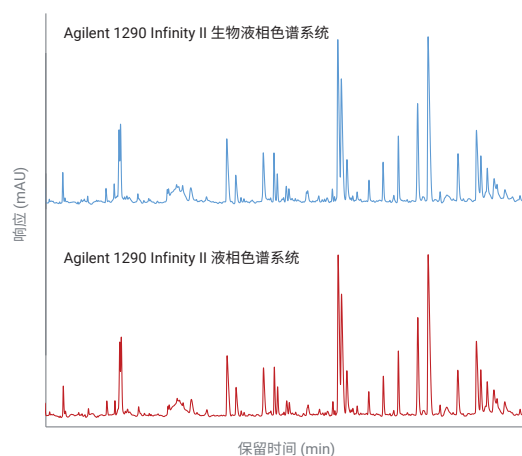


将方法无缝转移至 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统

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以及 PENNY 肽的深入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 高容量柱温箱 (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 高容量柱温箱 (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路，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。

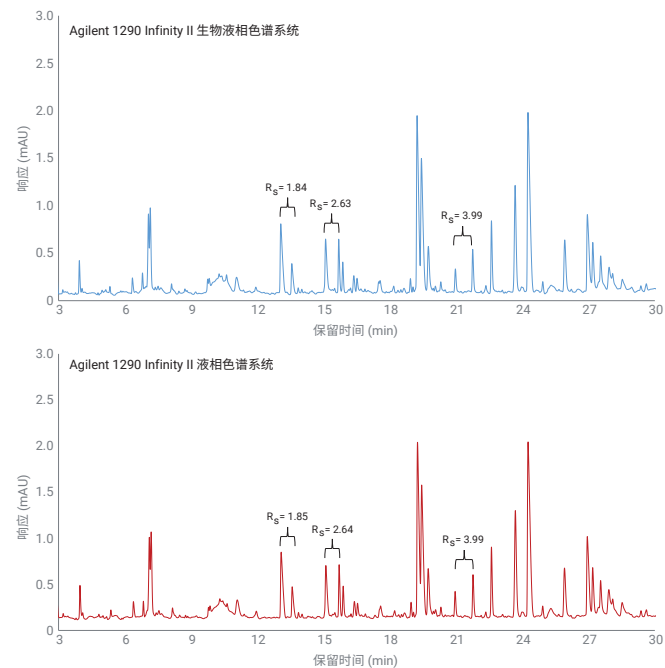


图 1. 由 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统使用相同方法 (表 1) 分离的 NISTmAb 胰蛋白酶酶解产物的色谱图

