

## 使用 PLRP-S 色谱柱优化合成肽的分析和纯化

可靠的色谱柱和填料，具有出色的可扩展性和多种孔径，可成功纯化合成肽

### 作者

Andrea Angelo P. Tripodi 和  
Andrew Coffey  
安捷伦科技有限公司

### 摘要

反相离子对色谱在使用含三氟乙酸（TFA，作为离子对试剂）的流动相来分析和纯化合成肽方面正得到越来越多的应用。从分析型高效液相色谱（HPLC）放大至制备型 HPLC 可能既昂贵又耗时，并且由于化学键合相、pH 条件、粒径和柱长的差异，通常难以实现。本应用简报介绍了合成肽的分析以及如何使用 Agilent PLRP-S 分析型 HPLC 色谱柱放大方法。将梯度和上样信息直接应用于填充有相同填料的更大尺寸的制备柱。

## 前言

由于生物技术和生物工程（包括癌症诊断和治疗、抗生素药物开发和新疫苗）的发展，多肽治疗药物越来越受欢迎。大多数多肽药物通过固相多肽合成法 (SPPS) 进行生产。在聚合物载体或树脂上进行合成，而聚合物载体或树脂可以轻松地从中反应中滤出。合成途径包括多个去保护、活化和偶联步骤。使用含有清除剂及其他组分的切割混合液从树脂上分离出最终肽序列，得到可直接纯化的最终粗产物。

利用 HPLC 和反相色谱柱分析通过固相多肽合成法合成的粗制肽，使用乙腈水溶液（通常含有作为离子对试剂的 0.1% 三氟乙酸 (TFA)）进行梯度洗脱。基于液/质联用系统 (LC/MS) 的多肽分析通常用于确认目标分子的结构。然而，由于 TFA 会引起离子抑制，导致 MS 信号较弱，因此它并非 LC/MS 分析的理想选择。LC/MS 方法的首选离子对试剂是甲酸 (FA)，一种比 TFA 更弱的酸。

本研究使用人胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 7-36 酰胺，这是一种含有 30 个氨基酸的多肽单链，分子量为 3297.7 道尔顿 (Da) (图 1)。

本应用简报介绍了从分析型 PLRP-S 4.6 × 250 mm, 8 μm 色谱柱直接放大至更大规模的制备型 PLRP-S 21.2 × 250 mm, 8 μm 色谱柱的能力。考察了适用于分离多肽的两种孔径，即 100 Å 和 300 Å。Agilent PLRP-S 是一种刚性大孔苯乙烯/二乙烯基苯 (PS-DVB) HPLC 固定相，具有出色的化学和物理稳定性。PLRP-S HPLC 填料本身具有疏水性，无需键合 C8 或 C18 等烷基链来赋予其疏水性。使用配备正交的 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱 (2.1 × 100 mm, 2.7 μm) 的 Agilent 6545XT AdvanceBio 液相色谱/四极杆飞行时间质谱 (LC/Q-TOF) 确认了最终产品的表征结果。

## 样品前处理

胰高血糖素样肽 GLP-17-36 酰胺由 CS Bio (Menlo Park, CA 94025, USA) 合成。用于合成的固相载体由安捷伦科技公司提供。使用标准侧链保护策略和偶联条件（苄基甲氧基羰基 (Fmoc) 化学基团）进行合成。

## 分析仪器

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统由以下模块组成：

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler, 配备样品恒温箱 (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7117C), 配备 10 mm InfinityLab 最大光强卡套式流通池 (G7117-60020)

## 制备仪器

Agilent 1290 Infinity II 制备型液相色谱系统由以下模块组成：

- Agilent 1290 Infinity II 制备型二元泵 (G7161B)
- Agilent 1260 Infinity II 馏分收集器 (G7157A)
- Agilent 1290 Infinity II 制备型柱温箱 (G7163B)
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7165A)

## LC/MS 仪器

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱与 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 联用系统 (G6549AA)

