

以更环保、成本更低的有机流动相溶剂用于完整生物治疗性蛋白质的LC-MS分析

Henry Shion, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

本应用纪要介绍了对蛋白质进行反相分离与质谱检测时，用更环保的III类、成本更低的液质联用(LC-MS)级醇（例如甲醇和异丙醇）替代乙腈（II类毒性）的最新趋势。本文报告了在生物制药的反相(RP) LC-MS分析中用异丙醇(IPA)替代乙腈的研究。本报告详细讨论了优点和潜在问题，但总体实验数据表明，IPA是在该应用领域中替代乙腈的可行替代品。

优势

- 异丙醇(IPA)是一种毒性低于乙腈的有机溶剂
 - 异丙醇(IPA)的成本低于乙腈
 - 在完整分子量分析与亚基LC-MS分析中，异丙醇(IPA)在峰形、残留和MS灵敏度方面表现良好
-

简介

本应用纪要介绍了在蛋白质RP LC-MS分析中使用更环保、更便宜的溶剂代替乙腈的最新进展。由于乙腈的紫外(UV)截止值和粘度均较低，因此广泛用于蛋白质的反相液相色谱(RPLC)分离，但它也带来了额外的挑战，例如毒性、废液处理和偶尔的稀缺。

随着人们不断追求更环保的LC有机流动相，乙醇或丙酮已成为代替乙腈(ACN)的热门候选^{1,2,3}。正如美国食品药品监督管理局(FDA)文件⁴—“Q3C-行业指南的表和清单”(Q3C-Tables and List Guidance for Industry)中所述，ACN在毒性方面被归类为2类溶剂，而乙醇和丙酮均被视为毒性较低的3类溶剂。对于RP LC-MS应用，Amgen尝试在流动相中使用IPA与0.1%三氟乙酸(TFA)进行蛋白分析⁵。本文报告了在生物制药的RP LC-MS分析中使用醇类(MeOH或IPA，也被归类为3类溶剂)取代ACN的研究。我们使用ACN、MeOH或IPA作为有机流动相溶剂(搭配常用的0.1%甲酸)，通过完整单克隆抗体(NISTmAb参考标准品)及其IdeS酶解和还原亚基比较了这些溶剂的色谱和质谱性能。总体实验数据表明，IPA非常适合取代乙腈用于mAb的常规LC-MS分析。



图1.本研究使用BioAccord™系统，包含一套ACQUITY™ UPLC™ I-Class PLUS系统，并将可变波长紫外检测器(TUV)与ACQUITY RDa™精确质谱检测器在线联用，在waters_connect™信息学平台下运行。

实验

标准物质和样品前处理

LC-MS级水、乙腈(ACN)、甲醇(MeOH)和异丙醇(IPA)购自Honeywell-Burdick & Jackson (美国密歇根州马斯基根)。LC-MS级甲酸购自Thermo Fisher Scientific (马萨诸塞州沃尔瑟姆)。本研究使用了沃特世人源化单克隆抗体(NISTmAb)质量数检查标准品 (沃特世部件号=[186009125 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009125-humanized-mab-mass-check-standard.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009125-humanized-mab-mass-check-standard.html)) 和沃特世单克隆抗体(NISTmAb)亚基标准品 (沃特世部件号=[186008927 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186008927-mab-subunit-standard.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186008927-mab-subunit-standard.html))。完整分子量分析：向含有80 µg完整mAb的样品瓶中加入400 µL水，制成0.2 µg/µL溶液，然后进样(4 µL)。亚基分析：向含有25 µg mAb亚基的样品瓶中加入250 µL水，制成0.1 µg/µL溶液，然后进样(4 µL)。

BioAccord系统

系统：	ACQUITY UPLC I-Class PLUS
检测器：	ACQUITY RDa质谱检测器，TUV光学检测器
软件：	waters_connect v1.9.9.6

