

# 谷胱甘肽键合柱对蛋白的选择性研究

柯从玉\* 孙妩娟 张群正 郑莉

(西安石油大学化学化工学院 西安 710065)

**摘要** 通过将谷胱甘肽键合到硅胶表面合成了同时具有弱阳离子交换(WCX)、疏水(HIC)和氢键作用的多功能色谱填料,该固定相在 HIC 和 WCX 模式下对蛋白都有很好的分离效果.实验通过计量置换保留模型对蛋白在谷胱甘肽键合柱上的色谱保留行为及机理进行了研究,结果发现,在流动相盐浓度较低时蛋白根据自身等电点高低通过静电作用力得以分离,而在高盐浓度下疏水和氢键作用力共同决定蛋白的保留.这种多作用力保留模式可有效提高色谱柱的选择性,尤其为蛋白质、多肽及氨基酸的高效分离提供新的解决思路.

**关键词** 多功能色谱填料;离子交换色谱;疏水相互作用色谱;计量置换保留模型;蛋白质分离

## Selectivity Research of Glutathione Bonded Column for Proteins

Ke, Congyu\* Sun, Wujuan Zhang, Qunzheng Zheng, Li

(College of Chemistry & Chemical Engineering, Xi'an Shiyou University, Xi'an 710065, China)

**Abstract** The multifunctional stationary phase with the properties of weak cation exchange (WCX), hydrophobic and hydrogen bonding interaction was synthesized by bonded the glutathione (GSH) to the silica surface. Five standard proteins myoglobin (Myo), ribonuclease (RNase), cytochrome (Cyt-C),  $\alpha$ -Chymotrypsin ( $\alpha$ -Chy) and lysozyme (Lys) were selected to evaluate the column efficiency. The experiments show that the stationary phase has the good separation performance for proteins both in hydrophobic interaction chromatography (HIC) and ion exchange chromatography (IEC). More importantly, the proteins separation in both HIC and IEC mode can be accomplished only by a single column and a kind of mobile phase. In order to compare the resolution of multifunctional column with other column, two popular commercial columns of TSKgel Ether-5PW in HIC mode and TSKgel CM-5PW in IEC mode were tested under optimum condition. It was found that the multifunctional column has a good resolution both in IEC and HIC mode compared with commercial TSKgel columns. The eluted order of five proteins were the same on multifunctional and TSKgel CM-5PW column in IEC mode, but there is a big different between multifunctional column and TSKgel Ether-5PW column in HIC mode, the eluted order of Myo and RNase as well as  $\alpha$ -Chy and Lys are changed completely. This indicates that the selectivity of the multifunctional column is significantly better than that of the TSKgel columns. The chromatographic retention behaviors and mechanisms for proteins in glutathione bonded column were studied. The results demonstrate that there are two retention mechanisms for a basic protein, at a low salt concentration, the retention time of proteins is decreased with the increasing of salt concentration and the proteins were separated by electrostatic force, while in high salt concentration the retention time of proteins is increased with the increasing of salt concentration and proteins were separated by hydrogen bonding interaction force. This multi-interaction forces retention mode can effectively improve the selectivity of HPLC column. The research provides a new solution for high performance separation of proteins, peptides and amino acids.

**Keywords** multifunctional stationary phase; ion exchange chromatography (IEC); hydrophobic interaction chromatography (HIC); stoichiometric displacement theory for retention (STD-R); proteins separation

## 1 引言

二维色谱(two dimensional chromatography, 2DC)及混合机理色谱(Mixed-mode Chromatography, MMC)填料<sup>[1-4]</sup>都是指一种色谱固定相可以在两种或两种以上模式下对蛋白进行分离,但二者也有区别,前者的特点是组分在这两种模式下都有很好的分离效果,可以采用一

根色谱柱实现在两种不同机理下对目标组分的分离;而后者一般是以一种机理为主,另一种机理为辅,很难做到在两种模式下都有很好的分离效果.由于这两种新型色谱填料具有分离效果好,选择性高及柱负载量大的优点,从而成为当今液相色谱(LC)研究的热点之一<sup>[5]</sup>.

由于使用盐水体体系做流动相,分离条件温和,离子交换和疏水色谱被认为是最理想的蛋白纯化及复性工

\* E-mail: kcy@xsyu.edu.cn

Received April 8, 2012; published May 26, 2012.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39880003), Doctoral Start-up Foundation of Xi'an Shiyou University (No. YS29030804) and the "13115" Science and Technology Innovation Project of Great Science and Technology Special Foundation of Shaanxi Province (No. 2010ZDKG-46).

