

高效液相色谱检测聚乙二醇化天花粉蛋白方法比较^{*}李艳萍¹ 戎隆富² 杜贤宇^{2,3} 宋礼华^{2,3}(1 安徽农业大学生命科学院 合肥 230036 2 安徽省安科生物工程(集团)股份有限公司 合肥 230088
3 安徽省生物研究所 230088)

摘要 目的:建立聚乙二醇化天花粉蛋白纯度的检测方法。方法:使用分子筛色谱法和反相高效液相色谱法测定了聚乙二醇天花粉蛋白。结果:聚乙二醇天花粉蛋白纯度分别为 100% 和 98.14%。结论:高效液相色谱法简单易行、准确、灵敏度高,适用于聚乙二醇化天花粉蛋白纯度检测。

关键词: SEC-HPLC; RP-HPLC; 聚乙二醇化天花粉蛋白; 纯度

中图分类号: Q503 **文献标识码:** A

Determination of protein PEG- TCS Purity by SEC- HPLC and RP- HPLC

LI Yan-ping¹, RONG Long-fu³, DU Xian-yu^{2,3}, SONG Li-hua^{2,3}

(1 School of Life Science, Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China;

2 Anhui Biological Institute, Hefei 230088, China;

3 Anhui Anke Biotechnology (Group) Co. Ltd., Hefei, 230088, China)

ABSTRACT Objective: To establish the method for the purity determination of protein PEG- TCS. **Methods:** SEC- HPLC and RP- HPLC methods are used to the determination of protein PEG- TCS. **Results:** The purity of SEC- HPLC and RP- HPLC are 100% and 98.41%. **Conclusion:** It shows HPLC methods are sensitive, accurate, simple and good enough for the purity analysis of protein PEG- TCS.

Key words: SEC- HPLC; RP- HPLC; PEG- TCS; Purity

前言

聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 修饰, 或称 PEG 化 (PEGylation) 是二十世纪 70 年代后期逐渐发展起来的一项热门技术, 目前已应用于多种蛋白药物的修饰^[1-2], 宋礼华等^[3]利用 PEG 修饰技术与现代生物提取技术相结合, 对传统中药天花粉蛋白 (Trichosanthin, TCS) 进行二次开发, 通过定点修饰, 使 PEG20000 与 TCS 分子 N 端氨基酸的天冬氨酸氨基交联, 首次研制出聚乙二醇化天花粉蛋白 (PEG- TCS)。本文利用高效液相色谱法^[3] (High performance Liquid chromatography) 来测定修饰后产物聚乙二醇化天花粉蛋白的纯度。

高效液相法是一种高效、快速、高灵敏度和自动化程度高的新型分析技术, 按照溶质分子在流动相中的体积大小进行分离的是体积排阻色谱 (SEC- HPLC) 又称分子筛色谱; 基于溶质、极性流动相和非极性固定相表面间的疏水效应建立的色谱法是反相色谱 (RP- HPLC)。高效液相法现已成为生化、医学、药物临床、化学化工、食品卫生、环保检测、商检和法检等领域最常用的分离分析手段^[4]。

1 材料与方法

1.1 仪器

岛津 LC- 10AT vp 高效液相色谱仪, 岛津 SPD- 10A vp 紫

外检测器, 浙大智达色谱工作站、真空泵

1.2 试剂

乙腈 (色谱纯, TEMEDIA Company, Inc) 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、硫酸钠均为分析纯 (上海化学试剂公司)、注射用水由安徽安科生物工程 (集团) 股份有限公司自制。

1.3 色谱条件

SEC- HPLC: 经反复试验^[5-6] 确定了色谱条件为: 色谱柱: TSK- G3000SW (7.5mm × 300mm); 流动相: 0.1 mol/L - 1Na2SO4 - 0.025 mol/L - 1PB; 用 0.22μm 微孔滤膜滤过; 流速: 0.6ml/min; 检测波长: 222nm; 柱温: 25℃; 进样量: 20μg。

RP- HPLC: 色谱柱: C4 (4.6mm × 250mm) 流动相: A: 0.1% 磷酸溶液; B: 0.1% 磷酸的乙腈溶液, 用 0.22μm 微孔滤膜滤过; 线性梯度洗脱, 5% ~ 75% B (30min); 流速 0.8ml/min; 检测波长: 222nm; 柱温: 25℃; 进样量: 20μg。

2 实验结果与分析

2.1 SEC- HPLC 色谱条件下, PEG- TCS 的纯度为 100% (见表 1 及图 1、图 2)。其中 22min 左右峰为样品缓冲液氯化钠溶液中的峰。

2.2 RP- HPLC 的色谱条件下, PEG- TCS 纯度为 98.14% (见图 3 和表 2), 图 3 为样品色谱图。样品的理论塔板数、分离度均达到纯度分析要求, 样品能够实现良好分离。

* 基金项目: 国家科技攻关计划资助项目 (2003BA758C); 安徽省“十五”重大科技专项资助项目 (01803024)

作者简介: 李艳萍, (1981), 女, 硕士研究生。微生物制药专业

通讯作者: 宋礼华, (1957), 男, 研究员, 博士生导师, 从事生物制药研究。E-mail: songlh@ankebio.com.

