

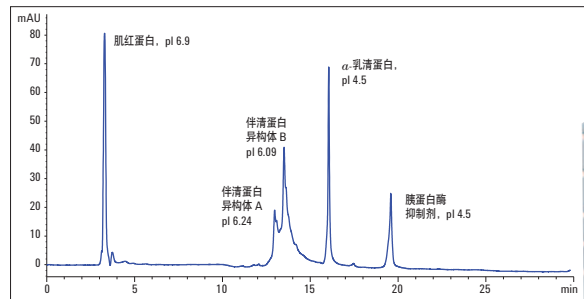
## 性能验证

# 采用阴离子交换色谱法对蛋白质进行分析

Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统用于高盐缓冲液应用领域的可行性

## 应用简报

### 化学和药物分析



## 作者

Sonja Schneider  
安捷伦科技有限公司  
德国瓦尔德布隆

## 摘要

在本应用简报中，我们展示了利用阴离子交换色谱法，在使用四种不同的高盐洗脱缓冲液（最大浓度为 2 M）进行线性和阶梯梯度洗脱条件下，对四种蛋白质进行分离的相关信息。Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统的流路设计中未采用铁/钢质材料，因此可耐受生物分析和生物纯化应用中的严苛条件，从而保持其出色的 UHPLC 性能。使用四种盐（氯化钠 (2 M)、氯化钾 (1 M)、乙酸钠 (1 M) 和四甲基氯化铵 (1 M)）进行线性梯度洗脱时，均可获得极高的保留时间和峰面积精确度。此外，使用 2 M 氯化钠作为洗脱缓冲液时，结果表明保留时间和分离度可保持稳定达 48 小时以上。

在此类条件下，采用不锈钢材质的液相色谱系统会面临一些问题，例如盐引起的腐蚀，因此需要执行特殊的、繁杂的清洗步骤。使用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统则可以完全避免此类清洗步骤，从而提高生物分析或生物纯化应用的通量和效率。



Agilent Technologies

## 前言

在诸如离子交换 (IEX) 或体积排阻色谱 (SEC) 法中使用的高盐流动相, 对于不锈钢材质的液相色谱系统而言是一项严峻挑战。由于长期使用含盐缓冲液所引发的腐蚀效应, 导致此类液相色谱系统存在损坏的风险。其结果就是需要执行繁杂的清洗步骤。因此, 强烈建议使用不含铁的系统, 避免受到高盐浓度的影响。

Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统在样品流路中不含金属成分。自动进样器、柱温箱和检测器流路中所有的毛细管和接头均完全是不含金属的, 因此, 生物分子只与陶瓷或 PEEK 管线接触。这使得用户可以使用高盐含量的缓冲液。此外, 相对于 Agilent 1260 Infinity 液相色谱系统而言, 该系统可在较宽的 pH 范围 (1-13, 短时间分析可以高达 14) 内保持稳定<sup>1</sup>。

在本应用简报中, 以阴离子交换色谱 (AEX) 为例, 论证了将 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统用于高盐应用的可行性。利用阴离子交换色谱 (AEX) 对四种蛋白质混合物进行分离, 其中使用了四种不同的洗脱盐: 氯化钠 (2 M NaCl)、氯化钾 (1 M KCl)、乙酸钠 (1 M CH<sub>3</sub>COONa) 和四甲基氯化铵 (1 M [(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>N]Cl)。在线性和阶梯梯度条件下, 分别分析了保留时间和峰面积的精确度。此外, 还使用 2 M NaCl 洗脱缓冲液考察了保留时间和峰面积的长时间稳定性 (48 小时)。

## 实验部分

Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统, 包括以下模块:

- Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元泵 (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 高效生物惰性自动进样器 (G5667A)
- Agilent 1260 Infinity DAD VL (G1315D, 配置生物惰性标准流通池, 10 mm)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)

### 色谱柱

Agilent Bio WAX, NP5, 4.6 × 250 mm, PK 色谱柱

### 软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation, LC 和 LC & MS 系统版, 修订版 C.01.02 [14]

### 溶剂

缓冲液 A: 20 mM Tris, pH 7.6

缓冲液 B: 20 mM Tris, pH 7.6 +

- 2 M NaCl
- 1 M KCl
- 1 M CH<sub>3</sub>COONa
- 1 M [(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>N]Cl

