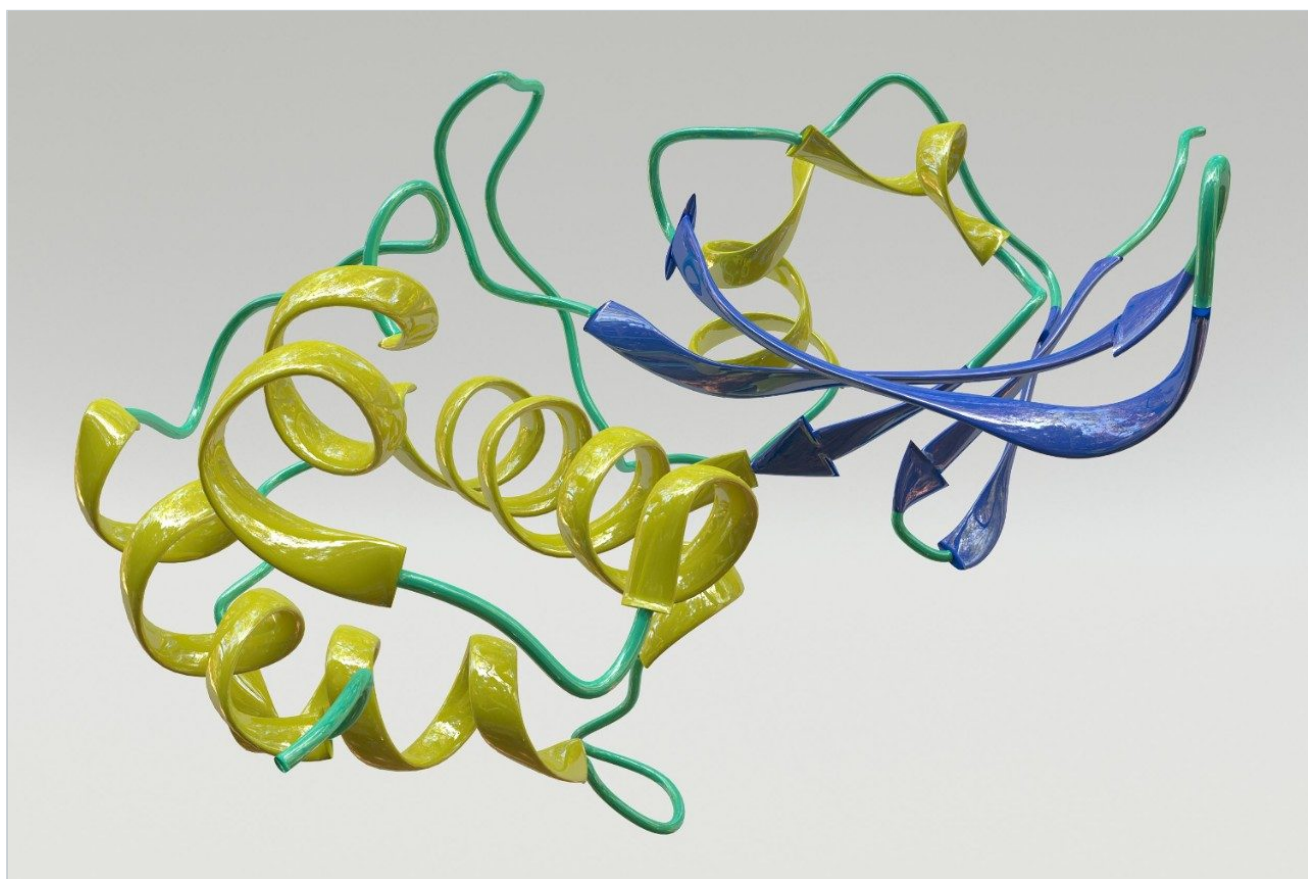


应用纪要

肽图分析在缓梯度条件下的保留时间重复性

David Dao, Brooke M. Koshel, Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

Waters Corporation



这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

在低流速和缓梯度条件下运行色谱方法需要液相色谱仪能够提供精密且准确的梯度，以确保保留时间重现性。肽图分析方法通常需要应用缓梯度条件，以便高度复杂的样品能获得优异的分离度。此外，低流速支持采用内径更小的色谱柱，并且更适合电喷雾电离质谱(ESI-MS)，也是此类分析的要求之一。本研究评估了使用生物兼容性二元液相色谱系统在24小时内采集的肽图分析结果，并对三天内的结果进行了比较。在三天的研究过程中，每一天所选色谱峰的保留时间平均标准偏差均小于0.5秒，三天内的保留时间平均差异小于3秒，表现出优异的批内和批间精密度。

