

Weiterentwicklung der chromatographischen Leistungsfähigkeit im Bereich des Peptid-Mappings

Mit der Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18-Inert-Säule

Autoren

Jordy Hsiao, Mahsan Miladi,
Li Gu, Stephen Sciuto,
Guannan Li und
Anne Blackwell
Agilent Technologies, Inc.

Zusammenfassung

Diese Studie hebt die Leistungsvorteile der Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18-Inert-Säule für das Peptid-Mapping hervor. Im Vergleich zu herkömmlicher Edelstahl-Hardware bietet die Altura-Säule eine verbesserte Peakform, Reproduzierbarkeit und Auflösung, insbesondere für hydrophobe und modifizierte Peptide. Bei der LC/MS-Analyse von synthetischen mAb-Peptiden und mit Trypsin aufgeschlossenem Herceptin ermöglichte die Inert-Säule eine zuverlässige Identifizierung posttranslationaler Modifikationen bei optimierten Peakformen und Auflösungen für deamidierte Peptide. Eine verbesserte Trennung von deamidierten Varianten zeigt, wie wertvoll die Säule für biopharmazeutische Workflows ist, die einer hohen Empfindlichkeit und Präzision bedürfen.

Einführung

Das Peptid-Mapping ist eine unerlässliche Technik bei der Entwicklung von Biopharmazeutika, mit der Proteinsequenzen bestätigt und posttranslationale Modifikationen (PTMs) identifiziert werden. Allerdings können Wechselwirkungen zwischen den Analyten und den Metalloberflächen innerhalb der Hardware für die Flüssigkeitschromatographie (LC) zu Beeinträchtigungen in Bezug auf Empfindlichkeit und Auflösung führen, insbesondere bei geladenen oder phosphorylierten Peptiden. Jüngste Studien haben bekräftigt, wie wichtig inerte Flusswege und inerte Säulen-Hardware für die Bewältigung dieser Herausforderungen sind.^{1,2}

In einer früheren Studie wurde eine unter Verwendung der AdvanceBio Peptid-Mapping-Säule angewandte Methode zum Peptid-Mapping optimiert, um die Analysendauer von 2,5 Stunden auf 1 Stunde zu verkürzen. Hierfür wurden die Partikel im Sub-2-µm-Bereich der ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18-Säule und ein UHPLC-System genutzt.³ Trotz der deutlich kürzeren Analysendauer wurden bei der AdvanceBio Peptid-Mapping-Säule und der ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18-Säule vergleichbare Peptidelutionsmuster beobachtet, womit Methodenübertragbarkeit und einheitliche analytische Ergebnisse über verschiedene Säulentecnologien hinweg gewährleistet sind. Diese Verbesserung fördert einen höheren Probendurchsatz und reduziert zeitgleich den Lösungsmittelverbrauch, ohne Abstriche bei der Leistung in Kauf nehmen zu müssen.

Für eine noch höhere Leistungsfähigkeit kommt bei den Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18-Inert-Säulen die Ultra Inert-Technologie zur Verwendung, die darauf ausgelegt ist, Wechselwirkungen zwischen Metallen und Analyten zu minimieren, während die mechanische Festigkeit von Edelstahl gewahrt bleibt. In dieser Studie vergleichen wir die Leistungsfähigkeit von Altura-Inert-Säulen mit der von herkömmlichen Edelstahlsäulen unter Verwendung der Agilent 1290 Infinity II Bio LC- und Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF-Systeme zur LC/MS/MS-Analyse von synthetischen Peptiden und Proben aufgeschlossener monoklonaler Antikörper (mAb).

Experimentelles

Probenvorbereitung

Unter Befolgung eines zuvor beschriebenen Protokolls⁴ mit Veränderungen wurde Herceptin mit Trypsin aufgeschlossen. Konkret erfolgte der Aufschluss mit Trypsin unter Anwendung eines Protein-Enzym-Verhältnisses von 50:1. In dem vorhergehenden Protokoll wurde Trypsin/LysC ohne Schritt zur Probenaufreinigung in einem Protein-Enzym-Verhältnis von 25:1 verwendet.

Im Vorfeld der LC/MS-Analyse wurden die Proben unter Verwendung einer C18-Spin-Säule aufgereinigt, um Verunreinigungen zu entfernen und die Lebensdauer der Säule zu verlängern.

Säulen (analytisch)

Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18-Säule,
2,1 × 150 mm, 1,8 µm (Bestellnummer 959759-902)

Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18-Inert-Säule,
2,1 × 150 mm, 1,8 µm (Bestellnummer 204215-308)

Geräte

Die LC/MS-Analyse wurde mit der folgenden Gerätekonfiguration durchgeführt:

- Agilent 1290 Infinity II Bio Hochgeschwindigkeitspumpe (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio Mehrfachprobengeber mit Probenthermostat (G7137A)
- Agilent 1290 Infinity II Thermostat für mehrere Säulen (G7116B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6549AA)

Tabelle 1. LC-Parameter.

Agilent 1290 Infinity II Bio LC-System		
Parameter	Wert	
Mobile Phase A	Wasser mit 0,1 % Ameisensäure	
Mobile Phase B	Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure	
Säulentemperatur	60 °C	
Flussrate	0,4 ml/min	
Einlasstemperatur	8 °C	
Gradient 1 für synthetische Peptide	Zeit (min)	% B
	0,00	2
	1,00	2
	7,00	38
	7,10	80
	9,00	80
	9,10	2
	14,0	2
Gradient 2 für tryptischen Herceptin-Aufschluss	Zeit (min)	% B
	0	2
	2	2
	42	42
	43	80
	47	80
	48	2
	55	2

Tabelle 2. MS-Parameter.

