

## 使用非变性 SEC-MS 分析单克隆抗体 (mAbs) 和 mAb 衍生的治疗药物

由于聚集体可能会影响蛋白质类疗法的疗效和免疫原性，因此聚集体的定量分析受到特别的关注。尺寸排阻色谱 (SEC) 与 UV 检测相结合是测定治疗性蛋白质聚集体的金标准方法。然而，研究人员越来越多地将 SEC 与非变性质谱 (Native-MS，一种高分辨率质谱技术) 相结合，以实现精确质量数测定<sup>[1]</sup>。对于某些实验目标而言，MS 是比 UV 更适合的检测器。除分子量确认外，Native-MS 检测还可以测量抗体药物偶联物 (ADCs) 的药物/抗体比率 (DAR)，并提供有关翻译后修饰 (PTMs) 的信息。

虽然反相分离通常与 MS 配套使用，但该方法在分析 mAbs 时存在局限性。反相色谱中使用的低 pH 和有机溶剂会使 mAbs 变性，并解离脆弱的非共价或酸不稳定结构，例如在半胱氨酸或赖氨酸连接的 ADCs 中观察到的结构。与反相技术相比，SEC 具有独特的优势。由于 SEC 在中性 pH 条件下使用缓冲流动相进行，因此保留了完整蛋白质的结构和不稳定的共价或非共价键，并能够对非变性状态下的 mAb 进行质量数测量。SEC 甚至可以保留极不稳定的半胱氨酸连接的 ADC 结构，从而根据 MS 数据进行 DAR 计算<sup>[2,3]</sup>。



### 与 SEC-MS 相关的挑战包括：

- 实现 mAb 单体与高分子量 (HMW) 和低分子量 (LMW) 杂质的高分离度 SEC 分离
- 确定与质谱检测兼容的 SEC 色谱柱和条件，使：
  - 固定相表面键合稳定，不会引起柱流失
  - 支持 MS 中分析物有效去溶剂化的流速不会导致样品聚集
  - 流动相具有足够高的挥发性和较低的盐浓度，可以准确检测质量数

## 为何使用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱进行 SEC-MS 分析？

- 粒径和孔径特征是改善峰形、峰灵敏度 and 分离度的重要因素。1.9  $\mu\text{m}$  填料 AdvanceBio SEC 色谱柱具有优化的孔径和孔容，可实现高分离度分离
- 与 SEC 填料表面的次级相互作用会阻止待分析物自由通过填料孔隙，并干扰基于体积的分离。独特的专利性亲水键合化学技术提供了惰性表面，能够尽可能减少与 ADCs 和 mAbs 的疏水性次级相互作用
- AdvanceBio SEC 杂化颗粒结合硅胶和聚合物技术的优异特性，可提供出色的机械稳定性，不会流失，使其成为与质谱检测器配套使用的理想选择
- AdvanceBio 1.9  $\mu\text{m}$  SEC 色谱柱既适用于变性流动相条件（例如乙腈/水/TFA），也适用于 MS 兼容的非变性条件（例如 80 mmol/L 乙酸铵），使其成为完整蛋白质 (> 2000 m/z) 的理想选择
- 2.1 和 4.6 mm 窄径色谱柱与分析物有效去溶剂化/离子化所需的低流速兼容。这是为了尽量减少干扰精确质量测量的加合物的形成
- 带 PEEK 内衬的不锈钢色谱柱硬件消除了样品流路中的金属。这使得使用较低浓度的流动相缓冲液变得更容易，从而减少了干扰精确质量测量的加合物的形成

### 色谱柱选择标准

SEC 实验适用孔径的选择取决于目标分析物的大小和实验目标。孔径选择基于蛋白质的分子量，分子量越大的蛋白质需要越大的孔径（见图 1）。AdvanceBio SEC 1.9  $\mu\text{m}$  色谱柱有两种孔径可供选择。在进行脱盐实验时，其目标是将蛋白质与小分子或缓冲溶液组分分离，小孔径能够尽可能提高分离度。在这种情况下，最好选择蛋白质分子量大于色谱柱排阻上限的色谱柱来去除蛋白质。

选择规格有助于实现 SEC-MS 实验目标并与您的样品限制条件兼容的 SEC 色谱柱。

- 对于简单的脱盐实验，长 30 或 50 mm 的短色谱柱即可满足要求<sup>[1]</sup>
- 长色谱柱具有更高的分离度，使您能够分离单体与二聚体，或单体与片段
- 窄径色谱柱所需的进样量较小，在样品量有限时非常有用
- 窄径色谱柱实现理想 SEC 分离所需的流速也较低，且更易利用理想流速和 MS 离子源条件为 Native MS 实现有效去溶剂化/离子化
- 带 PEEK 内衬的色谱柱能够尽可能减少样品与金属表面的接触，通过减少次级相互作用来改善峰形，并实现使用相对稀释的挥发性流动相<sup>[2]</sup>

## Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱入门指南：确保实现出色性能和分离的技巧

### 色谱柱操作和清洁

- 针对色谱柱内径匹配流速<sup>[4]</sup> — 窄径色谱柱实现理想 SEC 分离所需的流速较低，避免色谱柱压力过大。2.1 和 4.6 mm 窄径色谱柱是 Native MS 的理想选择，该方法要求样品的有效去溶剂化/离子化
  - 工作流速<sup>[5]</sup>:
    - 4.6  $\times$  150 mm, 0.1–0.7 mL/min
    - 4.6  $\times$  300 mm, 0.1–0.5 mL/min
    - 内径 2.1 mm 色谱柱, 0.05–0.10 mL/min
- 将流速变化斜率从默认值降至 1 mL/min<sup>2</sup> 及以下。随着流速的逐渐增大，色谱柱寿命将延长。在安捷伦软件中，可以在 LC 泵控制的高级部分找到此设置
- 在 LC 方法中设置最大压力限值以匹配色谱柱的相应值（AdvanceBio SEC 1.9  $\mu\text{m}$  色谱柱为 620 bar）。对于 LC 的最大压力能力超过色谱柱的所有案例，这都是关键
- 请勿反冲色谱柱。始终沿着箭头方向冲洗色谱柱，并调整流速，使压力低于 400 bar

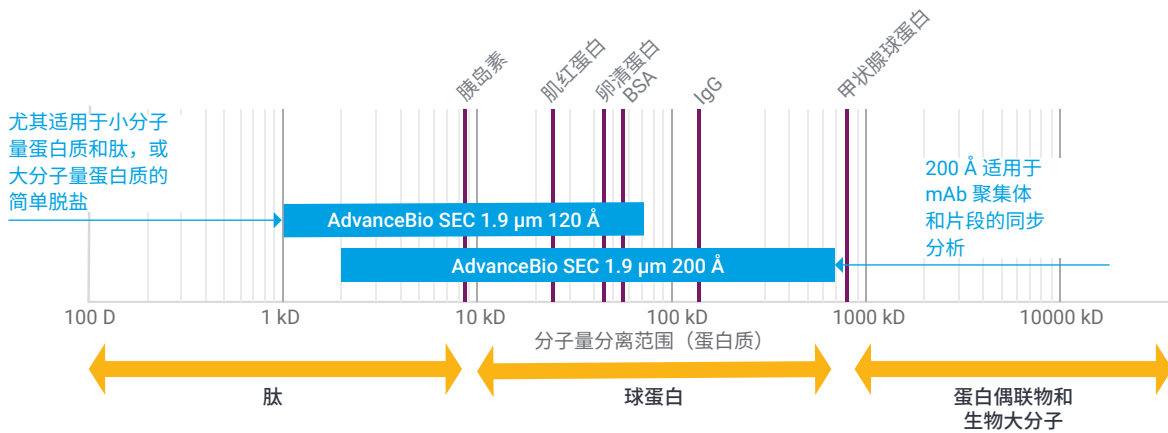


图 1. 分析物的大小决定了要使用的 SEC 孔径。蛋白质分子越大，则需要越大的孔径

- 在用清洗液（至少 20 倍柱体积）冲洗色谱柱之前和之后，使用至少 5 倍柱体积的超纯水进行冲洗
- 定期使用合适的 SEC 标准品验证系统性能

### 色谱优化

- 过滤样品，去除所有颗粒物
- 使用保护柱和/或在线过滤器延长色谱柱寿命，尤其是在处理复杂样品或“脏”样品时
- 确保色谱柱牢固连接且无泄漏
- 通过尽可能降低系统死体积来提高亚 2 μm SEC 填料颗粒的分离度。可以在 1290 型液相色谱系统上安装**超低扩散工具包**，从而进一步减小系统体积并避免谱带展宽<sup>[6]</sup>
- 通过尽可能减少进样量来提高色谱分离度。推荐的进样量为 1–5 μL，最大进样量为柱体积的 1%

### MS 维护和优化

- 在目标保留时间之外，将液相色谱流路切换到废液，特别是在可能会有大量盐流出的全渗透点附近，从而使 MS 离子源更干净
- 使用 HPLC 级或更高级别的溶剂

- 使用挥发性缓冲液（例如乙酸铵），并将 SEC 流动相优化为尽可能低浓度的缓冲液，从而保持色谱分离度并保留蛋白质结构。这使 MS 离子源更干净，并尽可能减少干扰质量数测量的加合物
- 尽可能每天用无纺布擦拭 MS 离子源。擦拭前确保离子源不要过热！

