

讲 座

高效液相色谱在生物医药研究中的应用(II)

肽化学研究中的高效液相色谱

唐 易 全

(中国科学院上海药物研究所, 200031)

七十年代中期以来, 色谱学家逐步建立起包括反相 HPLC 的一整套色谱方法, 并运用这些方法在肽的分离纯化, 制备, 定性定量分析, 分子量测定, 肽结构与其色谱保留值关系等方面进行了深入的研究。八十年代以来, HPLC 在肽化学研究领域得到了广泛应用, 取得突破性进展。主要表现在, 人们利用 HPLC 并与其它方法相结合, 发现了许多新的天然活性肽, 特别是神经肽。如作者自 83~88 年不完全统计, 已确定一级结构的新活性肽, 平均每年不少于 40 个。如今, 不用 HPLC 而发现新天然肽的报道已很少见。这许多新肽的发现, 为紧随而来的关于这些肽的前体蛋白的生物学研究, 肽的受体研究, 肽的药理和病理以及结构功能研究, 肽的工业生产和基因工程等方面起了带头作用。而在这些继之而起的工作中, 也还得使用 HPLC 这一技术。

分离纯化肽的最常用方法是反相 HPLC。这是因为: 1. 此方法以水为基本组成部分, 这与肽的生物学性质很相宜。虽然流动相中的酸和有机溶剂, 以及固定相均可能使肽的天然构象发生变化, 但当这些因素除去后, 肽的构象一般能恢复原状。因此在反相 HPLC 中, 肽的活性回收率是很高的, 一般在 80% 以上(1), 2. 与其它分离方法比较, 反相 HPLC 的分辨力更强, 适用范围更广泛。另外, 离子交换 HPLC 也是分离纯化肽的有效方法。

目前, 生物大、中分子的 HPLC 研究, 取得的经验较为成熟, 存在麻烦较少的, 或许要算肽分子的 HPLC 研究。

§ 2-1 色谱作用机理

在反相与离子交换 HPLC 中, 肽分子的某些疏水部分、亲水部分及带电荷基团, 与色谱固定相表面发生多位点吸附作用。其作用方式主要有疏水

作用, 氢键和静电吸引等。改变流动相中的离子添加剂, 有机溶剂的类型和/或浓度以及 pH 值等, 都会影响上述吸附位点, 从而引起肽分子色谱保留值的变化(2)。本文主要叙述影响肽色谱保留性质的诸因素。

在反相 HPLC 中, 肽的保留时间可用氨基酸及其端基的“保留常数”的加和值来预测。所谓保留常数, 是一类表示氨基酸疏水性质的经验常数。它们是在一定色谱条件下, 若干肽的保留时间, 与组成肽的氨基酸和端基对肽保留时间的贡献之间进行统计处理后得到的。肽分子中各氨基酸保留常数加和值越大, 该肽的保留时间就越长。对小于二十个氨基酸残基的肽, 预测值与实验值之间有良好的线性关系。如大白鼠神经垂体中 25 个神经肽保留时间的计算值与实测值之间的相关系数为 0.998, (三氟醋酸系统) 和 0.994 (七氟丁酸系统) (3)。上述关系对大肽不适用。因大肽的立体位阻限制了氨基酸与固定相表面的接触。表 2-1 给出常用 HPLC 系统中各氨基酸及端基的保留常数。

§ 2-2 反相高效液相色谱(4-7)

固定相。在肽的分离中, 常用的固定相为十八烷基、八烷基、苯烷基和氰基键合相硅胶。硅胶上的键合相为单层时的分离效果比多层聚合状的好, 未参加键合反应的残余硅羟基被掩蔽后有利于肽的洗脱, 但又可能降低分离选择性。由于肽分子比一般有机化合物分子大, 分离肽的色谱填料的孔径必需在 10nm 以上, 才能保证有合适的回收率和分离度。分子量很大的肽, 如三十个残基以上者, 用孔径 30nm 的填料则更好。色谱柱的长度为 15cm 左右, 内径 5mm 上下即可。更长的柱子, 分离效果未必更好。当需要在微克量以下分离肽时, 可用长如 1—3cm, 内径同上的短柱或用直径 1—2mm 的

