Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

反相蛋白质分离方法开发思路

Hillary B. Hewitson, Thomas E. Wheat, Paula Hong, Kenneth J. Fountain

应用优势

- 亚2 µm颗粒的BEH300 C_4填料可实现最大的分离度
- 通过更改操作条件改变选择性和分离度，以满足特定样品的要求
- BEH300 C_4填料稳定性极佳，可在高温下使用，提高回收率和改善选择性
- 物理强度大，可耐受一系列有机溶剂惰性表面，可耐受多种类不同浓度的酸
- 操作条件范围广，可进行自动的无需监视的方法开发
- 无需进行多种色谱柱的筛选，即可灵活的得到分析条件

沃特世解决方案

- 配备用于肽分析的进样针和混合器的ACQUITY UPLC®系统或ACQUITY® H-Class系统，TUV检测(220 nm)
- ACQUITY UPLC BEH300 C_4, 2.1 × 50 mm, 1.7 µm色谱柱，部件号186004495；ACQUITY UPLC BEH300 C_4, 2.1 × 150 mm, 1.7 µm色谱柱，部件号186004497；ACQUITY UPLC BEH300 C_4, 4.6 × 150 mm, 3.5 µm色谱柱，部件号186004504
- MassPREP™蛋白质标准品混合物，部件号186004900

关键词

单克隆抗体，还原型单克隆抗体，梯度斜率，蛋白质，BEH300 C_4，MassPREP蛋白质标准品混合物，方法开发

简介

反相色谱具备的分离能力使其成为了一直以来人们表征和定量分析各种物质的首选分析技术。随着蛋白类生物治疗药物越来越受到人们的重视，我们有必要开发这类大分子物质的反相分离方法。反相分离法分离蛋白的效果远比不上它分离小分子化合物的效果。因为对于蛋白这样的大分子，对其进行的改变和修饰往往只占其分子结构的很小一部分，从而导致蛋白变异体具有相似的色谱性能。但是，我们仍可利用许多其它的因素来优化特定样品的反相分离，而特定应用的需求则决定了方法开发的最佳途径。本文将考虑影响反相分离效果的多个分离因素，包括色谱柱填料的粒度、色谱柱柱长、流速、改性剂浓度、有机溶剂的种类、柱温以及梯度斜率，通过分析性质各不相同的多种蛋白质(包括单克隆抗体)来评估上述每个方法变量。其中，蛋白的不同性质包括不同的等电点、疏水性和分子量。

实验

样品描述

蛋白质混合物: 用含有0.1% CF_3COOH的5%乙腈溶液制备

蛋白质	mg/ml
核糖核酸酶A，来自牛胰腺	0.08
细胞色素C，来自马心脏	0.11
白蛋白，来自牛血清	0.40
肌红蛋白，来自马心脏	0.25
烯醇酶，来自面包酵母	0.43
磷酸化酶B，来自兔肌肉	1.18

完整的小鼠IgG1用0.1% CF_3COOH溶解，配制浓度为0.5 µg/µL。还原型/烷基化的小鼠IgG1用0.1% CF_3COOH溶解，配制浓度为0.5 µg/µL。完整IgG混合物：含人源化IgG_4、嵌合IgG1和小鼠IgG1，用0.1% CF_3COOH配制，每种IgG浓度均为0.5 µg/µL。

样品瓶: 沃特世认证的全回收样品瓶，部件号186000384c

LC条件

(除非在图标中另有说明)

系统: ACQUITY UPLC（用于肽分析的进样针和混合器）配备ACQUITY TUV检测器，检测波长220 nm;

