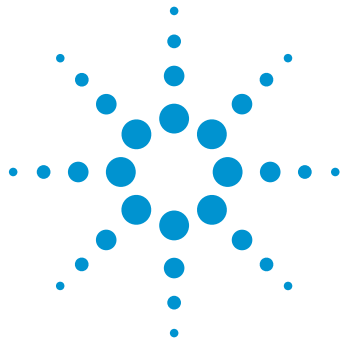




Синергия КЭ-МС и ЖХ-МС

Взаимодополняющие решения для картирования пептидов

Техническая информация

Автор

Суреш Бабу С. В. (Suresh Babu CV),
Agilent Technologies, Inc.
Бангалор, Индия

Введение

Картирование пептидов повсеместно используется для идентификации или определения характеристик исследуемого белка. Контроль картирования пептидов — критически важная часть методических указаний по определению характеристик биофармацевтических продуктов. Картирование пептидов является первым этапом контроля качества при разработке фармацевтических продуктов. Этот процесс включает химическую или ферментативную обработку белка с целью получения пептидных фрагментов для последующего разделения и обнаружения средствами масс-спектрометрии (МС). Для изучения картирования пептидов в сочетании с МС необходимо использовать как хроматографические методы, так и методы электрофоретического разделения. Хотя для картирования пептидов наиболее часто используется ЖХ-МС, КЭ-МС представляет собой альтернативу, которая предлагает дополнительную информацию о разделении пептидов и различной селективности. В этом документе рассматривается использование обоих методов (КЭ-МС и ЖХ-МС) для контроля разделения пептидов и обеспечения ортогональных решений.



Agilent Technologies

Экспериментальная часть

КЭ-МС

КЭ-МС-анализ проводился с использованием системы КЭ Agilent 7100 и системы квадрупольно-времяпролетной ЖХ-МС Agilent 6520 Accurate-Mass, оснащенной электрораспылительным источником и ортогональной коаксиальной оболочкой границы раздела жидкостей (G1607B). Разделение и стабильность распыления были оптимизированы с помощью холостых буферных растворов и стандарта. Для поддержания высокой эффективности разделения при КЭ и обеспечения стабильного потока и условий распыления, существенных для ионизации электрораспылением, поддерживалась оболочечная граница раздела жидкостей КЭ-МС с низкой скоростью потока (4 мкл/мин). Параметры квадрупольно-времяпролетной системы оптимизировались автоматически с помощью программ настройки МС, а система МС была откалибрована с использованием смеси для настройки электроспрея.

ЖХ-МС

Для целей анализа ЖХ-МС система Agilent 1260 Infinity с интерфейсом для работы с ВЭЖХ-колонками, интегрированными в чип, была объединена с платформой квадрупольно-времяпролетной ЖХ-МС Agilent 6520 Accurate-Mass. Интерфейс ВЭЖХ и МС обеспечивает автоматическую загрузку чипа, доставку пробы и растворителя к чипу, переключение потоков под высоким давлением, а также автоматизированное и воспроизводимое позиционирование чипа относительно источника МС для точного измерения массы.

