

应用纪要

评估Arc™ Premier泵运行长时间缓梯度肽图分析的性能

Andrew Steere, Norris Wong, Paula Hong

Waters Corporation

摘要

鉴于蛋白质酶解的复杂性，要通过反相色谱法分离大量具有相似化学性质的肽，对液相色谱(LC)系统采用的条件有严格要求。在低流速和缓梯度变化的严苛条件下，拥有准确且精密的泵性能是获得可重现结果的关键。本研究中，通过检查保留时间精密度和基线性能，采用低流速和缓梯度变化(0.5 %B/min)的肽图分析方法测量Arc Premier二元系统的适应性。评估该系统的性能并与竞争产品bio-LC系统进行比较。

优势

- Arc Premier二元系统可改善数据质量和重现性
- 由于具有混合特性且HPS技术改善了色谱基线，Arc Premier系统可提供更高的灵敏度

简介

开发液相色谱方法的目标是能可靠地生成准确且可重现的结果。超高压液相色谱(UHPLC)系统(例如Arc Premier)可用于分析多种样品,使用的方法条件可能各不相同,因此,无论使用何种方法,LC系统能够表现出高性能都至关重要。肽图分析所采用的方法条件非常适合用于评估LC泵性能。这些方法常与质量数检测相配合,在低流速和长时间缓梯度条件下,泵很难可靠地重现性能¹⁻³。鉴于蛋白质酶解物肽图分析的样品复杂性,要使大量酶解产物实现分离,需要采用复杂的条件。此外,肽样品中可能含有会与金属表面相互作用的酸性肽或磷酸化肽,使用传统LC系统分析时困难重重⁴。

Arc Premier系统非常适用于肽混合物和蛋白质酶解物的HPLC反相分离,该系统采用MaxPeak™高性能表面(HPS)技术,减少了系统与金属敏感分析物之间的相互作用。Arc Premier系统可配置四元溶剂管理器(QSM-R)或二元溶剂管理器(BSM-R)。由于低成分比例时准确度提高,二元泵在达到肽图分析检测所需的梯度精度方面更有效。该系统还有一个更大的50 µL混合器,对于在光学检测期间确保可重现的溶剂输送没有任何基线波动至关重要。有波动的或者“波浪形”的基线会导致进样和运行之间的不一致,通常表现为保留时间漂移以及峰面积和灵敏度的变化。有波动的基线也会受到作为流动相添加剂使用的三氟乙酸(TFA)影响¹。TFA在210 nm处有较低的UV截止值,因此溶剂成分的任何差异都会影响基线性能。有波动的基线还会导致不一致的积分,因为部分峰可能被基线升高的区域掩盖在下面。

本研究考察了配置二元溶剂管理器的Arc Premier系统和竞品四元bio-LC系统的保留时间和信噪比,Arc Premier系统和竞品系统均包含一条惰性或生物惰性的流路,旨在尽可能减少系统与分析物的相互作用。但是,竞品系统的缺省流路不包含混合器。

实验

样品描述

将Waters MassPREP烯醇酶酶解标准品(P/N: 186002325 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186002325-massprep-enolase-digestion-standard.html>>)复溶于100 µL 0.1%三氟乙酸水溶液(流动相A)中(按照维护和使用手册操作)。将样品瓶混合,为所有的系统提供充足的样品然后根据需求重新分配。流动相也按批次制备,并分配在各个系统中以尽可能减少变化。样品和流动相均当日制备。

液相色谱条件

液相色谱系统：	Arc Premier系统，配有CH-A和BSM-R
检测条件：	Arc Premier 2998 PDA检测器，配有10 mm分析型 Arc Premier流通池
样品：	MassPREP烯醇酶酶解标准品(P/N: 186002325)
色谱柱：	XSelect™ CSH™ C ₁₈ 2.5 μm, 4.6 × 150 mm (P/N: 186006729)
柱温：	60 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	25 μL
流速：	0.500 mL/min
流动相A：	0.1%三氟乙酸水溶液
流动相B：	0.1%三氟乙酸的乙腈溶液
洗针液：	50/50流动相A/流动相B
密封清洗液：	90:10水/甲醇
波长：	214 nm
采集速率：	10 Hz

梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.0	0.500	98	2	–
3.0	0.500	98	2	6
99.0	0.500	50	50	6
104.0	0.500	10	90	6
109.0	0.500	10	90	6
111.0	0.500	98	2	6
131.0	0.500	98	2	6

数据管理

软件：Empower™ 3.6.1

结果与讨论

要使样品中的多数酶解肽实现充分分离，肽图分析方法的常用条件是长时间缓梯度和较低流速。本研究使用的方法中，有机流动相在0.500 mL/min的流速下的96分钟内以0.5 %B/min的速率增加。每个样品组包括混合烯醇酶酶解样品的6次进样，且这些样品组四天内每套系统上重复分析四次。图1显示了使用配置BSM-R的Arc Premier系统从一个样品组采集六次重复进样的叠加图。重复进样显示了系统重现性的强烈可视表现。图中还显示了十一个标记的峰，将用于监测系统性能。

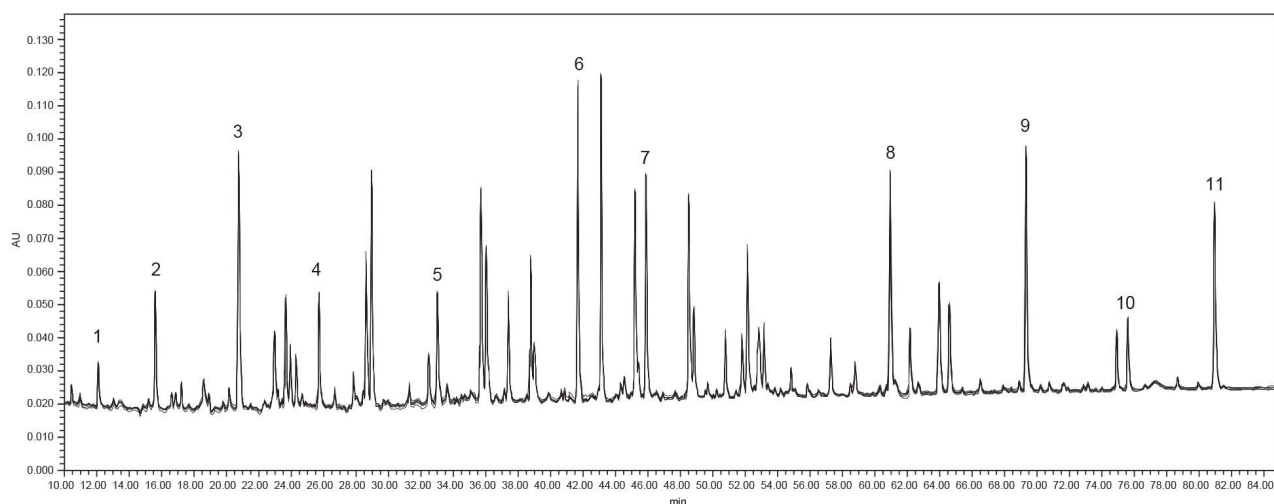


图1.MassPREP烯醇酶酶解物的六次重复进样的叠加图，包括后续分析中标记的峰

在上方色谱图中，有几个峰之间分离不完整的情况。为了监测性能特征（例如信噪比），所有系统上的峰都应被完全分离，以确保准确的比较。一个没有被完全分离的色谱峰在一个样品组中和多天的测试中都会产生较差的重现性结果。因此，尽管各系统之间存在色谱差异，被选定用于监测的峰在所有系统上都要显示出足够的分离度。此外，将所选峰在多种梯度条件下洗脱，能够监测梯度曲线过程中的性能差异。这种色谱差异如下面的图2所示。图2显示了两个系统在同一天运行的一次样品进样所得到的15分钟色谱结果窗口。虽然实际的时间范围因延迟体积等因素而变化，但对于相同的一组峰，系统之间存在着一些选择性差异，如两张色谱图所示。在Arc Premier系统上，在22.5分钟到25分钟的范围内有四个明显的峰。然而，在竞品LC系统中，在26.5分钟到29分钟的范围只有两个明显的峰。因此，该范围内在Arc Premier色谱图中查见的四个峰中任何一个都不能用于与竞品系统色谱图中的峰相比较的任何定量测量。

