

## 合成肽和相关杂质的高效方法开发

01-00780-cn

Shinichi Fujisaki

### 特点描述

- ◆ LabSolutions MD 可提高合成肽和杂质方法开发的整个工作流的效率。
- ◆ 可以使用流动相和色谱柱切换阀自动筛选多个流动相和色谱柱。
- ◆ 可以使用 LCMS-2050 (一种单四极杆质谱仪) 估计并准确追踪肽和相关杂质的分子量。

### ■ 引言

治疗性肽的特征是对其功能至关重要的特定氨基酸序列, 可以化学合成, 类似于小分子药物。合成肽的生产涉及多个步骤, 包括脱保护、活化、偶联和从固相支持体上切割最终序列。杂质, 例如因过早链终止或缺失氨基酸产生的杂质, 会影响最终产品的安全性和有效性, 因此, 必须通过液相色谱分析分离这些杂质。在液相分析中, 选择合适的流动相和色谱柱对于各组分实现最佳分离至关重要, 因为它会显著影响分离。然而, 由于因肽链长度、氨基酸组成和是否存在修饰导致分离模式差异, 因此优化每个肽序列的分离条件很耗时。本研究介绍了如何利用 LabSolutions MD (一款支持方法开发的专用软件) 在筛选和优化阶段高效地找到有关杂质的最佳分离条件。

### ■ 目标样品

使用一种肽和五种具有不同序列的有关杂质作为合成肽的模型样品 (表 1)。制备全长肽 (FLP:  $\beta$ -促黑素)、较短长度产物的 p.A1del、p.A1\_E2del、p.A1\_K3del 和 p.A1\_D5del 的缺失序列以及 Met (O2) (FLP 中的甲硫氨酸被氧化成甲硫氨酸磺) 作为样品混合物。

表 1 靶肽和有关杂质的序列

名称	序列
FLP	AEKKDEGPYRMEHFRWGSPPKD
p.A1del	EKKDEGPYRMEHFRWGSPPKD
p.A1_E2del	KKDEGPYRMEHFRWGSPPKD
p.A1_K3del	KDEGPYRMEHFRWGSPPKD
p.A1_D5del	EGPYRMEHFRWGSPPKD
Met (O2)	AEKKDEGPYR{Met(O2)}EHFRWGSPPKD

注: Met (O2) = 蛋氨酸磺

### ■ 流动相和色谱柱筛选

在筛选阶段 (分析条件: 表 2), 考察了流动相和色谱柱的最佳组合。对于流动相, 评价了四种水相流动相 (0.1% TFA、0.1% 甲酸、10 mmol/L 甲酸铵 [pH 4.0] 和 10 mmol/L 乙酸铵 [pH 5.0]) 和三种有机流动相 (乙腈、甲醇和 1:1 的乙腈/甲醇混合物)。对于色谱柱, 测试了六种不同固定相和孔径的色谱柱。使用这些流动相和色谱柱的总共 72 种 (4×3×6) 模式制定了全因子实验设计, 以探索最佳组合。LabSolutions MD 可通过流动相和柱温箱温度等不同参数快速轻松地制定分析计划 (图 1 中的步骤 (1) 至 (5))。此外, 流动相 (图 1 中的 (1)) 和色谱柱 (图 1 中 (2)) 分别可以使用流量切换阀自动切换。此外, 流动相混合功能通过简单地点击所需的流动相 (图 1 中的步骤 (1)) 自动制备乙腈和甲醇混合比不同的流动相。这大大减少了手动工作量并防止了人为制备错误。