色谱柱: BEH300 C_4, 2.1 x 50 mm, 1.7 µm, 部件号186004495

柱温: 40、60、80或90 °C（如图中所示）

样品温度: 10 °C

进样体积: 3.3 µL

流速: 0.2 mL/min

流动相A: 0.1% CF_3COOH的水溶液

流动相B: 0.1% CF_3COOH的乙腈溶液

弱洗针液: 0.1% CF_3COOH的5%乙腈溶液

强洗针液: 0.1% CF_3COOH的75%乙腈溶液

密封清洗液: 50:50的乙腈/水溶液

梯度: 在29.6 min内从20%增至71.4%；在90%的浓度下再生1 min；在初始条件下再平衡17 min

数据管理

Empower® 2 CDS

结果与讨论

色谱柱填料和粒径

亚2 µm颗粒以及UPLC®技术的问世使所有类型样品的分析效果都得到了极大提升。随着BEH300 C_4这种在杂化颗粒中将适当的孔体积与链长相结合的新型色谱柱填料[1]的出现，这种技术开始被应用于生物大分子物质的分离。这种固定相有3.5 µm和1.7 µm两种粒径，因此可以在HPLC和UPLC之间直接进行方法转换而不会影响色谱的选择性。图1展示了粒径对分离效果的影响，所使用的样品为还原型IgG和部分烷基化的IgG。使用两种不同粒径的色谱柱进行分离，所得的峰的相对位置是完全相同的。由于两次分离均使用相同的流动相和分析条件在同一UPLC系统上进行，我们可将在1.7 µm粒径色谱柱的分离结果中观察到的分离度改善直接归因于其粒径更小。颗粒合成过程中严格的生产控制确保了不同粒径间的可扩展性以及恒定的选择性。只有在专门为最大程度减少分离过程中的谱带展宽而设计的系统上，才能完全提高分离度。

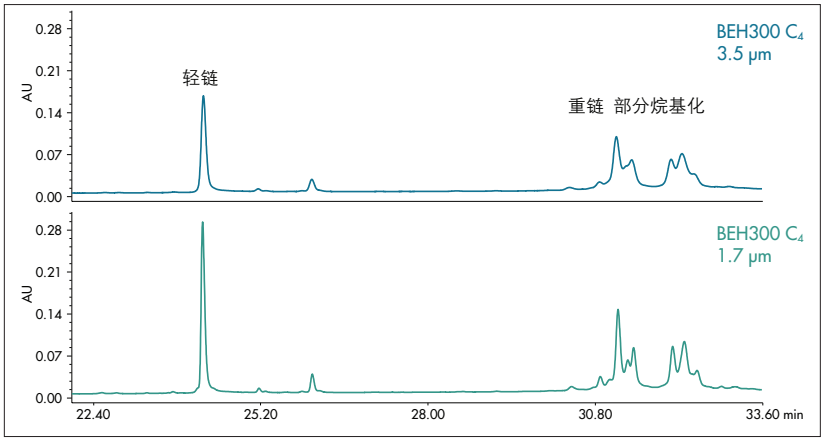

图1. 在40 °C下分别用3.5 µm和1.7 µm粒径的色谱柱分离还原型和烷基化单克隆抗体的结果对比。在两次分离中峰的相对位置完全相同，而使用1.7 µm粒径色谱柱进行分离所得的所有峰的峰形都更窄，并且重链的多种分子形式的峰形改善特别明显。

梯度斜率

在梯度分离中，色谱工作者常常将改变色谱的梯度斜率作为方法开发的一个主要手段。梯度斜率由单位色谱柱体积所对应的有机溶剂增加的百分比来定义，通过对其进行调整，可以优化组分的分离度或分析的速度。典型的蛋白质分离使用极为平缓的梯度，约为3%或更小。降低梯度斜率可提高分离度。然而，随着梯度变得更平缓，灵敏度会降低。蛋白质分离中分离度提高的速度通常比灵敏度降低或峰量增加的速度更缓慢。这种现象在图2所示的IgG混合物分离结果中非常明显。将梯度斜率从3%减少至0.5%，人源化IgG和嵌合IgG峰的分离度仅略有提高，而灵敏度损失超过3倍，运行时间则增加了4倍。虽然改变梯度斜率是反相分离方法开发的一个可行工具，但我们建议在使用这种方法之前先尝试其它方法。

