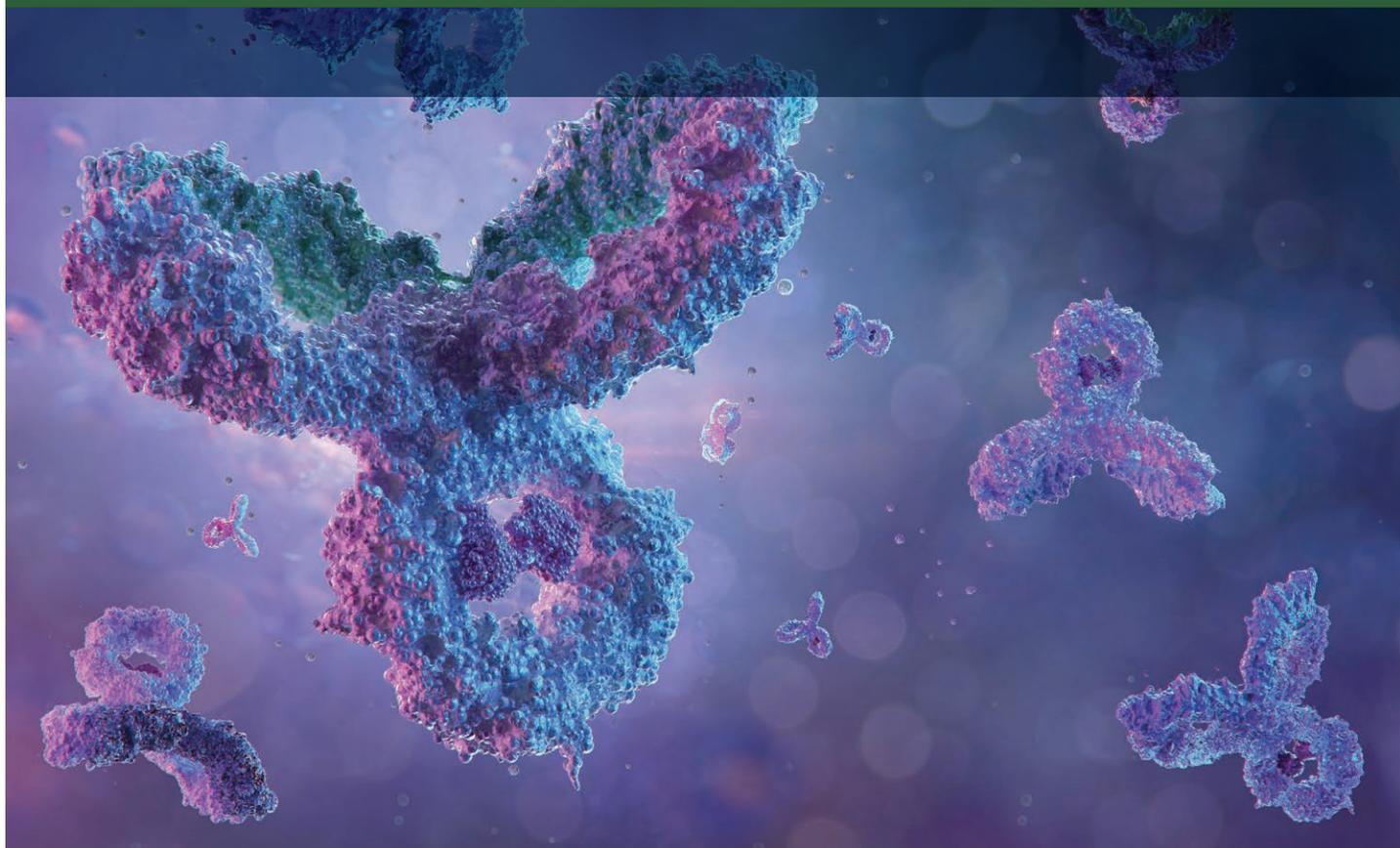


安捷伦生物色谱柱

关键质量属性

应用文集



目录

前言	06
1 滴度测定	10
1.1 背景	10
1.2 入门指南	09
1.3 用于滴度测定的亲和色谱操作指南	12
1.4 精选应用简报	25
1.5 稳定可靠的重组 Protein A Monolith 色谱柱，用于抗体滴度测定 — 5994-3088ZHCN	25
1.5 使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱和 LC/MS 进行细胞 克隆选择 — 5991-5124EN	32
1.6 使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱进行 mAb 滴度分析 — 5991-5135EN	40
1.7 更多应用简报	47
1.8 更多信息	47
2 完整蛋白质和亚基纯度	48
2.1 背景	48
2.2 入门指南	49
2.3 精选应用简报	51
2.4 监测产品相关的 mAb 片段 — 5994-3021ZHCN	51
2.5 测定半胱氨酸连接的 ADC 中的药物/抗体分布 — 5991-7192EN	57
2.6 对完整和还原态治疗性单克隆抗体 (mAb) 进行快速的高分离度分析 — 5991-6274EN	61
2.7 利用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统及 Agilent ZORBAX RRHD 二苯基亚 2 μm 色谱柱分析 IgG1 中的二硫键 — 5991-1694CHCN	66
2.8 便捷、可靠地分析抗体药物偶联物 — 5994-3522EN	71
2.9 高盐 — 高重现性 — 5994-2691ZHCN	75
2.10 AdvanceBio HIC：用于单克隆抗体 (mAb) 异构体分析的疏水性 HPLC 色谱柱 — 5994-0199ZHCN	80
2.11 更多应用简报	86

3	肽谱分析	87
3.1	背景	87
3.2	入门指南	88
3.3	优化肽段表征的要点 — 肽谱分析指南 — 5991-2348CHCN	89
3.4	精选应用简报	112
3.5	稳定可靠的肽谱分析 — 5994-2718ZHCHN	112
3.6	使用 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱分离脱酰胺形体肽段 — 5994-2971ZHCHN	117
3.7	合成肽及其杂质的分析 — 5994-2760ZHCHN	124
3.8	ADC 酶解产物中药物偶联肽段的高分离度分析 — 5991-6191EN	131
3.9	利用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱分析单克隆抗体和抗体药物 偶联物的胰蛋白酶酶解产物 — 5991-7374EN	135
3.10	利用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 表征病毒载体颗粒 — 5994-1980EN	141
3.11	将方法无缝转移至 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统 — 5994-2836EN	151
3.12	更多应用简报	157
4	氨基酸和细胞培养基分析	158
4.1	背景	158
4.2	入门指南	159
4.3	AdvanceBio 全程解决方案助您获得准确的分析结果 — 氨基酸分析 操作指南 — 5991-7694CHCN	160
4.4	精选应用简报	179
4.5	细胞培养基和蛋白质水解产物标准品中氨基酸组分的测定 — 5991-7922EN	179
4.6	使用 Agilent Poroshell HPH-C18 色谱柱进行自动化氨基酸分析 — 5991-5571EN	189

5	多聚糖分析	198
5.1	背景	198
5.2	入门指南	199
5.3	糖谱分析指南	200
5.4	精选应用简报	212
5.5	使用 Agilent AdvanceBio Gly-X InstantPC 和2-AB Express 样品前处理与 LC/FLD/MS 简化生物治疗药物的 N-糖分析工作流程 — 5994-1348ZHCN	212
5.6	用于生物治疗药物中唾液酸分析与定量的改进工作流程 — 5994-2352ZHCN	222
5.7	使用荧光检测和质谱检测对单克隆抗体 N-糖相对定量结果的比较 — 5991-6958EN	230
5.8	从样品前处理到数据分析的单克隆抗体 N-糖全面分析方法 — 5991-8550CHCN	239
5.9	使用快速高效的 HILIC 方法提高对复杂多聚糖结构的分析能力 — 5991-4896EN	249
5.10	使用 UHPLC 和荧光检测对单克隆抗体和其他糖蛋白的 N-糖进行分析 — 5991-5253CHCN	254
5.11	用于生物治疗药物 N-糖高通量分析的安捷伦解决方案 — 5991-6904EN	262
5.12	更多应用简报	267
5.13	更多信息	267

6	聚集体及片段分析	268
6.1	背景	268
6.2	入门指南	269
6.3	用于生物分子分析的体积排阻色谱操作指南 — 5991-3651CHCN	270
6.4	精选应用简报	288
6.5	提升 mAb 聚集体分析性能 — 5994-2709ZHCN	288
6.6	单克隆抗体的高分离度、高通量体积排阻色谱分析 — 5994-0828ZHCN	295
6.7	使用标准流 LC/MS 进行灵敏的大分子非变性质谱分析 — 5994-1739EN	299
6.8	使用 Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 µm 色谱柱和 AdvanceBio HIC 色谱柱分析驼源单域抗体 — 5994-1869ZHCN	308
6.9	小分子治疗性蛋白的高分离度体积排阻色谱分析 — 5994-1829ZHCN	317
6.10	共价高分子量胰岛素分析 — 5994-1566EN	325
6.11	校准 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱 — 5991-7799EN	331
6.12	胰岛素生物仿制药与创新药物的体积排阻色谱分析 — 5991-6872CHCN	338
6.13	优化和执行蛋白质聚集体研究的完整工作流程 — 5991-7476CHCN	345
6.14	体积排阻色谱在存在阴离子表面活性剂的情况下的应用 — 5991-7989EN	351
6.15	更多应用简报	358
6.16	更多信息	358

7	电荷异构体分析	359
7.1	背景	359
7.2	入门指南	360
7.3	用于生物分子分析的离子交换色谱操作指南 — 5991-3775EN	361
7.4	精选应用简报	379
7.5	便捷定制阳离子交换分析 — 5994-3257EN	379
7.6	您的分析可以采用多平缓的梯度? Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统助您改进 mAb 电荷异构体分析 — 5994-2692ZHCHN	386
7.7	利妥昔单抗创新药物与生物仿制药 mAb 的电荷异质性分析 — 5991-5557EN	394
7.8	采用安捷伦弱阳离子交换柱进行快速分离 — 5990-9931EN	399
7.9	使用安捷伦缓冲液顾问软件优化阳离子交换色谱法的蛋白质分离 — 5991-0565CHCN	403
7.10	使用 4D-LC/MS 对单克隆抗体电荷异构体进行全自动化表征 — 5994-2020EN	409
7.11	更多应用简报	421
8	最佳实践和故障排除	422

关键质量属性应用文集

引言

随着改变生命的治疗方法的出现，生物制药的未来前景看好。该领域正依托于癌症治疗和自身免疫疾病方面的突破性创新疗法不断蓬勃发展。推动这些新型生物治疗药物安全地应用于临床需要可靠的生产和质量控制过程。生物治疗药物复杂的异质性需要借助准确而稳定的分析检测方法进行分析，并需要可靠的色谱分离。鉴定关键质量属性 (CQA) 是实施质量源于设计 (QbD) 原则以开发和生产生物药物的过程中最困难的一步。定义各种产品属性极具挑战性，因此，产品质量的一致性变得更加重要。安捷伦设计并制造出了 AdvanceBio 色谱柱和消耗品以满足客户的需求。在本文集中，我们选择了一些应用来说明使用 HPLC-UV 或光散射检测器针对各种 CQA 的先进色谱分离。我们概述了分析各种 CQA 的不同色谱分离技术，这些技术采用了我们各种化学键合相的生物色谱柱产品。其中包括了分析治疗蛋白质、mAb 和抗体药物偶联物的反相色谱、体积排阻色谱、离子交换色谱和亲水相互作用色谱分析的示例。让我们帮助您提高分析效率、方法稳定性和分析结果的可靠性。我们希望在您开发更安全有效的生物治疗药物的过程中为您提供支持。您的成功就是我们的成功。

安捷伦专家遍布全球



美国特拉华州威尔明顿市



Bill Long
应用科学家

美国加利福尼亚州圣克拉拉市



Oscar Potter
研发科学家

新加坡



C. V. Suresh Babu
生物制药解决方案科学家

英国彻奇斯特雷顿



Andy Coffey
高级应用化学家



Andrea Angelo P. Tripodi
应用化学家

德国瓦尔德布隆



André Feith
应用科学家



Sonja Schneider
液相色谱应用开发经理

前言

生物治疗蛋白质是一类高度复杂的分子，通常使用重组方法通过发酵进行生产。然而，该生产过程中将产生许多这些蛋白质的不同异构体。确保此类材料的质量至关重要。这意味着需要确认产品的正确生产、任何杂质均得到鉴定和定量并且对蛋白质的效价进行测定。

因此，需要对完整的非变性分子进行测试。像单克隆抗体这样大的分子可能包含超过 1300 个单独的氨基酸，并且质量数超过 145000 道尔顿。但是，鉴定单一微量杂质（例如，天冬酰胺脱酰胺基化，其仅导致 1 道尔顿的质量数差异，可能发生在整个分子中 20 个或更多个不同的天冬酰胺位置中的任意位置处）具有挑战性。只有通过酶处理将分子分解成片段（例如轻链和重链），然后分解成更小的多肽链，才有可能明确这些细微差异中的部分差异。

可能形成许多不同类型的异构体，通常被称为翻译后修饰 (PTM)。它们在蛋白质表达之后产生，可能由生产条件或环境暴露导致变化的发生。温度、pH、浓度的波动或暴露于酶环境下都会导致异构体形成。糖基化尤其高度可变，而糖基化对于许多蛋白质的功效具有重大影响。

了解不同类型的杂质和各自的风险构成了关键质量属性 (CQA) 监测的基础。

本文集的目的是重点介绍一些适用于不同方面 CQA 监测的 HPLC 应用，同时为可能涉及的不同类型检测中所需用到的液相色谱柱提供使用指导，并提供重要的资料以备日后参考。

 滴度测定	 多聚糖分析	 电荷异构体分析
亲和色谱 工艺开发过程中 mAb 滴度测定的理想选择	亲水相互作用色谱 快速、高分离度、可重现的多聚糖分离	离子交换色谱 提高生物分子表征的准确度与速度
 氨基酸和细胞培养基分析	 肽谱分析	 聚集体/片段分析
小分子色谱 (< 150 Å) 提供稳定的高分离度分离	反相色谱 (< 150 Å) 可靠地表征一级结构并检测 PTM	体积排阻色谱 各种生物分子分离的准确定量分析
 完整蛋白质和亚基纯度		
大分子色谱 (> 150 Å) 广泛的选择性满足每一次分离要求		

无比可靠的 CQA 监测，源自安捷伦

滴度测定

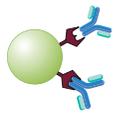
背景

在生物治疗药物的生产过程中，滴度测定用于测量发酵液中目标蛋白质的浓度。在以下两种重要的情况下，需要进行准确的滴度测定。第一种情况是在克隆选择过程中，仅选择那些提供足量目标蛋白质的转染克隆，因为并非所有克隆都同等有效。第二种情况是在发酵工艺的放大过程中监测目标蛋白质的浓度。细胞培养基条件的优化和最佳收获时间的确定依靠准确的滴度测定。

对于单克隆抗体，最有效的滴度测定方法之一是亲和色谱法。通过将 IgG 分子吸附到 Protein A 或 Protein G 亲和色谱柱上，可以去除来自发酵液的其他杂质和副产物。将经纯化的单克隆抗体洗脱，通过峰面积与校准曲线的对比进行定量分析，从而实现蛋白质浓度的快速测量。

采用整体式色谱柱有助于消除细胞培养基碎片堵塞的风险，并快速（短于 1 分钟）提供结果。

这些色谱柱也可用于纯化足量的材料，用于后续使用其他互补技术进行 CQA 分析（例如聚集体分析或电荷异构体分析），并且易于合并为 2D 工作流程。



滴度测定

亲和色谱

工艺开发过程中 mAb 滴度测定的理想选择

BioMonolith Protein A 和 BioMonolith Protein G

天然 Protein A 或 Protein G

属性	优势
快速分离	缩短方法开发时间
高结合容量	应用更灵活
大大减少堵塞	缩短系统停机时间

入门指南

在选择用于滴度测定的亲和色谱柱时，首先要考虑的是待纯化或分析的目标蛋白质。不同来源（人、小鼠等）的不同免疫球蛋白（IgG 1、2 等）对 Protein A 与 Protein G 具有不同的亲和力。例如，人 IgG3 与 Protein G 紧密结合，但是与 Protein A 完全不结合。有关选择 Protein A 或 Protein G 色谱柱的指南以及建议的流动相和样品方法，可参见以下操作指南。流动相 B（亲和色谱实验中的洗脱缓冲液）是一个可以优化的方法参数。

用于滴度测定的亲和色谱：操作指南

前言

亲和色谱是一种利用特定蛋白之间（如抗原/抗体）高度特异性分子间相互作用的强大分离技术。安捷伦提供了几种专门的亲和产品，包括用于对单克隆抗体 (mAb) 进行分离和定量的整体 Protein A 和 Protein G 色谱柱。

近年来，mAb 已成为可满足多种疾病治疗需求的主要生物制药产品。这些经特别设计的抗体具有特定的基因构成，能够更好地以病原为靶标。在这些抗体的开发过程中，Protein A 和 Protein G 分析型亲和色谱柱可用于测定各种细胞培养上清液中的抗体滴度或浓度，以选出高产量的克隆。

色谱柱选择

Protein A 和 G 色谱柱对抗体均具有高亲和性，因此它们仅结合细胞培养上清液中的抗体。然而，它们的选择性各有不同。例如，Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱对人亚类 IgG1、IgG2 和 IgG4 具有高亲和力，对 IgG3 没有亲和性，而 Agilent Bio-Monolith Protein G 色谱柱对人亚类 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 都具有高亲和力。IgG1 凭借其稳定性（半衰期较长）、在血清中的丰度以及较少出现聚集，成为最常用的生物治疗药物。通常不使用 IgG3，因为它容易聚集且不太稳定。相反，Protein G 色谱柱对人亚类单克隆抗体（例如 IgA 和 IgD）没有亲和性，但是 Protein A 色谱柱能够与这些抗体结合（表 1）。这些色谱柱相互补充，Protein G 对不与 Protein A 结合的 mAb 具有亲和性，反之亦然（图 1）。因此，它们能够实现目前作为生物治疗药物进行开发的各种 mAb 亚类和片段的滴度测定。

表 1. Protein A 和 G 与不同的人 IgG 亚类和小鼠 IgG 亚类的结合亲和性 [(1), (2)]

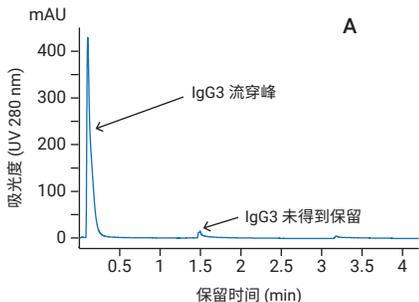
抗体	抗体	Protein A	Protein G
人	人 IgG1	++++	++++
	人 IgG2	++++	++++
	人 IgG3	-	++++
	人 IgG4	++++	++++
	人 IgA	++	-
	人 IgD	++	-
	人 IgE	++	-
	人 IgM	++	-
小鼠	小鼠 IgG1	+	++
	小鼠 IgG2a	++++	++++
	小鼠 IgG2b	+++	+++
	小鼠 IgG3	++	+++
	小鼠 IgM	+/-	-

抗体片段	Protein A	Protein G
人 Fab	+	+
人 F(ab') ₂	+	+
人 scFv	+	-
人 Fc	++	++
人 K	-	-
人 λ	-	-

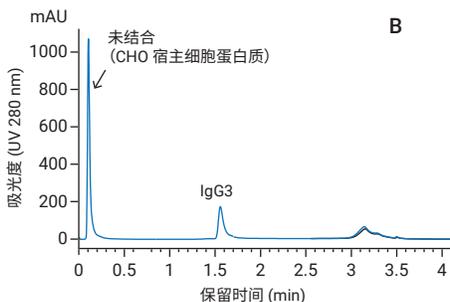
Protein A 和 G 对不同抗体的相对亲和性表示法：

- ++++ = 强亲和性
- +++ = 中等亲和性
- ++ = 弱亲和性
- + = 微弱亲和性
- = 无亲和性

Bio-Monolith Protein A 对 IgG3 无选择性



Bio-Monolith Protein G 对 IgG3 具有选择性



Bio-Monolith Protein A 柱对 IgG3 无亲和性，而 Bio-Monolith Protein G 柱则有亲和性。

图 1. 摘自 5991-6087CHCN 或应用简报 5991-6094CHCN

HPLC 系统注意事项 — 分析过程中确保蛋白质稳定

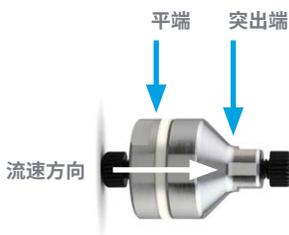
这些整体柱与 HPLC 和 UHPLC 系统兼容，但是此类分析的理想之选是 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统。它可以轻松处理具有挑战性的溶剂条件，例如 pH 1 至 pH 13 的极端 pH 值以及高盐浓度的缓冲液。溶剂输送系统使用耐腐蚀的钛材质，样品流路采用非金属材料，由此建立了极为稳定的仪器。

样品前处理

亲和色谱的样品前处理方法与 HPLC 蛋白质分析的样品前处理方法类似。进样前需要极少的样品前处理，以优化色谱柱性能并延长色谱柱寿命。

- 对样品进行离心或过滤，去除上清液或裂解液中的宿主细胞碎片和颗粒，以防止堵塞色谱柱
- 对于血清/血浆样品，最好去除样品中的脂类。脂类将与色谱柱发生强结合，导致色谱柱和仪器污染

Bio-Monolith Protein A 亲和色谱柱带有白色条带，而 Bio-Monolith Protein G 亲和色谱柱则带有黄色条带。



条件

样品进样

对于包含 1–5 mg/mL mAb 的样品，推荐进样量为 1–5 μ L。样品可溶于 H₂O 或流动相 A 中。每次最多进样 50 μ L 或 400–500 mg mAb 至色谱柱上。

流速

色谱柱可在 1.0–3.0 mL/min 的流速下运行，以实现高速分离。

温度

为实现成功分离，典型温度为 25 °C。色谱柱使用温度范围为 4–40 °C。

检测

推荐在 280 nm 下进行 UV 检测，在该波长下的吸收由具有芳香基或更多偶联侧链的氨基酸引起。

流动相

流动相 A 结合和清洗缓冲液

流动相 A 为结合缓冲液：50 mmol/L 磷酸钠缓冲液，pH 7.4。

结合/清洗缓冲液应新鲜配制。此外，建议使用 0.22 或 0.45 μ m 膜过滤缓冲液，以减少缓冲液杂质积聚在色谱柱内部筛板上。此过滤步骤有助于防止色谱柱堵塞。

流动相 B 洗脱缓冲液

Bio-Monolith Protein A 和 G 色谱柱与用于 mAb 洗脱的许多低 pH 缓冲液兼容，详见表 2。通常使用柠檬酸、甘氨酸、HCl 和乙酸。如果所用样品浓度低，并需要考虑基线噪音和伪峰，那么可选择 HCl 作为洗脱液，因为它的折射率较低。

注：通常，用于亲和色谱柱的洗脱缓冲液与结合/清洗缓冲液的折射率 (RI) 差异较大；因此，当洗脱液开始流动时，可能会出现基线噪音和伪峰。该峰可能干扰低浓度样品的定量分析。为了尽可能减小这种影响，建议使用高品质化学品，并且应运行空白以确定伪峰。如果需要，空白运行可用于基线扣除。

表 2. 兼容的洗脱缓冲液

色谱柱	洗脱缓冲液	浓度	pH
Bio-Monolith Protein A 和 rProtein A	柠檬酸	0.1 mol/L	2.5–3.0
	甘氨酸	0.1 mol/L	2.5–3.0
	乙酸	5%–20%	
Bio-Monolith Protein G	柠檬酸	0.1 mol/L	2.5–3.0
	甘氨酸	0.1 mol/L	2.5–3.0
	乙酸	5%–20%	

快速分离方案

Agilent Bio-Monolith rProtein A (重组蛋白 A) 分析柱是 Bio-Monolith 和亲和色谱家族的新成员。该色谱柱可用于高速分析单克隆抗体 (mAb) 滴度和小规模纯化, 并可轻松集成到二维液相色谱等其他分析工作流程中。本研究以最大流速测试了重组蛋白 A 色谱柱, 并对天然 Protein A 色谱柱进行了桥接研究。证明了一种色谱结合/洗脱法可用于测定 mAb 滴度, 该方法具有非常短的运行时间 (1 分钟), 适用于克隆筛选、工艺开发及优化等高通量应用。

高通量 mAb 滴度分析

实验部分

化学品与试剂

所有化学品和试剂均为 HPLC 级或更高级别, 且均购自 Sigma-Aldrich (现属于 Merck) 或 VWR Scientific。水经由 Milli-Q A10 (Millipore) 纯化。

样品

样品是从含有 1 mg/mL 重组 IgG 单克隆抗体的生物反应器中收集的粗制中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞培养上清液。

仪器

Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪包括:

- 1260 Infinity II 生物惰性泵 (G5654A)
- 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler (G5668A), 配备样品冷却装置 (选件 100)
- 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A), 配备生物惰性热交换器 (选件 019)
- 1260 Infinity II 可变波长检测器 (G7114A)

HPLC 方法条件

参数	值								
色谱柱:	Agilent Bio-Monolith rProtein A, 4.95 × 5.2 mm (部件号 5190-6903)								
结合缓冲液 (洗脱液 A):	50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.4								
结合缓冲液 (洗脱液 B):	100 mmol/L 柠檬酸, pH 2.6								
梯度曲线:	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>%B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0.0-0.2</td><td>0 (结合)</td></tr><tr><td>0.3-0.65</td><td>100 (洗脱)</td></tr><tr><td>0.66-0.90</td><td>0 (再平衡)</td></tr></tbody></table> <p>(0.1 min 后运行)</p>	时间 (min)	%B	0.0-0.2	0 (结合)	0.3-0.65	100 (洗脱)	0.66-0.90	0 (再平衡)
时间 (min)	%B								
0.0-0.2	0 (结合)								
0.3-0.65	100 (洗脱)								
0.66-0.90	0 (再平衡)								
流速:	3 mL/min								
柱温:	25 °C								
检测:	UV, 280 nm								
进样量:	4 µL (上样 10 µg)								

结果与讨论

高通量 mAb 滴度分析

证明使用高通量方法，在 1 分钟的色谱运行时间内即可实现 mAb 的高速滴度分析（图 1）。纯化的（结合/洗脱）mAb 的保留时间约为 0.61 分钟，与 CHO 细胞培养上清液中包含的宿主细胞蛋白的杂质峰（保留时间约为 0.05 分钟）分离良好。在图 1 中，重复进样添加了 mAb 的粗制上清液，在 125 bar 的反压水平下，通量为 60 个样品/小时，显示出了一致且可靠的性能。

在整个研究过程中，峰形、保留时间和反压没有明显变化。图 2 显示了不同上样量生成的色谱图。然后通过绘制峰面积与进样量之间的关系来生成校准曲线（图 3）。结果表明，如校准曲线所示，该方法的线性响应出色 ($R^2 = 0.9993$)，并能准确测量两组不同样品中 mAb 的含量。

这些数据证明了使用这种快速分析方法准确测定 mAb 滴度的可行性。

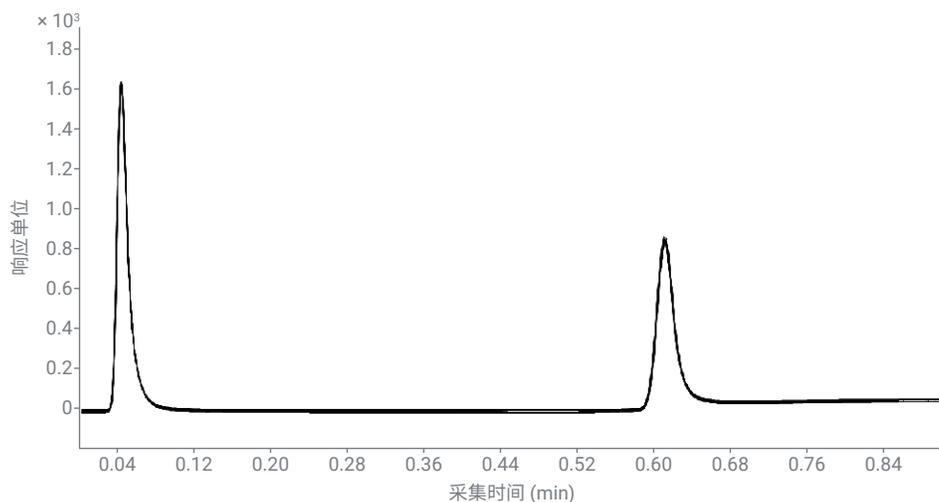


图 1. Agilent Bio-Monolith rProtein A 色谱柱：60 次连续进样的叠加色谱图。第一个峰为细胞培养上清液中宿主细胞蛋白杂质；第二个峰为纯化的 mAb

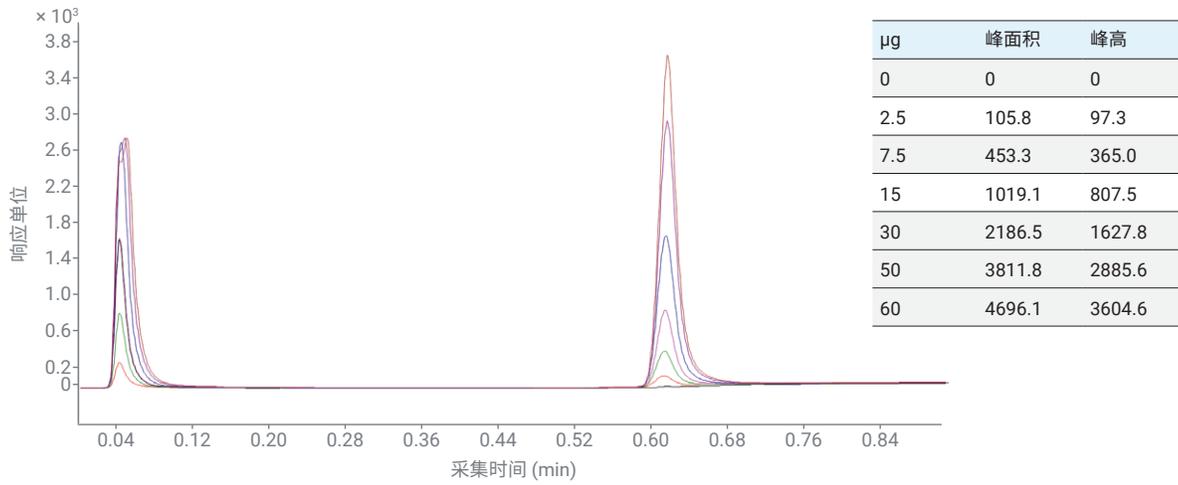


图 2. Agilent Bio-Monolith rProtein A 色谱柱：校准曲线。上样量递增的样品的叠加色谱图，用于生成校准曲线

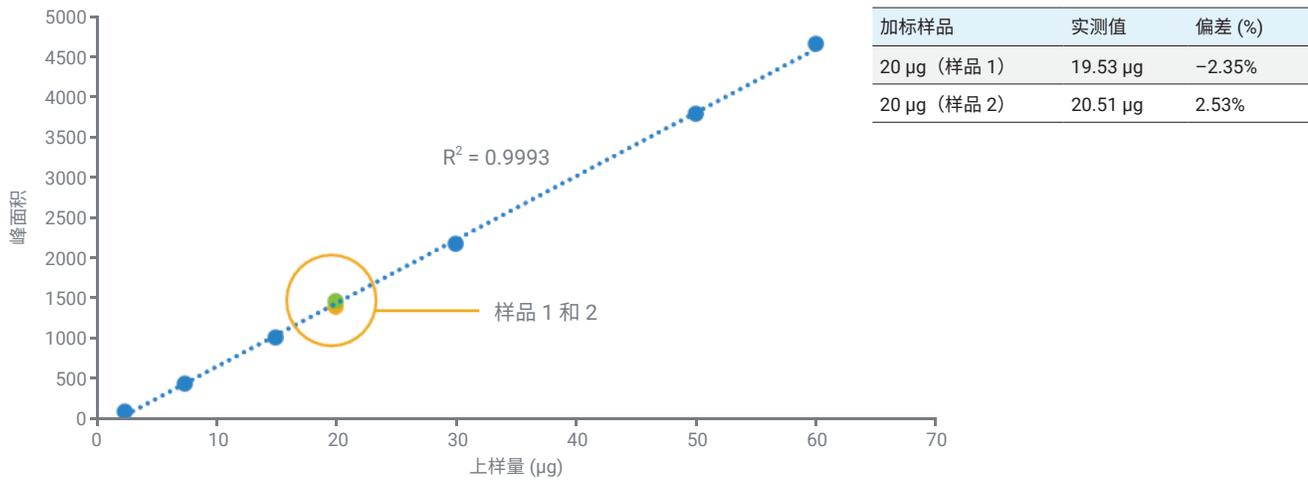


图 3. Agilent Bio-Monolith rProtein A 色谱柱：标准曲线线性响应和偏差 (%)

桥接研究

在桥接研究中，对于天然和重组色谱柱，保留时间、标准曲线的线性和偏差、样品交叉污染和回收率等性能特征没有可检出的差异。这项工作为那些正准备从天然 Protein A 色谱柱转换到 rProtein A 色谱柱的研究者提供了信心。

实验部分

化学品与试剂

所有化学品和试剂均为 HPLC 级或更高级别，且均购自 Sigma-Aldrich（现属于 Merck）或 VWR Scientific。水经由 Milli-Q A10 (Millipore) 纯化。

样品

样品是从含有 1.5 mg/mL 重组 IgG 单克隆抗体和相同浓度的纯化重组 IgG 单克隆抗体的生物反应器中收集的粗制中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞培养上清液。

仪器

Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统由以下组件组成：

- 1290 Infinity II 生物高速泵 (G7132A)
- 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A)
- 配备生物热交换器的 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)
- 各自配备生物流通池的 1290 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7117B) 和可变波长检测器

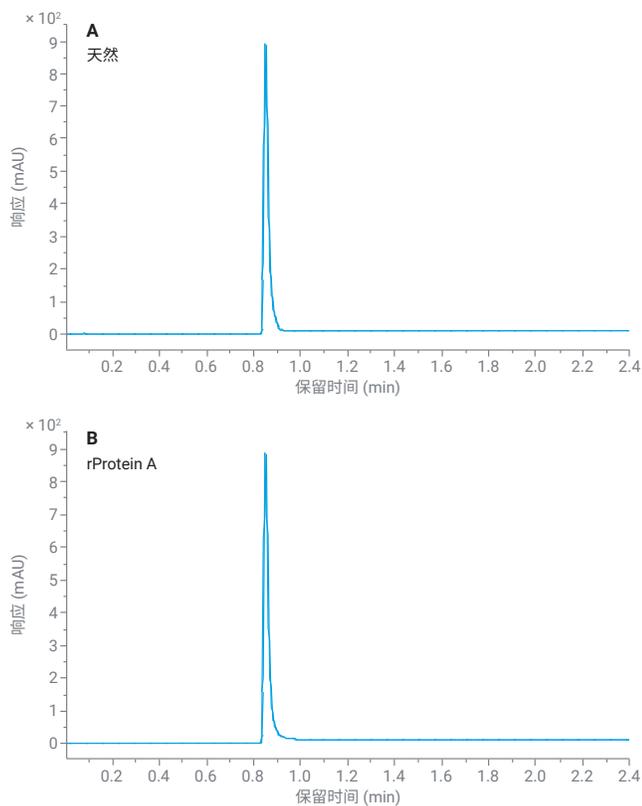
HPLC 方法条件

参数	值	
色谱柱：	Agilent Bio-Monolith rProtein A, 4.95 × 5.2 mm (部件号 5190-6903)	
	Agilent Bio-Monolith Protein A, 4.95 × 5.2 mm (部件号 5069-3639)	
结合缓冲液 (洗脱液 A)：	50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.4	
结合缓冲液 (洗脱液 B)：	100 mmol/L 柠檬酸, pH 2.6	
梯度曲线：	时间 (min)	%B
	0.0–0.5	0 (结合)
	0.6–2.6	100 (洗脱)
2.7–4.0	0 (再平衡)	
流速：	1.5 mL/min	
柱温：	25 °C	
检测：	UV, 280 nm	
进样量：	5–50 µL (上样 25 µg)	

结果与讨论

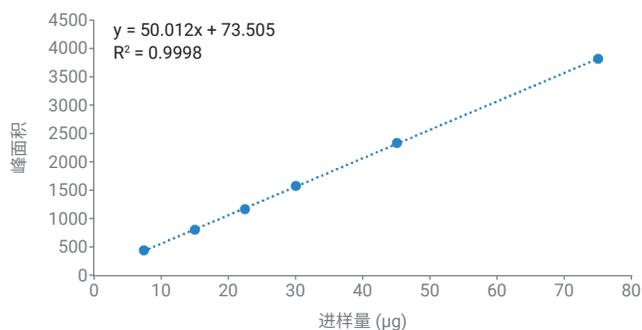
桥接研究

在相同条件下测试了两种 Bio-Monolith Protein A 色谱柱的性能。天然 Protein A 和 rProtein A 色谱柱之间的所有特性存在较小差异或没有差异，包括纯化的 mAb 的保留时间和峰形（图 4）、标准曲线的线性响应和加标样品回收率（图 5 和图 6），以及样品交叉污染（图 7）。



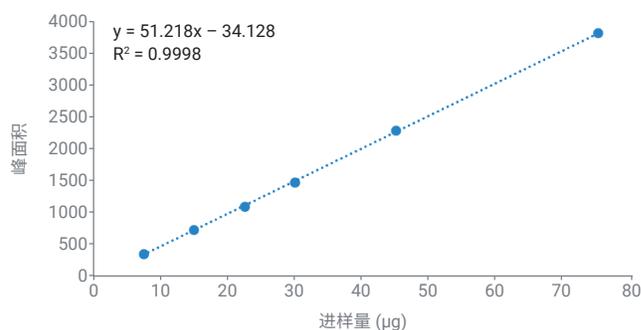
	天然	rProtein A
保留时间 (min)	0.850 ± 0.001	0.850 ± 0.001
峰高	880.9 ± 8.1	881.8 ± 5.3

图 4. 天然 Protein A 色谱柱和 rProtein A 色谱柱的色谱图和 mAb 峰结果比较



加标样品	实测值	偏差 (%)
25 μg (经纯化)	25.25 μg	0.99%
25 μg (上清液中)	26.09 μg	4.35%

图 5. rProtein A 色谱柱：线性响应



加标样品	实测值	偏差 (%)
25 μg (经纯化)	24.94 μg	-0.23%
25 μg (上清液中)	25.78 μg	3.12%

图 6. 天然 Protein A 色谱柱：线性响应

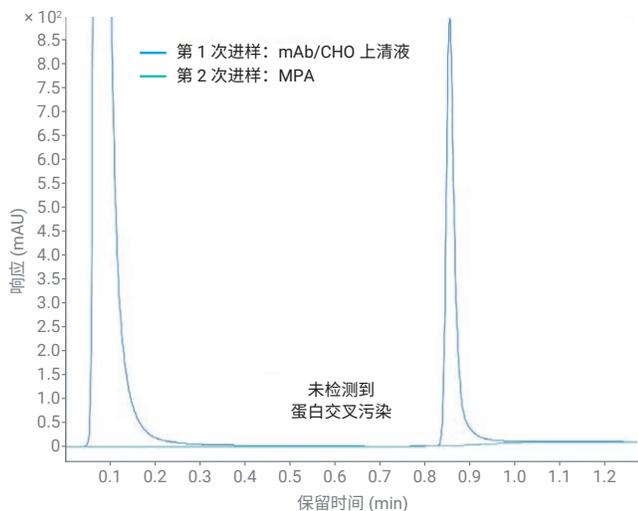


图 7. rProtein A 色谱柱：交叉污染分析。随后进样的结合缓冲液 (MPA) 没有检测到蛋白交叉污染

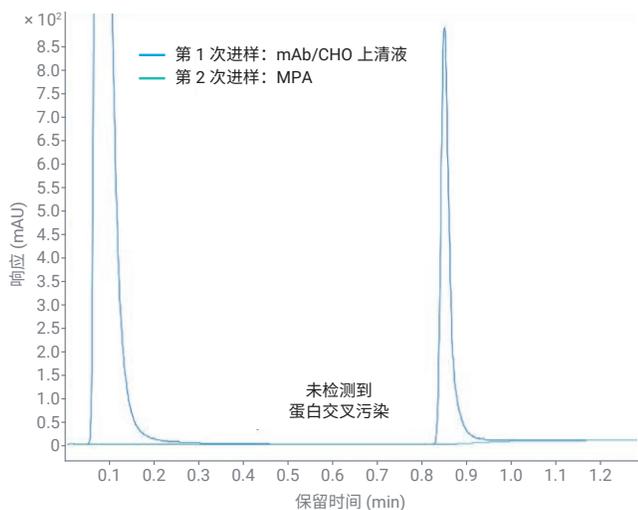


图 8. 天然 Protein A 色谱柱：交叉污染分析。随后进样的结合缓冲液 (MPA) 没有检测到蛋白交叉污染

回收率分析

除了比较天然 Protein A 和 rProtein A 色谱柱的回收率外，本研究还比较了两种非安捷伦的 rProtein A 色谱柱。流速调整为 2 mL/min，以适应非安捷伦色谱柱的运行流速。其他 mAb 样品包括：

- Agilent NISTmAb (部件号 5191-5744)
- Sigma SiLu mAb, 购自 Sigma-Aldrich (SiLu Lite, 部件号 MSQC4)

不使用色谱柱 (使用两通接头)，通过进样纯化的 mAb 样品获得 mAb 峰的基线曲线下面积 (AUC)，纯化的 mAb 样品用流动相 B 稀释。使用色谱柱，获得洗脱的 mAb 的 AUC。mAb 样品量与测定基线 AUC 时的用量相同。

$$\text{回收率 (\%)} = (\text{洗脱的 mAb 的 AUC} / \text{基线 AUC}) \times 100$$

HPLC 方法条件

参数	值								
色谱柱：	Agilent Bio-Monolith rProtein A, 4.95 × 5.2 mm (部件号 5190-6903)								
	Agilent Bio-Monolith Protein A, 4.95 × 5.2 mm (部件号 5069-3639)								
结合缓冲液 (洗脱液 A)：	50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.4								
结合缓冲液 (洗脱液 B)：	100 mmol/L 柠檬酸, pH 2.6								
梯度曲线：	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0–0.4</td> <td>0 (结合)</td> </tr> <tr> <td>0.5–1.3</td> <td>100 (洗脱)</td> </tr> <tr> <td>1.31–4.0</td> <td>0 (再平衡)</td> </tr> </tbody> </table>	时间 (min)	%B	0.0–0.4	0 (结合)	0.5–1.3	100 (洗脱)	1.31–4.0	0 (再平衡)
时间 (min)	%B								
0.0–0.4	0 (结合)								
0.5–1.3	100 (洗脱)								
1.31–4.0	0 (再平衡)								
流速：	2 mL/min								
柱温：	25 °C								
检测：	UV, 280 nm								
进样量：	4 μL (上样 10 μg)								

结果分析

rProtein A 色谱柱的平均回收率比天然 Protein A 色谱柱低 1%，但仍优于两种非安捷伦色谱柱。虽然天然 Protein A 色谱柱的回收率略占优势，但在 3 个 mAb 样品中，rProtein A 色谱柱的回收率最稳定。

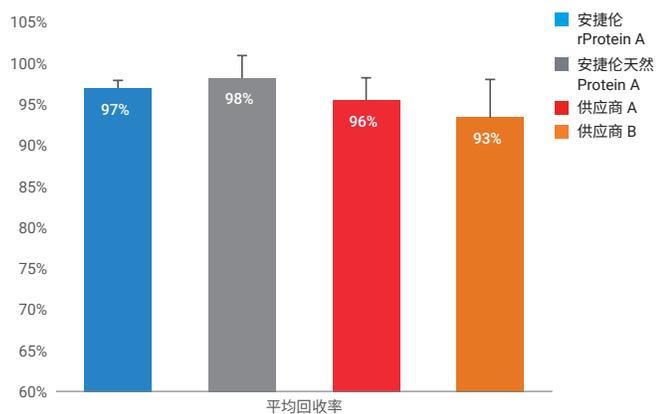


图 9. mAb 回收率结果比较

结论

天然 Protein A 色谱柱和 rProtein A 色谱柱之间的桥接研究表明，rProtein A 色谱柱具有与天然 Protein A 色谱柱相似或等效的性能。

大幅延长色谱柱寿命

色谱柱再生

使用一体式膜盘的主要优点在于，其具有的通道而非孔可以降低细胞培养样品进样时色谱柱堵塞的可能性。这样提高了稳定性并减少了清洗工作。通过在每 30–50 个样品后运行空白梯度进样，可减小色谱柱污染。

如果观察到色谱柱劣化（拖尾峰或宽峰），建议采用以下清洗程序。第一步是色谱柱再生。如果性能仍然无法达到理想状态，可使用原位清洗程序，这样将减少可用的 Protein A 的量。

色谱柱再生

- 用 2 mL（色谱柱体积 (CV) 的 20 倍）的 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 + 1 mol/L NaCl (pH 7–8) 在 0.5–1.0 mL/min 的流速下进行清洗
- 用 2 mL（20 倍 CV）的低 pH 溶液（例如洗脱缓冲液）进行清洗
- 用结合缓冲液重新平衡色谱柱

原位清洗

- 用 1–2 mL（10–20 倍 CV）的 0.1 mol/L NaOH 在 0.2–0.5 mL/min 的流速下进行清洗（反向冲洗）
- 用 1–2 mL（10–20 倍 CV）的去离子水在 0.5–1.0 mL/min 的流速下进行清洗
- 用 1–2 mL（10–20 倍 CV）浓缩缓冲液 (0.1–0.5 mol/L) 清洗以恢复正常 pH (7.0–7.4)
- 用 5 mL（50 倍 CV）结合缓冲液重新平衡色谱柱

如果杂质高度疏水或为脂类，并且不易从色谱柱中去除，则可以使用 2-丙醇（最多 30%）或盐酸胍（最多 3 mol/L）来去除这些杂质。使用这些替代清洗溶液后，请按照步骤 1 至 4 进行操作。

警告：使用这些清洗溶液清洗色谱柱时，务必降低色谱柱的流速，以免产生的高压超过色谱柱允许的最高压力。

短期储存

当需要过夜储存或储存几天时，可使用结合缓冲液冲洗色谱柱，然后将其与仪器断开连接，加盖并储存于 4–8 °C 下。在短期储存后首次进样前，应对色谱柱进行平衡。

长期储存

如果不使用色谱柱的时间超过两天，应使用至少 1 mL (10 倍 CV) 去离子水进行冲洗，然后用至少 2 mL (20 倍 CV) 包含 20 mmol/L Tris 缓冲液的 20% 乙醇 (pH 7.4) 在 0.2–0.5 mL/min 的流速下进行冲洗。然后使用色谱柱末端塞将其密封，并储存于 4–8 °C (39–46 °F) 下。

参考文献

1. Richman, D. D., Cleveland, P. H., Oxman, M. N., and Johnson, K. M. 1982. "The binding of 1. *Staphylococci* protein A by the sera of different animal species." *J. Immunol.* 128: 2300–2305
2. Frank, M. B. 1997. "Antibody Binding to Protein A and Protein G beads". 5. In: Frank, M. B., ed. *Molecular Biology Protocols*. Oklahoma City

订购信息

部件号	描述
5190-6903	Bio-Monolith 重组 Protein A, 4.95 × 5.2 mm
5069-3639	Bio-Monolith Protein A, 4.95 × 5.2 mm
5190-6900	Bio-Monolith Protein G 亲和色谱柱, 4.95 × 5.2 mm

更快速、更一致的生物分子表征 — Agilent AdvanceBio 色谱柱

Agilent AdvanceBio 色谱柱能够提供始终如一、出色的多肽及蛋白质分离和表征性能。这些先进的色谱柱能够提高分析准确度和分析效率，并消除可能妨碍分析的干扰。它们经过严格测试，并享有安捷伦 60 天完全满意质量保证。

如需了解更多信息，请访问
www.agilent.com/chem/AdvanceBio

与您携手合作，共获理想结果

不断出现的挑战需要更优异的解决方案。我们的解决方案将帮助生物制药科学家在疾病研究领域实现开拓创新、加速药物发现，且在整个产品开发和生产阶段更具信心。

如需了解更多有关安捷伦生物制药解决方案的信息，请访问 agilent.com/en/solutions/biopharma-pharma

稳定可靠的重组 Protein A Monolith 色谱柱，用于抗体滴度测定

作者

Te-Wei Chu 和
Andrew Coffey
安捷伦科技有限公司

摘要

在生物治疗抗体的制造过程中，在最佳时间点进行收集的必要条件是能够快速分离细胞培养上清液原液。使用重组 Protein A 亲和配体制成的 Bio-Monolith 色谱柱有几大优势。首先，Bio-Monolith 色谱柱具有超大孔结构，能大大降低阻塞风险。其次，相对与天然 Protein A 结合的 IgG，重组 Protein A 不但具有选择性，而且配体纯度更高、结构更稳定。最后，Bio-Monolith 色谱柱也可用于小规模纯化，以配合其他分析技术的使用，尤其是在测定关键质量属性 (CQAs) 时。

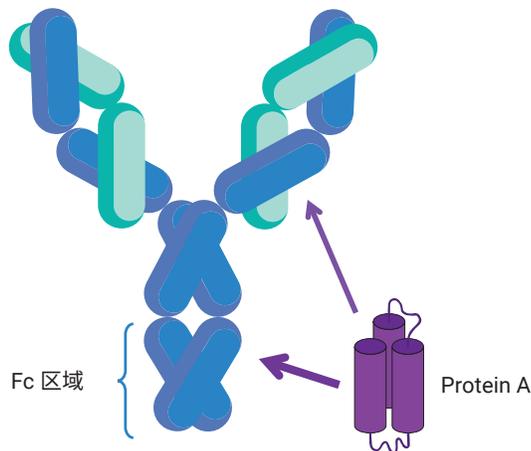


图 1. Protein A 与免疫球蛋白 G (IgG) 的相互作用

前言

天然 Protein A 是从金黄色葡萄球菌中分离出的表面蛋白，对不同物种的各种免疫球蛋白的 Fc 区域都具有强结合亲和性。天然 Protein A 亲和色谱已经成为从细胞培养上清液原液提取纯化单克隆抗体的一种选择方式。重组 Protein A 还可提供更多优势：重组 Protein A 自身的生产纯度更高；此外，还可经改造确保其固定在固定相上，为蛋白结合提供理想方向。

使用重组蛋白 A 还有助于延长色谱柱寿命。通常，色谱柱寿命会因细胞培养上清液天然特性而缩短。重组 Protein A 色谱柱寿命延长的原因在于其比天然 Protein A 色谱柱更能抵御色谱柱清洗所需的严苛条件。

本应用简报测试了一款全新的安捷伦重组 Protein A Bio-Monolith 色谱柱的寿命。

实验部分

试剂与化学品

所有化学品和试剂均为 HPLC 级或更高级别，且均购自 Sigma-Aldrich（现属于 Merck）或 VWR Scientific。水经由 Milli-Q A10 (Millipore) 纯化。

样品

样品是从含有 1 mg/mL 重组 IgG 单克隆抗体的生物反应器中收集的粗制中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞培养上清液。

仪器

Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪包括：

- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性泵 (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler (G5668A)，配备样品冷却装置（选件 #100）
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)，配备生物惰性热交换器（选件 #019）
- Agilent 1260 Infinity II 可变波长检测器 (G7114A)

HPLC 条件

参数	值
色谱柱：	Agilent Bio-Monolith rProtein A, 4.95 × 5.2 mm (部件号 5190-6903)
结合缓冲液 洗脱液 A)	50 mmol/L 磷酸盐, pH 7.4
洗脱缓冲液 洗脱液 B)	100 mmol/L 柠檬酸, pH 2.6
清洗缓冲液	1) 含 1 mol/L NaCl 的 100 mmol/L 磷酸钠, pH 7.4 2) 含 20% 异丙醇的 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.4
梯度：	时间 (min) %B
	0-0.5 0 (结合)
	0.6-1.8 100 (洗脱)
	1.9-4.0 0 (再平衡)
流速：	1 mL/min
进样量：	根据需要 (1-20 µL)
柱温：	24 °C
检测：	UV 280 nm

结果与讨论

使用与文献^[1]所述细胞培养上清液相比含有更高浓度宿主细胞蛋白质的细胞培养上清液原液，研究了 Bio-Monolith 重组 Protein A (rProtein A) 色谱柱的稳定性。

按照结合、洗脱和色谱柱再平衡的步骤顺序重复序列进行，每进样 250 次后的结果显示于图 2、图 3 和图 4。第 1500 次进样后，引入采用清洗缓冲液的色谱柱再生步骤（参见“方法条件”），此后每 500 次进样执行一次。正如预期，如此高挑战性的原液样品基体果然让色谱柱压力不断累积上升（图 5）。

而经过定期清洗，在 3000 次进样中，色谱柱持续提供了一致可靠的峰面积和滴度分析（图 6 和图 7）。

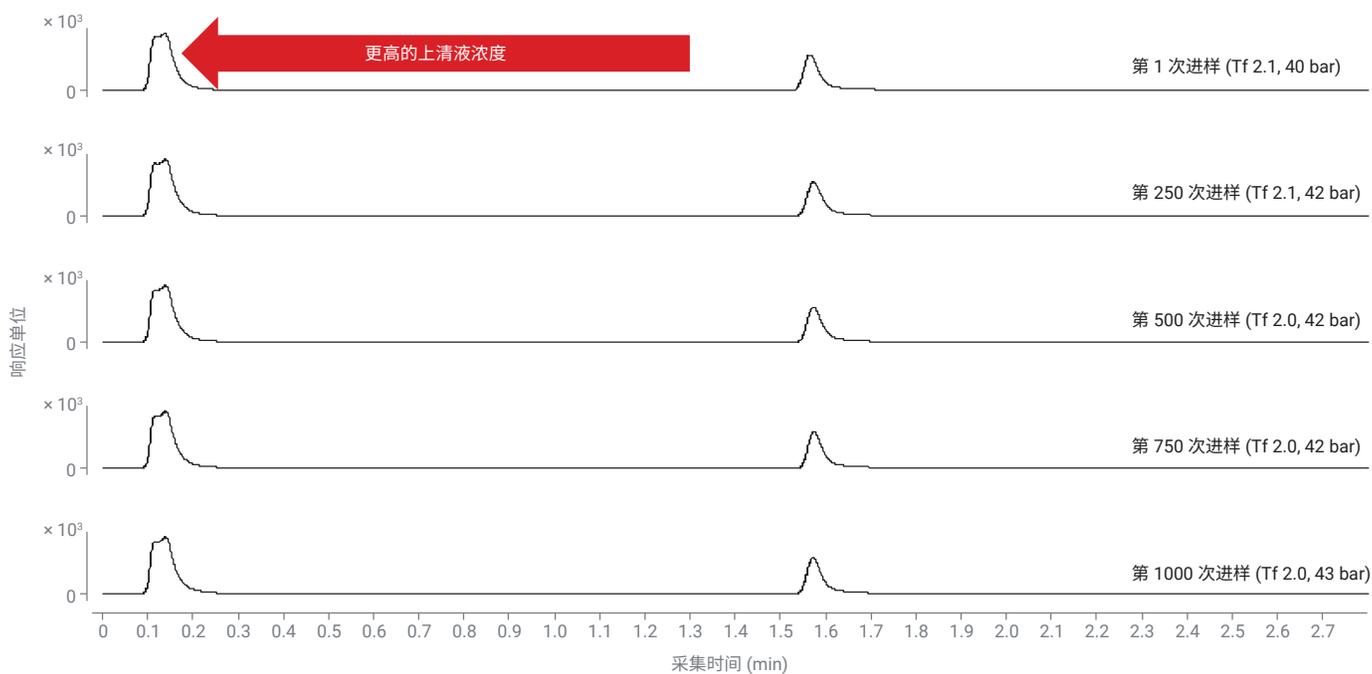


图 2. Agilent Bio-Monolith rProtein A 色谱柱寿命：第 1 次进样至第 1000 次进样

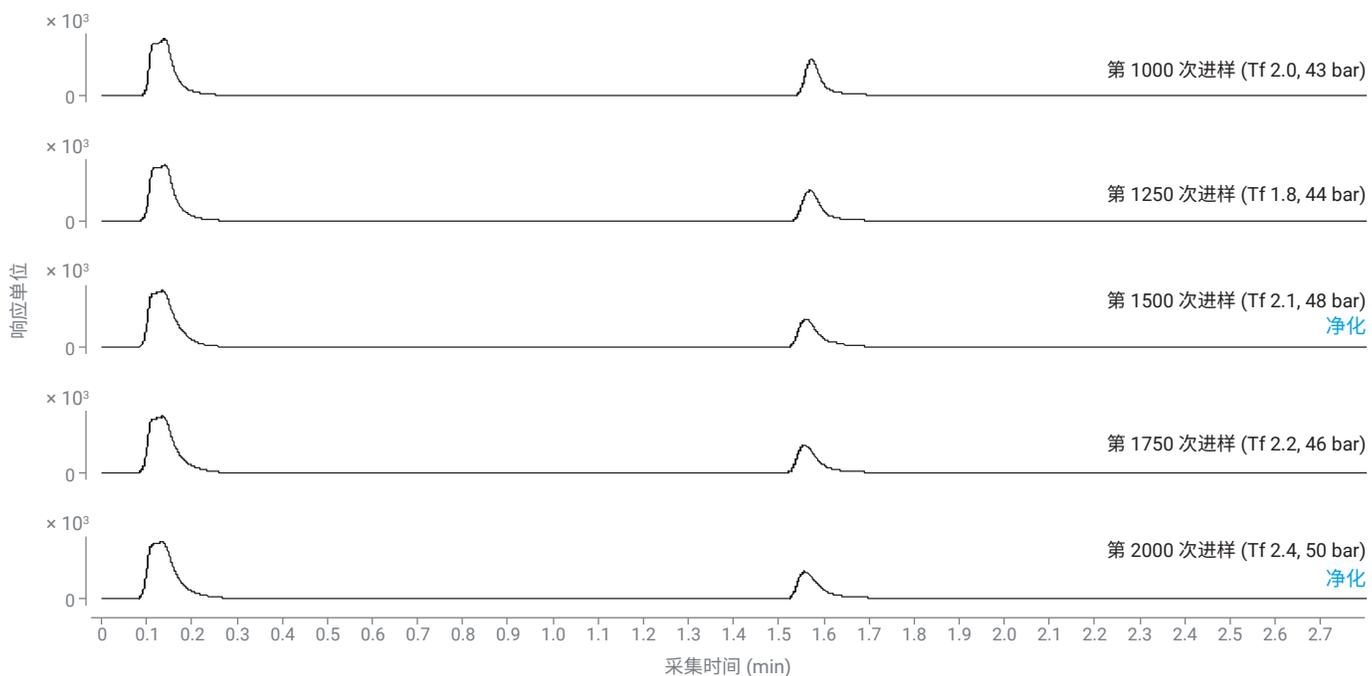


图 3. Agilent Bio-Monolith rProtein A 色谱柱寿命：第 1000 次进样至第 2000 次进样

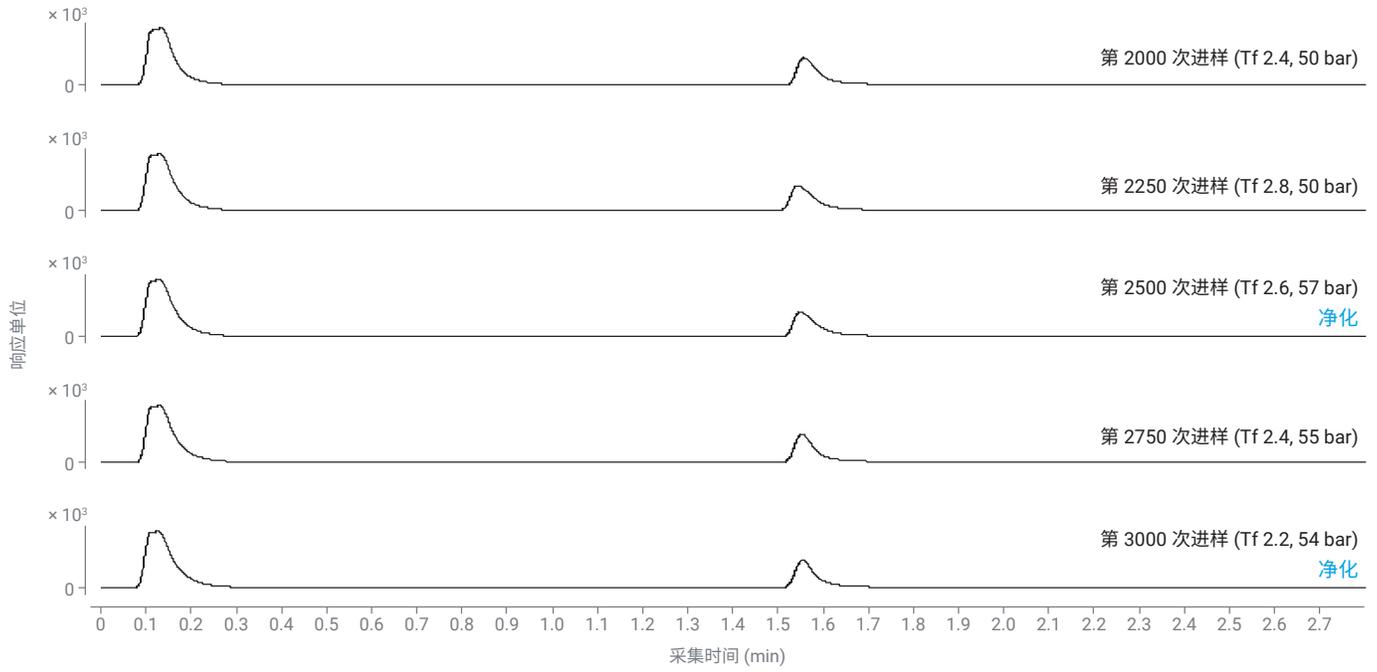


图 4. Agilent Bio-Monolith rProtein A 色谱柱寿命：第 2000 次进样至第 3000 次进样

表 1. 寿命范围内色谱柱压力与进样次数关系

N-糖	创新药物	生物仿制药
1	38.0	40.0
250	41.0	41.5
500	43.0	42.0
750	48.0	42.0
1000	-	43.0
1250	-	44.0
1500	-	48.0

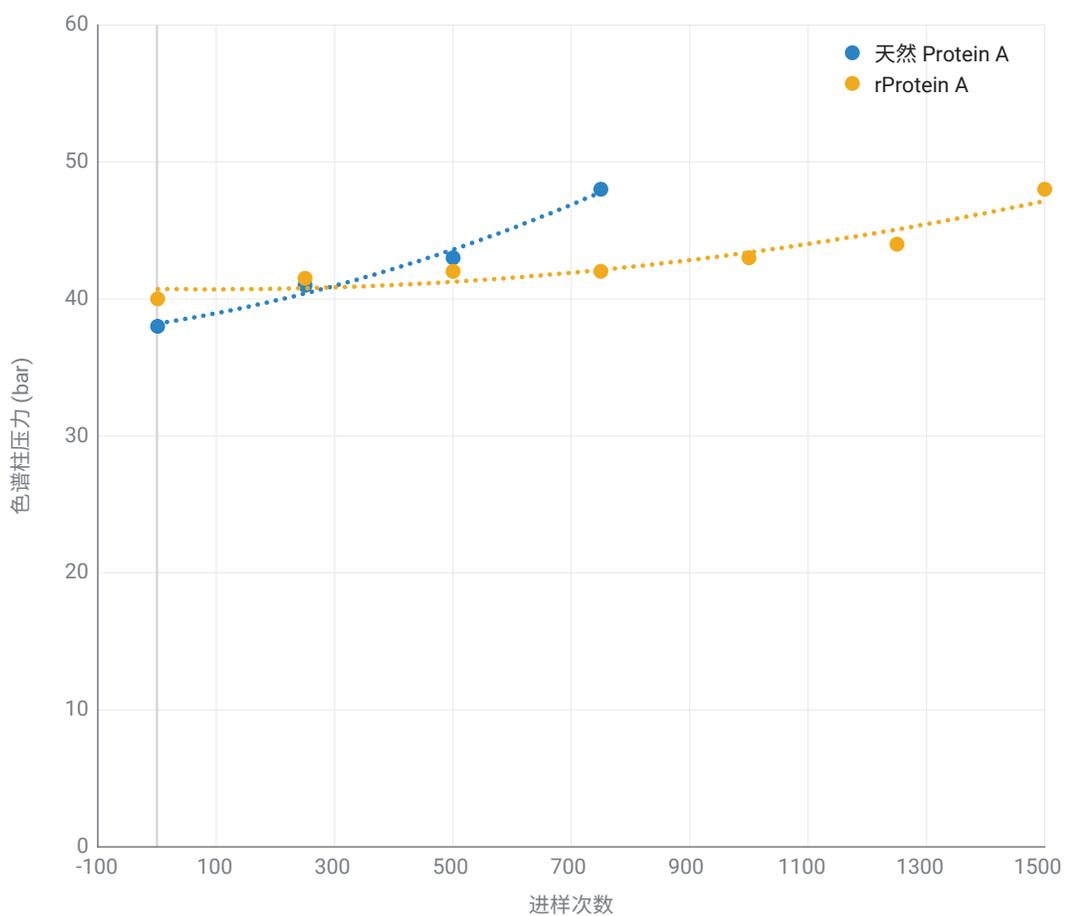


图 5. 寿命范围内色谱柱压力与进样次数关系

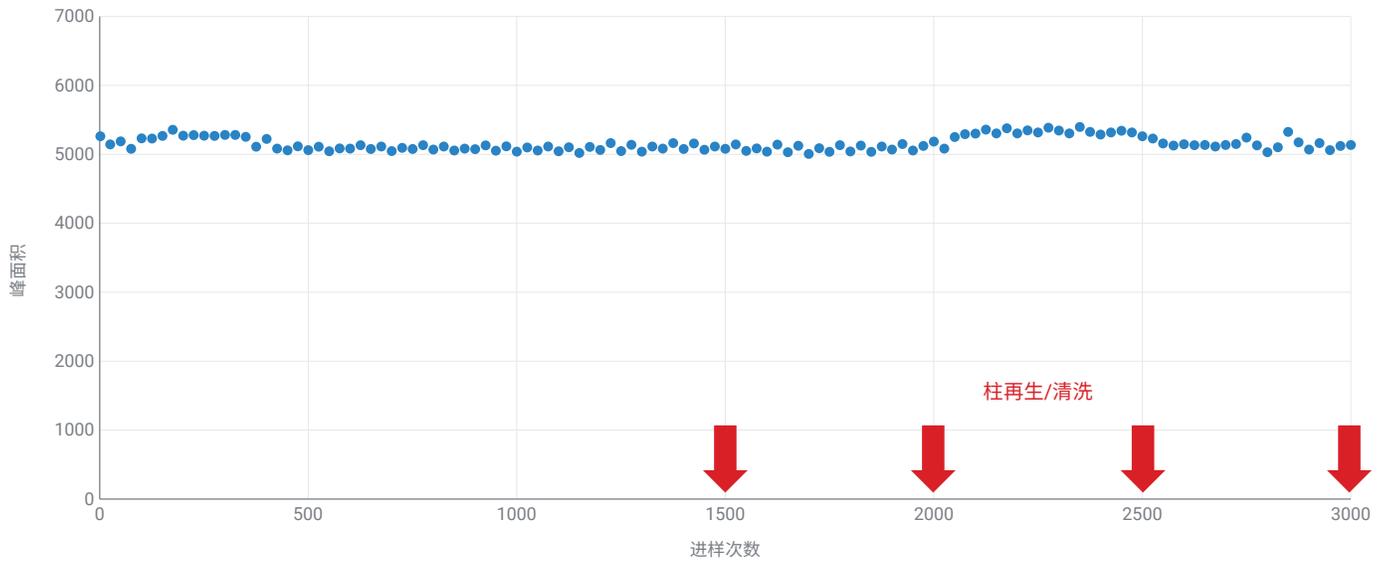


图 6. 色谱柱寿命范围内峰面积与进样次数关系

表 2. 色谱柱寿命范围内峰面积与进样量 (μg) 关系

数量 (μg)	初始	第 2000 次进样之后	第 3000 次进样之后
1	654	633	688
2	1363	1323	1308
5	2766	2984	2979
10	5526	5699	5666
15	7706	7653	7699
20	10541	10268	10347

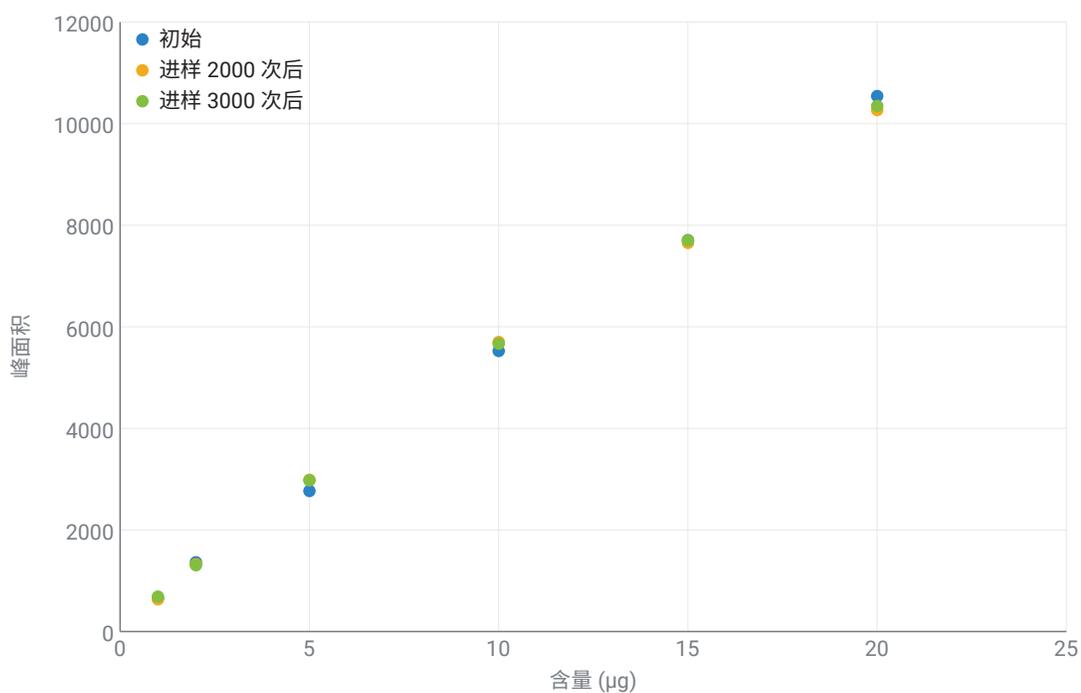


图 7. 色谱柱寿命范围内峰面积与进样次数关系

结论

本应用简报显示，Bio-Monolith rProtein A 色谱柱在滴度分析中的性能稳定可靠，超出了我们观察到的同等天然 Protein A 色谱柱的性能。

参考文献

1. Coffey, A.; Kondaveeti. 延长 Bio-Monolith Protein A 色谱柱在滴度测定中的使用寿命，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-2168ZHCN，2020

使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱和 LC/MS 进行细胞克隆选择

作者

Emmie Dumont,
Isabel Vandenheede,
Pat Sandra, Koen Sandra
色谱研究所 (RIC)

President Kennedypark 26
B-8500 Kortrijk, Belgium

James Martosella,
Phu Duong, Maureen Joseph
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了如何使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱测定中国仓鼠卵巢细胞培养上清液中的重组单克隆抗体滴度，以及如何使用该色谱柱富集 μg 级抗体，以便通过质谱进一步进行结构表征。该工作流程可为生物药物和生物仿制药开发中的克隆选择过程提供指导。

前言

当前，单克隆抗体 (mAb) 广泛应用于治疗危及生命的疾病，包括癌症和自身免疫性疾病。已经上市的单克隆抗体药物超过 30 种，其中 9 种成为了 2010 年的重磅炸弹级药物，2009 年的 10 种最畅销生物药物中有 5 种是单克隆抗体^[1]。目前，mAb 被认为是增长最快的一类治疗药物。由于未来几年这些畅销的 mAb 即将迎来市场开放（专利到期），导致相关生物仿制药的研发生产将呈现爆炸式增长。最早的 2013 年两种单克隆抗体生物仿制药首次获批，均含有相同的活性物质英夫利昔单抗^[2]。

无论是开发 mAb 创新药物还是生物仿制药，在开发过程的早期进行细致周密的克隆选择都至关重要。本应用简报介绍了 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱如何指导此过程。这种 HPLC 色谱柱由表面包覆金黄色葡萄球菌 Protein A 的聚(甲基丙烯酸缩水甘油酯-共聚-乙二醇二甲基丙烯酸酯) 高孔隙率整体载体组成。它结合了整体柱的优点（即快速高效的分离和极少的交叉污染）和 Protein A 受体对免疫球蛋白 G (IgG) Fc 区域的高选择性。因此，它是以高通量方式直接测定细胞培养上清液中 mAb 滴度和产量以及纯化足量 mAb 以供进一步分析测量（例如，通过质谱 (MS)、离子交换色谱 (IEX)、体积排阻色谱 (SEC) 或疏水相互作用色谱 (HIC) 进行测量）的理想工具。

我们展示了使用 Bio-Monolith Protein A 色谱柱基于滴度和结构特性选择产生曲妥珠单抗生物仿制药的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞克隆的过程。曲妥珠单抗于 1998 年上市，商品名为赫赛汀，目前仍广泛应用于 HER2 阳性乳腺癌的治疗^[3]。这种主要的生物治疗药物分别于 2014 年和 2018 年在欧洲和美国对市场开放。为了基于生物仿制药 mAb 滴度对克隆进行选择，我们利用赫赛汀原研药生成的校准曲线测定了绝对浓度。为评估结构特性并与原研药分子进行比较，我们使用 Protein A 色谱柱富集了足够分析量的 mAb，然后进行质谱分析。

实验部分

材料

乙腈、水和异丙醇购自 Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands)。柠檬酸、甲酸、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 和三(2-羧乙基)膦盐酸盐 (TCEP) 购自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)。人源化单克隆抗体曲妥珠单抗（商品名为赫赛汀）购自 Roche (Basel, Switzerland)。曲妥珠单抗生物仿制药 CHO 细胞培养上清液来自当地一家生物技术公司。

样品前处理

用流动相 A 稀释 21 mg/mL 的赫赛汀储备液以建立校准曲线。在 50 mmol/L Na_2HPO_4 中按 1:1 的比例稀释细胞上清液。进样之前，在 5000 g 下将上清液离心 5 分钟。加入 10 mmol/L TCEP，将收集的馏分在室温下还原 1 小时。

仪器

在下列仪器系统上使用 Bio-Monolith Protein A 进行测量：

- Agilent 1100 系列四元泵 (G1311A)
- Agilent 1100 系列自动进样器 (G1313A)
- Agilent 1100 系列二极管阵列检测器 (G1315A)
- Agilent 1200 Infinity 系列分析型馏分收集器 (G1364C)

在下列仪器系统上进行 LC/MS 测量：

Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱系统，配备：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220B)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 恒温箱 (G1330B)
- Agilent 6540 超高分辨率 (UHD) 精确质量 Q-TOF，配备安捷伦喷射流 LC/MS (G6540A)

软件

- 安捷伦科技公司 OpenLAB CDS ChemStation 修订版 C01.05 (35)
- 安捷伦科技公司 MassHunter 仪器控制软件 (B05.01)
- 安捷伦科技公司 MassHunter 数据分析软件 (B06.00)
- 安捷伦科技公司用于 MassHunter 的 BioConfirm 软件 (B06.00)

Bio-Monolith 色谱柱条件

参数	值								
色谱柱:	Agilent Bio-Monolith Protein A (部件号 5069-3639)								
流动相:	A) 50 mmol/L 磷酸盐, pH 7.4 B) 100 mmol/L 柠檬酸, pH 2.8								
梯度:	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>%B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0-0.5</td><td>0 (结合)</td></tr><tr><td>0.6-1.7</td><td>100 (洗脱)</td></tr><tr><td>1.8-3.5</td><td>0 (再生)</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	%B	0-0.5	0 (结合)	0.6-1.7	100 (洗脱)	1.8-3.5	0 (再生)
时间 (min)	%B								
0-0.5	0 (结合)								
0.6-1.7	100 (洗脱)								
1.8-3.5	0 (再生)								
流速:	1 mL/min								
进样量:	50 μ L								
检测:	UV 280 nm								
馏分收集:	基于时间								

LC/MS 条件

参数	值														
小柱:	在线脱盐小柱, 2.1 \times 10 mm														
流动相:	A) 0.1% 甲酸水溶液 (v:v) B) 0.1% 甲酸的乙腈溶液 (v:v)														
流速:	400 μ L/min														
进样量:	可变 (对应于 1 μ g 的蛋白质质量)														
针头清洗溶剂:	60% 乙腈, 35% 水, 5% 异丙醇														
自动进样器温度:	7 $^{\circ}$ C														
梯度:	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>%B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>5</td></tr><tr><td>0.5</td><td>5</td></tr><tr><td>2</td><td>80.0</td></tr><tr><td>3</td><td>80.0</td></tr><tr><td>3.10</td><td>5</td></tr><tr><td>5</td><td>5</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	%B	0	5	0.5	5	2	80.0	3	80.0	3.10	5	5	5
时间 (min)	%B														
0	5														
0.5	5														
2	80.0														
3	80.0														
3.10	5														
5	5														
Q-TOF 离子源:	安捷伦喷射流离子源, 正离子模式														
干燥气温度:	300 $^{\circ}$ C														
干燥气流速:	8 L/min														
干燥气流速:	35 psig														
雾化器压力:	350 $^{\circ}$ C														
鞘气温度:	11 L/min														
喷嘴电压:	1000 V														
毛细管电压:	3500 V														
碎裂电压:	200 V														
Q-TOF 检测:	质量数范围 3200 amu														
数据采集范围:	500-3200 m/z														
高分辨率模式	(4 GHz)														
数据采集速率: 模式	每秒 1 幅谱图														
曲线采集:															
分流阀:	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>流向</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>废液</td></tr><tr><td>1</td><td>MS</td></tr><tr><td>3.5</td><td>废液</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	流向	0	废液	1	MS	3.5	废液						
时间 (min)	流向														
0	废液														
1	MS														
3.5	废液														

结果与讨论

通过测定曲妥珠单抗滴度进行克隆选择

图 1 展示了特定的产生曲妥珠单抗的克隆的上清液与赫赛汀原研药的 Protein A 色谱图叠加。未结合的物质在流通中被洗脱，而 mAb 仅在降低 pH 后才释放出来。就原研药而言，未观察到任何物质的流穿峰，这一结果并不意外，因为它属于上市产品。就上清液而言，可以看到由未结合的物质产生的显著信号。

图 2 展示了在生物仿制药开发计划框架中得到的 12 种产生曲妥珠单抗的克隆的 Protein A 色谱图叠加。从这些色谱图中，已经能够区分低产量克隆和高产量克隆。可以通过峰面积和由稀释的赫赛汀原研药建立的外部校准曲线计算绝对 mAb 浓度。

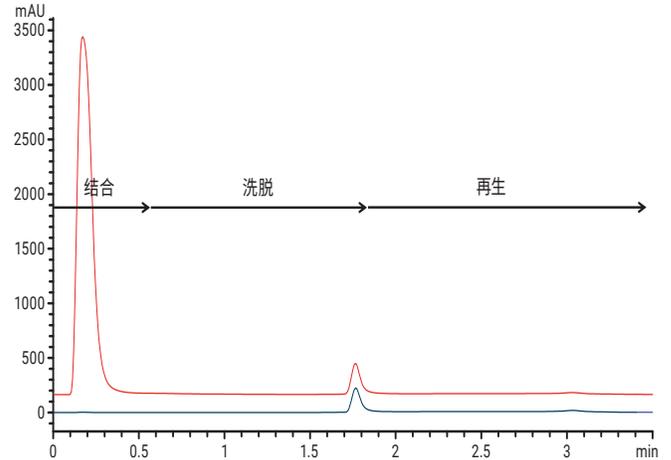


图 1. 产生曲妥珠单抗的 CHO 克隆（克隆 9，红色）以及用 50 mmol/L 磷酸钠 (pH 7.4) 稀释至 0.2 mg/mL 的赫赛汀原研药（蓝色）的 UV 280 nm Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱图。请注意，用磷酸盐缓冲液按 1:1 的比例对上清液进行稀释。

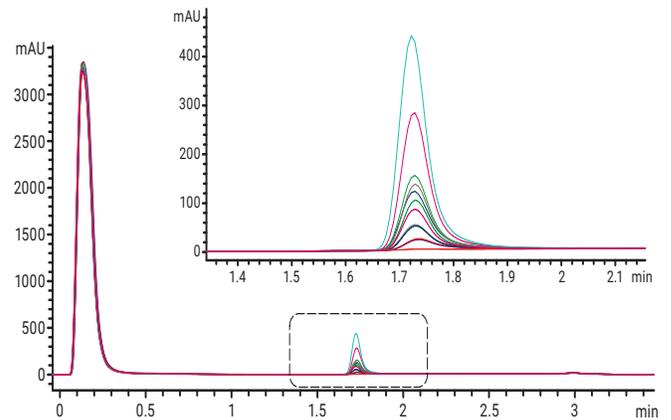


图 2. 12 种产生曲妥珠单抗的 CHO 克隆的 UV 280 nm Agilent Bio-Monolith Protein A 叠加色谱图

赫赛汀的校准曲线及校准点对应的色谱图分别如图 3 和图 4 所示。在 0.02–2 mg/mL 范围内获得了良好的线性，该浓度范围是 CHO 细胞中的典型 mAb 滴度范围。获得的 mAb 滴度如表 1 所示并以图形方式展示于图 5 中。根据这些结果，可以为进一步的生物仿制药开发制定明确的决策，即，可轻松选择高产量克隆 9 和 10 并对其进行亚克隆。通过峰面积和由稀释的赫赛汀原研药建立的外部校准曲线，表 1 还展示了在两种不同的细胞培养基中培养 CHO 克隆时获得的滴度，并清晰展示出两种培养基相互之间的优劣。

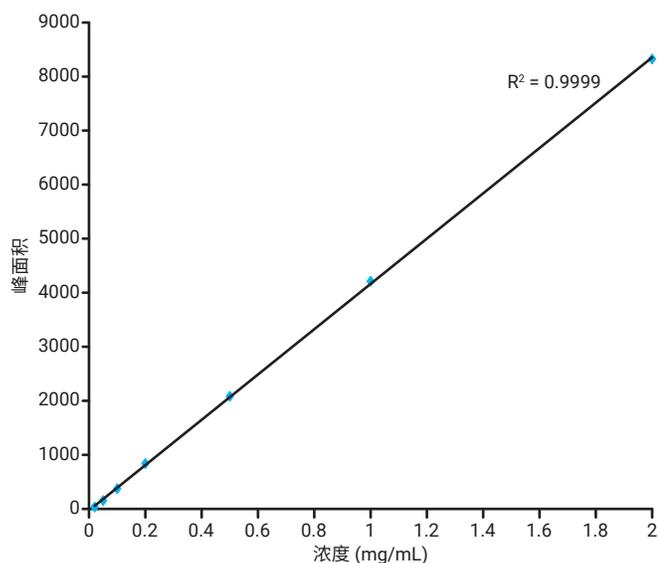


图 3. 赫赛汀 Agilent Bio-Monolith Protein A 校准曲线，校准浓度范围 0.02–2 mg/mL

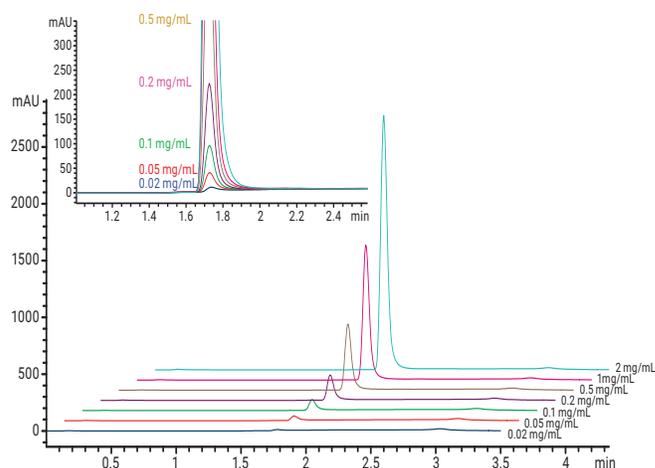


图 4. 赫赛汀校准点的 UV 280 nm Agilent Bio-Monolith Protein A 叠加色谱图

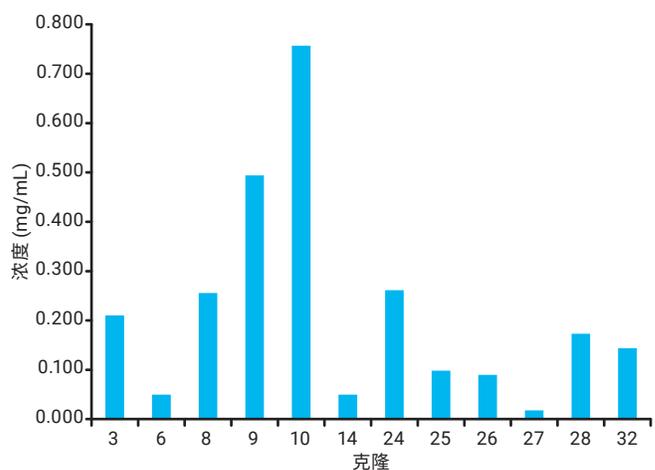


图 5. 以图形方式展示不同曲妥珠单抗 CHO 克隆中的生物仿制药 mAb 滴度，以 mg/mL 表示

表 1. 在两种不同培养基中培养的不同 CHO 克隆中测得的曲妥珠单抗生物仿制药绝对浓度

CHO 克隆 培养基 A	浓度 (mg/mL)	CHO 克隆 培养基 B	浓度 (mg/mL)
3	0.156	3	0.210
6	0.048	6	0.050
8	0.155	8	0.256
9	0.215	9	0.494
10	0.311	10	0.757
14	0.038	14	0.050
24	0.082	24	0.262
25	0.049	25	0.098
26	0.037	26	0.090
27	-	27	0.018
28	0.117	28	0.173
32	0.156	32	0.144

通过评估结构特性进行克隆选择

在 mAb 滴度评估之后，克隆选择的第二项重要标准基于结构方面。对于生物仿制药开发来说，仿制药的结构应当与原研药产品高度相似，并且保持在原研药批次间差异的范围内。因此，我们收集 Protein A 馏分后将二硫键还原得到轻链和重链，再通过高分辨率质谱进行分析。这一方法可用于验证氨基酸序列并揭示糖基化模式。

为了能够在包含酸性缓冲液的收集瓶中直接还原 mAb，选择 TCEP 替代更常用的还原剂二硫苏糖醇 (DTT)。前者能够在宽 pH 范围（包括低 pH 值）内进行还原，而后的还原能力仅限于高于 7 的 pH 值。在线脱盐后，将还原后的馏分输送至质谱系统。图 6 和图 7 展示了赫赛汀原研药和两种产生曲妥珠单抗生物仿制药的高产量克隆的解卷积轻链和重链质谱图。

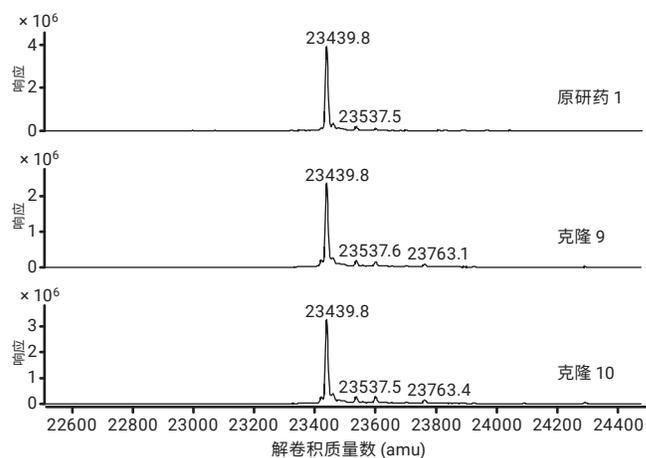


图 6. 赫赛汀原研药和两种产生曲妥珠单抗的克隆的解卷积轻链质谱图

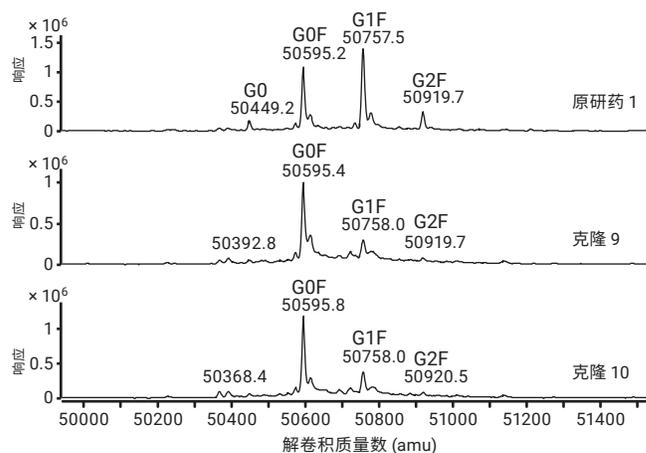


图 7. 赫赛汀原研药和两种产生曲妥珠单抗的克隆的解卷积重链质谱图。缩写 G0、G0F、G1 和 G2F 是指与 mAb 骨架连接的 N-糖

表 2 和表 3 展示了在四个原研药生产批次和 12 种曲妥珠单抗克隆中测得的 MW 值和主要糖型的相对强度。由此可以得出结论，赫赛汀原研药和克隆产生的曲妥珠单抗显示出相同的轻链和重链分子量。

此外，在原研药和克隆产生的 mAb 的重链上观察到相同的复合型 N-糖。

根据美国 and 欧洲监管机构的要求（一级结构应当相同，并且应保留糖基化），这些特点被视为生物相似性的最重要属性。虽然从定性角度来看，具有相似的糖基化，但从定量角度来看仍具有差异。一份单独的应用简报介绍了如何使用 Protein A Bio-Monolith 色谱柱分析通过调节生长培养基以使糖基化符合原研药指标要求^[4]。

表 2. 在原研药和曲妥珠单抗克隆中测得的轻链和重链 MW 值

MW (Da)	原研药 1	原研药 2	原研药 3	原研药 4	克隆 3	克隆 6
轻链	23439.8	23439.8	23439.8	23439.8	23439.8	23440.2
重链 *	49149.9	49150.2	49150.1	49150.1	49150.5	49151.0

MW (Da)	原研药 8	原研药 9	原研药 10	原研药 14	克隆 24	克隆 25
轻链	23439.8	23439.8	23439.8	23439.9	23439.8	23439.9
重链 *	49150.6	49150.1	49150.5	49150.2	49150.6	49151.1

MW (Da)	原研药 26	原研药 27	原研药 28	原研药 32
轻链	23440.0	23441.4	23439.8	23439.9
重链 *	49150.9	49151.9	49150.7	49150.9

* 去糖基化后的理论 MW 值

表 3. 四个原研药生产批次和曲妥珠单抗克隆中的主要糖型的相对强度

糖型	原研药 1	原研药 2	原研药 3	原研药 4	克隆 3	克隆 6
% Man 5	1.6	1.6	1.3	1.1	2.7	1.6
% G0F-GlcNAc	1.5	2.7	3.3	2.4	3.2	3.2
% G0	5.7	5.9	5.0	4.9	2.8	3.3
% G0F	35.2	44.8	50.5	48.2	66.1	56.2
% G1F	45.2	38.4	34.0	36.8	20.6	27.7
% G2F	10.7	6.6	5.9	6.7	4.7	8.1

糖型	克隆 8	克隆 9	克隆 10	克隆 14	克隆 24	克隆 25
% Man 5	2.6	3.3	5.0	1.2	1.9	5.1
% G0F-GlcNAc	3.8	4.8	4.6	2.1	3.6	4.2
% G0	1.7	2.9	2.9	3.9	2.2	2.3
% G0F	69.9	66.1	64.1	64.6	68.6	60.7
% G1F	18.4	18.5	19.5	22.9	19.4	20.9
% G2F	3.6	4.3	3.8	5.3	4.3	6.7

糖型	克隆 26	克隆 27	克隆 28	克隆 32
% Man 5	5.4	0.0	1.5	3.1
% G0F-GlcNAc	5.8	0.0	2.9	4.3
% G0	1.8	0.0	1.2	2.7
% G0F	61.6	67.2	61.6	64.3
% G1F	19.5	32.8	26.3	20.3
% G2F	5.8	0.0	6.5	5.3

结论

Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱成功应用于基于滴度以及与原研药的结构相似性来选择产生曲妥珠单抗生物仿制药的克隆。在 mAb 创新药物与生物仿制药开发的早期，这一克隆选择过程至关重要。

参考文献

1. K. Sandra, I. Vandenneede, P. Sandra. *J. Chromatogr. A.*, **1335**, 81 (2014)
2. www.ema.europa.eu
3. www.gene.com
4. E. Dumont, et al., Cell Culture Optimization Using an Agilent Bio-Monolith Protein A Column and LC/MS (使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱和 LC/MS 进行的细胞培养优化), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-5124EN (2014)

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱进行 mAb 滴度分析

作者

Emmie Dumont, Isabel Vandeneede, Pat Sandra 和 Koen Sandra

色谱研究所 (RIC)

President Kennedypark 26
B-8500 Kortrijk, Belgium

James Martosella, Phu Duong 和 Maureen Joseph
安捷伦科技有限公司

摘要

单克隆抗体 (mAb) 在多种疾病的治疗中变得越来越重要。在重组 mAb 的开发过程中，必须对各种细胞培养上清液中的蛋白质滴度和产量进行监测。本应用简报介绍了如何成功应用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱来测定 mAb 浓度。

前言

来自金黄色葡萄球菌的 Protein A 对免疫球蛋白 (IgG) 的 Fc 结构域具有极强的亲和性，能够从复杂基质（例如细胞培养上清液）中对其进行捕获。使用 Protein A 的亲亲和色谱是治疗性单克隆抗体 (mAb) 纯化的金标准，通常代表下游处理中的第一个色谱步骤。Protein A 色谱在这一大规模纯化之外也可用于其他应用。在分析型应用中，它在 mAb 的开发早期用于以高通量方式直接测定细胞培养上清液中的 mAb 滴度和产量，以及纯化 μg 级材料以供进一步测量，例如，通过质谱 (MS)、离子交换色谱 (IEX)、体积排阻色谱 (SEC) 或疏水相互作用色谱 (HIC) 进行测量。

本应用简报介绍了 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱在 mAb 滴度分析中的应用。该 HPLC 色谱柱 (图 1) 的内径为 5.2 mm, 柱长为 4.95 mm, 由高度交联的聚(甲基丙烯酸缩水甘油酯-共聚-乙二醇二甲丙烯酸酯) 一体式膜盘组成, 该多孔膜盘表面覆盖有来自金黄色葡萄球菌的天然 Protein A。其整体性特征表现在具有 1200–1500 nm 的均匀通道, 而不是孔和空洞, 从而可提供快速高效的分离, 基本不存在交叉污染并具有优异稳定性。这些功能使其非常适合用于 mAb 滴度分析, 能够成功指导克隆选择和细胞培养基优化。我们展示了使用该色谱柱测定中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞培养上清液中 mAb 绝对浓度的最佳实践。利用曲妥珠单抗生物仿制药项目的数据进行说明。曲妥珠单抗于 1998 年上市, 商品名为赫赛汀, 用于治疗 HER2 阳性乳腺癌, 其在欧洲的专利期于 2014 年到期, 在美国的专利期于 2018 年到期。

实验部分

材料

水来自 Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands)。柠檬酸、乙酸、 NaH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 购自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)。人源化单克隆抗体曲妥珠单抗 (商品名为赫赛汀) 购自 Roche (Basel, Switzerland)。曲妥珠单抗生物仿制药 CHO 细胞培养上清液来自当地一家生物技术公司。

样品前处理

进样之前, 用流动相 A 稀释 21 mg/mL 的赫赛汀储备液。在 50 mmol/L Na_2HPO_4 中按 1:1 的比例稀释细胞上清液。进样之前, 在 5000 g 下将上清液离心 5 分钟。

仪器

在下列仪器系统上使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 进行测量:

- Agilent 1100 系列四元泵 (G1311A)
- Agilent 1100 系列自动进样器 (G1313A)
- Agilent 1100 系列二极管阵列检测器 (G1315A)

软件

- 安捷伦科技公司 OpenLAB CDS ChemStation 修订版 C01.05 (35)

Bio-Monolith 色谱柱条件

参数	值								
色谱柱:	Agilent Bio-Monolith Protein A (部件号 5069-3639)								
流动相:	A) 50 mmol/L 磷酸盐, pH 7.4 B) 100 mmol/L 柠檬酸, pH 2.8, 500 mmol/L 乙酸, pH 2.6								
梯度:	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0–0.5</td> <td>0 (结合)</td> </tr> <tr> <td>0.6–1.7</td> <td>100 (洗脱)</td> </tr> <tr> <td>1.8–3.5</td> <td>0 (再生)</td> </tr> </tbody> </table>	时间 (min)	%B	0–0.5	0 (结合)	0.6–1.7	100 (洗脱)	1.8–3.5	0 (再生)
时间 (min)	%B								
0–0.5	0 (结合)								
0.6–1.7	100 (洗脱)								
1.8–3.5	0 (再生)								
流速:	1 mL/min								
进样量:	可变 (50 μL , 针对 CHO 细胞培养上清液进行优化)								
检测:	UV 280 nm								

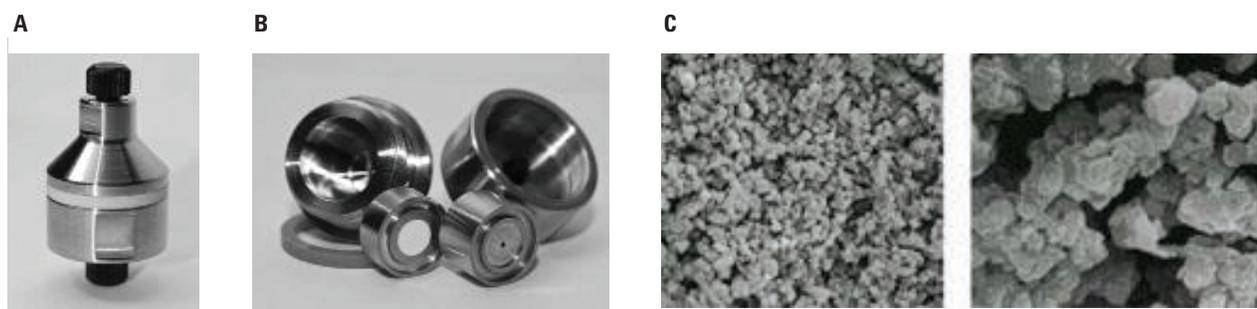


图 1. 产生曲妥珠单抗的 CHO 克隆 (克隆 9, 红色) 以及用 50 mmol/L 磷酸钠 (pH 7.4) 稀释至 0.2 mg/mL 的赫赛汀原研药 (蓝色) 的 UV 280 nm Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱图。请注意, 用磷酸盐缓冲液按 1:1 的比例对上清液进行稀释

结果与讨论

缓冲液选择

图 2 展示了由 Protein A 色谱柱得到的典型色谱图。示例色谱图由特定的产生曲妥珠单抗的 CHO 克隆的上清液进样一次得到。未结合的物质在流通中被洗脱，而 mAb 在中性 pH 条件下得到保留（结合），并且仅在应用阶梯梯度降低 pH 后才释放出来。在这种情况下，利用 pH 为 7.4 的 50 mmol/L 磷酸钠进行结合/上样，并利用 pH 为 2.8 的 100 mmol/L 柠檬酸进行洗脱。这是适合任何应用的良好起始条件。

在针对 Protein A 色谱柱开发新方法时，应对结合缓冲液和洗脱缓冲液进行优化。对于结合缓冲液，pH 为 7.4 的 50 mmol/L 磷酸钠是一个不错的选择，且 pH 可优化至介于 7 和 8 之间。对于洗脱缓冲液，此处所用的 100 mmol/L 柠檬酸是一个不错的选择。其他可能使用的洗脱缓冲液是 pH 为 2.6 的 500 mmol/L 乙酸、pH 为 2.8 的 100 mmol/L 甘氨酸盐酸盐和 pH 为 1.9 的 12 mmol/L HCl。

图 3 比较了乙酸和柠檬酸对赫赛汀原研药的洗脱效果。尽管使用柠檬酸获得了稍微更尖锐的峰，但是二者观察到的峰形和峰面积非常相似。就这种赫赛汀原研药而言，未观察到任何物质的流穿峰，这一结果并不意外，因为它属于上市产品，不含宿主细胞蛋白质。在所示的色谱图中，流速设置为 1 mL/min。整体性载体的特征在于依靠对流传质而非扩散传质，并且几乎不受流速影响，因而可实现高通量分离。这非常适用于 mAb 滴度测定，因为 mAb 滴度测定中通常需要处理大量样品。可应用于色谱柱的最大流速为 2 mL/min，这一流速可实现 2 分钟内的快速分离。

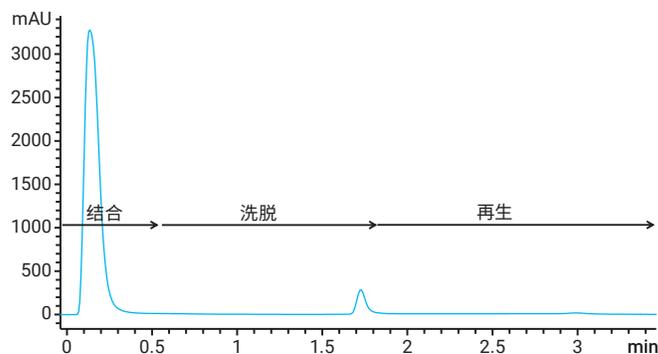


图 2. 产生曲妥珠单抗的 CHO 克隆的上清液的 UV 280 nm Protein A 色谱图。进样量为 50 μ L。未结合物质的半峰宽为 0.10 分钟，保留的 mAb 的半峰宽为 0.06 分钟

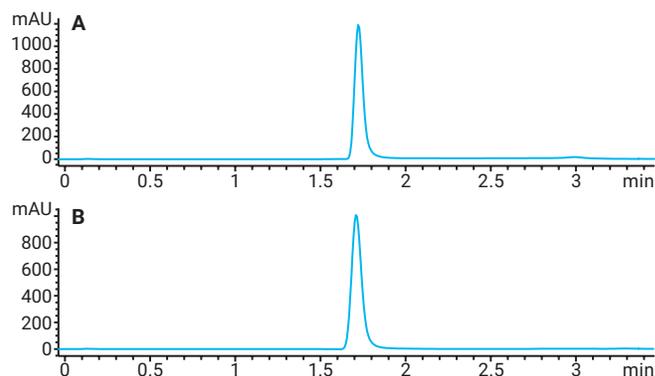


图 3. 用 50 mmol/L 磷酸钠 (pH 7.4) 稀释至 0.5 mg/mL 的赫赛汀原研药的 UV 280 nm Protein A 色谱图 (进样量 50 μ L, 上样量 25 μ g)。使用柠檬酸 (A) 和乙酸 (B) 进行洗脱。采用柠檬酸和乙酸洗脱时，半峰宽分别为 0.057 分钟和 0.067 分钟

精密度、线性、残留和进样量

精密度对于 mAb 滴度测定至关重要。表 1 展示了赫赛汀原研药进样 10 次通常可得到的峰面积和保留时间重现性。色谱图如图 4 所示。采用柠檬酸和乙酸作为洗脱缓冲液时，均获得了优异的相对标准偏差 (RSD) 值。通过在 mAb 进样序列后进样缓冲液空白来同时评估残留 (图 5)。在 10 倍色谱柱上样量 (5 μg) 下，几乎观察不到残留，这可以再次归因于整体载体的使用。当色谱柱上的单次 mAb 载样量达到 500 μg 时，可明显观察到 1% 的残留。这代表色谱柱的最大上样量，在实际实验中通常不会遇到。值得注意的是，在第二次进样缓冲液空白后该残留得到消除。

表 1. 对浓度为 0.5 mg/mL 的赫赛汀原研药重复分析 10 次 (进样量 5 μL)，获得的保留时间和峰面积 RSD 值

	乙酸		柠檬酸	
	峰面积	RT (min)	峰面积	RT (min)
1	361	1.669	383	1.666
2	362	1.668	372	1.666
3	373	1.668	365	1.665
4	365	1.669	389	1.667
5	370	1.669	383	1.666
6	373	1.669	378	1.666
7	367	1.671	379	1.678
8	365	1.668	377	1.666
9	366	1.670	376	1.667
10	360	1.670	377	1.667
平均值	366	1.669	378	1.667
S	4.64	0.001	6.52	0.001
% RSD	1.27	0.06	1.73	0.06

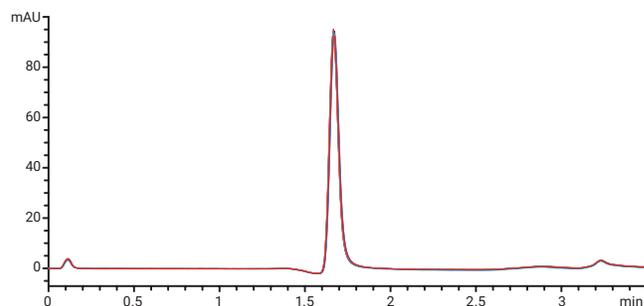


图 4. 用 50 mmol/L 磷酸钠 (pH 7.4) 稀释至 0.5 mg/mL 的赫赛汀原研药的重复测定 (n = 10) UV 280 nm Protein A 色谱图 (进样量 5 μL)。使用乙酸实现洗脱

检测限 (LOD) 接近色谱柱上样量 0.5 μg 。这对进样量提出了一些要求。如果样品具有较低的 mAb 浓度，则需要采用较高的进样量。图 6 展示了将 1 mg/mL 赫赛汀原研药的进样量从 5 μL 提高至 50 μL 所获得的线性。可以看出 50 μL 的进样量完全可行并且可检出的最低柱上量为 0.5 μg ，mAb 浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品即可满足该要求。

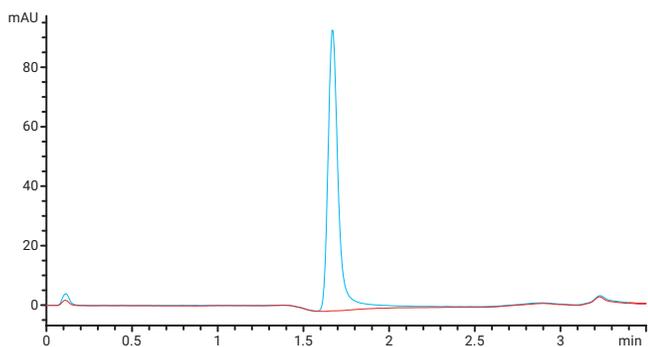


图 5. 用 50 mmol/L 磷酸钠 (pH 7.4) 稀释至 0.5 mg/mL 的赫赛汀原研药的 UV 280 nm Protein A 色谱图，以及在赫赛汀进样 10 次后分析的空白缓冲液。使用乙酸实现洗脱，且进样量为 5 μL 。

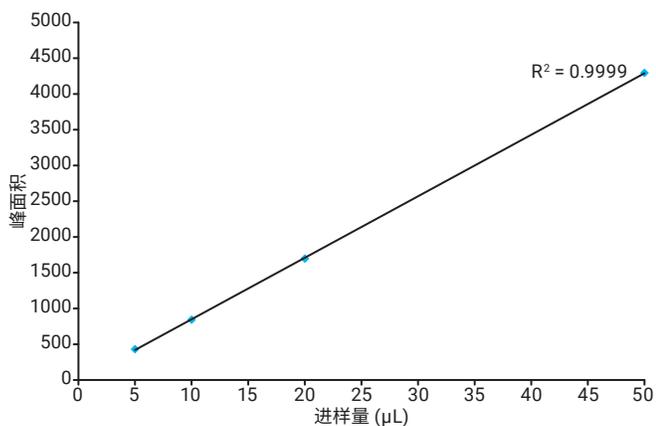


图 6. 将赫赛汀原研药 (0.5 mg/mL) 的进样量从 5 μL 提高至 50 μL 所获得的线性

在 mAb 滴度测定中，评估 mAb 绝对浓度至关重要。可通过细胞培养上清液中测得的峰面积和利用稀释的 mAb 标准品建立的外部校准曲线来计算 mAb 绝对浓度。对于赫赛汀生物仿制药项目来说，原研药产品中已采用了这一标准，原研药产品准确配制成 21 mg/mL。使用柠檬酸和乙酸作为洗脱缓冲液时，赫赛汀原研药一系列稀释溶液的校准曲线如图 7 所示。对应的色谱图如图 8 所示。在两种情况下，在 0.02 mg/mL 至 2 mg/mL 范围内均获得了优异的线性，该浓度范围为 CHO 细胞中常见的 mAb 滴度范围。

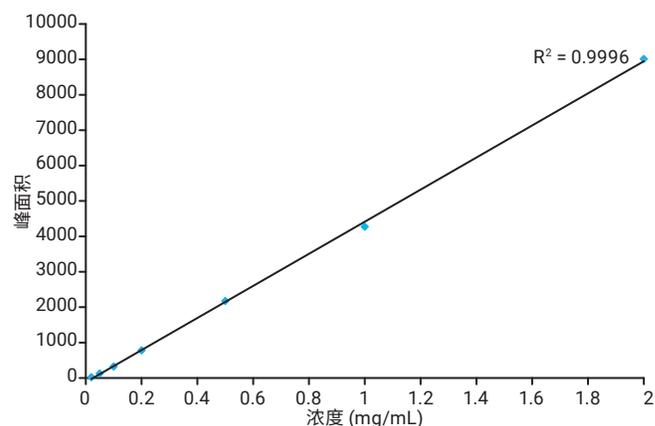
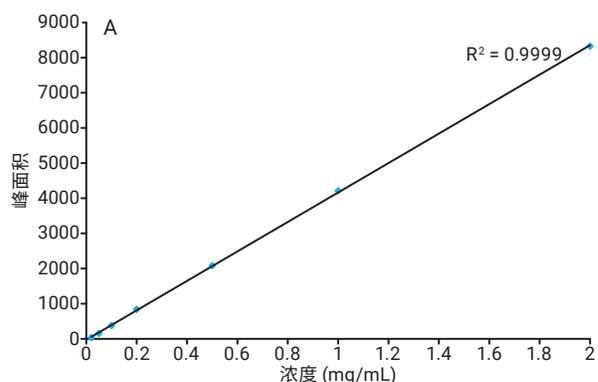


图 7. 使用柠檬酸 (A) 和乙酸 (B) 作为洗脱缓冲液得到的赫赛汀 Protein A 校准曲线 (0.02–2 mg/mL)

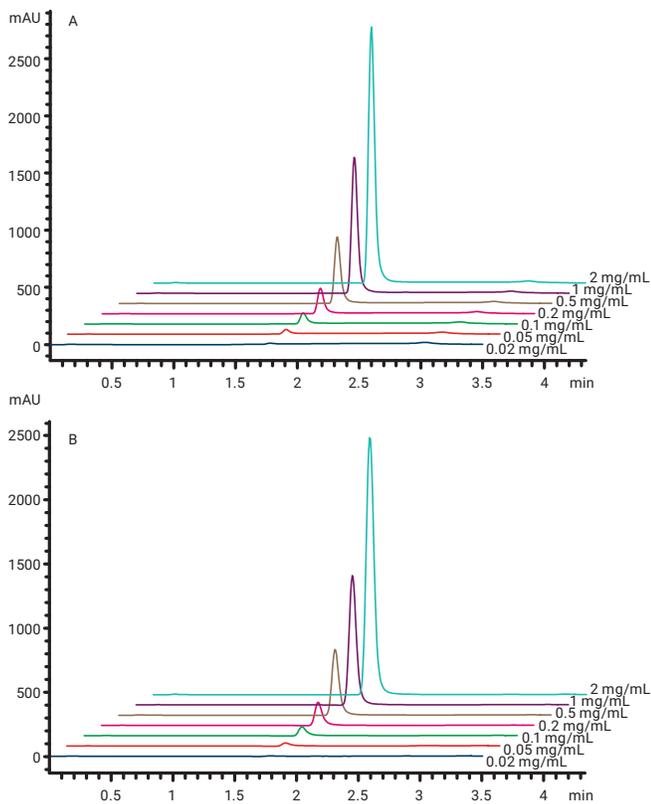


图 8. 使用柠檬酸 (A) 和乙酸 (B) 作为洗脱缓冲液得到的赫赛汀校准点的 UV 280 nm Protein A 叠加色谱图

在 mAb 滴度测定中的应用

该方法具有测定细胞培养上清液中 mAb 滴度所需的所有特性。它在预期的 mAb 浓度范围内可实现快速测定，结果准确且线性好，并且不受残留的影响。为说明这一点，使用 Bio-Monolith Protein A 色谱柱分析赫赛汀生物仿制药开发计划框架中所获得的 9 种产生曲妥珠单抗的克隆，以测定 mAb 绝对浓度。色谱图如图 9 所示，并且表 2 列出了使用柠檬酸和乙酸作为洗脱缓冲液所获得的 mAb 滴度。使用两种洗脱缓冲液获得了非常一致的数据。这些结果支持在 mAb 的开发过程中及早制定明确的决策。可轻松选择出高产量克隆并进行进一步开发。

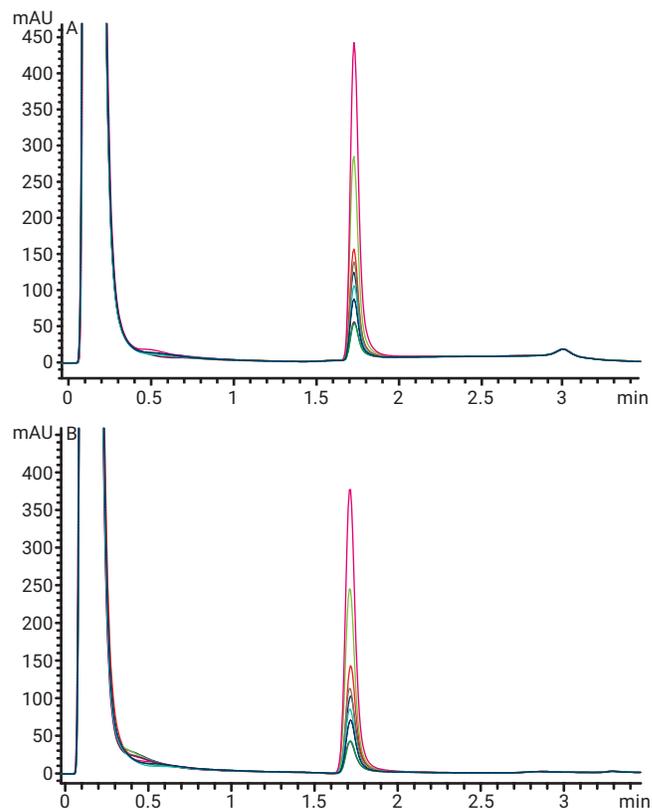


图 9. 使用柠檬酸 (A) 和乙酸 (B) 作为洗脱缓冲液得到的九种产生曲妥珠单抗的 CHO 克隆的 UV 280 nm Protein A 叠加色谱图

大幅延长色谱柱寿命

色谱柱再生

使用一体式膜盘的主要优点在于，其具有的通道而非孔可以降低细胞培养样品进样时色谱柱堵塞的可能性。这样提高了稳定性并减少了清洗工作。通过在每 30–50 个样品后运行空白梯度进样，可减小色谱柱污染。如果观察到色谱柱劣化（拖尾峰或宽峰），建议采用以下清洗程序。第一步是色谱柱再生。如果性能仍然无法达到理想状态，可使用原位清洗程序，这样将减少可用的 Protein A 的量。

色谱柱再生

1. 用 2 mL（色谱柱体积 (CV) 的 20 倍）的 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 + 1 mol/L NaCl (pH 7–8) 在 0.5–1.0 mL/min 的流速下进行清洗
2. 用 2 mL（20 倍 CV）的低 pH 溶液（例如洗脱缓冲液）进行清洗
3. 用结合缓冲液重新平衡色谱柱

原位清洗

1. 用 1–2 mL（10–20 倍 CV）的 0.1 mol/L NaOH 在 0.2–0.5 mL/min 的流速下进行清洗（反向冲洗）
2. 用 1–2 mL（10–20 倍 CV）的去离子水在 0.5–1.0 mL/min 的流速下进行清洗
3. 用 1–2 mL（10–20 倍 CV）浓缩缓冲液 (0.1–0.5 mol/L) 清洗以恢复正常 pH (7.0–7.4)
4. 用 5 mL (50 CV) 结合缓冲液重新平衡色谱柱

结论

Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱成功应用于基于滴度以及与原研药的结构相似性来选择产生曲妥珠单抗生物仿制药的克隆。在 mAb 创新药物与生物仿制药开发的早期，这一克隆选择过程至关重要

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

更多应用简报

出版号	标题
5991-2990CHCN	采用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱监测细胞培养液中的单克隆抗体滴度
5991-4723EN	使用 Agilent Bio-Monolith Protein A HPLC 色谱柱缩短定量分析人 IgG 的分析周期
5991-5125EN	使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱和 LC/MS 进行的细胞培养优化
5991-6094ZHCN	Bio-Monolith Protein G 色谱柱 — 更多 mAb 滴度测定选择

其他信息

Agilent Bio-Monolith 色谱柱还提供离子交换形式。

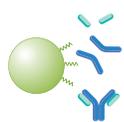
完整蛋白质和亚基纯度

背景

反相色谱仍然是色谱工作者“武器库”中最有价值的工具之一。这是一种广为人知的技术，依赖于分析物和固定相之间的疏水相互作用。对于完整蛋白质，该技术使用有机溶剂梯度作为流动相，通常使用离子对试剂。在这些条件下，分子很可能发生变性。这是一种灵敏的分析技术，因为样品保留在色谱柱上得到浓缩，且适用于质谱分析。因此，该技术适用于测定完整蛋白质的精确质量。

对于大分子蛋白质（例如单克隆抗体），甚至对于较小的片段（例如重链和轻链或 IgG 分子的 Fab 和 Fc 区域），推荐使用大孔径色谱柱。安捷伦提供多种配置的 300 Å 和 450 Å 产品，包括全多孔、采用表面多孔颗粒的 Poroshell 技术以及一系列烷基键合相。键合相通常具有较短的碳链长度（C8 或 C4/C3）或具有更多独特的配体，例如可提供不同选择性的二苯基。

由于反相色谱分析准确度高，因此可以使用完整蛋白质和片段分析来比较生物治疗药物的生物仿制药与原研药。然而，始终需要执行额外的测试以鉴定可能检出的不同异构体的具体位置。



完整蛋白质和 亚基纯度

大分子色谱 (> 150 Å)

广泛的选择性满足每一次分离要求

AdvanceBio RP-mAb

单克隆抗体的理想选择

属性	优势
孔径 450 Å, 表面多孔颗粒	适用于高分离度 mAb 分离的出色设计
更长的色谱柱寿命	更低的运行成本

ZORBAX RRHD 300 Å 1.8 µm

UHPLC 分离

属性	优势
最大压力 1200 bar	可兼容 UHPLC
1.8 µm 颗粒	超高分离度

PLRP-S*

适用于质谱检测的理想的甲酸性能

属性	优势
无硅醇基相互作用的 聚合物填料	更出色的峰形、更优异的 回收率和更低的残留
耐用的弹性填料	在更长的寿命期获得可重 现的结果

* 提供带 PEEK 内衬的不锈钢硬件

入门指南

选择用于完整蛋白质分析的反相色谱柱时需要考虑多个相互关联的因素：样品分子量和最适合的填料孔径，色谱柱固定相，所用的仪器（特别是检测器的类型），流动相条件，以及速度或通量要求等。

分析物分子越大，则需要越大的孔径。除一些例外情况，用于完整蛋白质分析的孔径通常为 300–500 Å。根据经验，孔径至少应为蛋白质流体动力学半径的三倍。AdvanceBio RP-mAb 色谱柱具有 450 Å 的孔径，ZORBAX RRHD 300 Å、ZORBAX 300SB 和 Poroshell 300 均具有 300 Å 的孔径，而 PLRP-S 提供多种孔径。虽然 1000 Å 的 5 µm PLRP-S 色谱柱孔径明显大于常用于完整蛋白质分析的色谱柱，但是该色谱柱可为完整蛋白质和蛋白质片段分析提供优异的结果。

对于反相色谱柱，选择色谱柱固定相的通用指南是，分子量越大，使用的烷基链应越短。因此，C18 色谱柱常用于多肽分析，而 C8、C4 和 C3 色谱柱常用于完整蛋白质分离。除线性烷基链以外，AdvanceBio RP-mAb、ZORBAX RRHD 300 和 ZORBAX 300SB 色谱柱可提供二苯基固定相。有时，二苯基固定相的不同选择性可提供所需的分离。PLRP-S 是一种聚合物填料而不是硅胶基填料。它提供典型的反相分离以及略有不同的选择性和宽 pH 耐受性。

可用的仪器决定了能够达到的最大压力。当然可以在支持 1200 bar 的 UHPLC 上使用最大耐压为 600 bar 的色谱柱。但是应注意不要使色谱柱超压，否则会导致色谱柱过早发生故障。在安捷伦反相产品组合中，ZORBAX RRHD 色谱柱的最大反压为 1200 bar，因此可用于高速、高压分离。

在考虑仪器和反压能力时，需要考虑是否要将正在开发的方法转移至具有不同的最大反压的另一套液相色谱系统。如果需要这样做，则开发能够在所有平台上运行的方法将更经济、省时。

检测器选择通常与流动相条件有关。对于蛋白质分离，通常需要决定使用紫外检测还是质谱 (MS)。传统上，紫外检测使用三氟乙酸 (TFA) 作为离子对试剂进行分离，而质谱检测优选甲酸。TFA 通常用于紫外检测是因为它在硅胶基色谱柱上可获得出色的峰形，但是它会导致质谱分析发生离子抑制。甲酸可保留 MS 灵敏度，但在硅胶基色谱柱上无法获得理想的峰形，因此，对于甲酸流动相，推荐使用聚合物型 PLRP-S 色谱柱。通过对各方面因素的权衡，也可以在硅胶基色谱柱上使用甲酸流动相，或在质谱分析中使用 TFA。采用紫外检测时，使用甲酸或 PLRP-S 也没有任何问题。

水/乙腈梯度常用于完整蛋白质和单克隆抗体片段的反相分离，并且通常适用于安捷伦反相色谱柱。在某些分离情况下，不同的有机溶剂（例如甲醇或异丙醇）可能会为选择性带来有利改变。AdvanceBio RP-mAb 色谱柱使用含有异丙醇、乙腈和水的有机流动相时可提供出色结果。应用简报 5991-6274EN 提供了有关此色谱柱和流动相配对的更多详细信息。

AdvanceBio 脱盐反相产品为在线脱盐提供了小柱形式的基于 PLRP-S 的方法。该小柱通常在质谱分析之前使用，但也可与紫外检测配合使用以及用于在进行后续分析之前对脱盐样品进行馏分收集。

监测产品相关的 mAb 片段

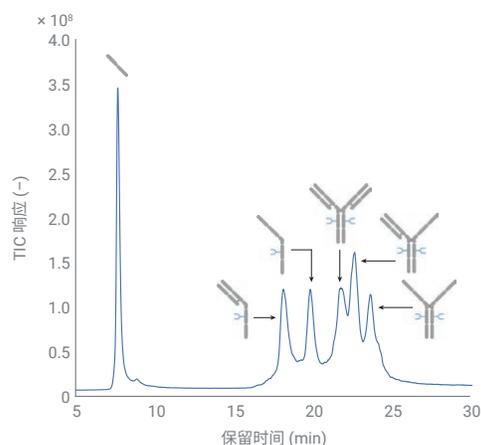
使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统进行完整蛋白质分析如何实现低分子量物质的 UV 和 MS 检测

作者

André Feith
安捷伦科技有限公司

摘要

普遍认为低分子量 (LMW) 或高分子量 (HMW) 物质等产品相关杂质是治疗性单克隆抗体 (mAb) 产品的关键质量属性 (CQAs)，需要在整个药物生产过程中进行监测。本应用简报基于 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统结合带 PEEK 内衬的 Agilent PLRP-S 色谱柱的卓越性能，开发了一种 RPLC 方法。通过分析 NISTmAb 的还原重链和轻链，即使梯度斜率非常平缓的情况下，也可观察到出色的相对保留时间和面积偏差。方法开发后，两条重链 (H2) 或两条重链一条轻链 (H2L) 等所有相关 LMW 片段均可得到分离与检测。得益于与 UV 和 MS 检测器的依次联用，该方法可用于生物药物生产链的多个领域。该方法也可作为 SDS-PAGE/CE-SDS 的替代方法，在一次运行中分析两种 CQAs — LMW 物质以及翻译后修饰 (PTMs)。



前言

mAbs 是生物药物中一类主要的产品，已成功用于各类疾病的治疗^[1]。这些生物分子具有保守的异四聚体结构，由两条重链和两条轻链通过二硫键连接组成。在生产过程中或储存不当时，可能会形成某些产品相关杂质，如低分子量 LMW 物质（见图 1）或高分子量 HMW 物质（如抗体二聚体）。即使经过大量纯化步骤，这些杂质也可能仍会存在，因此有必要将它们作为药品的 CQA 进行监测。抗体二聚体、三聚体或多聚体等 HMW 物质可通过体积排阻色谱 (SEC) 和 UV 检测进行常规分析和分离^[2]。SEC 与 MS 检测联用，可用于进一步表征杂质的相关分子量和 PTMs^[3]。重链 (H)、轻链 (L) 或 H2L 片段等 LMW 物质可通过毛细管电泳-十二烷基硫酸钠 (CE-SDS) 进行分析^[4]。遗憾的是，由于 SDS 引起的高离子抑制，CE-SDS 无法与 MS 检测联用，因此 LMW 物质的推测鉴定通常根据经验知识进行。本应用简报基于 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和带 PEEK 内衬的 PLRP-S 色谱柱的出色性能，展示了 mAbs 的 LMW 物质的另一种分析方法。由于采用了反相液相色谱 (RPLC) 模式，NISTmAb 的所有相关还原诱导 LMW 片段均可通过 UV 和 MS 进行检测，以根据需要用于常规或深入分析。

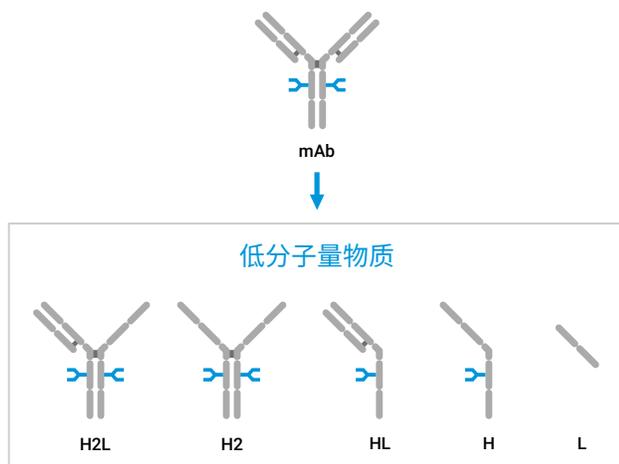


图 1. 单克隆抗体 (mAb) 的还原诱导 LMW 物质产生的示意图。缩写：H2L (两条重链和一条轻链)、H2 (两条重链)、HL (一条重链和一条轻链)、H (重链) 和 L (轻链)

实验部分

设备

与 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 联用的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统包括以下模块：

- Agilent 1290 Infinity II 生物高速泵 (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A)，配备样品恒温箱 (选件 #101)
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)，配备一个标准流速
- Quick Connect 快速连接生物热交换器 (G7116-60071) 和两个安捷伦热平衡装置 (G7116-60013)
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (VWD)(G7114B)，配备生物微量流通池 (用于 VWD, 3 mm, 2 μ L, RFID)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6545XT)

软件

- Agilent MassHunter 工作站数据采集软件 (B.09.00 或更高版本)
- Agilent MassHunter 定性分析软件 (10.0 或更高版本)
- Agilent MassHunter BioConfirm (10.0 或更高版本)

色谱柱

Agilent PLRP-S 5 μ m 1000 \AA , 2.1 \times 100 mm, 带 PEEK 内衬 (部件号 PL1912-2502PK)

化学品

使用 Agilent InfinityLab 超纯 LC/MS 乙腈 (部件号 5191-4496) 和 Agilent-NISTmAb (部件号 5191-5744)。新制超纯水来自配置 0.22 μ m 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA)。DL-二硫苏糖醇 (DTT) 购自 Merck (Darmstadt, Germany)。

样品前处理

将 40 µg NISTmAb 与 1 mmol/L DTT 在棕色玻璃样品瓶中孵育，4 °C 下直接置于 1290 Infinity II 生物 Multisampler 中，可实现 NISTmAb 的部分还原。将 40 µg NISTmAb 与 10 mmol/L DTT 在 60 °C 下孵育 30 分钟，可实现重链 (H) 和轻链 (L) 的完全还原。进样浓度为 1 mg/mL NISTmAb 或还原 NISTmAb。

方法

表 1. 使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分析完整 NISTmAb 和相应 LMW 物质的液相色谱方法

参数	值
色谱柱	Agilent PLRP-S 5 µm 1,000 Å, 2.1 × 100 mm, 带 PEEK 内衬
溶剂	A) 水 + 0.1% 甲酸 B) 乙腈 + 0.1% 甲酸
梯度	0.00 min – 25% B 9.00 min – 30% B 34.00 min – 38% B 34.01 min – 100% B 36.00 min – 100% B 36.01 min – 25% B 40.00 min – 25% B
流速	0.400 mL/min
温度	60 °C, 装有热平衡装置
紫外检测	VWD: 280 nm, 10 Hz/MS: 见表 2
进样	进样量: 0.3 µL 样品温度: 4 °C 清洗: 用水冲洗 3 s (清洗口)

表 2. 分析完整 NISTmAb 和相应 LMW 物质的离子源和质谱参数

参数	值
仪器	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
气体温度	350 °C
干燥气流速	12 L/min
雾化器	35 psig
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	4000 V
喷嘴电压	2000 V
碎裂电压	180 V
锥孔电压	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
采集模式	正离子, 扩展 (m/z 10000) 质量数范围
质量数范围	m/z 100–10000
采集速率	1 质谱图/秒
参比质量	m/z 922.0098

结果与讨论

从制造到质量控制的整个生产过程中，对生物药物的分析都需要液相色谱系统尽可能提供出色性能。为评估 1290 Infinity II 生物液相色谱系统在 mAb 片段分析方面的性能，利用 DTT 将 NISTmAb 完全还原成 H 和 L 片段。图 2 展示了七次连续进样获得的相对保留时间和峰面积标准偏差 (RSD)。结果表明，1290 Infinity II 生物液相色谱系统与 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 联用的保留时间和峰面积精度出色，非常适合以平缓梯度分析 mAb 抗体片段。尽管液相色谱方法由两个线性梯度步骤组成（斜率分别为 0.32% 和 0.55% B/min），但保留时间和峰面积精度的 RSD 值仍较低，前者为 0.190% (L) 和 0.056% (H)，后者为 0.530% (L) 和 0.744% (H)。

采用 RPLC 分析 LMW 物质时的一大挑战是由于它们的疏水性与实际 mAb 相似，因此对 H2 或 H2L 等抗体片段的分离能力有所欠缺。这些片段可以在发酵过程中产生，也可以由最终产品发生部分还原得到。而这些片段也可通过少量 DTT 或降温的方式经过一定时间的部分还原而人工生成。利用这项技术，开发了一种基于带 PEEK 内衬的 PLRP-S 色谱柱和 1290 Infinity II 生物液相色谱系统的 RPLC 方法。

图 3 的色谱图显示了 NISTmAb 在 1290 Infinity II 生物 Multisampler 中的动态还原情况。由于添加了 DTT，图 1 所示的所有相关 mAb 片段均实现很好的分离和随时间的变化。尤其是 H2、H2L 片段和 NISTmAb 在 RPLC 中实现了非常出色的分离，因此带 PEEK 内衬的 PLRP-S 色谱柱和 1290 Infinity II 生物液相色谱系统的结合是分析 LMW 的理想方法。得益于 RPLC 模式，1290 Infinity II 生物液相色谱系统可轻松与 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 联用，MS 数据可在 Agilent MassHunter BioConfirm 软件中进行分析。解卷积后，各片段的主要糖型如图 3 所示。NISTmAb 的特征性糖基化表明，该方法可轻松分析不同片段的 PTMs。此外，图 4B 所示为 mAb 峰周围聚集片段的代表性离子的提取离子色谱图 (EIC)。得益于带 PEEK 内衬的 PLRP-S 色谱柱的出色分离能力，这些 EICs 也具有良好的峰形。

由于仪器设置依次包括 1290 Infinity II 可变波长检测器和 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF，因此可在一次运行中同时进行 UV 和 MS 检测，几乎无谱带展宽，并可轻松完成过程开发到质量控制的方法转移（图 4A）。

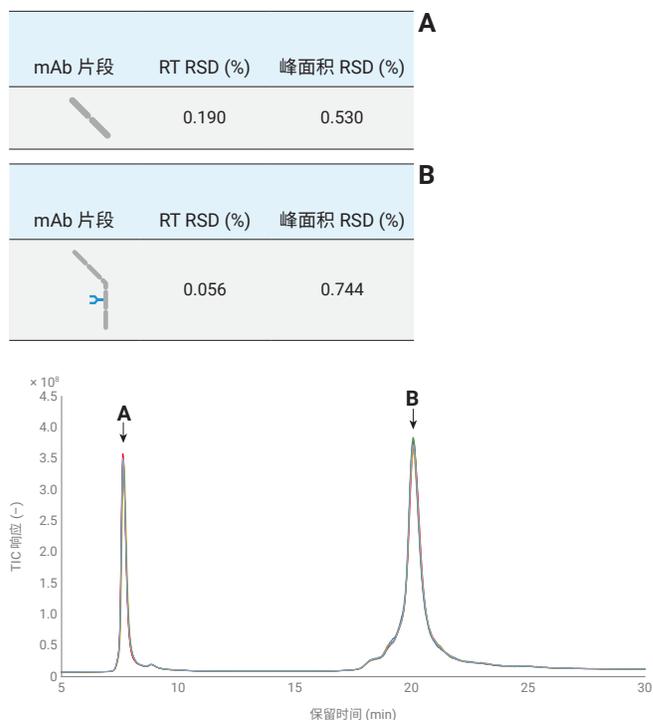


图 2. Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分析 NISTmAb 还原生成的重链和轻链片段的相对保留时间和峰面积精度值 (RSD, n = 7)

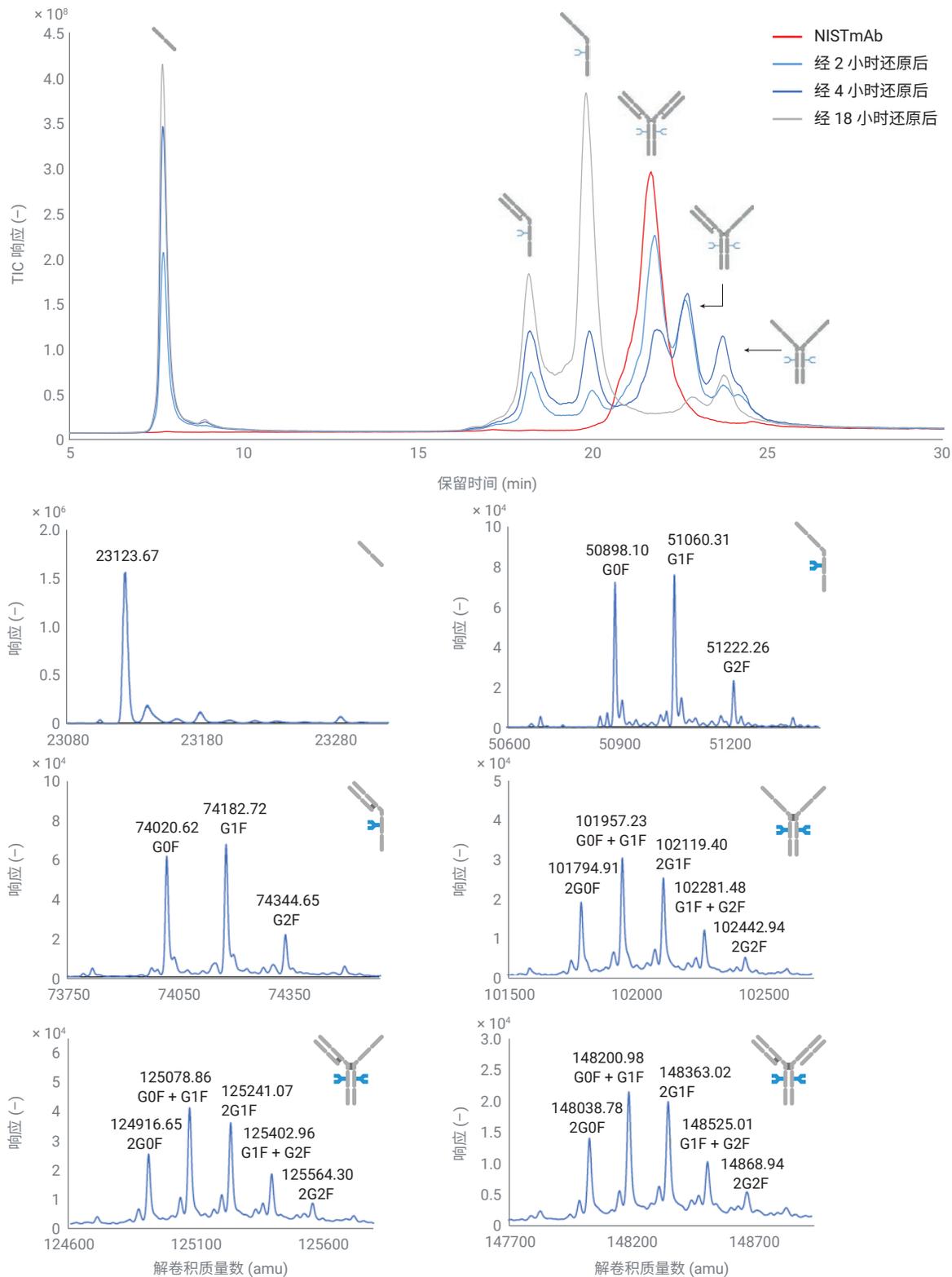


图 3. 由 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分离、Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 检测的 NISTmAb 部分动态还原的色谱图。各片段的相应提取质谱图显示出 NISTmAb 的特征性糖基化

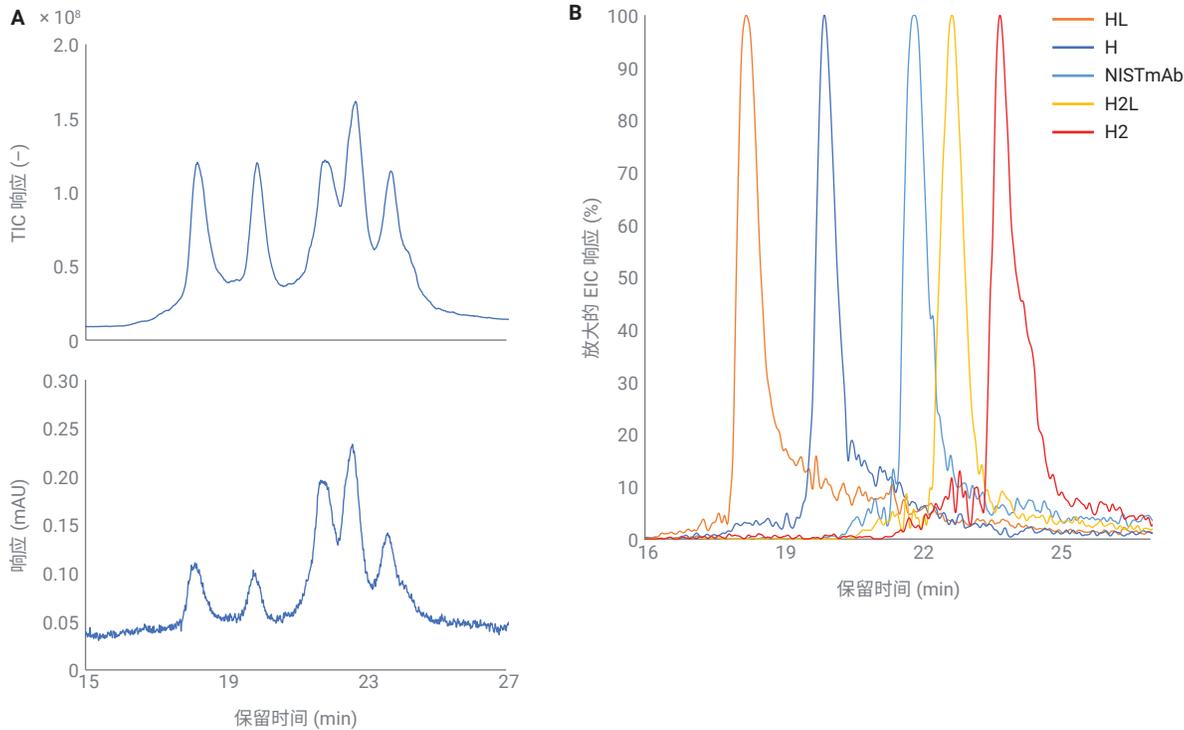


图 4. 一次运行中获得的 NISTmAb 周围聚集片段的 MS 和 UV 谱图 (A)。NISTmAb 片段的提取离子色谱图，展现出出色的峰形 (B)

结论

传统 SDS-PAGE 和现代等效的 CE-SDS 均广泛应用于 LMW 和 HMW 物质等产品相关杂质的分析。然而，利用这些方法鉴定 LMW 物质结构一直面临着挑战，且主要基于经验知识。本应用简报介绍了一种 RPLC 方法，该方法能够分离 NISTmAb 所有相关还原诱导 LMW 物质。基于重链和轻链片段分析结果，1290 Infinity II 生物液相色谱系统展现出出色的保留时间和峰面积精度值。在 1290 Infinity II 生物 Multisampler 中对 NISTmAb 进行动态还原，随后用 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 进行检测，这一系列操作展现了该方法分析翻译后修饰的潜力。与片段分析相结合时，这种能力可加速生物药物的发展。这就是在生产工艺到最终质量控制的生物药物分析过程中，带 PEEK 内衬的 PLRP-S 色谱柱和 1290 Infinity II 生物液相色谱系统能够适应未来需求的原因。

参考文献

1. Walsh, G. Biopharmaceutical Benchmarks 2014. *Nat. Biotechnol.* **2014**, 32, 992–1000
2. Nägele, E. 提升 mAb 聚集体分析性能：使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统进行高分离度 SEC 分析，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5994-2709ZHCN，**2020**
3. Vandenhede, I. et al. SEC Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry for Detailed Characterization of mAbs and ADCs (SEC 与高分辨率质谱联用系统用于 mAbs 和 ADCs 的详细表征)，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5994-0303EN，**2018**
4. Rustandi, R. R.; Washabaugh, M. W.; Wang, Y. Applications of CE SDS Gel in Development of Biopharmaceutical Antibody-Based Products. *Electrophoresis* **2008**, 29, 3612–3620

测定半胱氨酸连接的 ADC 中的药物/抗体分布

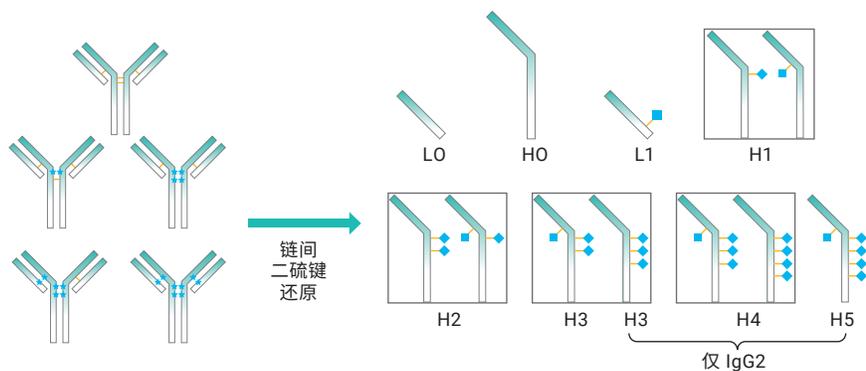
分析 IgG1 和 IgG2 亚类的 ADC

作者

Lily Liu
 Agensys, Inc.
 Santa Monica, CA, US
 Andy Coffey
 安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报展示了在药物/抗体比率测定过程中使用亚 2 μm 反相色谱柱获得了更出色的分离度和准确度。在本研究中，测定了来源于 IgG1 和 IgG2 亚类的抗体中间体的抗体药物偶联物的药物/抗体比率。



前言

抗体药物偶联物 (ADC) 代表了一类快速增长的抗癌治疗药物, 此类药物使用共价键与化学稳定键将抗体的特异性与化学治疗剂的效价相结合。ADC 领域不断扩展, 人们正在开发越来越多的偶联技术。一类主要的 ADC 包括与半胱氨酸残基的偶联, 该半胱氨酸残基通过马来酰亚胺键形成链间二硫键。与效价直接相关的 ADC 的主要关键质量属性之一是药物/抗体比率 (DAR)。每个抗体可以偶联最多 8 或 12 个药物连接物, 这取决于 IgG 抗体亚类^[1]。

疏水相互作用色谱 (HIC) 是测定偶联物分布并计算由 IgG1 mAb 生产的 ADC 的 DAR 的常用方法。然而, 由于位置异构体和可变偶联物之间的不完全分离, 通过 HIC 监测由 IgG2 mAb 生产的 ADC 的偶联物分布和 DAR 极具挑战性。反相 (RP) 色谱可用作一种替代或正交技术, 用于在还原链间二硫键后测定 ADC 的 DAR。使用这种技术, 可以通过实验由未偶联和偶联的轻链和重链的分布计算 DAR。对于由 IgG2 抗体生产的 ADC, RP 是一种更合适的方法。这是因为未偶联和可变偶联的轻链和重链之间的洗脱由偶联的药物连接物的数量决定, 而与偶联位点无关。

在这些应用中, 适用的 HIC 和 RP 色谱柱有限。本应用简报介绍了使用 Agilent ZORBAX RRHD SB300-C8 色谱柱表征未偶联和可变偶联的轻链和重链的分布, 并用于测定平均 DAR。本文介绍了适用于由 IgG1 和 IgG2 抗体生产的 ADC 的 RP UHPLC 方法。与使用常见 HPLC 色谱柱的方法相比, ZORBAX RRHD SB300-C8 色谱柱改善了峰分离度, 并得到了未偶联和偶联的轻链和重链的相似分布以及相似 DAR。

材料与方法

试剂、样品与材料

由完整的人 IgG1 和 IgG2 抗体中间体生产的 ADC 为专有产品。DL-二硫苏糖醇 (DTT) 购自 Thermo Scientific (Pierce NoWeigh DTT)。所有溶剂均为 HPLC 级并且购自 VWR 或 Fisher Scientific。

样品在其各自的制剂缓冲液 (pH 5-6) 中稀释至 5 mg/mL, 并用 1 mol/L tris (pH 9) 将 pH 调节至约 8。通过在 37 °C 下在 40 mmol/L DTT 中孵育 15 分钟来实现链间二硫键的部分还原。冷却至室温后, 用含 2% 甲酸的 50% 乙腈按照 1:1 的比例稀释还原后的样品以淬灭还原反应。

UHPLC 方法

参数	值
色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD SB300-C8, 50 mm × 2.1, 1.8 μm
其他色谱柱	Vydac 214MS, C4, 2.1 × 50 mm, 5 μm, 300 Å Agilent PLRP-S, 2.1 × 50 mm, 5 μm, 1,000 Å
流动相	A) 0.1% TFA 水溶液 B) 含 0.08% TFA 的 90% ACN
柱温	80 °C (IgG1) 70 °C (IgG2)
柱后冷却器	35 °C
进样量	2 μL (IgG1) 3 μL (IgG2)
流速	1 mL/min (IgG1) 0.8 mL/min (IgG2)
检测	UV, 214 和 280 nm
自动进样器温度	10 °C
IgG1 梯度	时间 (min) %B 0 34.5 3 38.0 5.5 38.5 25 55.0 25.1 75.0 26 75.0 26.1 34.5 后运行时间: 4 min
IgG2 梯度	时间 (min) %B 0 30.0 3 30.0 21 45.0 21.1 75.0 22 75.0 22.1 30.0 后运行时间: 2 min

仪器

配备 DAD 检测系统的 UHPLC 购自外部供应商。

用于 UHPLC 分析的同等安捷伦仪器为 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统，该仪器系统预期可提供相当或更出色的性能

峰归属

通过将 UHPLC 与在线质谱联用来确认峰归属（数据未示出）。主峰对应于未偶联和可变偶联的轻链和重链。作为拖尾肩峰从主峰洗脱的峰被鉴定为具有一个或多个还原的链内二硫键。观察到对应于偶联的重链的多个峰具有相同的质量数，并且被鉴定为位置异构体，其中药物连接物偶联于不同的半胱氨酸残基。

DAR 计算

使用公式 1 根据 UV 色谱图的分析结果计算 DAR 值。

$$\text{DAR} = 2 \left(\sum_{n=0}^1 \frac{\text{LC 峰面积} \times n_{\text{药物}}}{\text{总 LC 峰面积}} + \sum_{n=0}^1 \frac{\text{HC 峰面积} \times n_{\text{药物}}}{\text{总 HC 峰面积}} \right)$$

公式 1

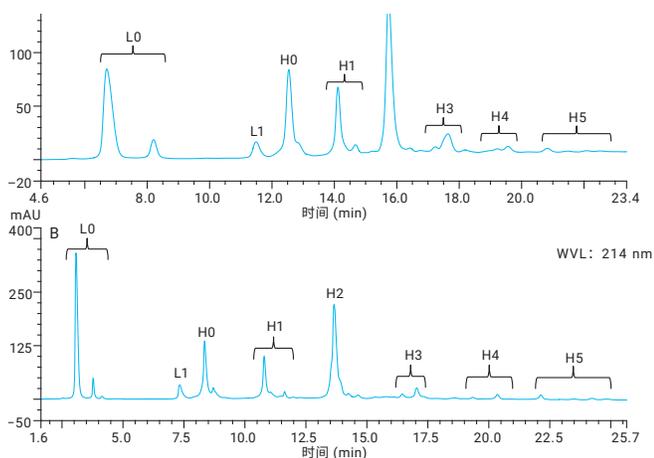


图 1. 在半胱氨酸偶联的 IgG2 ADC 分析中，使用 C4 HPLC 色谱柱 (A) 和 Agilent ZORBAX RRHD SB300-C8 (B) 获得的还原 RP 曲线的比较

结果与讨论

图 1 比较了使用传统 C4 HPLC 色谱柱和 ZORBAX RRHD SB300-C8 色谱柱获得的由 IgG2 mAb 中间体生产的 ADC 的反相色谱图。通过使用 ZORBAX RRHD SB300-C8 色谱柱的 UHPLC 方法获得的色谱图中，观察到的色谱峰更尖锐，并且相比于 C4 HPLC 色谱柱表现出更出色的分离度。使用 ZORBAX RRHD SB300-C8 色谱柱实现的峰分离能够提高色谱峰积分的准确度，因此计算得出的 DAR 值高出 0.1。

图 2 展示了使用 Agilent PLRP-S 色谱柱和 ZORBAX RRHD SB300-C8 色谱柱分析得到的由 IgG1 mAb 生产的还原态 ADC 的 RP 色谱图。与 PLRP-S HPLC 色谱柱相比，在 ZORBAX RRHD 300SB-C8 色谱柱上实现的未偶联和偶联的轻链和重链的分离产生了更尖锐的峰，并改善了微量物质的分离度。根据使用 ZORBAX RRHD 色谱柱得到的结果计算的 DAR 值比 PLRP-S 色谱柱得到的结果高 0.1。该差异可归因于更准确的峰积分。

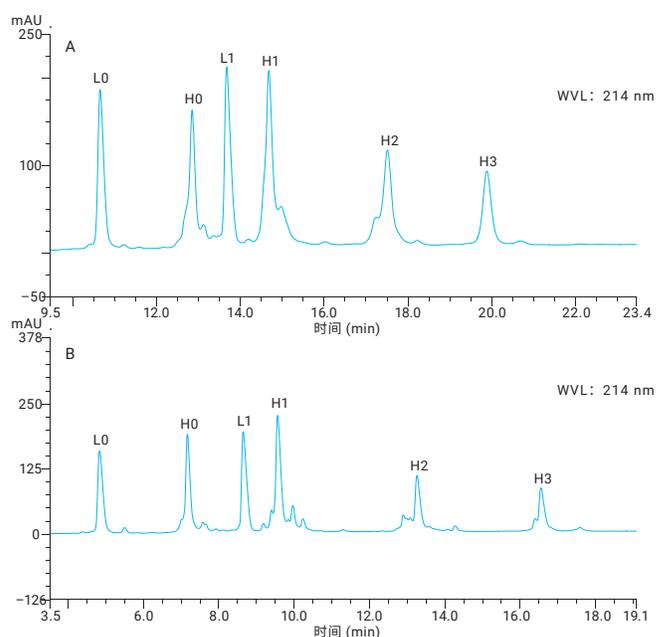


图 2. PLRP-S HPLC (A) 与 Agilent ZORBAX RRHD SB300-C8 的比较。半胱氨酸偶联的 IgG1 ADC 的 1.8 μm (底部) 曲线

