DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.10.019
第22卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 10
2000年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2000

文章编号:1000-5404(2000)10-0969-03

论著

Delta Pak C_{18}填料用于P44纯化制备工艺可行性研究

周 伟,吴玉章,王祥智,边 疆,贾正才 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究Delta Pak C_{18}反相填料用于P44纯化制备工艺可行性,为固相合成疏水性肽苗的制备工艺作探索性研究。方法 选用美国Waters公司Delta Pak C_{18}反相色谱填料和高压液相色谱系统Delta 600,采用乙腈、三氟乙酸体系为流动相,对P44从分析柱、半制备柱、径向加压制备柱3个水平进行了基线分离载量及放大的研究。结果 目标肽峰面积积分分别为71.14%、70.12%、69.68%,收率放大前后趋一致,载量分别为100 μg、< 5 mg、< 10 mg,制备目标肽收峰经Symmetry C_{18}柱分析及PDA纯度鉴定为单一组分。结论 该填料可作为P44的小量精制,用作放大制备其载量尚不能满足需要。

关键词:Delta Pak C_{18}反相填料,P44,载量,放大系数
中图法分类号:R392-33 文献标识码:A

Feasibility of Delta Pak C_{18} stuff in P44 prep

ZHOU Wei, WU Yu-zhang, WANG Xiang-zhi, BIAN Jiang, JIA Zheng-cai (Institute of Immunology PLA, Third military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the feasibility of Delta Pak C_{18} stuff in the preparation of purified P44. Methods Delta Pak C_{18} stuff and high-performance liquid chromatography (HPLC) were employed to separated P44 in analysis, semi-prep, and prep levels. Results Aim peptide peak area integrates were 71.14%, 70.12% and 69.68%. The sample load masses were 100 μg, < 5 mg and < 10 mg respectively. The aim peptide was confirmed to be purified with PDA detect. Conclusion Our findings suggest that Delta Pak C_{18} stuff can be used in laboratory prep for P44.

Key words: Delta Pak C_{18} stuff; P44; load mass; scale-up factor

固相合成多肽的纯化制备通常采用反相色谱的方法。C_{18}填料作为首先考虑对象而被运用;色谱方法则以乙腈、三氟乙酸体系为流动相的梯度方法最具代表[1]。经Fmoc法固相合成的P44为一种疏水性极强的多肽,疫苗分子设计在重点考虑肽苗免疫原性的同时,其被色谱分离纯化的难度也随之加大。早有报道以反相色谱的方法用于纯化小的强疏水肽,而对于氨基酸残基数目大于30的强疏水肽的分离罕见报道,其间夹杂更多的是差异较大的天然强疏水肽的分离纯化。为保证有良好的选择性及分辨率,本研究选用了长碳链键合相的Waters公司Delta Pak C_{18}填料,以论证Delta Pak填料用于肽苗放大制备的可行性,作为肽苗后期制备放大工艺填料筛选的基础研究。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39700132)
作者简介:周 伟(1968-),男,重庆市人,实验师,主要从事多肽及蛋白质分析、纯化及鉴定方面的研究。电话:(023)68752236
收稿日期:2000-08-04;修回日期:2000-09-30

1 材料与方法

1.1 色谱柱

Delta Pak C_{18} 5 μm 100Å 3.9× 150 mm分析柱(美国Waters公司),Delta Pak C_{18} 15 μm 100Å 19× 300 mm半制备柱(美国Waters公司),Delta Pak Prep C_{18} 15 μm 100Å 25× 300 mm径向加压柱(美国Waters公司),Symmetry C_{18} 5 μm 100Å 3.9× 150 mm分析柱(美国Waters公司)。

1.2 仪器及试剂

Purelab Plus UV/UF超纯水系统(德国USF),Delta 600分析兼半制备液相色谱系统(美国Waters公司),Millennium^{32}色谱工作站数据处理系统(美国Waters公司),HPLC级乙腈(CH_3CN)(美国Fisher公司),HPLC级三氟乙酸(TFA)(美国Sigma公司),HPLC级二甲亚砜(DMSO)(美国Sigma公司)。

