

金属离子对改善蛋白质在毛细管电泳系统中吸附作用的研究*

张凤云^a, 毛富春^a, 王 惠^b

(西北农林科技大学 a 生命科学学院; b 植保学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 研究了金属离子与血清蛋白形成配合物的条件, 探讨了用金属离子-蛋白质配合物消除毛细管区带电泳中管壁吸附作用的方法, 并将之成功应用于人血清中药物成分的分离。试验证明, 血清蛋白与多种金属离子能不同程度地形成配合物, 除 Mg^{2+} 外, 所选金属离子与血清蛋白形成配合物的优先顺序为 $Zn^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Co^{2+} > Fe^{3+} > Cr^{3+} > Mn^{2+} > Ca^{2+} > Ni^{2+}$; 配合物的稳定性取决于介质的 pH、温度和金属离子的浓度, 其适宜范围分别为 pH=6~8, 温度 40~50℃, 金属离子浓度 10~30 mg/L; 金属离子与蛋白质的作用有效地解决了管壁吸附问题, 铜和锌离子-蛋白质配合物既不影响药物成分的分离, 也不降低毛细管分离效能; 分离血清中药物成分的图谱基线稳定, 各成分的迁移时间在连续 3 周的多次实验中重复性好, 相对标准偏差在 0.14%~0.36%。

[关键词] 金属离子; 血清蛋白质; 毛细管电泳; 药物成分

[中图分类号] O 657.8

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)05-0100-05

人血液样品中含有高浓度的不同种类的蛋白质, 这些蛋白质在毛细管电泳和许多色谱研究中常常干扰药物成分的分离与分析, 尤其是在毛细管电泳分析中, 不论在酸性、中性还是碱性溶液中, 蛋白质极易吸附在未涂敷的熔硅毛细管壁上而导致毛细管堵塞^[1]。因此, 在分析之前, 必须设法除去样品中的蛋白质。样品的前处理方法通常有 2 种, 即沉淀法和渗析法。沉淀法是利用甲醇与蛋白质的作用将蛋白质以沉淀的形式除去, 方法简便省时。渗析法是将特定相对分子质量范围的较小粒子(如药物成分等)透过渗析膜进入渗析液, 而将大分子的蛋白质留在渗析管内。渗析法需要大量渗析液, 易引起样品的稀释, 且因渗析过程较长而比沉淀法慢。

也有文献报道了几种解决用毛细管电泳分离生物样品中药物成分时吸附问题的方法, 如调节电解质溶液 pH, 加入金属阳离子与氨的配合物、无机盐^[2]或两性化合物^[3], 动态修饰或在毛细管壁表面涂敷惰性物质等^[4], 但当用毛细管电泳分析人体血液(血清、血浆或全血)时, 还是要先通过沉淀将蛋白质除去^[5]。另外, 也有用十二烷基磺酸盐(SDS)作为高浓度电解液的胶束形成体, 直接将人血清样品注入电动胶束毛细管电色谱中分析药物成分的报道^[6], 但是在毛细管区带电泳(CZE)中, 仍然存在蛋

白质的吸附问题。

金属离子与人血清蛋白质反应的生物学意义已有许多报道^[7-9], 其研究方法主要是在不破坏反应平衡的情况下, 通过测定自由金属离子的浓度或已反应离子的浓度来确定蛋白质与金属离子的结合能力。能满足这种要求的技术有¹H-NMR、凝胶过滤色谱和原子吸收光谱法(AAS)^[8,10]。为了解决毛细管堵塞问题, 本试验研究了金属离子与人血清蛋白质形成稳定的水溶性金属配合物的条件, 以使血液样品在不经其他前处理而引入 CZE 分离时, 蛋白质既不干扰药物成分的分离, 也不堵塞毛细管。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器 毛细管电泳仪(Beckman 2050 P/ACE System 2000, 美国), A 272 原子吸收光谱仪(Perkin-Elmer, 美国), 渗析管(Thomas, 美国), 过滤膜 0.45 μm (Millipore, Molsheim, 法国)。

试剂 芦丁, 咖啡酸, 阿魏酸, 氯原酸, 黄酮和原儿茶酸(Sigma, 美国); 二水栎素(Aldrich Chemical Company, Zn, 美国); 甲醇及其他常用试剂(Merck, Darmstadt, 德国)。