Agilent 6545 XT AdvanceBio LC/Q-TOF	
Parameter	Wert
Quelle	Duale AJS-ESI, positiv
Quelle	
Trocknungsgastemperatur	250 °C
Trocknungsgasstrom	10 l/min
Sheathgas-Temperatur	250 °C
Sheathgas-Fluss	12 l/min
Zerstäubedruck	25 psi
Kapillarspannung	3500 V
Nozzle Voltage	0 V
Fragmentor	95 V
Skimmer	50 V

Parameter	Wert
Datenerfassung – MS	
Datenerfassungsmodus	Erweiterter dynamischer Bereich (2 GHz)
Massenbereich	m/z 100 bis 3000
Scanrate	1 Spektrum/s
Referenzmasse	121,0509, 922,0098
Datenerfassung – MS/MS	
Datenerfassungsmodus	Auto-MS/MS
Massenbereich	m/z 100 bis 3000
Scanrate	3 Spektren/s
Isolationsbreite (MS/MS)	Mittel (ca. 4 amu)
Max. Vorläufer pro Zyklus	5
Schwellenwert für MS/MS	6000 Counts und 0,001 %
Vorläuferladung	2+, 3+, > 3+
Ziel	50 000 Counts/Spektrum

Tabelle 3. MS/MS-Parameter für Kollisionsenergie.

Gesteigerte Kollisionsenergie		
Ladung	Steigung	Versatz
2	3,1	1
3	3,6	-4,8
> 3	3,6	-4,8

Tabelle 4. Verarbeitungsparameter der Agilent MassHunter BioConfirm Software, Version 12.1.

Arbeitsablauf und Sequenzierungen		
Arbeitsablauf	Proteinverdau	
Bedingungen	Reduziert	
Sequenzen	Herceptin (direkt alkyliert), Trypsin	
Variable Modifikationen	Deamidierung, G0, G0F, G0F-GlcNAc, G2, G2F, H5N3F1-1, Methylierung, Oxidation (M, W), pyroGlu (E)	
Enzyme	Trypsin	
Peptid-Suche		
Biomolekül-Filter	Anzeige von Molekülen mit MS/MS-Scans	Aktiviert
Extraktion	Verwendung von Peaks mit Höhe	≥ 600 Counts
Ionische Spezies	Positive Ionen	H ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , NH ₄ ⁺
Ladungszustand	Isotopenmodell	Peptide
	Beschränkung der zugewiesenen Ladungszustände auf einen Bereich von	1 bis 5
Peak-Filter (MS/MS)	Höhenfilter, Absoluthöhe aktiviert	≥ 50 Counts
Toleranzen für Übereinstimmung		
Massenübereinstimmung	±5 ppm MS1, ±20 ppm MS2	
Scoring	Warnung, wenn Score < 7,00	
	Keine Übereinstimmung, wenn Score < 5,00 (Sequenzabdeckung)	
Regeln für Übereinstimmung	MS/MS-Fragmentierungstyp	CID
	Anzahl der verpassten Spaltungen	2
	Max. Anzahl der Übereinstimmungen pro Biomolekül	3
	Peptid-Längenbereich	3 bis 70
	Nur entweder N-terminale oder C-terminale Trunkierung zulassen	Ausgewählt
	Maximale Anzahl der Modifikationen	2

Ergebnisse und Diskussion

Bewertung der durch die Inert-Säulen-Hardware bedingten chromatographischen Verbesserungen

Zur Beurteilung der Vorzüge in Bezug auf die Leistungsfähigkeit der Altura ZORBAX Eclipse Plus C18-Inert-Säulen-Hardware bei Arbeitsabläufen für das Peptid-Mapping wurde diese mit der ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18-Säule aus Edelstahl verglichen. Eine Mischung aus synthetischen Peptiden mit mAb-Sequenzen wurde unter Verwendung des 1290 Infinity II Bio LC-Systems in Kombination mit einem 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF analysiert.

Erste überlagerte Darstellungen der extrahierten Ionenchromatogramme (Abbildung 1) zeigten vergleichbare Retentionszeiten für beide Säulen. Eine nähere Betrachtung der einzelnen Peptide offenbarte jedoch deutliche Unterschiede in Bezug auf Signalintensität, Peakform und Auflösung (Abbildung 2). Beispielsweise wies das hydrophobe und basische Peptid VVSVLTVLHQDWLNGK mit der Edelstahlsäule breitere Peaks und eine geringere Signalintensität als mit der Altura-Säule auf. Dies legt nahe, dass sich Wechselwirkungen zwischen Metallen und Analyten in der Edelstahl-Hardware auf die Probenwiederfindung und/oder die chromatographische Leistungsfähigkeit auswirken können.

