

1. 多肽合成历史回顾

多肽化学已经走过了一百多年的光辉历程，1902年，Emil Fischer 首先化学方法合成了自由的二肽。由于当时在多肽合成方面的知识太少，进展也相当缓慢当时合成采用了苯甲酰，乙酰保护，脱去相当困难，而且容易导致肽链断裂。1932年，Max Bergmann 等人开始使用苄氧羰基（Z）来保护 α -氨基，该保护基可以在催化氢化或氢溴酸的条件下定量脱除，多肽合成才开始有了一定的发展。到了20世纪50年代，随着越来越多的生物活性多肽的发现，大大推动了有机化学家们对多肽合成方法以及保护基的研究，因此这一阶段的研究成果也非常丰富，人们合成了大量的生物活性多肽，包括催产素（Oxytocin），胰岛素等，同时多肽合成方法以及氨基酸保护基上面也取得了不少成绩，这为后来的固相合成方法的出现也提供了实验和理论基础。也就是这个阶段，Fred Sanger 发明了氨基酸序列测定方法，并为此获得了1958年的Nobel化学奖。他后来还发明了DNA序列检测方法，并于1980年再次获得了Nobel化学奖，成为到目前为止唯一获得两次Nobel化学奖的科学家。1963年，Merrifield 提出了固相多肽合成方法（SPPS），这个在多肽化学上具有里程碑意义的合成方法，一出来，就由于其合成方便，迅速，现在已经成为多肽合成的首选方法，随后的发展也证明了该方法不仅仅是一种合成方法，而且也带来了有机合成上的一次革命，并成为了一支独立的学科，固相有机合成（SPOS）。当然，Merrifield 也因此荣获了1984年的Nobel化学奖。也正是Merrifield，他经过了反复的筛选，最终摒弃了苄氧羰基（Z）在固相上的使用，首先将叔丁氧羰基（Boc）用于保护 α -氨基并在固相多肽合成上使用，其可以在酸性条件下定量的脱除，反应也非常迅速，在30min就可以反应完全。由于叔丁氧羰基（Boc）方法中，氨基酸侧链的保护基团大多基于苄基（Bzl），因此也称为BOC-Bzl策略。同时，Merrifield在20世纪60年代末发明了第一台全自动多肽合成仪，并首次合成生物蛋白酶，核糖核酸酶（124个氨基酸）。随后的多肽化学研究主要集中在固相合成树脂，多肽缩合试剂，氨基酸保护基的研究。1972，Lou Carpino 首先将9-芴甲氧羰基（Fmoc）用于保护 α -氨基，其在碱性条件下可以迅速脱除，10min就可以反应完全，而且由于其反应条件温和，迅速得到广泛使用，到了20世纪80年代取代了叔丁氧羰基

(Boc)，成为了固相多肽合成中的首选合成方法。该方法中氨基酸的侧链大多基于叔丁基 (tBu)，因此，也称为 Fmoc-tBu 策略。同时，在多肽合成树脂，缩合试剂以及氨基酸保护，包括合成环肽的氨基酸正交保护上也取得了丰硕的成果。进入 21 世纪，随着蛋白质组学的研究深入，对于多肽化学的要求不仅仅是改进合成方法，而更多的集中肽库的设计、多肽药物的大规模制备、多肽标记与修饰、以及蛋白结构与功能模拟多肽的合成以及长肽或蛋白合成。

2. 多肽合成的基础知识

多肽化学合成方法，包括液相和固相两种方法。液相合成方法现在主要采用 Boc 和 Z 两种保护方法，现在主要应用在短肽合成，如阿斯巴甜，力肽，催产素等，其相对与固相合成，具有保护基选择多，成本低廉，合成规模容易放大的许多优点。与固相合成比较，液相合成主要缺点是，合成范围小，一般都集中在 10 个氨基酸以内的多肽合成，还有合成中需要对中间体进行提纯，时间长，工作量大。固相合成方法现在主要采用 Fmoc 和 Boc 两种方法，它具有合成方便，迅速，容易实现自动化，而且可以比较容易的合成到 30 个氨基酸左右多肽。

2.1. 氨基酸保护基

20 种常见氨基酸，根据侧链可以分为几类：脂肪族氨基酸 (Ala, Gly, Val, Leu, Ile,)，芳香族氨基酸 (Phe, Tyr, Trp, His)，酰胺或羧基侧链氨基酸 (Asp, Glu, Asn, Gln)，碱性侧链氨基酸 (His, Arg, Lys)，含硫氨基酸 (Cys, Met)，含醇氨基酸 (Ser, Thr)，亚氨型氨基酸 (Pro)。多肽化学合成中氨基酸的保护非常关键，直接决定了合成能够成功的关键。因为常见的 20 中氨基酸中有很多都是带有活性侧链的，需要进行保护，一般要求，这些保护基在合成过程中稳定，无副反应，合成结束后可以完全定量的脱除。合成中需要进行保护的氨基酸包括：Cys, Asp, Glu, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp, Tyr。需要进行保护的基团：羟基，羧基，巯基，氨基，酰胺基，胍基，吲哚，咪唑等。在特殊的情况下，有些氨基酸也可以不保护，象 Trp, Asn, Gln, Thr, Tyr。

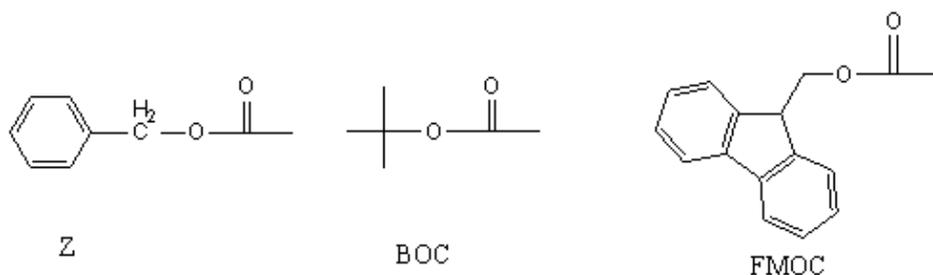


图 1 常见 3 种氨基保护基结构

氨基酸侧链保护基团非常多，同一个侧链有多种不同的保护基，可以在不同的条件下选择性的脱除，这点在环肽以及多肽修饰上具有很重要的意义。而且侧链保护基和选择的合成方法有密切的关系，液相和固相不一样，固相中 Boc 和 Fmoc 策略也不一样，从某种意义上看，多肽化学就是氨基酸保护基的灵活运用与搭配。关于侧链保护基的使用，请参考黄惟德《多肽合成》的有关章节，这里简单介绍 Cys, Lys, Asp 的几种保护基及其脱除方法。Cys 最常见的保护基有三种，Trt, Acm, Mob, 这三个保护基可以完成多对二硫键多肽的合成。Lys 最常见的保护基有：Boc, Fmoc, Trt, Dde, Alloc, 这对于固相合成环肽提供了很多正交的保护策略。Asp 最常见的保护基有：OtBu, OBzl, OMe, OAl1, OFm, 同样也提供了多种正交的保护策略。

表 1 巯基常见保护基

简称	结构	脱除条件
Trt		TFA, HCl/HOAc, I ₂ /MeOH
Acm	CH ₃ CONHCH ₂ ---	I ₂ /MeOH, Hg ²⁺
Mob		HF, TFMSA, Hg ²⁺

表 2 氨基常见保护基

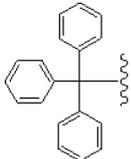
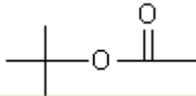
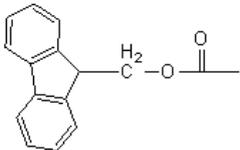
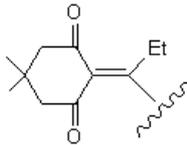
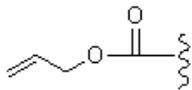
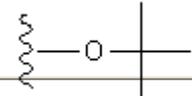
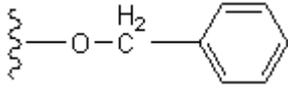
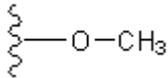
简称	结构	脱除条件
Trt		TFA, HOAc, HCOOH
Boc		HCl/HOAc, TFA/DCM
Fmoc		Piperidine/DMF, NaOH/MeOH
Dde		H2NNH2/DMF
Alloc		Pd (Ph3P) 4, 吗啉/THF

表 3 羧基常见保护基

简称	结构	脱除条件
OtBu		TFA, HOAc, HCOOH
OBzl		H2/Pd, HF, TFMSA
OMe		NaOH/MeOH

OA11		Pd (Ph ₃ P) ₄ , 吗啉/THF
OFm		Piperidine/DMF, DBU/DMF

2.2. 多肽缩合试剂

多肽合成中，主要采用羧基活化方法来完成接肽反应，最早使用的是将氨基酸活化为酰氯，叠氮，对称酸酐以及混合酸酐的方法，但是由于这些条件下，存在氨基酸消旋，以及反应试剂危险以及制备比较复杂，逐渐被后来的缩合试剂取代，按照其结构可以分为两种：缩合试剂主要有：碳二亚胺型，鎓盐型（Uronium）。

2.2.1. 碳二亚胺型

主要包括：DCC，DIC，EDC.HCl 等。采用 DCC 进行反应，由于反应中生成的 DCU，在 DMF 中溶解度很小，产生白色沉淀，所以一般不用在固相合成中，但是由于其价格便宜，在液相合成中，可以通过过滤除去，应用仍然相当广泛。EDC.HCl 因为其水溶解性的特点，在多肽与蛋白的连接中使用比较多，而且也相当成功。但是该类型的缩合试剂的一个最大的缺点，就是如果单独使用，会有比较多的副反应，但是研究表明如果在活化过程中添加 HOBt，HOAt 等试剂，可以将其副反应控制在很低的范围。其反应机理如下：

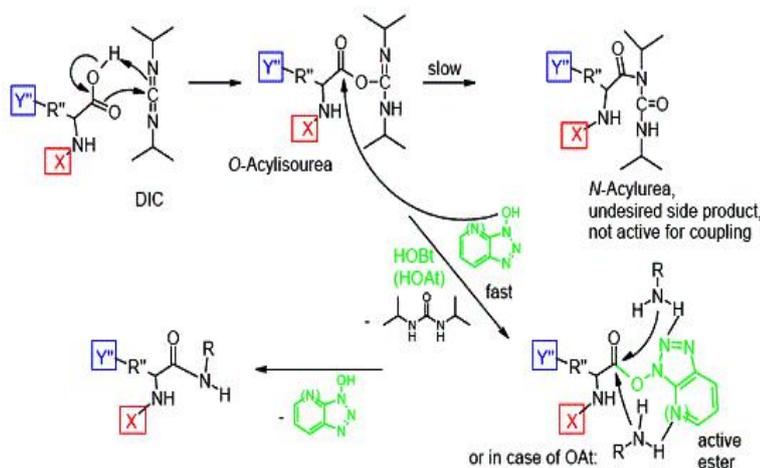


图 2 DIC 活化反应机理

2.2.2. 鎊盐型

鎊盐型缩合试剂反应活性高,速度快,现在使用非常广泛,主要包括: BOP, HBTU, TBTU, HCTU, HATU, PyBOP 等。该试剂使用过程中需要添加有机碱,如,二异丙基乙胺 (DIPEA), N-甲基吗啉 (NMM), 该试剂加入后,才能活化氨基酸。其反应机理如下:

