

反相色谱柱在肽分离和肽图分析分离中的性能

Hua Yang, Stephan M. Koza, Steve Shiner

Waters Corporation

摘要

本研究采用已有大量文献报道的肽标准品，比较了8款填充2~3 μm颗粒的Waters™反相色谱柱用于肽分离的性能。以甲酸(FA)为流动相添加剂，使用有机溶剂浓度递增的梯度，观察到不同色谱柱填料之间存在选择性和峰容量差异。MaxPeak™ Premier高性能表面(HPS)色谱柱的选择性与填充相同反相颗粒但未经表面处理的不锈钢色谱柱相当。提取离子流色谱图(XIC)显示，不同MaxPeak Premier色谱柱的选择性有差异，如果脱酰胺肽与未修饰的肽分离良好，则脱酰胺肽的谱图会更清晰。

优势

沃特世反相色谱柱能够在肽分离中展现出出色的性能。

简介

反相色谱是分离组成相似的肽的常用工具之一。根据美国药典(USP)最近的一项调查，目前已经有超过500种不同的C₁₈色谱柱（即USP“L1”类色谱柱）。2017年，我们并行比较了10款沃特世反相色谱柱的性能，并总结了每款色谱柱在肽图分析方面的特点¹。

MaxPeak Premier反相色谱柱配有MaxPeak高性能表面(HPS)硬件，能够尽可能减少分析物/色谱柱硬件表面之间的不良相互作用²。本应用纪要比较了8款沃特世反相色谱柱（包括MaxPeak Premier色谱柱和未经表面处理的不锈钢色谱柱）的性能，并说明了它们在选择性、峰容量和峰形方面的差异。

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
检测:	TUV @ 214 nm, ACQUITY BioAccord MS检测
色谱柱:	XSelect™ Premier CSH™ C ₁₈ 130 Å, 2.5 μm, 2.1 x 150 mm肽分析专用柱 (P/N: 186009906) XSelect CSH C ₁₈ , 2.5 μm, 2.1 x 150 mm肽分析专用柱 (P/N: 186006943) XBridge™ Premier BEH™ C ₁₈ 130 Å, 2.5 μm, 2.1 x 150 mm肽分析专用柱 (P/N: 186009835) XBridge BEH C ₁₈ 130 Å, 2.5 μm, 2.1 x 150 mm肽分析专用柱 (

P/N: 186008981)

XBridge Premier BEH C₁₈ 300 Å, 2.5
µm, 2.1 x 150 mm肽分析专用柱 (

P/N: 186009894)

XSelect Premier HSS T3, 2.5 µm,
2.1 x 150 mm肽分析专用柱 (

P/N: 186009840)

CORTECS™ Premier C18+, 2.7 µm,
2.1 x 150 mm (P/N: 186010457)

CORTECS C18+, 2.7 µm, 2.1 x 150
mm (P/N: 186007368)

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

B: 0.1%甲酸的乙腈溶液

MassPREP肽混标梯度表

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

mAb胰蛋白酶酶解标准品梯度表

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

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
裂解锥孔电压	60-120 V
毛细管电压:	1.20 kV
脱溶剂气温度:	350 °C

数据管理

LC/MS软件: waters_connect™

结果与讨论

在采用不同填料的8款沃特世反相色谱柱上分离充分表征的MassPREP肽混标（表1），结果表明不同色谱柱对肽的选择性各不相同，这与之前的研究得出的结论一致¹。

峰编号	组分名	保留时间	分子量**(g/mol)	pKa	肽序列
1	尿囊素 (VO标记)	0.76	158.0440	-	-
2	RASG-1	4.78	1000.4938	9.34	RGDSPASSKP
3	血管紧张素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.在多款反相色谱柱上分离的肽（MassPREP肽混标，P/N: 186002338）列表

填充相同颗粒（即填料）的MaxPeak Premier色谱柱与未经表面处理的不锈钢色谱柱相比，二者的肽分离选择性非常相似（图1a）。与之前的研究结论一致，在流动相中含有0.1%甲酸添加剂且有机溶剂浓度递增的梯度下，

