

## 通过ACQUITY Premier UPLC系统(BSM)的可重现性能来改进肽图分析研究并减少检测失败

---

Kellen DeLaney, Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

Waters Corporation

---

### 摘要

液相色谱(LC)系统的重现性在肽图分析工作流程中至关重要，良好的重现性可以简化样品可比性并确保准确的峰匹配。本研究考察了新一代Waters™ ACQUITY UPLC™生物分离平台ACQUITY™ Premier系统的性能。这项全面的研究评估了三套系统在九种液相色谱分离条件下的保留时间重现性，进而评估流速和梯度对检测重现性的影响。结果表明，在每种条件下，ACQUITY Premier系统能够为大多数受测肽段提供一致的保留时间，标准差小于1秒。此外，ACQUITY Premier MaxPeak™高性能表面(HPS)技术通过减少非特异性肽吸附显著提高了色谱性能，可实现低丰度杂质的准确检测和定量。总之，这些结果表明ACQUITY Premier系统能够为肽图分析工作流程提供一致且可重现的结果，能满足开发和质量控制组织的需求。

### 优势

- ACQUITY Premier系统在广泛条件下提供了较高的系统间和系统内保留时间精度
  - MaxPeak高性能表面技术可以减少峰拖尾，从而提高色谱性能
  - ACQUITY Premier系统稳健的性能可实现高可信度的属性分析和杂质测定
-

---

## 简介

液相色谱(LC)工作流程中肽图分析的可信度和稳健性部分取决于液相色谱泵提供一致的流动相梯度组成的能力。组成的偏差会影响肽的保留时间和/或峰形。在这方面，液相色谱泵的性能非常重要，因为可重现的保留时间和峰形对于充分分离和定量修饰或关键异构体来说十分必要。此外，确保系统之间的液相色谱性能具有重现性，能够增强研究人员对开发出可靠方法且在实验室和组织之间转移的信心。

之前的研究已经证明了Waters ACQUITY UPLC系统具备高性能，可在不同梯度下准确传递流动相组成，并且分析物保留时间具有较高的重现性<sup>1-3</sup>。最近，采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier UPLC系统作为液相色谱平台推出，由于减少了非特异性肽吸附，可实现更高的分离度和灵敏度<sup>4-6</sup>。本研究的目的是评估配置二元溶剂管理器(BSM)的ACQUITY Premier系统提供高性能肽图分析的能力。使用三个ACQUITY Premier系统在九种分离条件下测量保留时间，评估平台在各种条件下的适用性。使用了峰拖尾作为评估ACQUITY Premier MaxPeak HPS技术对色谱性能影响的指标。本文描述的结果证明了ACQUITY Premier BSM如何轻松提供支持肽图分析工作流程所需的高质量结果，使其既适合又灵活地应用于生物制药的开发和制造。

---

## 实验

### 样品描述

本研究使用的样品是复溶在300  $\mu$ L流动相A (0.133  $\mu$ g/ $\mu$ L)中的Waters mAb胰蛋白酶酶切标准品（部件号：[186009126 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009126-mab-tryptic-digestion-standard.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009126-mab-tryptic-digestion-standard.html)）。流动相A用于空白进样。

