

蛋白质的反相液相色谱保留方程研究

丁玲 董军 肖远胜 张秀莉 薛兴亚 梁鑫淼*

(中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023)

摘要 要以胰岛素、细胞色素 C、溶菌酶、转铁蛋白和肌红蛋白 5 种标准蛋白为研究对象, 将 6 种浓度的标准蛋白在反相色谱 (Waters Symmetry 300 C₄、Waters Symmetry 300 C₁₈、C₈HC) 的保留时间非线性拟合 (CSASS 软件), 获得了 5 种蛋白质在 3 种色谱柱的 $\ln k = a + cC_B$ 方程, 15 个方程的回归系数均大于 0.999, 证实方程 $\ln k = a + cC_B$ 可准确地描述蛋白质在反相色谱的保留规律。运用该方程可预测蛋白质在其它梯度条件下的保留时间, 预测值和实验值的相对误差均小于 5%。该方程还可用于蛋白质混合物的梯度分离的优化, 20 min 内可实现 5 种标准蛋白的基线分离。

关键词 蛋白质; 反相色谱; 保留方程; 预测; 优化

1 引言

蛋白质是生物有机体的重要组成部分, 它在生命活动的各个环节 (如新陈代谢、神经传导、遗传和繁殖过程) 中起着重要作用。同时, 蛋白质在食品、药品、医学诊断和生物催化领域也有广泛应用。蛋白质是现代科学研究的热点之一。大规模高效分离制备蛋白质, 对基础研究及工业生产都具有重要意义。

蛋白质的色谱分离方法主要包括离子交换色谱 (IEC)^[1,2]、体积排阻色谱 (SEC)^[3,4]、亲和色谱 (AFC)^[5,6]、疏水作用色谱 (HIC)^[7,8] 和反相高效液相色谱 (RPLC)^[9-12] 等。RPLC 与其它几种分离方法相比具有很多优势: 分离效率高、重现性好、操作简单, 使用挥发性流动相, 免去了脱盐的繁琐步骤, 还可以与质谱技术联用, 因此, RPLC 已成为一种重要的蛋白质分离纯化技术。然而蛋白质的反相分离经常存在一些问题。蛋白质的分子量较大, 空间结构复杂, 与固定相、流动相及其它溶质之间存在多种相互作用, 易造成谱带扩散、拖尾等问题。另外, 蛋白质与小分子化合物相比有着不同的保留行为。以往研究发现, 流动相中有机相浓度的微小变化都会对蛋白质的保留产生较大的影响^[13], 一旦有机相达到一定浓度, 分子会立即洗脱, 这个机理也被称为“on-off”机制^[14]。实际分离时, 不同蛋白质的特性不同, 选择合适的洗脱条件有一定困难。因此, 研究蛋白质的反相色谱保留规律并用于优化分离条件是非常重要的。

目前, 对于色谱保留规律的描述有很多模型, 如定量结构保留关系 (QSRR)^[15]、人工神经网络 (ANN)^[16]、计量置换理论 (SDT-R)^[17] 及线性溶剂强度模型 (LSS)^[18] 等。这些模型可以准确描述给定溶质的色谱保留行为, 但是它们的参数较多且复杂, 为了获取参数, 需要知道溶质的结构信息或者进行复杂的实验, 所以在实际分离中应用这些模型来优化蛋白质分离条件存在一定的局限性。邹汉法等^[19] 提出的顶替吸附-相互作用模型, 既考虑了溶质和溶剂在固定相表面的竞争顶替吸附效应, 又充分考虑到了溶剂和溶质的相互作用, 是一个较合理的液相色谱保留过程的物理化学模型。该模型的表达式参数少, 形式简单, 只需进行几次不同的梯度实验即可计算出保留参数值, 很适合实际分离过程的梯度条件优化。目前, 顶替吸附-相互作用模型可以很好地描述小分子化合物在反相色谱的保留行为, 实现保留时间的准确预测^[19,20], 但是用该模型描述蛋白质反相色谱保留行为的研究甚少。

本研究以标准蛋白为研究对象, 将 6 种浓度的标准蛋白在反相色谱的保留时间非线性拟合, 得到各蛋白的保留参数值, 验证了顶替吸附-相互作用模型能够准确的描述大分子蛋白质在反相色谱的保留行为, 实现了任意梯度下保留时间的预测, 以达到快速准确地优化蛋白质反相色谱分离条件的目的。

