

HPLC 法测定仔猪小肠刷状缘膜囊孵育体系中的二肽含量

代建国 李德发* 朴香淑 杨文军 武玉波

(中国农业大学动物科技学院, 北京 100094)

摘要 用高效液相色谱法测定了经仔猪小肠刷状缘膜囊水解后的甘-L-脯、L-亮-甘和 β -丙-组共3种二肽的剩余含量。分别以水-三氟乙酸(质量浓度分别为0.1%, 0.08%和0.1%, pH值分别为2.20, 2.30和2.20)和乙腈-三氟乙酸(三氟乙酸质量浓度0.1%)为流动相, 经Phenomenex ODS分析柱(250 mm \times 4.60 mm, 5 μ m, C₁₈)分离, 在200~400 nm处检测。结果表明, 3种二肽在0~300 μ g \cdot mL⁻¹之间, 其峰面积(X)对质量浓度(Y, μ g \cdot mL⁻¹)回归得方程分别为 $Y = 0.0001X - 5.6945$, ($R^2 = 0.9946$); $Y = 0.0004X - 1.4167$, ($R^2 = 0.9999$); $Y = 0.1842X - 7.3654$, ($R^2 = 0.9948$)。平均回收率依次为100.00%, 100.01%和99.92%, 保留时间依次为7.63, 8.01和4.17 min, 最大吸收波长依次为201, 200和280 nm。该方法快速、简便和准确, 结果稳定, 重现性好, 可以用来评定单个已知的二肽在动物小肠刷状缘膜囊孵育液中的水解状况。

关键词 高效液相色谱法; 甘-L-脯二肽; L-亮-甘二肽; β -丙-组二肽

中图分类号 O657.72

Determination of Dipeptide Content in Piglet Small Intestine Brush Border Membrane Incubation System with HPLC

Dai Jianguo Li Defa Piao Xiangshu Yang Wenjun Wu Yubo

(College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract The concentrations of Gly-L-pro, L-Leu-gly and β -Ala-his in piglet small intestine brush border membrane incubation system were analyzed by using high performance liquid chromatography. Water-trifluoroacetic acid (concentrates were 0.1%, 0.08% and 0.1% respectively, pH value were 2.20, 2.30 and 2.20 respectively) and trifluoroacetic acid-acetonitrile (concentrate was 0.1%) were used as mobile phase, sample were separated by Phenomenex ODS analytical column (250 mm \times 4.60 mm, 5 μ m, C₁₈) and detected between 200~400 nm. The results indicated that the regression equations of peak area (X) against concentrate (Y, μ g \cdot mL⁻¹) of the three dipeptides were, between 0~300 μ g \cdot mL⁻¹, $Y = 0.0001X - 5.6945$, $R^2 = 0.9946$; $Y = 0.0004X - 1.4167$, $R^2 = 0.9999$ and $Y = 0.1842X - 7.3654$, $R^2 = 0.9948$ respectively, the average recovery were 100.00%, 100.01% and 99.92% respectively. The determination method is rapid, simple, accurate, stable and reproducible, and is proposed to be used for determine content of the single and known dipeptide in piglet small intestine brush border membrane vesicle incubation system.

Key words HPLC; gly-L-pro dipeptide; L-leu-gly dipeptide; β -ala-L-his dipeptide

收稿日期: 2001-10-10

国家自然科学基金资助项目(39870583)

* 李德发, 博士, 教授, 研究方向为猪的营养。联系作者。北京圆明园西路2号



成年动物肠腔、刷状缘膜以及肠上皮细胞内均分布着一定的二肽酶^[1,2],因而小肠中的二肽在进行跨膜转运的同时,往往伴随着自身的水解,而且水解程度因动物种类及年龄的不同而可能呈现出一定的差异^[3~5]。因此在研究断奶仔猪小肠刷状缘膜囊对小肽转运的时候,必须探明动物对小肽水解的程度,为衡量小肽的运输效率提供必要的参数。目前,关于小肽水解的研究在国内尚属空白,国外多利用产物紫外吸收^[6,7]或同位素标记技术^[3~5]研究二肽的水解,产物紫外吸收仅用于研究那些含苯环氨基酸的小肽水解,而同位素标记试验可以适合于测定任何小肽的水解,且灵敏度高,但试剂标记和检测成本极其昂贵,且易造成环境污染,而通过 HPLC 直接测定水解前后二肽(底物)的含量来评价小肽的水解的报道尚不多见。本试验用 HPLC 法对引入到仔猪小肠刷状缘膜囊孵育体系中经过水解过程后剩余的 3 种二肽的含量进行了测定,并对此方法进行了评价。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