* [收稿日期] 2004-07-16

[作者简介] 张凤云(1957-), 女, 陕西武功人, 副教授, 主要从事分析化学研究。

1.2 血清控制样

血清控制样购自 Sigma (Sigma, Dorset, 英国) 公司。在毛细管电泳分离时, 按体积比 1:10 稀释血清样品, 而在金属离子与血清蛋白形成配合物的条件试验中不需稀释。

1.3 渗析缓冲液

渗析缓冲液选用 0.05 mol/L 的三羟甲基氨基甲烷 (Tris), pH 为 6.8 (用 0.01 mol/L HCl 或 0.01 mol/L NaOH 调节)。缓冲液经 0.45 μm 过滤膜过滤, 并置超声波发生器中排气后使用。

1.4 预处理过程

为确定金属离子与蛋白质形成配合物的可能性及其稳定性等状况, 未形成配合物的自由金属离子的浓度用原子吸收光谱法 (AAS) 测定。自由金属离子与金属-蛋白质配合物的分离用甲醇沉淀法或渗析法。

1.4.1 甲醇处理 准确移取 2.0 mL 金属离子标准溶液于 10.0 mL 具塞试管中, 加入 1.0 mL 血清控制样和 2.0 mL 甲醇。摇匀后 40℃ 控温 30 min, 然后在离心机上 4000 r/min 离心 20 min。分离上清液, 沉淀用重蒸水 (0.05 μS, pH 6.0) 洗涤, 合并上清液, 最后用重蒸水定容至 50 mL, 用 AAS 测定。选用的金属离子标准溶液浓度 (mg/L) 分别为: Cu²⁺ 400, Fe³⁺ 200, Mn²⁺ 100, Zn²⁺ 200, Co²⁺ 200, Ni²⁺ 200, Cd²⁺ 200, Ca²⁺ 200, Mg²⁺ 100, Cr³⁺ 200。

1.4.2 渗析处理 将 1.0 mL 血清控制样与 2.0

mL 金属离子标准溶液 (浓度同 1.4.1) 加入渗析管, 然后将渗析管浸没在 100 mL Tris 缓冲液中, 在磁力搅拌器上搅拌 30 min, 用 AAS 测定缓冲液中自由金属离子浓度。

1.4.3 毛细管电泳测定条件 石英毛细管柱内径 50 μm, 总长度 87 cm, 有效长度 80 cm; 毛细管柱温度 25℃; 检测器波长 220 nm; 运行缓冲液为 30 mmol/L NaH₂PO₄ 和 Na₂HPO₄ (pH 7.0); 进样方式为压力进样, 进样时间 20 s; 运行电压 30 kV; 柱清洗: 每次进样前分别用水和缓冲液冲洗 3 min。

2 金属离子与血清蛋白形成配合物的条件试验

2.1 反应温度

在 2.0 mL 血清中加入 Cu²⁺ 24 μg/mL, Mn²⁺ 12 μg/mL, 其他离子均为 20 μg/mL。改变甲醇沉淀法的温度, 用 AAS 法测定上清液中自由金属离子的浓度, 根据测定出的自由离子量与加进去的离子量之比 (*R*) 间接衡量离子与蛋白质形成配合物的可能性, *R* 值越小, 说明金属离子因与蛋白质形成配合物而沉淀的量越大, 溶液中自由离子的量就越小。其试验数据见表 1。表 1 表明, 温度对形成金属-蛋白质配合物影响不明显, 大部分离子与蛋白质配合物的稳定性在 40~70℃ 时变化不大, 只有 Cr(III)-蛋白质配合物在 60~70℃ 时达到稳定。所以温度宜控制在 40~50℃。

表 1 温度对金属离子-蛋白质配合物的影响

Table 1 Effect of temperature on metal-ion-protein complex

温度/ Temperature	<i>R</i> /%									
	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Mn ²⁺	Fe ³⁺	Ni ²⁺	Co ²⁺	Cd ²⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cr ³⁺
20	22.5	3.9	13.0	1.6	59.0	32.0	4.2	30.0	58.9	26.5
30	14.3	3.8	18.3	10.8	57.6	38.7	1.2	22.5	51.1	27.6
40	13.5	0.9	15.0	10.5	40.3	27.4	1.5	21.1	42.7	22.8
50	14.0	0.7	15.8	10.9	35.4	24.3	1.2	21.4	38.6	18.6
60	13.9	0.6	15.3	11.2	34.7	21.9	1.5	19.4	39.4	9.3
70	14.1	0.6	14.3	12.8	33.9	19.5	1.3	17.6	35.7	8.2

