

高效液相色谱在蛋白质多肽含量测定中的应用与分析

林晓诚

浙江诚意药业股份有限公司 浙江温州 325000

摘要: 高效液相色谱 (HPLC) 作为一种高效、灵敏的分析技术, 在蛋白质和多肽含量测定中具有广泛应用。本文综述了HPLC的基本原理、关键组件及分离机制, 重点分析了其在药物研发、质量控制、临床诊断及食品安全等领域的应用。通过优化色谱柱类型、流动相条件、检测波长及数据处理方法, 可显著提升分析效率和准确性。HPLC技术为复杂生物样品中蛋白质和多肽的定量分析提供了可靠手段, 推动了生物医药及食品安全领域的发展。

关键词: 高效液相色谱; 蛋白质多肽; 含量测定; 药物研发; 质量控制

引言

蛋白质和多肽作为生命活动的关键分子, 其含量测定在生物医药、食品安全等领域具有重要意义。高效液相色谱 (HPLC) 技术凭借其高分辨率、高灵敏度及自动化程度, 成为复杂生物样品中蛋白质和多肽定量分析的首选方法。随着色谱填料、检测器及数据处理技术的不断进步, HPLC在蛋白质组学、药物研发及临床诊断中的应用日益广泛。

一、高效液相色谱的基本原理

1.HPLC的定义与分类

高效液相色谱 (HPLC) 是一项利用液相流动相与固定相间的分配差异来实现化合物分离的高效分析方法。其核心在于高压输液泵推动流动相携带样品通过色谱柱, 通过组分与固定相的相互作用差异 (例如疏水性, 离子交换) 实现分离。根据固定相与流动相的极性关系, HPLC可分为正向色谱 (在极性化合物中, 固定相的极性明显高于流动相) 和反向色谱 (固定相的极性比流动相小, 适合于非极性或者弱极性的化合物)。在进行蛋白质和多肽的分析时, 反向色谱技术因其能够有效地利用C18等非极性固定相与多肽的疏水侧链进行相互作用, 从而实现高效的分离, 因此已经成为了主导技术。另外, 离子交换色谱和分子排阻色谱这些特殊的模式还可以应用到具体的情景中, 例如蛋白质电荷变异体的分析或者分子量分布的确定。

2.HPLC的关键组件

高效液相色谱 (HPLC) 系统中的关键组件共同协作, 以达到高效的分离和分析目的。高压输液泵通过精密活塞或双柱塞设计产生稳定高压 (通常 100-4000 psi),

确保流动相以恒定流速通过色谱柱; 该进样器通过六通阀或者自动进样装置实现纳升级到微升级试样的准确注入以避免峰展宽; 色谱柱作为分离心脏, 其内填充的硅胶基质或聚合物填料 (粒径 1.8-5 μm) 通过表面化学修饰 (如C18链) 提供特异性相互作用位点; 该检测器能够将分离出的成分转换为可量化的信号。紫外检测器 (214/280 nm) 主要用于含有共轭体系的多肽分析, 而荧光检测器或质谱检测器则是通过提高灵敏度来实现微量分析的; 数据处理系统将峰识别, 积分和定量算法集成在一起, 并结合标准曲线或者内标法来完成对复杂样本的分析。

3.HPLC的分离机制

高效液相色谱 (HPLC) 的分离机制是基于样本成分与固定相和流动相之间的动态平衡差异。在反向色谱中, 非极性固定相 (如C18链) 与多肽的疏水侧链通过范德华力或 $\pi-\pi$ 堆积作用结合, 而极性流动相 (如含乙腈的水溶液) 竞争性洗脱, 使疏水性强的组分保留时间延长; 离子交换色谱则通过固定相的带电基团 (如磺酸基或季铵基) 与多肽的电荷残基发生静电相互作用, 盐浓度梯度或pH变化调控解离平衡; 分子排阻色谱主要依靠多孔填料孔径筛分效应使小分子穿透孔隙路径变长, 大分子则直接穿过, 从而达到分子量依赖分离。这些机理既可以单独也可以共同发挥作用, 通过对流动相极性, 离子强度或者温度的优化来准确地调节组分和固定相之间相互作用的强弱, 以达到对复杂生物样品进行有效分离的目的。

