

治疗性肽和内源性肽 生物样品制备及方法开发

ASIS[®]
SAMPLE EXTRACTION PRODUCTS

本文档包括关于以下内容的指南：

- ✓ 肽类生物分析中的常见难点与注意事项
- ✓ SPE规格
- ✓ SPE吸附剂
- ✓ 样品制备方法：治疗性肽和内源性肽
- ✓ 样品制备方法：蛋白质酶解所得的胰蛋白酶肽
- ✓ 肽类定量分析的色谱柱选择
- ✓ 实验室术语和知识点
- ✓ 回收率计算
- ✓ 基质效应计算
- ✓ 实验设置
- ✓ 磷脂监测
- ✓ 故障排除
- ✓ 样品预处理
- ✓ 肽和蛋白质生物分析训练营



Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

肽类生物分析中的常见难点与注意事项

1. **蛋白质结合:** 要将肽与蛋白质等样品基质组分分离, 必须破坏蛋白质结合。否则, 与蛋白质相结合的肽会因体积排阻机理而流出SPE吸附剂, 无法得到保留。建议使用4% H_3PO_4 溶液或5%氨水1:1稀释血浆, 以此作为起始条件。此外, 可能还需要采用其它强度更大的预处理方法, 例如1:1蛋白沉淀, 或者使用盐酸胍、尿素或十二烷基硫酸钠(SDS)对蛋白质进行变性处理。
2. **非特异性结合(NSB):** 众所周知, 肽极具粘性, 容易结合(吸附)到玻璃或其它表面上。非特异性结合是指分析物吸附到任何表面上, 进而导致分析物损失。

减少NSB的策略包括:

- a. 制备或储存样品时避免使用玻璃制品。推荐使用聚丙烯和/或低吸附性材质的制品。
- b. 使用添加剂, 例如有机溶剂、表面活性剂和载体蛋白。有机溶剂有助于提高溶解性。添加SDS和盐酸胍等表面活性剂有助于肽/蛋白质变性, 从而提高其溶解性。向纯标准品溶液或蛋白质浓度较低的生物基质中(例如CSF)添加载体蛋白(5%大鼠血浆或40 $\mu g/mL$ BSA溶液), 可使目标肽可能接触到的表面结合位点饱和, 从而防止目标肽损失。
- c. 避免蒸发或挥干, 因为这些操作也会导致NSB。
- d. 制备高浓度储备液, 然后进行连续稀释。

3. **溶解性:** 从最初的粉末溶解到样品萃取, 再到LC-MS分析, 在这整个样品制备和分析过程中维持溶解性至关重要。由于肽完全不同于小分子, 建议有机溶剂浓度不要超过75%, 而使用改性剂来提高其溶解性。改性剂浓度可远高于小分子分析的典型浓度, 范围可在1% - 10%之间, 酸性或碱性改性剂皆可(例如TFA、FA、AA或氨水)。保证和维持溶解性对SPE洗脱步骤和色谱分离尤为重要。如果溶解性太差, 会影响回收率, 还会导致色谱柱污染和残留。
4. **专属性:** 要实现稳定、高灵敏度的肽类生物分析, 必须保证高专属性。尽管在定量血清/血浆中的小分子时, 蛋白沉淀法(PPT)是一种常用并且有效的样品制备策略(可有效破坏蛋白质结合, 回收率较高并且能够最大限度降低基质干扰), 但该方法通常不适用于大分子(肽/蛋白质)定量。这类分子的分子量较大且性质较为特殊, 因此基于高浓度有机溶剂的蛋白沉淀法往往会使得目标肽本身也发生沉淀, 进而导致目标肽损失。此外, PPT缺乏专属性, 这会带来基质效应问题。PPT方法通常还需要对样品进行蒸发/浓缩才能达到较高灵敏度。混合模式固相萃取(离子交换与反相净化机制相结合)是一种正交的样品净化策略, 既具备选择性保留目标肽所需的高专属性, 又能够去除基质干扰。
5. **回收率低:** 若未能成功破坏蛋白质结合、未能避免非特异性结合, 或者未能确保肽的溶解性, 回收率低是最常见的后果。(请参阅本页上的第1、第2和第3点)。

选择最适用的SPE规格

如需更多信息, 请访问
www.waters.com/oasis

SPE规格

从多方面来看, 96孔 μ Elution™板都是从生物基质中萃取肽分子的理想之选。 μ Elution板的上样量可达375 μ L(稀释前)并且最小洗脱体积仅为25 μ L, 因此无需挥干和复溶步骤即可将样品浓缩多达15倍(达到要求检测限通常必需的浓缩倍数)。其洗脱体积小, 避免了挥干过程中因收集板壁吸附、化学性质不稳定或挥干后复溶时溶解度降低可能造成的肽损失。此外, 分析人员在30 min内即可手动完成整个96孔板的处理(每个样品耗时不到20 s), 大大提升了通量。Oasis™肽分离技术方法开发专用 μ Elution板中包含装填有WCX和MAX两种Oasis吸附剂的孔各48个, 详见“样品制备方法: 治疗性肽和内源性肽”部分。