分布与 DAR 值

表 2 展示了 ZORBAX RRHD 色谱柱和两种不同的 HPLC 色谱柱得到的未偶联和偶联的轻链和重链的分布以及计算得出的平均 DAR。使用由 ZORBAX RRHD 色谱柱获得的结果计算得出的相对峰面积及相应的 DAR 值与使用 HPLC 色谱柱测得的值相似。使用亚 2 μm 色谱柱的主要优势在于峰分离度得到改善。这一改善的分离度有利于在使用 HPLC 色谱柱时获得与主峰共洗脱的微量物质的更出色的分离。本应用简报中使用的梯度还可用于通过 LC/MS 检测样品稳定性的微小变化，并对较小的峰进行表征。另外，ZORBAX RRHD 色谱柱更高的峰分离度和压力兼容性支持开发较短的梯度以实现高通量检测。

结论

反相方法可测定未偶联和偶联的轻链和重链的分布，并用于计算 ADC 的 DAR。结果表明，Agilent ZORBAX RRHD SB300-C8 色谱柱适用于这些应用，可支持对来源于 IgG1 和 IgG2 抗体中间体的 ADC 进行表征。观察到从 ZORBAX RRHD SB300-C8 色谱柱洗脱的峰更尖锐，并且相比于纳入比较的 HPLC 色谱柱获得了更出色的分离。这一改善能够实现更准确的峰积分和相应的 DAR 值。由 ZORBAX RRHD SB300-C8 色谱柱实现的峰分离度的改善还可检测偶联位点位置异构体。结果表明，使用 ZORBAX RRHD SB300-C8 色谱柱的 RP 方法适用于表征部分还原的 ADC 的偶联物分布以代替疏水相互作用色谱或与疏水相互作用色谱正交使用。

参考文献

1. Wiggins, B.; *et al.* Characterization of Cysteine-Linked Conjugation Profiles of Immunoglobulin G1 and Immunoglobulin G2 Antibody-Drug Conjugates. *J. Pharm. Sci.* **2015**, 104(4), 1362-1372

表 2. 使用 Agilent ZORBAX RRHD SB300-C8 与 HPLC 色谱柱得到的各种形态的相对峰面积和平均 DAR 值的比较

峰归属	IgG2 ADC		IgG1 ADC	
	% 利用 HPLC (C4)	% 利用 UHPLC (Agilent ZORBAX RRHD)	% 利用 HPLC (PLRP-S)	% 利用 UHPLC (Agilent ZORBAX RRHD)
L0	22.6	23.7	14.3	13.3
L1	2.3	3.4	15.6	17.7
H0	17.3	15.6	16.8	15.4
H1	12.5	13.1	26.2	27.8
H2	32.4	30.9	16.8	15.8
H3	7.4	8.1	10.5	10.0
H4	2.1	3.2	-	-
H5	3.3	2.2	-	-
DAR	3.5	3.6	3.6	3.7

对完整和还原态治疗性单克隆抗体 (mAb) 进行快速的高分离度分析

安捷伦生物惰性液相色谱系统和 AdvanceBio RP-mAb 色谱柱

作者

M. Sundaram Palaniswamy

安捷伦科技有限公司

班加罗尔, 印度

摘要

治疗性单克隆抗体 (mAb) 已成为针对许多疾病进行开发的治疗药物中增长最快的一类药物。新型 mAb 以每年 40 种的速度进入临床试验。此外, 还迫切需要一种能够用于高通量分析大量样品以支持生物制药开发的分析方法。本应用简报介绍了一种快速、高分离度方法用于通过反相 HPLC 分析完整和还原态治疗性 mAb 创新药物和生物仿制药。使用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统与 Agilent AdvanceBio RP-mAb C4 和 Diphenyl 色谱柱实现分离。RP-mAb 色谱柱具有表面多孔 3.5 μm 颗粒以及 450 \AA 的大孔径, 与相同尺寸的全多孔颗粒填料相比, 可提高分析准确度并缩短分析时间。该系统的生物惰性与高分离度、较短分析时间和高重现性的方法相结合, 使其非常适合用于生物制药 QA/QC 分析。

前言

在生物仿制药开发过程中，评估生物仿制药与参比分子或创新药物分子之间的分子相似性至关重要。监管机构需要采用许多物理化学方法，其中涉及各种相似性评估项目。监管机构希望看到与之前的公司或创新药物公司提交的在各仪器平台上的相似性数据，主要包括高效液相色谱 (HPLC)、TOF、Q-TOF 质谱和毛细管电泳。HPLC 是一种通过体积排阻或离子交换测定完整蛋白质的成熟技术。然而，反相 (RP) 色谱固定相 (300 Å 的大孔径或具有短烷基链的熔融核颗粒填料) 领域的技术发展使其成为一种分析完整蛋白质的极具应用前景的工具^[1]。

过去，使用大孔径、全多孔颗粒 RP HPLC 分析 mAb 及其片段收效甚微。由于它们的大尺寸和有限的多样性，分析时间通常过于漫长，并且洗脱的 mAb 峰较宽，从而影响分离度。相比之下，高效表面多孔色谱柱可在几分钟内轻松高效地分离 mAb 及其片段。

在本研究中，我们证明了 Agilent 1260 生物惰性四元液相色谱系统和 Agilent AdvanceBio RP-mAb 色谱柱适用于对完整的和片段化的治疗性创新药物和利妥昔单抗生物仿制药进行高分离度的快速分离。AdvanceBio RP-mAb 色谱柱的独特设计可提供独特的选择性，因为其采用具有大孔径 (450 Å) 的表面多孔颗粒填料 (3.5 μm)。该色谱柱在分离速度和分离度方面具有明显优势，同时可与所有仪器兼容。

实验部分

设备

采用完全生物兼容且最大系统耐压为 600 bar 的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统，由以下几个模块组成：

- Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱泵 (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 生物惰性高性能自动进样器 (G5667A)
- Agilent 1200 Infinity 系列恒温箱 (G1330B)
- 包含生物惰性溶剂加热元件的 Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (G1316C, 选项 19)
- 配备 60 mm 最大光程高灵敏度流通池的 Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212B, 选项 33)
- Agilent AdvanceBio RP-mAb Diphenyl, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm (部件号 799775-944)
- Agilent AdvanceBio RP-mAb C4, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm (部件号 799775-904)

在整个样品流路中没有任何金属组件，因此样品不会接触到金属表面。溶剂输送管路中没有任何不锈钢或铁质组件。

软件

Agilent ChemStation B.04.03 (或更高版本)

反相 HPLC 参数

使用 AdvanceBio RP-mAb 色谱柱进行完整和还原态 mAb 分析的色谱参数如表 1 所示。

表 1. 用于完整和还原态 mAb 分析的色谱参数

参数	HPLC (完整和还原态 mAb)
流动相	A) 水 + 0.1% TFA B) IPA:ACN:水 (70:20:10) + 0.09% TFA
色谱柱	Agilent AdvanceBio RP-mAb Diphenyl, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm Agilent AdvanceBio RP-mAb C4, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm
梯度	时间 (min) %B 0 15 0.5 25 1.5 35 1.51 35 3.0 60 4.0 60
后运行时间	2 min
进样量	1 μL
流速	1.0 mL/min
TCC	80 °C
紫外检测	220 和 280 nm

试剂、样品与材料

利妥昔单抗创新药物和生物仿制药购自当地药店，并根据制造商的使用说明进行储存。PBS 和三(2-羧乙基)膦盐酸盐 (TCEP) 购自 Sigma-Aldrich。所有化学品和溶剂均为 HPLC 级，高纯水来自 Milli-Q 水纯化系统 (Millipore Elix 10 型, 美国)。乙腈和 2-丙醇购自 Lab-Scan 公司 (曼谷, 泰国)。对于完整和还原态 mAb 分析, 使用 PBS 将利妥昔单抗样品稀释至 2 mg/mL。

样品前处理

mAb 还原

为分离轻链和重链, 将一份 0.5 M TCEP 储备液加入 mAb 样品中, 使最终浓度达为 10 mmol/L。将混合物在 60 °C 下保持 30 分钟。

结果与讨论

具有表面多孔颗粒填料和大孔径的 AdvanceBio RP-mAb 色谱柱可实现更高的分离度与更短的运行时间, 为生物药物发现、开发和 QA/QC 应用提供准确、可重现的单克隆抗体分析结果。与最高压力 600 bar 的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统相结合, 可用于 mAb 分离。流动相为异丙醇 (IPA)、乙腈 (ACN)、水和三氟乙酸 (TFA) 的混合物。图 1 和图 2 分别展示了完整利妥昔单抗创新药物和生物仿制药在 AdvanceBio RP-mAb Diphenyl (2.1 × 50 mm, 3.5 μm) 色谱柱和 AdvanceBio RP-mAb C4 (2.1 × 50 mm, 3.5 μm) 色谱柱上经优化的 RP HPLC 洗脱曲线, 证明能够在 4 分钟内实现快速分离并获得优异的峰形。图 1 和图 2 的对比结果表明, 在相同的色谱条件下使用不同的键合相可获得不同的选择性, 其中二苯基键合相可实现更细致的分离。

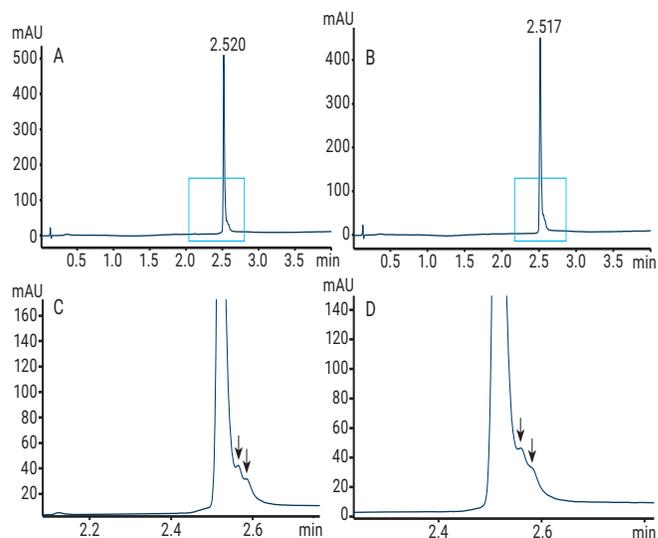


图 1. 利妥昔单抗创新药物 (A) 和利妥昔单抗生物仿制药 (B) 在 Agilent AdvanceBio RP-mAb Diphenyl, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm 色谱柱上的 RP-HPLC 分析结果。C 和 D 为放大图

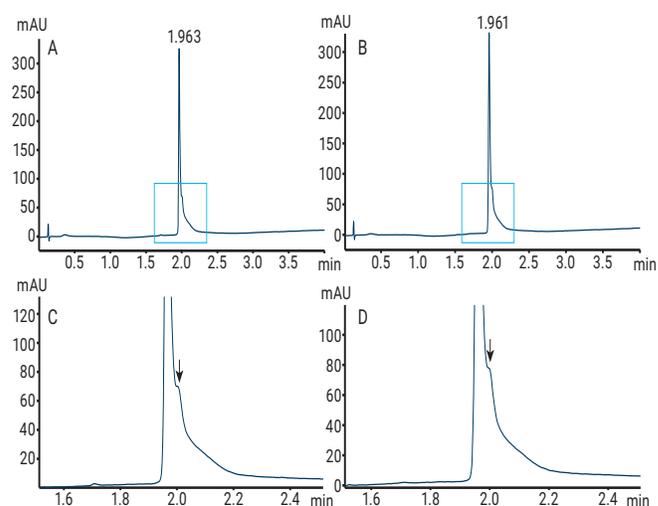


图 2. 完整利妥昔单抗创新药物 (A) 和利妥昔单抗生物仿制药 (B) 在 Agilent AdvanceBio RP-mAb C4, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm 色谱柱上得到的 RP-HPLC 曲线。C 和 D 为放大图

还原态 mAb 分析

利用 TCEP 还原得到游离的抗体轻链和重链。AdvanceBio RP-mAb 色谱柱在抗体片段的快速、高分离度分离方面非常有效。图 3 和图 4 中的曲线分别展示了使用 C4 和二苯基键合相针对抗体片段分离进行优化的快速反相分析结果（约 4 分钟）。

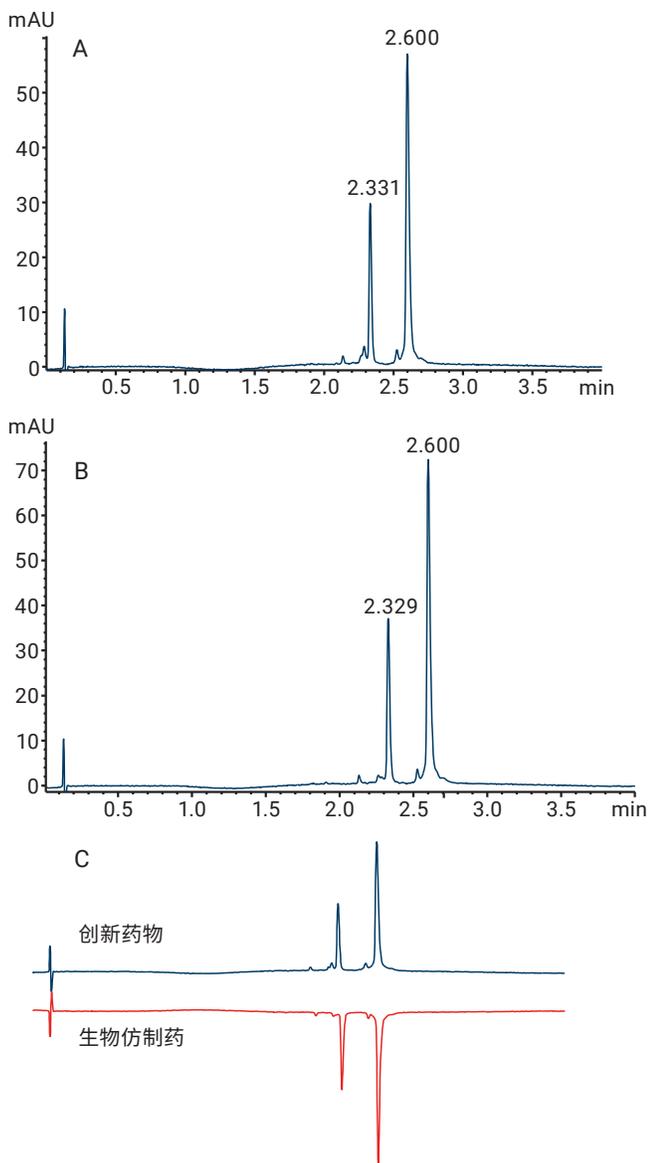


图 3. 利妥昔单抗创新药物 (A) 和利妥昔单抗生物仿制药 (B) 在 Agilent AdvanceBio RP-mAb Diphenyl, 2.1 x 50 mm, 3.5 μm 色谱柱上得到的 RP-HPLC 曲线。镜像图叠放 (C)

在这两种情况下，由于二硫键被还原，mAb 分离为单独的轻链 (LC) 和重链 (HC) 并被洗脱。用于完整 mAb 分析的梯度也同样能够分离还原态样品的 LC 和 HC。与在完整 mAb 分析中看到的一样，LC 和 HC 对 Diphenyl 和 C4 色谱柱表现出不同的选择性。使用 AdvanceBio RP-mAb Diphenyl 色谱柱和 C4 色谱柱对完整和还原态创新药物和生物仿制药的 RP HPLC 分析结果表明，这一对 mAb 高度相似。

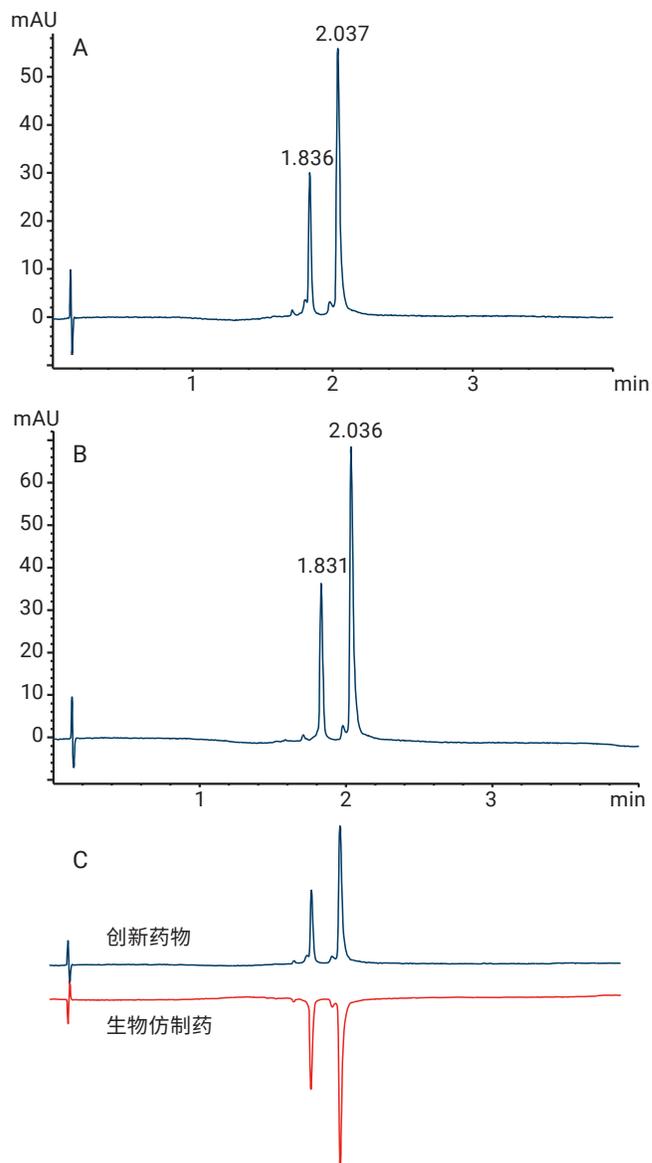


图 4. 利妥昔单抗创新药物 (A) 和利妥昔单抗生物仿制药 (B) 在 Agilent AdvanceBio RP-mAb C4, 2.1 x 50 mm, 3.5 μm 色谱柱上得到的 RP-HPLC 曲线。镜像图叠放 (C)

保留时间和峰面积的精密度

表 2 和表 3 展示了在二苯基和 C4 键合相色谱柱上六次重复测定完整和经 TCEP 还原的利妥昔单抗创新药物以及生物仿制药得到的平均保留时间和峰面积 RSD。结果表明，两种色谱柱的 RT 和峰面积精密度分别处于 $\pm 3\%$ 和 $\pm 5\%$ 的可接受限值内。

结论

在本应用简报中，我们展示了通过一种简单的基于 LC-UV 的方法来确定生物仿制药与其参比创新药物之间的分子相似性。我们首先使用 Agilent 1260 生物惰性四元液相色谱系统与 Agilent AdvanceBio RP-mAb Diphenyl 色谱柱和 C4 色谱柱开发用于完整 mAb 的高分离度、快速分离方法。使用相同的方法，我们还能在 TCEP 还原之后对轻链和重链进行分离。使用 AdvanceBio RP-mAb 色谱柱对完整和还原态 mAb 进行分析得到了优异的峰面积和 RT 精密度，并证明了方法的可靠性。这种用于完整和还原态 mAb 分析的快速、简单、可重现的方法与系统的生物惰性相结合，使该解决方案适用于生物制药行业中的 mAb 相似性分析。

参考文献

1. Navas, N; et al., Anal. Bioanal. Chem. 2013, 405, pp 9351-9363

表 2. 完整 mAb 分析的保留时间和峰面积 RSD (%), n = 6

样品	保留时间		峰面积	
	平均值 (min)	RSD	平均值 (mAU/min)	RSD
Agilent AdvanceBio RP-mAb C4, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm				
利妥昔单抗创新药物	1.96	0	71.61	1.98
利妥昔单抗生物仿制药	1.95	0.26	77.3	0.47
Agilent AdvanceBio RP-mAb Diphenyl, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm				
利妥昔单抗创新药物	2.51	0.20	66.7	0.458
利妥昔单抗生物仿制药	2.51	0	73.3	1.86

表 3. 还原态 mAb 分析的保留时间和峰面积 RSD (%), n = 6

样品	保留时间		峰面积	
	平均值 (min)	RSD	平均值 (mAU/min)	RSD
Agilent AdvanceBio RP-mAb Diphenyl, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm				
利妥昔单抗创新药物 LC	2.32	0.60	19.71	4.24
利妥昔单抗创新药物 HC	2.58	1.52	57.33	1.57
利妥昔单抗生物仿制药 LC	2.32	0.07	23.56	3.25
利妥昔单抗生物仿制药 HC	2.60	0.05	58.40	5.61
Agilent AdvanceBio RP-mAb C4, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm				
利妥昔单抗创新药物 LC	1.83	0	21.5	1.4
利妥昔单抗创新药物 HC	2.03	0.04	51.2	2.25
利妥昔单抗生物仿制药 LC	1.83	0.03	24.47	3.84
利妥昔单抗生物仿制药 HC	2.03	0.06	52.66	0.84

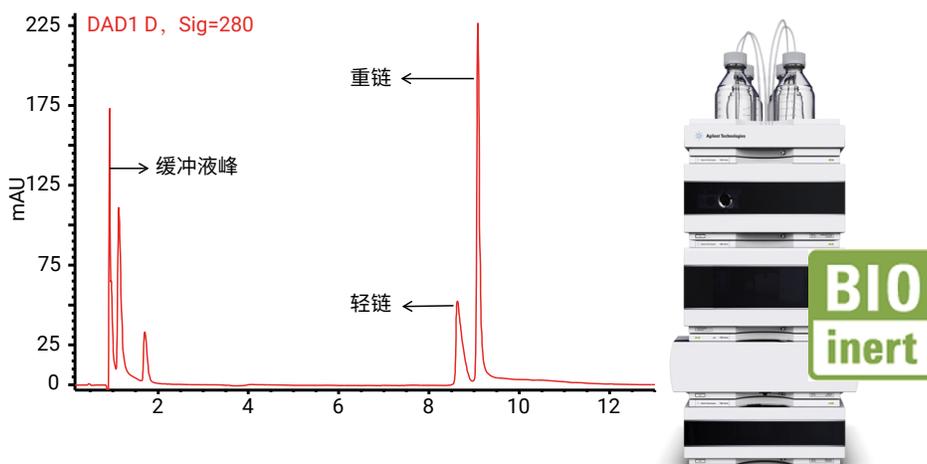
利用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统及 Agilent ZORBAX RRHD 二苯基亚 2 μm 色谱柱分析 IgG1 中的二硫键

作者

M. Sundaram Palaniswamy
安捷伦科技有限公司
班加罗尔, 印度

摘要

本应用简报介绍了一种简单的反相 HPLC 方法，用于分析单克隆抗体 (mAb) 中的二硫键。其中通过 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统及 Agilent ZORBAX RRHD 300 二苯基亚 2 μm 颗粒填料色谱柱实现分离。在完整蛋白质及多肽酶解物的反相分离中，二苯基 1.8 μm 色谱柱能够提供 UHPLC 级别的性能。当与 UHPLC 仪器联用时，这种通用型色谱柱可在更短的分析时间内获得更全面的表征结果。1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统的压力范围高达 600 bar，能够提供更低粒径（低至 1.7 μm ）的新型色谱柱技术所要求的更高压力。



前言

虽然近年来重组 mAb 治疗药物取得了很大的进展，但是关于它们的二硫键模式，人们掌握的信息很少。研究 IgG1 抗体中完整的二硫键分布极具挑战性，这是由于它们的分子量很大，并且二硫键的数目很多。对于治疗性单克隆抗体 (mAb)，二硫键是保持免疫球蛋白 (IgG) 三级和四级结构的关键因素。在 mAb 生产过程中，链间和链内的二硫键均在表达宿主细胞内形成，然后进行分泌和纯化。之前的报道指出，对于 IgG2 及二硫化介导的 IgG4 臂交换，二硫键会发生重排，反映出这些 IgG 类型的一种固有行为^[1,2]。但是，已有报道观察到 IgG1 中的二硫键数目呈现出不规则的显著降低^[3]，这对于治疗性 mAb 的生产而言是一个很重要的问题。本应用简报证实了 1260 生物惰性四元液相色谱系统适用于 IgG1 中二硫键的分离和分析，该系统采用反相 HPLC 方法和 ZORBAX RRHD 300 二苯基，2.1 × 100 mm，1.8 μm 粒径色谱柱。采用亚 2 μm 粒径色谱柱的超高效液相色谱 (UHPLC) 分离，可改善每次分析的分离度和灵敏度，缩短分析时间，并且可用于分析 IgG1、还原态 IgG1，以及 IgG1 酶解产生的肽段。

设备

仪器

采用完全生物兼容且最大系统耐压为 600 bar 的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统，由以下几个模块组成：

- Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱泵 (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 生物惰性高性能自动进样器 (G5667A)
- Agilent 1200 Infinity 系列恒温箱 (G1330B)
- 包含生物惰性溶剂加热元件的 Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (G1316C, 选项 19)
- 配备 60 mm 最大光程高灵敏度流通池的 Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212B, 选项 33)
- Agilent ZORBAX RRHD 300 Diphenyl, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm 色谱柱 (部件号 858750-944)

在整个样品流路中没有任何金属组件，因此样品不会接触到金属表面。溶剂输送管路中没有任何不锈钢或铁质组件。

软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，适用于 LC 和 LC/MS 系统，修订版 C.01.04

HPLC 分析

表 1 RP HPLC 的色谱参数

参数	条件	
流动相 A	水 + 0.1% TFA	
流动相 B	乙腈 + 0.09% TFA	
梯度	时间 (min)	流动相 B (%)
	0 分钟	25
	3 分钟	35
	4 分钟	40
	5 分钟	40
	15 分钟	90
	16 分钟	25
	后运行时间	5 分钟
进样量	3 μL (洗针进样， 针冲洗口启动 7 秒)	
流速	0.3 mL/min	
数据采集	214 和 280 nm	
采集速率	20 Hz	
流通池	60 mm 光程	
柱温箱	50 °C	
样品恒温箱	5 °C	

试剂、样品与材料

人单克隆抗体 IgG1 是一种专利药物分子。DL-二硫苏糖醇 (DTT)、碘乙酰胺、三羟甲基氨基甲烷以及蛋白内切酶 Lys C 均购自 Sigma Aldrich。所有化学品和溶剂均为 HPLC 级，高纯水来自 Milli Q 水纯化系统 (Millipore Elix 10 型, 美国)。乙腈为梯度极, 购自 Lab-Scan 公司 (曼谷, 泰国)。

完整 IgG1 的还原和烷基化

用 100 mmol/L Tris HCl 和 4 mol/L Gu HCl (pH 8.0) 将 IgG1 稀释至 2 mg/mL。加入 10 μ L 0.5 mol/L DTT 储备液, 使其最终浓度为 5 mmol/L。将混合物在 37 $^{\circ}$ C 下保持 30 分钟。反应混合物短暂冷却至室温。加入 26 μ L 0.5 mol/L 碘乙酰胺储备液, 使其最终浓度为 13 mmol/L。静置 45 分钟。然后加入 20 μ L DTT 以淬灭反应, 并使最终浓度为 10 mmol/L。

IgG1 的 Lys C 酶解和还原

使用 100 mmol/L Tris HCl (pH 8.0) 将 IgG1 稀释至 1 mg/mL。加入蛋白内切酶 Lys C 的 100 mmol/L Tris HCl 溶液 (pH 8.0), 其中酶与蛋白质的比例为 1:100 (w/w)。混合物在 37 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。然后加入 10% TFA 将 pH 值降至 6.0 以停止反应。随后, 使用本应用简报上文中介绍的方法还原 Lys C 酶解后的 IgG1。

结果与讨论

分离和检测

ZORBAX RRHD 300 二苯基 1.8 μ m 粒径色谱柱具有可耐受低 pH 和温度稳定性好的优势, 与能在更高压力下 (600 bar) 运行的 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统联用时, 可用于分离蛋白质。图 1 A 展示了优化后完整 IgG1 的 RP HPLC 洗脱曲线, 其中采用了 ZORBAX RRHD 300 二苯基, 2.1 \times 100 mm, 1.8 μ m 色谱柱, 证实了 IgG1 在 15 分钟内具有优异的保留性。进行 6 次重复分析以测定分析的重现性。图 1 B 为 6 次重复分析的叠加谱图。

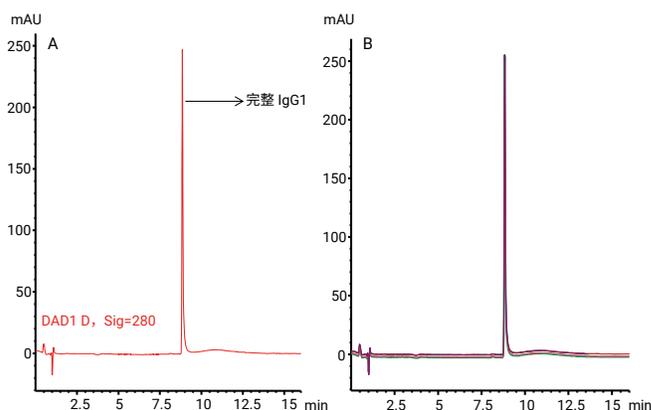


图 1. 利用 Agilent ZORBAX RRHD 300 二苯基, 2.1 \times 100 mm, 1.8 μ m 色谱柱所得的完整 IgG1 的 RP HPLC 谱图 (A), 以及六次重复分析的叠加谱图 (B)

表 2 完整 IgG1 的保留时间和峰面积 RSD (%), n = 6

保留时间		峰面积	
平均值 (min)	RSD (限值: \pm 3.0%)	平均值 (mAU/min)	RSD (限值: \pm 5.0%)
8.838	0.086	1170	0.461

还检测了对完整 IgG1 中二硫键进行还原和烷基化的效果。图 2 A 展示了经过还原和烷基化后的 IgG1 反相色谱图，B 为与还原/烷基化缓冲液空白的叠加图，C 为 6 次重复分析的叠加图以展示分离的重现性。由于二硫键被还原，IgG1 分离为轻链和重链。IgG1 洗脱后，存在明显的轻链 (LC) 和重链 (HC)，如图 2 中所示；但是，未采用质谱分析证实这一点。

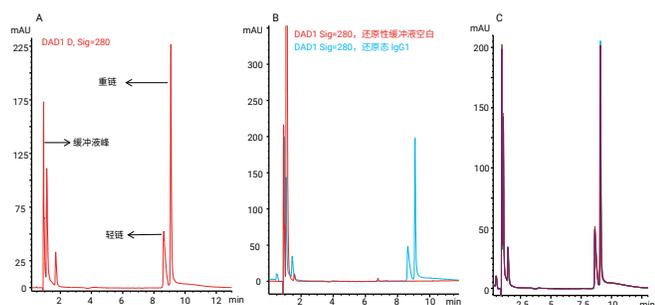


图 2. (A) 还原和烷基化 IgG1 的 RP HPLC 谱图，(B) 与缓冲液空白的叠加图，(C) 六次重复分析的叠加图

表 3. 轻链的保留时间和峰面积 RSD (%), n = 6

保留时间		峰面积	
平均值 (min)	RSD (限值: ±3.0%)	平均值 (mAU/min)	RSD (限值: ±5.0%)
8.638	0.091	504.33	2.780

表 4. 重链的保留时间和峰面积 RSD (%), n = 6

保留时间		峰面积	
平均值 (min)	RSD (限值: ±3.0%)	平均值 (mAU/min)	RSD (限值: ±5.0%)
9.084	0.152	1520	0.390

在未还原状态下，完整 IgG1 的 Lys C 酶解产物所得的肽谱图会形成复杂程度较低的 RP HPLC 谱图。IgG1 酶解产物的代表性色谱图 (图 3 A) 中显示了两个用于峰面积和保留时间精度评估的峰 (基线分离)。叠加图中展示了尖锐的色谱峰，且具有良好的分离度和优越的分离重现性 (图 3 B)。

此外，我们想要比较未还原和还原状态下 IgG1 的反相色谱图，以测定二硫键所连接的肽段。图 4 中展示了未还原 (红线) 和还原 (蓝线) IgG1 的 Lys C 肽谱图的叠加图。还原后，IgG1 的 Lys C 酶解产物中出现了额外的色谱峰 (以 * 号表示)，证实了它们由二硫键连接。

保留时间和峰面积的精密密度

完整 IgG1、还原态 IgG1 和未还原状态下蛋白内切酶 Lys C 酶解后的 IgG1 的保留时间和峰面积精密密度分别如表 2、3 和 4 中所示。结果显示 ZORBAX 二苯基亚 2 μm 色谱柱的保留时间和峰面积精密密度分别在 3% 和 5% 内。

用 Diphenyl, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm 分析 IgG1 的二硫键

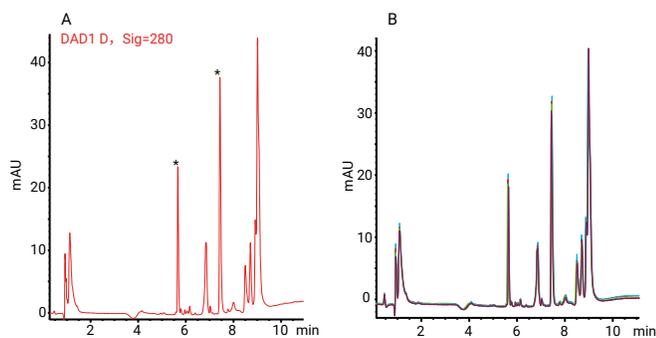


图 3. (A) Lys C 酶解后 IgG1 的 RP HPLC 谱图以及 (B) 六次重复分析的叠加图。用于保留时间和峰面积 RSD 评估的峰以 * 号标示

表 5 Lys C 酶解后 IgG1 的保留时间和峰面积 RSD (%), n = 6

	保留时间		峰面积	
	平均值 (min)	RSD (限值: ±3.0%)	平均值 (mAU/min)	RSD (限值: ±5.0%)
峰 1	5.525	0.307	60	0.544
峰 2	7.444	0.140	132.45	1.113

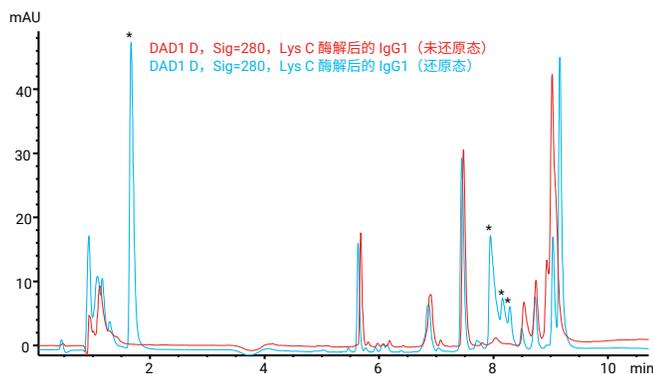


图 4. 比较未还原 (红线) 和还原 (蓝线) 状态下 Lys C 酶解后 IgG1 的肽谱图。二硫键连接的肽段以 * 号标示

结论

在生物制药工艺开发和监测过程中，二硫键分析对于研究蛋白质的一些翻译后修饰非常重要。我们展示了将 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统与 Agilent ZORBAX RRHD 300 二苯基, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm 色谱柱联用，能够实现单克隆抗体中二硫键的可重现、高分离度分析，适用于生物制药工艺开发和监测。优越的峰面积和保留时间精度证实该方法具有可靠性。此外，1260 Infinity 生物惰性液相色谱的压力范围高达 600 bar，能够采用耐压更高的新型小粒径（低至 1.7 μm）色谱柱技术。仪器的生物惰性和抗腐蚀性加上简单且可重现的方法，使得这种解决方案特别适合用于生物制药行业中单克隆抗体的 QA/QC 分析。

参考文献

1. R. Mhatre, J. Woodard, C. Zeng, Strategies for locating disulfide bonds in a monoclonal antibody via mass spectrometry spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 2503–2510
2. T.-Y. Yen, H. Yan, B.A. Macher, Characterizing closely spaced, complex disulfide bond patterns in peptides and proteins by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Mass. Spectrom.* 37 (2002) 15–30
3. Mullan et al. *BMC Proceedings* 2011, 5 (Suppl 8):P110

便捷、可靠地分析抗体药物偶联物

在 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统上使用三元梯度进行药物-抗体比率测定

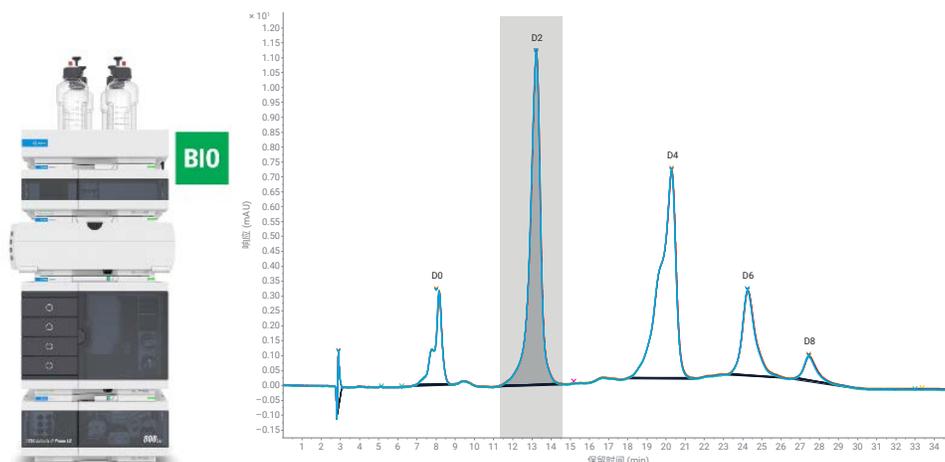
作者

Sonja Schneider
安捷伦科技有限公司

摘要

在疏水相互作用色谱 (HIC) 中加入异丙醇等有机改性剂是降低疏水性抗体药物偶联物 (ADC) 的保留能力以及调整选择性的重要参数。

本应用简报展示了使用三元梯度并将异丙醇作为第三通道中的有机改性剂，对本妥昔单抗 ADC 进行的药物-抗体比率 (DAR) 测定。结果表明，Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统对于这种具有挑战性的高浓度盐缓冲液和有机溶剂组合具有出色的重现性，使之成为新一代安捷伦高端液相色谱系统，可生成高度可靠的数据。



前言

ADC 是与细胞毒性小分子药物通过化学方法连接的单克隆抗体 (mAb)^[1]。与单独的抗体相比，其结构更为复杂，且具有异质性。

半胱氨酸连接的 ADC (例如本妥昔单抗 ADC) 在链间二硫键还原后生成，从而形成可与特定马来酰亚胺连接物偶联的游离巯基。游离巯基的数量限制了可偶联药物特定位置的数量，结果形成每个抗体包含 0 (D0)、2 (D2)、4 (D4)、6 (D6)、8 (D8) 个药物分子的混合物。

特别是由于高 DAR 物质的疏水性，加入有机改性剂 (例如异丙醇) 有助于从 HIC 柱中完全洗脱。通常，在二元梯度中，将改性剂添加到用于洗脱的流动相 (通常是含有少量盐或不含盐的缓冲液) 中。Agilent 1260 Infinity II 生物全能泵作为四元泵，可以使用第三通道添加有机改性剂。由于两种溶剂在泵中混合时可能形成盐晶体，因此高浓度盐缓冲液与有机流动相的结合至关重要。

1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统是新一代安捷伦高端液相色谱系统，专为生物色谱条件而设计：样品流路完全不含不锈钢 (SST) 或铁；贯穿 Multisampler、大容量柱温箱和检测器的所有毛细管和接头均由 MP35N (一种镍钴合金) 制成。因此，1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统非常适合用于生物色谱条件，凭借通常用于 HIC 的高浓度腐蚀性盐，可避免对系统造成潜在的腐蚀性损坏。

实验部分

设备

Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统，包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity II 生物全能泵 (G7131C)
- Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A)，配备样品恒温箱 (选件 #101)
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)，配备标准流速生物兼容性热交换器
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (G7114B)，配备生物兼容性微量流通池，3 mm，2 μ L

软件

Agilent OpenLab CDS 2.5 版或更新版本

色谱柱

Agilent AdvanceBio HIC 色谱柱，3.5 μ m，4.6 \times 100 mm (部件号 685975-908)

化学品

所有试剂纯度均为液相色谱级。异丙醇购自 Merck (Darmstadt, Germany)。新制超纯水来自配置 0.22 μ m 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA)。磷酸二氢钠一水合物、磷酸氢二钠七水合物和硫酸铵购自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)。

样品

本妥昔单抗 ADC (商品名 Adcetris，来自 Takeda, Tokyo, Japan) 溶于 50% 水: 50% 溶剂 A (见下文)，浓度为 100 mg/mL。

注：由于 Adcetris 含有多种佐剂，此处提及的浓度不只是蛋白质浓度，而是药物所有组分的总浓度。

缓冲液配制

A) 1.5 mol/L 硫酸铵溶于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液，pH 7

B) 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液，pH 7

C) 异丙醇

配制 2 L 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7)：取 5.84 g 磷酸二氢钠一水合物和 15.47 g 磷酸氢二钠七水合物加入 2 L 棕色瓶中，用超纯水定容至 2 L。测量 pH 值，如有需要，将 pH 值调至 7 (缓冲液 B)。将 198.21 g 硫酸铵 (总浓度 1.5 mol/L) 加入 1 L 棕色空瓶中，用配制好的磷酸盐缓冲液定容至 1 L (& 缓冲液 A)。测量 pH 值，如有需要，将 pH 值调至 7 (加入大量盐可改变 pH 值)。配制的缓冲液均使用 0.2 μ m 滤膜过滤。

方法

参数	值
溶剂	A) 1.5 mol/L 硫酸铵溶于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7 B) 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7 C) 异丙醇
梯度	梯度: 0 min 55% A, 40% B, 5% C 25 min 0% A, 75% B, 25% C 停止时间: 35 min 后运行时间: 10 min
流速	0.400 mL/min
温度	25 °C
检测	280 nm, 10 Hz
进样	进样量: 15 µL 样品温度: 10 °C 进样针清洗: 用水清洗 3 秒

注: 在 HIC 中使用高盐流动相需要一台能够耐受高盐的液相色谱系统, 而 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统完全不含不锈钢 (SST)/不含铁的流路避免了高浓度盐缓冲液的潜在腐蚀。此外, 密封垫清洗和进样针清洗等清洗功能有助于避免出现盐析问题。然而, 避免使液相色谱系统或色谱柱暴露于高浓度盐溶液中仍然很重要。

注: 使用高浓度盐溶液作为洗脱液时, 需要考虑在泵方法中设置相应溶剂类型。例如, 对于含 1.5 mol/L 硫酸铵的溶剂 A, 在泵方法的溶剂选择字段使用硫酸铵 1.5 mol/L 而非一般水相或水。高浓度盐可改变溶剂的压缩系数, 因此使用预先配置的溶剂表可以使泵达到理想性能。

结果与讨论

图 1 显示了本妥昔单抗 ADC 的分析结果, 5 个主峰分别对应于含 0、2、4、6、8 个小分子药物的 mAb。图 1 中的每个峰对应分别一个完整的 mAb 异构体, 附着的药物分子数量不断增加 (D0-D8 对应 0-8 个结合分子)。通过比较本妥昔单抗 ADC 的 HIC 色谱图与文献中的色谱图, 确定了这些峰^[2]。

我们评估了保留时间 (RT) 和峰面积的精度。通过 7 次后续运行, 经计算 RT 的相对标准偏差 (RSD) 低于 0.055%, 表明 RT 具有良好的精度。这证明了四元泵在运行三元梯度方面的出色性能, 即使在使用高浓度盐缓冲液 (例如本研究使用的 1.5 mol/L 硫酸铵缓冲液) 和异丙醇这样极具挑战性的组合作为有机改性剂的情况下也是如此。峰面积的精度也十分出色, RSD < 0.46% (最后一个峰除外) (见图 1 的表)。

HIC 分析既可以表征药物连接异构体的分布, 也可以测定 DAR。通过对每个峰的峰面积及其各自载药量进行积分, 能够计算总体 DAR (公式 1)。

公式 1.

$$DAR = \sum_{n=0}^8 \frac{LC \text{ 峰面积} \times n_{\text{药物}}}{\text{总 LC 峰面积}}$$

由 5 个观测峰的峰面积积分和峰面积百分比计算得到的 DAR 约为 3.3 (见表 1)。

表 1. DAR 异构体结果

DAR 异构体	RT (min)	峰面积	峰面积 %	DAR 计算值
D0	8.00	89.18	8.11	0
D2	13.22	427.04	38.83	0.78
D4	20.29	405.58	36.88	1.48
D6	24.27	140.51	12.78	0.77
D8	27.48	37.38	3.4	0.27
			DAR	3.3

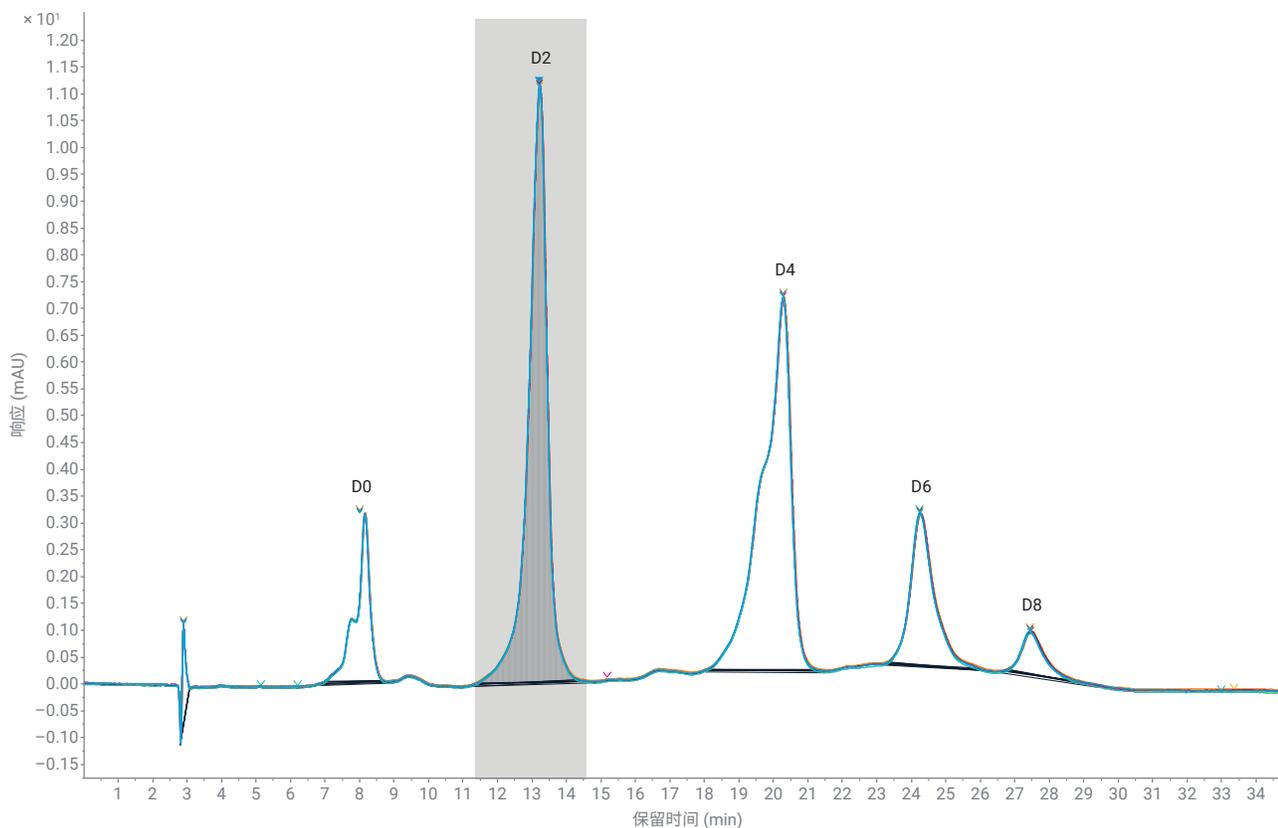


图 1. 使用 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统分离本妥昔单抗 ADC。D0–D8 表示不同的 DAR 异构体。所示为 7 次后续运行的叠加色谱图。通过空白扣除功能，使用在同一序列中运行的空白进样过滤缓冲液 A 中硫酸铵盐引起的基线漂移

结论

本研究使用三元梯度下的 HIC，并将异丙醇作为第三通道中的有机改性剂，对本妥昔单抗 ADC 进行了分析。5 种预期 ADC 均得到很好分离，分别对应于含 0、2、4、6、8 个小分子药物的 mAb。HIC 分析既可以表征药物连接异构体的分布，也可以测定 DAR，经计算为每个抗体 3.3 个药物分子。配备 Agilent 1260 Infinity II 生物全能泵的 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统出色地完成了挑战性溶剂组合的分析。保留时间重现性十分优异，相对标准偏差低于 0.055%，可实现类似二元泵的性能，生成高度可靠的数据。

参考文献

1. McCombs, J. R.; Owen, S. C. Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry. *J. Amer. Assoc. Pharm. Sci.* **2015**, 17(2), 339–51
2. Rodriguez-Aller, M. et al. Practical Method Development for the Separation of Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug-Conjugate Species in Hydrophobic Interaction Chromatography, Part 1: Optimization of the Mobile Phase. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, 118, 393-403

高盐 — 高重现性

使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统通过疏水相互作用色谱分析抗体药物偶联物

作者

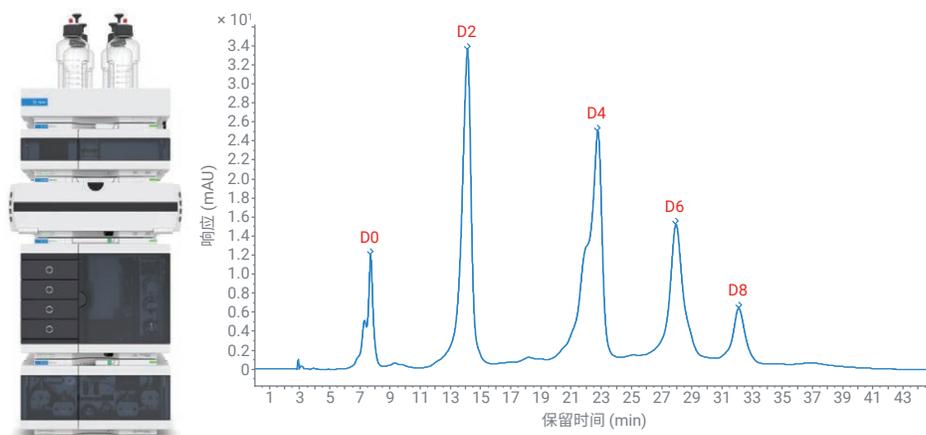
Sonja Schneider

安捷伦科技有限公司

摘要

通常使用疏水相互作用色谱 (HIC) 测定药物/抗体比率 (DAR)。这种温和的非变性分析方法的洗脱液含有高浓度腐蚀性盐，对液相色谱 (LC) 系统提出了挑战。

Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统包括高速泵及其完全不含铁的流路，非常适合用于生物色谱条件，可避免对系统造成潜在的腐蚀性损坏。本应用简报介绍了使用 HIC 测定本妥昔单抗 ADC 的 DAR。经计算，DAR 为每个抗体 3.7 个药物分子。所得结果具有良好的重现性，证明 1290 Infinity II 生物液相色谱仪作为新一代安捷伦高端液相色谱系统，生成的数据具有超高可信度。“空白扣除”是 Agilent OpenLab CDS 的一项软件功能，可以消除由于硫酸铵纯度较低造成的基线漂移，从而实现平滑积分。



前言

抗体药物偶联物 (ADCs) 是与细胞毒性小分子药物通过化学方法连接的单克隆抗体 (mAbs)^[1]。与单独的抗体相比, 其结构更为复杂, 且具有异质性。

半胱氨酸连接的 ADCs^[2] (如本妥昔单抗 ADC, 商品名为 Adcetris, 由 Takeda 原研) 将小分子连接到部分还原 mAb 的游离巯基上^[3,4]。游离巯基的数量限制了可偶联药物特定位置的数量, 结果形成每个抗体包含 0、2、4、6、8 个药物分子的混合物。与 mAb 偶联的平均药物分子数量是 ADC 最重要的质量属性之一, 因为它直接影响 ADC 的安全性和有效性。DAR 决定了可以递送到所需组织的有效载荷量^[5]。

HIC 是分离每个抗体载药量不同的半胱氨酸连接的 ADC 分子的参考技术^[6]。相对疏水性随 ADC 载药量的增加而增加, 因为与 mAb 连接的小分子通常相对具有疏水性。因此, HIC 非常适用于监测 DAR。

HIC 是一种可以保持天然蛋白结构的非变性分析技术。它通常在中性 pH 条件下进行, 可以使用从高到低的盐梯度分离蛋白质。分离原理与蛋白质盐析实验相同^[6]。在流动相 A 中使用高浓度盐缓冲液, 蛋白质失去水化层, 保留在固定相的疏水表面。流动相 B 通常为相同的缓冲液 (主要是磷酸盐), 不添加盐。随着流动相 B 在梯度中的占比增加, 蛋白质重新形成水化层并从色谱柱中洗脱。加入少量有机溶剂 (如异丙醇) 也有助于从色谱柱中洗脱蛋白质。

1290 Infinity II 生物液相色谱是新一代安捷伦高端液相色谱系统, 专为生物色谱条件 (如 2 mol/L NaCl^[7]、高达 8 mol/L 尿素的高盐浓度, 以及如 0.5 mol/L NaOH 或 0.5 mol/L HCl 的高/低 pH 溶剂) 而设计。样品流路完全不含不锈钢 (SST) 或铁; 贯穿 Multisampler、大容量柱温箱和检测器的所有毛细管和接头均由 MP35N (一种镍钴合金) 制成。这种材料可以减少高浓度盐缓冲液的潜在腐蚀, 避免因铁离子存在引起的蛋白质修饰 (如氧化、蛋白质复合物形成)。

本应用简报介绍了使用 HIC 测定本妥昔单抗 ADC 的 DAR, 评价了保留时间和峰面积的精度。此外, 还展示了 OpenLab 2 数据处理方法中的“空白扣除”功能过滤漂移基线的优势。

实验部分

设备

Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统, 包括以下模块:

- Agilent 1290 Infinity II 生物高速泵 (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A), 配备样品恒温箱 (选件 #101)
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B), 配备标准流速生物兼容性热交换器
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (G7114B), 配备生物兼容性微量流通池, 3 mm, 2 μ L

软件

Agilent OpenLab CDS 2.5 版

色谱柱

Agilent AdvanceBio HIC 色谱柱, 3.5 μ m, 4.6 \times 100 mm (部件号 685975-908)

化学品

所有试剂纯度均为液相色谱级。异丙醇购自 Merck (Darmstadt, Germany)。新制超纯水来自配置 0.22 μ m 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA)。磷酸二氢钠一水合物、磷酸氢二钠七水合物和硫酸铵购自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)。

样品

本妥昔单抗 ADC (商品名 Adcetris, 来自 Takeda, Tokyo, Japan) 溶于一半水、一半溶剂 A (见下文), 浓度为 100 mg/mL。

注: 由于 Adcetris 含有多种佐剂, 此处提及的浓度不只是蛋白质浓度, 而是药物所有组分的总浓度。

缓冲液配制

A: 1.5 mol/L 硫酸铵溶于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7

B: 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7 + 20% 异丙醇

配制 2 L 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7): 取 5.84 g 磷酸二氢钠一水合物和 15.47 g 磷酸氢二钠七水合物加入 2 L 棕色瓶中, 用超纯水定容至 2 L。测量 pH 值, 如有需要, 将 pH 值调至 7。然后, 将 198.21 g 硫酸铵 (总浓度 1.5 mol/L) 加入 1 L 棕色空瓶中, 用配制好的磷酸盐缓冲液定容至 1 L (& 缓冲液 A)。测量 pH 值, 如有需要, 将 pH 值调回 7 (加入大量盐可改变 pH 值)。将 200 mL 异丙醇和 800 mL 配制好的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7) 混合并加入 1 L 棕色空瓶中 (& 缓冲液 B)。配制的缓冲液均使用 0.2 μm 滤膜过滤。

注: 与 mAb 偶联的疏水性药物小分子的存在导致整体疏水性相应增加。因此, 有必要在流动相中加入一些有机改性剂 (此处加入 20% 异丙醇)。

方法

表 1. 盐梯度色谱条件

参数	HPLC (完整和还原态 mAb)
溶剂	A) 1.5 mol/L 硫酸铵溶于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7 B) 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7 + 20% 异丙醇
梯度	0 min 时 30% B, 30 min 时 100% B 停止时间: 45 分钟 后运行时间: 10 分钟
流速	0.400 mL/min
温度	25 °C
检测	280 nm, 10 Hz
进样	进样量: 15 μL 样品温度: 10 °C 进样针清洗: 用水清洗 3 秒

注: 在 HIC 中使用高盐流动相需要一台能够耐受高盐的液相色谱系统, 而 1290 Infinity II 生物液相色谱系统完全不含不锈钢 (SST)/不含铁的流路避免了高浓度盐缓冲液的潜在腐蚀。此外, 密封垫清洗和进样针清洗等清洗功能有助于避免出现盐析问题。然而, 避免使液相色谱系统或色谱柱暴露于高浓度盐溶液中仍然很重要。

注: 使用高浓度盐溶液作为洗脱液时, 需要考虑在泵方法中设置相应溶剂类型。例如, 对于含 1.5 mol/L 硫酸铵的溶剂 A, 在泵方法的溶剂选择字段使用“硫酸铵 1.5 mol/L”而非一般水相或水。高浓度盐可改变溶剂的压缩系数, 因此使用预先配置的溶剂表可以使泵达到理想性能。

结果与讨论

图 1 显示了本妥昔单抗 ADC 的分析结果, 5 个主峰分别对应于含 0、2、4、6、8 个小分子药物的 mAb。HIC 分析既可以表征药物连接异构体的分布, 也可以测定 DAR。

虽然链间二硫键被偶联的药物破坏和占据, 但抗体链间的共价键和非共价键力相结合足以使 mAb 在分析过程中保持完整形态。这是由于 HIC 在温和的非变性条件下进行, 使其成为分析半胱氨酸连接 ADCs 的理想选择。图 1 中的每个峰对应分别一个完整的 mAb 异构体, 附着的药物分子数量不断增加 (D0-D8 对应 0-8 个结合分子)。通过比较本妥昔单抗 ADC 的 HIC 色谱图与文献中的色谱图, 确定了这些峰^[6]。

通过对每个峰的峰面积及其各自载药量进行积分, 能够计算总体 DAR (公式 1)。

公式 1.

$$DAR = \sum_{n=0}^8 \frac{LC \text{ 峰面积} \times n_{\text{药物}}}{\text{总 LC 峰面积}}$$

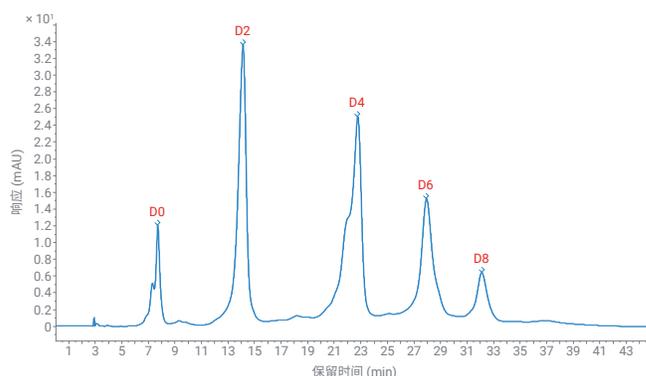


图 1. 使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分析本妥昔单抗 ADC。D0-D8 表示不同的 DAR 异构体

由 5 个观测峰的峰面积积分和峰面积百分比计算得到的 DAR 约为 3.7 (见表 2)。这一数值与文献一致^[9]。

我们还评估了保留时间 (RT) 和峰面积的精度 (图 2)。经过 7 次后续运行, 经计算 RT 的相对标准偏差 (RSD) 低于 0.081%, 表明 RT 具有良好的精度。峰面积的精度也十分出色, RSD < 0.282% (见图 2 的表)。

硫酸铵是 HIC 分析中一种极其常用的离液盐。通常使用的盐浓度范围为 1-2 mol/L, 这个浓度相当大。如果在分析中使用较低纯度的盐 (有时从盐晶体的颜色即可看出), 色谱图的基线会发生明显漂移, 造成潜在的积分误差。为了解决这个问题, 可使用一种称为“空白扣除”的软件功能利用空白进样过滤基线漂移。此功能可在 OpenLab 2 的数据处理方法中找到 (参见图 3)。图 4 显示了应用该功能之前和之后具有不同基线行为的色谱图。

表 2. DAR 异构体结果

DAR 异构体	RT (min)	峰面积	峰面积%	DAR 计算值
D0	7.68	378.116	7.59	0
D2	14.12	1537.829	30.84	0.6196
D4	22.78	1756.026	35.22	1.415
D6	27.98	951.983	19.13	1.1506
D8	32.15	340.176	6.79	0.5482
			DAR	3.733

峰归属

RSD 精度	RT (%)	峰面积 (%)
D0	0.074	0.064
D2	0.080	0.043
D4	0.072	0.071
D6	0.065	0.262
D8	0.066	0.281

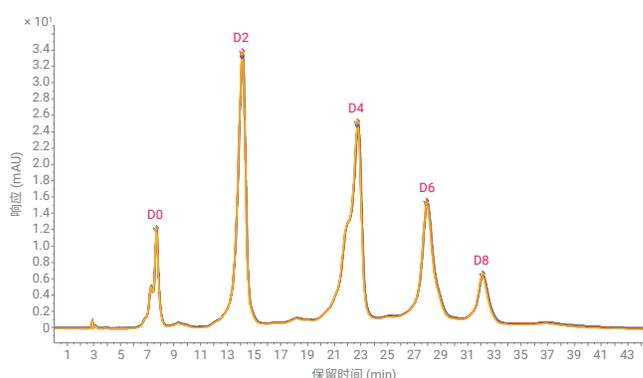


图 2. 使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分离本妥昔单抗 ADC (7 次后续运行的叠加色谱图)

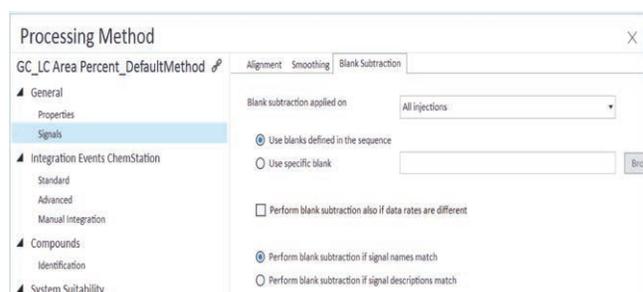


图 3. Agilent OpenLab CDS 2 的数据处理方法中“空白扣除”功能的屏幕截图

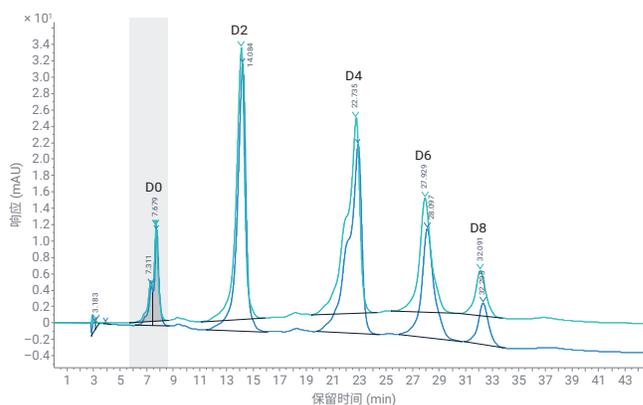


图 4. 空白扣除前 (蓝色) 和扣除后 (绿色) 的 HIC 色谱图比较

结论

在 Infinity II 1290 生物液相色谱系统上使用 HIC 法分析了本妥昔单抗 ADC。5 种预期 DAR 均得到良好分离，分别对应于含 0、2、4、6、8 个小分子药物的 mAb。HIC 分析既可以表征药物连接异构体的分布，也可以测定 DAR，经计算为每个抗体 3.7 个药物分子。7 次后续运行的精度分析显示了 RT 和峰面积的出色重现性。HIC 中使用的洗脱液含有高浓度的腐蚀性盐，对液相色谱系统带来了挑战。由于具有完全不含铁样品流路，1290 Infinity II 生物液相色谱系统非常适合在生物色谱条件下使用，可避免对系统造成潜在的腐蚀性损坏。

OpenLab 2 软件的空白扣除功能使用户可在分析中使用纯度更低的硫酸铵，而不会对结果产生负面影响。只需扣除空白运行即可校正基线，以实现平滑的积分计算。

1290 Infinity II 生物液相色谱仪的生物兼容性硬件与 OpenLab 2 的新软件功能相结合，产生的数据具有超高可信度。

参考文献

1. McCombs, J. R.; Owen, S. C. Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry. *J. Amer. Assoc. Pharm. Sci.* **2015**, *17*(2), 339–51
2. Marcoux, J. et al. Native Mass Spectrometry and Ion Mobility Characterization of Trastuzumab Emtansine, a Lysine-Linked Antibody Drug Conjugate. *Protein Sci.* **2015**, *24*, 1210–1223
3. Younes, A. et al. Brentuximab Vedotin (SGN-35) for Relapsed CD30-Positive Lymphomas. *N. Eng. J. Med.* **2010**, *363*(19), 1812–1821
4. Schneider, S. Analysis of Cysteine-Linked Antibody Drug Conjugates (半胱氨酸连接的抗体药物偶联物的分析)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-8493EN，**2017**
5. Wakankar, A. et al. Analytical Methods for Physicochemical Characterization of Antibody Drug Conjugates. *mAbs* **2011**, *3*(2), 161–172
6. Rodriguez-Aller, M. et al. Practical Method Development for the Separation of Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug-Conjugate Species in Hydrophobic Interaction Chromatography, Part 1: *Optimization of the Mobile Phase*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *118*, 393–403
7. 卓越性能，可靠结果，不负重托：Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统，安捷伦科技公司产品样本，出版号 5994-2376ZHCN，**2020**
8. van de Donk, N. W. C. J.; Dhimolea, E. Brentuximab Vedotin. *mAbs* **2012**, *4*(4), 458–465

AdvanceBio HIC：用于单克隆抗体 (mAb) 异构体分析的疏水性 HPLC 色谱柱

使用 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪

作者

Andrew Coffey 和
Sandeep Kondaveeti
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent AdvanceBio HIC 色谱柱从单克隆抗体 (mAb) 天然形式中分离其氧化异构体。暴露的氨基酸侧链残基（如甲硫氨酸、半胱氨酸、色氨酸）的氧化是单克隆抗体的一种常见降解途径，也是生物技术中面临的一项主要分析挑战。通常，与天然形式相比，氧化的 mAb 效价会降低^[1]。因此，为确保 mAb 产品的疗效，对这些降解的分析至关重要。mAb 氨基酸残基的氧化会改变 mAb 的疏水性，这是由于氧化形式具有更高的极性，或其构象发生变化^[2]。基于疏水性差异分离生物分子的 HPLC 法包括反相色谱和疏水相互作用色谱 (HIC)。HIC 可用于表征来自翻译后修饰 (PTM) 的 mAb 异构体。AdvanceBio HIC 色谱柱可为 mAb 氧化异构体与未修饰形式的分离提供出色的分离度，并可在不将 mAb 分解为亚基或不采用其他样品前处理方法的前提下分离被氧化的物质。

前言

mAb 及相关产品（如抗体药物偶联物 (ADC)、双特异性抗体 (bsAb)）是发展最快的一类生物治疗药物。重组 mAb 在加工、运输和储存过程中会进行大量 PTM。在这些修饰中，暴露的氨基酸侧链（如甲硫氨酸 (Met)、色氨酸 (Trp)）的氧化是一种常见现象。许多研究已报道，mAb 氧化会对产品保质期和生物活性造成负面影响^[1,2]。因此，用于检测 mAb 氧化异构体的分析方法的开发受到广泛关注。甲硫氨酸氧化的 mAb 产品的亚磺和磺侧链比其天然形式更大且极性更高，这可能将改变蛋白质的结构、稳定性和生物功能。反相液相色谱 (RPLC) 和 HIC 等疏水性 HPLC 法常用于表征 mAb 异构体。最近，已有多项研究表明 HIC 用于监测重组 mAb 的氧化具有较好的选择性和易用性，可作为一种出色的 RPLC 替代方法^[3]。

与 RPLC 类似，HIC 同样基于与固定相的疏水相互作用来分离分析物。HIC 的洗脱顺序使蛋白质按其相对疏水性依次排列。与 RPLC 不同的是，HIC 使用非变性条件，无需有机溶剂或高温，可在生理 pH 下实现分离，从而使蛋白质结构得到保留。因此，可使用 HIC 分析蛋白质天然形式的构象变化^[4]。

AdvanceBio HIC 是一种硅胶基 HPLC 色谱柱，专为分离 mAb 及其相关产品而设计。其独特的化学键合相可为 mAb 和 mAb 异构体分析提供高分离度和所需选择性。本应用简报介绍了使用 AdvanceBio HIC 色谱柱分离 NIST mAb 氧化异构体。

实验部分

设备与材料

所有化学品和试剂均为 HPLC 级或更高级别，且均购自 Sigma-Aldrich（现属于 Merck）或 VWR Scientific。人源化 IgG1k mAb 样品（产品项目编号 8671）购自 NIST SRM Standards。水经由 Milli-Q A10 水纯化系统 (Millipore) 纯化。

仪器

Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪包括：

- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性泵 (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler (G5668A)，配备样品冷却装置（选件编号 100）
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)，配备生物惰性热交换器（选件编号 019）
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 WR (G7115A)，配备生物惰性流通池（选件编号 028）

软件

Agilent OpenLab 2.2 CDS

t-BHP 氧化 mAb

将 1 mL NIST mAb (1 mg/mL)（溶于制剂缓冲溶液中）溶液与 0.2% (v/v) 的 70% 叔丁基过氧化氢 (t-BHP) 溶液在室温下共孵育 24 小时。用截留分子量为 10 kDa 的 Amicon Ultra-10 离心管去除残留氧化剂。然后用 50% 流动相 B 替换样品缓冲溶液。

获得图 6 所示数据所用的反应条件为：将 2% (v/v) 的 70% t-BHP 溶液加入 1 mL NIST mAb 样品 (1 mg/mL)，然后将反应混合物进样至色谱柱。进样瓶温度保持在 7 °C，同一样品瓶进行多次进样。

H₂O₂ 氧化 mAb

将 1 mL NIST mAb (1 mg/mL)（溶于制剂缓冲溶液中）溶液与 0.2% (v/v) 的 50% 过氧化氢 (H₂O₂) 溶液在室温下共孵育 24 小时。用截留分子量为 10 kDa 的 Amicon Ultra-10 离心管去除残留氧化剂。然后用 50% 流动相 B 替换样品缓冲溶液。

结果与讨论

在配方开发期间，常需监测稳定性研究或应力样品（例如样品暴露于过氧化氢 (H₂O₂)、紫外线或金属离子）中的蛋白质氧化情况。本研究中，使用 *t*-BHP 和 H₂O₂ 作为化学氧化剂促进 NIST mAb 样品的氧化。过往研究表明，这两种试剂均能特异性氧化 mAb 的 Met 侧链残基。H₂O₂ 更易氧化不易接近的掩蔽残基，而 *t*-BHP 则氧化表面暴露更多的 Met 残基^[7]。图 1 展示了化学氧化剂诱导的 Met 氧化反应示意图。

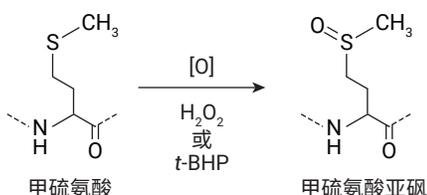


图 1. 化学氧化剂诱导的甲硫氨酸氧化

图 2 中的 NIST mAb（人源化 IgG1k）氨基酸序列表明，mAb 两条重链均含有六个可能的表面可及 Met 残基。之前对大多数人源化 IgG1 亚类抗体的研究表明，位于抗原结合（或 Fc）区域 CH₂ 和 CH₃ 结构域的 Met 残基更易发生氧化^[5]。在 NIST mAb 中，Met 255 和 Met 431 的氨基酸容易发生氧化。示意图如图 3 所示。

```

重链
QVTLRESGPA LVKPTQTLLT TCTFSGFSLT IAGM3VGVWIR QPPGKALEWL ADLWDDKCH YNPSLKRRLT
ISKDTSKNQV VLKVTNMDPA DTATYYCAR MLFNCFEDW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG
GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHRPS
NTKVDRKVEP KSCDRTHTCP FCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVSVLIT VLHQDWLNGK EYCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
VYTIPLPSREE MTKNGVSLTC LVKGFPSDI AVEWEISNGP ENNYKTTTPV LQSDGSEFLY SKLTVDKSRW
QQGKRVFCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

轻链
DIQMTQSPST LSASVGDRTV ITCSASSRYG YMIWYQOKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR FSGSGSGTEF
TLTISSLQPD DFATYYCQD SGYPIFFGGG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP
REARVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC
    
```

图 2. NIST mAb 氨基酸序列

方法条件

参数	HPLC 条件
色谱柱	AdvanceBio HIC, 4.6 × 100 mm (部件号 685975-908)
流动相	洗脱液 A) 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0 洗脱液 B) 含 2 mol/L 硫酸铵的 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0
流速	0.3–0.5 mL/min
柱温	25 °C
进样量	5 μL
最终样品浓度	1 mg/mL
检测	UV, 220 nm
梯度曲线	流速: 0.5 mL/min
	时间 %A %B
	0 50 50
	20 100 0
	25 100 0
	30 50 50
	40 50 20
平缓梯度	流速: 0.3 mL/min
	时间 %A %B
	0 40 60
	40 90 10
	45 90 10
	50 40 60
	60 40 60

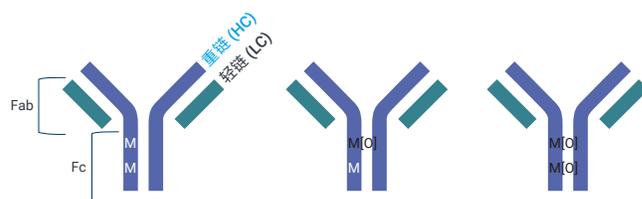


图 3. 人源化 IgG1 mAb 中，位于 Fc 区域的甲硫氨酸残基最易被氧化

AdvanceBio HIC 色谱柱在低盐浓度起始条件下可区分 mAb 氧化异构体与未处理的 mAb 样品。在所报告的实验条件下，经 t-BHP 氧化的 NIST mAb 将产生多个保留时间更短的峰，这可能是由于构象发生变化。HIC 色谱图（图 4）中标注为 1-6 的较早流出的峰表明 mAb 的 Met 残基被氧化。保留时间约为 12.6 分钟的峰 7 对应未氧化的 mAb。H₂O₂ 处理的 mAb 样品被完全氧化，洗脱的三个峰具有更短的保留时间，表明 Met 残基被氧化的程度更高。IgG1k mAb 样品与两种不同氧化剂共孵育后所得的色谱图差异表明，反应受 Met 残基溶剂可及性以及氧化剂空间限制的影响，这与之前的报道一致^[6]。

为进一步提高分离度，使用更慢的流速以及更平缓的梯度条件。设置流速为 0.3 mL/min，起始硫酸铵浓度为 1.2 mol/L 且梯度速率为 25 mmol/L/min，在相对更短的分析时间内实现了更好的分离（图 5）。在这幅色谱图中，可从未经处理的 mAb 样品中清晰观察到多种 mAb 氧化物。

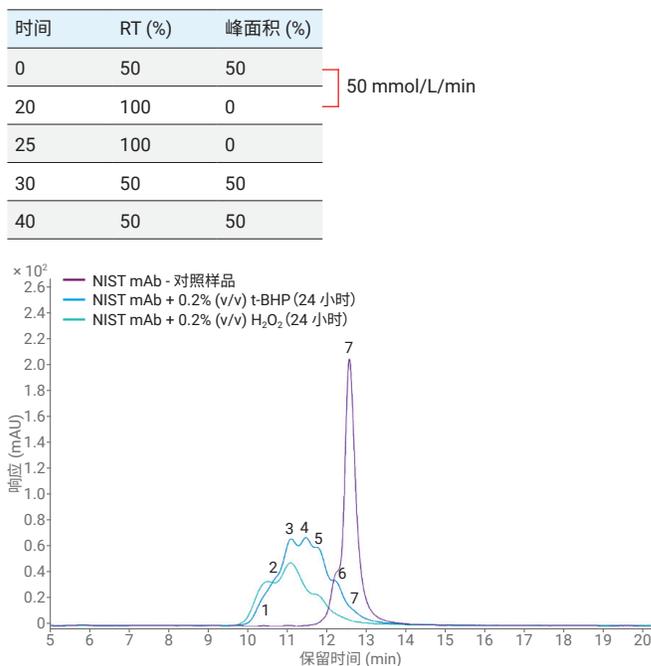


图 4. 使用更低的起始盐浓度分离 NIST mAb 氧化异构体

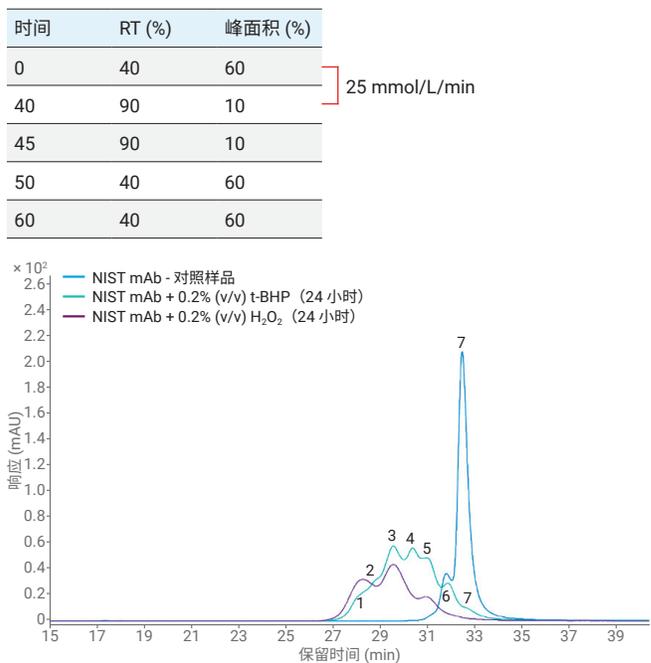


图 5. 使用平缓梯度分离 NIST mAb 氧化异构体

在图 6 中，NIST mAb 样品与 2 % (v/v) t-BHP 共孵育，使用更平缓的梯度条件在不同时间点监测氧化反应。从叠放的色谱图可以看出，mAb 氧化程度随 t-BHP 孵育时间的增加而增加。几个小时氧化反应后可观察到多种 mAb 氧化物。这表明 mAb 样品两条重链上的表面可及的 Met 残基可能被随机氧化，如之前的研究所报道^[5]。反应 10 小时后，mAb 样品被进一步氧化并产生一个较宽的峰，表明发生了强制氧化。之前的研究推测，掩蔽较深的 Met 残基的氧化会引起更显著的结构变化，这可能导致 mAb 部分展开^[7]。部分展开的 mAb 可能具有更多构象变异，导致产生更宽的峰以及更大的保留时间偏移。

结论

AdvanceBio HIC 色谱柱可实现 mAb 氧化异构体与其天然形式的分离。使用 AdvanceBio HIC 色谱柱，在更慢的流速以及更平缓的梯度条件下可实现 mAb 氧化异构体的出色分离，同时还可保持相对较短的分析时间。

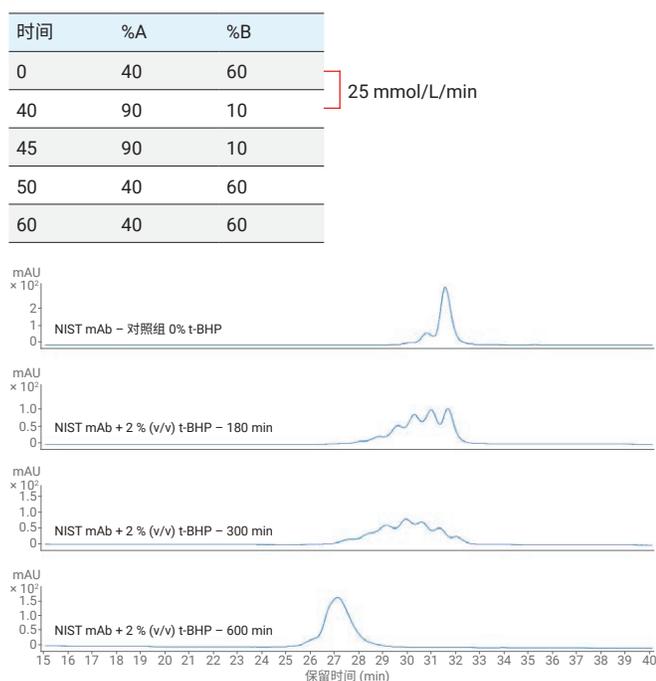


图 6. 监测 t-BHP 氧化 mAb 的反应

参考文献

1. Zhang, Y.; *et al.* Hydrophobic interaction chromatography of soluble Interleukin I receptor type II to reveal chemical degradations resulting in loss of potency, *Anal. Chem.* **2008**, *80*(18), 7022-8
2. Gaza-Bulseco, G.; *et al.* Effect of methionine oxidation of a recombinant monoclonal antibody on the binding affinity to protein A and protein G. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, *870*(1), 56–62
3. Boyd, D.; Kaschak, T.; Yan, B. HIC resolution of an IgG1 with an oxidized Trp in a complementarity determining region, *J. Chromatogr. B.* **2011**, *879*(13–14), 955-60
4. Fekete, S.; *et al.* Hydrophobic interaction chromatography for the characterization of monoclonal antibodies and related products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *130*, 3–18
5. Chumsae, C.; *et al.* Comparison of methionine oxidation in thermal stability and chemically stressed samples of a fully human monoclonal antibody. *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *850*(1–2), 285–294
6. Shen, F. J.; *et al.* The application of tert-butylhydroperoxide oxidation to study sites of potential methionine oxidation in a recombinant antibody. In *Techniques in Protein Chemistry*; Marshak, D. R., Ed.; Academic Press, Inc.: San Diego, CA, **1996**; 7, 275–284
7. Liu, D.; *et al.* Structure and stability changes of human IgG1 Fc as a consequence of methionine oxidation. *Biochemistry* **2008**, *47*(18), 5088–5100

更多应用简报

AdvanceBio RP mAb

出版号	标题
5991-6296EN	使用 AdvanceBio RP-mAb 对完整治疗性单克隆抗体进行 LC/MS 分析
5991-4723EN	使用 Agilent Bio-Monolith Protein A HPLC 色谱柱缩短定量分析人 IgG 的分析周期
5991-5125EN	使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱和 LC/MS 进行的细胞培养优化
5991-6094ZHCN	Bio-Monolith Protein G 色谱柱 — 更多 mAb 滴度测定选择

PLRP-S

出版号	标题
5991-6263CHCN	使用自动化样品前处理和新型 DAR 计算器软件计算抗体药物偶联物 (ADC) 的药物/抗体比率 (DAR)
5991-6559CHCN	使用 UHPLC/Q-TOF 测定抗体药物偶联物 (ADC) 的药物/抗体比率 (DAR)

AdvanceBio HIC

出版号	标题
5994-0149ZHCN	用于抗体药物偶联物 (ADC) 药物/抗体比率 (DAR) 分析的 AdvanceBio HIC 色谱柱
5994-1869ZHCN	使用 Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 µm 色谱柱和 AdvanceBio HIC 色谱柱分析驼源单域抗体

ZORBAX RRHD 300SB

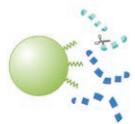
出版号	标题
5990-9668CHCN	利用 Agilent ZORBAX RRHD 亚 2 µm 300 二苯基 UHPLC 柱对还原态和完整单克隆抗体进行超快速高分离度分离
5990-7988EN	利用 Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C18 反相柱分析氧化胰岛素链
5990-7989EN	用于蛋白质分离的 Agilent ZORBAX 300SB-C18 1.8 µm 快速高分离度色谱柱
5990-9248CHCN	使用 Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C18 (1.8 µm) 反相色谱柱进行重组人促红细胞生成素的快速分离
5990-9631CHCN	利用 Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度 (RRHD) 300SB-C8 柱对还原态单克隆抗体进行快速 UHPLC 分析
5990-9016CHCN	使用 Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度 300SB-C8 1.8 µm 色谱柱进行完整单克隆抗体的反相分离
5990-9667CHCN	利用 Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度 300SB-C3 柱对完整和还原态单克隆抗体的超快速反相分析进行优化

肽谱分析

背景

肽谱分析是一种强大的技术，可用于全面鉴定蛋白质的一级结构，还能够区分蛋白质内异构基团的准确位置。由于重组蛋白质的一级结构或氨基酸序列是已知的，因此能够预测在使用酶（例如胰蛋白酶）酶解蛋白质时将生成的片段。胰蛋白酶通过水解赖氨酸或精氨酸以及除脯氨酸以外的任何其他氨基酸之间的键将蛋白质分解成片段。使用这种方法，曲妥珠单抗将被分解成 62 种单独的片段，并且高分离度反相分离能够将它们分离成经典的“指纹”色谱图。将分离与质谱检测相结合，能够将肽谱分析色谱图中观察到的实际的峰与分析软件预测的预期片段相关联。

不同蛋白质将产生不同的肽“指纹”，这些肽段具有不同的大小（从单个氨基酸和二肽到更大的多肽）并具有不同程度的疏水性。因此，推荐用于此类分离的色谱柱是表面多孔或全多孔颗粒填料的 C18 反相色谱柱。



肽谱分析

反相色谱 (< 150 Å)

可靠地表征一级结构并检测 PTM

AdvanceBio 肽谱分析柱

蛋白质鉴定和 PTM 分析

属性	优势
封端的 C18 键合相	对亲水性肽具有良好的保留性
表面多孔颗粒填料	在适度的反压下具有类似于 UHPLC 的效率

AdvanceBio Peptide Plus

适用于质谱检测的理想的甲酸性能

属性	优势
使用甲酸时可获得尖锐的峰形	良好的质谱灵敏度
高灵敏度	鉴定重要的低浓度修饰
电荷表面化学特性	大样品载样量下保持高性能
独特的选择性	分离重要 PTM (如脱酰胺基化)

AdvanceBio EC-C18

非常适用于易受不锈钢柱上假峰影响的样品

属性	优势
PEEK 硬件	消除柱上金属相互作用

入门指南

样品前处理对于成功的肽谱分析至关重要。这可能是一个耗时的过程，其中可能需要针对待酶解的各种蛋白质优化多个步骤。样品前处理的分步指导可参见下文的分析指南。对于肽谱分析样品体积较大的用户可能想要通过自动化提高速度并改善重现性。有关样品前处理自动化系统 AssayMAP Bravo 的更多信息可见于本章节的结尾。

使用三氟乙酸作为离子对试剂可获得更出色的峰形，并且 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱是该分离的理想选择。该色谱柱含有 120 Å 孔径的 Poroshell 颗粒，并提供优异的分度度和峰容量，且无需采用 UHPLC 仪器。对于使用质谱检测的应用，通常优先选择甲酸作为离子对试剂。在此类情况下，AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱将提供更出色的分离谱图。AdvanceBio Peptide Plus 也推荐用于需要采用较大的样品载样量以检测微量杂质的情况。对于亲水性极强的小分子肽，推荐使用 AdvanceBio 肽谱分析以实现更好的保留。

肽谱分析：操作指南

前言

肽谱分析（生物制药中的一项重要工具）是一款非常强大的方法，广泛用于蛋白质的鉴定测试，尤其适用于重组方式生成的蛋白。分析中常需通过酶解（常使用胰蛋白酶）蛋白质生成肽片段，然后进行可重现地片段分离和鉴定，从而检测并监测单一氨基酸变化、氧化、脱氨基及其他的降解产物。肽谱分析还可以直接检测常见的单克隆抗体变体，例如 N 端环化、C 端赖氨酸处理和 N 端糖基化，以及其他的翻译后修饰。

肽谱是一个蛋白及其多次处理后所得最终产物的指纹图谱，可为所分析的蛋白提供全面深入的认识。它包括 4 个主要步骤：蛋白质分离和纯化；肽键的选择性裂解；肽段的色谱分离以及肽段的验证分析。

肽谱被认为是一个对比流程，它可以确认蛋白质的一级结构，并检测结构的改变。此外，它还可用于证实工艺一致性和遗传稳定性。肽谱中应包含蛋白质的阳性鉴定、完整肽段序列的最大化覆盖，并提供非酶解的蛋白质水平信息之外的其他信息和序列鉴定。

选择适合的色谱技术用于分离肽段并生成肽谱时，需考虑蛋白质本身、实验目的及预期结果。然而，反相色谱 (RPC) 卓越的分离能力使其成为了肽谱分离中最主要的 HPLC 技术。由于此技术可使用挥发性的流动相洗脱液，因此也是分析性和制备性分离的理想选择。需要重点注意

的是：肽谱分离的首选色谱柱与用于小分子分离的色谱柱类似，但是由于大多数肽谱分离均在低 pH 和加热条件下进行，所以常使用具有出色 pH 稳定性和硅醇基效应更小的色谱柱。

要成功生成肽谱，需仔细检查完整的表征策略。一张谱图可能包含 100 多个色谱峰，代表不同的肽段及其衍生物，所以需要分析人员具备样品前处理方法、强大分离技术和验证方案方面的知识。拥有成功开发肽谱的技能和信息将有助于您获得理想的蛋白水解消化物分离，并成功进行肽段的可靠表征。

本肽谱分析指南的目的是：强调利用反相色谱进行肽谱分析时的一些重要事项；分享一些用于肽谱分析流程的基本技术；以及强调进行肽谱分离优化时的注意事项，尽可能获得理想结果。

蛋白质酶解:

处理蛋白质以增强肽谱分离

在分析前，需要很好地了解蛋白质酶解的步骤，这有助于确保酶解过程完整、成功地进行，以及帮助您更自信地选择策略。通常情况下，酶解方法需要一套独立的开发方案，以提供充足稳定的样品进行 LC 进样。虽然酶解过程的优化有许多选择可以考虑，但还是需要遵循一些常用方法。蛋白质酶解可分为五个步骤，如表 1 中总结：(1) 样品前处理，(2) 选择裂解试剂，(3) 还原/烷基化，(4) 酶解过程，(5) 富集/纯化。

表 1. 蛋白质酶解的五个步骤

步骤	预期效果	常规实验
1. 样品前处理	对样品进行前处理，用于酶解	去除、富集、透析、脱盐
2. 选择裂解试剂	特定的裂解要求	无
3. 还原和烷基化	还原反应可还原二硫键，烷基化可引入 SH 基团	还原：DTT，45 min，60 °C 烷基化：IAM，1 h，避光进行
4. 酶解过程	蛋白质裂解	酶解：pH 8，37 °C，过夜 淬灭：加入 TFA
5. 富集/纯化	制备样品用于 LC 或 LC/MS 分析	C18 枪头、浓缩、透析、亲和色谱柱

第 1 步：

样品前处理

根据蛋白质的大小或结构，样品的前处理方法不尽相同。在特定的条件下，可能需要进行样品富集，或从所添加的物质和稳定剂（用于产品剂型中）中分离蛋白质，尤其是在这些添加剂会干扰肽谱分析过程时。针对这些流程，现已开发出许多方法，每种蛋白质均具有一套对应的纯化措施或处理方法。但是，酶解前通常会使用一些更常用的方法进行样品纯化，包括去除/富集、透析和凝胶过滤脱盐。

去除和富集策略分别被开发用于去除样品中的高丰度蛋白质或分离目标蛋白质。更多的时候，去除用于蛋白质组学应用，用以降低生物样品（例如，血清）的复杂性，此类样品中含有高浓度的白蛋白和免疫球蛋白。利用安捷伦的多重亲和去除系统 (MARS) HPLC 色谱柱以及离心小柱，可以对血清、血浆和其他生物液体中高价值、低丰度蛋白质和生物标记物进行鉴定和表征。通过 MARS 去除 14 种高丰度蛋白质，可去除总蛋白量的约 94%。该去除过程稳定、易于自动化操作，且效率很高。



MARS 可以使用各种液相柱规格和离心小柱。可去除的蛋白质包括白蛋白、IgG、抗胰蛋白酶、IgA、转铁蛋白、结合珠蛋白、纤维蛋白原、 α 2-巨球蛋白、 α 1-酸性糖蛋白、IgM、载脂蛋白 AI、载脂蛋白 AII、补体 C3 及甲状腺素运载蛋白。

去除策略利用了免疫亲和技术（例如，免疫沉淀、免疫共沉淀及免疫亲和色谱法）。另一方面，富集技术会根据独特的生化活性、翻译后修饰 (PTM) 或胞内的空间定位分离细胞蛋白的亚类。翻译后修饰（例如磷酸化和糖基化）可使用亲和配体（例如，金属离子亲和色谱 (IMAC) 或固定化凝集素）分别进行富集。为引入独特的蛋白质化学，其他技术需使用代谢或酶促结合修饰后的氨基酸或 PTM。

不论是简单的样品还是复杂的样品，常需要通过透析或脱盐对样品进行优化处理，以确保它们酶解过程的兼容性。例如，由于质谱法 (MS) 将测定带电离子，因此必须在 MS 前进行除盐（特别是钠盐和磷酸盐），尽可能减少它们对检测的干扰。透析和脱盐产物可进行缓冲液交换、脱盐或小分子去除处理，以防止对后续过程的干扰。

透析是降低样品盐浓度的常规流程。具体步骤是先将样品装入透析袋（袋膜具有特定的孔隙）中，袋口打结，然后将其置入水浴或缓冲液中，通过扩散使盐浓度达到平衡。大分子无法扩散出透析袋，会留在袋内。如果使用水浴，袋内小分子的浓度会缓慢降低直到透析袋内外浓度相同。达到平衡后，即可撕破透析袋，将其中的溶液倒入收集容器中。虽然透析体积可达几升，但对于大量样品却并不实际，因为会需要几天时间才能将盐完全去除。

凝胶过滤 (GF) 是最实用的实验室流程，可在酶解前对样品进行脱盐。该方法是一种非吸附的色谱技术，可根据分子大小进行分子分离。脱盐可被用于完全去除或降低样品中的盐浓度或其他小分子量成分，而缓冲液的更换则会使用一种新的缓冲液替换样品中的缓冲液。

凝胶过滤法是最简单的色谱操作法之一，因为样品均在等度洗脱条件下处理。在其分析形式中，凝胶过滤法（也称为体积排阻色谱）可分离分子量差异小于两倍的分子（例如，蛋白质）。在这些应用中，目标分离物质的体积差异非常大（即蛋白质与盐相比）。通过选择凝胶过滤填料，可完全排除较大的分子，同时允许较小的分子自由扩散至所有的孔隙中。色谱柱使用缓冲液进行平衡，它与样品的缓冲液可能相同，也可能不同。将样品加载至色谱柱后，再添加更多的色谱柱缓冲液（洗脱缓冲液），携带样品分子自上而下地流过色谱柱。较大的分子（不能进入填料的孔隙中）首先从色谱柱中洗脱出来，然后是扩散入孔隙的较小分子，相对于较大的分子，小分子的洗脱时间更长。如果洗脱缓冲液与样品使用的缓冲液不同，则较大的分子会从原始盐中替换出来，并被这种新的缓冲液洗脱，从而从最初的样品缓冲液中完全分离出来。



AdvanceBio SEC 色谱柱可在肽谱分析应用前对蛋白质混合物进行有效分类（按大小）和脱盐。

Captiva 低蛋白质结合过滤器

无论您使用何种样品前处理方法，采用一种低蛋白质结合过滤器对样品进行过滤都是一个不错的选择。

安捷伦的 PES 过滤器在蛋白质相关的过滤中提供优越和一致的低蛋白质结合力。在大多数液相色谱分析中，PES 滤膜相对 PVDF 滤膜而言是一种更好的选择。对于常见的液相色谱溶剂，安捷伦的 PES 具有与 PVDF 过滤器相似的兼容性，而在蛋白质结合力和清洁度方面比 PVDF 更胜一筹。如需了解更多信息，请访问 agilent.com/chem/filtration

Captiva PES 过滤器				
直径	孔径 (μm)	认证	外壳	部件号
15	0.2	LC/MS	聚丙烯	5190-5096
4	0.45	LC	聚丙烯	5190-5095
4	0.2	LC/MS	聚丙烯	5190-5094
15	0.45	LC	聚丙烯	5190-5097
25	0.2	LC/MS	聚丙烯	5190-5098
25	0.45	LC	聚丙烯	5190-5099



第 2 步:

选择裂解试剂

裂解肽键的方法有两种 — 化学裂解和酶解。化学裂解涉及到使用亲核的非酶促试剂（例如，溴化氰 (CNBr)）在特定区域以化学形式裂解肽键，而胰蛋白酶等蛋白水解酶则被证实对于多个位点特异性裂解区域非常有效。裂解方法和试剂的选择取决于所要分析的蛋白质以及分析人员所期望的特定结果。此外，进行选择时还需要仔细考察整个肽谱分析过程，并考虑相关的表征。肽谱分析最常使用的裂解试剂是胰蛋白酶，因为它具有非常明确的特异性。胰蛋白酶仅水解由精氨酸 (Arg) 或赖氨酸 (Lys) 的羧基形成的肽键。表 2 中列出了一些常见的裂解试剂及它们的特异性。

表 2. 裂解类型

裂解	裂解试剂	特异性
酶解	胰蛋白酶	Arg 和 Lys 的羧基端
	胃蛋白酶	非特异性
	糜蛋白酶	疏水性残基的羧基端
化学裂解	谷酰胺肽链内切酶	Glu 及 Asp 的羧基端
	溴化氰	Met 的羧基端
	稀酸	Asp 与 Pro
	BNPS 粪臭素	Trp

第 3 步:

变性、还原和烷基化

为使蛋白水解酶有效地裂解肽链，需要利用各种试剂对样品进行变性、还原和烷基化。变性和还原常可同时进行，即在使用试剂（例如，1,4-二硫苏糖醇 (DTT)、巯基乙醇或三(2-羧乙基)膦)的同时进行加热。大多数情况下使用 DTT，这是一种强还原剂，可还原二硫键，从而保护蛋白质中半胱氨酸之间的分子间和分子内二硫键。通过同时进行变性和还原，可避免因二硫键被还原而导致的蛋白质复性，这是使用单独加热作为变性剂时常存在的问题。蛋白质变性及还原后，还需要对半胱氨酸进行烷基化，以进一步减少潜在的复性。酶解前对蛋白质样品进行烷基化最常用的试剂为碘乙酰胺 (IAM) 和碘乙酸 (IAA)。

图 1 为使用反相色谱分离方法评估一个单克隆抗体酶解前还原和烷基化反应完整性的实例。

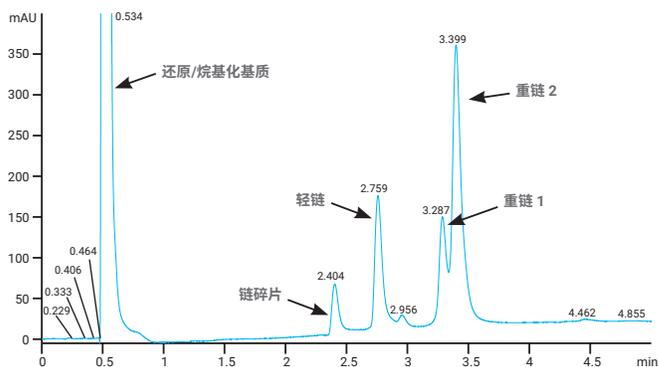


图 1. 在进行酶解方案前，使用 Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度 (RRHD) 300SB-C8, 2.1 × 50 mm 色谱柱 (安捷伦部件号 857750-906) 通过反相色谱分离还原、烷基化的单克隆抗体。分离的条件：Agilent 1290 Infinity LC, 流速 0.5 mL/min, 75 °C, 流动相为水 (0.1% TFA)/乙腈 (0.08%) 多段条件

第 4 步：

如前所述，因为胰蛋白酶具有明确的特异性，所以是最常用的消化蛋白酶。由于胰蛋白酶也是一种蛋白质，它自身可能会发生水解（即，自溶）。但是，天然存在于多数样品中的钙可与胰蛋白酶中的 Ca^{2+} 键合环相结合，从而阻止胰蛋白酶的自溶。现今，大多数实验室中均使用修饰型胰蛋白酶，因此自溶大大减少，不需要特别考虑。

胰蛋白酶的最佳酶解 pH 值范围为 7.5–8.5，通常在 37 °C 条件下进行。为使酶裂解能在最佳 pH 下进行，需要在添加胰蛋白酶前加入缓冲液（通常为 50 mmol/L 三乙基碳酸氢铵 (tABC)，或 12.5 mmol/L 碳酸氢铵 (ABC)）。2-氨基-2-羟甲基丙烷-1,3-二醇 (Tris) 缓冲液也可实现此作用，但需要仔细考虑，因为 Tris 缓冲液与质谱分析（例如 MALDI 及 ESI-MS）并不兼容，需通过固相萃取法 (SPE) 或 ZipTip 微量层析柱将其去除。为确保有足够（但不过多）量的酶用于酶解，正确的酶/蛋白比值非常关键。

蛋白质在不同环境下的酶解表现可能不同，在酶解混合物中的示范蛋白质时，其酶解效率会低于单独酶解的效率。其中一个原因可能是当多种蛋白质共同进行酶解时，它们对胰蛋白酶裂解位点的竞争性增加。此外，还有许多因素和条件参数可能会影响蛋白质酶解的完全性和有效性，从而导致各种各样的预期结果。如果我们能够充分了解或控制这些因素，将显著改善酶解结果。反应的 pH 值、酶解时间和温度以及使用的裂解试剂量均是酶解效率的关键影响因素。

- **酶解 pH。** 一般情况下，对于给定的裂解试剂，为确保获得理想效果，可按经验确定酶解混合物的 pH 值。例如，如果使用溴化氰作为裂解试剂，则必须保持强酸环境（例如，pH 2，甲酸）；但如果使用胰蛋白酶作为裂解试剂，那么最佳条件则为弱碱 (pH 8) 环境。一般情况下，反应环境的 pH 值不可改变酶解过程中蛋白质的化学完整性或碎裂反应过程
- **酶解时间及温度。** 时间和温度是酶解优化过程中的重要因素。为尽可能减少化学反应，大多数蛋白质酶解的温度建议控制在 25 °C 至 37 °C 之间，例如，胰蛋白酶酶解常在 37 °C 下进行。但是，蛋白质的类型和大小会最终决定反应的温度，因为随着反应温度的提高，蛋白质会发生变性。反应时间也是优化酶解方案时的一个考虑因素。如果样品量充足，需考虑通过实验性研究来确定最佳反应时间，以确保获得可重现的肽谱和避免酶解不完全。酶解时间从 2 h 到 30 h 不等，取决于样品大小和类型，可加酸停止反应，这对肽谱不会产生干扰，也可通过冷冻停止反应
- **裂解酶的浓度。** 裂解试剂的浓度应尽可能低，以避免干扰肽谱分析。实验中通常会使用过量的裂解试剂以获得合理的快速酶解时间（即，6 至 20 h）；但对于增加的试剂量，需给予充分的考虑。常用的蛋白质/蛋白酶比值为 10:1 至 200:1 之间，建议裂解试剂分两步或多步添加，以实现更出色的裂解。在许多胰蛋白酶的标准酶解流程中，胰蛋白酶都是以上述方式加入。尽管如此，最终的反应体积仍保持小到足以实现分离的水平（肽谱分析中的下一步）。为确定可能影响后续分析的酶解因素，将使用一个含有所有溶剂（无测试蛋白质）的酶解对照执行一次空白检测

图 2 — 胰蛋白酶酶解流程（第 I-V 部分）

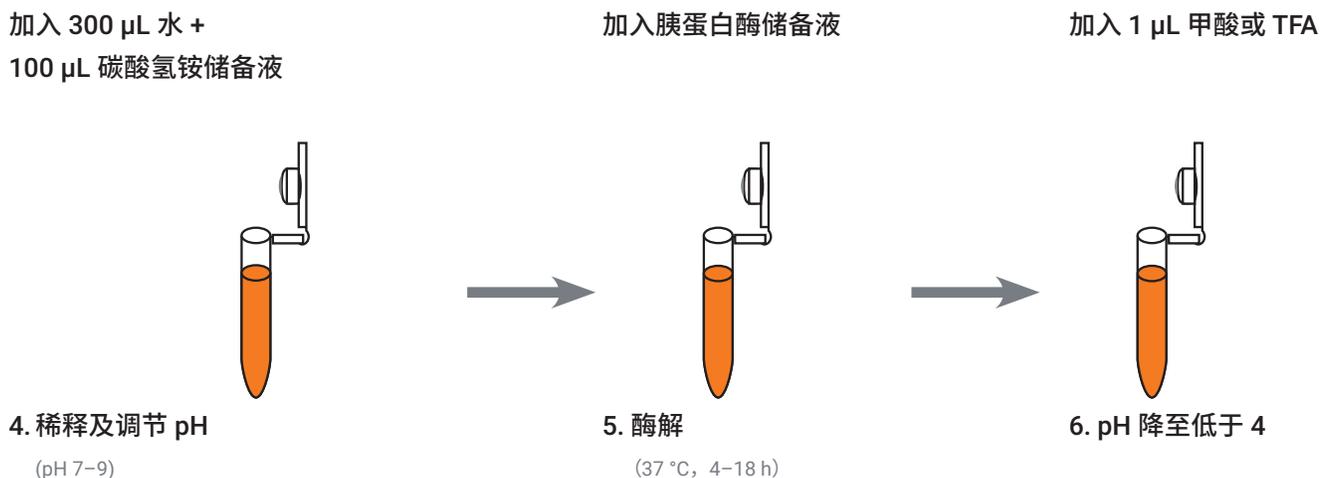
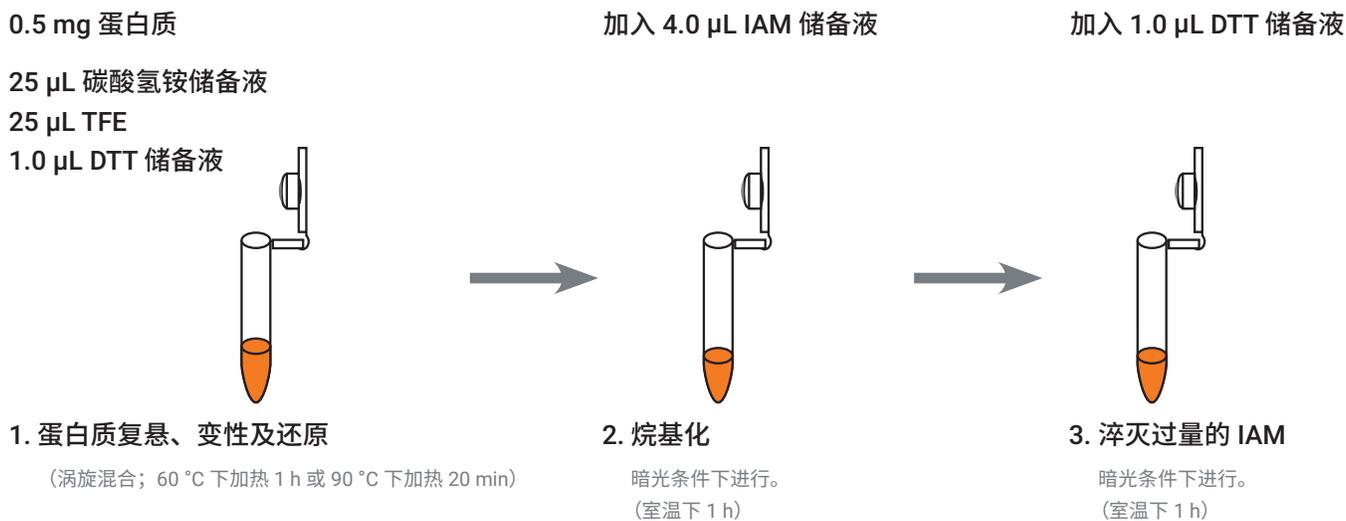
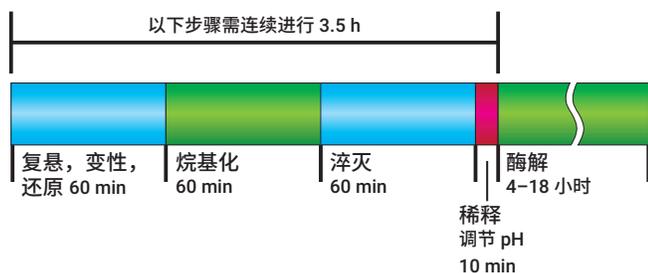


图 3 — 酶解流程的预期时间轴



下文中所介绍的以及图 2 和图 3 中总结的胰蛋白酶酶解方法是一个通用流程, 常用于还原、烷基化、溶液内酶解及蛋白质纯化 (0.5 mg)。此流程可针对少量蛋白质的酶解进行调节, 此外我们还提供有一张实用清单, 其中列有安捷伦试剂和部件号。

还原、烷基化、酶解溶液前处理：总结

100 mmol/L 碳酸氢铵：

取 0.7906 g 碳酸氢铵，加入 100 mL 水。保存于 4 °C 冰箱中，最长可使用 2 个月。

胰蛋白酶储备液：

修饰的胰蛋白酶可通过购买安捷伦蛋白质组学级胰蛋白酶（部件号 204310，见下页“试剂和设备”）获得。此酶为冻干形式，可在 -20 °C 条件下保存一年以上，活性无明显降低。需要时，可使用 100 μ L 50 mmol/L 的乙酸溶解冻干的胰蛋白酶，获得终浓度为 1 μ g/mL 的胰蛋白酶储备液。为了尽可能减少冻融循环，增加储备液稳定性，实验将溶解后的胰蛋白酶分为四管，每管约 10 μ L。将每份溶液保存在 -20 °C 的非无霜冰箱中。此 1 μ g/ μ L 的溶液可根据需要用于制备胰蛋白酶中间溶液（见下文）。注意，安捷伦蛋白质组学级胰蛋白酶随附有技术文献，提供了替代的胰蛋白酶裂解方法。我们采用了下述方法，结果表明该方法简单可靠。

200 mmol/L DTT：

取 0.031 g DTT 加入 1.5 mL Eppendorf 管中，再加入 1 mL 水。涡旋混合。将 DTT 溶液分成便于使用的等分溶液（例如，每管 100 μ L），置于微量离心管中。将每份溶液保存在 -20 °C 的非无霜冰箱中，最长可保存 1 个月。请勿反复冻融。

200 mmol/L IAM

（使用前新鲜配制）：取 0.037 g IAM 加入 1.5 mL Eppendorf 管中，再加入 1 mL 水。涡旋混合。

胰蛋白酶酶解方案

蛋白质的复悬、变性及还原	
1	在 0.5 mL 离心管中加入 0.5 mg 总蛋白
2	加入 25 μ L 碳酸氢铵储备液
3	加入 25 μ L TFE 变性剂
4	加入 1.0 μ L DTT 储备液
5	涡旋混合
6	在以下任一条件下加热以变性： ✓ 60 °C, 45 min 至 1 h ✓ 90 °C, 20 min (亲水性蛋白质) 至 1 h (疏水性蛋白质)
7	冷却至室温

烷基化	
1	加入 4.0 μ L IAM 储备液
2	短暂涡旋
3	将样品在避光 (箔纸覆盖)、室温下孵育 1 h

淬灭过量的 IAM	
1	加入 1.0 μ L DTT 储备液, 破坏多余的 IAM
2	在避光 (箔纸覆盖)、室温下放置 1 h

稀释及 pH 调节	
1	加入 300 μ L 水, 稀释变性剂
2	加入 100 μ L 碳酸氢铵储备液以增加 pH
3	或者, 也可以取 0.5–1 μ L 溶液滴在 pH 试纸上进行检测。典型值为 7.5–8.0。更重要的是, 当起始样品的 pH 未知时, 需要检查 pH 值
4	如果 pH 不在 7–9 的范围内, 则需加入更多碱 (碳酸氢铵)

酶解	
1	使用胰蛋白酶储存溶液配制新鲜的胰蛋白酶储备液。完全复悬需要 15 min。
2	如果您计划酶解的总蛋白质少于 20 μ g, 需添加 45 μ L 的超纯水将储备液稀释十倍, 制备胰蛋白酶中间溶液。此 100 ng/ μ L 溶液可保存在 -20 °C 条件下, 2 个月内活性不会明显下降。 注意: 如果 IAM 未被破坏, 则会减缓赖氨酸的烷基化
3	加入胰蛋白酶储备液, 其中酶与底物的质量比为 1:20 至 1:50。例如, 对于 500 μ g 蛋白质, 可添加 10 μ g 至 25 μ g 的胰蛋白酶 (10–25 μ L 胰蛋白酶储备液)
4	短暂涡旋
5	将试管置于加热器中, 在 37 °C 下孵育 4–18 h
6	冷却溶液

降低 pH, 终止胰蛋白酶活性	
1	加入 1 μ L 纯甲酸或 TFA, 降低 pH 值, 终止胰蛋白酶活性。如果您打算脱盐, 可选用 TFA, 有助于净化过程中肽段与树脂的结合
2	短暂涡旋
3	如果您担心原始样品的 pH, 可检查其 pH 值 (典型值为 3.0–3.3)。如果 pH 值大于 4, 可添加更多的酸

酶解物纯化	
1	根据样品的来源, 可能需要在质谱分析前进行脱盐
2	如果不需要脱盐, 但是样品呈现不透明状, 可在质谱分析前进行样品过滤。可使用安捷伦旋转过滤器, 部件号 5185-5990。不透明状可能是由于样品中的细胞碎屑所导致
3	必要时, 可稀释一份样品用于分析。如果蛋白质分子量为 50 kDa, 且酶解充分, 溶液浓度约为 20 pmol/ μ L。如果您的样品并不复杂, 可稀释为 50 fmol/ μ L 的溶液

第 5 步：

酶解产物的纯化和富集

进行肽谱分析之前，通常需要进行纯化和/或富集以便成功进行肽谱分析。根据样品类型和靶向目标，有多种方法可完成纯化和富集过程。例如，特定 PTM（例如，磷酸化、泛素化和糖基化）的富集可采用 PTM 特异性抗体或配体进行亲和纯化，而磷酸肽可使用抗磷酸化特异性抗体通过 IP 进行富集，或通过 Pull-down 实验使用 TiO₂（可特异性结合磷酸化的丝氨酸、酪氨酸或苏氨酸）进行富集。

多肽富集后，可使用石墨或 C-18 枪头或小柱去除盐类和缓冲液，而去垢剂则可通过亲和柱或去垢剂沉淀剂进行去除。稀释的样品可采用各种截留分子量 (MWCO) 范围的浓缩仪进行浓缩。纯化后，多肽样品可进行用于后续质谱分析的最终制备，根据分子类型的不同，制备方式各不相同。对于 LC/MS 或 LC-MS/MS 分析，为获得良好的 LC 分离度和分析结果，需正确选择流动相和离子对试剂。MALDI-MS 需要将多肽样品与特定的基质（结晶的能量吸收染料分子）结合，然后在 MALDI 板上干燥后再进行分析。



胰蛋白酶酶解方案

所需项	示例
碳酸氢铵，试剂级	Sigma 产品目录号 A-6141
二硫苏糖醇 (DTT), > 99+%	Sigma 产品目录号 D-5545
碘乙酰胺 (IAM), 97%	Sigma-Aldrich 产品目录号 I-670-9
三氟乙醇 (TFE), 99+%	Sigma-Aldrich 产品目录号 T63002-100G
胰蛋白酶（修饰型）	安捷伦蛋白质组学级胰蛋白酶（部件号 204310）
水，18 兆欧或等效	安捷伦部件号 8500-2236
甲酸（分析纯）或三氟乙酸（测序级）	安捷伦部件号 G2453-85060
Eppendorf Safe-Lock 微量离心管，无色，非硅化	Eppendorf 部件号 022363611（0.5 mL，每盒 500 个），或部件号 022363204（1.5 mL，每盒 500 个）
微量移液器及枪头：1–1000 μ L 范围	
试管加热器/振荡器	Eppendorf Thermomixer
pH 试纸，pH 范围为 2.5–4.5 及 7.0–9.0	EM Science ColorpHast 试纸，产品目录号 700181-2
分析天平	
Bond Elut OMIX 枪头，10 μ L（洗脱体积 2–10 μ L）	1 \times 96 微萃取头（安捷伦部件号 A5700310）；6 \times 96 微萃取头（安捷伦部件号 A5700310K）
Bond Elut OMIX 枪头，100 μ L（洗脱体积 10–100 μ L）	1 \times 96 微萃取头（安捷伦部件号 A57003100）；6 \times 96 微萃取头（安捷伦部件号 A57003100K）

用于小体积多肽纯化：Bond Elut OMIX 枪头

Bond Elut OMIX (10 µL 体积) 方法用于多肽酶解物纯化

所需项	示例
样品	使用 2.5% 三氟乙酸 (TFA) 溶液调节样品，使 TFA 最终浓度为 0.5–1.0%
预处理	吸取 10 µL 的 50% 乙腈 (ACN):水，然后弃掉溶剂。重复操作
调节及平衡	吸取 10 µL 的 1.0% TFA 溶液，然后弃掉溶剂。重复操作
样品应用	吸取最多 10 µL 预处理的样品至 OMIX 微萃取头。排出和吸入样品 3–5 个循环，获取更高效率。为提高结合率，最高可用 10 个循环
清洗	吸取 10 µL 的 0.1% TFA 缓冲液，然后弃掉溶剂。重复操作
洗脱	LC/MS 或 LC/MS/MS 分析：吸取 2–10 µL 的 0.1% 甲酸或 0.1% 乙酸（溶于 50%–75% 的乙腈或 50%–75% 的甲醇溶液），排入自动进样器样品瓶或孔板

为获得理想结果，可针对平衡、样品应用和清洗步骤设置移液器，使其与枪头体积 (10 µL) 匹配。对于洗脱，可将洗脱溶液精确等分至单独的容器中，并保持移液器在最大设置体积处，以匹配枪头体积 (10 µL)。

高通量多肽应用：

可用于肽谱分析的自动化样品前处理解决方案

“通过 AssayMAP 可联合进行一致的平行样品酶解以及自动化反相纯化，有利于我们考虑进行前所未有的规模和通量的合作研究。”

Jacob D. Jaffe 博士

蛋白质组学平台
助理总监



有关肽谱分析自动化样品前处理的更多信息请参见第 110 页。

反相色谱：肽谱分析的理想选择

在选择肽谱分析色谱柱和方法时，最终是依据所分析的蛋白质和工作流程的目的决定。最常用的肽谱分析色谱柱方法（特别是在生物制药领域）是反相色谱法 (RPC)。出色的分离能力及挥发性流动相（与质谱仪兼容）的使用，使得这种技术成为大多数多肽分离中的主要 HPLC 方法。其分离速度和效率均优于其他的 HPLC 分离模式。图 4 显示了使用方法 A 和 B，通过 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分离 NISTmAb 胰蛋白酶酶解产物得到的色谱图。选取 8 个峰用于后续的保留时间精度和峰容量计算。如需了解完整方法参数，请参阅应用简报 5994-2718ZHCN。

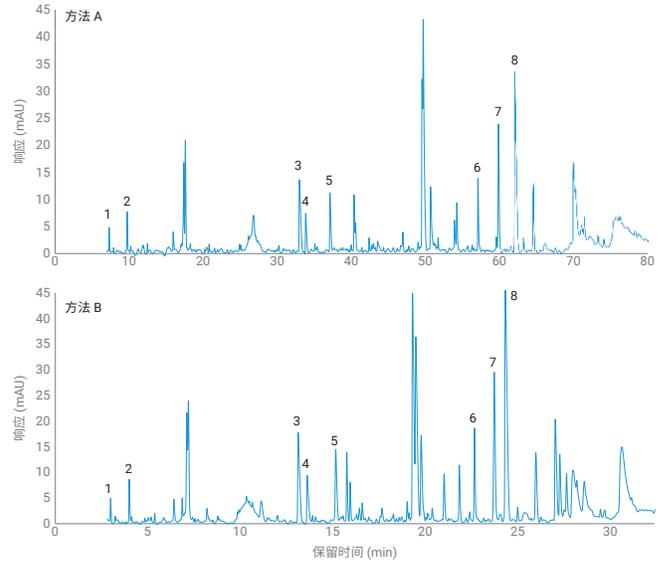
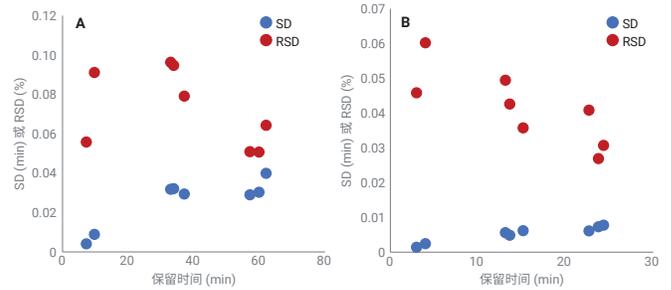


图 4. 使用方法 A 和 B，通过 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分离 NISTmAb 胰蛋白酶酶解产物得到的色谱图。选取 8 个峰用于后续的保留时间精度和峰容量计算



方法	梯度斜率 (%B/min)	∅ SD (min)	∅ RSD (%)	PC, 4σ (-)
方法 A	0.39	0.026	0.073	428
方法 B	0.98	0.005	0.039	348

图 5. 通过 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统获得的方法 A 和 B 的保留时间精度绝对 (SD) 值和相对 (RSD) 值。梯度斜率和峰容量如表所示

成功进行肽谱分离的必备条件

一般情况，需要很好地了解多肽特定的色谱柱要求，以及色谱方法开发过程来开发实用性 RPC 肽谱分析方法。虽然很多相同的色谱原则同时适用于多肽和小分子分离，但在优化多肽方法、获取可重现的稳定分离中，还是有许多条件特异性变量。色谱柱选择、色谱柱质量、流动相选择及检测要求均是肽谱分离的重要因素，可大大改善肽谱的质量。



色谱柱选择

为获取可靠、分离度良好的肽谱分离，其中最重要的因素是选择合适的色谱柱。色谱柱孔径、填料类型和粒径、键合相化学性质和稳定性（化学床和填充床）在改善肽谱分离、优化策略和光谱分析中有着重要作用。对于多肽分离，首选的色谱柱孔径范围为 100 Å–120 Å，而优化的固定相选择通常为 C18。虽然一些商业化色谱柱可针对多肽分离提供低至 60 Å 的孔径，但是这些色谱柱常用于较小肽段碎片或标准品的分析。同样地，一些较小的键合相碳链长度也在使用中，但这与特定的方法相关，在获取宽范围的疏水性多肽保留时，实用性较为有限。

由于多肽的扩散系数较高，因此其分离的塔板数较小，适合于在较低流速下，使用更小直径的全多孔色谱柱材料。由此衍生出亚 2 μm 的填料，用以更高效的肽谱分析。但是，最近，表面多孔色谱柱越来越多的使用于生物分离（尤其是在生物制药行业），因为这种材料解决了蛋白质和多肽的质量扩散问题。这些色谱柱的扩散路径更短，可在较高的线性速度下分离较大的分子，不会由于粒径的减少而出现系统反压增加的问题。图 6 所示为使用表面多孔色谱柱所得的快速高分离度肽谱示例。

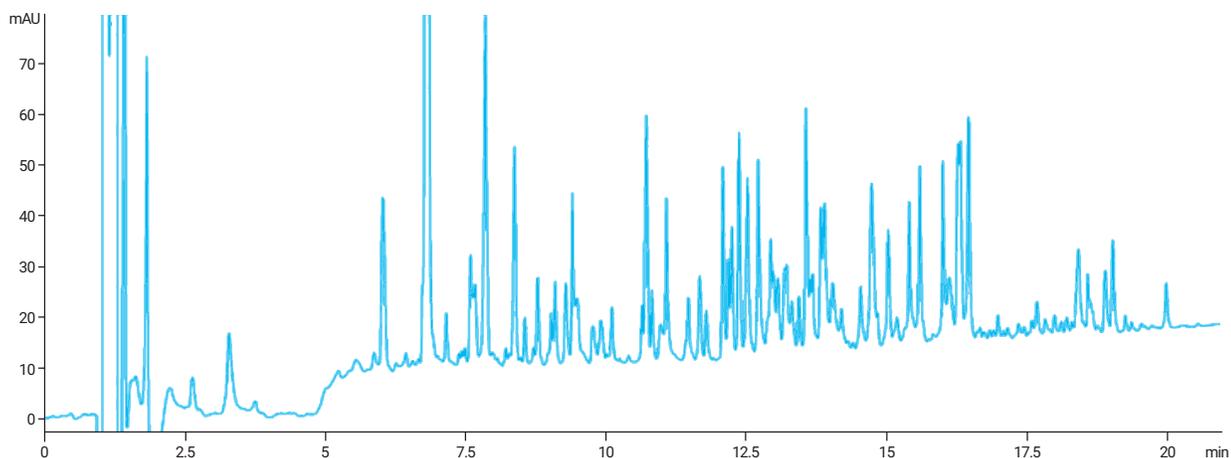


图 6. BSA 的反相分离图，采用 Agilent AdvanceBio 肽谱分析 2.1 × 150 mm 色谱柱（安捷伦部件号 653750-902）。肽谱分析条件为 0.3 mL/min，40 °C，流动相为水（含 0.1% TFA）/乙腈（0.08%），线性梯度

色谱柱质量（多次运行间的重现性和稳定性）是维持肽谱分离重现性和稳定性的关键因素，有时会被忽略。反相多肽分离常在低 pH (pH < 3)、高温下 (> 40 °C) 进行。

肽谱分析依赖于色谱柱的可重现操作，以获取准确的指纹图谱和重复验证的方案。在为肽谱分析选择一种色谱柱时，整个决策流程中，应优先考虑色谱柱质量。图 7 所示为具有优异可重现性的单克隆抗体胰蛋白酶水解物肽谱，在低 pH 和高温条件下分离，并进行了 LC/MS 分析。

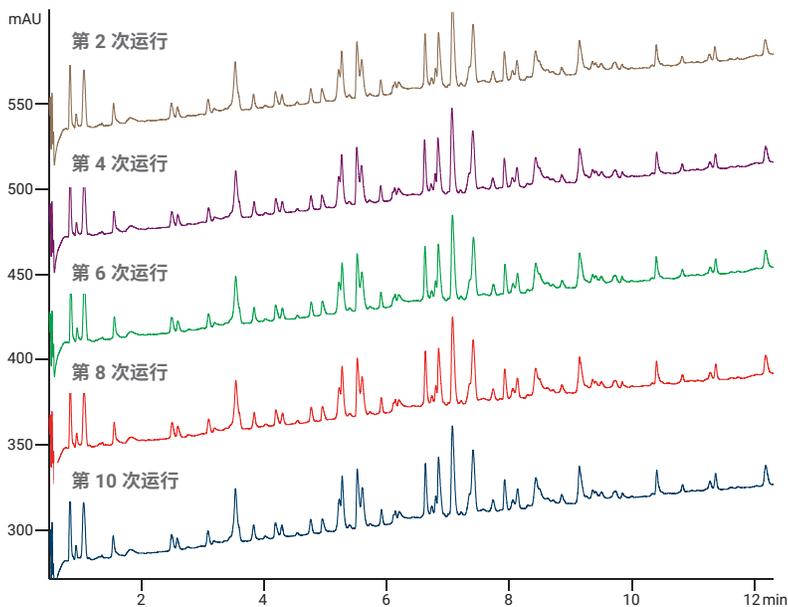


图 7. 一种单克隆抗体胰蛋白酶水解物的五次重复进样，在 Agilent 1200 液相色谱系统与 6520 Q-TOF 的联用系统上使用 3.0 × 150 mm 的 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱（安捷伦部件号 653950-302）。分离条件为 0.3 mL/min，40 °C，流动相为水（含 0.1% FA）/乙腈（含 0.1% FA），梯度洗脱

流动相选择

肽谱分析中最常用的溶剂为水和乙腈（用作有机改性剂），离子对试剂浓度建议不超过 0.1%。某些情况下，会加入丙醇或异丙醇用以溶解酶解成分，前提条件是加入后不会过度增加这些成分的粘性。使用含磷酸盐的缓冲流动相可为 pH 条件的选择提供一定的灵活性，因为 pH 在 3.0–5.0 范围内的变化可改善含酸性基团（例如，谷氨酸和天冬氨酸）多肽的分离。pH 在 2 与 7 之间（或更高，根据聚合物载体）的磷酸钠或磷酸钾、乙酸铵、磷酸也可用于乙腈梯度中。通常，乙腈中会加入三氟乙酸。

蛋白质和多肽 RPC 分析的流动相中含有用作离子对试剂的添加剂。这种成分可与多肽的带电基团形成离子对，增加多肽的疏水性。

因此，多肽可能与疏水性固定相发生相互作用，从而增加保留，改善分离。常用的添加剂（例如，三氟乙酸 (TFA)、甲酸 (FA) 以及乙酸 (AcOH)) 可产生非常低的 pH，促进蛋白质发生折叠和变性。因此，诸如多肽等分子，可洗脱得到更尖锐对称的色谱峰。蛋白质和多肽分离中最常用的离子对试剂为 TFA，因其与质谱具有良好的兼容性（高挥发性），且与带电多肽具有良好的亲和性。

检测

多肽的检测波长通常为 210 nm–220 nm 和/或 280 nm（图 7）。肽谱分析时，常同时使用 280 nm 和 210 nm 进行检测。色氨酸、酪氨酸及苯丙氨酸在 280 nm 下非常灵敏，而 210 nm 检测对样品基质中其他的大量生物制剂相对选择性较差。但是，210 nm 和 220 nm 下的灵敏度是 280 nm 下的 2 到 4 倍。此外，对肽谱检测而言，重要的是需要在水（A 溶剂）中加入 0.1% TFA，在乙腈（B 溶剂）中加入 0.08% TFA，可大大减小梯度洗脱过程中吸光度变化导致的基线漂移。图 8 比较了 220 nm 和 280 nm 波长下的肽谱分离，并详细说明了吸光灵敏度和 UV 峰轮廓的差别。

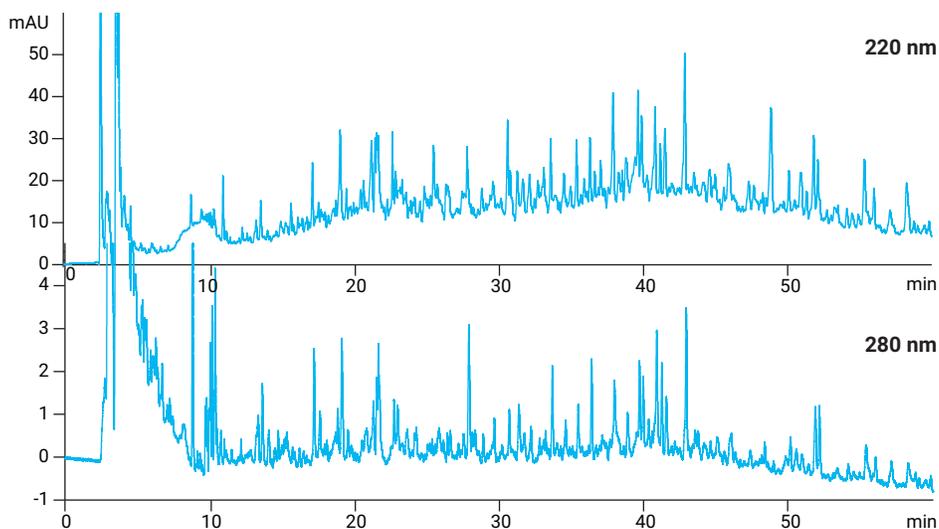


图 8. 利用 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱（安捷伦部件号 651750-902），2.1 × 250 mm，所得的大肠杆菌酶解产物谱图，220 nm（上图），280 nm（下图），采用 Agilent 1290 Infinity LC 进行分析

开发一种有效的肽谱分析方法

开发用于肽谱分离的 RPC 方法的常规方案与典型的 RP 方法开发实践相同，但有一些专门针对肽谱分析开发的特殊需求。本部分将提供一种推荐的基本方法，用于获取分离度良好的肽谱，通过 (1) 优化保留的梯度条件，(2) 选择性改变的变量，(3) 进一步优化色谱柱条件以更好地平衡分析时间和分离度要求。在方法开发过程的每一步中，肽谱分析实验中的样品类型和预期目标均需认真对待。

(1) 优化梯度条件

对于多肽分离，强烈建议使用低 pH 值的乙腈缓冲梯度，因为其可以：

- 促进大多数类型和结构的多肽分离
- 抑制硅醇离子化，其与分子中的碱性氨基酸链有不良的相互作用，会导致峰形变差
- 有助于多肽片段的变性，改善保留和分离度
- 可使用低 UV 检测波长 (< 210 nm)，大幅提高检测灵敏度
- 因为流动相的粘度较低，可获得更窄的色谱峰
- 通过与游离氨基端和碱性氨基酸的离子配对（在缓冲液中使用 TFA 时），增加较小且保留性较差的多肽的保留性

丙醇或异丙醇 (IPA) 可替代乙腈作为有机改性剂，提高疏水性多肽的回收率。但是，这些溶剂粘性较大，会导致色谱柱反压增加，且在某些情况下会产生较宽的色谱峰。这些溶剂也需使用更高的检测波长 (> 220 nm)，从而降低了检测灵敏度。

大多数多肽在 60 % 乙腈下均被洗脱，但有时也需用到更高的乙腈浓度。最初进行肽谱分析开发时，在 45 min (2%/min) 内由 0% 增加到 60% 是较好的选择。但在最终方法中通常需要更平稳的梯度以获得所需的分离度。梯度陡度（或 %B/min）决定了样品谱带在色谱柱中迁移时的平均保留性 (k')。 k' 值取决于色谱柱尺寸、流速、样品量和梯度陡度。

(2) 肽谱选择性变化的变量

色谱工作者分析生物样品时，通常会在谱带间隔改善后再对色谱柱条件进行更改。温度和梯度陡度的改变易于操作（不需要改变流动相或色谱柱），应先进行开发以改善谱带间隔，从而优化肽谱分离。

温度变化是改变选择性的有力方法，会使特定多肽残基的保留性发生变化。增加肽谱分离时的温度可获得较窄的色谱峰、降低系统反压，且可改变选择性。推荐的初始温度为 30–50 °C；但是，特定肽谱分离的最优温度取决于许多因素，与酶解类型和成分有关。一些疏水性很强的多肽需要在 60–80 °C 才能获取最优回收率，而给定样品通常在 30–60 °C 范围内的特定温度下具有最佳选择性。

图 9 详细比较了肌红蛋白胰蛋白酶酶解产物在两个相同梯度区域间的色谱图，温度分别为 30 °C（上图），60 °C（下图）。温度增加到 60 °C 时，分离谱图的谱带形状和峰位置均发生变化，可见突出标识的色谱峰 1–7。这个区域色谱峰的显著变化显示出：色谱峰 1、2 和 3 分离度得到改善，色谱峰 4 和 5 的位置发生改变（选择性）。

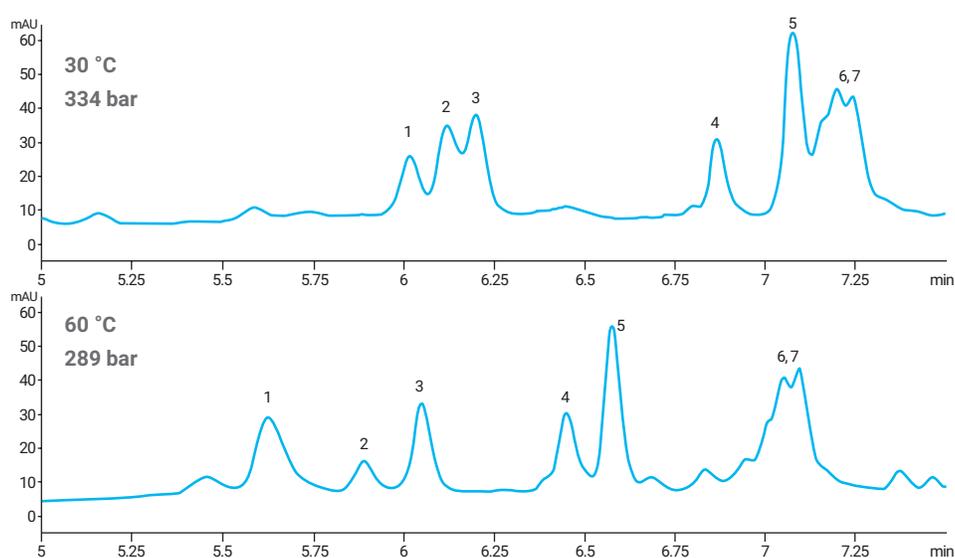


图 9. 肌红蛋白胰蛋白酶酶解产物的梯度分离，5.0–8.0 min（完整梯度为 20 min），其中使用了 2.1 × 150 mm AdvanceBio 肽谱分析色谱柱（安捷伦部件号 653950-302）。两种分离均采用水（含 1.0 % TFA）/乙腈（含 0.08 % TFA），线性梯度，0.3 mL/min，215 nm，使用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统。顶部色谱图为在 30 °C 温度下分析所得，底部色谱图为在 60 °C 温度下分析所得

梯度陡度的变化也可大大改善谱带间隔，并改变肽谱分离的选择性。梯度陡度可通过两种方式改变：保持流速不变，缩短（增加陡度）或延长（降低陡度）洗脱时间；或保持分析时间不变，改变流速。

图 10 证实了选择性随着梯度陡度的改变而改变。采用肌红蛋白胰蛋白酶多肽酶解物，梯度运行时间为 15 min（上图），与更长的梯度运行时间（40 min，下图）进行比较，两种分离均保持流速为 0.6 mL/min，温度为 50 °C。色谱图的比较（及各分离中相同色谱峰（星号标出）的鉴定）显示两者在谱带间隔、色谱峰数目和峰形上有许多的变化。

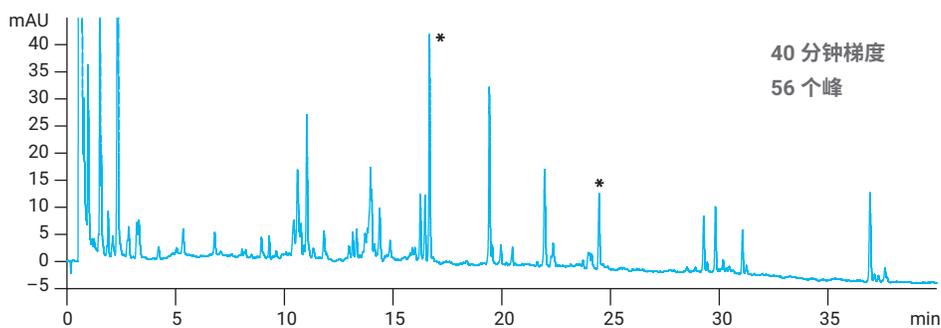
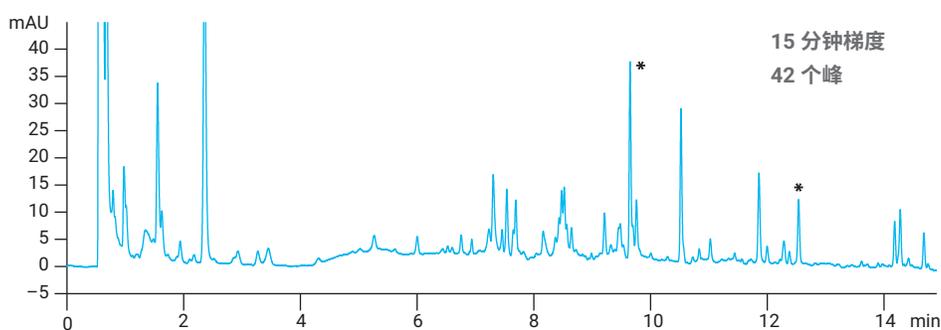


图 10. 肌红蛋白胰蛋白酶酶解产物的梯度分离，采用 2.1 × 150 mm AdvanceBio 肽谱分析色谱柱（安捷伦部件号 653950-302），利用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统，条件为水（含 1.0% TFA）/乙腈（含 0.08% TFA），线性梯度，0.6 mL/min，50 °C。顶部色谱图在 15 min 内完成，而底部色谱图在 40 min 内完成。两张色谱图中标星号代表相同色谱峰

(3) 调节色谱柱条件以进一步优化

当根据保留性 (k') 及选择性 (α) 完成梯度优化后, 可通过改变色谱柱长度和流速进一步改善分离。梯度洗脱中, 选择何种色谱柱条件进行改变, 基本与等度洗脱时相同。在两种情况下, 通过延长分析时间均能增加分离效率 (N)。只需略微增加分离度时, 分析时间的增加是次要的, 简单的做法是降低流速。但是, 如需大大增加分离度, 通常的方法是增加柱长。如果在优化选择性后, 分离度大于所需分离度, 此时可通过增加流速和/或减小柱长稍微降低分离度, 换取更短的分析时间。图 11 展示了当柱长从 150 mm 增加至 250 mm 时, 所提高的肌红蛋白胰蛋白酶酶解产物的肽谱分离度。在此对比中, 条件和梯度时间不变, 而柱长从 150 mm 增加至 250 mm。图中在两种分离的相同区域增加了一个红框, 突出 250 mm 柱长下分离度的增加, 强调出每单位时间内峰容量的增加。

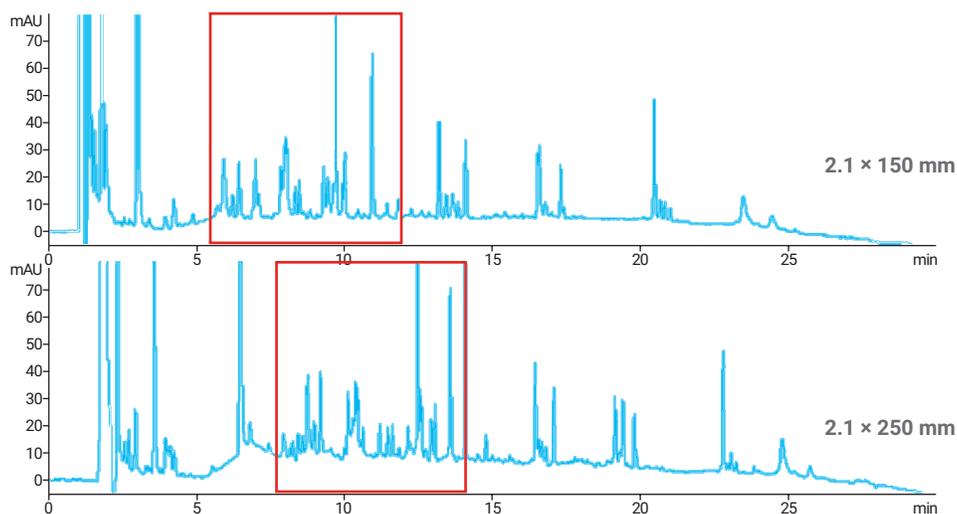


图 11. 柱长对分离度的影响, 采用肌红蛋白胰蛋白酶酶解产物 (安捷伦部件号 651750-902) 进行肽谱对比。红色高亮区域为等效的分离区域, 用来强调分离度和峰形。分离采用 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm (安捷伦部件号 651750-902), 利用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统, 条件为水 (含 1.0% TFA) / 乙腈 (含 0.08% TFA), 线性梯度, 30 min 内 B 由 10% 增加至 60%, 流速 0.3 mL/min, 45 °C

上文 (1)、(2) 和 (3) 中所讨论的与选择性优化有关的基本策略如梯度洗脱及后续变量, 以及色谱柱条件优化经证实可改善包括肽谱分析在内的任何分离策略。上述方法可通过下述步骤进行概括:

肽谱分析方法开发步骤

- 1 选择初始梯度条件: 柱长、流动相组成、流速、温度及检测条件。初始分离应针对保留性 (k') 进行优化。这要求梯度的陡度不能太大
- 2 调节梯度范围。通过消除色谱图开始和结束的浪费空间大大减少运行时间
- 3 不同选择性。如果观察到重叠的谱带或运行时间太长时, 可尝试选择性调节的方法
- 4 考虑梯度模式。在使用非线性梯度模式作为进一步改善分离的方法时, 可能会增加谱带间隔
- 5 调节色谱柱条件。在优化了谱带间隔和选择性后, 需考虑改变运行时间和/或柱长以改善分离度和/或分析速度

利用质谱仪进行肽谱表征

使用 RPC 联合质谱仪使得此组合技术成为表征多肽和肽谱的理想选择。例如，在生物制药行业，建立和监测治疗性靶标的序列一致性非常关键，蛋白质的生物稳定性是治疗剂开发的重要方面，用于监测修饰（例如，氧化、还原、糖基化和截短）。质谱可用作一种非限制性纯度测试，用以建立产品在其生命周期中的遗传稳定性。

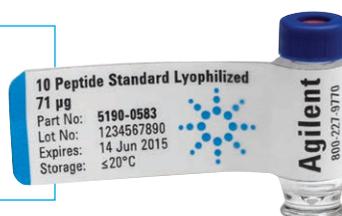
多肽的质谱分析可通过直接注入分离的多肽（或使用在线 LC/MS 以进行结构分析），然后与蛋白质的氨基酸序列相关联来完成。鉴定的多肽可确证肽谱中覆盖的特定氨基酸序列，以及进行蛋白质鉴定。肽谱的质谱分析适用于：

- 确认特定蛋白质的种类
- 对蛋白质进行具体表征，例如，确证 N 端和 C 端多肽、高序列覆盖率肽谱、氨基酸取代等
- 筛选和鉴定翻译后修饰（例如，糖基化、二硫键、N 端焦谷氨酸、甲硫氨酸和色氨酸氧化等）

一般情况下，质谱分析类型包括电喷雾和 MALDI-TOF-MS，以及快速原子轰击 (FAB)。串联质谱也可用于对修饰后蛋白质进行测序，并确定所发生的氨基酸修饰类型。使用电喷雾电离 (ESI) 或 MALDI-MS 时，蛋白水解多肽可完整电离为气相，并可测量它们的精确质量数。因为易于与液相色谱连接并且可以获得更高质量的串联质谱图用于确证的蛋白质鉴定，所以大多数多肽分离在电喷雾电离 (ESI) LC/MS 仪器上进行。例如，四极杆飞行时间 (QTOF) 质谱仪因其具有高分辨率和质量准确性，常可提供更多的结构信息，特别是对于较大的多肽。

基于质谱信息，通过将测定的质量与预期值（来自完整蛋白质或蛋白质数据库）进行比较，阐明质量和序列覆盖率信息，蛋白质的鉴定可轻松完成。通过肽谱表征蛋白质的目标是，对于蛋白质结构的理论组成，获得一致、至少 95% 的序列覆盖率。图 12 展示了经过高度优化后，所得的红细胞生成素蛋白质 (EPO) 酶解产物的 ESI-MS 肽谱。优化色谱条件和质谱参数后，可获得 100% 的序列覆盖率以及良好表征的肽谱分离。

使用安捷伦肽谱分析标准品确保您的系统
应用中实现高性能运行。



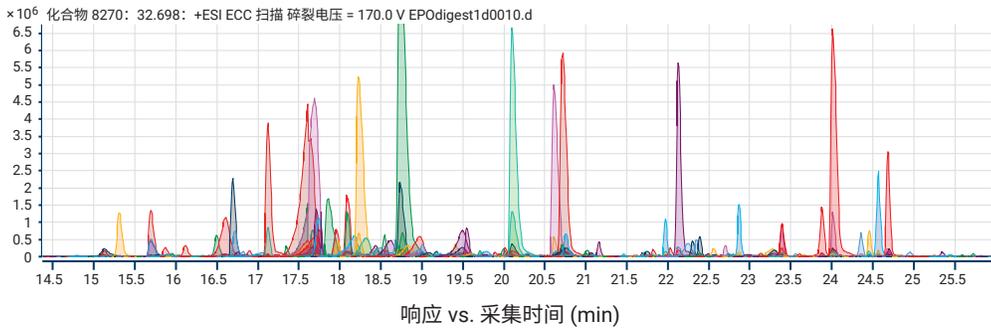
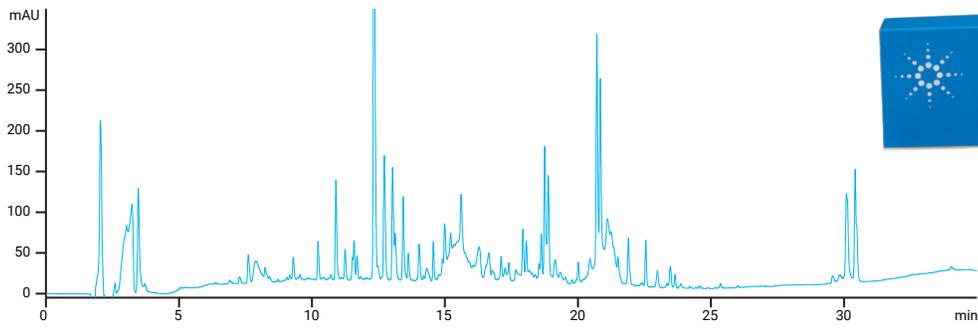


图 12. 顶部色谱图展示了使用 2.1 × 150 mm AdvanceBio 肽谱分析色谱柱对完全优化的 EPO 酶解产物进行分析所得到的肽谱分离图。底部色谱图展示了针对 Agilent Q-TOF 生成的序列覆盖率所进行的定性分析（使用分子特征提取器）

订购信息

对于肽谱分析，安捷伦推荐：

AdvanceBio 肽谱分析色谱柱 — 大多数应用的理想选择

描述	部件号	快速保护柱部件号
54.6 × 150 mm, 2.7 μm	653950-902	850750-911
53.0 × 150 mm, 2.7 μm	653950-302	853750-911
52.1 × 250 mm, 2.7 μm	651750-902	851725-911
52.1 × 150 mm, 2.7 μm	653750-902	
52.1 × 100 mm, 2.7 μm	655750-902	

* 快速保护柱可在不降低分离速度或不影响分离度的条件下延长色谱柱寿命

多肽质量控制标准品

使用安捷伦的十肽质量控制标准品（与安捷伦用于色谱柱质量控制的标准品相同）在色谱柱的寿命期内评估其性能。此标样可用于 HPLC 或 LC/MS。每瓶可进行约 20 次进样。

描述	部件号
肽质量控制标准品, 71 μg, 装在 2 mL 样品瓶中	85190-0583

AdvanceBio Peptide Plus — 提高蛋白质/多肽分析的可靠性

描述	部件号
4.6 × 150 mm, 2.7 μm	693975-949
3.0 × 150 mm, 2.7 μm	693975-349
2.1 × 250 mm, 2.7 μm	693775-949
2.1 × 150 mm, 2.7 μm	695775-949
2.1 × 50 mm, 2.7 μm	699775-949
4.6 mm 保护柱 (3/包)	820750-940
3.0 mm 保护柱 (3/包)	823750-952
2.1 mm 保护柱 (3/包)	821725-954
HSA 多肽混标	G2455-85001

AdvanceBio EC-C18 — 适用于易受不锈钢柱上假峰影响的样品

描述	部件号
AdvanceBio EC-C18, 2.7 μm, 2.1 × 150 mm, 带 PEEK 内衬	673775-902
AdvanceBio EC-C18, 2.7 μm, 2.1 × 100 mm, 带 PEEK 内衬	675775-902
AdvanceBio EC-C18, 2.7 μm, 2.1 × 50 mm, 带 PEEK 内衬	679775-902

用于质谱分析的智能自动化多肽样品前处理

人工进行多肽样品前处理是一个非常耗时的过程。如果您正在应用质谱进行肽谱分析，您一定渴望能够提高通量。并且您需要一个具有高度重现性的端对端工作流程，以确保结果的一致性。AssayMAP 改变了酶解、纯化及分离工作流程，可实现出色的精密度和通量：

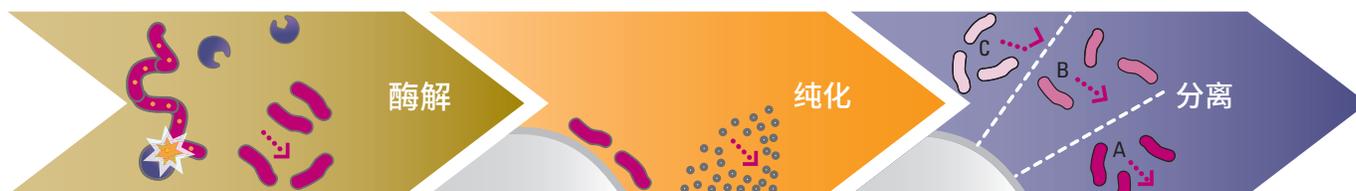
- 减少人工误差，改善重现性 — < 5% CV
- 增加通量 — 每天最多可处理 384 个样品
- 大大减少手动操作时间 — 使科学家们能够专注于分析工作
- 快速方法开发 — 自动化平台将帮助您快速优化方法



AssayMAP 多肽样品前处理解决方案基于强大的组合：小型填充床色谱、先进的 Bravo 液体处理平台，以及简单实用的用户界面（可为初学者和有经验的用户提供开放的存取环境），简化了非常具有挑战性的样品前处理工作流程。