所有试剂均为液相色谱级。新制超纯水产自配置 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。Tris 购自 Fluka 公司 (西格玛奥德里奇, 美国圣路易斯)。NaCl 购自 VWR 公司 (美国宾夕法尼亚州拉德诺)。[(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>N]Cl 和 KCl 购自 Merck KGaA 公司 (德国达姆斯塔特)。CH<sub>3</sub>COONa 购自 J.T. Baker 公司 (VWR, 美国宾夕法尼亚州拉德诺)。

## 色谱条件

	线性梯度	阶梯梯度
梯度 1 M	5 min – 100% A	5 min – 100% A
	20 min – 70% B	5.01 min – 20% B
	25 min – 100% B	10 min – 20% B
		10.01 min – 40% B
		15 min – 40% B
		15.01 min – 60% B
		20 min – 60% B
	20.01 min – 100% B	
梯度 2 M	5 min – 100% A	5 min – 100% A
	20 min – 35% B	5.01 min – 10% B
	25 min – 50% B	10 min – 10% B
	25.01 min – 100% B	10.01 min – 20% B
		15 min – 20% B
		15.01 min – 30% B
	20 min – 30% B	
	20.01 min – 100% B	
停止时间	30 min	25 min
后运行时间	20 min	20 min
温度	25 °C	
流速	0.5 mL/min	
进样体积	5 µL	
DAD	280 nm	
峰宽	0.025 min (0.5 s 响应时间) (10 Hz)	

## 柱塞杆密封垫清洗液

- 100% 超纯水
- 每 1.5 min 清洗 0.3 min

## 蛋白质

- 取自马骨骼肌的肌红蛋白, 17053 Da, pI 6.9 (1 mg/mL)
- 取自鸡蛋清的伴清蛋白, 76000 Da, pI 6.24 及 6.092 (2 mg/mL)
- 取自牛奶的  $\alpha$ -乳清蛋白, 14175 Da, pI 4.5 (1 mg/mL)
- 取自大豆的胰蛋白酶抑制剂, 20100 Da, pI 4.5 (1 mg/mL)

所有蛋白质均购自西格玛奥德里奇公司 (美国圣路易斯)。

## 结果和讨论

### 线性梯度

#### 阴离子交换色谱, 使用 2 M NaCl

利用 AEX 在线性梯度条件下, 对四种蛋白质的混合物进行了分离, 缓冲液 B 中使用 2 M NaCl 作为洗脱盐。图 1 中所示为线性梯度条件下蛋白质的分离色谱图。蛋白质的洗脱顺序主要与其等电点 (pI) 有关。其中  $\alpha$ -乳清蛋白及胰蛋白酶抑制剂的分离与蛋白表面的电荷变化有关, 其未必与总净电荷相等。七次运行后测定其保留时间和峰面积相对标准偏差, 即为精确度。伴清蛋白中存在不同的异构体, 具体取决于其结合铁的量<sup>2</sup>。因此, 选取五个色谱峰对保留时间精确度进行评估。相反的是, 伴清蛋白色谱峰不能用于计算峰面积 RSD, 原因在于其异构体未能实现基线分离。所有五个色谱峰的保留时间 RSD 均小于 0.09%。所评估蛋白质的峰面积 RSD 均小于 1.1%。

### 阴离子交换色谱，使用不同类型的盐

分离度和选择性受洗脱离子，即盐类型改变的影响<sup>3</sup>。根据所分析蛋白质的不同，盐可能会对蛋白质洗脱产生不同的色谱影响。为了找到针对具体应用的最佳洗脱离子，可以对多种盐进行测试。如果在一个序列中需要测试多于三种盐类型，那么在方法开发过程中最好选用溶剂选择阀。在本应用简报中，在洗脱缓冲液中评估了四种盐。图 2、3 和 4 中所示为线性梯度条件下蛋白质的分离结果，分别采用 1 M KCl (图 2)、1 M CH<sub>3</sub>COONa (图 3) 和 1 M [(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>N]Cl (图 4) 作为洗脱盐。并计算了保留时间和峰面积的 RSD，其中 n = 7。

