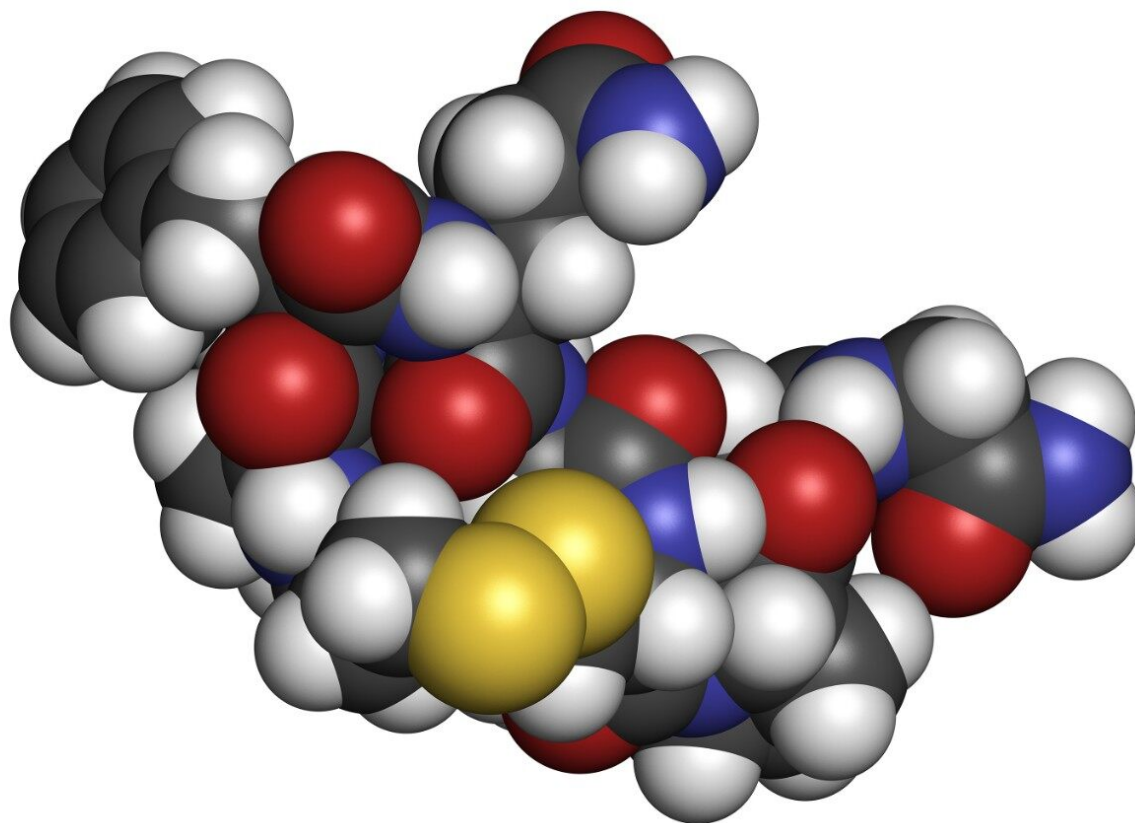


应用纪要

使用沃特世反相色谱柱分析合成肽中的杂质

Hua Yang, Stephan M. Koza, William J. Warren, Weibin Chen

Waters Corporation



摘要

在本应用纪要中，我们使用不同的沃特世反相色谱柱在不同的梯度分离条件下分离一系列市售的相关合成肽序列。并基于这些结果进行色谱柱筛选，进而得出色谱柱选择的一般指南。

优势

- 根据指南适当选择各种反相色谱柱，以在通用梯度条件下分离相关的生物治疗性肽
- 虽然所有反相色谱柱均存在细微的肽分离选择性差异，但可以通过仅选择4种沃特世肽分离色谱柱进行方法筛选来开发合理的方法
- 在复杂的合成肽反应混合物分析中有效应用质谱分析

简介

肽类作为一种极具潜力的生物治疗药物越来越受关注。目前，全球市场上有超过100种肽。治疗性肽有三种来源：天然来源、重组技术和化学合成。肽合成法与其他两种方法相比的优势在于，可以使用固相肽合成(SPPS)技术，以快速且可控的方式生成合成肽。此外，还可以相当容易地引入化学修饰，从而扩展肽的化学性质和结构多样性及稳定性^{1,2}。

合成肽终产品中的杂质可能来自于生产工艺，也可能在储存期间生成。由于这些杂质可能会影响治疗性肽的安全性和疗效，必须对它们进行监测和表征。

为合成肽杂质分析选择合适的色谱柱和分离方法往往并不简单。在本研究中，我们使用不同的沃特世反相色谱柱在不同的梯度分离条件下分离一系列市售的相关合成肽序列。并基于这些结果进行色谱柱筛选，进而得出色谱柱选择的一般指南。

实验

样品描述

所有合成肽样品均购自Bachem。将冻干材料复溶于水中，得到浓度为2 mg/mL（基于冻干肽的质量）的溶液。将样品用0.1%甲酸进一步稀释至更低的浓度。表1列出了这些肽及其性质。

肽	肽序列	长度	MW	pI*	注释
三氟乙酸 比伐卢定水合物	H-D-Phe-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Lle-Pro-Glu-Glu-Trp-Leu-OH, 三氟乙酸盐水合物	20 aa	2180.29	3.87	脱酰胺化
蓝肽二乙胺盐	Pyr-Gln-Asp-Tyr(OSO ₃ H)-Thr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂ , 二乙胺	10 aa	1352.42	3.34	化学修饰
去氨加压素醋酸盐	3-Mercaptopropionyl-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-D-Arg-Gly-NH ₂ , 醋酸盐	8 aa	1069.22	8.61	化学修饰二硫键
醋酸兰瑞肽	H-2Nal-c[Cys-Tyt-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH ₂ , 醋酸盐	8 aa	1096.33	8.40	环状化学修饰
促胰液素 (猪)	H-His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Leu-Arg-Asp-Ser-Ala-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH ₂	27 aa	3055.45	9.85	天冬酰亚胺形成
鲑鱼降钙素	H-c[Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys]-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH ₂	32 aa	3431.90	9.00	环状
PTH (1-34)	H-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-OH	34 aa	4117.74	9.10	氧化, 大分子

表1. 合成肽列表及其性质

*: pI得自BioLynx, 未经化学修饰。

液相色谱条件

系统:	ACQUITY UPLC H-Class Bio
样品温度:	4 °C
分析柱柱温:	60 °C
流速:	0.3 mL/min (通用梯度)
进样体积:	2.5-10 µL
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 肽分析专用柱, 300A, 1.7 µm, 2.1 × 150 mm (部件号: 186003687) ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 肽分析专用柱, 130A, 1.7 µm, 2.1 × 150 mm (部件号: 186003556) ACQUITY UPLC CSH C ₁₈ 肽分析专用柱, 130A, 1.7 µm, 2.1 × 150 mm (部件号: 186006938)

ACQUITY UPLC HSS T3肽分析专用柱, 100A, 1.8 μm , 2.1 \times 150 mm (部件号: 186008756)

ACQUITY UPLC CSH苯己基柱, 130A, 1.7 μm , 2.1 \times 150 mm (部件号: 186005408)

ACQUITY UPLC CSH氟苯基柱, 130A, 1.7 μm , 2.1 \times 150 mm (部件号: 186005353)

ACQUITY UPLC BEH C₈, 130A, 1.7 μm , 2.1 \times 150 mm (部件号: 186003377)

检测条件:

配备5 mm钛合金流通池的ACQUITY UPLC TUV检测器, 214 nm

样品收集/样品瓶:

通过LCGC认证的透明玻璃12 \times 32 mm螺纹颈口全回收样品瓶, 配有盖子和预切割PTFE/硅胶隔垫, 容积1 mL (部件号: 186000385C)

流动相A:

含0.1% (v/v)三氟乙酸(TFA)或0.1% (v/v)甲酸(FA)或20 mM甲酸铵的水溶液, pH 10

流动相B:

含0.1% (v/v)三氟乙酸(TFA)或0.085% (v/v)甲酸(FA)或20 mM甲酸铵的乙腈溶液, pH 10

数据管理:

MassLynx 4.1版

典型梯度:

时 间	流 速(mL/min)	%A	%B	曲 线
0.00	0.3	74	26	-
2.00	0.3	74*	26*	11

时 间	流 速(mL/min)	%A	%B	曲 线
22.00	0.3	54	46	6
24.00	0.3	5	95	6
24.01	0.3	74	26	11
34.00	0.0	74	26	11

* %A和%B组成随不同的流动相和不同的肽而变化。但是，梯度斜率保持不变，为每20分钟改变20%流动相B。

结果与讨论

色谱柱筛选

固相肽合成(SPPS)是一种常用的化学合成技术，与液相合成相比具有许多优势。SPPS的一般原理是进行一次去保护-清洗-偶联-清洗的重复循环。这项技术使用固态载体并按顺序添加氨基酸，可以洗出所有可溶性试剂和副产物。合成所需的肽后，去除所有氨基酸保护基团，将其从载体中裂解。

在启动SPPS时，将第一个氨基酸的C端与活化的固态载体（通常为无化学反应活性的聚苯乙烯）偶联。第一个氨基酸C端将与树脂偶联（氨基酸与载体之间存在一个连接基）。树脂作为C端保护基团，在过滤过程中可以保留固定的肽，同时冲洗掉液相试剂与合成副产物³。

合成完成后，从树脂上裂解所需的肽。合成的每一步都会引入杂质，包括氨基酸缺失、氨基酸插入、肽截断、外消旋、合成过程中形成的副产物等。即使经过初步的单步纯化和分离，仍然会存在一些杂质。此外，储存过程中也有可能发生肽产物降解^{4,5}。

通常采用色谱方法来评估合成肽制剂中这些杂质的含量，其中反相色谱是较为常用的色谱技术。

2017年，沃特世发表了一篇应用纪要，并行比较了10种反相色谱柱用于肽图分析应用的性能⁶。虽然所评价的

色谱柱在该应用中均有效，但考虑到蛋白质表征和质量检测的目的，我们极力推荐将以下四种色谱柱用于肽图分析。分别为：BEH C₁₈肽分析专用柱(130 Å)；BEH C₁₈肽分析专用柱(300 Å)；CSH C₁₈肽分析专用柱(130 Å)；以及HSS T3肽分析专用柱(100 Å)。

在本研究中，我们基于选择性和保留性的差异，通过筛选上述四种色谱柱以及其他三种色谱柱，实施了合成肽杂质分析。图1-7展示了在不同流动相条件下利用沃特世反相色谱柱分离七种合成肽所得到的色谱图。各种肽的结果汇总如下。

比伐卢定（图1a、1b和1c；表2）

比伐卢定（商品名：Angiomax、Angiox）是一种特异性、可逆的直接凝血酶抑制剂⁷。常与阿司匹林联合使用，以降低血液的凝血能力，有助于防止血管中形成有害的凝块。具体而言，其主要用于接受某些心脏和血管手术（例如冠状动脉血管成形术）的患者⁸。

比伐卢定是一种包含20个氨基酸的肽，单同位素质量数为2178.986 Da。它具有一个天冬酰胺(Asn)残基，可以发生脱酰胺作用。此外，序列中的聚甘氨酸基序也非常重要。

图1a、1b和1c分别展示了使用甲酸、TFA和甲酸铵(pH 10)流动相对比伐卢定及其杂质的分离结果。仔细检查色谱图后得出一些观察结果：

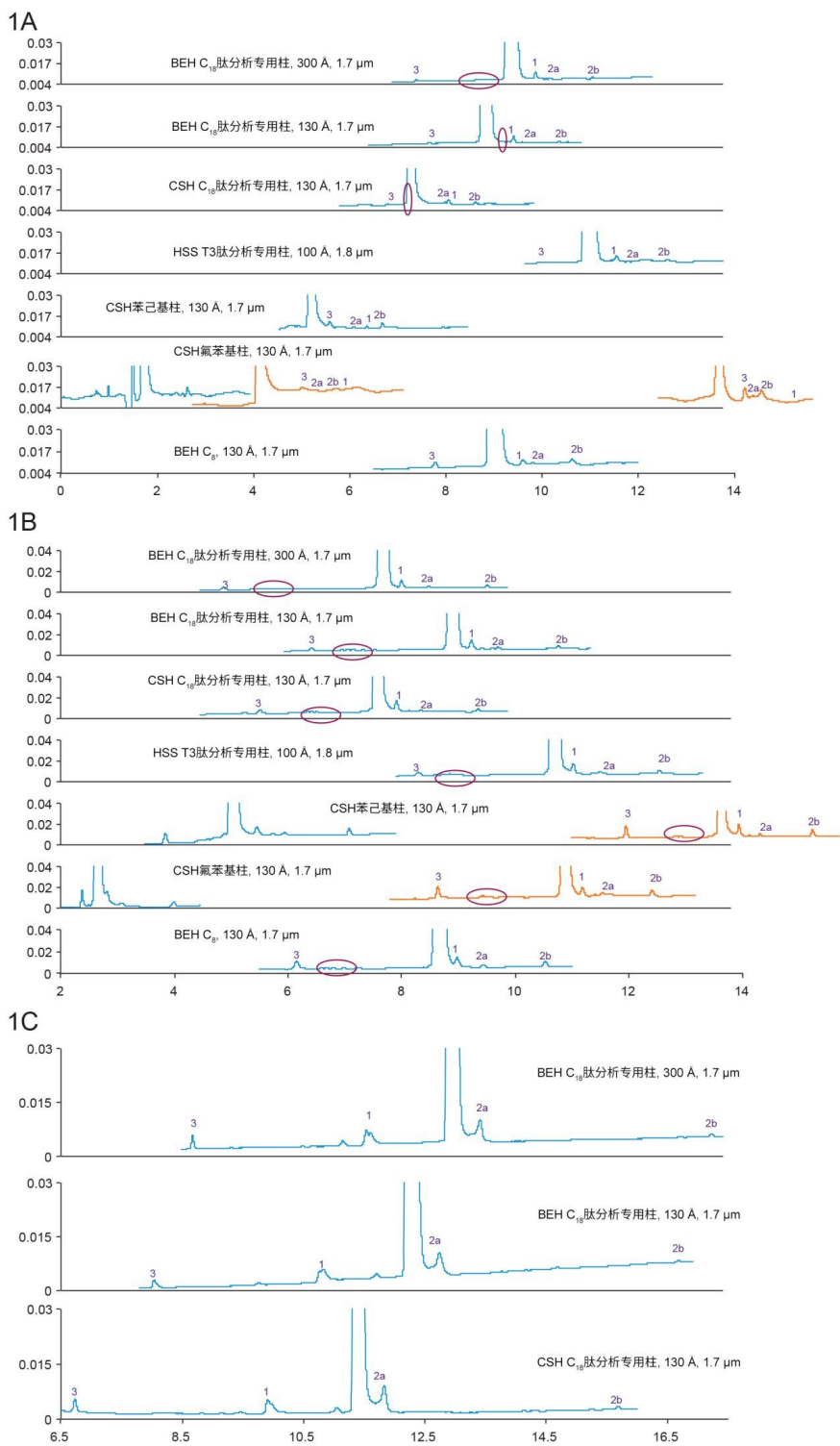


图1.1A: 利用甲酸流动相得到的比伐卢定分离结果。梯度: 流动相B在20 min内从18%增加到38%。橙色迹线: 流动相B在20 min内从15%增加到35%, 流动相B在20 min内从10%增加到30%。