1.3 样品预处理

固相合成疏水肽粗品(Fmoc法固相合成P44[2])用极性溶剂DMSO溶解,10 mg/ml,过0.45 μm滤膜置室温待用。

1.4 Delta Pak C_{18}分析柱色谱方法及各柱分离条件测试[3]

首先通过宽范围梯度预实验确定分离的最佳流动相梯度范围为40%~60% CH_3CN/0.1%TFA,流速为1 ml/min,梯度时间

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

30 min。因该方法将作为随后的放大方法，在色谱方法预实验时考虑了放大时线流速可能因柱反压太高而无法放大等因素，那么放大时因线流速的下降，目的肽峰保留时间也将延后，故首先在分析柱方法确定时所选择的梯度时间应为随后的放大留有充足的范围。分析柱载量的测试则分别以 20、50、100、200、500 μl 5 种进样环满环法进样进行测试。选取达到基线分离且载量最大者为 Delta Pak C_{18}填料分析柱载量值。Delta Pak C_{18}填料半制备柱、径向加压柱放大系数及载量的计算[4]参考以下公式：

放大系数=（制备柱直径）^{2}× 柱长/（分析柱直径）^{2}× 柱长

Delta Pak C_{18}填料半制备柱、径向加压柱最佳流速的选择根据柱耐受的压力上限（PSI）测得，Delta Pak C_{18}半制备柱的最佳流速为 8 ml/min，Delta Pak C_{18}径向加压柱的最佳流速为 15 ml/min；由分析柱的载量换算成半制备柱及径向加压柱的上样载量后分别进行半制备及制备（分别重复 3 次），收集径向加压柱制备的目的肽峰用 Waters Symmetry C_{18}反相对称柱以 40%～60% CH_3CN 0.1% TFA 1 ml/min 6 min 色谱方法分析及 996 PDA 峰纯度鉴定，半制备及制备色谱图进行峰面积积分处理。

2 结果

Delta Pak C_{18}分析柱载量测试结果，见表 1。由此选定 100 μl 为分析柱分离载量，即 100 μg。由于 DMSO 溶剂在 214 nm 有很强的吸收，故从 996 二极管矩阵检测器收集光谱数据中提取 280 nm 作为检测波长，目的肽峰面积百分比为 71.14%。

表 1 **Delta Pak C_{18}分析柱载量测试结果**

Tab 1 Sample load mass test of Delta Pak C_{18}

	20 μg	50 μg	100 μg	200 μg	500 μg
Seperation of baseline	Yes	Yes	Yes	No	No

根据溶样浓度及载量放大公式计算，半制备柱与径向加压制备柱载量分别为 4.74 mg 和 8.212 mg，但为保证进样的重现性及精确度，采用满环进样，半制备及制备柱上样量分别确定为 5 mg 和 10 mg，以适宜 500 μl 和 1 ml 进样环满环进样要求。从半制备及径向加压制备柱色谱图，见图 1、2。积分计算，其目的肽峰面积百分比分别为 70.12%和 69.68%。制备柱目的肽全峰收峰经 Symmetry C_{18}分析柱 280 nm 检测目的肽制备峰纯度为 98.96%，见图 3，目的肽峰 PDA 纯度鉴定通过，见图 4。