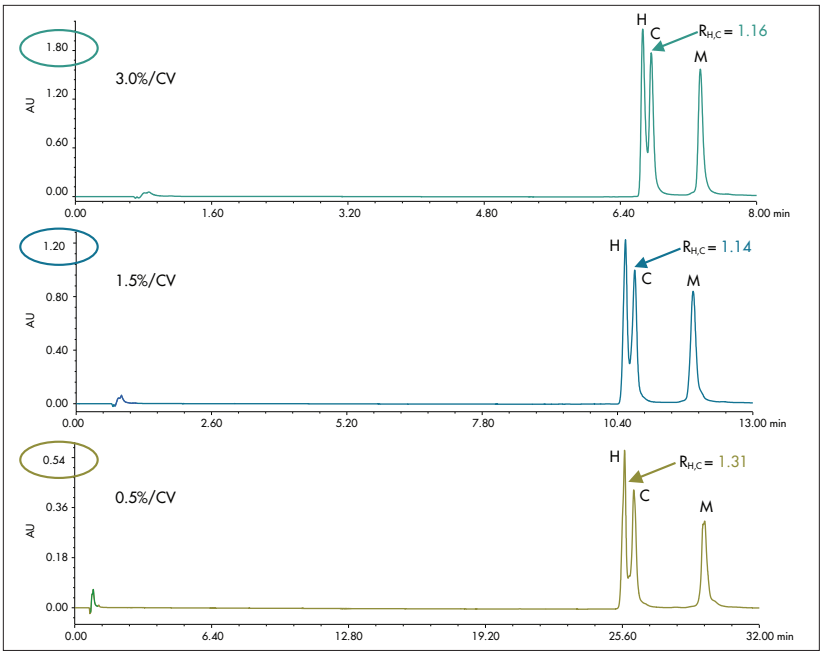

图2. 使用不同的梯度斜率在80°C条件下分离人源化单克隆抗体(H)、嵌合单克隆抗体(C)和小鼠单克隆抗体(M)的混合物。将梯度斜率从3%减少至0.5%，分离度仅略有提高，但灵敏度损失了3倍以上，运行时间增加了4倍，峰量增加了5倍。

有机溶剂和流动相改性剂浓度

改变有机溶剂可以改变分离的选择性。过去，人们选用乙腈作为蛋白分离的溶剂。异丙醇(IPA)的使用也较为普遍。但我们很少使用IPA浓度较高的梯度，因为此类溶剂混合物的粘度会使仪器的压力升高。因此，乙腈/异丙醇混合物(3:7)成为了更有利的条件。ACQUITY UPLC仪器可承受较高压力，我们可以使用到100%异丙醇，如图3所示，在IPA洗脱下，所有蛋白均更早出峰，对于该样品，我们还可观察到一些低含量组分分离度的提高。

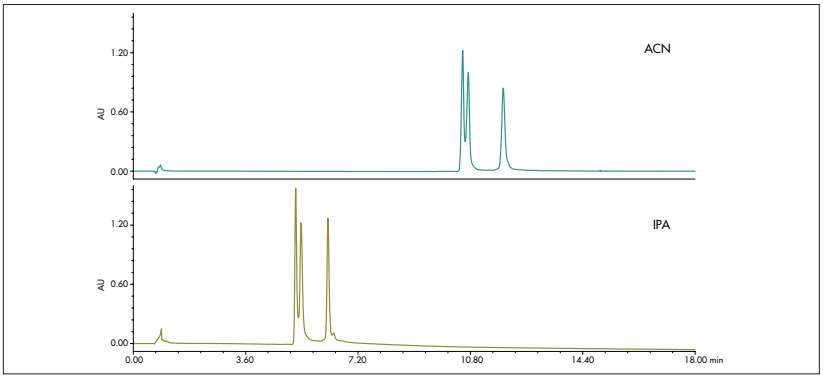

图3. 分别使用乙腈(ACN)和异丙醇(IPA)作为洗脱溶剂，在80°C条件下分离单克隆抗体混合物。使用IPA作为洗脱剂时可观察到保留时间缩短及痕量成分分离度的提高。

酸性改性剂的种类和浓度也可影响分离。甲酸是质谱应用领域的优选改性剂，而使用三氟乙酸(TFA)可得到更好的峰形。改变酸的浓度可以改变分离的选择性。通常，低浓度的三氟乙酸(TFA)会使蛋白质峰较早地洗脱出来，这种现象反映出离子对的减少。

