Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

运用ACQUITY Arc可靠地对肽图分析方法进行转换

Brooke M. Koshel和Sean M. McCarthy
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

应用优势

- 无需改变方法参数即可将肽图分析从Agilent 1100系列HPLC系统无缝转换至ACQUITY® Arc™系统。
- 不同ACQUITY Arc系统之间具有出色的系统间重现性。
- 将互补的质谱信息纳入到常规工作流程中。

沃特世解决方案

ACQUITY Arc系统

2489紫外可见光(UV/Vis)检测器

ACQUITY QDa®质谱检测器

XBridge® BEH C_{18}色谱柱

Empower® 3软件

关键词

方法转换，ACQUITY Arc，ACQUITY QDa，肽

简介

ACQUITY Arc系统能够在同一个平台上运行HPLC和UHPLC分离，是一款可以填补HPLC与UPLC®之间的性能差距的LC平台。利用Arc Multi-flow path™技术，用户可在流路1与流路2之间轻松切换，从而实现无缝的方法转换或改善现有方法。此前的研究表明，ACQUITY Arc系统能够轻松转换单克隆抗体的SEC-HPLC方法[1]以及CEX-HPLC方法[2]。这两项研究均采用流路1来模拟HPLC分离，而且两次分析的结果表明系统之间的相对保留时间、峰面积百分比和分离度几乎相同。本应用纪要的目的是展示不同LC平台之间进行肽图分析方法转换的等效性。

肽图分析已成为生物制药行业的一项常规分析，通常采用平台检测的方式进行。肽图可用于表征蛋白质的氨基酸序列，从而对蛋白质进行鉴定以及表征翻译后修饰。在产品的商业转化过程中，肽图常被用于批释放测试或在鉴定完成后用于基因稳定性检测[3]。肽图并不是一种通用的方法，分析人员必须针对特定的目标蛋白质专门开发分析方法[4]。为了获得高重现性的肽图，每种分析方法都必须考虑酶解和分离因素，只有这样才能准确评估鉴定结果以及与稳定性、安全性和有效性相关的关键质量属性(CQA)。

由于为特定的蛋白质建立肽图有一定的难度，本应用纪要将一个60分钟的通用平台方法从Agilent 1100系列HPLC转换至ACQUITY Arc系统，并对方法转换过程进行了评估。然后，在两款不同的ACQUITY Arc系统上应用该方法，通过对比所得的结果评估系统之间的差异性。最后，除光学检测技术之外，我们还使用ACQUITY QDa质谱检测器演示了如何将质谱检测技术应用于这类分析。

实验

样品描述

取90 µL 10 mg/mL的英夫利昔单抗，用二硫苏糖醇进行还原处理，并使用碘乙酰胺进行烷基化处理。加入胰蛋白酶酶解样品(酶与底物之比为1:20)，然后在37 °C下水浴18小时，最后加入纯TFA使胰蛋白酶失活。酶解后样品的最终浓度约为0.4 mg/mL，无需进一步稀释，直接进样分析。

LC条件

LC系统:	配备2489 UV/Vis检测器和QDa质谱检测器的ACQUITY Arc系统，流路1
	配备四元泵和DAD检测器的Agilent 1100系列HPLC系统
扩充定量环:	100 µL
吸收波长:	214 nm
采样速率:	20 Hz
色谱柱:	XBridge BEH C_{18} 130Å, 3.5 µm, 4.6 mm x 100 mm (部件号186003033)
	XBridge BEH C_{18} XP 130Å, 2.5 µm, 4.6 mm x 100 mm (部件号186006039)
柱温:	40 °C
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
样品温度:	4 °C

进样体积: 75 µL

梯度:

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	%C	%D
Initial	0.500	95	5	0	0
5.00	0.500	95	5	0	0
45.00	0.500	50	50	0	0
47.50	0.500	5	95	0	0
52.50	0.500	5	95	0	0
52.60	0.500	95	5	0	0
60.00	0.500	95	5	0	0