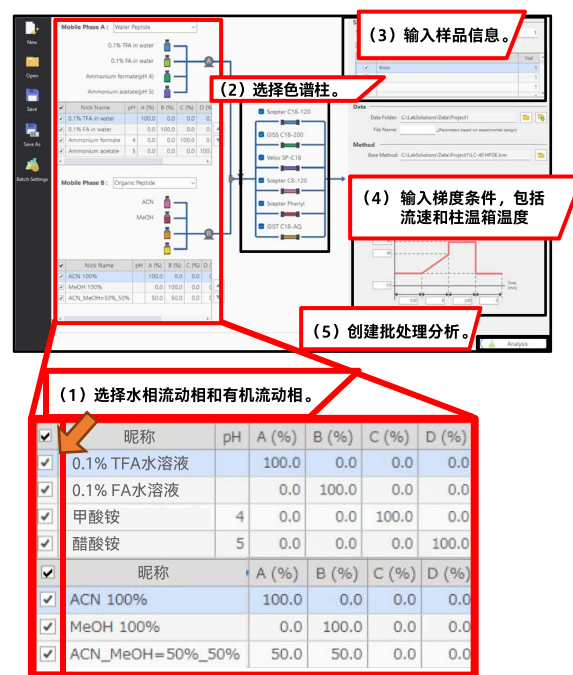


图 1 分析计划的创建步骤

表 2 流动相和色谱柱筛选的分析条件

系统:	Nexera™ X3 (方法开发系统)
色谱柱 1	Shim-pack Scepter™ C18-120 *1
色谱柱 2	Shim-pack™ GISS C18 *2
色谱柱 3	Shim-pack Velox™ SP-C18 *3
色谱柱 4	Shim-pack Scepter C8-120 *4
色谱柱 5	Shim-pack Scepter Phenyl-120 *5
色谱柱 6	Shim-pack GIST-HP C18-AQ *6 (100 mm×3.0 mm I.D., 1.9 μm: 色谱柱 1、2、4-6) (100 mm×3.0 mm I.D., 1.8 μm: 色谱柱 3)
温度	40°C
进样量	2 μL (FLP: 1000 mg/L, 其他杂质: 100 mg/L)
样品溶剂	水
流动相	
泵 A- 管线 A	0.1% 三氟乙酸 (TFA) 水溶液
- 管线 B	0.1% 甲酸水溶液
- 管线 C	10 mmol/L 甲酸铵 (pH 4) 水溶液
- 管线 D	10 mmol/L 醋酸铵 (pH 5) 水溶液
泵 B- 管线 A	乙腈
- 管线 B	甲醇
流速	0.5 mL/min
时间程序 (%B)	10% (0 min) → 60% (10 min) → 10% (10.01-15 min)
检测	220 nm (SPD-M40, UHPLC 流通池)
系统	LCMS-2050
离子源	ESI/APCI (DUIS™), 正模式
模式	SCAN (m/z 300-2000)
雾化气流速	2.0 L/min (N <sub>2</sub> )
干燥气流速	5.0 L/min (N <sub>2</sub> )
加热气流速	7.0 L/min (N <sub>2</sub> )
DL 温度	200°C
脱溶温度	450°C
接口电压	1.0 kV

\*1 P/N: 227-31013-03, \*2 P/N: 227-30049-02  
\*3 P/N: 227-32002-02, \*4 P/N: 227-31034-03  
\*5 P/N: 227-31064-03, \*6 P/N: 227-30808-02  
(Shimadzu GLC 产品号)

## 流动相和色谱柱筛选结果

各色谱柱在不同流动相条件下 (水相流动相: 0.1% TFA、0.1% 甲酸、10 mmol/L 甲酸铵、10 mmol/L 醋酸铵; 有机流动相: 100% 乙腈、100% 甲醇) 获得的色谱图如图 2-7 所示。