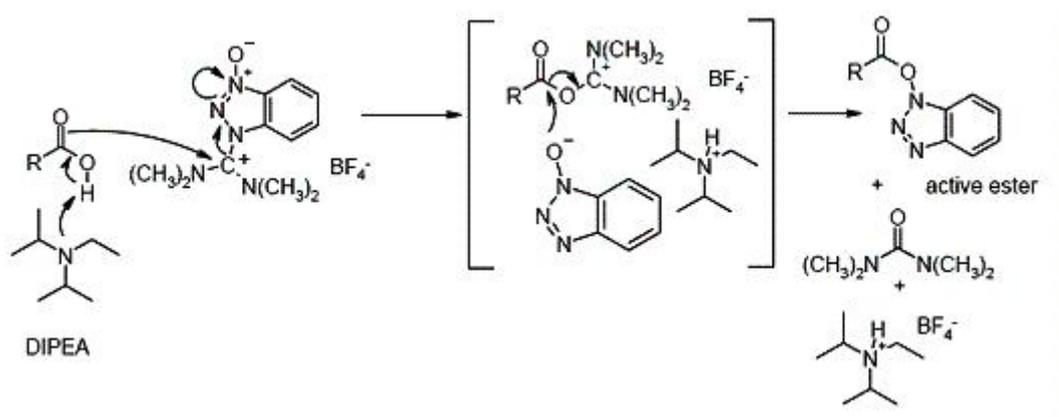


图 3 TBTU 活化反应机理

2.3. 多肽合成方法比较

2.3.1. 液相多肽合成 (solution peptide synthesis)

液相多肽合成现在仍然广泛的使用,在合成短肽和多肽片段上具有合成规模大,合成成本低的显著优点,而且由于是在均相中进行反应,可以选择的反应条件更加丰富,象一些催化氢化,碱性水解等条件,都可以使用,这在固相中,使用却由于反应效率低,以及副反应等原因,无法应用。液相多肽合成中主要采用 Boc 和 Z 两种反应策略。

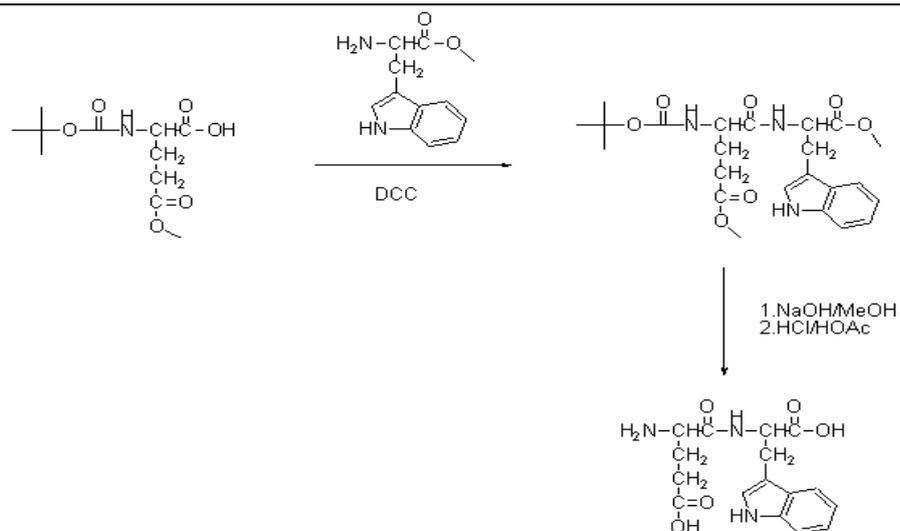


图4 液相合成 Glu-Trp

2.3.2. 固相多肽合成

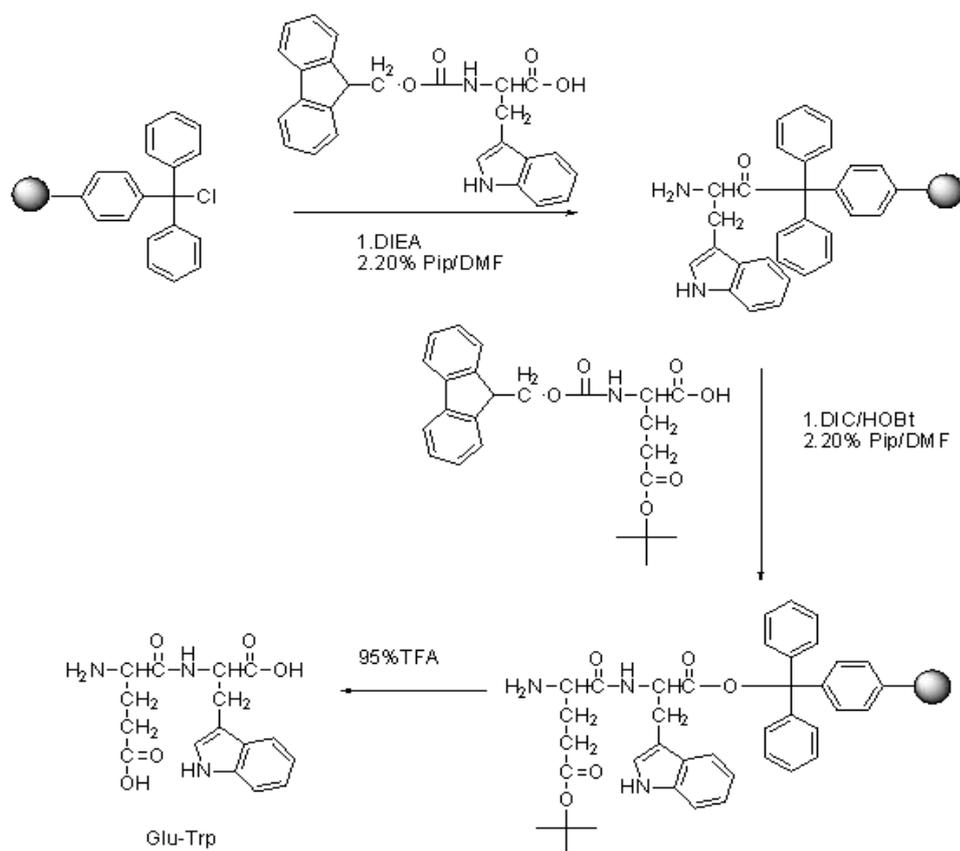


图5 Fmoc 固相合成 Glu-Trp

固相多肽合成现在使用的主要有两种策略：Boc 和 Fmoc 两种。Boc 方法合成过程中，需要反复使用 TFA 脱 Boc，而且在最后从树脂上切割下来需要使用 HF，由于

HF 必须使用专门的仪器进行操作，而且切割过程中容易产生副反应，因此现在使用受到实验条件限制，使用也逐渐减少。Fmoc 方法反应条件温和，在一般的实验条件下就可以进行合成，因此，也得到了非常广泛的应用。

2.3.2.1. 固相合成中常用树脂

固相合成中树脂，一般都是聚苯乙烯-二乙烯苯材料，大小在 75-150 μm ，交联度在 1-2%之间，现在使用的大多是 1%，因为这种交联度下，树脂在 DMF, DCM 中具有很好的溶胀性能，立体上是一个空间网状结构，反应物分子可以在树脂内部自由移动。树脂中最关键的部分是连接手臂，它一端连接在树脂上，一端作为反应位点。目前广泛使用的树脂有：PAM, MBHA, Wang, 2-Cl-Trt, Rink-Amide-MBHA 等。其中 PAM, MBHA 是用在 BOC 策略中，因为其对酸非常稳定，需要在 HF, TFMSA 等强酸条件下才能够切割下来。

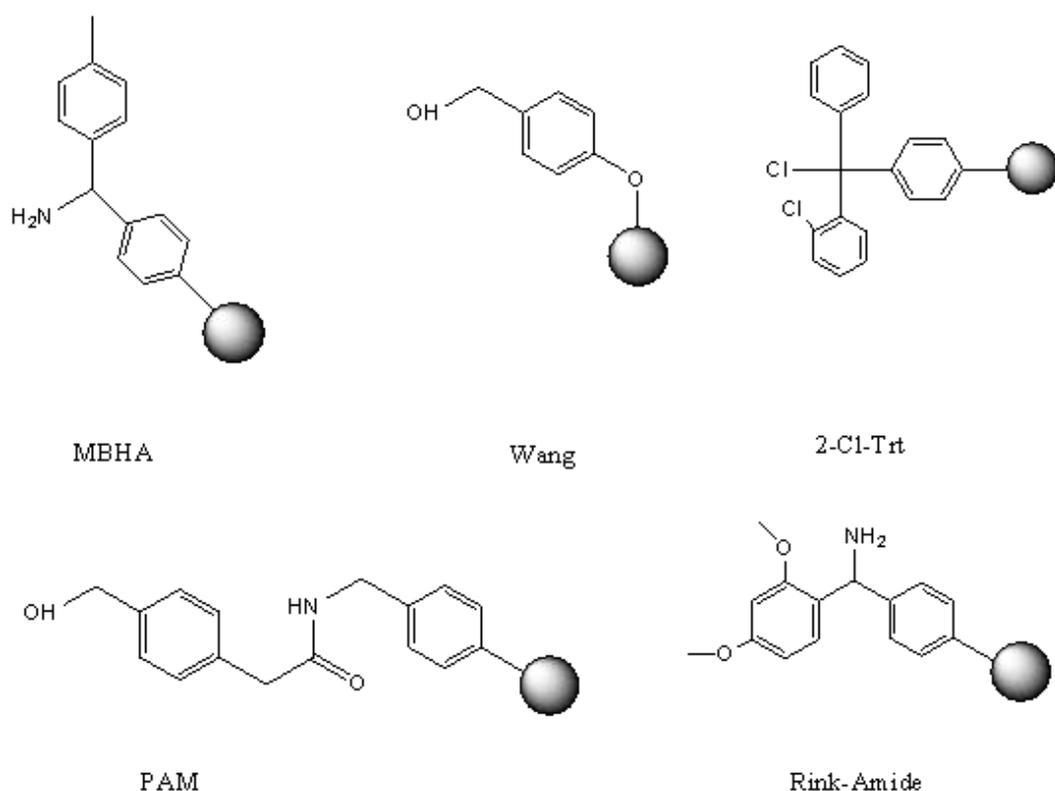


图 6 固相合成常用树脂

2.3.2.2. 茚三酮检测

固相多肽合成中，主要是通过检测树脂上游离氨基来判断连接效率，检测方法称为 Kaiser 方法，其检测结果，如果有游离氨基的时候，显示兰色，或红褐色 (Pro, Ser, His) Kaiser 试剂包括：

- (A) 6%茚三酮的乙醇溶液；
- (B) 80% 苯酚的乙醇溶液；
- (C) 2% 0.001M KCN 的吡啶溶液。 配制中的吡啶需要加茚三酮回流，重蒸后再使用。检测过程，取少量树脂，加入 A, B, C 各 2-3 滴，100℃下加热 1-2min，如果溶液有兰色，或树脂出现兰色，红褐色，表明还有游离氨基，否则说明连接完全。

