

Application News

No. L488

高效液相色谱
High Performance Liquid Chromatography

使用“Nexera-i”对抗体药物进行肽图分析

Peptide Mapping of Antibody Drugs by Nexera-i

使用 HPLC 对抗体药物的一级结构进行肽图分析是抗体药物研究中重要的手段之一。具体方法是将抗体酶解后使用反相色谱柱进行分离。但是该方法需要分离的峰非常多，因此近年来用于肽图分析的小粒径色谱柱和核-壳技术色谱柱得到广泛地应用。并且为检测样品特性和变异，需要对洗脱峰进行比较，因此要求系统具有良好的重复性。一体化 UHPLC “Nexera-i” 是满足此类分析的理想系统。

本文向您介绍使用“Nexera-i”对 IgG（免疫球蛋白 G）的胰蛋白酶解物进行分析的示例。

■ IgG 胰蛋白酶解物分析

Analysis of IgG Tryptic Digest

样品的制备步骤为先将 IgG 还原并烷基化，然后用胰蛋白酶对其进行酶解。图 1 为预处理方法。

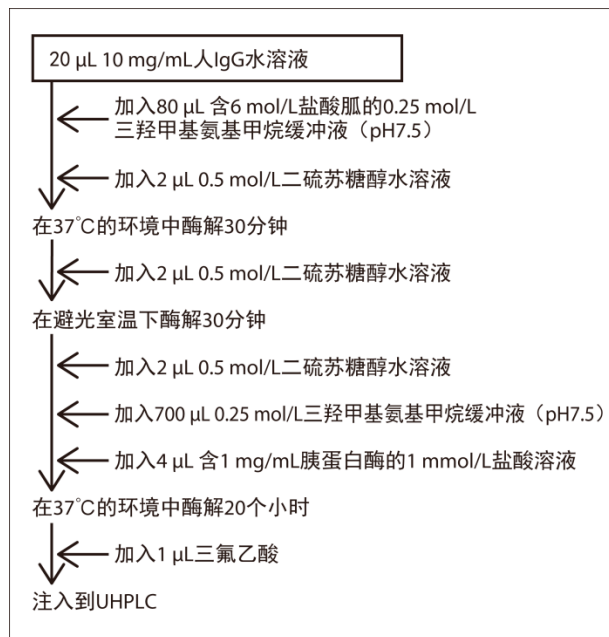


图 1 样品预处理
Sample Preparation

图 1 为分析条件。本次分析使用了一体化 UHPLC “Nexera-i” 和多肽分析核-壳色谱柱 “Aeris 1.7 μm PEPTIDE XB-C18 100 Å”。由于使用三氟醋酸水溶液和添加三氟醋酸的乙腈溶液作为流动相，因此使用了 300 μL 混合体积的混合器（选配件）。分析中为抑制基线漂移，将流动相 A 中的三氟醋酸浓度配制为 0.1%；流动相 B 中的三氟醋酸浓度配制为 0.08%。

图 2 为 IgG 胰蛋白酶解物的色谱图。由图可知，对很多峰进行了高效分离。

表 1 分析条件
Analytical Conditions

色谱柱	: Aeris 1.7 μm PEPTIDE XB-C18 100 Å (150 mm L. × 2.0 mm I.D., 1.7 μm)
流动相	: A: 0.1% 三氟乙酸水溶液 B: 0.08% 三氟乙酸乙腈溶液
时间程序	: B.Conc. 0% (0 min) → 45% (90 min) → 100% (90.01-95 min) → 0% (95.01-110 min)
流速	: 0.2 mL/min
柱温	: 60 °C
进样体积	: 10 μL
检测器	: LC-2040C 3D 215 nm
流通池	: 快速高灵敏度流通池

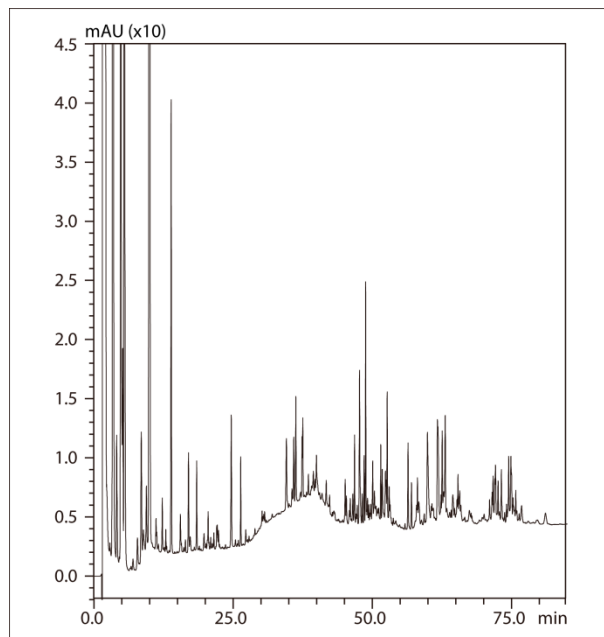


图 2 IgG 胰蛋白酶解物的色谱图
Chromatogram of IgG Tryptic Digest

■ 重复性

Repeatability

因为在肽图分析中需要对很多峰进行分离，所以使用斜率小的梯度。本次分析将流动相 B 在 90 分钟内由 0% 变为 45%，即斜率为 0.5%/min。在斜率较小的梯度分析中，尤其在低压梯度系统时，重复性将会变差。