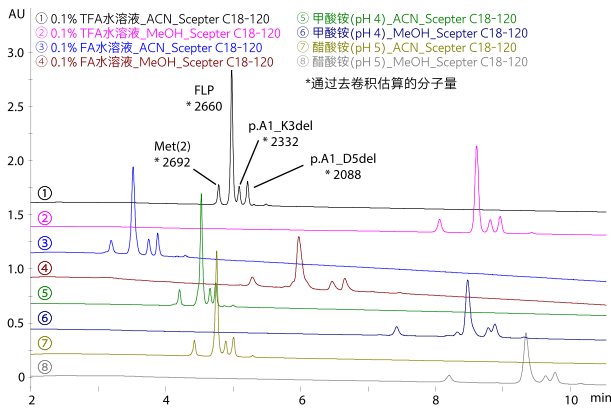


图 2 通过 Scepter C18-120 获得的色谱图

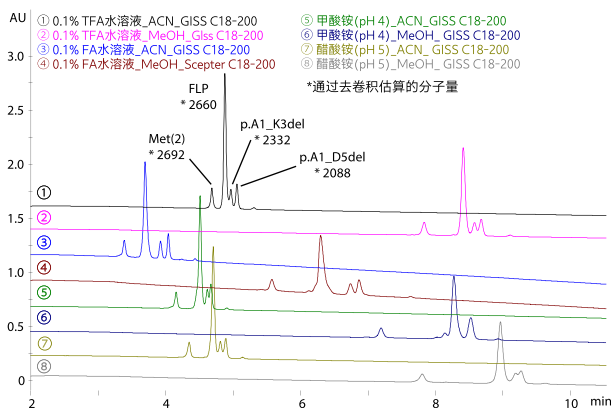


图 3 通过 GISS C18-200 获得的色谱图

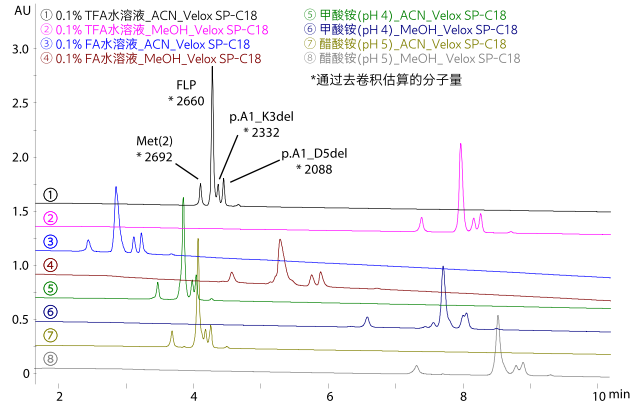


图 4 通过 Velox SP-C18 获得的色谱图

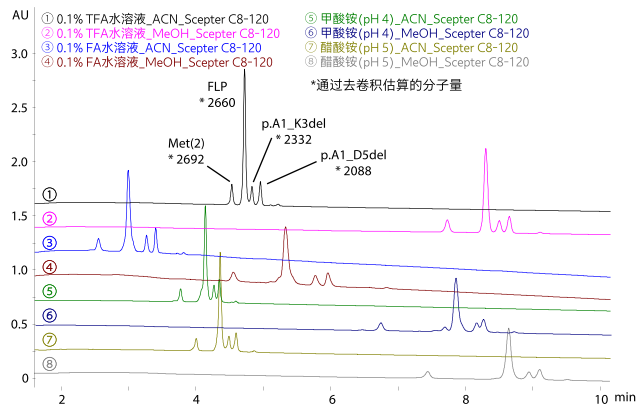


图 5 通过 Scepter C8-120 获得的色谱图

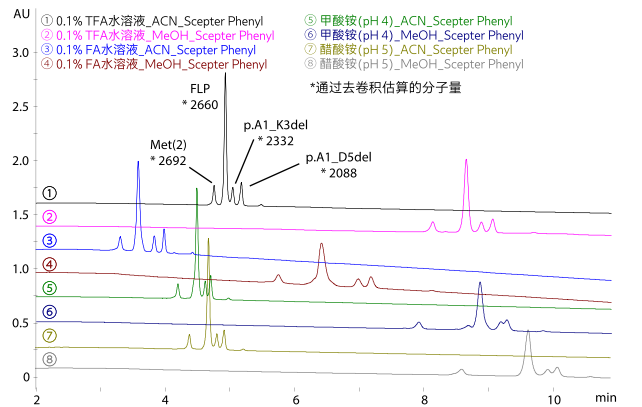


图 6 通过 Scepter Phenyl 获得的色谱图

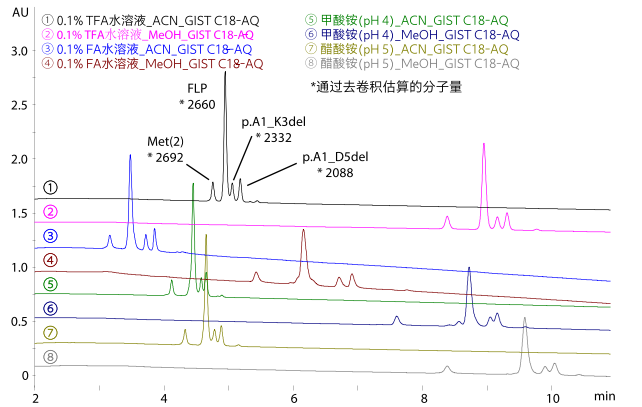


图 7 通过 GIST C18-AQ 获得的色谱图

流动相和色谱柱的筛选结果表明, 水相流动相和有机相流动相的组成对 FLP 及相关杂质的分离有显著影响。此外, LabSolutions MD 还可以计算每个峰的分子量 (通过 LCMS-2050 获得的 MS 谱图的解卷积来估计), 从而有助于确认合成化合物和估计未知杂质的分子量。