Alliance Waters 2690 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司):包括 2690 四元梯度高压泵、Masslynx 3.5 操作系统和 Waters 996 二极管阵列检测器等;Cole-Palmer 8892 超声振荡仪;Heraeus Sepatech Biofuge 22R 超速离心机;微量进样器(Eppendorf 200 和 Eppendorf 1000);样品过滤器及滤膜(Gelscience, 0.45 μm);Manopure 超纯水器。乙腈(色谱纯)、三氟乙酸 TFA(优级纯)和高氯酸(分析纯)均购自国内;Gly-L-Pro(分析纯)、L-Leu-Gly(分析纯)和 β -Ala-His(分析纯)等 3 种二肽均购自美国 Sigma 公司。

1.2 色谱条件

参照文献[8,9]选择色谱条件,并做适当改动。Phenomenex ODS 分析柱(250 mm \times 4.60 mm, 5 μm , C₁₈, 美国迪马公司);流动相 A 为 H₂O-三氟乙酸 TFA,其浓度依次为 0.1% TFA (pH 2.20)(体积比为 1:000),0.08% TFA (pH 2.30)(体积比为 1:000)和 0.1% TFA (pH 2.20)(体积比为 1:000);流动相 B 为乙腈-TFA(0.1% TFA)(体积比为 1:000);柱箱温度:38 $^{\circ}\text{C}$;流速:0.6 mL \cdot min⁻¹。检测波长 200~400 nm,进样量为 20 μL 。

1.3 工作液的配制

精密称取甘-L-脯二肽(Gly-L-Pro)、L-亮-甘二肽(L-Leu-Gly)和 β -丙-组二肽(β -Ala-His)等 3 种二肽各 30 mg,分别加入超纯水,超声振荡使之完全溶解,最终均定容于 50 mL 的容量瓶中,使之浓度均为 600 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。各取 10 mL 标准样品溶液,加入等体积的 0.6 mol \cdot L⁻¹的高氯酸,在 10 000 \times g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 15 min,取上清液-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,为标准工作储备液。

1.4 仔猪小肠刷状缘膜囊(BBMV)的制备

选择体重为 7.0~7.5 kg 左右的三元杂交(长白 \times 大白 \times 北京黑)35~40 日龄断奶的健康仔猪 6 头,饲喂常规日粮。屠宰取小肠之前,饥饿 24 h。参照文献^[10]所介绍的 MgCl₂ 沉淀法制备 BBMV,超低温冷冻保存。

用 25 号针头吸起离心管底的 BBMV,转移到另一装有 BBMV 前置液离心管中,前置液为 pH 为 7.5 的 1 mmol \cdot L⁻¹ Tris/Hepes(1 mmol \cdot L⁻¹ Tris 液,用 Hepes 调节 pH 到 7.5)液,内含 300 mmol \cdot L⁻¹ 的甘露醇溶液。用此溶液多次冲洗洗涤 BBMV、离心、弃上清液,终末将 BBMV 悬浮于该溶液中超低温冷冻保存。孵育水解前,用 Keenwood 匀浆机全速匀浆 BBMV,破坏其封闭的囊状结构,用前置液将其稀释成 0.8 mg \cdot mL⁻¹ 溶液,超低温冷冻保存。

1.5 水解样品的处理

参照文献[11, 12]方法,并略加改动进行处理。在硬质玻璃试管中准确加入pH值为7.5和浓度为 $281.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的Gly-Pro二肽底物溶液 $800 \mu\text{L}$,然后移入pH值为7.5的 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris/Hepes缓冲液,25℃下充分振荡预热10 min,再向试管加入经25℃下充分振荡预热的仔猪小肠刷状缘膜囊悬浮液 $100 \mu\text{L}$,置于微型振荡器上迅速混匀;25℃和 $100 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下准确孵育15 min,之后立即将试管放入100℃沸水浴中振荡1 min,以终止二肽酶对二肽的水解反应,之后将试管置于微型振荡器上充分混合均匀,所得的水解溶液为样品溶液。在 $10\,000 \times g$ 和4℃条件下离心15 min,取上清液,加等体积的 $0.6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高氯酸, $10\,000 \times g$ 和4℃离心15 min,收集上清液,经 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤,滤液上机分析。

