Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

使用表面带电杂化(CSH)C_{18}和不含TFA的流动相进行肽图分析和小分子蛋白分离

Matthew A. Lauber, Stephan M. Koza,和 Kenneth J. Fountain
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

应用优势

- 与其他C_{18}色谱柱相比，CSH130具有更大峰容量和独一无二的选择性
- 能与甲酸和ESI-MS兼容
- 实现对高达约10 kDa化合物的高分辨率分离
- CSH130 C_{18}用细胞色素c胰蛋白酶消化液进行QC质控

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC® H-Class Bio 系统

Xevo® G2-S Q-Tof™质谱仪

ACQUITY UPLC CSH130 C_{18}，1.7 µm色谱柱

MassPREP™烯醇酶解标准品

经LCGC认证的含内插管的透明玻璃样品瓶

关键词

反相、肽、UPLC®、三氟乙酸、TFA、甲酸、FA、离子对、表面带电杂化、CSH、C_{18}、CSH130 C_{18}、LC/MS、肽图、小分子蛋白质

引言

当用作质量控制时，生物药物的肽图分析在传统方法上都会涉及使用紫外吸收进行检验。但是，为表征肽图中的化合物，常常必须将LC分离与ESI-MS联合使用。含有三氟乙酸(TFA)的流动相几乎专用于肽图分析，这很可能是因为许多C_{18}色谱柱的性能高度依赖于改善峰形的强离子对试剂。对于LC/MS应用，由于发生离子抑制，最好避免使用强离子对试剂(例如TFA)，从而可使MS信号强度增加一个数量级。[1-3]离子配对能力低的弱酸改性剂(例如甲酸[FA])是LC/MS的首选，因为它们更容易实现更灵敏的检测[4-5]。

在另一篇应用纪要中[6]，新型含有低水平正电荷的C_{18}色谱柱与现有先进的肽分析色谱柱进行了对比。对9种肽混合物的分析结果证明，表面带电杂化(CSH™)C_{18}固定相能够带来更高的峰容量，并且对强离子对的依赖性很小，这与大部分色谱柱产品的强烈依赖性不同。 这种性质对于需要使用质谱表征的LC应用而言非常理想。

在本研究中，CSH130 C_{18}联合FA流动相被进一步应用于更严苛的分离中。在CSH130 C_{18}、BEH130 C_{18}和表面多孔型C_{18}色谱柱上，对烯醇酶胰蛋白消化液的LC/MS分析进行了对比。此外，还对这些色谱柱在分子量高达12 kDa多肽分离中进行了评估。

实验

LC条件

系统: Waters ACQUITY UPLC H-Class Bio系统(配有一个20 cm恒温箱)

检测: 配备500nL分析流通池的ACQUITY UPLC TUV检测器

Xevo G2 Q-Tof质谱仪(仅MS检测用于肽图分析。UV和MS检测均用于大分子肽/小分子蛋白的分析。)

波长: 214 nm

扫描速率: 10 Hz

色谱柱: C_{18}, 2.1 x 150 mm, 1.7 µm, 表面多孔型(核心1.25 µm, 外壳0.22µm) 100 Å(竞争厂家产品)

ACQUITY UPLC BEH130 C_{18} 2.1 x 150mm, 1.7 µm, 多孔型130 Å (部件编号: 186003556)

ACQUITY UPLC BEH300 C_{18} 2.1 x 150 mm, 1.7 µm, 多孔型300 Å (部件编号: 186003687)

ACQUITY UPLC CSH130 C_{18} 2.1 x 150 mm, 1.7 µm, 多孔型130 Å (部件编号: 186006938)

柱温: 40 °C

样品温度: 10 °C

进样量: 10 µL烯醇酶消化液
1 µL大分子肽/小分子蛋白混合物

流速: 0.3 mL/min

流动相: A: 0.1%FA (v/v) 水溶液
B: 0.1%FA (v/v) 的乙腈(ACN) 溶液
C: 0.1%三氟乙酸(TFA) (v/v) 水溶液
D: 0.1%TFA (v/v) 的乙腈溶液

样品瓶: 经LCGC认证透明玻璃瓶 12 x 32 mm 螺纹口样品瓶 (部件编号186001126C)

0.1%FA的梯度:

时间 (min)	%A	%B	%C	%D
0	98.0	2.0	0.0	0.0
1	98.0	2.0	0.0	0.0
61	50.0	50.0	0.0	0.0

0.1%FA的梯度:
(仅用于图1中的对比):

时间 (min)	%A	%B	%C	%D
0	0.0	0.0	98.0	2.0
1	0.0	0.0	98.0	2.0
61	0.0	0.0	50.0	50.0

质谱条件

质谱仪: Xevo G2 Qtof

电离模式: ESI+

分析仪模式: 分离度

扫描速率: 10 Hz

毛细管电压: 3.00 Kv

锥孔电压: 25 V

离子源温度: 120 °C

脱溶剂温度: 350 °C

锥孔气体流速: 0.0 L/h

脱溶剂气体流速: 800 L/h

校正: NaI 2 µg/µL, 50 ~ 2000 m/z

采集: 50 ~ 1990 m/z, 10 Hz 扫描速率

数据管理: MassLynx®软件

样品描述

Waters® MassPREP烯醇酶消化液标准品(部件编号186002325)用0.1%FA水溶液复溶，使肽总浓度约0.05 mM。将购自Sigma公司的大分子肽和小分子蛋白质用0.1%FA水溶液复溶，并入含有1 mg/mL各成分的混合物。

计算：

由烯醇酶得到的以下胰蛋白酶肽用于分离性能的评估：T6、T10、T14、T23、T27、T35、T37、T38、T40、T42、T45、T51。其半峰宽(Wh)由提取离子色谱(XICs)测定，求其平均值，然后根据下式计算峰容量。

$$P_{c,4\sigma} = 1 + \left[\left(\frac{2.35}{4}\right)\left(\frac{t_{gradient}}{w_{h,avg}}\right)\right]$$

结果与讨论

肽分离

反相肽分离一般用在蛋白水解分析中，如肽图分析。使用C_{18}色谱柱进行肽分离最好通过分析消化液标准品(例如烯醇酶的胰消化液)进行评估。通过使用这些样品，对ACQUITY UPLC CSH130 C_{18}，1.7 µm色谱柱性能进行评估，从而应用于LC/MS肽图绘制。图1是使用含FA(蓝色线)或TFA(橙色线)分离得到的烯醇酶胰蛋白酶肽总离子色谱图。TFA对质谱灵敏度的不利影响是很明显的，在LC/MS分析中用TFA作改性剂相比FA，质谱的灵敏度下降一个数量级。

之前对9种肽混合物进行的分析工作表明，CSH130 C_{18}肽分离的性能对强离子对试剂(如TFA)的依赖性很小。无论使用含FA还是含TFA的流动相，肽峰形都很好[6]。最明显的是：甚至在质谱兼容的条件下，CSH130 C_{18}也能够得到高峰容量的结果。为了说明这一点，我们用含FA的流动相测得烯醇酶肽图的峰容量(计算过程见实验部分)。12种保留时间分布广泛的肽标示在图1中，用于峰容量计算。

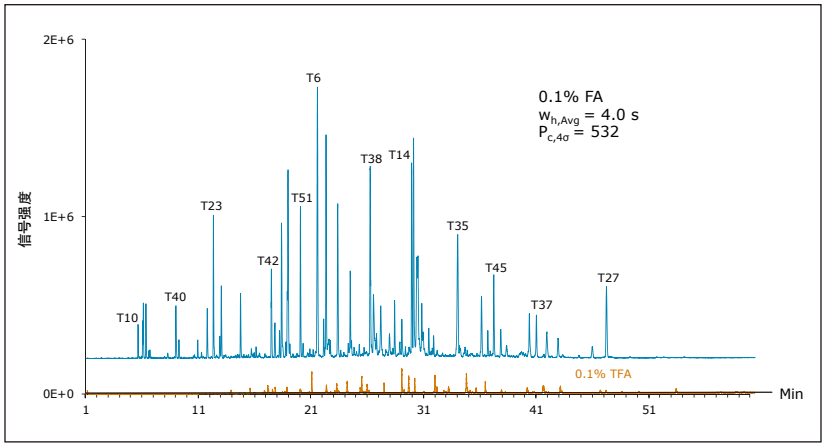

图1. 使用CSH130 C_{18}, 1.7µm色谱柱得到的烯醇酶胰蛋白酶消化液的LC/MS色谱图。使用0.1%FA或0.1%TFA得到的总离子色谱图分别以蓝色和橙色表示。两张色谱图显示比例相同。峰容量计算中使用的肽被标示出来。

