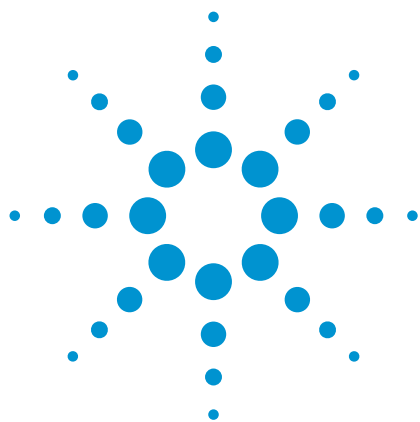




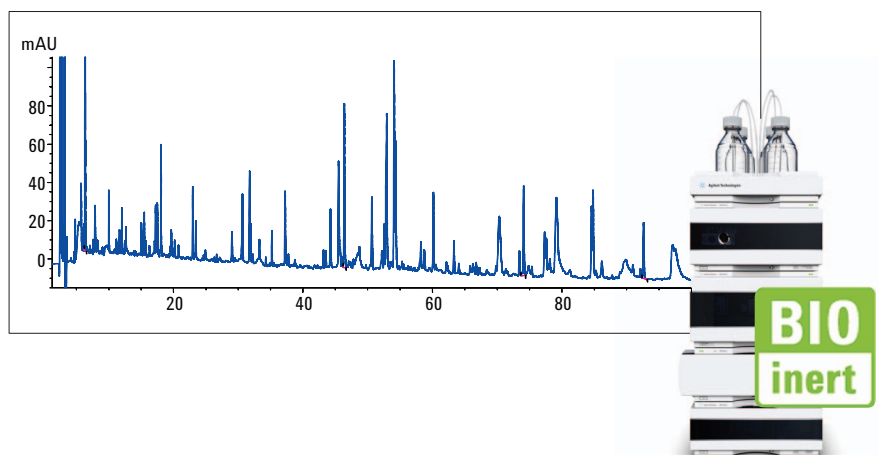
单克隆抗体的 QA/QC：采用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱和 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统进行高分离度肽图分析

应用简报

生物制药

作者

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



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系统进行单克隆抗体肽图分析的应用解决方案，并证明了其可靠性。该仪器具有生物惰性和耐腐蚀性，再结合简单且重现性好的方法，使得该解决方案尤其适用于生物制药行业中单克隆抗体的 QA/QC 分析。为了获得更高的分离度和检测灵敏度，我们将方法转移到 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统上，并使用了亚 2 μm 粒径色谱柱。1290 Infinity 液相色谱系统卓越的性能范围（压力与流速）克服了由于使用较小粒径填料和较长色谱柱导致背压上升的挑战，使该系统成为高分离度和高灵敏度分析应用的理想选择。



Agilent Technologies

前言

肽图分析是研究蛋白质一级结构的一项基本技术。对于重组蛋白质药物，肽图分析用于最初的“结构证明”表征，即确认预期氨基酸序列的表达并表征任何翻译后修饰。此外，肽图分析还被用于随后产品的批间一致性测试（即“指纹图分析”），以支持其生物工艺开发和临床试验。肽图分析也可用作当前监测重组细胞系“遗传稳定性”的方法。最近，新的技术平台使肽图分析方法变的更加快速和便捷，从而拓展到过程监控及其它更高样品量的应用中¹。

为了进行蛋白质表征，需要对复杂的蛋白质裂解产物进行色谱分离，这是一项严峻的挑战。这里，我们展示了使用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统，以及 Agilent Poroshell 120 SB C18，4.6 × 150 mm，2.7 μm 色谱柱分离 IgG1 单克隆抗体胰蛋白酶裂解多肽的优势。本文介绍了使用 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统，验证胰蛋白酶裂解 IgG1 肽图的优化 RP-HPLC 方法及其稳定性。为进一步提高方法性能，我们将方法转移到配备了 Agilent ZORBAX RRHD SB C18，2.1 × 150 mm，1.8 μm 色谱柱的 1290 Infinity 液相色谱系统上。使用亚 2 μm 颗粒填料的超高效液相色谱 (UHPLC) 分离，改善了单位时间内的分离度和检测灵敏度，缩短了运行时间，并使肽图分析变得更加简便。最后，将两根 RRHD 色谱柱串联使用，以评估更长亚 2 μm 颗粒色谱柱的肽图分析性能。

