

采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier 可提高RPLC-MS方法分析酸性肽的色谱性能

Robert E. Birdsall, Jacob Kellett, Samantha Ippoliti, Nilini Ranbaduge, Henry Shion, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

金属离子介导的分析物吸附是导致LC分析中峰形不佳、拖尾以及化合物回收率下降的主要因素，可能对数据质量和分析稳定性产生不良影响。分析物若含有磷酸基团、不带电荷的胺以及去质子化羧酸则特别容易受到这些现象的影响，而在蛋白类治疗药物的开发和生产中经常会遇到这些化合物。目前解决分析物/表面吸附的方法包括使用离子对添加剂、高离子强度流动相和进行色谱柱硬件钝化。这些策略虽然被证明有效，但由于存在仪器/技术兼容性方面的问题，可能难以在基于MS的方法中应用，此外，考虑到冗长的钝化程序可能会用到腐蚀性试剂，因此还需要确保以安全高效的方式实施这些策略。沃特世全新推出采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier色谱柱以应对这些挑战。Waters ACQUITY Premier色谱柱旨在提供出色的色谱性能，同时大幅减少敏感化合物的分析物/表面相互作用。本研究使用Waters NIST mAb胰蛋白酶酶解标准品，证明采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier色谱柱在基于RPLC-MS的肽图分析中可实现更高的回收率、重现性和稳定性。总之，本研究确定MaxPeak HPS技术可广泛应用于治疗药品的开发和生产中，使沃特世技术发挥预期的色谱性能，同时使易于发生表面相互作用的分析物获得更高的重现性、优异的峰形和回收率。

优势

- 通过提高回收率和减少峰拖尾来增加灵敏度

- 兼容传统方法，无需使用额外的添加剂
- 通过提高分析重现性来改善方法耐用性
- 通过缩短方法开发时间来提高生产率

简介

液相色谱法(LC)中的分析物/表面吸附是导致LC分析中峰形不佳、拖尾和化合物回收率下降的主要因素¹⁻³。近年来，金属离子介导的吸附被认定为分析物的特异性吸附机制，表现出路易斯酸/碱特性⁴。研究人员提出如下假设：携带富电子基团（例如磷酸基团、不带电荷的胺和去质子化羧酸）的分析物充当路易斯碱，通过非共价方式吸附到金属表面的电子缺陷位点，这些位点充当路易斯酸。为抑制金属离子介导的吸附，常规策略有离子对、硬件钝化和高离子强度流动相。这些策略虽然在大多数情况下能够成功运用，但在某些情况下仍然存在挑战，例如，分析物与金属表面的相互作用非常强（例如，携带多个富电子基团），并且/或者在不适当的条件下进行分析（例如，弱/强离子对）。尤其是在RPLC-MS的肽图分析中，包含天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)残基的肽段可能与金属表面发生相互作用，由此加剧吸附特性，从而导致分析物（易发生金属离子介导的吸附）拖尾增加、灵敏度降低，如图1所示。最近发现，将金属螯合剂用作流动相添加剂可以显著减轻吸附干扰⁵。不过，掺入此类添加剂的结果并不一定理想，因为会引入新的色谱干扰并抑制MS分析中的电离。为解决这些挑战，亟需使用新型色谱柱和仪器以减少金属离子介导的吸附，并且无需使用额外的添加剂或进行冗长的钝化程序。

沃特世全新推出采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier色谱柱以应对这些挑战。ACQUITY Premier色谱柱旨在提供出色的色谱性能，同时大幅减少敏感化合物的分析物/表面相互作用。本应用纪要的目的是展示采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier如何在生物药品开发和生产中提高分析的重现性、回收率和稳定性，从而提高实验室生产率并降低风险。

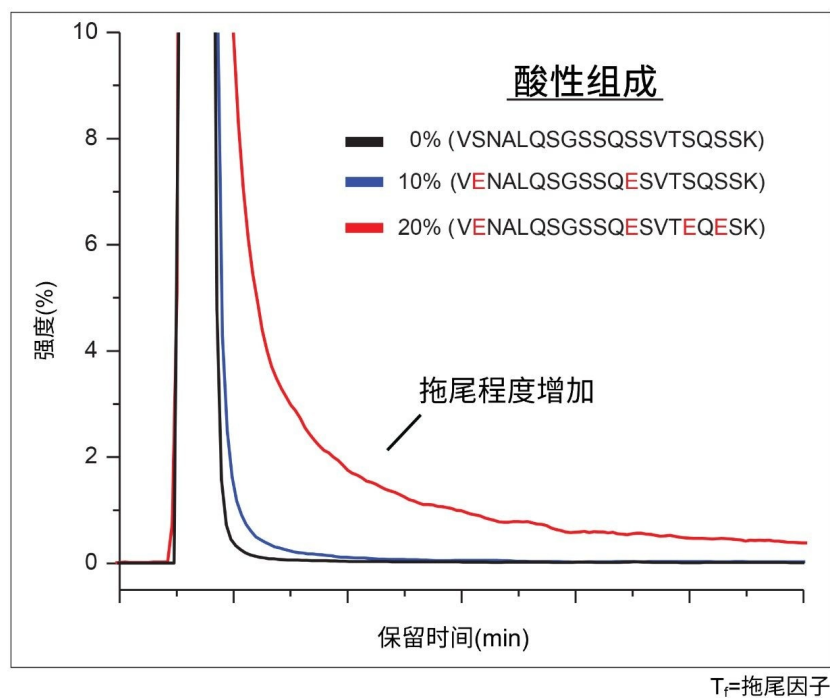


图1.合成的酸性肽校准曲线标准品。评估了三种合成肽（分别含0、2和4个谷氨酸(E)残基，分别代表酸性组成为0%、10%和20%的分析物）的拖尾情况。在等度条件下（流动相A：89%，流动相B：11%），观察到含有多个酸性残基的肽的拖尾程度显著增加。

