

## 制备高效液相色谱法分离纯化乌拉立肽的研究

覃玲莉<sup>1</sup>, 洪丽娟<sup>2\*</sup>, 韩绪儒<sup>2</sup>, 李子意<sup>2</sup>

1. 天津中医药大学 研究生院, 天津 300193

2. 斯涛利科技发展(天津)有限公司, 天津 300457

**摘要:** 目的 对乌拉立肽粗品纯化并制备符合纯度要求的乌拉立肽纯品。方法 采用 C<sub>18</sub>(H) ODS 柱(30 mm×250 mm, 10 μm); 流动相 A 为 0.1%甲酸-水溶液, 流动相 B 为 100%乙腈; 检测波长 215 nm; 体积流量 30 mL/min; 进样量 60 mg。结果 RP-HPLC 一步纯化后得到乌拉立肽质量分数达到 98%。通过多次样品收集和冷冻干燥, 制备了高纯度的乌拉立肽。结论 建立了乌拉立肽的纯化工艺, 制备出符合要求的乌拉立肽纯品。

**关键词:** 乌拉立肽; 制备高效液相色谱; 分离; 纯化

中图分类号: R977.4 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2013)01-0037-04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2013.01.010

## Separation and purification of ularitide by preparative-HPLC

QIN Ling-li<sup>1</sup>, HONG Li-juan<sup>2</sup>, HAN Xu-ru<sup>2</sup>, LI Zi-yi<sup>2</sup>

1. Graduate School of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Starbio Science and Technology Development (Tianjin) Co., Ltd., Tianjin 300457, China

**Abstract: Objective** To purify ularitide crude product and prepare qualified ularitide met to the purity requirement. **Methods** The samples were separated on C<sub>18</sub>(H) ODS column (30 mm×250 mm, 10 μm) with 0.1% formic acid (A) - water (B) as mobile phase at a flow rate of 30 mL/min. The detection wavelength was set at 215 nm with sample volume of 60 mg. **Results** The purity of ularitide could reach 98% after being purified once by RP-HPLC. The high purity ularitide was obtained after being lyophilized and collected for several times. **Conclusion** The purification technology is set up for ularitide and the prepared ularitide is qualified.

**Key words:** ularitide; preparative-HPLC; separation; purification

乌拉立肽是由 32 个氨基酸残基组成的促尿钠排泄环肽, 最初是在 1988 年由 Schulz-Knappe 等从尿液中分离得到的一种属于心房钠尿肽 (atrial natriuretic peptide, ANP) 家族的肾利钠肽<sup>[1]</sup>。内源性乌拉立肽在肾远端肾小管细胞合成, 由管腔后分泌, 在内部髓集合管与下游利钠肽 A 型受体结合, 能够调节肾脏钠和水的排泄<sup>[2]</sup>, 因此乌拉立肽有舒张血管和利钠利尿的作用, 并且已证实乌拉立肽能够降低肾脏对尿液的重吸收<sup>[3]</sup>。临床上治疗失代偿性心力衰竭 (DHF) 是以缓解症状和稳定病人的血液动力学为目标, 目前使用的治疗药物包括利尿剂、血管舒张药和增强收缩力药物, 然而这些药物都存在临床局限性<sup>[4-5]</sup>。国外对于乌拉立肽的研究已进入

二期临床<sup>[6]</sup>, 二期临床研究表明, 乌拉立肽能降低心脏充盈压力和改善呼吸困难, 且对 DHF 患者的肾脏功能没有明显的不良影响, 可见乌拉立肽在治疗 DHF 中有广阔前景。本研究采用制备高效液相色谱法对乌拉立肽粗品分离纯化, 并冷冻干燥, 制备乌拉立肽纯品。

### 1 仪器和材料

D—6000 Devote 液相色谱仪 (江苏迪沃特公司), 包括系统控制器、D—P6010 高压恒流泵、进样阀、D—UV 6000 紫外-可见检测器、Devote 6000 色谱工作站。DV215CD 电子天平 (美国奥豪斯公司), Milli-Q 超纯水净水器 (美国 Millipore 公司)。乙腈 (色谱纯); 无水甲酸、三氟乙酸 (分析纯);

