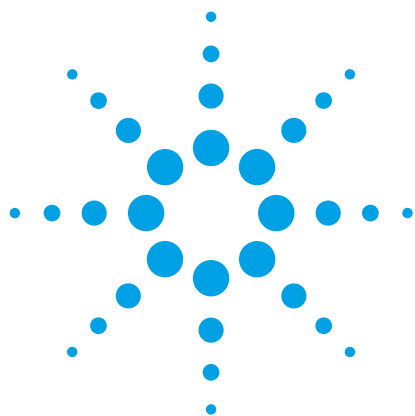




使用安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C8 1.8 μm 色谱柱反相分离完整单克隆抗体

应用报告

生物制药

作者

James Martosella 和 Phu Duong

安捷伦科技有限公司

2850 Centerville Rd

Wilmington, DE

美国

Linda Lloyd

安捷伦科技有限公司

Essex Rd

Church Stretton, Shropshire

英国

摘要

采用反相色谱法分离和分析单克隆抗体(mAb)，很难得到最佳的分离度、回收率和实验重现性。此外，将 UHPLC 方法用于该类物质的分离，以缩短分析时间，增加分析通量时，需选择耐用的色谱柱技术和特异的键合相，以实现分析条件的充分优化。安捷伦 ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD, 快速分离高分辨) 300SB-C8 1.8 μm 色谱柱能够提供更高的检测灵敏度、更短的分析时间、更高的分离度、更长的柱寿命和更好的重现性，特别适合复杂蛋白质，如 mAb 的分离。该色谱柱稳定键合的短链 C8 专利固定相可以替代 C18 固定相，是单克隆抗体等大分子疏水蛋白分离的理想选择。300SB-C8 涂层技术还使该色谱柱具有优异的耐热性和低 pH 稳定性，可以常规使用三氟乙酸或甲酸作流动相，耐热温度可达 80 °C。本文通过对中国仓鼠卵巢细胞产生的一种完整单克隆抗体进行分析，展示了该色谱柱的上述优良特性。



Agilent Technologies

前言

目前，单克隆抗体(MAb)代表了生物技术产品中最大的一类治疗药物，并将在未来的疾病药物干预中发挥重要作用。MAb 的纯化、表征和监测，对于药物研发极为重要，常规采用多种不同的技术进行分析。鉴于 mAb 疏水结构的异质性，反相色谱分离技术成为 mAb 生产、制剂和储存过程中纯度及稳定性监测的一种选择。然而，太多的反相色谱方法不具有快速、耐用的分离性能，人们一度认为它不能成为 mAb 杂质检测的主流技术。此外，能够提供良好重现性、高分离度的色谱柱也很有限。

我们采用安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C8 1.8 µm 色谱柱对完整单克隆抗体进行分析，在 mAb 筛选和优化关键分离参数时，证实了采用该色谱柱进行快速分析的实用性。ZORBAX StableBond C8 涂层技术结合优化的装柱工艺，在更短的运行时间内实现了 mAb 的高分离度分离。该色谱柱展现出对超过 1000 bar 背压的优异耐受力，以及在酸性和高温条件下操作的良好重现性。更重要的是，RRHD 300SB-C8 1.8 µm 色谱柱与 ZORBAX 300SB-C8 3.5 µm 色谱柱相比，能够在改善峰形和提高分离度的同时，提供更高的分析灵敏度。

材料和方法

中国仓鼠卵巢(CHO)细胞产生的单克隆抗体购自 Creative Biolab 公司(Pennsylvania)。三氟乙酸购自 Sigma-Adrich 公司(St. Louis, MO)。异丙醇和乙腈由 Honeywell-Burdick & Jackson 公司(Muskegon, MI)提供。