## 软件和数据处理

- Agilent OpenLab 软件套装, 2.6 版
- OpenLab ChemStation CDS, C01.09 版
- Agilent MassHunter 数据工作站采集软件, B10.00 版
- Agilent MassHunter BioConfirm 软件, 10.00 版

H-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-NH<sub>2</sub>

图 1. 合成的 GLP-1 (7-36) 酰胺的氨基酸序列

## 色谱柱

- **分析柱:** Agilent PLRP-S 100 Å, 4.6 × 250 mm, 8 μm (货号 PL1512-5800) ; Agilent PLRP-S 300 Å, 4.6 × 250 mm, 8 μm (货号 PL1512-5801)
- **制备柱:** Agilent PLRP-S 100 Å, 21.2 × 250 mm, 8 μm; Agilent PLRP-S 300 Å, 21.2 × 250 mm, 8 μm (定制规格)
- **LC/MS 色谱柱:** AdvanceBio 肽谱分析色谱柱 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (货号 655750-902)

## 固相载体

- AmphiSpheres 40 RAM 0.4 mmol/g 75–150 μm (货号 PL3867-4764)
- PL-Rink 树脂 (1% DVB) 0.3 mmol/g 75–150 μm (货号 PL1467-4749)

## 试剂与化学品

所有试剂均为 HPLC 级或更高等级。

## 方法条件

表 1. 液相色谱参数

Agilent 1290 Infinity II 分析型液相色谱系统			
参数	值		
色谱柱	Agilent PLRP-S, 4.6 × 250 mm, 8 μm		
恒温箱	4 °C		
溶剂 A	0.1% TFA 水溶液		
溶剂 B	0.1% TFA 乙腈溶液		
梯度	梯度 1:		
	时间 (min)	%B	
	0–2	35	
	2–22	35–50	
	22–24	50–90	
	24–28	90	
	28–30	90–35	
	30–36	35	
	梯度 2:		
	时间 (min)	%B	
	0–2	35	
	2–22	35–65	
	22–24	65–90	
	24–28	90	
28–30	90–35		
30–36	35		
柱温	25 °C		
流速	1.0 mL/min		
进样量	5.0 μL		
Agilent 1290 Infinity II 制备型液相色谱系统			
色谱柱	Agilent PLRP-S, 21.2 × 250 mm, 8 μm		
恒温箱	4 °C		
溶剂 A	0.1% TFA 水溶液		
溶剂 B	0.1% TFA 乙腈溶液		
梯度	时间 (min)	%B	
	0–2	35	
	2–22	35–50	
	22–24	50–90	
	24–28	90	
	28–30	90–35	
	30–45	35	
	柱温	室温	
	流速	21.2 mL/min	
	进样量	100 μL	
馏分收集	2.5 mL 馏分; 基于时间		

表 2. LC/MS 数据采集参数

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF		
参数	值	
离子源	双 AJS	
极性	正	
气体温度	325 °C	
气体流速	13 L/min	
雾化器压力	35 psi	
鞘气温度	275 °C	
鞘气流速	12 L/min	
毛细管电压	4000 V	
喷嘴电压	500 V	
碎裂电压	175 V	
锥孔电压	65 V	
采集模式	2.5 Hz	
质量范围	100–2100 m/z	
采集速率	5 幅谱图/秒	
Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统		
色谱柱	AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm	
恒温箱	4 °C	
溶剂 A	0.1% 甲酸水溶液	
溶剂 B	0.1% 甲酸乙腈溶液	
梯度	时间 (min)	%B
	0–2	3
	2–23	3–47
	23–25	47–50
	25–26	50–97
	26–27	97–3
	27–30	3*
	*等度 (后运行)	
柱温	55 °C	
流速	0.3 mL/min	
进样量	20 μL	

