

使用20 mm多联苯反相色谱柱快速分析mAb亚基和完整mAb

Hua Yang, Stephan M. Koza, Steve Shiner

Waters Corporation

摘要

生物制药行业（如单克隆抗体(mAb)）发展迅速，要求在整个开发过程中实现高通量表征。本应用纪要介绍了使用20 mm BioResolve™ Premier RP mAb多联苯450 Å, 2.7 µm色谱柱进行快速反相分离，用于mAb亚基和完整mAb的LC-MS分析。与100 mm色谱柱相比，尽管20 mm色谱柱的色谱分离度相应降低，但它的分析时间却能加快5-7倍，且质量数鉴定和确认效果相当。此外，20 mm色谱柱的重现性和稳定性也得到了验证。

优势

- 使用2.1 × 20 mm BioResolve Premier RP mAb多联苯450 Å, 2.7 µm色谱柱对mAb亚基和完整mAb进行快速LC-MS分析，以进行质量数鉴定和确认。
- 展示了该色谱柱在600次分析中的重现性和稳定性

简介

生物制药（如mAb、抗体偶联药物(ADC)和其他蛋白质）已成为一类重要的治疗药物。高通量表征有利于这些治疗药物的整个开发过程。研究表明，缩短分析型LC色谱柱的柱长通常可以为生物制药表征提供足够的峰分离度，同

时减少分析时间¹。本文介绍了使用BioResolve Premier RP mAb 多联苯450 Å, 2.7 µm颗粒的20 mm柱长色谱柱的快速反相分析方法。

实验

样品描述

将mAb亚基标准品（P/N: 186008927 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186008927-mab-subunit-standard.html>>）复溶于100 µL 0.1%甲酸溶液。将人源mAb质量数QC标准品（P/N: 186009125 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009125-humanized-mab-mass-check-standard.html>>）复溶于320 µL水中。

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY™ UPLC I-Class PLUS
检测:	TUV检测波长为280 nm, G2-XS QToF MS检测
色谱柱:	BioResolve Premier RP多联苯450 Å 2.7 µm 2.1 × 20 mm (P/N: 186011019) BioResolve RP多联苯450 Å 2.7 µm 2.1 × 100 mm (P/N: 186008945)
柱温:	80 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	1~5 µL
流速:	0.4 mL/min; 使用寿命研究: 0.8 mL/min
流动相:	A: 0.1%甲酸水溶液或TFA水溶液

B: 含0.1%甲酸或TFA的乙腈溶液

使用寿命研究:

A: 0.1% TFA水溶液

B: 含0.05%TFA的乙腈溶液

用于mAb亚基分析的20 mm色谱柱的梯度表*

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.0	0.4	80	20	初始
4.0	0.4	60	40	6
4.1	0.4	20	80	6
4.3	0.4	20	80	6
4.4	0.4	80	20	6
7.5	0.4	80	20	6

用于完整mAb分析的20 mm色谱柱的梯度表*

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.0	0.4	95	5	初始
0.4	0.4	95	5	6
1.4	0.4	15	85	6
1.56	0.4	15	85	6
1.60	0.4	5	95	6
2.00	0.4	5	95	6
2.04	0.4	95	5	6
6.00	0.4	95	5	6

*使用100 mm色谱柱时，运行时间延长为原来的5倍。

用于使用寿命研究的梯度 (图2)

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.0	0.8	95	5	初始
0.25	0.8	85	15	11
2.25	0.8	45	55	6
2.30	0.8	20	80	6
2.40	0.8	20	80	6
2.45	0.8	95	5	6

在使用寿命研究中，每进样24次水之后进样一次mAb亚基标准品，共执行了600次进样。

Xevo G2 QTof设置

模式:	MS实验
质量范围:	50~5000 <i>m/z</i>
极性:	正离子
采样速率:	2 Hz
锥孔电压:	70 V (亚基) , 150 V (完整mAb)
毛细管电压:	2.75 kV (亚基) , 2.25 kV (完整mAb)
离子源温度:	125 °C (亚基) , 150 °C (完整mAb)
脱溶剂气温度:	500 °C

数据管理

LC软件:

Empower™ 3

LC/MS软件:

waters_connect™

结果与讨论

2.1 × 20 mm BioResolve Premier RP多联苯450 Å 2.7 μm色谱柱在不同批次的MaxPeak™高性能表面(HPS)色谱柱硬件上均表现出优异的重现性。如图1所示,使用甲酸流动相和TFA流动相分离mAb亚基标准品时,峰容量平均%RSD值分别为2.51%和2.27%。该色谱柱的稳定性也得到了验证,在0.8 mL/min和80°C柱温下,使用0.1% TFA流动相进行600次进样后,保留时间和峰容量没有显著变化(图2)。

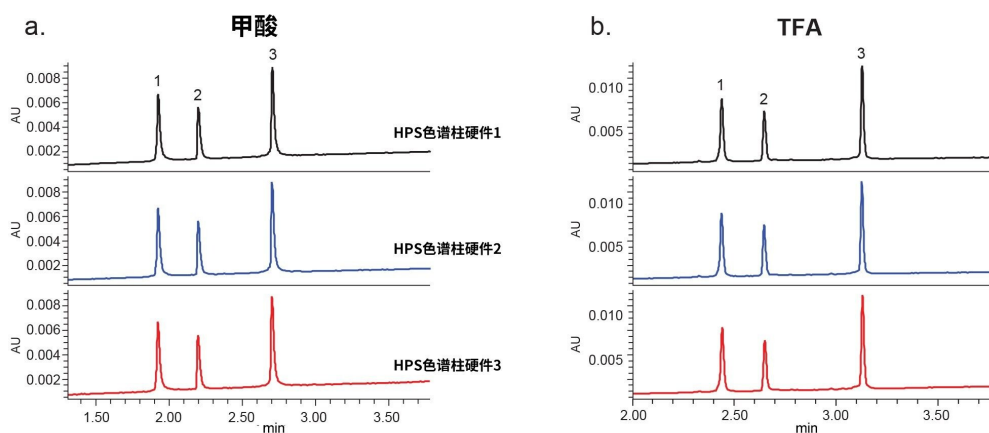


图1.在三根2.1 × 20 mm BioResolve RP mAb多联苯450 Å 2.7 μm色谱柱上使用不同批次的HPS色谱柱硬件分离mAb亚基标准品,获得了优异的重现性。使用甲酸流动相,流动相B在4分钟内从15%增加至55%,流速0.4 mL/min,柱温80 °C。峰1: Fc/2, 峰2: LC, 峰3: Fd'

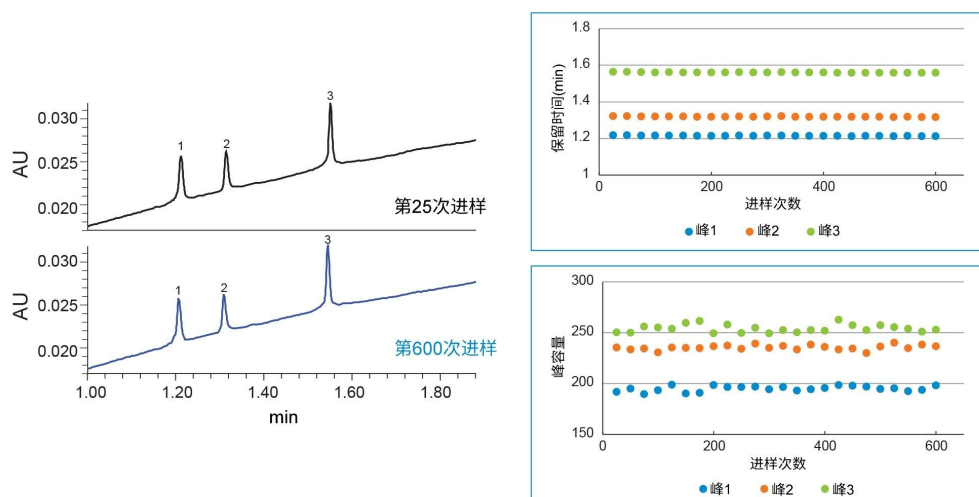


图2.每24次进样水之后进样一次mAb亚基标准品，证明了 $2.1 \times 20 \text{ mm BioResolve Premier RP mAb}$ 多联苯 450 \AA 2.7 \mu m 色谱柱的稳定性。在600次进样中，保留时间和峰容量无明显变化。使用TFA流动相，流动相B在2分钟内从15%增加至55%，流速 0.8 mL/min ，柱温 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

