

使用ACQUITY Premier CSH C₁₈肽分析专用柱改善磷酸肽定量性能

Jennifer M. Nguyen, Susan C. Rzewuski, Matthew A. Lauber

Waters Corporation

摘要

在LC分离过程中，许多分析物，尤其是带负电荷的分析物，会吸附到缺电子的金属氧化物表面，因此难以稳定地分析。肽类化合物可能本身就含有酸性带负电荷的残基（例如天冬氨酸和谷氨酸），此外，翻译后修饰（例如磷酸化）也会增加肽的酸性特征，加剧吸附损失¹。

应对这项挑战的一些常用方法是使用流动相添加剂或螯合剂。已有研究结果表明，强酸能够改善磷酸化化合物的回收率，但这种方法对需要MS检测的分析可能不利^{2,3}。使用螯合剂也有助于防止分析物被金属吸附⁴，但缺点是会导致MS信号强度下降或溶解度问题⁵。

近期有研究指出，ACQUITY Premier色谱柱及其MaxPeak高性能表面(HPS)可提高肽等分析物的回收率和重现性⁶。这项技术已被证明可以减少金属与分析物之间的相互作用，避免样品损失加剧，在这方面，已证明它是比钛更有效的硬件技术⁷。本应用纪要进一步展示了ACQUITY Premier色谱柱在磷酸化肽分析中的潜力，蛋白质组学分析或激酶抑制剂研究可能会对此感兴趣⁸。

优势

- 与常规色谱柱技术相比提高了回收率
- 大幅减少甚至消除色谱柱平衡需求

- 改善重现性和方法稳定性
- 优化质谱图质量

简介

在色谱分析中，分析物在金属表面吸附是一个非常棘手的问题，会导致峰拖尾、分析物回收率低和重现性不佳。这些金属离子介导的相互作用所导致的分析物损失会严重影响分析结果。研究表明，在较低载样量下，这些吸附效应导致分析物难以回收，不利于需要低检测限和定量限的分析⁹。

磷酸肽的定量生物分析正是这样一种需要高回收率的应用。由于蛋白质的磷酸化是一种至关重要的翻译后修饰 (PTM)，在许多生物途径中调节细胞信号传导，因此表征、检测和定量这些PTM极其重要¹⁰。在检测磷酸化修饰时，通常将蛋白质酶解为对应的磷酸肽，然后监测丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基的磷酸化¹¹。但是，磷酸肽的丰度通常低于非磷酸化肽，因此需要经过富集后才有可能进行分析¹⁰。此外，磷酸肽会吸附到金属上，导致更加难以检测和定量¹。

在本应用纪要中，我们考察了采用MaxPeak高性能表面(HPS)技术的ACQUITY Premier CSH C₁₈肽分析专用柱在磷酸化和非磷酸化肽分析中的回收率和定量性能。这种有机/无机杂化表面技术可以阻止分析物与金属表面的相互作用，从而大幅减少吸附损失^{9,12}。本文比较了该MaxPeak Premier技术与常规色谱柱的初始性能，即使两种色谱柱都经过平衡，MaxPeak Premier色谱柱仍表现出更高的回收率和重现性。此外，我们基于所收集馏分的酶标仪定量结果比较了两种色谱柱的定量性能，其中MaxPeak Premier技术即使在第一次进样时，就使双磷酸化肽几乎得到完全回收。使用ACQUITY Premier系统可以对这些色谱柱效应开展详细研究，该系统消除了LC系统中的金属相互作用。

实验

色谱柱的初始性能

样品制备

将血管紧张素I (DRVYIHPFHL序列) 的冻干颗粒复溶于0.1% TFA水溶液 (含10% DMSO) 中，得到浓度为771

pmol/ μ L的溶液，并进一步稀释至60 pmol/ μ L，制得三肽混合物。

将烯醇酶T37 (YPIVSIEDPFAEDDWEAWSHFFK序列)的冻干颗粒复溶于0.1% TFA水溶液 (含10% DMSO) 中，得到最终浓度为353 pmol/ μ L的溶液，并进一步稀释至60 pmol/ μ L，制得三肽混合物。

将双磷酸化胰岛素受体 (TRDIpYETDpYYRK序列，分子量为1782.6 Da)的冻干颗粒复溶于0.1%甲酸水溶液中，得到浓度为500 pmol/ μ L的样品，用于平衡步骤，并进一步稀释至60 pmol/ μ L，制得三肽混合物。

