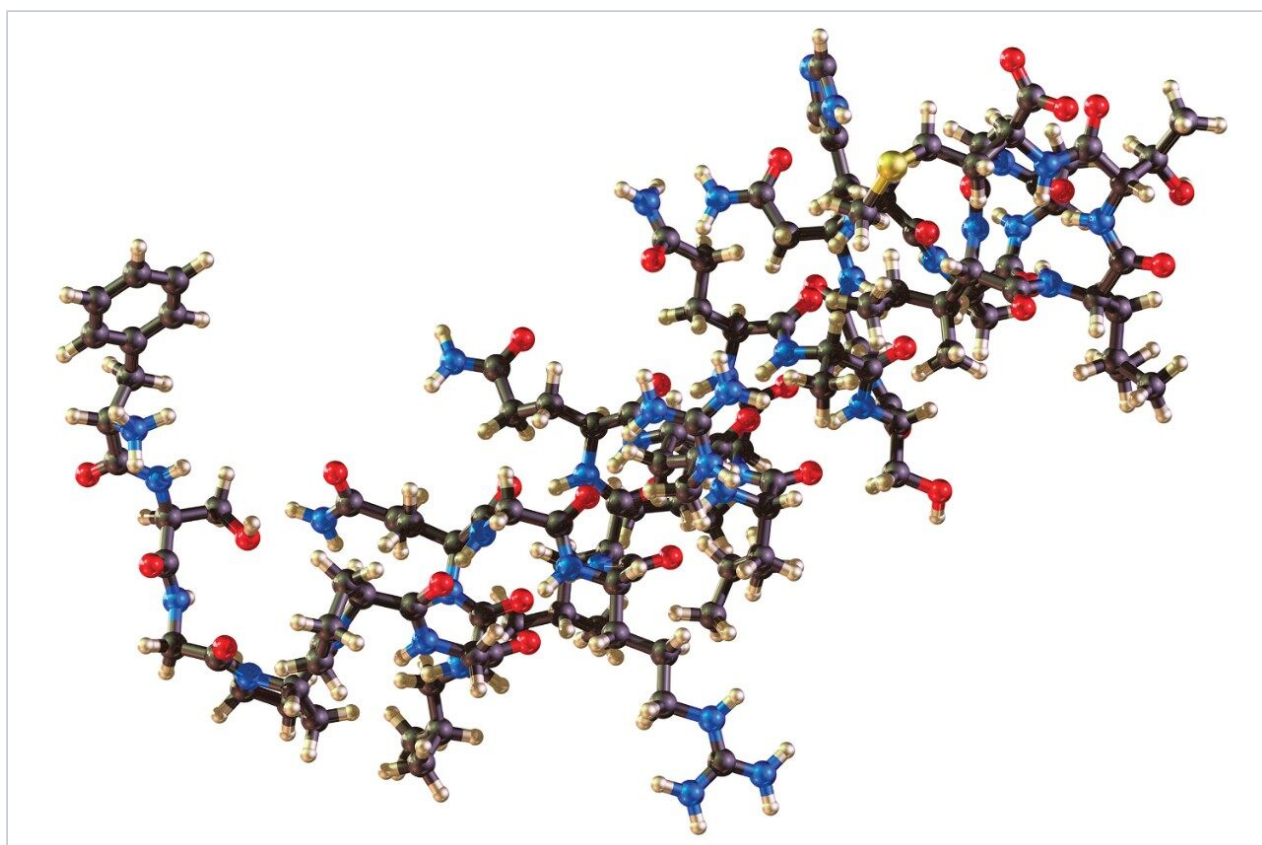


应用纪要

使用结合MaxPeak HPS技术的ACQUITY PREMIER在无需钝化液相色谱系统的情况下回收磷酸化肽

Brooke M. Koshel, Jennifer Simeone, David Dao, Jennifer M. Nguyen, Susan C. Rzewuski, Matthew A. Lauber, 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

化学钝化是敏感应用中提高色谱性能的常用技术之一。若未进行钝化，则使用常规液相色谱系统和色谱柱时，特别容易发生表面吸附的分析物会出现峰拖尾、回收率或重现性差的问题。在本研究中，蛋白质和肽分析专用的液相色谱系统只能在经过钝化后才能回收磷酸化肽。结果表明，采用MaxPeak HPS技术的Waters ACQUITY PREMIER提供了一种现成的解决方案，无需进行常规液相色谱技术所要求的系统钝化过程。

优势

- 在无需使用极端化学品进行系统钝化的情况下，提高分析物回收率
- 与常规液相色谱技术相比，方法重复性更高且更耐用

简介

传统的不锈钢液相色谱系统和色谱柱硬件可能会因表面发生分析物吸附，以及离子从流路中置换出来引起游离金属污染，对生物分子的色谱性能产生不良影响¹。虽然越来越多的现代液相色谱系统转换为耐腐蚀或生物兼容性系统组件和流路材料以缓解这一现象，但在特别敏感的应用中，仍需要对系统进行钝化，以实现优异的色谱性能。系统钝化用于恢复耐腐蚀的保护层，通常使用硝酸或磷酸进行处理^{1,2}。与系统或色谱柱“老化”或“灌注”（指通过上样或从储存条件转换为运行条件使用重复进样阻断活性位点）相比，化学钝化是一种更激进的方法。对于许多应用，可能从不需要进行系统钝化，老化或灌注足以实现所需的性能。

