

使用20 mm阳离子交换色谱柱进行mAb电荷异构体快速分析

Hua Yang, Lili Macedo, Stephan M. Koza, Steve Shiner

Waters Corporation

摘要

本文介绍了使用BioResolve™ Premier SCX色谱柱(3 μ m, 2.1 $\times$ 20 mm)，通过盐梯度和pH梯度对NISTmAb进行可靠的6 min快速阳离子交换(CEX)电荷异构体分析。尽管与使用较长色谱柱的早期结果相比，20 mm色谱柱在分离度方面如预期般下降，但在需要提高样品通量时，通常可以在分析时间缩短五倍的情况下实现有效分离。

优势

- 使用2.1 $\times$ 20 mm BioResolve Premier SCX 3 μ m色谱柱通过阳离子交换方法快速分析完整mAb
- 减少流动相和上样量要求

简介

由于单克隆抗体(mAb)等生物制药的迅速发展，对高通量方法的需求也日益增加。为满足这些需求，有研究人员提出了一种通过大幅缩短LC色谱柱长度来缩短分析时间的方法¹⁻²。虽然在这些报告中，较短的色谱柱会在一定程度上影响色谱分离细节，但这类色谱柱仍可为高通量应用提供足够的峰分离度。阳离子交换色谱(CEX)就是其中一种方法，它常用于监测天然状态的治疗性蛋白质（例如mAb）的电荷异构体。此外，提高CEX的样品通量也对这些

治疗药物的生产和配方开发大有裨益。在本应用纪要中，我们将使用柱长为20 mm的BioResolve Premier SCX色谱柱，通过盐梯度或pH梯度阳离子交换法对NISTmAb进行6 min快速阳离子交换电荷异构体分析。

实验

样品描述

将NISTmAb RM 8671 (10 mg/mL)用水稀释至浓度2.5 mg/mL。

方法条件

LC条件

LC系统：	ACQUITY™ UPLC™ H-Class Bio
检测：	ACQUITY TUV, 280 nm (流通池：5 mm, 1.5 μL)
色谱柱：	BioResolve Premier SCX色谱柱, 3 μm, 2.1 × 20 mm (P/N: 186011020)
柱温：	30 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	1 μL
流速：	0.3 mL/min
流动相：	用于盐梯度： 流动相A: 20 mM MES, pH 6.7 流动相B: 20 mM MES + 1M NaCl, pH 6.7

用于pH梯度：

流动相A：10倍稀释BioResolve CX pH浓缩液
A，pH 5.0（P/N：186009063）

流动相B：10倍稀释BioResolve CX pH浓缩液
B，pH 10.2（P/N：186009064）

盐梯度的梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.0	0.3	99	1	初始
0.5	0.3	94	6	11
1.0	0.3	94	6	6
4.0	0.3	89	11	6
4.5	0.3	50	50	6
5.0	0.3	50	50	6
5.1	0.3	99	1	6
6.0	0.3	99	1	6

pH梯度的梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.00	0.3	100	0	初始
0.20	0.3	100	0	11
4.72	0.3	0	100	6
4.92	0.3	0	100	6
5.12	0.3	100	0	6
6.00	0.3	100	0	6

数据管理

LC软件：

Empower™ 3

结果与讨论

图1展示了完整NISTmAb在 2.1×20 mm色谱柱上的盐梯度和pH梯度分离示例（3 min和4.5 min洗脱梯度，上样量 $2.5 \mu\text{g}$ ）。与之前报道的研究一致，pH梯度通常能够改善酸性电荷异构体的分离。我们还观察到，与NISTmAb在更长的色谱柱（4.6 mm内径）上的CEX分离相比，在20 mm长的色谱柱上，盐梯度分离比pH梯度分离产生的色谱分离细节损失更多³⁻⁴。尽管存在这些问题，但使用 2.1×20 mm CEX色谱柱和低扩散性LC系统仍可实现充分分离，从而使蛋白质电荷异构体分析的样品通量是参考的高分离度方法的五倍。该色谱柱的另一个优势在于，所用的样品和流动相体积比 4.6×50 mm CEX色谱柱的十分之一还低。

