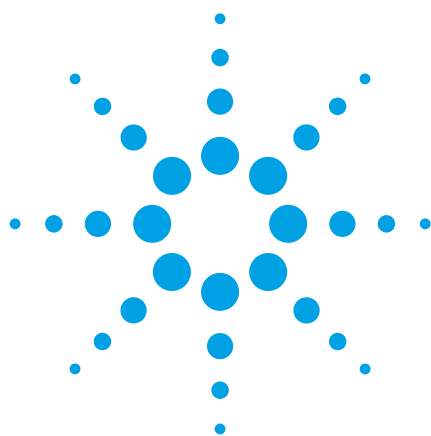




应用 1.8 μm 反相 Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C18 色谱柱快速分离重组人促红细胞生成素

应用报告

生物制药

作者

Phu T Duong
安捷伦科技有限公司
2850 Centerville Road
Wilmington DE 19808
美国

Linda L Lloyd
安捷伦科技有限公司
Essex Rd, Church Stretton, Shropshire
英格兰

摘要

生物技术和制药公司非常需要具有高灵敏度、短分离时间和良好运行重复性的蛋白质快速分离方法。在蛋白质的生产、净化、制剂制备及贮存过程中，高灵敏度的分析技术对于其纯度和稳定性监测是必需的。Agilent ZORBAX 300SB-C18 1.8 μm 快速分离高分辨 (RRHD) 色谱柱旨在应对这些挑战。C18 StableBond 涂层技术提供了更高的灵敏度、卓越的 pH 耐受范围和热稳定性。使用专为 UHPLC 系统设计的 1.8 μm 色谱柱可显著缩短分析时间，从而提高 QC 对蛋白质一级结构分析的效率。本文介绍了重组人促红细胞生成素诸多亚型的快速分离。与许多其它生物分子一样，重组 EPO 蛋白的异质性是由于生产过程中的修饰产生的。本文在含三氟乙酸的酸性条件下，从流速、梯度程序和重现性等方面对分析方法进行了优化。



Agilent Technologies

引言

血浆里的促红细胞生成素(EPO)蛋白是一种糖蛋白激素。它是一种作用于骨髓内红细胞前体细胞的细胞因子。EPO 控制着红细胞的生成。此外，它还具有神经保护作用，可防止多种潜在的脑损伤和一些组织中的细胞凋亡。重组人 EPO 蛋白(rEPO)是应用重组 DNA 技术由中国仓鼠卵巢(CHO)细胞产生的。rEPO 单独多肽链含有 165 个氨基酸，分子量约为 24000 道尔顿，糖基化后的表现分子量为 30400 道尔顿。重组人 EPO 蛋白是世界上许多生物制药公司广泛生产的治疗药物之一。应用多种类型的 HPLC 方法（包括反相色谱法）可实现 EPO 蛋白及其杂质的分离。本文介绍了应用分析型反相色谱法对 CHO 产生的具有不同疏水性的 EPO 蛋白的分离。分析方法采用配备 1.8 μm Agilent ZORBAX 300SB-C18 色谱柱的 Agilent 1290 Infinity LC 系统。

原料和方法

HPLC 系统

Agilent 1290 Infinity LC 系统耐压达 1200 bar。Agilent 1290 Infinity LC 设计可提供最高的分析速度、分辨率和灵敏度。其强大的性能使您能够采用任何类型的填料颗粒、任何规格的色谱柱及任何类型的流动相和固定相。创新的技术可将 UHPLC、RRLC 和 HPLC 应用性能提升到一个新的水平。凭借革命性的智能化系统模拟技术,1290 Infinity 成为了世界上第一个通用的 LC 系统,它可运行其他 HPLC 和 UHPLC 系统的方法,无需更换任何仪器组件或改变原方法就可获得相同的色谱结果。

HPLC 色谱柱

选用 Agilent ZORBAX 300 SB-C18 RRHD, 2.1 $\times$ 50 mm, 1.8 μm 色谱柱（部件号 857750-902）。这些色谱柱用于蛋白质一级结构的分析，可在生物治疗药物的发现、开发和生产应用中进行蛋白质的鉴定、蛋白质翻译后修饰的定量分析及杂质谱分析。新型大孔(300Å)RRHD 色谱柱可为完整蛋白质及其降解物的反相分离提供 UHPLC 级的性能。ZORBAX StableBond 固定相在低 pH 下具有高稳定性，允许常规使用包含三氟乙酸(TFA)或甲酸(FA)的流动相作洗脱剂，不会减少色谱柱的使用寿命。该色谱柱可在高达 90 °C 的温度条件下保持稳定。

