

使用二维液相色谱尽可能降低遗漏关键样品信息的风险

Gerd Vanhoenacker¹, Pat Sandra^{1,2}, Koen Sandra^{1,2}, ¹RIC group, 比利时科特赖克, ²根特大学, 比利时根特

生物制药、制药和食品等行业的分析要求比以往更苛刻。色谱技术是获得大量分子和样品类型详细信息的出色工具。目前研发 (R&D) 以及质量控制 (QC) 实验室面临的挑战是收集尽可能多的样品信息。然而, 即使使用最新的一维 (1D) 分析产品组合, 也不可能完全确保采集到样品的所有相关信息。本文展示了在线二维液相色谱 (2D-LC) 设置在揭示生物制药和药物样品的复杂性方面的强大能力。该技术大幅提高了应用 LC 的所有领域的分离能力, 并大大降低了遗漏样品中未知物的风险。

色谱仪器和色谱柱技术不断发展, 目前常规使用的先进设备令人印象深刻。超高效液相色谱法 (UHPLC) 使实验室能够提高色谱分离度, 从而增加分析运行中能够分离的化合物的数量。即使使用高端系统和成熟的一维 LC (1D-LC) 方法, 遗漏有关样品组成的关键信息的可能性 (例如, 由于色谱重叠峰) 也是确实存在

的。必须不断探索尽可能降低这种风险的方法。

色谱与质谱 (MS) 联用通常能够显著提高分析灵敏度和选择性。使用 MS 可以帮助用户检测由于信号强度不足或样品中存在的其他化合物干扰而被忽视的化合物。LC-MS 技术是一个巨大的飞跃, 但即使是这类仪器也并不总能提供答案, 与其他更传统的检测器相比, LC-MS 方法在适用于执行分析的化学品 (例如流动相缓冲液和添加剂) 方面存在更多限制。此外, 高端 MS 仪器的获得和运行成本很高, 且要求用户拥有大量专业知识。

综上所述, 可以得出以下结论, 即使使用高性能 UHPLC 和 MS 设备, 仍然存在遗漏有关样品关键信息的可能性。遗

漏样品中的相关化合物和不符合给定的分析或法规要求, 可能会产生严重的经济后果 (延迟), 损害部门或公司的声誉, 最重要的是会影响安全性和有效性。后者是产生与药物开发相关联的较大监管负担的重要原因。

能够大幅降低上述风险的一种新型工具是二维液相色谱 (2D-LC)。在 2D-LC 中, 结合了两种不同的色谱分离机制, 并在理想情况下具有正交分离行为的第二根色谱柱上进一步分离从第一根色谱柱上洗脱的峰。因此, 可以大幅提高分离能力, 轻松获得互补信息 (例如与大小、电荷、疏水性和亲和力等分子特性相关的信息), 并可以使分离具有 MS 兼容性, 使分析人员能够详细了解所研究的样品。可以以

2D-LC 能够克服的 1D-LC 主要缺陷

- 由选择性不足导致的共洗脱
- 给定样品复杂性下的分离能力不足
- 与 MS 不兼容的条件
- 基质干扰和 MS 电离抑制

在线或离线方式将峰从一个维度转移到另一个维度。过去，离线转移一直是首选方法，但是借助稳定、先进的在线 2D-LC 仪器以及近年来可商购的出色软件解决方案，该技术在主流实验室中流行开来。这种先进的系统提供了自动化完成和减少样品操作的进一步优势，从而防止溶质损失和降解。此外，与离线方法中应用的手动或外部追踪相比，自动化本身增加了对整个工作流程更可靠的追踪，从而提高了受监管环境中的可追溯性。

这篇短文讨论了与 1D-LC 相关的潜在缺陷，以及能够应对这些不足的 2D-LC 方法。这些讨论用一些与药物和生物药物分析相关的应用进行了简要说明^[1-17]。然而，读者应当注意到，同样的原则也适用于其他领域，例如食品、环境、毒理、化学、和石化分析等。

由选择性不足导致的共洗脱

制药行业中最常见的分析问题之一是关于方法缺乏选择性导致峰共洗脱，或无法证明结果具有充足的选择性。因此，将尽可能高的选择性纳入所有色谱方法中至关重要。在方法开发期间，使用强制降解甚至过程样品通常有助于确保实现充足选择性的目标。然而，使用单一 LC 方法不可能确保对原料药或药品中所有潜在和真实的杂质和降解物具有全面的选择性。因此，评价选择性不同的其他方法是评估峰共洗脱和证明峰纯度的常见良好实践。