2012-08-31 收稿; 2012-10-15 接受

本文系国家重点基础研究发展计划 (No.2012CB910601) 和“十二五”国家科技支撑计划项目 (No.2012BAD33B03) 资助

* E-mail: liangxm@dicp.ac.cn

2 实验部分

2.1 材料与试剂

乙腈(色谱纯,Fisher公司);实验用水经Milli-Q超纯水净化系统过滤,三氟乙酸(Tedia公司)。蛋白质标准品胰岛素(Ins, bovine pancreas)、溶菌酶(Lys, chicken egg white)、细胞色素C(Cyt c, bovine heart)、转铁蛋白(Tf, bovine)、肌红蛋白(Mb, equine skeletal muscle)均购于Sigma-Aldrich公司,5种标准蛋白的信息见表1。所有蛋白质保存于 -20°C ,色谱分析前,用0.1% TFA溶液配制成每种蛋白浓度为0.2 g/L的混合标准溶液。

表1 5种标准蛋白质的信息

Table 1 Information of five standard proteins

标准蛋白质 Standard proteins	分子量 Molecular weight	等电点 pI	总氨基酸个数 Total number of amino acid residues in protein
细胞色素 C Cytochrome C, Cyt c	11833	9.8	104
胰岛素 Insulin, Ins	5684	5.3	51
溶菌酶 Lysozyme, Lys	16238	11	147
转铁蛋白 Transferrin, Tf	78056	5.5	708
肌红蛋白 Myoglobin, Mb	17800	7.0	154

2.2 仪器条件

Waters 高效液相系统(包括 2695 梯度泵、自动进样器、柱恒温系统、2489 紫外检测器、Empower 色谱工作站);色谱柱: Symmetry 300 C_4 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm , Waters 公司), C_8HC (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm , 实验室自制), Symmetry 300 C_{18} (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm , Waters 公司)。流动相: A 为 0.1% TFA 溶液, B 为 0.1% TFA-乙腈。用于计算各蛋白质保留参数 a 和 c 的梯度条件和验证预测结果的梯度条件见表 2。流速为 1 mL/min, 进样量为 5 μL , 柱温为 30°C , 检测波长为 214 nm。

表2 实验梯度条件

Table 2 Linear gradient conditions for calculation and prediction

梯度名称 Gradient name	梯度条件 Gradient condition (B%)
Gra1	0 ~ 10 min, 5% ~ 60% B
Gra2	0 ~ 20 min, 5% ~ 60% B
Gra3	0 ~ 30 min, 5% ~ 60% B
Gra4	0 ~ 40 min, 5% ~ 60% B
Gra5	0 ~ 50 min, 5% ~ 60% B
Gra6	0 ~ 15 min, 30% ~ 60% B
Gra7	0 ~ 5 min, 25% ~ 30% B; 5 ~ 10 min, 30% ~ 35% B; 10 ~ 20 min, 35% ~ 60% B
Gra8	0 ~ 15 min, 5% ~ 60% B
Gra9	0 ~ 5 min, 30% B; 5 ~ 15 min, 30% ~ 40% B; 15 ~ 30 min, 40% ~ 60% B

2.3 死时间和系统延迟时间的测定

死时间用尿嘧啶测定,流动相为 80% 乙腈-20% 水,检测波长 260 nm,3 个色谱柱的死时间分别为 Symmetry 300 C_4 (1.935 min), C_8HC (1.918 min), Symmetry 300 C_{18} (1.780 min)。

梯度延迟时间的测定^[20]:流动相 A 为纯水, B 为 0.1% 丙酮溶液,色谱柱用细管(1 m \times 120 μm i. d.) 代替,检测波长 265 nm,流速 2 mL/min。梯度洗脱:0 ~ 20 min, 5% ~ 95% B。形成的梯度曲线如图 1 所示。梯度延迟时间(t_D): $t_D = t_{1/2} - (t_2 - t_1)/2$ 。3 次测定的平均时间为 1.193 min。

