

稳定高效的纳升二维分离技术——在线双反相色谱

贾伟

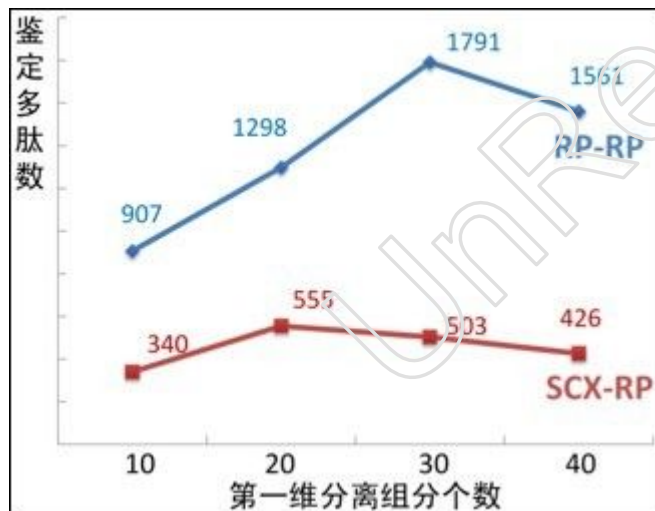
沃特世科技（上海）有限公司实验中心

对于微量而且复杂的样品，如蛋白质组学样品、蛋白药物中的残留宿主细胞蛋白（HCP）等，不但需要高灵敏的纳升级液相，而且需要更为充分的分离。在线二维纳升分离技术（on-line 2D NanoLC）应运而生，并已成为微量复杂样品液质分析所必不可少的分离手段。

传统的纳升在线二维技术，一般采用强阳离子交换（SCX）作为第一维，反相色谱（RP）作为第二维的分离手段。这种方法是根据样品在盐溶液中的离子特性与疏水性，这两种属性间的正交关系实现的。但是SCX-RP技术在纳升级分离中却困难重重。困难主要来自SCX分离维度。在SCX分离中需要使用浓度较高的盐溶液作为流动相，但含盐流动相易发生盐析或导致样品在管路内沉淀，而纳升液相的管路内径又非常小（25-100微米）。因此，在实际运用SCX-RP分离时，经常出现管路阻塞而导致实验失败。

为此，除提供传统的SCX-RP分离技术外，沃特世创造性地开发了双反相二维分离方法。（RP-RP）。这种RP-RP技术不必使用高浓度盐溶液作为流动相，避免了离子交换分离易造成的管路阻塞问题，从而大大提高了纳升二维液相的系统稳定性和实用性。更令人兴奋的是，经过哈佛医学院的Jarrod A. Marto全面的实验对比发现，较SCX-RP方法，运用RP-RP分离技术得到的液质分析结果更好（图1）^[1] RP-RP双反相二维方法可以帮助科学家得到更多的蛋白质分析结果。

这是因为：1、SCX方法使用的盐缓冲液易产生离子噪音背景，从而影响质谱数据质量；2、SCX分离效果取决于多肽所携带的电荷数，而多肽携带电荷数量类别有限，因此第一维SCX分离度较差，造成液质数据信息质量不高。



图一

RP-RP双反相分离技术在第一、第二维都使用了反相色谱，那么它是如何实现二维分离所必须的分离性质的正交呢？原来，经过研究发现，在不同pH值环境下，多肽的反相保留行为是不一样的（图2）^[2]。根据这个性质，沃特世的科学家开发出了独有的RP-RP纳升在线二维系统——nanoACQUITY UPLC® System with 2D-LC。这个系统的分离柱，使用了UPLC一贯的亚二微米颗粒填料，因此具有了UPLC的超高分离度等优点。此外，它还不需要分流就可以实现精准的纳升流速，可为实验室节省巨大的高纯度流动相购买费用及废液处理费用，而且更加环保。nanoACQUITY UPLC System with 2D-LC双反相二维系统优点总结如下：

- 较SCX-RP技术，使用RP-RP系统可得到更多的蛋白鉴定结果。
- RP-RP系统较SCX-RP系统更稳定、耐用。
- 与nano HPLC相比，nanoACQUITY UPLC具有UPLC超群的分离效果。