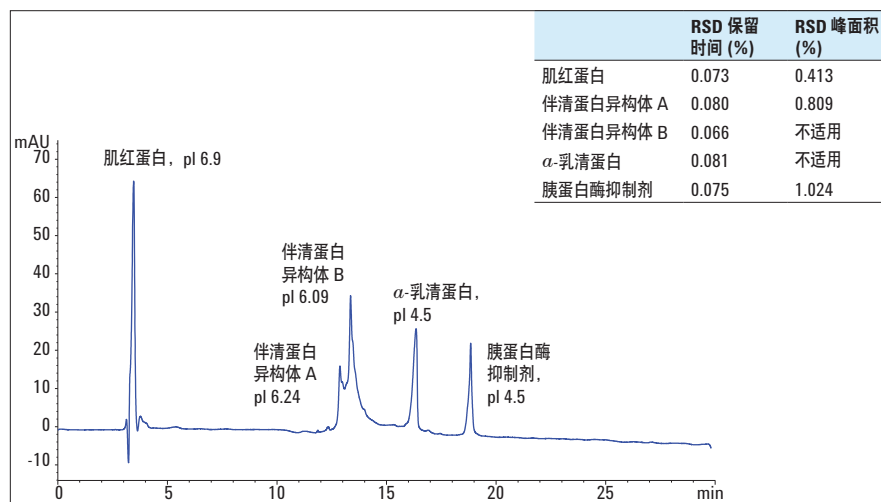


图 1 线性梯度条件下蛋白质的 AEX 分离色谱图，采用 2 M NaCl 作为洗脱盐

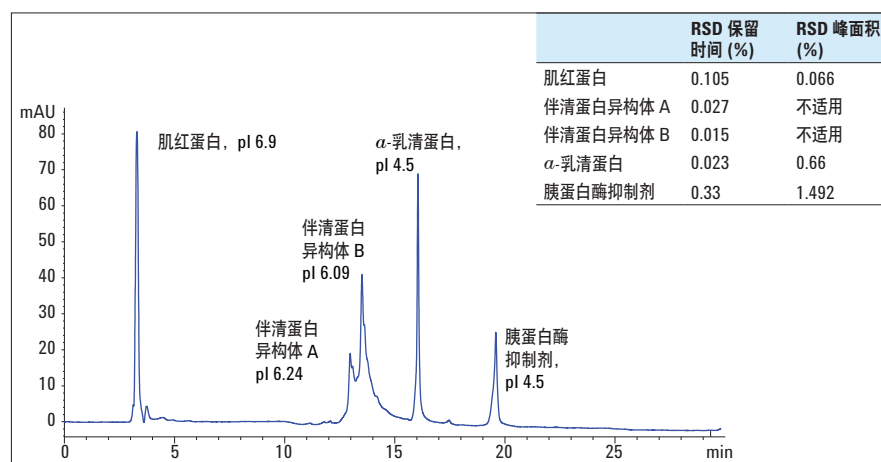


图 2 线性梯度条件下蛋白质的 AEX 分离色谱图，采用 1 M KCl 作为洗脱盐

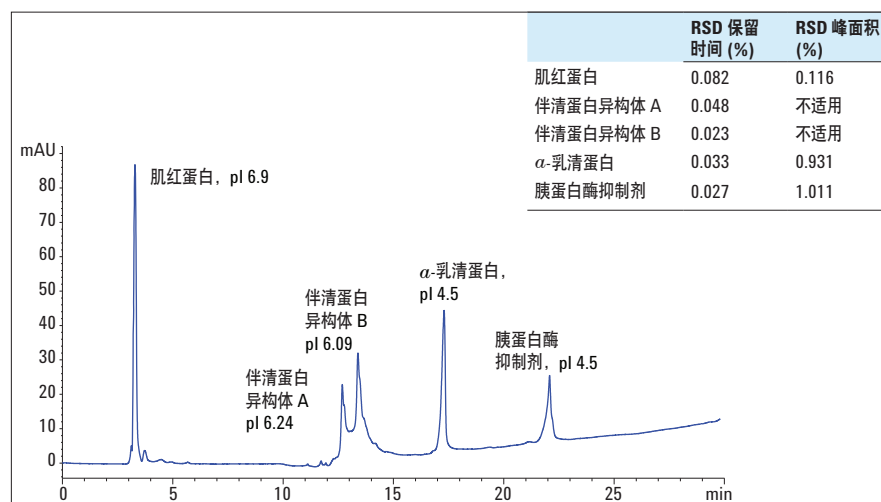


图 3 线性梯度条件下蛋白质的 AEX 分离色谱图，采用 1 M CH<sub>3</sub>COONa 作为洗脱盐

实验证实保留时间、分离度以及峰形和强度的变化与所使用的洗脱盐有关。特别是，伴清蛋白 A 和 B 的分离度在使用不同盐类型时也不同，其中使用 1 M CH<sub>3</sub>COONa 时的分离度最佳。考虑到上述所有因素（最佳分离度、最佳峰形和最高强度），且使基线最为平直，则 1 M KCl 是分离四种蛋白质的最佳选择。

