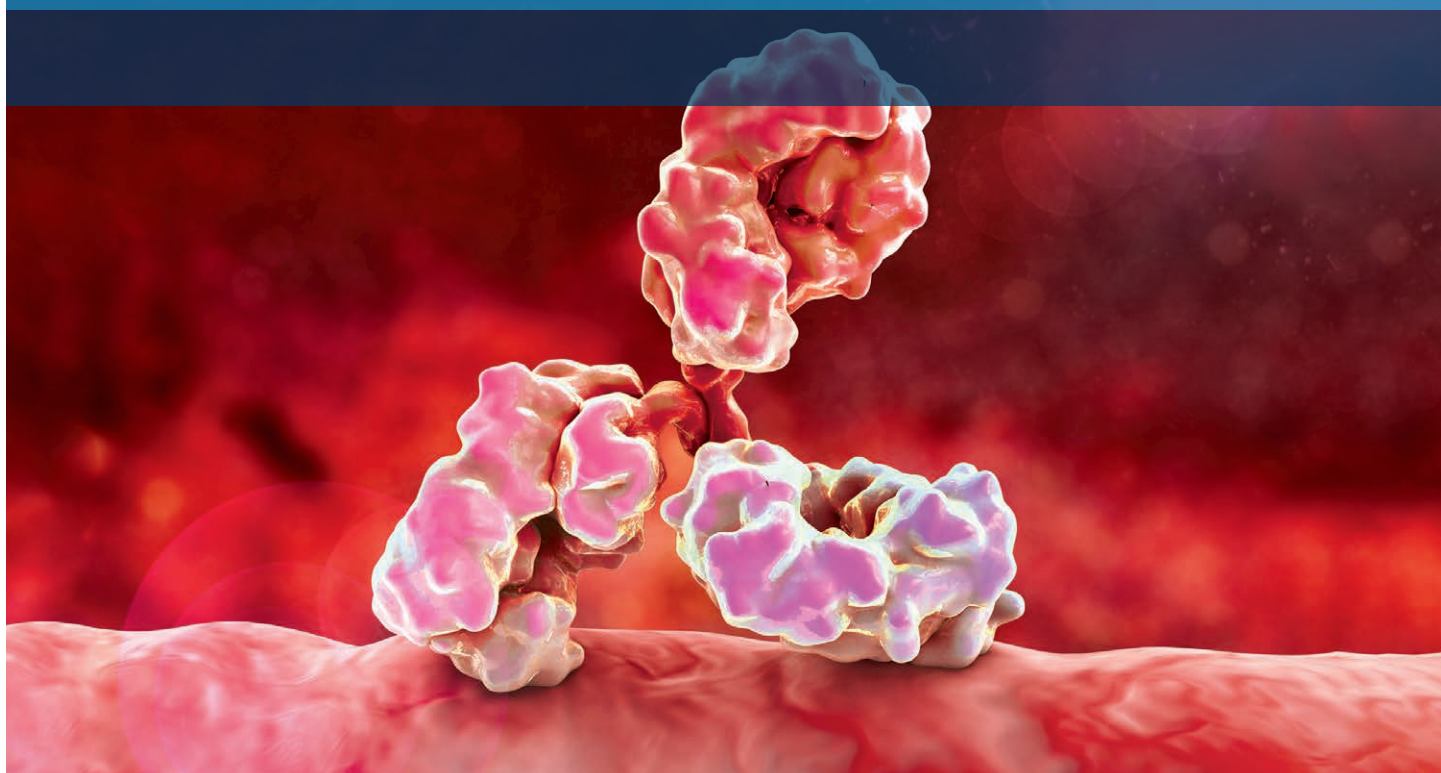


Agilent InfinityLab 生物液相色谱解决方案

# 高性能的生物制药分析

应用文集





# 克服生物制药领域的 分析挑战

日益复杂的生物制药分析要求创新，从而为整个生物制药工作流程提供出色性能。Agilent InfinityLab 生物液相色谱解决方案包括全系列完全生物兼容和生物惰性液相色谱系统，可实现从药物发现和研发到 QA/QC 的稳定、准确的生物分析。通过这些系统与生物色谱柱、质谱检测、软件和服务相结合，我们可以帮助您创建应对生物制药挑战的完整解决方案。

本应用文集包含一系列最新应用，展示了用于生物分析的 InfinityLab 生物液相色谱解决方案的卓越性能和全面功能。

**BIO**



# 目录

<b>1 单克隆抗体 (mAb)</b>	<b>8</b>
<b>1.1 改进 mAb 电荷异构体分析</b>	<b>8</b>
– 离子交换色谱	
– 配备高速泵的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱仪	
– Agilent Bio MAb, NP5, 2.1 × 250 mm, 5 μm, PEEK	
<b>1.2 优化的 mAb 聚集体分析</b>	<b>16</b>
– 体积排阻色谱	
– 配备高速泵的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱仪	
– Agilent AdvanceBio SEC, 200 Å, 4.6 × 300 mm, 1.9 μm	
<b>1.3 监测产品相关的 mAb 片段</b>	<b>24</b>
– 反相色谱	
– 配备高速泵的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱仪	
– Agilent PLRP-S, 1000 Å, 2.1 × 100 mm, 5 μm, 带 PEEK 内衬	
<b>1.4 便捷定制阳离子交换分析</b>	<b>30</b>
– 离子交换色谱	
– Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱仪	
– Agilent Bio MAb, NP5, 2.1 × 250 mm, 5 μm, PEEK	
<b>1.5 使用 4D-LC/MS 对单克隆抗体电荷异构体进行全自动化表征</b>	<b>38</b>
– 离子交换色谱;	
– 反相色谱	
– Agilent 1290 Infinity II 二维液相色谱系统与 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF	
– Agilent Bio MAb, NP5, 2.1 mm × 250 mm, 5 μm, PEEK;	
– Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm, 2.7 μm	
<b>1.6 二合一生物过程分析</b>	<b>50</b>
– 亲水相互作用色谱	
– 亲和色谱	
– Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪	
– Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm;	
– Agilent Bio-Monolith Protein A, 4.95 × 5.2 mm	
<b>2 肽</b>	<b>58</b>
<b>2.1 将方法无缝转移至 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱仪</b>	<b>58</b>
– 反相色谱	
– 配备高速泵的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱仪	
– Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm;	
– Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 快速保护柱, 2.1 × 5 mm, 1.8 μm	



<b>2.2 稳定可靠的肽谱分析</b>	<b>64</b>
– 反相色谱	
– 配备高速泵的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱仪	
– Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 × 250 mm, 2.7 μm;	
Agilent AdvanceBio 肽谱分析快速保护柱, 2.1 × 5 mm, 2.7 μm;	
Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm;	
Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 快速保护柱, 2.1 × 5 mm, 1.8 μm	
<b>3 抗体药物偶联物 (ADCs)</b>	<b>70</b>
<b>3.1 在高盐条件下分析抗体药物偶联物</b>	<b>70</b>
– 疏水相互作用色谱	
– 配备高速泵的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱仪	
– Agilent AdvanceBio HIC 色谱柱, 4.6 × 100 mm, 3.5 μm	
<b>3.2 便捷、可靠地分析抗体药物偶联物</b>	<b>76</b>
– 疏水相互作用色谱	
– Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱仪	
– Agilent AdvanceBio HIC 色谱柱, 4.6 × 100 mm, 3.5 μm	
<b>4 多聚糖</b>	<b>80</b>
<b>4.1 多聚糖分离的分离度和速度</b>	<b>80</b>
– 亲水相互作用液相色谱	
– 配备高速泵的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱仪	
– Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm;	
Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm	
<b>5 前体寡核苷酸</b>	<b>88</b>
<b>5.1 寡核苷酸合成原料的分析</b>	<b>88</b>
– 反相色谱	
– 配备全能泵的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱仪	
– Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm	
<b>6 中药</b>	<b>94</b>
<b>6.1 确定液相色谱方法兼容性的性能比较</b>	<b>94</b>
– 反相色谱	
– Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱仪	
– Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 150 mm, 5 μm;	
Agilent InfinityLab Poroshell EC-C18, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm;	
Agilent InfinityLab Poroshell SB-C18, 2.1 × 150 mm, 2.7 μm	

# 方法和系统概览

使用此表作为各应用的实验设置的快速指南。

	方法						1290 生物			1260 生物	
	IEX	SEC	RPLC	HILIC	HIC	AC	HSP	2D-LC	FP	Prime	惰性
<b>单克隆抗体 (mAb)</b>											
改进 mAb 电荷异构体分析	●						●				
优化的 mAb 聚集体分析		●					●				
监测产品相关的 mAb 片段			●				●				
便捷定制阳离子交换分析	●									●	
使用 4D-LC/MS 对单克隆抗体电荷异构体进行全自动化表征	●		●					●			
二合一生物过程分析				●		●					●
<b>肽</b>											
将方法无缝转移至 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱仪			●				●				
稳定可靠的肽谱分析			●				●				
<b>抗体药物偶联物 (ADCs)</b>											
在高盐条件下分析抗体药物偶联物					●		●				
便捷、可靠地分析抗体药物偶联物					●					●	
<b>多聚糖</b>											
多聚糖分离的分离度和速度				●			●				
<b>前体寡核苷酸</b>											
寡核苷酸合成原料的分析			●						●		
<b>中药</b>											
确定液相色谱方法兼容性的性能比较			●							●	

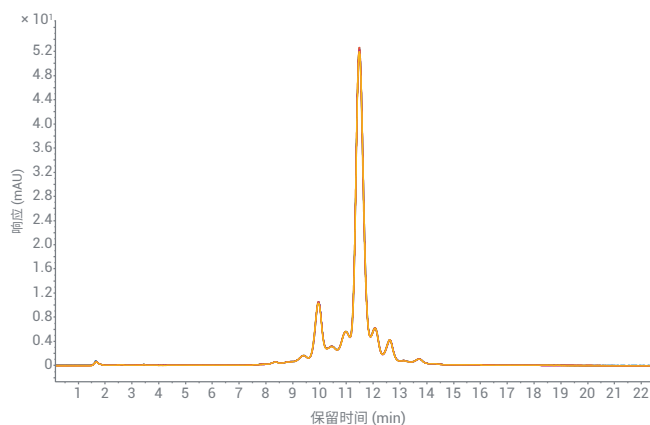
**HSP** 配备高速泵的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱仪  
**二维液相色谱** Agilent 1290 Infinity II 二维液相色谱系统与 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

**FP** 配备全能泵的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱仪  
**Prime** Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱仪  
**惰性** Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪



## 您的分析可以采用多平缓的梯度？

Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统助您改进  
mAbs 电荷异构体分析

**BIO**

### 作者

Sonja Schneider  
安捷伦科技有限公司

### 摘要

电荷异构体分析是一项对所用液相色谱系统有较高要求的应用，因为它需要使用腐蚀性的高浓度盐缓冲液和非常平缓的梯度来实现出色分离。使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统对不同的盐梯度进行评估，并分析分离度和重现性。

1290 Infinity II 生物液相色谱系统包括高速泵及其完全不含铁的流路，非常适合用于生物色谱条件，可避免对系统造成潜在的腐蚀性损坏。即使对于极具挑战性的平缓梯度也表现出出色的重现性，证实了 1290 Infinity II 生物液相色谱仪作为新一代安捷伦高端液相色谱系统，生成的数据具有高可信度。



## 前言

单克隆抗体 (mAbs) 是一种高度异质性大分子, 大小约为 150 kDa, 通常通过重组法生产。它们的生产要经历复杂的生物合成过程, 这一过程中可发生大量修饰, 从而产生数百种不同的异构体。脱酰胺化、氧化、二硫键、N-糖基化、N-末端和 C-末端加工是最常见的翻译后修饰 (PTMs)。所有这些修饰均可在合成过程中发生, 但生产和储存过程也会增加这些大分子的复杂性。PTMs 会形成复杂的异构体分布, 需要进行全面的分析和监测, 因为最终药品中的修饰可能与生物活性丧失、半衰期改变或免疫原性增加相关<sup>[1]</sup>。某些 PTMs 会导致分子形成电荷异构体, 通常使用离子交换色谱 (IEX) 对这些异构体进行分析<sup>[2]</sup>。电荷异构体是最重要的关键质量属性 (CQAs) 之一, 因此需要严格的验收标准和质量控制。确认产品正确生产并鉴别和定量任何杂质至关重要。

平缓梯度洗脱在蛋白质的 IEX 中非常常见。用于洗脱蛋白质的离子强度模式中的典型盐梯度约为 1–3 mmol/min, pH 值的允许误差为  $\pm 0.02$  个 pH 单位<sup>[3]</sup>。

1290 Infinity II 生物液相色谱系统配备高性能高速泵。与低压混合泵 (如四元泵) 相比, 二元泵的主要优势在于, 它能够更准确、更精密地混合小比例溶剂组分。这种精确混合能力可以在溶剂梯度开始和结束时提供高精度的溶剂组成<sup>[4]</sup>。这是生成可重现且准确的平缓梯度 (每个通道低于 1%/min) 的基础。

1290 Infinity II 生物液相色谱是新一代安捷伦高端液相色谱系统, 专为生物色谱条件 (如 2 mol/L NaCl、高达 8 mol/L 尿素的高盐浓度, 以及如 0.5 mol/L NaOH 或 0.5 mol/L HCl 的高/低 pH 溶剂) 而设计。整个流路完全不含不锈钢 (SST) 或铁; 贯穿 Multisampler、大容量柱温箱和检测器的所有毛细管和接头均由 MP35N (一种镍钴合金) 制成。这种材料可以减少高浓度盐缓冲液的潜在腐蚀, 避免因铁离子存在引起的蛋白质修饰 (如氧化、蛋白质复合物形成)。

本应用简报介绍了对曲妥珠单抗和 NISTmAb 参比标样的电荷异构体的分析。研究中测试了不同的盐梯度斜率, 以便达到出色分离。然后评估了理想梯度斜率的重现性。

## 实验部分

### 设备

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 (G7116B), 配备标准流速生物兼容性热交换器
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (G7114B), 配备生物兼容性微量流通池, 3 mm, 2  $\mu$ L

### 软件

Agilent OpenLab CDS 2.5 版

### 色谱柱

Bio MAb, NP5, 2.1  $\times$  250 mm, PEEK (部件号 5190-2411)

### 化学品

所有试剂纯度均为液相色谱级。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)。磷酸二氢钠一水合物、磷酸氢二钠七水合物、氯化钠、盐酸、氢氧化钠、三羟甲基甲胺、咪唑和哌嗪六水合物自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)。

## 样品

- Agilent-NISTmAb (部件号 5191-5744)
- 人源化单克隆抗体曲妥珠单抗 (商品名为赫赛汀) 购自 Roche (Basel, Switzerland)
- 曲妥珠单抗溶于 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液中, pH 6.8

## 缓冲液配制

配制 2 L 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8): 称取 4.45 g 磷酸二氢钠一水合物和 7.44 g 磷酸氢二钠七水合物加入 2 L 棕色瓶中, 用超纯水定容至 2 L (→ 缓冲液 A)。将 29.22 g 氯化钠 (总浓度 500 mmol/L) 加入 1 L 棕色空瓶中, 用配制好的磷酸盐缓冲液 A 定容至 1 L (→ 缓冲液 B)。测量两种配制缓冲液的 pH 值, 如有需要, 将 pH 值调至 6.8 (加入大量盐会改变 pH 值)。配制的缓冲液均使用 0.2 μm 滤膜过滤。

## 方法

见表 1。

**注:** 使用高浓度盐溶液作为洗脱液时, 需要考虑在泵方法中设置相应溶剂类型。例如, 对于含 500 mmol/L 氯化钠的溶剂 B, 在泵方法的溶剂选择字段使用“氯化钠 0.5 mol/L”而非一般水相或水。高浓度盐可改变溶剂的压缩系数, 因此使用预先配置的溶剂表可以使泵达到出色性能。

## 结果与讨论

### 方法开发

为获得所需分离度并实现出色分离, 电荷异构体分析需要进行全面的方法开发。有两个参数是成功的关键: 理想 pH 值和理想梯度斜率。这两个因素都会对分离产生重大影响。首先, 建议进行 pH 筛选, 以找到用于实现分离的理想 pH。在之前的实验中, 使用 pH 6.4–7.4 的缓冲液进行分析, 发现两种样品 (曲妥珠单抗和 NISTmAb 参比标样) 在 pH 6.8 时均获得出色结果 (数据未展示)。下一步是确定理想的梯度斜率, 以实现有效的分离。

表 1. 盐梯度色谱条件

参数	值
溶剂	A: 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 6.8, B: 30 mmol/L 磷酸盐, pH = 6.8, 500 mmol/L 氯化钠
梯度	30 min 内 0 或 25 mmol/L–150 mmol/L NaCl — 方法开发时使用不同的平缓梯度 30 min 内 0 mmol/L (曲妥珠单抗) 和 25 mmol/L (NIST)–100 mmol/L NaCl, 用于重现性研究 30 min 内 25–50 mmol/L NaCl, 用于重现性研究 (非常平缓的梯度) 31 min — 500 mmol/L NaCl 清洗 停止时间: 35 min 后运行时间: 15 min
流速	0.200 mL/min
温度	30 °C
检测	280 nm 10 Hz
进样	进样量: 3 μL (曲妥珠单抗) 和 2 μL (NIST) 样品温度: 10 °C 进样针清洗: 用水清洗 3 秒

图 1 显示了不同梯度斜率下曲妥珠单抗电荷异构体分析的叠加色谱图，梯度斜率范围为 1% B/min (5 mmol/L/min) 至 0.33% B/min (1.66 mmol/L/min)。梯度越平缓，对泵性能的要求就越高。为在梯度洗脱过程中始终提供高精度的溶剂组成，需要泵能够准确、精密地混合小比例溶剂组分。但必须考虑到，非常平缓的梯度对盐梯度而言并不总能获得更高分离度，但总会增加峰宽（如图 1 中的 0.33% B/min）。因此，重现性研究选择的梯度斜率处于各测试梯度的中间，为 0.66% B/min 和 3.3 mmol/L/min，此处梯度仍较为平缓。

我们对 NISTmAb 参比标样的电荷异构体进行了类似的分离方法开发（见图 2）。与等电点 (pI) 约为 9 的曲妥珠单抗相比，由于 NIST 抗体的 pI 较高（约为 9.2），故 NIST 的起始条件含盐量略高。为了更有效地分离 NISTmAb 参比标样的电荷异构体，所用梯度较曲妥珠单抗略为平缓，最平缓的梯度为 0.17% B/min (0.83 mmol/L/min)，这对泵来说是一项挑战性任务。对于进一步的重现性研究，我们选择了 0.5% B/min (2.5 mmol/L/min) 的梯度斜率。

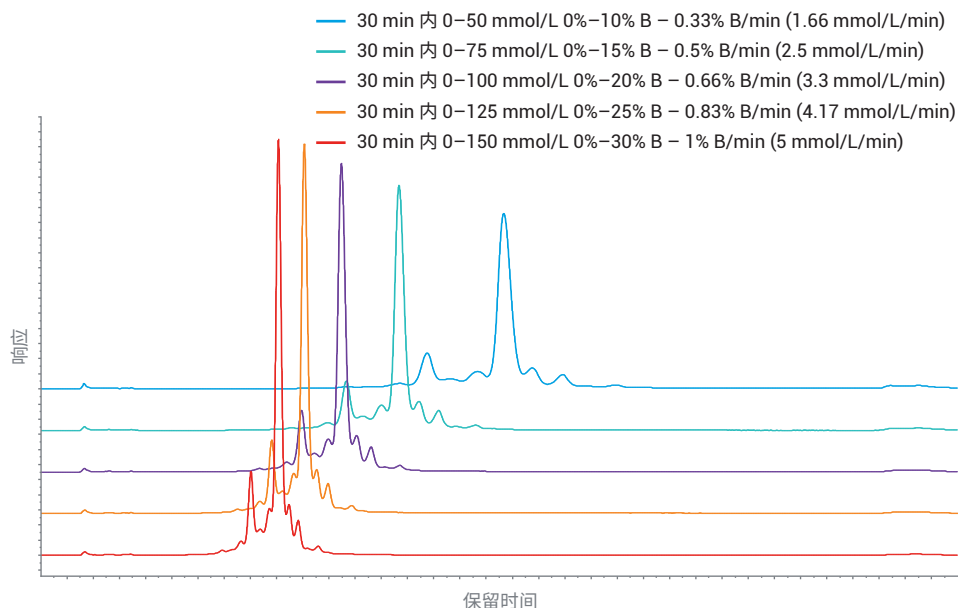


图 1. 不同盐梯度斜率下曲妥珠单抗分离的方法开发

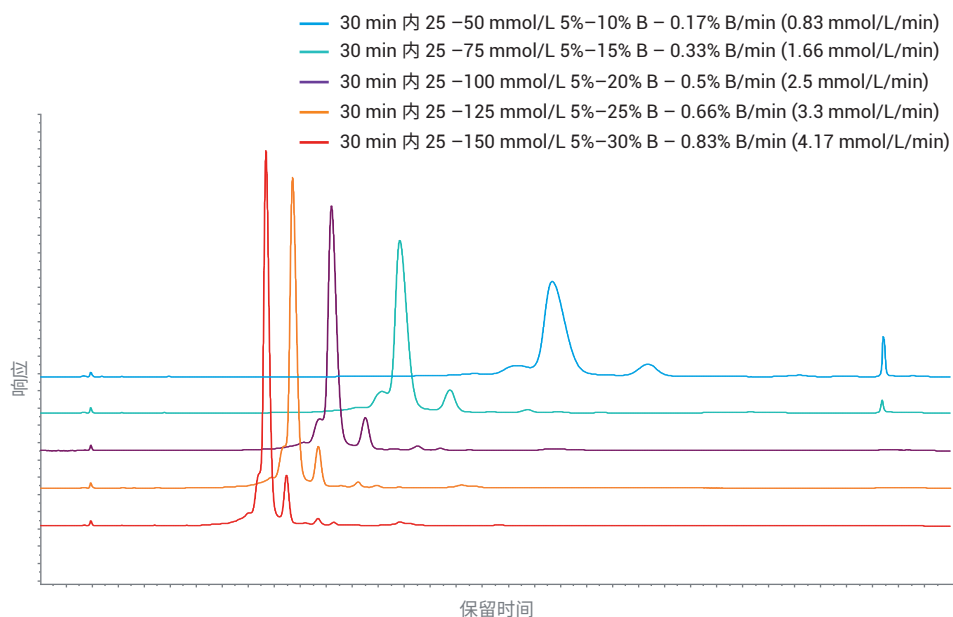


图 2. 不同盐梯度斜率下 NISTmAb 参比标样分离的方法开发

### 曲妥珠单抗电荷异构体分离的重现性

图 3 显示了曲妥珠单抗电荷异构体分离的重现性研究 (A)，梯度斜率为 0.66% B/min (3.3 mmol/L/min)。图 3B 显示了放大视图，以便更清晰地显示分离的异构体。标为 A 的异构体表示主峰前洗脱的酸性异构体，标为 B 的异构体表示主峰后洗脱的碱性异构体。主峰前有 5 种酸性异构体被洗脱，主峰后有 4 种碱性异构体被洗脱。对所有异构体和主峰的保留时间 (RT) 和峰面积的精度进行了评估。RT 和峰面积的精度均非常出色，RT 的相对标准偏差 (RSD) 低于 0.052%，除两个非常小的异构体峰 A1 和 B3 外，峰面积的 RSD 值均低于 0.82%。

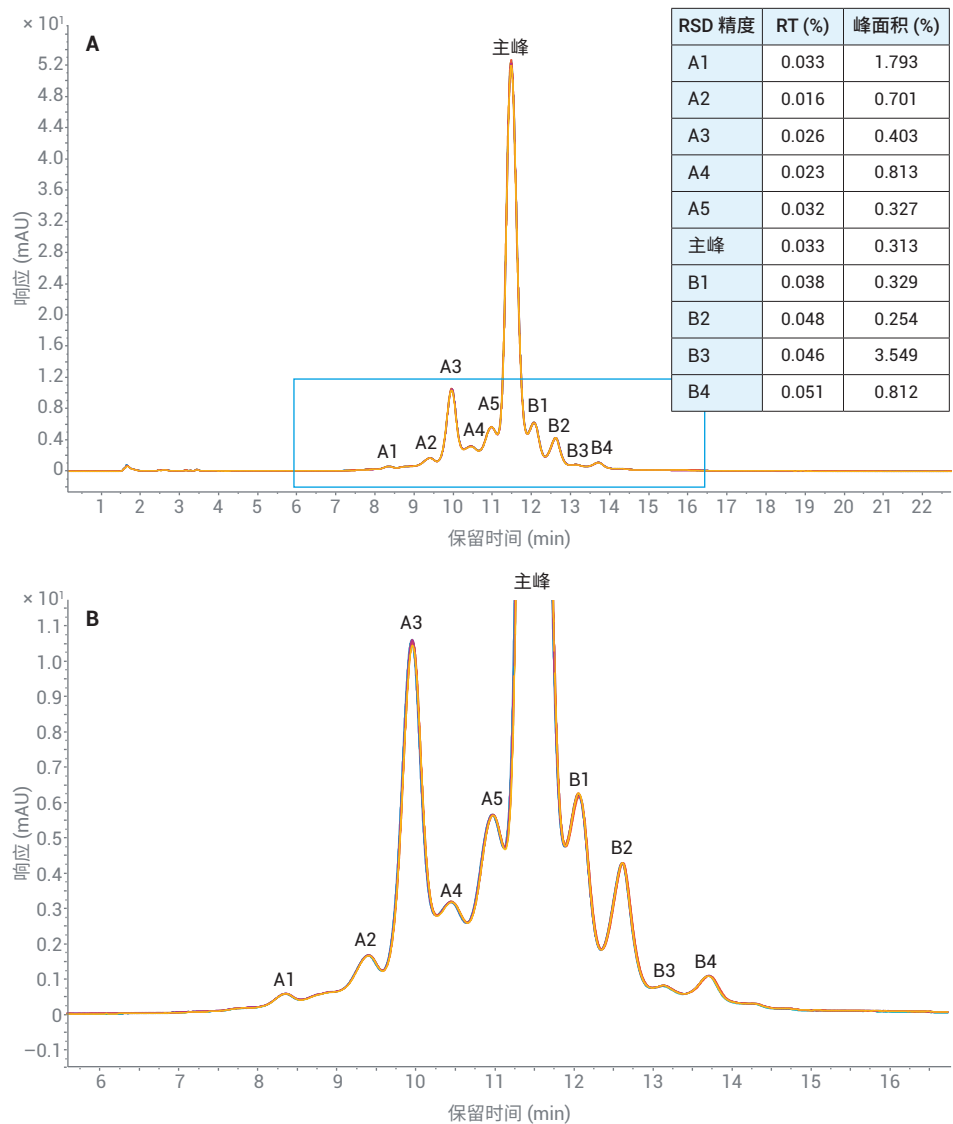


图 3. 曲妥珠单抗电荷异构体分离 7 次后续运行的重现性研究 (A)，梯度斜率为 0.66% B/min (3.3 mmol/L/min)。 (B) 放大图



### NISTmAb 电荷异构体分离的重现性

图 4 显示了 NISTmAb 参比标样电荷异构体分离的重现性研究 (A)，梯度斜率为 0.5% B/min (2.5 mmol/L/min)。

图 4B 显示了 2 个酸性异构体和 4 个碱性异构体的放大视图。再次对所有异构体和主峰的保留时间 (RT) 和峰面积的精度进行了评估。RT 和峰面积的精度均非常出色，RT 的 RSD 低于 0.06%，除一个非常小的异构体峰 B2 外，峰面积的 RSD 值均低于 0.55%。

如图 2 所示，与 0.5% B/min (2.5 mmol/L/min) 梯度 (仍较为平缓 — 用于重现性研究) 相比，最平缓的梯度 0.17% B/min (0.83 mmol/L/min) 并没有提供更好的分离度。

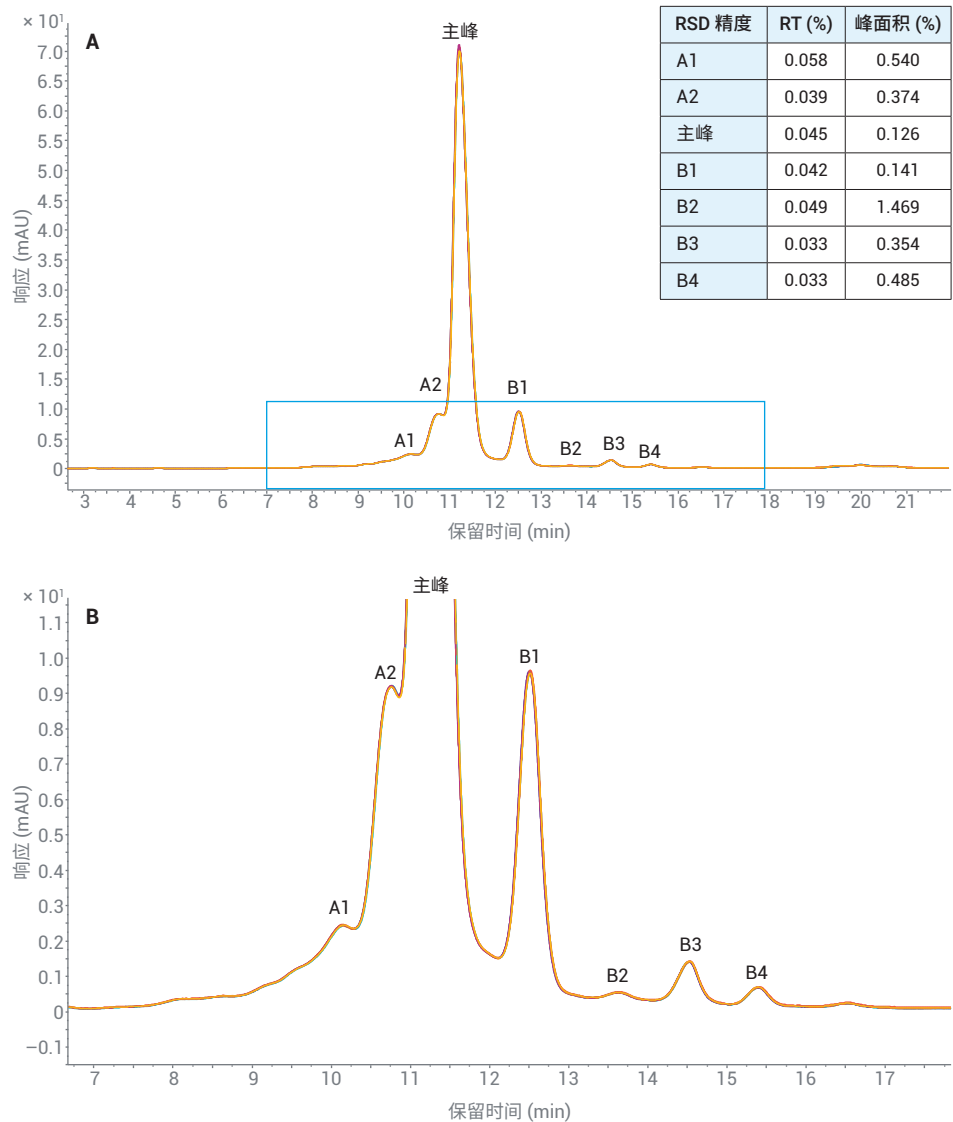


图 4. NISTmAb 参比标样电荷异构体分离 7 次后续运行的重现性研究 (A)，梯度斜率为 0.5% B/min (2.5 mmol/L/min)。 (B) 放大图

然而，1290 Infinity II 生物高速泵可应对具有挑战性的梯度斜率，如图 5 所示。在 7 次后续运行中，尽管峰宽在该梯度下有所增加，RT 的精度仍非常出色（RSD 低于 0.25%）。随着峰宽的增加，峰高减小，会对峰面积精度产生不利影响。

## 结论

使用 1290 Infinity II 生物液相色谱系统评估了不同盐梯度斜率下分析曲妥珠单抗和 NISTmAb 电荷异构体的分离度和重现性。乍看之下，更平缓的梯度似乎能提高分离度。而对两种 mAbs 而言，评估的最平缓梯度并没有提供出色的分离度，随着斜率的减小，峰开始变宽，分离度并没有进一步提高。进一步评估了高分离度和尖锐峰形理想组合梯度的方法重现性。对于 3.3 mmol/L/min（曲妥珠单抗）和 2.5 mmol/L/min（NISTmAb）的梯度斜率，RT 和峰面积的重现性均非常出色。评估的所有峰的 RT RSD 均低于 0.06%。对使用最平缓梯度的 NISTmAb 分析进行了重现性评估，即使对于斜率为 0.83 mmol/L/min 的超平缓梯度，RT 的精度仍非常出色（RSD 小于 0.25%）。这些数据表明，1290 Infinity II 生物液相色谱系统及其完全不含铁的流路非常适合在生物色谱条件下使用，可获得高度重现的结果。

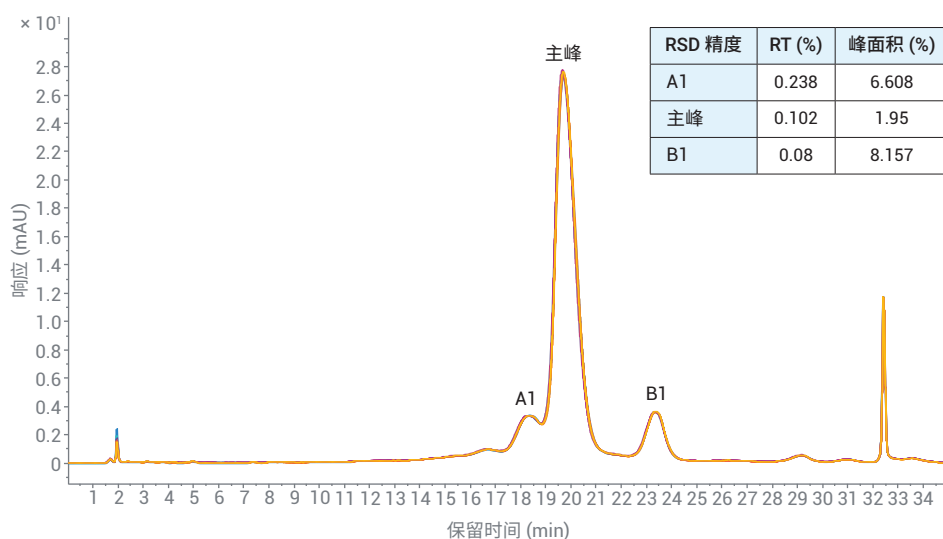


图 5. NISTmAb 参比标样电荷异构体分离 7 次后续运行的重现性研究，梯度斜率为 0.17% B/min (0.83 mmol/L/min)

## 参考文献

1. Dick Jr., L. W. *et al.* Identification and Measurement of Isoaspartic Acid Formation in the Complementarity Determining Region of a Fully Human Monoclonal Antibody. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, 877(30), 3841–3849
2. Zhang, L. *et al.* Improving pH Gradient Cation-Exchange Chromatography of Monoclonal Antibodies by Controlling Ionic Strength. *J. Chromatogr. A* **2013**, 1272, 56–64
3. Farnan, D.; Moreno, G. T. Multiproduct High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations by pH Gradient Ion-Exchange Chromatography. *Anal. Chem.* **2009**, 81(21), 8846–8857
4. 液相色谱手册：液相色谱柱与方法开发指南，安捷伦科技公司，出版号 5990-7595CHCN，**2016**
5. Goyon, A. *et al.* Determination of Isoelectric Points and Relative Charge Variants of 23 Therapeutic Monoclonal Antibodies. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2017**, 1065–1066, 119–128
6. Xie, L. *et al.* Demonstrating Analytical Similarity of Trastuzumab Biosimilar HLX02 to Herceptin with a Panel of Sensitive and Orthogonal Methods Including a Novel FcγRIIIa Affinity Chromatography Technology. *BioDrugs* **2020**, 34(3), 363–379

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

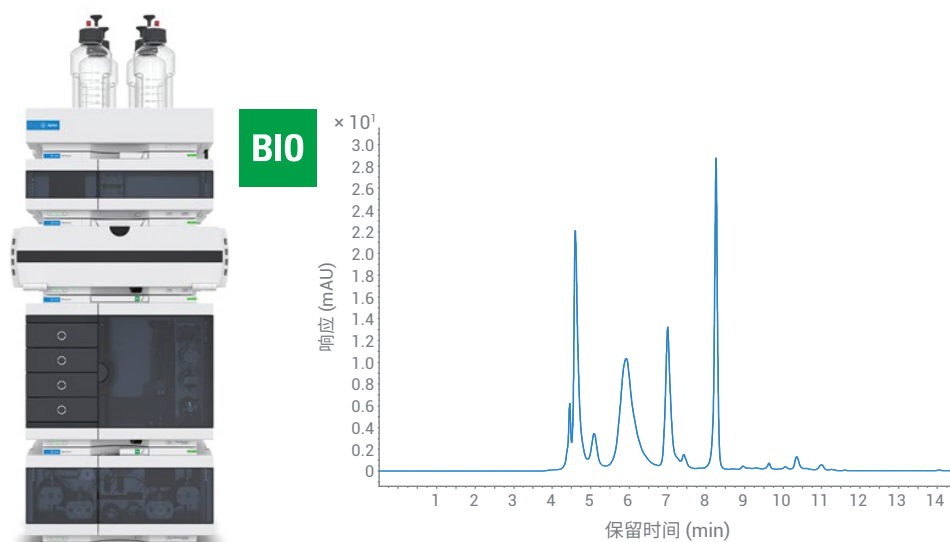
DE.964027778

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  
2020年10月12日，中国出版  
5994-2692ZHCN

## 提升 mAb 聚集体分析性能

使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统进行高分离度 SEC 分析



### 作者

Edgar Nägele  
安捷伦科技有限公司

### 摘要

本应用简报介绍了配备 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱和超低扩散毛细管的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统通过体积排阻色谱 (SEC) 分离蛋白质的出色分离度。生物兼容性 UHPLC 系统能够使用腐蚀性盐缓冲液进行分析，因此节省了维护费用。比较了不同内径毛细管 (0.17、0.12 和 0.07 mm) 在 SEC 分析中的分离度。对一种蛋白质混标和单克隆抗体 (mAbs) (包括聚集体) 进行了分离，并比较了分离度。此外，由单一软件解决方案中的 Agilent OpenLab GPC/SEC 附加软件确定了分子量，实现了一步式工作流程。



## 前言

mAbs 等现代生物药物是高度异质性的化合物。聚集体是最重要的关键质量属性 (CQAs) 之一，通常采用 SEC 进行监测。这项技术可根据标准品计算待测物分子量，从而对化合物进行鉴定。此外，该技术还可通过显示更高分子量的聚集体成分（如二聚体和更高程度聚集体）来确认纯度。为获得足够的分离度，推荐使用亚 2  $\mu\text{m}$  颗粒填充的现代 SEC 色谱柱。为实现出色性能，首选亚 2  $\mu\text{m}$  色谱柱和死体积尽可能小的 UHPLC 仪器。死体积过大因扩散效应而损失这些色谱柱获得的分离度。此外，完全生物兼容的 1290 Infinity II 生物液相色谱系统可以完美应对 SEC 缓冲液中常用的高浓度盐，以超低的维护成本提供可靠结果。

本应用简报介绍了现代亚 2  $\mu\text{m}$  SEC 色谱柱在 1290 Infinity II 生物液相色谱系统上的应用，展示了使用死体积极小的仪器带来的优势。为证明死体积对蛋白质和聚集体分离的影响，使用了不同内径的毛细管。将特征明确的 NISTmAb 通过 pH 诱导和热诱导产生更多聚集体，随后分离这些聚集体。

## 实验部分

### 仪器

- Agilent 1290 Infinity II 生物高速泵 (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A)，配备集成式样品恒温箱 (选件 #101)
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)，配备生物兼容性热交换器
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (G7114B)，配备生物兼容性微量流通池，3 mm，2  $\mu\text{L}$

### 其他部件

Agilent 1290 Infinity II 生物超低扩散工具包 (G7132A#006)

### 软件

Agilent OpenLab 2.5 版和 GPC/SEC 附加软件 1.2 版

### 液相色谱方法

参数	值
溶剂	磷酸盐缓冲液 (PBS), pH 7.4
流速	0.35 mL/min
等度分离	
柱温	30 °C
样品温度	4 °C
进样针清洗	用水清洗 3 秒
进样量	5 $\mu\text{L}$
检测 (VWD)	280 nm, 采集速率 20 Hz

### 色谱柱

Agilent AdvanceBio SEC 200 Å, 4.6 × 300 mm, 1.9  $\mu\text{m}$  (部件号 PL1580-5201)