QDa设置

采样速率:	2 Hz
质量数范围:	350 to 1250 Da
锥孔电压:	10 V
毛细管电压:	1.5 kV
探头温度:	500 °C

数据管理

Empower 3 CDS软件，SR2

结果与讨论

从Agilent 1100系列HPLC系统到ACQUITY Arc系统的HPLC肽图方法转换实现了方法等效性

为了评估肽图方法从Agilent 1100系列HPLC系统转换到ACQUITY Arc系统时的方法等效性，我们采用如上所述的方法参数建立了英夫利昔单抗的肽图。根据以前的评估结果，我们在ACQUITY Arc系统中配置了一个主动预加热器(CH-30A)，以确保两个系统可实现相当的温度控制水平5。首先在Agilent 1100系列HPLC系统上运行分离，建立一个基准结果(图1A)。然后，维持所有方法参数不变，将该方法转换至ACQUITY Arc系统。实验结果表明，两个系统之间存在185 µL的梯度补偿体积。因此我们在进样之后应用Gradient SmartStart技术6来补偿两个系统之间的延迟体积差异。该功能可相对于进样对梯度进行调节，而无需更改梯度表。ACQUITY Arc系统所得的色谱图如图1B所示。两个系统生成的色谱图显示出良好的一致性。

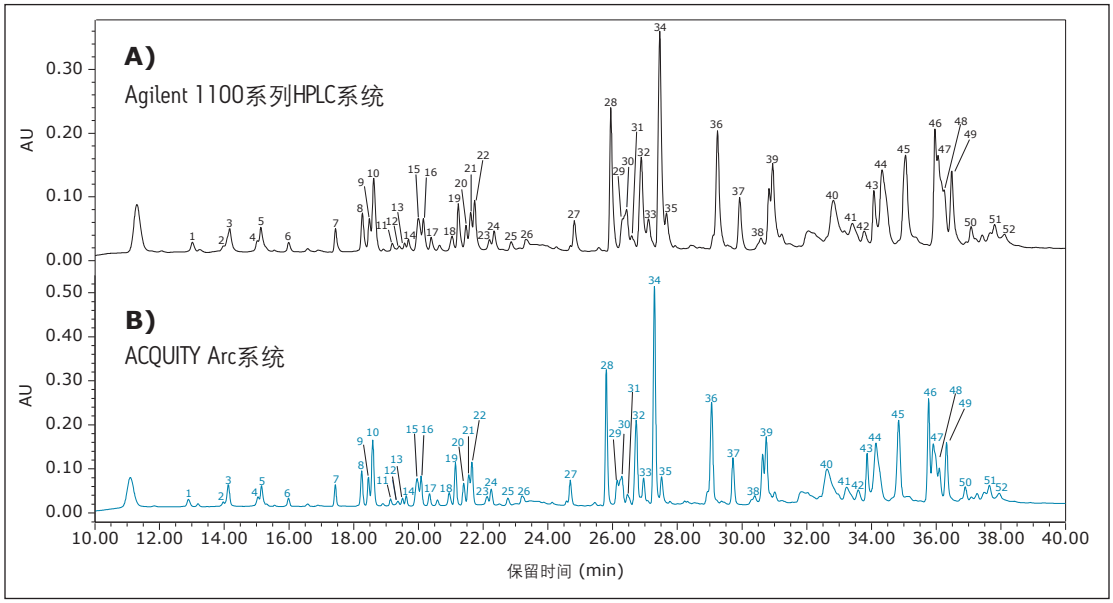

图1. 英夫利昔单抗的肽图对比，分别采用A) Agilent 1100系列HPLC系统和B) 应用了梯度补偿的ACQUITY Arc系统采集数据。实验计算了所有标记峰的相对保留时间。色谱峰的选择由洗脱位置和强度决定。相对保留时间依据峰1计算。

为进一步评估结果的可比性，我们研究了保留时间。表1列出了52个峰的保留时间，两个系统所得的对应色谱峰的保留时间之间略有差异，而对应色谱峰的相对保留时间之间的差异小到可以忽略不计。借助采用Gradient SmartStart技术的流路1，我们在不改变任何方法参数的前提下成功地将HPLC方法转换到了现代LC平台上。