### 阶梯梯度

使用阶梯梯度（特别是只有一种蛋白质需要分离时）可以加速分离过程，从而降低缓冲液的消耗量。图 5 和 6 中所示为阶梯梯度下的蛋白质分离，分别使用了 1 M KCl（图 5）和 1 M CH<sub>3</sub>COONa（图 6）。并计算了保留时间和峰面积的 RSD，其中 n = 7。

由于 AEX 色谱柱所需的平衡时间较长，与线性梯度相比，阶梯梯度的保留时间和峰面积精密度略差。此外，在梯度阶梯的时间点可观察到负峰，同样是由于平衡时间不足引起的。

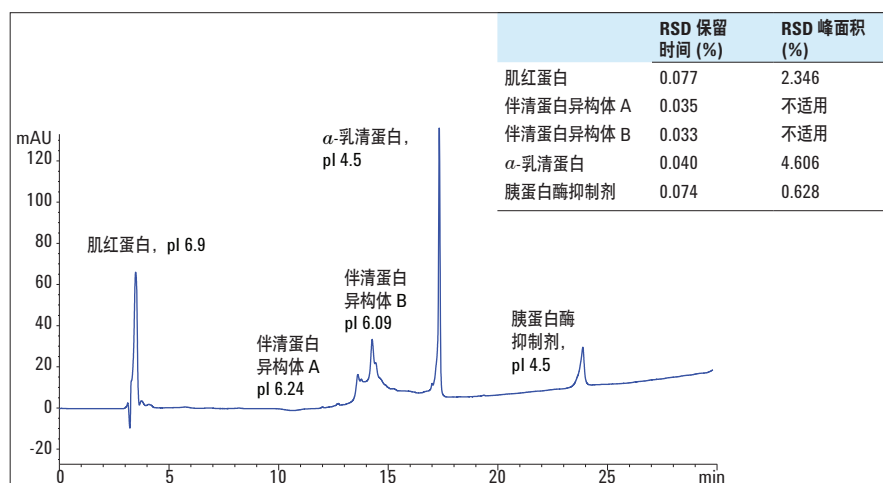


图 4 线性梯度条件下蛋白质的 AEX 分离色谱图，采用 1 M [(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>N]Cl 作为洗脱盐