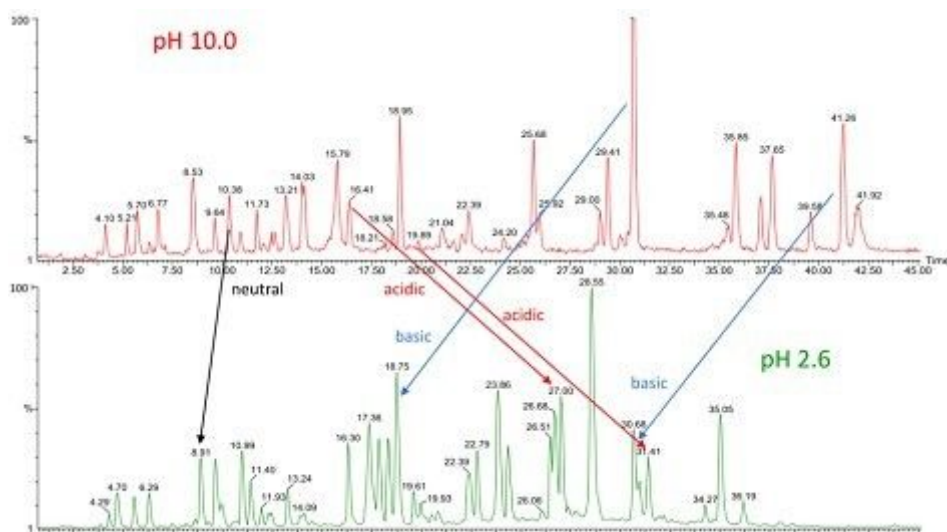
上海：上海市浦东新区张东路1387号41栋01室
北京：北京市朝阳区铜牛国际大厦光华路15号院2号楼9层
广州：广州市荔湾区中山七路50号西门口广场1707-08室

邮编：201203 电话：+86 21 6156 2666 传真：+86 21 6879 4588
邮编：100026 电话：+86 10 5209 3866 传真：+86 10 5293 2298
邮编：510170 电话：+86 20 2829 6555 传真：+86 20 2829 6556

售后服务热线：800(400) 820 2676

www.waters.com

不分流实现精准的纳



图二

nanoACQUITY UPLC System with 2D-LC双反相在线二维系统结构及分析流程如图3，其中包括三根色谱柱：高pH反相柱、捕获柱、低pH反相柱。在此系统中，第一维色谱柱为高pH色谱柱。样品进入第一维色谱柱后，第一维梯度泵可按使用者要求，自动地阶梯式提高有机相比例，以将样品中不同疏水性肽段分批洗脱下来。从高pH反相柱上洗脱下的多肽会被富集柱捕获。每批次被富集的多肽，将在第二维泵的线性梯度模式下进入低pH反相分析柱，在这里经过充分分离后，样品将到达离子源，进入质谱分析器。

其中左下图为结构示意图。步骤①：样品被自动进样器采集后，在第一维梯度泵的推动下进入高pH色谱柱。步骤②：样品在第一维泵阶梯式梯度作用下，将一部分多肽冲出，后被捕获柱富集。其中第二维梯度泵通过施加9倍于第一维泵的水相流动相，将溶剂稀释为适合捕获柱富集的体系。步骤③：在六通阀切换后，第二维泵通过线性梯度，将多肽样品进行充分分离并送至质谱分析。在执行完步骤①后，步骤②与步骤③交替进行直到完成所需分析。双反相在线二维系统nanoACQUITY UPLC System with 2D-LC已经在多肽的液质分析方面被广泛应用，帮助研究人员取得了众多极具价值的研究成果。

