

使用AccQ·Tag™ Ultra C₁₈ 2.5 μm色谱柱进行可靠的氨基酸分析的仪器注意事项

Kimberly Martin, Kenneth D. Berthelette, Paula Hong

Waters Corporation

摘要

氨基酸分析是多种样品的常规分析，包括水解蛋白质、细胞培养物以及食品和饲料样品。但是，用传统HPLC方法分析这些样品可能耗时较长且灵敏度较低。为应对这些挑战，沃特世开发了ACQUITY™ UPLC™ AAA解决方案，其中包括柱前衍生试剂盒、亚2 μm色谱柱和适用于UPLC分析的预包装流动相。通过将这些可靠且可重现的方法从亚2 μm颗粒放大至HPLC粒径（即2.5 μm）并适当调整，AccQ·Tag™ Ultra解决方案填料可以在较低压力下以兼容更多系统的条件运行。本研究将介绍从UPLC到UHPLC/HPLC系统调整这种柱前衍生方法的注意事项，展示分离方法经过调整和优化后的各项性能，包括线性、重复性、重现性、定量限和检测限。

优势

- 在HPLC系统（包括Arc HPLC和ACQUITY Arc™色谱系统）上放大经验证的AccQ·Tag UPLC分析方法
- 使用可有效延长分析柱寿命并降低每次分析成本的AccQ·Tag Ultra C₁₈ 2.5 μm VanGuard™小柱，保持AccQ·Tag Ultra C₁₈ 2.5 μm色谱柱的性能
- 与传统HPLC方法相比，使用AccQ·Tag Ultra C₁₈ 2.5 μm色谱柱能够缩短运行时间，从而提高通量并减少溶剂消耗量

简介

由于氨基酸的UV吸收少或缺乏UV吸收，并且化学性质各异，氨基酸分析(AAA)可能非常具有挑战性。鉴于这些挑战，我们发现，使用6-氨基喹啉-N-羧基琥珀酰亚胺基甲酸酯(AQC)进行柱前衍生化，然后再进行反相分离，对于使用UHPLC/UPLC系统的氨基酸定量分析而言，是一种具有高重现性的技术。但是，并不是一直有高压系统可用。虽有使用老式传统色谱柱的传统HPLC方法，但这些方法的灵敏度可能较低、运行时间较长并且需要使用复杂的流动相。因此，使用稳定的衍生化技术以及现代、可重现的色谱柱的HPLC方法可以为较低压力下的氨基酸分析提供高重现性方法。

实验

样品描述

所有校准标准品均由沃特世氨基酸标准品(P/N: [WAT088122 < https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/wat088122-amino-acid-standard-accq-tag-pico-tag-accq-tag-ultra.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/wat088122-accq-tag-pico-tag-accq-tag-ultra.html))制得，使用正缬氨酸(P/N: [186009301 < https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009301-amino-acid-internal-standard-norvaline.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009301-amino-acid-internal-standard-norvaline.html))作为内标，稀释剂为0.1 N HCl¹。用0.1 N HCl制得浓度为2500 μM的内标储备液。所有氨基酸校准品的最终浓度为1、5、10、20、50、100、200和500 μM（半胱氨酸除外，其最终浓度为其他氨基酸的1/2），正缬氨酸（内标）的最终浓度为250 μM。制得浓度为500 μM（半胱氨酸除外，其浓度为250 μM）的样品以评估精密度。正缬氨酸的浓度始终保持在250 μM。

液相色谱条件

| | |
|---------|----------------------------------|
| 液相色谱系统： | 配备30 cm CHC（含被动预加热器）的Arc HPLC系统 |
| | 配备CH-A柱温箱的ACQUITY Arc系统 |
| 检测条件： | 配备10 mm HPLC分析型流通池的Arc HPLC-2489 |

| | |
|----------|---|
| | TUV检测器(P/N: 176248901) |
| | 配备低扩散型10 mm UHPLC流通池的ACQUITY Arc-2489 TUV检测器(P/N: 176017007) |
| 波长: | 260 nm |
| 采集速率: | 10 Hz |
| 样品瓶: | LCGC认证透明玻璃12 × 32 mm螺纹颈口全回收样品瓶, 带瓶盖和PTFE/硅胶隔垫 (无预开口) (P/N: 186000384C) |
| 色谱柱: | AccQ · Tag Ultra C ₁₈ 色谱柱, 2.5 μm, 4.6 × 150 mm (P/N: 186010407) |
| 柱温: | 43 °C |
| 样品温度: | 20 °C |
| 进样体积: | 3 μL (Arc HPLC)和2 μL (ACQUITY Arc) |
| 流速: | 1.5 mL/min |
| 流动相A: | AccQ · Tag洗脱液A (P/N: 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 |

梯度表

| 时间 (min) | 流速 (mL/min) | %A | %B | %C | %D | 曲线 |
|-------------|----------------|------|------|------|------|----|
| 初始 | 1.500 | 10.0 | 0.0 | 90.0 | 0.0 | 初始 |
| 0.36 | 1.500 | 10.0 | 0.0 | 90.0 | 0.0 | 11 |
| 19.67 | 1.500 | 9.0 | 80.0 | 11.0 | 0.0 | 7 |
| 25.07 | 1.500 | 8.0 | 16.0 | 60.0 | 16.0 | 7 |
| 25.74 | 1.500 | 8.0 | 16.0 | 58.0 | 18.0 | 6 |
| 27.05 | 1.500 | 7.8 | 0.0 | 70.9 | 21.3 | 6 |
| 28.20 | 1.500 | 4.0 | 0.0 | 36.3 | 59.7 | 6 |
| 30.08 | 1.500 | 4.0 | 0.0 | 36.3 | 59.7 | 6 |
| 30.38 | 1.500 | 10.0 | 0.0 | 90.0 | 0.0 | 6 |
| 35.48 | 1.500 | 10.0 | 0.0 | 90.0 | 0.0 | 6 |

