

流动相pH对肽类LC-MS分析方法反相色谱柱选择性的影响

Hua Yang, Stephan M. Koza, Steve Shiner

Waters Corporation

摘要

分离肽类时，可通过改变流动相pH来改变选择性。本应用纪要展示了使用XBridge™ Premier BEH™ C₁₈ 130 Å肽分析专用柱和XSelect™ Premier CSH™ C₁₈肽分析专用柱，在pH 2.7~9.2的流动相条件下分离肽标准品和选定的几种NISTmAb™关键质量属性(CQA)胰蛋白酶肽的选择性差异。使用BioAccord™ LC-MS系统和waters_connect™获得的提取离子流色谱图(XIC)显示，所选肽及其脱酰胺形式之间存在明显的选择性差异。

优势

- 流动相pH可以改变反相肽分离的选择性，有助于分离难分离的关键分析物对

简介

已有研究表明，流动相pH会改变反相分离的选择性。有研究人员通过改变肽分离的pH，成功获得了高度正交性¹。本应用纪要展示了使用pH分别为2.7、3.1、3.8、5.5、6.5和9.2的流动相分离肽混标以及mAb胰蛋白酶酶解物样品的选择性差异。作为示例，文中给出了使用BioAccord LC-MS系统和waters_connect获得的提取离子流色谱图(XIC)，以展示胰蛋白酶肽及其脱酰胺形式的分离结果。使用pH不同的流动相分离样品时，选择性表现出显著的

差异，这表明改变流动相pH对难分离关键分析物对的分离可能会有帮助。

实验

样品描述

将MassPREP™肽混标（P/N：186002338 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186002338-massprep-peptide-mixture-5-pk.html>>）和mAb胰蛋白酶酶解标准品（P/N：186009126 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009126-mab-tryptic-digestion-standard.html>>）分别复溶于100 μL和80 μL的0.1%甲酸中。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY™ UPLC I-Class PLUS（系统总谱带展宽 $\sigma \leq 7 \mu\text{L}$ ）
检测：	ACQUITY BioAccord MS检测，TUV @ 214 nm
色谱柱：	XBridge Premier BEH C ₁₈ 130 Å, 2.5 μm, 2.1 x 150 mm肽分析专用柱（P/N：186009835） XSelect Premier CSH C ₁₈ 130 Å, 2.5 μm, 2.1 x 150 mm肽分析专用柱（P/N：186009906）
柱温：	60 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	15 μL, 10 μL
流速：	0.2 mL/min

流动相

A: 0.1%甲酸水溶液(pH 2.7)

B: 0.1%甲酸的乙腈溶液

A: 0.1%甲酸和10 mM甲酸铵的水溶液(pH 3.1)

B: 0.1%甲酸和10 mM甲酸铵的80%乙腈溶液

A: 10 mM甲酸铵的水溶液 (pH 3.8)

B: 10 mM甲酸铵的80%乙腈溶液

A: 10 mM乙酸铵的水溶液 (pH 5.5)

B: 10 mM乙酸铵的80%乙腈溶液

A: 10 mM乙酸铵的水溶液 (pH 6.5)

B: 10 mM乙酸铵的80%乙腈溶液

A: 10 mM甲酸铵的水溶液 (pH 9.2)

B: 10 mM甲酸铵的80%乙腈溶液

分析MassPREP肽混标的梯度表，流动相pH 2.7*

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.0	0.2	99.5	0.5	初始
2.0	0.2	99.5	0.5	6
22.0	0.2	45	55	6
25.0	0.2	5	95	6
26.0	0.2	5	95	6
28.0	0.2	99.5	0.5	6
40.0	0.2	99.5	0.5	6

*: 使用pH 3.1至pH 9.2的流动相时，由于流动相B中含有80% ACN，采用流动相B从0.6%变为68.8%的梯度。

分析mAb胰蛋白酶酶解标准品的梯度表，流动相pH 2.7**

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.0	0.2	99.5	0.5	初始
2.0	0.2	99.5	0.5	6
62.0	0.2	50	50	6
65.0	0.2	5	95	6
66.0	0.2	5	95	6
68.0	0.2	99.5	0.5	6
80.0	0.2	99.5	0.5	6

**：使用pH 3.1至pH 9.2的流动相时，由于流动相B中含有80% ACN，采用流动相B从0.6%变为62.5%的梯度。

ACQUITY RDa检测器设置

模式：	包括碎片的全扫描
质量范围：	50~2000 m/z
极性：	正
采样速率：	5 Hz
锥孔电压：	30 V
碎裂锥孔电压：	60~120 V
毛细管电压：	1.20 kV
脱溶剂气温度：	350 °C

