

提高肽谱分析的色谱性能

使用 Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 惰性色谱柱

作者

Jordy Hsiao,
Mahsan Miladi, Li Gu,
Stephen Sciuto, Guannan Li
和 Anne Blackwell
安捷伦科技有限公司

摘要

本研究重点介绍了 Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 惰性色谱柱在肽谱分析中的性能优势。与不锈钢硬件相比，Altura 色谱柱可改善峰形、提高重现性与分离度，尤其适用于疏水性及修饰肽段。在合成 mAb 多肽及赫赛汀胰蛋白酶酶解物的 LC/MS 分析中，惰性柱能够可靠地鉴定翻译后修饰，并改善脱酰胺肽段的峰形和分离度。更强的脱酰胺异构体分离能力，证明了该色谱柱在需要高灵敏度与精密度的生物制药工作流程中的价值。

前言

肽谱分析是生物制药开发中的一项关键技术，用于确认蛋白质序列以及鉴别翻译后修饰 (PTMs)。然而，分析物与液相色谱 (LC) 金属表面之间的相互作用会降低灵敏度与分离度，特别是对于带电或磷酸化肽段而言。近期研究强调了惰性流路和色谱柱硬件对于改善此类问题的重要性^[1,2]。

在先前的一项研究中，利用配备亚 2 µm 颗粒填料的 ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱和 UHPLC 系统，成功优化了基于 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱建立的肽谱分析方法，将运行时间从 2.5 小时缩短至 1 小时^[3]。尽管分析时间显著缩短，AdvanceBio 肽谱分析柱与 ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 柱之间仍展现出高度一致的肽段洗脱模式，确保了方法在不同色谱柱技术之间的可转移性以及分析结果的一致性。这一改进在保持分析性能的同时，提高了样品通量并减少了溶剂消耗。

为了进一步提高性能，Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 惰性色谱柱采用超高惰性技术，旨在更大程度减少金属与分析物的相互作用，同时保持不锈钢 (SS) 的机械强度。本研究采用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱和 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统，对合成多肽和酶解后的单克隆抗体 (mAb) 样品进行 LC/MS/MS 分析，比较了 Altura 惰性色谱柱与传统不锈钢色谱柱的性能。

实验部分

样品前处理

将先前的酶解方案^[4] 稍作调整，用胰蛋白酶酶解赫赛汀。具体而言，采用胰蛋白酶进行酶解，蛋白质与酶的比例为 50:1。而在之前的方案中，采用胰蛋白酶/LysC 时，蛋白质与酶的比例为 25:1，且无样品净化步骤。

在进行 LC/MS 分析之前，使用 C18 离心柱对样品进行净化，以去除杂质并延长色谱柱使用寿命。

分析柱

Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱，2.1 × 150 mm, 1.8 µm (部件号 959759-902)

Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 惰性色谱柱，2.1 × 150 mm, 1.8 µm (部件号 204215-308)

仪器

LC/MS 分析采用以下仪器配置：

- Agilent 1290 Infinity II 生物高速泵 (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio Multisampler，配备样品恒温器 (G7137A)
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6549AA)

表 1. 液相色谱参数

Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统		
参数	设定值	
流动相 A	0.1% 甲酸水溶液	
流动相 B	含 0.1% 甲酸的乙腈溶液	
柱温	60 °C	
流速	0.4 mL/min	
进样器温度	8 °C	
梯度 1（合成多肽）	时间 (min)	%B
	0.00	2
	1.00	2
	7.00	38
	7.10	80
	9.00	80
	9.10	2
	14.0	2
梯度 2（赫赛汀胰蛋白酶酶解物）	时间 (min)	%B
	0	2
	2	2
	42	42
	43	80
	47	80
	48	2
	55	2

表 2. 质谱参数

Agilent 6545 XT AdvanceBio LC/Q-TOF	
参数	设定值
离子源	双 AJS 正离子 ESI
离子源	
干燥气温度	250 °C
干燥气流量	10 L/min
鞘气温度	250 °C
鞘气流量	12 L/min
雾化器压力	25 psi
毛细管电压	3500 V
喷嘴电压	0 V
碎裂电压	95 V

参数	设定值
锥孔电压	50 V
采集 - MS	
采集模式	扩展动态范围 (2 GHz)
质量数范围	m/z 100–3000
扫描速率	1 幅质谱图/秒
参比质量	121.0509, 922.0098
采集 - MS/MS	
采集模式	自动 MS/MS
质量数范围	m/z 100–3000
扫描速率	3 幅质谱图/秒
分离峰宽 (MS/MS)	中等 (约 4 amu)
每个循环的最大母离子数	5
MS/MS 阈值	6000 响应值和 0.001%
母离子电荷	2+, 3+, > 3+