2.4 数据计算

根据顶替吸附-相互作用模型,在反相色谱中,溶质的保留因子与有机相浓度之间存在近似关系:

$$\ln k = a + cC_B \quad (1)$$

其中, k 是保留因子($k = (t_R - t_0)/t_0$), t_R 为溶质保留时间, t_0 为死时间。 a 是溶质与固定相的相互作用能,溶质同流动相中溶剂的相互作用能和溶质分子体积相关的常数; c 是溶质与流动相中溶剂的作用能相关的常数, C_B 为流动相的实际浓度。

利用实验室自编软件 CSASS 进行非线性回归,求得参数 a 和 c 值。运算方法如下:在液相色谱中,

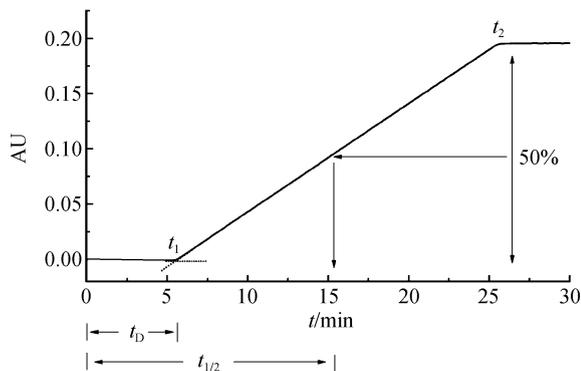


图1 系统梯度延迟时间的测定

Fig. 1 Determination of gradient delay of system

溶质的保留值取决于其在色谱柱内的迁移速率,而迁移速率又与流动相的组成密切相关,流动相组成对溶质的保留有很大影响。实验中溶质 i 在 t 时刻通过的距离可以用以下方程表示:

$$\theta_i = \int_0^R \frac{dt}{t_0(1+\exp[a+cC_B(t-t_0 \cdot \theta_i(t)-t_D))]} \quad (2)$$

当溶质从色谱柱流出时,上式可转化为:

$$\int_0^R \frac{dt}{t_0(1+\exp[a+cC_B(t-t_0 \cdot \theta_i(t)-t_D))]} = 1 \quad (3)$$

为了解这个方程,将柱子分成 n 段,采用欧拉算法来计算溶质通过每一段的保留时间,然后根据非线性最小二乘法完成迭代计算,输出最后的 a 和 c 值。根据计算的 a 和 c 值,在任意梯度下,溶质 i 的保留时间可以用式(4)计算:

$$t_{R,i} = \sum_{p=1}^m \sum_{j=0}^{n'-1} \frac{2j}{n'-1} t_R^*(t_{i,j}) \cdot \frac{\theta_i^p}{n'} \quad (4)$$

其中, t_R^* 是虚拟保留时间,它等于在 t 时刻对应浓度下溶质 i 通过全柱的保留时间,即式(5):

$$t_i^*(t) = t_0(1+\exp[a+cC_B(t-t_0 \cdot \theta_i(t)-t_D)]) \quad (5)$$

其中, m 为总阶数, n 为各阶梯段数, θ_i^p 为第 p 阶段组分 i 的相对迁移距离。

根据以上运算思路,每个蛋白质的保留参数 a 和 c 值都可以计算出来,同时根据该参数能够对任意梯度下的蛋白质保留时间进行预测。

3 结果与讨论

3.1 标准蛋白的反相色谱保留参数值

本实验选择5种性质不同的标准蛋白作为对象,对其在 Symmetry 300 C_4 上的保留参数值进行测定。根据方程(1),理论上用两个任意梯度就可以计算出 a 和 c 值,但是为了减小误差,获取更加准确的保留参数值,进行了6次不同的梯度洗脱,其中 Gra 1 ~ Gra 5 的起始、终止有机相浓度相同,但是运行时间不同; Gra6 提高了起始有机相浓度,以便获得更宽的梯度预测范围。根据6次梯度实验,可以得到每个蛋白在不同梯度下的保留时间,然后利用实验室自编软件 CSASS 进行非线性拟合,计算出5种标准蛋白在 Symmetry 300 C_4 上的保留参数,结果如表3所示。由表3可见,对于5种标准蛋白,方程(1)的回归系数均大于0.999,这说明不同性质的蛋白质在反相色谱的保留规律都可以用该方程描述。