色谱条件

仪器	配备自动进样器(ALS)、二元泵、恒温箱和二极阵列检测器(DAD)的 Agilent 1290 LC Infinity 系统
色谱柱	安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C8, 2.1 × 50 mm, 1.8 µm 色谱柱 (部件号 857750-906)
流动相	A. H ₂ O:IPA (98:2) + 0.1% TFA (v/v) B. IPA:ACN:H ₂ O (70:20:10) + 0.1% TFA (v/v)
进样量	1 µL (2 mg/mL)
流速	0.5 mL/min 到 1.0 mL/min 之间
梯度程序	多段梯度和线性洗脱
柱温	80 °C
检测器	UV, 225 nm

连续色谱运行时，增加 1 min 的后运行时间以再平衡色谱柱。

结果与讨论

通过升高柱温改善峰形和减少保留

溶剂黏度、蛋白质扩散系数和流动相极性在很大程度上取决于温度，柱温控制是实现疏水肽类和蛋白质分离的关键变量[1]。图 1 中放大的叠加色谱图展示了温度从 23 °C 增加至 80 °C 过程中，柱温对 mAb 分离的影响。如图所示，25% B 到 40% B (1.5% B/min) 的梯度洗脱条件下，mAb 小肩峰（突出显示为黄色）与基峰分离度随温度升高而增加，且柱压和两个色谱峰的保留时间均降低，因此 80 °C 温度条件非常适合 mAb 的快速、高效分析。

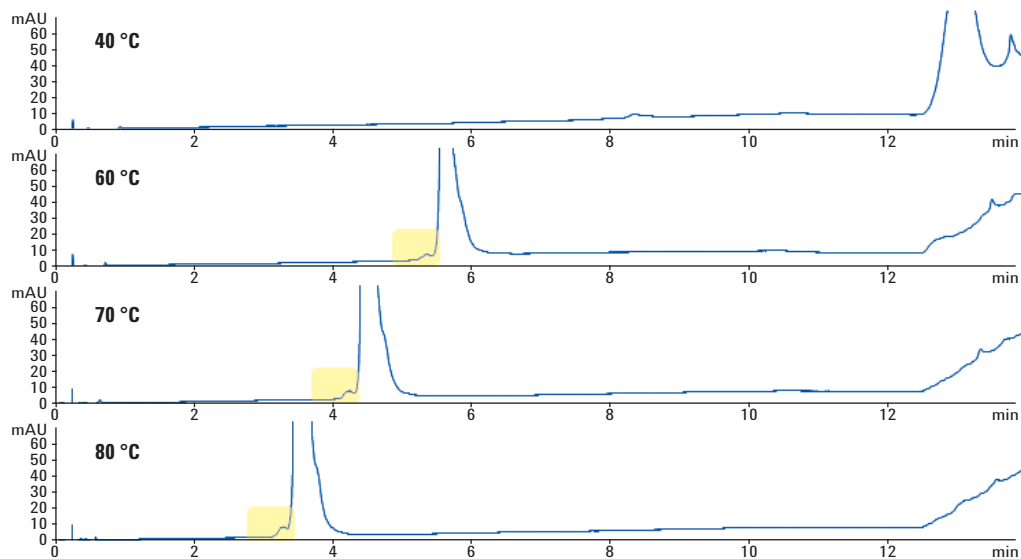


图 1. 使用安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C8 1.8 μm 色谱柱分析完整单克隆抗体性能的温度依赖性。色谱运行温度依次升高 (从上到下), 而流速保持 0.5 mL/min 不变。黄色标注的肩峰变化表明, 随着温度的升高, 分离度改善, 保留时间下降

