

高效微流电动液相色谱系统与电喷雾电离质谱联用分析肽和蛋白质

1. 背景介绍

毛细管电色谱 (CEC) 结合了毛细管电泳 (CE) 分离效率高和毛细管液相色谱 (cHPLC) 选择性多和样本容量大的特点。然而, 通过商用 CE 仪器, 在没有压力的情况下运行 CEC 系统时, 会出现与气泡形成和柱干燥等有关问题和困难。这些问题可以通过高效微流电动液相色谱系统 (eHPLC) 解决, 其中流动相由压力流和电渗透流 (EOF) 共同驱动。在此系统中, 压力作用于毛细管柱以抑制气泡的形成。eHPLC 可以通过旋转式注射器实现定量进样。EOF 可以与压力流方向相同, 也可以与压力流方向相反。因此, 可以控制样品的洗脱顺序。更重要的是, 通过改变洗脱液的组成, 可以使用类似于高效液相色谱法的溶剂梯度模式。基于 eHPLC 系统, CEC 的优势就可以得到充分利用。

质谱 (MS) 为各种样品提供了高灵敏度和可靠的检测, 特别是在样品数量非常有限的生物化学应用分析中。此外, MS 还提供了有关分析物结构和特征的重要信息。因此, eHPLC-MS 在生物样品分析中起着重要的作用。然而, eHPLC 和 MS 之间的接口可能会影响仪器的性能。在所有已开发的接口中, 电喷雾电离 (ESI) 的接口允许在低质量扫描范围内对质量高达几十万的大生物分子进行质谱分析, 并且其适合与 HPLC、CE、CEC、eHPLC 等联用。

我们使用相同的实验装置进行了 cHPLC-ESI-MS 和 eHPLC-ESI-MS, 从实验和理论两方面研究了 eHPLC 中电解质浓度和 pH 对 ESI-MS 信号强度的影响, 还研究了施加电压和有机改性剂对肽分离的影响。通过对胰蛋白酶分解形成的肽段、蛋白质和修饰蛋白的分析, 证明了 eHPLC-ESI-MS 系统的功能。

