

TN-1177

# 使用单一固定相, 通过改变选择性实现合成肽的多步纯化

J Preston, Guido Krautz, Srinivasa Gandholi 和 Marc Jacob  
Phenomenex, Inc., 411 Madrid Ave., Torrance, CA 90501, USA

在本技术说明中, 我们将讨论使用多步色谱的肽纯化过程。在进行纯化时, 我们仅使用单一固定相以提高工作效率并节省时间和成本。

### 概述

天然多肽是由氨基酸交联而成的短链聚合物。如今, 越来越多的人开始使用肽来作为治疗药物, 大规模生产这些肽的技术已经发展得很成熟, 而目前需要改善的技术, 是对这些肽进行纯化以获得所需的目标成分。粗合成肽混合物包含许多密切相关的成分, 实验人员很难仅通过一个纯化步骤就将所需的成分从其他成分的混合物中分离出来。通常这些纯化过程需要多个步骤, 而色谱法常常会被用于至少一个或多个步骤当中。肽很适合进行UV检测, 这为色谱纯化提供了便捷。

选择性是指色谱法将混合物分离成不同组分的能力。当采用多步骤色谱法时, 一般的入手点是使用两种或两种以上的互补色谱分离模式, 如离子交换、凝胶渗透、亲和或反相分离, 利用它们不同的选择性达到分离目的。改变固定相是获得不同选择性的有效方法, 但在大规模的纯化过程中, 这既昂贵又费时。幸运的是, 肽本身的性质允许根据pH值的变化或在分离中使用的有机溶剂来改变选择性。这种更改相对便宜, 并且使用单一色谱柱就可以轻松实现。

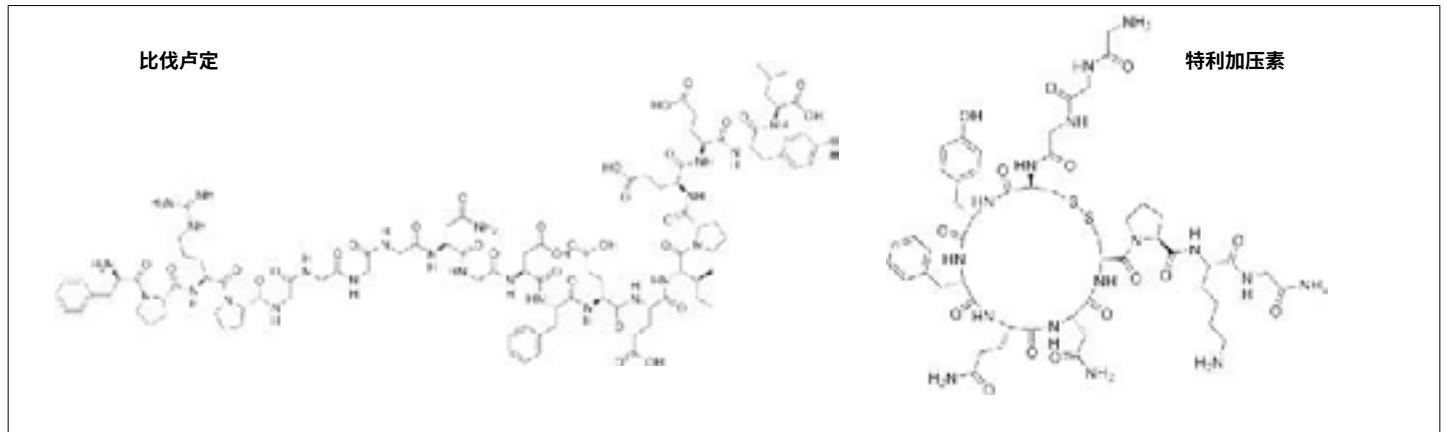
氨基酸按其侧链可以分为非极性、疏水性、极性不带电、带正电荷或负电荷(见表1)等几种。通过了解肽的氨基酸序列, 可以预测其电离和极性性质。色谱应用中有几个重要的关键属性, 而其中电离是最重要的。一些氨基酸同时具有酸性和碱性的可电离侧链, 因此洗脱液的pH值将决定这些侧链是带电的还是中性的。如果固定相是硅胶的, 则pH值也将决定硅胶是中性的还是带负电荷的。肽与固定相相互作用的模式会根据洗脱液中使用的有机溶剂的类型而改变。这与肽的极性有关, 其形成的主要原因在于未电离的侧链。