数据管理

色谱数据系统:

Empower™ 3, FR 3.6.1

结果与讨论

由于温度、梯度输送及其他条件的细微变化会影响保留性和选择性，各种氨基酸的分离具有挑战性。鉴于这些挑战，液相色谱(LC)系统之间的差异可能会使直接缩放更加棘手，并且需要逐个系统进行方法优化。我们将从蛋白质水解产物中分离氨基酸的方法条件从 2.1×100 mm色谱柱¹调整为 4.6×150 mm色谱柱，来开展相关研究。使用6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺基甲酸酯(AQC)进行氨基酸柱前衍生化²，然后使用反相液相色谱分离衍生物。

仪器注意事项

筛选初始分离条件时，在ACQUITY Arc系统上缩放并测试从ACQUITY UPLC H-Class AccQ·Tag Ultra解决方案中

获得的方法。该方法需要调整，以获得足够高的分离度和色谱性能。为评估最终方法条件，我们选择并采用了ACQUITY Arc和Arc HPLC系统两者，以控制系统间差异性。两种系统均由四元泵、流通针式样品管理器、配备被动预热器的柱温箱以及TUV（可变波长）检测器组成。

选择这两种系统以便了解和控制柱外体积或谱带展宽的差异。两种系统的主要区别包括：进样针到色谱柱的管路内径(ID)、柱后管路和流通池体积。ACQUITY Arc使用低扩散管路（内径0.005英寸）、被动预加热器和低扩散型10 mm流通池，测得的柱外体积约为25~35 μL (4σ)³。相比之下，Arc HPLC系统使用更宽口径的管路（内径0.010英寸）、被动预加热器和配备不锈钢入口管路的标准10 mm流通池，柱外体积约为45~75 μL (4σ)³。各系统的柱外扩散或谱带展宽将受到不同柱温箱选项、进样针尺寸、管路尺寸、检测器和流通池的影响。

对于各系统，柱外扩散的差异会导致关键分析物对的分离度降低，和/或由于强溶剂效应而导致早洗脱的峰发生峰畸变。例如，内径(ID)较大的柱后管路会导致关键分析物对的分离度损失，而内径较小的柱前管路会由于强溶剂效应而导致早洗脱的峰发生峰畸变。为评估各种液相色谱系统的适用性，在两种液相色谱系统上测试最终方法的最低色谱性能、重现性、精密度、线性以及检测限和定量限。

HPLC氨基酸分离方法优化

虽然原始方法是由现有UPLC解决方案缩放得到的，但由于分析的敏感性，需要对该方法进行优化，包括调整柱温和进样体积。评估进样体积，因为在之前的研究中发现，系统的细微变化会影响组氨酸的峰形⁴。查阅参考文献可知，峰畸变是由于样品与流动相混合不充分造成的，强溶剂效应会导致伸舌峰。虽然可以进行若干调整以尽可能减少不对称峰形，但我们发现，调整进样体积不失为一种有效的方式。

我们在所评估的两种系统上测试了不同的进样体积，以评估使组氨酸获得对称峰形的理想进样体积。结果发现，在Arc HPLC系统上，当进样体积大于4 μL 时产生明显的峰畸变。此外，进样4 μL 与进样3 μL 所观察到的检测限(LOD)或定量限(LOQ)没有差异，因此选择较少的进样体积来提供良好的结果（图1）。在ACQUITY Arc系统上，当进样体积超过2 μL 时，组氨酸产生了明显更大的峰畸变，因此将该系统可接受的进样体积定为2 μL （图2）。

