

L-羟脯氨酸寡肽混合物的高效液相色谱分离与质谱分析

孙艳亭¹, 卢奎¹, 马丽¹, 曹书霞², 赵玉芬^{2,3}

(1 河南工业大学化学化工学院, 河南 郑州 450052; 2 郑州大学化学系 化学生物学重点实验室, 河南 郑州 450052; 3 厦门大学化学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 研究了三氯氧磷辅助下 L-羟脯氨酸的成肽反应, 建立了采用反相高效液相色谱-质谱/质谱联用技术分离鉴定羟脯氨酸寡肽混合物的方法, 优化了 L-羟脯氨酸寡肽混合物的色谱分离条件。实验以 YWG C8柱 (10 μm, 250 mm × 10 mm) 为分离柱, 以乙腈-0.06% 三氟乙酸水溶液 (体积比为 2:98) 为流动相进行等度洗脱, 在正离子模式下对洗脱物进行了电喷雾电离串联质谱鉴定。结果显示, 分离出的各组分分别为 L-羟脯氨酸二肽、L-羟脯氨酸环二肽和 L-羟脯氨酸三肽。

关键词: 反相高效液相色谱; 电喷雾串联质谱; L-羟脯氨酸寡肽混合物

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2007)04-0524-04 栏目类别: 研究论文

Isolation and Identification of the Mixture of L-Hydroxyproline Oligo-Peptides by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

SUN Yanting¹, LU Kui¹, MA Li¹, CAO Shuxia², ZHAO Yufen^{2,3}

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450052, China;

2. Key Laboratory for Chemical Biology, Department of Chemistry, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 3. Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract A reversed-phase high performance liquid chromatographic-electrospray ionization tandem mass spectrometric method (RP-HPLC/MS²) was developed for the analysis and identification of a reaction mixture of L-hydroxyproline oligo-peptides. The mixture was separated on a YWG C8 column (10 μm, 250 mm × 10 mm) using acetonitrile-water containing 0.06% trifluoroacetic acid (2:98 v/v) as the mobile phase. The separation conditions were optimized. The mixture was analysed with electrospray ionization mass spectrometry (ESI/MS) and ESI-MS/MS in positive mode. MS and MS² spectra of individual chromatographic peak were obtained. It indicated that there were hydroxyproline dipeptide, hydroxyproline tripeptide and hydroxyproline cyclo-dipeptide in the mixtures, besides hydroxyproline. The described method can be effectively applied to perform identification of hydroxyproline oligo-peptide mixtures.

Key words reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC); electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI/MS/MS); L-hydroxyproline oligo-peptide mixture

寡肽类化合物一般具有较强的生物活性, 多数可作为药物或药物前体^[1], 因此如何利用分子生物学、基因工程、多合成技术获取更多具有生物活性的肽日益成为一个引人关注的研究热点。但由于肽的合成过程中可生成多种中间体及类似物, 因此需要

对其进行分离纯化, 以最终获得高纯度的产品。随着生命科学研究的不断深入, 用于多肽及蛋白质分离纯化的色谱方法得到了很大的发展。反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 因具有分离效果好、分辨率高、回收率高等特点, 在多肽的分离纯化和制备中得到

收稿日期: 2007-01-04

第一作者: 孙艳亭, 女, 硕士研究生, E-mail sun-yanting@163.com

通讯联系人: 卢奎, 男, 博士, 教授, Tel (0371)67789939, E-mail luekyluke@haut.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (Nos 20272055, 20572016), 河南省杰出青年科学基金资助项目 (No 0312000900) 和河南省教

育厅科技计划资助项目 (2006KYCX017, 200510459015) Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

广泛的应用^[2-4]。本文以三氯氧磷 (POCl_3) 作为辅助试剂研究了羟脯氨酸的成肽反应, 用 RP-HPLC 对成肽产物进行了分离纯化, 并用电喷雾电离串联质谱 (ESI-MS/MS) 对分离产物进行了鉴定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Bruker Esquire 3000 离子阱液相色谱-质谱仪; Agilent 1200 半制备高效液相色谱仪。