仪器设备

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 生物惰性高效自动进样器 (G5667A)
- Agilent 1200 Infinity 系列恒温器 (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 Poroshell 120 SB C18 色谱柱，4.6 × 150 mm，填充 2.7 μm 填料（部件号 683975 902）

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。

采用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统进行 UHPLC 分析，该系统包括如下模块：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵系统，带一体式真空脱气机 (G4220A) 和 100 μL Jet Weaver 混合器
- Agilent 1290 Infinity 高效自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212A)，配备最大光强流通池（容积 1.0 μL，光程 10 mm）(G4212-60008)
- Agilent ZORBAX RRHD SB C18 色谱柱，2.1 × 150 mm，填充 1.8 μm 填料（部件号 859700-902）。

软件

- 安捷伦化学工作站 B.04.02

蛋白质分析

采用 Agilent 2100 生物分析系统和 Agilent Protein 230 试剂盒进行蛋白质分析。按照蛋白质 230 试剂盒指南中所述执行蛋白质上样和样品分析²。将 4 µL IgG1 和裂解产物溶液与 2 µL 样品缓冲液混合（非还原环境）。将样品溶液和分子量标准品置于 95 °C 中保温 5 min，然后用 84 µL 水稀释。取 6 µL 置于蛋白质芯片中进行分析。采用 Agilent 2100 Expert 软件进行运行控制和数据分析。

色谱参数

反相液相色谱和 UHPLC 中使用的色谱参数见表 1。

试剂、样品与材料

人单克隆抗体 IgG1 是一种专有的药物分子。DL-二硫苏糖醇 (DTT)、碘乙酰胺、三羟甲基氨基甲烷和碳酸铵均购自西格玛奥德里奇公司。高品质测序级胰蛋白酶来自安捷伦科技公司。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。乙腈为“梯度级”，购自 Lab-Scan 公司（泰国曼谷）。

参数	Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统	Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统（单柱）	Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统（双柱）
柱温箱	50 °C	50 °C	50 °C
采集速率	20 Hz	20 Hz	20 Hz
数据采集	214 和 280 nm	214 和 280 nm	214 和 280 nm
流通池	60 mm 光程	10 mm 光程	10 mm 光程
进样体积	10 µL（洗针进样， 针冲洗口启动 6 秒）	2.1 µL（洗针进样， 针冲洗口启动 6 秒）	2.1 µL（洗针进样， 针冲洗口启动 6 秒）
样品恒温箱	5 °C	5 °C	5 °C
流动相 A	水 + 0.1% TFA	水 + 0.1% TFA	水 + 0.1% TFA
流动相 B	乙腈 + 0.09% TFA	乙腈 + 0.09% TFA	乙腈 + 0.09% TFA
梯度程序	0 min 时 2% B 15 min 时 20% B 50 min 时 40% B 55 min 时 60% B 60 min 时 90% B 61 min 时 2% B	0 min 时 2% B 15 min 时 20% B 50 min 时 40% B 55 min 时 60% B 60 min 时 90% B 61 min 时 2% B	0 min 时 2% B 30 min 时 20% B 100 min 时 40% B 110 min 时 60% B 120 min 时 90% B 122 min 时 2% B
后运行时间	10 min	10 min	10 min
流速	1.2 mL/min	0.25 mL/min	0.25 mL/min

表 1
色谱参数

步骤

裂解方案

IgG1 胰蛋白酶裂解步骤同以前的描述一致³。

稳定性研究

改变下列五个关键方法参数来评估方法的稳定性

- 进样体积的变化 ($\pm 10\%$)
- 柱温的变化 ($\pm 5\%$)
- 梯度斜率的变化 ($\pm 10\%$)
- 改性剂浓度的变化 ($\pm 10\%$)
- 流速的变化 ($\pm 2\%$)

对于每个稳定性参数，取 10 μL 裂解液进样分析，根据 6 次重复测定的数据计算峰面积和保留时间。计算与原方法相比的峰面积/保留时间 (RT) 的百分比偏差（准确度%）。

将随意选取的 4 个基线分离色谱峰（6 次重复测定）的 5 sigma 峰宽进行平均，并利用这些数值按照下式计算峰容量 (Pc)：

$$P_c = 1 + (T_g/P_w)$$

T_g = 梯度时间

P_w = 平均峰宽

方法转移

将原来使用 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统的方法转移到 1290 Infinity 液相色谱系统上，以展现 1290 Infinity 液相色谱系统的强大性能。使用 Agilent ZORBAX RRHD SB C18, $2.1 \times 150 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$ 色谱柱。使用与 1260 Infinity 生物惰性液相色谱方法相同的梯度程序和流动相。采用安捷伦方法转换软件确定流速和进样体积。另外，将两根 ZORBAX RRHD SB C18, $2.1 \times 150 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$ 色谱柱串联使用，梯度时间加倍，从而保持进样体积和流速不变。对得自 1260 Infinity 生物惰性液相色谱，以及配备了单根和两根串联色谱柱的 1290 Infinity 液相色谱系统的峰容量进行了比较。