1B: 利用TFA流动相得到的比伐卢定分离结果。梯度: 流动相B在20 min内从22%增加到42%。橙色迹线: 流动相B在20 min内从14%增加到34%。

1C: 利用甲酸铵(pH 10)流动相得到的比伐卢定分离结果。梯度: 流动相B在20 min内从5%增加到25%。

杂质	利用BEH C ₁₈ 130 Å 得到的保留时间(min)	质量数(Da)	Δ质量数 (Da)	推定的鉴定结果
峰 1	9.61	2180.00	1.01	脱酰胺化
峰 2a	9.79	2161.96	-17.03	2a = 2b + 脱酰胺化
峰 2b	10.58	2160.99	-18.00	H ₂ O损失
峰 3	7.83	1167.54	-1011.45	片段[12-20]

表2.比伐卢定杂质的推断性峰鉴定。

1.选择性

为展示色谱柱的选择性，使用质谱法对主峰进行鉴定。推断性鉴定结果列于表2中。正如预期所料，脱酰胺被视为主要杂质之一。如图 1a-1c 所示，不仅在色谱柱之间，在不同的流动相条件下，选择性也会发生变化。色谱柱之间选择性的变化可以用色谱柱填料（例如基质颗粒、表面电荷、键合相类型及键合相密度）的细微差异来解释；而不同流动相条件下选择性的显著变化可以通过肽与其杂质之间的相互作用（疏水相互作用和离子相互作用）以及不同pH和离子对条件下的固定相来解释。

2.保留性

在相同的梯度条件下（流动相B在20 min内从18%增加到38%），所测试的色谱柱表现出不同的保留性。CSH色谱柱的保留性最低，而HSS T3色谱柱的保留性最高。这一结果已在许多其他合成肽上观察到，并且与肽图分析结果一致⁶。在CSH系列中，CSH氟苯基柱的保留性最小，其次是CSH苯己基柱和CSH C₁₈肽分析专用柱。由于主峰在CSH氟苯基柱的空体积附近洗脱，在这种情况下，使用较低的起始有机物百分比（橙色迹线）。

3.上样容量/峰容量

如果分析人员希望检出丰度很低的杂质，则需要高上样容量。高上样容量也非常有利于纯化工作。

可以看出，CSH色谱柱上的主峰峰宽通常比其他色谱柱更窄，在采用FA流动相时尤其如此。此现象已在许多其他合成肽中观察到，并且也与肽图分析结果一致，表明CSH色谱柱通常具有更高的峰容量⁶。因此，可以向CSH色谱柱上样更多的样品，不会牺牲分离度。

在一些色谱柱上发现了独特的杂质峰，用橙色椭圆形标记（图1A）。

在FA流动相条件下，一组杂质仅在BEH C₁₈肽分析专用柱(300 Å)上出现，经鉴定为片段[6-20]、[7-20]、[8-20]、[9-20]、[10-20]，其中较短的片段较晚洗脱（图1A）。有趣的是，在TFA流动相条件下，在所有色谱柱上均观察到所有这些片段峰（图1B）。

在BEH C₁₈肽分析专用柱(130 Å)上观察到独特的峰，其质量数比主峰低129 Da，而在CSH C₁₈肽分析专用柱(130 Å)上观察到的独特的峰可能是甘氨酸插入片段（图1A）。

4.在不同流动相条件下也发现了额外的峰。例如，在TFA条件下鉴定出片段[3-20]和[11-20]，在甲酸铵(pH 10)条件下鉴定出片段[1-11]。在甲酸铵(pH 10)条件下，峰1分裂为具有相同质量数的两个峰（图1C）。此行为表明这两个峰是非对映异构体。

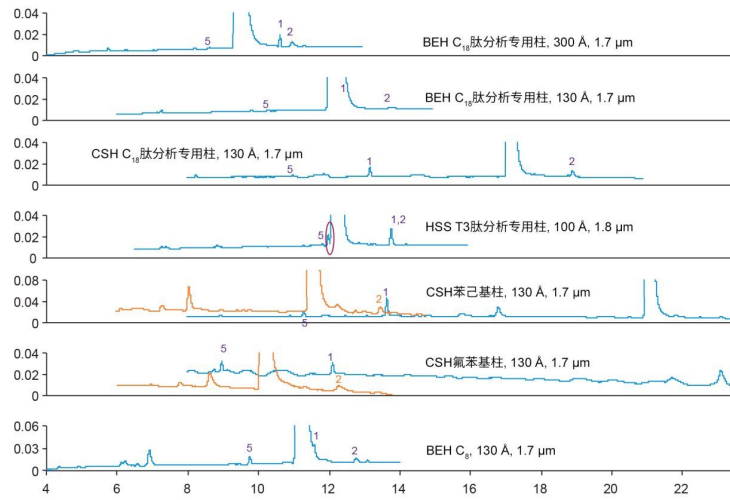
雨蛙素（图2a、2b和2c；表3）

雨蛙素（商品名：Takus、Tymtran）可刺激胃、胆、胰分泌和某些平滑肌，用作胰腺功能障碍的诊断辅助工具⁹。雨蛙素也称为雨蛙肽或硫酸化蓝肽。

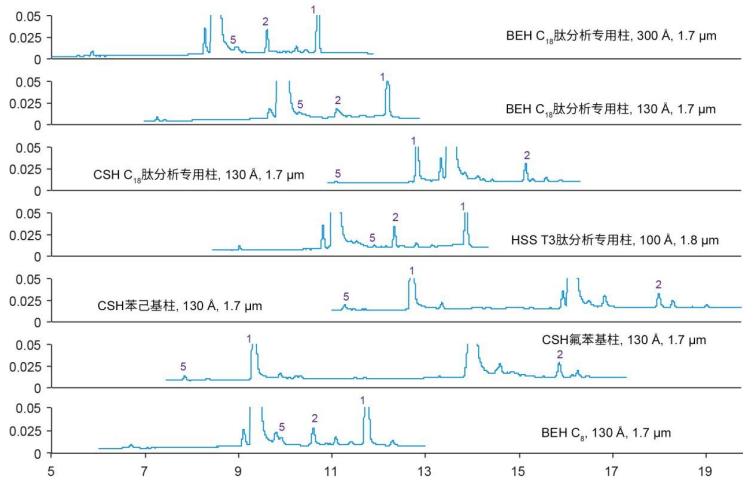
雨蛙素是一种包含10个氨基酸的肽，单同位素质量数为1351.449 Da。其所带的化学修饰（磺酸）预计会使分子呈极酸性。此外，还具有焦谷氨酸残基（N端）、可能容易氧化的蛋氨酸(Met)残基以及酰胺化C端。

图2a、2b和2c展示了在不同流动相下利用测试的色谱柱所得到的雨蛙素及其杂质的色谱分离结果。表3列出了几种主要杂质。

2A



2B



2C

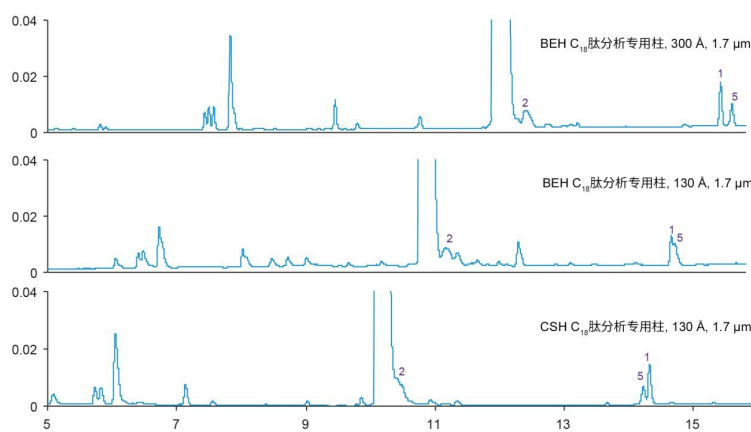


图2A.利用甲酸流动相得到的雨蛙素分离结果。梯度：流动相B在20 min内从18%增加到38%。橙色迹线：CSH苯己基柱，流动相B在20 min内从28%增加到48%；CSH氟苯基柱，流动相B在20 min内从35%增加到55%。