## 快速找到最佳条件

许多色谱图是根据筛选阶段考虑的条件数量生成的，需要一定水平的色谱知识以及大量的工作来评价哪种条件能够实现所需的分离。LabSolutions MD 可以使用下面的公式（公式 1）快速轻松地找到最佳条件，以定量评估分离。

$$(\text{评估值}) = P \times (Rs_1 + Rs_2 + \dots + Rs_{p-1}) \dots (\text{公式 1})$$

评估值的计算方式为检出峰数 (P) 乘以所有峰的分离度 (Rs) 之和。图 8 按从高到低的顺序列出了通过流动相筛选获得的评估值。图 9 显示了评估值最高的前三个色谱图。使用 Scepter C8-120 色谱柱，在 0.1% 甲酸和甲醇的流动相组成下获得最佳色谱图。然而，在具有第二和第三高评估值的条件下，也检测到 p.A1\_E2del，并且实现了一定程度的分离。因此，对于这前三个条件，使用不同柱温箱温度（40、50、60、70 和 80°C），进行了进一步考察。

MPA 昵称	MPS 昵称	色谱柱名称	评估值
0.1% FA 水溶液	MeOH	Scepter-CB-120	26.889
醋酸铵 (pH 5)	ACN_MeOH=50_50	Velox SP-C18	26.328
甲酸铵 (pH 4)	MeOH	Scepter-C8-120	26.073
甲酸铵 (pH 4)	ACN_MeOH=50_50	Scepter-C8-120	25.948
甲酸铵 (pH 4)	ACN_MeOH=50_50	Scepter C18-120	25.792
甲酸铵 (pH 4)	ACN_MeOH=50_50	Scepter Phenyl-120	25.575
甲酸铵 (pH 4)	ACN_MeOH=50_50	GIST-C18-AQ	25.502
甲酸铵 (pH 4)	MeOH	Scepter C18-120	25.318
甲酸铵 (pH 4)	ACN	Scepter-C8-120	24.890
甲酸铵 (pH 4)	ACN	Scepter Phenyl-120	24.860

图 8 按评估值对各条件的排序 (从最高到最低列出的前 10 个色谱图)

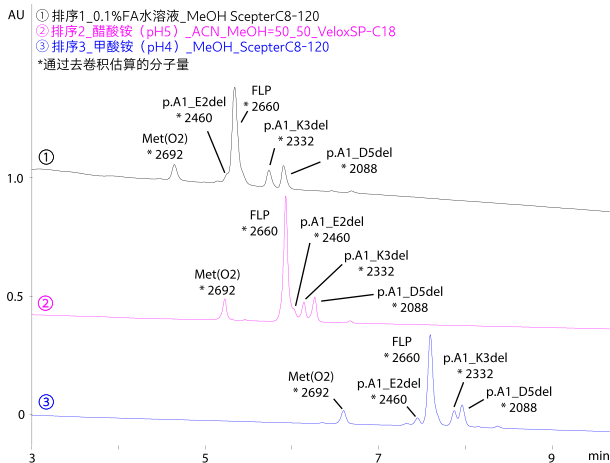


图 9 前三个评估值的色谱图

## 柱温箱温度筛选结果

图 10-12 分别显示了在 40、50、60、70 和 80°C 下改变柱温箱温度获得的前三个色谱图（图 9）。所有条件下温度较高时，分离度均得到提高，表明柱温箱温度可以有效提高分离度。此外，还证实了柱温箱温度升高可以提高最难分离的 p.A1del 和 FLP 之间的分离度。图 13 按从高到低的顺序列出了 p.A1del 和 FLP 之间的分离度结果。使用 Scepter C8-120 色谱柱，通过 0.1% 甲酸和甲醇的流动相组合物，观察到 p.A1del 和 FLP 之间的最高分离度（图 10 中的色谱图①）。

