

将 SEC 方法从二醇化学键合相转移到带聚合物涂层的硅胶固定相

作者

Richard Hurteau
安捷伦科技有限公司

摘要

Agilent AdvanceBio SEC 130 和 300 Å 色谱柱含有高度均匀的 2.7 µm 颗粒填料，采用带聚合物涂层的低结合硅胶固定相。上述色谱柱可在尺寸排阻色谱 (SEC) 分析中实现高效分离和最小的非特异性相互作用。这项技术代表对旧 Agilent ZORBAX GF-250 和 GF-450 二醇键合相色谱柱的改进。为了检验这些柱技术，本文进行了一系列实验。

前言

SEC 被视为是测量单克隆抗体 (mAb) 产品和其他治疗性蛋白质中聚集体含量的金标准¹。单克隆抗体产品、治疗性蛋白质和肽可用于治疗多种疾病和医疗状况^{2,3}。在 mAb、治疗性蛋白质和肽的生产和储存过程中，蛋白质的聚集会对药效和安全性产生负面影响，可能导致药物失效^{4,5}。安捷伦提供二醇键合相色谱柱和聚合物涂层的硅胶基色谱柱用于执行 SEC。

本应用简报优化了两种旧款二醇键合相色谱柱，即 Agilent ZORBAX GF-250 和 ZORBAX GF-450，还针对两种新款聚合物涂层硅胶基 Agilent AdvanceBio SEC 130 Å 和 AdvanceBio SEC 300 Å 色谱柱优化了方法。在方法优化期间使用三种不同的标准品，即 AdvanceBio SEC 300 和 130 Å 标准品（表 1–2）以及源自牛胰腺的胰岛素 (MW 5.7 kDa)。AdvanceBio SEC 标准品可证明该色谱柱分离各种大小蛋白质的能力。相比之下，胰岛素标准品是将方法从 ZORBAX GF-250 转移到 AdvanceBio 130 Å 色谱柱的一个示例。

材料

- Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 标准品（部件号 5190-9417）
- Agilent AdvanceBio SEC 130 Å 标准品（部件号 5190-9416）
- 源自牛胰腺的胰岛素，Sigma，I6634
- 安捷伦样品瓶，螺口，棕色，经认证，2 mL，100/包。样品瓶尺寸：12 × 32 mm（带 12 mm 瓶盖）（部件号 5188-6535）
- 安捷伦蓝色固定螺口盖，PTFE/白色硅橡胶隔垫，100/包。瓶盖尺寸：12 mm（部件号 5190-7021）

表 1. AdvanceBio SEC 300 Å 标准品

化合物	分子量
1. 甲状腺球蛋白	670 kDa
2. γ-球蛋白	150 kDa
3. 卵清蛋白	45 kDa
4. 肌红蛋白	17 kDa
5. 血管紧张素 II	1 kDa

表 2. AdvanceBio SEC 130 Å 标准品

化合物	分子量
1. 卵清蛋白	45 kDa
2. 肌红蛋白	17 kDa
3. 抑肽酶	6.7 kDa
4. 神经降压素	1.7 kDa
5. 血管紧张素 II	1 kDa

色谱柱

- Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm, 300 Å（部件号 PL1180-5301）
- Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm, 130 Å（部件号 PL1180-5350）
- Agilent ZORBAX GF-250, 9.4 × 250 mm, 4 µm, 150 Å（部件号 884973-901）
- Agilent ZORBAX GF-450, 9.4 × 250 mm, 6 µm, 300 Å（部件号 884973-902）

液相色谱系统

- Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元泵 (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 生物惰性自动进样器 (G5667A)
- 用于 1200 ALS/馏分收集器的安捷伦恒温器 (G1330B)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity DAD (G1315C)

仪器条件

缓冲液流速设置为 1 和 1.2 mL/min，柱温 25 °C，冷却器设置为 4 °C，检测波长 220 nm。

结果与讨论

方法优化

为优化色谱柱流动相条件，首先测试了以下流动相：50、100、150、200、400、600 mmol/L 磷酸盐缓冲液，pH 7.0，不含 NaCl。然后，使 pH 7.0 磷酸盐缓冲液的磷酸盐浓度恒定为 150 mmol/L，盐浓度分别为 50、100、150、200、500 mmol/L NaCl。AdvanceBio SEC 130 和 300 Å 色谱柱的流速保持在 1.0 mL/min。对于 ZORBAX GF-250 和 GF-450 色谱柱，流速保持在 1.2 mL/min（流速按比例缩放以获得不同色谱柱尺寸的相同线速度）。优化的条件为：标准品峰之间具有最高分离度和分辨率、无峰变形或肩峰、保留时间无漂移，以及由样品/流动相/色谱柱之间的次级相互作用引起的拖尾因子最小。

