

应用纪要

LC-MS工作流程开发中的离子对选择和混合器考虑要素

Robert E. Birdsall, David Dao, Brooke M. Koshel, 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

优化LC-MS工作流程时，通常需要在色谱性能与MS灵敏度之间取得平衡，因此选择合适的离子对试剂并非易事。本研究展示了如何利用大容量混合器降低光学基线噪音，同时保持联用工作流程中的MS灵敏度。具体而言，当使用沃特世340 μL 混合器时，基于FA的分析中UV基线噪音降低至三分之一，所得色谱性能与基于TFA的分析相当。此外，与使用TFA时观察到的最大峰强度 2×10^6 计数相比，将FA与大容量混合器结合使用时，在最大峰强度达到 9×10^7 计数的同时，MS灵敏度得以保持。本研究证明，在采用FA作为离子对试剂的RPLC方法中，大容量混合器提供了一种有效方法，在保持MS灵敏度的同时降低UV色谱图中的基线噪音。

优势

- ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统能够高效开发稳定且可重现的肽图分析方法
- 在基于甲酸的RPLC-UV/MS工作流程中，大容量混合器可降低UV基线噪音，同时保持高MS灵敏度。

简介

为确保业务增长和可持续性，制药公司持续投入资源来评价新技术及其提供稳定高效的方法以提高生产率的能力。方法开发过程中通常需要考虑最终应用和检测器需求，确定合适的仪器配置和优化前的初始方法条件。对于采用离子对试剂的方法，分析中离子对试剂的选择都取决于终点检测器（无论是光学检测器还是质谱检测器）。具体而言，甲酸(FA)和三氟乙酸(TFA)是反相液相色谱(RPLC)方法中常用的离子对试剂。作为一种“弱”($\text{pK}_a = 3.75$)离子对试剂，FA通常是MS检测的首选试剂，可以大幅提高质谱检测器响应从而提升分析灵敏度，同时发挥适当的色谱性能。相比之下，TFA作为一种“强”($\text{pK}_a = 0.6$)离子对试剂（已知会导致MS离子抑制作用），通常是UV分析的首选试剂，能够大幅减少吸附干扰（例如峰拖尾）以获得更高的峰容量。但是，在同样依赖UV数据的LC-MS工作流程中，选择合适的离子对试剂并非易事，在尝试同时提高分析灵敏度和色谱性能的情况下尤其如此¹。近期研究表明，在基于UV的分析中，沃特世大容量混合器可有效降低基线噪音，从而提高分析灵敏度和定量准确度方面的色谱性能，同时大幅减小对延迟体积的影响²。考虑到这一点，溶剂混合器代表了一种可在LC-MS工作流程中改善光学基线噪音方面的色谱性能，同时保持MS灵敏度的硬件组件。本研究的目的是评价沃特世大容量混合器作为配置选项在包含双检测器的LC-MS工作流程中优化检测器响应方面的性能。

结果与讨论

为考察混合器体积对LC-MS工作流程的影响，本研究选择ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统作为液相色谱平台，因为该仪器平台已证明能够在梯度条件下提供优异的流动相混合组成准确度²。选择沃特世340 μL 混

