Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

使用杂化颗粒C_{18}色谱柱和乙酸流动相进行肽的高载量研究

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市)

应用优势

- 两种具备独特选择性的杂化颗粒色谱柱(BEH130 C_{18}和CSH130 C_{18})。
- 在使用最优浓度的HOAc调节流动相时，BEH130 C_{18}和CSH130 C_{18}获得的目标肽峰比使用0.1% TFA时更窄，分离度也更高。利用这一特性，可以通过更少的步骤获得含有药用反离子的肽。
- BEH130 C_{18}和CSH130 C_{18}由细胞色素c的胰蛋白酶消化液进行质控测试。

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC® H-Class Bio 系统

XSelect™ CSH130 C_{18}, 5 µm

XBridge™ BEH130 C_{18}, 5 µm

MassPREP™ 肽混合物

关键词

反相(RP)，肽，乙酸(HOAc)，表面带电杂化颗粒(CSH)，CSH130 C_{18}，BEH130 C_{18}，制备型色谱，肽分离技术(PST)

简介

经证实，肽在研究中是非常有用的治疗剂和标记物。通常，为了实现这些用途，会通过制备型反相(RP)色谱对肽进行纯化。在大多数情况下，纯化出来的肽必须具有高纯度。如果存在污染物，会干扰生物分析的结果。如果活性药物成分中存在污染物，后果将会非常严重。因此，需要较高的色谱分辨率来尽量减少与目标肽化学性质非常接近的共洗脱杂质。此外，还需要色谱柱填料具有卓越的载样量，确保实现最佳的通量和生产率。肽分离使用的流动相中通常包含强离子对试剂，例如三氟乙酸(TFA)。但是，如果选用含有TFA的流动相，需要进行额外的制备步骤。由于三氟乙酸盐(TFA盐)固有的毒性，必须将其除去或置换[1]。最好使用毒性较低的反离子，尤如乙酸盐。实际上，大部分肽药都是乙酸盐或含有乙酸的液体制剂[2-3]。因此，尽可能用乙酸(HOAc)流动相替代TFA流动相，这种做法似乎更有优势。之前曾有研究表明，在使用HOAc流动相和等度反相色谱后，TFA溶液中的肽(例如粗制合成肽)[4-5]大部分转化为乙酸盐形式[6]。同时，使用高浓度乙酸盐缓冲液通过简单的洗脱步骤进行梯度分离，可实现更彻底的盐形式转化。[7]总之，使用HOAc流动相可简化纯化过程，有利于通过更少的步骤获得所需肽和反离子。

本文研究了使用BEH C_{18}和CSH™ C_{18}色谱柱进行制备型肽分离的过程。BEH C_{18}是一种有机硅C_{18}固定相，基于亚乙基桥杂化颗粒(BEH)技术，并具有卓越的耐用性和pH稳定性。表面带电杂化颗粒(CSH) C_{18}则是BEH C_{18}的升级产品，其表面被修饰在酸性条件下带有微弱正电荷。以下数据证明了这两种固定相均适用于高上样量的肽分离，既可用于TFA调节的流动相，也可用于HOAc调节的流动相。并且，在高上样量下，BEH C_{18}和CSH C_{18}在使用经优化的HOAc流动相时获得的目标峰均比使用0.1% TFA时更窄。

实验

样品描述

将MassPREP肽混合物(部件号186002337，如表1所示)复溶于0.1% TFA或0.1% HOAc(取决于所用流动相)中，使肽的总浓度为0.6或2.0 mg/mL(取决于上样量)。将合成肽的低纯度(<70%)制备样品DFVGYGVKDFVGVGVK复溶于0.1% TFA/0.1% HOAc中，使浓度为1或4 mg/mL。

方法条件
(除非另有说明)

LC条件

系统：带20-cm柱温箱的ACQUITY UPLC H-Class Bio系统

检测条件：带500-nL分析型流通池的ACQUITY UPLC TUV检测器

Xevo® G2 Q-Tof™质谱仪

波长：214 和 250 nm

扫描率：2 Hz(过滤时间常数，1 s)

色谱柱：XBridge BEH130 C_{18} 4.6 × 100 mm，5 µm，多孔，130Å (部件号186003579)
XSelect CSH130 C_{18} 4.6 × 100 mm，5 µm，多孔，130Å (部件号186007077)

