

在线单柱二维液相色谱法对蛋清中三种活性蛋白的快速分离纯化

王建山 夏红军 万广平 刘家玮 金丽花 白泉*

(西北大学合成与天然功能分子化学教育部重点实验室 西北大学现代分离科学研究所 现代分离科学陕西省重点实验室 西安 710069)

摘要 基于一种新型的强阳离子交换/疏水色谱(SCX/HIC)双功能色谱柱构建了在线单柱二维液相色谱(2DLC-1C), 分离系统实现了自动控制, 可在线进行样品收集、二维进样和二维色谱分离。采用 SCX-HIC 2DLC-1C, 在 120 min 内可将 8 种标准蛋白完全分离, 并成功应用于鸡蛋清中三种活性蛋白质的分离纯化。结果表明利用在线 2DLC-1C 技术可在 70 min 内完成对鸡蛋清中溶菌酶、卵清蛋白和卵转铁蛋白三种活性蛋白的快速分离纯化, 其纯度分别为 95%、93%和 97%。该方法减少了样品的处理步骤, 对样品的污染小, 纯化速度快, 操作简单, 易于实现自动化和放大, 对活性蛋白的快速分离制备和工业化生产具有广阔的应用前景。

关键词 在线单柱二维液相色谱; 蛋白质; 分离纯化; 蛋清

On-line Fast Purification of Three Kinds of Active Proteins from Egg White with Two-dimensional Liquid Chromatography Using a Single Column

Wang, Jianshan Xia, Hongjun Wan, Guangping Liu, Jiawei
Jin, Lihua Bai, Quan*

(Key Laboratory of Synthetic and Natural Functional Molecule Chemistry of Ministry of Education of China, Institute of Modern Separation Science, Northwest University, Key Laboratory of Modern Separation Science in Shaanxi Province, Xi'an 710069)

Abstract With the development of biotechnology and life science, both recombinant protein drug productions and proteomics research depend largely on fast and efficient protein separation technology. Analysis of complex samples has put forward higher and higher requirements to separation science. Therefore, developing new separation material, separation mode and more sensitive detection method should be one of the effective ways to solve these problems. Based on a novel strong cation exchange/hydrophobic interaction chromatography (SCX/HIC) dual-function column, which displays HIC character in a high salt concentration, and IEC character in a low salt concentration in mobile phase employed and can be employed to separate proteins with SCX and HIC modes, respectively, a new on-line two-dimensional liquid chromatography technology with a single column (2DLC-1C) was developed. An equipment with automatic control system called as "ChromatoExpert" for processing fast protein separation online 2DLC-1C was constructed, which has multiple functions, such as on-line fraction collection from the first separation mode and quantitatively sample re-injection into the second separation mode, on-line buffer exchange, etc. Eight kinds of protein standards were separated using SCX/HIC 2DLC-1C. The unretained and incompletely separated proteins in SCX mode were collected online and could be separated completely with each other by online re-injection and second dimensional separation of HIC mode. As a result, these eight kinds of proteins can be separated within 2 h. It also was applied to purify three kinds of active intact proteins from egg white successfully. The results indicated that lysozyme, ovotransferrin and ovalbumin from egg white could be purified just within 70 min by online 2DLC-1C. The purity of these proteins obtained was 95%, 93% and 97%, respectively. The new online 2DLC-1C technology can simplify the purification process and lower the separation cost. It is easy to realize automation and scale-up to preparative scale. Therefore, this new technology has a broad application prospect in the fast separation and preparation of active protein.

Keywords online 2DLC-1C; protein; purification; egg white

1 引言

液相色谱是蛋白质分离纯化的有力工具^[1,2], 但对于成分复杂的蛋白质样品, 仅用一维单模式色谱很难提

供足够的分辨率将目标蛋白纯化至所需纯度。二维液相色谱(two-dimensional liquid chromatography, 2DLC)是将分离机理不同而又相互独立的两支色谱柱串联起来构成的分离系统, 通过柱切换技术实现样品在一维和二

* E-mail: baiquan@nwu.edu.cn

Received December 4, 2015; published January 26, 2016.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21545007), Shaanxi Provincial Science and Technology Co-ordinating innovation projects (No. 2013SZS18-K01) and Shaanxi Province Key Laboratory (Nos. 14JS098, 15JS115).