合器（部件号：700011554）与50 μ L普通混合器进行比较，因为该普通混合器优先提高色谱性能²。ACQUITY QDa质谱检测器可与ACQUITY液相色谱产品线轻松联用并且与FA和TFA条件兼容，为评价混合器体积对MS响应的影响，完成UV检测后在线连接该质谱检测器以采集质谱数据³。本研究选择使用反相色谱的肽图分析代表业内使用FA或TFA梯度的常见技术。流动相(MP)为包含0.1% (v/v) FA或TFA的水溶液（流动相A）和乙腈溶液（流动相B）。执行24 min肽图分析：梯度为每分钟增加0.6%流动相B，流速0.500 mL/min，使用ACQUITY UPLC CSH C₁₈肽分析专用柱（130Å, 1.7 μ m, 2.1 mm \times 100 mm，部件号：[186006937 <https://www.waters.com/nextgen/xg/en/shop/columns/186006937-acquity-uplc-peptide-csh-c18-column-130a-17--m-21-mm-x-100-mm-1k.html>](https://www.waters.com/nextgen/xg/en/shop/columns/186006937-acquity-uplc-peptide-csh-c18-column-130a-17--m-21-mm-x-100-mm-1k.html)）分离沃特世胰蛋白酶酶解物标准品（部件号：[186009126 <https://www.waters.com/nextgen/in/en/shop/standards--reagents/186009126-mab-tryptic-digestion-standard.html>](https://www.waters.com/nextgen/in/en/shop/standards--reagents/186009126-mab-tryptic-digestion-standard.html)）。在214 nm的波长下进行光学(UV)检测，使用全扫描范围50–1250 m/z采集质谱数据。为确保硬件更换后的基线响应稳定，运行包含4次空白进样的样品组，然后进样5次胰蛋白酶酶解物标准品。

为测试基准性能，使用50 μ L普通混合器以及FA和TFA进行肽图分析。如图1所示，两种离子对试剂在分析经过酶处理的蛋白质时表现良好，且能够利用常规RPLC方法的色谱空间。如前文所述，两种离子对试剂都表现出独有特性，通常在方法优化过程中对这些特性加以利用。在本例中，观察到TFA的总体峰形略好，如使用整张色谱图中一组选定峰计算出的较高峰容量(FA $P_c=446$, TFA $P_c=468$)所示。需要注意的是，峰容量并非完全由离子对试剂决定，还有可能因固定相的选择而异。此外，基于色谱图的总体保留时间漂移以及使用ACQUITY QDa采集的质量数信息（数据未显示）所确认的选择性差异，TFA表现出更高的保留性。在重现性方面，基于观察到的保留时间偏差非常小（表1），两种离子对试剂在3天内均表现出优异的分析重复性。基于这些信息，可以得出以下结论：两种离子对试剂均具有可接受的性能水平，其中选择性或保留因子可能是决定因素。但是，仔细检查单张色谱图会发现不同离子对试剂之间存在一些细微差异。如图2A所示，当使用50 μ L普通混合器时，与TFA (0.23 mAU)相比，甲酸使空白水样的光学基线噪音增加至 ≥ 5 倍(1.3 mAU)。如图2B所示，这一结果导致UV色谱图中的基线噪音增加，可能对定量结果和分析重现性产生负面影响²。相比之下，观察到TFA在UV基线噪音方面具有更出色的性能，但如前所述，它不太适合用于质谱检测器。这在图3中得到证明，其中相同数据的质谱图显示，TFA表现出显著的离子抑制效应，在UV与MS色谱图之间未观察到峰；而FA则提供了明显更高的MS响应，可以很容易从基线噪音中识别出峰。