实验

按照色谱柱维护和使用手册中概述的条件对色谱柱进行老化。将沃特世单克隆抗体胰蛋白酶酶解标准品（P/N：[186009126](#)）复溶于含0.1%甲酸的MS级水中，制得浓度分别为0.2 mg/mL (SYNAPT XS)和0.5 mg/mL (ACQUITY QDa)的溶液，分装，在-80℃下存放以备使用。

液相色谱条件

液相色谱系统：

ACQUITY H-Class Binary Bio PLUS

检测条件:	TUV, 10 mm分析型流通池, $\lambda=214\text{ nm}$
样品瓶:	采用MaxPeak HPS的QuanRecovery样品瓶 (300 μL , 25个/包, P/N: 186009242)
色谱柱:	CSH 130 Å C ₁₈ (2.1×100 mm, 1.7 μm , P/N: 186005297) ACQUITY Premier CSH 130 Å C ₁₈ 肽分析专用柱 (2.1×100 mm, 1.7 μm , P/N: 186009461)
柱温:	60 °C
样品温度:	6 °C
进样体积:	QDa = 10 μL , Synapt XS = 1.0 μL
流速:	0.200 mL/min
流动相A:	水 + 0.1 %甲酸
流动相B:	乙腈 + 0.1 %甲酸

梯度表（图2-7）

时间	流速 (mL/min)	% A	% B	曲线
初始	0.200	99	1	6
2.00	0.200	99	1	6
52.00	0.200	65	35	6
57.00	0.200	15	85	6
62.00	0.200	15	85	6
67.00	0.200	99	1	6
80.00	0.200	99	1	6

MS条件（图1和图6）

质谱系统：ACQUITY QDa

电离模式：ESI+

采集范围：250-1250 *m/z*

毛细管电压：1.5 kV

锥孔电压：10 V

探头温度：600 °C

MS条件 (图2-5)

质谱系统:	SYNAPT XS
电离模式:	ESI+
采集范围:	50-2000 <i>m/z</i>
毛细管电压:	2.2 kV
锥孔电压:	20 V
离子源温度:	120 °C
脱溶剂气温度:	350 °C
锥孔气流速:	35 L/h
脱溶剂气流速:	500 L/h
实时质量校正标样:	Glu血纤维蛋白肽B, 100 fmol/mL, 溶于含 0.1%甲酸的75/25乙腈/水中

数据管理

色谱软件:	Empower 3 FR4
质谱软件:	MassLynx 4.2
信息学软件:	UNIFI 1.9.4

结果与讨论

行业相关性：

肽分析已被证明是蛋白类治疗药物表征和质量控制中不可或缺的工具，属于产品质量生命周期管理流程的一部分。作为该流程的一部分，LC-MS数据在提供有用信息以确定一级序列中的蛋白质修饰及其相关杂质方面起到至关重要的作用。这些分析中质谱信息的价值在一定程度上促使人们重新对扩展MS方法的作用引发关注，以提高药品开发与生产的生产率和数据质量。但是，包含MS检测的肽分析通常会使用极性较弱的流动相添加剂（例如甲酸），其有利于提高灵敏度而不是色谱性能。这可能导致痕量杂质（容易发生金属离子介导的吸附，例如“酸性”肽）的分析产生问题，因为分析重现性和结果准确度可能因分析物/表面相互作用的严重程度而改变。图2A展示了天冬酰胺脱酰胺化的示例色谱图。

