

体积排阻色谱法测定胸腺肽分子量校准 曲线条件的优化

王吉, 崔爱艳, 黄学英, 李彧娜*

(苏州赛分科技有限公司, 江苏 苏州 215123)

摘要: 在体积排阻色谱(SEC)法测定胸腺肽分子量校准曲线过程中, 流动相中乙腈的比例对核糖核酸酶A、人胰岛素、胸腺肽 $\alpha 1$ 和生长激素释放抑制因子4种蛋白的保留时间有重要影响, 进而影响校准曲线的线性关系。当乙腈比例为75%时, 胸腺肽分子量校准曲线线性最好, 此时分子量校准方程为 $y = -3.1386x + 21.724$, 线性相关系数 $r^2 = 0.9885$ 。4种蛋白的理论塔板数在45783~63345之间, 拖尾因子在0.96~1.18之间, 分离度在3.52~8.82之间。SEC法测定胸腺肽分子量校准曲线的液相色谱条件对4种蛋白的分离效果优异, 分子量校准曲线线性良好, 可用于胸腺肽制剂中高分子量物质的检测。

关键词: 体积排阻色谱; 分子量校准曲线; 胸腺肽

中图分类号: O657.7; O629.72 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2012)07-0863-05

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2012.07.019

Optimization of Calibration Curve Conditions for Determination of Thymosin Molecular Weight by Size Exclusion Chromatography

WANG Ji, CUI Ai-yan, HUANG Xue-ying, LI Yu-na*

(Suzhou Sepax Technologies, Ltd., Suzhou 215123, China)

Abstract: During the determination of molecular weight calibration curve of thymosin by size exclusion chromatography(SEC), the acetonitrile ratio in mobile phase performed significant influence on not only the retention time of four proteins(e.g. ribonuclease A, human insulin, thymosin $\alpha 1$ and somatostatin), but also the linearity of molecular weight calibration curve. The best linearity was obtained at the ratio of acetonitrile by 75%, with a calibration equation of $y = -3.1386x + 21.724$ and a linear correlation coefficient(r^2) of 0.9885. In that condition, the theoretical plate numbers of four proteins were between 45783 and 63345, tailing factors were between 0.96 and 1.18, and resolutions were between 3.52 and 8.82. The established LC method to determine molecular weight calibration curve of thymosin by SEC was proved to have excellent separation and good linearity. Thus it can be used to detect the high molecular weight substance in thymosin preparation.

Key words: size exclusion chromatography; molecular weight calibration curve; thymosin

胸腺肽是一类由胸腺产生的多肽激素, 能诱发和促进T淋巴细胞的分化和成熟, 其中胸腺肽 $\alpha 1$ 是胸腺肽最具生物活性的部分^[1]。胸腺肽制剂目前是肿瘤治疗中应用较广泛的一类免疫调节剂, 对系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、病毒性肝炎等疾病均有较好的疗效, 此外, 该制剂还是一种重要的肿瘤辅助治疗药物^[2-4]。

目前用于胸腺肽溶液质量检测的质量标准主要是国家食品药品监督管理局于2003年颁布的《胸腺肽溶液质量标准》(标准编号: WS1-XG-042-2000-2003), 该标准适用于胸腺肽注射液和注射用胸腺肽等制剂的质检^[5]。高分子量物质测定是药物质量监测中的重要检测项目, 一般使用体积排阻色谱(SEC)来测定。《胸腺肽溶液质量标准》中“高分子量物质”项规定所使用的胸腺肽分子量标准为核糖核酸酶A、人胰岛素、胸腺肽 $\alpha 1$ 和生长激素释放抑制因子4种蛋白(其分子量见表1), 标准曲线的制作采用凝胶色谱柱(又称体积排阻色谱柱、分子排阻色谱柱等), 流动相为三氟醋酸-乙腈-水

收稿日期: 2012-02-26; 修回日期: 2012-04-12

基金项目: 江苏省科技支撑(社发)项目(BE2010668)

