

## 反相制备色谱分离酪丝亮肽拟似物\*

刘 艺<sup>1</sup>, 孙迎基<sup>2</sup>, 张奕华<sup>1\*</sup>, 沈子龙<sup>2</sup>

(1. 新药研究中心; 2. 生物技术中心, 中国药科大学, 南京 210009)

**摘 要** 本文介绍了以反相 C<sub>18</sub> 制备色谱柱分离强极性小肽拟似物的方法。采用 B ÛCHI 中压制备系统, 以水-甲醇为梯度洗脱体系, 并配合 HPLC 检测, 结果成功分离纯化了三个活性拟肽化合物, 纯度达 97% 以上。该法简便、分离效果好, 可用于该类小肽化合物的分离制备。

**关键词** 反相制备色谱; 肽拟似物

中图分类号: R91

文献标识码: A

文章编号: 1005-8915(2006)04-0271-03

天然活性肽经结构修饰得到肽拟似物, 可改善活性或增强抗酶解能力, 是近年来药物研究的热点之一<sup>[1,2]</sup>。与传统药物不同, 肽拟似物自身极性较大, 且在合成过程中极易形成极性相近的类似物, 普通正相柱很难分离, 一般采用反相色谱法分离纯化<sup>[3]</sup>。反相色谱是利用疏水原理, 以非极性烷基为固定相, 极性溶剂或其水溶液作为流动相进行洗脱, 分辨率强, 收率高, 是制备肽类化合物的主要手段。

酪丝亮肽 (Tyrosyleutide, YSL) 是由酪氨酰、丝氨酰和亮氨酸组成的类新型抗肿瘤三肽化合物, 目前在我国已完成 I 期临床。研究表明, YSL 能促进体内巨噬细胞分泌合成多种细胞毒效应分子, 显著抑制肝肿瘤生长<sup>[4,5]</sup>。该药活性虽好, 但在体液中极不稳定, 半衰期为 30 s ~ 60 s, 因此我们对 YSL 进行结构改造, 合成了一系列新型肽拟似物, 以期提高其稳定性及抗癌活性。我们以其中三个化合物为模型化合物 (图 1), 采用 B ÛCHI 中压柱层析制备系统,

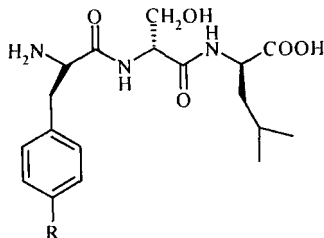


Fig 1 (R = F, Cl, Me)

以三氟乙酸、水、甲醇为洗脱系统, HPLC 检测纯度, 建立了该类小肽拟似物的分离方法, 成功分离纯化得到高纯度的产品。

### 1 实验仪器与试剂

**实验仪器:** B ÛCHI 中压系统 (Pump Manager C615, UV Monitor C-630, Fraction Collector C-660), 粒径 40µm; 高效液相系统 (Waters 四元泵; Waters 600 controller; Waters 717 自动进样器; Waters 2487 检测器)。

**试剂:** 甲醇 (特级色谱纯), 二次蒸馏水, 三氟乙酸 (TFA) (色谱纯), 富士反相 C<sub>18</sub> 填料

### 2 方法

#### 2.1 色谱条件

B ÛCHI 中压系统: B ÛCHI 15 mm × 460 mm。柱温: 室温。流动相 A 液为 0.2% TFA 水溶液; 流动相 B 液为甲醇溶液。流速: 30 ml/min。进样量: 100 mg。检测器: 检测波长, 280 nm。

高效液相系统: Lichrospher C<sub>18</sub> 柱, 江苏汉邦科技有限公司; 流动相: A', 含有 0.1% 三氟乙酸的水; B', 甲醇。0 ~ 20 min, 95% ~ 50% A'; 20 ~ 28 min, 50% A'; 28 ~ 43 min, 95% A'。检测波长: 280 nm。流速 1 ml/min。

#### 2.2 C<sub>18</sub> 填料装柱

20 g 富士反相 C<sub>18</sub> 填料加入 B ÛCHI 中压柱, 以 10 bar 的氮气加压至填料长度不再变化, 静置 1 h, 撤去氮气瓶。

#### 2.3 反相分离

精密称取各模型化合物 100mg 溶于 2 ml 纯

\* 收稿日期: 2005-10-07 修回日期: 2006-04-10

作者简介: 刘艺, 女, 1976 年 11 月生, 四川人, 博士研究生, 主要从事抗肿瘤短肽拟似物合成研究; E-mail: Ivy\_liuyi@yahoo.com.cn.