柱温：40 ℃

样品温度：10 ℃

进样体积：50 至 1000 µL，上样量见下文

流速：1 mL/min(在UV检测器后分流，以大约20 µL/min注入MS源)

流动相：参见梯度表

样品瓶：LCGC认证透明玻璃12 × 32 mm螺口Qsert样品瓶 (部件号186001126C)

梯度：MassPREP肽混合物
A：0.1% (v/v) TFA水溶液
B：0.1% (v/v) TFA的90:10乙腈(ACN)/水溶液
或
A：0.1% (v/v) HOAc水溶液
B：0.1% (v/v) HOAc的90:10 ACN/水溶液

时间 (min)	% A	% B
0	99.5	0.5
1	99.5	0.5
61	40.0	60.0
62	10.0	90.0
65	10.0	90.0
66	99.5	0.5
85	99.5	0.5

DFVGYGVKDFVGVGVK的聚焦梯度
A： 0.1% (v/v) TFA水溶液
B： 0.1% (v/v) TFA的90:10 ACN/水溶液

时间 (min)	% A	% B
0.0	90	10
3.0	90	10
4.0	80	20
24.2	60	40
29.2	10	90
32.2	10	90
33.2	90	10
52.0	90	10

A：0.1% (v/v) HOAc水溶液

B：0.1% (v/v) HOAc的90:10 ACN/水溶液

或

A：99:1 (v/v)水/HOAc – 1% HOAc

B：90:9:1 (v/v) ACN/水/HOAc – 1% HOAc

时间 (min)	% A	% B
0.0	90	10
3.0	90	10
3.3	87	13
23.5	67	33
29.2	10	90
32.2	10	90
33.2	90	10
52.0	90	10

MS条件

质谱仪：	Xevo G2 Q-Tof
电离模式：	ESI +
分析仪模式：	分离度
毛细管电压：	3.00 kV
锥孔电压：	25 V
源温度：	120 °C
脱溶剂气体温度：	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， 1 µg/µL，50至2000 m/z
采集：	50至1990 m/z，2 Hz扫描率

数据管理

MassLynx软件4.1版

结果与讨论

含有九种组分的肽混合物的载量研究

在之前的研究中，已经对CSH130 C_{18}和BEH130 C_{18}在分析型肽分离中的应用（例如肽图绘制）进行了广泛的探讨[8-9]。简而言之，与其他肽分离反相填料相比，CSH130 C_{18}及其创新的表面带电技术能够改善峰形和载量。在分析型应用中，尤其是在流动相含有极少或不含离子对试剂时，可以观察到峰容量有显著升高，最高达到90%。与BEH130 C_{18}相比，CSH130 C_{18}的表面正电荷还提供了独特的选择性和较低的保留性，使得它们成为肽分离色谱填料的绝佳搭配。

为了研究CSH130 C_{18}和BEH130 C_{18}在制备型分离中的表现，采用生产中常用的流动相（即含有TFA或HOAc的流动相）对一系列不同肽进行了载量研究。这些方法开发实验中使用的是5 µm颗粒填充的分析柱（4.6 mm内径）。

首先在这些色谱柱上进行测试的是MassPREP肽混合物，其包含九种不同的肽，如表1所示。图1所示为该混合物在半制备型上样下的一组色谱图，其中使用了BEH130 C_{18}和CSH130 C_{18}，以及两种不同的流动相，一种含有0.1% TFA，另一种含有0.1% HOAc。使用0.1% TFA时，BEH色谱柱的平均4σ峰宽为0.8 min。使用0.1% HOAc时，平均峰宽几乎翻了一倍，达到1.5 min。HOAc的酸性比TFA弱得多，从而导致流动相酸性减弱，离子强度和离子配对能力均显著降低。因此预计使用HOAc代替TFA时，大部分C18柱的峰形会较差。这一假设对于BEH130 C_{18}的半制备型上样是成立的，如图1所示。然而对于CSH130 C_{18}色谱柱，用HOAc替换TFA时峰形仍保持良好。使用0.1% TFA流动相和0.1% HOAc流动相时，在CSH130色谱柱中观察到的平均4σ峰宽分别为0.5和0.6 min。峰宽数据汇总于图2中，其中分别绘出了在不同色谱柱类型和流动相条件下混合物中每种肽的峰宽。除了半制备型上样量的数据之外，图中还显示了分析型上样量的数据。此图表明BEH130 C_{18}和CSH130 C_{18}在一些条件下会生成类似的肽峰形，包括0.1% TFA的分析型上样量。但是，在其他条件下，例如0.1% HOAc的半制备型上样量，CSH130 C_{18}生成的峰要窄得多。正如之前研究所证实[8-9]，CSH130 C_{18}在使用含有极少或不含离子对试剂的酸性流动相时，获得的肽峰形明显更好。同时也表明，当上样量高于常规分析20倍时，这种现象更为明显。