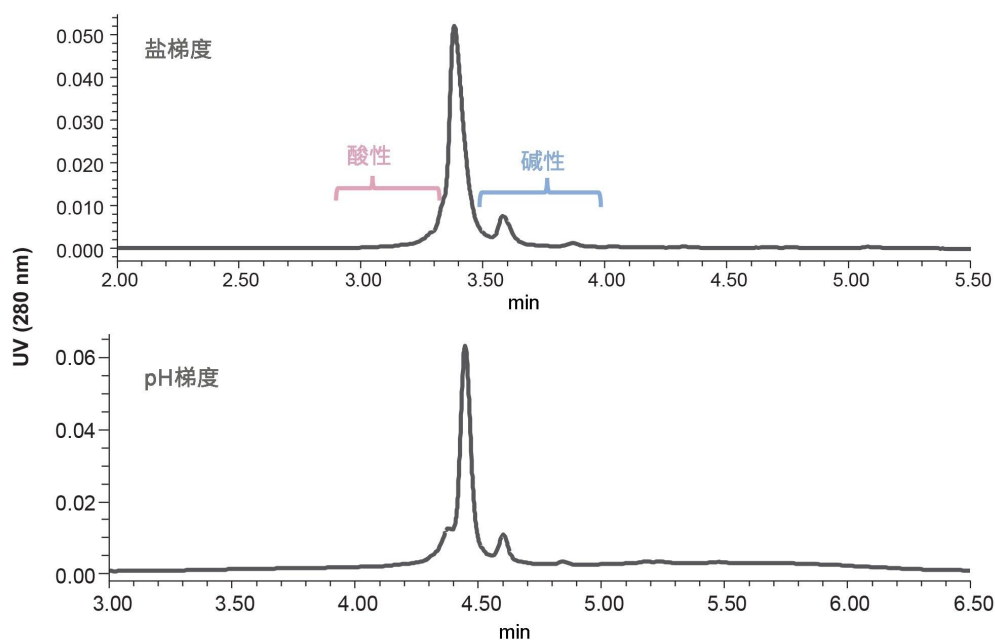


图1.在0.3 mL/min的流速下，使用BioResolve Premier SCX 2.1 × 20 mm色谱柱，以3 min和4.5 min的洗脱梯度，对NISTmAb电荷异构体进行盐梯度和pH梯度分离的示例。更多详细信息请参见正文。

高通量LC应用要求色谱柱性能稳健，并能够耐受严苛条件。为证明BioResolve Premier SCX 2.1 × 20 mm色谱柱的稳健性，研究中对该色谱柱进行了500次从0至4000 psi的快速压力循环。在压力循环前后使用盐梯度分析NISTmAb，评估色谱性能的变化（图2）。结果显示分离度和电荷异构体谱图变化微乎其微，表明该色谱柱具有高水平的机械床稳定性。

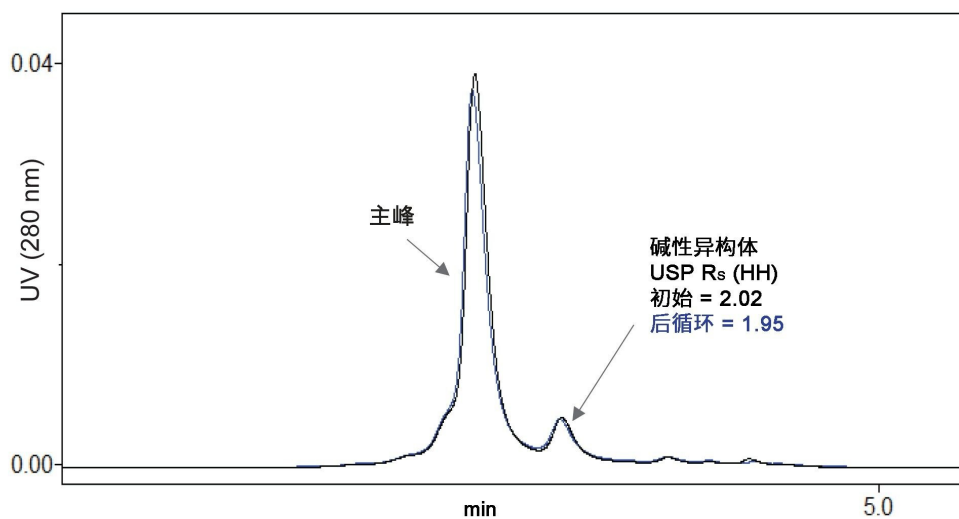


图2. NISTmAb电荷异构体在BioResolve Premier SCX 2.1 × 20 mm色谱柱上进行500次0~4000 psi (275 bar)的压力循环前后的盐梯度分离示例。对于碱性异构体，观察到分离度轻微下降（约3.5%）。LC方法为：75~125 mM NaCl，3 min梯度，20 mM MES pH 6.0，0.2 mL/min，30 °C，TUV = 280 nm。

结论

使用2.1 × 20 mm BioResolve Premier SCX 3 μm色谱柱上运行高通量（每次分析6分钟）CEX方法，虽然分离度有所降低，但对于mAb电荷异构体来说还是可以提供有用的分离结果。对于酸性形式的NISTmab，基于pH的洗脱梯度相较于盐梯度，能够保持更有效的分离度。2.1 × 20 mm色谱柱不仅具有更高的通量，还可以减少流动相用量、仪器运行时间和样品体积，同时提供稳健的性能。

参考资料

1. Fekete S. and Guillarme D. Ultra-short columns for the chromatographic analysis of large molecules. *Journal of Chromatography A* 1706 (2023) 464285.

2. Navarro-Huerta J.A., Murisier A., Nguyen J.M., Lauber M.A., Beck A., Guillarme D., Fekete S. Ultra-Short Ion-Exchange Columns for Fast Charge Variants Analysis of Therapeutic Proteins. *Journal of Chromatography A* 1657 (2021) 462568.
3. Yang H., Warren W., 和Koza S. 使用AutoBlend Plus技术进行离子交换色谱方法开发和耐用性测试. 沃特世应用纪要. [720006557ZH](#), 2019年4月.
4. Wang Q, Rzewuski S. C., Lauber M. A., Development of pH Gradient Mobile Phase Concentrates for Robust, High Resolution mAb Charge Variant Analysis. Waters Application Note. [720006491](#), January 2019.

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <<https://www.waters.com/10166246>>

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

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720008295ZH, 2024年4月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私策略](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)