完整分子量分析 - LC-MS方法设置

色谱柱：	BioResolve™ RP色谱柱, 450 Å, 2.7 µm, 2.1 mm × 50 mm (部件号=186008944)
柱温：	80 °C
流动相A：	0.1%甲酸的水溶液
流动相B：	1. 0.1%甲酸的乙腈溶液，

2.95%甲醇的水溶液（含0.1%甲酸），或

3.95% IPA的水溶液（含0.1%甲酸）

TUV光学检测器：

UV 280 nm

完整mAb分析的液相色谱梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	组分A (%)	组分B (%)	曲线
0.00	0.400	95.0	5.0	初始
1.00	0.400	15.0	85.0	6
1.20	0.400	5.0	95.0	6
1.50	0.400	95.0	5.0	6
2.50	0.400	95.0	5.0	6
5.00	0.400	95.0	5.0	6
5.50	0.400	95.0	5.0	6
7.00	0.400	95.0	5.0	6

总运行时间：7.0分钟。

完整分子量分析的MS条件

采集设置

模式：

全扫描

质量范围：

高(400-7000 m/z)

极性：	正
扫描速率：	2 Hz
锥孔电压：	自定义(70 V)
毛细管电压：	自定义(1.50 kV)
脱溶剂气温度：	自定义(550 °C)
智能数据捕获(IDC)：	关

亚基分子量分析的LC-MS方法设置

色谱柱：	BioResolve RP色谱柱, 450 Å, 2.7 µm, 2.1 mm × 50 mm（沃特世部件号=186008944）
柱温：	80 °C
流动相A：	0.1%甲酸的水溶液
流动相B：	1. 0.1%甲酸的乙腈溶液， 2. 95%甲醇的水溶液（含0.1%甲酸），或 3. 95% IPA的水溶液（含0.1%甲酸）
TUV光学检测器：	UV 280 nm

梯度表

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Mobile phase (A %)	Mobile phase (B %)	Curve
0.0	0.40	95.0	5.0	Initial
1.0	0.40	95.0	5.0	6
3.5	0.40	15.0	85.0	6
3.7	0.40	15.0	85.0	6
4.0	0.40	95.0	5.0	6
4.5	0.40	15.0	85.0	6
5.0	0.40	95.0	5.0	6
5.5	0.40	95.0	5.0	6
7.0	0.40	95.0	5.0	6

总运行时间：5.50分钟

亚基分析的MS条件

采集设置

模式：全扫描

质量范围：高(400-7000 m/z)

极性：正

扫描速率：2 Hz

锥孔电压：自定义(30 V)

毛细管电压：自定义(1.00 kV)

脱溶剂气温度：自定义(450 °C)

智能数据捕获(IDC)：关

结果与讨论

乙腈(ACN)主要在丙烯腈制造过程中作为副产物产生，然后提纯制成。MeOH是由一氧化碳和氢气合成气体产生的，然后蒸馏制成。IPA是通过水合反应将水和丙烯结合，然后进行共沸蒸馏制成的^{6,8,9,10}。由于生产工艺的差异，与ACN的生产相比，醇类的生产通常会产生纯度更高、污染物更少的溶剂。因此，在LC-MS分析中使用高纯度醇类的成本明显低于ACN。我们从当前美国市场上的众多供应商中选择了三个供应商，在表1中展示了IPA、MeOH和ACN之间的商业成本比较。ACN的平均成本接近MeOH和IPA平均成本的3倍，醇类明显更具成本优势。

	美国LC-MS级溶剂价格（美元/升）			
溶剂	供应商 1	供应商 2	供应商 3	平均值
异丙醇	55.0	36.0	74.0	55.0
甲醇	33.0	42.0	45.0	40.0
乙腈	93.0	133.5	183.0	136.5