使用等体积的60 pmol/ μ L血管紧张素I、烯醇酶T37和双磷酸化胰岛素受体肽，制备1:1:1等摩尔混合物，其中每种肽的最终浓度为约20 pmol/ μ L。

数据处理和分析

使用三根ACQUITY UPLC CSH肽分析专用柱与三根ACQUITY Premier CSH C₁₈肽分析专用柱比较。根据前四次进样的结果评估色谱柱的初始性能 (峰面积、梯度峰容量和保留时间)，取平均值，然后使用高载样量的肽平衡色谱柱，并运行第五次进样。根据从UV色谱图中观察到的峰面积估算回收肽的相对量(%)。

荧光分光光度法定量5-FAM标记肽

制备样品并生成校准曲线

使用流动相A与流动相B分别占79%和21%的溶液，将带有5-羧基荧光素(5-FAM) (一种用于赋予生物分子荧光特性的染料，序列为5-Fam-AKRRRLpSpSLRA，分子量为1831.9 Da) 标记的肽连续稀释至最终浓度为1 pmol/ μ L和0.1 pmol/ μ L，以用作荧光分光光度法分析的标准品。使用Molecular Devices (加利福尼亚州圣荷西)的Gemini XPS荧光分光光度计生成线性动态范围为载样量0.02 pmol~0.80 pmol的校准曲线。在激发波长和发射波长分别为443 nm和516 nm的条件下进行分析，使用SoftMax Pro 6.5.1采集和分析数据。

数据处理和分析

以两根色谱柱为一组，比较了ACQUITY UPLC CSH肽分析专用柱与ACQUITY Premier CSH C₁₈肽分析专用柱。每组色谱柱在初次使用时均对5-FAM标记肽进行了四次分离。每组测试分别在第四次进样期间收集含有5-FAM标记肽的馏分，并通过荧光分光光度法定量测定所得肽的回收率。根据测得的在第四次进样/分离中所收集馏分的UV峰面积和浓度的比率，为所有先前运行的5-FAM标记肽分配回收率百分比值。

液相色谱条件

液相色谱系统:

ACQUITY Premier (QSM)

检测波长： 214 nm

样品瓶： 采用MaxPeak HPS技术的QuanRecovery样品瓶（部件号： 186009186）

色谱柱： ACQUITY UPLC CSH C₁₈肽分析专用柱, 130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm × 50 mm（部件号： 186006936）
ACQUITY Premier CSH C₁₈肽分析专用柱, 130Å, 1.7 µm, 2.1 × 50 mm（部件号： 186009487）

柱温： 60 °C

样品温度： 4 °C

进样体积： 1.0 µL（样品）， 10.0 µL（平衡）

流速： 0.2 mL/min

流动相A： 0.1% (v/v)甲酸水溶液

流动相B： 0.09% (v/v)甲酸的乙腈溶液

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.20	99.5	0.5	6
12.00	0.20	60.0	40.0	6
14.00	0.20	20.0	80.0	6
14.01	0.20	99.5	0.5	6
17.00	0.20	99.5	0.5	6

质谱条件

质谱系统: Xevo G2-XS QTof

电离模式: ESI+, 分辨率

采集范围: 100–2000 *m/z*

毛细管电压: 2.5 kV

采样锥孔电压: 80 V

电离源补偿: 80 V

离子源温度: 120 °C

脱溶剂气温度: 500 °C

脱溶剂气流速: 800 L/h

数据管理

色谱和质谱软件：

数据采集：Empower 3 FR4或MassLynx
4.1；

数据分析：UNIFI 1.8

结果与讨论

色谱柱的初始性能

本研究尝试评估了MaxPeak Premier技术对磷酸肽的分离性能和回收率。目前可以确定的是，磷酸肽会吸附到不锈钢或钛等金属表面上。因此，我们使用常规ACQUITY UPLC CSH C₁₈肽分析专用柱或ACQUITY Premier CSH C₁₈肽分析专用柱填充同一批固定相，以LC-UV-MS法分析了由双磷酸化胰岛素受体肽、血管紧张素I和烯醇酶T37组成的等摩尔肽混合物的分离结果。