L-羟脯氨酸 (上海源聚生物科技有限公司, 进口分装), 三氯氧磷 (分析纯, 使用时需重蒸, 上海化学试剂公司), 乙腈 (色谱纯, 天津四友公司), 三氟乙酸 (TFA) (分析纯, 郑州派尼化学试剂厂), 实验用水均为二次重蒸水。

1.2 高效液相色谱和质谱条件

高效液相色谱条件: 色谱柱为 YWG C8 柱 (10 μm , 250 mm \times 10 mm); 紫外检测波长为 214 nm, 柱温为室温。流动相为 0.06% TFA 水溶液-乙腈 (体积比为 98:2), 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 10 μL 。

质谱条件: ESI 离子源, 正离子检测模式, 喷雾电压为 4 000 V, 喷雾气 (N_2) 压力为 172.25 kPa (25 psi), 干燥气 (N_2) 流速为 7 L/min, 干燥温度为 300 $^\circ\text{C}$ 。

1.3 L-羟脯氨酸与 POCl_3 的成肽反应

将 12.5 mmol (1.64 g) 的 L-羟脯氨酸、12.5 mmol POCl_3 (1.15 mL) 置于 100 mL 乙腈中, 于 20 $^\circ\text{C}$ 下搅拌 2 h 加入 20 mL 水终止反应。反应后的混合液经旋转蒸发除去乙腈, 加水 30 mL 稀释后用于液相色谱分析。

2 结果与讨论

2.1 合成产物的分离

RP-HPLC 方法中溶质的保留行为主要受固定相材料、流动相组成、酸性抑制剂种类及浓度、柱温、流速等多种分析因素的综合影响^[5]。因此, 本文从以下几方面对混合物的分离情况进行讨论。

2.1.1 色谱柱的选择

实验考察了合成产物在不同色谱柱上的分离情况。由于待分离组分的极性较大, 故在 C18 柱中的保留时间较短, 各组分不能很好地分离 (见图 1-a)。在 C18 柱上合成产物仅被分为两组峰, 峰 1 为 L-羟脯氨酸、L-羟脯氨酸二肽、L-羟脯氨酸三肽及其他杂质的混合峰, 峰 2 主要为 L-羟脯氨酸环二肽。改用 C8 柱分离, 在优化的流动相条件下获得了较好的分离, 图 1-b 中峰 1 对应 L-羟脯氨酸二肽, 峰 2 对应

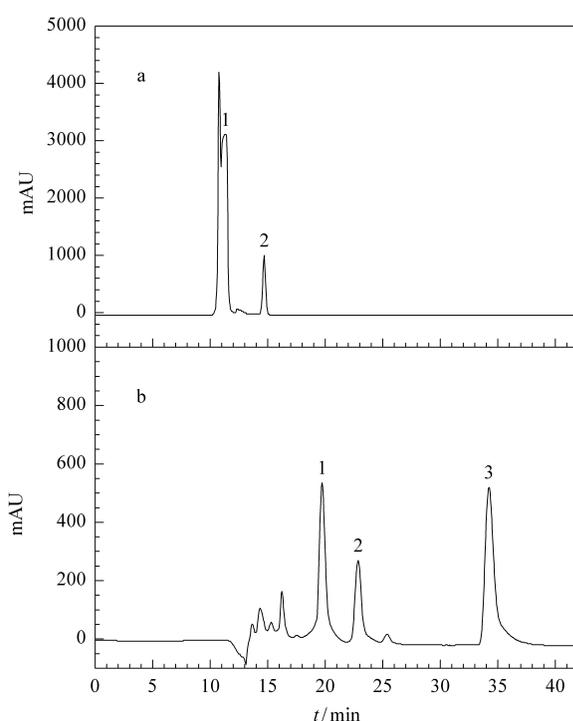


图 1 样品在不同色谱柱下的色谱分离图

Fig 1 Chromatograms of a reaction product on different columns

a C18 column 1. the mixture of L-hydroxyproline, L-hydroxyproline dipeptide and L-hydroxyproline tripeptide, 2 L-hydroxyproline cyclo-dipeptide
b C8 column 1. L-hydroxyproline dipeptide, 2 L-hydroxyproline tripeptide, 3. L-hydroxyproline cyclo-dipeptide