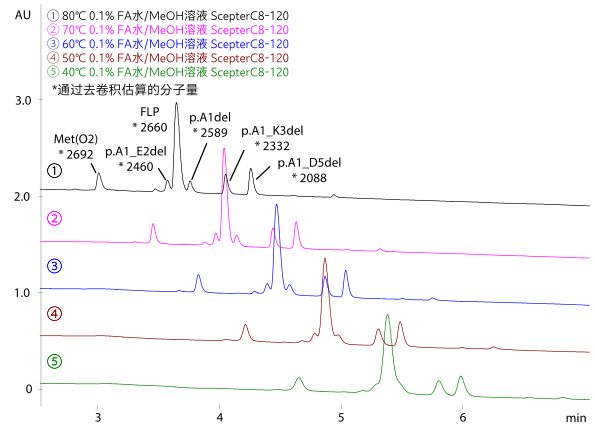


图 10 不同柱温箱温度的色谱图 80°C (①), 70°C (②), 60°C (③), 50°C (④), 40°C (⑤) (0.1% 甲酸/MeOH/Scepter C8-120)

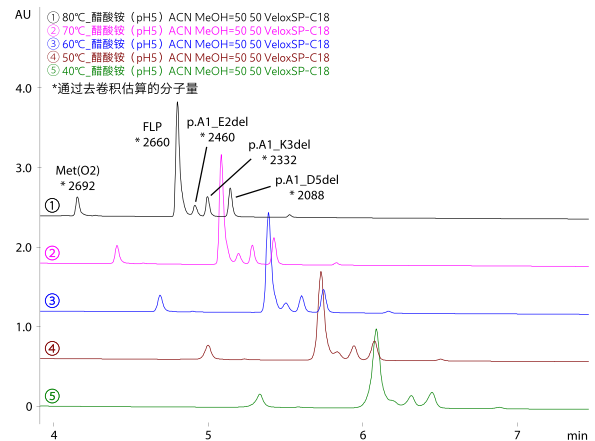


图 11 不同柱温箱温度的色谱图 80°C (①), 70°C (②), 60°C (③), 50°C (④), 40°C (⑤) (10 mmol/L 醋酸铵/ACN:MeOH=50:50/Velox SP-C18)

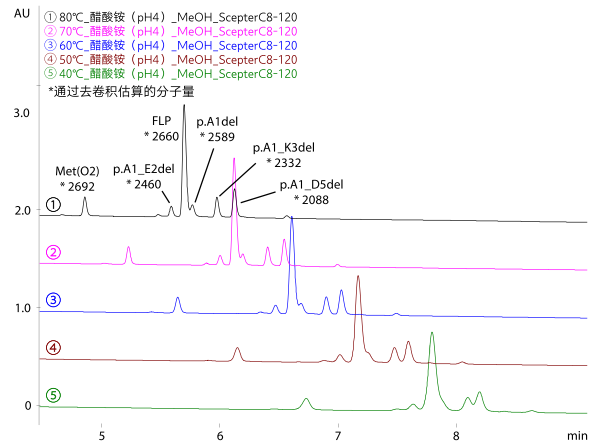


图 12 不同柱温箱温度的色谱图 80°C (①), 70°C (②), 60°C (③), 50°C (④), 40°C (⑤) (10 mmol/L 醋酸铵/MeOH/Scepter C8-120)

MPA 昵称	MPB 昵称	色谱柱名称	柱温箱温度	分离度 (p.A1del)
0.1% FA in water	MeOH	Scepter-C8-120	80	1.492
0.1% FA in water	MeOH	Scepter-C8-120	70	1.396
0.1% FA in water	MeOH	Scepter-C8-120	60	1.238
Ammonium formate (pH 4)	MeOH	Scepter-C8-120	80	1.175
Ammonium formate (pH 4)	MeOH	Scepter-C8-120	70	1.172

图 13 按 p.A1del 和 FLP 之间分离度的排序 (从最高到最低列出的前 5 个色谱图)

接着，进行优化阶段，通过调整液相色谱参数，如梯度条件和流速，进一步提高分离度和稳定性。

## ■ 优化阶段

基于最佳条件（水相流动相：0.1% 甲酸，有机流动相：甲醇，色谱柱：Scepter C8-120，柱温：80°C），优化初始梯度浓度（5、10 和 15%：图 14），梯度时间（5、10 和 15 分钟：图 14）和流速（0.5、0.6 和 0.7 mL/min），以进一步提高 FLP 和有关杂质的分离度。所得色谱图如图 15-17 所示。较高的初始梯度浓度和较长的梯度时间有助于提高相邻峰之间的分离度，而流速对分离度的影响较小。然后，对 FLP 和有关杂质进行峰追踪，以通过设计空间可视化分离度。

