



单克隆抗体非变性 SEC-MS 分析用色谱柱的选择

单克隆抗体 (mAb) 的表征对于产品的安全性和有效性至关重要。确定纯度和表征二聚体或片段等杂质是两个关键的质量参数。尺寸排阻色谱 (SEC) 法与质谱 (MS) 法联合使用在测定 mAb 精确分子量方面的应用也越来越广泛。然而, 即使在高分子量 (HMW) m/z 范围内执行操作, 传统 SEC 一般都会产生大量的颗粒脱落, 导致电离效率随时间推移逐渐降低。为避免 MS 和多角度光散射 (MALS) 检测时产生颗粒脱落, 东曹开发了 TSKgel® UP-SW3000-LS U/HPLC 尺寸排阻色谱柱。

本文中, 我们使用了 TSKgel UP-SW3000-LS 色谱柱与 MS 对 mAb 标准品进行了分析。数据表明, 就 MS 观察到的颗粒脱落而言, TSKgel UPSW3000-LS 色谱柱优于竞品 UHPLC 色谱柱和蛋白质 SEC 专用低脱落色谱柱。此外, 与 50 次以上的初始进样相比, 该色谱柱有助于将电喷雾电离 (ESI) 源的电离效率保持在 90% 以上。

实验条件

色谱柱: TSKgel UP-SW3000-LS,
4.6 mm ID×15 cm (2 μm)
竞品 SEC UHPLC 色谱柱,
4.6 mm ID×15 cm (1.7 μm)
光散射专用色谱柱,
4.6 mm ID×15 cm (3 μm)

仪器:

UHPLC 仪: Shimadzu Nexera® XR
质谱仪: SCIEX X500B QTOF
电离模式: ESI, 阳极模式
质谱模式: 扫描, TOF MS m/z 4000-8000
离子源气体 1: 50 psi
离子源气体 2: 50 psi
气帘气: 30 psi

方法和流动相:

流动相: 100 mmol/L 甲酸铵, pH 6.8
流速: 0.2 mL/min
检测: UV @ 280 nm
温度: 25° C
进样量: 10 μL

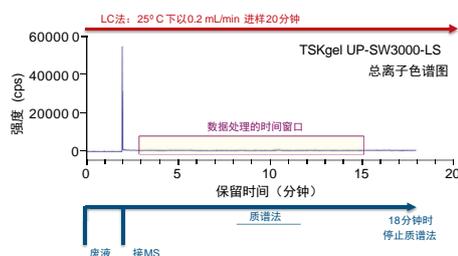
CAD 气体: 7 psi
喷雾电压: 5500 V
源温度: 450° C
去簇电压: 275 V ± 20 V
碰撞能量: 5 V
积累时间: 0.5 s
合计时间段: 80
完整蛋白质模式脚本: 开
Q1 传输窗口: 2250 Da 下 100%

结果和讨论

使用 TSKgel UP-SW3000-LS 可降低 SEC-MS 下的颗粒脱落

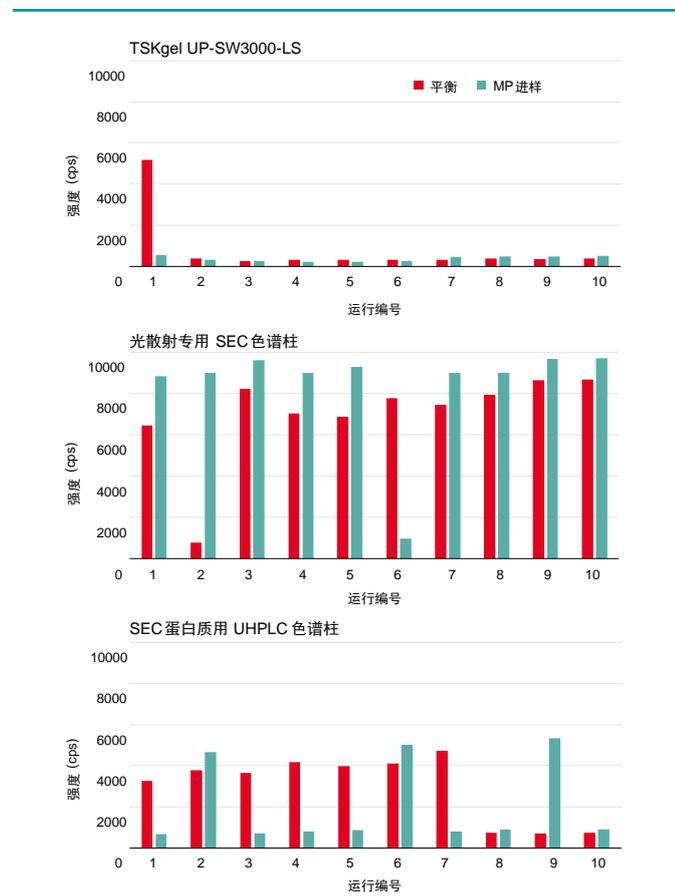
根据我们的首次观察结果, 颗粒脱落不会只在特定的保留时间下发生。该现象会在整个洗脱过程种连续发生。因此, 我们决定收集 3 到 15 分钟洗脱时间内的累积数据, 以此量化单次 SEC 运行期间色谱柱的脱落量 (见图 1)。

