

肽类药物中各种氨基酸的定性和定量分析



从左至右: L. Hamon, F. Diancourt, L. Roy和R. Sbafo-Poasevara*

法国IPSEN公司是一家生产并销售20余种药物的国际化专业药厂，在全球拥有4000余名雇员。其专注于特定的护理和治疗领域，如肿瘤、内分泌和神经肌肉障碍症等。坐落于巴黎近郊Les Ulis的Henri Beaufour研究所是IPSEN的研发中心之一，主任Roseline Sbafo-Poasevara女士领导着原料药分析开发部门。该部门的工作重点之一是合成多肽中间体的分析，这些多肽由天然和非天然氨基酸合成，并可能还连接有一些小分子。在新药注册申请中需要开发专论方法为肽类药物水解后的氨基酸进行分析。但在新药的开发过程中，如果能同时对药物中的游离氨基酸进行定量分析将更有帮助。为了实现上述目标，该部门制定了不同的分析方法，比如最近开始采用的HPTLC。

介绍

肽类药物首先在强酸介质中水解为氨基酸并进行鉴别。在酸水解过程中部分氨基酸会降解，在这一过程中只有7种氨基酸是稳定的。随后水解产物在茚三酮衍生化后进行HPLC分析。然而使用HPLC和氨基酸分析仪进行氨基酸分析耗时且昂贵，并且对于不稳定的氨基酸只能给出半定量的结果。因此该HPLC方法对于通常的非天然氨基酸的降解和多肽上连接的功能小分子分析而言缺乏灵活性。

为了进行多肽中游离氨基酸的痕量分析，多肽不能进行水解。当如此大量的多肽样品被注入色谱柱时，其在水相梯度洗脱时不断被冲洗下来从而影响色谱的分离。但在 HPTLC 分析时，由于多肽停留在原点或迁移至溶剂前沿，对于一次性使用的薄层板而言就不构成问题。因此这种优势使得 HPTLC 技术被选择用于该阶段的分析。最终确立了游离氨基酸的检测限以及多肽水解物中氨基酸的定量 HPTLC 分析方法。

对照品溶液的制备

氨基酸对照品 (Abu, Ala, Arg, Asp, Aib, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Nal, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val, D-Bal, Apc, Inp) 溶于水中，制备成各1mg/mL 的溶液。

供试品溶液的制备

以6M HCl (1%苯酚作为稳定剂) 于110℃水解24h，残渣加水溶解，制成0.15 µg/mL的溶液。

薄层板

HPTLC硅胶60 F254预制板, HPTLC二醇基F254预制板和HPTLC铝箔纤维素预制板, 20 x 10 cm (Merck)。

点样

采用CAMAG ATS4仪器进行条带状点样，条带宽6 mm，轨道间距8 mm。原点距底边8 mm，点样速度80 nL/s，加热喷嘴50 °C，点样体积氨基酸标准品0.5 µL，半胱氨酸1 µL，水解物10µL。

色谱条件

在CAMAG双槽层析缸或水平展开槽中，加入2-丁醇-

醋酸-吡啶-水 (15 : 3 : 10 : 12) 或2-丁醇-氨水-吡啶-水 (39:10:34:26) 。

注意：通常在水平展开槽中，薄层表面是朝下的。但由于使用了铝箔板，可以面朝上展开以便更好地监视溶剂前沿。

色谱后衍生化

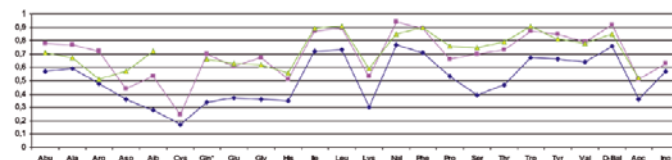
使用CAMAG薄层浸渍设备3型，将薄层板以4.5 cm/s 的速度浸渍于茚三酮显色剂 (0.5 %的2-丁醇溶液)中，停留1s。此外也可以将茚三酮以5%的比例加入展开剂。然后将薄层板置于CAMAG加热器上以110 °C加热5min。

光密度分析

使用CAMAG TLC Scanner 3和winCATS工作站软件，在440nm处测定吸收值。

结果与讨论

采用2-丁醇-醋酸-吡啶-水作为流动相的方法最初是为了分析感兴趣的24种氨基酸[1]。在水平展开槽中获得的斑点Rf值较垂直层析缸的结果重现性更好，这是由于铝箔板在后者中的放置位置不能完全固定。该方法的选择性和灵敏度都很好，但尚有一些关键的氨基酸没有得到互相分离。因此也对二醇基和硅胶固定相进行了研究(同样在水平展开中面朝上)。在二醇基固定相中，Rf值的迁移范围介于0.51和0.91之间，该范围比硅胶固定相 (0.25–0.94) 和纤维素 (0.17–0.77)要小。因此纤维素和硅胶的选择性更好。



24 种氨基酸在纤维素 (蓝色)、硅胶 (紫色) 和二醇 (绿色) 固定相上的 Rf 值

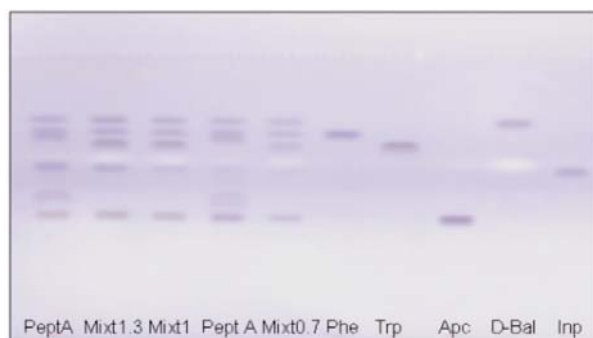


纤维素（左）和硅胶（右）固定相的分离结果比较，分别采用酸性（上）和碱性（下）展开剂

色谱系统的选择取决于分析任务，譬如那些氨基酸是必须得到分离的。因此泛泛的建议很难给出，但有 2 点在分析中被观察到：1）使用水平展开槽相对于传统的垂直展开缸相比，可使得常用的硅胶板获得扩散较少的斑点，并使得重现性和分离度都有所提高。2）含氨水的展开剂相较含醋酸的展开剂而言斑点扩散程度大一些。

基于上述对标准品的初步实验结果，多肽的样品被进行了分析。选用了醋酸展开剂和纤维素薄层板。水解多肽所含有的 2 种天然氨基酸（Phe 和 Trp）以及 3 种非天然氨基酸（D-Bal, Apc 和 Inp）被得到了分离。对所有 5 种氨基酸进行了定性和定量分析，结果显示含量介于理论值的 70%-130%之间，对于不稳定氨基酸而言其降解程度为 5%-30%。

茚三酮衍生化最简便的方法就是将试剂加入流动相中。采用这种方法，基线噪音可降低 2 个因子。选择性的显色对于样品分析非常有利，因为大量的未衍生化的基质成分不会对检测形成干扰。



色谱显示水解多肽（PeptA）包含 2 种天然氨基酸（Phe 和 Trp）以及 3 种非天然氨基酸（D-Bal, Apc 和 Inp），以及不同浓度的混合对照品溶液及单个氨基酸对照品。

说明：后来发现样品中所含的是 L-Trp 的异构体 D-Trp。

参考文献

[1] Merck Application for detection of amino acids and peptides

您可以从作者处获得更进一步的资料：

* Roseline Sbaffo-Poasevara, API Analytical Development, IPSEN,
5 avenue du Canada, 91966 Les Ulis, France,
roseline.poasevara@ipsen.com