

# 单克隆抗体的高分离度、高通量体积排阻色谱分析

采用 Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm 色谱柱

## 作者

Veronica Qin  
安捷伦科技有限公司

## 摘要

本应用简报介绍了采用 Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm 色谱柱进行单克隆抗体 (mAb) 的高分离度和高通量体积排阻色谱 (SEC) 分析。经优化的亚 2 µm 填料颗粒可实现更快的分离速度和无与伦比的高分离度，从而实现准确的定量分析。

## 前言

聚集体和片段是生物治疗蛋白的关键质量属性，需要对它们进行充分表征。通常使用体积排阻色谱 (SEC) 分析不同体积的上述物质。有些情况下需要高通量 SEC 分析。例如，在药物开发早期阶段的克隆选择或工艺开发期间，每天需要分析大量样品。AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm 色谱柱具有独特且耐用的亚 2 μm 填料颗粒，可实现高分离度快速分析。这些特性可显著提高样品通量，同时提供稳定、准确的结果。

## 实验部分

### 材料

SILu Lite SigmaMAb 通用抗体标准品购自 MilliporeSigma，并用水复溶至 1 mg/mL。磷酸二氢钠、磷酸氢二钠和氯化钠均购自 MilliporeSigma。所有化学品纯度均 ≥ 99.5%。水经由 Milli-Q A10 水纯化系统 (Millipore) 纯化。每天使用前配制新鲜溶液并通过 0.22 μm 膜过滤器进行过滤。

## 仪器

### 液相色谱系统

Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪包括如下配置：

- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性四元泵 (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler (G5668A)，配备样品冷却装置 (选件 #100)
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)，配备生物惰性热交换器 (选件 #019)

- Agilent 1260 Infinity II 可变波长检测器 (G7114A)

### 色谱柱

- Agilent AdvanceBio SEC 200 Å, 1.9 μm, 4.6 × 300 mm (部件号 PL1580-5201)
- Agilent AdvanceBio SEC 200 Å, 1.9 μm, 4.6 × 150 mm (部件号 PL1580-3201)

### 软件

Agilent OpenLab 2.2 CDS。

### 仪器条件

参数	1260 Infinity II LC
柱温	25 °C
流动相	50 mmol/L 磷酸钠, 200 mmol/L 氯化钠, pH 7.0
流速	0.3–0.7 mL/min
进样量	1 μL
检测器	UV 220 nm

## 结果与讨论

图 1 显示了含有聚集体和片段的 mAb 的 SEC 色谱图，使用 300 mm 色谱柱在 0.35、0.4 和 0.5 mL/min 流速下进行分析。即使在 0.5 mL/min 的流速下也获得了二聚体/单体以及单体/片段 1 的出色分离 (表 1)。与 0.35 mL/min 流速相比，节省了 28% 的运行时间，并且分离度不受影响。

