

# O8 肽的 HPLC 分析与制备研究

邹娟娟<sup>1,2</sup>, 张庆合<sup>2</sup>, 张维冰<sup>2</sup>, 李彤<sup>2</sup>, 王风云<sup>1</sup>

(1. 南京理工大学 化工学院, 江苏 南京 210094; 2. 大连化学物理研究所 大连依利特公司, 辽宁 大连 116011)

**摘要:** 系统建立了化学合成小分子肽(O8 肽)的反相 HPLC 分离分析方法, 考察了色谱填料种类、流动相组成及梯度条件对样品分离的影响。通过从分析型到半制备型分离线性放大过程中分离条件与分离效果的关系的探讨, 建立了等度洗脱条件下较大规模地分离制备该小肽的方法。试验结果表明: 硅胶基质的色谱柱比聚合物基质的色谱柱更适合于分离该小肽, 而粒径(5  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ )对分离的影响不大; 较缓的梯度条件可以明显改善分离, 但所需分离时间延长。在制备分离中应综合考虑分离效果与运行时间的关系。

**关键词:** 高效液相色谱; 制备; 小肽; O8 肽

中图分类号: O657. 72; O629. 72 文献标识码: A 文章编号: 1004- 4957(2004)04- 0037- 03

## Analysis and Preparation of O8 Peptide by High Performance Liquid Chromatography

ZOU Juan\_juan<sup>1,2</sup>, ZHANG Qing\_he<sup>2</sup>, ZHANG Wei\_bing<sup>2</sup>, LI Tong<sup>2</sup>, WANG Feng\_yun<sup>1</sup>

(1. College of Chemical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China;

2. Dalian Elite Scientific Instrumentas Co., Dalian Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences, Dalian 116011, China)

**Abstract:** A reversed-phase HPLC method for the purification and determination of a small synthetic peptide(O8 peptide) is reported. The effects of the stationary phase, particle size, mobile phase composition and gradient program on sample separation were investigated. In order to scale up to a semi-preparative scale, the performance of this separation method under various experimental conditions has been explored. Under isocratic elution conditions, the scaled-up separation of this O8 peptide was achieved. Our experimental results indicated that silica-based column is more suitable than polymer-based column for the separation of this peptide, whereas the particle size of adsorbents has little influence on separation. The flatter the gradient is, the greater the resolution is, but also the longer the separation time should be. Consequently, a compromise should be made between high resolution and reasonable separation time.

**Key words:** HPLC; Preparation; Small peptide; O8 peptide

反相高效液相色谱(RP- HPLC)已被广泛用于分析和制备多肽、蛋白等生物样品<sup>[1~3]</sup>。采用HPLC分离酶解的肽链<sup>[4,5]</sup>, 进一步进行质谱鉴定是蛋白质组学研究的常用方法; 此外在血色素的多态性研究<sup>[6]</sup>, 酶结构和细胞功能的关系研究<sup>[7]</sup>等方面的应用也取得了较好的结果。在制备用作序列分析微克级的肽<sup>[8]</sup>, 以及提纯制备由生物工程合成的从毫克到千克级别的多肽<sup>[9~11]</sup>等方面, HPLC 也发挥了重要的作用。

O8 肽是一种具有重要生物功能的药物, 可采用接肽缩合等化学反应人工合成。由于合成过程中可生成多种中间体及类似物, 因此需通过 HPLC 的方法进行提纯, 以获得最终的高纯度产品。本文通过对填料种类、粒径大小及流动相组成等因素对分离影响的探讨, 建立了 RP- HPLC 分离分析化学合成 O8 肽的方法, 并将分析型方法放大到半制备规模, 建立了可用于规模化制备的系统方法。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