Oasis μ Elution 板技术

- 获专利的 μ Elution板设计。
- 非常适用于10 - 375 μ L样品的SPE净化和分析物富集。
- 洗脱体积仅25 μ L, 无需挥干和复溶步骤。
- 无需挥干步骤即可将样品浓缩多达15倍(通常这对达到肽的LOD十分必要)。
- 最大限度减少分析物损失。
- 省去干燥步骤有助于最大限度减少因干燥后再溶解时的溶解度下降, 或热不稳定的肽所导致的样品损失。
- 1 mL 96孔收集板的残留体积 < 15 μ L。
- 兼容大多数自动化液体处理系统, 能够实现可靠、自动化的高通量SPE净化(HT-SPE)。



96-孔 萃取板

- 备受赞誉的创新型两级式孔设计。
- 高通量、高回收率。
- 提供每孔装填5 mg、10 mg、30 mg和60 mg吸附剂的多规格。
- 兼容大多数自动化液体处理系统, 能够实现可靠、自动化的高通量SPE净化 (HT-SPE)。



注射针筒式 小柱

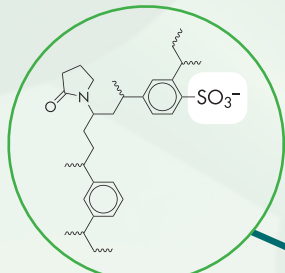
- 超洁净针筒和筛板。
- 提供1 cc/10 mg - 35 cc/6 g的各种小柱尺寸。
- 提供1 cc、3 cc和6 cc配置的无边沿注射针筒式小柱。

Oasis SPE系列吸附剂

Oasis系列产品采用独特的水可浸润性聚合物吸附剂，省去了其它品牌聚合物吸附剂和硅胶基质吸附剂所必需的活化和平衡步骤，直接使用即可。过去，这两个步骤是反相SPE有效保留分析物的必需步骤。得益于Oasis独具的水可浸润性，水性样品可直接上样而不损失回收率。

Oasis MCX

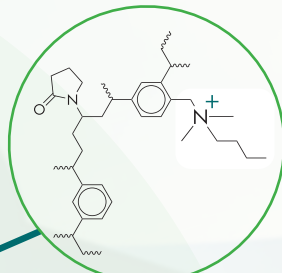
混合模式阳离子交换吸附剂，适用于碱性化合物



$pK_a < 1$

Oasis MAX

混合模式阴离子交换吸附剂，适用于酸性化合物



$pK_a > 18$

Oasis HLB

亲水-亲脂平衡反相吸附剂，适用于酸、碱和中性化合物

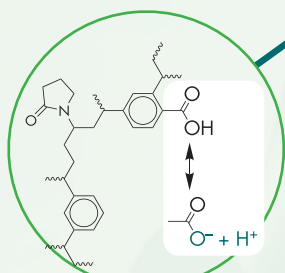
对极性基团的亲水保留性能

亲脂反相保留性能

在pH 0~14范围内稳定
水可浸润无硅醇基作用

Oasis WCX

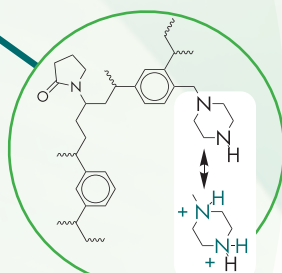
混合模式弱阴离子交换吸附剂，适用于强碱性和季胺类化合物



$pK_a \sim 5$

Oasis WAX

混合模式弱阴离子交换吸附剂，适用于强酸性化合物



$pK_a \sim 6$

Oasis PRiME HLB*提供一种简单且通用的净化方案，能够去除95%的常见基质干扰物(例如磷脂、脂肪、盐和蛋白质)，让您能够将固相萃取轻松应用于实验室的常规分析。

Oasis HLB是所有Oasis吸附剂的基础。它是一种多功能反相吸附剂，对许多化合物都具有较高的载量。

混合模式Oasis吸附剂兼具反相保留和离子交换功能，可进行正交模式的样品制备，提升分析物专属性和灵敏度。

Oasis PRiME MCX采用简单的3步或4步方案选择性地保留、浓缩和洗脱碱性化合物，同时可有效去除磷脂和蛋白质。

* Oasis PRiME HLB为专利型吸附剂(专利申请中)。

样品制备方法： 治疗性肽和内源性肽

随附于专为简化方法开发而设计的Oasis肽分离技术方法开发专用 μ Elution板中。

固相萃取、净化及浓缩用Oasis吸附剂

随着肽和蛋白质类治疗药物的数量不断增加，典型的生物分析实验室面临全新的挑战。为了分析这类化合物，我们需要高灵敏度、高选择性且可靠的生物分析方法。由于肽类的分子体积较大且电荷分布状态特殊，其质谱检测灵敏度可能会低于典型的小分子，因此有必要通过样品浓缩和其它手段来提高方法的整体灵敏度。

Oasis固相萃取(SPE)产品系列将适用的吸附剂填料、装置规格和净化方案相结合，简化并改进了样品制备过程。肽类是两性离子，因此难以预测哪种吸附剂的效果最佳。根据我们的研究，使用WCX和MAX时，大部分肽类都可达到最佳洗脱效果。