项目受国家自然科学基金(No. 21545007)、陕西省科技统筹重点实验室项目(No. 2013SZS18-K01)和陕西省重点实验室科研项目(Nos. 14JS098, 15JS115)资助。

色谱柱之间的流动. 这种 2DLC 的两种不同模式的组合一般认为具有分离的正交性(即保留机理不同), 对于完全正交的二维色谱系统, 理论上系统的分辨率是对应每一种一维模式分辨率平方和的平方根, 峰容量是对应每一种一维模式峰容量的乘积^[3]. 在一维色谱中没有达到完全分离的组分, 有可能在二维系统中被较好的分离, 所以 2DLC 分辨率高, 峰容量大, 分离能力强, 可实现复杂样品的高通量分析, 已成为蛋白质组学等复杂样品分离分析的关键技术^[4]. 通常, 一根色谱柱只能利用一种分离模式对生物大分子进行分离纯化, 只能“一柱一用”, 所以目前 2DLC 的构建就需要两根分离模式完全不同的色谱柱. 此外, 样品如何在两根色谱柱之间进行切换以及两种模式流动相之间的兼容性问题一直是限制 2DLC 发展的瓶颈^[5].

混合模式色谱(Mixed mode chromatography, MMC)是利用蛋白质与固定相配基之间多种相互作用进行分离的色谱模式, 具有高选择性、高负载量等优点^[6]. 最近我们课题组设计合成出了一类同时具有离子交换(ion exchange chromatography, IEC)和疏水色谱(hydrophobic interaction chromatography, HIC)性能的新型双功能高效色谱分离介质^[7-10]. 该介质在高盐浓度下表现为 HIC 的性质, 可作为 HIC 固定相使用; 而在低盐浓度条件下表现为 IEC 的性质, 可作为 IEC 固定相使用. 因此, 用一根色谱柱就可实现在 IEC 和 HIC 两种模式下对蛋白质的高效分离, 具有“一柱二用”的功能, 被形象地称之为“2D 色谱柱”. 以此为基础, 利用阀切换技术, 采用一根 IEC/HIC 双功能色谱柱构建了 2DLC 分离系统, 称之为单柱二维液相色谱(two-dimensional liquid chromatography with one single column, 2DLC-1C)^[11]. 与常规 2DLC 不同的是, 2DLC-1C 在一根色谱柱上就可实现 HIC-IEC 或 IEC-HIC 二维分离, 无疑该技术的发展将给传统的 2DLC 技术带来一场技术革新.

2DLC 通常将反相色谱(reversed-phase liquid chro-

matography, RPLC)作为第二维色谱使用^[12], 但蛋白质经 RPLC 分离后会变性失活. 由于 IEC 和 HIC 是在盐水体中对蛋白进行分离, 其色谱条件温和, 因此 IEC 和 HIC 被认为是整体活性蛋白分离纯化的最佳选择. 耿等^[13]虽然利用在线 2DLC-1C 对牛胰腺中细胞色素 C 进行了分离纯化, 但样品的收集和阀门的切换动作都是手动进行的. 最近我们对 2DLC-1C 分离系统进行了改造升级, 通过控制器对阀门的切换动作进行控制, 同时与计算机串联, 设计了阀门切换时间程序, 根据样品的色谱出峰时间, 完成样品的自动采集和二次自动进样. 整个分离过程完全通过系统自动控制, 称之为色谱专家分离系统(ChromatoExpert). 本文将利用该系统采用在线 2DLC-1C 技术对蛋清中活性蛋白进行分离, 建立一种整体活性蛋白快速分离纯化的新方法.

2 结果与讨论

2.1 SCX/HIC 双功能色谱柱对标准蛋白的保留

以硅胶为基质, 将磺酸基和苄基键合到硅胶表面, 合成了一种新型的强阳离子交换(strong cation exchange chromatography, SCX)/HIC 双功能式色谱填料^[10]. 该固定相在低盐浓度下表现出 SCX 的性质, 在较高盐浓度下表现出 HIC 的性质. 图 1 为该双功能色谱柱在 SCX 和 HIC 两种模式下对标准蛋白的色谱分离图. 从图中可看出该色谱柱在 SCX 和 HIC 模式下均能对蛋白质实现高效分离, 所以该色谱柱具有“一柱二用”的功能. 深入研究了蛋白质在两种分离模式下的质量和活性回收率、吸附量、重现性、柱寿命以及配基疏水性、pH、流速、梯度模式对蛋白质分离的影响, 探讨了蛋白质在该色谱柱上的混合模式保留机理. 结果表明该色谱柱具有高分辨率、高负载量、重现性好、使用寿命长等特点^[10], 可代替两根常规的 SCX 和 HIC 色谱柱对蛋白质进行分离纯化.

