

反相层析技术在多肽纯化中的优化策略 及环境友好性探讨

周光旭 方宝 易旭东 刘敏

太极集团重庆涪陵制药厂有限公司, 重庆

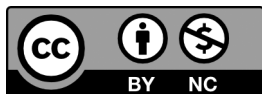
摘要 | 反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 可对复杂的多肽混合物进行有效分离, 是现阶段应用最为普遍的多肽纯化方法。传统RP-HPLC工艺存在溶剂消耗高、废液处理环保相关问题。如何优化RP-HPLC工艺, 进而提高纯化效率、减轻对环境的负担, 成为当下研究的焦点。本文归纳了RP-HPLC在多肽纯化中的应用, 接着探讨了几种优化途径, 涵盖对色谱条件的精细调控、新型固定相材料的应用以及绿色溶剂的替代措施, 水-醇体系、离子液体和低共熔溶剂等绿色溶剂被提出作为环境友好型替代选项。采用超高效液相色谱 (UHPLC) 和其他集成技术相配合, 如耐溶剂纳滤 (OSN) 这种, 有望进一步提高纯化效率, 同时减少溶剂消耗, 最后对RP-HPLC技术未来的发展方向予以展望, 提出采用智能化工艺与绿色化技术相结合, 有潜力推动多肽药物生产向更可持续发展的方向发展。

关键词 | 反相高效液相色谱; 多肽纯化; 绿色溶剂; 废液管理; 优化策略

Copyright © 2026 by authorx (s) and SciScan Publishing Limited

This article is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



1 引言

多肽是由氨基酸通过肽键连接而成的生物活性分子, 在激素调节、免疫反应以及细胞通讯等生理进程中扮演关键作用^[1]。伴随生物医药技术的革新, 多肽在疾病治疗、疫苗开发及靶向药物等方面显示出广阔的前景, 尤其针对像糖尿病、肿瘤这样的疾病, 多肽药物鉴于其高靶点选择性与低免疫原性而备受推崇。多肽药物大多存在口服生物利用度低 (一般<2%)、易被酶分解的缺点, 一般需进行注射给药, 这对药物纯度及杂质的控制 (例如宿主蛋白、缺失肽等状况) 提出了近乎严苛的要求^[2, 3]。因此, 推进高效、高分辨率纯化技术的发

展是多肽药物研发及生产的核心要素。

为保证多肽药物的生物活性与疗效, 高效纯化技术成为关键所在^[4]。反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 以疏水性固定相与极性流动相的相互作用为基础, 凭借出色的分辨率及灵活性, 已成为多肽纯化的主流技术^[5], 但传统RP-HPLC工艺在处理结构相似多肽的精准分离、规模化放大时的收率保障, 以及应对大量有机溶剂消耗带来的环境与经济成本等方面, 依然面临明显挑战。在追求更高纯化性能的同时, 依靠系统性策略降低该技术的环境副作用, 已成为此领域关键的发展方向, 本文将围绕RP-HPLC在多肽纯化方面的应用及优化策略展开论

通讯作者: 方宝, 太极集团重庆涪陵制药厂有限公司执业药师。

文章引用: 周光旭, 方宝, 易旭东, 等. 反相层析技术在多肽纯化中的优化策略及环境友好性探讨 [J]. 环境与资源, 2026, 8 (1): 61-65.

<https://doi.org/10.35534/er.0801007>

述,着重探讨如何通过调整色谱条件、引入新型固定相材料以及选用绿色溶剂替代方案,进而提高技术的效率以及环境友好度,通过对现有技术的剖析与研讨,为实现更绿色、高效的多肽药物生产提供切实可行的方案。

2 反相层析技术在多肽纯化中的应用及挑战

2.1 工作原理与技术优势

RP-HPLC分离的核心是多肽分子与固定相(通常为C18或C8键合硅胶)之间的疏水相互作用,在由水以及有机溶剂(如乙腈、甲醇)组成的流动相里,多肽按照其疏水性的差异被选择性地洗脱:疏水性越高,保留时长越长,梯度洗脱靠逐步提升有机相的比例达成,达成复杂混合物内各组分的有效分离目的。

该技术的优势显著:拥有高分辨率及选择性,可以分辨仅有个别氨基酸不一样的多肽;方法灵活度很强,可借助调整流动相成分、pH、温度,以及固定相种类,契合不同理化性质的多肽;技术达到成熟稳定水平,较易从分析规模扩大至制备及生产规模;与分析技术的相融性出色,纯化产物可直接拿去做质谱、活性检测等下游分析。