2B.利用TFA流动相得到的雨蛙素分离结果。梯度：流动相B在20 min内从18%增加到38%。

2C.利用甲酸铵(pH 10)流动相得到的雨蛙素分离结果。梯度：流动相B在20 min内从10%增加到30%。

杂质	利用BEH C ₁₈ 130 Å得到的保留时间(min)	质量数(Da)	Δ质量数(Da)	推定的鉴定结果
峰 1	10.69	1271.503	-79.960	SO ₃ 损失
峰 2	11.06	1074.417	-277.046	(-262-15): 片段[1-8]-15Da
峰 5	8.69	917.381	-434.082	(-354-80): 片段[4-10]和SO ₃ 损失

表3.雨蛙素杂质的推断性峰鉴定

1. 保留性

雨蛙素在不同色谱柱上的保留性非常有趣。通常，在相同的梯度条件下，CSH色谱柱对肽的保留性较低，而HSS T3肽分析专用柱上的保留性较高。但雨蛙素并非如此。与之相反，雨蛙素在CSH色谱柱上的保留性较高，在HSS T3肽分析专用柱上的保留性与BEH C₁₈肽分析专用柱(130 Å)相似。使用CSH氟苯基柱未洗脱出主峰，而对于之前的肽（比伐卢定），使用CSH氟苯基柱时主峰出现在空体积处。事实上，雨蛙素在CSH色谱柱和HSS T3肽分析专用柱上的保留性相反。

我们假设其原因在于雨蛙素是一种酸性非常的肽，其带有磺酸基团，因此即使在酸性条件下（FA和TFA），仍然带负电荷。由于CSH颗粒携带有受控的低水平正电荷，带负电荷的肽将与带正电荷的CSH颗粒相互作用。因此，肽在CSH色谱柱上洗脱较晚。另一方面，HSS T3肽分析专用柱采用硅胶基质颗粒，带负电荷的硅醇基团将排斥带负电荷的雨蛙素。因此，在HSS T3肽分析专用柱上的保留性大大降低。值得注意的是，FA条件下的保留时间差异比TFA条件下的差异大很多。

有趣的是，在甲酸铵(pH 10)流动相条件下，雨蛙素的保留性变为“正常”（图2C），即在CSH C₁₈肽分析专用柱上的保留性较低。与我们的假设一致，在pH 10的条件下，CSH颗粒上的正电荷被中和。因此，雨蛙素与CSH颗粒之间的离子相互作用显著下降，使其在CSH C₁₈肽分析专用柱上的保留性较低，这一现象通常在其他肽中观察到。未对HSS T3色谱柱进行测试，因为其采用的硅胶基质颗粒在pH 10的条件下不稳定。

2. 选择性

与比伐卢定的观察结果类似，色谱柱填料和流动相条件在改变分离选择性方面起到至关重要的作用。例如，在FA和TFA条件下，对于所有CSH色谱柱，峰1在主峰之前洗脱，而对于其他色谱柱，该峰在主峰之后洗脱。在pH 10的流动相条件下，峰1和峰5的洗脱时间非常接近，而在酸性条件下（FA和TFA），这两个峰的分离更充分。

3.在FA条件下，采用HSS T3肽分析专用柱(100 Å)鉴定出一个独特的峰，可能是焦谷氨酸缺失和三氧化硫(SO₃)缺失。在TFA条件下，对于大多数色谱柱，刚好在主峰之前观察到一个新峰，很可能是主峰的异构体。其他杂质包括氨基酸缺失、二聚体、+1 Da（推测是脱酰胺作用）、-64 Da、+16 Da（推测是氧化）以及SO₃丢失和片段的组合。

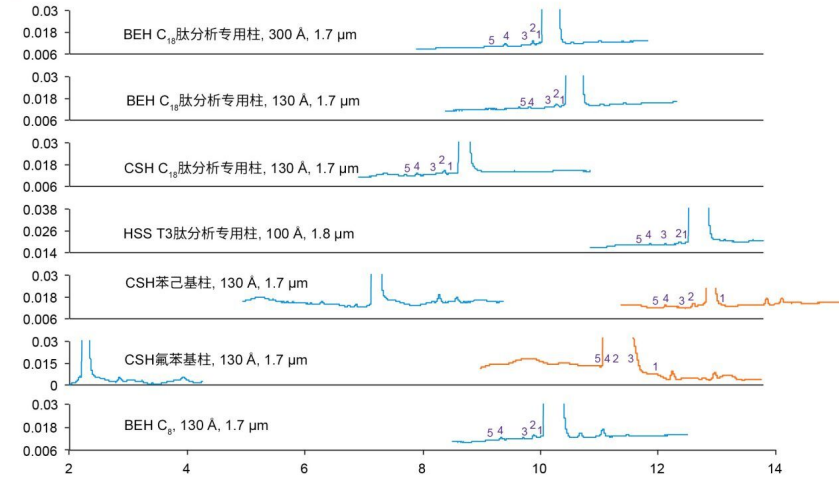
去氨加压素（图3a、3b和3c；表4）

去氨加压素（商品名：DDAVP、Minirin、Stimate）是一种合成形式的加压素，用于治疗尿崩症、尿床、血友病A、血管性血友病和高血尿素水平¹⁰。去氨加压素具有8个氨基酸，单同位素质量数为1068.427 Da。其N端有3-巯基丙酰基修饰，C端有酰胺化修饰。去氨加压素是一种环肽，在修饰部分与半胱氨酸(Cys)残基之间形成二硫键。它还具有一个天冬酰胺(Asn)残基，可以发生脱酰胺作用。

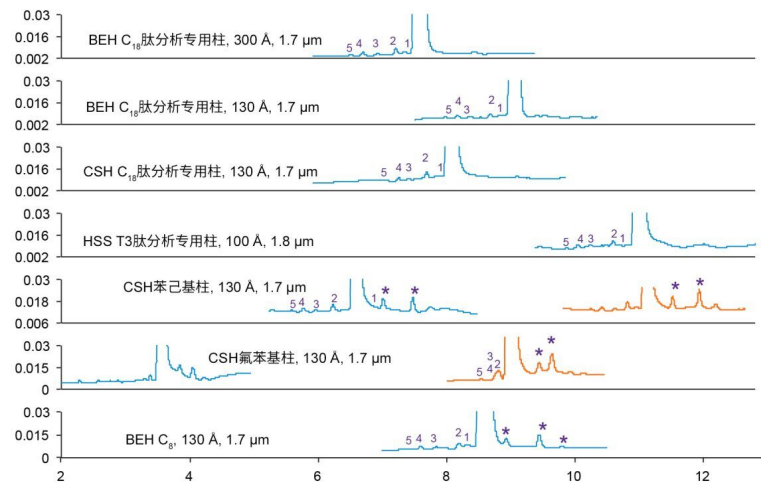
以星号(*)表示的峰为主峰+1 Da峰，可能对应于Asn的脱酰胺产物。最初并不清楚这些杂质是在色谱分离过程中还是在储存过程中出现的。将由储备液稀释得到新样品进样至其中一种色谱柱时，峰面积显著减小（数据未显示）。因此，这些杂质很可能是储存过程中产生的降解产物。

