

在线二维液相色谱法分析单抗药物滴度和大小变异体

LC-423

摘要：本文建立了在线二维液相色谱法同时测定单抗药物滴度和大小变异体含量的方法。一维采用 Protein A 亲和色谱柱分离单抗和杂质后测定单抗药物滴度，一维校准曲线范围为 0.03~6 mg/mL，线性相关系数 r 为 0.9999，线性佳。分析实际单抗样品，加标浓度为 1 mg/mL 时回收率为 100.7%，准确度高。将一维分离得到的目标物经阀切换至第二维，通过 SEC 法分离单抗单体和大小变异体，单体与聚集体和碎片的分离度分别为 1.77 和 1.41，分离度高。测得单体含量为 91.69%，重复分析 6 次，保留时间 RSD 为 0.014%，含量 RSD 为 0.73%，重复性佳。

关键词：二维液相色谱 单抗 滴度 大小变异体

技术特点：

- ❖ 采用二维液相色谱法，同时完成单抗药物的滴度和大小变异体分析，操作简便且效率高。
- ❖ 本方法一维滴度分析准确性高，二维大小变异体分析分离度高、重复性佳。

在单克隆抗体（单抗）药物的生产过程中，需测定细胞培养上清液中单抗的滴度或浓度，以选出高产量的单抗药物。此外，在药品的生产过程中还可能会产生聚集体和碎片，其与主产品具有不同的药效，有时会引起严重的副作用。所以，为了保证单抗药物的效价和纯度，滴度和大小变异体是单抗药物常见的分析检测项目。

滴度和大小变异体是两个不同的分析项目，一般情况下需两套液相系统才能完成实验，且大小变

异体分析需进行 SPE 前处理操作后才能开展。为了提高分析效率，缩减成本支出，本文介绍了一种采用在线二维液相色谱法测定单抗药物的滴度和大小变异体含量的方法。一维使用 Protein A 亲和色谱柱对抗抗溶液进行分离，通过阀切换将收集到定量环中的单抗组分转移到二维，利用 SEC 色谱柱分离样品中的大小变异体和单体，从而实现全自动在线二维液相分离单抗药物的目的。

实验部分

1.1 仪器

高效液相色谱仪 LC-40D XR，具体配置信息如下：

系统控制器：CBM-40

脱气机：DGU-405

输液泵：LC-40D XR×3

自动进样器：SIL-40C XR

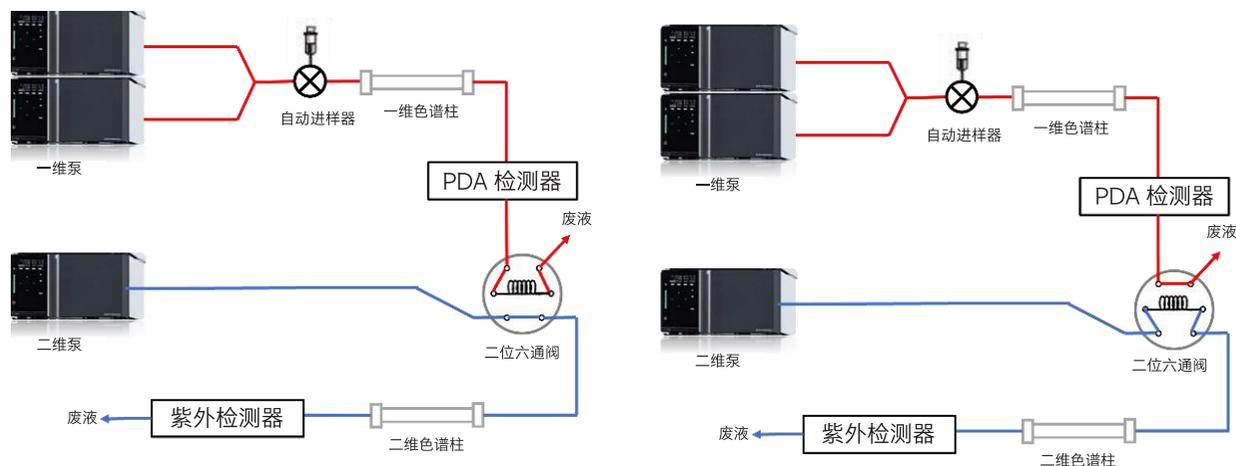
色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.118

柱温箱：CTO-40C

切换阀：FCV-0206H

检测器 1：SPD-M40

检测器 2：SPD-40



一维液相色谱进行梯度分析并将单抗组分导入定量环

定量环中单抗组分导入至二维液相色谱进行 SEC 分析

图 1 二维液相色谱系统流路图

1.2 分析条件

色 谱 柱：一维：SHIMSEN Ankylo Protein A(30 mm×2.1 mm., 15 μm, 岛津（上海）实验器材有限公司, P/N: 380-01215-74)