表1.LC-MS级有机溶剂流动相价格比较（2021年第四季度美国标价）

完整分子量分析

在完整分子量分析评估中，将0.8 µg沃特世人源化单克隆抗体(NISTmAb)质量数检查标准品上样到Waters BioResolve RP色谱柱。实验使用的流动相是A：0.1% FA的水溶液，B：0.1% FA的IPA（水溶液）、95% MeOH或95% ACN。使用优化的反相完整分子量分析梯度，总运行时间为7分钟。ACN和水的UV截止值均为190 nm，而MeOH和IPA的UV截止值均为205 nm⁷。由于完整分子量分析和亚基分析使用的TUV波长通常为280 nm（对于小

分子蛋白有时为260 nm)，MeOH和IPA的TUV截止值相对偏高应该不会对TUV检测产生任何影响。

图2比较了使用三种流动相B对NISTmAb进行完整LC-MS分析的总离子流色谱图(TIC)和UV吸光度色谱图。三种有机流动相均在UV和MS谱图中产生对称且窄的峰（偏移保留时间与预期一致）。然而，测量显示IPA、MeOH和ACN的TIC半高峰宽分别为3.6、4.8和3.6秒，表明IPA和ACN（作为流动相B）产生的TIC峰比MeOH更窄。此外，MeOH的TIC强度约为IPA或ACN的80%。比较结果表明，IPA可取代ACN用于完整NISTmAb分析。

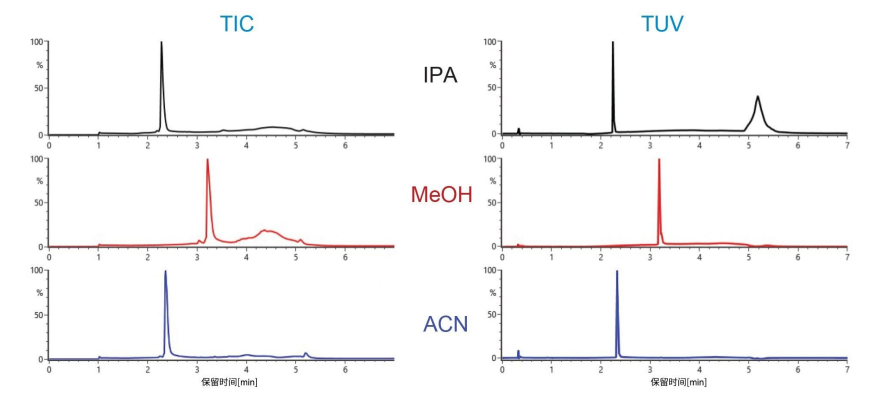


图2.不同流动相条件下NISTmAb完整分子量分析的TIC和UV色谱图

图3比较了三种流动相溶剂用于NISTmAb完整分子量分析的组合原始谱图（图2中的TIC）（左），并展示了三个谱图的50⁺ 电荷态叠加图（右）。三种流动相在NISTmAb原始谱图中产生了相似的电荷包络。然而，放大后的50⁺ 电荷态叠加图显示IPA（黑色迹线）和ACN（蓝色迹线）产生的原始谱图在标称上优于MeOH，且糖型间的峰谷比更低（17%对20%，如图3所示）。NISTmAb的前五种糖型被鉴定为G0F/G0F、G0F/G1F、G1F/G1F、G1F/G2F和G2F/G2F⁶。糖型间的峰谷比较低通常表明质谱仪离子源中的脱溶剂过程较充分（去簇较充分）。因此，对于mAb完整分子量分析，观察到IPA和ACN产生比MeOH更好的谱图，尽管这种效果并不明显。