3.2 流动相中乙腈浓度对蛋白质色谱保留行为的影响

从表3可见,大分子蛋白质的 c 的绝对值很大。而小分子化合物在反相色谱模式下的 c 的绝对值较小^[21~23]。为了进一步解释有机相浓度的变化对蛋白质反相色谱保留行为的影响,将求得的 a 和 c 值带入方程(1)中, $\ln k$ 和 t_R 分别对 C_B 作图,如图2所示。

在图2a中, a 代表曲线的截距,表示在洗脱剂浓度为0时,蛋白质与固定相之间的固有的吸附力, a 值越大越不易洗脱。 c 代表曲线的斜率, c 的绝对值越大时,相同的 C_B 的变化 (ΔC) 引起保留因子的变化 ($\Delta \ln k$) 就越大。由表3可知,蛋白质的 c 值的绝对值较大,这就意味着蛋白质只有一个很窄的有机溶剂洗脱浓度“窗口” (ΔC_B), 在这个窗口之外是两种极端情况——保留时间很长或者没有保留。此结论在图2b中可更加直观地反映出来。图2b是保留时间 t_R 对有机相浓度 C_B 的指数函数曲线。以 Cyt c 为例,在 $C_B=0.27$ 时, t_R 极大,可以视为死吸附; $C_B=0.3$ 时, t_R 接近死时间。只有在 $0.27 \sim 0.30$ 这个很小的区间内, Cyt c 的保留时间适合色谱分离。以上结论验证了大分子蛋白质保留时间对有机相浓度的敏感性,同时说明蛋白质不宜用等度条件分离,因为在实际操作中很难找准合适的有机相浓度,即使找到了这个浓度,实验误差造成的有机相微小变化也会对蛋白质的保留产生很大影响。

表3 5种标准蛋白在 Symmetry 300 C_4 上的保留参数 (a 和 c) 值

Table 3 Retention parameters (a and c) of five standard proteins on Symmetry 300 C_4 column

蛋白质 Proteins	a	c	R^2
Cyt c	38.92	-126.49	0.99987
Ins	21.02	-68.99	0.99999
Lys	47.2	-138.98	0.99997
Tf	163.62	-466.46	0.99988
Mb	76.64	-188.76	0.99998

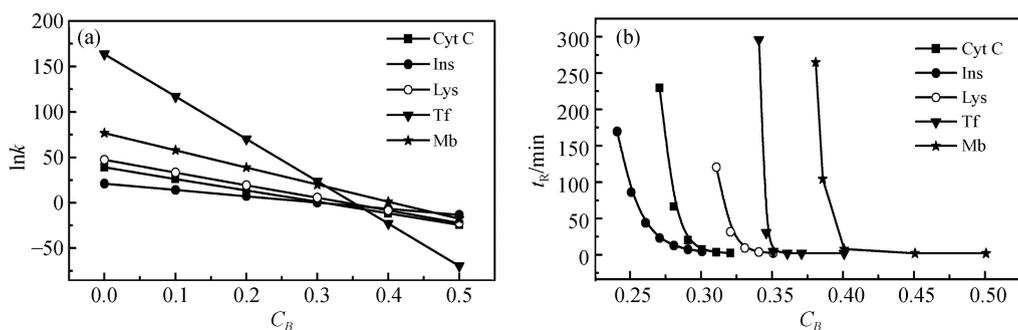


图 2 (a) 5 种蛋白质的保留因子随有机相浓度变化曲线 $\ln k$; (b) 保留时间随有机相浓度变化曲线 t_R-C_B 。 C_B 为流动相中乙腈的浓度

Fig. 2 Plot of (a) retention factors versus solvent content in mobile phase and (b) retention times versus solvent content in mobile phase for 5 proteins on Symmetry 300 C_4 column. C_B is the acetonitrile concentration in mobile phase

表 3 还显示了每个蛋白质的 c 值是不同的,所以它们的 $\ln k$ 对 C_B 曲线就会有交点。在交点处,两个蛋白共洗脱,提高或降低有机相浓度都可以使蛋白质分离。另外,在交点的两侧,两种蛋白的出峰顺序也发生了改变。方程(1)解释了蛋白质在不同梯度下有不同的分离选择性的原因,也进一步证明了该方程可以用于描述大分子蛋白质的反相色谱保留行为。