一个明显的例子是考察纯度 LC 方法（通常为反相 LC 模式）中分离的给定活性药物成分 (API) 及其杂质的手性。由于纯度方法为非手性，因此在 1D-LC 设置下

图 1：使用以下方法对储存于 40 °C 的甲氧氯普胺制剂进行分析：(a) 1D-LC，在反相 LC 分离中，以及 (b) 全二维液相色谱，在两个维度（反相 LC × 反相 LC）中均使用反相 LC。检测：DAD，275 nm。值得注意的是，通用反相 LC × 反相 LC 方法适用于各种小分子药物

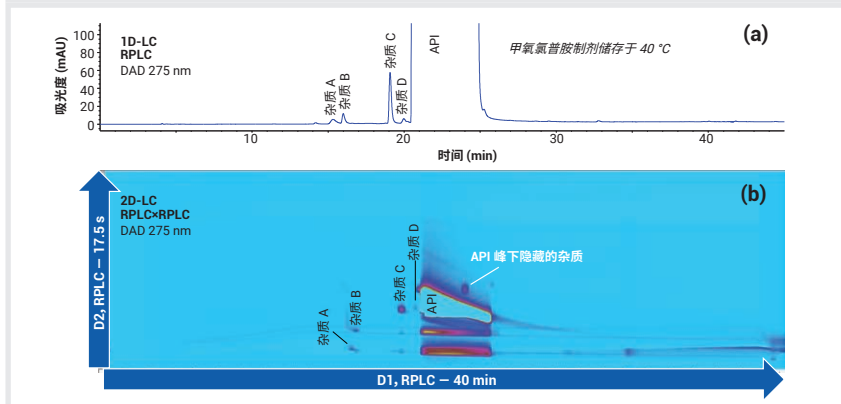
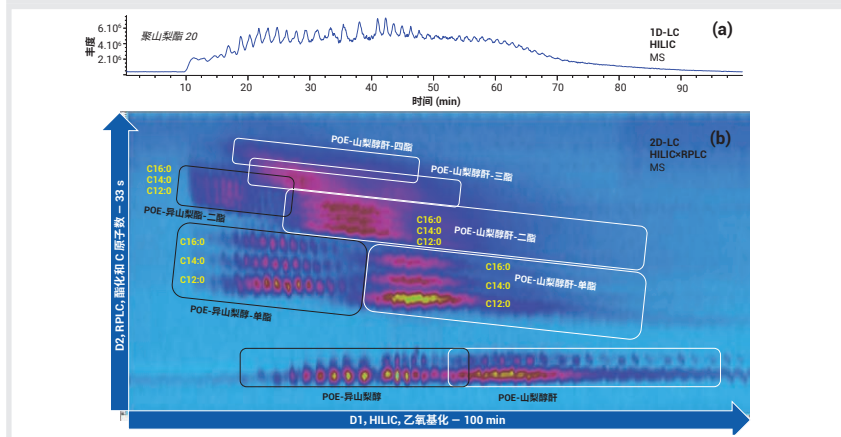


图 2：使用以下方法对聚山梨酯 20 进行分析：(a) 1D-LC，在 HILIC 分离中，以及 (b) 全二维液相色谱，在第一维使用 HILIC 并在第二维使用反相 LC（HILIC × 反相 LC）。检测：MS，ESI 正离子模式