优势

- 生物兼容性ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统在严苛的方法条件下也能提供优异的梯度输送和性能
- 保留时间的高重现性证明该方法具有出色的批内和批间精密度

简介

保留时间重现性是分析方法开发的关键，用于确保色谱峰能够得到正确鉴定和准确定量。肽图分析在确定保留时间重现性方面是较为复杂的生物制药分析方法，因为通常依赖低流速和缓梯度等分离条件来实现所需的分离度。由于需要采用这些严苛的分离条件，因此选择合适的液相色谱系统是获得优异性能的重要考虑因素。当使用低流速和缓梯度条件时，溶剂输送或泵设计可能对肽图分析的重现性起到关键作用。虽然四元液相色谱系统对于方法开发特别有用，因为附加的溶剂管路有助于更快地筛选分离参数，但二元泵在提供更精密且准确的梯度方面具有显著优势。沃特世二元泵经过精心设计，即使在肽图分析通常使用的严苛方法条件下也能提供出色的组分精密度和准确度。本研究的目的是在三天的肽图分析评估中凸显使用生物兼容性二元液相色谱系统提供低流速和缓梯度条件所得到的保留时间重现性。

结果与讨论

为评估ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统在严苛梯度方法条件下的性能，在三天内使用连续进样来比较

肽图分析数据。使用ACQUITY UPLC CSH C₁₈肽分析专用柱（130 Å, 1.7 μm, 2.1 mm x 100 mm, 部件号186006937 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186006937-acquity-uplc-peptide-csh-c18-column-130a-17--m-21-mm-x-100-mm-1k.html>>）分离沃特世单克隆抗体胰蛋白酶酶解物标准品、NIST mAb（部件号186009126 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186009126-mab-tryptic-digestion-standard.html>>）的还原和烷基化胰蛋白酶酶解物，方法条件为：流速0.200 mL/min，采用0.41% B/min的缓梯度，流动相A为0.1% v/v甲酸的水溶液，流动相B为0.1% v/v甲酸的乙腈溶液，运行时间135分钟。样品组包括四次空白进样，然后将胰蛋白酶酶解物标准品重复进样三次，各样品组之间包含平衡期，每个样品组的总运行时间为24小时。酶解物标准品每日现配现用。

从每天的进样系列得到的叠加色谱图可以看出，在单个数据集以及三天内结果中均观察到轻微的保留时间漂移（图1）。选择整个运行时间内得到的14个峰，进一步研究保留时间重现性。表1列出了在为期三天的研究中各种所选肽的平均保留时间和标准偏差。在三天内，每天的保留时间平均标准偏差均小于0.5秒，满足仪器规格要求，且每个数据集内均表现出优异的一致性。第3天与第1天的结果相比，可以看到保留时间稍微提前。第1天与第3天之间的保留时间平均差异小于3秒，这在135分钟的分析方法中可以忽略不计。由于保留时间的这种漂移是系统性的，因此可归因于整个研究过程中流动相组成的细微变化。此外，分离度不受影响，这也是准确鉴定和定量分析肽段的重要指标。上述结果证明，ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统能够在多天研究过程中为整个进样系列提供优异的批内和批间精密度。