组合原始谱图

一种电荷态(50+)的叠加图

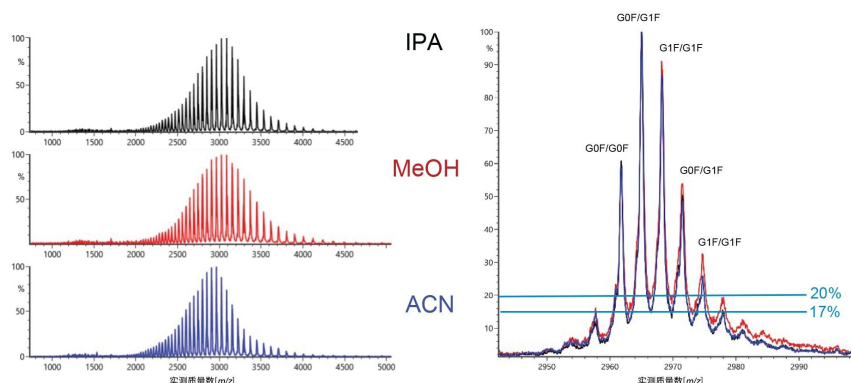


图3.三种流动相（作为溶剂B）用于NISTmAb完整分子量分析得到的组合原始谱图比较（左），不同糖型的50+电荷态信号的三个去卷积谱图叠加显示结果相当（右）。

三种流动相的去卷积谱图产生了相当的谱图质量和质量精度（数据未显示）。前五种主要糖型（G0F/G0F、G0F/G1F、G1F/G1F、G1F/G2F和G2F/G2F）的相对MS响应（电荷去卷积后）与图4中显示的相似。图4是重复进样的相对MS响应在waters_connect软件中生成的汇总图。如图所示，IPA和ACN流动相具有相似的相对MS响应，而MeOH报告的结果略有不同。这一观察结果在其他mAb上得到验证，例如曲妥单抗和英夫利昔单抗（数据未显示）。

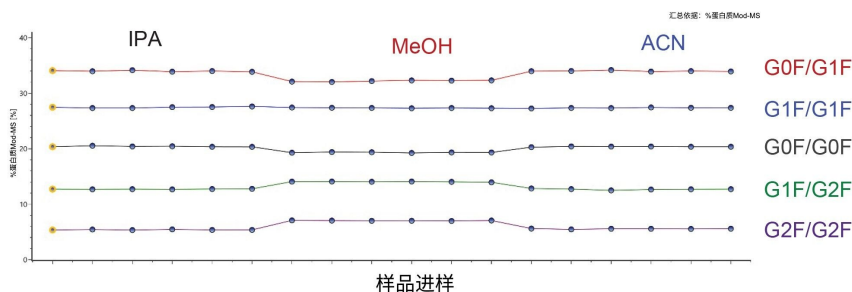


图4.利用三种RP溶剂体系重复进样($n=6$)进行NIST mAb完整分子量分析得到的五种主要糖型（G0F/G0F、G0F/G1F、G1F/G1F、G1F/G2F、G2F/G2F）去卷积谱图的相对MS响应比较。

mAb亚基（scFc、LC和Fd）分析

使用沃特世单克隆抗体亚基标准品和五分钟梯度LC-MS方法进行亚基分析。图5（左）分别显示了IPA、MeOH和ACN用作流动相B的TIC比较。这些色谱图表明亚基（scFc、LC和Fd）在所有流动相条件下均良好分离。图5（右）显示了scFc的组合原始谱图。总体而言，当使用不同的流动相溶剂时，三种亚基的信号质量均未观察到重大差异。如果将使用ACN作为流动相B时三次进样的平均TIC强度视为1.00，可计算出IPA和MeOH作为流动相B时，平均TIC强度分别为1.18和1.06。在原始MS谱图中观察到类似的信号响应比率。该实验结果表明IPA和MeOH对mAb亚基MS响应的性能至少与ACN一样好。