mAb亚基分析

图3展示了使用 $2.1 \times 20 \text{ mm}$ 色谱柱 (0.25 \mu g 上样量) 和 $2.1 \times 100 \text{ mm}$ 色谱柱 (1.25 \mu g 上样量) 分离mAb亚基的结果，在不同色谱柱体积下保持相同的梯度斜率。三个主要的亚基峰（峰1: Fc/2；峰2: LC；峰3: Fd'）在 20 mm 色谱柱上得到了良好分离²。如预期一样，由于分离效率降低，一些在 100 mm 色谱柱上观察到为肩峰的低丰度物质在 20 mm 色谱柱上没有与主峰分离。而另一方面， 20 mm 色谱柱的分析时间是 100 mm 色谱柱的五分之一。该色谱柱的另一个优势在于样品体积和流动相用量也仅为原来的五分之一。

通过减少梯度时间，可以进一步缩短分析时间（图4），同时保持速率为 0.4 mL/min ，以保持MS电离效率。因此，梯度斜率变陡，导致分离度降低。尽管分离度有所损失，但使用1分钟的梯度仍能有效分离三个主峰，并且质谱数据与4分钟梯度时间以及在 100 mm 色谱柱上的20分钟梯度时间获得的数据相当（图5）。

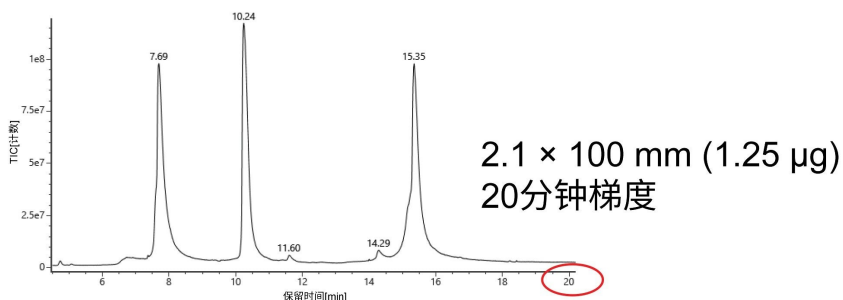
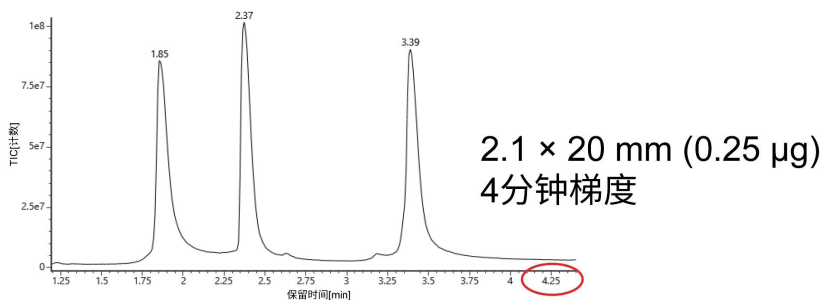


图3.mAb亚基标准品在2.1 × 20 mm *BioResolve Premier RP mAb*多联苯450 Å 2.7 μm色谱柱（4分钟梯度）和2.1 × 100 mm *BioResolve RP mAb*多联苯450 Å 2.7 μm色谱柱（20分钟梯度）上的LC-MS分离结果比较。