### 样品

- 校准用蛋白质混标 (部件号 5190-9417)：甲状腺球蛋白 (670000 Da)、 $\gamma$ -球蛋白 (150000 Da)、卵清蛋白 (45000 Da)、肌红蛋白 (17000 Da)、血管紧张素 II (1000 Da)
- 人源化单克隆抗体 (mAb) 曲妥珠单抗 (商品名为赫赛汀) 购自 Roche (Basel, Switzerland)。曲妥珠单抗溶于 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液中，pH 6.8
- Agilent NISTmAb，人源化 IgG1k mAb (部件号 5191-5745)

### pH 诱导/温度诱导 NISTmAb 方案

使用流动相将 mAb 稀释至 2 mg/mL 的最终浓度。pH 诱导方法与其他文献所述基本相同，仅有略微改动<sup>[1]</sup>：将 1 mol/L HCl 溶液缓缓滴加到样品溶液中，使其 pH 值从 6.0 改变为 1.0。然后，滴加 1 mol/L NaOH 溶液将 pH 值调节至 10.0。最后，再次滴加 1 mol/L HCl 溶液将 pH 值调回 6.0。pH 值变化间大约有 1 分钟的等待时间，期间持续缓慢搅拌溶液。将所得溶液在 60 °C 下温育 60 分钟。

### 溶剂和化学品

- PBS：在 25 °C 下将 1 片 PBS 片溶于 200 mL 去离子水，得到 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液、0.0027 mol/L 氯化钾、0.137 mol/L 氯化钠，pH 7.4
- 化学品购自德国 VWR 公司
- 新制超纯水产自配置 LC-Pak Polisher 和 0.22  $\mu\text{m}$  膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统

## 结果与讨论

用于蛋白质 SEC 分离的现代色谱柱中填充亚 2  $\mu\text{m}$  颗粒, 可实现出色分离。而这需要仪器具有优化的低死体积, 因为高死体积特别是内径较大的毛细管会损失获得的分离度。1290 Infinity II 生物液相色谱系统对 5 种蛋白质混标 (包括 3 种二聚体) 的分离结果如图 1A 所示。为了尽可能降低死体积和扩散效应, 我们使用了内径 0.07 mm 的毛细管进行分离。早洗脱的甲状腺球蛋白二聚体 (4.947 min) 实现了部分分离。如需设置用于分子量测定的校准, 使用该混合物中的所有蛋白质生成校准曲线 (图 1B)。获得了四阶理想曲线拟合。

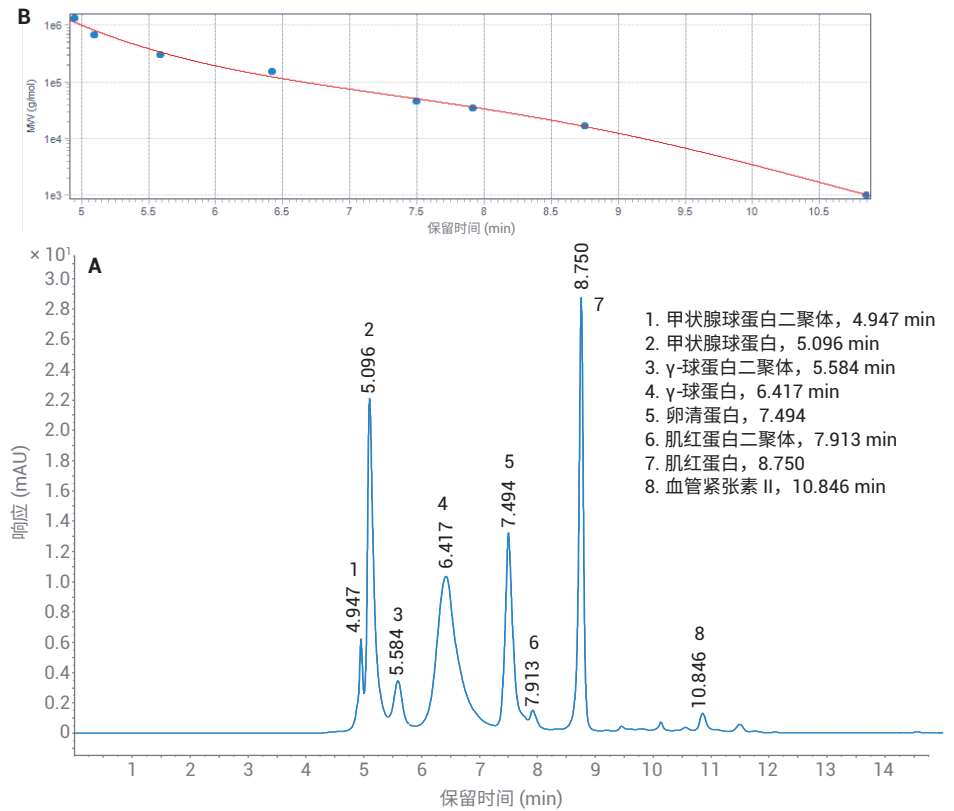


图 1. (A) Agilent AdvanceBio SEC, 200  $\text{\AA}$ ,  $4.6 \times 300$  mm, 1.9  $\mu\text{m}$  与 Agilent 1290 Infinity II 生物超低扩散工具包 (包括 0.07 mm 毛细管) 相结合, 分离包括 3 种二聚体在内的 5 种蛋白质混标。(B) 使用含有几种二聚体的蛋白质混标测定分子量的 SEC 校准曲线

使用校准曲线测定曲妥珠单抗和其中包含的二聚体的分子量（图 2）。抗体在 6.489 分钟洗脱，相应二聚体在 5.673 分钟洗脱（图 2A）。曲妥珠单抗和二聚体最大峰值处测得的分子量分别为 Mp 141566 Da 和 Mp 321609 Da。分子量分布如图 2B 所示，分子量计算值如图中表 (2C) 所示。

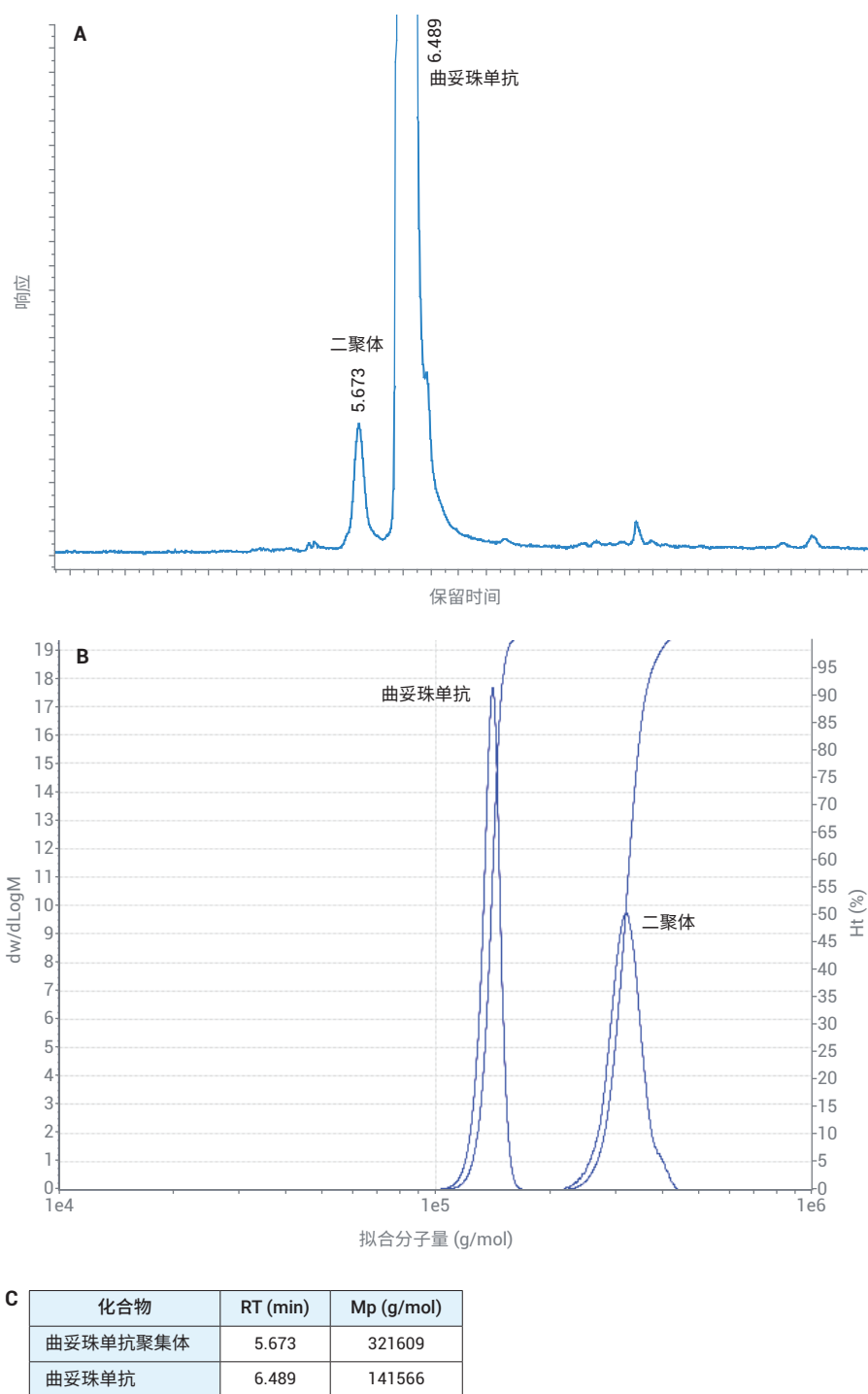


图 2. 曲妥珠单抗和二聚体，分子量测定。(A) 曲妥珠单抗单体和二聚体的 SEC 分离。(B) 曲妥珠单抗和二聚体的分子量。(C) 表列出了曲妥珠单抗及其聚集体的分子量。Mp: 最大峰分子量

比较内径 0.07 (ULD)、0.12 和 0.17 mm 的毛细管，可以看出所用毛细管内径的影响。为了证明这种影响，我们测定了蛋白质混标（如图 1 所示）第二个峰和第三个峰的分离度（图 3）。采用内径 0.07 mm 的毛细管，可以获得峰 2 和峰 3 的理想分离度值（图 3 中的表）。使用蛋白质混标的峰 2 测定半峰宽。从测量值可以看出，毛细管内径越大，峰宽越大。毛细管对曲妥珠单抗及其聚集体的分离影响如图 4 所示。此处可以看到一个额外的低分子量化合物隐藏在主峰下，在使用 0.17 mm 毛细管分离时只出现一个微弱的肩峰，在使用 0.07 mm 毛细管分离时肩峰更加清晰可见。

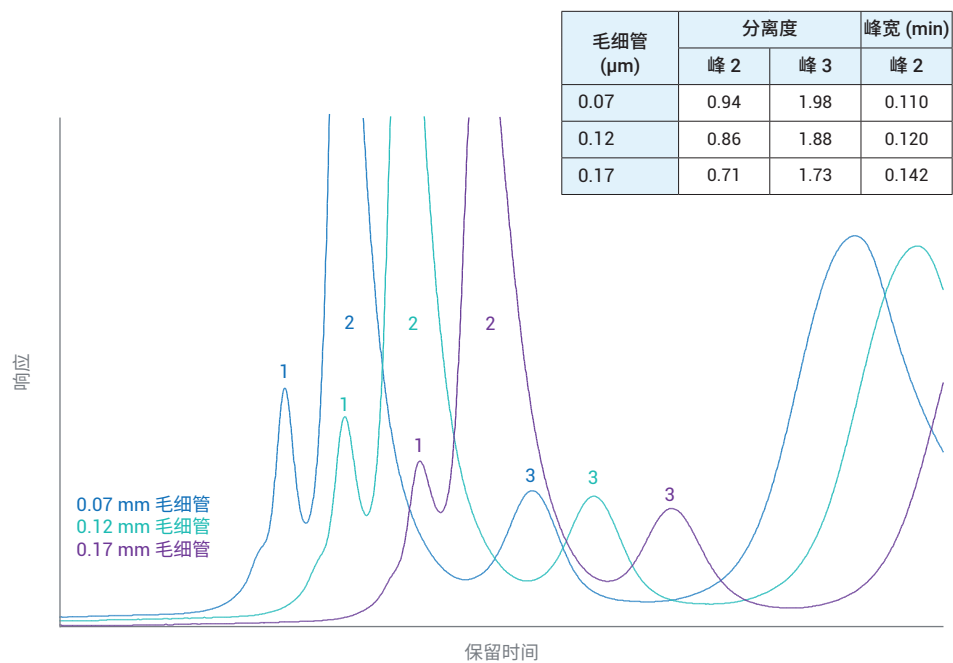


图 3. 比较毛细管内径增加对分离度和峰宽的影响

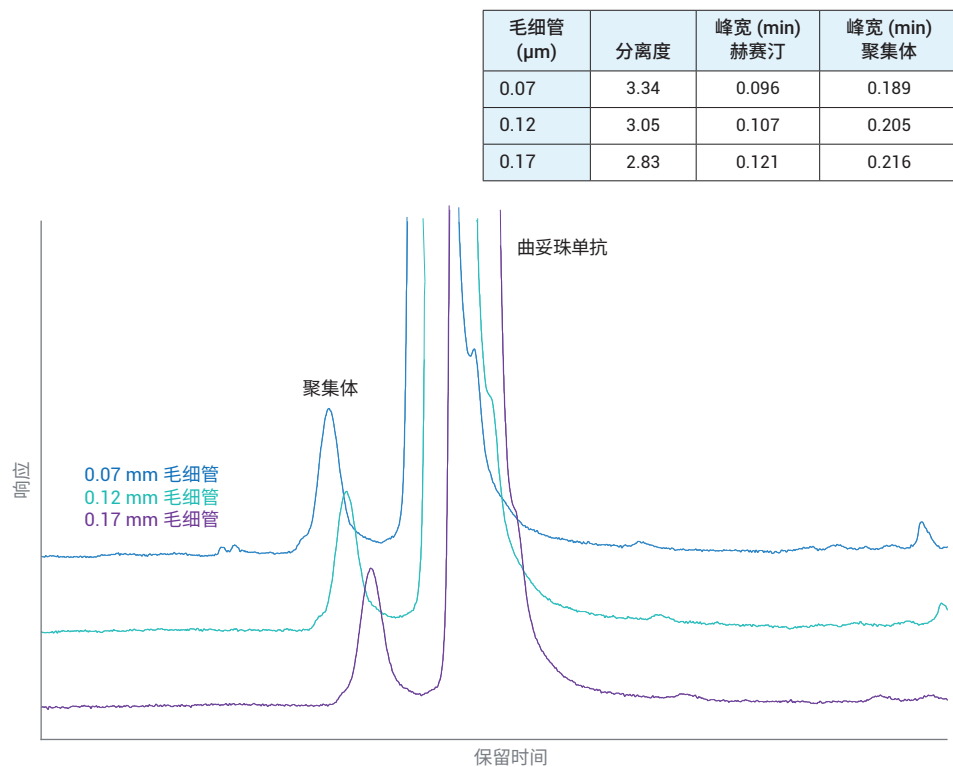


图 4. 所用毛细管内径对曲妥珠单抗与其二聚体的分离度和峰宽的影响



所有毛细管的保留时间和峰面积都具有出色的RSD值(表1)。

另一个例子是,将特征明确的NISTmAb(人源化IgG1k mAb)与聚集体分离,并测定分子量(图5)。

表 1. 所用毛细管分离曲妥珠单抗的保留时间和峰面积的 RSDs。随着毛细管体积的增加,保留时间相应增加

	0.07 mm 毛细管		0.12 mm 毛细管		0.17 mm 毛细管	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
平均值	6.464	1736.13	6.500	1727.05	6.554	1717.29
RSD (%)	0.02	0.10	0.01	0.28	0.01	0.25

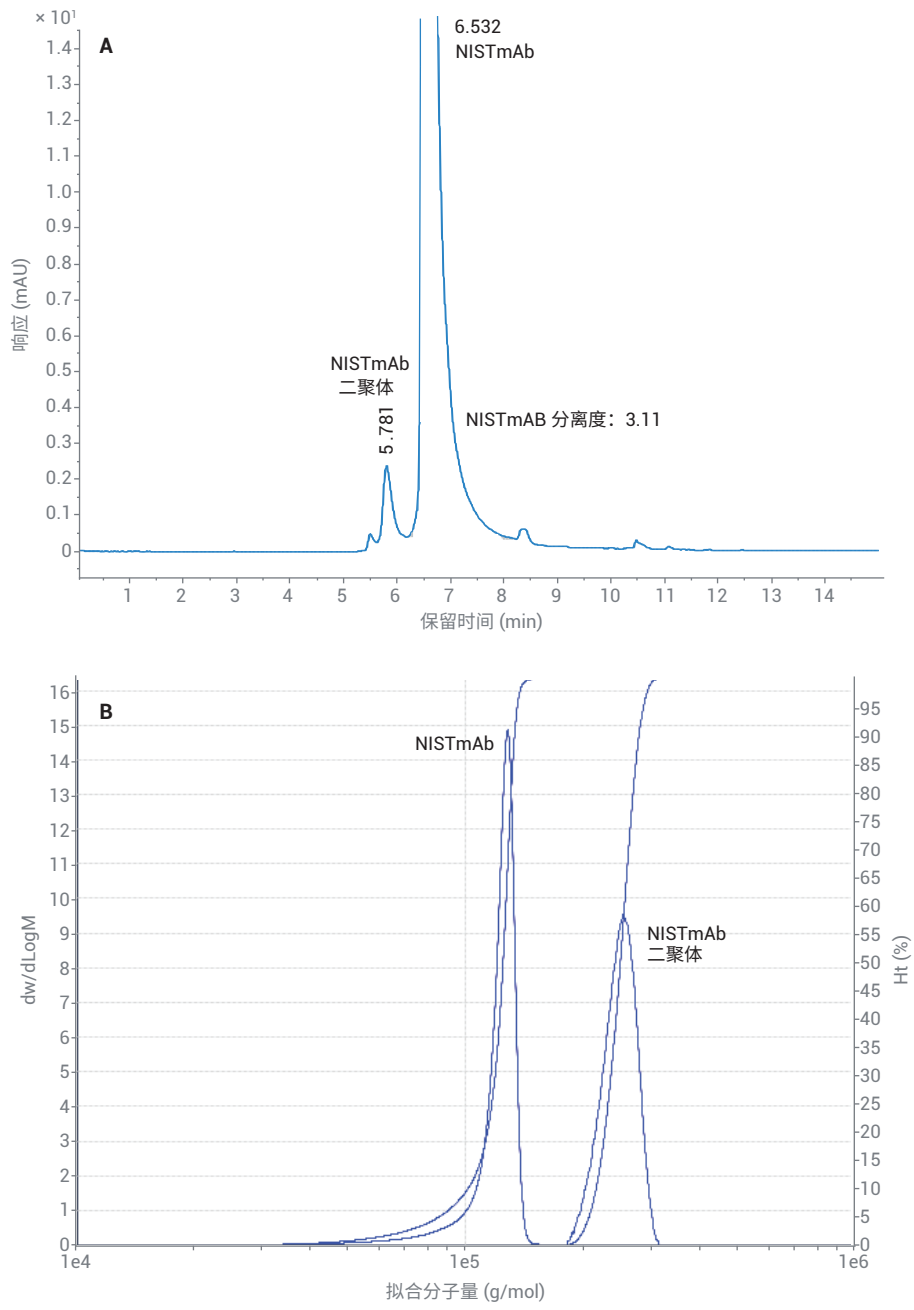


图 5. (A) NISTmAb 与其主要二聚体的分离, 分离度为 3.11。(B) NISTmAb 及其聚集体的分子量。(C) 表列出 NISTmAb 及其聚集体的主峰表征值。(D) 表列出 NISTmAb 及其聚集体的分子量

在 pH 诱导和温度诱导条件下（见“实验部分”），该 mAb 能够形成较高程度的聚集体（图 6）。使用超低扩散毛细管可分离出更高程度的聚集体（图 6A）。图 6B 和相应表格概述了它们的分子量分布和峰表征值。

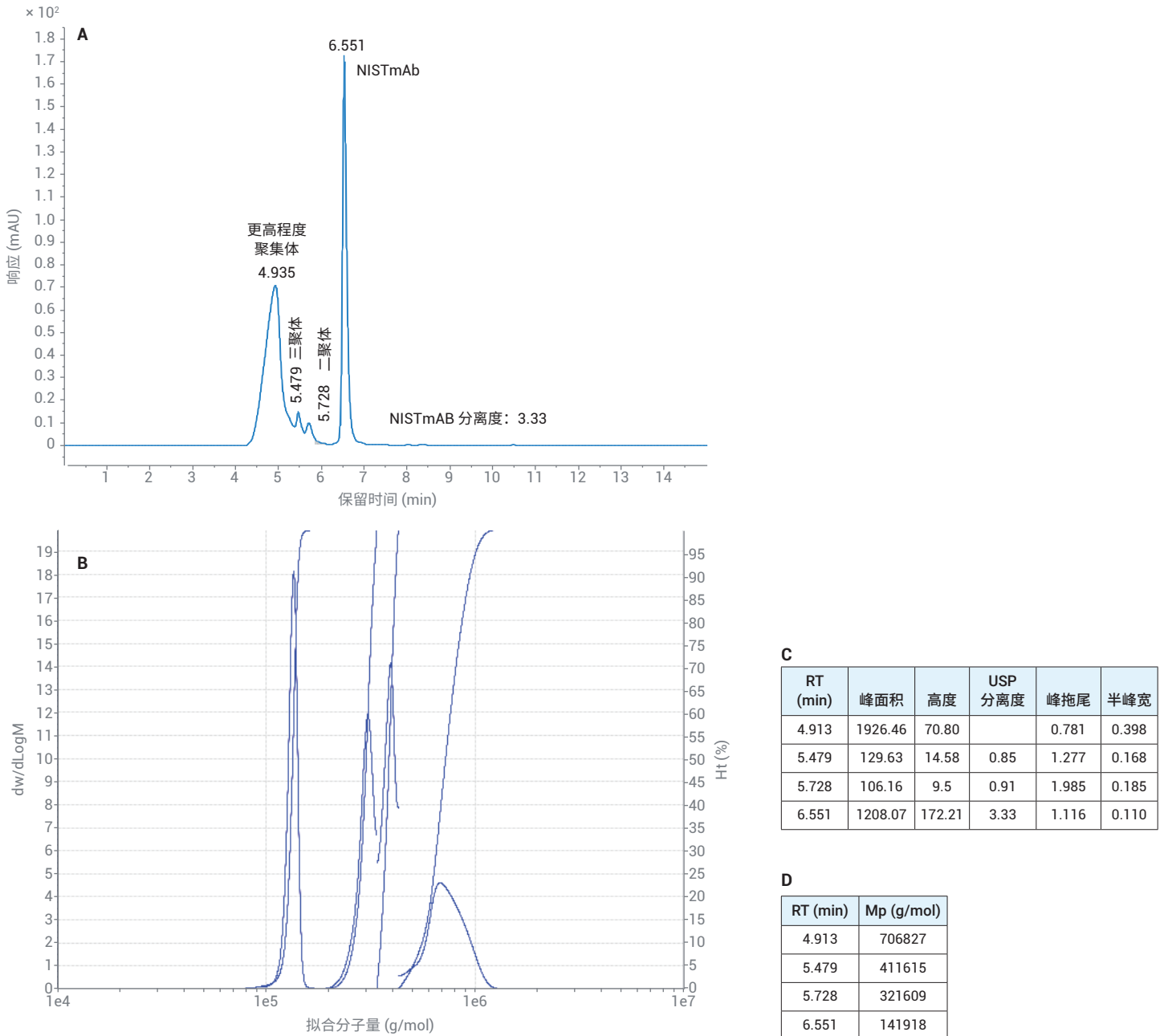


图 6. (A) pH 诱导产生的 NISTmAb 聚集体的分离。(B) 诱导条件下 NISTmAb 产生的聚集体的分子量分布。(C) 表列出 NISTmAb 及其聚集体的主峰表征值。(D) 表列出 NISTmAb 及其聚集体的分子量

## 结论

本应用简报介绍了 1290 Infinity II 生物液相色谱系统与 AdvanceBio SEC 色谱柱结合，因极小的系统死体积和毛细管的超低扩散性能，能够以超高分离度分离蛋白质及其聚集体。1290 Infinity II 生物液相色谱系统是一台完全生物兼容的系统，能够使用高浓度盐缓冲液，从而提供了超低的维护成本和理想的分离度性能。

## 参考文献

1. 利用 SEC 和水相流动相进行 mAb 和 ADC 聚集体的定量分析，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5991-6303CHCN，**2016**

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

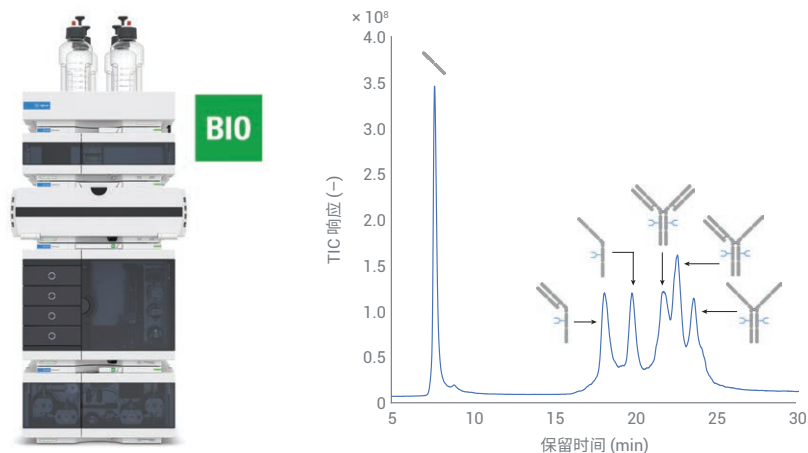
DE.1846180556

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  
2020 年 10 月 22 日，中国出版  
5994-2709ZHCN

## 监测产品相关的 mAb 片段

使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统进行完整蛋白质分析如何实现低分子量物质的 UV 和 MS 检测



### 作者

André Feith  
安捷伦科技有限公司

### 摘要

普遍认为低分子量 (LMW) 或高分子量 (HMW) 物质等产品相关杂质是治疗性单克隆抗体 (mAb) 产品的关键质量属性 (CQAs)，需要在整个药物生产过程中进行监测。本应用简报基于 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统结合带 PEEK 内衬的 Agilent PLRP-S 色谱柱的卓越性能，开发了一种 RPLC 方法。通过分析 NISTmAb 的还原重链和轻链，即使梯度斜率非常平缓的情况下，也可观察到出色的相对保留时间和面积偏差。方法开发后，两条重链 (H2) 或两条重链一条轻链 (H2L) 等所有相关 LMW 片段均可得到分离与检测。得益于与 UV 和 MS 检测器的依次联用，该方法可用于生物药物生产链的多个领域。该方法也可作为 SDS-PAGE/CE-SDS 的替代方法，在一次运行中分析两种 CQAs — LMW 物质以及翻译后修饰 (PTMs)。

## 前言

mAbs 是生物药物中一类主要的产品，已成功用于各类疾病的治疗<sup>[1]</sup>。这些生物分子具有保守的异四聚体结构，由两条重链和两条轻链通过二硫键连接组成。在生产过程中或储存不当时，可能会形成某些产品相关杂质，如低分子量 LMW 物质（见图 1）或高分子量 HMW 物质（如抗体二聚体）。即使经过大量纯化步骤，这些杂质也可能仍会存在，因此有必要将它们作为药品的 CQA 进行监测。抗体二聚体、三聚体或多聚体等 HMW 物质可通过体积排阻色谱 (SEC) 和 UV 检测进行常规分析和分离<sup>[2]</sup>。SEC 与 MS 检测联用，可用于进一步表征杂质的相关分子量和 PTMs<sup>[3]</sup>。重链 (H)、轻链 (L) 或 H2L 片段等 LMW 物质可通过毛细管电泳-十二烷基硫酸钠 (CE-SDS) 进行分析<sup>[4]</sup>。遗憾的是，由于 SDS 引起的高离子抑制，CE-SDS 无法与 MS 检测联用，因此 LMW 物质的推测鉴定通常根据经验知识进行。本应用简报基于 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和带 PEEK 内衬的 PLRP-S 色谱柱的卓越性能，展示了 mAbs 的 LMW 物质的另一种分析方法。由于采用了反相液相色谱 (RPLC) 模式，NISTmAb 的所有相关还原诱导 LMW 片段均可通过 UV 和 MS 进行检测，以根据需要用于常规或深入分析。

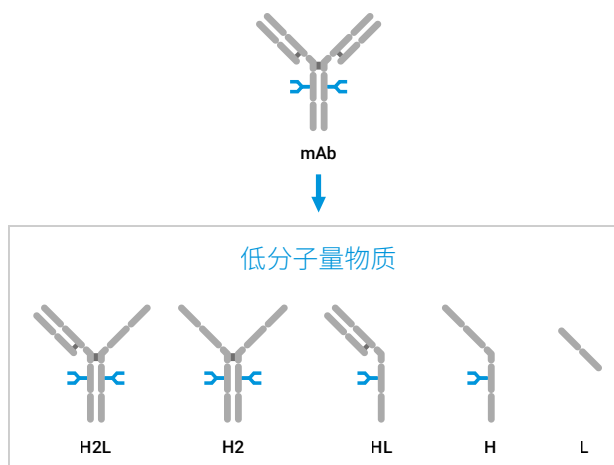


图 1. 单克隆抗体 (mAb) 的还原诱导 LMW 物质产生的示意图。缩写：H2L (两条重链和一条轻链)、H2 (两条重链)、HL (一条重链和一条轻链)、H (重链) 和 L (轻链)

## 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 (选项 #101)
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)，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 或更高版本)
- Agilent MassHunter 定性分析软件 (10.0 或更高版本)
- Agilent MassHunter BioConfirm (10.0 或更高版本)

### 色谱柱

Agilent PLRP-S 5  $\mu$ m 1000  $\text{\AA}$ , 2.1  $\times$  100 mm, 带 PEEK 内衬 (部件号 PL1912-2502PK)

### 化学品

使用 Agilent InfinityLab 超纯 LC/MS 乙腈 (部件号 5191-4496) 和 Agilent-NISTmAb (部件号 5191-5744)。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)。DL-二硫苏糖醇 (DTT) 购自 Merck (Darmstadt, Germany)。

## 样品前处理

将 40 µg NISTmAb 与 1 mmol/L DTT 在棕色玻璃样品瓶中孵育，4 °C 下直接置于 1290 Infinity II 生物 Multisampler 中，可实现 NISTmAb 的部分还原。将 40 µg NISTmAb 与 10 mmol/L DTT 在 60 °C 下孵育 30 分钟，可实现重链 (H) 和轻链 (L) 的完全还原。进样浓度为 1 mg/mL NISTmAb 或还原 NISTmAb。

表 1. 使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分析完整 NISTmAb 和相应 LMW 物质的液相色谱方法

参数	值
色谱柱	Agilent PLRP-S 5 µm 1000 Å, 2.1 × 100 mm, 带 PEEK 内衬
溶剂	A) 水 + 0.1% 甲酸 B) 乙腈 + 0.1% 甲酸
梯度	0.00 min – 25% B 9.00 min – 30% B 34.00 min – 38% B 34.01 min – 100% B 36.00 min – 100% B 36.01 min – 25% B 40.00 min – 25% B
流速	0.400 mL/min
温度	60 °C, 装有热平衡装置
紫外检测	VWD: 280 nm, 10 Hz/MS: 见表 2
进样	进样量: 0.3 µL 样品温度: 4 °C 冲洗: 用水冲洗 3 s (清洗口)

表 2. 分析完整 NISTmAb 和相应 LMW 物质的离子源和质谱参数

参数	值
仪器	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
气体温度	350 °C
干燥气流速	12 L/min
雾化器	35 psig
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	4000 V
喷嘴电压	2000 V
碎裂电压	180 V
锥孔电压	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
采集模式	正离子, 扩展 ( $m/z$ 10000) 质量数范围
质量数范围	$m/z$ 100–10000
采集速率	1 质谱图/秒
参比质量	$m/z$ 922.0098

## 结果与讨论

从制造到质量控制的整个生产过程中，对生物药物的分析都需要液相色谱系统尽可能提供出色性能。为评估 1290 Infinity II 生物液相色谱系统在 mAb 片段分析方面的性能，利用 DTT 将 NISTmAb 完全还原成 H 和 L 片段。图 2 展示了七次连续进样获得的相对保留时间和峰面积标准偏差 (RSD)。结果表明，1290 Infinity II 生物液相色谱系统与 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 联用的保留时间和峰面积精度出色，非常适合以平缓梯度分析 mAb 抗体片段。尽管液相色谱方法由两个线性梯度步骤组成（斜率分别为 0.32% 和 0.55% B/min），但保留时间和峰面积精度的 RSD 值仍较低，前者为 0.190% (L) 和 0.056% (H)，后者为 0.530% (L) 和 0.744% (H)。

采用 RPLC 分析 LMW 物质时的一大挑战是由于它们的疏水性与实际 mAb 相似，因此对 H2 或 H2L 等抗体片段的分离能力有所欠缺。这些片段可以在发酵过程中产生，也可以由最终产品发生部分还原得到。而这些片段也可通过少量 DTT 或降温的方式经过一定时间的部分还原而人工生成。利用这项技术，开发了一种基于带 PEEK 内衬的 PLRP-S 色谱柱和 1290 Infinity II 生物液相色谱系统的 RPLC 方法。

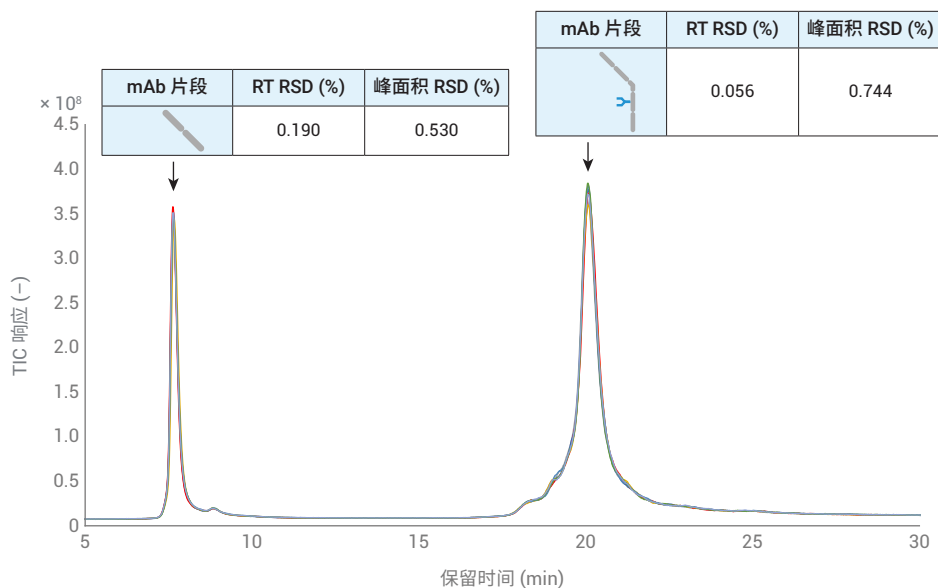


图 2. Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分析 NISTmAb 还原生成的重链和轻链片段的相对保留时间和峰面积精度值 (RSD, n = 7)

图 3 的色谱图显示了 NISTmAb 在 1290 Infinity II 生物 Multisampler 中的动态还原情况。由于添加了 DTT，图 1 所示的所有相关 mAb 片段均实现很好的分离和随时间的变化。尤其是 H2、H2L 片段和 NISTmAb 在 RPLC 中实现了非常出色的分离，因此带 PEEK 内衬的 PLRP-S 色谱柱和 1290 Infinity II 生物液相色谱系统的结合是分析 LMW 的首选方法。得益于 RPLC 模式，1290 Infinity II 生物液相色谱系统可轻松与 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 联用，MS 数据可在 Agilent MassHunter BioConfirm 软件中进行分析。解卷积后，各片段的主要糖型如

图 3 所示。NISTmAb 的特征性糖基化表明，该方法可轻松分析不同片段的 PTMs。此外，图 4B 所示为 mAb 峰周围聚集片段的代表性离子的提取离子色谱图 (EIC)。得益于带 PEEK 内衬的 PLRP-S 色谱柱的出色分离能力，这些 EICs 也具有好的峰形。

由于仪器设置依次包括 1290 Infinity II 可变波长检测器和 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF，因此可在一次运行中同时进行 UV 和 MS 检测，几乎无谱带展宽，并可轻松完成过程开发到质量控制的方法转移 (图 4A)。



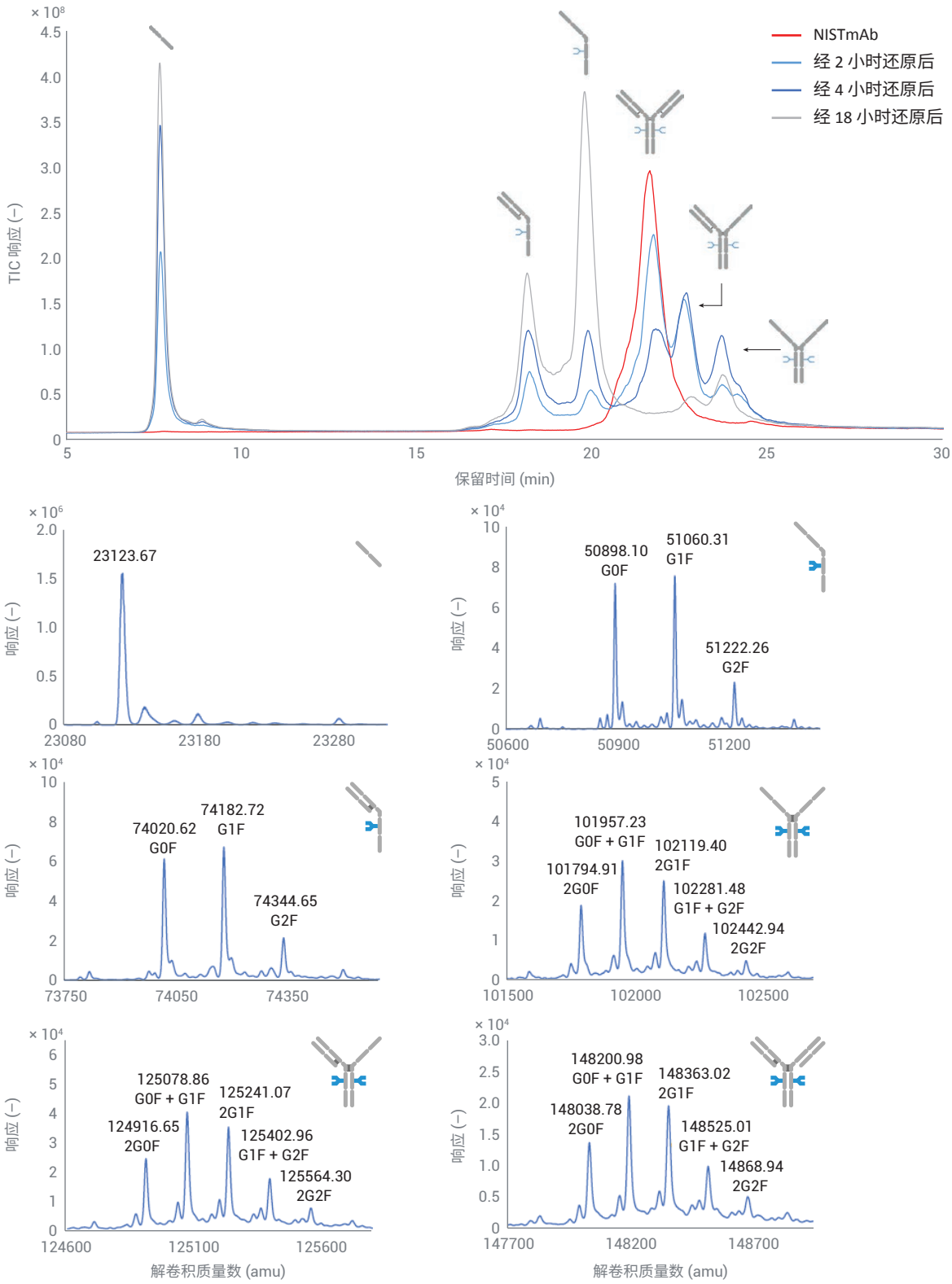


图 3. 由 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分离、Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 检测的 NISTmAb 部分动态还原的色谱图。各片段的相应提取质谱图显示出 NISTmAb 的特征性糖基化