L-羟脯氨酸三肽, 峰 3 对应 L-羟脯氨酸环二肽。

2.1.2 洗脱条件的选择与优化

以乙腈-水作为流动相对合成产物进行分离时, 各组分不能很好地分离 (如图 2-a 所示)。图 2-a 中峰 1 主要为 L-羟脯氨酸及其他杂质, 峰 2 为 L-羟脯氨酸二肽、L-羟脯氨酸三肽及 L-羟脯氨酸环二肽的混合物。这可能是由于流动相中含有大量的水, 使得 L-羟脯氨酸及其寡肽中的羟基、羧基等容易产生解离, 从而使色谱峰形拖尾、变宽和不对称。应用 RP-HPLC 分离蛋白质和肽, 通常在流动相中加入酸性抑制剂, 以调节流动相的 pH 值, 改善色谱峰的峰形和分离度。TFA 是 RP-HPLC 分离蛋白质和肽时最常用的离子对试剂, 且 TFA 易挥发, 有利于制备分离后样品的后处理。实验发现, 加入 TFA 后分离度及峰形均得到明显改善, 符合分离要求。

一般情况下, 随着流动相中 TFA 含量的增加, 各组分的保留减弱, 色谱峰对称度提高。但由于 TFA 酸性较强, 容易造成键合固定相表面功能团的流失, 降低色谱柱寿命^[6]。在综合考虑分离度、保留时间、色谱峰对称度、色谱柱寿命的基础上, 实验选择在流动相中添加 0.06% 的 TFA。在此流动相

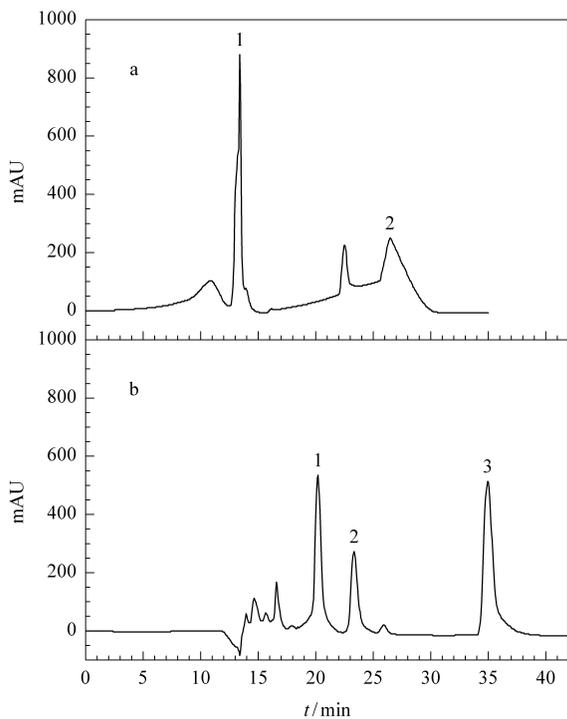


图 2 不同流动相对 L-羟脯氨酸寡肽分离的影响

Fig 2 Chromatograms of L-hydroxyproline oligo-peptide mixture using different mobile phases

a mobile phase acetonitrile-water (3:97 v/v). 1 the mixture of L-hydroxyproline and the impurities 2 the mixture of L-hydroxyproline dipeptide, L-hydroxyproline tripeptide and L-hydroxyproline cyclo-dipeptide

b mobile phase acetonitrile-water containing 0.06% TFA (2.98 v/v). 1 L-hydroxyproline dipeptide 2 L-hydroxyproline tripeptide 3 L-hydroxyproline cyclo-dipeptide

条件下等度洗脱, 比较了乙腈体积分数分别为 3%, 2%, 1.5% 时的分离情况。结果表明, 采用 3% 乙腈作为流动相时, L-羟脯氨酸二肽和三肽与邻近杂质不能得到很好的分离, 以 1.5% 乙腈作为流动相时保留时间过长, 而用 2% 的乙腈洗脱时, 各组分能够实现很好的分离, 且保留时间适中 (见图 2-b)。