二、HPLC在蛋白质和多肽含量测定中的具体应用

1.药物研发

在药品开发的全过程中, 高效液相色谱 (HPLC) 技

术起到了至关重要的作用，它为蛋白质和多肽药物的研究与开发提供了核心的技术支撑。药物合成阶段HPLC采用反向色谱将目标多肽从合成副产物中分离出来，使用梯度洗脱对条件进行优化，并结合紫外检测器对214 nm或者280 nm波长范围内色谱峰纯度进行监控，以保证合成产物化学完整性；对于含特殊氨基酸（如半胱氨酸、色氨酸）的多肽，需通过衍生化处理增强检测灵敏度，或采用HPLC-MS联用技术直接鉴定分子量与序列。制剂研制过程中采用HPLC对药物稳定性进行评价，并采用加速实验对高温高湿环境下多肽降解产物进行监控，同时采用离子交换色谱分析电荷变异体的含量以保证批次之间的一致性。在生物利用度的研究方面，采用HPLC与放射性标记或者同位素稀释相结合的方法检测血浆内药物浓度并采用内标法修正基质效应和计算药代动力学参数。另外，HPLC在进行杂质谱分析时能够检测到低至0.1%的与工艺相关的杂质，并结合质谱来确定其结构，从而为杂质的追溯提供了科学依据。随着多肽偶联药物（PDC）和抗体药物偶联物（ADC）的出现，HPLC-MS联用技术能够更精确地测定连接子的稳定性和药物与抗体的比例（DAR），从而加速了新型生物制剂研发的步伐。

2. 质量控制

在药品和生物制品的质量管理环节中，高效液相色谱（HPLC）技术因其出色的分辨率和精确的定量能力，已经成为确保产品安全性和有效性的关键工具。蛋白质及多肽类药物制备过程中HPLC采用反向色谱对主成分及杂质进行准确分离，并采用梯度洗脱对色谱条件进行了优化，利用紫外检测器在特定的波长范围内对目标峰的纯度进行监测，以确保药物中的活性成分达到ICH（国际人用药品登记技术协调会）的标准要求；对含有多个二硫键或者经过翻译改造的多肽需要采用离子交换色谱对其电荷变异体的分布情况进行分析，并结合面积归一化法对主峰比例进行计算以评价产品的均一性。考察制剂稳定性时，HPLC可以检测多肽长期贮存条件下降解产物如氧化，脱酰胺及其他杂质，并与标准品色谱图进行比较，证实杂质结构的存在，从而为有效期的制定提供了依据。另外，HPLC技术在原料药的质量控制过程中被应用于检测残存的溶剂、催化剂和外来污染物，通过与质谱联用技术的结合，实现了痕量杂质（ppm级）的定性和定量分析。针对生物类似药的研制，HPLC对原研药和仿制品氨基酸序列覆盖度和修饰位点进行肽图分析对比，以保证两者在品质上具有较高相似性。随着法规对生物药杂质控制要求的日益严格，HPLC与多维度检测技术