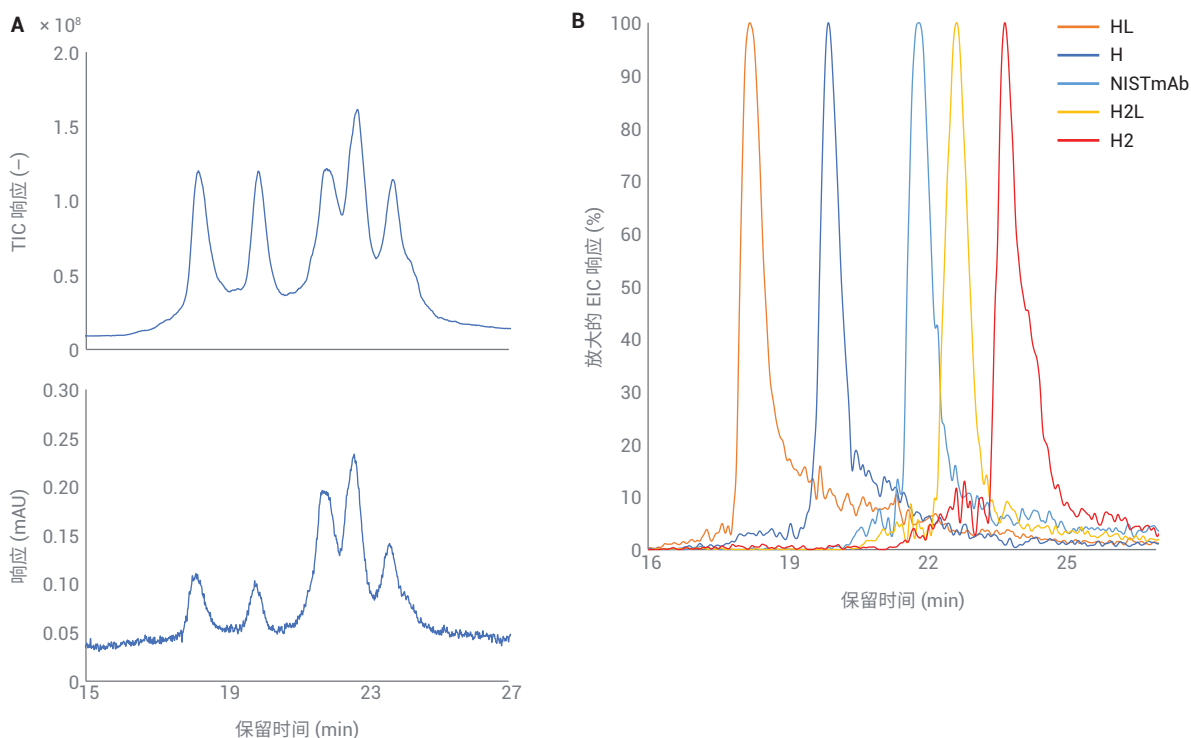


图 4. 一次运行中获得的 NISTmAb 周围聚集片段的 MS 和 UV 谱图 (A)。NISTmAb 片段的提取离子色谱图，展现出出色的峰形 (B)

## 结论

传统 SDS-PAGE 和现代等效的 CE-SDS 均广泛应用于 LMW 和 HMW 物质等产品相关杂质的分析。然而，利用这些方法鉴定 LMW 物质结构一直面临着挑战，且主要基于经验知识。本应用简报介绍了一种 RPLC 方法，该方法能够分离 NISTmAb 所有相关还原诱导 LMW 物质。基于重链和轻链片段分析结果，1290 Infinity II 生物液相色谱系统展现出出色的保留时

间和峰面积精度值。在 1290 Infinity II 生物 Multisampler 中对 NISTmAb 进行动态还原，随后用 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 进行检测，这一系列操作展现了该方法分析翻译后修饰的潜力。与片段分析相结合时，这种能力可加速生物药物的发展。这就是在生产工艺到最终质量控制的生物药物分析过程中，带 PEEK 内衬的 PLRP-S 色谱柱和 1290 Infinity II 生物液相色谱系统能够适应未来需求的原因。

## 参考文献

- Walsh, G. Biopharmaceutical Benchmarks 2014. *Nat. Biotechnol.* **2014**, 32, 992-1000
- Nägele, E. 提升 mAb 聚集体分析性能：使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统进行高分离度 SEC 分析，*安捷伦科技公司应用简报*，版本号 5994-2709ZHCN，**2020**
- Vandenheede, I. *et al.* SEC Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry for Detailed Characterization of mAbs and ADCs (SEC 与高分辨率质谱联用系统用于 mAbs 和 ADCs 的详细表征)，*安捷伦科技公司应用简报*，版本号 5994-0303EN，**2018**
- Rustandi, R. R.; Washabaugh, M. W.; Wang, Y. Applications of CE SDS Gel in Development of Biopharmaceutical Antibody-Based Products. *Electrophoresis* **2008**, 29, 3612-3620

www.agilent.com

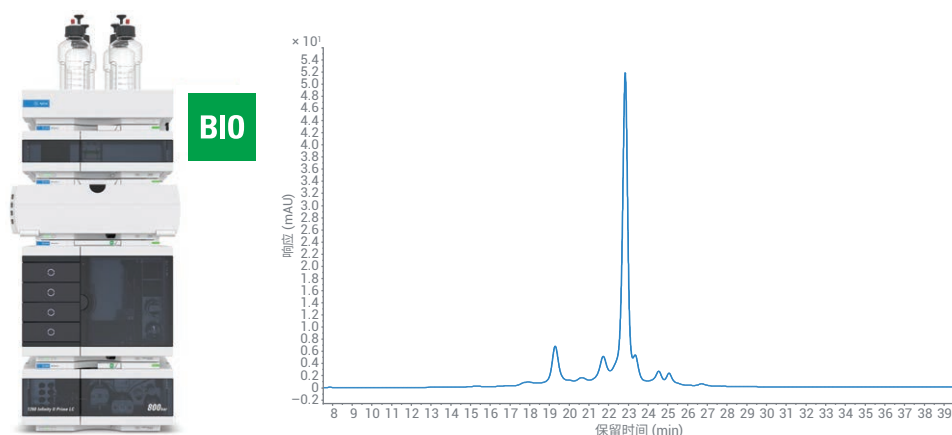
DE44181.2356018519

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 1 月 29 日, 中国出版  
5994-3021ZHCN

## 便捷定制阳离子交换分析

结合使用 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统、安捷伦缓冲液顾问软件和用于高分离度电荷异构体分析的 pH 梯度



### 作者

Sonja Schneider  
安捷伦科技有限公司

### 摘要

单克隆抗体的电荷异构体分离对于色谱工作者而言是一项充满挑战性的工作。由于所分析的单克隆抗体的微异质性，需要进行大量的方法开发才能找到所需的理想分离度。pH 梯度的分离能力优于许多传统的盐梯度，能够以非常有效的方式分离电荷异构体。本应用简报展示了使用不同类型的 pH 梯度对两种单克隆抗体（曲妥珠单抗和 NIST mAb）进行高分离度和可重现的电荷异构体分析。

Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统配备完全不含铁的流程和 Agilent 1260 Infinity II 生物全能泵，能够使用安捷伦缓冲液顾问软件对来自四种储备溶液的溶剂进行动态混合。

## 前言

治疗性单克隆抗体 (mAb) 是高度异质的分子，由大量异构体组成。它们天然存在于这种生物药物中，不一定被视为杂质。溶液中的蛋白质在与水性介质的界面处主要具有极性和带电荷的氨基酸，而疏水性残基则因疏水相互作用而倾向于自缔合。位于蛋白质“外部”并与周围液体接触的氨基酸更容易被修饰<sup>[1]</sup>。

变异（也称为蛋白质微异质性）可能源自抗体生产过程中的翻译后修饰。此外，纯化过程、配制和/或存储之后的修饰也可形成<sup>[2]</sup>。然而，如果这些变异存在于药物蛋白中，它们的生物活性可能会有所不同，免疫原性可能会增强<sup>[2]</sup>。因此，需要对 mAb 的微异质性进行广泛的分析表征，确保生物药物的安全性和有效性。

阳离子交换色谱 (CEX) 是单克隆抗体电荷异构体分析的金标准<sup>[3]</sup>。经典盐梯度方法经全面优化后具有较高的分离度。然而，开发用于蛋白质分离的高分离度离子交换方法的工作量非常大。需要优化包括盐浓度、流动相 pH 值和添加剂在内的许多参数。此外，每个分子（尤其是生物分子）可能表现出不同的行为，并且开发的方法不允许实验参数发生较大的变化，尤其是 pH 值的变化<sup>[1,4]</sup>。

基于 pH 梯度的 CEX（也被称为色谱聚焦）为分离 mAb 电荷异构体提供了高分离度且稳定的方法<sup>[1,4,5]</sup>。在典型的离子交换色谱 (IEX) 中，分子通过增加缓冲液的离子强度（主要是盐类，例如 NaCl）从色谱柱中洗脱出来。相比之下，在使用 pH 梯度时，结合分子会随着缓冲液 pH 值的变化而洗脱。这会改变它们的表面净电荷，使结合分子在其等电点 (pI) 洗脱，此时的分子呈电中性。

宽 pH 梯度方法更通用，可以在单个缓冲液系统中分离来自不同抗体的异构体<sup>[1]</sup>。此外，与基于离子强度的传统 IEX 相比，基于 pH 梯度的方法开发更简单、快捷。

1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统是新一代安捷伦高端液相色谱系统，专为生物色谱条件而设计：样品流路完全不含不锈钢 (SST) 或铁；贯穿 Multisampler、大容量柱温箱和检测器的所有毛细管和接头均由 MP35N（一种镍钴合金）制成。这种材料可以减少高浓度盐缓冲液的潜在腐蚀，避免因铁离子存在引起的蛋白质修饰（如氧化、蛋白质复合物形成）。

将 1260 Infinity II 生物全能泵作为四元泵，可以使用缓冲液顾问软件帮助动态混合来自四种储备溶液的溶剂，简化生物分析工作流程，并显著缩短缓冲液制备所需的时间。使用缓冲液顾问软件，可以通过计算 IEX 的泵时间表快速、简单地生成四元盐梯度和 pH 梯度。

本应用简报介绍了使用两种不同的 pH 梯度对曲妥珠单抗和 NIST mAb 参比标样的电荷异构体的分析。

## 实验部分

### 设备

Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统，包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity II 生物全能泵 (G7131C)
- Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A)，配备样品恒温箱（选项 #101）
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)，配备标准流速生物兼容性热交换器
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (G7114B)，配备生物兼容性微量流通池，3 mm，2  $\mu$ L

### 软件

Agilent OpenLab CDS 2.5 版或更新版本

### 色谱柱

Bio MAb, NP5, 2.1  $\times$  250 mm, PEEK（部件号 5190-2411）

### 化学品

所有试剂纯度均为液相色谱级。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)。磷酸二氢钠一水合物、磷酸氢二钠七水合物、氯化钠、tris（三羟甲基甲胺）、咪唑、盐酸和哌嗪六水合物购自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)。

## 样品

- Agilent-NISTmAb (部件号 5191-5744)
- 人源化单克隆抗体曲妥珠单抗 (商品名为赫赛汀) 购自 Roche (Basel, Switzerland)。曲妥珠单抗溶于 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液中, pH 6.8

## 缓冲液配制

根据缓冲液顾问软件的储备溶液配方配制缓冲液 (见图 1)。

### 由缓冲液顾问软件计算得到的四元磷酸盐缓冲液系统

- A: 水
- B: 1700 mmol/L 氯化钠
- C: 44.5 mmol/L 磷酸二氢钠
- D: 55 mmol/L 磷酸氢二钠

**注:** 此设置可用于盐梯度和 pH 梯度洗脱, 实现直接比较, 并增加方法开发的可能性。

### 由缓冲液顾问软件计算得到的二元宽 pH 梯度缓冲液系统

使用缓冲液顾问软件, 还可以创建宽范围的 pH 梯度 (也称为复合缓冲液)。在这些情况下, 仅使用 C 和 D 通道来创建梯度。本实验使用 Farnan 和 Moreno 描述的 pH 梯度<sup>[1]</sup>, 并将缓冲液组分以用户混合物的形式插入缓冲液顾问软件的储备溶液组成中 (2.4 mmol/L tris、1.5 mmol/L 咪唑、11.6 mmol/L 哌嗪, 以及用于将 pH 调节至 pH 6 → C 和 10.5 → D 的 HCl)。利用此

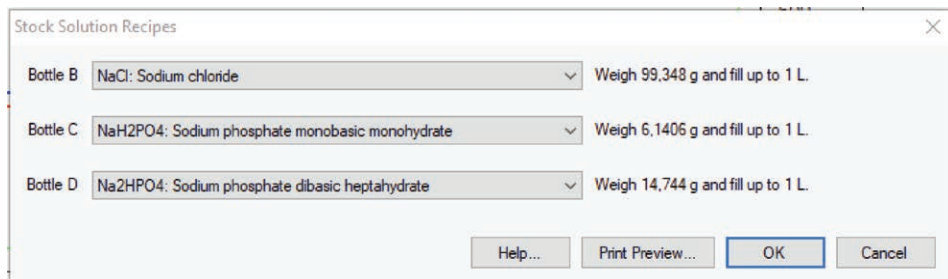


图 1. 安捷伦缓冲液顾问软件储备溶液配方 — 四元磷酸盐缓冲液系统

选项, 用户可以构建自制的缓冲液组成, 获得所需的 pH 范围。缓冲液顾问软件计算两种缓冲混合物的离子强度 (IS) 和缓冲容量 (BC)。

- A: 水
- B: n/a
- C: pH = 6; IS = 22.5 mmol/L;  
BC = 6.19 mmol/L
- D: pH = 10.5; IS = 0.717 mmol/L;  
BC = 2.31 mmol/L

## 方法

表 1. 四元磷酸盐缓冲液系统 — 盐梯度色谱条件

参数	值
溶剂	A: 水 B: 1700 mmol/L 氯化钠 C: 44.5 mmol/L 磷酸二氢钠 D: 55 mmol/L 磷酸氢二钠
梯度	梯度 0–30 分钟: 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液中 NaCl 的浓度从 10 mmol/L 升至 110 mmol/L; 30–31 分钟: 500 mmol/L NaCl (pH 6.8) 清洗步骤 停止时间: 31 min 后运行时间: 15 min
流速	0.200 mL/min
温度	30 °C
检测	280 nm 10 Hz
进样	进样量: 4 µL 样品温度: 8 °C 进样针清洗: 用水清洗 3 秒

表 2. 四元磷酸盐缓冲液系统 — pH 梯度色谱条件

参数	值
溶剂	A: 水 B: 1700 mmol/L 氯化钠 C: 44.5 mmol/L 磷酸二氢钠 D: 55 mmol/L 磷酸氢二钠
梯度	梯度 0–30 分钟: 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液 pH 从 7 升至 8.4; 30–31 分钟: 500 mmol/L NaCl (pH 6.8) 清洗步骤 停止时间: 31 min 后运行时间: 15 min
流速	0.200 mL/min
温度	30 °C
检测	280 nm 10 Hz
进样	进样量: 4 µL 样品温度: 8 °C 进样针清洗: 用水清洗 3 秒

**注：**使用高浓度盐溶液作为洗脱液时，需要在泵方法中设置相应溶剂类型。例如，对于磷酸盐缓冲梯度中含 1700 mmol/L 氯化钠的溶剂 B，在泵方法的溶剂选择字段使用氯化钠 1.5 mol/L 而非一般水相或水。高浓度盐可改变溶剂的压缩系数，因此使用预先配置的溶剂表可以使泵达到理想性能。

## 结果与讨论

使用缓冲液顾问软件，可以计算盐梯度和 pH 梯度。使用本应用简报实验部分描述的四元磷酸盐缓冲液，可以计算用于分离曲妥珠单抗电荷异构体的两种梯度。

图 2 显示了在平缓的盐梯度（蓝色）和磷酸盐缓冲 pH 梯度（pH 7-8.4）（绿色）下分离曲妥珠单抗电荷异构体得到的两幅色谱图的叠加图。通过盐梯度和 pH 梯度实现的分离性能相当，使用 pH 梯度时的分离度略有提高。

表 3. 二元宽 pH 梯度缓冲液系统/Farnan pH 梯度

参数	值
溶剂	A: n/a B: n/a C: pH = 6; IS = 22.4 mmol/L; BC = 6.14 mmol/L (Farnan 缓冲液) D: pH = 10.5; IS = 0.717 mmol/L; BC = 2.31 mmol/L (Farnan 缓冲液 <sup>1</sup> )
梯度	曲妥珠单抗梯度: 梯度 0-50 分钟: pH 从 8.3 升至 10; 然后在 51-55 分钟, 在 pH 10.5 下进行“清洗”步骤 停止时间: 55 min 后运行时间: 20 min NISTmAb 梯度: 梯度 0-45 分钟: pH 从 8.9 升至 10.5 停止时间: 50 min 后运行时间: 20 min
流速	0.200 mL/min
温度	30 °C
检测	280 nm 10 Hz
进样	进样量: 4 µL 样品温度: 8 °C 进样针清洗: 用水清洗 3 秒

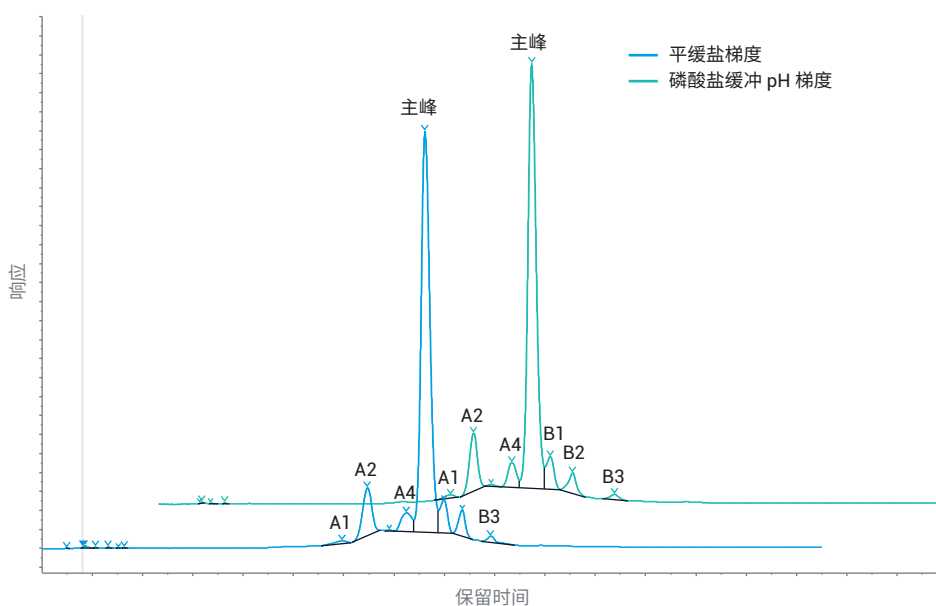


图 2. 在平缓的盐梯度（蓝色）和磷酸盐缓冲 pH 梯度（pH 7-8.4）（绿色）下分离电荷异构体得到的两幅色谱图的叠加图

缓冲液顾问软件的一个功能是通过在给定梯度内添加额外的梯度阶梯来改进线性梯度（盐梯度和 pH 梯度）的计算，从而实现完美的线性，而不会与所需/预设 pH 产生重大偏差。要启用此功能，需要选中缓冲液顾问软件用户界面 (UI) 中的 4. 创建 % 时间表部分的优化梯度选项框（见图 3A 和 3B 中的红色圆圈）。

图 3A 和 3B 展示了在未选中 (A) 和 (B) 选项框的情况下，预设 pH 值和实际 pH 值之间的差异。在不进一步优化缓冲液顾问软件的情况下，实际 pH 值可能与预设 pH 值偏离 0.4 个单位，这使得用户难以信任运行梯度线性。通过选中优化梯度选项框（图 3B），将额外的阶梯插入原始梯度中，确保 pH 梯度的线性。左下角的最终泵梯度时间表显示了额外插入的阶梯，它们使实际梯度尽可能接近预设梯度。然后，可以将此梯度时间表导出到 OpenLab 的方法中，实现轻松传输，而无需额外输入。

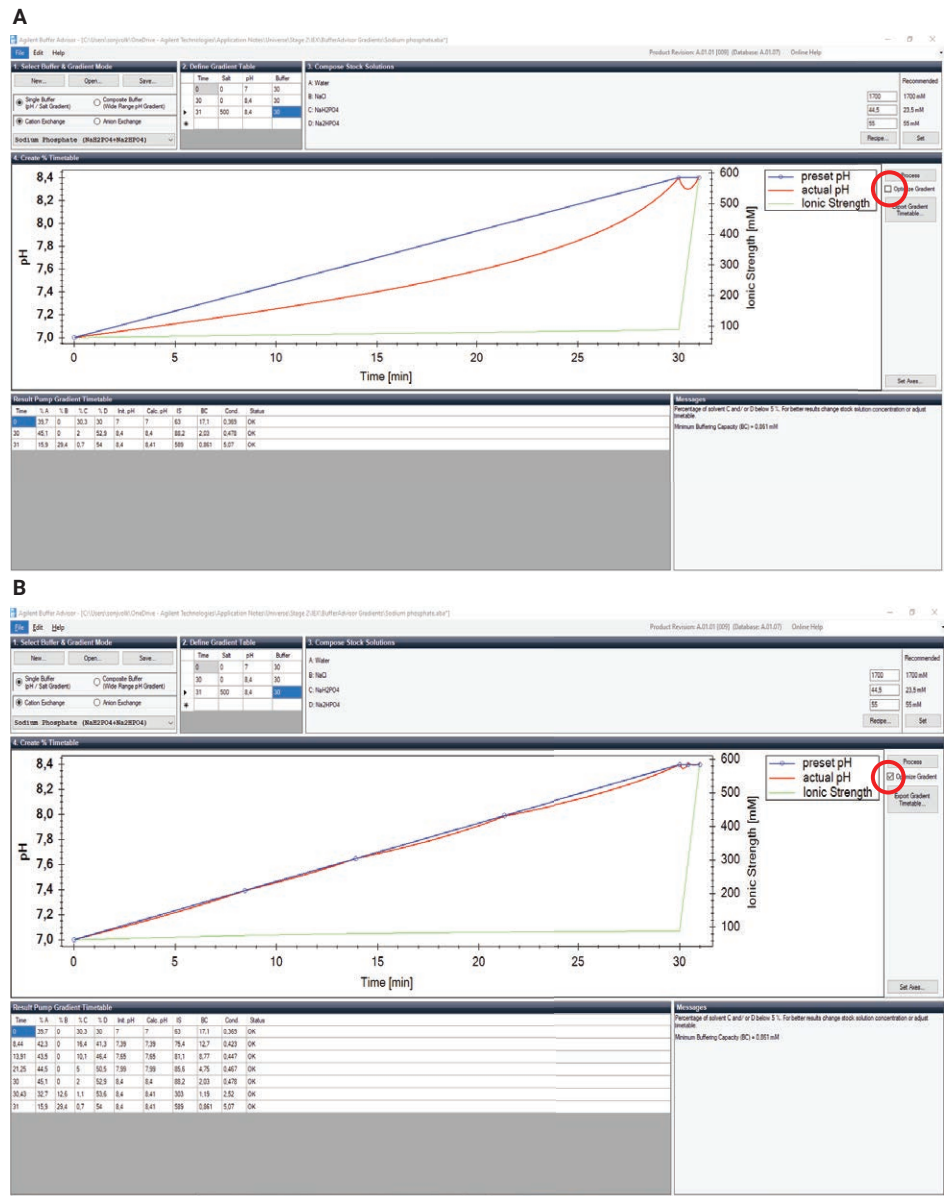


图 3. 优化安捷伦缓冲液顾问软件中的梯度功能，实现高度线性的 pH 梯度。A 显示优化前的梯度，B 显示优化后的梯度



图 4 显示了在磷酸盐缓冲 pH 梯度 (pH 7–8.4) 下 7 次后续曲妥珠单抗电荷异构体分析运行的叠加色谱图。除前两个峰外，其余峰的保留时间 (RT) 均具有出色的重现性 (相对标准偏差 (RSD) 小于 0.085%)。由于异构体 A3 和 B3 的峰面积和高度都很小，因此峰面积重现性高于 1%。

在磷酸盐缓冲系统中，方法开发受到限制，尤其是在目标分子的 pI 不在 pH 6–8 缓冲范围内的情况下。如果分子的 pI 太高，则无法使用该缓冲液系统完成洗脱。

例如，pI 为 9.18<sup>[6]</sup> 的 NIST mAb 需要使用不同的缓冲液系统才能从 CEX 色谱柱中洗脱。

更通用的一种方法是使用由多个缓冲液系统组成的宽范围 pH 梯度。该设置也以复合缓冲液 (宽范围 pH 梯度) 的名称包含在缓冲液顾问软件中。Farnan 和 Moreno (2009) 提出的 pH 6.0–10.5 的 pH 梯度<sup>[1]</sup> 是一种适用于分析单克隆抗体电荷异构体的缓冲液系统。进一步应用该系统，并针对曲妥珠单抗和 NIST mAb 对方法进行了优化。

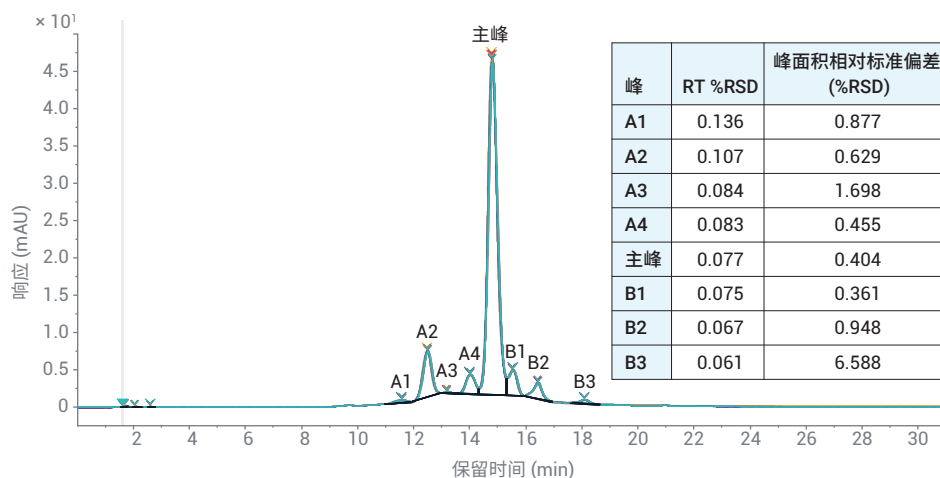


图 4. 采用 pH 7–8.4 的磷酸盐缓冲 pH 梯度分析曲妥珠单抗的七次连续运行的叠加色谱图，包括保留时间 (RT) 和峰面积精度表

图 5 显示了使用宽范围 pH 梯度对曲妥珠单抗电荷异构体的分离，将 pH 从 8.3 逐步调整到 10 以实现理想分离度。与磷酸盐缓冲 pH 梯度相比（见图 2），可以多分离出两种酸性异构体（A1-A6，在主峰之前洗脱）和一种碱性异构体（在主峰之后洗脱）。图 5B 中的放大图突出显示了主峰周围不同电荷异构体的出色分离度，与图 2 中所示的平缓盐梯度和 pH 梯度相比，具有更尖锐的峰形和更高的分离度。

对所有分离异构体的 RT 和峰面积精度进行了评估（见图 5 中的峰表）。即使是极小的峰，RT 精度也非常出色，其 RSD 均低于 0.06%（第一个异构体 A1 除外）。除极小的峰外，大多数峰的面积精度都十分出色。

研究还证明，Farnan 和 Moreno 使用的 pH 梯度<sup>[1]</sup>是 NISTmAb 分析的理想选择（见图 6）。针对 NISTmAb，由于其 pI 不同，pH 梯度被修改为不同的 pH 范围。利用这种 pH 8.9-10.5 的平缓梯度，可以分离出三种酸性异构体和两种碱性异构体。

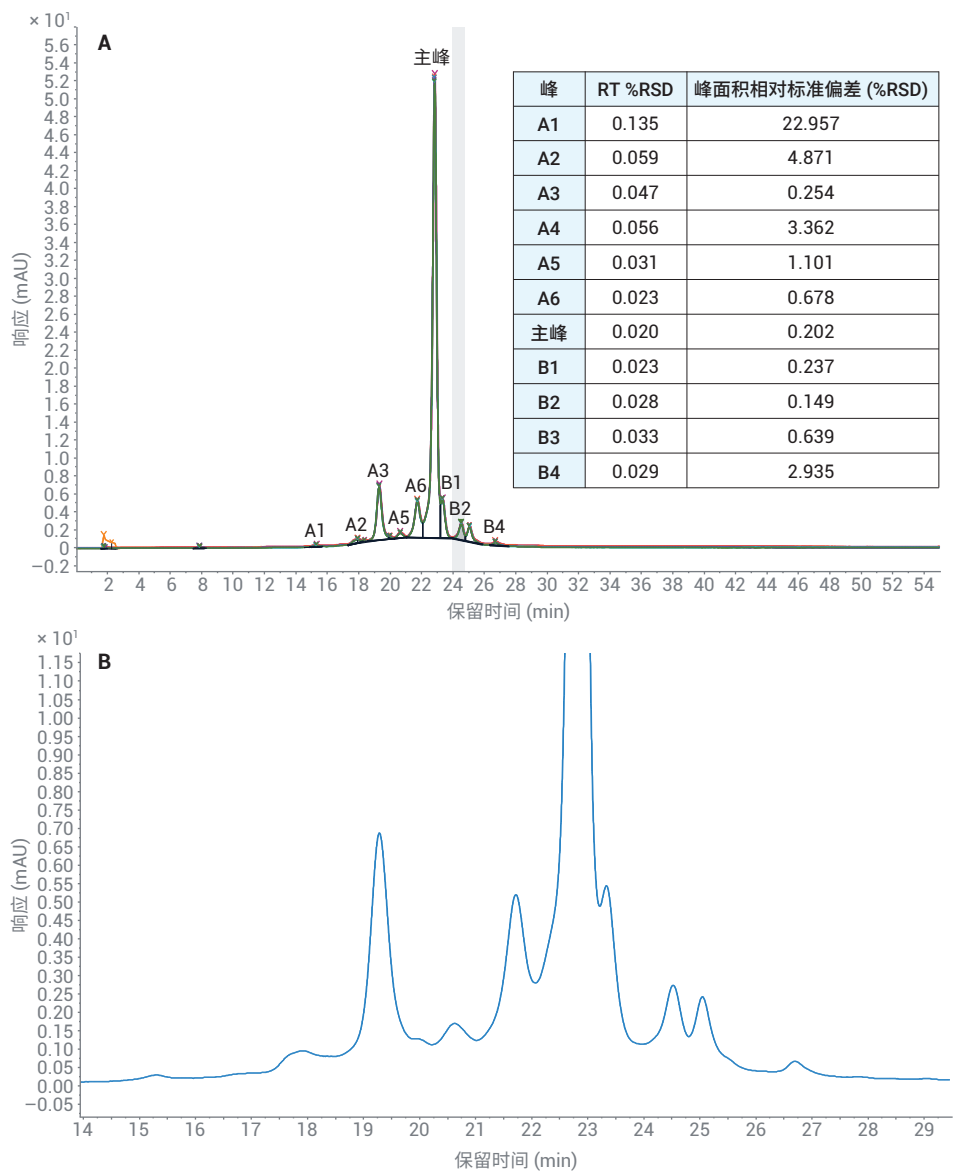


图 5. 采用 pH 8.3-10 的宽 pH 梯度七次连续运行曲妥珠单抗的叠加色谱图，包括保留时间 (RT) 和峰面积精度表 (A)，以及单次进样的放大图 (B)

## 结论

研究表明, 在分析单克隆抗体时, pH 梯度比盐梯度更具优势。即使是与平缓盐梯度相比, pH 梯度的表现也十分突出, 一方面简化了方法开发, 另一方面可生成高分离度色谱结果。盐梯度方法开发的潜力十分有限, 梯度斜率的变化只会增加峰宽, 而不会进一步改变分离度<sup>[7]</sup>, 而 pH 梯度则可提供进一步提高分离度并保持尖锐峰形的可能性。曲妥珠单抗和 NIST mAb 的分析证明了这一点, 尤其是在使用基于 Farnan 和 Moreno 的宽范围 pH 梯度<sup>[1]</sup> 时。缓冲液顾问软件促进磷酸盐缓冲系统四种储备液的动态混合, 消除了实验中耗时的手动缓冲液配制。此外, 缓冲液顾问软件可以轻松计算宽范围 pH 梯度。因此, 使用缓冲液顾问软件开发, 并在配备全能泵和完全不含铁样品流路的 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统上运行的所有方法均提供了高度可靠且可重现的结果。

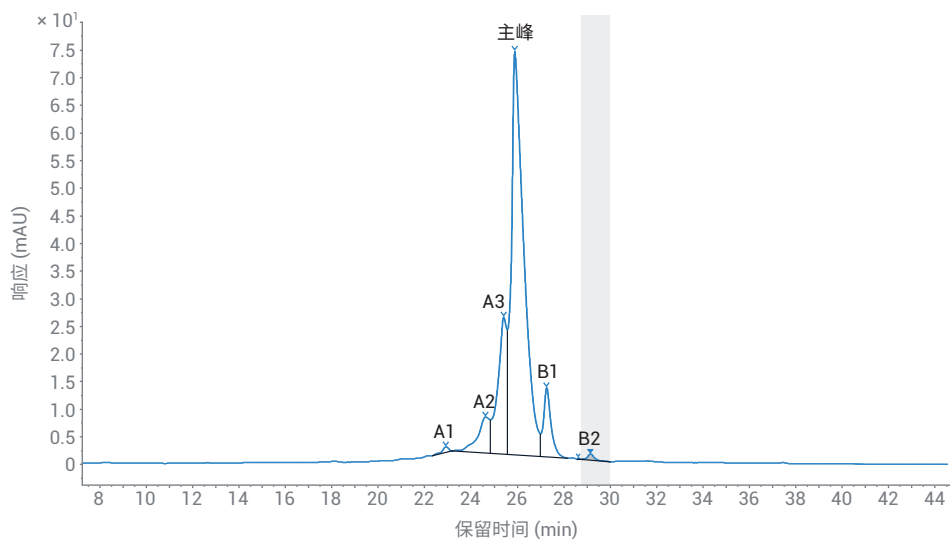


图 6. 使用根据 Farnan 和 Moreno<sup>[1]</sup> 修改的 pH 梯度在 pH 8.9–10.5 下分离 NISTmAb

## 参考文献

1. Farnan, D.; Moreno, G.T. Multiproduct High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations by pH Gradient Ion-Exchange Chromatography. *Anal. Chem.* **2009**, *81*(21), 8846–8857
2. Liu, H. et al. Heterogeneity of Monoclonal Antibodies. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 2426–2447
3. Vlasak, J.; Ionescu, R. Heterogeneity of Monoclonal Antibodies Revealed by Charge-Sensitive Methods. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2008**, *9*, 468–481
4. Rea, J. et al. Validation of a pH Gradient-Based Ion-Exchange Chromatography Method for High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *54*, 317–323
5. Lingg, N. et al., Highly Linear pH Gradients for Analyzing Monoclonal Antibody Charge Heterogeneity in the Alkaline Range: Validation of the Method Parameters. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1373*, 124–130
6. Turner, A.; Schiel, J. E. Qualification of NISTmAb Charge Heterogeneity Control Assays. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*(8), 2079–2093
7. Schneider, S., 您的分析可以采用多平缓的梯度? Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统助您改进 mAb 电荷异构体分析, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5994-2692ZHCN, **2020**

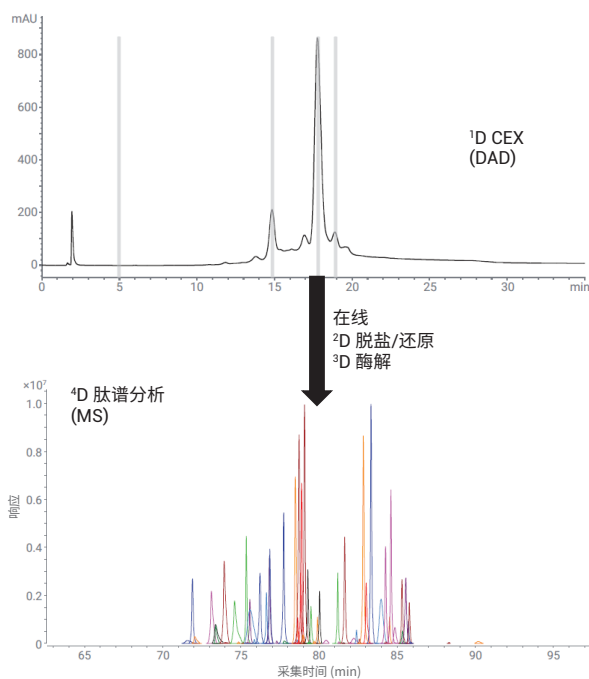
www.agilent.com

DE44286.1248842593

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 20 日, 中国出版  
5994-3257ZHCN

## 使用 4D-LC/MS 对单克隆抗体电荷异构体进行全自动化表征



### 作者

Liesa Verscheure,  
Gerd Vanhoenacker,  
Pat Sandra, Koen Sandra  
RIC Biologics  
Belgium

Sonja Schipperges,  
Sonja Schneider, Udo Huber  
安捷伦科技有限公司  
Germany

### 摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent InfinityLab 二维液相色谱解决方案和 Agilent 6545 LC/Q-TOF 系统的四维液相色谱/质谱 (4D-LC/MS) 对单克隆抗体 (mAb) 电荷异构体进行的全自动化深入表征。通过阳离子交换色谱 (CEX) 分离的电荷异构体被收集在安装于多中心切割阀上的定量环中，在对其进行基于 LC/MS 的肽谱分析之前，依次进行在线脱盐、变性、还原和胰蛋白酶酶解。

## 前言

蛋白质生物药物已成为治疗各种疾病的重要药物，包括癌症、心血管疾病、糖尿病、感染、炎症和自身免疫性疾病<sup>[1-3]</sup>。蛋白质生物药物有多种形式，包括单克隆抗体 (mAb)、抗体药物偶联物 (ADC)、融合蛋白、激素、生长因子、细胞因子、治疗性酶、血液因子、疫苗和抗凝血剂。这些分子在安全性和有效性方面具有明显的优势，极大地改变了制药市场，迄今为止，已有超过 350 种产品获得美国和欧盟的批准可用于人类<sup>[1-3]</sup>。这大约占了整个制药市场的四分之一，其中 mAb 是发展最快的一类药物。

伴随着巨大的治疗潜力，这些分子的结构非常复杂，对分析的要求极为苛刻<sup>[1,2]</sup>。与小分子药物相比，生物药物具有较大的质量数 (mAb 的 MW 约为 150 kDa) 和异质性。生物药物是一个或多个基因的产物。然而，可能同时存在数百种在翻译后修饰 (PTM)、氨基酸序列、高阶结构等方面有所不同的异构体，这些因素共同构成了产品的特征、安全性和有效性<sup>[1-3]</sup>。因此，它们的深入结构表征涉及大量的分析工具，而色谱 (LC) 和质谱 (MS) 是其中的前沿技术。

CEX 是研究可能因 PTM [例如天冬酰胺脱酰胺、C 端赖氨酸截短、N 端环化 (焦谷氨酸构造) 和唾液酸化等] 产生的电荷异构体的关键技术。在 CEX 技术中，固定相的阴离子基团和蛋白质表面的阳离子基团之间的静电相互作用为分离奠定了基础。在流动相 pH 低于其等电点 (pI) 时，将蛋白质加载到色谱柱上，并使用盐梯度或 pH 梯度实现洗脱。CEX 缓冲液通常由非挥发性成分组成，使得这些方法与质谱不兼容。峰鉴定是一项繁琐的任务，涉及在质谱分析之前进行峰采集和脱盐<sup>[4]</sup>。随着稳定的商用二维液相色谱仪器的最新推出，这一系列任务现在通常以在线、自动化的方式进行<sup>[5-9]</sup>。从 CEX 色谱柱洗脱的物质存储在定量环中，并在质谱测量之前使用反相液相色谱 (RPLC) 或体积排阻色谱 (SEC) 进行在线脱盐。全二维液相色谱 (LC × LC) 和 (多) 中心切割二维液相色谱 (LC-LC) 均得到使用<sup>[5-9]</sup>。然而，为了明确鉴定 CEX 峰，需要进行肽谱分析。虽然蛋白质测定可表明身份，并突出显示质量数差异超出质谱仪质量数准确度的主要修饰，但它通常不提供实际的氨基酸序列，也不允许我们定位修饰。针对后者，受之前研究工作的启发<sup>[10-12]</sup>，本应用简报介绍了一种完全自动化的在线 4D-LC/MS 设置，通过整合第一维 (1D) CEX、峰采集、2D 脱盐、变性、还原、3D 胰蛋白酶酶解以及基于 4D RPLC/MS 的肽谱分析，对 mAb 电荷异构体进行深入表征。

