

# Alliance™ HPLC 系统在生物化学分析中的应用

袁汉成 安蓉 刘晓英  
(美国 Waters 公司 北京代表处 100005)

**摘要** 生物化学分析研究工作的深入开展,对 HPLC (高效液相色谱) 仪器的系统性能,如灵敏度、准确度、可靠性,特别是重现性提出更加苛刻的要求。Waters 公司研制的新一代 HPLC 系统——Alliance HPLC 系统将 HPLC 分析的重现性提高到了前所未有的新水平,为生物化学分析工作者完成复杂的生物分析任务提供了一件利器。

**关键词** HPLC Alliance 氨基酸 肽

HPLC 是生化分析中的一种有力工具,但长期以来,由于仪器的系统性能,特别是重现性未能满足复杂生物分析的苛刻要求,因而限制了其应用。Waters 公司新近开发的 Alliance 系统,突破传统设计思路的束缚,第一次将溶剂管理系统和样品管理系统集成为一个整体——2690 分离单元,使 HPLC 分析的准确度、精度和稳定性得到了极大的提高,从而保证了分析结果的高度重现性。

测定蛋白质和氨基酸组成是生物表征中使用的常规技术。本文主要讨论 Alliance 系统在氨基酸分析和肽谱测定中所表现出的优异性能。

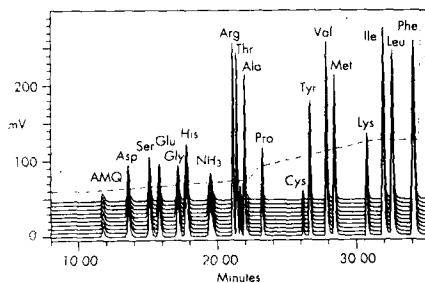
## 一、氨基酸分析

氨基酸是蛋白质和肽的组成单元。目前对蛋白质水解氨基酸的分析多采用柱前衍生、反相色谱分离的方法。本文采用新型 AQC (6-氨基喹啉基-N-

根据不同样品采用不同的梯度方法在反相 C18 色谱柱上进行分离 (即 AccQ·Tag 方法)。AccQ·Tag 方法与 Alliance HPLC 系统相结合,即使在复杂的梯度条件下也可提供高重现性的分离,确保分析结果的高置信度。图 1 为含十七种水解氨基酸样品的 10 次进样重叠图。表中数据为各种氨基酸十次分析 RT (保留时间) 值的平均标准偏差。

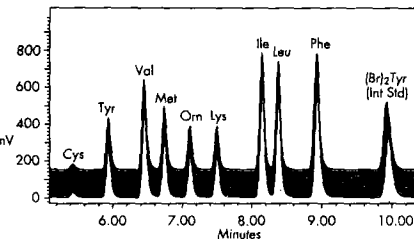
快速梯度 HPLC 方法对一台仪器能否既提供快速组成变化而又保持分离的重现性是一个挑战。Alliance 溶剂管理系统的快速循环时间结合先进的流速控制软件以及低系统体积足以产生这些极快速而精确的梯度,同时又无需改变硬件。图 2 是在 Alliance 系统上,采用优化的 AccQ·Tag 方法、快速梯度分离 10 种特殊氨基酸的谱图。17 种进样的重现性极高,分辨率亦极佳。

Amino Acid	RT (seconds)
AMQ	1.3
Asp	1.8
Ser	1.5
Glu	1.8
Gly	1.7
His	2.0
NH <sub>3</sub>	1.8
Arg	0.8
Thr	0.7
Ala	0.7
Pro	0.9
Cys	1.1
Tyr	1.0
Val	1.0
Met	1.0
Lys	0.8
Ile	0.8
Leu	0.9
Phe	1.3



Column: AccQ·Tag Column, 3.9 x 150mm  
Eluent A: AccQ·Tag Eluent A  
Eluent B: Acetonitrile  
Eluent C: Water  
Flow Rate: 1.0ml/min  
Column Temp: 37°C  
Detection: Fluorescence, λ<sub>ex</sub> = 250nm, λ<sub>em</sub> = 395nm

Amino Acid	Std Dev (n=17) (seconds)	% RSD
Gly	0.2	0.051
Thr	0.2	0.043
Val	0.1	0.036
Met	0.2	0.038
Orn	0.2	0.037
Lys	0.2	0.038
Ile	0.2	0.035
Leu	0.2	0.030
Phe	0.2	0.042
Int. Std	0.3	0.058