为优化分离的效果,尤其针对碱性的或带电的多肽,大多要在流动相添加离子对试剂(如三氟乙酸, TFA)。TFA主要经由两种机制发挥作用^[6]:(1)和多肽带正电基团产生疏水性离子对,加大其在固定相上的保留量;(2)贴于固定相的表面之上,动态修整其色谱性质,以此改进峰形与分离的效果。

2.2 面临的主要挑战

RP-HPLC应用于多肽纯化时面临的挑战,主要由多肽分子本身的复杂性、工艺放大规律,以及环境可持续性要求引起的。

(1)分子复杂特性引发的技术难题:多肽在序列、疏水性、电荷及空间构象上的细微差异,可能导致色谱行为高度相似,对分离选择性提出苛刻要求,在合成或表达过程中产生的结构相似杂质(像缺失肽、异构体),去除尤为不易。

(2)规模化生产里的工艺挑战点:放大操作期间,因上样量增加,柱效出现下降,表现为峰展宽以及分辨率出现降低,必须在载样量、流速、梯度以及回收率之间谋求新的平衡,在工艺开发与放大上成本支出高昂。

(3)环境跟成本的可持续性挑战:传统工艺要大量依赖高纯度的有机溶剂,生产这些溶剂需要消耗大量能源,使用时挥发性有机化合物(VOCs)排放引起安全与环境方面的风险,后续处理这些废液成本高昂,跟日渐严格的环保法规(像REACH,绿色化学原则)相悖离。

3 反相层析技术的优化策略

3.1 色谱条件的精细化调控

分离选择性的决定性要素是流动相组成,除传统的水-乙腈/甲醇构成的体系外,采用乙醇、异丙醇等低毒性醇类进行全部或部分替代,是主要的绿色化路径,但在方法开发中,需要重新评估其洗脱强度差异,优化梯度程序也同样关键,通过设计线性、非线性或多步梯度,可在保证分离度的前提下,有效缩短运行时间并削减溶剂用量。

柱温、流速与pH值是需协同优化的参数,适度把柱温提高(如30~50℃)可降低流动相的粘性,加大传质的效率,由此改善分离状况与峰的形状,流速的优化要在分辨率跟分析时间/溶剂用量之间实现平衡,精准调整pH能改变多肽的电离状态,有效把控其保留特性,对带电多肽的分离十分关键。

3.2 新型固定相材料的应用

RP-HPLC的固定相材料也取得了显著创新与改进,传统固定相材料以硅胶基质为主,通常通过在硅胶表面键合疏水性链(像C18)实现分离,尽管这些材料在分离大部分多肽时呈现出良好表现,但随着对分辨率以及选择性要求不断增高,研究者开始聚焦于新型固定相的开发。

功能化硅胶基固定相得到了普遍应用,经由在硅胶表面添加多种功能基团,可调控其对不同多肽的吸附能力大小,由此实现更强的选择性,这类固定相材料可依据不同的多肽特性,按需求调整其表面性质,提升分离的效率与选择性。

聚合物基固定相也被导入到RP-HPLC里面,聚合物基材料体现出较高的化学稳定性、较强的机械强度以及更好的生物相容性,聚合物基固定相不仅能给予更高的稳定性,提高色谱柱的使用寿命,而且一般能够给出更大的孔隙结构,适宜分离相对较大的蛋白或多肽分子,应用这些新型固定相材料,既提升了多肽纯化的分辨率,又提升了纯度,也拓宽了RP-HPLC的应用范畴,尤其在复杂样品的分离操作里具有明显优势。

3.3 多肽样品的预处理

有效的样品预处理对提高RP-HPLC纯化效率、延长色谱柱使用寿命意义重大,通过去除杂质、优化样品的溶解状态,可显著提升分离的成效,就合成多肽而言,固相萃取(SPE)法常用来去除大量盐分和短肽杂质,SPE凭借选择性吸附目标物质,协助去掉不需要的杂质,拉高多肽的纯度数值。再有一种常用方法是沉淀法,利用调整样品的离子强度使杂质沉淀下来,进而把这些干扰性的物质给除掉,调整样品的pH值以及离子强度也能优化多肽的溶解性,减弱非特异性吸附的影响,这能保证多肽处于最理想的分离状态,以此改进纯化的效果。

