

## 在氨基酸分析中使用AccQ·Tag Ultra VanGuard预柱获得相媲美的色谱性能

---

Kenneth D. Berthelette, Jennifer M. Nguyen, Ning Zhang, Paula Hong, Jennifer Simeone

Waters Corporation

---

### 摘要

复杂基质的常规分析可能会引起色谱柱性能问题。血浆、细胞培养基或食品样品中存在的脂质或蛋白质等内源性化合物可能导致色谱柱入口筛板随时间推移而堵塞，引起柱压升高和色谱柱使用寿命缩短。要缓解此问题，一种方法是使用保护柱，这些保护柱可定期更换以保护分析柱免受污染。本文所述研究比较了带和不带AccQ·Tag Ultra保护柱的AccQ·Tag Ultra色谱柱在纯细胞培养基标准品分析中的色谱性能。

### 优势

- AccQ·Tag VanGuard预柱可延长分析柱使用寿命
  - 在使用和不使用预柱时获得相媲美的色谱性能
- 

### 简介

氨基酸分析(AAA)在各行各业均有应用，不同行业采用的样品前处理方法有所不同。分析细胞培养基、食品和饲料中的蛋白质含量以及蛋白质水解都面临着独特的基质挑战。根据方法的不同，这些基质中存在的脂质、蛋白质、

---

糖类及其他化合物可能对分析柱产生不利影响。虽然过滤或其他样品前处理策略有助于减轻这些影响，但在原本复杂的样品前处理中额外增加步骤（即衍生化技术）并不符合需要。在这些情况下，将保护柱安装到样品流路中的分析柱前面可以起到保护分析柱的作用。

保护柱（例如新型AccQ·Tag Ultra预柱）是安装在AccQ·Tag Ultra分析柱入口处，填充有固定相的短柱。安装后，这些保护柱先受到基质的影响，并且先被内源性基质组分污染。定期更换保护柱，从而防止分析柱被污染。以前已经发表了几篇有关使用保护柱的示例文章<sup>1-2</sup>。保护柱的作用虽然非常强大，但由于在流路中增加了固定相并增加了系统扩散，因此可能会观察到色谱结果发生细微变化。本文所述研究比较了衍生化细胞培养基标准品在带和不带保护柱的AccQ·Tag Ultra色谱柱上的分离结果。

---

## 实验

### 样品描述

按照《氨基酸标准品试剂盒维护和使用手册》中概述的方法对氨基酸细胞培养标准品试剂盒（部件号：186009300 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009300-amino-acid-cell-culture-standard-kit.html>>）进行前处理和衍生化<sup>3</sup>。

### 液相色谱条件

液相色谱系统：	配有色谱柱管理器(CM)、辅助色谱柱管理器(CM-Aux)和PDA检测器的ACQUITY UPLC H-Class
检测条件：	UV 260 nm
色谱柱：	AccQ·Tag Ultra C <sub>18</sub> 色谱柱, 1.7 μm, 2.1 × 100 mm（部件号：186003837） AccQ·Tag Ultra C <sub>18</sub> , 1.7 μm, VanGuard预柱, 2.1 × 5 mm（部件号：186009955）
柱温：	43 °C

样品温度：	20 °C
进样体积：	0.5 µL
流速：	0.7 mL/min
流动相A：	AccQ · Tag洗脱液A（部件号：186003838）
流动相B：	90:10 (v/v)水:AccQ · Tag Ultra洗脱液B
流动相C：	Milli-Q水
流动相D：	AccQ · Tag洗脱液B（部件号：186003839）
样品管理器清洗液：	95:5 (v/v)水:乙腈
样品管理器灌注液：	95:5 (v/v)水:乙腈

## 梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	%C	%D	曲线
0.00	0.7	10.0	0.0	90.0	0.0	-
0.29	0.7	9.9	0.0	90.1	0.0	11
5.49	0.7	9.0	80.0	11.0	0.0	7
7.10	0.7	8.0	15.6	57.9	18.5	6
7.30	0.7	8.0	15.6	57.9	18.5	6
7.69	0.7	7.8	0.0	70.9	21.3	6
7.99	0.7	4.0	0.0	36.3	59.7	6
8.59	0.7	4.0	0.0	36.3	59.7	6
8.68	0.7	10.0	0.0	90.0	0.0	6
10.20	0.7	10.0	0.0	90.0	0.0	6

