

## 使用Waters ACQUITY Premier解决方案提高“酸性”肽的回收率和色谱性能

---

Robert E. Birdsall, Jacob Kellett, Samantha Ippoliti, 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

液相色谱法(LC)中的分析物/表面吸附是导致LC分析中峰形不佳、拖尾和化合物回收率下降的主要因素。本研究评估了采用MaxPeak高性能表面(HPS)的ACQUITY Premier解决方案减少金属引起的“酸性”肽(序列: VDNALQSGNSQESVTEQDSK, pI=3.9)吸附现象的能力。使用RPLC/MS技术观察到酸性肽的MS检测器响应提高到34倍。这一现象的部分原因是,与常规硬件相比,使用ACQUITY Premier MaxPeak HPS技术所观察到的拖尾显著减小。此外,当使用ACQUITY Premier LC系统和色谱柱时,峰面积增加4倍,证明MaxPeak HPS技术还可以提高金属敏感肽的回收率。与常规LC系统和色谱柱相比,采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier解决方案带来的色谱性能提升,可使高能量b/y碎片离子增加3倍(11 vs. 36)。综上,本研究展示了采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier解决方法如何通过提升色谱性能提高实验室工作效率并改善金属敏感分析物的数据质量。

### 优势

与不锈钢硬件相比,ACQUITY Premier解决方案可显著改善含有酸性氨基酸残基的肽的回收率、峰形和重现性

---

## 简介

生物分子在常规不锈钢LC系统和色谱柱上的分析结果表明，非特异性吸附造成敏感分析物的样品回收率下降和峰拖尾，从而导致分析差异性增加和检测器响应下降。在某些情况下，这些损失可归因于分析物与金属表面的不良相互作用。背后的机理是携带富电子部分的分析物充当路易斯碱，并以非共价方式吸附到LC和色谱柱硬件金属表面上的缺电子活性位点。酸性肽或由于存在酸性氨基酸（例如天冬氨酸或谷氨酸）而导致在中性pH下呈净负电荷的肽特别容易受到该吸附现象的影响。鉴于氨基酸普遍用作蛋白质类治疗药物的基块，因此在生物药物的开发和生产中经常遇到与金属引起的吸附现象相关的挑战。要降低与方法开发或常规研究相关的风险并尽可能避免不合时宜的延迟，需要可部署的解决方案，为肽分析提供可重现且可靠的结果。

---

## 结果与讨论

采用MaxPeak高性能表面(HPS)技术的ACQUITY Premier解决方案专为应对与分析物/表面相互作用所致吸附损失相关联的挑战而生。基于经验和既定知识，采用MaxPeak HPS技术的MaxPeak Premier产品系列专门设计有屏障层，以减少分析物的非特异性吸附，从而提高敏感分析物的回收率、改善峰形和重现性。本研究的目的是展示ACQUITY Premier解决方案分析“酸性”肽的优势，实验过程使用反相液相色谱技术进行业内典型的肽图分析。

我们比较了三种系统配置，以考察采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier与配置常规金属表面的系统相比，在改善样品回收率和峰形方面的表现。这些配置包括：配备不锈钢色谱柱的常规LC系统、配备ACQUITY Premier色谱柱的相同的常规LC系统，以及ACQUITY Premier解决方案（ACQUITY Premier系统搭配采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier色谱柱）。本研究利用来自酶解NIST mAb参比物质（沃特世部件号：[186009126 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186009126-mab-tryptic-digestion-standard.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186009126-mab-tryptic-digestion-standard.html)）的T14肽（序列：VDNALQSGNSQESVTEQDSK）评估了采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier的性能。鉴于T14肽的酸性组成（20%，粗体标注），并且已知这种化合物容易吸附到金属表面，因此非常适合用于该评估。使用0.68% B/min梯度（流动相A：H<sub>2</sub>O、0.1% v/v FA，流动相B：乙腈，0.1% v/v FA）在反相LC条件下分析样品。使用SYNAPT XS HRMS进行数据采集（仪器设置如图所示），并使用Waters UNIFI科学信息系统(v1.9.4)进行数据处理和肽鉴定。利用配备ACQUITY UPLC CSH C<sub>18</sub>色谱柱（部件号：[186005297 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186005297-acquity-uplc-csh-c18-column-130a-17--m-21-mm-x-100-mm-1-pk.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186005297-acquity-uplc-csh-c18-column-130a-17--m-21-mm-x-100-mm-1-pk.html)）的ACQUITY UPLC H-Class Bio二元PLUS系统代表常规LC系统，与ACQUITY Premier LC系统搭配ACQUITY Premier CSH色谱柱（部件号：[186009488 <](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186009488-acquity-premier-csh-c18-column-130a-17--m-21-mm-x-100-mm-1-pk.html)

