

展示ACQUITY™ Premier二元系统在长时间缓梯度肽图分析中的适用性

Corey E. Reed, Jennifer Simeone, Paula Hong

Waters Corporation

摘要

反相液相色谱(RPLC)是肽图分析中的关键分析工具。复杂的肽图可能需要使用长时间缓梯度来充分分离大量的酶解物和产物变体肽。采用MaxPeak™ HPS技术的ACQUITY Premier二元系统非常适合该任务，因为它的梯度准确度较高。在一项为期5天的研究中，ACQUITY Premier系统与竞争产品生物兼容性UHPLC系统相比，表现出出色的保留时间重复性。

优势

- 出色的保留时间重复性得益于长时间缓梯度在紫外(UV)和质谱(MS)检测中有意义的流速下所提供的高准确度
 - 无需峰对齐算法即可简化肽图可比性
-

简介

RPLC是肽图分析中广泛使用的色谱方法。为了获得诸如单克隆抗体(mAb)等复杂生物分子的详细图像，可使用多种酶切酶在不同位点裂解蛋白质，得到较小肽的混合物，然后分析这些混合物，以更深入地了解该分子。反相超

高效液相色谱(RP-UHPLC)是现代生物治疗性蛋白质肽图分析中常用的色谱方法¹。

配备二元泵溶剂输送模块的Waters ACQUITY Premier系统（图1）非常适合此类分析。高压混合二元泵是肽图分析应用的理想选择，特别是使用缓梯度的应用，它们需要可重现的精密混合才能实现可重复的峰保留时间。在本应用纪要中，我们使用常用色谱柱和样品在ACQUITY Premier系统和竞争产品生物兼容性系统上对烯醇酶酶解进行了一项为期5天的分析。通过监测在整个梯度曲线中分布的肽的保留时间来比较两个系统的结果。总体而言，这两个系统都表现良好，但ACQUITY Premier系统与竞争系统相比显示出更好的保留时间重复性。