大连依利特分析仪器有限公司高效液相色谱系统, 包括: P230 型高压恒流泵、UV230 型紫外可见

收稿日期: 2003- 06- 26; 修回日期: 2004- 04- 19

作者简介: 邹娟娟(1979- ), 女, 湖南长沙人, 硕士研究生; 张庆合, 联系人。

检测器, EChrom98 色谱工作站; O8 肽样品(1 mg/mL 溶液, 上海吉尔生化有限公司); 乙腈(山东禹城化工厂, 色谱纯), 三氟乙酸(TFA, Acros, 99%)。MILLIPORE SA67120 超纯水系统(USA)。

## 1.2 色谱条件

色谱柱: 250×4.6 mm i. d. 和 250×10 mm i. d., SinoChrom ODS-BP, 5 μm 和 10 μm(大连依利特分析仪器有限公司); 聚合物柱(MP000621-3); 流速: 1 mL/min; 检测波长 220 nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 洗脱条件选择

反相高效液相色谱分离复杂肽和蛋白质混合样品时, 通常使用含 TFA 的水和乙腈为流动相, 以梯度洗脱模式进行分离, 梯度变化速率对色谱峰形和分离度有较大影响<sup>[12]</sup>。实验比较了流动相从乙腈-水-TFA(体积比 10:90:0.1)溶液到 100% 乙腈(含 0.1% TFA)溶液的变化速率对分离的影响, 样品在不同条件下的分离结果如图 1 所示。可以看出, 增大梯度变化速率, 能够明显改善色谱峰形, 但分离度降低。为了获得满意的分离效果, 可以采用较缓的梯度变化速率( $\varphi(B)/\%$  为 (0.5%~1%)/min) 或在等度条件下进行分离。综合考虑制备分离的要求, 实验选择的流动相为: 乙腈-水(体积比 27:73, 含 0.2% TFA) 的等度条件下进行分离与制备。

图 2 给出了流动相中乙腈含量变化时, O8 肽色谱峰的容量因子与半峰宽的关系。随流动相中乙腈含量的提高, 保留有缓慢降低的趋势, 表明流动相的洗脱能力增强; 但同时半峰宽亦随之减小, 说明乙腈含量的提高有利于改善色谱峰的对称性。

### 2.2 流动相中 TFA 浓度对分离的影响

TFA 是 RP-HPLC 分离蛋白质和肽时最常用的缓冲试剂和离子对试剂, 可以抑制酰基的离子化, 使氨基保持质子化状态; 同时可以使键合硅胶填料表面残留硅羟基质子化, 减少碱性溶质发生离子交换作用的可能性, 同时改善峰形。TFA 易挥发, 有利于制备分离后样品的提纯。实验发现, 随流动相中 TFA 含量增加, O8 肽的保留减弱, 色谱峰形的对称度提高。TFA 含量为 0.025% 时, O8 肽的色谱峰展宽非常明显, 可能是由于 TFA 的缓冲能力不足之故。由于 TFA 酸性较强, 容易造成键合固定相表面 C<sub>18</sub> 功能团的流失, 降低色谱柱寿命<sup>[11]</sup>。在综合考虑保留时间、色谱峰对称度、分辨率、色谱柱寿命的基础上, 实验选择流动相 TFA 含量为 0.1% 进行分析与制备分离。

### 2.3 色谱填料对分离的影响

试验比较了用硅胶基质 C<sub>18</sub> 填料和多孔聚合微粒(聚苯乙烯-二乙烯基苯)填充色谱柱分离 O8 肽的情况, 见图 3。可以看出 O8 肽在硅胶 C<sub>18</sub> 色谱柱上保留比在聚苯乙烯-二乙烯基苯聚合物色谱柱上强, 而且在聚合物色谱柱上主峰和前面的杂质峰分离不够理想。降低流动相乙腈浓度使 O8 肽在聚合物柱上出峰时间延长到 12 min 左右时, 但色谱峰展宽非常明显, 柱效较低, 说明这种聚合物色谱柱不适于进行分析与制备分离。