	肽	序列
1	RASG-1	RGDSPASSKP
2	血管紧张素1-7	DRVYIHP
3	缓激肽	RPPGFSPFR
4	血管紧张素II	DRVYIHPF
5	血管紧张素I	DRVYIHPFHL
6	肾素底物	DRVYIHPFHLLVYS
7	烯醇化酶T35	WLTGPQLADLYHSLMK
8	烯醇化酶T37	YPIVSIEDPFAEDDWEAWSHFFK
9	蜂毒肽	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ

表1. MassPREP肽混合物。

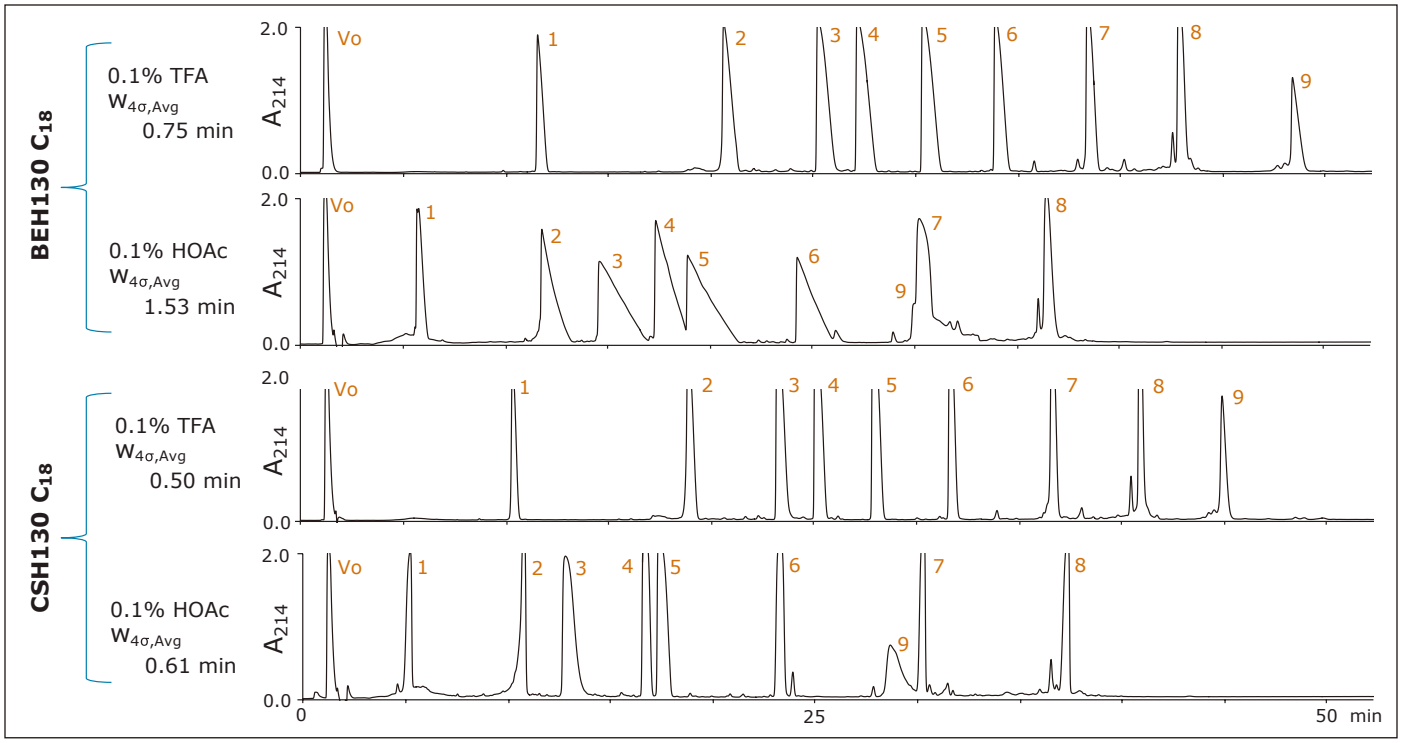