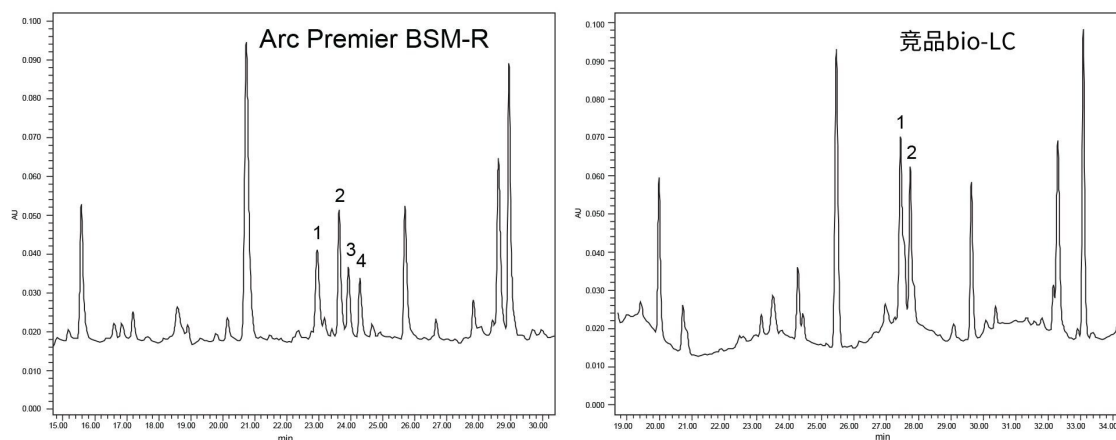


图2.使用选定的十五分钟窗口比较系统之间的色谱差异。A) *Arc Premier*系统上15分钟到30分钟的色谱图，在22.5分钟到25分钟的范围内有四个突出显示的峰。B)某供应商系统上19分钟到34分钟上的色谱图，在26.5分钟到29分钟的范围内有两个突出显示的峰。

最重要的是，在图2所示的竞品系统的色谱图中有一段很大的基线波动，而*Arc Premier*色谱图在这个范围内没有任何可见的波动。此问题的一种可能解释是竞品系统的流路中缺少混合器。*Arc Premier*系统的泵中包含一个50 μ L混合器，有助于尽可能降低噪音并使基线平整。这样的基线波动在竞品系统每张色谱图的开始部分最为明显，此时泵输送的流动相B与流动相A的比例最小。随着溶剂输送比例对泵的要求越来越低，可观察到竞品四元泵与*Arc Premier BSM-R*的噪音水平相似。因此，在梯度的早期部分，*Arc Premier*系统的平均峰到峰噪音测量值较低，而在梯度的其余部分两个系统产生相似的噪音水平（图3）。在图3中，两个系统的噪音范围都是围绕着被监测的11个峰选择的。噪音范围在总时间和区间宽度上是相等的，但由于上面讨论的改变绝对保留时间的因素，在开始和结束时间上有小差异。在*Arc Premier*系统中峰1之前测得的噪音值比竞品低五倍以上，并且在梯度的中间部分保持较低水平。到峰8时，流动相B的输送量超过30%，基线没有明显波动，两个系统的峰到峰噪音值相似。