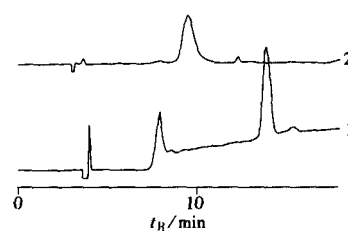


图 1 样品在不同梯度条件下的分离  
Fig. 1 Sample separation under different gradient steepness

column: SinoChrom ODS-BP(5 μm, 250×4.6 mm i. d.); flow rate: 1 mL/min; detection wavelength: UV, 220 nm; temperature: 25 °C; mobile phase: A. V(acetonitrile) : V(water, 0.1% TFA) = 10:90; B. acetonitrile(0.1% TFA); Linear gradient for  $\varphi(B)/\%$ : 1. from 22% ~ 32% in 20 min; 2. from 0% ~ 100% in 40 min

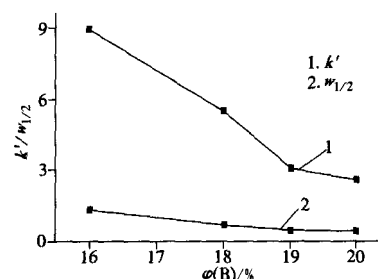


图 2 等度条件下乙腈含量对分离影响  
Fig. 2 The effect of ACN content on isocratic separation

column: SinoChrom ODS-BP(10 μm, 250×4.6 mm i. d.); mobile phase: A. V(acetonitrile) : V(water, 0.1% TFA) = 10:90; B. acetonitrile(0.1% TFA); other conditions are the same as in Fig. 1

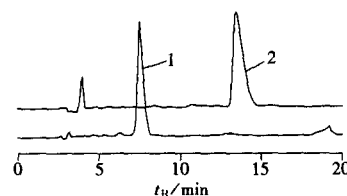


图 3 硅胶柱与聚合物柱比较

Fig. 3 A comparison of the performance of silica and polymer columns  
column: 1. MP000621-3, 7 μm, 250×4.6 mm i. d., 2. SinoChrom ODS-BP, 10 μm, 250×4.6 mm i. d.; mobile phase: acetonitrile-water-TFA = (27:73:0.1, by volume); other conditions as in Fig. 1

## 2.4 填料粒径对分离的影响

实验比较了 10  $\mu\text{m}$  和 5  $\mu\text{m}$  SinoChrom 键合硅胶  $\text{C}_{18}$  固定相上 O8 肽混合物的分离情况。结果表明, 10  $\mu\text{m}$  和 5  $\mu\text{m}$  SinoChrom  $\text{C}_{18}$  色谱柱对该肽的分离效果差别不明显, 在 10  $\mu\text{m}$  粒径的色谱柱保留稍弱, 但是峰形比在 5  $\mu\text{m}$  色谱柱上更好, 而且背压适中。可能是由于小分子肽在反相色谱中的保留行为介于大分子蛋白的吸附/解吸模式和小分子物质的分配模式之间, 不同于传统小分子在反相色谱固定相上的分配机理, 与柱效的相关性不是非常明显<sup>[4]</sup>。

## 2.5 O8肽的制备分离

在上述实验考察的基础上, 确定采用 10  $\mu\text{m}$  SinoChrom 键合硅胶  $\text{C}_{18}$  颗粒填料为放大制备的固定相, 在 250  $\times$  10 mm i. d. 半制备色谱柱进行线性放大试验。在流动相流速为 4 mL/min 条件下, 进样量分别为 1、2 和 4 mg 时的分离效果与分析色谱相当, 进样量 4 mg 时主峰前的小杂质峰部分已经与主峰重叠, 进一步提高进样量收集馏分达不到要求的纯度。