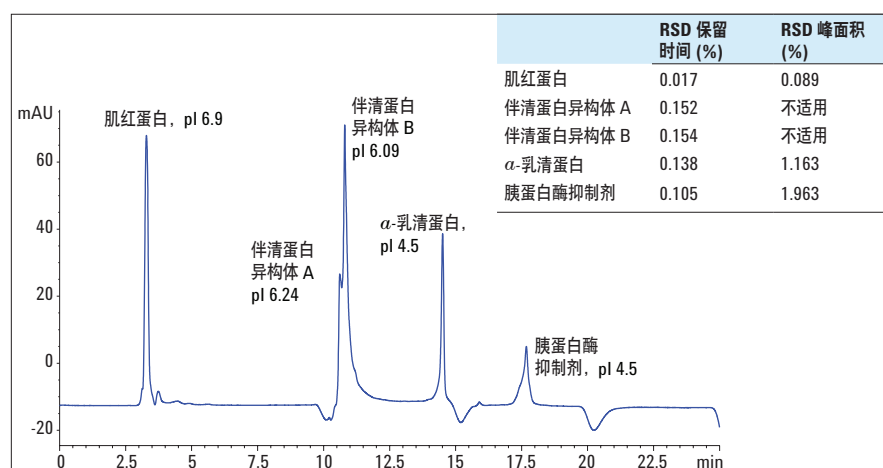


图 5 阶梯梯度条件下蛋白质的 AEX 分离色谱图，采用 1 M KCl 作为洗脱盐

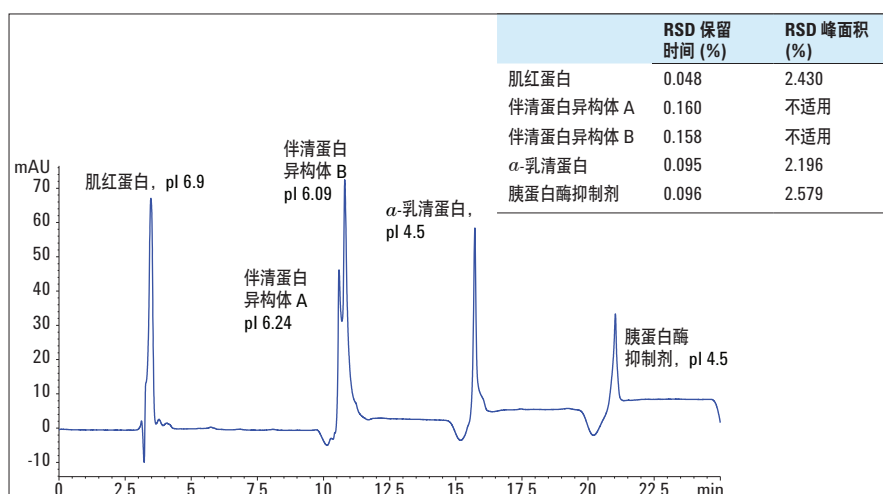


图 6 阶梯梯度条件下蛋白质的 AEX 分离色谱图，采用 1 M CH<sub>3</sub>COONa 作为洗脱盐

为了证明在使用高盐缓冲液条件下保留时间和分离度的长期稳定性，以 2 M NaCl 作为洗脱盐对蛋白质分离的情况（线性梯度）进行了长达 48 小时的监测，请参见图 7 和 8。结果证实在整个时间段内，保留时间和分离度均保持稳定。在所有测试中，柱塞杆密封垫清洗液（含有 100% 水）每 1.5 分钟启用一次，清洗 0.3 分钟，以去除泵柱塞杆上的盐。