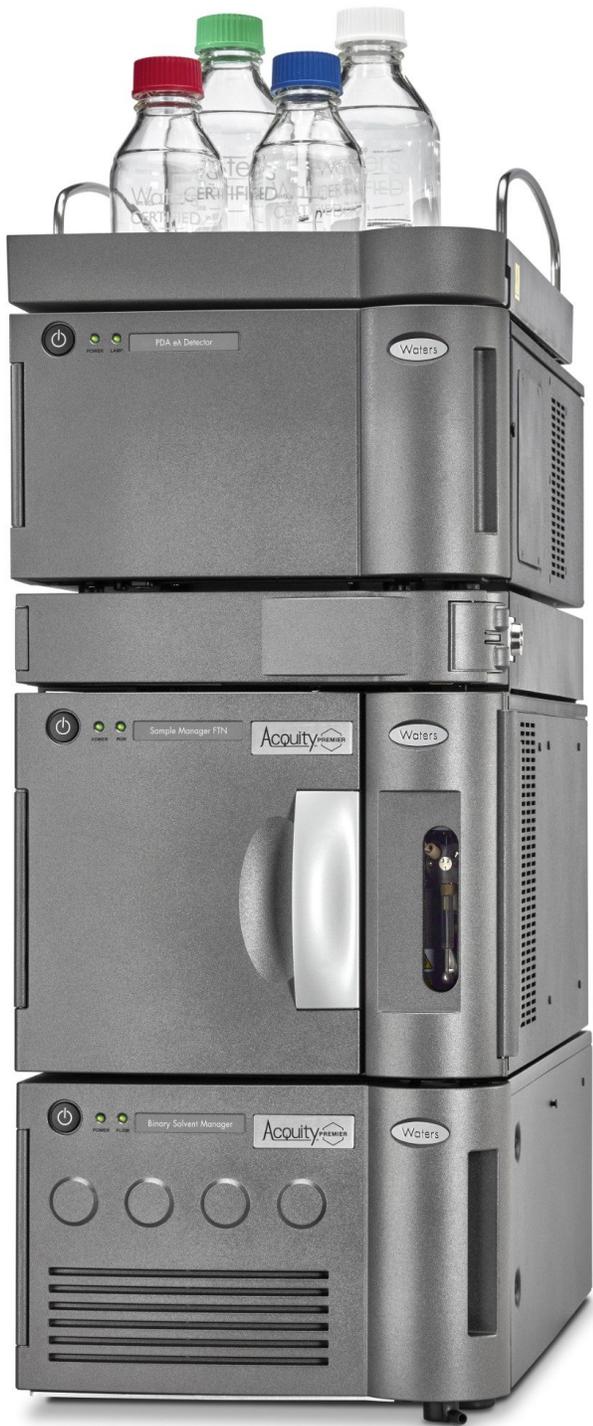


图1. 配备光电二极管阵列检测器的ACQUITY Premier UPLC二元生物系统

实验

样品描述

将两瓶MassPREP烯醇酶酶解标准品（部件号：[186002325 < https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186002325-massprep-enolase-digestion-standard.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186002325-massprep-enolase-digestion-standard.html)）复溶于100 μL 0.1%三氟乙酸(TFA)的水溶液中，将两个样品瓶涡旋10秒钟，确保复溶并充分混合。将混合样品涡旋10秒钟，取90 μL 转移到两个全回收样品瓶(P/N: [186002805 < https://www.waters.com/nextgen/global/shop/vials-containers--collection-plates/186002805-clear-glass-12-x-32-mm-screw-neck-total-recovery-vial-1-ml-volum.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/vials-containers--collection-plates/186002805-clear-glass-12-x-32-mm-screw-neck-total-recovery-vial-1-ml-volum.html))中，然后立即放入冷冻的自动进样器。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY Premier二元系统配备ACQUITY APC™储液瓶盖套件(P/N: 205001152) 竞争产品X生物兼容性UHPLC二元系统，配备标准储液瓶盖
检测条件：	光电二极管阵列检测器(PDA) — ACQUITY Premier系统 二极管阵列检测器 (DAD) — 竞争产品X, 214 nm, 10 Hz
样品瓶：	全回收(P/N: 186002805)
色谱柱：	ACQUITY UPLC™ CSH™ C ₁₈ , 130 Å, 1.7 μm , 2.1 x 150 mm肽分析专用柱(P/N: 186006938)
柱温：	65 °C
样品温度：	6 °C
进样体积：	10 μL

流动相A:	0.1% TFA水溶液
流动相B:	0.1% TFA乙腈溶液
洗针液/清除溶剂:	25/75流动相A/流动相B
密封清洗液:	80/20水/甲醇

Gradient Table

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0	0.2	99	1	6
3	0.2	99	1	6
88	0.2	50	50	6
90	0.2	10	90	6
100	0.2	10	90	6
102	0.2	99	1	6
126	0.2	99	1	6

数据管理

色谱软件: Empower™ 3.6.1

结果与讨论

含有生物分子酶解产生的肽的溶液往往很复杂，其中包含数十到数百个生物物理特性各异的肽峰。通常情况下，肽的疏水性是由肽段长度或肽段中烷基和芳香族氨基酸残基数量的增加所驱动的²。由此产生的混合物会导致复杂的色谱图或肽图，需要仔细分析才能了解肽对应的峰，从而了解分子。为了分离这些图中的许多峰，通常采用

反相长时间缓梯度，其中流动相的有机溶剂百分比缓慢增加³。长时间梯度内有机溶剂含量的微小变化有利于分离疏水性相似的肽。色谱系统上的泵精确输送这些微小变化的有机组成的能力对于结果的重复性至关重要。整个梯度曲线中有机组成的任何微小变化都将导致峰保留时间偏移，使得数据解释和比较变得困难。

ACQUITY Premier二元系统非常适合肽图分析分离应用，因为高压混合二元泵提供了出色的溶剂输送精度。在本应用纪要中，我们使用保留时间重复性作为泵性能的衡量指标，比较了ACQUITY Premier二元系统与前沿的竞争产品生物兼容性UHPLC二元系统（竞争产品X）。

为了评估系统的重复性，我们在两周内对ACQUITY Premier和竞争系统进行了为期五天的测试，使用的方法改编自之前的研究⁴。流动相和样品每天现配现用，两套系统同时运行，每套系统在测试开始时使用新的色谱柱。由于样品组分析时间长且流动相组分易挥发，因此使用了低蒸发瓶盖以确保溶剂稳定性。样品组包括沃特世烯醇酶酶解标准品的6次重复进样，其间穿插空白流动相进样。系统在研究之前已获得性能认证。在每个样品组开始之前进行动态渗漏测试，确保泵正常工作，并且系统上没有可能影响梯度输送精度的渗漏。