3.3 蛋白质在不同种类反相固定相上的保留规律

为了验证方程(1)在描述蛋白质反相色谱保留规律方面是否具有普遍适用性,选择了另外两种固定相 Symmetry 300 C_{18} 和 C_8 HC,用与 3.1 节相同的流动相梯度,计算两者的 a 和 c 值,结果见表 4。对这两个固定相,方程(1)的回归系数都高于 0.999,说明方程能够描述蛋白质在不同类型反相色谱上的保留规律。蛋白质在 3 个固定相的保留参数 a 和 c 值不同,体现了不同固定相对蛋白质保留性质的差异性。

表 4 5 种蛋白质在 Symmetry 300 C_{18} 和 C_8 HC 上的保留参数值

Table 4 Retention parameters (a , c) of five standard proteins on Symmetry 300 C_{18} and C_8 HC column

蛋白质 Proteins	Symmetry 300 C_{18}			C_8 HC		
	a	c	R^2	a	c	R^2
Cyt-c	39.6	-126.46	0.99984	35.41	-119.39	0.99986
Ins	23.53	-74.67	0.99993	22.83	-76.5	0.99993
Lys	53.22	-151.65	0.99991	90.07	-272.24	0.99995
Tf	180.63	-498.62	0.99992	153.31	-446.16	0.9998
Mb	55.78	-131.14	0.99996	188.41	-469.52	0.99997

3.4 蛋白质保留时间的预测和分离条件的优化

梯度条件的选择是蛋白质反相色谱分离的难点,仅凭借经验优化梯度条件费时费力,很难达到理想效果。前文已经证明顶替吸附-相互作用模型能够准确的描述大分子蛋白质在反相色谱的保留行为,结合软件 CSASS 的使用,就能实现蛋白质在反相色谱保留时间的预测和分离条件的优化。

采用该模型预测了 5 种标准蛋白在 Gra7, Gra8 和 Gra9 条件下的保留时间,预测结果与实际保留时间进行了对比,结果见表 5。对 3 种不同的固定相而言,预测的保留时间和实验测得的保留时间非常接近,所有预测值的相对误差均小于 5%,且只有一个为 4.31%,其余都在 2% 以内。

基于保留时间的准确预测,分离条件的快速优化就不难实现了。以 Symmetry 300 C_4 为例,5 种标准蛋白在 Gra1 ~ Gra6 条件都不能实现完全分离。Cyt c 和 Ins, Lys 和 Tf 在这几个梯度下经常出现峰重叠,但是它们的洗脱顺序在不同梯度下发生变化(图 3a 和图 3b),说明这几种蛋白具有一定的分离选择性,只是分离条件不合适。根据已知的 a 和 c 值,可以自行设置任意梯度条件,CSASS 软件会给出 5 种蛋白在该条件下的模拟色谱图。图 3c 是在梯度为 29% (0 min) ~ 31% (5 min) ~ 35% (10 min) ~ 60% (20 min) 时的模拟图,可预见 5 种蛋白在该条件下能够得到完全分离。为了验证这个优化结果是

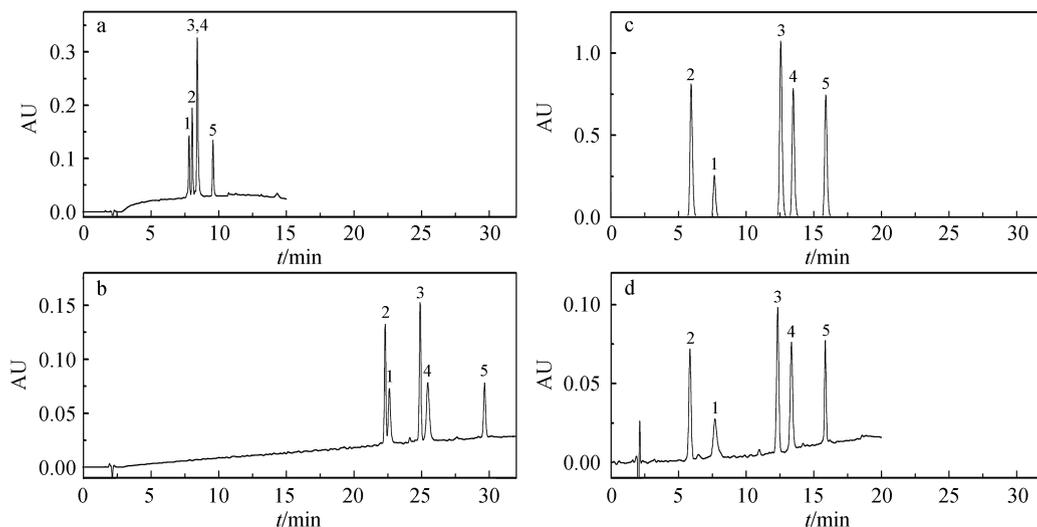
表5 5种标准蛋白在 Gra7, Gra8 和 Gra9 条件下实验保留时间和预测保留时间