AssayMAP 多肽样品前处理解决方案

针对质谱分析



酶解：

- 溶液内酶解，利用用户提供的试剂
- 最多可同时处理 4 个 96 孔板
- 1 次手动移液步骤

优势：

- 减少用户差异性
- 增加通量并提高重现性

纯化：

- 使用反相小柱的定量分离方法
- 可同时处理 1 个 96 孔板

优势：

- 10 μ L 洗脱液意味着可缩短干燥时间或“稀释与上样”方法
- 流程控制 — 所有样品的处理方式完全一致

分离：

- 强阳离子交换 (SCX) 小柱可通过 pH 或盐的逐步洗脱生成最多 6 个组分，以简化样品
- 可同时处理 1 个 96 孔板

优势：

- 增加 LC/MS 通量（通过离线分离），缩短较长的液相色谱梯度时间
- 强大的富集工具可简化样品并在分析前分离目标多肽，处理完全一致

工作流程总体优势：

- 标准化的工作流程用户界面，易于操作，并可链接以整合工作流程
- AssayMAP 降低了样品重复需求，只需要更少的重复样品

质谱分析前，利用 Agilent AssayMAP 解决方案进行样品前处理实现总体工作流程的可重现性

AssayMAP 多肽样品前处理解决方案用于酶解两种样品类型，各重复 64 次：BSA - 尿素和 BSA - 盐酸胍。样品纯化采用 AssayMAP 反相小柱，分析采用 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱、Agilent 1290 Infinity 液相色谱以及 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF 质谱仪。第二天重复实验以检测重现性。针对每个样品中的 25 种多肽均计算了 %CV，结果如表 1 所示。其中显示了不同的 %CV 区间，阐述了总平均 %CV 的影响。为进一步展示重现性，图 13 中展示了代表性多肽的峰面积。

AssayMAP 每天需要约 4 h 进行样品前处理，其中只有 2 h 需要手动操作。用于相同工作流程的手动样品前处理，每天需要花费约 8 h，其中 4 h 需要手动操作。

总工作流程的 CV < 4%。完整的工作流程包括 AssayMAP 多肽样品前处理系统、Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱、1290 Infinity 液相色谱系统以及 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF 质谱仪。

如需了解有关此应用的更多信息，请查看安捷伦出版物 4991-2474EN。

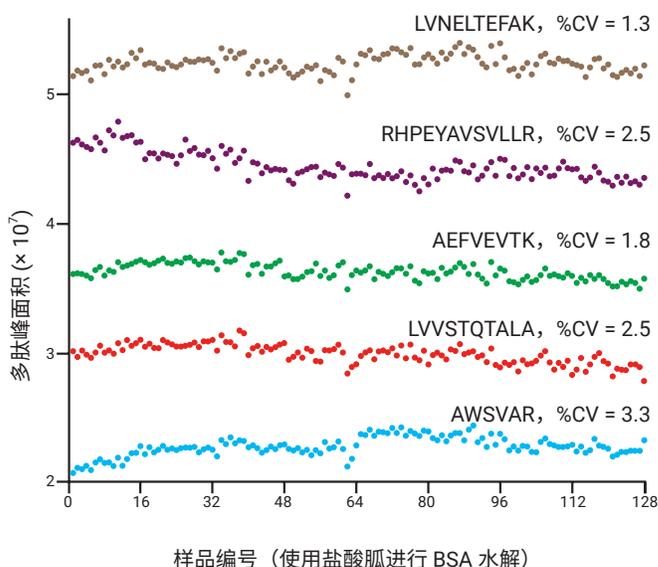


图 13. 4 种多肽在 2 天分析中的峰面积散点图

表 1. 不同天的 %CV (不同的 %CV 区间)

25 种多肽	尿素 (n=64, 62)		盐酸胍 (n=64, 62)	
	第 1 天	第 2 天	第 1 天	第 2 天
平均峰面积 %CV	3.3	3.7	2.3	2.6
%CV < 5 的多肽	23	21	25	23
5 < %CV < 10 的多肽	2	3		1
%CV > 10 的多肽		1		1

稳定可靠的肽谱分析

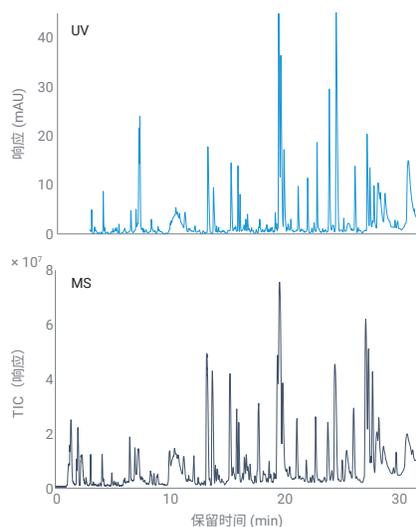
Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统 — 基于 UV 和 MS 的 mAbs 一级结构和 PTMs 分析新平台

作者

André Feith
安捷伦科技有限公司

摘要

肽谱分析是阐明单克隆抗体 (mAbs) 一级结构的金标准。而成功进行肽谱分析的关键在于能够实现高质量多肽分离的稳定可靠的液相色谱系统。在本应用简报中，我们介绍了肽谱分析的理想系统 — Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统。对已发表的 NISTmAb 全面肽谱分析方法的重建表明，即使采用非常平缓的梯度，其相对保留时间偏差也十分出色 (小于 0.1%)。进一步的方法开发使总运行时间缩短了 60%，并能够保持出色的相对标准偏差和峰容量值。此外，将 1290 Infinity II 生物液相色谱系统直接连接至 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF，作为方法开发系统配置的示例，可轻松实现整个生物药物生产链的方法转移。



前言

肽谱分析是一种用于生物药物一级结构和翻译后修饰 (PTMs) 分析的技术, 广泛应用于当今工业生物技术领域。一般而言, 采用自下而上的方法进行 mAb 的变性、烷基化和酶解。随后, 使用反相液相色谱甚至在某些情况下使用亲水相互作用色谱通过 HPLC 或 UHPLC 分离得到的肽段。涉及的检测方式有两种, 可以使用质谱 (MS) 鉴定药用物质, 或者在质量控制 (QC) 环境中使用紫外 (UV) 吸光度检测比较样品色谱图与参比谱图的一致性。肽谱分析可作为生物药品评估的验收标准的一部分, ICH Q6B 指南中对此进行了阐述^[1]。通过使用 LC/MS 或 UV, 可以评估肽谱的变化 (例如增加的氧化或脱酰胺基化^[2], 新的序列异构体的出现^[3] 或多聚糖组成的变化^[4])。因此, 精密度和稳定性对于放行和开发安全有效的生物药物至关重要, 使用紫外线检测器时尤其如此。

本应用简报展示了用于肽谱分析的新型平台 — 全新 1290 Infinity II 生物液相色谱系统。该系统利用高精度的 Agilent 1290 Infinity II 生物高速二元泵和生物兼容的不含铁流路, 特别适用于多肽、蛋白质和代谢物等生物分子分析。

实验部分

设备

与 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 联用的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统包括以下模块:

- Agilent 1290 Infinity II 生物高速泵 (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A), 配备样品恒温箱 (选件 #101)
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A), 配备一个标准流速 Quick Connect 快速连接生物热交换器 (G7116-60071) 和两个安捷伦热平衡装置 (G7116-60013)
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (VWD)(G7114B), 配备生物微量流通池 (用于 VWD, 3 mm, 2 μ L, RFID)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6545XT)

软件

- Agilent MassHunter 工作站数据采集软件 (B.09.00)
- Agilent MassHunter 定性分析软件 (B.10.00)
- Agilent MassHunter BioConfirm (B.10.00)

色谱柱

- Agilent AdvanceBio 肽谱分析柱, 2.1 \times 250 mm, 2.7 μ m (部件号 651750-902)
- Agilent AdvanceBio 肽谱分析快速保护柱, 2.1 \times 5 mm, 2.7 μ m (部件号 851725-911)
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 \times 150 mm, 1.8 μ m (部件号 959759-902)
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 快速保护柱, 2.1 \times 5 mm, 1.8 μ m (部件号 821725-901)

化学品

LC 级乙腈、碳酸氢铵、三(2-羧乙基)膦和 2-碘乙酰胺购自 Merck (Darmstadt, Germany)。新制超纯水来自配置 0.22 μ m 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA)。甲酸购自 VWR (Darmstadt, Germany)。胰蛋白酶 (猪, 质谱级) 购自 G-Biosciences (St. Louis, USA)。

样品前处理

向含有 0.8 mg Agilent-NISTmAb (部件号 5191-5744) 的 100 μ L 碳酸氢铵 (100 mmol/L) 中加入 2 μ L 三(2-羧乙基)膦 (TCEP, 200 mmol/L) 进行变性和还原, 并在 60 $^{\circ}$ C 下温育 1 小时。使用 4 μ L 2-碘乙酰胺 (IAM, 200 mmol/L, 室温下 1 小时) 对其进行烷基化处理后, 用 2 μ L TCEP 淬灭过量的 IAM (室温下 1 小时), 然后用 0.8 mL 25 mmol/L 碳酸氢铵进行稀释, 加入胰蛋白酶 (NISTmAb 与胰蛋白酶比例 20:1, w/w)。在 37 $^{\circ}$ C 下过夜酶解后, 加入 2 μ L 甲酸使所得悬液的 pH 值低于 4。

结果与讨论

蛋白质生物药物（例如 mAbs）的胰蛋白酶酶解产物存在高度复杂的大量肽段混合物。为测定和分析这些生物药物的一级结构，需要使用很长时间的平缓梯度，其运行时间可长达数小时，对仪器的要求较高。为了展示 1290 Infinity II 生物液相色谱系统对这一挑战性分析的适用性，我们选择重建了之前由美国国家标准技术研究院 (NIST) 发布用于 NISTmAb 的胰蛋白酶酶解产物的 LC/UV 和 MS 方法^[5]。在本研究中，使用长度为 250 mm 的 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱，方法总运行时间为 2.5 小时（方法 A，表 1）。此外还开发了第二种液相色谱方法，利用 ZORBAX RRHD Eclipse Plus 色谱柱的亚 2 μm 填料缩短运行时间（方法 B，表 2）。图 1 显示了使用 Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (VWD) 检测的两种方法的色谱图。

在两幅色谱图中可以观察到相似的肽谱。但是，与最初发布的 NIST 方法 A 的 80 分钟运行时间相比，使用方法 B 可使大多数分析物在 30 分钟内洗脱。因此，总运行时间可以缩短 60%。为系统地评价 1290 Infinity II 生物液相色谱系统的精密度和稳定性，两种方法均选择了 8 个峰。然后，基于 10 次连续进样计算保留时间标准偏差（图 2）。

方法 A 和 B 的相对保留时间偏差均小于 0.1%，表明 1290 Infinity II 生物高速泵即使在非常平缓的梯度斜率（分别为 0.39% 和 0.98% B/min）下仍可实现出色的性能。为评估液相色谱方法的综合分离特性，计算了 4σ 峰容量，并将其作为分离质量的衡量指标。由于方法 A 的运行时间更长，其相应的峰容量值最高，为 428。但是，方法 B 凭借出色的平均 RSD (0.039%) 和高峰容量 (348)，成为 NIST 提供的已发表肽谱分析方法的重要替代选择，并可大大缩短运行时间。

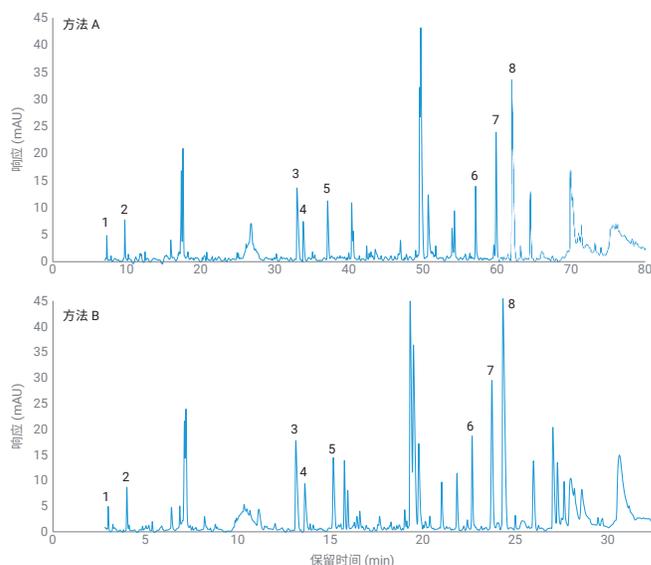
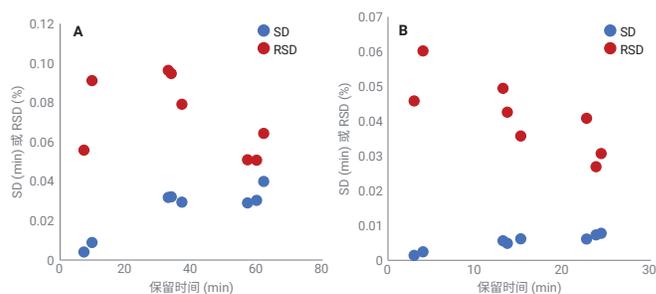


图 1. 使用方法 A 和 B，通过 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分离 NISTmAb 胰蛋白酶酶解产物得到的色谱图。选取 8 个峰用于后续的保留时间精度和峰容量计算



方法	梯度斜率 (%B/min)	\emptyset SD (min)	\emptyset RSD (%)	PC, 4σ (-)
方法 A	0.39	0.026	0.073	428
方法 B	0.98	0.005	0.039	348

图 2. 通过 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统获得的方法 A 和 B 的保留时间精度绝对 (SD) 值和相对 (RSD) 值。梯度斜率和峰容量如表所示

生物技术环境中进行肽谱分析的典型工作流程依次使用 UV 和 MS 检测器。采用这一设置后，可使用两个检测器进行 MS 鉴定肽段的方法开发。建立该方法后，可以将分析轻松转移到紫外检测器，实现 QC 环境中的高通量分析。为证明这一情况，将 1290 Infinity II 生物液相色谱系统与 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 直接连接，并使用方法 B 重新分析 NISTmAb 的胰蛋白酶酶解产物。如表 3 所示，MS 检测在迭代 MS /MS 模式下进行。得到的色谱图如图 3 所示。

即使没有采取任何特殊措施来防止峰展宽，分离度仍足够满足可靠 MS 检测的需要。使用 Agilent MassHunter BioConfirm 软件，可以方便地对 mAbs 的一级结构进行鉴定和确认。将 MS 和/或 MS/MS 水平上鉴定得到的多肽与所选生物药物的参考序列进行比较，可实现 PTMs 的分析与相对定量。采用这种方法，可鉴定出所谓的 PENNY 肽 (GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK)^[6] 以及相应的脱酰胺基化异构体。PENNY 肽是几乎所有人源或人源化 mAbs 共有的保守区域 (Fc) 的一部分，可用作诱导脱酰胺化的良好指标。图 4 所示为这些肽段的放大图。

完成肽段鉴定后，凭借优化的肽谱分析方法 B 的强大分离能力以及 1290 Infinity II 生物液相色谱系统出色的保留时间精度，在这种情况下也可以通过紫外检测进行相对定量。

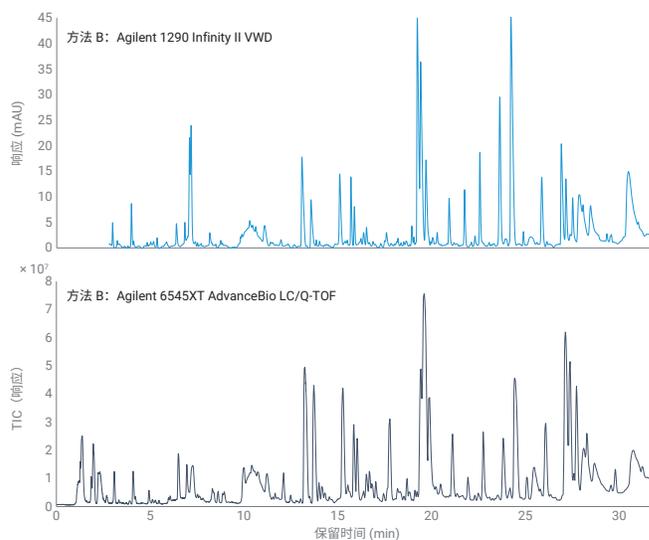


图 3. 使用配备生物兼容性微量流池的 Agilent 1290 Infinity II VWD (上图) 和 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (下图)，检测 NISTmAb 胰蛋白酶酶解产物得到的色谱图

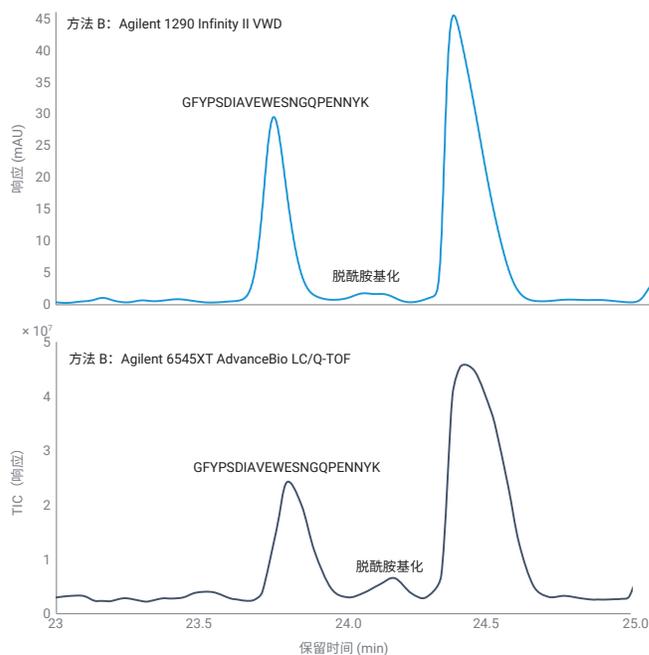


图 4. 先前色谱图的放大视图，突出显示 PENNY 肽 (GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK) 和相应脱酰胺基化异构体的分离

结论

通过肽谱分析方法可以分析序列或糖基化变异、氧化和脱酰胺基化等关键质量属性 (CQA)。但是, 必须确保使用的方法和仪器稳定且可靠, 才能实现理想结果。在本应用简报中, 我们证明了全新 1290 Infinity II 生物液相色谱系统可以满足这些高预期。通过重建已发表的 NISTmAb 全面肽谱分析方法, 可在常规操作下实现小于 0.1% 的保留时间精度偏差。通过优化这一方法, 采用 1290 Infinity II 生物高速泵, 总运行时间可缩短 60%, 同时不影响出色的精度和分离质量。在方法开发环境中的可用性测试结果表明, 1290 Infinity II 生物液相色谱系统与 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 的直接连接能力, 使方法能够直接转移到高通量 QC 环境。综上所述, 1290 Infinity II 生物液相色谱系统可用作基于 UV 和 MS 的 mAbs 一级结构和 PTMs 分析的新平台。

参考文献

1. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT Q6B. (1999). Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/Q6B_Guideline.pdf
2. Li, X. *et al.* High Throughput Peptide Mapping Method for Analysis of Site Specific Monoclonal Antibody Oxidation. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1460*, 51–60
3. Li, Y. *et al.* Characterization of Alanine to Valine Sequence Variants in the Fc Region of Nivolumab Biosimilar Produced in Chinese Hamster Ovary Cells. *MAbs* **2016**, *8*, 951–960
4. Wang, T. *et al.* Application of a Quantitative LC-MS Multiattribute Method for Monitoring Site-Specific Glycan Heterogeneity on a Monoclonal Antibody Containing Two N-Linked Glycosylation Sites. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 3562–3567
5. Mouchahoir, T.; Schiel, J. E. Development of an LC-MS/MS Peptide Mapping Protocol for the NISTmAb. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*, 2111–2126. High Stakes
6. Chelius, D.; Rehder, D. S.; Bondarenko, P. V. Identification and Characterization of Deamidation Sites in the Conserved Regions of Human Immunoglobulin Gamma Antibodies. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 6004–6011

使用 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱分离脱酰胺形体肽段

作者

Oscar Potter 和 Veronica Qin
安捷伦科技有限公司

摘要

谷氨酰胺和天冬酰胺的脱酰胺基化是影响蛋白质的最常见降解途径之一。然而，由于与未修饰形式相比质量偏移较小（小于 1 Da），因此通过质谱分析脱酰胺基化存在一定的挑战性。通常通过蛋白酶酶解和 LC/MS 分析来确定位点特异性脱酰胺基化，但是当未修饰形式和脱酰胺基化形式无法实现色谱分离时，即使这一方法也会失败。幸运的是，表面带电荷的 C18 色谱柱极大地提高了脱酰胺基化肽与其未修饰异构体的分离度。此外，流动相优化可以进一步控制这些分析物的分离度。

前言

蛋白质脱酰胺基化分析对生物药物开发和生产的多个阶段具有重要意义。从分析的角度来看，脱酰胺基化去除了一个酰胺基团并引入了一个新的羧酸基团，能够通过基于电荷的方法（例如 IEX 和等电聚焦）进行分析^[1]。然而，这些技术并不总是能够分离脱酰胺基化产物，也无法确认蛋白质中具体位点的脱酰胺基化。因此，许多分析人员对样品进行蛋白酶酶解，并通过反相 LC/MS 分析得到的肽段。与未修饰形式的肽相比，天冬酰胺或谷氨酰胺脱酰胺基化后质量会增加 0.9840 Da，通过这一点可以确定是否发生脱酰胺基化。在某些情况下，含有这些降解位点的肽段能够实现完全分离，并且可以根据不同形式的相对信号强度进行相对定量^[2]。然而，由于在低 pH 下天冬酰胺/谷氨酰胺转化为相应的羧酸不会导致疏水性发生较大变化，因此脱酰胺基化肽有时会与其未脱酰胺基化形式共洗脱^[3]。这种共洗脱导致脱酰胺基化肽的信号与未修饰形式的高丰度 ¹³C 同位素重叠，如图 1 所示。这可能会影响脱酰胺基化的定量，在某些情况下，甚至可能导致无法检测脱酰胺基化异构体。

本应用简报表明，与传统的 C18 色谱柱相比，相对于未修饰形式，表面带电荷的 C18 色谱柱极大地提高了对脱酰胺基化肽异构体的选择性。这提高了多肽水平脱酰胺基化的检测和定量结果的可信度。

Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱基于安捷伦表面多孔 Poroshell 技术，采用混合封端 C18 固定相，这种固定相的 120 Å 孔径、2.7 μm 颗粒填料经改性后表面带正电荷。与传统的 C18 色谱柱相比，提供了不同的选择性

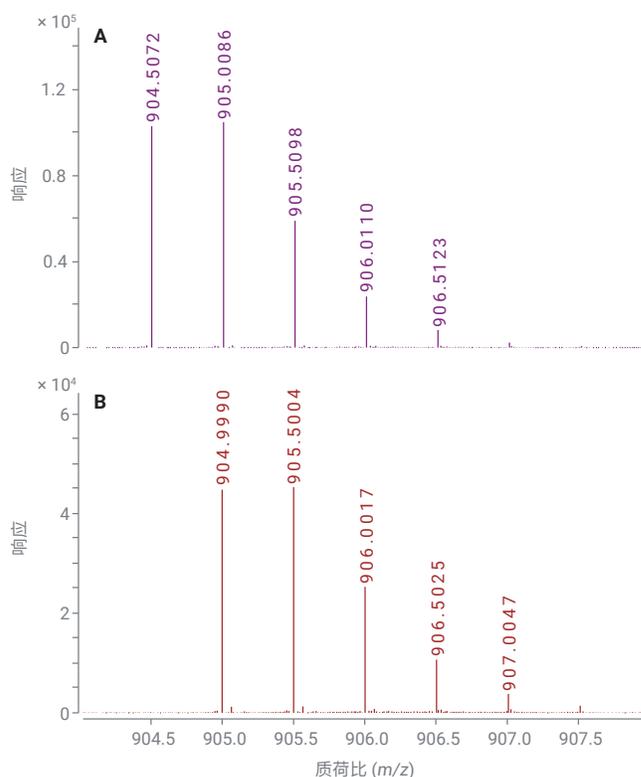


图 1. VVSVLTVLHQDWLNGK (A) 以及该肽段脱酰胺基化异构体 (B) 的质谱图，显示了质谱图之间的重叠

实验部分

材料

mAb 样品由中国仓鼠卵巢细胞表达并经纯化得到。样品经胰蛋白酶酶解，使用试剂级氢氧化铵 (Sigma-Aldrich) 调节 pH 至 11 左右，并置于 60 °C 下温育 4 小时加速脱酰胺基化。LC/MS 级甲酸 (部件号 533002) 和乙腈 (部件号 900667) 同样购自 Sigma-Aldrich。

仪器

液相色谱系统

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统，采用如下配置：

- Agilent 1290 Infinity II 二元泵 (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity II 自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity II 柱温箱 (G1316C)

质谱系统

Agilent 6546 LC/Q-TOF。

数据处理

LC/MS 数据由 Agilent MassHunter BioConfirm 软件 (10.0 SP1 版) 和 MassHunter 定性分析软件 (10.0 版) 进行处理。

结果与讨论

在 mAb 酶解产物中鉴定出 5 种显示部分脱酰胺基化的肽段，如表 1 所示。使用这些肽段考察了不同的色谱柱和流动相如何影响未修饰肽与其脱酰胺基化异构体的分离。

表 1.

肽段	序列 (非脱酰胺基化形式)	[M+2H] ²⁺ 的 m/z
A	NQVSLTCLVK	581.8103
B	FNWYVDGVEVHNAK	839.4047
C	VVSVLTVLHQDWLNGK	904.5071
D	NTAYLQMNSLR	655.8300
E	GLEWVGYIDPSNGETTYNQK	1136.0323

液相色谱条件

参数	Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统
色谱柱	Agilent AdvanceBio Peptide Plus, 2.1 × 150 mm (部件号 695775-949) Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm (部件号 653750-902)
柱温	60 °C
流动相	A) 0.1% 甲酸水溶液 B) 0.1% 甲酸的乙腈溶液
流速	0.4 mL/min
梯度	时间 (min) % B 0 3 2 3 40 40 50.5 100 53 3
后运行时间	7 分钟
进样量	3 µL

质谱条件

参数	Agilent 6546 Q-TOF
离子源	安捷伦喷射流
气体温度	323 °C
干燥气流速	13 L/min
雾化器气体	35 psi
鞘气温度	275 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	4000 V
喷嘴电压	0 V
碎裂电压	1255 V
锥孔电压	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
质量数范围	m/z 300–1700
MS 扫描速率 (质谱图/秒)	5
采集模式	正离子模式，扩展动态范围 (2 GHz) 棒状数据格式
数据分析	Agilent BioConfirm 软件 B.08

色谱柱类型

图 2 显示了使用典型的 LC/MS 分析方法，在甲酸改性的水/乙腈梯度下，两种不同的 C18 色谱柱对肽段及其脱酰胺基化异构体的分离结果。

AdvanceBio 肽谱分析色谱柱采用基于 120 Å 孔径、2.7 μm 表面多孔填料颗粒的封端 C18 硅胶。在该色谱柱上，脱酰胺基化异构体的洗脱时间通常稍晚于未修饰形式。在每种情况下，至少检测到两种脱酰胺基化异构体，表明天冬酰胺可能转化为天冬氨酸和异天冬氨酸。然而，就肽段 D 而言，一种脱酰胺基化异构体在未修饰形式之前洗脱，而对于肽段 C 和 E，一种脱酰胺基化异构体与未修饰形式共洗脱。这些结果表明，在极少数情况下，标准 C18 色谱柱无法从未修饰形式中分离脱酰胺基化异构体。

而 AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱在具有类似 C18 官能化和封端的相同类型颗粒填料上具有带正电的表面。在该色谱柱上，所有脱酰胺基化异构体都能与未修饰形式完全分离。此外，5 种肽段的所有脱酰胺基化异构体都比其未修饰形式晚洗脱。

由结果可知，造成两种色谱柱之间这一差异的原因可能是，与标准 C18 固定相相比，带正电荷的 C18 固定相对肽段的保留能力较弱。保留时间缩短可能是由于与肽段的离子相互作用，因为存在 0.1% 甲酸时它们通常带正电荷^[4]。这种保留时间缩短对于强碱性肽段的影响更大，而对于酸性氨基酸较多的肽段则没有明显的影响。由于脱酰胺基化引入了一个额外的酸性基团，因此脱酰胺基化肽异构体的碱性弱于其未修饰形式，从而在带电荷色谱柱上表现出更强的保留性。

相对于未修饰形式，对脱酰胺基化异构体的选择性增强，大大降低了这些分析物在带电荷色谱柱上共洗脱的几率，从而避免了质谱图重叠产生的任何挑战。

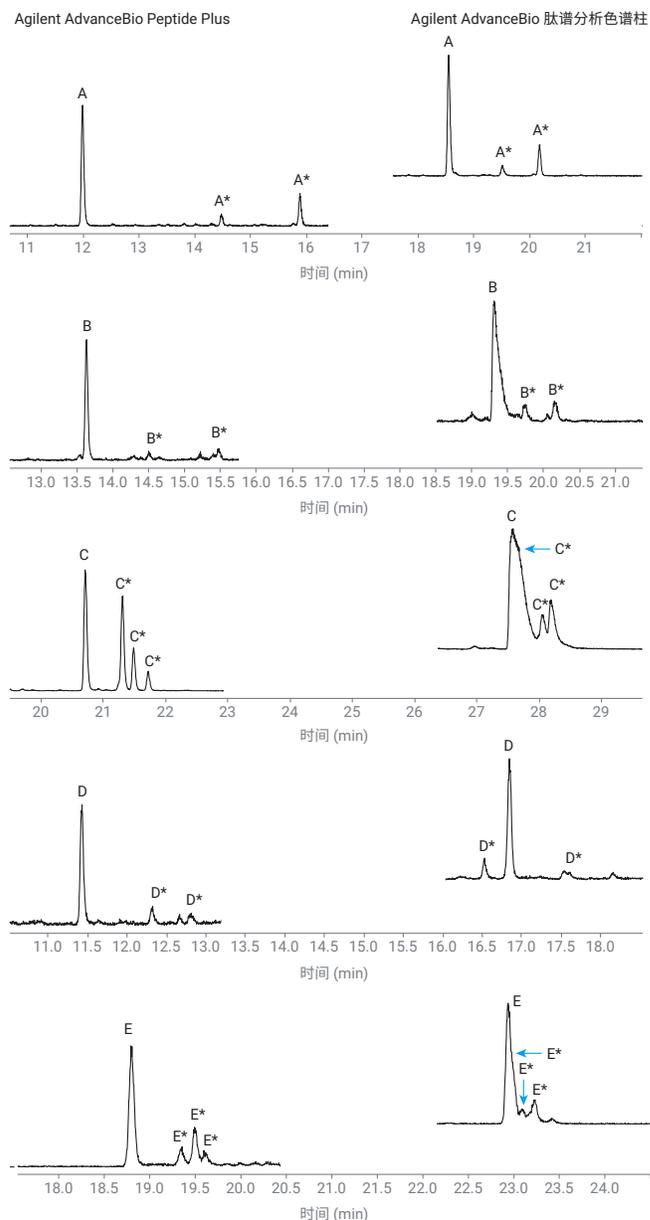


图 2. 在相同的条件下，使用 0.1% 甲酸流动相改性剂，在 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱（升高，较晚洗脱）和 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱（较早洗脱）上分离肽段及其脱酰胺基化异构体（用 * 表示）

流动相

在 0.1% 甲酸条件下，5 种肽段均在 AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱上与其脱酰胺基化异构体实现完全分离，这在很大程度上也受到了流动相的影响。

图 3 展示了使用 0.05%、0.1% 或 0.3% 甲酸对水相流动相和有机流动相进行改性后，肽段 C 与其异构体的分离情况。甲酸浓度降至 0.05% 时，选择性和分离度均增加，而浓度为 0.3% 时，分离度有所下降。在肽段 E 中也观察到类似的情况。

虽然甲酸通常是 LC/MS 肽段分离的首选流动相改性剂，但有时会使用三氟乙酸 (TFA) 改善峰形，即使它会影响 ESI-MS 的灵敏度^[5]。与甲酸相比，TFA 能更大程度地降低流动相的 pH，从而抑制脱酰胺基化生成的羧酸的电离。此外，据报道，TFA 作为一种比甲酸更强的离子对试剂，能够减少离子相互作用的影响。这可能会影响 AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱从未修饰形式肽中分离脱酰胺基化异构体的能力。

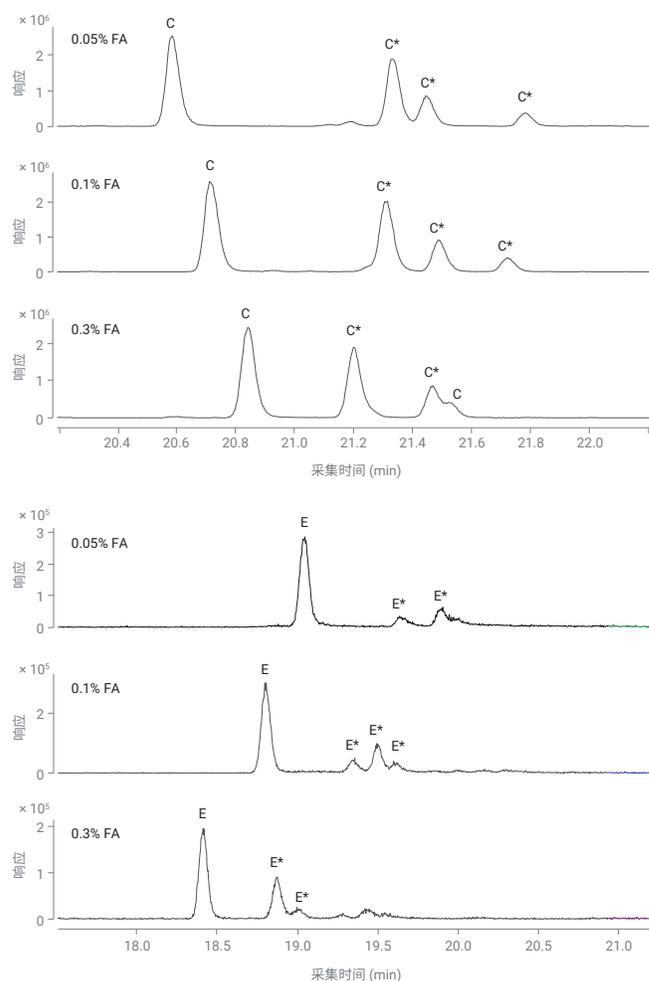


图 3. 逐渐增加甲酸流动相改性剂的浓度，在 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 上分离肽段。在低浓度下，相对于天然形式，可大大提高对脱酰胺基化肽异构体的选择性

图 4 显示了用 0.1% TFA 代替 0.1% 甲酸的效果。在此条件下，相对于未修饰形式，脱酰胺基化异构体的选择性大大降低。对于肽段 A，这使未修饰形式与异构体之间的基线减少。而对于肽段 C，其中一种脱酰胺基化异构体在未修饰形式之前洗脱。与此同时，肽段 E 的未修饰形式与其中一种脱酰胺基化异构体未实现分离。

总体而言，在 0.1% TFA 的条件下，AdvanceBio Peptide Plus 保留了脱酰胺基化肽在未修饰异构体之后洗脱的一般模式。但是，分析人员应该清楚，使用 TFA 时发生共洗脱的几率比使用甲酸时要高得多。

结论

与传统的 C18 色谱柱相比，AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱对脱酰胺基化肽异构体的选择性高于其未修饰形式。通过避免质谱图重叠问题，极大地提高了手动或通过自动分析软件检测和定量脱酰胺基化形式肽段的结果可信度。增加或降低甲酸流动相改性剂的浓度可以改变选择性。这些发现对任何使用 LC/MS 分析蛋白质脱酰胺基化的人可能都非常有用，如应用简报单克隆抗体化学诱导脱酰胺化和氧化的定量分析^[2]中所述。

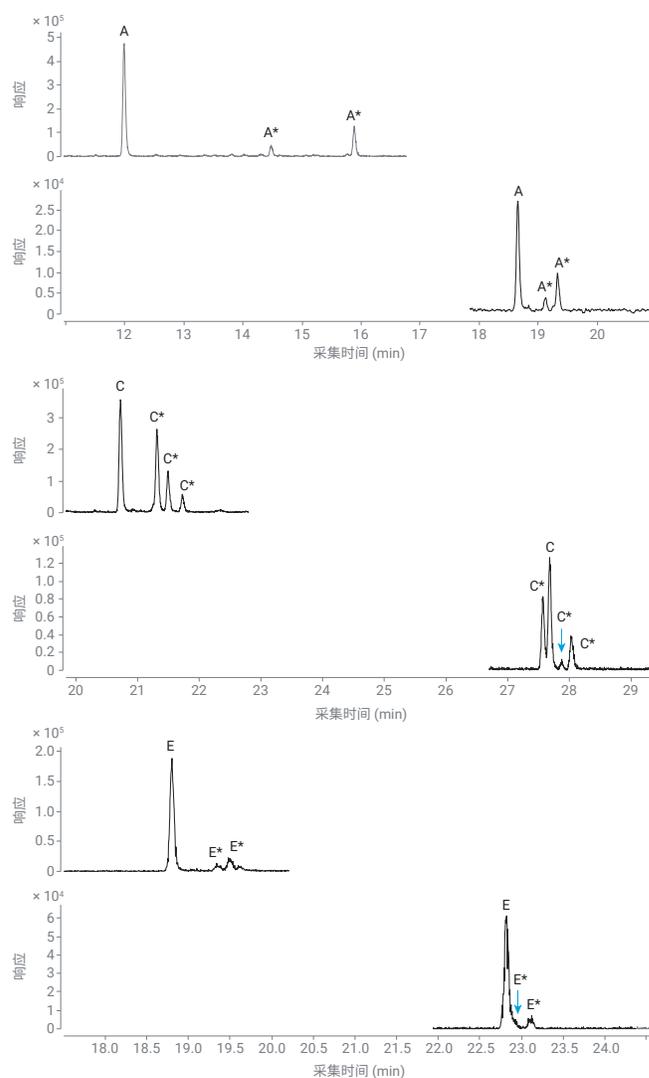


图 4. 使用 0.1% 甲酸流动相改性剂和 0.1% TFA 在 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 上分离肽段及其脱酰胺基化异构体的结果比较

参考文献

1. Gervais, D. Protein Deamidation in Biopharmaceutical Manufacture: Understanding, Control and Impact. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2015**, 91, 569–575
2. Linfeng, Wu. Quantitation of Chemical Induced Deamidation and Oxidation on Monoclonal Antibodies (单克隆抗体化学诱导脱酰胺化和氧化的定量分析), 安捷伦科技公司, **2018**
3. Wang, W. et al. Quantification and Characterization of Antibody Deamidation by Peptide Mapping with Mass Spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* **2011**, 312, 107–113
4. Nogueira, R.; Lämmerhofer, M.; Lindner, W. Alternative High-Performance Liquid Chromatographic Peptide Separation and Purification Concept Using a New Mixed-Mode Reversed-Phase/Weak Anion-Exchange Type Stationary Phase. *Journal of Chromatography A* **2005**, 1089, 158–169
5. Apffel, A. et al. Enhanced Sensitivity for Peptide Mapping with Electrospray Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Presence of Signal Suppression Due to Trifluoroacetic Acid-Containing Mobile Phase. *Journal of Chromatography A* **1995**, 712, 177–1190

合成肽及其杂质的分析

将质谱兼容的流动相与 **Agilent AdvanceBio Peptide Plus** 色谱柱配合使用

作者

Andrew Coffey 和
Veronica Qin
安捷伦科技有限公司

摘要

通常情况下，使用 C18 反相 HPLC 色谱柱和三氟乙酸 (TFA) 作为离子对试剂的流动相，对多肽进行色谱分离，并使用 UV 进行检测。虽然 TFA 提供了更高的分离度，但是它可能会抑制质谱 (MS) 信号。甲酸 (FA) 是用于 MS 检测的首选流动相离子对试剂，但它会导致许多传统 C18 柱无法达到最佳分离效果。本应用简报介绍了使用 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱和 MS 兼容的 FA（作为流动相改性剂）分离合成多肽杂质。

前言

大多数多肽药物通过固相多肽合成法进行生产。合成多肽相关杂质可能来自原辅料、生产过程，或者在生产或储存过程中因降解而产生^[1]。传统上，使用反相色谱柱实现多肽分离，并以三氟乙酸 (TFA) 作为流动相改性剂，UV 作为检测器。然而，TFA 会抑制质谱 (MS) 信号，因此它并不是 MS 的理想选择。

通过 LC/MS 方法鉴定杂质峰时，甲酸 (FA) 是首选的流动相改性剂，但它会导致传统 C18 柱无法达到最佳分离效果。

TFA (pKa ~0.23) 可以降低 pH 值，使固定相表面残留的（未完全烷基化或封端）硅醇基位点质子化，从而没有负电荷与带正电荷的肽相互作用，有利于形成良好的峰形。此外，TFA 阴离子与带正电荷的肽形成离子对，增强了疏水性并延长了保留时间。与此相反，FA (pKa = 3.77) 的酸性比 TFA 弱，无法将 pH 降低到使所有硅醇基位点质子化的程度，因此硅醇基与多肽之间的相互作用不会被完全掩盖。与使用 TFA 作为流动相改性剂相比，FA 会导致峰展宽、拖尾增加、整体分离度以及峰容量降低。

与传统的 C18 柱相比，Agilent AdvanceBio Peptide Plus 固定相具有杂化且带正电荷的表面，使用 FA 作为改性剂时也可以提供更好的峰形和分离效果。本简报介绍了一种使用 FA 作为流动相改性剂来分离合成肽杂质的液相色谱方法，此方法可以使用 UV 或 MS 检测器，因此更容易在 LC/UV 和 LC/MS 之间进行方法转移。LC/MS 和 LC/MS/MS 均可用于鉴定样品（合成比伐卢定，图 1）中的某些杂质。

比伐卢定是一种含有 20 个氨基酸的合成肽，能够可逆性地抑制凝血酶。

合成肽的质量控制要求对杂质进行检测和鉴定。比伐卢定氨基酸序列 (FPRPGGGGNGDFEIEPEEYL) 的单一同位素质量为 2178.9858 Da。

因此，使用 LC/MS 可以准确测定肽的质量，但是使用 MS/MS 分析还可以通过预测的碎裂模式来确定序列，如表 1 所示。

表 1.

序列	编号	b	y	编号 (+1)
F	1	148.076	2179.993	20
P	2	245.129	2032.925	19
R	3	401.230	1935.872	18
P	4	498.282	1779.771	17
G	5	555.304	1682.718	16
G	6	612.325	1625.697	15
G	7	669.347	1568.675	14
G	8	726.368	1511.654	13
N	9	840.411	1454.632	12
G	10	897.433	1340.589	11
D	11	1012.460	1283.568	10
F	12	1159.528	1168.541	9
E	13	1288.571	1021.472	8
E	14	1417.613	892.430	7
I	15	1530.697	763.387	6
P	16	1627.750	650.303	5
E	17	1756.793	553.250	4
E	18	1885.835	424.208	3
Y	19	2048.899	295.165	2
L	20	2161.983	132.102	1

H-D-Phe-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-OH

图 1. 合成比伐卢定的氨基酸序列

实验部分

试剂与化学品

所有试剂均为 HPLC 级或更高等级。

样品前处理

陈化的合成多肽三氟醋酸比伐卢定水合物购自 Selleckchem，与 0.1 % 甲酸水溶液复溶至 1 mg/mL。

仪器

对于 HPLC 实验，使用 Agilent 1290 Infinity LC，其中包括：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 (DAD) (G7115A)

对于 LC/MS 实验，将相同的 1290 Infinity LC 配置与 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 检测器配合使用。

数据处理

使用 Agilent OpenLab 2.2 CDS 处理 LC/UV 数据。使用 Agilent MassHunter BioConfirm B.08.00 软件处理 LC/MS 数据。MS/MS 谱图用于确认合成肽及其杂质的身份。

方法条件

参数	HPLC 条件
色谱柱	Agilent AdvanceBio Peptide Plus, 2.1 × 150 mm (部件号 695775-949)
柱温	60 °C
流动相	A) 0.1% 甲酸水溶液 B) 0.1% 甲酸的乙腈溶液
流速	0.4 mL/min
梯度	时间 (min) %B 0 17 2 17 22 37 24 95 26 95 26.1 17
后运行时间	5 分钟
进样量	5 µL (UV); 1 µL (MS)

条件

参数	值
仪器	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
离子源	双安捷伦喷射流
气体温度	350 °C
干燥气流速	10 L/min
雾化器气体	30 psi
鞘气温度	275 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	4000 V
喷嘴电压	0 V
碎裂电压	125 V
锥孔电压	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
质量数范围	m/z 100–1700 (MS); m/z 50–1700 (MS/MS)
MS 扫描速率	8 幅谱图/秒
MS/MS 扫描速率	3 幅谱图/秒
采集模式	正离子, 扩展动态范围 (2 GHz)
碰撞能量	3.6 × (m/z)/100 – 4.8

结果与讨论

图 2 展示了陈化的比伐卢定多肽样品的分离谱图，其中使用 FA 作为流动相改性剂，并通过 UV 进行检测。如表 2 所示，LC/MS/MS 用于鉴定谱图中的几个主要杂质峰时，具有非常低的质量偏差。

常见的杂质包括缺失序列（缺少单个氨基酸）、存在未完全去除的保护基团或在去除保护基团期间发生对肽的修饰、失水以及在此特定多肽序列中 Asn 易发生脱酰胺化（可能发生在生产或储存过程中）。

总共选择了 5 个峰来说明联合使用 LC/MS 和 LC/MS/MS 的鉴定技术。

表 2. 陈化的比伐卢定多肽和主要杂质的峰鉴定

峰	质量 (Da)	峰归属	目标质量 (Da)	质量偏差 (ppm)
1	2049.9467	Glu 缺失	2049.9432	1.71
2	2178.9894	产品	2178.9858	1.65
3	2121.9663	Gly 缺失	2121.9644	0.90
4	2160.9764	失水	2160.9705	2.73
5	2179.9742	脱酰胺基化	2179.9698	2.02

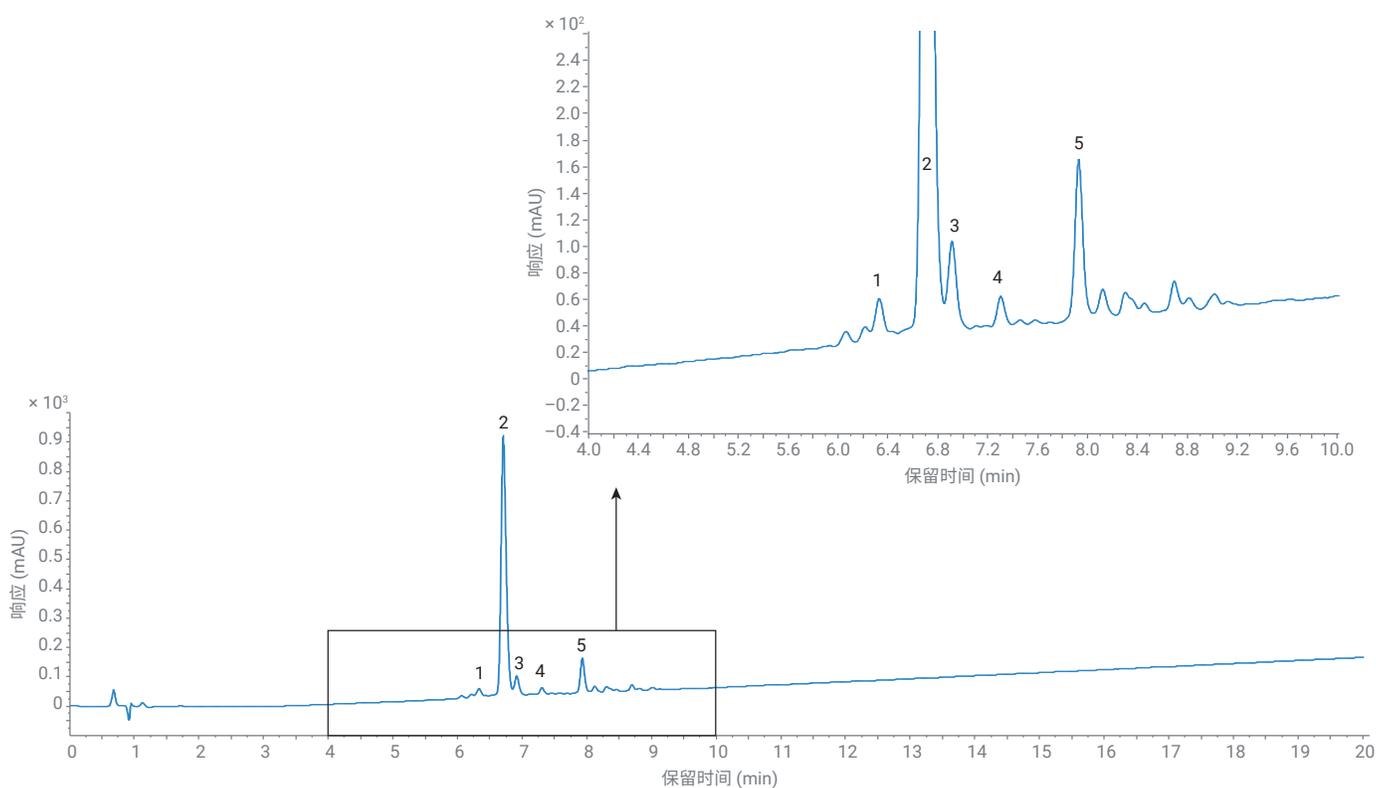


图 2. 合成比伐卢定的 LC/UV 谱图。展示了放大的合成比伐卢定的基线区域

LC/UV 色谱图的主要成分（峰 2）的 MS 谱图如图 3 所示。该质谱图对应 m/z $[M + 2H]^{2+}$ 和 $[M + 3H]^{3+}$ ，解卷积后质量为 2178.9894，对应比伐卢定的完整肽序列 FPRPGGGGNGDFEEIPEEYL。

使用类似的方法来鉴定较早洗脱的杂质峰 1。在本例中，得到了相似的质谱图（图 4A），但是解卷积之后，杂质的质量为 2049.9467。质量差为 -129 Da，表明该杂质只比比伐卢定少了一个谷氨酸。仔细查看 LC/MS/MS 谱图，可以确定丢失的 Glu 残基的位置（图 4B）。

BioConfirm 软件鉴定出 FPRPGGGGNGDFEEIPEYL（一个 19 个氨基酸的序列）的 b15 和 y4 片段，表明该序列在 17 或 18 号位丢失一个谷氨酸。

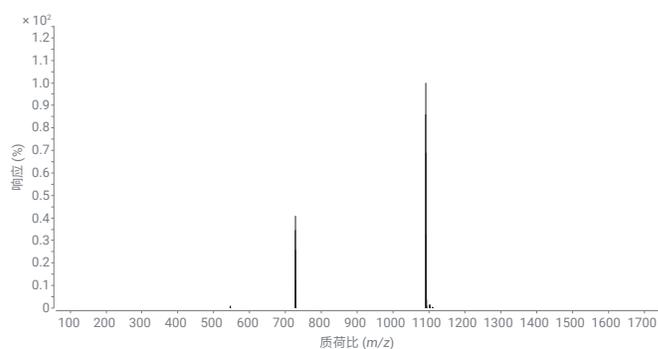


图 3. 主成分（峰 2）的 MS 谱图

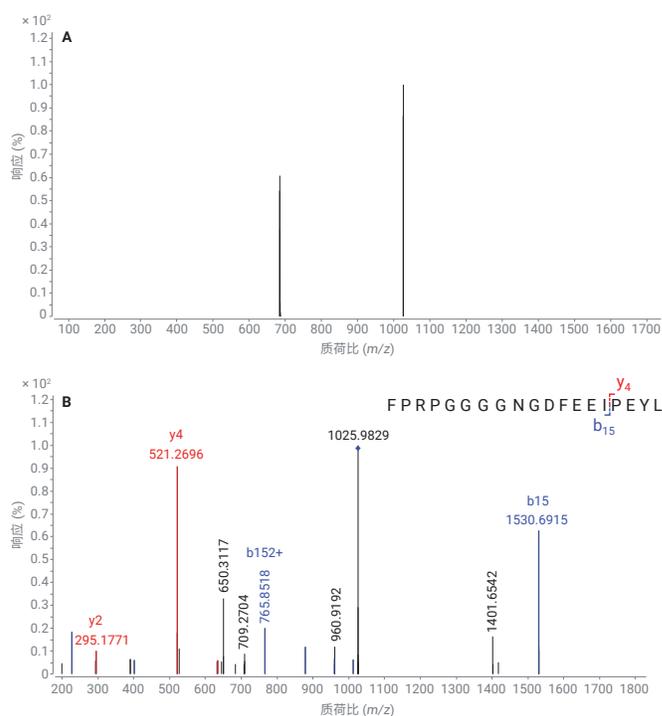


图 4. (A) 杂质峰 1 的 MS 谱图。(B) 杂质峰 1 的 MS/MS 谱图

分析杂质峰 3 得出的质量差为 -57 Da，表明该杂质丢失一个甘氨酸（图 5）。同时，杂质峰 4 的质量差为 18，表明由于脱水丢失了一个 H₂O 分子（MS 谱图未显示）。

最后，分析杂质峰 5 得出的质量差为 +1 Da，表明发生了脱酰胺反应（图 6A）。仔细查看该杂质的 MS/MS 数据后发现，该软件已确定位置 9 的 Asn (N) 已通过脱酰胺作用转化为 Asp (D)。

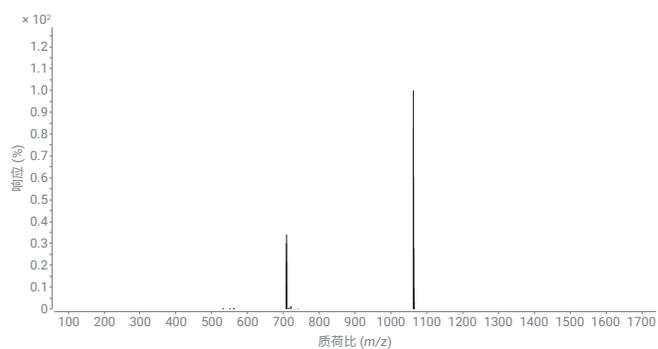


图 5. 杂质峰 3 的 MS 谱图

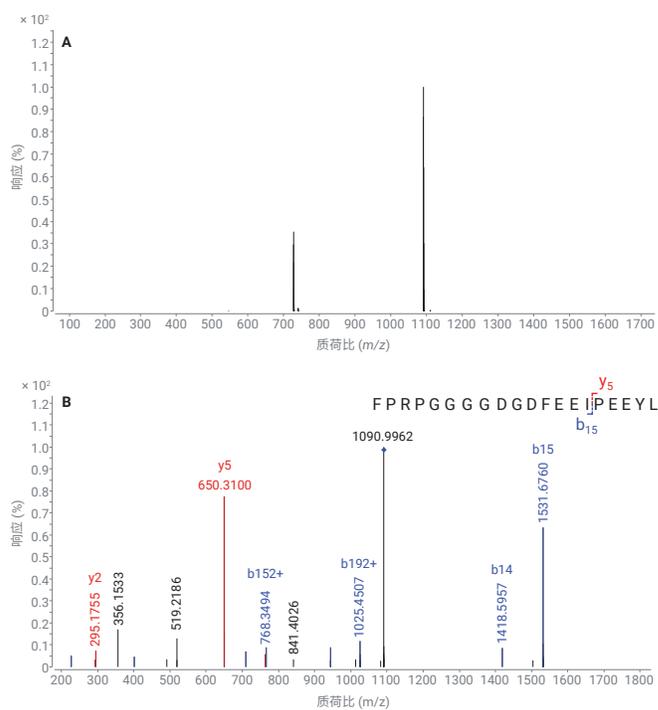


图 6. (A) 杂质峰 5 的 MS 谱图。(B) 杂质峰 5 的 MS/MS 谱图

结论

在本研究中，使用 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱并以甲酸作为流动相改性剂来分析合成肽及其杂质。采用的方法可以在 LC/UV 和 LC/MS 之间轻松转移。

参考文献

1. Eggen, I. *et al.* Control Strategies for Synthetic Therapeutic Peptide APIs Part III: Manufacturing Process Considerations. *Pharm. Technol.* **2014**, 38(5)

ADC 酶解产物中药物偶联肽段的高分离度分析

mAb 与药物偶联 mAb 的肽谱比较

作者

Suresh Babu C.V.
安捷伦科技有限公司

前言

目前，抗体药物偶联物 (ADC) 是用于生物治疗用途的主要蛋白质药物。当细胞毒性药物与生物治疗性单克隆抗体 (mAb) 偶联时，偶联位点有多种选择。作为 ADC 表征的一部分，对这些偶联位点的鉴定非常重要。这可以通过肽谱分析实现。酶将 mAb 裂解成肽段的特异性导致了不同的裂解模式，并由此生成包含偶联位点的不同肽段。高分离度肽谱分析可用于鉴定由细胞毒性药物的偶联所产生的肽。本应用简报证实了 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱和 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统在 ADC 肽谱分析中的应用。在使用 UV 进行分析时，实现高分离度对鉴定单个肽非常重要，因此，在方法开发时对流速和梯度时间进行了优化以提高峰容量。曲妥珠单抗生物治疗性 mAb 及其细胞毒性药物偶联物 ADC 的肽谱比较表明了对应于药物偶联多肽的肽谱差异。这些疏水性多肽在 AdvanceBio 肽谱分析柱上得到分离。

材料与amp;方法

治疗性蛋白质、ADC 和曲妥珠单抗购自当地药店。所有化学品和溶剂均为 HPLC 级。mAb 的胰蛋白酶酶解步骤同其他地方的描述一致^[1]。在用胰蛋白酶酶解 mAb 前，在变性条件下对二硫键进行还原与烷基化。

采用配备下列配置的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统开展研究：

- 带一体式真空脱气机的 Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器 (DAD) (G4212A)，配备 10 mm 最大光强流通池 (G4212-60008)
- AdvanceBio 肽谱分析色谱柱 (部件号 651750-902)

条件

参数	值
色谱柱	Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 × 250 mm, 2.7 μm (部件号 651750-902)
流动相	A) 0.1% 三氟乙酸水溶液 B) 含 0.08% 三氟乙酸的 90% 乙腈溶液
梯度	时间 (min) %B 0 3 60 50 65 90 66 90 70 3
进样量	5 μL (10 μg/μL)
流速	0.5 mL/min
数据采集	210 nm/4 nm, 252 nm/4 nm
柱温箱	60 °C
样品恒温箱	5 °C
后运行时间	10 分钟

结果与amp;讨论

峰容量通常用作评估标准以衡量给定色谱条件下色谱柱的性能。mAb 酶解将产生许多待分析的肽段。因此，有必要开发一种能够提高峰容量的方法。另外，峰容量在肽谱分析研究中至关重要，以解决较小的杂质峰或样品异质性。由于发生糖基化和细胞毒性药物偶联的 ADC 的异质性，相比于未偶联的 mAb，ADC 在胰蛋白酶酶解后将产生更多复杂的肽段。为监测胰蛋白酶酶解后的 ADC 肽段混合物，梯度时间和流速的优化对于实现更高的峰容量至关重要。

通过用梯度时间除以基线处五个肽段峰的平均峰宽 (5σ)，计算出峰容量值。图 1 展示了梯度时间和流速对峰容量的影响。结果表明，2.1 × 250 mm, 2.7 μm 色谱柱在 0.5 mL/min 流速和 60 分钟的梯度时间下具有最高峰容量。因此，这些条件是以高分离度鉴定具有细胞毒性药物偶联的肽段的最佳条件。

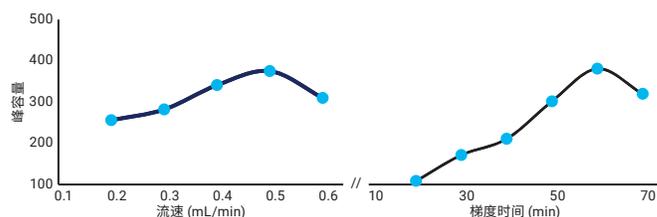


图 1. 流速和梯度时间对峰容量的影响

图 2 展示了胰蛋白酶酶解的 ADC 的肽谱。肽谱表现出优异的性能，在整个梯度曲线上实现了基线分离和良好的分离度。根据过往有关 ADC 的肽谱分析的文献报道^[2]，与 150 mm 色谱柱（220 分钟）相比，250 mm 色谱柱（60 分钟）的分离时间得到显著改善。获得的峰容量值为 354，并且 RSD 值证明保留时间和峰面积具有优异的重现性，从而也表明了系统优异的精密度（表 1）。

为鉴定连接有细胞毒性药物的肽段，通过监测 252 nm 处的 UV 迹线来分析 mAb 及其偶联物 ADC 酶解后的肽段（图 3）。ADC 的肽谱不同于曲妥珠单抗的肽谱。很明显，ADC 中疏水性更强的药物连接的肽更晚洗脱（约 40 至 60 分钟）。两个肽谱的比较表明，ADC 酶解产物中鉴定出的一组较晚洗脱的肽在 mAb 酶解产物中并未出现。这些疏水性多肽是具有细胞毒性药物偶联的肽段。

表 1. 图 2 所示的峰的保留时间和峰面积 RSD (n = 5)

峰	平均 RT (min)	RT RSD (%)	平均峰面积 (mAU/min)	峰面积 RSD (%)
峰 1	5.37	0.13	369.2	0.76
峰 2	14.27	0.06	106.1	1.66
峰 3	28.84	0.02	202.61	0.09
峰 4	35.86	0.02	193.83	0.58

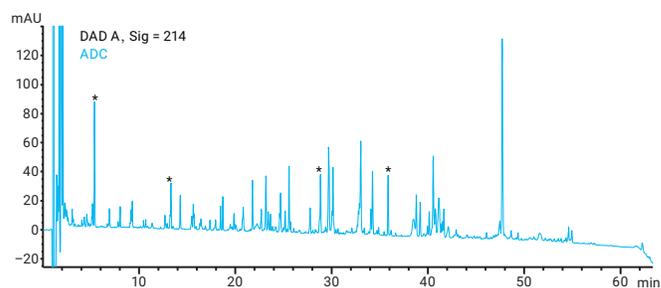


图 2. 胰蛋白酶酶解的 ADC 在 Agilent AdvancedBio 肽谱分析色谱柱上分离后所得的肽谱（选择标有 * 的峰计算 RSD）

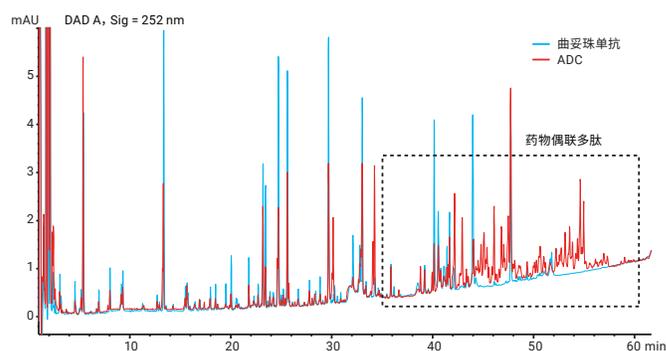


图 3. 胰蛋白酶酶解的 ADC 和曲妥珠单抗在 Agilent AdvancedBio 肽谱分析色谱柱上分离后所得的肽谱的叠加图

结论

将 250 mm Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱与 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统配合使用时，获得了高分离度肽谱。通过比较 mAb 及其偶联物 ADC 的肽谱，能够鉴定出 ADC 酶解产物中与细胞毒性药物偶联的肽。另外，我们证明了 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱可为各种类型的肽提供高分离度。在分析疏水性更强的偶联肽时获得了良好的峰形和重现性，能够实现鉴定和定量分析。

参考文献

1. Gudihal, R.; Waddell, K. Identification of Oxidation Sites on a Monoclonal Antibody Using an Agilent 1260 Infinity HPLC-Chip/MS System Coupled to an Accurate-Mass 6520 Q-TOF LC/MS (使用 Agilent 1260 Infinity HPLC-Chip/MS 系统与精确质量 6520 Q-TOF LC/MS 联用技术进行单克隆抗体氧化位点的鉴定)，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5990-8768EN，**2011**
2. Kim, M. T.; et al. Statistical Modeling of the Drug Load Distribution on Trastuzumab Emtansine (Kadcyla), a Lysine-Linked Antibody Drug Conjugate. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, pp 1223–1232

利用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱分析单克隆抗体和抗体药物偶联物的胰蛋白酶酶解产物

作者

Gerd Vanhoenacker,
Mieke Steenbeke, Isabel
Vandenheede, Pat Sandra
和 Koen Sandra

色谱研究所

President Kennedypark 26
B-8500 Kortrijk Belgium

Udo Huber 和 Sonja Schneider

安捷伦科技有限公司

Waldbronn, Germany

摘要

利用配备 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱分析单克隆抗体 (mAb) 曲妥珠单抗 (商品名为赫赛汀) 以及抗体药物偶联物 (ADC) 曲妥珠单抗-美坦新衍生物偶联物 (商品名为 Kadcyla) 的胰蛋白酶酶解产物。使用高效 Agilent V380 Jet Weaver 流动相混合器可显著降低由三氟乙酸 (TFA) 改性剂引起的基线噪音, 从而能够通过 UV 在 214 nm 处检测低丰度肽。通过修改梯度陡度, 可以分别获得大约 300、450 和 900 的峰容量, 总分析时间分别为 25 分钟、45 分钟和 205 分钟。

前言

单克隆抗体 (mAb) 已成为治疗癌症和自身免疫性疾病的重要治疗药物^[1,2]。mAb 的成功推动了各种新一代形式的单克隆抗体的开发, 包括抗体药物偶联物 (ADC), 其通过稳定的连接结合了特异性 mAb 和细胞毒性药物^[1,2]。ADC 的应用前景在于可以将高毒性药物选择性地运送至肿瘤细胞, 从而显著减少典型化疗通常会带来的副作用。肽谱分析是分析和表征这些分子的重要方法。在 mAb 和 ADC 胰蛋白酶酶解产物中存在数百种具有不同理化特性的肽, 并且这些肽的浓度范围较宽, 因此对分离能力提出了极高的要求。本应用简报介绍了配备 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱如何成功应对这些极具挑战性的分离。

实验部分

仪器

利用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统, 该系统包括:

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7117B), 配备 10 mm 流通池

利用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统, 该系统包括:

- Agilent Jet Weaver 混合器, 35 和 100 μL 配置均经过测试 (G4220-60006)
- 安捷伦高性能 Jet Weaver 混合器, 380 μL (G4220-60012)

样品与样品前处理

曲妥珠单抗 (赫赛汀) 和曲妥珠单抗-美坦新衍生物偶联物 (Kadcyla) 购自 Roche (Basel, Switzerland)。

通过加入 5 mmol/L 二硫苏糖醇, 将用 0.05% Rapigest/100 mmol/L Tris-HCl (pH 8) 稀释的 100 μg 蛋白质在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下还原 30 分钟, 并通过加入 10 mmol/L 碘乙酰胺在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下烷基化处理 1 小时。随后按 1:25 (w:w) 的酶-底物比值加入胰蛋白酶。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下酶解 16 小时。最终浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

方法参数

参数	值
色谱柱	Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 \times 250 mm, 2.7 μm (部件号 651750-902)
流动相	A) 含 0.05% TFA 的水/乙腈 99:1 (v:v) B) 含 0.045% TFA 的乙腈溶液
流速	0.35 mL/min
梯度	在各种梯度斜率下, B 由 0% 增至 60% (见峰容量) 在 0.5 分钟内, B 由 60% 增至 90%, 并保持 4.5 分钟 在 0% B 下后运行 7 分钟 40 分钟梯度的示例: 0 至 40 分钟 — B 由 0% 增至 60% 40 至 40.5 分钟 — B 由 60% 增至 90% 40.5 至 45 分钟 — 90% B
温度	60 $^{\circ}\text{C}$
进样量	5 μL 进样针冲洗口, 5 秒, 含 0.05% TFA 的水/乙腈 20:80 (v:v)
检测	信号 214/4 nm, 参比 360/60 nm 信号 252/4 nm, 参比 360/60 nm (用于 ADC) >0.025 min (0.5 秒响应时间) (10 Hz)

结果与讨论

Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱

Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱填充有孔径为 120 Å 的 2.7 μm 表面多孔 C18 颗粒填料。它是一种先进的肽谱分析柱，能够在较短的分析时间内实现高分离度分离。图 1 展示了赫赛汀胰蛋白酶酶解产物的快速分析结果（总分析时间为 25 分钟）。

Agilent Jet Weaver 混合器

为实现全面的肽谱分析，系统应能检测高丰度及低丰度肽。通常使用含三氟乙酸 (TFA) 的水/乙腈流动相通过 UV 检测在 214 nm 处进行肽谱分析，该流动相有利于肽的保留和峰形。但这些条件会导致基线噪音增加，因为 TFA 改性剂存在 UV 吸收^[3]。噪音取决于色谱柱尺寸和流速、梯度斜率以及系统梯度形成。

当流动相混合不充分时，流动相组成中的微小差异可通过色谱柱并到达检测器。就 TFA 而言，其在低波长（例如，214 nm）下具有显著的 UV 吸收，TFA 浓度和水/乙腈比值的较小波动也可在 UV 或 DAD 中观察到。通过提高流动相混合性能以尽可能使溶剂组成稳定，以解决过强的噪音问题。

通过比较三种先进的 Jet Weaver 流动相混合器，测试了混合过程对所选色谱柱和样品的影响。

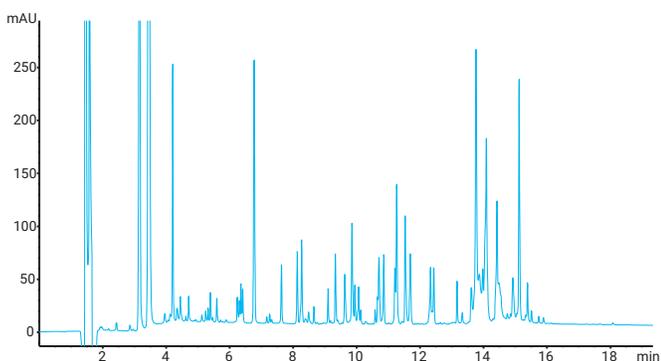


图 1. 赫赛汀胰蛋白酶酶解产物的分析结果，梯度为 20 分钟，在 214 nm 处进行 UV 检测

- Agilent V35 Jet Weaver: 内部体积 35 μL，最常使用，因为对延迟体积的影响较小
- Agilent V100 Jet Weaver: 内部体积 100 μL，用于需要较高的混合性能和较小的延迟体积的应用
- Agilent V380 高性能 Jet Weaver: 内部体积 380 μL，用于需要实现出色混合的应用

图 2 展示了采用各种 Jet Weaver 混合器在 40 分钟梯度下空白（流动相 A）进样的结果。很明显，尽管 V35 Jet Weaver 在大多数分析中具有出色的性能，但在这些特定条件下检测低浓度化合物的性能较差。将混合体积增加至 100 μL 显著提高了基线稳定性，并且通过安装 380 μL 混合器，几乎可消除由 TFA 引起的噪音。令人吃惊的是，在空白分析中 V35 Jet Weaver 无法检出的较小的系统峰（保留时间为 23–27 分钟），使用 V380 混合器则能够很容易地检测出。因此，选择 V380 高性能 Jet Weaver 进行进一步分析。

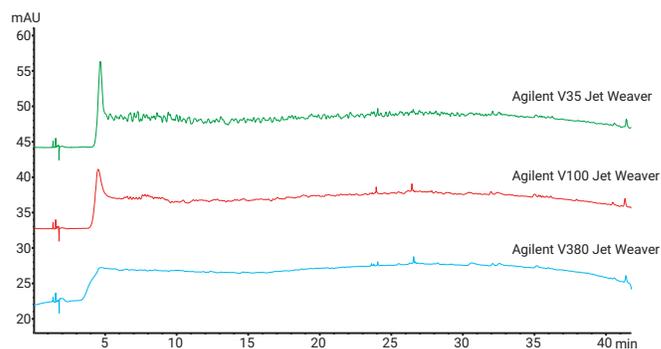


图 2. 利用 Agilent V35（绿色）、Agilent V100（红色）和 Agilent V380（蓝色）Jet Weaver 混合器分析空白溶液的结果，所用梯度为 40 分钟，在 214 nm 处进行 UV 检测

在小体积和大体积混合器之间进行切换将改变设置的延迟体积，影响保留时间，并可能影响选择性。为保持分离效果，应在梯度中增加一定的延迟时间以校正这一问题。该梯度时间偏移能够使所有三种混合器获得几乎相同的保留时间和选择性（图 3）。

峰容量考虑因素

如图 3 所示，胰蛋白酶酶解产物为复杂的样品，较高的峰容量对充分表征 mAb 和 ADC 非常必要。借助当前的系统以及色谱柱配置，可根据所需的性能，仅通过改变梯度陡度和梯度时间来调节峰容量^[4]。

如图所示，使用 12 种介于 5 分钟至 200 分钟之间的不同梯度时间对 Kadcylla 胰蛋白酶酶解产物进行分析。选择四种肽计算 4σ (= 13.4%) 峰高处的峰容量。图 4 和表 1 展示了结果。具有低于 250 的峰容量的较短梯度可用于快速（高分析效率）分析，而较长的梯度将使峰容量接近 900。在赫赛汀胰蛋白酶酶解产物进样时，采用一些选定的梯度条件作为对照，峰容量符合预期。图 5 展示了这些分析的结果。请注意，曲线的斜率在 120 分钟后显著变平，事实上，在更低的斜率下运行没有意义。

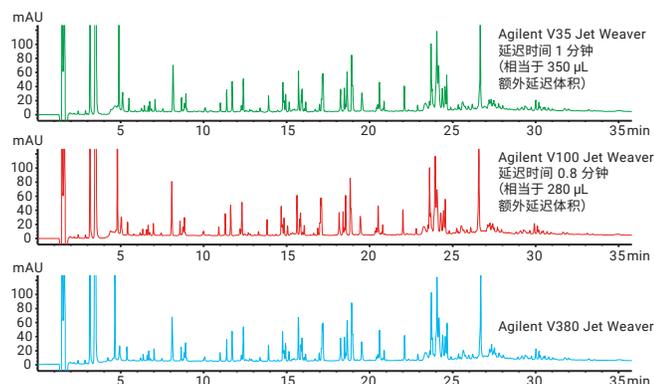


图 3. 利用 Agilent V35（绿色）、Agilent V100（红色）和 Agilent V380（蓝色）Jet Weaver 混合器分析 Kadcylla 胰蛋白酶酶解产物的结果，所用梯度为 40 分钟，在 214 nm 处进行 UV 检测

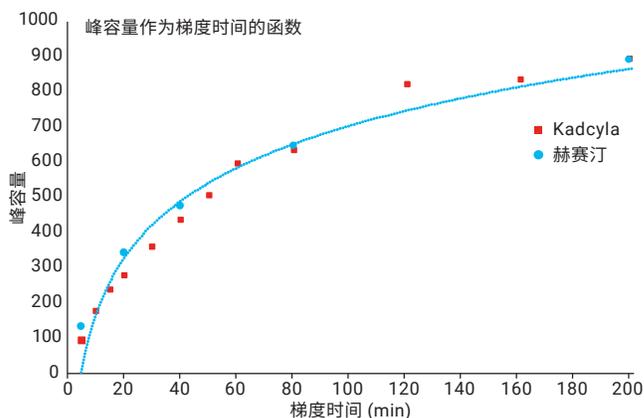


图 4. 峰容量作为梯度时间的函数。在 214 nm 处进行 UV 检测（检测器设置为 40 Hz 以确保在快速分析中获得足够的数据点）

表 1. 根据 Kadcylla 和赫赛汀采用的梯度获得的峰容量

梯度时间 (min)	峰容量	
	Kadcylla	赫赛汀
5	95	134
10	177	
15	238	
20	280	342
30	359	
40	438	475
50	506	
60	596	
80	635	646
120	822	
160	836	
200	893	891

有关赫赛汀和 Kadcyra 酶解产物分析的更多说明

40 分钟梯度获得的峰容量约为 450，并且这些条件（在分析时间和分离性能之间实现良好平衡）用于突出展示 mAb 和 ADC 之间的差异。Kadcyla 的蛋白质序列与赫赛汀相同；不同之处在于细胞毒素剂美坦新衍生物与赖氨酸残基的偶联。图 6 展示了两个样品的叠加图，检测波长为 214 nm 和 252 nm。总体而言，除了梯度后期（25 和 35 分钟之间）洗脱的峰簇外，色谱图非常相似。这些峰均是包含美坦新衍生物的肽-药物偶联物。这一复杂性是由于存在大量可供偶联的赖氨酸残基。图 7 展示了在 252 nm 处获得的色谱图的细节。肽连接药物后疏水性增加，从而保留性增强。由于该细胞毒素剂在 252 nm 处具有 UV 吸收，因此将检测器设置为该波长可以更好地观察到偶联物。通过五次重复进样 Kadcyra 胰蛋白酶酶解产物来评估所开发方法的重现性。图 8 中的叠加图表明进样和保留时间精度非常出色。

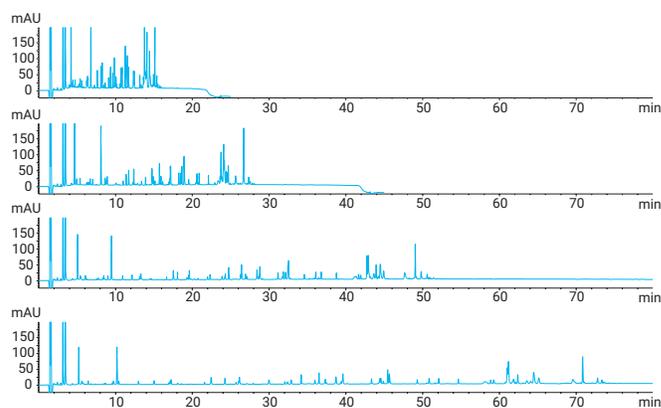


图 5. 赫赛汀胰蛋白酶酶解产物在 20、40、80 和 120 分钟梯度下的分析结果，在 214 nm 处进行 UV 检测。请注意，为了比较，y 标度随 Δ -梯度因子增加而增加

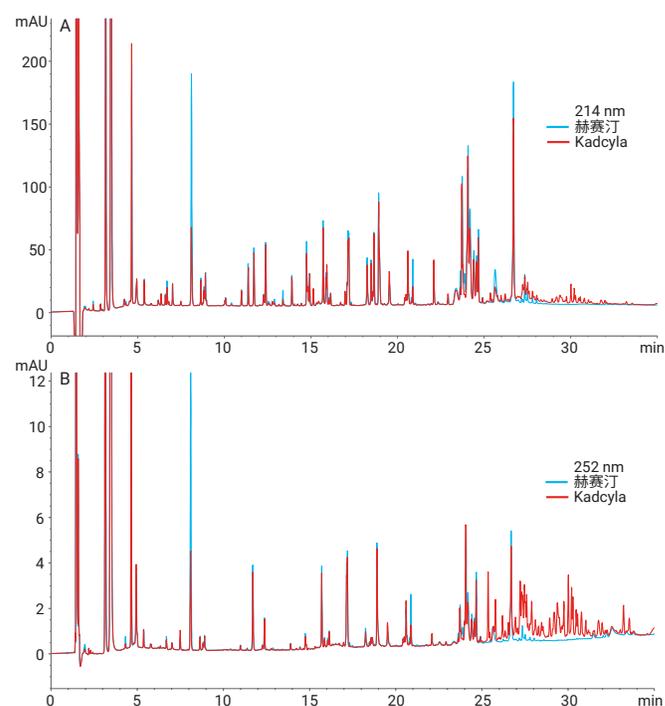


图 6. 赫赛汀（蓝色）和 Kadcyra（红色）胰蛋白酶酶解产物的分析结果比较，所用梯度为 40 分钟，UV 检测波长为 214 nm 和 252 nm

结论

使用配备 Agilent AdvanceBio 肽谱分析柱的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统分析 mAb 和 ADC 的胰蛋白酶酶解产物，可实现较高的峰容量。Agilent V380 Jet Weaver 流动相混合器可有效降低由 TFA 改性剂引起的噪音。这为定量分析复杂混合物中的低丰度物质提供了机会。使用当前配置所获得的优异精密度表明，这是一种用于详细分析蛋白质生物药物（例如 mAb 和 ADC）的有价值的工具。在 LC×LC 配置上分析这些酶解产物时，可以获得更深层次的细节信息，如最近的文献所报道^[5,6]。

参考文献

1. Sandra, K.; Vandenhede, I.; Sandra, P. Modern chromatographic and mass spectrometric techniques for protein biopharmaceutical characterization. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1335*, 81–103
2. Fekete, S.; et al. Chromatographic, electrophoretic, and mass spectrometric methods for the analytical characterization of protein biopharmaceuticals. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 480–507
3. Huesgen, A. G. Performance of the Agilent 1290 Infinity Quaternary Pump using Trifluoroacetic Acid (TFA) as the mobile phase modifier (使用三氟乙酸 (TFA) 作为流动相改性剂的 Agilent 1290 Infinity 四元泵系统的性能), *安捷伦科技公司技术概述*, 出版号 5991-1434EN, **2009**
4. Vanhoenacker, G. 等, 使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统分析胰蛋白酶酶解产物, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5990-4031CHCN, **2009**
5. Vanhoenacker, G.; et al. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography of therapeutic monoclonal antibody digests, *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 355–366
6. Sandra, K.; et al. Multiple heart-cutting and comprehensive two-dimensional liquid chromatography hyphenated to mass spectrometry for the characterization of the antibody-drug conjugate ado-trastuzumab emtansine, *J. Chromatogr. B*, doi: 10.1016/j.jchromb.2016.04.040

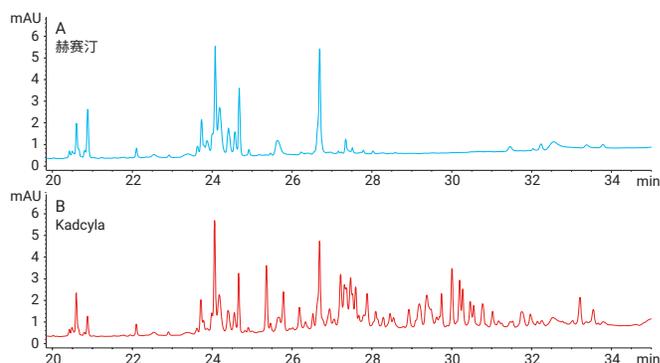


图 7. 赫赛汀和 Kadcyra 胰蛋白酶酶解产物的分析结果的详细比较，所用梯度为 40 分钟，在 252 nm 处进行 UV 检测

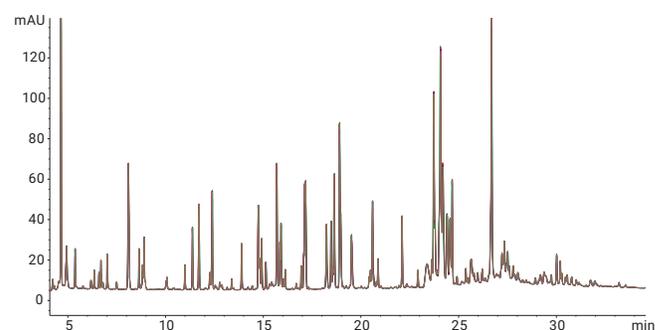


图 8. Kadcyra 胰蛋白酶酶解产物五次重复进样的叠加图，所用梯度为 40 分钟，在 214 nm 处进行 UV 检测

利用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 表征病毒载体颗粒

作者

Wendi A. Hale 和 Christopher
M. Colangelo
安捷伦科技有限公司
Lexington, MA, USA

Roy Hegedus 和
Norman Garceau
Lake Pharma
Worcester, MA, USA

摘要

本应用简报介绍了完整腺相关病毒 (AAVs) 关键质量属性 (CQAs) 的表征和测定以及衣壳蛋白的翻译后修饰 (PTM) 鉴定工作流程。该工作流程包括 Agilent 1290 Infinity II LC 与 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 的联用系统，以及用于数据分析的 Agilent MassHunter BioConfirm 10.0 软件。

前言

肽 AAVs 是基因治疗的主要病毒载体，已成功应用于治疗遗传性视网膜疾病和脊髓性肌肉萎缩症。AAV 由一个二十面体蛋白质外壳和一个大约 4.7 kb 的单链基因组组成。完整 AAVs 作为保护和递送寡核苷酸治疗药物的载体。已知有 13 种血清型可以转导不同的细胞类型，提高了治疗的选择性。随着对 AAVs 作为治疗药物递送平台的探索不断深入，确保维持治疗产品的所有 CQAs 至关重要。表征病毒衣壳蛋白面临着几个挑战。蛋白质外壳由三种衣壳蛋白 VP1、VP2 和 VP3 组成，它们以 1:1:10 的比例组成一个 3.9 兆道尔顿的结构，其中每个病毒颗粒有 60 个衣壳。除了 VP1 和 VP2 的摩尔比较低外，这三种蛋白质在 C 端都有重叠序列。传统上，使用 SDS-PAGE 确定衣壳蛋白的分子量，然而，这种技术提供的是分子量近似值，可能无法区分不同的血清型。质谱法 (MS) 在克服这些挑战并确定衣壳蛋白的 CQAs 方面非常有前景。本应用简报介绍了完整分析和肽谱分析的工作流程，包括病毒衣壳蛋白的 PTM 鉴定。工作流程中使用的工具包括 1290 Infinity II LC 与 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 的联用系统，并使用 MassHunter BioConfirm 10.0 软件进行数据分析。

实验部分

仪器

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统包括：

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)，配备用于完整分析的 20 μ L 定量环以及用于肽谱分析的 40 μ L 定量环
- Agilent 1290 Infinity II 柱温箱 (G7116B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

材料

AAV8 由 Lake Pharma (Worcester, MA, USA) 生产。分子量截留过滤器和三(2-羧乙基)膦 (TCEP) 购自 Millipore Sigma。胰蛋白酶和 rAsp-N 购自 Promega。

样品前处理

对于完整分析，在 10000 g 下使用 10 kDa 分子量过滤器对 AAVs 进行了 3 次缓冲液交换。缓冲液包含 5 mmol/L TCEP、80% H₂O 以及含 0.1% 甲酸 (v/v) 的 20% 乙腈溶液。样品在采集后经室温孵育后进样。对于肽谱分析，对 AAVs 进行变性、还原、烷基化和酶解处理。本实验使用的酶为胰蛋白酶和 rAsp-N。

LC/MS 分析

在 1290 Infinity II 液相色谱仪和配备双安捷伦喷射流离子源的 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 的联用系统上进行 LC/MS 分析。利用具有大分子 SWARM 自动调谐功能的 Agilent MassHunter 采集 (B.09.00) 工作站软件进行完整分析。仪器经过进一步校准并在标准质量模式下运行。在肽谱分析工作流程中使用迭代 MS/MS 功能。

数据处理

使用 MassHunter BioConfirm 10.0 软件处理所有 MS 数据。

表 1. 用于完整分析的液相色谱参数

参数	值
色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD 300-Diphenyl, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm
流动相 A	0.1% 甲酸水溶液
流动相 B	含 0.1% 甲酸的乙腈
流速	0.4 mL/min
进样量	20 μL
梯度	0–30 min: 30%–40% B; 30–38 min: 40%–90% B; 38–39 min: 90% B; 39–40 min: 90%–30% B; 40–45 min: 30% B
后运行时间	0 分钟
柱温	60 °C

表 2. 用于完整分析的 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 参数

参数	值
离子源	双安捷伦喷射流
气体温度	325 °C
气体流速	13 L/min
雾化器	35 psig
鞘气温度	375 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	5000 V
喷嘴电压	500 V
碎裂电压	180 V
采集速率	1 质谱图/秒
参比质量	922.0098

表 3. 用于肽谱分析的液相色谱参数

参数	值
色谱柱	Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm
流动相 A	0.1% 甲酸水溶液
流动相 B	含 0.1% 甲酸的乙腈
流速	0.4 mL/min
进样量	40 μL
梯度	0–3 min: 3% B; 3–50 min: 3%–35% B; 50–60 min: 35%–97% B; 60–62 min: 97% B; 62–62.5 min: 97%–3% B; 62.5–65 min: 3% B
后运行时间	5 分钟
柱温	60 °C

表 4. 用于肽谱分析的 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 参数

参数	值
离子源	双安捷伦喷射流
气体温度	325 °C
气体流速	13 L/min
雾化器	35 psig
鞘气温度	275 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	4000 V
喷嘴电压	0 V
碎裂电压	170 V
采集速率	MS 和 MS/MS 分别为 5/3 幅谱图/秒
参比质量	121.0509、922.0098

结果与讨论

使用 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 进行完整分析

虽然 SDS-PAGE 是确认 AAV 衣壳蛋白分子量的一种快速简单方法，但它的特异性不足以分离不同的蛋白质形式，例如乙酰化或磷酸化与未修饰形式。高分辨 Q-TOF MS 则可以提供足够高的灵敏度，可区分不同的 PTMs 并确定完整蛋白质的准确分子量。6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 的大分子 SWARM 自动调谐功能可进一步助力实现上述目标，其通过提高衣壳蛋白在整个质谱仪中的传输效率，为其提供了出色的灵敏度。此外，超低 TOF 真空 (e^{-8} torr) 通过延长蛋白质分子的平均自由路径，提高了质谱图的清晰度。

LC/MS 分析之前的样品前处理对于获得高质量质谱至关重要，我们在 AAVs 方面的研究进一步突出了这一点。图 1 显示了在进行和未进行样品前处理的条件下衣壳蛋白的总离子流色谱图 (TICs) 和原始质谱图。原始溶液的缓冲液将污染物引入质谱仪。此外，缓冲液交换后衣壳蛋白之间的分离得到改善。原始数据显示，蛋白质的丰度增至原来的 1.5 倍，并且谱图更加清晰。此处未显示解卷积数据，但由于没有钠和钾加合物，谱图更加清晰，使数据的解析更加简单。此外，这将提高工作流程的稳定性，从而延长仪器维护的间隔时间。

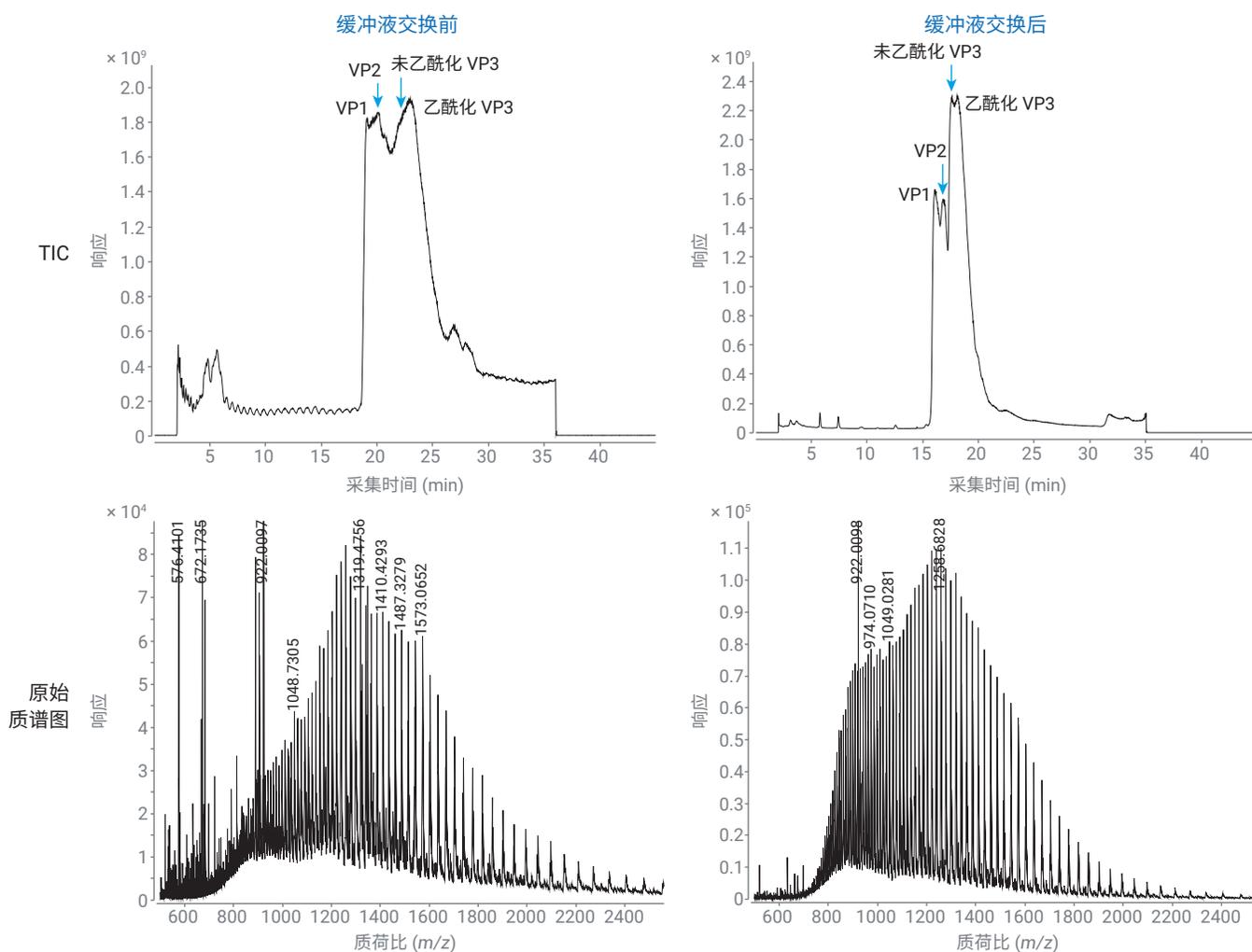


图 1. 在进行和未进行样品前处理的条件下，AAV 衣壳蛋白的 TIC 和 VP1 的原始质谱图

图 2 所示为 VP1 的原始谱图和解卷积谱图。通过这一工作流程，我们能够以低于 10 ppm 的误差检测 VP1 上的三个磷酸化位点。精确质量数据证实，VP1 的 N 端氨基酸残基缺失，并且新的 N 端被乙酰化。目前关于 AAV 衣壳蛋白 PTM 分析（包括 VP1 的磷酸化）的报道很少。VP2 与 VP1 实现了色谱分离。质谱法可以按质量数分离这些蛋白质，而色谱分离则可以减少这两种低丰度蛋白质的离子抑制。精确质量数据证实，VP2 上至少有两个磷酸化位点，图 3 中可能有第三个位点。

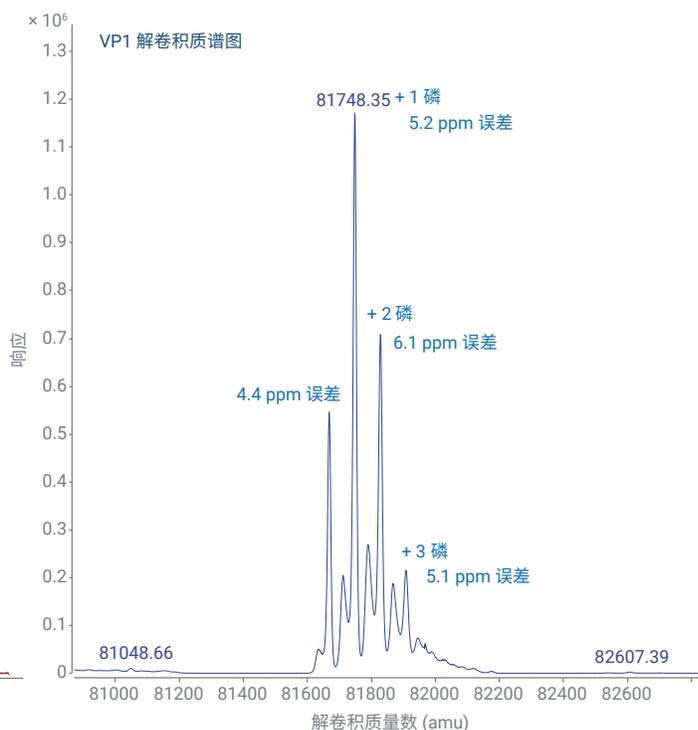
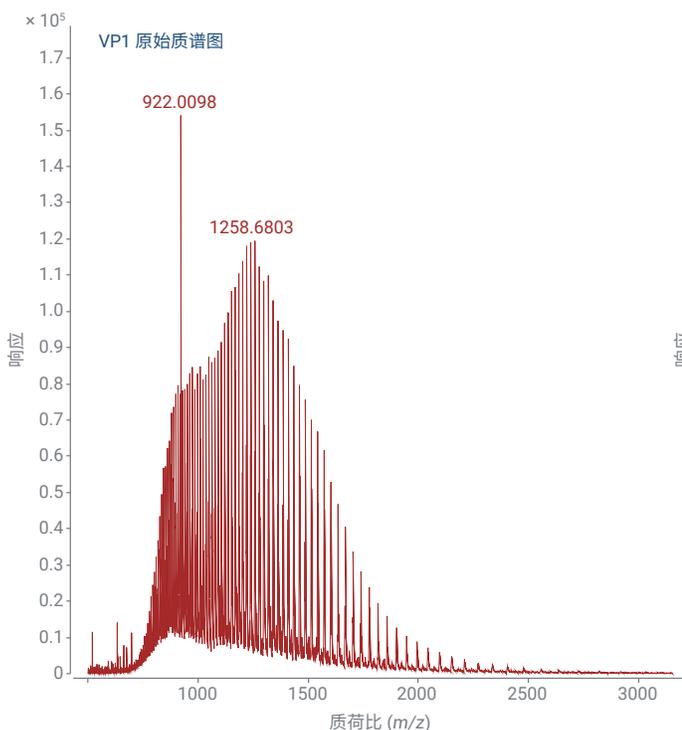


图 2. VP1 衣壳蛋白的原始谱图和解卷积谱图。蛋白质的天然形式和磷酸化形式具有出色的质量准确度

图 4 表明 VP3 的大部分未修饰形式与乙酰化 VP3 色谱分离。同样，解卷积谱图表明乙酰化 VP3 和未修饰 VP3 均具有较高的质量准确度。蛋白质的 N 端乙酰化是一种常见的 PTM，涉及蛋白质的稳定性、折叠以及与其他蛋白质的相互作用。VP1 被完全乙酰化，而 VP3 则约 70% 被乙酰化。虽然目前尚不清楚为什么 VP3 没有被完全乙酰化，但这可能会影响病毒衣壳的整体结构。6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 改进的真空设计结合大分子 SWARM 自动调谐功能提高了谱图清晰度，三种病毒衣壳蛋白及其 PTM 均获得了较高的质量准确度，所有蛋白质形式的误差均小于 10 ppm。

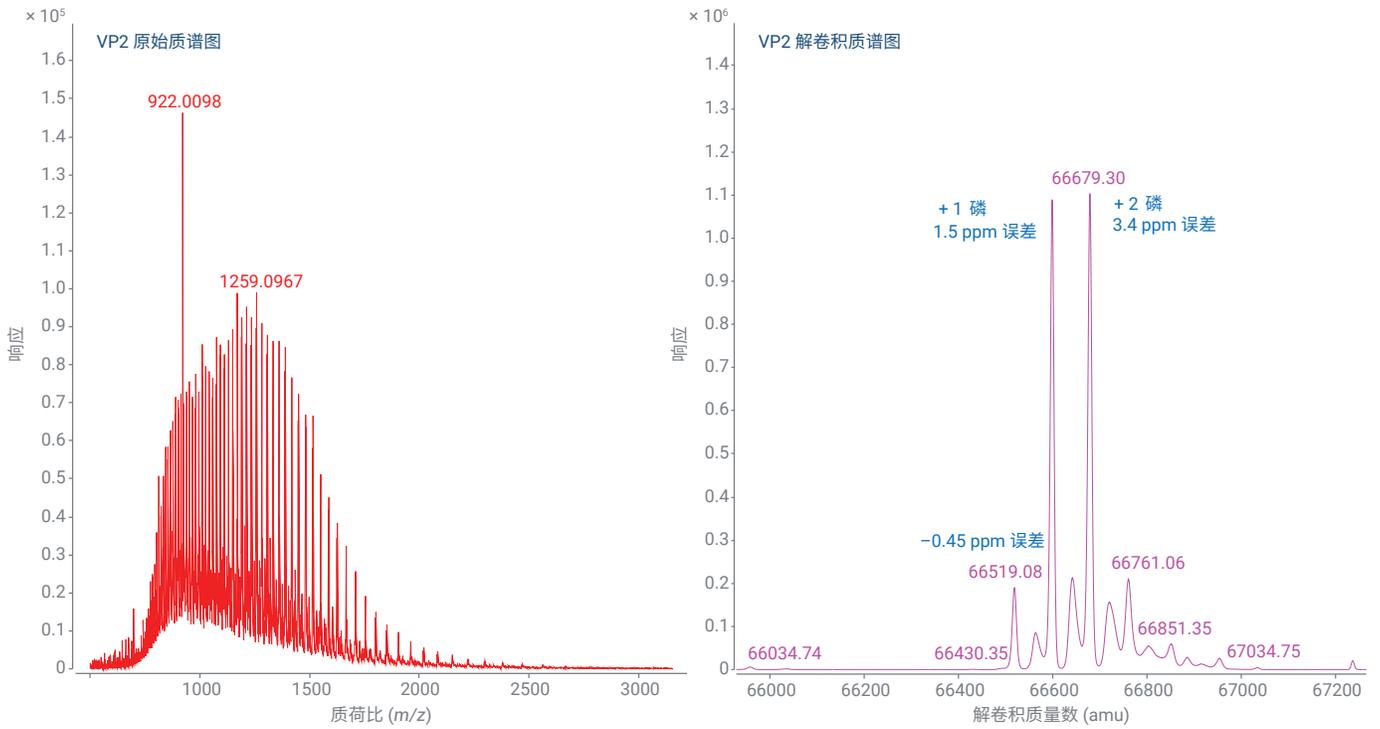


图 3. VP2 衣壳蛋白的原始谱图和解卷积谱图。蛋白质的天然形式和磷酸化形式具有出色的质量准确度，误差均小于 5 ppm

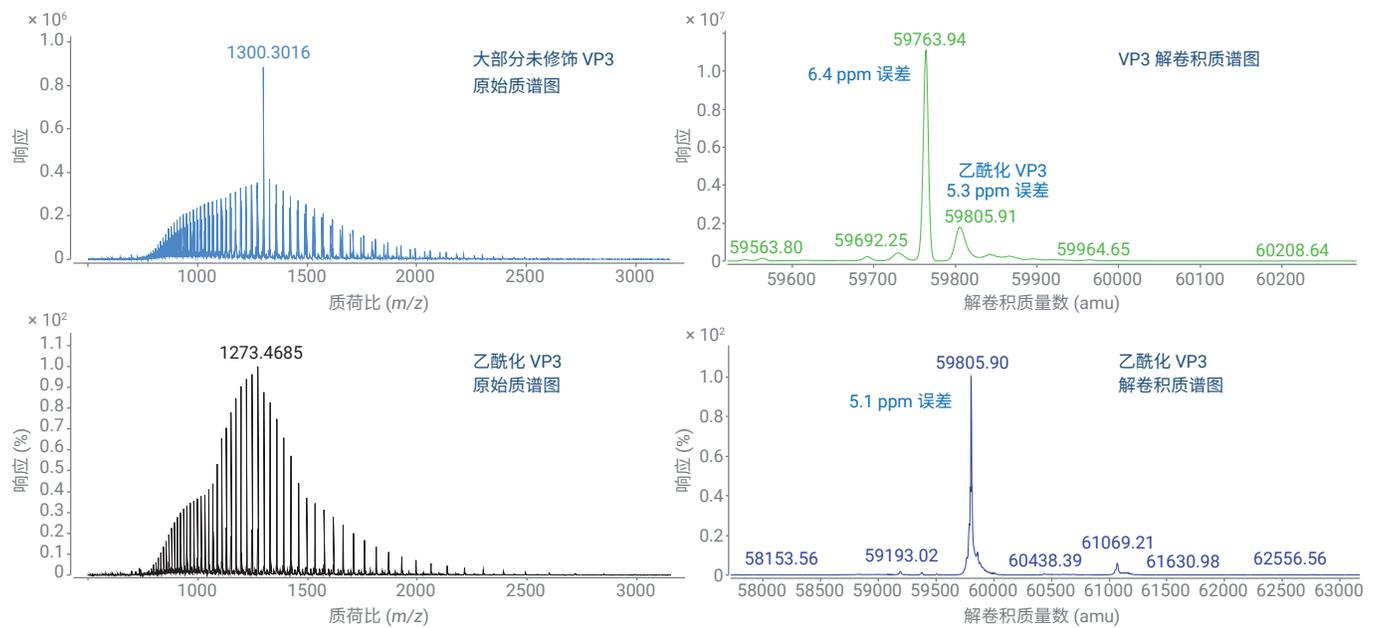


图 4. VP3 衣壳蛋白的原始谱图和解卷积谱图。大部分未修饰形式和乙酰化形式实现色谱分离，每种蛋白质形式均具有出色的质量准确度

使用 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 进行肽谱分析

生物治疗药物的肽谱分析是 ICH、FDA 和其他监管机构要求用于确定蛋白质序列和 PTM 的重要方法。虽然通过 AAV 进行基因治疗是一个新领域，但可以想象未来对于衣壳蛋白肽谱分析的需求。自 2020 年 1 月起，FDA 建议提供关于人类基因治疗药物的一级和二级结构信息（包括 PTMs）。6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 的迭代 MS/MS 功能排除了之前所有运行中进行分离和碎裂的肽段，从而可以选择和检测低丰度肽段。此外，MassHunter BioConfirm 10.0 可以选择多次运行，以实现整体序列覆盖。此功能对于结合迭代 MS/MS 运行的结果以及使用多种酶非常有用。

了解 PTMs 的类型（例如氧化和脱酰胺基化）对于确定蛋白质稳定性至关重要。为了获得可靠的肽谱分析结果，所有鉴定得到的肽段误差均小于 10 ppm，并且至少有一张 MS/MS 谱图可以确认肽段序列并定位 PTMs。此外，将假阳性率设置为 1%。AAV8 的序列中有几个区域常常存在赖氨酸和精氨酸残基，仅用胰蛋白酶难以获得完整序列。因此，使用 rAsp-N 实现完整序列覆盖。

最大的蛋白质 VP1 的总序列覆盖率为 97.7%，如图 5 所示。实线表示通过 MS/MS 鉴定的肽段。蓝色线和绿色线来自胰蛋白酶酶解的两次迭代运行，而黑色线和红色线则来自 rAsp-N 酶解的两次迭代运行。MS/MS 数据证实了位点特异性磷酸化，如图 6 所示。红色标注显示了含有磷酸化丝氨酸的肽段。如预期一样，存在其他常见的 PTM（例如天冬酰胺脱酰胺基化和甲硫氨酸氧化），但丰度较低。图 7 显示了使用 BioConfirm 10.0 中的相对定量功能测得的这些低浓度修饰的示例。VP2 和 VP3 的序列覆盖率分别为 98.5% 和 100.0%。虽然有关于 AAV8 中 N-糖基化的报告，但未发现 N-糖基化。这种差异可能是由于载体表达系统的不同。

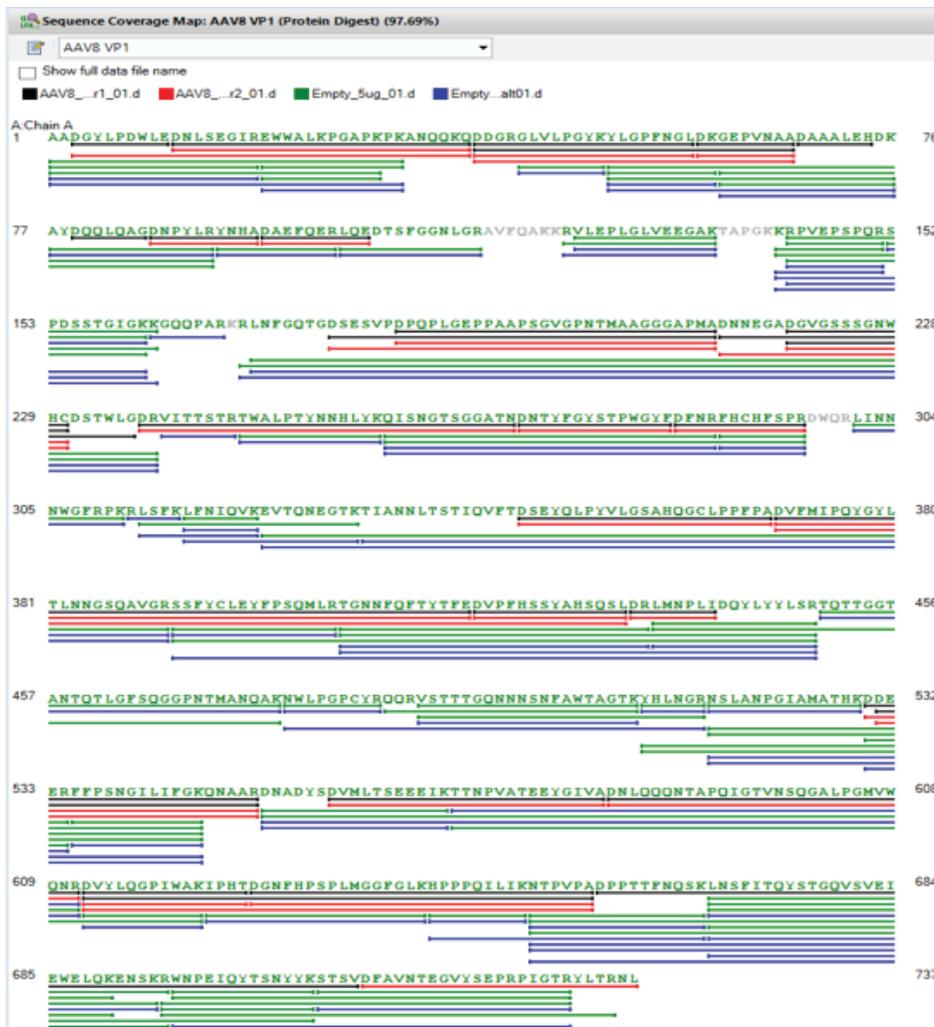


图 5. Agilent MassHunter BioConfirm 10.0 屏幕截图，显示了借助迭代 MS/MS 并使用胰蛋白酶和 rAsp-N 作为互补酶获得的 VP1 的序列覆盖。该蛋白质的序列覆盖率为 97.7%

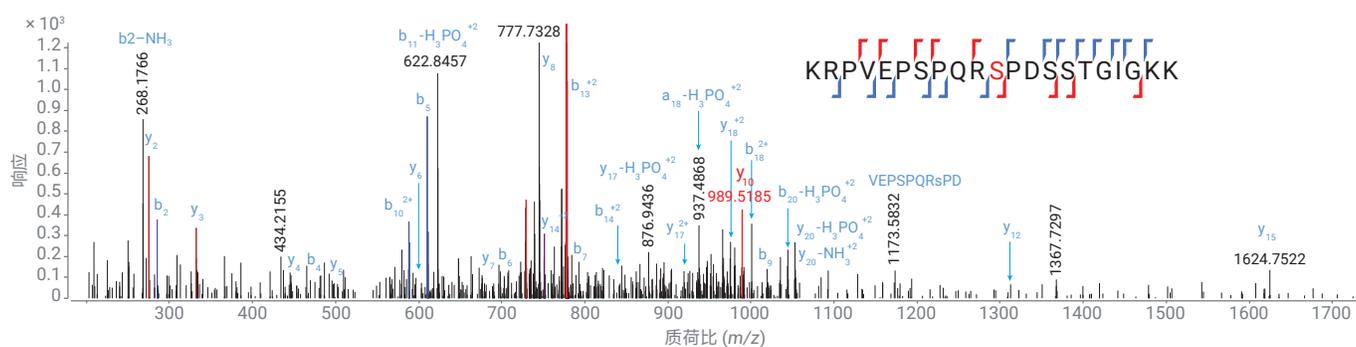


图 6. 使用 MS/MS 确认位点特异性磷酸化的示例。当标注肽段包含磷酸化的丝氨酸残基时带有红色标记

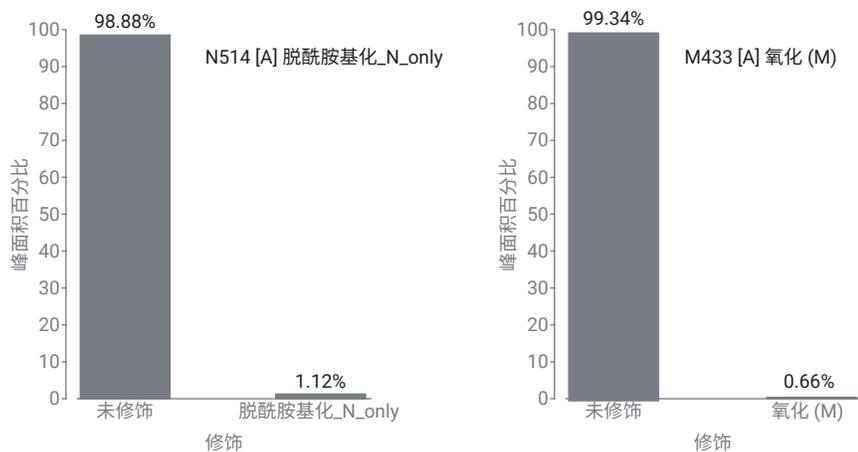


图 7. 蛋白质中常见 PTMs 示例：甲硫氨酸氧化和天冬酰胺脱酰胺基化。如预期一样，两种肽段均经过极低程度的修饰

结论

AAV 颗粒作为基因治疗的载体显示出巨大的潜力，因此衣壳蛋白 CQA 的表征对于药物批准流程至关重要。本研究展示了从样品前处理到数据分析的工作流程，可用于确定衣壳蛋白的精确质量并鉴定 PTMs。1290 Infinity II LC 联用 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF，同时搭配 MassHunter BioConfirm 10.0，为分析 AAV 衣壳蛋白提供了准确、可靠的解决方案。

致谢

安捷伦感谢 Lake Pharma 的 Dominique Garceau、Tristan Cano、Caitlin Jaeger 和 William Hermans 在样品生产方面所做的工作。同时感谢安捷伦新加坡公司的 Brian Liau 和 Ravindra Gudihal 分享想法。

参考文献

1. Dalkara, D. *et al.* *In vivo*-Directed Evolution of a New Adeno-Associated Virus for Therapeutic Outer Retinal Gene Delivery from the Vitreous. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*(189), 189ra76-189ra76
2. Xie, Q. *et al.* The Atomic Structure of Adeno-Associated Virus (AAV-2), a Vector for Human Gene Therapy. **2002**, *99*(16), 10405–10410
3. Wu, Z.; Asokan, A.; Samulski, R. J. Adeno-Associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy. *Mol. Ther.* **2006**, *14*(3), 316–327
4. Bui, H. *et al.* (**2014**) ASMS Poster WP-681
5. Jin, X. *et al.* Direct Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis for Complete Characterization of Recombinant Adeno-Associated Virus Capsid Proteins. *Hum. Gene Ther. Methods* **2017**, *28*(5), 255–267
6. Giles, A. R. *et al.* Deamidation of Amino Acids on the Surface of Adeno-Associated Virus Capsids Leads to Charge Heterogeneity and Altered Vector Function. *Mol. Ther.* **2018**, *26*(12), 2848–2862
7. Van Vliet, K. *et al.* Adeno-associated virus capsid serotype identification: Analytical methods development and application. *J. Virol. Methods* **2009**, *159*(2), 167–177
8. Arruda, V. R. *et al.* It's All About the Clothing: Capsid Domination in the Adeno-Associated Viral Vector World. *J. Thromb. Haemost.* **2007**, *5*(1), 12–15
9. Office of Medical Products and Tobacco, Center for Biologics Evaluation and Research. *Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)*. Silver Spring, MD. **2020**, 28–29

将方法无缝转移至 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统

与 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统相比，肽谱分析显示出优异的性能和较高的方法兼容性

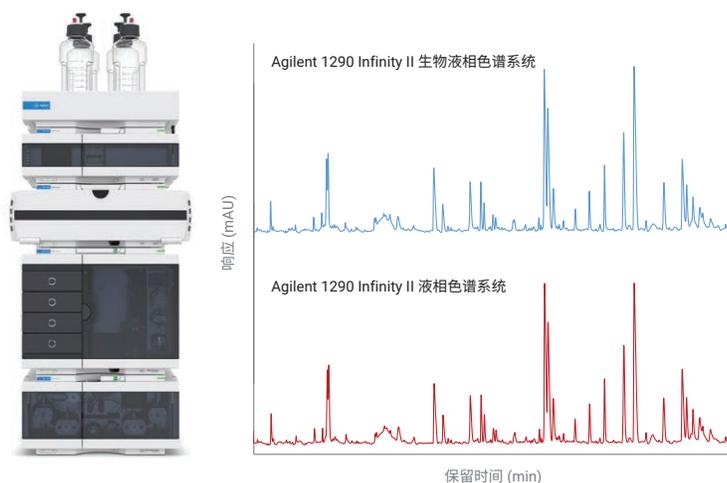
作者

André Feith

安捷伦科技有限公司

摘要

肽谱分析要求使用稳定、可靠的高精度方法来分析生物药物的一级结构和翻译后修饰 (PTM)。然而，已验证方法可能存在方法转移性和兼容性问题。本应用简报表明，使用新型 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统可以简单便捷地进行方法转移。以 12 种选定肽段的平均相对保留时间偏差为 0.039% 的出色性能为基础，研究发现 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统之间的保留时间偏差仅为 0.17%。通过将液相色谱系统与 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 相结合，峰丰度的额外对比统计分析表明两种系统之间没有显著差异，使新型 1290 Infinity II 生物液相色谱仪成为基于 UV 或 MS 的肽谱分析工作流程的理想选择。



前言

对于不同行业的实验室而言，不同仪器之间的方法转移和兼容性非常重要^[1]。尤其是在生物制药行业中，仪器间的方法转移对于经验证的方法至关重要。为了展示从 1290 Infinity II 液相色谱仪到 1290 Infinity II 生物液相色谱仪的无缝方法转移，本研究选择采用肽谱分析工作流程，因为其与 ICH 指南 Q6B^[2] 中所述的生物制品评估具有较大的相关性。本应用简报使用 NISTmAb 的胰蛋白酶酶解产物表明，得益于 1290 Infinity II 生物液相色谱仪，可轻松实现方法转移。

实验部分

设备

与 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 联用的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统包括以下模块：

Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱仪：

- Agilent 1290 Infinity II 生物高速泵 (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A)，配备样品恒温箱（选件 101）
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)，配备一个标准流速 Quick Connect 快速连接生物热交换器 (G7116-60071) 和两个安捷伦热平衡装置 (G7116-60013)
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (VWD)(G7114B)，配备生物微量流通池（用于 VWD，3 mm，2 μ L，RFID）
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6545XT)

Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统：

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167A)，配备样品恒温箱（选件 101）
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)，配备一个标准流速 Quick Connect 快速连接热交换器 (G7116-60015) 和两个安捷伦热平衡装置 (G7116-60013)
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (VWD) (G7114B)，配备微量流通池（用于 VWD，3 mm，2 μ L，RFID）
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6545XT)

软件

- Agilent MassHunter 工作站数据采集软件 (B.09.00)
- Agilent MassHunter 定性分析软件 (B.10.00)
- Agilent MassHunter Mass Profiler (B.10.00)

色谱柱

- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 \times 150 mm, 1.8 μ m（部件号 959759-902）
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 快速保护柱，2.1 \times 5 mm, 1.8 μ m（部件号 821725-901）

化学品

LC 级乙腈、碳酸氢铵、三(2-羧乙基)膦和 2-碘乙酰胺购自 Merck (Darmstadt, Germany)。新制超纯水来自配置 0.22 μ m 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA)。甲酸购自 VWR (Darmstadt, Germany)。胰蛋白酶（猪，质谱级）购自 G-Biosciences (St. Louis, USA)。

样品前处理

向含有 0.8 mg Agilent-NISTmAb（部件号 5191-5744）的 100 μ L 碳酸氢铵 (100 mmol/L) 中加入 2 μ L 三(2-羧乙基)膦 (TCEP, 200 mmol/L) 进行变性和还原，并在 60 $^{\circ}$ C 下温育 1 小时。使用 4 μ L 2-碘乙酰胺 (IAM, 200 mmol/L, 室温下 1 小时) 对其进行烷基化处理后，用 2 μ L TCEP 淬灭过量的 IAM（室温下 1 小时），然后用 0.8 mL 25 mmol/L 碳酸氢铵进行稀释，加入胰蛋白酶 (NISTmAb 与胰蛋白酶比例 20:1, w/w)。在 37 $^{\circ}$ C 下过夜酶解后，加入 2 μ L 甲酸使所得悬液的 pH 值低于 4。

结果与讨论

为了展示 1290 Infinity II 生物液相色谱仪和 1290 Infinity II 液相色谱仪的出色性能及两者之间的方法转移，我们使用 UV 和 MS 检测对 NISTmAb 的胰蛋白酶酶解产物进行了分析。两种系统均配备相同长度和直径的毛细管，因此具有相似的柱外体积。但 1290 Infinity II 生物液相色谱仪具有完全不含铁的流程，特别适用于粘性生物分子。两种分析均使用相同的 ZORBAX RRHD Eclipse Plus 色谱柱和方法参数（表 1）。图 1 显示了两种系统获得的肽谱分析色谱图。可以看出肽谱之间具有极高的相似度，几乎没有可检出的差异。

表 1. 用于 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱和生物液相色谱的肽谱分析方法

参数	值
色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm + 快速保护柱 2.1 × 5 mm
溶剂	A) 水 + 0.1% 甲酸 B) 乙腈 + 0.1% 甲酸
梯度	0.00 min – 2% B 44.00 min – 45% B 44.01 min – 97% B 50.00 min – 97% B 50.01 min – 2% B 60.00 min – 2% B
流速	0.300 mL/min
温度	40 °C, 装有热平衡装置
检测	VWD: 214 nm, 10 Hz/MS: 见表 2
进样	进样量: 15 μL 样品温度: 4 °C 清洗: 用水冲洗 3 s (清洗口)

表 2. 多肽全离子 MS/MS 分析的离子源和质谱参数

参数	值
仪器	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
气体温度	300 °C
干燥气流速	13 L/min
雾化器	40 psig
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	4000 V
喷嘴电压	500 V
碎裂电压	175 V
锥孔电压	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
采集速率	正离子, 扩展动态范围 (2 GHz)
质量数范围	m/z 100–1700
采集速率	6 质谱图/秒
碰撞能量	全离子 MS/MS – 0 V、10 V、25 V

为了更好地评估，计算了两种分离的三个一般分离度 (R_s) 值 (图 1)，它们同样显示出较高的一致性。为了分析 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 1290 Infinity II 液相色谱系统在保留时间精度方面的性能，选择采用 12 种肽段，并基于 10 次连续进样计算了相应的保留时间相对标准偏差 (RSD)。从图 2 可以看出，所有 RSD 值 (无论何种系统) 均低于 0.1%，表明 Agilent 1290 Infinity II 生物高速泵和 1290 Infinity II 高速泵具有出色的性能。1290 Infinity II 生物液相色谱系统获得的 12 种肽段的平均 RSD 值甚至低至 0.039%，使该系统成为稳定可靠的肽谱分析的理想选择。然而对于许多实验室而言，除了高性能之外，不同液相色谱系统之间的方法兼容性同样非常重要。

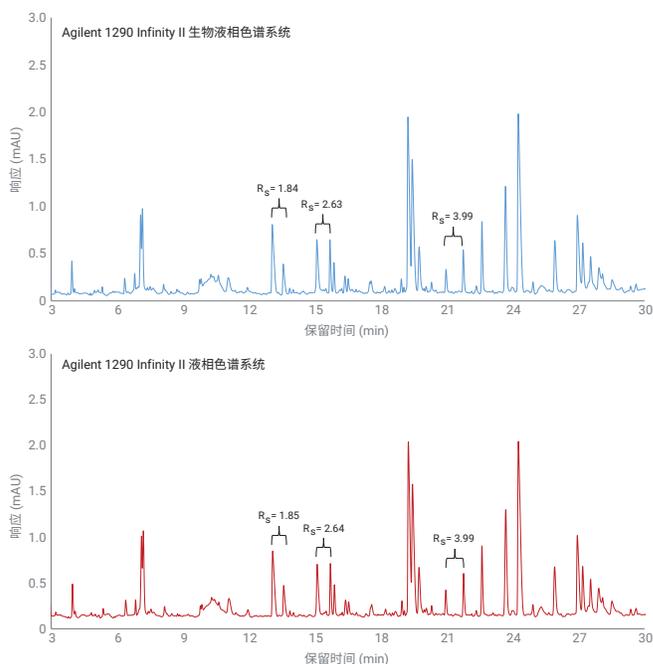


图 1. 由 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统使用相同方法 (表 1) 分离的 NISTmAb 胰蛋白酶酶解产物的色谱图

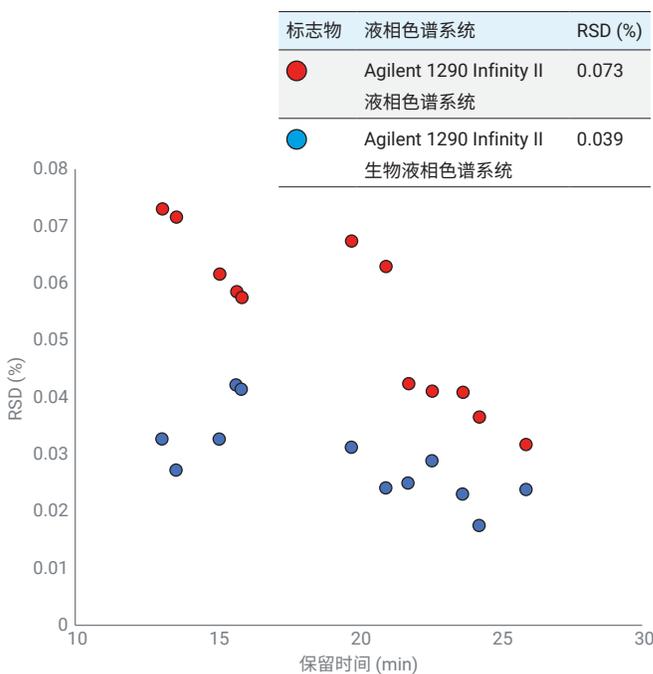


图 2. Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统的相对保留时间精度 (RSD) 值

液相色谱系统	肽段平均保留时间 (min)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统	13.082	13.577	15.104	15.704	15.887	19.751	20.968	21.769	22.599	23.684	24.261	25.907
Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统	13.062	13.559	15.084	15.677	15.860	19.743	20.961	21.742	22.585	23.663	24.249	25.907

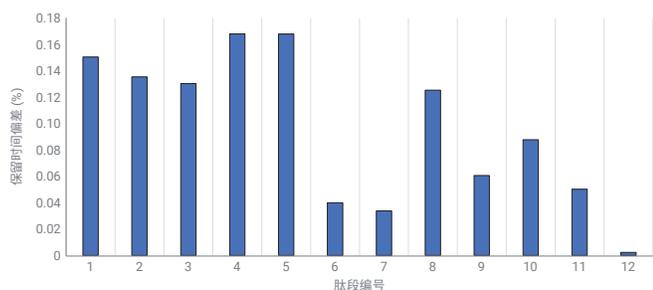


图 3. 两种液相色谱系统对所选 12 种肽段的平均保留时间及其偏差

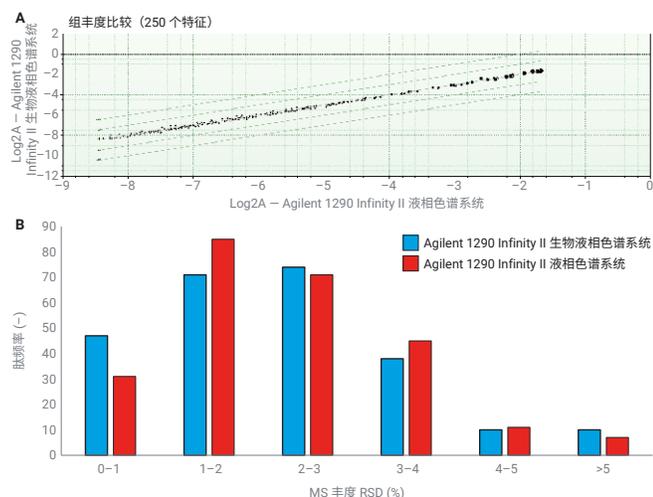


图 4. (A) 基于 10 次连续进样的统计相关性分析。黑点表示由 Agilent MassHunter Mass Profiler (B.10.00) 鉴定得到的 250 个最大丰度峰的倍数对数值。(B) Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 1290 Infinity II 液相色谱系统肽丰度 RSD 值的直方图

绝对保留时间需要在特定的窄时间窗口内，才能在经过验证或合规的环境中识别分析物。通过测定 12 种肽段在两种液相色谱系统中的平均保留时间，并计算 1290 Infinity II 生物液相色谱系统与 1290 Infinity II 液相色谱系统之间的保留时间偏差，对性能进行了评估。图 3 的表中显示了平均肽段保留时间，并以条形图的形式显示了相应的偏差。计算得到两种液相色谱系统之间的最大偏差仅为 0.17%，表明 1290 Infinity II 生物液相色谱系统与 1290 Infinity II 液相色谱系统之间实现了无缝方法转换。

为了进一步研究方法兼容性，将两种系统均与 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 联用。在非靶向方法中，MS 检测器用于全离子模式（表 2），在碰撞池中定期裂解所有母离子。然后使用 Agilent MassHunter Mass Profiler (B.10.00) 软件对两种液相色谱系统信息丰富的数据集进行评估，从而全面了解鉴定峰丰度的差异。在两种液相色谱系统上对 NISTmAb 胰蛋白酶酶解产物进行的 10 次连续进样是后续统计分析的基础。通过相关分析评估了 250 个丰度最大的峰，相应的对数倍数变化如图 4A 所示。如果两种系统中的峰没有差异，它将聚集在图 4A 中的 1x 线周围，表明峰面积之间无明显差异。然而，如果一个峰在一种系统中的丰度高出两倍，它将位于 2x 线附近。查看图形数据结果，可以清楚地看到大多数峰无明显差异。多达 75% 的峰的丰度变化不超过 10%。更引人注目的是，1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 1290 Infinity II 液相色谱系统 10 次进样的丰度 RSD 几乎相同（图 4B）。90% 以上肽峰的峰面积 RSD 值不超过 4%。

结论

对于许多实验室而言，在配置和安装新的液相色谱系统时，方法转移有时是一个费力且困难的过程。从本应用简报中可以看出，对于 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统而言，情况并非如此。在 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 1290 Infinity II 液相色谱系统上运行相同 NISTmAb 肽谱分析方法的结果表明，该方法可以在两种系统之间无缝转移，并且最大保留时间偏差仅为 0.17%。得益于 1290 Infinity II 生物高速泵，10 次进样后的平均相对保留时间偏差也同样出色，为 0.039%。通过将两种系统与 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 联用，峰丰度的综合统计分析无明显差异，平均 RSD 为 2.8%，具有出色的重现性。综合上述结果可以发现，1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 1290 Infinity II 液相色谱系统之间实现了高效、便捷的方法转移。因此，无论采用何种检测方法，1290 Infinity II 生物液相色谱系统都是肽谱分析工作流程的理想选择，同时还具有无死流路的优势。

参考文献

1. 采用 ISET 技术的 Agilent 1290 Infinity, *安捷伦科技公司用户手册*, 出版号 G4220-90314, **2015**。
2. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT Q6B, **1999**.
请访问: https://database.ich.org/sites/default/files/Q6B_Guideline.pdf

更多应用简报

出版号	标题
5991-1813CHCN	利用 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱进行高分离度的 EPO 糖肽谱分析
5991-2085CHCN	利用 HILIC LC/MS 和 RP-LC/MS 进行促红细胞生成素糖蛋白的肽谱分析
5991-3585CHCN	快速高效的单克隆抗体 (mAb) 肽谱分析: UHPLC 性能与表面多孔颗粒填料相结合
5991-4920EN	利用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统和 Agilent OpenLAB Match Compare 软件对单克隆抗体利妥昔单抗的生物仿制药与创新药物进行比较
5991-6338EN	肽谱分析: 质量源于设计 (QbD) 的方法

其他信息

对于用于肽谱分析的高通量蛋白质酶解, AssayMAP Bravo 平台支持自动化样品前处理。更多信息可参见 www.agilent.com 及下列文件。

部件号	标题
5991-6273ZHCN	Agilent AssayMAP Bravo 平台: 用于质谱分析的自动化蛋白质和多肽样品前处理
5991-6478EN	通过 Agilent AssayMAP Bravo 平台上的自动化反相脱盐实现快速抗体酶解

提供多种肽标准品以促进方法开发和系统校验。

部件号	名称
5190-0583	十肽标准品
G2455-85001	HSA 肽标准品
G1990-85000	胰蛋白酶酶解甲基化 BSA 标准品

氨基酸分析

背景

确定蛋白质的氨基酸组成是一种成熟的技术，该技术与其他技术一起使用以确认正确的结构。在分析之前，通常利用酸水解使蛋白质水解成氨基酸。氨基酸也是用于制备重组蛋白质的细胞培养基中的关键成分。通常需要监测发酵反应期间各种氨基酸的消耗量，因此可能会使用相同的色谱方法。

氨基酸本身属于两性离子，并具有各种侧链，其中包括中性基团、疏水性基团、亲水性基团、酸性基团和碱性基团。它们还缺少合适的 UV 发色团，使得分离和检测这 20 种左右的天然存在的氨基酸非常具有挑战性。安捷伦推出了一种独特的氨基酸分析方法，该方法结合了柱前衍生化，采用 Multisampler 的液体处理功能并与反相分离相结合，可实现所有常见氨基酸的基线分离。

为进行柱前衍生化，首先在高 pH 条件下在硼酸盐缓冲液中中和样品，以确保各种氨基酸的氨基端被中和。然后伯胺与邻苯二甲醛 (OPA) 进行反应，仲胺（脯氨酸、羟脯氨酸等）与 9-芴甲基氯甲酸酯 (FMOC-Cl) 进行反应。这使得能够通过反相色谱进行后续分离，但是实现基线分离所需的高 pH 条件意味着最新的 pH 稳定柱能够提供更长的色谱柱寿命。



氨基酸和细胞培养基分析

小分子色谱 (< 150 Å)

提供稳定的高分离度分离

AdvanceBio 氨基酸分析 (AAA) 柱

包含样品衍生化的 LC/UV 或 LC/FLD 分析

属性	优势
出色的分离度	更可靠的结果
耐高 pH 的 C18 固定相	更长的色谱柱寿命
兼容 HPLC 和 UHPLC	更高的灵活性

AdvanceBio MS Spent Media

不含样品衍生化的 LC/MS 分析

属性	优势
HILIC 液相色谱分离/质谱检测	一种适用于多种代谢物的方法
无需样品衍生化	使用任意 LC/MS 系统
PEEK 内衬的不锈钢色谱柱硬件	优异的峰形和回收率

入门指南

AdvanceBio 氨基酸分析试剂盒将分析所需的所有试剂和校准标准品组合至单一部件号 5190-9426。如果需要，各个组件也可以单独订购。后文的操作指南包含有关流动相配制、在自动进样器中设置自动化在线氨基酸衍生化以及液相色谱方法的详细说明。

AdvanceBio 氨基酸分析柱使用了 C18 硅胶颗粒填料，该填料经过化学改性，具有高 pH 稳定性。氨基酸分离在高 pH 条件下效率更高，并且这种改善相比于之前的氨基酸分析解决方案显著延长了色谱柱在这些流动相条件下的使用寿命。为了尽可能发挥这一改进的优点，注意切勿将色谱柱储存在流动相 A 中。短期储存应置于流动相 B 中；长期储存应置于 50% 乙腈中。该色谱柱可承受在梯度过程中短时间暴露于碱性 pH，但是长时间暴露于高 pH 下仍将缩短色谱柱寿命。

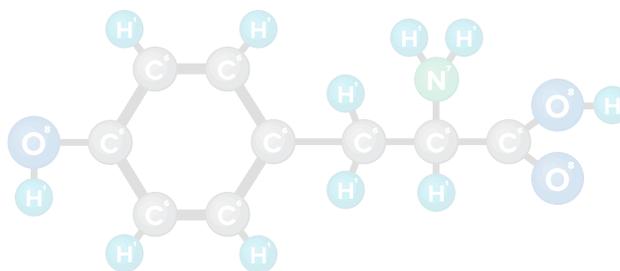
氨基酸分析：操作指南

AdvanceBio 全程解决方案助您获得准确的分析结果

Agilent AdvanceBio 氨基酸分析 (AAA) 全程解决方案将 Agilent InfinityLab 系列液相色谱仪和色谱柱技术的优势与成熟的柱前衍生化相结合，有助于优化工作流程效率。它是 AdvanceBio 系列产品中的一员，旨在为蛋白质、抗体、偶合物、新生物实体和生物药物的完整表征提供一致、卓越的性能。

这一完善的单供应商解决方案（包括化学品/标准品、色谱柱和应用支持）可实现快速、灵敏的自动化氨基酸分析。该方案基于最新的 InfinityLab 系列液相色谱仪和色谱柱技术。Agilent 1290/1260 Infinity II 样品瓶进样器的自动化在线衍生化省略了繁琐的手动操作流程，能够提供可重现的反应结果。AdvanceBio AAA 色谱柱的分析速度和分离度与亚 2 μm 色谱柱相当，而反压仅为亚 2 μm 色谱柱的 50%，并减少了色谱柱堵塞问题。

AdvanceBio AAA 溶液由用于氨基酸衍生化的经过验证的邻苯二甲醛/9-芴甲氧羰酰氯 (OPA/FMOC) 试剂发展而来。这些试剂与 AdvanceBio AAA 色谱柱和标准品结合，提供了一种兼具分析速度和灵敏度的理想氨基酸定量和定性分析方法。根据本文所述的方案使用时，AdvanceBio AAA 溶液能够帮助用户分离通常存在于蛋白质/肽水解产物中的氨基酸。

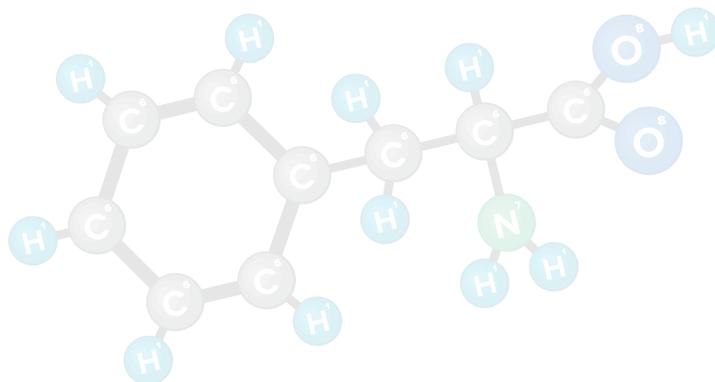
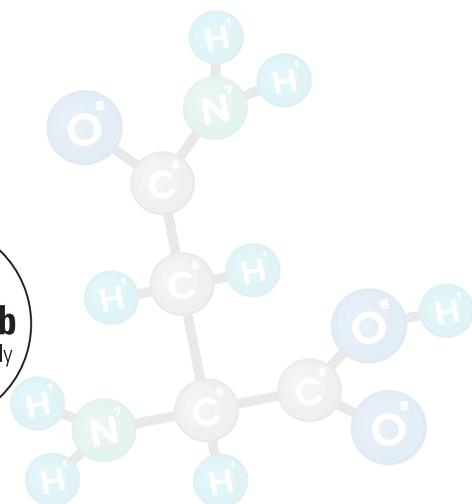
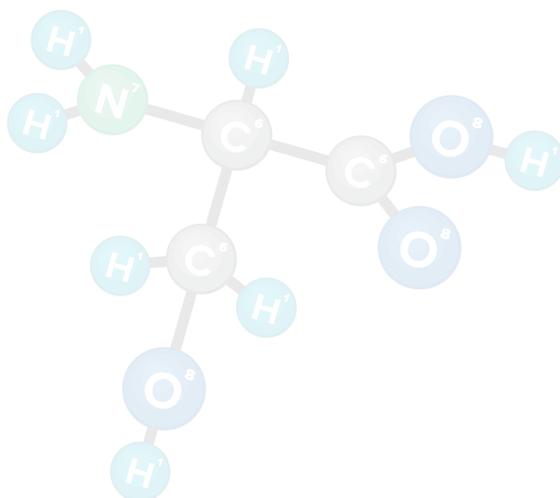


AdvanceBio AAA 色谱柱：表面多孔填料 (SPP) 技术

AdvanceBio AAA 色谱柱基于安捷伦创新的 2.7 μm 表面多孔颗粒填料 (SPP) Poroshell 技术，这种颗粒填料由 1.7 μm 的实心核和 0.5 μm 的多孔壳层组成。

2.7 μm SPP 的柱效为亚 2 μm 全多孔颗粒填料的 80%–90%，而反压比后者降低了 40%–50%。与全多孔颗粒填料相比，SPP 具有更窄的粒径分布，这使柱床更均匀，并能减小色谱柱中的扩散。同时，较薄的多孔壳层实现了较低的传质阻力。此外，由于色谱柱中含有一个 2 μm 筛板，因此它们的抗堵塞能力与 3.5 μm 和 5 μm 色谱柱相同。

直到目前，所有二氧化硅型 SPP 材料在 pH 较高的缓冲液（包括磷酸盐缓冲液）中的寿命仍然有限。为获得更长的寿命，必须对基础颗粒填料进行表面改性或特殊的键合改性。使用独特工艺对表面进行化学改性，形成一个有机层以避免硅胶在高 pH 条件下溶解。



AdvanceBio AAA 色谱柱：表面多孔填料 (SPP) 技术

AdvanceBio AAA 色谱柱可确保氨基酸分析获得优异的选择性。

快速稳定的氨基酸分离

- 具有亚 2 μm 色谱柱的速度和分离度，反压最多降低 50 %
- 采用 2 μm 筛板，使色谱柱对“脏”样品的耐受性更强
- 独特的化学改性，具有高 pH 稳定性和更长的色谱柱寿命
- 保护柱选件可延长色谱柱寿命，减少您的运行成本

效率始终如一，分析信心十足

- 能够在 600 bar 和 5 mL/min 下运行，具有更高的速度和更高分离度
- 具有进样器编程功能，可实现自动化在线衍生化
- 基于二极管阵列技术的高灵敏度紫外检测，在同步多波长检测中具有出色的灵敏度
- 在鉴定和峰纯度分析中可选用全谱检测
- 可灵活用于其他 LC 或 UHPLC 应用，与 HPLC 完全兼容

安捷伦检测器 — 检测灵活性高

多波长检测器：

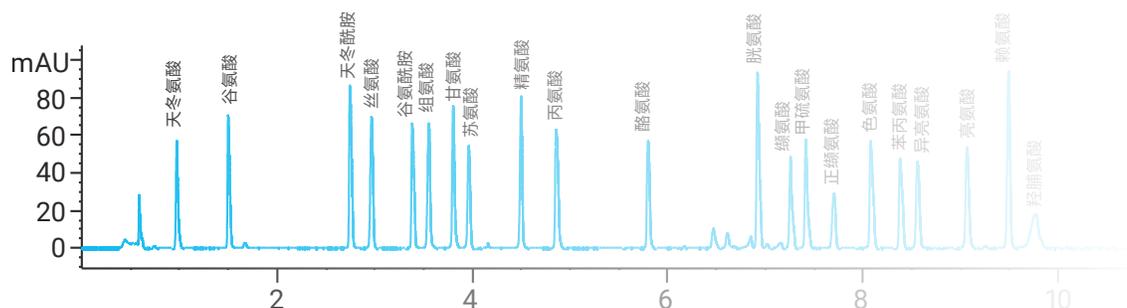
在同步多波长检测中具有出色的灵敏度。

提供光谱数据的二极管阵列检测器：

在鉴定和峰纯度分析中具有更高的选择性和更小的基质效应。

荧光检测器：

在多信号模式下，在飞摩尔范围内具有卓越的灵敏度。



提升您的分析信心：

Agilent AdvanceBio 氨基酸分析 (AAA)

快速、灵敏而重现地实现生物样品中的氨基酸分离

AAA 分析步骤

1. 配制 HPLC 流动相
2. 配制氨基酸标准品
3. 配制内标 (ISTD) 储备液
4. 进行在线衍生化
5. 设置检测参数
6. 运行高通量常规分析
7. 按照欧洲药典 (Ph. Eur.) 确定的系统适用性
8. 优化细胞培养基和蛋白质水解产物标准品

如需了解如何信心十足地分析氨基酸的更多信息，请访问

www.agilent.com/chem/advancebioaaa



第 1 步：

配制 HPLC 流动相

流动相 A：

10 mmol/L Na₂HPO₄ 和 10 mmol/L Na₂B₄O₇，pH 8.2

如需配制 1 L 流动相，称取 1.4 g 无水 Na₂HPO₄ 和 3.8 g Na₂B₄O₇·10H₂O，将其溶于 1 L 水中。用 1.2 mL 浓盐酸将 pH 调节为 8.4 左右，然后加入数滴酸，并将最终 pH 调节为 8.2。在调节 pH 之前充分搅拌，使硼酸盐晶体完全溶解。用 0.45 μm 再生纤维素膜（部件号 3150-0576）进行过滤。

流动相 B：

乙腈:甲醇:水 (45:45:10, v:v:v)

所有流动相溶剂均为 HPLC 级。

流动相 A 的消耗速率高于流动相 B，因此，建议每配制 1 L 流动相 B，则相应地配制 2 L 流动相 A。

进样稀释剂

进样稀释剂为 100 mL 流动相 A 和 0.4 mL 浓 H₃PO₄。该溶液在 100 mL 瓶中配制，并在 4 °C 下储存。

0.1 mol/L HCl

扩展氨基酸及内标储备液在 0.1 mol/L HCl 溶液中进行配制。如需配制 0.1 mol/L HCl，将 4.2 mL 浓盐酸 (36%) 加入盛有部分水的 500 mL 容量瓶中。混合，并用水定容至刻度。在 4 °C 下储存。

衍生化试剂

衍生化试剂（硼酸盐缓冲液、OPA 和 FMOC）由安捷伦提供，是即拆即用的溶液。只需将这些试剂从其容器中转移至自动进样器样品瓶中即可。推荐的安全预防措施包括：

- OPA 包装于惰性气体保护下的安瓿中，以防氧化。打开后，OPA 的保质期为 7 至 10 天左右。建议将 100 μL 的等份 OPA 转移至微量样品瓶内插管中，并储存在冰箱中。每天更换一次 OPA 自动进样器微量样品瓶
- FMOC 在干燥空气下可保持稳定，但在湿气下可发生降解。应当以 100 μL 的等份将其转移至微量样品瓶内插管中，并储存于冰箱内。与 OPA 类似，将打开的 FMOC 安瓿瓶转移至 10 个微量样品瓶内插管后，其保质期同样为 7-10 天左右
- 可以将硼酸盐缓冲液转移至不含样品瓶内插管的 1.5 mL 自动进样器样品瓶中。每三天更换一次

第 2 步:

配制氨基酸标准品

安捷伦可提供五种浓度的 17 种氨基酸 (AA) 溶液 (10 pmol/μL–1 nmol/μL)，用于绘制校准曲线。在 4 °C 下储存溶液。

如需配制扩展氨基酸 (EAA) 储备液，称取：

- 59.45 mg 天冬酰胺
- 59.00 mg 羟脯氨酸
- 65.77 mg 谷氨酰胺
- 91.95 mg 色氨酸

将称取的氨基酸置于 25 mL 容量瓶中，用 0.1 mol/L HCl 填充一半体积，并振摇或超声直至溶解。然后用水定容至刻度，使每种氨基酸的总浓度为 18 nmol/μL。

对于高灵敏度 EAA 储备液，量取 5 mL 该标准灵敏度溶液，并用 45 mL 水进行稀释 (1.8 nmol/μL)。含混合标准品的溶液在室温下不稳定。需要将其冷冻保存，并在首次出现灵敏度下降迹象时将其丢弃。



第 3 步:

配制内标 (ISTD) 储备液

对于一级氨基酸 ISTD 储备液，称取 58.58 mg 正缬氨酸置于 50 mL 容量瓶中。对于二级氨基酸，称取 44.54 mg 肌氨酸置于同一 50 mL 容量瓶中。用 0.1 mol/L HCl 填充容量瓶一半，并振摇或超声直至溶解。最后用水定容至刻度，使每种氨基酸的最终浓度为 10 nmol/μL (标准灵敏度)。对于高灵敏度 ISTD 储备液，量取 5 mL 标准灵敏度溶液，并用 45 mL 水进行稀释。每种氨基酸的高灵敏度 ISTD 的最终浓度为 1 nmol/μL。在 4 °C 下储存。

根据实验需要，使用两到五种标样绘制校准曲线。在“标准灵敏度”分析中，通常使用 100 pmol/μL、250 pmol/μL 和 1 nmol/μL 绘制三点校准曲线。

如果加入内标或其他氨基酸 (如扩展氨基酸)，则应按下表进行操作。表 1 列出紫外分析中通常使用的“标准灵敏度”浓度。表 2 列出通常用于“高灵敏度”荧光分析的浓度。

表 1. 标准灵敏度校准标样

	最终 AA 溶液的浓度 (pmol/μL)		
	900	225	90
量取 5 mL 18 nmol EAA 用水稀释	5 mL	5 mL	5 mL
	-	15 mL	45 mL
稀释后的 EAA 混合液	5 mL	20 mL	50 mL
量取 5 mL 稀释后的 EAA 混合液	5 mL	5 mL	5 mL
加入 10 nmol ISTD 溶液	5 mL	5 mL	5 mL
EAA-ISTD 混合液	10 mL	10 mL	10 mL
量取 100 μL EAA-ISTD 混合液	100 μL	100 μL	100 μL
对于 1 nmol AA，加入	900 μL	-	-
对于 250 pmol AA，加入	-	900 μL	-
对于 100 pmol AA，加入	-	-	900 μL
含 EAA 和 500 pmol/μL ISTD 的最终 AA 溶液	1 mL	1 mL	1 mL

表 2. 高灵敏度校准标样

	最终 AA 溶液的浓度 (pmol/μL)		
	90	22.5	9
量取 5 mL 1.8 nmol EAA	5 mL	5 mL	5 mL
用水稀释	-	15 mL	45 mL
稀释后的 EAA 混合液	5 mL	20 mL	50 mL
量取 5 mL 稀释后的 EAA 混合液	5 mL	5 mL	5 mL
加入 1 nmol ISTD 溶液	5 mL	5 mL	5 mL
高灵敏度 EAA-ISTD 混合液	10 mL	10 mL	10 mL
量取 100 μL EAA-ISTD 混合液	100 μL	100 μL	100 μL
对于 100 nmol AA, 加入	900 μL	-	-
对于 25 pmol AA, 加入	-	900 μL	-
对于 10 pmol AA, 加入	-	-	900 μL
含 EAA 和 50 pmol/μL ISTD 的最终 AA 溶液	1 mL	1 mL	1 mL



第 4 步:

进行在线衍生化

根据自动进样器型号不同，自动化在线衍生程序稍有不同。对于配备 100 μL 毛细管* 的 Agilent G7129A 孔板自动液体进样器 (WPALS)，进样程序如下：

1. 从硼酸盐样品瓶（部件号 5061-3339）中吸取 2.5 μL
2. 从样品瓶中吸取 1.0 μL
3. 在清洗口，将 3.5 μL 混合液混合 5 次
4. 等待 0.2 分钟
5. 从 OPA 样品瓶（部件号 5061-3335）中吸取 0.5 μL
6. 在清洗口，以默认速度将 4.0 μL 混合液混合 10 次
7. 从 FMOC 样品瓶（部件号 5061-3337）中吸取 0.4 μL
8. 在清洗口，以默认速度将 4.4 μL 混合液混合 10 次
9. 从进样稀释剂样品瓶中吸取 32 μL
10. 在清洗口，将 20 μL 混合液混合 8 次
11. 进样
12. 等待 0.1 分钟
13. 阀切换至旁路

* 注：其他型号的自动进样器可能安装不同体积的毛细管，此时需要对体积进行调整

衍生化试剂和样品的位置取决于分析人员和 ALS 样品盘配置。使用配备 2 × 56 孔板托盘的 G7129A (部件号 G2258-44502) 时, 位置为:

- 样品瓶 1: 硼酸盐缓冲液
- 样品瓶 2: OPA
- 样品瓶 3: FMOC
- 样品瓶 4: 进样稀释剂
- P1-A-1: 样品

注: 请使用正确的样品瓶、密封件和泵参数

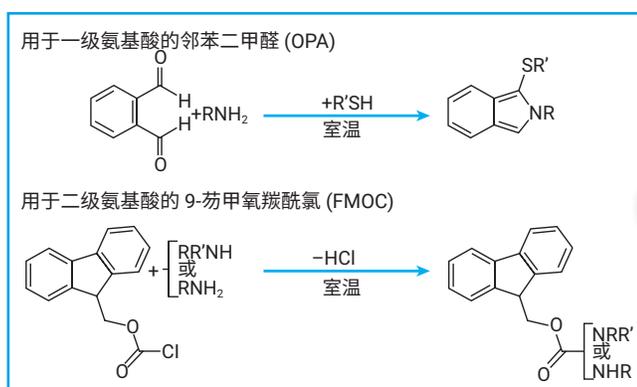
由于体积有限, 需要采用具有聚合物支脚的锥形样品瓶内插管 (图 1A) 来保存 OPA 和 FMOC 试剂。内插管与广口螺口盖 (图 1B 和图 1C) 或钳口盖样品瓶兼容。在这一程序中, 需要对 FMOC (具有高挥发性) 和 OPA (存在氧气时缓慢降解) 采用气密密封垫。因此, 该流程中不得使用卡口盖样品瓶。切勿使用针对其他仪器设计的样品瓶或瓶盖, 以防自动进样器损坏。