图 1. 使用 LC-MS 法测量 SEC 颗粒脱落的实验设计



我们计算了每根色谱柱中不同分子离子的测量强度，量化了多次运行 SEC 时色谱柱的颗粒脱落。分析序列包括 10 次平衡运行（不进样）和 10 次普通运行（色谱柱中注入了流动相空白）。颗粒脱落的量化结果如图 2 所示，其中横轴为运行次数，纵轴为颗粒脱落的强度或每秒计数（cps）。

图 2. 使用 LC-MS 量化 SEC 颗粒脱落



TSKgel UP-SW3000-LS 色谱柱首次平衡后几乎无颗粒脱落，且在颗粒脱落方面优于竞品 UHPLC 色谱柱和光散射专用色谱柱。由于首次平衡后无法测量颗粒脱落，因此无需在开始分析前长时间调节 SEC 色谱柱。

使用 TSKgel UP-SW3000-LS 提高 SEC-MS 的电离效率

我们通过测定了 28+ 峰的峰面积，来定量 NIST mAb 单体洗脱峰在不同色谱柱上连续 50 次以上进样的 MS 电离效率（见图 3 和图 4）。我们发现电离效率降低与高颗粒脱落之间具有相关性。

TSKgel UP-SW3000-LS 色谱柱具有超低的高颗粒脱落率，50 次以上进样时，可保持较高的电离效率（90% 以上）。

图 3. SEC-MS 分析 mAb

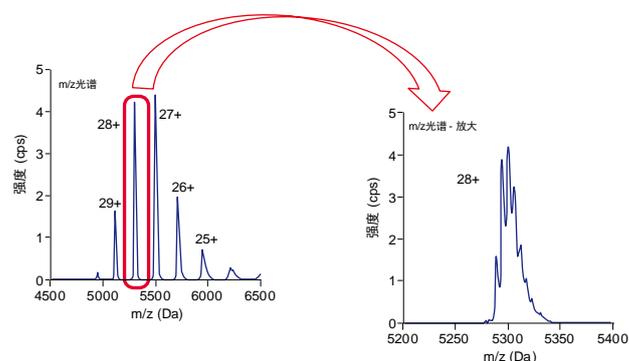
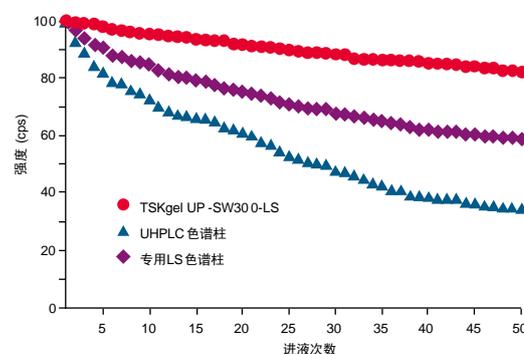


图 4. 电喷雾电离时 mAb 的电离效率



结论

使用 TSKgel UP-SW3000-LS 色谱柱进行 SEC-MS 分析，有助于限制色谱柱脱落，能够显著提高整体分析性能。相较于竞品色谱柱，还有助于通过降低 ESI 源的清洗频次保证仪器的正常运行时间。因此，使用 TSKgel UP-SW3000-LS 色谱柱时，不仅 SEC-MS 分析的重复性和可靠性更高，通量也更高。

产品列表

货号#	产品名称	色谱柱尺寸
23547	TSKgel UP-SW3000-LS	4.6 mm ID × 15 cm L
23546	TSKgel UP-SW3000-LS	4.6 mm ID × 30 cm L
23548	TSKgel guard column UP-SW-LS	4.6 mm ID × 20 cm L
23549	TSKgel guard column UP-SW-LS DC	4.6 mm ID × 20 cm L