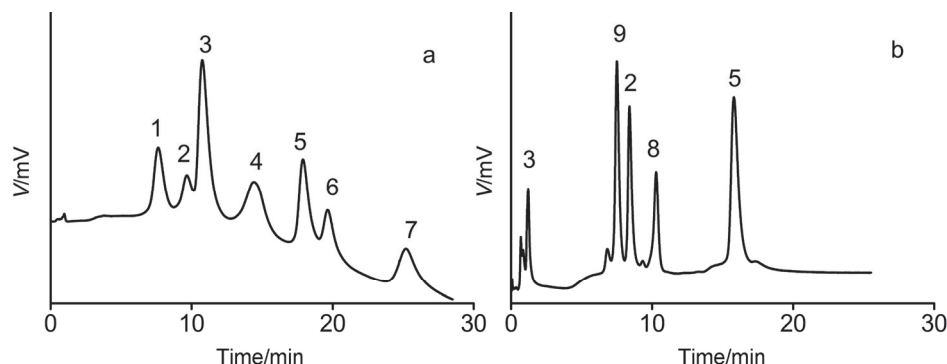


图 1 SCX/HIC 双功能色谱柱在疏水作用色谱(a)和强阳离子交换色谱模式(b)下对蛋白的色谱分离图

Figure 1 Chromatograms of standard proteins separated with SCX/HIC dual-function column (50×4.6 mm I.D.) in the HIC (a) and SCX modes (b), respectively

(a) HIC mode; mobile phase: Solution A, 3.0 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +0.02 mol/L KH_2PO_4 (pH 6.5); Solution B, 0.02 mol/L KH_2PO_4 (pH 6.5); (b) SCX mode; mobile phase: Solution A, 0.02 mol/L KH_2PO_4 (pH 6.5), Solution B, 0.02 mol/L KH_2PO_4 +1.0 mol/L NaCl (pH 6.5). The flow rate was 1.0 mL/min; linear gradient elution: 0→100% mobile phase B, 30 min; detection wavelength: 280 nm. Pressure: HIC mode 2.0~3.1 MPa, IEC mode 2.0~2.4 MPa. Peaks: 1. cytochrome c; 2. RNase A; 3. myoglobin; 4. ovalbumin; 5. lysozyme; 6. α -amylase; 7. insulin; 8. α -chymotrypsin A; 9. RNase B

2.2 在线 2DLC-1C 的构建

由于所合成的 SCX/HIC 双功能色谱柱在 SCX 和 HIC 两种模式下对蛋白质均可进行高效分离, 而且二者的分离机理完全不同是正交的. 基于这种 IEC/HIC 双功能色谱分离介质, 利用阀切换技术, 采用一根该双功能色谱柱构建了在线 2DLC-1C 分离系统, 如图 2 所示.

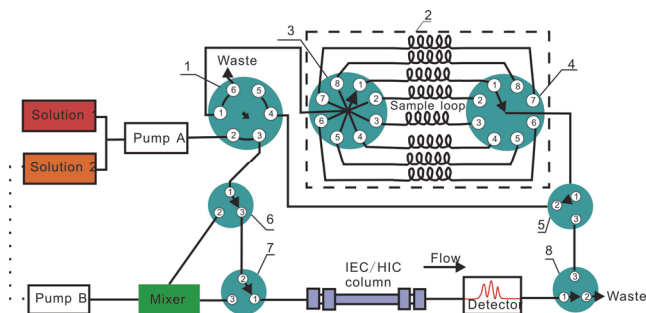


图 2 在线单柱二维液相色谱流程图

Figure 2 Schematic representation of the instrumentation used for comprehensive on-line separation of intact protein by 2DLC-1C
1, Sample injector; 2, box for maintaining the temperature at 4 °C; 3 and 4, eight-position valves; 5~8, three-position valves

虽然 IEC 和 HIC 被认为是活性蛋白分离纯化的最佳组合, 但采用 2DLC-1C 分离蛋白质, 存在 IEC 和 HIC 分离模式中哪一个作为第一分离模式, 即分离模式排序的问题. 从理论上讲, 可以仅通过改变流动相中强和弱的洗脱液顺序就能实现在同一根双功能色谱柱上用这两种机理对蛋白进行正交二维色谱分离. 哪一种模式在先都不重要, 取决于样品溶液的组成和目标蛋白在两种分离模式下保留的强弱.

当第一维采用 IEC 分离模式, 第二维采用 HIC 模式时, 经第一维 IEC 分离, 将不保留或者未完全分离的组分分别在线定量地收集于 5 mL 样品环中, 此时样品溶液的盐浓度较低, 如果直接大体积进样进行第二维 HIC 分离, 会导致前端样品由于溶液盐浓度太低, 在 HIC 模式下无法保留而导致样品损失. 第一维分割收集的馏分如何能定量转移到第二维以及如何进行溶剂交换是实现 2DLC-1C 的关键.