## 结果与讨论

使用两种树脂合成目标 GLP-1 7-36 酰胺肽。第一种是 AmphiSpheres 40 RAM 0.4 mmol/g 75–150  $\mu\text{m}$ ，其含有聚乙二醇链，可改善树脂对难合成多肽的合成性能。第二种是 PL-Rink 树脂 (1% DVB) 0.3 mmol/g 75–150  $\mu\text{m}$ ，其载量更低，适用于合成更长的肽链。

在相同的条件下进行合成，并得到两种粗制肽：多肽 1A（来自 AmphiSpheres 树脂）和多肽 1B（来自 PL-Rink 树脂）。

多肽的纯化通常要求孔径为 100  $\text{\AA}$  或 300  $\text{\AA}$ 。该孔径下可大幅提高载量，同时尽可能减少大分子的进入受限或排阻现象，并保持所需的传质以实现理想的分离。

粗制肽的分析型色谱分析是用于确认目标分子是否存在以及了解洗脱特性的不错的方法，因此非常有必要。最初，不了解两种样品的洗脱曲线，因此对不同的梯度方法进行了筛选（图 2A、2B、3A 和 3B），然后选择理想的梯度（B 由 35% 升至 50%）用于后续的制备型运行。实际方法条件见表 1。

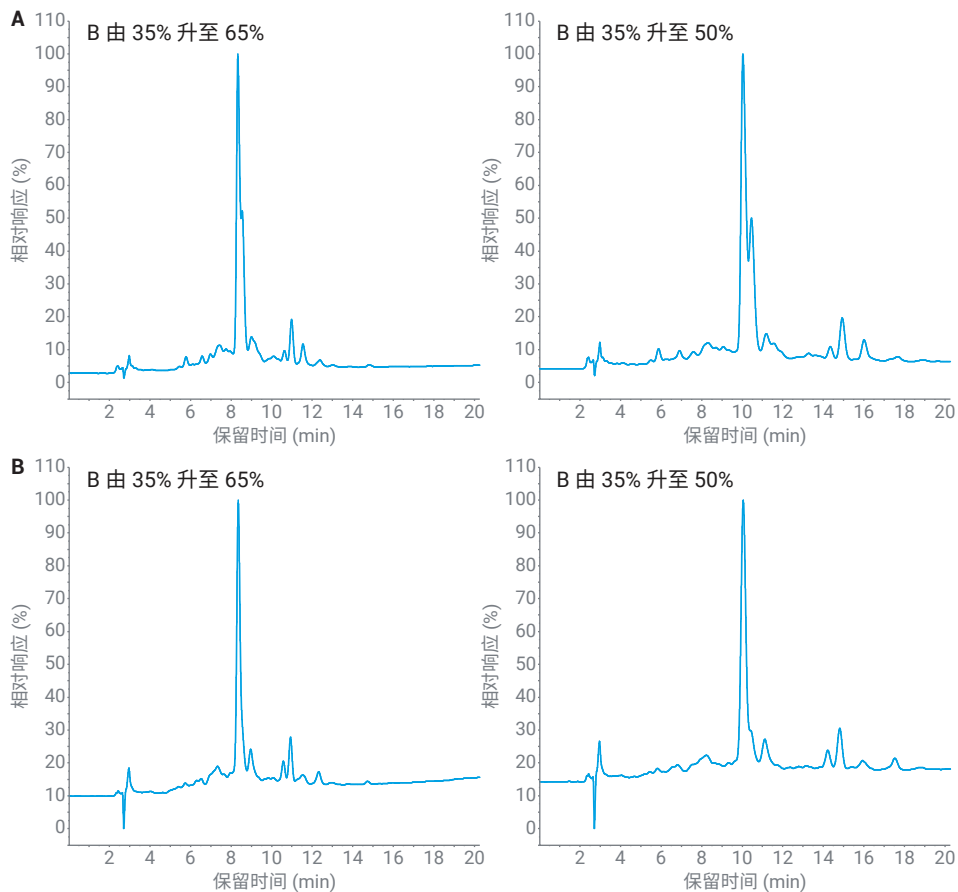


图 2. (A) Agilent PLRP-S 100  $\text{\AA}$  色谱柱上针对多肽 1A 的梯度优化。(B) Agilent PLRP-S 100  $\text{\AA}$  色谱柱上针对多肽 1B 的梯度优化