* 通讯作者: 李彧娜, 博士, 研究方向: 液相色谱应用技术开发, Tel: 0512-69369036, E-mail: yuna.li@sepax-tech.com.cn

(0.05 : 10 : 90), 流速为 0.7 mL/min, 检测波长为 214 nm。然而国内胸腺肽厂商在使用该方法时, 检测结果的重现性较差。而在中国药品生物制品检定所出品的“胸腺肽分子量标准”说明书中, 则将流动相调整为三氟醋酸-乙腈-水(0.1 : 35 : 65), 提高了乙腈的比例, 以减少样品疏水性对分离的影响, 然而其分离结果仍不能令人满意。目前市售的凝胶色谱柱对这 4 个峰的分离度偏低, 由于色谱柱批次间的微小差异, 会出现重现性差的情况。

体积排阻色谱是一种按化合物的分子体积大小进行分离的液相色谱方法^[6]。在体积排阻色谱中, 保留时间一般按照分子体积的大小顺序而依次延长。在理想状态下, 溶质分子与固定相之间无相互作用, 化合物的保留时间完全由其分子体积决定, 在一定的分子量范围内, 对于同一类聚合物, 其分子量对数与保留时间呈线性关系。然而在实际分离过程中, 存在非体积排阻效应^[7-11], 如离子交换、离子排斥、疏水作用等, 这些作用直接影响被分离组分的分子量对数值与保留时间之间的线性关系, 从而干扰分子量的准确测定。为消除这种影响, 可通过改进填料表面的化学性质, 尽量减小其与待分离组分之间的相互作用。如赛分科技研发的用于生物大分子分离的 Zenix 和 SRT SEC 柱, 采用在硅胶表面化学键合一层均一、亲水、纳米厚度的中性聚合物薄膜的固定相填料, 大大降低了填料对蛋白质、核酸等生物分子的吸附; 另外在色谱操作条件方面, 可以通过调整流动相、温度等条件, 尽可能地减弱待分离组分和填料表面基团之间的相互作用。

本文就体积排阻色谱法测定胸腺肽分子量标准(核糖核酸酶 A、人胰岛素、胸腺肽 $\alpha 1$ 和生长激素释放抑制因子)的分子量校准曲线进行了研究, 讨论了流动相条件对分子量校准曲线测定的影响, 并对色谱柱的选择和流动相条件进行了优化。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪; 胸腺肽分子量标准品(由核糖核酸酶 A、人胰岛素、胸腺肽 $\alpha 1$ 和生长激素释放抑制因子组成, 中国药品生物制品检定所); 三氟乙酸(分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司), 乙腈(色谱纯, 美国 Tedia 公司), 去离子水通过 Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)制得; SRT 100(5 μm , 100 \AA , 7.8 mm \times 300 mm)、SRT 150(5 μm , 150 \AA , 7.8 mm \times 300 mm)、Zenix 100(3 μm , 100 \AA , 7.8 mm \times 300 mm)、Zenix 150(3 μm , 150 \AA , 7.8 mm \times 300 mm)等 SEC 柱为 Sepax Technologies 公司产品。

1.2 色谱条件

色谱柱: Zenix 100、Zenix 150、SRT 100、SRT 150 等 SEC 柱; 流动相: 乙腈-水混合溶液, 含 0.1% 三氟乙酸; 流速: 0.7 mL/min; 检测波长: 214 nm; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μL 。

1.3 标准溶液的配制

分别将核糖核酸酶 A、人胰岛素、胸腺肽 $\alpha 1$ 和生长激素释放抑制因子 4 种蛋白标准品用三氟醋酸-乙腈-水(0.1 : 35 : 65)混合溶液溶解, 配成 1.0 g/L 的单标溶液。取 200 μL 核糖核酸酶 A 单标溶液、200 μL 人胰岛素单标溶液、400 μL 胸腺肽 $\alpha 1$ 单标溶液和 100 μL 生长激素释放抑制因子单标溶液, 混匀, 作为分子量标准混合溶液。