色谱峰	Agilent 1100系列HPLC系统		ACQUITY Arc系统		Δ
	保留时间 (min)	相对保留时间 (RRT)	保留时间 (min)	相对保留时间 (RRT)	
1	13.01	1.00	12.89	1.00	0.000
2	13.96	1.07	13.97	1.08	0.010
3	14.16	1.09	14.12	1.10	0.007
4	15.02	1.15	15.04	1.17	0.012
5	15.12	1.16	15.15	1.18	0.013
6	15.98	1.23	15.99	1.24	0.011
7	17.43	1.34	17.43	1.35	0.012
8	18.26	1.40	18.25	1.41	0.012
9	18.48	1.42	18.46	1.43	0.011
10	18.61	1.43	18.59	1.44	0.011
11	19.19	1.47	19.14	1.48	0.010
12	19.40	1.49	19.37	1.50	0.011
13	19.57	1.50	19.51	1.51	0.009
14	19.68	1.51	19.62	1.52	0.009
15	19.99	1.54	19.96	1.55	0.011
16	20.15	1.55	20.08	1.56	0.009
17	20.39	1.57	20.34	1.58	0.010
18	21.03	1.62	20.95	1.62	0.008
19	21.23	1.63	21.15	1.64	0.008
20	21.46	1.65	21.40	1.66	0.010
21	21.61	1.66	21.56	1.67	0.011
22	21.73	1.67	21.65	1.68	0.009
23	22.19	1.71	22.12	1.72	0.010
24	22.33	1.72	22.25	1.73	0.009
25	22.86	1.76	22.76	1.77	0.008
26	23.31	1.79	23.20	1.80	0.007
27	24.81	1.91	24.69	1.91	0.008
28	25.94	1.99	25.80	2.00	0.008
29	26.30	2.02	26.14	2.03	0.006
30	26.42	2.03	26.29	2.04	0.007
31	26.58	2.04	26.46	2.05	0.009
32	26.88	2.07	26.73	2.07	0.007
33	27.10	2.08	26.96	2.09	0.007
34	27.45	2.11	27.29	2.12	0.006
35	27.66	2.13	27.51	2.13	0.008
36	29.23	2.25	29.06	2.25	0.007
37	29.92	2.30	29.72	2.30	0.005
38	30.58	2.35	30.39	2.36	0.006
39	30.94	2.38	30.75	2.38	0.006
40	32.81	2.52	32.63	2.53	0.008
41	33.40	2.57	33.23	2.58	0.010
42	33.77	2.60	33.59	2.61	0.009
43	34.07	2.62	33.86	2.63	0.008
44	34.32	2.64	34.14	2.65	0.009
45	35.04	2.69	34.84	2.70	0.008
46	35.96	2.76	35.77	2.77	0.010
47	36.05	2.77	35.91	2.78	0.014
48	36.24	2.79	36.10	2.80	0.014
49	36.47	2.80	36.32	2.82	0.013
50	37.07	2.85	36.90	2.86	0.012
51	37.80	2.91	37.65	2.92	0.014
52	38.10	2.93	37.95	2.94	0.014

表1. 比较图1中Agilent 1100系列HPLC系统和ACQUITY Arc系统鉴定出的52个色谱峰的保留时间。采用Gradient SmartStart技术补偿两个系统之间的延迟体积差异。通过计算所得的Δ值可以看出，由补偿体积造成的相对保留时间差异几乎可以忽略不计。

比较两个系统时，ACQUITY Arc系统表现出了良好的系统间重复性

在整个实验室或其它分析场所中部署新的仪器平台时，确保分析结果的一致性是非常重要的。为了比较不同ACQUITY Arc系统的分析结果，我们采用具有相同核心配置的两套不同的ACQUITY Arc系统，在如上所述的方法条件下执行分析并采集了数据。这两套系统都配置了30 cm CH被动预加热器。每套系统分析时所采用的流动相和样品都是单独制备的，以模仿实际工业环境中不同分析人员在不同实验室内执行样品分析的情形。如图2所示，两个系统所得的英夫利昔单抗肽图具有良好的一致性。评估两个系统的相对保留时间差异之后可知，相对保留时间的差异不超过0.006(如表2所示)。采用同一平台的两台不同仪器获得了几乎相同的结果，表明了分析结果的可靠性。