许多有机溶剂和酸浓度的组合都可用于分离方法的开发。这一过程可应用Auto•Blend™技术进行简化，而简化过程将具体体现在四元溶剂ACQUITY UPLC H-Class系统的应用上。图4展示的优选系统配置可用于测试有机溶剂和流动相改性剂浓度对蛋白质分离的影响。待测条件以来自四条溶剂管路流量百分比的形式被编入方法程序。例如，将TFA与一系列不同百分比的浓缩酸性改性剂混合，配制成不同浓度的TFA并进行测试。图5所示的蛋白质分离结果使用了上述方法。在较低的TFA浓度下所有峰的洗脱时间均有所提前，其中肌红蛋白的洗脱时间相对于其它蛋白质提前最多。我们还注意到，较低的TFA浓度还会导致峰形普遍较宽，而这可使分离度降低，如图5中所示的磷酸化酶B的不同峰形。改变改性剂的浓度是进行方法开发的一个非常有用的工具，尤其是在我们需要改变选择性的情况下。同样的方法还可以用于比较不同的有机溶剂。

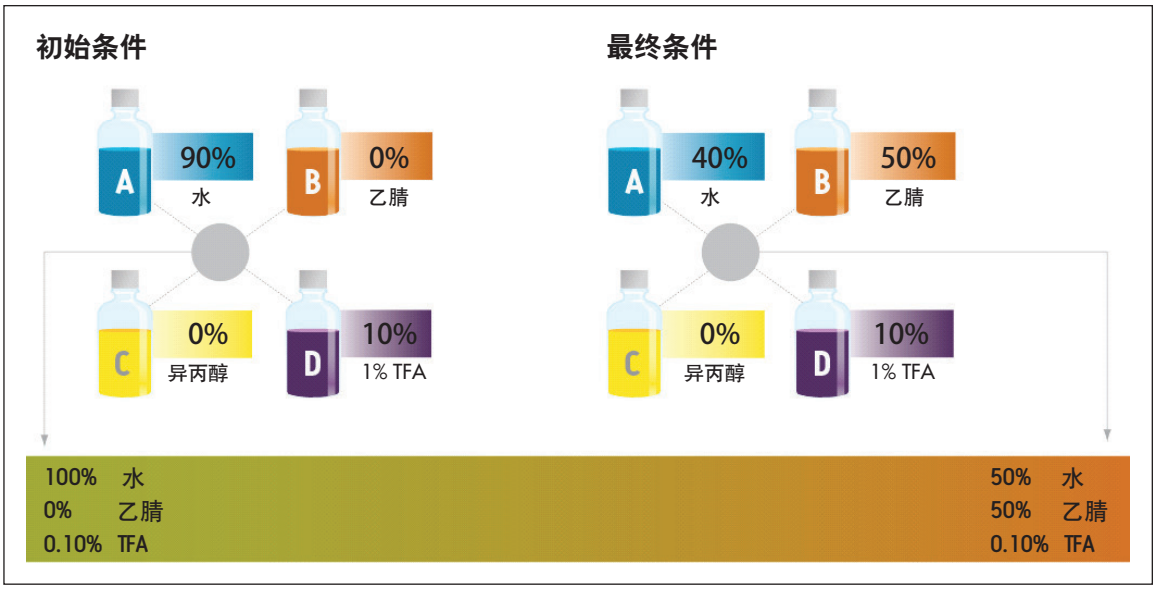

图4. ACQUITY H-Class系统四条溶剂管路的一种可能的配置示例。Auto•Blend技术使用户在开发方法时能够混合不同比例的浓缩改性剂，以及在单组分析时使用不同的有机溶剂。

