

活性碳色谱法分离制备高 F 值寡肽混合物

王 梅 谷文英 沈蓓英

(无锡轻工大学食品学院, 无锡 214036)

摘要 比较了 18 种颗粒及粉状活性碳吸附和解脱芳香族氨基酸的能力。找出了较适宜的活性碳品种、吸附条件和解脱溶液。显示了活性碳色谱法分离制备高 F 值寡肽混合物的有效性。测定了高 F 值寡肽混合物的氨基酸组成, 计算出 F 值 > 20 。并用 HPLC 测定了相对分子质量分布。

关键词 活性碳色谱; 高 F 值寡肽混合物; 氨基酸组成; 相对分子质量

分类号 Q514.3/T S201.21

0 前 言

在氨基酸或寡肽混合物中, 支链氨基酸(BCAA: Val, Ile, Leu)与芳香族氨基酸(AAA: Tyr, Phe)之比称为 Fischer Ratio, 简称 F 值。此值与改进肝脏疾病(如肝硬化, 肝性脑病等)有密切关系^[1]; 可有效地补充膳食蛋白、纠正负氮平衡、改善营养状态、并能恢复正氮平衡^[2]; 高 F 值制剂由于含有大量的支链氨基酸, 还具有抗疲劳等作用。

我国临床上使用的高 F 值制剂一般是采用纯净结晶的氨基酸按需要进行一定比例配制的。因此价格比较贵。由于许多实验证明口服高 F 值氨基酸混合物的治疗是有效的^[1]。因此, 这启发了人们采用水解食物蛋白来制备高 F 值口服制剂, 再者, 有人认为^[3, 4], 寡肽在肠道中的吸收行为不同于氨基酸而易于吸收、尤其是三肽或四肽。所以口服寡肽混合物比口服氨基酸混合物对机体的补充更有效。因此可以推测从食物蛋白制备高 F 值寡肽混合物应用于临床作为口服制剂将是行之有效的。

从食物蛋白质的水解液中去除芳香族氨基酸的方法很多, 如凝胶色谱法, 树脂色谱法等。但从工业应用方面考虑, 活性碳色谱法易于推广使用。活性碳对各种氨基酸吸附强度不同, 对苯丙氨酸、酪氨酸有选择性吸附特性。利用这一特性, 可将寡肽和芳香族氨基酸分离。

1 材料和方法

1.1 材料

玉米蛋白粉(来源于上海葡萄糖厂); 活性碳(购于林业部定点厂家); 754 紫外分光光度计; 层析柱($\varnothing 0.8\text{ cm} \times 30\text{ cm}$); 恒流泵; 旋转蒸发仪; 日立 835-5A 氨基酸自动分析仪; 高效

液相色谱(HPLC);UV-240 紫外扫描仪。

1.2 工艺流程

玉米蛋白粉→控制酶解成酶解液→调 pH2.8、含氮量 3% 溶液→活性炭→浓缩→高 F 值寡肽混合物^[5]。

1.3 检测方法

支链氨基酸的检测:高支链氨基酸寡肽在 220 nm 处有最大吸收峰。用 754 紫外分光光度计进行检测。

对芳香族氨基酸的检测:芳香族氨基酸在 280 nm 或 260 nm 处有特征性的最大吸收,而其它氨基酸对此波长的紫外线无吸收,故用 754 紫外分光光度计进行检测。