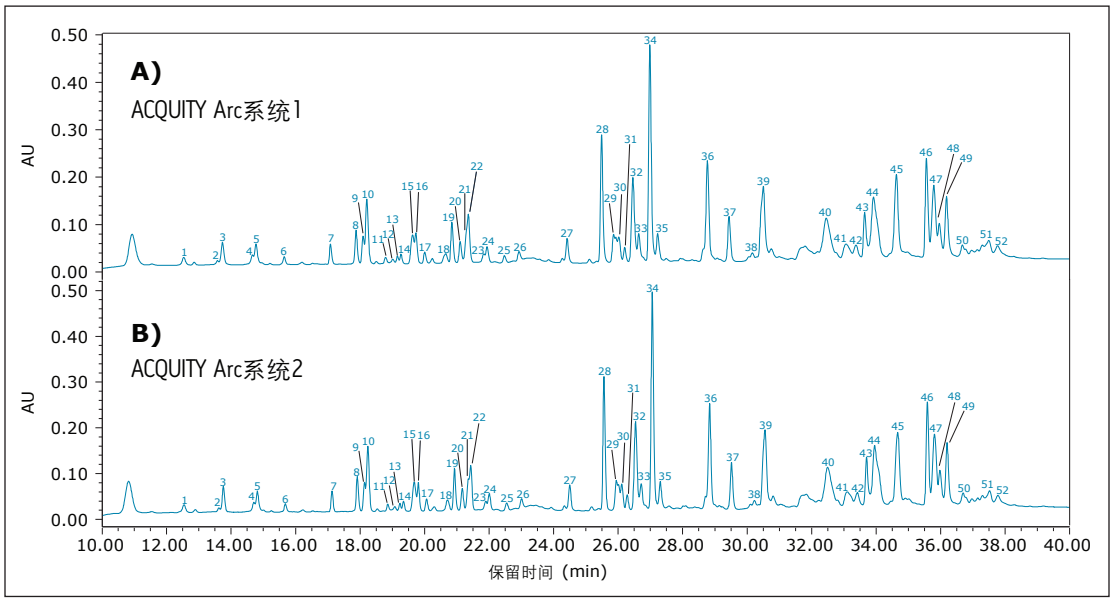

图2. 比较两套不同的ACQUITY Arc系统获得的英夫利昔单抗肽图：A) ACQUITY Arc系统1和B) ACQUITY Arc系统2。实验计算了所有标记峰的相对保留时间。色谱峰的选择由洗脱位置和强度决定。相对保留时间依据峰1计算。

通过质谱检测技术可改善UHPLC肽图数据的分离度

在常规的肽监测分析中，我们通常仅使用光学检测技术测定样品的相对保留时间和峰面积，然后将这些数据与参比标准品的数据进行对比，用以确定分析结果是否符合适应性标准。通过引入ACQUITY QDa质谱检测器作为正交检测方法，我们可借助它提供的质量数信息获得更加可靠的产品一致性分析结果。为了获得上述肽图方法的质谱数据，我们在光学检测器之后串联了ACQUITY QDa质谱检测器。本实验采用了填充小粒径颗粒的色谱柱，目的是充分利用ACQUITY Arc系统能够同时运行HPLC和UHPLC分离的优势。本示例用2.5 µm色谱柱替代了3.5 µm色谱柱。我们并未因色谱柱粒度改变而对方法进行缩放，而是沿用了之前的60分钟分析方法，这样可以充分利用小粒径色谱柱带来的分离度和峰容量优势。