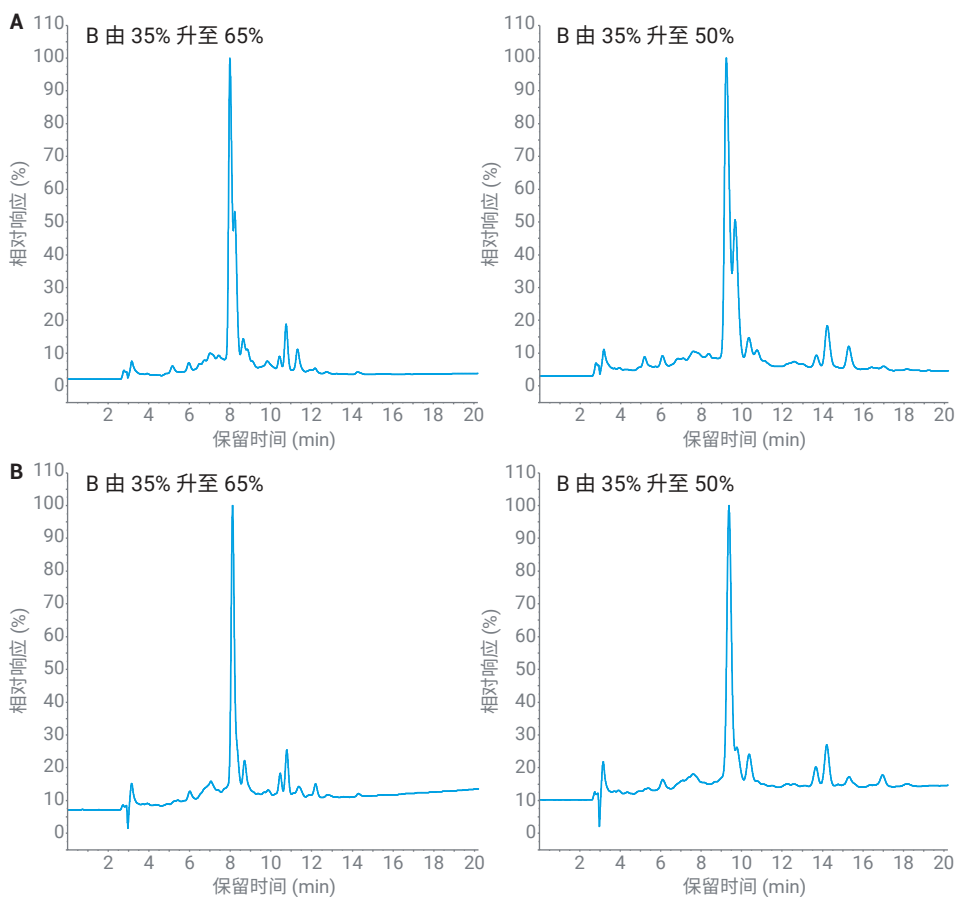


图 3. (A) Agilent PLRP-S 300 Å 色谱柱上针对多肽 1A 的梯度优化。(B) Agilent PLRP-S 300 Å 色谱柱上针对多肽 1B 的梯度优化

