

## 小 结

本文采用我所七室生产的硅胶薄层预制板,在选定的层析条件下,对 $CEE_3$ 、 $EE_3$ 、 $E_1$ 、 $E_2$ 、 $E_3$ 等五种雌激素混合组分可获得清晰、无拖尾、斑点圆而浓集的层析谱,并结合双波长薄层扫描技术进行定量,方法灵敏度达0.05微克。应用本法测定了大鼠腹腔注射 $CEE_3$ 后血中原药及其代谢产物的含量。

## 参 考 文 献

- (1) A. Zlatkis and R. E. Kaiser, *J. Chromatography Library*, 9,240(1977).
- (2) 孙仲诒、许光、马立人, 国产薄层色谱硅胶预

制板的板效探讨, 全国第一届薄层色谱会议资料, 青岛, 1984.10.

(收稿日期: 1985年4月2日)

**High-Performance Thin Layer Chromatographic Determination of Ethynylestriol-3-Cyclopentyl Ether and Its Metabolites in Rat Blood** Tang Xiu-lan, Shen Wen-mei, Tian Zeng-yue, *Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences*

For the simultaneous determination of 17 $\alpha$ -ethynylestriol-3-cyclopentyl ether and its metabolites a simple method based on high-performance thin layer chromatography with subsequent double beam scanning was proposed. The method is reliable, accurate and the detection limit is as low as 0.05 microgram. This method was successfully applied to the study of the metabolites of the synthetic steroid in rat blood after intraperitoneal injection.

# 用蛋白质I-60柱及挥发性缓冲液测定肽的分子量

唐易全 汪范生

(中国科学院上海药物研究所)

长期以来,肽和小分子的蛋白质的分子量测定是个难题。当用高效体积排斥色谱(HP-SEC)测定这类样品的分子量时,宜用填料孔径较小的色谱柱。在天然肽的研究中分离到的样品极少(微克级),要求在分子量测定后样品还能方便地回收,因而常用挥发性缓冲液作流动相。为了克服排斥色谱中的次级效应,即疏水效应和静电效应对分子量测定的不利影响,流动相中可加有机溶剂并保持适当离子强度。有关这几方面的叙述可参考文献<sup>(1-3)</sup>。本文用挥发性缓冲液,三氟酸三乙胺-乙腈为流动相,在Protein I-60(孔径 $6 \times 10^{-3}$ 微米)柱上建立了肽的分子量校正直线,用于肽分子量的测定。

## 实 验 部 分

仪器: Waters公司系列产品, M6000A

泵, M481紫外-可见分光检测器, U6K进样阀, M730数据处理机, Protein I-60柱(7.8 $\times$ 300毫米)。

色谱条件: 配制2.5% (或2%) 三氟醋酸-水溶液1000毫升, 加约45毫升重蒸的三乙胺调节pH=3.0, 然后配成此缓冲液: 乙腈=85:15 (体积/体积)的流动相。流速为1.0毫升/分。室温分离样品。样品溶于缓冲液, 每次进样的肽3~5微克, 蛋白质5~10微克。乙腈为HPLC二级(黄岩化学试剂厂)。水为二次蒸馏水。

## 结 果 与 讨 论

将每个样品分别进样, 所得10个样品的名称、分子量(文献值)和色谱保留时间列于表1。各样品分子量的对数logMW与相应的保留时间 $t_r$ 作图如图1。样品1的分

表 1 肽和蛋白质的分子量及保留时间

样 品*	分 子 量	保留时间(分)
1 木瓜酶	≈21,000	5.56
2 肌红蛋白	≈17,500	6.70
3 胰岛素	5,700	7.96
4 胰高血糖素	3,521	8.10
5 神经降压肽	1,673	8.60
6 生长抑素	1,638	8.82
7 缓激肽	1,060	9.08
8 皮啡肽	802	9.16
9 亮-脑啡肽	556	9.56
10 色氨酸	206	10.63

\* 样品来源:

- 1和2: Sigma Chemical Co. (美国)
- 3: N. Y. Organon Oss (荷兰)
- 4和10: Fluka AG. (瑞士)
- 5和6: Peninsula laboratories, Inc. (美国)
- 7: 天然品(4)
- 8和9: 本所合成品

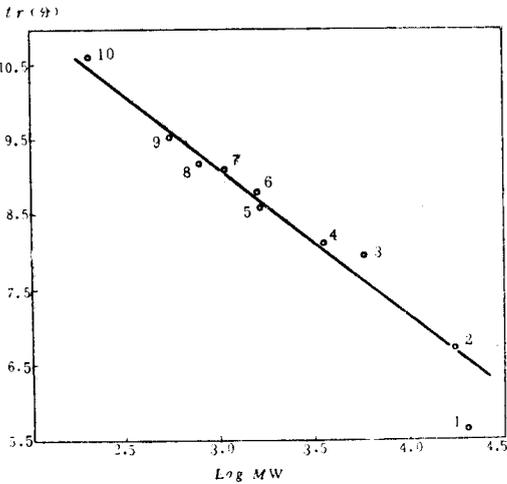


图 1 肽保留时间与分子量对数的校正图  
色谱条件见实验部分。图内标号见表 1 样品。

分子量较大, 明显偏离直线。取 2~9 点作一元线性回归处理得:

$$\log MW = 7.72 - 0.52t_r$$

$$\text{相关系数 } 0.992 \quad (1)$$

由式(1)知各样品的 logMW 与  $t_r$  具有优良线性关系。

本文条件下, 蛋白质 I-60 柱的分子量校正范围为 200~17,500, 与厂商给出的 1,000~20,000 有差别, 显然是由于各自使用的流动相不同之故。表 1 中样品的分子量会因不同厂商产品有小的差异, 但仍在本文校正范