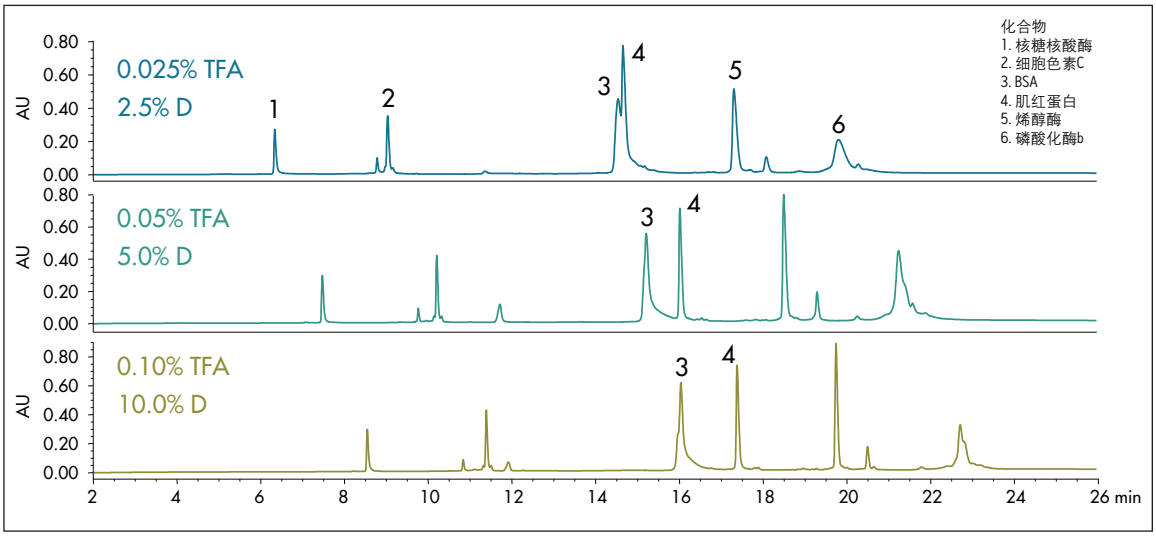

图5. 其它条件保持不变，在40 ℃条件下使用不同浓度的TFA对蛋白质测试混合物进行分离。

柱温

柱温度对分子的反相分离有很大影响。在小分子分离中，柱温变化所导致的回收率和选择性变化并不少见。升高温度可以显著改善蛋白(尤其是完整的单克隆抗体)的回收率(图6)，而通常不会影响分离选择性[2]。但并非所有的蛋白都需要通过升高分离温度来提高回收率。事实上，一些蛋白在较低的分离温度下反而会获得更理想的分离结果。因此，我们建议在所有新样品的方法开发策略中加入对温度的评估。

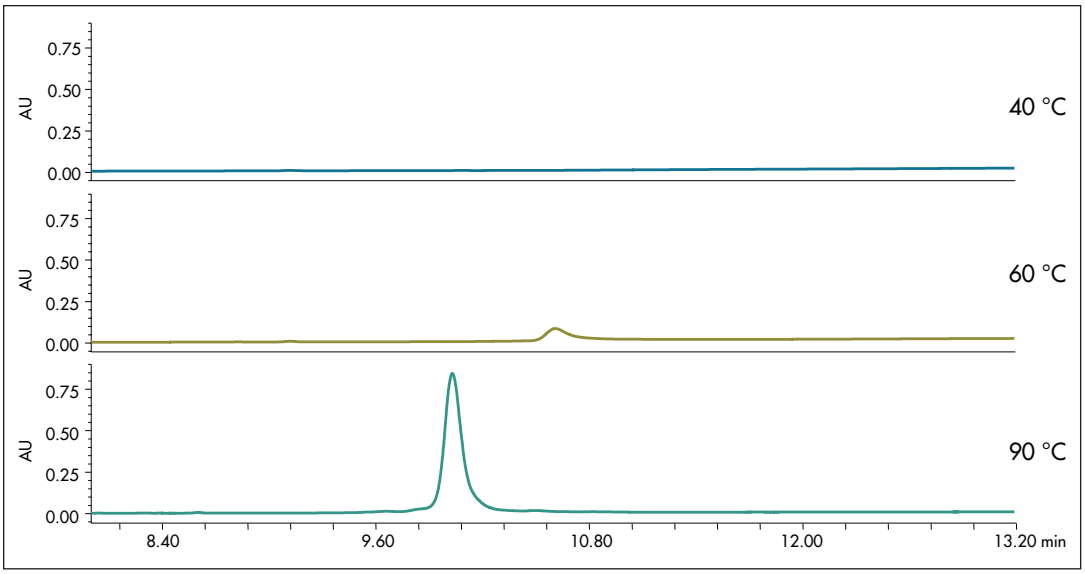

图6. 在40 °C条件下，完整的IgG样品没有获得明显的峰，但随着温度的升高，IgG样品的回收率逐渐提高。80 °C以上没有可测量的回收率增加或峰形改善。

色谱柱柱长

增加色谱柱的柱长将提高其分离能力。如图7中蛋白混合物的分离所示。使用较长的色谱柱时，我们可以更清晰地看到磷酸化酶b峰旁边的其它小峰(如插图中所示)，但与此同时，运行时间增加3倍，灵敏度损失了约40%。我们可以根据不同的应用目的来选择这一能够改善分离度的有用参数。

