

研究简报

应用液相色谱法分离纯化固相
化学合成胸腺素 α_1

甘一如 黄永东 吴 蕾
(天津大学化工学院, 天津 300072)

关键词 胸腺素 α_1 固相多肽合成 离子交换色谱 反相高效液相色谱 分离 纯化

中图分类号 Q 516

文献标识号 A

文章编号 0438-1157 (2004) 03-0497-04

APPLICATION OF LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR ISOLATION
AND PURIFICATION OF SOLID-PHASE SYNTHETIC THYMOSIN α_1

GAN Yiru, HUANG Yongdong and WU Lei

(School of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract By using ion-exchange preparative chromatography (IEPC) and reversed-phase high performance liquid preparative chromatography (RP-HPLC), thymosin α_1 was isolated and purified from the crude product synthesized by the solid-phase peptide synthesis (SPPS) method. The purity of the final product reached 95% through ion-exchange chromatography on DEAE Sepharose Fast Flow chromatography and Delta-Pak™ C18 purification after optimizing the chromatographic conditions. The capacity of purification process was 50mg/circle. The total yield was 36%. The technology is simple and reliable, and can be scaled up easily.

Keywords thymosin α_1 , solid-phase peptide synthesis (SPPS), ion-exchange chromatography (IEC), reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), isolation, purification

引 言

胸腺素 α_1 (T_{α_1}) 是由 28 个氨基酸组成的小分子多肽^[1], 它能够促进淋巴 T 细胞分化、成熟, 增强机体的免疫功能, 临床上主要用于治疗乙肝等病毒性肝炎, 也可作为艾滋病和恶性肿瘤的辅助药物^[2~4]. 目前, 我国所使用的胸腺素 α_1 主要依靠进口, 其昂贵的价格限制了胸腺素 α_1 在我国的使用. 因此, 依靠自己的技术生产相对便宜的胸腺素 α_1 , 实现胸腺素 α_1 的国产化, 具有重大的理论价值和应用价值.

多肽化学合成技术目前已较为成熟^[5,6], 本研究室应用 DIC/Fmoc 固相化学合成技术, 已得出一条简便、高效的胸腺素 α_1 合成路线. 但是, 化学合成的多肽往往含有大量的杂质, 令人棘手的是小部分杂质与目标物在分子结构和化学性质上十分相似, 给多肽的分离纯化带来了困难. 液相层析法在多肽的分离纯化中显示出优越的分离能力^[7~9], 对于固相合成的胸腺素 α_1 粗品, 本实验综合应用离子交换制备色谱和反相高效液相制备色谱在选择性上的差异成功地分离纯化出高质量的胸腺素 α_1 . 分离时先采用离子交换制备色谱除去粗品中的大部

2003-08-22 收到初稿, 2003-12-08 收到修改稿.

联系人及第一作者: 甘一如, 男, 46 岁, 教授.

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目 (No. 993804311).

Received date: 2003-08-22.

Corresponding author: Prof. GAN Yiru. E-mail: yrgan@hotmail.com

分杂质,再用反相高效液相制备色谱作进一步的纯化,所得的样品通过分析型反相高效液相色谱分析,结果表明胸腺素 α_1 的纯度达到 95% 以上。

1 实验部分

1.1 仪器

AKTA Explorer 100 层析系统 (Pharmacia 公司); Waters Prep LC 4000 System (Waters 公司); HP HPLC Seris 1100 (HP 公司)。

1.2 试剂

DEAE Sepharose Fast Flow (Pharmacia 公司); 乙腈 (色谱纯, Fisher 公司); 三氟乙酸 (Sigma 公司); 超纯水 (自制); 胸腺素 α_1 粗品 (自制); 胸腺素 α_1 标准品 (ZADAXIN, SciClone)。