- ✓ **单一方案：**专为肽类设计，省去了肽沉淀步骤，可提高肽的整体溶解度。
- ✓ **选择性更出色：**使用20%乙腈作为清洗溶液，既能去除极性干扰物，又不会洗脱极性肽。
- ✓ **疏水性干扰物**被留在吸附剂中，降低基质效应。
- ✓ **肽的溶解性：**在洗脱步骤中采用75%的有机溶剂以维持肽的溶解性，即使是疏水性最强的肽分子，溶解性也不受影响。
- ✓ **更出色的回收率和峰形：**最终洗脱步骤使用TFA，相较于使用甲酸可获得更出色的回收率和峰形，同时可提高酸性肽的回收率。

应用Oasis肽分离技术的肽类SPE方案



所需溶液

活化:	甲醇
平衡:	水
预处理:	4% (体积比) 磷酸水溶液
清洗1:	5% (体积比) 氨水
清洗2:	20% (体积比) 乙腈水溶液
洗脱:	含1% 三氟乙酸的乙腈/水(75/25)溶液(体积比)

样品制备方法： 蛋白质酶解所得的胰蛋白酶肽

详细方案请参阅《ProteinWorks
μElution SPE净化试剂盒维护和
使用手册》(部件号715004971ZH)

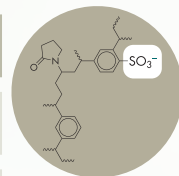
用于纯化蛋白质酶解物的ProteinWorks μElution SPE试剂盒

胰蛋白酶肽的净化是肽类分析中独有但也同样重要的一项挑战。胰蛋白酶肽带有碱性侧链(精氨酸和赖氨酸残基)。Oasis MCX吸附剂具有强阳离子交换功能,非常适合与肽段赖氨酸和精氨酸侧链上剩余的正电荷进行相互作用。

ProteinWorks™ μElution SPE净化方案是一种简单合理的方案,适用于从经过蛋白质酶解的血浆/血清生物基质中萃取胰蛋白酶肽。采用该方案可萃取胰蛋白酶肽;不仅SPE回收率高,还能去除可能影响分析的基质组分和酶解试剂。

- ✓ 去除干扰分析的缓冲盐和酶解试剂。
- ✓ 使用同一套SPE方案即可高效回收独有和通用的特征性肽段。
- ✓ 精心设计的μElution板可最大限度减少样品损失。
- ✓ 最高可将样品浓缩15倍。
- ✓ 保留强极性胰蛋白酶肽。