根据这些测定结果，CSH130 C_{18}，1.7 µm色谱柱得到的峰容量为532，明显高于日常工作中使用的LC/MS平台得到的峰容量。为验证这一观点，使用两根非表面带电的1.7 µm C_{18}色谱柱通过LC/MS方法对烯醇酶消化液进行了分析，如图2所示。完全多孔型的BEH130 C_{18}，1.7 µm色谱柱得到的峰容量为339，而表面多孔型C_{18}，1.7 µm色谱柱得到的相似峰容量为405。因此，新型CSH130 C_{18}固定相具有明显的性能优势，峰容量提高30%。

在图2所示的三张色谱图之间，肽的保留性和选择性也各有不同。图3是截取烯醇酶肽图上早期时间段的肽图。6种不同肽的相应峰被标示出来。由对比得到的最直接观察结果是：1)CSH130 C_{18}能够得到更好的峰形；2)CSH130 C_{18}固定相的保留性稍弱于其他固定相。与BEH130 C_{18}相比，标记肽在CSH130 C_{18}色谱柱中大约早洗脱5分钟；而与表面多孔型C_{18}色谱柱相比，大约早洗脱2分钟。就洗脱强度而言，分别大约在4%和2%乙腈时，洗脱强度存在差异。对这些色谱图进行更详细的分析显示，CSH130 C_{18} 色谱柱具有独一无二的选择性。当将BEH130 C_{18}换成CSH130 C_{18}时，肽洗脱顺序剧烈变化。在本色谱图中选择性差异最大的肽是T10和T19。大部分胰蛋白酶肽(例如T3、T5、T12和T40)仅含有两个碱性基，一个N端和一个C端赖氨酸或精酸残基。相比之下，肽T10和T19也含有碱性残基，使其带有额外的正电荷。这极可能是其具有较大保留差异的原因。因此，肽在CSH130 C_{18}上的保留似乎受到其电荷(可能是电荷密度)的影响，这种影响反过来影响了其选择性。这种情况有利于在复杂肽图分析时——尤其是旨在分离关键性肽对时，可以筛选BEH130 C_{18}和CSH130 C_{18}。

