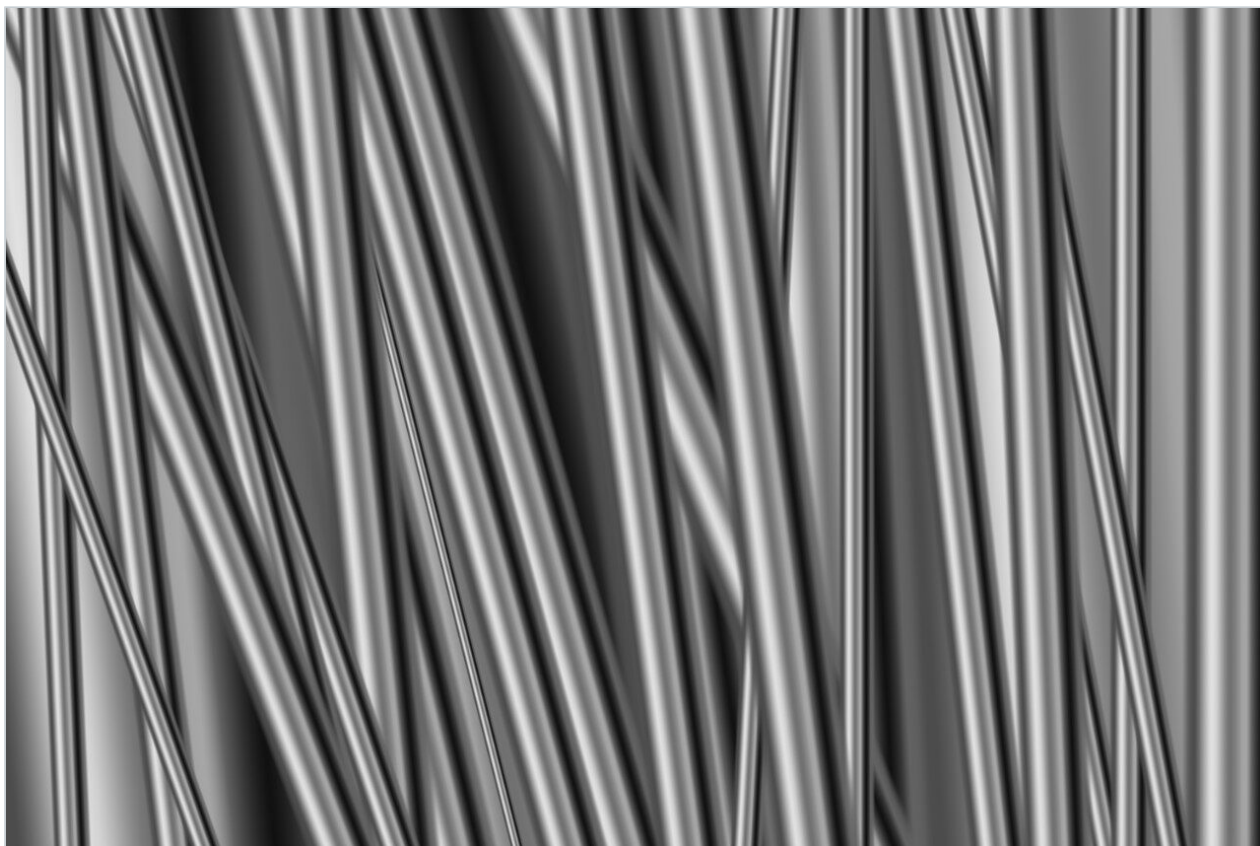


应用纪要

PREMIER C₁₈肽分析专用柱与钛内衬C₁₈色谱柱相比具有更高的色谱性能

Maureen DeLoffi, Jennifer M. Nguyen, Gary Izzo, Matthew A. Lauber, Mike Savaria

Waters Corporation



这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

含有酸性残基的肽（例如磷酸化翻译后修饰）在液相色谱(LC)中通常难以回收，因为分析物会吸附在缺电子金属表面（例如不锈钢）而损失。由于钛或金属合金制成的替代色谱柱硬件具有更高的耐腐蚀性，近年来，研究人员将其应用于此类分析物。但是，这些材料仍然可能导致金属离子介导的样品损失，导致难以回收含有酸性残基和修饰的低丰度物质或肽。