Oasis MCX μElution方案

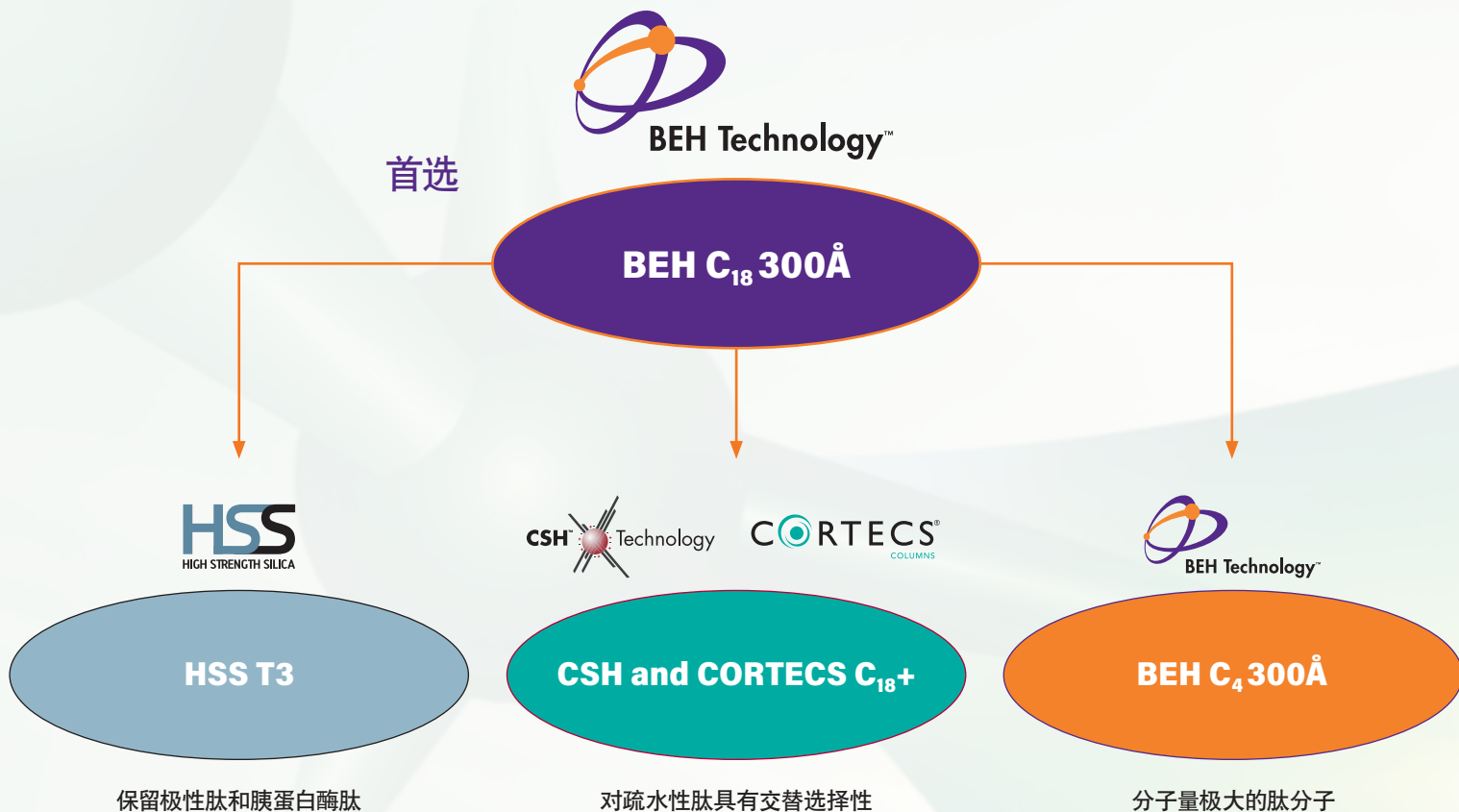


所需溶液

活化:	甲醇
平衡:	水
预处理:	4% (体积比) 磷酸水溶液*
清洗1:	2% (体积比) 甲酸水溶液
清洗2:	5% (体积比) 甲醇水溶液
洗脱:	含2%氨水的水/乙腈(60/40)溶液 (体积比)

*使用Waters ProteinWorks eXpress快速酶解试剂盒和直接酶解试剂盒得到的蛋白质酶解上清液无需使用酸化水溶液进行预处理。

肽定量分析的色谱柱选择



样品制备方法： 蛋白质酶解所得的胰蛋白酶肽

胰蛋白酶酶解物上清液上样量

ProteinWorks μ Elution SPE净化试剂盒酶解物上样的推荐最大上样量。

Oasis MCX 96孔 μ Elution板酶解物推荐最大上样量

SPE上样量(μ L)

初始血浆/血清体积*	直接酶解**	亲和纯化后再酶解†
15 μ L	110-200	全部酶解上清液
25 μ L	70-140	全部酶解上清液
35 μ L	50-100	全部酶解上清液
50 μ L	35-70	170-200
70 μ L	25-50	120-200

*初始血浆体积(采用ProteinWorks eXpress快速酶解试剂盒及方案进行蛋白酶解或亲和纯化), 最终得到的酶解样品体积为200 μ L。

**全血浆/血清中的总蛋白质含量按75 mg/mL计。

†经通用亲和纯化后的血浆(蛋白A/G)中的总蛋白质含量按15 mg/mL计, 并假设亲和纯化采集到的样品全部用于酶解。

实验室术语和知识点

1 将g/mL换算为mol/mL

示例:

肽分子量

1000 = 1 $\mu\text{g}/\text{nmol}$ 或1 ng/pmol

肽分子量

3000 = 3 $\mu\text{g}/\text{nmol}$ 或3 ng/pmol

pI = 等电点

分子净电荷量为零或正负电荷量相等时的pH

pH低于pI时 = 净电荷为正

pH高于pI时 = 净电荷为负

HPLC指数

指示肽的相对疏水性。

疏水性肽(HPLC指数 ≥ 30)

极性肽(HPLC指数 ≤ 30)

2 制备1体积摩尔浓度(1 M)的溶液

■ 溶液的体积摩尔浓度(M)是指1升溶液中化学物质的摩尔数

■ 确定化学式中每种原子的分子量

$\text{NaOH} = 1 \times \text{Na} (22.99), 1 \times \text{O} (15.999), 1 \times \text{H} (1.008)$

$\text{NaOH} = 39.997$

■ 1 M的NaOH相当于1 L蒸馏水中含有39.997 g NaOH

■ 如果需要制备100 mL 0.1 M的NaOH呢?

化学物质的质量(g) =

(溶液体积摩尔浓度, mol/L) x

(化学物质分子量, g/mol) x (溶液体积, mL) \div (1000 mL/L)

$\text{NaOH的质量(g)} = 0.1 \times 39.997 \times 100 \div 1000$

100 mL 0.1 M的NaOH中应该含有0.39997 g NaOH

3 制备重量/体积百分比(w/v%)溶液

■ 溶液w/v%的计算方法如下

$w/v(\%) =$

$\frac{\text{溶质质量}}{\text{溶液体积}} \times 100$

■ 250 mL含8 g氯化钠(NaCl)的氯化钠水溶液的w/v(%)是多少

$w/v(\%) = 8 \text{ g} \div 250 \text{ mL} \times 100$

■ 250 mL含有8 g氯化钠的氯化钠水溶液的w/v%为3.2%

■ 如需确定制备指定w/v%溶液所需的化学物质质量

化学物质的质量(g) = 溶液体积 \div 100 x w/v%

■ 制备250 mL 3.2% (w/v%)的溶液所需的NaCl质量是多少

$\text{NaCl的质量(g)} = 250 \div 100 \times 3.2$

250 mL 3.2% (w/v%)的NaCl溶液中含8 g NaCl

4 试剂/样品稀释计算

$C1 * V1 = C2 * V2$

■ 其中: C1 = 初始浓度, C2 = 最终浓度, V1 = 初始体积, V2 = 最终体积

■ 例如, 要使用10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的储备液制备5 mL目标分析物浓度为50 ng/mL 的血浆溶液。