表 3. MS/MS 碰撞能量参数

碰撞能量梯度		
电荷	斜率	偏移
2	3.1	1
3	3.6	-4.8
> 3	3.6	-4.8

表 4. Agilent MassHunter BioConfirm 软件 12.1 版处理参数

工作流程与序列设置		
工作流程	蛋白质酶解物	
条件	还原	
序列	赫赛汀（已直接烷基化），胰蛋白酶	
可变修饰	脱酰胺化、G0、G0F、G0F-GlcNAc、G2、G2F、H5N3F1-1、甲基化、氧化（M、W）、焦谷氨酸化（E）	
酶	胰蛋白酶	
查找肽段		
生物分子过滤器	显示包含 MS/MS 扫描的分子	已启用
提取	使用的峰高标准	≥ 600 计数
离子形态	正离子	H ⁺ 、Na ⁺ 、K ⁺ 、NH ₄ ⁺
电荷态	同位素模型	肽段
	分配电荷态的范围限制	1–5
峰过滤器 (MS/MS)	峰高过滤器，启用绝对峰高	≥ 50 计数
匹配容差		
质量匹配	MS1 ± 5 ppm, MS2 ± 20 ppm	
评分	评分 < 7.00 时警告	
	评分 < 5.00 时不匹配（序列覆盖度）	
匹配规则	MS/MS 碎裂类型	CID
	漏切位点数	2
	每个生物分子的最大匹配数	3
	肽段长度范围	3–70
	仅允许 N 端或 C 端截短	选中
	最大修饰数量	2

结果与讨论

评估惰性色谱柱硬件带来的色谱性能提升

为评估 Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 惰性色谱柱硬件在肽谱分析工作流程中的性能优势，我们将其与不锈钢 ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱进行了比较。使用 1290 Infinity II 生物液相色谱系统与 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 的联用系统，对含有 mAb 序列的合成多肽混合物进行分析。

初步叠加提取离子色谱图（图 1）发现，两种色谱柱的保留时间相当。然而，详细分析各个肽段发现，二者在信号强度、峰形和分离度方面存在显著差异（图 2）。例如，与 Altura 色谱柱相比，疏水性碱性肽段 VVSVLTVLHQDWLNGK 在不锈钢色谱柱上表现出更宽的峰和更低的信号强度。这表明不锈钢硬件中的金属-分析物相互作用可能会影响样品回收率和/或色谱性能。

