

利用可靠的高分离度蛋白质SEC分离进行在线非变性LC-MS mAb分析

Xiaoxiao Liu, Steve Shiner, Matthew A. Lauber

Waters Corporation

摘要

非变性液质联用法(LC-MS)是一种强大的蛋白分析方法，体积排阻色谱(SEC)则是此类测定的首选分析方法之一。SEC应作为一种由熵驱动的分选，在该分离模式中，分析物与颗粒或填充柱的表面不发生相互作用。但在实际分析中，这一点很难实现，在质谱分析中使用乙酸铵流动相时尤其如此。

本文探讨了使用ACQUITY Premier SEC 250 Å蛋白分析专用柱的SEC-MS方法，该色谱柱减少了不需要的分析物/表面相互作用。这种新型SEC色谱柱技术基于沃特世BEH颗粒，这些颗粒包含高覆盖率羟基封端聚环氧乙烷(PEO)键合相，适用于采用亲水性MaxPeak高性能表面的专用色谱柱硬件。研究表明，这些优化表面带来多种受到追捧的分析能力，包括更低的检测限、更对称的峰形和更高的分析物回收率。在mAb的非变性SEC-MS分析中，这些改善的性能特征使总体分析获得了优异的MS响应和更低的检测限。

优势

- 使用MaxPeak高性能表面以及ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 1.7 µm)和XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 µm)杂化有机硅胶颗粒，减少不需要的次级相互作用（离子和疏水相互作用）
- 使用较低浓度的乙酸铵流动相发挥理想的在线MS检测性能

简介

过去十年来，非变性SEC分离结合在线MS检测受到越来越多的关注。这种联用方法目前用于常规表征大小异构体（包括分子量较高的聚集体及分子量较低的片段）。大多数方法需要使用兼容MS的条件，乙酸铵是主要的流动相组分¹。兼容MS的离子交换方法也已有效地用于表征完整单克隆抗体和IdeS酶解单克隆抗体，并收集有关mAb电荷异构体的新信息²。一些研究人员甚至开始优化疏水作用色谱的MS兼容条件，使表面修饰提供的保留性差异足以解析抗体偶联药物中的产物变体³。

可以说，体积排阻色谱(SEC)非常适合执行基于乙酸铵的分离和实现更高通量的非变性LC-MS。SEC使样品能够完成在线快速脱盐，且进样间隔仅几分钟，能够获得高质量的质谱图。对于保持紧凑的球状结构的非变性蛋白样品，乙酸铵LC-MS实验可产生更简单、电荷态更低的离子，这些离子更不容易受到基质干扰，进而得到更高质量的去卷积质谱图。

SEC虽然概念简单，但可能难以通过优化得到所需的分离度，在只能使用挥发性流动相组成时尤其如此⁴。2017年，Goyon及合作者一起探讨了SEC-MS的条件，并注意到使用乙酸铵条件时存在的色谱挑战⁵。即使应用100 mM乙酸铵流动相，也会出现畸变峰和回收率低的问题。他们提出，必须改进SEC色谱柱技术以更好地促进此类分析工作。

为此，我们探讨了新型SEC颗粒和色谱柱硬件技术的应用，这些技术能够减少不需要的次级相互作用。我们还将这种组合SEC色谱柱技术搭配乙酸铵流动相用于非变性蛋白质表征。这种新型色谱柱技术基于高覆盖率羟基封端聚环氧乙烷(PEO)键合颗粒以及采用亲水性MaxPeak高性能表面的硬件（图1）。结果表明，借助这些独特的特性，当使用与MS兼容的乙酸铵流动相操作时，相应的ACQUITY Premier和XBridge Premier SEC 250 Å蛋白分析专用柱可提供更低的检测限、优异的峰形和高回收率。