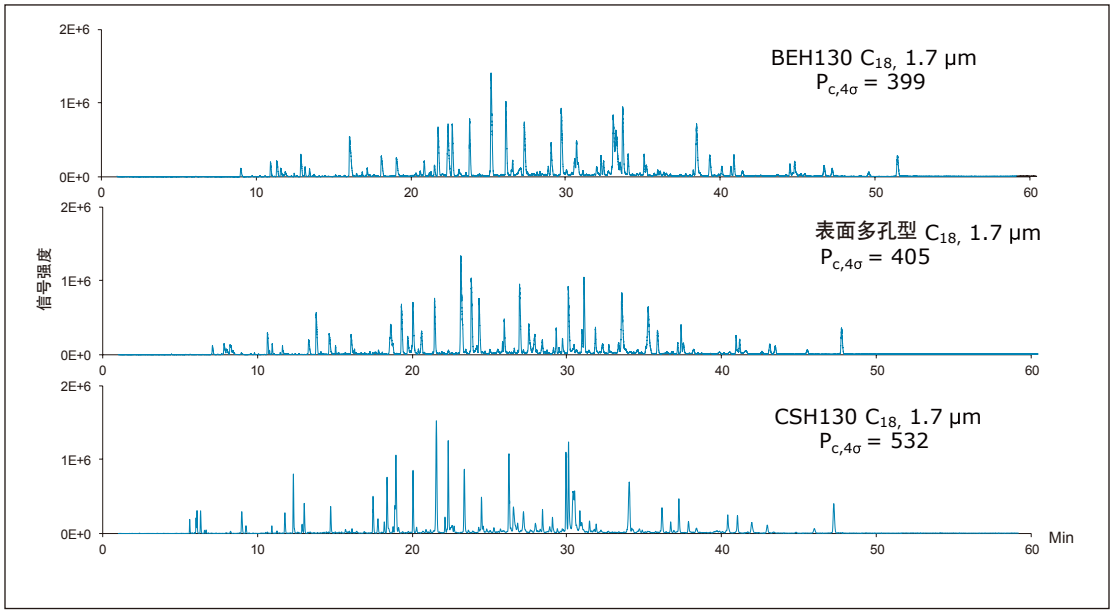

图2. 使用0.1%FA流动相和三种不同色谱柱得到的烯醇胰蛋白酶消化液的总离子色谱图。

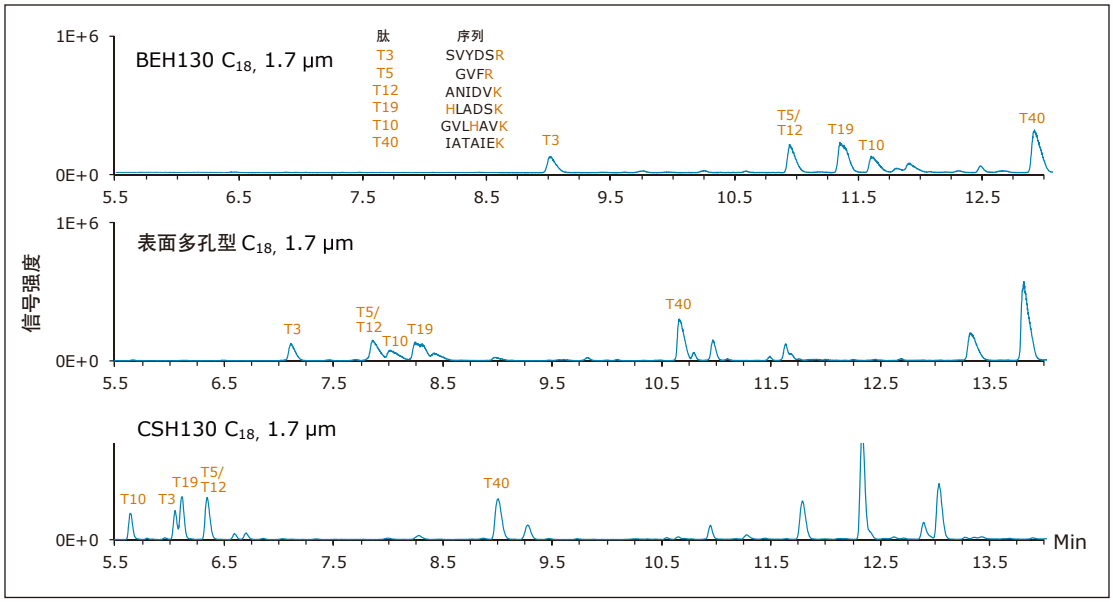

图3. 图2烯醇酶肽图的早期保留窗口的放大，突出显示保留性和选择性的差异。用三种不同色谱柱对6种不同肽进行追踪。肽序列如表格所示。

大分子肽和小分子蛋白质的分析

对于给定的肽分离，选择最佳的色谱柱会受到很多可变因素影响。前述工作已经显示表面电荷带来的深刻影响。另一个参数即是孔径。在这些结果基础上，CSH130 C_{18}能非常有效地分离胰蛋白酶肽。不过，即便孔径为130 Å，评价CSH130 C_{18}在分离大分子肽和小分子蛋白质方面的作用也很受人关注。

在四种孔径介于100 ~ 300 Å的色谱柱上对质量范围为1 ~ 12 kDa的6种肽进行了分离，如图4所示。比较这些色谱图，可以清楚地看到，CSH130 C_{18}对大部分肽化合物(包括胰岛素，5.8 kDa)都能获得最佳峰形。因此，CSH130 C_{18} 已经成为治疗性胰岛素类似物生物分析的一种固定相选择[7]。