### 液相色谱条件

LC系统： ACQUITY Premier UPLC BSM  
系统

检测条件： ACQUITY Premier TUV; 10  
mm分析流通池；波长= 214

nm

样品瓶：采用MaxPeak HPS的  
QuanRecovery样品瓶（部件号  
：186009186）

色谱柱：ACQUITY Premier CSH C<sub>18</sub> 1.7  
μm, 2.1 × 100 mm

柱温：60 °C

样品温度：8 °C

进样体积：10 μL

流速：0.200–0.500 mL/min

流动相A：0.1%甲酸水溶液（LCMS级）

流动相B：0.1%甲酸的乙腈溶液（LCMS级  
）

梯度：流动相B由5%升高至95%；每  
分钟0.25%–1%流动相B

## 质谱条件

质谱系统：ACQUITY QDa质谱检测器

电离模式：正

采集范围：350–1250 *m/z*

毛细管电压: 1.5 kV

锥孔电压: 15 V

## 保留时间评估的SIR值

| 肽      | <i>m/z</i> |
|--------|------------|
| LC:T3  | 406.4      |
| HC:T30 | 419.9      |
| HC:T21 | 418.4      |
| LC:T18 | 626.4      |
| LC:T5  | 476.9      |
| HC:T11 | 925.4      |
| HC:T36 | 581.7      |
| HC:T41 | 561.5      |
| HC:T23 | 560.3      |
| LC:T15 | 752.3      |
| HC:T22 | 714.2      |
| HC:T37 | 849.3      |

|        |        |
|--------|--------|
| HC:T20 | 712.4  |
| HC:T26 | 603.8  |
| LC:T11 | 600.4  |
| HC:T2  | 926.6  |
| HC:T15 | 960.5  |
| LC:T7  | 1122.1 |

### 峰拖尾评估的SIR值

| 肽       | <i>m/z</i> |
|---------|------------|
| LC:T14  | 713.1      |
| LC:T3   | 406.5      |
| LC:T1   | 477        |
| HC:T22  | 714.2      |
| HC:T37  | 849.3      |
| HC:T4-5 | 597.4      |
| HC:T4   | 831.3      |
| LC:T7   | 1122.3     |

---

## 结果与讨论

在生物制药分析中，可重现的结果对于增强产品可信度以及大幅缩短因需要调查分析偏差而导致的停机时间十分重要。肽图分析通常需要液相色谱系统在较低流速下提供一个缓梯度，对复杂的肽谱进行解析。因此，液相色谱即使在这些具有挑战性的条件下，也能够以可重现的方式提供流动相组成，这一点十分重要。作为新改进的ACQUITY UPLC生物分离平台，ACQUITY Premier系统采用二元溶剂管理器(BSM)配置，可满足这些苛刻的分离要求，同时与前几代生物兼容平台相比减少了分析物/表面吸附，从而提高了色谱性能。在此，证明了该系统提供可重现的保留时间以支持稳健的肽图分析工作流程的能力。

为了评估ACQUITY Premier BSM在实际应用中的性能，采用NIST人源化单克隆抗体(mAb)参比标准品41116107胰蛋白酶酶切物作为分析样品。在生物治疗药物产品的开发和商业化过程中可能遇到的一系列分离条件下运行该样品。实验设计的概览如图1所示。这包括三种不同流速的条件：高流速(0.500 mL/min)、中等流速(0.350 mL/min)和低流速(0.200 mL/min)，并且在每个流速下有三个梯度，包括1% B/min、0.5% B/min和更为平缓的0.25% B/min。在每种条件下重复进样三次，计算标准差。在三个ACQUITY Premier BSM系统上评估了这九种方法组合（共进样27次），测量系统间的重现性。