项目受国家自然科学基金(No. 39880003)、西安石油大学博士科研启动基金(No. YS29030804)及陕西省"13115"科技创新工程重大科技专项(No. 2010ZDKG-46)资助.

具<sup>[6-8]</sup>。这两种色谱所使用的固定相一般都是以硅胶或琼脂糖为基质,其中疏水色谱固定相一般是以烷基、苯基、聚氧乙烯醚和聚乙二醇等作为疏水配基,这些基团的疏水性一般较弱,蛋白在流动相中盐的作用下依据自身暴露在外面的氨基酸残基的疏水性强弱进行分离;而离子交换填料一般是以羧基、磺酸基以及季铵盐等为功能基团,蛋白通过静电引力与固定相相互作用。研究发现<sup>[4-10]</sup>,离子交换填料除了与蛋白发生静电相互作用力以外,一般还都具有一定的疏水作用力,而疏水色谱填料有时也具有离子交换性质,然而这两种填料都是仅在同一种模式下有好的分辨率,难以用做二维色谱填料。刘鹏等<sup>[1]</sup>讨论了弱阳离子交换填料的混合保留机理,认为离子交换填料在高盐浓度下为疏水保留模式,在低盐浓度下为离子交换保留模式,而在一定的盐浓度范围内是疏水和离子交换这两种作用力的共同作用。作者通过将多功能基团键合到硅胶表面合成了在疏水和离子交换模式下都有很好分辨率的多功能色谱填料,首次提出了用一根色谱柱来实现离子交换和疏水色谱快速分离整体蛋白的单柱二维液相色谱新方法<sup>[11,12]</sup>,但这种二维色谱填料对蛋白在不同模式下的保留机理目前还不是很清楚,有待进一步研究。

谷胱甘肽是一种具有多种功能的生物活性肽,在蛋白复性中被广泛用作蛋白折叠促进剂<sup>[13]</sup>,作者将谷胱甘肽键合到硅胶基质上成功用于变性核糖核酸酶的复性研究<sup>[14]</sup>。另外,谷胱甘肽还常被用来键合到某些介质上用于亲和分离谷胱甘肽-S-转移酶<sup>[15]</sup>。由于谷胱甘肽既具有适合弱阳离子交换所需的羧基,同时又带有高密度的酰胺基,因此将其通过一定的疏水间隔臂键合到基质表面上就可以合成同时带有疏水、离子交换和氢键性质的多功能色谱填料。本研究通过将还原型谷胱甘肽键合到硅胶表面上合成了具有多种功能的色谱固定相,研究了这种固定相在不同模式下对蛋白的保留行为和机理。

## 2 结果与讨论

### 2.1 填料的合成及表征

将硅胶用 6.0 mol/L 盐酸在 120 °C 条件下回流反应 4 h,经水洗烘干后在 0.2 mol/L 的醋酸缓冲溶液中滴加  $\gamma$ -缩水甘油醚基丙基三甲氧基硅烷(硅烷化试剂和硅胶的比例=1:2),95 °C 下恒温反应 2.5 h,水洗后加入 0.5 mol/L 盐酸溶液进行水解 10 h,然后加入 0.1 mol/L 的 NaIO<sub>4</sub> 对羟基进行氧化,最后在 0.1 mol/L 的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液中加入谷胱甘肽和 NaBCN<sub>4</sub> 反应 12 h,经过滤烘干后得到产物。填料表面配基结构如图 1 所示。

采用有机元素分析仪在 C, N, S 模式下对合成的固定相进行分析,结果见表 1。

元素分析结果表明,谷胱甘肽键合固定相表面配基

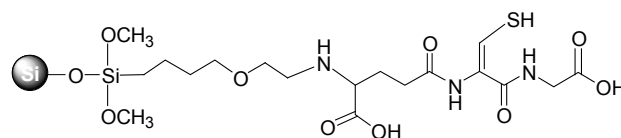


图 1 谷胱甘肽键合固定相结构

Figure 1 The structure of glutathione bonded stationary phase

表 1 谷胱甘肽键合固定相元素分析

Table 1 The elemental analysis of GSH bonded stationary phase

|            | C/%  | N/%  | S/%  | 键合量/<br>( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ ) |
|------------|------|------|------|-----------------------------------------------|
| GSH 键合硅胶 1 | 3.19 | 0.58 | 0.45 | 4.01                                          |
| GSH 键合硅胶 2 | 3.45 | 0.62 | 0.48 | 4.12                                          |
| GSH 键合硅胶 3 | 3.14 | 0.59 | 0.43 | 3.95                                          |

