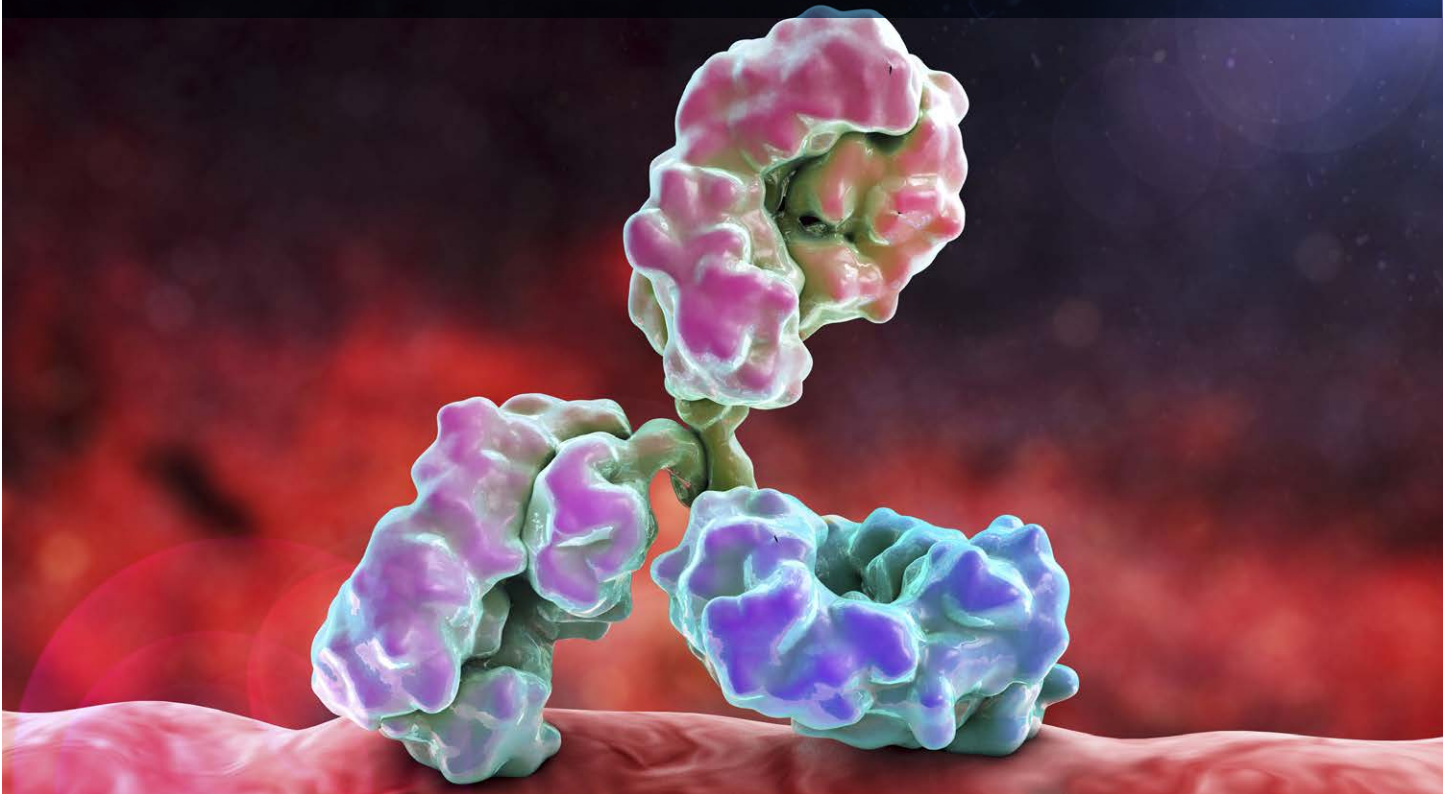


安捷伦生物色谱柱

# 肽谱分析

应用文集



# 目录

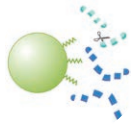
背景	2
入门指南	3
优化肽段表征的要点 — 肽谱分析指南 — 5991-2348CHCN	4
精选应用简报	27
稳定可靠的肽谱分析 — 5994-2718ZHCHN	27
使用 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱分离脱酰胺形体肽段 — 5994-2971ZHCHN	32
合成肽及其杂质的分析 — 5994-2760ZHCHN	39
ADC 酶解产物中药物偶联肽段的高分离度分析 — 5991-6191EN	46
利用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱分析单克隆抗体和抗体药物 偶联物的胰蛋白酶酶解产物 — 5991-7374EN	50
利用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 表征病毒载体颗粒 — 5994-1980EN	56
将方法无缝转移至 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统 — 5994-2836EN	66
更多应用简报	72

# 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这些物质分离成经典的“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、 $\alpha$ 2-巨球蛋白、 $\alpha$ 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](http://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。

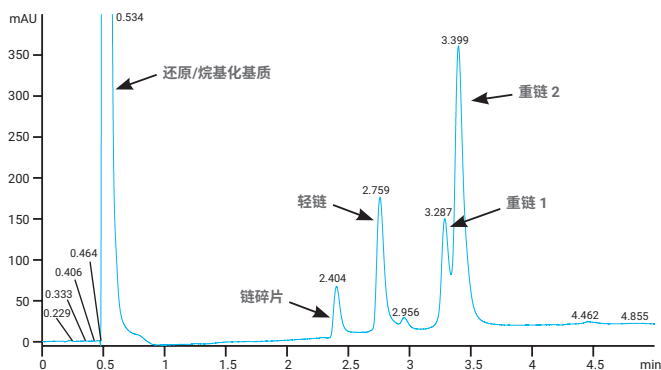


图 1. 在进行酶解方案前，使用 Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度 (RRHD) 300SB-C8, 2.1 × 50 mm 色谱柱 (安捷伦部件号 857750-906) 通过反相色谱分离还原、烷基化的单克隆抗体。分离的条件：Agilent 1290 Infinity LC, 流速 0.5 mL/min, 75 °C, 流动相为水 (0.1% TFA)/乙腈 (0.08%) 多段条件

## 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  $\text{Ca}^{2+}$  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）

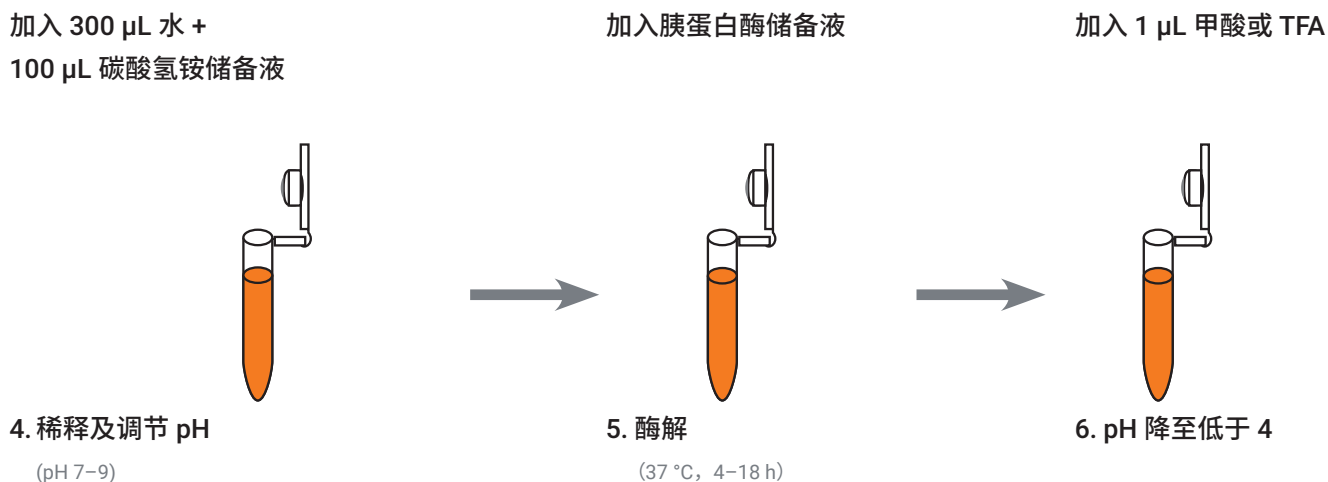
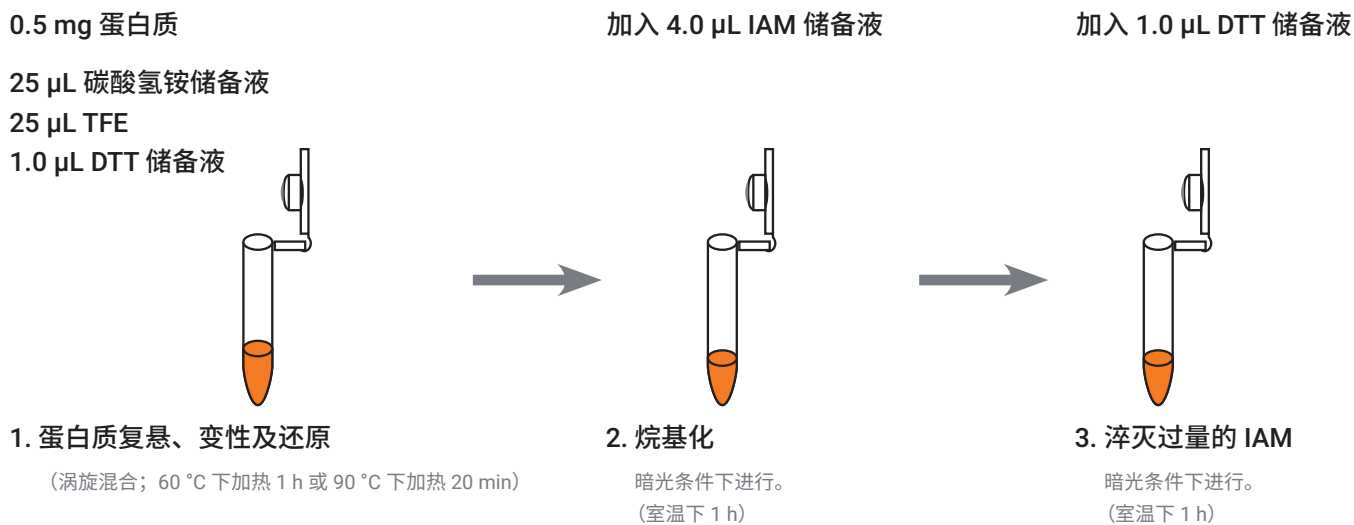
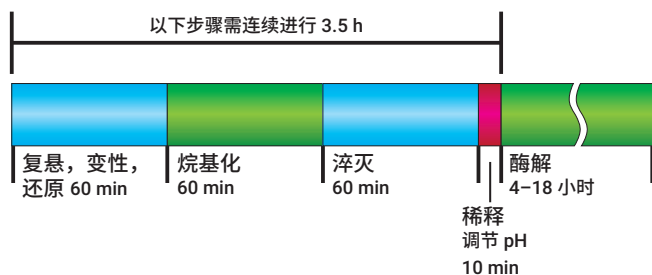


图 3 — 酶解流程的预期时间轴



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  $\mu$ L 50 mmol/L 的乙酸溶解冻干的胰蛋白酶，获得终浓度为 1  $\mu$ 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  $\mu$ L。将每份溶液保存在 -20 °C 的非无霜冰箱中。此 1  $\mu$ g/ $\mu$ 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  $\mu$ 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 $\mu$ L 碳酸氢铵储备液
3	加入 25 $\mu$ L TFE 变性剂
4	加入 1.0 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ L 水, 稀释变性剂
2	加入 100 $\mu$ L 碳酸氢铵储备液以增加 pH
3	或者, 也可以取 0.5–1 $\mu$ 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 $\mu$ g, 需添加 45 $\mu$ 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/ $\mu$ 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 $\mu$ g 蛋白质, 可添加 10 $\mu$ g 至 25 $\mu$ g 的胰蛋白酶 (10–25 $\mu$ 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 $\mu$ 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/ $\mu$ L。如果您的样品并不复杂, 可稀释为 50 fmol/ $\mu$ 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 TiO<sub>2</sub>（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 $\mu$ 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 $\mu$ L (洗脱体积 2–10 $\mu$ 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 $\mu$ L (洗脱体积 10–100 $\mu$ 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。