优化梯度洗脱流速, 提高亚 2 μm 色谱柱分离度

优化蛋白质分离, 尤其是 mAb 的分离时, 调整流速可以明显改善分离度、柱效和峰形, 这是由于大分子蛋白质扩散存在着传质限制。在不同的流速条件下, 蛋白质分子的动态尺寸、疏水性、极性和洗脱环境均会对获得满意的 mAb 组分峰形产生影响。因此, 对于较大尺寸蛋白质如 mAb 的梯度洗脱条件优化, 确定流速非常关键。理想情况下, 2.1 $\times$ 50 mm 色谱柱适用于快速梯度洗脱; 然而, 该色谱柱需要针对不同流速下梯度改变斜率进行严格的评估和优化。本文在梯度快速改变的条件下, 评估了 0.5 mL/min、0.75 mL/min 和 1.0 mL/min 三种流速 (表 1, 梯度 B) 对 mAb 分离效果的影响。如图 2 所示, 在较短保留时间条件下, 1.0 mL/min 的高流速 (相对于 2.1 mm 内径色谱柱) 提高了 mAb 色谱峰分离度。在较高流速下, 完整 mAb 良好的峰形显示出更高的峰分离度, 同时该色谱柱也良好地耐受了高流速所导致的高背压。

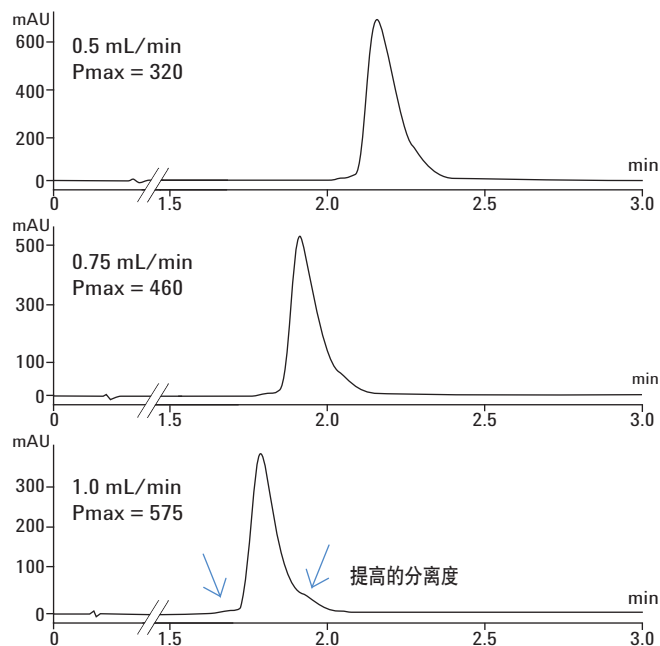


图 2. 使用安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C8 1.8 μm 色谱柱, 在 80 °C、快速梯度程序条件下, 三个不同流速实验的对比色谱图。流速从 0.5 mL/min (上) 提高到 0.75 mL/min (中), 再到 1.0 mL/min (下), mAb 的分离度依次提高, 保留时间依次缩短

优化梯度条件——提高分离度，实现 mAb 快速分析

在不同流速条件下进行系统梯度程序优化，以评估流速对 mAb 分离速度和分离度的影响。我们确定了两种梯度条件，分别适用于非常快速的 mAb 监测或在较长运行时间下实现超高分离度。为实现 mAb 高分离度分析，应使用缓慢变化的梯度，最佳流速为 0.5 mL/min（表 1-梯度 A）。图 3 上部色谱图展示了高分离度的细节，

并标出了梯度 A 条件下主峰的肩峰轮廓。为了在很短的分析时间内，实现适于 mAb 筛选的较高检测灵敏度和较低谱带展宽，需要采用 1.0 mL/min 的较高流速，以及快速变化的梯度洗脱程序（表 1-梯度 B）。图 3 下部色谱图和放大插图显示出比上部色谱图更快的 mAb 分离、更高的分析灵敏度，以及更短的洗脱时间，同时也展示出了肩峰与主峰的充分分离。

表 1. 图 3 中优化的梯度条件 A 和 B

梯度 A, 0.5 mL/min	%溶剂 B	时间 (min)	梯度 B, 1.0 mL/min	%溶剂 B	时间 (min)
	25	0		25	0
	35	10		35	3
	35	12		90	4
	90	14		25	5
	25	18			