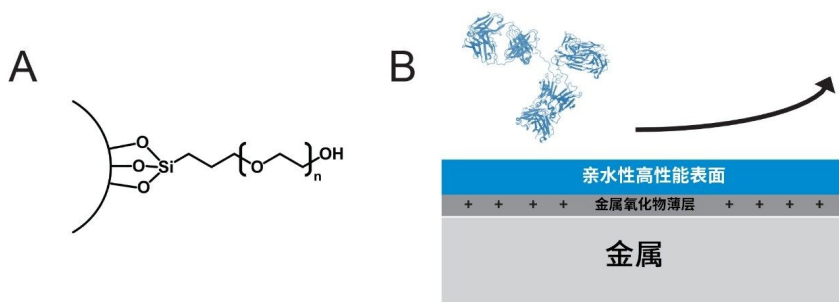


图1.使用ACQUITY和XBridge Premier SEC 250 Å蛋白分析专用柱技术减少不需要的次级相互作用。(A)羟基封端PEO键合BEH颗粒，具有较低的次级相互作用（离子和疏水相互作用）。(B)亲水性MaxPeak高性能表面，大幅减少生物分子与金属色谱柱硬件之间的次级相互作用。PDB代码1IGT。

实验

样品信息

在SEC分析之前，根据下文概述的实验细节，用水稀释NISTmAb标准物质8671和完整单克隆抗体质量数检查标准品（沃特世部件号：[186006552 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186006552-intact-mab-mass-check-standard.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186006552-intact-mab-mass-check-standard.html)）。将BEH200 SEC蛋白质标准品（沃特世部件号：[186006518 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186006518-beh200-sec-protein-standard-mix.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186006518-beh200-sec-protein-standard-mix.html)）溶于500 μL水中。用水稀释完整单克隆抗体质量数检查标准品。使用Waters IonHance CX-MS pH浓缩液A和B（沃特世部件号：[186009280 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009280-ionhance-cx-ms-ph-concentrate-a-ph-5-in-ms-certified-ldpe-contai.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009280-ionhance-cx-ms-ph-concentrate-a-ph-5-in-ms-certified-ldpe-contai.html)和[186009281 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009281-ionhance-cx-ms-ph-concentrate-b-ph-85-in-ms-](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009281-ionhance-cx-ms-ph-concentrate-b-ph-85-in-ms-)

[certified-ldpe-conta.html](#)) 配制流动相。为实现高灵敏度MS分析，务必采用高品质流动相。Waters IonHance浓缩液的生产和质量控制测试专为达到这一目的而实施。本研究利用专为阳离子交换(CX)-MS分离而设计的pH浓缩液，按比例制得经过优化的pH和离子强度用于SEC-MS分析。

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC I-Class
检测器:	ACQUITY UPLC TUV检测器 (配备钛合金流通池)
波长:	280 nm
色谱柱:	XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱, 250 Å, 2.5 µm, 4.6 × 150 mm (部件号: 186009959) ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱, 250 Å, 1.7 µm, 4.6 × 150 mm (部件号: 186009963) 市售MeO-PEO键合SEC色谱柱, 200 Å, 2.7 µm, 4.6 × 150 mm ACQUITY UPLC BEH SEC色谱柱, 200 Å, 1.7 µm, 4.6 × 150 mm (部件号: 186005225)
柱温:	30 °C

样品温度：	4 °C
进样：	7.5 μL
流速：	0.2 mL/min
流动相A： (图1、3和4)	1x IonHance CX-MS pH浓 缩液A (50 mM乙酸铵 , 2%乙腈, pH 5)
流动相B： (图1、3和4)	1x IonHance CX-MS pH浓 缩液B (160 mM乙酸铵 , 2%乙腈, pH 8.5)
流动相混合： (图1、3和4)	40:60 A/B (116 mM乙酸 铵, 2%乙腈)
流动相A： (图2)	200 mM乙酸铵 (pH 7; 未 滴定)
流动相B： (图2)	18.2 MΩ水
流动相混合： (图2)	变化 (详见图2)

质谱条件

质谱系统： (图1、2和4)：	BioAccord/ACQUITY RDa 检测器
--------------------	------------------------------

模式:	全扫描
极性:	正
锥孔电压:	150 V
质量范围:	高(400~5000 m/z)
扫描速率:	2 Hz
毛细管电压:	1.5 kV
质谱系统:	Xevo G2-XS QTof (图3)
采集窗口:	如图3所示
毛细管电压:	2.5 kV
锥孔电压:	60 V

色谱柱尺寸考量

为同时优化LC和MS条件，本研究使用了内径为4.6 mm（相对于2.1 mm）的色谱柱。内径为4.6 mm的SEC色谱柱能够在0.2 mL/min的合理低流速下以理想状态运行。该流速适用于电离源，并且有助于确保液相色谱系统扩散不会对峰形产生显著影响。