CSH C₁₈ 130 Å色谱柱的峰容量最高，其次是CORTECS C18+色谱柱（图1b），推测是由于少量正电荷嵌入了C₁₈颗粒。

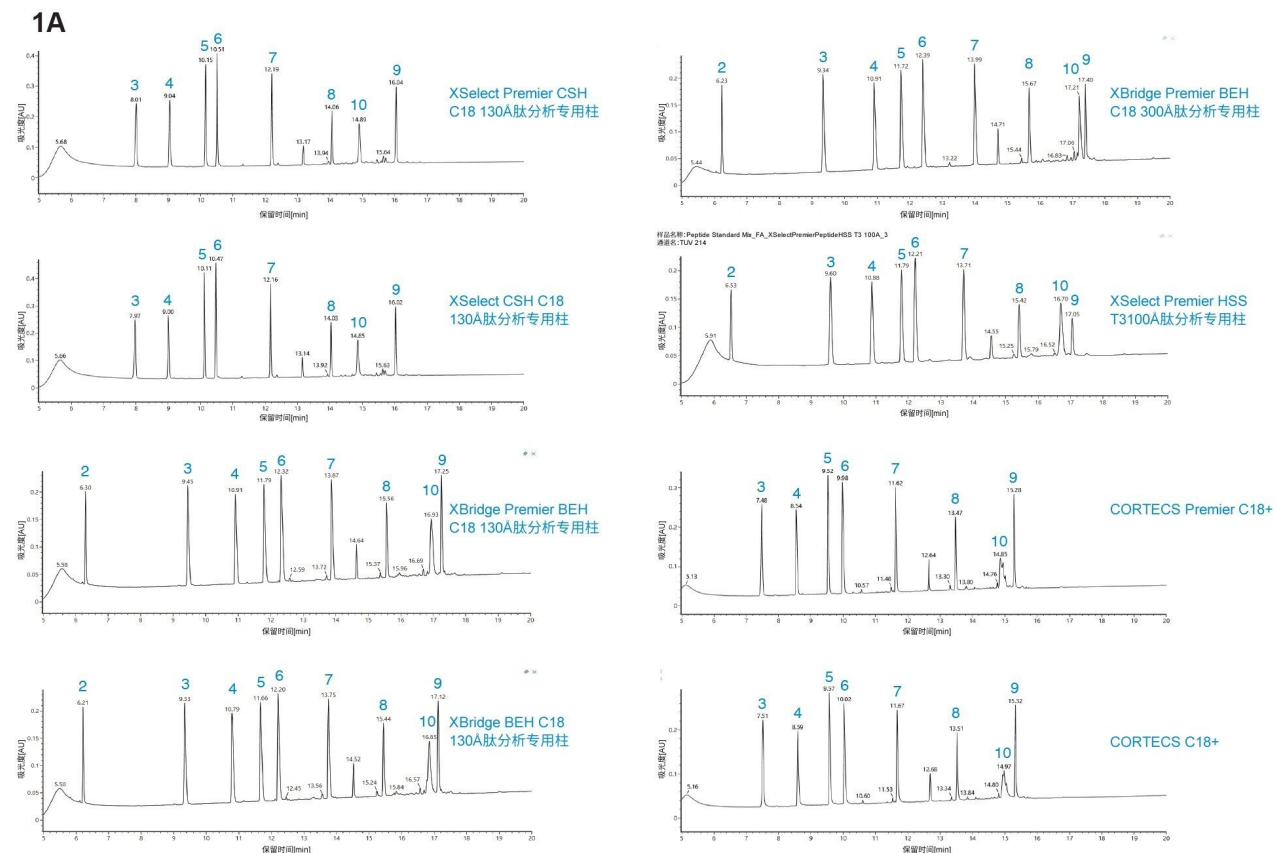


图1.a.流动相中添加0.1%甲酸添加剂，采用有机溶剂浓度递增的梯度在8款沃特世反相色谱柱上分离MassPREP肽混标得到的UV谱图

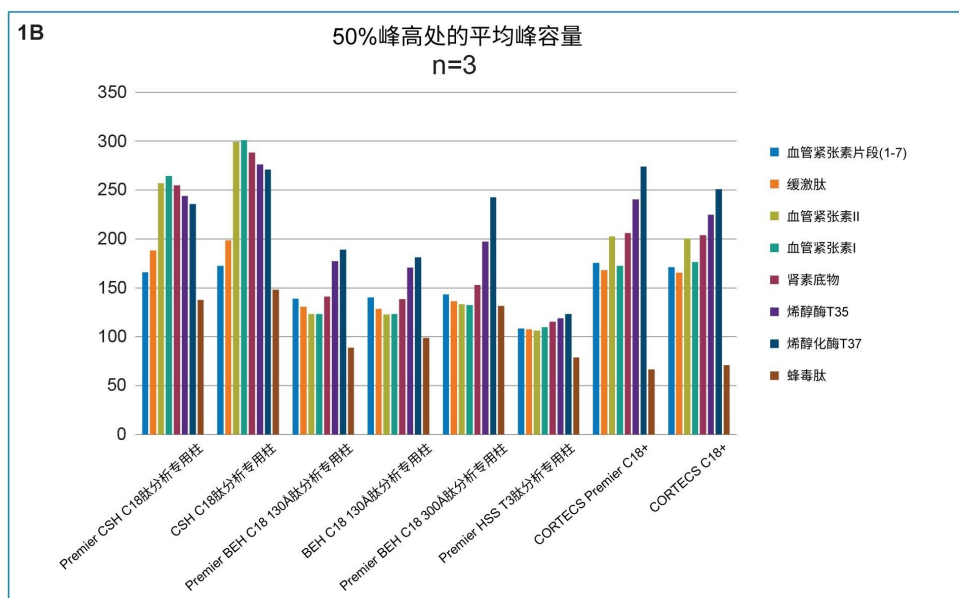


图1.b.所有被测色谱柱上每种肽标准品(#3~#10) 50%峰高处的平均峰容量(n=3)