2.2 金属离子浓度

在温度和酸度一定时, 改变甲醇沉淀法中加入到样品中的金属离子浓度, 用 AAS 法测定上清液中金属离子的浓度。图 1 表明, 当加入的金属离子浓度在 24.0 mg/L 以下时, *R* 值变化不大, 且上清液与沉淀界限分明; 当浓度大于 24.0 mg/L 时, 多数形成凝胶, 沉淀不易分离和清洗。从试验结果看, 各金属离子不同程度均能与蛋白质形成配合物, 但 Fe³⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 在浓度高于 20 mg/L

时, 自由离子浓度随浓度的增加而增加。Mg²⁺ 根本不适合用来与血清蛋白形成配合物, 因为 Mg²⁺ 的 *R* 值大于 50%; 而 Cu²⁺ 和 Zn²⁺ 的 *R* 值极小, 几乎可全部与血清蛋白形成配合物。

2.3 溶液 pH 值

金属离子浓度同 1.4.1, 温度为 40℃, 改变甲醇沉淀溶液的 pH 值, 用 AAS 法测定上清液中自由金属离子的浓度并计算 *R* 值, 结果见表 2。表 2 表明, pH 值对金属-蛋白质配合物稳定性的影响非常明显。Zn²⁺ 和 Cu²⁺ 在 pH 为 6~8, Cd²⁺ 在 pH > 10

时所形成的金属离子-蛋白质配合物最稳定。当 pH > 11 或 pH < 4 时,凝胶的形成使上清液的分离和离子浓度的测定均难进行。Mg²⁺ 几乎不与血清蛋白质形成配合物,其 R 值在 pH < 6.0 时高于 100%,pH > 9.0 时 R 值虽小于 100%,但因形成凝胶而不能说明镁与蛋白质配合,这在渗析结果(图 2)中得到了证实。

2.4 渗析试验

渗析过程是金属离子与蛋白质配合平衡的过

程。渗析之初,渗析液中金属离子浓度随时间的增加而增加,达到平衡时浓度变化不大(图 2)。渗析管只允许离子通过,而金属-蛋白质配合物不能通过,所以渗析液中离子浓度越低,说明该离子与蛋白质越易形成配合物或形成的配合物越稳定。图 2 表明,Zn²⁺ 和 Cu²⁺ 与蛋白质形成的配合物最稳定,其 R 值较低且几乎不随时间变化;Mg²⁺ 的 R > 50%,说明镁与蛋白质形成配合物的比例很小或未形成配合物。