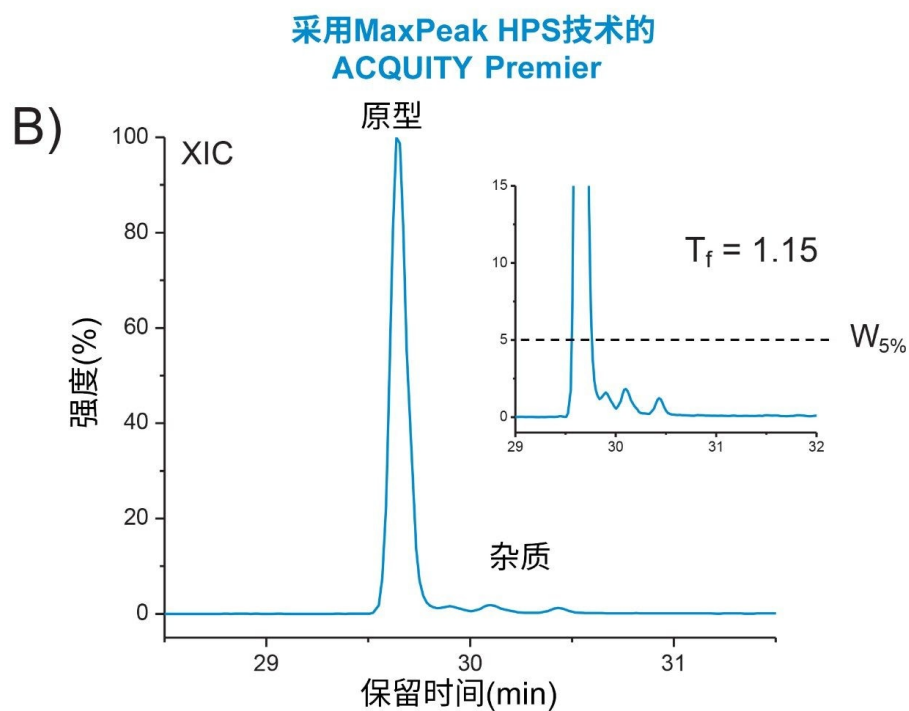
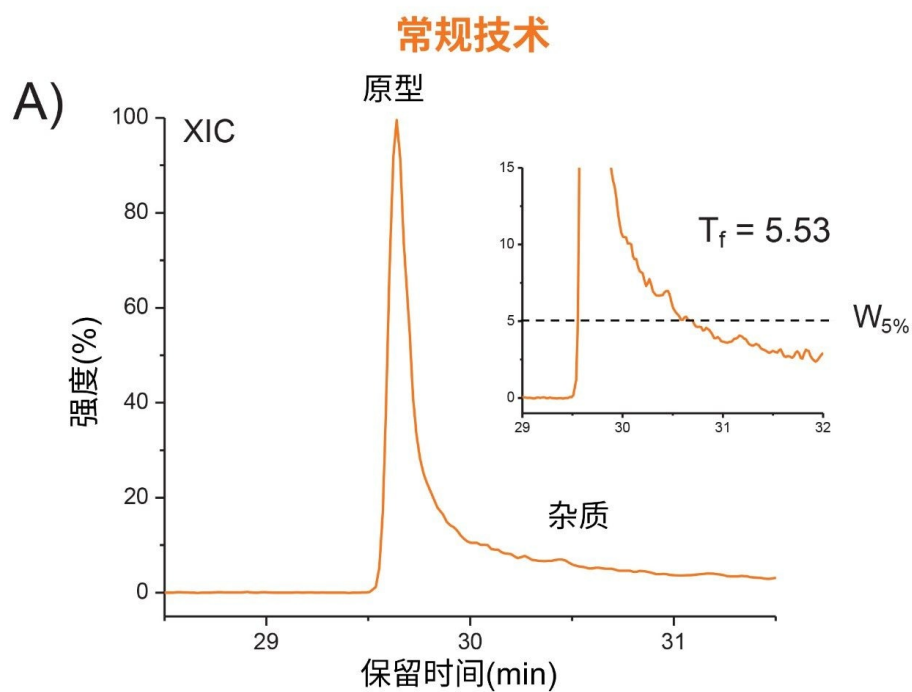


图2.关键质量属性相关的T37 PENNYK肽。A)使用常规的不锈钢色谱柱时，计算出T37原型峰的拖尾因子为

5.53, 无法检测到邻近洗脱的脱酰胺相关杂质。B)使用搭载MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier色谱柱时, 该原型峰的拖尾因子减小79%, 达到1.15, 能够检测到CQA相关的脱酰胺杂质。

天冬酰胺脱酰胺化形成天冬氨酸和异天冬氨酸, 是单克隆抗体(mAb)中常见的翻译后修饰, 与药物疗效相关。因此, 生物制药公司投入大量资源来控制 and 监测关键质量属性(CQA) (例如脱酰胺)。在监测的脱酰胺物质中, “PENNYK” T:37肽 (序列: GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK) 引人关注, 因为它是常规监测的Fc结构域肽, 已知其易受翻译后修饰 (例如脱酰胺) 的影响, 并且含有4个“酸性”残基 (3个谷氨酸和1个天冬氨酸)。如图2A所示, 与PENNYK肽相关的杂质由于与原型肽的理化特性相似, 在其邻近位置洗脱, 使其容易因拖尾干扰而导致误鉴/积分错误。在本例中, 在常规LC系统上使用Waters ACQUITY UPLC CSH 130 Å C₁₈色谱柱执行基于甲酸的RPLC肽图分析时, 原型PENNYK肽的拖尾因子为5.53。由于原型峰的拖尾过大, 因此无法检测邻近洗脱的杂质。相比之下, 使用Waters ACQUITY Premier CSH 130 Å C₁₈肽分析专用柱执行相同的分离时, 观察到原型肽的拖尾因子减小了79%, 达到1.15。该性能提升使研究人员能够对两种脱酰胺杂质进行色谱分离, 这两种杂质与原型峰之间几乎实现基线分离。上述结果表明, 采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier具有很大的价值, 能够改善色谱性能, 有助于开发和生产安全有效的药品。

提高回收率:

使用搭载MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier色谱柱时, 所观察到的性能提升使其在上游和下游活动的应用中均具有优势。肽段中谷氨酸和天冬氨酸残基的重复出现频率表明, 所有含酸性残基的肽都可以通过MaxPeak HPS技术大幅减少分析物/表面之间的相互作用, 从而在重现性、峰形和回收率方面获益。图3所示为NIST mAb胰蛋白酶酶解物的总离子流色谱图(TIC), 评估Waters UPLC CSH 130 Å C₁₈色谱柱 (图3A) 和采用MaxPeak HPS技术的Waters ACQUITY Premier CSH 130 Å C₁₈肽分析专用柱 (图3B) 对含有4个酸性残基(20%)的T:14肽段 (序列=VDNALQSGNSQESVTEQDSK) 的回收率, 使用Waters SYNAPT XS质谱仪进行检测。如图3A所示, 使用ACQUITY UPLC CSH 130 Å C₁₈色谱柱时, 在0.2 µg载样量下未检测到T:14肽段, 序列覆盖率降至90%。相比之下, 使用ACQUITY Premier CSH 130 Å C₁₈肽分析专用柱 (图3B) 以相同的方法分离同一样品时, 观察到T:14肽的回收率显著提高, 肽图分析的序列覆盖率达到94%。除提高回收率外, 采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier还具有其他优势。

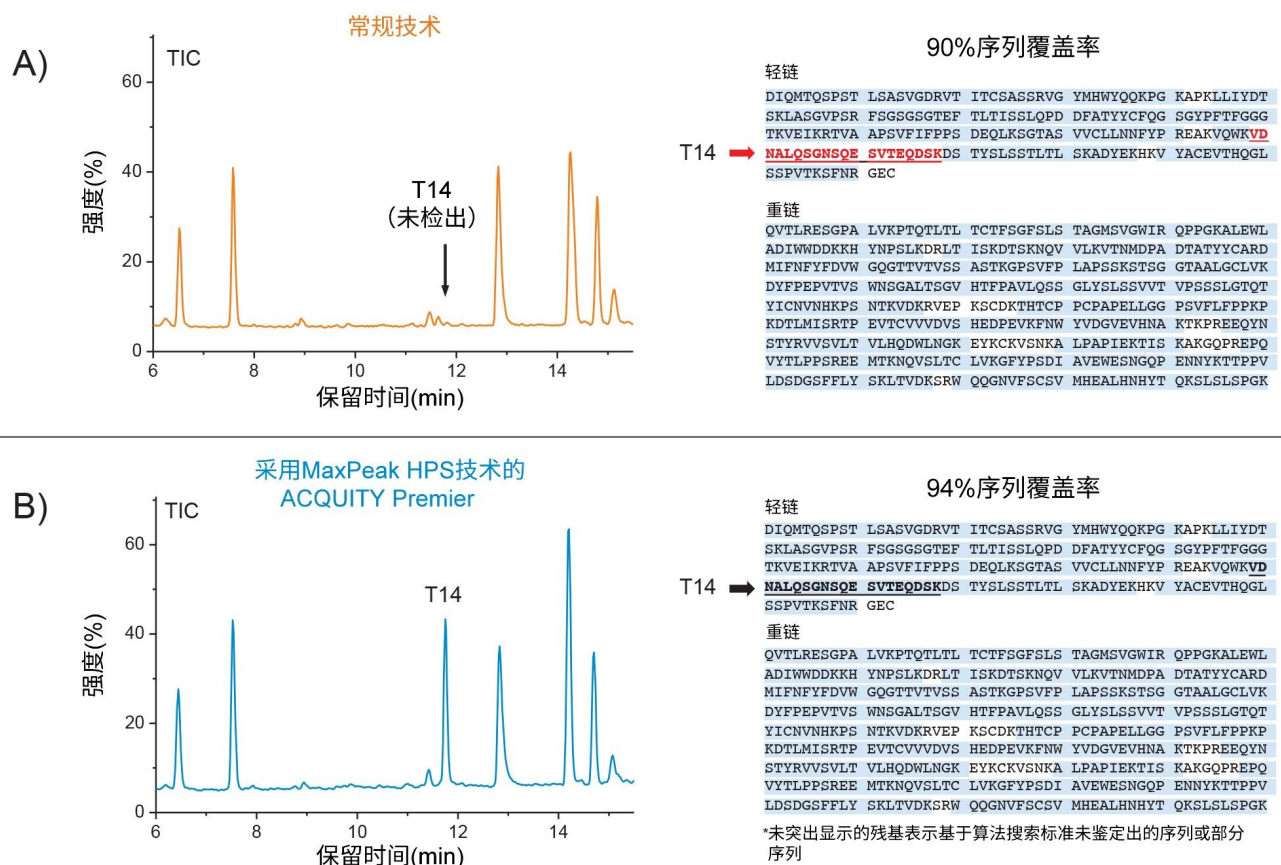


图3.提高回收率。A)使用常规的不锈钢色谱柱时，在0.2 μ g载样量下，在LC-MS肽图分析中未检测到Waters NIST mAb酶解标准品的T14肽段，序列覆盖率为90%。B)使用搭载MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier色谱柱可回收T14肽段，从而能够检测并鉴定T14肽段，序列覆盖率提高至94%。