此外，携带少量正电荷的色谱柱保留性通常较低。同样，在分离NISTmAb™胰蛋白酶酶解物时，也观察到8款不同的沃特世色谱柱填料之间存在肽选择性差异（图2）。

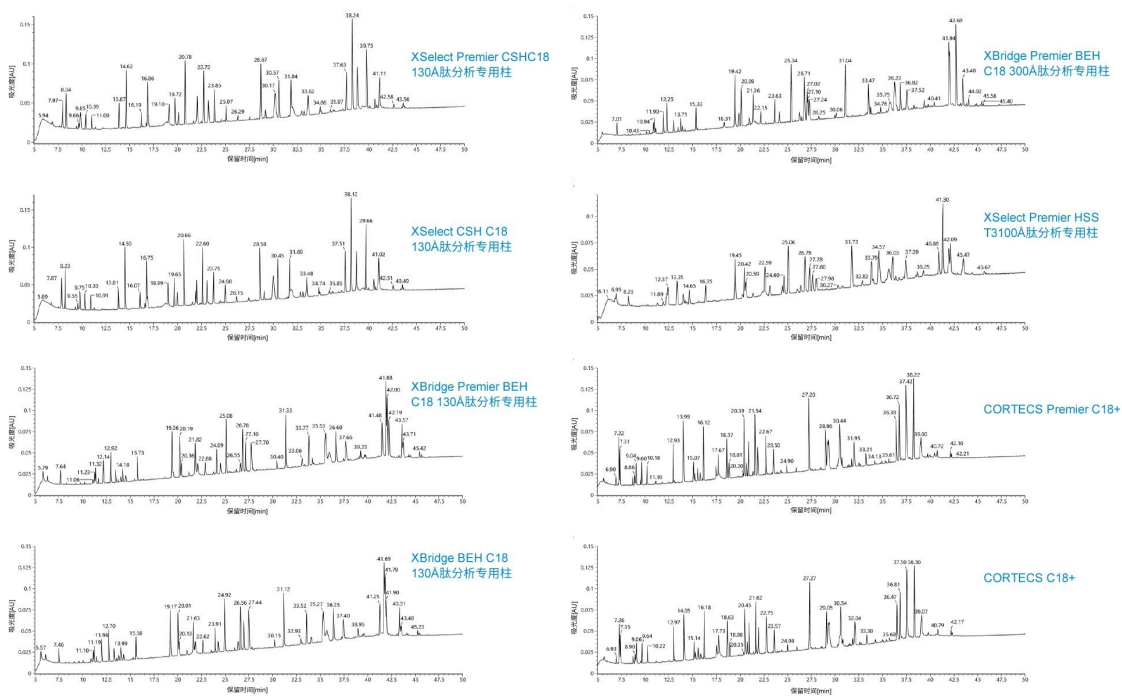


图2.流动相中添加0.1%甲酸添加剂，采用有机溶剂浓度递增的梯度在8款沃特世反相色谱柱上分离沃特世NISTmAb胰蛋白酶酶解物得到的UV谱图。仔细比较8款色谱柱的分离结果后，发现它们的肽选择性存在差异。

为详细阐释选择性差异，使用BioAccord LC-MS系统采集到的MS数据以及waters_connect鉴定了XSelect Premier CSH C₁₈ 130 Å肽分析专用柱和XBridge Premier BEH C₁₈ 130 Å肽分析专用柱洗脱的峰（图3a）。颜色相同的箭头表示同一种肽。