高 F 值寡肽混合物的氨基酸组成分析:用氨基酸自动分析仪进行分析。

高 F 值寡肽的相对分子质量分布:用高压液相色谱仪进行测定。

2 结果与讨论

2.1 活性炭的选择与去除芳香族氨基酸的条件

为了选择一种吸附芳香族氨基酸容量大而易洗脱的活性炭,对 18 种颗粒状及粉末状活性炭进行了筛选。首先选用静态吸附方法进行初步筛选,由此选出了是 8,9,11,14,17,18 号 6 种活性炭。根据静态吸附的结果,又对这 6 种活性炭进行进一步研究,结果见表 1。结果表明,活性炭去除芳香族氨基酸的能力与碳/液比(活性炭的量与酶解液的量之比)有关。我们的目的是得到高 F 值的寡肽混合物,因此不仅要考虑去除 D_{260} 组分的多少,而且也要最大限度地保留 D_{220} 组分。由表 1,不同的活性炭和不同的碳/液比, D_{220} 组分的保留率不相同。所以顾及两方面的结果,用不同品种的活性炭作为吸附剂时,就要采取不同的碳/液比。如 8 号活性炭,如果选择 1:10 的碳/液比,则酶解液中 D_{260} 组分的去除率为 98%,但是 D_{220} 的保留率只有 58%。因此要选用 1:12 的碳/液比,此时酶解液中的 D_{260} 组分的去除率为 94%, D_{220} 组分的保留率为 70%。11,14,18 号活性炭的最佳碳/液比为 1:10,而 17 号活性炭的最佳碳/液比最好选 1:12。

表 1 不同固液比与芳香族氨基酸的去除率 %

活性炭 编 号	D_{260} 组分去除率					D_{220} 组分保留率				
	1:10	1:12	1:20	1:40	1:60	1:10	1:12	1:20	1:40	1:60
8	98	94	68	44	33	58	70	83	88	89
9	90	60	48	40	28	78	83	86	90	90
11	93	74	31	29	28	75	81	84	89	89
14	95	86	74	49	33	72	76	80	87	88
17	98	94	78	53	46	53	72	80	86	87
18	85	64	58	40	39	80	85	86	88	89

活性炭去除芳香族氨基酸的能力不仅与碳/液比有关,而且与温度和 pH 有关。实验结果见表 2 和表 3。

从表 3 可见,在用活性炭去除酶解液中芳香族氨基酸时,pH 对活性炭去除芳香族氨基酸的能力有很大的影响。在用活性炭去除酶解液中芳香族氨基酸时,我们将酶解液调到 pH2.5 或 2.8,使活性炭去除酶解液中芳香族氨基酸的能力最强。

表 2 温度与活性碳去除芳香族氨基酸的能力

温度/	吸附后溶液的 D_{260}	吸附后溶液的 D_{220}
25	0.527	2.04
35	0.515	1.996
40	0.468	1.979
45	0.375	1.983
50	0.374	1.960

表 3 不同的 pH 与活性碳去除芳香族氨基酸的能力

pH	吸附后溶液的 D_{260}	吸附后溶液的 D_{220}
2.0	0.089	0.135
2.5	0.084	0.209
2.8	0.072	0.358
3.0	0.064	0.126
3.5	0.068	0.184
7	0.082	0.144
9	0.216	0.083

在用活性碳去除酶解液中芳香族氨基酸时,我们选择温度在 45 左右。

2.2 洗脱条件的选择

为了活性碳再生循环使用和从吸附在活性碳上的芳香族氨基酸中分离出苯丙氨酸,我们对吸附了氨基酸的活性碳进行了洗脱实验。见表 4, 表 5. 结果显示, 1 1 混合的 1 mol/L 氨水和无水乙醇作为洗脱液, 其洗脱效果较好。而且动态与静态洗脱比较, 动态洗脱效果好。这与孙淑斌^[6]的研究结果一致。

表 4 不同洗脱液的洗脱效果比较

洗 脱 液	洗脱下组分的 D_{260}					
	8 号碳	9 号碳	11 号碳	14 号碳	17 号碳	18 号碳
1 mol/L 氨水、无水乙醇*	1.295	1.118	0.784	1.718	1.509	1.648
无水乙醇	0.032	0.029	0.037	0.016	0.035	0.216
1 mol/L 氨水	0.246	0.235	0.472	0.571	0.320	0.330
1 mol/L 氨水、60% 乙醇*	1.437	0.241	0.327	0.286	0.332	0.330
60% 乙醇	0.166	0.070	0.076	0.076	0.091	0.123
2 mol/L 氨水、60% 乙醇*	0.063	0.043	0.038	0.014	0.120	0.031