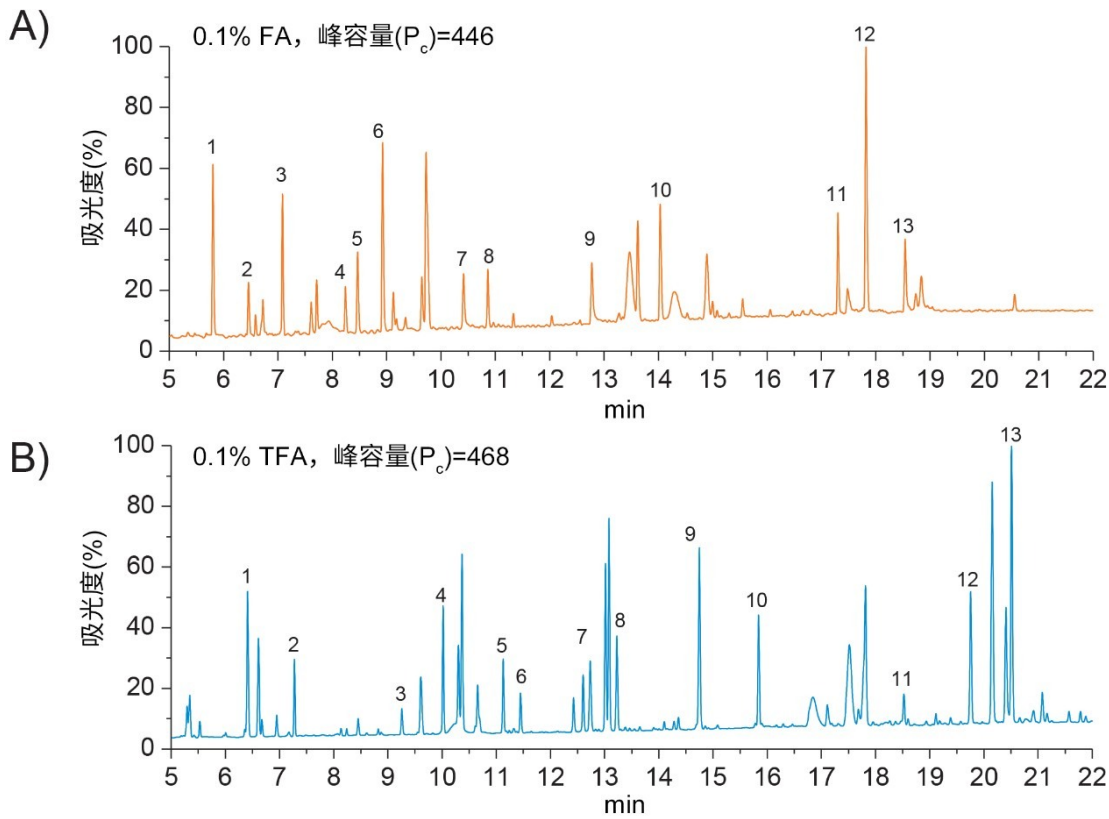


图1.谱图比较。使用A) FA或B) TFA作为离子对试剂分析沃特世胰蛋白酶酶解物标准品得到的反相肽图分析谱图。带标注的峰代表从整张色谱图中随机选择的一组峰，它们彼此不相关。

0.1% FA-NIST mAb RM肽图

峰	保留时间	标准偏差		
		第1天	第2天	第3天
1	5.80	0.0006	0.0025	0.0015
2	6.46	0.0020	0.0021	0.0020
3	7.08	0.0015	0.0021	0.0015
4	8.24	0.0015	0.0020	0.0021
5	8.46	0.0010	0.0020	0.0015
6	8.92	0.0010	0.0025	0.0021
7	10.41	0.0015	0.0026	0.0020
8	10.86	0.0012	0.0021	0.0015
9	12.77	0.0015	0.0038	0.0015
10	14.03	0.0015	0.0038	0.0020
11	17.30	0.0025	0.0044	0.0023
12	17.81	0.0031	0.0042	0.0026
13	18.54	0.0020	0.0026	0.0021

0.1% TFA-NIST mAb RM肽图

峰	保留时间	标准偏差		
		第1天	第2天	第3天
1	6.41	0.0012	0.0006	0.0007
2	7.28	0.0002	0.0005	0.0012
3	9.26	0.0005	0.0004	0.0016
4	10.02	0.0006	0.0005	0.0012
5	11.13	0.0003	0.0008	0.0006
6	11.45	0.0003	0.0003	0.0005
7	12.73	0.0001	0.0004	0.0012
8	13.23	0.0005	0.0006	0.0016
9	14.76	0.0001	0.0004	0.0013
10	15.84	0.0003	0.0006	0.0019
11	18.53	0.0006	0.0008	0.0015
12	19.76	0.0007	0.0006	0.0016
13	20.51	0.0015	0.0007	0.0012

