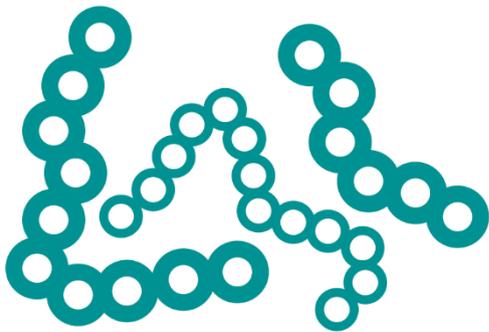


## SEC-MALS测定 多肽的分子量



### 多肽分析

#### 客户面临的挑战

- ▶ 需了解所研究的肽的分子量。
- ▶ 需使用非变性条件。

#### 东曹的解决方案

##### LenS<sub>3</sub> MALS检测器

- ▶ 精确测定 < 10 kDa的分子量。

##### 做了什么？

- ▶ 通过SEC分离分子量为4 kDa的肽，并通过RI和MALS进行测定。

##### 结果如何？

- ▶ 可对低至4 μg进样量的样品进行分子量测定。

LenS<sub>3</sub> MALS检测器可用于无损的肽分析，即使进样量很低（4 μg），也能精确测定分子量（例如3.7 kDa），这使其成为LC-MS的理想替代方案或补充手段。

#### 客户获益

对低MW样品及低样品量下进行高灵敏度的MALS分析

TOSOH BIOSCIENCE  
**SEPARATION  
& PURIFICATION**

CONNECTING MINDS.  
TOUCHING LIVES.



# 使用非变性SEC-MALS精确测定肽的分子量

## 简介

自1922年牛胰岛素首次用于治疗以来，肽已成为一类重要的治疗药物，并有超过110种的多肽类药物获批上市。它们之所以如此受欢迎，是因为其具有较高的靶点特异性、良好的疗效以及低副作用及持续改进的策略。这些策略包括PEG化、环化或与脂质偶联，用以克服诸如肾清除率高、膜渗透性差等局限性。

肽结构的表征对于治疗的安全性和有效性至关重要，而液相色谱-质谱联用（LC-MS）技术主要用于该目的。虽然该方法能提供有关结构及修饰的详细信息，但它可能会导致一些不良修饰，从而使结果出现偏差。这些不良修饰包括二级结构的破坏、肽与流动相组分形成加合物，或者肽在电离过程中发生裂解。因此，需要采用其他方法在非变性条件下测定肽的分子量（MW）和可能存在的杂质。

尺寸排阻色谱（SEC）与多角度光散射（MALS）联用作为一种无损的分子量测定方法，其应用一直局限于较大分子（>10 kDa）。LenS<sub>3</sub> MALS检测器的创新性流通池设计提高了灵敏度，实现了通过MALS表征肽之类的低分子量分子。研究人员使用LenS<sub>3</sub> MALS检测器对分子量为3.5~4 kDa的肽的分子量进行了测定，并且在肽进样量低至4 μg时仍能成功完成测定。

## 实验条件

色谱柱：市售SEC色谱柱  
 （8 nm（80 Å）孔径；4.6 mm ID × 5 cm L）  
 流动相：20 mmol/L磷酸盐缓冲溶液pH 7.0  
 流速：0.2 mL/min  
 检测：MALS（LenS<sub>3</sub>）、RI  
 温度：25°C  
 进样量：1~10 μL  
 样品：1 mg/mL的肽  
 （据生产商提供的信息，MW在3.5~4 kDa之间）  
 仪器：UHPLC系统