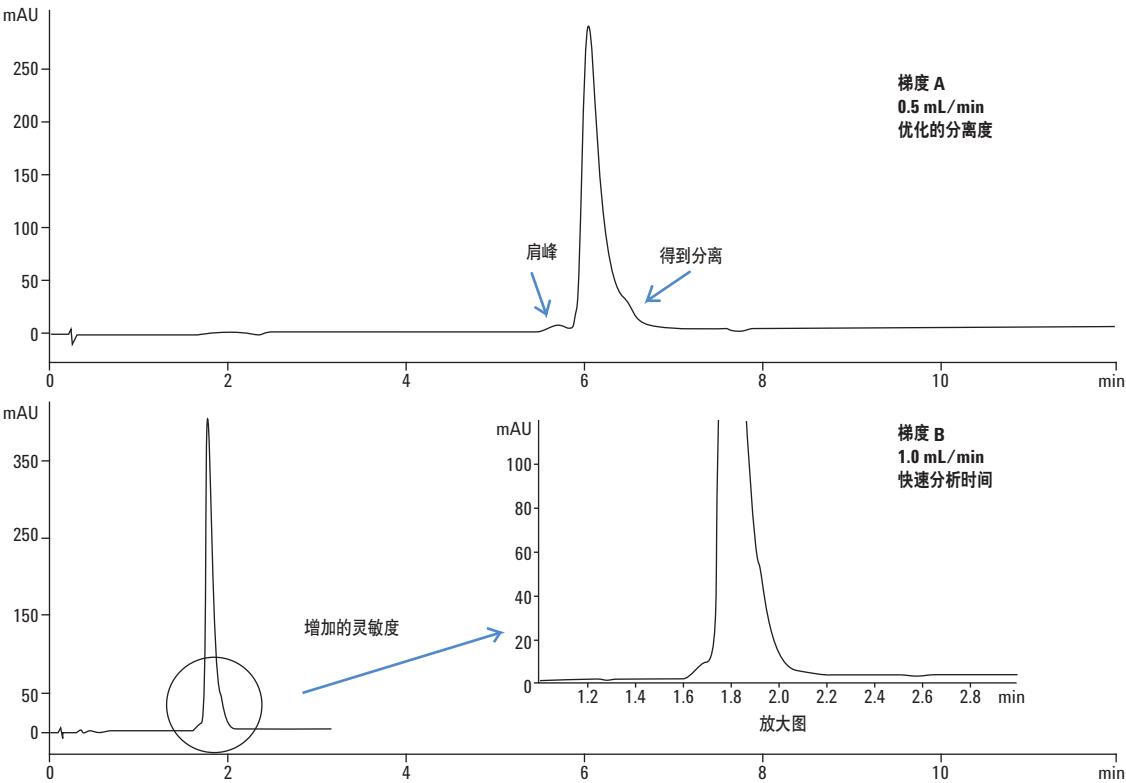


图 3. 使用安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C8 1.8 μ m 色谱柱分离 mAb 的两种优化梯度对比色谱图。上部色谱图展示了在较长运行时间和低流速条件下获得的超高分离度分离结果，而下部色谱图及放大图显示出在极快速分析条件下 mAb 的充分分离和提高的灵敏度，该条件很适合 mAb 筛选

安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C8 1.8 μm 色谱柱与 300SB-C8 3.5 μm 色谱柱性能对比

采用表 1 中的优化梯度程序 A 和 B，将 ZORBAX RRHD 300SB-C8 1.8 μm 色谱柱与 ZORBAX 300SB-C8 3.5 μm 色谱柱直接进行对比，结果如图 4a 和图 4b 所示。图 4a 为采用较长的梯度洗脱时间使 mAb 获得较高分离度的色谱图。在此梯度条件下（梯度程