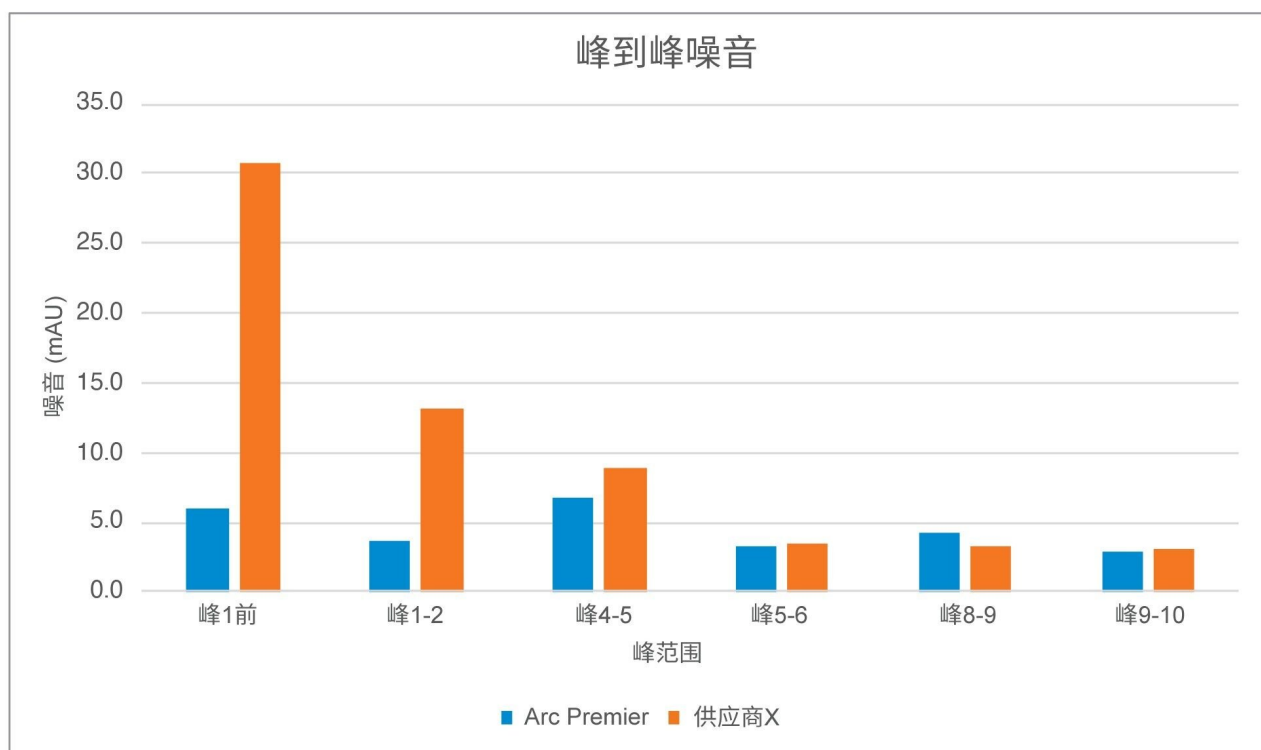


图3.Arc Premier系统和某供应商系统在整个样品进样过程中选定范围内的平均峰到峰噪音结果。噪音范围是相同的时间长度，根据实际应用情况在开始和结束时间有小的漂移。

如峰到峰噪音数据所示，两条色谱基线范围从不相上下到Arc Premier系统显著降低。这也在平均信噪比中有所反映。两个系统中的绝对信号响应相似，因此在Arc Premier系统中更平整的基线产生的信噪比值大于竞品系统中的值。提高的灵敏度如下面图4所示，在Arc Premier系统上所有峰测得的信噪比都更大。