就低浓度样品而言, 事先进行浓缩(如超滤或者冻干)是提升纯化通量的关键手段, 超滤借助除去水分, 加大样品的浓度; 冻干可把溶液中的水分去掉, 保障多肽的稳定性, 经过浓缩处理的样品能增加上样量, 增进纯化工作效率, 采用合理的样品预处理方式, 有助于提高RP-HPLC的纯化效率, 降低杂质的干扰, 增加色谱柱的使用寿命。

3.4 集成化与智能化策略

整合上述策略, 辅以高通量筛选(HTS)以及基于模型的工艺开发途径, 可大幅度加速优化进程。结合计算模拟预测多肽保留行为, 指导初始条件选择, 再通过实验设计(DoE)快速明确最优参数组合, 是实现高效、绿色纯化工艺开发的未来方向。

4 环境友好性与可持续性改进路径

伴随全球环保意识的提高与可持续发展目标的带动, 常用的多肽纯化技术中, 其环境友好及可持续的特性逐渐成为关注要点。虽然传统的RP-HPLC技术因高效以及应用广泛而普遍被采用, 但依靠大量有机溶剂、化学试剂, 同时消耗能源, 对环境和经济形成了一定的压力。

4.1 传统溶剂的环境负担分析

在多肽纯化操作中, RP-HPLC技术对环境的主要压力是大量使用乙腈、甲醇等有机溶剂引起的, 生产这些溶剂依赖于化石资源, 存在较高的能源消耗, 而在其生产进程中会释放出大量的温室气体, 对气候的变化造成负面影响, 乙腈以及甲醇等有机溶剂挥发性比较强, 作为挥发性的有机化合物, 使用时会散发到空气里面, 造成空气环境污染, 进而对操作人员的健康产生威胁, 长时间接触这些溶剂挥发的气体, 也许会造成呼吸道刺激、神经系统损伤等健康隐患。

RP-HPLC采用的有机溶剂在纯化操作中产生的废液处理是个巨大环保挑战, 溶剂废液往往含有有毒物质, 若处置不妥当, 不仅会加大废物处置的花销, 还可能对水体和土壤产生持久的污染后果, 废液中通常含有有害有机化学物质, 这些物质进入环境后, 会对水生生物、植物乃至整个生态系统造成长期破坏, 要处理废水, 不仅需高效的处理技术, 还牵扯到高昂的费用, 这肯定增加了制药或实验过程中的运营难题。

除了有机溶剂之外, RP-HPLC过程中采用的三氟乙酸(TFA)也引发了环境压力, TFA为一种强酸性化学物质, 一般用作离子对试剂, TFA废液呈现出较强的腐蚀性, 必须进行复杂的中和处理之后安全排放, 未经中和处理的TFA废液直接排放可能对水源、土壤和生物系统造成重大损害, 因为TFA的处理程序繁琐且花费高昂, 这让RP-HPLC应用在环境方面的负担进一步加剧。

使用RP-HPLC的过程中会大量消耗有机溶剂, 又会生成有毒的废液, 不但直接对环境形成污染, 又让废物处理

的复杂程度和费用上升, 在环保要求一天天变严的今天, 寻求更绿色、更高效的溶剂替代品以及废液处理对策, 已成为RP-HPLC技术应用时的一项关键挑战及研究方向。

4.2 绿色替代溶剂的探索与应用局限

搜寻环境友好的溶剂替代方案已成为RP-HPLC技术中的关键研究热点, 伴随环保法规愈发严格和绿色化学理念的推行, 研究者们纷纷尝试探索减少对传统溶剂的依赖途径, 尤其是减少诸如乙腈、甲醇这类挥发性有机溶剂的使用, 以弱化其对环境造成的消极影响。

水-乙醇/异丙醇体系是当下最可行、且具备较高工业化潜力的溶剂替代方案, 水和乙醇或者异丙醇组成的混合体系在多肽分离上取得了显著应用成果, 尤其是在实施极性较强的多肽分离时, 具备优良的溶解性能, 即便这种替代方案仍旧要重新开拓并优化相关的色谱方法, 但已有研究证实, 通过恰当调控水-醇混合溶剂的比例, 可以在维持分离效果的同时, 减少传统有机溶剂的使用频次, 减少对环境的损害, 随着工业化应用的逐步拓展, 该体系已成功应用于多种多肽的制备中, 且展现出宽泛的应用空间。

