准蛋白质混合物的分离效果, 结果如图 8 所示。图 8 A 在 L-I-T 模式下, 分配系数($K = C_L / C_U$)较大的细胞色素 C($K = 103.7$)^[3]在肌红蛋白($K = 2.08$)^[3]之前被洗脱出来, 2 种成分在 100 min 内实现了基线分离, 细胞色素 C 与肌红蛋白的分离度为 1.5, 固定相保留率为 82%。图 8 B 对于分配系数 $K = 0.59$ ^[9]的溶菌酶, 在 U-O-H

模式下较肌红蛋白先被洗脱出来, 2 种成分在 140 min 内实现了有效的分离, 溶菌酶与肌红蛋白的分离度为 0.9, 图中溶菌酶的肩峰为杂质峰, 固定相保留率为 64.5%。与 Shibusawa^[3]的实验结果对比, 在更快的流速和更高固定相保留率下, 分离度有所提高, 分离时间更短。

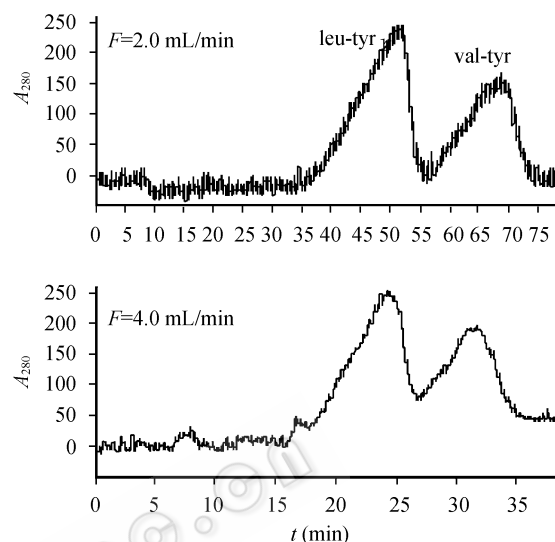


图 7 二肽标准品混合物的分离

Fig. 7 Separation of dipeptides mixture. Experimental conditions: apparatus: type-J HSCCC centrifuge with spiral disk column; rotation speed: 800 r/min; solvent system: 1-butanol-acetic acid-water (4:1:5, V/V/V); detection: 280 nm; sample: a mixture of Leu-Tyr (7.0 mg) and Val-Tyr (5.0 mg) in 1 mL lower phase; elution mode: U-O-H.

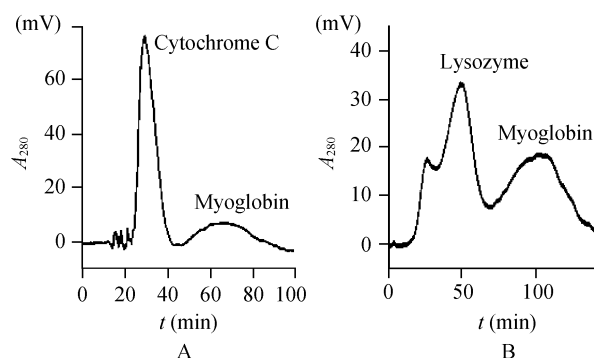


图 8 蛋白标准品混合物的分离

Fig. 8 Separation of protein mixtures. Experimental conditions: apparatus: type-J HSCCC centrifuge with spiral disk column; rotation speed: 800 r/min; solvent system: PEG1000- K_2HPO_4 -water (12.5:12.5:75, W/W/W) at pH 9.0; flow-rate: 1 mL/min; detection: 280 nm. (A) Sample: a mixture of cytochrome c (0.3 mg) and myoglobin (0.3 mg) in 1 mL mobile phase; elution mode: L-I-T. (B) Sample: a mixture of lysozyme (0.2 mg) and myoglobin (0.2 mg) in 3 mL mobile phase; elution mode: U-O-H.