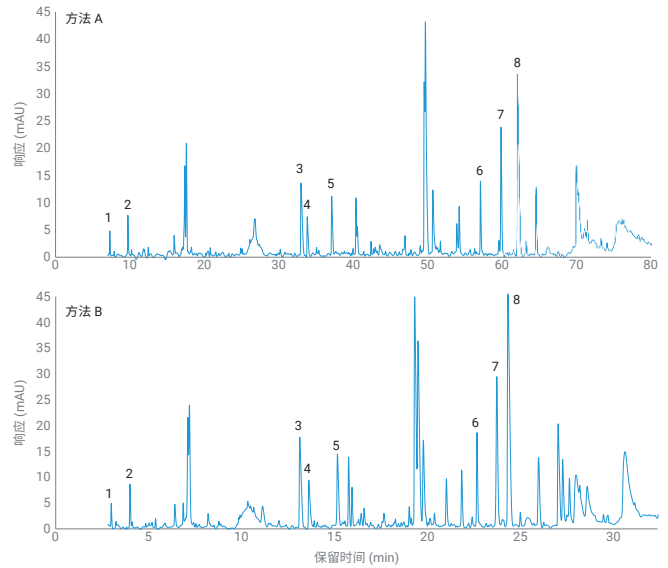
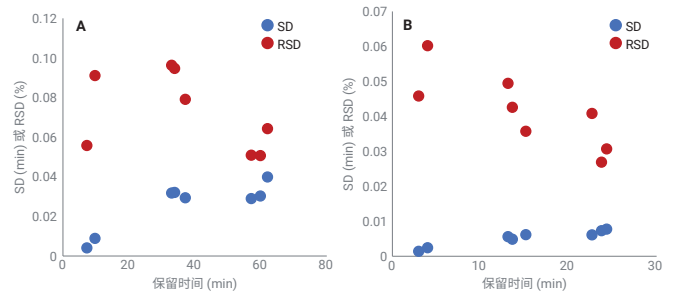


图 4. 使用方法 A 和 B，通过 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分离 NISTmAb 胰蛋白酶酶解产物得到的色谱图。选取 8 个峰用于后续的保留时间精度和峰容量计算



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。

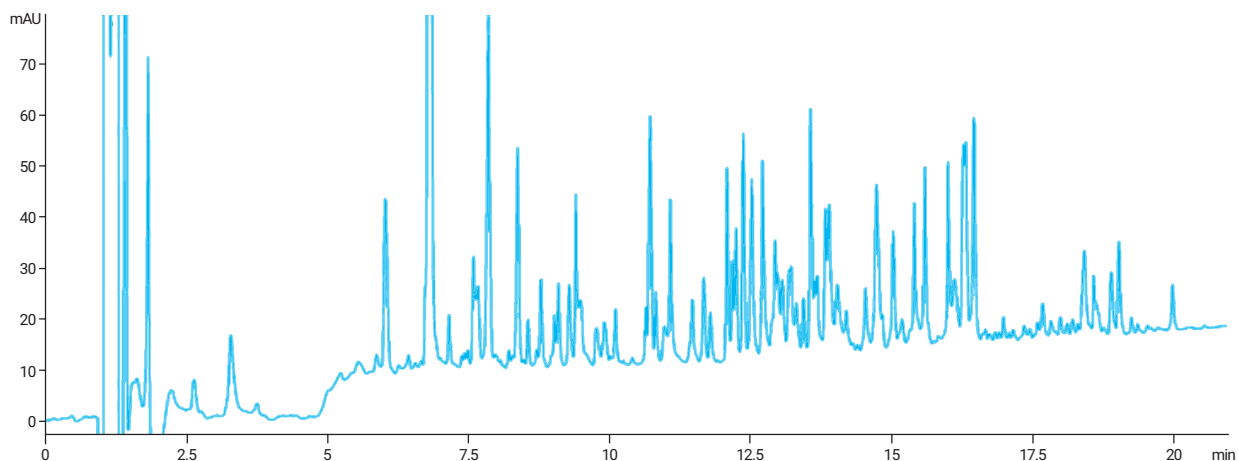


图 6. BSA 的反相分离图，采用 Agilent AdvanceBio 肽谱分析 2.1 × 150 mm 色谱柱（安捷伦部件号 653750-902）。肽谱分析条件为 0.3 mL/min，40 °C，流动相为水（含 0.1% TFA）/乙腈（0.08%），线性梯度

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。

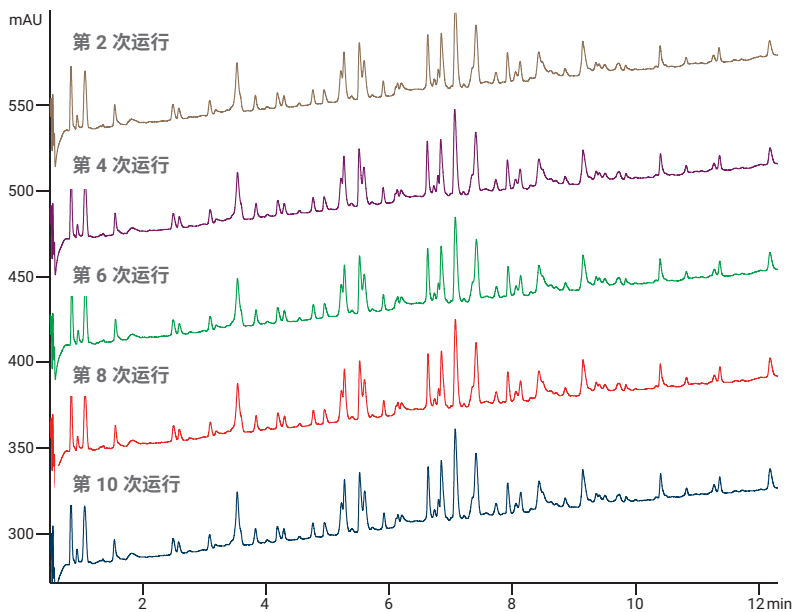


图 7. 一种单克隆抗体胰蛋白酶水解物的五次重复进样，在 Agilent 1200 液相色谱系统与 6520 Q-TOF 的联用系统上使用 3.0 × 150 mm 的 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱（安捷伦部件号 653950-302）。分离条件为 0.3 mL/min，40 °C，流动相为水（含 0.1% FA）/乙腈（含 0.1% FA），梯度洗脱

## 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。

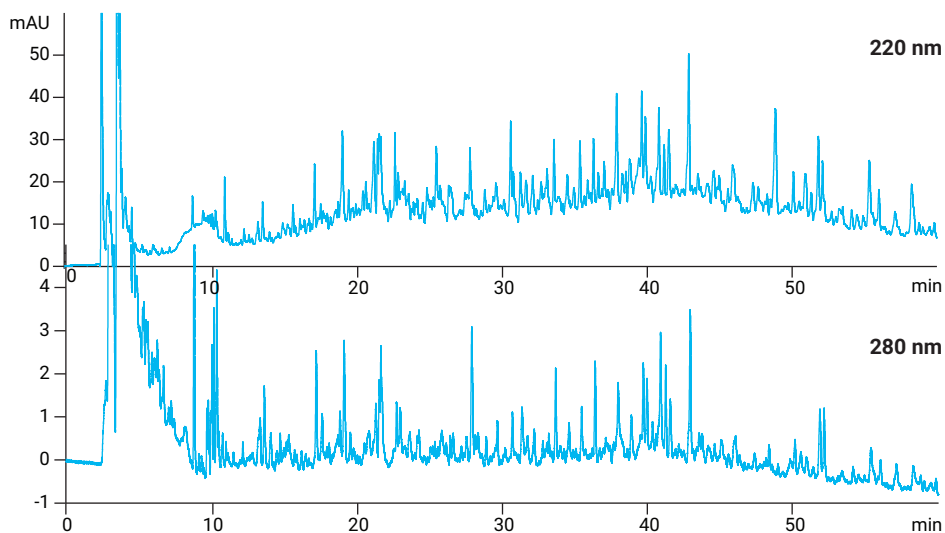


图 8. 利用 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱（安捷伦部件号 651750-902），2.1 × 250 mm，所得的大肠杆菌酶解产物谱图，220 nm（上图），280 nm（下图），采用 Agilent 1290 Infinity LC 进行分析

## 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）。

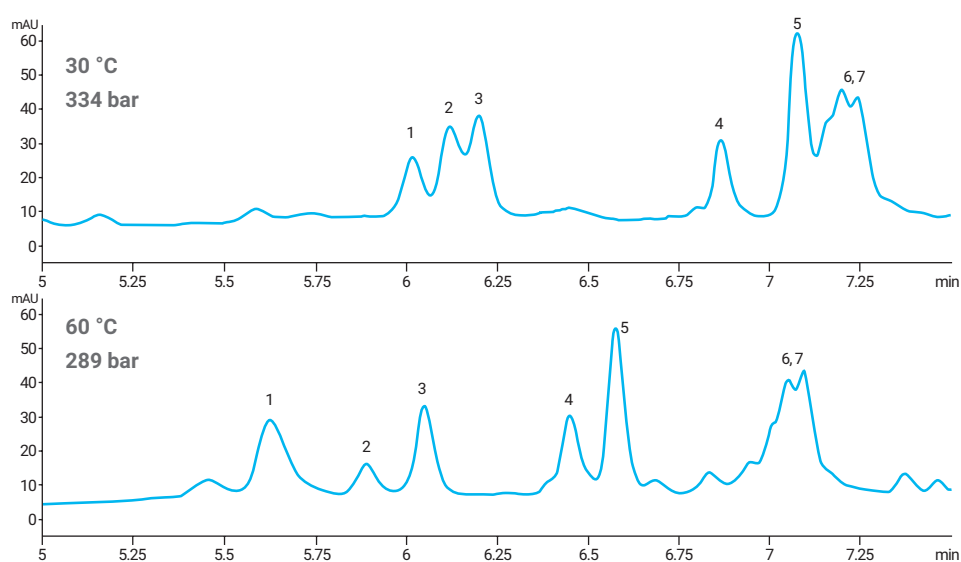


图 9. 肌红蛋白胰蛋白酶酶解产物的梯度分离，5.0–8.0 min（完整梯度为 20 min），其中使用了 2.1 × 150 mm AdvanceBio 肽谱分析色谱柱（安捷伦部件号 653950-302）。两种分离均采用水（含 1.0 % TFA）/乙腈（含 0.08 % TFA），线性梯度，0.3 mL/min，215 nm，使用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统。顶部色谱图为在 30 °C 温度下分析所得，底部色谱图为在 60 °C 温度下分析所得

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。

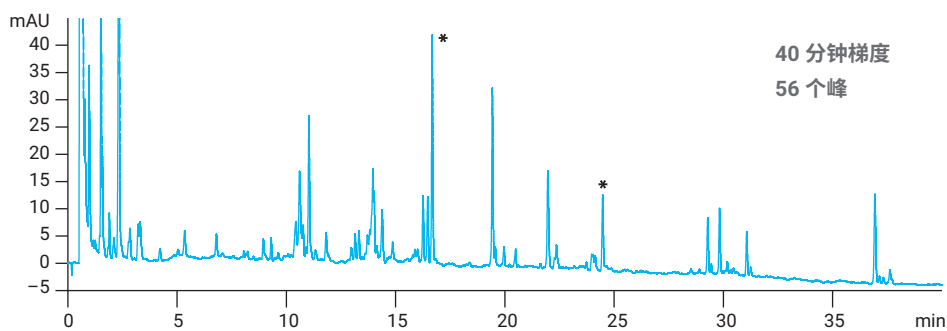
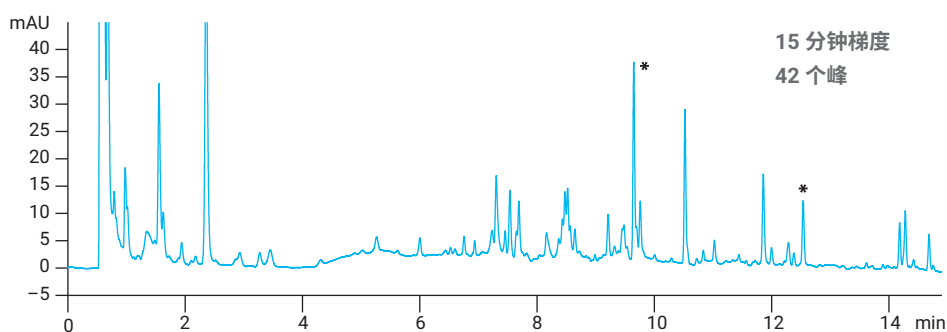