肽的反相分离通常采用酸性流动相改性剂，例如甲酸(FA)、二氟乙酸(DFA)或三氟乙酸(TFA)。MS分析首选甲酸，因为它是一种较弱的离子对试剂¹³。在肽分离中，使用甲酸也可能更容易发生金属结合相互作用。基于此原因，我们采用分别经0.1% (v/v)和0.09% (v/v)甲酸(FA)改性的水和乙腈作为流动相。根据前四次进样的结果评估色谱柱的初始性能（峰面积、梯度峰容量和保留时间），然后使用高载样量的肽平衡色谱柱，并运行第五次进样。以高载样量进样是平衡色谱柱或LC流路的一种常用方式，在这种方式下，大量样品将使色谱柱或LC流路内的结合位点达到饱和。在配备MaxPeak高性能表面的ACQUITY Premier系统上进行测试，柱温为60 °C，流速为0.2 mL/min。这种配置有助于更直接地观察色谱柱硬件的效应。图1显示了在以高载样量平衡色谱柱后，立即执行第四次和第五次进样获得的代表性UV色谱图。在所有色谱柱的前四次进样中，血管紧张素I和烯醇酶T37的梯度峰容量和峰面积基本相同。但常规色谱柱在初次使用时，双磷酸化胰岛素受体肽几乎未得到回收（图1A）。

相比之下，无论是否经过色谱柱平衡，ACQUITY Premier色谱柱在所有进样中均表现出可重现的性能（图1B）。平均峰面积、梯度峰容量和保留时间在平衡后的变化小于3%。常规色谱柱经过平衡后，双磷酸化肽的回收率有所提高，但峰面积仍然只有ACQUITY Premier色谱柱所得结果的39%。这表明还需要进一步平衡，或者使用常规色谱柱技术可能无法完全回收。

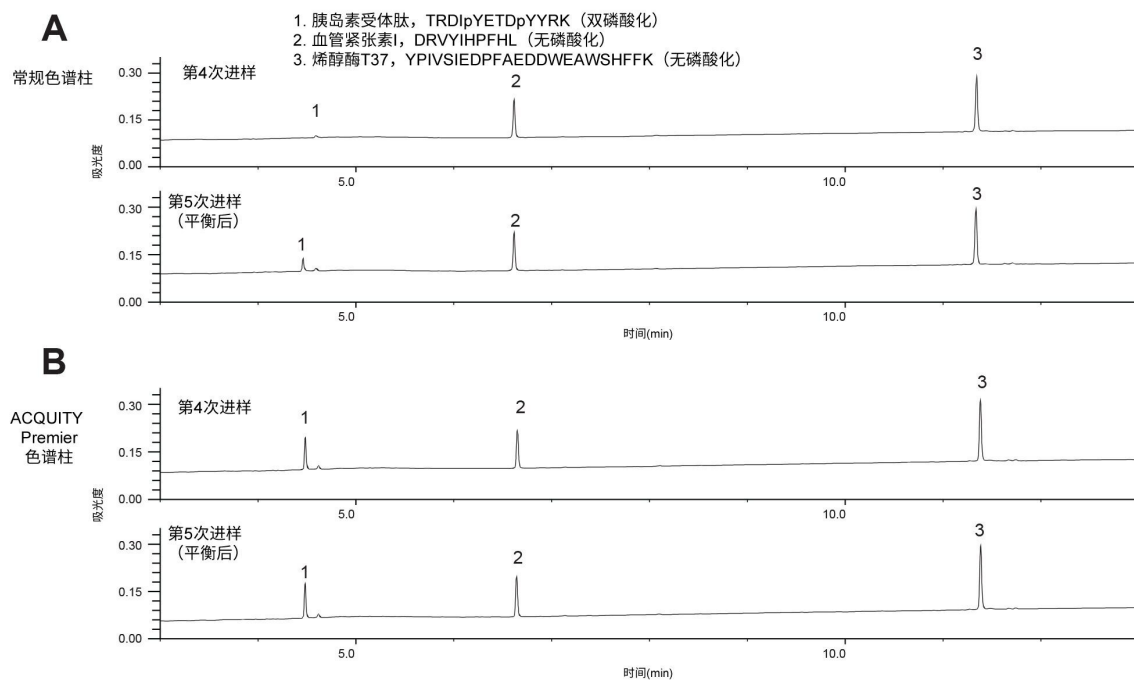


图1.(A) ACQUITY UPLC CSH C₁₈, 1.7 μm, 2.1 × 50 mm 色谱柱或者 (B) ACQUITY Premier CSH C₁₈, 1.7 μm, 2.1 × 50 mm 色谱柱在血管紧张素I、烯醇酶T37和双磷酸化胰岛素受体的等摩尔混合物第四次进样（色谱柱平衡前）和第五次进样（色谱柱平衡后）中获得的UV色谱图。分离系统为ACQUITY Premier，流速0.2 mL/min，柱温60 °C，使用经FA改性的流动相，载样量20 pmol。