平均键合密度为 4.03  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ,该结果要高于文献<sup>[16]</sup>报道的离子交换填料配基键合密度 1.6~2.4  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ,而且对 3 个不同批次的填料测定结果来看,该方法具有很好的重现性。红外光谱结果也证实谷胱甘肽配基被成功键合到硅胶表面<sup>[14]</sup>。

### 2.2 谷胱甘肽键合柱对蛋白的分离

从图 1 固定相表面配基结构可以看出,每个配基除了带有 2 个弱阳离子交换基团羧基外还带有 2 个羰基、3 个仲胺基、1 个自由巯基以及 1 个醚氧基,这些基团都具有很强的亲水性,而且都有较强的形成氢键的能力,另外硅烷试剂和配基之间还具有 6 个碳的疏水链,因此固定相同时还具有一定的疏水性。为了验证这 3 种作用力在蛋白保留过程中的作用,实验选用 5 种标准蛋白在不同模式下进行分离研究,结果见图 2A 和图 2B。

由于 HIC 和 IEC 都是用盐水体系作为流动相,只是盐浓度大小对蛋白的保留相反而已,因此实验在这两种模式下只采用一种流动相进行分析,仅通过改变流动相中硫酸铵的初始浓度来决定蛋白在色谱柱上的分离模式。从图 2 中可以看出,该固定相对蛋白具有理想的疏水和离子交换功能,蛋白在 HIC 和 IEC 模式下都有较强的保留,并且都有很好的分离效果,5 种标准蛋白在这两种模式下都达到了基线分离,分离效果不但好于单独软基质的商品柱(图 2C 和 2D),而且也优于聚合物基质填料<sup>[19]</sup>。从固定相配基结构来看,装填该固定相的色谱柱具有典型的亲水色谱性质<sup>[18-21]</sup>,然而从洗脱模式来看,这两者之间却有很大差异,蛋白质或多肽在该色谱柱上是以盐水体系为流动相,而亲水色谱则以有机溶剂/水作为流动相,蛋白在非极性较强的有机溶剂中保留,在极性溶剂(一般为水)下洗脱。为了与商品的 HIC 和 IEC 柱进行对比,试验选用商品疏水色谱柱 TSKgel Ether-5PW 和离子交换柱 TSKgel CM-5PW 在最佳色谱条件下对这 5 种标准蛋白进行了分离,如图 2C 和 2D,从分离效果来看,多功能色谱填料的柱效完全可以和单