图 10. 肌红蛋白胰蛋白酶酶解产物的梯度分离，采用 2.1 × 150 mm AdvanceBio 肽谱分析色谱柱（安捷伦部件号 653950-302），利用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统，条件为水（含 1.0% TFA）/乙腈（含 0.08% TFA），线性梯度，0.6 mL/min，50 °C。顶部色谱图在 15 min 内完成，而底部色谱图在 40 min 内完成。两张色谱图中标星号代表相同色谱峰

### (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 ( $\alpha$ ) 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。

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                  |

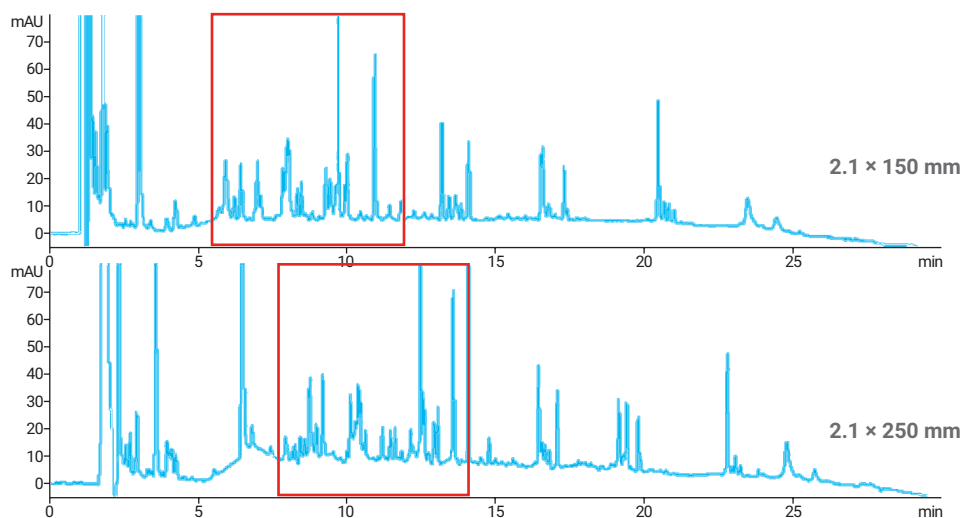


图 11. 柱长对分离度的影响, 采用肌红蛋白胰蛋白酶酶解产物 (安捷伦部件号 651750-902) 进行肽谱对比。红色高亮区域为等效的分离区域, 用来强调分离度和峰形。分离采用 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm (安捷伦部件号 651750-902), 利用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统, 条件为水 (含 1.0% TFA) / 乙腈 (含 0.08% TFA), 线性梯度, 30 min 内 B 由 10% 增加至 60%, 流速 0.3 mL/min, 45 °C

## 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  
在应用中实现高性能运行。



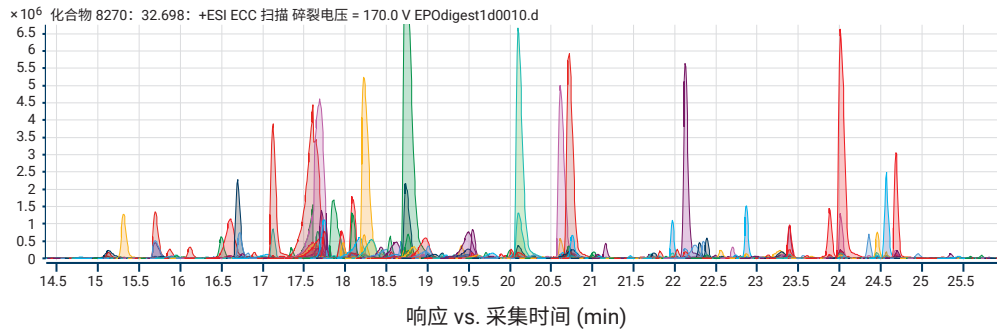
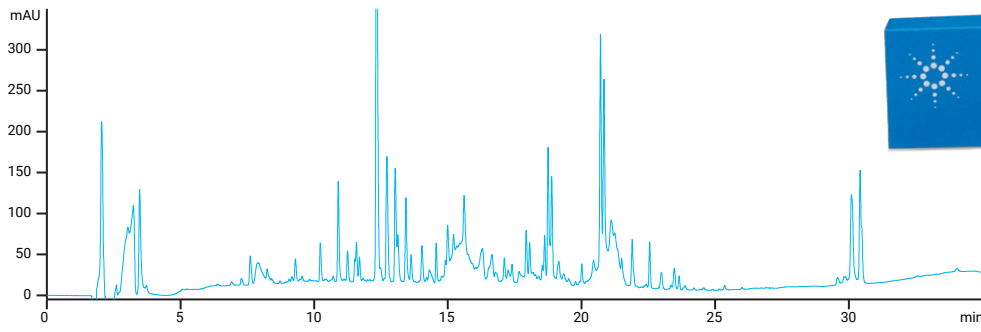


图 12. 顶部色谱图展示了使用 2.1 × 150 mm AdvanceBio 肽谱分析色谱柱对完全优化的 EPO 酶解产物进行分析所得到的肽谱分离图。底部色谱图展示了针对 Agilent Q-TOF 生成的序列覆盖率所进行的定性分析（使用分子特征提取器）

### 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
4.6 × 150 mm, 2.7 μm	653950-902	850750-911
3.0 × 150 mm, 2.7 μm	653950-302	853750-911
2.1 × 250 mm, 2.7 μm	651750-902	851725-911
2.1 × 150 mm, 2.7 μm	653750-902	
2.1 × 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：

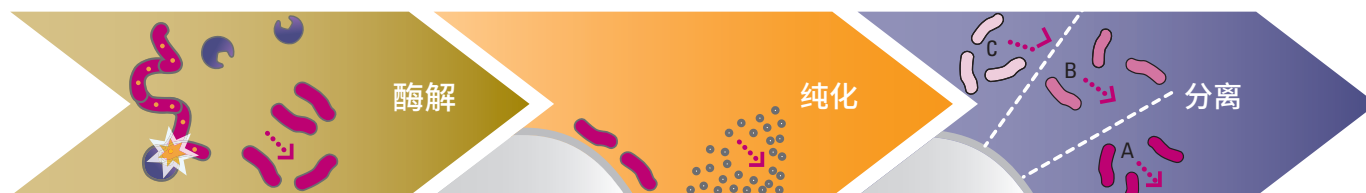
- 减少人工误差，改善重现性 — < 5% CV
- 增加通量 — 每天最多可处理 384 个样品
- 大大减少手动操作时间 — 使科学家们能够专注于分析工作
- 快速方法开发 — 自动化平台将帮助您快速优化方法



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  $\mu$ 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。

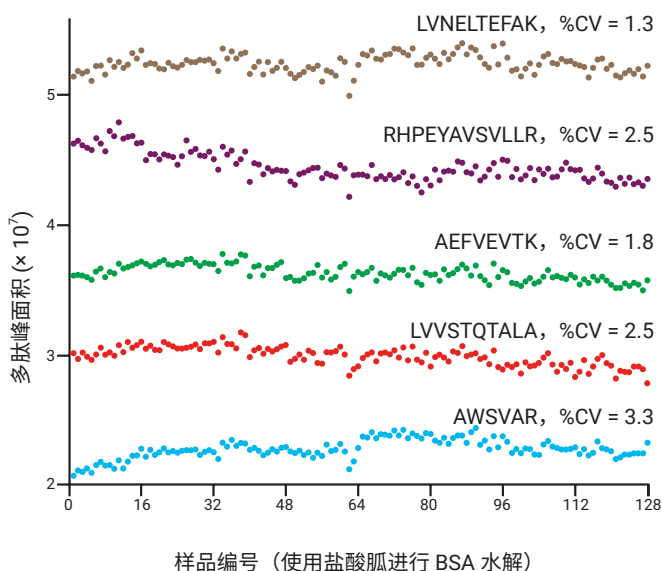


图 13. 4 种多肽在 2 天分析中的峰面积散点图

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

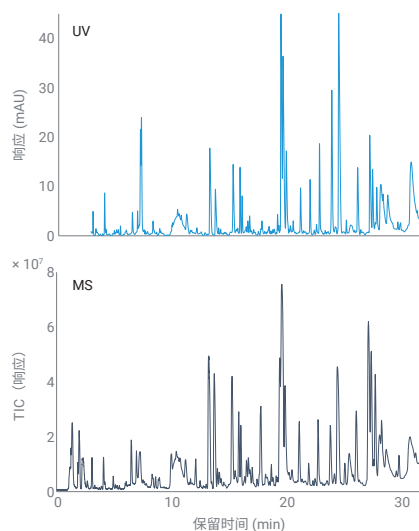
Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统 — 基于 UV 和 MS 的 mAbs 一级结构和 PTMs 分析新平台

### 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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>, 新的序列异构体的出现<sup>[3]</sup> 或多聚糖组成的变化<sup>[4]</sup>)。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  $\mu$ 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  $\mu$ m (部件号 651750-902)
- Agilent AdvanceBio 肽谱分析快速保护柱, 2.1  $\times$  5 mm, 2.7  $\mu$ m (部件号 851725-911)
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1  $\times$  150 mm, 1.8  $\mu$ m (部件号 959759-902)
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 快速保护柱, 2.1  $\times$  5 mm, 1.8  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L 碳酸氢铵 (100 mmol/L) 中加入 2  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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<sup>[5]</sup>。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  $\mu\text{m}$  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  $4\sigma$  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。

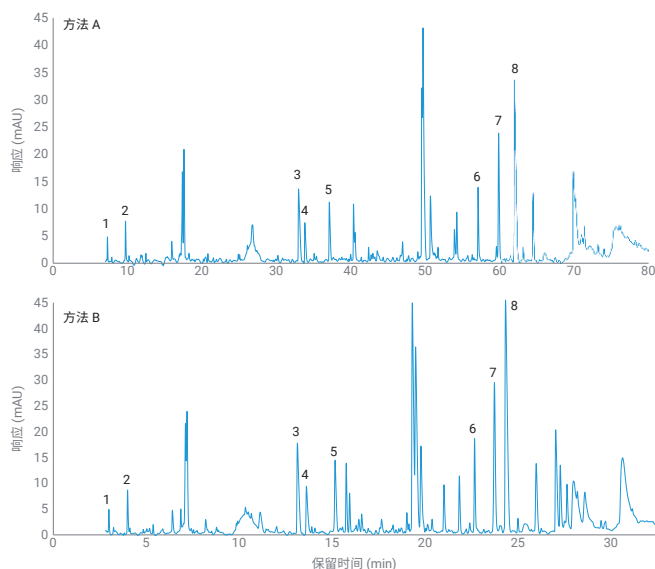
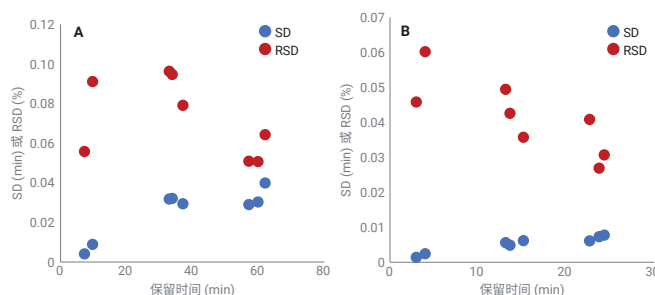


图 1. 使用方法 A 和 B，通过 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分离 NISTmAb 胰蛋白酶酶解产物得到的色谱图。选取 8 个峰用于后续的保留时间精度和峰容量计算



方法	梯度斜率 (%B/min)	$\emptyset$ SD (min)	$\emptyset$ RSD (%)	PC, $4\sigma$ (-)
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)<sup>[6]</sup> 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。