### 色谱柱的保存

- 短期保存（不到两周）— 将色谱柱保存在用于分析的流动相中
- 长期保存（超过两周）— 将色谱柱保存在过滤后的 100 mmol/L 磷酸钠 (pH ≤ 7.0, 添加或不添加 0.02% NaN<sub>3</sub>) 或 20% 甲醇水溶液中。使用至少 10 倍柱体积冲洗色谱柱。建议在引入甲醇或乙醇之前用水进行冲洗。当切换为 20% 甲醇或从 20% 甲醇进行切换时，必须在低流速下进行冲洗，避免因高粘度导致色谱柱压力过大。从较低的流速开始，4.6 mm 色谱柱的冲洗流速不超过 0.1 mL/min，2.1 mm 色谱柱的冲洗流速不超过 0.05 mL/min。务必保持压力低于 400 bar。在室温下保存色谱柱

### 参考文献

1. Sensitive Native Mass Spectrometry of Macromolecules using Standard Flow LC/MS (使用标准流 LC/MS 进行灵敏的大分子天然质谱分析) (Agilent.com) — [5994-1739EN](#)
2. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 μm 带 PEEK 内衬的色谱柱分析抗体片段-药物偶联物 — [5994-3045ZHCN](#)
3. Mass Spectrometric Characterization of Antibody-siRNA Conjugates using the Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q TOF (使用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 对抗体-siRNA 偶联物进行质谱表征) — [5994-2155EN](#)
4. Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm Column User Guide (Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm 色谱柱用户指南) — [5994-0739EN](#)
5. Analysis of Nanobodies Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 μm and AdvanceBio HIC Columns (使用 Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 μm 色谱柱和 AdvanceBio HIC 色谱柱分析纳米抗体) — [5994-1869EN](#)
6. 提升 mAb 聚集体分析性能 — [5994-2709ZHCN](#)

## 轻松挑选和订购信息

要从安捷伦网上商城订购下表中列出的商品，请通过单击标题中的“我的列表”链接将商品添加至您的“收藏产品”列表中。然后输入您需要的产品数量，添加至购物车并继续结算。您的列表便会保留在“收藏产品”下，供您将来订购时使用。

如果这是您首次使用“收藏产品”，系统会要求您输入电子邮件地址进行账户验证。如果您已有安捷伦账户，可以直接登录。但是，如果您尚未注册安捷伦账户，则需要注册账户。该功能仅在启用了电子商务功能的地区有效。您也可以单击各物品的部件号，或通过客户服务中心或经销商渠道订购所有物品。

| 描述  | 部件号           |
|---|---------------|
| <b>“我的列表”中的样品前处理</b>  |               |
| Captiva 一次性注射器, 5 mL, 100/包   | 9301-6476     |
| Captiva 优级针头过滤器, PES, 15 mm, 0.2 µm, 100/包  | 5190-5096     |
| <b>“我的列表”中的标准品</b>  |               |
| Agilent NISTmAb, 25 µL  | 5191-5744     |
| Agilent NISTmAb, 4 × 25 µL  | 5191-5745     |
| 300 Å AdvanceBio SEC 校准标样   | 5190-9417     |
| <b>“我的列表”中的 AdvanceBio SEC 色谱柱</b>  |               |
| <b>120 Å 色谱柱</b>  |               |
| AdvanceBio SEC 120 Å, 1.9 µm, 2.1 × 150 mm, 带 PEEK 内衬的不锈钢硬件 (推荐)                          | PL1980-3250PK |
| AdvanceBio SEC 120 Å, 1.9 µm, 2.1 × 50 mm, 保护柱, 带 PEEK 内衬的不锈钢硬件 (推荐)                      | PL1980-1250PK |
| AdvanceBio SEC 120 Å, 1.9 µm, 4.6 × 300 mm  | PL1580-5250   |
| AdvanceBio SEC 120 Å, 1.9 µm, 4.6 × 150 mm  | PL1580-3250   |
| AdvanceBio SEC 120 Å, 1.9 µm 保护柱, 4.6 × 30 mm   | PL1580-1250   |
| <b>200 Å 色谱柱</b>  |               |
| AdvanceBio SEC 200 Å, 1.9 µm 保护柱, 2.1 × 50 mm, 带 PEEK 内衬的不锈钢 (推荐)                         | PL1980-1201PK |
| AdvanceBio SEC 200 Å, 1.9 µm, 2.1 × 150 mm, 带 PEEK 内衬的不锈钢 (推荐)                            | PL1980-3201PK |
| AdvanceBio SEC 200 Å, 1.9 µm 保护柱, 4.6 × 30 mm   | PL1580-1201   |
| AdvanceBio SEC 200 Å, 1.9 µm, 4.6 × 300 mm  | PL1580-5201   |
| AdvanceBio SEC 200 Å, 1.9 µm, 4.6 × 150 mm  | PL1580-3201   |
| <b>“我的列表”中的色谱柱接头</b>  |               |
| Agilent InfinityLab Quick Connect 快速连接接头 (用于色谱柱入口连接)                                      | 5067-5965     |
| Agilent InfinityLab Quick Connect 快速连接毛细管, MP35N, 0.12 × 105 mm (用于 Quick Connect 快速连接接头) | 5500-1578     |