二维：SHIMSEN Ankylo SEC-300 (300 mm×7.8 mm., 3 μm, 岛津（上海）实验器材有限公司, P/N: 380-01215-10)

流 动 相：一维：A 相 -50 mmol/L 磷酸盐 +150 mmol/L 氯化钠溶液, B 相 -100 mmol/L 甘氨酸 +150 mmol/L 氯化钠溶液

二维：50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 +200 mmol/L 氯化钠, pH 7.0

进 样 体 积：10 μL

流 速：一维：1 mL/min; 二维：0.8 mL/min

柱 温：25℃

阀 切 换：见表 2

洗 脱 方 式：一维：梯度洗脱, B 相初始浓度为 0%, 时间程序见表 1。

二维：等度洗脱

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
1.00	泵	Pump B Conc.	0
1.10	泵	Pump B Conc.	100
2.50	泵	Pump B Conc.	100
2.60	泵	Pump B Conc.	0
25	控制器	Stop	

表 2 其他时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
Int.	柱温箱	CTO.RVR	1
1.75	柱温箱	CTO.RVR	0
1.90	柱温箱	CTO.RVR	1
25	控制器	Stop	

1.3 样品前处理方法

单抗样品直接上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 第一维分析单抗药物滴度

2.1.1 标准溶液色谱图及校准曲线

分析浓度为 0.03~6 mg/mL 的单抗标准溶液，得到色谱图如图 2 所示。以标准溶液浓度为横坐标，峰面积为纵坐标建立校准曲线，如图 3 所示，线性相关系数 r 为 0.9999，准确度为 97.3%~102.5%。

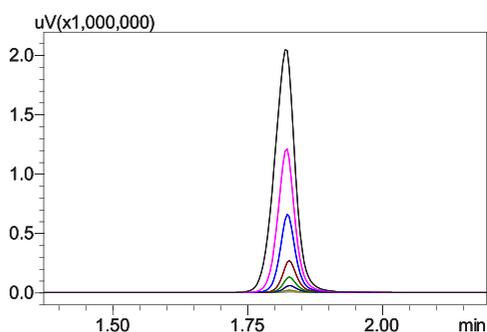


图 2 标准溶液色谱图（浓度为 0.03~6 mg/mL）

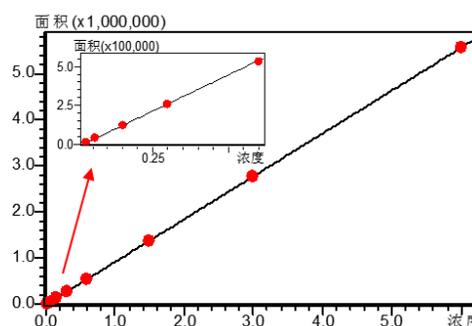


图 3 校准曲线

2.1.2 重复性实验结果

将 0.06 mg/mL 标准溶液重复分析 6 次，色谱图如图 4 所示，考察重复性。计算得到保留时间 RSD 为 0.089%，峰面积 RSD 为 0.83%，重复性良好。

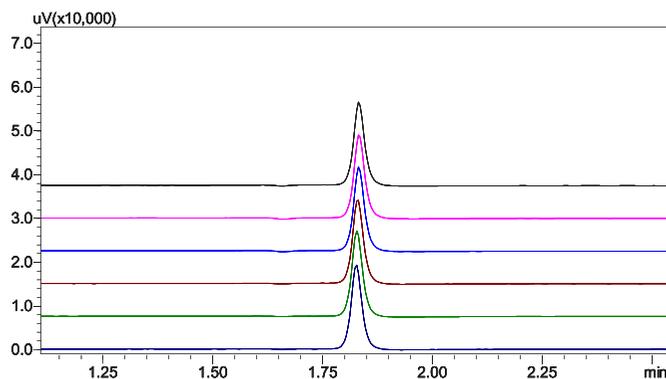


图 4 标准溶液重复分析色谱图（浓度为 0.06 mg/mL）

2.1.3 样品定量及加标结果

分析实际单抗样品，样品中单抗与杂质完全分离，计算得到单抗滴度为 1.766 mg/mL。根据样品滴度进行加标实验，加标量为 1 mg/mL，重复 3 次，考察定量准确性。标准溶液、样品和加标后色谱图比较如图 5 所示，加标后平均浓度为 2.780 mg/mL，平均加标回收率为 100.7%，相对标准偏差为 0.61%。