色谱峰	Agilent 1100系列HPLC系统		ACQUITY Arc系统		Δ
	保留时间 (min)	相对保留时间 (RRT)	保留时间 (min)	相对保留时间 (RRT)	
1	12.53	1.00	12.54	1.00	0.000
2	13.58	1.08	13.62	1.09	0.003
3	13.73	1.10	13.76	1.10	0.002
4	14.66	1.17	14.71	1.17	0.003
5	14.77	1.18	14.81	1.18	0.003
6	15.65	1.25	15.68	1.25	0.002
7	17.08	1.36	17.13	1.37	0.003
8	17.87	1.43	17.91	1.43	0.002
9	18.09	1.44	18.14	1.45	0.003
10	18.21	1.45	18.24	1.45	0.002
11	18.79	1.50	18.86	1.50	0.005
12	19.01	1.52	19.08	1.52	0.004
13	19.16	1.53	19.23	1.53	0.005
14	19.27	1.54	19.35	1.54	0.005
15	19.63	1.57	19.68	1.57	0.003
16	19.73	1.57	19.81	1.58	0.005
17	20.00	1.60	20.06	1.60	0.004
18	20.66	1.65	20.71	1.65	0.003
19	20.85	1.66	20.93	1.67	0.005
20	21.10	1.68	21.17	1.69	0.004
21	21.31	1.70	21.36	1.70	0.003
22	21.36	1.70	21.43	1.71	0.005
23	21.83	1.74	21.90	1.75	0.004
24	21.94	1.75	22.01	1.75	0.004
25	22.48	1.79	22.54	1.80	0.004
26	22.93	1.83	23.01	1.83	0.005
27	24.42	1.95	24.50	1.95	0.005
28	25.49	2.03	25.56	2.04	0.005
29	25.86	2.06	25.94	2.07	0.005
30	26.02	2.08	26.11	2.08	0.006
31	26.20	2.09	26.28	2.10	0.005
32	26.46	2.11	26.54	2.12	0.005
33	26.64	2.13	26.72	2.13	0.004
34	26.98	2.15	27.06	2.16	0.005
35	27.23	2.17	27.31	2.18	0.005
36	28.77	2.30	28.84	2.30	0.004
37	29.44	2.35	29.52	2.35	0.005
38	30.16	2.41	30.22	2.41	0.003
39	30.50	2.43	30.56	2.44	0.003
40	32.45	2.59	32.50	2.59	0.002
41	33.07	2.64	33.10	2.64	0.001
42	33.37	2.66	33.42	2.67	0.002
43	33.64	2.68	33.70	2.69	0.003
44	33.92	2.71	33.95	2.71	0.001
45	34.63	2.76	34.67	2.76	0.002
46	35.56	2.84	35.59	2.84	0.001
47	35.79	2.86	35.81	2.86	0.000
48	35.96	2.87	35.98	2.87	0.000
49	36.18	2.89	36.20	2.89	0.000
50	36.68	2.93	36.70	2.93	0.000
51	37.50	2.99	37.52	2.99	0.000
52	37.77	3.01	37.78	3.01	-0.001

表2. 比较图2中两套不同ACQUITY Arc系统鉴定出的52个峰的保留时间。系统之间的保留时间差异极小。由计算的Δ值可知，相对保留时间几乎一样。

图3A展示了使用3.5 µm色谱柱在Agilent 1100系列HPLC系统上获得的色谱图，以便进行比较(另见：图1A)。图3B展示了使用2.5 µm色谱柱在ACQUITY Arc系统上获得的结果，图3C展示了相应的质谱响应。将色谱柱粒径由3.5 µm降至2.5 µm，可以观察到微小的分离度差异。UV/Vis数据与相应的质谱数据高度相关，表明ACQUITY QDa质谱检测器可应用于常规分析。

ACQUITY QDa质谱检测器的引入，能够在完成色谱峰表征之后为分析人员提供确证鉴定结果所需的质谱数据，帮助他们进行批释放测试和产品批次间的比较分析。以肽序列ASQFVGSSIHWYQQR为例，粗体部分表示互补决定区(CDR)序列。根据肽的平均质量1794.0 Da，我们可计算出相应电荷态离子[M+1H]+1、[M+2H]+2和[M+3H]+3的质量分别为1795.0 Da、898.0 Da和599.0 Da。图4A中光学积分峰的质谱数据与图4B中峰顶点的质谱数据相当。我们为ACQUITY QDa质谱检测器设定的扫描范围为350 m/z到最大值1250 m/z。从图4B的质谱数据中我们可以观察到不同电荷态都可以落在该扫描范围内。在实验室环境中完成表征之后，进一步获取质谱数据有助于分析人员对产品进行确认。