结果与讨论

分离和检测

胰蛋白酶是一种肽链内切酶，它可以特异地切断蛋白质赖氨酸和精氨酸残基羧基一侧的肽键。采用 RP HPLC 方法分离多肽要求蛋白质完全裂解，裂解的完全程度决定了肽图分析的质量。在本文中，我们使用 Agilent 2100 生物分析仪确定裂解方案的效率。通过比较未裂解的 IgG1（泳道 2）和裂解的 IgG1（泳道 3），我们可以清楚地看到，裂解样品中没有蛋白质条带，说明 IgG1 已完全裂解（图 1）。

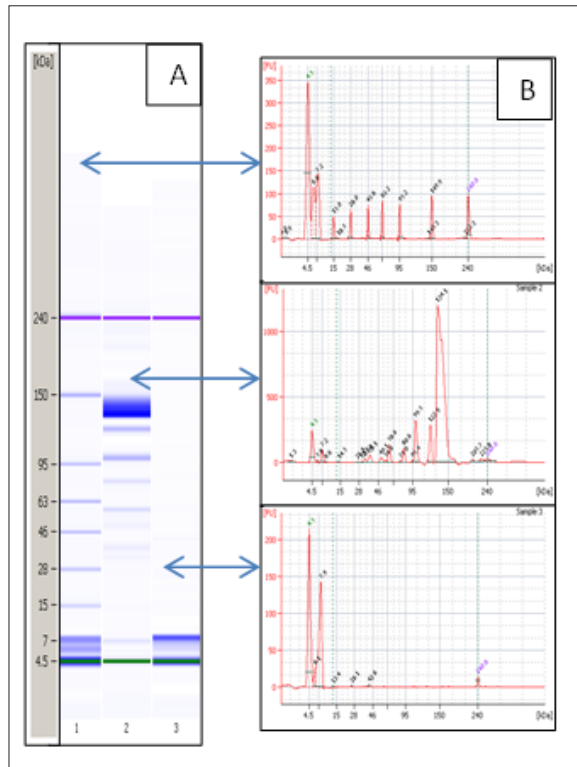


图 1

采用 Agilent 2100 生物分析系统分析胰蛋白酶裂解和完整的单克隆 IgG1 样品。

图 A. 凝胶图像，第 1 道，分子量标记，第 2 道，完整 IgG1，第 3 道，IgG1 裂解产物。图 B. 电泳图。

x 轴：相对分子量，y 轴：代表丰度的荧光信号强度

肽图分析最初使用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统来进行，以优化分离条件（表 1）。IgG1 裂解产物 6 次重复测定的重叠色谱图显示峰形尖锐，且分离度良好，并具有优异的分重复现性（图 2）。IgG1 裂解产物的典型色谱图（图 3）显示了所选择的整个色谱图中的 4 个（基线分离的）色谱峰，用于进行方法验证和峰容量计算。

保留时间和峰面积的精确度

IgG1 肽图 6 次重复测定中所选择的 4 个色谱峰的平均保留时间和峰面积的 RSD 见表 2。峰 2-4 保留时间的 RSD 小于 0.05%，而这些峰具有较大的 k' ，说明系统具有优异的梯度重现性。即使是很早洗脱出的峰 1，其保留时间的 RSD 也仅有 0.26%。峰面积的 RSD 小于 2.14%，表明进样精确度良好。上述 RSD 值证明方法的稳定性良好，并且液相色谱系统的精确度良好。