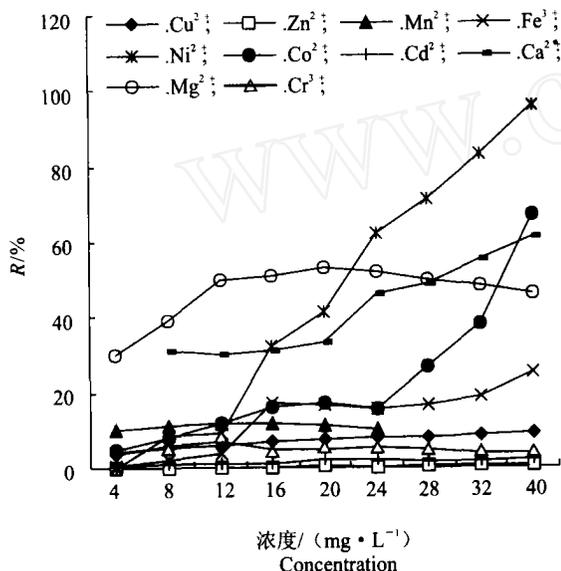


图 1 金属离子浓度对金属离子-蛋白质配合物的影响

Fig. 1 Effect of metal ion concentration on metal-protein complex

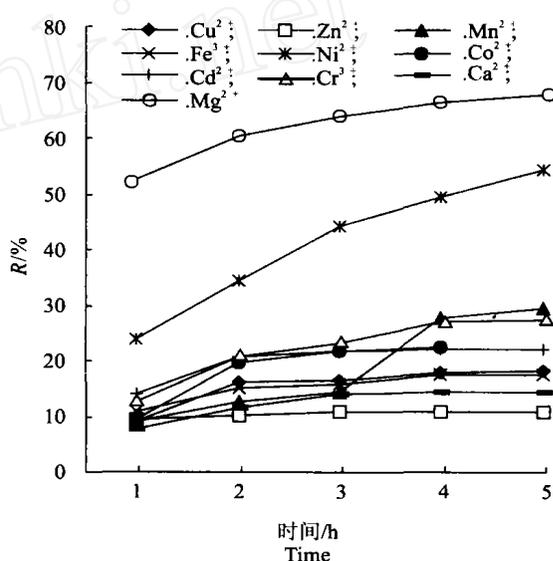


图 2 渗析时间对金属离子-蛋白质配合物的影响

Fig. 2 Effect of dialysis time on metal-protein complex

表 2 溶液 pH 对金属离子-蛋白质配合物的影响

Table 2 Effect of medium pH on the metal-protein complex

pH	R / %									
	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Mn ²⁺	Fe ³⁺	Co ²⁺	Ni ²⁺	Cd ³⁺	Cr ²⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
4.0	6.2	2.5	63	4.9	58	51	46	8.6	23	150
5.0	0.77	0.41	72	4.8	87	71	37	7.8	21	130
6.0	0.52	0.22	27	6.2	54	44	9.3	8.1	16	97
7.0	0.77	0.17	9.1	8.1	5.0	20	2.5	8.1	16	52
8.0	1.3	0.24	3.5	5.5	4.3	9.8	0.46	4.8	9.3	30
9.0	2.0	0.32	1.9	5.3	3.2	6.0	1.2	3.7	7.0	5.1
10.0	2.0	1.8	4.0	7.6	5.1	2.6	0.31	1.8	4.0	3.2
11.0	7.3	-	6.9	3.7	8.3	3.2	0.7	1.7	-	-

3 金属离子改善蛋白质吸附作用在毛细管电泳分析药物成分中的应用

根据金属离子与血清蛋白形成配合物的条件试验结果,将铜和锌的标准溶液加入含有多种药物成分的酸性人血清样品中,用磷酸盐缓冲液(pH 7.00,经滤膜处理)进行毛细管区带电泳分离,以验证其应

用的可行性。试验结果见图 3 和图 4。电泳图谱表明,由于金属离子与蛋白质的作用,首先有效地解决了管壁吸附问题,使电泳得以正常进行,并且蛋白质既不影响药物成分的分离,也不降低毛细管分离效能,分离图谱基线稳定。此外,在连续 3 周多次实验中没有观察到吸附作用,分析的重复性(表 3)很好,相对标准偏差(RSD)在 0.14% ~ 0.36%。