图1.使用BEH130和CSH130 C_{18} 4.6 × 100 mm，5μm色谱柱，在半制备型上样量下分析MassPREP肽混合物(500 μg)。

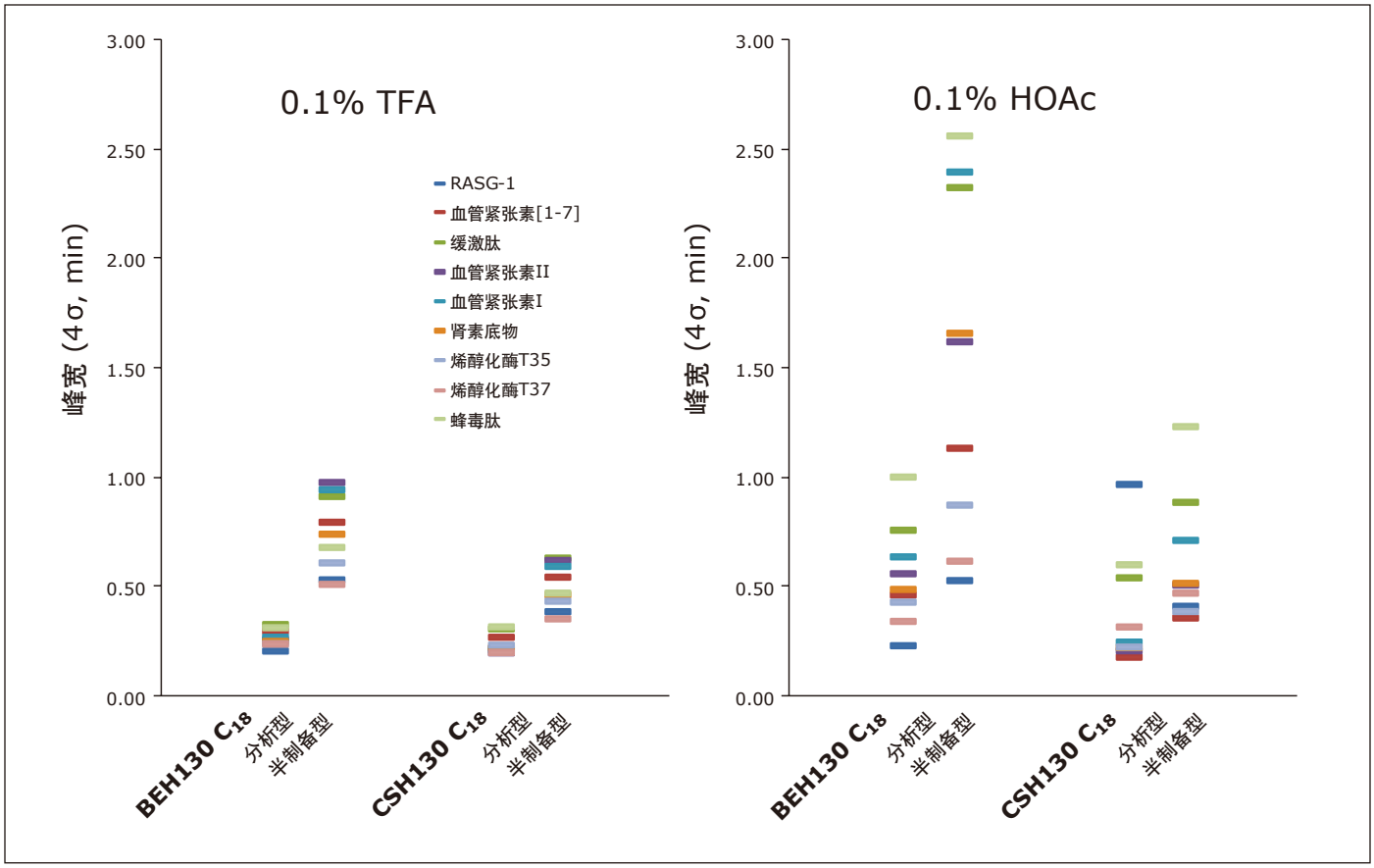

图2.在分析型(30 μg混合物)和半制备型(500 μg混合物)上样量下观察到的MassPREP肽混合物中各种物质的峰宽。

低纯度合成肽

制备型分离往往要求上样量必须达到(有时要高于)分析型分离所用上样量的1000倍。使用序列为DFVGYGVKDFVGVGVK的低纯度合成肽(一种中性肽，pI = 6，1.7 kDa)，对低于此范围和此范围之内的上样量进行研究。在BEH和CSH色谱柱上采用聚焦梯度分离以缩短运行时间，使用低灵敏度波长(250 nm)检测以获取完整峰形。