无法提供有关对映体杂质存在的信息。样品或收集的馏分需要用另一种方法和替代（手性）固定相进行分析。通过使用结合反相 LC 与手性 LC 色谱柱的在线 2D-LC

仪器，可以全自动方式从单次进样中同时获得非手性和手性杂质的数据。

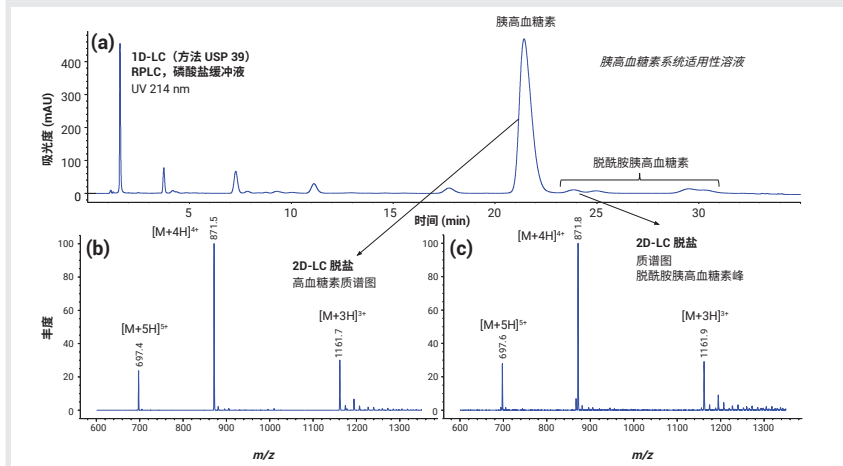
另一个典型的挑战是证明降解或合成反应可产生或不产生可能与主峰共洗脱

的降解杂质。主峰通常会超载且过宽而无法达到 0.05% 报告限，并可能掩盖低丰度化合物的存在。选择性检测器（例如 MS）有时可以基于差异 m/z 揭示这些杂质；然而，上样至 LC-MS 系统的高 API 和基质含量可能抑制电离和共洗脱杂质的检测。另外，通常无法区分共洗脱的异构体。因此，建议使用选择性不同的色谱方法来考察此类样品。小分子 API（甲氧氯普胺）的反相 LC 分析示例如图 1 所示。在 UV 色谱图中观察到的 API 大峰隐藏了可能在该区域洗脱的任何杂质。有关该运行的 MS 数据仅显示存在 API。另一方面，来自全二维液相色谱 (LC \times LC)（其中将整个第一维已分开的馏分送至选择性不同的第二维）的数据显示，未知杂质隐藏在主峰下方。

在方法开发过程早期检测这些杂质和降解物，对于简化最终方法开发至关重要。正因如此，通常会开发和应用多种 1D-LC 方法，以涵盖尽可能多的杂质。然而，这种方式耗费时间和资源，且峰追踪并非易事。在单一 2D-LC 方法中融合不同的选择性可能是更好且更有效的途径。

文献中可以找到许多应用于小分子、寡核苷酸、肽、蛋白质、单克隆抗体 (mAb)、抗体-药物偶联物 (ADC) 等的示例，说明 1D-LC 缺乏选择性，以及 2D-LC 如何揭示峰/药物纯度与药物质量。

图 3: (a) 按照 USP 39 对胰高血糖素系统适用性溶液的 1D-LC-UV 分析；(b) 和 (c)：在 (b) 胰高血糖素峰和 (c) 第一个脱酰胺胰高血糖素峰的中心切割的短聚合物反相液相色谱柱上在线脱盐 (2D-LC-MS) 后采集的质谱图。脱酰胺胰高血糖素峰的质谱图显示质量数差异与脱酰胺一致



给定样品复杂性下的分离能力不足

以上讨论重点集中在相对简单但具有挑战性且难以分离的混合物中遇到的潜在色谱问题。生物制药行业显然还面临许多高度复杂的样品，例如天然产物、发酵样品、反应混合物、酶解物、抗体、mRNA 等。显然，当样品的复杂性增加时，遗漏或未检出有价值信息的风险会上升。

肽谱分析是一种深入表征治疗性蛋白质（例如 mAb 和 ADC）的常见方法。该分析是多种色谱方法组合中的一种，本

身对互补选择性的需求已得到证明。有趣的是，倾向于在多维和并行设置中结合其中若干方法，这一原则被称为多属性分析^[1,2]。肽谱分析要求在色谱分离方面达到理想的程度，因为在肽生成后，样品的复杂性大幅增加。在较大治疗性蛋白质（例如 mAb）的酶解物中，遇到数百种以宽浓度范围存在、理化性质不同的肽并不少见。尽管在 UHPLC 中可能产生高达 1000 的峰容量，但峰的随机分布要求峰容量超过 10000，以便分离 98% 含有 100 个肽的胰蛋白酶酶解物。

因此，使用 1D-LC 进行肽谱分析无法提供全面的结果。相比之下，2D-LC 提供了明显更高的峰容量，只要两个维度具有良好的正交性，并在组分转移到第二维后也能保持在第一维中获得的分离度^[13]。

法规不仅要求对 API 进行全面表征；而且有关辅料评估的指导原则的要求也变得越来越苛刻。一些辅料（例如表面活性剂）具有高度异质性，其作为原辅料或制剂组分对分析产生了额外挑战。

另外，组成可能随时间推移而变化，需要以理想的色谱性能来评估稳定性。例如，聚山梨酯（吐温）是药物和生物制药制剂中常用的表面活性剂，并且由于合成工艺和所用原辅料中已经存在的固有分布而表现出高度复杂性。如果各组内的分布相对较窄（乙氧基化程度、脂肪酸），则成熟的反相 LC 方法可能足以分析聚山梨酯样品。然而，通常在合成中使用脂肪酸的天然混合物，乙氧基化程度范围也相对较宽，使得所有组难以清晰地彼此分离。MS 可用于在一定程度上增加选择性，但对于元素组成和分子量相同的组分应当谨慎。因此，1D-LC 无法分离这些样品中的所有化合物。但是，使用 2D-LC 揭示了令人印象深刻的特征和复杂性（图 2）^[14]。

