Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

满足未来需求的生物制药QC实验室液相色谱系统：采用ACQUITY UPLC H-Class Bio进行HPLC肽图分析

Eoin F.J. Cosgrave 和 Sean M. McCarthy
沃特世公司（美国马萨诸塞州米尔福德市）

应用优势

- 将肽图应用由HPLC向UPLC转移
- 满足实验室未来需求的UPLC分析方法

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC H-Class Bio系统

XBridge™ BEH C_{18} 130 Å 4.6 x 100 mm, 3.5 µm色谱柱（部件号 186003033）

MassPREP™ 肽混合物标准品（部件号 186002337）

Empower® 3 软件

关键词

生物制药分析，肽图分析，QC实验室

简介

此应用纪要将描述把生物制药HPLC分离方法转换为UPLC®方法时所执行一系列操作中的第一步。本文将介绍肽图分析方法由四元HPLC系统转移到ACQUITY UPLC® H-Class Bio系统的过程。第一步的目标是在UPLC系统上操作与HPLC完全相同的HPLC检测。此方法使QC实验室能够利用UPLC技术进行传统的HPLC分析，然后将其转换为UPLC分析。检测重现性的改善，以及最终同UPLC技术相结合，都将在后期进行系列讨论。

肽图分析是QC实验室中进行大分子药物日常分析的常用检测法。由于保留时间和选择性受大量试验参数的影响，所以在QC环境中进行肽分离困难重重。因此，鉴于新仪器的检定要求以及为UPLC仪器建立并验证新方法的需求，在QC环境中采用新的分离技术（如UPLC）是一项比较困难的任务。监管机构和药典委员会逐渐认识到UPLC在产品鉴定方面具有优势。同样，监管方针和药典各论正着手拟定用于未来药物应用的新分析要求。因此，生产此类药物的公司处于这种环境压力下，需要开始采用新的分析技术。

作为QC实验室中日常生物制药分析由HPLC转向UPLC技术的第一步，本文将展示一种使用ACQUITY UPLC H-Class Bio系统运行传统HPLC肽图分析方法的简化过程。此过程将帮助实验室实现UPLC技术，而无需增加开发、验证和鉴定新UPLC分离方法的额外负担。相比于HPLC仪器获取的等效肽图，在ACQUITY UPLC H-Class Bio系统上运行的HPLC肽图分析能够给出类似的色谱图。借助实验室中建立的UPLC技术，工作的重心即可放在将传统HPLC分析方法转换至UPLC分析方法，而不会对HPLC的分析工作流程造成破坏。然后，用户便可以在未来的合适时间利用之前已检定的仪器，对ACQUITY UPLC H-Class Bio系统进行配置，用于UPLC分离。

实验

UPLC条件

系统：	ACQUITY UPLC H-Class Bio
检测器：	ACQUITY UPLC 可变波长 UV (TUV)
扩充定量环：	100 µL
Bio混合器体积：	250 µL
色谱柱：	XBridge BEH C_{18} 130 Å 4.6 x 100 mm, 3.5 µm
柱温：	40 °C
流速：	0.500 mL/min
进样体积：	95 µL
流动相A：	含0.1% (v/v) TFA的H_2O
流动相B：	含0.1% (v/v) TFA的乙腈
检测波长：	214 nm

梯度：

时间 (min)	流速 (ml/min)	%A	%B	%C	%D	曲线
–	0.500	95	5	0	0	–
5.00	0.500	95	5	0	0	6
45.00	0.500	50	50	0	0	6
47.50	0.500	5	95	0	0	6
52.50	0.500	5	95	0	0	6
52.60	0.500	95	5	0	0	6
60.00	0.500	95	5	0	0	6

样品描述

本研究中制备了三种不同的肽以供使用：Waters® MassPREP肽混合物标准品，核糖核酸酶B (Sigma Aldrich，USA) 和英夫利昔单抗，后两种肽的未消化蛋白质样品按照以下步骤制备。取500 µg的核糖核酸酶B或英夫利昔单抗，经二硫苏糖醇还原，碘乙酰胺烷基化，最后使用NAP-5色谱柱 (GE Healthcare，USA) 进行分离。向每种蛋白质中添加测序级胰蛋白酶 (Promega，USA) 至最终组成为1:20的酶/底物，然后样品置于37 °C条件下消化过夜。消化完成后，经70 °C孵育15 min使胰蛋白酶失活，然后将60 µL的已消化蛋白质复溶于40 µL的5% MeCN/0.1% TFA中，形成浓度为0.6 µg/µL的最终肽浓度。