结果与讨论

对ACQUITY和XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱（250 Å，1.7 μm和2.5 μm）色谱柱技术的评估始于探索检测限的实验。将IonHance CX-MS pH浓缩液A和B以40:60 (v/v)的比例在线混合，制得含116 mM乙酸铵的流动相

。然后进样分析7.5 μL NISTmAb溶液（通过连续稀释制得），监测UV信号。使用4.6 \times 150 mm XBridge Premier BEH SEC蛋白分析专用柱(250 \AA , 2.5 μm) 在0.2 mL/min的流速下得到的分离结果如图2A所示。利用该色谱柱，可通过UV检测进样量低至37.5 ng的NISTmAb。使用另一种市售色谱柱进行相同的实验，即由甲氧基封端PEO键合的200 \AA 、2.7 μm 颗粒和金属硬件制成的4.6 \times 150 mm色谱柱。图2B显示了该色谱柱在同一系列载样量下获得的UV色谱图。虽然在0.75 μg 和0.375 μg 的载样量下可以观察到可辨识的峰，但应注意，它们表现出明显的拖尾量。在0.15 μg 的载样量下观察到回收率不佳的峰，在75 ng和37.5 ng的载样量下未识别出峰。当采用乙酸铵流动相时，XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 \AA , 2.5 μm)能够使质量范围低至纳克级的NISTmAb产生良好的峰形，预示其适用于常规SEC/LC-MS，特别是在样品量通常有限的克隆筛选等应用中。