由于 SCX 和 HIC 均采用盐水体系做流动相, 在 SCX 模式下, 蛋白质在低盐浓度下保留, 在高盐浓度下被洗脱, 而在 HIC 模式下恰恰相反, 因此二者可共用相同的流动相. 研究表明^[10], 在硫酸铵盐水体系中, 随盐浓度增大蛋白质在此 SCX/HIC 双功能色谱柱上的洗脱曲线呈现 U 型, 且在两种分离模式下均有很好的分离效果, 表明二者可共用相同的流动相. 在进行二维分离时, 只需通过调节两种流动相之间的配比, 即可完成两种分离模式之间的快速切换, 既避免了不同模式之间流动相不兼容的问题, 又缩短了系统的平衡时间.

生物大分子与小分子在色谱中的保留行为有很大的差别. 小分子的保留与柱长有关而蛋白质的保留几乎与柱长无关^[14]. 耿等^[15]研究表明在 HIC 中, 蛋白的保留

存在着双变量分离机理, 即由随进样时间变化的“迁移区(MR)”和不随进样时间变化的“停滞区(SR)”的双变量参数控制的. 如果进样时间在停滞区之前, 物质的出峰时间不变, 这一事实表明在该特定的保留时间之前存在着一个可供利用的“进样区域”, 在该区域内的任意一处进样, 包括了在该区域内的不同进样体积、洗脱剂浓度和样品浓度对蛋白质的保留均无影响. 图 3 为在 HIC 模式下, 采用非同步进样的方式测定 ovotransferrin 和 ovalbumin 在不同进样时间 T_{inj} 下的保留时间 T_R . 以进样时间 T_{inj} 对保留时间 T_R 作图(图 4), 计算得到 ovotransferrin 和 ovalbumin 的临界进样时间分别为 15.17 min 和 19.54 min. 由双变量机理可知, 在进样时间小于临界进样时间时, ovotransferrin 和 ovalbumin 的出峰时间均保持不变, 此时对应的 $(NH_4)_2SO_4$ 浓度分别为 1.48 mol/L 和 1.02 mol/L, 即当进样时的样品溶液的盐浓度大于临界浓度时, 可保证样品在第二维分离时完全保留. 通过在原来一维色谱系统的基础上, 增加一个外置的泵和一个在线混合器, 在进样时通过调节外置泵与原流路的流速比, 增加样品溶液的盐浓度, 使样品溶液中的盐浓度位于进样区内, 实现样品从第一维向第二维分离模式的定量转移.

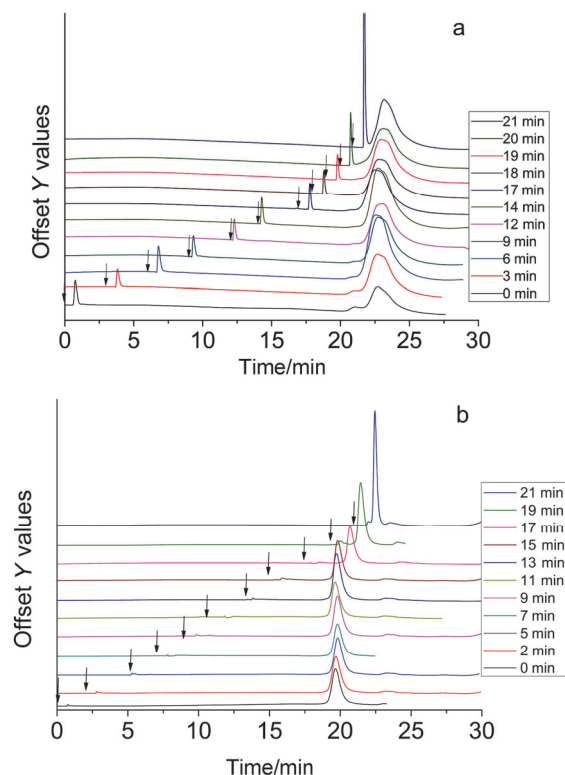


图 3 卵清蛋白(a)和卵转铁蛋白(b)在疏水模式下的非同步进样色谱图

Figure 3 The chromatograms of ovalbumin (a) and ovotransferrin (b) separated by HIC with nonsynchronous sampling
Mobile phases in the HIC mode: Solution A, 3.0 mol/L $(NH_4)_2SO_4$ + 0.02 mol/L KH_2PO_4 (pH 6.5); Solution B, 0.02 mol/L KH_2PO_4 (pH 6.5). The flow rate was 1.0 mL/min, linear gradient elution: 30 min, 0~100% mobile phase B; detection wavelength: 280 nm