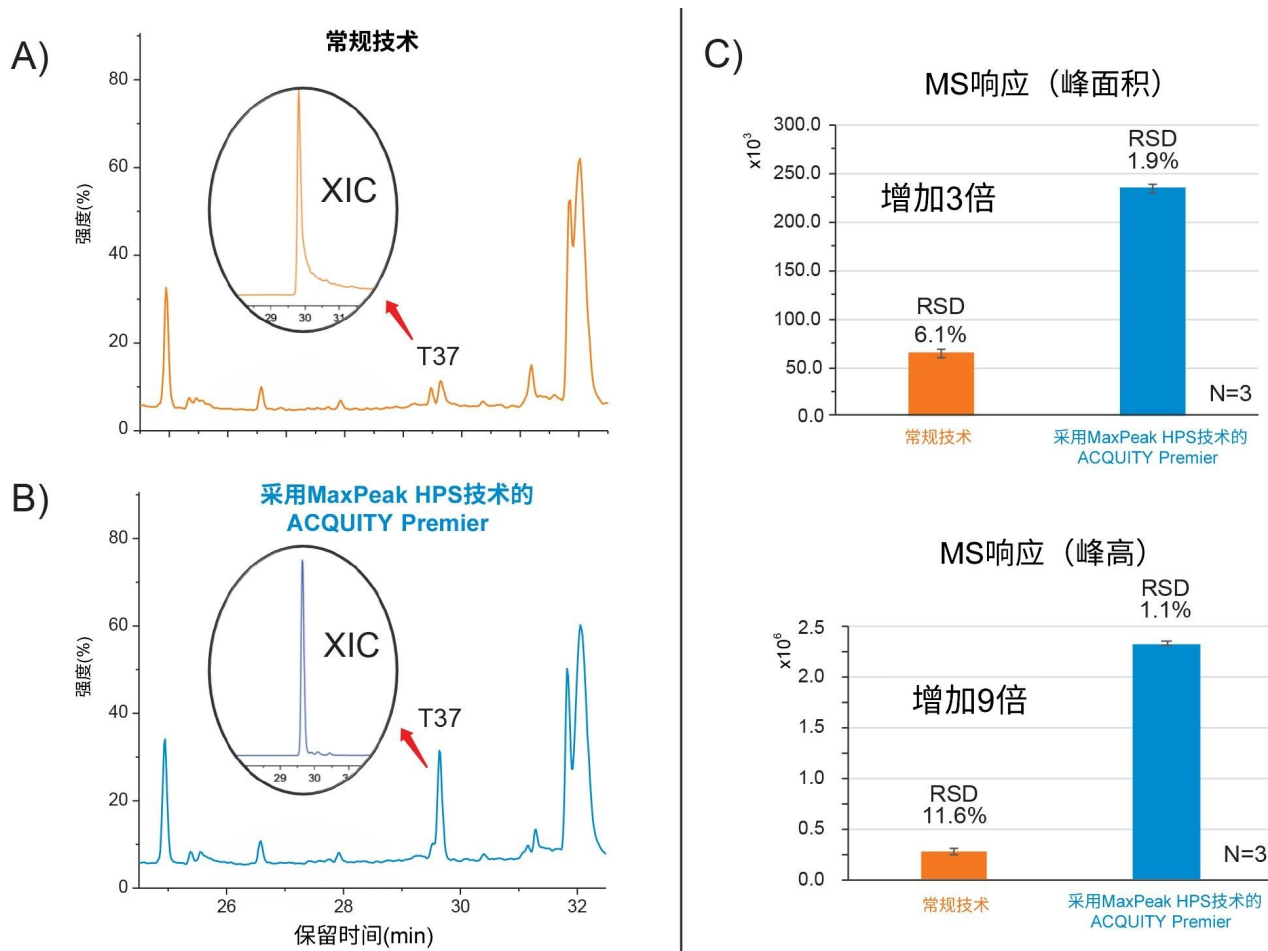


图4.提升响应。评估在A)常规色谱柱（不锈钢）和B)采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier色谱柱上实施肽图分析时，NIST参比mAb标准品的胰蛋白酶酶解物中T37肽段的回收率。C)由于使用MaxPeak HPS技术减少了拖尾，观察到峰高增加了9倍，峰面积增加了3倍。使用搭载MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier色谱柱时，在3次重复进样中观察到的回收率提升使MS响应差异性降低了约90%（峰高RSD%从11.6%降至1.1%）。

提升响应：

图4所示为使用相同的样品和系统配置，同时评估T:37肽和 T:14肽段。如图4A所示，在0.2 μg 载样量下，T:37肽段的XIC (848.7174 m/z)表现出明显的拖尾现象，导致无法检出与原型峰邻近洗脱的相关杂质，并增加了仪器响应的差异性（图4C）。相比之下，使用搭载MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier色谱柱以相同方法分离同一样品时，同一种肽的峰高增加了9倍，峰面积增加了3倍，这是拖尾减少且回收率提高的结果（图4B）。MaxPeak HPS技术可以提升回收率并改善峰形，从而提高分析重现性，在3次重复进样中，以R.S.D.计算的MS响应（峰高）差异性降低了90%，达到1.1%。上述结果表明，采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier可广泛应用于含