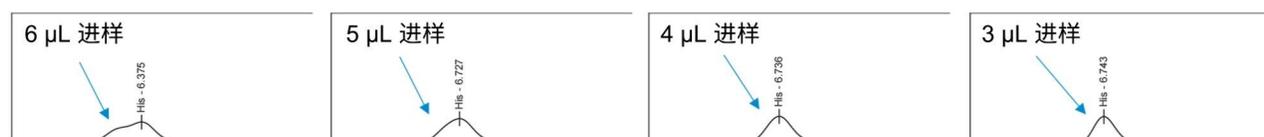


图1.在Arc HPLC系统上，进样体积对蛋白质水解产物AA标准品(500 μM)色谱图的影响

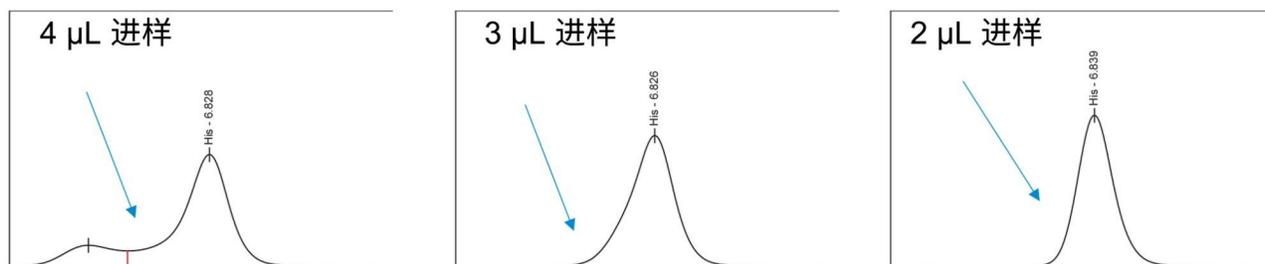


图2.在ACQUITY™ Arc系统上，进样体积对蛋白质水解产物AA标准品(500 μM)色谱图的影响

将各系统上的进样体积优化后，比较了色谱性能（表1），发现两种系统均使水解产物氨基酸获得了可接受的USP分离度(>2.0)和峰形（图3和4）。

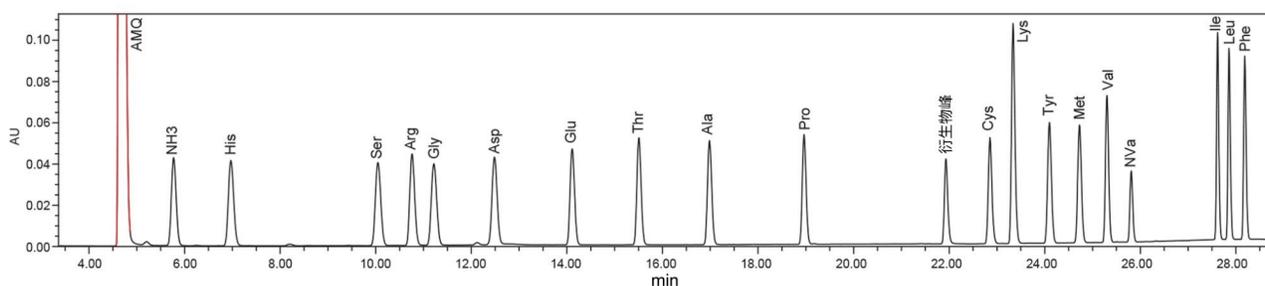


图3.在Arc HPLC系统上使用AccQ·Tag Ultra C₁₈ 2.5 μm色谱柱得到的蛋白质水解产物AA标准品(500 μM)色谱图

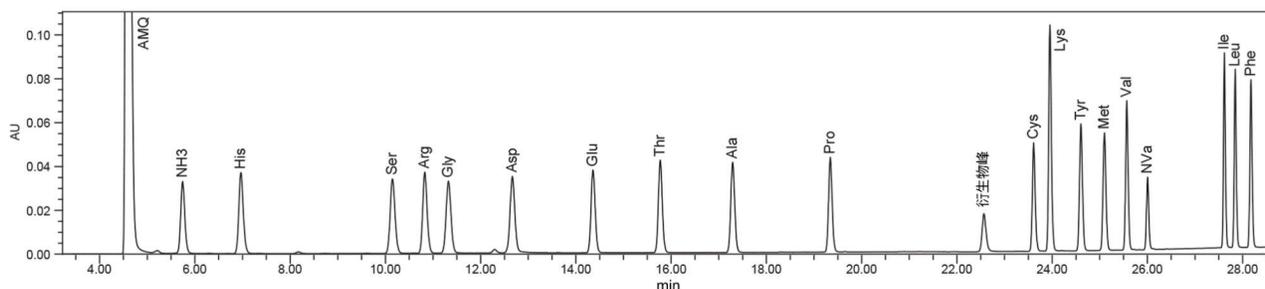


图4.在ACQUITY Arc系统上使用AccQ·Tag Ultra C₁₈ 2.5 μm色谱柱得到的蛋白质水解产物AA标准品(500 μM)色谱图

在Arc HPLC和ACQUITY Arc系统上使用AccQ·Tag Ultra C₁₈ 2.5 μm色谱柱验证氨基酸分

析

完成方法调整后，使用蛋白质AA水解产物标准品测试各系统的性能，确保保留时间和峰面积均具有足够高的重复性。保留时间重复性是衡量泵可重现地输送梯度的能力的指标，而峰面积重复性则反映进样器的精密度。两种系统均使用上述预先确定的进样体积重复进样相同的样品进行测试。两种系统的保留时间重复性的标准偏差均小于0.005 min或0.3 s，证明了四元泵性能的高重现性。鉴于各泵的相似性，预计结果相当。

尽管进样体积不同，但各系统的峰面积精密度结果也相当。Arc HPLC系统在3 μ L的进样体积下测试，所有水解产物氨基酸的峰面积RSD为0.2%~0.6%。ACQUITY Arc系统在2 μ L的进样体积下测试，水解产物的峰面积RSD为0.1%~0.3%。两种系统均表现出良好的峰面积重复性。保留时间和峰面积的重现性结果如表2和表3所示。