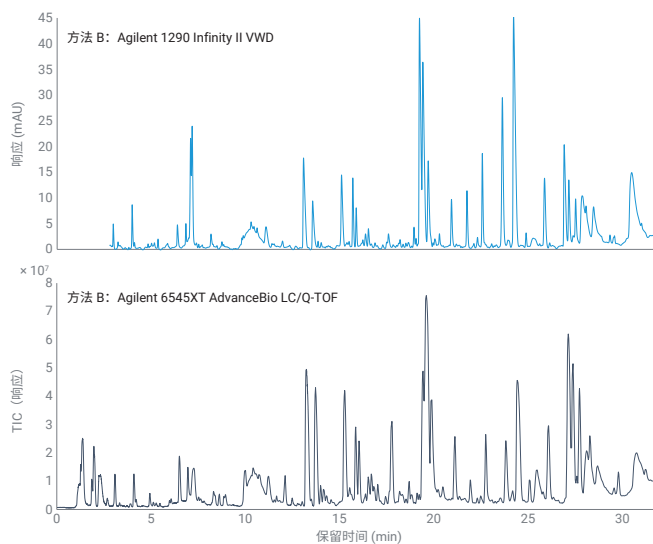


图 3. 使用配备生物兼容性微量流池的 Agilent 1290 Infinity II VWD (上图) 和 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (下图)，检测 NISTmAb 胰蛋白酶酶解产物得到的色谱图

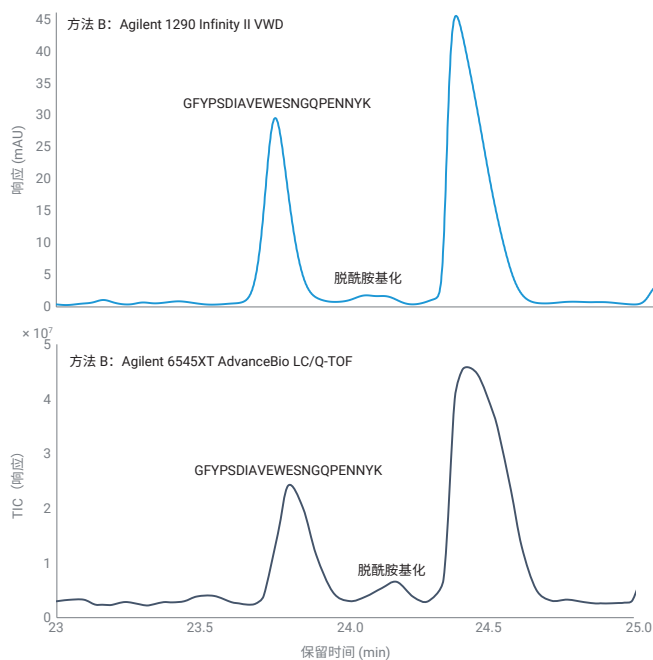


图 4. 先前色谱图的放大视图，突出显示 PENNY 肽 (GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK) 和相应脱酰胺基化异构体的分离

## 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](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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。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<sup>[3]</sup>。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 <sup>13</sup>C 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

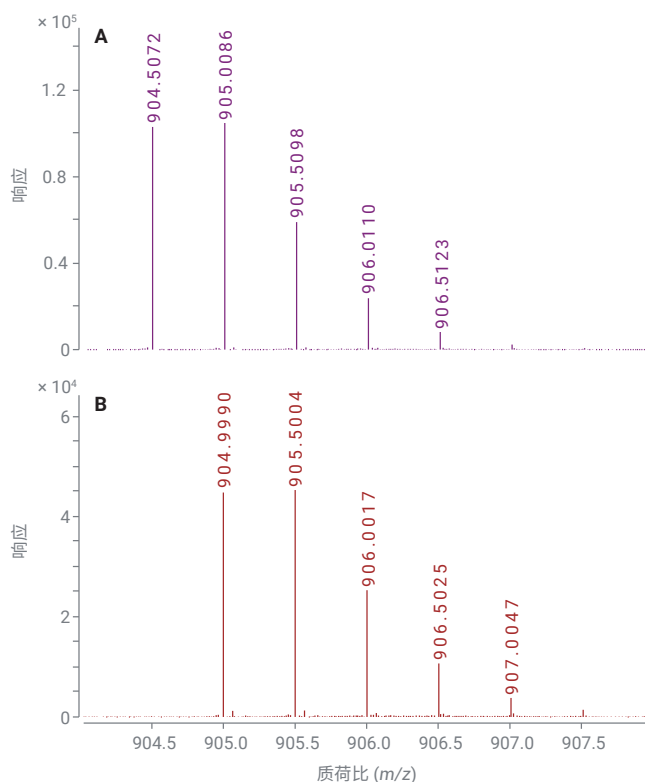


图 1. VVSVLTVLHQDWLNGK (A) 以及该肽段脱酰胺基化异构体 (B) 的质谱图，显示了质谱图之间的重叠

## 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] <sup>2+</sup> 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<sup>[4]</sup>。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。

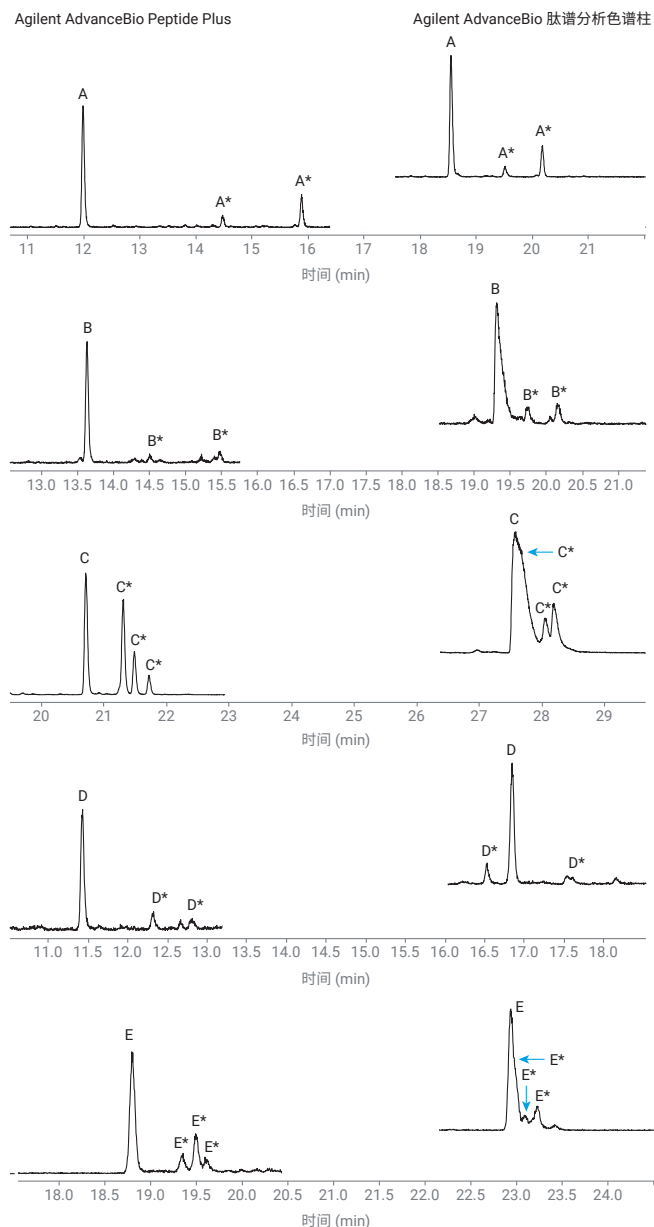


图 2. 在相同的条件下，使用 0.1% 甲酸流动相改性剂，在 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱（升高，较晚洗脱）和 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱（较早洗脱）上分离肽段及其脱酰胺基化异构体（用 \* 表示）

## 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<sup>[5]</sup>。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。

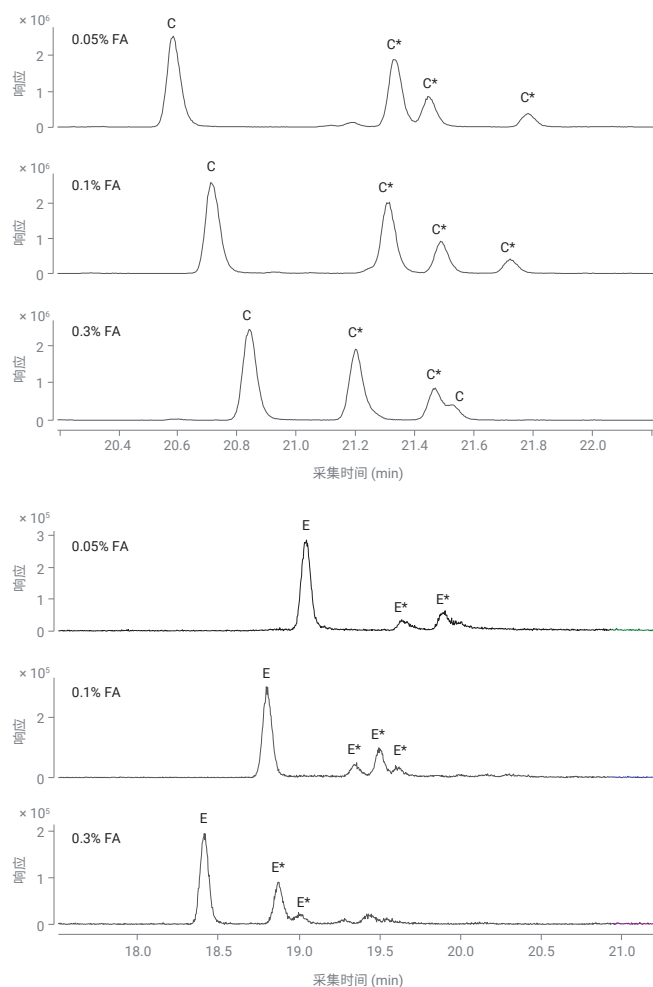


图 3. 逐渐增加甲酸流动相改性剂的浓度，在 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 上分离肽段。在低浓度下，相对于天然形式，可大大提高对脱酰胺基化肽异构体的选择性

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<sup>[2]</sup>中所述。

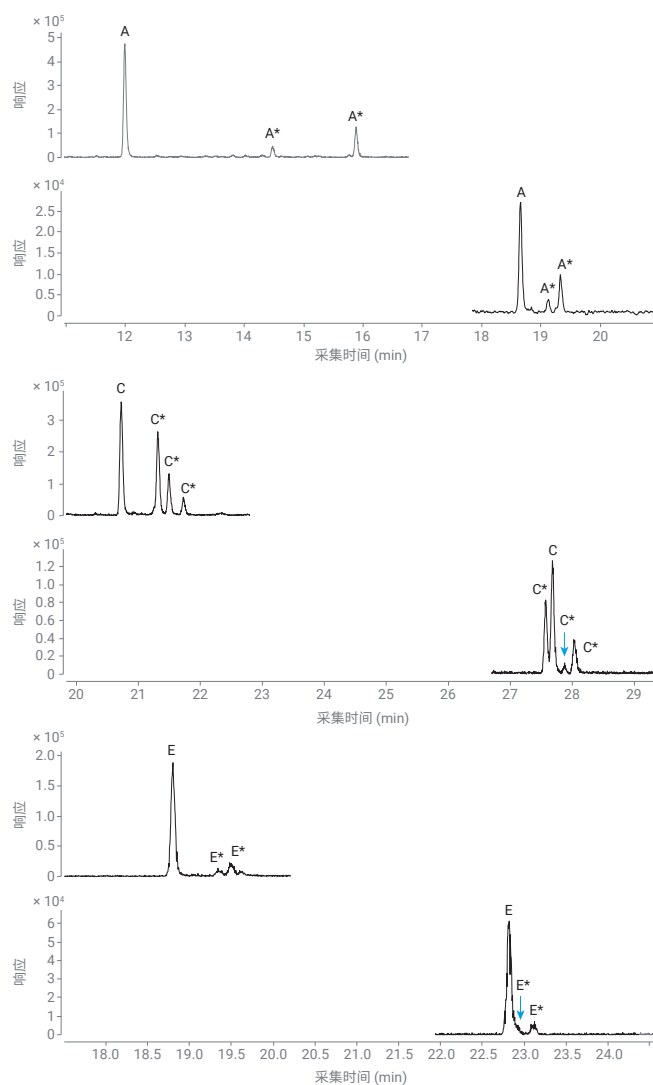


图 4. 使用 0.1% 甲酸流动相改性剂和 0.1% TFA 在 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 上分离肽段及其脱酰胺基化异构体的结果比较