结果与讨论

在仪器方法中添加梯度起始补偿

作为从HPLC转换到UPLC的第一步，本研究评估了ACQUITY UPLC H-Class Bio系统利用传统HPLC肽图分析法的相同条件生成类似色谱图的能力。此研究使用了MassPREP肽混合物标准品，其中含有疏水性不同的各种肽，可在设定的梯度范围内进行常规洗脱。使用ACQUITY UPLC H-Class Bio系统和HPLC仪器对MassPREP肽混合物进行分析，其中均配备有XBridge C_{18} 130 Å，3.5 µm色谱柱。如图1A所示，ACQUITY UPLC H-Class Bio系统上运行的分离显示肽混合物标准品中所有峰的洗脱位置提前。此结果表明UPLC相比HPLC减少的驻留体积引起了峰保留时间的变化。

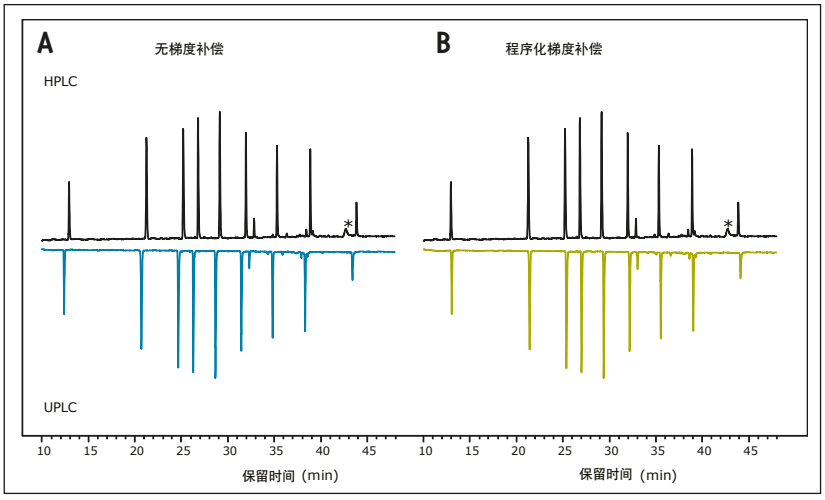

图1. 在具有不同驻留体积的仪器上生成的梯度起始补偿校准色谱图。利用HPLC或UPLC分离一个MassPREP肽混合物标准品。将不做任何改动直接转换的肽图分析方法与ACQUITY UPLC H-Class Bio仪器方法进行对比。(B)ACQUITY UPLC H-Class Bio仪器方法中添加360 µL梯度起始补偿体积后所得的色谱图。标有星号的峰(*)为HPLC仪器中观测到的系统峰。

对ACQUITY UPLC H-Class Bio系统分析方法进行简单的调整后，此差异即可消除，即模拟更大的驻留体积。为实现此调整，我们计算了每台仪器的驻留体积，发现仪器间存在360 µL的差异。然后仅改变ACQUITY UPLC H-Class Bio仪器方法中的这一数值，作为梯度起始补偿体积，如图2所示。