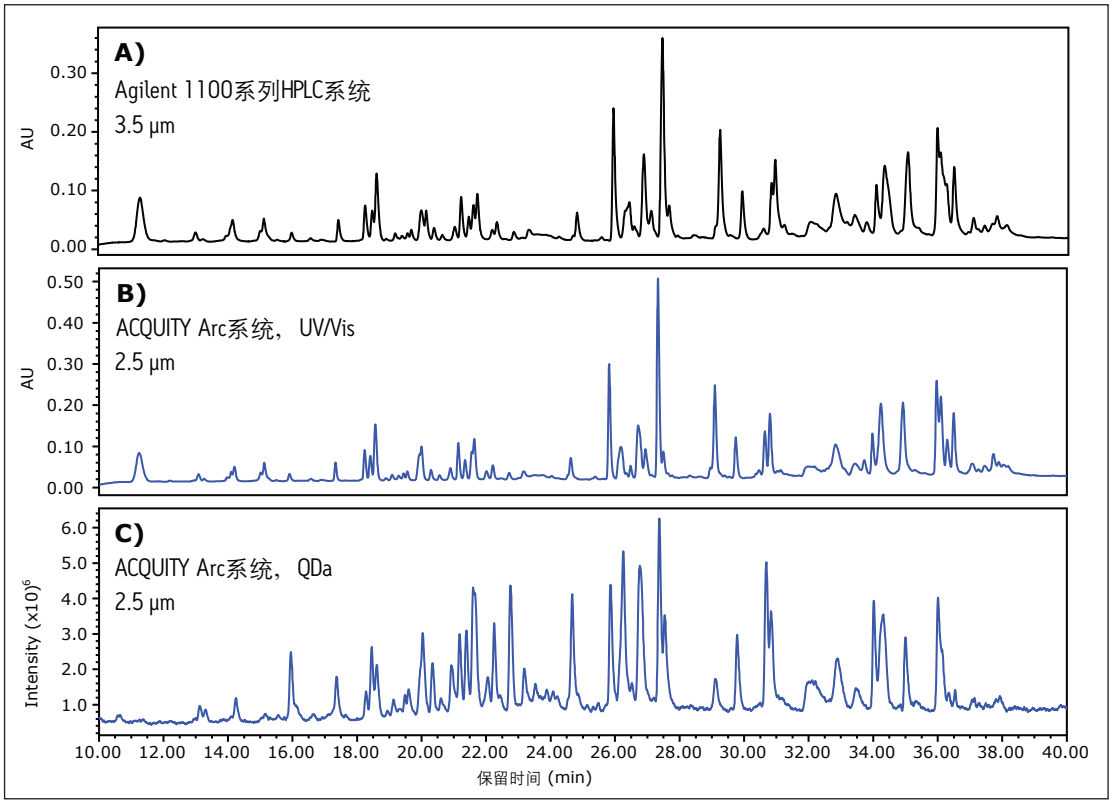

图3. 英夫利昔单抗的肽图对比，分别采用A) Agilent 1100系列HPLC系统和B) ACQUITY Arc系统采集数据，图C)则为通过ACQUITY QDa质谱检测器获得的相应质谱数据。Agilent 1100系列HPLC系统采集数据数据时使用的是填充3.5 µm颗粒的XBridge BEH C18 130 Å, 4.6 mm x 100 mm色谱柱，而ACQUITY Arc 系统采集数据时使用的是填充2.5 µm颗粒的XBridge BEH C18 130 Å, 4.6 mm x 100 mm色谱柱。相应的质谱数据与光学数据高度相关。