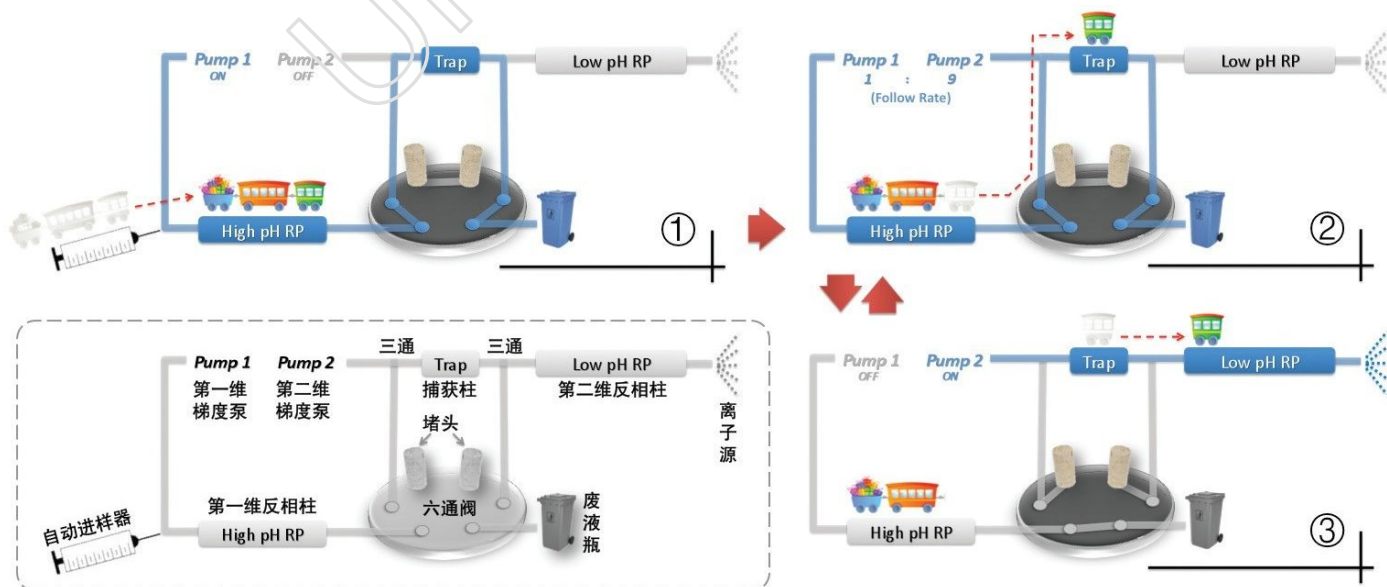


图3. nanoACQUITY UPLC System with 2D-LC系统结构及分析流程图。

沃特世科技(上海)有限公司

上海：上海市浦东新区张东路1387号41栋01室
北京：北京市朝阳区铜牛国际大厦光华路15号院2号楼9层

免费售后服务热线：800(400) 820 2676

www.waters.com

邮编：201203 T +86 21 6156 2666 F +86 21 6879 4588
邮编：100026 T +86 10 5209 3866 F +86 10 5293 2298

参考文献

(1) Zhou F, Cardoza JD, Ficarro SB, Adelmant GO, Lazaro JB, Marto JA. Online Nanoflow RP-RP-MS Reveals Dynamics of Multicomponent Ku Complex in Response to DNA Damage. J Proteome Res. 2010, 9, 6242-6255.

(2) Gilar M, Olivova P, Daly AE, Gebler JC. Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions. J. Sep. Sci. 2005, 28, 1694-1703.

关于沃特世公司 (www.waters.com)

50 多年来，沃特世公司(NYSE:WAT)通过提供实用和可持续的创新，使医疗服务、环境管理、食品安全和全球水质监测领域有了显著进步，从而为实验室相关机构创造了业务优势。

作为一系列分离科学、实验室信息管理、质谱分析和热分析技术的开创者，沃特世技术的重大突破和实验室解决方案为客户的成功创造了持久的平台。

2011 年沃特世公司拥有 18.5 亿美元的收入，它将继续带领全世界的客户探索科学并取得卓越成就。

###

联系方式：

叶晓晨

沃特世科技(上海)有限公司 市场服务部

xiao_chen_ye@waters.com

周瑞琳(GraceChow)

泰信策略(PMC)

020-83569288

13602845427

grace.chow@pmc.com.cn