在本技术说明中, 我们将讨论使用多步色谱过程的肽纯化, 在纯化时我们使用单一固定相来提高柱效并节省时间和成本。用于这项工作的肽为比伐卢定和特利加压素, 如图1所示。

表1 天然氨基酸分类

非极性疏水残基	极性不带电残基	带正电的残基(碱性)
丙氨酸	天冬酰胺	精氨酸
异亮氨酸	半胱氨酸	组氨酸
亮氨酸	谷氨酰胺	赖氨酸
蛋氨酸	甘氨酸	带负电荷的残基(酸性)
苯基丙氨酸	丝氨酸	天冬氨酸
脯氨酸	苏氨酸	谷氨酸
色氨酸	酪氨酸	
缬氨酸		

图1. 比伐卢定和特利加压素的化学结构

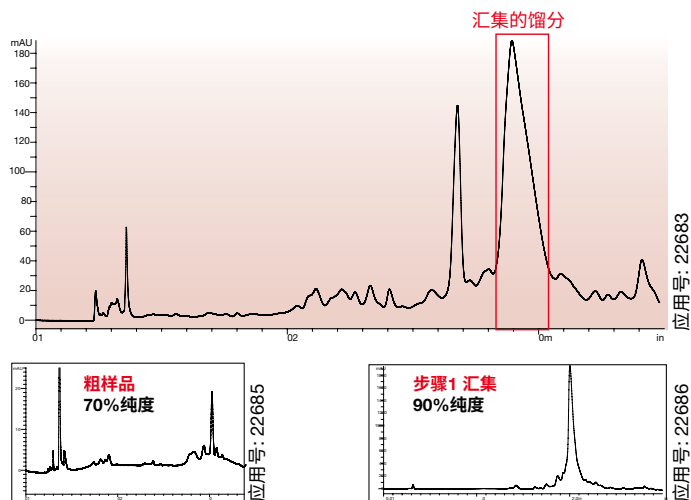


## 结果和讨论

例1使用粗样比伐卢定展示了当pH值从一个步骤到另一个步骤发生的变化,以及洗脱液使用相同的有机成分时,多步骤纯化的效果。比伐卢定的等电点为3.41,氨基酸中酸性侧链占很大比例(见表2)。当洗脱液pH为中性时,酸性侧链和硅胶都是带电的。在这一条件下,分析物和固定相的相互作用会受到这些带电物质的影响。当洗脱液的pH值较低时,酸性侧链和硅胶都不带电。比伐卢定的疏水和极性不带电侧链与固定相有明显的相互作用。

### 例1 比伐卢定 - pH 变化

#### 步骤1: 中性 pH 纯化



#### 步骤2: 酸性 pH 纯化

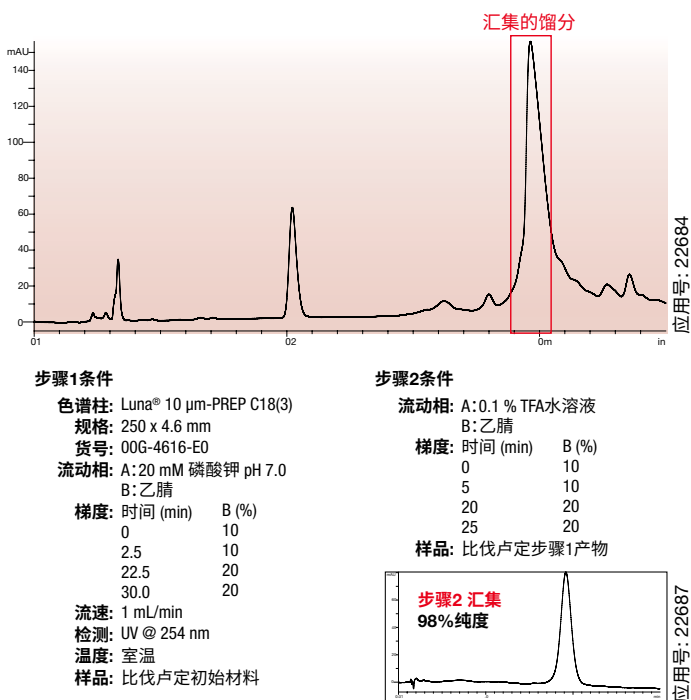


表2 比伐卢定和特利加压素中的氨基酸分布

	等电点	酸性侧链	碱性侧链	非极性侧链	极性不带电侧链
<b>例 1</b> 比伐卢定	3.41	5	1	7	7
<b>例 2</b> 特利加压素	9.75	0	1	4	7