其它检测游离氨基的方法有：三硝基苯磺酸法，苦味酸法，溴芬兰法等。

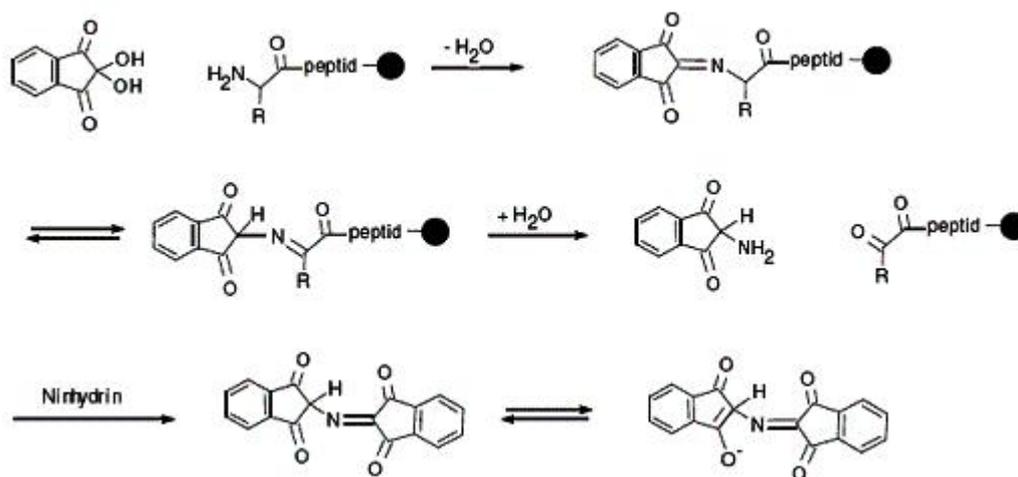


图 7 茚三酮反应原理

2.3.2.3. 固相合成切割方法

固相合成完成之后，必须选择合适的切割试剂将多肽从树脂上切割下来，然后经过冰乙醚沉淀，离心收集沉淀，经过 HPLC 分离纯化，冷冻干燥得到最后产品。由于选择的树脂不同，氨基酸序列不同，在切割时候，选择的切割方法也不完全相同，一般都是选择酸性条件下切割的条件，对于 PAM, MBHA 树脂，一般采用 HF 切割，切割过程中需要添加对甲苯酚，对巯基苯酚，苯甲醚等试剂。而对于

Wang, Rink-Amide, Trt 树脂, 一般采用 TFA 切割, 切割过程中加入, 乙二硫醇, 苯甲硫醚, 水, 三异丙基硅烷, 苯酚等。这些添加试剂主要作为碳正离子俘获试剂使用, 目的是俘获切割反应过程中生成的碳正离子, 减少这些碳正离子对部分氨基酸侧链的进攻导致的副反应, 比较容易产生副反应的氨基酸有: Trp, Tyr。切割试剂用量一般 10-15ml/g 树脂。常用的切割配比:

HF/p-cresol/p-thiocresol (90/5/5), TFA/TIS/EDT/H₂O (94/1/2.5/2.5), 反应一般是在室温条件下 1-2h。

2.3.3. 多肽合成中主要问题

2.3.3.1. 消旋及其反应机理

多肽合成过程中, 部分氨基酸在活化的过程中会导致不同程度的消旋, 特别容易消旋的氨基酸有: Cys, His, Phe, 当然这些消旋化和溶剂, 温度以及合成中的有机碱等因素有关。对于这些氨基酸, 可以通过采用高效缩合试剂, 减少反应时间, 可以减少消旋的比例, 一般条件选择适当, 消旋化都可以控制在 5% 以内。消旋反应机理如下:

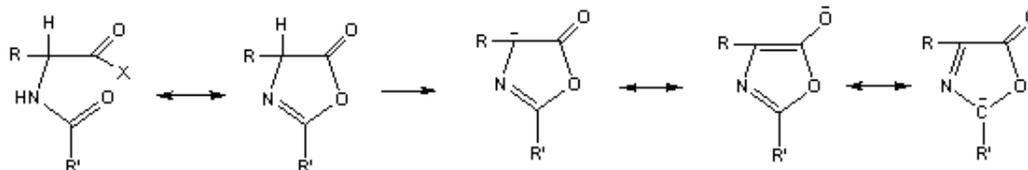


图 8 消旋反应机理

2.3.3.2. 二酮哌嗪 (DKP) 反应

DKP 副反应出现在 Fmoc-Wang 树脂合成过程中, 主要出现在第一个氨基酸为 Pro 的时候, 当第二个氨基酸脱 Fmoc 的时候, α -氨基被游离出来之后, 立即对 Wang 树脂的苯酯键进行分子内胺解, 生成六元环二酮哌嗪衍生物, 同时从 Wang 树脂上释放出来, 导致反应终止。该反应非常迅速, 文献报道采用 50%Pip/DMF, 脱 1min, 4min 的条件, 但是我们实验证明在多数情况下, 即使是 1min 左右反应就超过了 20%。因此一般在末端第一个氨基酸为 Pro 的时候, 建议采用 2-Cl-Trt 树脂合成, 由于该树脂巨大的空间阻力, 可以完全消除该副反应。这个副反应在 BOC 策略合成过程中, 却可以完全避免, 因为 BOC 在使用 TFA 脱除后, 使氨基以

TFA 盐的形式存在，从而失去了亲核性，不能进攻苄酯键。

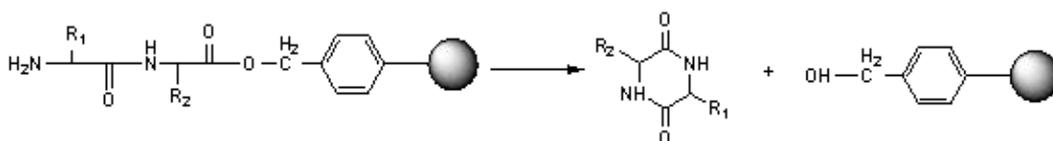


图9 DKP 反应机理

2.3.3.3. 困难序列多肽合成

固相多肽合成中也经常遇到多肽合成失败或合成效率很低的问题，这里面的主要原因是由于多肽序列引起的，因为有些多肽序列在树脂上形成β-折叠，改变了树脂的溶胀性能，还有可能将反应的活性位点埋藏在树脂里面，这样使得反应很难进行，目前报道使用的主要方法有：

- 使用混合溶剂，DMSO/DMF，6N 胍啉/DMF 溶液
- 提高反应温度，或采用微波方法
- 使用高离液盐，LiCl，NaClO₄ 等。
- 使用溶胀性能更好的 PEG-PS 树脂，同时减少树脂担载量
(0.05-0.2mmol/g)

2.4. 合成多肽分析鉴定方法

多肽的分析鉴定方法有多肽一级结构，二级结构鉴定，多肽一级结构包括：质谱分析，氨基酸组成分析，氨基酸序列分析。二级结构包括：圆二色谱 (CD)，NMR，X-衍射等方法。

2.4.1. 纯度分析

多肽的纯度分析，一般都采用 HPLC 进行分析，选择 RP-C18，粒径 5 μm，孔径 300A，4.6×150mm，流动相：A，0.1% TFA/H₂O；B，0.1% TFA/ACN，洗脱梯度，5%B--65%B，时间 30min。也有些多肽，特别是短肽，由于亲水性强，在 C18 上

保留很弱，需要改变条件，这里主要有两种方法：一个改变分析梯度，可以将起始梯度改为 2%，等度或小梯度洗脱；另外一个方法是在流动相中加入强离子对试剂，如七氟丁酸，十八烷基磺酸钠等。

2.4.2. 一级结构分析

2.4.2.1. 质谱分析

质谱分析的目的在于确证分子量，当然采用 MS/MS 可以部分的了解多肽序列的信息，但是这个需要比较全的数据库作为基础，分析才能比较准确。由于多肽性质不稳定，需要采用软电离技术，目前多肽分析主要使用了电喷雾（ESI-MS），基质辅助激光解吸（MALDI-MS）。其中 ESI-MS 通常会给出多电荷峰，电荷数目和多肽序列上氨基，胍基，咪唑基的数目有关，因此，经常给出了双电荷，三电荷等离子峰。MALDI-MS 可以分析蛋白大分子，而且通常情况下很少带多电荷，因此数据直接对应了分子离子峰，容易分析。此外，在分析长肽或蛋白过程中，需要添加 NH_4^+ ，Na，K 等离子，提高灵敏度，所以一般在 MS 中出现一组峰，分别对应： $(M+H)^+$ ， $(M+\text{NH}_4)^+$ ， $(M+\text{Na})^+$ ， $(M+K)^+$ 。

2.4.2.2. 氨基酸组成分析 略

2.4.2.3. 氨基酸序列分析 略

2.4.3. 二级结构分析 略

3. 多肽纯化的基础知识

3.1. 20 种常规氨基酸的代号、性质等

3.1.1. 20 个常规氨基酸

A——Alanine、Ala，丙氨酸；

C——Cysteine、Cys，半胱氨酸；

D——Aspartic Acid、Asp，天冬氨酸；

E——Glutamic Acid、Glu，谷氨酸；

F——Phenylalanine、Phe，苯丙氨酸；

G——Glycine、Gly，甘氨酸；

H——Histidine、His, 组氨酸;	I——Isoleucine、Ile, 异亮氨酸;
K——Lysine、Lys, 赖氨酸;	L——Leucine、Leu, 亮氨酸;
M——Methionine、Met, 蛋或甲硫氨酸;	N——Asparagine、Asn, 天冬酰胺;
P——Proline、Pro, 脯氨酸;	Q——Glutamine、Gln, 谷氨酰胺;
R——Arginine、Arg, 精氨酸;	S——Serine、Ser, 丝氨酸;
T——Threonine、Thr, 苏氨酸;	V——Valine、Val, 缬氨酸;
W——Tryptophan、Trp, 色氨酸;	Y——Tyrosine、Tyr, 酪氨酸。

3.1.2. 性质

3.1.2.1 物理性质

① α -氨基酸都是白色晶体, 每种氨基酸都有特殊的结晶形状, 可以用来鉴别各种氨基酸。除胱氨酸和酪氨酸外, 都能溶于水中。脯氨酸和羟脯氨酸还能溶于乙醇或乙醚中。

② 除甘氨酸外, α -氨基酸都有旋光性, α -碳原子具有手性。苏氨酸和异亮氨酸有两个手性碳原子。从蛋白质水解得到的氨基酸都是 L-型。但在生物体内特别是细菌中, D-氨基酸也存在, 如细菌的细胞壁和某些抗菌素中都含有 D-氨基酸。

③ 氨基酸分子中既含有氨基又含有羧基, 在水溶液中以偶极离子的形式存在。所以氨基酸晶体是离子晶体, 熔点在 200℃ 以上。氨基酸是两性电解质, 各个解离基的表观解离常数按其酸性强度递降的顺序, 当氨基酸分子所带的净电荷为零时的 pH 称为氨基酸的等电点(pI)。

3.1.2.2 化学性质

① 氨基的反应

(1) 酰化

氨基可与酰化试剂, 如酰氯或酸酐在碱性溶液中反应, 生成酰胺。该反应在多肽合成中可用于保护氨基。

(2) 与亚硝酸作用

氨基酸在室温下与亚硝酸反应, 脱氨, 生成羟基羧酸和氮气。因为伯胺都有这个反应, 所以赖氨酸的侧链氨基也能反应, 但速度较慢。常用于蛋白质的化学修饰、水解程度测定及氨基酸的定量。

