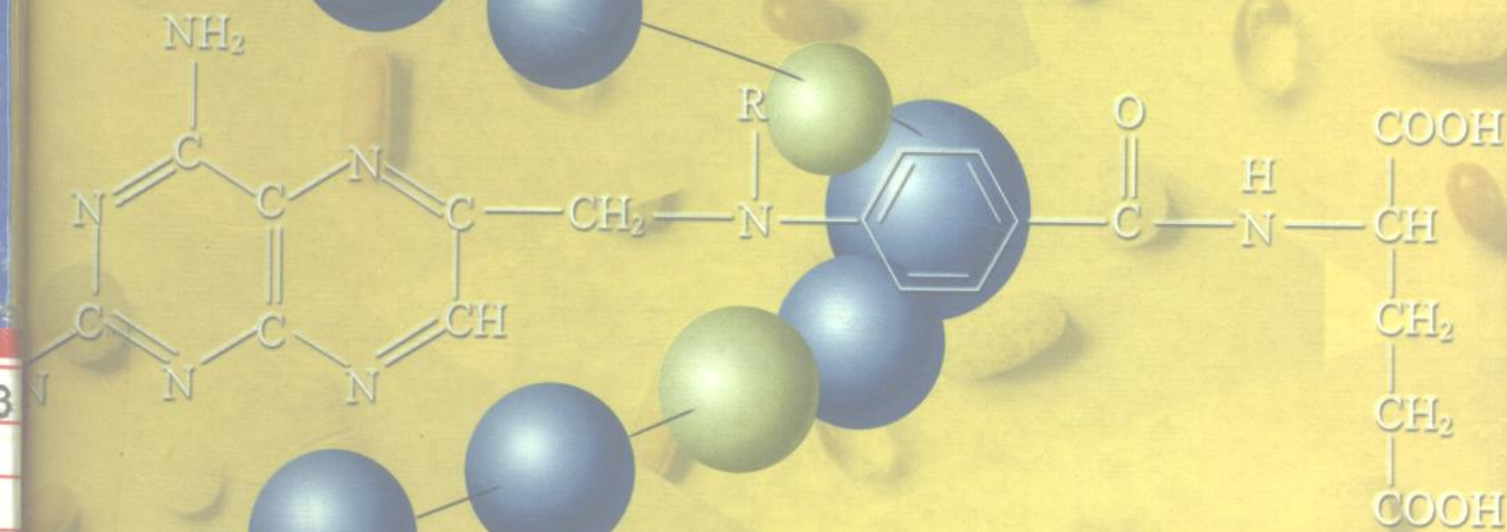


# 现代生化药物 与基因工程药物分析

陈执中 章月华 编著



上海医科大学出版社

# 现代生化药物与基因工程药物分析

陈执中 章月华 编著

上海医科大学出版社

**图书在版编目(CIP)数据**

现代生化药物与基因工程药物分析/陈执中,章月华  
编著,—上海:上海医科大学出版社,2000.3

ISBN 7-5627-0530-5

I. 现… II. ①陈…②章… III. ①药物:生物制品  
- 药物分析②药物:生物制品 - 检定 IV. R927

中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第 49598 号

责任编辑 周 迪

责任校对 王汇珊

2V82/12

**现代生化药物与基因工程药物分析**

陈执中 章月华 编著

---

上海医科大学出版社出版发行

上海市医学院路 138 号

邮政编码 200032

新华书店上海发行所经销

句容市排印厂印刷

开本 787×1092 1/16 印张 13.75 字数 334 000

2000 年 3 月第 1 版 2000 年 3 月第 1 次印刷

印数 1-3 500

---

ISBN 7-5627-0530-5/R·499

定价: 36.00 元

如遇印、装质量问题,请直接与印刷厂联系调换

(地址:江苏省句容市春城集镇 邮编:212404)

# 序 言

---

近年来,随着生物化学、基因工程技术的迅速发展,新的生化药物和基因工程药物不断涌现,为遗传性疾病和重大疑难疾病的治疗开辟了新的途径。这类药物作为高新技术产品是当前新药发展的方向,也是 21 世纪新药研究的热点。

生化新药与基因工程药物的质量标准和质量控制要求不同于一般合成药物,这类药物的分析除了应用合成药物常用的分析方法外,还涉及酶类、活性肽类、蛋白质类药物的化学结构分析、生物活性测定以及有关分子生物学分析新技术。新药分析技术为这类新药的研究、新药报批、产品质量控制等提供了扎实的基础。