表2-1 氨基酸和端基的保留常数

色氨酸	Trp	16.3	17.8
苯丙氨酸	Phe	19.2	14.7
亮氨酸	Leu	20.0	15.0
异亮氨酸	Ile	6.6	11.0
酪氨酸	Tyr	5.9	3.8
缬氨酸	Val	3.5	2.1
胱氨酸	Cys-Cys	—	—
甲硫氨酸	Met	5.6	4.1
脯氨酸	Pro	5.1	5.6
半胱氨酸	Cys	-9.2	-14.3
精氨酸	Arg	-3.6	3.2
丙氨酸	Ala	7.3	3.9
赖氨酸	Lys	-3.7	-2.5
甘氨酸	Gly	-1.2	-2.3
门冬氨酸	Asp	-2.9	-2.8
谷氨酸	Glu	-7.1	-7.5
组氨酸	His	-2.1	2.0
苏氨酸	Thr	0.8	1.1
丝氨酸	Ser	-4.1	-3.5
门冬酰胺	Asn	-5.7	-2.8
谷酰胺	Gln	-0.3	1.8
末端氨基	NH ₂ -	4.2	4.2
末端羧基	-COOH	2.4	2.4
酰胺基	CONH ₂ -	10.3	8.1
N-乙酰基	CH ₃ CO-	10.2	7.0

主要 色谱 条件	C ₁₈ 柱	
	三氟醋酸 -乙腈 pH 2	七氟丁酸 -乙腈 pH 2

细内径柱。填料粒径为5—10 μ m的高效型。市售常用的色谱柱有： μ Bondapak C₁₈ (CN, Phenyl), Ultrasphere ODS, Hypersil ODS, Nucleosil C₁₈, Lichrosorb SI-100C₁₈等等。由于现代肽的生化研究大都微量化，所以用上述分析型色谱柱即可应付一般需要。当然，配备一些半制备型色谱柱(10mm左右内径，长度基本同上)则更好。

流动相。流动相仅为有机溶剂-水的反相色谱可称为标准(normal)反相色谱。这在肽的分离中不常用。常用方法为以下二类：

(一)缓冲液反相色谱。即在标准反相色谱流动相中加入缓冲液，以控制离子化合物电离度的色谱。缓冲值的pH为5左右，如醋酸铵-醋酸(pH 4.0)，磷酸二氢钠-磷酸(pH 4.5)，吡啶-醋酸(pH 4.0)等。这样的酸度对肽的稳定是有利的，但有时洗脱能力较差。顺便说一下，人们在色谱实践中所指的“缓冲液”，与教科书中严格意义上的缓冲液

是不尽相同的。

(二)离子对反相色谱。通常将流动相pH调配在2~3范围，此时肽分子的酸性基团处于“电离抑制”状态，而带正电荷的碱性基团则与流动相中加入的负电离子(可称为反离子)形成所谓“离子对”化合物，从而实现色谱分离。同时，在上述pH范围内，一般的肽都极易溶解，便于肽的洗脱。目前，这一离子对色谱方法的使用很广泛，常见的反离子试剂有：三氟醋酸，七氟丁酸，甲酸、醋酸和磷酸，这几种酸分别与三乙胺组成的盐，甲酸(或醋酸)-吡啶，还有不同长度烷基的硫酸或磺酸盐，等等。试剂中的烷基越大，或浓度增加(在一定范围内)，肽的保留时间也随之增加。实验中根据不同的分离目的来选择不同的反离子试剂。生物活性肽的分离纯化中经常使用的是三氟醋酸和七氟丁酸。因其挥发性强，易冻干除去，可直接得到纯品肽。结构差别小，难于分开的肽，则宜用上述试剂中的后面几个。流动相中若含有非挥发性反离子试剂，应当在样品分开后，再以挥发性流动相分离一次，或用其它办法脱盐，便可得到纯品。当然，缓冲液反相色谱与离子对反相色谱之间并无严格留界限。如磷酸盐缓冲液的pH>3时，便可归之为后者。由此还可看出，流动相pH值是影响肽保留性质的重要因素之一。不同的酸度下，肽的色谱行为，作用机制以及洗脱快慢等都将有所不同。分离肽的流动相中可使用的有机溶剂，依洗脱能力递减次序排列为：正丙醇 \geq 异丙醇 \geq 四氢呋喃 \approx 二氧六环 \geq 乙腈 \approx 乙醇 \gg 甲醇，其中最常用的是乙腈。因其在UV210nm附近有很好的透光度，洗脱能力也较强。但当肽的疏水性很强而难于洗脱时，应当改用丙醇。其它几种溶剂较少使用。流动相中有机溶剂含量一般不超过60%。下面还要论及此点。