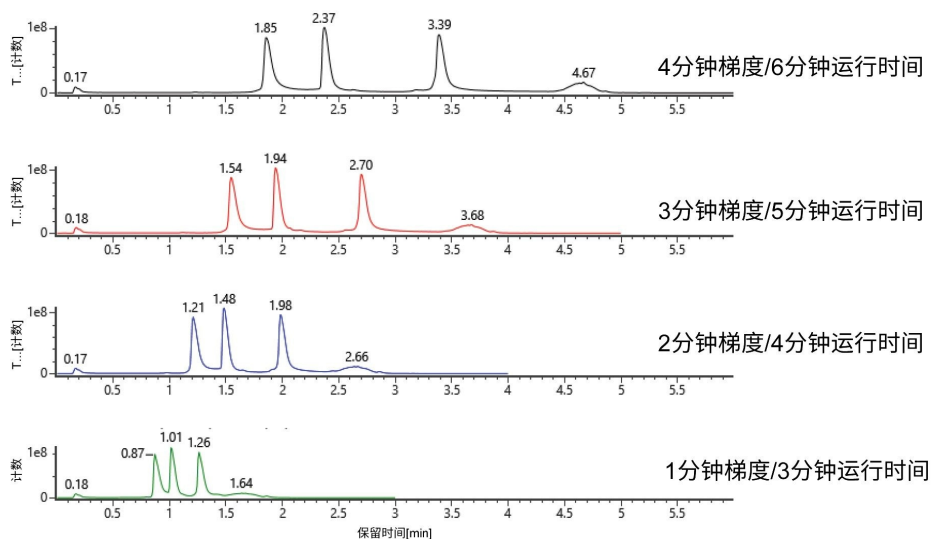


图4. mAb亚基标准品在 $2.1 \times 20 \text{ mm}$ BioResolve Premier RP mAb多联苯 450 \AA , $2.7 \mu\text{m}$ 色谱柱上的LC-MS分离结果比较，梯度时间为1~4分钟。

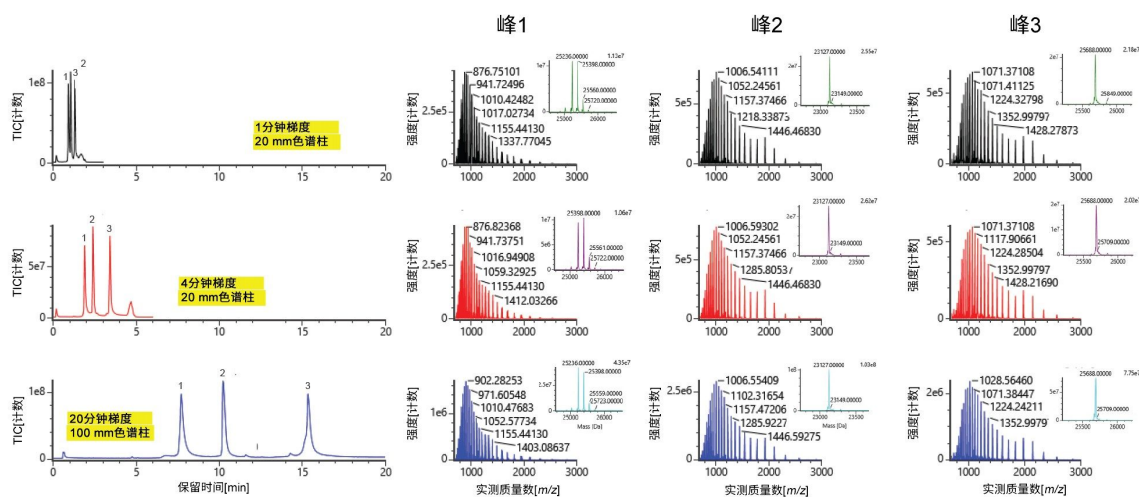


图5. mAb亚基标准的分离结果，在 20 mm 色谱柱上使用1分钟和4分钟梯度，在 100 mm 色谱柱上使用20分钟梯度。得到的三个主峰合并谱图和去卷积质量数（插图）相当。

完整mAb分析

图6a显示了使用 2.1×20 mm色谱柱（上样量 $0.25 \mu\text{g}$ ）和 2.1×100 mm色谱柱（上样量 $1.25 \mu\text{g}$ ）对完整NIST mAb（人源mAb质量数QC标准品）进行LC-MS分析得到的结果，在不同色谱柱体积下保持相同的梯度斜率^{3,4}。与mAb亚基标准品分离的分析结果类似，尽管主峰与低丰度肩峰之间有一定的分离度损失，但使用20 mm色谱柱仍显著减少了分析时间、样品体积和流动相的用量。图6b和6c分别展示了20 mm色谱柱和100 mm色谱柱的主峰合并谱图、单电荷态谱图和解卷积质谱图。在20 mm色谱柱上使用1分钟梯度运行获得的质量数数据与在100 mm色谱柱上使用5分钟梯度获得的质量数数据相当。