鉴于目前国内尚无这类药物分析专著,我们根据近 10 年来国内外有关文献资料和应邀讲学内容并结合药物分析教学、研究和 40 余年药品检验工作的经验编著出版本书。全书共两篇,十九章。总论部分系统地介绍最新分析方法、分析技术;各论则详述有关品种的具体分析检定,每章均附主要的参考文献。书末附有“DNA 质量标准控制要点”和有关数据的附录以供参考。

现代生物化学和基因工程技术的发展非常迅速,本书内容、信息实难赶上发展的需求,由于涉及技术面广且限于编著者的水平,难免有疏漏乃至错误之处,请不吝赐教。

陈执中  
1999 年 6 月

# 目 录

## 上 篇 总 论

<b>第一章 绪论</b> .....	3
第一节 现代生化药物的定义和基因工程药物概述 .....	3
第二节 生化药物与基因工程药物的质量控制 .....	4
<b>第二章 现代生化药物与基因工程药物的新分析法</b> .....	6
第一节 毛细管自由溶液区带电泳法 .....	6
第二节 毛细管等速电泳法 .....	8
第三节 新的色谱分析——灌注色谱法 .....	13
<b>第三章 蛋白质肽类新药的化学结构分析</b> .....	18
<b>第四章 酶法分析理论基础</b> .....	27
第一节 酶催化反应动力学原理 .....	27
第二节 酶动力学法的设计原理 .....	32
<b>第五章 酶法分析技术</b> .....	38
第一节 化学测定法 .....	38
第二节 可见及紫外分光光度法 .....	38
第三节 荧光分析法 .....	43
第四节 离子选择性电极分析法 .....	47
第五节 其他电化学分析法 .....	52
<b>第六章 酶催化反应基本产物的分析</b> .....	57
第一节 酶催化反应类型 .....	57
第二节 反应产物的分析 .....	65
<b>第七章 多糖类生化药物的分析检定</b> .....	74

第一节	新的多糖类药物的开发研究进展	74
第二节	多糖类新药的结构分析研究	77
第三节	多糖类新药的理化特性分析	79
<b>第八章</b>	<b>基因工程药物的检定</b>	81
第一节	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法	81
第二节	等电点聚焦电泳法	84
第三节	蛋白质含量的测定	85
<b>第九章</b>	<b>基因工程药物中的可能杂质及污染物的检查</b>	89
第一节	外源性 DNA	89
第二节	宿主细胞蛋白质	91
第三节	其他有关杂质	93
第四节	细菌内毒素	94
<b>第十章</b>	<b>临床前安全性试验</b>	97
第一节	过敏试验	97
第二节	致突变试验	98
第三节	生殖毒性试验	100

## 下篇 各 论

<b>第十一章</b>	<b>降钙素</b>	105
第一节	降钙素化学结构的分析	106
第二节	降钙素的含量测定	116
第三节	降钙素生物检定法	119
第四节	降钙素的质量标准	120
<b>第十二章</b>	<b>果糖二磷酸</b>	124
第一节	果糖二磷酸的含量测定	124
第二节	果糖二磷酸及制剂的分析检定	126
<b>第十三章</b>	<b>超氧化物歧化酶</b>	132
第一节	超氧化物歧化酶与自由基理论	132
第二节	超氧化物歧化酶二级结构预测	135
第三节	超氧化物歧化酶活力测定	136
第四节	新的类 SOD——SC——52608	139
<b>第十四章</b>	<b>生长抑素</b>	143
第一节	生长抑素的化学结构分析	143
第二节	生长抑素质量标准	146
<b>第十五章</b>	<b>白细胞介素-2</b>	150
第一节	白细胞介素-2 的生物效价测定	150
第二节	白细胞介素-2 的质量标准规格	154