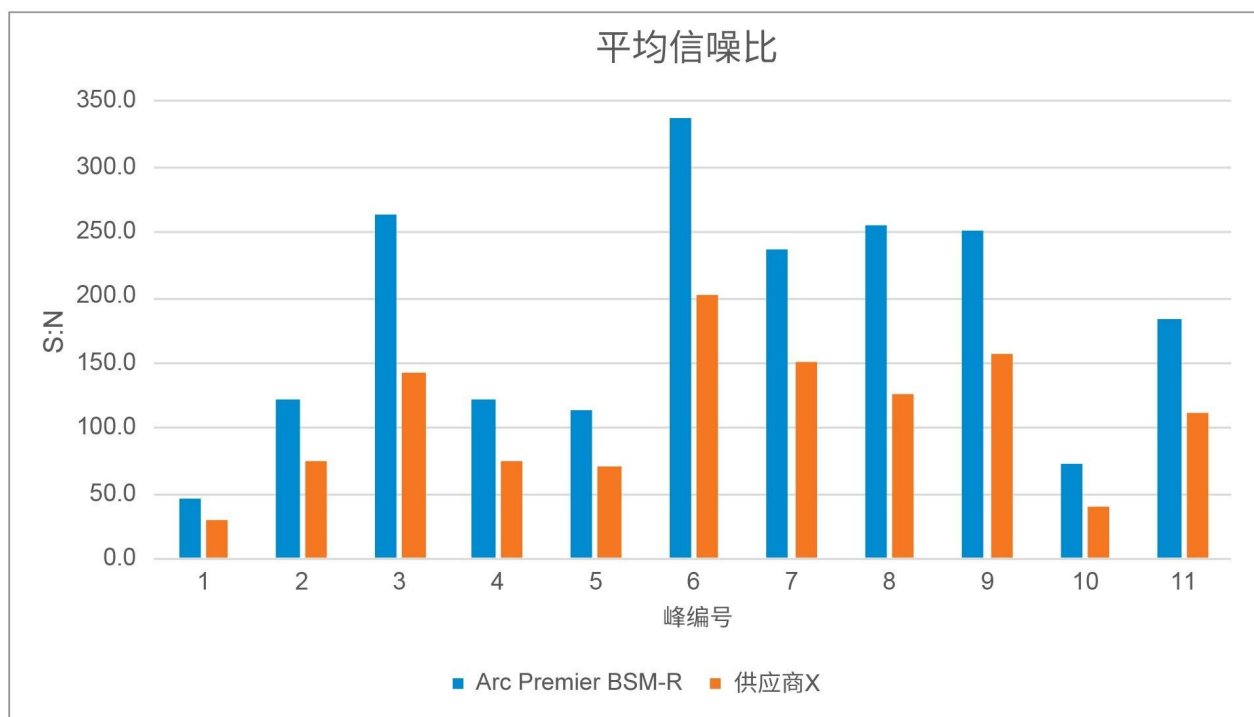


图4.在Arc Premier系统和某供应商系统上所有突出显示的峰的平均USP信噪比结果。

除了检查基线、峰到峰噪音和信噪比数据，保留时间重现性是另一个注重于泵的系统性能的定量测量指标。如图5所示，对于所有监测的峰，使用Arc Premier BSM-R的平均保留时间标准偏差比竞争替代系统的更低。保留时间重现性不佳在最早的洗脱峰上尤为明显，其在竞争系统上的基线最不稳定。在竞品系统上，前五个峰的平均偏差几乎是峰6-11的两倍（0.031分钟到0.016分钟）。尽管在Arc Premier系统的所有峰中峰1的总体误差最大，但Arc Premier系统前五个峰的平均偏差与峰6-11的平均偏差相似（0.014分钟到0.012分钟）。这表明Arc Premier系统即使在最苛刻的条件下也能保持优异的性能。