首先使用经0.1% HOAc调节的流动相对半制备型和制备型上样量进行分析，如图3所示。BEH色谱柱上的半制备型上样量(50 µg)产生的目标肽峰带有明显拖尾，这与常见的Langmuirian等温线一致。相反，在制备型上样量(1 mg)下，目标肽的洗脱峰呈略微前伸，正如典型的anti-Langmuirian等温线。我们知道，当肽以两性离子形式存在时，就会出现anti-Langmuirian等温线[10]。由此可知，经0.1% HOAc调节的流动相酸性不足以将这种合成肽的羧基完全质子化，肽可能同时以阳离子和两性离子存在。两性离子的相对含量应随上样量增大而增大，尤其是在目标肽浓度超过流动相的质子化/缓冲能力情况下。这就解释了BEH色谱柱上样量增大时峰形出现的巨大变化。

有趣的是，正如在图3中所看到的，对于BEH130 C_{18}，在制备型上样量下使用0.1% HOAc似乎更容易获得较窄的目标肽峰。在这些条件下，BEH色谱柱得到的目标肽峰比CSH色谱柱更窄。事实上，CSH130 C_{18}使用0.1% HOAc时在两种上样量下都获得了前伸峰。由于其表面所带的正电荷最大程度地减少了肽的拖尾，所以出现这种情况是意料之中的[8-9]。因此，前伸峰形也更加明显。由于没有拖尾峰，制备型上样量下CSH柱的目标峰宽度实际上要大于BEH柱。