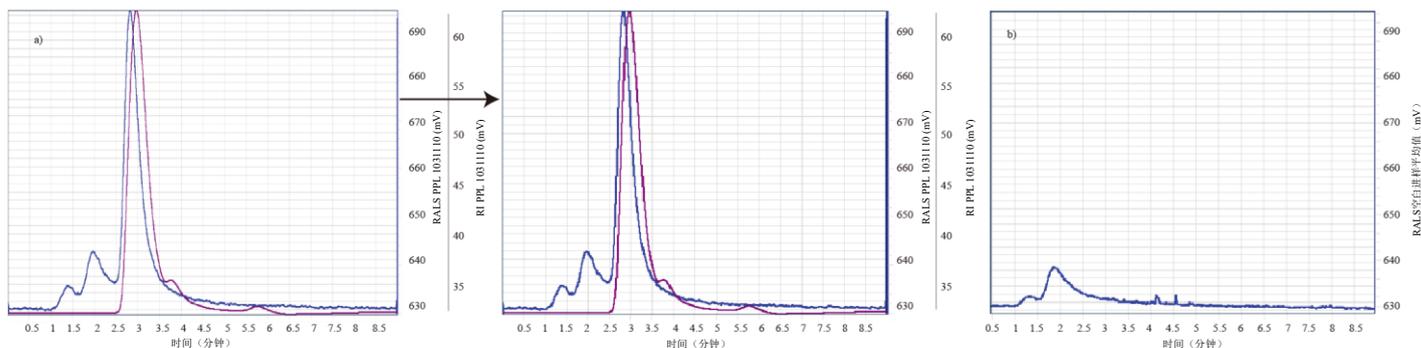
## 结果和讨论

### 肽分子量测定的灵敏度和稳健性

分子量可使用尺寸排阻色谱结合浓度检测器和光散射检测器的方式来测定。采用SEC色谱柱分离肽样品，同时通过RI和MALS进行检测。图1是用于MW计算的RI信号（紫色）和90°角光散射信号（RALS，蓝色）的色谱图。使用SECview软件中的系统校准步骤（右图）校正了因流路和检测器的流通池体积的差异而导致的RI信号保留时间的偏移（左图）。

RALS信号在3分钟处的主峰之前，于1.5分钟和2分钟处显示出额外的峰。由于这些峰在RI信号中不可见，但存在于空白进样的RALS信号中，所以该信号很可能源于进样过程中压力猛增所释放出的颗粒（例如色谱柱的填料脱落）。

图1 肽的SEC分离



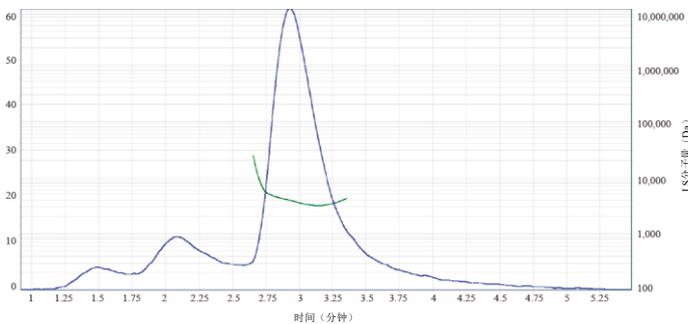
- a) 进样量为10 μg时，校准前（左图）和校准后（右图）的RI（紫色）信号和RALS（蓝色）信号。  
 b) 空白进样表示系统峰。

## 分子量测定

根据浓度（使用RI信号和 $dn/dc$ 为0.185）和RALS信号，通过SECview软件计算出主峰的分子量。在这个10  $\mu$ l进样量的示例中，计算出的平均分子量为3,947 Da。然而，由于存在系统峰，分子量曲线在峰前沿处呈现出急剧上升，这可能会导致对分子量的高估。计算出的峰最大值处的分子量（MWp）是3,705 Da，这一事实支持了上述假设。这两个数值均在生产商提供的3.5~4 kDa的分子量范围之内。