## 实验部分

### 材料

乙腈 (HPLC-S)、水 (ULC/MS) 和甲酸 (ULC/MS) 来自 Biosolve (Valkensward, The Netherlands)。NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、NaCl、NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>、三羟甲基氨基甲烷和二硫苏糖醇 (DTT) 购自 Sigma (St. Louis, MO, USA)。超纯 Tris-HCl (pH 7.5) 购自 ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)。I 级水由 Sartorius (Göttingen, Germany) Arium Pro 超纯实验室水纯化系统使用自来水生成。人源化单克隆抗体曲妥珠单抗 (商品名为赫赛汀) 购自 Roche (Basel, Switzerland)。

### 样品前处理

用一维 CEX 流动相 A (MPA: 10 mmol/L 磷酸钠, pH 7.65) 将曲妥珠单抗稀释至 7 mg/mL。在高 pH (100 mmol/L Tris, pH 9.0) 和 37 °C 条件下将曲妥珠单抗孵育 3 天，然后用一维 CEX 流动相 A 通过缓冲液交换至 7 mg/mL，从而诱导脱酰胺基化。

### 仪器

使用配备多中心切割选件的 Agilent 1290 Infinity II 二维液相色谱系统、额外的 Agilent 1260 Infinity II 四元泵和 Agilent 1260 Infinity II 等度泵，以及两个额外的 2 位/6 通阀和零死体积 T 形管。使用内径为 0.12 mm 的不锈钢管。配置的示意图如图 1 所示，并在本应用简报中进行了汇总。使用二极管阵列检测 (DAD) 进行第一维 (CEX) 和第四维 (RPLC) 检测。此外，使用配备喷射流电喷雾离子源的 Agilent 6545 LC/Q-TOF 进行第四维和最后维度的检测。

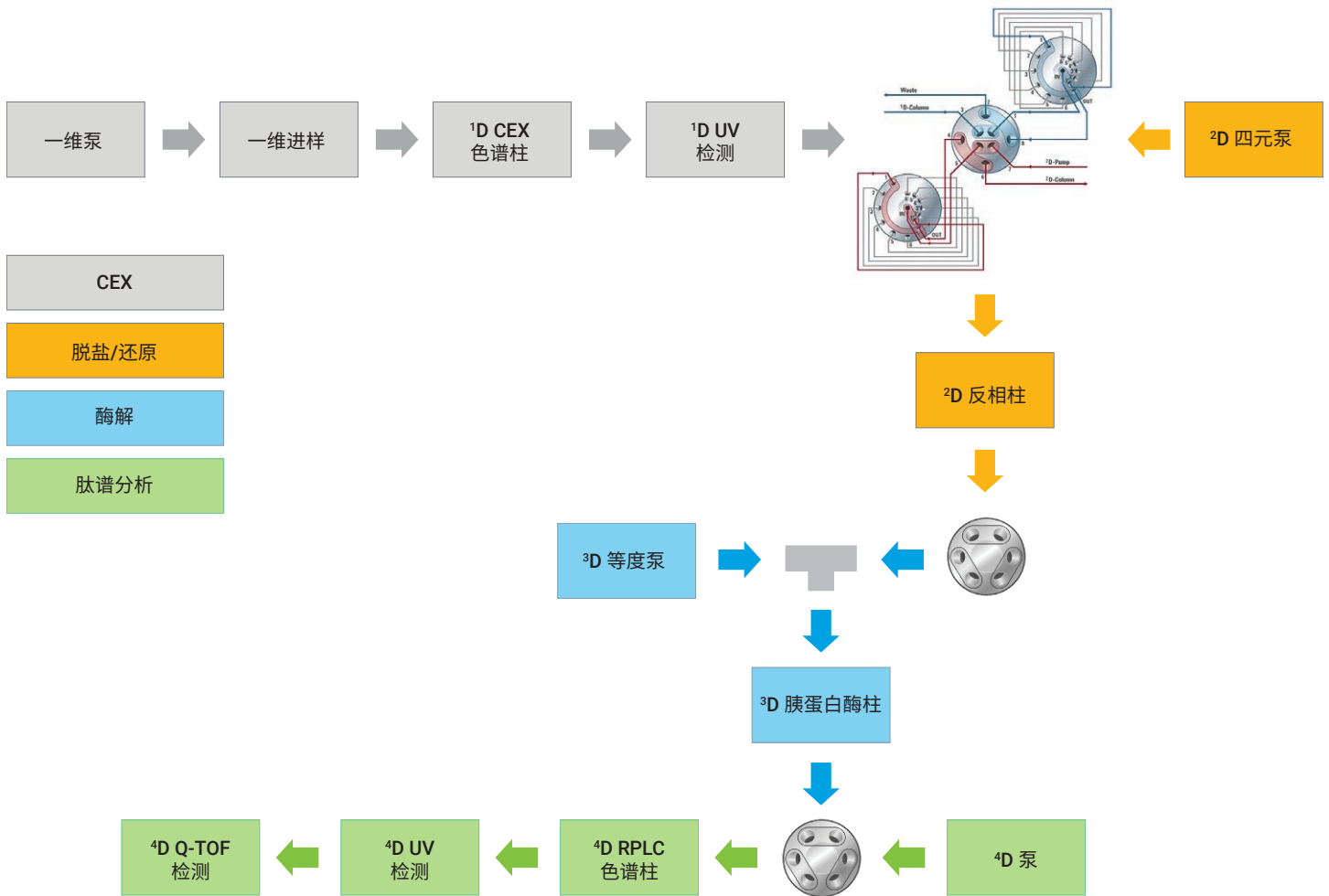


图 1. 4D-LC/MS 配置，包括在第一维使用多中心切割进行 CEX 分离和电荷异构体峰采集，第二维基于 RPLC 的脱盐、变性、还原，第三维的胰蛋白酶酶解，以及第四维基于 RPLC/MS 的肽谱分析

## 配置

### 第一维：阳离子交换色谱

- G7120A Agilent 1290 Infinity II 高速泵
- G7167B Agilent 1290 Infinity II Multisampler，配备样品恒温器（选件 101）
- G7116B Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱（MCT），安装了阀驱动（选件 058），配备 Agilent InfinityLab Quick Change 2 位/6 通快速切换阀（1300 bar，G4231C）

- G7117B Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器，配备 3.7 mm HDR InfinityLab 最大光强卡套式流通池（G4212-60032）

**注：**安装了短型 3.7 mm 检测器流通池，以降低信号强度并防止 UV 信号饱和。

### 具有多中心切割功能的二维液相色谱

- Agilent 1290 Infinity 阀驱动（G1170A），配备二维液相色谱阀（G4236A）
- 两个 Agilent 1290 Infinity 阀驱动（G1170A），配备带 40 μL 定量环的多中心切割阀（G4242-64000）

**第二维：**使用反相色谱进行脱盐、变性和还原

G7111B Agilent 1260 Infinity II 四元泵，配备主动入口阀（AIV）（选件 032）

**第三维：**胰蛋白酶酶解

- 0100-0969 ZDV T 形管
- G7110B Agilent 1260 Infinity II 等度泵

#### 第四维：使用反相色谱进行肽谱分析

- G7120A Agilent 1290 Infinity II 高速泵
- G7116B Agilent 1290 Infinity II MCT，安装了阀驱动（选件 058），配备 Agilent InfinityLab Quick Change 2 位/6 通快速切换阀（1300 bar，G4231C）
- G7117B Agilent 1290 Infinity II DAD，配备 10 mm InfinityLab 最大光强卡套式流通池（G4212-60008）
- G6545A Agilent 6545 LC/Q-TOF，配备喷射电喷雾离子源

注：Orachrom StyrosZyme TPCK-胰蛋白酶和 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱位于同一个柱温箱的不同区域，分别保持在 40 °C 和 60 °C。

#### 软件

- Agilent OpenLab CDS ChemStation 修正版 C.01.07 SR4 [505]
- 二维液相色谱附加软件修正版 A.01.04 [017]
- Agilent MassHunter 仪器控制软件 (B.09.00)
- Agilent MassHunter BioConfirm 数据分析软件 (B.07.00)

#### 方法

在二维液相色谱软件中对第一维和第四维进行配置，在常规方法设置中对第二维和第三维进行控制，并将其设定为重复事件。这些事件的循环时间为 110 分钟，与二维液相色谱软件中设定的第四维的循环时间相同。MassHunter 采集软件由二维液相色谱系统的远程启动触发。

在整个 CEX 分析过程中进行了四次中心切割。4.8 分钟时进行的第一次中心切割为空白切割，它使我们可以在分析实际的目标 CEX 中心切割之前对所有维度进行预处理。

第一维：阳离子交换色谱			
色谱柱	Agilent Bio MAb, 无孔 (2.1 mm × 250 mm, 5 μm) (部件号 5190-2411)		
温度	30 °C		
流动相 A	10 mmol/L 磷酸钠, pH 7.65		
流动相 B	10 mmol/L 磷酸钠, pH 7.65 + 100 mmol/L NaCl		
流速	0.2 mL/min		
梯度	时间 (min)	B (%)	CEX 分析
	0	5	
	36	70	
	36.5	100	
	46	100	
	46.5	5	
60	5		
进样	100 μg		
检测	220 和 280 nm		
峰宽	> 0.025 min (10 Hz)		

多中心切割第一维 > 第二维	
曲妥珠单抗采样时间表	
切割	时间 (min)
1 - 空白	4.80
2 - 前峰	14.93
3 - 主峰	17.55
4 - 后峰	18.99

第二维：使用反相色谱进行脱盐、变性和还原（手动输入重复事件）						
色谱柱	聚合物基脱盐小柱, 2.1 × 10 mm					
温度	23 °C					
流动相 A	0.1% (v/v) 甲酸水溶液					
流动相 B	0.1% (v/v) 甲酸的乙腈溶液					
流动相 C	20 mmol/L DTT 的 100 mmol/L Tris-HCl 溶液, pH 7.5					
梯度	时间 (min)	A (%)	B (%)	C (%)	流速 (mL/min)	
	10	99	1	0	0.5	脱盐和聚焦
	10.01	0	0	100	0.2	还原
	20	0	0	100	0.2	
	20.01	99	1	0	0.5	脱盐和洗脱
	25	99	1	0	---	
	25.01	40	60	0	---	
	27	40	60	0	0.5	
	27.01	40	60	0	0.015	洗脱和酶解
	68	40	60	0	0.015	
	68.01	0	100	0	0.5	
	85	0	100	0	---	
	95	99	1	0	---	
	120	99	1	0	---	
阀	27 min: 位置 1 → 位置 2 (开始胰蛋白酶酶解) 67 min: 位置 2 → 位置 1 (开始肽谱分析)					



第三维：胰蛋白酶酶解（手动输入的重复事件）			
色谱柱	Orachrom StyrosZyme TPCK-胰蛋白酶 PEEK (2.1 × 150 mm)		
温度	40 °C		
流动相	50 mmol/L NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , pH 8		
梯度	时间 (min)	流速 (mL/min)	
	25	0.06	
	25.01	0.135	酶解
	67	0.135	
	67.01	0.06	
135	0.06		
阀	27 min: 位置 1 -> 位置 2 (开始胰蛋白酶酶解) 67 min: 位置 2 -> 位置 1 (开始肽谱分析)		

## 数据处理

使用集成于 MassHunter 软件中的 BioConfirm 算法，将测量得到的信号与由兔单抗轻链和重链序列进行匹配。将实验数据与序列匹配的质量容差设置为 8 ppm。在 20 ppm 质量数准确度下获得的提取离子色谱图 (EIC) 用于监测 PTM (例如脱酰胺基化)。

## 结果与讨论

完全自动化的在线 4D-LC/MS 蛋白质分析仪（包括 CEX、峰采集、脱盐、变性、还原、胰蛋白酶酶解以及肽谱分析）的分析流程图如图 1 所示。将 CEX 分离的物质收集在安装于多中心切割阀上的 40 µL 定量环中，并逐一转移到聚合物 RP 小柱中进行脱盐、变性和还原。随后，通过升高乙腈浓度使捕集于小柱上的还原 mAb 洗脱到胰蛋白酶柱中。使用 T 形管将胰蛋白酶酶解缓冲液与反相流动相混合，以获

第四维：使用反相色谱进行肽谱分析（由二维液相色谱软件控制的重复事件）			
色谱柱	Agilent AdvanceBio 肽谱分析柱 (2.1 × 150 mm × 2.7 µm) (部件号 651750-902)		
温度	60 °C		
流动相 A	0.1% (v/v) 甲酸水溶液		
流动相 B	0.1% (v/v) 甲酸的乙腈溶液		
流速	0.4 mL/min		
梯度	时间 (min)	B (%)	
	0	1	
	8.5	1	
	9	100	
	15	100	
	16	1	
	20	1	将酶解产物加载到肽谱分析色谱柱
	64	1	
	64	1	肽谱分析
	97	45	
	98	100	
	103	100	
	104	1	
110	1		
DAD 检测	214 和 280 nm		
峰宽	> 0.025 min (10 Hz)		
<b>MS 检测</b>			
<b>离子源</b>			
正离子模式			
干燥气温度	300 °C		
干燥气流速	8 L/min		
雾化器压力	35 psi		
鞘气温度	350 °C		
鞘气流速	8 L/min		
毛细管电压	3500 V		
喷嘴电压	1000 V		
碎裂电压	175 V		
<b>采集</b>			
模式	扩展动态范围 (2 GHz)		
数据采集范围	m/z 100–3200		
	1 个谱图/s		
	重点采集模式		
67 分钟后将分流阀切换至 MS			

得理想酶解条件并降低乙腈浓度。在酶解过程中，胰蛋白酶柱与肽谱分析柱对齐，生成的肽段集中在 RPLC 柱头。20 分钟后，阀切换使酶解产物开始洗脱到质谱中。

mAb 曲妥珠单抗的 CEX 色谱图如图 2 所示。曲妥珠单抗，商品名赫赛汀，是一种结合 HER2 受体的人源 IgG1，因此可用于治疗 HER2 阳性转移性乳腺癌。mAb 的 pI 为 8.45，在 CEX 流动相 pH 下带正电荷，以此控制与带负电荷的色谱树脂之间的相互作用。使用 NaCl 盐梯度洗脱 mAb 后，出现了多种电荷异构体，随后对其进行在线肽谱分析。图 3A 示意图展示了涉及三个 CEX 峰（前峰、主峰和后峰）和一个 CEX 空白（如图 2 所示）的分析的 4D-LC/MS 实验。图 3B 为一个循环中压力和 DAD 谱图的放大图，并显示了 CEX 主峰的脱盐、变性、还原、酶解和肽谱分析。可实现超过 90% 的序列覆盖率。鉴定出的肽段如表 1 所示，LC/MS 化合物色谱图的叠加图如图 4 所示。未覆盖的肽段通常较小且/或具有亲水性，且在酶解过程中不会集中于肽谱分析柱的柱头。出于此原因，它们被转移到废液中。

除序列信息之外，肽谱分析还可揭示修饰和修饰位点信息。图 5 显示了 CEX 前峰、主峰和后峰的在线肽谱分析，并重点展示了两个肽段（即在 30 位处包含潜在脱酰胺基化位点的轻链肽段

ASQDVNTAVAWYQQKPGK (LC 25-42)，以及在 102 位处包含潜在异构化位点的重链肽段

WGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTK (HC 99-124) 的 EIC。从数据可以推断出，前峰对应于脱酰胺基化异构体，在其中一条轻链的 30 位处，天冬酰胺转变为天冬氨酸。还可以证明后峰在其中一条重链的 102 位处携带异天冬氨酸。对应于修饰和未修饰异构体的双组峰清楚、直观地说明了这一点。这些结果与 Harris 等人报告的结果一致，他们对赫赛汀的酸性和碱性异构体进行了离线馏分收集和肽谱分析<sup>[4]</sup>。

我们对高 pH 处理后的赫赛汀样品进行了相同的实验（图 6）。此类条件会诱导脱酰胺基化，从而使 mAb 具有更强的酸性。图 6 中呈现的 CEX 谱图显示了一种酸性位移，CEX 峰 1 和峰 2 的肽谱数据表示双脱酰胺基化异构体，其两条轻链均在 30 位处发生了脱酰胺基化。CEX 峰 3 和峰 4 对应于单次脱酰胺基化事件，一条轻链在 30 位处发生了脱酰胺基化。峰 1 和峰 2 以及峰 3 和峰 4 之间的差异源自另一次脱酰胺基化，这次发生在重链的 387 位。该脱酰胺基化位点出现在两个肽段（一个完全裂解，一个未裂解）中，当发生脱酰胺基化时，它们的酶解方式明显不同。

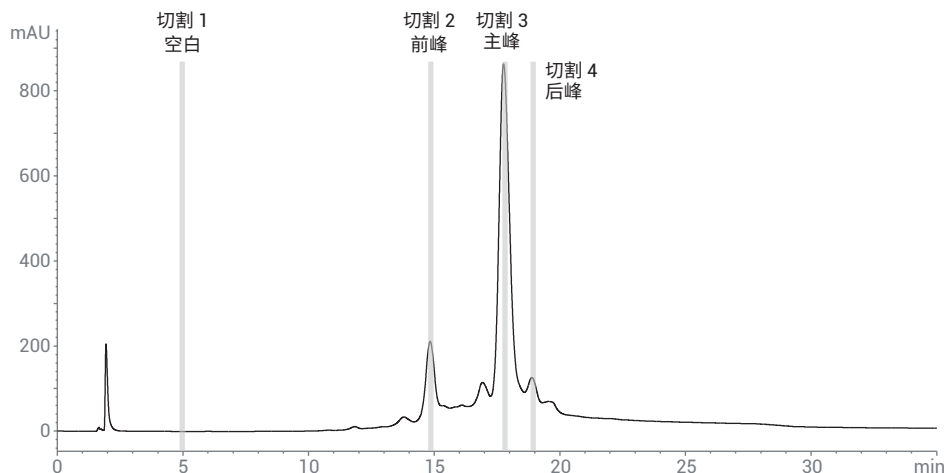
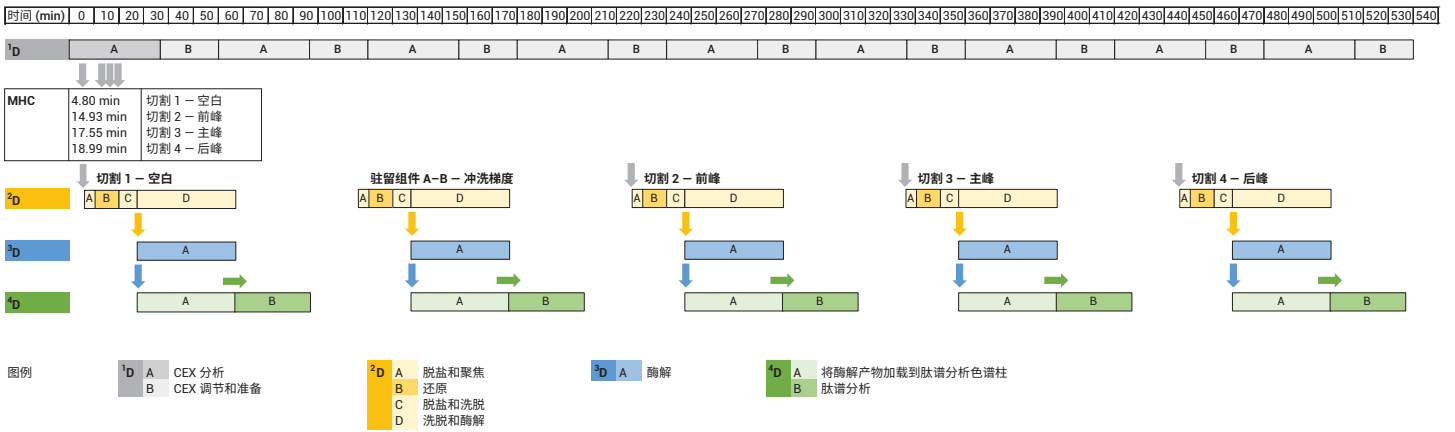


图 2. 单克隆抗体曲妥珠单抗的 CEX 色谱图。根据参考文献 13 设定条件。灰色表示进行的中心切割

A



B

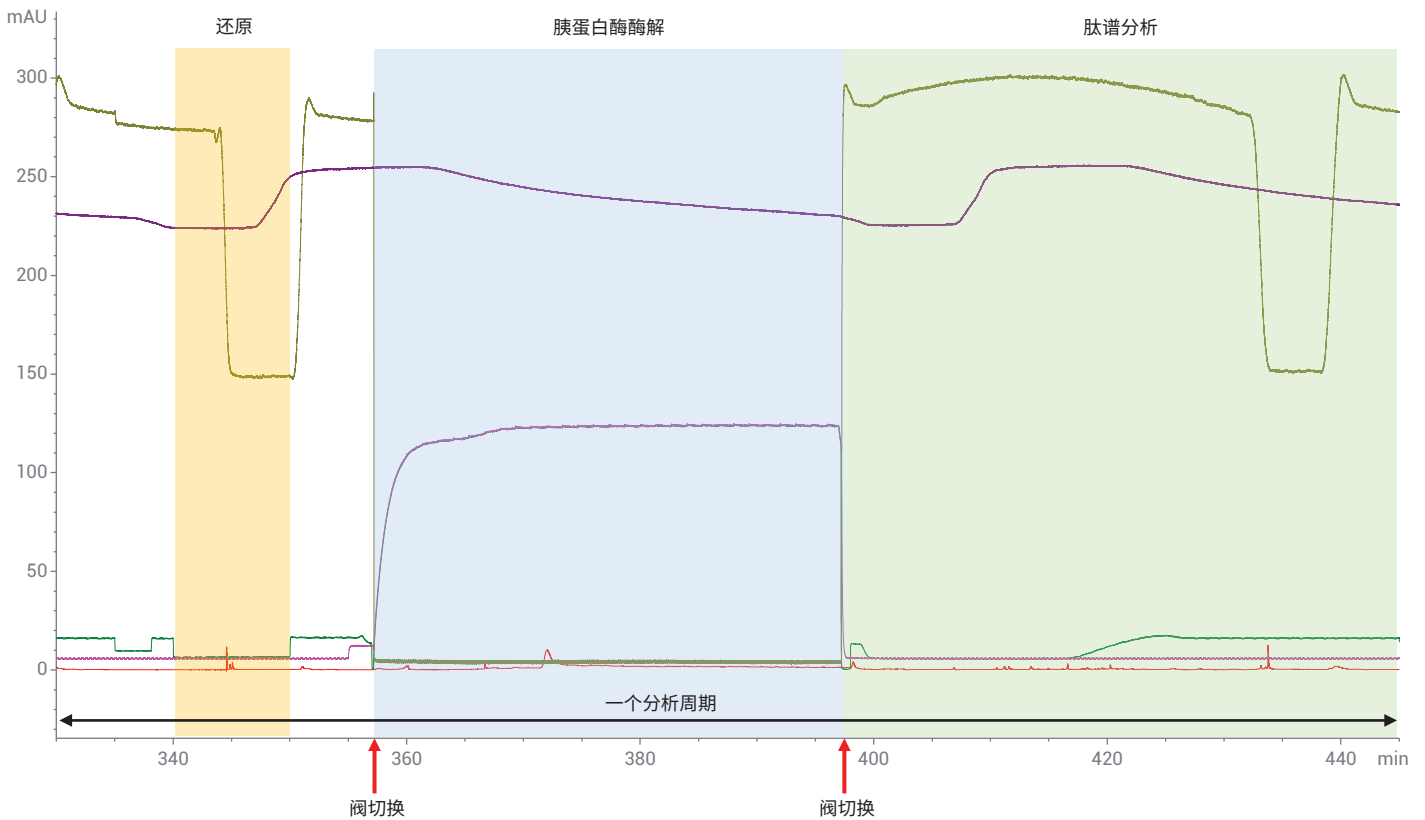


图 3. (A) 4D-LC/MS 实验不同阶段的示意图，重点显示前峰、主峰和后峰以及 CEX 空白（如图 2 所示）区域。(B) 重点显示 CEX 主峰的脱盐、变性、还原、酶解和肽谱分析

表 1. 通过基于 RPLC/MS 的在线肽谱分析, 在 CEX 主峰中鉴定出的肽段

保留时间	质量数	进样量	进样量%	序列	测序位置	靶向序列质量数	误差 (ppm)	漏切位点
79.1	1880.9972	66635668	6.61	EVQLVESGGGLVQPGGSLR	HC(001-019)	1880.9956	0.8	0
76.8	1109.5539	25727274	2.55	LSCAASGFNIK	HC(020-030)	1109.5539	0.0	0
81.2	2180.0864	16055279	1.59	LSCAASGFNIKDTYIHVVR	HC(020-038)	2180.0837	1.2	1
76.6	1088.5410	13618352	1.35	DTYIHVVR	HC(031-038)	1088.5403	0.6	0
76.2	829.4442	24354704	2.42	GLEWVAR	HC(044-050)	829.4446	-0.5	0
71.9	1083.5360	19879112	1.97	IYPTNGYTR	HC(051-059)	1083.5349	1.0	0
72.1	1181.6059	3708836	0.37	GRFTISADTSK	HC(066-076)	1181.6041	1.6	1
73.1	968.4819	26423682	2.62	FTISADTSK	HC(068-076)	968.4815	0.4	0
79.3	2260.1184	317550	0.03	FTISADTSKNTAYLQMNSLR	HC(068-087)	2260.1158	1.1	1
81.3	3518.6474	320893	0.03	FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR	HC(068-098)	3518.6446	0.8	2
76.8	1309.6451	24858112	2.47	NTAYLQMNSLR	HC(077-087)	1309.6449	0.1	0
79.9	2568.1769	5903991	0.59	NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR	HC(077-098)	2568.1737	1.2	1
71.6	1276.5392	2994056	0.30	AEDTAVYYCSR	HC(088-098)	1276.5394	-0.1	0
85.3	2783.2545	16863744	1.67	WGGDGFYAMDYWGQGLTVTSSASTK	HC(099-124)	2783.2537	0.3	0
78.7	1185.6398	68405792	6.79	GPSVFPLAPSSK	HC(125-136)	1185.6394	0.4	0
77.7	1263.6494	36588096	3.63	STSGGTAALGCLVK	HC(137-150)	1263.6493	0.1	0
88.3	6655.2898	221285	0.02	DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK	HC(151-213)	6655.2857	0.6	0
79.8	1374.7171	214690	0.02	VDKKVEPKSCDK	HC(214-225)	1374.7177	-0.4	3
84.9	2729.4093	7103687	0.71	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	HC(226-251)	2729.4073	0.7	0
73.4	834.4277	13166738	1.31	DTLMISR	HC(252-258)	834.4269	1.0	0
82.0	2897.4175	220680	0.02	DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK	HC(252-277)	2897.4151	0.9	1
84.3	4556.2041	547132	0.05	DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK	HC(252-291)	4556.1992	1.1	2
79.3	2081.0013	17858876	1.77	TPEVTCVVVDVSHEDPEVK	HC(259-277)	2080.9987	1.2	0
83.0	3739.7881	18901388	1.88	TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK	HC(259-291)	3739.7828	1.4	1
78.6	1676.7966	5991668	0.59	FNWYVDGVEVHNAK	HC(278-291)	1676.7947	1.1	0
84.6	1807.0008	38113724	3.78	VVSVLTVLHQDWLNGK	HC(305-320)	1806.9992	0.9	0
83.3	2227.2022	63210428	6.27	VVSVLTVLHQDWLNGKEYK	HC(305-323)	2227.2001	0.9	1
82.4	2458.3080	2959244	0.29	VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK	HC(305-325)	2458.3043	1.5	2
81.6	2886.5495	183447	0.02	VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK	HC(305-329)	2886.5426	2.4	3
73.9	837.4964	38694668	3.84	ALPAPIEK	HC(330-337)	837.4960	0.5	0
75.4	1285.6662	875645	0.09	EPQVYTLPPSR	HC(348-358)	1285.6667	-0.4	0
75.6	1903.9366	36378636	3.61	EPQVYTLPPSREEMTK	HC(348-363)	1903.9350	0.8	1
80.5	2989.5263	1849832	0.18	EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK	HC(348-373)	2989.5253	0.3	2
78.4	1721.8701	179925	0.02	EEMTKNQVSLTCLVK	HC(359-373)	1721.8692	0.6	1
78.9	1103.6013	45037560	4.47	NQVSLTCLVK	HC(364-373)	1103.6009	0.4	0
81.6	2543.1245	29221288	2.90	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	HC(374-395)	2543.1241	0.2	0
85.7	4398.0307	5032842	0.50	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK	HC(374-412)	4398.0281	0.6	1
85.9	4954.3531	225838	0.02	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK	HC(374-417)	4954.3502	0.6	2
82.8	1872.9144	57538216	5.71	TTPPVLDSDGSFFLYSK	HC(396-412)	1872.9146	-0.1	0
82.6	2429.2370	970108	0.10	TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK	HC(396-417)	2429.2366	0.2	1
77.8	2986.3744	1042270	0.10	SRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQK	HC(418-442)	2986.3715	1.0	1
78.5	2743.2427	46302832	4.60	WQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQK	HC(420-442)	2743.2384	1.6	0
74.6	659.3487	26985572	2.68	SLSLSPG	HC(443-449)	659.3490	-0.5	0
76.7	1877.8787	2655889	0.26	DIQMTQSPSSLSASVGDR	LC(001-018)	1877.8789	-0.1	0
79.5	2551.2398	9011163	0.89	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCR	LC(001-024)	2551.2371	1.1	1

保留时间	质量数	进样量	进样量%	序列	测序位置	靶向序列质量数	误差 (ppm)	漏切位点
75.6	1989.9932	10501849	1.04	ASQDVNTAVAWYQQKPGK	LC(025-042)	1989.9908	1.2	0
74.8	2286.1771	370620	0.04	ASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK	LC(025-045)	2286.1757	0.6	1
84.3	1771.9519	27274394	2.71	LLIYSASFLYSGVPSR	LC(046-061)	1771.9509	0.6	0
85.8	4129.8936	10160642	1.01	SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYTTPPTFGQGK	LC(067-103)	4129.8892	1.1	0
85.3	4599.1803	2980494	0.30	SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYTTPPTFGQGKVEIK	LC(067-107)	4599.1792	0.2	1
84.5	4755.2888	6157193	0.61	SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYTTPPTFGQGKVEIKR	LC(067-108)	4755.2803	1.8	2
82.2	2101.1217	3894068	0.39	RTVAAPSVFIFPPSDEQLK	LC(108-126)	2101.1208	0.4	1
84.0	1945.0220	32666390	3.24	TVAAPSVFIFPPSDEQLK	LC(109-126)	1945.0197	1.2	0
90.2	3666.8789	1457746	0.14	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR	LC(109-142)	3666.8756	0.9	1
85.5	1739.8676	23403588	2.32	SGTASVVCLLNNFYPR	LC(127-142)	1739.8665	0.6	0
75.9	2676.2628	852142	0.08	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK	LC(146-169)	2676.2627	0.0	1
80.0	4160.0087	11663837	1.16	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTSK	LC(146-183)	4160.0033	1.3	2
79.7	4766.2746	403170	0.04	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTSKADYK	LC(146-188)	4766.2683	1.3	3
78.8	3618.7073	16391463	1.63	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTSK	LC(150-183)	3618.7021	1.5	1
78.6	4224.9705	725845	0.07	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTSKADYK	LC(150-188)	4224.9670	0.8	2
77.3	4490.1265	478190	0.05	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTSKADYKHK	LC(150-190)	4490.1209	1.3	3
78.9	6290.0188	328711	0.03	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTK	LC(150-207)	6290.0085	1.6	4
79.0	1501.7515	2071466	0.21	DSTYLSLSTLTSK	LC(170-183)	1501.7512	0.2	0
74.0	2689.3218	547667	0.05	ADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTK	LC(184-207)	2689.3170	1.8	2
73.4	2083.0562	6116953	0.61	HKVYACEVTHQGLSSPVTK	LC(189-207)	2083.0521	2.0	1
75.3	1817.8988	25691042	2.55	VYACEVTHQGLSSPVTK	LC(191-207)	1817.8982	0.3	0

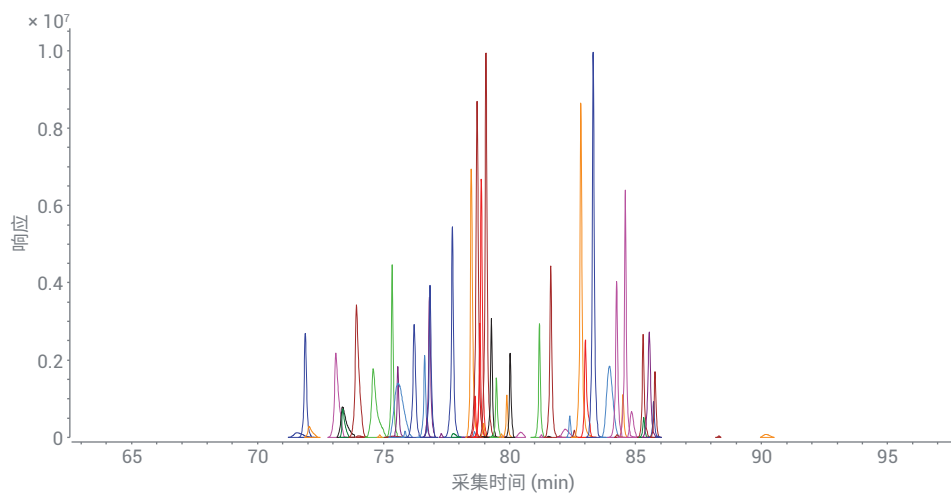


图 4. 通过在线肽谱分析，在 CEX 主峰中 MS 鉴定肽段的 RPLC/MS 化合物色谱图的叠加图

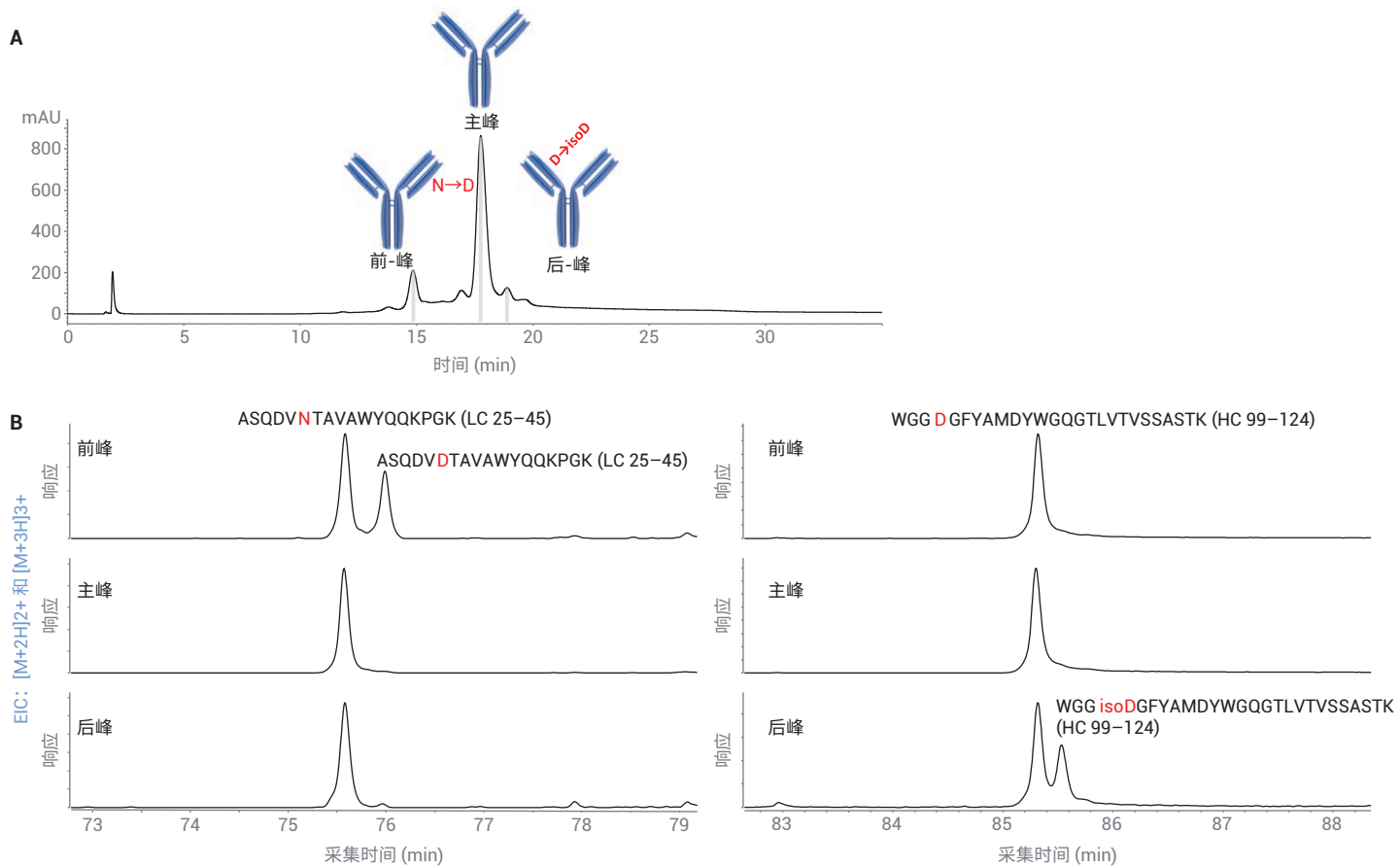


图 5. 曲妥珠单抗 CEX 前峰、主峰和后峰的在线肽谱分析。轻链肽段 ASQDVNTAVAWYQQKPGK (LC 25-42)、脱酰胺基化轻链肽段 ASQDVRTAVAWYQQKPGK (LC 25-42)、重链肽段 WGGDFYAMDYWGQGLTVSSASTK (HC 99-124) 和异构化重链肽段 WGGisoDFYAMDYWGQGLTVSSASTK (HC 99-124) 的 (A) CEX 色谱图和 (B) 提取离子色谱图

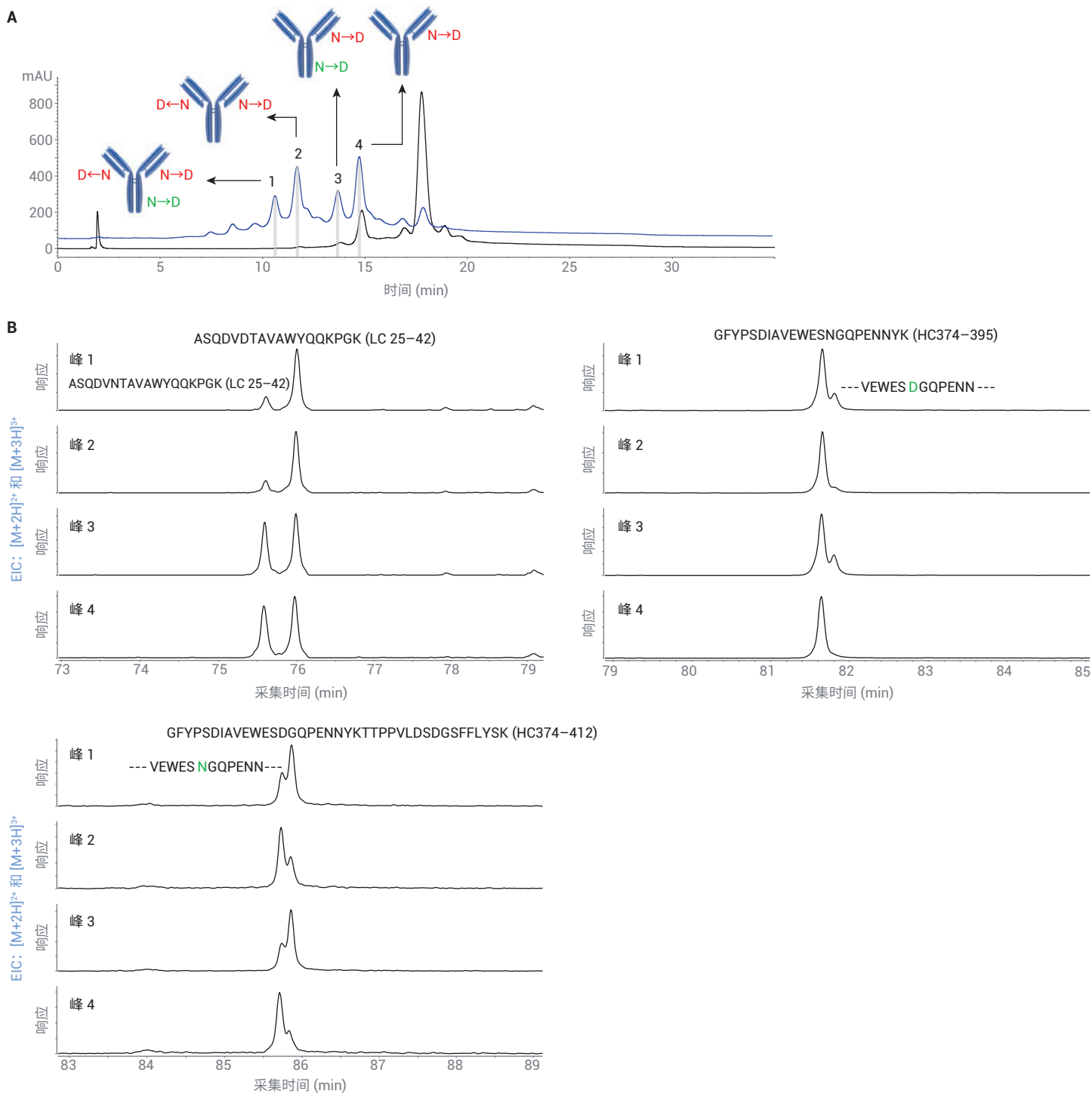


图 6. 高 pH 处理曲妥珠单抗 CEX 峰 1、2、3 和 4 的在线肽谱分析。(A) 未处理和高 pH 处理曲妥珠单抗的 CEX 色谱图的叠加图, (B) 轻链肽段 ASQDVNTAVAWYQQKPGK (LC 25-42)、脱酰胺基化轻链肽段 ASQDVTAVAWYQQKPGK (LC 25-42)、重链肽段 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK (HC 374-395)、脱酰胺基化重链肽段 GFYPSDIAVEWESDGPENNYK (HC 374-395)、重链肽段 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK (HC374-412) 和脱酰胺基化重链肽段 GFYPSDIAVEWESDGPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK (HC 374-412) 的提取离子色谱图