收稿日期: 2012-10-29

作者简介: 覃玲莉 (1987—), 女, 天津中医药大学药物分析专业硕士研究生, 2010 年毕业于西北民族大学, 主要从事药物分析研究。

Tel: 13512971951 E-mail: lingliqinjojo@163.com

\*通信作者 洪丽娟, 女, 中国药科大学硕士。Tel: (022)65378678

乌拉立肽粗品(自制,批号分别为 120701、120802、120803)。

## 2 方法和结果

### 2.1 样品溶液的制备

精密称定乌拉立肽粗品 8.0 g,以适量纯水溶解配制成 20 mg/mL 的溶液,用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤除不溶物,将滤液超声处理,即得。将粗品溶液稀释 5 倍,进行 HPLC 分析。

### 2.2 色谱条件的选择

本品的理化性质特殊,分离纯化不是简单的分析条件的放大,因此从以下几个方面进行优化分离纯化条件。

**2.2.1 流动相的选择** 参考文献方法<sup>[7]</sup>,用 0.1% 三氟乙酸(TFA)水-0.1% TFA 乙腈系统对乌拉立肽粗品进行分离。经检测,主峰与其后的相邻杂质峰分离效果差。收集分离得到的主峰馏分,冷冻干燥后用 HPLC 法分析,乌拉立肽质量分数为 72.7%。见图 1。曾采用磷酸盐系统作为制备液相系统,但获得的乌拉立肽馏分在冻干后发黏,不利于样品的保存和后续的实验研究;所以采用甲酸水-乙腈系统作为纯化的洗脱系统。使用分析型高效液相色谱比较甲酸水-乙腈系统与磷酸盐系统对乌拉立肽粗品的洗脱情况,发现磷酸盐洗脱分离效果更好,故选用磷酸盐系统对纯品进行分析。

**2.2.2 洗脱梯度的选择** 多肽对有机相的比例变化

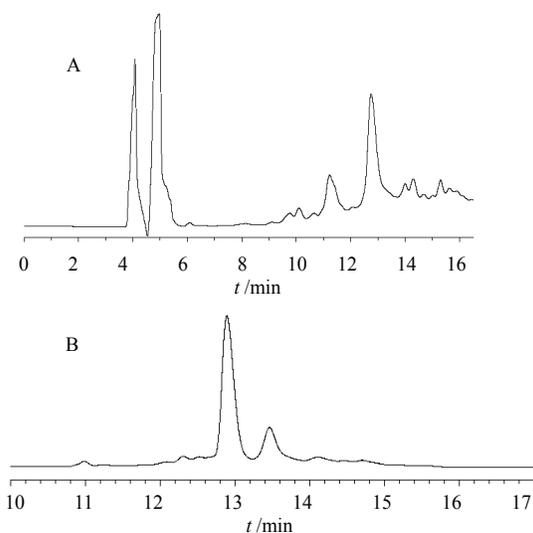


图 1 乌拉立肽的 HPLC 纯化分离色谱(A)和产品的 HPLC 分析色谱图(B)

Fig. 1 Chromatograms of purification of ularitide with preparative-HPLC (A) and purified products (B)

非常敏感。乙腈微小的变化就会对主峰的保留时间产生很大的影响,因此必须采用线性梯度洗脱方式分离纯化。采用 20%~38%乙腈的图谱见图 2-A; 12%~25%乙腈的图谱见图 2-B; 10%~20%乙腈, 1~21 min, 20%~30%乙腈, 21~25 min, 30%~40%乙腈, 25~32 min 的图谱见图 2-C。对洗脱时间和流动相比例进行优选后确定以 0~25 min, 10%~30%乙腈为佳。