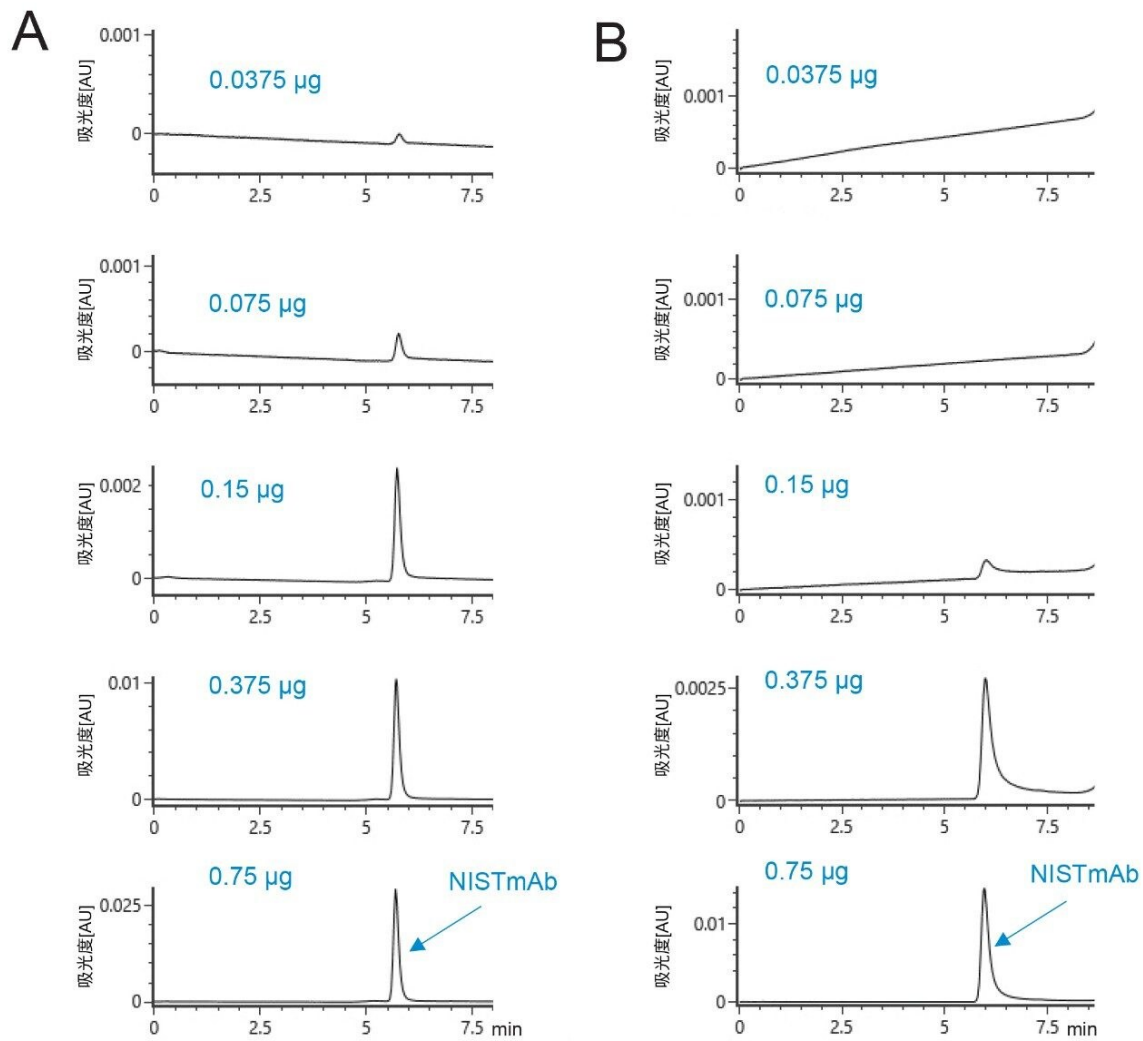


图2.XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 µm)提高了NISTmAb的灵敏度和回收率。(A)使用XBridge Premier蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 µm)以及116 mM乙酸铵流动相和0.2 mL/min的流速，在不同载样量下获得的NISTmAb的UV色谱图。从上到下：进样体积为7.5 µL的0.005、0.01、0.02、0.05和0.1 mg/mL NISTmAb；(B)使用由甲氧基封端PEO键合的2.7 µm颗粒和金属色谱柱硬件制成的另一种市售SEC色谱柱，在不同载样量下获得的NISTmAb溶液的UV色谱图。两种SEC色谱柱在测试前均经过两次15 µg NISTmAb进样老化。

本研究考察了ACQUITY和XBridge Premier SEC 250 Å蛋白分析专用柱对乙酸铵流动相离子强度的依赖性，旨在评估残留离子相互作用的程度。在考察中使用不同的流动相盐浓度分析了由四种不同蛋白质（分子量范围：10

kDa~300 kDa) 组成的标准品。在50 mM及更高浓度的乙酸铵条件下, 使用 4.6×150 mm ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱(250 \AA , $1.7 \mu\text{m}$)得到了所需水平的峰分离度、峰形和回收率(图3A)。在仅20 mM的流动相条件下, 峰形出现轻微畸变, 峰谷比更高。这些结果表明, 该样品所需的最低盐浓度可能在20 mM至50 mM之间。为进行比较, 采用粒径相当的ACQUITY UPLC BEH SEC 200 \AA , $1.7 \mu\text{m}$ 色谱柱重复这些分离, 该色谱柱基于二醇键合的BEH颗粒并使用不锈钢硬件制成。所得分离结果表现出一些明显差异。其中最显著的差异是, 采用20 mM乙酸铵进行分离时观察到严重的峰畸变。在该色谱图中, 峰不对称, 并且IgG与BSA存在共洗脱的问题。使用50 mM流动相显著改善了色谱柱性能, 但要从甲状腺球蛋白单体峰中分离出甲状腺球蛋白二聚体仍然是一个挑战。最终结果证明, ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱(250 \AA , $1.7 \mu\text{m}$)更适合使用较低离子强度的流动相, 有望实现更高灵敏度的非变性LC-MS分析。