1.4 精密度实验

取分子量标准混合溶液按“1.2”条件连续进样 6 次, 计算各蛋白保留时间的 RSD 值。

1.5 样品测定

取注射用胸腺肽 $\alpha 1$ 制剂加流动相制成 1.0 g/L 的溶液, 按“1.2”条件进行测定。

表 1 组成胸腺肽分子量标准 4 种蛋白的分子量及其对数值
Table 1 Molecular weight and lgMW of four MW standard proteins of thymosin

Protein	MW(Da)	lgMW
Ribonuclease A(核糖核酸酶 A)	13 700	4.136 7
Human insulin(人胰岛素)	5 808	3.764 0
Thymosin $\alpha 1$ (胸腺肽 $\alpha 1$)	3 108	3.492 5
Somatostatin(生长激素释放抑制因子)	1 638	3.214 3

2 结果与讨论

2.1 色谱柱的选择

采用 SRT 100 柱按国家食品药品监督管理局国家药品标准《胸腺肽溶液质量标准》的流动相条件即三氟醋酸-乙腈-水(0.05:10:90)对核糖核酸酶 A、人胰岛素、胸腺肽 $\alpha 1$ 、生长激素释放抑制因子 4 种蛋白进行分离, 结果显示该条件下 4 种蛋白的分离效果并不理想。改用中国药品生物制品检定所《胸腺肽分子量标准说明书》的流动相条件即三氟醋酸-乙腈-水(0.1:35:65)时, 发现人胰岛素和胸腺肽 $\alpha 1$ 的出峰顺序颠倒, 将流动相调整为三氟醋酸-乙腈-水(0.1:65:35)后, 4 种蛋白按分子量大小顺序出峰, 并获得良好的分离效果。在三氟醋酸-乙腈-水(0.1:65:35)流动相条件下, 比较了 SRT 150、SRT 100、Zenix 150、Zenix 100 4 种 SEC 柱对蛋白的分离效果(结果见表 2), 结果表明, Zenix 100 柱获得的柱效、峰形、分离度最好。因此, 后续实验采用 Zenix 100 柱作进一步研究。

表 2 不同 SEC 柱获得的 4 种蛋白分离参数
Table 2 Separation parameters of four proteins by different SEC columns

Column	Factor	Ribonuclease A	Human insulin	Thymosin $\alpha 1$	Somatostatin
SRT 100	Plates(理论塔板数)	17 988	28 940	32 985	39 216
	Tailing(拖尾因子)	1.26	1.08	0.93	0.99
	Resolution*(分离度)		4.55	1.71	5.04
SRT 150	Plates	10 215	16 232	18 260	23 281
	Tailing	1.35	1.05	0.92	0.97
	Resolution		5.20	1.73	3.22
Zenix 100	Plates	31 765	47 376	51 797	61 672
	Tailing	1.21	1.00	0.91	0.96
	Resolution		7.69	2.48	6.48
Zenix 150	Plates	12 651	36 582	41 213	50 175
	Tailing	1.79	1.38	1.32	1.36
	Resolution		6.38	2.61	4.53

* the resolution between two neighboring components

2.2 流动相对 4 种蛋白保留行为的影响

流动相中乙腈比例分别为 35%、49% 和 75% 条件下 4 种蛋白在 Zenix 100 柱上的分离色谱图见图 1, 各蛋白质所对应的峰分别通过单标进样确认。由图可知, 当流动相中的乙腈比例为 35% 时, 分子量大的胰岛素反而迟于胸腺肽 $\alpha 1$ 出峰; 当流动相中的乙腈比例升至 49% 时, 胸腺肽 $\alpha 1$ 峰和胰岛素峰重叠; 在乙腈比例为 75% 的情况下, 4 种蛋白按照分子量大小顺序依次出峰。

