

# 利用安捷伦 ZORBAX 超高压快速高分离度 (RRHD) 300SB-C8 色谱柱对还原型单克隆抗体进行快速 UHPLC 分析

## 应用报告

生物制药

### 作者

James Martosella, Phu Duong,  
Susanne Moyer  
Agilent Technologies, Inc.  
2850 Centerville Rd,  
Wilmington, DE, 19808  
USA

### 摘要

使用安捷伦 ZORBAX 亚-2  $\mu\text{m}$  超高压快速高分离度 (RRHD) 300SB-C8 反相色谱柱在其最佳条件下, 对还原型和烷基化的单克隆抗体实现了高分离度超快速分离。安捷伦的 StableBond C8 固定相和 RRHD 色谱柱技术结合强大的梯度洗脱条件, 使得轻链和两个重链单克隆抗体变体的高效、快速和有效分离可以在 4 分钟内完成。此外, 文中也考察了多种流动相组成, 使该方法可灵活用于超快速 LC/MS 分析。在较高的压力和温度条件下, 稳定的 C8 固定相和坚固耐用的装柱技术实现了重复性极好的分离效果和出色的批次间色谱运行结果。



**Agilent Technologies**

## 前言

随着制药行业的发展，生物治疗药物的开发也获得了快速发展。其中，抗体药物的表征是该类药物开发过程中一个很重要的挑战。尽管抗体可以通过多种分离技术进行表征，但因为无效率的规程、分离度差和总蛋白质回收率低等使得反相色谱法在该方面的分离应用有限。结构上看，单克隆抗体是一种糖蛋白，由两个相同的重链（50 kDa）和两个相同的轻链（25 kDa）通过二硫桥连接在一起。为了在生产、配方和储藏过程中高通量地监测样品纯度和稳定性，快速、高效地表征这些单克隆抗体链和异构体变得日益重要和关键。

我们利用一支安捷伦 ZORBAX 超高压快速高分离度（RRHD）300SB-C8, 1.8  $\mu\text{m}$  色谱柱，在其最佳色谱条件下进行还原型单克隆抗体分析，以展示其在快速 mAb 表征和筛选中的应用。ZORBAX StableBond C8 固定相、较高的温度（75  $^{\circ}\text{C}$ ）和优化的梯度条件，使得轻链和重链 mAbs 在极短的洗脱时间内完成分析（据我们所知，之前没有相关报道）。文中采用了多种流动相组成进行分离，并使用质谱（MS）兼容的离子对添加剂试剂，以保证该方法可灵活用于不同的 LC/MS 设置。色谱柱显示出了出色的耐高压能力（超过 900 bar）并确保了酸性流动相条件和高温条件下可重现的分离。此外，蛋白质回收率在 250 次运行中进行了重复评价，没有发现鬼峰或保留行为改变。

## 实验部分

### 材料

本文中使用的单克隆抗体使用 CDH 媒介（安捷伦，部件号：010774）生产，并储存在 pH 7.2 的 10 mM 磷酸缓冲液中，缓冲液中含有 0.09% (w/v) 叠氮化钠，温度为 4  $^{\circ}\text{C}$ 。抗体浓度为 10 mg/mL。三氟乙酸购自 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO，正丙醇和乙腈由 Honeywell-Burdick & Jackson, Muskegon, MI 提供。透析盒（3,500 MWCO）购自 Thermo Scientific（部件号：66330）。

## 还原和烷基化反应

还原和烷基化反应在变性条件下进行，使用盐酸胍以制备供反相色谱分析的游离轻链和重链。一份 0.5 mL (1.5 mg/mL) 的抗体试样在水中透析，以去除防腐剂。透析完成后，0.5 mL 样品溶液用 100 mM TRIS-HCl 和 4M 盐酸胍溶液（Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ, USA）稀释至样品最终浓度 0.75 mg/mL。溶液的 pH 调整至 pH 8.0。加入一份 10  $\mu\text{L}$ 、0.5 M 的二巯苏糖醇（DTT, Sigma）储备溶液以获得最终浓度为 5 mM 的样品溶液。混合液放置在 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴中并恒温 30 分钟。然后，抗体溶液快速降至室温，并加入一份 26  $\mu\text{L}$ 、0.5 M 碘乙酰胺（IAM, Sigma）储备溶液使得最终浓度为 13 mM。抗体溶液在室温下避光放置 45 分钟取出后，溶液立即用 20  $\mu\text{L}$ 、0.5 M DTT 停止反应，其最终浓度为 10 mM。然后，1.0 mL 还原型和烷基化的抗体通过一个 4 mL、3.5 KMWCO 的浓缩器（部件号：5185-5991）脱盐，用水（含有 0.1% TFA）在 3800 RPM 下脱盐 30 分钟。浓缩过程重复两次，最终体积为 0.5 mL (1.5 mg/mL)。