1.3 色谱条件

离子交换色谱: XK16 层析柱 (Pharmacia)。缓冲液 A: $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钠缓冲液, pH 值 5.8。缓冲液 B: $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠、 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钠缓冲液, pH 值 5.8。线性梯度洗脱程序: $100\% \text{ A} \xrightarrow{5 \text{ min}} 100\% \text{ A} \xrightarrow{5 \sim 10 \text{ min}} 90\% \text{ A} \xrightarrow{10 \sim 45 \text{ min}} 77\% \text{ A} \xrightarrow{45 \sim 50 \text{ min}} 0\% \text{ A}$ 。流速为 $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长为 214 nm, 进样量为 50 mg (25 ml)。

反相高效液相制备色谱: Delta-PakTM C18 制备柱 ($25 \text{ mm} \times 100 \text{ mm i.d.}$, 15μ , 10 nm, Waters)。流动相 A: 0.1% TFA/水; B: 0.1% TFA/90% 乙腈。线性梯度洗脱程序: $100\% \text{ A} \xrightarrow{2 \text{ min}} 100\% \text{ A} \xrightarrow{2 \sim 4 \text{ min}} 80\% \text{ A} \xrightarrow{4 \sim 34 \text{ min}} 70\% \text{ A}$ 。流速为 $6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长为 214 nm, 进样量为 50 mg, 在线脱气。

反相高效液相分析色谱: PLATINUM C18 分析柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm i.d.}$, 5μ , 10 nm, Alltech)。流动相 A: 0.1% TFA/水; B: 0.1% TFA/90% 乙腈。线性梯度洗脱程序: $5\% \text{ B} \xrightarrow{20 \text{ min}} 60\% \text{ B}$ 。流速为 $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长为 214 nm, 进样量为 $20 \mu\text{l}$ 。

1.4 样品的制备

精确称取 100 mg 化学合成的胸腺素 α_1 粗品, 用离子交换缓冲液 A 溶解, 定容至 50 ml, 得到 $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的粗品溶液, 经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后供

离子交换色谱用。

离子交换得到的样品不必经过浓缩和去盐处理, 只需用稀盐酸调 pH 值至 3, 就可以直接用于第 2 步的反相高效液相制备色谱。

用于反相高效液相分析色谱的粗品和标准品需要用流动相 A 溶解, 用稀盐酸调 pH 值至 3, 配制成 $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的粗品和标准品溶液, 经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤处理。离子交换得到的样品只需要用稀盐酸调 pH 值至 3; 反相高效液相制备色谱得到的样品可直接上样。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的确定

$\text{T}\alpha_1$ 不含芳香族氨基酸, 在 280 nm 处无明显吸收。而肽键的强吸收峰在 214 nm 处。为保证有较高的检测灵敏度, 将 $\text{T}\alpha_1$ 的检测波长设在 UV 214 nm 处。

2.2 化学合成胸腺素 α_1 的 RP-HPLC 分析

分别准确移取 $20 \mu\text{l}$ 胸腺素 α_1 标准品溶液 ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) 和粗品溶液 ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), 按 1.3 节所示色谱条件操作, 结果见图 1 和图 2。

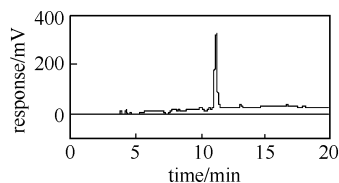


Fig. 1 RP-HPLC chromatogram of standard $\text{T}\alpha_1$

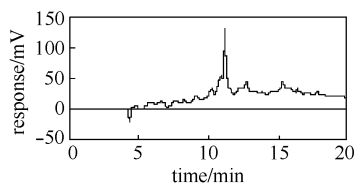


Fig. 2 RP-HPLC chromatogram of crude $\text{T}\alpha_1$

由图可见, 胸腺素 α_1 在 11.2 min 出峰, 由外标法峰面积定量得胸腺素 α_1 粗品的纯度为 45.3%。化学合成法得到的胸腺素 α_1 粗品组成较复杂, 含有部分结构、性质和目标物相近的杂质, 这严重干扰了胸腺素 α_1 的定性定量。在本色谱条件下, 目标峰和它周围的杂质峰能得到一定程度的分开, 表明该色谱条件适宜胸腺素 α_1 粗品特别是经过离子交换和反相高效液相色谱纯化后的胸腺素 α_1 样品的分析。

