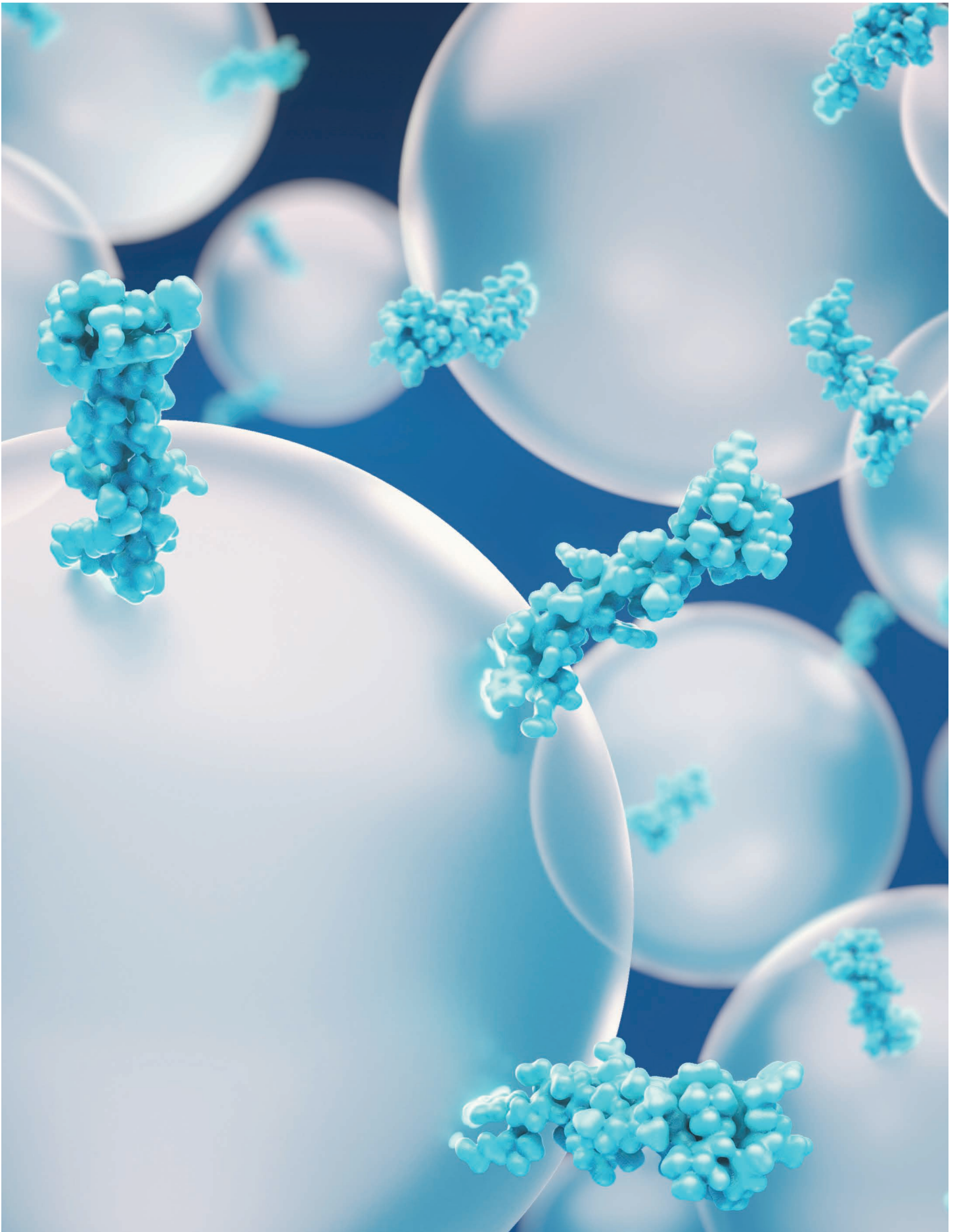


合成多肽的分析和纯化

消耗品工作流程订购指南





合成肽治疗药物

合成肽治疗药物具有较高的疗效、特异性和较低的毒性，因此在药物开发研究中的重要性日益凸显。肽在各种生物通路中起着关键作用，范围涉及从通路信号传导到酶调控和细胞通讯。合成肽设计用于复制体内天然存在的肽或蛋白质的功能，这些肽和蛋白质在多样化的生物学功能中发挥重要作用。它们还可以设计用于靶向新功能，并可以进一步在结构上进行修饰，来增加稳定性和生物利用度，从而提高整体治疗效果。

肽纯化技术

肽是序列长度为 2–50 个氨基酸的短氨基酸聚合物。许多合成肽是用固相肽合成 (SPPS) 方法生产的，该方法是将氨基酸逐步添加到锚定在聚合物固相载体树脂上的肽链中。一个氨基酸上的羧基与另一个氨基酸的氨基发生反应形成肽键。通过 SPPS 生成合成肽的过程包括多个去保护、活化和偶联步骤，然后从固相载体中切割分离出最终序列。最终粗产物含有可能影响药物安全性和有效性的杂质，因此必须通过液相色谱进行分离、表征和监测。

反相高效液相色谱 (HPLC) 结合 UV 检测是已有的分离方法。三氟乙酸 (TFA) 是该分析过程中常用的流动相添加剂和离子对试剂，可形成低 pH 环境，使氨基酸序列的羧基质子化，减少次级相互作用，从而达到更好的色谱分离效果和峰形，这在扩展制备型纯化分析方法的规模时至关重要。TFA 还可以与肽段序列中带正电荷的官能团形成离子对，增加肽与非极性反相色谱填料之间的整体疏水相互作用。然而，对于通过质谱 (MS) 检测确认和表征纯化组分，TFA 会抑制离子化效率并引起信号抑制。采用甲酸的 LC/MS 替代方法是表征最终产物的理想之选。

用于肽纯化的安捷伦反相色谱柱

安捷伦提供多种反相色谱柱和填料，旨在简化您的合成肽分析工作流程。Agilent PLRP-S 反相色谱柱含有刚性聚苯乙烯/二乙烯基苯 (PS/DVB) 颗粒填料，具有多种孔径和填料粒径可供选择，是用于分析肽分离的理想颗粒填料，可轻松扩展至制备型纯化。聚合物颗粒本身具有疏水性，不含传统硅胶基填料载体中发现的表面硅醇和痕量金属，可与肽段序列中带电荷的官能团发生不必要的次级相互作用，导致谱带展宽和峰拖尾。

对于需要 MS 表征的确认分析，采用高分离度 2.7 μm Agilent Poroshell 填料载体的 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱和 AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱非常适合 LC/MS 分离，其中甲酸替代 TFA 用作流动相添加剂。AdvanceBio 肽谱分析色谱柱采用 C18 化学键合相，专门设计用于确保肽分离的适用性和稳定性。对于更具挑战性的肽分离，其中与表面硅醇的次级相互作用导致峰展宽和拖尾，AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱填料采用另一种 C18 选择性设计，通过加入带电的表面修饰，有助于减少不必要的次级相互作用，以改善峰形和分离度。

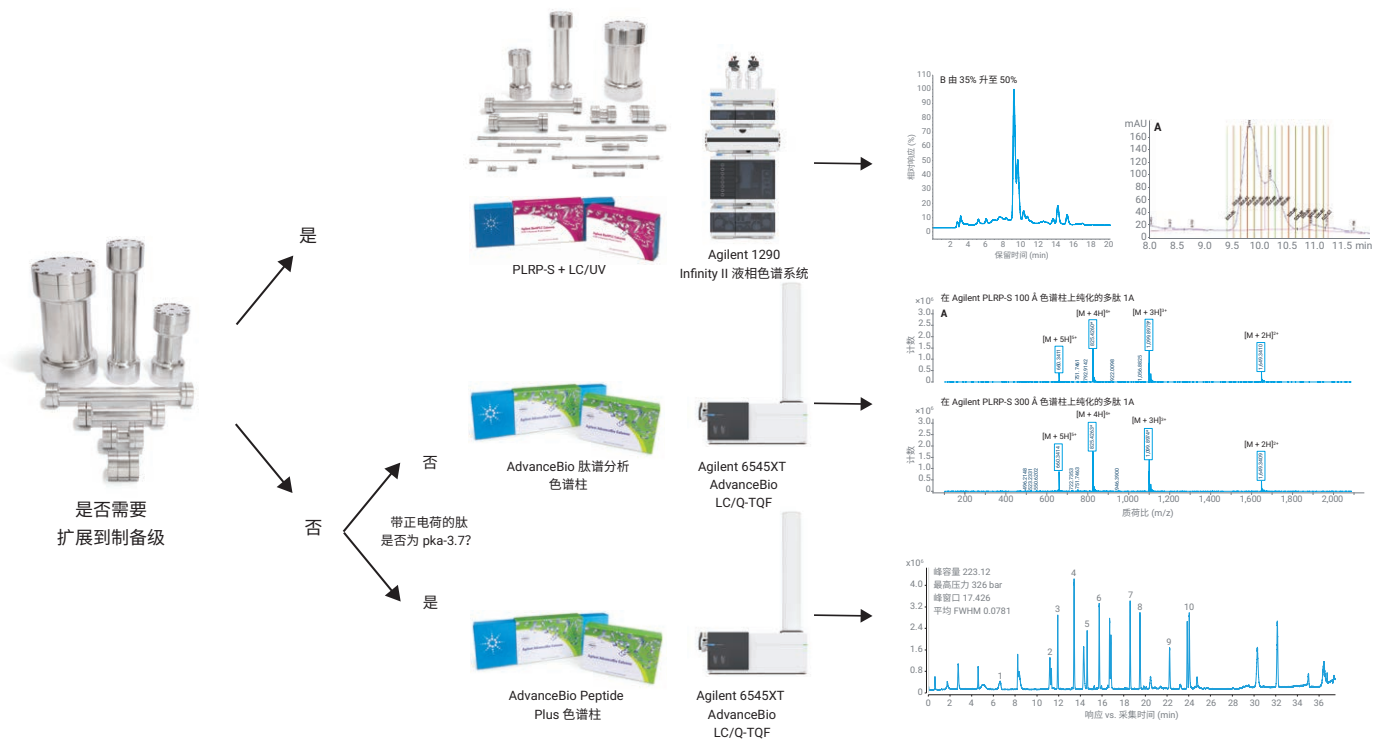


图 1. 合成肽的分析工作流程选择取决于分离的规模，以及是否需要用 MS 检测表征样品

实现理想色谱分离和检测的技巧



样品前处理

- 高性能和高品质树脂^[1]的 Agilent StratoSpheres 生产线涵盖了多种聚合物载体，用于通过固相载体肽合成途径来开发和生产合成肽
- StratoSpheres SPPS 树脂与 Boc 和 Fmoc 化学法兼容，可为更高纯度的肽提供卓越的合成性能
- 固相载体树脂可以简化工艺相关杂质和副产物的纯化，从而降低粗品的复杂性

色谱分离 — UV 检测

- 在工作流程中选择 UV 检测允许使用 TFA 作为流动相添加剂。当 pKa 约为 0.23 时，TFA 将降低 pH 值，使肽上的羧基官能团和硅胶表面残留的硅醇基质子化，以减少会导致峰展宽和拖尾的非必要次级相互作用
- PLRP-S 色谱柱组合便于灵活选择填料粒径和孔径。根据合成肽的序列长度评估不同的孔径（100Å 或 300Å）
- 采用范围为 5%–95% MPB 的初始通用筛选梯度优化分析方法^[2]，以了解目标产物的洗脱曲线以及粗品中仍存在的杂质
- 开发更优的聚焦梯度可以缩短总体分析时间，并优化全长目标产物与密切相关的杂质之间的分离度
- 一旦在分析规模下开发出优化的分离方法，您的方法就可以轻松地扩展用于更大内径的色谱柱，实现更大样品量的纯化
- 在规模扩展至制备型前，根据分析色谱柱尺寸优化梯度至关重要，因为分离度将决定可在制备规模下纯化的纯度和样品量

色谱分离 — MS 检测

- 在工作流程中选择 MS 检测会限制使用 TFA 作为流动相添加剂的能力。TFA 将影响样品的离子化效率，并导致信号抑制，从而抑制您检测和表征样品中潜在低丰度杂质的能力。甲酸作为 MS 检测中的酸性改性剂更具兼容性，但与 TFA 相比，它具有更高的 pKa（约 3.7），可影响样品与固定相的相互作用方式
- 采用 2.7 μm Poroshell 填料载体的 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱和 AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱^[3-4] 支持高分离度分离
- 采用范围为 5%–95% MPB 的初始通用筛选梯度优化分析方法，以了解目标产物的洗脱曲线以及粗品中仍存在的杂质
- 如果肽在其序列中具有高度带正电荷的官能团，并在 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱上的分离显示出峰展宽和拖尾，可能是由于样品与表面残留硅醇基的相互作用所致。评估 AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱
- 确定色谱柱填料后，开发更优的聚焦梯度可以缩短总体分析时间，并优化全长目标产物与密切相关的杂质之间的分离度

质谱

- 请勿在 MS 检测中使用 TFA 或含磷酸盐的缓冲液！
- 在目标保留时间之外，将液相色谱流路切换到废液，特别是对于在方法结束时进行高含量有机溶剂冲洗的过程，如果可能，请在空体积洗脱时这样操作
- 使用 HPLC 级或更高级别的溶剂
- 建立质谱仪离子源的定期清洁程序

样品方法和每种方法对应的色谱图

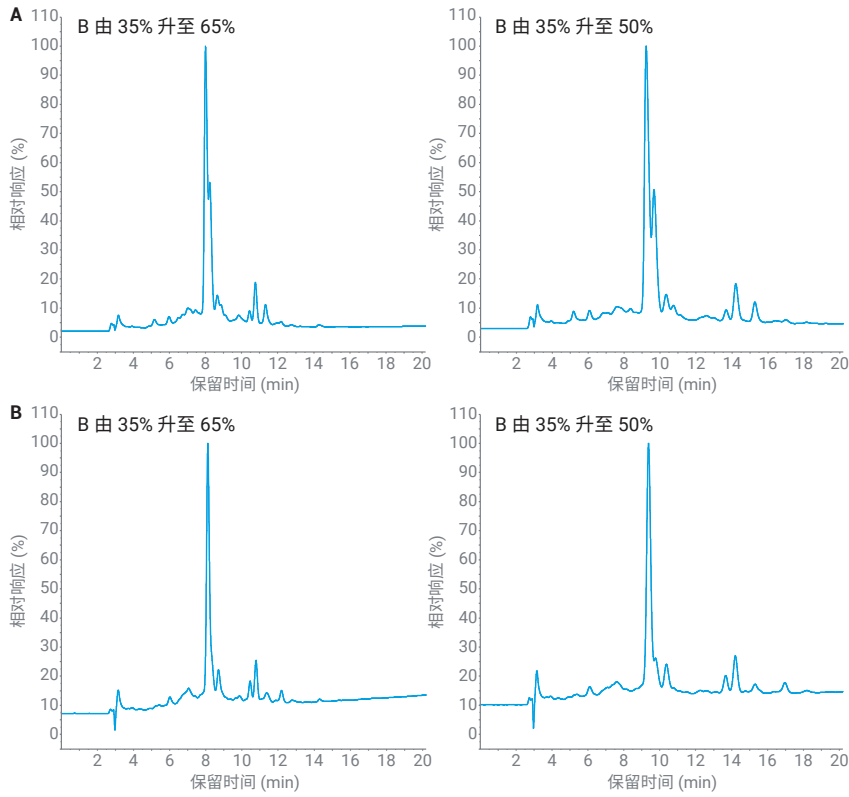


图 2.^[2] (A) Agilent PLRP-S 300 Å 色谱柱上针对多肽 1A 的梯度优化。
(B) Agilent PLRP-S 300 Å 色谱柱上针对多肽 1B 的梯度优化

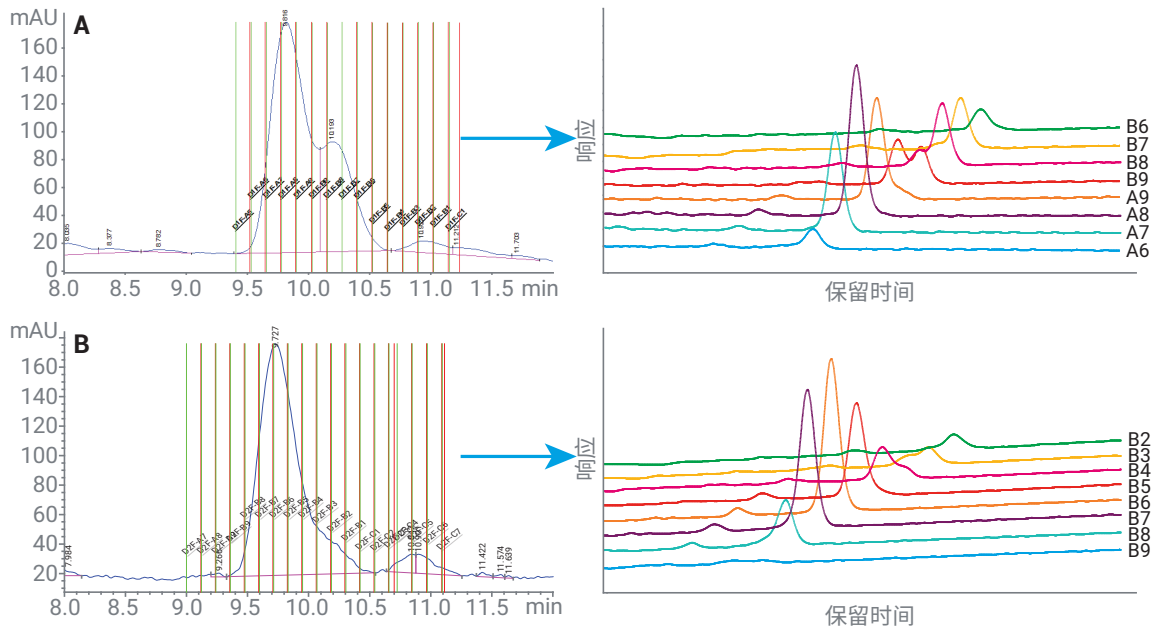


图 3.^[2] (A) Agilent PLRP-S 100 Å 上的多肽 1A 分析，显示了馏分重新分析的结果（右图）。
(B) Agilent PLRP-S 100 Å 上的多肽 1B 分析，显示了馏分重新分析的结果（右图）

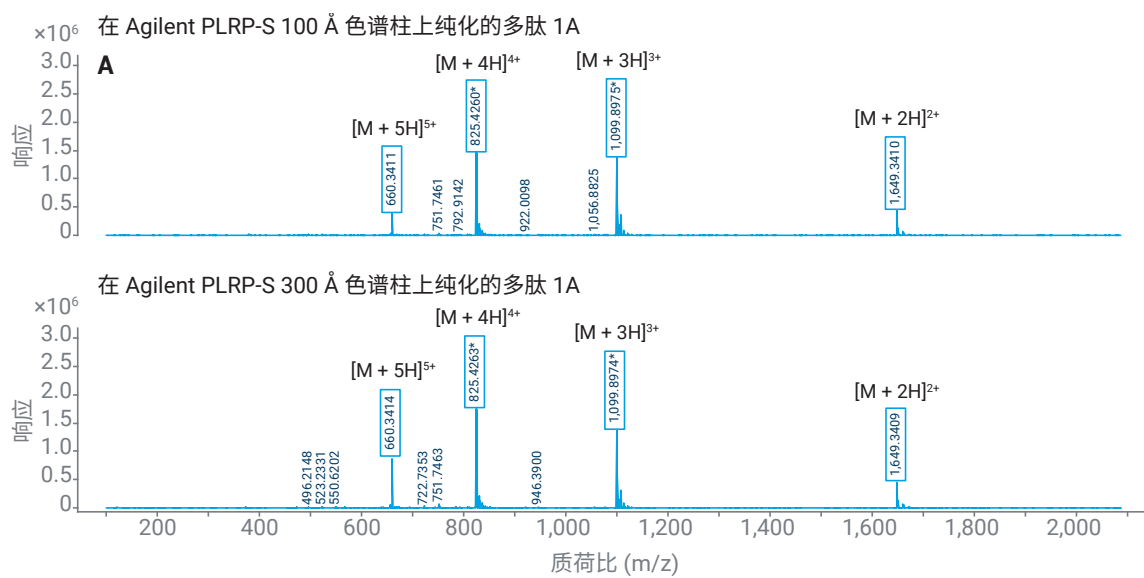


图 4. 利用 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱通过 LC/MS 分析纯化的多肽得到的质谱结果 (方法条件见参考文献 2)

参考文献

1. 使用 Agilent StratoSpheres 合成载体树脂进行生产规模的肽合成, [5991-1485ZHCN](#)
2. 使用 PLRP-S 色谱柱优化合成肽的分析和纯化, [5994-6087ZHCN](#)
3. 合成肽及其杂质的分析, [5994-2760ZHCN](#)
4. 用于肽谱表征的 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 2.7 μm 色谱柱, [5994-3508ZHCN](#)

轻松挑选和订购信息



如需订购下表中列出的商品，请通过单击标题中的“我的列表”链接将商品添加至您的“收藏产品”列表中。您的列表便会保留在“收藏产品”下，供您将来订购时使用。如果这是您首次使用“收藏产品”，系统会要求您输入电子邮件地址进行账户验证。如果您已有安捷伦账户，可以直接登录。如果您尚未注册安捷伦账户，则需要注册账户。该功能仅在启用了电子商务功能的地区有效。

您也可以单击货号超链接从安捷伦在线商城订购，或通过客户服务中心或经销商渠道订购单个产品。

我的列表 1: 用于肽合成的固定相担体

描述	货号
固相肽合成	
AmphiSpheres 40RAM, 0.4 mmol/g, 75–150 µm, 100 g	PL3867-4764
PL-Rink 树脂 (1% DVB) 0.3 mmol/g 75–150 µm, 100 g	PL1467-4749

我的列表 2: 用于肽纯化的 HPLC 色谱柱

描述	货号
PLRP-S 色谱柱	
PLRP-S 100 Å, 8 µm, 2.1 × 150 mm	PL1512-3800
PLRP-S 100 Å, 8 µm, 2.1 × 250 mm	PL1512-5800
PLRP-S 100 Å, 8 µm, 25 × 150 mm	PL1212-3800
PLRP-S 300 Å, 8 µm, 2.1 × 150 mm	PL1912-3801
PLRP-S 300 Å, 8 µm, 2.1 × 250 mm	PL1912-5801
PLRP-S 300 Å, 8 µm, 4.6 × 150 mm	PL1512-3801
PLRP-S 300 Å, 8 µm, 4.6 × 250 mm	PL1512-5801
PLRP-S 300 Å, 8 µm, 25 × 150 mm	PL1212-3801
PLRP-S 300 Å, 8 µm, 50 × 150 mm	PL1712-3801
AdvanceBio 肽谱分析色谱柱	
AdvanceBio 肽谱分析 120 Å, 2.7 µm, 2.1 × 100 mm	655750-902
AdvanceBio 肽谱分析 120 Å, 2.7 µm, 2.1 × 150 mm	653750-902
AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱	
AdvanceBio Peptide Plus 100 Å, 2.7 µm, 2.1 × 150 mm	695775-949

