

利用 HILIC 和反相色谱法分析促红细胞生成素糖肽和糖型

应用简报

生物制药

作者

Alex Zhu, James Martosella, 及
Phu T Duong
安捷伦科技公司

前言

肽图分析是一种综合表征蛋白生物治疗药物的重要技术。通常采用反相 UHPLC/HPLC 法进行分析，但是如果消化物中含有亲水性多肽，例如糖肽，则会丢失一些重要信息。本应用简报报导了将 Agilent ZORBAX 快速高分离度 300-HILIC 1.8 μm LC 色谱柱与飞行时间质谱 (TOF MS) 联用，可实现糖蛋白红细胞生成素 (EPO，一种控制红细胞生成的糖蛋白激素) 消化物的肽图分析。利用 HILIC (亲水作用色谱) 流动相中的高有机溶剂体系，可在 HILIC 色谱柱上实现糖肽的有效溶解、保留及分离。本应用简报通过比较分离效果、序列覆盖率以及反相和 HILIC 数据，证实了 HILIC 是 RPLC/MS 多肽分析的一种正交、互补的方法。



Agilent Technologies

实验部分

样品制备

胰蛋白酶消化后的 EPO 糖肽样品购自 Bio Creative 公司（纽约州雪莉）；将 100 μ L 样品 (2 mg/mL) 分别与 100 μ L HILIC 或 RP 洗脱液 A 溶剂适当混合。

操作条件

实验在 UHPLC/TOF 系统上进行，该系统包括 Agilent 1290 Infinity LC 系统，以及配有双 ESI 源（正模式）的精确质量 6224 TOF LC/MS。采用不同的 HILIC 和反相条件，对胰蛋白酶消化 EPO 蛋白后所得的多肽进行分离。

HILIC 条件

色谱柱：Agilent ZORBAX 快速高分离度 300-HILIC，
2.1 \times 100 mm，1.8 μ m 粒径色谱柱（部件号
858750-901）

洗脱液：A，95% 乙腈 + 5% 水；B，50 mM 甲酸铵，
pH 4.0

流速：0.4 mL/min

梯度：	时间 (min)	% B
	0	0
	15	100
	15.1	0
	20	0

温度：55 $^{\circ}$ C

反相条件

色谱柱：AdvanceBio Peptide Mapping 色谱柱
2.1 \times 250 mm，2.7 μ m（部件号 653750-902）

洗脱液：A，100% 水，0.1% 甲酸；
B，100% 乙腈，0.1% 甲酸；

流速：0.4 mL/min

梯度：	时间 (min)	% B
	0	3
	3	3
	33	45
	38	60

温度：55 $^{\circ}$ C

质谱条件

气体温度：350 $^{\circ}$ C

气体流速：10 L/min

雾化器：45 psi

毛细管电压：3,500 V

裂解电压：170 V

扫描速率：2 spec/s

质量数范围：400 至 3,200 m/z

结果与讨论

反相和亲水作用色谱中多肽的洗脱顺序是正交的。在反相分离中，多肽洗脱以疏水性的增加为顺序，疏水性最小的最先被洗脱，但是在亲水作用色谱中，疏水性最小的多肽会最大限度地保留在色谱柱中。因此，两者的洗脱顺序相反。与反相色谱柱相比，采用 HILIC 色谱柱分析由酶消化蛋白质所得的肽段，有望增加亲水性多肽（包括糖肽）的保留性和分离度。因此，HILIC 可用于鉴定在反相柱中无保留和未分离的肽段。

生物治疗性蛋白 EPO 是一种小分子蛋白质，分子量约为 34,000 Da。已知其糖基化程度较高，因此，胰蛋白酶消化物中应含有一系列多肽，包括小分子亲水性糖肽。

图 1 比较了 EPO 糖肽经不同色谱柱分离的质谱图，分别采用 ZORBAX RRHD 300-HILIC 和 AdvanceBio Peptide Mapping 色谱柱。