## UHPLC 条件

仪器	Agilent 1290 LC Infinity 系统带自动进样器（ALS）、二元泵、恒温柱温箱和二极阵列检测器（DAD）
色谱柱	Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度 300SB-C8, 2.1 $\times$ 100 mm, 1.8 $\mu\text{m}$ （部件号：858750-906）
流动相	(多种) A. $\text{H}_2\text{O}$ + 0.1% TFA (v/v) B. 正丙醇:ACN: $\text{H}_2\text{O}$ (80:10:10) + 0.1% TFA (v/v) A. $\text{H}_2\text{O}$ + 0.05% TFA/0.5% 乙酸 (v/v) B. 正丙醇:ACN: $\text{H}_2\text{O}$ (80:10:10) + 0.05% TFA/0.5% 乙酸 (v/v) A. $\text{H}_2\text{O}$ + 0.05% TFA/0.05% 甲酸 (v/v) B. ACN + 0.05% TFA/0.05% 甲酸 (v/v)
进样量	1-3 $\mu\text{L}$
流速	0.5 mL/min
梯度程序	多个阶段
温度	75 $^{\circ}\text{C}$
检测器	UV, 225 nm

对于连续色谱运行，需要增加 2 分钟的后运行，以重新平衡色谱柱。

## 结果和讨论

### 优化分离以实现超快速分析还原型和烷基化的单克隆抗体

图 1A 和 1B 中的色谱图详细展示了超快速分离还原型和烷基化抗体时两个优化的色谱特征图谱。Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C8, 1.8  $\mu\text{m}$  色谱柱、较高的温度 (75  $^{\circ}\text{C}$ ) 和优化的流动相组成, 保证了两次实验的快速洗脱和良好分离。上图 (1A) 为在不到 4 分钟时间内快速洗脱还原型抗体的详细情况。分离中呈现了较窄的轻链和重链谱带, 其柱效较高。作为对比, 图 2B 中的色谱图也实现了快速分离, 但运行时间相对较长。分离中, 轻链和重链谱带略

微有些展宽, 不过两个重链峰 1 和 2 获得完全分离。对于以上每次分离, 流动相 A 为水 (含 0.1%TFA), 流动相 B 为 80/10/10 的正丙醇、乙腈和水 (含 0.1%TFA)。试验中也尝试了其他组成的流动相 B, 包括 100% 乙腈, 然而这些类型的流动相 B 都没有实现如图 1 和图 2 所示的满意的峰形。上图中使用的优化的阶段梯度条件 (如表 1A) 是在 4 分钟内实现轻链和重链分离的关键所在, 而缓梯度条件 (如表 1B) 是为了获得两个重链变体的基线分离而优化的。对于这两组分离, 每次梯度运行完成后都需进行一次快速色谱柱清洗步骤。以完成快速的色谱柱平衡, 从而实现高通量分析和连续的批次间测试。