借助采用MaxPeak高性能表面的ACQUITY PREMIER C₁₈肽分析专用柱这项新技术，现在可以更轻松地研究对金属敏感的肽分析物。MaxPeak高性能表面可提供一层屏障，有效减少金属与分析物之间的相互作用以及由吸附引起的任何相关的样品损失。本应用简报比较了Waters ACQUITY PREMIER CSH C₁₈, 1.7 μm肽分析专用柱与市售钛内衬C₁₈, 1.6 μm色谱柱（表面带正电荷）。

本文重点介绍ACQUITY PREMIER C₁₈肽分析专用柱在高质量分离磷酸肽及某些推断的序列变体方面的性能优势，使用钛内衬C₁₈色谱柱无法实现这些分离。对于这些磷酸肽，ACQUITY PREMIER C₁₈肽分析专用柱可提供更高的回收率、更出色的峰形并显著减少样品调节的需求。此外，PREMIER色谱柱在高压下具有更高的填充床稳定性，因此非常适合高通量应用。

优势

- 与替代色谱柱硬件相比，能够改善回收率和峰形
- 具有更高的峰容量
- 大幅减少色谱柱老化需求
- 具有更高的填充床稳定性
- 表现出更高的耐压能力，能够以更快的流速完成高通量应用

简介

长期以来，分析物在金属表面的吸附一直是色谱分析领域的一道难题。之前的缓解策略包括表面钝化、使用流动相添加剂以及掺入惰性硬件材料。这些策略虽然在一定程度上取得成功，但各有其缺点。通过强酸或样品和/或基质老化对表面进行钝化非常耗时，由于需要使用强酸，因此色谱柱使用寿命不长¹。流动相添加剂（例如螯合剂）有助于防止分析物被金属吸附，但也存在离子抑制、可能的溶解度问题以及必须持续使用才能保持有效等缺点²。PEEK色谱柱或PEEK内衬不锈钢色谱柱用惰性材料替代金属表面，但单独使用PEEK无法耐受高压

，且PEEK材料的尺寸差异性较大、筛板渗透性较低且与某些溶剂不兼容。

近年来，市场上出现采用钛硬件的色谱柱，其生物惰性更强，可作为传统不锈钢色谱柱的替代品。钛具有耐腐蚀性，并且对某些化合物呈惰性。但是，由于其本质仍为金属，同样可能引起分析物吸附，从而造成样品损失。此外，已有研究发现，与甲醇流动相配合使用时，钛会浸出金属离子³。

本应用简报比较了带有钛内衬和钛制筛板的市售色谱柱与采用MaxPeak高性能表面(HPS)技术的ACQUITY PREMIER C₁₈肽分析专用柱。MaxPeak HPS是一种有机/无机杂化表面技术，已被证明可用于阻止分析物与金属表面的相互作用。本研究表明，竞争产品钛内衬C₁₈色谱柱对磷酸化肽的回收率明显低于ACQUITY PREMIER C₁₈肽分析专用柱。我们从以下两方面比较了这两种色谱柱的性能：使用4组分磷酸肽混合物考察色谱性能；通过填充床稳定性测试模拟色谱柱使用寿命。

结果与讨论

本研究选择磷酸肽应用来展示ACQUITY PREMIER肽分析专用柱和市售钛内衬色谱柱的性能差异。磷酸肽含有阴离子磷酸基团，据了解，该基团会吸附到金属的缺电子表面⁴。因此选择Waters MassPREP磷酸肽标准品（部件号：[186003285 <https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186003285>](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186003285)）来评估回收率，该标准品是由四种合成烯醇酶磷酸肽组成的混合物，其中一种磷酸肽含有两个磷酸基团(T43pp)。

使用经0.1%甲酸改性的流动相，通过表面携带正电荷的钛内衬C₁₈, 1.6 μm, 2.1×50 mm色谱柱或ACQUITY PREMIER CSH C₁₈, 1.7 μm, 2.1×50 mm肽分析专用柱进行分离。以三次重复进样评估每种色谱柱的初始性能。通过UV峰面积确定磷酸肽的回收率，并在每次破坏性试验（对色谱柱进行压力循环以模拟加速条件下的色谱柱使用寿命）后观察峰形、峰容量和色谱柱性能。