2.2 各色谱峰的归属

在无标准对照品的情况下, 利用 ESI/MS 对 RP-HPLC 分离出的各组分峰进行鉴定。由 ESI/MS 检测结果 (见图 3) 可知, 图 2-b 中保留时间在 20.16 min 处的准分子离子峰为 m/z 245 的组分相对分子质量为 244, 23.35 min 处的准分子离子峰为 m/z 227 的组分相对分子质量为 226, m/z 453 和 m/z 475 的峰分别为该组分的二倍体峰及二倍体加钠峰; 34.09 min 处的准分子离子峰为 m/z 358 的组分相对分子质量为 357。

为了进一步确证液相色谱分离出的各组分的结构, 利用 ESI/MS/MS 分别对各组分进行了研究并加以解析。 m/z 为 245, 227, 358 的分子离子峰的二级质谱图见图 4。在正离子模式下, 在 m/z 245

分子离子峰的二级质谱中可以观察到 m/z 132, 86 以及 m/z 68 的碎片离子峰。 m/z 132 为目标分子脱去一分子 L-羟脯氨酸残基的碎片离子峰; L-羟脯氨酸单体 (m/z 132) 脱去一分子甲酸得到 m/z 86 的碎片离子峰; 继而脱去一分子水得到 m/z 68 的碎片离子峰。在 m/z 227 分子离子峰的二级质谱中可以观察到 m/z 114, 86, 68 的碎片离子峰。目标分子均裂形成两分子羟脯氨酸残基, 即为 m/z 114 碎片离子峰; m/z 86 的碎片离子峰由 L-羟脯氨酸残基脱去一分子一氧化碳而得。在 m/z 358 分子离子峰的二级质谱中观察到了 m/z 245, 227, 199, 132 以及 m/z 114 的碎片离子峰。 m/z 245 为目标分子脱去一分子 L-羟脯氨酸残基的碎片离子峰, 继而脱去一分子水形成 m/z 227 的碎片离子峰; m/z 227 脱去一分子一氧化碳得到 m/z 199 的碎片离子峰; 脱去一分子 L-羟脯氨酸残基得到 m/z 132 的碎片离子峰或均裂形成 m/z 114 碎片离子峰。以上断裂形式均符合多肽 b 型断裂的典型特征。经上述分析可知分子离子峰为 m/z 245, 227, 358 的各组分分别对应 L-羟脯氨酸二肽、L-羟脯氨酸环二肽和 L-羟脯氨酸三肽。