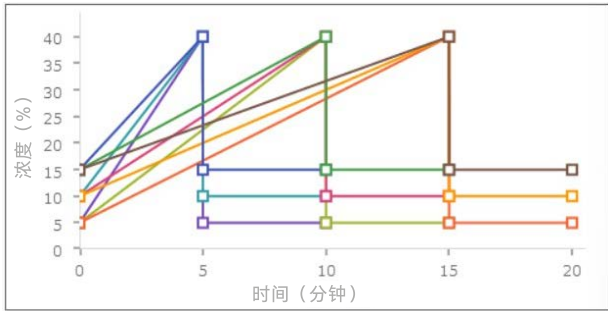


图 14 梯度条件的优化

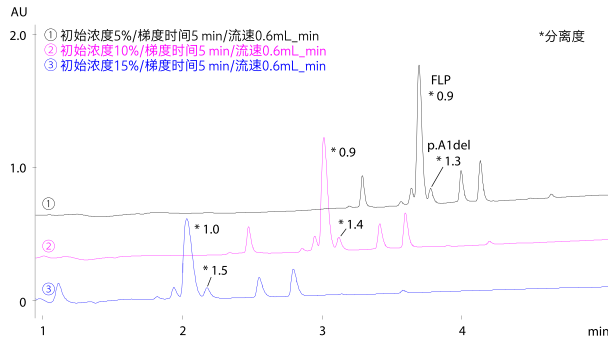


图 15 不同初始浓度的色谱图  
5% ( ① ), 10% ( ② ), 15% ( ③ )

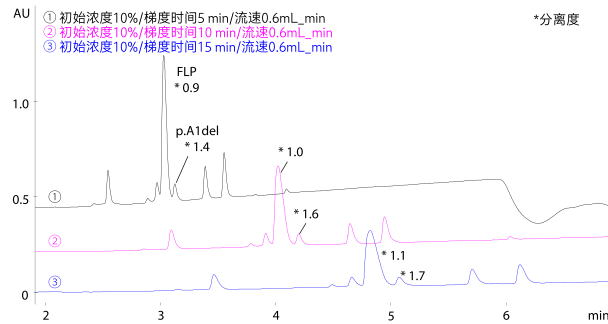


图 16 不同梯度时间的色谱图  
5 min ( ① ), 10 min ( ② ), 15 min ( ③ )

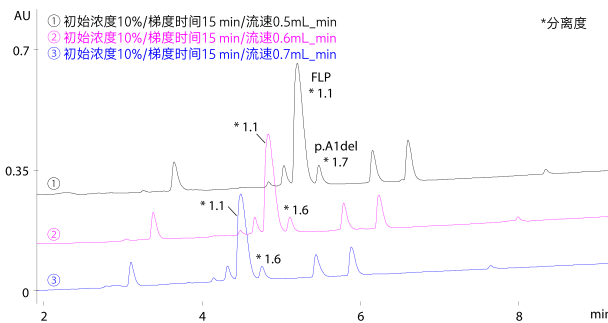


图 17 不同流速的色谱图  
0.5 mL/min ( ① ), 0.6 mL/min ( ② ), 0.7 mL/min ( ③ )

## ■ LCMS-2050 自动峰追踪

梯度时间为 5 min、流速为 0.6 mL/min、初始浓度为 5% 和 15% 时获得的液相色谱图，以及 FLP 和杂质的分子量如图 18 所示。每种杂质的 UV 光谱如图 19 所示。Met (O2)、p.A1del、p.A1\_E2del、p.A1\_K3del 和 p.A1\_D5del 的 UV 光谱之间的相似性大于 0.99，这表明基于 UV 光谱的峰追踪将具有挑战性。相比之下，LabSolutions MD 能够根据 LCMS-2050 获得的分子量进行峰追踪，以准确鉴定具有 UV 光谱类似的化合物（图 18）。与理论值相比，每种化合物的估计分子量显示出质量误差较小（表 3），这可用于确认已知化合物的分子量以及粗略估计未知杂质的分子量。