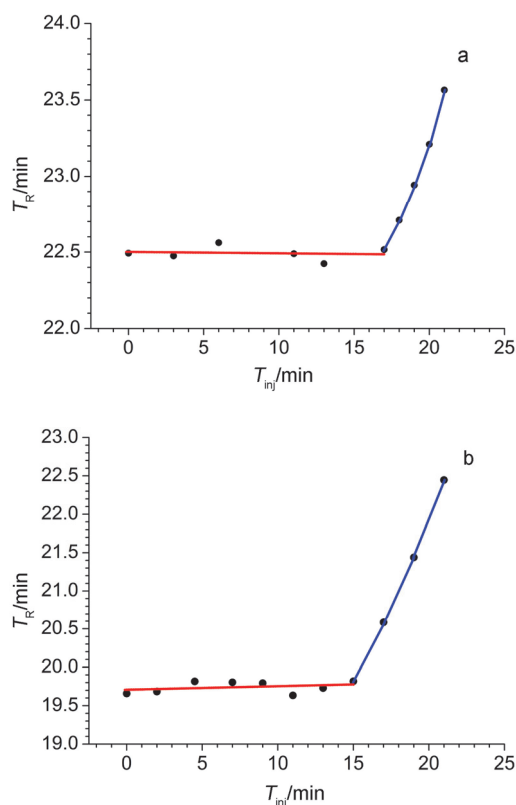


图4 卵清蛋白(a)和卵转铁蛋白(b)的保留时间对进样时间作图
Figure 4 Retention time T_R vs. sampling time T_{inj} for ovalbumin (a) and ovotransferrin (b)

2.3 在线 2DLC-1C 对标准蛋白的分离

将在线 2DLC-1C 分离系统用于标准蛋白的分离, 结果如图 5 所示. 八种标准蛋白经过第一维 SCX 分离后只有 RNase B、RNase A 和 lysozyme 被完全分离, 而 ovalbumin、BSA 和 insulin 三种酸性蛋白不保留而随溶剂峰直接流出色谱柱, 收集其馏分于样品环 1 中. α -chymotrypsin A 和 cytochrome C 有部分重叠, 不能完全分离, 亦收集其馏分于样品环 2 中. 当第一维 SCX 模式梯度分离完成后, 用 100% 3.0 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液交换 5 min, 将其转变为 HIC 模式后, 再将样品环 1 中第一维不保留的三种酸性蛋白馏分进入色谱柱, 进行第二维 HIC 模式分离. 经过 HIC 分离后, ovalbumin、BSA 和 insulin 三种酸性蛋白被完全分离. 以类似的步骤再将样品环 2 中未完全分离的馏分 α -chymotrypsin A 和 cytochrome C 进行 HIC 分离. 经 HIC 二维分离后, 二者亦被完全分离. 所以, 利用 SCX/HIC 双功能色谱柱所构建的在线 2DLC-1C 在 2 h 内可完成 8 种蛋白的快速分离.

2.4 在线 2DLC-1C 对蛋清中活性蛋白的分离

鸡蛋清中含有丰富的蛋白质、脂类、碳水化合物等物质, 其中蛋白质主要包括卵清蛋白(ovalbumin, 54%)、卵转铁蛋白(ovotransferrin, 12%)、卵粘蛋白(ovomucin, 3.5%)和溶菌酶(lysozyme, 3.4%)^[16], 这些蛋白具有独特

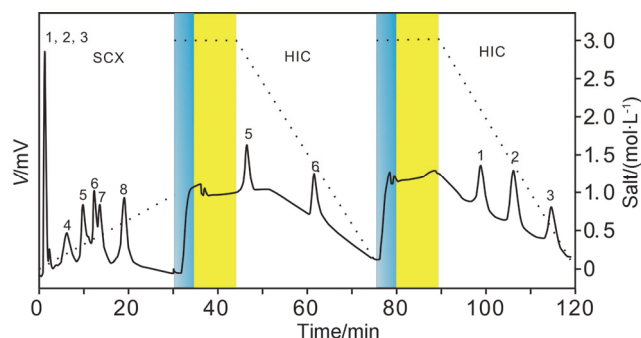


图5 在线单柱二维液相色谱对标准蛋白的分离图

Figure 5 Chromatogram of eight kinds of proteins separated by on-line 2DLC-1C

Mobile phase is the same as that of HIC in Figure 1, Solutions B and A in the SCX mode and Solutions A and B in the HIC mode. Flow rate is 1.0 mL/min except for re-sampling with 5.0 mL/min and the detection wavelength is at 280 nm. The linear gradient elution program is represented by the dashed line in the chromatogram. Column pressure is about 2.0~3.5 MPa except for re-sampling with 15.0~15.8 MPa. Peaks: 1, BSA; 2, ovalbumin; 3, insulin; 4, RNase B; 5, RNase A; 6, α -chymotrypsin A; 7, cytochrome C; 8, lysozyme