## 分析方法

HPLC 系统: Agilent 1100

分析 QC 条件:

### 例1: 比伐卢定 - pH变化

**色谱柱:** Kinetex® 2.6 µm XB-C18 (App ID: 22685)

**规格:** 50 x 4.6 mm

**货号:** 00B-4496-E0

**流动相:** A: 0.1% TFA 水溶液  
B: 乙腈

梯度: 时间(min)	B (%)
0.0	10
2.75	10
22.5	20
25	20

**流速:** 1.0 mL/min

**温度:** 室温

**检测:** UV @ 220 nm

**样品:** 比伐卢定

应用号: 22686和22687 条件如上, 除非另有说明:

梯度: 时间(min)	B (%)
0.0	10
0.25	10
1.0	30
1.75	30
2.0	40

**流速:** 2.0 mL/min

### 例2: 特利加压素 - 有机变化

**色谱柱:** Kinetex 5 µm C18 (App ID: 22690) (App ID: 22691) (App ID: 22692)

**规格:** 50 x 4.6 mm

**货号:** 00B-4601-E0

**流动相:** A: 0.1% TFA 水溶液  
B: 乙腈

梯度: 时间(min)	B (%)
0	10
3	40
3.1	10
5	10

**流速:** 2.0 mL/min

**温度:** 室温

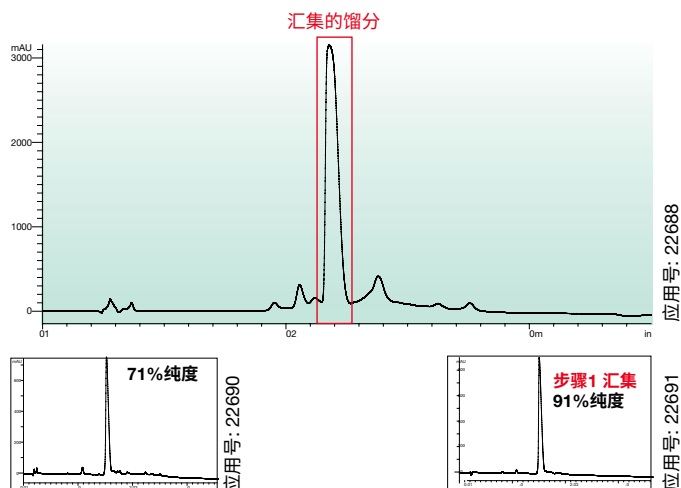
**检测:** UV @ 220 nm

**样品:** 特利加压素

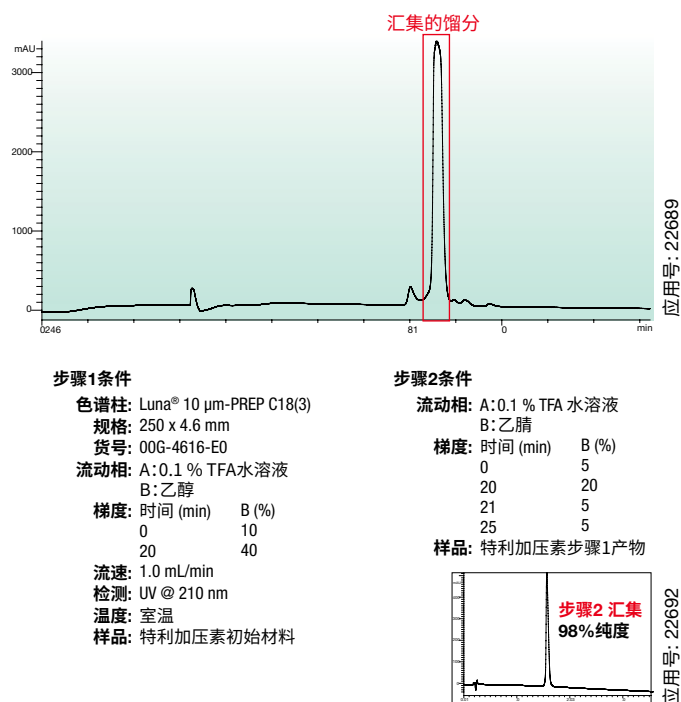
例2通过粗样特利加压素展示当洗脱液含有的有机溶剂类型从一个步骤到另一个步骤发生变化且pH保持不变时,多步骤纯化的效果。特利加压素的等电点为9.75,主要由非极性和极性不带电侧链组成(见表2)。当洗脱液的pH值较低时,肽能很好地与不带电的硅和固定相相互作用。当洗脱液中的强溶剂能像乙醇一样氢键键合,而不与乙腈键合时,肽的色谱结果有所不同。这很可能是由大量的不带电侧链而导致的。