## 结论

我们介绍并成功应用完全自动化的 4D-LC/MS 蛋白质分析仪（包括在第一维使用多中心切割进行 CEX 分离和电荷异构体峰采集，第二维基于 RPLC 的脱盐、变性、还原，第三维的胰蛋白酶酶解，以及第四维基于 RPLC/MS 的肽谱分析）对在未处理和高 pH 处理曲妥珠单抗的 CEX 谱图中观察到的酸性和碱性异构体进行了表征。该多维系统基于 InfinityLab 二维液相色谱解决方案和 6545 LC/Q-TOF 系统。通过在第一维中用 Protein A 亲和色谱、体积排阻色谱、疏水相互作用色谱等代替 CEX，可以轻松配置这种 4D-LC/MS 设计的不同形式。

## 参考文献

1. Sandra, K. *et al.* 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. Walsh, G. Biopharmaceutical Benchmarks 2018. *Nat. Biotechnol.* **2018**, 32, 992–1000
4. Harris, R. J. *et al.* Identification of Multiple Sources of Charge Heterogeneity in a Recombinant Antibody. *J. Chromatogr. B* **2001**, 752, 233–245
5. Stoll, D. *et al.* Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products by Two-Dimensional Liquid Chromatography Coupled with UV Absorbance and Mass Spectrometric Detection. *J. Chromatogr. B* **2016**, 1032, 51–60
6. Sandra, K. *et al.* Characterizing Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug Conjugates using 2D-LC-MS. *LCGC Europe* **2017**, 30, 149–157
7. Stoll, D. R. *et al.* Direct Identification of Rituximab Main Isoforms and Subunit Analysis by Online Selective Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 8307–8315
8. 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* **2016**, 1032, 119–130
9. Schneider, S. 2D-LC/MS Characterization of Charge Variants Using Ion Exchange and Reversed-Phase Chromatography (使用离子交换和反相色谱对电荷异构体进行 2D-LC/MS 表征)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-6673EN，**2016**
10. Gstöttner, C. *et al.* Fast and Automated Characterization of Antibody Variants with 4D HPLC/MS. *Anal. Chem.* **2018**, 90, 2119–2125
11. Goyon, A. *et al.* Streamlined Characterization of an Antibody-Drug Conjugate by Two-Dimensional and Four-Dimensional Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2019**, 91, 14896–14903
12. Goyon, A. *et al.* From Proof of Concept to the Routine Use of an Automated and Robust Multi-Dimensional Liquid Chromatography Mass Spectrometry Workflow Applied for the Charge Variant Characterization of Therapeutic Antibodies. *J. Chromatogr. A* **2020**, doi: 10.1016/j.chroma.2019.460740
13. Vandenheede, I. *et al.* Characterize mAb Charge Variants by Cation-Exchange Chromatography (通过阳离子交换色谱表征 mAb 电荷异构体)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-5273EN，**2014**

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

DE.5371643519

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  
2020 年 6 月 17 日，中国出版  
5994-2020ZHCN



## 二合一生物过程分析

使用 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪和 InfinityLab LC/MSD iQ 通过内部阀切换将 mAb 滴度测定和 Spent Media 分析相结合



### 作者

André Feith  
安捷伦科技有限公司  
德国瓦尔德布隆  
Natascha Verhagen,  
Lena Gaugler,  
Attila Teleki, Ralf Takors  
德国斯图加特大学  
生物化学工程研究所

### 摘要

关键工艺参数 (CPP) 和关键质量属性 (CQA) 的分析在生物药物生产过程的监测以及确保理想产量和产品质量方面发挥着重要的作用。通常使用 HPLC 法分析这些参数。但是，成本、实验室空间和工作量是应用此类工具的重要考虑因素。本应用简报介绍了采用 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪与配备自动色谱柱选择阀的 Agilent InfinityLab LC/MSD iQ 的联用系统进行的 Spent Media 分析和 Protein A 滴度测定。应用具有智能 MS 检测功能的亲水相互作用液相色谱 (HILIC)，为重要细胞培养基成分提供了出色的线性、灵敏度和选择性。借助 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统中使用的四元泵，可以通过 UV 检测实现单克隆抗体 (mAb) 产品的后续分析，而无需手动重新配置仪器。使用 Agilent OpenLab CDS 2 软件可以执行所有必要的维护操作（例如色谱柱切换、清洗或平衡），该软件完全合格，满足 FDA 21 CFR part 11 法规的要求。

## 前言

生物药物（例如 mAb）的生产主要通过生物反应器培养哺乳动物细胞系（例如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞）来进行。这些生产宿主需要大量的营养物质（例如糖、氨基酸、维生素和生长因子）来实现理想生长和产量<sup>[1]</sup>。国际人用药品注册技术协调会 (ICH) 通过质量源于设计 (QbD) 等理念，鼓励对过程和产品进行分析，旨在将质量融入生产过程而不是检测最终产品的质量<sup>[2]</sup>。多种分析方法可作为线上、在线或离线工具用于上游/下游过程或质量控制。需要监测的重要参数包括养分消耗、产品成分和产品质量 (CQA)<sup>[1]</sup>。由于实验室空间有限，并且分析方法的准备或切换非常耗时，因此需要使用先进的方法同时分析多个参数。本应用简报介绍了两种方法：用于极性培养化合物的 HILIC，以及用于产品滴度测定的 Protein A 亲和色谱。两种方法均在与 LC/MSD iQ（配备自动色谱柱选择阀）联用的单个 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统上运行。

## 实验部分

### 设备

与 LC/MSD iQ 联用的 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性泵 (G5654A)
- 配备 Agilent InfinityLab 样品恒温箱 (G5668A, 101) 和多重清洗选件 (G5668A, 112) 的 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler (G5668A)
- 配备生物惰性 4 位/10 通色谱柱选择阀 (G5639A) 和用于不同温度区的分隔器组件 (G7116-60006) 的 Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)
- 配备生物惰性标准流通池 (10 mm, G4212-60007) 的 Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 WR (G7115A)
- Agilent InfinityLab LC/MSD iQ (G6160AA)
- Agilent InfinityLab Flex Bench MS 移动支架 (G6015B)

### 软件

Agilent OpenLab CDS 2.4 版

### 色谱柱

- Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 685775-601)
- Agilent Bio-Monolith Protein A, 4.95 × 5.2 mm (部件号 5069-3639)

### 阀配置

根据图 1 安装和配置生物惰性 4 位/10 通色谱柱选择阀，在单个液相色谱系统中实现 Spent Media 分析和 mAb 滴度分析，而无需在运行序列之间进行重新配置。位置 3 的附加旁路毛细管可以冲洗色谱柱选择阀上游的液相色谱系统，避免两种方法使用的流动相之间的接触和潜在的盐沉淀。

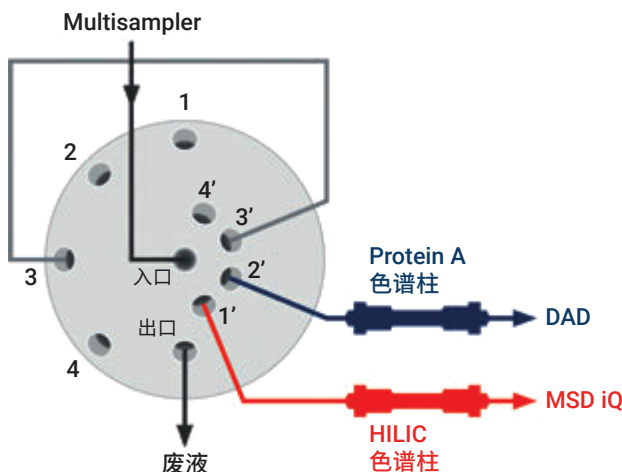


图 1. 配置的生物惰性 4 位/10 通色谱柱选择阀的示意图

## 化学品

液相色谱级乙腈购自 Merck (Darmstadt, Germany)。新制超纯水来自配置 0.22  $\mu\text{m}$  膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA)。D-葡萄糖、L-谷氨酸、L-谷氨酰胺、L-乳酸和 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺购自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)。此外, 还使用了预混氨基酸标准品 (部件号 5061-3330, 1 nmol/ $\mu\text{L}$ )。甲酸铵和甲酸购自 VWR (Darmstadt, Germany)。

## 标样和样品前处理

用水配制所有分析物的储备液, 作为参比标样, 浓度为 10 mmol/L。标准溶液或培养上清液 (由斯图加特大学生物化学工程研究所提供) 在离心 (12,100  $\times$  g, 2 分钟) 后直接进样, 通过 Protein A 色谱进行滴度分析, 或用水按 1:10 的比例稀释, 离心, 调整至 60% (v/v) 乙腈和 30 mmol/L 甲酸铵 (pH 3.0), 进行 HILIC 色谱分析。为了提高培养基化合物的色谱性能, 需要用有机溶剂和缓冲液对样品进行预稀释。

## 培养

在生物反应器中分批培养产生 IgG<sub>1</sub> 单克隆抗体 (抗 IL-8) 的 CHO DP12 细胞系, 起始体积为 1.0 L。培养基 (TC42, Xell AG, Germany) 的化学成分确定, 包含 L-谷氨酰胺、L-丙氨酰-L-谷氨酰胺、D-葡萄糖、生长因子及其他多种氨基酸。每天采集样品, 并通过 0.2  $\mu\text{m}$  PES 针头过滤器进行过滤。所得上清液在分析前储存于  $-70^\circ\text{C}$  下。

表 1. 用于 Spent Media 分析的 HILIC 方法

参数	值
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5, 2.1 $\times$ 100 mm, 2.7 $\mu\text{m}$
溶剂	A) 85% 乙腈/5% 2-丙醇/10% 水 + 30 mmol/L 甲酸铵, pH 3 B) 10% 乙腈/5% 2-丙醇/85% 水 + 30 mmol/L 甲酸铵, pH 3
梯度	0.00 min – 100% A/0% B 1.00 min – 100% A/0% B 11.00 min – 90% A/10% B 12.00 min – 0% A/100% B 12.01 min – 100% A/0% B 20.00 min – 100% A/0% B
流速	0.600 mL/min
温度	20 $^\circ\text{C}$
MS 检测	自动采集模式/SIM (见表 3)
进样	进样量: 1 $\mu\text{L}$ 样品温度: 4 $^\circ\text{C}$ 多重清洗: 用 90% 乙腈/10% 水冲洗 5 s (S1, 进样针清洗)

表 2. 用于 mAb 滴度分析的 Protein A 方法

参数	值
色谱柱	Agilent Bio-Monolith Protein A, 4.95 $\times$ 5.2 mm
溶剂	C) 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.4 D) 500 mmol/L 乙酸, pH 2.6
梯度	0.00 min – 100% C/0% D 0.50 min – 100% C/0% D 0.60 min – 0% C/100% D 1.70 min – 0% C/100% D 1.80 min – 100% C/0% D 3.5 min – 100% C/0% D
流速	1 mL/min
温度	30 $^\circ\text{C}$
紫外检测	280 nm/4 nm, 参比 360 nm/100 nm, 20 Hz
进样	进样量: 50 $\mu\text{L}$ 样品温度: 4 $^\circ\text{C}$ 多重清洗: 用 100% 水冲洗 5 s (S2, 进样针清洗)

## 结果与讨论

用于培养 CHO 细胞的化学成分确定的细胞培养基包含几种极性化学物质，无需预先在 HILIC 色谱柱上对它们进行衍生化处理即可实现分析。由于其中的大多数化合物缺乏发色团，因此不适合使用标准 UV 检测。在这种情况下，LC/MSD iQ 提供的简单易用的质谱检测可实现更高的特异性和选择性。使用自动采集模式，根据配置的液相色谱流速和化合物的离子质量数自动调整离子源参数和碎裂电压。仅手动配置合适的 SIM 通道。在低 pH 条件下，使用 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 色谱柱，以甲酸铵为缓冲液进行分离（表 1）。此外，向流动相 A 和 B 中加入 5% (v/v) 2-丙醇，作为有机改性剂，优化 HILIC 分离中的峰形。图 2 显示了通常存在于包含有机酸、氨基酸和二肽的细胞培养基中的 16 种极性化合物的分离。

为了证明 LC/MSD iQ 进行外部定量分析的能力，为每种化合物制备以下浓度的 10 点校准曲线：1、2、5、10、20、50、75、100、150、200  $\mu\text{mol/L}$ 。此外，通过 OpenLab CDS 中的自动信噪比 (S/N) 计算功能 (P2P) 确定检测限 (LOD, S/N = 3)，即每种化合物的三个最低浓度的平均值。如表 3 所示，大多数分析物都具有良好的线性 ( $R^2 > 0.99$ ) 以及柱上量低于 1 pmol 的 LOD，表明 LC/MSD iQ 是定量分析的用户友好型理想选择，并具有小巧的体积<sup>[3]</sup>。

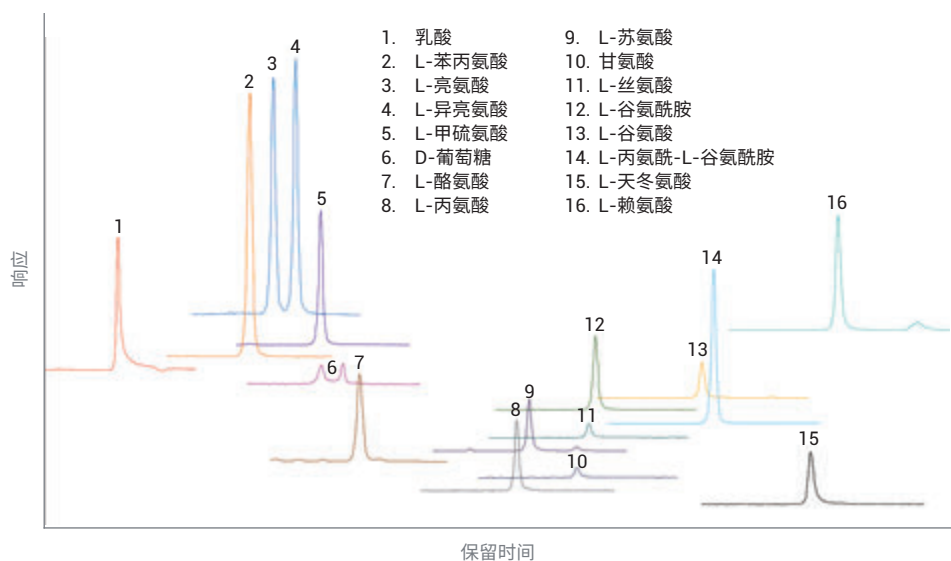


图 2. 采用 HILIC 方法，以 Agilent InfinityLab LC/MSD iQ 为检测器，在标样浓度为 200  $\mu\text{mol/L}$  下分析细胞培养基化合物获得的色谱图

表 3. 在 HILIC Spent Media 分析中分析的各化合物标准品的 MS 和定量分析参数

化合物	SIM (m/z)/ 极性	碎裂电压 (V)	保留时间 (min)	校准范围 ( $\mu\text{mol/L}$ )	$R^2$	LOD (柱上量, pmol)
乳酸	89/-	90	1.734	1-200	0.9979	0.63
L-苯丙氨酸	166/+	100	3.611	1-200	0.9956	0.41
L-亮氨酸	132/+	90	3.951	1-200	0.9964	0.86
L-异亮氨酸	132/+	90	4.274	1-200	0.9964	0.67
L-甲硫氨酸	150/+	100	4.615	1-200	0.9966	0.23
D-葡萄糖	179/-	100	4.917	20-200	0.9934	12.24
L-酪氨酸	182/+	100	5.134	2-200	0.9997	1.09
L-丙氨酸	90/+	90	7.358	1-200	0.9980	0.88
L-苏氨酸	120/+	90	7.534	1-200	0.9984	0.90
甘氨酸	76/+	90	8.218	5-200	0.9991	3.72
L-丝氨酸	106/+	90	8.387	5-200	0.9982	2.80
L-谷氨酰胺	147/+	90	8.512	2-200	0.9989	1.72
L-谷氨酸	148/+	90	10.100	2-200	0.9996	1.46
L-丙氨酰-L-谷氨酰胺	218/+	100	10.158	1-200	0.9952	0.54
L-天冬氨酸	132/-	90	11.537	2-200	0.9958	1.19
L-赖氨酸	147/+	90	11.969	1-150	0.9901	0.29

采用了两种 CHO 细胞培养方式 (A + B)，每天对生物反应器进行样品采集，以显示后一种 HILIC 方法在 Spent Media 分析中的适用性。营养物质的动态曲线如图 3 所示。在左侧的图中，所有化合物在培养过程中浓度均呈下降趋势。浓度增加的化

合物显示于右侧的图中。总体而言，培养基成分表明了一种典型的行为，例如，D-葡萄糖（碳源）和 L-谷氨酰胺/L-丙氨酰-L-谷氨酰胺（氮源）的消耗，或乳酸作为溢出代谢副产物的形成。化合物形成或消耗速率的细微差异表明不同 CHO 细

胞培养方式 (A 与 B) 具有不同的性能。通过在培养过程中应用这种 HILIC 方法，可以采取过程控制措施来控制流程并提高培养的产量。

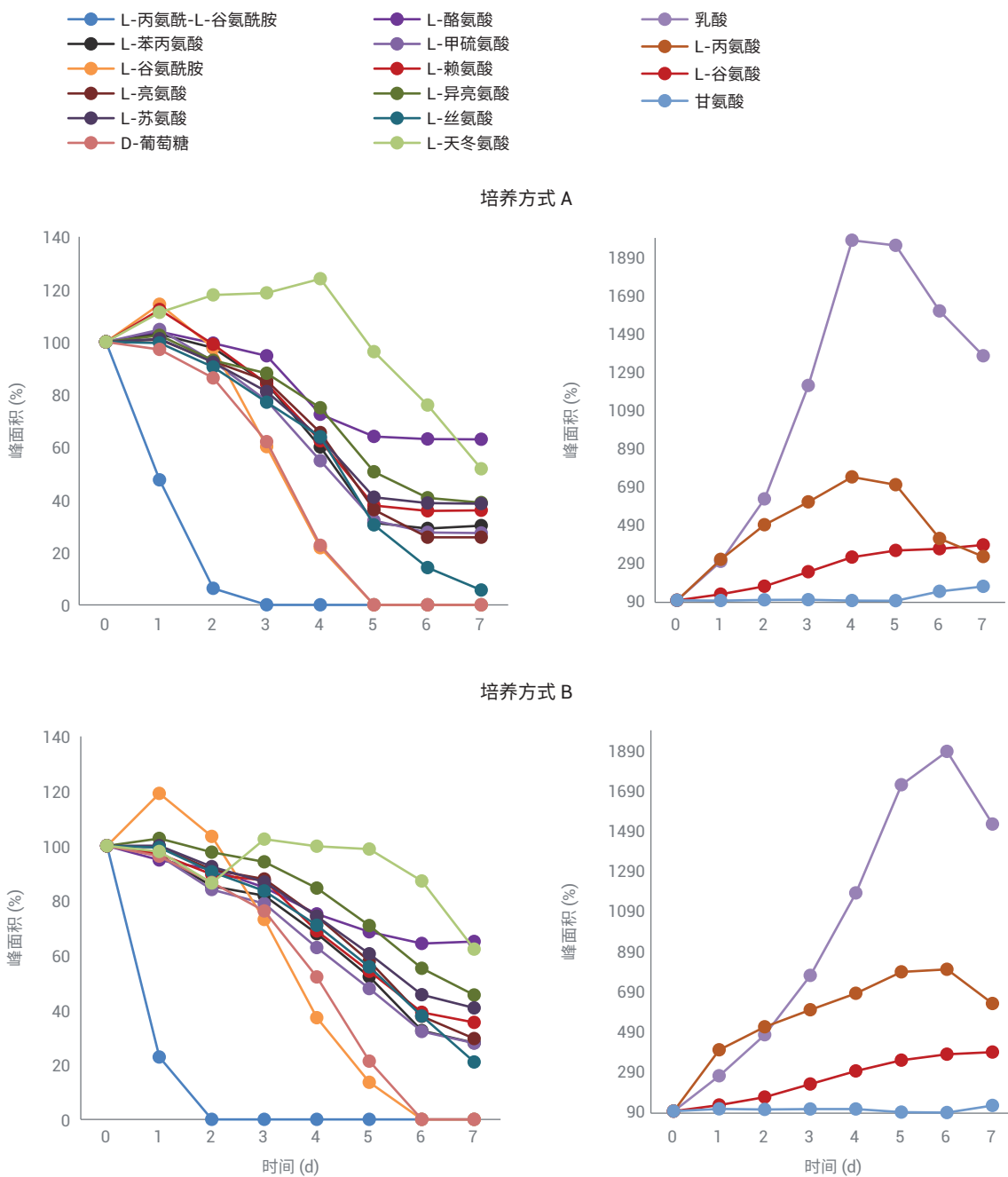


图 3. 细胞培养过程中 HILIC 分析的培养基化合物的曲线图

为了进一步监测过程变量，随后在相同的 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统中使用了 Protein A 亲和色谱，该系统包含全生物惰性流路，尤其适用于粘性生物分子和代谢物。使用所有四个可用的溶剂通道（A + B 用于 HILIC，C + D 用于 Protein A），两种方法均可在无需手动切换溶剂的情况下运行。此外，同时安装两根色谱柱，并将其控制在不同的温度，通过内部色谱柱选择阀进行切换，进一步减少了手动操作。开发和优化的 Protein A 方法如表 2 所示。图 4 显示了采用培养方式 A 的 Protein A 方法培养 6 天获得的 UV 色谱图。mAb 滴度在第 6 天达到最大值，然后下降，可能是由于与 Protein A 结合的 mAb Fc 区域发生热降解或酶促降解。

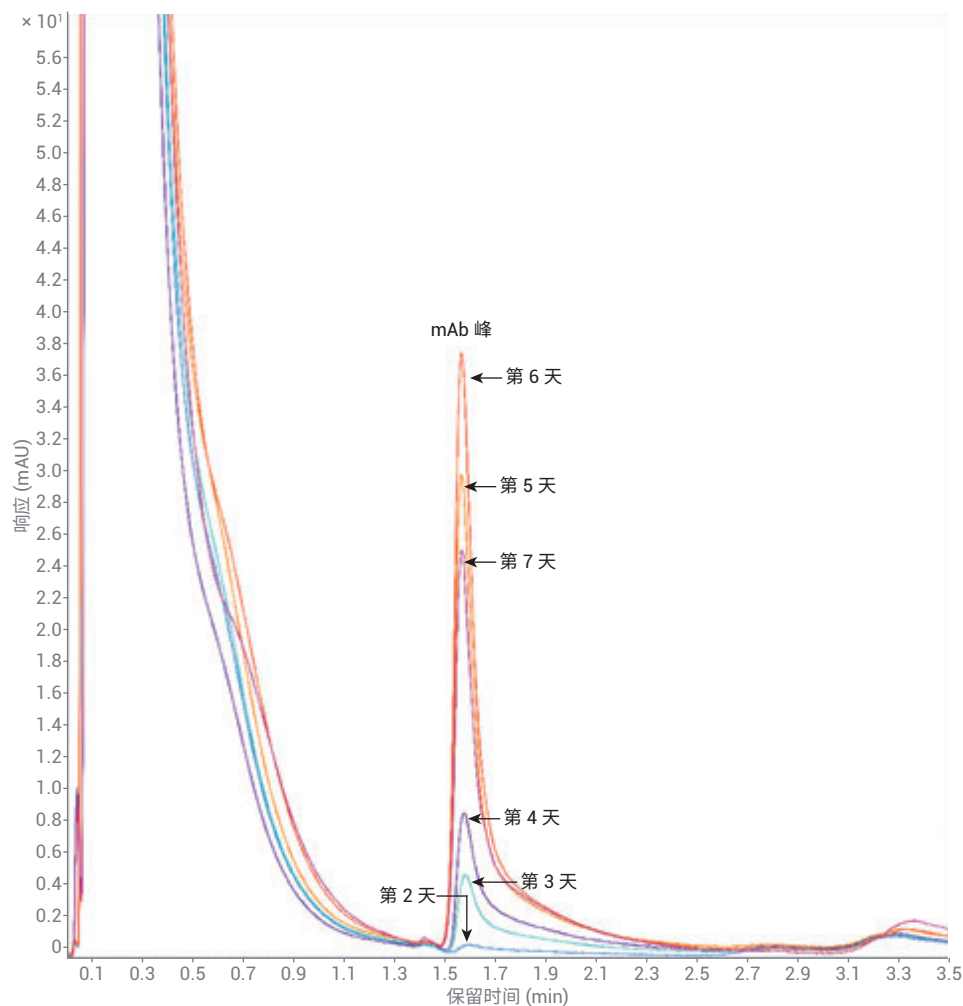


图 4. 在 6 天的发酵过程中，结合使用 Protein A 方法与 Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器（检测波长 280 nm）分析培养方式 A 的上清液样品获得的色谱图

在对 mAb 峰进行积分后，OpenLab 提供一种名为 Peak Explorer 的功能。图 5A 为 Peak Explorer 视图的截图，其中 Y 轴表示不同的进样，X 轴表示相应的保留时间。积分 mAb 峰的面积用圆形表示，圆形的直径与 mAb 的量成正比。该 Peak Explorer 视图提供动态 mAb 生产的快速定性和直观呈现。比较培养方式 A 和 B 的动态 mAb 积累可以发现，mAb 增加方面的差异变得明显（图 5B），这可能再次成为过程调整的信号。这两种方法的结合为在生产或过程开发环境中应用在线过程分析提供了出色的工具组合。

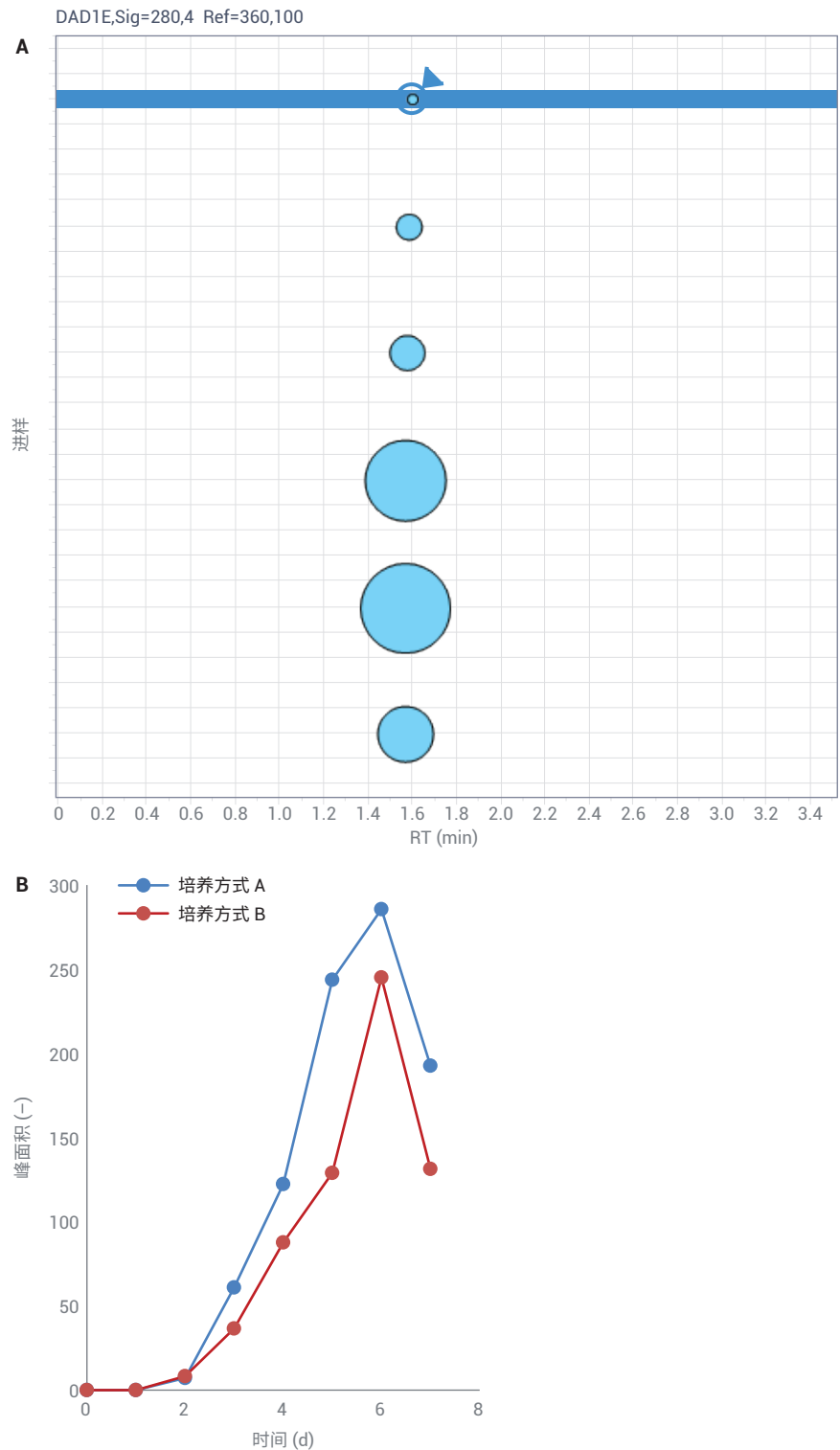


图 5. Agilent OpenLab CDS 中培养方式 A (A) 和培养期间 mAb 生产 (B) 的 Peak Explorer 视图截图

## 结论

过程分析技术 (PAT) 是在生产过程中调整和改进生物过程参数 (例如生长速率、产量和产品质量) 的强大工具。为便于理解, 我们在本应用简报中展示了 HPLC 测量作为过程控制手段的应用。本文所展示的以 LC/MSD iQ 为检测器的 HILIC 分析结果表明, 在易于使用的自动采集模式下, 关键细胞培养营养素具有出色的线性、灵敏度和选择性。通过将 Spent Media 分析与 Protein A 亲和色谱整合到 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱与具有自动化色谱柱切换功能的 LC/MSD IQ 的联用系统, 显著减少了手动操作。结合使用完全合格且可提供满足 21 CFR Part 11 要求的所有必要服务的 OpenLab CDS 2 软件, 这种在线 HPLC 解决方案完全适用于现代 QbD 环境。

## 参考文献

1. Tripathi, N. K.; Shrivastava, A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, *7*
2. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT Q8(R2). **2009**. Available at: [https://database.ich.org/sites/default/files/Q8\\_R2\\_Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q8_R2_Guideline.pdf). (Accessed: 20th April 2020)
3. Feith, A. *et al.* HILIC-Enabled <sup>13</sup>C Metabolomics Strategies: Comparing Quantitative Precision and Spectral Accuracy of QTOF High- and QQQ Low-Resolution Mass Spectrometry. *Metabolites* **2019**, *9*, 63

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

DE.028912037

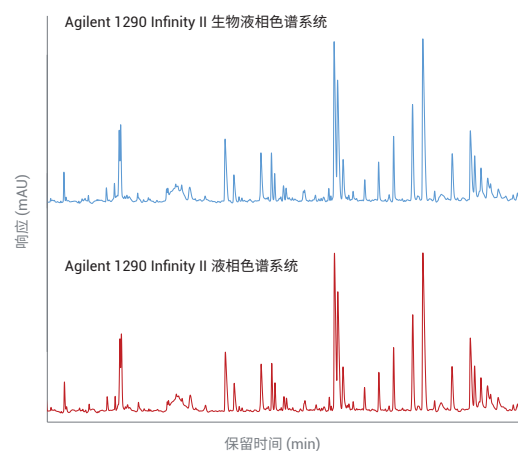
本文中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2020  
2020 年 7 月 16 日, 中国出版  
5994-2082ZHCN



## 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 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  $\mu$ L，RFID）
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6545XT)

Agilent 1290 Infinity II 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  $\mu$ 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
紫外检测	VWD: 214 nm, 10 Hz/MS: 见表 2
进样	进样量: 15 μL 样品温度: 4 °C 冲洗: 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
采集模式	正离子, 扩展动态范围 (2 GHz)
质量数范围	<i>m/z</i> 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。

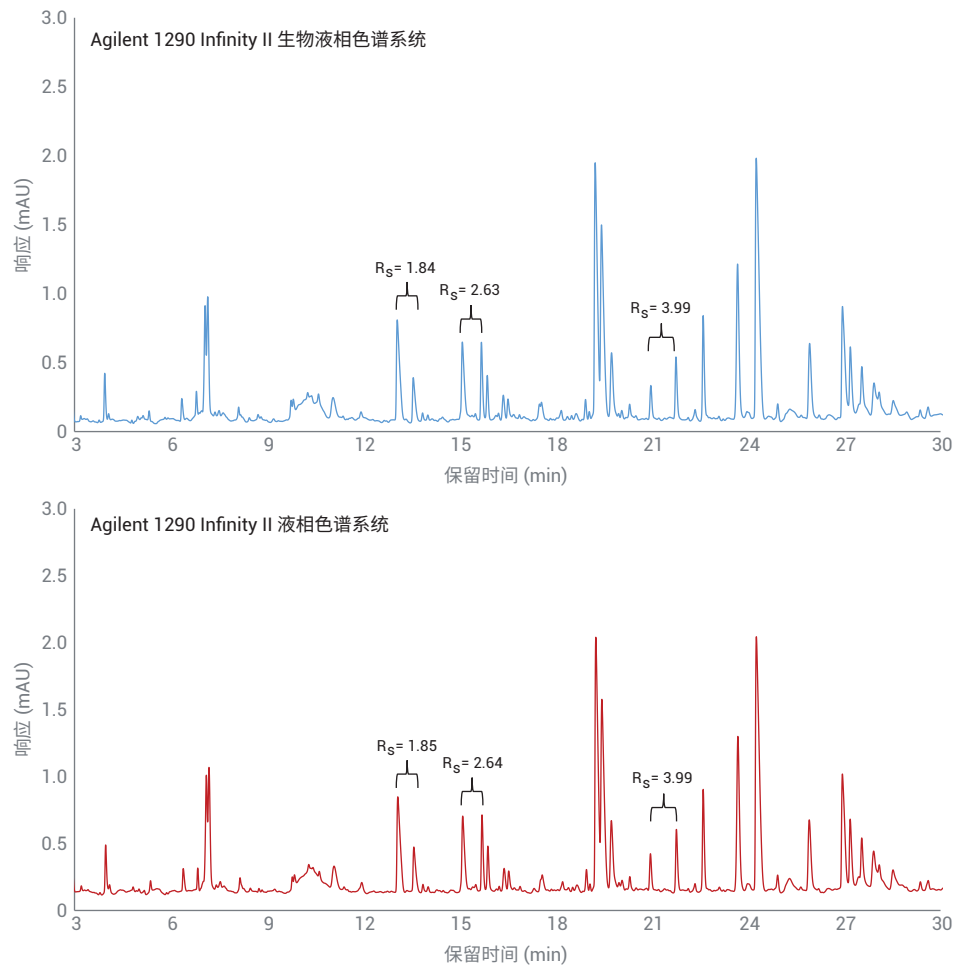


图 1. 由 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统使用相同方法 (表 1) 分离的 NISTmAb 胰蛋白酶酶解产物的色谱图

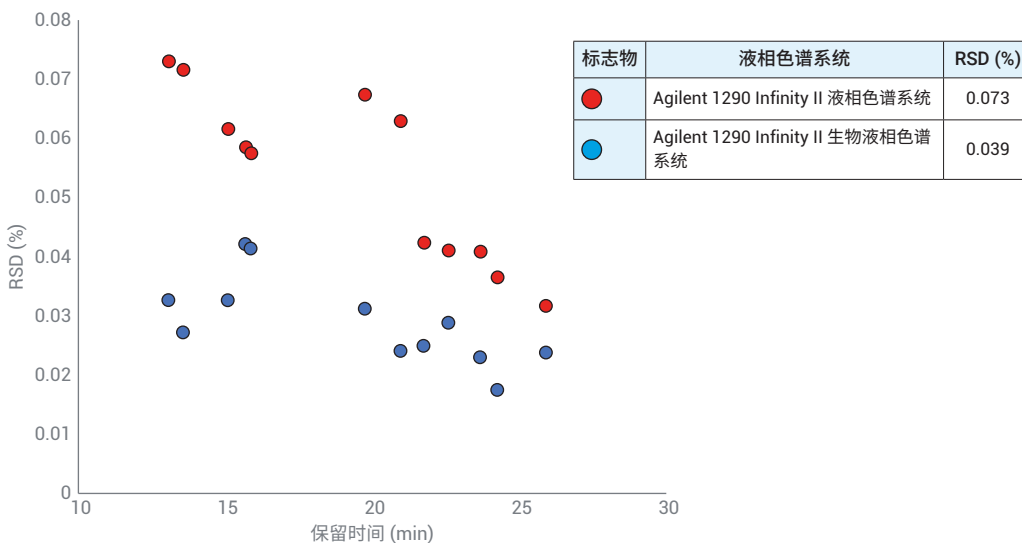


图 2. Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统的相对保留时间精度 (RSD) 值

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

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

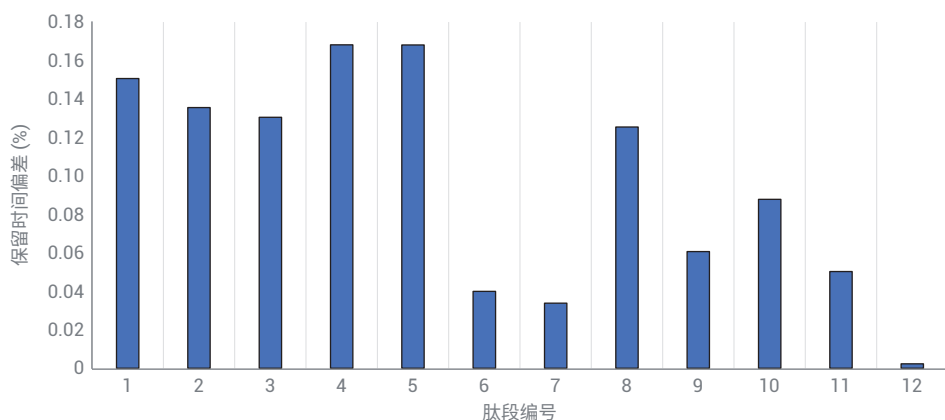


图 3. 两种液相色谱系统对所选 12 种肽段的平均保留时间及其偏差

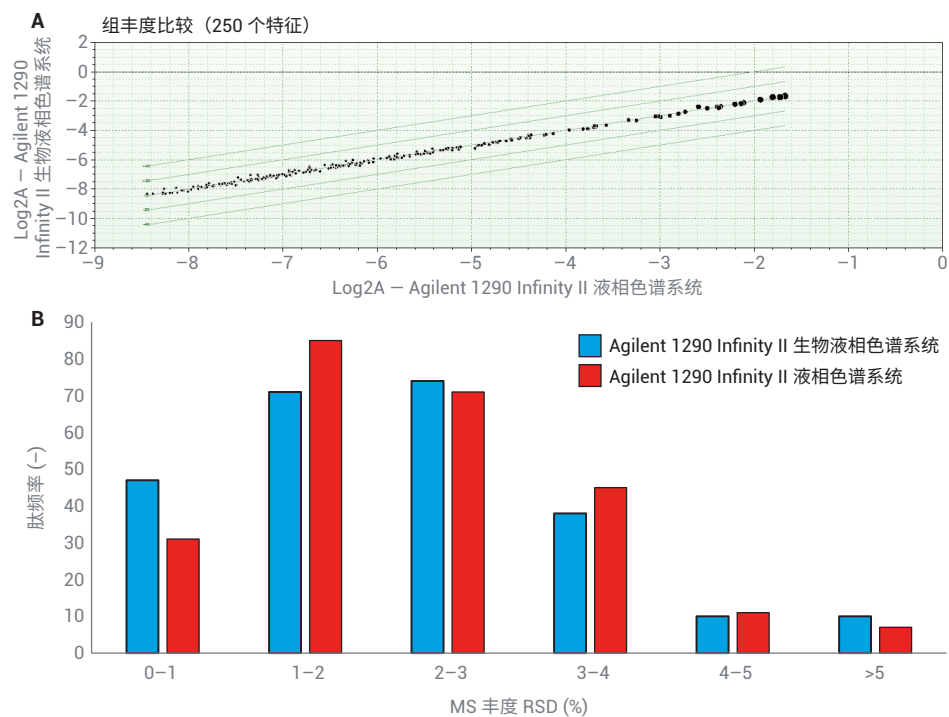


图 4. (A) 基于 10 次连续进样的统计相关性分析。黑点表示由 Agilent MassHunter Mass Profiler (B.10.00) 鉴定得到的 250 个最大丰度峰的倍数对数值。(B) Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 1290 Infinity II 液相色谱系统肽丰度 RSD 值的直方图