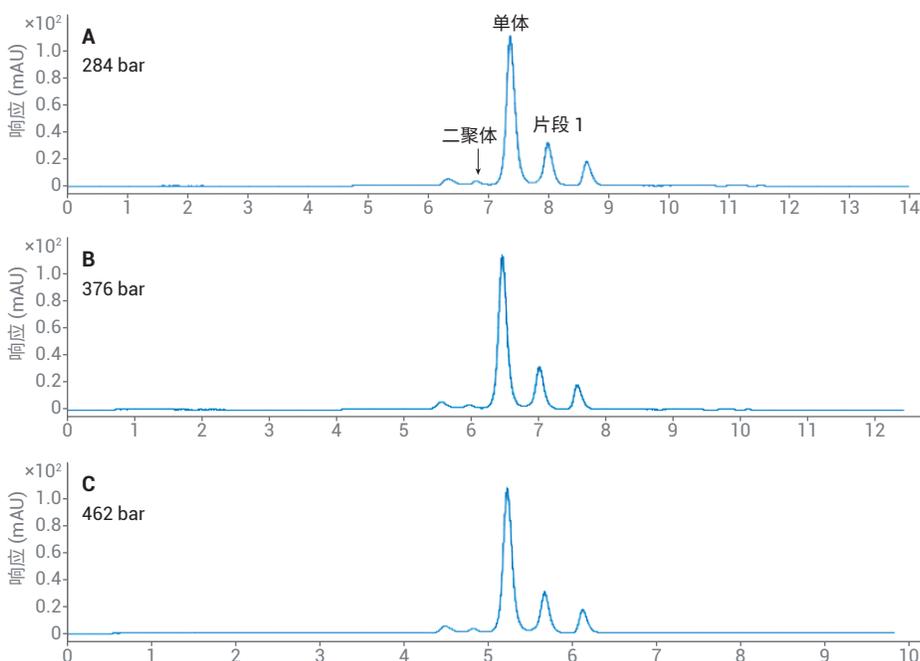


图 1. SigmaMAb (与其 F(ab)<sub>2</sub> 和 Fc 片段的混合物) 的体积排阻色谱图，采用 4.6 × 300 mm SEC 色谱柱，流动相为 50 mmol/L 磷酸钠，200 mmol/L NaCl，pH 7.0，流速为 A) 0.35 mL/min; B) 0.4 mL/min; C) 0.5 mL/min

150 mm 短色谱柱可实现快速的高通量 SEC 分析，该分析通常用于生物治疗药物开发的早期阶段，或者快速分析极为重要的情况下（例如在过程监测期间）。图 2 显示了在 150 mm AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm 色谱柱上测试不同流速（最高 0.7 mL/min）获得的结果。

表 1. 不同流速下的峰拖尾因子和分离度

流速 (mL/min)	拖尾因子 (单体)	分离度 (二聚体/单体)	分离度 (单体/片段 1)
0.35	1.18	1.98	2.37
0.4	1.16	1.96	2.36
0.5	1.14	1.91	2.29