使用优化方法评估标准品

采用 AdvanceBio SEC 300 Å 标准品表征四种色谱柱性能的参数有：

- 标准品的整体色谱
- IgG 单体和二聚体之间的分离度
- 血管紧张素 II 峰的拖尾因子
- 保留时间无漂移

AdvanceBio SEC 300 Å 色谱柱在分离 AdvanceBio 300 Å 标准混合物时性能优于其他三种色谱柱，该标准品适用于较大孔径色谱柱。AdvanceBio SEC 300 Å

实现了所有五个标准品峰的基线分离，IgG 单体和二聚体之间具有最高分离度，血管紧张素 II 峰的拖尾因子最低（表 4，图 1A-1D）。

表 4. 采用优化流动相获得的色谱柱分离度

色谱柱	优化流动相	IgG 单体/二聚体分离度	TF 血管紧张素 II
AdvanceBio SEC 300 Å	150 mmol/L 磷酸盐	1.83	1.07
AdvanceBio SEC 130 Å	不适用	不适用	不适用
ZORBAX GF-250	150 mmol/L 磷酸盐	0.91	1.61
ZORBAX GF-450	200 mmol/L 磷酸盐	0.97	1.92

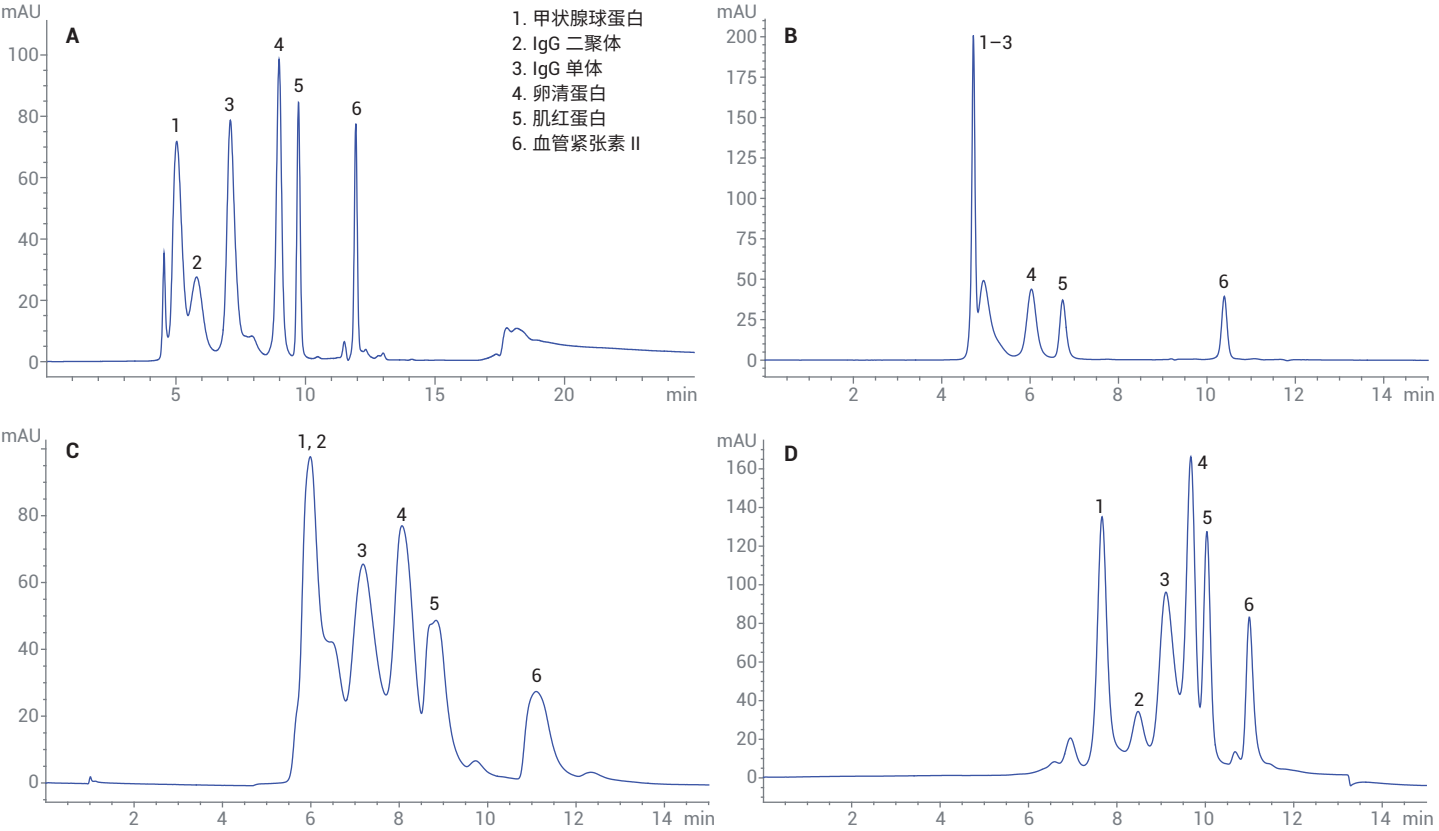


图 1. 采用四种不同色谱柱运行 AdvanceBio SEC 300 Å 标准品，每种色谱柱都采用表 4 列出的优化流动相。A) AdvanceBio SEC 300 Å；B) AdvanceBio SEC 130 Å；C) ZORBAX GF-250；D) ZORBAX GF-450