洗脱方式。对于成分复杂的样品，如天然来源生物活性肽，固相法合成的肽以及生物技术下游产品肽的分离，非用梯度洗脱不可。即使成分单一，但分子量较大的肽，也宜使用梯度。等比分离不易奏效。因大肽的洗脱中，有一个有机相组成突变范围，这个范围很窄，很难确定。当达到这个有机相组成时，肽分子的构象或溶解度突然改变，本来吸附在固定相上的肽，立即被洗脱下来，象这样的影响因素还有pH值及温度等。但很少有后者二者的梯度来分离肽的。在经常使用的有机溶剂梯度洗脱中，终点组成的有机相含量一般不超过60%。在等比洗脱中，有机相最高含量也应如此。大于此含量

后, 肽的保留时间随有机溶剂含量增加而增加, 与一般有机化合物的洗脱情况相反。这对肽的洗脱不利。通常采用线性梯度洗脱, 并应尽可能使众多的色谱峰较为均匀地分布在梯度曲线的中部。此可通过调整终点有机相组成, 改变梯度曲线的陡度或形状等办法来实现。正式上样品前, 要作1~2次空白梯度。图1中色谱峰的分布符合上述要求。

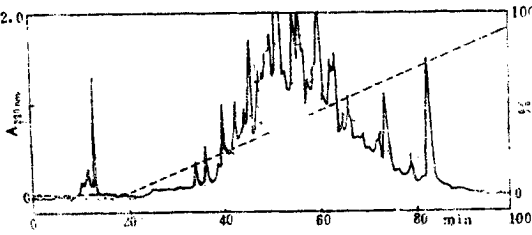


图2-1 Sep-Pak C₁₈筒柱上35%乙腈洗脱物的高效液相色谱图⁽⁸⁾

样品: 绿臭蛙皮提取物7.0mg, 色谱柱: μ Bondapak C₁₈, 0.78×30cm, 流速: 1.0ml/min, 流动相: A=5%乙腈-三氟醋酸(0.05%), B=60%乙腈-三氟醋酸(0.05%), 线性梯度洗脱, 0—90%B, 80min, 检测: UV220nm, 2.0auf

分离肽的流速宜小。对于分析型色谱柱, 小于1.0ml/min较好。

在利用反相 HPLC 分离肽的多年实践中, 已形成了一些乐于被许多实验室采用的色谱系统。比如: 色谱柱为 C₁₈或C₈, 流动相为挥发性的三氟醋酸或七氟丁酸和乙腈, 梯度洗脱。检测波长多设在 UV210—225nm 范围, 若设在 UV214nm, 可在pg 分子水平分离肽。在前面提到83~88年新发现的肽(230多个)中, 采用上述色谱条件分离纯化过的肽, 就占约65%。图2-2为上述分离条件的一个实例。图中带*的色谱峰为绿臭蛙降压肽, 仅400Pg分子的量便可明显检出。

综上所述, 反相 HPLC 具有分辨力强, 以水为流动相基本组分流动相价格较低廉以及可供选择的固定相品种及流动相成为多种多样等等优点。因此这一技术已是分离纯化肽的成熟的方法。

§2-3 离子交换高效液相色谱^(10, 11, 12)

有时用反相 HPLC 分离效果不好的肽, 若改用离子交换 HPLC 分离, 往往奏效。如 N-端焦谷封闭的肽与酶解去掉其焦谷氨酸后的部分, 两者出现电荷差异, 分别用强阳离子交换柱(SCX)及C₁₈柱分离, 结果前者的分离度明显高于后者。常用弱离子交换固定相分离肽, 如硅胶基质的烷胺基或烷