表1.分析重复性。使用浓度为0.1% v/v的FA或TFA作为离子对试剂，在3天内从基于RPLC的肽图中监测13个肽峰（不相关）的标准偏差。

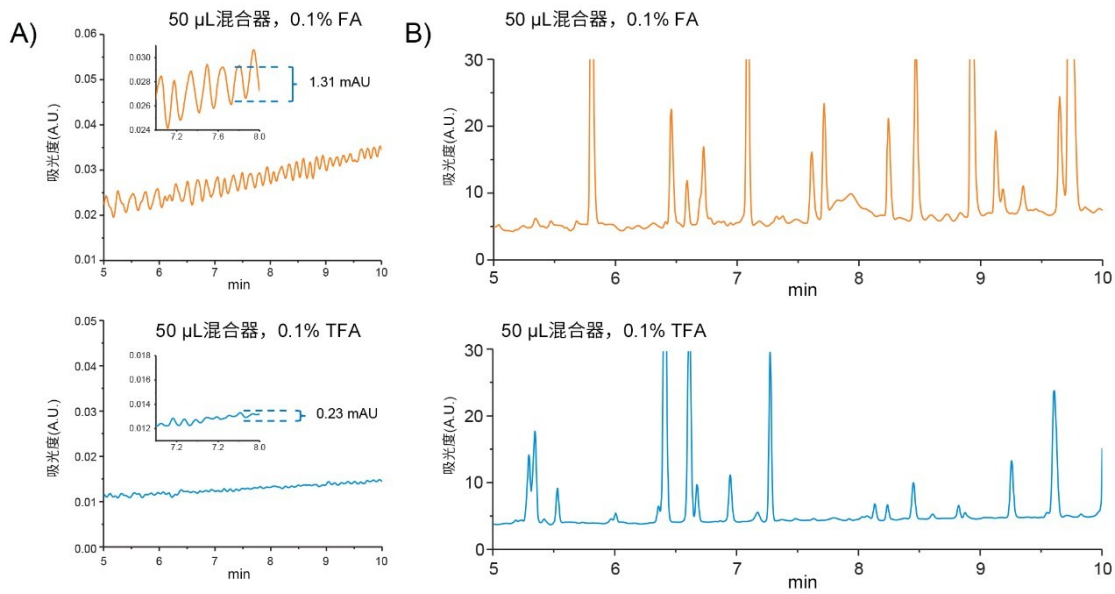


图2.基线噪音。A)使用50 µL普通混合器以FA（上图）或TFA（下图）作为离子对试剂分析空白水样得到的基线噪音，按照10 min内检测器响应的标准偏差计算。B)使用相同配置和流动相得到的肽图对应色谱图的放大图。