化学品与试剂

CHO 细胞产生的人 EPO 蛋白购自 Creative BioLabs 公司 (Shirley, NY)。三氟乙酸购自 Sigma-Aldrich 公司(St. Louis, MO)。乙腈购自 Honeywell-Burdick & Jackson 公司(Muskegon, MI)。

液相方法

表 1 列出了本实验采用的典型色谱条件。如有改动则在相关色谱图中标出。

表 1. 基本色谱条件

参数	条件
色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18, 2.1 $\times$ 50 mm, 1.8 μm
样品	重组人 EPO 蛋白(rEPO)
样品浓度	1.0 mg/mL
进样体积	3 μL
流速	1.0 mL/min
柱压	650 bar
流动相 A	0.1% TFA 去离子水溶液
流动相 B	0.01% TFA 乙腈溶液
检测器	UV, 280 nm
系统	Agilent 1290 Infinity HPLC

结果与讨论

通过优化流速和梯度程序实现高分辨率的快速分离

分别设定了 0.5、1.0 和 1.5 mL/min 三个流速，梯度程序起初为 5.0%B，均在 2.5 min 内升至 100%B。随后采用 5.0%B 再平衡色谱柱 2.5 min。应用色谱柱快速分离测试混合物，并在 5 min 内使 rEPO 蛋白与其杂质分离。使用 ZORBAX 300 SB-C18, 1.8 μm 色谱柱分离蛋白质时，1.0 和 1.5 mL/min 流速下峰形的完整性和对称性展现出快流速的优势（图 1，表 2），表明 1.8 μm 颗粒填料适合快速分离。

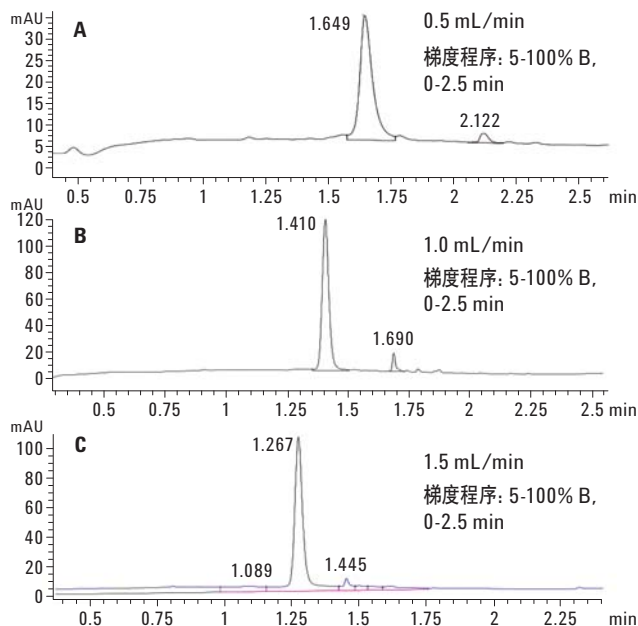


图 1. 使用 Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18, 2.1 × 50 mm, 1.8 μm 色谱柱选择不同的流速分离 rEPO 蛋白质

表 2. rEPO 蛋白分离中，流速对保留时间、不对称性及峰宽的影响。

流速 (mL)	柱压 (bar)	保留时间 (min)	不对称性	峰宽
0.5	350	1.64	0.6	0.047
1.0	650	1.41	0.85	0.030
1.5	890	1.26	0.84	0.030

也可选择不同的梯度程序实现同样时间的快速分析。图 2 展示了以 1.0 mL/min 流速分离 rEPO 蛋白，梯度程序为 0、2.5、3.0 min 时流动相 B 依次由 10% 升至 50%，再升至 70%，下次进样前采用 10% B 再平衡色谱柱 2 min。图 2 表明，该色谱柱能以与图 1B 的梯度类似的方式将 rEPO 蛋白与其杂质分离，分离所得色谱峰数目相同，只是保留时间不同而已。此外，该色谱柱可实现快速平衡表明该色谱柱适合宽含量范围有机溶剂的使用。