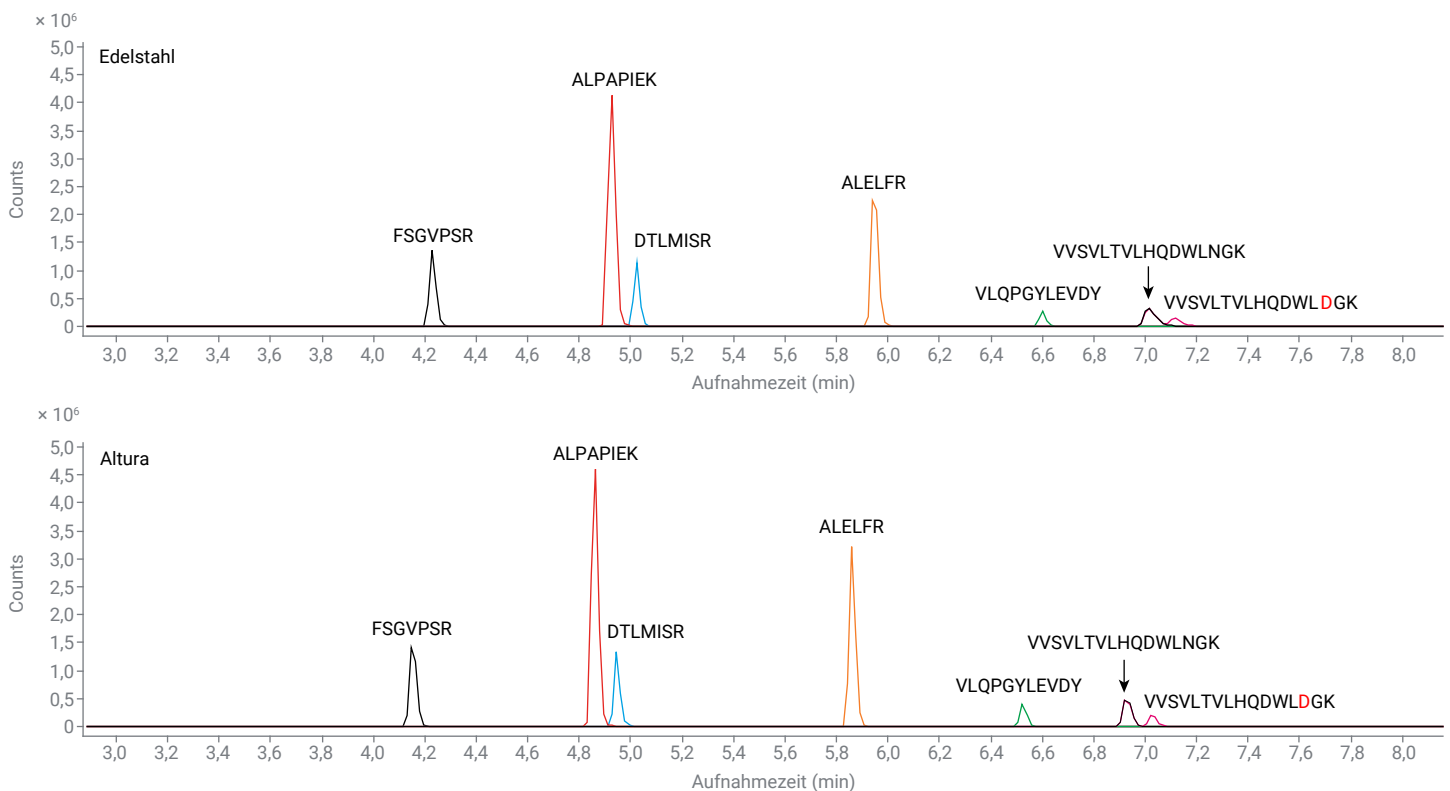


Abbildung 1: Chromatographische Trennung synthetischer Peptide mit monoklonalen Antikörpern unter Verwendung von Edelstahl- und Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18-Inert-Säulen-Hardware.

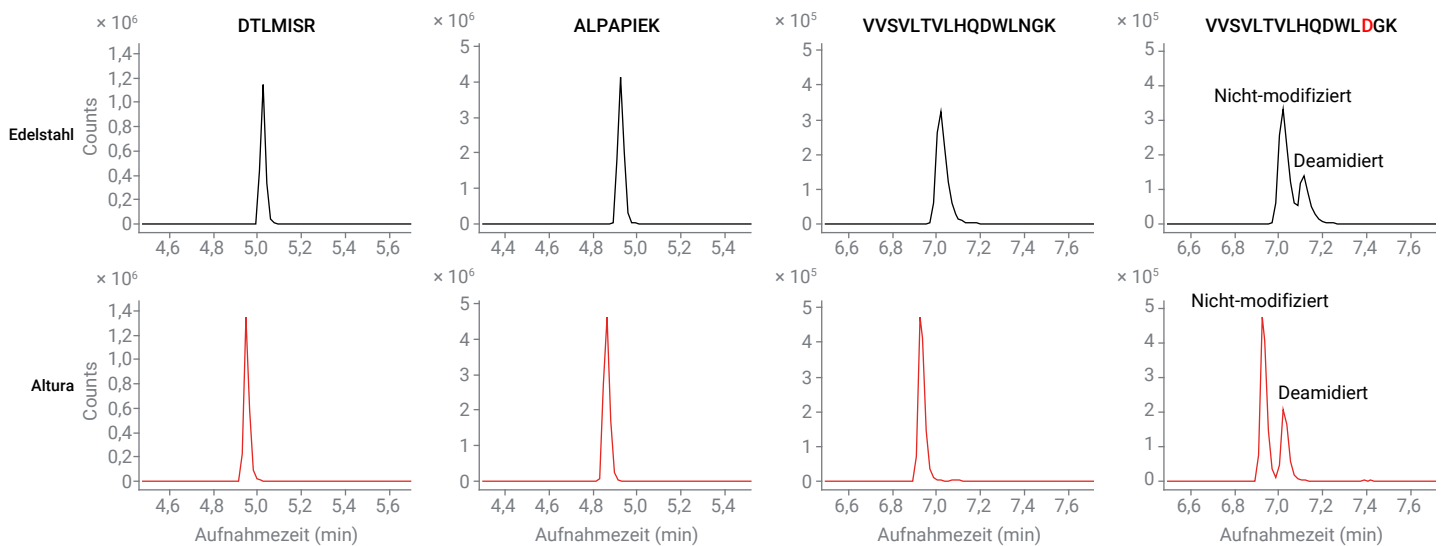


Abbildung 2: Verbesserte Peakform und Auflösung bei deamidierten Peptiden bei Verwendung der Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18-Inert-Säulen-Hardware im Vergleich zu Säulen-Hardware aus Edelstahl.