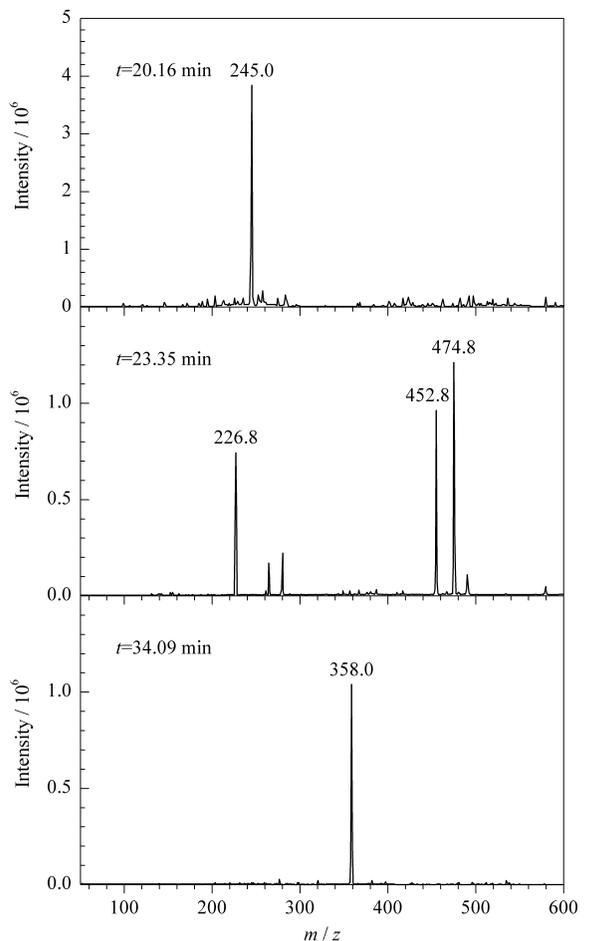


图 3 反应产物的 ESI-MS 分析

Fig 3 ESI-MS analysis of the reaction product

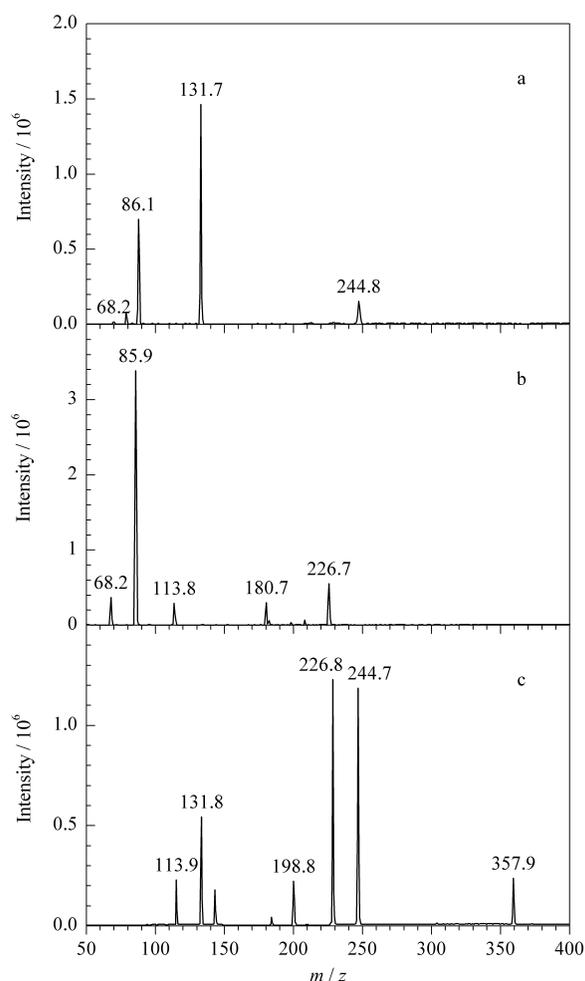


图 4 各产物的 ES/MS MS 裂解图

Fig 4 ES/MS MS spectra of the reaction mixture
 a m/z 245; b m/z 227; c m/z 358

3 结论

本研究通过对色谱柱、流动相组成等影响因素的探讨, 适当调节流动相中 TFA 的加入量、乙腈与水的比例, 找到了优化的流动相酸度及洗脱条件, 建立了 RP-HPLC 分离 L-羟脯氨酸寡肽混合物的方法。但在缺乏标准对照品的情况下 RP-HPLC 仅能用于合成产物的分离, 而难以给出各组分的化学结构信息。电喷雾质谱不仅可以一次性测定合成产物中各组分的相对分子质量, 而且可以获得目标肽和各主要副产物的结构信息, 成为鉴定化学合成多肽及其副产物的有效工具, 与高效液相色谱技术联用后更加有力地推动了化学合成多肽的鉴定。实验采用高效液相色谱-质谱联用技术分离鉴定了 L-羟脯氨酸寡肽合成产物中的 L-羟脯氨酸二肽、L-羟脯氨酸环二肽和 L-羟脯氨酸三肽。

参考文献:

- [1] Morita H, Yun Y S, Takeya K, Itokawa H, Shiota O. *Phytochemistry*, 1996, 42(2): 439
- [2] Purcell A W, Aguirre M I, Hearn M T W. *J Chromatogr A*, 1995, 711: 61
- [3] Sergeev N V, Gbukhova N S, Nazimov I V, Gulyaev V A, Shvets S V, Donesky I A, Miroshnikov A I. *J Chromatogr A*, 2001, 907: 131
- [4] Lu P, Carr C D, Chadwick P, Li M, Harrison K. *BioPharm*, 2001, 14(9): 28
- [5] Marko-Varga G, Barceš D. *Chromatographia*, 1992, 34: 146
- [6] Kunžan N M, Johnson D. *J Chromatogr*, 1986, 371: 313