围内, 均可用作本文方法的校正样品。

表 1 中部分样品的色谱分离如图 2。图 2 表明各样品的分离是令人满意的。若流速为 0.5 毫升/分, 则各峰之间的区别更为明显。当样品溶液放置几小时以后, 木瓜酶变成双峰。图 2 中缓冲液浓度为 2% 时, 各峰保留时间稍有增加。当降为 1% 时(此时离子强度下降, 静电效应增强)得如图 3 的分离结果。当流动相中不含乙腈(此时疏水效应增强), 结果如图 4。与图 2 比, 图 3 和图 4 中由于次级效应的不利影响, 样品分离不好, 回收率降低, 保留时间有所增加。若乙腈的含量为 30%, 则分子量较小的样品分离度下降。以上说明乙腈含量 15~30%, 缓冲液浓度为 2~2.5%, 流速 0.5~1.0 毫升/分, 是可行的。

我们还采用在 Protein I-125 柱上可行的

流动相如三氟醋酸(0.1%) - 乙腈, (40%、50%、60%) (3), 分子量大于 1,000 的样品难于洗脱, 不表现通常的排斥色谱行为。

应用: 从秉志齿蟾皮中

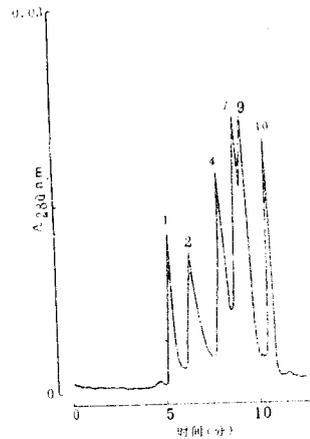


图 2 表 1 中部分样品的色谱分离图  
色谱条件见实验部分。图内标号见表 1 样品

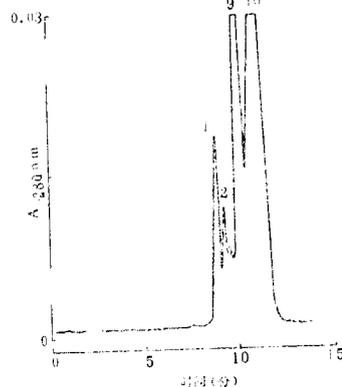


图 3 流动相中缓冲液浓度为 1% 时的色谱图  
每个样品 10 微克, 其余条件同图 1。图号见表 1

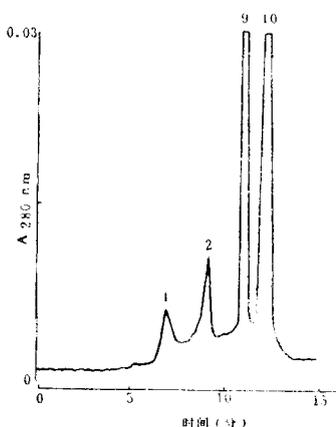


图 4 流动相中不含乙腈时的色谱图  
其余条件同图 3。图号见表 1。

分离到的二个有生物活性化合物(见(5)中图 1 的峰 8 和 9), 在本文色谱条件下, 保留时间分别为 9.23 和 8.76 分, 代入式(1)后算得相应的分子量为 833 和 1461 (道尔顿)。这二个化合物的结构在进一步研究中。

### 参 考 文 献

- (1) E. Pfannkoch et al., J. Chromatogr. Sci., 18, 430(1980).
  - (2) J. E. Rivier, J. Chromatogr., 202, 211(1980).
  - (3) H. P. J. Bennett et al., Anal. Biochem., 138, 121(1985).
  - (4) 华家桢等, 生物化学与生物物理学报, 17, 171 (1985).
  - (5) 唐易全等, 两栖爬行动物学报, 4, 99(1985).
- (收稿日期: 1985年3月4日)

Determination of the Molecular Weights of Peptides by HPSEC with Protein I-60 Column and Volatile Eluents *Tang Yi-quan, Wang Fan-sheng, Shanghai Institute of Pharmacology, Academia Sinica*

Triethylammonium trifluoroacetate buffer (2.5%, pH=3) in the presence of 15% acetonitrile have been shown to be compatible with the Protein I-60 column for size exclusion of Peptides and proteins. A linear relationship between the logarithm of molecular weights(200—17500) and the retention times is obtained with the correlation coefficient of 0.992. The advantages of this system are low ionic strength, good UV transparency (at UV 280nm) and lyophilizability.

## 磷酸二氘钾晶体中含氘量常温气相色谱测定

郭友嘉 谢国英

(中国科学院福建物质结构研究所, 福州)

磷酸二氘钾( $KD_2PO_4$ )是一种优良的光调制晶体。这种晶体是在重水中培养出来的, 晶体中含氘量与晶体性能密切相关。因此, 测定晶体中的含氘量对判断和提高晶体的性能、摸索晶体培养的最佳工艺条件, 以及研究晶体的结构和性能的关系都有着重要的意义。但是, 目前利用气相色谱法测定晶体材料中含氘量的有关报道甚少。我们利用重水和磷酸二氘钾晶体的化学特性建立了本测定方法, 在最佳操作条件下误差可达  $\pm 1.0\%$ , 基本上满足控制晶体生产质量的要求。

### 原 理 和 装 置

#### (一) 原理

实验方法的基本原理是利用磷酸二氘钾晶体加热分解的化学特性, 将晶体置于真空系统( $\leq 133.322 Pa$ )中加热分解, 释出的水样在密闭系统中与四氢化锂铝反应, 它们按如下化学反应式进行:

