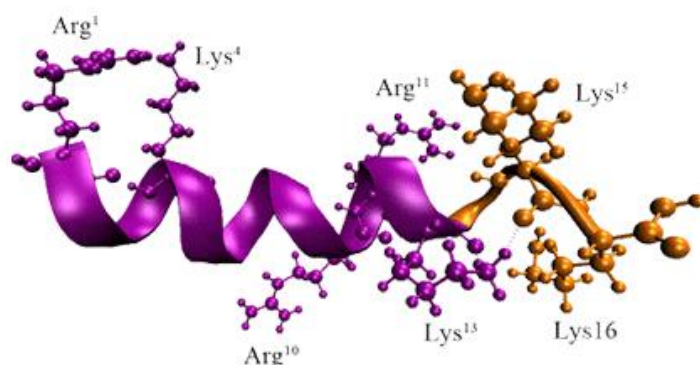


# 慧德易电子期刊

H&E Electronic Journal

第 151 期

TSKgel 尺寸排阻色谱柱在多肽分离分析中的应用



2022 年 6 月

# 第 151 期 TSKgel 尺寸排阻色谱柱在多肽分离分析中的应用

## 一、蛋白与多肽

蛋白质与多肽具有相同的氨基酸骨架

→ 一般来讲，分子量超过 10,000 的称为蛋白，小于 10,000 的称为多肽。但其实即使这种分类也还是模糊的。

蛋白质因为折叠具有特殊的空间构造。酸性或碱性溶液可以破坏这样的构造而使蛋白失活

→ 使用温和以维持蛋白活性的检测条件非常必要

多肽分子尺寸越小，其获得特殊空间构造越困难

→ 比起蛋白分离，多肽分离条件的选择自由度大（可使用有机溶剂）

→ 环状多肽还是有些特殊立体构造的（特殊多肽的个别应用）

多肽是 $\alpha$ -氨基酸的 $\alpha$ 位氨基和羧酸脱水缩合而成的产物

→ 在末端有未反应的氨基、羧基存在

→ 所以有 N 末端、C 末端的叫法

→ 在记述氨基酸序列时，N 末端在左侧、C 末端在右侧（因此，Lys-Arg 和 Arg-Lys 是不同的多肽）

## 二、多肽医药品与其他医药品的比较

	低分子化合物	经典多肽	特殊环状多肽	抗体**
分子量	1,000 以下	500-6,000	600-2,500	150,000 以上
活性	普通~高	高~极高	极高	极高
特异性	低	高	极高	极高
PPI*阻碍	困难但可能	可能	可能	可能
血中稳定性	低~普通	极低~低	普通~高	极高
口服	可以	几乎不可以	可以***	不可以
毒性·副作用	多	少	少	少
细胞内靶点	可	几乎不可	可	不可
生产成本	低	低~普通	低~普通	高

\* 蛋白与蛋白间的相互作用

\*\* 完整抗体，不含 Fab、scFv 等

\*\*\* 取决于分子量或环状多肽 Linker 的大小

## 三、多肽的色谱分离条件

1. 多肽的分离常使用中性-酸性流动相

2. 碱性条件下，可能会发生：

Asn/天冬氨酰（有时候 Gln/谷氨酰胺也是）脱胺

Asp/天冬氨酸 → isoAsp

## S-S 交换反应

3. 下列色谱分离模式更多使用中性--酸性流动相

反相色谱 (RPC)

离子交换色谱 (IEC): 尤其是阳离子交换色谱 (CIEC)

尺寸排阻色谱 (SEC)

正相色谱 (NPC·HILIC)

亲和色谱 (AFC: 尤其是金属螯合亲和色谱 (IMAC))

## 四、TSKgel 尺寸排阻色谱柱在多肽分离分析中的应用

尺寸排阻色谱 (SEC): 利用色谱填料的细孔径、基于分析物尺寸大小达成分离的模式。

※ 选择排阻界限在 10000 以下的 SEC 色谱柱

TSKgel UP-SW2000, SuperSW2000, G2000SWXL, TSKgel G2500PWXL, etc.

※ 优势

色谱条件单纯, 利于品质管理的使用。

根据分子量 (尺寸) 大小可以预判洗脱位置。

※ 缺点

样品可进样量相对较小。

分析物可能会与固定相 (色谱填料) 发生疏水相互作用 (→ 添加有机溶剂)。

※ 流动相推荐

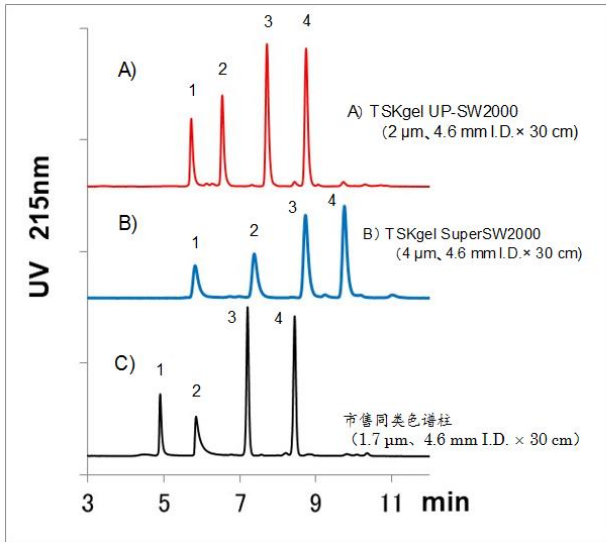
流动相: 0.1 % TFA + 45% 乙腈 (0.1 % TFA 非必须)。

同种流动相, 含有蛋白组分时蛋白的空间构造被破坏, 分子呈伸展状态 (变性), 这时候进行分子量表征时, 使用 100 % 水溶液条件下标准蛋白校正曲线不合适。

含 0.1 % TFA 的流动相分析疏水性高的多肽时, 如果洗脱较迟, 可以推荐使用醋酸溶液等。

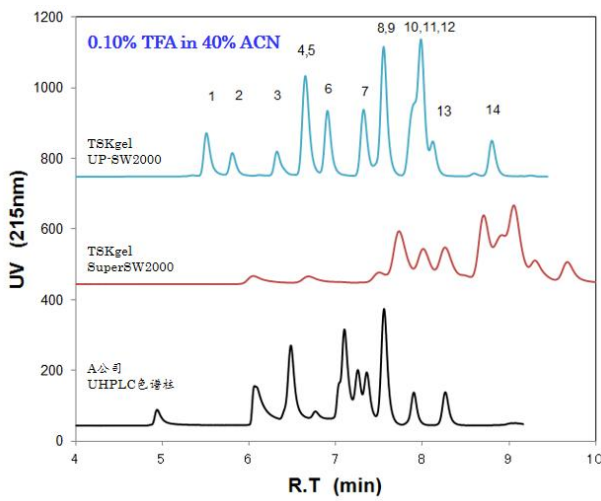
色谱柱	粒径	多肽/蛋白分子量排阻范围	特点
TSKgel UP-SW2000	2 μm	100 - 100000*	分辨率最高、排阻范围宽
TSKgel G2000SWXL	5 μm	100 - 100000*	分辨率高、排阻范围宽
TSKgel SuperSW2000	4 μm	100 - 100000*	分辨率高、排阻范围宽
TSKgel G2500PWXL	7 μm	100 - 5000	适用于低分子量多肽、耐碱
TSKgel G3000PWXL	7 μm	1,000 - 50000	适用于高分子量多肽、耐碱

参考谱图



色谱柱: A) TSKgel UP-SW2000  
 B) TSKgel SuperSW2000  
 C) 市售UHPLC用SEC色谱柱  
 流动相: 0.10% TFA in 40 % ACN  
 流速: 0.35 mL/min  
 检测: UV (215 nm); 使用微量检测池  
 温度: 25°C  
 进样量: 10 μL  
 样品浓度: 0.05 g/L  
 样品: 1. Myoglobin (MW 17,800)  
 2. Insulin (MW 5,808)  
 3. LH-RH (MW 1,182)  
 4. TRH (MW 362)

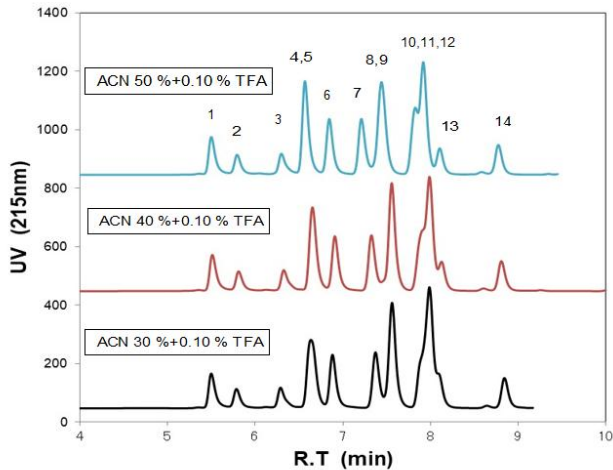
可以看出市售同类1.7 μm 的UHPLC色谱柱与多肽样品间还是有一定疏水相互作用而导致色谱峰拖尾的!



色谱柱: TSKgel UP-SW2000  
 TSKgel SuperSW2000  
 市售UHPLC用SEC色谱柱  
 色谱柱尺寸: 4.6 mm I.D. x 30 cm  
 流动相: 0.10% TFA in 40 % ACN  
 流速: 0.35 mL/min  
 温度: 25°C  
 检测: UV (215 nm)  
 样品: 0.04~0.06 g/L, 10 μL  
 样品: 1. Myoglobin (MW 17,800)  
 2. Ribonuclease A (MW 13,700)  
 3. Aprotinin (MW 6,512)  
 4. Insulin (MW 5,808)  
 5. β-Endorphin (MW 3,465)  
 6. Glucagon (MW 3,483)  
 7. Big Gastrin human (MW 3,849)  
 8. Substance P (MW 1,348)  
 9. α-endorphin (MW 1,746)  
 10. Angiotensin III (MW 931)  
 11. Bombesin (MW 1,620)  
 12. LH-RH (MW 1,182)  
 13. Gly-Gly-Tyr-Ag (MW 451)  
 14. Glycine (MW 75)

**TSKgel UP-SW2000的分离带(峰容)更宽、回收率更高!**

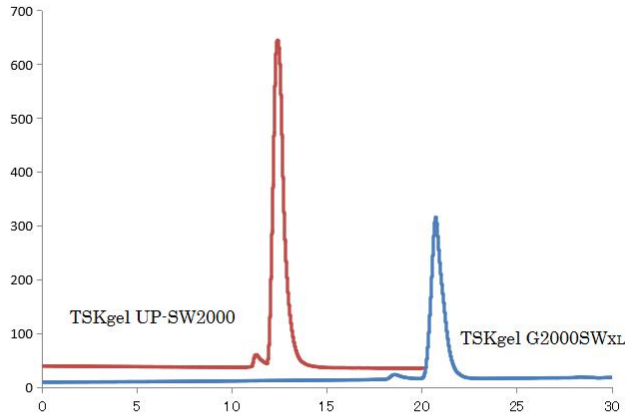
A公司色谱柱的分离带比较狭窄; 推测色谱柱对多肽亦有吸附。



色谱柱: TSKgel UP-SW2000  
 色谱柱尺寸: 4.6 mm I.D. x 30 cm  
 流动相: 30, 40, 50 % CAN + 0.10% TFA  
 流速: 0.35 mL/min  
 温度: 25°C  
 检测: UV (215 nm)  
 样品: 0.05 g/L, 10 μL  
 样品: 1. Myoglobin (MW 17,800)  
 2. Ribonuclease A (MW 13,700)  
 3. Aprotinin (MW 6,512)  
 4. Insulin (MW 5,808)  
 5. β-Endorphin (MW 3,465)  
 6. Glucagon (MW 3,483)  
 7. Big Gastrin human (MW 3,849)  
 8. Substance P (MW 1,348)  
 9. α-endorphin (MW 1,746)  
 10. Angiotensin III (MW 931)  
 11. Bombesin (MW 1,620)  
 12. LH-RH (MW 1,182)  
 13. Gly-Gly-Tyr-Ag (MW 451)  
 14. Glycine (MW 75)

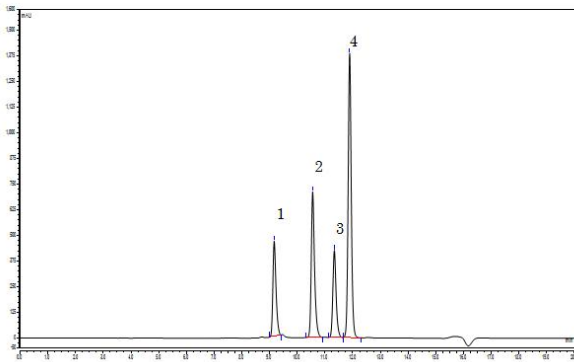
含0.1 % TFA的流动相中, 添加40-50 %的乙腈, 可以获得更好的分离!  
 (磷酸缓冲体系中, 也可以推荐20-40 %的乙腈)

## 重组人胰岛素的分离（药典方法）



**Conditions**  
 Column: TSKgel UP-SW 2000 (red line)  
 TSKgel G2000SWXL (blue line)  
 Eluent: 0.1 % L-arginine / acetonitrile / acetic acid =13 / 4 / 3  
 Flow rate: 0.2 mL/min (red line)  
 0.5mL/min (blue line)  
 Detection: UV (276 nm)  
 Sample: recombinant insulin

## 胸腺肽的UP-SW2000分析（优化方法）



**Conditions**  
 Sample info: 1. Ribonuclease A(Mw=13700)(0.25mg/mL)  
 2. Human Insulin (Mw=5808) (0.25mg/mL)  
 3. Thymosin α1(Mw=3108) (0.25mg/mL)  
 4. Somatostatin(Mw=1638) (0.25mg/mL)  
 Elution solution(NMPA): TFA:ACN:H<sub>2</sub>O=0.07:40:60(v:v:v)  
 Flow rate: 0.23 mL/min  
 Column temperate: room temperate  
 Injection volume: 7 μL; Detector: UV@214nm

Injection No.	RS(1&2)	RS(2&3)	RS(3&4)
1	6.97	3.85	2.74
2	6.93	3.83	2.74
3	6.95	3.84	2.74
4	6.93	3.82	2.73
Average	6.95	3.84	2.74
RSD	0.24%	0.29%	0.16%

Injection No.	1# RT (min)	1# TP	2#RT (min)	2#TP	3#RT (min)	3#TP	4#RT (min)	4#TP
1	9.165	34208	10.553	43969	11.335	48419	11.887	57649
2	9.167	33769	10.555	43515	11.337	47965	11.890	57680
3	9.167	33978	10.555	43743	11.337	48166	11.890	57812
4	9.167	33955	10.555	43392	11.337	47899	11.888	57350
Average	9.167	33978	10.555	43655	11.337	48112	11.889	57623
RSD	0.009%	0.46%	0.008%	0.51%	0.008%	0.42%	0.011%	0.29%

\* 如果需要更详细的资料，请联系我们。



北京慧德易科技有限责任公司

咨询电话：010-59812370/1/2/3

公司官网：www.prep-hplc.com

邮箱：sales@prep-hplc.com

微信公众号：北京慧德易