通讯作者: 张奕华, 教授, 博导; Tel: 025-86635503, E-mail: zyhtgd@sohu.com

水中,进样入 B ÜCHI 系统。起始以 A 相 0.2% TFA 水溶液洗脱,缓慢调高 B 相甲醇溶液的比例,至样品洗出。自动收集器收集洗脱组分,用 HPLC 检测洗脱液组分目的峰的纯度,合并 > 97% 的组分,在旋转蒸发器中蒸出甲醇后,残留物冷冻干燥,得白色疏松粉末。取少部分粉末,用水溶解,进 HPLC 检测最终纯度。

### 3 结果

模型化合物 1 经 BUCHI 系统分离后,洗脱组分 A-时间图见图 2,洗脱组分 HPLC 检查见图 3。模型化合物 1 分离前后的 HPLC 图谱见图 4(a)。

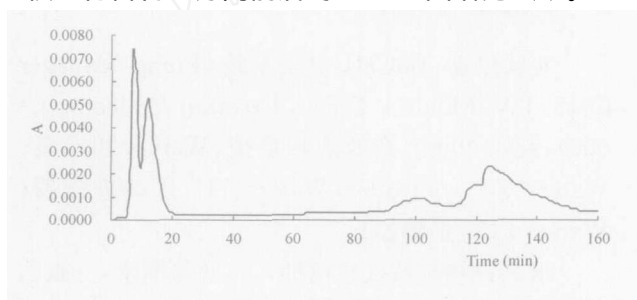
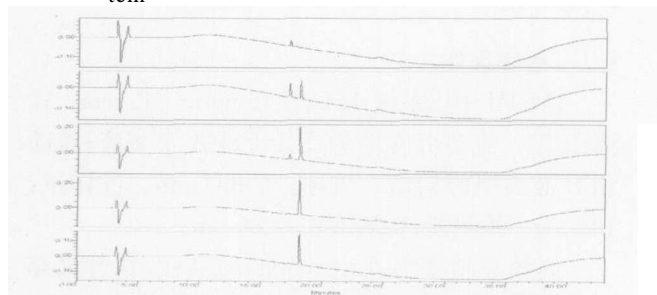


Fig 2 A- Time profile of model compound 1 in B ÜCHI system



(The fractions from top to underneath was collected at 122, 123, 124, 125, 126 min respectively)

Fig 3 The chromatogram for collecting fractions of model compound 1

从图 2 看出,模型化合物 1 的杂质主要在 100 min 和 120 min 时被洗脱,主峰在 126 min 时被洗脱。结合图 2 和图 3 看,126 min 时洗脱组分为单峰,吸收度最高,经质谱和  $^1\text{H-NMR}$  确定为化合物 1;122 min 时洗脱组分为 100% 杂质,123 min 时杂质峰和主峰各占 50% 左右,125 min 之后时,主峰面积 > 97%,收集洗脱液,低温冷冻干燥后得白色疏松粉末 90 mg。

同样,这种方法应用于模型化合物 2 和 3,分离前和分离后 HPLC 图谱见图 4(b) 和 4(c)。

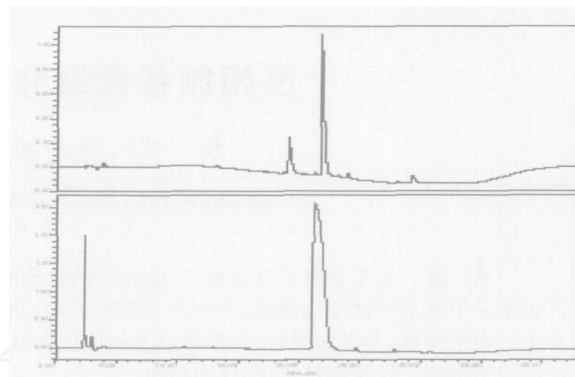


Fig 4(a) The chromatograms of model compound 1 before and after separation with B ÜCHI system.

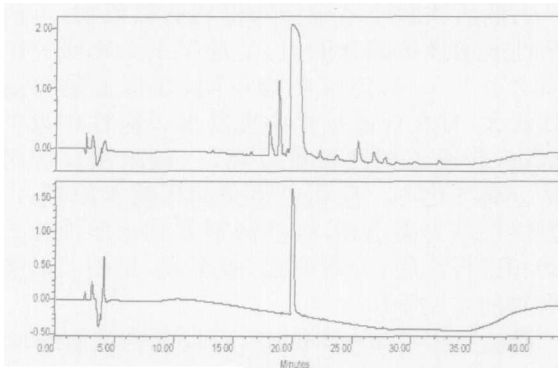


Fig 4(b) The chromatograms of model compound 2 before and after separation with B ÜCHI system.

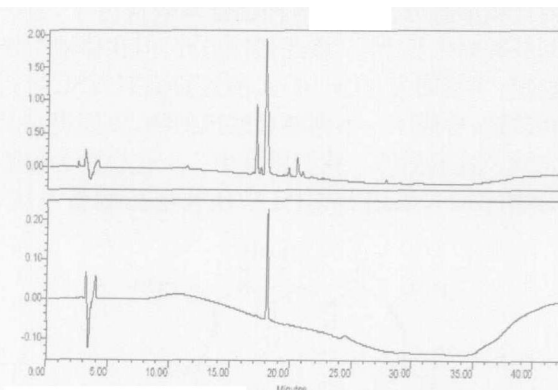


Fig 4(c) The chromatograms of model compound 3 before and after separation with B ÜCHI system.