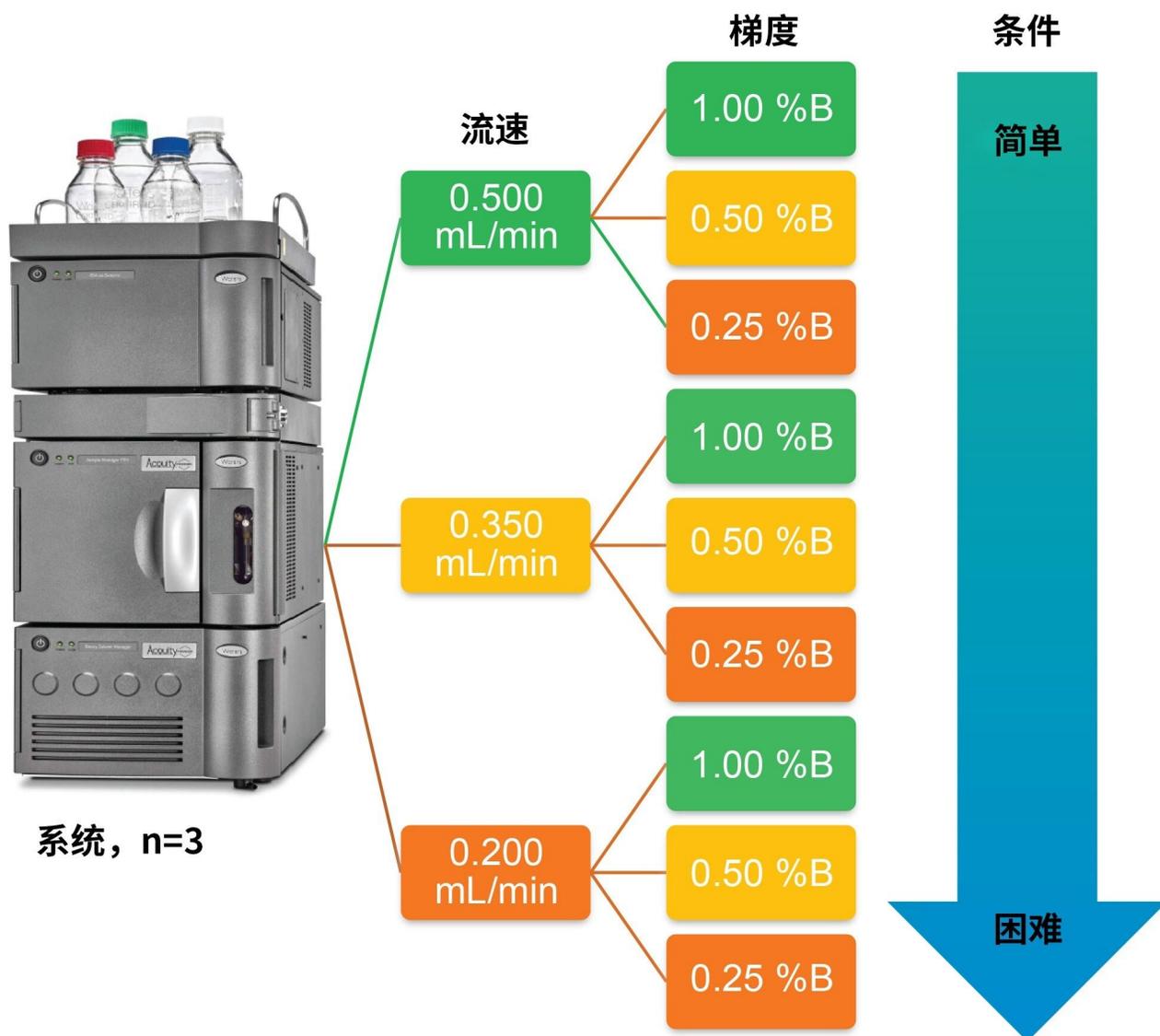


图1.用于评估不同液相色谱条件下的系统间性能的实验设计。

总共选择了18个峰，在肽图上以同等方式取样，用于保留时间重现性分析，如图2所示。表1列出了使用SIR-MS监测的每个峰的 $m/z$ ，以及所有条件下保留时间的标准差。每个肽的保留时间被归一化为每个条件下的平均值，以便在不同的条件和峰下进行比较。保留时间重现性表明，可以在不牺牲分析严谨性的情况下可信地进行系统间分析。