Eine weiterführende Analyse der deamidierten Variante VVSVLTVLHQDWLDGK, bei der Asparagin an Position 14 in Asparaginsäure umgewandelt wird, zeigte eine verbesserte Trennung von ihrem nicht modifizierten Gegenstück bei Verwendung der Altura-Säule. Diese verbesserte Auflösung ist insbesondere für die Erfassung von posttranslationalen und chemischen Modifikationen wie Deamidierung von Bedeutung, die kritische Qualitätsmerkmale darstellen, die bei der Entwicklung von Biopharmazeutika charakterisiert werden müssen.

Um den konkreten Nutzen der Inert-Säulen-Hardware zu quantifizieren, wurden neue Edelstahl- und Altura-Säulen einer Blindprobeninjektion zur schnellen Konditionierung unterzogen, gefolgt von 30 aufeinanderfolgenden Injektionen der Mischung aus synthetischen Peptiden mit mAb-Sequenzen (Abbildung 3). Diese Ergebnisse zeigten, dass für die Edelstahlsäule mindestens 10 Injektionen notwendig waren, um eine mit der Altura-Säule vergleichbare Peakflächen-Wiederfindung für ALPAPIEK und DTLISR zu erzielen. Für das hydrophobere/basischere Peptid VVSVLTVLHQDWLNGK erforderte die Edelstahlsäule nahezu 20 Injektionen, um der Leistungsfähigkeit der Altura-Säule nahezukommen, was für die schnellere Stabilisierung und die überlegene Reproduzierbarkeit der Inert-Säule spricht.

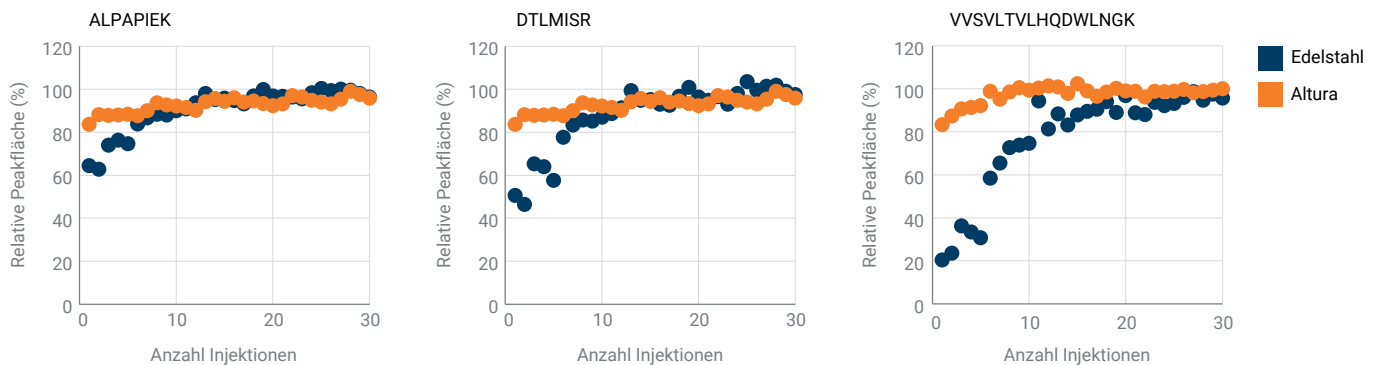


Abbildung 3: Quantitative Vergleiche für synthetische Peptide unter Verwendung von Edelstahl- und Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18-Inert-Säulen. Trends bezüglich der relativen Peakfläche sind für 30 Injektionen grafisch dargestellt. Die Altura-Hardware zeigt im Vergleich zu Edelstahlsäulen eine schnellere Stabilisierung und eine höhere Reproduzierbarkeit, insbesondere bei hydrophoben und basischen Peptiden.

Chromatographische Leistungsmerkmale wie Tailing-Faktoren (TF) – eine Kennzahl zur Quantifizierung der Peak-Asymmetrie – bekräftigten diese Ergebnisse zusätzlich (Abbildung 4). TF für ALPAPIEK und DTLMISR fielen bei beiden Säulen ähnlich aus, was auf vergleichbare Peakformen hindeutet. Allerdings zeigte VVSVLTVLHQDWLNGK einen signifikant besseren TF mit der Altura-Säule (durchschnittlicher TF = 1,3, n = 30) als mit der Edelstahlsäule (durchschnittlicher TF = 1,7, n = 30). Dies korreliert gut mit den qualitativen Beobachtungen in Abbildung 2 und legt nahe, dass die Inert-Hardware die Peak-Symmetrie bei schwierigen Peptiden verbessert.

Eine grafische Darstellung der TF für die 30 Injektionen offenbarte, dass sich die Leistungsfähigkeit der Edelstahlsäule mit der Konditionierung allmählich verbesserte und schlussendlich der Leistungsfähigkeit der Altura-Säule annäherte. Dennoch wirkte sich die anfänglich schlechte Peakform mit der Edelstahlsäule negativ auf die Trennung von nahe beieinander eluierenden Analyten wie dem deamidierten Peptid VVSVLTVLHQDWL^DGK von seinem nicht modifizierten Gegenstück aus. Wie in Abbildung 4C dargestellt, erzielte die Altura-Säule zwischen diesen Varianten eine größere Auflösung, was eine zuverlässigere Identifizierung der chemischen Modifikation ermöglichte.