使用与 AdvanceBio SEC 300 Å 色谱柱具有相同孔径但固定相不同的 ZORBAX GF-450 色谱柱，无法实现所有五个峰的基线分离。此外，与 AdvanceBio SEC 300 Å 相比，ZORBAX GF-450 对 IgG 单体和二聚体的分离度值较低（表 4，图 1D）。

AdvanceBio SEC 130 Å 色谱柱的较小孔径在任何条件下都无法分离 AdvanceBio SEC 300 Å 标准品中分子量较高的三种化合物（图 1B）。较小孔径的 ZORBAX GF-250 色谱柱对 IgG 单体和二聚体的分离度较低，且血管紧张素 II 峰具有较高的拖尾因子（图 1C，表 4）。

AdvanceBio SEC 130 Å 标准品

采用以下指标评估所选色谱柱对 AdvanceBio SEC 130 Å 标准品的分离性能：

- 标准品的整体色谱
- 卵清蛋白和肌红蛋白峰之间的分离度
- 血管紧张素 II 峰的拖尾因子
- 保留时间无漂移

AdvanceBio SEC 130 Å 色谱柱是实现 AdvanceBio 130 Å 蛋白质标准品所有五个峰基线分离的唯一一款色谱柱（图 2A–2D）。在四种色谱柱中，AdvanceBio SEC 130 Å 色谱柱血管紧张素 II 的拖尾因子最低（表 5）。AdvanceBio SEC 300 Å 具有较高的卵清蛋白和肌红蛋白峰分离度，但未能使标准品中的最后两个峰分离（表 5，图 2A）。因此，使用 AdvanceBio SEC 130 Å 色谱柱获得的色谱图优于 AdvanceBio SEC 300 Å 色谱柱。考虑到 AdvanceBio 130 Å 蛋白质标准品适用于较小孔径的 AdvanceBio SEC 130 Å 色谱柱，该结果在预期中。