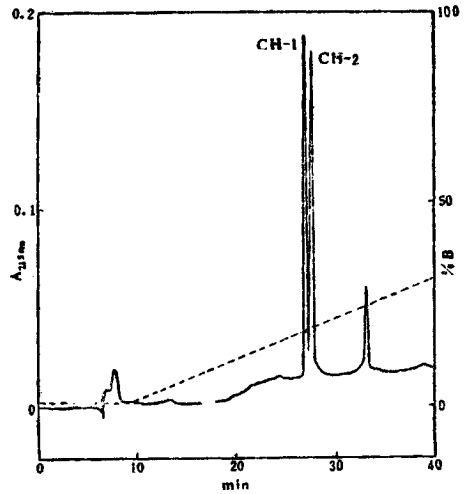


图2-2 胰凝乳蛋白酶解绿臭蛙降压肽所得片段的反相色谱图⁽⁹⁾

色谱柱: μ Bondapak C₁₈, 3.9×300mm. 流动相: A=0.1%三氟醋酸, B=60%乙腈-三氟醋酸(0.1%), 线性梯度洗脱, C=30%B, 30min, 流速: 0.8ml/min. 检测: UV215nm, 0.2auf.

羧基多孔微粒型固定相。对于小肽, 也可用强酸(磺酸)或强碱(季胺)型离子交换剂。新发展的粒径更小, 1.5—2.5 μ m的多孔微粒型离子交换固定相, 能做到快速分离肽样品。

离子交换HPLC中的流动相多为如前面缓冲液反相色谱中提到的缓冲液。对于复杂样品的分离, 当然也要梯度洗脱。大多采用盐的浓度梯度。也可用有机溶剂的组成梯度, 此时起点缓冲液中加有机溶剂如乙腈(15%左右), 终点缓冲液不加有机溶剂。以有机含量减少的方法进行梯度分离。此点与反相色谱的洗脱情形不同。

§2-4 肽的检测⁽⁶⁾

肽键及肽分子中大多数发色团的吸收峰在 UV 200—230nm 之间, 芳香基团的吸收峰在 UV 280nm 附近。前者在数目上占优势, 因此肽的检测波长设在 UV 200—230nm 之间才有较高的灵敏度。这就要求流动相中各种试剂在上述波长范围内应有较高的透过率, 且其纯度均应为 HPLC 纯或光学纯。流动相若为吡啶-甲酸(或醋酸) 因其在上述波长范围具有很强的吸收值, 便不能用紫外光, 而改为荧光检测。有的荧光检测器有分流装置, 一小部分肽生成荧光衍生物(从而损失), 但大部分样品可收集利用, 含色氨酸或酪氨酸的肽本身有荧光吸

收,因此也可直接用荧光检测,而不必做成荧光衍生物。

紫外光和荧光检测肽的灵敏度,分别在 nmol 和 pmol 水平。

§2-5 测定肽的结构

HPLC在肽结构测定中的应用主要有以下两方面。

对肽的酶解或化学降解产物进行 HPLC 肽图分析。分离到的肽段可供进一步的结构分析用。某肽的肽图分析的色谱条件,基本上参照该肽的 HPLC 分离条件进行。最好能用前面介绍的“保留常数”方法,计算可能获得的肽片段的保留常数加和值,事先估计各片段的大致的保留时间及洗脱次序,以保证所有肽片段,尤其是疏水性强的片段,都能检测到。

肽的氨基酸组成分析,主要是通过测定氨基酸与荧光胺或邻苯二甲醛生成的荧光衍生物以及与异硫氰酸苯酯生成的 PTC-氨基酸实现的。而氨基酸顺序分析,则是通过测定肽的 Edman 降解产物如 PTH 及 DABTH-氨基酸等来完成的。由于 HPLC 的运用,才使得得到上述测定能在 pmol 微量水平进行。详细内容见文献(13,5)中有关章节。

§2-6 应用实例

HPLC尤其是反相 HPLC,在市售肽制品的纯度分析,活性肽在体内的分布与代谢,化学合成肽及基因工程下游产品肽的纯化与制备等方面,都获得了广泛应用,发挥了强大威力。图2-3为市售 physalaemin 产品的纯度分析(原文待发表),结果表明,市售品中含有该肽的氧化型(图中的小峰)。

图2-4为为我所用固相法合成的黑斑蛙皮十肽(汪淑华等,待发表)的纯化图。其中*峰与天然黑斑蛙皮十肽完全一致,其余为杂质峰。一般地说,固相法合成的肽产品都比较复杂。由图4可见,若不用 HPLC 分离方法,是极难获得该肽纯品的。