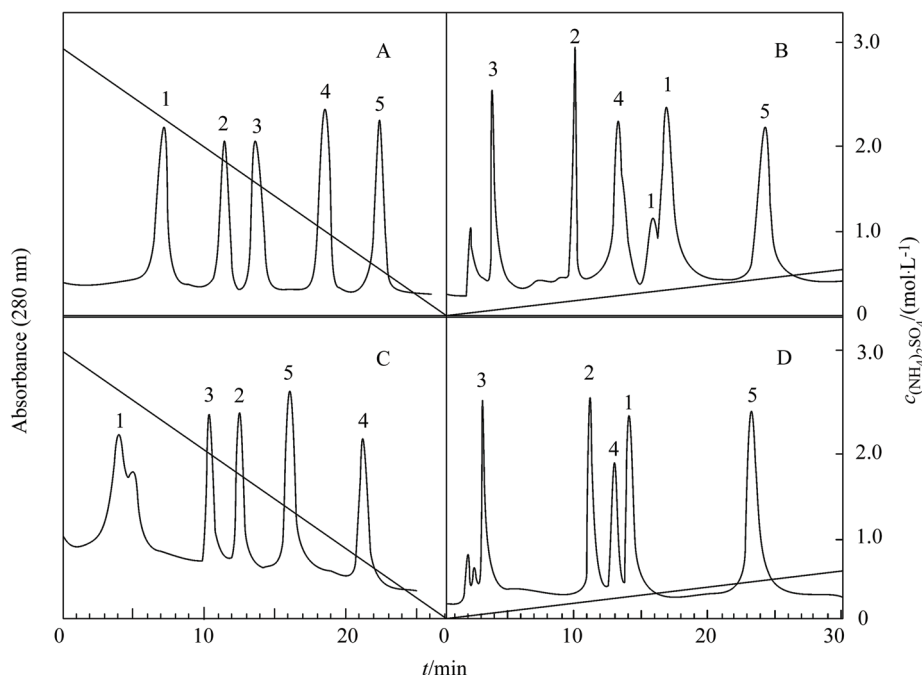


图2 不同固定相在 HIC 和 IEC 模式下对标准蛋白的色谱分离图

**Figure 2** The separation chromatograms of standard proteins by different stationary phase in HIC and IEC mode. Chromatographic condition: A and B were the separation chromatograms of standard proteins by glutathione bond column in HIC and IEC mode, respectively. C was the TSKgel Ether-5PW column in HIC mode and D was the TSKgel CM-5PW column in IEC mode. Mobile phases in the experiment as listed in 4.3.2, the gradient was 100% B to 100% A in HIC mode and 15% B to 100% A in IEC mode within 30 min. The lines in the figure were the gradient elution process. peaks: 1, Cyt-C; 2, RNase; 3, Myo; 4,  $\alpha$ -Chy; 5, Lys.

纯的商品 HIC 及 IEC 柱相媲美, 然而从蛋白的洗脱顺序来看, 在 IEC 模式下这 3 种色谱柱完全一致, 蛋白都是按照等电点由低到高进行洗脱的, 然而在 HIC 模式下却有很大差异. 对于商品 TSKgel Ether-5PW 柱, 这 5 种蛋白是按照疏水性由弱到强的顺序洗脱的, 而谷胱甘肽柱在该模式下对蛋白的保留顺序却不完全与蛋白的疏水性一致, 如图 2A 中的 Myo 与 RNase 及 Lys 与  $\alpha$ -Chy, 其保留顺序与图 2C 中的这 4 种蛋白正好相反, 这说明蛋白在 HIC 模式下对蛋白的保留不完全依靠疏水作用力, 而且应该存在第二种作用力.

### 2.3 盐浓度对蛋白在多功能色谱柱上的保留影响

为了解释蛋白在多功能色谱柱上的保留机理, 实验测定了这 5 种标准蛋白的保留因子  $k'$  随硫酸铵浓度的变化情况, 结果见图 3. 这 5 种蛋白的保留因子  $k'$  在硫酸铵浓度由小到大的过程中都是先减小后增大, 呈典型的“U”型曲线, 这恰好说明在不同盐浓度下蛋白在固定相上的保留存在两种以上的机理. 在低盐浓度下, 蛋白的保留时间随着盐浓度升高而减小, 表现为典型的离子交换模式, 蛋白通过静电引力与固定相结合, 其洗脱顺序由蛋白等电点高低决定; 当盐浓度达到一定值时蛋白的保留时间反而会增加, 呈现典型的疏水色谱分离模式, 这是由于蛋白的疏水性随盐浓度的升高而增强, 固定相和蛋白自身的疏水性决定着蛋白的保留. 显然, 在“U”型曲线的中间段, 即蛋白的保留由降低到升高的过渡段

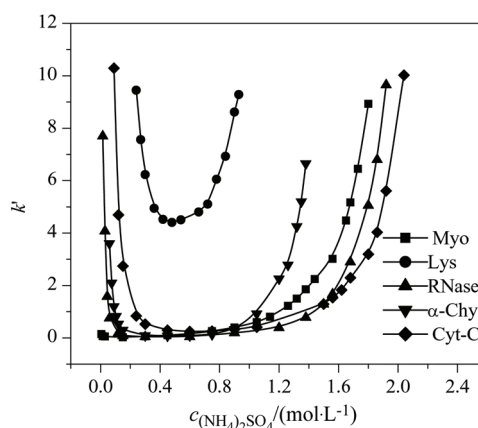


图3 蛋白在谷胱甘肽柱上的保留值随盐浓度变化曲线

**Figure 3** The curve of protein retention factor with the increase of salt concentration on glutathione bonded column

是疏水和离子交换共同起作用的结果, 但具体在某一浓度范围内由那种模式决定蛋白的保留需进一步讨论.

### 2.4 Z 和 $\lg I$ 值对蛋白保留研究

计量置换保留理论(stoichiometric displacement theory for retention, SDT-R)<sup>[22]</sup>中的两个重要参数 Z 和  $\lg I$  可以用来表征蛋白在色谱柱上的保留行为<sup>[23,24]</sup>, 研究表明: SDT 是一个适合于除 SEC 以外的各类色谱模式的统一保留机理, 也是一个可用于表征生物大分子色谱保留行为的统一模型.

$$\lg k' = \lg I - Z \lg [D] \quad (1)$$

其中,  $k'$  是蛋白的保留因子,  $[D]$  是置换剂摩尔浓度.  $Z$  是当 1 mol 蛋白被吸附时从蛋白和固定相间释放出的置换剂的摩尔数.  $\lg I$  是反映蛋白在固定相上亲和力的常数, 在 HIC 中置换剂是水分子, 而在 IEC 中是盐.