Trotz Anwendung eines relativ steilen Gradienten (6 % B/min über 6 Minuten) realisierte die Altura-Säule eine bessere Trennung. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass weitere Optimierungen möglich sind, indem der Gradient erweitert oder seine Steigung verringert wird, um die Auflösung noch deutlicher zu verbessern. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die Altura ZORBAX Eclipse Plus C18-Inert-Säule nicht nur die chromatographische Leistungsfähigkeit im Zusammenhang mit der Auflösung für die Erfassung von PTM und chemischen Modifikationen optimiert, sondern auch einen höheren Probendurchsatz und eine verbesserte Charakterisierung von Verunreinigungen fördert, was sie zu einem wertvollen Hilfsmittel für solide Arbeitsabläufe für das Peptid-Mapping macht.

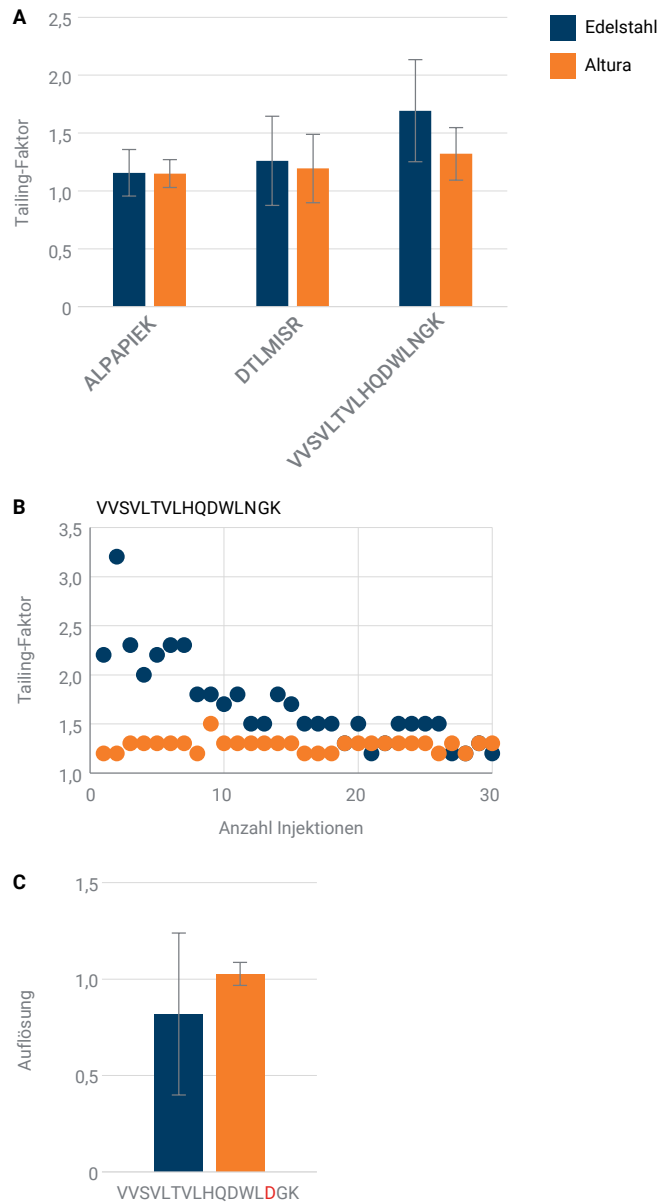
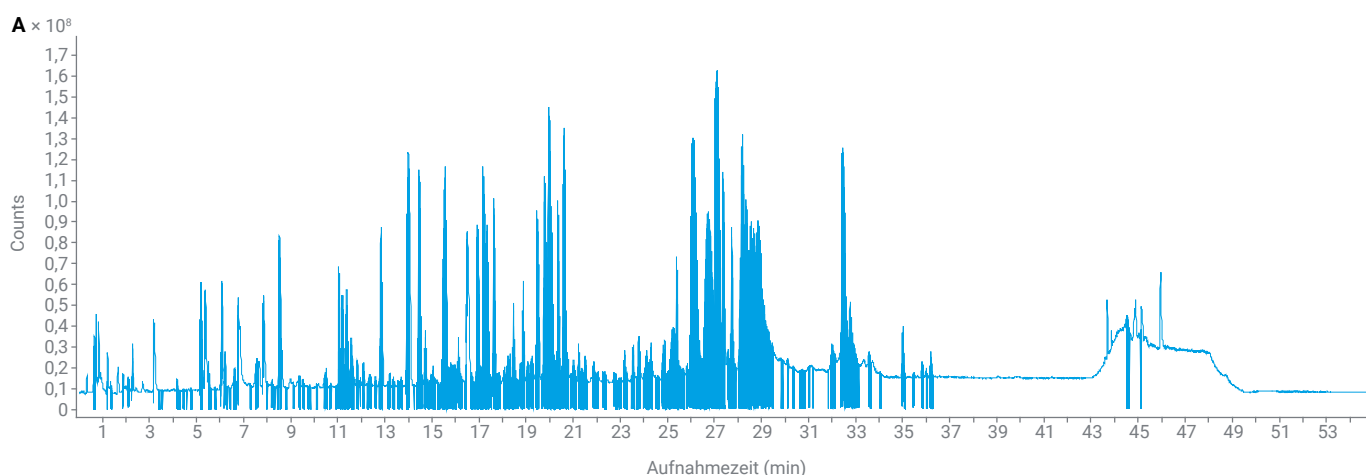


Abbildung 4: Chromatographische Leistungskennzahlen für synthetische Peptide unter Verwendung von Edelstahl- und Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18-Inert-Säulen. (A) Gemittelte Tailing-Faktoren für ALPAPIEK, DTLMISR und VVSVLTVLHQDWLNGK. (B) Trends bezüglich der Tailing-Faktoren sind für 30 Injektionen grafisch dargestellt. (C) Auflösung zwischen dem deamidierten Peptidpaar VVSVLTVLHQDWL^DGK und VVSVLTVLHQDWLNGK. Die Altura-Säule zeigt gegenüber Hardware aus Edelstahl eine verbesserte Peak-Symmetrie und eine optimierte Trennung von nahe beieinander eluierenden Varianten.