在本研究中，我们利用包含磷酸化肽的肽混合物凸显常规液相色谱技术与采用MaxPeak高性能表面(HPS)技术的ACQUITY PREMIER之间的性能差异。使用常规液相色谱系统和色谱柱时，回收分析物只能通过使用磷酸进行系统钝化来实现。MaxPeak HPS技术无需进行系统钝化，可通过改善回收率提高色谱性能的可靠性，使实验室能够更高效地运行。

结果与讨论

使用常规液相色谱系统和色谱柱，以含甲酸的水和乙腈在RPLC梯度条件下分离包含胰岛素受体（具有序列TRDipYETDpYYRK的双磷酸化肽）、血管紧张素I、烯醇化酶T37和缓激肽的四组分混合物。这款经过妥善老

化的液相色谱系统专门用于蛋白质和肽的RPLC分析，并已执行过多种常规分析，在保留时间重复性、峰拖尾和分析物回收率方面满足各种系统适应性要求。图1A中只检出该混合物中的三种组分。由于胰岛素受体是一种对金属表面具有高亲和力的磷酸化分析物，因此会完全吸附到润湿的流路中。仅在用磷酸对系统进行钝化后，才能回收这种肽（图1B）。而使用ACQUITY PREMIER CSH C₁₈肽分析专用柱 (130 Å, 1.7 μm, 2.1×100 mm)和ACQUITY PREMIER系统进行同一分离，无需经过常规液相色谱技术所要求的钝化步骤，即可回收混合物中的所有组分（图1C）。结果表明，ACQUITY PREMIER技术能够提供可靠的性能，无需使用极端化学品进行耗时的系统钝化。

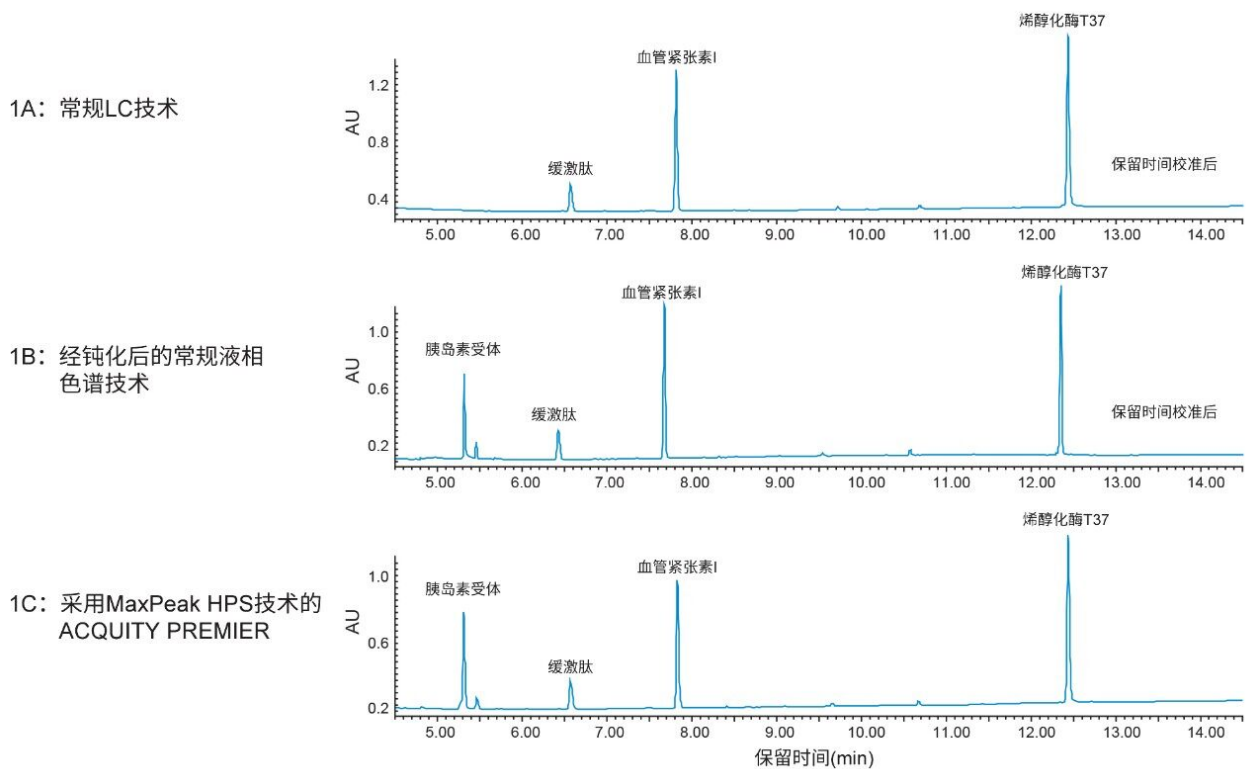


图1: 胰岛素受体（一种双磷酸化肽(*TRDIPYETDpYYRK*)）的回收率。1A: 使用“成熟”的常规液相色谱技术无法回收胰岛素受体。1B: 经过系统钝化后，吸附量大大降低，胰岛素受体得到回收。1C: 采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY PREMIER开箱即用，可提供优异的色谱性能，无需进行常规液相色谱技术所要求的系统钝化。