以蛋白  $\alpha$ -chy 在谷胱甘肽柱上的分离过程为例, 通过  $\lg k'$  对  $\lg[H_2O]$  作图, 得到的曲线可以分为 5 个部分 (见图 4), 在 ab 段, 由于流动相中的盐浓度足够大, 蛋白通过疏水部位与固定相表面产生较强吸附作用, 这时蛋白不会被洗脱, 其保留时间趋向于无穷大, 这也是大分子在疏水色谱上保留的一个典型特征; 随着盐浓度逐渐减小, 当盐浓度达到 b 点, 即  $\alpha$ -Chy 的洗脱浓度时蛋白开始从固定相上解吸附, 其保留时间随洗脱剂  $H_2O$  浓度的增大而减小, 当水的浓度增加到一定值 (图 4 中的 c 点) 后, 蛋白的疏水性减弱, 静电引力作用逐渐增强, 蛋白的保留时间降低的速度变缓, 随着盐浓度的进一步减小,  $\lg k'$  在达到最低点之后又开始上升, 见图 3 中的 cd 段, 显然在这部分区域是几种作用力共同作用的结果. 在 d 点以后静电引力占主导地位, 疏水作用力又可以忽略, 而 e 点以后, 由于盐浓度已经非常小了, 蛋白通过静电作用力和固定相牢牢结合, 这时蛋白同样不会被洗脱. 从蛋白在低盐浓度下的保留也充分说明, 虽然蛋白和固定相配基都具有较强的亲水性, 但相对于较强的静电作用力, 这种亲水作用力对蛋白的保留可以忽略.

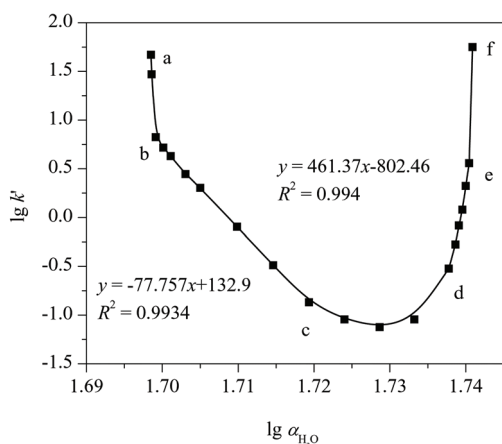


图 4 标准蛋白  $\alpha$ -Chy 的  $\lg k'$  对  $\lg[H_2O]$  作图线性关系  
Figure 4 The linear plot of  $\lg k'$  vs.  $\lg[H_2O]$  of standard proteins  $\alpha$ -Chy

通过对 bc 段和 de 段这些点进行数据拟合发现  $\lg k'$  对  $\lg[H_2O]$  有很好的线性关系, 测得这 5 种蛋白的  $Z$  和  $\lg I$  值如表 2 所示, 其线性相关系数均大于 0.99, 这表明蛋白在该柱上的保留能很好地遵循 SDT-R. 根据图 4 的关系曲线一方面我们可以清楚看到  $\lg k'$  对  $\lg[H_2O]$  作图只是在一定范围内有良好的线性关系, 这恰好能够表明蛋白在不同盐浓度下存在不同保留机理, 另一方面可以通过曲线对应关系确定 b, c, d 和 e 点所对应的盐浓度.

实验发现, 在 IEC 模式下采用梯度洗脱时, 当洗脱

剂硫酸铵浓度从 0 增加到 0.45 mol/L 时, 几乎所有的蛋白都可以被洗脱下来, 此时蛋白与固定相间的疏水作用力可以忽略; 而在 HIC 模式下时, 当硫酸铵浓度从 3.0 mol/L 降低到 1.0 mol/L 时, 由于蛋白与固定相间疏水相互作用力的逐渐降低, 蛋白根据疏水性由弱到强依次被洗脱下来, 但此时流动相中的盐浓度仍旧相对较高, 静电作用力可以忽略, 只是在该模式下疏水和氢键作用力共同决定了蛋白的保留. 通过测定这 5 种标准蛋白在该色谱柱上的质量回收率发现, 无论是在 HIC 模式还是 IEC 模式下蛋白的质量回收率均大于 97%, 表面固定相在这两种模式下的不可逆吸附可以忽略, 该结论也进一步表明蛋白在这两种模式下的保留并不产生冲突.