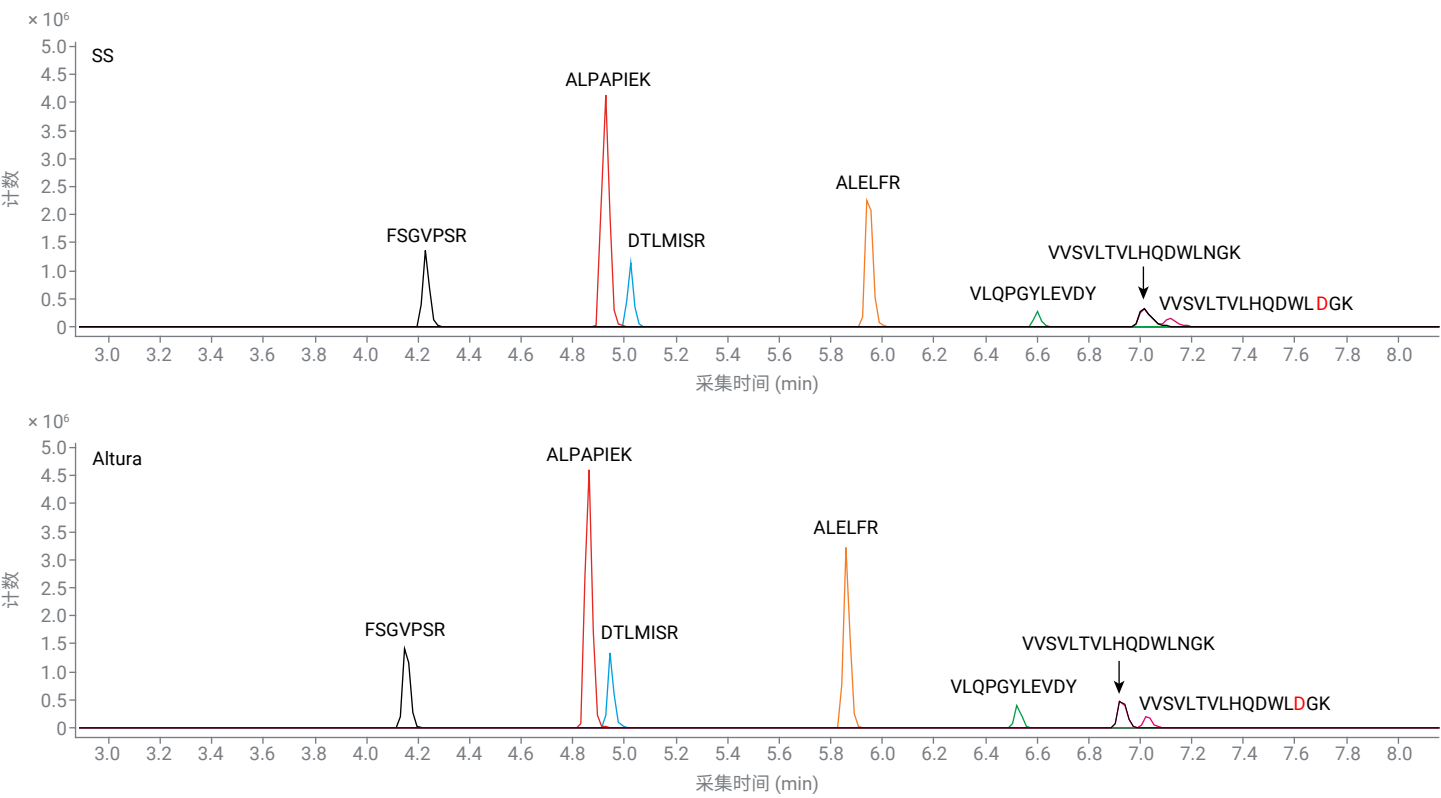


图 1. 使用不锈钢 (SS) 和 Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 惰性色谱柱硬件对合成单克隆抗体多肽进行色谱分离

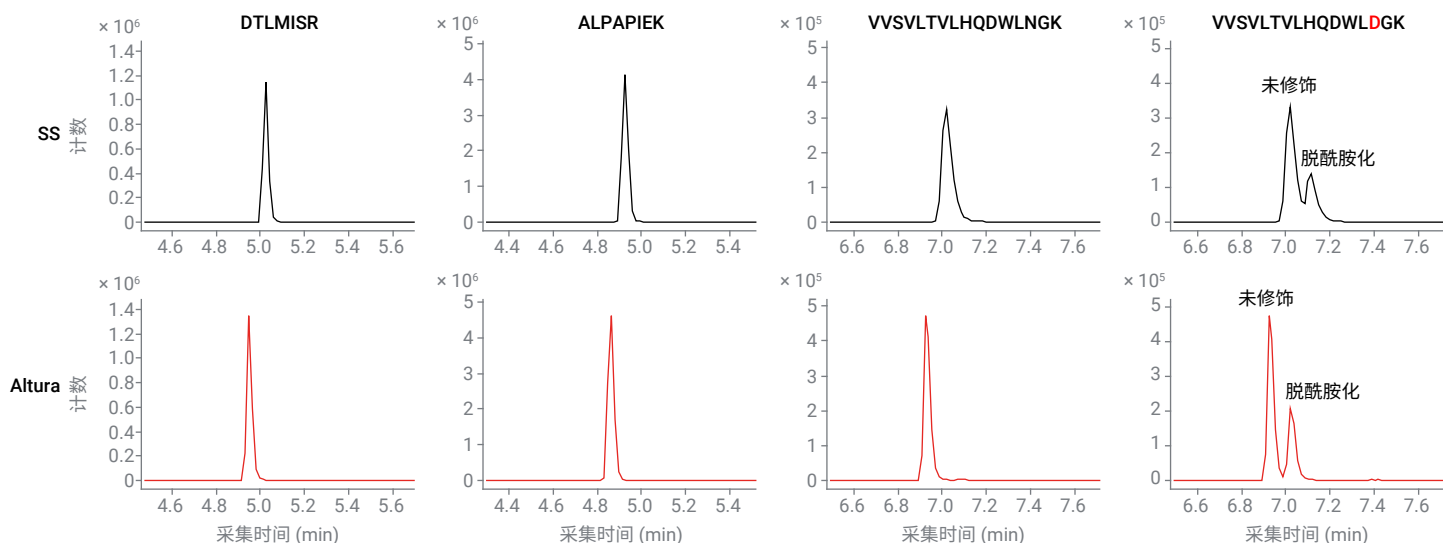


图 2. 与不锈钢 (SS) 色谱柱硬件相比，使用 Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 惰性色谱柱硬件可改善脱酰胺肽段的峰形和分离度

对脱酰胺异构体 VVSVLTVLHQDWLDGK（第 14 号位的天冬酰胺转化为天冬氨酸）的进一步分析表明，使用 Altura 色谱柱时，其与未修饰形式的分离效果得到了显著改善，这对于检测翻译后修饰和化学修饰（如脱酰胺作用）尤其有价值，此类修饰是生物制药研发过程中必须表征的关键质量属性。

为了评估惰性柱硬件的具体优势，对新的不锈钢柱和 Altura 柱进行了一组测试：先进行一次空白进样以快速活化，然后对合成 mAb 多肽混合物连续进样 30 次（图 3）。结果表明，对于 ALPAPIEK 和 DTLMISR，不锈钢柱至少需要 10 次进样才能达到与 Altura 色谱柱相当的峰面积回收率。对于疏水性/碱性肽段 VVSVLTVLHQDWLNGK，不锈钢柱需要近 20 次进样才能达到 Altura 色谱柱的性能，这表明了惰性色谱柱的快速稳定性和卓越重现性。