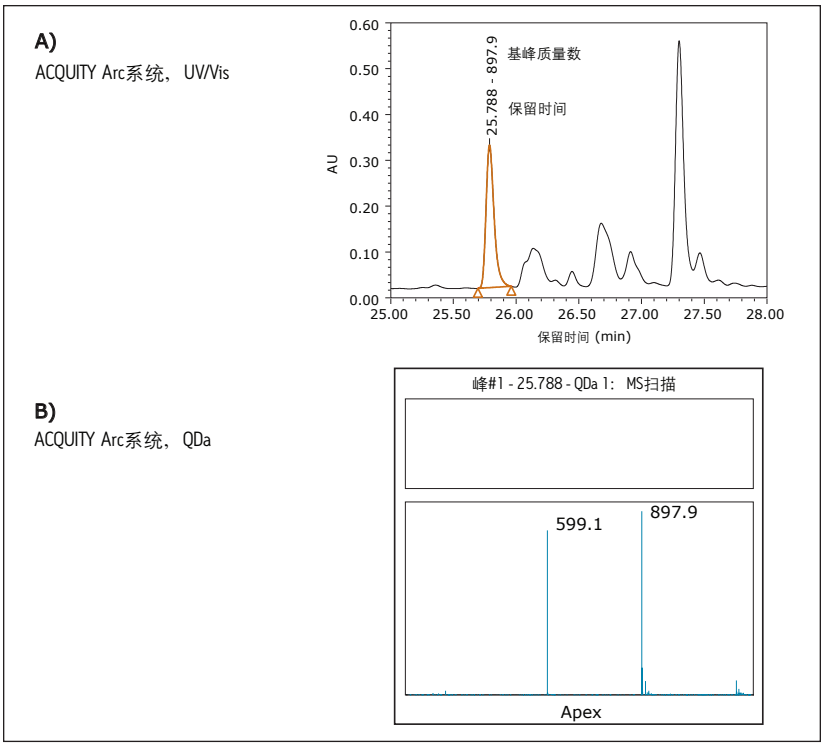

图4. 来自ACQUITY Arc系统的英夫利昔单抗肽图的放大图，分别展示了A)光学数据以及B)光谱积分峰的相应质谱数据。采集数据时使用的是填充2.5 µm颗粒的XBridge BEH C_{18} 130 Å, 4.6 mm x 100 mm色谱柱。图B)中所示的电荷态分别对应为肽序列ASQFVGSSIHWYQQR(粗体部分代表CDR序列)的[M+1H]+1和[M+2H]+2计算所得的值。

结论

生物制药行业已经认识到了应用新技术和新方法的重要性，纷纷向实验室中引入ACQUITY Arc系统等现代化的LC平台。随着分析方法越来越频繁地在整个机构中进行转换或转换到合同研究机构中，我们需要证明分析方法在相同及不同的类似仪器平台上能够获得一致的结果。ACQUITY Arc系统不仅可以模拟传统的HPLC方法，还能应用Arc Multi-flow path技术将HPLC方法升级为UHPLC方法。通过将HPLC方法升级为UHPLC方法并结合ACQUITY QDa质谱检测器，我们可以将常规的质谱检测结合到分析中，以利于结果的确认。

参考文献

1. Koshel, B. M., McCarthy, S. M. Transfer of an SEC Method for Monoclonal Antibody Analysis from HPLC to UHPLC using the ACQUITY Arc System. 2015; 720005510en.
2. Koshel, B. M., McCarthy, S. M. IEX Method Transfer: Replicating a Method for Monoclonal Antibody Analysis on an ACQUITY Arc System. 2015; 720005529en.
3. Luo, Y. et al. Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis. In Separation Science and Technology; Ahuja, S.; Scypinski, S., Ed.; Academic Press: Burlington, MA, 2010; Vol. 10; pp 283–359.
4. U.S. Pharmacopeial Convention, General Chapter <1055> Biotechnology-Derived Articles- Peptide Mapping, USP38-NF33, Official from August 1, 2015.
5. Hong, P., McConville, P. R. Method Transfer from Agilent 1100 Series LC System to the ACQUITY UPLC H-Class System: The Effect of Temperature. 2015; 720005204en.
6. ACQUITY Arc System Brochure. Waters Brochure. 2015; 720005393en.

扫一扫，关注沃特世微信

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters、The Science of What's Possible、ACQUITY、QDa, XBridge和Empower是沃特世公司的注册商标。
Arc和Arc Multi-flow path是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2016年 沃特世公司 中国印刷 2016年1月 720005588ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
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 5999
成都：028 - 6765 3588
香港：852 - 2964 1800

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