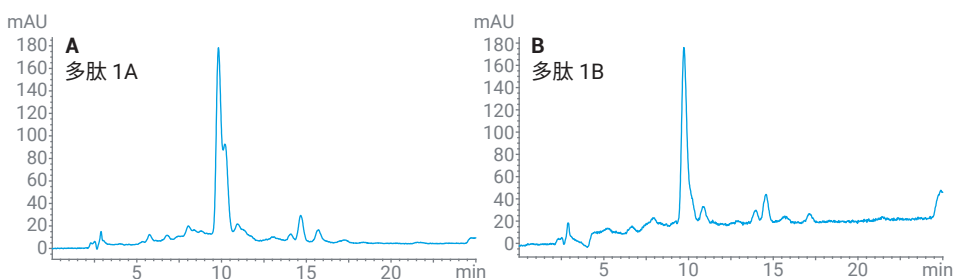


图 4. Agilent PLRP-S 100 Å 色谱柱上获得的多肽 1A (A) 和多肽 1B (B) 的制备色谱图

很明显，在本例中，多肽 1B（使用 PL-Rink 树脂 0.3 mmol/g 制得）的粗纯度高于 AmphiSpheres 40 RAM（表 3）。

表 3. 粗制肽纯度

	多肽 1A	多肽 1B
PLRP-S 100 Å	33.15%	43.19%
PLRP-S 300 Å	41.23%	46.53%

通过进样 100  $\mu$ L 溶于流动相 A（含 0.1% TFA 水溶液）中的浓度为 1 mg/mL 的粗制肽进行制备级分离。在 PLRP-S 100 Å 和 PLRP-S 300 Å 色谱柱（内径为 21.2 mm）上纯化的总量为 1 mg，色谱柱规格从内径 4.6 mm 放大至 21.2 mm（图 4 和图 6）。将馏分收集器设置为在主峰洗脱的时间段内使用固定体积的 2.5 mL 馏分收集全长产物 (FLP)。通过在分析柱上重新分析相应的馏分，可轻松鉴定产物和任何邻近洗脱的杂质（图 5 和图 7）。

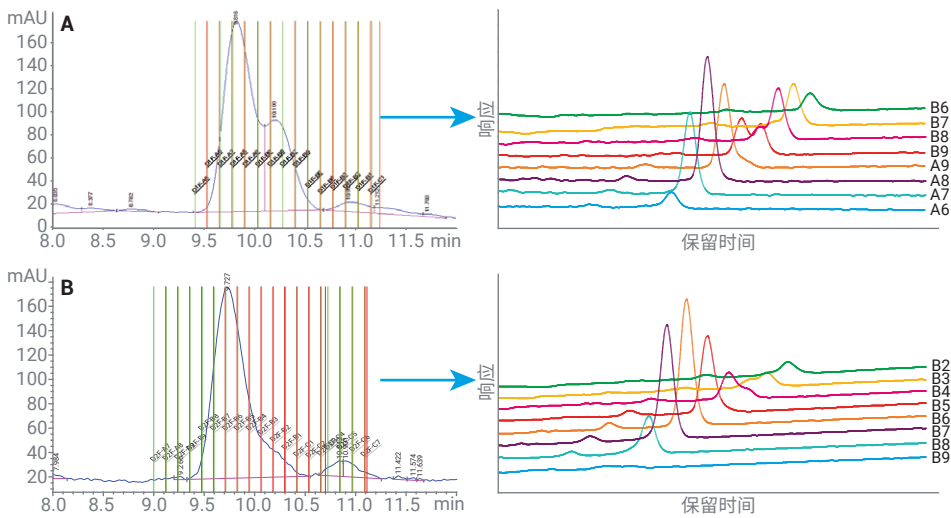


图 5. (A) Agilent PLRP-S 100 Å 上的多肽 1A 分析，显示了馏分重新分析的结果（右图）。(B) Agilent PLRP-S 100 Å 上的多肽 1B 分析，显示了馏分重新分析的结果（右图）