(3) 与醛反应

氨基酸的 α -氨基能与醛类物质反应，生成西佛碱 $-C=N-$ 。西佛碱是氨基酸作为底物的某些酶促反应的中间物。赖氨酸的侧链氨基也能反应。氨基还可以与甲醛反应，生成羟甲基化合物。由于氨基酸在溶液中以偶极离子形式存在，所以不能用酸碱滴定测定含量。与甲醛反应后，氨基酸不再是偶极离子，其滴定终点可用一般的酸碱指示剂指示，因而可以滴定，这叫甲醛滴定法，可用于测定氨基酸。

(4) 与异硫氰酸苯酯(PITC)反应

α -氨基与 PITC 在弱碱性条件下形成相应的苯氨基硫甲酰衍生物 (PTC-AA)，后者在硝基甲烷中与酸作用发生环化，生成相应的苯乙内酰硫脲衍生物 (PTH-AA)。这些衍生物是无色的，可用层析法加以分离鉴定。这个反应首先为 Edman 用来鉴定蛋白质的 N-末端氨基酸，在蛋白质的氨基酸顺序分析方面占有重要地位。

(5) 磺酰化

氨基酸与 5-(二甲氨基)萘-1-磺酰氯 (DNS-Cl) 反应，生成 DNS-氨基酸。产物在酸性条件下 (6NHCl) 100°C 也不破坏，因此可用于氨基酸末端分析。DNS-氨基酸有强荧光，激发波长在 360nm 左右，比较灵敏，可用于微量分析。

(6) 与 DNFB 反应

氨基酸与 2,4-二硝基氟苯 (DNFB) 在弱碱性溶液中作用生成二硝基苯基氨基酸 (DNP 氨基酸)。这一反应是定量转变的，产物黄色，可经受酸性 100°C 高温。该反应曾被英国的 Sanger 用来测定胰岛素的氨基酸顺序，也叫桑格尔试剂，现在应用于蛋白质 N-末端测定。

(7) 转氨反应

在转氨酶的催化下，氨基酸可脱去氨基，变成相应的酮酸。

②. 羧基的反应

羧基可与碱作用生成盐，其中重金属盐不溶于水。羧基可与醇生成酯，此反应常用于多肽合成中的羧基保护。某些酯有活化作用，可增加羧基活性，如对硝基苯酯。将氨基保护以后，可与二氯亚砷或五氯化磷作用生成酰氯，在多肽合成中用于活化羧基。在脱羧酶的催化下，可脱去羧基，形成伯胺。

③ 茚三酮反应

氨基酸与茚三酮在微酸性溶液中加热，最后生成蓝色物质。而脯氨酸生成黄色化合物。根据这个反应可通过二氧化碳测定氨基酸含量。

④. 侧链的反应

丝氨酸、苏氨酸含羟基，能形成酯或苷。

⑤. 半胱氨酸侧链巯基反应性高：

(1) 二硫键(disulfide bond)

半胱氨酸在碱性溶液中容易被氧化形成二硫键，生成胱氨酸。胱氨酸中的二硫键在形成蛋白质的构象上起很大的作用。氧化剂和还原剂都可以打开二硫键。在研究蛋白质结构时，氧化剂过甲酸可以定量地拆开二硫键，生成相应的磺酸。还原剂如巯基乙醇、巯基乙酸也能拆开二硫键，生成相应的巯基化合物。由于半胱氨酸中的巯基很不稳定，极易氧化，因此利用还原剂拆开二硫键时，往往进一步用碘乙酰胺、氯化苄、N-乙基丁烯二亚酰胺和对氯汞苯甲酸等试剂与巯基作用，把它保护起来，防止它重新氧化。

(2) 烷化

半胱氨酸可与烷基试剂，如碘乙酸、碘乙酰胺等发生烷化反应。

半胱氨酸与γ丙啶反应，生成带正电的侧链，称为S-氨乙基半胱氨酸(AECys)。

(3) 与重金属反应

极微量的某些重金属离子，如Ag⁺、Hg²⁺，就能与巯基反应，生成硫醇盐，导致含巯基的酶失活。

⑥. 以下反应常用于氨基酸的检验：

(1)酪氨酸、组氨酸能与重氮化合物反应(Pauly 反应)，可用于定性、定量测定。

组氨酸生成棕红色的化合物，酪氨酸为桔黄色。

(2)精氨酸在氢氧化钠中与1-萘酚和次溴酸钠反应，生成深红色，称为坂口反应。用于胍基的鉴定。

(3)酪氨酸与硝酸、亚硝酸、硝酸汞和亚硝酸汞反应，生成白色沉淀，加热后变红，称为米伦反应，是鉴定酚基的特性反应。

(4)色氨酸中加入乙醛酸后再缓慢加入浓硫酸，在界面会出现紫色环，用于鉴定吲哚基。

3.1.3. 分类:

①按等电点分; 分为: 酸性 (D、E), 碱性 (H、R、K) 和中性。

②按极性分; 分为: 极性和非极性

(1)非极性AA: 9种, G、A、V、L、I、F、W、M、P

这类AA的侧链 (R基) 都是疏水性的, 因此不易溶于水, 而易溶于有机溶剂。

(2)不带电荷的极性AA: 6种, S、T、Y、C、N、Q

这类AA的侧链 (R基) 都能与水形成氢键, 因此较易溶于水。

(3)带负电荷的极性AA (酸性): 2种, D、E

在PH6-7时第二个-COOH解离, D的侧链-COOH的pKa为3.86, E的侧链-COOH的pKa为4.25, 易溶于水。

(4)带正电荷的极性AA (碱性): 3种, H、R、K

在PH7时带净正电荷, K的侧链 (R基) 上含有一个-NH₃, pKa为10.53, R是碱性最强的AA, 侧链的胍基是已知碱性最强的有机碱, pKa为12.48, H含咪唑环, pKa在游离AA中为6.00、在多肽链中为7.35, 易溶于水。

3.1.4. 特殊性:

①R中含有芳基的AA: F、Y、W, 在紫外区有特殊吸收峰, 在280nm处吸收 W>Y>F。

②F的疏水性最强。

③C、M、W的多肽特别容易氧化

3.2 多肽的溶解

多肽有着很多特性, 关于一些特殊肽建议先用少量肽来试验最适合的溶解方法, 当多肽完全溶解后, 才能加缓冲液。(注意: 应将多肽加入到适当溶剂中搅拌)。

3.2.1. 多肽溶解的主要问题是二级结构的形成。

虽然疏水肽链二级结构的形成更明显, 但除最短的肽链外, 此现象产生在几乎所有肽链, 与极性无关。所以, 溶解多肽的第一个原则是使用无菌蒸馏水或去离子水, 当然无氧水最好。

多肽溶液可能遇到细菌降解。为防止此情况的发生, 应溶解在无菌的蒸馏水中或用0.45或0.2孔径的滤膜过滤除菌。

含有 Cys、Met、Trp 的多肽很容易氧化，应溶于无氧的水中。无氧水可通过注入惰性气体（氮、氦、氩）减压除气得到。

3.2.2. 若多肽不溶于纯水，超声处理有助于打碎颗粒并增加溶解度。注意：超声处理会引起溶液发热或多肽降解。

3.2.3. 若多肽含有多个碱性氨基酸，使用（1-10%）的乙酸水溶液：对于疏水性强的多肽，应使用 50%的乙酸。

3.2.4. 若多肽中含有大量酸性氨基酸，可用氨溶液（1-10%）或乙酸乙基吗啡或重碳酸盐等挥发性的碱性缓冲液溶解。PH 值在层析前必须调整。

3.2.5. 异丙醇和乙腈能溶解中等大小的多肽。若肽要上柱，有机溶剂的量必须很少否则将严重影响停留时间。

3.2.6. 若多肽因含有 Val、Leu、Met、Phe、Tyr、Ala 等芳炟链而高度疏水、或为中性肽时，DMF 或 DMSO 等模变性剂的使用，有利于多肽的溶解。

a. 高浓度模变性剂通过破坏多肽的二级结构而助溶。

b. 膜变性剂适于多肽分析液的制备，但可能会对其生物活性的研究工作造成干扰。

c. DMF 是最佳变性剂（最高浓度可达 30%），滴加至多肽溶解。

d. 反相层析法时，DMF 将与洗脱液前锋一起流出，根据入量的多少，峰值可能很高。大多数肽能在大量 DMF 流出后几分钟内流出，若肽链很小，洗脱太早，多肽的量将很低。

3.3. 各种溶剂以及各种流动相的配置

1、流动相的性质要求：一个理想的液相色谱流动相溶剂应具有低粘度、与检测器兼容性好、易于得到纯品和低毒性等特征。①流动相应不改变填料的任何性质。②纯度。色谱柱的寿命与大量流动相通过有关，特别是当溶剂所含杂质在柱上积累时。③必须与检测器匹配。使用 UV 检测器时，所用流动相在检测波长下应没有吸收，或吸收很小。④粘度要低（应 $<2\text{cp}$ ）。高粘度溶剂会影响溶质的扩散、传质，降低柱效，还会使柱压降增加，使分离时间延长。最好选择沸点在 100°C 以下的流动相。⑤对样品的溶解度要适宜。如果溶解度欠佳，样品会在柱头沉淀，

不但影响了纯化分离，且会使柱子恶化。⑥样品易于回收。应选用挥发性溶剂。

2、流动相的选择：在化学键合相色谱法中，溶剂的洗脱能力直接与它的极性相关。在正相色谱中，溶剂的强度随极性的增强而增加；在反相色谱中，溶剂的强度随极性的增强而减弱。正相色谱的流动相通常采用烷烃加适量极性调整剂。反相色谱的流动相通常以水作基础溶剂，再加入一定量的能与水互溶的极性调整剂，如甲醇、乙腈、四氢呋喃等。极性调整剂的性质及其所占比例对溶质的保留值和分离选择性有显著影响。一般情况下，甲醇-水系统已能满足多数样品的分离要求，且流动相粘度小、价格低，是反相色谱最常用的流动相。但 Snyder 则推荐采用乙腈-水系统做初始实验，因为与甲醇相比，乙腈的溶剂强度较高且粘度较小，并可满足在紫外 185~205nm 处检测的要求，因此，综合来看，乙腈-水系统要优于甲醇-水系统。在分离含极性差别较大的多组分样品时，为了使各组分均有合适的 k 值并分离良好，也需采用梯度洗脱技术。

3、流动相的脱气：HPLC 所用流动相必须预先脱气，否则容易在系统内逸出气泡，影响泵的工作。气泡还会影响柱的分离效率，影响检测器的灵敏度、基线稳定性，甚至使无法检测。（噪声增大，基线不稳，突然跳动）。此外，溶解在流动相中的氧还可能与样品、流动相甚至固定相（如烷基胺）反应。溶解气体还会引起溶剂 pH 的变化，对分离或分析结果带来误差。溶解氧能与某些溶剂（如甲醇、四氢呋喃）形成有紫外吸收的络合物，此络合物会提高背景吸收（特别是在 260nm 以下），并导致检测灵敏度的轻微降低，但更重要的是，会在梯度淋洗时造成基线漂移或形成鬼峰（假峰）。除去流动相中的溶解氧将大大提高 UV 检测器的性能，也将改善在一些荧光检测应用中的灵敏度。常用的脱气方法有：加热煮沸、抽真空、超声、吹氮等。对混合溶剂，若采用抽气或煮沸法，则需要考虑低沸点溶剂挥发造成的组成变化。超声时应注意避免溶剂瓶与超声槽底部或壁接触，以免玻璃瓶破裂，容器内液面不要高出水面太多。