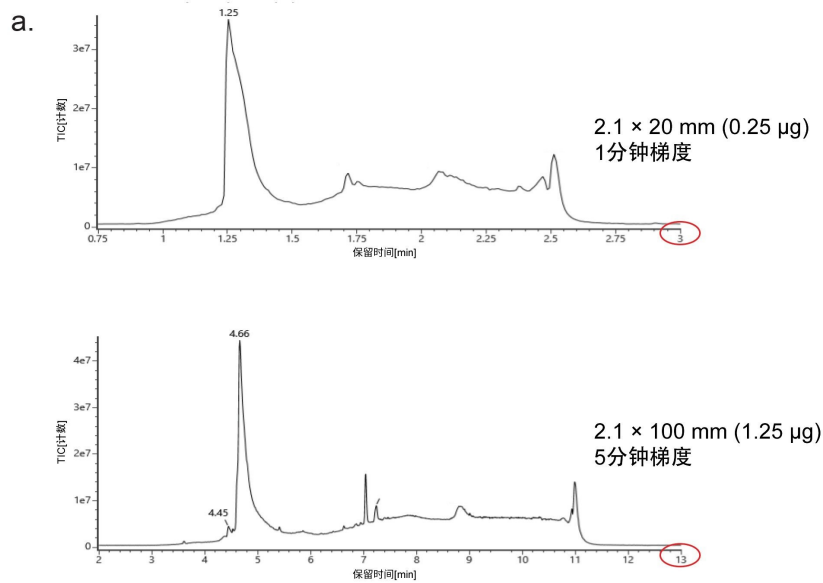


图6.完整NIST mAb（人源mAb质量数QC标准品）的LC-MS分析。

a. 完整NIST mAb在 2.1×20 mm BioResolve Premier RP mAb多联苯 450 \AA $2.7 \mu\text{m}$ 色谱柱（1分钟梯度）和 2.1×100 mm BioResolve RP mAb多联苯 450 \AA $2.7 \mu\text{m}$ 色谱柱（5分钟梯度）上的LC-MS分离结果比较。