## 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<sup>[1]</sup>。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

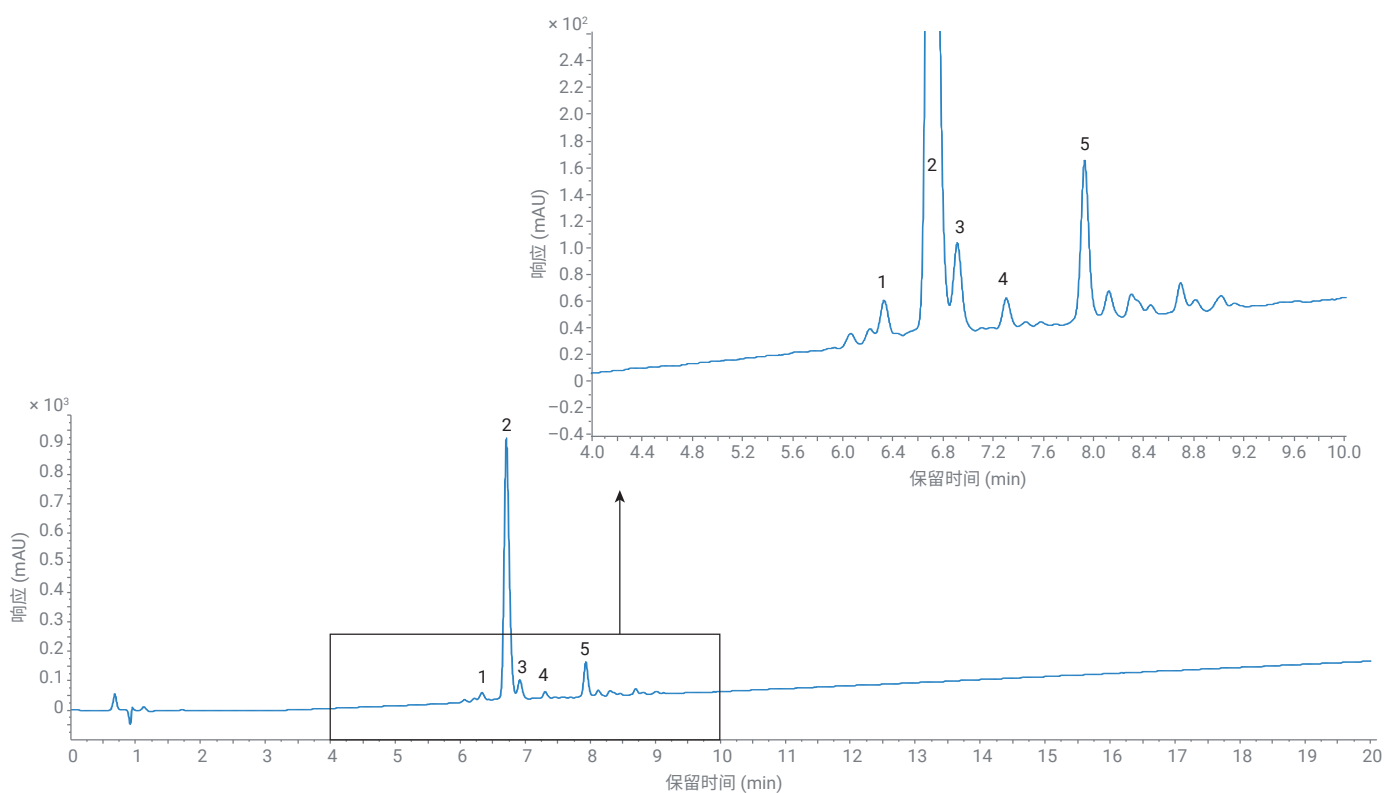


图 2. 合成比伐卢定的 LC/UV 谱图。展示了放大的合成比伐卢定的基线区域

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。

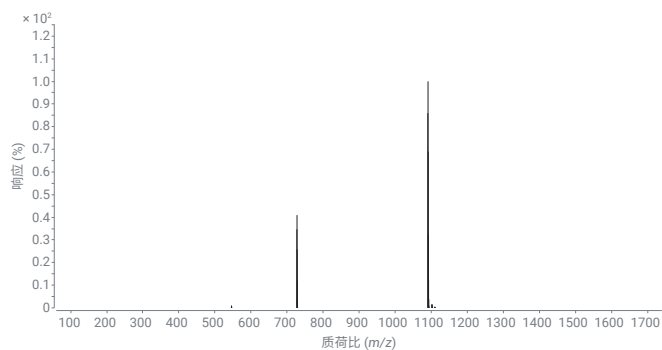


图 3. 主成分（峰 2）的 MS 谱图

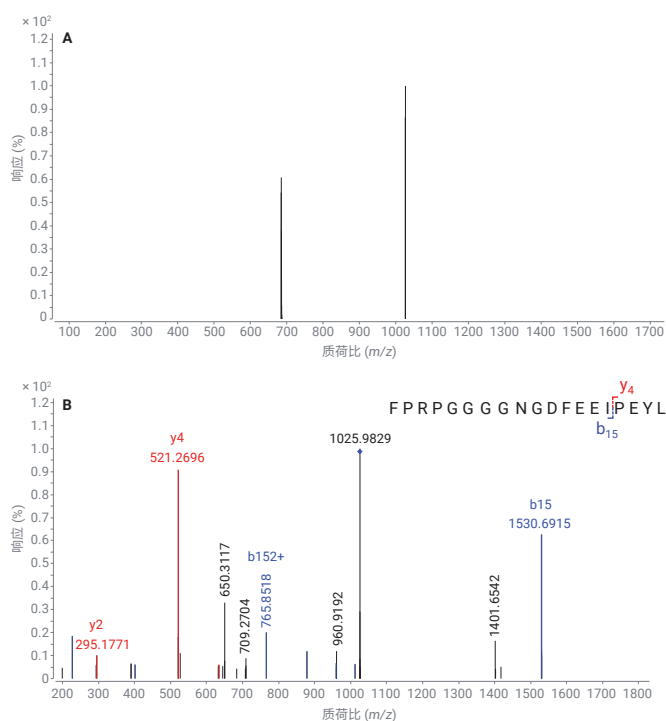


图 4. (A) 杂质峰 1 的 MS 谱图。(B) 杂质峰 1 的 MS/MS 谱图

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 H<sub>2</sub>O 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)。

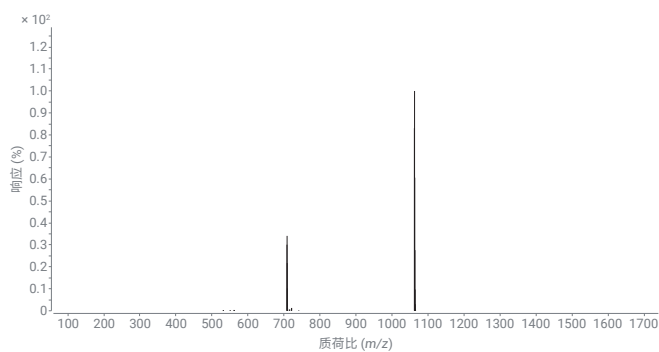


图 5. 杂质峰 3 的 MS 谱图

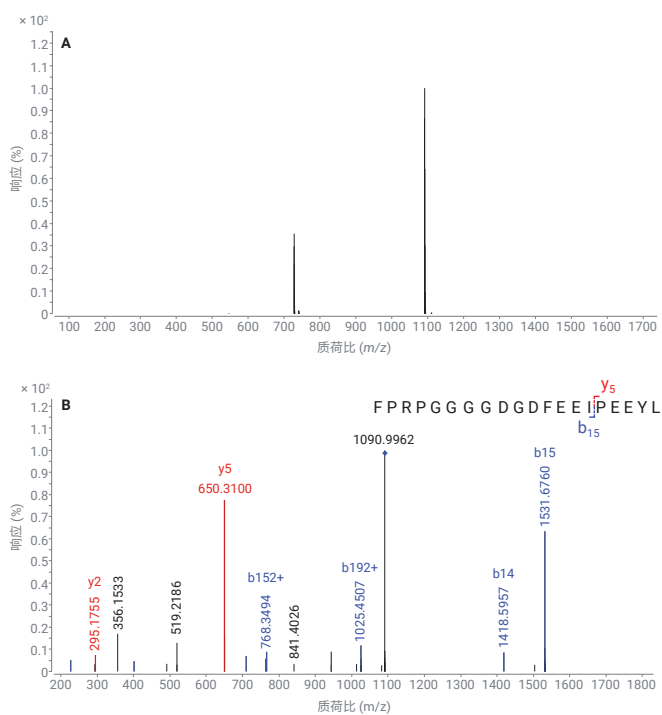


图 6. (A) 杂质峰 5 的 MS 谱图。(B) 杂质峰 5 的 MS/MS 谱图

## 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<sup>[1]</sup>。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。

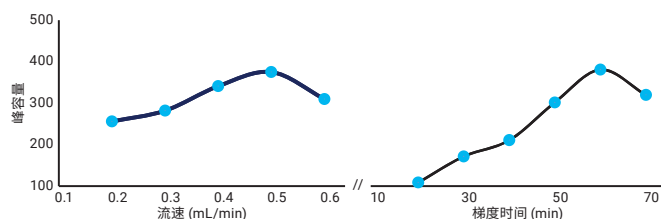


图 1. 流速和梯度时间对峰容量的影响

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<sup>[2]</sup>，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

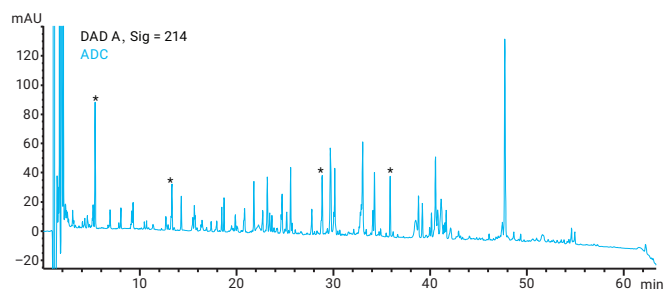


图 2. 胰蛋白酶酶解的 ADC 在 Agilent AdvancedBio 肽谱分析色谱柱上分离后所得的肽谱（选择标有 \* 的峰计算 RSD）

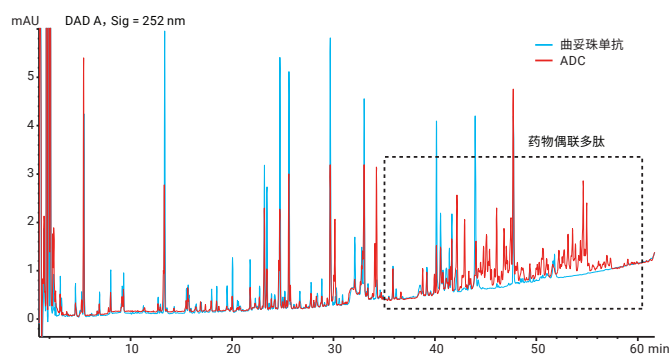


图 3. 胰蛋白酶酶解的 ADC 和曲妥珠单抗在 Agilent AdvancedBio 肽谱分析色谱柱上分离后所得的肽谱的叠加图

## 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  
Vandenhede, 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 Kadcyra) 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<sup>[1,2]</sup>。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<sup>[1,2]</sup>。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  $\mu\text{L}$  配置均经过测试 (G4220-60006)
- 安捷伦高性能 Jet Weaver 混合器, 380  $\mu\text{L}$  (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  $\mu\text{g}$  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 $\mu\text{m}$ (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 $\mu\text{L}$ 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<sup>[3]</sup>。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。