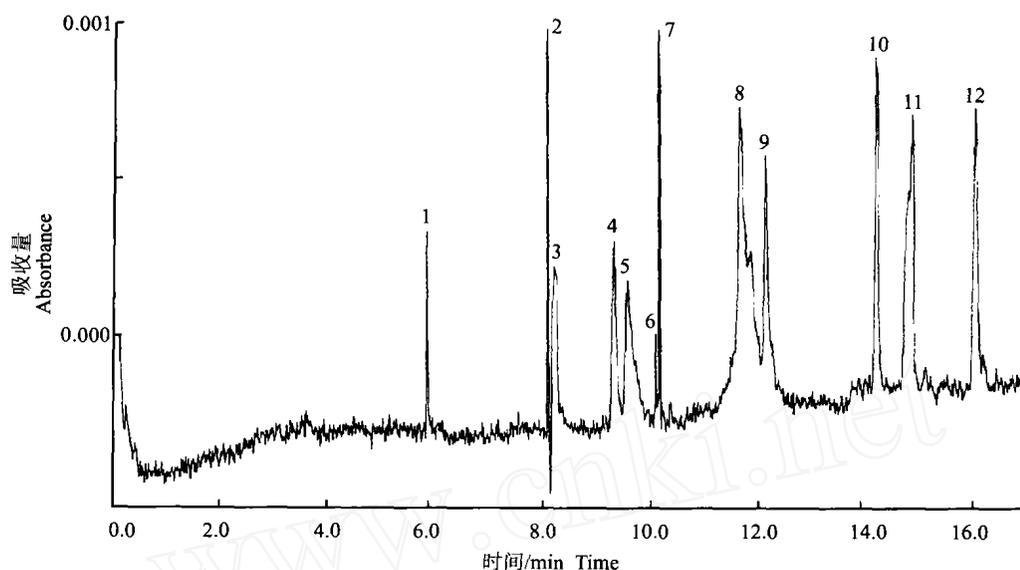


图 3 在含有药物成分的血清样中加入 CuSO_4 的电泳分离结果

1. 麻黄碱; 3 黄酮; 4 芦丁; 5 栲素; 9 氯原酸; 10 阿魏酸; 11 咖啡酸; 12 原儿茶酸; 2, 6, 7 未知峰; 8 血清蛋白峰

Fig 3 Electrophoretograms of acidic serum sample containing medical compounds spiked with CuSO_4

1. Ephedrine; 3 Flavone; 4 Rutin; 5 Quercitrin dihydrate; 9 Chlorogenic acid; 10 Ferulic acid; 11. Caffeic acid; 12 Protocatehuic acid; 2, 6, 7. Unknown peak; 8 Sum of serum proteins

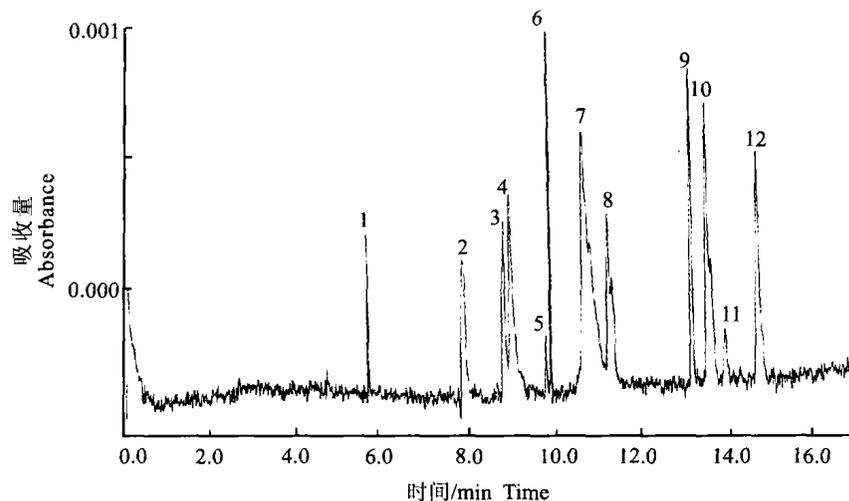


图 4 在含有药物成分的血清样中加入 ZnSO_4 的电泳分离结果

1. 麻黄碱; 2 黄酮; 3 芦丁; 4 栲素; 8 氯原酸; 9 阿魏酸; 10 咖啡酸; 12 原儿茶酸; 5, 6, 11 未知峰; 7 血清蛋白峰

Fig 4 Electrophoretograms of acidic serum sample containing medical compounds spiked with ZnSO_4

1. Ephedrine; 2 Flavone; 3 Rutin; 4 Quercitrin dihydrate; 8 Chlorogenic acid; 9 Ferulic acid; 10 caffeic acid; 12 Protocatehuic acid; 5, 6, 11. Unknown Peak; 7. Sum of serum proteins

表 3 在含有药物成分的血清样中加入 CuSO_4 后迁移时间 (min) 的重复性

Table 3 Repeatability of mobile time after spiking CuSO_4 into acidic serum sample containing medical compounds

项目 Item	峰 1* Peak 1	峰 2 Peak 2	峰 3 Peak 3	峰 4 Peak 4	峰 5 Peak 5	峰 6 Peak 6	峰 7 Peak 7	峰 8 Peak 8	峰 9 Peak 9	峰 10 Peak 10	峰 11 Peak 11	峰 12 Peak 12
次数	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
平均值/min	5.73	7.88	8.01	9.09	9.54	9.87	9.90	11.20	11.94	13.77	14.65	15.32
RSD/%	0.36	0.19	0.22	0.34	0.16	0.23	0.25	0.15	0.14	0.19	0.22	0.26