2.3 离子交换层析

按 1.3 节所示色谱条件对胸腺素 α_1 进行离子交换层析,将离子交换后的胸腺素 α_1 进行反相高效液相色谱分析,分析结果见图 3。

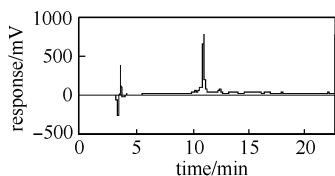


Fig. 3 RP-HPLC chromatogram of ion-exchange product

由图可见,离子交换过程中胸腺素 α_1 和其他杂质得到很好的分离,除去了大部分杂质。通过计算得胸腺素 α_1 的纯度为 75%,纯度有了较大提高,收率为 60%,达到了对胸腺素 α_1 粗品进行初步分离纯化的目的。

同时考察了缓冲体系的 pH 值和洗脱梯度对分离效果的影响,选用 pH 值为 7.4 的缓冲体系作进一步的研究,发现胸腺素 α_1 也能被吸附,不同的是杂质峰与主峰未能很好分开,基本达不到分离的目的。缓冲体系的 pH 值通过改变溶质的分配系数影响分离效果。当选用 100% A $\xrightarrow{5\text{ min}}$ 100% A $\xrightarrow{5\sim 10\text{ min}}$ 90% A $\xrightarrow{10\sim 55\text{ min}}$ 60% A $\xrightarrow{55\sim 60\text{ min}}$ 0% A 的洗脱梯度时,胸腺素 α_1 得不到很好的分离,离子交换所得的胸腺素 α_1 的纯度只有 60%。原因在于胸腺素 α_1 粗品含有部分与目标物结构和物理化学性质十分相近的杂质,它们所具有的带电基团的性质和荷电量的差异较小,洗脱梯度过快地上升,难以实现胸腺素 α_1 粗品的有效分离。

2.4 反相高效液相层析

对离子交换层析所得的样品作简单的处理,调 pH 值至 3.0,即可进行反相高效液相层析。按 1.3 节所示色谱条件操作,所得胸腺素 α_1 样品的分析结果见图 4。

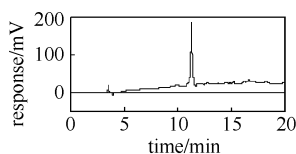


Fig. 4 RP-HPLC chromatogram of thymosin α_1 separated with RP-HPLC

由图可见,经过反相高效液相层析纯化几乎除去了所有杂质,胸腺素 α_1 的纯度大大提高,计算

得胸腺素 α_1 的纯度达到 95% 以上,收率可达 60%,两步纯化的总收率为 36%。纯度接近黄臻辉^[10]报道的 98.5%,而总收率比 20% 有较大的提高。

2.5 反相高效液相层析一步纯化效果的考察

本实验曾尝试只用反相高效液相层析操作一步完成胸腺素 α_1 粗品的分离纯化。上样量为 10 mg,其他色谱条件与 1.3 节所示的完全一样。一步纯化后产物的纯度只达到 82%,即使采取降低上样量、将产物进行二次反相高效液相层析及降低洗脱梯度的措施也都没有取得满意的结果,纯度始终达不到 95% 的水平。这是因为化学合成的胸腺素 α_1 粗品中往往含有一些杂质,其分子结构与胸腺素 α_1 十分相似,其反相色谱行为与胸腺素 α_1 十分接近,只用反相色谱法达不到化学合成胸腺素 α_1 有效的分离纯化。