Table 5 Experimental and predicted retention times of five standard proteins under Gra7, Gra8 and Gra9 conditions

蛋白质 Proteins	Symmetry C ₄ -Gra7			C ₈ HC-Gra8			C ₁₈ -Gra9		
	Exp (min)	Pre (min)	Err (%)	Exp (min)	Pre (min)	Err (%)	Exp (min)	Pre (min)	Err (%)
Cyt-c	9.63	9.61	0.24	9.38	9.52	1.46	9.30	9.25	0.57
Ins	8.91	9.02	1.16	9.62	9.69	0.76	7.01	7.31	4.31
Lys	12.68	12.8	0.92	10.37	10.35	0.16	13.59	13.72	0.94
Tf	13.33	13.43	0.73	10.53	10.64	1.01	14.67	14.64	0.19
Mb	15.83	15.84	0.04	12.35	12.37	0.16	20.49	20.52	0.14

Exp: experimental; Pre: Predicted; Err: error.

否准确,用这个预测梯度进行了实验,结果见图3d。对比真实保留时间和预测保留时间,每种蛋白的预测相对误差均小于2%,可见本方法可以用于蛋白质的分离条件优化。

图3 5种标准蛋白在 Symmetry 300 C₄ 不同梯度下的色谱图Fig. 3 Chromatograms for five standard proteins on Symmetry 300 C₄ under different gradient conditions

(a) Gra1; (b) Gra4; (c) 优化梯度预测谱图; (d) 优化梯度实际谱图。1. 细胞色素 C; 2. 胰岛素; 3. 溶菌酶; 4. 转铁蛋白; 5. 肌红蛋白。

(a) Gra1; (b) Gra4; (c) Predicted result for optimizing gradient; (d) Experimental result for optimizing gradient. 1. Cyt-C; 2. Ins; 3. Lys; 4. Tf; 5. Mb.

4 结论

本研究利用6次线性梯度,获取了5种标准蛋白的保留参数,验证了基于顶替吸附-相互作用模型的方程 $\ln k = a + cC_B$ 能够准确描述大分子蛋白质在反相色谱的保留规律。结合 CSASS 软件的使用,可以对保留时间进行预测,获得了很好的预测结果。本方法可以帮助实现蛋白质色谱分离条件的快速准确优化。

References

- Guérin-Dubiard C, Pasco M, Hietanen A, Quiros del Bosque A, Nau F, Croguennec T. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1090(1-2): 58-67
- Pessela B C C, Munilla R, Betancor L, Fuentes M, Carrascosa A V, Vian A, Fernandez-Lafuente R, Guisán J M. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1034(1-2): 155-159
- Kunji E R S, Harding M, Butler P J G, Akamine P. *Methods*, **2008**, 46(2): 62-72
- Yuan H, Zhang L, Zhang W, Liang Z, Zhang Y. *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216(42): 7024-7032
- Huse K, Böhme H J, Scholz G H. *J. Biochem. Bioph. Methods*, **2002**, 51(3): 217-231
- Lehr R V, Elefante L C, Kikly K K, O'Brien S P, Kirkpatrick R B. *Protein Expr. Purif.*, **2000**, 19(3): 362-368