（例如二维液相色谱、电荷变异体的分析等）的联用，进一步提高了复杂生物制品品质评价工作的深度和可靠性。

3. 临床诊断

针对蛋白质和多肽类生物标志物，HPLC通过反向色谱或离子交换色谱实现复杂基质中目标分子的分离与富集，结合紫外检测器在214 nm或280 nm波长下定量分析血清、血浆或尿液中的多肽激素（如胰岛素、胰高血糖素）水平，辅助糖尿病、甲状腺疾病等内分泌代谢疾病的诊断；对于肿瘤标志物检测，HPLC可分离低丰度多肽片段，通过与质谱联用技术（HPLC-MS）鉴定特定序列，提升早期癌症筛查的准确性。在遗传性疾病诊断中，HPLC用于分析血浆中异常修饰的载脂蛋白或凝血因子，结合肽图分析技术定位突变位点，为镰状细胞贫血、血友病等疾病的基因分型提供依据。此外，HPLC在药物浓度监测中发挥关键作用，通过测定治疗性抗体或多肽药物的血清浓度，优化个体化给药方案，避免药物过量或不足导致的疗效波动。针对新生儿筛查，HPLC可快速检测干血斑样本中的氨基酸代谢异常（如苯丙酮尿症相关多肽），结合衍生化技术增强检测灵敏度，实现疾病的早期干预。随着多组学技术的融合，HPLC与蛋白质组学、代谢组学的联用正推动临床诊断向精准化、多维化方向发展。

4. 食品安全

在食品安全方面，高效液相色谱（HPLC）技术通过精确的分离和定量分析手段，为食品中的蛋白质和多肽成分的合规性检测提供了坚实的保障。对于乳制品质量监控，采用HPLC与紫外检测器联用，可以对牛奶中 β -乳球蛋白和 α -乳白蛋白过敏原残留进行定量检测，采用反向色谱分离技术排除基质干扰保证乳清蛋白粉及其他制品低敏性与标签声明一致；针对肉类制品中掺假的识别，HPLC利用肽图分析技术对胶原蛋白的特征肽段进行解析，并结合主成分分析算法与标准图谱进行匹配，能够准确地识别出马肉假冒牛肉的诈骗现象。在食品添加剂的检测过程中，HPLC被应用于评估谷氨酰胺转氨酶等酶制剂的活性和残留量，并通过离子对色谱技术来优化流动相体系，从而提高极性多肽分离的效率；针对非法添加物筛查，HPLC-MS联用技术可检测肉类中的瘦肉精（如克伦特罗）代谢多肽片段，通过多反应监测模式（MRM）实现ppb级灵敏度检测。婴幼儿配方食品监管方面，HPLC采用梯度洗脱的方法分离乳铁蛋白和免疫球蛋白两种功能性多肽并结合内标法对含量波动情况进行定量分析，确保营养强化剂加入量达到国家标准。另外，将HPLC应用于发酵食品品质控制，对生物活性成分大

豆肽和玉米肽进行了分子量分布分析,并利用凝胶过滤色谱对肽链聚合度进行了评价,为产品功能声称提供了科学依据。

三、高效液相色谱在蛋白质多肽含量测定中的优化策略

1. 色谱柱的选择与优化

在高效液相色谱(HPLC)分析蛋白质和多肽时,色谱柱的选择与优化是决定分离效率与峰形质量的核心环节。针对多肽类化合物,反向色谱柱(如C18、C8)因能通过疏水相互作用实现高效分离而成为主流选择,其中C18柱因碳链较长,对中等疏水性多肽的保留能力更强,适用于分子量500–5000 Da的肽段分析;若需分离极性较强或带电多肽,可选用苯基己基柱或两性离子柱,通过 $\pi-\pi$ 相互作用或静电排斥效应增强选择性。柱长与粒径需根据样品复杂度调整,常规分析采用150–250 mm柱长与3–5 μm 粒径以平衡分离度与分析时间,痕量多肽检测则可选用超高效液相色谱(UPLC)的1.7–1.8 μm 粒径柱提升灵敏度。