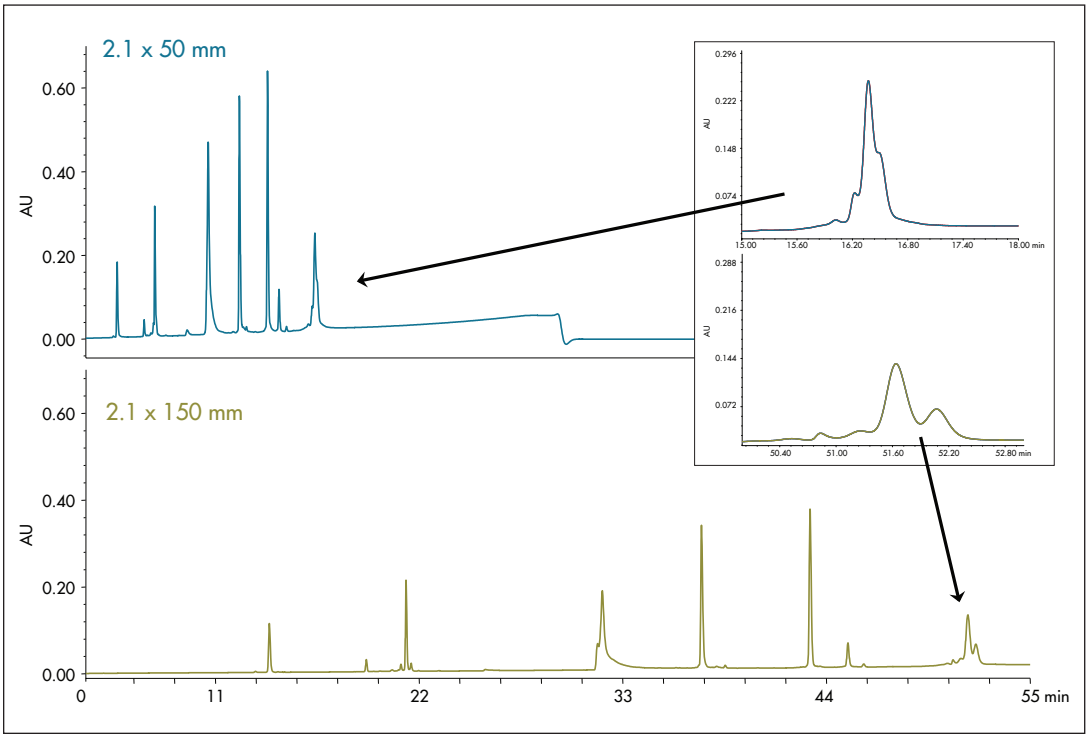

图7. 在40 °C条件下分离蛋白质混合物，使用较长的色谱柱时，可以更清晰地看到磷酸化酶b峰旁边的其它小峰的分离度明显提高(插图所示)。但分离度的提高是以运行时间增加3倍、灵敏度损失约40%为代价得到的。

流速

流速很少被视为方法开发中的重要参数，它通常仅被当作用于修正梯度斜率的一个间接参数。然而，这一变量对大分子物质却有着显著的影响。图8比较了蛋白质混合物在200 µL/min和75 µL/min流速下的分离情况。插图展示了在较低流速下磷酸化酶b分离度的改善和灵敏度的增加。