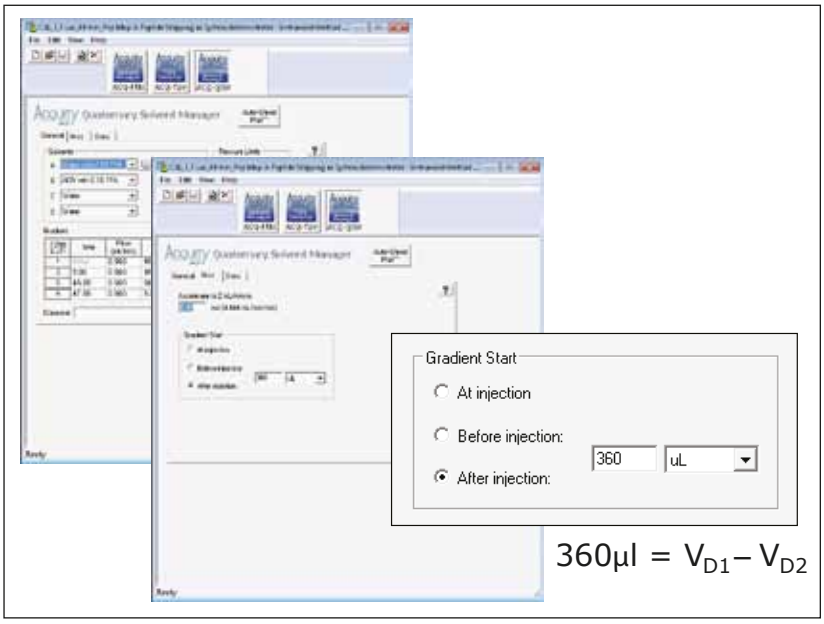

图2．调整现有HPLC肽图分析仪器方法，在其中包含梯度起始补偿。要访问仪器方法中的此选项，请选择QSM选项卡下的“Misc”（其它）选项卡。弹出的窗口将提供用于在所选肽图分析方法中包含梯度起始选项的字段。选择“after injection”（进样后）选项，输入各仪器之前已计算的驻留体积差异。

样品注入后，增加梯度起始补偿可增加等度保持阶段的长度，提供了一种用于模拟具有更大驻留体积仪器的方法。由于进样步骤采用常规方式进行，因此该补偿不会影响可能在等度保持阶段中洗脱的死体标记物，确保所有的未保留分子可在色谱图中相似的位置处显示。此性质实现了相对保留时间的连续性，从而可以按照死体标记物计算感兴趣的参比峰。如图1B所示，完成驻留体积校准后，MassPREP肽混合物标准品的分离可获得与原有HPLC系统几乎一样的色谱性能。

梯度起始补偿对胰蛋白酶化核糖核酸酶B的影响

虽然梯度起始补偿功能可以校准两台独立仪器上所得的色谱图，但MassPREP肽混合物标准品仅包含有限数量的峰。为拓宽此方法的实际应用，我们选取以胰蛋白酶化核糖核酸酶B形式存在的更为复杂的样品进行分析。如图3所示，启用梯度起始补偿后，ACQUITY UPLC H-Class Bio系统上获得的核糖核酸酶B的肽图和传统HPLC所得的肽图高度一致。相似峰的保留时间略有不同，但这些差别不超过两秒钟，如表1所示。我们还计算了各仪器上全部33个检出峰的相对保留时间，用以确定HPLC和UPLC仪器之间的兼容性程度，如表1所示。每台仪器所得的肽图表现出极为类似的相对保留时间值。