Peptid-Mapping von mit Trypsin aufgeschlossenem Herceptin

An die nachgewiesenen Vorzüge der Altura ZORBAX Eclipse Plus C18-Inert-Säule anknüpfend, haben wir diese Technologie auf das Peptid-Mapping einer mit Trypsin aufgeschlossenen Herceptin-Probe angewandt. Die aufgeschlossene Probe wurde unter Anwendung von LC/MS/MS mit der Altura-Säule analysiert. Das resultierende Totalionen-Chromatogramm (TIC) und die Sequenzabdeckung sind in Abbildung 5 dargestellt. Die Analyse ergab eine Sequenzabdeckung von 87,03 %, wobei die fehlenden tryptischen Peptide kürzer und hydrophiler waren.

Hier sei anzumerken, dass der im Vorfeld der LC/MS/MS-Analyse durchgeführte C18-Aufreinigungsschritt, wie im Abschnitt „Experimentelles“ beschrieben, zum Verlust dieser kürzeren hydrophilen Peptide beigetragen haben könnte. Diese Beobachtung beleuchtet einen wichtigen Aspekt für künftige Versuchsaufbauten, die auf eine vollständige Sequenzabdeckung abzielen. In einer früheren Application Note, in der keine Probenaufreinigung für den Herceptin-Aufschluss vorgenommen wurde, ließ sich eine Sequenzabdeckung von rund 98 % erzielen.⁴



B Peptid-Mapping für Herceptin mit Trypsin (Sequenzabdeckung: 87,03 %)

Schwere Kette

1	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFNIK	DTYIHWVRQA	PGKGLEWVAR
51	IYPTNGYTRY	ADSVKGRFTI	SADTSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCSRWG
101	GDGFYAMDYW	GQGTLVTVSS	ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK
151	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT
201	YICNVNHNKPS	NTKVDKKVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG	PSVFLFPPKP
251	KDTLMISRTP	EVTCVVDVDS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN
301	STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ
351	VYTLPPSREE	MTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTPPV
401	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW	QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPG

Leichte Kette

1	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQDVN	TAVAWYQQKP	GKAPKLLIYS
51	ASFLYSGVPS	RFSGSRSGTD	FTLTISSLQP	EDFATYYCQQ	HYTTPPTFGQ
101	GTKVEIKRTV	AAPSVFIFPP	SDEQLKSGTA	SVVCLLNIFY	PREAKVQWKV
151	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSSTLT	LSKADYEKHK	VYACEVTHQG
201	LSSPVTKSFN	RGEC			

Abbildung 5: Peptid-Mapping von mit Trypsin aufgeschlossenem Herceptin unter Verwendung der Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18-Inert-Säule. (A) Totalionen-Chromatogramm (TIC) für die LC/MS/MS-Analyse von mit Trypsin aufgeschlossenem Herceptin. (B) Sequenzabdeckungs-Kartierung mit einer Abdeckung von 87,03 %, wobei die identifizierten Peptide in dunkelblauem Text dargestellt sind. Die fehlenden tryptischen Peptide (hellblauer Text) weisen kurze und hydrophile chemische Merkmale auf, durch die es während des C18-Aufreinigungsschritts zu Probenverlust kommen kann.

Abbildung 6 zeigt die CID-MS/MS-Spektren für das Peptid NTAYLQMDSLRL in seiner deamidierten Form. Fragment-Ionen-Daten ermöglichten eine zuverlässige Zuordnung der Deamidierungsstelle an Position 8, was den Nutzen von MS/MS bei der Charakterisierung von posttranslationalen und chemischen Modifikationen belegt.

Um die Bedeutsamkeit der chromatographischen Trennung für die Charakterisierung von deamidierten Peptiden zu bekräftigen, zeigt Abbildung 7 die EICs für NTAYLQMNSLR in seiner nativen wie auch in seiner deamidierten Form. Aufgrund der kleinen Massenverschiebung von 0,98 Da und der relativ niedrigen Signalintensität der deamidierten Variante ist die chromatographische Auflösung dieser Formen von entscheidender Bedeutung. Die Massenspektrometrie alleine kann sie nicht wirksam voneinander unterscheiden, da sich der monoisotopische Peak (656,3221 m/z) des deamidierten Peptids mit dem zweiten Isotopenpeak des nativen Peptids überschneidet (monoisotopischer Peak: 655,8318 m/z , zweiter Isotopenpeak: 656,3328 m/z) (Differenz von 16 ppm). Folglich ist eine hochauflösende chromatographische Trennung auf der Basis von Inert-Säulen-Hardware für eine genaue Identifizierung und Quantifizierung bei der Peptid-Deamidierung unerlässlich.