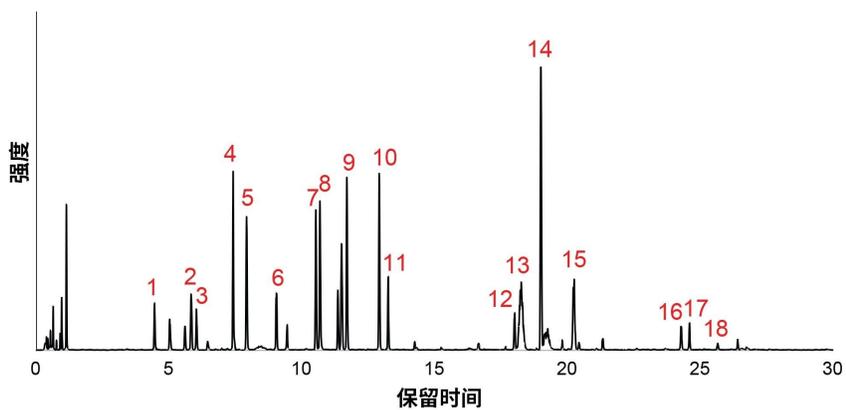


图2.本研究中使用的NIST mAb酶切物的基峰离子(BPI)色谱图，分析中包含的峰用数字标出。峰编号与表1中显示的信息相对应。

表1. 峰结果：保留时间重现性。

| 峰  | 名称     | <i>m/z</i> | 保留时间SD |      |
|----|--------|------------|--------|------|
|    |        |            | 分      | 秒    |
| 1  | LC:T3  | 406.4      | 0.009  | 0.52 |
| 2  | HC:T30 | 419.9      | 0.008  | 0.46 |
| 3  | HC:T21 | 418.4      | 0.007  | 0.41 |
| 4  | LC:T18 | 626.4      | 0.007  | 0.41 |
| 5  | LC:T5  | 476.9      | 0.009  | 0.56 |
| 6  | HC:T11 | 925.4      | 0.006  | 0.36 |
| 7  | HC:T36 | 581.7      | 0.010  | 0.59 |
| 8  | HC:T41 | 561.5      | 0.010  | 0.60 |
| 9  | HC:T23 | 560.3      | 0.009  | 0.51 |
| 10 | LC:T15 | 714.2      | 0.009  | 0.56 |
| 11 | HC:T22 | 752.3      | 0.010  | 0.63 |
| 12 | HC:T37 | 849.3      | 0.008  | 0.49 |
| 13 | HC:T20 | 712.4      | 0.020  | 1.21 |
| 14 | HC:T26 | 603.8      | 0.011  | 0.64 |
| 15 | LC:T11 | 600.4      | 0.014  | 0.83 |
| 16 | HC:T2  | 926.6      | 0.012  | 0.71 |
| 17 | HC:T15 | 960.5      | 0.015  | 0.88 |
| 18 | LC:T7  | 1122.1     | 0.012  | 0.70 |

SD, 标准差; LC, 轻链; HC, 重链; T, 胰蛋白酶片段。

图3中的表格表示系统在各个特定条件下的性能，结合了来自全部三个系统的所有18种肽的数据。与预期相同，使用陡梯度，尤其是在较高的流速下，肽洗脱的重现性最高。随着对二元泵系统条件的要求越来越高，保留时间标准差也随之增加。然而，标准差最大值仍约为1秒，这表明该系统能够在这些更苛刻的条件下提供易于验证的肽图分析。

将所有18种肽在全部九种条件和三个系统中的保留时间均进行了均值归一化，绘制为直方图，并拟合为高斯分布，作为对性能的全面分析。根据拟合的高斯分布可知，总体的68% ( $\sigma$ )在 $\pm 0.0057$  min以内，95% ( $2\sigma$ )在 $\pm 0.0114$  min以内，99.7% ( $3\sigma$ )在 $\pm 0.0171$  min以内。这些结果表明ACQUITY Premier BSM可以提供与之前的沃特世二元液相色谱系统相同的高精度肽图分析结果<sup>1-3</sup>。