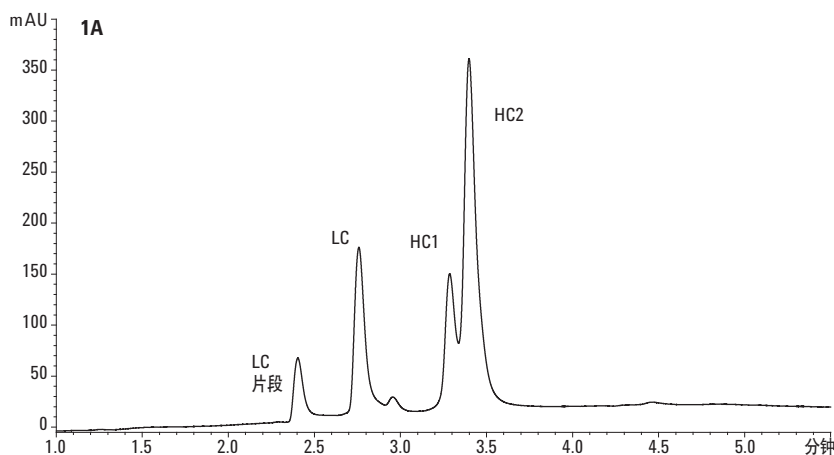


表 1A. 为速度优化

梯度	% 流动相 B	时间 (分钟)
	20	0
	35	3
	40	4
	40	5
	90	5.1
	90	5.5
	25	6

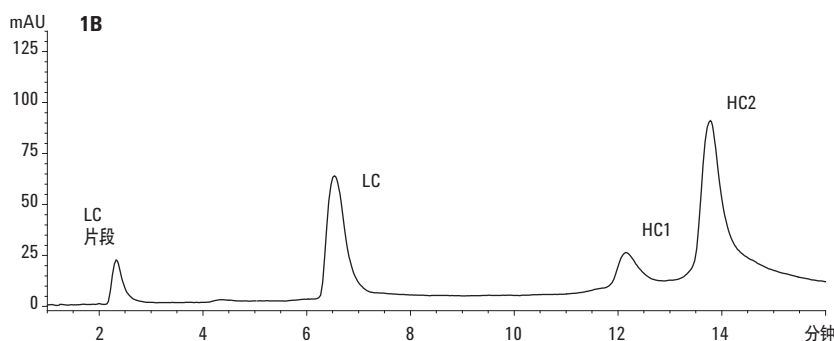


表 1B. 为分离度优化

梯度	% 流动相 B	时间 (分钟)
	25	0
	32	15
	32	16
	90	17
	90	17.5
	25	18

图 1. 在 Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition 300SB-C8, 1.8  $\mu\text{m}$  色谱柱 (2.1  $\times$  100 mm), 上进行还原型和烷基化单克隆抗体的快速分离时, 两种优化梯度分离的结果比较。上图详细列出了运行时间缩短至不足 4 分钟的条件下, 实现了轻链和重链的快速分离。下图显示了使用较缓梯度在较长运行时间内实现了两种重链变体的完全基线分离。两次分离均在 75  $^{\circ}\text{C}$  下完成, 并使用了一个 90% 正丙醇快速冲洗步骤 (UV 结果未给出)

## 快速增强的 LC/MS 分析的流动相组成

MS 电喷雾离子源在正离子模式下运行时需要减少三氟乙酸 (TFA) 的用量。因为三氟乙酸会极大地导致信号抑制。此外, 添加挥发性流动相添加剂可以增强信号强度, 有利于 MS 分析。因此, 小分子有机酸例如甲酸 (FA) 或乙酸 (AcOH) 是反相液相色谱串联 MS 检测器时的首选离子对试剂。我们评价了几种不同的有机流动相 B 和多种离子对添加剂组合, 以获得更高的信号强度, 来替换传统的唯一适于 LC/MS 分析的乙腈/TFA 溶剂系统。离子对试剂的浓度在 0.5% 和 5% 之间调整, 流动相 B 则包括乙腈、正丙醇和异丙醇以及他们的组合。图 2A 和 2B 显示了此实验中两次最佳的分离结果。在设定的梯度条件下 (如表 2A 和 2B), 对轻链和两个重链变体的分离进行优化以实现快速分析, 使每次分离在不足 5 分钟

内完成。上图中的分离经过优化, 使用的是与图 1A 和 1B 中相同的流动相组成。然而, TFA 的含量从 1.0% 降低到 0.05%, 同时加入了 0.5% 乙酸。此次分离的梯度程序如表 2A 所示。下面的图形 (图 2B) 显示了使用常规的水/乙腈溶剂系统进行的梯度洗脱, 但其中 TFA 的含量减少到了 0.05% 并添加了 0.05% 甲酸。此次分离中, 两个重链变体表现出了与图 2A (使用正丙醇) 不同的分离度, 并且此处的 HC1 和 HC2 颠倒了出峰位置。此外, 值得注意的是在图 2B 色谱条件下使用相同梯度坡度和流动相组成, 但不添加甲酸时, HC1 和 HC2 不能实现有效分离。实验中分离的条件表明, 减少 TFA 用量, 但是添加一定甲酸或乙酸的流动相组成非常适于 mAb 的超快速分析, 是 LC/MS 分析的另一有利选择。