请注意，与使用XBridge BEH C₁₈ 130 Å色谱柱收集到的数据相比，使用Premier XSelect CSH C₁₈ 130 Å色谱柱的总体肽保留性较差。此外，观察到这两款色谱柱洗脱的某些已鉴定肽（由彩色箭头标记）之间的间距不同（例如蓝色和紫色这一对，及红色和绿色这一对），而两款色谱柱洗脱的15种肽的保留时间总体上具有良好的相关性（图3b），表明它们的选择性在一定程度上是相似的。

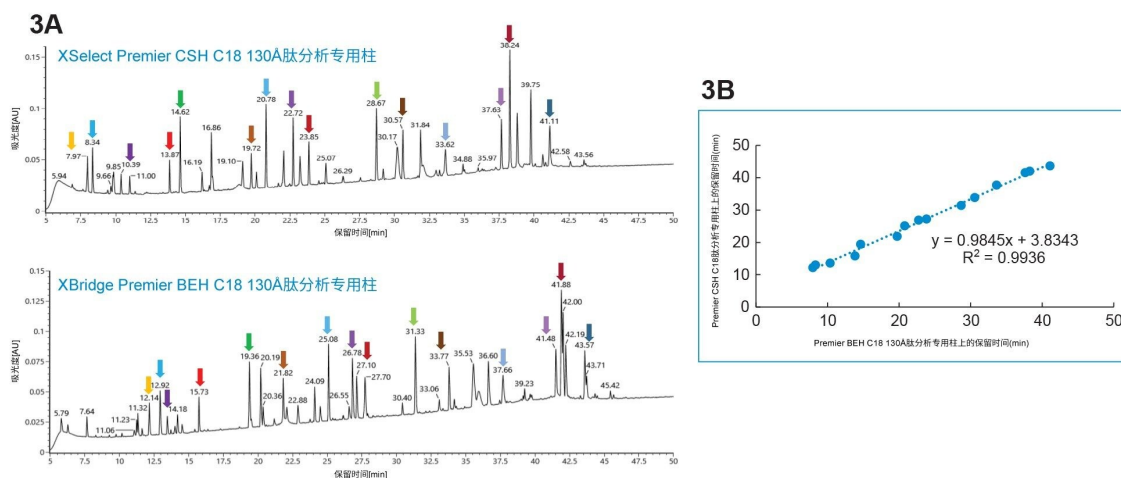


图3.a.流动相中添加0.1%甲酸添加剂，采用有机溶剂浓度递增的梯度在XSelect Premier CSH C₁₈肽分析专用柱和XBridge Premier BEH C₁₈ 130 Å肽分析专用柱上分离NISTmAb胰蛋白酶酶解物得到的UV谱图。使用BioAccord LC-MS系统采集到的MS数据和waters_connect鉴定峰。颜色相同的箭头表示同一种肽。b.右图显示了保留时间相关性。