我的列表 3: 用于合成肽 HPLC 纯化的备件和溶剂

描述	货号
超低扩散工具包[†]	
用于 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统的超低扩散管线工具包	5067-5963
用于 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统的超低扩散管线工具包	5004-0007
样品容器备件	
A-Line 螺口样品瓶, 2 mL, 12 × 32 mm (12 mm 瓶盖), 棕色, 带书写签, 100/包	5190-9590
螺口盖, 12 mm, 固定, 蓝色, PTFE/白色硅橡胶隔垫, 100/包	5190-7021
样品瓶内插管, 250 µL, 5.6 × 30 mm, 去活玻璃, 带聚合物支脚, 100/包	5181-8872
InfinityLab 96 孔板/0.5 mL, 30/包	5043-9310
InfinityLab 多孔板硅胶密封垫, 用于 96 孔板, 50/包	5042-1389
溶剂和添加剂	
InfinityLab LC/MS 级超纯水, 1 L	5191-4498
InfinityLab LC/MS 级超纯甲醇, 1 L	5191-4497
甲酸, 纯度 99.5%, 5 mL	G2453-85060
溶剂过滤备件[*]	
InfinityLab 溶剂过滤组件	5191-6776
InfinityLab 溶剂过滤烧瓶, 玻璃, 2 L	5191-6781
尼龙滤膜, 47 mm, 孔径 0.2 µm, 100/包	5191-4341
再生纤维素滤膜, 47 mm, 孔径 0.2 µm, 100/包	5191-4340
溶剂瓶玻璃过滤器, 溶剂入口, 20 µm	5041-2168
溶剂处理备件	
InfinityLab Stay Safe 溶剂瓶安全盖启动工具包	5043-1222
InfinityLab 溶剂瓶, 透明, 1 L	9301-6524
InfinityLab 溶剂瓶, 棕色, 1 L	9301-6526
溶剂瓶, 透明, 2 L	9301-6342
溶剂瓶, 棕色, 2 L	9301-6341
InfinityLab Stay Safe 吹扫瓶	5043-1339
InfinityLab 废液瓶, GL45, 6 L, 带 Stay Safe 安全盖 (不包括活性炭过滤器 5043-1193)	5043-1221
带时间标签的 InfinityLab 活性炭过滤器, 58 g (适用于 5043-1221)	5043-1193

[†] 如果使用 1290 Infinity II 生物液相色谱系统, 建议使用用于 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统的超低扩散管线工具包

^{*} 使用本表中未列出的溶剂时, 请在分析前使用 InfinityLab 溶剂过滤组件

Agilent CrossLab 服务

CrossLab 代表了安捷伦集服务和消耗品于一体的独特解决方案，以支持客户获得工作流程的成功以及更高的生产力和运行效率等重要成果。安捷伦通过 CrossLab 在每一次互动中为您提供深刻见解，助您实现业务目标。CrossLab 提供方法优化、灵活的服务计划以及针对各种技能水平的培训。我们还有许多其他产品和服务来帮助您管理仪器和实验室，确保实现理想性能。

如需了解关于 Agilent CrossLab 的更多信息，以及洞察敏锐、成就超群的示例，请访问 www.agilent.com/crosslab



获取更多安捷伦消耗品工作流程订购指南：

www.agilent.com/chem/ordering-guide

了解更多信息：

www.agilent.com/chem/oligonucleotide-analysis

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

安捷伦客户服务中心：

免费专线：**800-820-3278**

400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

DE58592975

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8月31日，中国出版
5994-6704ZH-CN