序 A），1.8 μm 300SB-C8 色谱柱优于 3.5 μm 300SB-C8 色谱柱，前者可提供更好的分离度、更高的灵敏度，以及略减小的保留因子。对比发现，使用 3.5 μm 色谱柱左肩峰减低，基本无法与主峰分离。另外，图 4b 显示，采用较大流速且变化更快的梯度程序 B，1.8 μm 300SB-C8 色谱柱展现了更高的分离度、改善了峰形且使检测灵敏度提高了约 2 倍。

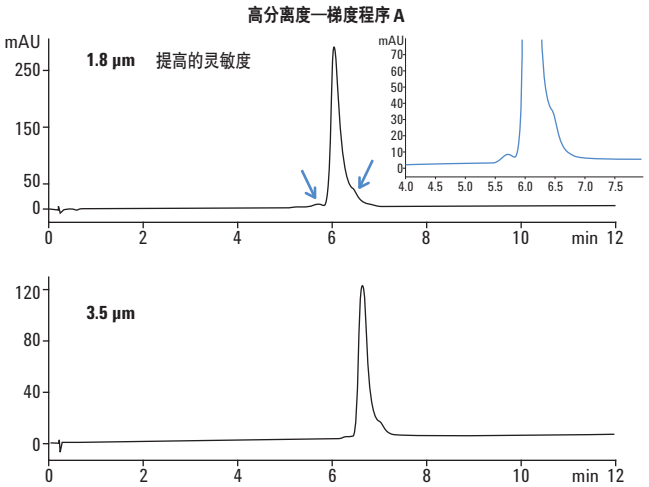


图 4a. 采用梯度程序 A（表 1），在 80 °C 的柱温条件下，对比 1.8 μm（上图）和 3.5 μm（下图）安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C8，2.1 × 50 mm 色谱柱的分离效果。上面 1.8 μm 色谱柱的色谱放大插图展示了提高的分离度。

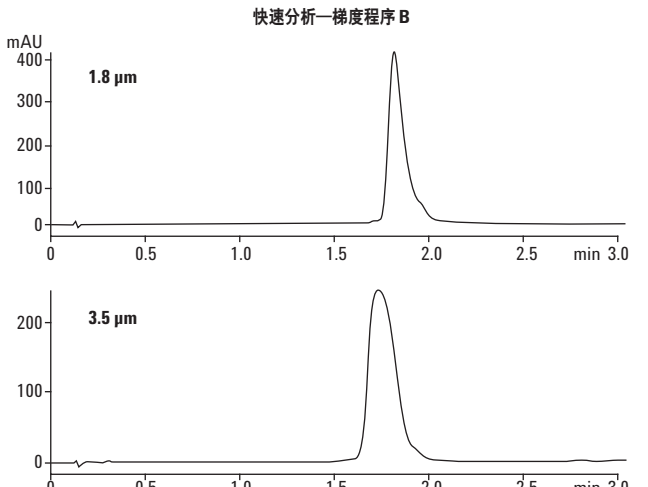


图 4b. 采用梯度程序 B（表 1），在 80 °C 的柱温条件下，对比 1.8 μm（上图）和 3.5 μm（下图）安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C8，2.1 × 50 mm 色谱柱的分离效果。上面 1.8 μm 色谱柱的色谱图显示其可以改善峰形、提高分离度和灵敏度

评估色谱柱连续运行的重现性及 mAb 回收率

采用梯度程序 A（表 1），在 80 °C 的柱温条件下考察了色谱柱的重现性和回收率。只需较短平衡时间的快速分离方法是全面评估色谱柱连续运行重现性和总蛋白回收率的首选方法。高蛋白回收率是 mAb 分析的关键 [2]。尽管在进样间隙可采用专设的运行后清洗程序净化色谱柱，但是我们更期望通过优化的色谱条件，实现快速组分平衡转移并避免鬼峰干扰。通过连续运行 150 针来评价