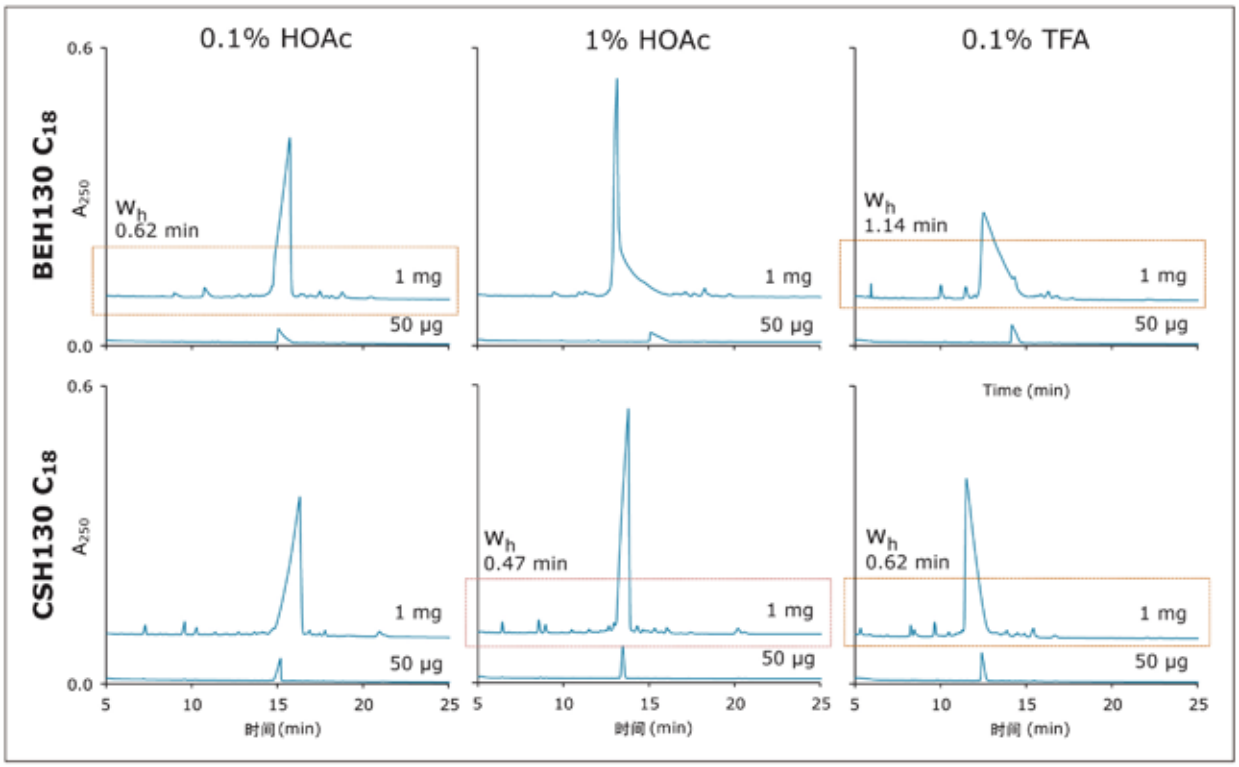

图3.在半制备型(50 µg混合物)和制备型(1 mg混合物)上样量下得到的低纯度合成肽DFVGYGVKDFVGVGVK (pI 6，1.7 kDa)色谱图。框出的色谱图见图4。

基于此，CSH130 C_{18}和BEH130 C_{18}生成最佳峰形的流动相条件应该有所不同。为此，还使用10倍酸性的酸(1% HOAc)调节的流动相进行了分离。尽管中等浓度对于开发纯化工艺可能具有一定参考价值，但此处未对其进行评估。如图3所示，改变流动相组分后，CSH柱的峰形大大改善，但BEH柱的峰形变得更差。使用二者各自的最佳HOAc流动相时，BEH柱(0.1% HOAc)和CSH柱(1% HOAc)都能生成较窄的目标肽峰(半峰宽分别为0.5和0.6 min)。为了参照，使用0.1% TFA作为离子对试剂进行了分离，如图3中右侧所示。在使用TFA时，CSH130 C_{18}上的目标肽峰宽为0.6 min，BEH130 C_{18}上则为1.1 min。无论选用哪种色谱柱填料，使用优化的HOAc流动相获得的肽目标峰都远远窄于TFA流动相。这些结果表明，乙酸流动相对于肽制备型分离更为实用。

较窄的目标肽峰往往伴随着更高的杂质分离度，从而有机会收集到纯度更高的流分。色谱柱填料和流动相添加剂对DFVGYGVKDFVGVGVK制备型上样量的影响如图4所示，其中重点显示了基线以及每种分离方法对目标峰中杂质的分离能力，这些杂质已通过MS确认。如前所述，HOAc流动相获得的目标峰更窄。图4还表明，使用HOAc流动相也在最大程度上减少了所监测杂质的共洗脱。此外，很明显可以看出，通过使用不同的流动相添加剂和两种不同的色谱柱填料，目标肽和杂质之间的色谱选择性发生了极大的变化。就此项载量研究筛选的参数而言，采用1% HOAc流动相的CSH柱提供的目标肽峰最窄，并且所监测杂质的共洗脱也最少。不过，使用BEH色谱柱和0.1% HOAc流动相也能获得与此相当的分离效果。具有不同选择性和最佳添加剂浓度的色谱柱填料将会有利于高难度制备型分离工艺的开发。