<b>第十六章 重组人生长激素</b>	156
第一节 重组人生长激素的分子结构与特性分析	156
第二节 重组人生长激素的蛋白质含量测定	162
第三节 重组人生长激素的生物效价测定	163
第四节 重组人生长激素的杂质检查	165
第五节 重组人生长激素的质量标准	167
<b>第十七章 重组人粒细胞集落刺激因子</b>	173
第一节 重组人粒细胞集落刺激因子的结构及特性分析	173
第二节 重组人粒细胞集落刺激因子的含量测定	180
第三节 重组人粒细胞集落刺激因子的生物活性测定	182
<b>第十八章 重组人促红细胞生成素</b>	186
第一节 重组人促红细胞生成素分子结构及特性分析	186
第二节 重组人促红细胞生成素的生物活性测定	190
第三节 重组人促红细胞生成素及其成品(制剂)的质量检定	195
<b>第十九章 细胞生长因子类基因工程药物</b>	198
第一节 细胞生长因子的发展概况	198
第二节 神经生长因子的生物活性测定	200
第三节 体液中神经生长因子的测定	201
<b>附录一 人用重组 DNA 制品质量控制要点</b>	204
<b>附录二 蛋白质换算数据</b>	209
<b>附录三 聚丙烯酰胺凝胶浓度与蛋白质分辨范围</b>	210

# 上篇 总论





# 第一章 绪 论

近年来,随着科学技术和医药工业的迅速发展,生化新药的生产从生化提取、细胞水平提高到分子生物学水平,促进了现代生化药物的发展。

在现代生化新药不断涌现的同时,由于分子遗传学、核酸化学和重组脱氧核糖核酸(重组 DNA 或 rDNA)技术的进展,现已能确定和获得许多天然活性蛋白的编码基因,将其插入表达载体或引入某种宿主细胞后,能有效地表达该基因产物。再经分离、纯化和检定,可得到生物活性增强或不良特性更少的基因工程产品。用于预防和治疗某些人类疾病的这类制品及单克隆抗体称为基因工程药物。

## 第一节 现代生化药物的定义和基因工程药物概述

### 一、现代生化药物

在生物机体的许多器官中广泛存在着各种具有一定生理和生物化学功能的有机物质,这类有机物质能起到补充生命要素,调节和恢复机体功能的作用。例如:在健康动物的胃粘膜中存在着一种能分解和消化蛋白质的物质,在猪的胃粘膜中还含有一种以粘蛋白为主的成分;在健康动物的胰脏中存在着几种酶的混合物(胰酶),在猪的胰腺中含有蛋白质水解酶——胰蛋白酶和 $\alpha$ 糜蛋白酶;在牛胰或牛肺中存在着一种能抑制胰蛋白酶及糜蛋白酶的小分子蛋白质——抑肽酶;在动物胰腺中还含有一种能水解弹性蛋白的酶——弹性酶;猪胰腺或颌下腺存在着相对分子质量为 26 000 ~ 32 000 的糖蛋白;在动物心肌中含有一种能促进氧化磷酸化反应的细胞代谢的激活剂——辅酶 Q<sub>10</sub>;在动物鱼中存在着能参与生物氧化反应的原卟啉化合物(protoporphyrin);在家禽或其他动物胆汁中含有一种能促进胆石溶解的胆烷酸。健康早期妊娠孕妇尿中含有一种水溶性酸性粘蛋白(人绒毛膜促性腺素,HCG);绝经妇女尿中含有人绝经促性腺素(HMG);健康人尿中含有可使纤维蛋白溶酶原激活形成纤维蛋白溶酶的一种酶——尿激酶等等。

生物化学家和生化制药学家从生物体的器官中用生物提取法将这类具有生物化学活性的物质——酶类、蛋白质类、糖蛋白、多糖类及有机酸类等提取、分离、纯化而制得了用于临床治疗的药物即生化药物。

目前,中国药典和卫生部药品标准收载的生化药品有:多酶片、胃蛋白酶、胃膜素、胰蛋白酶及注射用胰蛋白酶、抑肽酶及注射用抑肽酶、尿激酶及注射用尿激酶、弹性酶、辅酶 Q<sub>10</sub> 及辅酶 Q<sub>10</sub> 注射液、溶菌酶及溶菌酶两种片剂以及垂体后叶粉及垂体后叶注射液等 30 余种。

近年来,随着提取分离和纯化技术和半合成、结构修饰以及多肽固相合成等技术的发展,应用这类新技术生产的新生化药物不断涌现。例如根据已知天然生物活性多肽分子结构合成生长激素释放因子及其同系物(human growth hormone release factor,简称 hGHRF)的6~20多肽及低分子肝素等。

这类新的生化药物在我国药典1995年版、卫生部药品标准尚未收载,国外许多药典也均未收载,且系应用现代生化技术生产的不同于一般生物提取的、已获广泛应用的生化药物因而被视为属于现代生化药物。