3 结论

综上所述, DIC/Fmoc 固相化学合成胸腺素 α_1 , 粗产品收率高 (84.9%), 纯度高 (45.3%)。粗产品经离子交换和反相高效液相色谱两步纯化后,纯度可达 95% 以上,纯化总收率可达 36%。处理量大,每循环 50 mg 的处理量达到了半制备水平,为以后实现工业化奠定了基础。实验结果重复性良好,离子交换填料一般可重复使用 15 次,反相柱基本上可长期使用。本方法综合利用离子交换和反相高效液相色谱两种不同的分离、纯化方法的优势,分别达到初步分离、浓缩和提高纯度的目的。同时,离子交换后的胸腺素 α_1 样品溶液无需脱盐和浓缩处理,只需要简单地对其 pH 值作适当的调整就能直接上样做进一步的纯化,使纯化和脱盐合二为一,简化了操作,大大提高了产品的收率和质量。在此基础上,今后只需要进行相应的放大处理和优化,就可以满足工业化生产的要求。

References

- Goldstein R L. Thymosin Alpha 1. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, **69**: 1800
- Goldstein A L, Low T L K, McAdoo M, McClure J, Thurman G B, Rossio J L, Lai C Y, Chang D, Wang S S, Harvey C, Ramel A H, Meienhofer J. Thymosin α_1 : Isolation and Sequence Analysis of an Immunologically Active Thymic Polypeptide. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, **74**: 725—729
- Zata M M, Goldstein A L. Thymosins, Lymphokines and

- Immunology of Aging. *Gerontology*, 1985, **31**: 263
- 4 Guan Youyan (关有炎), Zhou Weiwei (周伟伟), Qiu Xueshan (邱雪衫). Thymosin and Tumour. *Chinese Journal of Pathology (China)* (中国病理学杂志), 2001, **30** (3): 227
- 5 Wang S S, Kulesha I D, Winter D P. Synthesis of Thymosin α_1 . *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**: 253
- 6 Field G B, Noble R L. Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1990, **35**: 161
- 7 Zhang Ruoheng (张若蓓), Xu Xiaojie (徐筱杰), Tang Youqi (唐有祺). Application of Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography for the Analysis and Purification of Synthesized Polypeptides. *Chinese Journal of Chromatography (China)* (色谱), 1996, **14** (3): 182—184
- 8 Chen Weidong (陈为东), Sun Yan (孙彦). Analysis of Steric Mass-action Model for Protein Ion-exchange Equilibrium. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)* (化工学报), 2002, **53** (1): 88—91
- 9 Zhang Zhiqiang (张志强), Su Zhiguo (苏志国), Gu Tingyue (顾停月). Column Dynamics of Taxol Purification on Reversed Phase Chromatography. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)* (化工学报), 2002, **53** (1): 476—481
- 10 Huang Zhenhui (黄臻辉). Isolation and Purification of Synthesis Thymosin α_1 . *Pharmaceutical Biotechnology (China)* (药物生物技术), 2001, **8** (4): 207—209

信息与交流

一批化学化工类项目入围国家精品课程

经过网上申报、网上评审、会议终审、网上公示等四个步骤, 国家教育部 2003 年 4 月启动的 2003 年度首批 151 门国家精品课程近日诞生, 一些化学化工课程榜上有名。

此次上榜国家精品课程的化学化工类项目都是本科课程, 主要有北京化工大学杨祖荣负责的《化工原理》和张常群负责的《物理化学》(工科); 北京大学李克安负责的《分析化学》及贾弘提负责的《生物化学》; 天津大学贾绍义负责的《化工原理及实验》; 大连理工大学高占先负责的《有机化学及实验》及孟长功负责的《无机化学及实验》; 吉林大学宋天佑负责的《无机化学》; 华东理工大学黑恩成负责的《物理化学》; 南京大学沈文霞负责的《物理化学》。

据悉, 实施“高等学校教学质量和教学改革工程”是教育部为不断提高教学质量而推出的一项重大举措, 同时也是教育部《2003~2007 年教育振兴行动计划》的重要组成部分。精品课程建设是“质量工程”的重要内容之一, 教育部计划用五年时间(2003~2007 年)建设 1500 门国家级精品课程, 利用现代化的教育信息技术手段将精品课程的相关内容上网并免费开放, 以实现优质教学资源共享, 提高人才培养质量。

(摘自“中国化工信息网”)