由于胰岛素受体肽具有两个磷酸化位点，这些基团造成负电荷增加，并且对金属硬件表面的吸附程度更高，化合物的回收率可能会受到影响。从这些结果可以看出，血管紧张素I和烯醇酶T37不受选择何种色谱柱硬件的影响。观察分离过程中采集的质谱图发现了一些不同之处。事实上，我们还通过使用平衡过的色谱柱来分离三肽混合物，评估了质谱分析结果。分析采用电喷雾电离和Xevo G2-XS QTof。虽然TIC中的数据在肽的峰面积方面与UV数据相关，但我们在肽的质谱图中发现了差异：ACQUITY Premier色谱柱更容易获得质量更高的MS数据。使用常规色谱柱进行分离时，各种肽的所有电荷态均得到了高丰度的铁加合物。如烯醇酶T37的质谱图所示（图2A），分离结果中充斥着铁加合离子的身影，这些离子可能是从金属硬件表面浸出的。在烯醇酶T37的4+电荷态中，铁加合峰的离子信号丰度最高（图2A）。3+电荷态中铁加合物的含量为5.9%，2+电荷态中为9.5%，而在4+电荷态中，铁加合物的含量是主峰的两倍以上。相比之下，使用ACQUITY Premier CSH C₁₈肽分析专用柱执行的分离使铁加合物减少了80–90%（图2B）。

此外，我们还观察到ACQUITY Premier色谱柱产生的离子电荷态更低。由此推测，铁离子的存在可能会影响肽的

去溶剂化效率和电离，从而有利于形成更高的电荷态。一个铁原子与一个质子的简单相加也会使电喷雾过程中存在铁离子的任何位置的电荷态分布产生偏差。在常规色谱柱得到的结果中，烯醇酶T37的2+电荷态的相对丰度为19.5%，而在ACQUITY Premier色谱柱中观察到的丰度为29%。比较2+电荷态与3+电荷态可以发现，ACQUITY Premier色谱柱使较低电荷态的丰度比常规色谱柱高出50%。虽然此结果中可能未见低含量金属污染物影响肽分离，但显然会影响肽质谱图的质量。

