

使用XSelect Premier色谱柱提高ACQUITY QDa检测器在磷酸肽LC-MS分析中的灵敏度

Kenneth D. Berthelette, Jennifer M. Nguyen, Kim Haynes

Waters Corporation

摘要

已知使用金属表面（例如不锈钢）时，磷酸化肽会发生吸附损失。虽然可以采用惰性硬件（例如带有PEEK内衬的色谱柱）大幅减少酸性基团与金属表面之间的相互作用，但我们还可以选择压力更稳定且适用范围更广的技术。MaxPeak Premier色谱柱采用了一种新型表面技术，可大幅减少（甚至消除）分析物与金属表面的结合。本文所述研究证明使用MaxPeak Premier色谱柱能够提高单四极杆质谱检测器分析磷酸肽的MS灵敏度。

优势

- 提高了对磷酸肽的MS灵敏度
- 改善重现性和分析物回收率
- 开箱即用，几乎不需色谱柱老化操作

简介

金属表面通过路易斯酸-碱相互作用与酸性化合物发生相互作用，由此可能导致化合物吸附到金属表面上。这不利于通过LC和LC-MS分析这些酸性化合物，因为大多数系统和填充柱均使用金属硬件组成。由这种非特异性结合引起的不利影响包括峰拖尾和分析物回收率下降。虽然存在减轻这些相互作用的策略，例如使用钝化剂或惰性硬件（例如PEEK），但这些方法各有其问题，包括操作压力下降或质谱干扰。

为此我们专门推出了MaxPeak高性能表面(HPS)技术，用于在不影响操作压力的情况下解决金属与分析物相互作用的问题。MaxPeak Premier色谱柱包含有机/无机屏障，可减轻酸性分析物（例如磷酸化探针）与色谱金属表面之间的相互作用。这一优势在小分子、寡核苷酸和肽分离中均有体现¹。此外，MaxPeak高性能表面(HPS)硬件无需采用任何特殊的钝化溶剂，可兼容各种流动相以实施方法开发和优化。

为证明MaxPeak Premier色谱柱在LC-MS分析中的优势，将ACQUITY UPLC H-Class系统与用于质谱检测的ACQUITY QDa质谱检测器联用，使用三种色谱柱分析MassPREP烯醇酶磷酸肽标准品。将采用MaxPeak HPS技术的XSelect Premier CSH C₁₈肽分析专用柱与XSelect CSH C₁₈肽分析专用柱和竞争厂商肽分析专用柱进行比较。选择磷酸肽标准品是因为它们的丰度通常低于非磷酸化肽，并且已知会吸附到金属上。此外，准确分析这些肽对于许多工作流程至关重要。通过峰面积和峰高比较所有三种色谱柱所得到的分析物回收率。结果表明，XSelect Premier色谱柱为所有磷酸化肽提供了更高的灵敏度和回收率，进而提高了进样之间的重现性。

实验

样品描述

MassPREP烯醇酶磷酸肽标准品（部件号：[186003285 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186003285-massprep-phosphopeptide-standard-enolase.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186003285-massprep-phosphopeptide-standard-enolase.html)）中含有四种合成烯醇酶磷酸肽各1 nmol：T18（1P，酪氨酸）、T19（1P，丝氨酸）、T43（1P，苏氨酸）和T43（2P，丝氨酸）。将样品瓶内容物复溶于50 μL Milli-Q水中，得到20 pmol/μL溶液，在进样前涡旋混合10 s。

方法条件

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC H-Class系统
检测条件：	ESI+全扫描
样品瓶：	TruView LCMS认证样品瓶全回收透明玻璃样品瓶 (部件号：186005669CV)
色谱柱：	XSelect CSH C ₁₈ XP肽分析专用柱, 2.1 × 50 mm,

2.5 μm (部件号: 186006941)

XSelect Premier CSH C_{18} 肽分析专用柱, 2.1 \times 50 mm, 2.5 μm (部件号: 186009904)