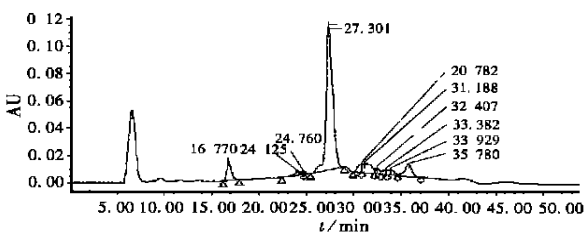


图 1 **5 mg P44 Delta Pak C_{18}半制备柱色谱图**

Fig 1 Chromatogram of Semi-Prep column

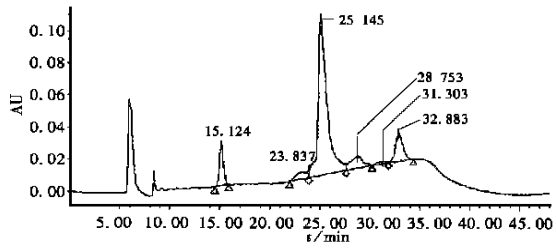


图 2 **10 mg P44 Delta Pak C_{18}径向加压柱色谱图**

Fig 2 Chromatogram of Prep column

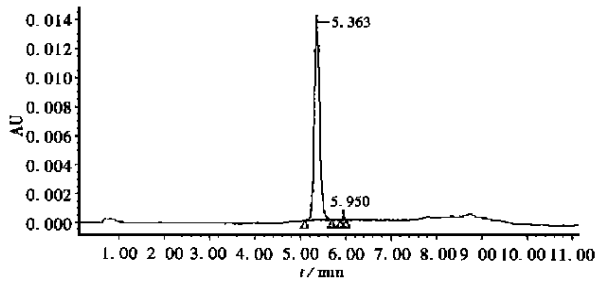


图 3 制备收集峰 **Symmetry C_{18}柱分析色谱图**

Fig 3 Symmetry C_{18} column Chromatogram of aim peptide from Prep column

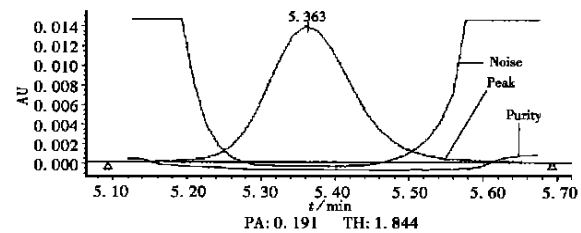


图 4 制备收集峰 **Symmetry C_{18}柱分析色谱峰 PDA 纯度分析**

Fig 4 Purity plot of aim peptide from Prep column

3 讨论

以上结果显示 Delta Pak C_{18}填料从 3.9 mm 分析柱到 2.5 cm 径向加压制备柱放大线形关系良好。主峰面积积分为 70%左右，Symmetry C_{18}柱分析及 PDA 纯度鉴定说明能达到制备质控要求（纯度＞95%）。然而问题是即使在大于柱基线分离载量的情况下测试，载量仍然太小（10 mg），设想放大到柱生产厂最大规格的 4 cm直径的径向加压制备柱，理论上也只能每次纯化 20 mg，离制备级水平存在较大距离。本研究目的在为 P44 的放大工艺作探索性研究，选用了 Waters Delta Pak C_{18} 100 Å 5 μm 及 15 μm 填料作为制备的前期基础研究，因 P44 较强的疏水性，样品预处理采用了比流动相

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

极性强的DMSO 极性溶剂溶样, 可能制约了 Delta Pak C_{18}填料的优势, 对其柱效产生一定的影响。在本实验展示 Delta Pak C_{18}填料在 3 种柱水平收率都保持在相当恒定范围的同时, 又为其低载量深感遗憾, 这几乎限制了其在 P44 制备工艺的应用。能否找到一种高载量的反相填料将成为解决 P44 制备工艺的关键。总之, 本实验提示将 Delta Pak C_{18}填料在 P44 的应用定位于分析及实验室小量的制备的确是一种不错的选择。

参考文献:

[1] Young P M, Wheat T E. Alternative mobile phases for enhanced chromatographic selectivity and increased sensitivity in peptide separations[J]. Pept Res, 1990, 3(6): 287—292.

[2] Zeng W, Regamey P O, Rose K, Wang Y, *et al*. Use of Fmoc-N-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl) amino acids in peptide synthesis [J]. J Pept Res, 1997, 49(3): 273—279.

[3] TBarbosa J, Sanz Nebot V, Toro I. Solvatochromic parameter values and pH in acetonitrile water mixtures. Optimization of mobile phase for the separation of peptides by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 1996, 725(2): 249—260.

[4] Knight M, Strickler M P, Stone M J, *et al*. Scale-up methodology for the preparative purification of peptide M[J]. J Chromatogr, 1988, 459: 361—367.

(编辑　汪勤俭)

(上接 968 页)

主要症状及体征: 伤后神志清醒 14 例, 意识障碍 12 例, 其中意识障碍 30 min 者 7 例, 30 min 至 1 h 者 5 例, 中间有清醒期 2 例。多数病例伤后 2~48 h 才出现相应梗塞体征, 3~5 d 最典型, 其中偏瘫 9 例, 单瘫 3 例, 偏身感觉障碍 2 例, 语言障碍 3 例, 抽搐 2 例, 头痛及躁动不安 7 例。

辅助检查: 本组病例均在伤后 24~72 h 行头颅 CT 检查, 23 例明显的显示脑梗塞灶, 其单侧基底区 19 例中右侧 13 例, 左侧 6 例, 双侧基底节区 3 例, 枕叶 1 例。梗塞灶呈圆形或椭圆形, 边界多较清楚, 直径< 5 mm 1 例; 5~10 mm 13 例; 10~20 mm 9 例, 全为腔隙性梗塞。另 3 例未见梗塞, 伤后 5~7 d 再次行 CT 检查均见梗塞病灶。

治疗方法及结果: 本组病例均采用非手术治疗方法。用 20% 甘露醇降颅内压(用量按每次每公斤体重 0.5~1 g/kg, 2~3 次/d 静滴); 用地塞米松 5~10 mg 分 2 次静滴, 预防和治疗脑水肿。使用能量合剂(三磷酸腺苷、辅酶 A、细胞色素 C)、脑复康、美络宁等药, 促进神经功能的恢复。