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，同时还具有无铁流路的优势。

## 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**. Available at: [https://database.ich.org/sites/default/files/Q6B\\_Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q6B_Guideline.pdf)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

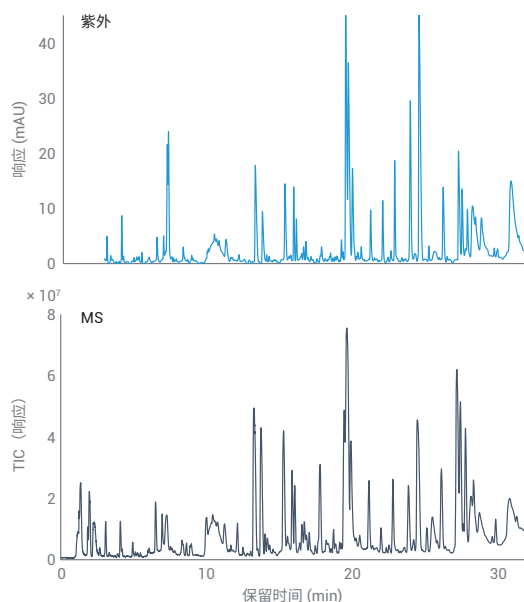
DE.44140.1323148148

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  
2020 年 11 月 19 日，中国出版  
5994-2836ZHCN

## 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首选系统 — 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。



表 1. 方法 A: NISTmAb 全面肽谱分析方法, 摘自 Mouchahoir & Schiel, 2018<sup>[5]</sup>

参数	值
色谱柱	Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 × 250 mm, 2.7 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 110.00 min – 45% B 110.01 min – 97% B 125.00 min – 97% B 125.01 min – 2% B 150.00 min – 2% B
流速	0.200 mL/min
温度	40 °C, 装有热平衡装置
检测	VWD: 214 nm, 10 Hz/MS: 见表 3
进样	进样量: 15 μL 样品温度: 4 °C 冲洗: 用水冲洗 3 s (清洗口)

表 2. 方法 B: 优化且时间缩短的肽谱分析方法

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
紫外检测	VWD: 214 nm, 10 Hz/MS: 见表 3
进样	进样量: 15 μL 样品温度: 4 °C 冲洗: 用水冲洗 3 s (清洗口)

表 3. 多肽迭代 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	325 °C
干燥气流速	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
采集模式	扩展动态范围 (2 GHz)
质量数范围	<i>m/z</i> 100–1700
采集速率	8 质谱图/秒
自动 MS/MS 范围	<i>m/z</i> 50–1700
分离峰宽	窄 (约 <i>m/z</i> 1.3)
母离子/循环	10
碰撞能量	电荷态 2: 3.1 (斜率) 和 1 (偏移) 电荷态 3 和 > 3: 3.6 (斜率) 和 -4.8 (偏移)
母离子阈值	1000 响应值和 0.001%
主动排除	采集一个谱图后排除 0.2 min
扫描速度基于母离子丰度	是, 25000 响应值/质谱图
MS/MS 累积时间限	是
纯度	严格性: 100%/截留率: 30%
同位素模型	肽
母离子排序	先按电荷态, 再按丰度进行排序

## 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）。

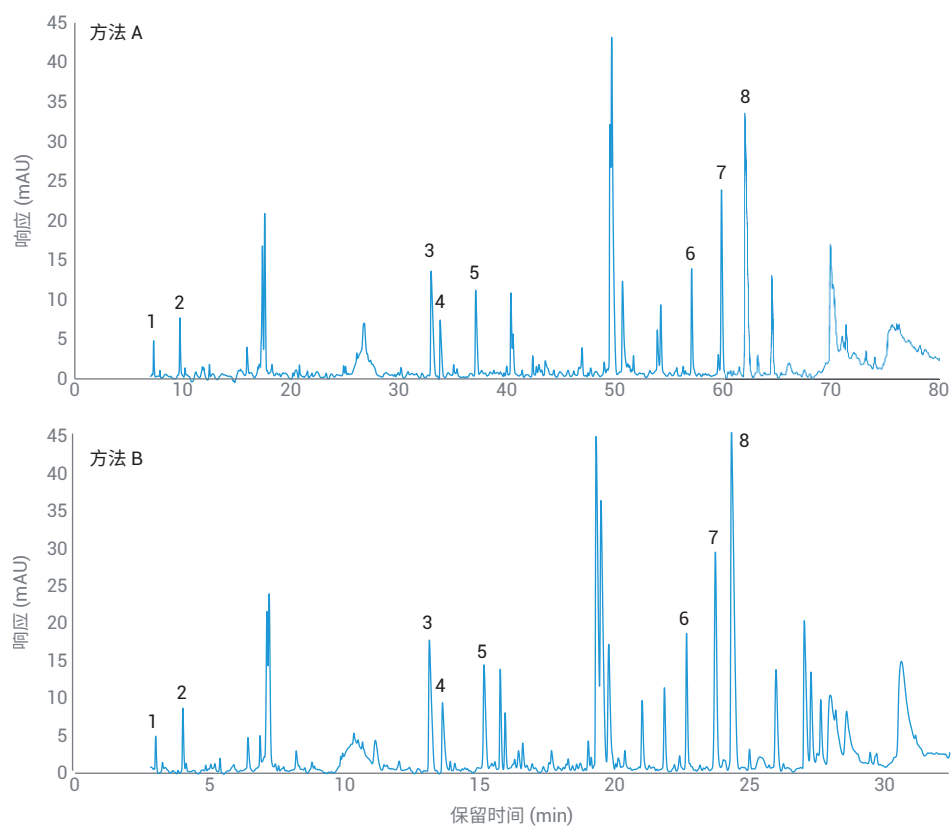
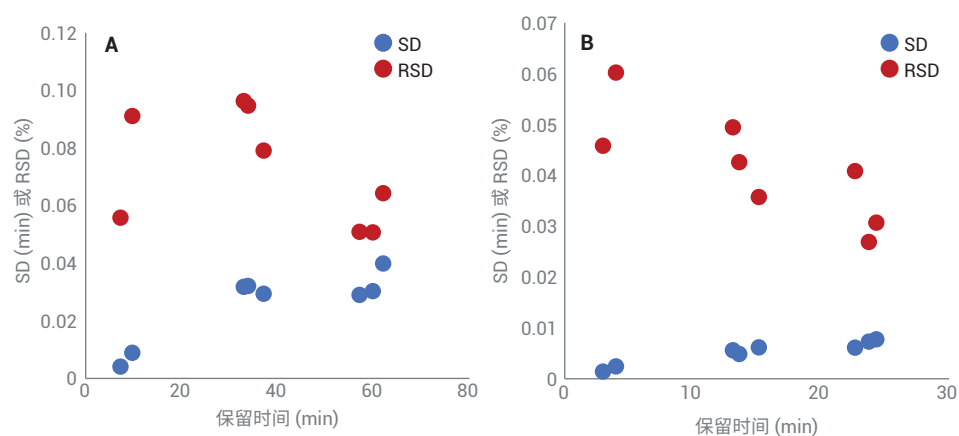


图 1. 使用方法 A 和 B，通过 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分离 NISTmAb 胰蛋白酶酶解产物得到的色谱图。选取 8 个峰用于后续的保留时间精度和峰容量计算



	梯度斜率 (%B/min)	$\emptyset$ SD (min)	$\emptyset$ RSD (%)	$P_{C_{40}}$ (-)
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

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）下仍可实现卓越的性能。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。

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 (GFYPDSIAVEWESNGQPENNYK)<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。

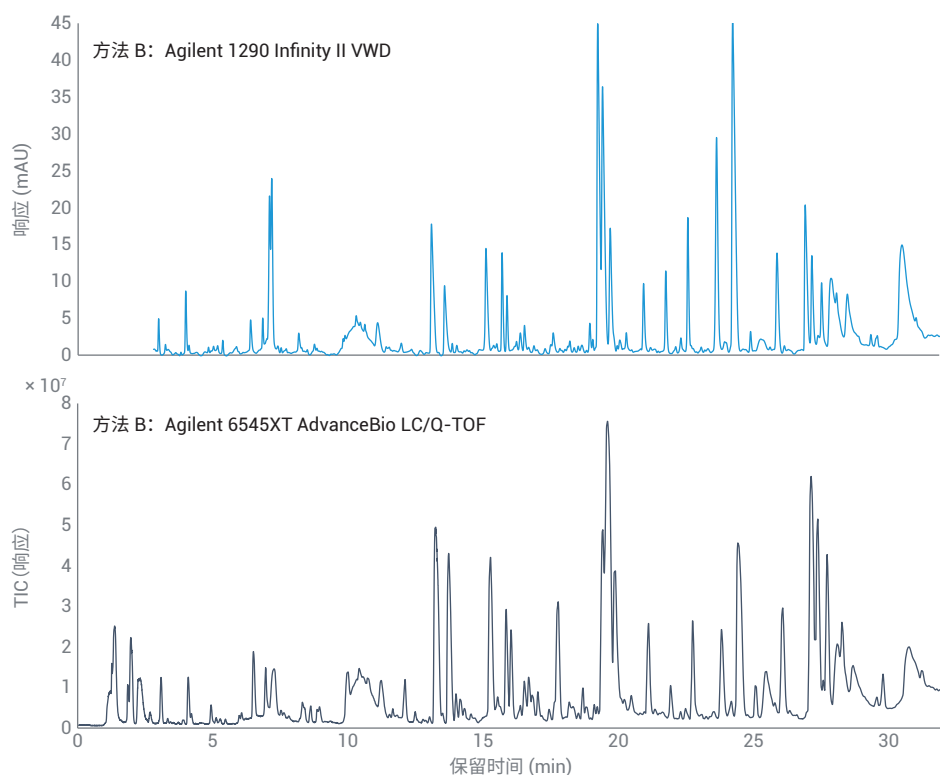


图 3. 使用配备生物兼容性微量流池的 Agilent 1290 Infinity II VWD（上图）和 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF（下图），检测 NISTmAb 胰蛋白酶酶解产物得到的色谱图

## 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
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

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

DE.1797222222

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  
2020 年 10 月 12 日, 中国出版  
5994-2718ZHCN

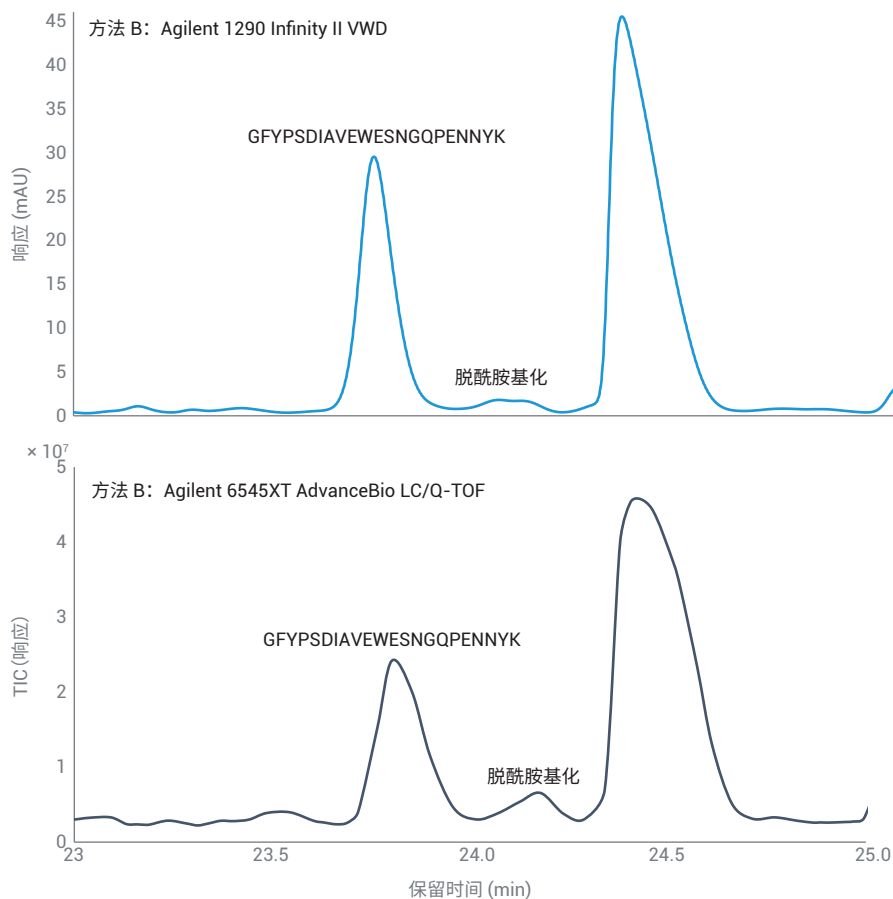
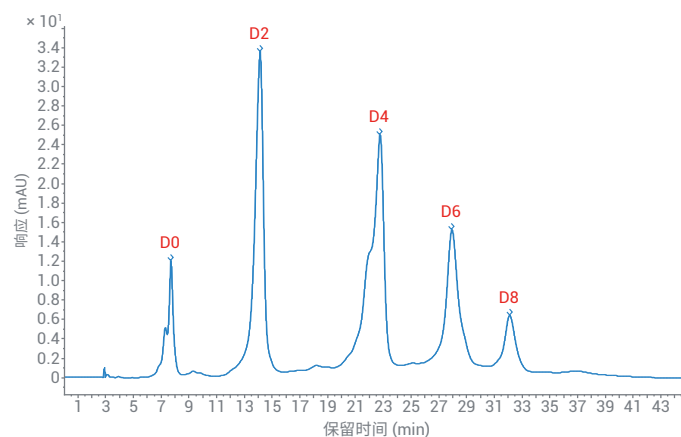


图 4. 先前色谱图的放大视图, 突出显示 PENNY 肽 (GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK) 和相应脱酰胺基化异构体的分离

## 高盐 — 高重现性

使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统通过疏水相互作用色谱分析抗体药物偶联物



### 作者

Sonja Schneider  
安捷伦科技有限公司

### 摘要

通常使用疏水相互作用色谱 (HIC) 测定药物/抗体比率 (DAR)。这种温和的非变性分析方法的洗脱液含有高浓度腐蚀性盐，对液相色谱 (LC) 系统提出了挑战。

Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统包括高速泵及其完全不含铁的流路，非常适合用于生物色谱条件，可避免对系统造成潜在的腐蚀性损坏。本应用简报介绍了使用 HIC 测定本妥昔单抗 ADC 的 DAR。经计算，DAR 为每个抗体 3.7 个药物分子。所得结果具有良好的重现性，证明 1290 Infinity II 生物液相色谱仪作为新一代安捷伦高端液相色谱系统，生成的数据具有超高可信度。“空白扣除”是 Agilent OpenLab CDS 的一项软件功能，可以消除由于硫酸铵纯度较低造成的基线漂移，从而实现平滑积分。

## 前言

抗体药物偶联物 (ADCs) 是与细胞毒性小分子药物通过化学方法连接的单克隆抗体 (mAbs)<sup>[1]</sup>。与单独的抗体相比, 其结构更为复杂, 且具有异质性。

半胱氨酸连接的 ADCs<sup>[2]</sup> (如本妥昔单抗 ADC, 商品名为 Adcetris, 由 Takeda 原研) 将小分子连接到部分还原 mAb 的游离巯基上<sup>[3,4]</sup>。游离巯基的数量限制了可偶联药物特定位置的数量, 结果形成每个抗体包含 0、2、4、6、8 个药物分子的混合物。与 mAb 偶联的平均药物分子数量是 ADC 最重要的质量属性之一, 因为它直接影响 ADC 的安全性和有效性。DAR 决定了可以递送到所需组织的有效载药量<sup>[5]</sup>。

HIC 是分离每个抗体的载药量不同的半胱氨酸连接的 ADC 分子的参考技术<sup>[6]</sup>。相对疏水性随 ADC 载药量的增加而增加, 因为与 mAb 连接的小分子通常相对具有疏水性。因此, HIC 非常适用于监测 DAR。

HIC 是一种可以保持天然蛋白结构的非变性分析技术。它通常在中性 pH 条件下进行, 可以使用从高到低的盐梯度分离蛋白质。分离原理与蛋白质盐析实验相同<sup>[6]</sup>。在流动相 A 中使用高浓度盐缓冲液, 蛋白质失去水化层, 保留在固定相的疏水表面。流动相 B 通常为相同的缓冲液 (主要是磷酸盐), 不添加盐。随着流动相 B 在梯度中的占比增加, 蛋白质重新形成水化层并从色谱柱中洗脱。加入少量有机溶剂 (如异丙醇) 也有助于从色谱柱中洗脱蛋白质。

1290 Infinity II 生物液相色谱是新一代安捷伦高端液相色谱系统, 专为生物色谱条件 (如 2 mol/L NaCl<sup>[7]</sup>、高达 8 mol/L 尿素的高盐浓度, 以及如 0.5 mol/L NaOH 或 0.5 mol/L HCl 的高/低 pH 溶剂) 而设计。样品流路完全不含不锈钢 (SST) 或铁; 贯穿 Multisampler、高容量柱温箱和检测器的所有毛细管和接头均由 MP35N (一种镍钴合金) 制成。这种材料可以减少高浓度盐缓冲液的潜在腐蚀, 避免因铁离子存在引起的蛋白质修饰 (如氧化、蛋白质复合物形成)。

本应用简报介绍了使用 HIC 测定本妥昔单抗 ADC 的 DAR, 评价了保留时间和峰面积的精度。此外, 还展示了 OpenLab 2 数据处理方法中的“空白扣除”功能过滤漂移基线的优势。

## 实验部分

### 设备

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 高容量柱温箱 (G7116B), 配备标准流速生物兼容性热交换器
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (G7114B), 配备生物兼容性微量流通池, 3 mm, 2  $\mu$ L

### 软件

Agilent OpenLab CDS 2.5 版

### 色谱柱

Agilent AdvanceBio HIC 色谱柱, 3.5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  100 mm (部件号 685975-908)

### 化学品

所有试剂纯度均为液相色谱级。异丙醇购自 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)。磷酸二氢钠一水合物、磷酸氢二钠七水合物和硫酸铵购自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)。

### 样品

本妥昔单抗 ADC (商品名 Adcetris, 来自 Takeda, Tokyo, Japan) 溶于一半水、一半溶剂 A (见下文), 浓度为 100 mg/mL。

**注:** 由于 Adcetris 含有多种佐剂, 此处提及的浓度不只是蛋白质浓度, 而是药物所有组分的总浓度。

### 缓冲液配制

**A:** 1.5 mol/L 硫酸铵溶于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7

**B:** 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7 + 20% 异丙醇

配制 2 L 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7): 取 5.84 g 磷酸二氢钠一水合物和 15.47 g 磷酸氢二钠七水合物加入 2 L 棕色瓶中, 用超纯水定容至 2 L。测量 pH 值, 如有需要, 将 pH 值调至 7。然后, 将 198.21 g 硫酸铵 (总浓度 1.5 mol/L)

加入 1 L 棕色空瓶中，用配制好的磷酸盐缓冲液定容至 1 L (→ 缓冲液 A)。测量 pH 值，如有需要，将 pH 值调回 7 (加入大量盐可改变 pH 值)。将 200 mL 异丙醇和 800 mL 配制好的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7) 混合并加入 1 L 棕色空瓶中 (→ 缓冲液 B)。配制的缓冲液均使用 0.2 μm 滤膜过滤。

**注：**与 mAb 偶联的疏水性药物小分子的存在导致整体疏水性相应增加。因此，有必要在流动相中加入一些有机改性剂 (此处加入 20% 异丙醇)。

## 方法

表 1. 盐梯度色谱条件

参数	值
溶剂	A) 1.5 mol/L 硫酸铵溶于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7 B) 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7 + 20% 异丙醇
梯度	0 min 时 30% B, 30 min 时 100% B 停止时间: 45 分钟 后运行时间: 10 分钟
流速	0.400 mL/min
温度	25 °C
检测	280 nm, 10 Hz
进样	进样量: 15 μL 样品温度: 10 °C 进样针清洗: 用水清洗 3 秒

**注：**在 HIC 中使用高盐流动相需要一台能够耐受高盐的液相色谱系统，而 1290 Infinity II 生物液相色谱系统完全不含不锈钢 (SST)/不含铁的流路避免了高浓度盐缓冲液的潜在腐蚀。此外，密封垫清洗和进样针清洗等清洗功能有助于避免出现盐析问题。然而，避免使液相色谱系统或色谱柱暴露于高浓度盐溶液中仍然很重要。

**注：**使用高浓度盐溶液作为洗脱液时，需要在泵方法中设置相应溶剂类型。例如，对于含 1.5 mol/L 硫酸铵的溶剂 A，在泵方法的溶剂选择字段使用“硫酸铵 1.5 mol/L”而非一般水相或水。高浓度盐可改变溶剂的压缩系数，因此使用预先配置的溶剂表可以使泵达到理想性能。

## 结果与讨论

图 1 显示了本妥昔单抗 ADC 的分析结果，5 个主峰分别对应于含 0、2、4、6、8 个小分子药物的 mAb。HIC 分析既可以表征药物连接异构体的分布，也可以测定 DAR。

虽然链间二硫键被偶联的药物破坏和占据，但抗体链间的共价键和非共价键力相结合足以使 mAb 在分析过程中保持完整形态。这是由于 HIC 在温和的非变性条件下进行，使其成为分析半胱氨酸连接 ADCs 的理想选择。图 1 中的每个峰对应分别一个完整的 mAb 异构体，附着的药物分子数量不断增加 (D0-D8 对应 0-8 个结合分子)。通过比较本妥昔单抗 ADC 的 HIC 色谱图与文献中的色谱图，确定了这些峰<sup>[6]</sup>。

通过对每个峰的峰面积及其各自载药量进行积分，能够计算总体 DAR (公式 1)。

公式 1.

$$DAR = \sum_{n=0}^8 \frac{LC \text{ 峰面积} \times n_{\text{药物}}}{\text{总 LC 峰面积}}$$

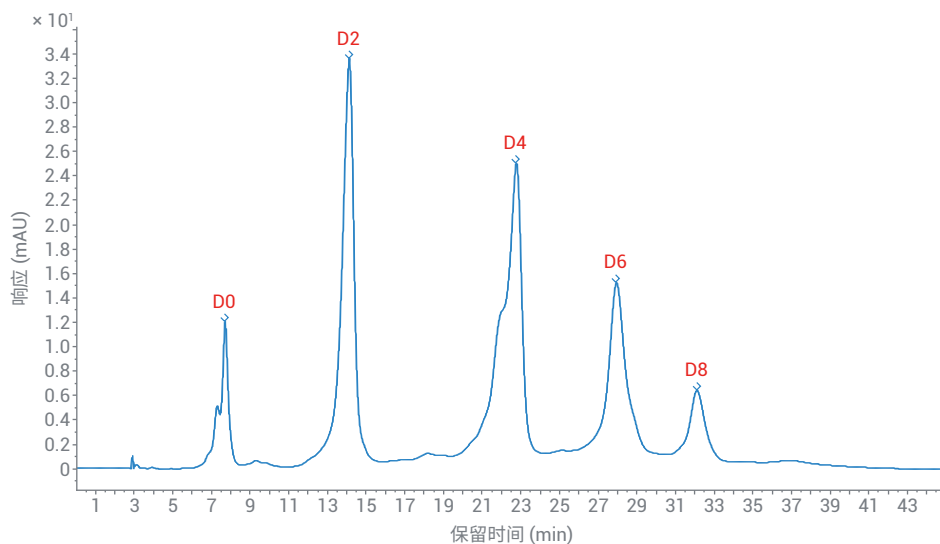


图 1. 使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分析本妥昔单抗 ADC。D0-D8 表示不同的 DAR 异构体



由 5 个观测峰的峰面积积分和峰面积百分比计算得到的 DAR 约为 3.7 (见表 2)。这一数值与文献一致<sup>[6]</sup>。

我们还评估了保留时间 (RT) 和峰面积的精度 (图 2)。经过 7 次后续运行, 经计算 RT 的相对标准偏差 (RSD) 低于 0.081%, 表明 RT 具有良好的精度。峰面积的精度也十分出色, RSD < 0.282% (见图 2 的表)。

硫酸铵是 HIC 分析中一种极其常用的离液盐。通常使用的盐浓度范围为 1-2 mol/L, 这个浓度相当大。如果在分析中使用较低纯度的盐 (有时从盐晶体的颜色即可看出), 色谱图的基线会发生明显漂移, 造成潜在的积分误差。为了解决这个问题, 可使用一种称为“空白扣除”的软件功能利用空白进样过滤基线漂移。此功能可在 OpenLab 2 的数据处理方法中找到 (参见图 3)。图 4 显示了应用该功能之前和之后具有不同基线行为的色谱图。

表 2. DAR 异构体结果

DAR 异构体	RT (min)	峰面积	峰面积%	DAR 计算值
D0	7.68	378.116	7.59	0
D2	14.12	1537.829	30.84	0.6196
D4	22.78	1756.026	35.22	1.415
D6	27.98	951.983	19.13	1.1506
D8	32.15	340.176	6.79	0.5482
			<b>DAR</b>	<b>3.733</b>

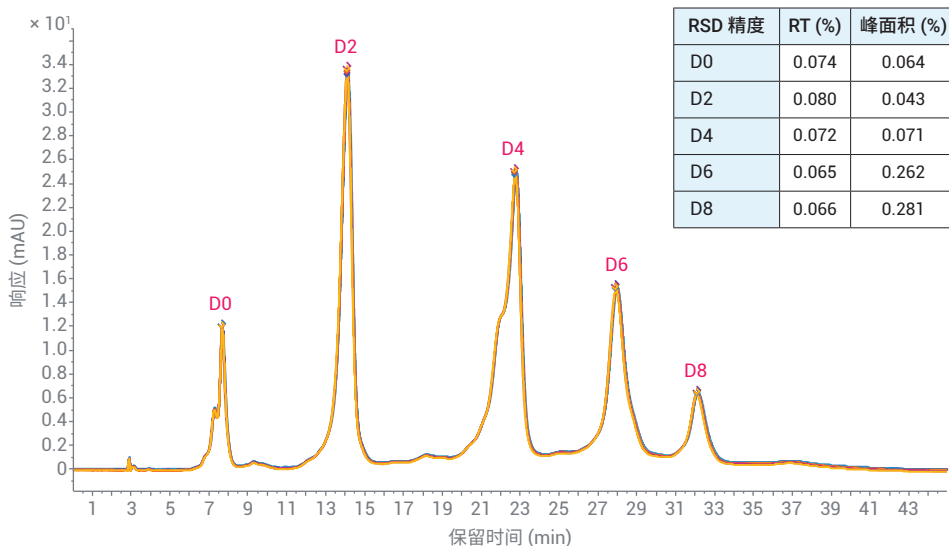


图 2. 使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分离本妥昔单抗 ADC (7 次后续运行的叠加色谱图)

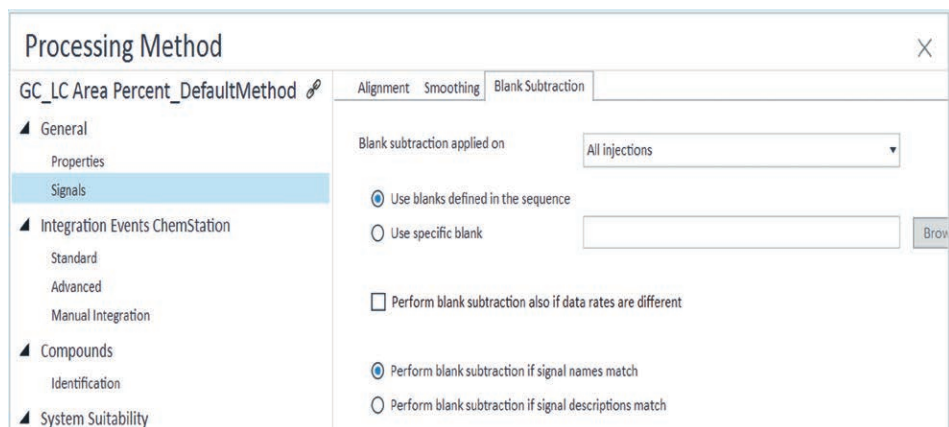


图 3. Agilent OpenLab CDS 2 的数据处理方法中“空白扣除”功能的屏幕截图



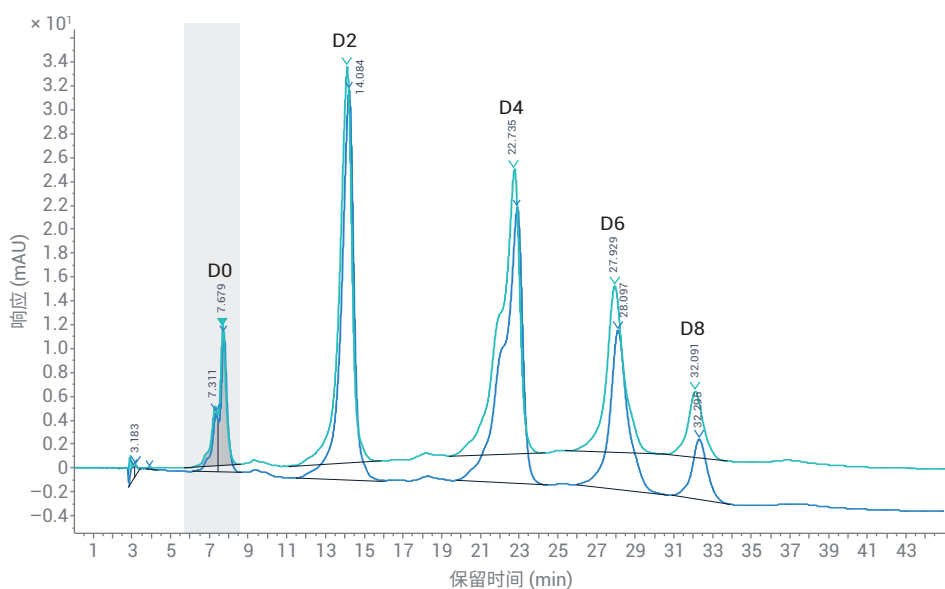


图 4. 空白扣除前（蓝色）和扣除后（绿色）的 HIC 色谱图比较

## 结论

在 Infinity II 1290 生物液相色谱系统上使用 HIC 法分析了本妥昔单抗 ADC。5 种预期 DAR 异构体均得到很好分离，分别对应于含 0、2、4、6、8 个小分子药物的 mAb。HIC 分析既可以表征药物连接异构体的分布，也可以测定 DAR，经计算为每个抗体 3.7 个药物分子。7 次后续运行的精度分析显示了 RT 和峰面积的出色重现性。HIC 中使用的洗脱液含有高浓度的腐蚀性盐，对液相色谱系统带来了挑战。由于具有完全不含铁样品流路，1290 Infinity II 生物液相色谱系统非常适合在生物色谱条件下使用，可避免对系统造成潜在的腐蚀性损坏。

OpenLab 2 软件的空白扣除功能使用户可在分析中使用纯度更低的硫酸铵，而不会对结果产生负面影响。只需扣除空白运行即可校正基线，以实现平滑的积分计算。

1290 Infinity II 生物液相色谱仪的生物兼容性硬件与 OpenLab 2 的新软件功能相结合，产生的数据具有超高可信度。

## 参考文献

1. McCombs, J. R.; Owen, S. C. Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry. *J. Amer. Assoc. Pharm. Sci.* **2015**, *17*(2), 339–51
2. Marcoux, J. *et al.* Native Mass Spectrometry and Ion Mobility Characterization of Trastuzumab Emtansine, a Lysine-Linked Antibody Drug Conjugate. *Protein Sci.* **2015**, *24*, 1210–1223
3. Younes, A. *et al.* Brentuximab Vedotin (SGN-35) for Relapsed CD30-Positive Lymphomas. *N. Eng. J. Med.* **2010**, *363*(19), 1812–1821
4. Schneider, S. Analysis of Cysteine-Linked Antibody Drug Conjugates (半胱氨酸连接的抗体药物偶联物的分析), *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-8493EN, **2017**
5. Wakankar, A. *et al.* Analytical Methods for Physicochemical Characterization of Antibody Drug Conjugates. *mAbs* **2011**, *3*(2), 161–172
6. Rodriguez-Aller, M. *et al.* Practical Method Development for the Separation of Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug-Conjugate Species in Hydrophobic Interaction Chromatography, Part 1: Optimization of the Mobile Phase. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *118*, 393–403
7. 卓越性能, 可靠结果, 不负重托: Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统, *安捷伦科技公司产品样本*, 出版号 5994-2376ZHCN, **2020**
8. van de Donk, N. W. C. J.; Dhimolea, E. Brentuximab Vedotin. *mAbs* **2012**, *4*(4), 458–465

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

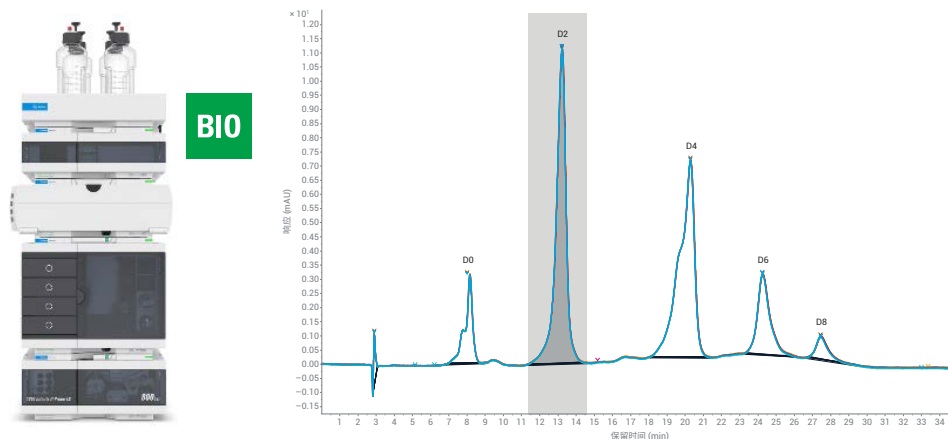
DE.9605902778

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  
2020年10月12日, 中国出版  
5994-2691ZHCN

## 便捷、可靠地分析抗体药物偶联物

在 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统上使用三元梯度进行药物-抗体比率测定



### 作者

Sonja Schneider  
安捷伦科技有限公司

### 摘要

在疏水相互作用色谱 (HIC) 中加入异丙醇等有机改性剂是降低疏水性抗体药物偶联物 (ADC) 的保留能力以及调整选择性的重要参数。本应用简报展示了使用三元梯度并将异丙醇作为第三通道中的有机改性剂, 对本妥昔单抗 ADC 进行的药物-抗体比率 (DAR) 测定。结果表明, Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统对于这种具有挑战性的高浓度盐缓冲液和有机溶剂组合具有出色的重现性, 使之成为新一代安捷伦高端液相色谱系统, 可生成高度可靠的数据。

## 前言

ADC 是与细胞毒性小分子药物通过化学方法连接的单克隆抗体 (mAb)<sup>[1]</sup>。与单独的抗体相比,其结构更为复杂,且具有异质性。

半胱氨酸连接的 ADC (例如本妥昔单抗 ADC) 在链间二硫键还原后生成,从而形成可与特定马来酰亚胺连接物偶联的游离巯基。游离巯基的数量限制了可偶联药物特定位置的数量,结果形成每个抗体包含 0 (D0)、2 (D2)、4 (D4)、6 (D6)、8 (D8) 个药物分子的混合物。

特别是由于高 DAR 物质的疏水性,加入有机改性剂 (例如异丙醇) 有助于从 HIC 柱中完全洗脱。通常,在二元梯度中,将改性剂添加到用于洗脱的流动相 (通常是含有少量盐或不含盐的缓冲液) 中。

Agilent 1260 Infinity II 生物全能泵作为四元泵,可以使用第三通道添加有机改性剂。由于两种溶剂在泵中混合时可能形成盐晶体,因此高浓度盐缓冲液与有机流动相的结合至关重要。

1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统是新一代安捷伦高端液相色谱系统,专为生物色谱条件而设计:样品流路完全不含不锈钢 (SST) 或铁;贯穿 Multisampler、高容量柱温箱和检测器的所有毛细管和接头均由 MP35N (一种镍钴合金) 制成。因此,1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统非常适合用于生物色谱条件,凭借通常用于 HIC 的高浓度腐蚀性盐,可避免对系统造成潜在的腐蚀性损坏。

## 实验部分

### 设备

Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统,包括以下模块:

- Agilent 1260 Infinity II 生物全能泵 (G7131C)
- 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 (G7116B), 配备标准流速生物兼容性热交换器
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (G7114B), 配备生物兼容性微量流通池, 3 mm, 2  $\mu$ L

### 软件

Agilent OpenLab CDS 2.5 版或更新版本

### 色谱柱

Agilent AdvanceBio HIC 色谱柱, 3.5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  100 mm (部件号 685975-908)

### 化学品

所有试剂纯度均为液相色谱级。异丙醇购自 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)。磷酸二氢钠一水合物、磷酸氢二钠七水合物和硫酸铵购自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)。

## 样品

本妥昔单抗 ADC (商品名 Adcetris, 来自 Takeda, Tokyo, Japan) 溶于 50% 水: 50% 溶剂 A (见下文), 浓度为 100 mg/mL。

**注:** 由于 Adcetris 含有多种佐剂, 此处提及的浓度不只是蛋白质浓度, 而是药物所有组分的总浓度。

### 缓冲液配制

- A) 1.5 mol/L 硫酸铵溶于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7
- B) 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7
- C) 异丙醇

配制 2 L 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7): 取 5.84 g 磷酸二氢钠一水合物和 15.47 g 磷酸氢二钠七水合物加入 2 L 棕色瓶中, 用超纯水定容至 2 L。测量 pH 值, 如有需要, 将 pH 值调至 7 (缓冲液 B)。将 198.21 g 硫酸铵 (总浓度 1.5 mol/L) 加入 1 L 棕色空瓶中, 用配制好的磷酸盐缓冲液定容至 1 L ( $\rightarrow$  缓冲液 A)。测量 pH 值, 如有需要, 将 pH 值调至 7 (加入大量盐可改变 pH 值)。配制的缓冲液均使用 0.2  $\mu$ m 滤膜过滤。

## 方法

色谱条件	
参数	值
溶剂	A) 1.5 mol/L 硫酸铵溶于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7 B) 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7 C) 异丙醇
梯度	梯度: 0 min 55% A, 40% B, 5% C 25 min 0% A, 75% B, 25% C 停止时间: 35 min 后运行时间: 10 min
流速	0.400 mL/min
温度	25 $^{\circ}$ C
检测	280 nm 10 Hz
进样	进样量: 15 $\mu$ L 样品温度: 10 $^{\circ}$ C 进样针清洗: 用水清洗 3 秒