L-Leu-Gly和 β -Ala-His的水解采用同样的方法进行,二者的底物浓度分别为 $355.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $470.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。每个处理做6个重复。

2 结果与讨论

2.1 色谱分离条件的选择

3种二肽的极性较大,在HPLC中对非极性固定相之间的作用力较弱,样品保留时间随流动相极性增大而减少,故对流动相中的乙腈等极性物质较敏感。在流动相中若乙腈用量高,会使保留时间提前以及基线漂移,并出现典型的吸收峰干扰。采用B液从0到12.0 min匀速上升至2%,可以有效改善洗脱条件,减少杂峰干扰。

此外,流动相pH值的变化直接影响3种二肽的分离效果。本试验以pH值为2.20,2.30和2.20的流动相进行洗脱,取得了较好的分离效果。在pH值为2.20时,分离3种二肽的混合液,结果发现仅仅出现甘-L-脯二肽和 β -丙-组二肽的峰形,在pH值为2.30时,仅仅出现L-亮-甘二肽的峰形。各样品中的二肽图谱见图1。如何使几种二肽在同一条件下同时得到分离和检测出来,有待于进一步探索。

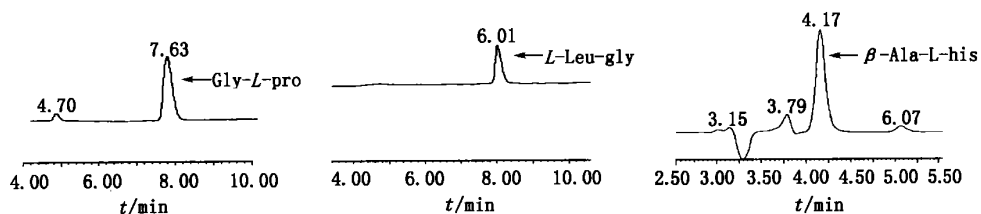


图1 仔猪小肠刷状缘膜囊孵育液中3种二肽的HPLC图谱

2.2 工作曲线

用超纯水准确稀释标准工作储备液,分别制得0, 9.38, 18.75, 37.50, 75.00, 150.00和 $300.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的3种二肽标准溶液,经过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜超滤后上机测定,进样 $20 \mu\text{L}$ (每种样品进样2次,记录色谱图),用各样品的峰面积(X)对质量浓度(Y, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)回归得方程分别为 $Y = 0.0001X - 5.6945$, $R^2 = 0.9946$; $Y = 0.0004X - 1.4167$, $R^2 = 0.9999$; $Y = 0.1842X - 7.3654$, $R^2 = 0.9948$ 。结果表明,3种二肽标准品的峰面积(X)与质量浓度(Y, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)呈现显著的直线线性关系。

2.3 回收试验

分别于 6 个试管中准确移入已知浓度的 Gly-L-Pro 二肽样品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 和 1.0 mL, 然后用预冷的超纯水均补足至 1.0 mL。置于微型振荡器上迅速混匀; 25 和 100 $r \cdot m \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下准确孵育 15 min, 立即将试管放入 100 °C 沸水浴中振荡 1 min, 之后将试管置于微型振荡器上充分混合均匀, 然后在 10 000 $\times g$ 和 4 °C 条件下离心 15 min, 取上清液, 加等体积的 0.6 mol $\cdot L^{-1}$ 高氯酸, 10 000 $\times g$ 和 4 °C 离心 15 min, 收集上清液, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 滤液上机分析测定, 计算样品处理方法回收率。同法测定 L-Leu-Gly 和 β -Ala-His 的回收率。结果发现样品处理方法的平均回收率依次为 100.00%, 100.01% 和 99.92% (表 1), 样品抽样测定结果见表 2。

表 1 3 种二肽的回收率测定

$\mu g \cdot mL^{-1}$

Gly-L-Pro			L-Leu-Gly			β -Ala-His		
加入	测定	回收/%	加入	测定	回收/%	加入	测定	回收/%
14.06	14.06	100.00	17.75	17.74	99.94	23.50	23.45	99.79
28.13	28.14	100.04	35.50	35.51	100.03	47.00	46.93	99.85
56.25	56.23	99.96	71.00	71.02	100.03	94.00	93.95	99.95
84.38	84.36	99.98	106.50	106.50	100.00	141.00	140.95	99.96
112.50	112.51	100.01	142.00	142.01	100.01	188.00	187.95	99.97
140.63	140.66	100.02	177.50	177.53	100.02	235.00	234.96	99.98
平均 (%)		100.00	平均 (%)		100.01	平均 (%)		99.92
标准误 (SE, %)		1.17	标准误 (SE, %)		1.38	标准误 (SE, %)		3.18

