

使用分析 / 制备切换 LC-MS 系统实现合成肽的高效制备纯化工作流程

Yuki Suzuki, Yusuke Masuda

特点描述

- ◆ 合成肽的多步无缝制备纯化工作流程可在单 LC-MS 系统内完成。
- ◆ LabSolutions MD 可以轻松研究目标化合物的最佳分离条件。
- ◆ 基于 LCMS-2050 优异的鉴别能力，可以从粗品中纯化出高纯度、高回收率的目标化合物。

■ 引言

21 世纪初，抗体药物等生物制药应运而生，但由于其生产工艺采用了基因技术，仍有许多挑战需要克服。肽类药物是中分子药物中的一种，其具有制造成本低，分子量小，易被细胞吸收，进入人体后可通过特定的三维结构防止药物降解等优点，因此，中分子药物目前备受重视。肽类与小分子药物一样通过化学合成产生，因此有必要对最终合成产物进行纯化、分馏和纯度确认。本文以应用 [01-00650-EN](#) 和 [01-00651-EN](#) 为基础，介绍了使用制备纯化液相色谱仪 Nexera Prep (图 1) 对合成肽进行多步无缝制备纯化工作流程 (优化分离条件、放大、分馏和确认纯度 / 回收率) 的案例研究。



图 1 Nexera™ Prep 系统

■ 分析 / 制备切换 LC-MS 的概述

本文使用的是分析 / 制备切换式 LC-MS 系统，该系统同时配备了分析流路和制备流路。分析流路用于评估分离条件、负载能力和纯度 / 回收率，而制备流路则用于目标肽的分馏。LCMS-2050 不仅能在优化分离条件时提供目标化合物的质量信息，还能有效地用于样品收集 (MS 触发馏分收集)，因此，可以回收高纯度的目标化合物。详细信息请参阅应用 [01-00650-EN](#)。

■ 优化分析规模的分离条件

以分析规模研究了含目标合成肽 (甲状旁腺素 (1-34) : PTH) 的合成样品粗品的分离条件。图 2 ①显示了优化分离条件前样品的紫外光谱图 (分析条件: 表 1)。在这种条件下，PTH 与共存杂质的分离不够充分，而进样量的增加会进一步恶化与杂质的分离，因此提高分离度对于回收高纯度 PTH 至关重要。

本研究采用 LabSolutions MD，其能够使用不同参数设置 (25 种梯度曲线模式和 5 种有机溶剂初始浓度和最终浓度组合模式) 全面研究 HPLC 分离条件。

在有机溶剂初始浓度为 25% 和最终浓度为 35% 的条件下，合成粗样品中的 PTH (蓝色箭头) 和杂质的分离效果最佳 (图 2 ②)。

表 1 分析条件

流动相	: 泵 A: 0.1% TFA 水溶液 泵 B: 0.1% TFA 乙腈溶液
色谱柱	: Shim-pack Scepter™ C18-120 (150 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm) *1
样品浓度	: 2 mg/mL N- 甲基吡咯烷酮溶液
进样量	: 10 μL
LC 条件	
时间程序 (%B)	: B 浓度 X%(0 min) → Y%(10 min) → 90% (10.01-15 min) → X%(15.01-20 min) X: 10, 15, 20, 25, 30 Y: 30, 35, 40, 45, 50
柱温	: 环境温度
流速	: 1 mL/min
进样环路大小	: 500 μL
注射器规格	: 500 μL
检测 (PDA)	: 220 nm (SPD-M40, 常规样品池)
MS 条件	
离子源	: ESI/APCI (DUIS™), 正离子模式 SCAN (m/z 500-2000)
雾化气流量	: 2.0 L/min
干燥气流量	: 5.0 L/min
加热气体流量	: 7.0 L/min
DL 温度	: 200°C
脱溶温度	: 250°C
接口电压	: 0.5 kV

*1 P/N: 227-31020-05

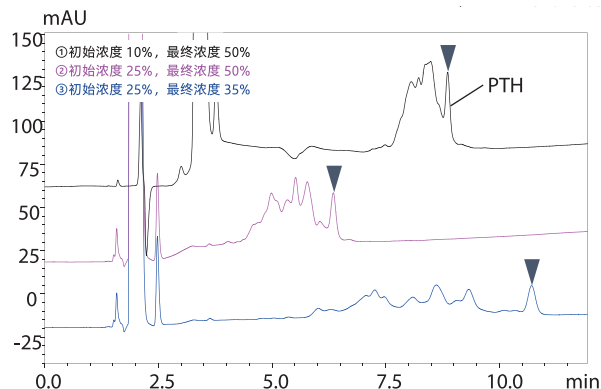


图 2 分离条件的优化结果

■ 上样量评价

在分析流路条件下 (图 2 ②)，合成样品 (10 mg/mL) 在 5、10、20 和 50 μL 的进样量下研究了上样量变化 (图 3)。由于 PTH 的分离效果并没有随着进样量的增加而降低，因此决定扩大规模，并采用 50 μL 进样量进行制备分析。

