[技术简报]

ACQUITY UPLC M-Class系统用于微升级二维反相/反相（2D-RP/RP）肽段分离

Matthew A. Lauber、Stephan M. Koza 和 Kenneth J. Fountain

目的

证明ACQUITY UPLC® M-Class系统和配套的色谱柱进行微升级2D-RP/RP肽段色谱的性能和重现性。

背景信息

微升级LC-MS方法在蛋白质组学领域得到了日益广泛的应用。近来此方法作为Elisa免疫分析的互补技术，在分析生物药品中残留宿主细胞蛋白质（HCP）上也得到了关注和应用。采用如300 µm窄内径色谱柱能够从相对少量的样品中获得丰富的信息。同时，在此类工作中需要进行高峰容量的肽段分离，因为更高的分离效率才能更容易检出待测物。

通过多维色谱可以提高肽段分析的峰容量，二维正交的色谱分离方法相结合可提供更好的分离能力。反相/反相（2D-RP/RP）二维色谱具有特殊的优势，通过使用具有卓越的化学稳定性和机械稳定性的亚乙基桥杂化硅胶颗粒固定相（BEH Technology™），第一维进行高pH反相分离，随后经过在线富集后得肽段混合物在亚2 µm颗粒的分析柱进行第二维低pH反相梯度分离（具体操作请参考以前的应用资料）。

使用配置2D-RP/RP功能的ACQUITY M-Class系统和配套的色谱柱进行复杂肽段分析，峰容量更高，重现性更好。

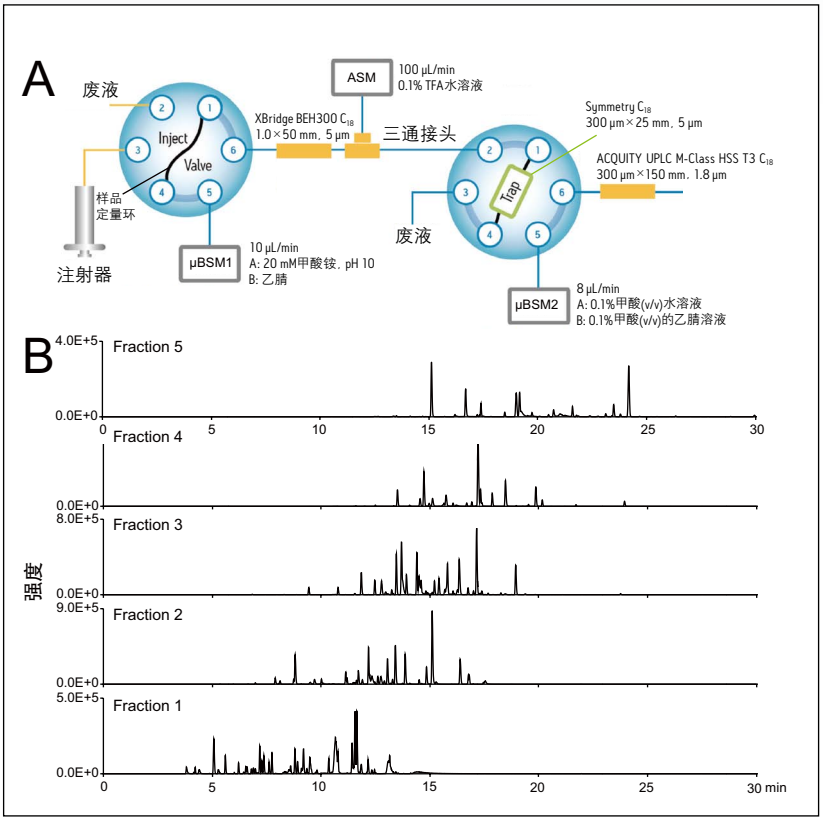

图1. 微升级反相/反相二维色谱（2D-RP/RP）流路配置和应用。(A) 流路配置。(B) 采用ACQUITY UPLC M-Class系统、SYNAPT® G2-S质谱系统得到的MassPREP蛋白质酶解标准品混合物1的BPI基峰强度色谱图。第一维高pH分离将样品分为五段，第二维低pH分离使用ACQUITY UPLC M-Class HSS T3，300 µm × 150 mm的色谱柱，上样量为400 fmol。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