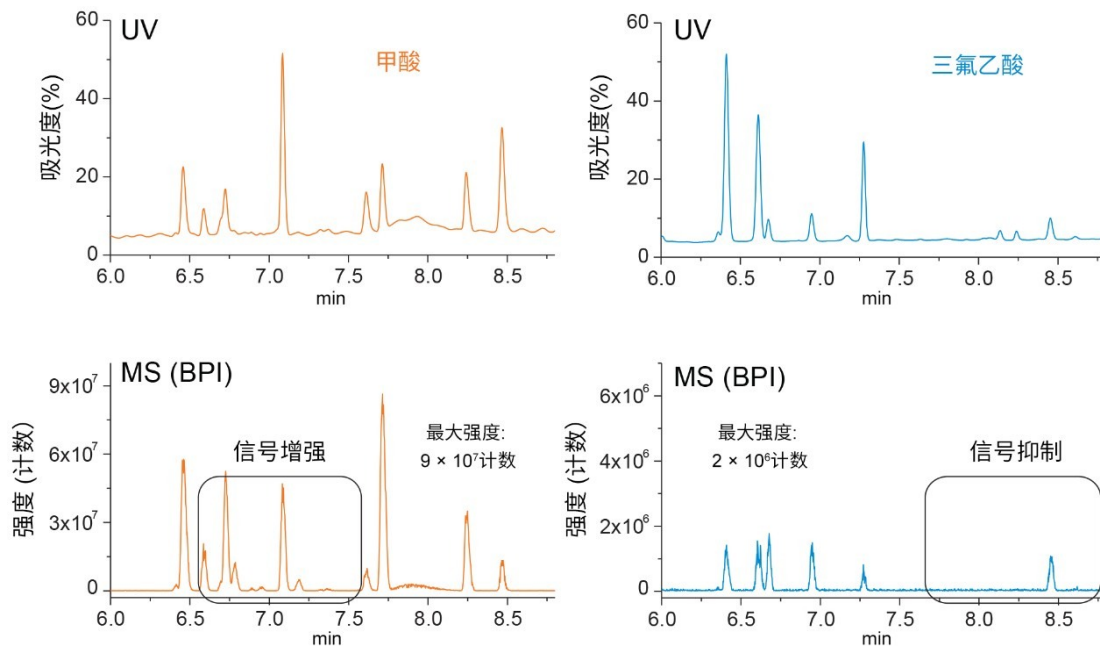


图3.离子对影响。使用50 µL普通混合器以A) FA或B) TFA作为离子对试剂进行RPLC-UV/MS肽图分析所得到的UV及其对应的MS响应。ACQUITY QDa设置：采样速率=10 Hz，探头温度=600 °C，毛细管电压=0.8 kV，锥孔电压=15 V。

为测试大容量混合器在联用工作流程中提高色谱性能的适用性，使用沃特世340 μL 混合器（部件号：700011554）实施相同的分离。如图4A所示，当使用甲酸（插图）时，与50 μL 混合器的结果相比，沃特世340 μL 混合器能够使UV基线噪音有效降至三分之一(1.31 mAU vs. 0.46 mAU)。有趣的是，当使用TFA时，与50 μL 混合器的结果（数据未显示）相比，大容量混合器仅使基线噪音降至百分之八十(0.19 mAU vs. 0.23 mAU)，表明采用FA所得到的色谱性能在基线噪音方面与基于TFA的分析结果接近。UV色谱图中的噪音下降使分析人员很容易从基线噪音中识别出低丰度峰，且对保留时间的影响极小($\Delta RT \cong +0.30 \text{ min}$)，如图4A所示。更重要的是，使用大容量混合器有利于在LC-MS工作流程中保持MS灵敏度。如图4B所示，与使用50 μL 混合器和FA得到的结果相比，使用340 μL 混合器和FA时观察到MS响应相当（MS强度= 9×10^7 ）。这些结果证明，可以在基于FA的分析中部署大容量混合器，以在联用LC-MS工作流程中改善UV检测器响应，同时保持MS灵敏度。