近年来，肽图分析作为一种多属性方法(MAM)被应用于监测关键质量属性(CQA)^{3,4}。例如，图4和图5为使用5款Premier色谱柱分析两种NISTmAb胰蛋白酶解肽（重链T26和重链T37）及其脱酰胺修饰变体的XIC。未修饰峰及其脱酰胺峰的谱图见右侧。重链T26的未修饰峰和脱酰胺峰1在Premier CSH C₁₈肽分析专用柱和CORTECS Premier C18+色谱柱上分离效果更好（图4）。重链T37的未修饰峰与脱酰胺峰1在Premier CSH C₁₈ 130 Å肽分析专用柱和Premier BEH C₁₈ 130 Å肽分析专用柱上分离效果更好（图5）。此外，已知脱酰胺肽会发生约+1 Da的质量数漂移。如右侧图中的绿色框所示，当脱酰胺肽与未修饰肽更好地分离时，其谱图更加清晰。

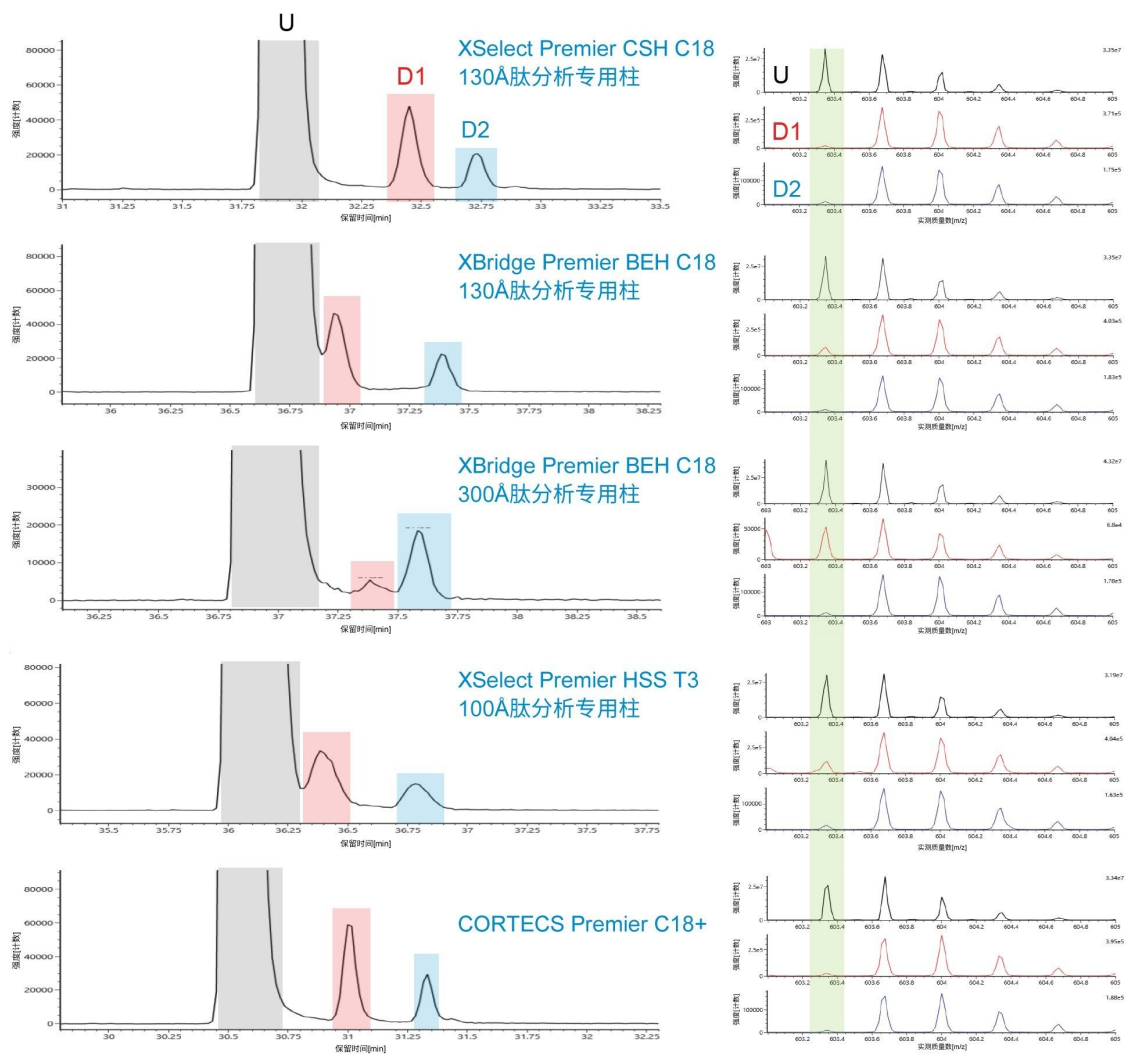


图4.在5款MaxPeak Premier反相色谱柱上分离NISTmAb胰蛋白酶解肽HC T26 (VVSVLTVLHQDWLNGK)及其脱酰胺修饰变体得到的XIC。左侧图中的灰色、红色和蓝色框分别显示了合并未修饰峰、脱酰胺峰1和脱酰胺峰2的谱图以获得右侧谱图时选取的位置。右侧的黑色、红色和蓝色迹线分别表示未修饰峰、脱酰胺峰1和脱酰胺峰2的合并谱图。绿色框显示了脱酰胺峰谱图的干净程度。U=未修饰肽，D1=脱酰胺肽1，D2=脱酰胺肽2

