

## 使用体积排阻色谱 (SEC) 分析单克隆抗体 (mAb) 片段和二聚体

在药物开发、储存、运输或交付过程中，生物治疗蛋白形成可能形成低分子量 (LMW) 片段与高分子量 (HMW) 二聚体和聚集体。这些体积异构体作为关键的质量属性 (CQA) 必须进行充分表征，避免产生免疫原性反应以及药代动力学或药物效价的差异。使用体积排阻色谱 (SEC) 进行基于分子量的分离是一种标准技术，用于分析不同大小的形体，监测生物治疗药物（如单克隆抗体 mAbs）的纯度水平。SEC 完全基于蛋白质通过色谱柱固定相孔产生的渗透性，而不是由于与固定相的任何相互作用。因此，球状蛋白质和肽段会根据动态半径（体积）分离，较大的蛋白质和聚集体先洗脱，然后是片段和小分子量肽段。

### 影响 mAb 片段和聚集体分离过程和分离度的关键因素

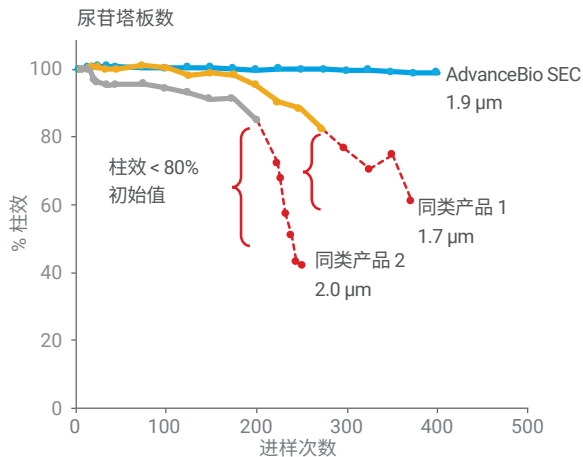
**粒径和孔隙特征**是改善峰形、峰灵敏度和分离度的重要因素。有效分离体积相近聚集体或片段需要使用适当的孔径。较大的孔径能使孔内生物分子更有效渗透，并使化合物之间的洗脱时间增宽。另一方面，孔体积会降低填料的强度，使其更易碎。找到分离度和机械强度之间的适当平衡对于使用 SEC 色谱柱实现所需分离至关重要。

与 SEC 树脂表面的**次级相互作用**会阻止物质自由通过孔，影响基于体积的分离。选择 SEC 色谱柱时，使用次级相互作用尽可能低的颗粒非常重要。



### 为何使用 Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm 色谱柱进行 mAb 片段和聚集体分离？

- 专有的 AdvanceBio 1.9 µm 单分散硅胶颗粒经过精心设计，可提供出色的机械稳定性。这使其适用于 UHPLC 和 HPLC 仪器，具有优异的色谱柱寿命<sup>[1]</sup>
- 1.9 µm 粒径 AdvanceBio SEC 色谱柱具有理想的孔特性，非常适合使用单根色谱柱对低分子量蛋白质片段、mAb 聚集体和二聚体进行高分离度的快速分离<sup>[2]</sup>
- 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

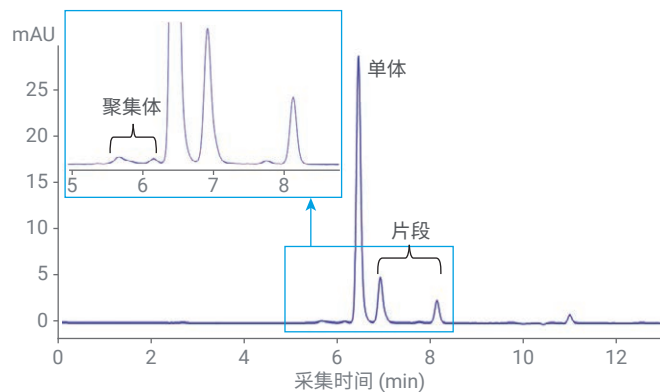


**色谱柱:** 4.6 × 300 mm  
**流动相:** 150 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0  
**流速:** 0.35 mL/min  
**温度:** 室温  
**检测器:** 220 nm  
**样品:** Bio-Rad 蛋白质混标和尿苷 (每 50 次进样后停泵)

**图 1.** 经过 400 多次进样后, AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm 色谱柱的塔板数下降小于 2%, 证明了其出色的机械稳定性

### 推荐的初始条件<sup>[3]</sup>

参数	值
色谱柱	AdvanceBio SEC 200 Å, 4.6 × 300 mm, 1.9 μm (部件号 PL1580-5201)
仪器	Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统
流速	0.35 mL/min
流动相	150 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0
波长	280 nm
柱温	25 °C
样品	经诱导的 mAb (1 μg, 进样至色谱柱)。将 mAb 样品置于 100 mmol/L 碳酸氢钠 pH 9.0 中诱导, 并在 40 °C 下孵育过夜



**图 2.** 在推荐的起始条件下, 在 AdvanceBio SEC 200 Å 4.6 × 300 mm, 1.9 μm 色谱柱上分离经诱导的 mAb 样品中的聚集体和片段

### 如何优化色谱分析条件

查看初始色谱图后, 考虑调整以下条件以改善分离或保持蛋白质溶解度:

**流动相的离子强度** — 常用的缓冲液包括:

- 100–150 mmol/L 氯化钠 (溶于 50 mmol/L 磷酸钠中), pH 7.0
- 100–150 mmol/L 硫酸钠 (溶于 50 mmol/L 磷酸钠中), pH 7.0
- 50–100 mmol/L 尿素 (溶于 50 mmol/L 磷酸钠中), pH 7.0。也可以用其他类似的盐 (如 KCl) 和盐酸胍

**pH** — 以 ±0.2 单位的精度进行调节。AdvanceBio SEC 色谱柱的稳定性范围为 pH 2.0–8.5

**温度** — SEC 分离通常在 10–30 °C 间运行。可能需要更高温度来提高疏水性肽段的分离度和回收率。为尽可能保持温度敏感型蛋白质的最大生物活性, 可在低温环境中运行 SEC。在较低温度下运行分离时, 监测压力以避免压力过高, 并根据需要调节流速。Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱的最高运行温度为 80 °C

注: 较高温度会使蛋白质变性。

### 有机溶剂添加剂

- 含有 5%–10% EtOH (或其他类似溶剂, 如 MeOH 或 CH<sub>3</sub>CN) 的 50 mmol/L 磷酸钠溶液 (pH 7.0) 有利于高度疏水的蛋白质
- 对于半胱氨酸残基含量高且容易氧化/聚集的蛋白质, 可加入含 5% DMSO 的 50 mmol/L 磷酸钠溶液 (pH 7.0)

注: 使用高粘度流动相时, 应当降低流速以保持压力不超过最高运行压力。

### 参考文献

1. 使用 AdvanceBio SEC 色谱柱快速分离聚集体和片段 — [5994-0873ZHCHN](#)
2. 单克隆抗体和抗体药物偶联物的体积排阻色谱分析 — [5994-0827ZHCHN](#)
3. Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm Column user guide (Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm 色谱柱用户指南) — [5994-0739EN](#)
4. 提升 mAb 聚集体分析性能 — [5994-2709ZHCHN](#)
5. 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 — [5994-3045ZHCHN](#)
6. 使用快速高分离度体积排阻色谱柱分析生物治疗药物中的聚集体 — [5991-6458ZHCHN](#)

## Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 色谱柱入门指南： 确保获得出色性能和分离的技巧

### 样品考虑因素

- 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>[4]</sup>
- 使用尽可能小的进样量，以保持高分离度。推荐的进样量为 1–5 µL，最大进样量为柱体积的 1%

### 色谱柱选择因素

可使用以下标准为样品选择正确的色谱柱：

- 长色谱柱可提高分离度 — 适合从二聚体中分离单体，或从片段中分离单体
- 较小的色谱柱直径：
  - 需要较小的进样量 — 适合样品量有限的情况
  - 需要较低的流速 — 适合在 native MS 中进行高效去溶剂化/电离<sup>[3]</sup>
- PEEK 内衬色谱柱可大大减少样品与金属表面的次级相互作用，从而改善峰形 — 因此这类色谱柱适合使用挥发性流动相缓冲液的情形<sup>[5]</sup>
- 专注于高阶聚集体分析时，**AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 µm** 色谱柱可对 mAb 聚集体、二聚体和单体进行快速准确定量，具有同样可靠的性能<sup>[6]</sup>

### 色谱柱操作和清洁

- 针对色谱柱内径匹配流速<sup>[3]</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，该方法要求样品有效去溶剂化/离子化
  - 工作流速<sup>[3]</sup>：
    - 4.6 × 150 mm, 0.1–0.7 mL/min
    - 4.6 × 300 mm, 0.1–0.5 mL/min
    - 内径 2.1 mm 色谱柱, 0.05–0.10 mL/min
- 将最大流量梯度从默认值降至 1 mL/min<sup>2</sup> 或更低。流速的缓慢提升，使得色谱柱寿命延长。在安捷伦软件中，可以在 LC 泵控制的高级选项卡找到此设置
- 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 µm 色谱柱为 620 bar)。这对于 LC 最大耐压能力超过色谱柱的所有情况均至关重要
- 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
- 在用至少 20 倍柱体积的清洁溶液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% NaNO<sub>3</sub>) 或 20% 甲醇水溶液中。使用至少 10 倍柱体积的清洁液冲洗色谱柱。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色谱柱冲洗，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

## 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”中的样品前处理备件</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，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>	
AdvanceBio SEC 200 Å，1.9 µm 保护柱，4.6 × 30 mm (推荐)	PL1580-1201
AdvanceBio SEC 200 Å，1.9 µm，4.6 × 300 mm (推荐)	PL1580-5201
AdvanceBio SEC 200 Å，1.9 µm，4.6 × 150 mm	PL1580-3201
AdvanceBio SEC 200 Å，1.9 µm 保护柱，2.1 × 50 mm，带 PEEK 内衬的不锈钢硬件	PL1980-1201PK
AdvanceBio SEC 200 Å，1.9 µm，2.1 × 150 mm，带 PEEK 内衬的不锈钢硬件	PL1980-3201PK
<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
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

描述	部件号
<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”中的样品容器备件</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

如需了解更多用于聚集体和片段分析的 SEC 色谱柱解决方案，请访问：

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

DE44462.411099537

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 11 日，中国出版  
5994-3947ZHCN

 **Agilent**  
Trusted Answers