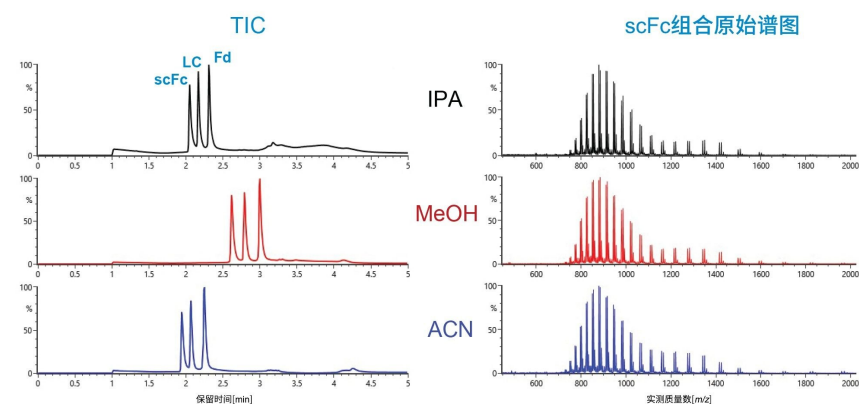


图5.使用IPA、MeOH和ACN作为流动相溶剂分析Waters NISTmAb IdeS酶解和还原亚基标准品获得的TIC比较（左）。scFc亚基的组合原始谱图比较（右）表明，几种溶剂得到的MS谱图质量相当。

使用UNIFI/waters_connect进行MaxEnt1电荷态去卷积处理后，主要的已鉴定亚基（scFc、LC和Fd）见表2。在实验中，三种亚基获得了相似的质量精度（小于15 ppm）和主要蛋白形态相对丰度。

亚基名称	改性剂	预期 质量数 (Da)	异丙醇(IPA)		甲醇(MeOH)		乙腈(ACN)	
			质量 精度 (ppm)	%蛋白质 Mod-MS (%)	质量 精度 (ppm)	%蛋白质 Mod-MS (%)	质量 精度 (ppm)	%蛋白质 Mod-MS (%)
NISTmAb LC		23127.6	3.5	96.1	4.3	95.7	4.5	96.0
NISTmAb LC	糖化(1)	23289.4	-5.2	3.9	-9.4	3.8	-11.2	4.0
NISTmAb Fc	G0F N(1)	25236.0	2.4	41.7	2	41.9	4.2	41.2
NISTmAb Fc	G1F N(1)	25398.1	4.2	46.5	2.3	46.7	3.2	47.3
NISTmAb Fc	G2F N(1)	25560.3	3.1	11.8	1.8	11.0	5.9	11.5
NISTmAb Fd	N端形成焦谷氨酸Q (1)	25689.0	5.7	96.8	8.2	97.3	8.7	97.2
NISTmAb Fd	N端形成焦谷氨酸Q (1), 糖化(1)	25850.7	-8.6	3.2	-12.6	2.7	-13.5	2.8

表2.使用IPA、MeOH和ACN作为LC-MS溶剂分析Waters NISTmAb IdeS酶解和还原亚基标准品获得的质量精度和相对丰度比较。

在本研究中，LC系统压力随不同的溶剂体系发生显著变化。图6是三种有机溶剂的系统压力叠加图。使用IPA时的系统压力(7500 psi)远高于MeOH (3000 psi)和ACN (2500 psi)。系统压力差反映出IPA在单独使用或按梯度与水混合使用时，比其他两种溶剂具有更高的粘度^{6, 7, 8}。本研究使用的流速为0.4 mL/min，色谱柱(2.1 x 50 mm)保持在80 °C，系统压力稳定保持在ACQUITY系统的18k psi限制范围内。然而，作为额外的预防措施，当使用IPA作为有机流动相时，仍应注意系统压力的变化，尤其是在修改了本研究所用流速、色谱柱尺寸或柱温的情况下。