Column: AccQ·Tag Column, 3.9 x 150mm  
Eluent A: AccQ·Tag Eluent A  
Eluent B: Acetonitrile  
Eluent C: Water  
Flow Rate: 1.5ml/min  
Column Temp: 37°C  
Detection: Fluorescence, λ<sub>ex</sub> = 250nm, λ<sub>em</sub> = 395nm  
Sample: 50 pmol Hydrolysate Standard  
Sample Temp: 5°C

图 2 快速氨基酸分析和保留时间重现性

图 1 用于氨基酸分析的 AccQ·Tag 方法的重现性  
琥珀亚胺基氨基酸酯) 衍生剂对所测氨基酸衍生,

用 AccQ·Tag 方法可以容易地分析胶原蛋白和细胞培养介质这样的复杂样品基质。Alliance 系统控制

的四元溶剂混合 (Auto·Blend™), 在分离过程中同时有 pH 和离子强度的改变时, 仍然能提供可重现的、可传递的高分辨的分离 (图 3、4)。

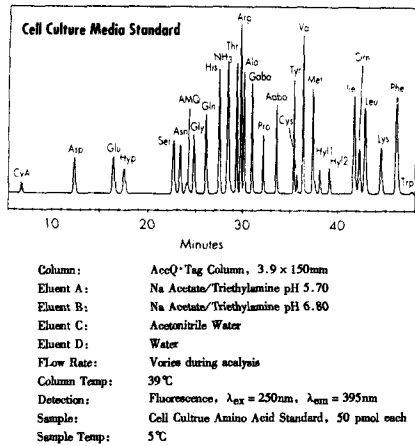


图 3 细胞培养基标准

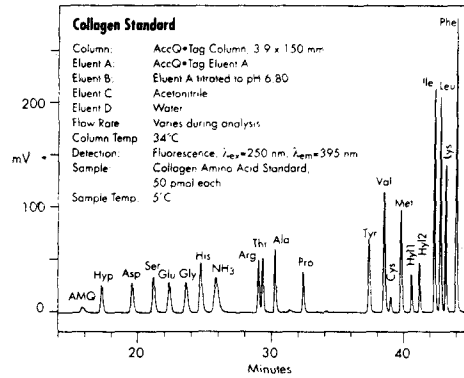


图 4 胶原蛋白标准

Alliance 系统四元洗脱剂混合能力可满足非正常梯度方法应用。在这些 AQC 衍生的氨基酸的分离中, 洗脱液 A 和 B 是具有不同 pH 的缓冲液。流动相的 pH 可以通过在分离的各个区域精确地混合 A 和 B

或从 A 转换到 B 而优化选择。上述分离在运行中还采用了流速变化以提供最佳分辨率。对于生理氨基酸的分析, 我们采用了异硫氰酸苯酯 (PITC) 衍生剂的 Pico·Tag 方法分离存在于生物样品中的 40 多种氨基酸。鉴定复杂样品 (例如生理液) 中的氨基酸需要优异的保留时间重现性, Alliance 系统对复杂多步梯度方法也能提供各次运行之间的优异重现性。