4 种蛋白在 Zenix 100 柱上的保留时间随流动相中乙腈比例的变化而发生变化(见表 3)。乙腈比例在 35%~65% 范围内, 随着乙腈比例的提高, 4 种蛋白的保留时间提前, 其中生长激素释放抑制因子和胰岛素的保留时间下降趋势最为明显。乙腈比例在 65%~85% 范围内, 4 种蛋白的保留时间变化总体趋缓, 其中胸腺肽 $\alpha 1$ 的保留时间随乙腈比例的提高略呈上升趋势。

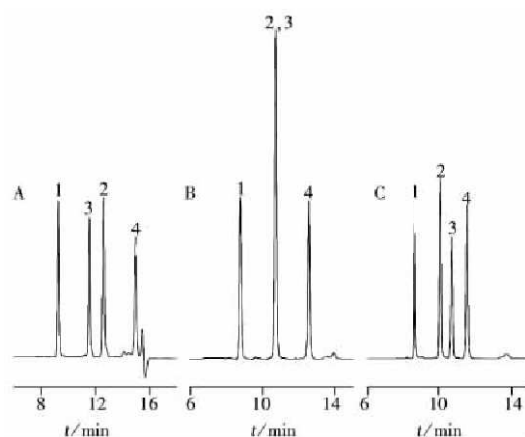


图 1 4 种蛋白在乙腈比例分别为 35% (A)、49% (B) 和 75% (C) 流动相中的 HPLC 谱图

Fig. 1 HPLC profiles of four proteins under 35% (A), 49% (B) and 75% (C) of ACN in mobile phase

1. ribonuclease A, 2. human insulin, 3. thymosin $\alpha 1$, 4. somatostatin

表3 不同乙腈比例下4种蛋白的保留时间
Table 3 Retention times of four proteins under different ACN proportion

ACN φ /%	Retention time t /min			
	Ribonuclease A	Human insulin	Thymosin α 1	Somatostatin
35	9.268	12.602	11.558	14.964
49	8.777	10.740	10.740	12.569
65	8.581	10.040	10.444	11.596
70	8.597	10.038	10.550	11.552
73	8.605	10.057	10.634	11.549
74	8.623	10.094	10.688	11.576
75	8.636	10.106	10.724	11.584
76	8.665	10.148	10.784	11.622
78	8.664	10.182	10.862	11.643
80	8.645	10.187	10.913	11.653
85	8.604	10.157	10.984	11.543

核糖核酸酶 A 和胸腺肽 α 1 是亲水性较强的蛋白。其中核糖核酸酶 A 结构中缺乏疏水基团^[12], 胸腺肽 α 1 结构中含有大量亲水氨基酸 Asp 和 Glu^[13], 因此, 这2种蛋白与 SEC 固定相表面上修饰基团的疏水作用很小, 其保留时间受流动相中乙腈比例变化的影响较小(如图2)。而人胰岛素和生长激素释放抑制因子是具有一定疏水性的蛋白, 生长激素释放抑制因子的分子结构中含有多个苯环, 人胰岛素分子中则存在一个大的疏水区^[14]。因此, 这两种蛋白容易与固定相上的某些非极性基团发生疏水作用, 使得在乙腈比例提高的过程中, 保留时间下降明显(如图2)。当流动相中的乙腈比例较高时, 蛋白与 SEC 固定相之间的疏水作用基本被消除, 因此其保留时间随乙腈比例提高的变化趋缓。在乙腈比例较高的情况下, 胸腺肽 α 1 的保留时间随乙腈比例增加呈上升趋势。这可能与其结构不稳定有关^[15], 胸腺肽 α 1 在水相比例较高的溶液中缺乏稳定的折叠, 而在有机相较高的情况下逐渐形成 α 螺旋结构, 使其空间体积变小, 从而延长在体积排阻色谱中的保留时间。