离子液体作为新型绿色溶剂, 缘于其挥发性极低、可设计性表现优越等特性, 引起了广泛的关注。离子液体呈现出低挥发性以及较高的热稳定性, 因此在高温或极端条件下的应用表现上佳; 鉴于其极低的蒸汽压力, 可有效降低溶剂挥发造成的污染。离子液体呈现出高粘度、高成本, 以及和传统色谱系统兼容性欠佳的情形, 妨碍了其在工业化规模生产里的运用, 离子液体回收起来难度不小, 虽说其可回收的概率比较高, 但回收流程繁琐且费用高昂, 这进一步增添了其大规模应用的阻碍。

低共熔溶剂(DESs)同样体现出较低的挥发性与较强的可设计性, 在一定程度上可对传统溶剂进行替代, DESs表现出的高粘度以及和常规色谱系统的兼容性相关难题, 令其在实际应用方面面临挑战, DESs作为绿色溶剂, 在一些特殊情形下依旧展现出巨大潜力, 尤其是在对低温和高粘度溶剂存在需求的应用场合。

虽说离子液体和低共熔溶剂在环保性以及性能上优势显著, 但高成本、回收方面的困难以及和色谱系统的兼容性问题, 依旧是制约其在工业化规模应用的关键因素, 当前更符合实际的做法是通过削减传统溶剂使用量来降低环境压力, 并非完全把传统溶剂替代。借助优化色谱条件、强化分离效率以及采用小规格的色谱柱, 可切实减少溶剂的消耗量, 同时保证纯化过程在高效的同时兼顾环境友好, 渐渐减少有害溶剂的用量, 且结合绿色溶剂的部分应用实例, 会是RP-HPLC技术往绿色化转型的重要发展路径。

4.3 系统性减废与资源化策略

(1) 工艺端减量: 采用超高效液相色谱(UHPLC)

抑或整体柱技术,借助其高柱效,于更短时间、更低溶剂消耗下完成分离操作,调整并优化梯度程序,降低等度洗脱与高比例有机相的冲洗时长。

(2) 工程端回收:构建高效的溶剂蒸馏回收体系,就大规模生产而言,溶剂回收率可实现70%~90%,能有效减少原材料成本以及环境排放,耐溶剂纳滤(OSN)等技术可运用到在线浓缩以及溶剂交换中,进一步降低新鲜溶剂的消耗数量。

(3) 废液合规管理:认真落实废液分类收集要求,对含TFA等特殊废液开展专门的中和及预先处理,保证契合环保法规要求后再排放或转由专业机构去处理。

5 案例分析与工业化前景

5.1 优化实践案例

案例一:艾塞那肽工艺整合与溶剂减量。针对艾塞那肽(39肽),研究者将传统的三步纯化步骤优化为两步RP-HPLC策略^[7]。最初选用选择性C8填料开展捕获工作,经优化梯度后,直接一步把纯度从66%提高至96.5%;随后换用醋酸铵缓冲体系实施精制,最终纯度达到99.3%的水平,总收率实现了78%,主要效益在于实施工艺整合,令乙腈总消耗量跟原工艺相比降低约40%,实现了效率跟绿色化状态的双重提升。

案例二:司美格鲁肽固定相创新应对高疏水性挑战。司美格鲁肽因脂肪酸修饰,疏水性极为强烈,在传统C18柱上出现严重拖尾现象,采用经表面修饰与孔径优化处理的专用C8填料,明显优化了峰形,把动态载量增长到15 mg/mL,一次纯化就能从纯度82%的粗品里得到纯度99.6%的产品,实现了88%的回收率,该案例彰显了针对特定分子特性去选择或者开发专用固定相的重要意义。

案例三:替尔泊肽(片段)耦合技术实现资源闭环。在替尔泊肽衍生多肽的提纯操作中,将RP-HPLC与耐溶剂纳滤(OSN)加以耦合,当RP-HPLC初步纯化结束后,利用OSN对洗脱液进行在线浓缩与溶剂置换操作,大幅降低含产物流动相里乙腈的含量大幅降低后回收,与此同时浓缩产物,该集成工艺让溶剂总用量下降了35%,产物的质量回收百分比提升了10%,展现了末端处理技术在提高工艺经济性以及环保性上的潜力。