竞争厂商肽分析专用柱, 2.1 \times 50 mm, 2.7 μm

柱温: 60 $^{\circ}\text{C}$

样品温度: 室温

进样体积: 1 μL

流速: 0.45 mL/min

流动相A: 0.1%甲酸的水溶液

流动相B: 0.1%甲酸的乙腈溶液

梯度: 参见下表

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.00	0.45	99	1	6
7.35	0.45	75	25	6
8.09	0.45	75	25	6
8.10	0.45	99	1	6
9.00	0.45	99	1	6

数据管理

色谱软件: Empower 3 Feature Release 4

质谱软件: Empower 3 Feature Release 4

信息学软件: Empower 3 Feature Release 4

结果与讨论

为证明MaxPeak Premier液相色谱柱的优势,我们使用常规XSelect CSH C₁₈肽分析专用柱、竞争厂商肽分析专用柱和XSelect Premier CSH C₁₈肽分析专用柱评价了磷酸肽标准品的分离结果和回收率。图1显示了在各种色谱柱上首次进样得到的提取离子色谱图。质谱检测采用ACQUITY QDa质谱检测器在(M+2H)⁺²的质量数下进行,如表1所示。

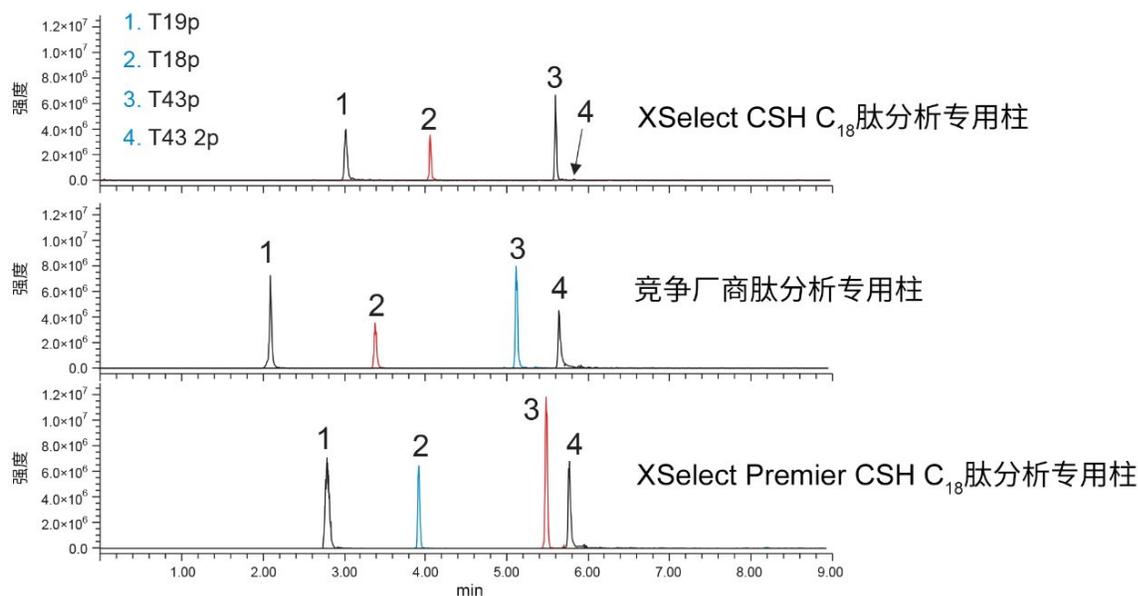


图1.四种磷酸肽在三种色谱柱上的分离。全扫描ESI+谱图中的[M+2H]⁺²离子在五次进样中第1次进样得到的提取离子色谱图。

肽	序列	平均分子量 (g/mol)	同位素质量数, (M + H) 1+	同位素质量数, (H + 2H) 2+
T18 1P或T18p	NVPLpYK	812.858	813.3912	407.1995
T19 1P或T19p	HLADLpSK	862.875	863.4028	432.2053
T43 1P或T43p	VNQIGpTLSESIK	1368.444	1368.6776	684.8428
T43 2P或T43pp	VNQIGTLpSEpSIK	1448.424	1448.6439	724.8259