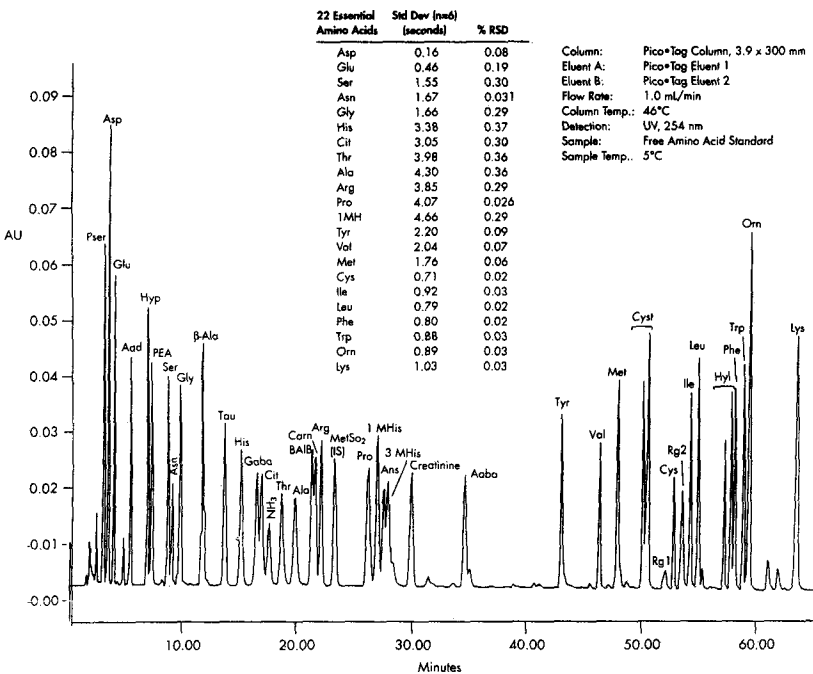


图 5 用 Pico·Tag 方法分析生理氨基酸

## 二、肽谱分析

蛋白质的表征通常是从用化学法或酶解法把完整

的分子水解成较小的碎片开始。然后再借助于反相 HPLC 分离得到这些碎片的肽谱图。由于全部肽的保留时间的重现性和一致的分辨率是至关重要的, 故而对分析仪器的精度和准确度提出了严格的要求。

当分离一个复杂的蛋白质消解样时，峰的鉴定取决于已判定峰的保留时间。当用肽谱来测定肽和蛋白质结构的细微变化（脱氨基或氧化）时，这一点尤为重要。由于肽和蛋白质结构的改变与否是依据保留时间的改变而确定的，故各次测定的肽谱必须具有精确的重现性。

Peak Number	Std Dev. min (% RSD)		
	F = 50 $\mu$ l/min	F = 75 $\mu$ l/min	F = 100 $\mu$ l/min
1	0.15 (0.25)	0.09 (0.19)	0.05 (0.12)
2	0.15 (0.24)	0.09 (0.18)	0.05 (0.11)
3	0.16 (0.26)	0.09 (0.16)	0.04 (0.09)
4	0.20 (0.28)	0.06 (0.10)	0.06 (0.11)
5	0.18 (0.22)	0.07 (0.10)	0.05 (0.08)
Average	0.17 (0.25)	0.08 (0.15)	0.05 (0.10)

Column: Symmetry C18, 1.0 x 150mm  
 Eluent A: 0.1% TFA in Water  
 Eluent B: 0.1% TFA in Acetonitrile  
 Gradient: 0.30% B in 90 minutes  
 Column Temp: 35°C  
 Detection: UV@214nm, 996 PDA detector  
 Sample: 50 Peptide Retention Time Standard  
 Sample Temp: 5°C

由于 Alliance 系统采用优化的低扩散设计，故无需费力改变硬件即可进行微柱分析，该系统提供的灵活性使分析者可在标准分析柱上进行微量制备级的分析，以及在微柱和窄柱上进行低到 p mol 量的蛋白质消解物的高灵敏度的肽谱分析（见图 6）。

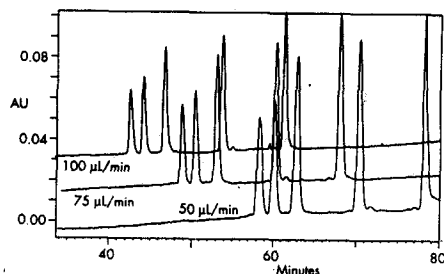


图 6 肽的分析：柱尺寸的比较  
梯度分离标样的分辨率甚至当流速降低 95% 时仍然保持不变。

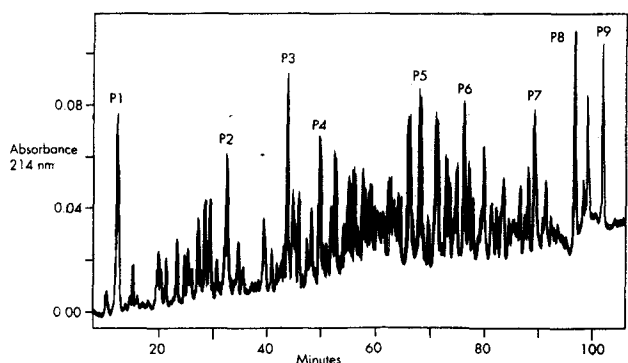


图 7 复杂肽谱的重现性

图 7 所示的是牛血清蛋白的胰酶解消化物谱图，连续 20 次进样的重叠图，运行时间为 48 小时。此例表明 Alliance 系统卓越的样品和溶剂管理设计可满足长时间连续运行的重现性要求，而不必担心样品不稳定。

