

使用离子交换色谱柱快速分析IgG电荷异质性

考察强、弱阳离子交换色谱柱，以及流动相pH值对其分离状况的影响

摘要

治疗性抗体药物市场正进入快速增长期。2013年，全球十大畅销药物品牌中有六个是单克隆抗体（mAb）药物。在过程监控和质量控制中需要对多聚体和片段的含量、糖基化模式和带电异构体等这些主要产品特性进行检测。本文使用了阳离子交换色谱柱TSKgel STAT对mAb电荷异质性进行了快速分析。

简介

天冬酰胺或谷氨酰胺残基的脱酰胺作用，或者C末端赖氨酸残基的缺失都会导致蛋白质电荷异构体的产生。除等电聚焦外，离子交换色谱法是分析蛋白质电荷异质性的首选方法。TSKgel STAT色谱柱装填的是无孔聚合物基质固定相，专利的表面改性技术确保了颗粒表面覆盖有高密度的带电基团。与传统的多孔型IEX固定相相比，STAT色谱柱可以在较短的分析时间内进行高分辨率的分析。TSKgel STAT色谱柱系列产品既包括弱阳离子交换剂（WCX，羧甲基），也包括强阳离子交换剂（SCX，磺丙基）。建议与死体积较小的色谱系统（例如UHPLC）配合使用，可以发挥最佳性能。

结果

使用弱阳离子交换色谱柱TSKgel CM-STAT和强阳离子交换色谱柱TSKgel SP-STAT，对两种单克隆抗体的电荷异构体进行了分析。图1显示的是在pH 7条件下两根色谱柱上对mAb A的分析结果。对于该IgG，弱阳离子交换色谱柱可以更好地将异构体从主峰中分离出来。mAb B的情况则与之不同，如图2所示，强阳离子交换色谱柱表现出了更好的分离性能。图3是TSKgel SP-STAT对mAb B的分离情况，可以看出流动相的pH值会影响电荷异构体的保留时间和分离度。

讨论

强、弱阳离子交换色谱柱为分析蛋白质电荷异质性提供了不同的选择。为了将酸性和碱性异构体从主峰上更好地分离出来，在方法开发时应在不同pH值流动相条件下评估两种色谱柱的分离性能。TSKgel STAT系列色谱柱能够在短时间内高分辨率分离异构体，非常适合用在UHPLC或HPLC系统上对生物药进行质控分析。

pH 7.0条件下强/弱阳离子交换柱上mAb A的分析

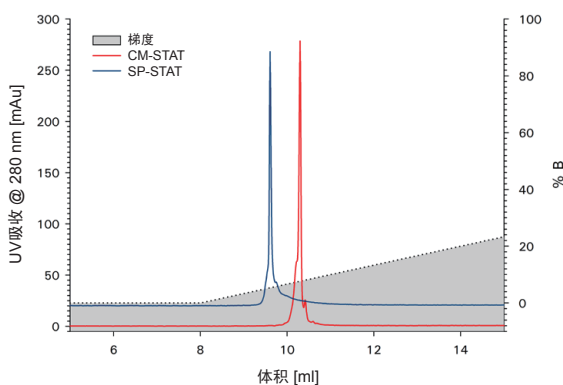


图1

pH 7.0条件下强/弱阳离子交换柱上mAb B的分析

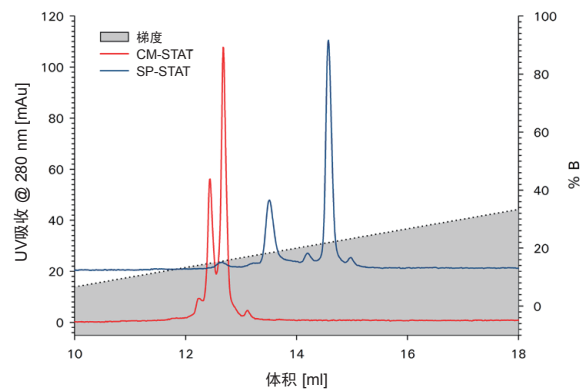


图2

实验条件

色谱柱: TSKgel SP-STAT (7 μm, 4.6 mm ID×10 cm);
TSKgel CM-STAT (7 μm, 4.6 mm ID×10 cm)

流动相 A: 10 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液
pH 7.0 (图1、2、3)
10 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 pH 6.0
(图3)
10 mmol/L 醋酸盐缓冲溶液 pH 5.0
(图3)

流动相 B: 100 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 pH 7.0 +
500 mmol/L NaCl (图1、2、3)
100 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液, pH 6.0 +
500 mmol/L NaCl (图3)
100 mmol/L 醋酸盐缓冲溶液, pH 5.0 +
500 mmol/L NaCl (图3)

梯度: 50分钟内0~100 % B

流速: 1 mL/min

进样量: 10 μL

检测: UV @ 280 nm

样品: mAb A (2 g/L); mAb B (2 g/L)

阳离子交换分离状况与流动相pH值的关系考察

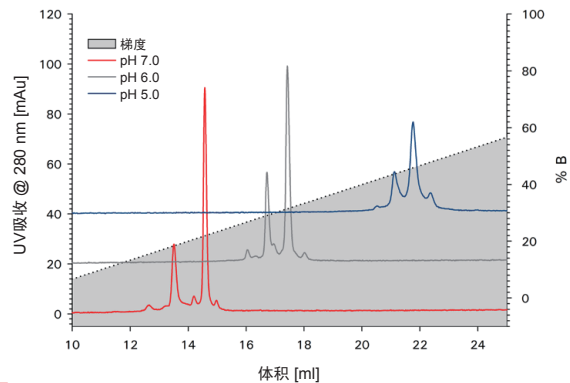


图3