| 描述  | 部件号         |
|---|-------------|
| Agilent InfinityLab Quick Turn 接头 (用于色谱柱出口连接)                     | 5067-5966   |
| Quick Turn 毛细管, MP35N, 0.12 × 280 mm (用于 Quick Turn 接头)           | 5500-1596   |
| 用于 Quick Turn 接头的安装工具   | 5043-0915   |
| 毛细管, MP35N, 0.17 × 100 mm, SL/SL, ps/ps (用于连接保护柱和色谱柱)             | 5500-1278   |
| <b>“我的列表”中的超低扩散工具包</b>  |             |
| 用于 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统的超低扩散管线工具包                      | 5067-5963   |
| 用于 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统的超低扩散管线工具包*                   | 5004-0007   |
| <b>“我的列表”中的样品容器</b>   |             |
| A-Line 螺口样品瓶, 2 mL, 12 × 32 mm (12 mm 瓶盖), 棕色, 带书写签, 100/包        | 5190-9590   |
| 螺口盖, 12 mm, 固定, 蓝色, PTFE/白色硅橡胶隔垫, 100/包                           | 5190-7021   |
| 样品瓶内插管, 250 µL, 5.6 × 30 mm, 去活玻璃, 带聚合物支脚, 100/包                  | 5181-8872   |
| InfinityLab 96 孔板/0.5 mL, 30/包                                    | 5043-9310   |
| InfinityLab 微孔板密封垫, 50/包  | 5042-1389   |
| <b>“我的列表”中的溶剂和添加剂</b>   |             |
| InfinityLab 超纯 LC/MS 水, 1 L                                       | 5191-4498   |
| InfinityLab LC/MS 级超纯甲醇, 1 L (用于色谱柱保存)                            | 5191-4497   |
| 甲酸, 5 mL  | G2453-85060 |
| <b>“我的列表”中的溶剂过滤备件†</b>  |             |
| InfinityLab 溶剂过滤组件  | 5191-6776   |
| InfinityLab 溶剂过滤烧瓶, 玻璃, 2 L                                       | 5191-6781   |
| 尼龙滤膜, 47 mm, 孔径 0.2 µm, 100/包                                     | 5191-4341   |
| 再生纤维素滤膜, 47 mm, 孔径 0.2 µm, 100/包                                  | 5191-4340   |
| 溶剂瓶玻璃过滤器, 溶剂入口, 20 µm   | 5041-2168   |
| <b>“我的列表”中的溶剂处理备件</b>   |             |
| InfinityLab Stay Safe 溶剂瓶安全盖起始工具包                                 | 5043-1222   |
| InfinityLab 溶剂瓶, 透明, 1 L  | 9301-6524   |
| InfinityLab 溶剂瓶, 棕色, 1 L  | 9301-6526   |
| 溶剂瓶, 透明, 2 L  | 9301-6342   |
| 溶剂瓶, 棕色, 2 L  | 9301-6341   |
| InfinityLab Stay Safe 吹扫瓶, 1 L                                    | 5043-1339   |
| InfinityLab 废液瓶, GL45, 6 L, 带 Stay Safe 安全盖 (不包括活性炭过滤器 5043-1193) | 5043-1221   |
| 带时间标签的 InfinityLab 活性炭过滤器, 58 g (适用于 5043-1221)                   | 5043-1193   |

\* 推荐用于 1290 Infinity II 生物液相色谱系统

† 使用本表中未列出的溶剂时, 请在分析前使用 InfinityLab 溶剂过滤组件

查找当地的安捷伦客户中心:

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价:

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

DE44462.6107060185

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, 2021  
2021 年 10 月 12 日, 中国出版  
5994-4200ZHCN



Trusted Answers