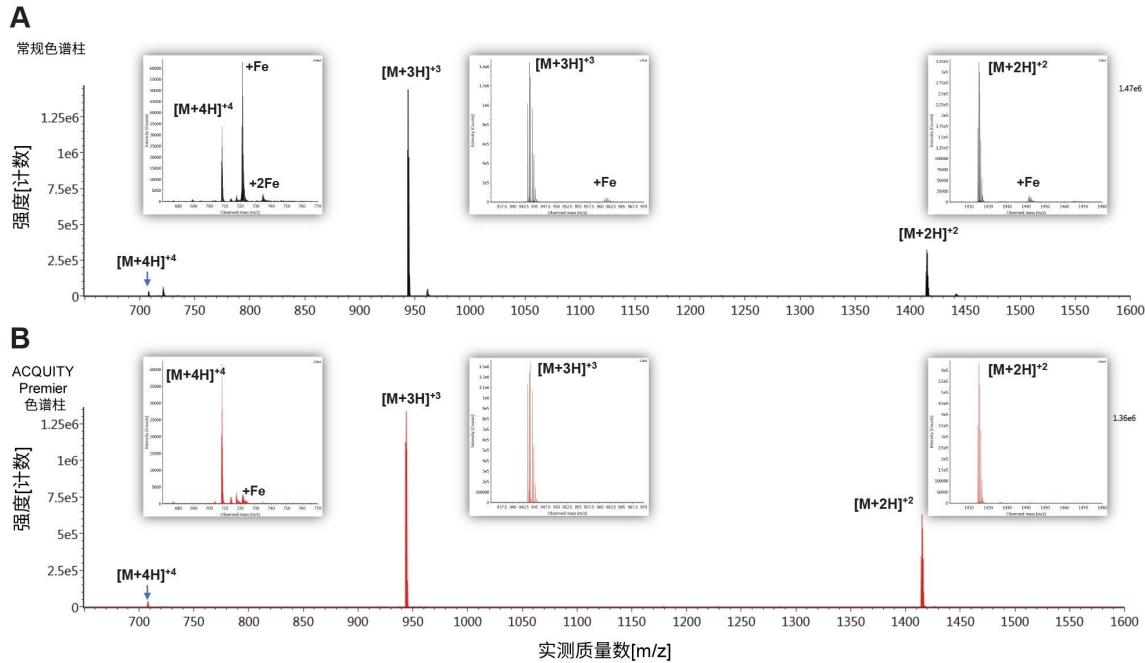


图2.使用先前平衡过的(A) ACQUITY UPLC CSH C_{18} , $1.7 \mu m$, $2.1 \times 50 mm$ 色谱柱或者(B) ACQUITY Premier CSH C_{18} , $1.7 \mu m$, $2.1 \times 50 mm$ 色谱柱分离血管紧张素I、烯醇酶T37和双磷酸化胰岛素受体肽的等摩尔混合物获得的烯醇酶T37的质谱图。分离系统为ACQUITY Premier，流速 $0.2 mL/min$ ，柱温 $60^\circ C$ ，使用经FA改性的流动相，载样量 $20 pmol$ 。

荧光分光光度法定量5-FAM标记肽

LC-MS法定量肽是一种成熟的技术，可用于发现和开发生物治疗药物以及发现可能改变磷酸化级联反应的小分子药物。在本研究中，我们观察到在修饰中赋予了额外电荷的肽已被证明难以回收。例如双磷酸化胰岛素受体肽，这种肽因具有带负电荷的磷酸基团等修饰，对金属的亲合力较高，因此极难回收。本研究尝试定量评估MaxPeak Premier技术的种种优势。

为准确测量和比较肽的回收量，我们采用荧光分光光度法检测，通过离线酶标仪分析来生成用于定量的标准曲线。一开始，我们计划继续使用双磷酸化胰岛素受体进行回收率定量分析，但这种肽不含强荧光团，采用荧光标记时不稳定且不溶于溶液。因此使用更稳定的5-FAM标记双磷酸化肽。首先采用常规LC系统和常规色谱柱对5-FAM标记肽进行四次进样。两组不同的特有组件均在第四次进样过程中收集含有5-FAM标记肽的馏分。使用ACQUITY Premier系统组件搭配ACQUITY Premier色谱柱重复该方法。

将磷酸化胰岛素受体肽转换为5-FAM标记的磷酸化肽，分析肽的回收率。使用MaxPeak Premier技术检测到更出色的回收率。有趣的是，该磷酸肽的回收率差异程度与先前实验中所用的磷酸肽在相同色谱条件下得到的结果相比并不明显（图3A）。对此结果，有一个可能的解释是，磷酸化发生在5-FAM标记肽的不同氨基酸（即丝氨酸，而非酪氨酸）上，带负电荷的磷酸基团具有更大的空间位阻。也可能是由于双磷酸化胰岛素受体肽比5-FAM标记肽具有更高的负表面电位，进一步加强了金属亲和力和色谱吸附¹⁴。此外，构象效应可能存在差异，这可能导致某种肽比其他肽更容易参与表面吸附。