表 2 和表 3 分别为保留时间的日内重复性和日间重复性结果；图 3 为 IgG 胰蛋白酶解物的日间重复性。对色谱图中的若干主峰（峰 a~f）确认了重复性。对于日内重复性，根据连续 6 次的分析结果进行了计算。而对于日间重复性，则在 6 天内每天进行 3 次分析，再根据 3 次结果的平均值进行了计算。

综上所述，使用 Nexera-i 进行肽图分析，虽然在低压梯度系统中重复性容易变差，但是日内和日间的重复性却比较良好。

表 2 保留时间的日内重复性 (n = 6)
Intraday Repeatability of Retention Time (n = 6)

Peak	Avg.R.T. (min)	Std. Dev. (min)	%RSD (%)
Peak a	9.929	0.027	0.271
Peak b	24.669	0.047	0.192
Peak c	36.299	0.042	0.117
Peak d	48.815	0.033	0.068
Peak e	59.864	0.032	0.054
Peak f	74.535	0.043	0.057

表 3 保留时间的日间重复性 (n = 6)
Interday Repeatability of Retention Time (n = 6)

Peak	Avg.R.T. (min)	Std. Dev. (min)	%RSD (%)
Peak a	9.907	0.016	0.159
Peak b	24.708	0.033	0.132
Peak c	36.355	0.034	0.093
Peak d	48.877	0.034	0.069
Peak e	59.901	0.027	0.046
Peak f	74.555	0.036	0.049

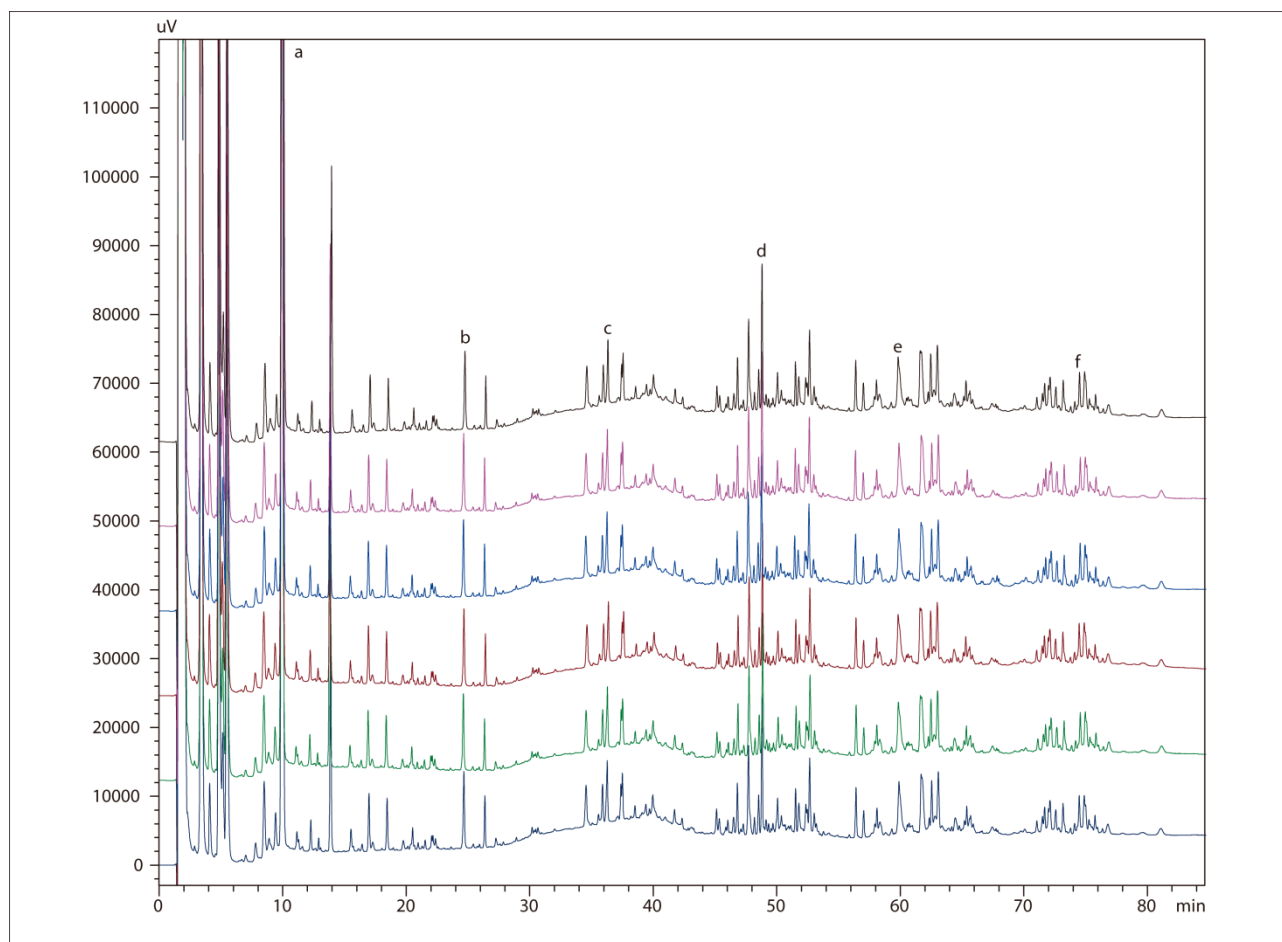


图 3 IgG 胰蛋白酶解物的日间重复性
Intraday Repeatability in Chromatogram of IgG Tryptic Digest



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2015 年 4 月