MS 兼容性

目前，无论是在研发 (R&D) 还是质量控制 (QC) 环境中，MS 都是分析实验室中不可或缺的工具。然而，由于流动相不兼容，直接联用 LC 方法与 MS 并不总是理想选择。对于传统方法和药典 LC 方法，主要原因在于使用了与 MS 不兼

容的非挥发性流动相添加剂，例如磷酸盐和离子对试剂。另外，各种色谱模式（例如离子交换 (IEC)、疏水相互作用 (HIC) 和体积排阻色谱 (SEC)）用于突出蛋白质生物药物的电荷、疏水性和体积异构体差异，且在理想情况下使用无机或非挥发性流动相运行，这些流动相也与 MS 不兼容。

在缺乏 MS 数据的情况下，遗漏关键样品信息的可能性是确实存在的。一种可能的解决方案是使用类似但与 MS 兼容的条件来执行 LC-MS 实验，例如，用甲酸代替磷酸。在某些情况下，这种方法能够成功。然而，更常见的是选择性的变化将会过于剧烈，最糟糕的情况下分离将被完全破坏。从 MS 不兼容的运行中获取 MS 读数的另一种方法，是使用馏分收集器（或在试管中手动）离线收集目标峰，并在脱盐或浓缩后进行 MS 分析。理想情况下，在将收集的馏分重新进样至与 MS 兼容的 LC 方法（通常基于反相 LC）期间进行脱盐或浓缩，其中盐类在目标化合物之前洗脱。

上述过程可使用（多）中心切割 2D-LC 全自动完成，其中将一个或几个一维峰或馏分收集到安装在阀上的定量环中，然后依次转移至处理脱盐、浓缩或两者兼有的第二个色谱维度。第二维可能增加了另外的分离能力或选择性，进一步有利于区分源内片段与真实信号。因此，现有方法以及先前采集的色谱图保持不变，并可以鉴定在一维图谱中观察到的目标峰或目标区域。在线 2D-LC-MS 的其他优势在于完全可追溯性以及有限的样

品操作，可防止样品损失和降解。当以离线方式收集低丰度峰且尚未使用在线 2D-LC 方法进行全面检索时，无法检出低丰度峰的情况并不少见。

此方法的一些常见应用是对 mAb 的 SEC、IEC 或 HIC 色谱图中观察到的蛋白异构体进行 MS 表征，或鉴定采用与 MS 不兼容的传统和经验证的方法检出的未知杂质或新杂质。图 3 显示了按照 USP 39 中的专论使用与 MS 不兼容的流动相进行的胰高血糖素分析，以及在第二维使用短柱反相 LC 小柱和 MS 兼容性流动相对目标峰的自动脱盐。获得了主要峰和次要峰干净且无加合物的质谱图^[15]。作为更先进的示例，最近的文献描述了一种用于表征 mAb 的全自动四维 (4D)-LC-MS 蛋白质分析仪。通过 IEC 分离的电荷异构体被收集在安装于多中心切割阀上的定量环中，在对其进行基于 LC-MS 的肽谱分析之前，依次进行在线脱盐、变性、还原和胰蛋白酶酶解^[16]。这一创新大大缩短了周转时间、减少了样品操作、损失和伪峰，并增加了信息收集。结果揭示了对离线收集的 IEC 峰进行经典的溶液中过夜酶解时，未得以保持的不稳定的蛋白质修饰，例如琥珀酰亚胺中间体。

样品基质效应

除流动相添加剂的影响以外，样品基质也可能显著影响 MS 行为。由于样品（药品、生物基质）中存在高含量的盐、聚合物、表面活性剂、脂质、蛋白质等，电喷雾电离 (ESI) 可能受到抑制。

除引起信号抑制和伴随的有限灵敏度之外，重基质还可能导致 MS 系统的污染和性能损失。因此，在 LC-MS 分析之前，有必要进行大量样品纯化，以去除尽可能多的基质。一个挑战是尽可能减少目标分析物的损失，并在要分析大量样品的情况下（例如在药代动力学研究中）尽可能减少工作量。相比之下，2D-LC（其中一维色谱图中的相关部分被转移到选择性不同的第二维）是一种出色的方法，可以大幅减小基质效应并检测其他方法无法检出的分析物，或将灵敏度提高至少一个数量级。