| AccQ • Tag Ultra™ C ₁₈ , 2.5 μ m 4.6 × 150 mm 色谱柱 RT重复性 50 pmol (n=6) | | | | AccQ • Tag Ultra™ C ₁₈ , 2.5 μ m 4.6 × 150 mm 色谱柱 峰面积重复性 50 pmol (n=6) | | | |
|---|--------|-------|------|--|--------|-------|------|
| 化合物 | RT | STDEV | %RSD | 化合物 | 峰面积 | STDEV | %RSD |
| His | 6.591 | 0.005 | 0.1 | His | 297275 | 497 | 0.2 |
| Ser | 9.803 | 0.005 | 0.1 | Ser | 292694 | 649 | 0.2 |
| Arg | 10.438 | 0.005 | 0 | Arg | 296522 | 449 | 0.2 |
| Gly | 10.974 | 0.004 | 0 | Gly | 288133 | 595 | 0.2 |
| Asp | 12.364 | 0.003 | 0 | Asp | 288095 | 1819 | 0.6 |
| Glu | 14.036 | 0.003 | 0 | Glu | 279484 | 1131 | 0.4 |
| Thr | 15.444 | 0.003 | 0 | Thr | 297706 | 653 | 0.2 |
| Ala | 16.959 | 0.003 | 0 | Ala | 297846 | 1380 | 0.5 |
| Pro | 18.971 | 0.003 | 0 | Pro | 272782 | 846 | 0.3 |
| Cys | 23.219 | 0.004 | 0 | Cys | 253242 | 189 | 0.1 |
| Lys | 23.596 | 0.004 | 0 | Lys | 483176 | 2528 | 0.5 |
| Tyr | 24.324 | 0.004 | 0 | Tyr | 303705 | 498 | 0.2 |
| Met | 24.854 | 0.004 | 0 | Met | 291717 | 99 | 0 |
| Val | 25.379 | 0.004 | 0 | Val | 299546 | 996 | 0.3 |
| Ile | 27.537 | 0.004 | 0 | Ile | 303121 | 984 | 0.3 |
| Leu | 27.764 | 0.004 | 0 | Leu | 297853 | 986 | 0.3 |
| Phe | 28.075 | 0.004 | 0 | Phe | 302390 | 513 | 0.2 |

表2.在Arc HPLC系统上使用AccQ•Tag Ultra C₁₈ 2.5 μ m色谱柱得到的蛋白质水解产物AA标准品(500 μ M)保留时间和峰面积重复性结果

| AccQ·Tag Ultra™ C ₁₈ , 2.5 μm 4.6 × 150 mm 色谱柱 RT重复性 50 pmol (n=6) | | | | AccQ·Tag Ultra™ C ₁₈ , 2.5 μm 4.6 × 150 mm 色谱柱 峰面积重复性 50 pmol (n=6) | | | |
|--|--------|-------|------|---|--------|-------|------|
| 化合物 | RT | STDEV | %RSD | 化合物 | 峰面积 | STDEV | %RSD |
| His | 6.743 | 0.002 | 0.03 | His | 295476 | 481 | 0.2 |
| Ser | 9.951 | 0.001 | 0.01 | Ser | 286932 | 532 | 0.2 |
| Arg | 10.593 | 0.001 | 0.01 | Arg | 287057 | 479 | 0.2 |
| Gly | 11.119 | 0.001 | 0.01 | Gly | 277464 | 488 | 0.2 |
| Asp | 12.484 | 0.001 | 0.01 | Asp | 272035 | 377 | 0.1 |
| Glu | 14.185 | 0.001 | 0.01 | Glu | 268891 | 557 | 0.2 |
| Thr | 15.601 | 0.001 | 0.01 | Thr | 292470 | 580 | 0.2 |
| Ala | 17.118 | 0.002 | 0.01 | Ala | 288072 | 493 | 0.2 |
| Pro | 19.177 | 0.002 | 0.01 | Pro | 266489 | 469 | 0.2 |
| Cys | 23.464 | 0.002 | 0.01 | Cys | 254701 | 483 | 0.2 |
| Lys | 23.8 | 0.002 | 0.01 | Lys | 478242 | 586 | 0.1 |
| Tyr | 24.466 | 0.002 | 0.01 | Tyr | 302908 | 554 | 0.2 |
| Met | 24.962 | 0.002 | 0.01 | Met | 279338 | 800 | 0.3 |
| Val | 25.449 | 0.002 | 0.01 | Val | 295199 | 602 | 0.2 |
| Ile | 27.537 | 0.001 | 0 | Ile | 299435 | 593 | 0.2 |
| Leu | 27.76 | 0.001 | 0 | Leu | 294579 | 418 | 0.1 |
| Phe | 28.085 | 0.001 | 0 | Phe | 298659 | 613 | 0.2 |

表3.在ACQUITY Arc系统上使用AccQ·Tag Ultra C₁₈ 2.5 μm色谱柱得到的蛋白质水解产物AA标准品(500 μM)保留时间和峰面积重复性结果

以保留时间和峰面积RSD表示的日内精密度和日间精密度

除重复性以外，日内精密度和日间精密度对于氨基酸的分析和定量也至关重要。ACQUITY Arc和Arc HPLC的测试时间均为三天，每天测试六个样品。利用内标归一化样品前处理中的差异。分析评估了六次进样的日内精密度以及三天内每天六次进样的总精密度。

两种系统的结果均表现出较高的日内保留时间精密度和峰面积精密度。在为期三天的分析过程中，所有保留时间的RSD均在0.35%以内，精密度完全处于各系统的预期保留时间范围内。日内峰面积%RSD在0.5%以内，三天内的峰面积%RSD在0.6%以内。结果证明，该分析在ACQUITY Arc和Arc HPLC系统上均具有良好的重现性。