2.4.3 鸡蛋清蛋白的分离

采用上述螺旋槽圆盘柱系统对实际鸡蛋清蛋白样品进行分离试验。鸡蛋清中主要含有卵转铁蛋白(12%~15%)、卵白蛋白(54%~57%)、溶菌酶(<3.4%)等蛋白成分^[15]。文献中曾报道了采用 PEG1000-磷酸盐-水体系分离鸡蛋清蛋白时,不同 pH 值(6.0~9.2)和 PEG 浓度(13%~16%)对上述几种蛋白分配系数的影响^[7,16]。结果表明,在 PEG1000 浓度为 16%,pH 值为 8 或 9.2 时,几种蛋白之间分配系数的差异较大,有利于分离。本实验中也曾采用这 2 种 pH 条件进行了分离,2 种条件下的分离图谱没有显著的差异。图 9 为采用 PEG1000-磷酸盐-水(16:12.5:71.5, W/W/W)(pH 8.0)体系、L-I-T 洗脱模式,在流速为 1.5 mL/min 下所得分离图谱。其固定相保留率为 75%。150 min 后,为了尽快洗脱保留时间较长的其他成分,改换 U-O-H 的洗脱模式。

经 SDS-PAGE 电泳检测,图 9 中峰 1 为卵转铁蛋白、峰 2 为卵白蛋白,其分离度为 1.25。对 90 min 之后流出的溶液以及转换模式后洗脱出的部分进行收集,浓缩,检测,未出现明显的溶菌酶条带。这可能与蛋清样品中溶菌酶的含量很少有关。

3 结论

本研究表明,相对于传统的多层螺旋管逆流色

谱仪,螺旋槽圆盘柱逆流色谱系统对分离肽类常用的正丁醇-醋酸-水极性体系和分离蛋白常用的 PEG1000-磷酸盐-水双水相体系的固定相保留能力有了显著提高,从而更有利于肽类、蛋白质等生物样品的高效分离。其固定相保留率 S_f 与流速 F 及转速 w 之间满足 $S_f = A - BF^{1/2}/w$ 关系,可用于一定条件下固定相保留值的预测。同时转速对上述 2 种体系的固定相保留率均有一定的影响,但温度对于粘度较大的双水相体系影响较大,该溶剂体系不适合在较低的温度下使用。

洗脱模式、流速、温度、转速等因素对固定相保留的影响是同时作用的。实验中需根据溶剂体系的组成和固定相,选择合适的洗脱模式和流动相流速,在仪器设计转速范围内选择尽可能高的转速。同时条件容许还应采取控温措施,这对于粘度较大的溶剂体系影响是较大的。

初步的应用结果表明,利用该螺旋槽圆盘柱逆流色谱系统,采用正丁醇-醋酸-水和 PEG1000-磷酸钾盐-水体系可以在较高的流动相流速和较高的固定相保留下分别实现对二肽类物质和蛋白混合物及实际样品中蛋白成分的成功分离。对于粘度较高、分子量较大的聚合物双水相体系还需要通过改善传质效率等措施,进一步提高蛋白质等生物大分子的分离效率。

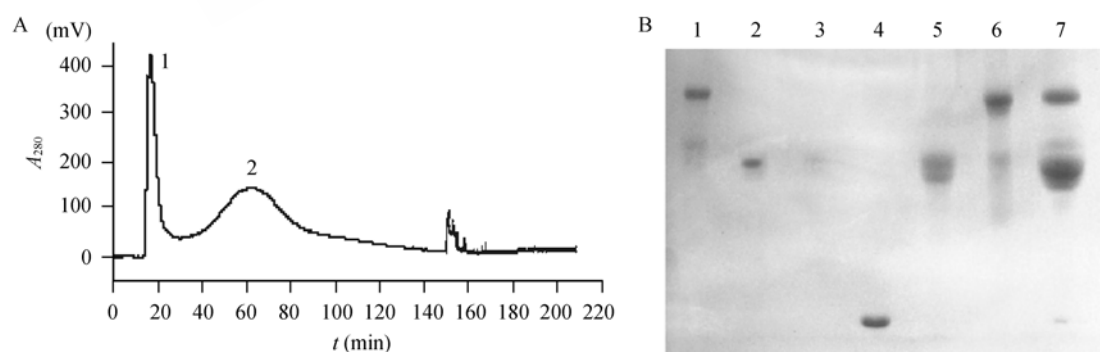


图 9 鸡蛋清样品的分离(A)及各分离级分的 SDS-PAGE 检测(B)

Fig. 9 Separation of chicken egg-white (A) and SDS-PAGE of each fraction (B). (A) Apparatus: type-J HSCCC centrifuge with spiral disk column; rotation speed: 800 r/min; solvent system: PEG1000- K_2HPO_4 -water (16:12.5:71.5, W/W/W) at pH 8.0; flow-rate: 1.5 mL/min; detection: 280 nm; sample: chicken egg-white solution (5.0 g) prepared in above-mentioned method; elution mode: L-I-T and followed by U-O-H. (B) SDS-PAGE analysis of chicken egg-white fractions obtained from (A). 1: peak 1; 2: peak 2; 3: peak 2, tail (90~140 min); 4: lysozyme; 5: ovalbumin; 6: conalbumin; 7: chicken egg-white.