<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186009488-acquity-premier-peptide-csh-c18-column-130a-17-m-21-x-100-mm-1-.html>) 所组成的ACQUITY Premier解决方案进行对比。

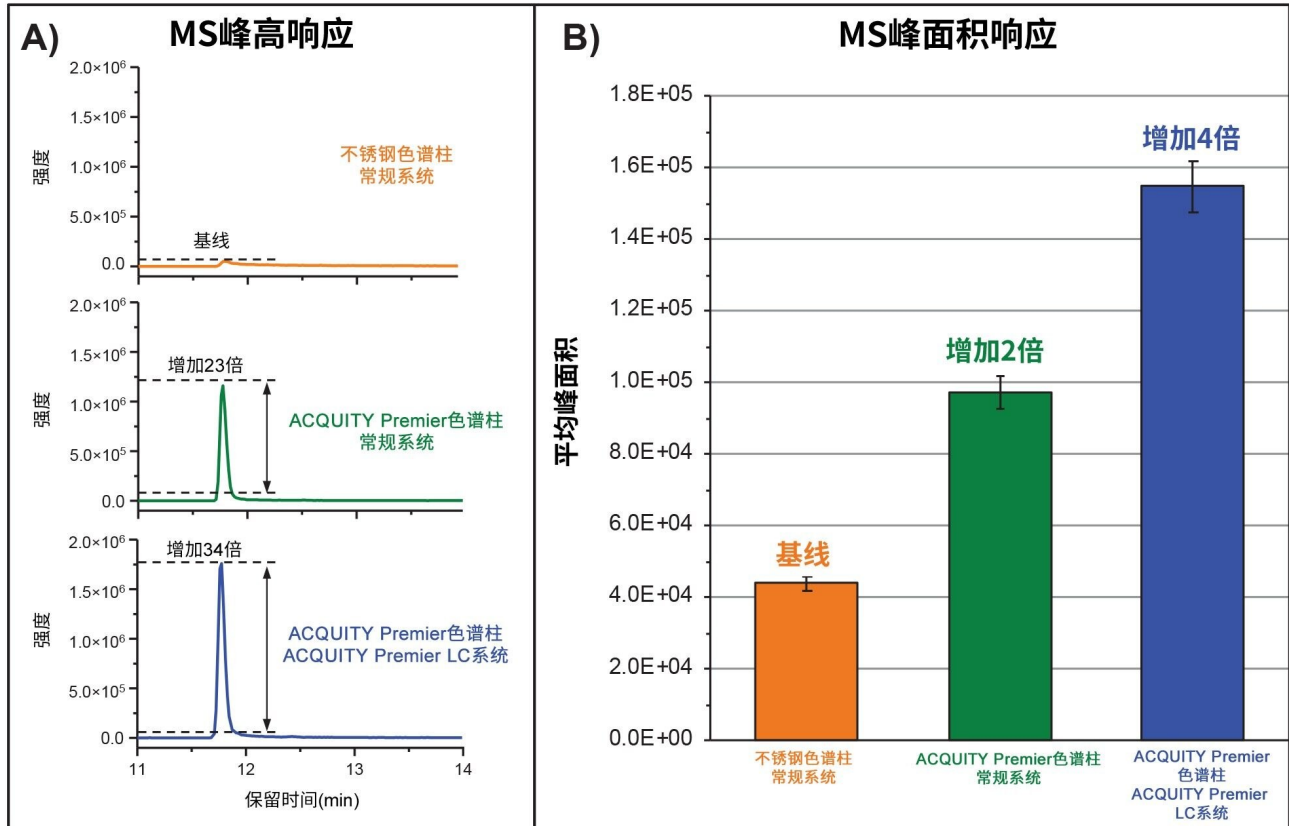


图1.采用HPS技术的MaxPeak Premier。A)利用T14肽（序列：VDNALQSGNSQESVTEQDSK）的[M+3H]<sup>3+</sup>电荷态(m/z = 712.6533)的提取离子流色谱图(XIC)，确定常规LC系统和色谱柱（上图）、配备ACQUITY Premier色谱柱的常规LC系统（中图）和配备ACQUITY Premier色谱柱的ACQUITY Premier LC系统（下图）的MS响应。B)使用一组3次重复进样，计算相应XIC中T14峰的平均峰面积和标准偏差。

如图1A所示，在配备不锈钢色谱柱的常规LC上进行肽图分析时，T14肽表现出明显拖尾，导致峰严重展宽，观察到的最大信号为离子计数 $5.2 \times 10^4$ （橙色迹线）。相比之下，在采用MaxPeak HPS技术的Waters ACQUITY Premier色谱柱上进行相同的分离时，拖尾和峰形得到显著改善，信号强度增加23倍，最大信号响应为离子计数 $1.2 \times 10^6$ （绿色迹线）。