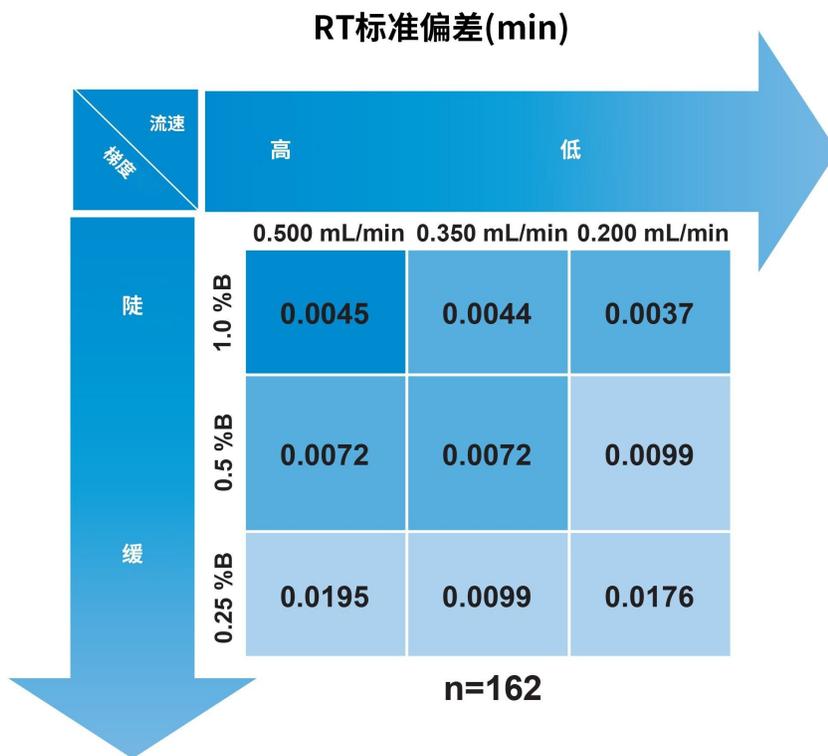


图3.在九个评估条件下的实验设计和系统间保留时间标准差。保留时间是根据在三个不同系统上三次进样测量的18个峰计算的( $n = 162$ )。

因为可简化方法迁移，该跨系统平台出色的重现性具有很大优势。在一个系统上开发的方法可以在另一个系统上以很少干预实现。这方面的一个示例如图4所示，NIST mAb胰蛋白酶酶切样品在三个ACQUITY Premier BSM UPLC系统上运行得到的三个色谱叠加图。所示的色谱图代表了最极端的测试条件，即最高流速(0.5 mL/min)下的

最陡梯度(1% B/min)和最低流速(0.2 mL/min)下的最缓梯度(0.25% B/min)。在这两种情况下，三个系统中的峰非常一致，无需进行保留时间校准或其他用户干预。