* 体积比 1 1, 实验条件为 5 g 14 号活性碳装入色谱柱中, 以 0.3 mL/min 流速上酶解液 50 mL 后, 以同样速度上洗脱液 10mL。

活性碳吸附与分离苯丙氨酸、酪氨酸的机理尚不完全清楚。其吸附可理解为非极性苯环侧链与活性碳巨大表面间非极性吸附与氨基酸极性集团同活性炭含氧集团间极性吸附的总和。从两种氨基酸的结构看, 在吸附过程中产生具有电子转移的化学吸附应不占主要地位, 而应以物理吸附为主。一般说, 分子中苯环部分与活性炭表面的石墨型微晶 结构以色散力为主的物理吸附, 很可能苯环部分横卧于石墨的微结晶上, 而当 - OH 基取代时又很可能由横卧转向垂直, 此外二者对固体-溶液界面能影响有异, 从而使吸附的情况不同。

2.3 紫外扫描结果

用紫外扫描仪对酶解液经活性碳吸附前后的紫外吸收进行扫描, 结果见图 1. 在 280 nm 处的吸收峰经活性碳吸附后迅速降低。这说明活性碳吸附芳香族是非常有效的。

表 5 动态洗脱过程中组分 D_{260} 的变化

洗 脱 液	对应洗脱体积的组分的 D_{260}					
	2 mL	4 mL	6 mL	8 mL	10 mL	12 mL
蒸馏水	0.149	0.046	0.017	0.015	0.015	0.015
1 mol/L 氨水 无水乙醇*	0.925	2.92	3.04	2.95	2.60	2.60

* 体积比 1 1

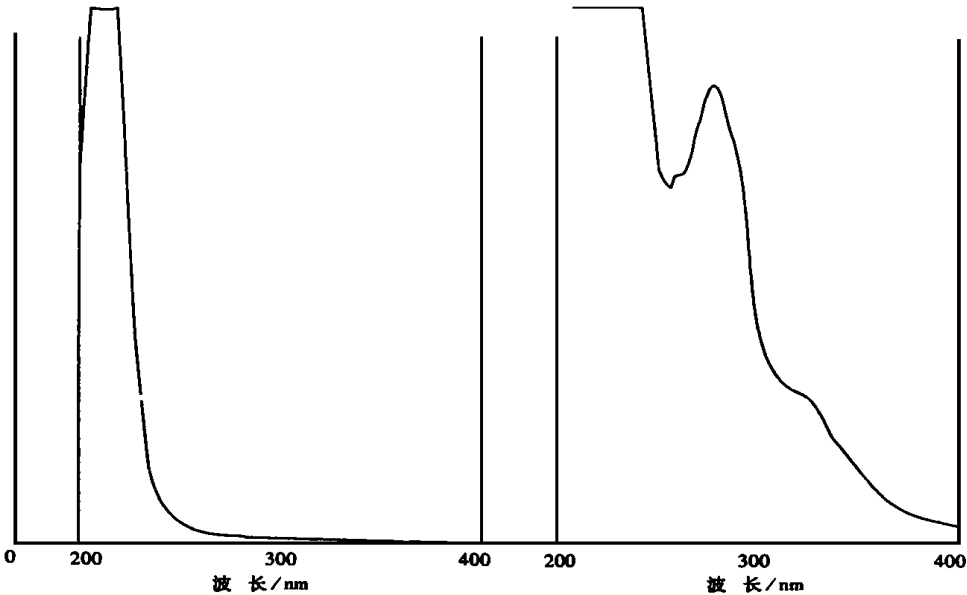


图 1 产品的紫外扫描图谱

2.4 高 *F* 值寡肽混合物的氨基酸组成

用氨基酸自动分析仪对高 *F* 值氨基酸混合物进行了氨基酸组成的测定。其结果见表 6。并求出 *F* 值 > 20。说明得到的产品为高 *F* 值寡肽混合物。Shuji Adachi 等人^[7]利用活性碳色谱分离酪蛋白酶解液也得到 *F* 值 > 20 的高 *F* 值寡肽混合物。与之比较,虽然所用的原料不同,但是利用活性碳色谱处理酶解液都可提高 *F* 值。