更值得注意的是，当使用ACQUITY Premier解决方案（配备ACQUITY Premier色谱柱的ACQUITY Premier系统）进行分离时，与使用不锈钢色谱柱的常规系统（如图1A的蓝色迹线所示）相比，仪器响应提高了34倍（离子计数为 $1.8 \times 10^6$ ）。使用ACQUITY Premier技术与MaxPeak高性能表面时观察到的性能改善

可归因于其不仅能够减少金属引起的吸附干扰，例如敏感分析物的拖尾，而且提高了分析物的回收率。这在各实验中增加的峰面积响应中得到证明，如图1B所示。在本例中，ACQUITY Premier解决方案将肽回收率提高了4倍，否则这些肽回收率将在系统和色谱柱的金属表面上发生损失，证明将MaxPeak HPS技术作为集成解决方案同时部署在LC系统和色谱柱硬件中的综合优势。采用MaxPeak HPS的ACQUITY Premier技术所获得的性能提升可直接转化为数据质量的提升，如图2所示。使用适当的筛选参数，当使用配备不锈钢色谱柱的常规系统时，在T14肽的数据非依赖型采集( $MS^E$ )分析过程中仅检测到11个b/y碎片离子（图2A）。相比之下，当使用配备MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier时，检测到T14肽的36个b/y离子（图2B），提高了数据解析和肽分配的可信度。总而言之，这些示例清楚地展示了配备MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier解决方案为实验室带来的价值，其能够提高工作效率并增强数据分析和解析的可信度。