酸性残基的肽，通过改善色谱性能提高分析的稳定性和重现性。

提高肽表征的数据质量：

ACQUITY Premier和MaxPeak HPS技术所实现的回收率与色谱性能提升还具有改善数据质量和数据解析的额外优势。在上游活动中，蛋白类治疗药物的表征很大程度上依赖于通过肽图分析确定预期候选药物的氨基酸序列及相关杂质。在这一方面，采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier能够减少拖尾并分离敏感肽的关键物质，使分析人员更有信心地对候选药物进行测序。T:37肽段的碎裂谱图证明了这一点，如图5所示。图5所示为在Waters SYNAPT XS质谱仪上使用MS^E采集模式（非数据依赖型采集）得到质谱图，每张谱图分别对应与T:37 (GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK)物质相关的4个峰（插图）。在本例中，观察到关键的y系列碎片离子，并用其指定未修饰（蓝色）以及脱酰胺或琥珀酰亚胺形式（红色）的脱酰胺位点。从对应于N393的y3离子开始，该离子在所有峰中均未经修饰。接下来，y4离子在峰3中发生修饰，表现出+0.9801 Da的漂移，表明N392上发生脱酰胺。如预期一样，峰3的y系列继续表现出脱酰胺的质量数漂移。直到y9离子，才在峰2和峰4中观察到质量数漂移。观察到对应于N387的y9离子在峰2（脱酰胺）和峰4（琥珀酰亚胺中间体）中分别发生+0.9870 Da和-17.0052 Da的漂移。因此，可以明确地将这些色谱分离的T:37物质指定为：峰1 - 未修饰，峰2 - N387脱酰胺，峰3 - N392脱酰胺，峰4 - N387琥珀酰亚胺中间体。上述结果表明，采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier可以减少拖尾以分离共流出峰并提升检测器响应，不仅能够提高分析的回收率和重现性，还能增加数据解析和肽鉴定的可信度，从而支持与治疗药物的开发和生产相关的上游和下游活动。

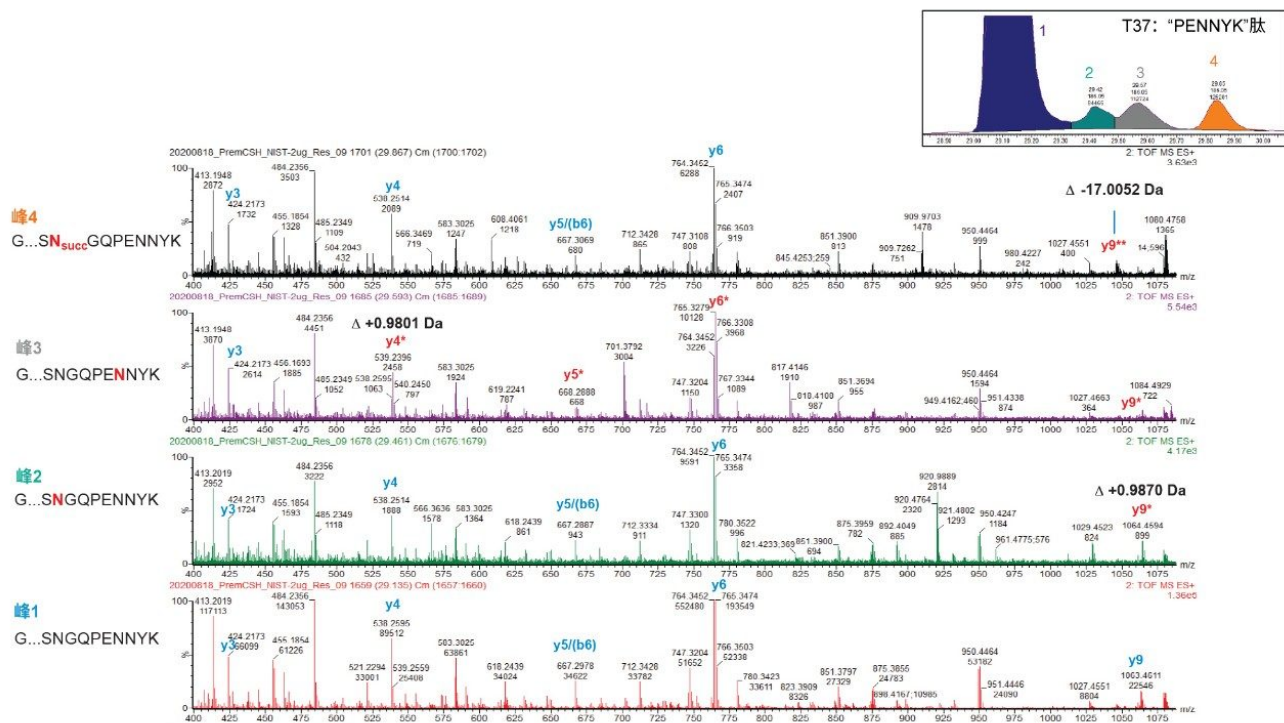


图5.提高数据质量。 MS^E 高能碎片离子质谱图(m/z 400-1150)，其中标记出GFYPDSIAVEWESNGQPENNYK肽及其相应脱酰胺物质（显示在右上角的XIC中）的关键y系列碎片离子。下图对应于峰1（未修饰）的 MS^E 谱图，中间图对应于峰2和3（脱酰胺物质），上图对应于峰4（琥珀酰亚胺中间体）。未修饰的y离子标记为蓝色，脱酰胺(*)和琥珀酰亚胺(**)物质标记为红色。

可重现的色谱性能：

随着方法从开发环境转移至生产环境，重现性作为一项分析指标，对于确保以高效的方式获得一致的结果并准确反映药品中的CQA至关重要（缺少重现性可能导致项目延期，耗费大量成本，在某些情况下，例如在受法规监管的环境中，如果结果不合格，需要展开调查）。为此，色谱工作者通常在标准操作程序中加入钝化程序，以帮助稳定色谱性能。这些钝化程序涵盖相对温和的操作（例如重复进样分析样品基质）以及更激进的技术（包括使用腐蚀性溶剂诸如硝酸和/或磷酸来钝化金属表面）。虽然这些做法并非毫无价值，但它们的实施需要时间，使实验室和仪器资源无法得到充分利用。采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier使用户能够绕过这些冗长且可能有害的程序，获得“开箱即用”且一致、可靠的性能。