C1 = 初始浓度 = 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ = 10,000 ng/mL

C2 = 最终浓度 = 50 ng/mL

V1 = 初始体积 = 未知

V2 = 最终体积 = 5 mL = 5,000 μL

$C1 * V1 = C2 * V2$

$V1 = (C2 * V2) / C1$

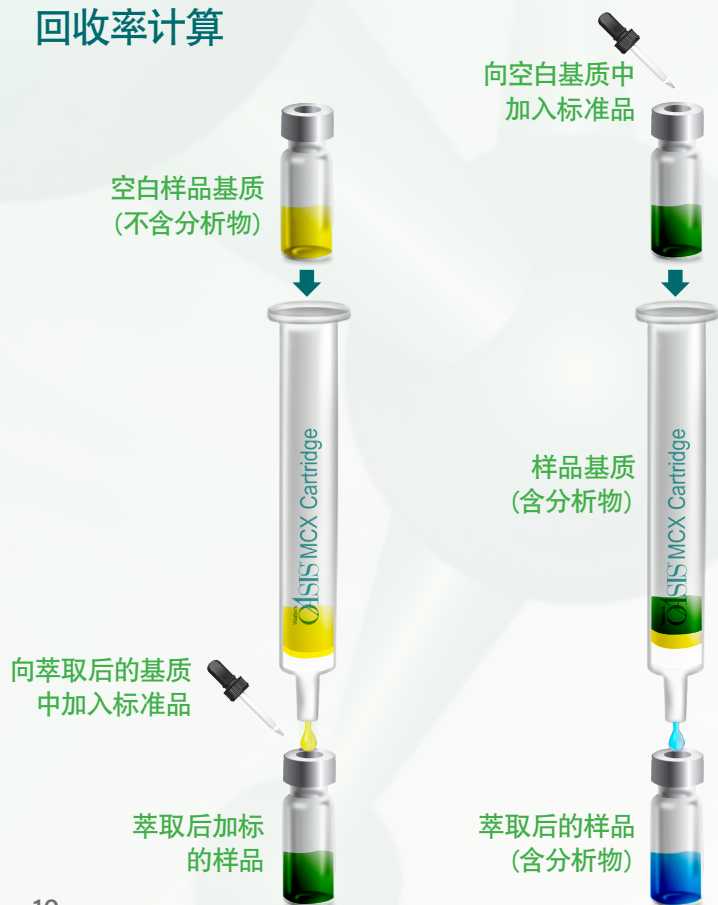
$V1 = (50 \text{ ng/mL} * 5,000 \mu\text{L}) / (10,000 \text{ ng/mL})$

$V1 = 25 \mu\text{L}$

回收率计算

要确定SPE方法是否成功，必须评估两个关键参数：**回收率**和**基质效应**。回收率代表SPE方法对目标化合物的分离效果。**基质效应**则能够确定您是否成功去除了可能干扰化合物定量准确性和一致性的基质组分。

回收率计算



萃取方案的回收率(RE)*(或SPE回收率)

$$\% RE = 100 \times \frac{\text{响应}}{\text{响应}}$$

萃取后的样品(含分析物)

萃取后加标的样品

应采用相同的溶液萃取样品

**Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., Chavez-Eng, C.M. Anal. Chem. 2003, 75, 3019-3030.*

基质效应计算

要确定SPE方法是否成功, 必须评估两个关键参数: **回收率**和**基质效应**。回收率代表SPE方法对目标化合物的分离效果。**基质效应**则能够确定您是否成功去除了可能干扰化合物定量准确性和一致性的基质组分。

基质效应计算



基质效应和基质因子

$$\text{基质因子(MF)} = \frac{\text{响应}_{\text{基质存在时}}}{\text{响应}_{\text{无基质时}}}$$

$$\% \text{基质效应(ME)} = \left(\left(\frac{\text{响应}_{\text{萃取后加标的样品}}}{\text{响应}_{\text{溶剂标准品}}} \right) - 1 \right) * 100$$

- 两种样品的溶液组成应相同
- MF值 < 1, %ME为负 = 基质抑制
- MF值 > 1, %ME为正 = 基质增强

回收率和基质效应计算

计算回收率时的样品制备示例

萃取后加标的样品



500 µL空白基质

SPE - 使用
50 µL溶液洗脱

萃取后加标溶剂 -
50 µL, 浓度100 ng/mL
= 含5 ng分析物

50 µL萃取物

萃取后的样品



500 µL基质(含浓度为
10 ng/mL的分析物)

500 µL,
浓度10 ng/mL = 5 ng
SPE - 使用50 µL溶液洗脱

萃取后加标溶剂 -
50 µL(不含分析物)

50 µL萃取物
5 ng分析物

计算基质效应时的样品制备示例

萃取后加标的样品



500 µL
空白基质

SPE - 使用
50 µL溶液洗脱

萃取后加标溶剂 -
50 µL, 浓度
100 ng/mL =
含5 ng分析物

50 µL萃取物

标准品溶液
(分析物)