所有方法的泵参数包括压缩系数 ($\times 10^{-6}$ bar) A: 40, B: 80, 在最小进样量 20 μ L 下 (A, B)。



图 1. 使用 Agilent 4226A 自动进样器进行氨基酸分析的內插管、样品瓶和瓶盖: A) 锥形內插管 (安捷伦部件号 5181-1270), B) 棕色广口瓶 (安捷伦部件号 5182-0716), 和 C) 螺口盖 (安捷伦部件号 5182-0721)

利用自动进样器提高精密度



自动添加试剂

提高精密度
无需手动操作



图 2. OPA 和 FMOC 的在线衍生化: 反相分离极性氨基酸并采用紫外和荧光检测器进行检测

第 5 步：

设置检测参数

柱温箱 (TCC)

左侧和右侧温度均应设置为 40 °C。当温度处于 ± 0.8 °C 以内时进行分析。

二极管阵列检测器 (DAD)

信号 A: 338 nm	带宽 10 nm	参比波长 390 nm	带宽 20 nm
信号 B: 262 nm	带宽 16 nm	参比波长 324 nm	带宽 8 nm
信号 C*: 338 nmix	带宽 10 nm	参比波长 390 nm	带宽 20 nm

* 如果按照下列说明进行操作，则无需信号 C

如需在一幅色谱图中同时检测 OPA 和 FMOC 衍生化氨基酸，必须在最后洗脱的 OPA 衍生化氨基酸（赖氨酸，标准品中的峰 20）和第一个洗脱的 FMOC 衍生化氨基酸（羟脯氨酸，标准品中的峰 21）之间切换检测器波长。

通过首先采集两个通道（信号 A 338 nm，用于检测 OPA 衍生化氨基酸；信号 B 262 nm，用于检测 FMOC 衍生化氨基酸），即可使用 DAD 确定适当的转换点。如此可确定在运行过程中切换波长的最佳时间点。可使用单个通道进行后续运行，采用检测器时间表功能，在适当的时间处设定从 338 nm 至 262 nm 的波长切换程序。在洗脱 OPA-赖氨酸和 FMOC-羟脯氨酸之间正好可以进行这一切换，从而能够在幅色谱图中同时检出 OPA 和 FMOC 衍生化氨基酸。

所有色谱柱均使用 > 0.01 分钟的峰宽设置。



荧光检测

FLD 应始终作为液流中的最后一个检测器模块，以免损坏高压流通池（最高耐压 20 bar）。

峰宽 0.01 min，停止时间 18 min（根据需要调整）

激发波长 340 nm；发射波长 450 nm；滤光片波长 390 nm（默认滤光片）

时间表信号：

0.00 min 激发波长 340 nm，发射波长 450 nm；增益（根据需要）

5.53 min 激发波长 260 nm，发射波长 325 nm；

PMT 增益 10（根据需要；在赖氨酸和羟脯氨酸之间进行转换）

为确定荧光检测 (FLD) 所需的转换点，需要执行两次单独的运行：首先使用激发波长 340 nm、发射波长 450 nm 检测 OPA 衍生化氨基酸，其次使用激发波长 260 nm、发射波长 325 nm 检测 FMOC 衍生化氨基酸。使用检测器时间表功能，OPA 和 FMOC 衍生化氨基酸可在一幅色谱图中得到检测。该功能在最后洗脱的 OPA 衍生化氨基酸（赖氨酸，标准品中的峰 20）之后和第一个洗脱的 FMOC 衍生化氨基酸（羟脯氨酸，标准品中的峰 21）之前的适当点处设置波长切换程序。

注：如果氨基酸的浓度低于 100 pmol，则建议使用荧光检测。

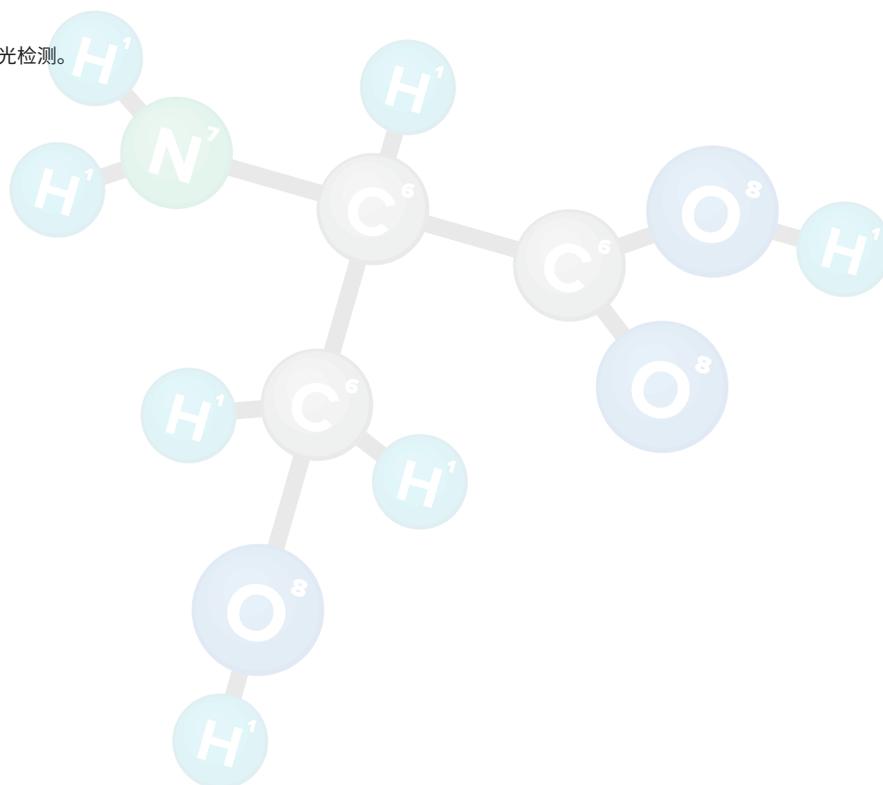


梯度程序

时间 (min)	%B
0	2
0.35	2
13.4	57
13.5	100
15.7	100
15.8	2
18	结束

流速： 4.6 mm 内径的色谱柱采用 1.5 mL/min；3 mm 内径的色谱柱采用 0.62 mL/min。

进样量：1 μ L，进样针在进样口清洗 7 s。



典型分离

使用 AdvanceBio AAA 色谱柱分离 20 种氨基酸得到的结果如图 3 所示。

请注意下列参数：

- 无论流动相中是否含 NaN_3 ，氨基酸的洗脱曲线不变
- NaN_3 仅用作抑制细菌/真菌生长的防腐剂
- 强烈推荐使用 $0.45\ \mu\text{m}$ 过滤器对流动相进行过滤。注：如果氨基酸的浓度低于 $100\ \text{pmol}$ ，则建议使用荧光检测

*DAD1 A, Sig = 338,10 Ref = 390,20 (AAA FINAL\STD WITH NAN3\1B E-0201.D)

*DAD1 A, Sig = 338,10 Ref = 390,20, TT (AAA FINAL\STD WITHOUT\1B G-0401.D)

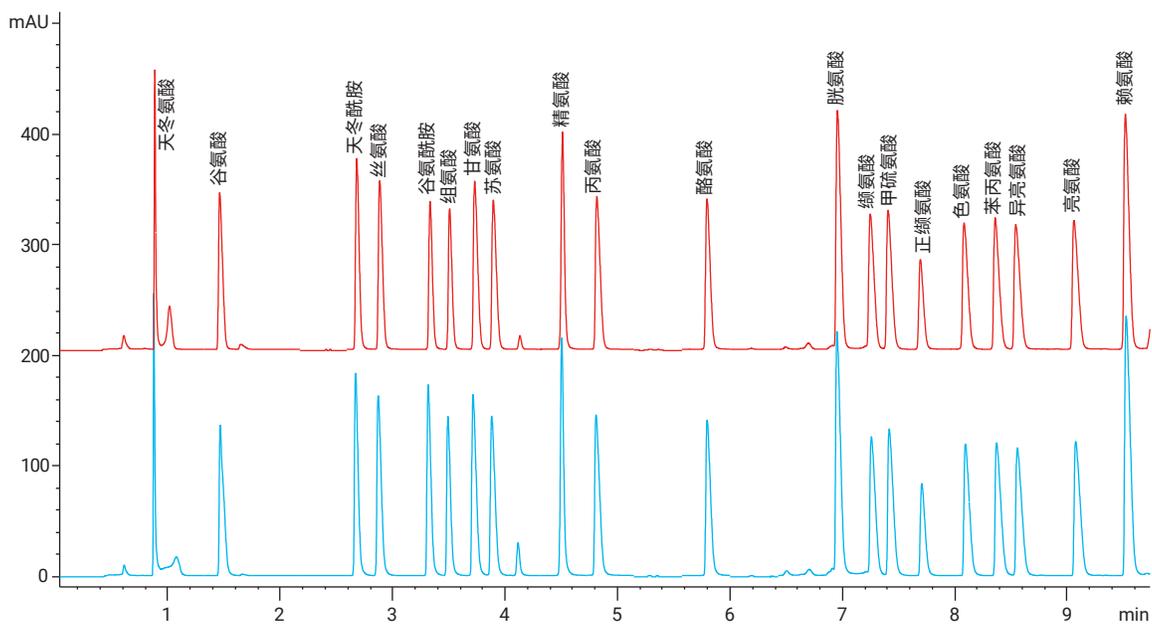


图 3. 使用 Agilent AdvanceBio AAA $4.6 \times 100\ \text{mm}$ 色谱柱，在流动相中含与不含 $5\ \text{mmol/L}$ 叠氮化钠的情况下分离 20 种氨基酸标准品

注：可选择向流动相 A 中加入 $5\ \text{mmol/L}$ 叠氮化钠 (NaN_3)，以防止微生物生长并延长缓冲液的保质期。

第 6 步:

运行高通量氨基酸分析

图 4 中的色谱图显示出在高通量应用中使用 Agilent AdvanceBio AAA 色谱柱可获得的典型常规标准灵敏度。这些分离采用配备 AdvanceBio AAA 100 mm, 2.7 μm 不同内径的色谱柱以及 DAD 检测器的 Agilent 1260 Infinity II HPLC 二元系统完成。一次运行可在 20 分钟内完成 (包括重新平衡), 并获得足够高的分离度。在 338 nm 下监测一级氨基酸 (1-20, 经 OPA 衍生化), 同时在 262 nm 下监测二级氨基酸 (21-23, 经 FMOC 衍生化)。

用 OPA 对图 4 中的前 20 种氨基酸 (一级氨基酸) 进行衍生化。用 FMOC 对后三种氨基酸 (羟脯氨酸、肌氨酸和脯氨酸) 进行衍生化。从 338 nm 至 265 nm 的可编程波长切换发生在赖氨酸 (峰 20) 洗脱之后, 羟脯氨酸 (峰 21) 洗脱之前。

- 该方法可轻松扩展至不同色谱柱尺寸
- 在这种情况下, 方法的唯一变化是根据色谱柱内径改变流速数值
- 将小体积热交换器与较短的红色管线配套使用, 以尽可能减小柱外体积

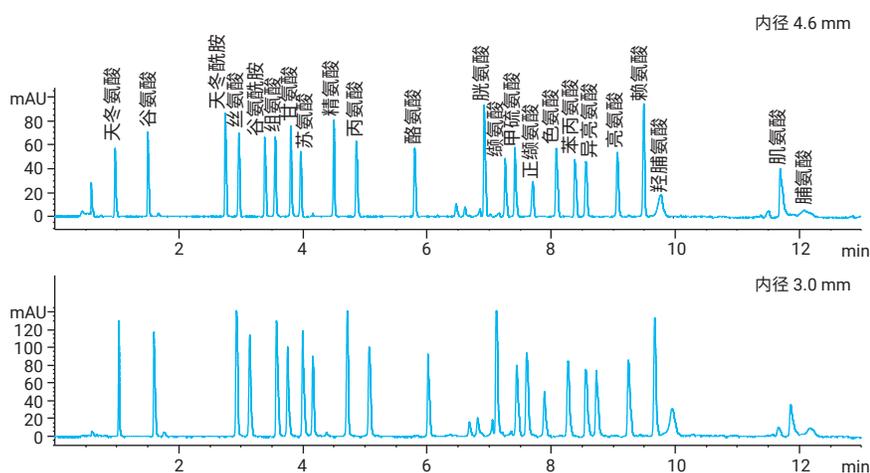


图 4. 使用氨基酸分析方法和具有不同内径的 Agilent AdvanceBio AAA 色谱柱分离 AA 标准品



100 pmol 和 1000 pmol 分析的保留时间和峰面积 精密度 (n = 6)

表 3. 使用 AdvanceBio AAA 4.6 × 100 mm 色谱柱分离氨基酸 (100 pmol) 得到的保留时间和峰面积精密度 (重复测定六次)

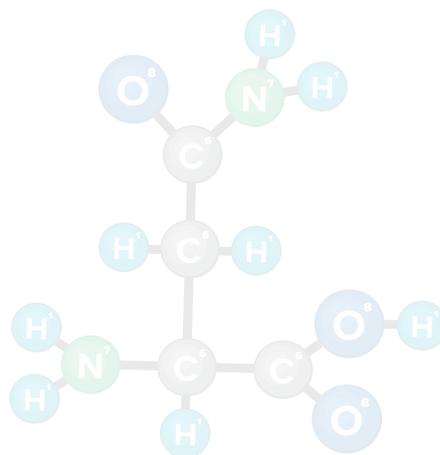
氨基酸	平均 RT	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)
1.天冬氨酸	0.851	1.270	1.066
2.谷氨酸	1.428	0.973	1.850
3.天冬酰胺	2.639	0.605	1.790
4.丝氨酸	2.835	0.629	1.820
5.谷氨酰胺	3.285	0.470	1.560
6.组氨酸	3.465	0.430	1.220
7.甘氨酸	3.681	0.477	1.920
8.苏氨酸	3.837	0.440	1.950
9.精氨酸	4.458	0.251	2.150
10.丙氨酸	4.764	0.280	3.060
11.酪氨酸	5.762	0.128	1.650
12.胱氨酸	6.870	0.067	1.900

氨基酸	平均 RT	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)
13.缬氨酸	7.201	0.084	2.47
14.甲硫氨酸	7.363	0.073	1.82
15.正缬氨酸	7.602	0.073	1.72
16.色氨酸	8.055	0.054	1.57
17.苯丙氨酸	8.341	0.051	1.66
18.异亮氨酸	8.503	0.047	1.72
19.亮氨酸	9.000	0.030	1.70
20.赖氨酸	9.428	0.028	1.66
21.羟脯氨酸	9.747	0.021	4.13
22.肌氨酸	10.980	0.026	1.15
23.脯氨酸	11.620	0.021	4.36

表 4. 使用 AdvanceBio AAA 4.6 × 100 mm 色谱柱分离氨基酸 (1000 pmol) 得到的保留时间和峰面积精密度 (重复测定六次)

氨基酸	平均 RT	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)
1.天冬氨酸	0.837	0.151	2.60
2.谷氨酸	1.400	0.512	2.19
3.天冬酰胺	2.583	0.124	2.13
4.丝氨酸	2.772	0.114	1.74
5.谷氨酰胺	3.220	0.092	1.80
6.组氨酸	3.405	0.077	1.39
7.甘氨酸	3.598	0.068	1.48
8.苏氨酸	3.766	0.059	2.26
9.精氨酸	4.422	0.027	1.66
10.丙氨酸	4.685	0.031	1.87
11.酪氨酸	5.695	0.034	2.04
12.胱氨酸	6.794	0.030	2.22

氨基酸	平均 RT	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)
13.缬氨酸	7.118	0.025	2.40
14.甲硫氨酸	7.281	0.025	1.78
15.正缬氨酸	7.573	0.019	1.77
16.色氨酸	7.970	0.024	2.03
17.苯丙氨酸	8.238	0.027	1.98
18.异亮氨酸	8.413	0.025	2.17
19.亮氨酸	8.925	0.020	1.81
20.赖氨酸	9.357	0.022	2.00
21.羟脯氨酸	9.718	0.014	3.14
22.肌氨酸	10.961	0.015	5.91
23.脯氨酸	11.911	0.011	2.58



第 7 步：

按照欧洲药典确保系统适用性

欧洲药典 (Ph. Eur.) 规定了对氨基酸及氨基酸混合物的定性和定量组成的要求。还规定了允许的杂质要求。氨基酸制造商在欧洲经销其产品之前，在法律上有义务证明其氨基酸可满足这些指标要求。

亮氨酸 (Leu) 是一种支链 α -氨基酸，通过发酵工艺进行生产。在该工艺过程中，异亮氨酸可作为副产物生成。欧洲药典规定亮氨酸与异亮氨酸的分离度不得小于 1.5^[1]

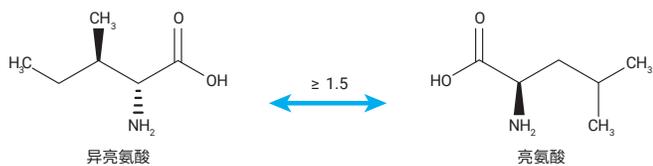


表 5. 使用 Agilent AdvanceBio AAA 色谱柱和 AA 标准品进行系统适用性测试

系统适用性	AdvanceBio AAA, C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μ m	AdvanceBio AAA, C18, 3.0 × 100 mm, 2.7 μ m
亮氨酸与异亮氨酸之间的分离度 (≥ 1.5)	4.5	4.6

参考文献：

1. 欧洲药典 9.0 (2.2.56) 氨基酸分析

第 8 步：

优化细胞培养基和蛋白质水解产物标准品

细胞培养广泛用于生产生物药物及其他生物活性化合物。细胞培养基的组成会影响所需产物的产率和结构，因此需要精心优化。细胞培养基通常由氨基酸、维生素、碳水化合物、无机盐以及不同的肽、蛋白质及其他化合物的混合物组成。在细胞生长时，它们消耗营养物质，并释放出目标生物药物与废物。氨基酸可用作蛋白质的结构单元以及多种代谢途径的中间体。因此，通常将氨基酸加入细胞培养基中，以满足细胞的营养要求。

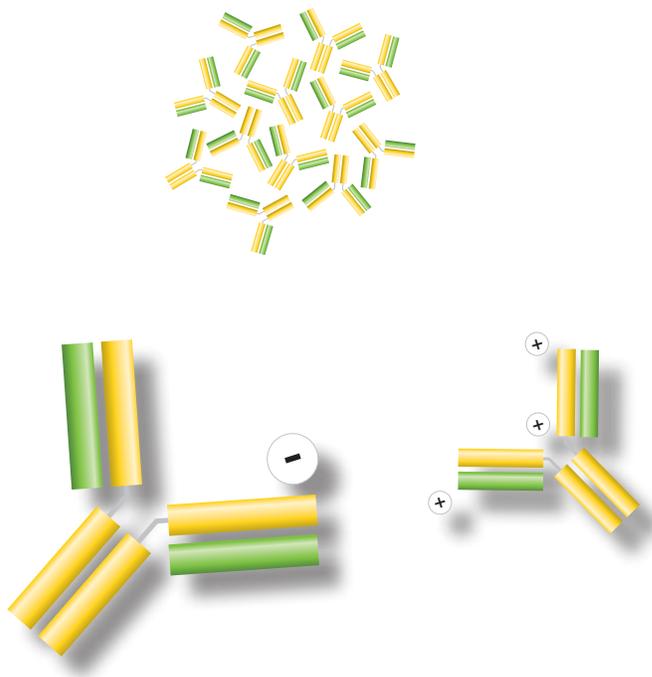
培养细胞中氨基酸流量的测定值是这些细胞代谢速率和健康状态的重要指标。它也可以用作剩余可用碳和氮养料的指标。在肝细胞和肝癌细胞系中尤其如此，其中广泛的糖原异生、尿素生成和蛋白质合成可能会消耗比其他细胞类型更多的氨基酸。

采用柱前衍生化的 HPLC 是一种分析氨基酸的标准技术。在 HPLC 分离与紫外或荧光检测中，有时通过离线手动方式完成溶液中游离氨基酸的柱前衍生化。离线衍生化的直观缺点在于，操作人员技能、能力和实验室技术可能成为误差来源；需要额外的样品处理；需要额外的时间；并提高了污染的风险。自动化在线衍生大大减少了这些误差来源，有助于提高精密度并节省时间。耐用的高分离度 HPLC 方法包括在线衍生化，相比离线方法，可提高工作效率。

常用细胞培养基和蛋白质水解产物的氨基酸组成分析结果如图 5-8 所示。该分析证实，细胞培养基的氨基酸组成与其理论组成准确匹配。此类应用可用于监测和调整氨基酸组成。该分析是通过优化生产过程确保最终生物药物产品具有高质量和高产量的重要组成部分。

下列细胞培养基用于采用 AdvanceBio AAA 4.6 × 100 mm 色谱柱，通过氨基酸分析方法进行组成分析（图 5-8）。

1. 最低限度基础 Eagle 培养基 (MEM) M4655: L-精氨酸、L-胱氨酸、L-谷氨酰胺、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸和 L-缬氨酸
2. 非必需氨基酸 (NEAA) 细胞培养基补充剂 M7145: L-丙氨酸、L-天冬酰胺、L-天冬氨酸、L-谷氨酸、甘氨酸、L-脯氨酸和 L-丝氨酸
3. RPMI 1640 R0083: L-精氨酸、L-天冬酰胺、L-胱氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、羟基-L-脯氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸和 L-缬氨酸



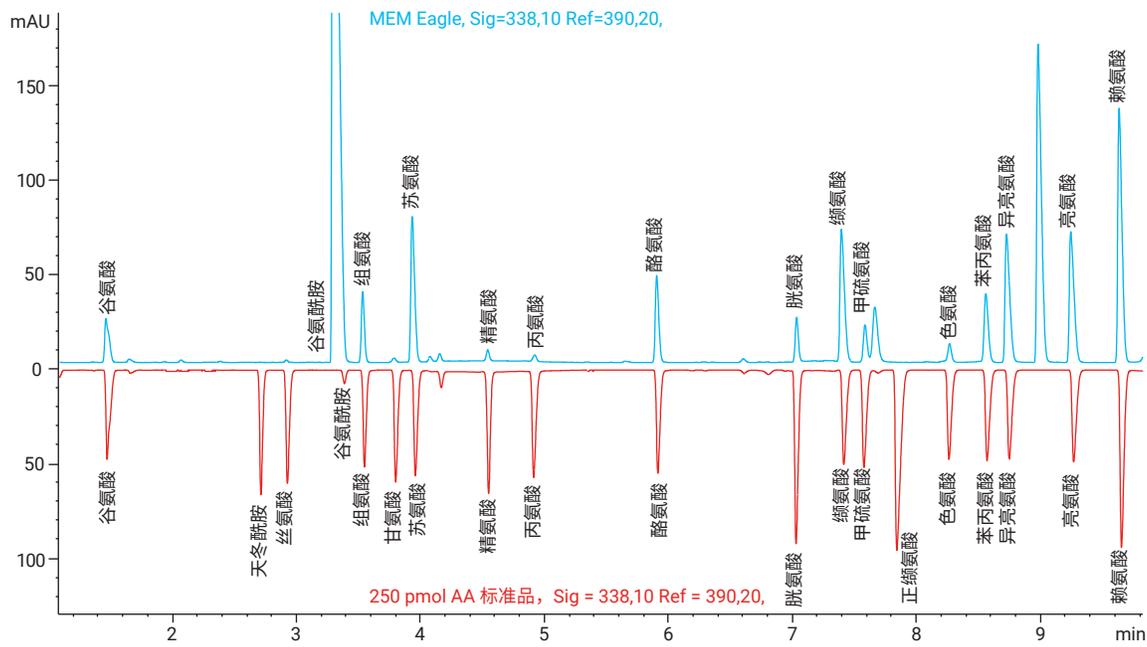


图 5. 使用 Agilent AdvanceBio AAA 解决方案进行的 Eagle MEM 培养基（蓝色迹线）氨基酸分析以及与氨基酸标准品的对比

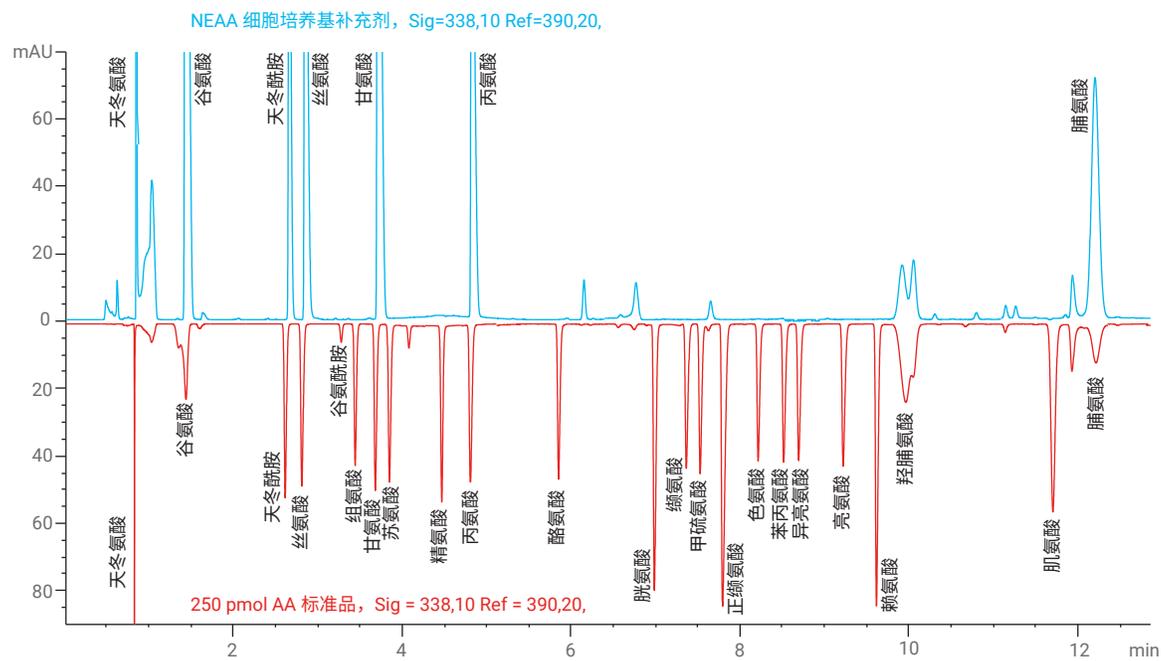


图 6. 使用 Agilent AdvanceBio AAA 解决方案进行的非必需氨基酸 (NEAA) 培养基（蓝色迹线）氨基酸分析以及与氨基酸标准品的对比

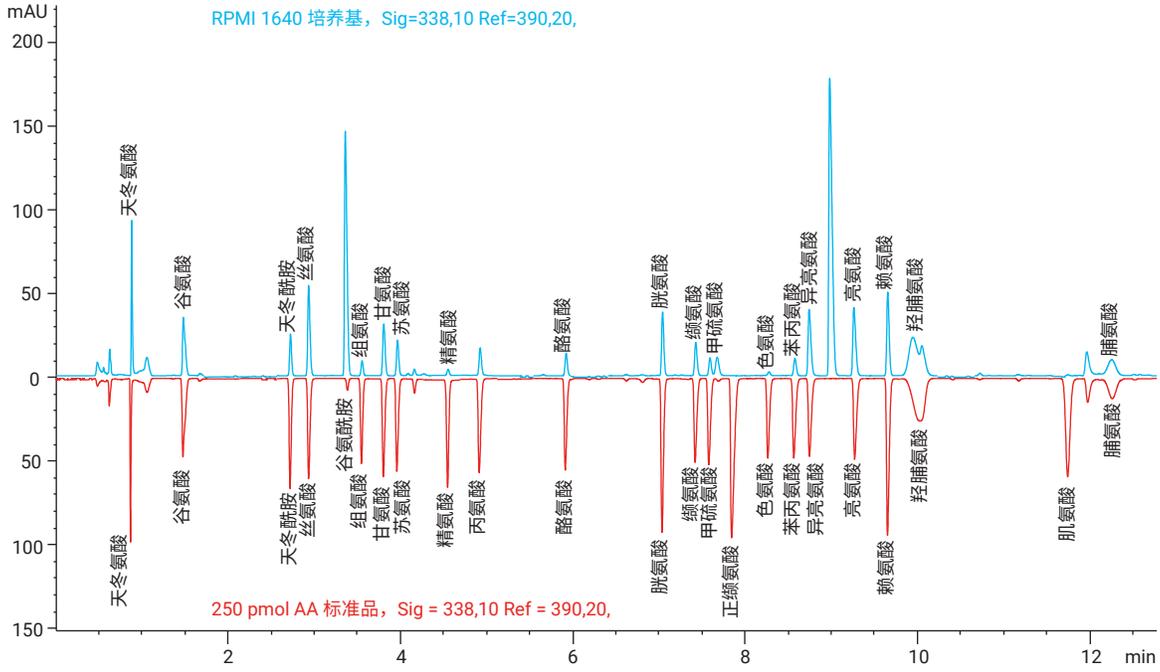


图 7. 使用 Agilent AdvanceBio AAA 解决方案进行的 RPMI 1650 培养基（蓝色迹线）氨基酸分析以及与氨基酸标准品的对比

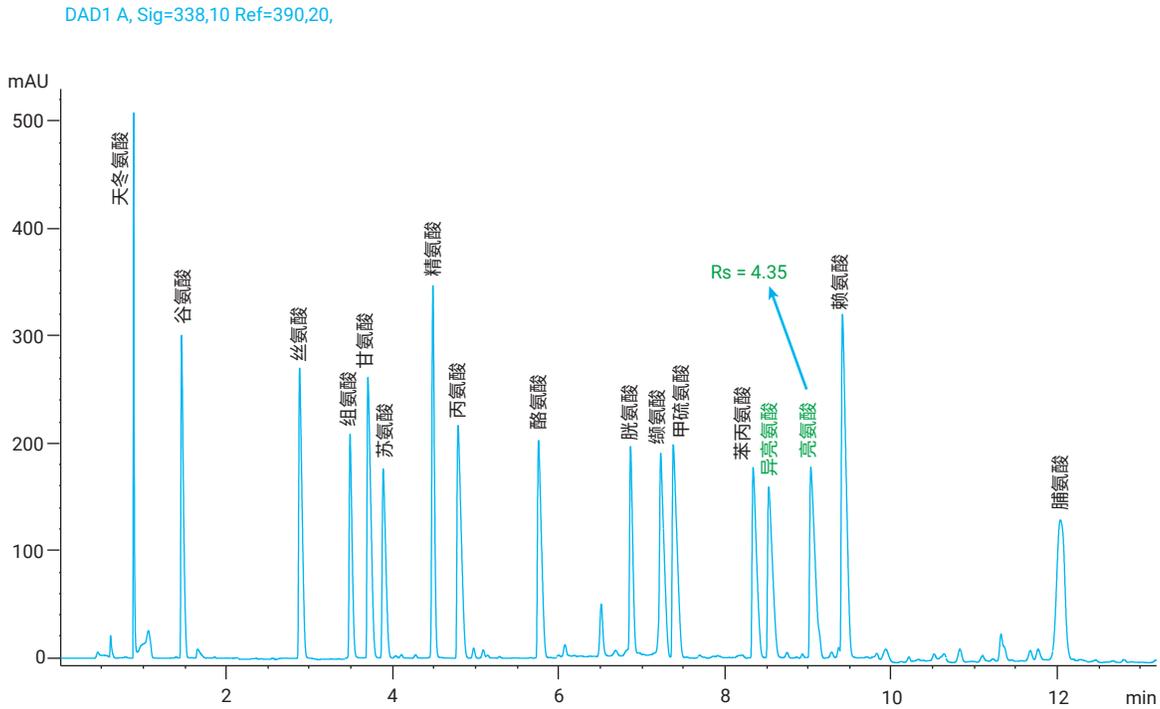


图 8. 蛋白质水解产物的氨基酸分析。利用 AdvanceBio AAA, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱得到的亮氨酸与异亮氨酸之间的分离度远高于系统适用性要求的报告值

维护和故障排除

Agilent AdvanceBio AAA 解决方案包括技术和应用支持。推荐下列维护和故障排除小技巧，以确保您的 InfinityLab 系列液相色谱仪平稳运行。

日常维护：

- 更换自动进样器托盘中的衍生化试剂、硼酸盐缓冲液、氨基酸标准品和清洗用水
- 重新校准保留时间和响应因子
- 使用系统适用性报告检查色谱柱和保护柱性能
- 每两天将流动相 A 和 B 更换为新配制的溶剂

故障排除：

色谱分离度差

- 保护柱失效
- 分析柱损坏
- 由于连接管线过长引起柱后谱带展宽
- 务必使用较短的红色管线与小体积热交换器，以尽可能减小柱外体积

色谱图强度低

- OPA 试剂变质
- FMOC 试剂变质
- 甘氨酸污染



订购信息

色谱柱、备件和化学品	规格	部件号
AdvanceBio AAA 液相色谱柱	4.6 × 100 mm, 2.7 μm	655950-802
AdvanceBio AAA 保护柱	4.6 × 5 mm, 2.7 μm, 3/包	820750-931
AdvanceBio AAA 液相色谱柱	3.0 × 100 mm, 2.7 μm	695975-322
AdvanceBio AAA 保护柱	3.0 × 5 mm, 2.7 μm, 3/包	823750-946
硼酸盐缓冲液	0.4 mol/L 水溶液, pH 10.2, 100 mL	5061-3339
FMOC 试剂	2.5 mg/mL, 溶于乙腈, 10 × 1 mL 安瓿瓶	5061-3337
OPA 试剂	10 mg/mL, 溶于 0.4 mol/L 硼酸盐缓冲液和 3-巯基丙酸, 6 × 1 mL 安瓿瓶	5061-3335
二硫代二丙酸 (DTDPA) 试剂	5 g	5062-2479
内插管, 带聚合物支脚	250 μL, 100/包	5181-1270
样品瓶, 螺口盖, 棕色, 带书写签	2 mL, 经认证, 100/包	5182-0716
螺口盖, 绿色, PTFE/白色硅橡胶隔垫	100/包	5182-0721
螺口样品瓶, 透明, 平底	用于液相色谱, 6 mL, 经认证, 100/包	9301-1377
螺口盖	用于 6 mL 样品瓶, 100/包	9301-1379
隔垫	用于 6 mL 样品瓶, 100/包	9301-1378
AA 标准品	1 nmol/μL, 10 × 1 mL	5061-3330
AA 标准品	250 pmol, 10/包	5061-3331
AA 标准品	100 pmol/μL, 10 × 1 mL	5061-3332
AA 标准品	25 pmol/μL, 10 × 1 mL	5061-3333
AA 标准品	10 pmol/μL, 10 × 1 mL	5061-3334
氨基酸补充剂试剂盒		5062-2478

如需了解有关专为生物分子表征设计的 Agilent AdvanceBio 系列创新产品的更多信息, 请访问 www.agilent.com/chem/advancebio



细胞培养基和蛋白质水解产物标准品 中氨基酸组分的测定

Agilent AdvanceBio 氨基酸分析解决方案

作者

M. Sundaram Palaniswam
安捷伦科技有限公司

摘要

本研究介绍了一种使用 Agilent AdvanceBio 氨基酸分析 (AAA) 解决方案与吸光度检测分析细胞培养基中一级氨基酸的方法。使用在线进样器程序利用 OPA 和 FMOC 进行衍生化可缩短样品前处理时间，并且相比于传统离线方法获得了更高的重现性。采用系统适用性测试以及保留时间和峰面积精密度研究证实了该解决方案在常规分析中的有效性。AdvanceBio AAA 解决方案为细胞培养基中的所有氨基酸提供了灵敏的高分离度分离。此外，还给出了用于定性分析的氨基酸的检测限 (LOD)、定量限 (LOQ) 和线性结果。

前言

氨基酸是蛋白质的基本结构单元。它们构成了细胞的所有蛋白质类物质，包括细胞骨架以及酶、受体和信号分子的蛋白质组分。此外，氨基酸还用于细胞生长和维持。细胞培养基在生物制药行业中发挥着重要作用。由细胞培养基提供的大部分氨基酸会参与到可能影响培养细胞命运的细胞通路中。在补料分批和灌注培养中，鉴定最佳的氨基酸浓度非常重要。因此，通过鉴定宿主细胞生长和产物生产对培养基中氨基酸的需求，可以简化氨基酸补充策略的设计。

采用柱前衍生化的 HPLC 常用于分析氨基酸。在 HPLC 分离与紫外或荧光检测中，有时通过离线手动方式完成溶液中游离氨基酸的柱前衍生化。离线衍生化的一些直接缺点在于操作者技能、能力和实验室技术会成为误差的来源。其他缺点包括需要额外的样品操作、需要额外的时间并且污染风险较高。自动化在线衍生大大减少了这些误差来源，有助于提高精密度并节省时间。因此，稳定的高分离度 HPLC 方法包括在线衍生化，相比离线方法，可提高工作效率。使用 HPLC 自动进样器的进样器编程实现一致的自动化 OPA 衍生化，并采用高效的 Agilent AdvanceBio AAA 色谱柱，可得到一种非常适用于细胞培养基的快速、可重现的氨基酸分析方法。该方法非常便捷，因为仅需将细胞培养基样品转移至自动进样器样品瓶进行分析。AdvanceBio AAA 色谱柱的选择性和流动相梯度可实现 23 种氨基酸的高分离度分离。

材料与amp;方法

仪器

使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统进行分析，该系统配备 Agilent 1290 Infinity 二元泵输送系统 (G4220A)、Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)、Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C) 和 Agilent 1290 Infinity DAD (G4212A)。

试剂、样品与材料

用于组成分析的细胞培养基，即最低限度基础 Eagle 培养基 (M4655)、必需氨基酸 (M7145)、RPMI 1640 (R0083)、 Na_2HPO_4 和 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ，均购自 Sigma-Aldrich。蛋白质水解产物购自 Fisher Scientific。所用的乙腈和甲醇购自 Lab-Scan (曼谷, 泰国)。HPLC 级高纯水来自 Milli Q 水纯化系统 (Millipore Elix 10 型, 美国)。

色谱柱

Agilent AdvanceBio AAA, C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 655950-802)

配制 HPLC 流动相

流动相 A，包含 10 mmol/L Na_2HPO_4 和 10 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ，pH 8.2。流动相 B，包含乙腈、甲醇和水 (45:45:10, v:v:v)。由于流动相 A 的消耗速率快于流动相 B，因此方便的做法是每配制 1 L 流动相 B 时配制 2 L 流动相 A。

进样稀释剂

进样稀释剂为 100 mL 流动相 A 与 0.4 mL 浓磷酸，在 4 °C 下储存于 100 mL 瓶中。为配制 0.1 mol/L HCl，将 4.2 mL 浓盐酸 (36%) 加入 500 mL 容量瓶中，该容量瓶中预先加入部分水，混合，然后加水定容至刻度。然后使用该溶液配制扩展氨基酸和内标储备液。储存于 4 °C 下。

Agilent AdvanceBio AAA 标准品和试剂盒 (部件号 5190-9426)，包括：

部件号	组分
5061-3339	硼酸盐缓冲液：0.4 mol/L 水溶液，pH 10.2，100 mL
5061-3337	FMOC 试剂，2.5 mg/mL，溶于乙腈，10 × 1 mL 安瓿瓶
5061-3335	OPA 试剂，10 mg/mL，溶于 0.4 mol/L 硼酸盐缓冲液和 3-巯基丙酸，6 × 1 mL 安瓿瓶
5062-2479	二硫代二丙酸 (DTDPA) 试剂，5 g
5061-3330	氨基酸标准品，1 nmol/μL，10 × 1 mL
5061-3331	氨基酸标准品，250 pmol，10/包
5061-3332	氨基酸标准品，100 pmol/μL，10 × 1 mL
5061-3333	氨基酸标准品，25 pmol/μL，10 × 1 mL
5061-3334	氨基酸标准品，10 pmol/μL，10 × 1 mL
5062-2478	氨基酸补充剂试剂盒，各 1 g

衍生化试剂

衍生化试剂（硼酸盐缓冲液、OPA 和 FMOC）是由安捷伦提供的现成溶液，并将其从容器中转移至自动进样器样品瓶中。预防措施包括：

- OPA 包装于惰性气体保护下的安瓿瓶中，以防氧化。打开后，OPA 的保质期约为 7-10 天。因此，将 100 μL 的等份 OPA 转移至微量样品瓶内插管中，并冷藏保存。然后每天更换一次 OPA 自动进样器微量样品瓶。每个安瓿瓶可连续使用 10 天（1 个样品瓶/天）
- FMOC 在干燥空气下可保持稳定，但在湿气下可发生降解。因此，将 FMOC 以 100 μL 等分转移至微量样品瓶内插管中，并冷藏保存。将打开的 FMOC 安瓿瓶转移至 10 个微量样品瓶内插管中后可持续使用 10 天
- 将硼酸盐缓冲液转移至不含样品瓶内插管的 1.5 mL 自动进样器样品瓶中，并且每 3 天更换一次

氨基酸标样的配制

- 安捷伦提供五种浓度的 17 种氨基酸溶液（10 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ - 1 $\text{nmol}/\mu\text{L}$ ），用于绘制校准曲线。将每 1 mL 安瓿瓶的标准品按 100 μL 分装于锥形样品瓶内插管中，并储存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下
- 称取 59.45 mg 天冬酰胺、59.00 mg 羟脯氨酸、65.77 mg 谷氨酰胺和 91.95 mg 色氨酸加入 25 mL 容量瓶中，配制扩展氨基酸 (EAA) 储备液。用 0.1 mol/L HCl 填充至容量瓶一半，振摇或超声处理直至氨基酸溶解。然后用水定容至刻度，使每种氨基酸的总浓度达到 18 $\text{nmol}/\mu\text{L}$
- 对于高灵敏度 EAA 储备液，量取 5 mL 该标准灵敏度溶液，并用 45 mL 水进行稀释 (1.8 $\text{nmol}/\mu\text{L}$)。包含扩展标准品的溶液在室温下不稳定，需要将其冷冻保存，并在首次出现灵敏度下降迹象时将其丢弃

内标 (ISTD) 储备液

对于一级氨基酸 ISTD 储备液，称取 58.58 mg 正缬氨酸置于 50 mL 容量瓶中。对于二级氨基酸，称取 44.54 mg 肌氨酸置于同一 50 mL 容量瓶中。用 0.1 mol/L HCl 将该容量瓶填充一半，振摇或超声直至溶解，然后用水定容至刻度，使每种氨基酸的最终浓度为 10 $\text{nmol}/\mu\text{L}$ （标准灵敏度）。对于高灵敏度 ISTD 储备液，量取 5 mL 标准灵敏度溶液，用 45 mL 水进行稀释，并储存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下。

根据实验需要，使用两到五种标样绘制校准曲线。在“标准分析灵敏度”分析中，通常使用 100 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ 、250 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ 和 1 $\text{nmol}/\mu\text{L}$ 绘制三点校准曲线。如果加入内标或其他氨基酸（如扩展氨基酸），则应按下表进行操作。表 1 列出紫外分析中通常使用的“标准分析灵敏度”浓度。

表 1. 用于完整和还原态 mAb 分析的色谱参数

	最终 AA 溶液的浓度 ($\text{pmol}/\mu\text{L}$)		
	900	225	90
量取 5 mL 18 nmol EAA	5 mL	5 mL	5 mL
用水稀释		15 mL	45 mL
稀释后的 EAA 混合液	5 mL	20 mL	50 mL
量取 5 mL 稀释后的 EAA 混合液	5 mL	5 mL	5 mL
加入 10 nmol ISTD 溶液	5 mL	5 mL	5 mL
EAA-ISTD 混合液	10 mL	10 mL	10 mL
量取 100 μL EAA-ISTD 混合液	100 μL	100 μL	100 μL
对于 1 nmol AA，加入：	900 μL	-	-
对于 250 pmol AA，加入：	900 μL	-	-
对于 100 pmol AA，加入：	-	-	900 μL
含 EAA 和 500 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ ISTD 的最终 AA 溶液	1 mL	1 mL	1 mL

在线衍生

根据自动进样器型号不同，自动化在线衍生程序稍有不同。对于 Agilent G4226A 孔板自动液体进样器 (WPALS)，进样程序如下：

1. 从硼酸盐样品瓶（部件号 5061-3339）中吸取 2.5 μL
2. 从样品瓶中吸取 1.0 μL
3. 在清洗口，将 3.5 μL 混合液混合 5 次
4. 等待 0.2 分钟
5. 从 OPA 样品瓶（部件号 5061-3335）中吸取 0.5 μL
6. 在清洗口，以默认速度将 4.0 μL 混合液混合 10 次
7. 从 FMOC 样品瓶（部件号 5061-3337）中吸取 0.4 μL
8. 在清洗口，以默认速度将 4.4 μL 混合液混合 10 次
9. 从进样稀释剂样品瓶中吸取 32 μL
10. 在清洗口，将 20 μL 混合液混合 8 次
11. 进样
12. 等待 0.1 分钟
13. 阀切换至旁路

衍生化试剂和样品的位置取决于分析人员和 ALS 样品盘配置。使用配备 2 \times 56 孔板托盘的 G1367C（部件号 G2258-44502）时，位置为：

- 样品瓶 1：硼酸盐缓冲液
- 样品瓶 2：OPA
- 样品瓶 3：FMOC
- 样品瓶 4：进样稀释剂
- P1-A-1：样品

柱温箱 (TCC)

左侧和右侧温度均设置为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。在温度处于 ± 0.8 $^{\circ}\text{C}$ 以内时进行分析。

二极管阵列检测器 (DAD)

信号 A：338 nm，带宽 10 nm，参比波长 390 nm，带宽 20 nm。

信号 B：262 nm，带宽 16 nm，参比波长 324 nm，带宽 8 nm。

信号 C：338 nm，带宽 10 nm，参比波长 390 nm，带宽 20 nm。

为了在一幅色谱图中检测 OPA 和 FMOC 衍生化氨基酸，需要切换检测器波长。在最后洗脱的 OPA 衍生化氨基酸（赖氨酸，标准品中的峰 20）和第一个洗脱的 FMOC 衍生化氨基酸（羟脯氨酸，标准品中的峰 21）之间进行切换。

使用 DAD，可以通过首先采集两个通道来确定适当的转换点。信号 A 338 nm，用于检测 OPA 衍生化氨基酸；信号 B 262 nm，用于检测 FMOC 衍生化氨基酸。根据该分析确定在运行过程中切换波长的最佳时间点。然后使用单个通道进行后续运行，利用检测器时间表功能，在 OPA-赖氨酸洗脱和 FMOC-羟脯氨酸洗脱之间适当的时间处设定从 338 nm 至 262 nm 的波长切换程序。这种切换可以在一幅色谱图中检测 OPA 和 FMOC 衍生化氨基酸。所有色谱柱均使用 > 0.01 分钟的峰宽设置：

线性、检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 测定

例如，使用扩展氨基酸 (EAA) 储备溶液、天冬酰胺 (59.45 mg)、谷氨酰胺 (65.77 mg) 和色氨酸 (91.95 mg) 进行线性、LOD 和 LOQ 测定。称取这些标准品，加入 25 mL 容量瓶中，用 0.1 N HCl 填充一半体积，然后混合或超声直至溶解。然后用水将容量瓶定容至刻度，使每种氨基酸的总浓度为 18 nmol/ μL 。

在这些标准氨基酸浓度为 0.9–1000 pmol/ μL 的范围内研究线性。配制三份适当的 AA 标准溶液，进样到色谱仪中。由校准函数估算 LOD 和 LOQ。LOD 和 LOQ 分别按 3 (SD(a)/b) 和 10 (Sd(a)/b) 计算，其中 SD(a) 是截距的标准偏差，b 是校准函数的斜率。

梯度程序	
时间 (min)	%B
0	2
0.35	2
13.4	57
13.5	100
15.7	100
15.8	2
18	结束

流速：4.6 mm 内径时为 1.5 mL/min

表 3. 使用 Agilent AdvanceBio AAA 4.6 × 100 mm 色谱柱 (n = 6) 分离氨基酸 (1000 pmol) 得到的保留时间和峰面积精度 (重复测定六次)

氨基酸	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)	氨基酸	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)
1.天冬氨酸	0.151	2.60	13.缬氨酸	0.025	2.4
2.谷氨酸	0.512	2.19	14.甲硫氨酸	0.025	1.78
3.天冬酰胺	0.124	2.13	15.正缬氨酸	0.019	1.77
4.丝氨酸	0.114	1.74	16.色氨酸	0.024	2.03
5.谷氨酰胺	0.092	1.8	17.苯丙氨酸	0.027	1.98
6.组氨酸	0.077	1.39	18.异亮氨酸	0.025	2.17
7.甘氨酸	0.068	1.48	19.亮氨酸	0.020	1.81
8.苏氨酸	0.059	2.26	20.赖氨酸	0.022	2
9.精氨酸	0.027	1.66	21.羟脯氨酸	0.014	3.14
10.丙氨酸	0.031	1.87	22.肌氨酸	0.015	5.01
11.酪氨酸	0.034	2.04	23.脯氨酸	0.011	2.58
12.半胱氨酸	0.030	2.22			

根据欧洲药典 (Ph. Eur.) 确定的系统适用性

欧洲药典 (Ph. Eur.) 规定了对氨基酸及氨基酸混合物的定性和定量组成的要求。还规定了允许的杂质要求。氨基酸制造商在欧洲经销其产品之前，在法律上有义务证明其氨基酸可满足这些指标要求。亮氨酸 (Leu) 是一种支链 α-氨基酸，通过发酵工艺生产 (图 2)。在该工艺过程中，异亮氨酸可作为副产物得到。欧洲药典规定亮氨酸与异亮氨酸的分离度不得小于 1.5^[1]。

测定三种氨基酸的十个浓度点，重复三次。三种标准氨基酸在测试范围内显示出良好的线性。峰面积响应遵循等式 $y = mx + C$ ，其中截距 C 在 95% 置信区间内为零，相关系数的平方 (R²) 始终大于 0.99。图 3 显示了所评估浓度范围内天冬酰胺、谷氨酰胺和色氨酸的线性曲线。

使用 UV 检测得到的 LOD 和 LOQ 分别为 0.9 pmol 和 3.8 pmol，表明该方法的灵敏度很高。表 5 所示为天冬酰胺、谷氨酰胺和色氨酸的 LOD 和 LOQ 测定值。

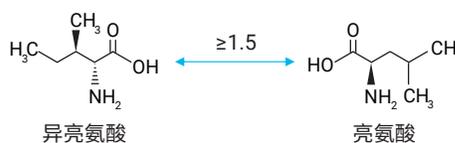


图 2. 异亮氨酸与亮氨酸的化学关系

表 4. 使用 AdvanceBio AAA 色谱柱和 AA 标准品进行系统适用性测试

系统适用性	Agilent AdvanceBio AAA, C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm	Agilent AdvanceBio AAA, C18, 3 × 100 mm, 2.7 μm
亮氨酸与异亮氨酸之间的分离度 (≥ 1.5)	4.5	4.6

表 5. 三种氨基酸的 LOD 和 LOQ

天冬酰胺		谷氨酰胺		色氨酸	
浓度 (pmol)	信噪比	浓度 (pmol)	信噪比	浓度 (pmol)	信噪比
0.9 (LOD)	5.3	0.9 (LOD)	3.0	0.9 (LOD)	4.5
1.9 (LOQ)	10.8	3.8 (LOQ)	13.8	3.8 (LOQ)	20.5

结果与讨论

高通量常规分析

图 1 中的色谱图显示了高通量氨基酸分离应用中实现的标准分析灵敏度。该色谱图采用配备 Agilent AdvanceBio AAA, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪, 通过氨基酸分析方法和 DAD 检测获得。一次运行可在 18 分钟内完成 (包括再平衡), 并获得足够高的分离度。在 338 nm 下监测一级氨基酸 (1-20, 经 OPA 衍生化), 如图 1 所示, 同时在 262 nm 下监测二级氨基酸 (21-23, 经 FMOC 衍生化)。

保留时间和峰面积的精密度 (n = 6)

表 2 和表 3 为氨基酸方法重复分析六次后 100 和 1000 pmol 浓度下所有氨基酸的平均保留时间和峰面积的 RSD 值。所有氨基酸峰的保留时间 RSD (包括早洗脱峰 1) 均小于 1.2%, 显示出优异的梯度重现性。峰面积 RSD 小于 5%, 表明进样精度较高。RSD 值体现出氨基酸分析方法的稳定性和精度。

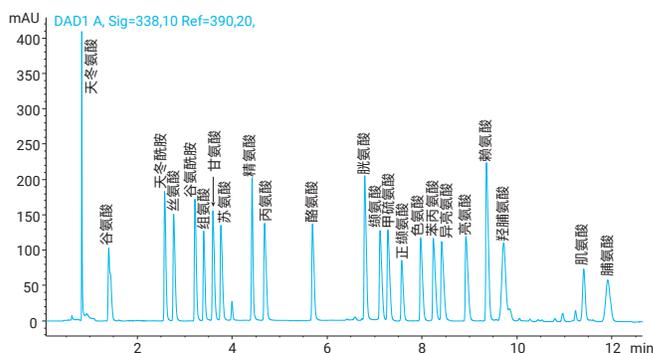


图 1. 使用氨基酸分析方法和 AdvanceBio AAA 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱分离氨基酸标准品 (1 nmol)

表 2. 使用 Agilent AdvanceBio AAA 4.6 × 100 mm 色谱柱分离氨基酸 (100 pmol) 得到的保留时间和峰面积精度 (n = 6)

氨基酸	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)	氨基酸	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)
1.天冬氨酸	1.270	1.066	13.缬氨酸	0.084	2.47
2.谷氨酸	0.973	1.85	14.甲硫氨酸	0.073	1.82
3.天冬酰胺	0.605	1.79	15.正缬氨酸	0.073	1.72
4.丝氨酸	0.629	1.82	16.色氨酸	0.054	1.57
5.谷氨酰胺	0.470	1.56	17.苯丙氨酸	0.051	1.66
6.组氨酸	0.430	1.22	18.异亮氨酸	0.047	1.72
7.甘氨酸	0.477	1.92	19.亮氨酸	0.03	1.7
8.苏氨酸	0.440	1.95	20.赖氨酸	0.028	1.66
9.精氨酸	0.251	2.15	21.羟脯氨酸	0.021	4.13
10.丙氨酸	0.280	3.06	22.肌氨酸	0.026	1.15
11.酪氨酸	0.128	1.65	23.脯氨酸	0.021	4.36
12.半胱氨酸	0.067	1.9			

细胞培养基和蛋白质水解产物标准品的氨基酸分析

我们分析了常用细胞培养基补充剂的氨基酸组成。这些标准品包括：最低限度基础 Eagle 培养基 (MEM)、非必需氨基酸 (NEAA)、RPMI 1640 R0083、蛋白质水解产物标准品。然后将结果与氨基酸标准品进行比较。图 4 和表 7 所示为培养基和氨基酸标准品的氨基酸组成叠加图。

显然，通过该方法测定的细胞培养基补充剂氨基酸组成与其理论组成准确匹配。此外，观察到蛋白质水解产物标准品中异亮氨酸和亮氨酸基线分离的分离度因子为 4.35，在满足这些组分的法规要求方面表现明显优于其他厂商的色谱柱。此类应用可用于监测和调节氨基酸组成，是通过优化生产过程确保最终生物药物产品具有高质量和高产量的重要组成部分。

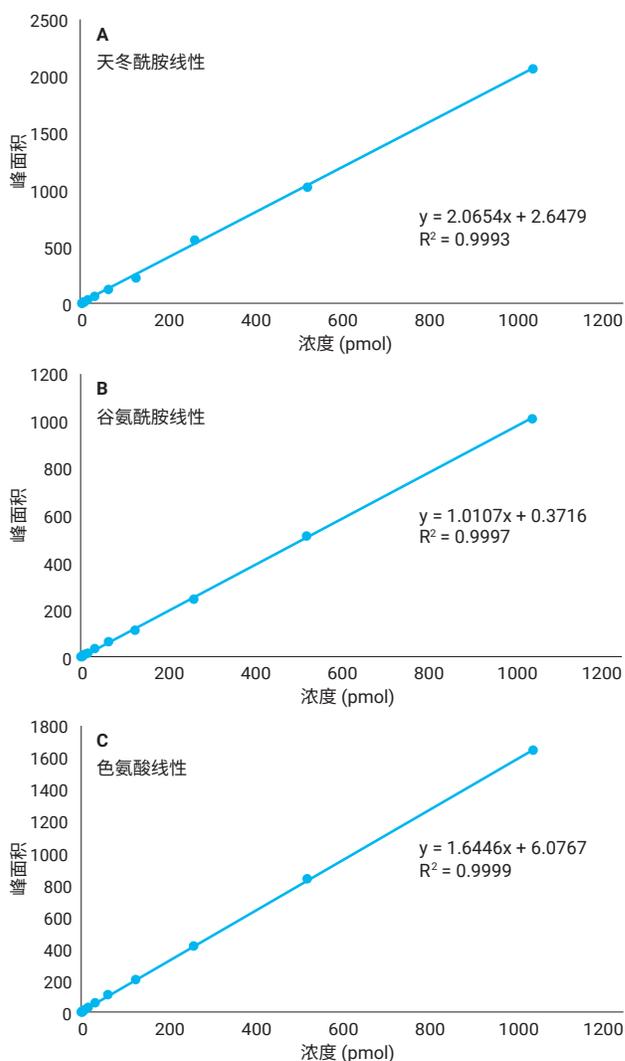


图 3. 浓度范围为 0.9-1000 pmol 的 10 个标准浓度天冬酰胺、谷氨酰胺和色氨酸的线性曲线，显示出出色的线性相关系数值

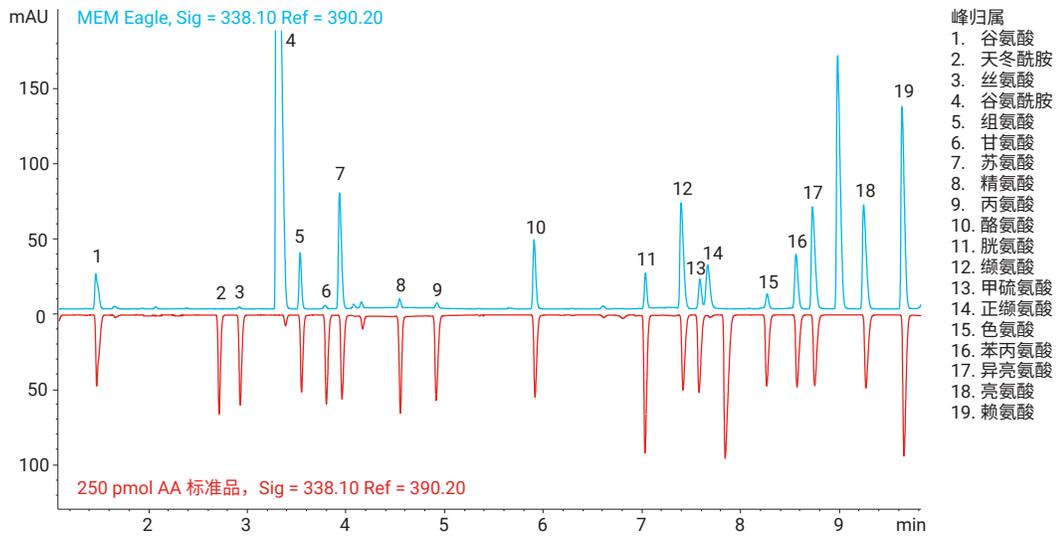


图 4. MEM 培养基的氨基酸分析结果（蓝色迹线）和 AA 标准品分析结果（红色迹线）的镜像

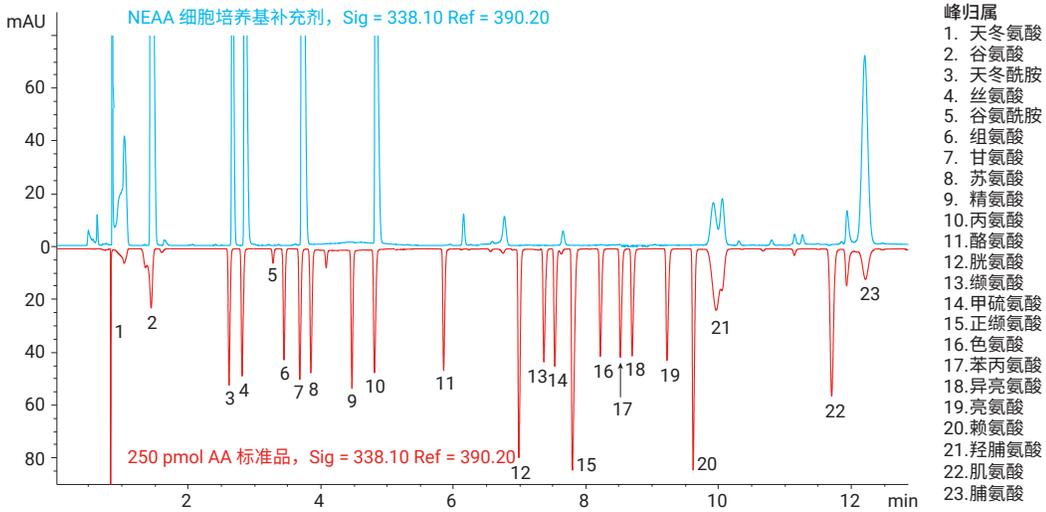


图 5. NEAA 培养基的氨基酸分析结果（蓝色迹线）和 AA 标准品分析结果（红色迹线）的对比



图 6. RPMI 1650 培养基的氨基酸分析结果（蓝色迹线）和 AA 标准品分析结果（红色迹线）的对比

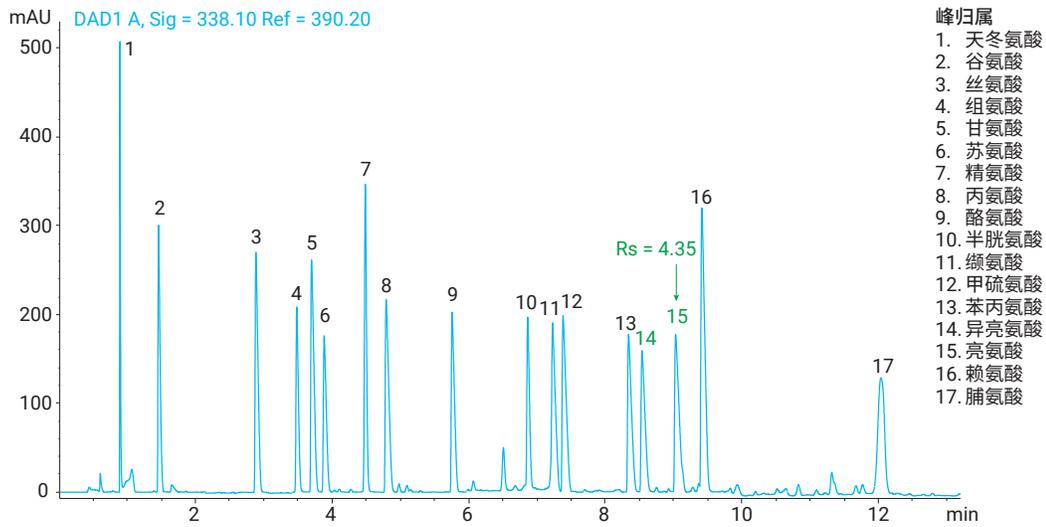


图 7. 蛋白质水解产物标准品的氨基酸分析利用 Agilent AdvanceBio AAA, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱得到的亮氨酸与异亮氨酸之间的分离度远高于这对化合物系统适用性要求的报告值

结论

氨基酸分析是表征蛋白质和肽基产品的重要方法。研究生物工艺中氨基酸的作用有助于更好地理解培养策略，提高产品的产量和质量。此外，通过确定的氨基酸组成，可以确认样品身份并衡量样品纯度。本应用简报介绍了几种用于分析氨基酸的安捷伦工具。我们首先使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪和 Agilent AdvanceBio AAA 试剂盒，使用 OPA/FMOC 试剂进行氨基酸的自动在线衍生化。然后使用 AdvanceBio AAA 液相色谱柱分离衍生化氨基酸，从而快速、灵敏、可重现地实现氨基酸的分离。该方法具有优异的峰面积和 RT 精度，并能满足系统适用性要求。三种氨基酸浓度范围为 0.9 pmol–1 nmol 的 10 个标准浓度的线性曲线显示出出色的线性相关系数值，表明该方法可以实现准确定量。氨基酸的 LOD 和 LOQ 分别为 0.9 pmol 和 3.8 pmol，表明该方法的灵敏度很高。此外，该方法能够分离和检测细胞培养基和蛋白质水解产物标准物中的氨基酸。通过该方法测定的氨基酸组成与其理论组成呈良好相关性。

参考文献

1. 欧洲药典 9.0 (2.2.56) 氨基酸分析

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的信息，请访问 www.agilent.com。

使用 Agilent Poroshell HPH-C18 色谱柱进行自动氨基酸分析

作者

William Long
安捷伦科技公司

摘要

在本应用简报中，将之前使用 3.5 和 1.8 μm Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱开发的自动预柱 OPA/FMOC 氨基酸方法扩展至包括 2.7 μm Agilent Poroshell HPH-C18 表面多孔色谱柱。该色谱柱具有良好的使用寿命，并可以轻松转换至不同的色谱柱规格，这两个特性在本研究中均有体现。此外，本文还介绍了该色谱柱在发酵产物中的应用。

前言

表面多孔颗粒填料 (SPP) 技术基于具有实心核和表面多孔外壳的颗粒开发。这种颗粒具有 1.7 μm 的实心核和 0.5 μm 的多孔外壳。总粒径约为 2.7 μm 。2.7 μm 表面多孔颗粒填料的柱效为亚 2 μm 全多孔颗粒填料的 80%–90%，而反压比后者降低了 40%–50%。与全多孔颗粒填料相比，表面多孔颗粒填料具有更窄的粒度分布，这使柱床更均匀，并能减小色谱柱中的扩散。同时，较薄的多孔壳层实现了较低的传质阻力。因此，较高流速下的柱效损失极小^[1]。此外，由于色谱柱中含有一个 2 μm 筛板，因此它们的抗堵塞能力与 3.5 μm 和 5 μm 色谱柱相同。直到目前，所有二氧化硅型 SPP 材料在 pH 较高的缓冲液（包括磷酸盐缓冲液）中的寿命仍然有限。为获得更长的寿命，必须通过表面改性或特殊的键合改性对基颗粒填料进行保护。使用独特工艺对 Agilent Poroshell HPH-C18 颗粒的表面进行化学改性，形成一个有机层以避免硅胶在高 pH 条件下溶解。HPLC 色谱柱和仪器的持续改进带来了改进 HPLC 方法的机遇。一种久经验证的邻苯二甲醛/9-芴基甲基氯甲酸酯 (OPA/FMOC) 衍生氨基酸方法原本是在 HP 1090 系列 HPLC 系统上开发，之后针对 Agilent 1100 系列进行过更新，现在又借助 Agilent 1260 Infinity 二元液相色谱和表面多孔 Agilent Poroshell HPH-C18 色谱柱得到了进一步的发展^[2-8]。

实验部分

配制 HPLC 流动相

流动相 A 含有 10 mmol/L Na_2HPO_4 、10 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 和 5 mmol/L NaN_3 ，pH 8.2。为配制 1 L 流动相，称取 1.4 g 无水 Na_2HPO_4 和 3.8 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ，将其溶于 1 L 水中，加入 32 mg NaN_3 。用 1.2 mL 浓盐酸将 pH 调节为 8.4 左右，然后加入数滴酸，将 pH 调节为 8.2。在调节 pH 之前充分搅拌，使硼酸盐晶体完全溶解。用 0.45 μm 再生纤维素膜（部件号 3150-0576）进行过滤。流动相 B 含有乙腈:甲醇:水 (45:45:10, v:v:v)。所有流动相溶剂均为 HPLC 级。流动相 A 的消耗速率高于流动相 B，因此，每配制 1 L 流动相 B，应配制 2 L 流动相 A 为宜。

进样稀释剂为 100 mL 流动相 A 和 0.4 mL 浓 H_3PO_4 ，盛装在 100 mL 瓶中，在 4 $^\circ\text{C}$ 下储存。

如需配制 0.1 mol/L HCl，将 4.2 mL 浓盐酸 (36%) 加入盛有部分水的 500 mL 容量瓶中。混合，并用水定容至刻度。此溶液用于制备扩展氨基酸及内标储备液。在 4 $^\circ\text{C}$ 下储存

衍生化试剂（硼酸盐缓冲液、OPA 和 FMOC）由安捷伦提供，是即拆即用的溶液。只需将它们从容器中转移至自动进样器样品瓶中即可。安全预防措施包括：

- OPA 包装于惰性气体保护下的安瓿中，以防氧化。打开后，OPA 的保质期为 7 至 10 天左右。建议将 100 μL 的等份 OPA 转移至微量样品瓶内插管中。标示名称和日期，加盖并冷藏。每天更换一次 OPA 自动进样器微量样品瓶。每个安瓿可连续使用 10 天
- FMOC 在干燥空气下可保持稳定，但在湿气下可发生降解。也应以 100 μL 的等份将其转移至微量样品瓶内插管中。标示名称和日期，盖紧并冷藏。与 OPA 类似，将打开的 FMOC 安瓿转移至 10 个微量样品瓶内插管后，可连续使用 10 天（每天一瓶）
- 可以将硼酸盐缓冲液转移至不含样品瓶内插管的 1.5 mL 自动进样器样品瓶中。每三天更换一次

氨基酸标样的配制

安捷伦提供五种浓度的 17 种氨基酸溶液 (10 pmol/ μL –1 nmol/ μL)，用于绘制校准曲线。将每个 1 mL 的标准品安瓿（部件号 5061-3330 至 5061-3334）分配至锥形样品瓶内插管中，分为 100 μL 等份。将等份标准品加盖并冷藏于 4 $^\circ\text{C}$ 下。如需配制扩展氨基酸 (EAA) 储备液，称取 59.45 mg 天冬酰胺、59.00 mg 羟脯氨酸、65.77 mg 谷氨酰胺、91.95 mg 色氨酸，加入 25 mL 容量瓶中。用 0.1 mol/L HCl 填充容量瓶一半，并振摇或超声直至溶解。用水定容至刻度，使每种氨基酸的总浓度为 18 nmol/ μL 。对于高灵敏度 EAA 储备液，量取 5 mL 该标准灵敏度溶液，并用 45 mL 水进行稀释 (1.8 nmol/ μL)。含混合标准品的溶液在室温下不稳定。需要将其冷冻保存，并在首次出现灵敏度下降迹象时将其丢弃。

对于一级氨基酸 ISTD 储备液，称取 58.58 mg 正缬氨酸置于 50 mL 容量瓶中。对于二级氨基酸，称取 44.54 mg 肌氨酸置于同一 50 mL 容量瓶中。用 0.1 mol/L HCl 填充容量瓶一半，并振摇或超声直至溶解，然后用水定容至刻度，使每种氨基酸的最终浓度为 10 nmol/ μL (标准灵敏度)。对于高灵敏度 ISTD 储备液，量取 5 mL 标准灵敏度溶液，并用 45 mL 水进行稀释。在 4 $^\circ\text{C}$ 下储存。根据实验需要，使用两到五种标样绘制校准曲线。在标准灵敏度分析中，通常使用 100 pmol/ μL 、250 pmol/ μL 和 1 nmol/ μL 绘制三点校准曲线。

泵参数

所有方法的泵参数包括压缩系数 ($\times 10^{-6}$ bar) A: 35, B: 80, 在最小进样量 20 μL 下 (A, B)。

在线衍生

根据自动进样器型号不同, 自动化在线衍生程序稍有不同。对于 Agilent G1376C 孔板自动液体进样器 (WPALS), 进样程序如下:

1. 从硼酸盐样品瓶 (部件号 5061-3339) 中吸取 2.5 μL
2. 从样品瓶中吸取 1.0 μL
3. 在清洗口, 将 3.5 μL 混合液混合 5 次
4. 等待 0.2 分钟
5. 从 OPA 样品瓶 (部件号 5061-3335) 中吸取 0.5 μL
6. 在清洗口, 以默认速度将 4.0 μL 混合液混合 10 次
7. 从 FMOC 样品瓶 (部件号 5061-3337) 中吸取 0.4 μL
8. 在清洗口, 以默认速度将 4.4 μL 混合液混合 10 次
9. 从进样稀释剂样品瓶中吸取 32 μL
10. 在清洗口, 将 20 μL 混合液混合 8 次
11. 进样
12. 等待 0.1 分钟
13. 阀切换至旁路

衍生化试剂和样品的位置取决于分析人员和 ALS 样品盘配置。使用配备 2×56 孔板托盘的 G1367C (部件号 G2258-44502) 时, 位置为:

- 样品瓶 1: 硼酸盐缓冲液
- 样品瓶 2: OPA
- 样品瓶 3: FMOC
- 样品瓶 4: 进样稀释剂
- P1-A-1: 样品

柱温箱 (TCC)

左侧和右侧温度设置为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。当温度处于 ± 0.8 $^{\circ}\text{C}$ 以内时进行分析。使用的散热器请参见表 5。

二极管阵列检测器 (DAD)

信号 A: 338 nm, 带宽 10 nm, 参比波长 390 nm, 带宽 20 nm

信号 B: 262 nm, 带宽 16 nm, 参比波长 324 nm, 带宽 8 nm

信号 C: 338 nm, 带宽 10 nm, 参比波长 390 nm, 带宽 20 nm

DAD 编程为在赖氨酸洗脱之后, 羟脯氨酸洗脱之前, 切换至 262 nm, 带宽 16 nm, 参比波长 324 nm, 带宽 8 nm。通过检查峰 20 和 21 之间的信号 A 和 B 时间来确定信号 C, 然后选择合适的波长切换点。确定切换时间并编程到方法中之后, 信号 A 和 B 是可选的。

所有色谱柱均使用 > 0.01 分钟的峰宽设置。

结果与讨论

如图 1 所示，使用相同的色谱条件时，分离结果非常接近。两根色谱柱上混合物的洗脱顺序相同，如图 2 所示，Eclipse Plus C18 和 Poroshell HPH-C18 的氨基酸样品保留时间高度相关，相关系数为 0.997。从色谱图中可以看出，Poroshell HPH-C18 色谱柱的保留时间略短。存在一些显著的色谱差异。因此，使用 Poroshell HPH-C18 时，亮氨酸和赖氨酸的分离较好，而赖氨酸和羟脯氨酸与肌氨酸/脯氨酸的分离较差。正如之前应用简报中的建议，可以改变色谱法以增强所需峰对的分离度。

图 1 中的条件

参数	值																
色谱柱:	Agilent Poroshell HPH C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695975-702) 或 Agilent Eclipse Plus C18, 4.6 × 100 mm, 3.5 μm (部件号 959961-902)																
流速:	1.5 mL/min																
梯度:	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>0.35</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>13.4</td> <td>57</td> </tr> <tr> <td>13.5</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>15.7</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>82</td> </tr> <tr> <td>18</td> <td>结束</td> </tr> </tbody> </table>	时间 (min)	%B	0	2	0.35	2	13.4	57	13.5	100	15.7	100	15	82	18	结束
时间 (min)	%B																
0	2																
0.35	2																
13.4	57																
13.5	100																
15.7	100																
15	82																
18	结束																

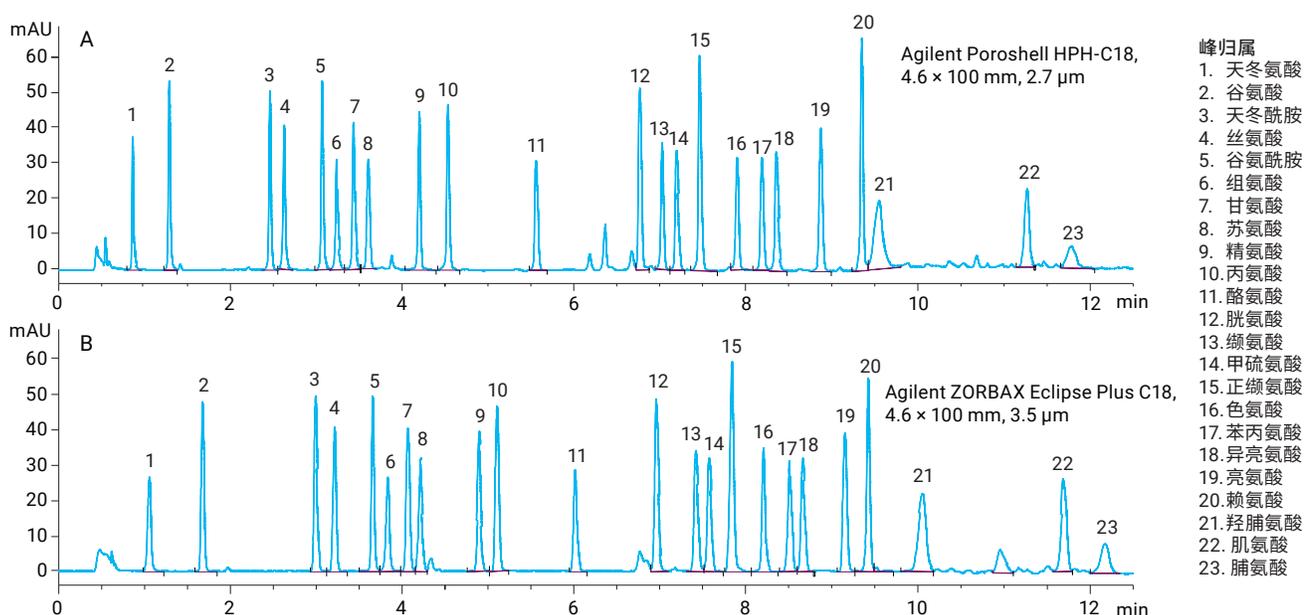


图 1. 使用氨基酸方法对比 Agilent Poroshell HPH C18 和 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱

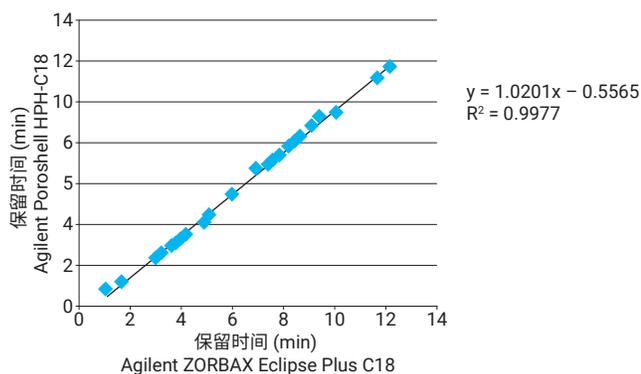


图 2. Agilent Poroshell HPH-C18 和 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱的保留时间相关性

色谱柱规格

该方法可轻松扩展至不同色谱柱尺寸。本次研究了三种色谱柱规格。所有色谱柱的长度均为 100 mm，内径分别为 4.6 mm、3.0 mm、2.1 mm，如图 3 所示。本研究方法的唯一变化是流速的改变。表 1 列出了整个过程中使用的梯度程序。流速根据色谱柱的直径变化。4.6 mm × 100 mm 色谱柱使用的流速为 1.5 mL/min。3 mm 和 2.1 mm 色谱柱的流速分别为 0.62 mL/min 和 0.21 mL/min。对于所有情况，均将小体积热交换器与较短的红色管线配套使用，以尽可能减小柱外体积。使用配备低扩散加热和管线的 Agilent 1260 Infinity 二元液相色谱系统，柱压为大约 175 bar。我们观察到，随着色谱柱内径从大到小，所有分析物的保留时间均略有增加（选择性未改变）。这是由于梯度延迟时间增加所致。随着流速随色谱柱内径从大到小的变化而降低，梯度延迟体积保持不变，因此梯度到达色谱柱所需的时间延长。通过增减液相色谱系统的梯度延迟体积（增加或减少泵和色谱柱进样口之间的毛细管长度/直径/体积），可以减小或消除各种色谱柱内径之间的保留时间差异。

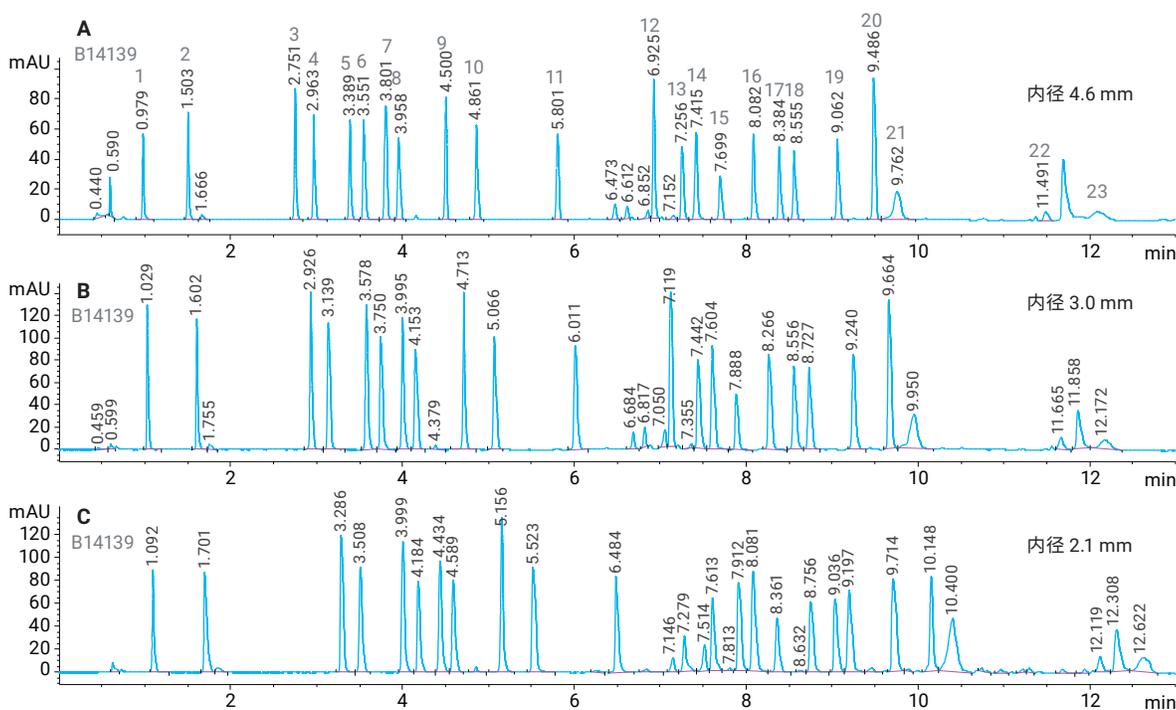


图 3. 使用氨基酸方法对比不同内径的 Agilent Poroshell HPH-C18 100 mm 色谱柱

批间变异性

批间重现性也是方法开发中的一个重要因素。在采用一种方法之前，建议采取的早期验证步骤之一是使用至少三个不同批次的色谱柱检查方法性能。

遵循良好的验证实践，对装填生产批次不同颗粒填料，规格分别为 $4.6 \times 100 \text{ mm}$ 、 $3.0 \times 100 \text{ mm}$ 、 $2.1 \times 100 \text{ mm}$ 的三根色谱柱进行检验。图 4A-C 所示是这三组的叠加图。从图 4A 中可以看出，在使用 $4.6 \times 100 \text{ mm}$ 色谱柱进行的氨基酸分离中，所有化合物均获得了良好的峰形和基线分离形状。洗脱顺序没有明显变化，批间重现性良好。图 4A 中可以看到保留时间有轻微变化，但 *k'* 保持不变。然而，波长切换时间必须有轻微变化，因为这关系到亮氨酸和羟脯氨酸的洗脱时间。由图 4B 和图 4C 可见，内径较小的色谱柱也表现出类似的重现性。

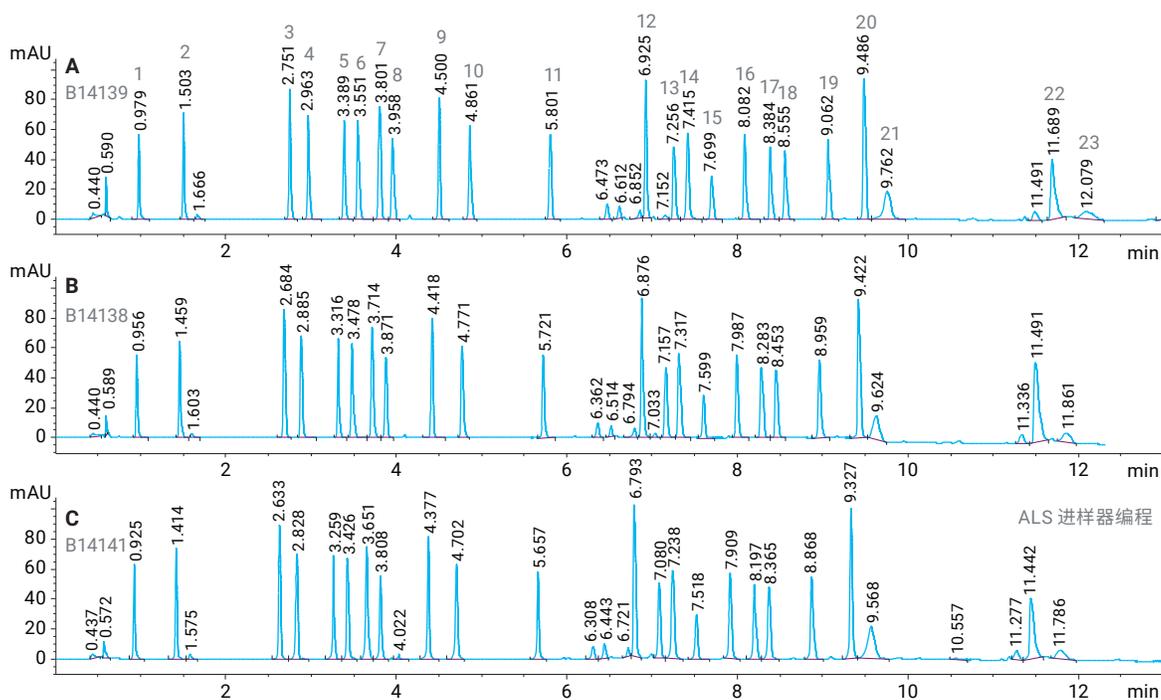


图 4A. 使用三个批次的 Agilent Poroshell HPH-C18, $4.6 \times 100 \text{ mm}$, $2.7 \mu\text{m}$ (部件号 695975-702) 分离氨基酸和内标

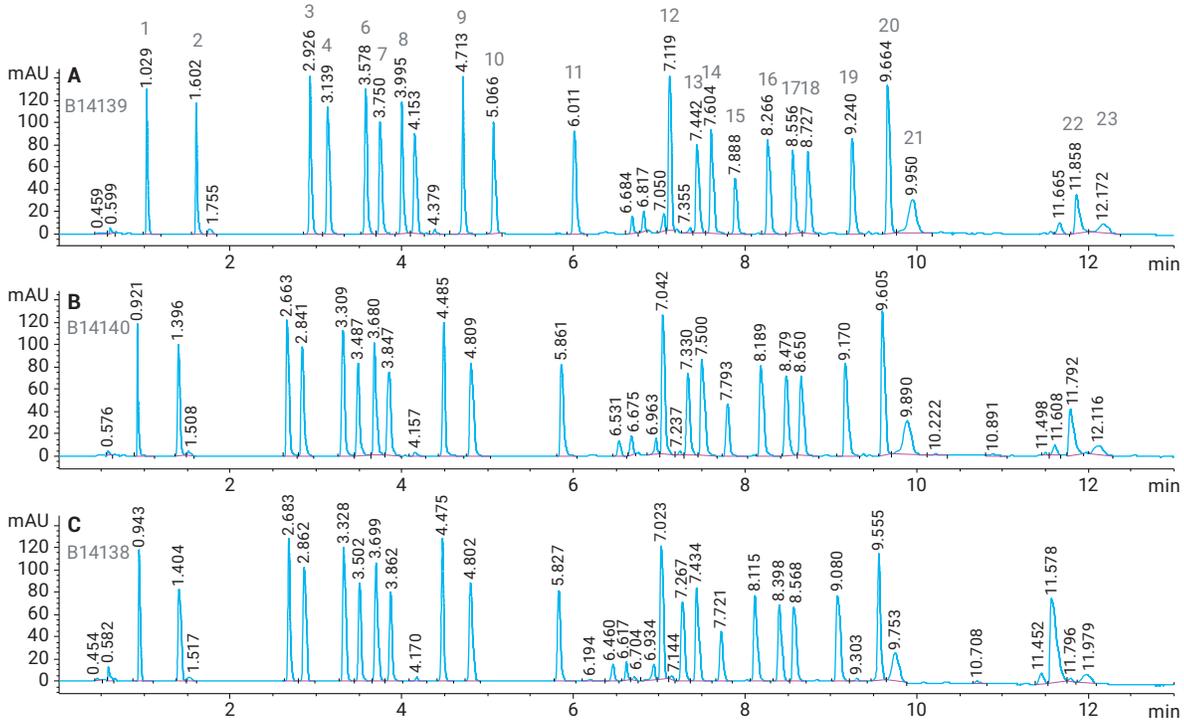


图 4B. 使用三个批次的 Agilent Poroshell HPH-C18, 3 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695975-502) 分离氨基酸和内标

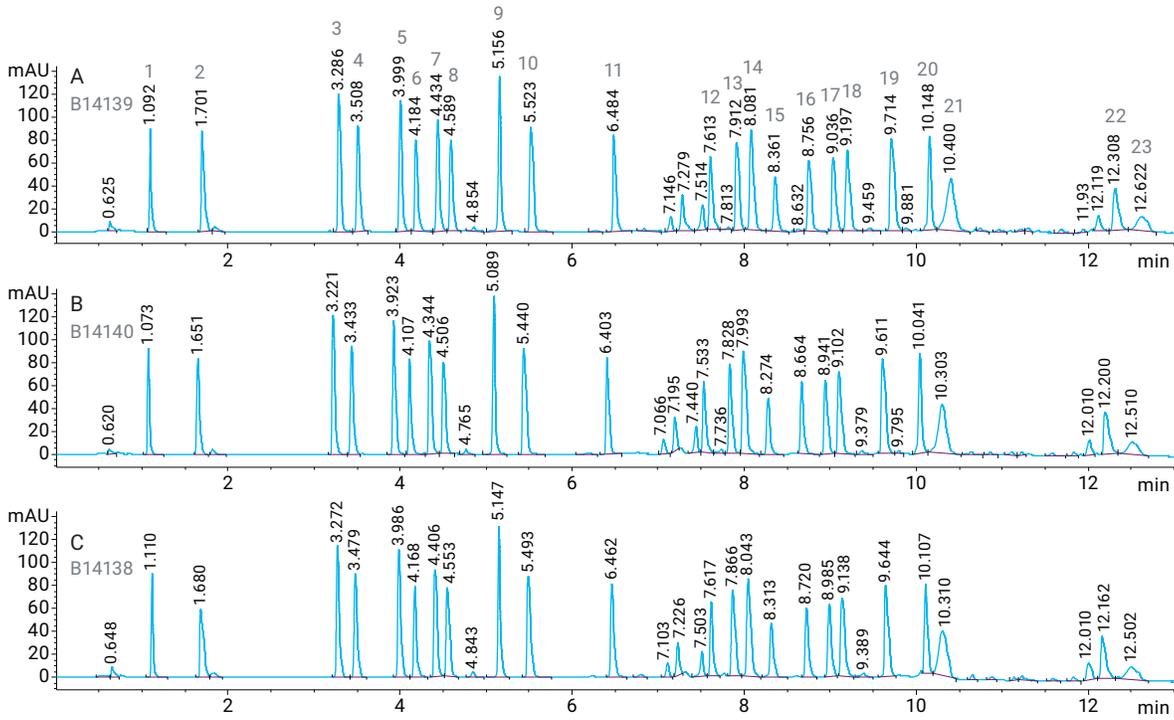


图 4C. 使用三个批次的 Agilent Poroshell HPH-C18, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695775-702) 分离氨基酸和内标

使用寿命

色谱柱的使用寿命是色谱分析人员分析氨基酸样品时的重要考虑因素。大多数硅胶柱在长期暴露于这些条件之后都会失效。Kirkland 等人^[9] 以及 Tindall 和 Perry^[10] 讨论了硅胶柱在磷酸盐缓冲液中使用寿命缩短的可能原因，双方都认为色谱柱的使用寿命不长。

有两种方法可以在高 pH 条件下保持硅胶 HPLC 色谱柱的稳定性。一种方法是采用类似 Agilent ZORBAX Extend C18 色谱柱的特殊键合相。该色谱柱使用双配位键合以防止硅胶在高 pH 条件下发生溶解。在高 pH 条件下保持稳定性的另一种方法是对硅胶自身进行改性，以降低其溶解性。Poroshell HPH 颗粒填料的表面使用独特工艺进行了化学改性，形成有机层以避免硅胶在高 pH 条件下溶解^[11]。

图 5 是四张色谱图的叠加图。分别制备一瓶 4 L 的流动相 A 和 B。使用一根 2.1 × 100 mm 色谱柱进行系列寿命测试，在四周时间内运行 500 次分析。在该系列测试中，每周使用新鲜开封的氨基酸混标和试剂进行约 102 次进样。序列结束后，用 100% B 流动相冲洗色谱柱 40 分钟，然后关闭仪器。以这种方式运行该方法 3.5 天，然后在不进行分析的情况下将色谱柱存放 3.5 天。这模拟了实验室的典型做法，即长时间运行样品后，将色谱柱清洗并储存。原始氨基酸定量方法建议将色谱柱储存在 100% 流动相 B 中，这也是许多经常运行氨基酸分析的成功实验室常见的做法。我们进行了实际的使用寿命研究，标准品进样超过 500 次，每个序列结束后关闭并储存，如此使用一个月后，色谱柱显示出优异的使用寿命。从图 5 中可以看出，17 种氨基酸样品的分离度没有损失，只观察到轻微的保留时间偏移。

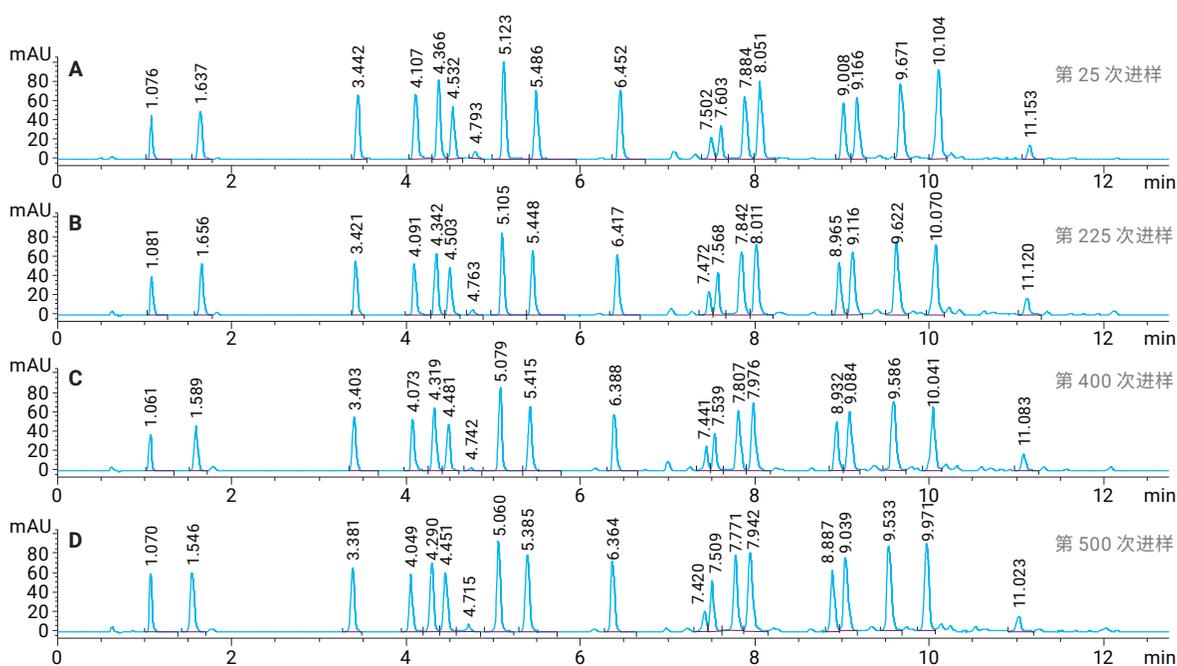


图 5. 色谱柱使用寿命测试，使用 Agilent Poroshell HPH-C18 2.1 × 100 mm 色谱柱运行氨基酸分析方法

结论

Agilent Poroshell HPH-C18 的选择性与全多孔 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 相近。这样就可以实现氨基酸方法等现有方法的轻松转换。在本研究中，虽然可以通过改变梯度来提高选定氨基酸的分离度，但未对色谱条件进行任何改变。大多数情况下，Poroshell HPH-C18 的保留性略低于全多孔 Eclipse Plus C18。使用 4.6 × 100 mm、3.0 × 100 mm 和 2.1 mm × 100 mm 色谱柱对方法进行研究。建议使用小体积色谱柱加热器。总共研究了四个批次的颗粒填料，只需要稍微改变波长切换时间。我们进行了实际的使用寿命研究，标准品进样超过 500 次，每个序列结束后关闭并储存，如此使用一个月后，色谱柱显示出优异的使用寿命。

参考文献

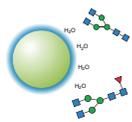
1. Wang, X.; Barber, W. E.; Long, W. J. Applications of superficially porous particles: High Speed, high efficiency or both? *J. Chromatogr. A.* **2012**, 1228, 72-88
2. Schuster, R.; Apfel, A. A new technique for the analysis of primary and secondary amino acids; Application note, Hewlett-Packard Publication number 5954-6257, **1986**
3. Schuster, R. Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* **1988**, 431, 271-284
4. Henderson, Jr., J. W.; Ricker, R. D.; Bidlingmeyer, B. A.; Woodward, C. 快速、准确、灵敏、重现性高的 HPLC 氨基酸分析方法；应用简报，安捷伦科技有限公司，出版号 5980-1193CHCN, **2000**
5. Woodward, C.; Henderson, Jr., J. W.; Todd Wielgos, T. 用亚 2 μm 反相 (RP) 色谱柱进行快速氨基酸分析 (AAA)；应用简报，安捷伦科技有限公司，出版号 5989-6297CHCN, **2007**
6. Gratzfeld-Huesgen, A. Sensitive and Reliable Amino Acid Analysis in Protein Hydrolysates using the Agilent 1100 Series HPLC (使用 Agilent 1100 系列 HPLC 对蛋白质水解产物进行灵敏可靠的氨基酸分析)；应用简报，安捷伦科技有限公司，出版号 5968-5658EN, **1999**
7. Greene, J.; Henderson, Jr., J. W.; Wikswo, J. P. Rapid and Precise Determination of Cellular Amino Acid Flux Rates Using HPLC with Automated Derivatization with Absorbance Detection (使用带自动衍生化的 HPLC 结合吸光度检测快速准确地测定细胞氨基酸流量)；应用简报，安捷伦科技有限公司，出版号 5990-3283EN, **2009**
8. Henderson Jr., J. W.; Brooks, A. Improved Amino Acid Methods using Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Columns for a Variety of Agilent LC Instrumentation and Separation Goals (采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱的改进氨基酸分析方法，适合多种安捷伦液相色谱仪和分离目的)；应用简报，安捷伦科技有限公司，出版号 5990-4547EN, **2010**
9. Kirkland, J. J.; van Straten, M. A.; Claessens, H. A. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of basic compounds at pH 11 with silica-based column packings. *J. Chromatogr. A.* **1998**, 797, 111-120
10. Tindall, G. W.; Perry, R. L. Explanation for the enhanced dissolution of silica column packing in high pH phosphate and carbonate buffers. *J. Chromatogr. A.* **2003**, 988, 309-312
11. Anon. Extending Column Lifetime in Pharmaceutical Methods with High pH stable Poroshell HPH chemistries (使用高 pH 稳定的 Poroshell HPH 键合固定相延长色谱柱在药物分析中的使用寿命)；技术概述，安捷伦科技有限公司，出版号 5991-5022EN, **2014**

多聚糖分析

背景

糖基化是一种重要的翻译后修饰，因为多聚糖在蛋白质识别和生物治疗药物疗效方面起着关键作用。人体细胞中的糖基化模式遵循基于共同核心结构的典型天线样模式，而重组蛋白质制造商的目标是使用细胞培养的方式尝试复制该模式。这需要采用哺乳动物细胞系，但糖基化途径非常复杂，而且并非所有克隆都能产生所需的糖谱。监管机构认为这是一项重大挑战，并就如何确定糖指纹谱提供了指导，包括使用特定的酶 PNGase F 切割 N-糖，用荧光团标记它们以提高检测灵敏度，然后使用亲水相互作用色谱 (HILIC) 柱（通常与荧光检测器结合使用，但也可使用质谱）将它们分离。

安捷伦提供多种试剂盒，其中含有用各种标签（包括 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB)、InstantPC 和 APTS）手动进行去糖基化和标记反应所需的所有试剂。或者也可使用只需极短时间即可处理更多样品的全自动 AssayMAP 平台获得更高通量。该方法的示意图见第 66 页的应用简报。



多聚糖分析

亲水相互作用色谱

快速、高分离度、可重现的
多聚糖分离

AdvanceBio 糖谱分析柱

一种酰胺 HILIC 色谱柱

属性	优势
2.7 μm 表面多孔颗粒填料	低反压，高分离度
1.8 μm 全多孔颗粒填料	超高分离度
兼容荧光和质谱检测	方法转移简单

入门指南

亲水相互作用色谱 (HILIC) 是一种正相色谱。在某些方面与更常见的反相色谱相反，梯度从高有机溶剂含量（而不是高含水量）开始。分析物与固定相之间相互作用的机理是从有机溶剂含量较高的洗脱液分配到固定相表面上的水层。水也是强洗脱溶剂。方法结束时充足的再平衡时间和极小的进样量对色谱重现性和良好的峰形至关重要。AdvanceBio 糖谱分析色谱柱提供表面多孔 2.7 μm 色谱柱（适用于所有 HPLC 仪器），或全多孔 1.8 μm 色谱柱（适用于 UHPLC 仪器）。在本节详述的工作流程操作指南中，可以找到密切相关的难分离多聚糖结构达到理想分离度所需的相应方法条件。

糖谱分析： 操作指南

前言

一级氨基酸序列的翻译后修饰（包括糖基化）将会造成功能上的变化，并且可能影响生物药物的疗效和免疫源性。多聚糖结构还会影响血浆中的蛋白质清除率以及单克隆抗体触发具有治疗意义的免疫应答的能力。许多监管机构将糖基化归为生物分子的关键质量属性，因此在糖蛋白原研药、生物仿制药或改良型生物相似药的开发阶段，研究人员必须对糖基化进行表征和定量，并确定可接受范围。

Agilent AdvanceBio 糖谱分析解决方案提供的优化工作流程专为实现荧光标记多聚糖的重现性分析而设计，用以实现准确鉴定与定量。

样品前处理 — AdvanceBio N-糖样品前处理试剂盒

对糖蛋白（包括单克隆抗体）的 N-糖组分谱进行分析时，需要使用 PNGase F 将 N-糖从蛋白质氨基酸主链上酶切下来。切下的 N-糖可使用亲水相互作用色谱 (HILIC) 联用质谱检测进行分析。更常见的是用一种荧光团标记 N-糖，并使用 HILIC 色谱进行分离，然后再进行荧光或质谱检测。

AdvanceBio 多聚糖样品前处理试剂盒可提供样品前处理所需的全部试剂。安捷伦的样品前处理试剂盒采用模块化形式，通常分为用于去糖基化、标记和净化的子试剂盒。此外，工作流程每个步骤所使用的模块都有独立的部件号，灵活方便。通过该工作流程，可得到适合液相色谱分析（通常为 HILIC 分析）的样品。

色谱柱选择

Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱经过精心设计和制造，可通过 HILIC 色谱提供快速、高分离度和高重现性的多聚糖鉴定。AdvanceBio 糖谱分析色谱柱应用了先进技术，能够提高质谱和荧光检测结果的准确性。有以下两种 UHPLC 配置可供选择：2.7 μm 的表面多孔填料和 1.8 μm 的表面多孔填料，前者可实现更低反压下的高分离度分析，而后者则可实现超高分离度分析。

AdvanceBio 糖谱分析色谱柱	氨基键合相可缩短平衡时间并提高多聚糖选择性。
1.8 μm	该色谱柱基于全多孔颗粒填料，适合高速分离和高通量应用。耐压高达 1200 bar，可与 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪一起使用。
2.7 μm	该色谱柱基于 Poroshell 技术，可提供表面多孔填料颗粒，减少了扩散距离，在更低的压力下可实现高分离度分离，并且能够使用更长的色谱柱来提升分离效率。

分析速度

AdvanceBio 糖谱分析 1.8 μm 色谱柱可实现高通量的 N-糖分析，适合由于样品数量庞大或需要快速得到数据而需要将速度作为主要考虑因素的应用。这些色谱柱可提供出色的结果，同时比竞争对手节约 40% 的时间。

条件

参数	值
色谱柱 A	AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.1 \times 150 mm, 1.8 μm
色谱柱 B	竞争产品亚 2 μm 糖谱分析色谱柱
仪器	配备 1260 Infinity 荧光检测器的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱柱
柱温	55 $^{\circ}\text{C}$
样品恒温箱	105 $^{\circ}\text{C}$
流动相	A: 100 mmol/L 甲酸铵, pH 4.5 B: ACN
FLD	激发波长 = 260 发射波长 = 430
进样量	2 μL , 溶液为 70:30 乙腈: 100 mmol/L 甲酸铵
样品	安捷伦 2-AB 标记的人 IgG N-糖文库 (部件号 5190-6996)

分离度

使用 AdvanceBio 糖谱分析 2.7 μm 填料和 250 mm 柱长的色谱柱实现高分离度分离。这种更高的分离度可对目标多糖以及表达过程中可能出现的蛋白糖基化谱图变化进行准确的定量分析。

时间	%A	%B	流速 (mL/min)
0	20	80	0.5
25	40	60	0.5
26	100	0	0.5
27	40	80	0.5

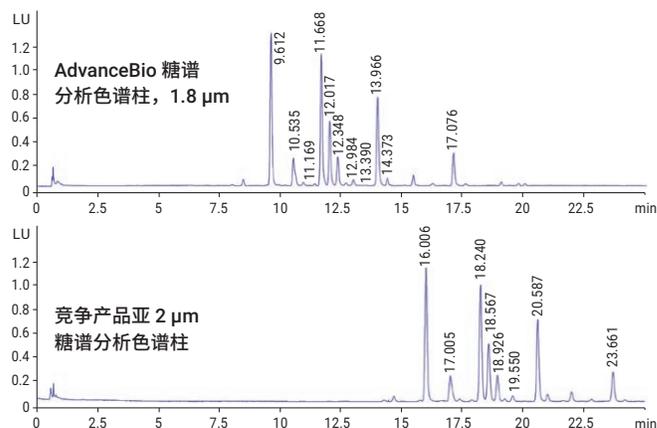


图 1. 与 2.1 \times 150 mm 规格的非安捷伦亚 2 μm 糖分析色谱柱相比, Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱可提供更高的分离度、更窄的色谱峰以及更高的峰容量

利用多聚糖标准品确保性能测试与保留谱分析获得一致的结果

开发早期阶段丢失信息可能引起下游过程严重受挫。此外，生产过程中的不一致将导致糖基化改变，从而对免疫原性和功效产生负面影响。安捷伦参比标准品有助于可靠地采集重要数据，并使每个工作流程组件都处于理想工作状态。安捷伦提供全系列预标记的多聚糖标准品和文库，以及未标记的多聚糖标准品。第 12-15 页提供了包含结构图和部件号的完整列表。

2-AB 标记葡聚糖分子量标准品的分离

条件

参数	值
色谱柱	AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 859700-913 2.1 × 150 mm, 1.8 μm
流动相	A: 100 mmol/L 甲酸铵, pH 4.5 B: ACN
FLD	激发波长 = 260 发射波长 = 430
进样量	2 μL (10 pmol 总多聚糖/1 μL, 75:25 乙腈:水)
样品	安捷伦 2-AB 标记葡聚糖分子量标准品 (部件号 GKSB-503)

灵活高效的液相色谱仪

可靠稳定、简便易用：

100% 生物惰性的 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统具有低表面活性、耐腐蚀性、主动密封垫冲洗和四元缓冲液混合功能，可获得出色的分析结果。

效率的新标杆：

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统是新一代 UHPLC，可大大提高分析效率、仪器效率与实验室效率，最高压力 1300 bar，最高流速为 5 mL/min。

更高的效率与互不影响的结果：安捷伦生物惰性液相色谱凭借更尖锐的峰形与更高的重现性大大提高色谱分析的可靠性。

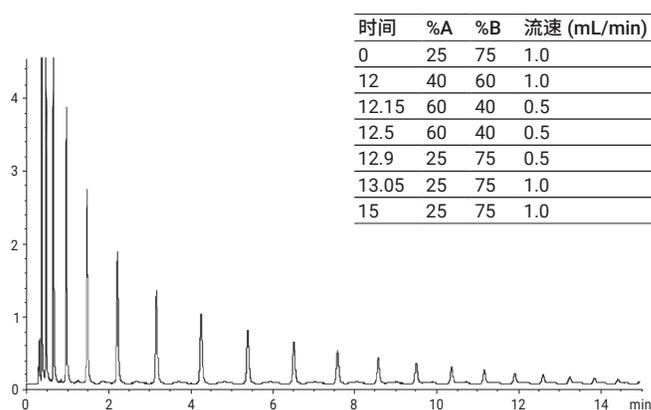


图 2. 本次分析使用安捷伦葡聚糖分子量标准品与 AdvanceBio 糖谱分析色谱柱，以便关联未知多聚糖的保留时间。图片来自 5990-9384CHCN

条件

流动相

AdvanceBio 糖谱分析色谱柱保存在储存缓冲液乙腈:水溶液中运输,可直接用于 HILIC 分离。HILIC 色谱柱可兼容多聚糖分析最常用水性缓冲液和乙腈。多聚糖分析使用的典型流动相是:

缓冲液 A: 100 mmol/L 甲酸铵水溶液, pH 4.5

缓冲液 B: 乙腈 (可兼容质谱)

AdvanceBio 糖谱分析色谱柱运行的 pH 范围为 2 至 7。AdvanceBio 糖谱分析色谱柱是具有 HILIC 酰胺固定相的硅胶基色谱柱。所有硅胶在 pH 值大于 6 的水相流动相中均有一定的溶解度,因此在 pH 7 以上使用色谱柱会缩短其使用寿命。

进样

为实现更高分离度,进样量应为 1 至 2 μL 。样品应首先溶解于水中,然后配制成 70:30 乙腈:水溶液。自动进样器应冷却,以保持样品的完整性。此外,在进样到色谱柱前应先对样品进行过滤。对于 UHPLC 分析,建议进样 1 μL 水溶液。对于 AdvanceBio 糖谱分析 1.8 μm 色谱柱,色谱柱入口筛板的标称值为 0.5 μm ,对于 AdvanceBio 糖谱分析 2.7 μm 色谱柱,色谱柱入口筛板的标称值为 2 μm 。因此,应通过 0.2 μm 样品过滤器对样品进行过滤。

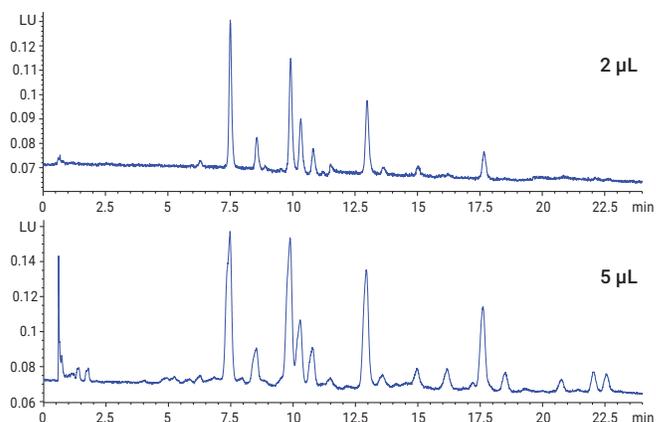


图 3. 所示为 AdvanceBio 糖谱分析 1.8 μm , 2.1 \times 150 mm 色谱柱上进样量为 5 μL 的结果 (底部色谱图), 与进样量为 2 μL 的结果 (顶部色谱图) 相比, 色谱峰宽度增加并且分离度有所损失。图片来自 5991-6183CHCN

流速

高分离度分离时应采用 0.5 mL/min 的流速, 而高速分离时最高可采用 1.0 mL/min 的流速。高含水量净化务必在低流速下运行。

1.8 μm 色谱柱的最大运行压力为 1200 bar, 而 2.7 μm 色谱柱的最大运行压力为 600 bar。运行时不超过最大压力的 80%, 可达到理想色谱柱使用寿命。

AdvanceBio 糖谱分析 2.7 μm 色谱柱的建议梯度

提高分离度的建议梯度

时间	洗脱液 A	洗脱液 B	流速
0	20%	80%	0.5 mL/min
32	40%	60%	0.5 mL/min
33	80%	20%	0.5 mL/min
35	80%	20%	0.5 mL/min
36	20%	80%	0.5 mL/min
45	20%	80%	0.5 mL/min

加快分析速度的建议梯度

时间	洗脱液 A	洗脱液 B	流速
0	20%	80%	0.7 mL/min
12	40%	60%	0.7 mL/min
12.5	80%	20%	0.5 mL/min
13.5	80%	20%	0.5 mL/min
16	20%	80%	0.5 mL/min
17	20%	80%	0.7 mL/min
18	20%	80%	0.7 mL/min

AdvanceBio 糖谱分析 1.8 μm 色谱柱的建议梯度

提高分离度的建议梯度

时间	洗脱液 A	洗脱液 B	流速
0	20%	80%	0.5 mL/min
32	40%	60%	0.5 mL/min
33	80%	20%	0.5 mL/min
35	80%	20%	0.5 mL/min
36	20%	80%	0.5 mL/min
45	20%	80%	0.5 mL/min

加快分析速度的建议梯度

时间	洗脱液 A	洗脱液 B	流速
0	25%	75%	1.0 mL/min
12	40%	60%	1.0 mL/min
12.5	80%	20%	0.5 mL/min
13.5	80%	20%	0.5 mL/min
14	25%	75%	0.5 mL/min
15	25%	75%	1.0 mL/min
20	25%	75%	1.0 mL/min

可能需要调整起点和终点，使包含不同类型多聚糖的样品获得更高的分离度。例如，较大的多聚糖结构可能需要采用 75%–55% 的乙腈梯度以获得理想结果。

温度

为得到尖锐的峰形，典型运行温度为 60 °C。可以在更高温度下使用，但可能会缩短色谱柱使用寿命。为延长色谱柱寿命，建议在 40 °C 下使用。选择性和分离度可随温度发生变化。

检测

可使用质谱检测 N-糖。然而，荧光检测是标记 N-糖最常用的分析方法。激发和发射波长具有染料特异性，Agilent 1260 Infinity 荧光检测器的值请参见样品前处理试剂盒的说明书。

大幅延长色谱柱寿命并提升柱效

色谱柱活化

AdvanceBio 糖谱分析色谱柱专为分离从糖蛋白和糖肽上裂解下来的 N-糖。为使 HILIC 机制有效发挥作用，色谱柱在使用前必须达到完全平衡。

- 使用至少 10 倍色谱柱体积的 100% 乙腈冲洗色谱柱
- 再使用 10 倍色谱柱体积的含有 15% 乙腈的水性相冲洗色谱柱
- 最后，使用分析开始时要使用的流动相以 20 倍色谱柱体积冲洗色谱柱

为检查色谱柱是否已达到完全平衡，可以运行两到三次分析以检查重现性。

反压过高故障排除

如果溶剂流动受阻（色谱柱反压异常偏高），首先应检查色谱柱入口前的溶剂流是否畅通。如果堵塞出现在色谱柱之前，应更换相应一段管线或受堵的过滤器。如果色谱柱堵塞，不要反冲色谱柱，应更换色谱柱。

储存色谱柱

推荐使用乙腈:水 (95:5) 进行长期储存。在切换至储存溶剂前，可能需要使用 60% 乙腈: 40% 水冲洗色谱柱，以去除缓冲液。储存色谱柱之前将堵头紧紧密封在柱端接头上，以免填料变干。

色谱柱可以在短时间内安全储存于流动相中。然而，为了保护仪器，最好采用无缓冲液的相同流动相冲洗色谱柱以除去仪器和色谱柱中的盐。例如采用 90:10 ACN:H₂O 去除 90:10 乙腈:0.01 mol/L 甲酸盐缓冲液的流动相。

对于短期储存，将色谱柱储存在 80% 乙腈:20% 5 mmol/L 甲酸铵中时，再平衡的速度会更快。应进行数次（3 至 6 次）进样来验证色谱柱是否达到平衡。

订购信息

AdvanceBio 糖谱分析色谱柱

1.8 μm , 最高耐压 1200 bar

描述	部件号
2.1 \times 100 mm	858700-913
2.1 \times 150 mm*	859700-913
快速保护柱, 2.1 mm, 1.8 μm	651750-913

* 推荐的初始色谱柱尺寸

2.7 μm 表面多孔颗粒填料, 在 600 bar 下稳定

描述	部件号
2.1 \times 100 mm	685775-913
2.1 \times 150 mm*	683775-913
2.1 \times 250 mm	651750-913
快速保护柱, 2.1 mm, 2.7 μm	821725-906
4.6 \times 100 mm	685975-913
4.6 \times 150 mm	683975-913
4.6 \times 250 mm	680975-913

* 推荐的初始色谱柱尺寸

如需了解关于多聚糖标准品的更多信息,
请参阅第 12–15 页的 5994-2202ZHCN

AdvanceBio 多聚糖标准品 InstantPC、2-AB、2-AA、APTS、InstantAB 和未标记的标准品

多聚糖标准品结构

多聚糖结构图遵循功能性糖组学协会 (CFG) 的建议^[3]，并使用 GlycoWorkbench 2.1 绘制^[4]。

Neu5Ac = N-乙酰神经氨酸；

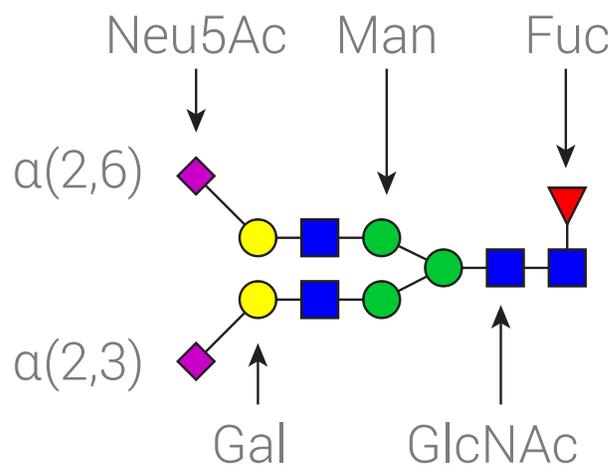
Gal = 半乳糖；

Man = 甘露糖；

GlcNAc = N-乙酰氨基葡萄糖；

Fuc = 岩藻糖。

在由中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞产生的糖蛋白上发现 $\alpha(2,3)$ 唾液酸结合位点^[5]。不同的是，静脉注射用人免疫球蛋白 (IVIG) IgG Fc N-糖主要为 $\alpha(2,6)$ -唾液酸化^[6]。



多聚糖	ProZyme 名称	Oxford 名称 ^[1]	CFG 结构	未标记 ^[2]	InstantPC	InstantAB	2-AB	2-AA	APTS
复合型天然 N-糖									
G0-N	NGA2-N	A1			GKPC-401		GKSB-401		GKSP-401
G0	NGA2	A2		GKC-004300	GKPC-301	GKIB-301	GKSB-301	GKSA-301	GKSP-301
G0F-N	NGA2F-N	F(6)A1			GKPC-402		GKSB-402		GKSP-402
G0F	NGA2F	F(6)A2		GKC-004301	GKPC-302	GKIB-302	GKSB-302	GKSA-302	GKSP-302
G0FB	NGA2FB	F(6)A2B		GKC-004311			GKSB-303		
G1	NA2G1	A2G1		GKC-014300	GKPC-317	GKIB-317	GKSB-317		GKSP-317
G1F	NA2G1F	F(6)A2G1		GKC-014301	GKPC-316	GKIB-316	GKSB-316	GKSA-316	GKSP-316

多聚糖	ProZyme 名称	Oxford 名称 ^[1]	CFG 结构	未标记 ^[2]	InstantPC	InstantAB	2-AB	2-AA	APTS
G2	NA2	A2G(4)2		GKC-024300	GKPC-304	GKIB-304	GKSB-304	GKSA-304	GKSP-304
G2F	NA2F	F(6)A2G(4)2		GKC-024301	GKPC-305	GKIB-305	GKSB-305	GKSA-305	GKSP-305
G2FB	NA2FB	F(6)A2BG(4)2		GKC-024311			GKSB-306		
G1S1 α(2,3)		A2G(4)1S(3)1			GKPC-329				
G1S1 α(2,6)		A2G(4)1S(6)1			GKPC-319				
G1FS1 α(2,3)		FA2G(4)1S(3)1			GKPC-330				
G1FS1 α(2,6)		FA2G(4)1S(6)1			GKPC-320				
G2S1 α(2,3)	A1(α2,3)	A2G(4)2S(3)1			GKPC-321				
G2S1 α(2,6)	A1(α2,6)	A2G(4)2S(6)1		GKC-124300	GKPC-311	GKIB-311	GKSB-311	GKSA-311	GKSP-311
G2FS1 α(2,3)	A1F(α2,3)	F(6)A2G(4)2S(3)1			GKPC-325				
G2FS1 α(2,6)	A1F(α2,6)	F(6)A2G(4)2S(6)1		GKC-124301	GKPC-315	GKIB-315	GKSB-315	GKSA-315	GKSP-315
G2S2 α(2,3)	A2(α2,3)	A2G(4)2S(3)2			GKPC-322				
G2S2 α(2,6)	A2(α2,6)	A2G(4)2S(6)2		GKC-224300	GKPC-312	GKIB-312	GKSB-312	GKSA-312	GKSP-312
G2FS2 α(2,3)	A2F(α2,3)	F(6)A2G(4)2S(3)2			GKPC-323				
G2FS2 α(2,6)	A2F(α2,6)	F(6)A2G(4)2S(6)2		GKC-224301	GKPC-313	GKIB-313	GKSB-313	GKSA-313	GKSP-313
G2F w/2 α-gal	NA2Ga2F	F(6)A2G(4)2Ga(3)2			GKPC-318		GKSB-318		GKSP-318
G1F w/1 α-gal	NA2G 1FGa1	F(6) A2G(4)1Ga(3)1			GKPC-403				
G2F w/1 α-gal	NA2FGa1	F(6)A2G(4)2Ga(3)1			GKPC-404				
A3	NGA3	A3		GKC-005300		GKIB-307	GKSB-307	GKSA-307	

多聚糖	ProZyme 名称	Oxford 名称 ^[1]	CFG 结构	未标记 ^[2]	InstantPC	InstantAB	2-AB	2-AA	APTS
G3	NA3	A3G(4)3		GKC-035300			GKSB-308	GKSA-308	
G3S3 α(2,6)	A3(a2,6)	A3G(4)3S(6)3		GKC-335300			GKSB-314		
A4	NGA4	A4		GKC-006300			GKSB-309	GKSA-309	
G4	NA4	A4G(4)4		GKC-046300			GKSB-310		
高甘露糖型天然 N-糖									
Man5	MAN-5	M5		GKM-002500	GKPC-103	GKIB-103	GKSB-103	GKSA-103	GKSP-103
Man6	MAN-6	M6		GKM-002600	GKPC-104	GKIB-104	GKSB-104	GKSA-104	GKSP-104
Man7	MAN-7	M7		GKM-002700	GKPC-105	GKIB-105	GKSB-105	GKSA-105	GKSP-105
Man8	MAN-8	M8		GKM-002800	GKPC-106	GKIB-106	GKSB-106	GKSA-106	GKSP-106
Man9	MAN-9	M9		GKM-002900	GKPC-107	GKIB-107	GKSB-107	GKSA-107	GKSP-107
杂合型天然 N-糖									
杂合型	HYBR	M5A1B					GKSB-111		
天然 N-糖核心									
NF	NF			GKR-001001					
NN	NN			GKR-002000			GKSB-100		
NNF	NNF			GKR-002001					
Man1	MNN	M1		GKR-002100					
Man1F	MNNF	F(6)M1		GKR-002101					
Man3				GKR-002300			GKSB-101		
Man3F				GKR-002301			GKSB-102		

多聚糖	未标记	InstantPC	InstantAB	2-AB	2-AA	APTS
N-糖文库						
人 IgG N-糖文库	GKLB-005	GKPC-005	GKIB-005	GKSB-005	GKSA-005	GKSP-005
CHO mAb N-糖文库		GKPC-020				
CHO mAb N-糖文库 + CHO mAb 糖蛋白		GKPC-020-P				
人 α 1-酸糖蛋白 N-糖文库	GKLB-001		GKIB-001	GKSB-001	GKSA-001	
牛胎球蛋白 N-糖文库	GKLB-002		GKIB-002	GKSB-002	GKSA-002	
RNase B N-糖文库 (高甘露糖)			GKIB-009			
二天线型与高甘露糖分区文库			GKIB-520	GKSB-520		GKSP-520
唾液酸化二天线型 N-糖文库			GKIB-232	GKSB-232		GKSP-232
α (2,6) 唾液酸化二天线型 N-糖文库				GKSB-262		GKSP-262
α (2,3) 唾液酸化三天线型 N-糖文库		GKPC-233	GKIB-233	GKSB-233		GKSP-233
α (2,6) 唾液酸化三天线型 N-糖文库		GKPC-263		GKSB-263		GKSP-263
α (2,3) 唾液酸化四天线型 N-糖文库		GKPC-234	GKIB-234	GKSB-234		GKSP-234
α (2,6) 唾液酸化四天线型 N-糖文库		GKPC-264		GKSB-264		GKSP-264
比对标准品						
葡萄糖单元 (GU) 分子量标准品		GKPC-503	GKIB-503	GKSB-503	GKSA-503	GKSP-503
用于毛细管电泳 (CE) 的迁移内标						GKSP-500

参考文献

1. Harvey DJ, et al. Proposal for a standard system for drawing structural diagrams of N- and O-linked carbohydrates and related compounds. *Proteomics*. **2009**, 9(15):3796–801
2. 未显示所有未标记的多聚糖
3. Varki A, et al. Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans. *Glycobiology*. **2015 Dec**; 25(12): 1323–1324
4. Ceroni A, et al. GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J Proteome Res*. **2008 Apr**;7(4):1650-9
5. Lee EU, et al. Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. *J Biol Chem*. **1989**, 264(23), 13848-55
6. Anthony RM, et al. Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. *Science*. **2008**, 320(5874), 373-6

使用 Agilent AdvanceBio Gly-X InstantPC 和 2-AB Express 样品前处 理与 LC/FLD/MS 简化生物治疗药物的 N-糖分析工作流程

作者

John Yan, Aled Jones
安捷伦科技有限公司

前言

本应用简报介绍使用 InstantPC 和 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 两种标记物，从生物治疗性糖蛋白中制备和分析游离 N-糖。N-糖分析对于生物治疗药物的开发和生产至关重要，因为糖基化会影响最终药物产品的治疗功能。本文介绍的工作流程使用 Agilent AdvanceBio Gly-X 配合 InstantPC 和 Gly-X 2-AB Express 试剂盒（原 ProZyme），通过 PNGase F 释放 N-糖，然后分别使用 InstantPC 进行即时糖胺标记或使用 2-AB Express 进行还原胺化标记。使用亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 分离标记的 N-糖，并用荧光和质谱 (MS) 进行检测。Gly-X 样品前处理可提供高重现性和通量，InstantPC 的前处理时间为 1 小时，2-AB Express 的前处理时间为 2 小时。此外，InstantPC 标记可改进荧光响应和 MS 电离效率。

前言

N-糖表征是生物治疗药物开发过程的重要环节，因为 N-糖的结构会影响糖基化生物治疗药物的功能，这常常使糖基化成为关键质量属性 (CQA)^[1]。N-糖分析通常涉及用标签标记游离多聚糖，以便进行荧光 (FLD) 检测，并增强质谱 (MS) 的电离，及后续的 N-糖分离、检测和相对定量。与最近推出的染料（如 InstantPC）相比，许多常用的荧光标签（如 2-AB^[2]）在 MS 灵敏度方面受到限制，且过往的 N-糖样品前处理工作流程可能非常耗时^[3]。然而，2-AB 的使用已超过 20 年，因此在文献和许多实验室中得到了明确证实。

本应用简报介绍了简化的工作流程，用于准备 InstantPC 和 2-AB 标记的 N-糖，并使用安捷伦 LC/FLD/MS 仪器进行分析。用于 InstantPC 或 2-AB Express 标记（原 ProZyme）的 Gly-X N-糖样品前处理试剂盒包括用于 N-糖样品前处理所需的所有试剂：变性、去糖基化、标记和样品净化，如图 1 所示。

实验部分

N-糖样品前处理

使用带 InstantPC 和 Gly-X 2-AB Express 的 Agilent AdvanceBio Gly-X N-糖前处理试剂盒（部件号分别为 GX96-IPC 和 GX96-2AB），标记来自单克隆抗体利妥昔单抗（Rituxan，批号 M190170）和 Fc 融合蛋白依那西普（恩利，批号 1092537）的 N-糖，每次前处理 40 µg 蛋白。使用荧光/MS 检测分析每个样品的四次重复进样，并计算多聚糖峰面积的相对百分比。

使用标准手动方案进行 InstantPC 和 2-AB 标记样品的前处理。Gly-X 溶液内去糖基化实验方案在 90 °C 下变性 3 分钟，打开糖蛋白靶标，使 PNGase F 在 50 °C 下进行 5 分钟的去糖基化反应。溶液内去糖基化后，对游离 N-糖进行 1 分钟的糖胺标记，制备 InstantPC 标记样品（图 2），然后在真空条件下使用 HILIC 固相萃取 (SPE) 净化游离染料。

使用标准 Gly-X 2-AB Express 方案和还原胺化化学反应制备 2-AB 标记的 N-糖样品。在使用 PNGase F 进行 Gly-X 的 5 分钟去糖基化后，游离 N-糖从糖胺形式 (-NH₂) 转化为游离还原末端 (-OH)，使 2-AB 能够进行还原胺化标记。然后通过真空过滤将 N-糖去溶剂化到固态基质上，然后在基质上进行 2-AB 标记步骤。该过程无需在 2-AB 标记步骤之前进行多聚糖干燥，从而缩短了总样品前处理时间。

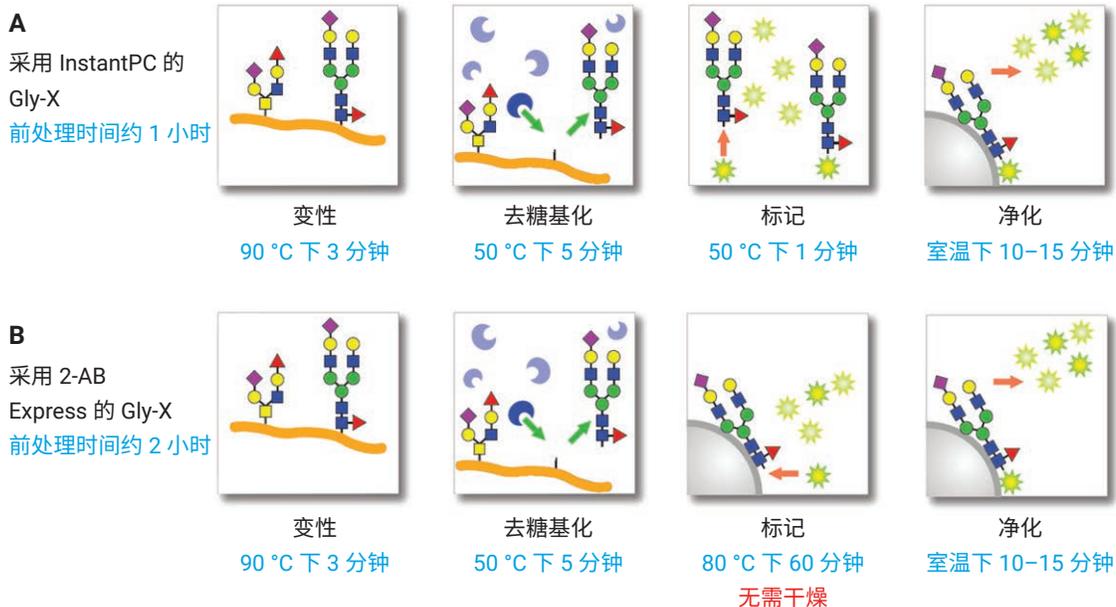
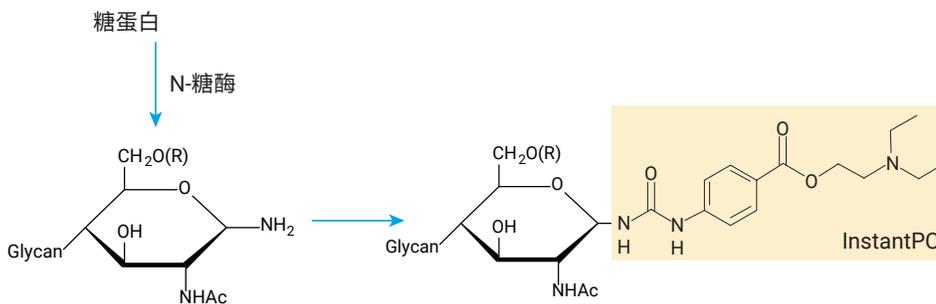


图 1. Gly-X N-糖样品前处理。

A) InstantPC 工作流程，包括溶液内去糖基化和标记，后续基质上净化；
B) 2-AB 工作流程，在溶液内进行去糖基化，然后进行基质上标记和净化

InstantDyes:
糖胺标记
(-NH₂)



还原胺化:
自由还原末端
标记 (-OH)

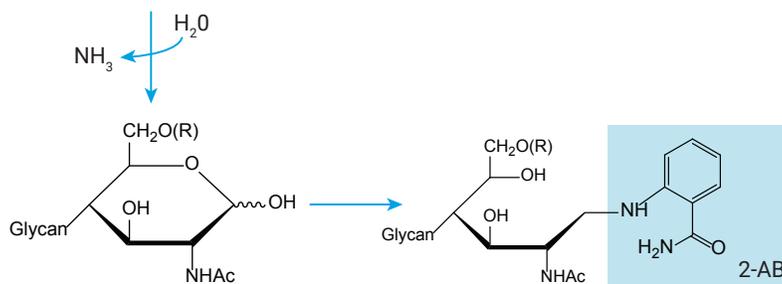


图 2. InstantPC 糖胺标记与传统 2-AB 还原胺化的比较

N-糖分析

通过亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 分离 InstantPC 和 2-AB 标记的 N-糖, 使用 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm (部件号 859700-913) 以及配备在线荧光检测器的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统 (表 1), 并联用 Agilent AdvanceBio 6545XT LC/Q-TOF (表 2)。

所有 HILIC 分离均在表 1 描述的条件下进行。FLD 后使用固定分流器 (购自 IDEX Health & Science, 部件号 UH-427), 将大约 50% 的液流分至废液, 50% 分至 MS。使用带个人化合物数据库 (PCD) 的 Agilent MassHunter BioConfirm 软件进行数据处理。

材料

LC/MS 级乙腈和水购自 Honeywell Research Chemicals。

仪器

使用 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱 (表 1 显示方法详细信息) 在安捷伦 LC/MS 上分离标记的 N-糖样品, 仪器配置包括:

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)
- Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1321B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (参数见表 2)

软件

- Agilent MassHunter 采集软件
- Agilent MassHunter 定性分析软件

表 1. Agilent 1290 Infinity II UHPLC HILIC/FLD 条件

Agilent 1290 Infinity II UHPLC HILIC/FLD 条件

参数	值																
色谱柱:	Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm (部件号 859700-913)																
柱温:	40 °C																
流动相:	A) 50 mmol/L 甲酸铵, pH 4.5 B) 乙腈																
梯度:	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>%B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>80</td></tr><tr><td>2</td><td>75</td></tr><tr><td>48</td><td>62</td></tr><tr><td>49</td><td>40</td></tr><tr><td>51.5</td><td>80</td></tr><tr><td>52</td><td>80</td></tr><tr><td>60</td><td>80</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	%B	0	80	2	75	48	62	49	40	51.5	80	52	80	60	80
时间 (min)	%B																
0	80																
2	75																
48	62																
49	40																
51.5	80																
52	80																
60	80																
流速:	0.5 mL/min																
进样量:	1 μL (相当于 0.4 μg 蛋白质中的多聚糖)																
检测:	Agilent 1260 Infinity II FLD InstantPC: λ激发 285 nm, λ发射 345 nm 2-AB: λ激发 260 nm, λ发射 430 nm																

表 2. Agilent 6545XT Q-TOF 参数

Agilent 6545XT Q-TOF 参数	
离子源	双 AJS ESI
气体温度	150 °C
干燥气流速	9 L/min
雾化器	35 psi
鞘气温度	300 °C
鞘气流速	10 L/min
毛细管电压	3000 V
喷嘴电压	500 V
碎裂电压	120 V
锥孔电压	65 V
质量数范围	m/z 600–3000
扫描速率	1 质谱图/秒
采集模式	高分辨率 (4GHz)

结果与讨论

使用 HILIC 分离 InstantPC 和 2-AB N-糖

使用 60 分钟的方法对 Rituxan 和恩利中 InstantPC 或 2-AB 标记的 N-糖进行 HILIC 分离 (图 3 和图 4)，主要多聚糖种类的峰分离良好。Rituxan (图 3A 为 InstantPC; 图 4A 为 2-AB) 是一种免疫球蛋白 G (IgG)，具有典型的单克隆抗体 N-糖谱图，在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞产生的 Fc 区域具有一个 N-糖基化位点，主要为中性复合二天线型 N-糖与核心岩藻糖、部分 Man5 和比例相对较低的唾液酸化多聚糖。恩利为 Fc 融合蛋白，除 Fc 区域中的单个 N-糖位点外，由于融合伙伴蛋白 TNF- α 受体 (TNFR) 胞外区有两个额外的 N-糖基化位点，因此其 N-糖谱图 (图 3B 为 InstantPC; 图 4B 为 2-AB) 含有更高水平的唾液酸化多聚糖^[5]。

尽管 N-糖种类的洗脱顺序相当，2-AB N-糖的 HILIC 保留时间比 InstantPC N-糖的 HILIC 保留时间短。对于 G0F/Man5 和 Man5/G1 等经常在生物治疗药物开发过程中监测的关键物质对，使用 InstantPC 和 2-AB 标记均可得到良好分离，进而可靠地确定组成的相对百分比。G1F 异构体 G1F[6] 和 G1F[3] 也可得到分离。表 3 至表 6 中列出了相对百分比面积、标准偏差和相对标准偏差，表明 4 次样品处理重复进样之间的差异程度较低。差异程度会随多聚糖丰度降低而增加。

与 2-AB (图 4B) 相比，InstantPC 的额外优势在于使用前文所述的色谱条件时，可从恩利中分离异构体 G2S1[6]/[3] 和 G2FS1[6] (图 3B)。使用荧光检测对生物治疗药物 Rituxan 和恩利中 InstantPC 和 2-AB 标记的 N-糖进行分析，得出的主要糖型 G0F、G1F[6]/[3]、G2F、G2S2 和 G2FS2 的相对百分比面积相当。

使用 FLD 和 MS 检测 InstantPC 和 2-AB N-糖

当使用相同量的糖蛋白起始材料 (40 μ g)，且 HILIC 分离的相对进样体积 (100 μ L 试剂盒洗脱液中的 1 μ L) 相同时，InstantPC 显示的荧光和 MS 信号高于 2-AB (图 5)。InstantPC 和 2-AB 标记的 Man5 单个谱图表明 InstantPC 的 MS 信号更高 (图 6)。

表 3. 在两种不同培养基中培养的不同 CHO 克隆中测得的曲妥珠单抗生物仿制药绝对浓度

	平均相对峰面积 (%)	标准偏差	%CV
G0F-N	0.75	0.01	1.55
G0	1.47	0.02	1.18
G0F	46.82	0.07	0.15
Man5	1.21	0.01	0.83
G1[6]	0.75	0.02	2.67
G1F[6]	31.21	0.11	0.35
G1F[3]	9.27	0.05	0.54
G2F	7.04	0.04	0.51
G2FS1[6]	0.67	0.02	2.29
G2FS1[3]	0.37	0.06	15.98
G2FS2	0.45	0.03	6.67

表 4. 图 3B 用 InstantPC 标记的恩利 N-糖的相对峰面积百分比、SD 和 %CV, n = 4

	平均相对峰面积 (%)	标准偏差	%CV
G0	1.10	0.02	2.09
G0F	19.36	0.16	0.84
Man5	5.08	0.03	0.52
G1[6]	0.48	0.00	0.00
G1F[6]	10.48	0.04	0.39
G1F[3]	3.97	0.01	0.25
G2	2.08	0.01	0.55
G1FS1	1.84	0.05	2.49
G2F	4.26	0.09	1.99
G2S1[6]	1.18	0.01	0.49
G2S1[3]	13.91	0.04	0.31
G2FS1[6]	0.89	0.00	0.00
G2FS1[3]	20.54	0.08	0.37
G2S2	4.26	0.01	0.14
G2FS2	10.54	0.08	0.78

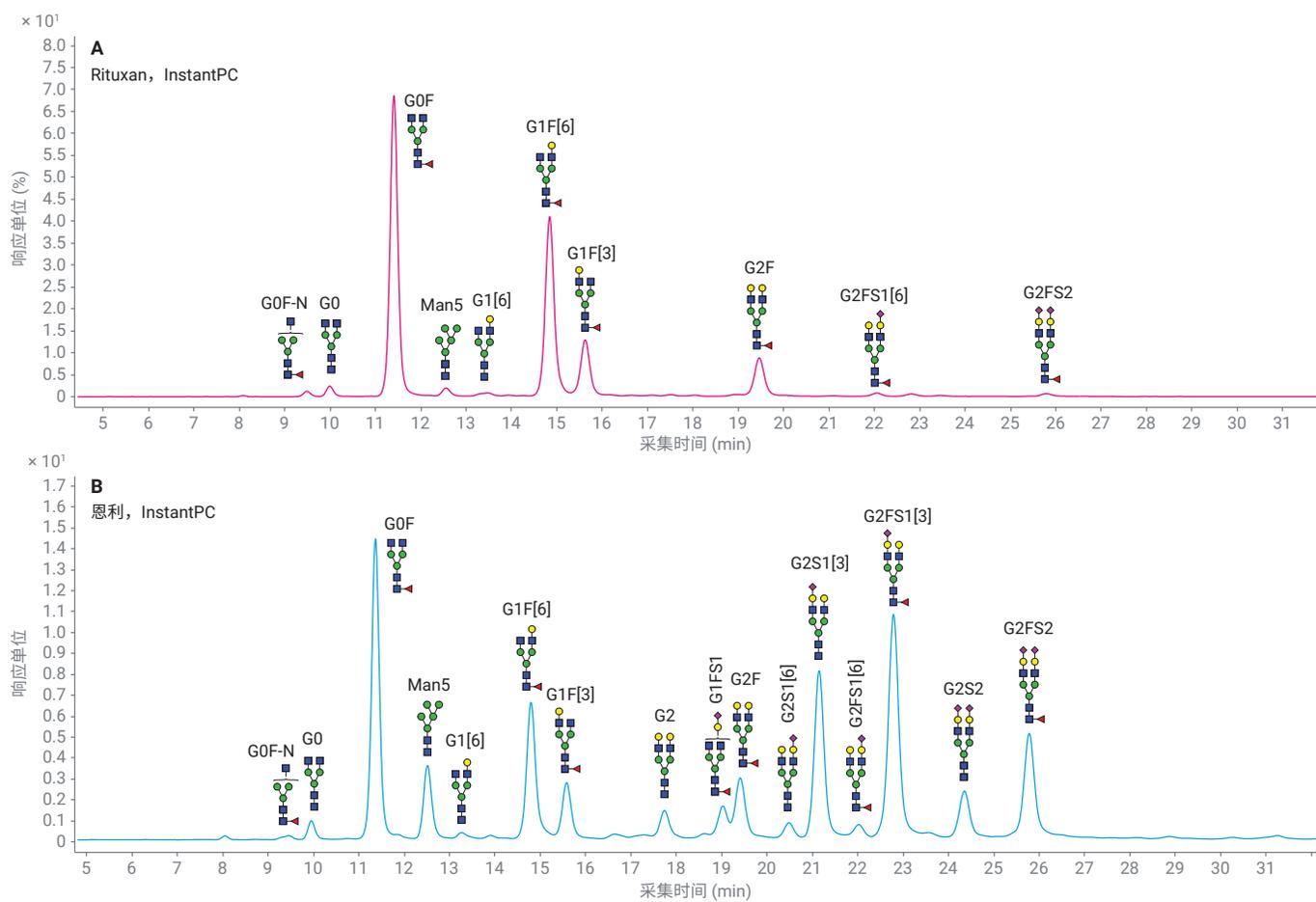


图 3. 用 InstantPC 标记的 A) Rituxan 和 B) 恩利 N-糖 HILIC-UHPLC 荧光谱图。N-糖相对面积百分比如表 3 和表 4 所示，n = 4

表 5. 图 4A 用 2-AB 标记的 Rituxan N-糖的相对峰面积百分比、SD 和 %CV, n = 4

	平均相对峰面积 (%)	标准偏差	%CV
G0F-N	0.78	0.09	11.94
G0	1.64	0.05	3.12
G0F	44.89	0.39	0.87
Man5	1.54	0.14	8.83
G1F[6]	31.39	0.09	0.27
G1F[3]	10.40	0.14	1.34
G2F	7.52	0.16	2.10
G2FS1	1.17	0.03	2.13
G2FS2	0.67	0.02	3.58

表 6. 图 4B 用 2-AB 标记的 Rituxan N-糖的相对峰面积百分比、SD 和 %CV, n = 4

	平均相对峰面积 (%)	标准偏差	%CV
G0F-N	0.32	0.02	7.44
G0	1.27	0.07	5.34
G0F	20.18	0.45	2.22
Man5	5.50	0.34	6.17
G1[6]	0.45	0.02	3.89
G1F[6]	10.35	0.33	3.18
G1F[3]	3.92	0.17	4.39
G2	2.21	0.15	6.78
G2F/G1FS1	7.00	0.25	3.63
G2S1	15.19	0.17	1.09
G2FS1	20.10	0.32	1.59
G2S2	4.19	0.25	5.95
G2SF2	9.35	0.74	7.93

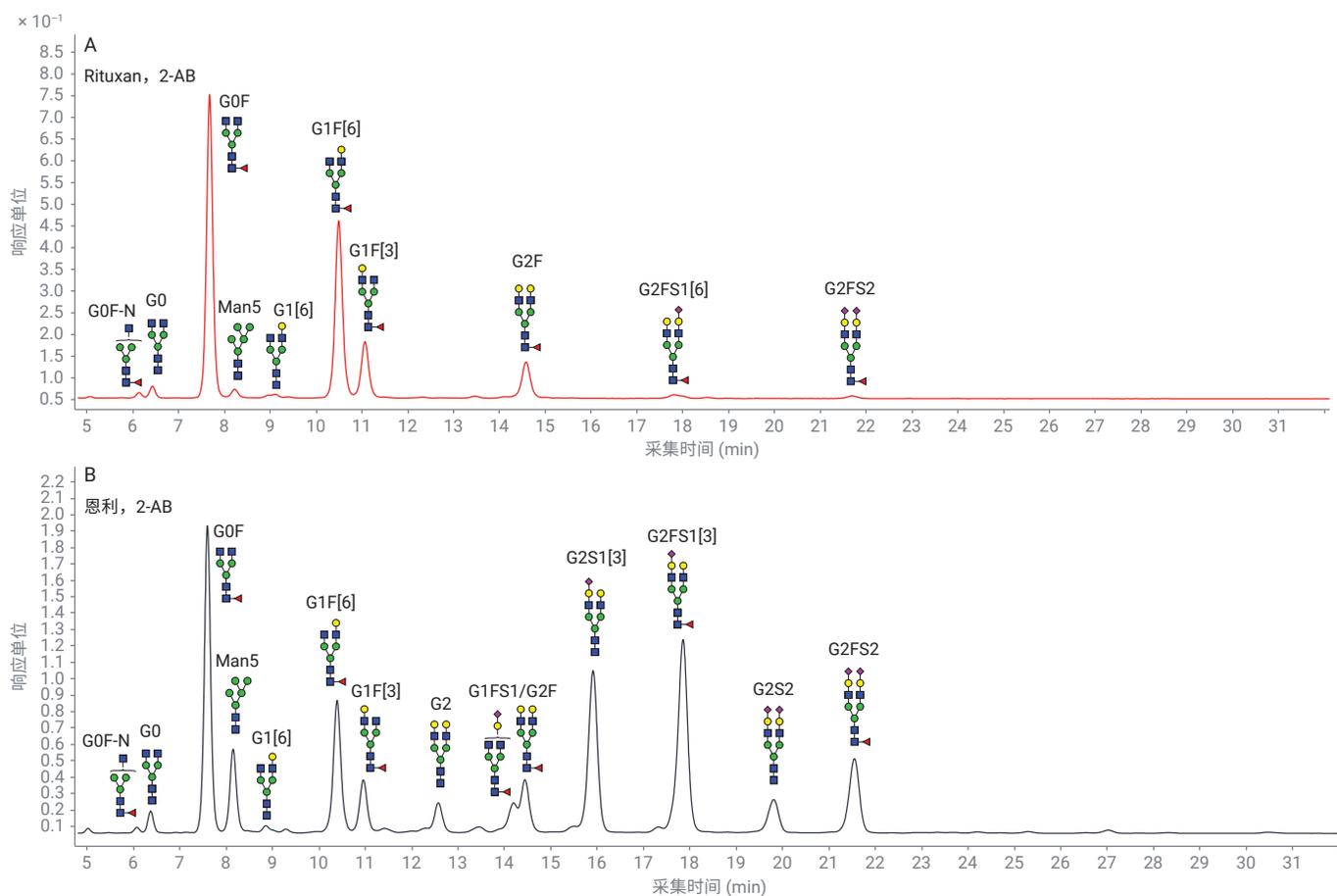


图 4. 用 2-AB 标记的 A) Rituxan 和 B) 恩利 N-糖 HILIC-UHPLC 荧光谱图。N-糖相对面积百分比如表 5 和表 6 所示，n = 4

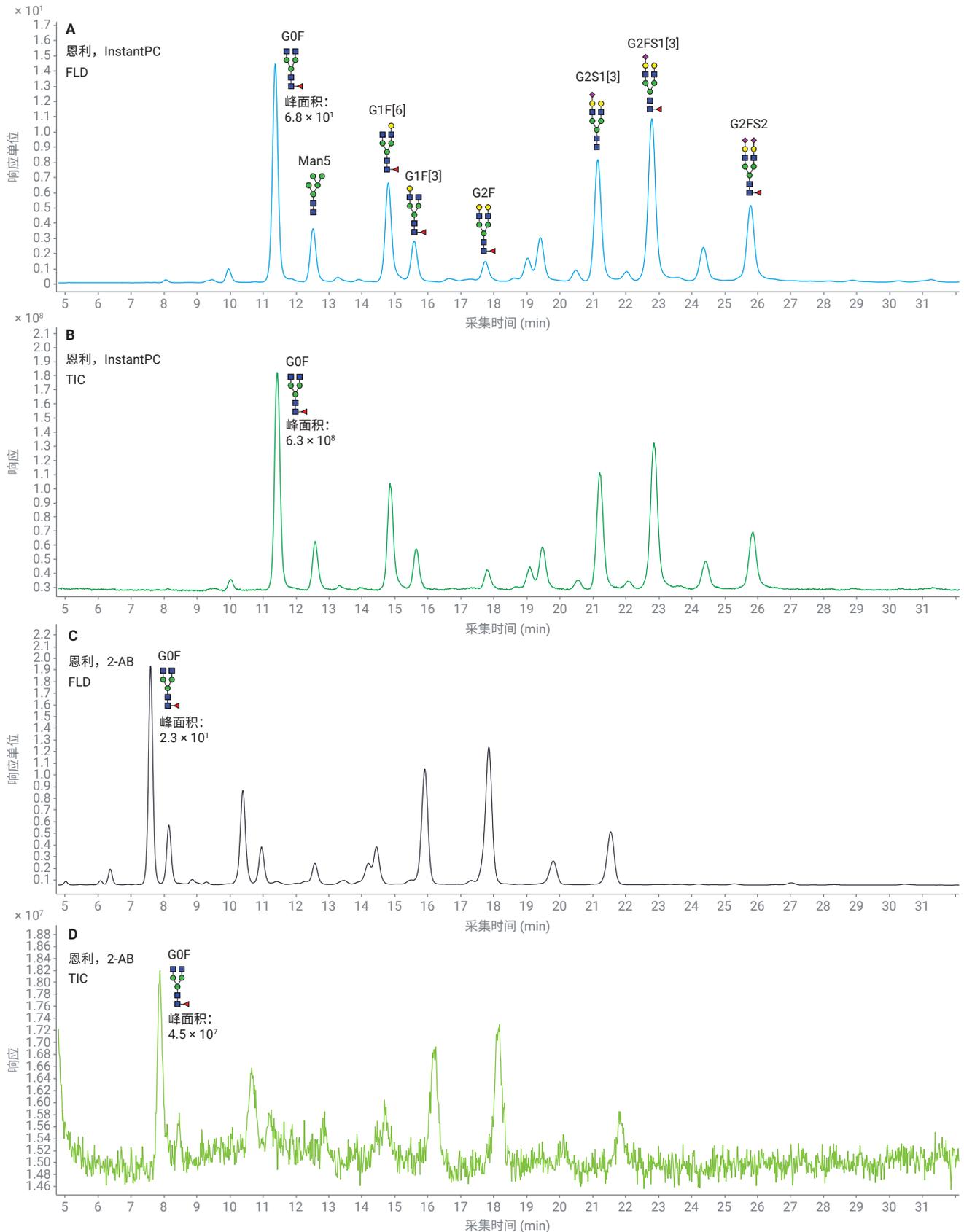


图 5. 用 InstantPC 和 2-AB 标记的恩利 N-糖的 FLD 和 MS 结果。A) InstantPC FLD; B) InstantPC 总离子流色谱图 (TIC); C) 2-AB FLD; D) 2-AB TIC