图6显示了CQA相关的PENNYK肽分析示例。使用新清洁的ACQUITY UPLC系统（经磷酸清洗）和单四级杆质谱检测器(ACQUITY QDa)，将选择离子监测(SIR)值设定为849.20 m/z ，在使用和不使用ACQUITY Premier MaxPeak

HPS技术的情况下进行肽图分析的分离步骤，监测PENNYK肽的拖尾因子。如图6A所示，在不使用MaxPeak HPS技术的情况下（常规技术），分离得到的峰拖尾增加，在48 h内，随着系统趋于稳态，RSD%达到8.87%。与此相反，当在新清洁的系统上使用搭载MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier进行分析时，色谱性能稳定且一致，在相同时间段内峰拖尾的RSD%为1.01%。在本例中，MaxPeak HPS技术的重现性转化为稳定且一致的色谱性能。如图6B所示，当使用MaxPeak HPS技术时，PENNYK肽的色谱性能在48 h进样系列中保持一致且具有高重现性，能够准确测定相对丰度，且RSD%低于2.5%。上述结果表明，采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier可提供一致且可靠的结果，通过缩短实验室中的仪器停机时间并减小结果差异性，提高实验室的生产率，而分析质量对于确保安全有效的药品高效上市至关重要。

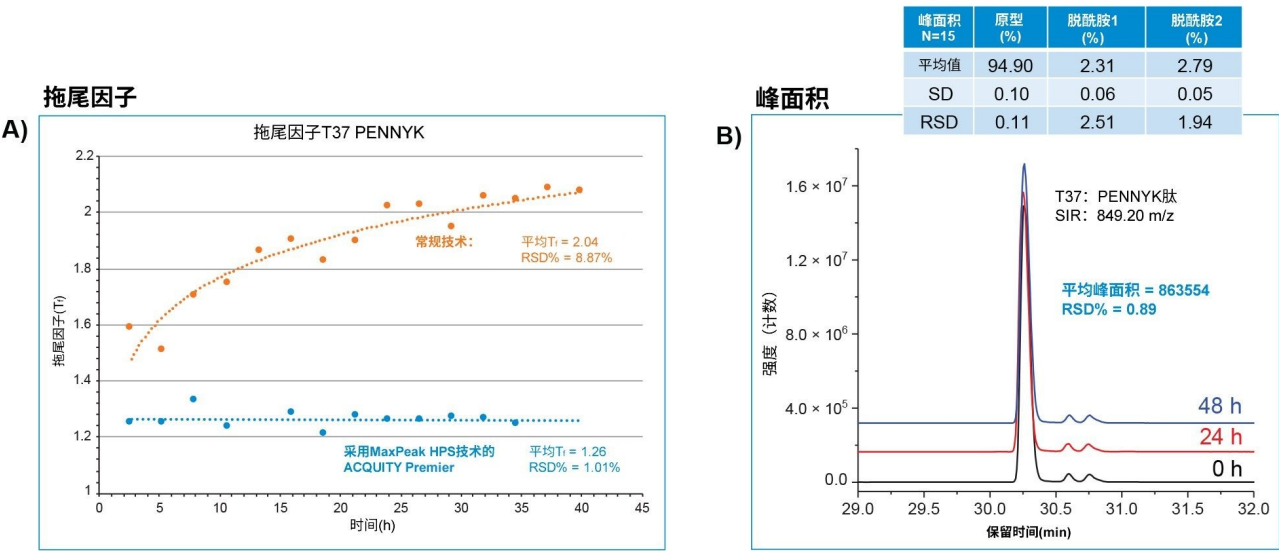


图6.采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier的重现性。A)在新清洁的系统中，使用（蓝色数据迹线）和不使用（橙色数据迹线）MaxPeak HPS技术时，在48 h内监测PENNYK肽的拖尾因子。在不使用MaxPeak HPS技术的情况下进行分离时，计算出的峰拖尾RSD%为8.87%，而使用搭载MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier时，峰拖尾RSD%为1.01%。B)在48 h进样系列中，PENNYK肽及相关杂质的色谱性能一致，相对丰度的RSD%低于2.5%（表插图）。

传统方法兼容性：

建议将评估有助于缩短药品生命周期的新技术作为药物质量体系的一部分。在评估过程中，制药公司经常进行可比性研究，以确定新技术对治疗药物的开发和生产中采用的现有方法可能产生的影响。基于这些原则，比较了在使用和不使用MaxPeak Premier技术的情况下进行NIST mAb酶解物肽图分析得到的保留时间和选择性。为确保

可比性，在数据采集前采用相同的系统准备（数据采集前，用酸清洗）和色谱柱老化（将mAb胰蛋白酶酶解物进样分析15次）方法，得到两个数据集。如图7A和7B所示，分析了由两次分离得到的色谱图以评估两者之间的差异。为便于比较，对UV色谱图进行时间校准以调整延迟体积差异，并以相同的刻度作图。从定性层面看，使用MaxPeak HPS技术进行的分离表明，肽T:14和T:37（插图）的峰拖尾和回收率得到改善，与之前的结果一致。更值得注意的是，肽图分析在谱图和丰度方面彼此高度一致，表明MaxPeak HPS技术对分离无不良影响。使用更严格的方法，对 $S/N \geq 3$ 的峰进行积分，并使用最后一个洗脱峰作为参比峰，将各峰的峰面积作为相对保留时间的函数作图。如图7C所示，正交比较表明保留时间一致性良好（斜率 = 1.00），两次分离之间的时间偏移（y轴截距 = -0.005）可忽略不计，表明使用MaxPeak HPS技术时的选择性基本不变。上述结果表明，采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier可应用于传统的RPLC方法，对色谱选择性的影响可忽略不计，同时能够大幅减少分析物/表面相互作用，从而改善敏感分析物的重现性、峰形和回收率。