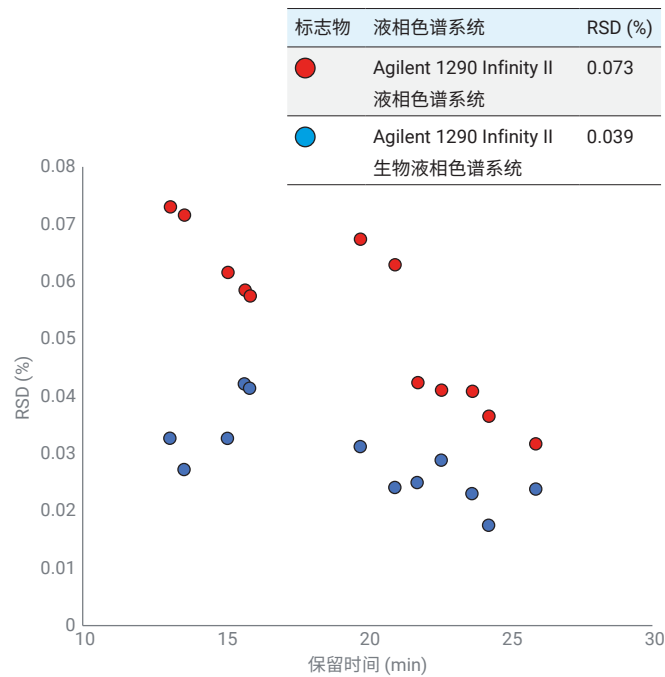


图 2. Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统的相对保留时间精度 (RSD) 值

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

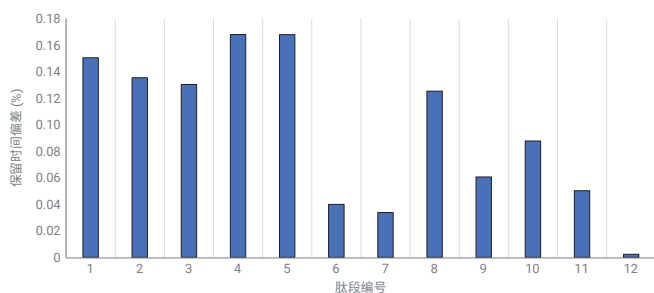


图 3. 两种液相色谱系统对所选 12 种肽段的平均保留时间及其偏差

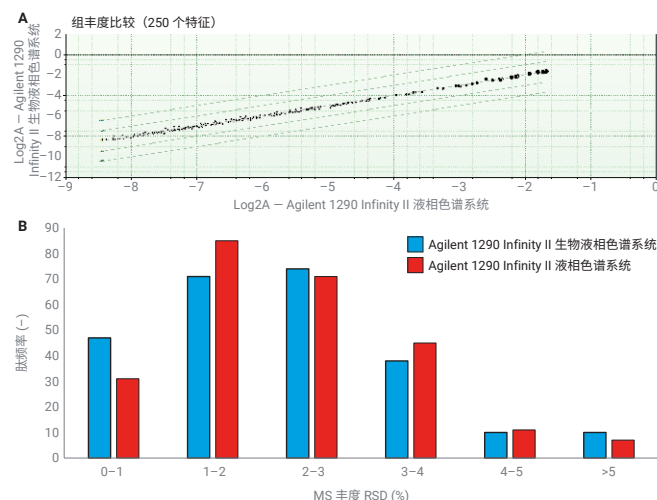


图 4. (A) 基于 10 次连续进样的统计相关性分析。黑点表示由 Agilent MassHunter Mass Profiler (B.10.00) 鉴定得到的 250 个最大丰度峰的倍数对数值。(B) Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 1290 Infinity II 液相色谱系统肽丰度 RSD 值的直方图

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 1× 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 2× 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%。

为了进一步评估这两种系统，本研究通过提取两种系统的 EIC 图对 PENNY 肽 (GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK) 进行了分析 (见图 5)。这种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，并含有 4 种酸性氨基酸残基^[3]。之前的研究报道了含有磷酸基团或多个羧酸基团的酸性小分子在不锈钢表面上的吸附和峰拖尾现象^[4]。引人注目的是，尽管存在酸性残基，PENNY 肽在 1290 Infinity II 液相色谱仪上没有出现明显的拖尾。PENNY 肽在两种液相色谱系统上具有相似的拖尾因子 (见图 5, T_f)。两种系统均具有出色的相对保留时间 (生物液相色谱系统 = 0.02%，液相色谱系统 = 0.04%， $n = 3$) 和峰面积精度值 (生物液相色谱系统 = 1.26%，液相色谱系统 = 1.41%， $n = 3$)。这些结果突出体现了 1290 Infinity II 生物液相色谱系统在肽谱分析方面的出色性能，以及生物兼容性流路提供的附加优势。生物兼容性流路对于磷酸化肽等粘性化合物而言必不可少。

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

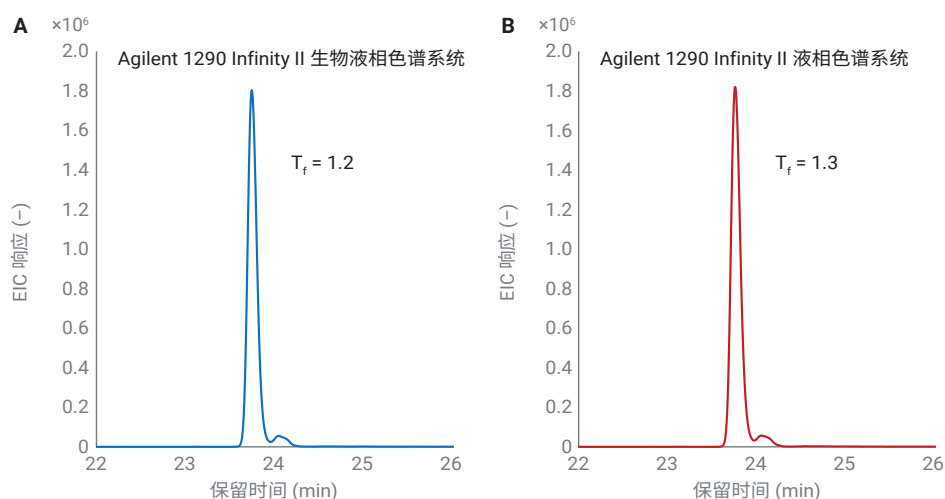


图 5. Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统的 PENNY 肽 (GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK) 提取离子色谱图 (EIC)。两种系统均具有出色的拖尾因子 (T_f)

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，并且在 PENNY 肽分析中均表现出优异的性能。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，同时还具有无铁流路的优势。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

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

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
3. Chelius, D.; Rehder, D.; Bondarenko, P. Identification and Characterization of Deamidation Sites in the Conserved Regions of Human Immunoglobulin Gamma Antibodies. *Analytical Chemistry* **2005**, 77, 6004–6011
4. Nagayasu, T. et al. Effects of Carboxyl Groups on the Adsorption Behavior of Low-Molecular-Weight Substances on A Stainless Steel Surface. *Journal of Colloid and Interface Science* **2004**, 279, 296–306

www.agilent.com

DE.44140.1323148148

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, 2020, 2022
2022 年 2 月 8 日, 中国出版
5994-2836ZHCN