## 数据管理

色谱软件： Empower 3 Feature Release 4

## 结果与讨论

保护分析柱是延长色谱柱使用寿命的一种稳妥方法，而使用保护柱或预柱是保护分析柱的简单方法之一。这些短柱使用与分析柱相同的固定相，并且直接安装在系统流路中的分析柱前面。分析复杂基质时，样品基质中的蛋白质或脂质等组分先污染保护柱，从而防止分析柱被污染。保护柱也需要定期更换，以确保分析柱得到保护。

虽然使用保护柱有明显优势，但在样品流路中增加固定相以及额外连接可能会影响分析结果和系统压力。图1显示了ACQUITY UPLC H-Class系统在安装和未安装AccQ·Tag Ultra预柱的条件下运行AccQ·Tag Ultra色谱柱时的系统压力。

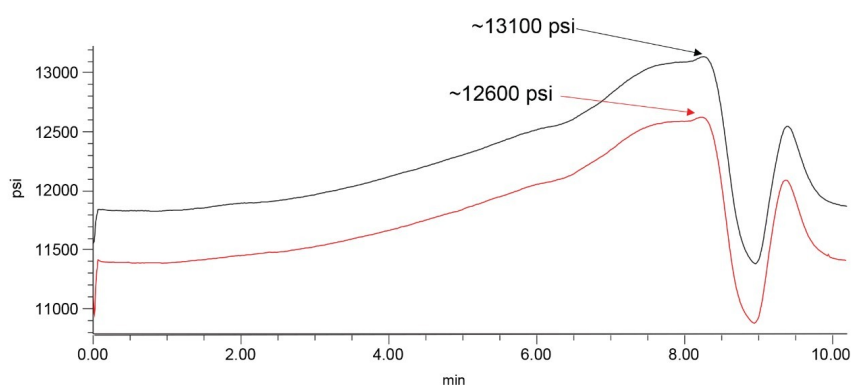


图1.ACQUITY UPLC H-Class系统在安装（黑色）和未安装（红色）AccQ·Tag Ultra预柱的AccQ·Tag Ultra色谱柱上运行上述梯度条件时的系统压力

在这些测试条件下，使用AccQ·Tag Ultra预柱会导致系统压力升高约500 psi。这是因为预柱在系统中增加了5 mm的填充床，导致压力升高4%。为评估预柱对色谱性能的影响，我们使用AccQ·Tag Ultra衍生试剂盒检测和分析了细胞培养基标准品，分析在带和不带保护柱的AccQ·Tag Ultra色谱柱分别进行（图2）。