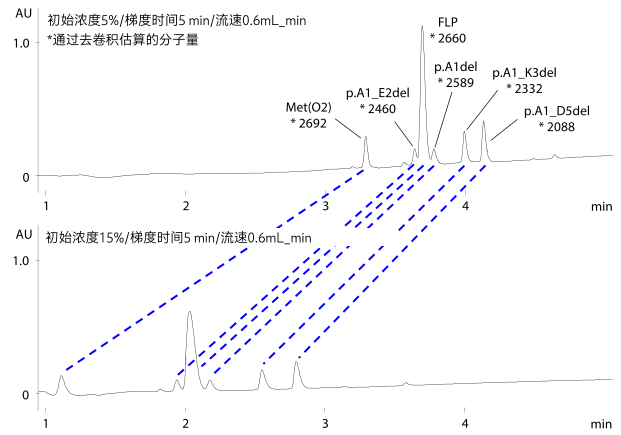


图 18 梯度时间为 5 min，流速为 0.6 mL/min，初始浓度为 5% (上图) 和 15% (下图) 时的液相色谱图（虚线表示基于分子量的追踪）

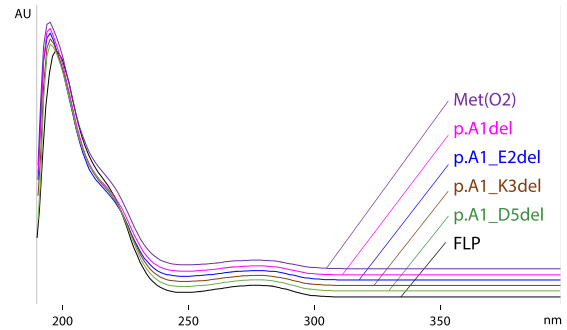


图 19 FLP 杂质 UV 光谱图

图 3 FLP 和杂质的估计 / 理论分子量

名称	估计分子量	理论分子量
FLP	2660	2661
p.A1del	2589	2590
p.A1_E2del	2460	2461
p.A1_K3del	2332	2333
p.A1_D5del	2088	2089
Met(O2)	2692	2693

接下来，通过设计用空间可视化 FLP 和每种杂质的分离度，鉴别提供最佳分离度和稳定性的最佳条件。

## 最佳条件的设计空间评估

显示了 FLP 和各杂质分离度的设计空间 (图 20)。纵轴代表梯度时间, 而横轴代表初始浓度。红色区域表示分离度较高, 蓝色区域表示分离度较低。通过设计空间可视化分离度, 很明显较高的初始浓度和较长的梯度时间可提高每个峰的分离度。

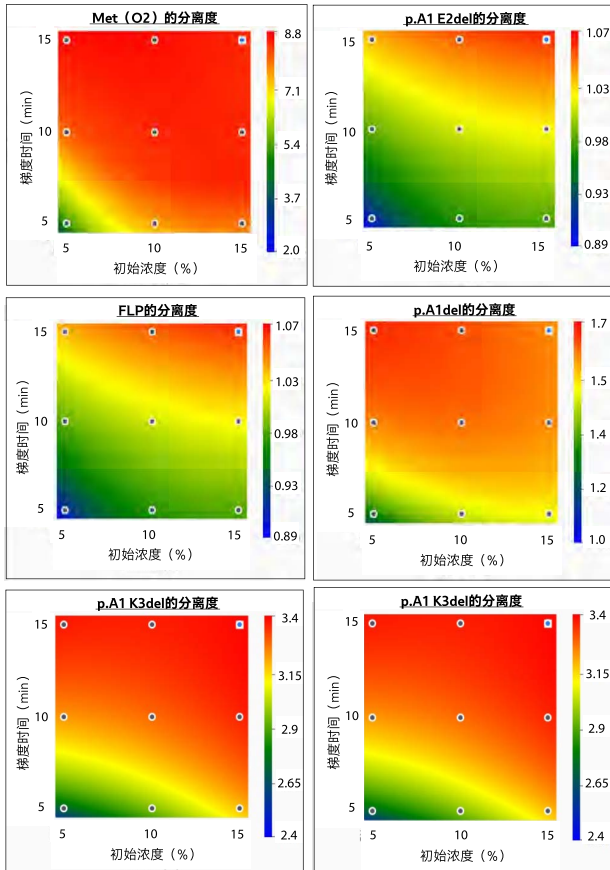


图 20 FLP 和杂质分离度的设计空间 (流速: 0.6 mL/min)