表 2 5 种标准蛋白在 HIC 模式下的  $Z$  和  $\lg I$

Table 2 The  $Z$  and  $\lg I$  values of five standard proteins in HIC mode

|               | $\lg I$ | $Z$   | $R^2$  |
|---------------|---------|-------|--------|
| Myo           | 93.04   | 49    | 0.9982 |
| RNase         | 99.91   | 58.28 | 0.9981 |
| Cyt-C         | 54.7    | 36.29 | 0.9986 |
| $\alpha$ -Chy | 134.9   | 77.76 | 0.9934 |
| Lys           | 72.7    | 41.78 | 0.9905 |

SDT 中的另外一个重要的线性方程为:

$$\lg I = jZ + \lg \Phi^{[25]} \quad (2)$$

式中,  $\Phi$  为柱相比<sup>[26]</sup>,  $j$  为一个与 1 mol 置换剂对固定相的亲势有关的常数. (2) 式可以用来判断蛋白与固定相间的作用力性质, 如果用溶质的  $\lg I$  对  $Z$  作图有很好的线性关系就表明溶质与固定相之间只存在非选择性作用力, 反之则存在选择性作用力<sup>[25]</sup>. 用表 2 中 5 种蛋白的  $\lg I$  对  $Z$  作图, 结果见图 5.  $\lg I$  对  $Z$  作图有一定的线性关系, 但线性关系较差,  $R^2$  只有 0.9658, 而且所得到的  $J$  值 0.592 与理论值 1.74<sup>[27]</sup> 也相差甚远, 这表明在疏水模式下蛋白与固定相的作用除了非选择性疏水作用力以外还有其他选择性作用力存在, 根据固定相配基性质推断, 这种影响蛋白在疏水模式下保留顺序的选择性作用力应该就是氢键作用力.

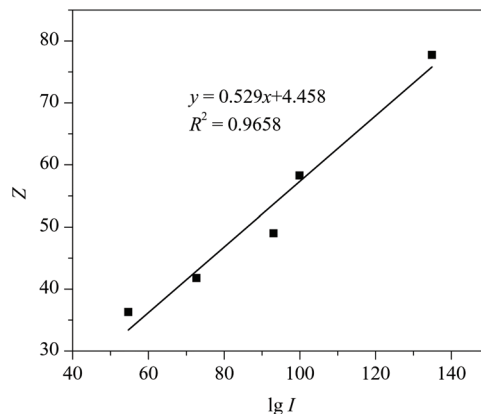


图 5 5 种标准蛋白的  $\lg I$  对  $Z$  作图线性关系  
Figure 5 Linear plot of  $\lg I$  vs.  $Z$  of five standard proteins