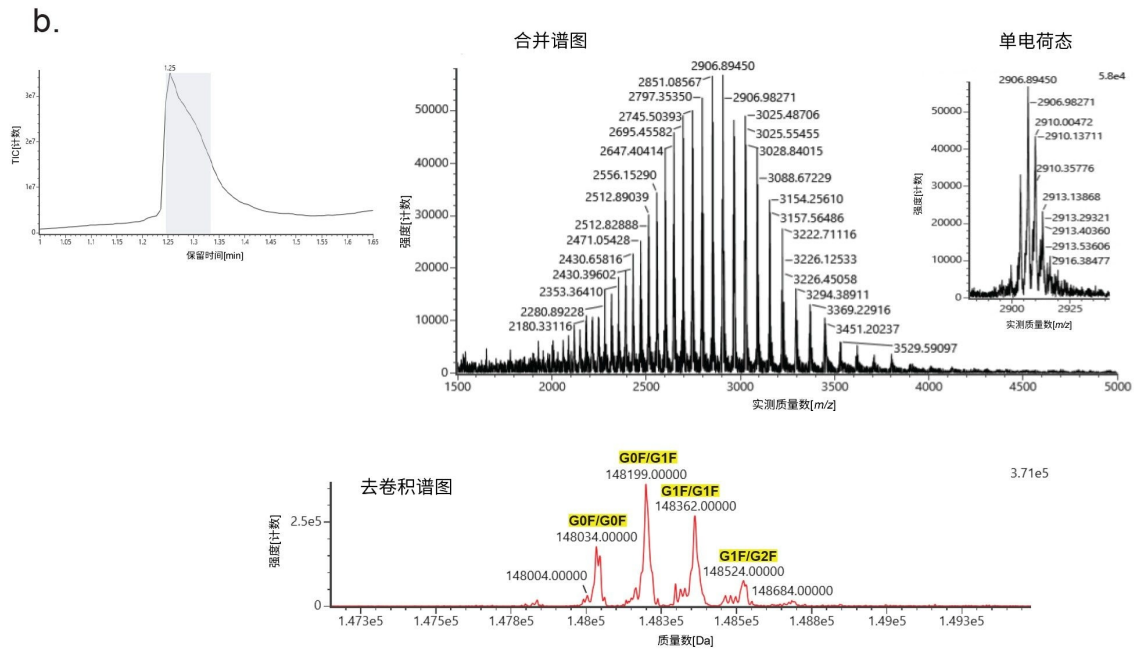


图6.完整NIST mAb（人源mAb质量数QC标准品）的LC-MS分析。

b. 使用20 mm色谱柱获得的合并谱图、单电荷态（插图）以及去卷积质量数。

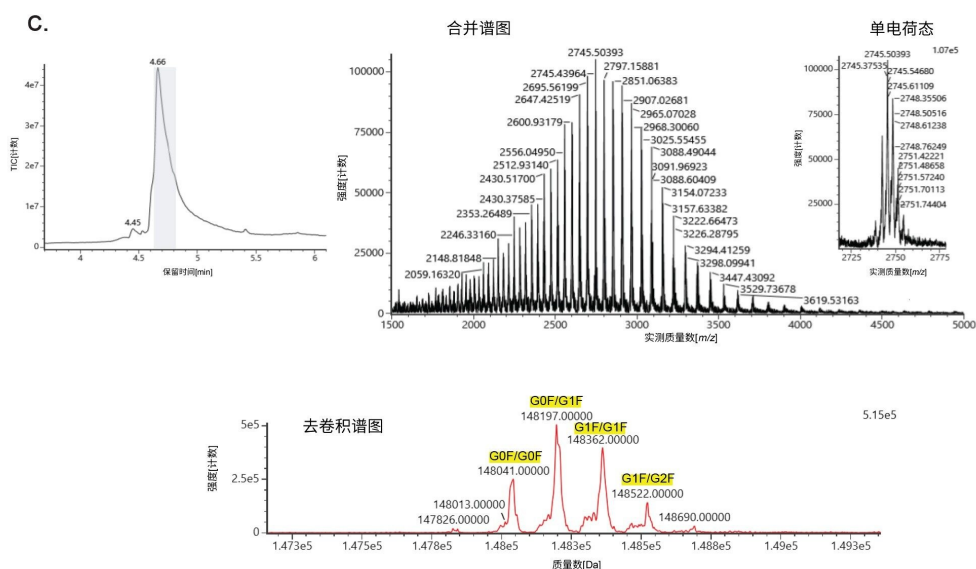


图6.完整NIST mAb（人源mAb质量数QC标准品）的LC-MS分析。

c. 使用100 mm色谱柱获得的合并谱图、单电荷态（插图）以及去卷积质量数。灰色区域表示合并谱图的位置。

结论

本研究表明， 2.1×20 mm BioResolve Premier RP多联苯 450 \AA $2.7 \mu\text{m}$ 色谱柱具有优异的重现性和稳定性。使用这根短色谱柱（运行时间 ≤ 3 分钟）能够快速运行反相方法，并有效分离mAb亚基。尽管色谱分离度相应降低，但获得的质谱图和去卷积质量数与在100 mm色谱柱上采用20分钟梯度获得的结果相当。类似地，使用20 mm色谱柱规格进行完整mAb分析的快速LC-MS方法（运行时间 ≤ 3 分钟）也可用于质量数鉴定。

参考资料

1. Fekete S. and Guillarme D. Ultra-short Columns for the Chromatographic Analysis of Large Molecules. *Journal of Chromatography A* 1706 (2023) 464285.

2. Ranbaduge N, Shion H, Lauber M.A., and Yu Y.Q., 使用BioResolve RP色谱柱对抗体亚基进行LC-MS表征.沃特世技术简报.720006199ZH.2018.
3. Shion H., Yu Y.Q., and Chen W. 在数据可靠性环境下进行可重现的完整蛋白质量数例行分析.沃特世应用纪要.720006472ZH.2020.
4. 人源mAb质量数QC标准品.沃特世维护和使用手册.720006358ZH <<https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=135009313>> .2019.

特色产品

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

ACQUITY UPLC和ACQUITY Premier可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

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

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

waters_connect软件解决方案 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>>

720008299ZH, 2024年4月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私策略](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie](#)
[设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号