2.3 流动相对分子量校准曲线线性关系的影响

当乙腈比例大于49%时, 4种蛋白在 Zenix 100 SEC 柱上按照分子量大小顺序出峰, 因此, 本实验主要考察了在4种蛋白正常出峰顺序情况下的线性关系。如表4所示, 当乙腈比例为65%, 所得分子量校准方程的相关系数 $r^2 = 0.9769$, 随着乙腈比例的提高, 相关系数呈递增趋势, 在乙腈比例为75%时, 相关系数达到最大值(0.9885), 随后, 相关系数随乙腈比例的提高呈递减趋势。且当乙腈比例为75%时, 分子量对数(y)与保留时间(x)之间的线性关系最好, 分子量校准方程为 $y = -3.1386x + 21.724$, 在该流动相条件下, 4种蛋白在 Zenix 100 柱上的分离效果令人满意, 其理论塔板数在45783~63345之间, 拖尾因子在0.96~1.18之间, 分离度在3.52~8.82之间(见表5)。

表4 不同乙腈比例流动相下的分子量校准方程

Table 4 Molecular weight calibration equation by various ratios of acetonitrile in mobile phase

ACN φ /%	Calibration equation	Correlation coefficient (r^2)	ACN φ /%	Calibration equation	Correlation coefficient (r^2)
35	$y = -5.3465x + 31.623$	0.7919	75	$y = -3.1386x + 21.724$	0.9885
49	$y = -3.7717x + 24.480$	0.9186	76	$y = -3.1546x + 21.825$	0.9881
65	$y = -3.1272x + 21.585$	0.9769	78	$y = -3.1940x + 22.002$	0.9864
70	$y = -3.1059x + 21.527$	0.9859	80	$y = -3.2395x + 22.180$	0.9852
73	$y = -3.1190x + 21.601$	0.9883	85	$y = -3.2103x + 22.046$	0.9755
74	$y = -3.1352x + 21.695$	0.9880			

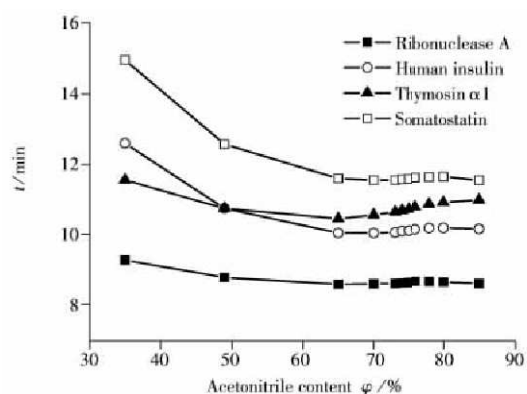


图2 流动相中乙腈比例对4种蛋白保留时间的影响
Fig. 2 Effect of acetonitrile proportion in mobile phase on retention time of four proteins

2.4 精密度实验

当流动相为三氟醋酸-乙腈-水(0.1:75:25)时,按保留时间计算,核糖核酸酶A、人胰岛素、胸腺肽 $\alpha 1$ 和生长激素释放抑制因子的相对标准偏差($n=6$)分别为0.28%、0.35%、0.14%和0.07%。

2.5 样品测定

在优化色谱条件下对某国内厂家生产的注射用胸腺肽进行了含量和高分子量物质测定。如图3所示,该制剂主要含有3种组分,按峰面积计算,其中含胸腺肽 $\alpha 1$ 为34.6%,其他两种物质含量分别为35.1%和11.4%,保留时间均在胸腺肽 $\alpha 1$ 之后,未检测到出峰时间在胸腺肽 $\alpha 1$ 之前的组分,即不含分子量大于10 kD的高分子量物质。检测结果符合《胸腺肽溶液质量标准》规定。

3 结论

本文通过对体积排阻色谱法测定胸腺肽分子量校准曲线的研究,讨论了流动相条件对测定的影响,并通过优化建立了一种液相色谱分析方法。该方法对4种胸腺肽分子量标准蛋白的分离效果优异,所得校准曲线线性关系良好,具有良好的准确性、稳定性和可靠性。因此,该方法在胸腺肽制剂质量检测方面具有良好的应用价值,可用于胸腺肽制剂中高分子量物质的检测,以及样品的分子量分布分析与各组分含量测定。