5.2 工业化应用前景与挑战

伴随多肽药物市场的不断扩大,RP-HPLC在工业化应用上前景十分宽广,核心面临的机遇为:绿色生产需求带动工艺优化及溶剂替换;连续流色谱等新技术有潜力提高生产效率并降低溶剂消耗程度;智能制造凭借实时监控和自适应控制提升工艺的稳健性。

然而,挑战并存。规模化状态下,溶剂消耗以及废液处理造成的环保压力巨大;高性能填料及回收设备一

开始的投资成本就很高;做每一种新多肽的个性化工艺开发依旧要花费大量时间精力,未来发展靠的是产学研之间的合作,一同促进从绿色溶剂、高效设备直至智能工艺控制的全链条创新。

6 结论与展望

反相层析技术(RP-HPLC)凭借其高分辨率及灵活性,依旧是多肽纯化不可替代的核心方式,面临分子复杂性、放大难题与环境可持续性要求,依靠色谱条件精细把控、应用新型固定相、开展智能工艺打造等策略,可持续增进其纯化效率。

增强环境友好性属于一项系统工程,其实际能走通的路径为:优先凭借工艺优化和工程回收极大减少传统溶剂的用量,并逐步落实水-醇体系等更绿色溶剂的替代运用,集成化工艺设计可同时实现纯度、收率,以及环保指标的多重优化。

该领域的研究重点应放在:(1)研发兼具优异色谱性能与真正可持续性的新一代绿色溶剂;(2)开发高效、低能耗的废液资源化及溶剂回收新方法;(3)采用人工智能和数字孪生技术,实现多肽纯化工艺的快速预评与优化;(4)促进连续、集成的绿色纯化平台从实验室迈向工业生产,凭借多学科交叉跟技术整合,RP-HPLC技术必定可在保证多肽药物供给的阶段,为制药产业的绿色可持续发展注入更大动力。

参考文献

- [1] 单春乔,赵红岩,崔丽,等.生物活性肽生理作用及功能研究[J].粮食与油脂,2011,24(4):15-7.
- [2] 哲锋崔.生物制药技术的发展现状与未来趋势分析[J].自然科学研究,2024,1(2):25-27.
- [3] 樊蓉,张纯,高申.蛋白多肽类药物的药代动力学研究概况[J].药学实践杂志,2006,(3):135-138.
- [4] 赵悦,赵海波,冷小京,等.多肽化学合成技术发展及多肽计量发展现状[J].计量科学与技术,2024,68(12):39-44.
- [5] 杨毅,李崎,陈蕴,等.反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定啤酒中有机酸[J].食品与发酵工业,2003,(8):6-12.
- [6] 朱晓因,苏志国.反相液相色谱在蛋白质及多肽分离分析中的应用[J].分析化学,2004,(2):248-254.
- [7] 吴宏斌,王永智,饶玲,等.高效液相色谱法测定重组艾塞那肽纯度的方法验证研究[J].药物生物技术,2016,23(4):341-344.

Optimization Strategies and Environmental Friendliness of Reversed-phase Chromatography in Peptide Purification

Zhou Guangxu Fang Bao Yi Xudong Liu Min

Taiji Group Chongqing Fuling Pharmaceutical Factory Co., Ltd. Fuling District, Chongqing

Abstract: Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) is an effective method for separating complex peptide mixtures and currently the most widely used technique for peptide purification. Traditional RP-HPLC processes face challenges such as high solvent consumption and environmental issues related to waste liquid disposal. Therefore, optimizing RP-HPLC processes to improve purification efficiency and reduce environmental impact has become a focal point of current research. This article summarizes the application of RP-HPLC in peptide purification and explores several optimization strategies, including fine-tuning chromatographic conditions, the use of novel stationary phase materials, and the substitution with green solvents. Environmentally friendly alternatives such as water-alcohol systems, ionic liquids, and deep eutectic solvents are proposed as green solvent options. By integrating ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) with other technologies, such as organic solvent nanofiltration (OSN), purification efficiency can be further enhanced while reducing solvent consumption. Finally, the future development directions of RP-HPLC technology are discussed, highlighting that the combination of intelligent processes and green technologies has the potential to promote more sustainable peptide drug production.

Key words: Reversed-phase high-performance liquid chromatography; Peptide purification; Green solvents; Waste liquid management; Optimization strategies