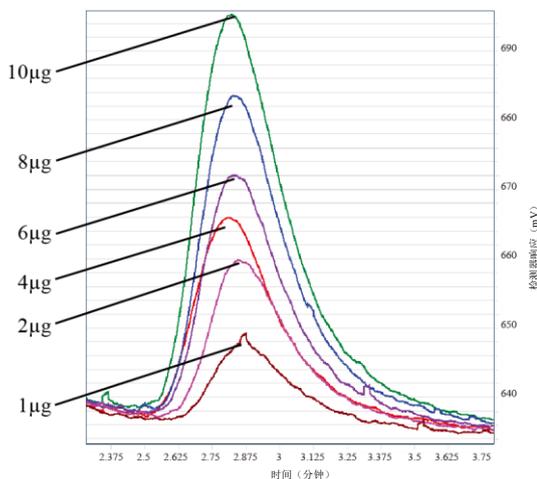
上述分析的肽分子量约为3.5~4 kDa，与蛋白质、聚合物这类样品相比，其光散射响应相对较低。由于光散射检测器的信号取决于MW和浓度，因此小样品量分析的难度更大，而且只有使用灵敏度高的MALS检测器才有可能完成分析（详细信息请参阅“用于测定分子量和回转半径的光散射”一文）。LenS<sub>3</sub> MALS检测器的灵敏度已在1  $\mu$ g~10  $\mu$ g的样品量范围内得到了验证。

图2 肽的MALS分析



进样量为10  $\mu$ g的肽的RALS信号及分子量轨迹。在峰最大值处计算出的分子量为3,705 kDa，峰的平均分子量为3,947 kDa。

图3 RALS信号的叠加图（进样量为1~10  $\mu$ g）



对于所有进样量的样品，RALS信号均产生了一个明显高于噪音水平的可见峰（图3，表1）。根据生产商提供的信息，该肽的分子量在3.5~4.0 kDa之间，这与MALS检测器测定到的约3.7 kDa的分子量相符。然而，由于系统峰会干扰肽峰（另见图1的b），所以只有在进样量低至约4  $\mu$ g时，才能进行可靠的分子量计算。使用孔径较大的色谱柱（例如TSKgel® UP-SW2000）或者使用无填料脱落的色谱柱（TSKgel UP-SW3000-LS），来实现肽的后期洗脱，分子量测定的下限可降低至更低的进样量。

研究人员通过三次重复进样，对MALS测定肽分子量的重复性进行了测试。所有三次重复进样的标准偏差均低于1%（表1），这表明该方法是一种稳健的方法。

表1 SEC-MALS测定肽的分子量

进样量 ( $\mu$ g)	计算出的MWp (kDa)	标准偏差 (kDa)	标准偏差 (%)	信号/噪音
10	3.717	0.009	0.254	203
8	3.703	0.017	0.459	167
6	3.751	0.007	0.176	130
4	3.867	0.025	0.679	93
2	4.202	0.070	1.673	47
1	4.79	0.070	1.465	26

系统峰影响增大——无法进行可靠的分子量计算。

SEC-MALS对不同进样量的肽进行分子量测定。标准偏差是基于三次重复进样计算的。信噪比是基于三次进样的平均值计算的。

## 结论

我们的分析方法展示了利用RI，MALS检测器有效检测肽这类低散射物质的能力。即使进样量低至1  $\mu$ g，也仍未达到IUPAC所定义的检测限（3倍噪音+基线），这表明了检测器具有较高的灵敏度。

分子量测定取得了成功，得出的结果为3.7 kDa，在预期值范围3.5~4 kDa之间。检测进样量低至4  $\mu$ g时，也能够实现可靠且可重复的肽分子量的测定。LenS<sub>3</sub> MALS检测器是一种可靠且无损的质量分析方法，可成为LC-MS的理想替代方案或补充手段。

## 精选产品

货号	产品描述
0040000	LenS <sub>3</sub> 多角度光散射检测器

Tosoh Bioscience和TSKgel是Tosoh Corporation的注册商标。

LenS是Tosoh Bioscience LLC的商标。

数据是与PolyPeptide Laboratories France公司合作生成的。

