



TOSOH

No.116

SEPARATION REPORT

高性能 SEC 色谱柱 TSKgel[®] UP-SW3000

	页码
1.前言	1
2.TSKgel UP-SW3000 色谱柱的基本特性	1
2-1. 填料的特点	1
2-2. 标准曲线和分离性能	1
2-3. 洗脱液盐浓度对蛋白质出峰结果的影响	3
2-4. 测定流速的影响	5
2-5. 样品载量及样品进样量的影响	7
2-6. 色谱柱外（管路中）扩散作用的影响	8
2-7. 色谱柱的耐用性	10
2-8. 填料的批间差异	11
2-9. 与 TSKgel G3000SW _{XL} 的对比	12
2-10. 与市售 UHPLC 用 SEC 色谱柱的对比	13
3.分离实例	15
3-1. 抗体类药物的精密分析	15
3-2. 抗体木瓜蛋白酶消化物的分离实例	16
4.总结	16

1.前言

抗体药物中使用的单克隆抗体,在生产、贮藏或运输过程中可能会形成二聚体等凝聚物,存在引发不良反应的风险因素,故在质量控制中采用体积排阻色谱法(SEC)对单克隆抗体进行分离分析。现有的 TSKgel G3000SW_{XL} 色谱柱常用于此用途,但仍需要更高分离度以及更短分析时间的 SEC 分析技术。现在 2 μ m 粒径的高性能 SEC 色谱柱 TSKgel UP-SW3000 已实现了商品化。在本报告中,介绍了 TSKgel UP-SW3000 色谱柱的基本特性及其分离实例。

表 1: 填料特性、色谱柱规格

	本色谱柱		现有色谱柱		
	TSKgel UP-SW3000		TSKgel UltraSW Aggregate	TSKgel SuperSW mAb HR	TSKgel G3000SW _{XL}
色谱柱尺寸	4.6 mm I.D. x 30 cm	4.6 mm I.D. x 15 cm	7.8 mm I.D. x 30 cm	7.8 mm I.D. x 30 cm	7.8 mm I.D. x 30 cm
基可质	硅胶		硅胶	硅胶	硅胶
官能团	二醇基		二醇基	二醇基	二醇基
粒径	2 μ m		3 μ m	4 μ m	5 μ m
孔径	25 nm		30 nm	25 nm	25 nm
分子量排阻界限	800 kDa		2,500 kDa (推算值)	800 kDa	800 kDa
分子量测定范围	10 ~500 kDa		10 ~2,000 kDa	10 ~500 kDa	10 ~500 kDa
用途	抗体(二聚体/单体/片段)的高效分离分析	抗体(二聚体/单体)的快速分析	抗体(多聚体)的高效分离分析	抗体(二聚体/单体)的高效分离分析	一般蛋白质、抗体(二聚体/单体)的高效分离分析

2-2. 标准曲线和分离性能

使用 TSKgel UP-SW3000、TSKgel SuperSW3000 (4 μ m) 及 TSKgel G3000SW_{XL} (5 μ m) 测定标准蛋白质的色谱图对比如图 1 所示,采用标准蛋白质制成的校正曲线对比如图 2 所示。具有相同孔径特性的 TSKgel UP-SW3000、TSKgel SuperSW3000 及 TSKgel G3000SW_{XL} 中,甲状腺球蛋白的二聚体及多聚体不会渗入小孔内而排出,进入间隙体积(V_0) (图 1),校正曲线的斜率相同(图 2)。表 2

2.TSKgel UP-SW3000 色谱柱的基本特性

2-1. 填料的特性

表 1 所示为 TSKgel UP-SW3000 色谱柱的填料特性、色谱柱规格,以及与常用于抗体分离的现有 SW 型色谱柱的性能对比。TSKgel UP-SW3000 色谱柱是以 25nm 孔径硅胶表面导入二醇基后形成的 2 μ m 微粒为填料的色谱柱。与现有 SW 型色谱柱相比,具有更高的分离性能,适用于抗体二聚体及单体的分离。

所示为样品核糖核酸酶 A 的理论塔板数。粒径较小的 TSKgel UP-SW3000 比其他色谱柱的理论塔板数更高。

图 3 所示为使用 TSKgel UP-SW3000、TSKgel SuperSW3000、及 TSKgel G3000SW_{XL} 分离单克隆抗体的色谱图对比,表 3 所示为各溶出峰分离度(R)的对比。粒径较小的 TSKgel UP-SW3000 比其他色谱柱的分离度更高。