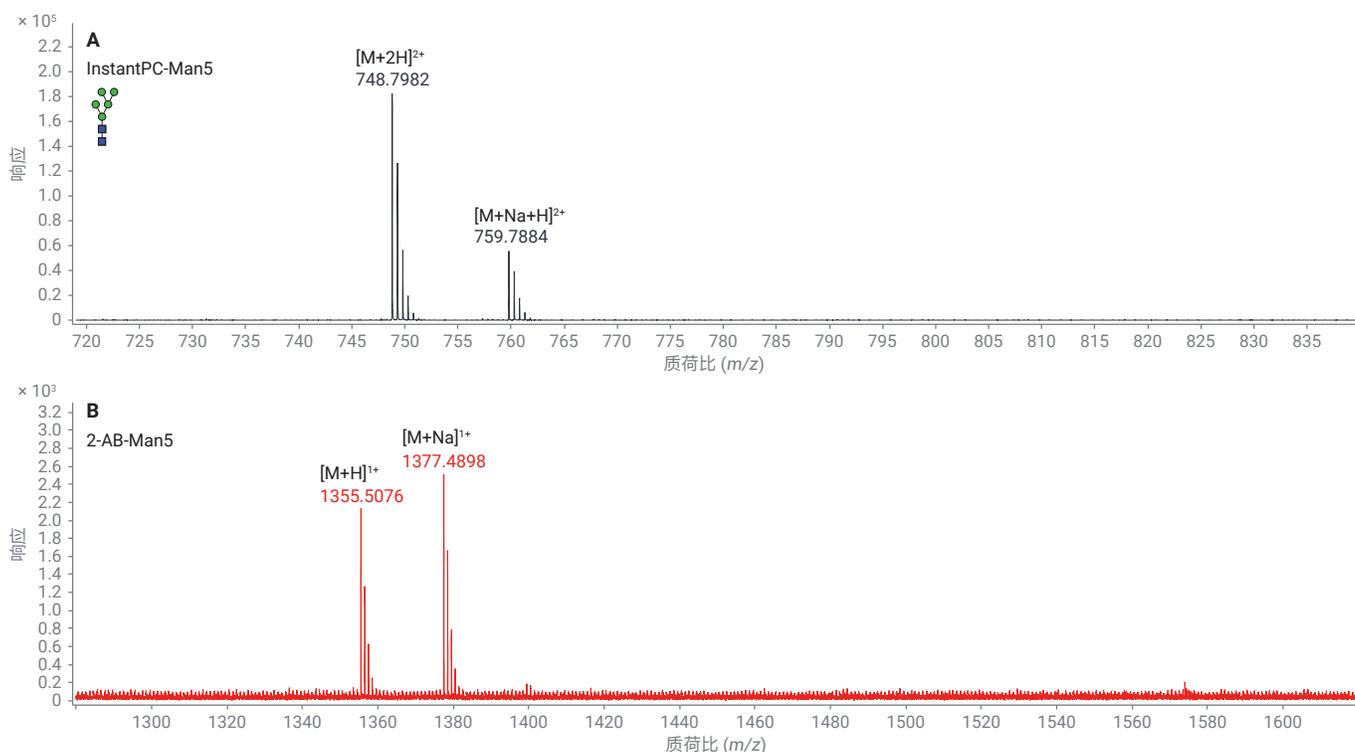


图 6. 用 A) InstantPC 和 B) 2-AB 标记的恩利 Man5 的质谱比较

结论

糖基化为许多生物治疗蛋白的特征之一，常作为必须监测的 CQA。N-糖分析在治疗性蛋白质的开发和生产中十分重要。Gly-X N-糖样品前处理工作流程可在 5 分钟内释放 N-糖，同时适合使用 InstantPC 进行糖胺标记和使用 2-AB 进行还原胺化化学标记。该工作流程可使用 InstantPC 进行即时糖胺标记，或者在无需干燥的情况下使用 2-AB 进行基质还原胺化标记。根据相对荧光峰面积百分比对多聚糖种类进行谱图分析，并使用高分辨率质谱确认峰归属。与 2-AB 相比，InstantPC 标记的多聚糖在正离子模式下显示出更高的 FLD 信号和更高的 MS 电离效率，从而能够可靠地检测低丰度的多聚糖种类。尽管 InstantPC 的性能优势明显，但 2-AB 是已使用多年的 N-糖标记。因此，快速的 2-AB 工作流程可保证与 2-AB N-糖历史数据集的连续性。

参考文献

1. Liu, L. Antibody Glycosylation and its Impact on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins. *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104*(6), 1866–1884
2. Anumula, K. R. Advances in Fluorescence Derivatization Methods for High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Glycoprotein Carbohydrates. *Anal. Biochem.* **2006**, *350*, 1–23
3. Kimzey, M. et al. Development of a 5-Minute Deglycosylation Method for High Throughput N-Glycan Analysis by Mass Spectrometry. ProZyme Technical Note, Bulletin 4001, Rev E
4. Yan, J. 等人，采用 Agilent AdvanceBio Gly-X 2-AB Express 由单克隆抗体进行用于液相色谱-荧光分析的游离 N-糖样品前处理，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-0682ZHCN，2019
5. Houel, S.; et al. N- and O-Glycosylation Analysis of Etanercept Using Liquid Chromatography and Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry Equipped with Electron-Transfer Dissociation Functionality. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 576–584

用于生物治疗药物中唾液酸分析与定量的改进工作流程

作者

Anna Fong, John Yan, Ace
G. Galermo, Tom Rice, Aled
Jones, Ted Haxo
安捷伦科技有限公司

前言

本应用简报介绍了使用 Agilent AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒（部件号 GS24-SAP）对生物治疗性糖蛋白以及 NISTmAb 中的唾液酸进行分析和绝对定量。该试剂盒使用改进的全新高通量工作流程进行前处理、分离，并检测标记有 1,2-二氨基-4,5-亚甲基二氧基苯 (DMB) 的唾液酸。N-糖或 O-糖非还原末端的唾液酸在调节生物治疗性糖蛋白的有效性中发挥着关键作用^[1]。

本文介绍的工作流程展示了使用 AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒，通过酸水解释放末端唾液酸，然后进行 DMB 标记以及定性和定量分析。样品和标准品中经 DMB 标记的唾液酸通过反相液相色谱 (LC) 进行分离，然后使用荧光检测 (FLD) 进行定量，并通过质谱 (MS) 进行结构确认。

前言

生物治疗性糖蛋白上多聚糖的组成会影响免疫原性、药代动力学和药效学^[2]。多聚糖是由单糖组成的碳水化合物，根据组成和键合位置的不同可排列成多种不同的寡糖结构。根据分子和应用的不同，末端唾液酸可能会降低清除率，降低抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 活性或具有抗炎作用^[3-5]。生物治疗药物中常见的两种形式是 N-乙酰神经氨酸 (Neu5Ac) 和 N-羟乙酰神经氨酸 (Neu5Gc)。Neu5Ac 通常为主要形态，而 Neu5Gc 不能由人类合成，它存在于生物治疗药物中使其可能具有免疫原性。因此，监测唾液酸的绝对含量以及治疗性糖蛋白中不同唾液酸种类的水平都至关重要。

本文展示了全新的高通量工作流程，其采用 96 孔微孔板对治疗性糖蛋白中的唾液酸进行释放、标记和分析，此处以利妥昔单抗、依那西普、NISTmAb 和西妥昔单抗为例。唾液酸残基被释放后，使用 1,2-二氨基-4,5-亚甲基二氧基苯 (DMB)，通过两步法进行标记。然后使用基于反相超高效液相色谱 (UHPLC) 的 10 分钟快速方法对 DMB 标记的唾液酸进行分离和分析，采用 FLD 检测进行定量，还可以选择 MS 检测进行质量分析。本工作流程可以使用唾液酸参比组合 (SARP) 对 Neu5Ac、Neu5Gc 和其他唾液酸种类进行定性表征，还可以使用包含的 Neu5Ac 和 Neu5Gc 定量标准品实现皮摩尔水平的绝对定量。本工作流程能够实现可靠且可重现的高通量样品前处理，以备唾液酸分析和定量。本试剂盒对于低唾液酸化水平的分子具有更宽的检测范围和更高的灵敏度。

实验部分

样品前处理

在 96 孔板中对样品进行前处理。通过酸水解反应从利妥昔单抗 (Rituxan, 批号 M190170)、依那西普 (恩利, 批号 M190088)、NISTmAb (批号 14HB-D-002) 和爱必妥 (西妥昔单抗, 批号 MI60886) 中释放出唾液酸。该方法无需干燥步骤，从而将整个样品前处理时间减少了 1-2 个小时。所需样品量通常为 200 µg 唾液酸化水平较低的糖蛋白或 5 µg 唾液酸化水平较高的糖蛋白。使用唾液酸参比标样 Neu5Ac 和 Neu5Gc 的连续稀释液配制标准曲线，确定分析的定量限 (LOQ) 和检测限 (LOD)。然后按照图 1 所示的工作流程，用 DMB 对游离唾液酸、SARP 和标样进行生化，释放和标记步骤在热循环仪中进行。

使用 LC/FLD/MS 分析 DMB 标记的唾液酸

使用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统对来自 Rituxan、恩利、NISTmAb 和爱必妥且经 DMB 标记的唾液酸进行反相 (RP) 分离，使用荧光检测 (FLD) 进行定量分析。所有 RP-UHPLC 分离均在表 1 中描述的条件下进行。此外，使用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 质谱仪 (表 2) 进行在线分析，以确认 SARP 中 DMB 标记的唾液酸种类的洗脱顺序。FLD 后使用固定分流器将大约 50% 的液流分至废液，50% 分至 MS。使用 Agilent OpenLab CDS 2.3 和 MassHunter 定性分析软件 10.0 进行数据分析。通过校准曲线对 Neu5Gc 和 Neu5Ac 定量。

材料

乙腈 (LC/MS 级, Honeywell Burdick & Jackson) 购自 VWR。甲醇 (Optima LC/MS 级) 购自 Fisher Scientific。使用实验室内部制备的 Nanopure 水进行所有实验。

仪器

使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱 (2.1 × 75 mm, 2.7 μm; 部件号 697775-902), 采用表 1 中的方法详细信息分离 DMB 标记的唾液酸样品。安捷伦 LC/MS 配置如下:

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent Infinity Multisampler (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)
- Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1321B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (参数见表 2)

软件

- Agilent OpenLab CDS 2.3
- Agilent MassHunter 定性分析软件 10.0

表 1. 反相 UHPLC 条件

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统条件

参数	值																												
色谱柱:	Agilent InfinityLab Poroshell 120EC-C18, 2.1 × 75 mm, 2.7 μm (部件号 697775-902)																												
柱温:	30 °C																												
流动相:	A) 甲醇:乙腈:水 (4:8:88) B) 乙腈																												
梯度:	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>%A</th><th>%B</th><th></th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>100</td><td>0</td><td>等度</td></tr><tr><td>6</td><td>100</td><td>0</td><td>洗脱</td></tr><tr><td>6.25</td><td>20</td><td>80</td><td></td></tr><tr><td>7.3</td><td>20</td><td>80</td><td>清洗</td></tr><tr><td>7.5</td><td>100</td><td>0</td><td>再平衡</td></tr><tr><td>10</td><td>100</td><td>0</td><td></td></tr></tbody></table>	时间 (min)	%A	%B		0	100	0	等度	6	100	0	洗脱	6.25	20	80		7.3	20	80	清洗	7.5	100	0	再平衡	10	100	0	
时间 (min)	%A	%B																											
0	100	0	等度																										
6	100	0	洗脱																										
6.25	20	80																											
7.3	20	80	清洗																										
7.5	100	0	再平衡																										
10	100	0																											
流速:	0.4 mL/min																												
进样量:	10 μL																												
检测:	Agilent 1260 Infinity II FLD λ激发 373 nm, λ发射 448 nm																												

表 2. Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 参数

6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 参数	
离子源	双 AJS ESI
气体温度	350 °C
干燥气流速	11 L/min
雾化器	15 psi
鞘气温度	400 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	1400 V
喷嘴电压	1800 V
碎裂电压	120 V
锥孔电压	65 V
质量数范围 (MS)	m/z 400–1000
质量数范围 (MS/MS)	m/z 100–550
采集模式	高分辨率 (4GHz)

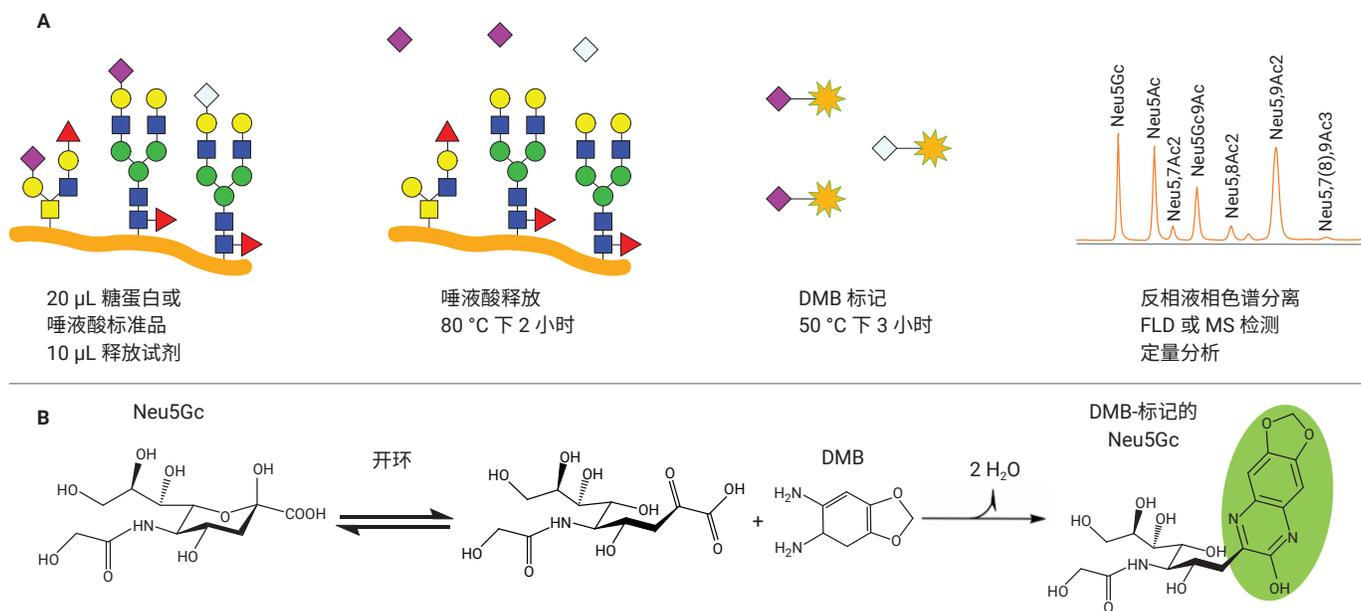


图 1. (A) 唾液酸释放和 DMB 标记工作流程概览, (B) 唾液酸 Neu5Gc 的 DMB 标记机制

结果与讨论

使用 LC/FLD/MS 分析 DMB 标记的唾液酸

对 DMB 标记的 SARP 进行 RP-UHPLC 分析, 最终分离并检测到 7 种唾液酸衍生物: Neu5Gc、Neu5Ac、Neu5,7Ac2、Neu5Gc,9Ac、Neu5,8Ac2、Neu5,9Ac2 和 Neu5,7(8),9Ac3。虽然使用不同的色谱柱、流速、溶剂或在不同的实验室条件下可能会观察到保留时间的差异, 但 DMB 衍生的唾液酸的洗脱顺序保持一致。参比组合用于在样品序列开始时评估色谱系统的分离度和准确度。图 2A 展示了 DMB 标记的 SARP 的典型 FLD 色谱图。使用质谱确认了 DMB-唾液酸衍生物的鉴定结果 (图 2B)。

分析生物治疗药物和 NISTmAb 的唾液酸含量

将工作流程应用于 Rituxan、恩利、NISTmAb 和爱必妥, 鉴定出的 DMB 标记的唾液酸如图 3 所示。Rituxan (图 3A) 和恩利 (图 3B) 主要包含 Neu5Ac, 而 NISTmAb (图 3C) 和爱必妥 (图 3D) 主要包含 Neu5Gc。来自恩利和爱必妥的 DMB 标记样品中主峰的质谱证实它们分别为 Neu5Ac 和 Neu5Gc (图 4)。

唾液酸含量的定量分析

基于 DMB 标记的 Neu5Ac 和 Neu5Gc 标准品的色谱分离和荧光响应, 生成了定量校准曲线 (图 5)。使用由 OpenLab CDS 2.3 通过 P2P 噪音计算得到的噪音计算出了 LOD 和 LOQ。基于积分峰面积确定 Rituxan、恩利、NISTmAb 和爱必妥中 Neu5Gc 和 Neu5Ac 的可检测摩尔量, 如表 3 所列。总唾液酸定量结果与通过 AdvanceBio 总唾液酸定量分析试剂盒 (部件号 GS48-SAQ) 获得的结果一致 (表 4)。与以往的 DMB 标记工作流程 (部件号 GKK-407) 相比, 此试剂盒具有更出色的性能 (表 5), 其提高了每个样品的糖蛋白浓度, 减少了分析前的样品稀释, 从而增加了 DMB 标记唾液酸的荧光信号。

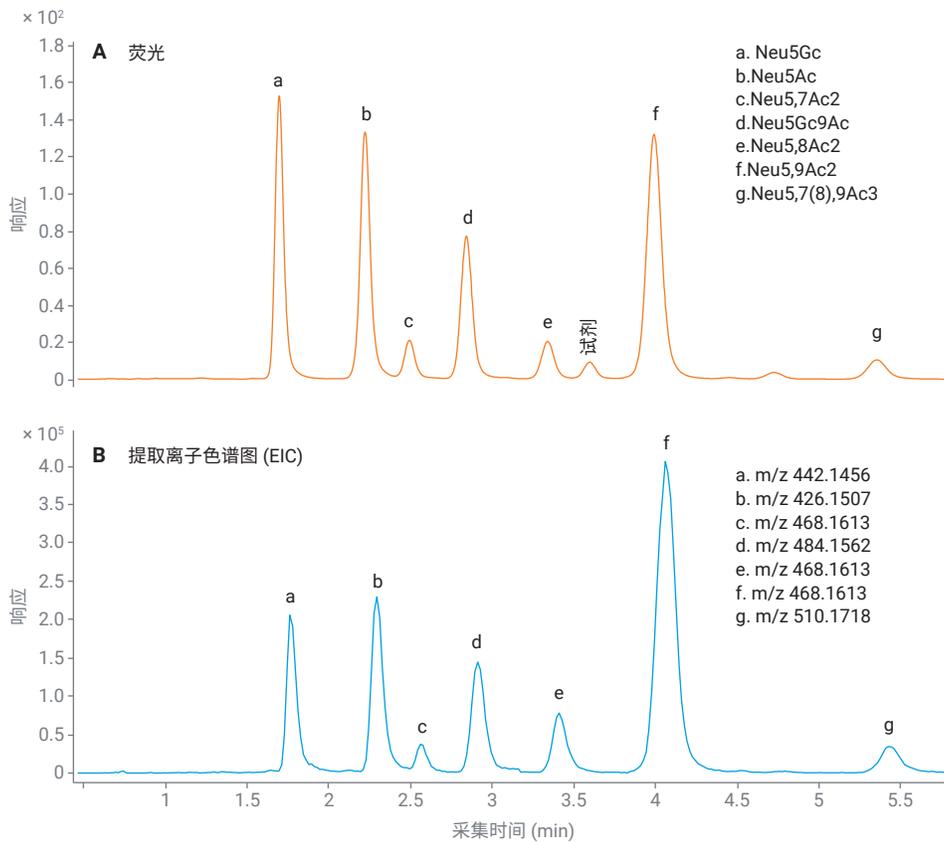


图 2. DMB 标记 SARP 的 UHPLC 色谱图。DMB 标记的唾液酸参比组合的 (A) 荧光分析谱图和 (B) 提取离子色谱图, $[M+H]^+$

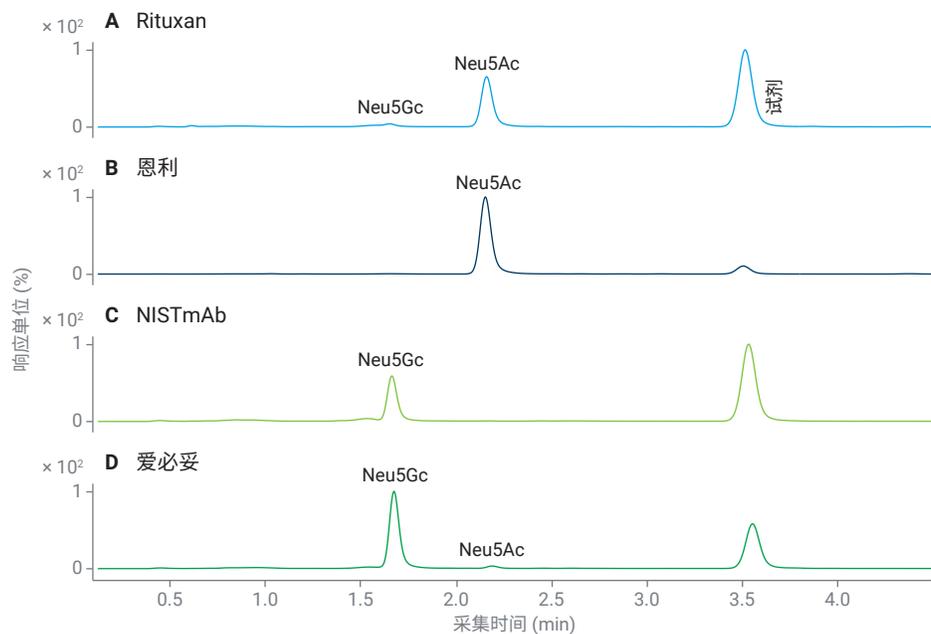


图 3. 来自不同糖蛋白的 DMB 标记唾液酸的 UHPLC 荧光谱图 (A) Rituxan; (B) 恩利; (C) NISTmAb; (D) 爱必妥

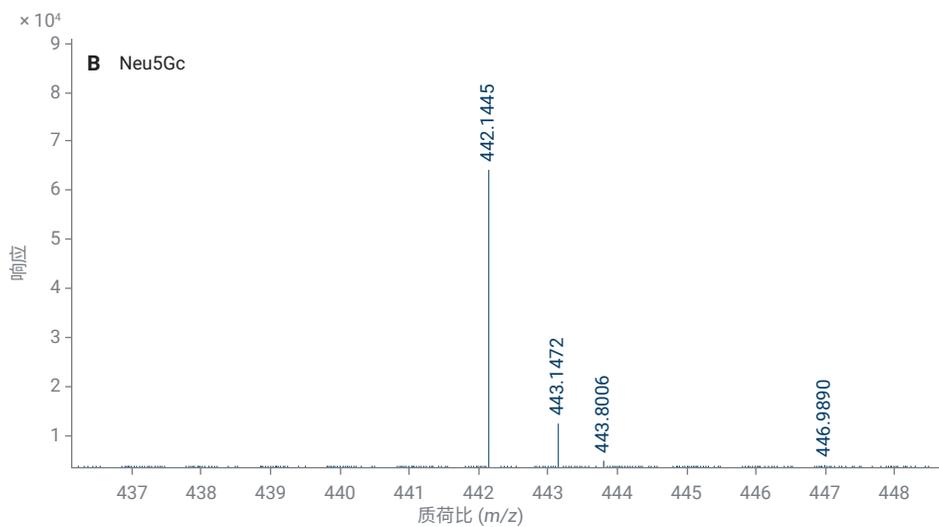
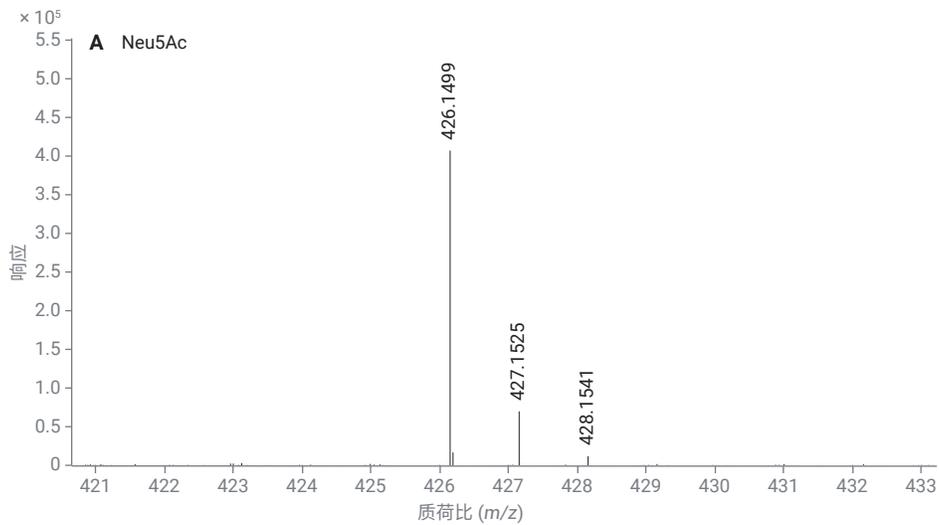


图 4. DMB 标记唾液酸的质谱图, (A) 来自恩利的 Neu5Ac; (B) 来自爱必妥的 Neu5Gc

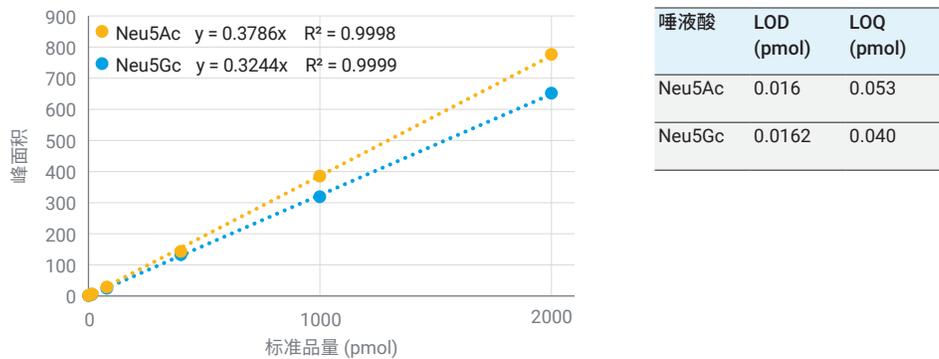


图 5. Neu5Ac 和 Neu5Gc 校准曲线, $n = 2$ 。表中显示了 Neu5Ac 和 Neu5Gc 的 LOD 和 LOQ

表 3. 表中显示了每种糖蛋白 Neu5Ac 和 Neu5Gc 的 pmol/μg 平均值, n = 3。ND = 未检出

色谱柱	浓度 (mg/mL)	样品质量 (μg)	Neu5Ac (pmol/μg)	%CV	Neu5Gc (pmol/μg)	%CV
Rituxan	10	200	0.60	4.2%	0.02	1.8%
恩利	0.25	5	228	6.9%	ND	-
NIST mAb	10	200	ND	-	0.36	1.8%
爱必妥	2	40	0.12	10.9%	3.72	7.1%

表 4. 使用 Agilent AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒 (部件号 GS24-SAP) 获得的总唾液酸 (Neu5Ac 和 Neu5Gc) 定量结果与使用 Agilent AdvanceBio 总唾液酸定量分析试剂盒 (部件号 GS48-SAQ) 获得的结果的比较, n = 3

糖蛋白	唾液酸	GKK-407		Agilent AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒	
		pmol/μg	%CV	pmol/μg	%CV
Rituxan	Neu5Gc	ND	-	40.02	1.75%
	Neu5Ac	0.58	1.12%	0.60	4.25%
恩利	Neu5Ac	226	3.57%	223	2.92%
爱必妥	Neu5Gc	ND	-	3.68	1.02%
	Neu5Ac	ND	-	0.12	4.46%
胎球蛋白	Neu5Gc	ND	-	10.9%	3.72
	Neu5Ac	201	1.47%	222	4.44%

表 5. 使用 Agilent AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒 (部件号 GS24-SAP) 获得的 Neu5Ac 和 Neu5Gc 定量结果 (pmol/μg) 与使用 Signal DMB 唾液酸标记试剂盒 (部件号 GKK-407) 获得的结果的比较, n = 3。ND = 未检出

峰	Agilent AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒		Agilent AdvanceBio 总唾液酸定量分析试剂盒	
	(pmol/μg)	%CV	(pmol/μg)	%CV
Rituxan	0.62	4.17%	0.47	5.04%
恩利	220	1.65%	210	12.34%
爱必妥	3.80	7.26%	3.49	0.69%
胎球蛋白	226	4.45%	232	7.39%

结论

AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒提高了对唾液酸化水平较低的蛋白质的分析灵敏度，例如在 Fc 区域具有单个 N-糖基化位点的单克隆抗体。更新后的 DMB 标记工作流程消除了样品干燥步骤，减少了样品前处理时间。

该工作流程为确定生物治疗药物中 Neu5Ac 和 Neu5Gc 的绝对和相对含量提供了一种出色方法。采用 96 孔板进行高通量样品前处理，并且具有高重现性。定量分析数据与以往的 DMB 标记工作流程 (GKK-407) 和 AdvanceBio 总唾液酸定量分析试剂盒 (GS48-SAQ) 结果相当。

参考文献

1. Varki, A. Sialic Acids in Human Health and Disease. *Trends Mol. Med.* **2008**, *14*(8), 351–360
2. Liu, L. Antibody Glycosylation and its Impact on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins. *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104*(6), 1866–1884
3. Li, Y. *et al.* Sialylation on O-glycans Protects Platelets from Clearance by Liver Kupffer Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2017**, *114*(31), 8360–8365
4. Scallon, B. J. *et al.* Higher Levels of Sialylated Fc Glycans in Immunoglobulin G Molecules can Adversely Impact Functionality. *Mol. Immunol.* **2007**, *44*(7), 1524–1534
5. Kaneko, Y. *et al.* Anti-inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. *Science* **2006**, *313*, 670–673

使用荧光检测和质谱检测对单克隆抗体 N-糖相对定量结果的比较

作者

Oscar Potter 和
Gregory Staples
安捷伦科技有限公司
Santa Clara, California, USA

前言

本应用简报介绍了使用 Agilent AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒（部件号 GS24-SAP）对生物治疗性糖蛋白以及 NISTmAb 中的唾液酸进行分析和绝对定量。该试剂盒使用改进的全新高通量工作流程进行前处理、分离，并检测标记有 1,2-二氨基-4,5-亚甲基二氧基苯 (DMB) 的唾液酸。N-糖或 O-糖非还原末端的唾液酸在调节生物治疗性糖蛋白的有效性中发挥着关键作用^[1]。

本文介绍的工作流程展示了使用 AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒，通过酸水解释放末端唾液酸，然后进行 DMB 标记以及定性和定量分析。样品和标准品中经 DMB 标记的唾液酸通过反相液相色谱 (LC) 进行分离，然后使用荧光检测 (FLD) 进行定量，并通过质谱 (MS) 进行结构确认。

前言

单克隆抗体 (mAb) 在细胞培养的生物合成过程中发生 N-糖修饰。典型的 mAb 包含两个 N-糖基化位点，分子的每个 Fc 区域各包含一个位点。一些 mAb 还有额外的糖基化位点，包括 Fab 区域中的 N-糖基化或 O-糖基化位点。多聚糖会影响 mAb 的功能，因此使用适当的分析方法监测糖基化谱图非常重要。

常用的多聚糖分析方法包括 NMR、CE-LIF、具备荧光检测功能 (FLD) 的 HPLC，以及最近的 LC/MS 方法。CE-LIF 和 HPLC-FLD 都需要用染料标记多聚糖，以进行光学检测。传统上，与未标记的物质相比，染料还能提高多聚糖的电离效率，但使用质谱仍只能检测到丰度最高的组分。最近开发出一种新型染料 (ProZyme 公司推出的 InstantPC，如图 1 所示)，它在一定程度上提高了荧光活性，并显著改善了质谱分析的电离效率。借助这种标签，研究人员现在可以使用质谱 (以精确质量或串联质谱的形式) 来鉴定通过 LC 分离的多聚糖。此外，他们可以选择使用质谱而非荧光检测进行相对定量。

本应用简报考察了 InstantPC 在对两种 mAb 制剂释放的 N-糖进行相对定量方面的性能。使用 ProZyme 公司推出的 InstantPC 试剂盒处理 mAb 样品，一式四份。然后在 UHPLC 系统上进行 HILIC 分离，并进行 FLD 和质谱检测。对液相色谱分离条件进行了优化，以实现更出色的色谱分离。这样做的目的是减少重叠峰的数量，否则单独使用 FLD 检测无法辨别这些峰。最终，我们能够比较两种检测方法对几乎所有重要多聚糖结构的相对定量结果。获得了所有多聚糖组分的精确质量和串联质谱图，并将其用于鉴定 mAb 制剂中存在的多聚糖。图 2 显示了完整工作流程。

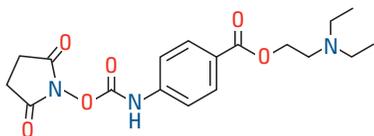


图 1. InstantPC (ProZyme 公司) 的示意图，它是一种胺类反应性即时标记，用于多聚糖的荧光和质谱检测

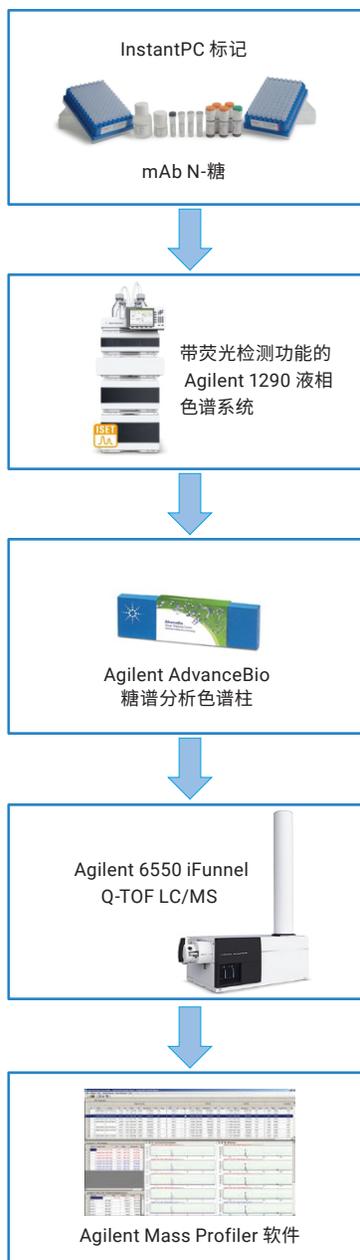


图 2. 用于鉴定和定量 mAb 中 InstantPC 标记的 N-糖的工作流程

实验部分

本研究所用的安捷伦 LC/MS 系统由下列模块组成：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 高性能自动进样器 (G4226A)，配备 Agilent 1290 Infinity 恒温箱 (G1330B)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1321B)

质谱系统

配备双雾化器 AJS 离子源的 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 系统。

色谱柱

Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱，2.1 × 150 mm，1.8 μm，与另一根 AdvanceBio 糖谱分析色谱柱，2.1 × 100 mm 连接。

软件

- Agilent PCDL Manager (版本 B.07.00 Build 7024.0) 和 Agilent Mass Profiler (版本 B.07.01 Build 99.0)
- Agilent MassHunter 工作站软件，版本 B.05.01，Build 5.01.5125.1

溶剂和样品

使用的所有试剂和溶剂均达到超高纯度。

色谱条件

参数	值														
柱温：	40 °C														
流动相：	A) 50 mmol/L 甲酸铵，pH 4.4 B) 乙腈														
梯度：	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>%B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>75</td></tr><tr><td>32</td><td>69</td></tr><tr><td>48</td><td>60</td></tr><tr><td>48.5</td><td>25</td></tr><tr><td>50.5</td><td>25</td></tr><tr><td>52</td><td>75</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	%B	0	75	32	69	48	60	48.5	25	50.5	25	52	75
时间 (min)	%B														
0	75														
32	69														
48	60														
48.5	25														
50.5	25														
52	75														
流速：	0.4 mL/min														
进样量：	2 μL 20% DMSO 溶液 (相当于 1 μg IgG)														
自动进样器温度：	4 °C														
FLD：	激发波长285，发射波长345														
柱温：	40 °C														

结果与讨论

mAb 1 和 mAb 2 的 FLD 色谱图表明，每个分子都被一组非常相似的糖型修饰，如图 3 所示。图中标注了一些结构，并根据功能性糖组学协会 (CFG)^[1] 的指南用符号进行了表示。

使用精确质量和串联质谱信息，将 FLD 峰以下列形式归属至多聚糖组分：

HxNxFxSgx + 核

H = 半乳糖或甘露糖，

N = N-乙酰氨基葡萄糖，

F = 岩藻糖，

Sg = N-羟乙酰神经氨酸，

核 = 三甘露糖苷，这是所有 N-糖共有的核心结构。

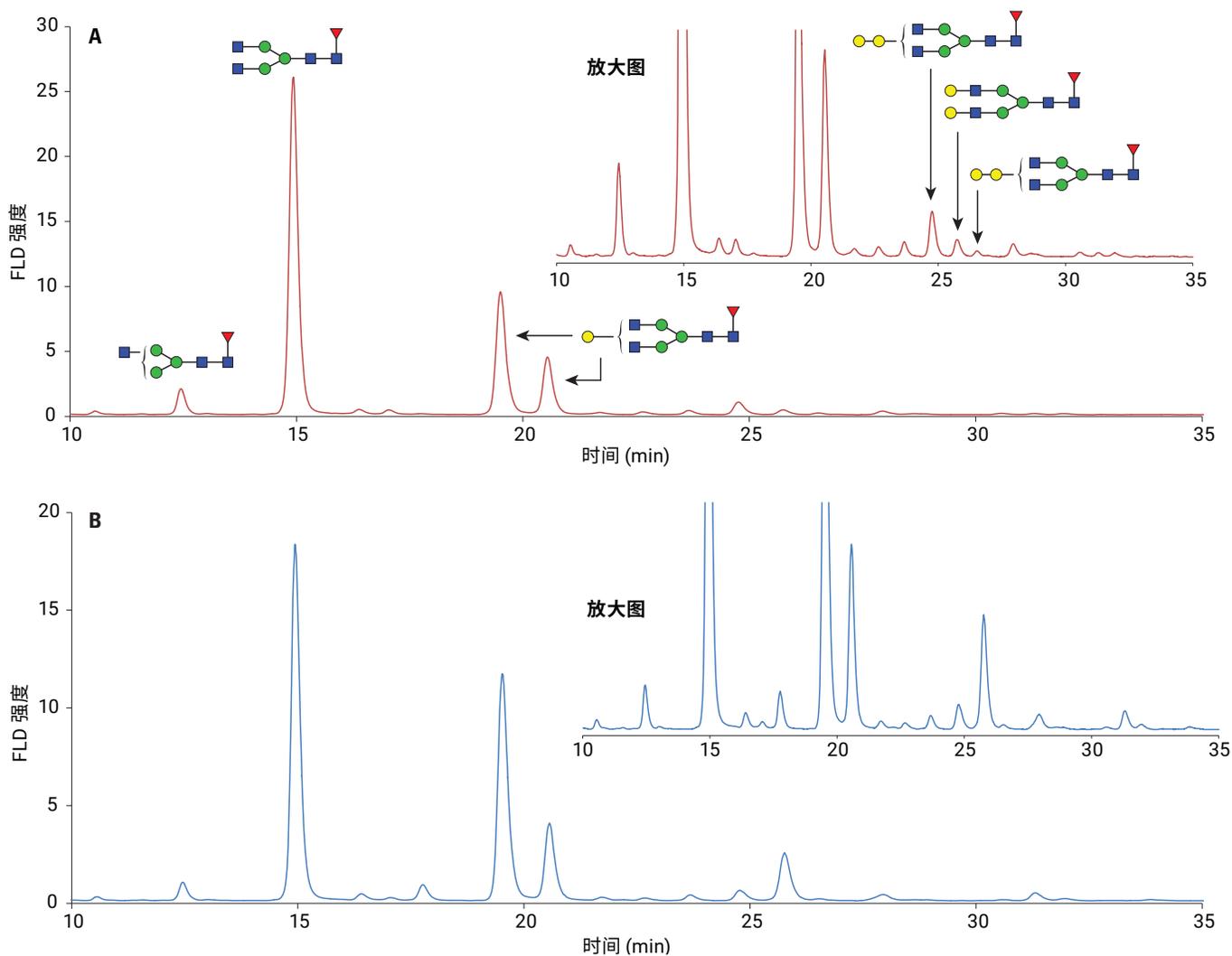


图 3. mAb 1 和 mAb 2 释放的 InstantPC 标记 N-糖的 FLD 色谱图。A) mAb 1 的 FLD 色谱图。B) mAb 2 的 FLD 色谱图

根据 FLD 色谱图的峰面积，以所有组分的总 FLD 峰面积的相对百分比之和对每种组分进行定量。结果如图 4 中的直方图所示。

总体而言，基于 FLD 数据对 21 种多聚糖组分进行了定量。FLD 定量的纳入标准为相对丰度 $\geq 0.1\%$ ，并与相邻峰适当分离。一个例外是 H2N1F1Sg1 + 核/H2N3F1 + 核。这些共洗脱组分具有足够高的丰度，满足 FLD 定量的纳入标准。因此，根据质谱测定的各峰的相对丰度，将该峰的 FLD 信号区域分为两个部分。

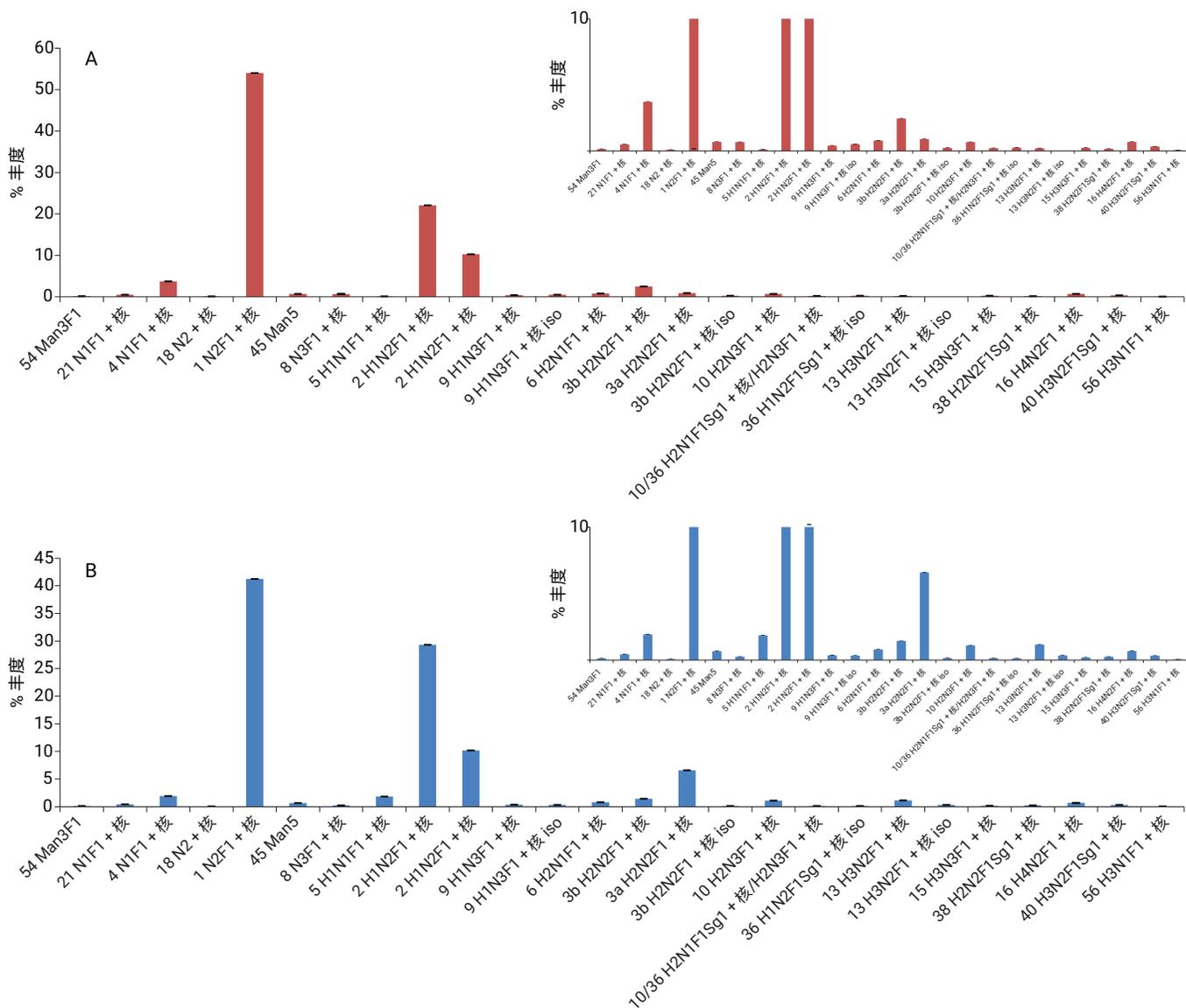


图 4. A) mAb 1 多聚糖的相对 FLD 定量结果。B) mAb 2 多聚糖的相对 FLD 定量结果。误差线表示经过完整工作流程的四次重复进样的 \pm 标准偏差。使用 Agilent MassHunter 定性分析软件对 FLD 信号进行积分。插图为相同数据的放大图，以便更好地显示相对丰度 $< 10\%$ 的组分

InstantPC 为 N-糖提供了更高的电离效率。因此，可以使用质谱检测得到的提取离子色谱图的峰面积进行相对定量。为了评估这种可能性，我们将 FLD 色谱图与离子色谱图进行了比较。从图 5 可以看出，FLD 和 MS 色谱图高度相似。检测到的每个 FLD 峰都有对应的质谱峰。

基于图 5 所示的高度相似性，我们根据质谱数据对 mAb 1 和 mAb 2 中的多聚糖进行了相对定量。使用 Agilent Mass Profiler 软件创建每个特征组分的离子色谱图（定义为质量-保留时间对，包括所有电荷态和加合物的信号）。在本例中，没有设置检测阈值下限。使用为这些实验构建的个人化合物数据库 (PCD) 鉴定了 Mass Profiler 确定的特征。

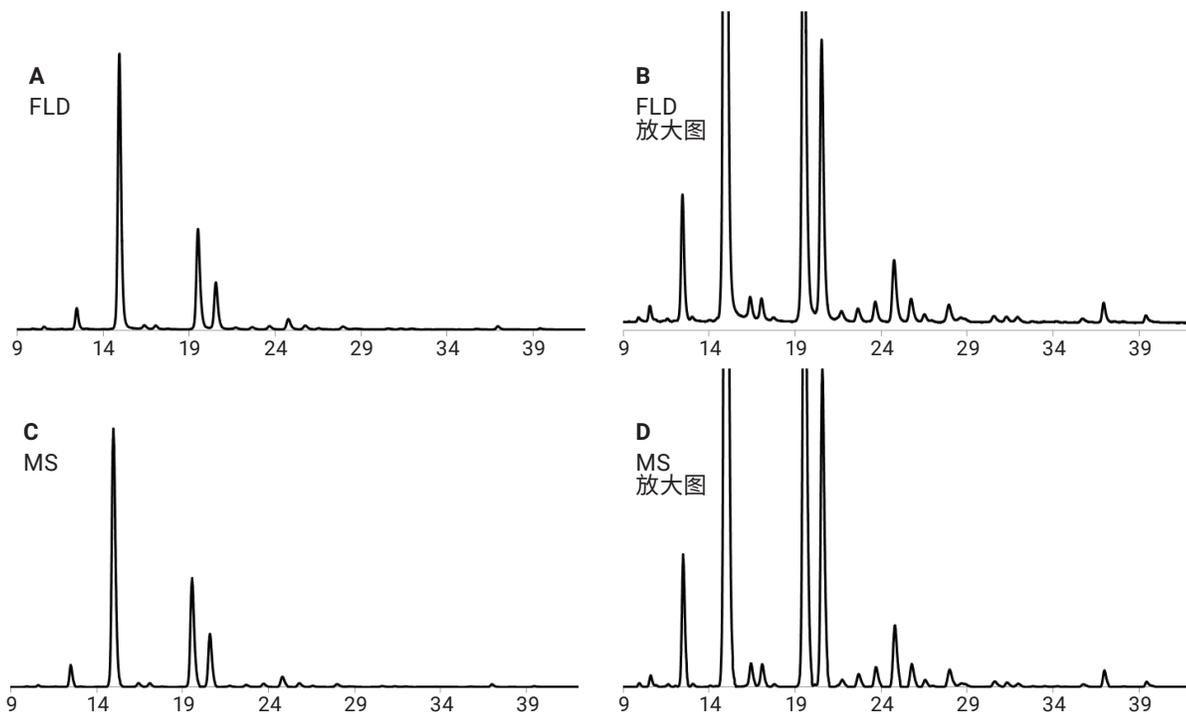


图 5. mAb 1 的 FLD 和 MS 色谱图比较。A) mAb 1 多聚糖的 FLD 色谱图。B) mAb 1 多聚糖的 FLD 色谱图放大图。C) mAb 1 多聚糖的 MS 色谱图。D) mAb 1 的 MS 色谱图放大图

PCD 包含 mAb 多聚糖的精确质量和保留时间信息。该数据库基于当前研究获得的串联质谱信息，以及多聚糖生物合成规则的知识构建。图 6 显示了使用串联质谱确定多聚糖组成的示例。需要特别注意的是，图 6B 中所示的示例说明了一种常见情况，即仅使用质量可能不足以确定组成，因为 NeuGc + 岩藻糖的质量与 NeuAc + 半乳糖的质量相等。串联质谱可以解决这一问题，因为 m/z 673 处存在的碎片离子有力地证明了该结构包含 NeuGc 天线。

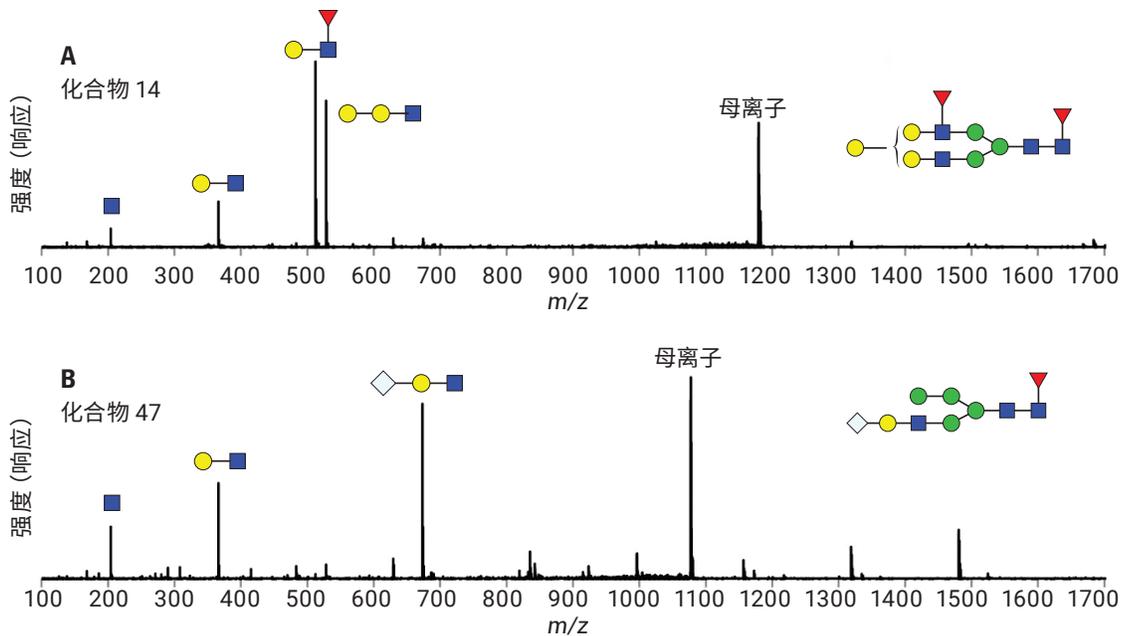


图 6. 采集了所有多聚糖的串联质谱数据。当精确质量不足以实现化合物鉴定时，MS/MS 可以提供帮助。上述两个例子与半乳糖-半乳糖和外臂岩藻糖 (A) 及 NeuGC (B) 修饰一致

图 7 显示了 mAb 1 和 mAb 2 多聚糖基于 MS 的定量结果。

借助 Q-TOF 检测提供的质量选择性，相比 FLD 检测可以定量更多组分。在本例中，总共定量了 35 种组分。对于不受丰度影响的所有特征，mAb 1 的平均 RSD 为 3.2%，mAb 2 的平均 RSD 为 3.9%。对于相对丰度大于或等于 0.1% 的特征，RSD 分别为 2.7% 和 3.4%。

最后，我们使用 FLD 和 MS 直接比较了 mAb 1 和 mAb 2 释放的多聚糖的相对定量结果。图 8 用直方图比较了每种方法的结果。

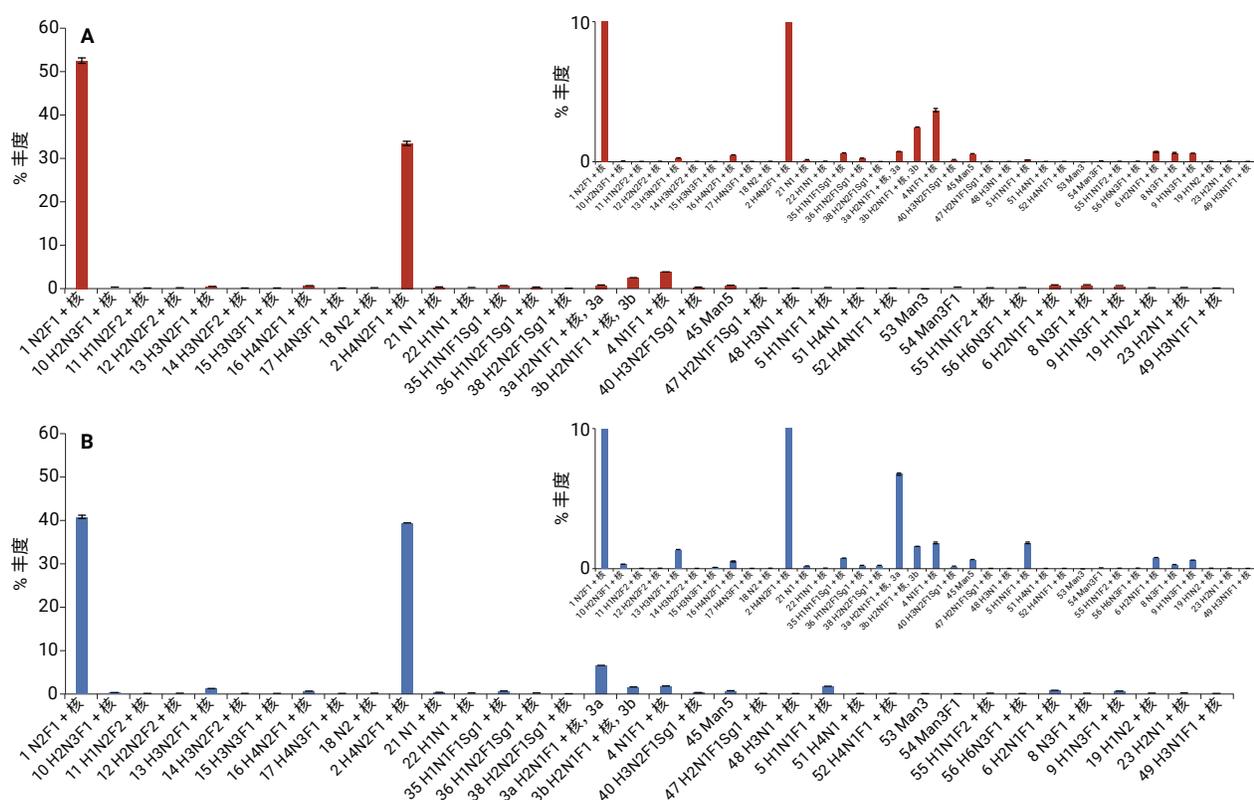


图 7. mAb 1 和 mAb 2 释放的 InstantPC 标记 N-糖的相对质谱定量结果。A) mAb 1 多聚糖的相对质谱定量结果。B) mAb 2 多聚糖的相对质谱定量结果。误差线表示经过完整工作流程的四次重复进样的 \pm 标准偏差。插图为相同数据的放大图，以便更好地显示相对丰度 < 10% 的组分

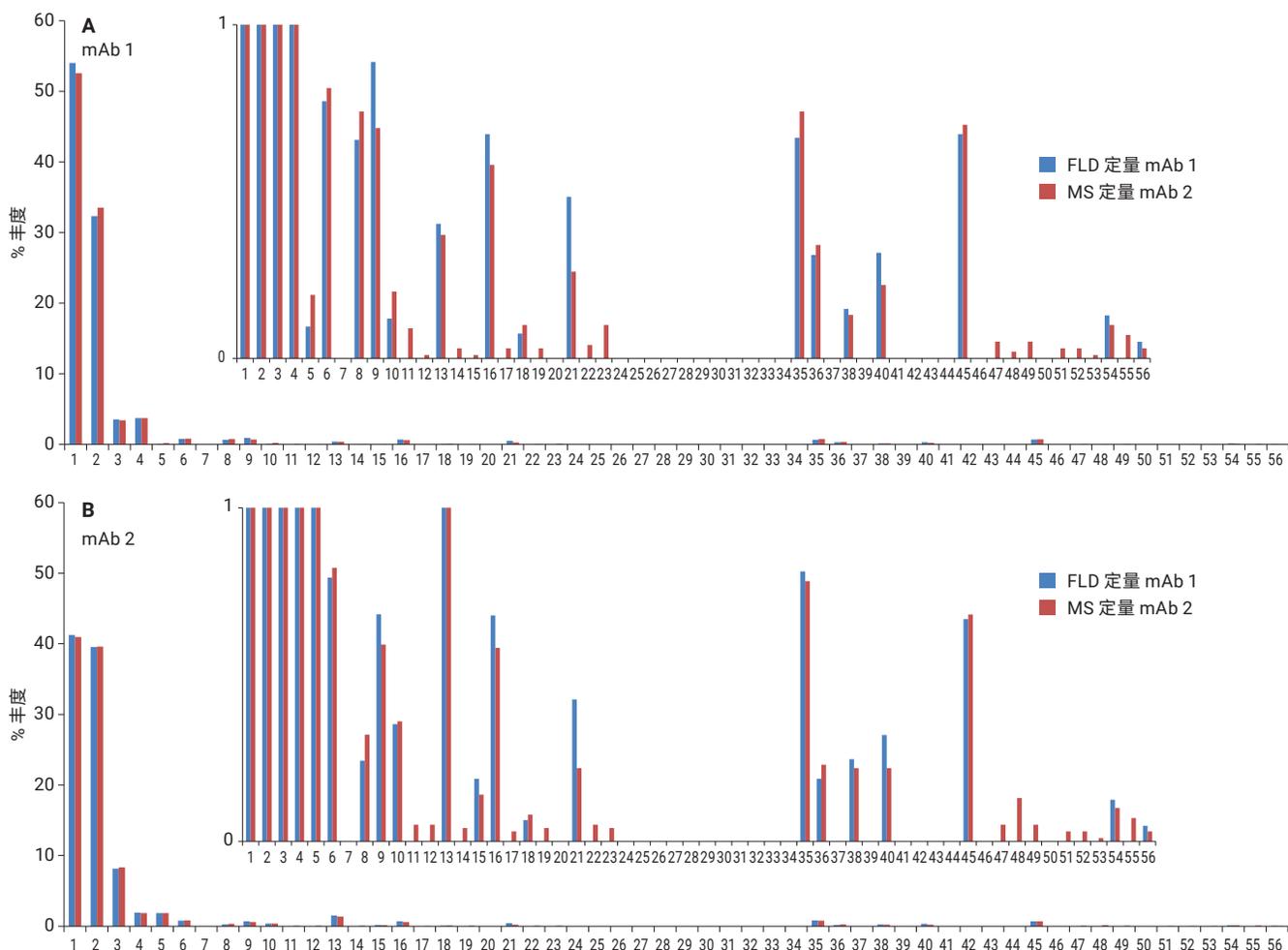


图 8. mAb 1 和 mAb 2 释放的 InstantPC 标记 N-糖的荧光和相对 MS 丰度（面积之和百分比）比较。X 轴表示研究中定量的单个多聚糖组分

结论

如图 8 所示，FLD 和 MS 的相对定量结果非常相似。两种方法获得的结果之间的微小差异可能是因为两种方法定量的组分数量不同（FLD 定量了 21 种，MS 定量了 35 种）。本研究的结果表明，Prozyme 的 InstantPC 标记与安捷伦 LC/MS 系统相结合，使研究人员能够对 mAb 释放的多聚糖进行基于 MS 的定量分析。尽管如此，FLD 可能仍然是此类化合物的检测方法金标准。在这种情况下，高质量的 Q-TOF MS 数据可以为 FLD 检测到的每种 InstantPC 标记多聚糖提供精确质量和串联质谱信息，极大地促进了峰归属。

致谢

衷心感谢 NIST 为本研究提供的两种 mAb 样品。

参考文献

1. <http://glycomics.scripps.edu/CFGnomenclature.pdf>

从样品前处理到数据分析的单克隆抗体 N-糖全面分析方法

作者

David L. Wong, Oscar Potter, Jordy Hsiao 和 Te-Wei Chu
安捷伦科技有限公司,
Santa Clara, CA, USA

前言

单克隆抗体 (mAb) 及其衍生物包含一类非常重要的生物分子，它们具有广泛的应用。由于 mAb 的异质性，必须对此类生物分子进行全面的分析表征。分析包括测定 mAb 及其异构体的完整氨基酸序列，以及糖基化、氧化和脱酰胺等翻译后修饰 (PTM) 的表征。

糖基化在许多生物过程中起着重要的作用。它还会对治疗效果、稳定性、药代动力学和免疫原性产生影响^[1]。多聚糖表征通常会涉及到 NMR、HPLC 或质谱 (MS) 等技术。由于多聚糖在组成和结构方面十分多样，并且很难采用电喷雾电离，因此基于质谱方法的多聚糖表征具有挑战性。InstantPC 是 ProZyme 公司推出的一种新型荧光标签 (图 1)，已开发用于改善 N-糖分子的 MS 电离效率和检测灵敏度。

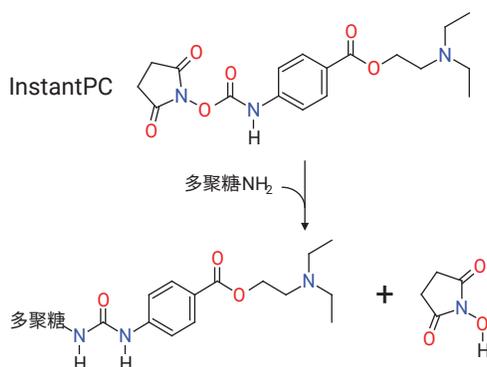


图 1. mAb 释放的 InstantPC 标记 N-糖示意图

传统的多聚糖分析方法费时费力，而且步骤繁琐，首先通过 PNGaseF 酶解释放多聚糖（过夜），然后进行样品净化，通过还原胺化反应进行荧光标记（2-AB 或 InstantPC），最后在 LC-FLD 或 LC/MS 分析之前对释放的标记 N-糖进行净化^[2,3]。尽管使用荧光标签可显著提高 MS 灵敏度，但是手动样品前处理费时费力、重现性低以及不便扩大样品处理规模是生物制药行业面临的主要问题。

本研究展示了如何使用 Agilent AssayMAP Bravo 液体处理平台增加多聚糖表征工作流程的样品通量。该解决方案结合了 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统、Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱、安捷伦高灵敏度荧光检测器 (FLD) 以及 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF。Q-TOF 数据使用 Agilent MassHunter BioConfirm B.09.00 软件自动进行分析（图 2）。该解决方案通过便捷的样品前处理、简化的数据采集和数据分析显著提高了效率，另外还可基于 FLD 或 MS 信号灵活进行定量分析，并从 N-糖质量数数据库获得精确质量峰归属结果。

实验部分

样品前处理

本研究中使用四种单克隆抗体 (mAb)：

- 单克隆抗体标准品 RM 8671，购自美国国家标准技术研究院 (NIST)，又名 NISTmAb
- 赫赛汀（曲妥珠单抗）制剂，购自基因泰克 (So.San Francisco, California, USA)
- Sigma SiLu mAb，购自 Sigma-Aldrich (SiLu Lite，部件号：MSQC4)
- 经安捷伦研发实验室表达和纯化的 CHO mAb1。配备双雾化器 AJS 离子源的 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 系统

将所有 mAb 样品用去离子水稀释至 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，之后使用 AssayMAP Bravo 液体处理系统 (G5542A) 以及带 InstantPC (96 ct) 的 GlykoPrep-plus 快速 N-糖样品前处理产品（购自 ProZyme 公司）进行样品前处理。样品前处理的详细步骤请见 ProZyme 的应用简报（产品代码：GPPNG-PC）。在最终的净化步骤之后，经洗脱、释放和标记的 N-糖最终体积为 50 μL ，因此每 1 μL 制得的样品含有 1 μg mAb 中的 N-糖。



图 2. mAb 多聚糖表征工作流程

LC/MS 分析

在配备 Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1321B) 的 1290 Infinity II 液相色谱系统, 以及配备双安捷伦喷射流离子源的 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统上进行 LC/MS 分析。将检测器设置为 λ 激发 = 285 nm, λ 发射 = 345 nm, PMT 增益 = 10。用 AdvanceBio 糖谱分析色谱柱 (2.1 × 100 mm, 1.8 μ m) 对多聚糖进行色谱分离。表 1 和表 2 列出了所采用的 LC/MS 参数。在 LC/MS 分析中每次进样约 1–2 μ L 的 N-糖样品。

数据处理

使用 MassHunter BioConfirm B.09.00 软件的游离多聚糖工作流程对经 InstantPC 标记的游离 N-糖进行分析。分析工作流程中采用安捷伦个人化合物数据库 (PCD) 多聚糖数据库。PCD 多聚糖数据库能够提供准确的多聚糖鉴定和确认结果。最后, 使用 BioConfirm B.09.00 软件中的报告生成器程序生成 PDF 格式的分析物总结报告。

表 1. 液相色谱参数

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统条件

参数	值
色谱柱:	Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.1 × 100 mm, 1.8 μ m
柱温:	40 °C
恒温箱:	4 °C
溶剂:	A) 50 mmol/L 甲酸, 用氢氧化铵将 pH 调至 4.5 B) 乙腈
梯度:	时间 (min) %B 0–0.5 75–71 0.5–1.6 71–67.5 1–22 67.5–60 22–22.5 60–40 22.5–23.5 40 (0.7 mL/min) 23.5–24 40–75 (0.7 mL/min) 24–30 75 (0.9 mL/min)
流速:	0.4 mL/min
进样量:	2.0 μ L

使用 Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1321B)。

将检测器设置为 λ 激发 = 285 nm, λ 发射 = 345 nm, PMT 增益 = 10。

表 2. 质谱采集参数

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统	
气体温度	150 °C
干燥气流速	9 L/min
雾化器	35 psi
鞘气温度	300 °C
鞘气流速	10 L/min
毛细管电压	3000 V
喷嘴电压	500 V
碎裂电压	120 V
锥孔电压	65 V
采集模式	低质量数范围, HiRes (4 GHz)
质量数范围 (MS)	m/z 300-1700
采集速率	2 质谱图/秒

结果与讨论

对释放的标记多聚糖进行 LC-FLD 分析是测定药用蛋白糖基化最常用的方法之一。我们在之前发布的应用简报中展示了使用各种色谱柱尺寸和运行条件对几种 mAb 多聚糖结构的优化分离^[4,5]。本报告中的分离方法代表了本研究中几种不同 mAb N-糖样品的理想总体性能，即具有出色的峰分离度和优异的稳定性。

图 3 所示为 NISTmAb N-糖的代表性色谱图 (FLD 和 MS EIC)。FLD 色谱图 (图 3 上图放大图) 表明检测到 15 个以上的多聚糖峰。丰度较高的多聚糖 (例如 G0F、G1F 异构体和 G2F) 糖基化模式的荧光和质谱数据相近 (图 7)。

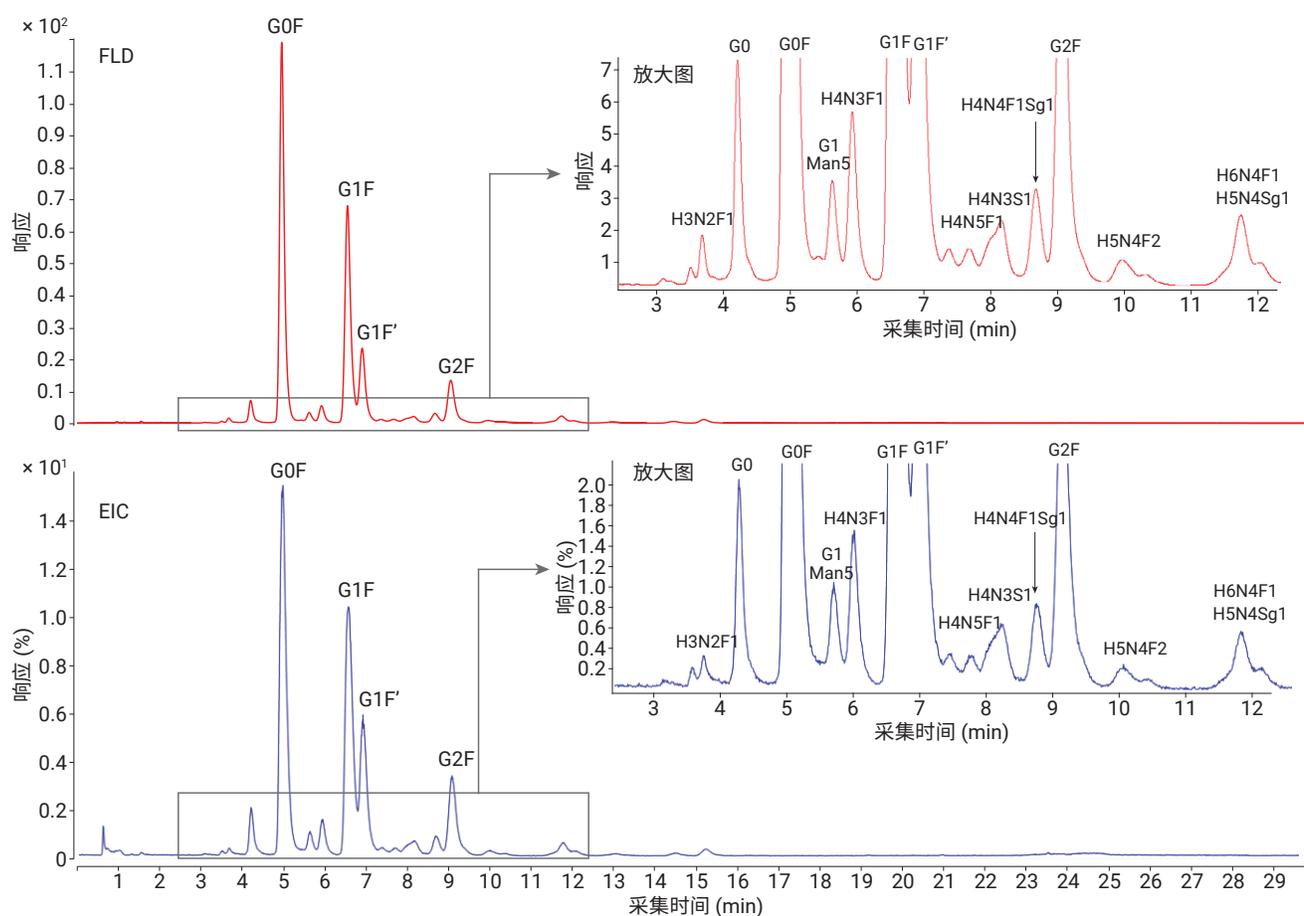


图 3. NISTmAb 得到的 InstantPC 标记 N-糖的 FLD 色谱图和质谱图 (EIC)

虽然荧光检测不能直接进行结构解析，但 mAb 多聚糖的质谱分析可以用于确定多聚糖的单糖组成。即使在有很多 mAb N-糖的情况下，这一组成信息也足够获得可信度较高的结构归属结果。带正电荷的 InstantPC 标签和高灵敏度安捷伦喷射流 (AJS) 电喷雾电离 (ESI) 离子源技术的结合显著提高了 N-糖的质谱检测灵敏度。此外我们优化了质谱参数，在大幅提升 InstantPC 标记 N-糖灵敏度的同时，大大减少了不稳定分子的源内裂解。

经优化的条件大大提高了质谱图的质量，从而实现准确的 N-糖鉴定和相对定量结果。图 4 所示为一个 InstantPC 标记 N-糖 (G2F) 的质谱图，其中只观察到其质子化形式的双电荷离子 $[M+2H]^{2+}$ 及其加合物 $[M+H+Na]^{2+}$ 和 $[M+H+K]^{2+}$ (请注意：InstantPC 标签与多聚糖的自由还原末端形式相比具有 261.1477 Da 的质量数增加)。

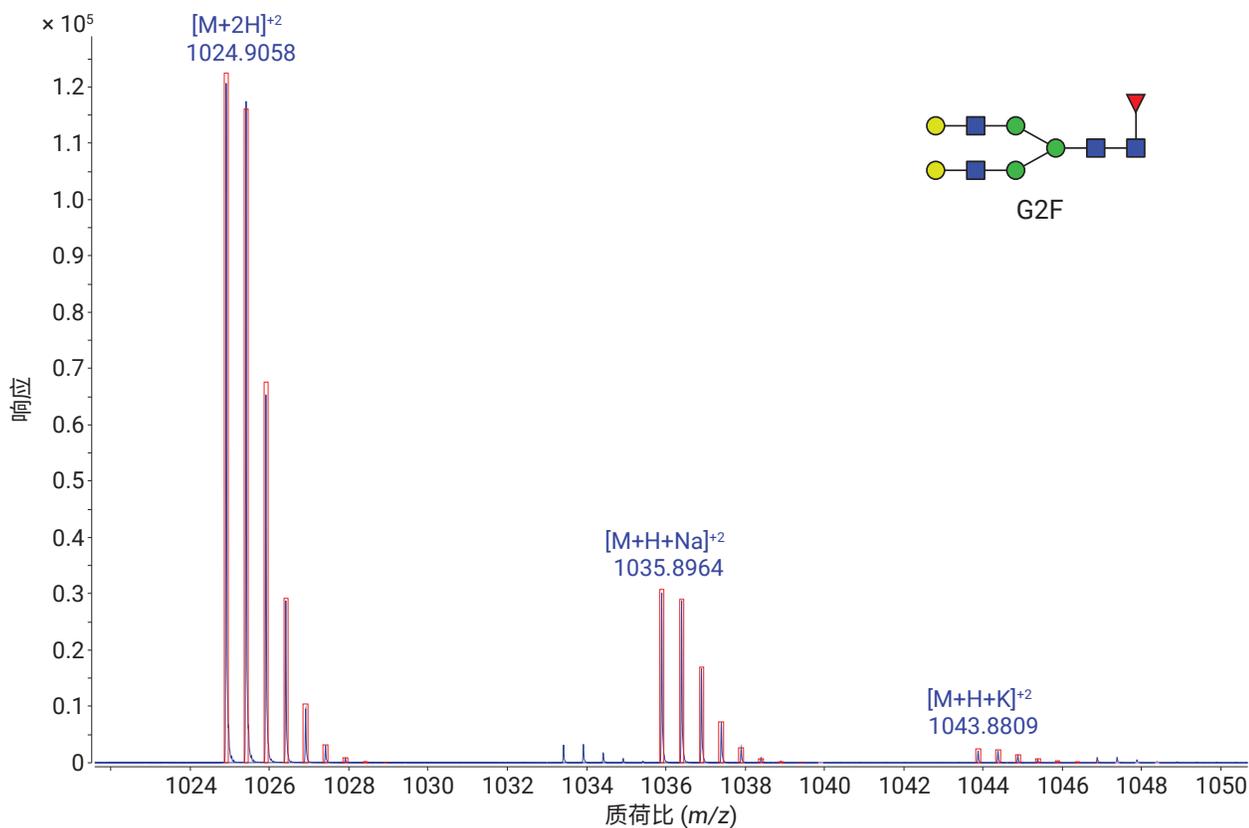


图 4. InstantPC 标记 N-糖 (G2F) 的代表性谱图。InstantPC 标记 G2F 多聚糖及其加合物的电荷态具有优异的同位素保真性。红色方框代表理论同位素模式，蓝色方框代表实际的原始质谱图

我们在 MassHunter BioConfirm 软件中引入一个用于游离多聚糖分析的工作流程。这一工作流程能够轻松设置样品的批量分析。该软件适用于各种市售或定制的荧光标签。个人化合物数据库 (PCD) 包含多聚糖的精确质量和结构信息，用于凭借安捷伦独特的分子式查找算法进行鉴定。随后，可以客户自定义的报告格式创建总结分析报告。图 5 所示为鉴定出的多聚糖的提取离子色谱图 (EIC)。

BioConfirm 中的生物分子结果表 (图 6) 方便快速查看详细的多聚糖信息，包括名称、质量数、保留时间、峰面积、组成和数据库匹配得分。对于可能有异构体结构的多聚糖显示了多个 ID。这使用户能够查看样品的 TIC 和各个多聚糖的质谱图。另外，多个数据文件也可以批量模式进行处理和分析。用户可以使用结果表中选中多聚糖的峰面积进行相对定量分析。

之前的研究证明，InstantPC 标记的多聚糖在 MS 和 FLD 分析中得出了相似的相对定量分析结果^[4]。使用 Agilent MassHunter 定性分析软件对 CHO mAb1 样品的 FLD 色谱图进行积分。计算丰度较高的前 7 个 N-糖的相对总丰度，并与质谱分析中所得的相同数据进行比较 (图 7)。为得到等效结果，不要使质谱检测器饱和。该工作流程的理想进样量是约 0.5 μg mAb 中释放的 N-糖。

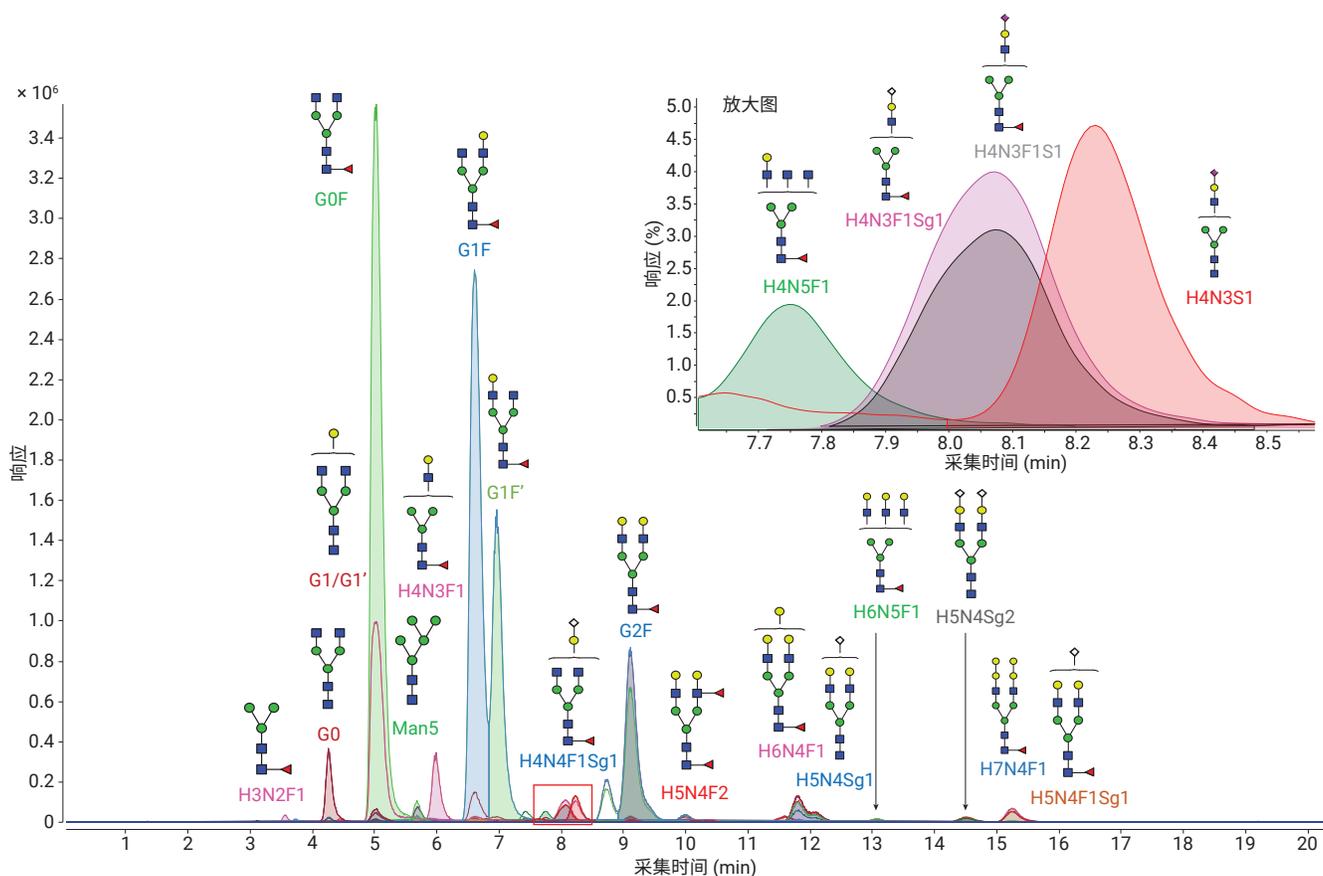


图 5. NISTmAb 中鉴定的多聚糖提取离子色谱图。插图：所鉴定多聚糖在 7.6–8.6 min 的保留时间范围内洗脱的 EIC 放大图

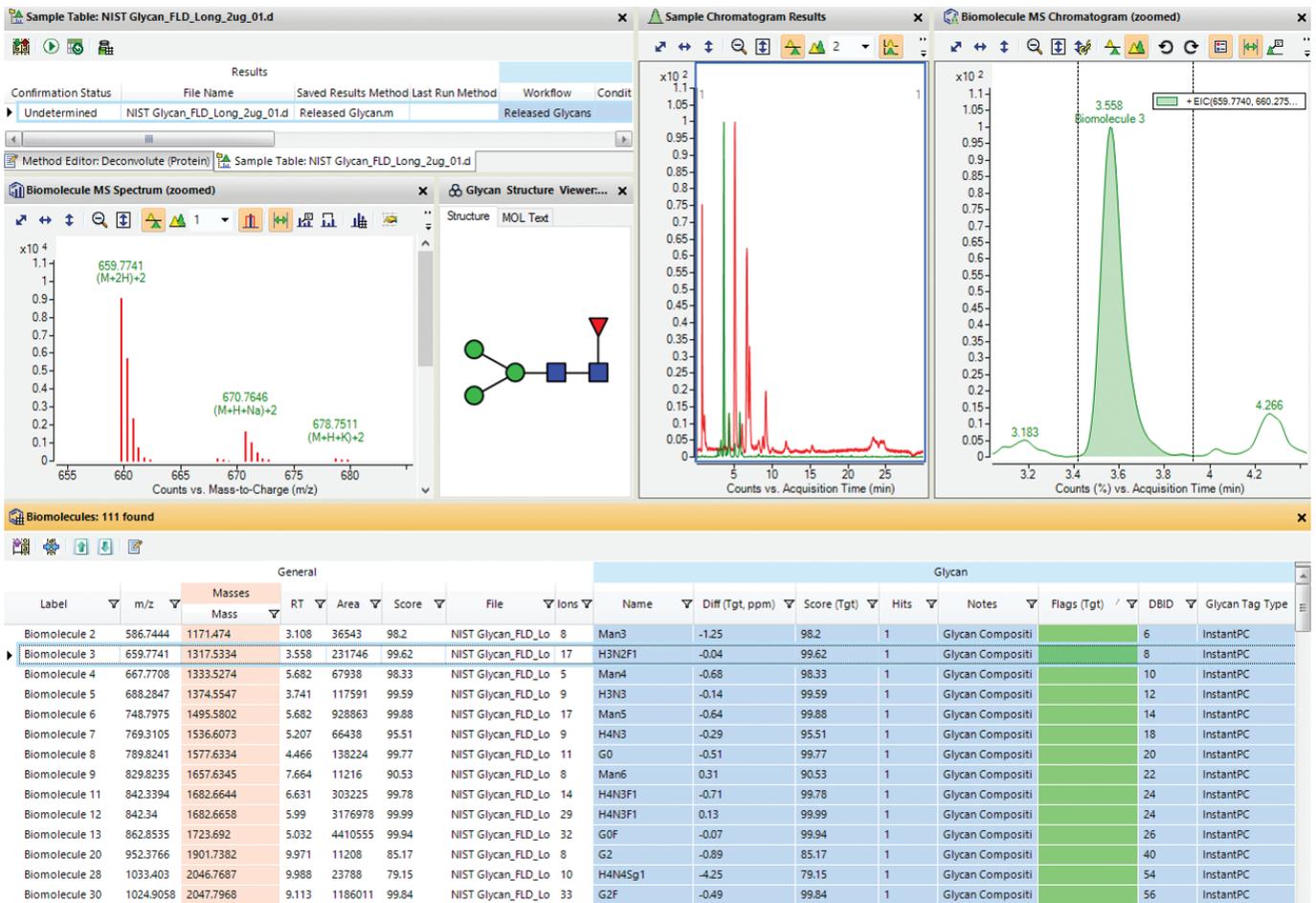


图 6. Agilent MassHunter BioConfirm B.09.00 软件与代表性糖谱结果的截图

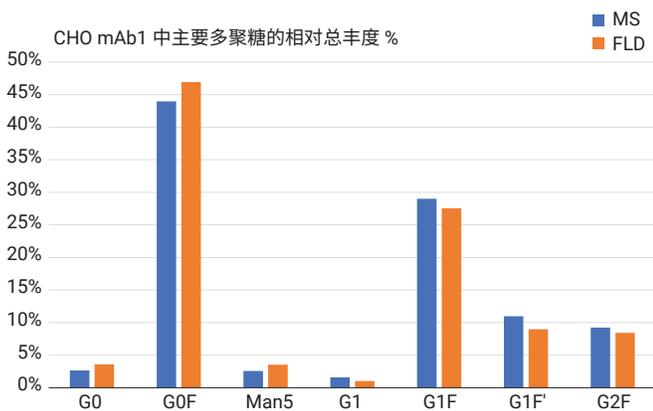


图 7. CHO mAb1 (0.5 µg) 中主要 N-糖的相对总丰度 %, 以及 MS 检测量 (蓝色) 和 FLD 检测量 (橙色) 的结果对比

为总结和比较质谱结果，使用每种 mAb 样品中丰度较高的 5 个 N-糖来计算相对总丰度 %。图 8 所示为得到的数据。

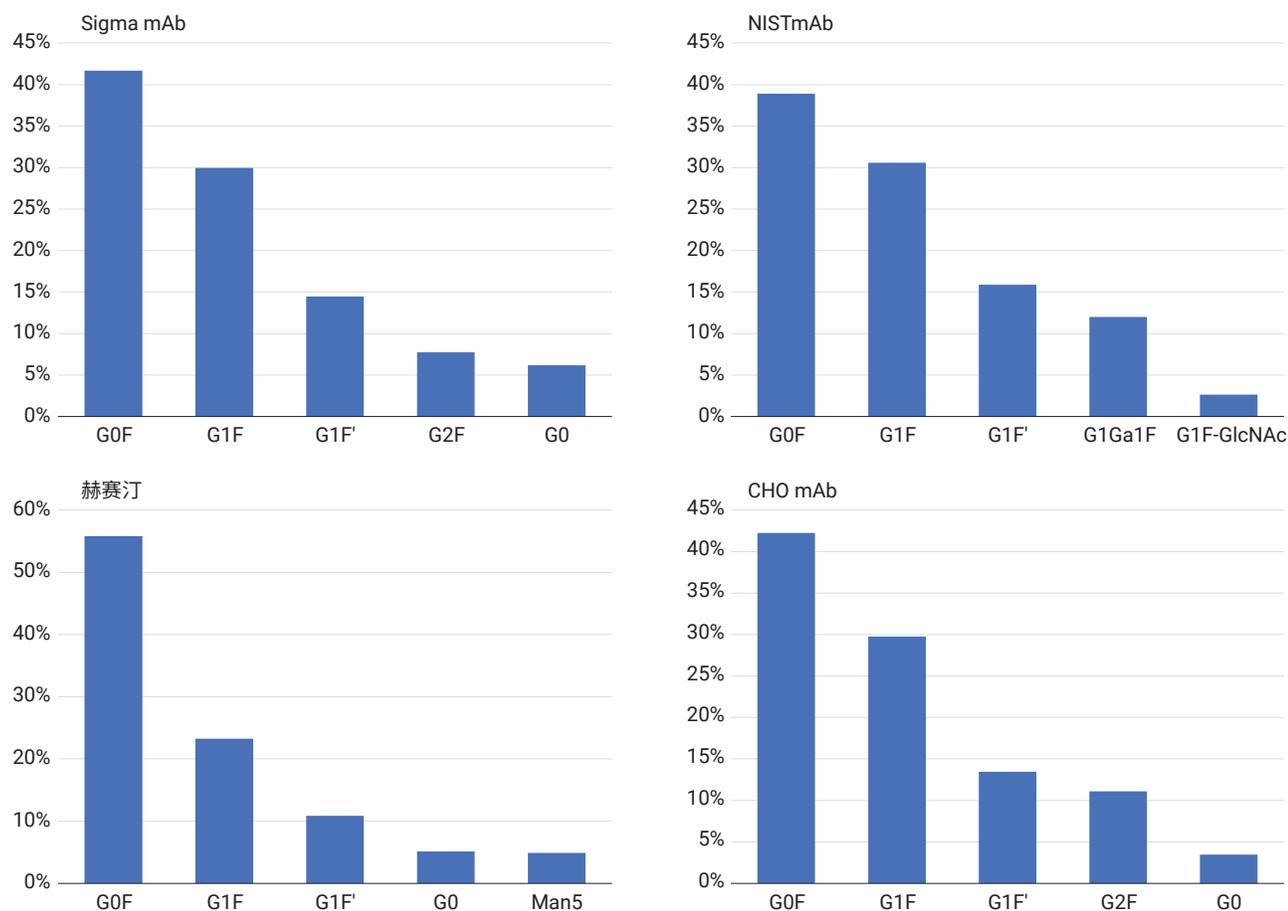


图 8. 四种 mAb 样品中丰度较高的 5 个 N-糖的相对总丰度 %
 注：NISTmAb 中含有疑似 G1F 的结构，另外还有标记为 G1Ga1F 的 α -1,3-半乳糖

BioConfirm B.09.00 软件允许用户使用报告生成器程序来生成自己的糖谱报告。图 9 所示为游离多聚糖报告的一个示例。在报告生成器中，用户可以使用样品信息、样品色谱图、生物分子总结与生物分子详情等信息来自定义报告页面。相应的多聚糖结构与所鉴定的多聚糖一同显示。

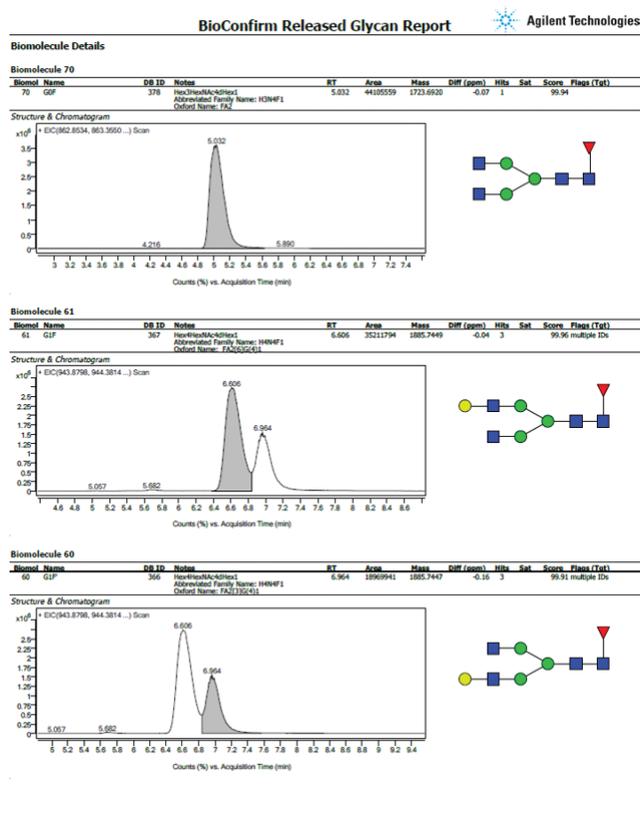
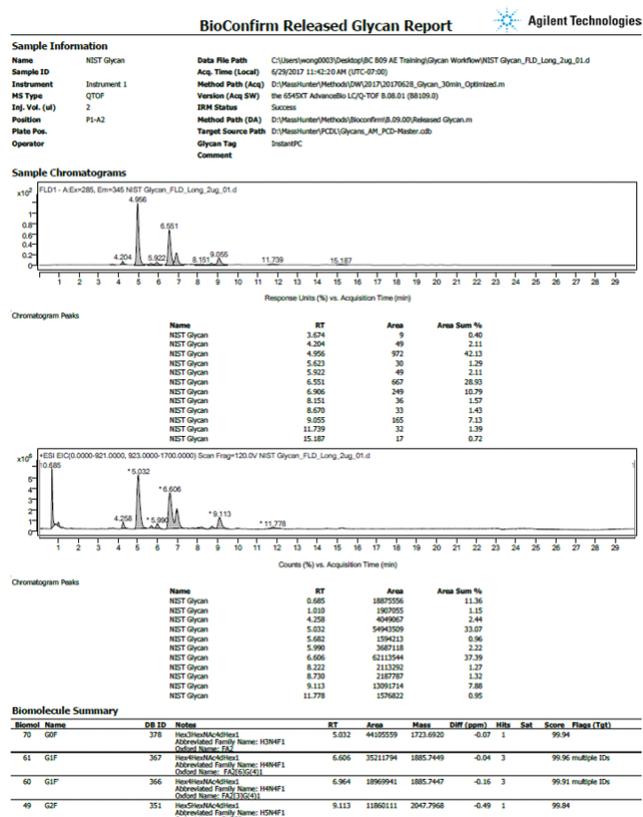


图 9. Agilent MassHunter BioConfirm B.09.00 软件 — 游离多聚糖报告

结论

本研究展示了 Agilent AssayMap Bravo、6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 和 MassHunter BioConfirm 软件作为游离多聚糖分析集成解决方案的优异性能。

- 该工作流程在实现高通量样品前处理的同时，还使用 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱获得优异的色谱分离结果
- BioConfirm B.09.00 包含的多聚糖数据库易于设置和使用，具有准确分析、鉴定和执行相对定量的功能
- 使用 6545XT 多聚糖分析能够生成与荧光分析相似的定量结果，可用于比较不同 mAb 样品之间的 N-糖差异
- BioConfirm B.09.00 的报告生成器功能可以创建定制报告

总之，安捷伦的解决方案使 N-糖分析从样品前处理到高精度数据分析的整个过程实现了自动化。该方法使用荧光和额外的质谱检测鉴定手段，为多聚糖分析提供了高灵敏度和出色定量结果。

参考文献

1. Rademacher, T. W; Williams, P; DwekMark, R. A. "Agalactosyl glycoforms of IgG autoantibodies are pathogenic" *P. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 6123–6127
2. Anumula, K. R. "Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates" *Anal. Biochem.* **2006**, *350*, 1–23
3. 使用 UHPLC 和荧光检测对 mAb 和其他糖蛋白的 N-糖进行分析, 安捷伦科技公司, 出版号 5991-5253CHCN
4. Comparison of Relative Quantification of Monoclonal Antibody N-glycans Using Fluorescence and MS Detection (使用荧光检测和质谱检测对单克隆抗体 N-糖相对定量结果的比较), 安捷伦科技公司, 出版号 5991-6958EN
5. 使用安捷伦 LC/MSD XT 通过荧光检测器和稳定的质量选择检测器进行单克隆抗体的 N-糖分析, 安捷伦科技公司, 出版号 5991-8071ZHCN

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

使用快速高效的 HILIC 方法提高对复杂多聚糖结构的分析能力

作者

James Martosella, Oscar Potter, Danny Mancheno 和 Jia Liu
安捷伦科技有限公司

前言

N 连接糖基化是一种极其重要且非常复杂的翻译后修饰，因此需要在糖蛋白药物开发、处理和生产的每个阶段对其进行控制和监测。治疗性蛋白的安全性、有效性和血清半衰期等特性也会因糖基化模式的不同而受到影响，所以对这些模式进行分析是表征治疗性糖蛋白（尤其是 mAb）的一个重要环节。采用配合荧光检测的 HILIC 分离是一种非常稳健的糖基化分析方法，同时 HILIC/LC 还可与质谱联用，以获得重要的质量及结构信息。

然而，HILIC/LC 领域日益严峻的挑战之一是在较短的分析时间内实现高分离度分离。随着对提高生物表征通量的需求不断增长，研究人员正在寻找不会损失分离性能的改进分离 (HILIC) 方法。由于多聚糖包括许多密切相关的结构，因此至关重要的是尽可能提高分离度，并且最好是在较短的分析时间内。

在本研究中，我们使用一种采用酰胺化学技术的亚 2 μm UHPLC HILIC 色谱柱进行高通量糖基化分析。具体而言，我们使用配备荧光检测器的 1.8 μm , 2.1 \times 150 mm 色谱柱分析 2-AB 标记的人 IgG 和牛胎球蛋白 N-糖。实现了快速灵敏的高选择性分离，运行时间仅 9 分钟，即可提供这些复杂多聚糖的超高分离度。与目前可用的 UHPLC 糖谱分析色谱柱的运行时间比较，我们观察到在相同条件下人 IgG N-糖的分析时间缩短了 40%。

材料与amp;方法

重组人 IgG1 条件

参数	值
样品:	安捷伦 2-AB 标记的 IgG N-糖文库, 200 pmol (部件号 5190-6996)
色谱柱:	Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm (部件号 859700-913)
流动相:	A: 100 mmol/L 甲酸铵, pH 4.5; B: 乙腈
进样量:	2 μL, 溶液为 70:30 乙腈:水
柱温:	55 °C
样品恒温箱:	10 °C
检测:	荧光, 激发波长 = 260 nm, 发射波长 = 430 nm
仪器:	配备 1260 荧光检测器的 Agilent 1290 Infinity LC

牛胎球蛋白条件

参数	值
样品:	AdvanceBio 2-AB 牛胎球蛋白 N-糖文库 (部件号 GKSB-002)
色谱柱:	Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm (部件号 859700-913)
流动相:	A: 100 mmol/L 甲酸铵, pH 4.5; B: 乙腈
进样量:	5 μL (20 pmol), 溶液为 70:30 乙腈:水
柱温:	55 °C
	其他条件同上

葡聚糖分子量标准品条件

参数	值
样品:	安捷伦 2-AB 标记葡聚糖分子量标准品 GKSB-503
色谱柱:	Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm (部件号 859700-913)
流动相:	A: 100 mmol/L 甲酸铵, pH 4.5; B: 乙腈
进样量:	2 L 75:25 乙腈:水 (10 pmol 总多聚糖)
	其他条件同上

重组人 IgG1 质谱条件

参数	值
仪器:	Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS
离子源:	安捷伦双喷射流离子源
干燥气温度:	200 °C
干燥气流速:	12 L/min
鞘气温度:	250 °C
鞘气流速:	12 L/min
雾化器压力:	25 psi
毛细管电压:	3500 V
喷嘴电压:	500 V
碎裂电压:	250 V
锥孔电压:	45 V
八极杆 RF Vpp:	550 V
MS 范围:	100–1700 m/z
MS 扫描速率:	2 幅谱图/秒

工作流程见图 1。

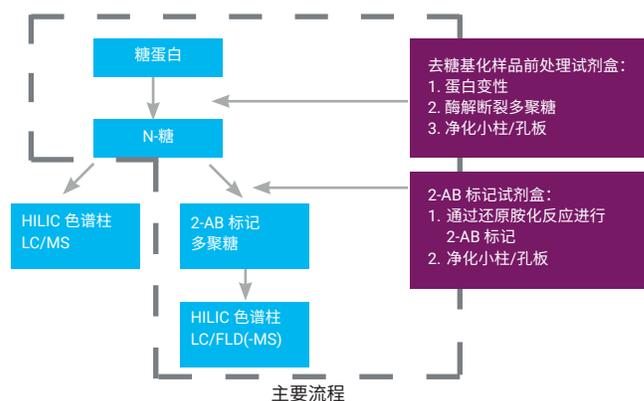


图 1. 采用 AdvanceBio 糖谱分析 HILIC 色谱柱及荧光检测进行 2-AB 标记天线型多聚糖研究的总工作流程解决方案

结果与讨论

葡聚糖分子量标准品

图 2 所示为 2-AB 标记葡聚糖分子量标准品的分离。本次分离中，均聚物系列的 20 种葡萄糖低聚物在不到 15 分钟的时间内实现了有效的基线分离。

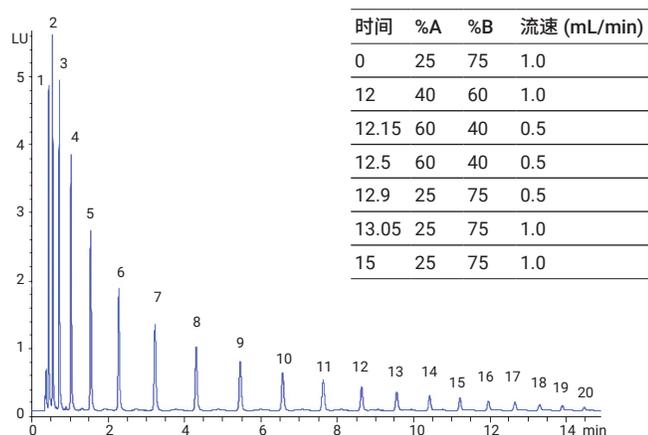


图 2. Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱在不到 15 分钟内实现 2-AB 标记葡聚糖分子量标准品的基线分离

人 IgG 多聚糖

图 3 所示为 2-AB 标记人 IgG N-糖的超高分离度分离。

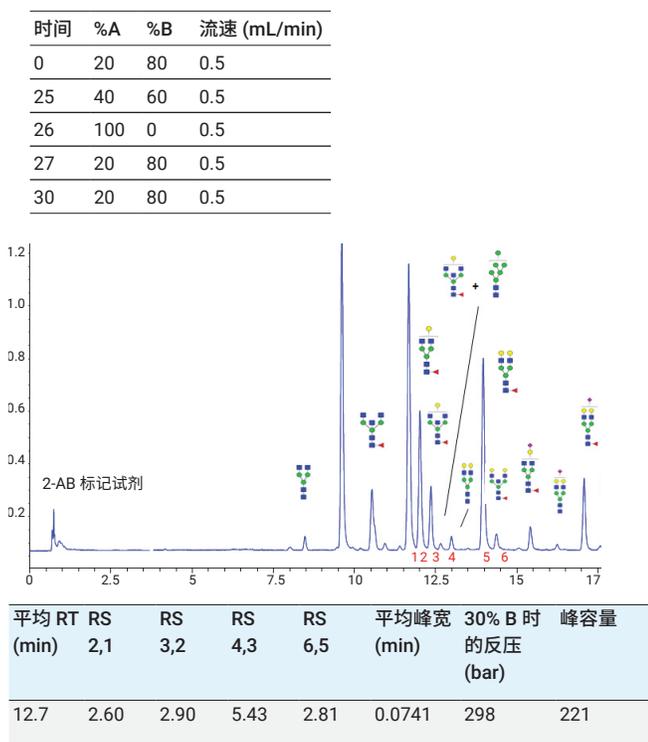


图 3. 使用 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱实现 2-AB 标记人 IgG N-糖的超高分离度分离

同时也在不到 10 分钟的时间内实现了快速分离，如图 4 所示。

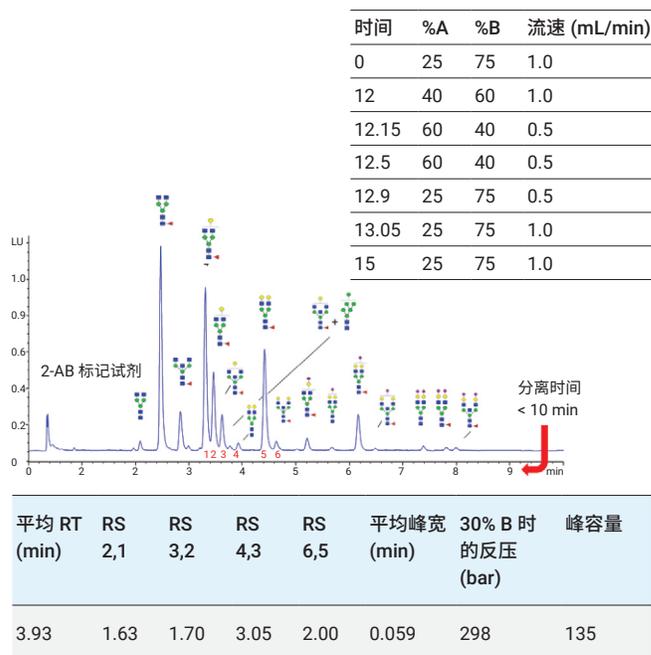


图 4. Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱在不到 10 分钟内实现 2-AB 标记人 IgG N-糖的分离

N-糖质谱

图 5 所示为人 IgG 多聚糖超高分离度分离的八张代表性质谱图。这些质谱由 Q-TOF 分析（实验）生成。所有谱图与理论质量数的误差均不超过 6 ppm。

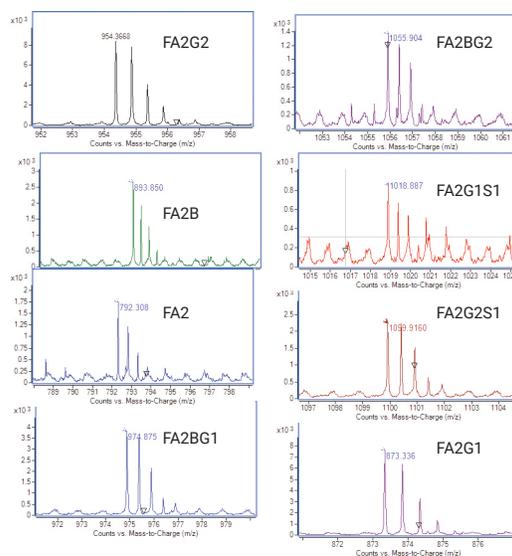
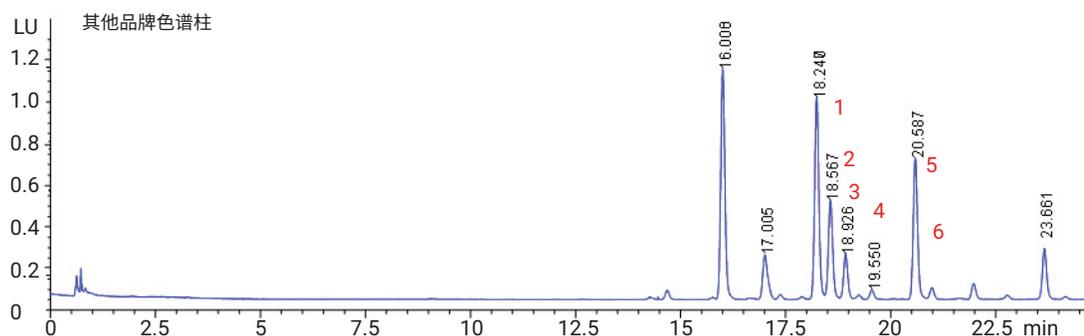
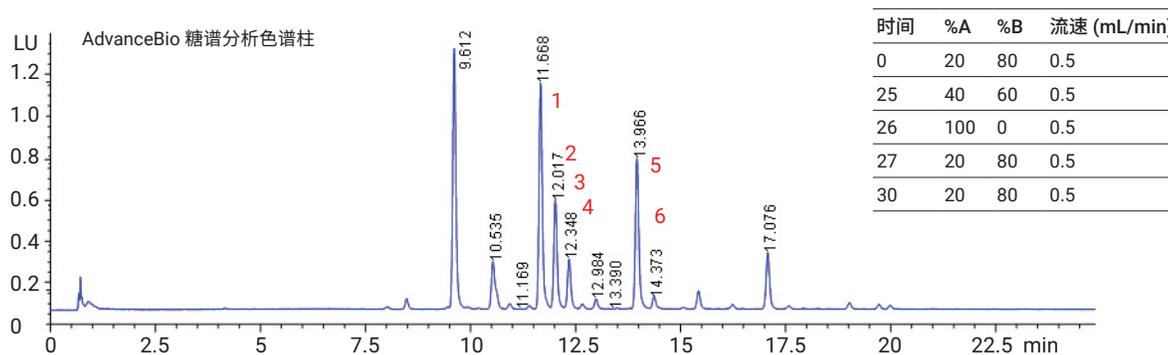


图 5. 人 IgG 多聚糖超高分离度分离的八张代表性质谱图（左图所示为荧光检测器分离）

亚 2 μm HILIC 对比

图 6 为糖谱分析酰胺色谱柱的对比结果。在相同色谱条件下，与另一品牌 2.1 × 150 mm 配置的亚 2 μm HILIC 色谱柱相比，AdvanceBio 糖谱分析色谱柱提供了更高的分离度、更窄的色谱峰和更高的峰容量，且分离时间缩短了 40 %。



色谱柱	平均 RT (min)	RS 2,1	RS 3,2	RS 4,3	RS 6,5	平均峰宽 (min)	30% B 时的反压 (bar)	峰容量
Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱	12.7	2.60	2.90	5.43	2.81	0.0741	298	221
其他品牌	20.2	1.77	1.94	3.39	2.10	0.1085	349	214

图 6. AdvanceBio 糖谱分析色谱柱提供更高的分离度、更窄的色谱峰和更高的峰容量，且分离时间缩短 40%。

胎球蛋白多聚糖

最后, AdvanceBio 糖谱分析色谱柱在分离 2-AB 标记牛胎球蛋白 N-糖中表现出快速高效的性能 (图 7)。

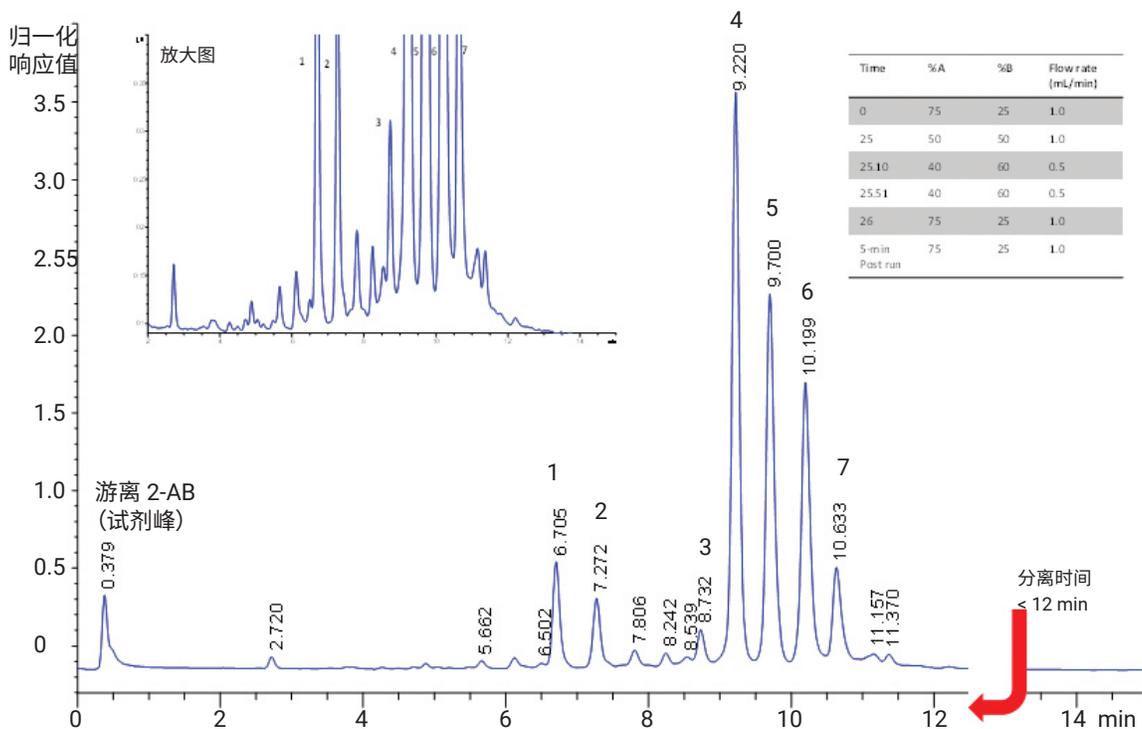


图 7. 2-AB 标记牛胎球蛋白 N-糖的快速高效分离, $2.1 \times 150\text{ mm}$ $1.8\ \mu\text{m}$ AdvanceBio 糖谱分析色谱柱

表 1. 图 7 顶部色谱图所示 2-AB 标记牛胎球蛋白 N-糖优化快速分离的多聚糖命名和结构归属

峰	保留时间	GU 值	多聚糖结构	结构
1	6.70	9.4	A2G2S2	
2	7.27	9.8	A2G2S2	
3	8.73	10.8	A3G3S3, A3G3S2 (痕量)	
4	9.22	11.2	A3G3S3, A3G3S2 (痕量)	
5	9.70	11.6	A3G3S3, A3G3S4 (痕量)	
6	10.20	12	A3G3S4, A3G3S3	
7	10.63	12.4	A3G3S4	



结论

Agilent $1.8\ \mu\text{m}$ HILIC 酰胺 AdvanceBio 糖谱分析色谱柱可实现快速、高效、分离度出色的 N-糖分离。在 $2.1 \times 150\text{ mm}$ 的配置和同样的色谱条件下, 该色谱柱能够很好地分离 2-AB 标记 IgG N-糖, 同时与另一品牌的 $2\ \mu\text{m}$ HILIC 色谱柱相比, 洗脱时间缩短 40%。通过分离 2-AB 标记牛胎球蛋白 N-糖, 展示了该色谱柱出色的分析选择性和针对这类复杂双天线和三天线多聚糖的分离能力。

致谢

本研究已在 2014 年 6 月 15 日至 19 日于巴尔的摩举行的第 62 届 ASMS 质谱与相关专题会议的海报展上展示。

使用 UHPLC 和荧光检测对单克隆抗体和其他糖蛋白的 N-糖进行分析

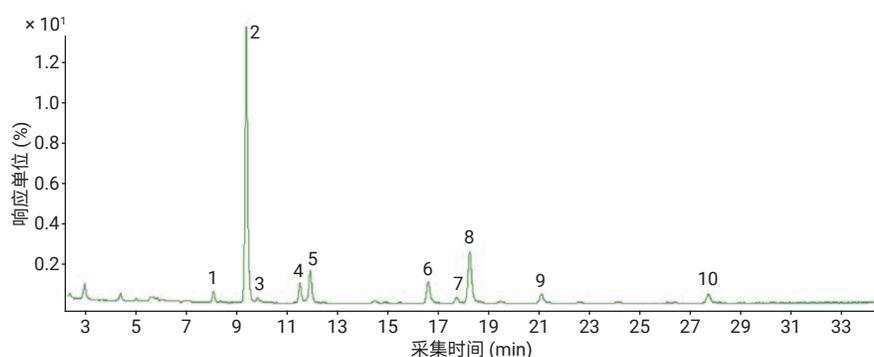
配备 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱的 Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱系统

作者

Sonja Schneider 和
Oscar Potter
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本文描述了使用配备 Agilent 1260 Infinity 荧光检测器和 Agilent 6530 精确质量 Q-TOF LC/MS 的 Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱系统，通过亲水相互作用色谱 (HILIC) 对 N-糖的分析。使用 PNGase F 对单克隆抗体 (mAb) 及另外两种糖蛋白 (胎球蛋白和卵清蛋白) 进行酶解后，再利用 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 对释放所得的多聚糖进行衍生化反应。Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱具有的出色分离度使我们可以对 mAb 样品中所有主要的 N-糖进行检测和鉴定。此外，从胎球蛋白和卵清蛋白中释放出的多种高度复杂的 N-糖可以得到良好分离。



前言

糖基化是一种最为常见的翻译后修饰。哺乳动物糖蛋白包括三种主要类型的多聚糖：即由一个或多个单糖单元构成的 N-糖、O-糖以及糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 脂锚。单个糖基化位点即可使糖蛋白质量和电荷数产生可观的异质性。这些低聚糖参与许多生物调节和识别过程，例如蛋白质分选、免疫及受体识别、炎症、致病性、新陈代谢及其他细胞过程^[1,2]。此外，治疗性蛋白的安全性、有效性和血清半衰期等特性也会受到其糖基化模式的影响。

重组单克隆抗体治疗药物 (mAb) 是最大的一组治疗性蛋白药物。此类治疗性药物的有效性高度依赖于 mAb 正确的糖基化模式，且迄今为止，所有批准的治疗性 mAb 均为免疫球蛋白 G (IgG)^[3]。人 IgG 有一个单独的保守 N 连接糖基化位点，位于每条重链 Fc 区域的 Asn297^[4] (图 1)，这使得每个 IgG 上存在两种 N-糖。它通常包含少量主结构和众多细微结构^[5]。再加上 Fc 段中这两个糖基化位点上不同多聚糖的组合，导致每批 mAb 产品中包含有大量不同的糖型。

多聚糖的结构在补体激活和受体亲和性上发挥着至关重要的作用^[6]，可影响治疗性 mAb 的有效性。此外，非人类来源的多聚糖还存在安全性问题，因为它们会引发免疫反应。因此，糖基化模式分析是表征治疗性糖蛋白 (尤其是 mAb) 的一个重要部分。

本应用简报依照美国功能性糖组学协会 (CFG) 的规定使用符号式多聚糖结构，如图 2 所示。归属的多聚糖也采用 Oxford 多聚糖命名法和另一种风格的命名法来描述，后者对于 mAb 多聚糖更常见。

图 2A 中展示了用于描述蛋白质不同多聚糖结构的糖残基的一般命名法。图 2B 中展示了出现在人 IgG Asn-297 位点上的一些主要多聚糖结构。通常 N-糖有一个核心结构，包括两个 b-D-N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 及三个甘露糖 (Man) 单元。IgG Fc N-糖主要为双天线复合型结构，部分经核心岩藻糖糖基化 (例如 FA2 或 G0F)。

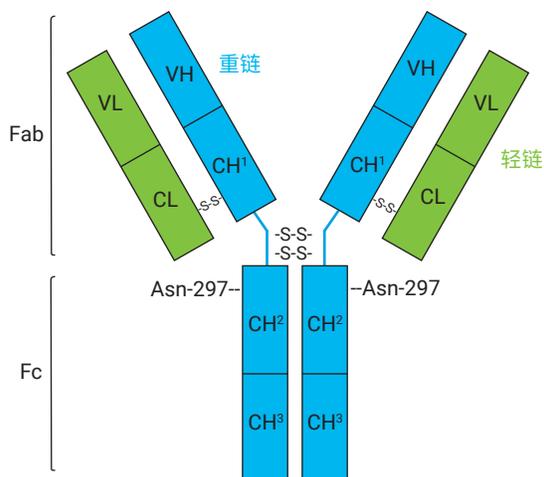


图 1. IgG 抗体结构

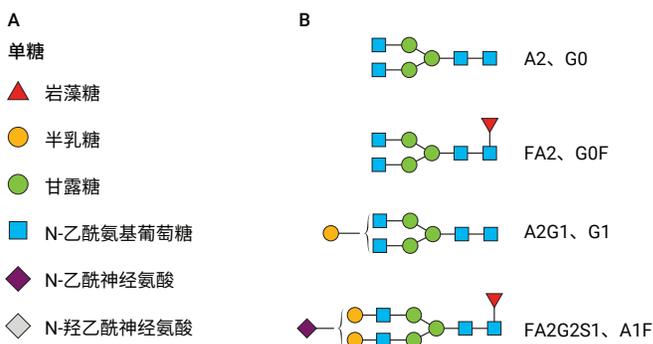


图 2. 多聚糖结构及异构体。A) 基于功能性糖组学协会的单糖描述，B) 人 IgG 的主要多聚糖结构

关于 N-糖分析，已有一些不同的方法策略。多数方法均基于通过 PNGase F 对蛋白质 N-糖进行酶促释放。由于缺乏内在发色团，分析前通常还会使用荧光标记物对多聚糖进行衍生化^[7]。每个 N-糖包含一个可以与过量荧光标记物反应的还原端位点，因此每条 N-糖将与一个荧光基团连接。因此，处理后的样品即适用于通过分离和荧光检测进行相对定量分析，无需任何定量标样或校准步骤。2-AB 是一种稳定的中性标记物，常用于 N-糖的分析^[7,8,9]。图 3 说明了 2-AB 通过还原胺化反应进行标记（希夫碱中间体未展示）。

后续的纯化过程采用亲水相互作用色谱/固相萃取 (HILIC/SPE) 法以去除大量过量的 2-AB，从而不对 HILIC/FLD 分析产生干扰。

本文中，我们描述了通过 PNGase F 对 N-糖进行酶促释放，并在采用 HILIC UHPLC 分离前使用 2-AB 进行衍生化反应，以及采用荧光检测和通过在线四极杆飞行时间质谱 (Q-TOF/MS) 进行鉴定。

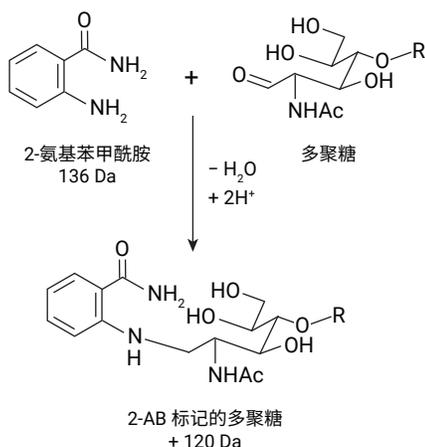


图 3. 采用 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 对多聚糖进行的标记

实验部分

试剂、样品与材料

Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱系统由如下模块组成：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)，带 35 μ L Jet Weaver 混合器
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 恒温箱 (G1330B)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1321B)，配有标准流通池

试剂、样品与材料

Agilent 6530 精确质量 Q-TOF LC/MS

色谱柱

Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱，2.1 \times 150 mm，1.8 μ m（部件号 859700-913）

软件

用于 LC 与 LC/MS 系统的 Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，修订版 C.01.05 [38]，以及 Agilent MassHunter 工作站软件，版本 B.05.01, Build 4.0.479.0。采用 2.1 稳定版 GlycoWorkbench (146) 创建多聚糖结构。

样品前处理

去糖基化步骤：

使用 PNGase F 将 N-糖从单克隆抗体、胎球蛋白和卵清蛋白上裂解下来。此酶可用于从糖蛋白上分离天冬酰胺连接的高甘露糖和复杂的混合型低聚糖，并且保持多聚糖的完整性。胎球蛋白上有三个 N 糖基化位点 (Asn-81、Asn-138 和 Asn-158) 以及四个 O-连接位点 (Ser-253、Thr-262、Ser-264 和 Ser-323)^[11]。卵清蛋白只有一个糖基化位点，而 mAb 有两个糖基化位点。需根据 N 糖基化位点的数量调整 PNGase F 的用量。蛋白的去糖基化过程依据说明书，在 37 $^{\circ}$ C 下反应 3 小时。然后停止反应，对样品真空干燥以进行进一步处理。

利用 2-AB 标记进行荧光检测及样品纯化

根据实验步骤使用 2-氨基苯甲酰胺对干燥的多聚糖样品进行标记，在 65 $^{\circ}$ C 下反应 3 小时。标记过程完成后，根据说明书使用 HILIC 纯化小柱对样品进行纯化。纯化步骤完成后，对样品进行真空干燥，并采用超纯水:乙腈 30:70 (v/v) 复溶以便分析。

溶剂和样品

缓冲液 A 为 100 mmol/L 甲酸铵水溶液，pH 为 4.5，缓冲液 B 为乙腈。所有试剂纯度均为液相色谱级。新制超纯水产自配置 0.22 μ m 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。单克隆抗体为小鼠抗 DYKDDDDK 标记抗体。甲酸铵、胎球蛋白和卵清蛋白、Elizabethkingia miricola 源 PNGase F、GlycoProfil 2-AB 标记试剂盒及 GlycoProfil 多聚糖纯化小柱均购自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, USA)。

仪器条件

	抗体标准梯度	胎球蛋白梯度	卵清蛋白梯度
初始流速	0.5 mL/min	0.5 mL/min	0.5 mL/min
梯度	0 min 85 % B	0 min 75% B	0–6 min 85% B
	5 min 75% B	45 min 50% B	10 min 80% B
	35 min 64% B	47 min 40% B, 流速 0.5 mL/min	60 min 70% B
	40 min 50% B	47.01 min, 流速 0.25 mL/min	65 min 50% B, 流速 0.5 mL/min
	42 min, 流速 0.5 mL/min 42.01 min, 流速 0.25 mL/min	49 min 0 % B	65.01 min, 流速 0.25 mL/min
	43 min 0% B	51 min 0% B	68 min 0% B
	48 min 0% B	51.01 min 75% B, 流速 0.25 mL/min	73 min 0% B
	50 min 85% B 50.01 min, 流速 0.25 mL/min	52.00 min, 流速 0.5 mL/min	74 min 85% B, 流速 0.25 mL/min
	51 min, 流速 0.5 mL/min		75.00 min, 流速 0.5 mL/min
	停止时间	51 分钟	52 分钟
后运行时间	20 分钟	20 分钟	20 分钟
进样量	5 µL	1 µL	1 µL
温控自动进样器	5 °C		
柱温	60 °C		
FLD	激发波长260 nm, 发射波长430 nm		
峰宽	> 0.013 min (响应时间为 0.25 s) (37.04 Hz)		

质谱参数	
气体温度	250 °C
鞘气温度	250 °C
气体流速	8 L/min
鞘气流速	8 L/min
雾化器	25 psi
毛细管电压	3500 V
喷嘴电压	1000 V
碎裂电压	200 V
锥孔电压	45 V
Oct 1 RF Vpp	550
碰撞能量	15 V 和 30 V
模式	MS 和靶向 MS/MS

结果与讨论

分析源自单克隆抗体的 N-糖

图 4 中显示了 mAb N-糖的分离情况。mAb 多聚糖模式实现了出色分离，所有主要的 N-糖均得到分离并可积分。根据峰面积百分比的计算结果进行了相对定量分析。通过设置 1260 Infinity 荧光检测器的最佳多聚糖检测波长，可实现标记后多聚糖的高强度响应，其中激发波长为 260 nm，发射波长为 430 nm^[10]。

根据观察到的母离子质量和相关的 MS/MS 谱图，可将得到的 HILIC 多聚糖图谱归属至相应的多聚糖结构。将母离子质量输入 Expsy 的 GlycoMod 工具中以查找相关多聚糖结构。

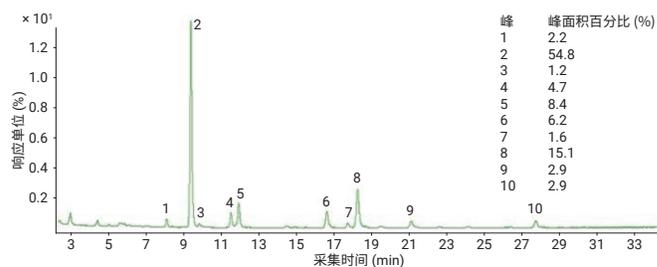


图 4. 以 260 nm 为激发波长进行 mAb N-糖分离的荧光检测

根据实验测得的质量, GlycoMod 可预测已标记或未标记的可能多聚糖结构 (<http://web.expasy.org/glycomod/>)。用于多聚糖归属和多聚糖结构设计的另一款有用的工具是 GlycoWorkbench^[15], 本研究中使用该工具制作多聚糖结构动画。

作为该工作流程的一个实例, 我们选择了母离子质量为 1026.88 [z = 2] (峰 7 和 8) 的 N-糖 FA2G1Sg1。针对此质量, 多聚糖数据库中可能存在两种最可能的多聚糖结构 (图 5)。

随后利用 MS/MS 数据来区分这两种潜在的结构。图 6 展示了 N-糖 FA2G1Sg1 的碰撞诱导解离 (CID) MS/MS 谱图。这些 MS/MS 数据确定了一种唾液酸, 即 N-羟乙酰神经氨酸 (NeuGc) 的存在, 它在 m/z 308 (NeuGc) 和 m/z 673 (与半乳糖和 N-乙酰氨基葡萄糖连接的 NeuGc) 处的碎片离子有强信号。同时, 在 m/z 292 或 m/z 657 处未产生信号, 这表明不存在 N-乙酰神经氨酸 (NeuAc)。因此, 这些结果有力地证明了此多聚糖结构为含有 NeuGc 的 FA2G1Sg1, 而不是含有 NeuAc 的 A2G2S1。支持将一个结构归属为含有核心岩藻糖的原因是 MS/MS 数据在 m/z 512 或 m/z 350 处没有强碎片离子信号, 而如果岩藻糖位于外臂区, 则这两处应存在信号。

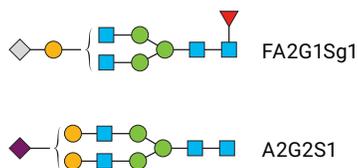


图 5. 对于 1026.88 [z = 2] 的母离子质量, 两个最可能的多聚糖结构 FA2G1Sg1 和 A2G2S1

所有其他峰都通过分析其 MS 和 MS/MS 谱图, 以类似的方式进行归属。归属结构如表 1 所列。结果表明, mAb 主要含有核心岩藻糖基化的复杂多聚糖, 包括一些带有 NeuGc 的结构。这些发现一般适用于由大鼠细胞产生的 IgG 抗体。正常情况下人糖蛋白中不含 NeuGc, 并且这一结构不适合用于治疗性蛋白^[12]。人糖蛋白中的唾液酸通常是 N-乙酰神经氨酸。

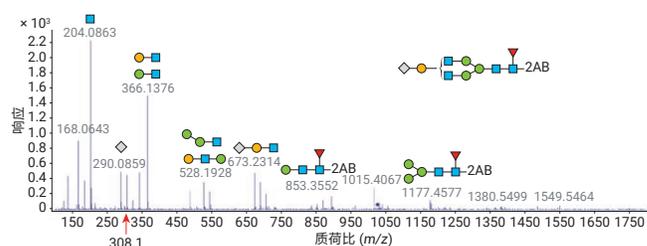


图 6. FA2G1Sg1 的 MS/MS 谱图 - 1026.88 [z = 2] - 1931.6876 Da

表 1. 大鼠单克隆抗体质量和 2-AB 多聚糖结构归属概述

峰	Oxford	生物制药 mAb 类型	质谱检测器 (Da)	结构
1	FA1	G0-GlcNAc	A2G2S2	
2	FA2	G0F	792.3130 [z = 2]	
3	M5	Man5	1355.5 [z = 1]	
4,5	FA2G1	G1F	873.34 [z = 2]	
6	FA1G1Sg1	G1FSg1-GlcNAc	925.34 [z = 2]	
7,8	FA2G1Sg1	G1FSg1	1026.88 [z = 2]	
9	FA2G2Sg1	Ag1F	1107.9135 [z = 2]	
10	FA2G2Sg2	Ag2F	1261.446 [z = 2]	

胎球蛋白和卵清蛋白中的抗体分析

实验通过 PNGase F 将胎球蛋白和卵清蛋白这两种蛋白质中的 N-糖裂解下来，以 2-AB 进行衍生化反应并采用配有在线 MS 的 HILIC/UHPLC 进行分析。图 7 展示了牛胎球蛋白 N-糖的分离情况。此糖基化谱主要展示了含 NeuAc 的复杂非岩藻糖基化双天线或三天线多聚糖。采用 Q-TOF/MS 检测可实现对 9 个主要峰的归属。表 2 展示了已归属的多聚糖结构。

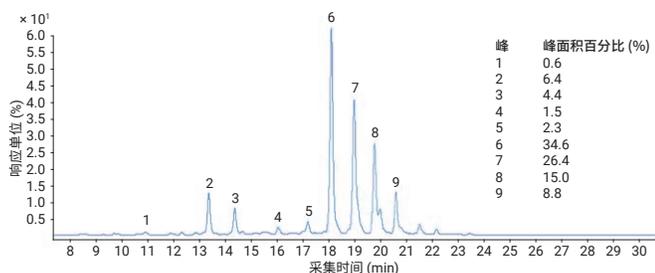


图 7. 2-AB 标记的胎球蛋白的分离

表 2. 卵清蛋白 N-糖的详细信息

峰	Oxford	结构
1	A2G2S1	
2,3	A2G2S2	
4	A3G3S2	
5	A3G3S3, A3G3S2 (痕量)	
6	A3G3S3, A3G3S2 (痕量)	
7	A3G3S3, A3G3S4 (痕量)	
8	FA3G3S4 和 A3G3S3	
9	A3G3S4	

图 8 展示了卵清蛋白多聚糖的分离情况。卵清蛋白仅在一个位点 (Asn-292) 上发生 N-糖基化，但是与该位点相关的糖基化模式非常复杂^[13]。由于该多聚糖谱的复杂性，需要调整梯度并延长分离时间，以实现更高的分离度。AdvanceBio 糖谱分析色谱柱的高性能可以实现对 50 多个峰的分离，同时具有良好的信噪 (S/N) 比。实验根据母离子质量数据 (表 3) 对 20 个主要峰进行了归属。由于同量异位结构存在的很大可能性，而且其中的某些结构不能通过 MS/MS 数据进行区分，因此我们未能对详细结构作出定论。取而代之，我们依据其单糖组成来描述 N-糖。

与相对简单的 mAb 多聚糖模式相比，其他两种糖蛋白存在更多种类的多聚糖结构。与 mAb 多聚糖相反，在卵清蛋白中没有检测到岩藻糖基化多聚糖，与先前报道的鸟类卵清蛋白未经岩藻糖基化的结果吻合^[14]。

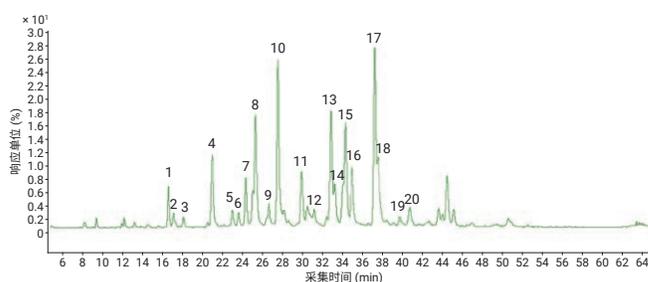


图 8. 卵清蛋白释放的 N-糖的分离情况

表 3. 卵清蛋白 N-糖归属的质量和单糖组成；H = 己糖，即半乳糖或甘露糖；
N = N-乙酰氨基葡萄糖

峰	质量 + 2AB (Da)	质量 计算值 (Da)	组成 (简短格式)	组成 (详细格式)
1,2	1234.48 [M]	1114.48	H3N3	(HexNAc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
3	1193.45 [M]	1073.45	H4N2	(Hex) ₄ (HexNAc) ₂
4	1437.56 [M]	1317.56	H3N4	(HexNAc) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
5	1396.53 [M]	1276.53	H4N3	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
6, 7	1640.64 [M]	1520.64	H3N5	(HexNAc) ₃ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
8	1355.506 [M]	1235.51	H3N5	(Hex) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
9	1599.61 [M]	1479.61	H4N4	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
10	1843.73 [M]	1723.73	H3N6	(HexNAc) ₄ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
11	1802.74 [M]	1682.74	H4N5	(Hex) ₁ (HexNAc) ₃ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
12, 14	2046.884 [M]	1926.88	H3N7	(HexNAc) ₅ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
13	1517.56 [M]	1397.56	H6N2	(Hex) ₃ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
15	1761.6574 [M]	1641.66	H5N4	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
16	2005.8098 [M]	1885.81	H4N6	(Hex) ₁ (HexNAc) ₄ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
17	2249.9728 [M]	2129.97	H3N8	(HexNAc) ₆ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
18	1964.82 [M]	1844.82	H5N5	(Hex) ₂ (HexNAc) ₃ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
19, 20	2208.87 [M]	2088.87	H4N7	(Hex) ₁ (HexNAc) ₅ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂

结论

Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱系统与 Agilent 1260 Infinity 荧光检测器和 Agilent 6530 精确质量 Q-TOF LC/MS 系统联用是分析 2-氨基苯甲酰胺衍生的 N-糖样品的理想组合。本实验对一种单克隆抗体和其他两种糖蛋白样品使用 PNGase F 进行样品前处理以释放 N-糖，然后利用 2-AB 进行衍生化，再进行 HILIC 样品纯化。

Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱具有优异的分離能力，可以实现大鼠 mAb 样品中所有主要 N-糖的分離和鉴定。这款色谱柱还可对胎球蛋白和卵清蛋白复杂的双天线和三天线 N-糖进行分析，表现出极高分離度。经优化的 260 和 430 nm 的荧光激发和发射波长实现了更高的信噪比。根据样品的复杂性，电喷雾电离 Q-TOF MS 分析能够归属不同的多聚糖结构或确定其单糖组成。

参考文献

1. Rademacher, T. W; Williams, P; DwekMark, R. A. Agalactosyl glycoforms of IgG autoantibodies are pathogenic. *P. Natl. Acad. Sci.* **1994**, 91, pp 6123–6127
2. Peracaula, R; et al. Glycosylation of human pancreatic ribonuclease: differences between normal and tumor states. *Glycobiology* **2003**, 13, pp 227–244.
3. Jefferis, R. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnol. Progr.* 2005, 21, pp 11–16.4. Arnold, J. N; et al. Human immunoglobulin glycosylation and the lectin pathway of complement activation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2005**, 564, pp 27–43
4. Fernandes, D. Demonstrating comparability of antibody glycosylation during biomanufacturing. *Euro. Biopharm. Re.* **2005**, Summer, pp 106–110
5. Abès, R; Teillaud, J. L. Impact of Glycosylation on Effector Functions of Therapeutic IgG. *Pharmaceuticals* **2010**, 3, pp 146–157
6. Ruhaak, L. R; et al. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 397, pp 3457–3481
7. Royle, L; et al. HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software. *Anal. Biochem.* **2008**, 376, pp 1–12
8. Huhn, C; et al. IgG glycosylation analysis. *Proteomics* **2009**, 9, pp 882–913
9. Melmer, M; et al. HILIC analysis of fluorescence-labeled N-glycans from recombinant biopharmaceuticals. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 398, pp 905–914
10. Ding, W; et al. Identification and Quantification of Glycoproteins Using Ion-Pairing Normal-phase Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteom.* **2009**, 8, pp 2170–2185
11. Leibiger, H; et al. Variable domain-linked oligosaccharides of a human monoclonal IgG: structure and influence on antigen binding. *Biochem. J.* **1999**, 338, pp 529–538
12. Anumula, K. R. Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates. *Anal. Biochem.* **2006**, 350, pp 1–23.
13. Montreuil, J; Vliegthart, J. F. G; Schachter, H., Eds.; Glycoproteins II. Elsevier B. V., Amsterdam, **1997**
14. Ceroni, A; et al. GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J. Proteome Res.* **2008**, 7, pp 1650–1659

用于生物治疗药物 N-糖高通量分析的安捷伦解决方案

作者

Arunkumar Padmanaban,
Sreelakshmy Menon 和 Suresh
Babu CV

安捷伦科技公司 (印度),
印度班加罗尔

摘要

本应用简报介绍了针对创新药和生物仿制药单克隆抗体 (mAb) 的 2-AB 标记 N-糖的自动化高通量样品前处理和随后的液相色谱 (LC) 分析。Agilent AssayMAP Bravo 液体处理平台用于自动化样品前处理, 包括 mAb 多聚糖裂解和释放、2-AB 标记和纯化。样品准备好接受下游分析后, 使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统和 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱进行分析。通过比较创新药和生物仿制药单克隆抗体的色谱图, 分析了样品之间的多聚糖分布差异。

本研究重点介绍 AssayMAP Bravo 平台在自动化和可重现的多聚糖分析样品前处理中的高通量应用, 以及后续使用 1290 Infinity 液相色谱系统进行快速色谱分离。



前言

单克隆抗体 (mAb) 作为生物治疗领域的前沿, 彻底改变了疾病的治疗和干预方式。通过临床审批^[1] 的 20 种第一代单克隆抗体中, 大多数专利已经过期或即将过期。这为生产生物仿制药提供了巨大的机会。美国食品药品监督管理局 (FDA) 和欧洲药品管理局 (EMA) 等监管机构发布了生物仿制药蛋白质治疗药物 (包括翻译后修饰) 的表征指南^[2]。糖基化修饰会造成结构异质性, 从而改变 mAb 的靶标结合能力、稳定性、电荷和质量数^[3]。在通过细胞系开发抗体的过程中, 需要监测糖基化模式以便改变细胞系和优化培养基。这需要高通量的样品前处理, 并行筛选数种细胞培养条件。Agilent Bravo 自动化液体处理平台是一套精确的液体处理系统, 专为多聚糖分析等高通量应用而设计。Agilent Bravo 采用 Agilent AssayMAP 技术, 将自动化与用于样品前处理的微型 5 μ L 填充床小柱相结合, 可在更短的时间内实现高通量色谱分析和样品前处理^[4]。

本应用简报介绍了使用 Agilent AssayMAP Bravo 平台分析 mAb 中 N-糖的工作流程解决方案。该系统使用 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 染料自动进行 N-糖的纯化和衍生化, 然后使用安捷伦糖谱分析色谱柱进行安捷伦 HPLC 分析。我们展示了 AssayMAP Bravo 在高通量分析研究所需的自动化样品前处理中的易用性。

实验部分

材料

使用安捷伦包含 2-AB 的 AdvanceBio GlykoPrep-plus 快速 N 糖样品前处理试剂盒以及 2-AB 标记的低聚甘露糖 5 和 6 进行样品前处理和分析。Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.1 \times 150 mm, 1.8 μ m (部件号 859700-913) 和安捷伦 2-AB 标记人 IgG N-糖标准品 (部件号 GKSB-005) 购自安捷伦科技公司。利妥昔单抗创新药和生物仿制药产品购自当地一家药店。其他所有化学品均为 HPLC 纯度, 购自 Sigma。

样品前处理

样品前处理使用 Agilent AdvanceBio GlykoPrep-plus 试剂盒中的试剂和 AssayMAP 方案。将创新药和生物仿制药样品稀释至 1 mg/mL, 然后分别加载到 96 孔板的三列上 (每种样品 24 份)。按照指南^[5] 中的规定放置样品板和试剂板后, 启动 Agilent VWorks 软件中的 N-糖样品前处理: RX 酶解和 2-AB 标记模块, 对样品进行处理。该方案由五个模块组成, 这些模块按顺序依次执行以固定样品, 酶解多聚糖, 洗脱, 用 2-AB 标记, 再完成最终净化以去除多余染料。然后将每个孔中经过最终纯化的标记多聚糖转移至 HPLC 样品瓶中, 立即进行分析或在 -80°C 下储存。

图 1 给出了完整工作流程的示意图。



图 1. 多聚糖分离、标记、纯化并随后使用安捷伦解决方案进行液相色谱分析的工作流程示意图。Agilent AssayMAP 步骤显示为蓝色; AdvanceBio 试剂盒显示为橙色

仪器

Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统，包括：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 G4220A
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 G4226A
- Agilent 1290 Infinity TCC G1316 C
- Agilent 1260 荧光检测器 G1321 B

本研究采取了之前描述过的液相色谱方法^[6]。每种样品均以四连进样形式进行分析，然后再进行空白进样。

软件

- Agilent VWorks 自动化控制 11.4.0.1233
- Agilent AssayMAP Launch Pad 3.0
- 安捷伦 N-糖样品前处理：RX 酶解和 2-AB 标记方案 1.0
- Agilent ChemStation C.01.06

结果与讨论

Agilent AssayMAP 样品前处理

按照由五个模块组成的方案处理样品，如图 2 所示。软件套件包括每个待执行模块的台板布局、实验室器皿表 and 应用程序设置选项卡（图 3）。软件会提示用户将实验室器皿表中列出的相应消耗品和试剂放在指定的台板位置。设置所有实验室器皿后，执行方案，AssayMAP Bravo 会完成方案，并显示确认消息以继续执行下一个模块。

最后的净化方案模块将水性缓冲液中经过标记纯化的多聚糖洗脱到洁净的 96 孔板中。然后下游液相色谱分析使用 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱对样品和空白样品进行四连进样分析。



图 2. Agilent AssayMAP N-糖样品前处理的 Agilent VWorks 模块

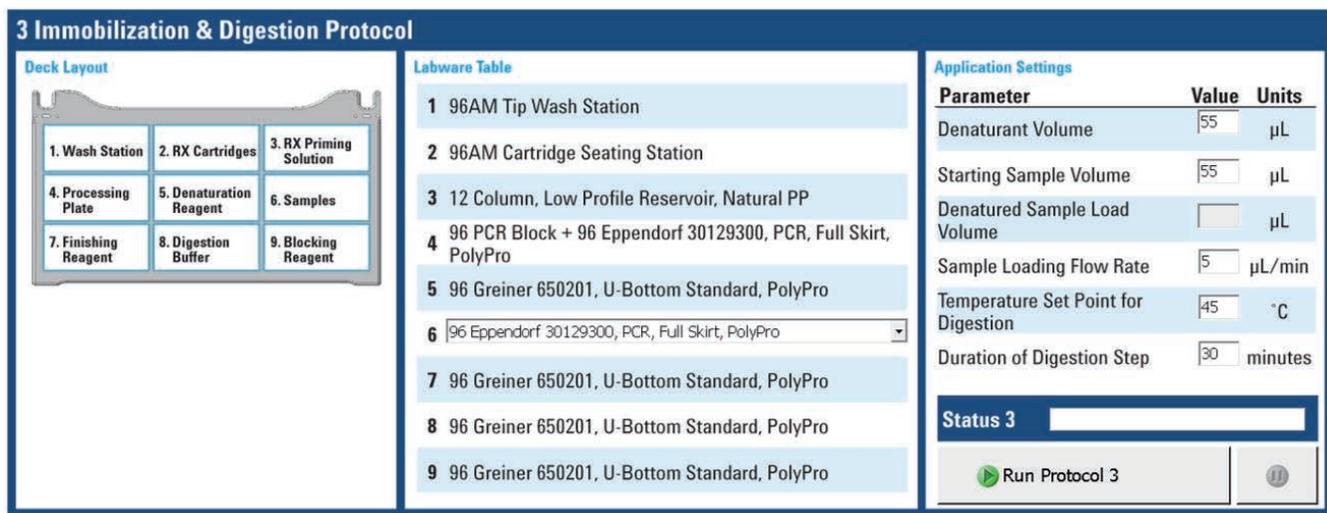


图 3. 固定和酶解方案（Agilent VWorks 软件中五个样品前处理模块之一）的台板布局、实验室器皿表 and 应用程序设置

HPLC 分析

使用 Agilent 1290 Infinity 系统的快速分析方法，比较创新药和生物仿制药单克隆抗体的 N-糖谱图。使用安捷伦 2-AB 标记 IgG N-糖文库作为标准来评估色谱柱性能并标注 mAb 样品的峰。适合高压的 1290 Infinity 系统可在不到 6 分钟的时间内完成样品分析，从而节省每个样品的分析时间，并提高样品通量。

对每个样品进行 4 次重复 HPLC 分析。图 4 所示为 96 次重复分析中四种主要多聚糖的峰面积，展现了 AssayMAP 微型色谱移液器吸头优异的柱间重现性。峰面积和峰高的重现性标准偏差 (RSD) 计算结果显示，所有多聚糖种类的变异系数 (CV) 均小于 6%。这展示了 AssayMAP Bravo 系统非常强大且可重现的样品前处理能力。

创新药与生物仿制药的糖谱分析和对比

将创新药和生物仿制药利妥昔单抗的色谱图与标准 IgG N-糖文库进行比较，并标注多聚糖对应的峰。此外还使用包含 2-AB 标记低聚甘露糖 5 和 6 的单独标准品标注其他的峰。创新药和生物仿制药产品丰度较高的多聚糖（例如 G0F、G1F 异构体和 G2F）糖基化模式相近（图 5）。低丰度多聚糖则观察到微小差异；生物仿制药样品的甘露糖含量较低 (Man5)，如图 6 的放大视图所示。尽管一些低丰度多聚糖存在微小差异，但可认为创新药和生物仿制药利妥昔单抗的多聚糖谱图基本一致。

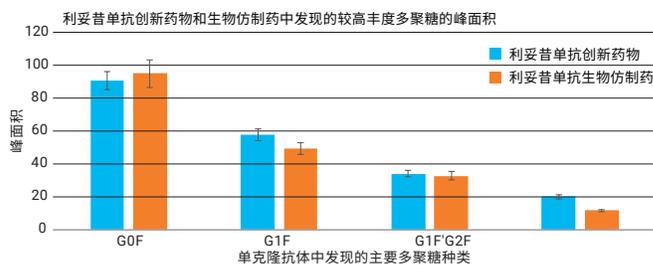


图 4. 每种创新药和生物仿制药样品 96 次重复分析中主要多聚糖种类的峰面积

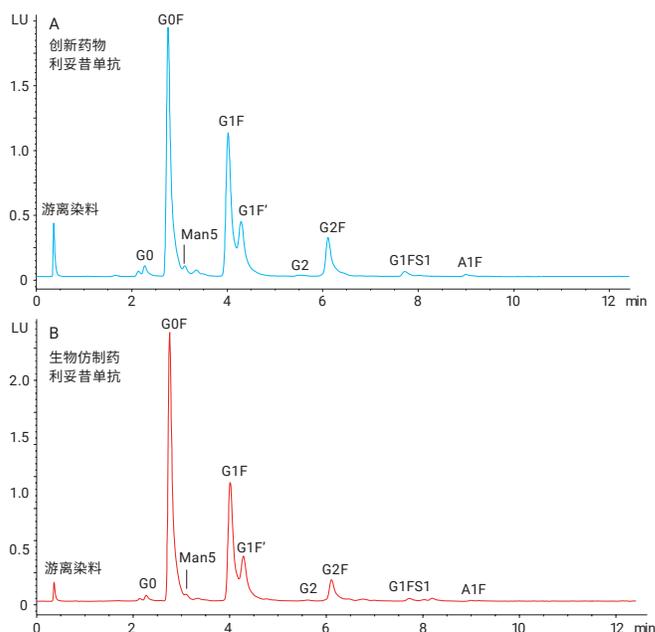


图 5. 创新药与生物仿制药利妥昔单抗的糖基化模式

计算每个 N-糖核心的面积百分比，并将两个样品进行对比。表 1 所示为创新药和生物仿制药利妥昔单抗 N-糖的比例。表中显示，创新药和生物仿制药的 N-糖指纹图谱类似。

两个样品的 N-糖分布中显示出类似的趋势，其中 G0F 为主要糖型，然后是 G1F、G1F' 和 G2F。除了已标注的多聚糖外，还有一些未知的多聚糖形式可以通过正交检测系统进行标注。两个样品面积百分比的关联图（图 7）显示出高相似性，R2 为 0.973。

表 1. 创新药与生物仿制药单克隆抗体的多聚糖面积百分比

N-糖百分比		
N-糖	创新药物	生物仿制药
G0	1.5	0.8
G0F	42.2	50.5
Man5	1.7	1.2
G1F	28.6	26.7
G1F'	13.0	11.6
G2	0.3	0.2
G2F	8.7	5.5
G1FS1	0.9	0.6
A1F	0.2	0.5

结论

本研究重点介绍了 Agilent AssayMAP Bravo 系统在高通量样品前处理中丰富的功能。

- Agilent VWorks 自动化控制软件套件通过现成可用的方案简化了样品前处理，使样品可以兼容下游分析，同时大大减少手动操作
- 对 96 孔板中的单克隆抗体样品进行酶促多聚糖裂解、分离、2-AB 衍生化和纯化的并行处理
- AssayMAP 在多聚糖纯化中表现出优异的重现性，性能非常稳定
- 然后，使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统和糖谱分析色谱柱对纯化的样品进行分析
- 在短时间内实现了多聚糖种类的良好分离，并使用标准品进行了标注
- 对创新药和生物仿制药的多聚糖种类分布进行了评估，数据表明本研究中使用的创新药和生物仿制药利妥昔单抗的多聚糖谱图基本一致