的功能, 在食品加工和药物上被广泛使用^[17~20]. 本文采用 SCX/HIC 双功能色谱柱, 利用在线 2DLC-1C 对蛋清中的活性蛋白进行快速分离纯化. 针对蛋清样品, 我们采用 SCX-HIC 分离顺序. 因为若采用 HIC-SCX 分离顺序, 由于 HIC 是一种通用型色谱, lysozyme、ovalbumin 和 ovotransferrin 三种蛋白在 HIC 模式下均可保留, 但 lysozyme 的色谱峰分别与后两者重叠而不能完全分离, 因此需要收集这三个组分的馏分再进行第二维 SCX 分离. 但是, 酸性蛋白 ovalbumin (pI 4.7)和 ovotransferrin (pI 6.1)在 SCX 模式下是不保留的, 无法进行二维分离. 因此采用 SCX-HIC 分离顺序是最佳选择. 在线 2DLC-1C 对蛋清中的活性蛋白快速分离纯化如图 6a 所示. 从图 6a 可看出, 500 μL 蛋清处理液经第一维 SCX 分离后, 仅有碱性蛋白 lysozyme (Peak 2, pI 11.0)被完全分离, 而酸性蛋白不保留随溶剂峰一起流出. 收集不保留馏分(Peak 1)于样品环中. 不保留馏分经 HIC 二维分离后, ovotransferrin (Peak 3, pI 6.1)和 ovalbumin (Peak 4, pI 4.7)被完全分离. 收集色谱峰 1~4 进行电泳分析, 结果如图 6b 所示, 被分离出的溶菌酶、卵清蛋白和卵转铁蛋白纯度分别为 95%、93%和 97%, 质量分别为 0.021、0.33 和 0.069 mg, 回收率分别为 96%、93%和 94%. 结果表明, 采用在线 SCX/HIC 单柱二维液相色谱可在 70 min 内完成对蛋清中三种活性蛋白的分离纯化.

3 结论

利用 SCX/HIC 双功能色谱柱构建的在线 2DLC-1C 在 70 min 内实现了对蛋清中的溶菌酶、卵清蛋白和卵转铁蛋白三种活性蛋白的快速分离纯化. 与常规 2DLC 不同的是, 2DLC-1C 在一根色谱柱上就可实现 HIC-IEC 或 IEC-HIC 二维色谱分离, 两种分离模式共用相同的盐水体系流动相, 解决了传统 2DLC 流动相不兼容的难题.

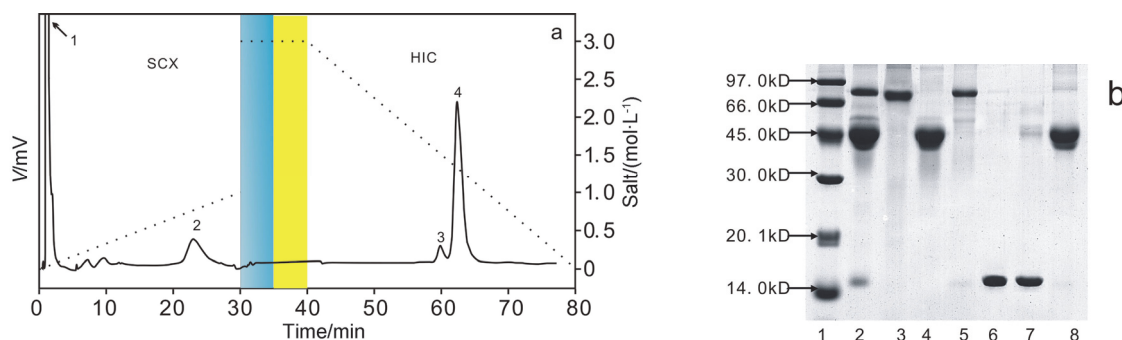


图6 在线单柱二维液相色谱对鸡蛋清中蛋白的分离图(a)和电泳图(b)