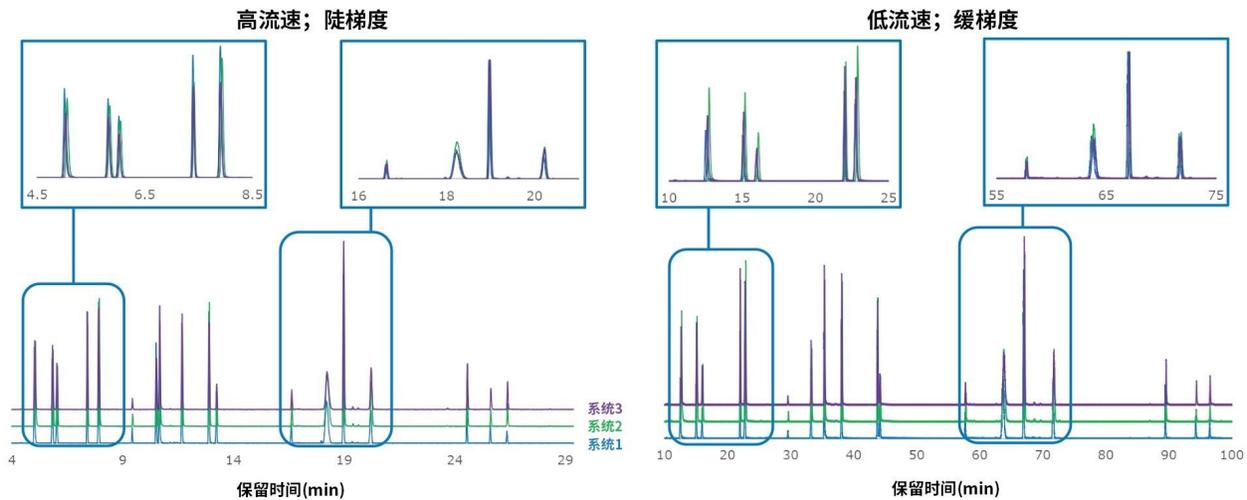


图4.将NIST mAb酶切物进样到三个ACQUITY Premier BSM系统中，在两种极端分离条件下运行得到的叠加图。左图：流速为0.5 mL/min，梯度为1% B/min；右图：流速为0.2 mL/min，梯度为0.25% B/min。为便于显示，将色谱图强度偏移了10%。

随着ACQUITY Premier系统在一系列条件下的保留时间系统间和系统内性能的确立，我们尝试评估了MaxPeak HPS技术的性能。在高比表面积的液相色谱组件上，这种新型表面技术旨在减少金属表面上的非特异性肽吸附，从而改善峰形、灵敏度和重现性<sup>4-6</sup>。为了评估肽吸附，选择了七种易于吸附在金属表面上的酸性肽进行分析。还将一种碱性肽纳入了评估，作为阴性对照。根据USP的定义计算峰拖尾因子，等于峰宽除以两倍的5%峰高处峰前沿到峰顶距离（见图5A的插图）。根据此等式，拖尾因子>1表示存在拖尾，通常情况下认为拖尾因子值≤1.5即可用于基于RPLC的肽图分析。

图5A显示了在三种不同流速（0.5 mL/min、0.35 mL/min和0.2 mL/min）下评估的各峰的拖尾因子。作为对比，还使用标准不锈钢CSH™ C<sub>18</sub>色谱柱以0.5 mL/min的流速对峰进行了评估。ACQUITY Premier色谱柱在所有流速下峰的拖尾因子都最小，并且对于大多数肽而言，其拖尾因子都明显优于标准色谱柱。如图所示，在相同流速下，ACQUITY Premier色谱柱的肽峰拖尾减少高达83%。此外，与标准柱相比，ACQUITY Premier色谱柱的误差线（表示各系统3次重复进样的标准差）显著降低，表明重现性和定量性能有所改进。

使用MaxPeak HPS技术的另一个显著优势是，峰拖尾的减少能够显示出一些低丰度杂质，否则可能会由于更大的

伪宽峰而被遮盖。如图5B中显示的一个示例，其中HC:T37在标准色谱柱中峰拖尾现象较为严重，遮盖了在其后洗脱的低丰度峰。使用ACQUITY Premier色谱柱后，则可以检测和定量这些被鉴定为HC:T37脱酰胺形式的低丰度峰。以上结果表明，高质量的分离可以用于目标属性和产品纯度分析的肽图分析产生直接影响。