LabSolutions MD 可通过叠加设计空间, 自动检索满足多项标准的最佳条件。例如, 图 21 显示了满足以下要求的分析条件区域: FLP 和 p.A1del 分离度 >1.5、FLP 和 p.A1\_E2del 分离度 >1.0、p.A1\_D5del 保留时间 <6 min, 以缩短分析时间, 以及 Met (O2) 保留时间 >3 min, 以获得适当的保留。橘黄色线包围的区域是 FLP 和 p.A1del 的分离度 < 1.5 的区域, 粉色线包围的区域是 FLP 和 p.A1\_E2del 的分离度 < 1.0 的区域, 黄线包围的区域是 p.A1\_D5del 的保留时间 > 6 min 的区域, 棕线包围的区域是 Met (O2) 的保留时间 < 3 min 的区域。其余区域中的点 A (红色圆圈) (由黑色阴影线示出) 代表满足所有标准的最佳条件 (初始浓度: 9%, 梯度时间: 11.5 min, 流速: 0.6 mL/min)。通过叠加设计空间, 可以轻松确定所需的条件。

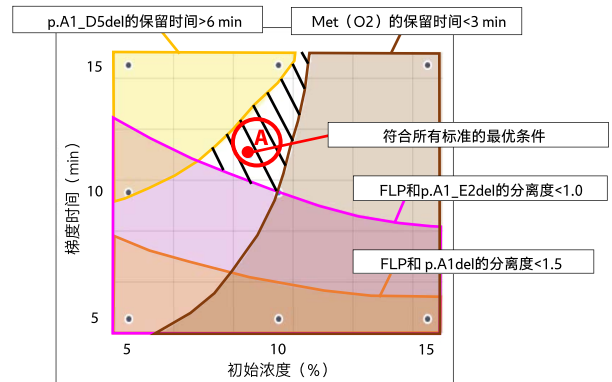


图 21 分离度和保留时间设计空间的叠加

## 最佳条件下的色谱图

在最佳条件下得到的色谱图 (A 点) 如图 22 所示。结果显示 FLP 和 p.A1del 的分离度 >1.5, FLP 和 p.A1\_E2del 的分离度 >1.0, p.A1\_D5del 的保留时间 <6 min, Met (O2) 的保留时间 >3 min, 成功满足优化标准。通过利用设计空间, 可以轻松确定所需的条件, 且无需色谱分析经验。

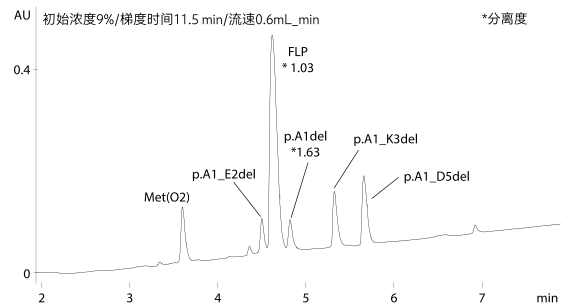


图 22 最佳条件下的色谱图 (水相流动相: 0.1% 甲酸 / 有机流动相: MeOH / 色谱柱: Scepter C8-120 / 柱温: 80°C)

## 结论

合成肽的分离模式因流动相组成、色谱柱类型和各种液相参数 (如梯度条件、柱温箱温度和流速) 而异。分离行为也可能因肽结构而异, 包括长度、氨基酸组成和修饰的存在。因此, 必须单独优化每个肽序列的分离。然而, 通过大量分析和数据处理来优化分析条件可能非常耗时。LabSolutions MD 具有自动峰追踪、对色谱图进行排序和设计空间可视化等功能, 可实现整个工作流程的自动化, 包括分析计划的生成、流动相的制备和数据处理。本文介绍了一个通过筛选和优化阶段有效确定合成肽最佳分离条件的案例。LabSolutions MD 还通过 AI 算法实现全自动梯度优化, 以满足用户定义的标准。有关更多详细信息, 请参见应用新闻“AI 算法对合成肽和杂质的梯度条件自动优化: 01-00814”。

岛津应用云



LabSolutions、Nexera、Shim-pack、Shim-pack Velox、Shim-pack Scepter 和 DUIS 是 Shimadzu Corporation 或其附属公司在日本和 / 或其他国家的商标。



岛津企业管理 (中国) 有限公司  
岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439  
400-650-0439

免责声明:

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;  
\* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。  
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2024 年 10 月