## 二、基因工程药物概述

基因工程药物主要指用重组DNA技术将DNA片段插入到质粒、病毒载体中形成遗传物质的新组合转移到宿主细胞中扩增和表达而制得的基因工程药物和杂交瘤技术即杂交瘤细胞系的细胞库用于体内或体外连续产生制得的单克隆抗体新药。

### (一) 重组DNA技术

1. 原核(细菌)法 rDNA技术的关键为含有所需蛋白质编码基因的重组质粒。质粒为形态简单及环状的细菌DNA。由菌体分离且能自我复制,用特异性酶切开质粒再插入含所需基因的DNA片段即得重组质粒。

2. 真核(哺乳动物细胞及酵母)法 近来的发展,用中国仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary cell,简称CHO)进行大规模培养,提高了表达水平且高度有效。

### (二) 单克隆抗体

抗体为分化的B淋巴细胞产生的蛋白质。每一淋巴细胞产生的抗体具有一定的特异性。免疫动物产生的抗体是由不同的B淋巴细胞克隆生成,因此称为多克隆抗体。

由传代的细胞系(杂交瘤)产生的抗体因细胞系是由单一B淋巴细胞得来的,故称为单克隆抗体。单克隆抗体视其来源而有两种生产方法:①对来源于鼠的抗体,由事先接种过的小鼠或大鼠脾脏中选择适宜的淋巴细胞,与一转化细胞系融合得杂交瘤细胞;②对于来源于人的抗体,用人的B淋巴细胞按所得抗体半抗原结合特异性进行细胞系选择,再感染一种病毒使之连续传代。

## 第二节 生化药物与基因工程药物的质量控制

### 一、生化药物的质量控制

生化药物特别是近年来研究开发的多糖类、酶类药物及化学合成多肽类等新药的质量控制除了应符合一般化学合成药物的要求外,根据生化药物不同类别的特性更有其特殊的质量控制项目。

#### (一) 原料药化学结构的证实

1. 多糖类 主要的结构分析:多糖中单糖组分分析(包括单糖的分离鉴定、各单糖的含量测定及组分的分子比值)、分子量测定、糖苷键连接方式的测定、糖苷键连接位置的测定。分析检定方法详见第七章“多糖类生化药物的分析检定”。

2. 化学合成多肽 主要进行氨基酸成分的定量、蛋白质或多肽的氨基酸序列分析及二硫键分析。分析检定方法详见第三章“蛋白质肽类新药的化学结构分析”。

## (二) 原料药的特性及纯度分析

1. 多糖类 物理常数如溶解度、比旋度及粘度测定,纯度分析包括:低聚糖及可能混入的核酸、蛋白质等的“有关杂质”的测定。

2. 酶类药物 酶的活力或效价测定、酶催化反应基本产物的分析,具有一定活性的其他有关酶的检查。分析检定方法详见第五章“酶法分析技术”及第六章“酶催化反应基本产物的分析”。

3. 化学合成多肽 蛋白质含量测定及聚丙烯酰胺电泳法、醋酸纤维薄膜电泳法测定。

## 二、基因工程药物的质量控制

基因工程药物与传统药物之间质量要求的基本区别在于鉴别、一致性、纯度及杂质的测试方法上的不同。基因工程药物的质量控制还必须结合最终产品和有效的中间测试及方法有效性以保证去除不需要含有的或可能存在的杂质,使之符合管理部门的要求。

1990年我国卫生部药政局正式公布了《人用重组DNA制品质量控制要点》,对原材料的控制、生产的控制、最终产品的控制、临床前安全性评价及临床试验都作出了规定。1991年世界卫生组织(World Health Organization,简称WHO)公布了《用DNA重组技术制备药品和生物制品的质量保证指南》。

目前,我国生产的基因工程药物主要根据卫生部的《人用重组DNA制品质量控制要点》进行质量控制。具体要求详见附录。分析测定方法参阅本书第二章、第三章及第八至第十章。

## 参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典 1995年版二部. 北京:人民卫生出版社, 1995
- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 药品标准二部第六册(生化药品第一分册). 北京:人民卫生出版社, 1998, 1~154
- [3] 陈执中, 章月华. 生化新药研究动向. 中国药学杂志, 1994, 29(1): 12
- [4] 卫药政字(90)第37号批准. 人用重组DNA制品质量控制要点. 生物工程进展, 1992, 增刊: 69
- [5] Points to consider in the production and testing of new drugs and biologicals produced by recombinant DNA technology. Office of biologics research and review. National center for drugs and biologics. FDA, USA, 1983
- [6] Guide in the production and quality control of biologicals produced by recombinant DNA technology. WHO Tech Rep Ser No. 814. 1991. 59~69
- [7] 周海钧. 用细胞培养技术生产药品和生物制品安全性问题的进展. 药物生物技术, 1997, 4(1): 61