4、流动相的滤过：所有溶剂使用前都必须经 0.45 μm （或 0.22 μm ）滤过，以除去杂质微粒，色谱纯试剂也不例外（除非在标签上标明“已滤过”）。用滤膜过滤时，特别要注意分清有机相（脂溶性）滤膜和水相（水溶性）滤膜。有机相滤膜一般用于过滤有机溶剂，过滤水溶液时流速低或滤不动。水相滤膜只

能用于过滤水溶液，严禁用于有机溶剂，否则滤膜会被溶解！溶有滤膜的溶剂不得用于 HPLC。对于混合流动相，可在混合前分别滤过，如需混合后滤过，首选有机相滤膜。现在已有混合型滤膜出售。

5、流动相的贮存：流动相一般贮存于玻璃、聚四氟乙烯或不锈钢容器内，不能贮存在塑料容器中。因许多溶剂如甲醇、乙酸等可浸出塑料表面的增塑剂，导致溶剂受污染。这种被污染的溶剂如用于 HPLC 系统，可能造成柱效降低。贮存容器一定要盖严，防止溶剂挥发引起组成变化，也防止氧和二氧化碳溶入流动相。磷酸盐、乙酸盐缓冲液很易长霉，应尽量新鲜配制使用，不要贮存。如确需贮存，可在冰箱内冷藏，并在 3 天内使用，用前应重新滤过。容器应定期清洗，特别是盛水、缓冲液和混合溶液的瓶子，以除去底部的杂质沉淀和可能生长的微生物。因甲醇有防腐作用，所以盛甲醇的瓶子无此现象。

6、有机相：常见的有机溶剂有甲醇、乙醇、乙腈、DMSO、DMF、二氯甲烷、四氢呋喃等。

7、水相：常见的作为水相的试剂有 TFA、乙酸、甲酸、磷酸、三乙胺、氨水、醋酸铵、KH₂PO₄、K₂HPO₄ 等。

8、配置：

① 常用水相配置：

(1)、0.1%TFA——1mlTFA 到 1000ml 水；

(2)、0.1%醋酸——1ml 醋酸到 1000ml 水；

(3)、0.3%醋酸——3ml 醋酸到 1000ml 水；

(4)、0.05%磷酸——0.5ml 磷酸到 1000ml 水；

(5)、0.5g 磷酸到 500ml 水；

(6)、TEAP——11ml H₃PO₄ 到 975ml 水中加 15ml 三乙胺调 PH 到 2.3

(7)、0.1%三乙胺：0.5ml三乙胺至500ml水中，用H₃PO₄调PH至6.8

(8)、磷酸-氨水：0.2% H₃PO₄(NH₃调PH到6.5)

(9)、0.1%甲酸——1ml 醋酸到 1000ml 水；

(10)、0.3%甲酸——3ml 醋酸到 1000ml 水；

(11)、乙酸铵：浓度 10mmol、20mmol

(12)、PBS: ①0.05mol/L 磷酸二氢钾 (PH4.0); ②0.01mol/L 磷酸二氢钾 (不调 PH); ③0.01mol/L 磷酸二氢钾 (调 PH 到 6.8); ④0.01mol/L 磷酸二氢钾 (调 PH 到 3.0)

其中最常用的是 0.1%TFA、0.3%醋酸、0.1%醋酸、TEAP、磷酸-氨水等。

9、有机相：甲醇、乙腈的比较。一般情况下选择色谱级的乙腈。

- ① 乙腈价格比甲醇高，特别是 HPLC 级的。
- ② 乙腈吸光度小，在 UV 检测时，产生的噪音小，在 UV 检测的梯度基线上产生的鬼峰小。
- ③ 乙腈压力低：各种有机溶剂与水混合后在柱内承受的压力各不相同，甲醇与水混合压力升高，但乙腈并不如此，因此在梯度洗脱时使用乙腈压力比使用甲醇平稳许多。
- ④ 一般而言，乙腈的洗脱能力比甲醇强，特别是有机溶剂混合比例较低时，在有机溶剂混合比例较高时，有可能甲醇的洗脱能力比乙腈高。
- ⑤ 分离（洗脱）的选择性：由于甲醇和乙腈的化学性质不同，甲醇（和乙醇）是质子性，乙腈（和四氢呋喃）是非质子性，所以两者在分离的选择性上部同，因此，用乙腈不能分离的样品可以选择甲醇试试。
- ⑥ 脱气：由于甲醇和水混合时发热，多余的溶解空气较易脱出（脱气容易）；乙腈与水混合属于吸热冷却，随着慢慢回到室温，产生气泡，所以要考虑脱气（加热搅拌、过滤膜、He 脱气等）。
- ⑦ 乙腈的毒性是甲醇的 5 倍。

10、水相使用的试剂如若不是色谱级则需要过滤，特别是固体试剂，但是使用分析级的液体配制备流动相时也可以不过滤，但要确保流动相里没有可见异物等杂质。

11、试剂使用安全

- ① 各种试剂均有一定的毒性和腐蚀性，使用时要注意，手套、口罩等防护一定要到位；
- ② 液体试剂和固体试剂要分开存放；
- ③ 碱性试剂和酸性试剂要分开存放；

- ④ 取完试剂后，试剂瓶盖要及时盖好；
- ⑤ 取液体试剂的吸管（或者取固体的钥匙）要干净，避免有交叉污染；

3.4. 各种实验室仪器的原理及运用

- 1、HPLC：高效液相色谱仪（后有详述）
- 2、旋转蒸发器：通过减压蒸馏方法旋掉样品中的乙腈等有机溶剂和水，将样品浓缩成较小体积。具体运用详见（旋蒸仪标准操作及维护保养规程）
- 3、冻干机：将冻成冰的样品中的水份通过减压方法直接升华除去，以得到干燥的固体样品。具体运用详见（冻干机标准操作及维护保养规程）
- 4、超声仪：略
- 5、电子天平，具体运用详见（电子天平标准操作及维护保养规程）
- 6、PH 计：略

3.5. 高效液相色谱

- 1、高效液相色谱是一种以液体作流动相和固体微粒作固定相，待测组分在柱内的两相之间进行高速分配和高效分离的柱液体色谱方法。样品溶液中的各组分，因其物理化学性质的微小差异，当其随流动相进入色谱柱后，便在柱的两相之间产生不同的相互作用力，从而导致柱上迁移速率的微小差异。随着流动相的连续推移，这种微小的差异被不断扩大，直至柱内出现明显不同的迁移距离，使最终达到组分完全分离。
- 2、分离原理是：溶于流动相(mobile phase)中的各组分经过固定相时，由于与固定相(stationary phase)发生作用（吸附、分配、离子吸引、排阻、亲和）的大小、强弱不同，在固定相中滞留时间不同，从而先后从固定相中流出。又称为色层法、层析法。
- 3、高效液相色谱法，简称：HPLC，是一种区别于经典液相色谱；基于仪器方法的高效能分离手段。
- 4、HPLC 系统：一般由输液泵、进样器、色谱柱、检测器、数据记录及处理装置等组成。其中输液泵、色谱柱、检测器是关键部件。

5、输液泵是 HPLC 系统中最重要部件之一。泵的性能好坏直接影响到整个系统的质量和实验结果的可靠性。输液泵应具备如下性能：①流量稳定，其 RSD 应 < 0.5%，这对定性定量的准确性至关重要；②流量范围宽，分析型应在 0.1~10 ml/min 范围内连续可调，制备型应能达到 100 ml/min；③输出压力高，一般应能达到 150~300kg/cm²；④液缸容积小；⑤密封性能好，耐腐蚀。

6、泵的使用和维护注意事项为了延长泵的使用寿命和维持其输液的稳定性，必须按照下列注意事项进行操作：①防止任何固体微粒进入泵体，因为尘埃或其它任何杂质微粒都会磨损柱塞、密封环、缸体和单向阀，因此应预先除去流动相中的任何固体微粒。流动相最好在玻璃容器内蒸馏，而常用的方法是滤过，可采用 Millipore 滤膜（0.2μm 或 0.45μm）等滤器。泵的入口都应连接砂滤棒（或片）。输液泵的滤器应经常清洗或更换。②流动相不应含有任何腐蚀性物质，含有缓冲液的流动相不应保留在泵内，尤其是在停泵过夜或更长时间的情况下。如果将含缓冲液的流动相留在泵内，由于蒸发或泄漏，甚至只是由于溶液的静置，就可能析出盐的微细晶体，这些晶体将和上述固体微粒一样损坏密封环和柱塞等。因此，必须泵入纯水将泵充分清洗后，再换成适合于色谱柱保存和有利于泵维护的溶剂（对于反相键合硅胶固定相，可以是甲醇或甲醇-水）。③泵工作时要留心防止溶剂瓶内的流动相被用完，否则空泵运转也会磨损柱塞、缸体或密封环，最终产生漏液。④输液泵的工作压力决不要超过规定的最高压力，否则会使高压密封环变形，产生漏液。⑤流动相应先脱气，以免在泵内产生气泡，影响流量的稳定性，如果有大量气泡，泵就无法正常工作。

7、泵产生故障，须查明原因：①没有流动相流出，又无压力指示。原因可能是泵内有大量气体，这时可打开泄压阀，使泵在较大流量（如 5ml/min）下运转，将气泡排尽，也可用一个 50ml 针筒在泵出口处帮助抽出气体。另一个可能原因是密封环磨损，需更换。②压力和流量不稳。原因可能是气泡，需要排除；或者是单向阀内有异物，可卸下单向阀，浸入丙酮内超声清洗。有时可能是砂滤棒内有气泡，或被盐的微细晶粒或滋生的微生物部分堵塞，这时，可卸下砂滤棒浸入流动相内超声除气泡，或将砂滤棒浸入稀酸（如 4mol/L 硝酸）内迅速除去微生物，或将盐溶解，再立即清洗。③压力过高的原因是管路被堵塞，需要清除和清