方法条件：流动相A：0.1%甲酸水溶液；流动相B：0.1%甲酸的乙腈溶液；梯度条件：流动相B在12 min内由0.5%增加至40%。使用30%磷酸清洗液进行系统钝化（仅图1B），然后在初始梯度条件下进行平衡。

此外，使用结合MaxPeak HPS技术的ACQUITY PREMIER还观察到分析重复性得到改善。比较了经过系统钝化后使用常规技术和MaxPeak HPS技术得到的峰面积重复性（反映分析物回收率）（图2）。通过15次进样计算出常规技术和MaxPeak HPS技术的RSD%分别为6.22%和0.48%。MaxPeak HPS技术不仅在进样系列中

提供了更稳定的性能，平均峰面积也约为传统技术报告峰面积的1.5倍。分析物回收率和重复性的改善进一步证明，MaxPeak HPS技术在开发稳定的方法改善敏感分析物的检测方面具有优势。

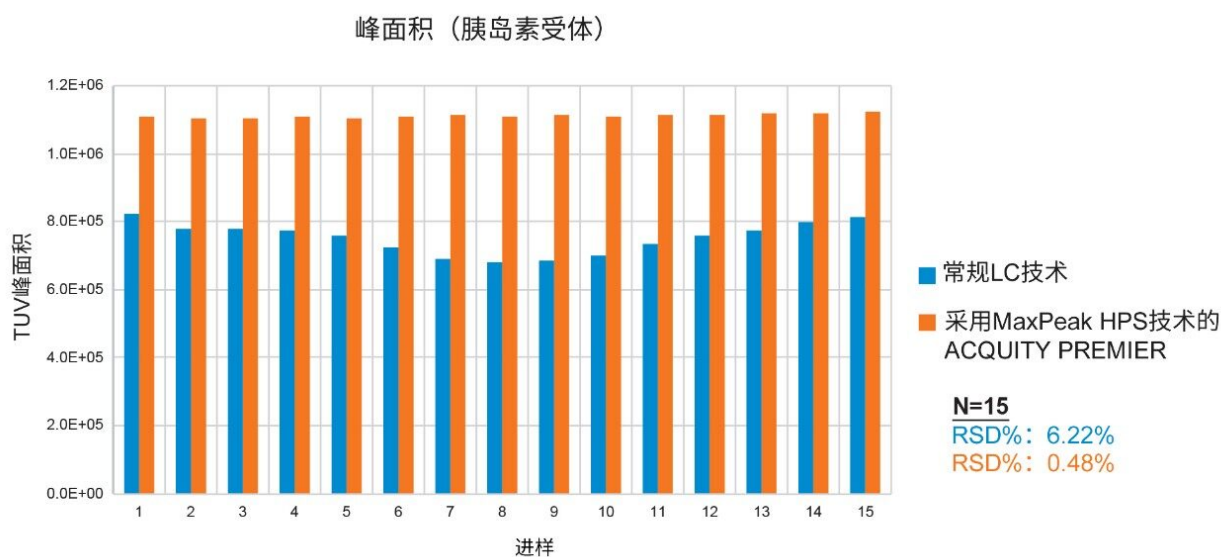


图2.胰岛素受体（一种双磷酸化肽(*TRDipYETDpYYRK*)）的回收率和峰面积重复性。对于常规液相色谱技术和采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY PREMIER，通过15次进样计算出的RSD%分别为6.22%和0.48%。

方法条件：使用30%磷酸清洗液进行系统钝化，然后在初始梯度条件下进行平衡。流动相A：0.1%甲酸水溶液；流动相B：0.1%甲酸的乙腈溶液；梯度条件：流动相B在12 min内由0.5%增加至40%。

结论

系统钝化已成为分析具有表面吸附问题的敏感生物制药分析物时提高回收率和分析重现性的常用方法之一。本研究表明，经过妥善老化的液相色谱系统专用于蛋白质和肽的RPLC分析，仅在经过酸处理以钝化表面后才能有效回收磷酸化肽。采用MaxPeak HPS技术的Waters ACQUITY PREMIER提供了一种现成的解决方案，与常规的液相色谱技术相比，可通过提高分析物回收率和重复性来增强色谱性能。

参考文献

1. D. T. Gjerde, C. P. Hanna, D. Hornby, Appendix 2: System Cleaning and Passivation Treatment, DNA Chromatography, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2002.
2. R. Day, “Passivating Stainless Steel in HPLC Systems,” Waters Lab Highlights, LAH 0376.

特色产品

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

ACQUITY UPLC系统 <<https://www.waters.com/514207>>

720006921ZH, 2020年5月