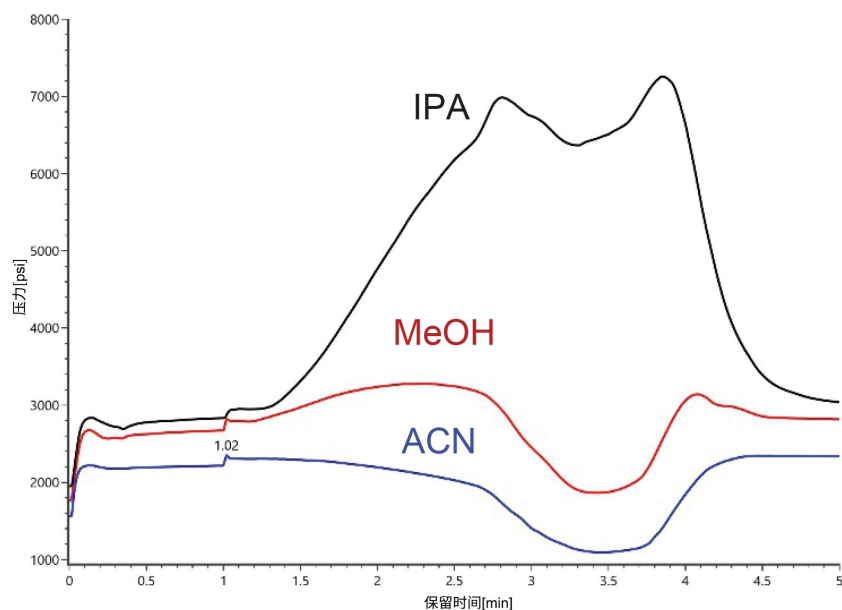


图6.使用IPA、MeOH和ACN作为流动相溶剂分析Waters NISTmAb IdeS酶解和还原亚基标准品获得的系统压力曲线。

结论

本研究探索了异丙醇(IPA)和甲醇(MeOH)作为更安全、更经济的有机流动相溶剂，取代ACN用于生物治疗药物完整分子量分析的应用。实验结果表明，醇类溶剂在完整单克隆抗体数据质量（例如峰形、原始谱图的糖型峰谷百分比）、质量精度和灵敏度方面与ACN具有可比性。当我们在类似的LC-MS实验条件下实施mAb亚基（scFc、LC和Fd）分析时，观察到了相同的结果。基于上述环保和成本优势，沃特世支持科学家们为完整蛋白的LC-MS分析开发更环保、更具成本效益的方法。

参考资料

1. Welch, J., et al. Greening Analytical Chromatography, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol.29, No.7, 2010.

2. Yabré, M., *et al.* Greening, Reversed-Phase Liquid chromatography Methods Using Alternative Solvents for Pharmaceutical Analysis, *Molecules* Vol.23, 1065, 2018.
3. Funari, C., *et al.* Acetone as a Greener Alternative to Acetonitrile in Liquid Chromatographic Fingerprinting. *J Separation Science*. Volume 38, Issue 9, Pages: 1441–1624, 2015.
4. FDA Q3C–Tables and List Guidance for Industry: <https://www.fda.gov/media/71737/download> <<https://www.fda.gov/media/71737/download>> .
5. Dillon, T., *et al.* US patent: US 2005O161399A1, 2005.
6. Waters “ACQUITY UPLC TUV Detector, Operator’s Overview and Maintenance Guide” , Waters User manual: [715004733](https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=10152517&cid=10152516&type=USRM) <<https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=10152517&cid=10152516&type=USRM>> , Page 82, 2014.
7. Shion, H.; *et al.* 在数据完整性环境下进行可重现的完整分子量例行分析. 沃特世应用纪要, [720006472ZH](#), 2019.
8. Li, J., *et al.* Selection of Solvents and Mobile Phases for HPLC to Optimize Sensitivity of UV Detection, *Analysis and Purification* 2(1): 72–75 (1987).
9. Li, J., *et al.* Signal-to-Noise Optimization in HPLC UV detection, *LC-GC* 10 (11): 856–864 (1992).
10. Snyder, L. *et al.* Practical HPLC Method Development, 2nd ed., pp.59-79 and 722–726, 1997.

致谢

作者在此感谢Scott Berger（沃特世公司生物制药市场团队高级经理）对本应用纪要草稿的宝贵意见和编辑。

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

生物制药领域专用的BioAccord LC-MS系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>>

ACQUITY RDa检测器 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077027>>

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

waters_connect <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>>

720007540ZH, 2022年2月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号