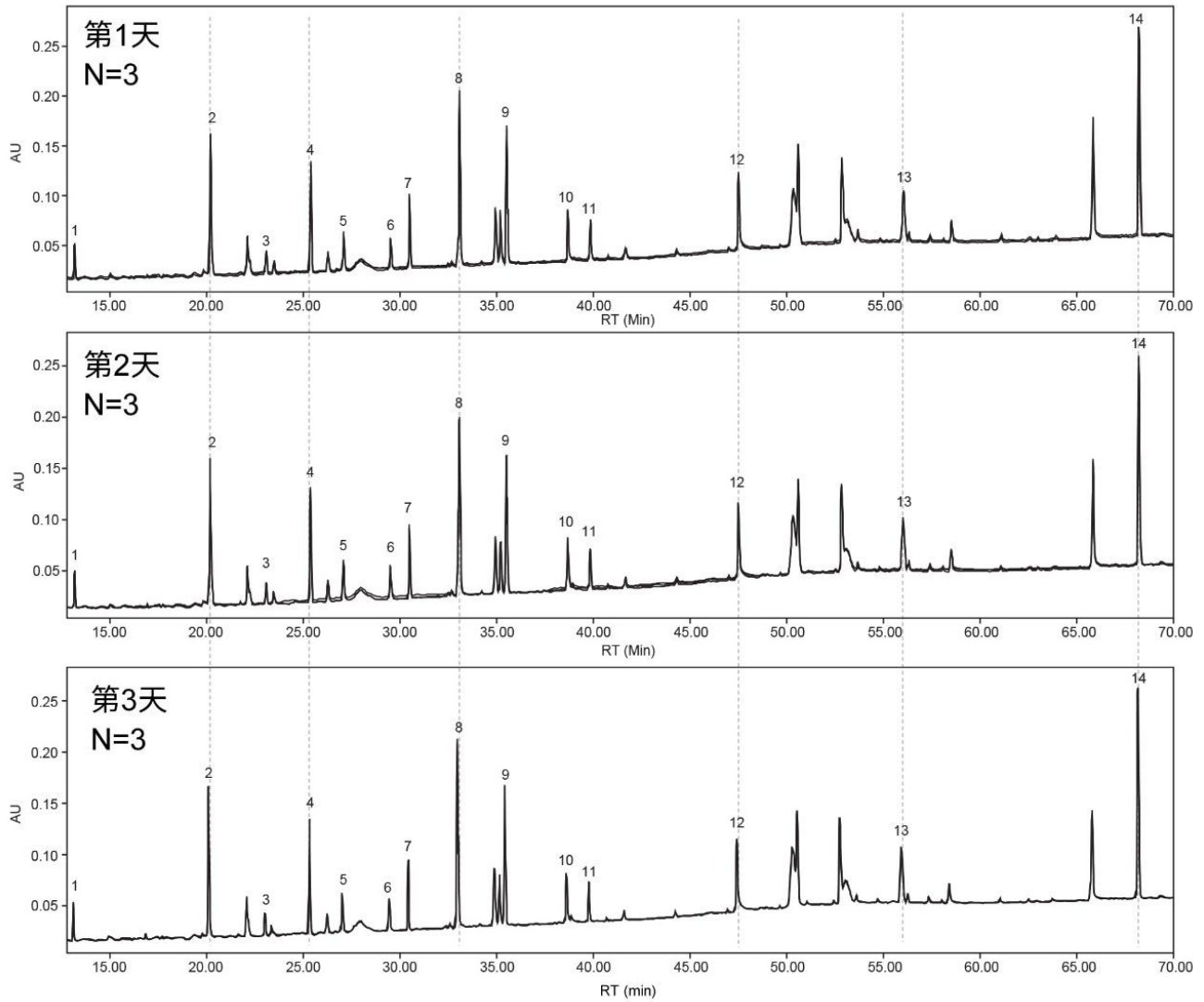


图1.在三天评估过程中，沃特世胰蛋白酶酶解物标准品重复进样三次得到的叠加色谱图

峰	第1天		第2天		第3天	
	RT平均值	RT标准偏差	RT平均值	RT标准偏差	RT平均值	RT标准偏差
1	13.37	0.0096	13.37	0.0049	13.35	0.0067
2	20.37	0.0050	20.36	0.0050	20.33	0.0035
3	23.24	0.0023	23.24	0.0059	23.21	0.0006
4	25.53	0.0026	25.53	0.0081	25.50	0.0051
5	27.23	0.0010	27.22	0.0052	27.19	0.0035
6	29.65	0.0010	29.64	0.0053	29.59	0.0046
7	30.64	0.0038	30.64	0.0055	30.61	0.0061
8	33.19	0.0026	33.18	0.0092	33.14	0.0064
9	35.62	0.0031	35.61	0.0099	35.57	0.0070
10	38.77	0.0038	38.78	0.0108	38.73	0.0072
11	39.94	0.0044	39.94	0.0106	39.89	0.0081
12	47.57	0.0045	47.57	0.0086	47.53	0.0105
13	56.07	0.0032	56.06	0.0056	55.99	0.0182
14	68.19	0.0151	68.19	0.0049	68.11	0.0179

表1.在三天评估过程中，所选肽在三次重复进样中得到的平均保留时间(*min*)和标准偏差

结论

肽图分析通常采用低流速和缓梯度，这些条件对于开发稳定的分析方法而言具有挑战性。虽然预计保留时间在这些条件下存在一定差异，但保留时间重现性对于准确的肽鉴定和定量分析至关重要。本研究证明，ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统能够提供出色的梯度精密度，大幅减小严苛方法条件下的保留时间差异。

特色产品

ACQUITY UPLC系统 <<https://www.waters.com/514207>>

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

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

720007086ZH, 2020年12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