### 4 讨论

#### 4.1 检测波长的选择

本实验采用梯度洗脱,考虑到目标化合物均含有苯环,所以选择苯环特征吸收 280nm 作为在线检测波长,以提高检测灵敏度。

#### 4.2 洗脱系统的选择

小肽类化合物有游离的羧基端和氨基端,具有较强的极性,一般需要添加 TFA 以抑制电离。为

保证目标物在柱中有较长的保留时间,提高分辨率,我们选择在 A 相洗脱液中加入 0.2% TFA。此外,国外用反相柱分离肽类样品时,一般采用洗脱能力较强,粘滞度低的乙腈为有机溶剂。我们通过预试验,比较了甲醇水溶液和乙腈水溶液对目标化合物的分离情况,结果表明甲醇与乙腈对目标化合物的分离效果相差不大,考虑到毒性及价格因素,最终选定甲醇水溶液作为 B 相洗脱液。

#### 4.3 洗脱梯度选择

从模型化合物的 HPLC 检测过程可以看出,合成的肽拟似物杂质情况较为复杂,有的极性非常接近,HPLC 保留时间仅相差 1~2 min。模型化合物 1 在 122~125 min 共 3 min 内,杂质峰和主峰的相对面积发生了巨大变化,主峰面积从零变到 100%。这就要求 B 相改变一定要缓慢,如果改变过快,杂质和化合物一起被洗脱,导致纯度降低和收率下降。

根据模型化合物 1,2 和 3 粗品 HPLC 图(见图 4(a),(b),(c)),分析主峰位置和杂质的相对极性和位置,最后选择洗脱条件为 0~30 min:0% B;30~50 min:1~5% B;50~130 min:5~10% B;130~160 min:10~20% B。采用上述优化的洗脱条件,分离纯化了化合物 2 和化合物 3,分别为 85 mg、87 mg。

#### 4.4 柱载量

逐步提高化合物 1 上柱量,10,20,50,100 mg,其分析行为相近,无明显峰前延现象,根据厂家提供的信息,100 mg 已接近柱载量上限,所以实验采用的最大载样量为 100 mg。

### 5 结 论

与多肽相比,小肽类化合物极性更强,在反相色谱柱中保留时间极短,更难于分离纯化,根据肽

的结构、长度选择适宜的检测波长及流动相的 pH 值,是分离纯化该类化合物的关键之一。目前关于强极性小肽类分离纯化的报道较少,有文献采用特殊固定相或样品柱前衍生化处理来分离强极性小肽<sup>[6,7]</sup>,但处理繁琐,不适合常规的小肽分离纯化。本实验选择简单的“甲醇-水-三氟乙酸”洗脱体系,不需要对小肽衍生化,即可得到纯度好、收率高的目标物,所建立的方法对今后分离纯化该类小肽样品提供了有益的参考。

#### 参考文献

- [1] Ohkanda J, Buckner F S, Lockman J M, et al. Design and synthesis of peptidomimetic protein farnesyltransferase inhibitors as anti-Trypanosoma brucei agents [J]. J Med Chem, 2004, 47(2):432.
- [2] Lee H B, Zaccaro M C, Pattarawarapan M, et al. Syntheses and activities of new C10 beta-turn peptidomimetics [J]. J Org Chem, 2004, 69(3):701.
- [3] Dong W Y, Guan F Y, Liang M L, et al. High performance liquid chromatographic analysis of structurally similar peptides by combinatorial chemistry synthesis [J]. J Phar Anal, 1999, 19(4):222.
- [4] 李雁,汤钊猷,王鲁,等.小分子三肽 CMS024 对转移性人肝癌裸鼠模型的抑制作用 [J]. 中华医学杂志,2004, 84(8):675.
- [5] 邱爽,陆融,赵岚,等.三肽化合物酪丝亮肽抗肿瘤作用及对单核巨噬细胞激活作用机制 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2005, 12(2):129.
- [6] 肖玉秀,岳卫华,达世禄.氮杂 18-冠-6 键合硅胶固定向上小分子肽的高效液相色谱研究 [J]. 氨基酸和生物资源,2000, 22(2):49.
- [7] Roturier J, Bars D, Gripon J. Separation and identification of hydrophilic peptides in dairy products using FMOc derivatization [J]. J Chromatogra, 1995, 696(2):209.

## Purification of Tyrosyleutide Peptidomimetics by Reversed Phase Preparative Chromatography

LIU Yi<sup>1</sup>, SUN Ying-ji<sup>2</sup>, ZHANG Yi-hua<sup>1</sup>, SHEN Zi-long<sup>2</sup>

(1. Center of Drug Discovery; 2. Biotechnical Research Center, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**Abstract** A method is described for the separation of strong-polar short peptidomimetics by reversed-phase C<sub>18</sub> preparative chromatographic column. B üCHI middle pressure preparative system was applied to automatically control the experiments, using water-methanol as the gradient elution system. The purity of the eluate was validated by HPLC, and three short peptidomimetics were purified which reached 97% purity. The method is simple and effective. It can be applied to separate short peptidomimetics.

**Key words** Reversed-phase preparative chromatography, Peptidomimetics