**注：**在 HIC 中使用高盐流动相需要一台能够耐受高盐的液相色谱系统，而 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统完全不含不锈钢 (SST)/不含铁的流路避免了高浓度盐缓冲液的潜在腐蚀。此外，密封垫清洗和进样针清洗等清洗功能有助于避免出现盐析问题。然而，避免使液相色谱系统或色谱柱暴露于高浓度盐溶液中仍然很重要。

**注：**使用高浓度盐溶液作为洗脱液时，需要在泵方法中设置相应溶剂类型。例如，对于含 1.5 mol/L 硫酸铵的溶剂 A，在泵方法的溶剂选择字段使用硫酸铵

1.5 mol/L 而非一般水相或水。高浓度盐可改变溶剂的压缩系数，因此使用预先配置的溶剂表可以使泵达到理想性能。

## 结果与讨论

图 1 显示了本妥昔单抗 ADC 的分析结果，5 个主峰分别对应于含 0、2、4、6、8 个小分子药物的 mAb。图 1 中的每个峰对应分别一个完整的 mAb 异构体，附着的药物分子数量不断增加 (D0-D8 对应 0-8 个结合分子)。通过比较本妥昔单抗 ADC 的 HIC 色谱图与文献中的色谱图，确定了这些峰<sup>[2]</sup>。

我们评估了保留时间 (RT) 和峰面积的精度。通过 7 次后续运行，经计算 RT 的相对标准偏差 (RSD) 低于 0.055%，表明 RT 具有良好的精度。这证明了四元泵在运行三元梯度方面的出色性能，即使在使用高浓度盐缓冲液 (例如本研究使用的 1.5 mol/L 硫酸铵缓冲液) 和异丙醇这样极具挑战性的组合作为有机改性剂的情况下也是如此。峰面积的精度也十分出色，RSD < 0.46% (最后一个峰除外) (见图 1 的表)。

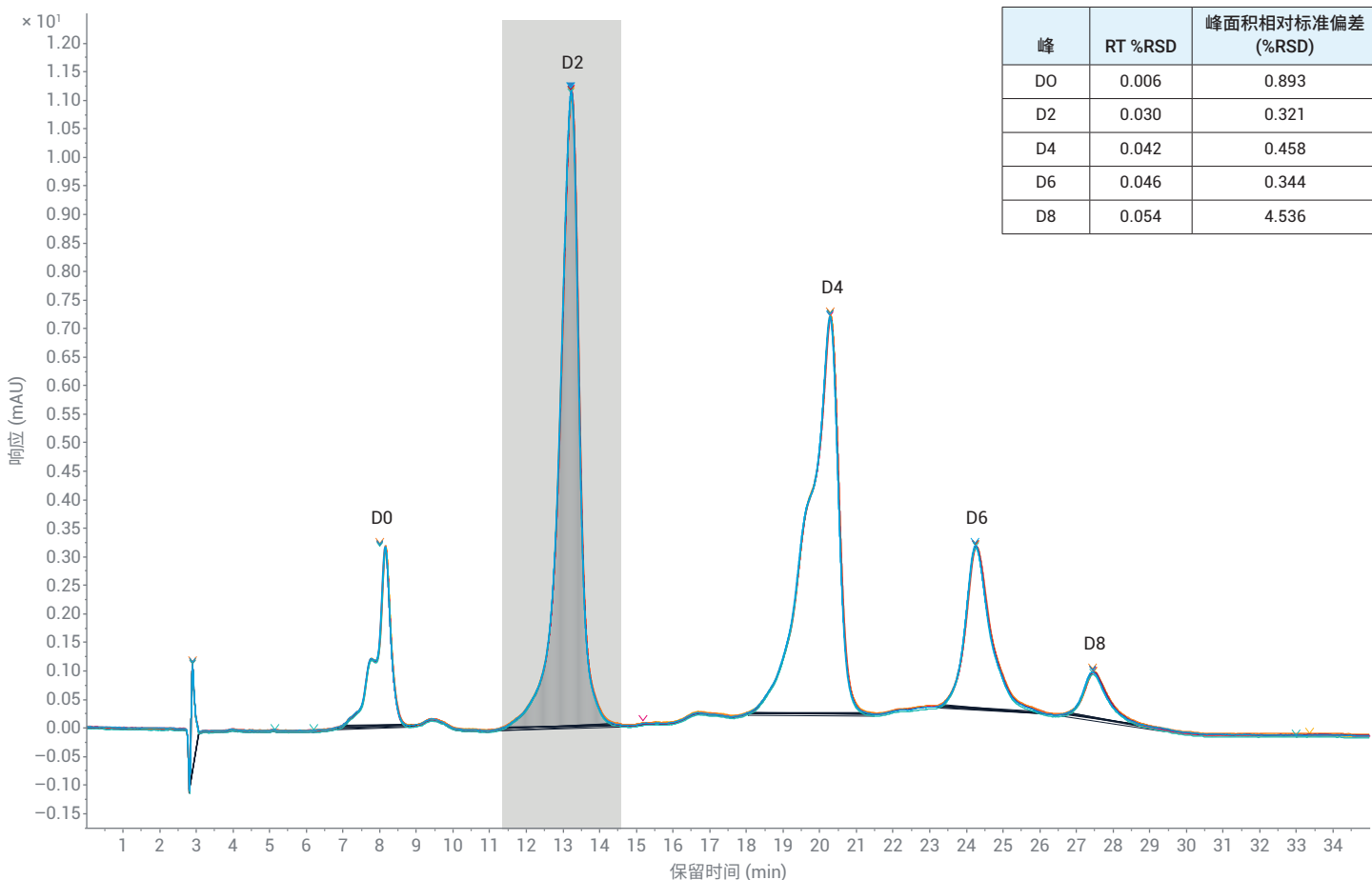


图 1. 使用 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统分离本妥昔单抗 ADC。D0-D8 表示不同的 DAR 异构体。所示为 7 次后续运行的叠加色谱图。通过空白扣除功能，使用在同一序列中运行的空白进样过滤缓冲液 A 中硫酸铵盐引起的基线漂移

HIC 分析既可以表征药物连接异构体的分布，也可以测定 DAR。通过对每个峰的峰面积及其各自载药量进行积分，能够计算总体 DAR（公式 1）。

$$DAR = \sum_{n=0}^8 \frac{LC \text{ 峰面积} \times n_{\text{药物}}}{\text{总 LC 峰面积}}$$

公式 1.

由 5 个观测峰的峰面积积分和峰面积百分比计算得到的 DAR 约为 3.3（见表 1）。

表 1. DAR 异构体结果

DAR 异构体	RT (min)	峰面积	峰面积%	DAR 计算值
D0	8.00	89.18	8.11	0
D2	13.22	427.04	38.83	0.78
D4	20.29	405.58	36.88	1.48
D6	24.27	140.51	12.78	0.77
D8	27.48	37.38	3.4	0.27
			<b>DAR</b>	<b>3.3</b>

## 结论

本研究使用三元梯度下的 HIC，并将异丙醇作为第三通道中的有机改性剂，对本妥昔单抗 ADC 进行了分析。5 种预期 ADC 均得到很好分离，分别对应于含 0、2、4、6、8 个小分子药物的 mAb。HIC 分析既可以表征药物连接异构体的分布，也可以测定 DAR，经计算为每个抗体 3.3 个药物分子。配备 Agilent 1260 Infinity II 生物全能泵的 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统出色地完成了挑战性溶剂组合的分析。保留时间重现性十分优异，相对标准偏差低于 0.055%，可实现类似二元泵的性能，生成高度可靠的数据。

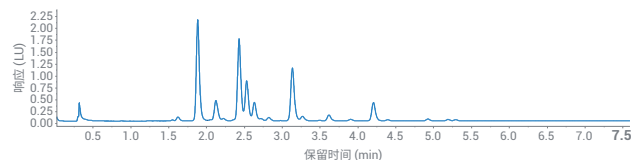
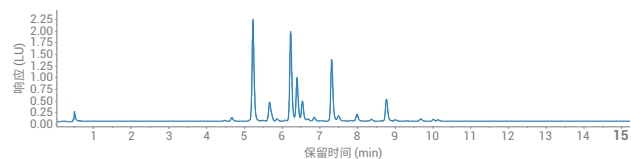
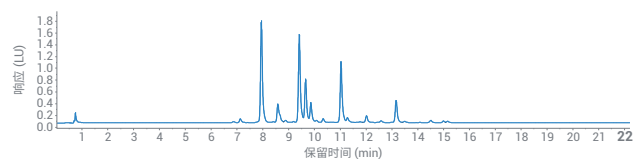
## 参考文献

1. McCombs, J. R.; Owen, S. C. Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry. *J. Amer. Assoc. Pharm. Sci.* **2015**, 17(2), 339–51
2. Rodriguez-Aller, M. *et al.* Practical Method Development for the Separation of Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug-Conjugate Species in Hydrophobic Interaction Chromatography, Part 1: Optimization of the Mobile Phase. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, 118, 393–403

## 多聚糖分离的分离度和速度



BIO



### 作者

Edgar Naegele  
安捷伦科技有限公司

### 摘要

本应用简报展示了使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统在优化的分离度和速度条件下对 2-AB 和 InstantPC 标记多聚糖的可靠分离。通过计算并得到出色的保留时间精度、峰面积精度和分离度等性能值证明了该方法的可靠性。使用配备生物惰性流通池的 Agilent 1260 Infinity II 荧光检测器 (FLD) 进行检测。1290 Infinity II 生物液相色谱系统的内部体积较小，同时，二元泵可提供高精度的溶剂组成和流速，实现从高分离度到速度优化方法的转换，并生成相似的结果。

## 前言

目前,单克隆抗体 (mAb) 是现代生物治疗化合物中最重要的一类。所有治疗性 mAb 都属于免疫球蛋白 G (IgG)<sup>[1]</sup>。在 IgG 表面上,每条重链上都有一个 N-连接糖基化位点,可产生包含多达 30 种糖型的混合物<sup>[2]</sup>。糖基化模式对于 mAb 的疗效非常重要,因此它的分析是 QA/QC 过程的关键部分。此外,糖基化是 mAb 最重要的关键质量属性 (CQA) 之一。

为了应对大量的样品,不仅需要快速的样品前处理方法,还需要对复杂混合物具备足够分离能力的快速分析方法。通常,用荧光化合物标记多聚糖,以便在色谱分离后用 FLD 进行检测。标记方法通过现代标记化合物 (例如 InstantPC) 得到了加速。与经典标记相比,该标记具有更高的荧光灵敏度,并为质谱检测提供了良好的电离<sup>[3]</sup>。然后在 HILIC 柱上进行色谱分离,这是目前分离多聚糖的标准方法<sup>[4]</sup>。

本应用简报将展示使用配备 Agilent AdvanceBio 糖谱分析 HILIC 色谱柱的 1290 Infinity II 生物液相色谱系统对荧光标记的多聚糖分子量标准品和荧光标记的人 IgG N-糖文库进行的高分离度和高速分离。将显示 150 和 100 mm 色谱柱的典型性能参数,例如峰面积、保留时间 RSD 和分离度。经典的 2-AB 标记和现代 InstantPC 标记作为荧光标记,将针对 IgG 文库进行比较,表明高分离度和高速方法可以获得相同的洗脱模式。

## 实验部分

### 仪器

- Agilent 1290 Infinity II 生物高速泵 (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A), 配备集成式样品恒温箱 (选件 #101)
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B), 配备生物兼容性热交换器
- Agilent 1290 Infinity II 荧光检测器 (FLD) (G7162B), 配备生物惰性标准 FLD 流通池 (G5615-60005)

### 色谱柱

1. Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm (859700-913)
2. Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm (858700-913)

### 软件

Agilent OpenLab 2.5 版和 GPC/SEC 附加软件 1.2 版

### 样品

- AdvanceBio 2-AB 人 IgG N-糖文库 (部件号 GKSB-005)
- AdvanceBio InstantPC 人 IgG N-糖文库 (部件号 GKPC-005)
- AdvanceBio 2-AB 葡萄糖均聚物标准品 (部件号 GKSB-503)

### 化学品

- 乙腈, HPLC 级
- 甲酸铵

化学品购自德国 VWR 公司。新制超纯水产自配置 LC-Pak Polisher 和 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。



## 通用方法设置

参数	值
二元泵	
溶剂	A) 水 + 100 mmol/L 甲酸铵, pH 4.5 B) ACN
MCT	
柱温	60 °C
FLD	
波长 (2AB)	激发波长 260 nm, 发射波长 430 nm
波长 (InstantPC)	激发波长 285 nm, 发射波长 345 nm
数据采集速率	18.75 Hz (高分辨率方法)
数据采集速率	39.75 Hz (高分离度方法)
进样器	
进样	1 µL
进样针清洗	使用 30/70 的水/ACN 清洗 3 s
高分辨率方法, 150 mm 色谱柱	
二元泵	
流速	0.5 mL/min
梯度	0 min - 80% B; 22 min - 55% B; 22.25 min - 40% B; 24.25 min - 40% B; 24.5 min - 80% B; 停止时间: 24.5 min; 后运行时间: 7 min
MCT	
	色谱柱 1
高分辨率方法, 100 mm 色谱柱	
二元泵	
流速	0.5 mL/min
梯度	0 min - 80% B; 15 min - 55% B; 15.25 min - 40% B; 16.75 min - 40% B; 17.0 min - 80% B; 停止时间: 17.0 min; 后运行时间: 5 min
MCT	
	色谱柱 2
高速方法, 100 mm 色谱柱	
二元泵	
流速	0.75 mL/min
梯度	0 min - 75% B; 7.5 min - 65% B; 7.75 min - 40% B; 8.75 min - 40% B; 9.0 min - 75% B; 停止时间: 9.0 min; 后运行时间: 3 min
MCT	
	色谱柱 2

## 结果与讨论

在 150 mm AdvanceBio 糖谱分析色谱柱上初步开发高分离度方法时, 我们使用包含 2-AB 荧光标记的基于葡萄糖的多聚糖分子量标准品。初始溶剂比、终点溶剂比和运行时间的测定结果表明, 残留 2-AB 标记 (0.735 分钟) 和葡萄糖单元 1 (GU1, 0.934 分钟) 之间具有良好的分离度 (图 1)。分离并检测到多至 GU18 的葡萄糖均聚物。

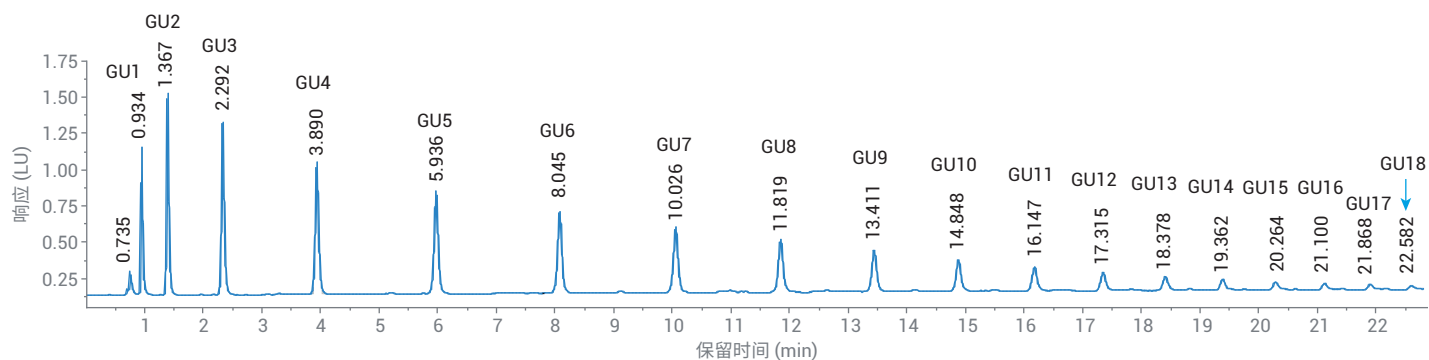


图 1. 在 150 mm 色谱柱上对多聚糖分子量标准品进行的高分离度分离, 在开始时使用通用线性梯度针对残留 2-AB 和 GU1 的基线分离进行了调整

残留 2-AB 和 GU1 的初始分离度为 4.23，明显为基线分离。分离度在 8.045 分钟时提升至 GU6。对于后洗脱的葡萄糖均聚物，分离度随着峰宽的增加而降低。在 GU5 之前，峰面积 RSD 低于 0.65%，在 GU6 到 GU13 之间为 1.17%–3.4%。较晚洗脱的均聚物峰面积 RSD 较高，但相应的峰面积较小。所有化合物的保留时间 RSD 均低于 0.08%（表 1）。

通过将相应的分离梯度缩短至 15 分钟，将最初的高分离度方法中使用的 150 mm 色谱柱调整为 100 mm 色谱柱。根据 100 mm 色谱柱的较小柱体积调整冲洗和再生时间。最终，残留 2-AB 仍与 GU1 分离，18 种葡萄糖均聚物在梯度运行时仍处于基线分离状态（图 2）。

表 1. 150 mm 色谱柱上多聚糖分子量标准品分离的性能结果

GU	峰面积 RSD (%)	RT (min)	RT RSD (%)	USP 分离度	半峰宽 (min)
1	0.59	0.934	0.06	4.23	0.028
2	0.47	1.367	0.08	8.29	0.034
3	0.64	2.292	0.09	14.03	0.044
4	0.33	3.890	0.08	18.27	0.057
5	0.61	5.936	0.06	18.59	0.069
6	1.23	8.045	0.09	16.89	0.075
7	1.20	10.026	0.08	14.81	0.079
8	1.17	11.819	0.05	12.85	0.082
9	1.50	13.411	0.06	11.17	0.082
10	1.77	14.848	0.05	9.92	0.084
11	2.65	16.147	0.05	8.84	0.085
12	3.40	17.315	0.05	7.92	0.085
13	2.79	18.378	0.05	7.15	0.085
14	6.65	19.362	0.04	6.53	0.089
15	6.44	20.264	0.04	5.99	0.090
16	6.76	21.100	0.03	5.39	0.094
17	6.77	21.868	0.04	4.77	0.093
18	5.57	22.582	0.04	4.52	0.093

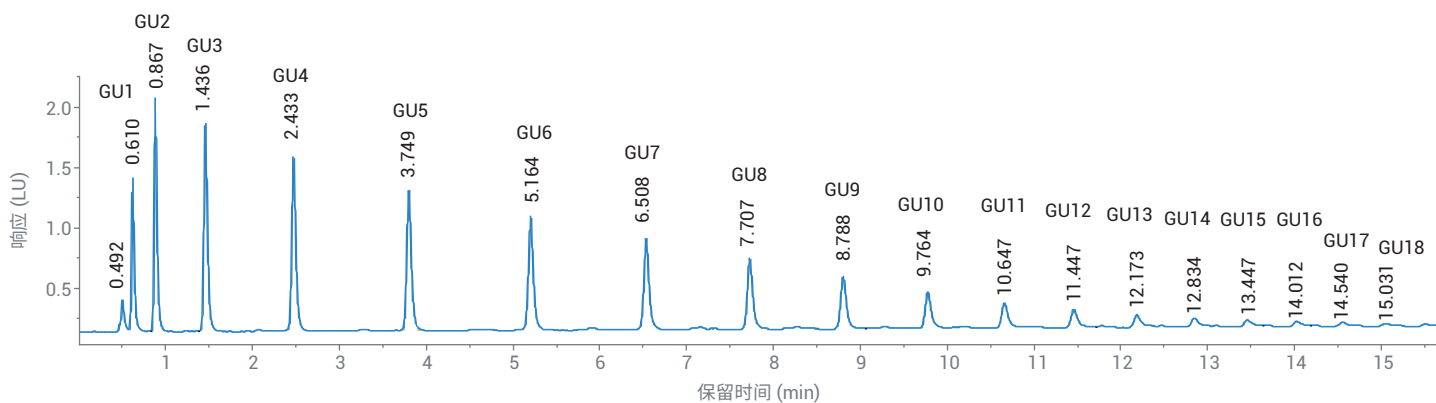


图 2. 在 100 mm 色谱柱上对多聚糖分子量标准品进行的高分离度分离，通过调整梯度从 150 mm 色谱柱转移到较短的色谱柱。残留 2-AB 和 GU1 仍可实现充分分离

残留 2-AB 和 GU1 的分离度为 2.16。在 3.749 分钟时，分离度仍提升至 GU5。在 GU4 之前，峰面积 RSD 低于 1.00%，在 GU5 到 GU14 之间为 1.09%–3.5%。较晚洗脱的均聚物峰面积 RSD 较高，但相应的峰面积较小。所有化合物的保留时间 RSD 均低于 0.09% (表 2)。

通过比较 (表 1 和表 2) 可知，150 mm 和 100 mm 色谱柱获得的峰面积 RSD 和保留时间 RSD 处于相同的数量级。当然，在使用较短的 100 mm 色谱柱时分离度降低，但仍然足够高，可以实现所有峰的基线分离。

使用针对 100 mm AdvanceBio 糖谱分析柱和 150 mm AdvanceBio 糖谱分析柱开发的两种高分离度方法分离多聚糖样品，即荧光标记的人 IgG N-糖文库 (图 3 和图 4)。使用 2-AB 标记的 IgG N-糖文库 (图 3A 和 3B) 和 InstantPC 标记的 IgG N-糖文库 (图 4A 和 4B) 完成分离。2-AB 标记的多聚糖文库的分离表明 100 mm 和 150 mm 色谱柱具有相似的

表 2. 100 mm 色谱柱上多聚糖分子量标准品分离的性能结果

GU	峰面积 RSD (%)	RT (min)	RT RSD (%)	USP 分离度	半峰宽 (min)
1	0.86	0.610	0.13	2.16	0.031
2	0.82	0.867	0.18	4.87	0.032
3	0.95	1.436	0.19	9.23	0.040
4	0.97	2.433	0.09	13.35	0.048
5	1.09	3.749	0.06	15.02	0.054
6	1.13	5.164	0.03	14.41	0.058
7	1.41	6.508	0.08	12.94	0.061
8	1.24	7.707	0.08	11.11	0.063
9	1.57	8.788	0.05	9.59	0.066
10	2.30	9.764	0.04	8.33	0.069
11	3.46	10.647	0.03	7.28	0.071
12	1.82	11.447	0.02	6.32	0.074
13	1.50	12.173	0.03	5.50	0.078
14	3.25	12.834	0.02	4.87	0.079
15	5.92	13.447	0.03	4.25	0.087
16	3.75	14.012	0.03	3.64	0.097
17	5.38	14.540	0.02	3.06	0.105
18	6.17	15.031	0.04	2.82	0.106

洗脱模式 (图 3A 和 3B)，其中 100 mm 色谱柱的梯度运行时间缩短了约三分之一。在两种情况下都可以观察到相同的低丰度峰，并且在模式中间洗脱的三个峰实现了高分离度分离。例如，在 9.651 分

钟与在 9.408 分钟从 150 mm 色谱柱洗脱出来的峰的分离度值为 1.94。在 100 mm 色谱柱上，该峰在 6.391 分钟洗脱，分离度为 1.68。

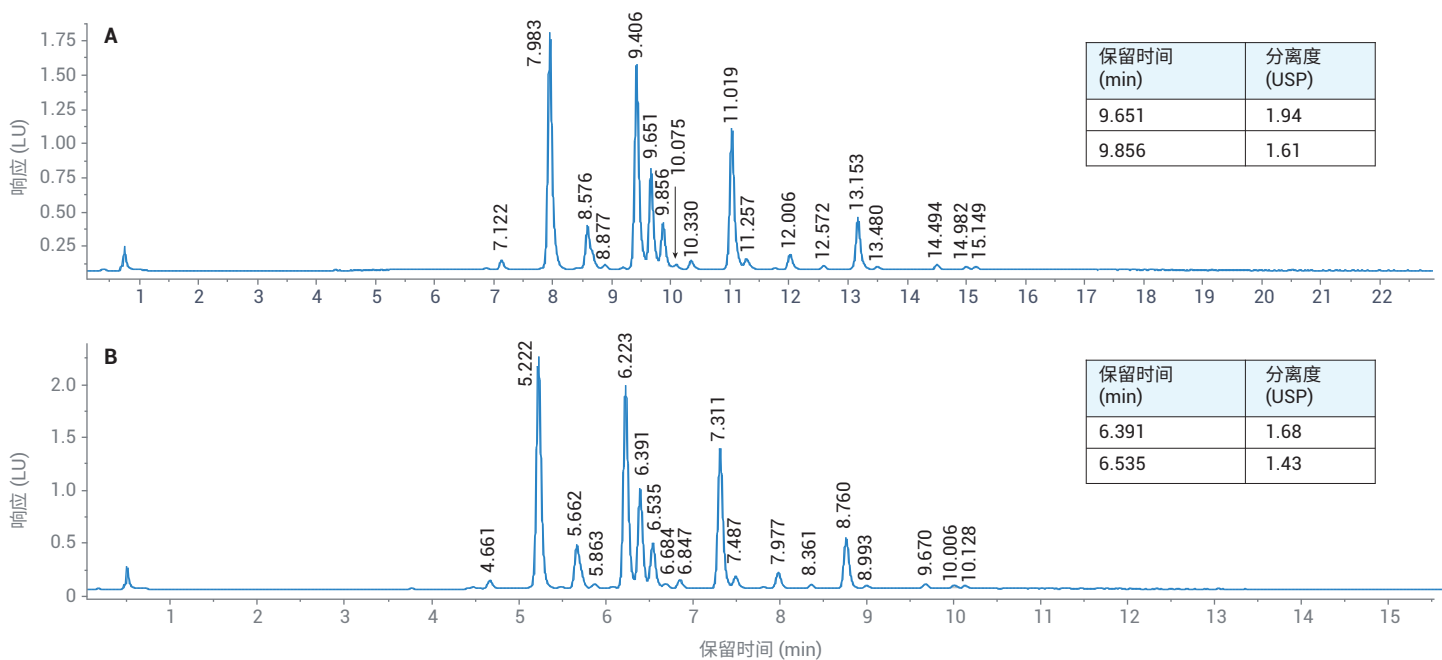


图 3. 在 150 mm Agilent AdvanceBio 糖谱分析柱 (A) 和 100 mm AdvanceBio 糖谱分析柱 (B) 上对 2-AB 标记的 IgG N-糖文库进行的高分离度分离

荧光标记 InstantPC 是一种最新开发的技术，具有更高的荧光灵敏度以及针对质谱检测的电离能力优势<sup>[3]</sup>。从 150 mm 和 100 mm 色谱柱获得的洗脱模式基本一致(图 4A 和 4B)。它们提供相同的低浓度多聚糖信息，并为峰实现相似的分离度。100 mm 色谱柱的梯度运行时间缩短了约三分之一。在运行时间中间的峰型

模式中，在 10.702 分钟与在 10.438 分钟从 150 mm 色谱柱洗脱出来的峰的分离度为 2.09 (图 4A)。在 100 mm 色谱柱上，相同的峰在 7.186 分钟洗脱，分离度为 1.74 (图 4B)。对于分别在 10.837 和 7.237 分钟以及分别在 15.456 和 10.424 分钟从 150 mm 和 100 mm 色谱柱洗脱的峰，可以观察到相同的行为。

比较使用的两种标记可知，由于 InstantPC 标记的荧光灵敏度比标记 2 更高，因此 InstantPC 标记的多聚糖文库分离出更多的低丰度峰。

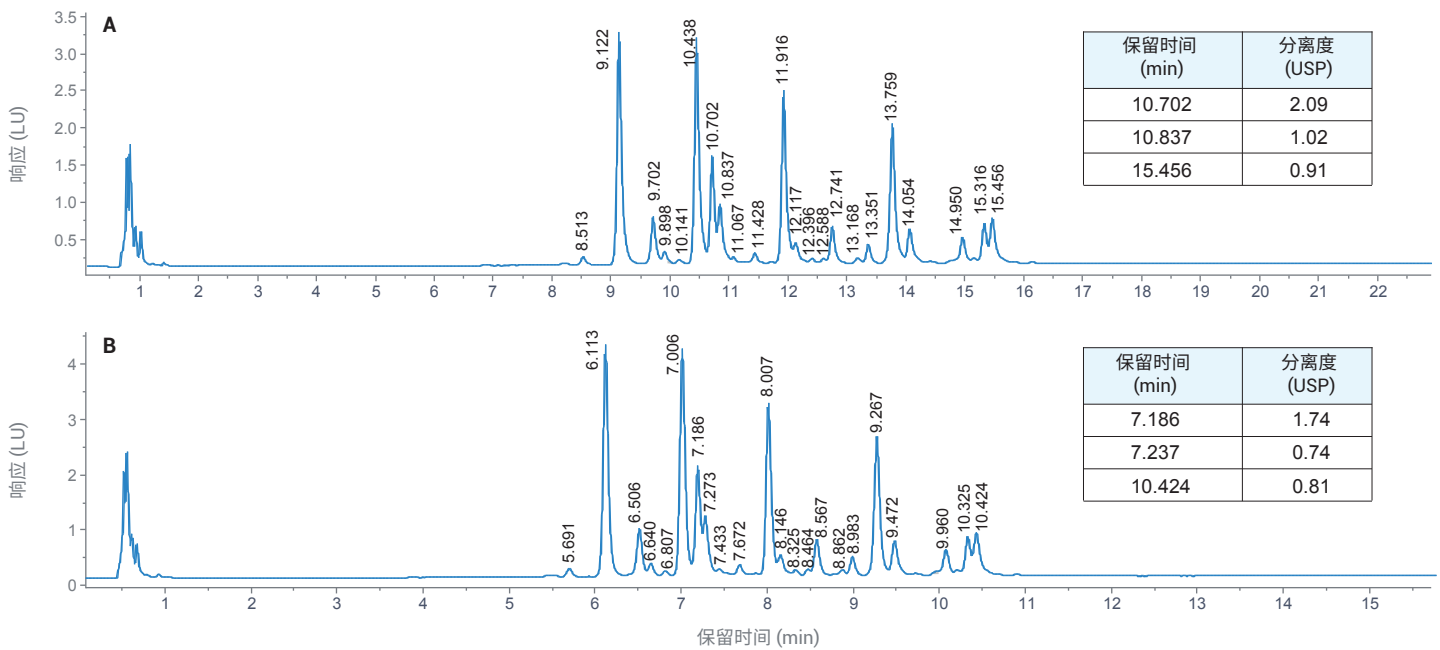


图 4. 在 150 mm Agilent AdvanceBio 糖谱分析柱 (A) 和 100 mm AdvanceBio 糖谱分析柱 (B) 上对 InstantPC 标记的 IgG N-糖文库进行的高分离度分离

由于在样品前处理方面有所改进，具有更快的速度，从而提高了通量，因此需要使用快速分析方法<sup>[3,4]</sup>。以开发用于 100 mm 色谱柱的高分离度分离方法为基础，开发快速多聚糖分离方法。为了缩短运行时间同时保留具有足够分离度的已知洗脱模式，我们逐渐提高流速，同时相应地缩短梯度时间。通过这样做，我们获得了梯度运行时间只有以前的一半，但流速提高了 50% 的方法。使用这种方法，对 2-AB 和

InstantPC 标记的 IgG N-糖文库的分离进行了比较（图 5 和图 6）。

将快速分离 2-AB 标记多聚糖所得的洗脱模式（图 5）与高分离度方法（图 3B）的分离进行比较，显示出相同的洗脱模式。即使在模式中间洗脱多聚糖的分离度也足以对其进行视觉识别和定量。在 2.527 分钟洗脱的峰与之前洗脱的峰具有足够高的分离度 (1.24)，而高分离度方法的分离度为 1.68。

通过比较发现，InstantPC 标记多聚糖的快速分离（图 6）与高分离度分离（图 4B）也具有相似的洗脱模式。在 3.063 分钟洗脱的峰的分度为 1.48，而高分离度方法获得的分离度为 1.74。通过比较图 5 和图 6 还发现，正如在高分离度分离中所看到的那样，InstantPC 标记样品提供了更丰富的低丰度多聚糖信息。由于不同的色谱行为，与 2-AB 标记多聚糖相比，InstantPC 标记化合物的分离度在某些情况下会受到影响。

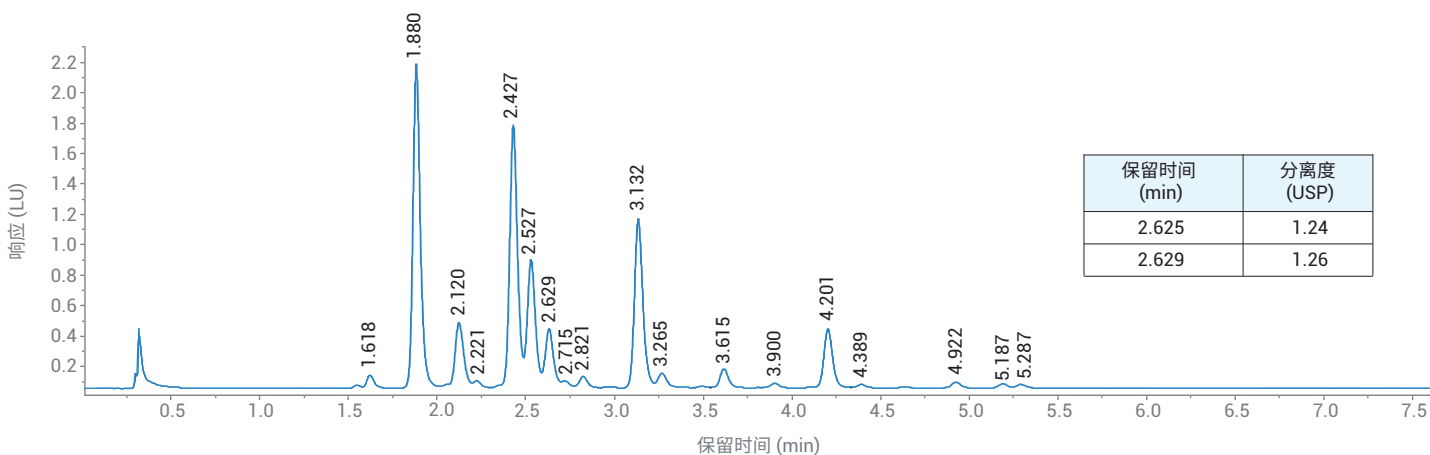


图 5. 利用开发的快速分离方法，在 100 mm Agilent AdvanceBio 糖谱分析柱上实现的 2-AB 标记 IgG N-糖文库分离

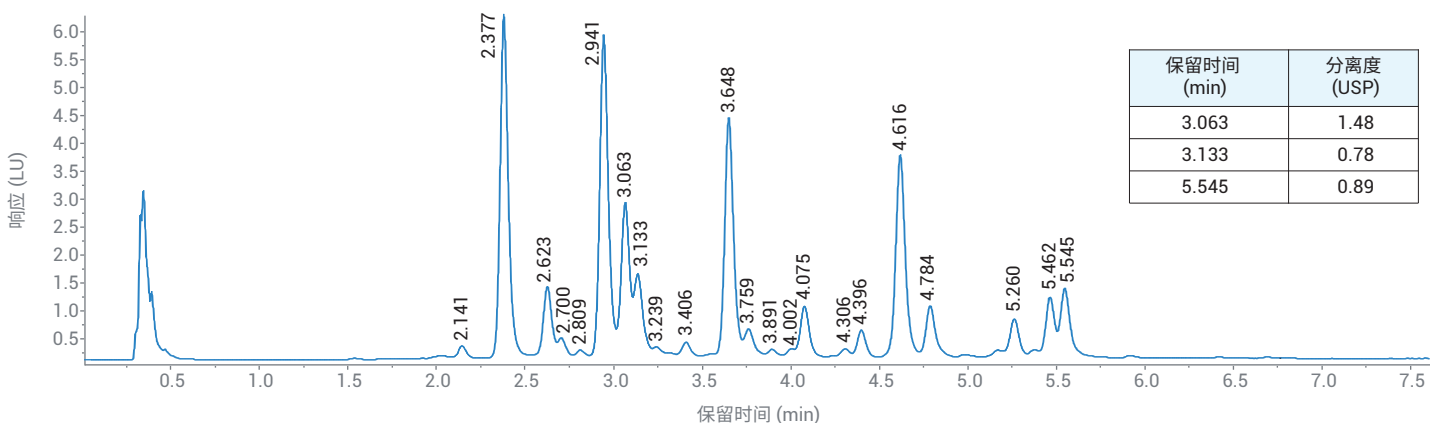


图 6. 利用开发的快速分离方法，在 100 mm Agilent AdvanceBio 糖谱分析柱上实现的 InstantPC 标记 IgG N-糖文库分离

## 结论

本应用简报展示了使用 1290 Infinity II 生物液相色谱系统对荧光标记多聚糖的分离。生物兼容性 UHPLC 系统能够分析高度复杂的生物化合物（例如多聚糖），而不会因系统活性表面的非特异性吸附而丢失低丰度化合物。

由于 1290 Infinity II 生物液相色谱系统的较小内部延迟体积以及 1290 Infinity II 生物高速泵提供的高精度溶剂混合和流速，从高分离度方法转换到速度优化方法可以获得非常相似的结果。计算得到的所有性能值（如保留时间精度、峰面积精度和分离度）均十分出色。

## 参考文献

1. Jefferis, R. Glycosylation of Recombinant Antibody Therapeutics. *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21(1)*, 11–16
2. Arnold, J. N. et al. Human Immunoglobulin glycosylation and the Lectin Pathway of Complement Activation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2005**, *564*, 27–43
3. Yan, J.; Jones, A., 使用 Agilent AdvanceBio Gly-X InstantPC 和 2-AB Express 样品前处理与 FLD/MS 简化生物治疗药物的 N-糖分析工作流程, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5994-1348ZHCN, **2019**
4. Marosella, J. et al. 采用新型 HILIC 色谱柱实现快速 N-糖分析, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-4886CHCN, **2017**

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

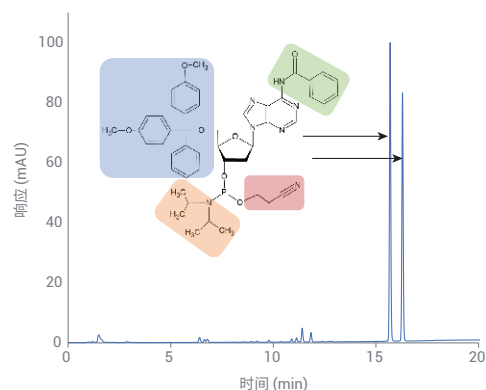
DE44251.1113541667

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 5 月 11 日，中国出版  
5994-3130ZHCN

## 分析寡核苷酸合成原料

使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统进行核苷亚磷酰胺分析的灵活和稳定方法开发



### 作者

André Feith  
安捷伦科技有限公司

### 摘要

作为生物药物生产过程的第一步，需要全面分析用于合成的所有原料，以获得优质的产品。寡核苷酸的原料被称为核苷亚磷酰胺，在后续的 DNA 合成中充当基础结构单元。在本应用简报中，我们开发了基于生物兼容性 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统的液相色谱方法。通过将液相色谱仪与 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 联用，可利用精确质量数鉴定多种杂质，并且可通过具有出色保留时间和峰面积精度的四通道 Agilent 1290 Infinity II 生物全能泵轻松进行方法开发。在此基础上进行了额外的方法开发，将液相色谱运行时间缩短了 66%，同时保持出色的性能，并进行了方法兼容性实验，显示了从传统 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统实现的无缝方法转移。综上所述，这些结果表明 1290 Infinity II 生物液相色谱系统是对用于寡核苷酸合成的原料进行稳定和灵活分析的理想选择。

## 前言

DNA 寡核苷酸的化学合成是现代分子生物学中的一种关键技术<sup>[1]</sup>。近期几种寡核苷酸类生物药物获得上市批准<sup>[2]</sup>，在寡核苷酸的制造和生产链中对于可靠和稳定分析方法的需求随之增长。核苷亚磷酸胺被认为是 DNA 合成技术中的金标准结构单元，因为它可以快速轻松地去除相关保护基团<sup>[3]</sup>。天然核苷含有羟基 (-OH) 和氨基 (-NH<sub>2</sub>) 等大量的反应位点。这些官能团在亚磷酸胺结构单元中被修饰。图 1 显示了具有四种不同修饰的 5'-DMT-脱氧腺苷 3'-亚磷酸胺分子的结构式：保护脱氧核糖 5'-羟基的二甲氧基三苯甲烷 (DMT) 基团 (蓝色)，二异丙基氨基 (橙色) 和修饰亚磷酸胺部分的 2-氰乙基 (红色)，以及保护腺嘌呤碱基中的氨基的苯甲酰基 (绿色)。修饰后，相应 DNA 核苷的亚磷酸胺 (如脱氧腺苷 (dA)、脱氧鸟苷 (dG)、脱氧胞苷 (dC) 和脱氧胸苷 (dT)) 作为后续自动化寡核苷酸合成的原料，经历由不同的脱保护、偶联、氧化和封端步骤组成的多个合成循环<sup>[1]</sup>。但需要密切监测和鉴定原料的纯度和杂质，尽可能减少序列杂质并提高偶联效率。