如表4所示，发现氨基酸插入多数情况下为推定的杂质。

3A



3B



3C

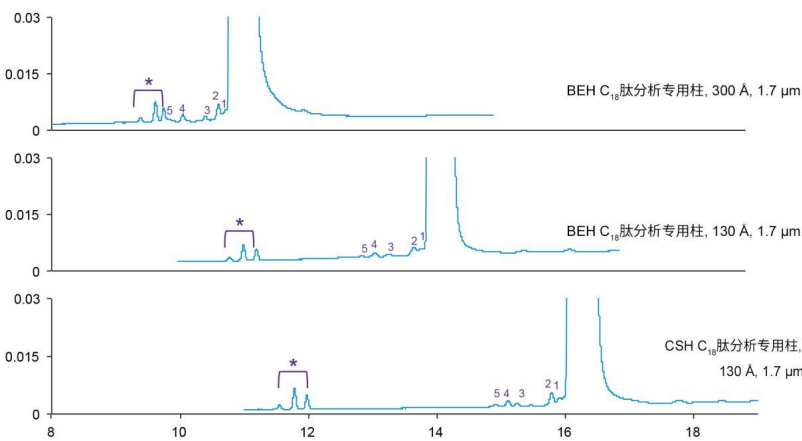


图3A.利用甲酸流动相得到的去氨加压素分离结果。梯度：流动相B在20 min内从10%增加到30%。橙色迹线：流动相B在20 min内从5%增加到25%。

3B.利用TFA流动相得到的去氨加压素分离结果。梯度：流动相B在20 min内从14%增加到34%。橙色迹线：流动相B在20 min内从8%增加到28%。

3C.利用甲酸铵(pH 10)流动相得到的去氨加压素分离结果。梯度：流动相B在20 min内从12%增加到32%。

杂质	利用BEH C ₁₈ 130 Å 得到的保留时间(min)	质量数 (Da)	Δ质量数 (Da)	推定的鉴定结果
峰 1	10.58	1165.49	97.05	Pro 插入 + 主峰
峰 2	10.46	1125.46	57.02	Gly插入
峰 3	10.30	1139.49	71.05	未知
峰 4	10.01	1196.50	128.06	Gln插入
峰 5	9.81	1182.49	114.04	Asn插入

表4.去氨加压素杂质的推断性峰鉴定

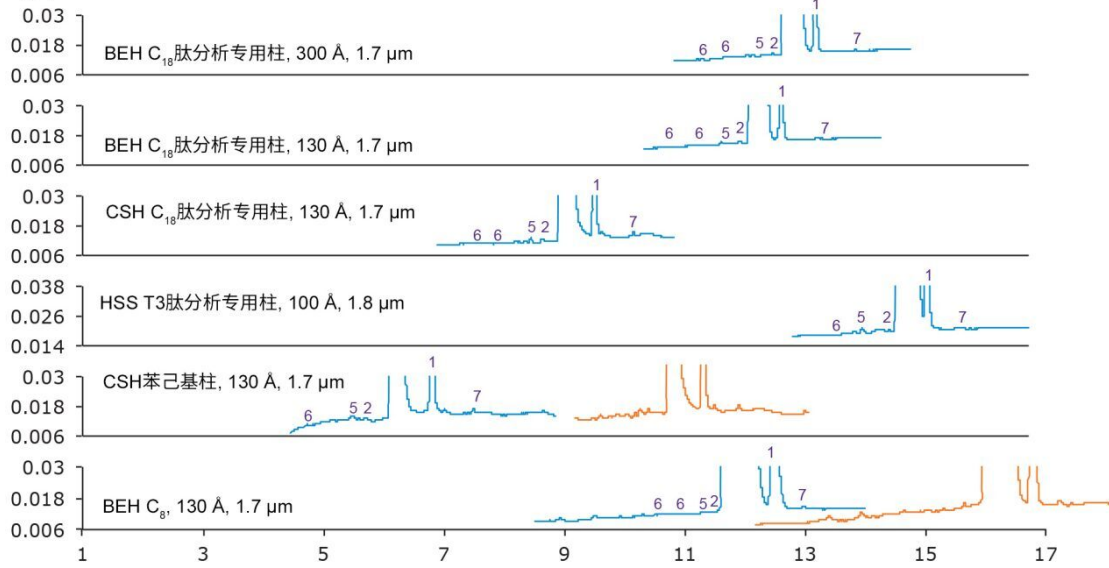
兰瑞肽（图4a和4b；表5）

兰瑞肽（商品名：Somatuline Autogel、Somatuline Depot）是生长抑素的合成类似物。生长抑素是一种天然存在的抑制性激素，可阻断多种其他激素（包括生长激素、促甲状腺激素(TSH)、胰岛素和胰高血糖素）的释放¹¹。兰瑞肽具有8个氨基酸，单同位素质量数为1095.476 Da。其所带的化学修饰（2-萘基）可增加分子疏水性，此外还携带有二硫键和酰胺化C端。

在FA流动相下，峰1（一种异构体）与主峰分离良好。但是，在TFA流动相下，主峰旁边仅出现一个肩峰（数据未显示）。这再次表明，使用不同流动相所获得的选择性有所不同。

发现峰6的两种异构体在大多数色谱柱上均得到分离，因为两个峰下的主要组分具有相同的质量数。

4A



4B

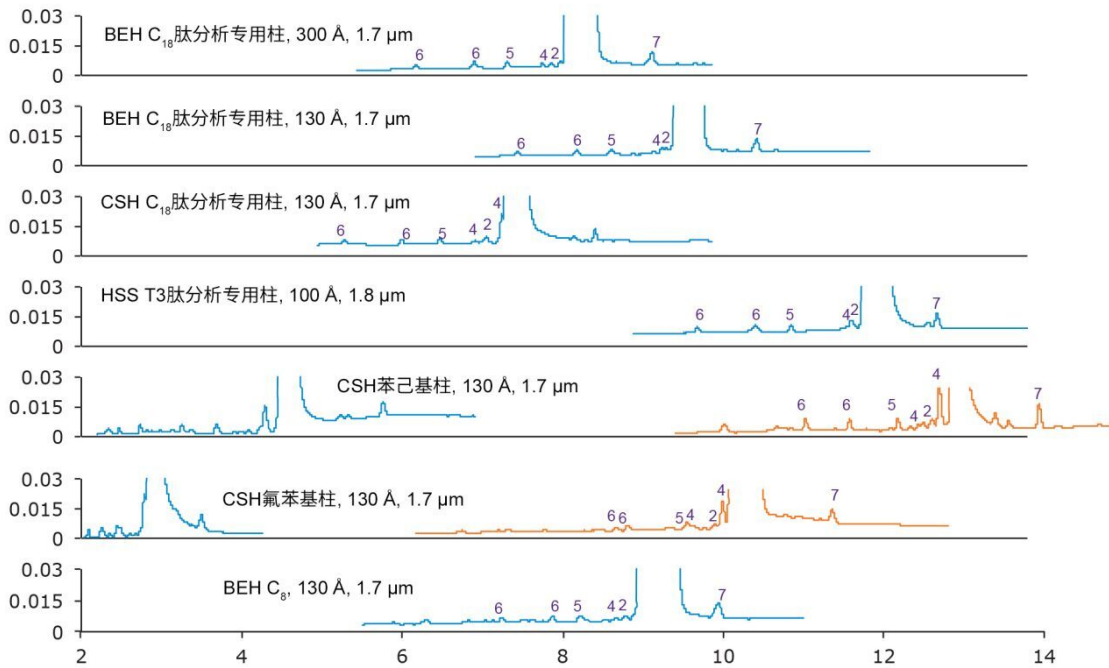


图4A.利用甲酸流动相得到的兰瑞肽分离结果。梯度：流动相B在20 min内从12%增加到32%。橙色迹线：流动相B在20 min内从8%增加到28%。

4B.利用TFA流动相得到的兰瑞肽分离结果。梯度：流动相B在20 min内从20%增加到40%。橙色迹线：流动相B在20 min内从12%增加到32%。

杂质	利用BEH C ₁₈ 130 Å 得到的保留时间(min)	质量数 (Da)	Δ质量数 (Da)	推定的鉴定结果
峰 1	12.85	1095.49	0	异构体
峰 2	12.16	1065.46	-30.03	发生-2 Da偏移 (-28 -2)
峰 5	11.85	1166.53	71.04	未知
峰 6	11.40, 10.97	1063.50	-31.99	硫缺失
峰 7	13.46	1127.45	31.96	异构体, 硫插入