## 例2 特利加压素 - 有机变化

### 步骤1: 0.1% TFA + 乙醇



### 步骤2: 0.1% TFA + 乙腈



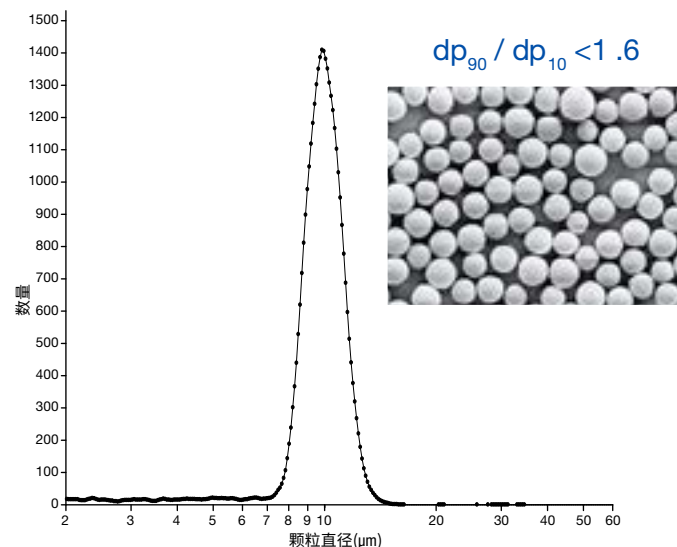
#### 步骤1条件

色谱柱: Luna® 10 µm-PREP C18(3)  
 规格: 250 x 4.6 mm  
 货号: 00G-4616-E0  
 流动相: A: 0.1% TFA水溶液  
 B: 乙醇  
 梯度: 时间 (min) B (%)  
 0 10  
 20 40  
 流速: 1.0 mL/min  
 检测: UV @ 210 nm  
 温度: 室温  
 样品: 特利加压素初始材料

#### 步骤2条件

流动相: A: 0.1% TFA 水溶液  
 B: 乙腈  
 梯度: 时间 (min) B (%)  
 0 5  
 20 20  
 21 5  
 25 5  
 样品: 特利加压素步骤1产物

图2. Luna (3) 粒径分布曲线



## 总结

用于大规模纯化的色谱柱是纯化过程总成本的一个重要部分。这一成本不仅包括色谱柱内的固定相,还需要计入硬件成本以及填装和清空这些色谱柱所需的时间。从图中可以看出,在只改变流动相的多步纯化过程中,每一步都使用同一根色谱柱可以节省大量的时间和费用。本技术说明中介绍的两个例子使用了Luna 10µm PREP C18(3)固定相。与其它的Luna和Luna(2)填料相比,Luna(3)填料的粒径分布更窄(见图1),性能更好,背压也更低。这种新的Luna(3) 填料提供了更均匀、更稳定且可重现的色谱柱床,从而有效延长使用寿命,提高生产效率。这些例子展示了多步纯化过程中使用单一固定相和色谱柱所能实现的多样性,以及可以获得更好的通量和整体经济。

## 订购信息

Luna 10 µm-PREP	侦查色谱柱		HPLC 散装填料		
	Phase	250 x 4.6 mm	250 x 10 mm	1 kg	5 kg
C18(3)	00G-4616-E0	00G-4616-N0	04K-4616	04L-4616	04M-4616
C8(3)	00G-4623-E0	00G-4623-N0	04K-4623	04L-4623	04M-4623