(收稿日期: 2006- 04- 11 接受日期: 2006- 05- 10)

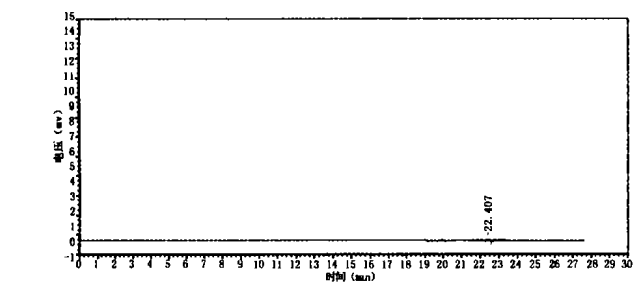


图 1 样品缓冲液色谱图

Fig 1 SEC- HPLC chromatograms of sample buffer solution

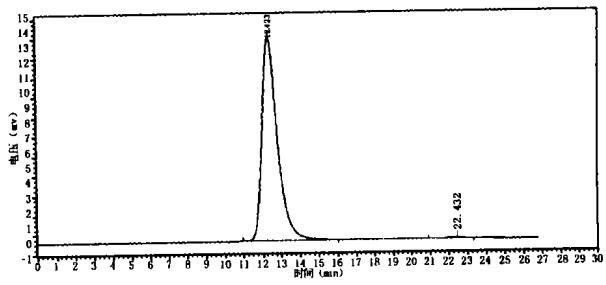


图 2 PEG-TCS 的 SEC- HPLC 色谱图

Fig 2 SEC- HPLC chromatograms of PEG- TCS

表 1 PEG-TCS 的 SEC- HPLC 色谱图结果

Table 1 SEC- HPLC chromatograms results of PEG- TCS

保留时间(/min)	峰高(/mv)	峰面积(/mv. s ⁻¹)	面积含量(%)
12. 423	13377. 119	613630. 438	100%

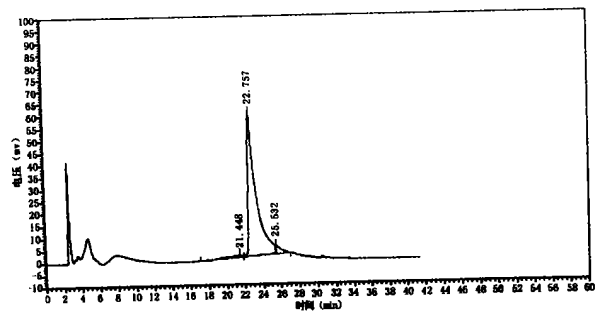


图 3 PEG-TCS 的 RP- HPLC 色谱图

Fig 3 RP- HPLC chromatograms of PEG- TCS

(其中 10min 以前的峰是样品缓冲液的非保留组分)

表 2 PEG-TCS 的 RP- HPLC 色谱结果

Table 2 RP- HPLC chromatograms results of PEG- TCS

峰号	保留时间 (/min)	峰高 (/mv)	峰面积 (/mv. s ⁻¹)	塔板数	分离度	面积含量 (%)
1	21.448	221	25762	391	- -	0. 64
2	22.757	60243	3939441	5169	0. 8	98. 14
3	25.5352	589	49000	6300	2. 0	1. 22

3 讨论

TCS 具有多种生物学及药学功能,传统临床应用于引产及宫外孕,葡萄胎癌的治疗,同时也在治疗肿瘤与艾滋病方面也有潜在的应用价值^[7]。但是,作为一类外源蛋白,注射时容易引起体内的免疫反应,且 TCS 体内半衰期较短,限制了它在临床上广泛应用。TCS 与 PEG 连接不仅能降低药物的免疫原性

和毒性,而且延长在血浆中的半衰期。关于游离 TCS 与修饰后 PEG-TCS 在 HPLC 检测中的分离度情况等另文进行了分析与验证(待发表)。

TCS 疏水性较强,PEG 修饰以后更稳定,故在 RP- HPLC 流动相中选择了添加磷酸离子对试剂,增加蛋白的亲水性,降低在色谱柱上的保留时间;乙腈 UV 吸收大于水的吸收,在梯度洗脱中基线严重漂移,实验中发现适当降低有机相中磷酸的浓度可消除基线漂移。

PEG-TCS 经紫外扫描在 222nm 和 280nm 处有最大吸收峰,222nm 处的吸光度比 280nm 处吸光度高约 2 个数量级,故用 222nm 作为波长可以提高检测灵敏度。

4 结论

本文所建立的检测 PEG-TCS 纯度的高效液相法灵敏度高、重现性好、简单易行,可以有效地控制聚乙二醇化天花粉蛋白的质量,也为其他类聚乙二醇修饰化蛋白质药物进行检测提供了依据。由实验结果可以看出 RP- HPLC 的灵敏度比 SEC- HPLC 高,更适用于精确的纯度分析。

参考文献

[1] Roberts MJ, Bentley MD&Harris JM. Chemistry for peptide and protein PEGlation[J]. Adv Drug Deliv Rev 2002, 54(4) : 459- 476

[2] 宋礼华, 戎隆富, 王荣海. 聚乙二醇化天花粉蛋白药物及其生产工艺[P]. 中国专利, 公开号 CN 1631435A. 2005

[3] 王军志. 生物技术药物研究和质量控制[M]. 第一版. 北京: 科学出版社, 2002: 121- 12

[4] 邹汉法. 高效液相色谱法[M]. 第一版. 北京: 科学出版社, 2001: 521- 522

[5] 许培, 戎隆富, 王荣海, 等. 聚乙二醇修饰天花粉蛋白的初步研究[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(5) : 348~ 351

[6] John M. Maraganore, Michael Joseph, and Mason C. Bailey. Purification and characterization of trichosanthin[J]. Biological Chemistry . 1987, 262(24) : 11628- 11633

[7] 汪猷主编. 天花粉蛋白[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 2000: 2- 5