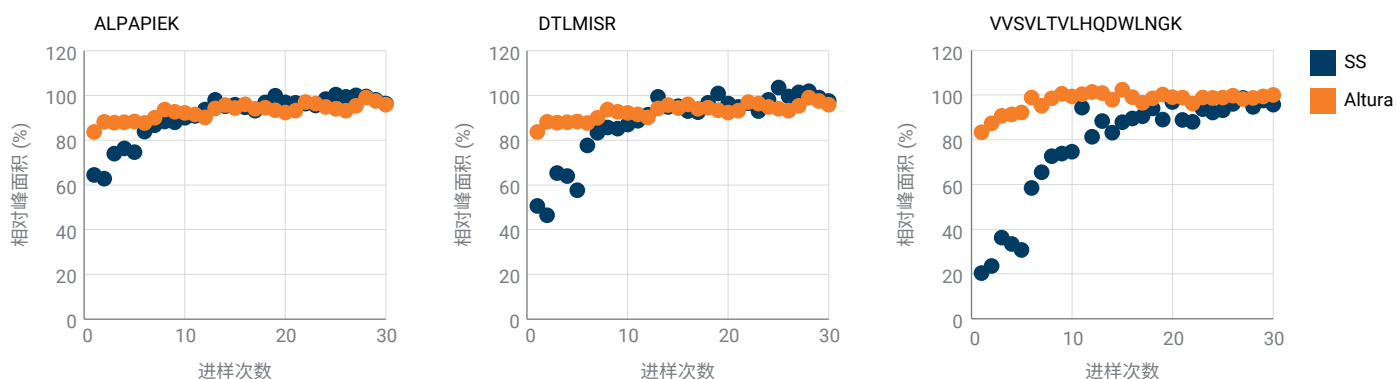


图 3. 不锈钢 (SS) 色谱柱和 Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 惰性色谱柱合成多肽分析性能的定量比较。绘制了 30 次进样的相对峰面积变化趋势图。与 SS 色谱柱相比，Altura 硬件能够更快达到稳定并具有更高的重现性，尤其适用于疏水性和碱性肽段

色谱性能指标，如用于量化峰不对称性的拖尾因子 (TF)，进一步佐证了上述结果 (图 4)。ALPAPIEK 和 DTLMISR 在两根色谱柱上的 TF 相当，表明峰形相似。然而，与不锈钢柱 (平均 TF = 1.7, n = 30) 相比，VSVLTVLHQDWLNGK 在 Altura 柱 (平均 TF = 1.3, n = 30) 上获得了更优异的 TF。该结果与图 2 中的定性观察结果高度吻合，表明惰性硬件可以改善难分析肽段的峰对称性。

对 30 次进样的 TF 作图发现，不锈钢柱的性能随着柱活化过程逐渐改善，最终接近 Altura 柱的性能。然而，不锈钢柱上初始峰形较差，会影响紧邻洗脱的分析物 (如脱酰胺肽段 VSVLTVLHQDWLDGK 与其未修饰形式) 的分离。如图 4C 所示，Altura 色谱柱能够为这些异构体提供更高的分离度，从而可靠地鉴定化学修饰。

尽管使用了相对陡峭的梯度条件 (6% B/分钟, 6 分钟)，Altura 色谱柱仍实现了优异的分离。这一结果表明，通过延长梯度时间或降低梯度斜率可以进一步优化，以提高分离度。总体而言，这些结果表明，Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 惰性色谱柱不仅提高了 PTM 和化学修饰的色谱分离性能，而且还能实现更高的样品通量和更出色的杂质分析，使其成为强大的肽谱分析工作流程的重要工具。