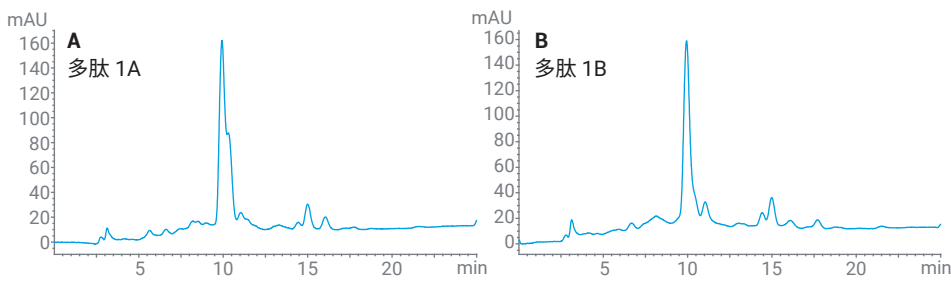


图 6. Agilent PLRP-S 300 Å 色谱柱上获得的多肽 1A (A) 和多肽 1B (B) 的制备色谱图

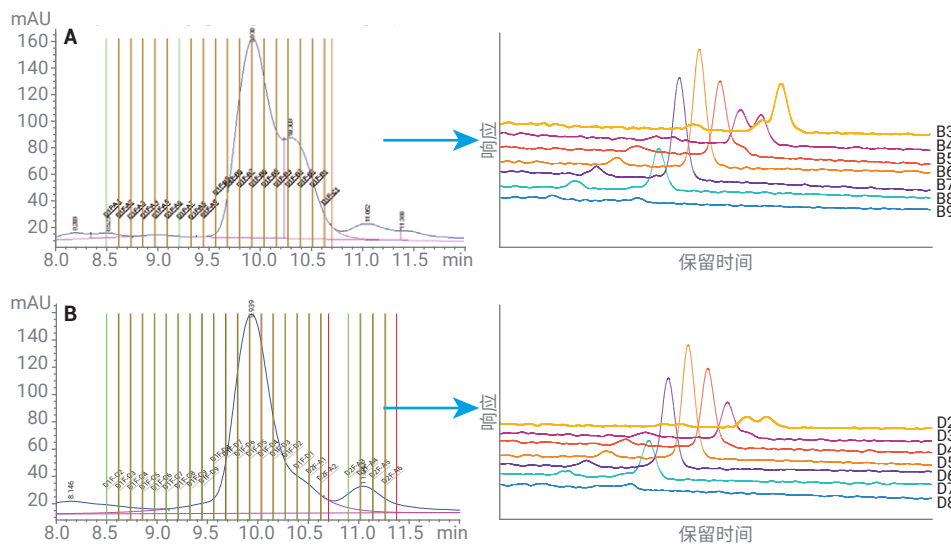


图 7. (A) Agilent PLRP-S 300 Å 上的多肽 1A 分析，显示了馏分重新分析的结果（右图）。(B) Agilent PLRP-S 300 Å 上的多肽 1B 分析，显示了馏分重新分析的结果（右图）

总体纯度水平根据各馏分的峰面积百分比进行计算（表 4）。

表 4. 由馏分组合得到的纯度和收率汇总

多肽 1A	峰面积% (纯度)	总体收率 (%)
PLRP-S 100 Å (馏分 A6-B9)	89.28	85.59
PLRP-S 300 Å (馏分 B8-B5)	90.26	73.02
多肽 1B	峰面积% (纯度)	总体收率 (%)
PLRP-S 100 Å (馏分 B8-B4)	97.81	92.69
PLRP-S 300 Å (馏分 D7-D3)	90.55	90.93

在 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱上对纯化的主要组分进行 LC/MS 分析，以确认鉴定结果。

合成多肽样品通常含有大量不同分子量的杂质、缺失氨基酸的序列、失水产物，有时因从固相载体上切割失败导致合成过程中的保护基团仍然可能连接在目标分子上。因此，用于合成肽的分析方法必须涵盖各种可能的杂质。来自纯度最高的馏分的主要组分获得了预期的 660.34 处的  $[M + 2H]^{2+}$ 、825.42 处的  $[M + 3H]^{3+}$ 、1099.89 处的  $[M + 4H]^{4+}$  和 1649.34 处的  $[M + 5H]^{5+}$ 。结果对应于分子量为 3297.7 Da 的 (GLP-1) 7-36 酰胺的全长氨基酸序列（图 8）。方法条件和仪器参数见表 2。