色谱性能

图1展示了在每种色谱柱上分离得到的UV色谱图，图2比较了MassPREP磷酸肽标准品中T43pp肽的UV峰面积以及所有四种肽的峰面积总和。在最初的三次进样中，使用PREMIER色谱柱时所有色谱峰的回收率更高且更一致。而使用钛内衬色谱柱时，由于双磷酸化肽(T43pp)具有额外的酸性磷酸基团，回收非常困难，在第一次进样中几乎未得到回收。T43pp回收率仅为由PREMIER色谱柱所得回收率的5%。虽然钛内衬色谱柱的性能的确随时间推移而有所改善，表明需要进行老化，但T43pp肽的回收率似乎稳定在比PREMIER色谱柱低65%的水平。

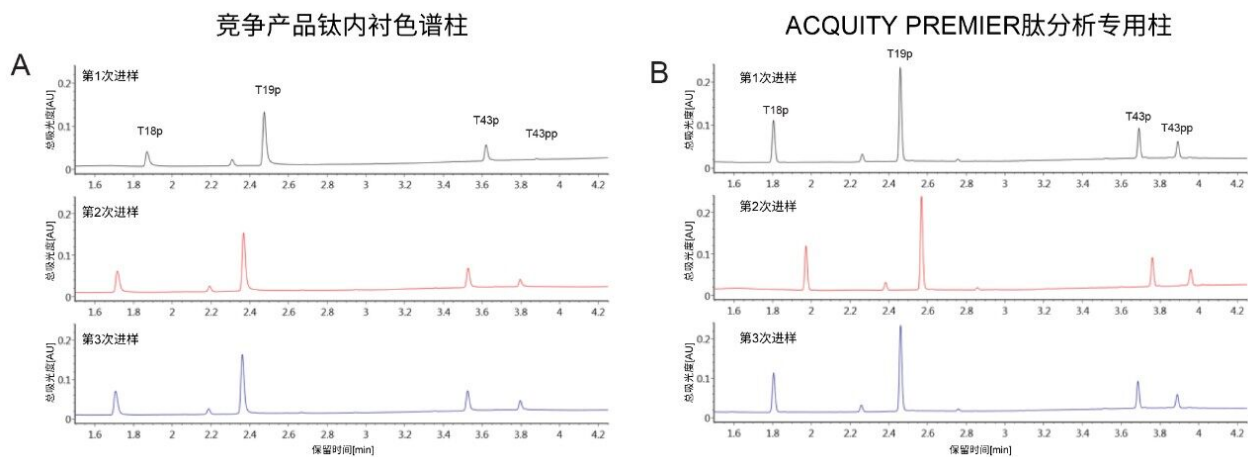


图1.使用经0.1%甲酸改性的流动相和(A)填充有带正电 C_{18} , $1.6 \mu m$ 固定相的竞争产品钛内衬 $2.1 \times 50 mm$ 色谱柱或(B) ACQUITY PREMIER CSH C_{18} , $1.7 \mu m$, $2.1 \times 50 mm$ 肽分析专用柱分离MassPREP磷酸肽标准品, 在 $220 nm$ 下测得的UV色谱图。分离采用ACQUITY UPLC H-Class Bio系统进行, 流速 $0.6 mL/min$, 柱温 $60^\circ C$, 梯度为乙腈在 $5 min$ 内由 0.7% 增加至 25% , 载样量 $200 pmol$ 。