如需要未列出的其他散装填料和规格信息,请咨询您的 Phenomenex 技术顾问。

**Australia 澳大利亚**  
电话: +61 (0)2-9428-6444  
auiinfo@phenomenex.com

**Austria 奥地利**  
电话: +43 (0)1-319-1301  
anfrage@phenomenex.com

**Belgium 比利时**  
电话: +32 (0)2 503 4015 (法语)  
电话: +32 (0)2 511 8666 (荷兰语)  
beinfo@phenomenex.com

**Canada 加拿大**  
电话: +1 (800) 543-3681  
info@phenomenex.com

**China 中国**  
电话: +86 400-606-8099  
cninfo@phenomenex.com

**Czech Republic 捷克共和国**  
电话: +420 272 017 077  
cz-info@phenomenex.com

**Denmark 丹麦**  
电话: +45 4824 8048  
nordicinfo@phenomenex.com

**Slovakia 斯洛伐克**  
电话: +420 272 017 077  
sk-info@phenomenex.com

**Finland 芬兰**  
电话: +358 (0)9 4789 0063  
nordicinfo@phenomenex.com

**France 法国**  
电话: +33 (0)1 30 09 21 10  
franceinfo@phenomenex.com

**Germany 德国**  
电话: +49 (0)6021-58830-0  
anfrage@phenomenex.com

**Hong Kong 香港**  
电话: +852 6012 8162  
hkinfo@phenomenex.com

**India 印度**  
电话: +91 (0)40-3012 2400  
indiainfo@phenomenex.com

**Ireland 爱尔兰**  
电话: +353 (0)1 247 5405  
eireinfo@phenomenex.com

**Italy 意大利**  
电话: +39 051 6327511  
italiainfo@phenomenex.com

**Luxembourg 卢森堡**  
电话: +31 (0)30-2418700  
nlinfo@phenomenex.com

**Mexico 墨西哥**  
电话: 01-800-844-5226  
tecnicomx@phenomenex.com

**The Netherlands 荷兰**  
电话: +31 (0)30-2418700  
nlinfo@phenomenex.com

**New Zealand 新西兰**  
电话: +64 (0)9-4780951  
nzinfo@phenomenex.com

**Norway 挪威**  
电话: +47 810 02 005  
nordicinfo@phenomenex.com

**Poland 波兰**  
电话: +48 22 104 21 72  
pl-info@phenomenex.com

**Portugal 葡萄牙**  
电话: +351 221 450 488  
ptinfo@phenomenex.com

**Singapore 新加坡**  
电话: +65 800-852-3944  
sginfo@phenomenex.com

**Spain 西班牙**  
电话: +34 91-413-8613  
espinfo@phenomenex.com

**Sweden 瑞典**  
电话: +46 (0)8 611 6950  
nordicinfo@phenomenex.com

**Switzerland 瑞士**  
电话: +41 (0)61 692 20 20  
swissinfo@phenomenex.com

**Thailand 泰国**  
电话: +66 (0) 2 566 0287  
thaiinfo@phenomenex.com

**United Kingdom 英国**  
电话: +44 (0)1625-501367  
ukinfo@phenomenex.com

**USA 美国**  
电话: +1 (310) 212-0555  
info@phenomenex.com

☎ 所有其他国家/地区  
请联系美国总部  
电话: +1 (310) 212-0555  
info@phenomenex.com

## www.phenomenex.com

Phenomenex 产品在全球各地有售。如需了解您所在国家/地区的分销商,请联系Phenomenex美国国际部,邮箱地址为 international@phenomenex.com

## 条款和条件

本文档受 Phenomenex 标准条款与条件的约束,具体详情请浏览 [www.phenomenex.com.cn/TermsAndConditions](http://www.phenomenex.com.cn/TermsAndConditions)。

## 商标

Luna 和 Kinetex 是 Phenomenex 的注册商标。

对比不代表所有应用。

仅用于研究目的,并非用于临床诊断流程。

© 2021 Phenomenex, Inc. 保留所有权利。



如果您对于本方法的执行有任何问题,或想要了解更多信息,我们很乐意为您提供帮助!  
请访问 <https://www.phenomenex.com.cn/chatcn>, 联系我们的技术专家。