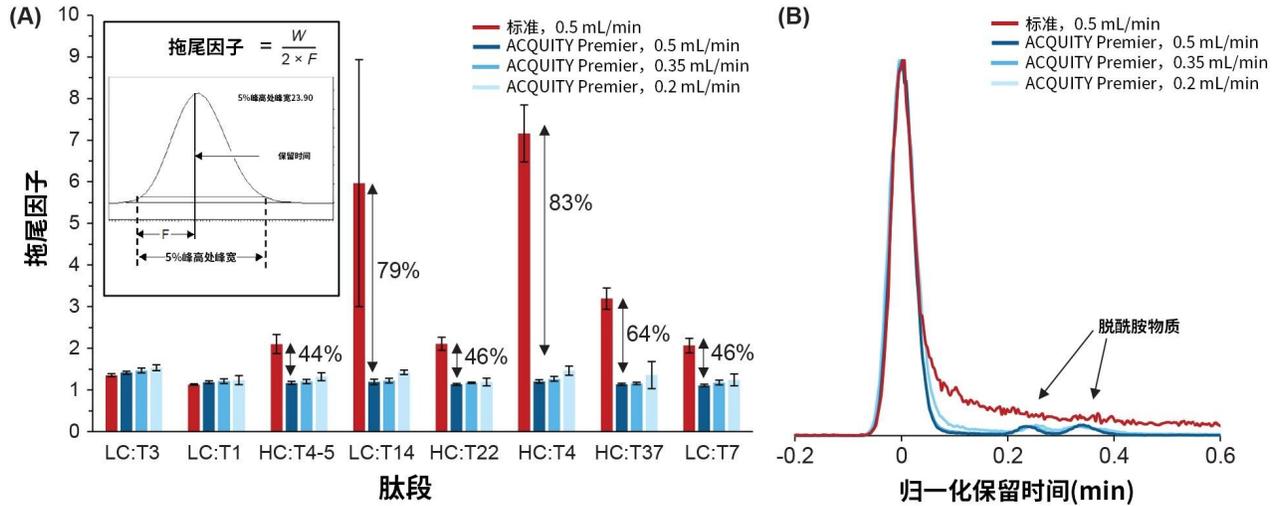


图5. MaxPeak HPS技术性能的评估，包括(A)分别以0.5 mL/min的流速在标准CSH C<sub>18</sub>色谱柱中和以三个流速在ACQUITY Premier CSH C<sub>18</sub>色谱柱中运行一种碱性肽(LC:T3)和七种酸性肽，并计算拖尾因子，以及(B)MaxPeak HPS技术通过减少峰拖尾检测出低丰度物质(HC:T37及其两种低丰度脱酰胺形式)的示例。误差线代表三个系统的标准差(各系统重复进样三次(n = 9))，(A)中的注释表示标准色谱柱和ACQUITY Premier色谱柱之间拖尾减少的百分比。

## 结论

在肽图分析工作流程中，可重现的保留时间对于减少分析失败和确保准确的峰匹配与跨分析的可比性至关重要。本研究展示了，即使在严苛分离条件下，ACQUITY Premier BSM也能在系统间维持保留时间精度。创新的MaxPeak HPS技术通过减少峰拖尾的影响显著提高了色谱性能。系统性能和系统生物惰性相结合将带来更强大的测定方法，可以更容易地转移和验证，增加肽属性图谱和产品杂质分析的数据解析可信度。

---

## 参考资料

1. Kaffashan A, Wheat TE.ACQUITY UPLC System-to-System Reproducibility for Peptide Mapping. 2009 July, Waters Application Note, [720003175](#).
2. Simeone J, Hong P, McConville PR.ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统运行长时间缓梯度时的分析性能.2018年5月, 沃特世应用纪要, [720006290ZH](#).
3. Dao D, Koshel BM, Birdsall, RE, Yu YQ.缓梯度条件下肽图分析的保留时间重现性.2020年12月, 沃特世应用纪要, [720007086ZH](#).
4. DeLano M, Walter TH, Lauber MA, Gilar M, Jung MC, Nguyen JM, Boissel C, Patel AM, Bates-Harrison A, Wyndham KD.Using Hybrid Organic-Inorganic Surface Technology to Mitigate Analyte Interactions with Metal Surfaces in UHPLC.*Anal Chem*.2021 Apr;93:5773–81.
5. Gilar M, DeLano M, Gritti F. Mitigation of Analyte Loss on Metal Surfaces in Liquid Chromatography.*J Chromatogr A*.2021 May;462247.
6. Birdsall RE, Kellett J, Ippoliti S, Ranbaduge N, Lauber MA, Yu YQ, Chen W. Reducing Metal-Ion Mediated Adsorption of Acidic Peptides in Rplc-Based Assays Using Hybrid Silica Chromatographic Surfaces.*J Chromatogr B*.2021 Apr;122700.

---

## 特色产品

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

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

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

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

720007593ZH, 2022年4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