结论

尽管 1D-LC 的当前发展水平令人印象深刻，但仍然存在遗漏相关样品信息和不符合法规要求的持续风险，要求不断提高的情形下更是如此。事实上，考虑到目前正在开发和推出的所有新治疗方式的结构复杂性不断增加，这些风险也呈增加趋势。为持续给患者带来安全且有效的产品，当前和未来的制药和生物制药科学家都需要不断探索分析领域，保证利用最新和最强大的工具。

近几十年来，色谱界对 2D-LC 的发展给予了大量关注。最近，2D-LC 硬件和软件开始商业化，该技术迅速被制药和生物制药行业采用，并被证明具有巨大的价值。与 1D-LC 相比，2D-LC 在药物和生物药物分析中的主要特点在于：1) 选择性提高，限制了共洗脱峰的风险，

使获得有关样品的互补信息（例如体积、电荷、疏水性和亲和力）成为可能；2) 对复杂样品的分离能力大幅提高；3) MS 兼容性以及将所有 LC 模式和方法与 MS 联用的选项；以及 4) 减少或甚至消除基质干扰，从而提高可检测性。此外，所有这些优势均可在 2D 分离中获得，这些 2D 分离能够在极少的样品操作下以全自动方式运行，从而降低样品损失和降解的风险，同时提供完全可追溯性。

而且，鉴于当前仪器的耐用性，开发 2D-LC 方法并不比开发 1D-LC 方法更具挑战性，且 2D-LC 中的方法验证已经得到证明^[7]。

随着 2D-LC 在制药和生物制药行业中的应用，遗漏相关样品信息的风险将大幅降低到所有人（当然包括患者）都能获益的程度！此外，尽管本文所示的示例与药物分析相关，但 2D-LC 的应用领域远远超出药物领域，其同样适用于食品、环境、毒理学、化学和石化分析等。

参考文献

- 1) K. Zhang, J. Wang, M. Tsang, L. Wigman, and N. Chetwyn, *Am. Pharm. Rev.* **16**, 39–44 (2013)
- 2) K. Sandra and P. Sandra, *Bioanalysis* **7**(22), 2843–2847 (2015)
- 3) D. Stoll, J. Danforth, K. Zhang, and A. Beck, *J. Chromatogr. B* **1032**, 51–60 (2016)
- 4) T.D. Maloney and D.R. Stoll, *LCGC North Am.* **35**(9), 680–687 (2017)

- 5) G. Vanhoenacker, M. Steenbeke, K. Sandra, and P. Sandra, *LCGC Europe* **31**(7), 360–371 (2018)
- 6) C.J. Venkatramani, *LCGC Europe* **31**(s10), 22–29 (2018)
- 7) V. D'Atri, S. Fekete, A. Clarke, J.L. Veuthey, and D. Guilleme, *Anal. Chem.* **91**, 210–239 (2019)
- 8) B.W.J. Pirok, D.R. Stoll, and P.J. Schoenmakers, *Anal. Chem.* **91**(1), 240–263 (2019)
- 9) A. Goyon and K. Zhang, *Anal. Chem.* **92**(8), 5944–5951 (2020)
- 10) J. Camperi, A. Goyon, D. Guilleme, K. Zhang, and C. Stella, *Analyst* **146**(3), 747–769 (2021)
- 11) F. Li and M. Lämmerhofer, *J. Chromatogr. A* **1643**, 462065 (2021)
- 12) L. Verscheure, G. Vanhoenacker, S. Schneider, T. Merchiers, J. Storms, P. Sandra, et al., *Anal. Chem.* **94**(17), 6502–6511 (2022)
- 13) G. Vanhoenacker, I. Vandenheede, F. David, P. Sandra, and K. Sandra, *Anal. Bioanal. Chem.* **407**(1), 355–366 (2015)
- 14) G. Vanhoenacker, M. Steenbeke, K. Sandra, and P. Sandra, *LCGC Europe* **31**(7), 360–371 (2018)
- 15) S. Krieger, 安捷伦科技公司应用简报 5991-8437ZHCN (2017)
- 16) L. Verscheure, A. Cerdobbel, P. Sandra, F. Lynen, and K. Sandra, *J. Chromatogr. A* **1653**, 462409 (2021)
- 17) S.H. Wang, J. Wang, and K. Zhang, *J. Chromatogr. A* **1492**, 89–97 (2017)

Gerd Vanhoenacker 是比利时科特赖克 RIC group 的 HPLC 资深科学家。**Pat Sandra** 是 RIC group 的创始人和顾问兼根特大学（比利时根特）名誉教授。**Koen Sandra** 是 RIC group 的 CEO 兼根特大学客座教授。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

DE86440105

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2023
5994-6750ZH-CN

www.chromatographyonline.com

赞助方