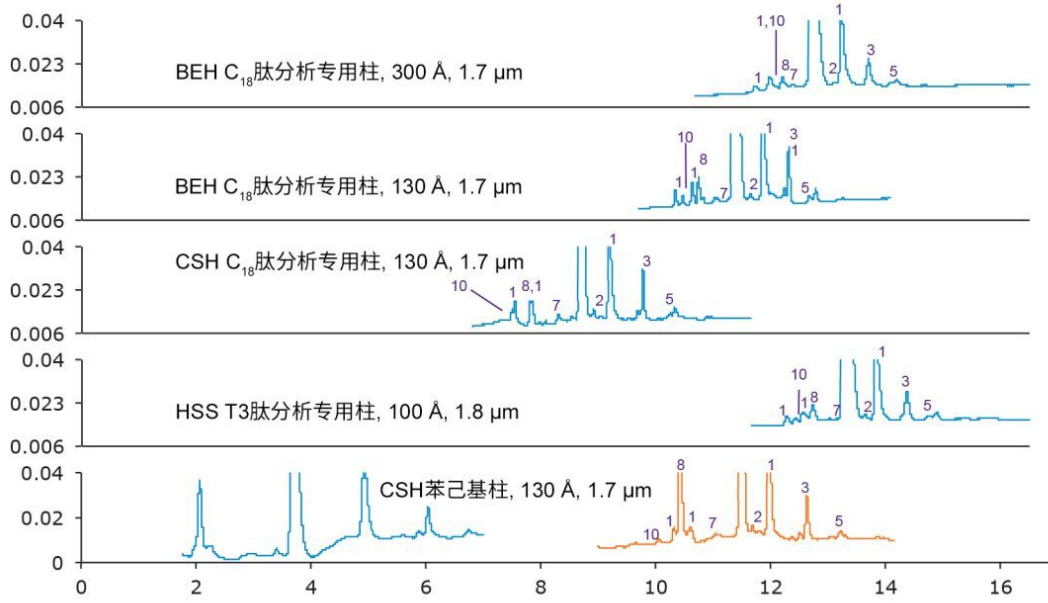
表5. 兰瑞肽杂质的推断性峰鉴定

促胰液素（图5a和5b；表6）

此肽（商品名：SecreFlo）为合成形式的天然促胰液素。其主要作用是通过控制胃酸分泌和用碳酸氢盐进行缓冲来调节小肠内容物的pH。天然促胰液素是第一种被发现的激素¹²。

促胰液素具有27个氨基酸，单同位素质量数为3054.632 Da。其具有酰胺化C端，并包含Asp-Gly和Asp-Ser基序，可以形成天冬酰亚胺，从而生成异构体¹³。事实上，在FA和TFA条件下分别观察到三种异构体和五种异构体。

5A



5B

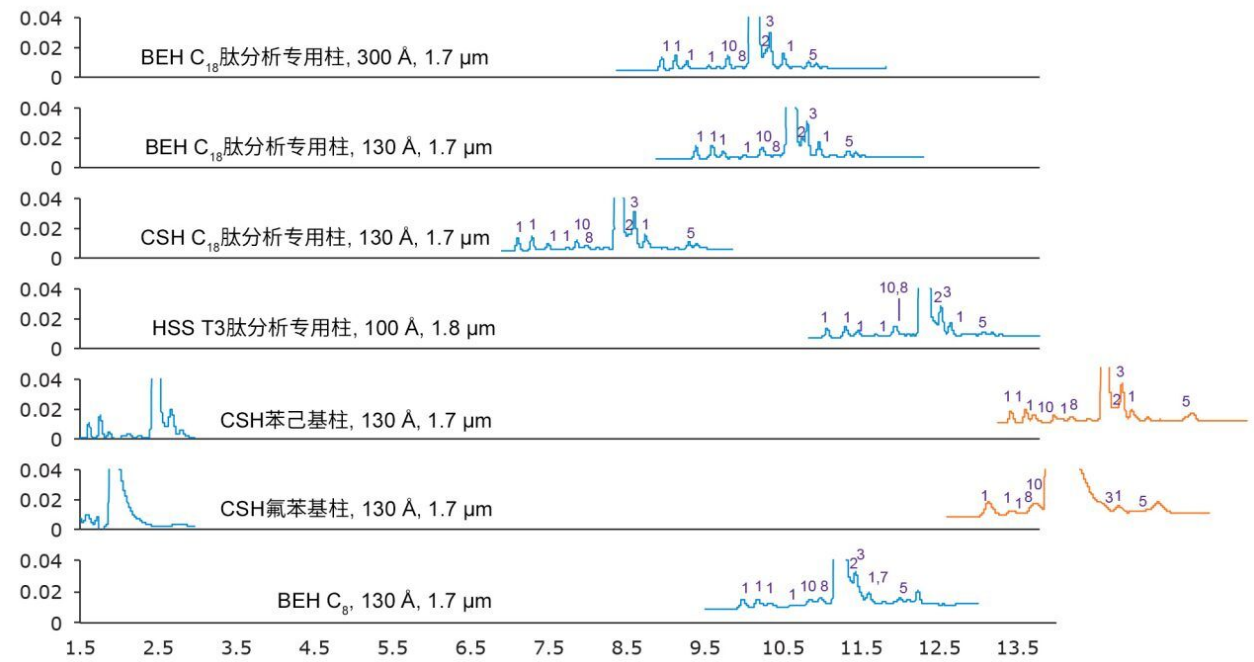


图5A.利用甲酸流动相得到的促胰液素分离结果。梯度：流动相B在20 min内从18%增加到38%。橙色迹线：流动相B在20 min内从12%增加到32%。

5B.利用TFA流动相得到的促胰液素分离结果。梯度：流动相B在20 min内从26%增加到46%。橙色迹线：流动相B在20 min内从16%增加到36%。

杂质	利用BEH C ₁₈ 130 Å 得到的保留时间(min)	质量数 (Da)	Δ质量数 (Da)	推定的鉴定结果
峰 1	12.27	3053.703	0	异构体
峰 2	12.05	3124.699	70.997	Ala插入
峰 3	12.72	3079.72	26.01	+26 Da
峰 5	13.08	2916.58	-137.13	His缺失
峰 7	11.40	3037.70	-16.00	主峰, -16 Da
峰 8	11.11	3035.70	-18.00	H ₂ O损失
峰 10	10.81	3190.7155	137.013	His插入

表6.促胰液素杂质的推断性峰鉴定

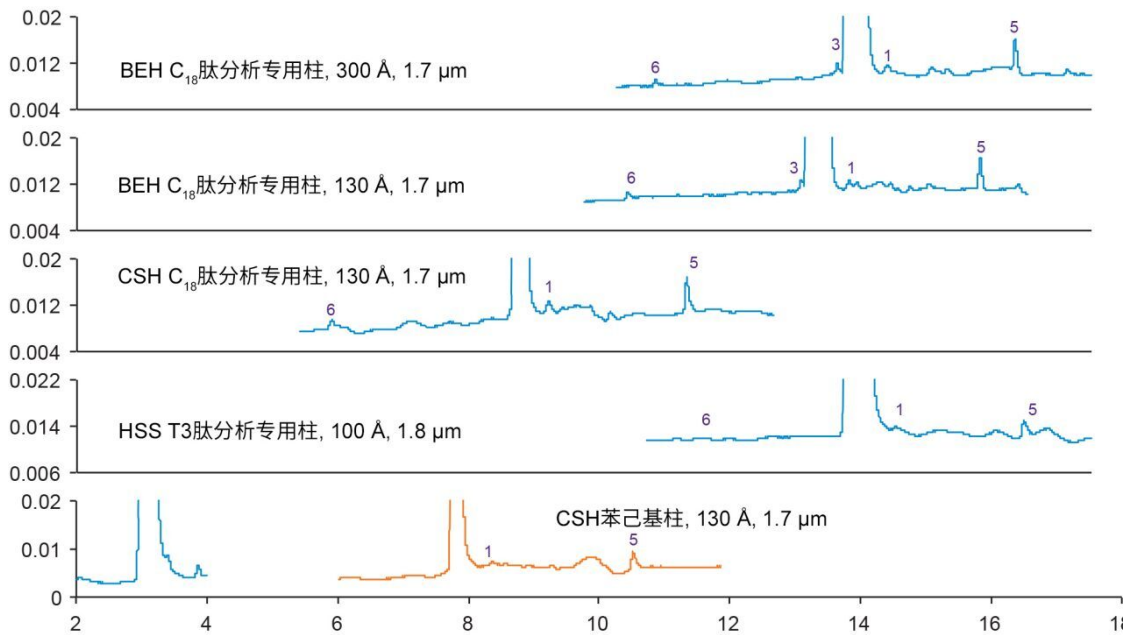
鲑鱼降钙素I (图6a和6b; 表7)