洗。压力降低的原因则可能是管路有泄漏。检查堵塞或泄漏时应逐段进行。

8、色谱峰 — Peak——色谱柱流出组分通过检测器时产生的响应信号的微分曲线

峰底 — Peak Base——峰的起点与终点之间连接的直线

峰高 — Peak Height——峰最大值到峰底的距离

峰宽 — Peak Width——在峰两侧拐点处所作切线与峰底相交两点之间的距离

半（高）峰宽 — Peak Width at Half Height——通过峰高的中点作平行于峰底的直线，其与峰两侧相交两点之间的距离

峰面积 — Peak Area——峰与峰底之间的面积，又称响应值

标准偏差； σ — Standard Error——0.607 倍峰高处所对应峰宽的一半

拖尾峰 — Tailing Peak——后沿较前沿平缓的不对称峰

前伸峰 — Leading Peak——前沿较后沿平缓的不对称峰

鬼峰 — Ghost Peak——并非由试样所产生的峰；亦称假峰

基线 — Baseline——在正常操作条件下，仅由流动相所产生的响应信号的曲线

基线飘移 — Baseline Drift——基线随时间定向的缓慢变化

基线噪声；N — Baseline Noise——由各种因素所引起的基线波动

谱带扩展 — Band Broadening——由于纵向扩散，传质阻力等因素的影响，使组分在色谱柱内移动过程中谱带宽度增加的现象

死时间， t_0 — Dead time——不被固定相滞留的组分，从进样到出现峰最大值所需的时间

保留时间， t_R — Retention time——组分从进样到出现峰最大值所需的时间

死体积， V_0 — Dead volume——不被固定相滞留的组分，从进样到出现峰最大值所需的流动相体积

保留体积， V_R — Retention volume——组分从进样到出现峰最大值所需的流动相体积

9、液相色谱实验所需的基本参数：

流动相：种类及配比，等度或梯度

固定相：色谱柱类型及内径、长短

流动相输送系统参数：流速

检测器参数：紫外检测波长，灵敏度等

温度控制

进样量

以上参数即构成一个具体的 HPLC 方法，亦称色谱条件

10、色谱图即色谱柱流出物通过检测器时所产生的响应信号对时间的曲线图，其纵坐标为信号强度，横坐标为保留时间。

流出曲线上的突起部分称为色谱峰，正常色谱峰为对称形正态分布曲线，不对称色谱峰有两种：前延峰和拖尾峰，样品进入色谱柱，经流动相冲洗，由检测器测得的信号-洗脱时间曲线，即色谱图。

11、HPLC 的故障诊断与维护

1、基线噪音——可能的原因：流动池脏、检测器灯有问题、如果是周期性的，电压或泵的脉冲、温度对检测器的影响气泡经过检测器。

2、基线漂移——可能的原因：• 梯度洗脱、• 温度不稳定（示差检测器）、• 流动相中有污染物• 柱中的流动相没有平衡、体系中有污染物流出

3、鬼峰——即使不进样也会出现的峰

问题 1- 流动相脏、问题 2- 容器污染、问题 3- 柱子污染

4、峰型—①双峰——可能原因：柱中有死体积、过滤片部分堵塞、只有一个双峰——组分的共洗脱样品与溶剂不匹配，溶剂与柱子不匹配

②峰展宽——(1)所有的峰都展宽：柱效降低——柱死体积，大进样量，高粘度流动相，样品与流动相不匹配。(2)部分峰展宽：前次进样后流出的组分，大分子量样品（蛋白或聚合物）

③拖尾峰（对称性 > 1.2 ）——(1)部分峰拖尾：二次保留效应——残留硅醇基的反应、小峰紧跟在大峰的后面流出。(2)所有峰拖尾：额外的柱效应、柱坏/不适当的溶剂、柱头有污染、金属、不适当的样品量。

④前伸峰（不对称性 < 0.9 ）可能的原因：在大峰前，有小峰流出、柱死体积、样品溶剂不适当、过滤片部分堵塞、柱过载。

⑤倒峰——原因：(1)样品的吸收比流动相的吸收值低(2)当样品组分通过色谱柱

时打破了原来的平衡(3)用示差检测器时是正常的

⑥宽峰——柱外体积增加：(1)在进样口到柱或柱到检测器之间，使用细的短的连接管，(2)保证所有的管路接头都使用正确，(3)用小体积检测池，(4)减少进样量或降低样品浓度。

5、压力

I. 不进样时柱压连续升高

1、泵密封垫，2、流动相有颗粒，3、流动相溶解性，4、流动相的不稳定性(聚合)，5、形成柱死体积(与使用条件有关)。

II. 进样时压力升高

1、样品有颗粒，2、样品在流动相中不溶，3、样品组分与固定相不兼容

6、保留值漂移

I. 所有峰都向低保留值方向漂移(酸、碱、中性化合物)

1、键合相流失，2、流动相不稳定(可能性较小)，3、溶剂输送系统(流速变化)

II. 所有峰都向高保留值方向漂移

1、在水/有机溶剂的混合体系中，有机溶剂含量减少，

2、柱改变(可能性较小)，3、溶剂输送系统(流速变化)

III. 离子型化合物的色谱峰的保留值漂移

1、流动相中挥发性组分损失(离子强度，pH 漂移)，2、柱改变(键合相或污染)。

3.6. 色谱柱

1、反相色谱的主要类型，基于分子的极性分离，洗脱次序：一般为反相，即极性高的先被洗脱

2、常用的流动相：

有机溶剂如甲醇、乙腈，四氢呋喃，

应用添加剂，成为离子对、离子抑制方法

3、常用固定相：

碳十八、碳八、胺基、氰基，二醇基等基团

反相色谱固定相大多数为键合相

4、以硅胶为基质，通过化学键合方式把碳十八、碳八、胺基等基团联在基质上，作为固定相。

优点：固定相稳定，不易流失，应用广泛，可使用多种溶剂，消除硅羟基的不良影响

缺点：pH 值不能小于 2 或大于 8，同样填料，各种牌号色谱柱不尽相同

5、pH 对色谱柱的影响

1) 填料的稳定性

(1) 硅胶填料，pH: 2-8

pH 值大于 7 时键合相溶解

pH 值小于 2 时键合相水解

经常用缓冲液——固定相降解

(2) 聚合物填料，pH:2-12 或 0-14

6、色谱柱的选择

非极性或极性较小的样品可用一般的 C18 柱

酸碱性的化合物建议选用填料经封尾钝化过的 C18 柱，PH 范围 2-9 (12)

糖类，氨基酸，有机酸，多环芳烃，GPC 有专用柱

7、良好的色谱实验习惯

拿到一根新色谱柱时，先测柱效；保留在新色谱柱上测得的色谱图，并记录条件；

定期检测柱效；色谱柱的使用及操作

8、流动相的转换（特别是 GPC 柱）

流速(压力)的变化幅度；温度的变化幅度；专用色谱柱：样品及溶剂的要求

9、色谱柱的保养

1) 样品方面：除去微粒及杂质，了解样品在流动相中的溶解度，如样品的溶剂不是流动相，一定要用流动相试溶解度，防止其在流动相中析出，了解样品与色谱柱的基质/填料是否相互作用，流动相方面，除去微粒，

2) 纯度的要求：超纯水，梯度实验时水中有机杂质含量要低；缓冲液的 pH 值，在填料的允许范围内；缓冲液（盐）的浓度；溶剂：色谱纯，并与填料相匹配；溶剂中的杂质含量；流动相对样品的溶解度；有机溶剂或水的比例；

3) 在线的保护装置：给色谱柱提供物理的保护；除去样品及流动相中的颗粒；给色谱柱提供化学的保护；防止分析柱被化学污染

4) 装置：在线过滤器；自装填料保护柱；预装保护柱；在线过滤器；

(1) 在线过滤器——防止颗粒在色谱柱头累积

优点：基本不影响柱效

在需要高柱效的分析时中常用（如：氨基酸分析）

(2) 可更换的消耗品——更换滤芯；更换垫圈；保护柱

可避免化学污染。多数保护柱影响到整个色谱柱的柱效，特别是在用微柱时

3) 保护柱的种类——普通自装填料的保护柱；用户自装填料影响柱效同装填技术有关，柱效降低较大

5) 色谱柱的清洗——对所做的样品要有充分的了解；用对该样品洗脱能力最强的流动相清洗；

(1) 硅胶柱的一般方法：先用甲醇洗去极性杂质；用干燥的二氯甲烷、正庚烷 100~200ml 依次活化；

(2) 键合相柱(烷基)的一般方法：20 倍柱体积的：甲醇-氯仿-甲醇-水依次冲洗

柱子尺寸	柱子体积	冲洗体积
150x4.6mm	2.5ml	50ml
200x4.6mm	3.3ml	65ml
250x4.6mm	4.2ml	80ml

10、色谱柱的存放

存放前的处理：除去杂质、盐；合适的存放溶剂；避免色谱柱床的干枯；避免机械震动；防止细菌生长；注意存放的温度

11、色谱柱常见毛病

柱压过高——多少才算高？不同色谱柱有差异、不同系统有差异；不同溶剂有差异

为什么柱压会过高？微粒堵塞，样品，流动相，密封垫，柱床膨胀，不可逆吸附，细菌生长

柱效低——重复性差、不出峰，回收率低

为什么柱效低？

色谱柱被污染，过滤片部分堵塞，样品、流动相或密封垫的细小颗粒造成的堵塞，色谱柱内的死体积。流动相 pH 值及组成不合适造成固定相流失，流速急剧变化造成固定相物理损坏，机械震动造成固定相产生裂缝，柱床收缩或干枯

12、色谱柱维修/再生——物理阻塞

1) 在安装柱前后测试压力差

2) 如果柱压力太高，反装色谱柱，并用 10-20 倍柱体积的流动相冲洗色谱柱，监测压力变化

3) 若出现沉淀（如：蛋白凝聚、细胞物、聚合物）设法用相应的可溶性溶剂，如 0.1% TFA/ 80% 乙腈，6M 盐酸胍，THF，HFIP

4) 若仍无效，应考虑更换过滤片

柱头有塌陷，用填料修补

实验的重复性差——色谱柱被污染、流动相 pH 值及组成不合适造成键合相流失、样品溶剂不同或样品本身不稳定

回收率低，不出峰——“不可逆”吸附、固定相过强或流动相过弱、非特异性吸附

13、色谱柱以外的因素

(1) “柱效”问题，不一定是色谱柱问题！

1) 仪器问题：连接不好造成死体积进样器、检测器、管路，连接口、保护柱、在线过滤器堵塞

2) 流动相问题：色谱柱未平衡好、进样量太大、

3) 色谱柱与仪器的联接

(2) 不同公司产品，其接头不同。处理不当时，会造成：

1) 色谱峰展宽（死体积）使柱效下降、或渗漏

解决办法：自制相应的转换接头、使用“通用”型接头（锥箍及螺母）、这种锥箍在不锈钢管上是活动的，因此可以换接不同的色谱系统及色谱柱。PEEK 工程塑料的接头，可用在所有类型的色谱柱上的。

(3) 柱压过高问题，不一定是色谱柱问题！

1) 系统反压问题：阻尼器堵塞、进样器堵塞、管路或接口堵塞

在线过滤器不干净、保护柱、压力传感器不准确、流速是否错误？

2) 实验的重复性差：梯度实验时平衡时间不足、温度波动、流动相组成改变、样品溶剂不同、样品稳定性不好、方法的开发不好、缓冲液的 pH 值不合适、缓冲液的缓冲能力不足

4. 冻干多肽的保存

多肽溶液比干粉的稳定性的差很多，标有“冻干保存”说明的多肽应该保存在冰冻条件下，以-20℃最佳，其活性可保持多年。当使用冰冻产品时，开盖前其容器应在装有新鲜干燥箱内升至室温。-20℃的产品，此过程需要一小时或更长，随包装而定。否则，当容器打开，水气进入导致凝缩而降低稳定性。一旦打开，应迅速称量完毕，立即封闭以免潮解，亲水肽更应注意。

5. 多肽标记及修饰

目前多肽标记及修饰的内容非常多，广泛应用在多肽药物，多肽生物学，多肽抗体以及多肽试剂的研究中。目前应用广泛的有：非放射性核素标记（C13，H2），荧光标记（FAM，FITC），生物素标记，磷酸化修饰等。

5.1. 非放射性核素标记

目前在非放射性核素标记中，使用广泛的仍然是 C13，H2，因为其使用安全，放射性小。现在有比较完全的非放射性标记的氨基酸，可以按照正常的多肽合成方法将标记好的氨基酸直接连接到多肽上。