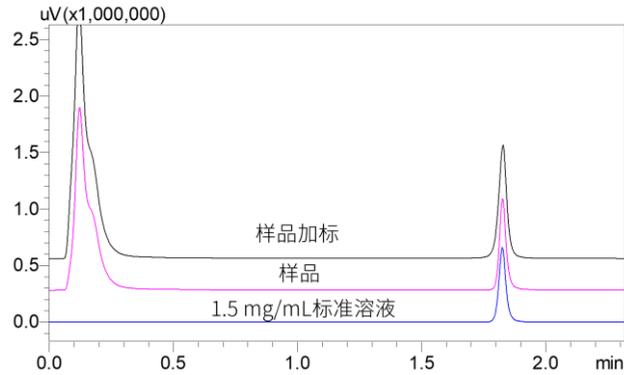


图5 标准溶液、样品和加标后溶液色谱图比较

2.2 第二维分析单抗样品大小变异体含量

本例中，第一维分离时单抗的出峰时间为 1.75~1.90 min，通过阀切换将单抗溶液切至定量环。接着在阀切换后第二维的流动相将定量环中单抗溶液冲洗至二维色谱柱，通过 SEC 方法分离测定单抗样品单体、聚集体和碎片。

第二维采集得到的色谱图如图 6 所示，其中单体和聚集体和碎片的分离度为 1.77 和 1.41，分离度高。通过面积归一化法计算得到单抗单体含量为 91.54%，其他聚集体和碎片含量见表 3。重复分析单抗样品 6 次，得到的色谱图如图 7 所示，单体保留时间 RSD 为 0.014%，含量 RSD 为 0.73%，重复性佳。

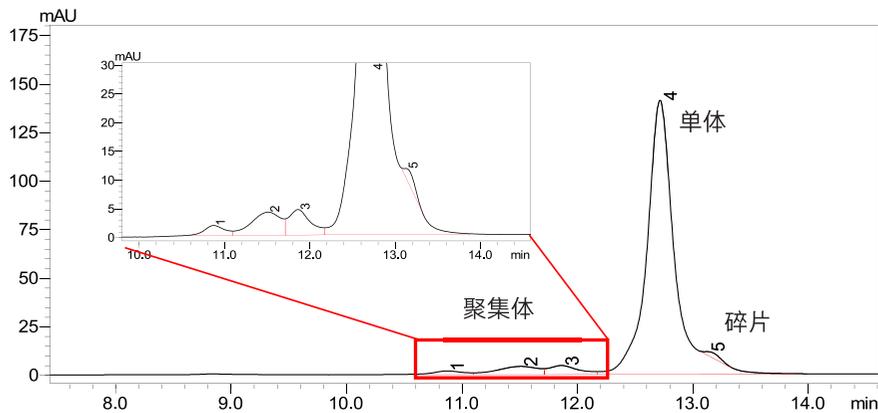


图6 单抗样品大小变异体分析色谱图

表3 单抗单体、聚集体和碎片峰面积及百分比

峰号	保留时间 (min)	峰面积	峰面积 (%)	分离度
1	10.872	27518	1.062	/
2	11.511	94296	3.641	1.02
3	11.866	77003	2.973	0.51
4	12.719	2371014	91.544	1.77
5	13.131	20197	0.78	1.41

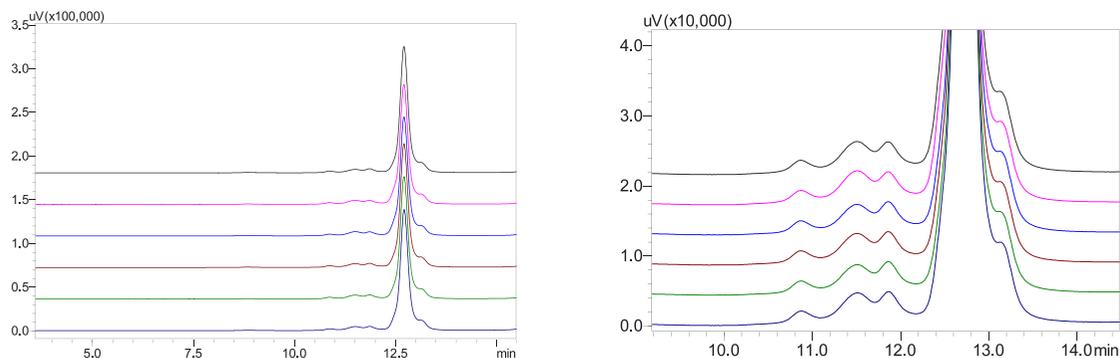


图7 单抗样品大小变异体分析重复性结果（右侧为放大图）

■ 结论

本文建立了在线二维液相色谱法同时分析单抗药物滴度和大小变异体的方法。一维采用 Protein A 亲和色谱柱分析单抗药物滴度，经过一维液相色谱分离纯化后，通过阀切换将单抗组分导入至二维，采用 SEC 法进行大小变异体分析。本方法操作简便且效率高，可实现全自动在线二维液相分析单抗药物滴度和大小变异体。

岛津应用云