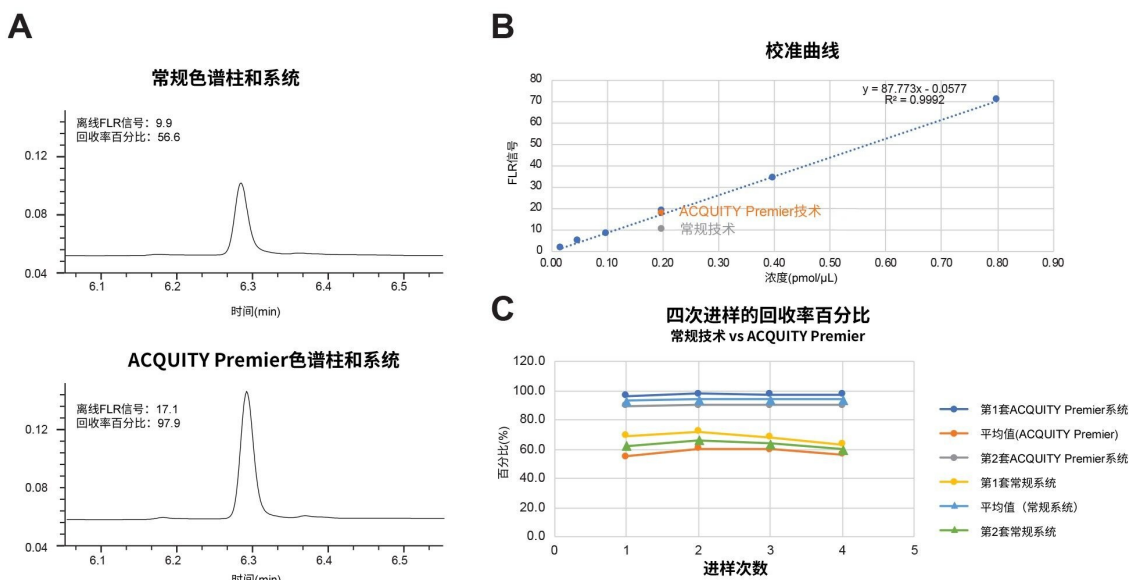


图3.(A)使用常规LC系统和ACQUITY UPLC CSH C_{18} , $1.7 \mu\text{m}$, $2.1 \times 50 \text{ mm}$ 色谱柱或ACQUITY Premier系统和ACQUITY Premier CSH C_{18} , $1.7 \mu\text{m}$, $2.1 \times 50 \text{ mm}$ 色谱柱, 在5-FAM标记肽的第四次进样中获得的UV色谱图。(B)在六种不同浓度(0.02、0.05、0.10、0.20、0.40和0.80 pmol/ μL)下通过离线荧光分光光度法分析生成的第四个5-FAM标记肽馏分的校准曲线和定量测量结果。(C) 5-FAM标记肽在四次进样中的单组和平均组回收率百分比, 根据测得的在第四次进样中所收集馏分的UV峰面积和浓度的比率计算。分离使用以下条件: 流速0.2 mL/min, 柱温60°C, 经FA改性的流动相, 载样量20 pmol。

利用图3B所示的校准曲线计算5-FAM标记肽的回收率百分比。从图3A所示的数据可以看出, 第一组ACQUITY Premier色谱柱和ACQUITY Premier LC组件使磷酸化肽几乎实现完全回收; 观察到回收率测量结果为97.9%。该结果比常规色谱柱与常规LC系统配合使用所得到的结果高出73%。此外, 我们确定在使用ACQUITY Premier系统和ACQUITY Premier色谱柱分析重复样1或2时, 四次进样的回收率百分比几乎没有变化。这种新的LC设置所获得的平均回收率在93.5%~94.2%的范围内(图3C)。相比之下, 常规色谱柱与常规LC系统配合使用时, 肽的回收率更低且变化更大, 在60.1%~66.4%的范围内。MaxPeak Premier技术即使在第一次进样时就获得非常高的磷酸化肽回收率, 证明了惰性更高的色谱表面在磷酸化肽分析中的实用性。

结论

本文证明，采用MaxPeak高性能表面(HPS)技术的ACQUITY Premier CSH C₁₈肽分析专用柱显著提高了酸性修饰（例如磷酸化）肽的回收率和重现性。这些数据再次确认了先前的观察结果，即MaxPeak HPS提供的表面屏障可减少金属离子介导的吸附。与常规色谱柱不同，ACQUITY Premier色谱柱从首次使用和首次进样开始始终表现出一致的性能。

与先前有关酸性小分子化合物的观察结果类似，本研究还发现，不只是双磷酸化肽，所有肽都可以获得更清晰的MS谱图¹²。常规色谱柱得到的质谱图显示出严重污染的铁加合物离子，而ACQUITY Premier色谱柱显示几乎不存在铁加合物。

总之，这些结果表明，MaxPeak Premier技术对提高肽类化合物分析（尤其是需要鉴定和定量磷酸化的分析）的色谱性能有利。毫无疑问，该技术可提高磷酸肽或其他带负电荷分子的生物分析稳定性和灵敏度。