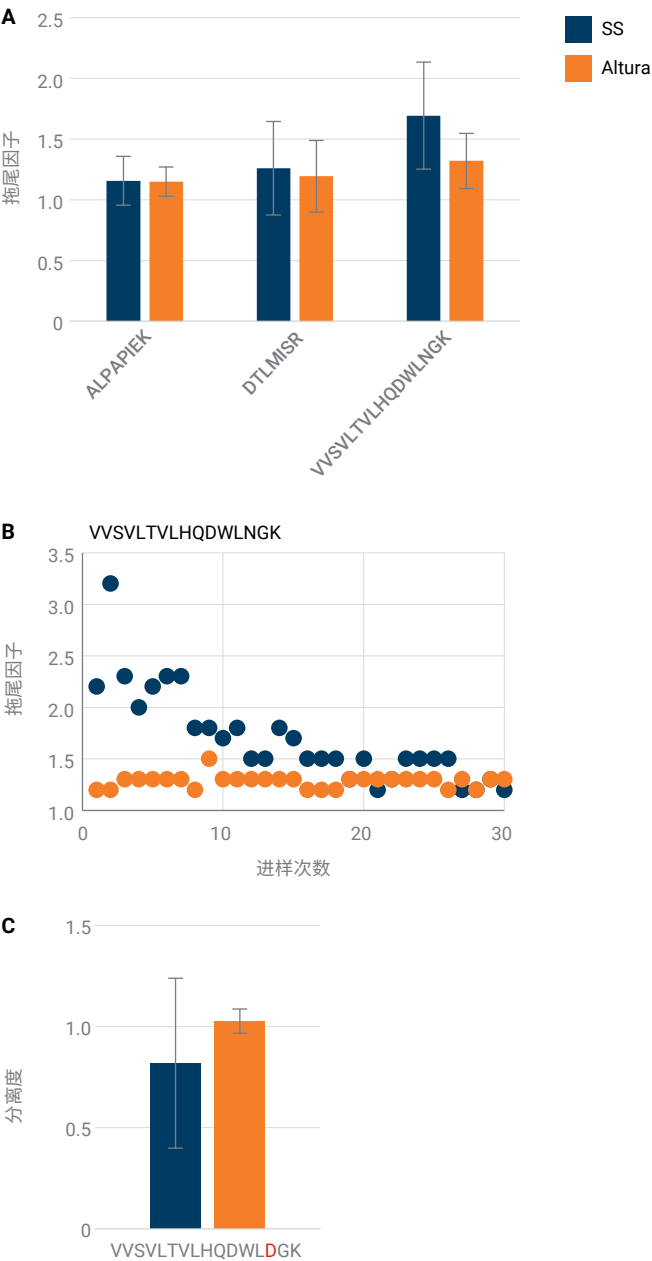


图 4. 不锈钢 (SS) 色谱柱和 Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 惰性色谱柱合成多肽分析的色谱性能指标。(A) ALPAPIEK、DTLMISR 和 VSVLTVLHQDWLNGK 的平均拖尾因子。(B) 30 次进样的拖尾因子趋势。(C) 脱酰胺肽段对 VSVLTVLHQDWLDGK 和 VSVLTVLHQDWLNGK 的分离情况。与 SS 硬件相比，Altura 色谱柱可提供更好的峰对称性，能够对紧邻洗脱的异构体实现更出色的分离

赫赛汀胰蛋白酶酶解物的肽谱分析

鉴于 Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 惰性色谱柱已证实的优越性能，我们将其应用于赫赛汀胰蛋白酶酶解物的肽谱分析。使用 Altura 色谱柱对酶解样品进行 LC/MS/MS 分析，得到的总离子流色谱图 (TIC) 和序列覆盖度如图 5 所示。分析结果表明，序列覆盖度为 87.03%，未检出的胰蛋白酶酶解肽段多为亲水性较强的小分子短肽段。

值得注意的是，在 LC/MS/MS 分析之前进行的 C18 净化步骤（如实验部分所述）可能导致了这些较短的亲水性肽段的丢失。在未来的实验设计中需要重点考虑这个问题，以实现全面的序列覆盖。之前的应用简报中未对赫赛汀酶解物进行净化，获得了约 98% 的序列覆盖度^[4]。