5.2. 荧光标记

荧光标记由于没有放射性，实验操作简单。因此，目前在生物学研究中荧光标记应用非常广泛，荧光标记方法与荧光试剂的结构有关系，对于有游离羧基的采用的方法与接肽反应相同，也采用 HBTU/HOBt/DIEA 方法连接。但是对于 FITC 标记，需要在连接 FITC 前，增加一个氨基己酸，避免在切割的过程中被 TFA 切割掉。

5.3. 生物素标记

生物素-亲合素系统 (biotin-avidin system, BAS), 是 70 年代后期应用于免疫学, 并得到迅速发展的一种新型生物反应放大系统。由于它具有生物素与亲合素之间高度亲和力及多级放大效应, 并与荧光素、酶、同位素等免疫标记技术有机地结合, 使各种示踪免疫分析的特异性和灵敏度进一步提高。主要有用于标记多肽氨基的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯 (BNHS) 和生物素对硝基酚酯 (pBNP), 其中以 BNHS 最常用, 当然, 也可以直接使用生物素也可以标记, 因为其结构上有个游离的羧基, 采用 HBTU/HOBt/DIEA 方法缩合, 由于生物素的溶解度低, 使用 DMSO/DMF 的混合溶剂增加溶解度。

5.4. 磷酸肽合成

磷酸肽在生命过程中发挥重要作用, 磷酸化的位置在多肽上的 Ser, Thr, Tyr。目前磷酸肽合成一般都采用磷酸化氨基酸, 目前使用的都是单苄基磷酸化氨基酸, Tyr 也可以直接使用磷酸化氨基酸。磷酸化氨基酸的连接一般采用 HBTU/HOBt/DIEA 方法, 但是目前采用该方法合成磷酸化也有缺点, 特别是在合成多磷酸化多肽或长肽的时候, 连接效率低, 最后产品纯度很低, 对于这种磷酸化多肽, 我们考虑采用后磷酸化方法, 其合成过程就是在多肽合成结束后, 选择性脱去要标记的氨基酸的侧链保护基, 对于 Tyr, Thr 可以直接使用侧链不保护的氨基酸进行反应, 而 Ser 可以采用 Fmoc-Ser (Trt), 在 1% TFA/DCM 条件下可以定量的脱除。后磷酸化, 采用双苄基亚磷酰胺, 四氮唑生成亚磷酰胺四唑活性中间体, 连接到羟基上, 随后在过氧酸下氧化生成磷酰基, 完成反应。

6. 蛋白结构与功能模拟多肽

多肽在与蛋白受体结合发挥功能的时候, 总是先折叠出某些特殊的结构, 多肽类似物合成主要是为了模拟这些结构, 保持或提高生物活性, 同时也为了改变多肽的稳定性, 提高其抗酶解能力。

6.1. α -螺旋多肽

α -螺旋是蛋白结构中最普遍的一种, 但是一般多肽在溶液中大多是无规卷曲

的，目前使用最多的方法是多肽保持 α -螺旋结构就是在多肽表面通过共价键将处在 α -螺旋结构的两个氨基酸连接起来，选择的位点 ($i, i+4$ 或 $i, i+7$)，选择的化学键包括：二硫键，硫醚键，酰胺键，烯炔键 (RCM) 等方法。

6.1.1. 二硫键

二硫键广泛存在与蛋白结构中，对稳定蛋白结构具有非常重要的意义，二硫键一般是通过序列中的 2 个 Cys 的巯基，经氧化形成。形成二硫键的方法很多：空气氧化法，DMSO 氧化法，过氧化氢氧化法等。二硫键的合成过程，可以通过 Ellman 检测以及 HPLC 检测方法对其反应进程进行监测。

6.1.2. 硫醚键

硫醚键的形成可以通过序列中的 Lys，将溴乙酸连接到 Lys 的侧链氨基上，利用其和巯基的特异性反应，反应在缓冲溶液中进行，迅速高效。

6.1.3. 酰胺键

多肽的内酰胺环肽的合成一般是利用 Lys, Asp (Glu) 的选择性保护，在固相上直接环化。BOC 策略中可以采用 BOC-Lys (Fmoc), BOC-Asp (OFm), Fmoc 策略中可以采用 Fmoc-Lys (Alloc), Fmoc-Asp (Allyl)。对于首尾环肽，还可以先合成保护的多肽，然后在液相中环化生成目标多肽。

6.1.4. 烯炔键 (RCM)

RCM 反应是一个过渡金属催化反应，其反应中使用催化剂： $(Cy_3P)_2C_12Ru=CHPh$ ，可以催化烯炔环化，过程中脱去一分子乙烯。

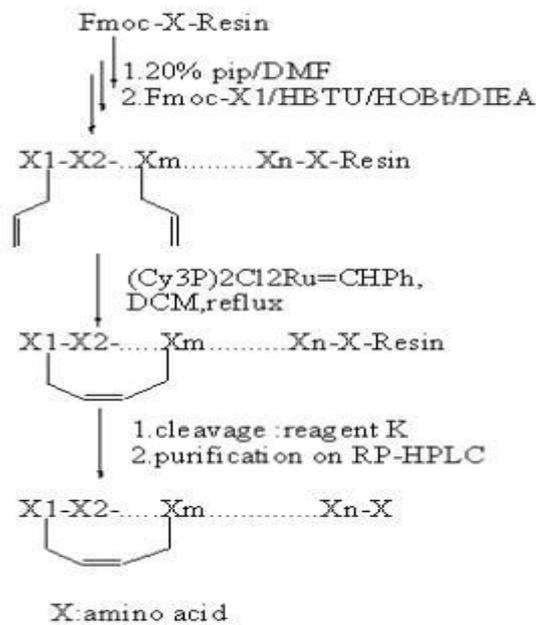


图 10 固相 RCM 反应

该反应也可以在固相树脂上直接环化, 反应条件: 15-25% (Cy3P)₂Cl₂Ru=CHPh, DCM, 60-80°C, 24-48h。

6.2. TASP (Template-Assembled Synthetic Peptide) 多肽

瑞士 Basel 大学的化学家首次提出 TASP 的概念, 他们利用具有“发夹”结构的肽链作为模板, 然后将具有 α-螺旋结构的多肽直接连接到模板上, 模拟蛋白质的高级结构。

6.3. 长肽或蛋白合成

6.3.1. Fmoc-tBu 片段缩合方法

Fmoc-tBu 片段缩合方法在合成长肽以及蛋白上面运用非常广泛, 其合成过程首先是合成保护性肽片段, 经过纯化后, 将几个片段在液相或固相上组装起来。使用本方法主要注意几个方面: 片段的选择, 片段的合成与纯化, 片段缩合方法。片段选择要考虑到片段连接反应时间长, 容易导致消旋, 故片段的 C 末端最好选择 Gly, Pro。合成的片段一般需要经过 C4, C8 等纯化, 对于溶解性很差的多肽, 可以采用硅胶柱层析方法进行纯化。由于片段的分子大, 在树脂内移动速度慢, 故反应时间一般都很长, 而且反应过程中与片段浓度关系很大, 溶解的时候, 尽量提高片段的浓度。对多种条件的选择, 发现采用 DMF 为溶剂, DIC/HOBt 的方

法缩合效率最高，消旋也最小。

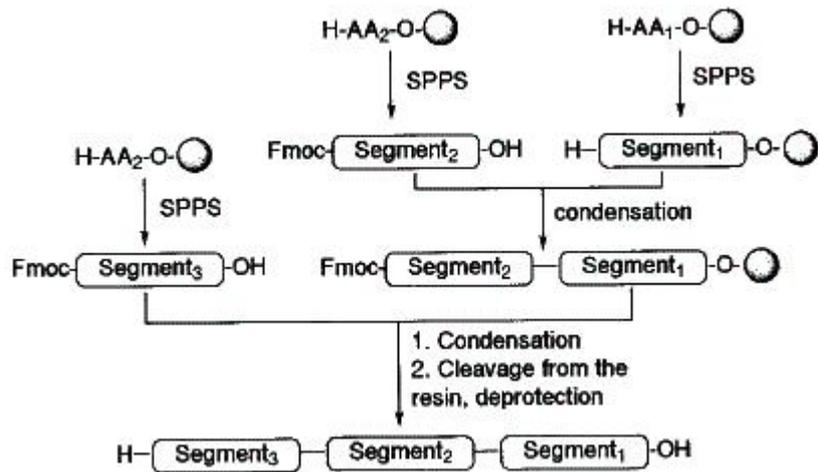


图 11 Fmoc-tBu 片段缩合示意图

6.3.2. 自然化学连接 (Native Chemical Ligation)

自然化学连接方法的优点是可以采用完全脱保护的多肽，因此不存在溶解性问题，其反应也是在缓冲水溶液中进行，由于其利用的是巯基和硫酯的特异性反应，再经过由 S 到 N 的转变完成肽键的合成。

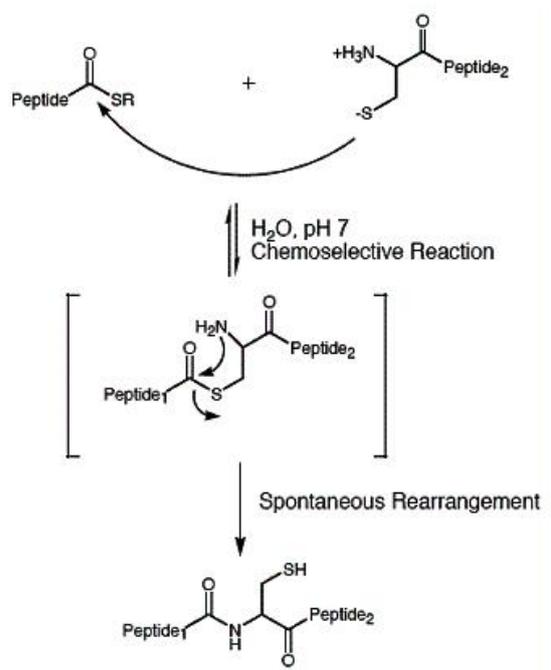


图 13 自然化学连接

总之，今后多肽化学的研究，不仅是将更多的有机化学合成新方法，新技术引入到多肽研究当中，而且对蛋白的结构以及功能模拟，开展结构活性研究

(structure activity relationship) 将是研究开发的热点，因为这将为揭示蛋白的内在的生物活性本质提供大量实验数据。

附录一、质谱解析常用数据

1. 氨基酸保护氨基酸常用数据

名称	缩写	分子	残基量	保护氨基酸	分子量
Alanine(丙氨酸)	A-Al	89.1	71.07	Fmoc-Ala-OH	329.3
Arginine(精氨酸)	R-Ar	174.	156.18	Fmoc-Arg(Pbf)	648.77
Asparagine(天冬氨酸)	N-As	132.	114.10	Fmoc-Asn(Trt)	596.7
Aspartic Acid(天冬氨酸)	D-As	133.	115.08	Fmoc-Asp(OtBu)	411.46
Cysteine(半胱氨酸)	C-Cy	121.	103.14	Fmoc-Cys(Trt)	585.7
Glutamine(谷氨酰胺)	Q-Gl	146.	128.13	Fmoc-Gln(Trt)	610.7
Glutamic Acid(谷氨酸)	E-Gl	147.	129.11	Fmoc-Glu(OtBu)	425.48
Glycine(甘氨酸)	G-Gl	75.1	57.05	Fmoc-Gly-OH	297.3
Histidine(组氨酸)	H-Hi	155.	137.14	Fmoc-His(Trt)	619.7
Isoleucine(异亮氨酸)	I-Il	131.	113.15	Fmoc-Ile-OH	353.4
Leucine(亮氨酸)	L-Le	131.	113.15	Fmoc-Leu-OH	353.5
Lysine(赖氨酸)	K-Lv	146.	128.17	Fmoc-Lvs(Boc)	468.5
Methionine(蛋氨酸)	M-Me	149.	131.19	Fmoc-Met-OH	371.5
Phenylalanine(苯丙氨酸)	F-Ph	165.	147.17	Fmoc-Phe-OH	387.4
Proline(脯氨酸)	P-Pr	115.	97.11	Fmoc-Pro-OH	337.4
Serine(丝氨酸)	S-Se	105.	87.07	Fmoc-Ser(tBu)	383.4
Threonine(苏氨酸)	T-Th	119.	101.10	Fmoc-Thr(tBu)	397.5
Tryptophan(色氨酸)	W-Tr	204.	186.20	Fmoc-Trp(Boc)	526.59
Tyrosine(酪氨酸)	Y-Ty	181.	163.17	Fmoc-Tyr(tBu)	459.5
Valine(缬氨酸)	V-Va	117.	99.13	Fmoc-Val-OH	339.4