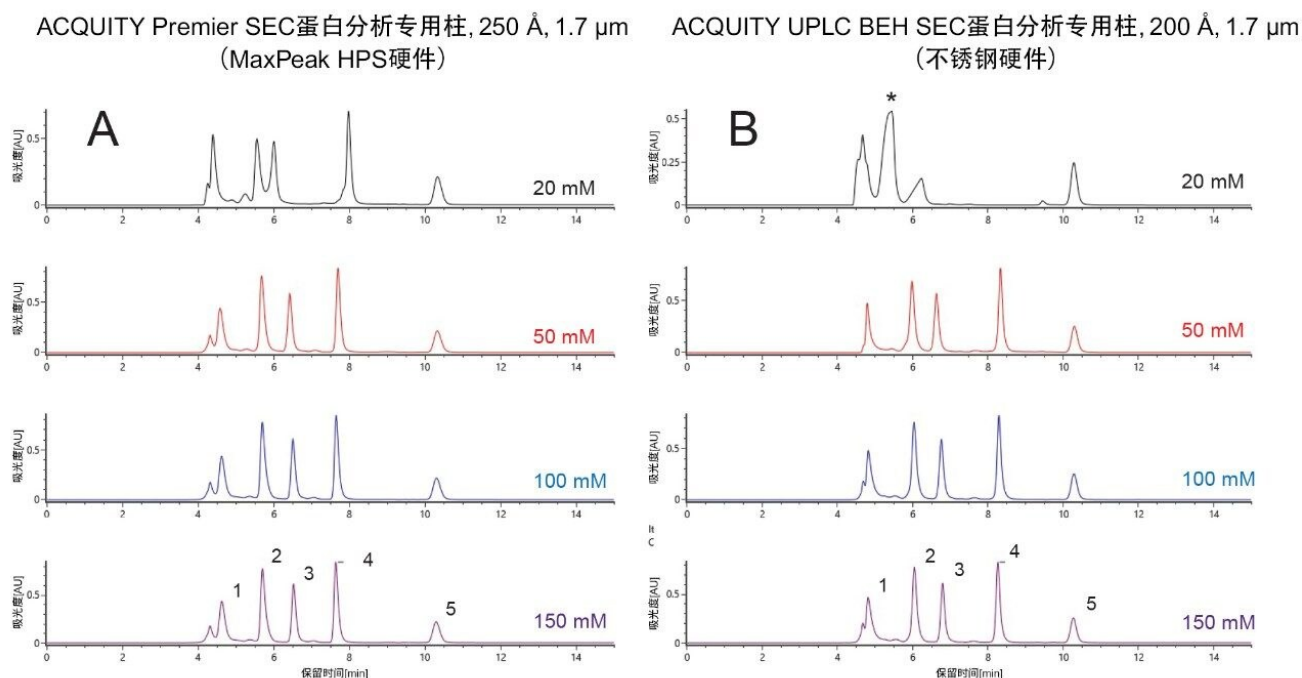


图3.使用 4.6×150 mm, $1.7 \mu\text{m}$ 色谱柱和乙酸铵进行非变性SEC色谱分析。使用(A) ACQUITY Premier SEC 250 \AA 蛋白分析专用柱或(B) ACQUITY UPLC BEH SEC 200 \AA 色谱柱分析BEH200蛋白质混标样品。评估了不同乙酸铵浓度的流动相。峰1: 甲状腺球蛋白(前峰为甲状腺球蛋白二聚体); 峰2: IgG; 峰3: 牛血清白蛋白; 峰4: 肌红蛋白; 峰5: 尿嘧啶。星号(*)表示IgG与BSA共洗脱。

非变性SEC分离现在通常与在线电喷雾电离(ESI)-MS检测联用, 作为深入表征蛋白质药物及其非共价蛋白质复合物和大小异构体(如片段)的一种手段。接下来的研究考察了XBridge Premier SEC 250 \AA 蛋白分析专用柱与两种不

同的飞行时间质谱仪：QToF质谱仪(Xevo G2-XS QToF)和紧凑型TOF质谱检测器（由ACQUITY UPLC I-Class PLUS和ACQUITY RDa质谱检测器组成的BioAccord系统）直接联用的性能。

与质谱联用时，所有液相色谱柱均表现出一定水平的背景离子。ACQUITY和XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱都采用了高覆盖率PEO键合相，如上所述，这提供了更高的回收率，并可与挥发性SEC流动相中较低浓度的乙酸铵相容。我们在600~900 m/z 之间观察到明显的背景离子，这些背景离子源于颗粒键合。在执行非变性mAb SEC-MS分析时，若将采集窗口起点设置为1000 m/z 或更高，即可通过排除该区域大幅提高TIC信噪比。这些干扰离子信号可能会干扰mAb或mAb片段的变性SEC分析。对于变性SEC-MS实验，建议使用ACQUITY UPLC BEH SEC 200 Å蛋白分析专用柱，如其他研究中所述⁶。