萃取后加标
溶剂**
50 µL, 浓度
100 ng/mL

50 µL洗脱溶剂

**有关制备萃取后加标溶剂的特殊注意
事项。考虑到肽的溶解性和非特异性结
合, 建议加入含载体蛋白和有机溶剂的50
µL储备液(例如含1% FA和0.05%大鼠血
浆的乙腈/水(20/80)溶液)。

- 两个样品瓶中都含有来自500 µL基质的基质组分(使用50 µL洗脱溶剂洗脱而得)、50 µL萃取后加标的溶剂, 而且每份溶液理论上都含5 ng分析物。

- 两个样品瓶中都含5 ng分析物(50 µL洗脱溶剂和50 µL萃取后加标溶剂)。
- 萃取后加标的样品中还含有萃取自样品基质的组分。

实验设置

SPE板和收集板样品设置

回收率和基质效应实验的96孔板模板

用于计算回收率和基质效应	用于计算回收率	用于计算基质效应
萃取后加标的样品(PESS)	萃取后的样品(ES)	标准品溶液(SS)
按照SPE流程处理空白样品基质, 最后直接将标准品加入这些样品孔中。 制备4个重复样	在SPE流程开始之前将标准品加入样品基质中, 然后收集这些样品孔的最终洗脱物。 制备4个重复样	吸取SPE方案所用的最终洗脱溶液添加到这些样品孔中, 然后加入标准品。不对这些样品孔中的溶液进行SPE处理。 制备4个重复样

回收率和基质效应实验的96孔板模板

SPE板

第②列中有4个未使用的样品孔

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PESS											
B	PESS											
C	PESS											
D	PESS											
E	ES											
F	ES											
G	ES											
H	ES											

PESS = 萃取后加标的样品, ES = 萃取后的样品

收集板

将SS添加到第②列的样品孔中

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PESS	SS										
B	PESS	SS										
C	PESS	SS										
D	PESS	SS										
E	ES											
F	ES											
G	ES											
H												

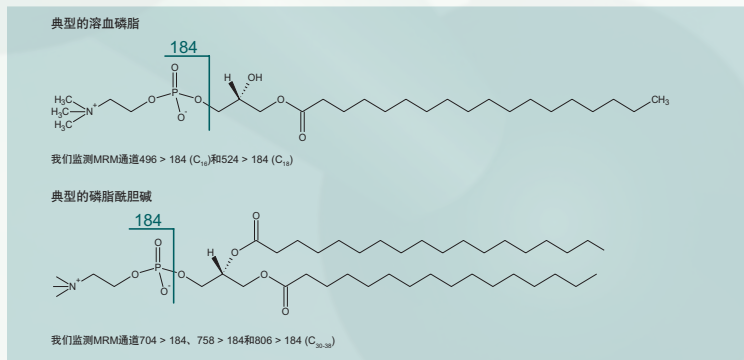
PESS = 萃取后加标的样品, ES = 萃取后的样品, SS = 标准品溶液

磷脂监测

您可能需要监测最终样品中的磷脂，以评估SPE流程对磷脂的去除程度。磷脂是导致基质效应的常见因素之一，去除这类物质不仅能提升方法稳定性，还能延长仪器正常运行时间和色谱柱使用寿命。监测磷脂的常用方法有两种，第一种方法是单独监测不同磷脂的MRM通道(需监测5个或更多MRM通道)，第二种方法只需监测1个MRM通道，即m/z 184.4碎片离子，这是含磷脂酰胆碱的磷脂(丰度最高的一类磷脂)的极性头部基团所共有的碎片离子。上述两种方法都能很好地指示样品的整体洁净度。

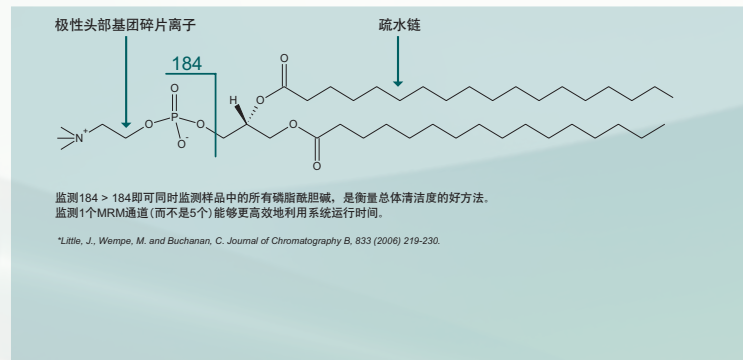
磷脂监测MS方法1:

监测单个MRM通道



磷脂监测MS方法2:

监测所有磷脂酰胆碱*



监测磷脂的质谱条件

母离子 (m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压	碰撞能量
184.40**	184.40	90	3
496.40 [†]	184.40	35	30
520.40	184.40	35	30
522.40	184.40	35	30
524.40*	184.40	35	30
704.40*	184.40	35	30

母离子 (m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压	碰撞能量
758.40*	184.40	35	30
760.40	184.40	35	30
784.40	184.40	35	30
786.40	184.40	35	30
806.40*	184.40	35	30
808.40	184.40	35	30