注: 各峰对应的物质与图 3 一致。

Note: The composition responding to each peak is consistent with fig. 3

4 结 论

1) 血清蛋白与多种金属离子都能不同程度地形成配合物,除 Mg^{2+} 外,所选金属离子与血清蛋白形成配合物的优先顺序为 $Zn^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Co^{2+} > Fe^{3+} > Cr^{3+} > Mn^{2+} > Ca^{2+} > Ni^{2+}$ 。

2) 配合物的稳定性取决于介质的 pH、温度和

金属离子的本性及其浓度,其适宜范围分别为 $pH=6\sim 8$, 温度 $40\sim 50$,金属离子浓度 $10\sim 30\text{ mg/L}$ 。

3) 金属离子改善了蛋白质在毛细管壁上的吸附作用,铜和锌与血清蛋白形成的配合物在毛细管电泳分离药物成分中的应用是可行的,分离图谱基线稳定,各成分的迁移时间重复性好,相对标准偏差在 $0.14\% \sim 0.36\%$ 。

[参考文献]

- [1] 任吉存,邓延倬,程介克 碱性蛋白质毛细管电泳分离研究[J]. 高等学校化学学报,1996,17(7):1059-1061.
- [2] Jonathan S Green, James W Jorgenson Minimizing adsorption of proteins on fused silica in capillary Zone electrophoresis by the addition of alkalimetal salts to the buffers[J]. Chromatogr, 1989, 478: 63-70.
- [3] Michellenn M Bushley, James W Jorgenson Capillary electrophoresis of proteins in buffers containing high concentrations of Zwitterionic salts[J]. Chromatogr, 1989, 480: 301-310.
- [4] 姜廷福,陆豪杰,李菊白,等 正电荷聚电物动态涂敷毛细管电泳柱对碱性蛋白的分离[J]. 分析化学,2002,30(2):144-147.
- [5] Lukkari P, Jumppanen J, Holma T. Effect of the buffer solution on elution order and separation of bis(amidino)hydrozoles by micellar electrokinetic capillary chromatography[J]. J Chromatogr, 1992, 608: 317-323.
- [6] Toshihiro Kitahashi, Itaru Furuta Detemination of vancomycin in human serum by micellar electrokinetic capillary chromatography with direct sample injection[J]. Clinica Chemica Acta, 2001, 312(1-2): 221-225.
- [7] Sunil U Patel, Peter J Sadler, Alan Tucker, et al Direct detection of albumin in human blood plasma by 1H NMR spectroscopy, Complexation of Nickel²⁺ [J]. J Am Chem Soc, 1993, 115(20): 9285-9286.
- [8] 杨斌盛,杨 频 人血清白蛋白与金属离子作用的荧光光谱研究[J]. 生物化学与生物物理进展,1992,19(2):110-113.
- [9] 李 蓉,邱泽梅,陈国亮 金属螯合亲合色谱中固定金属与蛋白质的作用[J]. 分析化学,2002,30(5):552-555.
- [10] Paul R Haddad, Soehendra Laksana, Ray G Simons Electrodialysis for clean-up of strongly alkaline samples in ion chromatography[J]. Chromatogr, 1993, 640: 135-143.

Study of the metal ion modification to protein absorption in capillary electrophoresis system

ZHANG Feng-yun^a, MAO Fu-chun^a, WANG Hu^b

(^a College of Life Sciences; ^b College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: This paper studied the reaction condition of metal ions with human serum protein by atomic absorption spectrometry, discussed method of eliminating the absorption of protein on the wall of capillary tube, and successfully applied it to separate medical compound in human serum. It was proved that except Mg^{2+} , serum protein could form metal-protein complex with several metal ions and the order was $Zn^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Co^{2+} > Fe^{3+} > Cr^{3+} > Mn^{2+} > Ca^{2+} > Ni^{2+}$. Stability of the complex depended on medium pH, temperature and ion concentration. The suitable ranges were $pH=6\sim 8$, temperature $40\sim 50$, ion concentration $10\sim 30\text{ mg/L}$. It was separated by capillary zone electrophoresis by adding either copper or zinc ions, which was most efficient among the metals into acidified human serum samples spiked with some medical compounds. The electrophoretograms showed that baseline was stable, and no absorption was observed during three weeks day-to-day experiments, the repeatability of mobile time with each compound was good, RSD between $0.14\% - 0.36\%$.

Key words: metals; serum proteins; capillary electrophoresis; medical compounds