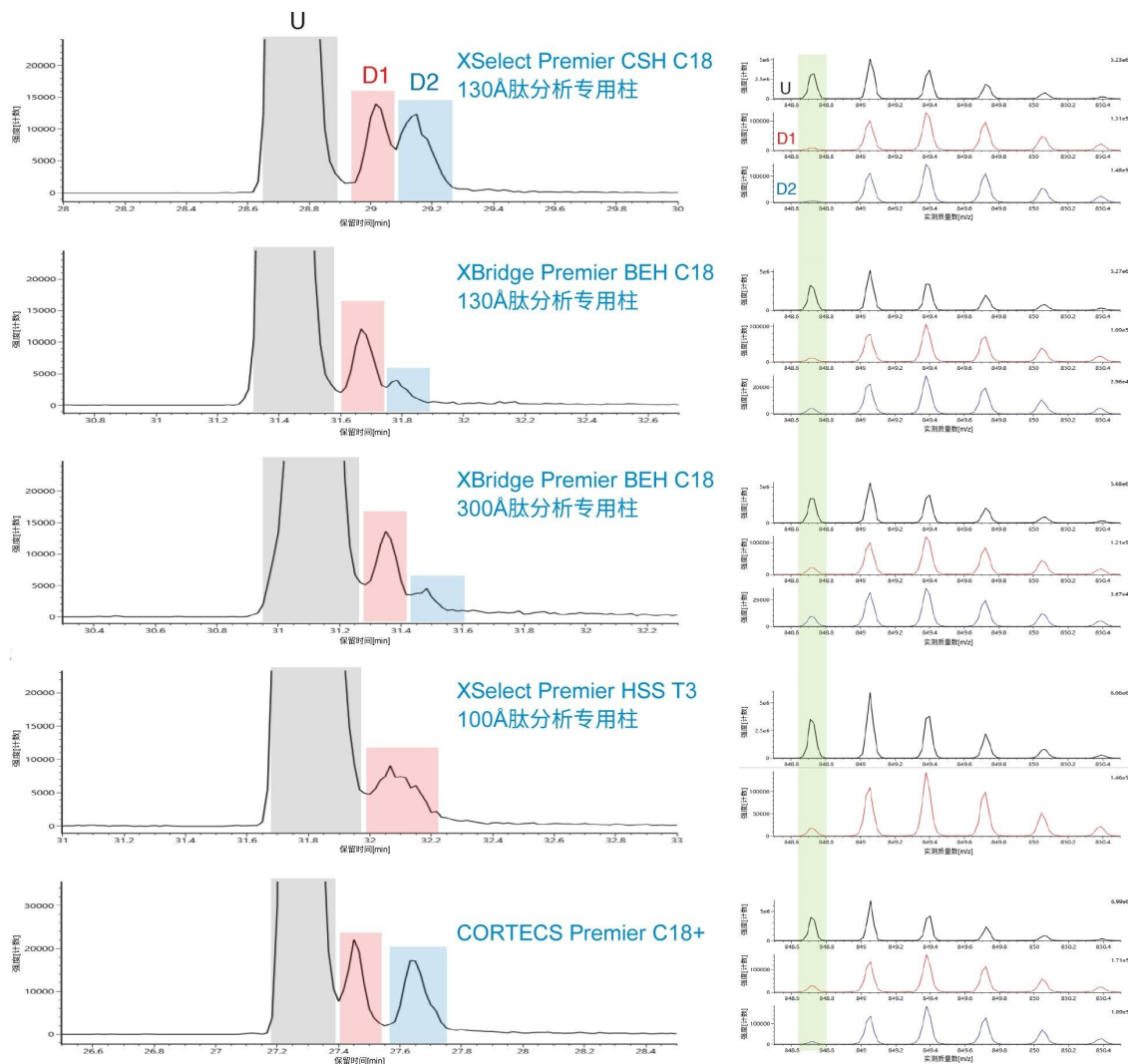


图5.在5款MaxPeak Premier反相色谱柱上分离NIST mAb胰蛋白酶解肽HC T37 (GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK)及其脱酰胺修饰变体得到的XIC。左侧图中的灰色、红色和蓝色框分别显示了合并未修饰峰、脱酰胺峰1和脱酰胺峰2的谱图以获得右侧谱图时选取的位置。右侧的黑色、红色和蓝色迹线分别表示未修饰峰、脱酰胺峰1和脱酰胺峰2的合并谱图。绿色框显示了脱酰胺峰谱图的干净程度。U=未修饰肽，D1=脱酰胺肽1，D2=脱酰胺肽2

结论

本研究比较了8款沃特世反相色谱柱的肽分离性能，观察到不同色谱柱填料在选择性和峰容量方面存在差异。使用MaxPeak Premier HPS色谱柱硬件并未显著改变肽分离的选择性，但高度磷酸化的肽可能会得到不同的结果。XIC表明，当NISTmAb胰蛋白酶解肽及其脱酰胺修饰变体分离得更好时，脱酰胺修饰变体的谱图会更清晰。

总体而言，本研究中的所有色谱柱都为肽分析提供了有效的分离。不同色谱柱填料的特性¹会导致不同的选择性，这在开发分离棘手肽样品的方法时会很有用¹。

参考文献

1. Koza S.M., 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 .2017.
2. Birdsall R.E., Kellett J., Ippoliti S., Ranbaduge N., Lauber M.A., Yu Y.Q., Chen W. Reducing Metal-Ion Mediated Adsorption of Acidic Peptides in RPLC-Based Assays Using Hybrid Silica Chromatographic Surfaces.*Journal of Chromatography B* 1179 (2021) 122700.
3. Mouchahoir T., and Schiel J.E. Development of an LC-MS/MS peptide mapping protocol for the NISTmAb.*Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2018) 410:2111–2126.
4. Guan X., Eris T., Zhang L., Ren D., Ricci M.S., Thiel T., Goudar C.T. A High-Resolution Multi-Attribute Method for Product Characterization, Process Characterization, and Quality Control of Therapeutic Proteins.*Analytical Biochemistry* 643 (2022) 114575.

特色产品

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

UNIFI生物制药平台解决方案 <<https://www.waters.com/10195515>>

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

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

waters_connect <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/informatics-and->

[software/waters_connect.html](#)>

720008035ZH, 2023年9月



© 2023 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](#)