尤其重要的是,人们利用 HPLC 并与其它分离方法和生物鉴定相结合,发现了大量生物活性肽。这些肽可概括为:神经肽、内脏肽、皮肤肽、免疫肽、肿瘤肽、生殖肽、抗菌肽和毒肽等等。表2列出上述各类肽的一部分,并给出相应的色谱条件。这些色谱条件分别是前述缓冲液反相色谱(1~

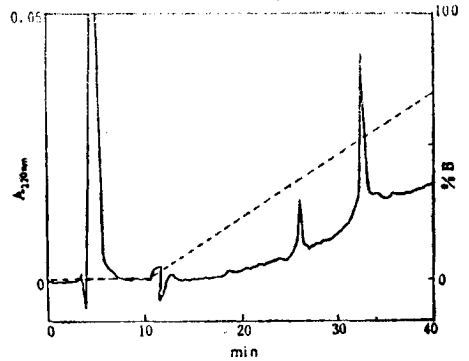


图2-3 市售 physalaemin 的纯度分析

样品来源: 美国半岛实验室。
 色谱柱: $\mu\text{Bondapak C}_{18}$, $3.9 \times 305 \text{mm}$ 。
 流动相: A=0.1% 三氟醋酸, B=60% 乙腈-三氟醋酸(0.1%), 线性梯度洗脱, 0—70% B, 30min, 流速: 0.8ml/min, 检测: UV220nm, 0.05auf.s.

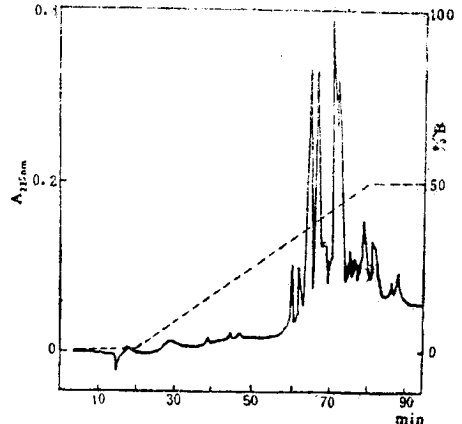


图2-4 固相法合成的黑斑蛙皮十肽的色谱图

色谱柱: $\mu\text{Bondapak C}_{18}$, $7.8 \times 300 \text{mm}$ 。
 流动相: A=20% 乙腈-七氟丁酸(0.05%), B=60% 乙腈-七氟丁酸(0.05%), 线性梯度: 0—50% B, 60min, 流速: 1.0ml/min, 检测: UV225nm, 0.4auf.s. 有*的峰为合成的十肽, 其余为杂质。

2)、离子对反相色谱(3~10)和离子交换色谱(11)各方法的典型实例。

参考文献

- (1) B. S. Welinder et al., J. Chromatogr., 408, 19(1987).
- (2) F. E. Reanier. Science, 238, 319(1987).
- (3) C. A. Browne et al., Anal. Biochem., 124, 20(1982).
- (4) W. Voelter, in "High performance liquid chromatography in protein and peptide chemistry" (F. Lottspeich et al., ed.) Walter de Gruyter Co., Berlin, p.205, 1981.