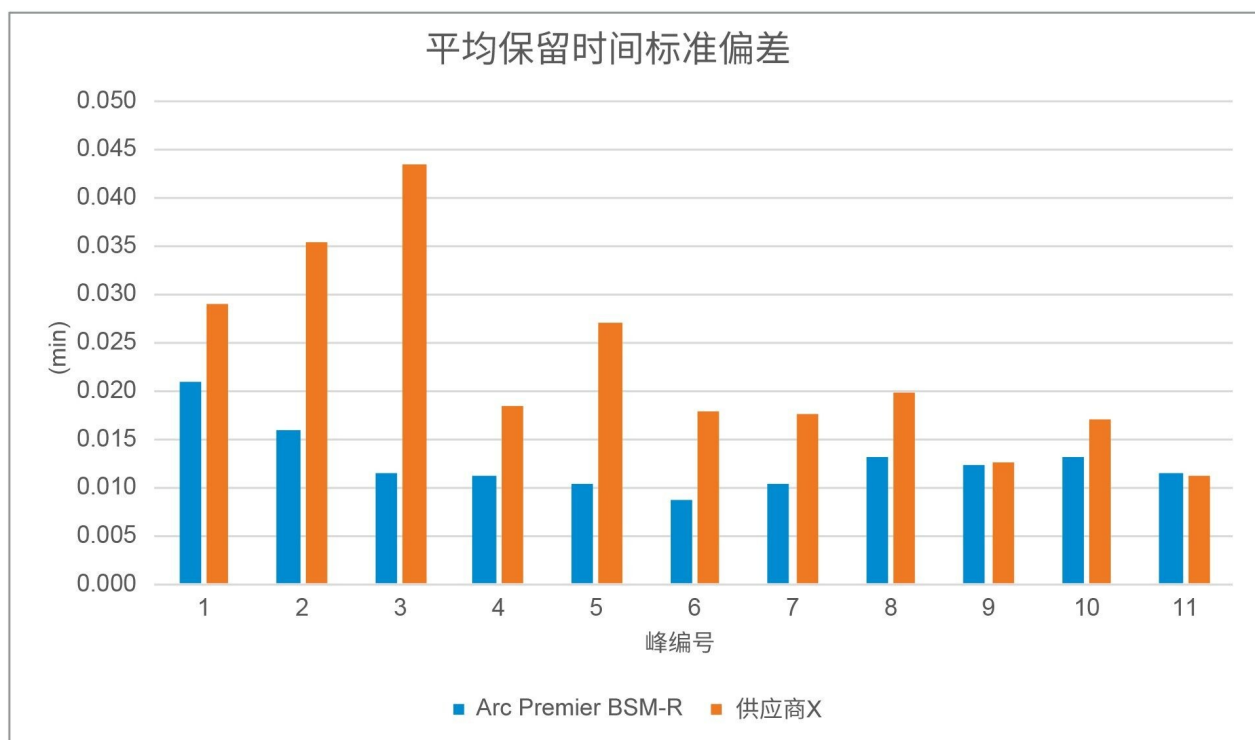


图5.在配有BSM-R的Arc Premier系统和某供应商系统上获得的平均保留时间偏差结果。首先计算样品组（六次进样）内的平均数，然后对四个样品组进行汇总。

结论

肽图分析需要苛刻的方法，系统性能的微小变化会对色谱结果产生很大影响。鉴于本研究中的方法条件，配有二元泵的系统预计将拥有非常强大的性能。当与另一个bio-LC解决方案相比时，配有BSM-R的Arc Premier系统获得了重现性更高的保留时间结果，同时也产生了一个更平整且更少噪音的基线。基线的改善产生了更大的信噪比和更低的峰到峰噪音，并获得更加一致的积分 — 这些对于系统性能都至关重要。因此，配有二元溶剂管理器的Arc Premier系统的可靠性和灵活性使其成为这种类型分析的理想系统。

参考资料

1. Simeone J, Hong P. 使用生物兼容性二元液相色谱系统进行肽图分析：评估沃特世与竞争厂商液相色谱系统的保留时间精度以及混合效应. 沃特世应用纪要, [720007078ZH](#), 2021年修订.
2. Delaney K, Birdsall RE, Yu YQ. 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. 沃特世应用纪要, [720007593ZH](#), 2022.
3. 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. 沃特世应用纪要, [720006290ZH](#), 2018.
4. Martin W, Shah D, Grzonka C, Dovell A, Li Z, Hong P, Turyan I, Dyke J. 利用Arc Premier解决方案提高金属敏感分析物的回收率：系统间重现性以及常规液相色谱的多系统比较. 沃特世应用纪要, [720007330ZH](#), 2021.

特色产品

Arc Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135083359>>

2998光电二极管阵列(PDA)检测器 <<https://www.waters.com/1001362>>

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

720007709ZH, 2022年9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](#)