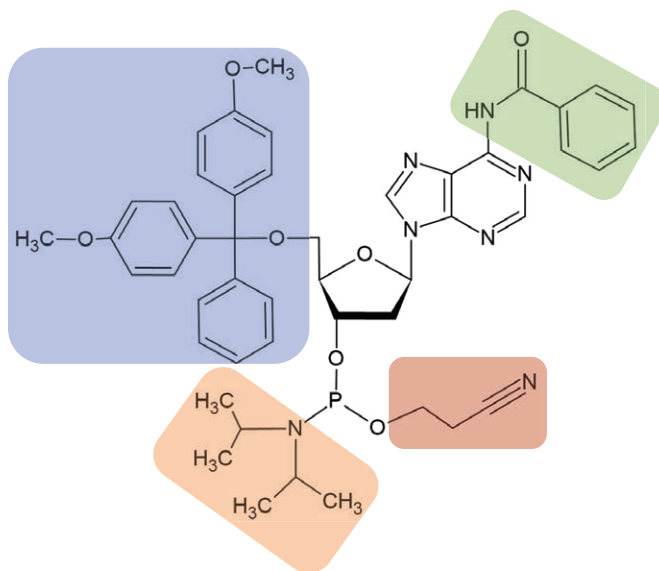


图 1. 5'-DMT-脱氧腺苷 3'-亚磷酸胺分子中修饰基团的概览图。蓝色：二甲氧基三苯甲烷 (DMT) 基团。绿色：苯甲酰基。橙色：二异丙基氨基。红色：2-氰乙基

## 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 生物液相色谱系统：

- Agilent 1290 Infinity II 生物全能泵 (G7131A)
- 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 (G7116B)，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 液相色谱系统，包括以下模块：

#### Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统：

- Agilent 1290 Infinity II 全能泵 (G7104A)
- 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 (G7116B)，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)

### 软件

- Agilent MassHunter 工作站数据采集软件 (B.09.00 或更高版本)
- Agilent MassHunter 定性分析软件 (10.0 或更高版本)



## 色谱柱

Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 95 Å, 2.1 × 100 mm, 1.8 µm (部件号 959758-902)

## 化学品

使用 InfinityLab 超纯 LC/MS 乙腈 (部件号 5191-4496) 和 InfinityLab 超纯 LC/MS 水 (部件号 5191-4498)。乙酸铵及乙酸购自 VWR (Darmstadt, Germany)。

## 样品前处理

用于合成寡核苷酸的正宗 5'-O-DMT 2' 脱氧腺苷亚磷酰胺 (dA) 原料由安捷伦核酸解决方案事业部提供。亚磷酰胺的乙腈溶液的进样浓度为 1 mg/mL。

表 3. 使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统对 5'-DMT-脱氧腺苷 3'-亚磷酰胺原料进行杂质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	320 °C
干燥气流速	8 L/min
雾化器	35 psi
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	3500 V
喷嘴电压	1000 V
碎裂电压	140 V
锥孔电压	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
采集模式	正离子, 扩展 ( $m/z$ 10000) 质量数范围
质量数范围	$m/z$ 25–10000
采集速率	1 质谱图/秒
参比质量	$m/z$ 121.050873, $m/z$ 922.0098

表 1. 使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统对 5'-DMT-脱氧腺苷 3'-亚磷酰胺原料进行杂质分析的方法 A

参数	值																																
色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 95 Å, 2.1 × 100 mm, 1.8 µm																																
溶剂	A) 乙腈 B) 水 C) 500 mmol/L 乙酸铵, pH 5.5																																
梯度	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>A (%)</th><th>B (%)</th><th>C (%)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0.00</td><td>50</td><td>48</td><td>2</td></tr><tr><td>1.00</td><td>50</td><td>48</td><td>2</td></tr><tr><td>15.00</td><td>90</td><td>8</td><td>2</td></tr><tr><td>15.01</td><td>90</td><td>8</td><td>2</td></tr><tr><td>18.00</td><td>90</td><td>8</td><td>2</td></tr><tr><td>18.01</td><td>50</td><td>48</td><td>2</td></tr><tr><td>25.00</td><td>50</td><td>48</td><td>2</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	A (%)	B (%)	C (%)	0.00	50	48	2	1.00	50	48	2	15.00	90	8	2	15.01	90	8	2	18.00	90	8	2	18.01	50	48	2	25.00	50	48	2
时间 (min)	A (%)	B (%)	C (%)																														
0.00	50	48	2																														
1.00	50	48	2																														
15.00	90	8	2																														
15.01	90	8	2																														
18.00	90	8	2																														
18.01	50	48	2																														
25.00	50	48	2																														
流速	0.200 mL/min																																
温度	20 °C, 装有热平衡装置																																
紫外检测	VWD: 236 nm, 10 Hz/MS: 见表 2																																
进样	进样量: 2 µL 样品温度: 4 °C 冲洗: 用 90% 乙腈/10% 水冲洗 3 s (清洗口)																																

表 2. 使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统对 5'-DMT-脱氧腺苷 3'-亚磷酰胺原料进行杂质分析的运行时间经过优化的方法 B

参数	值																																
色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 95 Å, 2.1 × 100 mm, 1.8 µm																																
溶剂	A) 乙腈 B) 水 C) 500 mmol/L 乙酸铵, pH 5.5																																
梯度	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>A (%)</th><th>B (%)</th><th>C (%)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0.00</td><td>50</td><td>48</td><td>2</td></tr><tr><td>0.33</td><td>50</td><td>48</td><td>2</td></tr><tr><td>5.00</td><td>90</td><td>8</td><td>2</td></tr><tr><td>5.01</td><td>90</td><td>8</td><td>2</td></tr><tr><td>6.00</td><td>90</td><td>8</td><td>2</td></tr><tr><td>6.01</td><td>50</td><td>48</td><td>2</td></tr><tr><td>8.33</td><td>50</td><td>48</td><td>2</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	A (%)	B (%)	C (%)	0.00	50	48	2	0.33	50	48	2	5.00	90	8	2	5.01	90	8	2	6.00	90	8	2	6.01	50	48	2	8.33	50	48	2
时间 (min)	A (%)	B (%)	C (%)																														
0.00	50	48	2																														
0.33	50	48	2																														
5.00	90	8	2																														
5.01	90	8	2																														
6.00	90	8	2																														
6.01	50	48	2																														
8.33	50	48	2																														
流速	0.600 mL/min																																
柱温	20 °C, 装有热平衡装置																																
紫外检测	VWD: 236 nm, 10 Hz																																
进样	进样量: 2 µL 样品温度: 4 °C 冲洗: 用 90% 乙腈/10% 水冲洗 3 s (清洗口)																																

## 结果与讨论

HPLC 方法开发以及将方法转移到不同的业务部门（如早期工艺开发和质量控制）是一个繁琐的过程。然而，1290 Infinity II 生物全能泵为 1290 Infinity II 生物液相色谱系统提供了多功能性，因此能够便捷、可靠地进行方法开发。为了展示这一点，通过在四通道 Infinity II 生物全能泵上采用三元梯度开发了 5'-DMT-脱氧腺苷 3'-亚磷酰胺原料的杂质分析液相色谱方法。1290 Infinity II 生物液相色谱系统具有耐腐蚀流路，因此可以使用 500 mmol/L 乙酸铵 (pH 5.5) 等高浓度缓冲液进行常规的方法开发，从而能够利用实时梯度混合快速筛选不同浓度和类型的缓冲液（表 1，方法 A）。通过依次使用 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF，可以对产物和三种杂质（表 4）进行精确质量数鉴定，从而可以对化合物进行 UV 和 MS 同步分析。由于亚磷酰胺磷原子手性中心的差向异构化，产物、杂质 2 和杂质 3 均可以看到两个峰（A 和 B）。

图 2 显示了使用配备生物微量流通池的 VWD 检测到的原料分离色谱图。下方色谱图显示了杂质的放大图，其目标峰之间具有出色的分离度。3'-DMT-脱氧腺苷 5'-亚磷酰胺（杂质 2A/2B）的分析尤为重要，因为所谓的“反向酰胺”会导致后续的 DNA 合成出错。

表 4. 在 5'-DMT-脱氧腺苷 3'-亚磷酰胺原料中鉴定得到的产物和杂质

名称	物质	保留时间 (min)
5'-DMT-脱氧腺苷 3'-亚磷酰胺	产物 A	15.69
	产物 B	16.29
5'-DMT-脱氧腺苷	杂质 1	6.40
3'-DMT-脱氧腺苷 5'-亚磷酰胺（反向酰胺）	杂质 2A	10.89
	杂质 2B	11.13
5'-DMT-脱氧腺苷亚磷酰胺	杂质 3A	11.41
	杂质 3B	11.83

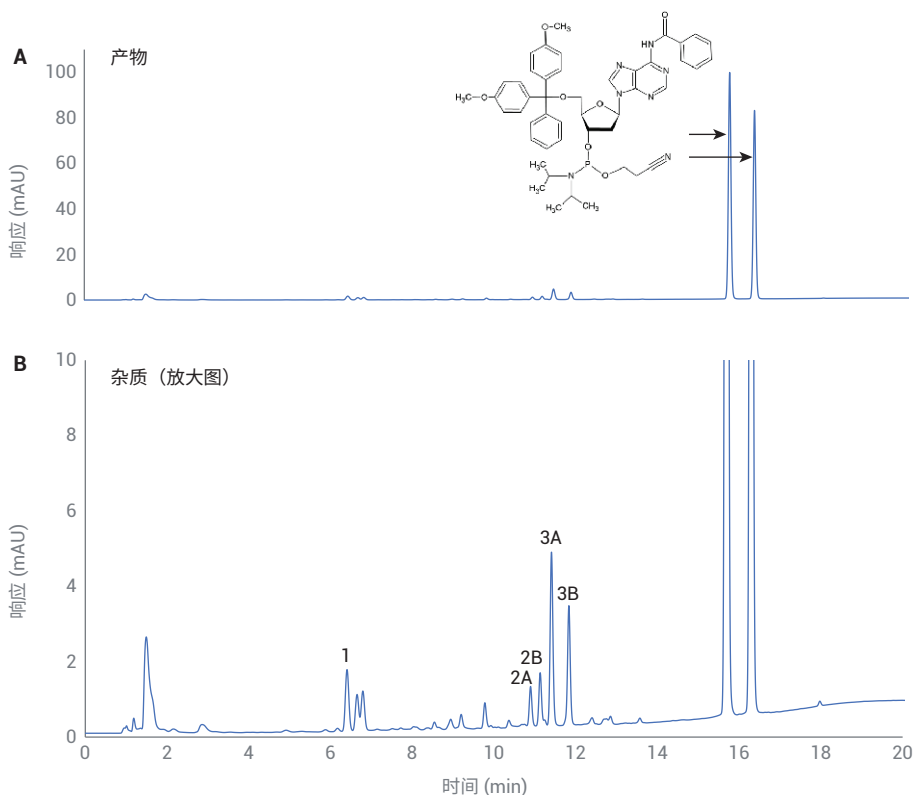


图 2. A: 使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统对原料进行液相色谱分离（方法 A）得到的色谱图（重点显示产物）。B: 为便于更好地观察杂质，对同一色谱图进行了放大

为了进一步研究 1290 Infinity II 生物液相色谱系统的性能, 分析了 10 次连续进样, 并计算了保留时间和峰面积精度值 (表 5)。测定了产物和杂质优异的保留时间 RSD 值 (0.015%–0.050%), 展示了 1290 Infinity II 生物全能泵在应用具有挑战性的三元梯度分离时的出色性能。此外, 1290 Infinity II 生物液相色谱系统在峰面积精度方面的性能也非常出色, 平均相对标准偏差为 0.269%。为了进一步评估 1290 Infinity II 生物液相色谱系统与 1290 Infinity II 液相色谱系统的方法兼容性, 还使用 1290 Infinity II 液相色谱系统进行了前面的实验。如表 5 所示, 两种液相色谱系统的绝对保留时间平均偏差仅为 0.686%, 表明可从 1290 Infinity II 液相色谱系统实现出色的方法转移。

时间是现代实验室的重要资源, 对于生物制药及其原料质量控制方面的常规分析尤其如此。因此, 采用了进一步的方法开发来缩短液相色谱分析的运行时间。1290 Infinity II 生物液相色谱系统的额定高压可达 1300 bar, 因此可以使用高流速和小颗粒优化性能并缩短运行时间。通过将流速增加到 0.6 mL/min 并保持梯度体积恒定, 液相色谱方法的运行时间缩短了 66%, 仅需 8.33 分钟 (表 2, 方法 B)。尽管缩短了运行时间, 仍然保持出色的性能, 具有较高的保留时间和峰面积精度 (图 3 和表 6), 使 1290 Infinity II 生物液相色谱系统非常适用于开发整个寡核苷酸生产链的灵活、稳定分析方法。

表 5. 使用方法 A 分析化合物得到的保留时间和峰面积精度值, 以及 Agilent 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绝对保留时间偏差

物质	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)	1290 生物液相色谱与 1290 液相色谱的保留时间偏差 (%)
产物 A	0.017	0.113	0.07
产物 B	0.015	0.118	0.19
杂质 1	0.050	0.211	1.53
杂质 2A	0.026	0.314	0.85
杂质 2B	0.020	0.539	0.76
杂质 3A	0.022	0.209	0.73
杂质 3B	0.021	0.378	0.67

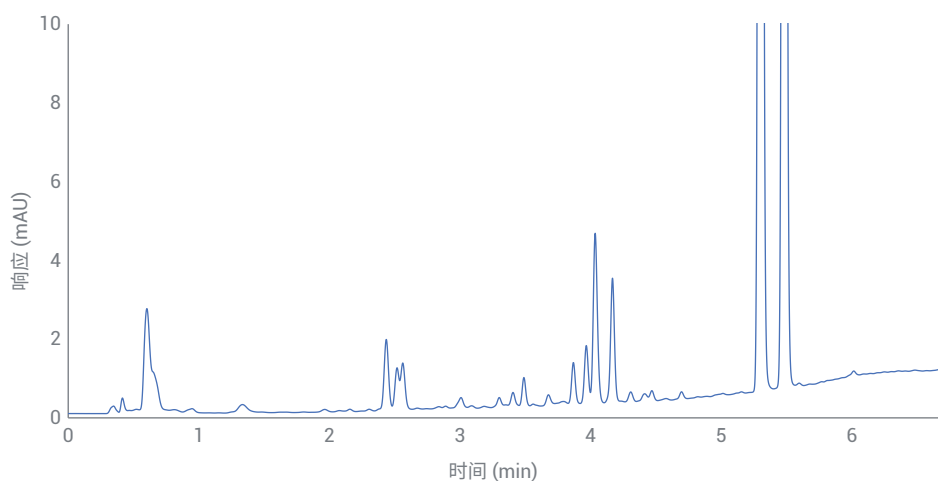


图 3. 使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统以更短的运行时间 (方法 B) 对原料进行液相色谱分离的放大图

表 6. 使用方法 B 分析化合物得到的保留时间和峰面积精度值

物质	保留时间 (min)	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)
产物 A	5.30	0.042	0.180
产物 B	5.48	0.40	0.185
杂质 1	2.43	0.115	0.214
杂质 2A	3.86	0.079	0.557
杂质 2B	3.96	0.066	0.986
杂质 3A	4.03	0.065	0.355
杂质 3B	4.16	0.059	0.301

## 结论

尽管基于亚磷酰胺的 DNA 合成技术自 1980 年代就一直为人们所使用，但简化相关分析挑战仍然是一项重要任务。在本应用简报中，我们展示了配备全能泵的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统对 5'-DMT-脱氧腺苷 3'-亚磷酰胺结构单元的正宗原料进行杂质分析的能力，该系统能够在工艺开发和质量控制环境中提供超高可信度。得益于 Agilent 1290 Infinity II 生物全能泵的通用性和高性能，以及整个 1290 Infinity II 生物液相色谱系统的生物兼容性流路，实现了出色的保留时间和峰面积精度，以及无缝的方法兼容性。这就是在具有挑战性的生物分子分析中，1290 Infinity II 生物液相色谱系统能够适应未来需求的原因。

## 参考文献

1. Hughes, R. A.; Ellington, A. D. Synthetic DNA Synthesis and Assembly: Putting the Synthetic in Synthetic Biology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, *9*, a023812
2. Roberts, T. C.; Langer, R.; Wood, M. J. A. Advances in Oligonucleotide Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 673–694
3. Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. Deoxynucleoside Phosphoramidites—A New Class of Key Intermediates for Deoxypolynucleotide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

DE44302.1218287037

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

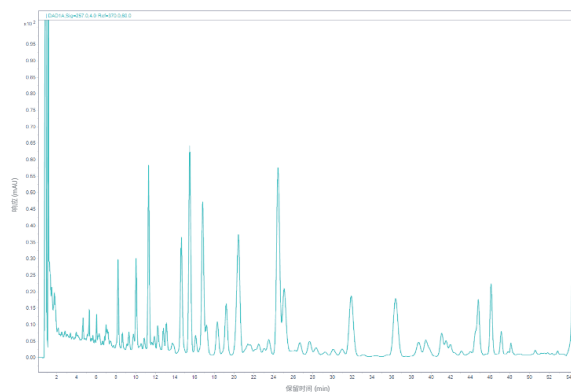
© 安捷伦科技（中国）有限公司，2021  
2021 年 5 月 10 日，中国出版  
5994-3498ZHCN

## 确定液相色谱方法兼容性的性能比较

Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统和 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统的对比研究



BIO



### 作者

Jochen Strassner  
安捷伦科技有限公司

### 摘要

新型 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统配备额定压力为 800 bar 的四元泵，为大量应用提供了便利。适用于以小分子为主的反相液相色谱应用领域，以及包含天然蛋白质和核酸应用的生物分子领域。将这种完全不含铁、稳定且多功能的液相色谱系统的性能与其不锈钢等效仪器 — Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统进行比较。

通过等度、快速梯度和平缓梯度应用比较泵混合精度和方法兼容性方面的性能。所有应用在两种系统上都表现出优异的重现性。在等度和快速梯度应用中观察到了出色的方法兼容性，但由于流动相组成的微小变化会严重影响样品成分的保留时间 (RT)，平缓梯度方法需要一些调整。

## 前言

在 (U)HPLC 中使用蛋白质和核酸等生物分子作为样品的应用正在不断增多。这引起了人们对液相色谱硬件的实用性和稳定性的关注，在涉及到高盐缓冲液作为流动相以及要求严苛的原位清洗溶剂（如盐酸、氢氧化钠和尿素）时尤其如此。显然需要能够承受这些运行和清洁条件的稳定可靠的仪器，为生物应用和标准反相应用提供出色性能。

1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统是通用系统家族中的一员，以 800 bar 四元泵作为核心溶剂输送模块。它在标准反相应用领域的对应产品是 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统。两种系统具有相同的性能指标。

客户在购买新的液相色谱仪器时，方法兼容性是一个重要的考虑因素，可能作为旧安捷伦液相色谱系统的替代品。由于两种 1260 Infinity II Prime 系统的性能指标相同，通常可实现方法兼容性。

本技术概述比较了不含铁和生物兼容性 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统和基于不锈钢 (SST) 的 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统在许多不同应用（即等度、快速梯度和平缓梯度模式）中的泵性能。

## 实验部分

### 设备

Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统，包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity II 生物全能泵 (G7131C)
- 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 (G7116B)，配备标准流速生物兼容性热交换器
- Agilent 1290 Infinity II DAD (G7117B)，配备 10 mm 生物兼容性 InfinityLab 最大光强卡套式流通池

Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统，包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity II 全能泵 (G7104C)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)，配备样品恒温箱（选件 101）
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II DAD (G7117B)

### 软件

Agilent OpenLab CDS 2.5 版或更新版本。

### 色谱柱

- **等度色谱方法：**Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 150 mm, 5 μm（部件号 959993-902）
- **快速梯度方法：**Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm（部件号 699775-902）
- **平缓梯度方法：**Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 2.1 × 150 mm, 2.7 μm（部件号 683775-902）

### 化学品

所有试剂纯度均为液相色谱级。新制超纯水来自配置 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA)。乙腈 (Lichrosolv) 和甲醇 (Lichrosolv) 购自 VWR International, Darmstadt, Germany。

### 样品

- 安捷伦等度样品（部件号 01080-68704）
- 安捷伦 RRLC 混合样品（部件号 5188-6529）
- 灵芝子实体干提取物（USP 参比标样，目录号 1288372）将 15.5 mg 灵芝子实体干提取物溶解在 7.75 mL MeOH 中，进行涡旋混合和超声处理。在真空浓缩仪中进行约四倍的浓缩，然后离心，通过 0.22 μm 针头过滤器进行过滤，得到最终的样品溶液

## 方法

### 等度色谱方法

表 1. 等度色谱方法条件

参数	值
溶剂	A) 水 B) 乙腈 (ACN) C) ACN D) 水
梯度	等度, 65% B (通道 A/B) 或 65% C (通道 C/D) 停止时间: 20 分钟 后运行时间: 取消
泵设置	最小冲程: 自动 压缩系数: $60 \times 10^{-6}$ /bar 主通道: 自动
流速	1.000 mL/min
温度	40 °C
检测	254 nm 10 Hz
进样	进样量: 5 $\mu$ L 样品温度: 10 °C 进样针清洗: 用 ACN/水 (50/50) 冲洗 3 s

### 快速梯度方法

表 2. 快速梯度方法条件

参数	值
溶剂	A) 水 B) ACN
梯度	0 min 20% B 5 min 90% B 停止时间: 6 min 后运行时间: 3 min
泵设置	最小冲程: 自动 压缩系数: $55 \times 10^{-6}$ /bar 主通道: 自动
流速	1.000 mL/min
温度	40 °C
检测	245 nm 40 Hz
进样	进样量: 5 $\mu$ L 样品温度: 10 °C 进样针清洗: 用 ACN/水 (50/50) 冲洗 3 s

### 平缓梯度方法

表 3. 平缓梯度方法条件

参数	值
溶剂	A) 0.075% 磷酸水溶液 B) ACN
梯度	0 min 20% B 3 min 26.5% B 34 min 26.5% B 52 min 38.5% B 54 min 100% B 停止时间: 55 min 后运行时间: 15 min
泵设置	最小冲程: 自动 压缩系数: $50 \times 10^{-6}$ /bar 主通道: 自动
流速	0.400 mL/min
温度	30 °C
检测	257 nm 20 Hz
进样	进样量: 5 $\mu$ L 样品温度: 10 °C 进样针清洗: 用 ACN/水 (50/50) 冲洗 3 s

## 结果与讨论

### 等度色谱方法

通过这一应用，解锁了泵混合流动相，从而以准确、稳定和精确的方式分离等度样品组分的能力。通过运行 10 次等度样品进样来测试重现性和方法兼容性，其中一个序列使用溶剂通道 A/B，另一个序列使用 C/D 作为混合流动相的溶剂管线。使用每个序列的最后 7 个连续色谱图进行评估（见图 1）。

在两种系统上运行相同的方法。对应色谱图的叠加图表明，两种系统的两种通道组合在峰保留时间方面具有出色的重现性。峰形的微小差异与仪器之间的微小差异有关。

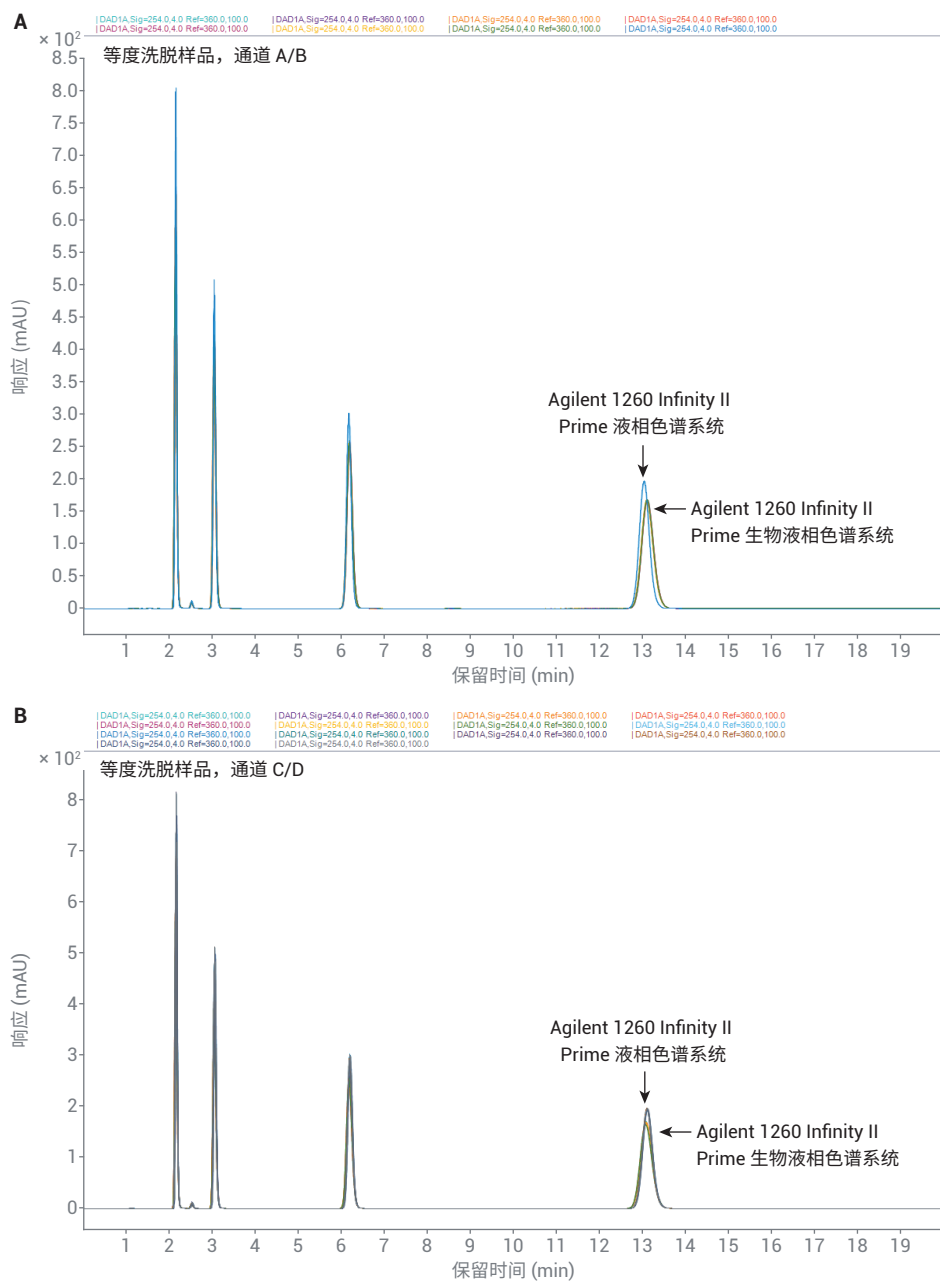


图 1. 在 Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统和 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统上对等度样品进行 7 次后续色谱运行的叠加图。(A) 通道 A/B 的数据；(B) 通道 C/D 的数据



两种系统的溶剂组成精度指标均定义为 < 0.15% RSD 或 0.02 分钟 SD，以较大者为准。表 4 显示了等度样品在其成分的给定保留时间下的组成精度 RSD 值。无论使用何种溶剂通道组合，泵的出色性能都可以得到保证。具有优异的方法兼容性，RT 偏差远低于 ±1% 范围，证明两台仪器之间的性能高度匹配。

### 快速梯度方法

UHPLC 方法通常使用在较高背压下运行的小颗粒色谱柱的更快、更陡的溶剂组成梯度。在本例中，采用从 20% B 升至 90% B 的 5 分钟梯度，运行时间为 6 分钟。将两种系统生成的 7 条 UV 曲线进行叠加，显示了出色的泵混合精度重现性 (图 2, 表 5)。

可以看出两种系统之间的保留时间差异，在较晚洗脱的峰中尤其明显。然而，两种仪器之间洗脱样品成分的相对保留时间偏差 (%RT) 远低于 2%，证明了方法兼容性，这一点十分重要。

表 4. 两种溶剂通道的方法兼容性和保留时间 (RT) 精度评估。使用来自两种液相色谱系统的 7 次进样平均 RT 值。在方法兼容性评估中，使用 Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统的值作为参考

溶剂通道	保留时间 1260 Agilent Infinity II Prime 液相色谱系统 (min)	保留时间 %RSD	保留时间 1260 Agilent Infinity II Prime 生物液相色谱系统 (min)	保留时间 %RSD	保留时间偏差 (min)	保留时间偏差 (%)
A/B	2.1533	0.0408	2.1487	0.0164	0.0046	-0.2134
A/B	3.0430	0.0361	3.0431	0.0771	0.0000	0.0012
A/B	6.1627	0.0226	6.1780	0.0417	-0.0153	0.2478
A/B	13.0088	0.0236	13.0808	0.0235	-0.0720	0.5537
C/D	2.1579	0.0536	2.1494	0.0385	0.0085	-0.3920
C/D	3.0534	0.0632	3.0435	0.0523	0.0099	-0.3244
C/D	6.1957	0.0349	6.1791	0.0380	0.0165	-0.2668
C/D	13.1101	0.0190	13.0814	0.0232	0.0287	-0.2191

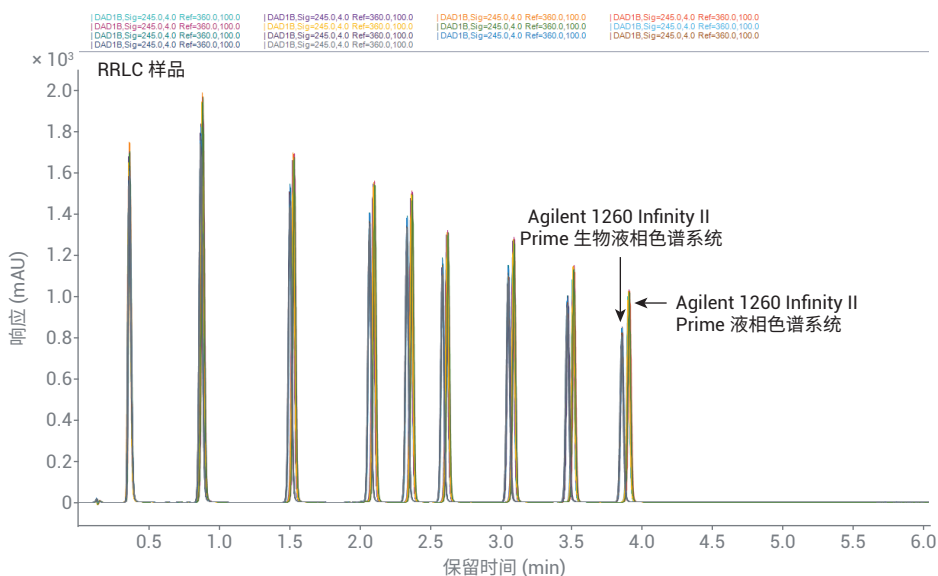


图 2. 在 Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统和 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统上对 RRLC 样品进行 7 次后续色谱运行的叠加图

表 5. 使用 RRLC 样品进行的方法兼容性和保留时间 (RT) 精度评估。使用来自两种液相色谱系统的 7 次进样平均 RT 值。在方法兼容性评估中，使用 Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统的值作为参考

化合物鉴定 RRLC 样品	保留时间 Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统 (min)	RT %RSD	保留时间 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统 (min)	RT %RSD	保留时间偏差 (min)	保留时间偏差 (%)
1	0.3604	0.5275	0.3593	0.0766	0.0012	-0.3233
2	0.8738	0.3954	0.8625	0.0578	0.0113	-1.2879
3	1.5150	0.3013	1.4900	0.0514	0.0250	-1.6513
4	2.0798	0.2418	2.0486	0.0252	0.0312	-1.5021
5	2.3447	0.1989	2.3117	0.0327	0.0331	-1.4106
6	2.5960	0.1765	2.5610	0.0238	0.0350	-1.3463
7	3.0619	0.1427	3.0236	0.0617	0.0384	-1.2531
8	3.4828	0.1268	3.4395	0.0684	0.0434	-1.2448
9	3.8720	0.1170	3.8227	0.0369	0.0492	-1.2719

## 平缓梯度方法

在第三个应用中，选择了复杂样品进行分析，需要使用非常平缓的梯度来进行分离。灵芝子实体提取物是一种富含三萜类化合物的提取物，由 USP (USP, Rockville, MD, USA) 作为标准试剂提供。分离方法基于 USP 发布的色谱方法<sup>[1]</sup>，根据灵芝子实体干提取物批次证书 F012B0，USP 目录号 1288372<sup>[2]</sup> 对所得峰进行峰归属。如图 3 所示，两种系统均实现了良好的流动相组成精度和相同的样品洗脱模式。

但是，可以观察到保留时间偏移，在方法的等度保持步骤期间尤其明显（图 3）。表 6 详细显示了这一点，其中几个峰的保留时间偏差超过 5%，表明与前两种应用相比，这种特殊方法的兼容性较差。

为了进一步评估 RT 偏差较大的根本原因，对方法进行了略微调整，将 B 的等度保持步骤调整为原方法的  $\pm 0.2\%$ 。这模拟了两台泵之间的微小组成准确度差异导致的分离化合物保留时间的变化，两台泵的偏差仍在  $\pm 0.4\%$  的指定范围内。如图 4 所示，组成的微小变化导致洗脱峰的保留时间发生了明显的偏移，表明该方法对组成变化过于敏感，从而高估了两台泵之间的组成准确度差异。在测试方法兼容性时，通常需要考虑这种影响。

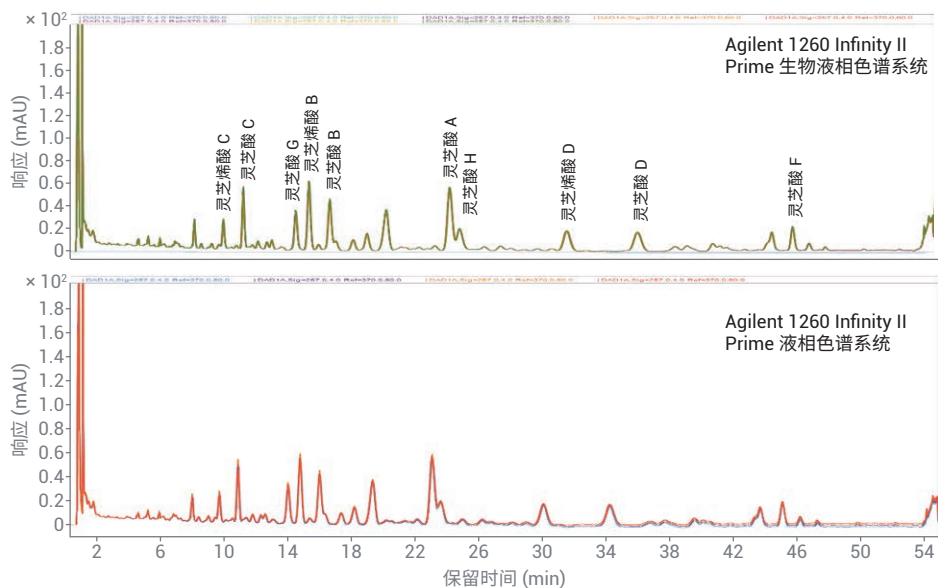


图 3. 在 Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统和 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统上对灵芝子实体提取物进行 7 次后续色谱分离的叠加图。如上文所述进行峰归属

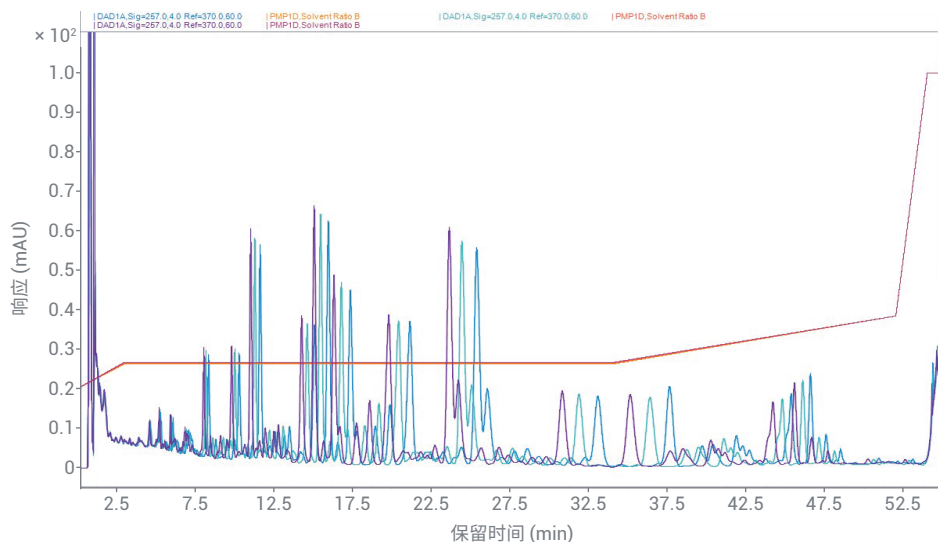


图 4. 等度保持步骤的细微变化对保留时间的影响。等度保持步骤调整了  $\pm 0.2\%$  B。显示 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统的结果绿色：26.5% B 等度保持步骤（原始）；蓝色：26.3% B；品红：26.7% B

表 6. Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统和 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统之间保留时间偏差的计算。将 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统的保留时间作为计算偏差的参考。对应显示了每台仪器的 RT 精度。各 RT 和 RT %RSD 值为 7 次测量的平均值

化合物鉴定 灵芝提取物	保留时间 Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统 (min)	RT %RSD	保留时间 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统 (min)	RT %RSD2	保留时间 偏差 (min)	保留时间 偏差 (%)
1. 灵芝烯酸 C	9.6596	0.1357	9.9924	0.0111	-0.3327	3.4446
2. 灵芝酸 C	10.8330	0.1216	11.2505	0.0112	-0.4176	3.8546
3. 灵芝酸 G	13.9869	0.0977	14.5709	0.0123	-0.5839	4.1749
4. 灵芝烯酸 B	14.7444	0.0811	15.4070	0.0138	-0.6627	4.4943
5. 灵芝酸 B	15.9688	0.0868	16.7174	0.0136	-0.7486	4.6878
6. 灵芝酸 A	23.0435	0.1056	24.2967	0.0136	-1.2532	5.4386
7. 灵芝酸 H	23.5823	0.1021	24.9284	0.0082	-1.3461	5.7080
8. 灵芝烯酸 D	30.0558	0.0992	31.7005	0.0223	-1.6447	5.4721
9. 灵芝酸 D	34.2341	0.1031	36.1752	0.0187	-1.9411	5.6700
10. 灵芝酸 F	45.1035	0.0405	45.9687	0.0108	-0.8652	1.9182

## 结论

在本技术概述中，通过运行三种不同的应用，将新型 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统的性能与基于标准不锈钢的 Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统进行了比较。由于各系统在三种应用中都具有较高的重现性，因此可以证明等度和快速梯度方法具有良好的方法兼容性。相对于相应洗脱化合物的保留时间，保留时间偏差保持在  $\pm 2\%$  以下。

第三种应用采用平缓的梯度，包括时间较长的等度保持步骤，使许多洗脱化合物具有更高的 RT 偏差。结果表明，两种系统之间流动相组成的微小差异可能会造成较大的偏差。即使泵在其组成准确度指标

范围内运行，仍会显示大于 5% 的 RT 偏移，表明使用合适的方法来评估方法兼容性的重要性。

## 参考文献

1. Ganoderma lucidum Fruiting Body Monograph, Source URL: <https://hmc.usp.org/monographs/ganoderma-lucidum-fruiting-body-1-0>, The United States Pharmacopeial Convention, **2015**
2. Ganoderma lucidum Fruiting Body Dry Extract Lot Certificate F012B0, USP Catalog No. 1288372, The United States Pharmacopeial Convention, **2014**

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

DE44314.0505092593

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5月20日，中国出版  
5994-3533ZHCN

了解更多信息：

[www.agilent.com/chem/infinitylab-bio-lc-solutions](http://www.agilent.com/chem/infinitylab-bio-lc-solutions)

如需获取技术问题的答案和安捷伦社区的资源，请访问：

[community.agilent.com](http://community.agilent.com)

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)

DE44348.2760069444

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6月1日，中国出版  
5994-2900ZHCN