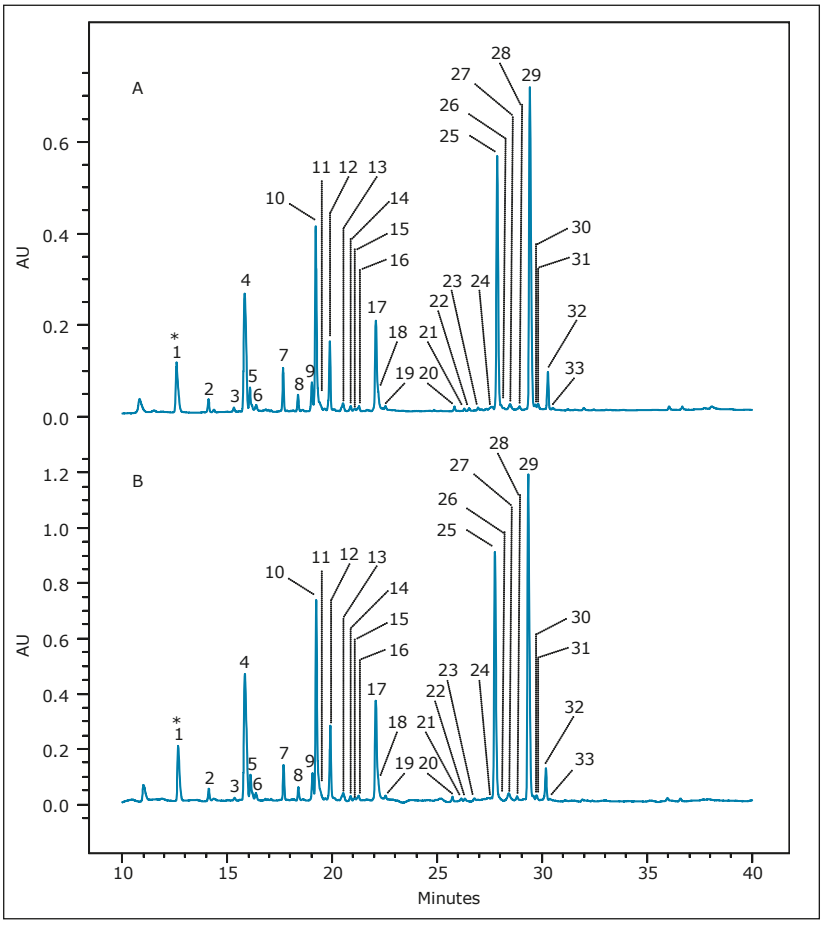

图3．采用梯度起始补偿功能对HPLC和ACQUITY UPLC H-Class Bio系统上采集的胰蛋白酶化核糖核酸酶B肽图进行校准。利用来自胰蛋白酶化核糖核酸酶B的肽混合物评估梯度起始补偿功能的稳定性。通过使用同样的360 µL补偿，HPLC生成的肽图(A)可由ACQUITY UPLC H-Class Bio系统生成，并可实现近乎相同的分离。标有星号(*)的峰用于计算相对保留时间。

峰	传统 HPLC		ACQUITY UPLC H-Class Bio		D
	RT (min)	RRT	RT (min)	RRT	
1	12.680	1.000	12.604	1.000	0.000
2	14.140	1.115	14.127	1.121	0.006
3	15.372	1.212	15.332	1.216	0.004
4	15.856	1.250	15.845	1.257	0.007
5	16.128	1.272	16.099	1.277	0.005
6	16.381	1.292	16.396	1.301	0.009
7	17.699	1.396	17.678	1.403	0.007
8	18.403	1.451	18.383	1.459	0.007
9	19.072	1.504	19.042	1.511	0.007
10	19.250	1.518	19.228	1.526	0.007
11	19.680	1.552	19.647	1.559	0.007
12	19.923	1.571	19.900	1.579	0.008
13	20.540	1.620	20.529	1.629	0.009
14	20.886	1.647	20.889	1.657	0.010
15	21.091	1.663	21.109	1.675	0.011
16	21.272	1.678	21.294	1.689	0.012
17	22.083	1.742	22.086	1.752	0.011
18	22.402	1.767	22.408	1.778	0.011
19	22.546	1.778	22.543	1.789	0.010
20	25.822	2.036	25.832	2.050	0.013
21	26.150	2.062	26.301	2.087	0.024
22	26.332	2.077	26.526	2.105	0.028
23	26.780	2.112	26.956	2.139	0.027
24	27.580	2.175	27.590	2.189	0.014
25	27.755	2.189	27.863	2.211	0.022
26	28.030	2.211	28.171	2.235	0.025
27	28.413	2.241	28.474	2.259	0.018
28	28.810	2.272	28.928	2.295	0.023
29	29.338	2.314	29.414	2.334	0.020
30	29.578	2.333	29.674	2.354	0.022
31	29.734	2.345	29.811	2.365	0.020
32	30.181	2.380	30.276	2.402	0.022
33	30.365	2.395	30.512	2.421	0.026

表1. 启用梯度起始补偿功能时，HPLC和ACQUITY UPLC H-Class Bio系统上分离的胰蛋白酶化核糖核酸酶B生成了几乎相同的色谱数据。核糖核酸酶B的肽图中，记录了33个测定峰的保留时间(RT)和相对保留时间(RRT)。实验计算并记录了HPLC和UPLC分离之间的相对保留时间差异(D)。