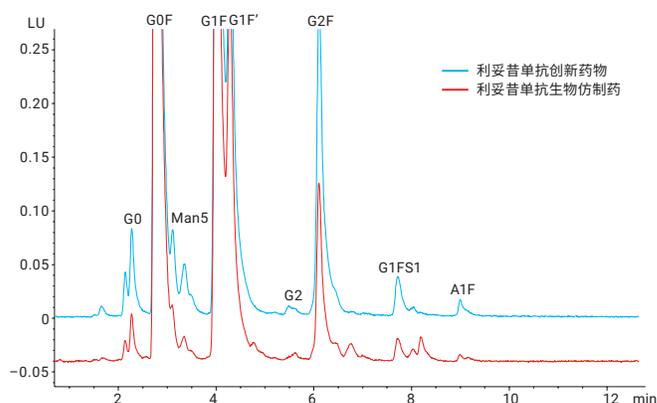


图 6. 图 5 的放大视图：创新药和生物仿制药利妥昔单抗的糖基化模式，低丰度聚糖存在微小差异

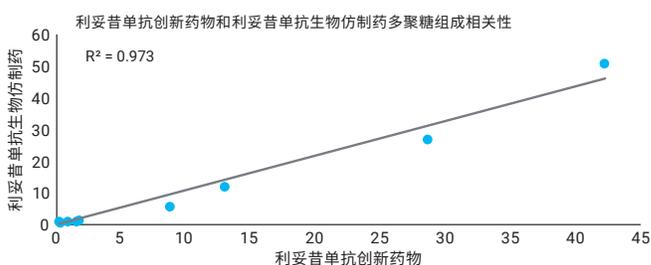


图 7. 创新药和生物仿制药利妥昔单抗释放的多聚糖的面积百分比线图对比

参考文献

1. Chames, P.; Baty, D. Bispecific antibodies for cancer therapy. *mAbs* **2009**, 1:6, 539–547
2. Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product: Guidance for Industry. Food and Drug Administration. Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). April 2015. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM291128.pdf>
3. Zhang, Q.; et al. A Perspective on the Maillard Reaction and the Analysis of Protein Glycation by Mass Spectrometry: Probing the Pathogenesis of Chronic Disease. *Journal of Proteome Research* **2009**, 8(2), 754–769
4. Agilent AssayMAP Cartridges Automated Sample Preparation (Agilent AssayMAP 小柱自动化样品前处理)，安捷伦科技公司数据表，版本号 5991-1774EN，**2013**
5. AssayMAP with ProZyme GlykoPrep-plus Rapid N-Glycan Sample Preparation with 2-AB Protocol Guide (使用 ProZyme 带 2-AB 试剂盒的 GlykoPrep-plus 快速 N-糖样品前处理产品的 AssayMAP 方案指南)，安捷伦科技公司手册，版本号 G5409-90012EN，**2013** 年 5 月修订版
6. Martosella, J.; et al. 采用新型 HILIC 色谱柱实现快速 N-糖分析，安捷伦科技公司应用简报，版本号 5991-4886CHCN，**2014**

更多应用简报

部件号	标题
5991-4801CHCN	人免疫球蛋白 G 的高灵敏度和高重现性多聚糖分析
5991-4886CHCN	采用新型 HILIC 色谱柱实现快速 N-糖分析
5991-7024EN	使用 Agilent AssayMAP 自动化样品前处理和 Agilent 1290 Infinity 液相系统对抗体药物偶联物 (ADC) N-糖的分析
5991-8071ZHCN	使用安捷伦 LC/MSD XT 通过荧光检测器和稳定的质量选择检测器进行单克隆抗体的 N-糖分析
5991-8796ZHCN	采用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 对单克隆抗体进行三个不同层次的糖基化分析

其他信息

安捷伦提供多聚糖样品前处理试剂盒，包含用于去糖基化、多聚糖标记和样品净化的备件和试剂。详细方案可查看用户指南：5991-9561EN 和 5991-9560EN。

多聚糖标准品可用于协助方法开发、数据分析和系统检查。请参阅第 12–15 页，或下载 [5994-2202ZHCN](#)。

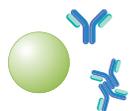
如需了解糖谱分析工作流程的更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/glycoscience

聚集体/片段分析

背景

蛋白质经常容易由于环境条件刺激而发生聚集，形成二聚体和大分子量低聚物或高阶结构。这在生物治疗蛋白质的生产中尤其成问题，因为目标蛋白质需要承受的多种环境条件都可能诱导聚集。这些条件包括发酵过程中温度和浓度的变化，以及下游处理过程中 pH 和浓度的变化。甚至剪切力（来自叶轮叶片、搅拌器和其他工程设备）也可能导致应激相关聚集。聚集体，特别是分子量非常大的多聚体以至显微镜下可见颗粒的存在，可能会对健康有害。因此，必须量化和确定聚集水平，并予以限制。

体积排阻色谱是特别适合从高阶聚集体中分离单体峰的技术之一。使用合适的浓度检测器，例如 UV 或 DAD，可以相对直观地进行定量。抗体药物偶联物或 ADC 等更为复杂的分子可能更具挑战性，因为疏水性细胞毒性药物的存在可能导致许多体积排阻色谱柱无法发挥理想性能。为解决这一问题，安捷伦开发了一种新的固定相，可显著降低次级相互作用的风险。因此，新型 AdvanceBio SEC 色谱柱非常适合聚合物的快速分离和定量。



聚集体/片段分析

体积排阻色谱

各种生物分子分离的准确定量分析

AdvanceBio SEC 1.9 和 2.7 μm

功能全面，可应对常规和挑战性应用

属性	优势
亲水性聚合物涂层	避免次级相互作用
提高分析速度	按时交付结果
提高重现性	减少重复工作
提高灵敏度	即使是低浓度聚集体也能实现定量分析
1.9 μm 颗粒填料	极高分离度
带 PEEK 内衬的不锈钢硬件选项	适用于金属敏感型样品和检测的无金属流路

Bio SEC-3 和 Bio SEC-5

超大孔径和放大选项

属性	优势
与大多数水相缓冲液兼容	方法灵活
孔径选择范围广，包括 1000 \AA 和 2000 \AA	从肽到 VLP，选项丰富
分析和半制备规格	便于放大或缩小

入门指南

由于外部因素可能导致蛋白质聚集，因此样品前处理是聚集体分析中最重要的步骤之一。需要确保蛋白质完全溶解在流动相中，同时不会受到可能改变聚集水平的因素影响，例如超声处理、温度、pH 和过度浓缩。体积排阻色谱是一种依赖于等度洗脱的技术，相对比较简单直接。流动相条件应能确保蛋白质与色谱柱固定相之间不会发生次级相互作用。通常使用水相缓冲液，例如在中性 pH 下的 150 mmol/L 磷酸钠或 PBS（磷酸盐缓冲液）。这种流动相溶液同时也为细菌生长提供了理想条件。因此，必须定期制备新鲜缓冲液，并在使用前用 0.2 μm 过滤器过滤。在任何情况下，都不能将未使用的缓冲液长时间留在仪器上。

若能避免在流动相中添加叠氮化钠等防腐剂，就可以使用低波长 (210–220 nm)，从而大大提高该技术的灵敏度。储存色谱柱时建议使用防腐剂，例如 20% 乙醇。但必须小心谨慎，因为含有机改性剂的流动相粘度通常会大幅增加，可能导致色谱柱损坏。

生物分子分析体积排阻色谱：操作指南

SEC 成功分析指南

利用生物分子在溶液中的体积而进行色谱分离的方法即为体积排阻色谱 (SEC)。与其他色谱模式不同，SEC 的分离不依靠分析物和色谱柱固定相之间的任何化学作用。这是从多种干扰物（包括聚集物、赋形剂、细胞碎片及其他降解产生的杂质）中分离和分析完整蛋白质的理想解决方案。因此，SEC 广泛应用于开发和生产过程中的生物治疗性分子表征。

在本指南中，我们将讨论 SEC 分离、溶质大小和分子量的影响、色谱柱选择、流动相重要注意事项，以及 SEC 的使用规则等内容。



分离方法简单直接

利用 SEC，分子可按其在溶液中的尺寸从大到小依次分离。非常大的分子不会进入填充柱床，会在死体积内最先洗脱。大小适中的分子依据其体积的不同可以不同程度地渗透进微孔中（图 1），而最小的分子在微孔结构中扩散最深，从而最后洗脱。

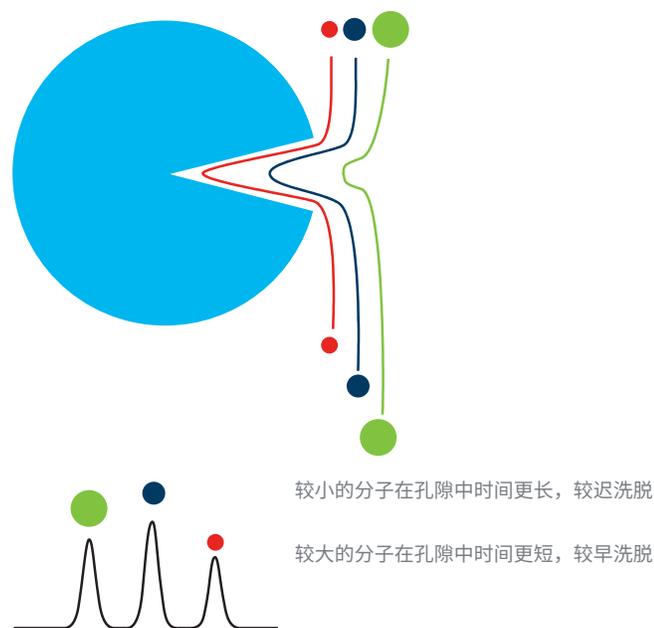


图 1. 不同体积的分子以不同程度渗入固定相孔隙内

体积排阻色谱法适用于分离和定量蛋白质混合物，因此是重组蛋白生产过程中的一种重要质控手段。包括测定聚集体（二聚体、三聚体、四聚体等）以及从较大分子量的蛋白质中分离低分子量的赋形剂和杂质（图 2）。

了解并控制治疗性蛋白中的聚集体十分必要，因为其会影响药物有效性、保质期甚至会导致潜在的严重免疫反应。ICH(Q6B) 等法规明确指出必须分离并定量目标产品中的聚集体。

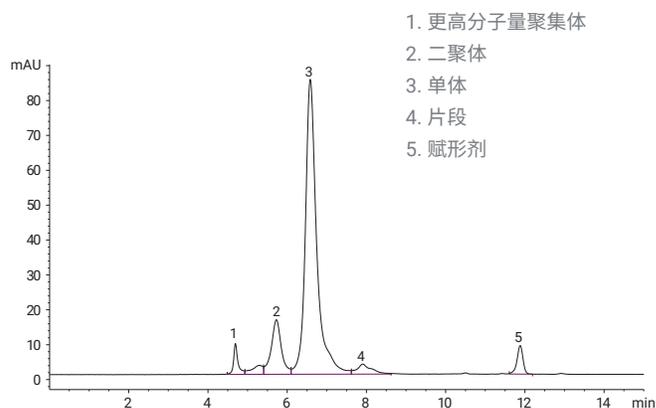


图 2. IgG 聚集体和赋形剂的分离

完整 IgG 单体和二聚体的分离条件

参数	值
样品:	多克隆 IgG
样品浓度:	150 mmol/L 磷酸钠缓冲液
色谱柱:	Agilent AdvanceBio SEC, 300 Å 7.8 × 300 mm
仪器:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统
流速:	1.0 mL/min
温度:	室温
检测器:	UV, 220 nm
进样量:	5 µL

洗脱顺序通常由分子量大小决定，分子量最大的分子最先被洗脱，但 SEC 真正的分离机制是基于分子在溶液中的体积。大多数蛋白是致密的球形结构，但一些蛋白分子是圆柱形，因此可能会比预期洗脱更早，这是由于它们在溶液中有着更大的流体动力学半径（图 3）。此外，不同的流动相也会影响洗脱顺序，因为溶液中分子体积会改变（流体动力学半径或回转半径）。

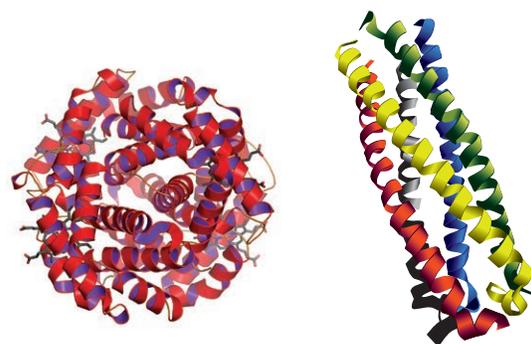
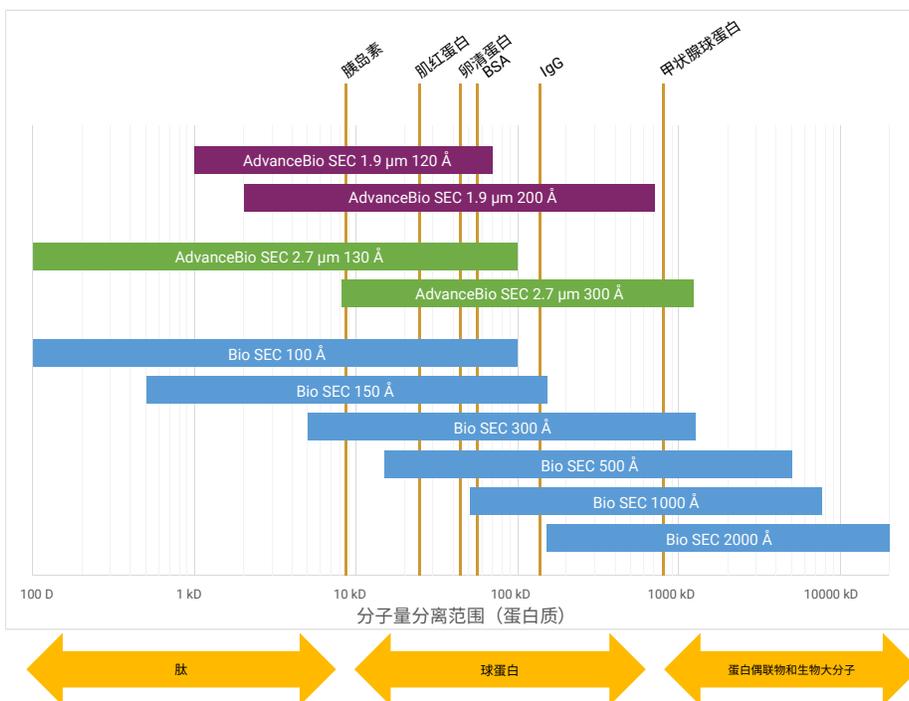


图 3. 致密型球状蛋白与圆柱形蛋白的对比

SEC-UV/DAD 方法开发指南

针对生物分子、聚集体分析（肽、多肽和蛋白质）的基于体积的分离选择初始色谱柱和条件。



推荐的初始分离条件

色谱柱: AdvanceBio SEC 或 Agilent Bio SEC-5
流动相: 150 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0*
梯度: 10–30 min 等度洗脱
温度: 推荐: 10–30 °C, 最高: 80 °C

流速: 7.8 mm 内径色谱柱: 0.1–1.25 mL/min
4.6 mm 内径色谱柱: 0.1–0.4 mL/min
2.1 mm 内径柱: 0.05–0.1 mL/min
样品量: ≤ 总柱体积的 5%
*可以使用高盐和低盐的其他水相缓冲液

如需了解其他信息, 请参见应用简报: *蛋白质高效体积分离的最佳参数优化* (出版号 5990-8895EN) www.agilent.com/chem/library

得到初始色谱图后, 可能需要进行某些改变以改善分离度、保持蛋白质溶解性, 或降低样品与色谱填料之间的相互作用。可以上下调整流动相的离子强度, 以便获得更出色的分离。通常, pH 值也可以调节 ± 0.2 个单位。如果还需要进一步优化, 上下调整的范围则应相应扩大。还可以改变温度或添加有机溶剂。

对于需要加盐的方案, 以下为常用缓冲液:
100–150 mmol/L 氯化钠溶于 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0
100–150 mmol/L 硫酸钠溶于 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0
50–100 mmol/L 尿素溶于 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0。也可以用其他类似的盐 (如 KCl) 和盐酸胍。

pH 范围: 2.0–8.5

可添加的有机溶剂包括:

5%–10% 乙醇 (或其他类似溶剂, 如甲醇或乙腈) 溶于 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0; 5% DMSO 溶于 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0。请注意: 使用高粘度流动相时, 应当降低流速以保持压力不超过最高运行压力。

温度:

SEC 分离通常在 10–30 °C 下进行。蛋白质和多肽的分离需要较高温度, 以改善蛋白质和疏水性多肽的分离度和回收率。为尽可能保持温度敏感型蛋白质的最大生物活性, 可在低温环境中运行 SEC。Agilent Bio SEC 色谱柱的最高运行温度为 80 °C。注意高温会使蛋白质变性。

SEC 的仪器注意事项

SEC 的分离原理意味着洗脱体积或保留时间对分析结果至关重要。只有高性能的仪器才能确保高精度和重现性。最好用等度泵或梯度泵运行等度模式，同时可采用示差折光 (RI) 检测器以及更为常规的 UV 或 DAD 检测器。为确保基线稳定，特别是当使用 RI 检测器时，强烈建议对流动相进行在线脱气并使用柱温箱。高温下运行可以增加扩散系数，从而提高分离度、重现性并降低柱压。因此对于高性能系统而言，柱温箱必不可少。

即使复杂溶剂条件也能确保稳定可靠运行

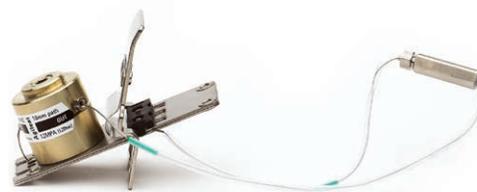
分析生物分子时通常使用 2 mol/L NaCl 或 8 mol/L 尿素等高盐浓度的缓冲液且使用 1-13 的极端 pH 值给液相色谱仪带来了严峻的挑战。1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱采用的特殊设计可轻易应对这些严苛的溶剂条件。溶剂运送系统使用耐腐蚀的钛材质，样品流路采用非金属材料，由此建立了极为稳定的仪器，不仅可以保护您的样品，同时还能保护您的仪器投资。此外，检测器专为生物分子分离而设计，不会影响蛋白质分析、峰形和回收率。

分析过程中确保蛋白质稳定

加热会使蛋白质变性，所以样品在整个液相流路中保持恒定的温度非常重要。使用附加的控温器可有效冷却配有惰性样品定量环和陶瓷进样针的安捷伦生物惰性自动进样器。柱温箱中的生物惰性热交换器可保持温度恒定。



Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统



配有 RFID 标签的生物惰性流通池，10 mm，13 μ L（部件号 G5615-60022）

安捷伦提供了多种适用于蛋白质的生物惰性流通池，可确保在不同条件下进行可靠的蛋白质分析。对于 DAD，新型最大光强卡套式流通池 LSS 将降低光强度，确保样品完整性。如需了解关于流通池选件的更多信息，请访问

www.agilent.com/chem/bioflowcells

软件解决方案提供全新见解

使用体积排阻色谱时，有多种可选软件为您提供支持：

- HPLC 软件：Agilent OpenLAB CDS ChemStation 软件有助于获取、查看和组织色谱数据，并执行定量分析
- GPC/SEC 软件：可作为安捷伦 GPC/SEC 系统的配置部件，提供基于分子量的更多信息
- 缓冲液顾问软件：快速简单地创建盐梯度和 pH 梯度，免除繁琐且易于出错的方法开发步骤，如缓冲液前处理、缓冲液混合及 pH 测定



体积排阻表征步骤

样品前处理

体积排阻色谱的样品前处理方法与 HPLC 蛋白质分析的样品前处理方法类似。最重要的一点是样品必须能够溶于洗脱液，且自身可在流动相条件下实现良好分离。由于 SEC 分离与 HPLC 的其他形式相比具有更大的色谱柱尺寸与更小的线速度从而具有相对较低的流速（见下文的“色谱柱尺寸”部分），因此样品浓度和进样量需要大于常规量。为避免损害色谱柱，建议在使用前进行样品过滤或离心以除去颗粒物。然而过滤无法解决样品溶解度低的问题，此时需要更换洗脱液。

为进行有效的样品前处理，确保溶解样品的方法不会改变样品本身的性质也很重要。某些蛋白质可能会在压力条件下发生聚集（形成二聚体或更大分子量的多聚体）或解离（形成更低分子量的亚基）。这些条件包括反复冻融、极端温度、超声甚至浓缩。请参见第 5 页的方法开发指南了解详细信息。

Captiva 低蛋白质结合过滤器

无论您使用何种样品前处理方法，采用一种低蛋白结合过滤器对样品进行过滤都是一个不错的选择。

安捷伦的 PES 过滤器在蛋白质相关的过滤中提供优越和一致的低蛋白质结合力。在大多数液相色谱分析中，PES 滤膜相对 PVDF 滤膜而言是一种更好的选择。对于常见的液相色谱溶剂，安捷伦的 PES 具有与 PVDF 过滤器相似的兼容性，而在蛋白质结合力和清洁度方面比 PVDF 更胜一筹。更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/filtration

Captiva PES 过滤器

直径 (mm)	孔径 (µm)	认证	外壳	部件号
4	0.45	LC	聚丙烯	5190-5095
4	0.2	LC	聚丙烯	5190-5094
15	0.2	LC	聚丙烯	5190-5096
15	0.45	LC	聚丙烯	5190-5097
25	0.2	LC	聚丙烯	5190-5098
25	0.45	LC	聚丙烯	5190-5099



色谱柱选择

色谱柱尺寸

SEC 色谱柱尺寸通常大于其他色谱所用的色谱柱尺寸，而流速及线速度却相对较小。SEC 标准色谱柱尺寸为 7.8×300 mm，流速 1.0 mL/min，而反相色谱柱常为 2.1×150 mm 或 4.6×150 mm，线速度为 SEC 的 2-3 倍。这不是色谱柱尺寸决定的，而是 SEC 分离原理所致。

进行 SEC 分离时，样品浓度不会增加，而样品浓度增加这一现象在其他色谱技术中较为常见，原因是分析物会被固定相吸附或是发生相互作用。因此，SEC 的进样量要大得多 (5-20 μ L)，且浓度通常较高 (1-4 mg/mL)。每根色谱柱的分析时间通常为 10-12 分钟 (假定常规 7.8×300 mm 色谱柱流速为 1.0 mL/min)，色谱峰通常很宽，因此无需较高的数据采集速率。蛋白质聚集体的对比或定量要用到 HPLC 软件。获得多分散聚合物的分子量分布信息需要使用特定的 SEC 软件。

最为重要的是要通过定期校准来了解所选色谱柱的性质。使用足够大的、无法渗入任何孔隙的分子，便可测定色谱柱的排阻极限。同样地，使用非常小的、可渗入任何孔隙的分子，便可测定色谱柱的总渗透极限。然后，您需要确保所进行的分离处于这两个极限值之间。如果样品的色谱图中存在排阻物质或在总渗透点处洗脱的物质，这表明需要选用其他孔径的色谱柱进行分析。



较短的色谱柱可提高分析速度

通常需要使用 300 mm 长的色谱柱以获得所需的分离度。不过为了提高分离速度，可以考虑使用更短的色谱柱。使用 150 mm 柱长的色谱柱可使分离时间缩短一半，但分离度会降低。如果需要通过实现高通量，通常可在不超过反压限值的前提下采用更短的色谱柱和更高的流速，从而可进一步缩短分析时间。见图 5。

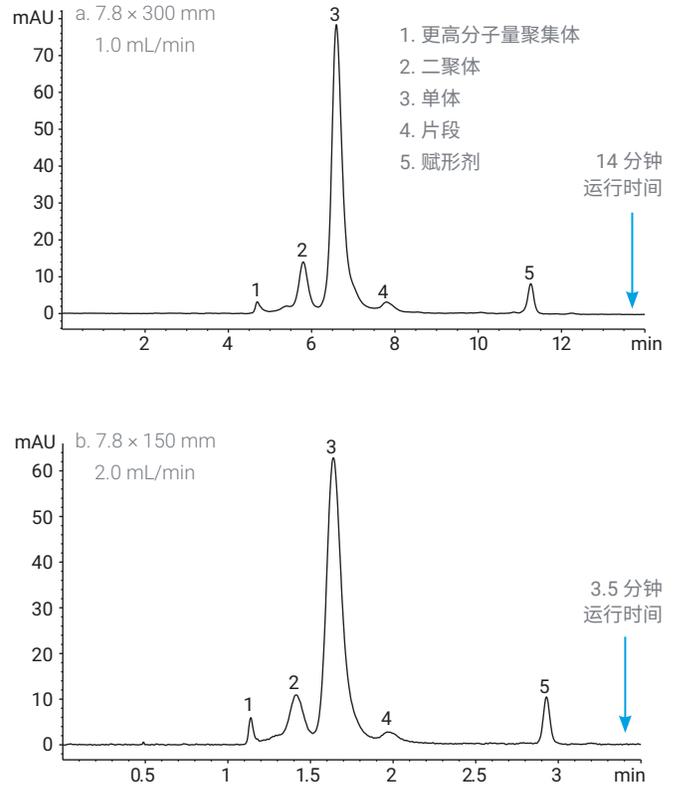


图 5. 比较 300 mm 与 150 mm AdvanceBio SEC 色谱柱的多克隆 IgG 分析结果，以表明可以节省的时间

色谱柱填料选择

测定样品溶解性以及确定分离流动相（水、缓冲液或有机溶剂）后，根据分子的类型和尺寸选择合适的体积排阻色谱柱。对于分子量分布范围较宽的聚合物分子，如肝素、淀粉或纤维素，常使用装填聚合物吸附剂的色谱柱。硅胶基固定相最适于分析蛋白质和分子量不均一的分子（表 1）。

Agilent Bio SEC 色谱柱用于分离包括蛋白聚集体在内的生物分子，而安捷伦 GPC 色谱柱用于包括多糖分子量测定在内的天然聚合物分析。需要记住，蛋白质中含有众多氨基酸带有不同侧链基团，如酸性、碱性、疏水性、中性/亲水性。为了防止它们与硅胶色谱柱的固定相相互作用，需要在流动相中加入缓冲液。

安捷伦会针对色谱柱给出适合的分子量范围，理想情况下您所选用的色谱柱应该处于该操作范围的中间区间。



Agilent Bio SEC 色谱柱用于分离包括蛋白聚集体在内的生物分子，而安捷伦 GPC 色谱柱用于包括多糖分子量测定在内的天然聚合物分析。

体积排阻色谱 (SEC)

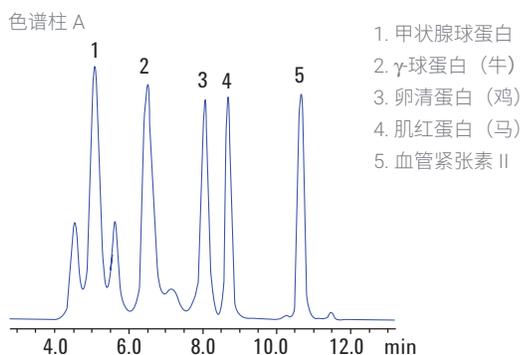
表 1. 安捷伦提供各种 SEC 色谱柱，可满足您的所有体积排阻分析需求

应用	安捷伦色谱柱	说明
蛋白质		
mAb、蛋白质和多肽的 SEC-UV/DAD、非变性 SEC/MS 或 LS 分析	Agilent AdvanceBio SEC	一种创新技术，能够提供高分离度，避免样品重复分析，并能缩短分析时间，从而提高实验室分析效率。可选用于非变性 SEC-MS 的带 PEEK 内衬的色谱柱。
生物大分子及含有多种分子量组成的样品	Agilent Bio SEC-5	多种孔径可供选择（100 Å、150 Å、300 Å、500 Å、1000 Å 和 2000 Å），能够覆盖更宽的分析物范围。
球蛋白，抗体	ProSEC 300S	高盐 浓度下进行蛋白质分析的理想色谱柱。
蛋白质，球蛋白	ZORBAX GF-250/450	在方案仍要求使用 USP 指定产品 L35 时应采用的老式产品。

孔径

相对于其他生物聚合物而言，蛋白质的体积相对较小且致密，所以 300 Å 孔径是进行初始色谱柱选择的一个不错选择。图 6 对比了使用不同孔径的色谱柱分离含 5 种蛋白质混合物的参比标样和多克隆 IgG 样品，结果清楚表明了孔径对分离度的影响。

Agilent AdvanceBio SEC 蛋白质标准品



条件

参数	值
色谱柱 A:	AdvanceBio SEC 300 Å 4.6 × 300 mm, 2.7 μm (部件号 PL1580-5301)
色谱柱 B:	AdvanceBio SEC 130 Å 4.6 × 300 mm, 2.7 μm (部件号 PL1580-5350)
样品:	Agilent AdvanceBio SEC 蛋白质标准品 (300 Å, 部件号 5190-9417 和 130 Å, 部件号 5190-9416)
仪器:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统
流动相:	150 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0
流速:	0.35 mL/min
检测器:	UV, 220 nm

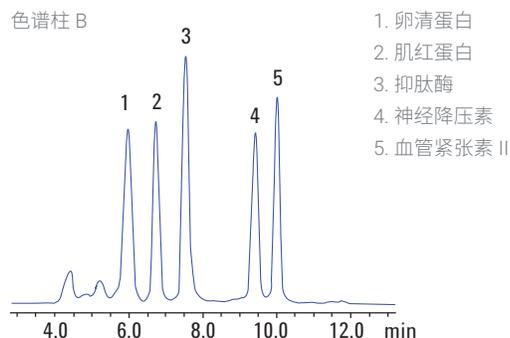
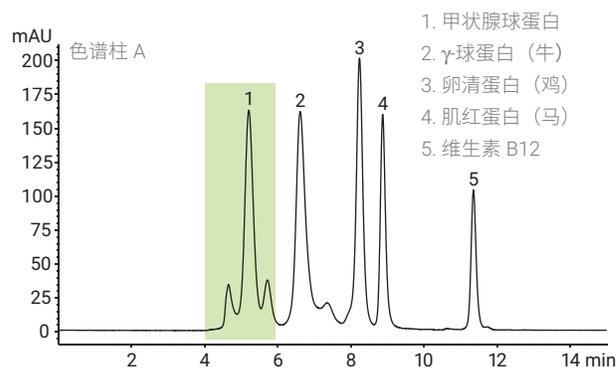


图 6. 比较孔径对 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 标准品分离度的影响。绿色区域突出显示了两种孔径下的不同分离度。分析较大蛋白质时需使用较大的孔径

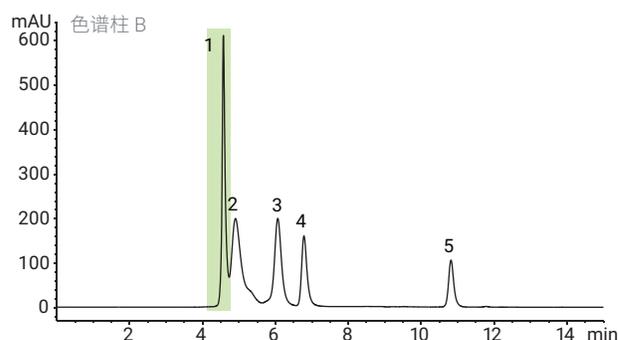
使用 300 Å 孔径的色谱柱时，最大体积的蛋白质甲状腺球蛋白和 IgG 二聚体可实现分离，但随着孔径的减小，最大的蛋白质均被排出色谱柱，因此无法进行有效分离。

BioRad 凝胶过滤混标



条件

参数	值
色谱柱 A:	AdvanceBio SEC 300 Å 4.6 × 300 mm, 2.7 μm (部件号 PL1580-5301)
色谱柱 B:	AdvanceBio SEC 130 Å 4.6 × 300 mm, 2.7 μm (部件号 PL1580-5350)
样品:	BioRad 凝胶过滤混标
仪器:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统
流动相:	150 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0
流速:	0.35 mL/min
检测器:	UV, 220 nm



评价 SEC 的渗透范围

对于蛋白质分离，必须了解，SEC 的分离机制是依据溶质在溶液中的体积而非它们的分子量。比较蛋白质/多肽与支链淀粉/多糖及 PEG/PEO 的校准曲线时，这一点尤为明显，如图 7 所示。支链淀粉/多糖与 PEG/PEO 的校准曲线非常类似，而蛋白质/多肽的曲线就发生了偏移且形状不同。蛋白质由形成三维结构的复杂多肽链组成。而这些结构会受到它们所暴露环境的影响，如 pH 值或离子强度。氨基酸链会形成最适宜的形状，导致蛋白质的结构和体积发生变化。

为了证实洗脱时间取决于体积而非分子量，查看分子量约 50000 左右的校准物的保留时间，可发现其中存在显著差异（图 8）。PEG 在 7 分钟左右时洗脱，多糖在 7.5 分钟左右时洗脱，而蛋白质的洗脱时间则约为 9.5 分钟。

这清楚地表明 SEC 的分离机制是基于分子的实际体积而非分子量。因此，当使用校准曲线时需要说明所使用的校准物。例如，可说明目标样品相当于分子量 50000 的支链淀粉/多糖。第 16 页中的先进检测器就不存在这种相对性。

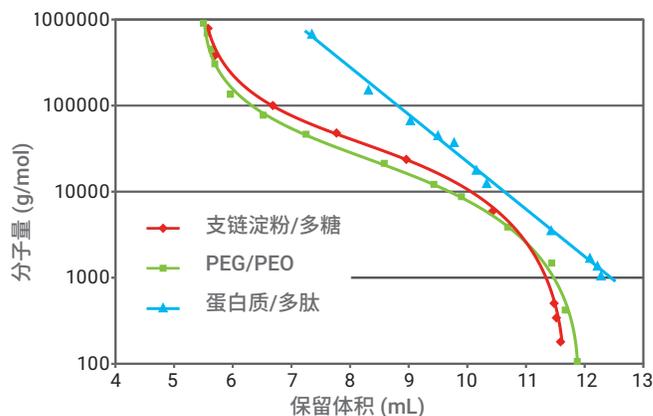


图 7. 三种类型的校准物所得的校准曲线对比

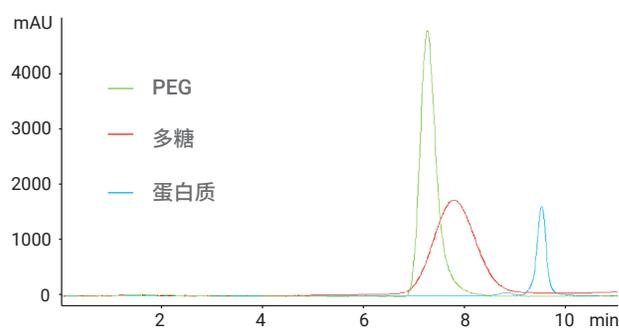


图 8. 分子量相似的校准物的叠加色谱图



130 Å AdvanceBio SEC 校准标样 (部件号 5190-9416, 130 Å AdvanceBio SEC 校准标样, 2 mL/瓶)

含 5 种精选蛋白质（卵清蛋白、肌红蛋白、抑肽酶、神经降压素、血管紧张素 II，分子量范围为 43–1.1 kDa）的蛋白质混合物，适用于校准 Agilent 130 Å AdvanceBio SEC 色谱柱。该标准品可用于常规色谱柱校准，以确保涉及蛋白质纯化与分析的多种应用可在理想的系统性能下进行。

300 Å AdvanceBio SEC 校准标样 (部件号 5190-9417, 300 Å AdvanceBio SEC 校准标样, 2 mL/瓶)

含 5 种精选蛋白质（甲状腺球蛋白、 γ -球蛋白、卵清蛋白、肌红蛋白、血管紧张素 II）的蛋白质混合物，适用于校准 Agilent 300 Å AdvanceBio SEC 色谱柱。该标准品可用于 200 Å 和 300 Å AdvanceBio SEC 色谱柱的常规校准，以确保涉及蛋白质纯化与分析的多种应用可在理想的系统性能下进行。

粒径

选择色谱柱时，粒径也是一个重要考虑因素。较小的粒径可提供更有效的分离，从而实现更高的分离度，但是存在较大蛋白质降解（剪切/变形）的风险。图 9 比较了 Agilent Bio SEC 色谱柱 3 μm 和 5 μm 填料颗粒。如果样品前处理和洗脱液前处理过程中不够仔细，会造成色谱柱反压升高、色谱柱堵塞的风险。推荐采用过滤器去除不溶物质和碎片。使用保护柱或在线过滤器还可延长色谱柱使用寿命。

3 μm 和 5 μm SEC 填料颗粒的比较

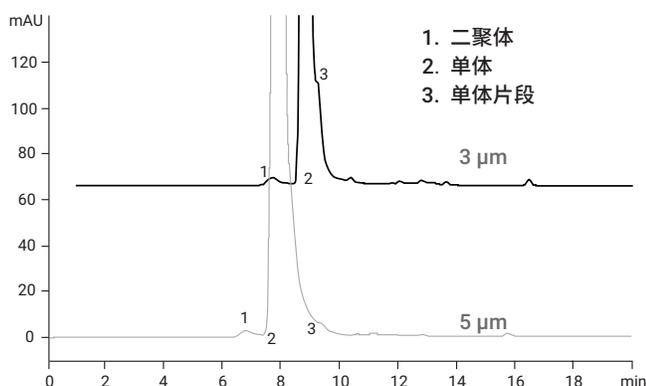


图 9. Agilent Bio SEC-3 和 Agilent Bio SEC-5 填料颗粒的对比。3 μm 柱具有更出色的分离效果

色谱柱内径

根据样品量选择色谱柱内径也十分重要。如果待分析物质的量很少，采用 4.6 mm 内径色谱柱（流速 0.35 mL/min）即可。但使用更小内径的色谱柱时，尽可能减小系统体积非常重要，可以避免过度扩散和分离度降低。当使用水相洗脱液时，SEC 被认为是一种非变性技术，极为适用于分离复杂样品或样品成分，以便进一步分析。Agilent SEC-3 和 SEC-5 产品系列的 21.2 mm 色谱柱等大内径色谱柱可用于通过分析型 HPLC 系统进行实验室制备型分离。

单克隆抗体分析条件

参数	值
色谱柱 A:	Bio SEC-3, 300 \AA 7.8 \times 300 mm, 3 μm (部件号 5190-2511)
色谱柱 B:	Bio SEC-5, 300 \AA 7.8 \times 300 mm, 5 μm (部件号 5190-2526)
样品:	人源化单克隆抗体
仪器:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统
流动相:	150 mmol/L 磷酸钠, pH 7
流速:	1 mL/min
检测器:	UV, 220 nm



Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱 7.8 \times 300 mm 和 4.6 \times 300 mm

方法参数

流速

对有些应用而言，分析速度十分关键。采用短色谱柱（如采用 150 mm 替代常规 300 mm）和/或提高流速均可缩短分析时间。但这两种方法同时也会降低分离度，这是因为 SEC 依靠分子不断扩散进入和排出色谱柱的孔隙中而形成不同的路径长度，从而实现分离。尽管如此，如图 10 所示，使用 150 mm 长色谱柱在 2 mL/min 流速下分析 IgG 二聚体和单体时，仍可在 4 分钟内获得定量分析所需的足够分离度。

条件

参数	值
色谱柱:	AdvanceBio SEC 300 Å 7.8 × 150 mm, 2.7 μm (部件号 PL1180-3301)
样品:	IgG (2 mg/mL)
洗脱液:	150 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0
流速:	0.5、1.0、1.5 mL/min (52、102、152 bar)
检测器:	UV, 220 nm
进样量:	5 μL

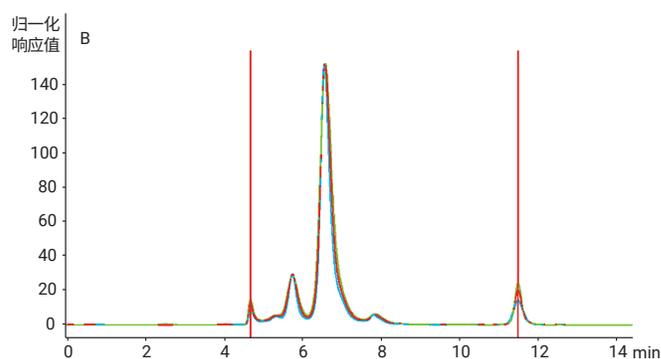
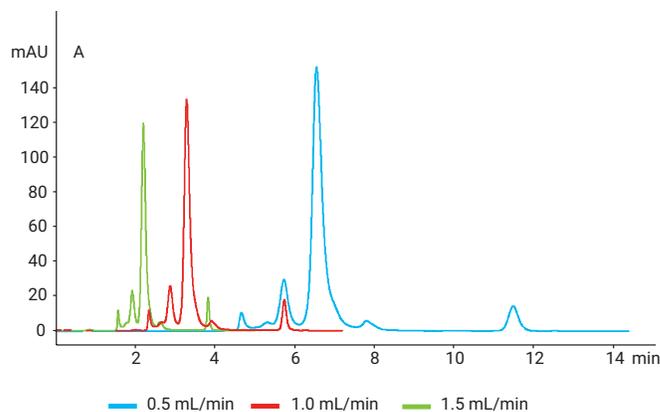


图 10. 提高流速可将分析时间从 12 min 缩短至 4 min (A)。将保留时间进行归一化处理后叠加时 (B)，可明显发现保留时间是一致的，且几乎没有损失分离度

SEC 方法的故障排除

问题	来源	解决方案
回收率低于预期，或峰形过宽	疏水性分析物	在流动相内加入少量 (10%–20%) 有机改性剂 (乙腈或甲醇)
色谱峰出现在不应出现的地方 (根据分子量判断)，或色谱峰拖尾	离子相互作用或碱性蛋白	增加离子强度，使盐浓度达到 50–100 mmol/L 之间；加入磷酸盐缓冲液
峰形差	非特异性吸附	增加盐浓度或试用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统
分析物保留/分离度差	孔径小于分子体积	检查色谱柱孔径；详见第 6 页和第 12 页

流动相选择

次级相互作用会导致分离不佳

可以通过进行方法优化,来防止次级相互作用的发生。这样的相互作用可能会导致迟于预期的分析物洗脱, 出现分子量较低的假象。稍微调整流动相组成: pH 值、离子强度或有机改性剂, 就有利于解决类似问题 (图 11)。还可能需改善孔径选择、串联色谱柱、降低分析流速或改变柱温来获得期望的分离效果。

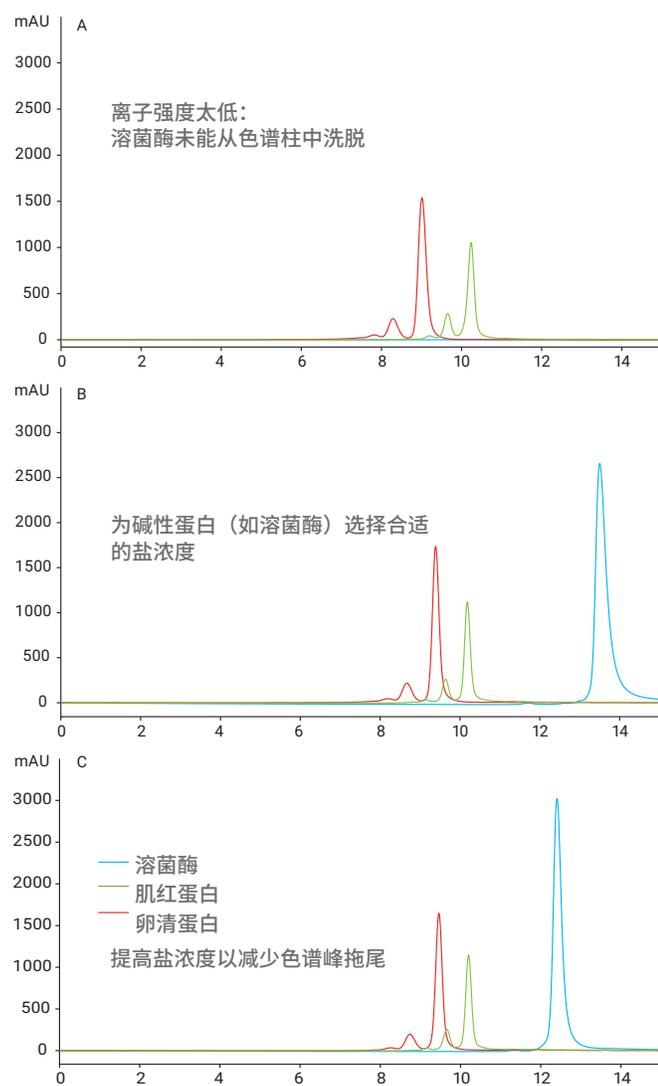


图 11. 离子强度过高或过低对所需分离度的影响

条件

参数	值
色谱柱:	Agilent Bio SEC-3, 300 Å 4.6 × 300 mm, 3 μm (部件号 5190-2513)
样品:	蛋白质 (1 mg/mL 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7)
仪器:	150 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0
流速:	0.35 mL/min
检测器:	UV, 220 nm
	A: 洗脱液 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7 + 50 mmol/L NaCl B: 洗脱液 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7 + 100 mmol/L NaCl C: 洗脱液 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7 + 400 mmol/L NaCl
进样量:	5 μL

50 mmol/L NaCl 溶于
20 mmol/L 缓冲液



400 mmol/L NaCl 溶于
20 mmol/L 缓冲液

校准

选择了色谱柱后，需要使用已知分子量的标样进行校准。每次更改色谱柱或流动相后，都需要再次校准。保留时间对分子量作图便得到校准曲线（图 12）。根据目标分子选择合适的标样极其重要。对蛋白质分离而言，需采用蛋白质分子量标样。对多糖分离而言，需采用支链淀粉分子量标样。

蛋白质	MW	保留体积				
		1000 Å	500 Å	300 Å	150 Å	100 Å
甲状腺球蛋白	670000	10.07	8.23	7.03	5.82	5.77
γ-球蛋白	158000	10.88	9.80	8.57	6.55	5.79
BSA	67000	11.13	10.44	9.44	7.29	6.00
卵清蛋白	45000	11.28	10.83	9.89	7.90	6.40
肌红蛋白	17000	11.44	11.28	10.42	8.66	7.05
核糖核酸酶 A	12700	11.52	11.41	10.58	8.93	7.32
维生素 B12	1350	12.00	12.59	11.78	11.49	10.30
尿嘧啶	112	12.08	12.68	12.21	12.13	11.41

理想情况下，标样应溶解于流动相，且需确保样品完全溶于流动相。如果溶液浑浊，则需要进一步处理。进样前应采用离心或过滤以除去不溶物。而物理方法可能会改变分子量组成，因此有必要通过改变流动相条件以提高样品溶解度。

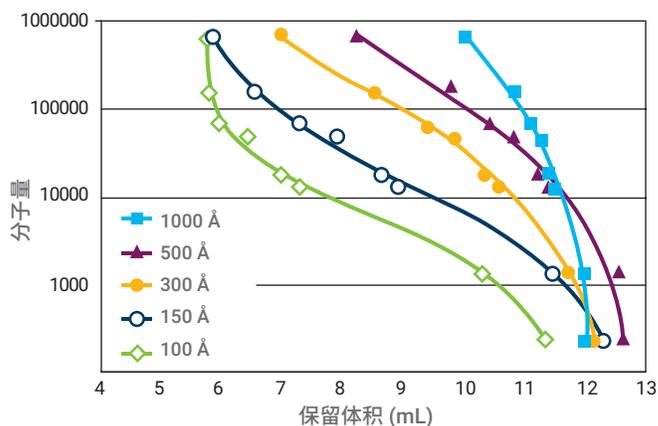


图 12. 将保留时间对分子量作图得到的校准曲线

条件

参数	值
色谱柱:	Agilent Bio SEC-5 7.8 × 300 mm, 5 μm (部件号 5190-2521)
仪器:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统
流动相:	150 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0
流速:	1.0 mL/min
检测器:	UV



先进的检测技术

需要进一步考虑的因素包括检测器的选择。UV 或二极管阵列 (DAD) 检测器常用于蛋白质分离。多肽和蛋白质通常可在 220 nm 下获得最佳结果 (最高灵敏度)。一些缓冲液或有机改性剂可能在低波长处背景吸收过高, 这时有必要选择 254 nm 或 280 nm。UV 检测的一个缺点是有些分子不具有发色团, 而由于分析物为等度洗脱, 则可改用 RI 检测器。高级光散射检测器的加入可显著提高 SEC 的性能。静态光散射检测可准确测定摩尔质量, 无需色谱柱校准, 还可避免不良的相互作用。联用动态光散射检测还可用于分子体积大小研究。光散射检测大大提高了灵敏度, 可用于发现含量极低的聚集体 (图 13)。选择死体积较低的检测器非常重要, 可确保获取额外信息且丝毫不损色谱性能。

在特殊情况下, 质谱 (MS) 可以在非变性模式 (标准水性缓冲液流动相) 或变性 (流动相中包含有机溶剂) 条件下与 SEC 一起使用。在使用质谱的情况下, 窄径色谱柱因流速较低而更常用于非变性模式质谱分析。在某些情况下, 带 PEEK 内衬的色谱柱有助于消除不利的样品-金属相互作用。针对这些情况, AdvanceBio SEC 1.9 μm 色谱柱可提供 2.1 mm 内径和带 PEEK 内衬的规格。

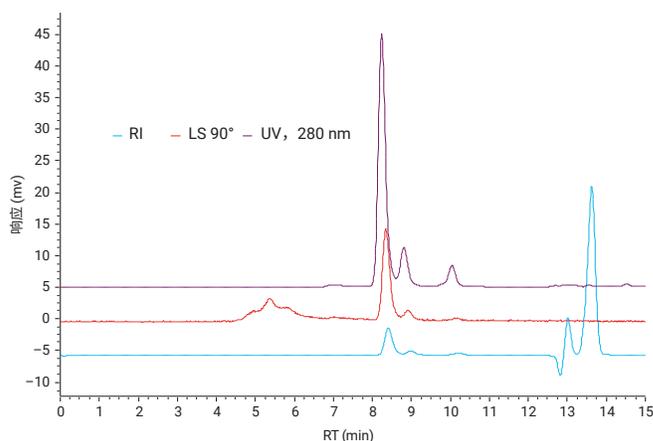


图 13. 使用不同检测器对蛋白质分离的检测结果

条件

参数	值
色谱柱:	Agilent AdvanceBio 300 Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 μm
样品:	降解的单克隆抗体
仪器:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统联用 Agilent 1260 Infinity 多检测器 GPC/SEC 系统
流动相:	150 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0
流速:	0.8 mL/min
温度:	30 °C
检测器:	UV, 280 nm + RI + LS 90°
进样量:	5 μL

蛋白质偶联物

治疗性蛋白质容易在开发过程的表达、再折叠、下游处理、制剂、灭菌和储存等所有阶段发生聚集和降解。尽管聚集体/降解产物的含量极低，但它们仍可对生物药物产生严重影响，如导致活性丧失、降低溶解度以及增加免疫原性。体积排阻色谱是表征蛋白质聚集体的标准方法，法规文件申报和审批中也明确要求使用体积排阻色谱。

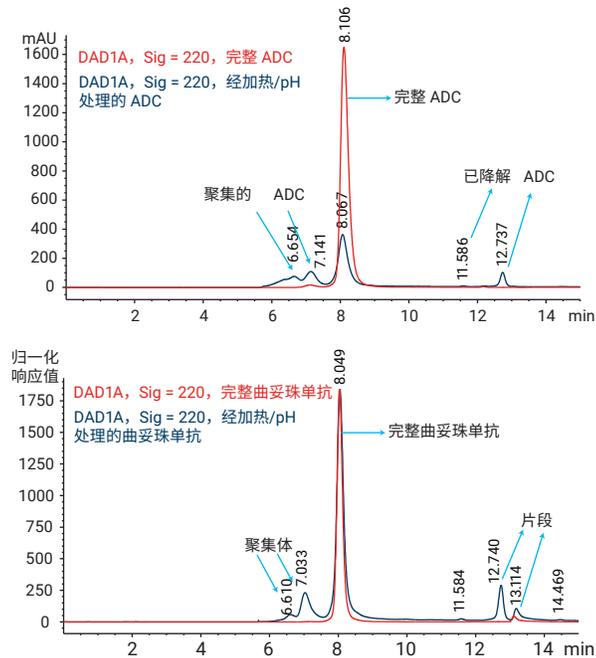


图 14. mAb 和疏水性较强的 ADC 均使用同一种水性流动相

为改善给药方式并提高半衰期与效价，可将包括单克隆抗体在内的蛋白质进行偶联。将水溶性聚合物（如聚乙二醇）与蛋白质偶联可提高药物活性、延长药物在血液中的半衰期并降低免疫原性。最近，抗体药物偶联物 ADC 越来越受到关注，期间研究人员将单克隆抗体与细胞毒素剂偶联以进行靶向给药并增强治疗效果。偶联后同样需要进行聚集体研究，因为样品特性的改变将为 SEC 分离带来更大挑战。需使用具有低非特异性结合的色谱柱（如 AdvanceBio SEC）分析抗体和 ADC，流动相可使用水性流动相。见图 14。

条件

参数	值
色谱柱:	AdvanceBio SEC 300 Å 7.8 × 300 mm, 2.7 μm
仪器:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统
流动相:	PBS, 50 mmol/L 磷酸钠 + 150 mmol/L 氯化钠, pH 7.4
TCC 温度:	室温
进样量:	10 μL
流速:	0.8 mL/min
检测器:	UV, 220 nm

为您的成功之路指引方向

www.agilent.com/chem/navigator

安捷伦液相色谱和样品前处理在线选择工具中包括品种丰富的生物色谱柱和小分子色谱柱系列产品，帮助您针对应用选择合适的色谱柱。

在线选择工具为您提供四种简单的搜索选项：

- 按部件号搜索，液相色谱柱和样品前处理产品交叉引用信息将帮助您寻找合适的安捷伦替换部件



- 按化合物搜索，使用下拉列表
- 按 USP 方法搜索
- 按色谱柱搜索，根据所用的色谱柱方法提供建议

样品前处理

- 理想情况下，样品应溶解于流动相
- 如果样品浑浊，可能需要改变流动相条件
- 过滤或离心可使样品澄清，但这些方法会改变样品的分子量组成
- 为溶解样品，可通过略微加热、漩涡振荡，或有时使用超声，但需要小心使用，因为这会改变分子量组成
- 小心仔细，确保样品不会在储存中发生变化
- 样品需新鲜制备并尽快用于分析
- 细菌会在缓冲液中快速生长
- 高浓度样品可能会逐渐发生变化，导致聚集甚至沉淀



色谱柱选择

- 为确保样品完整性，需使用长柱以较低的流速进行 SEC 分离
- 色谱柱长度通常为 150 或 300 mm
- 7.5 或 7.8 mm 内径的色谱柱常规流速为 1.0 mL/min，4.6 mm 内径的色谱柱常规流速为 0.35 mL/min，2.1 mm 内径的色谱柱常规流速为 0.1 mL/min
- 通常采用串联色谱柱以提高生物聚合物应用的分离度
- 使用较小填料粒径可提高蛋白质应用中的分离度
- 采用较小填料粒径的 150 mm 色谱柱可缩短分析时间

色谱柱填料选择

- 分析物不得与色谱柱填料发生非特异性相互作用
- 硅胶基质吸附剂可用于分析多肽和蛋白
- 聚合物基质吸附剂可用于分析生物聚合物

色谱柱参数

- **孔径** — 取决于样品的分子量范围，避免排阻出样品成分，尽可能增加所需分离区域的体积
- **粒径** — 填料粒径越小分离度越高（但反压更高）
- **色谱柱长度** — 平衡好分离度及分析时间
- **色谱柱内径** — 使用较小内径的色谱柱可减少溶剂损耗和进样量



流动相

- 流动相应包括缓冲液/盐以克服离子相互作用，但盐度太高会导致疏水作用
- 请勿改变分析物，以避免蛋白质降解/聚集等现象的发生
- 新鲜配制流动相并迅速使用，室温下存储的稀缓冲液非常利于细菌生长
- 缓冲液的保存期不得超过 7 天，除非冷藏保存
- 使用前应过滤水（可能性小）或缓冲盐（可能性大）中的颗粒物
- 当使用硅胶色谱柱时，高 pH 磷酸盐缓冲液（尤其是高温条件下）会显著缩短色谱柱寿命

如需了解用于 SEC 的安捷伦生物色谱柱的更多信息，请访问

www.agilent.com/chem/advancebio

提升 mAb 聚集体分析性能

使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统进行高分离度 SEC 分析

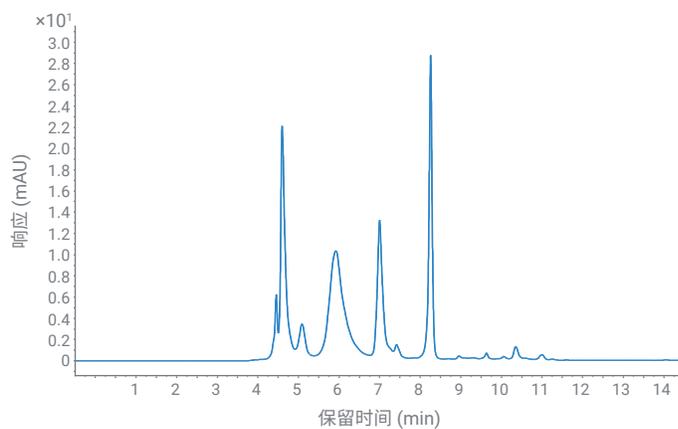
作者

Edgar Nägele

安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了配备 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱和超低扩散毛细管的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统通过体积排阻色谱 (SEC) 分离蛋白质的出色分离度。生物兼容性 UHPLC 系统能够使用腐蚀性盐缓冲液进行分析, 因此节省了维护费用。比较了不同内径毛细管 (0.17、0.12 和 0.07 mm) 在 SEC 分析中的分离度。对一种蛋白质混标和单克隆抗体 (mAbs) (包括聚集体) 进行了分离, 并比较了分离度。此外, 由单一软件解决方案中的 Agilent OpenLab GPC/SEC 附加软件确定了分子量, 实现了一步式工作流程。



前言

mAbs 等现代生物药物是高度异质性的化合物。聚集体是最重要的关键质量属性 (CQAs) 之一，通常采用 SEC 进行监测。这项技术可根据标准品计算待测物分子量，从而对化合物进行鉴定。此外，该技术还可通过显示更高分子量的聚集体成分（如二聚体和更高程度聚集体）来确认纯度。为获得足够的分离度，推荐使用亚 2 μm 颗粒填充的现代 SEC 色谱柱。为实现出色性能，首选亚 2 μm 色谱柱和死体积尽可能小的 UHPLC 仪器。死体积过大会因扩散效应而损失这些色谱柱获得的分离度。此外，完全生物兼容的 1290 Infinity II 生物液相色谱系统可以充分应对 SEC 缓冲液中常用的高浓度盐，以超低的维护成本提供可靠结果。

本应用简报介绍了现代亚 2 μm SEC 色谱柱在 1290 Infinity II 生物液相色谱系统上的应用，展示了使用死体积极小的仪器带来的优势。为证明死体积对蛋白质和聚集体分离的影响，使用了不同内径的毛细管。将特征明确的 NISTmAb 通过 pH 诱导和热诱导产生更多聚集体，随后分离这些聚集体。

实验部分

仪器

- Agilent 1290 Infinity II 生物高速泵 (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A)，配备集成式样品恒温箱（选件 #101）
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)，配备生物兼容性热交换器
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (G7114B)，配备生物兼容性微量流通池，3 mm，2 μL

其他部件

Agilent 1290 Infinity II 生物超低扩散工具包 (G7132A#006)

软件

Agilent OpenLab 2.5 版和 GPC/SEC 附加软件 1.2 版

液相色谱方法

参数	阀
溶剂	磷酸盐缓冲液 (PBS), pH 7.4
流速	0.35 mL/min
等度分离	
柱温	30 °C
样品温度	4 °C
进样针清洗	用水清洗 3 秒
进样量	5 μL
检测 (VWD)	280 nm, 采集速率 20 Hz

色谱柱

Agilent AdvanceBio SEC 200 Å, 4.6 × 300 mm, 1.9 μm (部件号 PL1580-5201)

样品

- 校准用蛋白质混标 (部件号 5190-9417)：甲状腺球蛋白 (670000 Da)、 γ -球蛋白 (150000 Da)、卵清蛋白 (45000 Da)、肌红蛋白 (17000 Da)、血管紧张素 II (1000 Da)
- 人源化单克隆抗体 (mAb) 曲妥珠单抗 (商品名为赫赛汀) 购自 Roche (Basel, Switzerland)。曲妥珠单抗溶于 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液中，pH 6.8
- Agilent NISTmAb，人源化 IgG1 κ mAb (部件号 5191-5745) (Steinheim, Germany)

pH 诱导/温度诱导 NISTmAb 方案

使用流动相将 mAb 稀释至 2 mg/mL 的最终浓度。pH 诱导方法与其他文献所述基本相同，仅有略微改动^[1]：将 1 mol/L HCl 溶液缓缓滴加到样品溶液中，使其 pH 值从 6.0 改变为 1.0。然后，滴加 1 mol/L NaOH 溶液将 pH 值调节至 10.0。最后，再次滴加 1 mol/L HCl 溶液将 pH 值调回 6.0。pH 值变化间大约有 1 分钟的等待时间，期间持续缓慢搅拌溶液。将所得溶液在 60 °C 下温育 60 min。

溶剂和化学品

- **PBS**：在 25 °C 下将 1 片 PBS 片溶于 200 mL 去离子水，得到 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液、0.0027 mol/L 氯化钾、0.137 mol/L 氯化钠，pH 7.4
- 化学品购自德国 VWR 公司
- 新制超纯水产自配置 LC-Pak Polisher 和 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统

结果与讨论

用于蛋白质 SEC 分离的现代色谱柱中填充亚 2 μm 颗粒, 可实现出色分离。而这需要仪器具有优化的低死体积, 因为高死体积特别是内径较大的毛细管会损失获得的分离度。1290 Infinity II 生物液相色谱系统对 5 种蛋白质混标 (包括 3 种二聚体) 的分离结果如图 1A 所示。为了尽可能降低死体积和扩散效应, 我们使用了内径 0.07 mm 的毛细管进行分离。早洗脱的甲状腺球蛋白二聚体 (4.947 min) 实现了部分分离。如需设置用于分子量测定的校准, 使用该混合物中的所有蛋白质生成校准曲线 (图 1B)。获得了四阶理想曲线拟合。

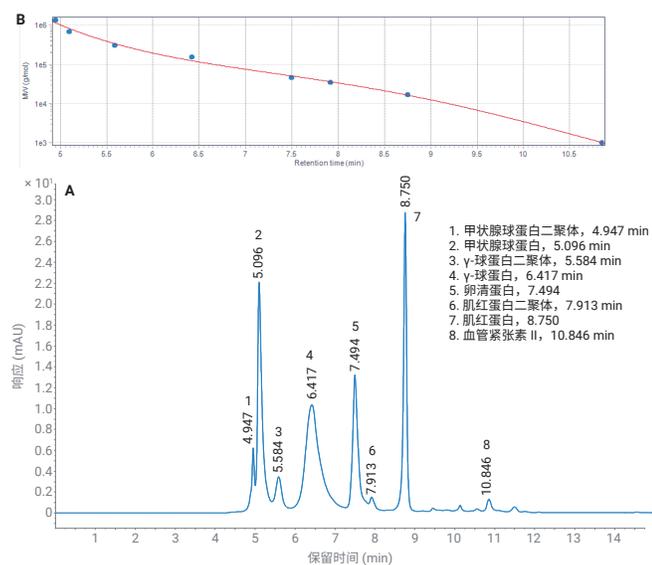


图 1. (A) Agilent AdvanceBio SEC, 200 \AA , 4.6 \times 300 mm, 1.9 μm 与 Agilent 1290 Infinity II 生物超低扩散工具包 (包括 0.07 mm 毛细管) 相结合, 分离包括 3 种二聚体在内的 5 种蛋白质混标。(B) 使用含有几种二聚体的蛋白质混标测定分子量的 SEC 校准曲线

使用校准曲线测定曲妥珠单抗和其中包含的二聚体的分子量 (图 2)。抗体在 6.489 分钟洗脱, 相应二聚体在 5.673 分钟洗脱 (图 2A)。曲妥珠单抗和二聚体最大峰值处测得的分子量分别为 Mp 141566 Da 和 Mp 321609 Da。分子量分布如图 2B 所示, 分子量计算值如图中表 (2C) 所示。

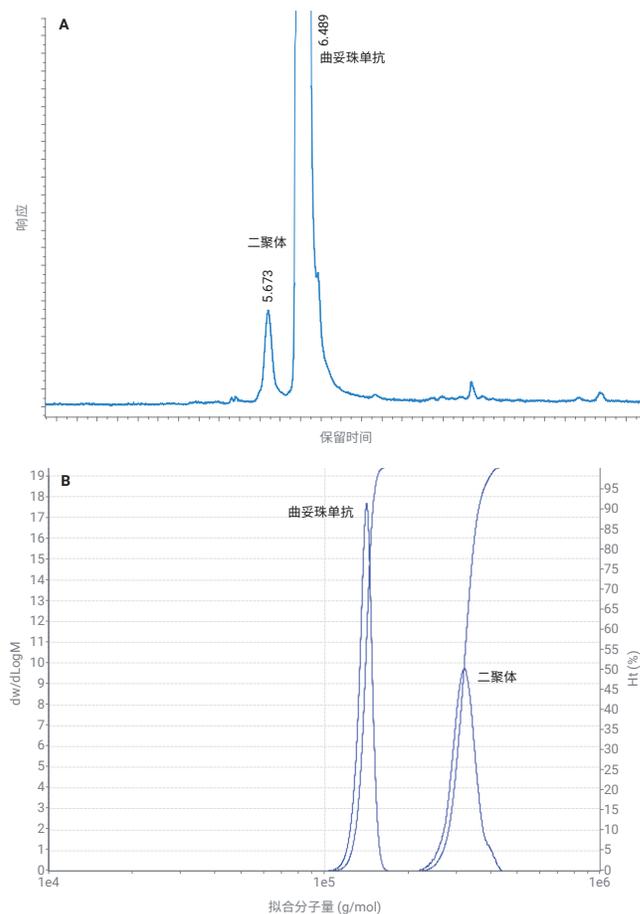


表 2C: 曲妥珠单抗及其聚集体的分子量

化合物	RT (min)	Mp (g/mol)
曲妥珠单抗聚集体	5.673	321609
曲妥珠单抗	6.489	141566
D4	0.072	0.071
D6	0.065	0.262
D8	0.066	0.281

图 2. 曲妥珠单抗和二聚体, 分子量测定。(A) 曲妥珠单抗单体和二聚体的 SEC 分离。(B) 曲妥珠单抗和二聚体的分子量。(C) 表列出了曲妥珠单抗及其聚集体的分子量。Mp: 最大峰分子量

比较内径 0.07 (ULD)、0.12 和 0.17 mm 的毛细管，可以看出所用毛细管内径的影响。为了证明这种影响，我们测定了蛋白质混标（如图 1 所示）第二个峰和第三个峰的分离度（图 3）。采用内径 0.07 mm 的毛细管，可以获得峰 2 和峰 3 的理想分离度值（图 3 中的表）。使用蛋白质混标的峰 2 测定半峰宽。从测量值可以看出，毛细管内径越大，峰宽越大。

毛细管对曲妥珠单抗及其聚集体的分离影响如图 4 所示。此处可以看到一个额外的低分子量化合物隐藏在主峰下，在使用 0.17 mm 毛细管分离时只出现一个微弱的肩峰，在使用 0.07 mm 毛细管分离时肩峰更加清晰可见。

毛细管 (μm)	分离度		峰宽 (min)
	峰 2	峰 3	峰 2
0.07	0.94	1.98	0.110
0.12	0.86	1.88	0.120
0.17	0.71	1.73	0.142

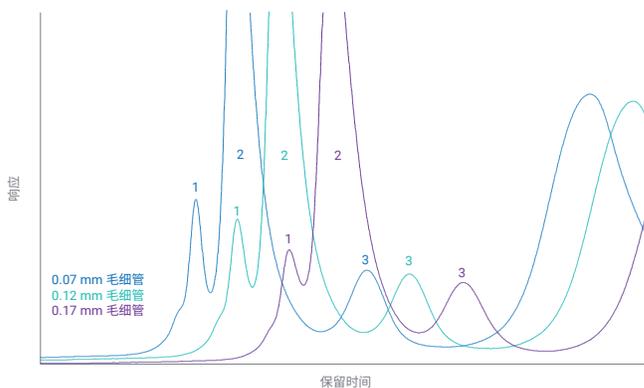


图 3. 比较毛细管内径增加对分离度和峰宽的影响

毛细管 (μm)	分离度	峰宽 (min)	
		赫赛汀	聚集体
0.07	3.34	0.096	0.189
0.12	3.05	0.107	0.205
0.17	2.83	0.121	0.216

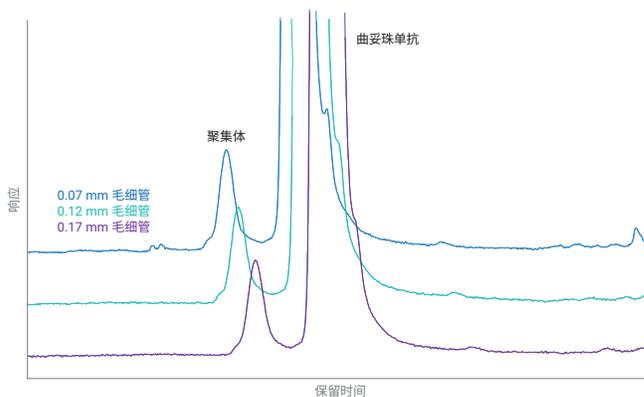


图 4. 所用毛细管内径对曲妥珠单抗与其二聚体的分离度和峰宽的影响

所有毛细管的保留时间和峰面积都具有出色的 RSD 值（表 1）。

另一个例子是，将特征明确的 NISTmAb（人源化 IgG1k mAb）与聚集体分离，并测定分子量（图 5）。

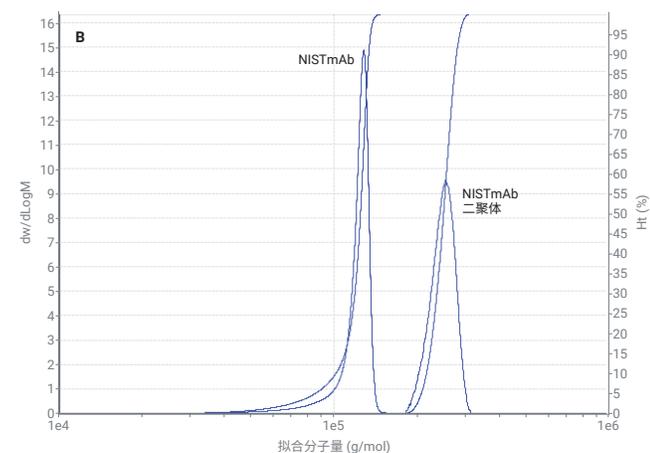
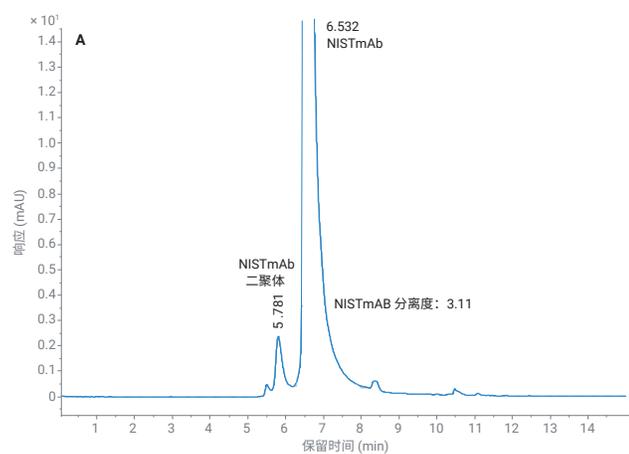


表 1. 所用毛细管分离曲妥珠单抗的保留时间和峰面积的 RSDs。随着毛细管体积的增加，保留时间相应增加

	0.07 mm 毛细管		0.12 mm 毛细管		0.17 mm 毛细管	
	RT	峰面积	RT	峰面积	RT	峰面积
平均值	6.464	1736.13	6.500	1727.05	6.554	1717.29
RSD (%)	0.02	0.10	0.01	0.28	0.01	0.25

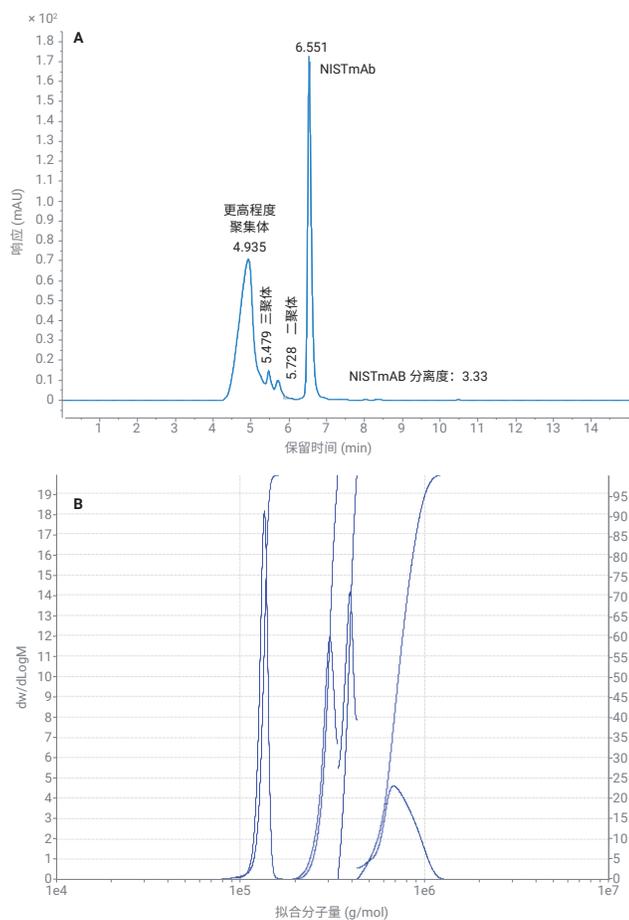
C

RT (min)	峰面积	峰高	分离度USP	峰拖尾	半峰宽
5.781	23.80	2.08	7.59	1.940	1.940
6.532	3006.00	409.40	3.11	1.569	0.100

D

RT (min)	Mp (g/mol)
5.781	305626
6.532	144767

图 5. (A) NISTmAb 与其主要二聚体的分离，分离度为 3.11。(B) NISTmAb 及其聚集体的分子量。(C) 表列出 NISTmAb 及其聚集体的主峰表征值。(D) 表列出 NISTmAb 及其聚集体的分子量



在 pH 诱导和温度诱导条件下（见“实验部分”），该 mAb 能够形成较高度度的聚集体（图 6）。使用超低扩散毛细管可分离出更高度度的聚集体（图 6A）。图 6B 和相应表格概述了它们的分子量分布和峰表征值。

C

RT (min)	峰面积	峰高	分离度USP	峰拖尾	半峰宽
4.913	1926.46	70.80	7.59	0.781	0.398
5.479	129.63	14.58	0.85	1.277	0.168
5.728	106.16	9.5	0.91	1.985	0.185
6.551	1208.07	172.21	3.33	1.116	0.110

D

RT (min)	Mp (g/mol)
4.913	706827
5.479	411615
5.728	321609
6.551	141918

图 6. (A) pH 诱导产生的 NISTmAb 聚集体的分离。(B) 诱导条件下 NISTmAb 产生的聚集体的分子量分布。(C) 表列出 NISTmAb 及其聚集体的主峰表征值。(D) 表列出 NISTmAb 及其聚集体的分子量

结论

本应用简报介绍了 1290 Infinity II 生物液相色谱系统与 AdvanceBio SEC 色谱柱结合，因极小的系统死体积和毛细管的超低扩散性能，能够以超高分离度分离蛋白质及其聚集体。1290 Infinity II 生物液相色谱系统是一台完全生物兼容的系统，能够使用高浓度盐缓冲液，从而提供了超低的维护成本和理想的分离度性能。

参考文献

1. 利用 SEC 和水相流动相进行 mAb 和 ADC 聚集体的定量分析
安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-6303CHCN，**2016**

单克隆抗体的高分离度、高通量体积排阻色谱分析

采用 Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm 色谱柱

作者

Veronica Qin

安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了采用 Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm 色谱柱进行单克隆抗体 (mAb) 的高分离度和高通量体积排阻色谱 (SEC) 分析。经优化的亚 2 µm 填料颗粒可实现更快的分离速度和高分离度，从而实现准确的定量分析。

前言

聚集体和片段是生物治疗蛋白的关键质量属性，需要对它们进行充分表征。通常使用体积排阻色谱 (SEC) 分析不同体积的上述物质。有些情况下需要高通量 SEC 分析。例如，在药物开发早期阶段的克隆选择或工艺开发期间，每天需要分析大量样品。AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm 色谱柱具有独特且耐用的亚 2 μm 填料颗粒，可实现高分离度快速分析。这些特性可显著提高样品通量，同时提供稳定、准确的结果。

实验部分

材料

SILu Lite SigmaMAb 通用抗体标准品购自 MilliporeSigma，并用水复溶至 1 mg/mL。磷酸二氢钠、磷酸氢二钠和氯化钠均购自 MilliporeSigma。所有化学品纯度均 ≥ 99.5 %。水经由 Milli-Q A10 水纯化系统 (Millipore) 纯化。每天配制新鲜溶液，使用前通过 0.22 μm 滤膜过滤。

仪器

Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪包括如下配置：

- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性四元泵 (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler (G5668A)，配备样品冷却装置 (选件 #100)
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)，配备生物惰性热交换器 (选件 #019)
- Agilent 1260 Infinity II 可变波长检测器 (G7114A)

色谱柱

- Agilent AdvanceBio SEC 200 Å, 1.9 μm, 4.6 × 300 mm (部件号 PL1580-5201)
- Agilent AdvanceBio SEC 200 Å, 1.9 μm, 4.6 × 150 mm (部件号 PL1580-3201) 生物惰性流通池 (选件 #028)

软件

Agilent OpenLab 2.2 CDS。

结果与讨论

材料

图 1 显示了含有聚集体和片段的 mAb 的 SEC 色谱图，使用 300 mm 色谱柱在 0.35、0.4 和 0.5 mL/min 流速下进行分析。即使在 0.5 mL/min 的流速下也获得了二聚体/单体以及单体/片段 1 的出色分离 (表 1)。与 0.35 mL/min 流速相比，节省了 28% 的运行时间，并且分离度不受影响。

仪器条件

参数	HPLC 条件
柱温	25 °C
流动相	50 mmol/L 磷酸钠, 200 mmol/L NaCl, pH 7.0
流速	0.3–0.7 mL/min
进样量	1 μL
检测	UV 220 nm

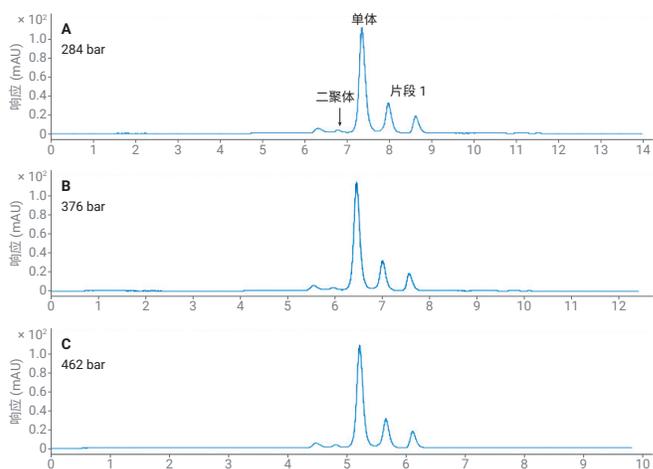


图 1. SigmaMAb (与其 F(ab')₂ 和 Fc 片段的混合物) 的体积排阻色谱图，采用 4.6 × 300 mm SEC 色谱柱，流动相为 50 mmol/L 磷酸钠，200 mmol/L NaCl, pH 7.0，流速为 A) 0.35 mL/min; B) 0.4 mL/min; C) 0.5 mL/min

聚集体和片段是生物治疗蛋白的关键质量属性，需要对它们进行充分表征。通常使用体积排阻色谱 (SEC) 分析不同体积的上述物质。有些情况下需要高通量 SEC 分析。例如，在药物开发早期阶段的克隆选择或工艺开发期间，每天需要分析大量样品。AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm 色谱柱具有独特且耐用的亚 2 μm 填料颗粒，可实现高分离度快速分析。这些特性可显著提高样品通量，同时提供稳定、准确的结果。

表 1. 不同流速下的峰拖尾因子和分离度

流速 (mL/min)	拖尾因子 (单体)	分离度 (二聚体/单体)	分离度 (单体/片段 1)
0.35	1.18	1.98	2.37
0.4	1.16	1.96	2.36
0.5	1.14	1.91	2.29

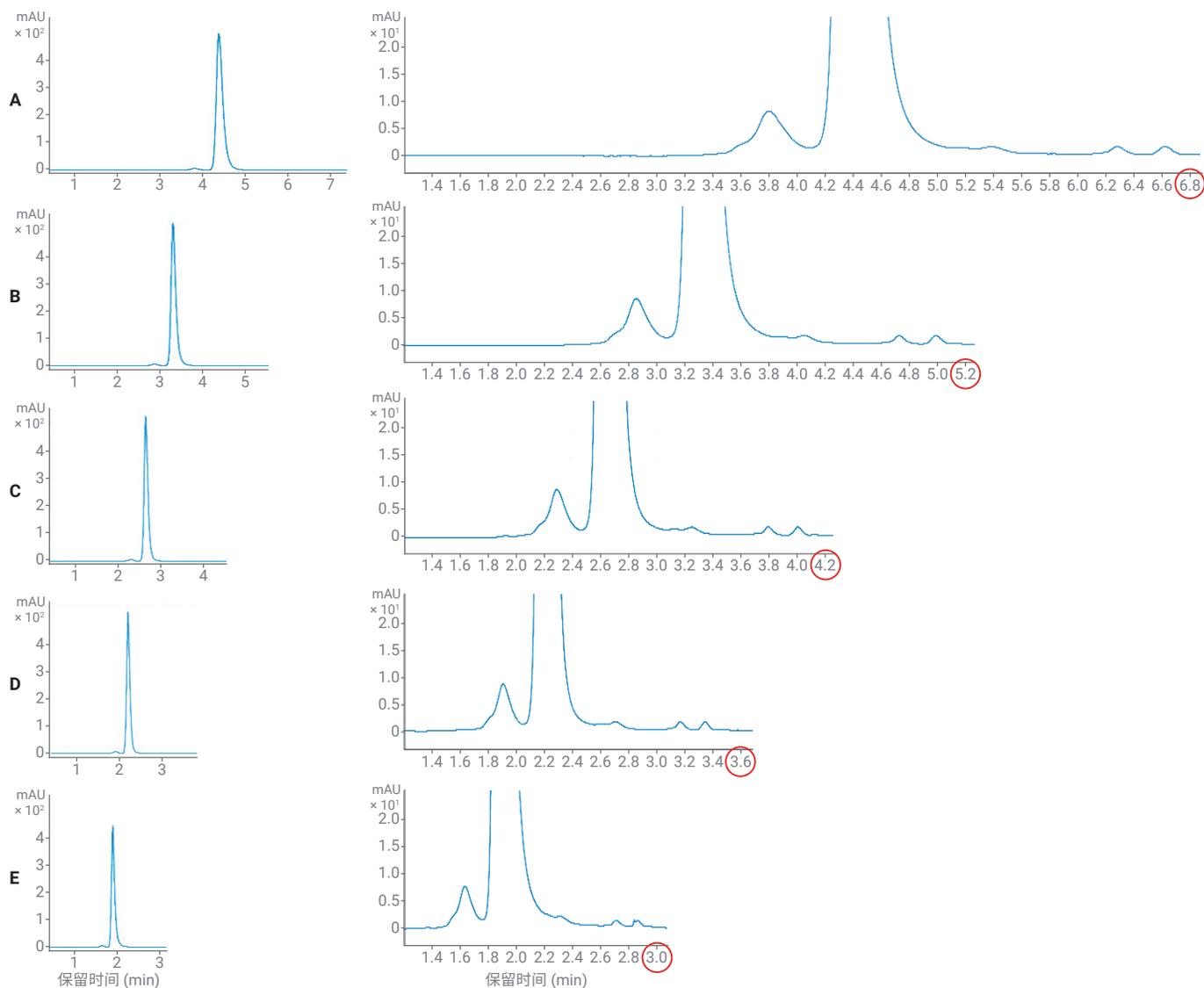


图 1. SigmaMAb 的体积排阻色谱图，采用 4.6 × 150 mm SEC 色谱柱，流动相为 50 mmol/L 磷酸钠，200 mmol/L NaCl，pH 7.0，流速为 A) 0.3 mL/min；B) 0.4 mL/min；C) 0.5 mL/min；D) 0.6 mL/min；E) 0.7 mL/min

该色谱柱所用的独特填料颗粒可在更高流速下实现出色的稳定性，并且二聚体/单体具有出色的分离度，可准确定量二聚体峰面积（表 2）。

表 2 计算了流速对样品通量的影响。当流速从 0.3 mL/min 增加到 0.7 mL/min 时，每天可以分析 480 个样品，通量提高了 2.3 倍。与以 0.3 mL/min 运行的 300 mm 色谱柱（每天只能分析 105 个样品）相比，通量提高了 4.6 倍。

结论

本研究表明，AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm 色谱柱能够实现 mAb 聚集体的快速分析。耐用的填料颗粒能够以更高流速运行，并且保持高分离度。通过将色谱柱柱长从 300 mm 缩短至 150 mm，将流速从 0.3 mL/min 提高到 0.7 mL/min，样品通量将提高 4.6 倍。

表 2. 流速对分离度、单体峰面积百分比和样品通量的影响

RT	运行时间 (min)	反压 (bar)	分离度	二聚体峰面积 (%)	每小时可处理的样品数	每天处理的样品数 (24 小时)
0.3	6.8	164	1.81	2.33	8-9	211
0.4	5.2	218	1.79	2.35	11-12	276
0.5	4.2	272	1.78	2.35	14	342
0.6	3.6	324	1.77	2.39	16-17	400
0.73	3.0	380	1.58	2.30	20	480

使用标准流 LC/MS 进行灵敏的大分子非变性质谱分析

作者

David L. Wong

安捷伦科技有限公司

摘要

非变性质谱法可用于各种蛋白质相关应用，例如蛋白质-蛋白质相互作用、蛋白质-配体结合、蛋白质复合物结构、蛋白质折叠和抗体药物偶联物。大多数非变性质谱分析使用纳流电喷雾方法，而这面临着巨大的挑战。

本应用简报介绍了一种稳定且灵敏的 LC/MS 方法，使用标准液相色谱流速进行天然蛋白质分析。该工作流程包括 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统、AdvanceBio SEC 色谱柱、6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 和 MassHunter BioConfirm 软件。

前言

非变性质谱 (MS) 技术已广泛用于表征完整蛋白质和非共价蛋白质复合物。尽管存在巨大的分析挑战, 但该技术成功地分析和研究了从几 kDa 到 1 MDa 以上的各种大小的蛋白质复合物结构 (蛋白质-配体结合或蛋白质-蛋白质相互作用)^[1-4]。在不使用有机溶剂和酸增强样品去溶剂化和离子化作用的情况下, 在中性 pH 条件下对蛋白质样品进行非变性质谱分析时, 每个分子的电荷往往较少, 并且在较高 m/z 范围内 MS 信号丰度低得多。在过去十年间, 纳流电喷雾电离 (nESI) 方法已成为天然蛋白质分析的关键方法。nESI 形成细小的带电液滴, 可显著提高样品的去溶剂化和离子化效率, 同时保留非共价蛋白质-蛋白质复合物。然而, 中性水性蛋白质样品在不稳定的纳流流速条件下通常容易聚集, 并导致纳流喷雾针堵塞。此外, 需要训练有素或经验丰富的研究人员使用 nESI 技术生成高质量的 MS 数据。

在本研究中, 我们展示了一种用于分析天然蛋白质和蛋白质复合物的高灵敏度分析流 LC/MS 方法。该工作流程使用 AdvanceBio 体积排阻色谱 (SEC) 柱进行在线样品分离。6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 具有大分子 SWARM 自动调谐功能和 30000 m/z 扩展质量范围, 用于实现快速且可重现的天然蛋白质分析 (图 1)。

实验部分

材料与方法

单克隆抗体标准品 RM 8671 购自美国国家标准技术研究院 (NIST), 该标准品通常被称为 NIST-mAb。赫赛汀 (曲妥珠单抗) 制剂购自基因泰克 (South San Francisco, California, USA)。曲妥珠单抗-美坦新衍生物偶联物制剂 (TDM1, ADC) 同样购自基因泰克。其余全部蛋白质样品和化学品均购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。

样品前处理

为了进行非变性质谱分析, 将蛋白质样品保存在中性 pH 和挥发性水溶液 (例如乙酸铵或甲酸铵) 中至关重要。因此, 在质谱分析之前, 通常需要进行样品脱盐和缓冲液交换。简而言之, 就是使用 Bio-Rad Bio-Spin P-6 (限值 6000 MW) 或 P-30 (限值 40000 MW) 小柱将蛋白质储备液 (1-10 mg/mL) 脱盐并使用 100 mmol/L 乙酸铵进行溶剂交换。首先用 100 mmol/L 乙酸铵缓冲液使小柱完全平衡。然后将蛋白质样品转移至色谱柱顶部并以 1000 × g 离心 5 分钟。然后使用 100 mmol/L 乙酸铵进行蛋白质缓冲液交换, 随后即可进行质谱分析。这种脱盐方案导致的样品损失极小, 蛋白质分子的结构改变也非常少。



图 1. 天然蛋白质分析工作流程的分析组件

仪器

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统包括：

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

LC/MS 分析

在 1290 Infinity II 液相色谱仪与配备安捷伦喷射流离子源的 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 的联用系统上进行 LC/MS 分析。使用具有大分子 SWARM 自动调谐功能的 Agilent MassHunter 采集 (B.09.00) 工作站软件。

使用 Agilent AdvanceBio SEC 保护柱 (4.6 × 30 mm, 200 Å, 1.9 μm) 进行液相色谱分离。

表 1 和表 2 列出了所采用的 LC/MS 参数。

数据处理

使用 Agilent MassHunter 定性分析 10.0 和 BioConfirm 10.0 软件处理天然完整 mAbs 或蛋白质复合物的所有质谱数据。

结果与讨论

天然蛋白质和蛋白质复合物分析的方法优化

为了克服天然蛋白质分析的挑战，进行了一些关键的方法开发和优化：

- 在质谱分析之前使用离线脱盐小柱 (Bio-Rad Bio-Spin P-30) 进行样品前处理 (脱盐和缓冲液交换)，并使用在线 SEC 色谱柱进一步分离目标蛋白质和背景盐，提高了质谱分析灵敏度和质谱数据质量
- 使用常规流速 (0.2 mL/min) 下的 100 mmol/L 乙酸铵缓冲液不仅消除了样品聚集，而且提高了保存完好的天然蛋白质样品的 LC/MS 分析重现性
- 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统具有用于优化大分子离子传输效率的大分子 SWARM 自动调谐功能，以及高达 m/z 30000 的扩展质量数范围，可实现高灵敏度的天然蛋白质复合物分析

表 1. 液相色谱参数

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统	
色谱柱	AdvanceBio SEC (200 Å, 4.6 × 30 mm, 1.9 μm) (部件号: PL1580-1201)
恒温箱	4 °C
溶剂 (A)	100 mmol/L 乙酸铵 (pH 7)
等度洗脱	0–5 min, 100% A
柱温	室温
流速	0.2 mL/min
进样量	1–5 μL

表 2. 非变性质谱数据采集参数

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统			
样品类型	肌红蛋白	完整 mAbs	完整大分子蛋白质复合物
离子源	安捷伦喷射流	安捷伦喷射流	安捷伦喷射流
干燥气温度	150 °C	365 °C	150 °C
干燥气流速	10 L/min	12 L/min	10 L/min
雾化器	30 psig	35 psig	30 psig
鞘气温度	150 °C	300 °C	150 °C
鞘气流速	10 L/min	12 L/min	10 L/min
毛细管电压	5000 V	5500 V	5000 V
喷嘴电压	2000 V	2000 V	2000 V
碎裂电压	250 V	300 V	250 V
锥孔电压	100 V	220 V	100 V
四极杆 AMU	m/z 500	m/z 1000	m/z 3000
质量范围	m/z 300–7000n	m/z 3000–10000n	m/z 5000–25000n
采集速率	1.0 幅谱图/s	1.0 幅谱图/s	1.0 幅谱图/s
采集模式	正离子， 扩展 (m/z 10000) 质量数范围	正离子， 扩展 (m/z 10000) 质量数范围	正离子， 扩展 (m/z 25000) 质量数范围

完整肌红蛋白（含血红素）的非变性质谱分析

肌红蛋白非共价相互作用的非变性质谱分析已得到充分研究^[4]。在肌红蛋白中，血红素通过氢键和疏水相互作用与珠蛋白非共价结合。当血红素与珠蛋白结合时，该蛋白质称为全肌红蛋白（天然构象）。监测 ESI-MS 质谱图中肌红蛋白离子的电荷态分布已用于蛋白质折叠/去折叠研究^[4]。电荷较高的脱辅基肌红蛋白（不含血红素）表明天然血红素-蛋白质相互作用被破坏，导致蛋白质出现较大程度的去折叠。如图 2A 所示，肌红蛋白在有机和酸性溶剂中以及严苛的质谱离子源条件下变性。

变性肌红蛋白的电荷分布包迹为 m/z 1000 (17+)–3500 (5+)，强度最高的带电离子为 12+。大多数天然全肌红蛋白变性为脱辅基肌红蛋白和血红素（图 2A 的插图）。我们经过优化的肌红蛋白非变性质谱分析清楚地表明，肌红蛋白的天然构象得到保留（图 2B）。仅可检测到痕量的脱辅基肌红蛋白和血红素。全肌红蛋白的电荷分布包迹为 9+ 至 5+，电荷态 8+ 的离子丰度最高。非变性质谱离子的整体质谱信号强度约为变性质谱图的 1/10。

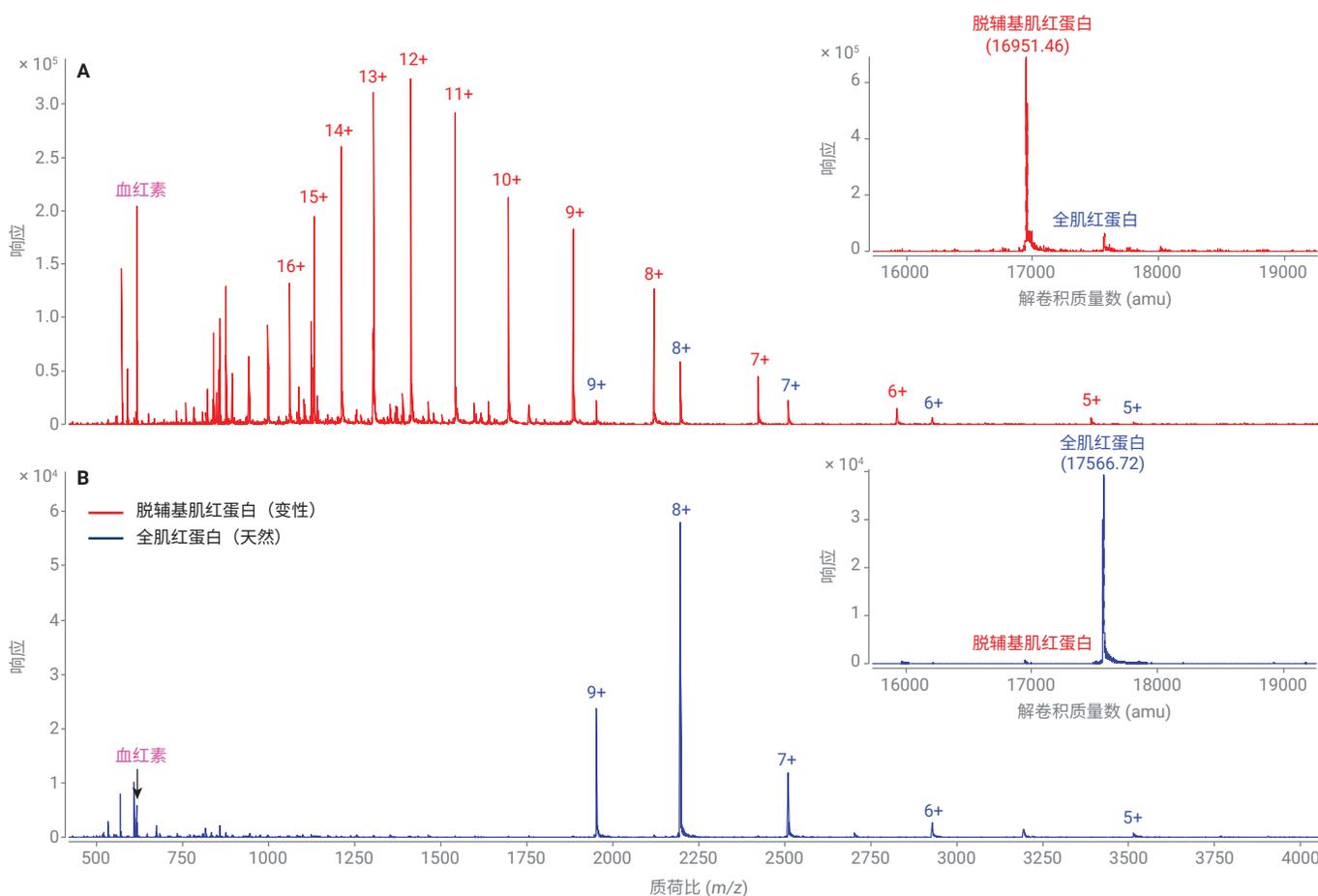


图 2. 完整肌红蛋白样品的 LC/MS 分析。

A) 在变性 LC/MS 条件下分析肌红蛋白样品（之前的研究）。

血红素基团从蛋白质复合物中解离出来，大部分蛋白质为脱辅基肌红蛋白（插图）。

B) 肌红蛋白的非变性质谱分析。全肌红蛋白（含血红素）结构得以保留，仅检测到痕量的血红素

非变性质谱分析结果证实，SEC 色谱柱流动相的离子强度在维持蛋白质天然构象方面也发挥着重要作用^[2]。图 3 展示了两种流动相条件下乙醇脱氢酶（ADH，四聚体）的非变性质谱分析。尽管两种流动相均为中性 pH，但在流动相中用甲酸铵代替乙酸铵时，观察到蛋白质解离产物（二聚体）（图 3A 和 3B）。此外，与 100 mmol/L 乙酸铵相比，50 mmol/L 甲酸铵中完整天然 ADH 的电荷态分布包迹转移到较低的 m/z 范围（图 3C）。

结果表明，在流动相中使用甲酸铵会增加多电荷离子的数量和强度（最大为 26+，而使用乙酸铵时为 23+，图 3），尽管仍将 ADH 视为完整的蛋白质四聚体复合物。因此，我们认为 100 mmol/L 乙酸铵溶液在非变性质谱分析过程中为蛋白质复合物提供了更好的结构保护作用。

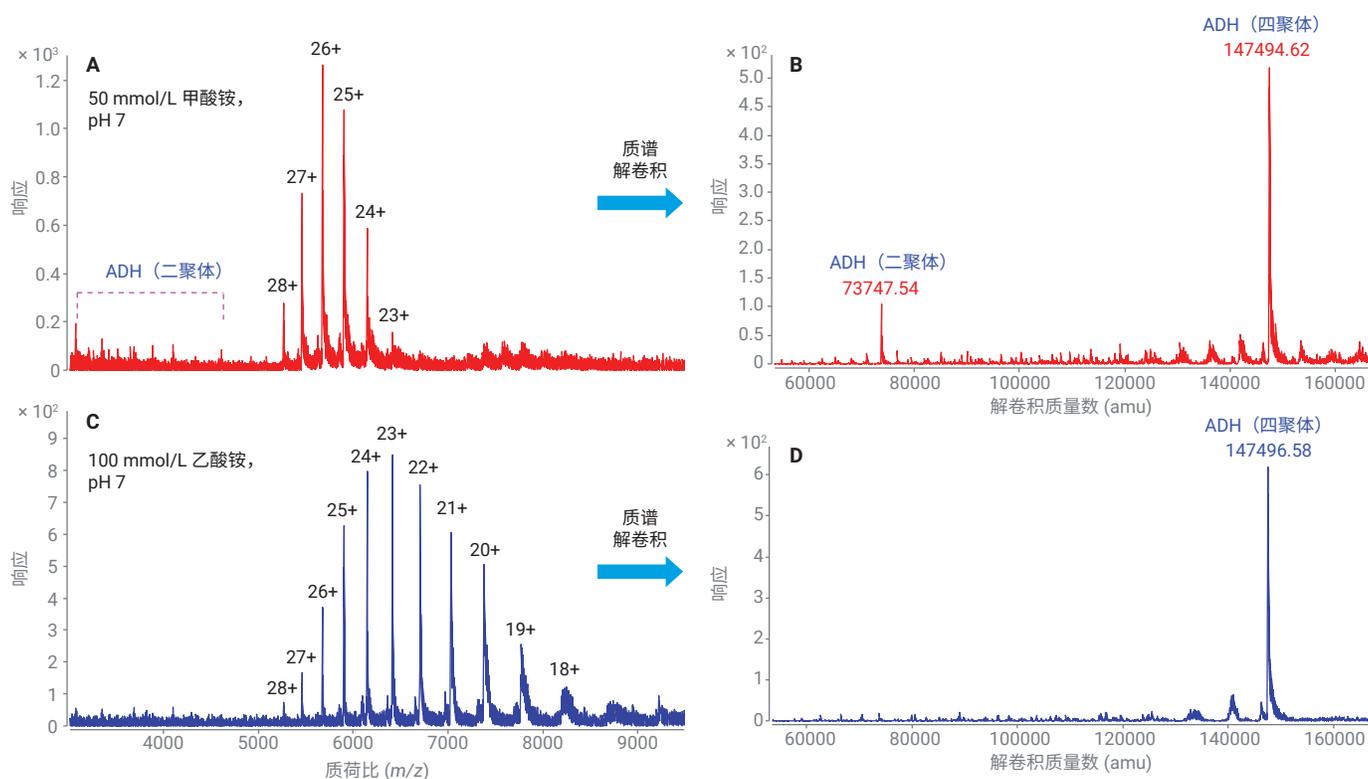


图 3. 不同溶剂条件下的天然乙醇脱氢酶（ADH，四聚体）分析。

A) 天然 ADH 在 50 mmol/L 甲酸铵溶液 (pH 7) 下的分析结果。C) 天然 ADH 在 100 mmol/L 乙酸铵溶液 (pH 7) 下的分析结果。B) 和 D) 两个样品的解卷积质谱图

完整 mAbs 的非变性质谱分析

单克隆抗体 (mAbs) 及其衍生物迅速成为一类重要的生物药物分子，广泛应用于各种治疗应用。mAbs 的非变性质谱分析可以提供有价值的信息，例如：蛋白质折叠、mAb 聚集体 (mAb 二聚体或三聚体)、抗体药物偶联物 (ADCs) 和双特异性 mAbs 等。

在本研究中，我们采用在线 SEC 方法进行快速、可靠的 mAbs 非变性质谱分析。使用 100 mmol/L 乙酸铵溶剂，以 0.2 mL/min 的流速进行 5 分钟等度洗脱，将约 0.5–1.0 μg mAb 进样至 AdvanceBio SEC 保护柱。Q-TOF 离子源条件经过优化，可在 m/z 5000–10000 的质量范围内获得优质的非变性质谱图。

图 4 展示了变性质谱条件 (图 4A 和 4B) 以及非变性质谱条件 (图 4C 和 4D) 下完整 NIST mAb 标准品的 LC/MS 分析。在这两种条件下，NIST mAb 的所有主要糖型均实现了良好分离 (图 4A 和 4C, 插图)。变性 NIST mAb 的电荷态分布范围为 m/z 2000–5000 (30+ 至 75+)，而天然 NIST mAb 的电荷分布包迹为 m/z 5000–10000 (15+ 至 30+)。如解卷积质谱图 (图 4B 和 4D) 所示，所有主要糖型的质量误差均低至几个 ppm。在两种质谱条件下，我们还获得了完整 NIST mAb 分析数据的出色一致性。

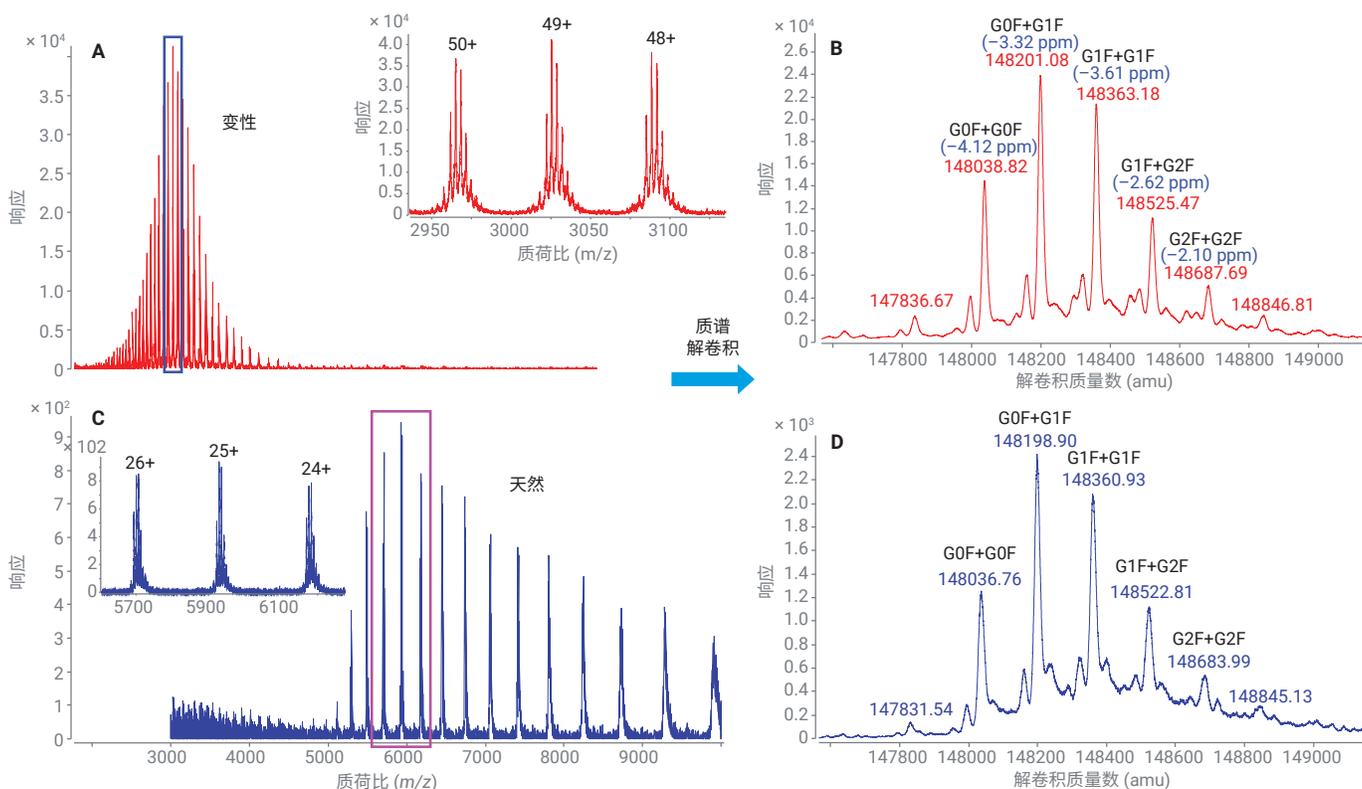


图 4. NISTmAb 的 LC/MS 分析，其分析条件为：A) 变性质谱条件 (乙腈和 0.1% 甲酸) (之前的研究，参考文献 5)，以及 C) 非变性质谱条件 (100 mmol/L 乙酸铵，pH 7)。图 B) 和 D) 分别显示了两个样品的解卷积质谱图

同样，对生物治疗药物（曲妥珠单抗，商品名：赫赛汀）及其 ADC（曲妥珠单抗-美坦新衍生物偶联物，T-DM1）进行了非变性质谱分析和比较。图 5A 所示为完整赫赛汀的非变性质谱图，电荷分布包迹良好 (m/z 5000–10000)，电荷态范围为 15+ 至 28+。响应最强的电荷态为 24+，表明完整赫赛汀处于其天然/折叠构象。如插图解卷积谱图所示，主要糖型实现了较高的质量数准确度。

非变性质谱分析可以在保留蛋白质分子天然结构构象的情况下对其进行检测。由于该方法大大降低了流动相中有机溶剂和酸的干扰，因此是非共价蛋白质复合物或酸不稳定蛋白质偶联物（例如某些 ADCs）的理想分析工具。图 5 显示了 T-DM1 的非变性原始质谱图和解卷积质谱图（插图）。使用 BioConfirm DAR 计算器计算得到的平均 DAR 值为 3.5（图 5B，插图），这与基因泰克（制造商）报告的完整 ADC 的 DAR 值一致。

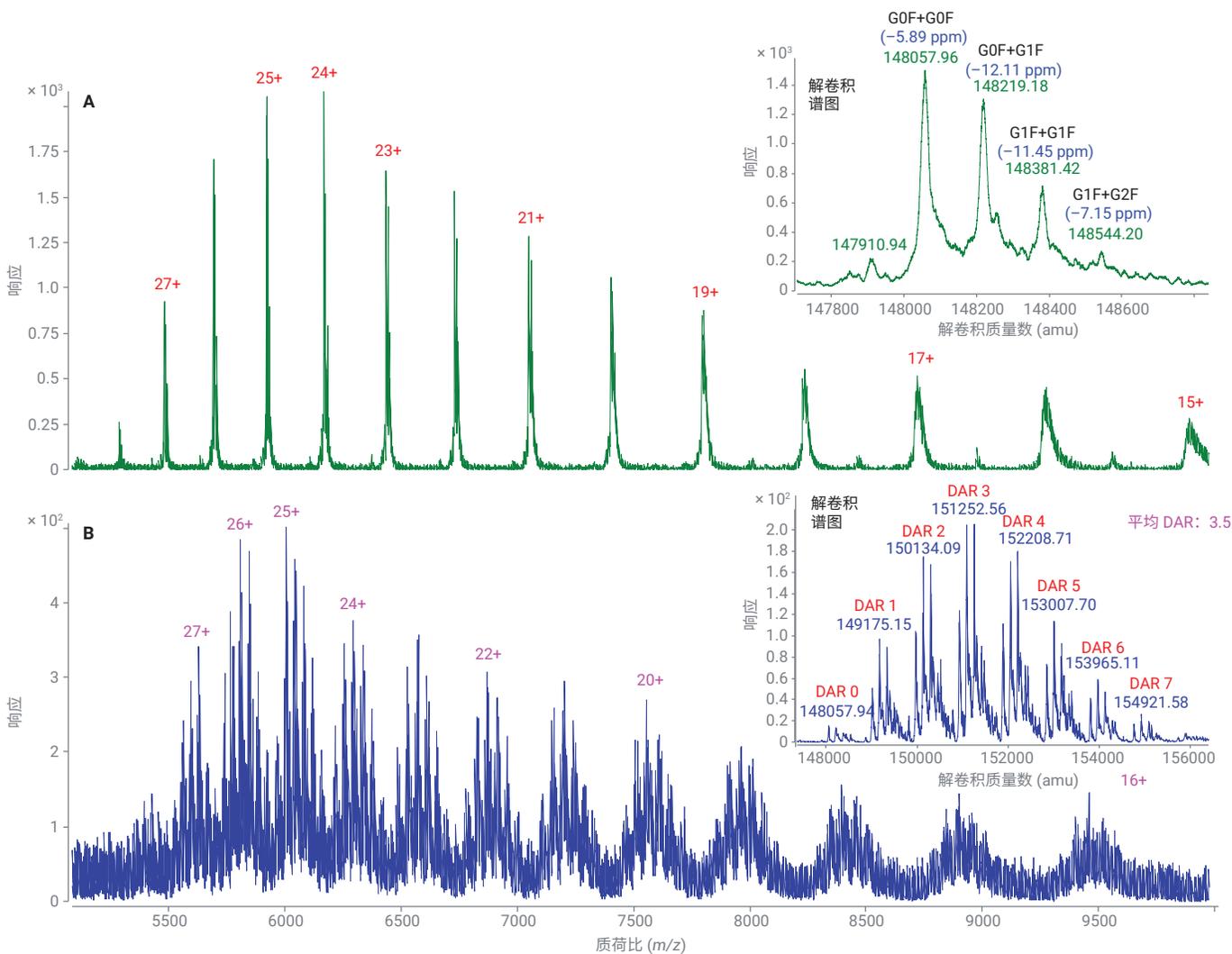


图 5. mAb 及其抗体药物偶联物 (ADC) 的非变性 LC/MS 分析: A) 赫赛汀和 B) T-DM1。插图显示了两个样品的解卷积质谱图

完整蛋白质复合物的非变性质谱分析

使用 3 种蛋白质复合物样品对优化的非变性质谱分析方法进行了评估。样品包括：四聚体丙酮酸激酶 (PK, 232 kDa)、六聚体谷氨酸脱氢酶 (GDH, 335 kDa) 和四聚体 β -半乳糖苷酶 (466 kDa)。6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统提供大分子 SWARM 自动调谐功能, 可在高达 m/z 30000 的扩展质量数范围内优化大分子离子传输效率。它是用于天然蛋白质复合物分析的理想 LC/MS 系统。图 6A 显示了四聚体丙酮酸激酶的非变性质谱图。检测到范围为 m/z 6000–10000 的两个电荷分布包迹, 电荷态为 24+ 至 37+。

解卷积谱图显示, 样品中存在 PK 四聚体的两种多蛋白质形式复合物: 全长丙酮酸激酶和截短的 PK 四聚体 (三个完整亚基加上一个具有 N 端裂解的 PK 蛋白质形式)^[3]。

在较高的 m/z (> m/z 10000) 下, 6545XT 系统对蛋白质复合物也表现出了出色的检测灵敏度。图 6B 和 6C 显示了 GDH 和 β -半乳糖苷酶的非变性质谱图。GDH 和 β -半乳糖苷酶的蛋白质电荷包迹均大于 m/z 8000, 而其丰度最高的离子分别位于 m/z 9566 (35+) 和 m/z 10832 (43+)。在进样量为 1–10 μg 的情况下, 测得完整六聚体 GDH 和四聚体 β -半乳糖苷酶的分子量分别为 334754 Da 和 465788 Da。

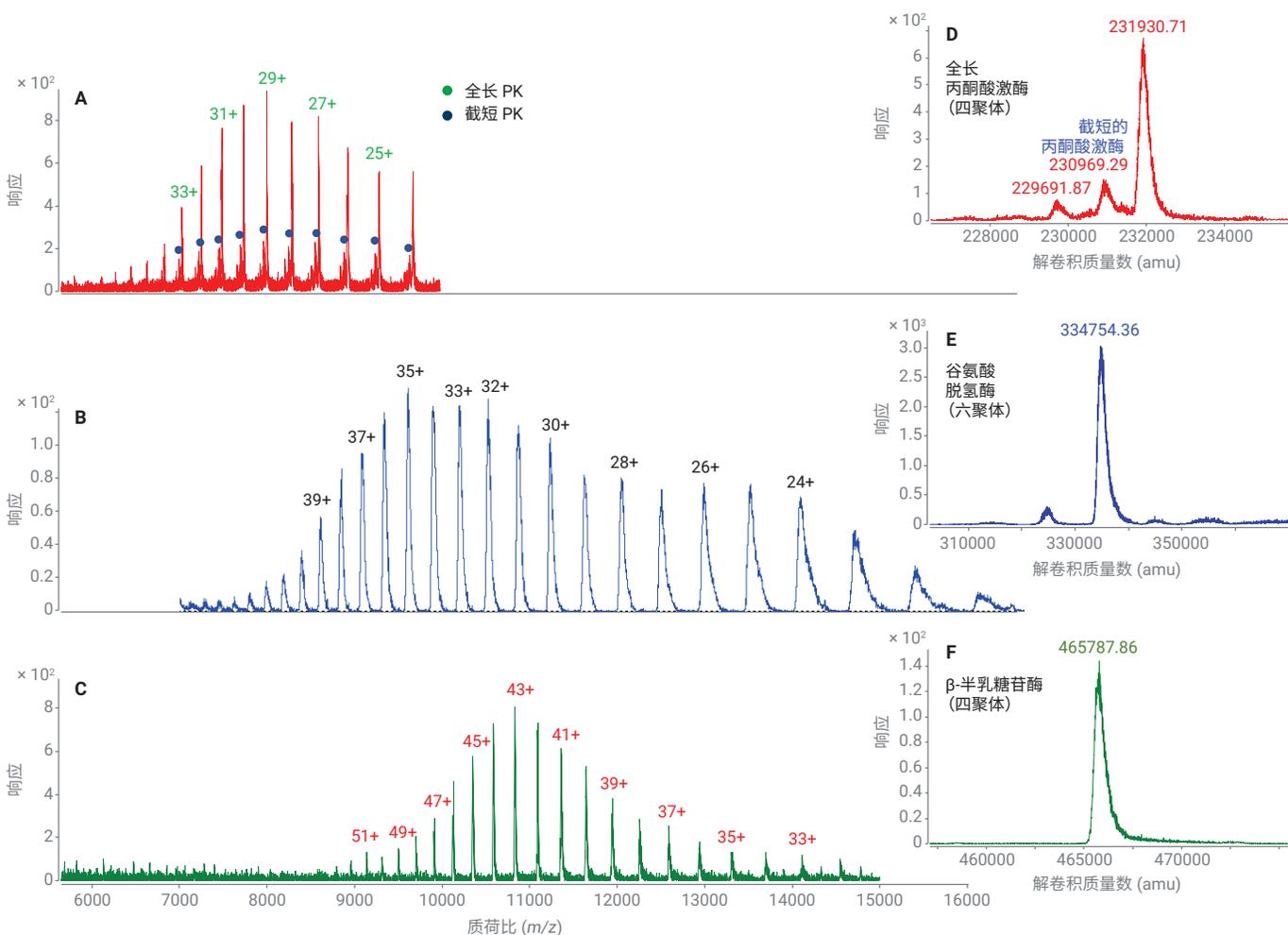


图 6. 不同完整蛋白质复合物的非变性质谱分析。A) 丙酮酸激酶 (PK, 四聚体, 232 kDa), B) 谷氨酸脱氢酶 (GDH, 六聚体, 335 kDa) 以及 C) β -半乳糖苷酶 (四聚体, 466 kDa)。解卷积谱图分别显示于图 D) 至图 F) 中。使用 mMass 开源质谱软件工具对图 6B 中的原始质谱图进行了平滑处理

结论

针对天然蛋白质分析，我们开发了一种高灵敏度且稳定的 LC/MS 工作流程方法。这种优化的工作流程使用配备 AdvanceBio SEC 色谱柱的 1290 Infinity II 液相色谱系统、质量数范围扩展至 m/z 30000 的 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 以及 MassHunter BioConfirm 软件。研究表明，这种非变性质谱分析方法具有以下优势：

- 在典型的分析型液相色谱流速下，使用在线 SEC 色谱柱消除了与 nanoESI 分析相关的挑战性问题（蛋白质聚集和不稳定的喷雾流）
- 经过优化的非变性质谱条件为 ADC 表征提供了高可信度，并能准确测定 DAR 值
- 结合大分子 SWARM 自动调谐功能和 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 的扩展质量数范围，可实现对天然完整大分子蛋白质复合物的灵敏检测和表征

参考文献

1. Heck, A. J. Native Mass Spectrometry: A Bridge Between Interactomics and Structural Biology. *Nat. Methods* **2008**, 5, 927–933
2. Freeke, J.; Robinson, C. V.; Ruotolo, B. T. Residual Counter Ions can Stabilise a Large Protein Complex in the Gas Phase. *Intl. J. Mass Spec.* **2010**, 298, 91–98
3. Schachner, L. F.; Kelleher, N. L. Standard Proteoforms and Their Complexes for Native Mass Spectrometry. *JASMS* **2019**, 30, 1190–1198
4. Konermann, L., Rosell, F. L., Mauk, A. G.; Douglas, D. J. Acid-Induced Denaturation of Myoglobin Studied by Time-Resolved Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Biochemistry* **1997**, 36(21), 6448–6454
5. Wong, D. L., 利用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 准确表征完整单克隆抗体，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5991-7813CHCN，**2017**

使用 Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 μm 色谱柱和 AdvanceBio HIC 色谱柱分析驼源单域抗体

作者

Te-Wei Chu 和 Greg Staples
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了使用体积排阻色谱 (SEC) 和疏水相互作用色谱 (HIC) 对驼源单域抗体 (纳米抗体) 的分析。纳米抗体是一类日益增长的用于治疗目的的单域抗体片段。与其他 SEC 色谱柱相比, Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 μm 色谱柱在纳米抗体聚集体和片段的高分离度分离方面具有独特的优势。Agilent AdvanceBio HIC 色谱柱能够分析纳米抗体的翻译后修饰 (PTMs), 例如谷氨酰胺/焦谷氨酸转化。另外, 本文还展示了一种基于 SEC 的非变性 LC/MS 方法, 该方法有助于更好地了解 PTM 和杂质表征。

前言

尽管单克隆抗体 (mAb) 等生物治疗药物取得了成功, 但这类药物仍然存在许多明显的缺陷。例如, 应用最广泛的生物药物 IgG mAbs 具有复杂的结构和相当大的分子量 (150 kDa)。大分子量使它们无法在体内有效地递送到病变细胞 (例如肿瘤中的细胞)。而单域抗体 (也称为纳米抗体) 在达到其预期靶点方面则提供了巨大的机会^[1]。

纳米抗体是来源于骆驼重链抗体的小分子量 (约 15 kDa) 天然单域蛋白质 (图 1)。它们是重组产生的抗原结合 V_{HH} 片段, 具有与常规 IgG mAbs 相当的结合亲和性。由于分子量较小, 纳米抗体可以与常规 mAbs 通常无法接近的抗原基序结合, 从而到达目前“无成药性”的靶点。此外, 相对简单的蛋白质构象为药物开发人员提供了许多优势, 例如便于生产和不同的给药途径^[1]。这些颇具前景的特征使纳米抗体和 V_{HH} 片段衍生的生物制剂成为生物药物研发管线中的新星^[2]。

本应用简报介绍了使用 SEC 和 HIC, 结合紫外检测对两种 V_{HH} 片段 (抗-PD1 和抗-PDL1 单域抗体) 进行的全面表征。此外, 我们还展示了两种样品基于 SEC 的非变性 LC/MS 分析。Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 μm 色谱柱设计用于分子量范围为 1–80 kDa 的蛋白质等生物小分子的水相 SEC 分离。该色谱柱非常适用于纳米抗体分析。与来自其他供应商的 SEC 色谱柱相比, 独特的亚 2 μm 亲水聚合物涂层硅胶填料技术可实现更高分离度的聚集体和片段分离。HIC 分析可在非变性条件下对蛋白质异构体进行反相式分离。Agilent AdvanceBio HIC 色谱柱在纳米抗体 PTM 表征方面具有出色的疏水性和选择性。使用通用 HIC 方法 (不使用有机溶剂改性剂), 观察到一种常见的 PTM, 即谷氨酰胺/焦谷氨酸转化。这些方法的结合为深入分析纳米抗体纯度和评估关键质量属性提供了完整的解决方案。

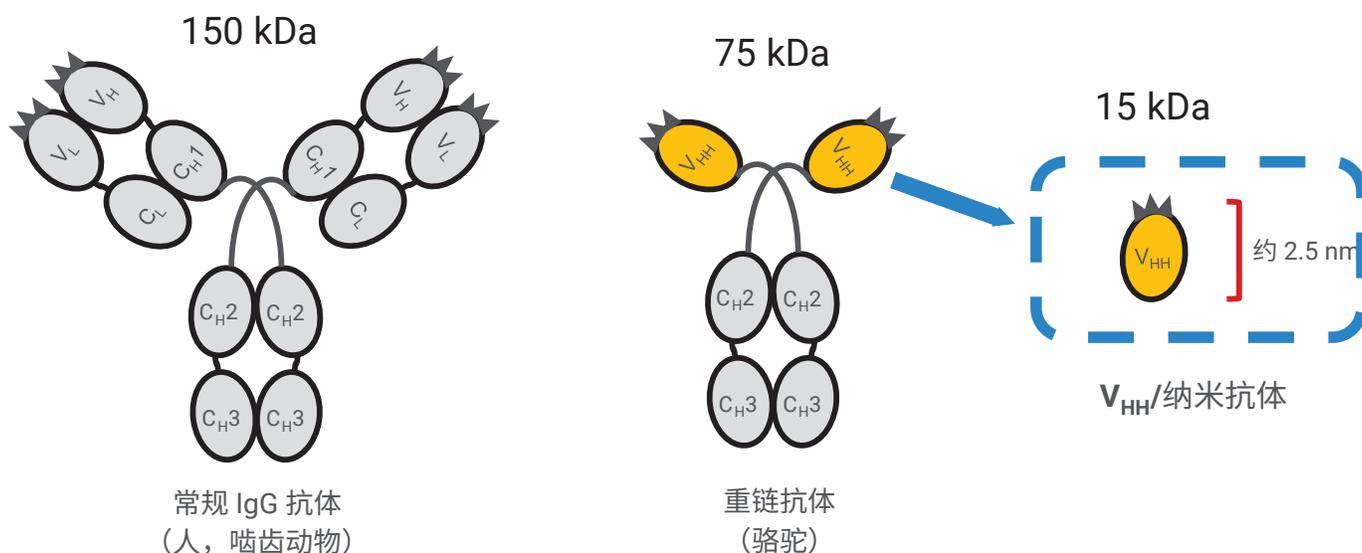


图 6. V_{HH} 单域抗体 (纳米抗体) 和常规 mAb 的对比示意图

实验部分

样品和化学品

- 美洲驼抗-PD1 单域抗体 [F12A8]; 购自 ProSci Inc (Poway, CA)
- 美洲驼抗-PDL1 单域抗体 [F2G2]; 购自 ProSci Inc (Poway, CA)
- 谷氨酰胺酰肽环转移酶; 购自 R&D Systems (Minneapolis, MN)
- 人抗-IL8 IgG 单克隆抗体; 由内部 CHO 细胞产生

使用的所有化学品和试剂均为 HPLC 级或更高等级。磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钠和硫酸铵购自 Sigma-Aldrich。使用配备 LC-Pak Polisher 和 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipore) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统对水进行纯化。

色谱柱

- Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA , 4.6 \times 300 mm (部件号 PL1580-5250)
- Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA , 4.6 \times 150 mm (部件号 PL1580-3250)
- Agilent AdvanceBio HIC, 4.6 \times 100 mm (部件号 685975-908)

仪器

对于 HPLC 实验, 使用 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统, 其中包括:

- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性泵 (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler (G5668A), 配备样品冷却装置 (选件 100)
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A), 配备生物惰性热交换器 (选件 019)
- Agilent 1260 Infinity II 可变波长检测器 (G7114A)

对于 LC/MS 实验, 使用 Agilent 6224 精确质量飞行时间 (TOF) 液质联用系统和 1290 Infinity II 液相色谱仪, 其中包括:

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II 柱温箱 (G7116B)
- 双 ESI 离子源 Agilent 6224 精确质量飞行时间 (TOF) 液质联用系统

结果与讨论

SEC 是表征生物制剂聚集体的金标准技术。它的色谱分离机制比较独特，分析物不会在固定相中保留；相反，它们根据对填料颗粒孔隙的可及性进行分离。因此，根据溶液中蛋白质分析物的大小（流体动力学半径）仔细选择色谱柱孔径非常重要。纳米抗体是分子量约为 15 kDa 的小分子蛋白质，即流体动力学半径约为 25 Å。填充小孔径 (120–130 Å) 填料颗粒的 SEC 色谱柱可在适合此类应用的范围内提供线性分离^[3,4]。图 2 显示了采用标准方法并使用 pH 7 的磷酸钠作为流动相（以保持蛋白质的天然状态）对抗-PD1 单抗 (sdAb) 进行的 SEC 分离。从图中可以看出，使用 AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 Å 色谱柱可以实现 sdAb 单体与杂质（即高分子量 (HMW) 和低分子量 (LMW) 物质）的出色分离。

与填充大颗粒 (2.7 μm) 填料的色谱柱相比，HMW 和 LMW 物质的分离度以及单体峰的峰宽和拖尾因子均明显改善。与其他供应商的 2 μm SEC 技术相比，AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 Å 色谱柱表现出更优异的性能。这归功于颗粒表面精心设计的键合相覆盖，可以消除不利的次级相互作用^[3,4]。

方法条件

参数	HPLC 条件 (SEC 分析)
色谱柱	Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 Å, 4.6 × 300 mm (部件号 PL1580-5250)
流动相	150 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0
流速	0.35 mL/min
柱温	25 °C
进样量	5 μL, 1 mg/mL
总运行时间	15 min
检测	UV 214 nm

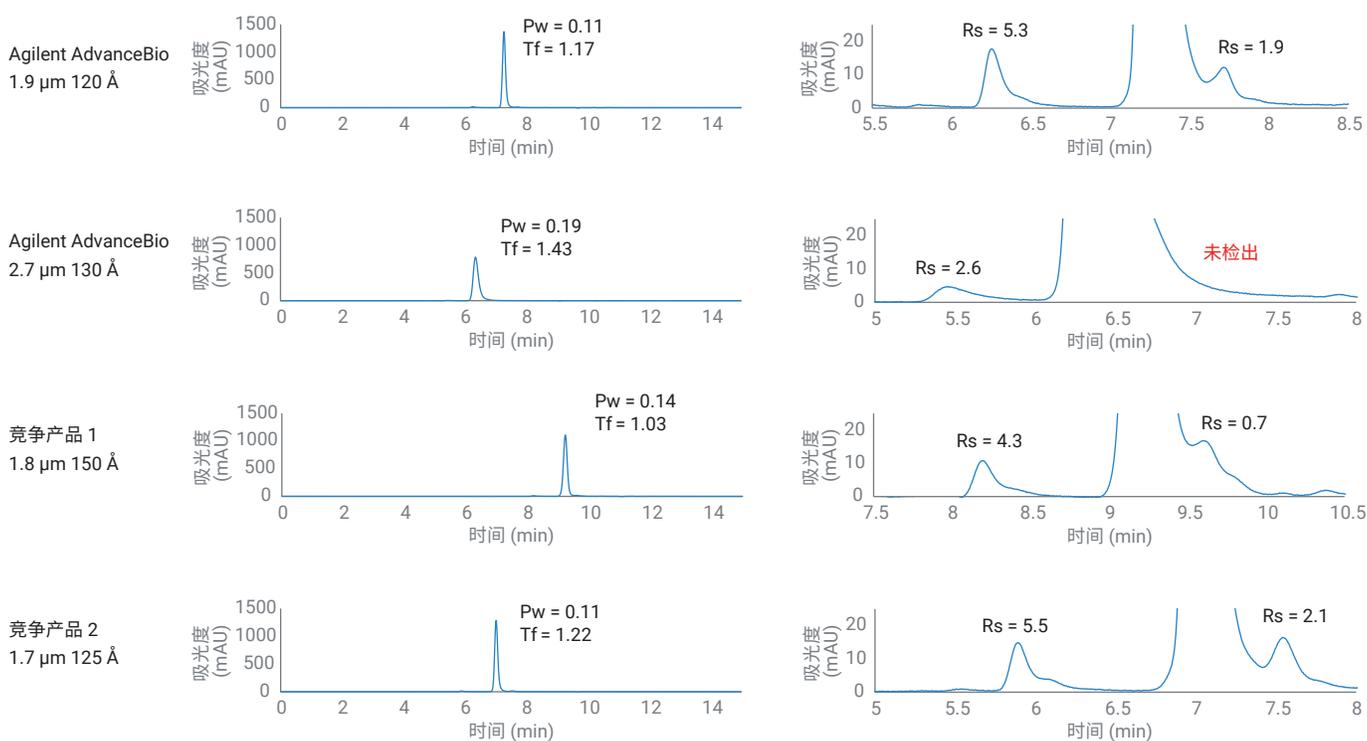


图 2. 抗-PD1 单抗的 SEC 分离。右图对左图中的运行进行了基线放大。显示了 HMW 聚集峰（较早洗脱）或 LMW 片段峰（较晚洗脱）与单体峰的分

SEC 是一种相对简单的色谱方法，色谱柱以等度模式运行。方法开发和优化涉及流动相参数（pH、盐浓度等）的选择，以尽可能减少潜在的次级相互作用，例如离子或疏水相互作用。图 3 显示了用于优化抗-PD1 和抗-PDL1 sdAb 分析方法的 SEC 盐浓度实验。该实验选择长度为 15 cm 的短色谱柱，以实现更高的通量并加快方法优化速度。结果表明，在所使用的流动相 NaCl 浓度范围内，抗-PD1 sdAb 与色谱柱的次级相互作用极少或没有。从各流动相条件下相似的色谱峰形和保留时间可以看出这一点。相反，在较高盐浓度的流动相条件下，抗-PDL1 sdAb 的峰形质量略有下降，并且保留时间延迟，表明分析物与色谱柱之间存在潜在的疏水相互作用。有趣的是，在 250 mmol/L NaCl 及更高浓度下，次级（肩峰）峰变得明显。

方法条件

参数	HPLC 条件 (SEC 盐浓度实验)
色谱柱	Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA , 4.6 \times 150 mm (部件号 PL1580-3250)
流动相	20 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0, 氯化钠浓度如图 3 所示
流速	0.35 mL/min
柱温	25 $^{\circ}\text{C}$
进样量	2 μL , 1 mg/mL
总运行时间	7 min
检测	UV 214 nm

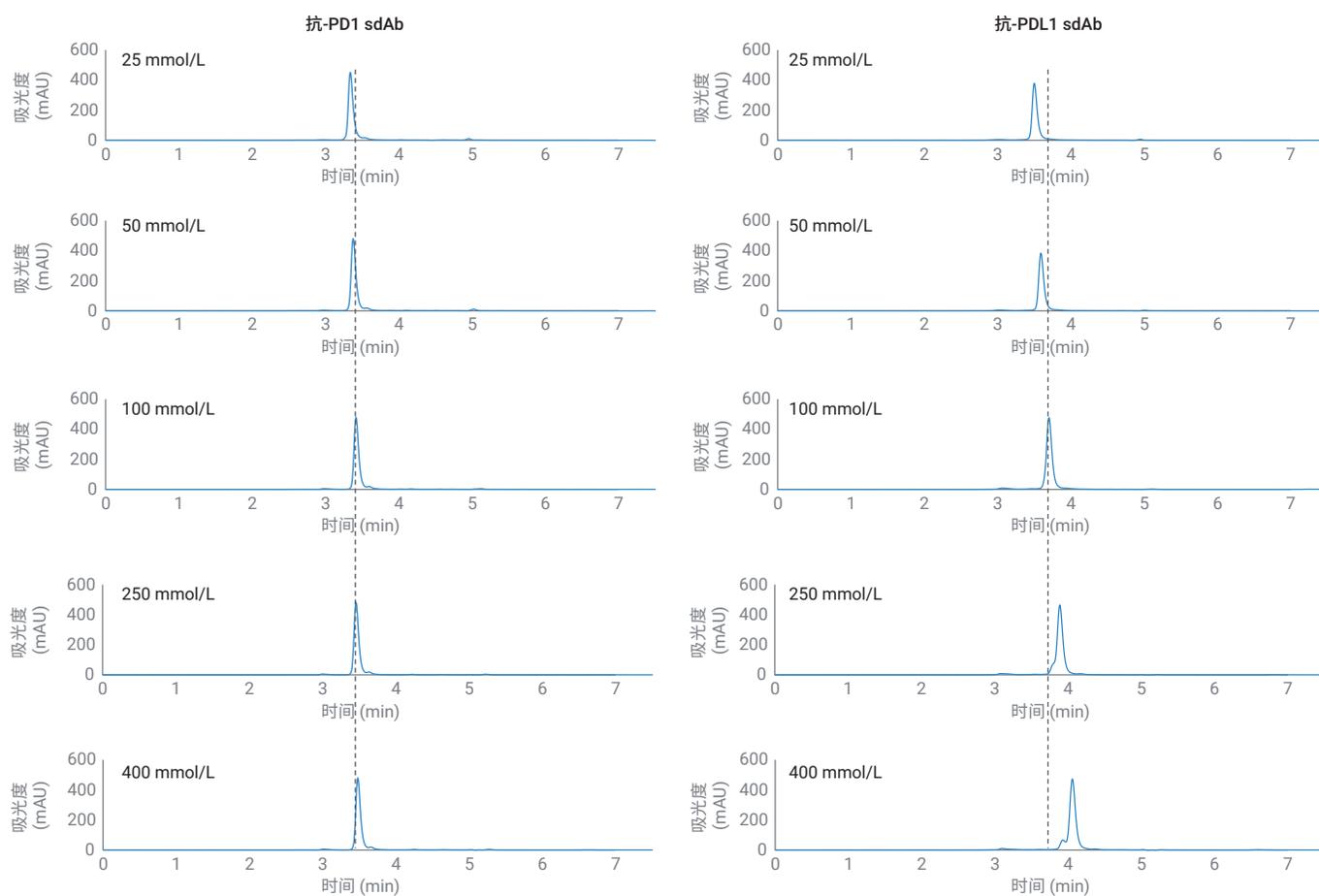


图 3. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA 色谱柱对抗-PD1 (左) 和抗-PDL1 (右) 单域抗体进行的盐浓度实验

这种现象常见于含有高度疏水性模体或具有极端等电点的挑战性蛋白质。由于纳米抗体仅包含抗体的可变结构域，因此不同纳米抗体之间的氨基酸序列相差极大，这可能会导致蛋白质的理化特性存在巨大差异。本文介绍的方法可用于快速筛选 SEC 流动相条件，以确定分析不同样品的最佳条件。数据显示，对于抗-PDL1 sdAb，应使用具有较低盐浓度（50 mmol/L 或更低）的流动相。

为了进一步表征这两种纳米抗体，我们进行了非变性 SEC-LC/MS 实验（图 4）。结果表明，AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA 色谱柱适用于使用低浓度挥发性水性缓冲液（即 50 mmol/L 乙酸铵）的 SEC-MS。可以看出，两个 sdAb 样品均获得了出色的离子色谱图和高分辨率质谱图。解卷积质谱结果显示了两个样品的精确分子量测定值：抗-PD1 sdAb (16528 Da) 和抗-PDL1 sdAb (16895 Da)。

方法条件

参数	非变性 SEC-LC/MS 条件
色谱柱	Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA , 4.6 \times 300 mm (部件号 PL1580-5250)
流动相	50 mmol/L 乙酸铵, pH 7.0
流速	0.35 mL/min
柱温	25 $^{\circ}\text{C}$
进样量	20 μL , 1 mg/mL
总运行时间	15 min
质谱检测	最小范围: 300 m/z 最大范围: 7000 m/z 离子极性: 正
质谱离子源参数	气体温度: 325 $^{\circ}\text{C}$ 气体流速: 5 L/min 雾化器压力: 30 psi 毛细管电压: 5500 V 碎裂电压: 250 V 锥孔电压: 65 V 八极杆 RF 峰: 750 V

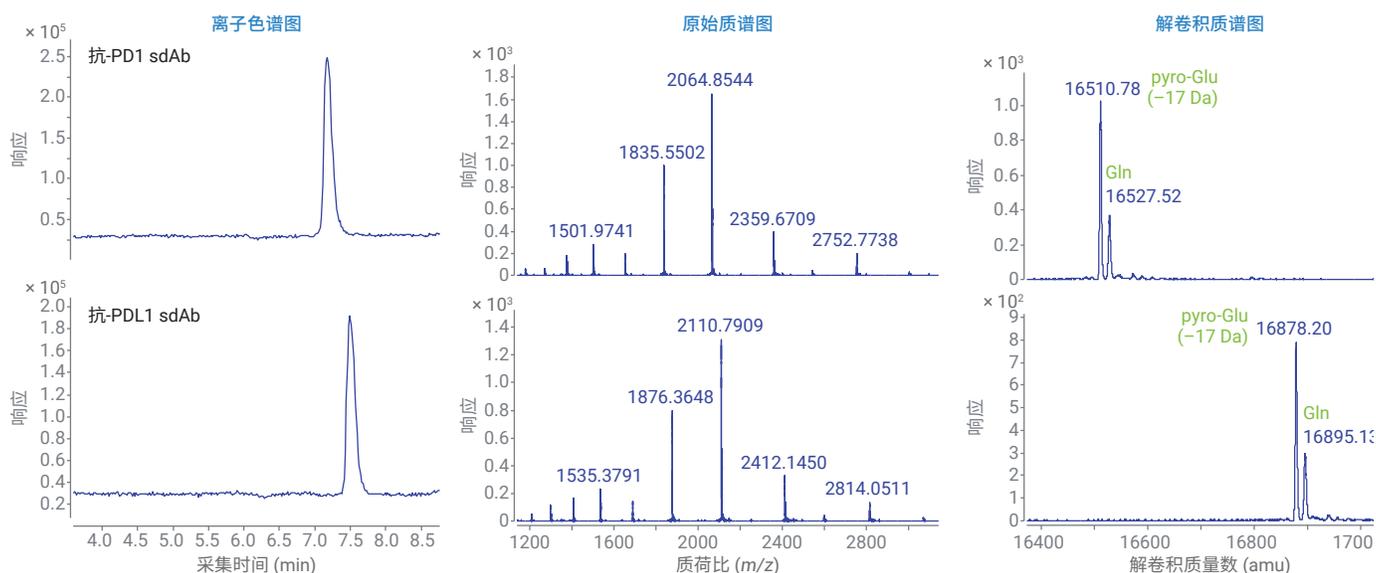


图 4. 抗-PD1（上图）和抗-PDL1（下图）单域抗体的非变性 SEC-LC/MS 分析

有趣的是，质谱结果显示两个样品都存在大量的 -17 Da 修饰。这是与 N-端谷氨酰胺 (Gln) 环化形成焦谷氨酸 (pyro-Glu) 相关的典型质量转移^[5]。Gln/pyro-Glu 转化通常发生在抗体的重链可变结构域；因此，在纳米抗体 (V_{HH} 片段) 中观察到这种 PTM 也就不足为奇了。本研究分析的两种 sdAb 样品均在细菌 (大肠杆菌) 中产生。研究表明，在原核系统中进行生产时，可能导致蛋白质作为包涵体被回收，从而导致非常规的 PTMs^[5]。由于 V_{HH} 的 N 端 Gln 残基靠近互补性决定区域 (CDR)，pyro-Glu 的形成可能会对靶标结合产生显著影响^[1]。因此，通常需要对这种 PTM 进行仔细的特征和记录^[5]。

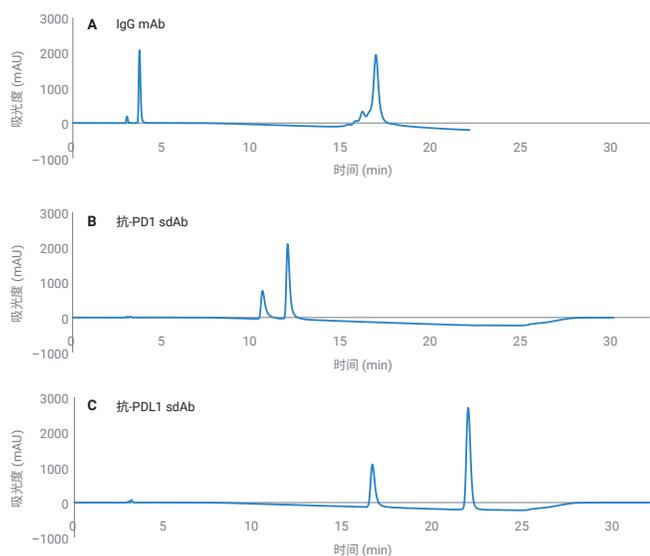


图 5. (A) IgG mAb、(B) 抗-PD1 单域抗体和 (C) 抗-PDL1 单域抗体的疏水相互作用色谱图

方法条件

参数	HPLC 条件 (HIC 分析)
色谱柱	Agilent AdvanceBio HIC, 4.6 × 100 mm (部件号 685975-908)
流动相	A) 含 2 mol/L 硫酸铵的 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0 B) 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7
梯度	0 min: 50% B 2 min: 50% B 17 min: 100% B 20 min: 100% B 22 min: 50% B 32 min: 50% B
流速	0.4 mL/min
柱温	30 °C
进样量	5 μ L, 0.8 mg/mL (mAb) 5 μ L, 1.0 mg/mL (sdAb)
检测	UV 214 nm

为了表征蛋白质的 Gln/pyro-Glu 转化，可以使用离子交换色谱和 HIC 等色谱方法。本研究选择的是 HIC，因为除了 PTM 分析之外，它还可以评估两种 sdAb 样品的疏水性。HIC 利用盐析机制，在接近生理条件下基于疏水性分离完整的天然蛋白质。图 5 显示了使用通用硫酸铵梯度法对抗-PD1 和抗-PDL1 sdAb 以及 IgG mAb 进行的 HIC 分离。两种纳米抗体的两个色谱峰均实现良好分离，表明两份样品都含有两种不同疏水性的物质。该结果与显示 Gln/pyro-Glu 转化的 LC/MS 数据一致。此外，HIC 数据表明抗-PDL1 sdAb 的疏水性非常强。抗-PDL1 sdAb 的保留时间比抗-PD1 sdAb 和 IgG mAb（分子量大 10 倍）长得多。这些结果有助于解释 SEC 盐浓度实验中观察到的现象（图 3），表明了两种单域抗体之间的主要理化特性差异。

为了进一步确认 HIC 分离的两个峰是否确实为含有 Gln 或 pyro-Glu 的 sdAb 物质，本研究使用谷氨酰胺酰胺环转移酶 (QPCT) 开发了一种生化方法（图 6）。已知该酶能催化蛋白质 N-端谷氨酰胺残基转化为焦谷氨酰胺基团^[6]。事实上，用 QPCT 处理两种 sdAb 样品后，色谱图仅包含 pyro-Glu 峰。本研究中使用 AdvanceBio HIC 色谱柱进行的实验表明，该色谱柱可以为纳米抗体 PTM 分析提供出色的选择性。

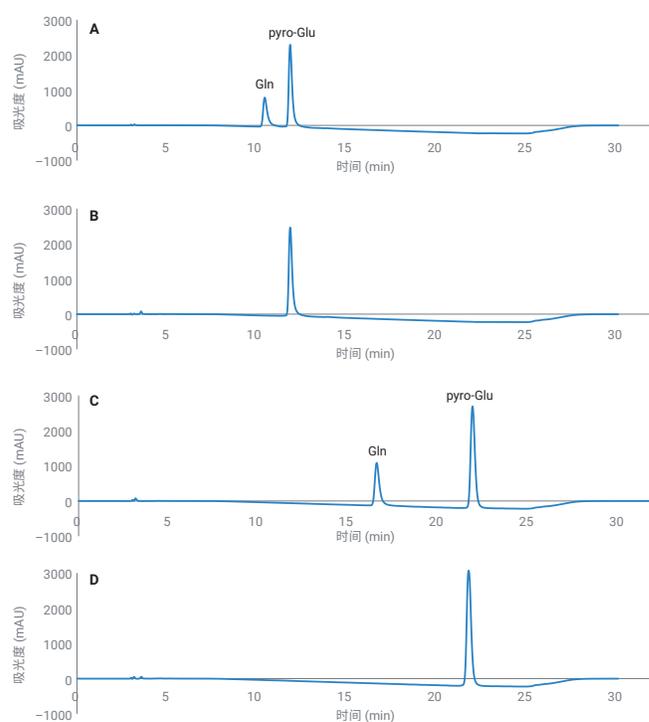


图 6. (A) 抗-PD1 sdAb、(B) 抗-PD1 sdAb + QPCT、(C) 抗-PDL1 sdAb 和 (D) 抗-PDL1 sdAb + QPCT 的 HIC 分析。对于酶处理，将 20 μ L sdAb (1 mg/mL) 与 4 μ L QPCT 在 37 $^{\circ}$ C 下共孵育 16–18 小时

结论

这种纳米抗体是一类革命性的新型生物药物形式，与传统的 mAb 疗法相比具有许多优势。针对这一类新型生物产品的研发，表征和记录在生产 and 储存过程中可能形成或改变的质量属性至关重要。研究表明，这些属性会影响药物效价、药代动力学、免疫原性和安全性。需要使用可靠且稳定的分析工具和方法。本应用简报介绍了可成功应用于纳米抗体表征的 SEC、HIC 和 SEC-LC/MS 技术。可以使用 SEC 对重要的关键质量属性 (CQA)，例如 HMW 聚集体和 LMW 片段 GluGln，进行高分辨率和高通量表征。使用 HIC 和 SEC-MS 方法可以检测分子的细微变化，例如翻译后 Gln/pyro-Glu 转化。本文介绍的方法为在天然、非变性模式下详细分析纳米抗体提供了指导。

参考文献

1. Bannas, P.; Hambach, J.; Koch-Nolte, F. Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies as Antitumor Therapeutics. *Front Immunol.* **2017**, *8*, 1603
2. Morrison, C. Nanobody Approval Gives Domain Antibodies A Boost. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18*, 485–487
3. Kondaveeti, S. Analysis of Covalent High Molecular Weight Insulin (共价高分子量胰岛素分析), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5994-1566EN, **2020**
4. Kondaveeti, S.; Chu, T-W.; Coffey, A., 小分子治疗性蛋白的高分离度体积排阻色谱分析, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5994-1829ZHCN, **2020**
5. Jefferis, R. Posttranslational Modifications and the Immunogenicity of Biotherapeutics. *J. Immunol. Res.* **2016**, *2016*, 5358272
6. Busby, W. Jr. *et al.* An Enzyme(s) That Converts Glutaminy-Peptides into Pyroglutamyl-Peptides. Presence in Pituitary, Brain, Adrenal Medulla, and Lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 8532–6

小分子治疗性蛋白的高分离度体积排阻色谱分析

作者

Sandeep Kondaveeti, Te-Wei
Chu 和 Andrew Coffey
安捷伦科技有限公司

摘要

涉及聚集的蛋白质变性过程是阻碍稳定蛋白质药物制剂开发的因素之一。使用体积排阻色谱 (SEC) HPLC 测定这些蛋白质的纯度和聚集体是一种相对简单的技术。定期校准 SEC 方法可确保更好的重现性,从而提高准确性,还可及早发现样品及批次中的潜在问题。本简报将 Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 µm 色谱柱与其他供应商的亚 2 µm 填料色谱柱进行了比较。对重组人生长激素 (hGH)、人粒细胞集落刺激因子 (hG-CSF) 以及干扰素 α-2b (INF α-2b) 蛋白的分析结果表明, AdvanceBio 色谱柱在小分子蛋白质治疗药物应用方面具有卓越性能。

前言

近年来，生物衍生的治疗药物（称为生物制剂）的开发显著增长，广泛应用于治疗各种疾病。一些生物药物包括生长因子和细胞因子等小分子蛋白质治疗药物，它们在调节血液、肌肉和骨细胞的产生、成熟和活性方面发挥着关键作用。例如，人生长激素 (hGH) 用于刺激由于缺乏激素而生长缓慢或生长不正常的儿童和成人的生长^[1]。人粒细胞集落刺激因子 (hG-CSF) 用于治疗化疗中的癌症患者，以提高被细胞毒性治疗药物降低的白细胞水平^[2]。干扰素是一类具有多种治疗用途的糖蛋白，但会形成部分去折叠的形式以及聚集体，尤其当暴露于 pH 或热降解条件下时^[3]。

涉及聚集的蛋白质变性过程是阻碍稳定蛋白质药物制剂开发的主要因素之一。美国药典专论方法推荐使用体积排阻色谱 (SEC) HPLC 测定这类蛋白质的纯度和聚集体。SEC 是一种相对简单的技术。它依靠的是向固定相孔结构进行的简单扩散：较大的分子无法渗透到颗粒孔隙中，会首先洗脱，而较小的分子比较容易扩散到孔隙中，会较晚洗脱。Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 µm 色谱柱专为生物分子的水相体积排阻色谱 (SEC) 分析而设计。这些填料颗粒采用独特技术制造，同时具备适用于分离小分子蛋白和多肽等分子的理想孔径和孔隙体积。

实验部分

设备与材料

所有化学品和试剂均为 HPLC 级或更高级别，且均购自 Sigma-Aldrich (现属于 Merck) 或 VWR Scientific。水经由 Milli-Q A10 (Millipore) 纯化。

仪器

Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪包括：

- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性泵 (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler (G5668A)，配备样品冷却装置（选件 #100）
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)，配备生物惰性热交换器（选件 #019）
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 WR (G7115A)，配备生物惰性流通池（选件 #028）

软件

OpenLab 2.2 CDS

方法条件

参数	HPLC 条件
色谱柱	AdvanceBio SEC 1.9 µm 120 Å, 4.6 × 300 mm (部件号 PL1580-5250)
流动相	150 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0
流速	0.30 或 0.35 mL/min (如文中所示)
柱温	25 °C
进样量	2 µL, 1 mg/mL
总运行时间	低分子量蛋白质混标 人生长激素, rhGH 人粒细胞集落刺激因子, rG-CSH
总运行时间	15 或 20 分钟 (取决于流速)

结果与讨论

蛋白质是含有酸性、碱性、中性和疏水性等多种侧链基团的复杂分子。寻求避免次级相互作用的最佳条件可能较为困难，但 AdvanceBio SEC 产品系列的硅胶颗粒具有聚合物表面涂层，可以解决很多这方面的问题。分离机理是基于溶液中分子的大小（流体动力学半径）。自然界中的蛋白质通常是致密的球状结构，通常会在极端温度、pH 或盐组成等应激条件下聚集，形成二聚体和更大的单元。这对于蛋白质分子而言是一个特殊问题，如果存在蛋白质聚集，在作为治疗药物分子给药时可能引发不良反应。SEC 为蛋白质聚集的量化和监测提供了理想工具。图 1 展示了低分子量蛋白质和多肽标准品的 SEC 分离。这些标准品基于保留时间的校准曲线如图 2 所示。由此估计该色谱柱的最佳分子量范围为 1–80 kDa。

