

大鲵糖肽组分的高效液相色谱分析 及其抗氧化活性研究

金 桥¹, 魏 芳¹, 佟长青¹, 李 伟^{1,2*}, 孔 亮³

(1. 辽宁省水产品加工及综合利用重点开放实验室, 大连海洋大学食品工程学院, 辽宁 大连 116023;

2. 张家界(中国)金驰大鲵生物科技有限公司, 湖南 张家界 427400; 3. 大连海洋大学海洋环境工程学院, 辽宁 大连 116023)

摘 要: 利用高效液相色谱方法对大鲵糖肽进行分析, 使用 Sino Chrom C₁₈ 反相柱和紫外可变波长检测器, 并测定大鲵糖肽的羟基自由基清除能力。结果表明: 大鲵糖肽组分的最佳液相色谱检测条件为: 检测波长 280 nm; 流动相为 V(乙腈): V(甲醇): V(0.1% 三氟乙酸) = 5: 5: 90; 流速 1.0 mL/min; 进样量 20 μL。大鲵糖肽在 5.78 μg/mL 浓度时, 羟基自由基的清除率达 60.19%, 具有较好的抗氧化活性。

关键词: 大鲵; 糖肽; 高效液相色谱; 抗氧化活性

中图分类号: Q331; Q959.53 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-3186(2011)01-0027-03

HPLC analysis and antioxidative activity of glycopeptides from *Andrias davidianus*

JIN Qiao¹, WEI Fang¹, TONG Chang-qing¹, LI Wei^{1,2*}, KONG Liang³

(1. Key and Open Laboratory of Aquatic Products Processing and Utilization of Liaoning Province, Dalian Ocean University, Dalian Liaoning 116023, China; 2. Jinchu Giant Salamander Biological Technology Co., Ltd, Zhangjiajie (China), Zhangjiajie, Hunan 427400, China; 3. College of Marine Environmental Engineering, Dalian Ocean University, Dalian Liaoning 116023, China)

Abstract: Glycopeptides from *Andrias davidianus* (ADGP) were analysed by HPLC. C₁₈ column Sino Chrom (5 μm, 4.6 mm × 150 mm) and ultraviolet detector were used. The effect of ADGP on ·OH scavenging was studied by 2-deoxyribose oxidation method. The results showed that the optimal separated conditions were detection wavelength 280nm, mobile phase (acetonitrile, methanol and water) at a volume ratio of 5: 5: 90, flow rate 1.0 mL/min, and sampling 20 μL each time. ADGP had 60.19% antioxidant activity at 5.78 μg/mL on ·OH scavenging.

Key words: *Andrias davidianus*; glycopeptide; HPLC; OH-scavenging activity

大鲵俗称娃娃鱼(*Andrias davidianus*), 是世界上现存最大的也是最珍贵的两栖动物。大鲵既是国家二类保护水生野生动物, 也是农业产业化和特色农业的重点开发品种, 具有较大的开发利用潜力。国外学者对两栖类动物皮肤分泌物的研究已长达 40 多年, 报道了 500 多种活性肽^[1]。两栖类动物皮肤中含有的多种生物活性肽是生物活性肽的重要来源^[2]。作者利用高效液相色谱方法(HPLC)对从大鲵皮肤粘液中制备的活性糖肽进行分析, 建立了较为理想的大鲵糖肽的 HPLC 分离体系, 同时, 对大鲵糖肽的抗氧化活性进行了测定。

1 材料方法

1.1 材料、试剂、仪器

大鲵糖肽, 2009 年 9 月由辽宁省水产品加工及综合利用重点开放实验室提供, 分子量 ≤ 4 000, 含糖量占 27.6%

(质量比)。

甲醇、乙腈、三氟乙酸(TFA)为色谱纯。

P230 高效液相色谱仪, UV230 + 紫外检测器, Sino Chrom C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 150 mm) 分析柱(大连依利特分析仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件筛选 将 1 mg 大鲵糖肽溶解于 1 mL 双蒸水中, 进行全波长扫描确定检测波长。通过对流动相配比的顺序优化法进行分离条件的选择^[3]。