LC/MS软件：waters_connect

结果与讨论

图1显示了在不同的流动相pH条件下，使用两根Premier C₁₈肽分析专用柱分离MassPrep肽混标（组分见表1）得到的UV谱图。根据BioAccord RDa质谱检测器和waters_connect获得的质量数鉴定峰。虽然这两根色谱柱的选择性略有不同，但实验观察到流动相pH变化导致了更显著的选择性差异。值得注意的是，pH > 5.5时，峰9（烯醇酶T37）和峰10（蜂毒肽）的回收率降低了。虽然我们没有研究原因，但推测是由于在pH较高的流动相中，低pI的大分子烯醇酶T37肽溶解度降低，且高pI (>12)的大分子蜂毒肽肽的离子保留性增加。尽管如此，在碱性较强的条件下分离大分子肽时需要谨慎。此外，由于流动相pH的微小变化也可能显著改变选择性，使用高pH流动相时应仔细评估方法重现性。

峰编号	组分名	保留时间 *(min)	分子量 **(g/mol)	pKa	肽序列
1	尿囊素（VO标记）	0.76	158.0440	-	-
2	RASG-1	0.48	1000.4938	9.34	RGDSPASSKP
3	血管紧张素片段1-7	9.59	898.4661	7.35	DRVYIHP
4	缓激肽	12.04	1059.5613	12.00	RPPGFSPFR
5	血管紧张素II	13.06	1045.5345	7.35	DRVYIHPF
6	血管紧张素I	14.92	1295.6775	7.51	DRVYIHPFHL
7	肾素底物	16.82	1757.9253	7.61	DRVYIHPFHLVYS
8	烯醇酶T35	19.18	1871.9604	7.34	WLTGPQLADLYHSLMK
9	烯醇化酶T37	21.55	2827.2806	3.97	YPIVSIEDPFAEDDWEAWSHFFK
10	蜂毒肽	24.93	2845.7381	12.06	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ

表1.使用乙腈浓度递增的梯度在不同pH条件下分离的肽（MassPREP肽混标，P/N：186002338）列表（请参见图1）

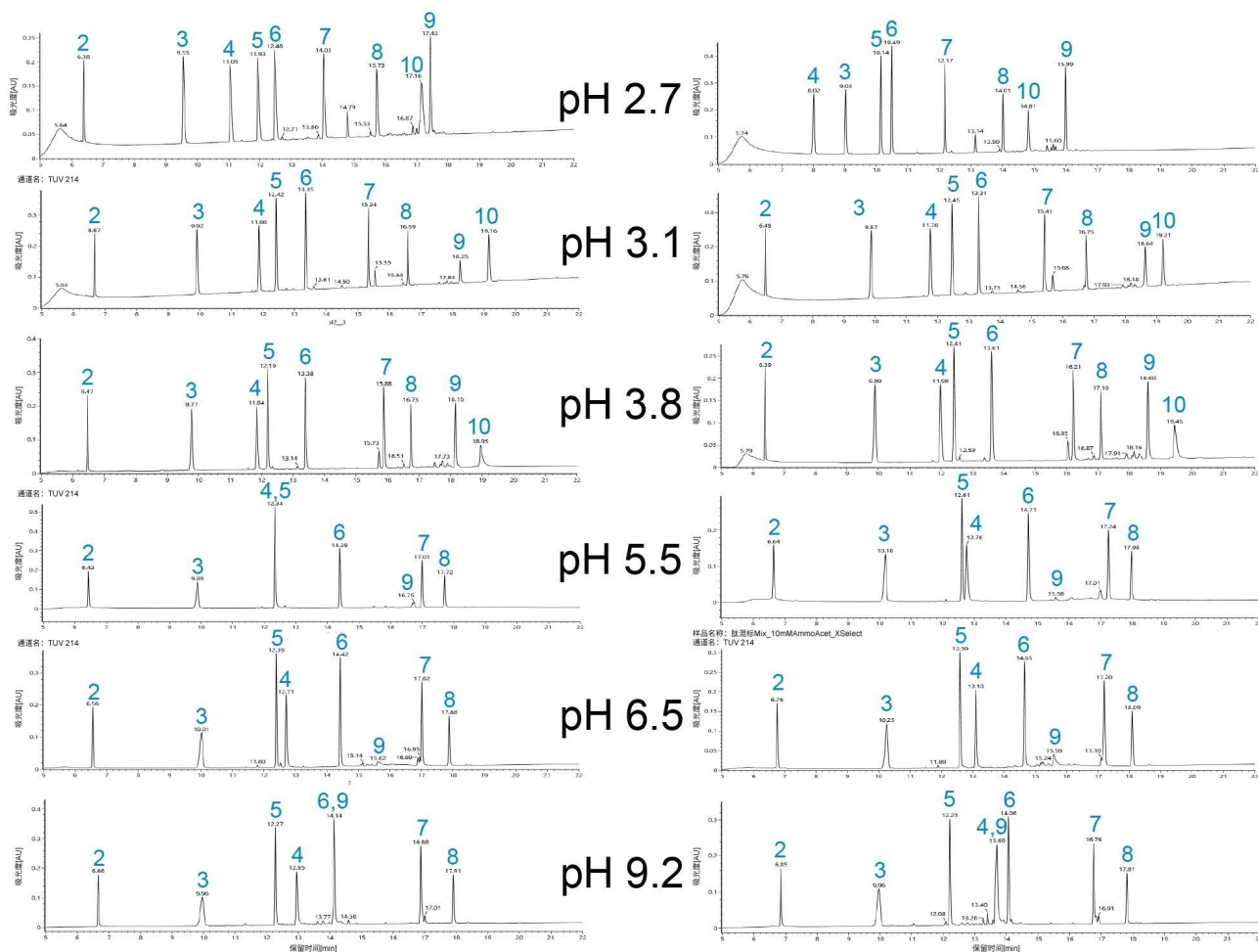
Premier BEH C₁₈ 130 Å肽分析专用柱Premier CSH C₁₈肽分析专用柱