2. 重排离子

化合物类别	质量数	化合物类别	质量数
烯	$14 \times N + 42$	羧酸酯	$14 \times N + 74$
苄基	$14 \times N + 91$	甲酸酯	$14 \times N + 46$
醛	$14 \times N + 44$	酰胺	$14 \times N + 59$
酮	$14 \times N + 58$	乙腈	$14 \times N + 41$
羧酸	$14 \times N + 60$	硝基化合物	$14 \times N + 61$

3. 几种常用氨基保护基团的分子量

缩写	基团式	基团量
Z	$C_2H_5O_2$	135.14
Mz	$C_6H_6O_3$	165.12
Boc	$C_6H_9O_2$	101.12
Fmoc	$C_{15}H_{11}O_2$	223
Tfa	$C_2F_3O_2$	97
Pbf	$C_{13}H_{16}O_3S$	253
Trt	$C_{10}H_{15}$	243.31
Acm	C_7H_6O	72
tBu	C_4H_9	57
OtBu	C_4H_9O	73
Acetyl	C_2H_3O	43

4. 中性分子和金属离子

HCN	27
HF/HBr/HI	20/81/128
CO ₂ /CO	44/28
H ₂ S	34
CH ₃ COOH	60
CH ₃ OH	32
H ₂ O	18
TFA	114
Na	23
K	39
Fe	56

附录二、多肽合成技巧

N 末端的生物素标记

- Wash 0.1 mmol resin with DMF.
- Dissolve 0.244 g (+)-biotin (1 mmol, MW 244.3) in 5 mL DMF-DMSO (1:1) solution. A little warming is necessary.

- Add 2.1 mL 0.45 M HBTU/HOBt solution and 0.3 mL DIEA to the solution prepared in step 2.
- Add the activated biotin solution to the resin and let stir overnight.
- Check resin to make sure coupling is complete as evidenced by negative ninhydrin test (colorless).
- Wash resin with DMF-DMSO (1:1) (2x) to remove excess (+)-biotin.
- Wash resin with DMF (2x) and DCM (2x).
- Let the resin dry before proceeding to cleavage.

在 2-氯 TRT 树脂上挂第一个 Fmoc 氨基酸的方法

- Weigh 10 g 2-chlorotriethyl chloride resin (15 mmol) in a reaction vessel, wash with DMF (2x), swell the resin in 50 mL DMF for 10 min, drain vessel.
- Weigh 10 mmol Fmoc-amino acid in a test tube, dissolve Fmoc-amino acid in 40 mL DMF, transfer the solution into the reaction vessel above, add 8.7 mL DIEA (50 mmol), swirl mixture for 30 min at room temperature.
- Add 5 mL methanol into the reaction vessel and swirl for 5 min.
- Drain and wash with DMF (5x).
- Check substitution.
- Add 50 mL 20% piperidine to remove the Fmoc group. Swirl mixture for 30 min.
- Wash with DMF (5x), DCM (2x), put resin on tissue paper over a foam pad and let dry at room temperature overnight under the hood. Cover the resin with another piece of tissue paper, press lightly to break aggregates.
- Weigh loaded resin.

- Pack in appropriate container.

检测树脂上面是否挂上第一个 Fmoc 氨基酸的方法

- Weigh duplicate samples of 5 to 10 mg loaded resin in an eppendorf tube, add 1.00 mL 20% piperidine/DMF, shake for 20 min, centrifuge down the resin.
- Transfer 100 μ L of the above solution into a tube containing 10 mL DMF, mix well.
- Pipette 2 mL DMF into each of the two cells (reference cell and sample cell), set spectrophotometer to zero. Empty the sample cell, transfer 2 mL of the solution from step 2 into the sample cell, check absorbance.
- $\text{Subs} = 101(A)/7.8(w)$
A = absorbance
w = mg of resin
- Check absorbance three times at 301 nm, calculate average substitution.

Fmoc 方法合成多肽操作步骤 (0.25 mmol)

- Wash resin with DMF (4x) and then drain completely.
- Add approximately 10 mL 20% piperidine/DMF to resin. Shake for one min and drain.
- Add another 10 mL 20% piperidine/DMF. Shake for 30 min.
- Drain reaction vessel and wash resin with DMF (4x). Make sure there is no piperidine remaining. Check beads using ninhydrin test, beads should be blue.

- Coupling Step - Prepare the following solution:

1 mmol Fmoc-amino acid

2.1 mL 0.45 M HBTU/HOBT (1mmol)

348 μ L DIEA (2 mmol)

Add above solution to the resin and shake for a minimum of 30 min. This coupling step can be longer if desired.

- Drain reaction vessel and wash resin with DMF (4x).
- Perform Ninhydrin test:
 - If negative (colorless), proceed to step 2 and continue synthesis.
 - If positive (blue), return to step 5 and re-couple the same Fmoc-amino acid. Increase the coupling time if necessary.

合成含有磷酸化酪氨酸多肽的方法

Reagent: N-a-Fmoc-O-phosphotyrosine

- For 0.1 mmol or 0.25 mmol synthesis, use 0.483 g Fmoc-Tyr(P03H2)-OH (1 mmol, MW 483.4) . For ABI synthesizers, pack Fmoc-Tyr(P03H2)-OH in a cartridge.
- The cycle program for coupling Fmoc-Tyr (P03H2)-OH is the same as for other Fmoc-amino acids except for the coupling time (see step 3). (Note: ABI synthesizers use HBTU/HOBT as the activating reagent.)
- The coupling time for Fmoc-Tyr(P03H2)-OH needs to be increased. For ABI model 430A peptide synthesizer, insert several steps (i.e., vortex on, wait 990 sec, vortex off, to increase the coupling time). For ABI model 431A peptide synthesizer, add additional "I"s. Overnight coupling may be necessary for some sequences.

- After the coupling step for Fmoc-Tyr(P03H2)-OH, perform ninhydrin test to ensure complete coupling. Negative (colorless) ninhydrin test indicates complete coupling, while a positive (blue) ninhydrin test indicates incomplete coupling.
- Increase the coupling time of the amino acid residues after the phosphotyrosine or perform double coupling. (Note: The coupling of amino acids after the phosphotyrosine can be difficult.)
- There is a limit on the number of amino acid residues that can be coupled after the phosphotyrosine. Since the phospho group is unprotected, side reactions are likely to occur. (Note: Peptides have been successfully coupled with sequences containing up to ten additional amino acids following the phosphotyrosine residue.)

用 Wang 树脂和 2-氯 TRT 树脂同时合成多肽

Peptides which differ in the C-termini can be simultaneously synthesized in one reaction vessel by employing resins that possess different cleavage properties. The resins used were the weak acid labile 2-chlorotrityl resins and the TFA labile Wang resins. The success of this approach was shown by the co-synthesis of ACTH (4-10) with ACTH (4-11) and Neuropeptide Y, a C-terminal amide peptide with its corresponding C-terminal free acid analog.

*Hong A., Le T., and Phan T. Techniques in Protein Chemistry VI, 531-562 (1995).

切割程序

Starting Resin: Chlorotrityl resins

Reagents for 1 g Peptide-Resin:

1 mL acetic acid (AcOH)

2 mL trifluoroethanol (TFE)

7 mL dichloromethane (DCM)

- Prepare above mixture.
- Add peptide-resin to the mixture and let it stir at room temperature for 1 h.
- Filter and wash resin with 10 mL TFE:DCM (2:8) (2x) to ensure that all of the product is recovered.
- Evaporate the solvent until there is less than 5 mL of liquid.
- Add ether to a test tube containing about 100 mL of the above solution. Check solubility of the fully protected peptide in ether. If the product precipitates, proceed to step 6. If no precipitate is observed, proceed to step 7.
- Add cold ether to the residual liquid in step 4 to precipitate the fully protected peptide. Filter through a fine sintered funnel to obtain the product.
- Some fully protected peptides are soluble in ether. In this case, add water to precipitate them out. Filter through a fine sintered funnel to obtain the product.

从 Fmoc-Lys(Mtt) 氨基酸上脱去 Mtt 的方法

Reagent:

Fmoc-Lys(Mtt)-OH

- Swell resin in DCM.
- Wash resin with 3% TFA/DCM (2x) (since the resin is swollen in DCM, this step of washing the resin quickly with 3% TFA/DCM ensures that the actual concentration of TFA is 3%).
- Shake the resin in 3% TFA for 10 min.

- Repeat step 3.
- Wash resin with DCM (3x), DMF (3x), isopropanol (3x), and DCM (3x).
- Let the resin dry in air.

多肽标记 FITC 方法

Reagents:

FITC

Fmoc-e-Ahx-OH

- Couple Fmoc-e-Ahx-OH to the amino terminal of the peptide-resin using standard coupling conditions.
- "De-Fmoc" with piperidine using the standard 20% piperidine procedure.
- Wash resin with DMF (3-4x).
- Swell resin with DCM and drain.
- Prepare solution of 1.1 equivalent of FITC in pyridine/DMF/DCM (12:7:5). Use just enough solution to form a slurry with the resin. Do not use too much solution since the rate of the reaction is proportionate to the concentration of the solution.
- Add the solution prepared in step 2 to the resin.
- Let mix overnight.
- Check the completion of the reaction using ninhydrin test.
- If the coupling of FITC to the amino group is not complete, ninhydrin test will give a blue color. Repeat the coupling with FITC (steps 5-7) if necessary.
- Wash resin with DMF (2x), isopropanol (2x), and DCM (2x).

多肽标记 FAM 方法

Reagent:

5-carboxyfluorescein (5-FAM)

Use standard coupling method to couple 5-carboxyfluorescein to the amino group of the peptide. For cost saving purposes, use 2x excess compared to the mmol of resin, instead of the standard 4x excess used for Fmoc-amino acids. For 0.1 mmol synthesis, use 75 mg 5-carboxyfluorescein, 76 mg HBTU, and 70 mL DIEA.