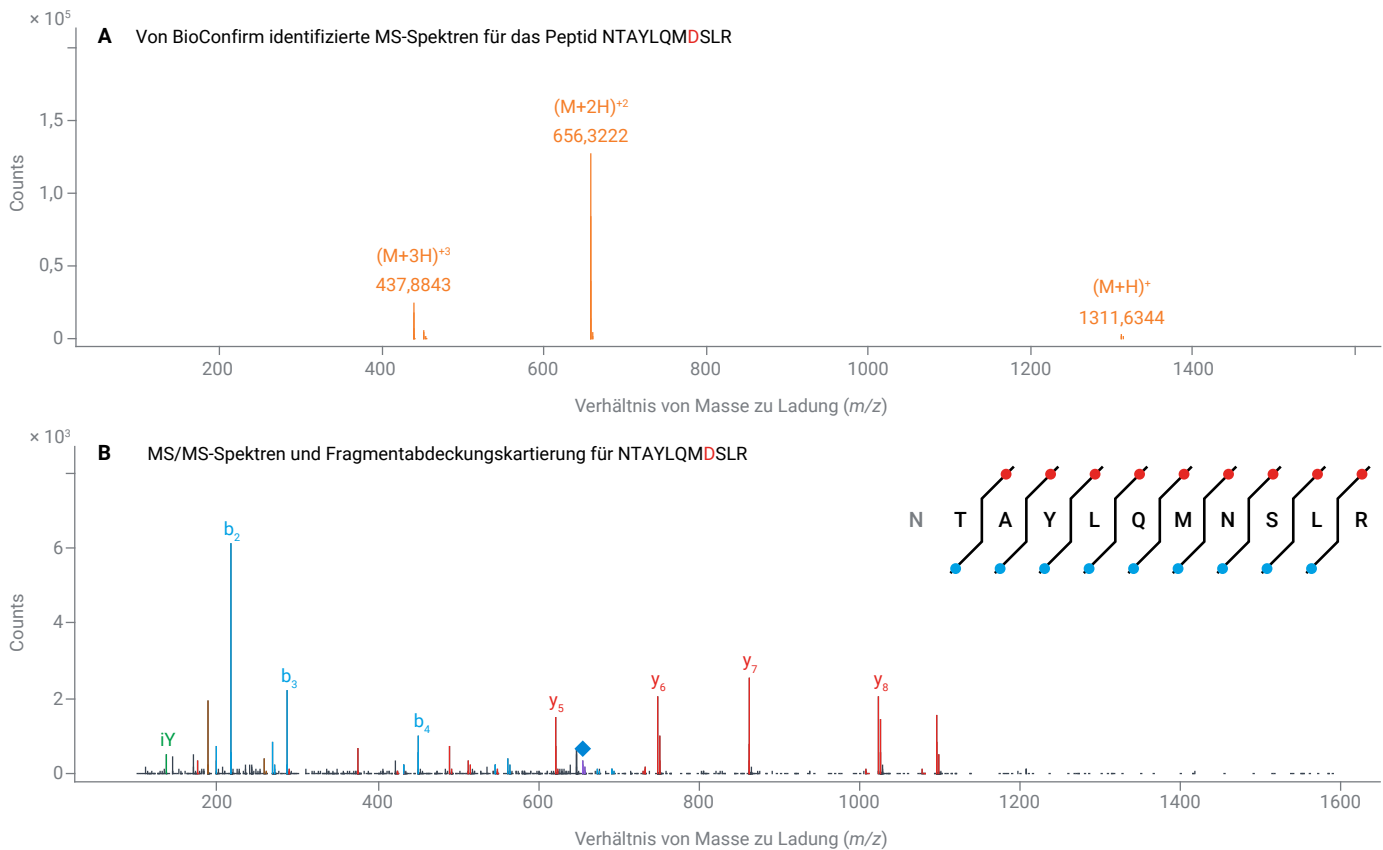


Abbildung 6: MS-Spektren und Fragmentabdeckungskartierung für das Peptid NTAYLQMDSLRL. Anhand von Fragmentierungsdaten wurde die Deamidierungsstelle mit der Agilent MassHunter BioConfirm Software an Position 8 zugeordnet.