- 7 Kato Y, Nakamura K, Kitamura T, Moriyama H, Hasegawa M, Sasaki H. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 971(1-2): 143-149
- 8 Queiroz J A, Tomaz C T, Cabral J M S. *J. Biotechnol.*, **2001**, 87(2): 143-159
- 9 ZHAO Xin-Ying, QU Feng, DONG Min, CHEN Fan, LUO Ai-Qin, ZHANG Jing-Hua. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2012**, 40(1): 38-42
赵新颖, 屈锋, 董敏, 陈凡, 罗爱芹, 张经华. *分析化学*, **2012**, 40(1): 38-42
- 10 Eschelbach J W, Jorgenson J W. *Anal. Chem.*, **2006**, 78(5): 1697-1706
- 11 Hamada T, Tanaka H, Izumine H, Ohira M. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1043(1): 27-32
- 12 Mant C T, Hodges R S. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 972(1): 101-114
- 13 Barford R A, Sliwinski B J, Breyer A C, Rothbart H L. *J. Chromatogr. A*, **1982**, 235(2): 281-288
- 14 Belenkii B G, Podkladenko A M, Kurenbin O I, Mal'tsev V G, Nasledov D G, Trushin S A. *J. Chromatogr. A*, **1993**, 645(1): 1-15
- 15 Ladiwala A, Xia F, Luo Q, Breneman C M, Cramer S M. *Biotechnol. Bioeng.*, **2006**, 93(5): 836-850
- 16 Petritis K, Kangas L J, Ferguson P L, Anderson G A, Pasa-Tolic L, Lipton M S, Auberry K J, Strittmatter E F, Shen Y F, Zhao R, Smith R D. *Anal. Chem.*, **2003**, 75(5): 1039-1048
- 17 Xindu G, Regnier F E. *J. Chromatogr. A*, **1984**, 296(0): 15-30
- 18 Snyder L R, Dolan J W, Gant J R. *J. Chromatogr. A*, **1979**, 165(1): 3-30
- 19 ZOU Han-Fa, ZHANG Yu-Kui, LU Pei-Zhang. *High Performance Liquid Chromatography*. Beijing: Science Press, **1998**: 41-45
邹汉法, 张玉奎, 卢佩章. *高效液相色谱法*. 北京: 科学出版社, **1998**: 41-45
- 20 Dolan J W. *LCCG North Am.*, **2006**, 24(5): 458-466
- 21 Jin G, Xue X, Zhang F, Jin Y, Liang X. *Talanta*, **2009**, 78(1): 278-283
- 22 MA Xiao-Qiong, WANG Long-Xing, XU Qing, ZHANG Feng, XIAO Hong-Bin, LIANG Xin-Miao. *Chem. J. Chinese Universities*, **2004**, 25(2): 238-242
马小琼, 王龙星, 徐青, 张峰, 肖红斌, 梁鑫淼. *高等学校化学学报*, **2004**, 25(2): 238-242
- 23 XU Qing, WANG Long-Xing, ZHANG Xi, JIN Gao-Wa, XIAO Hong-Bin, LIANG Xin-Miao. *Chinese Journal of Chromatography*, **2005**, 23(6): 630-632
徐青, 王龙星, 张曦, 金高娃, 肖红斌, 梁鑫淼. *色谱*, **2005**, 23(6): 630-632

Study on Retention Equation for Protein in Reversed Phase Liquid Chromatography

DING Ling, DONG Jun, XIAO Yuan-Sheng, ZHANG Xiu-Li*, XUE Xing-Ya, LIANG Xin-Miao*
(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract Study on the retention equation for protein in RPLC can contribute to optimizing gradient conditions for protein separation. In this study, five standard proteins, insulin, cytochrome C, lysozyme, transferrin and myoglobin were selected, and their retention time on three reversed-phase columns (Waters Symmetry 300 C₄, Waters Symmetry 300 C₁₈, C₈HC) under six different linear gradients was obtained. According to nonlinear curve fit (CSASS software), the retention equation for five standard proteins on three columns was established. The regression coefficients of the 15 equations were all above 0.999, indicating that the equation could accurately describe protein retention behavior on RPLC mode. Based on the equation, retention time for 5 standard proteins under other gradient conditions was predicted, and the relative errors for each protein were below 5%. This retention equation could be used in optimizing gradient conditions for protein separation on RPLC, leading to rapid baseline separation of five mixed standard proteins within 20 min.

Keywords Protein; Reversed phase liquid chromatography; Retention equation; Predict; Optimization

(Received 31 August 2012; accepted 15 October 2012)