| RT %RSD | | | | | | | | | 峰面积%RSD | | | | | | | | |
|-------------|------|------|------|------|----------|------|------|------|-------------|------|------|------|------|----------|------|------|------|
| ACQUITY Arc | | | | | Arc HPLC | | | | ACQUITY Arc | | | | | Arc HPLC | | | |
| 化合物 | 第1天 | 第2天 | 第3天 | 日间 | 第1天 | 第2天 | 第3天 | 日间 | 化合物 | 第1天 | 第2天 | 第3天 | 日间 | 第1天 | 第2天 | 第3天 | 日间 |
| His | 0.00 | 0.10 | 0.00 | 0.03 | 0.10 | 0.80 | 0.10 | 0.33 | His | 0.20 | 0.20 | 0.30 | 0.23 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| Ser | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.10 | 0.30 | 0.00 | 0.13 | Ser | 0.20 | 0.20 | 0.30 | 0.23 | 0.20 | 0.30 | 0.40 | 0.30 |
| Arg | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.30 | 0.00 | 0.10 | Arg | 0.20 | 0.20 | 0.30 | 0.23 | 0.10 | 0.20 | 0.20 | 0.17 |
| Gly | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.20 | 0.00 | 0.07 | Gly | 0.20 | 0.20 | 0.30 | 0.23 | 0.20 | 0.30 | 0.30 | 0.27 |
| Asp | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.20 | 0.00 | 0.07 | Asp | 0.10 | 0.10 | 0.40 | 0.20 | 0.50 | 0.40 | 0.70 | 0.53 |
| Glu | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.10 | 0.00 | 0.03 | Glu | 0.20 | 0.10 | 0.30 | 0.20 | 0.40 | 0.30 | 0.60 | 0.43 |
| Thr | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.10 | 0.00 | 0.03 | Thr | 0.20 | 0.10 | 0.30 | 0.20 | 0.20 | 0.30 | 0.30 | 0.27 |
| Ala | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.10 | 0.00 | 0.03 | Ala | 0.20 | 0.10 | 0.30 | 0.20 | 0.40 | 0.40 | 0.70 | 0.50 |
| Pro | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.10 | 0.00 | 0.03 | Pro | 0.20 | 0.10 | 0.30 | 0.20 | 0.30 | 0.30 | 0.50 | 0.37 |
| Cys | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.20 | 0.00 | 0.07 | Cys | 0.20 | 0.20 | 0.30 | 0.23 | 0.10 | 0.30 | 0.10 | 0.17 |
| Lys | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.20 | 0.00 | 0.07 | Lys | 0.10 | 0.10 | 0.30 | 0.17 | 0.60 | 0.40 | 0.80 | 0.60 |
| Tyr | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.20 | 0.00 | 0.07 | Tyr | 0.20 | 0.10 | 0.30 | 0.20 | 0.20 | 0.30 | 0.20 | 0.23 |
| Met | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.10 | 0.00 | 0.03 | Met | 0.30 | 0.20 | 0.30 | 0.27 | 0.00 | 0.20 | 0.20 | 0.13 |
| Val | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.10 | 0.00 | 0.03 | Val | 0.20 | 0.10 | 0.30 | 0.20 | 0.30 | 0.30 | 0.50 | 0.37 |
| Ile | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | Ile | 0.20 | 0.20 | 0.30 | 0.23 | 0.30 | 0.30 | 0.50 | 0.37 |
| Leu | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | Leu | 0.10 | 0.20 | 0.30 | 0.20 | 0.30 | 0.40 | 0.50 | 0.40 |
| Phe | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | Phe | 0.20 | 0.10 | 0.30 | 0.20 | 0.20 | 0.30 | 0.20 | 0.23 |

表4.在Arc HPLC和ACQUITY Arc系统上使用AccQ•Tag Ultra C₁₈ 2.5 μm色谱柱所得到的日间保留时间和峰面积重现性

线性和检测限/定量限

为确保准确定量所有氨基酸，我们评估了ACQUITY Arc系统（进样体积2 μL）和Arc HPLC系统（进样体积3 μL）的线性以及LOD和LOQ。通过进样分析1 μM~500 μM范围内8个浓度水平的水解产物标准品来确定线性。利用两种仪器得到的校准曲线显示，所有氨基酸均获得了可接受的R² (>0.995)。鉴于标准品在动态范围内的分布，使用1/x的加权因子绘制校准曲线。对于两种系统，由信噪比大于等于10:1所定义的LOQ均为1 μM。所有高于LOQ的值均表现出<5%的偏差，并且在LOQ下表现出<25%的偏差。尽管两种仪器的进样体积存在差异，但基于3:1的信噪比所确定的LOD均为0.5 μM。虽然ACQUITY Arc使用的进样体积低于Arc HPLC系统，但由于ACQUITY Arc系统的柱外扩散或谱带展宽较低，导致与Arc HPLC相比峰更窄，因此两者的LOQ和LOD保持一致。