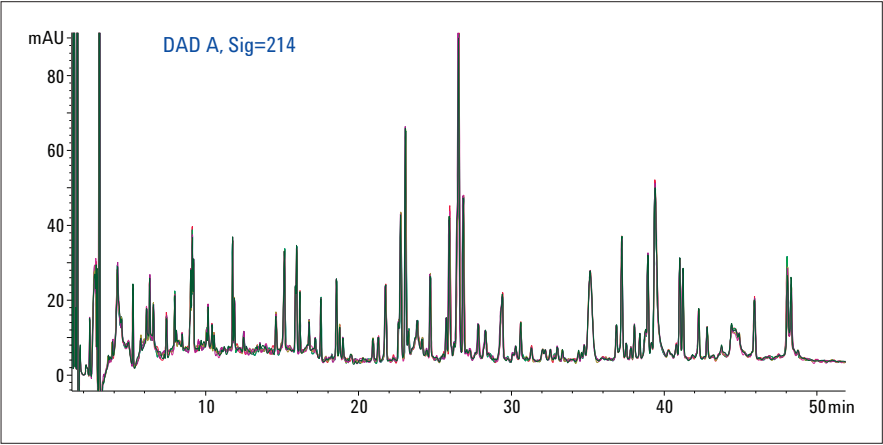


图 2
采用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统和 Agilent Poroshell 120 SB C18, 4.6 × 150 mm, 2.7 μm 色谱柱 6 次重复进样分离 IgG1 裂解产物的重叠肽图

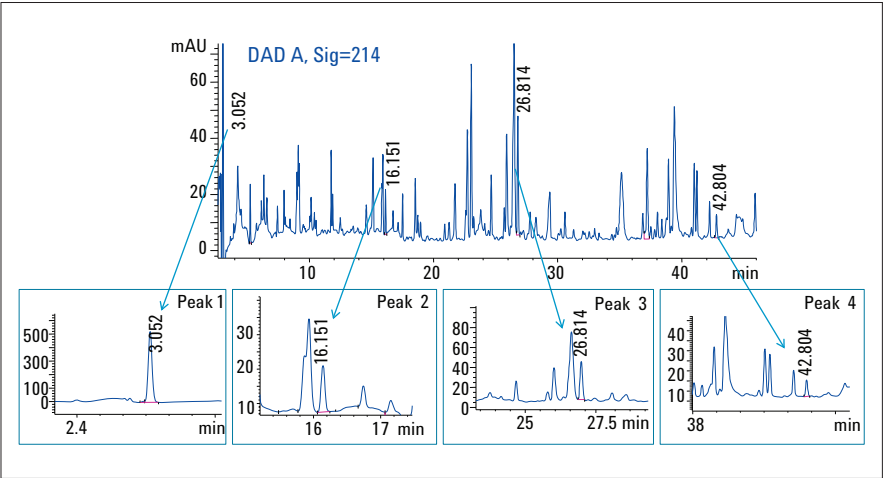


图 3
用于方法验证研究和峰容量计算所选择的色谱峰

峰号	保留时间		峰面积	
	平均值 (min)	RSD (%)	平均值 (mAU/min)	RSD (%)
1	3.03	0.26	1393	0.40
2	16.16	0.04	63.98	2.14
3	26.86	0.04	250.83	0.63
4	42.80	0.01	54.33	1.90

表 2
整个色谱图中选择的 4 个色谱峰的保留时间和峰面积的 RSD (%), n = 6

稳定性

改变原方法的 6 个关键参数来评估方法的稳定性（表 3 和 4）。进样体积、柱温、梯度斜率、改性剂浓度和流速对保留时间的影响均在可接受的限度内。保留时间和峰面积 RSD 值的允许偏差分别设定为 ±3.0%（表 3）和 ±5%（表 4）。红色数字表示结果超过了允许偏差的范围。当进样体积与实际方法相比改变了 ± 10% 时，所有 4 个色谱峰峰面积偏差的 RSD 均超过了允许限度。流速的改变使峰 2 和峰 3 峰面积偏差的 RSD 正好位于界限上，而峰 4 峰面积的偏差则很明显。我们的结果表明，方法对于常规的 QA/QC 应用是可靠的。在很大程度上，系统的性能不受关键参数改变的影响。当然，有些参数非常关键，必须仔细控制。

峰容量

峰容量本质上是色谱图中死体积和保留上限间可完全分离色谱峰的数量。使用 Agilent Poroshell 120 SB C18，4.6 × 150 mm，2.7 µm 色谱柱计算的峰容量见表 5。292 的峰容量值对于肽图分析应用而言是合适的。

保留时间偏差（限度：± 3.0%）					
参数	变化值	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4
进样体积的变化（10 µL ± 10%）	- 1 µL	-0.098	0.006	-0.11	0.10
	+1 µL	-0.098	0.12	0.07	0.13
柱温的变化 (± 5%)	- 5%	-0.69	0.30	0.14	0.26
	+5%	0.55	0.50	0.44	0.32
梯度斜率的变化 (± 10%)	- 10%	-0.098	1.32	2.19	0.83
	+10%	-0.42	0.06	0.81	0.69
改性剂浓度的变化 (± 10%)	-10%	0.0	0.87	0.85	0.241
	+10%	-0.72	0.68	0.14	0.02
流速的变化 (± 2%)	- 2%	-1.40	0.99	1.19	0
		1.87	0.56	0.37	0.26