在这篇简报中，我们使用ACQUITY UPLC M-Class系统和300 µm内径的色谱柱在超过10,000 psi压力条件下，运行在线2D-RP/RP色谱分离，峰容量高，重现性好且结果可靠。数据结果表明，ACQUITY UPLC M-Class系统提供高分离度、杰出的重现性，满足多种不同的应用方向。

实验方案

采用图1A所示配置，利用在线2D-RP/RP方法对四种不同蛋白质经胰蛋白酶消化后的肽段混合物（标准品，MassPREP™蛋白质酶解肽段混合物1，订货号186002865）进行研究。使用ACQUITY UPLC M-Class系统，流速为8 µL/min，线性梯度，操作压力为10,000 psi，进样量为400 fmol肽段混合物标准品，质谱检测使用新型微升级ESI喷针的SYNAPT G2-S质谱系统，分辨率设为20,000。图1B是得到的BPI基峰强度色谱图，第一维高pH分离将样品分为五段，每段经过在线捕集后进行第二维的低pH分析，使用ACQUITY UPLC M-Class HSS T3，300 µm × 150 mm色谱柱，30 min梯度/段。

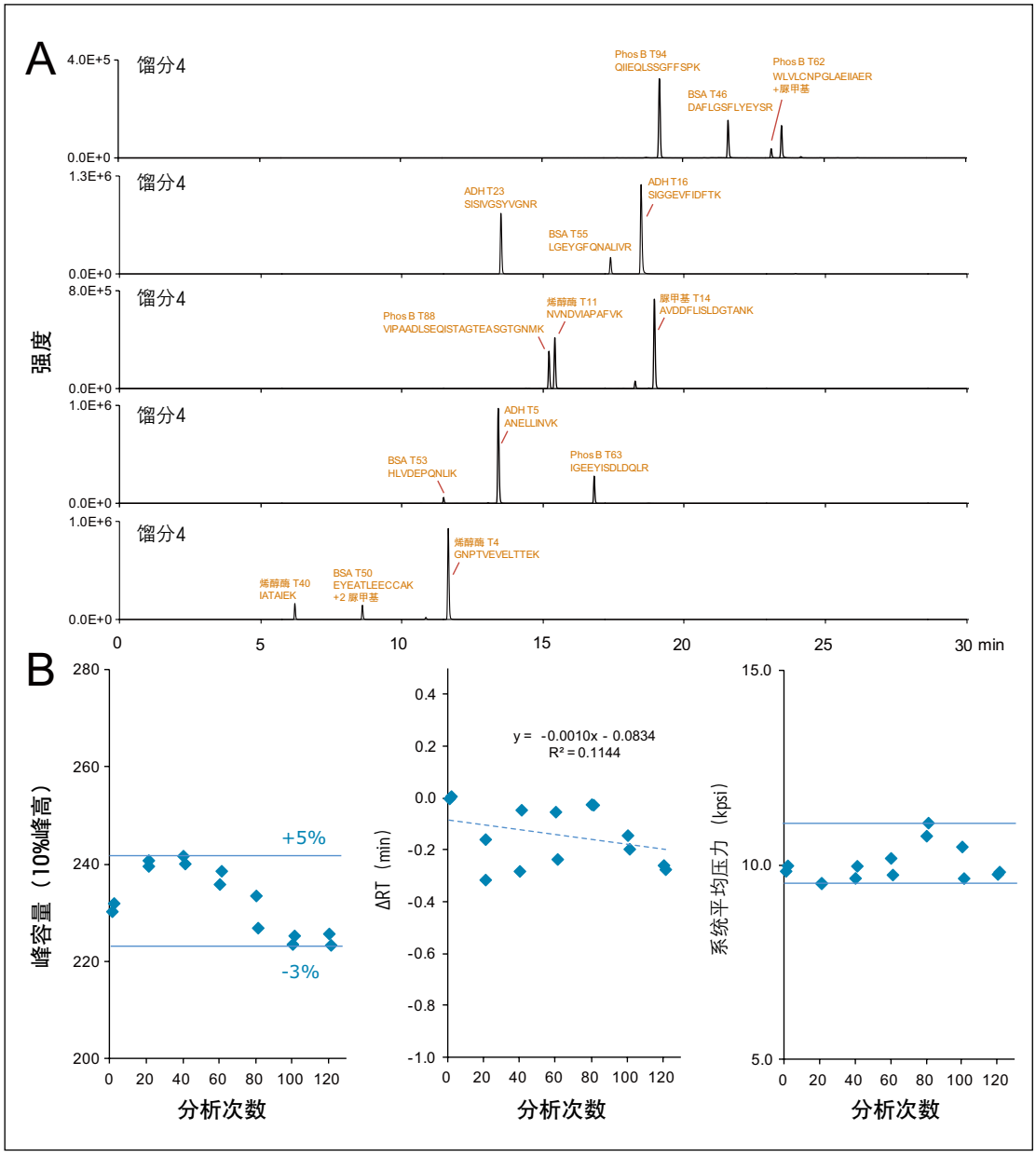

图2. 色谱性能测试结果。(A) 选择15个不同肽段，提取其离子色谱图，考察重复多次分析的结果。(B) 微升级2D-RP/RP仪器系统的使用寿命测试数据。在开始第二维梯度3 min后测量系统压力，并取五次完整2D-RP/RP循环中的压力平均值。

根据选择的15个不同肽段的提取离子色谱图中所观测到的峰宽（图2A），估计每段的平均峰容量（10%峰高）为277，整体分析共五段，因此2D RP/RP ACQUITY UPLC M-Class系统能够提供的理论峰容量为1385。

2D RP/RP ACQUITY UPLC M-Class系统的色谱重现性同样令人印象深刻。我们分别使用三组不同批号的色谱柱分析同一个样品，发现选择的15个肽段在6次重复分析中的保留时间标准偏差低于0.11 min。不同色谱柱之间同一个肽段的平均保留时间最大差异仅为3.2%，且每组色谱柱的峰容量差异也都在20%以内。