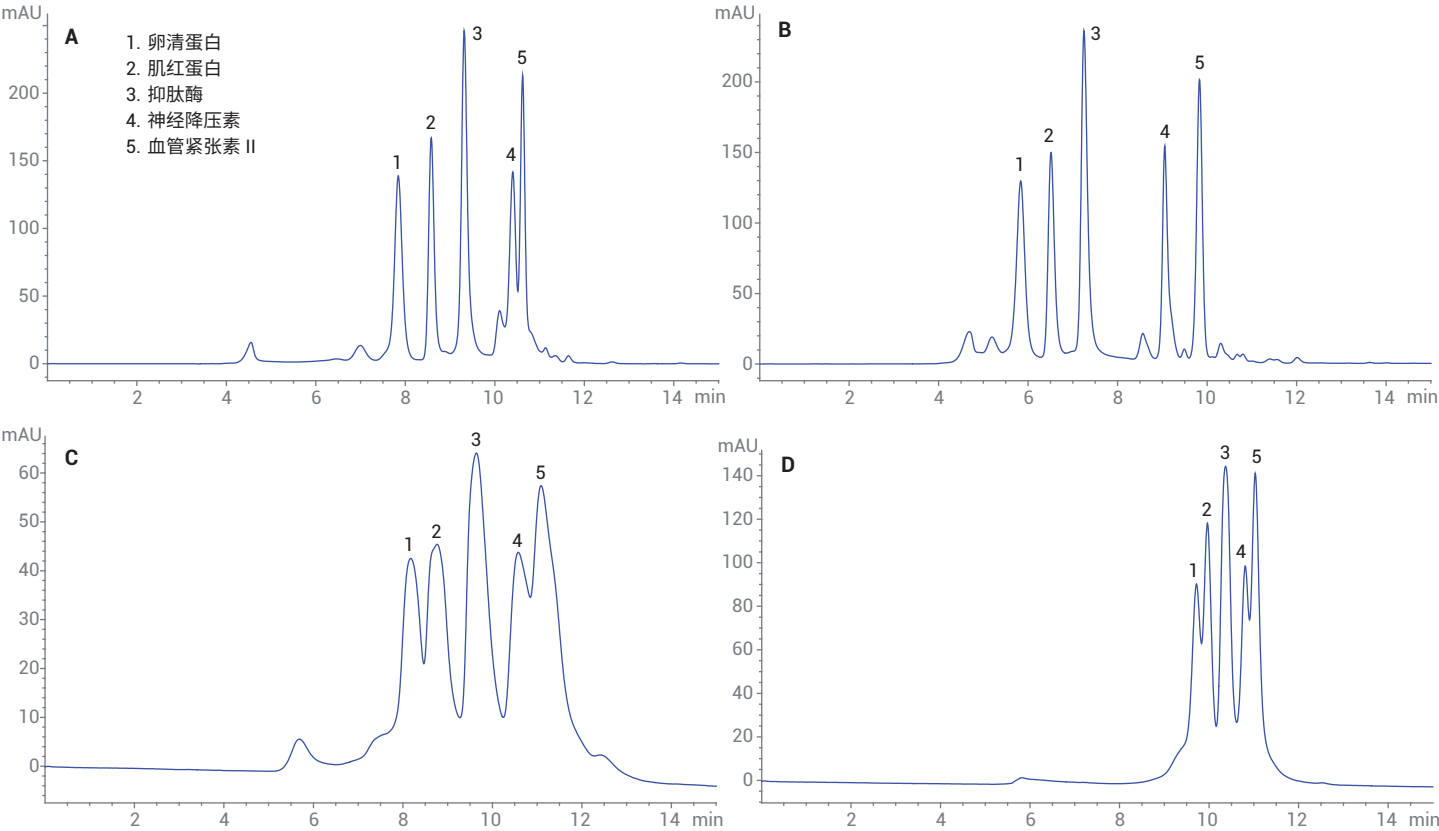


图 2. 采用四种不同色谱柱运行 AdvanceBio SEC 130 Å 标准品，每种色谱柱均采用表 5 列出的优化流动相；A) AdvanceBio SEC 300 Å；B) AdvanceBio SEC 130 Å；C) ZORBAX GF-250；D) ZORBAX GF-450

与 AdvanceBio SEC 130 Å 和 300 Å 色谱柱相比，ZORBAX GF-250 色谱柱前两个峰的分度明显降低，血管紧张素 II 峰的拖尾因子增大。尽管 ZORBAX GF-250 具有与 AdvanceBio 130 Å 相近的孔径，但仍然出现了较低的分度（表 5）。ZORBAX GF-250 色谱柱还需要更高浓度的磷酸盐缓冲液来分离标准混合物（表 5）。尽管 ZORBAX GF-450 色谱柱与 GF-250 色谱柱的孔径不同，但两种色谱柱具有相似的性能（表 5）。

与 ZORBAX GF-250 (4 μm) 和 GF-450 (6 μm) 填料粒径较大的色谱柱相比，AdvanceBio 130 Å 和 300 Å 色谱柱的较小粒径 (2.7 μm) 也有助于提高相应标准品的分度。AdvanceBio 色谱柱的反压比 ZORBAX GF-250 和 GF-450 色谱柱平均高出约 100 bar。然而，AdvanceBio SEC 色谱柱的反压仍低于约 180 bar，适用于 HPLC 系统。

胰岛素标准品

本应用简报采用源于牛胰腺的胰岛素作为色谱柱比较的最终标准品。该标准品的分子量为 5.7 kDa，选择 AdvanceBio SEC 130 Å 和 ZORBAX GF-250（孔径为 150 Å）来确定适用的最佳色谱柱。使用 ZORBAX GF-250 色谱柱生成的色谱图在每个测试流动相下，峰形都会发生变形。同时，使用 AdvanceBio SEC 130 Å 生成的色谱图峰形没有发生变形。因此，AdvanceBio SEC 130 Å 是胰岛素标准品的最佳色谱柱（图 3A 和图 3B，表 6）。