两套系统上烯醇酶酶解标准品的代表性色谱图见图2。对于此分析，流动相中的有机溶剂含量一开始非常低（1%），目的是完全分离酶解物中所含的早期洗脱的强极性肽段。采用长时间缓梯度，流动相的有机溶剂变化速率为0.58 %/min，持续85分钟，使大多数分析物实现分离，并测试二元泵的溶剂输送精度。竞争系统的绝对保留时间略高于ACQUITY Premier系统，这是因为色谱柱室内的色谱柱切换阀以及不同的梯度延迟体积导致系统体积增加。此外，两套系统之间的选择性明显存在微小变化，在图中用括号突出显示。如前所述，样品的复杂性导致许多结构相似的肽可能难以通过色谱分离。因此，梯度输送、柱温控制、溶剂混合和/或梯度延迟体积的任何细微变化都可能导致选择性发生可检测的变化。这表明在系统之间转移既定方法存在困难，即使是专为限制系统-分析物相互作用而设计的方法。

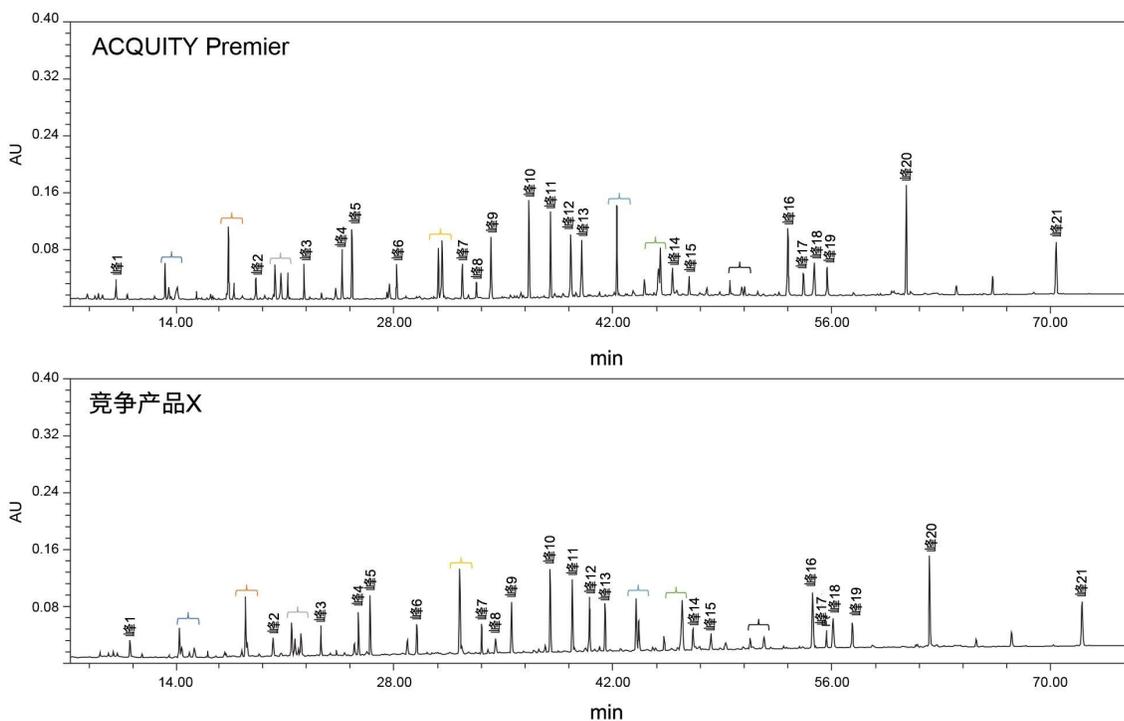


图2.ACQUITY Premier和竞争系统上烯醇酶酶解标准品的堆叠色谱图。图中标注了为保留时间重复性而监测的21个峰。彩色括号用于区分不同系统之间存在选择性差异的峰。色谱图来自使用214 nm波长在第2天测试的第2次进样。