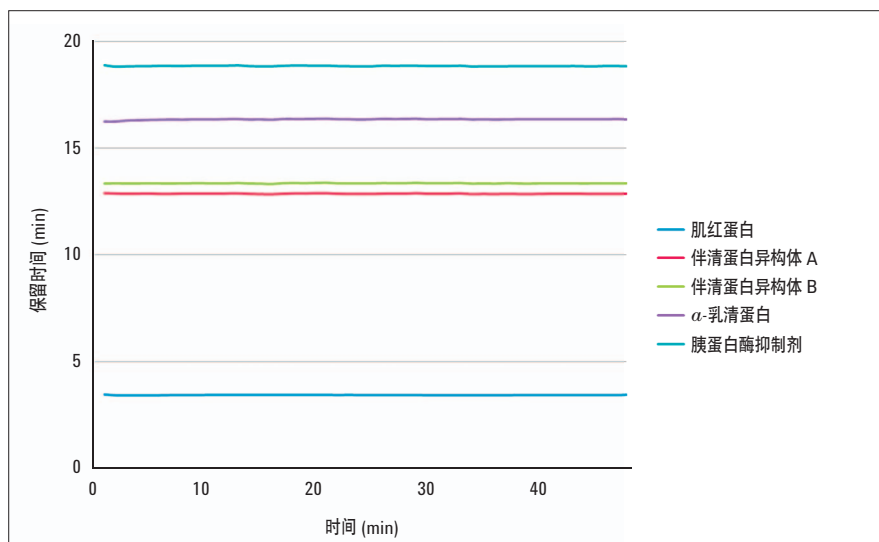


图 7  
使用 2 M NaCl 时超过 48 小时的保留时间稳定性

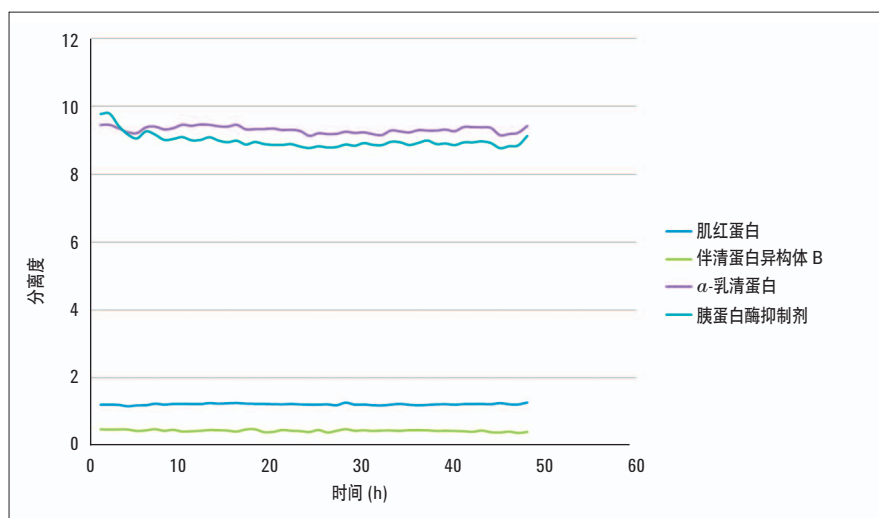


图 8  
使用 2 M NaCl 时超过 48 小时的分离度稳定性

## 结论

本应用简报论证了 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统是高盐应用的理想选择。通过采用阴离子交换色谱法对四种不同蛋白质进行分离，使用四种不同的洗脱离子/盐类型在线性梯度条件下均可获得较高的精确度。根据所使用的盐类型，色谱图中的保留时间、分离度、峰形和强度随之变化。因此，我们建议测试不同的盐类型，找到最适宜的一种以实现最佳的样品分离。如果需要测试多于三种盐类型，那么在方法开发过程中最好选用溶剂选择阀。

当使用 2 M NaCl 作为蛋白质分析的洗脱盐时，结果证实保留时间和分离度可在超过 48 小时的时间内保持稳定。

采用阶梯梯度可缩短分离时间，并降低缓冲液消耗。但是，需要考虑的是色谱柱需要更长的平衡时间。因此，强烈建议在每次分析之间留有足够的平衡时间，不论使用的是线性还是阶梯梯度。另外一个要点是定期（例如，每 1.5 分钟清洗 0.3 分钟）进行密封垫清洗（含有 100% 水），以去除泵柱塞杆上的盐。

在高盐应用中，Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统和 Agilent Bio WAX, NP5, 4.6 x 250 mm, PK 色谱柱均表现出了极高的保留时间和分离度稳定性。

## 参考文献

1. 分析高 pH 流动相中的化合物——Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统用于普通高 pH 应用的可行性。安捷伦出版物 5990-9353CHCN, 2011。
2. Mark P. Richards, Tung-Liang Huang (1997). Metalloprotein analysis by capillary isoelectric focusing. *Journal of Chromatography B*, 690, 43-54.
3. Jan-Christer Janson & Lars Rydén (1998). *Protein purification: principles, high-resolution methods, and applications*. John Wiley & Sons.

**[www.agilent.com/chem/  
bio-inert](http://www.agilent.com/chem/bio-inert)**

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012  
2012年2月1日，中国出版  
出版号 5990-9614CHCN



**Agilent Technologies**