梯度起始补偿法校准胰蛋白酶化单克隆抗体肽图

为进一步拓宽梯度起始补偿法的应用，我们选取英夫利昔单抗（一种治疗性单克隆抗体）进行分析，因为其代表了QC实验室中日常肽图分析常用的蛋白质。虽然UPLC和HPLC的色谱图内约有90个相同的峰，我们只选择了共56个英夫利昔单抗的肽峰进行测定。色谱峰的选择基于很多因素，包括信号强度、洗脱位置和相对分离度。选择此方法的目的是为了简化对比分析。使用ACQUITY UPLC H-Class Bio系统进行分离时，相比于HPLC仪器上的分析结果，UPLC系统上所得的英夫利昔单抗肽图显示出明显的色谱一致性，如图4所示。如表2所示，我们评估了相对保留时间，实际上报告值小于0.005时没有观察到任何不同。这些数据证实：采用梯度起始补偿是实现从传统HPLC肽图方法向ACQUITY UPLC H-Class Bio系统转换的适用策略。

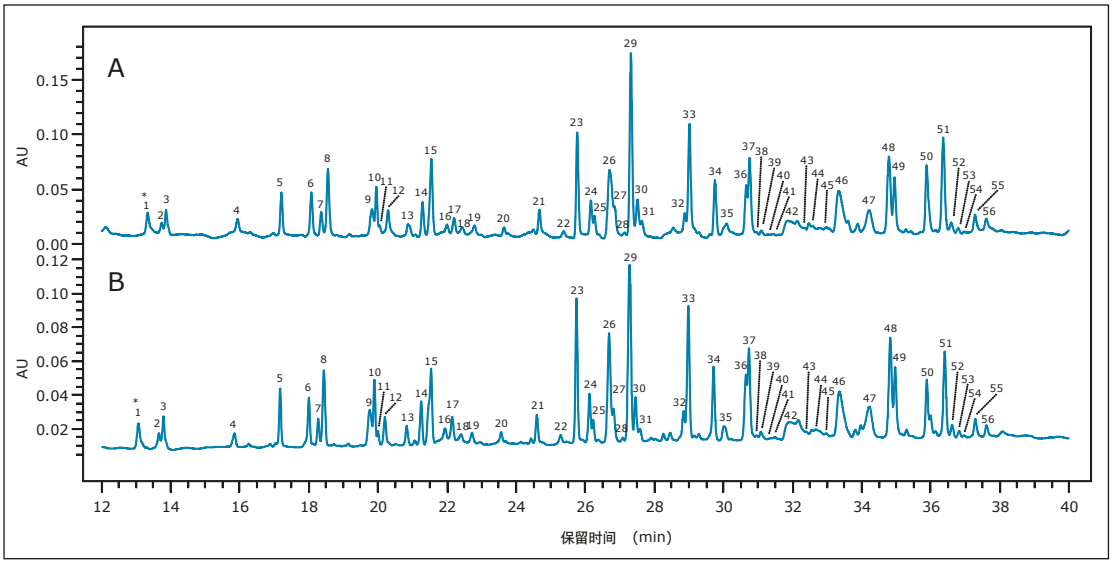

图4. 复杂胰蛋白酶化英夫利昔单抗的梯度起始补偿功能校准色谱图。选取英夫利昔单抗评估梯度起始补偿选项的驻留体积调整性能。HPLC系统(A)和UPLC系统(B)上生成的色谱图表现出全面的相似性。各色谱图中标有星号(*)的峰用于计算相对保留时间。