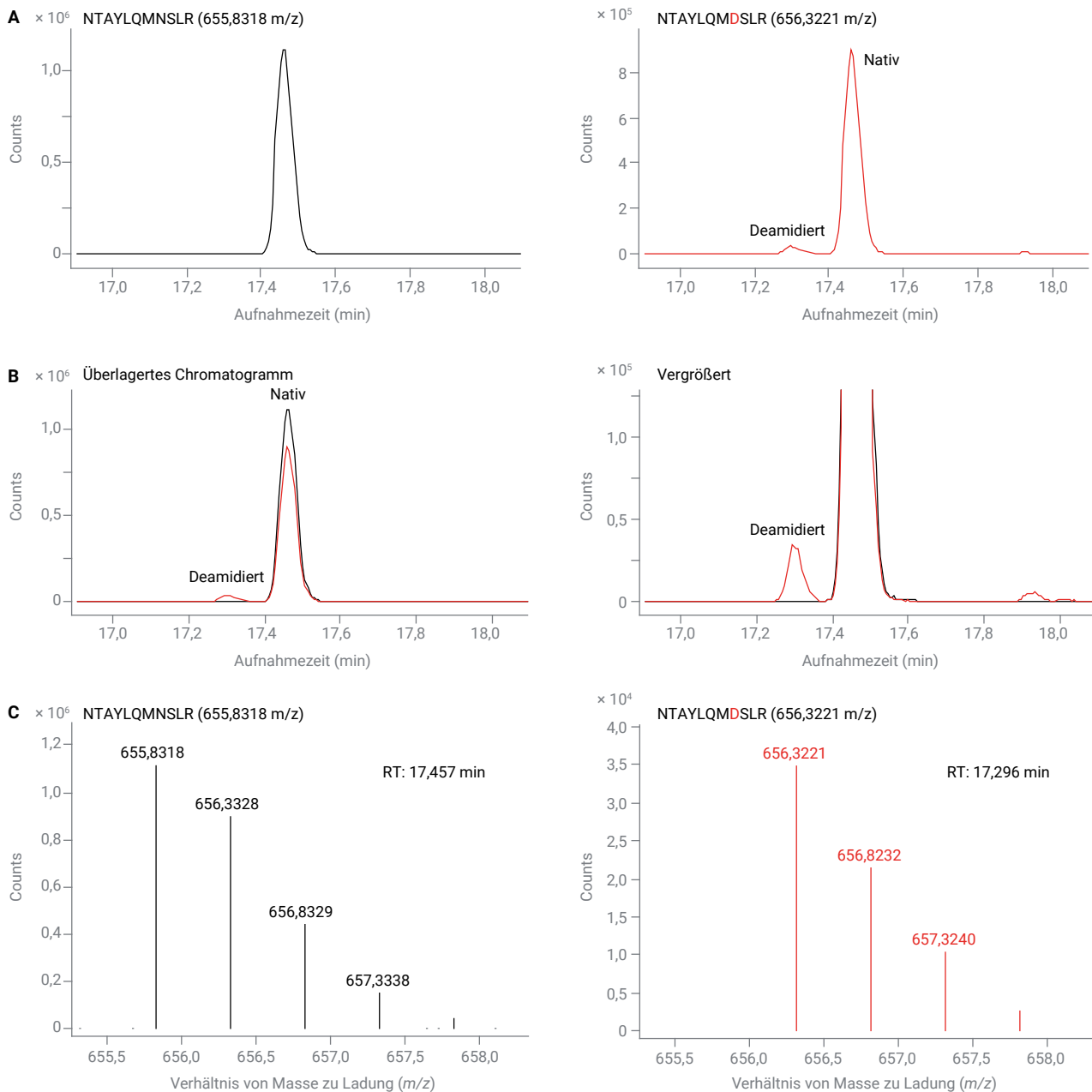


Abbildung 7: Chromatographische Trennung des Peptids NTAYLQMNSLR in seiner nativen und deamidierten Form. (A) Extrahierte Ionenchromatogramme (EICs) unter Berücksichtigung der Vorläufermassen für die native (655,8318 m/z) und deamidierte (656,3221 m/z) Form bei einem Ladungszustand von 2+. (B) Die individuellen Chromatogramme wurden überlagert, um die chromatographische Trennung zwischen den nativen und deamidierten Peptiden zu veranschaulichen. Die vergrößerte Chromatogrammansicht hebt hierbei die Trennung der Verunreinigungen in geringen Konzentrationen hervor. (C) Die Massenspektren für die nativen und deamidierten Peptide sollen veranschaulichen, dass es zwingend einer chromatographischen Auflösung der deamidierten Form von der nativen Form bedarf. Die Massenspektren alleine wären sonst nicht imstande, die beiden Formen voneinander zu unterscheiden, würden diese koeluiieren.

Fazit

Diese Studie zeigt die signifikanten Vorzüge der Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18-Inert-Säulen-Hardware bei Arbeitsabläufen für das Peptid-Mapping auf, insbesondere bei der Analyse von mAb-Peptiden sowie posttranslationalen und chemischen Modifikationen. Im Vergleich zu herkömmlicher Edelstahlsäulen-Hardware bot die Altura-Säule durchweg eine verbesserte Peakform, eine geringere Variabilität und eine optimierte Auflösung, allem voran bei schwierigen hydrophoben und modifizierten Peptiden.

Quantitative Daten für 30 aufeinanderfolgende Injektionen zeigten eine schnellere Säulenstabilisierung und eine verbesserte Reproduzierbarkeit mit der Altura-Hardware, während ihre Fähigkeit, nahe beieinander eluierende Spezies besser trennen zu können, durch chromatographische Kennzahlen wie Tailing-Faktor und Auflösung bestätigt wurde. Diese Vorzüge wurden beim Peptid-Mapping von mit Trypsin aufgeschlossenem Herceptin weiter bekräftigt. Hier ermöglichte die Altura-Säule eine zuverlässige Identifizierung von deamidierten Varianten.

Insgesamt bildet die Altura ZORBAX Eclipse Plus C18-Inert-Säule in Verbindung mit den 1290 Infinity II Bio LC- und 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF-Systemen eine solide und zuverlässige Lösung für das Peptid-Mapping und die Charakterisierung von Modifikationen bei hohem Probendurchsatz. Hiermit fördert sie sowohl die analytische Präzision als auch die betriebliche Effizienz bei der Entwicklung von Biopharmazeutika.

Referenzen

1. Hsiao, J.; *et al.* Pushing the Boundaries of Chromatographic Separation with Inert HPLC Column Hardware. *Agilent Technologies application note*, 5994-8618EN, **2025**.
2. Vanluchene, H.; *et al.* mRNA Mapping with IO-RPLC-MS on a Low-Adsorption Flow Path. *Agilent Technologies application note*, 5994-8055EN, **2025**.
3. Feith, A. Robust and Reliable Peptide Mapping. *Agilent Technologies application note*, 5994-2718EN, **2024**.
4. Sciuto, S. Peptide Mapping of Trastuzumab Tryptic Digests on an Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF. *Agilent Technologies application note*, 5994-7969EN, **2024**.