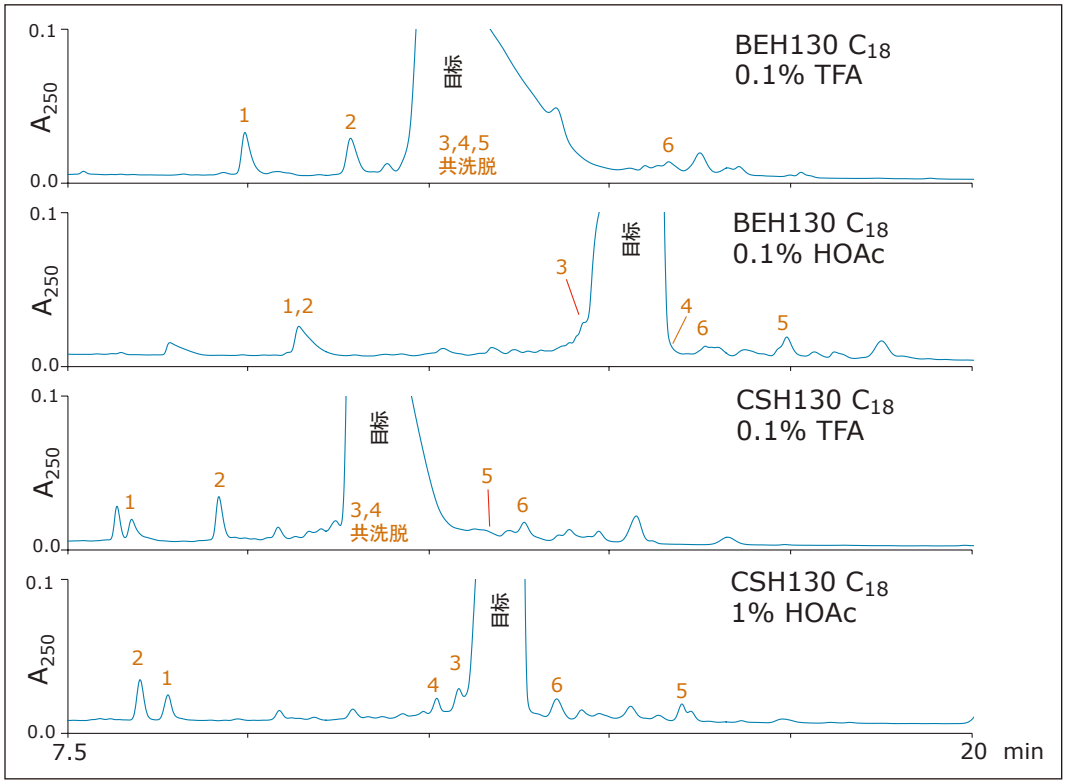

图4.使用BEH130 C_{18}和CSH130 C_{18}在制备型上样量(1 mg)下获得的DFVGYGVKDFVGVGVK色谱图，使用的流动相分别为优化的HOAc流动相和0.1% TFA调节的流动相。目标肽和监测杂质的保留时间由ESI-MS确定。观察到所确定杂质的质量变化如下：(1，- 147.1 Da)，(2，- 263.1Da)，(3，- 470.2Da)，(4，+548.4 Da)，(5，- 227.2 Da)和(6，+988.6Da)。

以上我们仅对合成肽的中等制备型上样量(1 mg)结果进行了讨论。图5所示为4mg肽上样得到的色谱图。这一上样量对应0.5 g原料，对于较大的50 mm内径色谱柱，这是非常高的单次进样生产率。从这些数据可以明显看出，CSH和BEH色谱柱都适合用于高上样量。值得注意的是，从半制备型(50 µg)到制备型(4 mg)，CSH色谱柱获得的峰形保持了惊人的一致。当需要在不消耗大量样品前提下开发分离方法时，这种高度可预测性可能会非常有用。