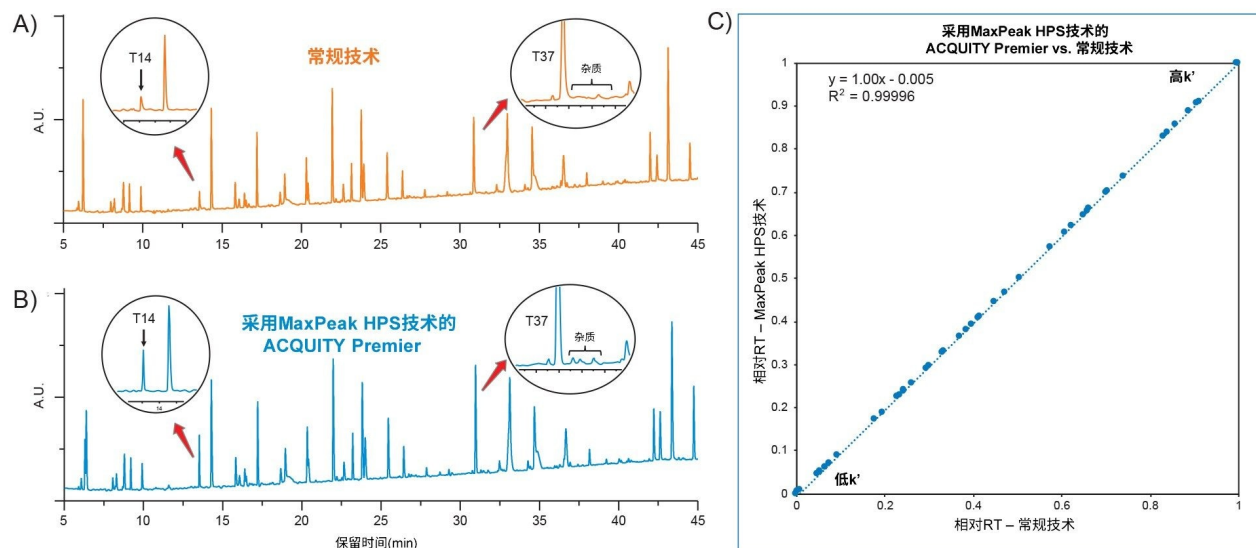


图7.可比性。使用A)常规LC技术与B)搭载MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier进行NIST mAb酶解物肽图分析得到的肽图在谱图和丰度方面高度相似。C)使用 $S/N \geq 3$ 的峰的相对保留时间进行正交比较表明，保留时间的一致性良好（斜率 = 1.00），时间偏移可忽略不计（y轴截距 = -0.005），说明使用结合MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier时，选择性基本不变。

结论

液相色谱中的分析物/表面吸附是导致峰形不佳、拖尾和回收率下降的主要因素，其可能导致分析差异性增加、分析灵敏度下降以及对易受表面相互作用影响的分析物的结果解析错误。沃特世应对这些挑战的解决方案是采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier。Waters ACQUITY Premier色谱柱旨在提供出色的色谱性能，同时大幅减少敏感化合物的分析物/表面相互作用。总之，本研究证明MaxPeak HPS技术可广泛应用于新型或现有治疗药品的开发和生产中，使沃特世技术发挥预期的色谱性能，同时使易于发生表面相互作用的分析物获得更高的重现性、优异的峰形和回收率。

参考资料

1. Giddings JC, Eyring H. A Molecular Dynamic Theory of Chromatography, *The Journal of Physical Chemistry*, 59 (1955) 416–421.
2. Fornstedt T, Zhong G, Guiochon G. Peak Tailing and Slow Mass Transfer Kinetics in Nonlinear Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 742 (1996) 55–68.
3. Fornstedt T, Zhong G, Guiochon G. Peak Tailing and Mass Transfer Kinetics in Linear Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 741 (1996) 1–12.
4. M. Lauber et al. Low Adsorption LC Technology Based on MaxPeak High Performance Surfaces. Waters White Paper 720006930EN <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006930en.pdf>> .2020.
5. Birdsall R, Kellett J, Yu YQ, Chen W. Application of Mobile Phase Additives to Reduce Metal-ion Mediated Adsorption of Non-phosphorylated Peptides in RPLC-MS-based Assays. *Journal of Chromatography B*, 1126–1127 (2019) 121773.

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10166246>>
Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/513188>>

[ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <https://www.waters.com/514228>](https://www.waters.com/514228)

[ACQUITY QDa质谱检测器 <https://www.waters.com/134761404>](https://www.waters.com/134761404)

[SYNAPT XS高分辨率质谱仪 <https://www.waters.com/135020928>](https://www.waters.com/135020928)

[UNIFI科学信息系统 <https://www.waters.com/134801648>](https://www.waters.com/134801648)

[MassLynx MS软件 <https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)

720007003ZH, 2020年9月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号