REFERENCES

- [1] Ito Y, Conway WD (ed.). High-speed Countercurrent Chromatography, in Chemical Analysis. New York: Wiley-Interscience, 1995.
- [2] Cao XL. High-speed Countercurrent Chromatographic Separation Techniques. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
曹学丽. 高速逆流色谱分离技术及应用. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [3] Shibusawa Y, Ito Y. Protein separation with aqueous-aqueous polymer systems by two types of counter-current chromatographs. *J Chromatogr A*, 1991, **550**: 695–704.
- [4] Shibusawa Y, Ito Y, Ikewaki K, *et al.* Counter-current chromatography of lipoproteins with a polymer phase system using the cross-axis synchronous coil planet centrifuge. *J Chromatogr A*, 1992, **596**(1): 118–122.
- [5] Shibusawa Y, Mugiyama M, Matsumoto U, *et al.* Complementary use of counter-current chromatography and hydroxyapatite chromatography for the separation of three main classes of lipoproteins from human serum. *J Chromatogr B*, 1995, **664**(2): 295–301.
- [6] Lee YW. Cross-axis Countercurrent Chromatography: A Versatile Technique for Biotech Purification, in Countercurrent Chromatography. New York: Marcel Dekker, 1999.
- [7] Shibusawa Y, Iino S, Shindo H, *et al.* Separation of chicken egg white proteins by high-speed countercurrent chromatography. *J Liq Chromatogr Related Technol*, 2001, **24**(13): 2007–2016.
- [8] Shinomiya K, Kabasawa Y, Ito Y. Protein separation by cross axis coil planet centrifuge with spiral column assemblies. *J Liq Chromatogr Related Technol*, 2002, **25**(17): 2665–2678.
- [9] Ito Y, Yang FQ, Fitze PE, *et al.* Improved spiral disk assembly for high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A*, 2003, **1017** (1-2): 71–81.
- [10] Ito Y, Yang FQ, Fitze PE, *et al.* Spiral disk assembly for HSCCC: Column design and basic studies on chromatographic resolution and stationary phase retention. *J Liq Chromatogr Related Technol*, 2003, **26**(9-10): 1355–1372.
- [11] Ito Y, Qi L, Powell J, *et al.* Mixer-settler counter-current chromatography with a barricaded spiral disk assembly with glass beads. *J Chromatogr A*, 2007, **1151**(1-2): 108–114.
- [12] Cao XL, Huo LS, Zhu XP, *et al.* A counter-current chromatography column for the separation of both small molecules and macromolecules: CN, 2007201739463, 2008-11-05.
曹学丽, 霍亮生, 朱小平, 等. 一种适用于小分子和生物大分子分离的逆流色谱分离柱: 中国, 2007201739463, 2008-11-05.
- [13] Awade AC, Moreau S, Molle D, *et al.* Two-step chromatographic procedure for the purification of hen egg white ovomucin, lysozyme, ovotransferrin and ovalbumin and characterization of purified proteins. *J Chromatogr A*, 1994, **677**(2): 279–288.
- [14] Du QZ, Wu CJ, Qian GJ, *et al.* Relationship between the flow-rate of the mobile phase and retention of the stationary phase in counter-current chromatography. *J Chromatogr A*, 1999, **835**(1-2): 231–235.
- [15] Bergquist DH. Eggs, in Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 4th Ed. New York: Wiley-Interscience, 1993.
- [16] Zhi WB, Deng QY, Song JN, *et al.* Purification of ovalbumin from hen egg white by high-speed counter-current aqueous two-phase chromatography. *Chin J Biotech*, 2005, **21**(1): 129–134.
鄧文波, 鄧秋云, 宋江楠, 等. 高速逆流双水相色谱法纯化卵白蛋白. 生物工程学报, 2005, **21**(1): 129–134.