**适用于监测单个MRM的方法
**最常监测的离子

回收率相关故障排除

有关详细信息，请访问
www.waters.com/oasis

问题: 上样量超出SPE吸附剂的载量，肽分子直接通过吸附剂而未得到保留。

解决方案1: 在SPE处理之前，先采用蛋白沉淀(1:1)等方法去除部分基质组分。

解决方案2: 减少上样至吸附剂的样品量。

解决方案3: 增加吸附剂用量，但请谨慎，因为干燥/挥干步骤可能会导致肽损失。

问题: 强极性肽的回收率差

解决方案1: 由于离子交换结合能力不够强，导致上样时肽分子穿透。上样时，大部分肽依赖反相机理保留。因此，可能需要通过预处理步骤对部分极性肽进行改性处理，改变化合物的离子化状态，从而提高其初始保留性能。

解决方案2: 清洗步骤也可能导致极性肽损失。对于在碱性环境下不稳定的分析物，可考虑将清洗溶液1替换为10 mM磷酸盐缓冲液(pH 7)或10 mM醋酸铵(pH约为6)，并且/或者降低清洗溶液2中有机溶剂的比例。

问题: 肽分子未从SPE吸附剂上洗脱下来，且上样或清洗步骤的废液中也检测不到肽分子。肽分子滞留在吸附剂上。这可能是由于肽的溶解性较差。

解决方案1: 另外选用适合的洗脱溶液或增加洗脱溶液体积，确保肽分子能够从SPE吸附剂上彻底洗脱。

解决方案2: 提高洗脱溶液强度(有机溶剂含量不超过75%)或增加洗脱溶液体积。

解决方案3: 降低洗脱溶液通过SPE板的流速。确保洗脱溶液从板孔中逐滴缓慢流出，不能连成线。

解决方案4: 肽分子因有机溶剂浓度过高而发生了沉淀，此时请将有机溶剂浓度降至75%以下。

解决方案5: 增加改性剂浓度以提高肽的溶解性(提高酸度或碱度)。

问题: 样品基质中分析物的回收率低于标准品溶液中分析物的回收率。

解决方案1: 未成功破坏蛋白质结合。改变样品预处理方案，向血浆中加入4% H₃PO₄或5%氨水，或者尝试在SPE之前先进行蛋白沉淀(1:1)处理。在某些情况下，可能还需要使用SDS或盐酸胍等表面活性剂使蛋白质变性。

解决方案2: 竞争性基质干扰物质使吸附剂上的结合位点饱和，导致SPE吸附剂的载量不足以完全保留目标肽。减少上样至吸附剂的样品质量/体积，或增大吸附剂用量。

SPE关键因素

流速

上样或洗脱流速过快(真空压力过大/或速度过快)可导致回收率降低。鉴于肽的固有的分子体积，我们必须考虑响应时间(进出色谱孔隙的时间)。流速不应超过1.0 mL/min，然后将真空度提高至15~20"汞柱，以确保所有溶剂均能通过。

样品预处理

此步骤是确保目标分析物所在溶液适用于SPE方案的关键步骤。例如，组织或血液样品中的分析物可能需要先提取至分离溶液中，再进行SPE。此外，为了保留目标分析物，过SPE之前还必须破坏药物与蛋白质之间的结合。我们通常使用4% H_3PO_4 (磷酸)溶液按1:1的比例将样品(例如血浆)稀释为含2% H_3PO_4 的最终浓度。在某些情况下，可能还需要进行破坏性更强的处理。请参阅“样品预处理”部分获取更多建议。

离子化状态

使用混合型吸附剂时，我们不仅要考虑目标分析物所带的电荷，还应考虑SPE吸附剂所带的电荷，这一点非常重要。强离子交换吸附剂始终处于带电状态。弱离子交换吸附剂可能带电也可能不带电，具体取决于流经吸附剂的溶液pH值。了解这些带电状态对样品的影响十分重要。一般而言，工作溶液的pH值应与分析物pI和/或吸附剂pKa相差少2个整pH单位。

样品预处理

血浆

血浆的标准预处理方法是使用4%磷酸按1:1的比例进行稀释。这种方法可稀释样品、降低粘度、增加样品与吸附剂的接触时间，还有助于破坏蛋白质结合。如果需要调整上样样品的pH值，可使用5%的浓氨水或其它适用的缓冲液按1:1的比例进行稀释。如果使用酸或碱对样品进行预处理不足以破坏蛋白质结合，可能需要使用有机溶剂沉淀蛋白质。不建议使用经典的蛋白沉淀法处理肽样品。通常以1:1的比例进行蛋白沉淀可确保肽回收率。用水稀释样品，使得有机溶剂的最终浓度不超过10%~20%，否则上样时可能会发生流穿。