表 3
稳定性（保留时间 RSD %），n = 6，保留时间偏差限度± 3%

峰面积偏差（限度：± 5.0%）					
参数	变化值	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4
进样体积的变化（10 µL ± 10%）	- 1 µL	11.77	17.05	4	3.84
	+1 µL	-11.19	-14.24	-11.6	-9.61
柱温的变化 (± 5%)	- 5%	-1.65	-3.26	3.2	-3.84
	+5%	-0.71	-0.71	1.7	-5.76
梯度斜率的变化 (± 10%)	- 10%	-2.22	2.22	0.40	1.92
	+10%	-3.08	-3.086	2.4	7.6
改性剂浓度的变化 (± 10%)	-10%	3.87	2.97	-5.2	-1.9
	+10%	-0.78	-0.15	-1.44	-3.84
流速的变化 (± 2%)	- 2%	-4.73	1.40	-5.6	-7.6
	+ 2%	0	7.19	-2.4	-11.53

表 4
稳定性（峰面积 RSD %），n = 6，峰面积偏差限度± 5%

5 sigma 峰宽	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4
重复测定 1	0.09	0.132	0.22	0.225
重复测定 2	0.095	0.153	0.22	0.237
重复测定 3	0.092	0.265	0.2	0.245
重复测定 4	0.1	0.132	0.19	0.246
重复测定 5	0.095	0.131	0.21	0.288
重复测定 6	0.081	0.132	0.19	0.288
平均值	0.0921	0.140	0.205	0.254
平均 5 sigma 峰宽 (Pw)			0.172	
梯度时间 (Tg)			50	
Tg/Pw			291	
峰容量 = 1 + (Tg/Pw)			292	

表 5
峰容量（对于所选择的 4 个基线分离的色谱峰），n = 6

将方法转移到 1290 Infinity 液相色谱系统

1290 Infinity 液相色谱系统具有超常的性能范围，适合分离复杂样品。因此，我们采用方法转换软件将该方法转移到 1290 Infinity 液相色谱系统上。图 4 中所示为分别采用 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统和 Poroshell 120 SB C18 色谱柱，以及 1290 Infinity 液相色谱系统和 ZORBAX RRHD SB C18，2.1 × 150 mm，1.8 μm 色谱柱分析 IgG1 的重叠肽图。两张色谱图高度相似。图 5 中所示为采用 1290 Infinity 液相色谱系统和两根串联 RRHD 色谱柱 6 次重复进样分析 IgG1 裂解产物的重叠肽图。由于峰容量较高（表 6），与 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统相比，配备单根或两根串联窄径色谱柱的 1290 Infinity 液相色谱系统可以获得更尖锐和更窄的色谱峰。使用单根 RRHD 色谱柱时峰容量提高了 7%，采用串联色谱柱时则提高了 39%，这说明该系统对于分离复杂样品具有卓越的能力。因此，使用 1.8 μm 颗粒色谱柱可以在相近的分离时间里获得更高的分离度。

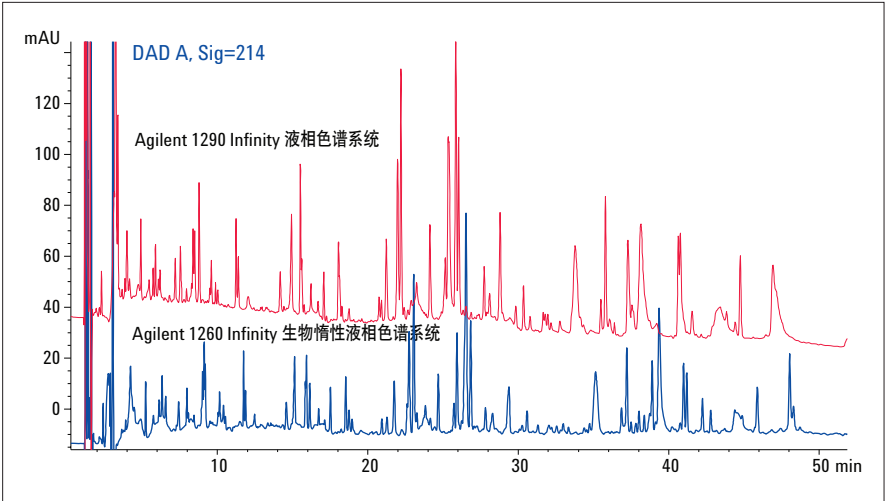


图 4
IgG1 的肽图。分别采用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统和 Agilent Poroshell 120 SB C18，4.6 × 150 mm，2.7 μm 色谱柱，以及 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统和单根 Agilent ZORBAX RRHD SB C18，2.1 × 150 mm，1.8 μm 色谱柱分析的重叠色谱图