表 6 高 *F* 值氨基酸混合物氨基酸的种类及含量 mg/mL

氨基酸种类	组成氨基酸含量	游离氨基酸含量	氨基酸种类	组成氨基酸含量	游离氨基酸含量
ASP	0.687	0.028 5	ILE	0.242	0
THR	0.397	0.043 4	LEU	1.182	0.032 6
SER	0.666	0.033 5	TYR	0.059	0.022 0
GLU	2.128	0.014 5	PHE	0	0
GLY	0.222	0.026 3	LYS	0.197	0.005 6
ALA	1.203	0.100 0	HIS	0.139	0
VAL	0.458	0.063 2	ARG	0.248	0
MET	0.184	0.060 6	PRO	0.440	0
占总含量比例(%)	94.9	5.1			
BCAA	1.882	—			
AAA	0.059	—			
<i>F</i> 值(BCAA/AAA)	31.9	—			

2.8 产品的相对分子质量分布

用高压液相色谱仪对凝胶柱流出样品进行测定,由测定结果经计算可得(方法略)相对分子质量分布见表 7。由此可见,相对分子质量为 500~600 占 18.5%、相对分子质量为 200~300 占 63.5%。因此,产品为寡肽混合物。

表 7 产品的相对分子质量分布

保留时间/min	<i>Mr</i>	<i>D</i>	含量/%
18.678~20.056	591.1	1.013 37	18.5
20.056~22.074	236.1	1.028 8	63.5

3 结 论

笔者利用活性碳吸附法对玉米寡肽混合物进行分离, 分别用 18 种活性碳对芳香族氨基酸的吸附能力进行了比较, 对活性碳吸附芳香族氨基酸的影响因素作了分析, 得出较佳活性碳种类、碳液比为 1:10、温度 45℃、pH 为 2.5 或 2.8; 选择出较佳洗脱为 1:1 混合的 1 mol/L 氨水和无水乙醇溶液; 以动态洗脱效果较好。

用紫外扫描仪对活性碳吸附前后的寡肽混合物进行紫外扫描分析结果可见, 活性碳吸附前 280 nm 左右有一个较强吸收峰, 而活性碳吸附后 280 nm 左右的吸收峰几乎没有了, 这说明了活性碳吸附芳香族氨基酸的有效性; 用氨基酸自动分析仪对高 F 值寡肽混合物的氨基酸组成进行分析, 结果求出 F 值 > 20 , 符合临床治疗肝硬化及肝性脑病的标准; 用高压液相色谱仪对凝胶柱流出样品进行测定, 其结果可见产品为寡肽混合物。

参 考 文 献

- 1 Fischer J E. The effect of normalization of plasma amino acids on hepatic encephalopathy in man. *Surgery* 1976, 80(1): 77~91
- 2 Shin-ya Tanimoto. Enzymatic Modification of Zein to Produce a Non-bitter Peptide Fraction with a Very High Fischer Ratio for Patients With Hepatic Encephalopathy. *Agric Biol Chem*, 1991, 55(4): 1119~1123
- 3 Shuji Adachi. Preparation of a Peptide Mixture with Nutritionally Definite Characteristics from a Protein Hydrolysate. *Proceeding of Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference*. Singapore, 1992
- 4 Soichi A. Comparative Nutritional Value for Amino Acids, Oligopeptides and Soybean Protein. *J. Assoc. Food Biochem. Eng.*, 1987, 64(12): 1692~1695
- 5 Wang Mei. Enzymatic Modification of Corn Gluten Meal to Produce Oligo-Peptide Mixture with A High Fischer Ratio. *J. Food Sci. Technol.*, 1997, 20(1): 125~128
- 6 孙淑. 氨基酸混合液脱色条件的比较选择. *氨基酸与生物之资源*, 1996, 1, 18~19

Preparation of High Fischer Ratio Oligo-Peptide Mixture with Active Carbon Chromatograph

Wang Mei Gu Wenying Shen Peiying

(School of Food Science & Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

Abstract The absorption and desorption of eighteen kinds of active carbon have been investigated. High Fischer ratio oligo-peptide mixture was prepared with active carbon chromatographic methods. The amino acid composition and molecular weight distribution have been measured.

Key words corn gluten meal; active carbon chromatograph; amino acid composition; molecule weight; oligo-peptide mixture

(责任编辑: 陈 娇)