Табл. 1. Параметры КЭ-МС и ЖХ-МС

Условия КЭ	
КЭ	Agilent 7100 CE
Проба	Расщепленный БСА (бычий сывороточный альбумин)
Инжекция	Разное время инъекции при 50 мбар
Капилляры	Спеченный силикагель без покрытия, общая длина 60 см, 65 см, 85 см, внутренний диаметр 50 мкм
Буфер	Уксусная кислота, 10 ммоль
Напряжение	27 кВ (пилообразное 0,3 мин.)
Температура	20 °C
Подготовка	Промывка буфером в течение 15 минут при давлении 1 бар
Условия МС	
МС	Квадрупольно-времяпролетная ЖХ-МС Agilent 6520 Accurate-Mass
Режим ионизации	Электроспрей
Режим сбора данных	МС (диапазон массы 100 – 3 200 m/z)
Жидкость оболочки	0,5%-ный раствор уксусной кислоты в 50%-ном метаноле, 4 мкл/мин
Расход осушающего газа	5 л/мин
Распылитель	0,69 бар
Температура осушающего газа	175 °C
Фрагментор	175 В
Уколп.	3 500 В
Условия ЖХ	
ЖХ	Система нанопотоковой ЖХ Agilent 1260 Infinity Nanoflow и система капиллярной ЖХ 1260 Infinity Capillary
Проба	Расщепленный БСА
Инжекция	2 мкл
Чиповая ВЭЖХ	G4240-62005, 5 мкм, Agilent ZORBAX 300SB-C18, обогатительная колонка на 40 нл, аналитическая колонка 75 мкм × 43 мм
Расход	3 мкл/мин (манжетный насос), 0,6 мкл/мин (нанонасос)
Растворители	А) 0,1%-ный раствор муравьиной кислоты в воде; В) 90%-ный раствор ацетонитрила в воде с 0,1%-ным раствором муравьиной кислоты
Градиент	Время (мин) В (%)
	Исходн. 3
	30 50
	32 95
	34 95
	34,10 3
Условия МС	
МС	Квадрупольно-времяпролетная ЖХ-МС Agilent 6540 Accurate-Mass
Режим ионизации	Электроспрей
Режим сбора данных	МС (диапазон массы 100 – 3 200 m/z)
Расход осушающего газа	5 л/мин
Распылитель	0,69 бар
Температура осушающего газа	325 °C
Фрагментор	175 В
Уколп.	3 500 В

Результаты и обсуждение

Капиллярный электрофорез (КЭ) представляет собой разделение в жидкой среде под действием электричества, при котором аналиты разделяются в соответствии с различной скоростью их перемещения в электрическом поле. Скорость отдельного соединения зависит от заряда и размера аналита. Жидкостная хроматография, напротив, представляет собой осуществляемое с помощью давления разделение в жидкой среде, при котором аналиты разделяются в зависимости от кинетики адсорбции и десорбции. В этом документе исследование картирования пептидов бычьего сывороточного альбумина (БСА) рассматривается в качестве примера для понимания ортогональности методов КЭ-МС и ЖХ-МС. Кроме того, была выбрана система ЖХ/МС с интерфейсом для работы с ВЭЖХ-колонок, интегрированными в чип, поскольку она создает скорость потока на источник электрораспылителя порядка нанолитров, аналогичную потоку, создаваемому системой КЭ-МС. ЖХ-МС в нанодиапазоне — один из наиболее чувствительных методов ЖХ, обеспечивающий более достоверное сравнение.

На рисунке 1 представлено пептидное картирование БСА средствами КЭ-МС и ЖХ-МС. Теоретический список масс пептидов, образующихся после гидролиза на 80% совпал с экспериментально определенными массами; покрытие последовательности составило 81% (с погрешностью определения массы 5 ppm) для циклов КЭ-МС и ЖХ-МС соответственно. Из общего числа идентифицированных пептидов (114) с помощью КЭ-МС было выявлено 37 уникальных пептидов, а с помощью ЖХ-МС — 33 уникальных пептида. С помощью каждого метода было выявлено 44 идентичных пептида, что показывает сходство между модами распределения пептидов обоих методов разделения. Выявление отдельных пептидов трипсинового гидролизата демонстрирует взаимодополняющее значение методов КЭ-МС и ЖХ-МС.

