

采用MaxPeak高性能表面的ACQUITY Premier技术可提高磷酸化肽的回收率

Jacob Kellett, Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

肽结构中的磷酸化基团可能会吸附至液相色谱(LC)系统和色谱柱硬件的金属表面，导致峰拖尾、回收率下降和重现性不佳。在痕量分析中，由于仪器响应减弱且/或敏感样品的表面吸附显著，这些问题会更加突出。本研究评估了采用MaxPeak高性能表面(HPS)的Waters ACQUITY Premier解决方案缓解痕量磷酸化肽因金属引起的表面吸附的能力。研究使用基于RPLC-MS的技术，观察到采用搭载MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier系统时，磷酸化肽的MS检测器响应高达使用常规硬件时的10倍。这种性能提升部分归功于MaxPeak HPS技术显著减少了金属敏感分析物拖尾并且提高了回收率，观察磷酸化肽的峰面积响应（与MaxPeak HPS技术表面积成比例增加）可以证明这一点。本研究展示了采用MaxPeak高性能表面的ACQUITY Premier解决方案如何通过改善金属敏感分析物的回收率、峰形和重现性来提高实验室的数据质量和工作效率。

优势

与常规液相色谱硬件和色谱柱相比，采用MaxPeak高性能表面的Waters ACQUITY Premier解决方案显著改善了磷酸化肽的回收率、峰形和重现性。

简介

吸附现象以及减少这种现象对色谱性能影响的策略仍然是一个受到持续关注的领域。吸附干扰（例如峰拖尾）会增加分析变异性并降低定量分析的准确度。在痕量分析中，吸附干扰会导致样品回收率降低和分析物的检测器响应不佳，使这些挑战更为突出。在某些情况下，这些吸附干扰可归因于分析物与金属表面的相互作用。背后的机理是携带富电子部分的分析物充当路易斯碱，并以非共价方式吸附到LC和色谱柱硬件金属表面上的缺电子活性位点。诸如此类因金属引起的吸附干扰在制药行业尤其受到关注，在这个行业，金属敏感部分（例如羧酸和/或磷酸基团）在药品组成中很常见。要降低与方法开发或常规研究相关的风险并尽可能避免不合时宜的延迟，需要可部署的解决方案，以提供可重现的结果来准确反映药物组成。

结果与讨论

采用MaxPeak高性能表面(HPS)技术的ACQUITY Premier解决方案是沃特世为解决因分析物/表面相互作用导致的吸附损失相关挑战而推出的。基于经验和既定知识，采用MaxPeak HPS技术的Waters ACQUITY Premier产品系列专门设计有屏障层，以减少分析物的非特异性吸附，从而提高敏感分析物的回收率、改善峰形和重现性。本研究的目的是展示ACQUITY Premier系统在使用反相液相色谱技术分析痕量磷酸化肽时的优势。

我们比较了三种系统配置，以考察采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier解决方案与配置常规金属表面的系统相比，在改善样品回收率和峰形方面的表现。这些配置包括：配备不锈钢色谱柱的常规LC系统、配备ACQUITY Premier色谱柱的相同的常规LC系统，以及由ACQUITY Premier系统搭配采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier色谱柱组成的ACQUITY Premier解决方案。本研究使用Waters MassPREP磷酸肽标准品—烯醇酶（沃特世P/N：186003285 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186003285-massprep-phosphopeptide-standard-enolase.html>>）中的单磷酸化肽（序列VNQIGpTLSESIK，单同位素质量数为1368.6776 Da）来评估采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier的性能。磷酸盐以其富电子结构而具有与金属离子络合的能力，因此成为评估MaxPeak高性能表面技术的理想探针，还可扩展用于评估ACQUITY Premier技术对分析含磷酸盐分析物的潜在影响。

简言之，使用1.85% B/min梯度（流动相A：H₂O、0.1% v/v FA，流动相B：乙腈、0.1% v/v FA）在反相LC条件下分离2.0 μL样品(3 pmol/μL)。使用ACQUITY QDa单四极杆质谱检测器在选择离子记录(SIR)模式下进行数据采集，以获得高灵敏度（仪器设置见图1）。利用Empower 3.0 (FR 4)进行峰积分和数据处理。利用配备ACQUITY

UPLC CSH C₁₈色谱柱(P/N: 186005297 <

<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186005297-acquity-uplc-csh-c18-column-130a-17--m-21-mm-x-100-mm-1-pk.html>>)的ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统代表常规LC系统, 与ACQUITY

Premier系统搭配ACQUITY Premier CSH色谱柱(P/N: 186009488 <

<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186009488-acquity-premier-peptide-csh-c18-column-130a-17--m-21-x-100-mm-1-.html>>)所组成的ACQUITY Premier解决方案进行对比。