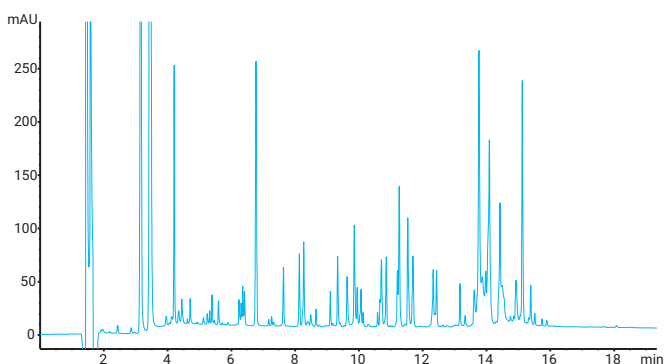


图 1. 赫赛汀胰蛋白酶酶解产物的分析结果，梯度为 20 分钟，在 214 nm 处进行 UV 检测

- 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。

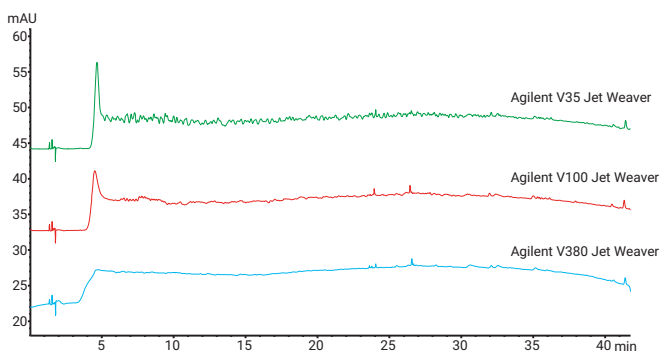


图 2. 利用 Agilent V35（绿色）、Agilent V100（红色）和 Agilent V380（蓝色）Jet Weaver 混合器分析空白溶液的结果，所用梯度为 40 分钟，在 214 nm 处进行 UV 检测

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<sup>[4]</sup>。

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 Kadcylya 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。

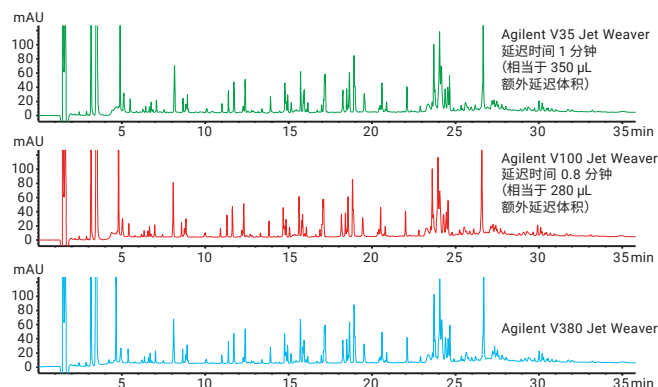


图 3. 利用 Agilent V35（绿色）、Agilent V100（红色）和 Agilent V380（蓝色）Jet Weaver 混合器分析 Kadcylya 胰蛋白酶酶解产物的结果，所用梯度为 40 分钟，在 214 nm 处进行 UV 检测

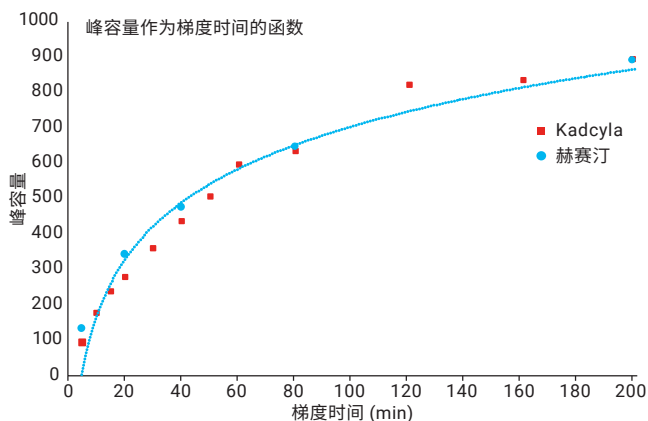


图 4. 峰容量作为梯度时间的函数。在 214 nm 处进行 UV 检测（检测器设置为 40 Hz 以确保在快速分析中获得足够的数据点）

表 1. 根据 Kadcylya 和赫赛汀采用的梯度获得的峰容量

梯度时间 (min)	峰容量	
	Kadcylya	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。

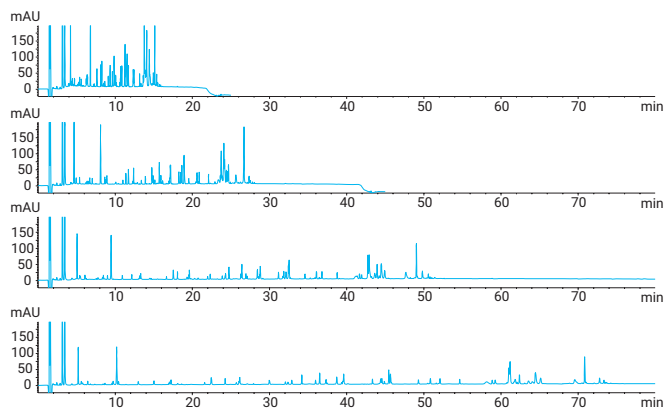


图 5. 赫赛汀胰蛋白酶酶解产物在 20、40、80 和 120 分钟梯度下的分析结果，在 214 nm 处进行 UV 检测。请注意，为了比较，y 标度随  $\Delta$ -梯度因子增加而增加

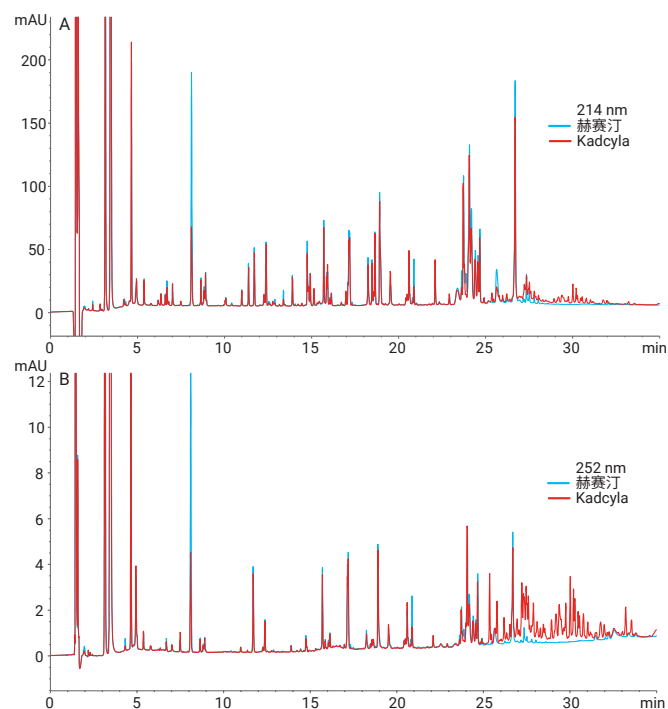


图 6. 赫赛汀（蓝色）和 Kadcyra（红色）胰蛋白酶酶解产物的分析结果比较，所用梯度为 40 分钟，UV 检测波长为 214 nm 和 252 nm

## 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<sup>[5,6]</sup>。

## 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

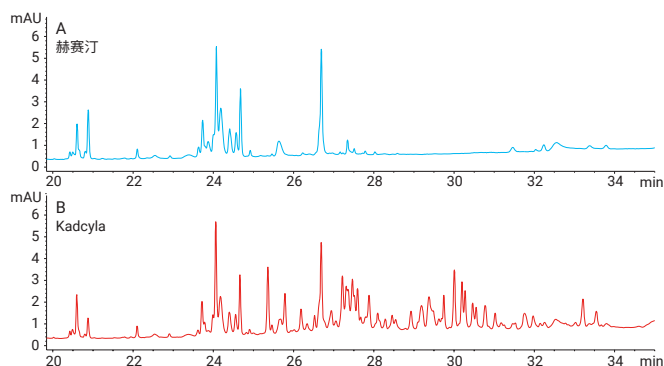


图 7. 赫赛汀和 Kadcyta 胰蛋白酶酶解产物的分析结果的详细比较，所用梯度为 40 分钟，在 252 nm 处进行 UV 检测

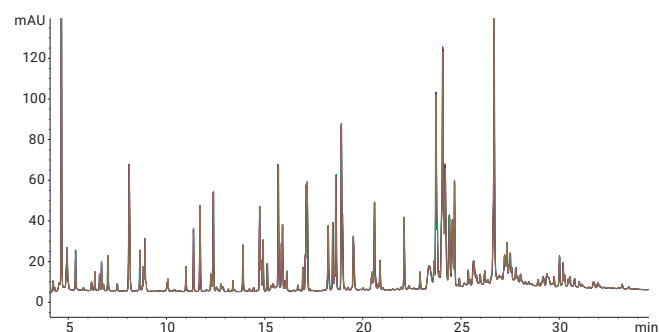


图 8. Kadcyta 胰蛋白酶酶解产物五次重复进样的叠加图，所用梯度为 40 分钟，在 214 nm 处进行 UV 检测

# 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  $\mu$ L 定量环以及用于肽谱分析的 40  $\mu$ 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% H<sub>2</sub>O 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。