参考资料

1. Tuytten; R.; Lemiere; F.; Witters; E.; Van Dongen, W.; Slegers, H.; Newton, R. P.; *et al.* Stainless-Steel Electrospray Probe: A Dead End for Phosphorylated Organic Compounds. *J. Chromatogr., A*. 2006, 1104, 209-21.doi:10.1016/j.chroma.2005.12.004.
2. Asara, J. M.; Allison, J. Enhanced Detection of Phosphopeptides in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Using Ammonium Salts.*J. Am.Soc.Mass Spectrom.*1999, 10, 35-44.doi:10.1016/S1044-0305(98)00129-9.
3. Kjellstrom, S.; Jensen, O. N. Phosphoric Acid as a Matrix Additive for MALDI MS Analysis of Phosphopeptides and Phosphoproteins.*Anal.Chem.* 2004, 76, 5109-17.doi:10.1021/ac0400257.
4. Birdsall, R. E.; Kellett, J.; Yu, Y. Q.; Chen, W. Application of Mobile Phase Additives to Reduce Metal-Ion Mediated Adsorption of Non-Phosphorylated Peptides in RPLC/MS-based Assays.*J. Chromatogr., B: Anal.Technol.Biomed.Life Sci.* 2019, 1126-1127, 121773.doi:10.1016/j.jchromb.2019.121773.
5. 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.

6. Birdsall, R. E.; Kellett, J.; Ippoliti, S.; Ranbaduge, N.; Shion, H.; Yu, Y. Q. 采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier可提高RPLC-MS方法分析酸性肽的色谱性能. 沃特世应用纪要, 720007003ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/increasing-chromatographic-performance-of-acidic-peptides-in-rplc-ms-based-assays-with-acquity-premier-featuring-maxpeak-hps-technology.html>> , 2020.
7. DeLoffi, M.; Nguyen, J. M.; Izzo, G. S.; Lauber, M.; Savaria, M. ACQUITY 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. 沃特世应用简报, 720007022ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/improved-chromatographic-performance-with-a-premier-peptide-c18-column-versus-a-titanium-lined-c18-column-technology.html>> , 2020.
8. Ji, L.; Wu, J. H.; Luo, Q.; Li, X.; Zheng, W.; Zhai, G.; *et al.* Quantitative Mass Spectrometry Combined with Separation and Enrichment of Phosphopeptides by Titania Coated Magnetic Mesoporous Silica Microspheres for Screening of Protein Kinase Inhibitors. *Anal.Chem.* 2012, 84, 2284-91. doi:10.1021/ac202897u.
9. Lauber, M.; Walter, T. H.; Gilar, M.; DeLano, M.; Boissel, C. A.; Smith, K.; *et al.* Low Adsorption HPLC Columns Based on MaxPeak High Performance Surfaces. Waters White Paper, 720006930EN <<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135074404&lcid=135074403>> , 2020.
10. Cheng, L. C.; Li, Z.; Graeber, T. G.; Graham, N. A.; Drake, J. M. Phosphopeptide Enrichment Coupled with Label-Free Quantitative Mass Spectrometry to Investigate the Phosphoproteome in Prostate Cancer. *J. Vis.Exp.* 2018. doi:10.3791/57996.
11. McLachlin, D. T.; Chait, B. T. Analysis of Phosphorylated Proteins and Peptides by Mass Spectrometry. *Current Opinion in Chemical Biology.* 2001, 5, 591–602. doi:10.1016/s1367-5931(00)00250–7.
12. Smith, K. M.; Wilson, I. D.; Rainville, P. D. Sensitive and Reproducible Mass Spectrometry-Compatible RP-UHPLC Analysis of Tricarboxylic Acid Cycle and Related Metabolites in Biological Fluids: Application to Human Urine. *Anal.Chem.* 2020. doi:10.1021/acs.analchem.0c03863.
13. Lauber, M. A.; Koza, S. M.; McCall, S. A.; Alden, B. A.; Iraneta, P. C.; Fountain, K. J. High-Resolution

Peptide Mapping Separations with MS-friendly Mobile Phases and Charge-Surface-Modified C₁₈.
Anal.Chem. 2013, 85, 6936-44.doi:10.1021/ac401481z.

14. Vallee, A.; Humblot, V.; Pradier, C. M. Peptide Interactions with Metal and Oxide Surfaces.
Acc.Chem.Res. 2010, 43, 1297-306.doi:10.1021/ar100017n.

特色产品

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

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

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

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

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

MaxPeak Premier色谱柱 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?&cid=135074078>>

720007211ZH, 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