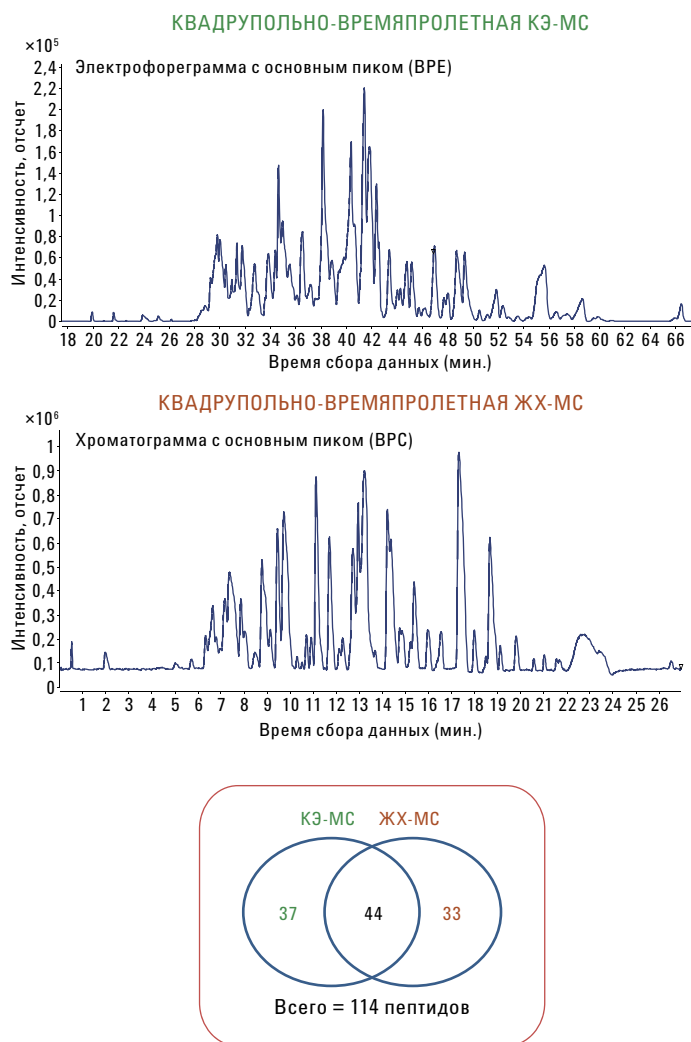


Рис. 1. Картирование пептидов с помощью КЭ-МС и ЖХ-МС.

С учетом разных механизмов разделения, используемых в каждом из методов, порядок элюции анализов в профиле КЭ-МС и в профиле ЖХ-МС будет различным. Порядки элюции определяются гидрофобностью и подвижностью. На рисунке 2 отражено изменение порядка элюции для одного и того же набора пептидов БСА. Для обоих методов причиной изменения порядка элюции является различная селективность, обусловленная различными физическими принципами разделения. В случае КЭ изменение селективности можно получать простым переключением на другой pH фонового электролита (запуск буфера). Однако в случае ЖХ для значительного изменения селективности требуется иная химическая природа наполнителя колонки и другой набор растворителей.

Обычно гидрофильные соединения плохо удерживаются и быстро элюируют при использовании обратнофазных материалов, таких как колонка C18. На рисунке 3 представлены результаты КЭ-МС и ЖХ-МС для двух гидрофильных пептидов. Пептид АТЕЕQLК с трудом удалось обнаружить с помощью ЖХ-МС, тогда как КЭ-МС дала более высокий уровень сигналов для всех представленных гидрофильных пептидов. КЭ-МС обеспечила также более четкую форму пика для пептида ТСВАДЕШАГСЕК.