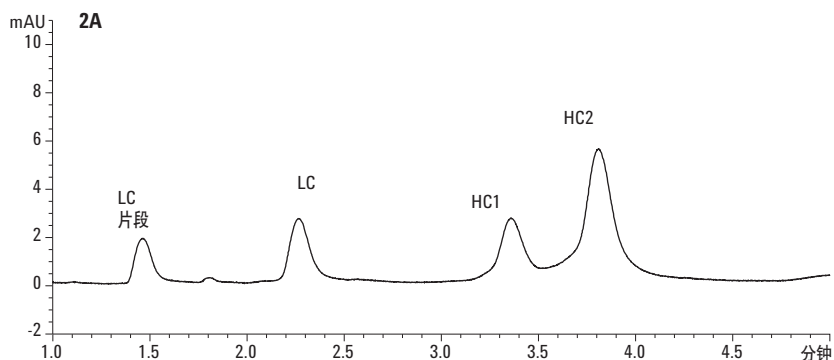


表 2A. A:  $H_2O + 0.5\% \text{ AcOH} / 0.05\% \text{ TFA}$  (v/v)  
B: 正丙醇:ACN: $H_2O$  (80:10:10) +  
0.5% AcOH/0.05% TFA (v/v)

梯度	% 流动相 B	时间 (分钟)
25		0
35		10
35		12
90		14
25		18

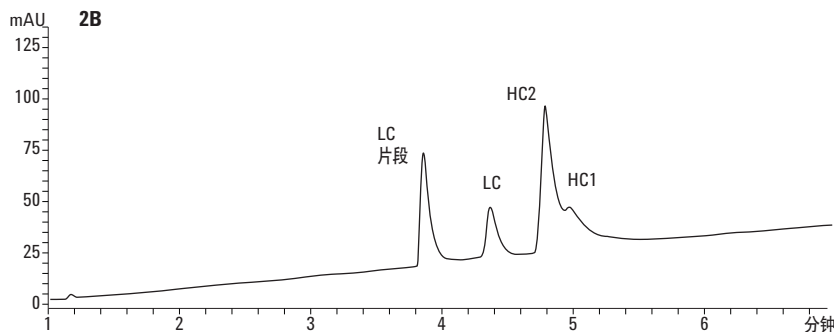


表 2B. A:  $H_2O + 0.05\% \text{ FA} / 0.05\% \text{ TFA}$  (v/v)  
B: 正丙醇:ACN: $H_2O$  (80:10:10) +  
0.05% FA/0.05% TFA (v/v)

梯度	% 流动相 B	时间 (分钟)
25		0
50		7
90		8
25		9

图 2. 质谱兼容的流动相组成, 用于 Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C8,  $2.1 \times 100 \text{ mm}$  色谱柱进行超快速 LC/MS 分析表征还原型和烷基化的抗体。上图 (2A) 的分离使用了与图 1A 和 1B 中相同的溶剂组成。只不过为了增强 MS 信号强度添加了乙酸。下图 (2B) 使用的是常规的水/乙腈流动相, 但是减少了 TFA 的用量, 增加了甲酸以减少信号抑制

## 重复 mAb 分析的重现性和回收率

利用 ZORBAX RRHD SB C8, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm 色谱柱考察了还原型单克隆抗体批次间梯度分析的重现性和回收率。梯度组成和条件见表 3。为了评价色谱柱的重现性和回收率,进行了 250 次连续进样,其中每 20 次进样进行一次空白运行和色谱柱压力测试。在使用寿命分析中,色谱柱经历了重复的高压 (>700 bar) 和