Figure 6 Chromatogram (a) and SDS-PAGE analysis (b) of egg white separated by on-line 2DLC-1C

(a) Chromatographic condition: Solution 1, 20 mmol/L KH_2PO_4 (pH 6.5); Solution 2, 20 mmol/L KH_2PO_4 + 3.0 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH 6.5), linear gradient elution: 0~30 min, Solution 1%~33% Solution 2; 30~40 min, 100% Solution 2; 40~70 min, Solution 2~100% solution 1. The flow rate is 1.0 mL/min except for re-sampling with 5.0 mL/min and the detection wavelength is at 280 nm, Column pressure is about 2.0~3.5 MPa except for re-sampling with 15.0~15.8 MPa pressure. Sample size: 500 μL . (b) Lane: 1. marker; 2. fraction of peak 1; 3. fraction of peak 3; 4. fraction of peak 4; 5. Ovotransferrin; 6. fraction of peak 2; 7. lysozyme; 8. ovalbumin

目标产品可定量从上一维转移到下一维, 解决了目前全2DLC 每次取样的体积仅为纳升(nL)到微升(μL)难以应用于制备规模的难题. 在线 2DLC-1C 使蛋白质的分离纯化在一个密闭恒温系统中进行, 可防止样品污染和失活, 更易实现自动化操作和放大到制备规模, 在活性蛋白的快速分离制备和工业化生产方面具有广阔的应用前景.

4 实验部分

4.1 试剂与仪器

LC-10AVP 高效液相色谱系统, 包括高压泵, 紫外可见检测器, 系统控制器, 四元低压梯度仪, 脱气装置, 色谱工作站(日本 Shimadzu 公司); 超纯水系统(Cascade LS, Pall, 美国); 紫外可见分光光度计(UV-1601PC, 日本 Shimadzu 公司); 电泳仪(DYY-6C 型, 北京市六一仪器厂); 高速冷冻离心机(Sorvall Evolution RC, 美国科峻仪器公司); 薄层扫描仪(CS-3000, 日本 Shimadzu 公司); 色谱专家(ChromatoExpert)系统其中包括: LC-10AVP 高压泵(Shimadzu, 日本)、六通进样阀(Rheodyne 7725i, 美国), 四通、六通、八通和十通切换阀(C5-2004、C5-2006、C5H-2008 和 C5H-2000)以及八通(Z8M1)和十通(Z10M1)均购自瑞士 VICI 公司.

色谱柱为 50 mm $\times$ 4.6 mm I.D. 不锈钢管, 采用匀浆法装填由本实验室合成的 SCX/HIC 双功能色谱填料^[7].

4.2 化学试剂

溶菌酶(lysozyme, 蛋清)、核糖核酸酶 A (RNaseA, 牛胰脏)、细胞色素-C (cytochrome-C, 马心)、核糖核酸酶 B (RNaseB, 牛胰脏)、 α -糜蛋白酶原 A (α -chymotrypsinogen A, 牛胰脏)、肌红蛋白(myoglobin, 马心)、胰岛素(insulin, 牛胰脏)、卵白蛋白(ovalbumin, 蛋清)、卵转铁蛋白(ovotransferrin, 蛋清)、 α -淀粉酶(α -amylase, 枯草杆菌)、蛋白质分子量标准(Marker, 分子量 14200~97000)购买自 Sigma 公司(St. Louis, MO,

美国). 考马氏亮兰 R250 为 Fluka 进口分装, 其它所用试剂均为分析纯.

4.3 在线单柱二维分离系统对蛋白质的分离

样品经第一维 SCX 色谱分离, 不保留或未完全分开的馏分通过阀切换技术分别收集于样品环中. 具体流程如图2所示: 样品 $\rightarrow$ 进样阀 1(2-3) $\rightarrow$ 二位四通阀 6(1-3) $\rightarrow$ 二位四通阀 7(2-1) $\rightarrow$ 色谱柱 $\rightarrow$ 检测器 $\rightarrow$ 二位四通阀 8(1-2) $\rightarrow$ waste. 收样时, 将二位四通阀 8 的阀门位置置于(1-3), 流经二位四通阀 5(3-1) $\rightarrow$ 八位八通阀 4(1) $\rightarrow$ 定量环 1 $\rightarrow$ 八位八通阀 3(1)流出, 收集一号样于定量环 1. 样品 1 收集完后, 切换二位四通阀 8 的阀门位置于(1-2). 通过切换八位八通阀 3、4 的阀门位置, 可将不同的样品收集于不同的样品环中. 第一维分离完成后, 系统进行缓冲液交换, 由 SCX 模式转换为 HIC 分离模式. 待系统平衡后, 进行在线进样和二维分离. 二维进样时, 切换八位八通阀于 3(1)位, 流动相流经样品环 1 $\rightarrow$ 八位八通阀 4(1) $\rightarrow$ 二位四通阀 5(1-2) $\rightarrow$ 二位六通进样阀 1(4-3) $\rightarrow$ 二位四通阀 6(1-2) $\rightarrow$ 混合器 $\rightarrow$ 二位四通阀 7(3-1) $\rightarrow$ 色谱柱 $\rightarrow$ 检测器 $\rightarrow$ 二位四通阀 8(1-2) $\rightarrow$ 废液, 完成第二维 HIC 进样. 通过切换八位八通阀, 可将一维分离收集的馏分依次完成二维分离.