图4展示了一组色谱图和质谱图，举例说明了XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm , 4.6 \times 150 mm)获得的非变性mAb数据的质量。使用约100 mM乙酸铵作为流动相进行分离，获得的UV色谱图如图4A所示，证明主要的大小异构体峰得到了合理的峰面积和回收率。在以前实施的许多在线质谱检测中，聚集体和高分子量物质(HMWS)的回收率飘忽不定。本研究的结果证实，XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm , 4.6 \times 150 mm)可检测不同的HMW峰，且分析质量与优化后的非挥发性SEC流动相系统相媲美。图4A色谱图中的HMW峰代表相对丰度约2%，与NISTmAb标准物质的规格一致。接下来，图4B显示了在UV检测之后使用QToF质谱仪连续检测所采集的总离子流色谱图。本研究中，QToF在各种采集窗口下操作。底部为使用400~7000 m/z 宽质量范围的色谱图，对应于NISTmAb洗脱时间的累加质谱图如图4C的底部谱图所示。谱图的基峰可归因于 $\Delta 44$ Da PEO背景离子。这是使用ACQUITY或XBridge Premier SEC 250 Å蛋白分析专用柱的预期结果。由于存在这些离子，分析总离子流色谱图时不易观察到NISTmAb信号。相反，当采集窗口的质量数下限设置为1000、1400和4200 m/z 时，蛋白质物质的检测灵敏度越来越高。此外，随着质量数上限增加至9000 m/z ，还可以观察到HMWS的一些离子计数。在该实验设置下，需要增加载样量以获得HMW物质的分子量。

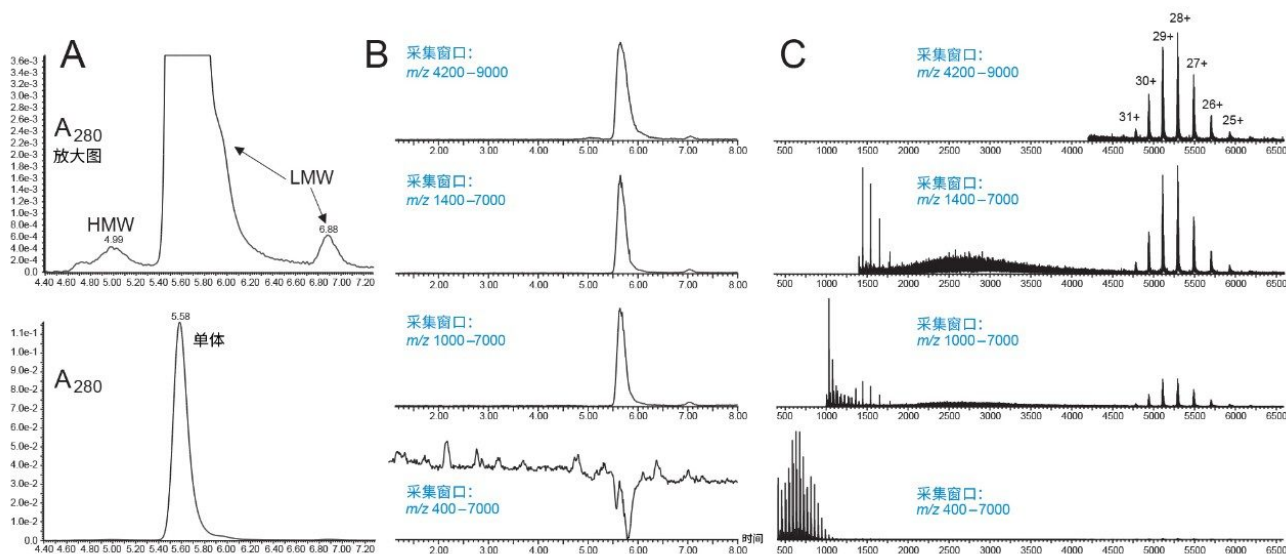


图4.使用Xevo G2-XS QTof质谱仪，在不同MS采集窗口下对NISTmAb进行SEC-MS分析。使用XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)和乙酸铵流动相以及UV和MS检测，分析进样体积为7.5 μL的2 mg/mL NISTmAb溶液。调整MS采集窗口以大幅减小低m/z背景离子的干扰。从上到下应用的MS采集窗口分别为m/z 4200~9000、1400~7000、1000~7000和400~7000。(A)由NISTmAb示例运行得到的UV迹线，包括高分子量(HMW)和低分子量(LMW)物质的放大图；(B)四次不同采集设置运行的MS-TIC；(C)在5.5~6 min的时间窗口内累加的组合质谱图，观察不同MS采集窗口。