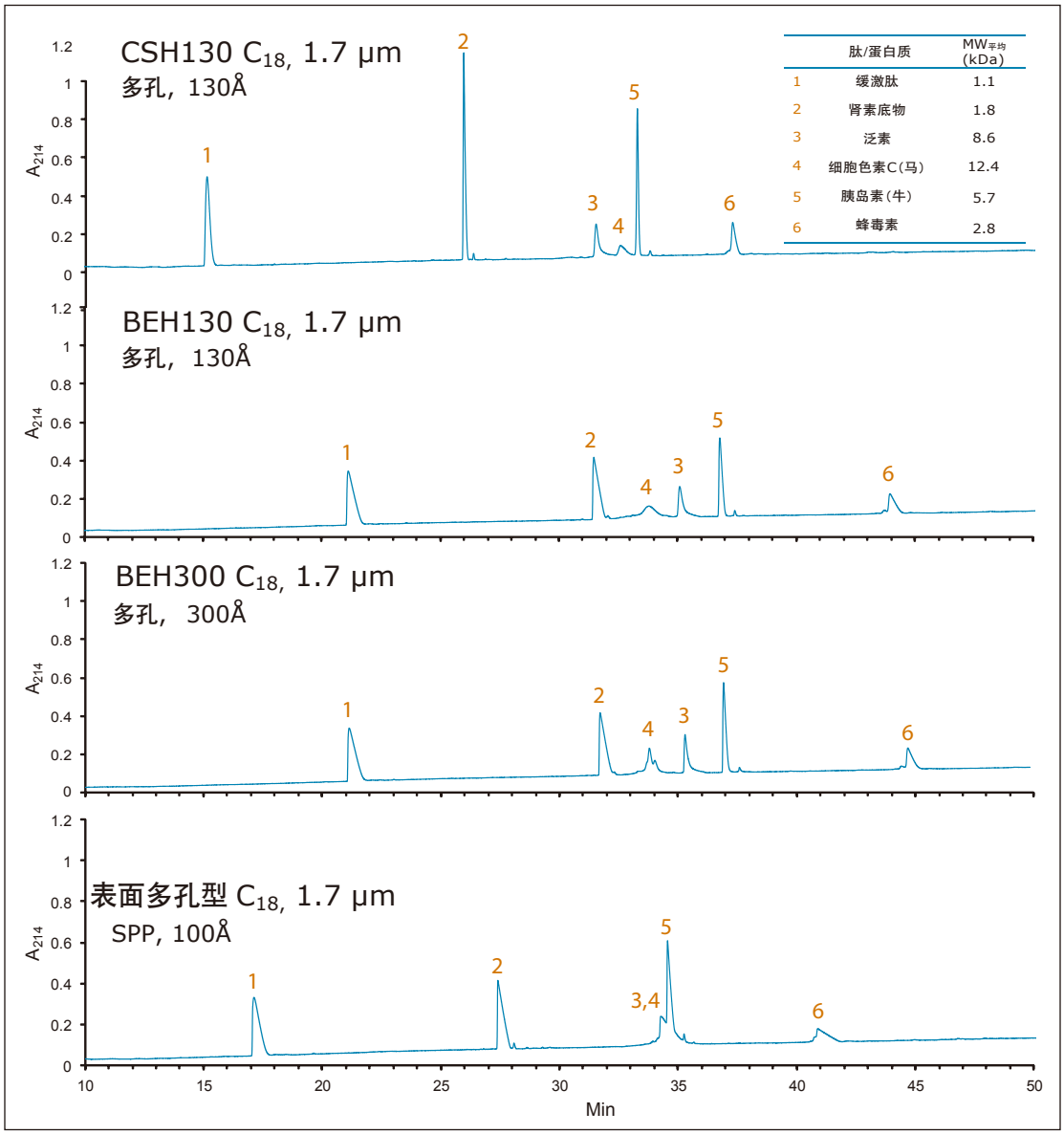

图4. 使用0.1%FA流动相和四种色谱柱得到的大分子肽和小分子蛋白质的色谱图。通过ESI-MS鉴别色谱峰。

多肽、泛素(8.6 kDa)和细胞色素C(12.4 kDa)的分析更好地确定了300 Å和130 Å孔径的影响。泛素在BEH300 C18(300 Å)色谱柱上比CSH130 C_{18}(130 Å) 和BEH130 C_{18} (130 Å)仅得到稍好一点的峰形。相比之下，对于最大的多肽——细胞色素c，BEH300 C_{18}上可得到明显更好的峰形。实际上，BEH300 C_{18}色谱柱能够将细胞色素c分离成多个峰，表明了蛋白质的异质性。大部分肽的分离，例如由蛋白水解消化液得到的肽，会含有(假如有)这样大分子的肽。由于这个原因，与较大孔径相比，使用130 Å孔径颗粒(如CSH130 C_{18})可以更好地实现蛋白消化液的分离，因为130 Å孔径颗粒提供更大的表面积并且更有可能保留小分子亲水肽。当主要分析大分子肽时——例如分子量大于 6 kDa的肽，首选较大孔径的颗粒，例如300Å。当高效地保持或分离较小分子的非交联肽不是关键因素时，这种分析可能涉及Lys-C消化免疫球蛋白G的肽二巯键连接研究。同时，值得注意的是，不同孔径有时可用于改变肽图分析时的选择性[8]。

100 Å孔径的表面多孔型色谱柱能够分离最小的肽，得到的峰宽和峰形与BEH C_{18}相当。但是，对于最大的肽化合物(3 ~ 12 kDa)，峰形明显变形。此外，该色谱柱并不能将三种最大的肽分开。这些数据说明，表面多孔型C_{18} 色谱柱局限于分析较小的肽，而CSH130和BEH130/300 C_{18}色谱柱则可以分离范围更宽的肽和小分子蛋白质。

结论

使用FA而不用TFA进行肽图分析有利于使用ESI-MS获得更高的灵敏度。因此，CSH130 C_{18}适用于LC/MS肽图分析，因为无论使用哪一种酸改性剂，其性能都非常出色。使用FA流动相对由烯醇酶得到的胰蛋白酶肽进行分析，CSH130 C_{18}，1.7 µm色谱柱比粒径相当的传统全多孔或表面多孔的色谱柱峰容量大30%。此外，烯醇酶胰蛋白肽的分析表明，CSH130 C_{18}在肽的分离中具有独一无二的选择性。因此，在绘制肽图时，可将CSH130 C_{18} 与传统的C_{18}色谱柱一起筛选。除提供更大的峰容量外，CSH130 C_{18}色谱柱还可以为关键肽对提供期望的选择。最后，通过对大分子肽和小分子蛋白质的分析，已经确定，孔径为130 Å 的CSH130 C_{18}色谱柱，也适用于分离分子量高达至少10 kDa的多肽化合物。

参考文献

1. Kuhlmann FE, Apffel A, Fischer S, Goldberg G, Goodley PC. Enhanced sensitivity for peptide mapping with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry in the presence of signal suppression due to trifluoroacetic acid-containing mobile phases. *J Am Soc Mass Spectrom.* 1995; 6 (12): 1221-1225.