为了评估每种系统的性能，我们监测了21个肽峰在样品组内以及在五天的测试中的保留时间重复性。注意排除共洗脱峰和系统间选择性发生变化的峰。图3显示了两种系统上所有21个峰的每日保留时间标准偏差平均值。在同一个系统集中，几天内没有观察到明显趋势。图4显示了所有五天测试的总标准偏差平均值。流动相制备、样品制备、室温、柱温和自动进样器温度的差异都会导致绝对保留时间的细微变化，这并不代表泵的性能。取日内标准偏差的平均值来计算几天内的平均标准偏差，以消除这些外部变异来源。在所有情况下，ACQUITY Premier系统的保留时间标准偏差均低于竞争系统，改善范围为13%（峰1）至146%（峰17）。这表明ACQUITY Premier系统上的二元泵能够在多次进样和数天内提供重现性和重复性更高的梯度。总体而言，两种系统上的二元泵性能均符合质量标准，ACQUITY Premier系统上所有峰的平均标准偏差为0.017 min，而竞争系统上所有峰的平均标准偏差为0.030 min，所有标准偏差平均值均低于0.045 min（图4）。

日内保留时间标准偏差

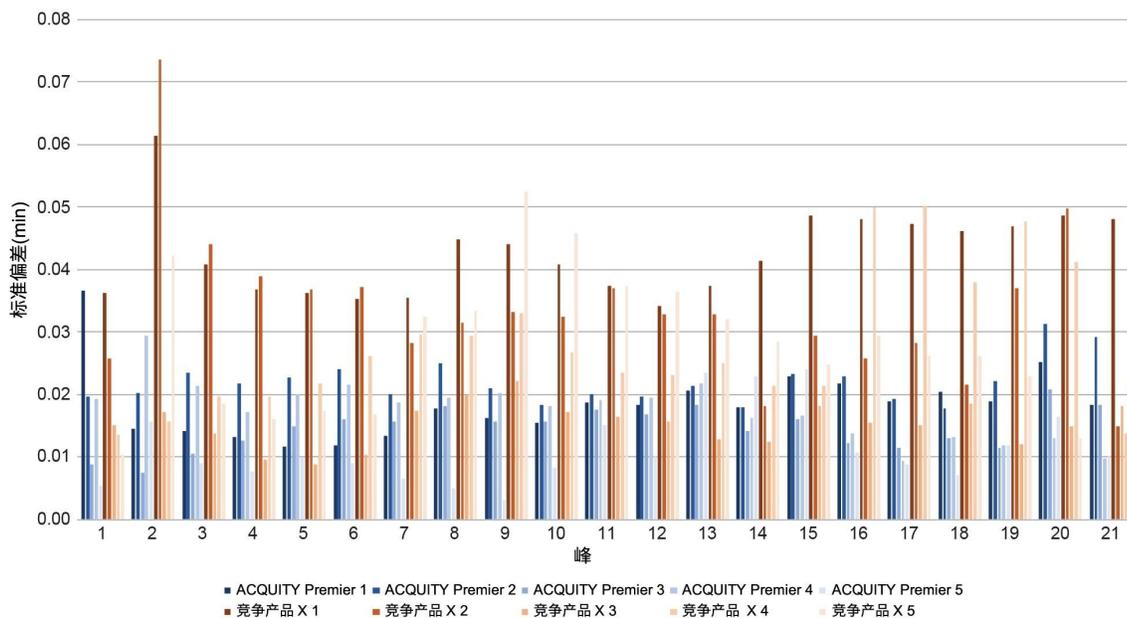


图3.在使用烯醇酶酶解标准品进行的所有5天测试中，ACQUITY Premier和竞争产品X系统的每日平均保留时间标准偏差。每天N=6，由于进样错误，ACQUITY Premier第1天(N=5)和第5天(N=3)除外。

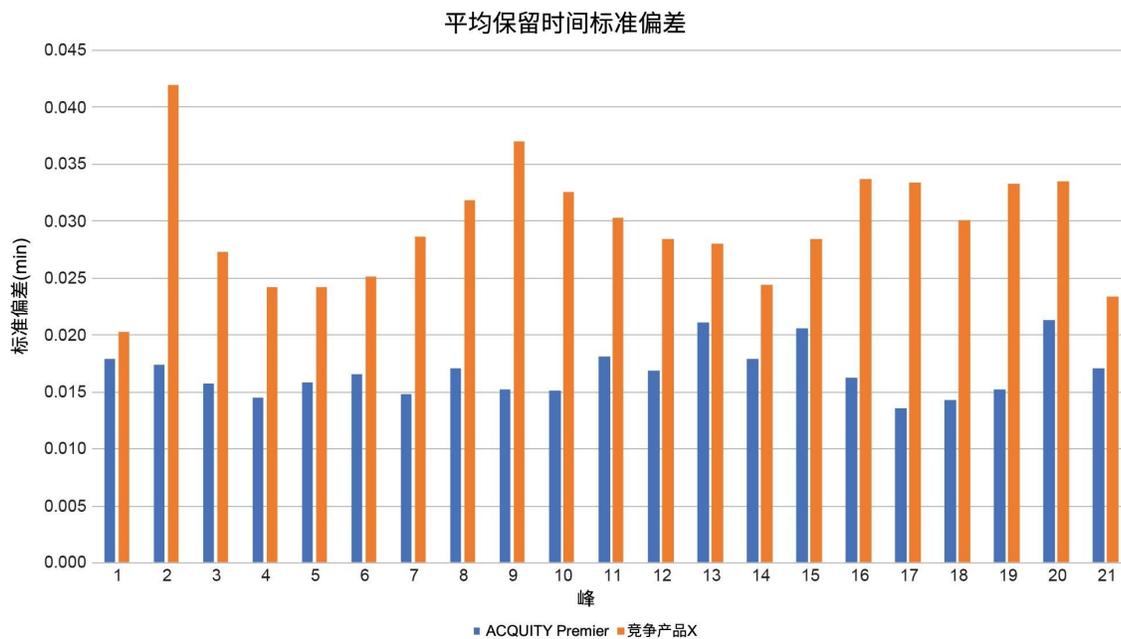


图4. 在使用烯醇酶酶解标准品进行的所有5天测试中，ACQUITY Premier和竞争系统的平均保留时间标准偏差。每日计算保留时间标准偏差的平均值，利用每日平均值计算此处给出的总体研究平均保留时间标准偏差。竞争产品X的 $N = 30$ ，ACQUITY Premier的 $N = 26$ ，由于进样错误，ACQUITY Premier在第1天($N = 5$)和第5天($N = 3$)的样品数量不一致。

结论

反相肽图分析是用于生物治疗药物表征和属性分析的重要工具。与四元泵系统相比，配备二元泵的色谱系统非常适合这些分离，因为它们可提供更精确的梯度。本研究比较了ACQUITY Premier二元系统与竞争产品UHPLC二元系统在肽图分析研究中提供典型的长时间缓梯度的能力。总体而言，两种系统均表现良好，在烯醇化酶酶解标准品的整个肽图中监测的所有21个峰的5天平均标准偏差均不大于0.045 min。不过，ACQUITY Premier系统对所有21个峰的性能均优于竞争系统，平均标准偏差的改善范围为13%~146%。本研究展示了ACQUITY Premier二元系统在肽图分析研究中的适用性，特别是采用长时间缓梯度的肽图研究，这种梯度可能会对泵的可重现输送带来挑战。

参考资料

1. Zhu, R.; Zacharias, L.; Wooding, K. M.; Peng, W.; Mechref, Y. Chapter Twenty-One - Glycoprotein Enrichment Analytical Techniques: Advantages and Disadvantages. In *Proteomics in Biology, Part A*; Shukla, A. K., Ed.; Methods in Enzymology; Academic Press, 2017; Vol.585, pp 397–429. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.11.009>.
2. Mitulovic, G.; Mechtler, K. HPLC Techniques for Proteomics Analysis - a Short Overview of Latest Developments. *Briefings in Functional Genomics* 2006, 5 (4), 249–260. <https://doi.org/10.1093>.
3. Gruber, K. A.; Stein, S.; Brink, L.; Radhakrishnan, A.; Udenfriend, S. Fluorometric Assay of Vasopressin and Oxytocin: A General Approach to the Assay of Peptides in Tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1976, 73 (4), 1314–1318.
4. Simeone, J.; Hong, P.; McConville, P. R. ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统运行长时间缓梯度时的分析性能. 沃特世应用纪要, [720006290ZH](#), 2018.

特色产品

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

ACQUITY UPLC PDA检测器 <<https://www.waters.com/514225>>

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

720007631ZH, 2022年6月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号