利用 Agilent MassHunter 分子特征提取软件提取 HILIC/MS 结果，然后与消化后的 EPO 蛋白序列进行匹配，结果显示序列覆盖率为 100%（图 1 A）。注意分离过程只需不到 15 分钟。使用 ZORBAX RRHD 300-HILIC 色谱柱可鉴定出约 43 种独特的糖肽。

采用反相 AdvanceBio Peptide Mapping 色谱柱对同样品进行分析。提取化合物并与 EPO 消化后多肽进行匹配，序列覆盖率为 100%（图 1 B）。这种方法可鉴定出约 36 种独特的糖肽。

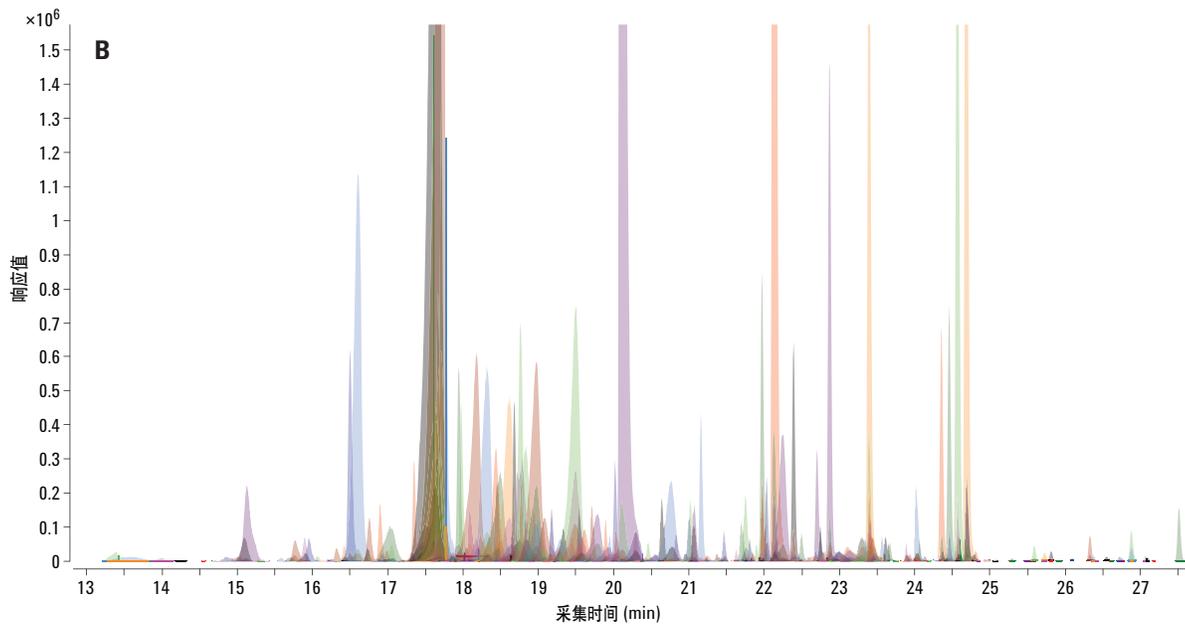
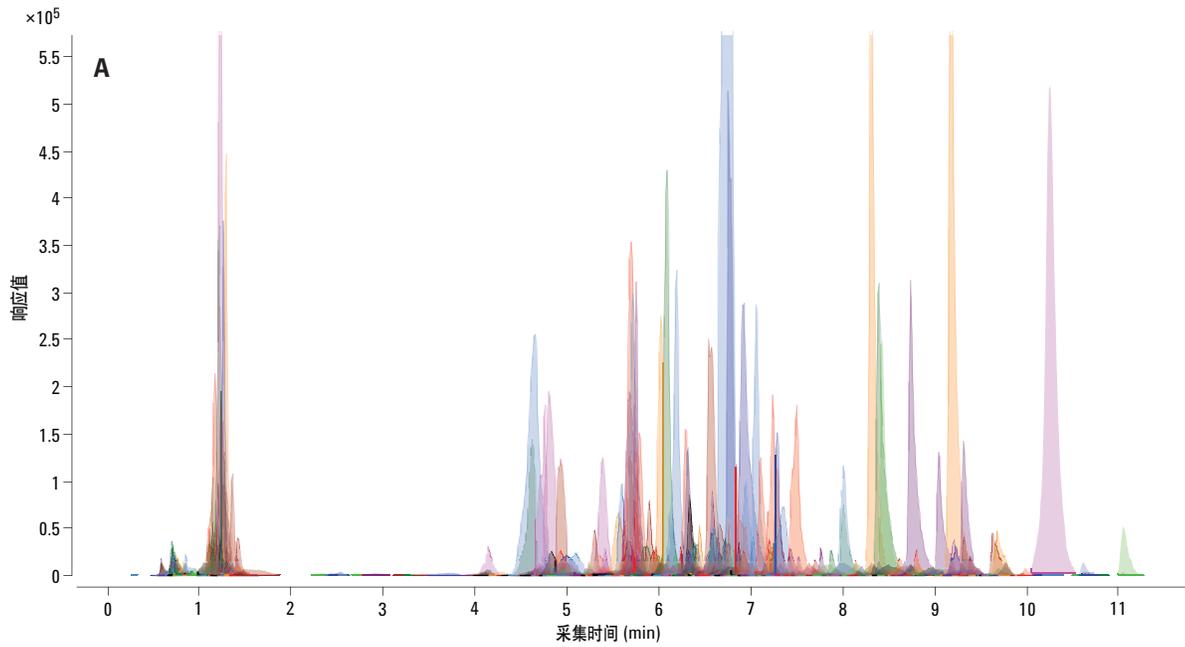