峰	传统 HPLC		ACQUITY UPLC H-Class Bio		D
	RT (min)	RRT	RT (min)	RRT	
1	13.060	1.000	13.034	1.000	0.000
2	13.655	1.046	13.639	1.046	0.001
3	13.785	1.056	13.770	1.056	0.001
4	15.843	1.213	15.826	1.214	0.001
5	17.165	1.314	17.151	1.316	0.002
6	17.997	1.378	17.982	1.380	0.002
7	18.267	1.399	18.254	1.400	0.002
8	18.430	1.411	18.416	1.413	0.002
9	19.757	1.513	19.741	1.515	0.002
10	19.894	1.523	19.878	1.525	0.002
11	19.995	1.531	19.980	1.533	0.002
12	20.197	1.546	20.180	1.548	0.002
13	20.826	1.595	20.815	1.597	0.002
14	21.247	1.627	21.233	1.629	0.002
15	21.533	1.649	21.518	1.651	0.002
16	21.938	1.680	21.916	1.681	0.002
17	22.147	1.696	22.125	1.697	0.002
18	22.403	1.715	22.382	1.717	0.002
19	22.721	1.740	22.705	1.742	0.002
20	23.563	1.804	23.547	1.807	0.002
21	24.596	1.883	24.582	1.886	0.003
22	25.288	1.936	25.270	1.939	0.002
23	25.745	1.971	25.730	1.974	0.003
24	26.121	2.000	26.106	2.003	0.003
25	26.227	2.008	26.211	2.011	0.003
26	26.686	2.043	26.668	2.046	0.003
27	26.815	2.053	26.792	2.056	0.002
28	27.081	2.074	27.063	2.076	0.003
29	27.281	2.089	27.266	2.092	0.003
30	27.452	2.102	27.436	2.105	0.003
31	27.587	2.112	27.569	2.115	0.003
32	28.844	2.209	28.831	2.212	0.003
33	28.982	2.219	28.969	2.223	0.003
34	29.713	2.275	29.701	2.279	0.004
35	30.015	2.298	30.022	2.303	0.005
36	30.647	2.347	30.636	2.350	0.004
37	30.737	2.354	30.726	2.357	0.004
38	30.963	2.371	30.950	2.375	0.004
39	31.085	2.380	31.075	2.384	0.004
40	31.493	2.411	31.484	2.416	0.004
41	31.934	2.445	31.899	2.447	0.002
42	32.164	2.463	32.156	2.467	0.004
43	32.393	2.480	32.410	2.487	0.006
44	32.553	2.493	32.537	2.496	0.004
45	32.972	2.525	33.102	2.540	0.015
46	33.354	2.554	33.342	2.558	0.004
47	34.222	2.620	34.213	2.625	0.005
48	34.828	2.667	34.819	2.671	0.005
49	34.970	2.678	34.962	2.682	0.005
50	35.887	2.748	35.876	2.752	0.005
51	36.404	2.787	36.396	2.792	0.005
52	36.619	2.804	36.614	2.809	0.005
53	36.824	2.820	36.818	2.825	0.005
54	36.965	2.830	36.959	2.836	0.005
55	37.292	2.855	37.281	2.860	0.005
56	37.616	2.880	37.603	2.885	0.005

表2．梯度起始补偿能够生成极为相近的复杂单克隆抗体肽图色谱数据。英夫利昔单抗的肽图中，记录了56个测定峰的保留时间(RT)和相对保留时间(RRT)。实验计算并记录了HPLC和UPLC分离之间的相对保留时间差异(D)。

结论

大分子分离由HPLC向UPLC的转换是QC实验室中的关键性难题。虽然UPLC的优势十分明显，但很多实验室并不愿做出改变，主要原因是仪器和新的UPLC分离的检定和验证十分耗时。本应用纪要对使用ACQUITY UPLC H-Class Bio系统进行HPLC肽图分析进行了详细描述。以梯度起始补偿的形式对传统HPLC作出简单的调整后，ACQUITY UPLC H-Class Bio系统可获得与HPLC所得近乎相同的色谱图。值得重点注意的是，本应用纪要描述的方法应当根据具体情况使用，因为蛋白质种类繁多，所含的肽对分离条件的变化会出现不同的响应。通过使用梯度起始补偿消除不同仪器间的驻留体积差异，QC实验室可以顺利采用UPLC仪器方法，而无需直接转为UPLC分离，避免了过去在为UPLC方法转换做出努力之后仍情愿选择使用传统HPLC方法的情况。这使得QC实验室能够让自己的仪器与组织内部其他部门的仪器技术保持在同一水平，实现与时俱进，并逐步转向UPLC技术，将对分析工作流程的影响降至最低。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, UPLC, ACQUITY UPLC, Empower和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。 XBridge, MassPREP是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

© 2013 沃特世公司。中国印刷。

2013 年 2 月 720004614ZH AG-PDF

沃特世科技（上海）有限公司
北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999

沃特斯中国有限公司
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com