| ACQUITY Arc | | | | | | | | | | Arc HPLC | | | | | | | | | |
|-----------------|----------------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 各浓度水平下的%偏差 (μM) | | | | | | | | | | 各浓度水平下的%偏差 (μM) | | | | | | | | | |
| 化合物 | R ² | 1 | 5 | 10 | 20 | 50 | 100 | 200 | 500 | 化合物 | R ² | 1 | 5 | 10 | 20 | 50 | 100 | 200 | 500 |
| His | 0.9999 | 10.11 | -4.19 | -2.26 | -2.21 | -1.21 | -0.41 | -0.32 | 0.48 | His | 0.9995 | 24.95 | -8.47 | -7.48 | -6.17 | -2.55 | -0.65 | -0.75 | 1.12 |
| Ser | 0.9999 | -5.97 | 5.31 | 2.00 | -0.92 | -0.40 | 0.34 | -0.47 | 0.12 | Ser | 0.9999 | 7.65 | -0.82 | -2.92 | -1.76 | -2.18 | -0.01 | -0.52 | 0.55 |
| Arg | 0.9999 | -0.53 | 2.18 | 3.21 | -2.43 | -1.44 | -0.99 | -0.60 | 0.59 | Arg | 0.9998 | 0.83 | 7.43 | -3.11 | -1.85 | -2.98 | -0.43 | -0.57 | 0.67 |
| Gly | 0.9998 | 15.12 | -6.65 | -3.34 | -2.66 | -1.86 | -0.76 | -0.65 | 0.81 | Gly | 0.9999 | -3.31 | 4.21 | -0.96 | 0.86 | -0.46 | 0.36 | -1.05 | 0.34 |
| Asp | 0.9979 | -0.10 | -24.81 | 3.94 | 24.25 | -4.44 | 0.99 | 1.21 | -1.04 | Asp | 0.9997 | 4.84 | -3.1 | -4.67 | -0.87 | 0.58 | 3.17 | 1 | -0.94 |
| Glu | 0.9998 | -2.62 | -1.21 | 1.45 | -0.29 | 0.70 | 1.70 | 1.15 | -0.87 | Glu | 0.9999 | -4.11 | 2.23 | -1.08 | 0.87 | 0.63 | 1.65 | 0.38 | -0.57 |
| Thr | 0.9999 | -0.15 | 0.14 | -0.12 | 0.66 | -0.36 | -0.10 | -0.16 | 0.09 | Thr | 0.9998 | -6.3 | 10.76 | -0.94 | -1.89 | -1.55 | 0.15 | -0.6 | 0.36 |
| Ala | 0.9999 | -5.41 | 1.48 | 2.76 | 0.84 | -0.13 | 0.67 | 0.01 | -0.22 | Ala | 0.9999 | -6.06 | 4.1 | 0.23 | 1.24 | -0.22 | 1.1 | -0.18 | -0.21 |
| Pro | 0.9999 | -3.13 | 1.77 | 2.19 | -0.06 | -0.68 | 0.22 | -0.47 | 0.16 | Pro | 0.9999 | 4.16 | -0.75 | -0.97 | -1.45 | -1.27 | 0.41 | -0.42 | 0.29 |
| Cys | 0.9999 | 9.21 | -4.01 | -0.98 | -1.89 | -1.80 | -0.62 | -0.57 | 0.65 | Cys | 0.9999 | 5.7 | 0.05 | -1.99 | -1.05 | -2.23 | -0.36 | -0.8 | 0.69 |
| Lys | 0.9999 | 4.37 | -0.64 | -0.41 | -1.29 | -1.76 | -0.61 | 0.00 | 0.36 | Lys | 0.9999 | 1.55 | -0.19 | -1.78 | -0.25 | -0.26 | 0.98 | 0.14 | -0.18 |
| Tyr | 0.9999 | -0.13 | -0.09 | 1.42 | -0.51 | -0.34 | -0.10 | -0.49 | 0.24 | Tyr | 0.9999 | 1.35 | -0.48 | 1.29 | -0.31 | -1.38 | -0.08 | -0.91 | 0.51 |
| Met | 0.9999 | 7.74 | -3.12 | -0.33 | -1.86 | -1.78 | -0.68 | -0.63 | 0.66 | Met | 0.9998 | -0.87 | 8.15 | -2.06 | -1.6 | -2.69 | -0.66 | -1.17 | 0.89 |
| Val | 0.9999 | 0.33 | -1.78 | 1.97 | 0.02 | -0.30 | 0.06 | -0.49 | 0.19 | Val | 0.9999 | 5.4 | -1.42 | -2.13 | -0.94 | -1.32 | 0.54 | -0.41 | 0.27 |
| Ile | 0.9999 | 2.58 | -3.05 | 1.74 | -0.63 | -0.78 | 0.39 | -0.44 | 0.19 | Ile | 0.9999 | 6.97 | -0.68 | -1.8 | -3.22 | -1.87 | 0.7 | 0.5 | -0.41 |
| Leu | 0.9999 | -1.83 | 0.08 | 2.77 | -0.17 | -0.78 | 0.26 | -0.50 | 0.18 | Leu | 0.9999 | 8.02 | -2.67 | -2.89 | -1.59 | -1.23 | 0.51 | -0.49 | 0.35 |
| Phe | 0.9999 | -1.96 | -0.86 | 2.87 | -0.30 | 0.34 | 0.39 | -0.54 | 0.07 | Phe | 0.9999 | 4.53 | -0.36 | -1.76 | -0.68 | -1.52 | 0.01 | -0.72 | 0.5 |

表5.在ACQUITY Arc和Arc HPLC系统上使用AccQ·Tag Ultra C₁₈ 2.5 μm色谱柱分析蛋白质水解产物AA标准品(1~500 μM)得到的线性结果: R²和各浓度水平下的%偏差

AccQ · Tag Ultra™ C₁₈ 2.5 μm VanGuard小柱对色谱性能的影响

虽然氨基酸分析具有挑战性,但活样品的复杂样品基质会增加额外的复杂性。为延长AccQ · Tag Ultra C₁₈ 2.5 μm分析柱的使用寿命,建议使用AccQ · Tag Ultra C₁₈ 2.5 μm VanGuard小柱。但是,必须确保使用保护装置对色谱分离无不利影响。