图 1. (A) Agilent ZORBAX RRHD 300-HILIC 色谱柱, (B) Agilent AdvanceBio Peptide Mapping 色谱柱匹配的 EPO 消化多肽的提取化合物色谱图, 由 Agilent MassHunter 分子特征提取软件所得。

HILIC 和 RP 均可鉴定的多肽

比较数据可以发现，有 8 个多肽在两种色谱柱方法中均存在。这说明这些糖肽对这两种模式的色谱均有亲和性（表 1）。一般而言，HILIC 谱图中的洗脱顺序与 RP 谱图中的相反，但也并非总如此。洗脱顺序由亲水性和电荷数决定。因此，HILIC 中的洗脱顺序并不一定是从 8 到 1（图 2）。

图 2 中的上图和下图显示 P1 到 P4 可在 ZORBAX RRHD 300-HILIC 色谱柱中得到更好地分离。它们在反相色谱柱中共流出。

图 1. 两种色谱柱中共同鉴定的多肽

多肽	序列	疏水性	RP 保留时间 (min)	HILIC 保留时间 (min)
P1	APPR	1.83	2.103	10.259
P2	GKLK	3.84	2.118	8.437
P3	ALGAQK	4.57	2.119	9.181
P4	AVSGLR	9.15	2.13	8.316
P5	YLLEAK	19.64	15.698	8.014
P6	VYSNFLRGK	23.14	18.742	6.583
P7	SLTLLR	24.79	20.109	7.492
P8	VNFYAWKR	27.64	22.87	0.587