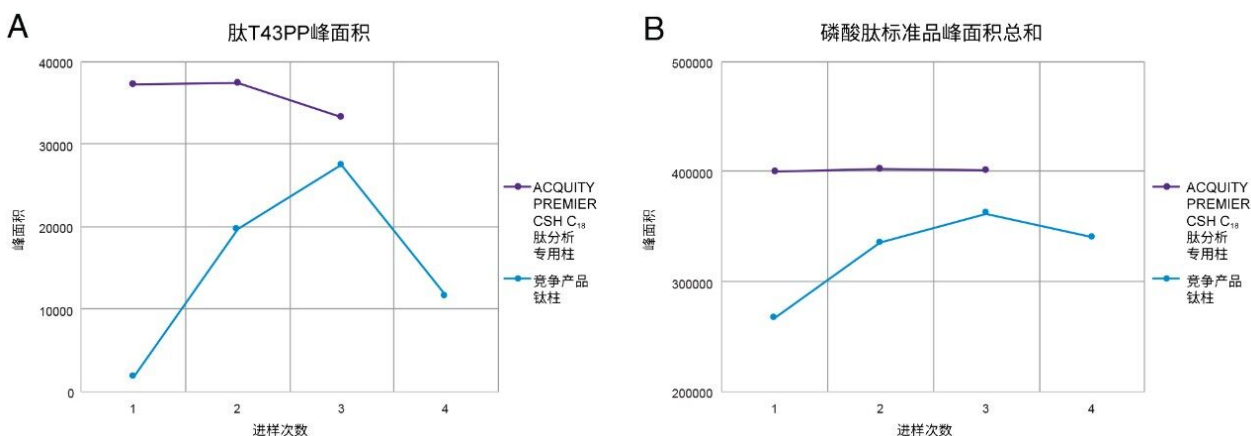


图2.(A)肽T43PP的UV峰面积和(B) MassPREP磷酸肽标准品的峰面积总和。分析采用ACQUITY UPLC H-Class Bio系统和经0.1%甲酸改性的流动相, 在填充有带正电 C_{18} , $1.6 \mu m$ 固定相的竞争产品钛内衬 $2.1 \times 50 mm$ 色谱柱或ACQUITY PREMIER CSH C_{18} , $1.7 \mu m$, $2.1 \times 50 mm$ 肽分析专用柱上运行。分离条件包括: 流速 $0.6 mL/min$, 柱温 $60^\circ C$, 梯度为乙腈在 $5 min$ 内由 0.7% 增加至 25% , 检测波长 $220 nm$, 载样量 $200 pmol$ 。

当使用每种色谱柱上的第三次进样比较四种肽的峰面积总和时, 观察到钛内衬色谱柱得到的峰面积相比PREMIER色谱柱得到的结果少 10% 。利用钛内衬色谱柱进行三次额外进样后, 峰面积总和仍然比PREMIER色谱柱得到的结果低 14% 。总体而言, ACQUITY PREMIER肽分析专用柱的峰容量比钛内衬色谱柱高出约 20% 。

此外，使用PREMIER色谱柱更容易观察到丰度较低的肽。这些肽很可能是标准品中的合成肽在生产过程中得到的序列变体，亦或是稳定性相关的降解物。PREMIER色谱柱在色谱图中提供了更多详细信息，预示其在多种不同分析（包括治疗性肽的杂质分析）中具有良好的应用前景。

与钛内衬C₁₈色谱柱相比，ACQUITY PREMIER肽分析专用柱还表现出优异的峰形。每种色谱柱的拖尾因子如图3所示。在第一次进样中，使用钛内衬色谱柱得到的平均拖尾因子比ACQUITY PREMIER肽分析专用柱高63%。经过10次后续进样后，所有四种肽的平均拖尾因子高出25%。同时，使用钛内衬色谱柱时，T43pp肽的拖尾因子仍高出54%。这表明尽管经过额外进样，但为了使钛内衬色谱柱得到的拖尾因子降低至接近ACQUITY PREMIER肽分析专用柱的结果，可能需要进行更极端的样品调节。