4.4 色谱条件

HIC 模式: 流动相 A 液, 3.0 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 0.02 mol/L KH_2PO_4 , pH 6.5; B 液, 0.02 mol/L KH_2PO_4 , pH 6.5; SCX 模式: 流动相 A 液, 0.02 mol/L KH_2PO_4 , pH 6.5; B 液, 0.02 mol/L KH_2PO_4 + 1.0 mol/L NaCl, pH 6.5.

4.5 鸡蛋清的预处理

用 20 mmol/L KH_2PO_4 溶液(pH 7.0)将蛋清稀释 5 倍, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下缓慢搅拌 1 h 待沉淀完全后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用.

References

- [1] Li, X. Q.; Yu, D. P.; Feng, X. M.; Guo, Z. M.; Li, X. L.; Zou, L. J.; Liang, X. M. *Acta Chim. Sinica* **2015**, *73*, 1074. (李先琴, 俞冬萍, 丰小敏, 郭志谋, 李秀玲, 邹丽娟, 梁鑫淼, 化学学报, **2015**, *73*, 1074.)
- [2] Ke, C. Y.; Sun, F. J.; Zhang, Q. Z.; Zheng, L. *Acta Chim. Sinica* **2012**, *70*, 1637. (柯从玉, 孙妩娟, 张群正, 郑莉, 化学学报, **2012**, *70*, 1637.)
- [3] Giddings, J. C. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 1258A.
- [4] Pepaj, M.; Holm, A.; Fleckenstein, B.; Lundanes, E.; Greibrokk, T. *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 519.
- [5] Tian, H. Z.; Xu, J.; Xu, Y.; Guan, Y. F. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1137*, 42.
- [6] McLaughlin, L. W. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 309.
- [7] Zhao, K. L.; Yang, F.; Xia, H. J.; Wang, F.; Song, Q. G.; Bai, Q. *J. Sep. Sci.* **2015**, *38*, 703.
- [8] Yang, F.; Bai, Q.; Zhao, K. L.; Gao, D.; Tian, L. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 1721.
- [9] Song, C.; Wang, J. S.; Zhao, K. L.; Bai, Q. *Biomed. Chromatogr.* **2013**, *27*, 1741.
- [10] Zhao, K. L.; Yang, L.; Wang, X. J.; Bai, Q.; Yang, F.; Wang, F. *Talanta* **2012**, *98*, 86.
- [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] Lämmerhofer, M.; Nogueira, R.; Lindner, W. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 2517.
- [13] Yang, X. M.; Yu, Y.; Geng, X. D. *Sci. Sini. Chim.* **2013**, *43*, 599. (杨晓明, 余炜, 耿信笃, 中国科学 化学(中文版), **2013**, *43*, 599.)
- [14] Liu, T.; Geng, X. D. *Chin. Chem. Lett.* **1999**, *10*, 219.
- [15] Geng, X. D.; Jia, X. D.; Liu, P.; Wang, F.; Yang, X. M. *Analyst* **2015**, *140*, 6692.
- [16] Stadelman, W. J.; Newkirk, D.; Newby, L. *Egg Science and Technology*, CRC Press, **1995**.
- [17] Huntington, J. A.; Stein, P. E. *J. Chromatogr. B* **2001**, *756*, 189.
- [18] Nimalaratne, C.; Bandara, N.; Wu, J. *Food Chem.* **2015**, *188*, 467.
- [19] Diederich, P.; Amrhein, S.; Hämmerling, F.; Hubbuch, J. *Chem. Eng. Sci.* **2013**, *104*, 945.
- [20] Xia, H. F.; Jin, X. H.; Wu, P. Q.; Zheng, Z. Y. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1223*, 126.

(Cheng, F.)