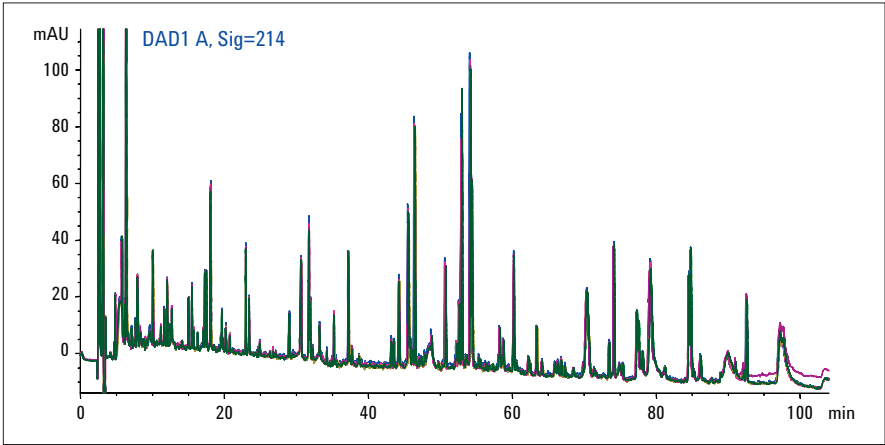


图 5
采用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统和串联色谱柱（Agilent ZORBAX RRHD SB C18，2.1 × 150 mm，1.8 μm 色谱柱）的 6 次重复进样分析 IgG1 裂解产物的重叠肽图

仪器平台	色谱柱	峰容量
Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱	Agilent Poroshell 120 SB C18，4.6 x 150 mm，2.7 μm	292
Agilent 1290 Infinity 液相色谱	单根 Agilent ZORBAX RRHD SB C18，2.1 x 150 mm，1.8 μm 色谱柱	313
Agilent 1290 Infinity 液相色谱	两根串联 Agilent ZORBAX RRHD SB C18，2.1 x 150 mm，1.8 μm 色谱柱	406

表 6
峰容量比较（6 次重复测定的平均值）

结论

肽图分析是研究蛋白质一级结构的重要方法，广泛应用于生物制药的 QA/QC 分析。在本文中，我们展示了采用该技术分析单克隆抗体的一些安捷伦工具。我们首先使用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统和 Poroshell 120 SB C18， 4.6×150 mm， $2.7 \mu\text{m}$ 色谱柱开发了简单、高分离度分离 IgG1 胰蛋白酶裂解产物的方法。方法的峰面积、保留时间精确度和稳定性优异，表明方法的可靠性较高。为了获得更高的峰容量，我们将原始方法转移到配备 ZORBAX RRHD SB C18， 2.1×150 mm， $1.8 \mu\text{m}$ 色谱柱的 Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统上。由于提高了峰容量，采用 $1.8 \mu\text{m}$ 颗粒色谱柱可以获得更高的分离度。采用两根串联的 $1.8 \mu\text{m}$ 色谱柱可以进一步显著提高峰容量。这仅在系统能够承受超高背压的情况下才可实现。此外，Agilent 2100 生物分析系统为裂解方案的有效性提供了保证。

参考文献

1. J. Bongers *et al.* J. Pharm. Biomed. Anal. 21 (2000) 1099–1128
2. “Protein 230 Kit Guide (Protein 230 试剂盒指南)” 安捷伦出版号 G2938-90054, 2011
3. Peptide Mapping of a Monoclonal Antibody using a Microfluidic-based HPLC-Chip coupled to an Agilent Accurate-Mass Q-TOF LC/MS (采用安捷伦精确质量飞行时间液质联用系统结合微流体 HPLC-Chip 对单克隆抗体进行肽图分析)，安捷伦应用简报，出版号 5990-4587EN, 2011

www.agilent.com/chem/bio-inert

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2012
2012 年 6 月 1 日, 中国出版
5991-0524CHCN



Agilent Technologies