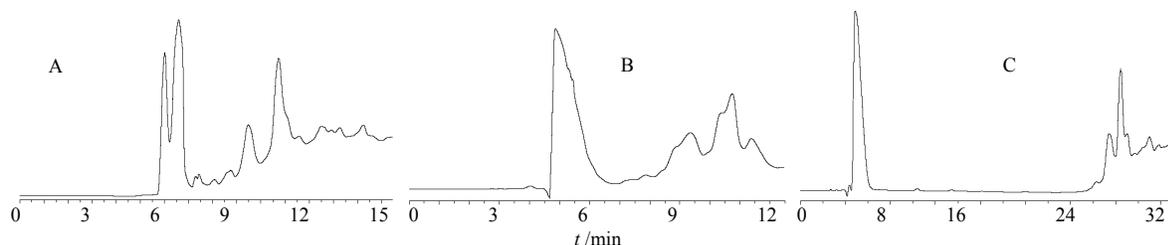


图 2 乌拉立肽粗品不同洗脱梯度洗脱的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of ularitide crude products with different elution gradients

**2.2.3 进样量的考察** 按照上述洗脱条件 10%~30%乙腈洗脱 25 min,进行上样量的调整,逐步放大进样量。分别考察了进样量 20、40、60、80 mg 时的色谱情况。当进样量大于 60 mg 时,主峰与前后杂质峰的分选效果变差,基本达到超载。见图 3。

**2.2.4 色谱条件的确定** 制备型色谱柱 Devote C<sub>18</sub> (H) ODS 柱(30 mm×250 mm, 10  $\mu\text{m}$ );流动相 A 为 0.1%甲酸-水溶液,流动相 B 为 100%乙腈;检

测波长 215 nm; 体积流量 30 mL/min。

### 2.3 高效液相色谱的分离纯化

流动相 A、B 超声脱气后,以 10% B 相、90% A 相平衡色谱柱。精密量取乌拉立肽粗品溶液 3 mL 进样,通过色谱图上的出峰情况选择性收集乌拉立肽及其主要杂质的馏分(当乌拉立肽主峰曲线上升到峰高 1/2 处时开始收集馏分至峰往下走到峰高 1/2 处时停止收集。杂质收集同主峰)。之后将流动相 B

的比例调至 60% 冲洗色谱柱约 10 min, 使残余在柱上的物质完全冲洗下来, 再以起始的流动相比比例平

衡色谱柱, 以构成一个完整的色谱过程。分离纯化的色谱图见图 4。

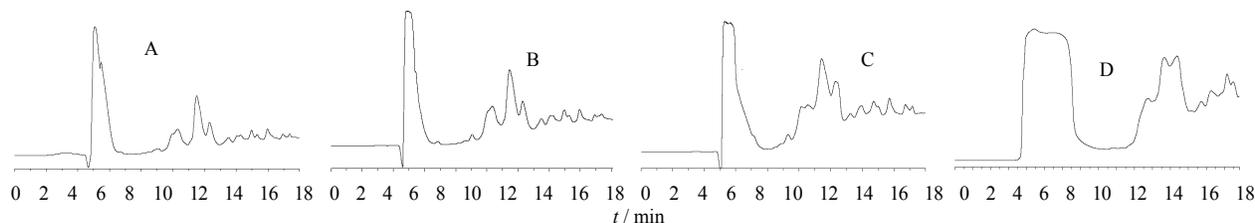


图 3 乌拉立肽粗品进样量 20 mg (A)、40 mg (B)、60 mg (C)、80 mg (D) 的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatograms of ularitide crude product with injection of 20 mg (A), 40 mg (B), 60 mg (C), and 80 mg (D)

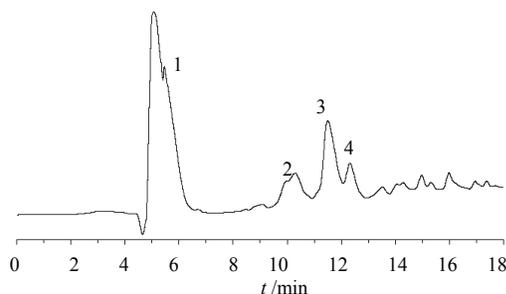


图 4 乌拉立肽粗品的 HPLC 纯化分离色谱图

Fig. 4 HPLC chromatogram of separation and purification of ularitide crude product