## 第二章 现代生化药物与基因工程 药物的新分析法

现代生化药物与基因工程药物的新分析方法主要有:高效毛细管电泳法中的毛细管自由溶液区带电泳法和毛细管等速电泳法以及新的色谱分析——灌注色谱法等。

### 第一节 毛细管自由溶液区带电泳法

高效毛细管电泳法(high performance capillary electrophoresis,简称 HPCE,又称 CE)是 80 年代后期才发展起来的新的色谱分析法。毛细管自由溶液区带电泳法(capillary zone electrophoresis, CZE)又称自由溶液毛细管电泳(free solution capillary electrophoresis, FSCE),是高效毛细管电泳法中应用最广的技术之一。

#### 一、CZE 基本原理

CZE 中溶质的迁移时间由下式决定:

$$t = L^2 \mu V$$

式中  $t$  表示迁移时间, $L$  表示毛细管长度; $\mu$  表示溶质总速度; $V$  表示施加电压。

迁移时间是由两个主要因素决定的:一为电泳速度,在电泳力的作用下,带负电荷的组分向正极移动,带正电荷的组分向负极移动;第二种作用力是由于高压引起的毛细管内壁的大量电荷移动所产生的电渗透力。因此,电解质的总流速由电泳速度和电渗流速度组成。

对大多数分子来说,电渗透力大于电泳力,因此不管溶质是带正电荷还是带负电荷,所有的分子都向阴极移动。带正电荷离子的流速比电渗透流速快,带负电荷离子的流速比电渗透流速慢,而中性分子的流速与电渗透流速一致。因此使混合物中的各组分获得分离。

毛细管电泳具有极高的分离能力,理论塔板数  $N$  可用下式表示

$$N = \mu V / 2 D$$

式中  $\mu$  表示溶质流速, $V$  表示施加电压, $D$  表示溶质的扩散系数。

由上式可知:理论塔板数  $N$  与施加电压  $V$  成正比,即高电压可得到高的柱效。而  $N$  与溶质的扩散系数  $D$  成反比,可预测大分子可得到高柱效。在理想条件下柱效可达 100 万。在通常的操作条件下,柱效可达到 10 万~20 万。

## 二、CZE 在重组 DNA 技术生产的蛋白质类药物分析研究中的应用

### (一) 生物技术产品肽图的研究

重组 DNA 技术生产的蛋白质类药物经特定酶或化学法水解后,用色谱分离可得到不同的多肽片段的指纹图(肽图),多种蛋白质的肽图具有其特征性,对于蛋白质结构研究和特性鉴别具有重要的意义。肽图可以用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)分离测定,利用二极管矩阵检测器,通过光谱特征加以鉴别。但是亲水性多肽在反相柱上不保留,某些结构相差一个氨基酸的多肽片段则难以分离。而用高效毛细管电泳法则可检测多种带电类型的多肽。

重组人生长激素(r-hGH)含有 191 个氨基酸,相对分子质量为 22 125,等电点 pH 5。重组人生长激素经胰蛋白酶降解,含有 21 个片段,其中两个片段由二硫桥交联。片段的大小为 147 ~ 3 763 bp,可用毛细管自由溶液区带电泳(CZE)进行分离测定。

Nielsen 等应用 CZE 进行了重组人生长激素的胰蛋白酶降解多肽片段的分离测定,并与 RP-HPLC 分离结果进行比较。结果表明:片段 1,2 及 19 以及片段 8 和 18 具有相对类似的疏水特征,用 RP-HPLC 不能分离。而所有的这些峰用 CZE 可获得分离。由于 CZE 具有较高分离效率(高理论塔板数)和不同的灵敏度,用于结构研究具有一定的优点。是为胰肽图谱常规分析技术的强有力补充研究方法。