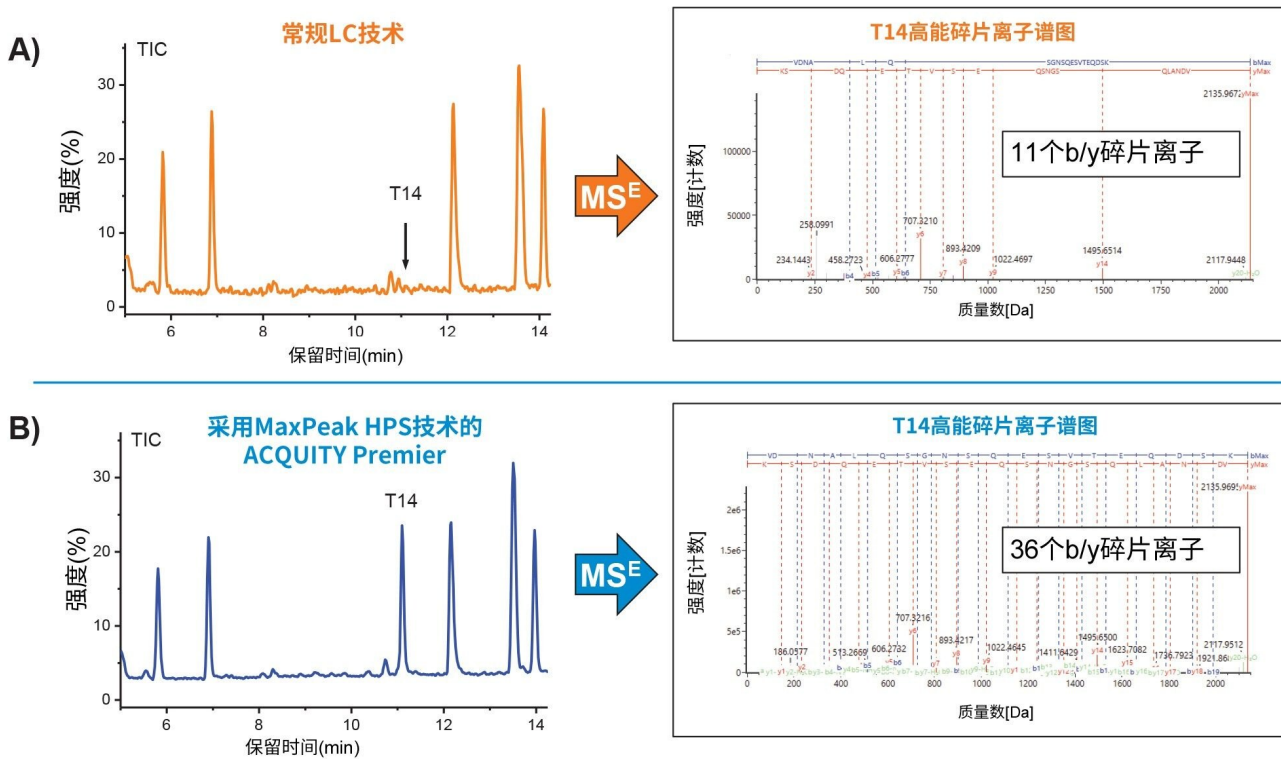


图2.提升数据质量。A)当使用配备不锈钢色谱柱的常规LC运行RPLC/MS分离方法时，利用数据非依赖型采集( $MS^E$ )鉴定与NIST mAb参比物质(RM8671)的胰蛋白酶酶解物的T14肽相关联的11个b/y肽片段。B)当使用采用高性能表面的ACQUITY Premier技术进行分离时，用相同的方法在同一样品鉴定出36个T14肽的b/y片段。方法参数：分辨率模式 - 全扫描(50~2000  $m/z$ )，毛细管电压 = 2.2kV，离子源温度 = 120 °C，脱溶剂气温度 = 300 °C，锥孔电压 = 20 V，电离源补偿 = 4V。锥孔气和脱溶剂气分别为35 L/h和500 L/h， $MS^E$ 低/高能量阶梯 = 20~50V。肽可接受标准：对于 $\geq 3$ 个匹配的b/y碎片离子的母离子质量数，质量数误差 $\leq 5$  ppm。

## 结论

当使用配备不锈钢硬件的常规LC系统时，分析物的非特异性吸附会导致样品回收率下降和峰形不佳。采用MaxPeak高性能表面的Waters ACQUITY Premier解决方案解决了与非特异性吸附相关的挑战，改善了敏感分析物的回收率、峰形和重现性。采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier的优势使科学家能够提高实验室工作效率，并在生物药物产品的开发和生产过程中提高分析的重现性、回收率和稳定性，从而降低风险。

---

## 特色产品

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

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

[ACQUITY Premier解决方案 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135071970>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135071970)

[SYNAPT XS高分辨率质谱仪 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135020928>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135020928)

[UNIFI科学信息系统 <https://www.waters.com/134801648>](https://www.waters.com/134801648)

[UNIFI生物制药平台解决方案 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10195515>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10195515)

720007173ZH, 2021年3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