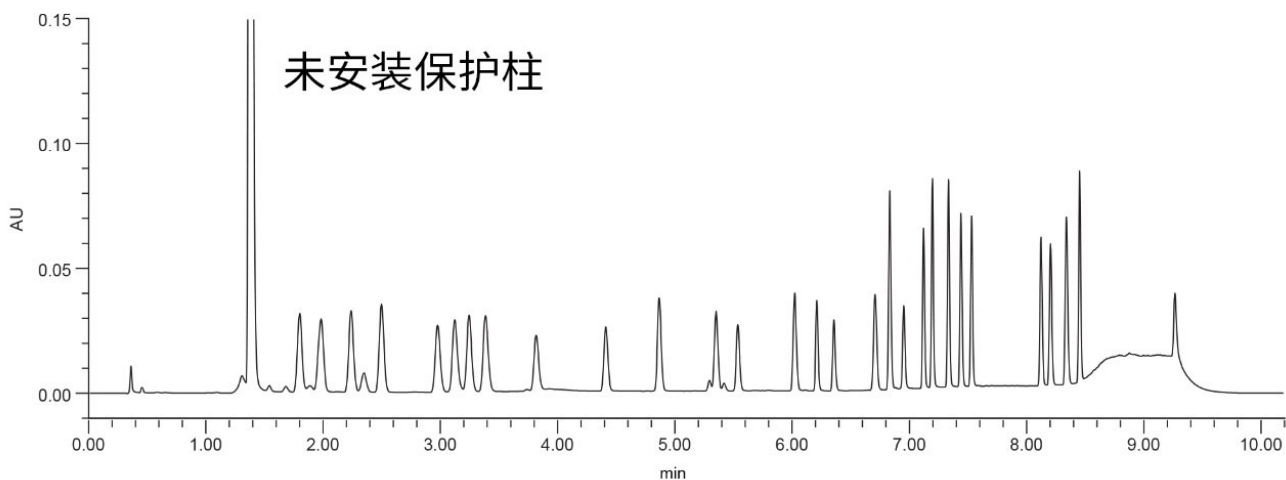
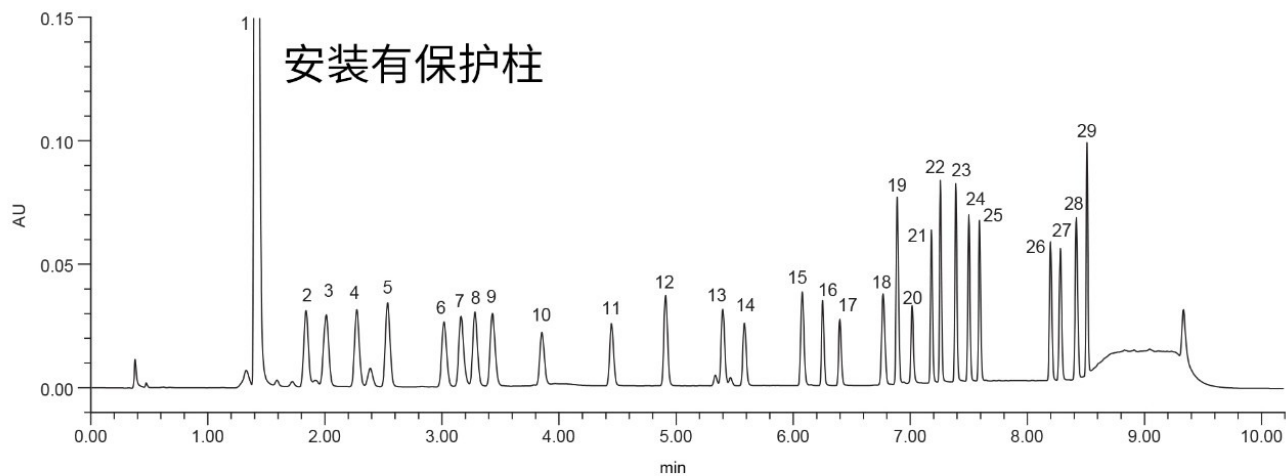


图2.在配备PDA检测器的ACQUITY UPLC H-Class系统上，使用细胞培养基梯度方法在安装（上图）和未安装（下图）保护柱的AccQ•Tag Ultra色谱柱上分析细胞培养基标准品的结果。1) AMQ, 2) HyPro, 3) His, 4) Asn, 5) Tau, 6) Ser, 7) Gln, 8) Arg, 9) Gly, 10) Asp, 11) Glu, 12) Thr, 13) Ala, 14) GABA, 15) Pro, 16) HyLys1, 17) HyLys2, 18) AABA, 19) Orn, 20) 衍生峰, 21) Cys, 22) Lys, 23) Tyr, 24) Met, 25) Val, 26) Ile, 27) Leu, 28) Phe, 29) Trp。

关键分析物对Gln/Arg (7/8)和Cys/Lys (21/22)在使用和不使用保护柱时获得的色谱性能相当。在安装和未安装预柱的条件下，这些关键分析物均得到基线分离，USP分离度大于1.5。应注意的是，组分4与5之间的峰可能是部分衍生的赖氨酸盐，仅在赖氨酸未完全衍生化时才会出现。存在的赖氨酸盐峰不影响本研究的结果。在安装和未安装预柱的条件下，峰拖尾、保留时间和USP分离度值也表现出相媲美的结果（表1）。固定相增加的确导致保留时间略有偏移；但保留时间差异很小(< 0.2 min)，仍处于该处理方法的保留时间窗口内。