随访期 6~24 个月, 全组 26 例均获随访, 无死亡。伤后出现偏瘫、偏侧感觉障碍、语言障碍, 先后完全恢复。癫痫症状消失, 未再服用抗癫痫药物, 其中 10 例病人 14 个月内复查头颅 CT, 基底节区可见残留陈旧性梗塞病灶, 但较治疗前明显缩小。

2　讨论

小儿外伤性脑梗塞在临床较少见, 多数学者认为本病属颅脑外伤的并发症, 并逐渐被人们所认识, 其发病机制还不十分清楚, 推测可能与以下几个方面有关: (1)小儿颈部肌肉支持和保护作用差, 外伤时头颅过伸损伤颈内动脉形成微小血栓, 栓子脱落造成脑梗塞[1]。(2)基底节为终末血管供血, 血供相对差, 侧枝循环少, 供血的脉络膜动脉深穿支从主干动脉分支时多呈直角, 再加小儿的脑血管发育不完善, 外界暴力作用于头部时颅底与脑组织, 表面脑组织与深部组织产生相对运动, 易造成供血动脉扭曲、牵拉、移位等, 引起血管内膜或分支处的损伤, 致血浆内皮素增强, 强烈的缩血管物质使血小板聚集增多, TXA_2 释放, 脑血管痉挛, 狭窄, 继发脑血栓形成, 引起脑梗塞。本组多例基底节区发生脑梗也说明与该处解剖因素密切。(3)小儿颅脑损伤后, 由于脑水肿和脑血管痉挛, 脑循环发生障碍和脑血流的改变, 脑局部缺血可产生腔隙梗塞, 并多为伤后 3~7 d 达高峰, 本组患儿症状明显期与此期符合, 也说明脑外伤后腔隙梗塞与伤后循环障碍互为因果[1,2]。

小儿外伤性脑梗塞早期诊断较困难, 常常被颅脑损伤的症状所掩盖, 临床中应警惕。本病通常在伤后 2~48 h 发病, 有时延迟到 3~7 d。由于症状迟缓, 在伤后有一中间好转状态, 通常误诊为急性硬膜外血肿, 其主要区别在于脑梗塞的病人有明显的偏瘫, 而意识状态相对较好。我院所收治的 26 例小儿外伤性脑梗塞, 主要为腔隙性脑梗塞, 早期临床症状往往不明显。根据我们收治 26 例的体会, 作者认为对于: (1)小儿有头部较轻的外伤史, 尤其头颅过伸旋转受伤者; (2)亚急性起病, 症状体征多在 3~5 d 较典型, 一般不伴严重的意识障碍; (3)头部损伤不重, 伤后出现相对较迟的肢体运动障碍, 如偏瘫、单瘫, 少数的感觉改变者, 意识障碍往往与体征不成正比, 瘫痪重于意识改变; (4)头颅 CT 片上排除了颅内小血肿, 脑挫伤, 而在基底节区可见孤立的(15 mm 大小的低密度区, 且无占位效应及脑疝征, 应考虑小儿外伤性脑梗塞的诊断。对于 CT 片阴性表现者, 可多次复查头部 CT 或 MRI 检查, 有利于本病的诊断。本组有 3 例早期 CT 扫描未发现明显病灶, 伤后 5~7 d 采用 0.5 cm 基底节薄层扫描病灶显示清楚, 发现基底节区有一 5~10 mm 大小腔隙性梗塞灶。

在治疗上, 应早期使用脱水药和肾上腺皮质激素, 降低颅内压, 消除脑水肿; 应用脑细胞代谢药物, 促进神经功能恢复。注意水盐电解质酸碱平衡, 维持正常的颅内压, 保护好脑的灌注。对于有昏迷者, 应用胞二磷胆碱药苏醒, 对于并有外伤性蛛网膜下腔出血的病人, 应早期使用钙离子拮抗剂, 如尼莫地平或尼莫通, 缓解血管痉挛。本组 26 例经综合治疗, 效果满意。

关键词: 脑外伤; 脑梗塞; 小儿
中图法分类号: R743.33　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 樊金陵, 郭建军. 外伤后基底节区腔隙梗塞 21 例临床分析[J]. 中华神经外科杂志, 1993, 9(5): 200.

[2] 刘泉开, 陈　恒. 小儿外伤性腔隙梗塞 17 例报告[J]. 中华神经外科杂志, 1995, 11(6): 354—355.

(编辑　谢义霞)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net