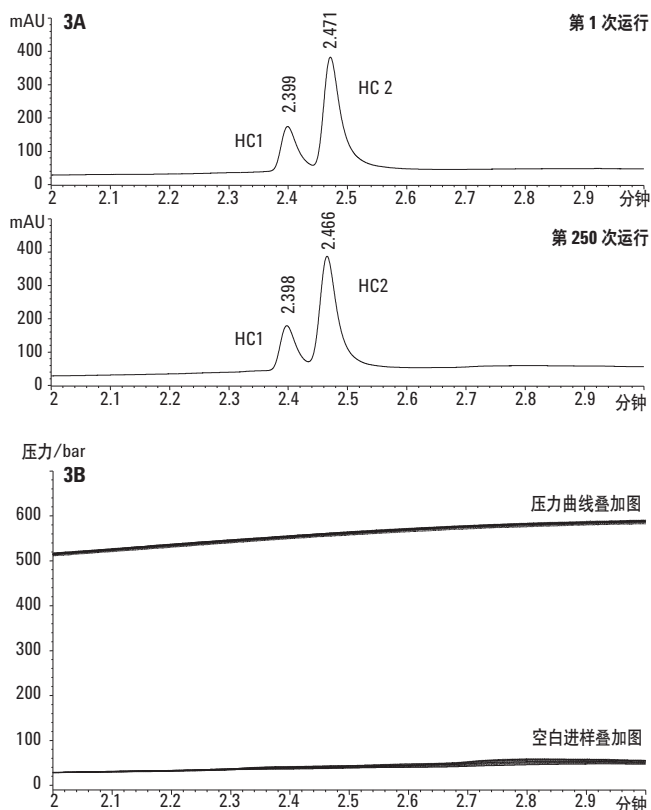


图 3A. 第 1 次运行 (上) 和第 250 次运行 (下) 重链 1 和重链 2 峰形和保留时间重现性对比

图 3B. 250 次重复进样中十三次的空白进样 UV 图和压力曲线叠加图。空白曲线是在使用寿命分析中每 20 次进样收集一次

75 °C 高温运行。如图 3A 所示,重链变体 1 和 2 的重复分离重现性高,并且保留时间和峰形没有变化。图 3B 中下图的空白运行 UV 叠加色谱图说明了连续运行时并没有出现残留 mAb 的交叉污染,而 3B 上图的压力曲线叠加图说明了重复分析时色谱柱耐用性好且使用寿命长,因而对内部色谱柱污染和筛板堵塞具有较高的耐受性。

表 3. 重复 mAb 分析的流动相和梯度

流动相	A. H <sub>2</sub> O + 0.1% TFA (v/v)	
	B. 正丙醇:ACN:H <sub>2</sub> O (80:10:10) + 0.1% TFA (v/v)	
梯度	% 流动相 B	时间 (分钟)
	25	0
	35	10
	35	12
	90	14
	25	18

## 结论

Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C8, 1.8 μm 色谱柱实现了对还原型和烷基化的单克隆抗体的超快速和高效分离。优化的色谱条件和较高的运行温度 (75 °C), 结合耐用的 ZORBAX C8 涂层技术, 使得抗体轻链和两个重链变体的高分离度分析在不到 4 分钟内完成。梯度条件和溶剂组成经过系统优化, 缩短了抗体的基线分离、色谱柱清洗和再平衡时间。此外, 优化超快速分析时考察了其他流动相添加剂 (例如, 甲酸和乙酸), 为获得更高的 MS 灵敏度提供了不同的流动相系统选择。

经 250 次连续运行还原型单克隆抗体的分离，获得了出色的重现性和回收率结果。在超过 700 bar 的高压下运行，重复分离保持了稳定的峰形和保留时间。并且没有出现因筛板堵塞或填充柱床不稳定而造成色谱柱提前损坏的迹象。1.8  $\mu\text{m}$  ZORBAX RRHD 300SB-C8 色谱柱显示出了出色的回收率，没有峰的交叉污染，并且对还原型和烷基化抗体的重复分析性能稳定。所有运行均实现了对还原型轻链和重链的高分离度和超快速分离，因而这种方法可以应用于高通量 mAb 筛选。

## 更多详细信息

这些数据代表了典型的结果。有关我们产品和服务的更多信息，请访问 [www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)。

[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

安捷伦科技公司对本资料中所包含的错误，以及由于使用本资料引起的相关损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和性能指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012  
2012 年 1 月 16 日，中国印刷  
5990-9631CHCN



**Agilent Technologies**