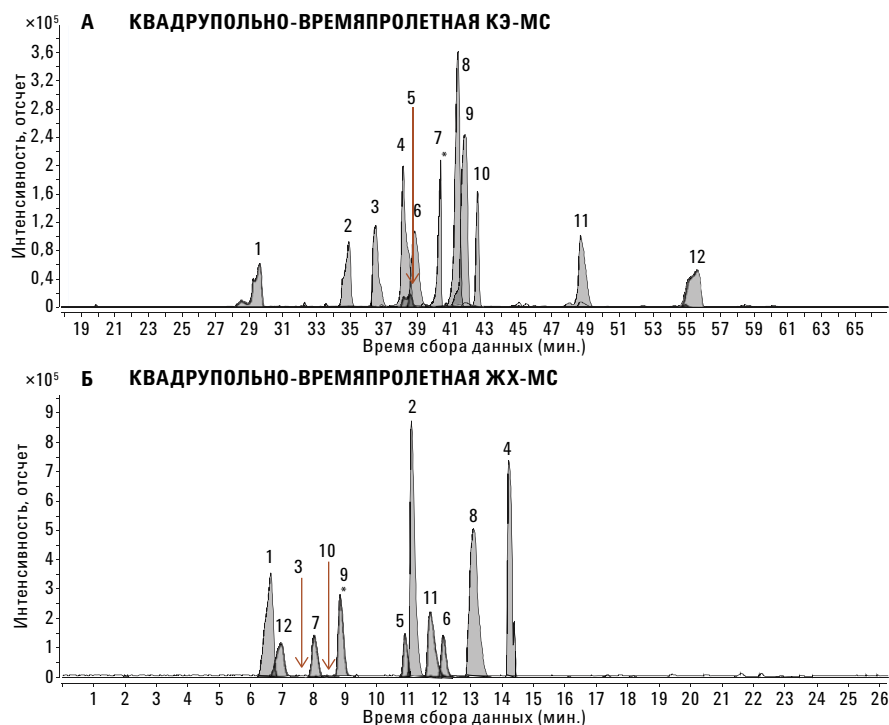


Рис. 2. Сравнение результатов разделения одинакового набора триптических пептидов БСА средствами квадрупльно-времяпролетной КЭ-МС (А) и квадрупльно-времяпролетной ЖХ-МС (Б). Пептиды: 1. LCVLHEK, 2. HLVDEPNLIK, 3. NYQEAK, 4. QTALVELLK, 5. YLYEIAR, 6. ECCHGDLLECADDR, 7. LVTDLTK, 8. LVNELTEFAK, 9. AEFVEVTK, 10. LCVLHEKTPVSEK, 11. LVVSTQTA, 12. DDSPDLPK.

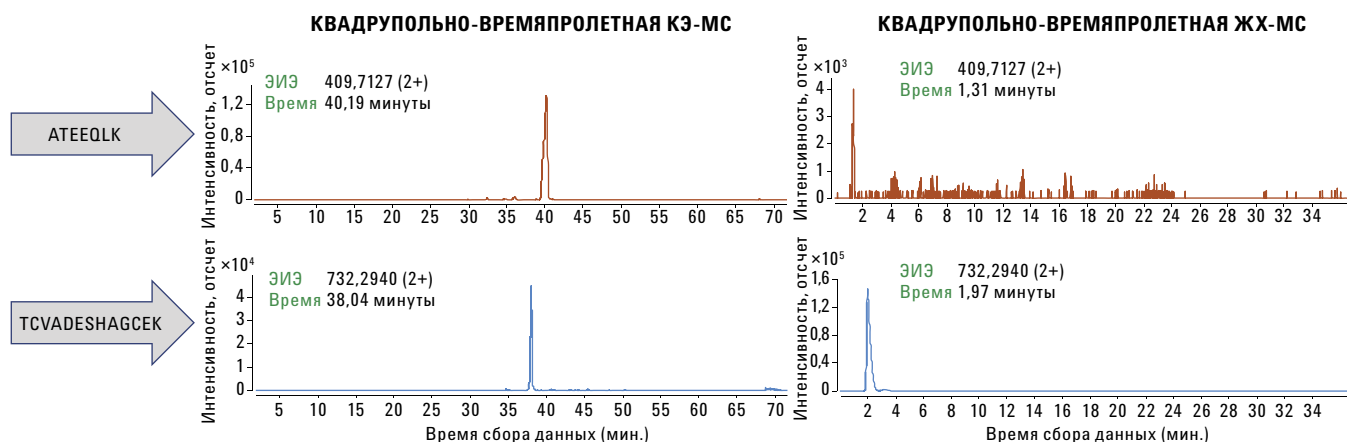


Рис. 3. Сравнение поведения гидрофильных пептидов при КЭ-МС и ЖХ-МС.

Дальнейший анализ распределения пептидов показывает, что пептиды с низким молекулярным весом и более короткой последовательностью аминокислот хорошо представлены КЭ-МС, но ЖХ-МС охватывает широкий диапазон идентификации длины пептидов. Кроме того, кислые пептиды хорошо ведут себя в условиях КЭ-МС.