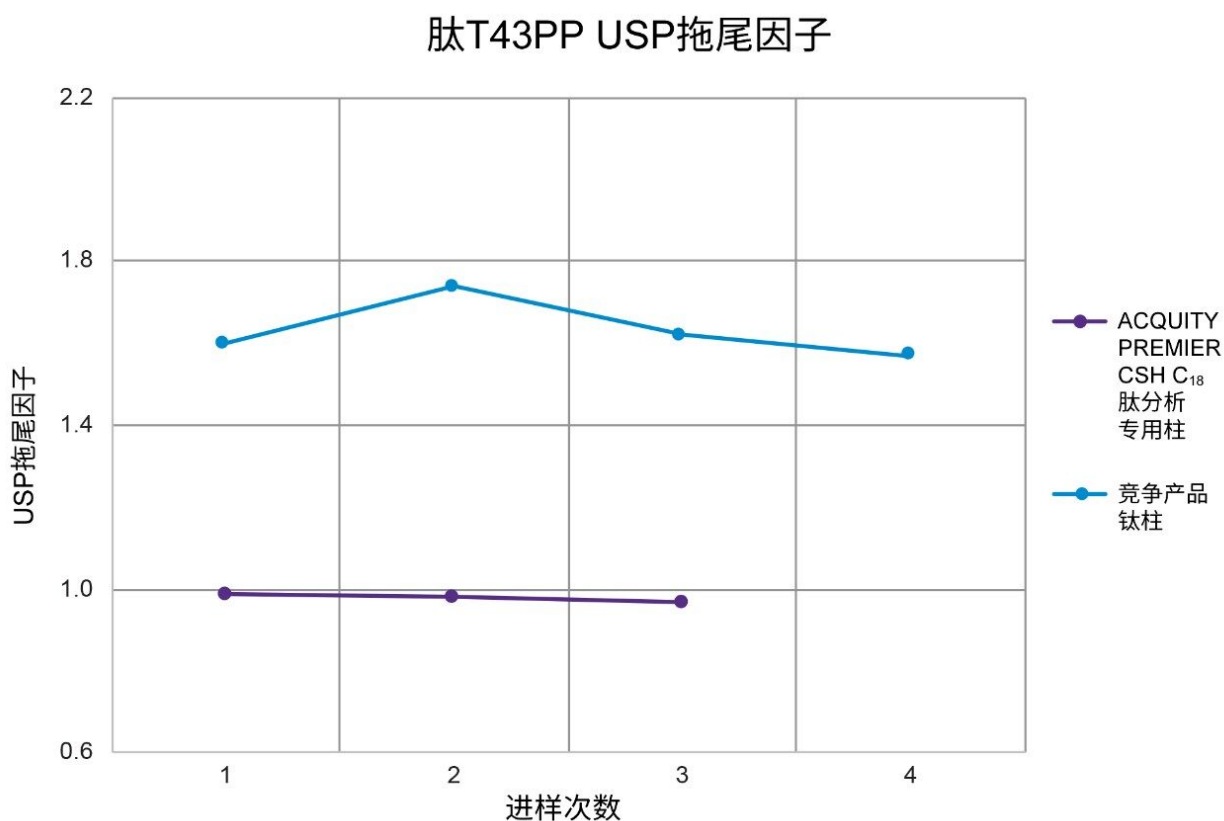


图3.肽T43PP的USP拖尾因子。分析采用ACQUITY UPLC H-Class Bio系统和经0.1%甲酸改性的流动相，在填充有带正电C₁₈, 1.6 μm固定相的竞争产品钛内衬2.1×50 mm色谱柱或ACQUITY PREMIER CSH C₁₈, 1.7 μm, 2.1×50 mm肽分析专用柱上运行。分离条件包括：流速0.6 mL/min，柱温60 °C，梯度为乙腈在5 min内由0.7%增加至25%，检测波长220 nm，载样量200 pmol。

填充床稳定性

研究还比较了填充床稳定性。虽然填充床稳定性机械测试可能无法直接说明色谱柱在正常操作参数下的使用寿命

命，但它可以评估色谱柱的性能上限。

本研究对每种色谱柱均施以高流速(1.5 mL/min)运行，使在柱头产生的压力超过11,000 psi。除施以该流速外，还对每种色谱柱进行多次停止液流再恢复的反复操作。对于钛内衬色谱柱，观察到在经过不到200次压力循环后，柱效和峰拖尾迅速下降，如范的等度分离结果所示。相比之下，ACQUITY PREMIER肽分析专用柱经过1000多次压力循环后，未产生不利影响。图4展示了在整个稳定性测试过程中观察到的范的塔板数（柱效）和拖尾因子变化。结果表明，ACQUITY PREMIER肽分析专用柱相比市售的钛内衬色谱柱能够承受更高的压力，因此非常适合高压、高流速的高通量应用。尽管两种色谱柱的额定耐压上限均为15,000 psi，但发现ACQUITY PREMIER肽分析专用柱与钛内衬色谱柱相比，在填充床稳定性方面具有显著优势。