表 5. 采用更高的流动相浓度获得的色谱柱分度

色谱柱	优化流动相	IgG 单体/二聚体分度	TF 血管紧张素 II
AdvanceBio SEC 300 Å	150 mmol/L 磷酸盐， 150 mmol/L NaCl	2.67	1.29
AdvanceBio SEC 130 Å	100 mmol/L 磷酸盐	2.29	0.86
ZORBAX GF-250	600 mmol/L 磷酸盐	0.59	3.03
ZORBAX GF-450	600 mmol/L 磷酸盐	0.62	2.46

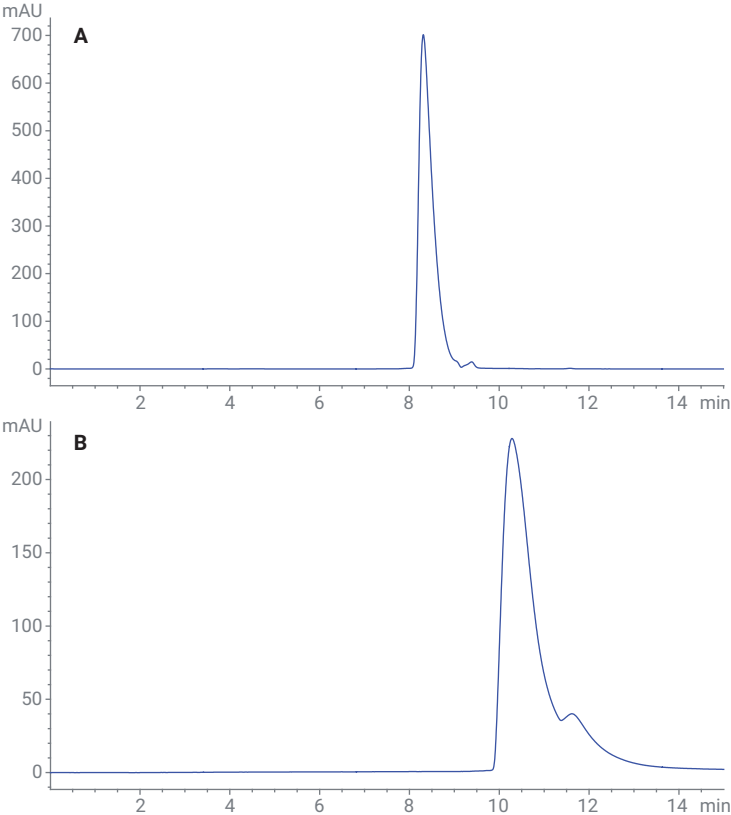


图 3. 采用两种小孔径 SEC 色谱柱运行胰岛素标准品，每种色谱柱都采用表 5 列出的优化流动相。A) AdvanceBio SEC 130 Å；B) ZORBAX GF-250

表 6. 用于优化胰岛素峰形的色谱柱比较

色谱柱	优化流动相	RT 胰岛素	TF 胰岛素
AdvanceBio SEC 130 Å	200 mmol/L 磷酸盐	8.54	1.74
ZORBAX GF-250	200 mmol/L 磷酸盐	峰	肩峰

结论

AdvanceBio SEC 130 Å 和 300 Å 色谱柱采用填料技术，采用带聚合物涂层的低结合硅胶固定相。这些 AdvanceBio SEC 色谱柱对 AdvanceBio SEC 130 Å 和 300 Å 标准品实现了出色的色谱分析，与 ZORBAX GF-250 和 GF-450 色谱柱相比，涵盖大量蛋白质和肽标准品。AdvanceBio SEC 130 Å 和 300 Å 色谱柱还缩短了三种标准品的洗脱时间，特点是流速降低了 20%。这种早期洗脱可以减少配制和处理流动相组分的时间，从而提高实验室效率，减少配制流动相所需的材料，节省资金和人力。将方法转移到采用带聚合物涂层的低结合填料技术中，获得的性能改进使其成为有价值的投资。

参考文献

1. Hong, P.; Koza, S.; Bouvier, E. S. P. Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* **2012**, 35(20), 2923–2950
2. H. A. Daniel Lagassé, *et al.* Recent advances in (therapeutic protein) drug development, *F1000 Research* **2017**, February 7
3. Lau, J. L.; Dunn, M. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 1 June **2018**, 26(10), 2700–2707
4. Aggregation of Monoclonal Antibody Products: Formation and Removal, *BioPharm International* March 1 **2013**, 26(3)
5. ADC Targets Fail Because of Aggregation Problems, Pharmaceutical Technology Editors, *PharmTech* 2017, November 14, **2017**

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。