1.2.2 大鲵糖肽的 ·OH 清除活力测定 采用改进的 2-脱氧核糖(2-Deoxy-D-ribose) 氧化方法^[4]测定 OH 清除活力。将 5 mmol/L FeSO₄, 5 mmol/L EDTA 和 5 mmol/L 2-Deoxy-D-ribose 各 0.2 mL, 与 0.2 mL 不同浓度的大鲵糖肽混合, 加入 0.1

收稿日期: 2010-06-25

基金项目: 大连市科技局项目(2008J22JH015); 辽宁省教育厅 2009 度高等学校科研项目计划(2009A163)

作者简介: 金桥, 男, 1977 年出生, 讲师, 研究方向为食品生物技术, E-mail: jinqiao43@hotmail.com

通讯作者: 李伟, 男, 1964 年出生, 教授, 研究方向为食品生物技术, Tel: 0411-84763553, E-mail: aisingioro@hotmail.com

mol/L PB(pH 7.4) 1.0 mL后, 再加入0.2 mL的5 mmol/L H₂O₂, 37 °C保温4 h后, 加入1.4% TCA、0.5% TBA各1 mL。反应混合物置于沸水浴中煮沸10 min。测定532 nm处吸光值, 抑制率按如下公式计算:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(C-CB) - (S-SB)}{C-CB} \times 100\%$$

式中: C为标准液的吸光度值; CB为空白液的吸光度值; S为样品反应液的吸光度值; SB为对照液的吸光度值。

2 结果

2.1 波长的选择

经全波长扫描, 发现大鲵糖肽在280 nm处有较强吸收峰, 因此选定280 nm作为检测波长。

2.2 流动相的组成对分离效果的影响

采用混合液设计顺序优化实验方案。利用具有确定组成的多元混合溶剂的多重选择性, 对一个分析任务进行分离条件的优化^[5]。首先选择3种具有确定组成的二元混合溶剂流动相, 构成等边三角形的3个顶点(图1), 各点混合溶剂的体积分数组成如下:

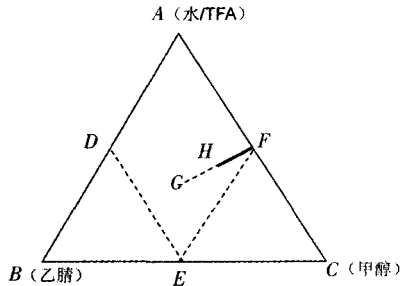


图1 顺序优化模型

Fig.1 Modeling for order optimizing

A点, V(0.1% TFA) = 100,
B点, V(乙腈) : V(0.1% TFA) = 30 : 70,
C点, V(甲醇) : V(0.1% TFA) = 40 : 60。

在A、B、C 3种流动相中进行样品分析, 图谱见图2。

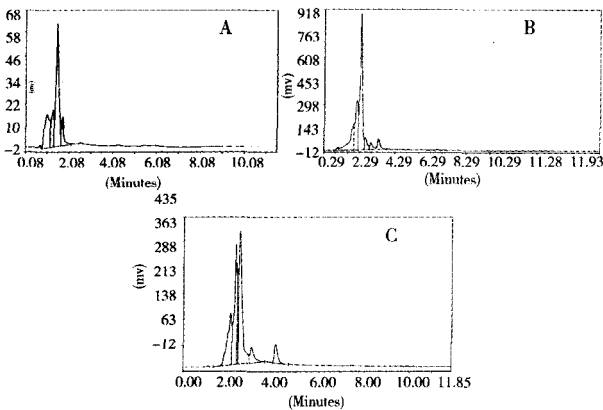


图2 A、B、C 3点顺序优化对应的HPLC图谱

Fig.2 HPLC chromatogram of A, B, C

如图2所示, 在A、B、C点流动相组成下, 不能实现样品组分的分离, 因此可选择三角形各边上的中点(固定组成的三元混合溶剂)以及中心点(固定组成的四元混合溶剂)所对应的流动相, 进行上述样品分析。各点组成如下:

D点, V(乙腈) : V(0.1% TFA) = 15 : 85,

E点, V(甲醇) : V(0.1% TFA) = 20 : 80,

F点, V(乙腈) : V(甲醇) : V(0.1% TFA) = 15 : 20 : 65,

G点, V(乙腈) : V(甲醇) : V(0.1% TFA) = 10 : 13 : 77。

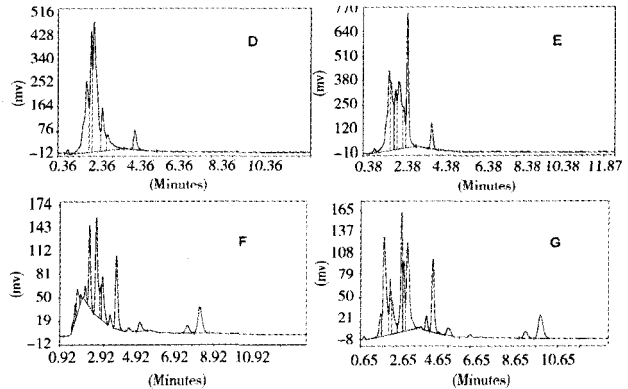


图3 D、E、F、G、H顺序优化对应的图谱

Fig.3 HPLC chromatogram of D、E、F、G、H

由图3可以看到, 在D、E、F、G点流动相组成下, 样品组分不能完全分离。但通过7个点的图谱分析, 可以看出F、G两点虽然没有将样品组分完全分离开, 但其重合峰较少, 并且样品各组分都有显现, 因此应在两点之间去寻求实现样品组分完全分离的最佳混合溶剂的配比, 经试验确定, H点可获较好的分离结果。

H点的组成为: V(乙腈) : V(甲醇) : V(0.1% TFA) = 5 : 5 : 90。从图3中可见, H点流动相组成下, 大鲵糖肽中各成分已经达到了较好的分离效果。

2.3 流速对分离度的影响

按已选定的检测条件考察不同流速对样品各组分分离效果的影响, 结果表明: 随着流速的增大, 样品的保留时间逐渐缩小, 分离度降低, 柱压升高; 随着流速减小, 保留时间延长, 分离度增大, 但流速小于0.2 mL/min时, 保留时间过长, 且色谱峰变宽。为缩短分离时间, 且保留良好的分辨率, 选择流速为1.0 mL/min。

2.4 大鲵糖肽的·OH清除活力

测定各浓度大鲵糖肽的·OH的清除率结果如图4。由图4可知, 在0.58~5.78 μg/mL内, 随糖肽溶液浓度的增加, 对羟自由基的清除率也随之增加, 当溶液中活性肽的浓度为5.78 μg/mL时, 对·OH的清除率达到62%。Yang等^[6]从高原蛙类的皮肤中提取了多个家族的抗氧化肽, 确立了在两栖动物中存在新的皮肤抗氧化系统。从大鲵皮肤黏液中制备的糖肽具有抗氧化活性, 是两栖动物中存在新皮肤抗氧化系统的补充证据。

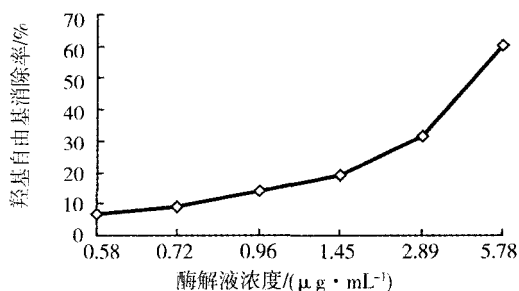


图4 大鲵活性糖肽的·OH清除活力

Fig. 4 The scavenging effect of glycopeptides from *Andrias davidianus* on ·OH free radical