峰	蛋白质/多肽	分子量 (Da)
1	卵清蛋白	44000
2	肌红蛋白	17000
3	抑肽酶	6700
4	神经降压素	1700
5	尿苷	244

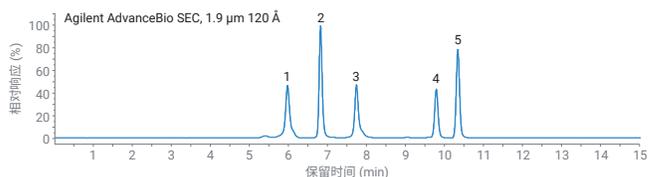


图 1. 低分子量蛋白质和多肽混合物在 0.35 mL/min 下的体积排阻色谱图

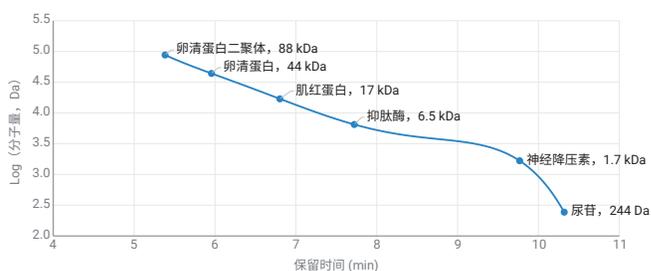


图 2. 低分子量蛋白质和多肽标准品的 AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 Å 校准曲线

即使使用 AdvanceBio SEC 色谱柱是为了定量单体和二聚体含量，使用适当的分子量标准品定期进行校准仍然是个很好的做法。定期校准可确保更好的重现性，从而提高准确性，还可及早发现潜在问题，减少系统停机时间和故障排除工作。对于蛋白质分离，应使用的标准品是一系列充分表征的蛋白质，涵盖色谱柱的整个操作范围。选择正确的标准品可确保成功应用 SEC 的两个关键环节：分析物与固定相之间的次级相互作用应尽可能小。选择的孔径应匹配所分析分子的大小。

本应用简报展示了使用 Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 μm 色谱柱对重组 hGH 和 hG-CSF 治疗性蛋白质进行体积排阻色谱 (SEC) 分析，与当前的竞品亚 2 μm 填料技术相比，其可实现高分离度分离。通过进一步优化流动相条件，还比较了未降解和热降解干扰素 α-2b (IFN α-2b) 的 SEC 分离。

将目标分析物的保留时间与校准曲线进行比较，可以确定是否存在次级相互作用。峰洗脱时间早于或晚于预期或是峰形不佳，则表明流动相条件可能未得到充分优化。图 3 展示了使用 AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 Å 色谱柱获得的 hG-CSF 体积排阻色谱图，其保留时间与 20 kDa 左右的蛋白质的保留时间非常接近。

图 4 展示了在 AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 Å 色谱柱和其他供应商的亚 2 μm 色谱柱上获得的 hG-CSF 谱图的基线放大图。色谱图的底端部分表明了与次级相互作用相关的问题（晚于预期洗脱时间和拖尾峰）。

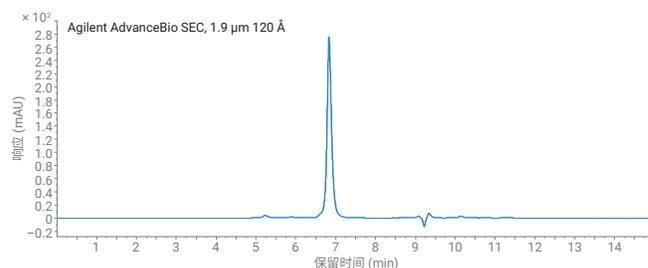


图 3. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 Å 4.6 × 300 mm 色谱柱，在 0.35 mL/min 下获得的 hG-CSF 的体积排阻色谱图

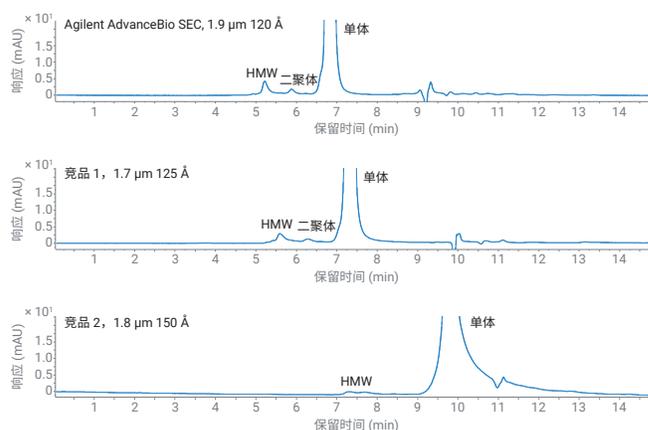


图 4. hG-CSF 体积排阻色谱图的放大图，流速 0.35 mL/min

许多其他生物治疗性蛋白质具有相似的分子量，因此也适合在同一 AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA 色谱柱上进行分析。重组形式的 hGH 及生长激素可能由于翻译后修饰或下游加工而含有一些杂质。图 5 展示了在上述相同条件下获得的生长激素的体积排阻色谱图。插图显示了放大后的基线区域，可以明显观察到二聚体和高分子量聚集体的存在。

其他蛋白质可能需要进一步开发方法以获得理想峰形和分离度。如表 2 所示，通过在不同流动相条件下进行一系列实验来确定获得理想 IFN α -2b 峰形和蛋白质回收率的流动相组成。

表 1. hG-CSF 高分子量 (HMW)、二聚体和单体峰的峰面积数据

	AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA				竞品 1, 1.7 μm 125 \AA				竞品 2, 1.8 μm 150 \AA			
	RT (min)	峰面积 (%)	Rs USP	峰拖尾	RT (min)	峰面积 (%)	Rs USP	峰拖尾	RT (min)	峰面积 (%)	Rs USP	峰拖尾
HMW	5.22	2.61		1.16	5.59	2.49		1.28	7.40	2.01		1.37
二聚体	5.88	1.02	2.41	1.11	6.27	0.83	1.68	1.26	N.D.			
单体	6.82	96.37	3.77	1.13	7.31	96.68	3.04	1.11	9.74	97.99		2.13

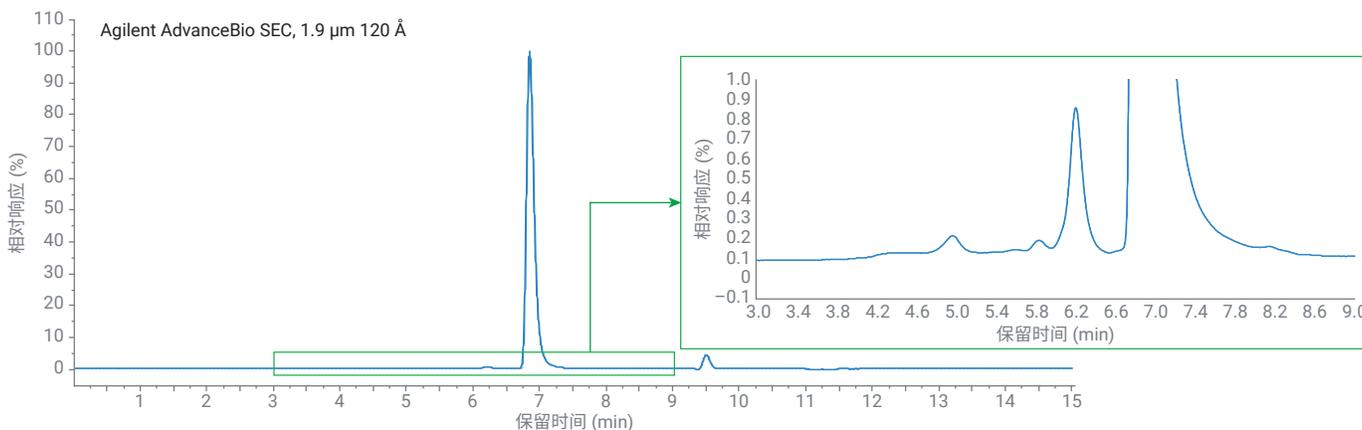


图 5. 生长激素 (rhGH) 的体积排阻色谱图

表 2. IFN α -2b 方法优化期间的峰形数据

NaCl (mmol/L)	峰宽 (min)	峰拖尾	分离度 HMW-单体	分离度 单体-LMW
100	0.20	2.88	1.94	1.98
150	0.18	2.65	2.25	2.31
200	0.16	2.52	2.26	2.66
250	0.15	2.39	2.84	2.86
400	0.14	2.08	3.32	3.59

图 6 展示了在三种不同的亚 2 μm SEC 色谱柱上获得的干扰素 α -2b 标准物质的体积排阻色谱图以及保留时间和色谱峰拖尾数据。利用 SEC 分离 IFN α -2b 杂质时，色谱柱性能的差异可能会导致分离度的不同，因此使用降解样品重复进行该实验。

对于干扰素 α -2b，有研究认为聚集体的形成涉及分子的部分去折叠，但部分去折叠的分子在一定程度上是稳定的^[3]。此外，O-糖基化也会降低这些分子的热稳定性^[4]。由于大肠杆菌细胞系不会引入糖基化变体，因此用于生产重组蛋白的细胞系的选择是一个关键参数。

方法条件

参数	INF α -2b 的 HPLC 优化条件
色谱柱	Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA , 4.6 \times 300 mm (部件号 PL1580-5250)
流动相	200 mmol/L 磷酸钠 + 250 mmol/L 氯化钠, pH 6.5
流速	0.35 mL/min
柱温	25 $^{\circ}\text{C}$
进样量	2 μL , 1 mg/mL
样品	干扰素 α -2b (INF α -2b) 热处理干扰素 α -2b (INF α -2b): 60 $^{\circ}\text{C}$ (保持 30 min)
总运行时间	15 min

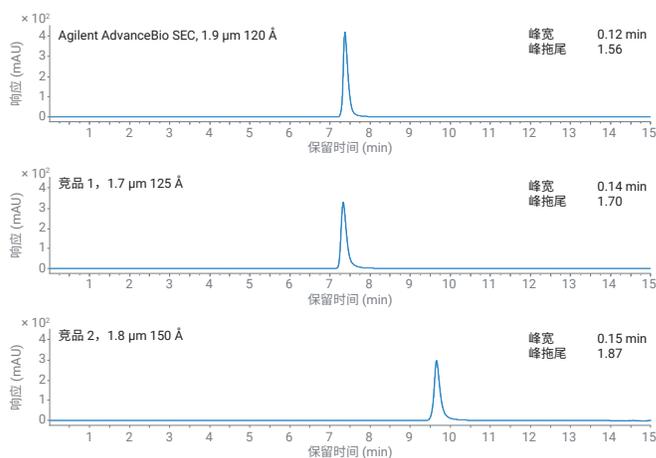


图 6. 干扰素 α -2b 的体积排阻色谱图

图 6 展示了在三种不同的亚 2 μm SEC 色谱柱上获得的干扰素 α -2b 标准物质的体积排阻色谱图以及保留时间和色谱峰拖尾数据。利用 SEC 分离 IFN α -2b 杂质时，色谱柱性能的差异可能会导致分离度的不同，因此使用降解样品重复进行该实验。

对于干扰素 α -2b，有研究认为聚集体的形成涉及分子的部分去折叠，但部分去折叠的分子在一定程度上是稳定的^[3]。此外，O-糖基化也会降低这些分子的热稳定性^[4]。由于大肠杆菌细胞系不会引入糖基化变体，因此用于生产重组蛋白的细胞系的选择是一个关键参数。

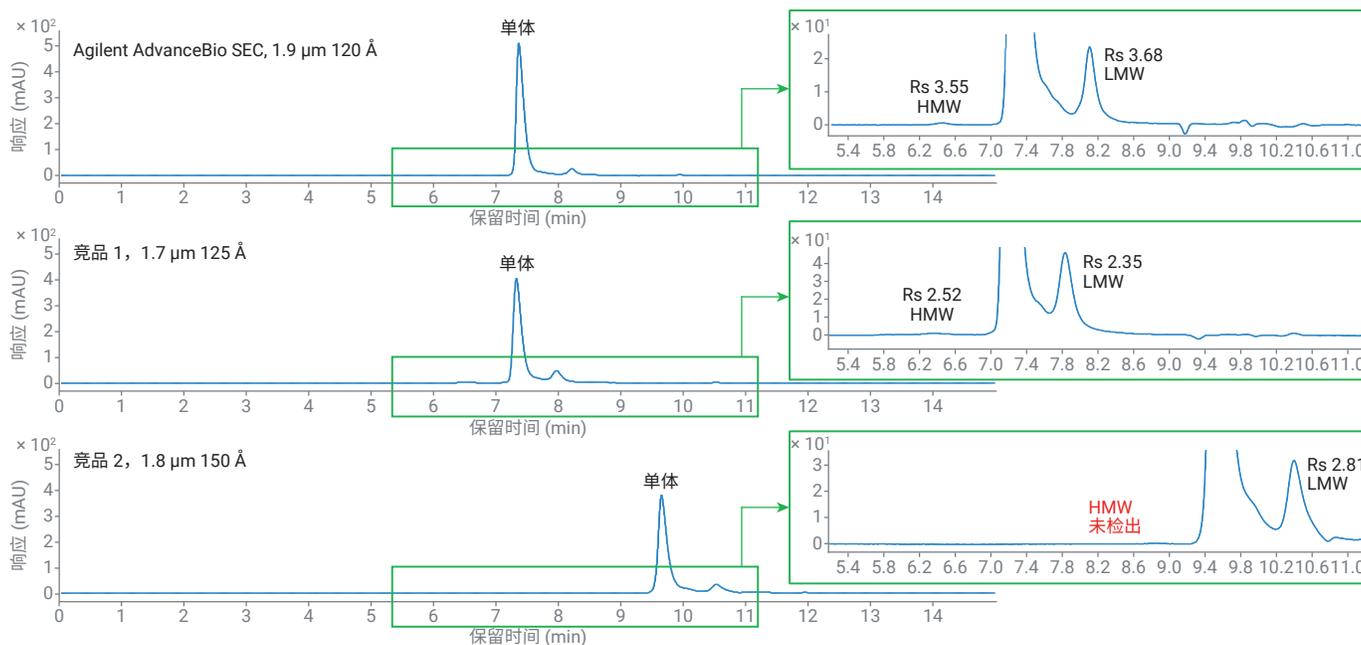


图 7. 干扰素 α -2b 的体积排阻色谱图

结论

Agilent AdvanceBio SEC 提供一系列色谱柱尺寸和不同孔径，适用于不同大小的分子。与其他供应商类似填料粒径和孔径特征的色谱柱相比，独具特色的 AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 µm 色谱柱可实现对小分子治疗性蛋白质的高分离度 SEC 分析，展现出了优异的性能。

使用适当的标准品校准 AdvanceBio SEC 体积排阻色谱柱，可以确保您充分了解正确的工作范围，并且可以通过校准曲线估算未知分子的分子大小。但是，使用一系列标准品进行定期校准非常有益，可以用于监测色谱柱性能随时间的变化，从而及早发现潜在的问题。继而，可以采取纠正措施，最终缩短系统停机时间并提高分析效率。

参考文献

1. Bayol, A. et al. *Pharmeuropa Bio*. 2004, **2004**(1), 35–45
2. Advani, S. H. et al. *Indian J. Med. Paediatr. Oncol.* **2010** (Jul-Sep), *31*(3), 79–82
3. Sharma, V. K.; Kalonia, D. S. *Pharmaceutical Research* **2003**, *20*, 1721–1729
4. Johnston, M. J. W. et al. *Pharmaceutical Research* **2011**, *28*, 1661–1667

共价高分子量胰岛素分析

使用高性能体积排阻色谱提高速度和分离度

作者

Sandeep Kondaveeti
安捷伦科技有限公司

摘要

使用 HPLC 体积排阻色谱 (SEC) 法对胰岛素进行了分析，采用的色谱柱为 Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 孔径、亚 2 μm 亲水聚合物涂层硅胶填料色谱柱。将分析结果与传统方法和竞争厂商色谱柱进行了性能和效率的比较。使用 AdvanceBio 色谱柱时，胰岛素和高分子量 (HMW) 蛋白质的分离度显著高于传统方法，并且色谱分析时间更短，使高通量胰岛素样品分析成为现实。

前言

胰岛素是一种用于控制血糖稳态的小分子多肽激素，广泛应用于糖尿病治疗。基因工程技术使生物制药公司开发出了各种长效胰岛素类似物。早有研究表明，在酸性和高温条件下，胰岛素单体会形成淀粉样纤维^[1]。由于胰岛素类似物比天然胰岛素更易聚集，对于胰岛素类似物制造商来说，这是一个非常棘手的问题^[2]。可注射胰岛素的关键质量控制属性之一是控制胰岛素纤维化，通常称为高分子量 (HMW) 蛋白质。在当前的美国药典 (USP) 和欧洲药典 (EP) 专论方法中，对 HMW 聚集体的测定基于 HPLC 体积排阻色谱 (SEC)^[3,4]。根据 EP 方法，规定使用“孔径为 12–12.5 nm 的色谱 R 亲水性硅胶 (5–10 μm)，适用于从共价二聚体和聚合物中分离胰岛素单体”，长度为 30 cm，最小内径为 7.5 mm 的色谱柱。然而，该方法的运行时间长达 35 分钟，这对于任何进行高通量样品分析的实验室来说都会产生高昂成本。本文介绍了一种使用 Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 孔径、亚 2 μm 亲水聚合物涂层硅胶填料色谱柱开发的 SEC 方法。与传统药典方法相比，本方法具有运行速度更快、胰岛素和共价胰岛素 HMW 分离度更高的优点。

方法条件

参数	HPLC 条件
色谱柱	Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 Å, 4.6 × 300 mm (部件号 PL1580-5250)
流动相	精氨酸 (1.0 g/L)/乙酸/乙腈 (65/15/20 v/v/v)
流速	0.30 mL/min
柱温	25 °C
进样量	2 μL
样品	人胰岛素对照品， 热处理胰岛素 (60 °C, 6 个小时)
总运行时间	15 min

实验部分

设备与材料

所有化学品和试剂均为 HPLC 级或更高级别，且均购自 Sigma-Aldrich (现属于 Merck) 或 VWR Scientific。水经由 Milli-Q A10 (Millipore) 纯化。

样品前处理

为了进行非变性质谱分析，将蛋白质样品保存在中性 pH 和挥发性水溶液 (例如乙酸铵或甲酸铵) 中至关重要。因此，在质谱分析之前，通常需要进行样品脱盐和缓冲液交换。简而言之，就是使用 Bio-Rad Bio-Spin P-6 (限值 6000 MW) 或 P-30 (限值 40000 MW) 小柱将蛋白质储备液 (1–10 mg/mL) 脱盐并使用 100 mmol/L 乙酸铵进行溶剂交换。首先用 100 mmol/L 乙酸铵缓冲液使小柱完全平衡。然后将蛋白质样品转移至色谱柱顶部并以 1000 × g 离心 5 分钟。然后使用 100 mmol/L 乙酸铵进行蛋白质缓冲液交换，随后即可进行质谱分析。这种脱盐方案导致的样品损失极小，蛋白质分子的结构改变也非常少。

仪器

Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪包括：

- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性泵 (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler (G5668A)，配备样品冷却装置 (选件 #100)
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)，配备生物惰性热交换器 (选件 #019)
- Agilent 1260 Infinity II 可变波长检测器 (G7114A)

软件

Agilent OpenLab 2.2 CDS。

样品前处理

人胰岛素对照品 (Sigma, I2643) 和热处理胰岛素样品按照欧洲药典进行处理。

复溶样品，在 0.01 mol/L 盐酸溶液中稀释至 4.0 mg/mL，然后进一步稀释至终浓度 2 mg/mL。

结果与讨论

本应用重点展示了在 USP 和 EP 专论方法提供的条件下，对 AdvanceBio SEC 120 Å, 1.9 μm, 4.6 × 300 mm 色谱柱分析胰岛素样品中 HMW 蛋白质的性能评估。这两种药典方法规定的酸性流动相由 0.65 g/L L-精氨酸、15% 乙酸和 20% (v/v) 乙腈组成。此流动相能够评估这些制剂中共价 HMW 的含量，同时破坏非共价胰岛素的自缔合以及与色谱柱间的相互作用。这款特色 AdvanceBio SEC 1.9 μm 色谱柱采用亲水性聚合物涂层设计，大大减少了分析物与填料颗粒表面之间不必要的次级效应。该色谱柱可实现出色的分离度和准确的 HMW 蛋白质定量。

图 1 显示了使用欧洲药典胰岛素对照品获得的系统适用性色谱图。1.9 μm 色谱柱的单体和 HWM 蛋白质分离度为 4.03，远远超过专论方法中系统适用性要求 ≥ 2.0 的分离度。胰岛素对照样品中 HMW 蛋白质的峰面积（表 1）满足 $< 1\%$ 的适用性要求。值得注意的是，此分析方法使用 AdvanceBio SEC 120 Å, 1.9 μm, 4.6 × 300 mm 色谱柱，总分析时间约为 15 分钟，而使用更大粒径的传统亲水性硅胶色谱柱的欧洲药典专论方法则需要 35 分钟。

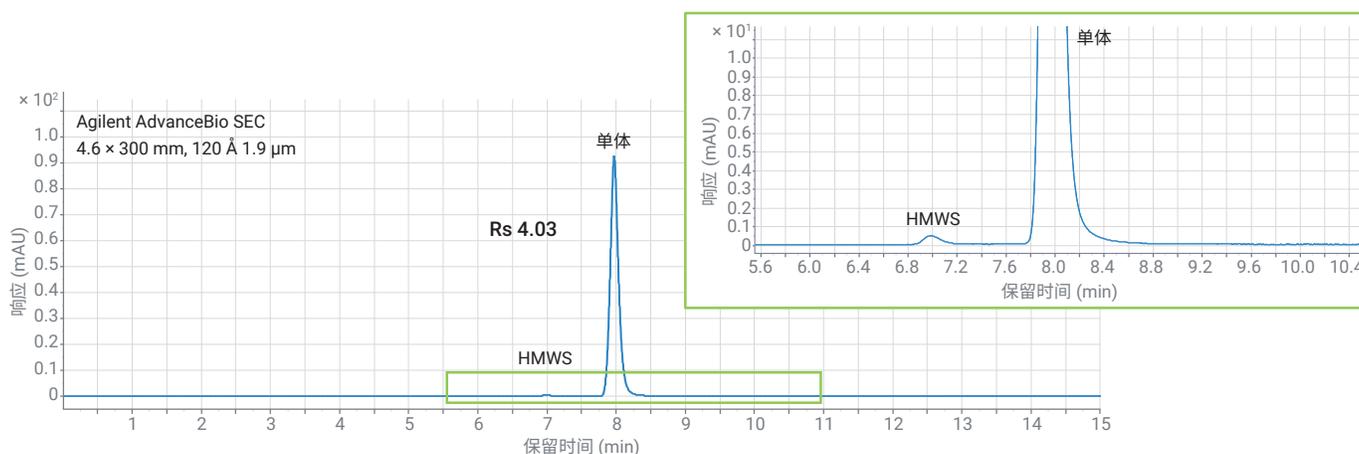


图 1. 具有单体和 HMW 蛋白质的人胰岛素对照品的体积排阻色谱图

表 1. 人胰岛素对照品 SEC 分析的结果汇总

峰归属	RT (min)	峰面积百分比	分离度 USP	峰拖尾	半峰宽
胰岛素 HWM	6.99	0.67	1.48	1.04	0.15
胰岛素单体	7.96	99.33	4.03	1.04	0.15

欧洲药典专论中胰岛素 SEC HMW 测定方法规定 SEC 粒径为 5–10 μm ，而美国药典专论中没有规定粒径范围。作为本研究的一部分，对 AdvanceBio SEC 120 Å, 1.9 μm 色谱柱和其他 SEC 色谱柱供应商的产品进行了比较，这些色谱柱均采用亚 2 μm 颗粒，长度相当于 300 mm，内径 4.6 mm（图 2）。与竞争厂商的色谱柱相比，安捷伦 1.9 μm 色谱柱的分离度显著提高 (> 50%)。胰岛素单体峰尾的分离度也得到明显改善，与供应商 2 SEC 色谱柱相比，低分子量片段峰在安捷伦 SEC 色谱柱上实现了更出色的分离。在供应商 2 SEC 色谱柱中观察到明显的峰拖尾，这可能是次级相互作用造成。需要重点注意的是，胰岛素峰的不同洗脱时间是由于这些色谱柱之间的孔径差异造成的。

热处理胰岛素样品中 HMW 蛋白质的峰面积百分比在所有色谱柱中均超过 1%，表明该样品不符合适用性测试限值。然而，与其他供应商的色谱柱相比，使用安捷伦 SEC 120 Å, 1.9 μm 色谱柱分离出更高百分比的聚集体。

汇总数据如表 2 所示。在 AdvanceBio SEC 120 Å, 1.9 μm , 4.6 \times 300 mm 色谱柱方法中，单体和共价二聚体峰的分析效率有所提高，再次证明更新后的方法可提高分离度，并缩短运行时间。根据 USP (USP37-NF32S1) 和 EP 指南，等度方法的最大调整范围为粒径减小 50%，色谱柱内径改变 25%。基于这些要求，使用粒径为亚 2 μm 、内径为 4.6 mm 的色谱柱来分析胰岛素的 SEC 方法仍需要进一步的方法验证和优化，以便将现代颗粒填料技术融入已建立的方法中。

表 2. 使用竞争产品对热处理胰岛素样品进行 SEC 分析的结果汇总

峰归属	AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 Å			供应商 1 SEC 125 Å 1.7 μm			供应商 2 SEC 150 Å 1.8 μm		
	峰面积 (%)	峰拖尾	半峰宽	峰面积 (%)	峰拖尾	半峰宽	峰面积 (%)	峰拖尾	半峰宽
HMWS	1.93			1.57			1.10	2.01	
胰岛素单体	97.66	1.00	0.13	97.85	1.10	0.13	98.80	1.37	0.14
LMWS	0.41			0.58			0.20	97.99	

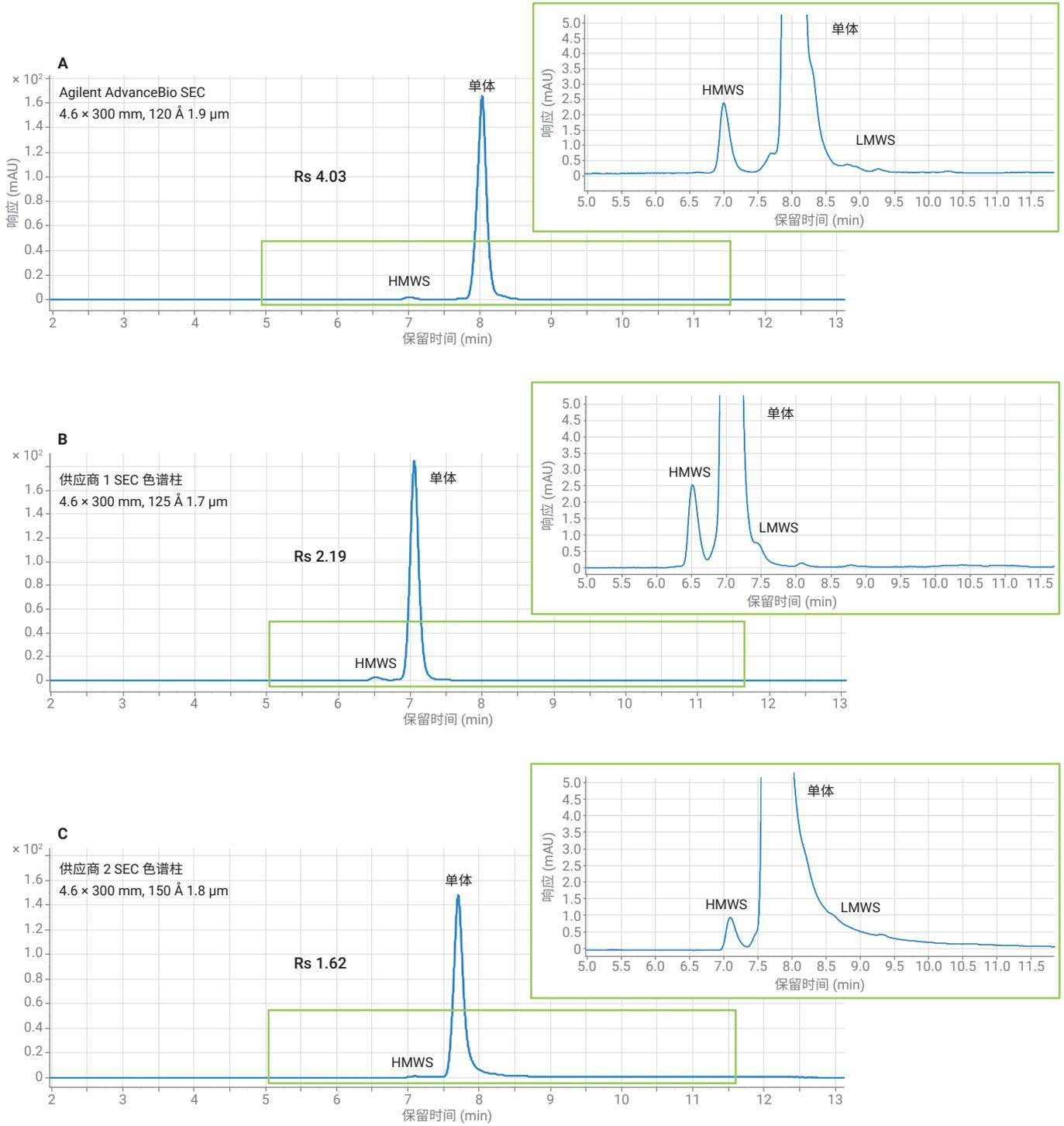


图 2. 使用竞争产品对具有聚集体和低分子量片段的热处理胰岛素进行 SEC 分析

结论

体积排阻色谱是美国药典和欧洲药典规定的分析治疗制剂中共价 HMW 胰岛素的标准方法。本文给出了色谱图，展示了使用不同竞争厂商的 SEC 色谱柱时该方法的性能。结果表明，与传统的 SEC-HPLC 方法相比，使用 Agilent BioAdvance SEC 120 Å 孔径、AdvanceBio SEC 1.9 μm 色谱柱和 Agilent Infinity II 生物惰性液相色谱仪能够显著提高分离度，同时减少分析时间和流动相使用。

参考文献

1. Yang, Y., *et al.* An Achilles' Heel in an Amyloidogenic Protein and Its Repair: Insulin Fibrillation and Therapeutic Design." *J. Biol. Chem.* **2010**, 10806–10821
2. Librizzi; Fabio; Rischel. The Kinetic Behavior of Insulin Fibrillation is Determined by Heterogeneous Nucleation Pathways. *Protein Science* **2005**, 12, 3129–3134
3. Insulin Monograph, *USP Pharmacopeial Forum*, 31(5), 1375
4. European Pharmacopeia 5.0, *Human Insulin Monograph* **2005**, 838, 1800–1802

Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱校准

技术概述

作者

Andy Coffey
安捷伦科技有限公司

前言

Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱专为生物分子的水相体积排阻色谱 (SEC) 而设计。这些填料颗粒采用独特技术制造，同时具备适用于分离蛋白质、多糖或水溶性聚合物等分子的理想孔径和孔体积。

即使使用 AdvanceBio SEC 色谱柱是为了定量单体和二聚体含量，使用适当的分子量标准品定期进行校准仍然是个很好的做法。定期校准可确保更好的重现性，从而提高准确性，还可及早发现潜在问题，减少系统停机时间和故障排除工作。

对于蛋白质分离，应使用的标准品是一系列充分表征的蛋白质，涵盖色谱柱的整个操作范围。对于多糖分析，应使用支链淀粉多糖分子量标准品，而对于合成聚乙二醇或聚环氧乙烷，PEG/PEO 标准品较为适宜。

SEC 是一种相对简单的技术。它依靠的是向固定相孔结构进行的简单扩散；较大的分子无法渗透到颗粒孔隙中，会首先洗脱，而较小的分子比较容易扩散到孔隙中，会较晚洗脱。由此就提出了成功使用 SEC 需要的两个关键环节：

- 分析物与固定相之间不应存在次级相互作用
- 选择的孔径应匹配所分析分子的大小

蛋白质是含有酸性、碱性、中性和疏水性等多种侧链基团的复杂分子。寻求避免次级相互作用的最佳条件可能较为困难，但 AdvanceBio SEC 产品系列的硅胶颗粒具有聚合物表面涂层，可以解决很多这方面的问题。

分离机理是基于溶液中分子的大小。自然界中的蛋白质通常是致密的球状结构，通常会在极端温度、pH 或盐组成等应激条件下聚集，形成二聚体和更大的单元^[1]。这对于单克隆抗体等分子而言是一个特殊问题，如果存在蛋白质聚集，在用药时可能引发不良反应。SEC 为蛋白质聚集的量化和监测提供了理想工具。相比之下，多糖和聚环氧乙烷等合成聚合物不具有多种基团，但通常是由一系列密切相关的低聚物组成。在这种情况下，SEC 可以提供分子量、分子量分布和支化信息的分析^[2]。

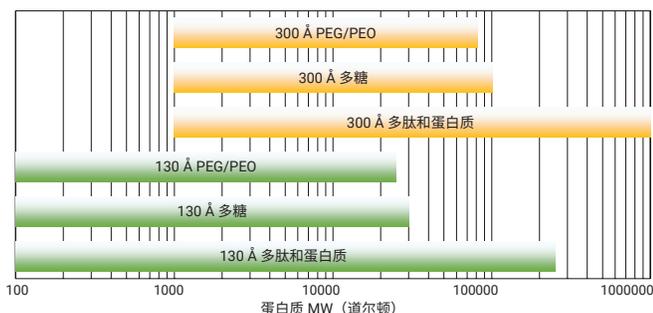


图 1. Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱的分离范围

Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱校准

选择分析中使用的洗脱液。样品需要能够溶于流动相，并且不应存在会导致分子提前或延后洗脱的次级相互作用。对于蛋白质，我们建议使用 150 mmol/L 磷酸钠，pH 7.0，因为这样可以消除 HPLC 系统中可能导致腐蚀的氯化钠。不过仍然可以使用其他流动相，包括磷酸盐缓冲液 (PBS) 或 0.1 mol/L 磷酸钠/0.1 mol/L 硫酸钠等高强度流动相（请参见第 10–11 页）。

将标准品溶解于流动相中。确保溶液澄清，没有不溶物质存在。如有必要，可过滤样品。为确保样品完全溶解，可考虑更换流动相。

记录每种标准品的色谱图，并绘制保留时间 (x 轴) 与分子量 (y 轴) 的关系图，以创建校准曲线。请注意，y 轴是以对数刻度绘制。

条件

参数	值
色谱柱:	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 μm, 7.8 × 300 mm (部件号 PL1180-5350) Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μm, 7.8 × 300 mm (部件号 PL1180-5301)
样品:	安捷伦聚乙二醇校准试剂盒, PEG-10, 10 × 0.2 g (部件号 PL2070-0100) 安捷伦环氧乙烷校准试剂盒, PEO-10, 10 × 0.2 g (部件号 PL2080-0101) AdvanceBio SEC 130 Å 蛋白质标准品, 冻干, 1.5 mL (部件号 5190-9416) AdvanceBio SEC 300 Å 蛋白质标准品, 冻干, 1.5 mL (部件号 5190-9417) 蛋白质标准品 (Sigma-Aldrich) 使用流动相将样品配制为 0.5–1.0 mg/mL
洗脱液 A:	150 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.0, PBS, pH 7.4 (10 mmol/L 磷酸盐, 140 mmol/L NaCl) 或 100 mmol/L 磷酸钠 + 100 mmol/L 硫酸钠, pH 7.0
流速:	1.0 mL/min
检测器:	多糖和 PEG/PEO 标准品使用 RI 检测器 多肽和蛋白质使用 UV 检测器, 220 nm
系统:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱 (附带示差折光检测器)

多肽和蛋白质校准

蛋白质和多肽通常是结构非常紧凑的分子，包含多个氢键、静电相互作用或二硫桥等共价键。最好选择能够涵盖色谱柱操作范围的一系列标准品来校准。还可以使用制备好的标准混合物，因为容易对峰进行清晰界定和良好分离（图 3A 和 3B）。

如果存在来自不同氨基酸的各种侧链官能团，就意味着可能发生不利的次级相互作用，因此可能需要测试不同的流动相组成。

图中的峰大多非常尖锐清晰，因为它们代表的是单一分子种类。蛋白质含有聚集体是很常见的，通常也得到了良好分离——明显是早洗脱峰或一系列峰。

蛋白质/多肽	MW	保留时间 (min)	
		130 Å	300 Å
甲状腺球蛋白	670000	4.60	5.14
γ-球蛋白	150000	4.90	6.53
BSA	66000	5.53	7.57
卵清蛋白	44300	6.04	8.13
肌红蛋白	17600	6.77	8.79
细胞色素 C	12327	6.95	8.92
抑肽酶	6511	7.56	9.38
神经降压素	1672	9.42	10.54
血管紧张素 II	1040	9.94	10.82

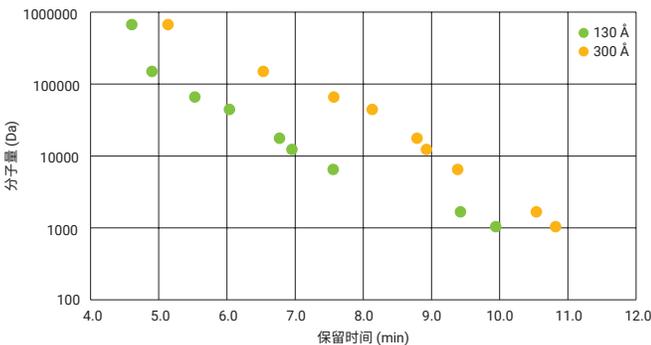


图 2. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱进行蛋白质和多肽校准

蛋白质和多肽标准品的代表性色谱图

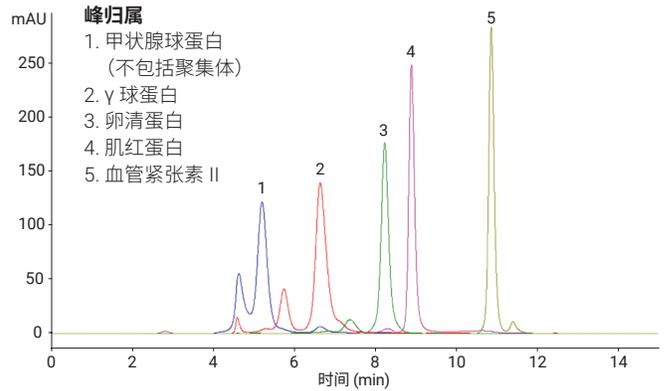


图 3A. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 色谱柱分析 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 蛋白质标准品（部件号 5190-9417）中包含的每种多肽和蛋白质

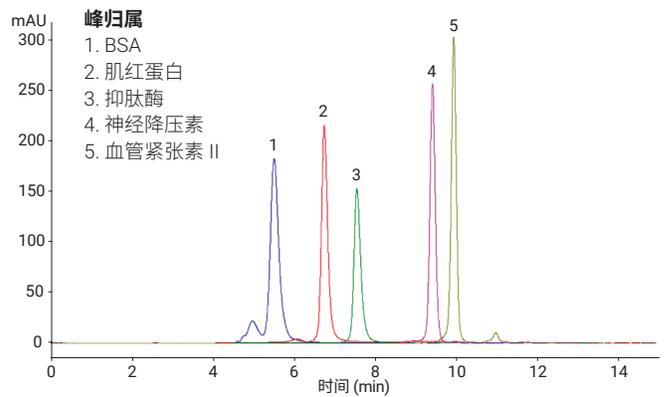


图 3B. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 130 Å 色谱柱分析 Agilent AdvanceBio SEC 130 Å 蛋白质标准品（部件号 5190-9416）中包含的每种多肽和蛋白质

多糖校准

如果分析物也是多糖，应使用淀粉或纤维素等多糖标准品进行校准。多糖有许多类型，包括直链、支链或硫酸化分子。与多肽或蛋白质不同，它们包含多种链长，体积可能非常大。因此，您需要确保使用的色谱柱能够分离要研究的多糖的分子量范围。

每多一个己糖，质量数差异为 162，这意味着很难分离各种低聚物，除非样品足够小（图 5C），使用两个串联色谱柱以提高分离度。

串联运行两个色谱柱可以提高分离度，使单个低聚物在 5800 Da 多糖样品中可见。

该样品含有约 30–40 个单元的低聚物，质量数差异为 162 Da。

多糖	MW	保留时间 (min)	
		130 Å	300 Å
788K	788000	4.48	4.74
380K	380000	4.58	4.84
100K	100000	4.73	5.33
48K	48000	4.89	6.19
23.7K	23700	5.39	7.42
5.8K	5800	7.16	9.22
麦芽三糖	504	9.46	10.72
麦芽糖	342	9.73	10.82
葡萄糖	180	10.01	11.09

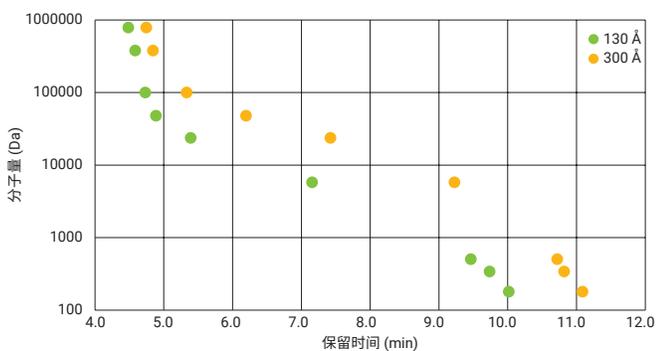


图 4. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱进行多糖校准

多糖标准品的代表性色谱图

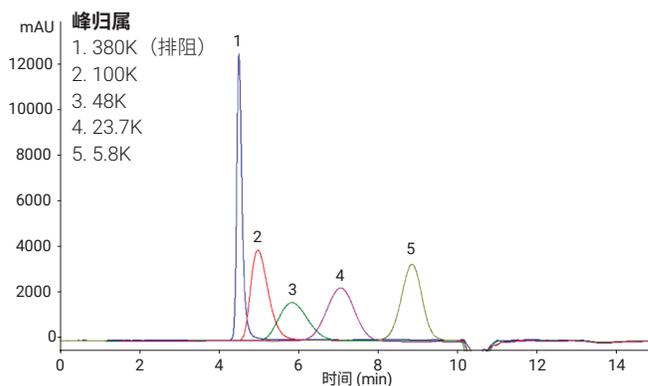


图 5A. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 色谱柱分离多糖标准品

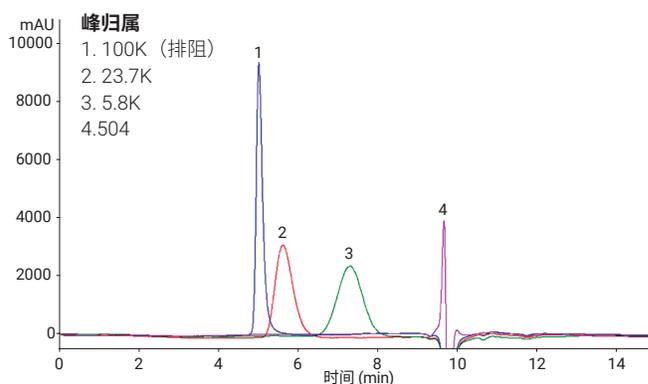


图 5B. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 130 Å 色谱柱分离多糖标准品

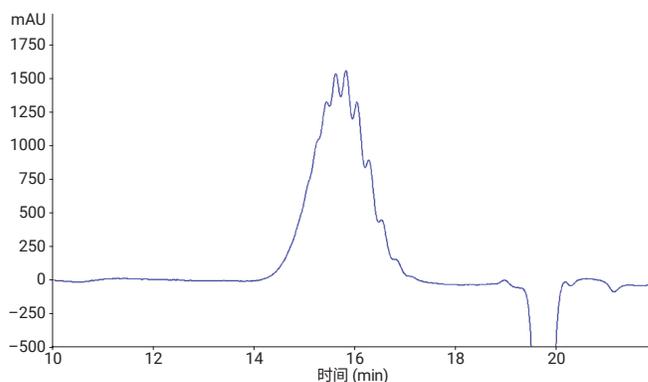


图 5C. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å + 130 Å 色谱柱串联运行多糖 5.8K 分离

PEG/PEO 校准

聚乙二醇 (PEG) 和聚环氧乙烷 (PEO) 类化合物为合成聚合物，有多种规格可供选择，覆盖的分子量范围较为宽广。与多糖类似，它们包含多种链长，但质量数差异只有 44 Da。

PEG/PEO	MW	保留时间 (min)	
		130 Å	300 Å
905K	905000	4.41	4.73
692K	692000	4.41	4.73
498.6K	498600	4.58	4.83
305.5K	305500	4.55	4.85
135.8K	135800	4.65	4.93
77.35K	77350	4.71	5.20
46.47K	46470	4.77	5.67
21.3K	21300	5.11	6.81
12.14K	12140	5.65	7.74
8.73K	8730	6.10	8.28
3.87K	3870	7.26	9.32
1.48K	1480	8.59	10.26
420	420	9.79	11.03
106	106	10.64	11.44

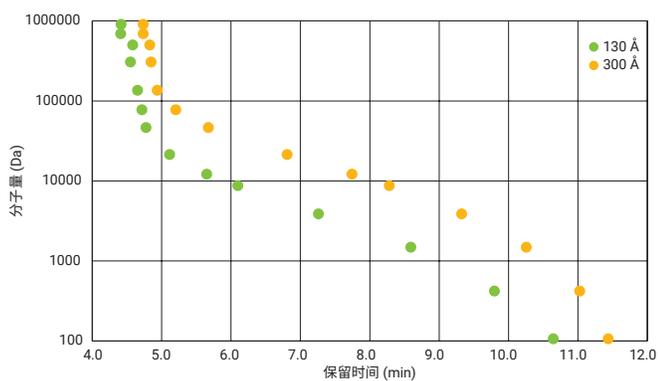


图 6. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱进行 PEG/PEO 校准

PEG/PEO 标准品的代表性色谱图

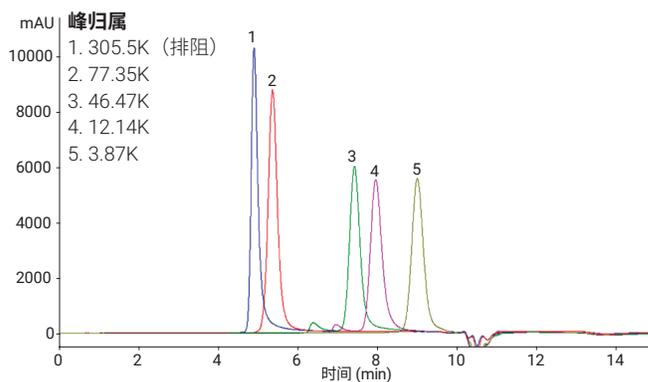


图 7A. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 色谱柱分离 PEG/PEO 标准品

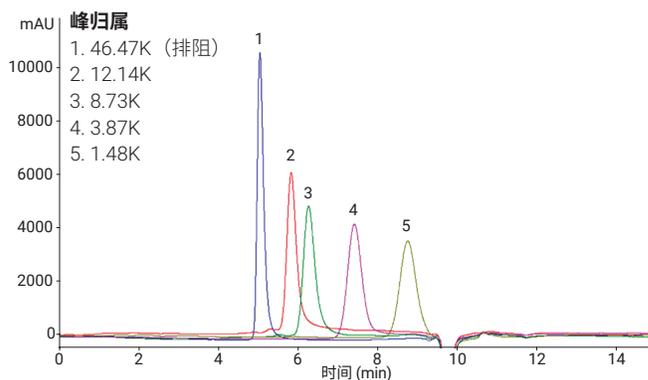


图 7B. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 130 Å 色谱柱分离 PEG/PEO 标准品

流动相组成的影响

需要考虑流动相对溶液中分子大小的影响或者对防止次级相互作用的影响，因为会影响保留时间，改变校准曲线的形状。在以下三种不同流动相的比较中，可以清晰地看到这一点：150 mmol/L 磷酸钠缓冲液，pH 7.0；PBS，pH 7.4（约 10 mmol/L 磷酸盐，140 mmol/L NaCl）；0.1 mol/L 磷酸钠 + 0.1 mol/L 硫酸钠，pH 7.0（图 8）。

对于多糖等不存在次级相互作用的分子，流动相组成的影响最小（图 9）。

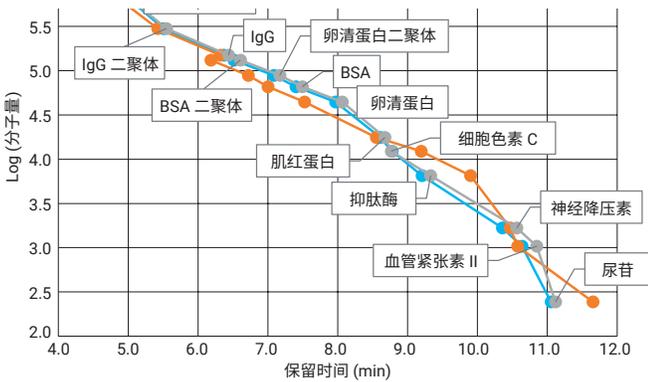


图 8. 流动相组成对使用蛋白质标准品进行色谱柱校准的影响

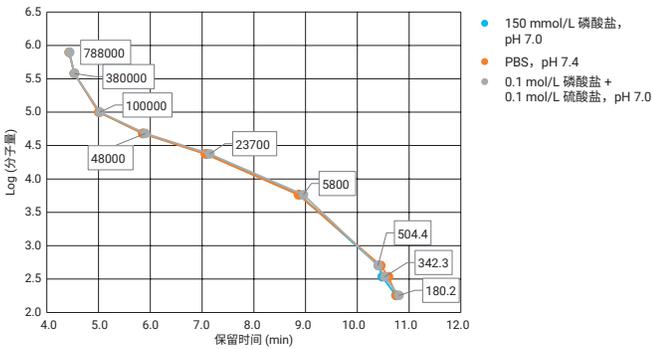


图 9. 流动相组成对使用多糖标准品进行色谱柱校准的影响

为多肽或蛋白质 SEC 分析选择流动相时，需要确定 pH 或离子强度的差异可能对目标样品造成的影响。图 10A、10B 和 10C 显示不同流动相条件下 BSA 的保留时间存在明显变化。二聚体和单体峰之间的分离度因子可能也会受到影响，因此应对方法优化和方法稳定性进行充分探讨。

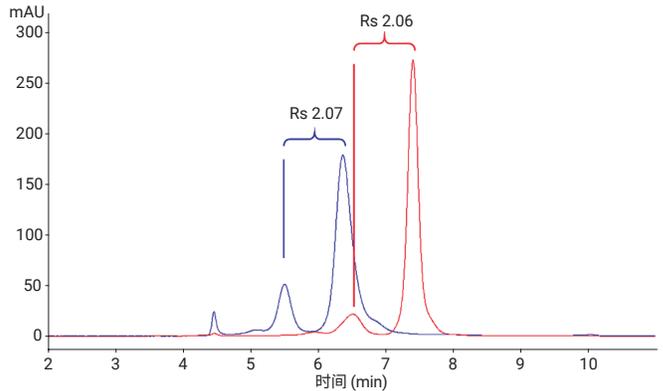


图 10A. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 色谱柱和 150 mmol/L 磷酸钠 (pH 7.0) 分离 γ 球蛋白和 BSA

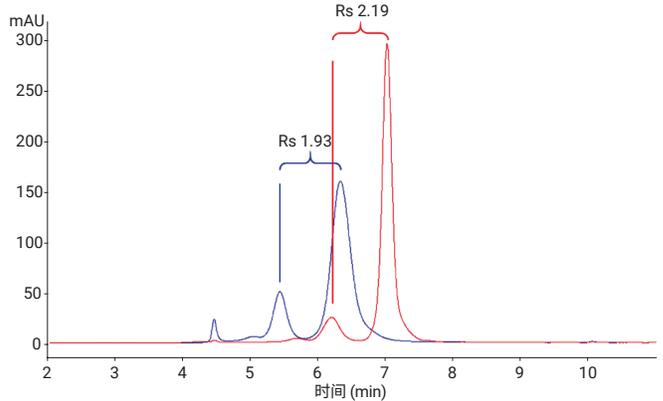


图 10B. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 色谱柱和 PBS (pH 7.4) 分离 γ 球蛋白和 BSA

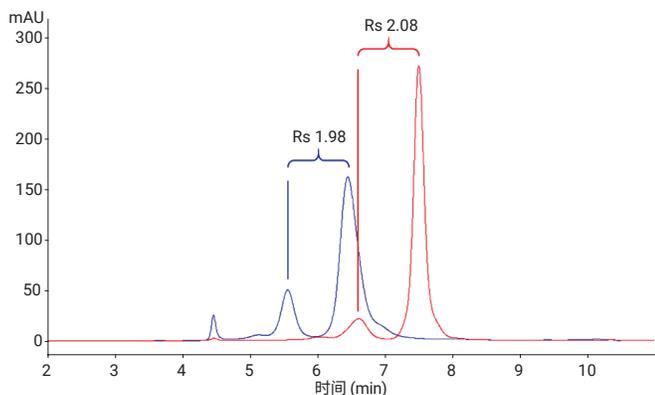


图 10C. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 色谱柱和 100 mmol/L 磷酸钠 + 100 mmol/L 硫酸钠 (pH 7.0) 分离 γ 球蛋白和 BSA

结论

使用适当的标准品校准 Agilent AdvanceBio SEC 体积排阻色谱柱，可以确保您了解正确的工作范围，并且可以使用校准曲线估算未知分子的分子大小。但是，使用一系列标准品进行定期校准非常有益，可以用于监测一段时间内的色谱柱性能，从而及早发现潜在的问题。继而，可以采取纠正措施，最终缩短系统停机时间并提高分析效率。

安捷伦提供一系列色谱柱尺寸和不同孔径，适用于不同大小的分子。结合品种齐全的安捷伦液相色谱仪器、耗材和技术支持，我们可以根据您的需求提供完整工作流程解决方案。

订购信息

部件号	描述
PL1180-5301	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μ m, 7.8 \times 300 mm
PL1180-3301	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μ m, 7.8 \times 150 mm
PL1180-1301	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μ m, 7.8 \times 50 mm 保护柱
PL1580-5301	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μ m, 4.6 \times 300 mm
PL1580-3301	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μ m, 4.6 \times 150 mm
PL1580-1301	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μ m, 4.6 \times 50 mm 保护柱
5190-9417	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 冻干蛋白质标准品, 1.5 mL
PL1180-5350	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 μ m, 7.8 \times 300 mm
PL1180-3350	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 μ m, 7.8 \times 150 mm
PL1180-1350	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 μ m, 7.8 \times 50 mm 保护柱
PL1580-5350	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 μ m, 4.6 \times 300 mm
PL1580-3350	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 μ m, 4.6 \times 150 mm
PL1580-1350	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 μ m, 4.6 \times 50 mm 保护柱
5190-9416	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å 冻干蛋白质标准品, 1.5 mL

另请参见

1. 生物分子分析体积排阻色谱：使用指南；5991-3651CHCN
2. GPC/SEC 标准品：产品指南；5990-7996CHCN
3. GPC 色谱柱校准：最佳实践指南；5991-2720CHCN

参考文献

1. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems **1993**, *10(4)*, 307-377

www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/1-Conventional_GPC_-_Polymers_ans_Molecular_Weight.pdf

胰岛素生物仿制药与创新药的体积排阻色谱分析

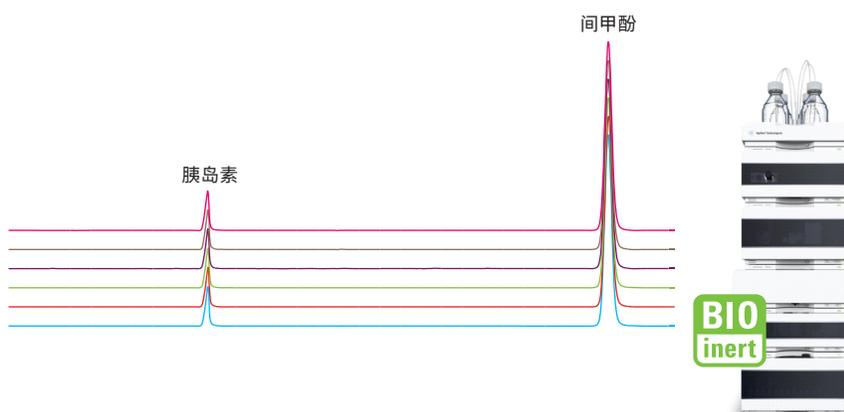
使用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱

作者

M. Sundaram Palaniswamy 与
Andrew Coffey
安捷伦科技有限公司

摘要

胰岛素是一种用于控制血糖稳态的小分子多肽激素。基因工程技术使生物制药公司开发出了各种长效胰岛素类似物。目前仍未出现用于胰岛素类似物分析的药典方法。本文根据 EP 方法草案，采用 Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 μm 色谱柱开发出了一种用于鉴定胰岛素类似物创新药和生物仿制药的 SEC 方法。采用系统适用性测试以及由胰岛素创新药作为标准物质的保留时间 (RT) 和峰面积精度研究证实了该方法在常规分析中的有效性。本应用简报还介绍了这款色谱柱在定量研究中检测分子量大于胰岛素的杂质方面的应用。



前言

新型胰岛素类似物是人胰岛素产品的一种替代物。临床试验已经证明，与人胰岛素相比，这些类似物具有相同或更好的疗效。胰岛素类似物目前是市面上的长效型人胰岛素。美国食品药品监督管理局 (USFDA) 在 2000 年 4 月批准了胰岛素类似物的使用。与小分子不同，生物治疗药物来自于生物过程。每个制造商各自都有一套用于生产原料药和药品的内部开发过程。这些生产方法可能使原料药中产生聚集体和降解产物等杂质。由于对降糖药需求的不断增加，因此生产不含杂质的药物以及提供无副作用的安全药物是一项十分重要却充满挑战的任务。在生物制药行业中，配备紫外检测器的液相色谱仪是批签发和表征研究的一种通用工具^[1]。体积排阻色谱 (SEC) 则是纯度分析的首选方法，可用于检测药品中的聚集体。本应用简报描述了一种用于测定胰岛素生物仿制药及其创新药参比之间的分子相似性，并进行了系统适用性与方法精密度分析的 SEC-UV 方法^[2]。这些测试可确保方法所得到的结果具有合格的准确度和精密度。所选标准基于关键色谱参数及其在可接受限值范围内的变异，方法评价实验中对该限值进行了定义。胰岛素的线性曲线在 10.6–3400 µg/mL 的范围内具有出色的相关系数，表明此方法适用于定量分析。文中还描述了采用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱监测并分离强制应激研究中测得的分子量大于药品的杂质。

表 1. SEC HPLC 的色谱参数

参数	条件
流动相	200 mL 无水乙酸、300 mL 乙腈和 400 mL 水，用浓氨水将 pH 调节至 3.0，并用水稀释至 1000.0 mL
TCC 温度	室温
等度运行	流动相 A
进样量	10 µL
流速	0.5 mL/min
紫外检测	276 nm

材料与方法

仪器

- 采用完全生物兼容、最高压力达 600 bar 的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统，由以下模块组成：
- Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱泵 (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 生物惰性高性能自动进样器 (G5667A)
- Agilent 1200 Infinity 系列恒温箱 (G1330B)
- 包含生物惰性溶剂加热元件的 Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (G1316C, 选项 19)
- Agilent 1260 Infinity DAD VL (G1315D, 配备生物惰性标准 10 mm 流通池)
- Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm (部件号 PL1180-5350)
- 软件
- Agilent ChemStation B.04.03 (或更高版本)
- 体积排阻色谱参数
- 表 1 展示了使用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统进行体积排阻分析时的色谱参数

试剂、样品与材料

商品化胰岛素创新药与生物仿制药购自当地药店并根据制造商的使用说明进行储存。乙酸和氨水购自 Sigma-Aldrich。所有化学品和溶剂均为 HPLC 级，高纯水采用 Milli-Q 水纯化系统 (Millipore Elix 10 型, 美国) 进行处理。

步骤

进样 10 µL 流动相 A 作为空白，随后对各线性浓度分别重复进样三次。用每个浓度的峰面积和保留时间 (RT) 计算标准偏差 (SD) 和相对标准偏差 (RSD%) 值。以较低线性浓度样品的进样分析确定检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。将各线性浓度下的平均峰面积对胰岛素浓度作图，得出单体校准曲线。

线性和范围

校准曲线由浓度范围为 10.6–3400 µg/mL 的 9 个胰岛素创新药的标准浓度点构建。

LOQ 和 LOD

将信噪比 (S/N) > 3 时的最低胰岛素浓度定义为 LOD，而将 S/N > 10 时的最低浓度定义为 LOQ。

胰岛素聚集体制备

通过温度处理制备胰岛素聚集体。简言之，将约 3.4 mg/mL 的药品置于聚丙烯管中并在 60 °C 下温育 6 小时。将样品冷却至室温并立即进行分析。

系统适用性

根据各论草案得出以下系统适用性要求：

- 对称因子：胰岛素类似物色谱峰的最大值为 2.0
- 峰谷比：最小值为 2
- 保留时间小于胰岛素类似物保留时间的所有杂质总和：不高于色谱峰总面积的 0.3%，不考虑 RT 大于胰岛素峰的所有峰

结果与讨论

分离和检测

采用胰岛素创新药为参比标样，与胰岛素生物仿制药进行对比。通过优化 SEC HPLC 分离条件，完整胰岛素生物仿制药与创新药 AdvanceBio SEC 130 Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm 色谱柱上实现了出色分离。55 分钟的总分析时间表明样品十分均匀，并未发生聚集。色谱柱中还可观察到防腐剂间甲酚的峰，洗脱时间约为 49 分钟（图 1）。

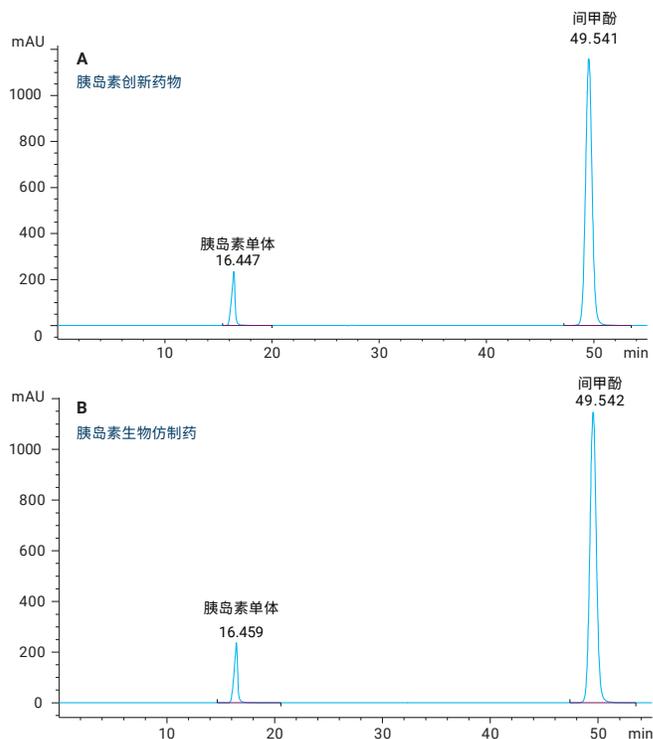


图 1. 胰岛素创新药和生物仿制药在 Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm 色谱柱上得到的 SEC HPLC 色谱图

保留时间和峰面积的精密度

图 2 展示了胰岛素创新药与生物仿制药六次重复进样的叠加色谱图，表明结果具有出色的分离重现性。表 2 列出了六次重复进样中胰岛素单体的平均 RT 与峰面积 RSD。胰岛素单体的 RT 和峰面积 RSD 分别在可接受限值 $\pm 3\%$ 和 $\pm 5\%$ 的范围内，表明该方法具有优异的重现性和精密度。

系统适用性

表 3 列出了胰岛素类似物此次系统适用性研究的可接受标准，表 4 则展示了系统适用性的汇总结果。

胰岛素创新药与生物仿制药的系统适用性测试结果表明，使用安捷伦生物惰性液相色谱仪以及 AdvanceBio SEC 色谱柱的方法符合胰岛素 QA/QC 分析的严格性能要求。

表 2. RT 和峰面积精度 (n = 6)

样品	RT		峰面积	
	平均值 (min)	RSD	平均值 (mAU/min)	RSD
胰岛素创新药物	16.450	0.057	5544.91	0.285
胰岛素生物仿制药	16.460	0.044	5459.55	0.662

表 3. 可接受标准

参数	限值
对称因子	胰岛素类似物色谱峰的最大值为 2.0
峰谷比	最小值为 2
保留时间小于胰岛素类似物保留时间的所有杂质总和	不高于色谱峰总面积的 0.3%

表 4. 系统适用性测试结果汇总

样品	Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 μm 色谱柱分析结果			通过 (是/否)
	对称因子	峰谷比	保留时间小于胰岛素类似物保留时间的所有杂质总和	
胰岛素创新药物	1.71	-	0.167	是
胰岛素生物仿制药	1.72	-	0	是

表 5. 胰岛素创新药的 LOD、LOQ 和 S/N 结果 (n = 3)

浓度 (μg/mL)	信噪比	平均峰面积
10.6 (LOD)	11.9	12.8
31.8 (LOQ)	34.7	37.4

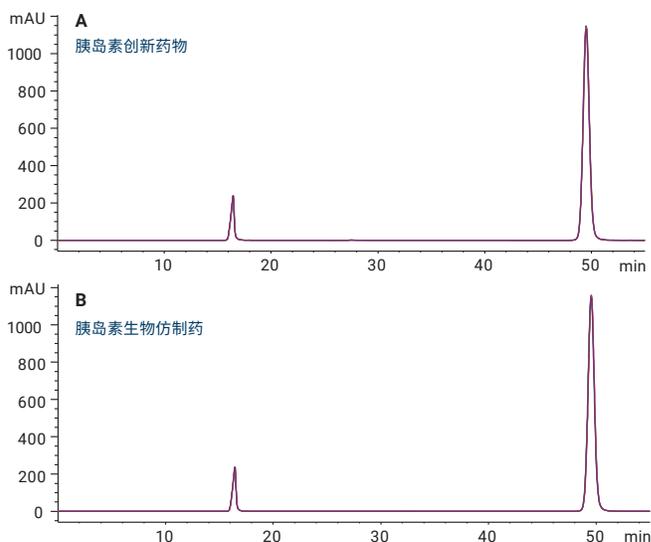


图 2. 在 Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 μm 色谱柱上分离得到的胰岛素创新药和生物仿制药的 6 次重复叠加色谱图

LOD 和 LOQ

胰岛素创新药的 LOD 和 LOQ 分别为 11.3 µg/mL 和 28 µg/mL，表明该方法的灵敏度很高。表 5 展示了胰岛素创新药的 LOD 和 LOQ 测定值。

线性

使用面积响应与胰岛素浓度从 LOD 到本研究声明的最高浓度水平 (3.4 mg/mL) 构建了胰岛素创新药的线性曲线。图 3 显示了浓度范围为 10.6–3400 µg 的胰岛素线性曲线。R² 测定值大于 0.99，表明峰面积与胰岛素浓度之间存在良好的剂量依赖相关性。

聚集/降解分析与定量

生物治疗药物中的杂质分布对药品安全的重要性日益凸显。尽管聚集浓度极低，但仍会对产品质量产生极大影响。AdvanceBio SEC 色谱柱设计用于尽可能减少与生物分子的相互作用，从而实现胰岛素聚集体的完全基线分离。这些胰岛素聚集体在 AdvanceBio SEC 色谱柱上的洗脱时间分别为 11.181 和 13.884 分钟，如图 4 所示。

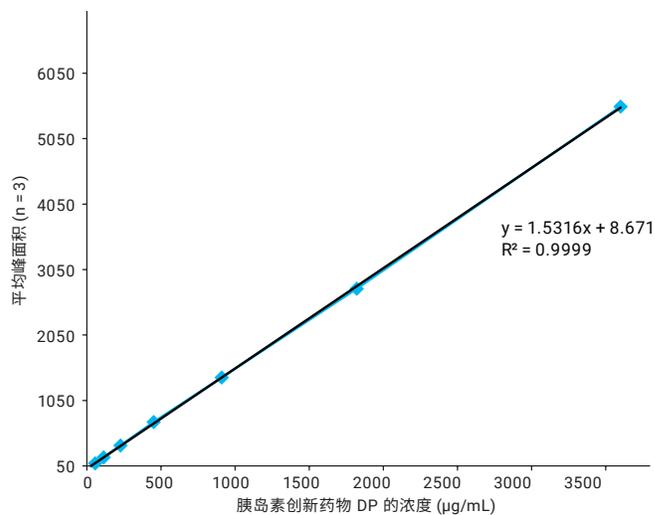


图 3. 10.6-3400 µg/mL 胰岛素标准浓度的线性曲线，显示出出色的线性相关系数数值

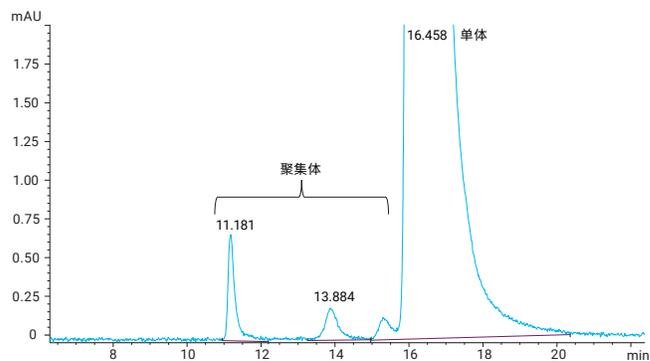


图 4. 经加热处理胰岛素的 Agilent AdvanceBio SEC 色谱图表明胰岛素聚集体实现了基线分离

经济价值和使用寿命研究

成本是实验室主管或团队负责人可能会重点关注的一个方面，特别是相比其他色谱柱类型的 AdvanceBio SEC 色谱柱成本。在 SEC 分离中，除操作人员和仪器成本外，最昂贵的开销就是色谱柱本身的成本。如果色谱柱寿命不够长或柱间重现性出现问题，那么就可能需要筛选多个色谱柱。通过控制整个生产过程来确保批间重现性是必不可少的。图 5 展示了 AdvanceBio 130 Å 蛋白质标准品在 4 个不同批次 AdvanceBio SEC 130 Å 填料中的分离，确保对整个生产过程实现了完全控制。

我们的一个目标是确保色谱柱在整个用户开发过程中具有更长的使用寿命。延长色谱柱使用寿命具有额外优势，例如可大大缩短停机时间。图 6 显示 3 mg/mL 胰岛素原料药共进样 250 次，每隔 50 次选择一张色谱柱得到的 6 张叠加色谱图。表 6 列出了所选进样的 RT、峰面积、拖尾因子与理论塔板数。

结果清晰表明，RT、峰面积和拖尾因子在 250 进样中几乎未发生改变。理论塔板数和柱效指标也未产生明显差异。

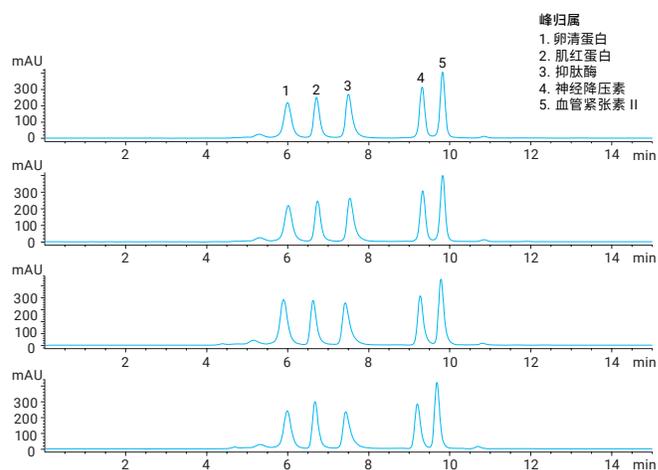


图 5. AdvanceBio 130 Å 蛋白质标准品在 4 个不同批次 AdvanceBio SEC 130 Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 μm 填料中的分离

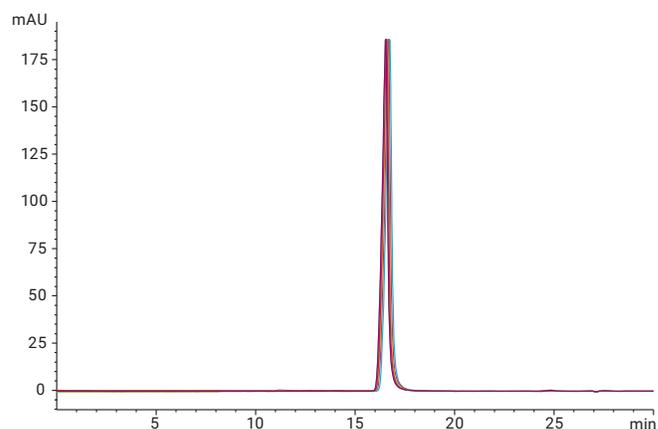


图 6. 250 次进样中每隔 50 次选择一张色谱图得到的 6 次重复进样叠加色谱图

结论

体积排阻色谱法是检测与监控生物药物聚集体和单体的常用方法。本应用简报证明了 Agilent AdvanceBio SEC 130 Å 色谱柱是进行胰岛素类似物研究的理想选择。我们采用药典方法草案开发了一个用于定义胰岛素生物仿制药品和创新药品之间生物相似性的紫外型简单方法，方法采用了 AdvanceBio SEC 130 Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm 色谱柱。该方法具有优异的 RT 和峰面积精度，并能满足系统适用性要求。峰面积与胰岛素药品的 8 个标准浓度之间呈线性关系，并具有出色的线性相关系数。LOD 和 LOQ 测定值分别为 10.6 µg/mL 和 31.8 µg/mL，表明方法的灵敏度极高。AdvanceBio SEC 色谱柱可用于分离和监测强制应激研究中分析的聚集体。我们还展示了使用 AdvanceBio SEC 色谱柱所具备的更大经济效益，其中包括减少批间生产差异，以及利用重现而稳定的结果延长色谱柱使用寿命。将这一简单的重现方法与生物惰性和耐腐蚀仪器相结合，可作为整个开发过程中胰岛素常规质量检查的可靠适用方法。

表 6. 胰岛素原料药 250 进样的 RT、峰面积、拖尾因子和理论塔板数

进样次数	RT (min)	峰面积	拖尾因子	理论塔板数
1	16.657	3944	0.899	16001
50	16.671	3966	0.890	15849
100	16.681	3968	0.898	15982
150	16.622	3942	0.893	15942
200	16.634	3953	0.895	15919
250	16.634	3963	0.890	15944

参考文献

1. Kannan V; Narayanaswamy P; Gadamsetty D; Hazra P; Khedkar A; Iyer, H. A tandem mass spectrometric approach to the identification of O-glycosylated glargine glycoforms in active pharmaceutical ingredient expressed in *Pichia pastoris*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2009**, 23(7), 1035-42
2. Pharmeuropa, Vol. 23, No. 2, April **2011**

优化和执行蛋白质聚集体研究的完整 工作流程

将体积排阻色谱与方法开发和光散射检测相结合

作者

Andy Coffey 和 Matthew Rain
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了一套完整的聚集体分析工作流程，它能够：

- 优化单克隆抗体高性能体积排阻色谱 (SEC) 的流动相条件
- 表征包括单体、二聚体和高阶聚集体等物质的聚集特征

我们使用安捷伦缓冲液顾问软件自动进行复杂的 SEC 优化实验，实验中充分利用 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统的功能，在一系列快速液相色谱运行中对各种缓冲液组分进行自动实时混合。Agilent 1260 Infinity Bio-MDS 多检测器套装提供了动态光散射检测功能，能够检测高阶蛋白质聚集体、测定绝对分子量并扩大紫外检测系统的测量范围。

前言

一些单克隆抗体 (mAb) 和蛋白质在溶液中容易自发聚集^[1,2]。在许多生物制药应用中, 必须在各种条件下准确地表征和定量此类聚集的程度。体积排阻色谱 (SEC) 是一种表征和定量蛋白质聚集体的强大技术, 但是准确测量需要在适合天然蛋白质确证的条件下具有优异的色谱性能。为通过改善特定蛋白质的色谱峰形提高其分离度, 通常需要评估各种不同的流动相条件。

采用 SEC 技术时有时会忽略对缓冲液条件的优化。过去, 通过优化缓冲液条件克服与固定相材料之间不必要的非特异性相互作用, 但对色谱柱缺陷的优化有可能造成对待测聚集体造成破坏的风险。然而, Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱的惰性表面涂层有助于减少各种缓冲液条件下的次级相互作用, 并提供更高的灵活性以优化用于蛋白质构象分析和色谱分离的缓冲液化学组成。参数筛选实验的复杂性是日常优化聚集体分析 SEC 缓冲液条件的另一障碍。优化实验需要设计复杂的备选流动相表格, 并繁琐地手动配制许多不同的溶液以通过实验评估盐分基质、缓冲液和 pH 变化。然而, 现代工具已大幅简化了优化 SEC 条件、表征和定量聚集体以及在日常使用中配置合适技术的工作流程。

本应用简报展示了一套用于聚集体研究的完整工作流程解决方案, 其能够:

- 从四种简单的储备液中自动混合指定列表中的液相色谱缓冲液, 并使用安捷伦缓冲液顾问软件和高分离度生物惰性四元液相色谱泵实时调节 pH 和缓冲液浓度
- 利用动态光散射检测技术测量高阶蛋白质聚集体, 补充紫外检测以将高灵敏度扩展至宽质量范围
- 利用光散射检测表征聚集蛋白质和单体蛋白质的绝对分子量和流体动力学半径

在该分析中, 我们使用 Agilent AdvanceBio SEC 150 mm 色谱柱为快速筛查提供快速分离。值得注意的是, AdvanceBio SEC 色谱柱提供更长 (和更短) 的类型, 因此在可能需要更高分离度的情况下, 该方法可轻松适用于 300 cm 色谱柱或甚至更多色谱柱。本研究中的单克隆抗体样品包括市售利妥昔单抗和市售利妥昔单抗生物仿制药。

材料与方法

试剂、样品与材料

磷酸二氢钠、磷酸氢二钠和氯化钠均购自 VWR。使用的所有化学品和试剂纯度均 $\geq 99.7\%$ 。所用的 $> 18 \text{ M}\Omega$ 纯水来自 Milli-Q A10 水纯化系统 (Millipore, 美国)。每天使用前配制新鲜溶液并通过 $0.22 \mu\text{m}$ 膜过滤器进行过滤。

仪器

用于聚集体分析的 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统包括:

- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性四元泵 (G5654A)
- 配备样品冷却器和多重清洗功能的 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler (G5668A)
- 配备生物惰性热交换器的 Agilent 1260 Infinity II 多柱恒温箱 (G7116A)
- 配备生物惰性标准流通池的 Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 WR (G7115A)
- Agilent 1260 Infinity Bio-SEC 多检测器系统 (G7805AA)
- Agilent AdvanceBio SEC, 300 \AA , $7.8 \times 150 \text{ mm}$, $2.7 \mu\text{m}$ 色谱柱 (部件号 PL1180-3301) 或
- Agilent AdvanceBio SEC, $2.7 \mu\text{m}$ 300 \AA $7.8 \times 300 \text{ mm}$ 色谱柱 (部件号 PL1180-5301)

仪器条件

参数	值
流动相	见表 1
流速	0.8 mL/min
温度	25 °C
进样量	1–25 μL (取决于样品浓度)
检测	220 nm, 280 nm, LS 90°, 以及 DLS
样品	利妥昔单抗创新药、利妥昔单抗生物仿制药和 BSA

结果与讨论

为确定每种分析物混合物的理想流动相组成，我们评估了四种不同 pH 条件下的三种不同流动相，代表了 12 种实验条件。缓冲液组成为：

- 150 mmol/L 磷酸钠
- 10 mmol/L 磷酸钠 + 140 mmol/L NaCl (模拟不同 pH 值的 PBS)
- 100 mmol/L 磷酸钠 + 150 mmol/L NaCl

每种流动相在 pH 6.2、6.6、7.0 和 7.4 下进行测试。

执行每次实验时，我们在安捷伦缓冲液顾问软件中指定了每次处理的缓冲液组成和 pH。软件自动计算储备液 A-D 的适当混合比例，以在液相色谱参数筛选运行中实时获得所需的流动相组成。

表 1 汇总了 12 种实验条件。

使用这些条件分析市售利妥昔单抗样品、利妥昔单抗生物仿制药样品和市售 BSA 蛋白质混标 (10 mg/mL 溶液，用于仪器校准)。

使用 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 150 × 7.8 mm 色谱柱，每个样品能够在 10 分钟内完成筛选实验。

表 1. 实验条件及相应流动相组成

实验	用户指定的参数				软件计算的参数			
	pH	缓冲液 (mmol/L)	NaCl (mmol/L)	总浓度 (mmol/L)	%A	%B	%C	%D
1	6.2	150	0	150	25.0	0.0	57.0	18.0
2	6.6	150	0	150	25.0	0.0	42.3	32.7
3	7.0	150	0	150	25.0	0.0	26.3	48.7
4	7.4	150	0	150	25.0	0.0	13.8	61.2
5	7.4	10	140	150	67.0	28.0	0.9	4.1
6	7.0	10	140	150	67.0	28.0	1.8	3.2
7	6.6	10	140	150	67.0	28.0	2.9	2.1
8	6.2	10	140	150	67.0	28.0	3.9	1.1
9	6.2	100	150	250	20.0	30.0	36.3	13.7
10	6.6	100	150	250	20.0	30.0	26.1	23.9
11	7.0	100	150	250	20.0	30.0	15.6	34.4
12	7.4	100	150	250	20.0	30.0	7.8	42.2

A = 水

B = 500 mmol/L NaCl

C = 200 mmol/L NaH₂PO₄

D = 200 mmol/L Na₂HPO₄

对色谱数据的初步审查表明，流动相条件影响实验过程中利妥昔单抗创新药和利妥昔单抗生物仿制药的峰形，如图 1 和图 2 所示。两种分子具有相似结构，采用 10 mmol/L 磷酸钠和 140 mmol/L NaCl 的流动相组成也表现出了相同的异常行为。该流动相组成所获得的峰拖尾显著增加，峰高明显降低。其他蛋白质也可观察到这种行为，说明需要认真评估流动相组成对两种方法开发和方法稳定性的影响。

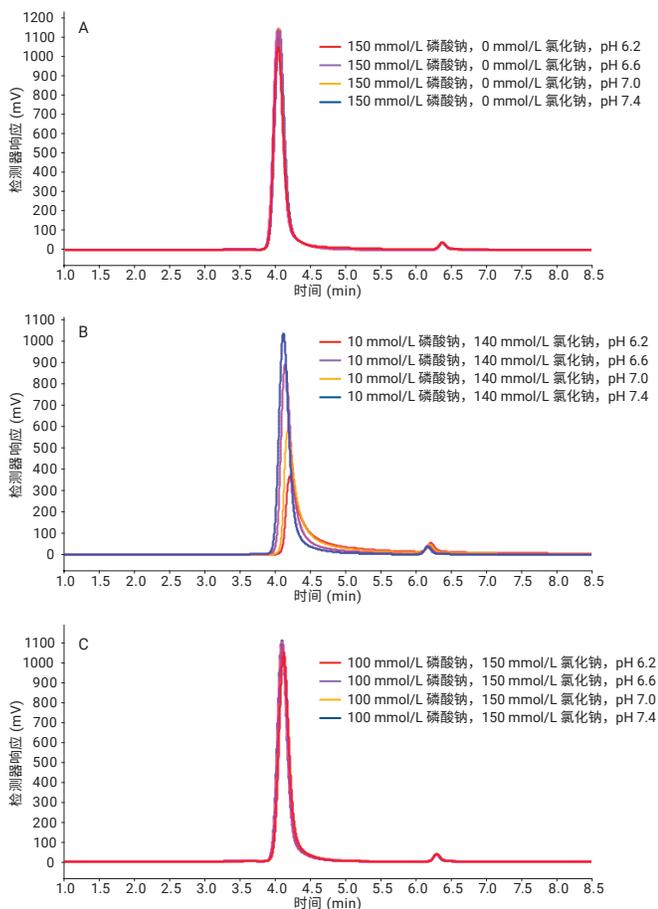


图 1. 利妥昔单抗创新药（进样量 1 μ L）在 12 种不同流动相条件下的连续运行结果（实验 1-12：见表 1）

为定量分析聚集体含量，需要使用紫外检测器。单体峰和聚集体峰（如能检出）的积分能够确定峰面积聚集体百分比。图 3A 和图 3B 分别给出了利妥昔单抗创新药和利妥昔单抗生物仿制药的结果。在 pH 7.0 下使用 150 mmol/L 磷酸钠或 100 mmol/L 磷酸钠配合 150 mmol/L NaCl（实验 3 和 11）获得了一致性最好的结果。

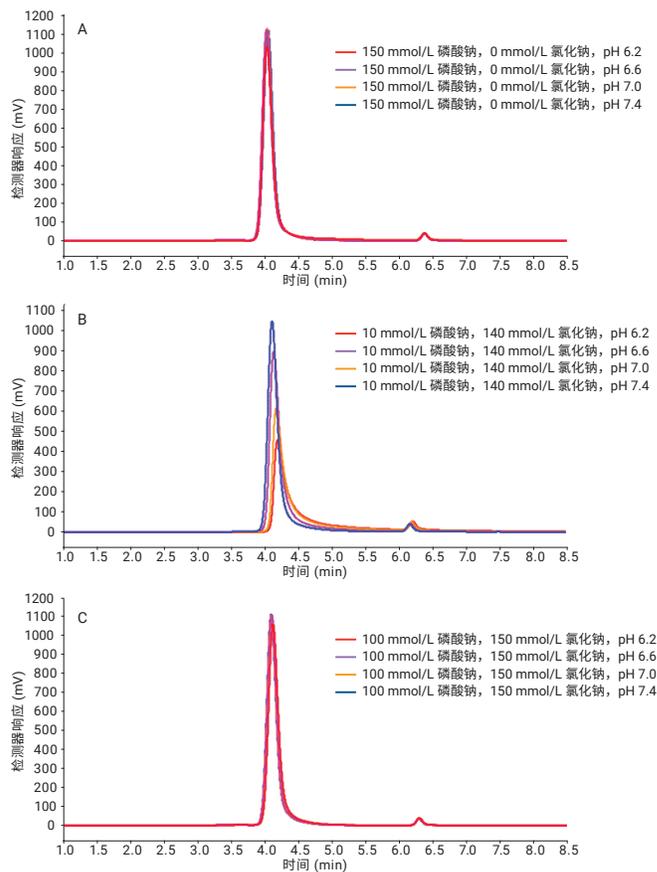


图 2. 利妥昔单抗生物仿制药（进样量 1 μ L）在 12 种不同流动相条件下的连续运行结果（实验 1-12：见表 1）

图 4 示出了在 pH 7.0 的三种不同缓冲液组成下获得的色谱图，结果清楚地表明，当使用 10 mmol/L 磷酸钠和 140 mmol/L NaCl 作为流动相分析该分子时未检出聚集体（用箭头突出显示）。

可另外选择在聚集体分析工作流程中增加光散射检测器，它可以揭示蛋白质聚集体相关的更有用信息。在单次进样特征明确的分子（在本例中为 BSA）以完成简单的仪器校准后，即可快速测定检测器间延迟和仪器常数。Agilent Bio-SEC 软件可用于根据同一色谱柱和流速条件下获得的任何其他色谱图的单个峰报告分子量信息。

图 5 示出在实验 11 的高浓度盐条件下运行得到的利妥昔单抗创新药和利妥昔单抗生物仿制药的光散射分析结果。光散射分析仅关注单体峰，报告的分子量接近之前的应用简报^[1]中发现的精确质量数值。预期生物仿制药分子具有略高的质量数，因为其中存在 C 末端赖氨酸变体，该变体在原研药分子中并不明显。

较大聚集体和在显微镜下才能看到的颗粒的形成在生物制药应用中受到特别关注。光散射检测对高度聚集样品的灵敏度对紫外检测获得的浓度数据形成补充。

尽管紫外检测得出的单体和二聚体结果非常相似，但光散射检测器对高阶聚集体具有更高的响应，并在图 6 所示的某些流动相条件下揭示了利妥昔单抗创新药和生物仿制药发生了差异化的更广泛的聚集。

DLS 功能的补充进一步扩充了可获得的信息量，使流体动力学半径测量成为可能（图 7）。

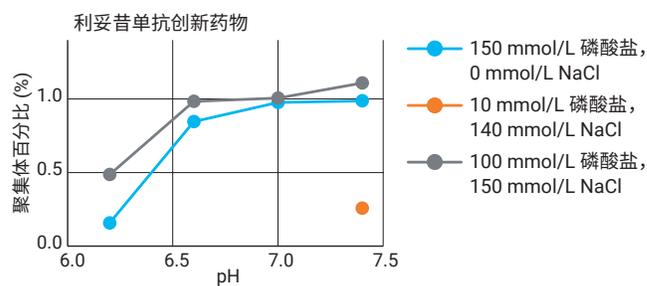


图 3A. 利妥昔单抗创新药中聚集体含量的峰面积百分比（实验 1-12：见表 1）。图中显示了检出聚集体的实验数据点

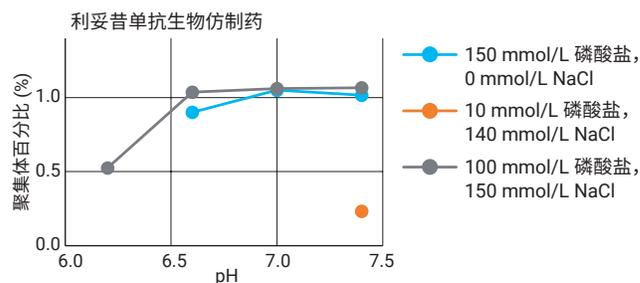


图 3B. 利妥昔单抗生物仿制药中聚集体含量的峰面积百分比（实验 1-12：见表 1）。图中显示了检出聚集体的实验数据点

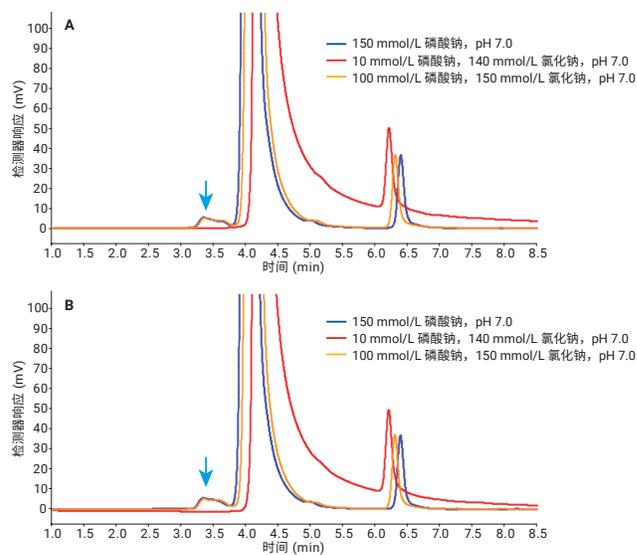


图 4. 在 pH 7.0 最佳条件的不同缓冲盐浓度下（表 1 中的实验 3、6 和 11）运行得到的利妥昔单抗创新药 (A) 和利妥昔单抗生物仿制药 (B) 的 UV 220 nm 信号的基线放大图

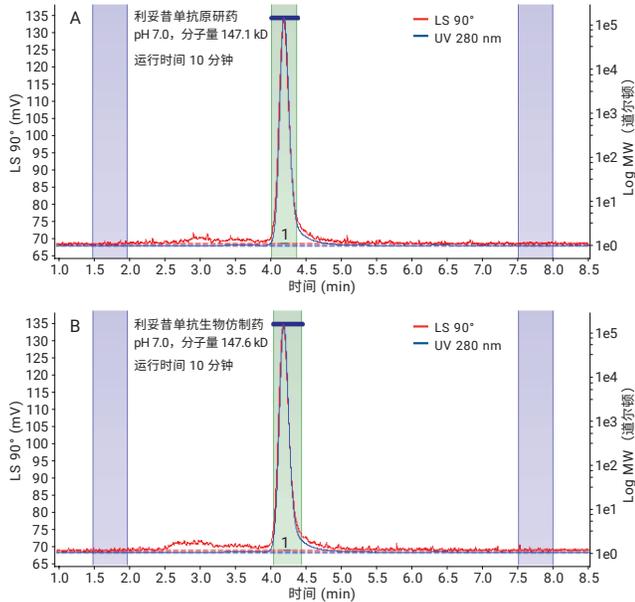


图 5. 在 100 mmol/L 磷酸钠、150 mmol/L NaCl 和 pH 7.0 条件下 (表 1 中的实验 11) 运行的利妥昔单抗创新药 (A) 和利妥昔单抗生物仿制药 (B) LS 分析结果的比较

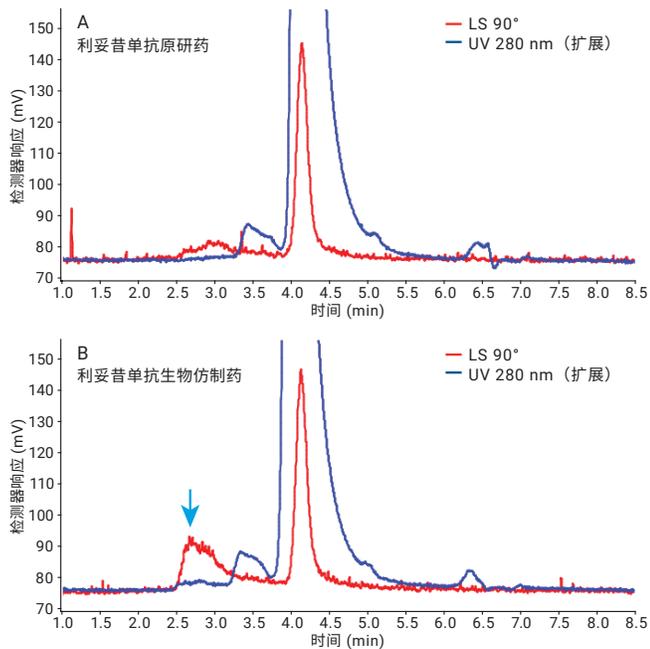


图 6. 在 150 mmol/L 磷酸钠和 pH 7.0 条件下 (表 1 中的实验 3) 运行的利妥昔单抗创新药 (A) 和利妥昔单抗生物仿制药 (B) LS 分析结果的比较

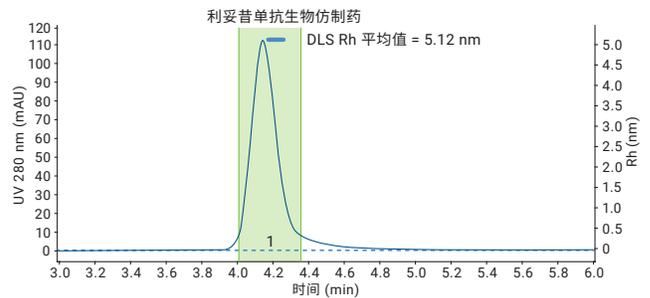


图 7. 利妥昔单抗生物仿制药的 DLS 分析显示了 LS 检测器得到的流体动力学半径结果

结论

包含全生物惰性流路的 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统与安捷伦缓冲液顾问软件相结合, 提供了对用于蛋白质聚集集体定量分析的体积排阻色谱进行方法优化的简单方法。在较短的 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 150 mm 色谱柱下能够实现更快速的分离, 大大提高了通量并缩短了筛选各种分析条件所需的时间。为获得更高的分离度和准确度, 可使用更长的 300 cm 色谱柱。AdvanceBio SEC 色谱柱表现出更多优势, 例如非特异性结合。BioMDS 多检测器套装与 Bio-SEC 软件可用于揭示通过任何其他方法难以检测的低浓度高分子量聚集集体。最后, Bio-MDS 可用于测定蛋白质分子量或与 DLS 检测结合测定流体动力学半径信息。该技术组合包括完整的工作流程解决方案, 可快速优化 SEC 条件, 准确定量整个分子量范围内的聚集集体, 并表征单克隆抗体在相关缓冲液条件下的聚集动力学。

参考文献

1. Guidance for Industry Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), **2014**
2. Mahler, H-C.; et al. Protein Aggregation: Pathways, Induction Factors and Analysis, *J. Pharm. Sci.* **2008**, *98*(9)
3. Schneider, S. 2D-LC/MS Characterization of Charge Variants Using Ion Exchange and Reversed-Phase Chromatography (使用离子交换和反相色谱对电荷异构体进行 2D-LC/MS 表征), *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-6673EN, **2016**

存在阴离子表面活性剂的情况下使用 体积排阻色谱

完整蛋白质分析

作者

Andy Coffey
安捷伦科技有限公司

摘要

十二烷基硫酸钠 (SDS 或 SLS) 是人们熟知的阴离子表面活性剂，常用于使蛋白质变性。它常用于聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)，通过与广泛蛋白质极其一致的结合水平提供可靠的质荷比。这样，就能够根据相对离子淌度对应的相对分子大小来分离变性蛋白质。相反，基于分子大小的蛋白质分离使用的体积排阻色谱 (SEC) 通常在非变性条件下进行，主要使用水相缓冲液作为流动相。

本应用简报将 SEC 和光散射检测结合使用，以研究不同 SDS 浓度对蛋白质分子的影响。通过研究 RT、表观分子量和流体动力学半径的变化来研究这一影响。

前言

为使蛋白质变性，在其临界胶束浓度 (CMC) 以上使用十二烷基硫酸钠 (SDS)。SDS 在纯水中的 CMC 为 8.2 mmol/L (约 0.2% w/v)。但是，缓冲盐的存在或 pH 和温度的变化可显著降低 CMC。例如，在磷酸盐缓冲液 (PBS) 中观察到的 CMC 值约为 1.0 mmol/L (约 0.04% w/v)。当大约 62 个 SDS 分子聚结成球形，其中疏水核被阴离子表面包围时，会形成胶束，如图 1 所示。通常，SDS-PAGE 样品前处理使用的 SDS 浓度远高于 2% w/v，同时还会使用还原剂裂解蛋白质分子内的二硫键。得到的饱和 SDS-蛋白质复合物中，平均每克蛋白质含有 1.4 g SDS^[1]。研究者认为这种变性蛋白质是刚性圆柱形状，因此凝胶电泳中观察到的离子淌度与分子量成正比。省略二硫键还原后，观察到 SDS 与蛋白质的比例显著降低，达到平衡的时间可能加倍^[2]。

相反，研究者发现添加 SDS (约 10:1 摩尔比) 可阻止 BSA 溶液发生热变性，否则热变性会产生高分子量低聚物^[3]，或降低非共价聚集水平。过去建议在流动相中使用 0.1% w/v SDS 以减少保留时间 (RT)，并改善蛋白质体积排阻色谱 (SEC) 的峰形^[4]。

SDS 使蛋白质变性的机制尚不完全清楚。由于表面活性剂分子和蛋白质都具有互补的离子和疏水区域，因此显然可能涉及到多种机制的组合。热力学研究表明，并非只有离子相互作用。SDS 可能首先通过与蛋白质表面上带正电荷的氨基酸侧链 (Lys 和 Arg) 之间的离子相互作用开始结合。增加 SDS 浓度会导致更高的掺入水平，推测柔性蛋白质链最终由 SDS 胶束修饰，而不是最初提出的刚性圆柱模型^[5]。

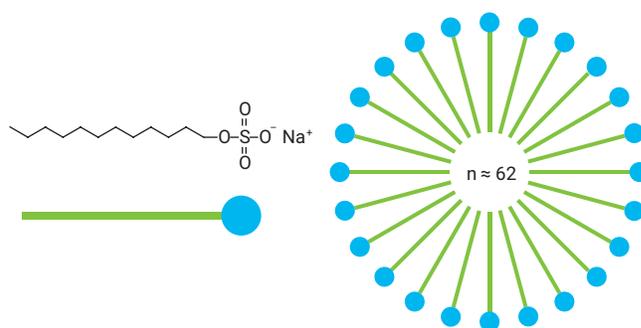


图 1. 浓度高于 CMC 时形成 SDS 胶束的动画 (聚集数约为 62)

牛血清白蛋白 (BSA) 是一种蛋白质，由于能够作为组织和细胞之间小分子的载体而得到充分研究。研究者已使用多种分析技术测定了 BSA 单体的结构和体积 (流体动力学半径)。其一级结构为 583 个氨基酸，分子量为 66,463 道尔顿，如图 2 所示。商业样品通常含有不同量的二聚体和高阶聚集集体，不同的分离技术可能导致这些低聚物的含量不同。由于 BSA 含有 35 个半胱氨酸残基，因此存在 17 个二硫键和一个游离巯基。研究者认为 BSA 低聚物主要通过这个多余巯基参与的二硫键共价连接。因此，在不存在还原剂的情况下，用 SDS 变性不会导致这种共价连接的二聚体和高阶聚集集体恢复为单体形式。

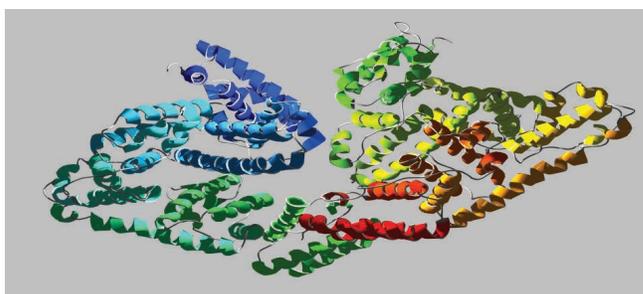


图 2. 牛血清白蛋白的天然心形构象

为研究 SDS 变性对 BSA 特征的影响，进行了一系列实验。使用未还原 BSA 蛋白的 SEC，可以确定二聚体和高阶聚集体的含量。另外使用具有动态光散射 (DLS) 功能的光散射检测器，可以测量分子量和流体动力学半径 (Rh)。该系列实验选用的洗脱液是磷酸盐缓冲液 (PBS)，其中含有 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液和 140 mmol/L NaCl, pH 7.4 (洗脱液 A)。用相同方式制备第二流动相，但添加 2% w/v SDS (洗脱液 B)。然后通过改变洗脱液 A 和洗脱液 B 的比例增加流动相中 SDS 的浓度，运行 HPLC 仪器。

在整个实验过程中使用同样的 BSA 样品，只在 PBS 中以 10 mg/mL 的浓度制备。

该实验旨在确定：

- SDS 是否能使 BSA 低聚物变性
- 对于使用在线光散射检测测定的分子量，会观察到什么影响
- 对于流体动力学半径，会观察到什么变化

条件

参数	值
色谱柱：	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μm, 7.8 × 300 mm (部件号 PL1180-5301)
样品：	BSA (Sigma-Aldrich) 用洗脱液 A 配制浓度为 10 mg/mL 的样品
洗脱液 A：	PBS, pH 7.4 (10 mmol/L 磷酸盐, 140 mmol/L NaCl)
洗脱液 B：	PBS, pH 7.4 (10 mmol/L 磷酸钠, 140 mmol/L 氯化钠) + 2.0% w/v SDS
梯度：	在 0% B; 10% B; 20% B; 30% B; 40% B; 50% B; 60% B; 70% B 时等度洗脱
流速：	0.8 mL/min
检测器：	UV; 280 nm; LS 15°, LS 90°
仪器：	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱联用 Agilent 1260 Infinity Bio-SEC 多检测器系统

结果与讨论

进行两次空白进样以使色谱柱在流动相中活化，然后重复进样 10 mg/mL 的 BSA。

图 3 显示了不同流动相组成下的四次单独实验的叠加色谱图 (UV 280 nm 信号)。表 1 列出了整个实验系列的相关 RT 信息。

从表 1 可以看出，不同运行的总峰面积几乎没有变化。这说明增加 SDS 浓度不会导致蛋白质吸附，或由于诱导聚集而导致蛋白质损失。RT 有所缩短，但从 0.6% 到 1.4% SDS (w/v) 保持稳定，如图 4 所示。RT 缩短也导致峰间分离度降低，因此难以准确确定二聚体和高阶聚集体变性的程度。显然这些多聚体峰的丰度仍然很高，因此应当主要是共价连接。

表 1. RT 和总峰面积

流动相中的 SDS 浓度	RT (min)			总峰面积
	高阶聚集体	二聚体	单体	
0.0%	6.00	6.46	7.29	3632
0.2%	5.22	5.59	6.45	3633
0.4%	4.96	5.23	5.96	3668
0.6%	4.89	5.15	5.83	3588
0.8%	4.89	5.13	5.80	3571
1.0%	4.89	5.11	5.77	3572
1.2%	4.88	5.11	5.76	3536
1.4%	4.90	5.10	5.75	3566

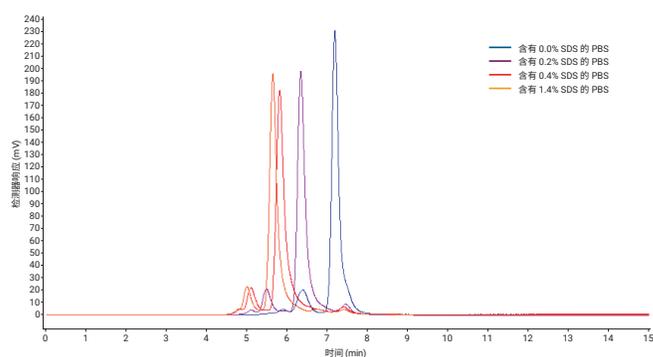


图 3. 流动相中 SDS 浓度增加的 BSA 色谱图

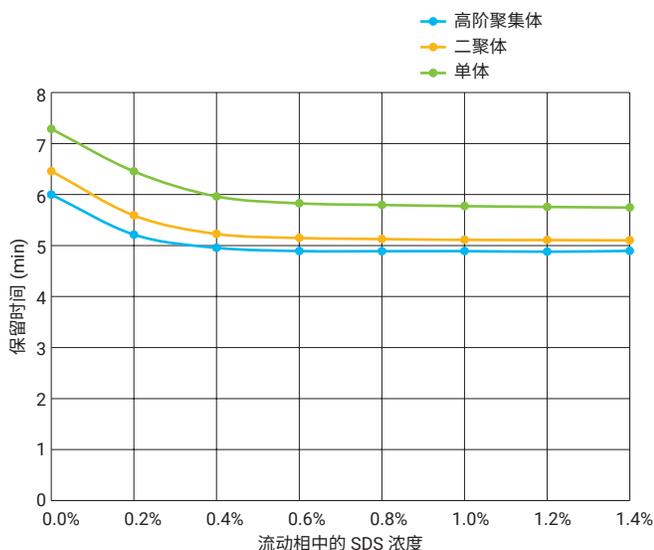


图 4. 流动相中 SDS 浓度对 RT 的影响

在 SEC 中，RT 较短表示溶液中分子体积较大，但不一定表示分子量较大。为确定色谱图中三个主峰的分子量，使用 BioSEC 软件按照下式^[6]描述的关系计算分子量：

位置：

(LS) = 光散射检测器信号

K_{LS} = LS 检测器常数

dn/dc = 比折射率增量*

(UV) = UV 检测器信号 (280 nm)

ϵ = 消光系数

* 对于非糖基化蛋白，使用近似值 $dn/dc \approx 0.186 \text{ mL/g}$

图 5 显示了选择进行光散射分子量测定的每个峰的区域，如此选择是为了尽可能减少预期的峰叠加引起的干扰。表 2 显示了分子量测量的结果。表中包括已计算单体相对数量的列。需要认识到，高阶聚集体峰的分子量几乎都比单体峰的分子量大三倍，说明它是三聚体。二聚体峰的分子量比单体峰的分子量大两倍，符合预期。此外，每个峰的分子量都随着 SDS 浓度的增加而增加，直到在 0.6% w/v SDS 达到平台期，这与此时 RT 的稳定化一致。

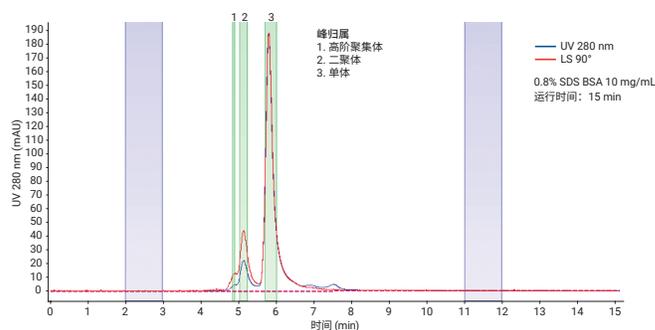


图 5. BSA (1) 高阶聚集体、(2) 二聚体和 (3) 单体峰的分子量计算区域

表 2. 光散射检测的分子量分析

SDS w/v%	质量数增加			SDS:BSA (g/g)		
	高阶聚集体	二聚体	单体	高阶聚集体	二聚体	单体
0.0	202197	136383	67838	3.0	2.0	1.0
0.2	242541	194876	107905	2.2	1.8	1.0
0.4	560154	359239	203737	2.7	1.8	1.0
0.6	667318	423418	212596	3.1	2.0	1.0
0.8	615726	404898	207028	3.0	2.0	1.0
1.0	624648	404634	205868	3.0	2.0	1.0
1.2	617385	405618	206376	3.0	2.0	1.0
1.4	612031	406699	206614	3.0	2.0	1.0

表 3. 随着表面活性剂浓度增加，BSA 的质量数增加，在浓度 > 0.6% 时达到稳定状态

SDS w/v%	质量数增加			SDS:BSA (g/g)		
	高阶聚集体	二聚体	单体	高阶聚集体	二聚体	单体
0.0	0	0	0	0.0	0.0	0.0
0.2	40344	58493	40067	0.2	0.4	0.6
0.4	357957	222856	135899	1.8	1.6	2.0
0.6	465121	287035	144758	2.3	2.1	2.1
0.8	413529	268515	139190	2.0	2.0	2.1
1.0	422451	268251	138030	2.1	2.0	2.0
1.2	415188	269235	138538	2.1	2.0	2.0
1.4	409834	270316	138776	2.0	2.0	2.0

由于观察到的分子量随流动相中存在的 SDS 浓度增加而增加，可以推断每种分子的质量数实际上会通过相连 SDS 的积聚而增加。然而，观察到的质量数增加相当大，高于预期，特别是因为该 BSA 样品并未经过还原（表 3）。在分析条件下的稳定状态质量数增加是每 1 g 蛋白质 2 g SDS，说明 SDS 胶束沿着蛋白质分子的积聚不受其包含低聚物数量的影响。

仔细检查 0.0% SDS 和 1.4% SDS 下色谱图浓度依赖的 UV 迹线，可发现更进一步的差异。分子量较高的物质分离度明显降低，但在流动相组成为 1.4% SDS 时，单体峰之后洗脱的一些较小的峰显露出来（图 6）。这些分子量较小的物质无法鉴定。

图 7A 显示了 BSA 在 0.0% SDS 和 1.4% SDS 浓度下的 LS 90° 检测器信号。由于光散射检测器是质量敏感型而非浓度依赖型，因此在较高表面活性剂浓度条件下获得的信号远大于天然条件下的信号也就不足为奇。

除了图 7A 所示最高 SDS 浓度下的响应增加之外，还存在垂直偏移。在分析 DLS 数据以确定 Rh 时发现了这一现象的原因。我们不仅发现单体峰的 Rh 增加（大约 3.8–5.7 nm，接近文献中的数值）^[7,8,9]，还检测到大小为 2.4–2.8 nm 的颗粒连续背景信号，几乎可以肯定这是由于溶液中存在 SDS 胶束而产生。

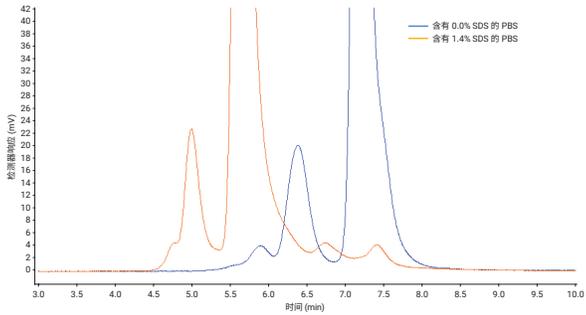


图 6. 含有 0.0% SDS 和 1.4% SDS 的 PBS 流动相中 BSA 的 UV 280 nm 信号放大图

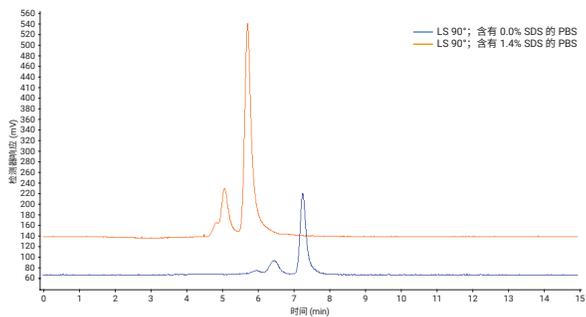


图 7A. 含有 0.0% SDS 和 1.4% SDS 的 PBS 流动相中 BSA 的 LS 90° 信号概览

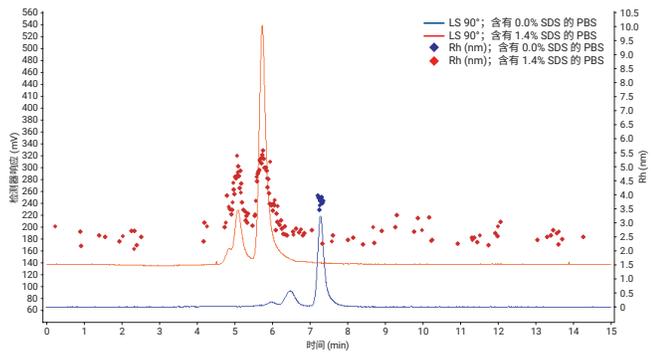


图 7B. 含有 0.0% SDS 和 1.4% SDS 的 PBS 流动相中 BSA 的 LS 90° 信号概览，增加了流体动力学半径 (Rh) 数据

结论

本实验起初旨在使用具有光散射检测的 SEC 确定 SDS 是否可以使 BSA 低聚物变性。我们发现，无法通过分离度损失精确定量低聚物含量，因为对应于单体、二聚体和高阶聚集体的各个峰密集洗脱。但是很明显，三种物质均保持完整并被 SDS 饱和至相同程度。

即使蛋白质变性，会使分子展开，预计会在溶液中产生更大的结构，导致 SEC 的 RT 更短。然而，随着 SDS 浓度从 0.0 增加到 0.4% w/v，单体、二聚体和高阶聚集体的分子量均按比例增加。在较高的 SDS 浓度 (0.6%–1.4% w/v) 下，随着各种分子被 SDS 饱和，光散射测定的 RT（溶液中的体积也随之稳定）和分子量趋于稳定。

使用 DLS 功能确定流体动力学半径时发现，体积的增加与文献中经过还原 BSA 样品的数值相当。体积增加没有反映出非还原条件下运行的 BSA 样品的构象变化，但是重复了随着分子与 SDS 胶束复合并被其饱和时观察到的分子量增加。

显然，尽管从良好的峰形和可重现的回收率可以看出，Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 色谱柱能够耐受流动相中的 SDS，但如果所分析蛋白质类型的体积和分子量大幅增加，SEC 分离会受到很大影响。应尽可能避免在 SEC 的流动相中使用表面活性剂。

参考文献

1. Reynolds, J. A.; Tanford, C. The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*(19), 5161–5165
2. Pitt-Rivers, R.; Impiombato, F. S. A. The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins. *The Biochemical Journal* **1968**, *109*, 825–830
3. Aoki, K.; Hiramatsu, K.; Kimura, K.; Kaneshina, S.; Nakamura, Y.; Sato, K. Heat Denaturation of Bovine Serum Albumin. I : Analysis by Acrylamide-gel Electrophoresis. *Bulletin of the Institute for Chemical Research, Kyoto University* **1969**, *47*(4), 274–282
4. Hagarová, D.; Horváthová, M.; Žúbor, V.; Breier, A. Optimization of conditions for size-exclusion chromatography of proteins. *Chemical Papers* **1991**, *45*(3), 341–348
5. Shirahama, K.; Tsujii, K.; Takagi, T. Free-boundary electrophoresis of sodium dodecyl sulfate-protein polypeptide complexes with special reference to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biochem.* **1974**, *75*, 309–319
6. Wen, J.; Arakawa, T.; Philo, J. S. Size-Exclusion Chromatography with On-Line Light-Scattering, Absorbance, and Refractive Index Detectors for Studying Proteins and Their Interactions. *Anal. Biochem.* **1996**, *240*, 155–166
7. Lorber, B.; Fischer, F.; Bailly, M.; Roy, H.; Kern, D. Protein Analysis by Dynamic Light Scattering: Methods and Techniques for Students. *Biochem. and Mol. Biol. Ed.* **2012**, *40*(6), 372–382
8. Valstar, A.; Almgren, M.; Brown, W. The Interaction of Bovine Serum Albumin with Surfactants Studied by Light Scattering. *Langmuir* **2000**, *16*(3), 922–927
9. Tanner, R. E.; Herpigny, B.; Chen, S.-H.; Rha, C. K. Conformational change of protein sodium dodecylsulfate complexes in solution: A study of dynamic light scattering. *J. Chem. Phys.* **1982**, *76*(8), 3866–3872

更多应用简报

AdvanceBio SEC

部件号	标题
5994-0876EN	使用 Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm 色谱柱开发 NIST mAb 的体积排阻色谱分析方法
5991-6791CHCN	使用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱分析聚乙二醇化蛋白质
5991-7165CHCN	使用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱对生物制剂进行灵敏的高通量体积排阻色谱 (SEC) 分析
5991-6458ZHCN	使用快速高分离度体积排阻色谱柱分析生物治疗药物中的聚集体
5991-6304CHCN	利妥昔单抗聚集体和片段的高分离度 SEC 分离与定量分析
5991-6303CHCN	利用 SEC 和水相流动相进行 mAb 和 ADC 聚集体的定量分析
5991-6302CHCN	用于聚集体分析的 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱：仪器兼容性
5991-6474CHCN	Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱在生物治疗药物分析方面的优势

Bio SEC-3

部件号	标题
5991-2463EN	为 Agilent Bio SEC-3 色谱柱选择适合的校准
5991-3955EN	利用 Agilent 1260 Infinity 多检测器 Bio-SEC 解决方案的先进的光散射检测功能确定蛋白质分子量和分子大小
5990-9894CHCN	Agilent Bio SEC 柱用于生物分子表征的孔径优化

其他信息

许多标准品可用于协助方法开发、分子量估算和系统 QC 测试。

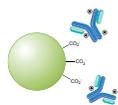
部件号	名称
5190-9416	AdvanceBio SEC 130 Å 冻干蛋白质标准品, 1.5 mL
5190-9417	AdvanceBio SEC 300 Å 冻干蛋白质标准品, 1.5 mL
PL2070-0100	聚乙二醇校准试剂盒, PEG-10, 10 × 0.5 g
PL2080-0101	聚环氧乙烷校准试剂盒, PEO-10, 10 × 0.2 g
PL2090-0101	普鲁兰多糖校准试剂盒
5191-5744	Agilent-NISTmAb 标准品, 1/包
5191-5745	Agilent-NISTmAb 标准品, 4/包

电荷异构体分析

背景

由于存在带正电荷和带负电荷的氨基酸以及带负电荷的多聚糖（唾液酸），意味着大分子蛋白质作为多电荷物质存在，并且有几种副反应可导致净电荷变化。了解涉及到的氨基酸或多聚糖及其在大分子生物治疗蛋白质中的特定位置至关重要。抗体抗原结合区内的异构体对功能的影响可能更为重大。

离子交换色谱可以分离一些电荷异构体，特别是那些位于蛋白质表面（而不是隐藏在结构内）的电荷异构体。尽管如此，分离可能具有 +50 净电荷的分子和 +49 或 +51 的电荷异构体仍然相当困难。通过使用非多孔颗粒避免孔结构，从而避免孔扩散，在某种程度上可以改善峰形并提高分离度。通常需要重新使用弱阳离子交换柱并进行广泛的方法优化，以确定特定分子最合适的条件。



电荷异构体分析

离子交换色谱

提高生物分子表征的准确度与速度

Bio MAb

单克隆抗体分离的理想选择

属性	优势
刚性非多孔颗粒	高效分离
亲水聚合物层	避免非特异性吸附
高密度 WCX 固定相	高离子交换容量，非常适合 MAb

Bio IEX

蛋白质和多肽分离的理想选择

属性	优势
具有亲水性涂层的刚性颗粒	避免非特异性吸附
强/弱阳离子、阴离子固定相	只需一个色谱柱即可应对所有分离

入门指南

由于大多数蛋白质所含的碱性氨基酸多于酸性氨基酸，因此大多数电荷异构体分离需要采用阳离子交换。然而，每种蛋白质都不相同，找到能够实现所需最佳分辨率的条件可能需要相当多的优化工作。强阳离子交换柱通常更易于使用，但对于单克隆抗体，弱阳离子交换柱可能是实现所需分离度的唯一途径。

在开始方法开发之前，确定目标蛋白质的等电点 (pI) 至关重要。如果初始流动相条件的 pH 值过分接近蛋白质的 pI，蛋白质就不会保留在色谱柱上。pH 与主要物质的等电点之间的差距应为至少 0.5 至 2 个 pH 单位，具体取决于电荷异构体 pI 的差异。蛋白质可以通过盐梯度（用高离子强度破坏蛋白质在色谱柱上的吸附）或 pH 梯度（蛋白质在 pH 等于 pI 时洗脱）洗脱。

值得考虑采用一种能够在方法开发过程中筛选几种不同色谱柱的仪器。即使是离子强度和 pH 等方法条件的微小变化，也很难预测会产生怎样的结果；这两个因素都会影响蛋白质上的净电荷，如果是弱离子交换色谱柱，还会影响色谱柱上的净电荷。建议采用严格的“质量源于设计”方针。建议使用开发矩阵或系统化设计实验的软件。缓冲液顾问软件可以利用 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱的四元 HPLC 泵功能，从而为方法开发节约大量时间。本节列出的一些应用简报，包括“操作指南”和相关应用简报，说明了如何使用缓冲液顾问软件来测试一系列流动相条件。如果最佳分离条件要求缓冲液在缓冲范围极限的 pH 水平下具有非常低的离子强度，也可以采用 PEEK 色谱柱。

与体积排阻色谱一样，离子交换通常采用非变性条件，对完整的天然蛋白质进行分离。这意味着这种方法不兼容 MS，除非将其作为二维液相色谱中的第一维。不过，可以通过 UV 检测实现定量。

用于生物分子分析的离子交换色谱： 操作指南

前言

蛋白质由含有许多氨基酸的链组成，其中几种氨基酸具有酸性或碱性侧链基团。因此，蛋白质表面上的总电荷可以通过调节周围溶液的 pH 来控制。等电点 pI 是蛋白质的净电荷为中性时的 pH（正电荷数量等于负电荷数量）。如果 pH 低于 pI ，则蛋白质总电荷为正，可以保留在带负电荷的阳离子交换吸附剂上；如果 pH 高于 pI ，则蛋白质总电荷为负，可以保留在阴离子交换吸附剂上。

在本“操作指南”中，我们将讨论离子交换 (IEX) 色谱、色谱柱选择，流动相的重要注意事项、使用 IEX 的一般经验规则、仪器注意事项等。

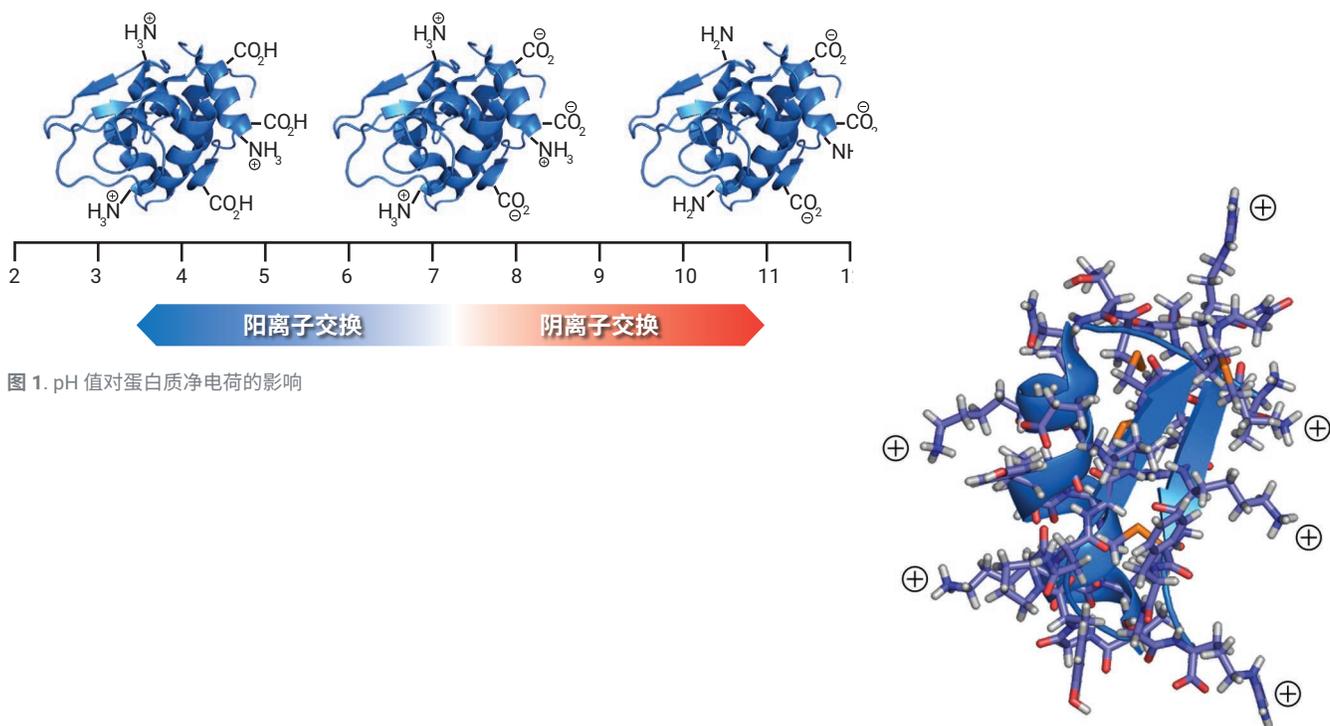


图 1. pH 值对蛋白质净电荷的影响

基于离子电荷的分离通常在非变性条件下进行

离子交换是一种广泛使用的方法，根据离子电荷的差异分离生物分子。它是一种温和的非变性技术，不需要有机溶剂，因此经常用于表征天然或活性形式的蛋白质，也用于纯化。

蛋白质含有多种基团，这些基团可能带来电荷差异。酸性基团包括 C 端羧酸、天冬氨酸和谷氨酸的酸性侧链以及糖基化蛋白质中唾液酸产生的酸性基团；碱性基团包括 N 端胺以及精氨酸、赖氨酸和组氨酸的碱性侧链。因此，分子的总电荷取决于周围溶液的 pH，继而又会影响可以使用的离子交换方法。必须在整个分离过程中控制流动相的 pH，因此使用水相缓冲液作为洗脱液。

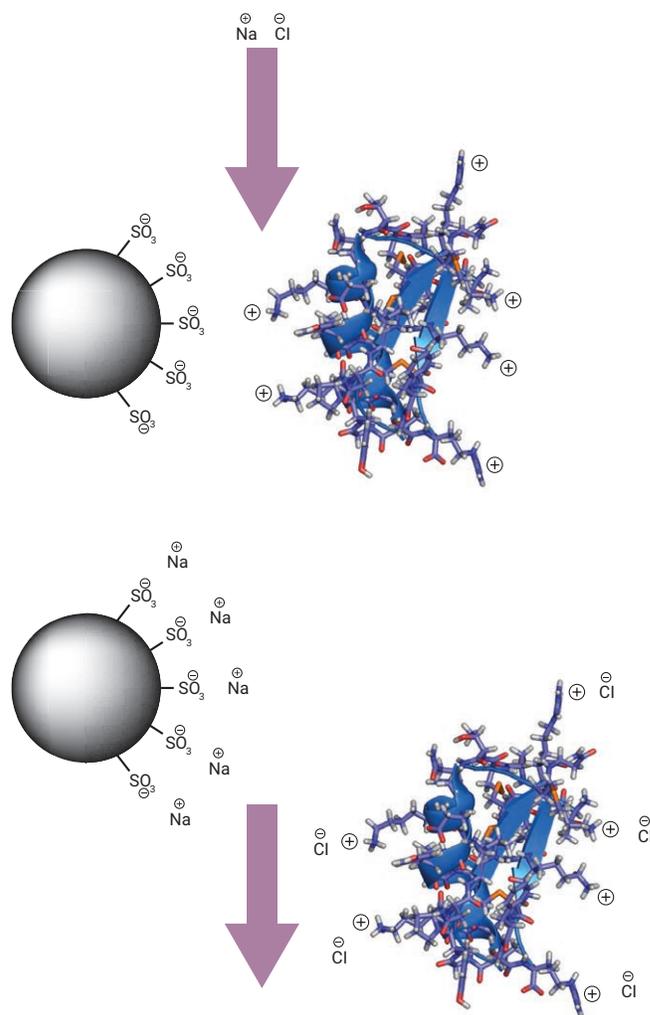


图 2. 离子交换的分离机制

因此，离子交换技术适用于分离具有不同等电点的蛋白质，但它在分离单个蛋白质的带电异构体方面同样很有价值。在越来越重要的生物制药领域，蛋白质通过生物工程生产并从发酵反应中分离出来，带电异构体表示着蛋白质的一级结构存在差异，因此带电异构体的鉴定非常重要。一级结构的差异可能说明糖基化或降解途径有所变化，例如 C 端残基缺失或酰胺化/脱酰胺化作用。它们还可能导致稳定性或活性发生改变，并可能引起不良免疫反应。离子交换用于在开发过程中分离和量化电荷异构体，也用于生物治疗药物生产过程中的质量控制和质量保证。对于单克隆抗体 (mAb) 等大分子，还需要考虑分子的大小和结构 (mAb 通常为 150 kD)，特别是当色谱相互作用只会发生在表面电荷上时。

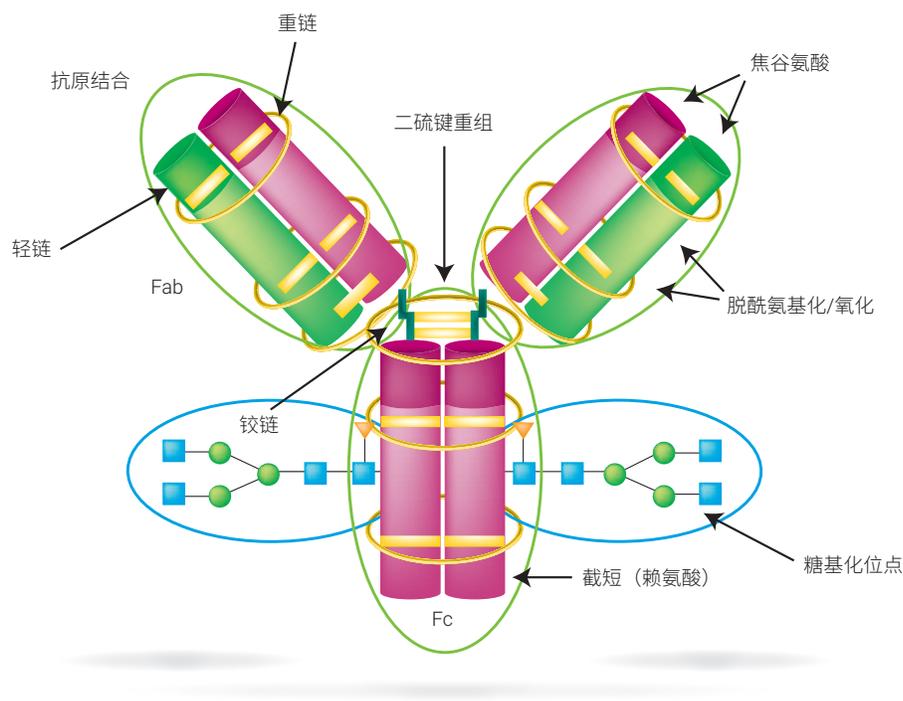
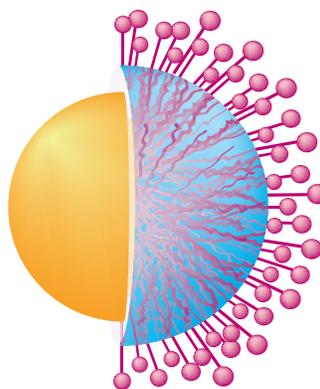


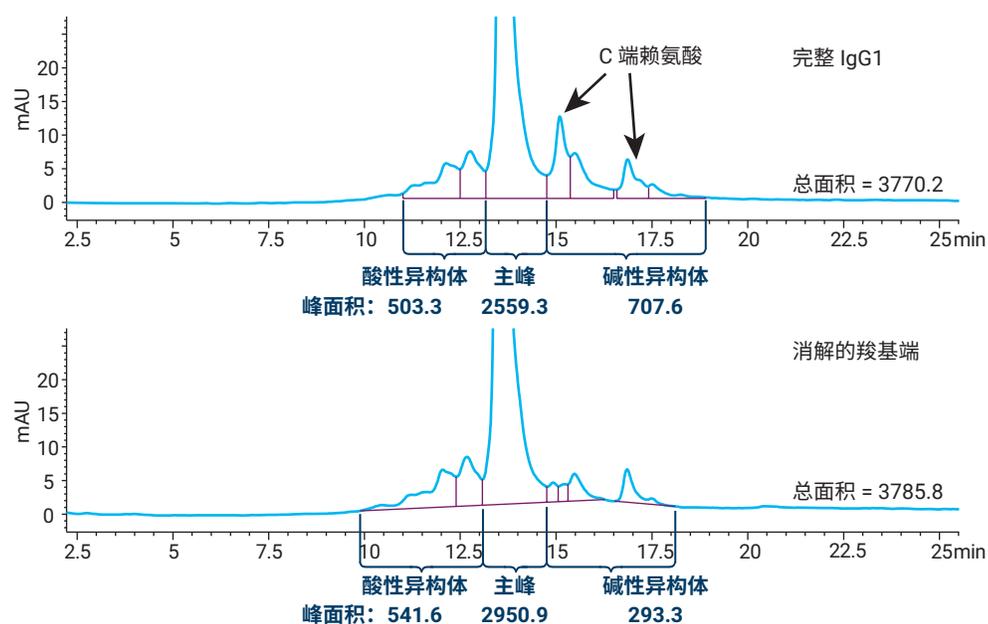
图 3. 通过不同程度的氨基酸糖基化、脱酰胺化和氧化作用，以及重链的赖氨酸截短生成的单克隆抗体的电荷异构体

Agilent Bio MAb HPLC 色谱柱： 从内到外的优越性能

- 填料、涂层和键合能够耐高压，有助于实现更高的分离度和更快速的分离
- 亲水聚合物层消除了大多数非特异性键合
- 高度均一、致密填装的弱阳离子交换 (WCX) 功能团化学键合到亲水聚合物层上



使用 Bio MAb 色谱柱鉴定重链的羧基端截短



条件

参数	值
色谱柱:	Bio MAb, PEEK 5190-2407 4.6 × 250 mm, 5 μm
样品:	5 μL 1 mg/mL 完整或羧基端消解的 IgG1
仪器:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱
流动相:	A: 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 5.5 B: A + 0.5 mol/L NaCl
流速:	0.85 mL/min
梯度:	0 到 25 分钟 B 从 10% 增加到 35%
检测器:	UV, 225 nm
进样量:	5 μL

图 4. 在 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统上使用 Agilent Bio MAb 5 μm 色谱柱分析羧基端消解的 IgG1 的计算数据。色谱柱展现出高分离度，可以进一步改善色谱峰鉴定和准确定量

了解成功离子交换分离的要求

第 1 步：

样品前处理

离子交换色谱的样品前处理方法与其他蛋白质分析并没有什么不同。最重要的一点是样品必须能够溶于洗脱液，且自身可在流动相条件下实现良好分离。为了避免损害色谱柱，建议在使用前进行样品过滤以除去颗粒物。但是，不能用过滤来补偿样品的低溶解度问题，需要更换洗脱液。



Captiva 低蛋白质结合过滤器

Agilent Captiva 优级 PES 针头过滤器可在蛋白质相关的过滤中提供出色而一致的低蛋白质结合力。在大多数液相色谱分析中，聚醚砜 (PES) 滤膜相对聚偏二氟乙烯 (PVDF) 滤膜而言是一种更好的选择。对于常见的液相色谱溶剂，安捷伦的 PES 具有与 PVDF 过滤器相似的兼容性，而在蛋白质结合力和清洁度方面比 PVDF 更胜一筹。更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/filtration



Captiva 优级 PES 针头过滤器

直径 (mm)	孔径 (μm)	认证	外壳	部件号
4	0.2	LC/MS	聚丙烯	5190-5094
4	0.45	LC	聚丙烯	5190-5095
15	0.2	LC/MS	聚丙烯	5190-5096
15	0.45	LC	聚丙烯	5190-5097
25	0.2	LC/MS	聚丙烯	5190-5098
25	0.45	LC	聚丙烯	5190-5099



AssayMAP 自动化蛋白质和多肽样品前处理

AssayMAP 样品前处理是一种用于蛋白质纯化、消化、肽段纯化和肽段分馏的自动化解决方案，可以大大缩短实际操作时间，同时大幅提高工作流程的重现性和效率。标准化的用户界面简化了工作流程，同时可以灵活控制关键分析参数。AssayMAP 技术具有高水平的数据质量和增强的功能，可从发现到验证和生产过程中提供无可比拟的工作能力。

- 可重现的结果
- 缩短手动操作时间
- 简单的用户定制方案
- 高通量，每天可处理 8 到 384 个样品
- 轻松进行方法转换

了解更多有关 AssayMAP 技术的信息：

www.agilent.com/lifesciences/assaymap

对于完整蛋白质的分析工作流程（例如本指南中提供的工作流程），可以使用 Protein A 或 Protein G 微量色谱柱在 AssayMAP 平台上定量纯化目标蛋白质，然后进样至 HPLC 色谱柱以便分离和检测完整的蛋白质电荷异构体。

为进行有效的样品前处理，还需要确保溶解样品的方法不会改变样品本身的性质。



第 2 步：

色谱柱选择 - 离子交换

应用	安捷伦色谱柱	说明
单克隆抗体	Bio MAb	单克隆抗体的全面表征，包括酸性和碱性亚型的鉴别和监测。Agilent Bio MAb HPLC 色谱柱填充了专为单克隆抗体基于带电量的高分离度分离而设计的特殊树脂颗粒。
肽和蛋白质	Bio IEX	Agilent Bio IEX 色谱柱填充的是聚合物型非多孔离子交换填料。Bio IEX 色谱柱专为实现高分离度、高回收率和高分离效率而设计。
蛋白质、多肽和脱保护寡核苷酸	PL-SAX 1000 Å PL-SAX 4000 Å	强阴离子交换官能团共价连接到化学稳定的全多孔聚合物表面，拓展了操作的 pH 范围。此外，阴离子交换能力与 pH 值无关。对于合成寡核苷酸，可以使用高温、有机溶剂和高 pH 等变性条件进行分离。5 μm 填料能够提供比中等压力液相色谱中使用的 30 μm 填料更高的分离度。
球蛋白和肽 非常大的生物分子/高速	PL-SAX 1000 Å PL-SAX 4000 Å	
小肽到大蛋白	PL-SCX 1000 Å PL-SCX 4000 Å	PL-SCX 是一种具有强亲水性涂层和强阳离子交换官能团的大孔 PS/DVB 填料。其生产工艺受到严格控制，能够提供理想的强阳离子交换官能团密度，适用于分析、分离和纯化广泛的生物分子。5 μm 填料能够提供比中等压力液相色谱中使用的 30 μm 填料更高的分离度。
球蛋白 非常大的生物分子/高速	PL-SCX 1000 Å PL-SCX 4000 Å	
抗体 (IgG、IgM)、 质粒 DNA、病毒、 噬菌体和其他生物大分子	Bio-Monolith QA Bio-Monolith DEAE Bio-Monolith SO ₃	强阳离子交换相、强阴离子交换相和弱阴离子交换相。 Bio-Monolith HPLC 色谱柱与 HPLC 和制备型 LC 系统兼容，包括 Agilent 1100 和 1200 Infinity 系列。
病毒、DNA、大分子蛋白 质粒 DNA、噬菌体 蛋白质、抗体	Bio-Monolith QA Bio-Monolith DEAE Bio-Monolith SO ₃	

色谱柱填料选择

与大多数色谱技术一样，有一系列色谱柱可供选择。对于离子交换，首先要考虑的是“阴离子交换还是阳离子交换”。还可以在强离子交换或弱离子交换之间选择。大多数情况下，最好从强离子交换色谱柱开始。如果需要，可以使用弱离子交换剂来提供选择性差异。

强阳离子交换色谱柱中的基团是磺酸，因此固定相在所有流动相中（酸性最强的流动相除外）均带负电。相反，强阴离子交换色谱柱中的基团是季胺基团，其所有流动相中（碱性最强的流动相除外）带正电。因此，强阳离子交换色谱柱的操作范围最宽。弱离子交换吸附剂（弱阳离子交换剂中的羧酸和弱阴离子交换剂中的胺）受流动相条件的影响更大。这些基团与蛋白质本身的带电基团并无不同，并且带电程度可能受到离子强度以及流动相 pH 的影响。

这可能导致分离度发生变化，但可以通过精心选择操作条件来巧妙地控制和优化。因此，弱离子交换剂是一种附加工具，有时可以提供强离子交换色谱柱无法提供的选择性。

孔径

如果分离度的重要性高于容量，则 Agilent Bio IEX 产品系列提供的刚性球形非多孔颗粒填料（具有适当的表面官能团）可能是有益的。在分析特别大的生物分子，或者需要达到更高速度时，Agilent Bio-Monolith 色谱柱可以提供出色结果。一些固定相，如 PL-SCX 或 PL-SAX 吸附剂，是具有 1000 或 4000 Å 孔的全多孔颗粒。必须确保孔足够大，以便蛋白质不受阻碍地完全渗透到结构中。这样可以提高的表面积，从而提高载样量，更加适合于制备级分离。

出色的分离能力

填料具有亲水聚合物层和紧密装填的离子交换官能团，对各种等电点 (pI) 的蛋白质混合样品能够提供非常尖锐的峰形和极高的分离度。

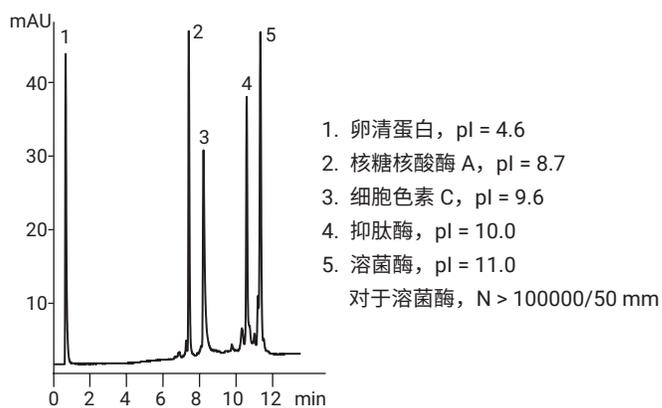


图 5. Agilent Bio SCX 出色的分离能力

条件

参数	值
色谱柱:	Bio SCX, 不锈钢 5190-2423 4.6 × 50 mm, 3 μm
缓冲液: A:	10 mmol/L 磷酸盐, pH 6.0
流速:	0.5 mL/min
梯度:	0–1.0 mol/L NaCl, 15 min
检测器:	280 nm

粒径

选择色谱柱时，粒径是一个重要考虑因素。较小的粒径可提高分离效率，但代价是操作压力较高。因为生物分子相对较大并且扩散速率较慢，所以减小粒径提高的分离度不一定能达到与小分子相同的水平。此外，含有水相缓冲液的洗脱液相对粘稠，必须注意避免反压过高。

使用阳离子交换色谱通过安捷伦 3 μm 离子交换色谱柱分离蛋白质标准品

条件

参数	值
色谱柱 A:	Bio SCX, 不锈钢 5190-2423 4.6 \times 50 mm, 3 μm
色谱柱 B:	Bio WCX, 不锈钢 5190-2443 4.6 \times 50 mm, 3 μm
色谱柱 C:	Bio MAb, 不锈钢 5190-2403 4.6 \times 50 mm, 3 μm
样品:	核糖核酸酶 A、细胞色素 c、溶菌酶和蛋白质混合物
仪器:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱
流动相:	A: 10 mmol/L 磷酸钠, pH 5.7 B: A + 1 mol/L NaCl
流速:	0.5 mL/min
梯度:	0 min - 100% A: 0% B 25 min - 0% A: 100% B
温度:	室温
检测器:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱, 带二极管阵列检测器, 波长 220 nm

柱卡套

选择色谱柱时，粒径是一个重要考虑因素。较小的粒径可提高分离效率，但代价是操作压力较高。因为生物分子相对较大并且扩散速率较慢，所以减小粒径提高的分离度不一定能达到与小分子相同的水平。此外，含有水相缓冲液的洗脱液相对粘稠，必须注意避免反压过高。

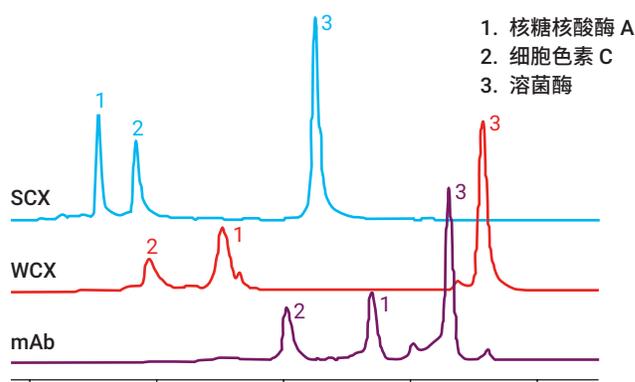


图 6. 使用阳离子交换色谱通过安捷伦 3 μm 离子交换色谱柱分离蛋白质标准品

利用更小粒径的填料和更短的色谱柱实现更快分析 — 分离速度提高 30%

可使用不锈钢色谱柱，但盐梯度可能具有腐蚀性，如果任其与色谱柱接触，会导致腐蚀。PEEK 色谱柱就没有这个问题，可能适合于金属敏感分子，但它们工作的反压较低。如需非金属样品流路，应使用 PEEK 色谱柱和生物惰性色谱仪，如 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱。

条件

参数	值
色谱柱 A:	Bio WCX, 不锈钢 5190-2445 4.6 × 250 mm, 5 μm
色谱柱 B:	Bio WCX, 不锈钢 5190-2443 4.6 × 50 mm, 3 μm
样品:	0.5 mg/mL
仪器:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱
流动相:	A: 20 mmol/L 磷酸钠, pH 6.5 B: A + 1.6 mol/L NaCl 梯度: 0 min - 100% A: 0% B
梯度:	0%–50% B
温度:	室温
进样量:	10 μL
检测器:	UV, 220 nm

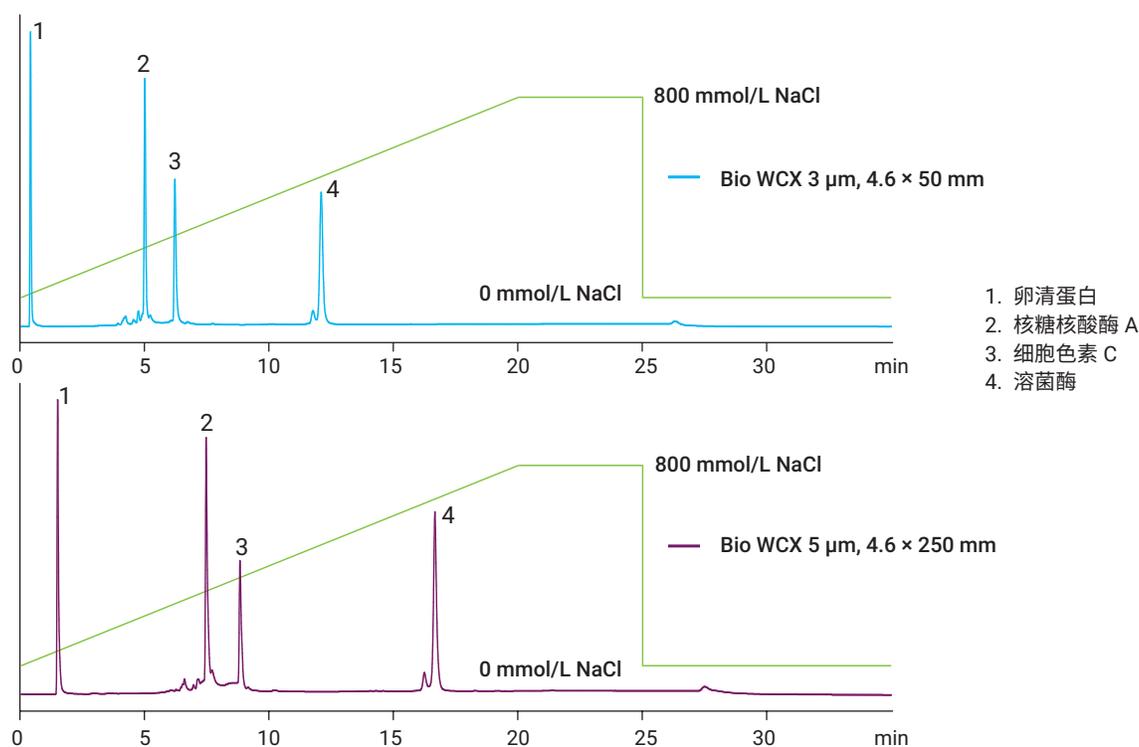


图 7. 使用 Agilent Bio WCX 色谱柱 (4.6 × 50 mm, 3 μm 和 4.6 × 250 mm, 5 μm) 在 1 mL/min 的流速下进行蛋白质分离。较小的填料粒径和较短的色谱柱分析速度较快 — 样品在较长色谱柱中洗脱需要 17 min，而在较短色谱柱洗脱仅需 12 min

色谱柱内径

根据待分析的样品量选择色谱柱内径也十分重要。如果待分析物质的量很少，采用 2.1 mm 内径色谱柱 (流速 0.35 mL/min) 即可。但使用更小内径的色谱柱时，需要尽可能减小色谱柱和检测器之间的系统体积，这样可以避免过度扩散和分离度降低。

第 3 步：

HPLC 系统的注意事项

这类分析的理想选择是 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱。它可以轻松处理具有挑战性的溶剂条件，例如 pH 1 至 pH 13 的极端 pH 值以及高盐浓度的缓冲液。

溶剂运送系统使用耐腐蚀的钛材质，样品流路采用非金属材料，因而仪器极为稳定。

检测

对于生物分子，例如由通过酰胺键连接的多个氨基酸组成的蛋白质，UV 检测波长为 210 nm 或 220 nm 时信号强度和灵敏度更好。然而，离子交换常用的一些洗脱剂在低波长处背景吸收过高，因此可能需要换成 254 nm 或 280 nm。这些波长仅对具有芳香侧链或更高共轭程度侧链的氨基酸敏感，这会大大降低灵敏度。

优化无相互作用色谱

安捷伦生物惰性液相色谱备件可提供稳定且无相互作用的结果，从而确保提高系统效率，同时凭借更尖锐的峰形与更高的分析重现性提高色谱分析的可靠性。

如需了解更多信息，请访问：

www.agilent.com/chem/biosupplies



Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱是离子交换色谱理想的 HPLC 仪器。



第 4 步：

流速

4.6 mm 内径色谱柱使用的典型流速为 0.5–1.0 mL/min。对有些应用而言，分析速度十分关键。使用较短色谱柱（如采用 50 mm 替代常规的 150 mm 或 250 mm）或提高流速，或者同时采用两种方案，均可缩短分析时间（注意不要超过色谱柱压力限制）。

较小粒径填料显著提高分离度

条件

参数	值
色谱柱 A:	Bio WCX, 不锈钢 5190-2441 4.6 × 50 mm, 1.7 μm
色谱柱 B:	
样品:	0.5 mg/mL
仪器:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱
流动相:	A: 20 mmol/L 磷酸钠, pH 6.5 B: A + 1.6 mol/L NaCl
梯度:	0%–50% B
温度:	室温
进样量:	10 μL
检测器:	UV, 220 nm