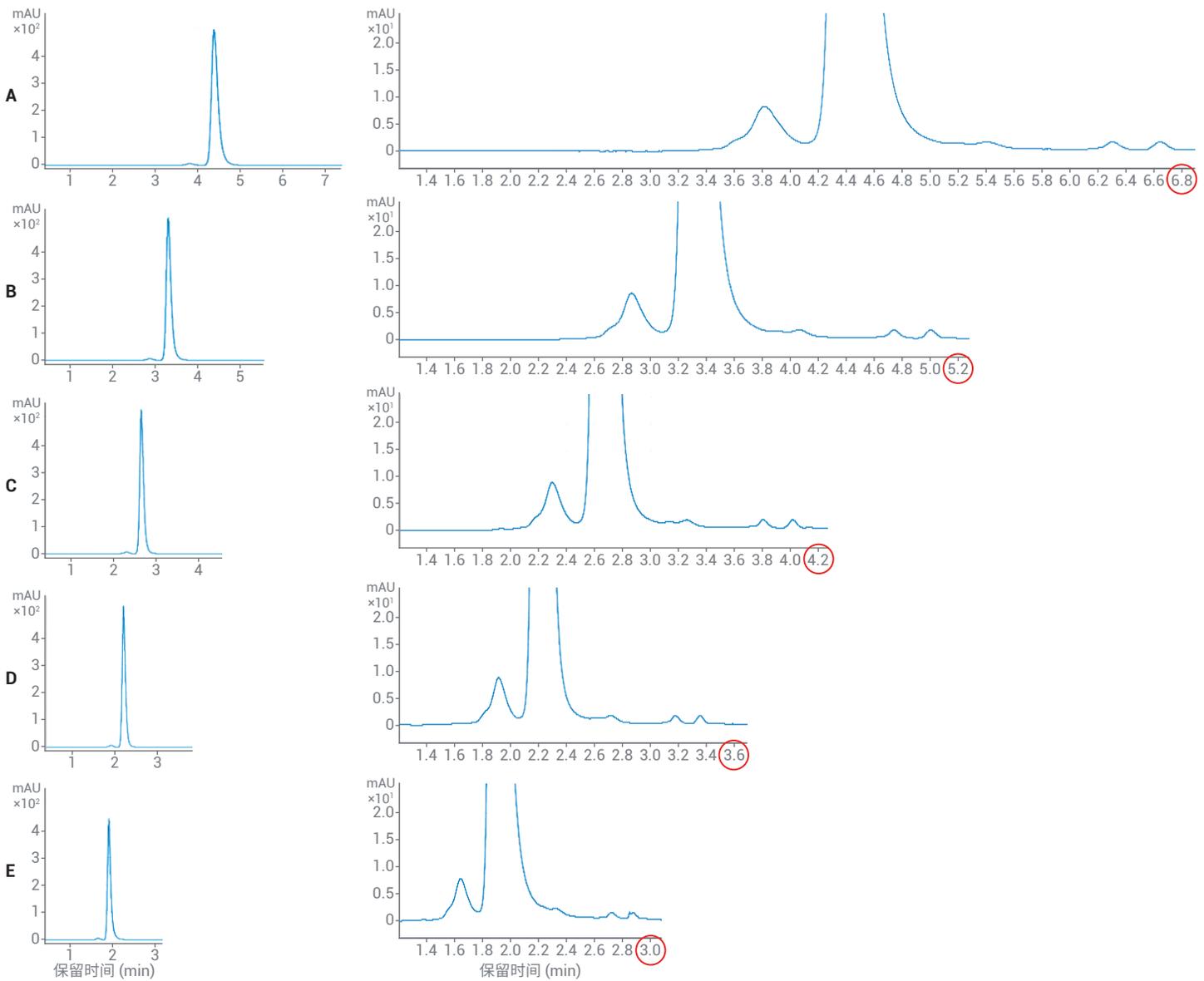


图 2. SigmaMAb 的体积排阻色谱图，采用 4.6 × 150 mm SEC 色谱柱，流动相为 50 mmol/L 磷酸钠，200 mmol/L NaCl，pH 7.0，流速为 A) 0.3 mL/min；B) 0.4 mL/min；C) 0.5 mL/min；D) 0.6 mL/min；E) 0.7 mL/min

该色谱柱所用的独特填料颗粒可在更高流速下实现出色的稳定性，并且二聚体/单体具有出色的分离度，可准确定量二聚体峰面积（表 2）。

表 2 计算了流速对样品通量的影响。当流速从 0.3 mL/min 增加到 0.7 mL/min 时，每天可以分析 480 个样品，通量提高了 2.3 倍。与以 0.3 mL/min 运行的 300 mm 色谱柱（每天只能分析 105 个样品）相比，通量提高了 4.6 倍。

## 结论

本研究表明，AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm 色谱柱能够实现 mAb 聚集体的快速分析。耐用的填料颗粒能够以更高流速运行，并且保持高分离度。通过将色谱柱柱长从 300 mm 缩短至 150 mm，将流速从 0.3 mL/min 提高到 0.7 mL/min，样品通量将提高 4.6 倍。

表 2. 流速对分离度、单体峰面积百分比和样品通量的影响

流速 (mL/min)	运行时间 (min)	反压 (bar)	分离度 (二聚体/单体)	二聚体峰面积 (%)	每小时处理的样品数	每天处理的样品数 (24 小时)
0.3	6.8	164	1.81	2.33	8-9	211
0.4	5.2	218	1.79	2.35	11-12	276
0.5	4.2	272	1.78	2.35	14	342
0.6	3.6	324	1.77	2.39	16-17	400
0.7	3.0	380	1.58	2.30	20	480

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)

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

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, 2019  
2019 年 3 月 28 日, 中国出版  
5994-0828ZHCN