Vinther 等以重组人生长激素为典型的生物技术制得的蛋白类代表,应用 CZE 进行了系统的研究(图 2-1)。

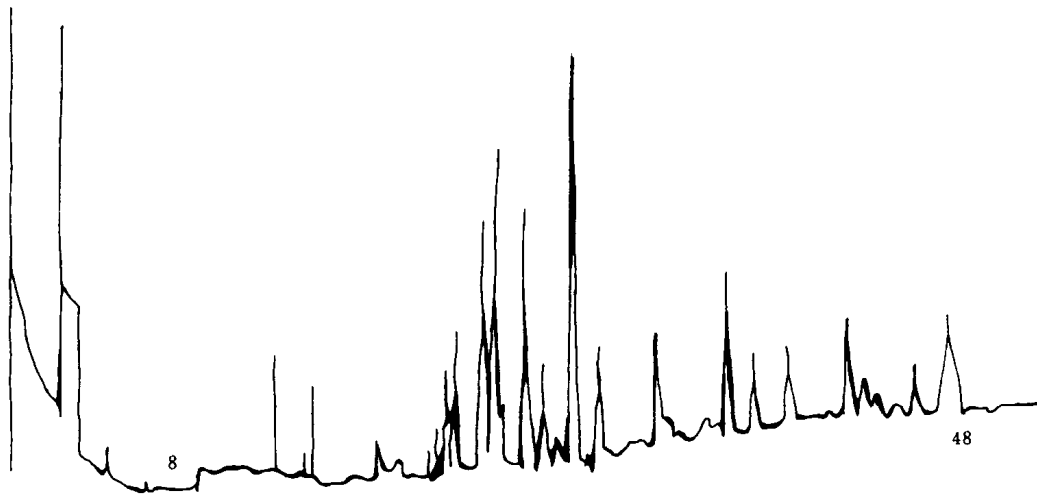


图 2-1 r-hGH 的 CZE 肽图

### (二) 基因工程药物的 CZE 分析测定

重组人生长激素(r-hGH)及其降解产物脱酰胺人生长激素(desamido hGH)及二脱酰胺人生长激素(didesamido hGH)应用 CZE 分析可获得很好的分离效果。

Wu 等应用 CZE 对 T<sub>4</sub> 受体蛋白质(rCD4)、组织型纤溶酶原激活剂(r-tpA)及重组人生长激素(r-hGH)等进行了分析测定。

HPE 100 高效毛细管电泳系统(Bio-Rad 公司)长 20 cm,内径 25  $\mu$ m 的石英毛细管柱,内表面以共价键合的聚合物涂层,样品溶液(0.5 ~ 1.0 mg/ml)10  $\mu$ l,以电压 8 kV,5 s 进样,电泳时

电压: 12 kV, pH 4.5.

## 第二节 毛细管等速电泳法

毛细管等速电泳法(capillary isotachopheresis, 简称 CITP)为高效毛细管电泳法(HPCE)的主要分离技术之一,与高效液相色谱法比较,可在自由溶液中分离测定,不需吸着剂、凝胶或其他载体。无载体介质的 CITP 可直接应用以分析研究肽类和蛋白质类的复合混合物。而高效液相色谱法对某些多肽或非多肽、离子化或非离子化的化合物例如脂蛋白、糖蛋白及脂肽、糖肽脂质类及多糖类可以不可逆结合于柱的充填上,降低其分离度和重现性。无载体介质的 CITP 则为容易回复最初的分离条件且具有高度的重现性。由于 CITP 分析技术的发展和具有快速、高速和微量分析的优点,使其应用更有了新的进展。

### 一、理论基础

#### (一) CITP 分离原理

毛细管等速电泳(CITP)是一种“移动界面”电泳技术,用两种缓冲液体系造成所有被分离的区带等速分离状态。分离区带夹在前导电解质和尾随电解质之间。例如分离负离子,选择前导电解质中含有比溶质中所有负离子的淌度都大,尾随电解质应比溶质中所有负离子的淌度都小。施加电场后,负离子向阳极移动。由于前导电解质离子淌度最大,移动最快,紧跟其后的是淌度次之的分离离子,最后为尾随电解质的离子,分离过程如图 2-2 所示。

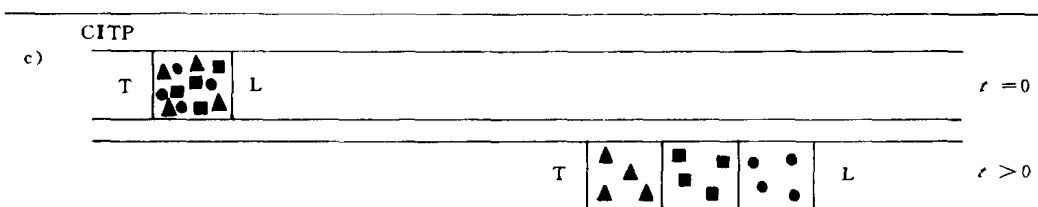


图 2-2 CITP 电泳过程图解

T: 尾随电解质; L: 前导电解质

#### (二) CITP 的数学描述

毛细管等速电泳系统的基础描述从电泳操作的总方程式开始,包括以下几项:

- (1) 电解质溶液中均相化学反应的传递过程。
- (2) 离子迁移率与电流之间的关系。
- (3) 电解质系统的欧姆定律。
- (4) 溶液的电中性质。
- (5) 平衡常数的定义。
- (6) 存在于各种物种溶液中物质的分析浓度的定义。
- (7) 溶剂的质子化平衡。

#### (三) 肽类 CITP 的数学模式

Kasicka 等介绍了肽类的数学模式,以  $X(M)$  和  $X(N)$  表示 X 肽的最大电荷  $M$  及最小电

荷  $N$ , 以  $K(J)$  表示, 具有  $(J+1)$  与  $J$  电荷组分的表观离解常数, 则:



$$K(J) = C_X(J) \cdot H / C_X(J+1) \quad (2)$$

式中  $C_X(J)$  和  $C_X(J+1)$  为 X 肽两种离子式的平衡浓度,  $H$  为氢离子的平衡浓度。

$$D_X(J) = C_X(J) / C_X$$

式中  $D_X(J)$  表示组分  $X(J)$  的分子部分,  $C_X$  表示 X 肽的总浓度。

推导得下式:

$$D_X(J) = \frac{[\prod_{l=0}^{J-1} K(l)/H^{(J)}]^{-1} \cdot (J > 0) + [\prod_{l=J}^{-1} K(l)/H^{(J)}] (J < 0)}{1 + \sum_{i=N}^{J-1} [\prod_{l=i}^{-1} K(l)/H^{[i]}] + \sum_{i=1}^M [\prod_{l=0}^{i-1} K(l)/H^{[i]}]^{-1}}$$

$$J \leftarrow \langle N, M \rangle, J \neq 0$$

式中  $K(l)$  为  $X(l+1)$  与  $X(l)$  组分间的酸碱平衡离解常数,  $i, l$  为辅助变量。

X 化合物在给定 pH 值时的有效电荷  $Z_X$  如下式:

$$Z_X = \sum_{J=N}^M J \cdot D_X(J) \quad (3)$$

比电荷  $Z_{X,S}$  可从 X 肽的相对分子质量  $M_X$  计算而得

$$Z_{X,S} = Z_X / M_X \quad (4)$$

## 二、肽类 CITP 的选择条件

### (一) 电解质系统溶剂

毛细管等速电泳法主要在前导的和尾随的电解质水溶液中进行, 但其他溶剂也用于影响分析物的迁移率和溶解度, 例如甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、丙酮、二噁烷、乙腈、二甲酰甲胺及二甲亚砜等。用于 CITP 的溶剂自动离解和本身的电导率也必须是低的, 其离子化产物必须与水的离子化产物类似 ( $pK_{H_2O} = 14$ ) 或更高, 因为溶剂的离子浓度与电解质系统中的离子浓度相比较必须是可以忽略的。

### (二) 检测

无触光度检测器最为常用, 其优点是具有对肽类混合物的高分辨力和高重现性。

光度检测器适用于肽类光吸收波长, 最常用的波长为 254 nm, 此波长的吸收是由于在肽链中的芳香氨基酸(酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸)所致。

特定的光度检测器可用于逆离子的先导电质光吸收的检测。在毛细管等速电泳区带, 不同平衡离子浓度对每一区带产生不同检测器信号。

肽类的通用检测器检测波长为 206 nm 即肽键的吸收区域。要获取更多信息时可用两个波长同时检测, 或用分光光度检测。毛细管等速电泳中的分光光度检测用经典的分光光度计, 以逆流使区带停止或者应用矩阵二极管检测器。