图 4 给出了进样量分别为 0.5 mg 和 4 mg 时收集主馏分再次进行 HPLC 纯度分析的色谱图, 可见所得的收集液中, O8 肽中几乎不含杂质。

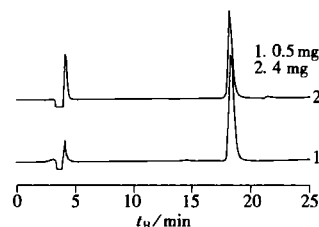


图 4 纯度检测谱图

Fig. 4 Chromatograms for checking the product purity  
column: SinoChrom ODS- BP (10  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4.6 mm i. d.); mobile phase: A.  $V(\text{acetonitrile}) : V(\text{water}, 0.1\% \text{ TFA}) = 10: 90$ ; B. acetonitrile (0.12% TFA); linear gradient for  $\varphi$  (B)% from 15% ~ 35% in 30 min; other conditions as in Fig. 1

## 3 结 论

研究了反相 HPLC 分离化学合成 O8 肽方法中色谱填料、粒度、流动相添加剂 TFA 浓度、洗脱条件等实验条件对保留和分离的影响, 建立了等度条件下 O8 肽的分离分析方法。在此基础上, 实现了从分析分离到半制备分离的线性放大, 在等度条件下也建立了 O8 肽的分离制备方法。建立的分离制备方法简单、进样量大、产物纯度高, 可用于实际 O8 肽的生产。

### 参考文献:

- [1] PURCELL A W, AGUILAR M I, HEARN M T W. Conformational effects in reversed phase high performance liquid chromatography of polypeptides I. Resolution of insulin variants[J]. J Chromatogr, A, 1995, 711: 61- 70.
- [2] SERGEEV N V, GLOUKHOVA N S. Monitoring of recombinant human insulin production by narrow bore reversed phase high performance liquid chromatography, high performance capillary electrophoresis and matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry[J]. J Chromatogr, A, 2001, 907: 131- 144.
- [3] LU P, CARR C D, CHADWICK P. Process purification of polypeptides and proteins by reversed phase column chromatography: Misconceptions and reality[J]. BioPharm, 2001, 14(9): 28- 35.
- [4] CHANG J P, RICHARDSON J M, RIGGIN R M. Characterization of tryptic peptides of a potent growth hormone releasing hormone analog by reversed phase high performance liquid chromatography- ion spray mass spectrometry[J]. J Liq Chrom, 1994, 17(13): 2881- 2894.
- [5] 齐 崑, 何明霞, 何志敏, 等. 胰蛋白酶水解全酪蛋白反应过程中的色谱分析[J]. 色谱, 2002, 20(1): 1- 5.
- [6] SCHROEDER W A, SHELTON J B, SHELTON J R. High performance liquid chromatographic separations of the globin chains of non human hemoglobins[J]. Hemoglobin, 1985, 9(4): 461- 482.
- [7] ROBINSON N C, DALE M D, TALBERT L H. Subunit analysis of bovine cytochrome c oxidase by reverse phase high performance liquid chromatography, for characterization of biosynthetic human growth hormone[J]. Arch of Biochem and Biophys, 1990, 281(2): 239- 244.
- [8] ELICONE C, LUI M, GERMANOS S. Microbore reversed phase high performance liquid chromatographic purification of peptides for combined chemical sequencing- laser desorption mass spectrometric analysis[J]. J Chromatogr, A, 1994, 676: 121- 137.
- [9] GILLIS S, URDAL D, CLEVENGER W. Production of recombinant human colony stimulating factors in yeast[J]. Behring Institute Research Communications, 1988, 83: 1- 7.
- [10] KROEFF E P, OWENS R A, CAMPBELL E L. Production scale purification of biosynthetic human insulin by reversed phase high performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr, 1989, 461: 45- 61.
- [11] KUNITANI M, JOHNSON D. Model of protein conformation in the reversed phase separation of interleukin- 2 muteins[J]. J Chromatogr, 1986, 371: 313- 333.
- [12] 张养军, 李 巷, 耿信笃. 用于蛋白同时复性及纯化的制备型装置中流动相用量的优化研究[J]. 色谱, 2001, 19(5): 423- 426.