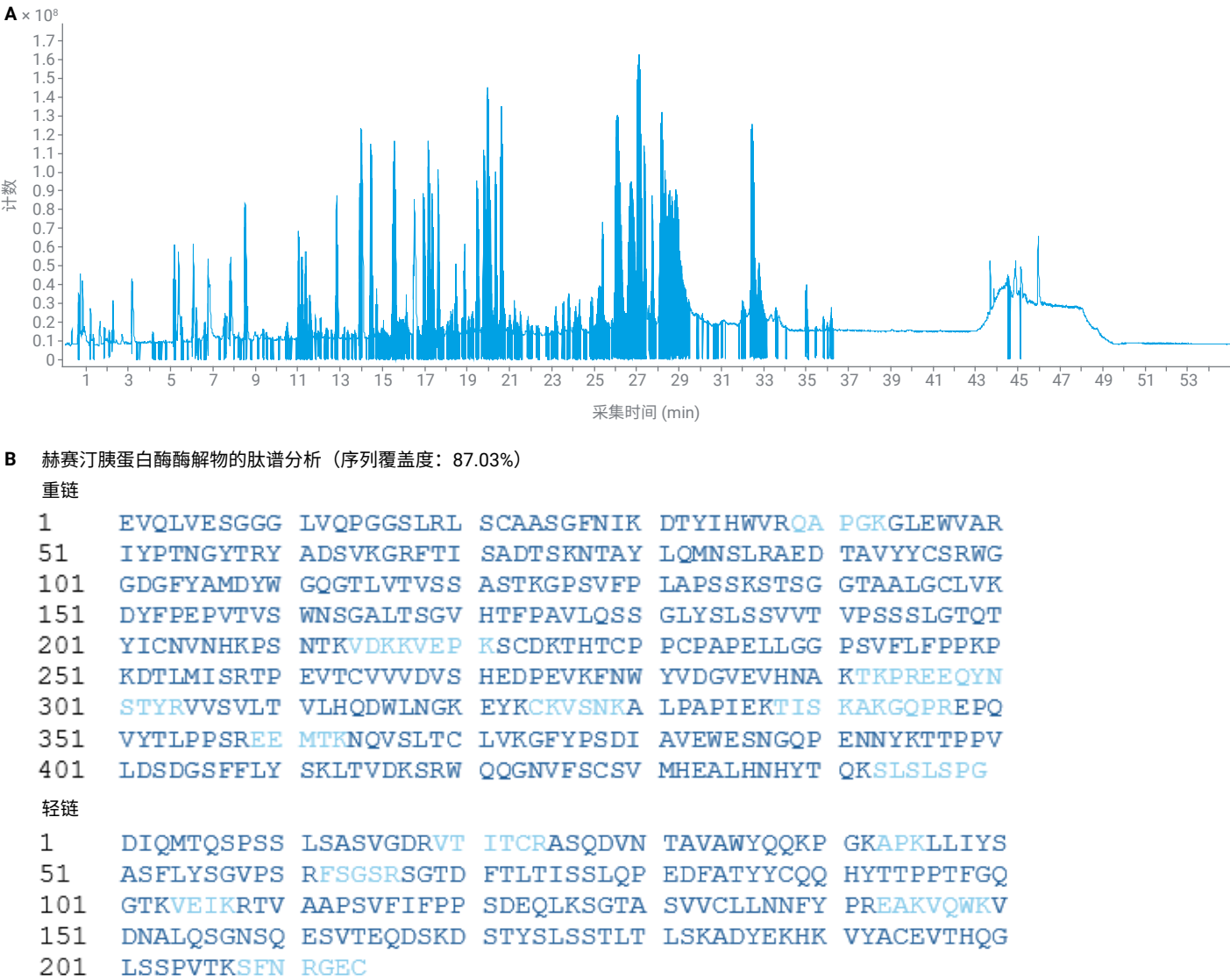


图 5. 使用 Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 惰性柱对赫赛汀胰蛋白酶酶解物进行肽谱分析。(A) 赫赛汀胰蛋白酶酶解物 LC/MS/MS 分析的总离子流色谱图 (TIC)。(B) 序列覆盖图表明覆盖度为 87.03%，其中已鉴定的肽段以深蓝色显示。缺失的胰蛋白酶酶解肽段（浅蓝色）多为亲水性小分子短肽段，容易在 C18 净化步骤中丢失

图 6 为 NTAYLQMDSLRL 肽段脱酰胺形式的 CID MS/MS 谱图。碎片离子数据能够可靠地确定 8 号位为脱酰胺位点，证明了 MS/MS 在表征翻译后修饰和化学修饰方面的实用性。

为了进一步表明色谱分离在表征脱酰胺肽段中的重要性，图 7 显示了 NTAYLQMNSLR 肽段天然形式和脱酰胺形式的 EICs。由于脱酰胺异构体的质量偏移仅 0.98 Da，且信号强度相对较低，色谱分离对区分这两种形式至关重要。仅凭质谱无法有效区分它们，因为脱酰胺肽段的单一同位素峰 (656.3221 m/z) 与天然肽段的第二同位素峰 (单一同位素峰：655.8318 m/z ，第二同位素峰：656.3328 m/z) 会发生重叠 (相差 16 ppm)。因此，利用惰性色谱柱硬件实现高分离度色谱分离，对于脱酰胺肽段的准确鉴定和定量非常关键。