鲑鱼降钙素 (商品名: Miacalcin) 是一种天然存在于甲状腺中的激素的合成形式, 用于治疗佩吉特氏骨病、绝经后骨质疏松症或血液中的高钙含量¹⁴。

降钙素是一种包含32个氨基酸的肽, 单同位素质量数为3429.713 Da。它是一种环肽, 具有酰胺化C端。

一些主要杂质包括硫插入和乙酰化, 如图6a和6b所示, 详见表7。

6A



6B

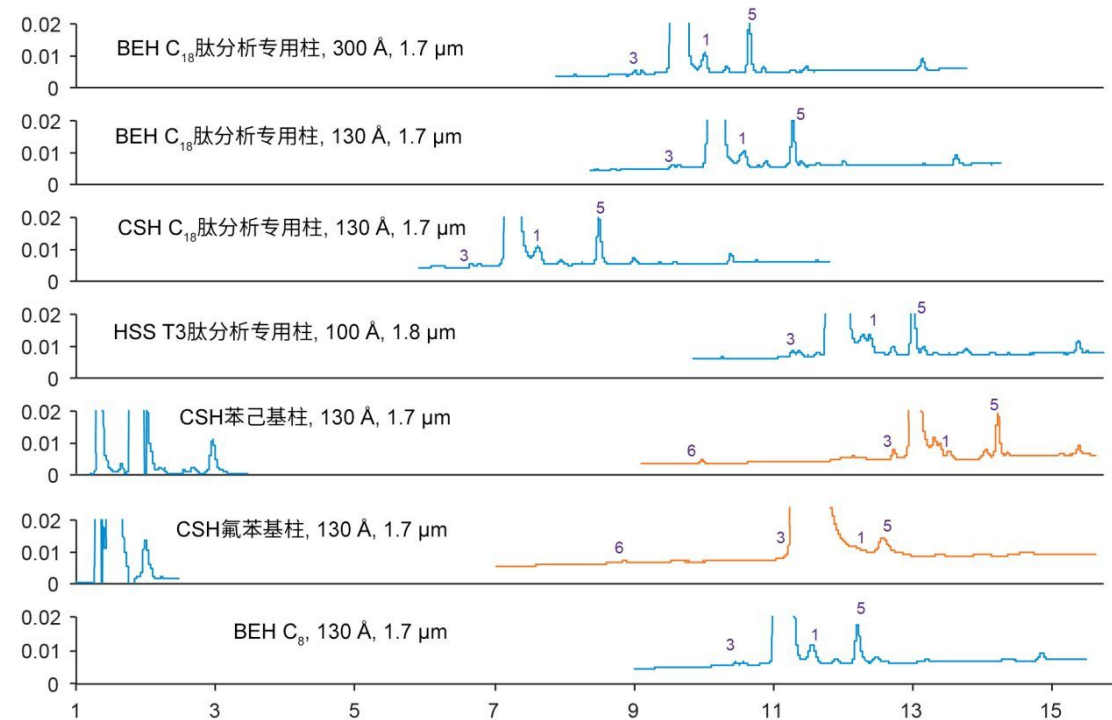


图6A.利用甲酸得到的降钙素分离结果。梯度：流动相B在20 min内从18%增加到38%。橙色迹线：流动相B在20 min内从15%增加到35%。

6B.利用TFA得到的降钙素分离结果。梯度：流动相B在20 min内从28%增加到48%。橙色迹线：流动相B在20 min内从18%增加到38%。

杂质	利用BEH C ₁₈ 130 Å 得到的保留时间(min)	质量数 (Da)	Δ质量数 (Da)	推定的鉴定结果
峰 1	14.22, 12.89	3412.722	-17.037	H ₂ O损失 + 1 Da
峰 3	13.46	3461.75	31.99	S插入
峰 5	16.28, 15.47, 16.89	3471.722	41.963	乙酰化
峰 6	10.72	3447.72	17.97	H ₂ O获得

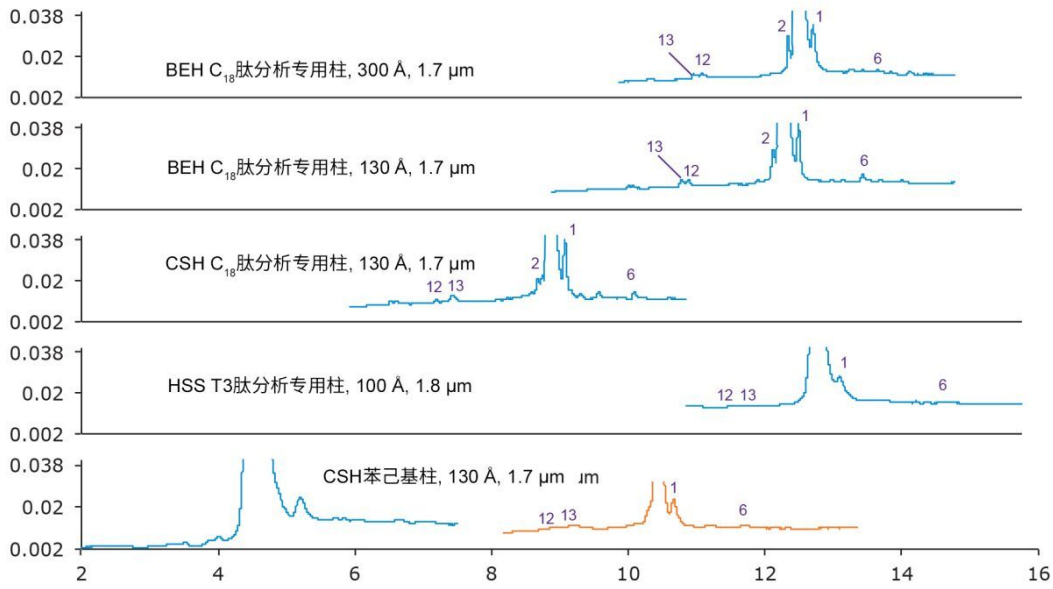
表7.降钙素杂质的推断性峰鉴定

人p-TH (1-34) (图7a和7b; 表8)

p-TH (1-34) (商品名: Forteo) 是天然存在的人甲状旁腺素(PTH)的肽片段 (34个氨基酸), 为钙磷代谢的重要调节剂¹⁵, 用于治疗骨质疏松症。