表1. MassPREP磷酸肽标准品中的合成烯醇酶磷酸化肽以及各种电荷态的质荷比(m/z)²。

XSelect CSH C₁₈肽分析专用柱对所有肽的信号强度最低，其中T43 2p峰在背景噪音中几乎检测不到，并且与单磷酸化肽相比强度低得多。双磷酸化肽由于具有额外的酸性磷酸酯基团而更难回收，在使用竞争厂商肽分析专用柱时表现出增强的信号强度。而采用XSelect Premier CSH C₁₈肽分析专用柱得到的T43 2p信号强度最高。事实上，与测试的其他色谱柱相比，XSelect Premier CSH C₁₈肽分析专用柱使所有探针均获得了更高的信号强度。尽管单磷酸化肽酸性弱于双磷酸化T43 2p，但仍然表现出吸附损失，如常规XSelect CSH C₁₈肽分析专用柱和竞争厂商肽分析专用柱所得到的较低信号强度和峰面积所示（表2）。除信号强度差异以外，XSelect Premier CSH C₁₈肽分析专用柱与XSelect CSH C₁₈肽分析专用柱具有相似的选择性，对于T43p和T43 2p峰而言尤其如此。竞争厂商肽分析专用柱使这两种探针获得了更出色的分离，但总体保留性低于XSelect CSH C₁₈填料（无论其是否采用MaxPeak HPS硬件）。XSelect Premier CSH C₁₈肽分析专用柱和XSelect CSH C₁₈肽分析专用柱的保留性略有不同，标准硬件色谱柱的保留性略高，这可能是由于探针与金属表面之间的离子相互作用。从标准色谱柱切换为MaxPeak Premier色谱柱而不产生重大选择性差异的能力，使MaxPeak HPS技术可以在关键分析中更快运用。

化合物	XSelect CSH C ₁₈ 肽分析专用柱	XSelect Premier CSH C ₁₈ 肽分析专用柱	竞争厂商肽分析专用柱
T19p	10409467	28055540	14101364
T18p	631465	14236846	7405508
T43p	9679489	26468286	16095331
T43 2p	305512	24497628	11621357

表2. 在所有三种固定相上获得的四种化合物的峰面积

对于峰面积，最显著的差异同样体现在T43 2p肽的结果上（表2）：与MaxPeak Premier色谱柱相比，第1次进样时，竞争厂商肽分析专用柱得到的T43 2p肽的峰面积低约50%，XSelect CSH C₁₈所得到的结果则低约99%。但是，当连续进样时，常规XSelect CSH C₁₈肽分析专用柱和竞争厂商肽分析专用柱得到的所有磷酸肽的峰面积均开始增加，如图2所示。