ZORBAX 300SB-C8 1.8 μm 色谱柱的重现性和回收率。mAb 的重复分离表明未出现保留时间漂移、峰展宽或峰形对称性的改变（表 2）。图 5 下部展示了进样 150 针前后空白运行（进 0 μL）的色谱图和梯度压力曲线。采用 225 nm UV 检测显示进样 150 针后，无明显的鬼峰或基线干扰，而且压力保持稳定，表明进样口筛板无污染，或柱床稳定无移动。

表 2. #1~#150 重现性运行中，每运行 50 次计算的保留时间、峰宽和对称因子

重现性 进样 #	保留时间 (min)	峰宽 (W)	对称因子
1	1.975	0.0938	0.518
50	1.980	0.0969	0.540

重现性 进样 #	保留时间 (min)	峰宽 (W)	对称因子
100	1.990	0.0999	0.539
150	1.977	0.0828	0.546

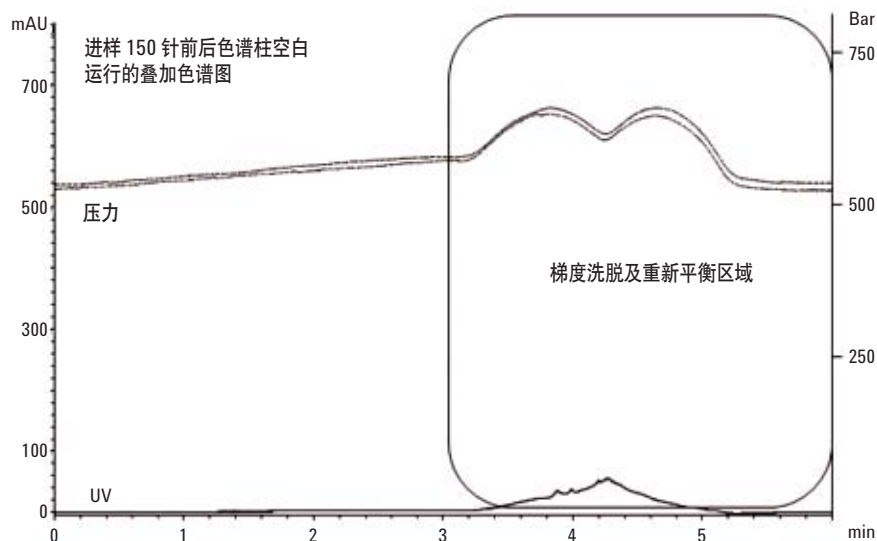


图 5. 采用安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C8 1.8 μm 色谱柱分析 mAb，第 1 针和第 150 针的色谱压力和 UV 检测叠加色谱图。从#1 到#150 以 6 min 的时间间隔连续进样

结论

考察了 80 °C 柱温下，采用安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C8 1.8 μm 色谱柱在优化的梯度条件下对完整单克隆抗体的分离。采用两个优选的梯度方法有效分离 mAb，实现了 mAb 的快速筛选或 mAb 及其组分的超高分离度分离。另外，对柱温、回收率和流速条件进行了优化和评价，并与 3.5 μm ZORBAX RRHD 300SB-C8 色谱柱进行了对比。1.8 μm ZORBAX RRHD 300SB-C8 色谱柱可实现 mAb 的快速高效分离，并且在高柱温和低 pH 条件下运行稳定。在最佳梯度条件和高柱温下，RRHD 300SB-C8 色谱柱在连续进样 150 针的快速运行中，获得了良好的重现性分离结果。

参考文献

1. K. Kalghatgi, C. Horvath, J. Chromatogr., 1987, 398, 335-339.
2. C. T. Mant, L. H. Kondejewski, P. J. Cachia, O. D. Monera, R. S. Hodges, Methods Enzymol., 1997, 289, 426-429.

更多信息

这些数据代表了典型的分析结果。如需了解更多有关我们产品和服务的信息，请登录我们的网站：www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011
2011 年 9 月 30 日，中国印刷
5990-9016CHCN



Agilent Technologies