参考文献:

- [1] Low T L, Thurman G B, McAdoo M, McClure J, Rossio J L, Naylor P H, Goldstein A L. *J. Biol. Chem.*, **1979**, 254(3): 981-986.
- [2] Chen S, Ma B L. *Chin. J. Hospital Pharm.* (陈适, 马本良. 中国医院药学杂志), **2001**, 21(10): 617-618.
- [3] Chien R N, Liaw Y F, Chen T C, Yeh C T, Sheen I S. *Hepatology*, **1998**, 27(5): 1383-1387.
- [4] Zatz M M, Oliver J, Goldstein A L, Novak C, Jacobs R P. *Thymus*, **1984**, 6(4): 205-218.
- [5] WS1-XG-042-2000-2003. Quality Standard of Thymopeptides Solution. National Drug Standards of State Food and Drug Administration(胸腺肽溶液质量标准. 国家食品药品监督管理局国家药品标准).
- [6] Yu S L. *HPLC Method and Its Application*. 2nd ed. Beijing: Chemical Industry Press(于世林. 高效液相色谱方法及应用. 北京: 化学工业出版社), **2000**: 144-146.
- [7] Han D, Ye M L, Shi L H. *Chin. J. Chromatogr.* (韩冬, 叶美玲, 施良和. 色谱), **1995**, 13(6): 432-436.
- [8] Barth H G, Boyes B E, Jackson C. *Anal. Chem.*, **1998**, 70: 251-278.
- [9] Harms A V, Van Elteren J T, Claessens H A. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 755(2): 219-225.
- [10] Konáš M, Moy T M, Rogers M E, Shultz A R, Ward T C, Mcgrath J E. *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, **1995**, 33(10): 1429-1439.
- [11] Golovchenko N P, Kataeva I A, Akimenko V K. *J. Chromatogr. A*, **1992**, 591(1): 121-128.
- [12] Wlodawer A, Sjoelin L. *Biochemistry*, **1983**, 22(11): 2720-2728.
- [13] Han X, Gu J, Yuan Q L, Gan Y R. *Chin. J. Pharm.* (韩香, 顾军, 苑庆兰, 甘一如. 中国医药工业杂志), **2004**, 35(6): 335-337.
- [14] Derewenda U, Derewenda Z, Dodson G G, Hubbard R E, Korber F. *Br. Med. Bull.*, **1989**, 45(1): 4-18.
- [15] Grottesi A, Sette M, Palamara A T, Rotilio G, Garaci E, Paci M. *Peptides*, **1998**, 19(10): 1731-1738.

表5 75%乙腈比例流动相下4种蛋白的色谱分离参数
Table 5 Separation parameters of four proteins under 75% of acetonitrile in mobile phase

Compound	Retention time t_r /min	Plates	Tailing factor	Resolution *
Ribonuclease A	8.64	45 783	1.18	8.82
Human insulin	10.11	55 648	1.01	3.52
Thymosin $\alpha 1$	10.72	56 887	0.96	4.72
Somatostatin	11.58	63 345	0.97	

* the resolution between two neighboring components

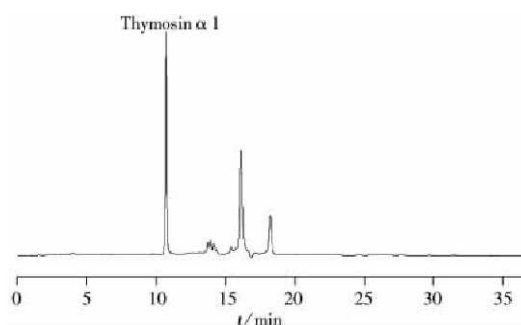


图3 胸腺肽制剂的液相色谱图
Fig. 3 Liquid chromatogram of thymosin preparation