本研究还使用紧凑型Tof仪器（即配备ACQUITY RDa质谱检测器的BioAccord系统）进行了SEC-MS分析。ACQUITY RDa的操作有两种默认质量范围设置，其中一种为高质量范围采集设置(400~7000 m/z)，这是SEC-MS分析最合适的选择。选择的提取离子流色谱图(XIC)质量范围与上述质量采集窗口类似，可产生突出显示非变性mAb信号的色谱图。

使用BioAccord系统获得的总离子流色谱图示例见图5A。图5B展示了对应于NISTmAb洗脱窗口的组合质谱图。3000~7000 m/z范围内的放大XIC视图显示了非变性NISTmAb的明显信号。

我们利用XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)重复进样分析鼠源IgG（完整单克隆抗体质量数检查标准品）考察了BioAccord系统的稳定性。本研究在色谱柱上进样250次，并在整个研究过程中重复SEC-MS运行，不穿插任何空白进样。每十次运行的mAb提取离子峰面积汇总于图5C中。从实验开始到第250次进样，蛋白质MS信号始终保持一致。每次进样报告的平均值RSD仅为2.9%。利用UV观察到的峰面积同样表现出极小变化。因此，这些数据表明Premier SEC蛋白分析专用柱适用于搭配乙酸铵流动相进行SEC-MS分析。

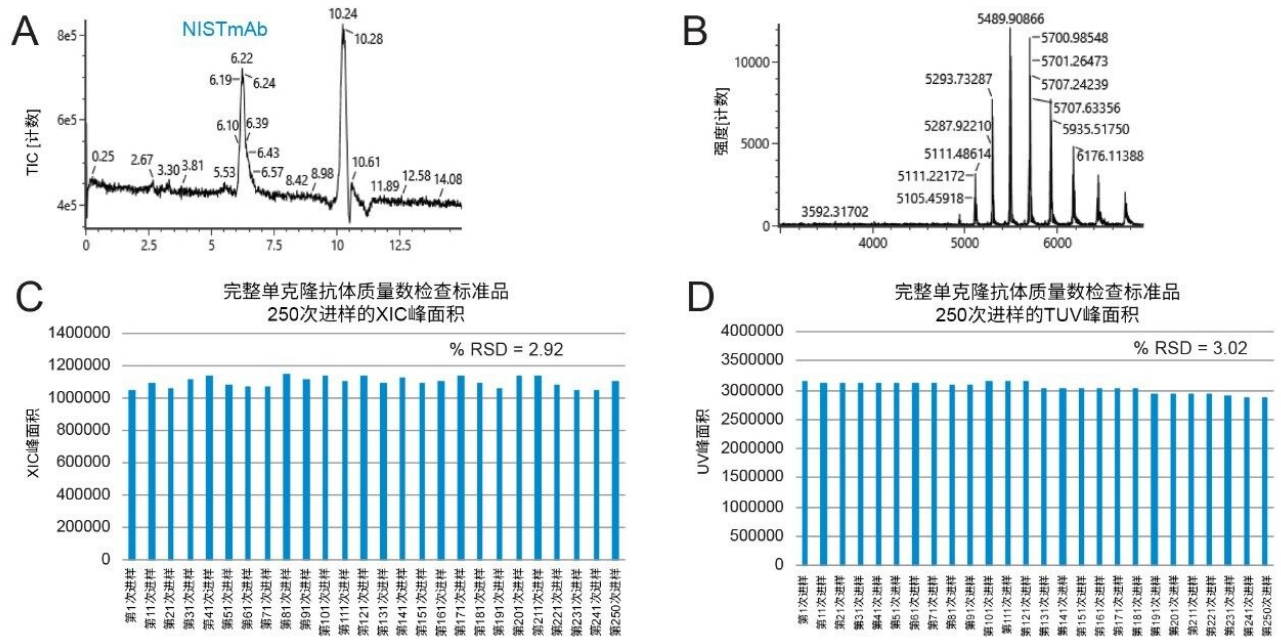


图5.使用XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱和配备ACQUITY RDa台式ToF质谱检测器的BioAccord对mAb样品进行ToF SEC-MS分析。(A)使用 $4.6 \times 150 \text{ mm}$ 色谱柱和乙酸铵流动相,结合BioAccord MS检测,进样 $7.5 \mu\text{g}$ NISTmAb获得的TIC。(B)对应于 $6\sim 7 \text{ min}$ 时间窗口的组合质谱图。在 $400\sim 1400 \text{ m/z}$ 范围内观察到低质量数背景离子,但 $3000\sim 7000 \text{ m/z}$ 范围内的放大图显示出明显的NISTmAb信号;(C)完整单克隆抗体质量数检查标准品进样250次所得到的XIC峰面积(m/z 4000~7000)图。观察到XIC峰面积的%RSD为2.92;(D)在250次进样中得到的UV峰面积图,观察到的%RSD为3.02。