## 三、物理化学特性测定

毛细管等速电泳用于肽类的物理化学特性的测定, 主要用以测定有效迁移率和迁移率限度、解离常数及相对分子质量等。

Hirokawa 等测定了 28 种二肽的相对高度 ( $R_E$ )、组分 A 的相对高度 ( $R_E$ )<sub>A</sub> 用下式定义

$$(R_E)_A = E_A / E_B \quad (1)$$



式中  $E_A$  为组分 A 区带的电场强度(电位梯度),  $E_B$  为先导电质区带的电场强度(电位梯度)。

从测定数据可得肽的有效迁移率  $m_{ef}$ , 绝对迁移率  $m_0$  及解离常数  $pK_a$  值。

-价二肽离子的绝对迁移率测定范围为  $(21.6 \sim 31.5) \times 10^{-9} m^2 V^{-1} S^{-1}$ , 解离常数范围为  $8.269 \sim 8.746$ 。

应用  $m_0$  及  $pK_a$  测定值, 毛细管等速电泳可分离 28 种二肽及 15 种氨基酸, 其有效迁移率可经计算和比较而得。肽和氨基酸混合物的计算和实验的毛细管等速电泳分离完全一致。毛细管等速电泳图谱见图 2-3A 和图 2-3B。

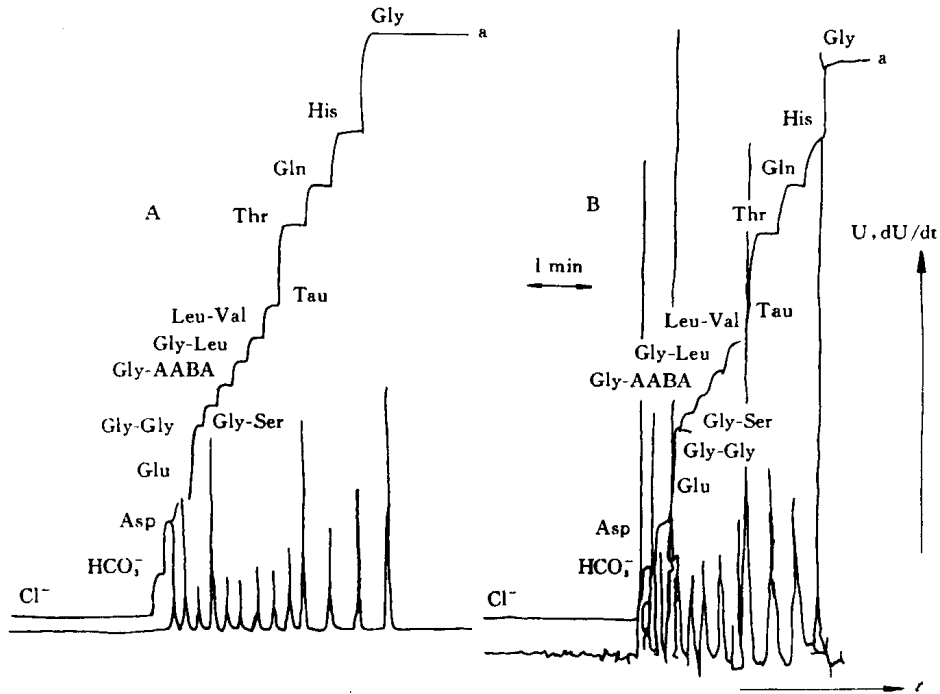


图 2-3 肽和氨基酸混合物的毛细管等速电泳图谱

从毛细管等速电泳测定的肽类  $m_0$  和  $pK_a$  值和氨基酸组成的  $m_0$  和  $pK_a$  值的比较可获得这些值之间的简单的近似关系

$$m_{AB}(m_A^{-3} + m_B^{-3})^{1/3} \quad (2)$$

式中  $m_A$ 、 $m_B$  分别为氨基酸 A, 氨基酸 B 的迁移率,  $m_{AB}$  为二肽 AB 的一价阴离子的迁移率。

许多二肽一价阴离子氨基基团的  $pK_a$  值较游离氨基酸的氨基基团  $pK_a$  值约低 1.4 单位。此可用于二肽类  $pK_a$  值的近似值计算。

在二肽类的一系列研究中可导出绝对迁移率  $m_0$  与相对分子量  $M_r$  之间的关系

$$m_0 = (306.9M_r^{1/2} + 3.4) \times 10^{-9} m^2 V^{-1} S^{-1} \quad (3)$$

用一组二肽以此关系式的统计学计算其相关系数为 0.94, 计算和测得的  $m_0$  之间的平均偏差为 2.5%。根据其相对分子量或从其氨基酸组分的绝对迁移率, 可用公式(2)及(3)测定二肽的绝对迁移率。