2. 测试条件

仪器:	TriSep [®] -3000 高效微流电动液相色谱系统
色谱柱:	通微 EP-100-20/30-C18

3. 测试结果

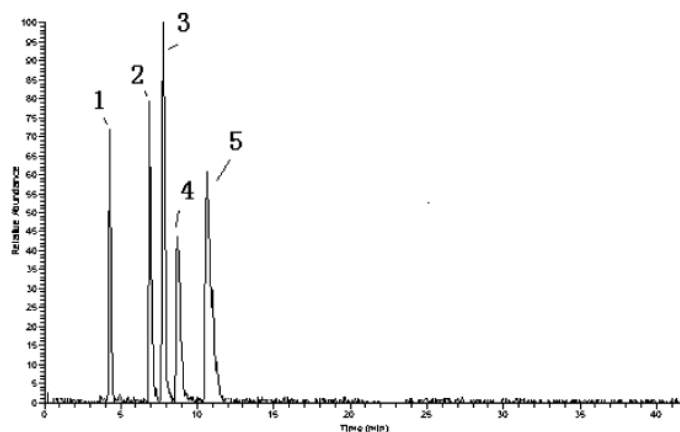


图 1 eHPLC-ESI-MS 分离检测 5 种肽

注：1 Gly-His; 2 Leu-Ala-Pro; 3 Pro-Phe-Asp; 4 Ala-Trp; 5 Gly-Leu-Tyr。

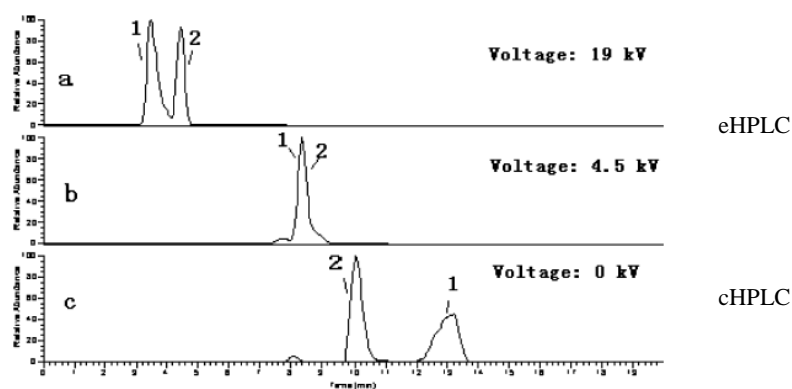


图 2 cHPLC 与 eHPLC 分离肽的比较色谱图

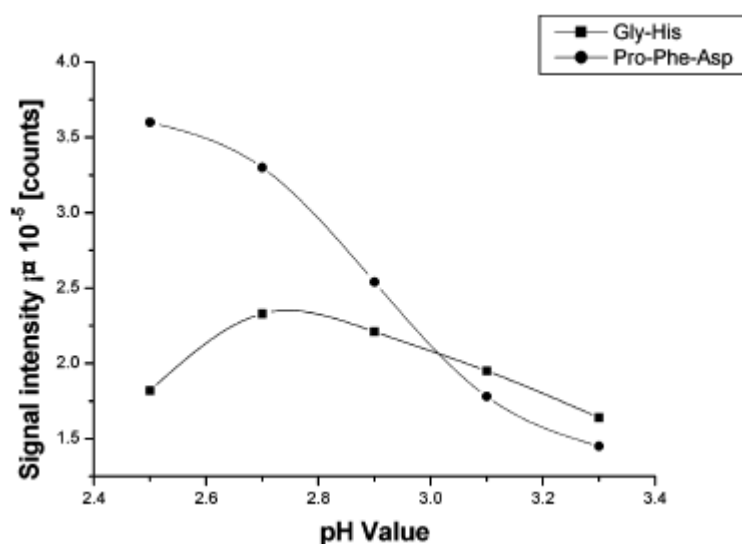


图 3 流动相 pH 对 ESI-MS 信号的影响

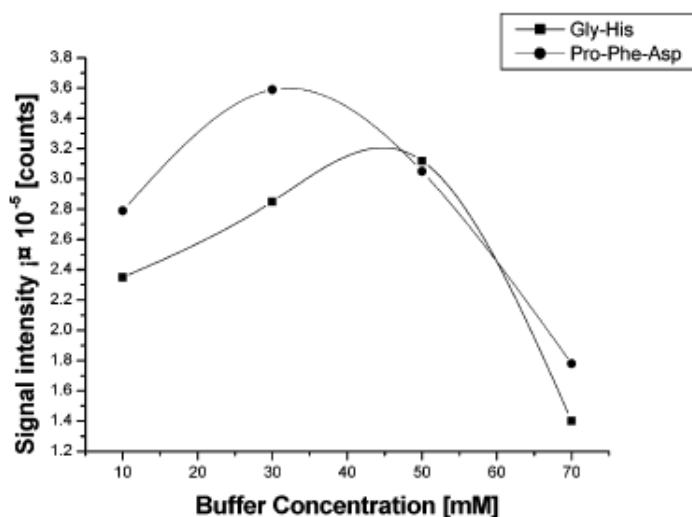


图 4 流动相浓度对 ESI-MS 信号的影响

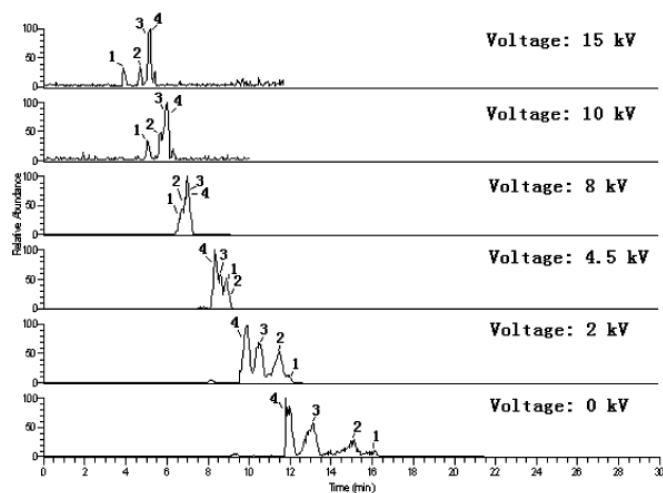


图 5 施加不同电压对肽分离的影响

注：1 Gly-His; 2 Leu-Ala-Pro; 3 Gly-Leu-Tyr; 4 Pro-Phe-Asp。