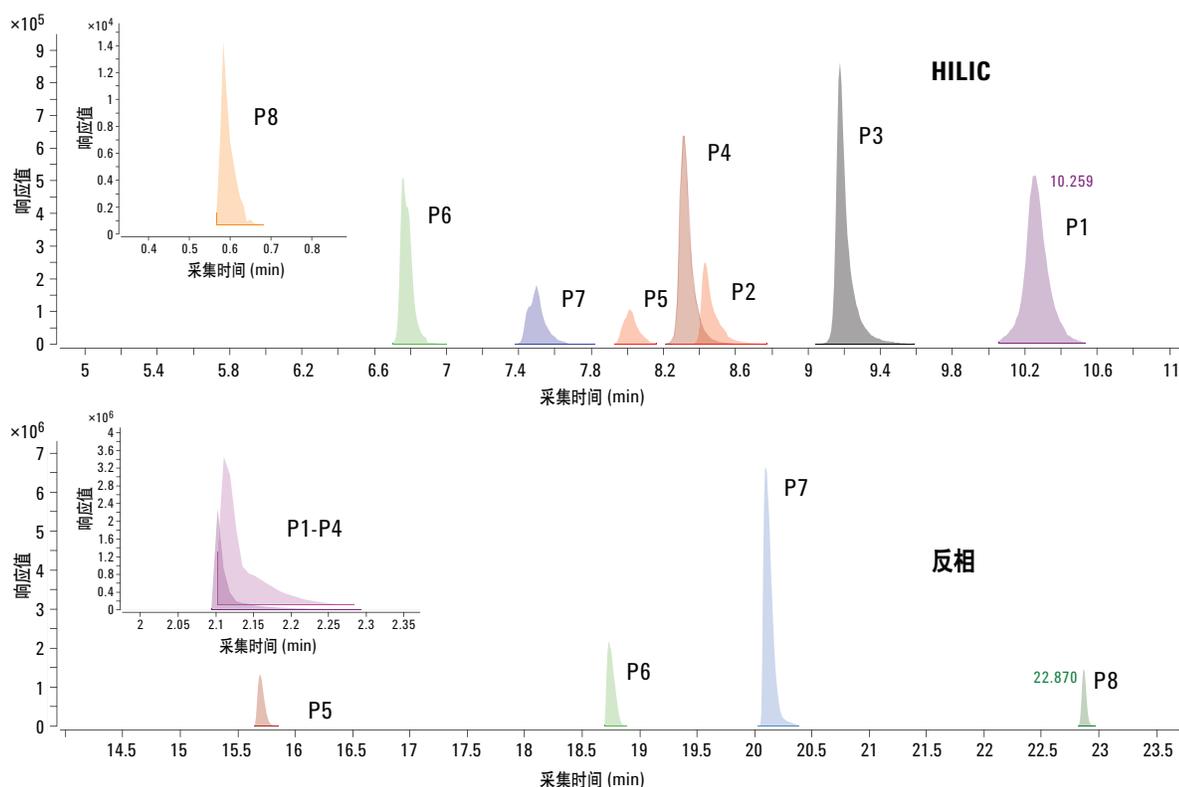


图 2. 比较两种色谱柱中共同鉴定糖肽的保留时间和分离度

只能由 HILIC 鉴定的多肽

一般而言，在反相条件下，与疏水性糖肽相比，亲水性糖肽无保留或很早被洗脱。因此，采用反相色谱柱分离亲水性糖肽并不是最优的方法，且会给定量带来困难。此外，一些疏水性很强的糖肽在水相条件下很难溶解，而 RPLC/MS 分析常使用水相作为溶剂。这还会导致灵敏度的降低。因此，当使用高有机溶剂的流动相，且样品与高比例有机溶剂混合时，一些疏水性很强的糖肽可在 HILIC 色谱柱中实现溶解和更好地分离。表 2 中的数据显示了只能使用 HILIC/MS 方法鉴定的亲水性糖肽。另外，也有一些疏水性多肽只能使用 HILIC/MS 方法进行鉴定。

结论

ZORBAX 快速高分离度 300-HILIC 色谱柱的应用表明这种色谱柱可实现亲水性糖肽的分离和鉴定，而由于这些糖肽的疏水特性，反相色谱柱无法实现分离。因此，将该型色谱柱与 MS 联用可作为 RPLC/MS 的一种正交互补方法，可为亲水性糖肽提供更好的保留，以及为蛋白表征提供更好的序列覆盖率。

表 2. 只能由 HILIC 色谱柱鉴定的糖肽

序列	疏水性	保留时间 (min)	高度
VER	6.24	6.747	1396603
LKLYTGEACRTGDR	18.13	9.175	2192
ALGAQKEAISPDAASAAPLRITADTFR	37.09	11.059	5263
APPRLICDSRVLER	27.7	6.493	1485
GOALLVNSSQPWEPLQLHVDK	40.19	4.941	1995
KLFRVYSNFLR	36.51	4.629	3745
LFRVYSNFLR	35.24	4.945	1972

更多信息

这些数据仅代表典型结果。有关我们的产品和服务的详细信息，
请访问我们的网站：

www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013

中国印制

2013年4月17日

5991-2085CHCN



Agilent Technologies