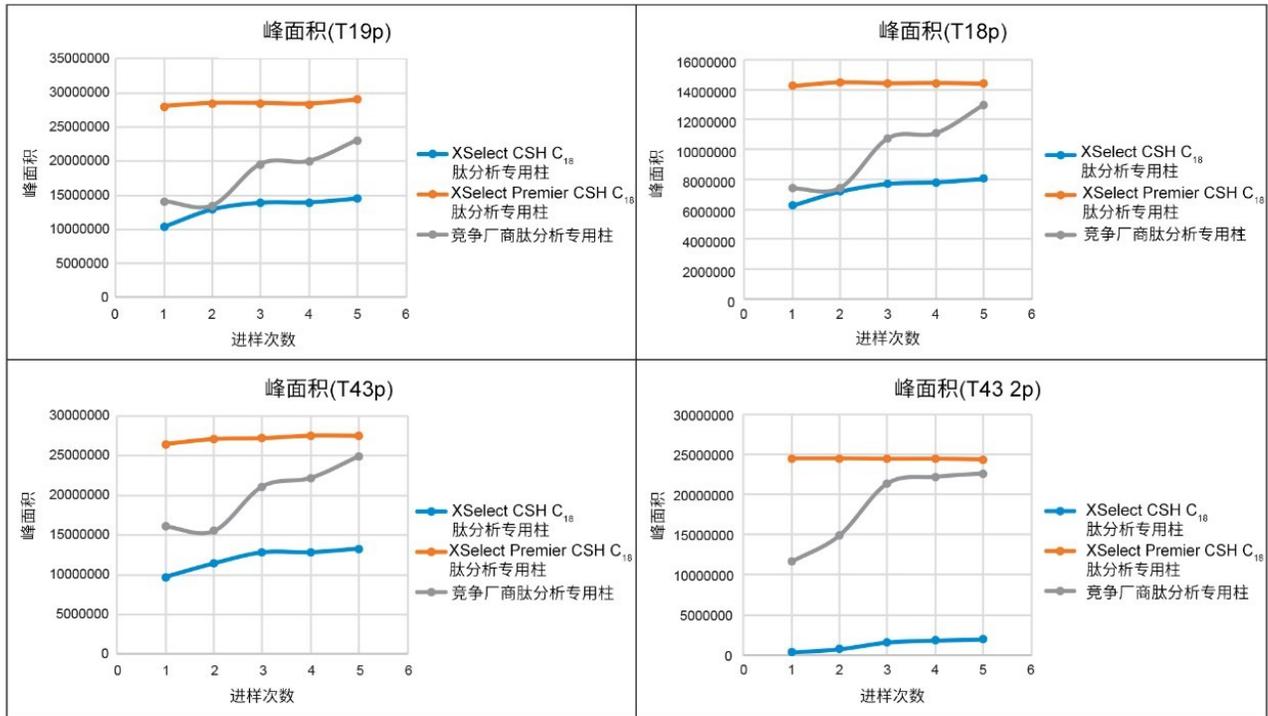


图2.四种磷酸肽在五次进样中的峰面积趋势

在图2中，与其他两种色谱柱相比，采用XSelect Premier CSH C₁₈肽分析专用柱从第1次进样开始即得到了可重现的峰面积。XSelect CSH C₁₈肽分析专用柱在五次进样中所得到的峰面积增加非常缓慢，而竞争厂商肽分析专用柱所得到的峰面积改善更加显著，但并非随着时间的推移而发生线性增加。对于5次进样中的任何磷酸肽，这两种色谱柱均未达到MaxPeak Premier色谱柱的性能水平，表明需要进行进一步的色谱柱老化或根本无法达到MaxPeak Premier色谱柱的性能水平。MaxPeak Premier色谱柱所得到的更高回收率证明了惰性色谱表面对于磷酸肽分析的重要性和实用性。

结论

采用MaxPeak Premier色谱柱，大幅减少了酸性分析物（例如磷酸肽）与色谱表面之间的金属相互作用。本应用纪要证明，使用MaxPeak Premier液相色谱柱可提高单四极杆质谱仪检测磷酸肽的回收率，且选择性或分析物保留性无显著变化。XSelect Premier CSH C₁₈ 色谱柱所实现的灵敏度提升使其可以检测更低浓度的肽，从而通过肽图分析更好地表征生物系统或蛋白质酶解。因此，MaxPeak Premier色谱柱在低浓度分析中非常有用，对于分析前通常需要进行富集的低丰度磷酸化肽而言尤其如此。

参考资料

1. DeLano M, Walter TH, Lauber M, Gilar M, Jung MC, Nguyen JM, Boissel C, Patel AV, Bates-Harrison A, Wyndham K. Using Hybrid Organic-Inorganic Surface Technology to Mitigate Analyte Interactions with Metal Surfaces in UHPLC. *Analytical Chemistry* (93) 2021.5773-5781.
2. MassPrep Phosphopeptide Standard-Enolase Care and Use Manual. [715001599 <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715001599.pdf>](https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715001599.pdf).

特色产品

- [ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/10138533>](https://www.waters.com/10138533)
- [Empower 色谱数据系统 <https://www.waters.com/10190669>](https://www.waters.com/10190669)

720007292ZH, 2021年6月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.