表 2 样品 3 种二肽的浓度测定结果

$\mu g \cdot mL^{-1}$

pH	Gly-L-Pro	L-Leu-Gly	β -Ala-His
3.5	112.94 \pm 0.36	142.36 \pm 0.97	186.63 \pm 0.31
4.0	112.75 \pm 0.44	141.85 \pm 0.26	187.12 \pm 1.34
4.5	112.44 \pm 0.44	142.07 \pm 0.46	186.66 \pm 1.78
5.0	112.76 \pm 0.46	140.65 \pm 0.34	187.03 \pm 2.05
5.5	112.26 \pm 0.52	142.22 \pm 0.73	187.30 \pm 1.98
6.0	112.25 \pm 0.59	142.56 \pm 0.78	187.79 \pm 1.09
6.5	112.62 \pm 0.45	142.71 \pm 0.78	187.64 \pm 1.90
7.0	112.62 \pm 0.43	142.31 \pm 0.73	189.30 \pm 1.80
7.5	112.86 \pm 0.39	141.52 \pm 0.94	187.76 \pm 1.70
8.0	112.71 \pm 0.36	141.77 \pm 0.97	187.21 \pm 2.95

注: 数值均以平均数 \pm 标准误表示, 均为 6 个重复的数据计算而来

3 结 论

HPLC 法测定仔猪小肠刷状缘膜囊水解孵育液中的二肽的含量快速、简便和准确, 结果稳定, 重现性好, 可以用来测定单个已知的小肽在动物小肠中的水解状况。

参 考 文 献

- 1 Adibi S A , Krzysik B A , Drash A L. Metabolism of intravenously administered dipeptides in rats: effects of amino acid pools, glucose concentration and insulin and glucagon secretion. *Clin Sci Mol Med*, 1977, 52 (2): 193~ 204
- 2 Krzysik B A , Adibi S A. Cytoplasmic dipeptidase activities of kidney, ileum, jejunum, liver, muscles and blood. *Am J Physiol*, 1977, 233(6): E450~ 456
- 3 Ganapathy V , Leibach F H. Minireview: Peptide transport in intestinal and renal brush border membrane vesicles. *Life Sci*, 1982, 30: 2137~ 2146
- 4 Ganapathy V , Leibach F H. Role of pH gradient and membrane potential in dipeptide transport in intestinal and renal brush border membrane vesicles from the rabbit. *J Biol Chem*, 1983, 258: 14189~ 14192
- 5 Ganapathy V , Mendicino J F , Leibach F H. Transport of glycyl-L-proline into intestinal and renal brush border vesicles from rabbit. *J Biol Chem*, 1981, 256: 118~ 124
- 6 Silk D B A , Kim Y S. Release of peptide hydrolases during incubation of intact intestinal segments *in vitro*. *J Physiol*, 1976, 258: 489~ 497
- 7 Heizer W D , Kerley R L , Isselbacher K J. Intestinal peptide hydrolases: differences between brush border and cytoplasmic enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 1972, 264: 450~ 461
- 8 Li Defa , Zhao X H , Yang T B , Johnson E W , Thacker P A. A comparison of the intestinal absorption of amino acids in piglets when provided in free or as a dipeptide. *Australian J Anim Sci*, 1999, 12 (6): 939~ 943
- 9 冯秀燕, 计成. 高效液相色谱法进行寡肽分离测定的研究. *中国饲料*, 2001, 20: 25~ 27
- 10 Christiansen K , Carlsen J. Microvillus membrane vesicles from pig small intestine: purity and lipid composition. *Biochim Biophys Acta*, 1981, 647: 188~ 195
- 11 Seal C J , Parker D S. Isolation and characterization of circulating low molecular weight peptides in steer, sheep and rat portal and peripheral blood. *Comp Biochem Physiol*, 1991, 99: 679~ 685
- 12 Sleisenger M H , Pelling D , Burston D , Matthews D M. Amino acid concentrations in portal venous plasma during absorption from the small intestine of the guinea pig of an amino acid mixture simulating casein and a partial enzymatic hydrolysate of casein. *Clin Sci Mol Med*, 1977, 52: 259~ 264