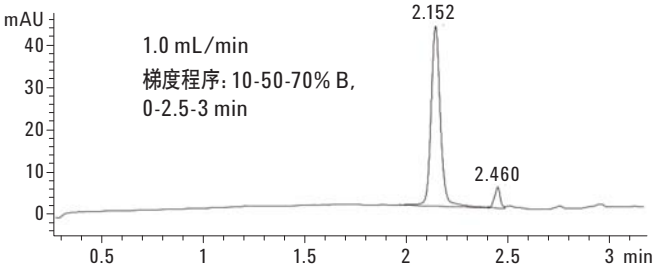


图 2. 使用 Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18, 2.1 × 50 mm, 1.8 μm 色谱柱，可选择不同的梯度程序，5min 内实现 rEPO 与其杂质的分离

分离热降解的重组人 EPO 蛋白

重组人 EPO 蛋白在中性 pH (pH 7.0) 和酸性 pH (pH 4.0) 条件下，60 °C 恒温过夜(16 h)。由于其特性决定，rEPO 蛋白在不同 pH 条件下加热至如 60 °C 的高温时，会发生降解或亚型转换。中性 pH 条件下，rEPO 较少发生变构形成异构体，而酸性 pH 条件下，rEPO 蛋白结构将显著改变，pH 越低，变构现象越明显 1。图 3 展示了在两种 pH 条件下加热 rEPO 蛋白的色谱图。A 图为样品在中性 pH 下加热处理后的分离色谱图。如图所示，ZORBAX RRHD 300 SB-C18, 1.8 μm 色谱柱实现了 rEPO 主峰与其降解产物或异构体的完美分离。我们注意到，rEPO 蛋白的组成并没有发生太多改变，rEPO 蛋白主峰的保留时间仍为 1.4 min，与图 1B 中的（未加热样品）样品分离结果相同。然而，杂质峰明显增高，并能与主峰良好分离（对比图 1B）。图 3B 展示了 pH 6.0 条件下热降解 rEPO 的分离，该分离采用了与中性 pH 下热降解样品相同的分离条件，但色谱图却完全改变。如前面分析所述，酸性条件下加热非常容易使 rEPO 蛋白变构并降解。如图所示，主峰的保留时间从 1.4 min 迁移至 1.68 min，且包含了一个右肩峰，此外，还出现了较多的杂质峰。这些结果清楚地表明，ZORBAX RRHD 300 SB-C18, 1.8 μm 色谱柱也能良好地分离 rEPO 杂质及其降解产物。

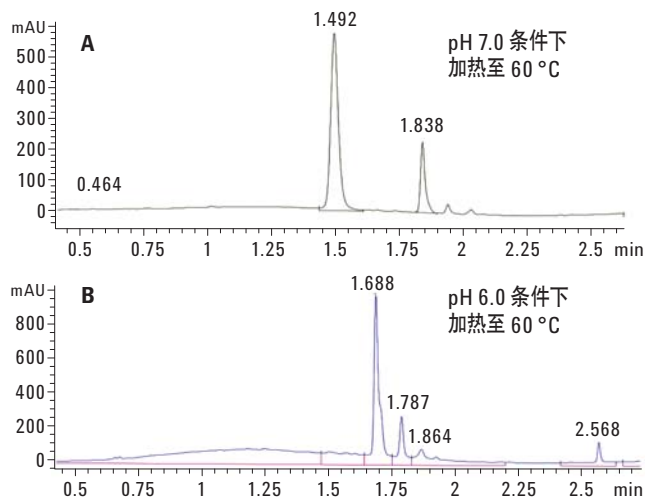


图 3. 使用 Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18, 2.1×50 mm, $1.8 \mu\text{m}$ 色谱柱良好分离了热处理的 rEPO 蛋白。本分离采用 1.0 mL/min 的流速, 在 0 至 2.5 min 内, 溶剂 B 由 5 % 升至 100 %

参考文献

1. Yoshiyuki Endo, *et al.*, *J. Biochem* (1992) 112 (5): 700-706.

更多信息

如需了解更多有关我们产品和服务的信息, 请登录我们的网站:

www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和技术指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2011

2011 年 10 月 13 日, 中国印刷

5990-9248CHCN



Agilent Technologies