2. 流动相条件的优化

在使用高效液相色谱(HPLC)对蛋白质和多肽进行分析时,流动相条件的优化是决定分离效果和数据可靠性的关键因素。反向色谱中,水–有机溶剂体系(如乙腈/甲醇–水)是主流选择,乙腈因黏度低、洗脱能力强,常用于快速分离多肽混合物,但甲醇与极性肽段的亲和力较强,适用于疏水性弱分子的保留。缓冲盐的种类和浓度需要进行精确的调节。磷酸盐(pH 2–7.5)和醋酸盐(pH 3–6)能够通过稳定的离子强度来抑制多肽电荷的变异,而0.05–0.1 mol/L的浓度可以平衡峰形和柱压;含碱性赖氨酸或精氨酸的多肽需添加三氟乙酸(TFA, 0.05–0.1%)或甲酸(0.1%)抑制硅羟基吸附,但过量TFA可能导致峰拖尾或质谱抑制效应,需结合检测器类型权衡。pH值能够通过调节多肽的解离状态来影响其保留行为。在酸性环境(pH 2–3)中,疏水相互作用得到增强;而在碱性条件(pH 8–9)中,静电排斥现象得到促进。因此,需要根据目标肽的等电点(pI)进行相应的调整。梯度洗脱过程需要对初始有机相比例、斜率和终末浓度进行优化。典型的解决方案是使用5–95%的乙腈线性梯度(20–60 min),并结合柱温(25–40 $^{\circ}\text{C}$)来调整传质速度,以实现复杂肽谱的高效分离。

3. 检测波长的选择

在高效液相色谱(HPLC)分析蛋白质和多肽时,检测波长的选择需兼顾灵敏度与特异性,以准确捕获目标

分子的吸收特征。多肽类化合物因含芳香族氨基酸(如色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸)而具备紫外吸收特性,214 nm波长处肽键的羰基–酰胺基电子跃迁可产生普遍响应,适用于多数未衍生化多肽的定量分析,但背景吸收较强可能影响低浓度样品的信噪比;若需增强检测灵敏度,可针对含色氨酸(最大吸收约280 nm)或酪氨酸(275 nm)的多肽调整波长,利用特征吸收峰提升信号强度,但需注意共洗脱杂质的干扰。对于缺乏芳香族残基的肽段,需通过衍生化引入生色团(如邻苯二甲醛、荧光胺),将检测波长转移至330–450 nm荧光激发区,实现痕量多肽的灵敏检测。

4. 数据处理与分析

在高效液相色谱(HPLC)分析蛋白质和多肽的数据处理环节,需通过多维度策略确保结果准确性。色谱峰识别依赖保留时间与峰形对称性,结合软件自动积分功能划定基线并计算峰面积,手动校正重叠峰或肩峰以消除干扰。定量分析采用内标法或外标法,内标物需与目标肽段保留行为相近且无基质干扰,通过校正曲线拟合(线性范围 $R^2 \geq 0.995$)实现绝对定量;对于复杂样品,相对定量可基于峰面积百分比评估组分比例。此外,需结合质谱数据验证分子量与序列信息,排除同分异构体或降解产物的干扰,异常峰通过保留时间偏移、峰宽变化等参数标记复检,确保数据可溯源且符合质量控制标准。

结论

HPLC技术具有高效、灵敏等优点,对于蛋白质及多肽含量的检测具有不可替代的重要作用。通过对色谱柱,流动相条件以及检测方法的优化,可以显著提高分析的效率与准确性。随着色谱技术的持续进步,HPLC在生物医学、食品安全等多个领域的应用潜力将变得更为广泛,为复杂生物样本的定量分析提供了坚实的支撑。

参考文献

- [1]叶聪,谢翡翠,李国卫,等.基于超高效液相色谱–串联质谱法和多肽组学分析的鸡内金真伪鉴别策略[J].中国中药杂志,2024,49(12):3185–3193.
- [2]GB/T 42699.1–2023,纺织品某些动物毛纤维蛋白质组定性和定量分析第1部分:还原蛋白质多肽分析液相色谱质谱(LC–ESI–MS)法[S].
- [3]苗苗.超高效液相测定多肽药物有关物质的方法开发[C]//第二十一届中国科学家论坛.北京赛升药物股份有限公司,2023.