#### 2.4 产品的检测

收集目标峰馏分进行 HPLC 法分析, 确定峰 1 为醋酸峰。收集峰 2、3、4 馏分进行 LC-MS 分析, 结果峰 3 为乌拉立肽主峰, 峰 4 为相邻杂质峰。多次进样并收集目标峰与相邻杂质峰馏分, 冷冻干燥, 检测得乌拉立肽纯化物样品质量分数为 98% (图 5), 相邻杂质质量分数为 95% (图 6)。乌拉立肽样品的收率为 28.6%。

收率 = 纯化后冻干得到的乌拉立肽的质量 / (纯化前乌拉立肽粗品的质量 × 质量分数)

按以上方法对 3 批粗品进行纯化, 结果见表 1。

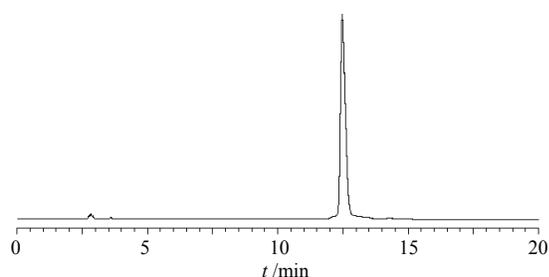


图 5 纯化后的乌拉立肽 HPLC 图谱

Fig. 5 HPLC chromatogram of purified ularitide

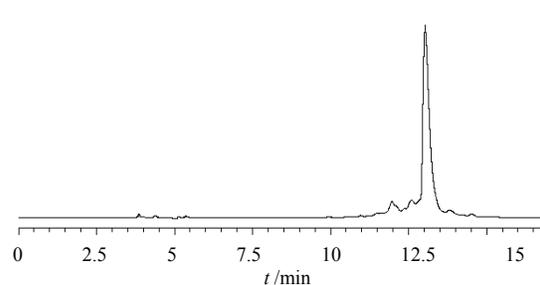


图 6 乌拉立肽相邻杂质的 HPLC 图谱

Fig. 6 HPLC chromatogram of adjacent impurity of ularitide

表 1 乌拉立肽纯化结果

Table 1 Purification of ularitide

批号	质量分数/%		收率/%
	纯化前	纯化后	
120701	25.0	98.0	26.7
120802	24.5	98.3	25.8
120803	25.1	98.1	25.6

#### 3 讨论

乌拉立肽由固相法合成, 经氧化反应成环。产物成分较复杂, 通常是以目标物多肽为主的几种结构相似的多肽混合物, 尤其是以主成分后的相邻杂质最为难分离, 故对粗品的分离纯化研究格外重要。为完善合成工艺过程和继续终产物的质量研究及稳定性研究等, 收集制备相邻杂质也是必要的。

#### 参考文献

- [1] Schulz-Knappe P, Forssmann K, Herbst F, *et al.* Isolation and structural analysis of "urodilatin", a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine. [J]. *Klin Wochenschr*, 1988, 66(17): 752-759.
- [2] Mitrovic V, Seferovic P M, Simeunovic D, *et al.* Haemodynamic and clinical effects of ularitide in

- decompensated heart failure [J]. *Eur Heart J*, 2006, 27(23): 2823-2832.
- [3] Rocha A S, Kudo L H. Effect of atrial natriuretic factor and cyclic guanosine monophosphate on water and urea transport in the inner medullary collecting duct [J]. *Pflugers Arch*, 1990, 417(1): 84-90.
- [4] Sackner-Bernstein J D, Skopicki H A, Aaronson K D. Risk of worsening renal function with nesiritide in patients with acutely decompensated heart failure [J]. *Circulation*, 2005, 111(12): 1487-1491.
- [5] Sackner-Bernstein J D, Kowalski M, Fox M, *et al.* Short-term risk of death after treatment with nesiritide for decompensated heart failure: a pooled analysis of randomized controlled trials [J]. *JAMA*, 2005, 293(15): 1900-1905.
- [6] Lüss H, Mitrovic V, Seferovic P M, *et al.* Renal effects of ularitide in patients with decompensated heart failure [J]. *Am Heart J*, 2008, 155(6): 1012.e1-1012.e8.
- [7] David C. *The Handbook of Analysis and Purification of Peptides and Proteins by Reversed-Phase HPLC* [M]. 3rd edition. Baltimore: Grace Vydac Technical Support Group, 2002: 30-40.