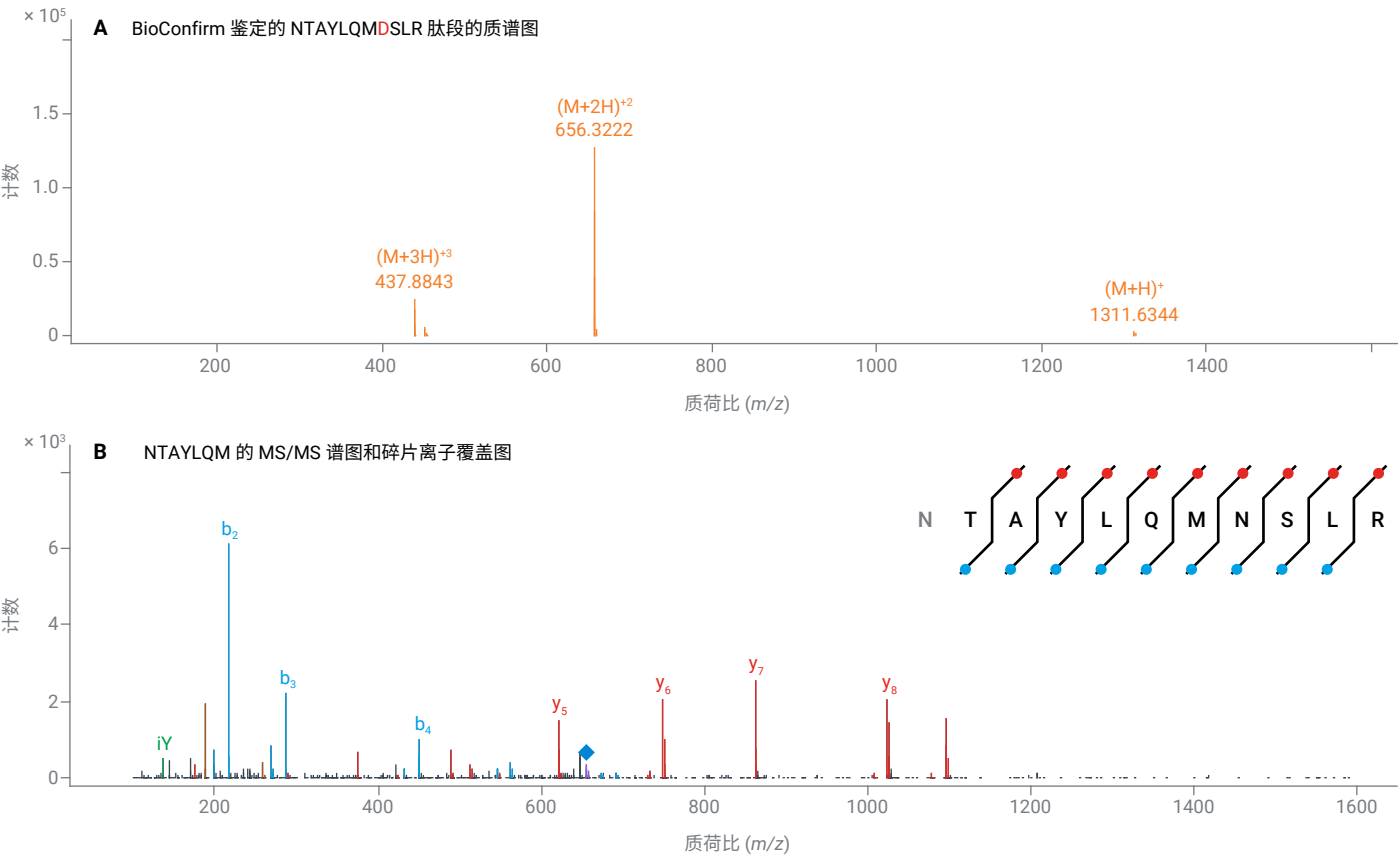


图 6. NTAYLQMDSLRL 肽段的 MS 谱图和碎片离子覆盖图。使用 Agilent MassHunter BioConfirm 软件，通过碎片离子数据确定 8 号位发生了脱酰胺作用