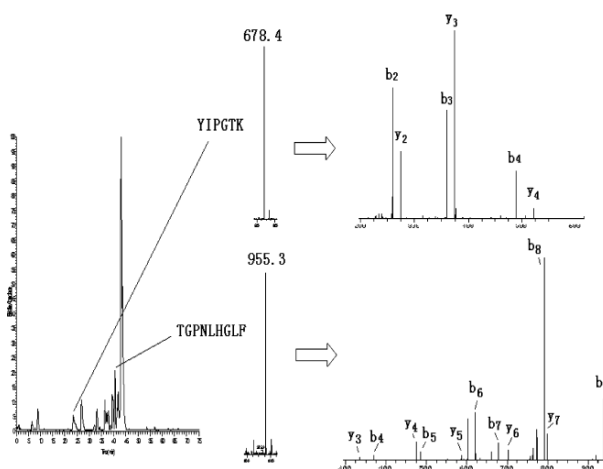


图 6 eHPLC-ESI-MS 分离检测细胞色素 c 胰蛋白酶解液色谱图

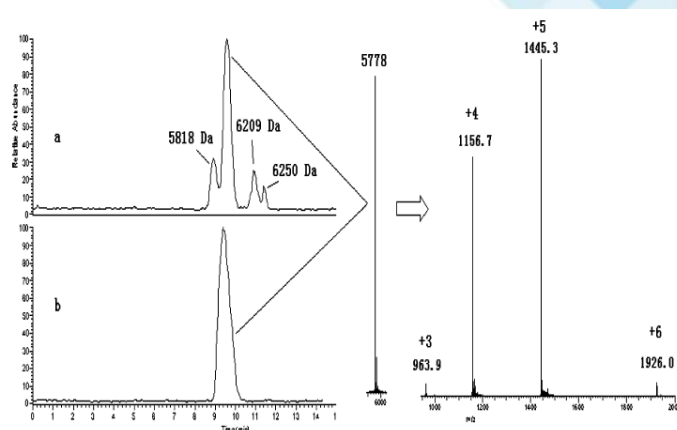


图 7 eHPLC-ESI-MS 检测修饰蛋白色谱图

4. 结论

采用 TriSep[®]-3000 高效微流电动液相色谱系统与 ESI 离子源质谱联用，系统的研究了电解质浓度和 pH 对 ESI-MS 信号强度的影响，施加电压和有机改性剂对肽分离的影响。比较了 cHPLC 和 eHPLC 分离肽混合物的能力。为了评价本系统的可行性和可靠性，采用 eHPLC-ESI-MS 对细胞色素 C 胰蛋白酶酶解液和修饰蛋白的进行了分析。实验结果表明，基于 eHPLC-ESI-MS 系统，在梯度条件下实现肽的基线分离。并可完成修饰蛋白和细胞色素 c 胰蛋白酶酶解液的检测。

5. 配置列表

仪器配置	TriSep [®] -3000 高效微流电动液相色谱系统（配二元梯度泵、柱温箱、UV 检测器、高压电源、自动进样器、微流控、控制器、MS）
	Clarity Lite 色谱工作站