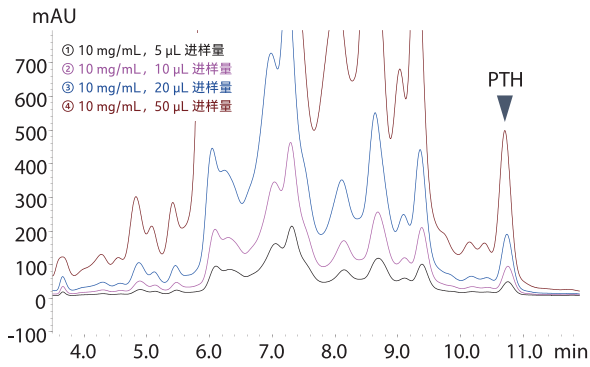


图3 上样量评估结果

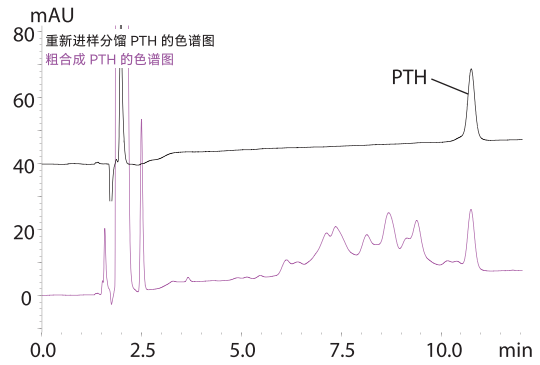


图5 PTH 馏分的纯度确认

■ PTH 的分馏

使用紫外信号触发和质谱信号对 PTH 进行触发收集。制备条件见表 2 (仅列表 1 不同的参数), 所得 LC 色谱图见图 4 (蓝色区域为馏份收集区间)。根据制备色谱柱 (内径 20 mm) 与分析色谱柱 (内径 4.6 mm) 的横截面积比 (约 20 倍), 将流速按比例增加至 20 mL/min (在规模放大前后, 线速度保持不变), 进样量增加至 1 mL。

放大前后获得相似的分离度, 并保持与杂质的分离; MS 和 UV 触发的联合使用可实现高选择性的 PTH 分馏。

表 2 分析条件

色谱柱	: Shim-pack Scepter C18-120 (150 mm × 20 mm I.D., 5 μm)*1
样品浓度	: 10 mg/mL N-甲基吡咯烷酮溶液
进样量	: 1000 μL
LC 条件	
流速 (Prep)	: 20 mL/min
流速 (MS 尾吹)	: 1.5 mL/min (0.1% 丙酸水溶液 / 甲醇 = 90/10)
进样环路大小	: 2 mL
注射器规格	: 5 mL
检测 (PDA)	: 220 nm (SPD-40V, 制备池)

*1 P/N: 227-31102-03

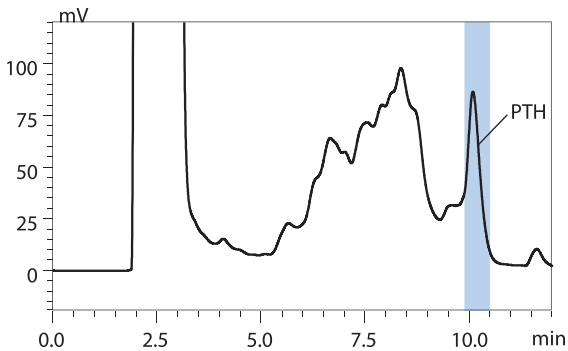


图4 使用 UV+MS 触发的制备色谱图

* 蓝色带表示馏分区间

■ 确认收集馏分的纯度

图 5 显示了通过将馏分收集后的 PTH 重新进样至分析流路获得的色谱图和馏分前合成样品的色谱图比较, 合成样品与制备收集的 PTH 馏分具有相同的理论浓度。色谱图比较表明成功纯化了目标 PTH。

■ 使用标准 PTH 评估纯度和回收率

使用血管紧张素 I 的标准溶液对该系统设置的制备性能 (纯度和回收率) 进行了评估。图 6 显示了将分馏血管紧张素 I 重新进样至分析路径时获得的色谱图, 以及制备的标准溶液的色谱图进行比较, 该标准溶液具有与收集的血管紧张素 I 馏分相同的理论浓度。纯度和回收率见表 3。以面积归一化计, 纯度为 100%, 通过峰面积比较计算的回收率为 97.9%, 表明能够进行可靠的制备。

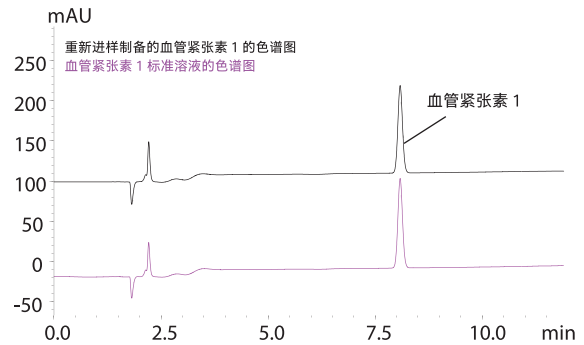


图6 血管紧张素 I 的纯度和回收率确认

表 3 制备的血管紧张素 I 的纯度和回收率

	纯度 (面积 %)	回收率 (%)
血管紧张素 I	100.0	97.9

■ 结论

可以使用分析 / 制备切换 LC-MS 系统执行无缝制备纯化工作流程。此外, LabSolutions MD 可以自动创建一个分析批计划, 其中研究各种 HPLC 参数设置, 从而有效地优化分离条件。

此外, LCMS-2050 能够基于 MS 触发对目标化合物进行高选择性收集制备。本文中使用的分析 / 制备切换 LC-MS 具有分析和制备两种流路, 能够在多肽的制备纯化 (包括其合成过程确认) 中实现高效的制备纯化工作流程。

< 相关应用 >

1. 在单个 LC-MS 系统中从分析到制备的无缝纯化流程, [Q1-00650-EN](#)
2. 通过 LC-MS 系统上的 UV/MS 触发器实现高纯度制备纯化, [Q1-00651-EN](#)

岛津应用云



LCMS、Nexera、LabSolutions、Shim-pack Scepter 和 DUIS 是岛津制作所或其附属公司在日本和 / 或其他国家的商标。



岛津企业管理 (中国) 有限公司
岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

免责声明:

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;
* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2024 年 6 月