	安装有预柱的 AccQ·Tag Ultra色谱柱			未安装预柱的 AccQ·Tag Ultra色谱柱		
	保留时间 (min)	USP 分离度	USP 拖尾因子	保留时间 (min)	USP 分离度	USP 拖尾因子
AMQ	1.413	-	1.41	1.379	-	1.35
HyPro	1.840	6.35	1.05	1.801	6.25	1.02
His	2.012	2.17	0.99	1.983	2.23	0.94
Asn	2.273	3.25	1.12	2.239	3.14	1.08
Tau	2.536	3.48	1.09	2.498	3.45	1.07
Ser	3.018	6.28	1.12	2.977	6.19	1.10
Gln	3.163	1.85	1.27	3.123	1.82	1.24
Arg	3.282	1.56	1.10	3.245	1.55	1.07
Gly	3.431	1.94	1.19	3.385	1.79	1.17
Asp	3.853	5.58	1.23	3.817	5.57	1.35
Glu	4.448	8.78	1.14	4.411	8.49	1.12
Thr	4.910	7.59	1.14	4.866	7.36	1.11
Ala	5.398	8.37	1.15	5.351	8.24	1.15
GABA	5.583	3.31	1.14	5.537	3.30	1.12
Pro	6.077	9.41	1.15	6.022	9.19	1.12
HyLys1	6.252	3.88	1.18	6.210	4.18	1.15
HyLys2	6.398	3.62	1.18	6.356	3.64	1.15
AABA	6.768	7.85	1.14	6.707	7.51	1.12
Orn	6.888	2.64	1.18	6.832	2.77	1.15
衍生化峰	7.016	3.25	1.22	6.952	3.09	1.17
Cys	7.180	4.47	1.15	7.121	4.65	1.14
Lys	7.257	2.34	1.16	7.196	2.29	1.14
Tyr	7.389	3.98	1.14	7.334	4.12	1.12
Met	7.500	3.18	1.14	7.440	3.06	1.11
Val	7.591	2.64	1.15	7.530	2.64	1.12
Ile	8.198	16.8	1.15	8.123	16.7	1.12
Leu	8.281	2.15	1.15	8.204	2.13	1.12
Phe	8.418	3.44	1.12	8.339	3.42	1.12
Trp	8.509	2.64	1.10	8.452	3.04	1.08

表1.在安装和未安装预柱的条件下，已鉴定氨基酸的保留时间、峰拖尾和USP分离度。

总体而言，安装和未安装预柱时获得的色谱性能相当。保留时间差异不超过5%。除Asp的峰形表现出9%的改善外，峰拖尾变化也小于5%。USP分离度变化也小于5%（HyLys1和Trp除外），且分离度仍然远高于基线分离截止值1.5。这些细微变化不足以改变分离性能。使用预柱后，AccQ·Tag Ultra色谱柱有可能分析更多样品，无需更

换色谱柱。

---

## 结论

在分析柱前面使用保护柱有助于保护分析柱并延长使用寿命。保护柱也称为预柱，是先经历任何进样的固定相填充床。这意味着如果样品含有特别棘手的基质（可能会污染色谱柱，例如细胞培养基或食品和饲料基质），在污染分析柱之前会先污染保护柱。因此，可通过更换被污染的保护柱而不是色谱柱来延长色谱柱使用寿命。

AccQ·Tag Ultra预柱的研究结果表明，在安装和未安装保护柱的条件下获得了相媲美的色谱性能。使用带和不带保护柱的色谱柱时，观察到系统压力和保留时间的差异小于 5%。保护柱的使用有助于保护更昂贵的分析柱，同时对色谱性能无显著影响。

---

## 参考资料

1. Shiner S, Delano M, Lauber M, Rzewuski S, Warren W, McLaughlin J, Byrd S. VanGuard FIT: A Breakthrough in Guard Column Performance for Challenging Chromatographic Separations. Waters Application Note, [720006500EN](#), 2019.
2. Koza S, Chen W. BioResolve SEC mAb保护柱在样品生产工艺和制剂开发中的应用. 沃特世应用纪要, [720006955ZH](#), 2020.
3. 《氨基酸标准品试剂盒维护和使用手册》. 沃特世维护和使用手册, [72000663ZH](#) <<https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/720006663en.pdf>> , 2020.

---

## 特色产品

[ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/10138533>](https://www.waters.com/10138533)

[ACQUITY UPLC PDA检测器 <https://www.waters.com/514225>](https://www.waters.com/514225)

---

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007460ZH, 2021年12月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.