p-TH (1-34)的单同位素质量数为4115.131 Da。它包含两个蛋氨酸(Met)残基, 容易发生氧化。事实上, 氧化峰 (峰13) 是主要杂质之一。

7A



7B

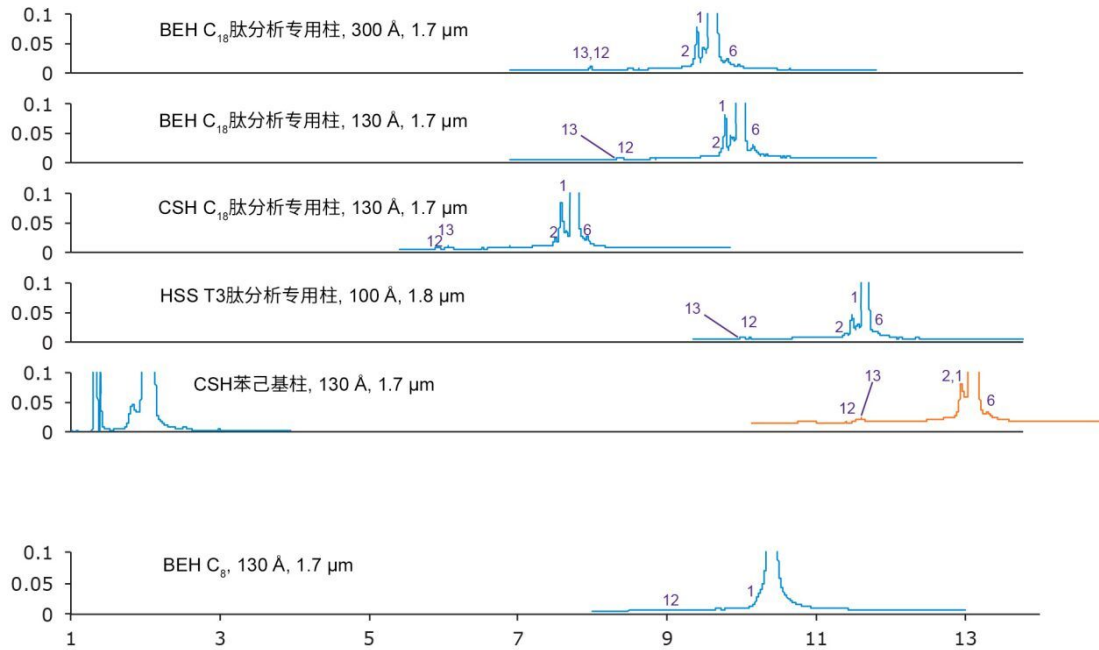


图7A.利用甲酸得到的p-TH分离结果。梯度：流动相B在20 min内从15%增加到35%。橙色迹线：流动相B在20 min内从10%增加到30%。

7B.利用TFA得到的p-TH分离结果。梯度：流动相B在20 min内从24%增加到44%。橙色迹线：流动相B在20 min内从14%增加到34%。

杂质	利用BEH C ₁₈ 130 Å 得到的保留时间(min)	质量数 (Da)	Δ质量数 (Da)	推定的鉴定结果
峰 1	12.71	4115.211	0	异构体
峰 2	12.35	4229.285	114.074	Asn插入
峰 6	13.67	4127.30	12.09	+12 Da
峰 12	11.08	3617.964	-497.247	片段[1-30]
峰 13	10.98	4131.2154	16.0044	蛋氨酸氧化

表8.p-TH杂质的推断性峰鉴定

结论

本研究在不同的流动相条件下利用多种反相色谱柱分离各种合成肽。根据色谱结果可以明显看出，对于所有尝试的合成肽杂质分析，不存在最有效的单一色谱柱。因此，筛选合适的色谱柱用于该应用非常有帮助。此外，筛选多种具有不同分析选择性的色谱柱，将提高最终开发的方法有效监测杂质分析全过程的可信度。在一些情况下，可以认为完全覆盖各种杂质甚至可能需要使用两种不同的色谱柱分别进行分析。

但是，筛选可能对肽分析有效的所有反相色谱柱在可行性或合理性上可能存在问题。作为切入点，分析人员可能会发现，将其正在分析的肽与本研究中测试的肽进行特性比较，可能有助于缩小色谱柱选择范围，从而针对其方法找出具有理想选择性特性的色谱柱填料。虽然在沃特世制造的众多反相色谱柱中，评价的所有色谱柱均可重现地制造并且非常适合提供一致的分选，但目前只有四种色谱柱被称为“肽分析专用”柱。这些“肽分析专用”品牌的色谱柱在多年的制造中均对肽分离应用表现出一致的性能，并且使用肽混合物进行常规的批次检测，以在肽分离中提供额外的重现性保证。这些色谱柱及其重要特性为：

- BEH C₁₈肽分析专用柱（130 Å和300 Å）

用于常规用途

为在FA流动相中获得更高的保留性，对于分子量较高的肽(>2100 Da)或体积较大的肽（例如，聚乙二醇化肽），使用300 Å色谱柱；对于分子量较低的肽(<1400 Da)，则使用130 Å色谱柱

- CSH C₁₈肽分析专用柱(130 Å)：

与BEH C₁₈固定相相比存在显著的选择性差异

在FA和TFA中均得到最窄的峰宽（最高上样能力）

保留性低于HSS T3和BEH C₁₈固定相（例外情况参见雨蛙素）

- HSS T3肽分析专用柱(100 Å):

肽保留性更强 (例外情况参见雨蛙素)

能够很好地保留先洗脱 (短、亲水性) 的肽

本研究中测试的其他三种色谱柱也各有特性。与BEH C₁₈固定相相比, CSH苯己基柱和CSH氟苯基柱均存在显著的选择性差异, 其保留性低于CSH C₁₈、HSS T3和BEH C₁₈固定相 (例外情况参见雨蛙素)。尽管BEH C₈ (130 Å) 色谱柱对于本研究中测试的肽与BEH C₁₈ (130 Å) 色谱柱表现出相似的性能, 但它可以为大分子疏水性肽提供更出色的分离。本研究未介绍的色谱柱中有许多已成功用于肽相关的分离。例如, 已证明CORTECS C₁₈、CORTECS UPLC C₁₈+和CORTECS UPLC T3可以很好地分离单克隆抗体的合成肽和胰蛋白酶解肽⁶。它们是合成肽杂质分析的绝佳选择。

参考资料

1. Ali, R. et al. New peptide based therapeutics approaches. Omics Group eBooks, 2014.
2. Vliehe, P. et al. Synthetic therapeutic peptides: science and market. Drug Discovery Today, Vol.15, Numbers 1/2, 2010.
3. Merrifield, R.B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide J. Am. Chem. Soc. 1963, 85 (14), 2149–2154.
4. Eggen I. et al. Control strategies for synthetic therapeutic peptide APIs Part III: Manufacturing process considerations. Pharmaceutical Technology. Vol.38, Issue 5, 2014.
5. Bracke N. et al. Related impurities in peptide medicines. J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2014, 101, 2-30.
6. Koza, S. 和 Chambers E.E. 选择用于生物治疗性蛋白质肽图分析的反相色谱柱. 沃特世应用纪要 .720005924ZH. <<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134935546>> 2017.
7. <https://en.wikipedia.org/wiki/Bivalirudin>
8. <https://www.mayoclinic.org/drugs-supplements/bivalirudin-intravenous-route/description/drg-20071090>
9. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00403>

10. <https://en.wikipedia.org/wiki/Desmopressin>
 11. <https://en.wikipedia.org/wiki/Lanreotide>
 12. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00021>
 13. Toney, K. et al. Aspartimide formation in the joining peptide sequence of porcine and mouse pro-opiomelanocortin. *J of Biological Chemistry*. 1993, 268 (2), 1024–1031.
 14. <https://www.rxlist.com/miacalcin-side-effects-drug-center.htm>
 15. https://www.genscript.com/peptide/RP01001-Parathyroid-34_Human.html
-

特色产品

[ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <https://www.waters.com/10166246>](https://www.waters.com/10166246)

[MassLynx MS软件 <https://www.waters.com/513164>](https://www.waters.com/513164)

[ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <https://www.waters.com/514228>](https://www.waters.com/514228)

720006244ZH, 2018年4月