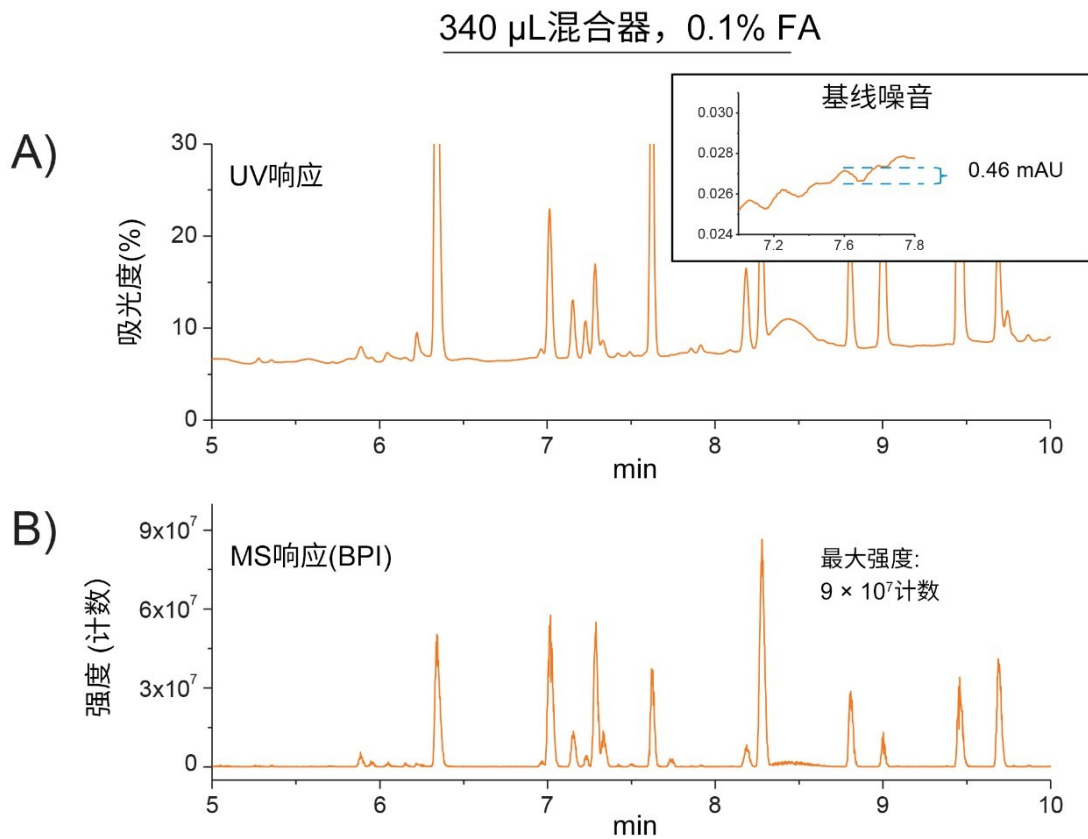


图4.混合器影响。使用340 μL 大容量混合器并以FA作为离子对试剂进行RPLC-UV/MS肽图分析所得到的A) UV和B) MS响应。ACQUITY QDa设置：采样速率=10 Hz，探头温度=600 $^{\circ}\text{C}$ ，毛细管电压=0.8 kV，锥孔电压=15V。

结论

在方法开发过程中，必须优化系统性能以便获得可靠且一致的结果。通常需要评价离子对试剂的性能，因为它们对色谱性能的影响并不总是很明显。在采用UV检测器的LC-MS工作流程中尤其如此，此类工作流程通常需要在UV基线噪音与MS灵敏度之间取得平衡。本研究证明，在采用FA作为离子对试剂的RPLC方法中，沃特世大容量混合器提供了一种有效方法，可在保持MS灵敏度的同时降低UV色谱图中的基线噪音，且对保留时间的影响极小。

参考资料

1. Chakraborty AB, Berger SJ. Optimization of Reversed-phase Peptide Liquid Chromatography Ultraviolet Mass Spectrometry Analyses using an Automated Blending Methodology. J Biomol Tech. 2005;16(4):327–335.
2. Dao, D., Birdsall, R., Yu, YQ. 提高分析重现性和灵敏度需要考虑的仪器混合器要素. 沃特世应用纪要, 720007011ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/instrument-mixer-considerations-to-improve-assay-reproducibility-and-sensitivity.html>> , 2020年9月.
3. Birdsall, R., McCarthy S. ACQUITY QDa质谱检测器在常规肽水平生物治疗药物分析中的应用. 沃特世应用纪要, 720005266ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2015/adding-mass-detection-to-routine-peptide-level-biotherapeutic-analyses-with-acquity-qda.html>> , 2015年1月.

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <<https://www.waters.com/10166246>>

ACQUITY QDa质谱检测器 <<https://www.waters.com/134761404>>

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

720007281ZH, 2021年6月