3 讨 论

目前,有关活性多肽和蛋白质类药物在临床治疗和制药工业中的应用取得了快速发展,因此,建立一套完整的活性多肽分离纯化技术具有重要意义。该试验利用高效液相色谱,通过混合液顺序优化方法,实现了大鲵糖肽的有效分离。与其他分离纯化方法相比,高效液相色谱纯化体系具有分辨率和回收率高、操作简便、重复性好等优势,可使用挥发性体系如水溶三氟乙酸(TFA)、乙腈(CAN)等作为流动相,纯化产物不必脱盐,大大简化了操作步骤。虽然纯化的蛋白质会发生变性,但通过HPLC能得到该蛋白的结构特征及疏水性等信息,并可将其精确地与其他蛋白相区分^[7]。甘一如等^[8]利用高效液相色谱法分离纯化经化学合成的活性多肽药物胸腺素 α_1 。吴亚丽等^[9]对高效液相色谱法在降血压肽分离与纯化中的应用进行了研究,并对其分离条件进行了优化。肖向红等^[10]建立了东北林蛙皮肤活性抗菌肽的高效液相色谱纯化体系。

两栖动物皮肤分泌物中主要含有四大类生物化学成分,即生物胺、蟾蜍配基、生物碱、多肽与蛋白质^[11]。其中多肽的种类和数量特别丰富,因此,两栖类生物又被称为生物活性多肽资源的巨大贮存库^[12]。当前有关两栖动物皮肤黏液的研究有很多报道,但多集中于蛙类两栖动物活性抗菌肽的研究^[13],有关大鲵皮肤活性物质的研究未见报道。在此研究中,大鲵糖肽的体外抗氧化活性结果表明,大鲵皮肤活性糖肽具有清除羟基自由基的作用,并且呈明显的量效关系。这些结果既丰富了两栖动物皮肤分泌物的研究,也为大鲵糖肽的利用提供了基础数据。

参考文献:

- [1] Conlona J M, Kolodziejek J, Nowotny N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1696 (1): 1-14
- [2] 苟小军, 邬晓勇, 杨灿宇. 蛙皮多肽抗毒素的研究进展[J]. *成都大学学报: 自然科学版*, 2006, 25 (1): 25-30
- [3] 于世林. 高效液相色谱方法及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 202-211
- [4] Chung S K, Osawa T, Kawakishi S. Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*) [J]. *BioSci Biotech Biochem*, 1997, 61 (1): 118-123
- [5] 郑荣梁, 黄中洋. 自由基生物学: 第3版 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 18-25
- [6] Yang H, Wang X, Liu X, et al. Antioxidant peptidomics reveals novel skin antioxidant system [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8 (3): 571-583
- [7] 朱晓因, 苏志国. 反相液相色谱在蛋白质及多肽分离分析中的应用 [J]. *分析化学*, 2004 (2): 248-254
- [8] 甘一如, 黄永东, 吴蕾. 应用液相色谱法分离纯化固相化学合成胸腺素 α_1 [J]. *化工学报*, 2004, 55 (3): 497-500
- [9] 吴亚丽, 邓毛程, 梁世中. 反相高效液相色谱法在降血压肽分离和纯化中的应用的研究 [J]. *广东轻工业职业技术学院学报*, 2007, 9 (6): 27-30
- [10] 肖向红, 申屠德君, 孙芳, 等. 东北林蛙皮肤活性肽的反相高效液相色谱纯化体系建立 [J]. *东北林业大学学报*, 2009, 37 (7): 104-105
- [11] Charles L B, Michael Z. Peptides from frog skin [J]. *Annu Rev Biochem*, 1990, 59: 395-414
- [12] Clarke B T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal function and potential medical applications [J]. *Bio Rev*, 1997, 72 (3): 365-379
- [13] Conlon J M, Kolodziejek J, Nowotny N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1696 (1): 1-14