结论

非变性LC-MS是一种强大的蛋白质药物分析方法。借助非变性LC-MS,可以获得更低的电荷态和更简单的电荷态分布以及更低的基质信号,从而更容易地从采集的质谱图中去卷积得到分子量信息。非变性LC-MS可提供有关大小异构体的关键信息,并且有助于分析非共价相互作用。这类分析可以采用多种不同类型的色谱方法,但体积排阻色谱(SEC)在概念上和操作上都是较为简单的一种分离方法。理想情况下,SEC分离应由熵驱动,该分离模式下分析物与色谱柱内表面之间不发生相互作用或吸附。但在实际分析中,要大幅减少这些不需要的相互作用一直都是一项挑战,在非变性LC-MS分析中使用首选的乙酸铵流动相时尤其如此。许多市售色谱柱技术在使用 100 mM 乙酸铵流动相时会出现畸变峰和回收率低的问题,阻碍了分析人员开发稳定且灵敏度更高的SEC-MS方法。

本文探讨了一种新型SEC色谱柱技术的应用，该技术在这些兼容MS的分离条件下表现出更低水平的不良次级离子和疏水相互作用。这种新型色谱柱技术基于高覆盖率羟基封端聚环氧乙烷(PEO)键合颗粒，辅以由亲水性MaxPeak高性能表面制成的色谱柱硬件，可大幅减少分析物与金属色谱柱硬件之间的相互作用。在本研究中，这些独特表面具有很受欢迎的SEC-MS能力，包括更低的检测限、更对称的峰形和更高的分析物回收率。

参考资料

1. Farsang, E.; Guillarme, D.; Veuthey, J. L.; Beck, A.; Lauber, M.; Schmudlach, A.; Fekete, S., Coupling Non-denaturing Chromatography to Mass Spectrometry for the Characterization of Monoclonal Antibodies and Related Products. *J Pharm Biomed Anal* 2020, 185, 113207.
2. Murisier, A.; Duivelshof, B. L.; Fekete, S.; Bourquin, J.; Schmudlach, A.; Lauber, M. A.; Nguyen, J. M.; Beck, A.; Guillarme, D.; D'Atri, V., Towards a Simple On-Line Coupling of Ion Exchange Chromatography and Native Mass Spectrometry for the Detailed Characterization of Monoclonal Antibodies. *Journal of chromatography.A* 2021, 1655, 462499.
3. Chen, B.; Peng, Y.; Valeja, S. G.; Xiu, L.; Alpert, A. J.; Ge, Y., Online Hydrophobic Interaction Chromatography-Mass Spectrometry for Top-Down Proteomics. *Analytical chemistry* 2016, 88 (3), 1885–91.
4. Lauber, M. A., Wanted: Native Protein LC-MS. *The Analytical Scientist* 2019.
5. Goyon, A.; D'Atri, V.; Colas, O.; Fekete, S.; Beck, A.; Guillarme, D., Characterization of 30 Therapeutic Antibodies and Related Products by Size Exclusion Chromatography: Feasibility Assessment for Future Mass Spectrometry Hyphenation. *Journal of chromatography.B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 2017, 1065–1066, 35–43.
6. Shion, H.; Yu, Y.Q.; Chen, W.; 使用BioAccord系统实现单克隆抗体轻链和重链质谱分析的平台方法. 沃特世应用纪要, [720006529ZH](#).

特色产品

[ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/134613317>](https://www.waters.com/134613317)

[ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/10138533>](https://www.waters.com/10138533)

[Xevo G2-XS QToF四极杆飞行时间质谱仪 <https://www.waters.com/134798222>](https://www.waters.com/134798222)

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

[生物制药领域专用的BioAccord LC-MS系统 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818)

[UNIFI生物制药平台解决方案 <https://www.waters.com/waters/10195515>](https://www.waters.com/waters/10195515)

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

720007455ZH, 2021年12月



© 2023 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](#)