采用微柱作微量制备保证了质量灵敏度的提高，因为它允许用户在较小体积内收集到较高浓度的肽。这些柱子必须在低流速（50 ~ 200 $\mu$ l）下运行才能得到最佳分辨率。Alliance 系统的低系统体积（< 650 $\mu$ l）允许生成平缓梯度并减少了重新平衡所需的时间，从而满足了微柱流速的需要。使用微柱还将降低溶剂消耗、废物生成和运行总费用。

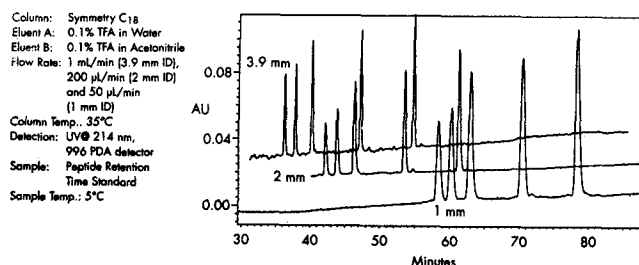


图 8 微柱色谱的重现性：肽保留时间标准样

由于 Alliance 系统内的溶剂管理系统采用创新的方法实现无脉动的溶剂输送，就可通过降低基线噪音来提供更高的灵敏度。该系统能自动对流动相脱气和补偿洗脱液粘度的变化，因而改善了梯度应用时的信噪比性能。加上采用 Waters 996PDA 检测器和 Millennium 色谱管理软件，对肽的测定提供最高灵敏度和最丰富的信息。

综上所述，Alliance 系统之独特设计，充分满足了对分析方法的灵活性、优异的灵敏度和检测资料的丰富性及分析结果重现性能满足特殊需求之生物分析的需要。Alliance 系统是生化分析工作者手中对付任何艰巨分析任务挑战的一件利器。

Alliance 系统的低系统体积使得梯度延迟更短，两次进样之间的再平衡更快。肽保留时间标样的重现性说明了完美的低流速性能。

Column: Symmetry C18, 1.0 x 150mm  
 Eluent A: 0.05% TFA in Water  
 Eluent B: 0.045% TFA in Acetonitrile  
 Gradient: 0.60% B in 60 minutes  
 Column Temp: 35 °C  
 Detection: UV @ 214nm, 996 PDA detector  
 Sample: 50 Mixture of Met and leu Enkephalin  
 Sample Temp: 5 °C

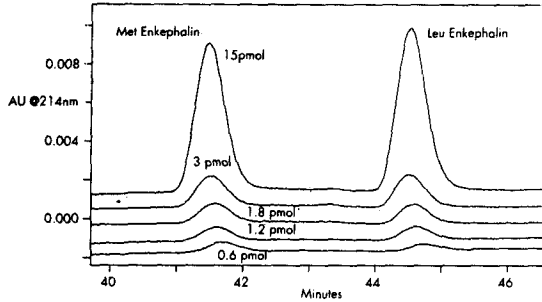


图9 肽的高灵敏度分析

996PDA 检测器的高灵敏度与 Alliance 系统的无脉、因而提供了测定低达 p mol 量的肽的能力。动流体输送和微柱兼容性，得到很高的信噪比响应，

## The Application of Alliance™ HPLC System in Bioseparation

Yuan Hancheng An Rong Liu Xiaoying  
 (Waters China Ltd Beijing office 100005)

**Abstract** Waters Alliance™ Systems were designed to meet the needs of life science researchers who are investigating proteins, peptides, and amino acids. They are developed specifically for analytical method flexibility, superior sensitivity, and reproducibility required for bioanalysis.

**Key words** HPLC Alliance Amino Acid Peptide

## 《现代仪器使用与维修》免费查询表 (复印有效)

《现代仪器使用与维修》:

本人阅读了《现代仪器使用与维修》\_\_\_\_年\_\_\_\_月号，希望进一步了解以下广告中产品和服务项目，烦请免费为我查询。

980301 980302 980303 980304

(每副广告下部均有与此一致的代号)

本人姓名和通讯地址

姓名 \_\_\_\_\_ 职务 \_\_\_\_\_

单位名称 \_\_\_\_\_

通信地址 \_\_\_\_\_

电话 \_\_\_\_\_ 传真 \_\_\_\_\_ 邮政编号 \_\_\_\_\_

Name: \_\_\_\_\_ Titel: \_\_\_\_\_

Company: \_\_\_\_\_

Address: \_\_\_\_\_

Telephone: \_\_\_\_\_ Fax: \_\_\_\_\_ Post Code: \_\_\_\_\_