这项对2D-RP/RP系统使用寿命的测试同时也证明了此色谱方法的稳定性和耐用性。我们通过100多次的2D RP/RP实际肽段样品分析考察色谱柱的性能，我们在考察过程中使用了加速破坏色谱柱的策略，每20次梯度周期仅仅有两次对第二维色谱柱进行高比例溶剂梯度洗脱，这样将加速第一维高pH色谱柱和捕获色谱柱的老化。图2B显示了按此方式进行第1次分析至第121次分析所得的数据。值得注意的是，2D-RP/RP方法在整个寿命研究中显示出一致的峰容量（峰容量变化≤5%），平均保留时间变化为每次千分之一分钟（每百次0.1 min），平均系统压力为9,500 psi至11,100 psi，远远低于ACQUITY UPLC M-Class系统的最大运行压力15,000 psi。

总结

2D RP/RP在线二维色谱方法包括使用高度稳定的亚乙基桥杂化硅胶颗粒色谱柱（BEH Technology）进行第一维高pH分离，经在线富集后在亚2 µm颗粒分析柱上进行第二维低pH的梯度分离，这是二维色谱的极佳范例。在本简报中，我们通过使用ACQUITY UPLC M-Class系统和ACQUITY UPLC M-Class 300 µm内径的分析柱，进一步拓展了此技术的应用和性能。通过测试不同色谱柱组和使用寿命可以看到，此系统不仅具有卓越的分离能力，还实现了绝佳的重现性和可靠性。使用ACQUITY UPLC M-Class系统和色谱柱的2D RP/RP在线二维色谱分离将是一种进行复杂样品研究肽段混合物如残留宿主细胞蛋白的理想方法，峰容量高，性能稳定可靠。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters，The Science of What's Possible，ACQUITY UPLC和SYNAPT是沃特世公司的注册商标。BEH Technology和MassPREP是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2014 年沃特世公司。印制于中国。2014年1月 720004934ZH TC-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com