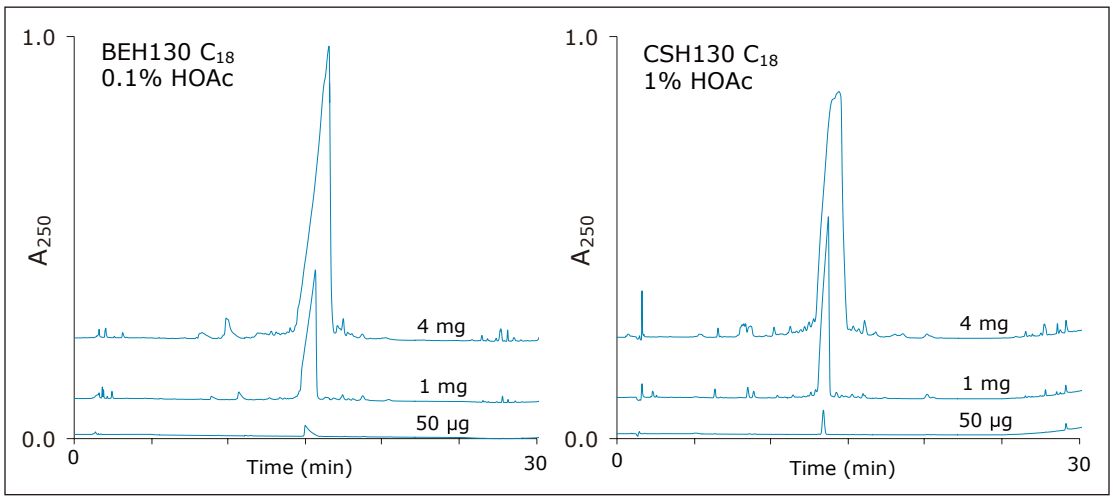

图5．采用优化的乙酸流动相在BEH130 C_{18}和CSH130 C_{18}上加载高上样量（最高4 mg）。

结论

根据对分析型内径色谱柱进行的载量研究，5-µm BEH130 C_{18}和5-µm CSH130 C_{18}在使用含TFA或HOAc的流动相时均显示出有利于制备型肽分离的巨大潜力。BEH130 C_{18}和CSH130 C_{18}色谱柱都具备有益特性。在酸性条件下，CSH130 C_{18}与BEH130 C_{18}相比显示出更高的载样能力，并且通常能产生更窄的目标峰。因此， CSH130 C_{18}流分体积更少，这一特性对后续的纯化和去溶剂步骤可能会有帮助。BEH130 C_{18}则极适于中性/碱性pH环境下的制备分离，因其在此类条件下具有更长更高的温度稳定性。最后，CSH130 C_{18}和BEH130 C_{18}还各自表现出独特选择性，成为解决高难度杂质/目标肽分析问题的有效搭配。

比上述特性更引人注意的是，两种固定相分别在不同浓度的流动相添加剂下对制备级上样量的合成肽取得了最佳效果。使用优化的HOAc时取得的峰形最佳，比使用0.1%TFA效果更好。这意味着可以利用这些杂化颗粒C_{18}色谱柱简化纯化工艺，因为使用HOAc流动相可用更少的步骤即获得含有药用反离子的肽。

References

1. Cornish J, Callon KE, Lin CQ, Xiao CL, Mulvey TB, Cooper GJ, Reid IR. Trifluoroacetate, a contaminant in purified proteins, inhibits proliferation of osteoblasts and chondrocytes. *Am J Physiol.* 1999; 277 (5 Pt 1): E779-83.
2. Pini A, Lozzi L, Bernini A, Brunetti J, Falciani C, Scali S, Bindi S, Di Maggio T, Rossolini GM, Niccolai N, Bracci L. Efficacy and toxicity of the antimicrobial peptide M33 produced with different counter-ions. *Amino Acids.* 2012; 43(1): 467-73.
3. Reichert JP, Tartat A, Dunn MK. Development trends for peptide therapeutics: A comprehensive quantitative analysis of peptide therapeutics in clinical development. Peptide Therapeutics Foundation. 2010.
4. Fields GB, Carr SA, Marshak DR, Smith AJ, Stults JT, Williams LC, Williams KR, Young JD. In Techniques in Protein Chemistry IV. Hogue-Angeletti R, Ed. San Diego, 1993; 229-237.
5. Kent, SBH. Chemical Synthesis of Peptides and Proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 1988; (57): 957-989.
6. Roux S, Zekri E, Rousseau B, Paternostre M, Cintrat JC, Fay N. Elimination and exchange of trifluoroacetate counter-ion from cationic peptides: a critical evaluation of different approaches. *J Pept Sci.* 2008; 14 (3): 354-9.
7. Alon H, Butilca GM, Eidelman C, Elster S, Ivchenko A, Shusman S, Tovi A, Zaoui GA. Counterion Exchange Process for Peptides. Patent Pending, 2006; 2010.
8. Lauber MA, Koza SM, Fountain KJ. Peptide Mapping and Small Protein Separations with Charged Surface Hybrid (CSH) C_{18} and TFA-Free Mobile Phases. Waters Application Note 720004571en. 2013 January.
9. Lauber MA, Koza SM, Fountain KJ. Increasing Peak Capacity in Reversed-Phase Peptide Separations with Charged Surface Hybrid (CSH) C_{18} Columns. Waters Application Note 720004568en. 2013 January.
10. Gritti F, Guiochon G. Adsorption behavior of the three species of the biprotic peptide Phe-Ala onto an end-capped C_{18}-bonded organic/inorganic hybrid stationary phase. *Anal Chem.* 2009; 81(24): 9871-84.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters、ACQUITY UPLC、Xevo、MassLynx和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。CSH、XSelect、XBridge、MassPREP和Q-Tof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 4 月 720004674ZH AG-PDF

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 6555
成都：028 - 6554 5999

沃特斯中国有限公司
香港：852 - 2964 1800

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