图1.使用两根Premier C₁₈肽分析专用柱（XBridge Premier BEH C₁₈ 130 Å, 2.5 μm, 2.1 x 150 mm肽分析专用柱（P/N：186009835）和XSelect Premier CSH C₁₈ 130 Å, 2.5 μm, 2.1 x 150 mm肽分析专用柱（P/N：186009906）），在不同流动相pH条件下使用乙腈浓度递增的梯度分离肽混标获得的UV谱图。

图2a显示了在不同流动相pH条件下，使用乙腈浓度递增的梯度在XBridge Premier BEH C₁₈ 130 Å肽分析专用柱上分离NISTmAb胰蛋白酶酶解物得到的基峰强度(BPI)。颜色相同的箭头表示waters_connect鉴定出的同种胰蛋白酶肽。重链T37肽(GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK)以红色突出显示。图2b显示了重链T37肽及其脱酰胺形式的提取离子流色谱图(XIC)。在不同的流动相pH条件下，选择性差异很大。图2c显示了42种肽在不同pH下的保留时间与这些肽在pH 2.7下的保留时间的相关性图。相关性(R²)随流动相pH升高而降低。这表明较高的pH条件与低pH

条件(pH 2.7)之间的正交性更高 (R^2 更低)，与之前的研究结论一致¹。基于10种强度最大的肽离子，计算出pH 9.2甲酸铵条件下的平均响应约为0.1%甲酸(pH 2.7)条件下平均响应的三分之一。

结论

本研究使用两根Premier C₁₈肽分析专用柱在pH 2.7~pH 9.2的各种流动相pH条件下对肽混标和mAb胰蛋白酶酶解物样品进行了反相分离。采用乙腈浓度递增的梯度，在不同流动相pH条件下观察到了显著的选择性差异，这对开发难分离关键肽对的分析方法具有指导意义。一般而言，对于常规的合成肽和肽图分析分离，可在反相洗脱液中添加低pH甲酸（例如在质谱分析中使用0.1%甲酸）或三氟乙酸（例如在光学检测中使用0.1% TFA）作为添加剂。不过，如本研究所示，如果要改进表征比较研究，采用高pH的分离方案可能会有所帮助，因为这有助于获得不同的肽分离选择性（即正交性），使得评估更加全面。此外，杂化硅胶基质BEH和CSH肽分析专用柱具有较高的pH稳定性，因此可在同一样品组中使用同一色谱柱运行低pH和高pH方法。

参考资料

1. Gilar M., Olivova P., Daly A.E., Gebler J.C. Development of Orthogonal Separation Methods for 2D-HPLC (MS/MS) Analysis of Peptides. Waters Poster, 2005.

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801359>>

ACQUITY UPLC和ACQUITY Premier可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

生物制药领域专用的BioAccord LC-MS系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>>

720008017ZH，2023年8月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)