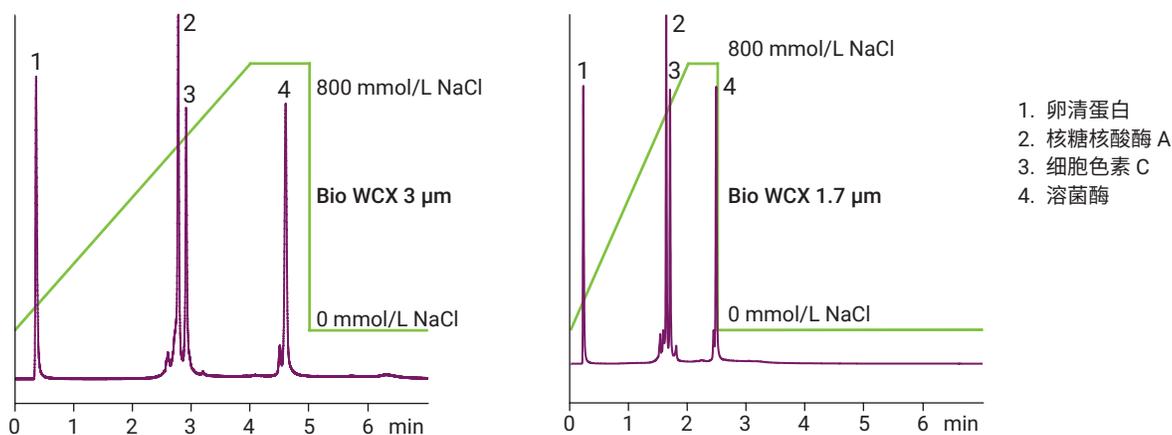


图 8. 通过提高流速缩短分析时间（峰形和分离度不受影响）

流动相选择

第 5 步：

初始流动相选择将由蛋白质的 pI 和分析方法（阳离子交换或阴离子交换）决定。图 10 所示为常用的缓冲液范围。

缓冲剂的作用是控制分离过程中 pH 的变化，从而在保持所分析化合物上的电荷一致。需要记住，缓冲液只有在与其解离常数 pKa 相差不到一个 pH 单位时才能良好发挥作用。磷酸或磷酸盐具有三种解离常数：



因此，pH 在 6–7 范围内的磷酸盐缓冲液适用于阳离子交换色谱，其浓度通常为 20–30 mmol/L，并且具有在波长为 210 nm 时背景吸收较低的优点。必须系统且精确地制备缓冲液，因为即使离子强度或 pH 值的微小差异也会在不同程度上影响蛋白质的保留时间，并且可能导致色谱分析的分选度和变异性不佳。

需要意识到，与在正常操作条件下完全电离的强离子交换柱不同，弱离子交换柱的离子化程度会受到缓冲液 pH 和离子强度的影响。这是可用于改变选择性以实现所需分离的工具之一。

但是，为了让生物分子从色谱柱洗脱，必须引入竞争离子。这通常会通过线性氯化钠梯度实现。洗脱液 A 含有调节至适当 pH 的缓冲液。洗脱液 B 含有相同浓度的缓冲液和更高浓度的氯化钠（可能为 0.5 mol/L），然后将 pH 调节至同样的值。



条件

参数	值
色谱柱 A:	Bio MAb, PEEK 5190-2407 4.6 × 250 mm, 5 μm
样品:	三种蛋白质的混合物, 溶于 PBS (磷酸盐缓冲液), pH 7.4 核糖核酸酶 A: 13700 Da, pI 9.6 细胞色素 C: 12384 Da, pI 10-10.5 溶菌酶: 14307 Da, pI 11.35
仪器:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统
流动相:	A: 水 B: 1.5 mol/L NaCl C: 40 mmol/L NaH ₂ PO ₄ D: 40 mmol/L Na ₂ HPO ₄ 按照由缓冲液顾问软件预先确定的比例混合 C 和 D, 得到具有所需 pH 范围和强度的缓冲液。
流速:	1 mL/min

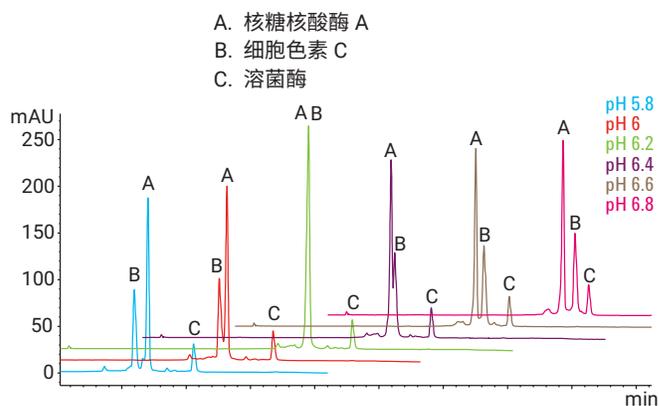


图 9. 利用动态混合四元梯度进行三种蛋白质混合物分离的 pH 筛选

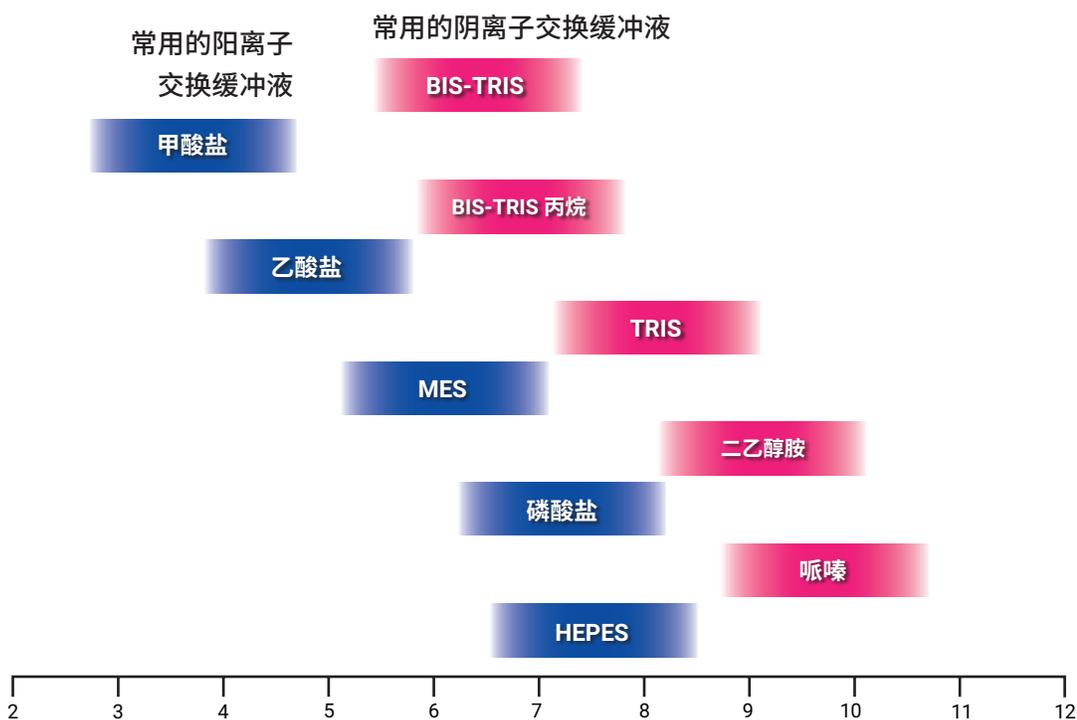


图 10. 离子交换常用缓冲液

开发一种有效的离子交换方法

必须记住，单克隆抗体等生物分子的复杂程度超乎想象。一个典型的 mAb 包含超过 1300 个单个氨基酸。其中，可能 130 个具有酸性侧链，180 个具有碱性残基。单克隆抗体可能在中性 pH 下净电荷为正，因此应使用阳离子交换色谱柱分离。但是，很难预测这种分子的实际等电点 pI，因此可能需要一些方法开发或优化工作。

样品前处理

- 理想情况下，样品应溶解于流动相（洗脱液 A）
- 如果样品浑浊，可能需要改变流动相条件
- 过滤或离心可使样品澄清，但这些方法会改变样品的组成
- 样品需新鲜制备并尽快用于分析。冷藏可以延长样品的“保质期”
- 细菌会在缓冲液中快速生长

色谱柱填料选择

- 阴离子交换和阳离子交换之间的选择取决于目标蛋白质的等电点
- 强离子交换剂是很好的首选，如果需要，可以使用弱离子交换剂来提供选择性差异

色谱柱选择

- 孔径：目标蛋白质必须能够自由渗透到颗粒孔隙中。对于不太在意色谱柱载样量的分析级分离，非多孔球形颗粒填料可以提供更高分离度
- 粒径：填料粒径越小，分离度越高（但反压更高）
- 色谱柱柱长：较短的 50 mm 色谱柱可提供更快的分离速度，特别是颗粒较小时，而较长的 250 mm 色谱柱则可提供更高的分离度
- 色谱柱内径：使用较小内径的色谱柱可减少溶剂损耗和进样量（适合样品有限的情况）



流动相

- 流动相中应含有维持所需操作 pH 的缓冲液，浓度通常为 20 mmol/L。缓冲液的 pH 和离子强度会影响弱离子交换产物的分离度，因此应通过实验找到最佳条件
- 向流动相中加入氯化钠会改变 pH 值。应根据需要重新调整
- 新鲜配制流动相并迅速使用，因为室温下存储的稀缓冲液非常利于细菌生长
- 缓冲液的保存期不得超过 7 天，除非冷藏保存
- 使用前过滤。水（可能性小）或缓冲盐（可能性大）中可能存在颗粒物

色谱柱活化及平衡

为了实现可重现的离子交换分离，必须对色谱柱进行平衡，并在梯度中设置净化阶段。蛋白质洗脱是通过增加离子强度或改变洗脱液 pH 或同时采取两种措施来实现的，因此在每次分析结束时，必须让色谱柱平衡恢复到起始条件、离子强度和 pH。如果没有这样做，下一次色谱柱运行的谱图将会有所不同，因为蛋白质与色谱柱的相互作用方式不同。

软件

安捷伦缓冲液顾问软件是另一个可以简化工作流程的工具。通过提供快速简单的途径来建立盐梯度（图 11）和 pH 梯度（图 12），安捷伦缓冲液顾问软件消除了繁琐并易于出错的方法开发步骤，如缓冲液前处理、缓冲液混合和 pH 初筛。缓冲液顾问软件可利用 1260 Infinity 生物惰性四元泵的混合机制，对来自四种储备溶液的溶剂进行动态混合，简化生物分析工作流程，大幅缩短缓冲液前处理所需时间。此外，缓冲液的制备也更加准确，由此可以将方法更稳定地转移到其他实验室。

为了建立盐梯度，要将来自通道 D 的不断增加的盐溶液与分别来自通道 A 和 B 的酸性和碱性缓冲液混合，并使用来自通道 C 的水进行稀释。



利用安捷伦缓冲液顾问软件进行快速缓冲液初筛。
观看视频：agilent.com/chem/bufferadvisor-video

只用了四种流动相洗脱液便完成了 20 个实验的初筛，而此前需要 40 种洗脱液。软件可自动混合各种缓冲液，得到需要的 pH 和缓冲液强度。然后就可以在四元泵中程控运行梯度时间表，如图 13 所示。

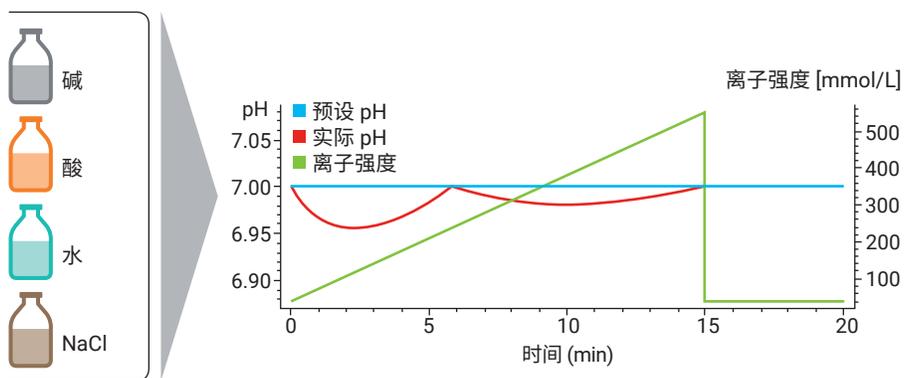


图 11. 使用安捷伦缓冲液顾问软件从储备溶液轻松建立盐梯度

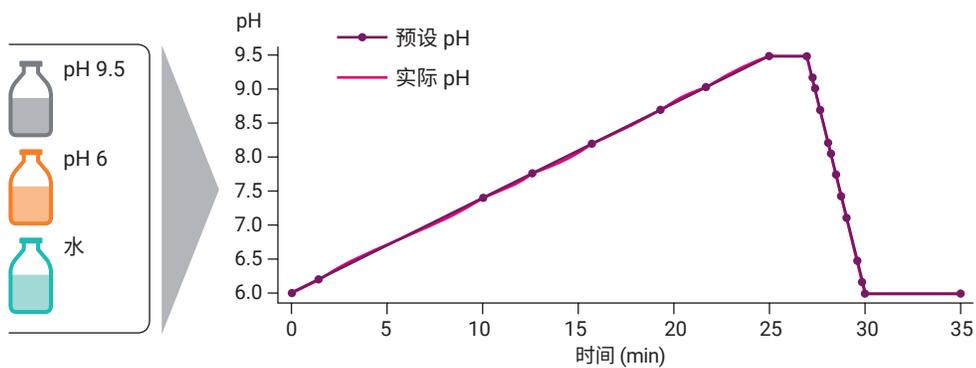


图 12. 单克隆抗体分离的缓冲液强度优化 — 从储备溶液轻松建立 pH 梯度

条件

参数	值
色谱柱 A:	Bio WCX, 不锈钢 5190-2443 4.6 × 50 mm, 3 μm
色谱柱 B:	Bio SCX, 不锈钢 5190-2423 4.6 × 50 mm, 3 μm
样品:	IgG 单克隆抗体
样品浓度:	2 mg/mL (溶于 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 6.0)
仪器:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱
流动相:	A: 水 B: 1.5 mol/L NaCl C: 40 mmol/L NaH ₂ PO ₄ D: 40 mmol/L Na ₂ HPO ₄ 按照由缓冲液顾问软件预先确定的比例混合 C 和 D, 得到具有所需 pH 范围和强度的缓冲液。
流速:	1.0 mL/min
梯度:	色谱图采集条件: pH 5.0 到 7.0, 缓冲液强度 10 到 25 mmol/L 0 到 15 min 内 0 到 500 mmol/L NaCl, 15 到 20 min 内 500 mmol/L NaCl DOE 实验 pH 5.0 到 7.0 0 到 200 mmol/L, 0 到 250 mmol/L, 以及 0 到 300 mmol/L
温度:	室温
进样量:	5 μL
检测器:	UV, 220 nm

条件

参数	值										
色谱柱 A:	Bio MAb, PEEK 5190-2407 4.6 × 250 mm, 5 μm										
样品:	IgG 单克隆抗体										
恒温箱											
流动相:	A: 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 6.0 B: 10 mmol/L 碳酸氢钠缓冲液, pH 9.5										
流速:	1.0 mL/min										
梯度:	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>流动相 (%B)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>27</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	时间 (min)	流动相 (%B)	0	0	25	100	27	100	30	0
时间 (min)	流动相 (%B)										
0	0										
25	100										
27	100										
30	0										
后运行时间:	5 min										
温度:	30 °C										
数据采集:	214 和 280 nm										
采集速率:	20 Hz										
流通池:	60 mm 光程										
进样量:	10 μL (洗针进样, 冲洗进样口 7 s)										
检测器:											

优化电荷异构体分离的自动化方法开发

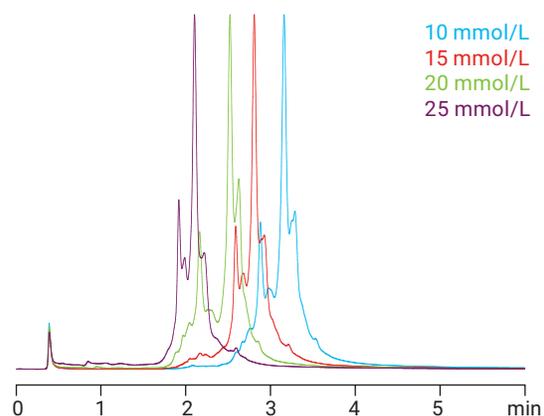


图 13. 从单克隆 IgG 分离的筛选色谱图中, 在 pH 6.5 条件下优化缓冲液强度

使用 Bio MAb 色谱柱获得准确定量的可靠方法

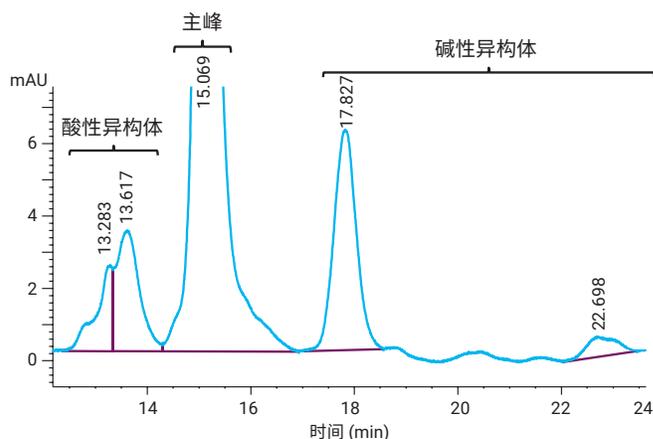


图 14. 使用 Agilent Bio MAb PEEK, 4.6 × 250mm, 5 μm 色谱柱进行基于 pH 梯度的阳离子交换 IgG1 分离色谱图

便捷定制阳离子交换分析

结合使用 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统、安捷伦缓冲液顾问软件和用于高分离度电荷异构体分析的 pH 梯度

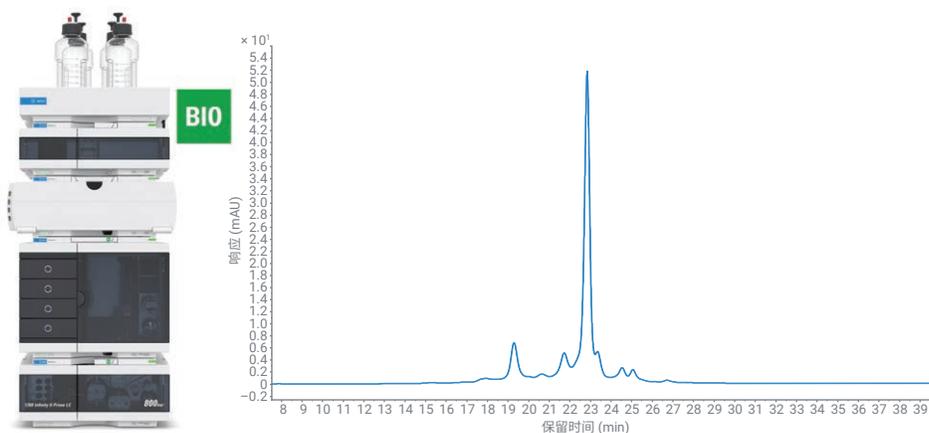
作者

Sonja Schneider
安捷伦科技有限公司

摘要

单克隆抗体的电荷异构体分离对于色谱工作者而言是一项充满挑战性的工作。由于所分析的单克隆抗体的微异质性，需要进行大量的方法开发才能找到所需的理想分离度。pH 梯度的分离能力优于许多传统的盐梯度，能够以非常有效的方式分离电荷异构体。本应用简报展示了使用不同类型的 pH 梯度对两种单克隆抗体（曲妥珠单抗和 NIST mAb）进行高分离度和可重现的电荷异构体分析。

Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统配备完全不含铁的流路和 Agilent 1260 Infinity II 生物全能泵，能够使用安捷伦缓冲液顾问软件对来自四种储备溶液的溶剂进行动态混合。



前言

治疗性单克隆抗体 (mAb) 是高度异质的分子, 由大量异构体组成。它们天然存在于这种生物药物中, 不一定被视为杂质。溶液中的蛋白质在与水性介质的界面处主要具有极性和带电荷的氨基酸, 而疏水性残基则因疏水相互作用而倾向于自缔合。位于蛋白质“外部”并与周围液体接触的氨基酸更容易被修饰^[1]。

变异 (也称为蛋白质微异质性) 可能源自抗体生产过程中的翻译后修饰。此外, 纯化过程、配制和/或存储之后的修饰也可形成^[2]。然而, 如果这些变异存在于药物蛋白中, 它们的生物活性可能会有所不同, 免疫原性可能会增强^[2]。因此, 需要对 mAb 的微异质性进行广泛的分析表征, 确保生物药物的安全性和有效性。

阳离子交换色谱 (CEX) 是单克隆抗体电荷异构体分析的金标准^[3]。经典盐梯度方法经全面优化后具有较高的分离度。然而, 开发用于蛋白质分离的高分离度离子交换方法的工作量非常大。需要优化包括盐浓度、流动相 pH 值和添加剂在内的许多参数。此外, 每个分子 (尤其是生物分子) 可能表现出不同的行为, 并且开发的方法不允许实验参数发生较大的变化, 尤其是 pH 值的变化^[1,4]。

基于 pH 梯度的 CEX (也被称为色谱聚焦) 为分离 mAb 电荷异构体提供了高分离度且稳定的方法^[1,4,5]。在典型的离子交换色谱 (IEX) 中, 分子通过增加缓冲液的离子强度 (主要是盐类, 例如 NaCl) 从色谱柱中洗脱出来。相比之下, 在使用 pH 梯度时, 结合的分子会随着缓冲液 pH 值的变化而洗脱。这会改变它们的表面净电荷, 使结合的分子在其等电点 (pI) 洗脱, 此时的分子呈电中性。

宽 pH 梯度方法更通用, 可以在单个缓冲液系统中分离来自不同抗体的异构体^[1]。此外, 与基于离子强度的传统 IEX 相比, 基于 pH 梯度的方法开发更简单、快捷。

宽 pH 梯度方法更通用, 可以在单个缓冲液系统中分离来自不同抗体的异构体^[1]。此外, 与基于离子强度的传统 IEX 相比, 基于 pH 梯度的方法开发更简单、快捷。

1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统是新一代安捷伦高端液相色谱系统, 专为生物色谱条件而设计: 样品流路完全不含不锈钢 (SST) 或铁; 贯穿 Multisampler、大容量柱温箱和检测器的所有毛细管和接头均由 MP35N (一种镍钴合金) 制成。这种材料可以减少高浓度盐缓冲液的潜在腐蚀, 避免因铁离子存在引起的蛋白质修饰 (如氧化、蛋白质复合物形成)。

将 1260 Infinity II 生物全能泵作为四元泵, 可以使用缓冲液顾问软件帮助动态混合来自四种储备溶液的溶剂, 简化生物分析工作流程, 并显著缩短缓冲液制备所需的时间。使用缓冲液顾问软件, 可以通过计算 IEX 的泵时间表快速、简单地生成四元盐梯度和 pH 梯度。

本应用简报介绍了使用两种不同的 pH 梯度对曲妥珠单抗和 NIST mAb 参比标样的电荷异构体的分析。

实验部分

设备

Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统，包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity II 生物全能泵 (G7131C)
- Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A)，配备样品恒温箱（选件 #101）
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)，配备标准流速生物兼容性热交换器
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (G7114B)，配备生物兼容性微量流通池，3 mm，2 μ L

软件

Agilent OpenLab CDS 2.5 版或更新版本

色谱柱

Bio MAb, NP5, 2.1 \times 250 mm, PEEK（部件号 5190-2411）

化学品

所有试剂纯度均为液相色谱级。新制超纯水来自配置 0.22 μ m 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA)。磷酸二氢钠一水合物、磷酸氢二钠七水合物、氯化钠、tris（三羟甲基甲胺）、咪唑、盐酸和哌嗪六水合物购自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)。

样品

Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统，包括以下模块：

- Agilent NISTmAb（部件号 5191-5744）
- 人源化单克隆抗体曲妥珠单抗（商品名为赫赛汀）购自 Roche (Basel, Switzerland)。曲妥珠单抗溶于 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液中，pH 6.8

缓冲液配制

根据缓冲液顾问软件的储备溶液配方配制缓冲液（见图 1）。

由缓冲液顾问软件计算得到的四元磷酸盐缓冲液系统

- A: 水
- B: 1700 mmol/L 氯化钠
- C: 44.5 mmol/L 磷酸二氢钠
- D: 55 mmol/L 磷酸氢二钠

注：此设置可用于盐梯度和 pH 梯度洗脱，实现直接比较，并增加方法开发的可能性。

由缓冲液顾问软件计算得到的二元宽 pH 梯度缓冲液系统

使用缓冲液顾问软件，还可以创建宽范围的 pH 梯度（也称为复合缓冲液）。在这些情况下，仅使用 C 和 D 通道来创建梯度。本实验使用 Farnan 和 Moreno 描述的 pH 梯度^[1]，并将缓冲液组分以用户混合物的形式插入缓冲液顾问软件的储备溶液组成中（2.4 mmol/L tris、1.5 mmol/L 咪唑、11.6 mmol/L 哌嗪，以及用于将 pH 调节至 pH 6 & C 和 10.5 & D 的 HCl）。利用此选项，用户可以构建自制的缓冲液组成，获得所需的 pH 范围。缓冲液顾问软件计算两种缓冲混合物的离子强度 (IS) 和缓冲容量 (BC)。

A: 水

B: n/a

C: pH = 6; IS = 22.5 mmol/L; BC = 6.19 mmol/L

D: pH = 10.5; IS = 0.717 mmol/L; BC = 2.31 mmol/L

注：使用高浓度盐溶液作为洗脱液时，需要在泵方法中设置相应溶剂类型。例如，对于磷酸盐缓冲梯度中含 1700 mmol/L 氯化钠的溶剂 B，在泵方法的溶剂选择字段使用氯化钠 1.5 mol/L 而非一般水相或水。高浓度盐可改变溶剂的压缩系数，因此使用预先配置的溶剂表可以使泵达到理想性能。

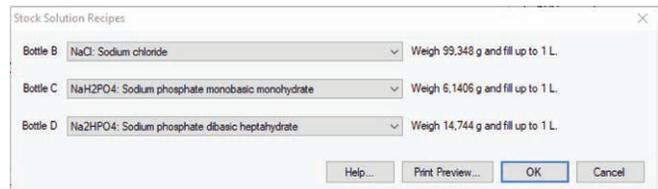


图 1. 安捷伦缓冲液顾问软件储备溶液配方 — 四元磷酸盐缓冲液系统

方法

表 1. 四元磷酸盐缓冲液系统 — 盐梯度色谱条件

参数	值
溶剂	A) 水 B) 1700 mmol/L 氯化钠 C) 44.5 mmol/L 磷酸二氢钠 D) 55 mmol/L 磷酸氢二钠
梯度	梯度 0–30 分钟: 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液中 NaCl 的浓度从 10 mmol/L 升至 110 mmol/L; 30–31 分钟: 500 mmol/L NaCl (pH 6.8) 清洗步骤 停止时间: 31 分钟 后运行时间: 15 分钟
流速	0.200 mL/min
温度	30 °C
紫外检测	280 nm 10 Hz
进样	进样量: 4 µL 样品温度: 8 °C 进样针清洗: 用水清洗 3 秒

表 2. 四元磷酸盐缓冲液系统 — pH 梯度色谱条件

参数	值
溶剂	A) 水 B) 1700 mmol/L 氯化钠 C) 44.5 mmol/L 磷酸二氢钠 D) 55 mmol/L 磷酸氢二钠
梯度	梯度 0–30 分钟: 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液 pH 从 7 升至 8.4; 30–31 分钟: 500 mmol/L NaCl (pH 6.8) 清洗步骤 停止时间: 31 分钟 后运行时间: 15 分钟
流速	0.200 mL/min
温度	30 °C
紫外检测	280 nm 10 Hz
进样	进样量: 4 µL 样品温度: 8 °C 进样针清洗: 用水清洗 3 秒

表 3. 二元宽 pH 梯度缓冲液系统/Farnan pH 梯度

参数	值
溶剂	A) n/a B) n/a C) pH = 6; IS = 22.4 mmol/L; BC = 6.14 mmol/L (Farnan 缓冲液 ^[1]) D) pH = 10.5; IS = 0.717 mmol/L; BC = 2.31 mmol/L (Farnan 缓冲液 ^[1])
梯度	曲妥珠单抗梯度: 梯度 0–50 分钟: pH 从 8.3 升至 10; 然后在 51–55 分钟, 在 pH 10.5 下进行“清洗”步骤 停止时间: 55 分钟 后运行时间: 20 分钟 NISTmAb 梯度: 梯度 0–45 分钟: pH 从 8.9 升至 10.5 停止时间: 50 分钟 后运行时间: 20 分钟
流速	0.200 mL/min
温度	30 °C
紫外检测	280 nm 10 Hz
进样	进样量: 4 µL 样品温度: 8 °C 进样针清洗: 用水清洗 3 秒

结果与讨论

使用缓冲液顾问软件，可以计算盐梯度和 pH 梯度。使用本应用简报实验部分描述的四元磷酸盐缓冲液，可以计算用于分离曲妥珠单抗电荷异构体的两种梯度。

图 2 显示了在平缓的盐梯度（蓝色）和磷酸盐缓冲 pH 梯度（pH 7-8.4）（绿色）下分离曲妥珠单抗电荷异构体得到的两幅色谱图的叠加图。通过盐梯度和 pH 梯度实现的分离性能相当，使用 pH 梯度时的分离度略有提高。

缓冲液顾问软件的一个功能是通过在给定梯度内添加额外的梯度阶梯来改进线性梯度（盐梯度和 pH 梯度）的计算，从而实现出色的线性，而不会与所需/预设 pH 产生重大偏差。要启用此功能，需要选中缓冲液顾问软件用户界面 (UI) 中的 4. 创建 % 时间表部分的优化梯度选项框（见图 3A 和 3B 中的红色圆圈）。

图 3A 和 3B 展示了在未选中 (A) 和 (B) 选项框的情况下，预设 pH 值和实际 pH 值之间的差异。在不进一步优化缓冲液顾问软件的情况下，实际 pH 值可能与预设 pH 值偏离 0.4 个单位，这使得用户难以信任运行梯度线性。通过选中优化梯度选项框（图 3B），将额外的阶梯插入原始梯度中，确保 pH 梯度的线性。左下角的最终泵梯度时间表显示了额外插入的阶梯，它们使实际梯度尽可能接近预设梯度。然后，可以将此梯度时间表导出到 OpenLab 的方法中，实现轻松传输，而无需额外输入。

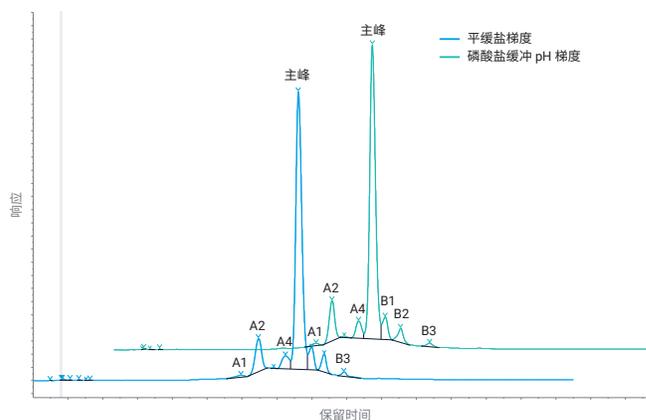


图 2. 在平缓的盐梯度（蓝色）和磷酸盐缓冲 pH 梯度（pH 7-8.4）（绿色）下分离电荷异构体得到的两幅色谱图的叠加图



图 3. 优化安捷伦缓冲液顾问软件中的梯度功能，实现高度线性的 pH 梯度。A 显示优化前的梯度，B 显示优化后的梯度

图 4 显示了在磷酸盐缓冲 pH 梯度 (pH 7–8.4) 下 7 次后续曲妥珠单抗电荷异构体分析运行的叠加色谱图。除前两个峰外, 其余峰的保留时间 (RT) 均具有出色的重现性 (相对标准偏差 (RSD) 小于 0.085%)。由于异构体 A3 和 B3 的峰面积和高度都很小, 因此峰面积重现性高于 1%。

在磷酸盐缓冲系统中, 方法开发受到限制, 尤其是在目标分子的 pI 不在 pH 6–8 缓冲范围内的情况下。如果分子的 pI 太高, 则无法使用该缓冲液系统完成洗脱。例如, pI 为 9.186 的 NIST mAb 需要使用不同的缓冲液系统才能从 CEX 色谱柱中洗脱。

更通用的一种方法是使用由多个缓冲液系统组成的宽范围 pH 梯度。该设置也以复合缓冲液 (宽范围 pH 梯度) 的名称包含在缓冲液顾问软件中。Farnan 和 Moreno (2009) 提出的 pH 6.0–10.5 的 pH 梯度^[1]是一种适用于分析单克隆抗体电荷异构体的缓冲液系统。

进一步应用该系统, 并针对曲妥珠单抗和 NIST mAb 对方法进行了优化。

图 5 显示了使用宽范围 pH 梯度对曲妥珠单抗电荷异构体的分离, 将 pH 从 8.3 逐步调整到 10 以实现理想分离度。与磷酸盐缓冲 pH 梯度相比 (见图 2), 可以多分离出两种酸性异构体 (A1–A6, 在主峰之前洗脱) 和一种碱性异构体 (在主峰之后洗脱)。图 5B 中的放大图突出显示了主峰周围不同电荷异构体的出色分离度, 与图 2 中所示的平缓盐梯度和 pH 梯度相比, 具有更尖锐的峰形和更高的分离度。

对所有分离异构体的 RT 和峰面积精度进行了评估 (见图 5 中的峰表)。即使是极小的峰, RT 精度也非常出色, 其 RSD 均低于 0.06% (第一个异构体 A1 除外)。除极小的峰外, 大多数峰的面积精度都十分出色。

研究还证明, Farnan 和 Moreno 使用的 pH 梯度^[1]是 NISTmAb 分析的理想选择 (见图 6)。针对 NISTmAb, 由于其 pI 不同, pH 梯度被修改为不同的 pH 范围。利用这种 pH 8.9–10.5 的平缓梯度, 可以分离出三种酸性异构体和两种碱性异构体。

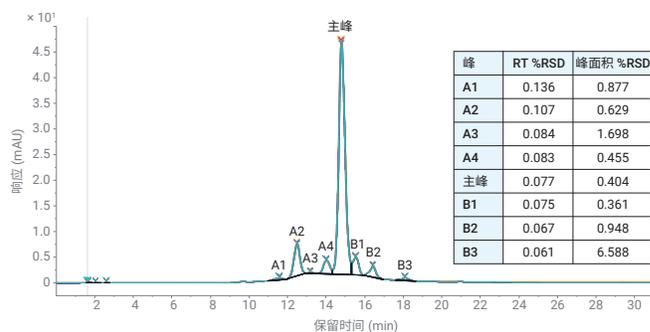


图 4. 采用 pH 7–8.4 的磷酸盐缓冲 pH 梯度分析曲妥珠单抗的七次连续运行的叠加色谱图, 包括保留时间 (RT) 和峰面积精度表

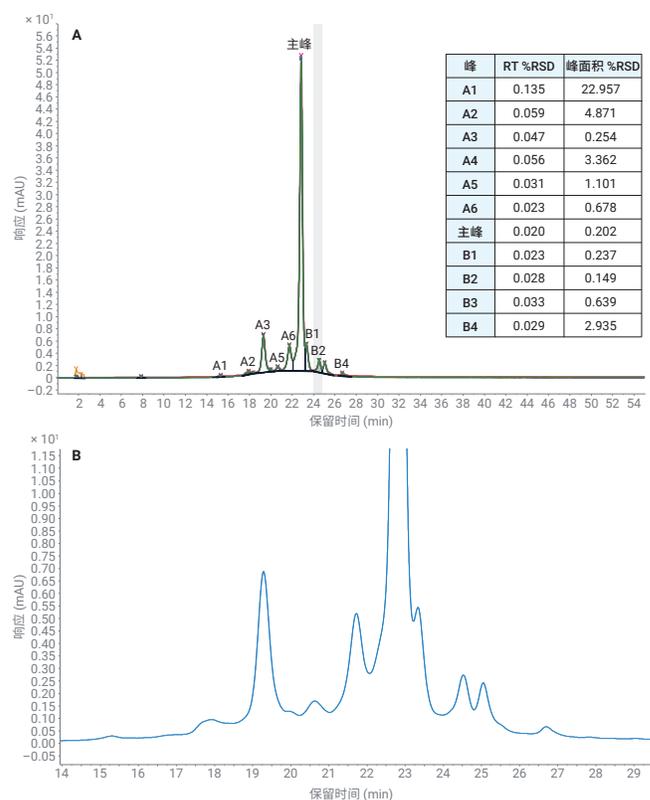


图 5. 采用 pH 8.3–10 的宽 pH 梯度七次连续运行曲妥珠单抗的叠加色谱图, 包括保留时间 (RT) 和峰面积精度表 (A), 以及单次进样的放大图 (B)

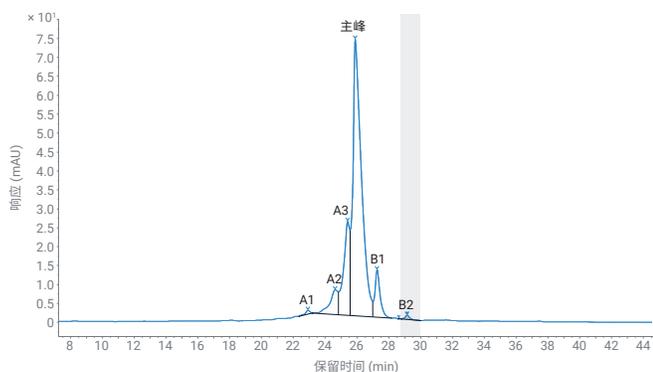


图 6. 使用根据 Farnan 和 Moreno^[1] 修改的 pH 梯度在 pH 8.9–10.5 下分离 NISTmAb

结论

研究表明，在分析单克隆抗体时，pH 梯度比盐梯度更具优势。即使是与平缓盐梯度相比，pH 梯度的表现也十分突出，一方面简化了方法开发，另一方面可生成高分离度色谱结果。盐梯度方法开发的潜力十分有限，梯度斜率的变化只会增加峰宽，而不会进一步改变分离度^[7]，而 pH 梯度则可提供进一步提高分离度并保持尖锐峰形的可能性。曲妥珠单抗和 NIST mAb 的分析证明了这一点，尤其是在使用基于 Farnan 和 Moreno 的宽范围 pH 梯度^[1]时。缓冲液顾问软件促进磷酸盐缓冲系统四种储备液的动态混合，消除了实验中耗时的手动缓冲液配制。此外，缓冲液顾问软件可以轻松计算宽范围 pH 梯度。因此，使用缓冲液顾问软件开发，并在配备全能泵和完全不含铁样品流路的 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统上运行的所有方法均提供了高度可靠且可重现的结果。

参考文献

1. Farnan, D.; Moreno, G.T. Multiproduct High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations by pH Gradient Ion-Exchange Chromatography. *Anal. Chem.* **2009**, *81*(21), 8846–8857
2. Liu, H. *et al.* Heterogeneity of Monoclonal Antibodies. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 2426–2447
3. Vlasak, J.; Ionescu, R. Heterogeneity of Monoclonal Antibodies Revealed by Charge-Sensitive Methods. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2008**, *9*, 468–481
4. Rea, J. *et al.* Validation of a pH Gradient-Based Ion-Exchange Chromatography Method for High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *54*, 317–323
5. Lingg, N. *et al.*, Highly Linear pH Gradients for Analyzing Monoclonal Antibody Charge Heterogeneity in the Alkaline Range: Validation of the Method Parameters. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1373*, 124–130
6. Turner, A.; Schiel, J. E. Qualification of NISTmAb Charge Heterogeneity Control Assays. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*(8), 2079–2093
7. Schneider, S., 您的分析可以采用多平缓的梯度？Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统助您改进 mAb 电荷异构体分析，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5994-2692ZHCN，**2020**

您的分析可以采用多平缓的梯度？

Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统助您改进 mAbs 电荷异构体分析

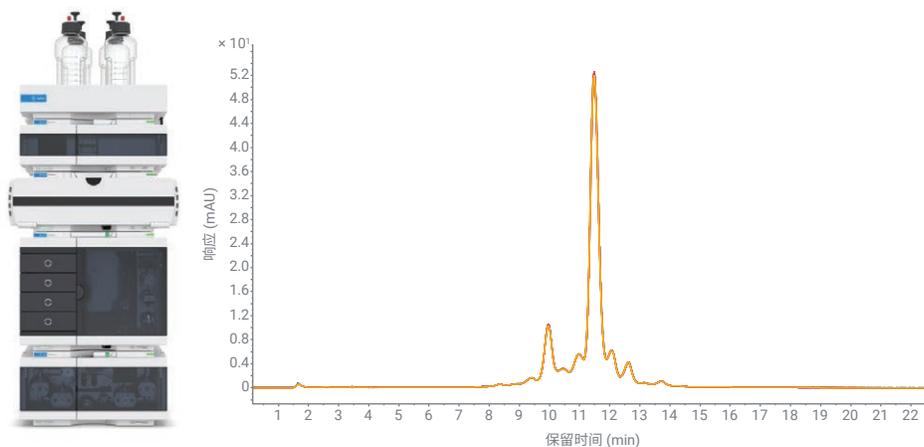
作者

Sonja Schneider
安捷伦科技有限公司

摘要

电荷异构体分析是一项对所用液相色谱系统有较高要求的应用，因为它需要使用腐蚀性的高浓度盐缓冲液和非常平缓的梯度来实现出色分离。使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统对不同的盐梯度进行评估，并分析分离度和重现性。

1290 Infinity II 生物液相色谱系统包括高速泵及其完全不含铁的路路，非常适合用于生物色谱条件，可避免对系统造成潜在的腐蚀性损坏。即使对于极具挑战性的平缓梯度也表现出出色的重现性，证实了 1290 Infinity II 生物液相色谱仪作为新一代安捷伦高端液相色谱系统，生成的数据具有高可信度。



前言

单克隆抗体 (mAbs) 是一种高度异质性大分子, 大小约为 150 kDa, 通常通过重组法生产。它们的生产要经历复杂的生物合成过程, 这一过程中可发生大量修饰, 从而产生数百种不同的异构体。脱酰胺化、氧化、二硫键、N-糖基化、N-末端和 C-末端加工是最常见的翻译后修饰 (PTMs)。所有这些修饰均可在合成过程中发生, 但生产和储存过程也会增加这些大分子的复杂性。PTMs 会形成复杂的异构体分布, 需要进行全面的分析和监测, 因为最终药品中的修饰可能与生物活性丧失、半衰期改变或免疫原性增加相关^[1]。某些 PTMs 会导致分子形成电荷异构体, 通常使用离子交换色谱 (IEX) 对这些异构体进行分析^[2]。电荷异构体是最重要的关键质量属性 (CQAs) 之一, 因此需要严格的验收标准和质量控制。确认产品正确生产并鉴别和定量任何杂质至关重要。

平缓梯度洗脱在蛋白质的 IEX 中非常常见。用于洗脱蛋白质的离子强度模式中的典型盐梯度约为 1–3 mmol/min, pH 值的允许误差为 ± 0.02 个 pH 单位^[3]。

1290 Infinity II 生物液相色谱系统配备高性能高速泵。与低压混合泵 (如四元泵) 相比, 二元泵的主要优势在于, 它能够更准确、更精密地混合小比例溶剂组分。这种准确混合能力可以在溶剂梯度开始和结束时提供高精度的溶剂组成^[4]。这是生成可重现且准确的平缓梯度 (每个通道低于 1%/min) 的基础。

1290 Infinity II 生物液相色谱是新一代安捷伦高端液相色谱系统, 专为生物色谱条件 (如 2 mol/L NaCl、高达 8 mol/L 尿素的高盐浓度, 以及如 0.5 mol/L NaOH 或 0.5 mol/L HCl 的高/低 pH 溶剂) 而设计。整个流路完全不含不锈钢 (SST) 或铁; 贯穿 Multisampler、高容量柱温箱和检测器的所有毛细管和接头均由 MP35N (一种镍钴合金) 制成。这种材料可以减少高浓度盐缓冲液的潜在腐蚀, 避免因铁离子存在引起的蛋白质修饰 (如氧化、蛋白质复合物形成)。

本应用简报介绍了对曲妥珠单抗和 NISTmAb 参比标样的电荷异构体的分析。研究中测试了不同的盐梯度斜率, 以便达到出色分离。然后评估了理想梯度斜率的重现性。

实验部分

设备

Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统, 包括以下模块:

- Agilent 1290 Infinity II 生物高速泵 (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A), 配备样品恒温箱 (选件 #101)
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B), 配备标准流速生物兼容性热交换器
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (G7114B), 配备生物兼容性微量流通池, 3 mm, 2 μ L

软件

Agilent OpenLab CDS 2.5 版

色谱柱

Agilent Bio MAb, NP5, 2.1 \times 250 mm, PEEK (部件号 5190-2411)

化学品

所有试剂纯度均为液相色谱级。新制超纯水来自配置 0.22 μ m 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA)。磷酸二氢钠一水合物、磷酸氢二钠七水合物、氯化钠、盐酸、氢氧化钠、三羟甲基甲胺、咪唑和哌嗪六水合物购自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)。

样品

- Agilent-NISTmAb (部件号 5191-5744)
- 人源化单克隆抗体曲妥珠单抗 (商品名为赫赛汀) 购自 Roche (Basel, Switzerland)
- 曲妥珠单抗溶于 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液中, pH 6.8

注: 由于 Adcetris 含有多种佐剂, 此处提及的浓度不只是蛋白质浓度, 而是药物所有组分的总浓度。

缓冲液配制

配制 2 L 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8): 称取 4.45 g 磷酸二氢钠一水合物和 7.44 g 磷酸氢二钠七水合物加入 2 L 棕色瓶中, 用超纯水定容至 2 L (缓冲液 A)。将 29.22 g 氯化钠 (总浓度 500 mmol/L) 加入 1 L 棕色空瓶中, 用配制好的磷酸盐缓冲液 A 定容至 1 L (缓冲液 B)。测量两种配制缓冲液的 pH 值, 如有需要, 将 pH 值调至 6.8 (加入大量盐会改变 pH 值)。配制的缓冲液均使用 0.2 μ m 滤膜过滤。

方法

表 1. 盐梯度色谱条件

参数	值
溶剂	A: 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 6.8, B: 30 mmol/L 磷酸盐, pH = 6.8, 500 mmol/L 氯化钠
梯度	30 min 内 0 或 25 mmol/L–150 mmol/L NaCl — 方法开发时使用不同的平缓梯度 30 min 内 0 mmol/L (曲妥珠单抗) 和 25 mmol/L (NIST)–100 mmol/L NaCl, 用于重现性研究 30 min 内 25–50 mmol/L NaCl, 用于重现性研究 (非常平缓的梯度) 31 min — 500 mmol/L NaCl 清洗 停止时间: 35 分钟 后运行时间: 15 分钟
流速	0.200 mL/min
温度	30 °C
检测	280 nm, 10 Hz
进样	进样量: 3 µL (曲妥珠单抗) 和 2 µL (NIST) 样品温度: 10 °C 进样针清洗: 用水清洗 3 秒

注: 使用高浓度盐溶液作为洗脱液时, 需要考虑在泵方法中设置相应溶剂类型。例如, 对于含 500 mmol/L 氯化钠的溶剂 B, 在泵方法的溶剂选择字段使用“氯化钠 0.5 mol/L”而非一般水相或水。高浓度盐可改变溶剂的压缩系数, 因此使用预先配置的溶剂表可以使泵达到理想性能。

结果与讨论

方法开发

为获得所需分离度并实现出色分离, 电荷异构体分析需要进行全面的方法开发。有两个参数是成功的关键: 理想 pH 值和理想梯度斜率。这两个因素都会对分离产生重大影响。首先, 建议进行 pH 筛选, 以找到用于实现分离的理想 pH。在之前的实验中, 使用 pH 6.4–7.4 的缓冲液进行分析, 发现两种样品 (曲妥珠单抗和 NISTmAb 参比标样) 在 pH 6.8 时均获得出色结果 (数据未展示)。下一步是确定理想的梯度斜率, 以实现有效的分离。

图 1 显示了不同梯度斜率下曲妥珠单抗电荷异构体分析的叠加色谱图，梯度斜率范围为 1% B/min (5 mmol/L/min) 至 0.33% B/min (1.66 mmol/L/min)。梯度越平缓，对泵性能的要求就越高。为在梯度洗脱过程中始终提供高精度的溶剂组成，需要泵能够准确、精密地混合小比例溶剂组分。但必须考虑到，非常平缓的梯度对盐梯度而言并不总能获得更高分离度，但总会增加峰宽（如图 1 中的 0.33% B/min）。因此，重现性研究选择的梯度斜率处于各测试梯度的中间，为 0.66% B/min 和 3.3 mmol/L/min，此处梯度仍较为平缓。

我们对 NISTmAb 参比标样的电荷异构体进行了类似的分离方法开发（见图 2）。与等电点 (pI) 约为 9 的曲妥珠单抗相比，由于 NIST 抗体的 pI 较高（约为 9.2），故 NIST 的起始条件含盐量略高。为了更有效地分离 NISTmAb 参比标样的电荷异构体，所用梯度较曲妥珠单抗略为平缓，最平缓的梯度为 0.17% B/min (0.83 mmol/L/min)，这对泵来说是一项挑战性任务。对于进一步的重现性研究，我们选择了 0.5% B/min (2.5 mmol/L/min) 的梯度斜率。

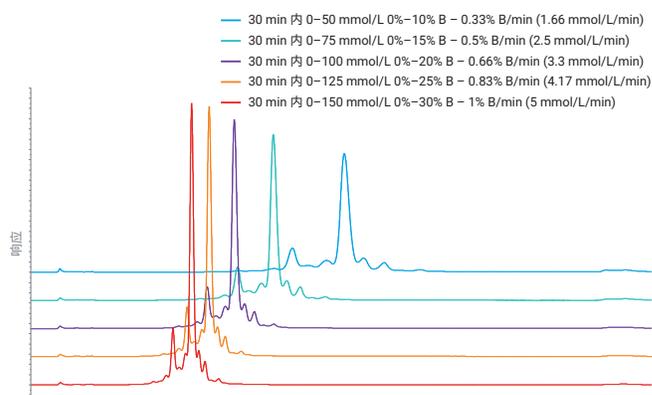


图 1. 不同盐梯度斜率下曲妥珠单抗分离的方法开发

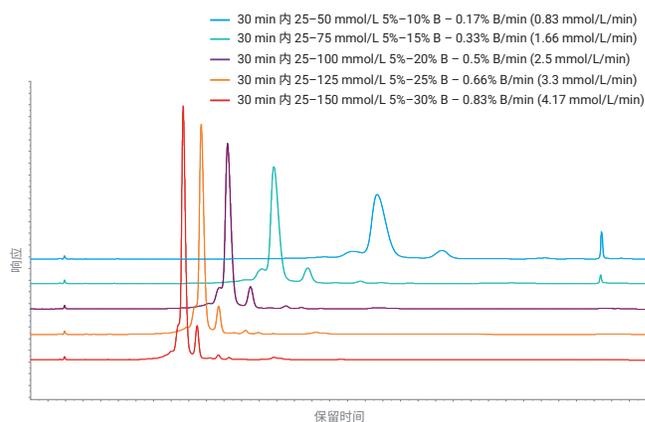
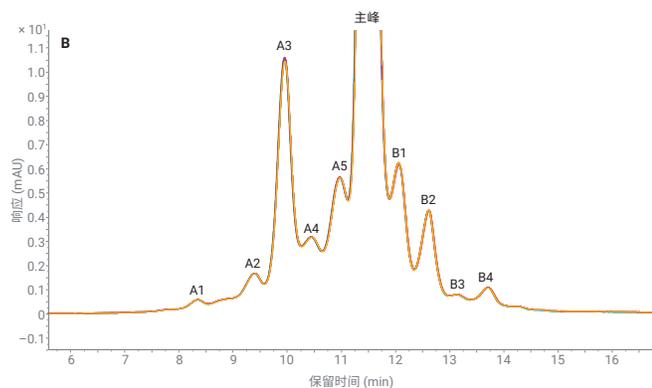
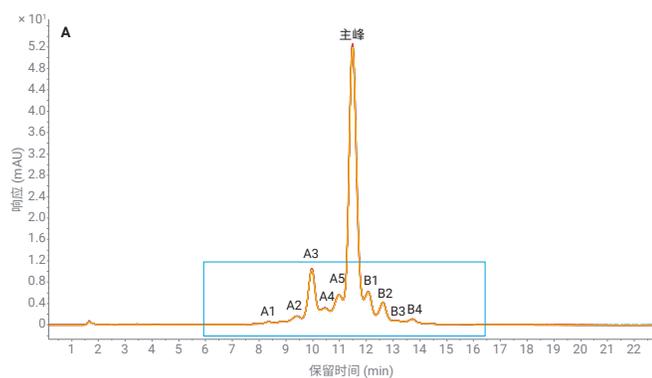


图 2. 不同盐梯度斜率下 NISTmAb 参比标样分离的方法开发

曲妥珠单抗电荷异构体分离的重现性

图 3 显示了曲妥珠单抗电荷异构体分离的重现性研究 (A)，梯度斜率为 0.66% B/min (3.3 mmol/L/min)。图 3B 显示了放大视图，以便更清晰地显示分离的异构体。标为 A 的异构体表示主峰前洗脱的酸性异构体，标为 B 的异构体表示主峰后洗脱的碱性异构体。主峰前有 5 种酸性异构体被洗脱，主峰后有 4 种碱性异构体被洗脱。对所有异构体和主峰的保留时间 (RT) 和峰面积的精度进行了评估。RT 和峰面积的精度均非常出色，RT 的相对标准偏差 (RSD) 低于 0.052%，除两个非常小的异构体峰 A1 和 B3 外，峰面积的 RSD 值均低于 0.82%。



RSD 精度	RT (%)	峰面积 (%)
A1	0.033	1.793
A2	0.016	0.701
A3	0.026	0.403
A4	0.023	0.813
A5	0.032	0.327
主峰	0.033	0.313
B1	0.038	0.329
B2	0.048	0.254
B3	0.046	3.549
B4	0.051	0.812

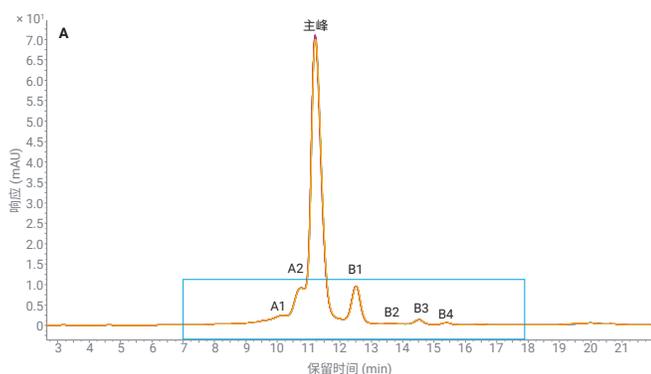
图 3. 曲妥珠单抗电荷异构体分离 7 次后续运行的重现性研究 (A)，梯度斜率为 0.66% B/min (3.3 mmol/L/min)。(B) 放大图

NISTmAb 电荷异构体分离的重现性

图 4 显示了 NISTmAb 参比标样电荷异构体分离的重现性研究 (A)，梯度斜率为 0.5% B/min (2.5 mmol/L/min)。

图 4B 显示了 2 个酸性异构体和 4 个碱性异构体的放大视图。再次对所有异构体和主峰的保留时间 (RT) 和峰面积的精度进行了评估。RT 和峰面积的精度均非常出色，RT 的 RSD 低于 0.06%，除一个非常小的异构体峰 B2 外，峰面积的 RSD 值均低于 0.55%。

如图 2 所示，与 0.5% B/min (2.5 mmol/L/min) 梯度（仍较为平缓 — 用于重现性研究）相比，最平缓的梯度 0.17% B/min (0.83 mmol/L/min) 并没有提供更好的分离度。



RSD 精度	RT (%)	峰面积 (%)
A1	0.058	0.540
A2	0.039	0.374
主峰	0.045	0.126
B1	0.042	0.141
B2	0.049	1.469
B3	0.033	0.354
B4	0.033	0.485

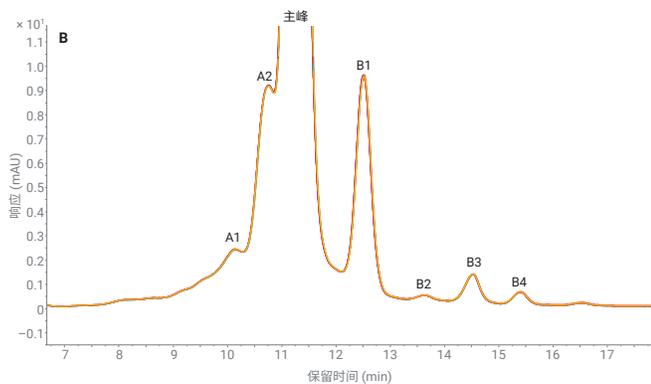
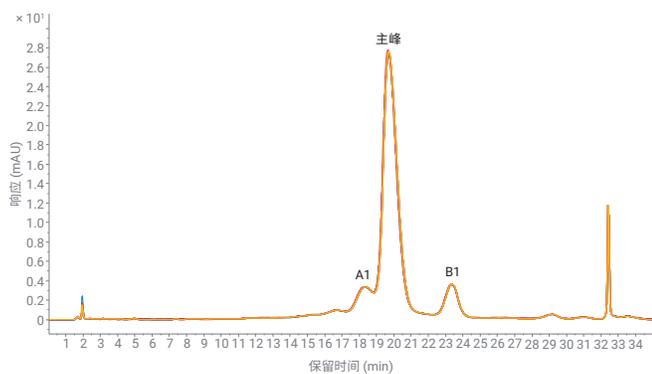


图 4. NISTmAb 参比标样电荷异构体分离 7 次后续运行的重现性研究 (A)，梯度斜率为 0.5% B/min (2.5 mmol/L/min)。 (B) 放大图

然而，1290 Infinity II 生物高速泵可应对具有挑战性的梯度斜率，如图 5 所示。在 7 次后续运行中，尽管峰宽在该梯度下有所增加，RT 的精度仍非常出色（RSD 低于 0.25%）。随着峰宽的增加，峰高减小，会对峰面积精度产生不利影响。



RSD 精度	RT (%)	峰面积 (%)
A1	0.238	6.608
主峰	0.102	1.95
B1	0.08	8.157

图 5. NISTmAb 参比标样电荷异构体分离 7 次后续运行的重现性研究，梯度斜率为 0.17% B/min (0.83 mmol/L/min)

结论

使用 1290 Infinity II 生物液相色谱系统评估了不同盐梯度斜率下分析曲妥珠单抗和 NISTmAb 电荷异构体的分离度和重现性。乍看之下,更平缓的梯度似乎能提高分离度。而对两种 mAbs 而言,评估的最平缓梯度并没有提供出色的分离度,随着斜率的减小,峰开始变宽,分离度并没有进一步提高。进一步评估了高分离度和尖锐峰形理想组合梯度的方法重现性。对于 3.3 mmol/L/min (曲妥珠单抗)和 2.5 mmol/L/min (NISTmAb)的梯度斜率,RT 和峰面积的重现性均非常出色。评估的所有峰的 RT RSD 均低于 0.06%。对使用最平缓梯度的 NISTmAb 分析进行了重现性评估,即使对于斜率为 0.83 mmol/L/min 的超平缓梯度,RT 的精度仍非常出色 (RSD 小于 0.25%)。这些数据表明,1290 Infinity II 生物液相色谱系统及其完全不含铁的流路非常适合在生物色谱条件下使用,可获得高度重现的结果。

参考文献

1. Dick Jr., L. W. *et al.* Identification and Measurement of Isoaspartic Acid Formation in the Complementarity Determining Region of a Fully Human Monoclonal Antibody. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877(30)*, 3841–3849
2. Zhang, L. *et al.* Improving pH Gradient Cation-Exchange Chromatography of Monoclonal Antibodies by Controlling Ionic Strength. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1272*, 56–64
3. Farnan, D.; Moreno, G. T. Multiproduct High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations by pH Gradient Ion-Exchange Chromatography. *Anal. Chem.* **2009**, *81(21)*, 8846–8857
4. 液相色谱手册:液相色谱柱与方法开发指南,安捷伦科技公司,出版号 5990-7595CHCN, **2016**
5. Goyon, A. *et al.* Determination of Isoelectric Points and Relative Charge Variants of 23 Therapeutic Monoclonal Antibodies. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2017**, *1065–1066*, 119–128
6. Xie, L. *et al.* Demonstrating Analytical Similarity of Trastuzumab Biosimilar HLX02 to Herceptin with a Panel of Sensitive and Orthogonal Methods Including a Novel FcγRIIIa Affinity Chromatography Technology. *BioDrugs* **2020**, *34(3)*, 363–379

利妥昔单抗创新药和生物仿制药的电荷异质性分析

作者

Suresh Babu C.V.

安捷伦科技印度私人有限公司，

班加罗尔，印度

摘要

本应用简报介绍了采用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱、生物色谱柱和 Agilent OpenLAB ChemStation 软件工具进行利妥昔单抗创新药和生物仿制药的电荷异构体高分离度分离。Agilent Bio MAb, 4.6 × 250 mm, 5 μm PEEK 离子交换色谱柱填充的是专为单克隆抗体 (mAb) 基于电荷的分离而设计的特殊树脂颗粒。优化的盐梯度显示了利妥昔单抗创新药和生物仿制药之间酸性和碱性电荷异构体谱图之间的差异。电荷异构体保留时间、峰高和峰面积的精度均在可接受的范围内。通过羧肽酶 B (CPB) 进行 C 端消化，显示出利妥昔单抗生物仿制药中的主要赖氨酸变体峰。

前言

最近，生物仿制药产品在生物制药中日益普及。mAb 可经历各种翻译后修饰 (PTM)，包括赖氨酸截短、脱酰胺基化、氧化、糖基化等，从而使其生物化学和生物物理学性质异质化。由于这些修饰，电荷异构体可影响 mAb 作为生物治疗药物的治疗效果、活性和稳定性。因此，在药物开发中对电荷异质性进行表征非常重要，这会成为生物制药行业中的质量控制 (QC) 步骤。此外，必须使用精确的生物分析方法才能证明生物仿制药与创新药之间的相似性。

阳离子交换色谱 (CEX) 是电荷敏感抗体分析的金标准。在 CEX 中，通常需要针对每种蛋白质优化方法参数，因为离子交换取决于带电荷的蛋白质分子对固定离子交换基团的可逆吸附。本应用简报介绍了采用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱和 Agilent Bio MAb NP5, 4.6 × 250 mm, PEEK 色谱柱分离利妥昔单抗创新药和生物仿制药电荷异构体的盐梯度方法。该方法比较了利妥昔单抗创新药和生物仿制药的 CEX 谱图，确定了酸性、碱性和主要形式的保留时间、高度、面积和量化的精度。进行羧肽酶 B (CPB) 消化以研究 C 端赖氨酸变体的贡献。

实验部分

仪器

实验采用最高操作压力达 600 bar 的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱仪。在整个样品流路中没有任何金属组件，因此样品不会接触到金属表面。溶剂输送管路中没有任何不锈钢或铁质组件。

系统

- Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱泵 (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 生物惰性高性能自动进样器(G5667A)
- Agilent 1200 Infinity 系列恒温箱 (G1330B)
- 包含生物惰性溶剂加热元件的 Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (TCC) (G1316C 选项 19)
- 配备 10 mm 生物惰性标准流通池的 Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 (G1315D)
- Agilent Bio mAb NP5, 4.6 × 250 mm, PEEK (部件号 5190-2407)

软件

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，修订版 C.01.062
安捷伦缓冲液顾问软件，修订版 A.01.01

表 1. IEX 色谱使用的色谱参数

参数	条件				
流动相 A	水				
流动相 B	NaCl (850.0 mmol/L)				
流动相 C	NaH ₂ PO ₄ (41.0 mmol/L)				
流动相 D	Na ₂ HPO ₄ (55.0 mmol/L)				
梯度	时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)	流动相 C (%)	流动相 D (%)
	0	30.3	0	59.6	10.1
	2	26.0	5.0	56.9	12.1
	8	21.5	10.0	54.9	13.6
	20	13.3	19.0	51.9	15.8
	21	30.3	0	59.6	10.1
进样量	5 µL				
流速	0.75 mL/min				
数据采集	280 nm/4 nm, 参比: 360 nm/100 nm				
采集速率	5 Hz				
TCC	室温				
样品恒温箱	5 °C				
后运行时间	10 分钟				

试剂、样品与步骤

利妥昔单抗创新药与生物仿制药购自当地药店并根据制造商的使用说明进行储存。磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠、盐酸 (HCl) 和氢氧化钠均购自 Sigma-Aldrich。所有化学品和溶剂均为 HPLC 级，高纯水使用 Milli Q 水纯化系统 (Millipore Elix 10 型, 美国) 制备。羧肽酶 B (C9584) 购自 Sigma-Aldrich。

离子交换色谱参数

表 1 展示了使用 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱进行离子交换色谱分析时采用的色谱参数。将利妥昔单抗 (创新药和生物仿制药) 在水中稀释至 1 mg/mL, 使用 280 nm 波长监测洗脱。利用保留时间 (RT)、峰面积和峰面积百分比计算标准偏差 (SD) 和相对标准偏差 (RSD%) 值。利用相对峰面积百分比对 mAb 的电荷异构体进行定量。

羧肽酶 B 消化

将利妥昔单抗生物仿制药和创新药用 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 稀释至 1 mg/mL, 向其中加入 0.25 单位的 CPB 并在 37 °C 下孵育。分析前, 在不同时间点将反应混合物等分并用乙酸淬灭。

结果与讨论

安捷伦缓冲液顾问软件是为蛋白质电荷异构体分离生成 pH 或离子强度梯度的理想工具。它可以缩短方法开发所需的时间。为实现理想的 mAb 电荷异构体分离, 本研究使用缓冲液顾问软件进行了一系列方法开发筛选运行。图 1 所示为使用 Bio MAb PEEK 色谱柱分析利妥昔单抗创新药和生物仿制药的电荷异构体图谱, 显示在 20 分钟内实现了电荷异构体的高分离度分离, 其中生物仿制药有三个不同的峰 (缓冲液: 30 mmol/L, pH: 6.3, NaCl: 0-161.5 mmol/L)。Agilent Bio MAb 色谱柱含有致密填充的弱阳离子交换树脂。早洗脱和晚洗脱峰分别称为酸性异构体和碱性异构体。11.4 分钟处的峰记为主峰。利妥昔单抗创新药与生物仿制药五次重复进样的叠加色谱图表明结果具有出色的分离重现性 (图 2)。主峰的平均 RT 和面积 RSD 如图所示。RSD 在可接受的范围内, 证明系统精度较高。

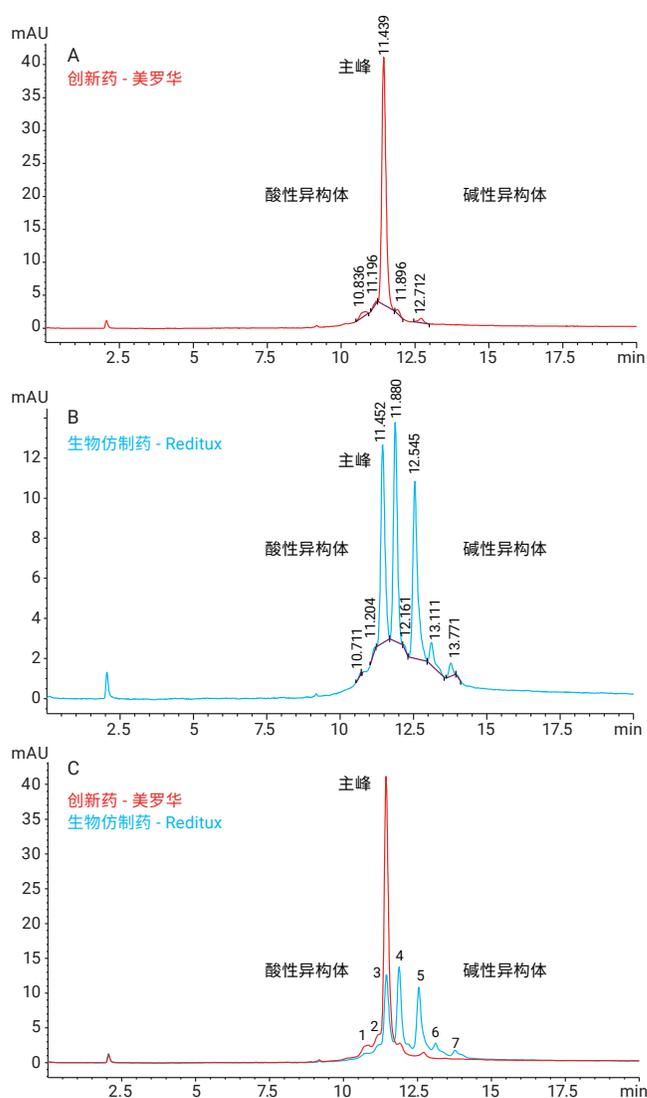


图 1. 使用 Agilent Bio MAb 5 μm 色谱柱获得的利妥昔单抗创新药 (A) 和生物仿制药 (B) 的电荷异构体谱图。C) 利妥昔单抗创新药与生物仿制药的叠加谱图。峰 1 和 2: 酸性异构体; 3: 主要形式; 4、5、6、7: 碱性异构体。

mAb 的高分离度分离有助于使用峰面积对电荷异构体进行定量。表 2 所列为五次连续分析中电荷异构体的面积百分比。两种 mAb 的电荷异构体面积百分比存在显著差异。在利妥昔单抗生物仿制药中，利妥昔单抗的主要形式为 93.21% 和 29.78%。与创新药 (3.22%) 相比，利妥昔单抗生物仿制药的主要电荷异构体为 69.46% 碱性异构体。

表 2. 根据峰面积百分比对电荷异构体进行定量分析, n = 5

创新药 - 美罗华		RT (min)	峰面积 %
酸性异构体		10.84、11.21	3.56
主峰		11.44	93.21
碱性异构体		11.9、12.7	3.22
生物仿制药 - 美罗华		RT (min)	峰面积 %
酸性异构体		10.73、11.22	0.76
主峰		11.45	29.78
碱性异构体		11.87、12.15、 12.59、13.1 和 13.77	69.46

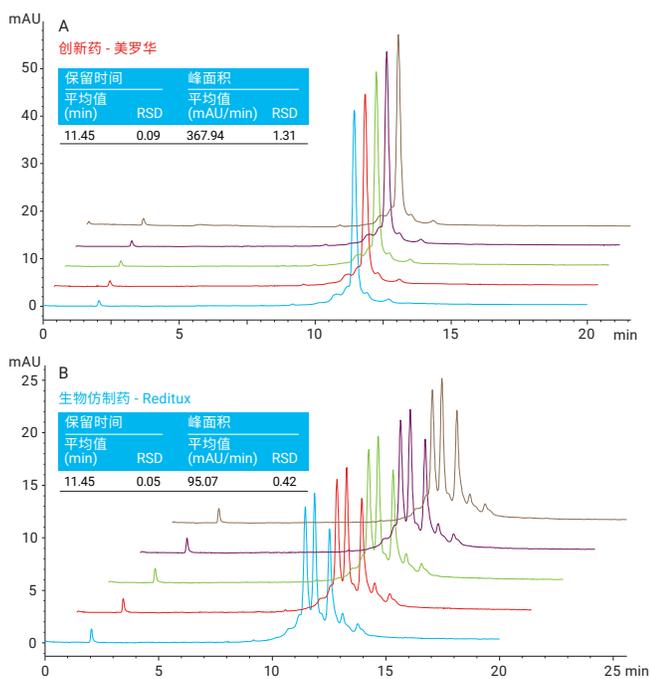


图 2. 采用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统和 Agilent Bio Mab, 4.6 × 250 mm, 5 μm, PEEK 色谱柱五次重复进样分离利妥昔单抗创新药 (A) 和生物仿制药 (B) 的重叠谱图。插入表所示为保留时间和峰面积的精度, n = 5

为了进一步表征碱性异构体 mAU 峰, 使用羧肽酶 B 消化两种 mAb。图 3A 和 3B 分别显示了利妥昔单抗创新药和生物仿制药 C 端裂解之前和之后的 IEX 叠加谱图 50。经羧肽酶 B 处理后碱性异构体峰消失, 证实这些峰对应于赖氨酸 20 变体。图 4 所示为经 CPB 处理的利妥昔单抗生物仿制药与未经 CPB 处理的利妥昔单抗创新药的 IEX 叠加谱图, 0 表示两种 mAb 的电荷异构体存在相似性。

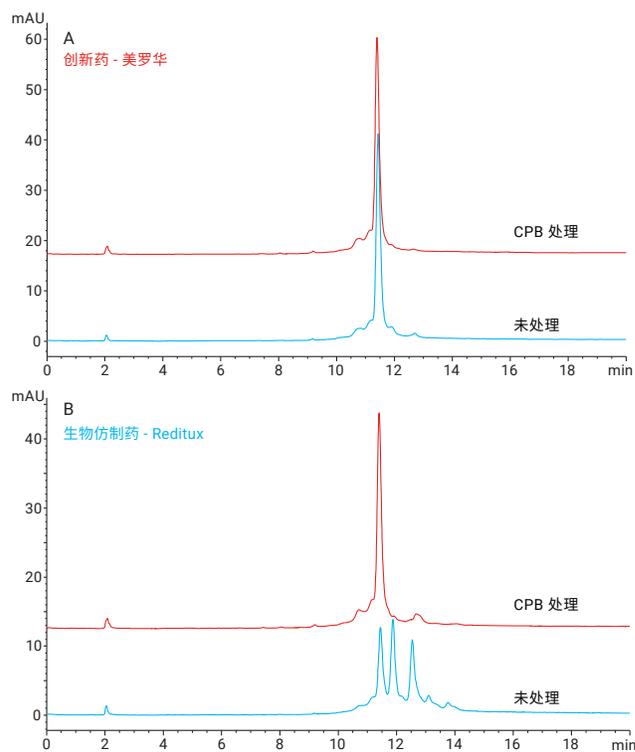


图 3. 碱性电荷变异体表征。采用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统和 Agilent Bio Mab, 4.6 × 250 mm, 5 μm, PEEK 色谱柱分离经 CPB 处理 (过夜) 和未经处理的利妥昔单抗创新药 (A) 和生物仿制药 (B)

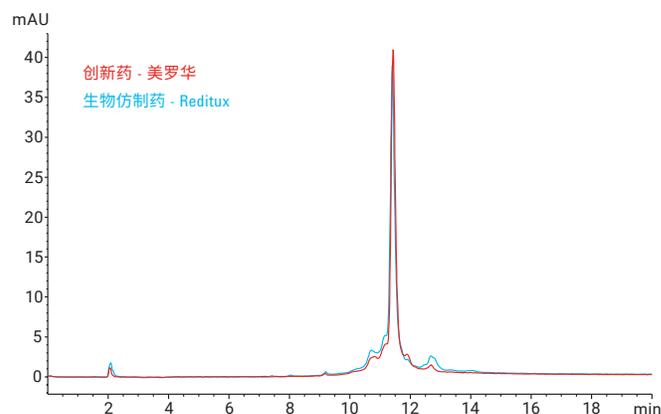


图 4. 未经 CPB 处理 (红色) 的利妥昔单抗创新药和经 CPB 处理的利妥昔单抗生物仿制药 (蓝色) 的叠加谱图

结论

本应用简报介绍的盐梯度方法展示了使用 Agilent Bio MAb, 4.6 × 250 mm, 5 μm PEEK 色谱柱对 mAb 电荷异构体谱图进行高分离度分离。利妥昔单抗创新药和生物仿制药具有不同的分离谱, 酸性和碱性异构体的含量不同。羧肽酶 B 消化证实, 生物仿制药中的主要碱性异构体对应于赖氨酸变体。该解决方案将 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱、Bio MAb PEEK 色谱柱与重现性良好的方法结合, 特别适用于生物制药行业中 mAb 的 QA/QC 分析。

参考文献

Yan, He; et al. J. Sep. Sci. **2011**, 34, 548–555

安捷伦出版号 5991-0895CHCN

安捷伦出版号 5990-6844CHCN

安捷伦出版号 5991-0565CHCN

采用安捷伦弱阳离子交换柱进行更快 分离

作者

Andrew Coffey
安捷伦科技有限公司

摘要

离子交换色谱是分离复杂蛋白质混合物的常用方法。传统上，使用增加盐浓度的平缓梯度和可提供必要分离度的长柱长进行这种分离。通常使用大直径颗粒填充色谱柱，以尽可能减小反压。本应用简报展示了如何通过利用小粒径非多孔离子交换吸附剂的优势，在不影响分析性能的前提下显著缩短分析时间并提高通量。

前言

蛋白质、多肽和寡核苷酸是表面上带有多个电荷的复杂分子，因此通常采用离子交换色谱法分析这些物质。该技术非常适合用于分离带电的生物分子，因为它使用非变性条件，并且具有良好的性能和分离度。

传统上，这意味着使用高度多孔的颗粒填料，以便这类大分子能够穿透。此外，通常使用填充有 5 μm 或 10 μm 颗粒填料，长度为 15 cm 或 25 cm 的色谱柱。

安捷伦的 Bio IEX 系列等非多孔吸附剂由刚性聚合物核颗粒及其结合的包含离子交换官能团的亲水层组成，它们的出现提高了分离度。这是因为消除了由于分子渗透进入大颗粒核心导致的扩散限制谱带展宽。继而，这意味着可以使用更小的颗粒和更短的色谱柱长度来显著提高通量，从而大大缩短分析时间。馏分分析等任务效率提升的好处非常明显。

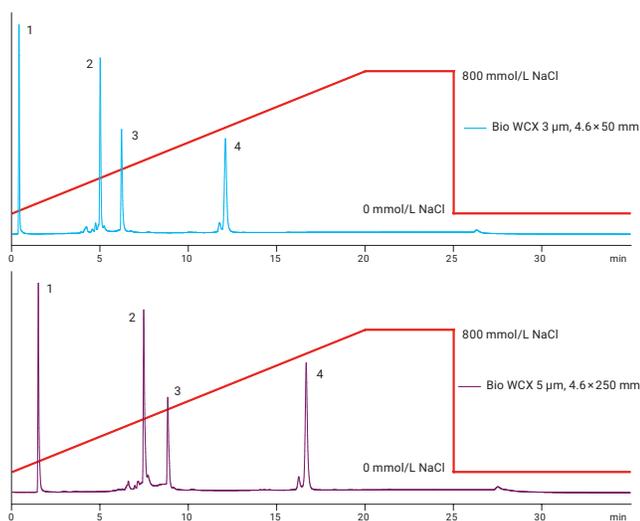


图 1. 使用 Agilent Bio WCX 5 μm 4.6 \times 250 mm 色谱柱和 Agilent Bio WCX 3 μm 4.6 \times 50 mm 色谱柱分离蛋白质的色谱图对比 (流速 1.0 mL/min)

材料与方法

Agilent Bio IEX 色谱柱填充的刚性聚合物非多孔颗粒结合有带官能团的亲水聚合物层。由此得到的 1.7、3 和 5 μm 刚性颗粒能够减少由全多孔颗粒的扩散限制引起的谱带展宽效应，从而提供高分离度和高分离效率。化学键合的亲水涂层可以显著降低非特异性结合的影响，提高回收率。

Bio-Monolith 色谱柱条件

参数	值
色谱柱:	Agilent Bio WCX 5 μm , 4.6 \times 250 mm SS (部件号 5190-2445) Agilent Bio WCX 3 μm , 4.6 \times 50 mm SS (部件号 5190-2443) Agilent Bio WCX 1.7 μm , 4.6 \times 50 mm SS (部件号 5190-2441)
样品:	卵清蛋白 (1), 核糖核酸酶 A (2), 细胞色素 c (3), 溶菌酶 (4)
仪器:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱
流动相:	A: 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 6.5 B: A + 1.6 mol/L NaCl
梯度:	0%–50% B
温度:	室温
进样量:	10 μL
浓度:	0.5 mg/mL
检测:	UV, 220 nm

结果与讨论

由塔板数衡量的色谱柱性能取决于粒径和柱长。由此可以推断，与填充较大颗粒的较长色谱柱相比，填充较小颗粒的较短色谱柱可实现相同的性能水平（图 1）。这在实践中很常见。然而，对于梯度洗脱，该方法还需要进一步改进，才能提供缩短运行时间和提高分析效率的更多优势。

计算较短梯度程序时，将梯度时间转换为色谱柱体积是一种有用的方法，可以在提高分离速度方面达到理想效果（表 1）。然而，较小的粒径可能需要较高的流速才能大幅提高性能。这可以通过图 2 所示的 van Deemter 曲线来说明。

为了尽可能提高使用 Agilent Bio WCX 3 μm , 4.6 \times 50 mm 色谱柱的分离效率，以 1.0 mL/min、1.5 mL/min、2.0 mL/min、2.5 mL/min 的流速进行 4 分钟梯度分离（图 3）。与预期结果相同，较高流速带来的较高线速度改善了峰形。

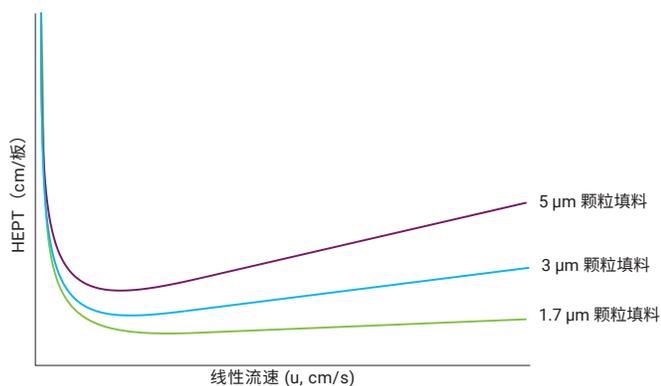


图 2. 典型的 van Deemter 曲线

表 1. 梯度时间到色谱柱体积的转换

时间 (分钟)	mmol/L NaCl	#CV
0	0	0.0
20	800	4.8
25	800	6.0
25.01	0	6.0
35	0	8.4

#CV = 1.0 mL/min 下得色谱柱体积数 (4.6 \AA ~ 250 mm 色谱柱)

时间 (分钟)	mmol/L NaCl	#CV
0	0	0.0
4	800	4.8
5	800	6.0
5.01	0	6.0
7	0	8.4

#CV = 1.0 mL/min 下得色谱柱体积数 (4.6 \AA ~ 50 mm 色谱柱)

相比之下，Agilent Bio WCX 1.7 μm , 4.6 \times 50 mm 色谱柱在相同条件下的峰形更为尖锐（图 4）。

提高流速应当意味着可以进一步缩短梯度时间。使用 Bio WCX 1.7 μm , 4.6 \times 50 mm 色谱柱对此进行研究。0 到 800 mmol/L NaCl 梯度运行时间由 4 分钟缩短至 2 分钟。

结果发现，在 1.7 mL/min 的流速下，反压仍然低于 400 bar，峰形和分离度也依旧出色（图 5）。

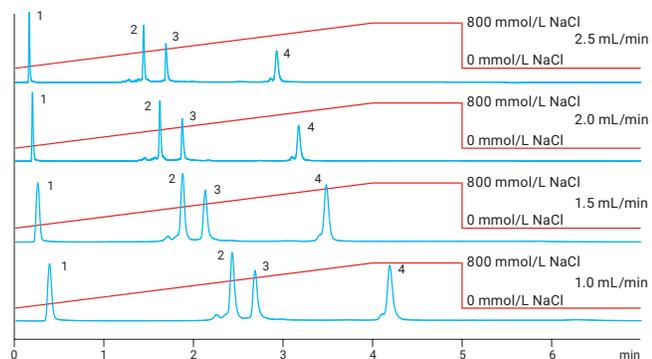


图 3. 流速对色谱性能的影响 (Agilent Bio WCX 3 μm , 4.6 \times 50 mm)

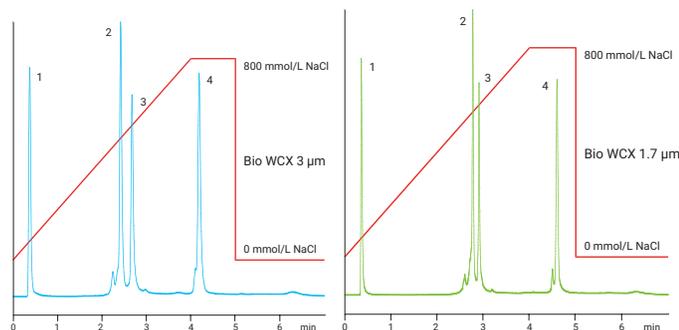


图 4. Agilent Bio WCX 3 μm , 4.6 \times 50 mm 和 Agilent Bio WCX 1.7 μm 色谱柱的对比

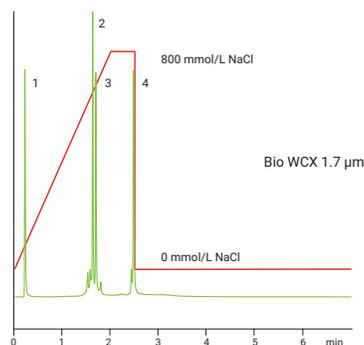


图 5. 使用 Agilent Bio WCX 1.7 μm , 4.6 \times 50 mm 色谱柱在 3 分钟内分离蛋白质（流速 1.7 mL/min）

结论

我们已经证明，通过使用填充较小粒径（3 μm 和 1.7 μm ）的较短的 5 cm 色谱柱，Agilent Bio WCX 产品能够将运行时间从 20 分钟或 30 分钟大幅缩短至不到 3 分钟，同时仍然保持出色的峰分离度。在注重时间的应用中，这可以实现更高的通量。

反压为 400 bar，说明将整个梯度的分析时间从 30 分钟以上大幅缩短至 4 分钟以内时，像 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱仪这样的 600 bar 系统仍然适用。

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

使用安捷伦缓冲液顾问软件优化阳离子交换色谱法中的蛋白质分离

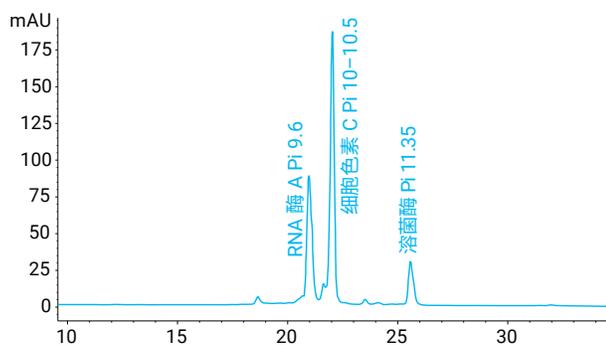
采用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统进行蛋白质分离

作者

Sonja Schneider
Jochen Strassner
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本应用简报表明，将安捷伦缓冲液顾问软件与 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统联用，是利用离子强度梯度进行自动化蛋白质分离的理想解决方案。通常，利用预先混合的二元梯度进行 pH 筛选既浪费时间又增加了工作强度。而使用由缓冲液顾问软件计算得到的动态混合四元梯度时，可以缩短并简化 pH 筛选过程。此外，使用缓冲液顾问软件计算得到的梯度还可获得卓越的保留时间精度和 pH 一致性。



前言

蛋白质由多种不同的氨基酸组成，其中含有弱酸性（羧基）和碱性（氨基）基团。因此，蛋白质是种两性分子，在特定 pH 值范围内大多以两性离子形式存在。在某一 pH 值下，蛋白质所带静电荷为零，且不与任何带电介质相互作用，此时的 pH 值即为等电点 (pI)。在离子交换色谱 (IEX) 中，可利用蛋白质表面净电荷和 pH 值间的独特关系实现更出色的蛋白质分离。在分析过程中，pH 值将确定蛋白质所带的电荷数，并有助于缓冲液中的蛋白质保持其自然结构。

为了确保目标蛋白质与 IEX 色谱柱更好的结合及洗脱特性，所用缓冲液的 pH 值和离子强度是非常重要的因素。即使这两个参数出现很小的变化也会影响分离效果。因此，当使用离子强度梯度时，pH 筛选是一种寻找最优分离条件的重要方法。与 pH 梯度相反的是，离子强度梯度的 pH 值将保持恒定。通过增加流动相的离子强度（盐浓度），弱结合能力的蛋白质先于强结合能力的蛋白质被洗脱出来。

一般来说，用于分析的预混合二元梯度包括弱离子强度的起始缓冲液和强离子强度的洗脱缓冲液。这包括下列准备步骤：

- 溶解适量缓冲液化合物至指定的浓度
- 利用酸/碱滴定调节流动相的 pH 值
- 分装缓冲液，并向其中一份缓冲液中加入盐（洗脱缓冲液）
- 必要时利用酸/碱滴定调节洗脱缓冲液的 pH 值

要利用预先混合的二元梯度进行 pH 筛选，应准备多瓶缓冲液。例如，为了测试 6 种不同的 pH 值，需要准备 12 瓶预先混合的缓冲液。相反，如果使用动态混合的四元梯度，只需准备 4 瓶缓冲液即可获得多种 pH 值。此外动态混合缓冲液可免除人工滴定缓冲液溶液的步骤，该步骤通常很耗时且容易引入误差。应用动态混合的四元梯度可简化方法开发过程，并且由于只需提供四瓶储备溶液，可大大缩短缓冲液前处理时间：

- 管路 A：水
- 管路 B：盐溶液
- 管路 C：酸性缓冲组分
- 管路 D：碱性缓冲组分

通过使用这四种储备溶液，可前处理不同 pH 值和盐浓度的不同缓冲液。缓冲液顾问软件可帮助您计算储备溶液的百分比，以获得所需的 pH 值、缓冲液浓度和离子强度（图 1）。

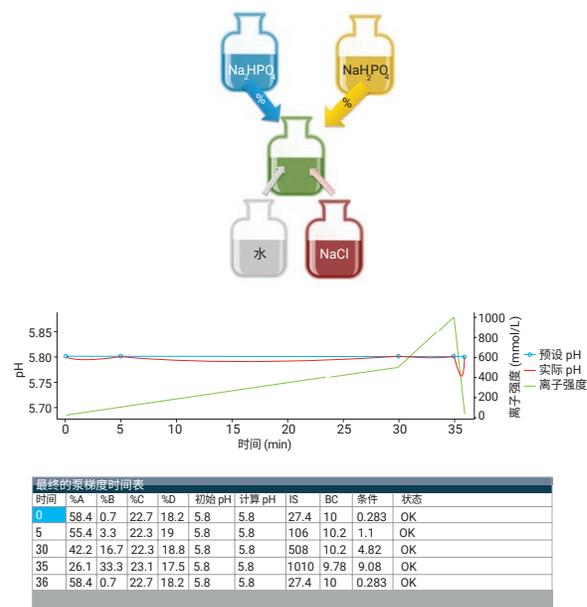


图 1. 四元混合以产生具有恒定 pH 值的盐梯度

缓冲液顾问软件将生成一个时间表，可通过 Agilent OpenLAB CDS ChemStation 软件中的导入溶剂混合文件功能导入到 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱泵方法中（图 2）。

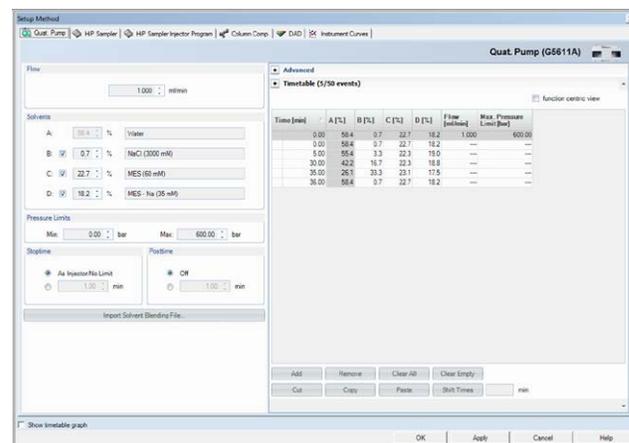


图 2. 生成的时间表可由 Agilent OpenLAB CDS ChemStation 软件导入 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统的方法中

缓冲液顾问软件可应用于阴离子或阳离子交换色谱法中的离子强度或 pH 梯度控制。该软件可为单缓冲液（离子强度梯度）或复合缓冲液（pH 梯度）应用提供多种可供选择的缓冲液。用户可根据目标蛋白质和所使用的色谱柱为阴离子或阳离子交换选择缓冲液（图 3）。为了确保更出色的缓冲容量，列出了缓冲液应使用的推荐 pH 范围和浓度。

在使用离子强度梯度的离子交换色谱法中，一个常见的问题是加入中性盐（例如 NaCl）会导致 pH 值降低^[1,2]。缓冲液顾问软件将考虑酸性和碱性缓冲液的浓度以维持所需的恒定 pH 值，之后重新计算整体流动相成分以解决这个问题。此外，如果 pH 偏移过大，缓冲液顾问软件会在泵时间表中自动插入额外的时间点。

1. Select Buffer & Gradient Mode		2. Define Gradient Table				3. Compose Stock Solution	
New	Open...	Time	Salt	pH	Buffer		
Single Buffer (pH / Salt Gradient)	Composite Buffer (Wide Range pH Gradient)	0	20	5.8	20	A: Water	
Cation Exchange	Anion Exchange	5	100	5.8	20	B: NaCl	
		30	500	5.8	20	C: MES	
		35	1000	5.8	20	D: MES - Na	
		36	20	5.8	20		
MES/Na (MES+MES/Na)		pH 2.9-3.7, 3.7-6.2		7.5-15 mM			
Sodium Citrate (Citric + NaOH)		pH 3.2-4.4		7.5-125 mM			
Formic/Na (acid + Na salt)		pH 3.2-4.5		10-50 mM			
Lactic/Na (acid + Na salt)		pH 3.4-4.7		7.5-125 mM			
Lactic/Na (acid + NaOH)		pH 3.9-5.4		7.5-50 mM			
Acetic/Na (Acetic+Acetate/Na)		pH 4.1-5.6		7.5-125 mM			
Acetic/Na (Acetic+NaOH)		pH 5.6-5.6		7.5-125 mM			
Succinic/Na (acid + Na salt)		pH 3.9-6.3		10-20 mM			
Succinic/Na (acid + NaOH)		pH 2.9-5.5		7.5-25 mM			
Malonic/Na (acid + Na salt)		pH 2.9-5.5		7.5-25 mM			
Malonic/Na (acid + NaOH)		pH 5.5-7.3		7.5-40 mM			
MES/Na (MES+NaOH)		pH 2.6-3.5, 5.0-6.2		7.5-125 mM			
Maleic/Na (acid + Na salt)		pH 2.6-3.6, 4.9-6.7		10-20 mM			
Maleic/Na (acid + NaOH)		pH 6.1-7.7		7.5-40 mM			
ACES/Na (acid + NaOH)		pH 6.2-8.1		7.5-125 mM			
MOPS/Na (acid + Na salt)		pH 6.5-8.3		7.5-40 mM			
MOPS/Na (acid + NaOH)		pH 6.6-8.5		7.5-125 mM			
HEPES/Na (HEPES + salt)		pH 6.9-8.7		7.5-40 mM			
HEPES/Na (HEPES + NaOH)		pH 7.3-9.1		7.5-125 mM			
BICINE/Na (BICINE + Na salt)		pH 7.6-9.3		7.5-50 mM			
BICINE/Na (BICINE + NaOH)		pH 7.6-9.4		7.5-125 mM			
TAPS (acid + Na salt)		pH 7.9-9.9		7.5-40 mM			
TAPS (acid + NaOH)		pH 8.1-8.9		7.5-125 mM			
Sodium borate (H3BO3 + Tetraborate)		pH 9.4-10.6		7.5-70 mM			
Sodium borate (Tetraborate+NaOH)		pH 8.4-9.5		7.5-50 mM			
Sodium borate (H3BO3 + NaOH)		pH 9.3-10.2		7.5-125 mM			
Sodium borate (Na2CO3+Na2CO3)							

图 3. 用于阳离子交换色谱的缓冲液列表，根据推荐的 pH 值范围排序

实验部分

仪器

Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统，包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元泵 (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 高效生物惰性自动进样器 (G5667A)
- Agilent 1290 Infinity 恒温箱 (G1330B)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)，配备生物惰性溶剂热交换器
- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 VL (G1315D，配置生物惰性标准流通池，10 mm)
- Agilent 1260 Infinity 生物惰性分析型馏分收集器 (G5664A)

色谱柱

- Agilent Bio MAb 色谱柱，PEEK，4.6 × 250 mm，5 μm

软件

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，适用于 LC 和 LC/MS 系统，修订版 C.01.03 [32]
- 安捷伦缓冲液顾问软件，修订版 A.01.01

溶剂

缓冲液 A: H₂O

缓冲液 B: NaCl 3 mol/L

缓冲液 C: MES (2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物) 60 mmol/L

缓冲液 D: MES-Na (2-(N-吗啉)乙磺酸钠盐) 35 mmol/L

样品

三种蛋白质混合物，溶于 PBS (磷酸盐缓冲液)，pH 7.4

核糖核酸酶 A: 13700 Da pI 9.6

细胞色素 C: 12384 Da pI 10-10.5

溶菌酶: 14307 Da pI 11.35

所有溶剂均为液相色谱级。新制超纯水产自配置 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。MES (2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物) 及 MES-Na (2-(N-吗啉)乙磺酸钠盐) 购自 Merck (Darmstadt, Germany)。NaCl 购自 VWR (Radnor, PA, USA)。

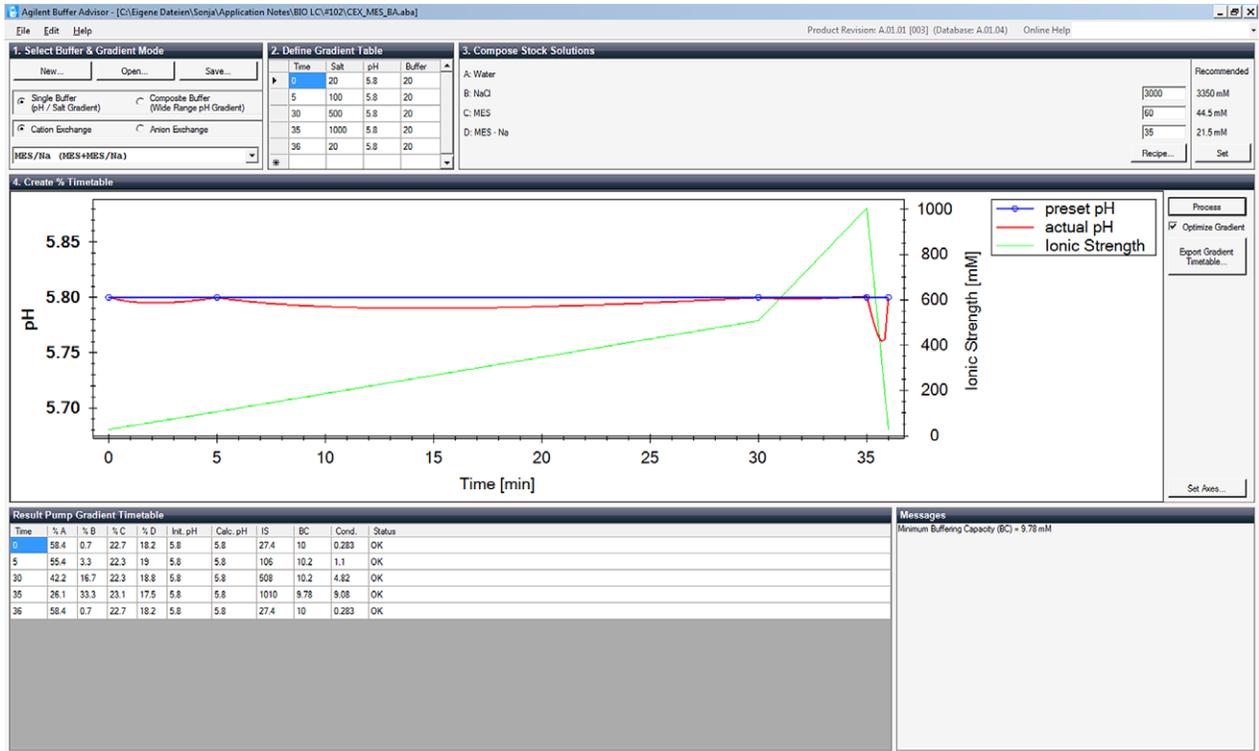


图 4. 安捷伦缓冲液顾问软件，显示了“结果与讨论”中所描述的步骤

条件

参数	值
流速:	1 mL/min
梯度:	0 min – 20 mmol/L NaCl 5 min – 20 mmol/L NaCl 30 min – 500 mmol/L NaCl 35 min – 1000 mmol/L NaCl 36 min – 20 mmol/L NaCl
进样量:	10 µL
恒温箱:	4 °C
TCC 温度:	25 °C
DAD:	280 nm/4 nm
参比:	关闭
峰宽:	> 0.05 min (1.0 s 响应时间) (5 Hz)

Stock Solution Recipes	
Bottle B	NaCl: Sodium chloride Weight 175.32 g and fill up to 1 L.
Bottle C	MES: MES Weight 11.714 g and fill up to 1 L.
Bottle D	MES - Na: MES sodium salt Weight 7.6027 g and fill up to 1 L.

图 5. 储备溶液配方

结果与讨论

使用安捷伦缓冲液顾问软件对 pH 值 5.8 至 6.8 之间的计算结果进行 pH 筛选。在四元盐梯度的 6 种不同 pH 值下进行三种蛋白质混合物（核糖核酸酶 A、细胞色素 C 及溶菌酶）的分离。动态混合的四元梯度由软件的计算结果生成。缓冲液顾问软件通过计算指定时间点下流动相中每种储备溶液的百分比，可简化不同四元梯度的生成过程（图 4）。

1. 在确定梯度参数后，例如时间，最大盐浓度，pH 值，以及缓冲液浓度
2. 缓冲液顾问软件将计算所需的储备溶液浓度。按下 Recipe 按钮后，软件将显示前处理储备溶液所需化学品的精确质量（图 5）。用户可调整这些建议的储备溶液浓度
3. 选择 Process 选项卡
4. 缓冲液顾问软件将计算每个通道所需的量以便在整个色谱方法运行过程中维持正确的 pH 值。此外，它还将计算所输入的 pH 值，盐浓度和缓冲液浓度是否适合所选的缓冲液体系。时间表中还列有其他数据，例如流动相的缓冲容量

对核糖核酸酶A (A)、细胞色素 C (B) 和溶菌酶 (C) 这三种蛋白质混合物的 pH 筛选结果证实了安捷伦缓冲液顾问软件的优势 (图 6)。从此图中我们可以看出, 即使 pH 值发生很小的变化 (例如 0.2), 也会显著影响蛋白质在弱阳离子交换 (WCX) 色谱柱上的保留性。当 pH 值从 5.8 变为 6.8 时, 洗脱顺序发生明显变化。

人工前处理预先混合二元梯度的相应缓冲液包括的一些步骤。对每种 pH 值及每个准备好的试剂瓶 (一个为低离子强度, 另一个为高离子强度), 都需要对缓冲液进行人工滴定。为了获得最佳分离度, 对 6 种不同 pH 值进行 pH 筛选时需准备 12 个溶剂瓶 (包括化学品称量, pH 值调节)。这是一个非常耗时的过程, 而且非常容易出现误差和差异。

相反, 安捷伦缓冲液顾问软件可以自动地、可重现地利用四种储备溶液混合得到所有六种分离条件, 无需任何人工干预。在 pH 5.8 下可实现更出色的分离效果 (图 6)。

根据该研究结果, 用户对如何进行操作可有多种选择:

1. 微调所得的 pH 值和梯度
2. 通过 OpenLAB CDS ChemStation 软件将动态混合四元梯度转移至其他仪器
3. 使用预先混合的缓冲液, 在二元梯度中实施 pH 值结果筛选

但是在最后一种情况下, 由于缓冲液顾问软件中具有 pH 值优化程序, 预计会在正确 pH 值处发生偏移。

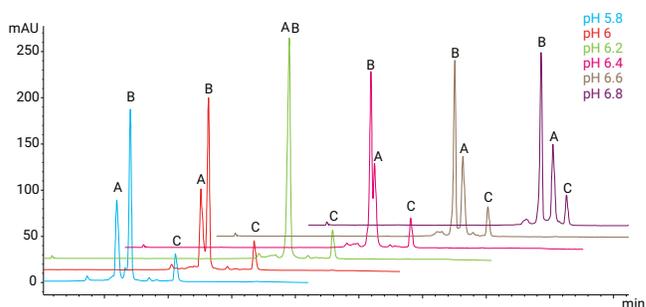


图 6. 利用动态混合四元梯度进行三种蛋白质混合物分离的 pH 筛选

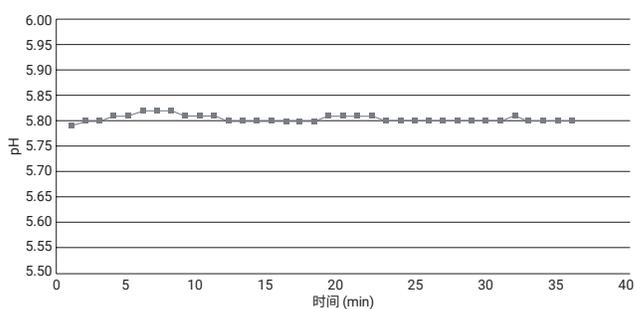


图 7. 离线 pH 测量

结论

使用由缓冲液顾问软件计算得到的动态混合四元梯度时，可以缩短并简化 pH 筛选过程。利用缓冲液顾问软件计算得到的动态混合四元梯度，可显著减少缓冲液准备时间，尤其是与人工前处理的预先混合二元梯度缓冲液相比。缓冲液顾问软件为阴离子和阳离子交换色谱提供了众多的预先验证、用户可选的缓冲系统，并提供了前处理最适合储备溶液所需的配方。软件会对 pH 值加以优化，令得出的 pH 值比通过人工前处理的缓冲液所形成预混合梯度的 pH 值更为准确和精确。缓冲液顾问软件将考虑酸性和碱性缓冲液的浓度以维持所需的恒定 pH 值，之后重新计算四元梯度以解决这个问题。

将缓冲液顾问软件与 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统联用，是生成四元梯度的一种非常好的方法。借助缓冲液顾问软件的计算结果可实现准确、可重现性的分析，是自动化 pH 筛选和准确离子交换色谱领域中的出色工具软件。因此，缓冲液顾问软件是离子交换色谱中分析方法自动化开发的理想工具，可无缝转移至相关的 QA/QC 部门。

参考文献

1. R. J. C. Brown & M. J. T. Milton. Observation of a combined dilution and salting effect in buffers under conditions of high dilution and high ionic strength, *Accred Qual Assur* 8(11): 505–510, **2003**
2. A. E. Voinescu et al. Similarity of Salt Influences on the pH of Buffers, Polyelectrolytes, and Proteins, *J. Phys. Chem. B* 110: 8870–8876, **2006**

使用 4D-LC/MS 对单克隆抗体电荷异构体进行全自动化表征

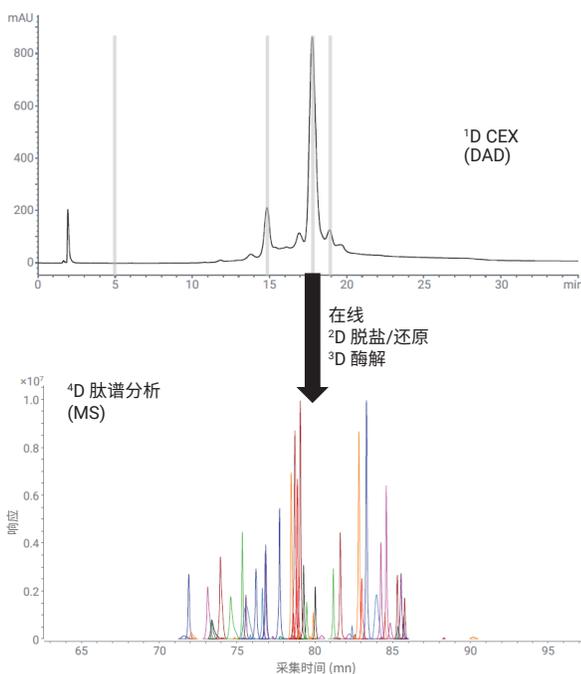
作者

Liesa Verscheure,
Gerd Vanhoenacker,
Pat Sandra, Koen Sandra
RIC Biologics, Belgium

Sonja Schipperges,
Sonja Schneider,
Udo Huber
安捷伦科技有限公司
德国

摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent InfinityLab 二维液相色谱解决方案和 Agilent 6545 LC/Q-TOF 系统的四维液相色谱/质谱 (4D-LC/MS) 对单克隆抗体 (mAb) 电荷异构体进行的全自动化深入表征。通过阳离子交换色谱 (CEX) 分离的电荷异构体被收集在安装在多中心切割阀上的定量环中，在对其进行基于 LC/MS 的肽谱分析之前，依次进行在线脱盐、变性、还原和胰蛋白酶酶解。



前言

蛋白质生物药物已成为治疗各种疾病的重要药物，包括癌症、心血管疾病、糖尿病、感染、炎症和自身免疫性疾病^[1-3]。蛋白质生物药物有多种形式，包括单克隆抗体 (mAb)、抗体药物偶联物 (ADC)、融合蛋白、激素、生长因子、细胞因子、治疗性酶、血液因子、疫苗和抗凝血剂。这些分子在安全性和有效性方面具有明显的优势，极大地改变了制药市场，迄今为止，已有超过 350 种产品获得美国和欧盟的批准可用于人类^[1-3]。这大约占了整个制药市场的四分之一，其中 mAb 是发展最快的一类药物。

伴随着巨大的治疗潜力，这些分子的结构非常复杂，对分析的要求极为苛刻^[1,2]。与小分子药物相比，生物药物具有较大的质量数 (mAb 的 MW 约为 150 kDa) 和异质性。生物药物是一个或多个基因的产物。然而，可能同时存在数百种在翻译后修饰 (PTM)、氨基酸序列、高阶结构等方面有所不同的异构体，这些因素共同构成了产品的特征、安全性和有效性^[1-3]。因此，它们的深入结构表征涉及大量的分析工具，而色谱 (LC) 和质谱 (MS) 是其中的前沿技术。

CEX 是研究可能因 PTM [例如天冬酰胺脱酰胺、C 端赖氨酸截短、N 端环化 (焦谷氨酸构造) 和唾液酸化等] 产生的电荷异构体的关键技术。在 CEX 技术中，固定相的阴离子基团和蛋白质表面的阳离子基团之间的静电相互作用为分离奠定了基础。在流动相 pH 低于其等电点 (pI) 时，将蛋白质加载到色谱柱上，并使用盐梯度或 pH 梯度实现洗脱。CEX 缓冲液通常由非挥发性成分组成，使得这些方法与质谱不兼容。峰鉴定是一项繁琐的任务，涉及在质谱分析之前进行峰采集和脱盐^[4]。随着稳定的商用二维液相色谱仪器的最新推出，这一系列任务现在通常以在线、自动化的方式进行^[5-9]。从 CEX 色谱柱洗脱的物质存储在定量环中，并在质谱测量之前使用反相液相色谱 (RPLC) 或体积排阻色谱 (SEC) 进行在线脱盐。全二维液相色谱 (LC × LC) 和 (多) 中心切割二维液相色谱 (LC-LC) 均得到使用^[5-9]。

然而，为了明确鉴定 CEX 峰，需要进行肽谱分析。虽然蛋白质测定可表明身份，并突出显示质量数差异超出质谱仪质量数准确度的主要修饰，但它通常不提供实际的氨基酸序列，也不允许我们定位修饰。针对后者，受之前研究工作的启发^[10-12]，本应用简报介绍了一种完全自动化的在线 ⁴D-LC/MS 设置，通过整合第一维 (¹D) CEX、峰采集、²D 脱盐、变性、还原、³D 胰蛋白酶酶解以及基于 ⁴D RPLC/MS 的肽谱分析，对 mAb 电荷异构体进行深入表征。

实验部分

材料

乙腈 (HPLC-S)、水 (ULC/MS) 和甲酸 (ULC/MS) 来自 Biosolve (valkenward, The Netherlands)。NaH₂PO₄、Na₂HPO₄·2H₂O、NaCl、NH₄HCO₃、三羟甲基氨基甲烷和二硫苏糖醇 (DTT) 购自 Sigma (St. Louis, MO, USA)。超纯 Tris-HCl (pH 7.5) 购自 ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)。I 级水由 Sartorius (Göttingen, Germany) Arium Pro 超纯实验室水纯化系统使用自来水生成。人源化单克隆抗体曲妥珠单抗 (商品名为赫赛汀) 购自 Roche (Basel, Switzerland)。

样品前处理

用一维 CEX 流动相 A (MPA: 10 mmol/L 磷酸钠, pH 7.65) 将曲妥珠单抗稀释至 7 mg/mL。在高 pH (100 mmol/L Tris, pH 9.0) 和 37 °C 条件下将曲妥珠单抗孵育 3 天，然后用一维 CEX 流动相 A 通过缓冲液交换至 7 mg/mL，从而诱导脱酰胺基化。

仪器

使用配备多中心切割选件的 Agilent 1290 Infinity II 二维液相色谱系统、额外的 Agilent 1260 Infinity II 四元泵和 Agilent 1260 Infinity II 等度泵，以及两个额外的 2 位/6 通阀和零死体积 T 形管。使用内径为 0.12 mm 的不锈钢管。配置的示意图如图 1 所示，并在本应用简报中进行了汇总。使用二极管阵列检测 (DAD) 进行第一维 (CEX) 和第四维 (RPLC) 检测。此外，使用配备喷射流电喷雾离子源的 Agilent 6545 LC/Q-TOF 进行第四维和最后维度的检测。

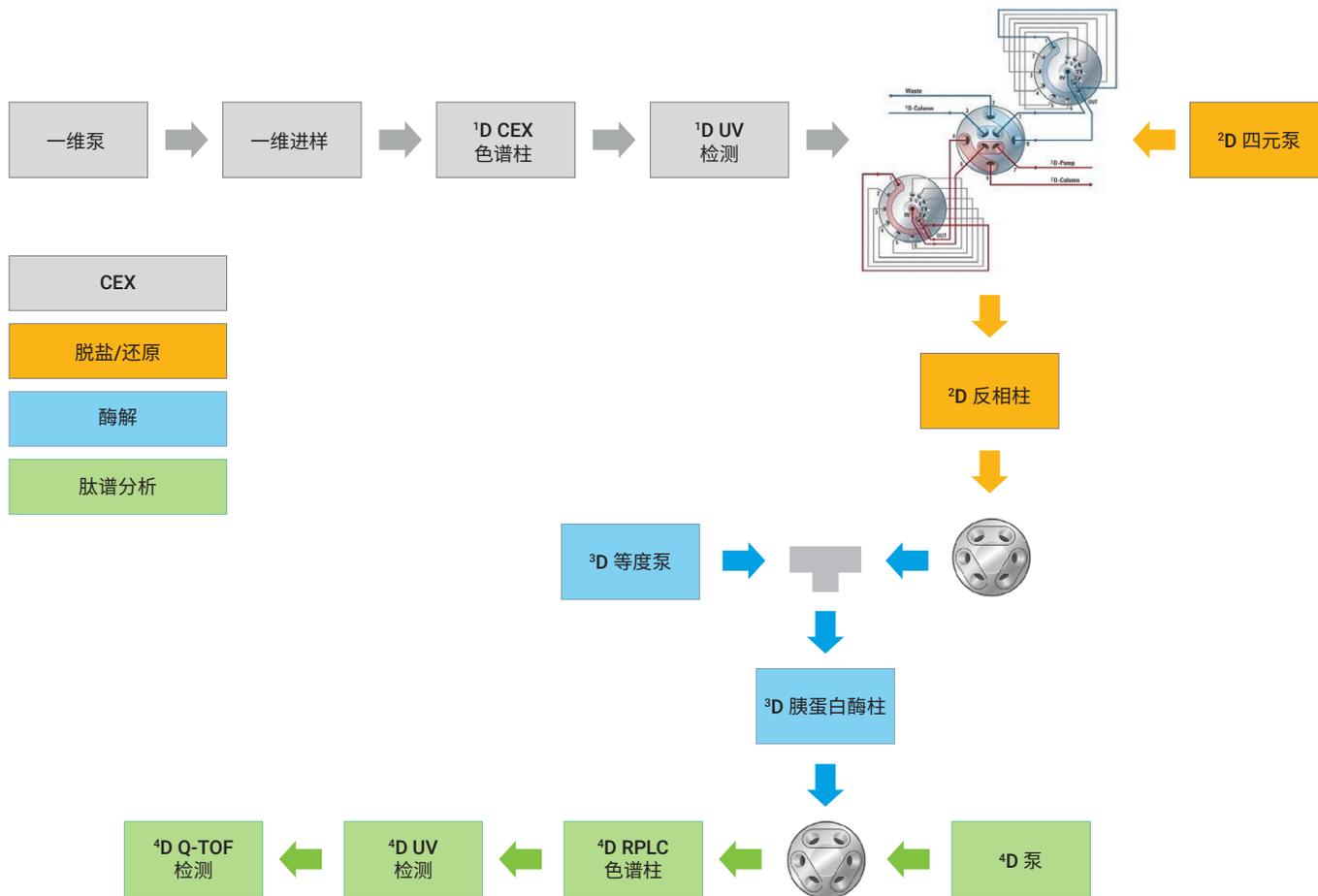


图 1. 4D-LC/MS 配置，包括在第一维使用多中心切割进行 CEX 分离和电荷异构体峰采集，第二维基于 RPLC 的脱盐、变性、还原，第三维的胰蛋白酶酶解，以及第四维基于 RPLC/MS 的肽谱分析

配置

第一维：阳离子交换色谱：

- G7120A Agilent 1290 Infinity II 高速泵
- G7167B Agilent 1290 Infinity II Multisampler，配备样品恒温箱（选件 101）
- G7116B Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (MCT)，安装了阀驱动（选件 058），配备 Agilent InfinityLab Quick Change 2 位/6 通快速切换阀（1300 bar，G4231C）
- G7117B Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器，配备 3.7 mm HDR InfinityLab 最大光强卡套式流通池 (G4212-60032)

注：安装了短型 3.7 mm 检测器流通池，以降低信号强度并防止 UV 信号饱和

具有多中心切割功能的二维液相色谱

- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，配备二维液相色谱阀 (G4236A)
- 两个 Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，配备带 40 μ L 定量环的多中心切割阀 (G4242-64000)

第二维：使用反相色谱进行脱盐、变性和还原：

G7111B Agilent 1260 Infinity II 四元泵，配备主动入口阀 (AIV) (选件 032)

第三维：胰蛋白酶酶解

- G7111B Agilent 1260 Infinity II 四元泵，配备主动入口阀 (AIV) (选件 032)

第四维：使用反相色谱进行肽谱分析：

- G7120A Agilent 1290 Infinity II 高速泵
- G7116B Agilent 1290 Infinity II MCT，安装了阀驱动（选件 058），配备 Agilent InfinityLab Quick Change 2 位/6 通快速切换阀（1300 bar，G4231C）
- G7117B Agilent 1290 Infinity II DAD，配备 10 mm InfinityLab 最大光强卡套式流通池（G4212-60008）
- G6545A Agilent 6545 LC/Q-TOF，配备喷射流电喷雾离子源

注：Orachrom StyrosZyme TPCK-胰蛋白酶和 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱位于同一个柱温箱的不同区域，分别保持在 40 °C 和 60 °C。

第一维：阳离子交换色谱															
色谱柱	Agilent Bio MAb, 无孔 (2.1 mm × 250 mm, 5 μm) (部件号 5190-2411)														
温度	30 °C														
流动相 A	10 mmol/L 磷酸钠, pH 7.65														
流动相 B	10 mmol/L 磷酸钠, pH 7.65 + 100 mmol/L NaCl														
流速	0.2 mL/min														
梯度	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>36</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>36.5</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>46</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>46.5</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	时间 (min)	B (%)	0	5	36	70	36.5	100	46	100	46.5	5	60	5
时间 (min)	B (%)														
0	5														
36	70														
36.5	100														
46	100														
46.5	5														
60	5														
进样量	100 μg														
检测	220 和 280 nm														
峰宽	> 0.025 min (10 Hz)														

第二维：使用反相色谱进行脱盐、变性和还原（手动输入重复事件）						
色谱柱	聚合物基脱盐小柱，2.1 × 10 mm					
温度	23 °C					
流动相 A	0.1% (v/v) 甲酸水溶液					
流动相 B	0.1% (v/v) 甲酸的乙腈溶液					
流动相 C	20 mmol/L DTT 的 100 mmol/L Tris-HCl 溶液，pH 7.5					
梯度	时间 (min)	A (%)	B (%)	C (%)	流速 (mL/min)	
	10	99	1	0	0.5	脱盐和聚焦
	10.01	0	0	100	0.2	还原
	20	0	0	100	0.2	
	20.01	99	1	0	0.5	
	25	99	1	0	—	脱盐和洗脱
	25.01	40	60	0	—	
	27	40	60	0	0.5	
	27.01	40	60	0	0.015	洗脱和酶解
	68	40	60	0	0.015	
	68.01	0	100	0	0.5	
	85	0	100	0	—	
	95	99	1	0	—	
	120	99	1	0	—	
阀	27 min：位置 1 & 位置 2（开始胰蛋白酶酶解） 67 min：位置 2 & 位置 1（开始肽谱分析）					

软件

- Agilent OpenLab CDS ChemStation 修正版 C.01.07 SR4 [505]
- 二维液相色谱附加软件修正版 A.01.04 [017]
- Agilent MassHunter 仪器控制软件 (B.09.00)
- Agilent MassHunter BioConfirm 数据分析软件 (B.07.00)

方法

在二维液相色谱软件中对第一维和第四维进行配置，在常规方法设置中对第二维和第三维进行控制，并将其设定为重复事件。这些事件的循环时间为 110 分钟，与二维液相色谱软件中设定的第四维的循环时间相同。MassHunter 采集软件由二维液相色谱系统的远程启动触发。

在整个 CEX 分析过程中进行了四次中心切割。4.8 分钟时进行的第一次中心切割为空白切割，它使我们可以在分析实际的目标 CEX 中心切割之前对所有维度进行预处理。

多中心切割第一维 > 第二维	
曲妥珠单抗采样时间表	
切割	时间 (min)
1 - 空白	4.80
2 - 前峰	14.93
3 - 主峰	17.55
4 - 后峰	18.99

第三维：胰蛋白酶酶解（手动输入的重复事件）		
色谱柱	Orachrom StyrosZyme TPCK-胰蛋白酶 PEEK (2.1 × 150 mm)	
温度	40 °C	
流动相	50 mmol/L NH ₄ HCO ₃ , pH 8	
	时间 (min)	流速 (mL/min)
	25	0.06
梯度	25.01	0.135
	67	0.135
	67.01	0.06
	135	0.06
	酶解	
阀	27 min: 位置 1 -> 位置 2 (开始胰蛋白酶酶解)	
	67 min: 位置 2 -> 位置 1 (开始肽谱分析)	

数据处理

使用集成于 MassHunter 软件中的 BioConfirm 算法，将测量得到的信号与曲妥珠单抗轻链和重链序列进行匹配。将实验数据与序列匹配的质量容差设置为 8 ppm。在 20 ppm 质量数准确度下获得的提取离子色谱图 (EIC) 用于监测 PTM（例如脱酰胺基化）。

结果与讨论

完全自动化的在线 4D-LC/MS 蛋白质分析仪（包括 CEX、峰采集、脱盐、变性、还原、胰蛋白酶酶解以及肽谱分析）的分析流程图如图 1 所示。将 CEX 分离的物质收集在安装于多中心切割阀上的 40 µL 定量环中，并逐一转移到聚合物 RP 小柱中进行脱盐、变性和还原。随后，通过升高乙腈浓度使捕集于小柱上的还原 mAb 洗脱到胰蛋白酶柱中。使用 T 形管将胰蛋白酶酶解缓冲液与反相流动相混合，以获得理想酶解条件并降低乙腈浓度。

第四维：使用反相色谱进行肽谱分析（由二维液相色谱软件控制的重复事件）		
色谱柱	Agilent AdvanceBio 肽谱分析柱 (2.1 × 150 mm × 2.7 µm) (部件号 651750-902)	
温度	60 °C	
流动相 A	0.1% (v/v) 甲酸水溶液	
流动相 B	0.1% (v/v) 甲酸的乙腈溶液	
流速	0.4 mL/min	
	时间 (min)	B (%)
	0	1
	8.5	1
	9	100
	15	100
	16	1
梯度	20	1
	64	1
	64	1
	97	45
	98	100
	103	100
	104	1
	110	1
DAD 检测	214 和 280 nm	
峰宽	> 0.025 min (10 Hz)	

质谱检测	
参数	离子源
正离子模式	
干燥气温度	300 °C
干燥气流速	8 L/min
雾化器压力	35 psi
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	8 L/min
毛细管电压	3500 V
喷嘴电压	1000 V
碎裂电压	175 V
参数	采集
模式	扩展动态范围 (2 GHz)
数据采集范围	m/z 100–3200
	1 幅谱图/s
	重点采集模式
67 分钟后将分流阀切换至 MS	

在酶解过程中，胰蛋白酶柱与肽谱分析柱对齐，生成的肽段集中在 RPLC 柱头。20 分钟后，阀切换使酶解产物开始洗脱到质谱中。

mAb 曲妥珠单抗的 CEX 色谱图如图 2 所示。曲妥珠单抗，商品名赫赛汀，是一种结合 HER2 受体的人源 IgG1，因此可用于治疗 HER2 阳性转移性乳腺癌。mAb 的 pI 为 8.45，在 CEX 流动相 pH 下带正电荷，以此控制与带负电荷的色谱树脂之间的相互作用。使用 NaCl 盐梯度洗脱 mAb 后，出现了多种电荷异构体，随后对其进行在线肽谱分析。图 3A 示意图展示了涉及三个 CEX 峰（前峰、主峰和后峰）和一个 CEX 空白（如图 2 所示）的分析的 4D-LC/MS 实验。图 3B 为一个循环中压力和 DAD 谱图的放大图，并显示了 CEX 主峰的脱盐、变性、还原、酶解和肽谱分析。可实现超过 90% 的序列覆盖率。鉴定出的肽段如表 1 所示，LC/MS 化合物色谱图的叠加图如图 4 所示。未覆盖的肽段通常较小且/或具有亲水性，且在酶解过程中不会集中于肽谱分析柱的柱头。出于此原因，它们被转移到废液瓶中。

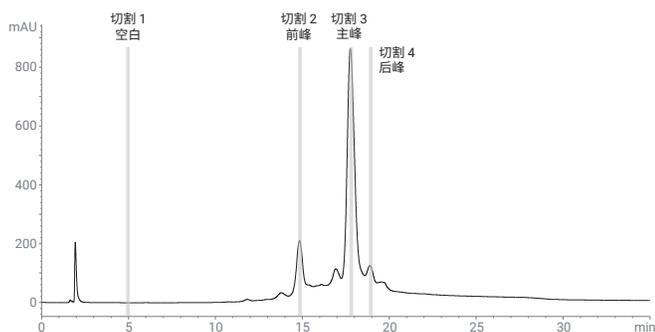


图 2. 单克隆抗体曲妥珠单抗的 CEX 色谱图。根据参考文献 13 设定条件。灰色表示进行的中心切割

除序列信息之外，肽谱分析还可揭示修饰和修饰位点信息。图 5 显示了 CEX 前峰、主峰和后峰的在线肽谱分析，并重点展示了两个肽段（即在 30 位处包含潜在脱酰胺化位点的轻链肽段 ASQDVNTAVAWYQKPGK (LC 25-42)，以及在 102 位处包含潜在异构化位点的重链肽段 WGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTK (HC 99-124)）的 EIC。从数据可以推断出，前峰对应于脱酰胺化异构体，在其中一条轻链的 30 位处，天冬酰胺转变为天冬氨酸。还可以证明后峰在其中一条重链的 102 位处携带异天冬氨酸。对应于修饰和未修饰异构体的双组分峰清楚、直观地说明了这一点。这些结果与 Harris 等人报告的结果一致，他们对赫赛汀的酸性和碱性异构体进行了离线馏分收集和肽谱分析^[4]。

我们对高 pH 处理后的赫赛汀样品进行了相同的实验（图 6）。此类条件会诱导脱酰胺化，从而使 mAb 具有更强的酸性。图 6 中呈现的 CEX 谱图显示了一种酸性位移，CEX 峰 1 和峰 2 的肽谱数据表示双脱酰胺化异构体，其两条轻链均在 30 位处发生了脱酰胺化。CEX 峰 3 和峰 4 对应于单次脱酰胺化事件，一条轻链在 30 位处发生了脱酰胺化。峰 1 和峰 2 以及峰 3 和峰 4 之间的差异源自另一次脱酰胺化，这次发生在重链的 387 位。该脱酰胺化位点出现在两个肽段（一个完全裂解，一个未裂解）中，当发生脱酰胺化时，它们的酶解方式明显不同。

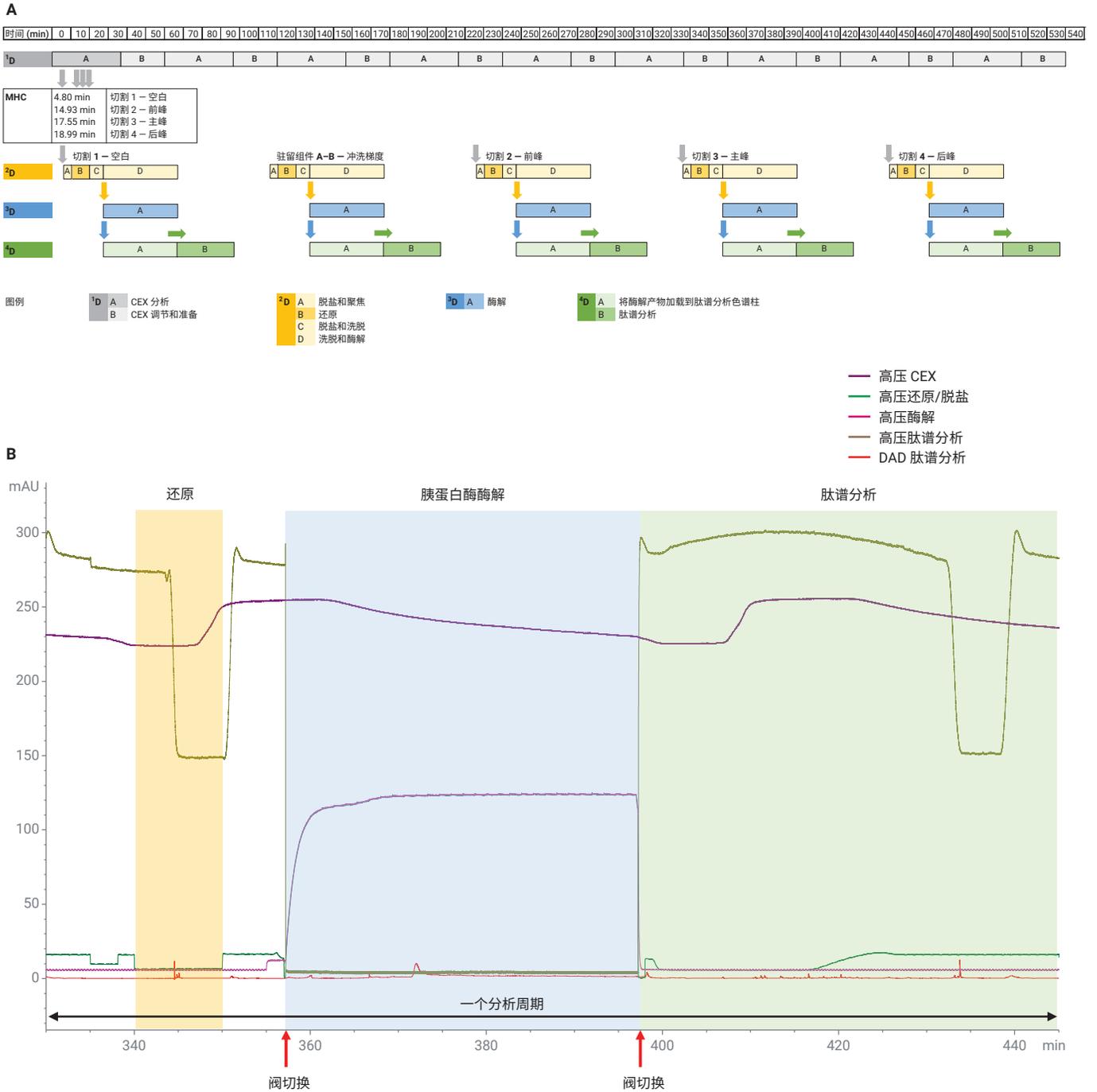


图 3. (A) 4D-LC/MS 实验不同阶段的示意图，重点显示前峰、主峰和后峰以及 CEX 空白（如图 2 所示）区域。(B) 重点显示 CEX 主峰的脱盐、变性、还原、酶解和肽谱分析

表 1. 通过基于 RPLC/MS 的在线肽谱分析, 在 CEX 主峰中鉴定出的肽段

RT	质量数	进样量	进样量%	序列	测序位置	靶向序列 质量数	误差 (ppm)	漏切位点
79.1	1880.9972	66635668	6.61	EVQLVESGGGLVQPGGSLR	HC(001-019)	1880.9956	0.8	0
76.8	1109.5539	25727274	2.55	LSCAASGFNIK	HC(020-030)	1109.5539	0.0	0
81.2	2180.0864	16055279	1.59	LSCAASGFNIKDTYIHWVR	HC(020-038)	2180.0837	1.2	1
76.6	1088.5410	13618352	1.35	DTYIHWVR	HC(031-038)	1088.5403	0.6	0
76.2	829.4442	24354704	2.42	GLEWVAR	HC(044-050)	829.4446	-0.5	0
71.9	1083.5360	19879112	1.97	IYPTNGYTR	HC(051-059)	1083.5349	1.0	0
72.1	1181.6059	3708836	0.37	GRFTISADTSK	HC(066-076)	1181.6041	1.6	1
73.1	968.4819	26423682	2.62	FTISADTSK	HC(068-076)	968.4815	0.4	0
79.3	2260.1184	317550	0.03	FTISADTSKNTAYLQMNSLR	HC(068-087)	2260.1158	1.1	1
81.3	3518.6474	320893	0.03	FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR	HC(068-098)	3518.6446	0.8	2
76.8	1309.6451	24858112	2.47	NTAYLQMNSLR	HC(077-087)	1309.6449	0.1	0
79.9	2568.1769	5903991	0.59	NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR	HC(077-098)	2568.1737	1.2	1
71.6	1276.5392	2994056	0.30	AEDTAVYYCSR	HC(088-098)	1276.5394	-0.1	0
85.3	2783.2545	16863744	1.67	WGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTK	HC(099-124)	2783.2537	0.3	0
78.7	1185.6398	68405792	6.79	GPSVFPLAPSSK	HC(125-136)	1185.6394	0.4	0
77.7	1263.6494	36588096	3.63	STSGGTAALGCLVK	HC(137-150)	1263.6493	0.1	0
88.3	6655.2898	221285	0.02	DYFPEPVTYSWNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYLSVVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK	HC(151-213)	6655.2857	0.6	0
79.8	1374.7171	214690	0.02	VDKKVEPKSCDK	HC(214-225)	1374.7177	-0.4	3
84.9	2729.4093	7103687	0.71	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	HC(226-251)	2729.4073	0.7	0
73.4	834.4277	13166738	1.31	DTLMISR	HC(252-258)	834.4269	1.0	0
82.0	2897.4175	220680	0.02	DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK	HC(252-277)	2897.4151	0.9	1
84.3	4556.2041	547132	0.05	DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK	HC(252-291)	4556.1992	1.1	2
79.3	2081.0013	17858876	1.77	TPEVTCVVVDVSHEDPEVK	HC(259-277)	2080.9987	1.2	0
83.0	3739.7881	18901388	1.88	TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK	HC(259-291)	3739.7828	1.4	1
78.6	1676.7966	5991668	0.59	FNWYVDGVEVHNAK	HC(278-291)	1676.7947	1.1	0
84.6	1807.0008	38113724	3.78	VVSVLTVLHQDWLNGK	HC(305-320)	1806.9992	0.9	0
83.3	2227.2022	63210428	6.27	VVSVLTVLHQDWLNGKEYK	HC(305-323)	2227.2001	0.9	1
82.4	2458.3080	2959244	0.29	VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK	HC(305-325)	2458.3043	1.5	2
81.6	2886.5495	183447	0.02	VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK	HC(305-329)	2886.5426	2.4	3
73.9	837.4964	38694668	3.84	ALPAPIEK	HC(330-337)	837.4960	0.5	0
75.4	1285.6662	875645	0.09	EPQVYTLPPSR	HC(348-358)	1285.6667	-0.4	0
75.6	1903.9366	36378636	3.61	EPQVYTLPPSREEMTK	HC(348-363)	1903.9350	0.8	1
80.5	2989.5263	1849832	0.18	EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK	HC(348-373)	2989.5253	0.3	2
78.4	1721.8701	179925	0.02	EEMTKNQVSLTCLVK	HC(359-373)	1721.8692	0.6	1
78.9	1103.6013	45037560	4.47	NQVSLTCLVK	HC(364-373)	1103.6009	0.4	0
81.6	2543.1245	29221288	2.90	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	HC(374-395)	2543.1241	0.2	0
85.7	4398.0307	5032842	0.50	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK	HC(374-412)	4398.0281	0.6	1
85.9	4954.3531	225838	0.02	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK	HC(374-417)	4954.3502	0.6	2
82.8	1872.9144	57538216	5.71	TTTPVLDSDGSFFLYSK	HC(396-412)	1872.9146	-0.1	0
82.6	2429.2370	970108	0.10	TTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK	HC(396-417)	2429.2366	0.2	1
77.8	2986.3744	1042270	0.10	SRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQK	HC(418-442)	2986.3715	1.0	1
78.5	2743.2427	46302832	4.60	WQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQK	HC(420-442)	2743.2384	1.6	0
74.6	659.3487	26985572	2.68	SLSLSPG	HC(443-449)	659.3490	-0.5	0
76.7	1877.8787	2655889	0.26	DIQMTQSPSSLSASVGDR	LC(001-018)	1877.8789	-0.1	0
79.5	2551.2398	9011163	0.89	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCR	LC(001-024)	2551.2371	1.1	1

表 1. 续

RT	质量数	进样量	进样量%	序列	测序位置	靶向序列 质量数	误差 (ppm)	漏切位点
75.6	1989.9932	10501849	1.04	ASQDVNTAVAWYQQKPGK	LC(025-042)	1989.9908	1.2	0
74.8	2286.1771	370620	0.04	ASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK	LC(025-045)	2286.1757	0.6	1
84.3	1771.9519	27274394	2.71	LLIYSASFLYSGVPSR	LC(046-061)	1771.9509	0.6	0
85.8	4129.8936	10160642	1.01	SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTK	LC(067-103)	4129.8892	1.1	0
85.3	4599.1803	2980494	0.30	SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIK	LC(067-107)	4599.1792	0.2	1
84.5	4755.2888	6157193	0.61	SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIKR	LC(067-108)	4755.2803	1.8	2
82.2	2101.1217	3894068	0.39	RTVAAPSVFIFPPSDEQLK	LC(108-126)	2101.1208	0.4	1
84.0	1945.0220	32666390	3.24	TVAAPSVFIFPPSDEQLK	LC(109-126)	1945.0197	1.2	0
90.2	3666.8789	1457746	0.14	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPR	LC(109-142)	3666.8756	0.9	1
85.5	1739.8676	23403588	2.32	SGTASVCLLNFFYPR	LC(127-142)	1739.8665	0.6	0
75.9	2676.2628	852142	0.08	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK	LC(146-169)	2676.2627	0.0	1
80.0	4160.0087	11663837	1.16	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTK	LC(146-183)	4160.0033	1.3	2
79.7	4766.2746	403170	0.04	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEK	LC(146-188)	4766.2683	1.3	3
78.8	3618.7073	16391463	1.63	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTK	LC(150-183)	3618.7021	1.5	1
78.6	4224.9705	725845	0.07	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEK	LC(150-188)	4224.9670	0.8	2
77.3	4490.1265	478190	0.05	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHK	LC(150-190)	4490.1209	1.3	3
78.9	6290.0188	328711	0.03	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK	LC(150-207)	6290.0085	1.6	4
79.0	1501.7515	2071466	0.21	DSTYLSLSTLTK	LC(170-183)	1501.7512	0.2	0
74.0	2689.3218	547667	0.05	ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK	LC(184-207)	2689.3170	1.8	2
73.4	2083.0562	6116953	0.61	HKVYACEVTHQGLSSPVTK	LC(189-207)	2083.0521	2.0	1
75.3	1817.8988	25691042	2.55	VYACEVTHQGLSSPVTK	LC(191-207)	1817.8982	0.3	0

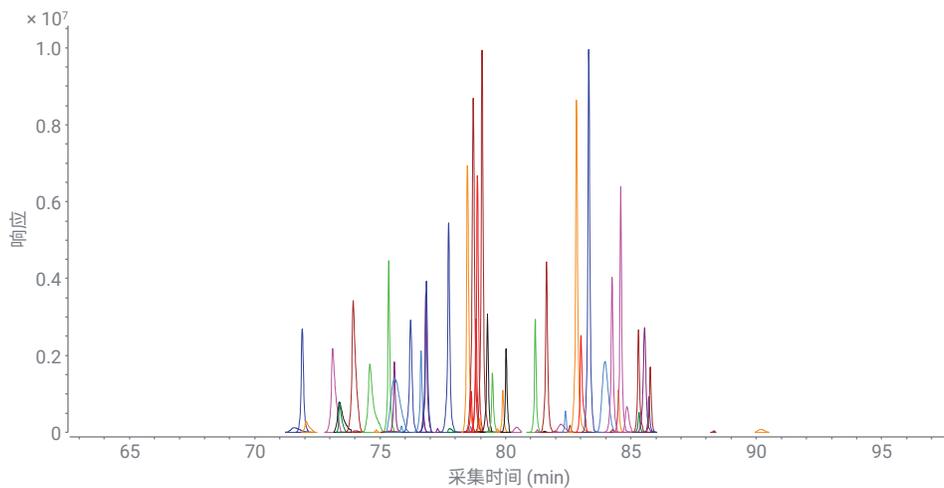


图 4. 通过在线肽谱分析, 在 CEX 主峰中 MS 鉴定肽段的 RPLC/MS 化合物色谱图的叠加图

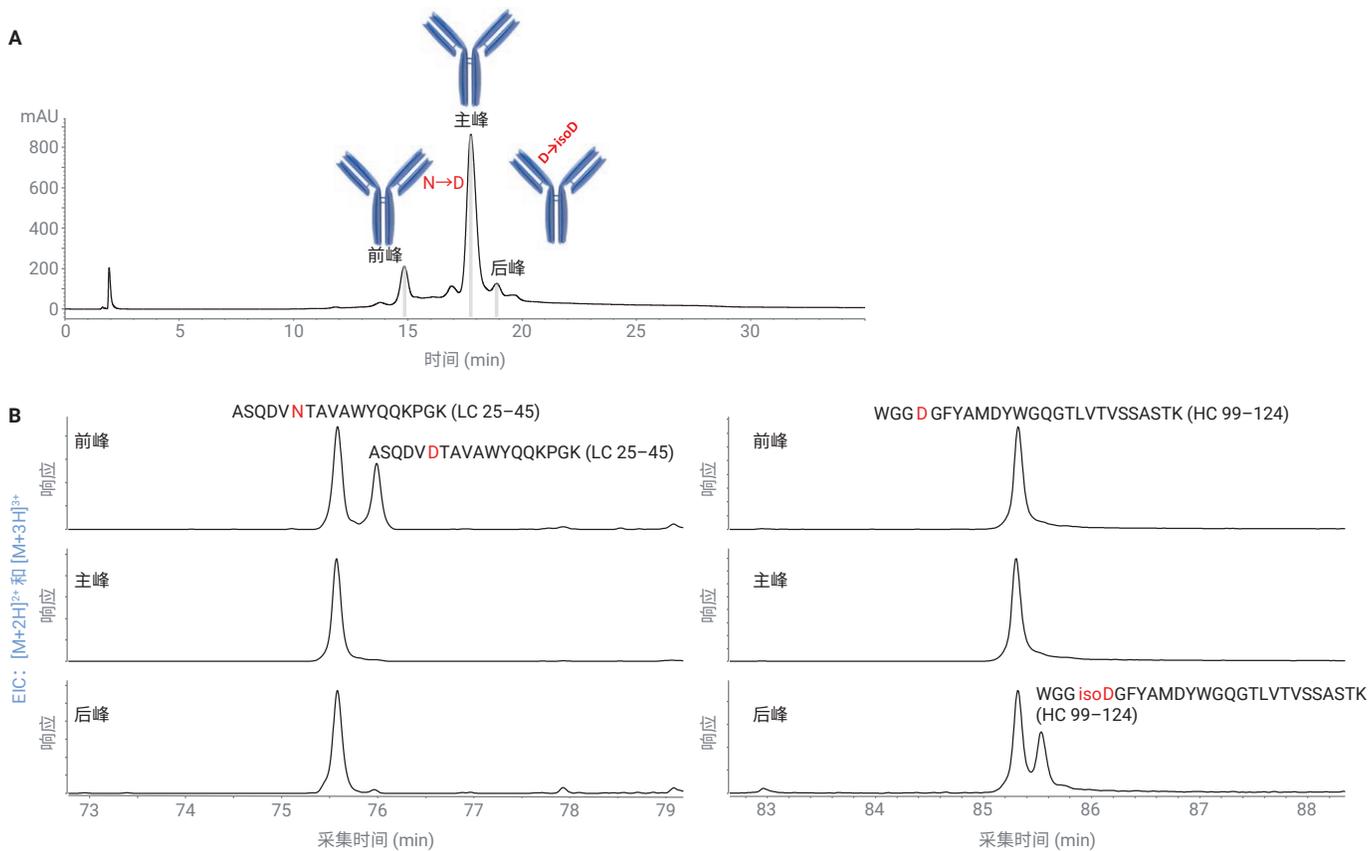


图 5. 曲妥珠单抗 CEX 前峰、主峰和后峰的在线肽谱分析。轻链肽段 ASQDV^NTAVAWYQQKPGK (LC 25-42)、脱酰胺基化轻链肽段 ASQDV^DTAVAWYQQKPGK (LC 25-42)、重链肽段 WGG^DGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTK (HC 99-124) 和异构化重链肽段 WGG^{isoD}GFYAMDYWGQGLTVTVSSASTK (HC 99-124) 的 (A) CEX 色谱图和 (B) 提取离子色谱图

结论

我们介绍并成功应用完全自动化的 4D-LC/MS 蛋白质分析仪（包括在第一维使用多中心切割进行 CEX 分离和电荷异构体峰采集，第二维基于 RPLC 的脱盐、变性、还原，第三维的胰蛋白酶酶解，以及第四维基于 RPLC/MS 的肽谱分析）对在未处理和高 pH 处理曲妥珠单抗的 CEX 谱图中观察到的酸性和碱性异构体进行了表征。该多维系统基于 InfinityLab 二维液相色谱解决方案和 6545 LC/Q-TOF 系统。通过在第一维中用 Protein A 亲和色谱、体积排阻色谱、疏水相互作用色谱等代替 CEX，可以轻松配置这种 4D-LC/MS 设计的不同形式。

参考文献

1. Sandra, K. *et al.* Modern Chromatographic and Mass Spectrometric Techniques for Protein Biopharmaceutical Characterization. *J. Chromatogr. A* **2014**, 1335, 81–103
2. Fekete, S. *et al.* Chromatographic, Electrophoretic and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals. *Anal. Chem.* **2016**, 88, 480–507
3. Walsh, G. Biopharmaceutical Benchmarks 2018. *Nat. Biotechnol.* **2018**, 32, 992–1000
4. Harris, R. J. *et al.* Identification of Multiple Sources of Charge Heterogeneity in a Recombinant Antibody. *J. Chromatogr. B* **2001**, 752, 233–245
5. Stoll, D. *et al.* Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products by Two-Dimensional Liquid Chromatography Coupled with UV Absorbance and Mass Spectrometric Detection. *J. Chromatogr. B* **2016**, 1032, 51–60
6. Sandra, K. *et al.* Characterizing Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug Conjugates using 2D-LC-MS. *LCGC Europe* **2017**, 30, 149–157
7. Stoll, D. R. *et al.* Direct Identification of Rituximab Main Isoforms and Subunit Analysis by Online Selective Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 8307–8315
8. Sandra, K. *et al.* Multiple Heart-Cutting and Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography Hyphenated to Mass Spectrometry for the Characterization of the Antibody-Drug Conjugate Ado-Trastuzumab Emtansine. *J. Chromatogr. B* **2016**, 1032, 119–130
9. Schneider, S. 2D-LC/MS Characterization of Charge Variants Using Ion Exchange and Reversed-Phase Chromatography (使用离子交换和反相色谱对电荷异构体进行 2D-LC/MS 表征)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-6673EN，**2016**
10. Gstöttner, C. *et al.* Fast and Automated Characterization of Antibody Variants with 4D HPLC/MS. *Anal. Chem.* **2018**, 90, 2119–2125
11. Goyon, A. *et al.* Streamlined Characterization of an Antibody-Drug Conjugate by Two-Dimensional and Four-Dimensional Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2019**, 91, 14896–14903
12. Goyon, A. *et al.* From Proof of Concept to the Routine Use of an Automated and Robust Multi-Dimensional Liquid Chromatography Mass Spectrometry Workflow Applied for the Charge Variant Characterization of Therapeutic Antibodies. *J. Chromatogr. A* **2020**, doi: 10.1016/j.chroma. 2019.460740
13. Vandenheede, I. *et al.* Characterize mAb Charge Variants by Cation-Exchange Chromatography (通过阳离子交换色谱表征 mAb 电荷异构体)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-5273EN，**2014**

更多应用简报

出版号	标题
5991-7442CHCN	从 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱仪到 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪的无缝方法转移
5991-5273EN	通过阳离子交换色谱表征 mAb 电荷异构体
5991-5274EN	通过阳离子交换色谱表征 Fab 和 Fc 片段
5991-0895CHCN	应用 Agilent Bio MAb 5 μ m 色谱柱对完整的和 C 端消化的 IgG1 进行分析
5990-9629CHCN	pH 梯度洗脱用于改善单克隆抗体电荷异构体的分离
5991-1407EN	使用 pH 梯度阳离子交换色谱对单克隆抗体中的电荷异质性进行高分离度分析
5991-1408EN	使用经安捷伦缓冲液顾问软件计算的复合缓冲系统的 pH 梯度进行蛋白质分离
5991-4722EN	缩短单克隆抗体电荷异构体分析的周期时间
5991-3365EN	使用缓冲液顾问软件生成的 pH 梯度以及在线 pH 和电导率监测功能简化 mAb 电荷异构体分析方法的优化
5990-9270EN	使用阳离子交换色谱通过安捷伦 3 μ m 离子交换色谱柱分离蛋白质标准品
5990-9614CHCN	通过阴离子交换色谱法进行蛋白质分析
5991-5221EN	2AB 标记 N-糖的电荷分析

最佳实践和故障排除

为了快速确定可能发生的任何问题的原因，需要一种系统性的故障排除方法。在色谱分离中，样品前处理、流动相、方法条件、仪器组件和色谱柱都是重要的因素，确定根本原因可能非常困难。

我们可以采取几个小步骤来避免常见问题，或者在出现问题时帮助识别和诊断问题。本文档不同章节提供的指导原则中包含有一些示例。其他可以采取的措施包括：

- 应尽可能定期使用合适的参比标准品并保存性能记录。这种做法有助于发现问题，避免浪费大量时间。此外，所观察到的变化本身也有助于准确识别问题
- 了解液相色谱系统、色谱柱和保护柱（如有使用）所产生的典型反压。如果观察到压力偏差，会更容易确定变化的来源，从而确定需要更换或清洁的元件

与色谱柱直接相关的一些最佳实践包括：

- 从较低的流速（例如 0.1 mL/min）开始，在几分钟内逐渐增加流速。虽然方法流速的反压可能远低于最大压力，但是从零开始流动时，压力的突然增大可能会导致色谱柱损坏
- 对于梯度方法，方法中在下次进样前重新平衡之前应有一个清洗步骤。对于反相方法，可保持较高的有机溶剂浓度几分钟。对于电荷异构体离子交换分析等水性方法，可让高盐流动相流动几分钟。通常该步骤宜采用 100% 流动相 B
- 在方法开发过程中，请注意建议的温度、压力和 pH 的最小和最大条件。与较为温和的条件相比，在建议范围的极限下操作会导致色谱柱寿命缩短

为了获得理想性能，应当使用高质量的流动相溶剂和添加剂，但先考虑一下其他一些参数对于避免常见问题也会大有帮助：

- 考虑溶剂混溶性和任何添加剂的溶解度。流动相 A 和 B 需要完全混溶，同时样品溶液也必须与初始流动相条件混溶。此外，在更换用于清洁或储存色谱柱的流动相体系时，应先考虑兼容性，并降低流速，因为混合可能会增加反压
- 有关适当的储存溶剂，请参阅色谱柱使用指南
- 对于水相色谱，流动相的“清洁”至关重要。水性流动相，尤其是中性 pH 的含盐流动相，非常适合细菌生长。使用 0.2 μm 过滤器过滤水性流动相，储存在冰箱中并且经常制备新鲜流动相，可以大大减少可能导致堵塞的细菌生长

关于更好地维护液相色谱柱以及进一步解决出现的问题，有一些资源可供参考：

- 液相色谱手册：液相色谱柱与方法开发指南包含了有关方法开发的丰富信息以及根据观察到的现象进行故障排除的建议。
www.agilent.com/cs/library/primers/Public/LC-Handbook-Complete-2.pdf
- 每根色谱柱随附的色谱柱用户指南详细说明了适当的温度、压力和 pH 范围，兼容的流动相，以及清洁和存储色谱柱的说明。如果不慎遗失，在以下网址可以找到所有色谱柱用户指南：www.agilent.com/chem/biolc-columns-user-guides。
- 在美国和加拿大可致电 800-227-9770 联系客户支持。关于您所在地区的支持资源，请参见 www.agilent.com

如需了解更多信息，请访问：

www.agilent.com/chem/advancebio

安捷伦客户服务中心：

免费专线：800-820-3278

400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

RA44539.6305439815

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2022
2022年1月25日，中国出版
5991-9072ZHCN