2. Apffel A, Fischer S, Goldberg G, Goodley PC, Kuhlmann FE. Enhanced sensitivity for peptide mapping with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry in the presence of signal suppression due to trifluoroacetic acid-containing mobile phases. *J Chromatogr A.* 1995; 712 (1): 177-90.
3. Chakraborty AB, Berger SJ. Optimization of reversed-phase peptide liquid chromatography ultraviolet mass spectrometry analyses using an automated blending methodology. *J Biomol Tech.* 2005; 16(4): 327-35.
4. Annesley TM. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem.* 2003; 49(7): 1041-4.
5. Temesi D, Law B. *LC-GC Int.* 1999; 17: 626-32.
6. Lauber MA, Koza S, Fountain KJ. Increasing Peak Capacity in Reversed-phase Peptide Separations with Charged Surface Hybrid (CSH) C_{18} Columns. Waters Application Note 720004568EN. 2013 Jan.
7. Chambers EE, Legido-Quigley C, Smith N, Fountain KJ. Development of a fast method for direct analysis of intact synthetic insulins in human plasma: the large peptide challenge. *Bioanalysis*. 2013; 5 (1).
8. Gillece-Castro BL, Wheat TE, Mazzeo JR. Waters Application Note 720001792EN. 2011 July.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, ACQUITY UPLC, Xevo, UPLC和MassLynx是沃特世公司的注册商标。CSH, Q-Tof, MassPREP和The Science of What's Possible是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2013年 沃特世公司　印制于中国　2013 年 1 月 720004571ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 5999
成都：028 - 6578 4990
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com