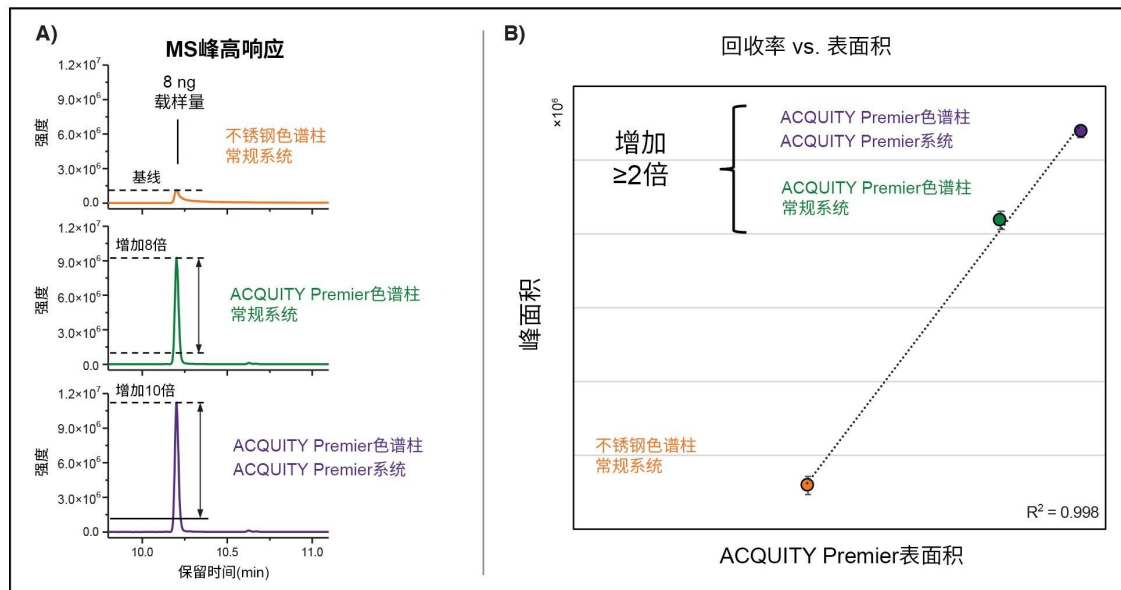


图1.采用HPS技术的ACQUITY Premier。A)利用单磷酸化肽(序列:VNQIGpTLSESIK,平均质量数=1369.4 Da)的[M+2H]²⁺电荷态(m/z = 685.0)的选择离子记录(SIR)色谱图,确定常规LC系统和色谱柱(上图)、配备ACQUITY Premier色谱柱的常规LC系统(中图)和配备ACQUITY Premier色谱柱的ACQUITY Premier系统(下图)的MS响应。B)使用一组3次重复进样,计算相应SIR中磷酸化肽峰的平均峰面积和标准偏差。ACQUITY QDa质谱检测器设置:探头温度 = 600 °C,毛细管电压 = 1.5 kV,锥孔电压 = 10 V, SIR = 685.0 m/z。

如图1A所示,在柱上载样量为8 ng的情况下,在配备不锈钢柱的常规LC上进行分离时,磷酸化肽表现出显著的吸附特性(橙色迹线),导致峰拖尾和严重的峰展宽,观察到的最大信号为离子计数 1.1×10^6 。相比之下,在采用MaxPeak HPS技术的Waters ACQUITY Premier色谱柱上进行相同的分离时,拖尾和峰形得到显著改善,导致信号强度增加8倍,最大信号响应为离子计数 9.3×10^6 (绿色迹线)。此外,当使用ACQUITY Premier解决方案(配备ACQUITY Premier色谱柱的ACQUITY Premier系统)进行分离时,与使用不锈钢色谱柱的常规系统相比,MS响

应提高10倍（离子计数 = 1.1×10^7 ），如图1A的紫色迹线所示。使用ACQUITY Premier解决方案与MaxPeak高性能表面时观察到的性能改善可归因于其不仅能够减少金属引起的吸附干扰，例如敏感分析物的拖尾，而且能够在痕量分析中提高样品回收率。这在峰面积响应随表面积相互作用的变化中得到了证明，如图1B所示。在本例中，与常规LC系统相比，采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier色谱柱所得到的样品回收率增幅最大，峰面积增加2倍。这归因于色谱柱硬件（例如筛板和外壳）的表面积相对于LC系统表面积具有明显更大的影响。不过，磷酸化分析物只有在使用ACQUITY Premier解决方案（配备ACQUITY Premier色谱柱的ACQUITY Premier系统）时才能获得最高的回收率，与单独使用ACQUITY Premier色谱柱相比，该解决方案可额外回收25%的磷酸化肽。这些结果展示了采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier解决方案在部署为实现理想色谱性能的综合解决方案时，如何实现高效的方法开发以及敏感分析物的准确监测，从而提高实验室工作效率。

结论

当使用配备常规金属硬件的LC系统时，分析物的非特异性吸附会导致样品回收率下降和峰形不佳。采用MaxPeak高性能表面的Waters ACQUITY Premier解决方案解决了与非特异性吸附相关的挑战，改善了敏感分析物的回收率、峰形和重现性。采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier系统带来的性能提升使科学家能够提高实验室工作效率，并在生物药物产品的开发和生产过程中提高分析的重现性、回收率和稳定性，从而降低风险。

特色产品

ACQUITY Premier解决方案 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135071970>>

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

ACQUITY QDa质谱检测器 <<https://www.waters.com/134761404>>

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007198ZH, 2021年3月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号