表2-2

生物活性肽的 HPLC 分离实例表

活性肽	分离条件			
	固定相	流动相	洗脱方式	检测
1. 肾啡肽 (adrenorphin, 8肽, 肿瘤组织)	μBondpak C ₁₈	A=甲酸铵(0.012mol/L, pH4.0):乙腈(90:10) B=甲酸铵(0.02mol/L):乙腈(50:50)	线性梯度 0—100%B 40min	UV 210nm ⁽¹⁴⁾
2. 新胸腺素 β ₄ (thymosin β ₄ , 43肽)	Altex Ultrasphere IP	A=吡啶(0.11mol/L)-醋酸(0.076mol/L)-水 B=正丙醇	线性梯度 0—100%B 75min	荧光 ⁽¹⁵⁾
3. 脑钠肽(brain natriuretic peptide, 26肽)	Hitachi 3063	A=三氟醋酸(0.1%)-水 B=乙腈:水(60:40, 含三氟醋酸0.1%)	线性梯度 0—100%B 135min	UV 210nm ⁽¹⁶⁾
4. 瓜糖皮防御肽 (magainin, 23肽)	Vydac C ₄	A=三氟醋酸(0.1%)-水 B=乙腈:水(70:30, 含三氟醋酸0.1%)	分步梯度 0—80%B 45min	UV 224nm ⁽¹⁷⁾
5. 组氨抑菌肽 (histatin, 38肽, 腮腺)	TSK ODS 120T C ₁₈	A=三氟醋酸(0.1%)-水 B=乙腈:水(80:20, 含三氟醋酸0.1%)	分步梯度 0—100%B 80min	UV 220nm ⁽¹⁸⁾
6. (sarafotoxin s6, 21肽, 蛇毒液)	Pep RPCHR 5/5	A=三氟醋酸(0.1%)-水 B=乙腈	线性梯度 0—32%B 10min	UV 280nm ⁽¹⁹⁾
7. α-抑制素 (α-inhibin, 92肽人精浆)	Vydac 218TP104	A=三氟醋酸(0.1%)-水 B=异丙醇	线性梯度 10—20%B 60min	UV 210nm ⁽²⁰⁾
8. 神经肽-γ (neuropeptide-γ 21肽, 兔肠)	Supelcosil LC-18-DB	A=三氟醋酸(0.1%)-水 B=乙腈	线性梯度 0—35%B 60min	UV 214nm ⁽²¹⁾
9. 绿臭蛙速激肽 (ranamarginin, 14肽, 蛙皮)	μBondapak phenyl	A=七氟丁酸(0.05%)-水 B=乙腈:水(60:40, 含七氟丁酸0.05%)	线性梯度 0—45%B 60min	UV 220nm ⁽²²⁾
10. 小脑肽 (cerebelin, 16肽)	Altex IP	A=三氟醋酸(0.1%)-辛酸硫酸钠(0.14%)*-水 B=三氟醋酸(0.1%)-辛酸硫酸钠(0.14%)*-乙腈	线性梯度 20—30%B 120min	荧光 ⁽²²⁾
11. 神经调节肽 U-25(neuromedin U-25, 25肽, 猪脊髓)	TSK IEX-530 CM	A=甲酸铵(0.01mol/L, pH6.5):乙腈(90:10) B=甲酸铵(1.0mol/L, pH6.5):乙腈(90:10)	线性梯度 15—50%B 48min	UV 210nm ⁽²³⁾

注: 肽的来源, 在其名称中不明显者, 于括号里给出。流动相中的成份比例, 除 (*为wt/Vol) 外, 均为Vol/Vol。

- (5) M. Hermodson et al., in "Methods in Enzymology", Vol. 91(C. H. W. Hirs, ed.) Academic Press, Inc., New York, p.352, 1983.
- (6) 唐易全等, 化学通报, 5, 31(1984).
- (7) M. A. Stadalius et al., J. Chromatogr., 327, 93(1985).
- (8) 唐易全等, 中国科学 (B辑), 9, 967(1988).
- (9) 唐易全等, 中国科学 (B辑), 12, 1288(1990).
- (10) M. Dizdareolu et al., *ibid.*, 334, 49(1985).
- (11) D. L. Crimminis et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 156, 910(1988).
- (12) G. P. Rozing et al., J. Chromatogr., 476, 3 (1989).
- (13) J. E. Shively, "Methods of protein micro-characterization, a practical handbook", Humana Press Inc., Clifton, New Jersey, 1986.
- (14) H. Matsuo et al., Nature, 305, 721(1983).
- (15) E. Hannappel et al., Arch. Biochem. Biophys., 260, 546(1988).
- (16) T. Sudo et al., Nature, 332, 78(1988).
- (17) M. Zasloff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84, 5449(1987).
- (18) F. G. Oppenheim et al., J. Biol. Chem., 263, 7472(1988).
- (19) C. Takasaki et al., Toxicol., 26, 543(1988).
- (20) C. H. Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82, 4041(1985).
- (21) R. Kage et al., J. Neurochem., 50, 1412 (1988).
- (22) J. R. Stemmon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 6866(1984).
- (23) N. Minamino et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 130, 1078 (1985).