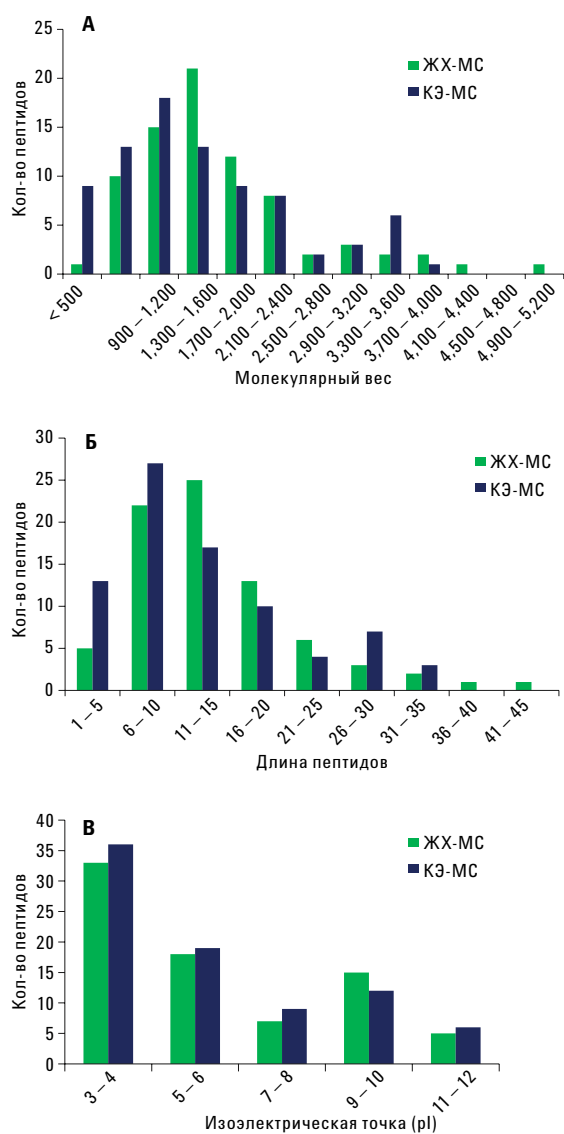


Рис. 4. Сравнение распределений пептидов при КЭ-МС и ЖХ-МС. (А) Молекулярный вес; (Б) Длина пептида; (В) Изоэлектрическая точка.

Заключение

Сравнительное исследование, представленное в этом документе, демонстрирует преимущества обоих методов КЭ-МС и ЖХ-МС (таблица 2). Как мы видим, оба метода предоставляют дополнительную информацию и, следовательно, являются ортогональными и взаимодополняющими подходами к разделению пептидов.

Табл. 2. Преимущества методов КЭ-МС и ЖХ-МС.

	Квадрупольно-времяпролетная КЭ-МС (система квадрупольно-времяпролетной ЖХ-МС Agilent 6520 Accurate-Mass)	Квадрупольно-времяпролетная ЖХ-МС (система квадрупольно-времяпролетной ЖХ-МС Chipcube-Agilent 6540 Accurate-Mass)
Введенная проба	44 нл (0,34 пмоль)	2 мкл (15 пмоль)
Окно элюции пептидов	30 мин.	16 мин.
Покрывание последовательности	80%	81%
Всего выявленных пептидов	82	78
Кол-во отчетливо выявленных пептидов	37	33
Селективность и разрешение	Изменение порядка элюции пептидов демонстрирует взаимодополняемое значение двух методов	
Селективность	КЭ-МС показывает наилучшее разделение/ионизацию гидрофильных пептидов	
Распределение пептидов	Представлены более короткие пептиды (1 – 5 аминокислот)	Короткие пептиды (1 – 5 аминокислот) представлены хуже, а также охвачен широкий диапазон длины пептидов
	Выявление пептидов, начиная с длины от трех аминокислот	Выявление пептидов, начиная с длины от четырех аминокислот
	Хорошо представлены пептиды с низким молекулярным весом (< 500 Да)	Пептиды с низким молекулярным весом (< 500 Да) представлены хуже
	Хорошо представлены кислые пептиды (pI 3 – 4)	

www.agilent.com/chem

Информация может быть изменена без предварительного уведомления.

© Agilent Technologies, Inc., 2013.
Опубликовано в США 1 сентября 2013 г.
5991-2583RU



Agilent Technologies