为评估保护装置的影响,我们在使用和不使用VanGuard小柱的情况下测试了AccQ · Tag Ultra C₁₈色谱柱(2.5 μm, 4.6 × 150 mm)的性能。VanGuard小柱设计用于保护色谱柱,同时保持色谱性能。该测试在ACQUITY Arc系统上进行,以考察对分离度和峰拖尾的影响。结果表明,使用VanGuard小柱未导致分离度明显损失,对于一些关键分析物对,分离度(Leu/Ile)还有所提高。此外,所有USP分离度值均为基线分离度(>2.0),确保实现可重量的定量。额外分析显示,USP拖尾和峰宽值均相当,表明添加保护小柱无不利影响(图5)。数值数据如表6所示。

| 化合物 | 不使用保护柱 | | | 使用保护柱 | | | 使用保护柱与不使用保护柱时的%差异 |
|-----|--------|---------|------------|--------|---------|------------|-------------------|
| | USP分离度 | USP拖尾因子 | 4.4%峰高处的峰宽 | USP分离度 | USP拖尾因子 | 4.4%峰高处的峰宽 | USP分离度 |
| His | 6.96 | 1.11 | 0.24 | 6.70 | 1.10 | 0.25 | 3.8% |
| Ser | 17.42 | 1.11 | 0.24 | 16.77 | 1.11 | 0.25 | 3.7% |
| Arg | 3.59 | 1.14 | 0.22 | 3.45 | 1.13 | 0.23 | 3.9% |
| Gly | 2.93 | 1.09 | 0.24 | 2.91 | 1.08 | 0.25 | 0.6% |
| Asp | 7.46 | 1.07 | 0.23 | 7.18 | 1.08 | 0.24 | 3.8% |
| Glu | 10.08 | 1.10 | 0.20 | 9.75 | 1.11 | 0.21 | 3.4% |
| Thr | 9.11 | 1.10 | 0.20 | 8.78 | 1.10 | 0.2 | 3.6% |
| Ala | 9.99 | 1.09 | 0.19 | 9.77 | 1.09 | 0.2 | 2.2% |
| Pro | 14.24 | 1.10 | 0.18 | 13.87 | 1.10 | 0.18 | 2.6% |
| Cys | 8.92 | 1.15 | 0.15 | 8.23 | 1.15 | 0.15 | 7.7% |
| Lys | 3.18 | 1.18 | 0.14 | 3.19 | 1.17 | 0.14 | -0.2% |
| Tyr | 6.12 | 1.11 | 0.15 | 6.40 | 1.11 | 0.15 | -4.5% |
| Met | 4.31 | 1.09 | 0.15 | 4.32 | 1.09 | 0.15 | -0.1% |
| Val | 4.60 | 1.09 | 0.13 | 4.43 | 1.11 | 0.13 | 3.6% |
| Ile | 20.22 | 1.12 | 0.10 | 20.07 | 1.12 | 0.1 | 0.8% |
| Leu | 2.99 | 1.13 | 0.10 | 3.01 | 1.13 | 0.1 | -0.7% |
| Phe | 4.10 | 1.13 | 0.11 | 4.17 | 1.13 | 0.11 | -1.6% |

表6.在安装和未安装AccQ·Tag Ultra C₁₈ VanGuard小柱(2.5 μm, 3.9 × 5 mm)的条件下, 用AccQ·Tag Ultra C₁₈色谱柱(2.5 μm, 4.6 × 150 mm)分析蛋白质水解产物AA标准品所得到的USP分离度、USP拖尾和4.4%峰高处的峰宽

AccQ · Tag Ultra™ C₁₈, 2.5 μm柱间和批次间重现性

除评估ACQUITY Arc和Arc HPLC系统的性能以外, 还评估了柱间和批次间差异性。柱间重现性的评估是在ACQUITY Arc系统上使用相同的流动相测试了同一批次的两根色谱柱。每根色谱柱均经过六次进样测试, 并报告平均值(表7)。虽然保留时间存在一定差异, 但所有值均在预期保留时间窗口内, 并且在两根色谱柱之间可以得到明确鉴定。两根色谱柱的保留时间标准偏差均在0.29 min或30 s以内, 表明获得了良好的色谱性能。