## 2.5 新型多功能色谱柱对蛋白的选择性保留机理

结合所合成固定相性质和前面实验分析结果可以推断蛋白在色谱柱上的保留机理如图 6 所示。

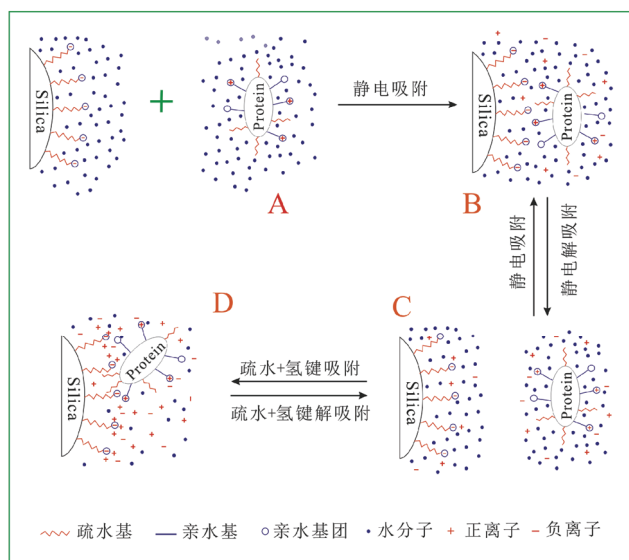


图 6 蛋白在谷胱甘肽键合柱上的保留机理

Figure 6 The retention mechanisms of protein in glutathione bonded column

在水溶液中, 由于水合作用, 蛋白和固定相表面都被水分子所包围, 见图 6A, 蛋白和固定相配基表面的水合作用使这两者之间的氢键作用可以忽略, 此时蛋白与固定相主要通过静电作用力结合, 见图 6B; 随着流动相中盐浓度的增加, 流动相中的正负离子逐渐抵消了固定相和蛋白质表面所带电荷, 这两者之间的静电作用力逐渐减弱, 蛋白根据等电点由低到高逐渐被洗脱, 见图 6C, 但此时流动相中的盐浓度相对较低, 不足以使蛋白发生疏水保留, 蛋白的保留机理为纯粹的 IEC 模式。随着流动相中盐浓度的进一步升高, 流动相中的水分子与盐进行高度水合, 这不仅使蛋白质表面的疏水性氨基酸残基暴露出来, 而且降低了蛋白质以及固定相配基与水分子形成氢键的能力, 因此, 在疏水作用力下蛋白质表面的疏水性氨基酸残基首先向固定相表面疏水部分靠近并被吸附, 而这种靠近同时也拉近了蛋白与固定相表面亲水基团的距离, 为这二者之间形成分子间氢键提供了基础, 同时由于溶液中大量的正负离子使蛋白与固定相间的静电作用力抵消, 见图 6D。在 HIC 模式下进行梯度洗脱时, 随着体系中盐浓度的降低, 水分子与蛋白和固定相配基间的水合作用增强, 而疏水和氢键作用力随之减弱, 蛋白从固定相上解吸附下来而随流动相一起被洗脱。由于每一种蛋白表面能形成氢键的氨基酸种类及数量都不一样, 因此氢键对蛋白保留贡献也不一样。

从固定相配基空间结构来看, 固定相配基末端具有较强的亲水性, 疏水部位靠近硅胶表面, 当蛋白和固定相靠近时蛋白首先和配基亲水部分接触, 加上空间位阻

效应, 蛋白的疏水氨基酸残基较难与固定相疏水部分接触, 而且疏水作用力是短程作用力, 只有相互靠近时才能发生相互作用, 因此蛋白和固定相之间的疏水作用力应该是比较弱的, 但从保留时间来看, 蛋白在谷胱甘肽键合柱上的保留并不比商品的疏水固定相弱, 这表明在疏水模式下配基与蛋白间的氢键作用对蛋白的保留力起着重要作用。

## 3 结论

谷胱甘肽键合固定相由于同时具有疏水、氢键和离子交换基团, 该色谱柱无论在 IEC 还是 HIC 模式下对蛋白都有很高的分辨率, 完全能够在同一根色谱柱上仅用一种流动相实现蛋白的二维液相色谱分离。通过对标准蛋白的分离研究表明, 蛋白在固定相上的保留主要受流动相中盐浓度控制, 在低盐浓度为 IEC 机理, 而在高盐浓度下蛋白与固定相间的相互作用除了疏水作用力外, 氢键作用力也起到关键性作用, 蛋白在高盐浓度下的洗脱顺序是这两种力共同作用的结果, 固定相的这种多保留模式更有利于提高色谱柱的选择性, 该研究对色谱填料的合成及高效液相色谱的发展具有一定的指导意义。

## 4 实验部分

### 4.1 仪器和材料

高效液相色谱仪(LC-10A, 日本岛津公司), KQ-250 型超声仪(上海昆山检测仪器厂); CYG-100 高压气动泵(北京西助技术报务中心); 紫外-可见分光光度计(UV-1601PC, 日本岛津公司); PB-10 型 pH 计; JJ-1 型精密增力电磁搅拌器, WMZK-01 温度指示控制仪。TSKgel CM-5PW 和 TSKgel Ether-5PW 柱(75 mm×7.5 mm I.D.).

### 4.2 主要试剂

全多孔型硅胶(粒度: 5  $\mu\text{m}$ , 比表面积: 70  $\text{m}^2/\text{g}$ , 孔径: 22 nm, 孔体积: 0.40  $\text{cm}^3/\text{g}$ , 中科院兰州化学物理研究所),  $\gamma$ -缩水甘油醚基丙基三甲氧基硅烷(TM-560, 武汉天目科技发展有限公司), 高碘酸钠( $\text{NaIO}_4$ , 上海精细化工科技有限公司), 硼氢化钠( $\text{NaBH}_4$ , 中医药(集团)上海化学试剂公司), 硫酸铵(分析纯, 沈阳化学试剂厂), 磷酸二氢钾(分析纯, 西安化学试剂厂)。其它试剂均为分析纯。

所用标准蛋白为: 肌红蛋白(Myo, 马心)、核糖核酸酶(RNase-A, 牛红细胞)、细胞色素 C (Cyt-C, 马心)、溶菌酶(Lys, 卵清蛋白)及  $\alpha$ -糜蛋白酶( $\alpha$ -Chy, 牛胰脏)均购自美国 Sigma 公司。