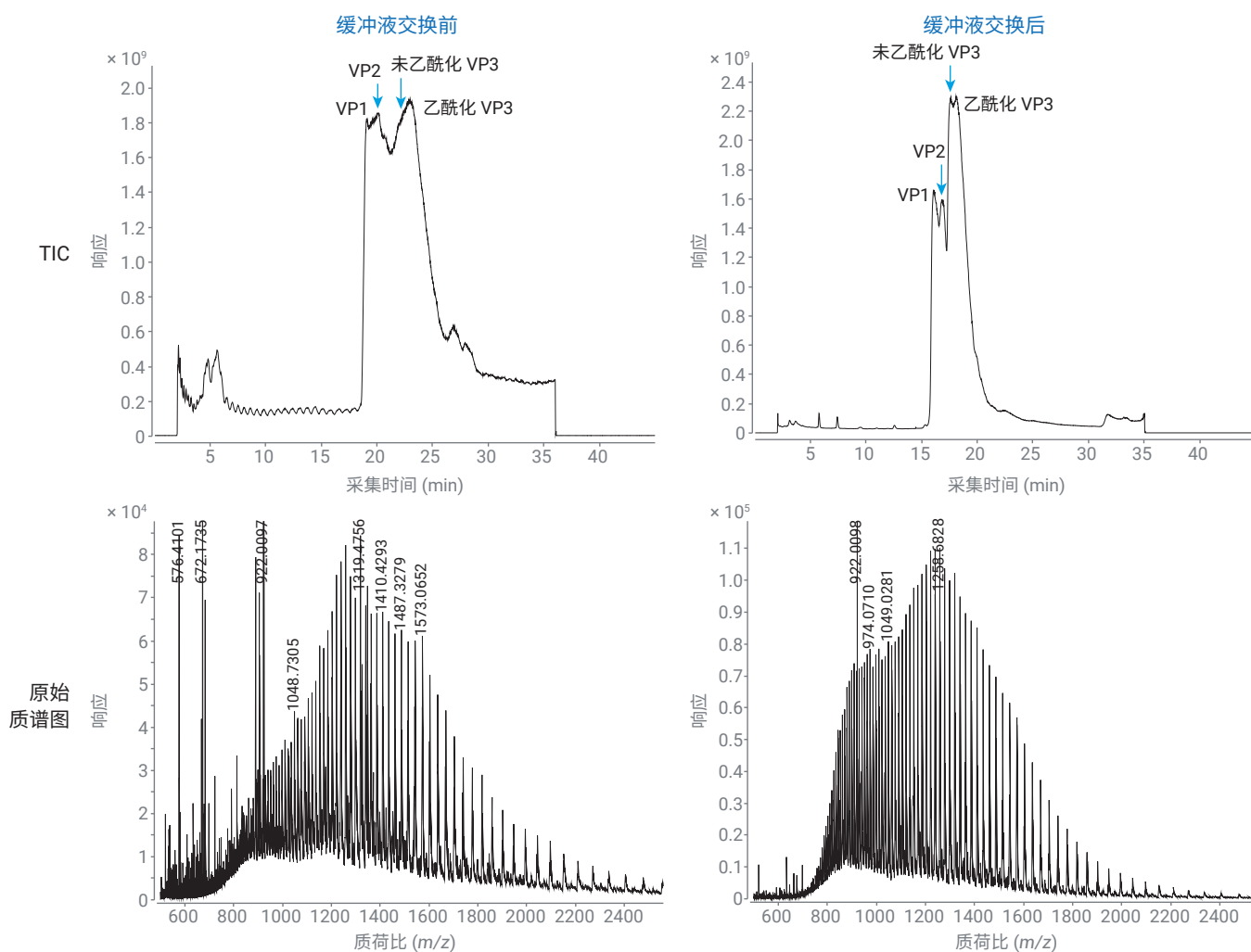


图 1. 在进行和未进行样品前处理的条件下，AAV 衣壳蛋白的 TIC 和 VP1 的原始谱图

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。

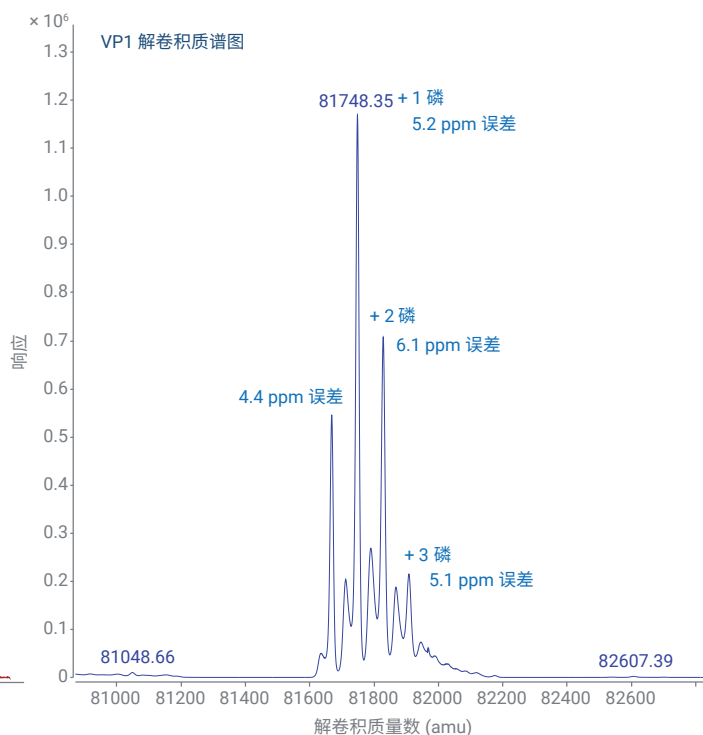
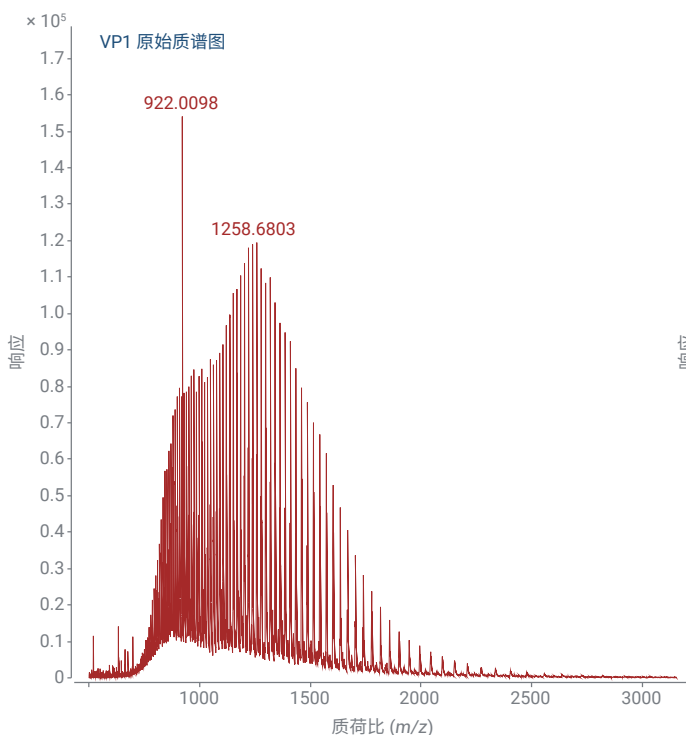


图 4 表明 VP3 的大部分未修饰形式与乙酰化 VP3 色谱分离。同样，解卷积谱图表明乙酰化 VP3 和未修饰 VP3 均具有较高的质量准确度。蛋白质的 N 端乙酰化是一种常见的 PTM，涉及蛋白质的稳定性、折叠以及与其他蛋白质的相互作用。VP1 被完全乙酰化，而 VP3 则约 70% 被乙酰化。虽然目前尚不清楚为什么 VP3 没有被完全乙酰化，但这可能会影响病毒衣壳的整体结构。6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 改进的真空设计结合大分子 SWARM 自动调谐功能提高了谱图清晰度，三种病毒衣壳蛋白及其 PTM 均获得了较高的质量准确度，所有蛋白质形式的误差均小于 10 ppm。