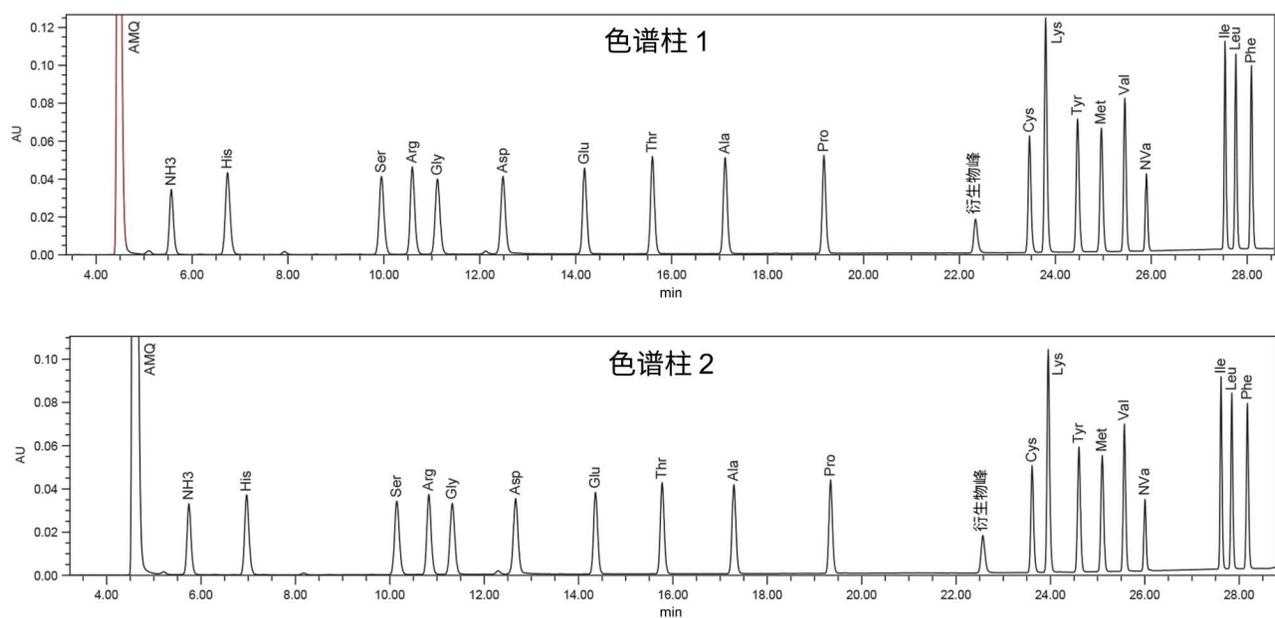


图6.在ACQUITY Arc系统上使用AccQ•Tag Ultra C₁₈ (2.5 μm, 4.6 × 150 mm)色谱柱分析蛋白质水解产物AA标准品以考察批次内重现性

| AccQ · Tag Ultra™ C ₁₈ , 2.5 μm 4.6 × 150 mm 色谱柱 批次间保留时间重现性 | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|
| 化合物 | 填料 1 | 填料 2 | 平均值 | STDEV |
| His | 7.37 | 6.97 | 7.17 | 0.29 |
| Ser | 10.47 | 10.15 | 10.31 | 0.22 |
| Arg | 11.25 | 10.83 | 11.04 | 0.30 |
| Gly | 11.65 | 11.33 | 11.49 | 0.23 |
| Asp | 12.93 | 12.67 | 12.80 | 0.19 |
| Glu | 14.61 | 14.36 | 14.48 | 0.17 |
| Thr | 16.03 | 15.77 | 15.90 | 0.18 |
| Ala | 17.55 | 17.29 | 17.42 | 0.18 |
| Pro | 19.60 | 19.34 | 19.47 | 0.18 |
| Cys | 23.78 | 23.62 | 23.70 | 0.11 |
| Lys | 24.16 | 23.96 | 24.06 | 0.15 |
| Tyr | 24.76 | 24.61 | 24.68 | 0.11 |
| Met | 25.27 | 25.10 | 25.19 | 0.12 |
| Val | 25.73 | 25.57 | 25.65 | 0.12 |
| Ile | 27.76 | 27.62 | 27.69 | 0.10 |
| Leu | 28.00 | 27.85 | 27.92 | 0.11 |
| Phe | 28.34 | 28.18 | 28.26 | 0.11 |

表7.在ACQUITY Arc上使用AccQ·Tag Ultra C₁₈ (2.5 μm, 4.6 × 150 mm)色谱柱分析蛋白质水解产物AA标准品以考察批次间保留时间重现性

虽然柱间差异性至关重要，但我们仍建议对三个不同批次的填料进行测试，以确保方法的稳定性。该测试在Arc HPLC系统上测试三根AccQ · Tag Ultra C₁₈ (2.5 μm, 4.6 × 150 mm)色谱柱，每根色谱柱含不同批次的填料。与柱间测试一样，使用同一批流动相和样品以尽可能减小潜在的差异性。结果显示出良好的重现性，所测试的三个批次之间分离度无显著变化。所有氨基酸均处于预期保留时间范围内，色谱峰之间的分离度相似。这些结果证明，该方法在使用不同批次的填料时具有良好的稳定性（图7和表8）。

结论

氨基酸的分离可能具有挑战性，不同系统特征会影响方法性能。虽然UHPLC/HPLC系统通常足以用于许多分析，但鉴于氨基酸分离的要求，评估各系统的柱外体积或谱带展宽对氨基酸分离的影响非常重要。柱外扩散的差异可能导致较大口径的柱后管路引起分离度下降或较小口径的柱前管路引起峰畸变。

本研究在ACQUITY Arc和Arc HPLC系统上使用AccQ·Tag Ultra C₁₈, 2.5 μm, 4.6 x 150 mm色谱柱成功开发并优化了一种稳定、精密且高效的氨基酸分析方法。我们优化了各系统的进样体积，以确保实现所需的灵敏度，同时尽可能减小任何强溶剂效应。

为评估各种液相色谱系统的适用性，我们测试了最终方法的最低色谱性能、重现性、精密度、线性以及检测限和定量限。结果表明，在Arc HPLC和ACQUITY Arc系统上使用AccQ·Tag Ultra C₁₈ (2.5 μm, 4.6 × 150 mm)色谱柱能够分离水解产物氨基酸。

参考资料

1. 《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, 720006663ZH <<https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/720006663en.pdf>> , 2020.
2. Amino Acid Analysis Application Notebook, 720006130 <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006130en.pdf>> , 2020.
3. Paula Hong, Patricia R McConville.什么是延迟体积和柱外体积？它们如何影响方法转换？, 沃特世白皮书, 720005723ZH <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005723en.pdf>> , 2018年4月.
4. Jennifer Simeone, Paula Hong.从ACQUITY UPLC到ACQUITY UPLC H-Class PLUS二元系统成功调整利用柱前衍生的氨基酸分析方法的仪器注意事项, 沃特世应用纪要, 720007368ZH, 2021.

特色产品

ACQUITY Arc系统 <<https://www.waters.com/134844390>>

Arc HPLC系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135068659>>

[2489紫外可见光\(UV/Vis\)检测器 <https://www.waters.com/515198>](https://www.waters.com/515198)

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

720007678ZH, 2022年7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](#)