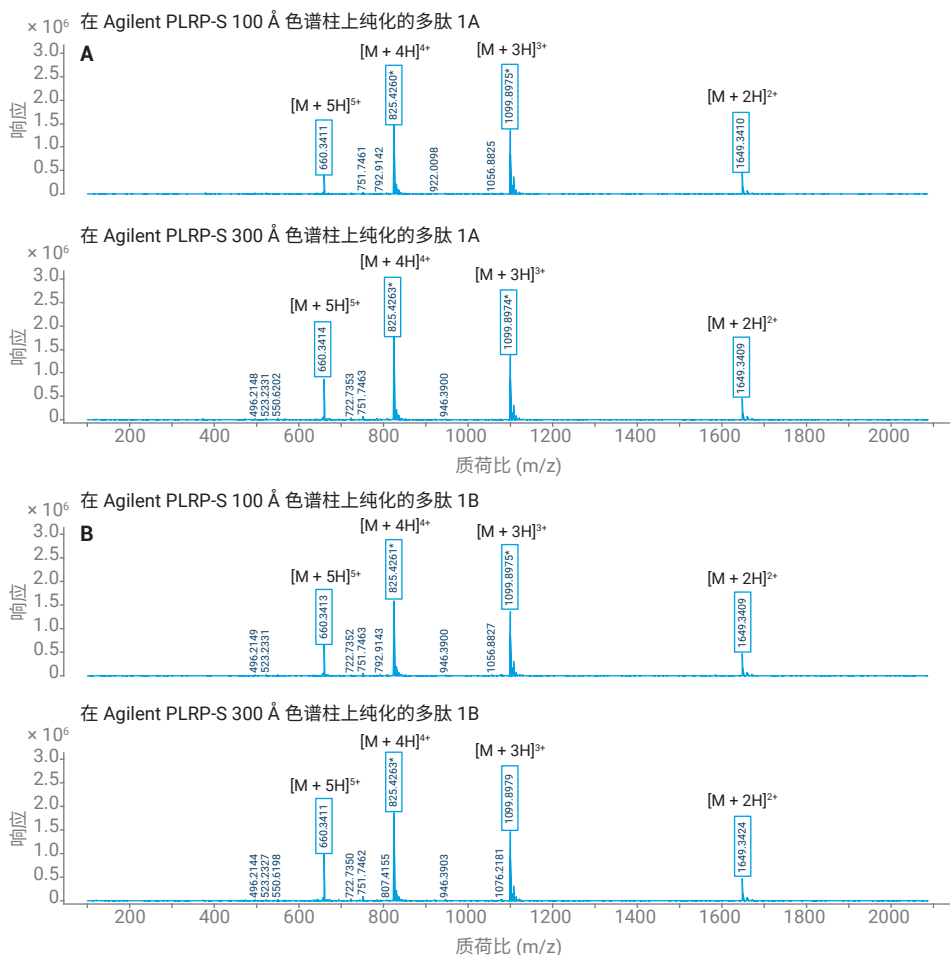


图 8. 利用 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱通过 LC/MS 分析纯化的多肽得到的质谱结果（方法条件见表 2）

## 结论

本应用简报表明，粗制肽纯度可能取决于合成条件（包括所选择的固相树脂）。然而，Agilent PLRP-S 色谱柱是合成肽的离子对反相纯化的理想选择。孔径较小的 100 Å 颗粒填料具有更高的可用表面积，可提供更高的纯化能力。对于更大的物质，更宽的孔径可提供更出色的传质和更窄的峰。

Agilent PLRP-S 制备型 HPLC 色谱柱搭配 Agilent 1290 Infinity II 制备型液相色谱系统可实现高效分离。最后，对于 LC/MS 方法，使用 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱并以甲酸作为流动相改性剂，成功确认了分子的鉴定结果。

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278（手机用户）

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

DE85357928

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2023  
2023 年 5 月 3 日，中国出版  
5994-6087ZHCN