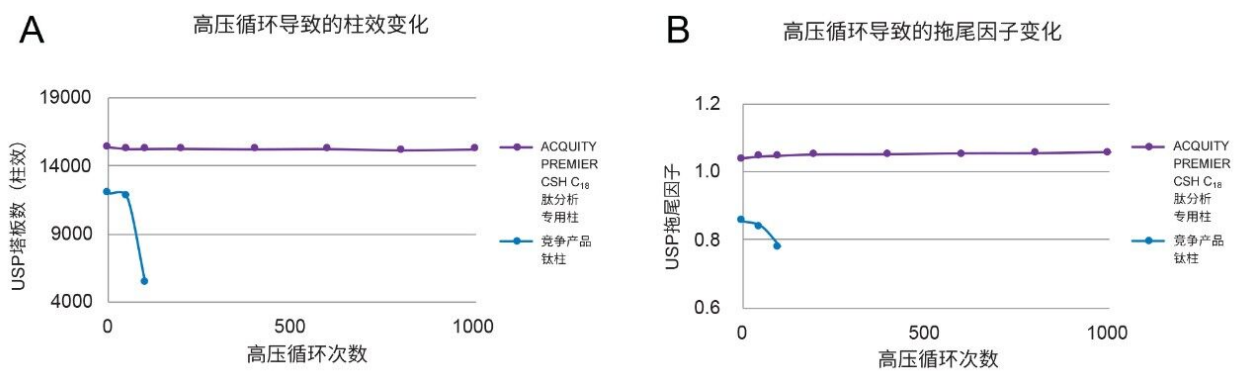


图4.在填充床稳定性测试的1000次高压循环中，ACQUITY PREMIER肽分析专用柱与竞争产品钛内衬色谱柱的(A)柱效和(B)拖尾因子变化，在流速0.35 mL/min、柱温30 °C和75%乙腈流动相条件下对范进行等度分离测得。

结论

采用MaxPeak高性能表面技术的ACQUITY PREMIER肽分析专用柱能够显著提高回收率，从而改善磷酸肽和低丰度肽的分离度和峰形。MaxPeak HPS的有机/无机杂化技术可防止分析物被金属吸附，进一步提高样品回收率。使用钛内衬色谱柱进行多次进样后，可以看到双磷酸化T43pp肽的回收率有所提高。这表明需要进行样品调节。使用PREMIER色谱柱时未观察到此类性能问题，从第一次进样开始，研究的所有四种肽即表现出一致的回收率。Waters ACQUITY PREMIER CSH C₁₈肽分析专用柱无需针对磷酸化肽分析应用进行大量老化工作，开箱即可直接使用。

根据这些结果，我们可以得出以下结论：PREMIER色谱柱凭借着MaxPeak高性能表面技术实现了全新的惰性

水平，能够大幅减少棘手肽（例如含有磷酸化氨基酸残基的肽）的吸附。因此，无论是以磷酸化蛋白质组学技术进行药用靶点研究，还是检测合成肽制剂中的杂质，在多种不同的分离应用中，PREMIER色谱柱都能产生非常可靠的色谱数据，表现出良好的应用前景。

参考文献

1. Gjerde, D. T.; Hanna, C. P.; Hoang, L.; Hornby, D. *DNA Chromatography*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.: 2002.
2. Lough, J.; Mills, M. J.; Maltas, J. Analyte Adsorption in Liquid Chromatography Valve Injectors for Samples in Non-Eluting Solvents. *J. Chromatogr.A* 1996, 726, 67–75.
3. De Pra, M.; Greco, G.; Krajewski, M. P.; Martin, M. M.; George, E.; Bartsch, N.; Steiner, F. Effects of Titanium Contamination Caused by Iron-Free High-Performance Liquid Chromatography Systems on Peak Shape and Retention of Drugs with Chelating Properties. *J. Chromatogr.A* 2020, 1611, 460619.
4. Tuytten, R.; Lemiere, F.; Witters, E.; Van Dongen, W.; Slegers, H.; Newton, R. P.; Van Onckelen, H.; Esmans, E. L. Stainless Steel Electrospray Probe: A Dead End for Phosphorylated Organic Compounds. *J. Chromatogr.A* 2006, 1104 (1–2), 209–21.

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <<https://www.waters.com/10166246>>

Xevo G2-XS QToF四极杆飞行时间质谱仪 <<https://www.waters.com/134798222>>

720007022ZH, 2020年9月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.