全血样品

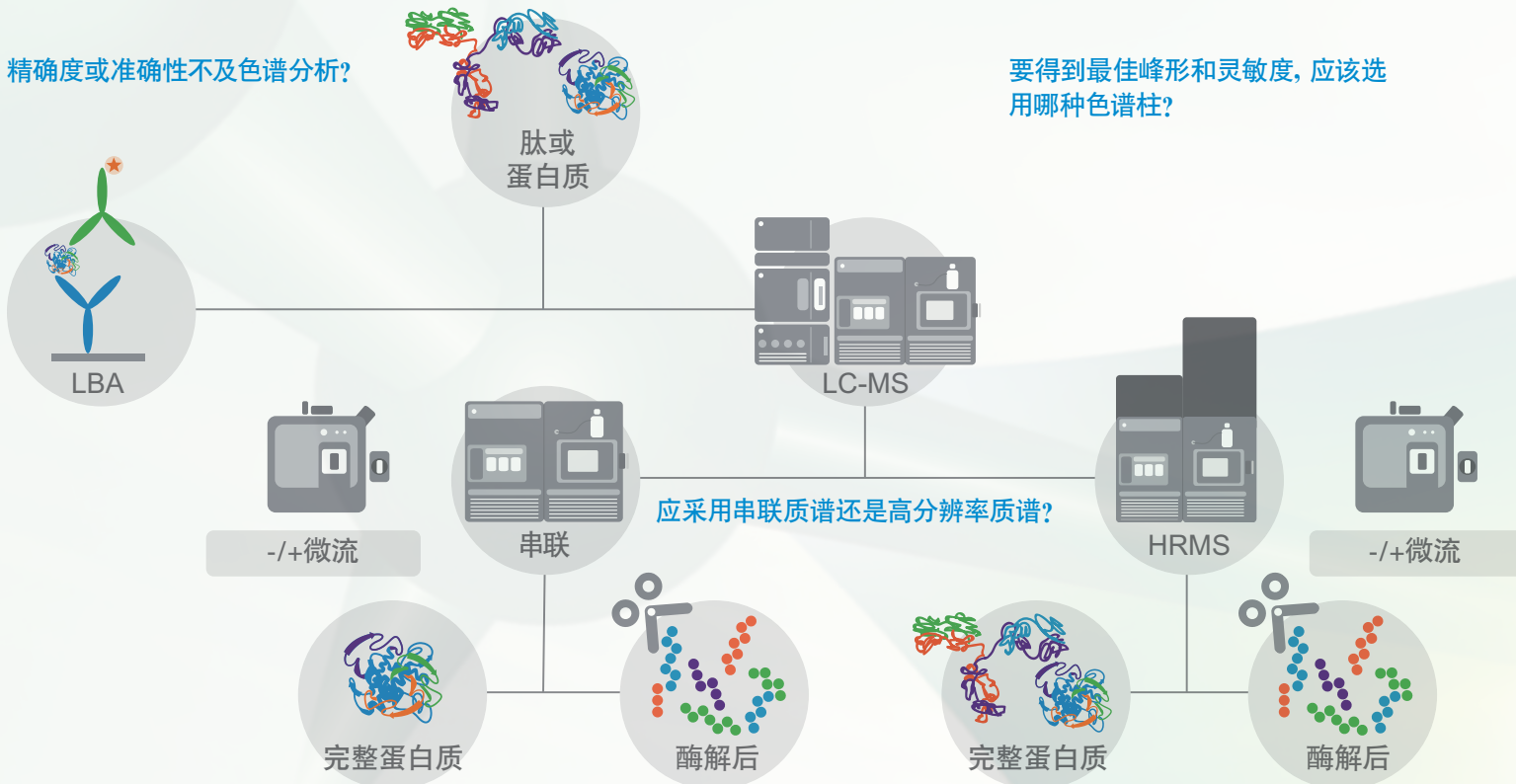
制备全血样品时，需要先溶解血细胞并沉淀整个样品，然后再进行SPE。溶解细胞时，通常使用0.1 M的 $ZnSO_4$ 按1:1或1:2的比例稀释样品即可。例如，100 μL 全血样品可使用50 μL 或100 μL $ZnSO_4$ 进行稀释。也可使用0.1 M $ZnSO_4$ 和0.1 M醋酸铵(NH_4OAc)溶液。溶解细胞之后，按1:1(有机溶剂:样品)的比例混合有机溶剂和样品，以沉淀蛋白质。

尿液

尿液是预处理方法最简单的基质，通常使用合适的水溶液按1:1的比例对其进行稀释。如果使用反相SPE，用水稀释样品即可，如果使用混合模式离子交换吸附剂，4%磷酸或5%浓氨水是个不错的选择。请务必确保样品上样至吸附剂时，分析物和/或吸附剂处于正确的离子化状态。如果需要将样品调节至特定pH值，请务必使用体积摩尔浓度足够的溶液进行调节，以克服尿液本身的缓冲能力。此外，使用离子交换吸附剂处理尿液萃取物时，请注意吸附剂的载量。

肽和蛋白质生物分析训练营

在哪里可以找到以下问题和其它更多问题的答案?



蛋白质生物分析工作流程

欢迎通过以下网址访问
训练营，获取有关蛋白质和
肽生物分析的详细教学网络广播！
dmpk.waters.com/en/boot-camp



扫一扫，
了解更多合成肽分析解决方案！



扫一扫，关注沃特世微信

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters, The Science of What's Possible, μ Elution, ProteinWorks和Oasis是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2018年 沃特世公司。中国印刷。2018年7月 720006298ZH KP-KP