### 4.3 实验方法

#### 4.3.1 色谱柱的装填

称取填料 1.0 g, 先用蒸馏水超声 5 min 左右, 用匀浆法在 40 MPa 装填到不锈钢色谱空柱管(10×4.6 mm)

中, 装填 30 min 后在色谱仪上用蒸馏水在 2 mL/min 的条件下冲洗 1~2 h 后即可使用。

#### 4.3.2 色谱条件

流动相组成: A 液, 20 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH=6.5; B 液, 20 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ +3.0 mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH=6.5, 过滤后使用。流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 280 nm。

## References

- [1] Liu, P.; Yang, H.; Geng, X. D. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 7497.
- [2] Sun, X.; Yang, Y.; Geng, X.-D. *J. Anal. Sci.* **2010**, 26, 6. (孙萱, 杨云, 耿信笃, 分析科学学报, **2010**, 26, 6.)
- [3] Kennedy, L. A.; Kopaciewicz, W.; Regnier, F. E. *J. Chromatogr.* **1986**, 359, 73.
- [4] Melander, W. R.; Rassi, Z. E.; Horvath, C. J. *J. Chromatogr.* **1989**, 469, 3.
- [5] Yang, Y.; Geng, X. D. *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, 8813.
- [6] Geng, X. D.; Wang, C. Z. *J. Chromatogr. B* **2007**, 849, 69.
- [7] Wu, D.; Wang, C. Z.; Geng, X. D. *Chin. J. Chromatogr.* **2007**, 25, 197. (吴丹, 王超展, 耿信笃, 色谱, **2007**, 25, 197.)
- [8] Wang, C. Z.; Geng, X. D.; Wang, D. W. *J. Chromatogr. B* **2004**, 806, 185.
- [9] Kennedy, L. A.; Kopaciewicz, W.; Regnier, F. E. *J. Chromatogr. A* **1986**, 359, 73.
- [10] Chhatre, S.; Bracewell, D. G.; Titchener-Hooker, N. J. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 7806.
- [11] Geng, X. D.; Ke, C. Y.; Chen, G.; Liu, P.; Wang, F.; Zhang, H. Q.; Sun, X. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 3553.
- [12] Ke, C. Y.; Geng, X. D. *Chin. Sci. Bull.* **2008**, 53, 1113.
- [13] Hevehan, D. L.; De Bernardez, C. E. *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, 54, 221.
- [14] Ke, C.-Y.; Meng, Z.-C. *Chem. J. Chin. Univ.* **2012**, 33, 925. (柯从玉, 孟祖超, 高等学校化学学报, **2012**, 33, 925.)
- [15] Jing, X.-B.; Dong, X.-Q.; Huang, Y.-B. 20110161212, **2011** [chem. Abstr. **2012**, 156, 288050]. (景遐斌, 董晓庆, 黄宇彬, 20110161212, **2011**.)
- [16] He, X.-J.; Wu, X.-J.; Qiao, X.; Liu, G.-Q. *Chin. J. Chromatogr.* **1997**, 15, 15. (何秀娟, 吴晓军, 乔霞, 刘国詮, 色谱, **1997**, 15, 15.)
- [17] Gong, B. L.; Ke, C. Y.; Geng, X. D. *Chin. J. Chem.* **2004**, 22, 283.
- [18] Buszewski, B.; Noga, S. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 402, 231.
- [19] Li, R.; Huang, J. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1041, 163.
- [20] Guo, Y.; Gaiki, S. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1074, 71.
- [21] Cubbon, S.; Bradbury, T.; Wilson, J.; Thomas-Oates, J. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 8911.
- [22] Despa, F.; Berry, R. S. *J. Biophys.* **2007**, 92, 373.
- [23] Rounds, M. A.; Regnier, F. E. *J. Chromatogr.* **1984**, 283, 37.
- [24] Bai, Q.; Geng, X.-D. *Acta Chim. Sinica* **2002**, 60, 870. (白泉, 耿信笃, 化学学报, **2002**, 60, 870.)
- [25] Geng, X. D.; Guo, L. A.; Chang, J. H. *J. Chromatogr.* **1990**, 507, 1.
- [26] Geng, X. D. *Sci. China (Ser. B)* **1995**, 25, 364.
- [27] Geng, X. D.; Wang, L. L. *J. Chromatogr. B* **2008**, 866, 133.

(Zhao, X.)