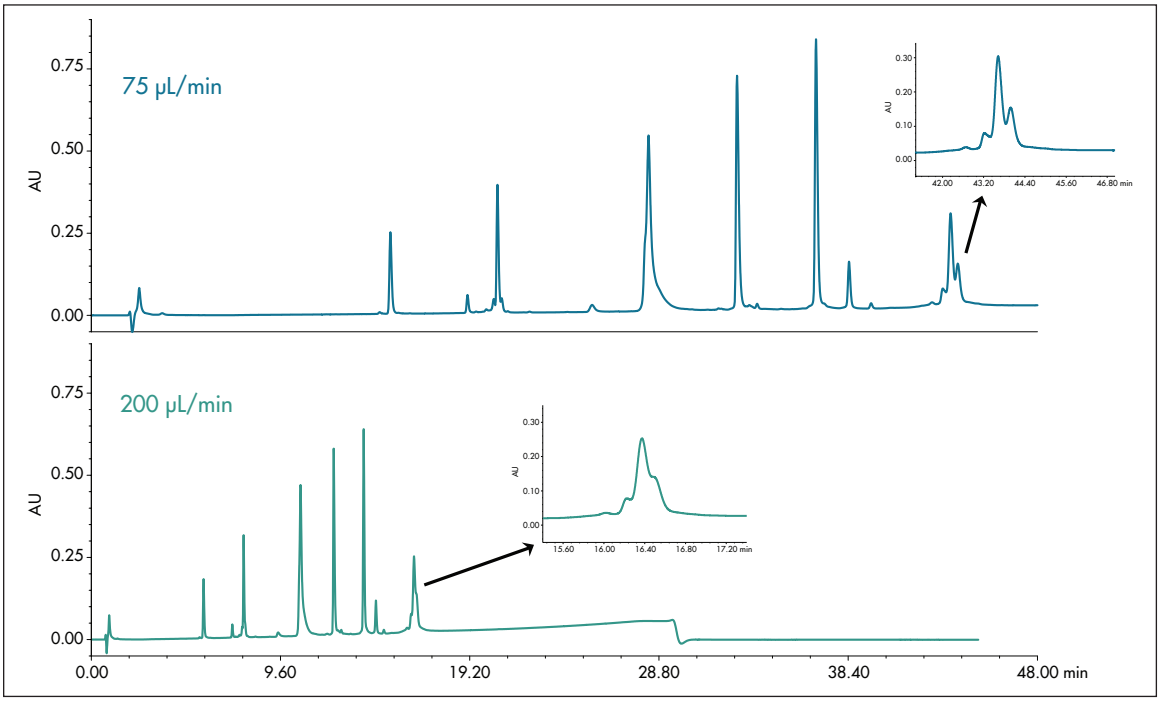

图8. 蛋白质混合物在40 ℃、不同流速条件下的分离结果表明，降低流速可提高分离度，而不影响灵敏度。在较低的流速下，磷酸化酶b亚基的分离度得到改善(如插图所示)。分离的运行时间根据其流速成比例地增加，以使两次分离保持相同的梯度斜率。

结论

色谱工作者在进行蛋白分离的方法开发时，有多种参数可以选择。在选择调整方法的途径时，必须充分考虑分析的目标。

与小分子物质的分离不同，蛋白的分离不容易出现明显的分离度变化。因此，本文所讨论的大多数变量仅能较小程度地改善分离度，并且有的还会以损失灵敏度和增加运行时间为代价。但不可否认的是，具有更小粒径的色谱柱的确能够在不损失灵敏度或增加运行时间的情况下提高分离度。在此基础上，我们可以通过调控流速、色谱柱柱长、梯度斜率和改性剂的浓度来进一步提高分离度。

调节改性剂浓度是进行方法开发的一个有用工具。它可以通过适当地改变选择性提供分离度的改善。此外，改变改性剂浓度还可影响峰形和检测。

Auto•Blend技术是一种方便高效的方法，可以系统地优化改性剂浓度和有机溶剂选择对分离的影响。

调整柱温通常不会明显提高选择性，但它可对峰形和蛋白回收率产生显著影响。蛋白样品的理想分离温度不一定是可预测的。因此，最好能在评估蛋白的最适分离条件时考虑多个分离温度。

增加色谱柱柱长和降低流速都能够在增加运行时间的基础上提高分离度。但是，降低流速或使用较长色谱柱均不会影响灵敏度。较长的色谱柱允许更大的进样量，这对于痕量成分的分析有一定价值。

更小粒径的颗粒可带来灵敏度、分离度和运行时间方面的优势，而这些优势只有在UPLC系统的整体设计中才能最好地体现出来。

参考文献

[1] Developing Protein Separation Method on a Reversed-Phase UPLC Column, Waters poster 720002974EN

[2] Protein Separation Technology ACQUITY BEH300 C_4, 1.7 µm, Waters care and use manual 715001870EN

扫一扫，关注沃特世微信

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters、The Science of What's Possible、ACQUITY UPLC、ACQUITY、Empower和UPLC是沃特世公司的注册商标。
MassPREP、Auto Blend是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2011年 沃特世公司 中国印刷 2011年5月 720003875ZH KK-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 5999
成都：028 - 6765 3588
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com