图 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

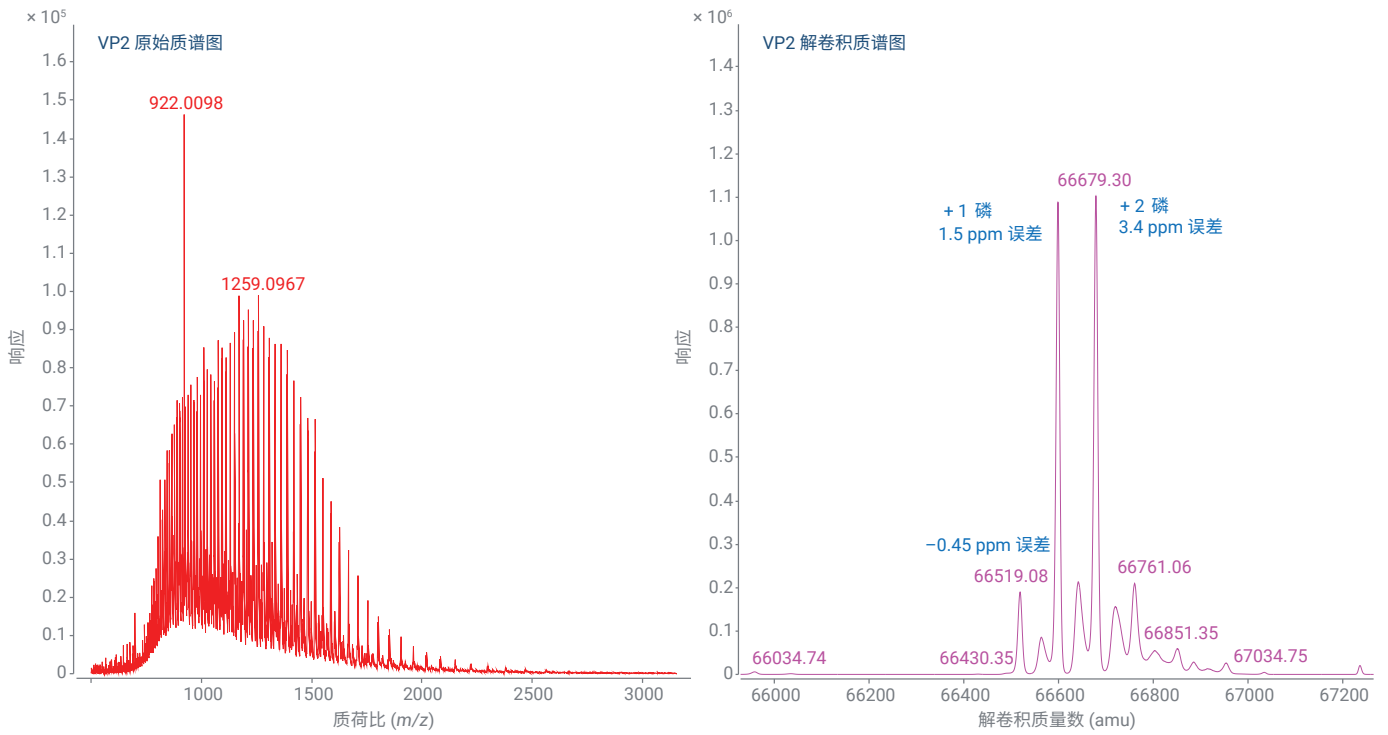


图 3. VP2 衣壳蛋白的原始谱图和解卷积谱图。蛋白质的天然形式和磷酸化形式具有出色的质量准确度，误差均小于 5 ppm

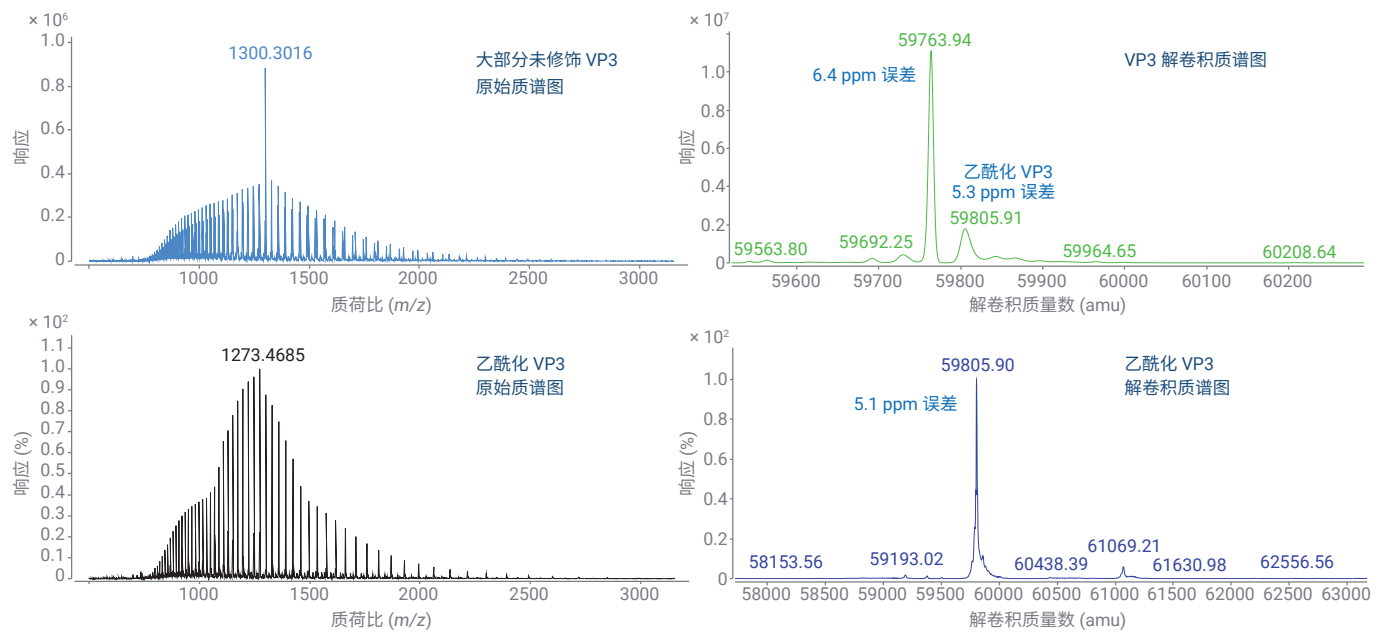


图 4. VP3 衣壳蛋白的原始谱图和解卷积谱图。大部分未修饰形式和乙酰化形式实现色谱分离，每种蛋白质形式均具有出色的质量准确度

## 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。

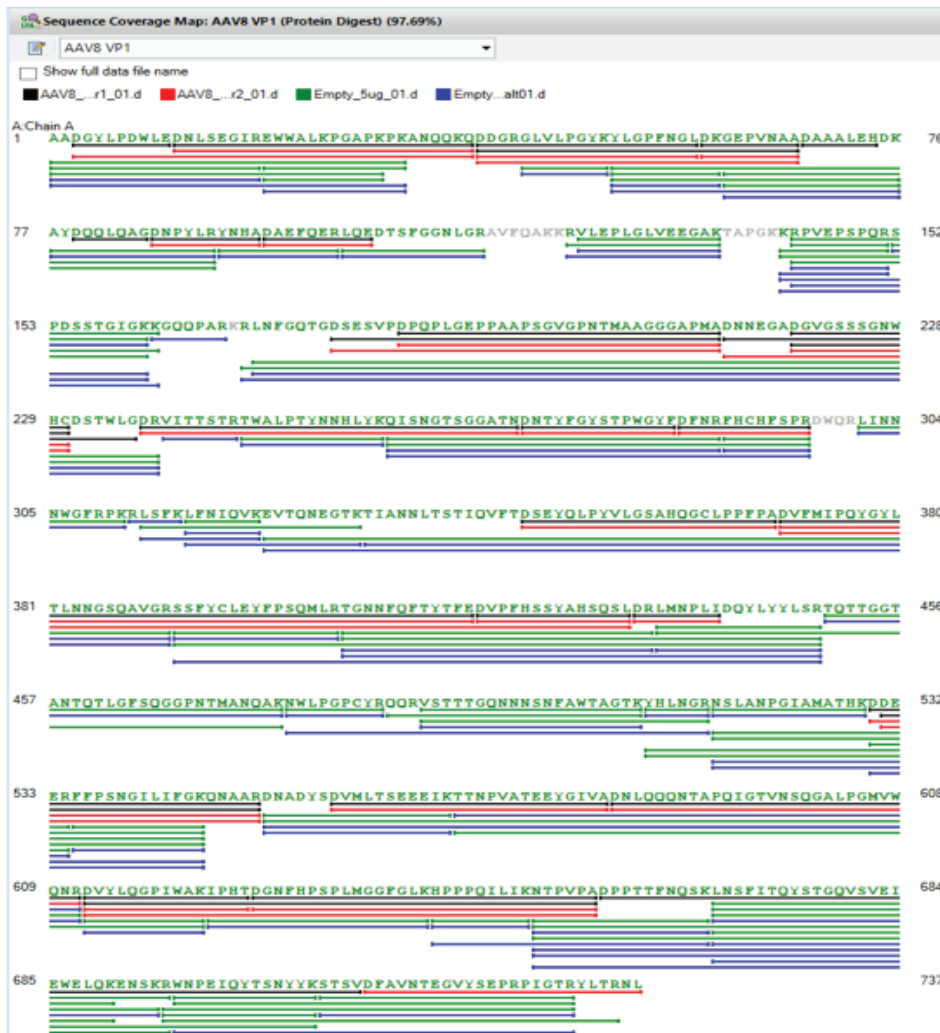


图 5. Agilent MassHunter BioConfirm 10.0 屏幕截图，显示了借助迭代 MS/MS 并使用胰蛋白酶和 rAsp-N 作为互补酶获得的 VP1 的序列覆盖。该蛋白质的序列覆盖率为 97.7%

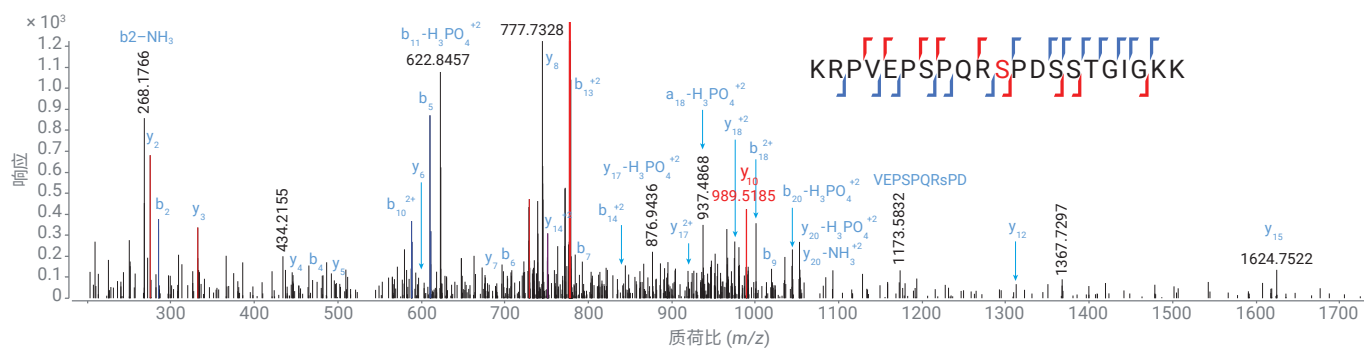


图 6. 使用 MS/MS 确认位点特异性磷酸化的示例。当标注肽段包含磷酸化的丝氨酸残基时带有红色标记

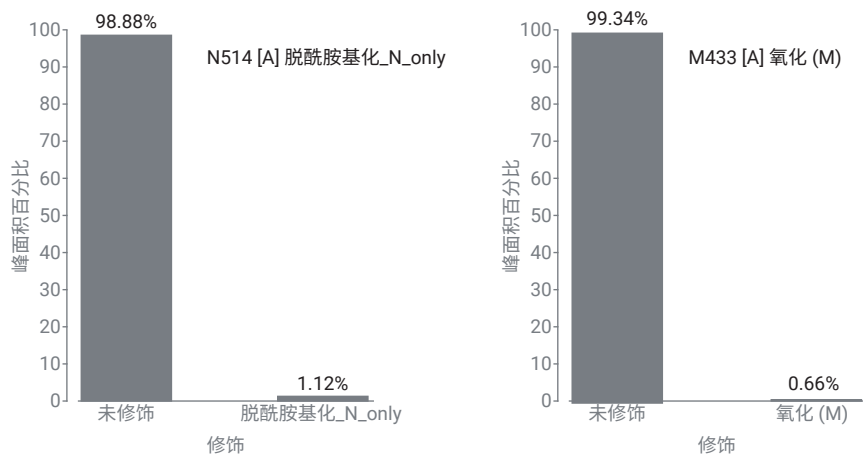


图 7. 蛋白质中常见 PTMs 示例：甲硫氨酸氧化和天冬酰胺脱酰胺基化。如预期一样，两种肽段均经过极低程度的修饰

## 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

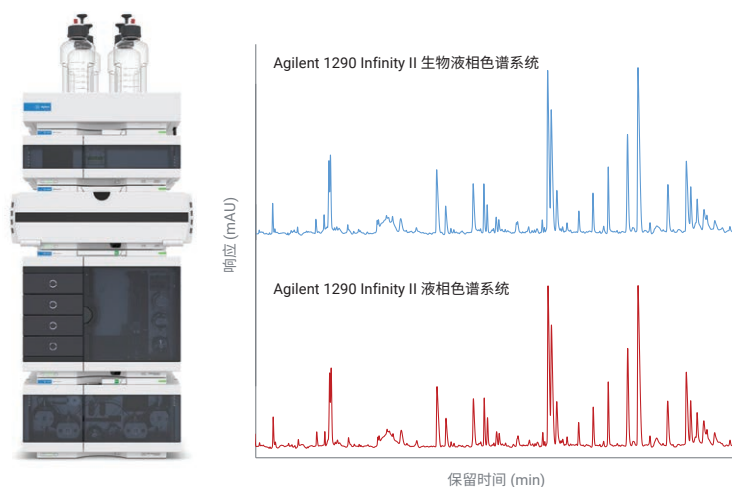
## 作者

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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup> 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ m（部件号 959759-902）
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 快速保护柱，2.1  $\times$  5 mm, 1.8  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L 碳酸氢铵 (100 mmol/L) 中加入 2  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

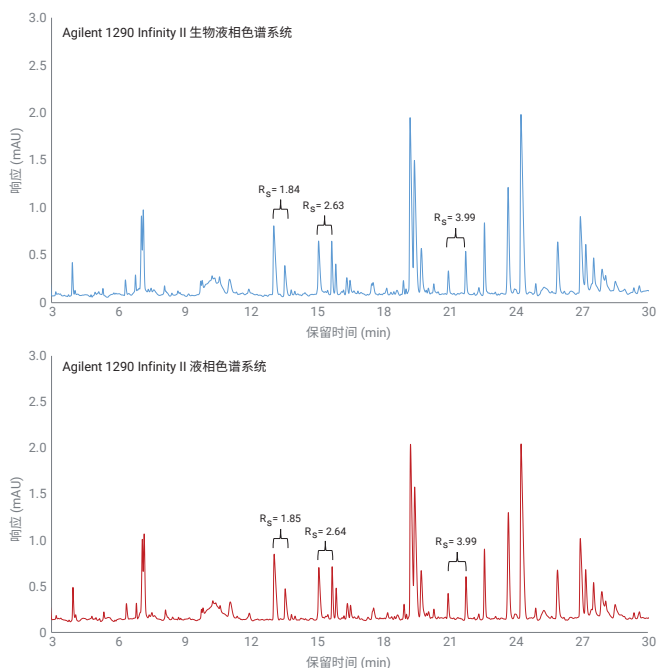


图 1. 由 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统使用相同方法 (表 1) 分离的 NISTmAb 胰蛋白酶酶解产物的色谱图

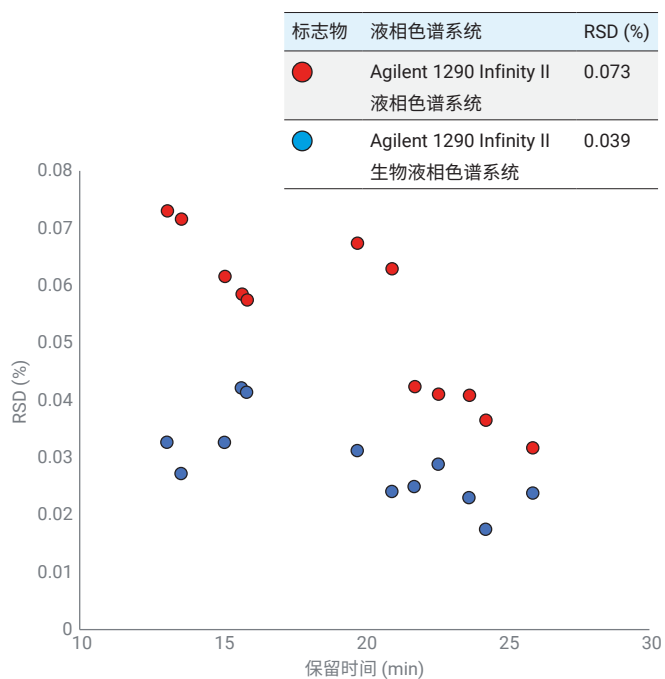


图 2. Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统的相对保留时间精度 (RSD) 值

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

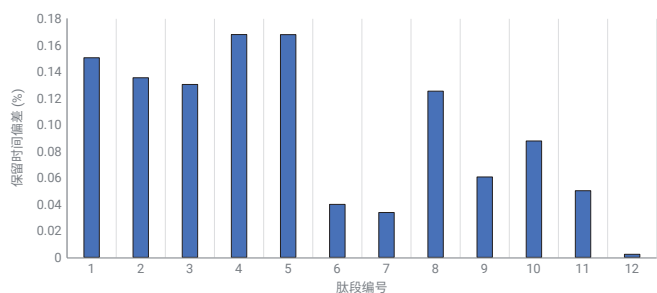


图 3. 两种液相色谱系统对所选 12 种肽段的平均保留时间及其偏差

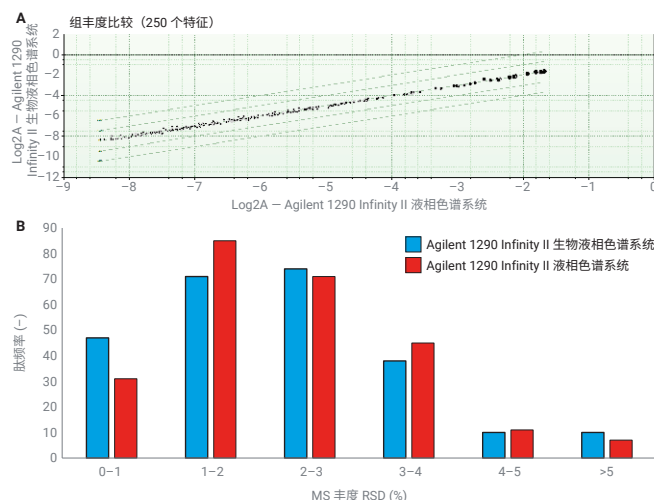


图 4. (A) 基于 10 次连续进样的统计相关性分析。黑点表示由 Agilent MassHunter Mass Profiler (B.10.00) 鉴定得到的 250 个最大丰度峰的倍数对数值。(B) Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 1290 Infinity II 液相色谱系统肽丰度 RSD 值的直方图

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](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](http://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

如需了解更多信息，请访问：

[www.agilent.com/chem/advancebio](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

DE44286.3650925926

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，2021  
2021年4月23日，中国出版  
5994-0037ZHCN