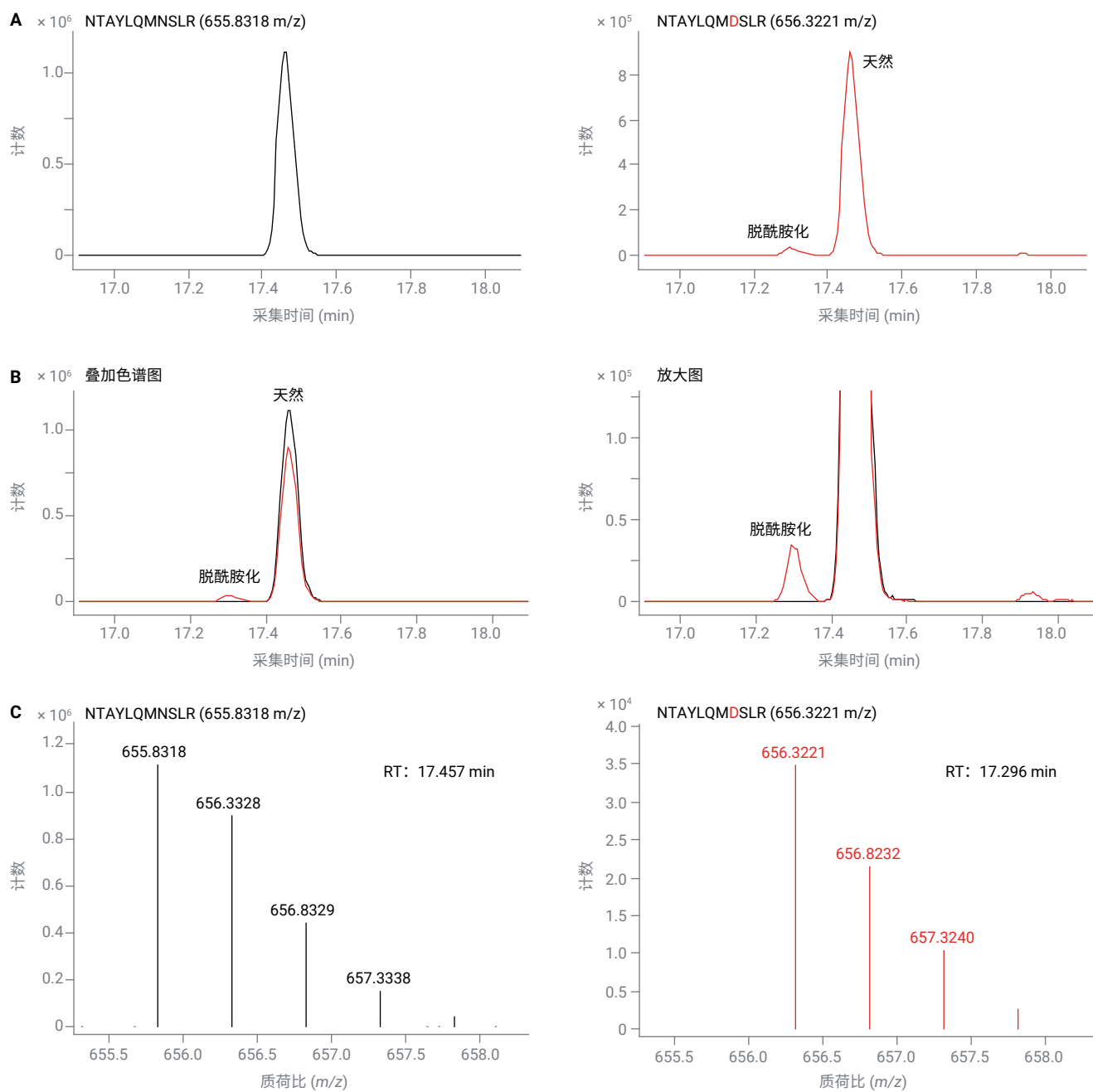


图 7. NTAYLQMNSLR 肽段天然形式和脱酰胺形式的色谱分离。(A) 使用 2+ 电荷态下天然形式 (655.8318 m/z) 和脱酰胺形式 (656.3221 m/z) 的母离子质量提取的离子色谱图 (EICs)。(B) 将各色谱图叠加, 以说明天然肽段和脱酰胺肽段之间的色谱分离情况, 放大的色谱图显示了低含量杂质的分离情况。(C) 天然肽段和脱酰胺肽段的质谱图, 表明需要通过色谱将脱酰胺形式与天然形式分离, 否则, 如果这两种形式同时洗脱, 仅凭质谱图将无法区分它们

结论

本研究证明, Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 惰性色谱柱硬件在肽谱分析工作流程中具有显著优势, 尤其是在 mAb 肽段、翻译后修饰和化学修饰分析方面。与传统的不锈钢色谱柱硬件相比, Altura 色谱柱能够改善峰形、降低变异性并提高分离度, 尤其适用于具有挑战性的疏水性及修饰肽段。

连续 30 次进样的定量数据表明, Altura 硬件能够实现更快的色谱柱稳定速度和更优异的重现性, 拖尾因子和分离度等色谱指标也证实了其能够更好地分离紧邻洗脱的物质。这些优势在赫赛汀胰蛋白酶酶解物的肽谱分析中得到了进一步验证, Altura 色谱柱能够可靠地鉴定脱酰胺异构体。

总体而言, Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 惰性色谱柱与 1290 Infinity II 生物液相色谱和 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统组合使用, 为高通量肽谱分析和修饰表征提供了稳健可靠的解决方案, 能够为生物制药开发提供更出色的分析精度和操作效率。

参考文献

1. Hsiao, J. 等, 利用惰性 HPLC 色谱柱硬件突破色谱分离的界限, *安捷伦科技公司应用简报*, 5994-8618ZHCN, **2025**
2. Vanluchene, H. 等, 采用低吸附流路 IP-RPLC-MS 进行 mRNA 图谱分析, *安捷伦科技公司应用简报*, 5994-8055ZHCN, **2025**
3. Feith, A. 稳定可靠的肽谱分析, *安捷伦科技公司应用简报*, 5994-2718ZHCN, **2024**
4. Sciuto, S. Peptide Mapping of Trastuzumab Tryptic Digests on an Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (采用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 对曲妥珠单抗胰蛋白酶酶解物进行肽谱分析), *安捷伦科技公司应用简报*, 5994-7969EN, **2024**

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

DE-010885

本文中的信息、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, 2025
2025 年 11 月 18 日, 中国出版
5994-8776ZHCN