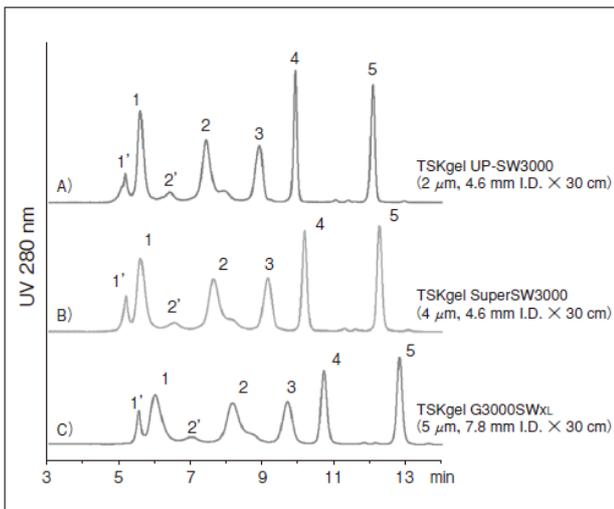


图 1 标准蛋白质的色谱图对比

〈检测条件〉

- 色谱柱: A) TSKgel UP-SW3000 (2 μm, 4.6 mm I.D. x 30 cm)
 B) TSKgel SuperSW3000 (4 μm, 4.6 mm I.D. x 30 cm)
 C) TSKgel G3000SW_{XL}, (5 μm, 7.8 mm I.D. x 30 cm)
- 洗脱液: 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7)
 + 100 mmol/L 硫酸钠
 + 0.05 % 叠氮化钠
- 流速: A, B) 0.35 mL/min, C) 1.0 mL/min
- 检测波长: UV 280 nm
- 温度: 25°C
- 进样量: 10 μL
- 样品: 1. 甲状腺球蛋白, 640,000 Da (1'甲状腺球蛋白的二聚体)
 2. γ-球蛋白, 155,000 Da (2'γ-球蛋白的二聚体)
 3. 卵白蛋白, 47,000 Da
 4. 核糖核酸酶 A, 13,700 Da
 5. 对氨基苯甲酸, 137 Da

表 2 色谱柱性能对比 (理论塔板数)

色谱柱	粒径	理论塔板数 (核糖核酸酶 A)
A) TSKgel UP-SW3000	2 μm	45,625
B) TSKgel SuperSW3000	4 μm	24,419
C) TSKgel G3000SW _{XL}	5 μm	18,325

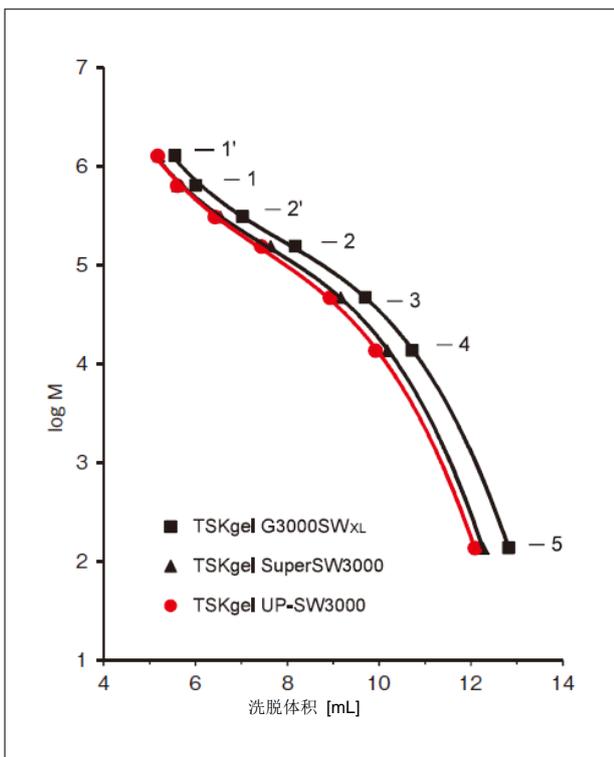


图 2 采用标准蛋白质制成的校正曲线对比

〈检测条件〉

- 色谱柱: TSKgel UP-SW3000 (2 μm, 4.6 mm I.D. x 30 cm)
 TSKgel SuperSW3000 (4 μm, 4.6 mm I.D. x 30 cm)
 TSKgel G3000SW_{XL}, (5 μm, 7.8 mm I.D. x 30 cm)
- 洗脱液: 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7)
 + 100 mmol/L 硫酸钠
 + 0.05 % 叠氮化钠
- 流速: A, B) 0.35 mL/min, C) 1.0 mL/min
- 温度: 25 °C
- 检测波长: UV 280 nm
- 进样量: 10 μL
- 样品: 1. 甲状腺球蛋白, 640,000 Da (1'甲状腺球蛋白的二聚体)
 2. γ-球蛋白, 155,000 Da (2'γ-球蛋白的二聚体)
 3. 卵清蛋白, 47,000 Da
 4. 核糖核酸酶 A, 13,700 Da
 5. 对氨基苯甲酸, 137 Da

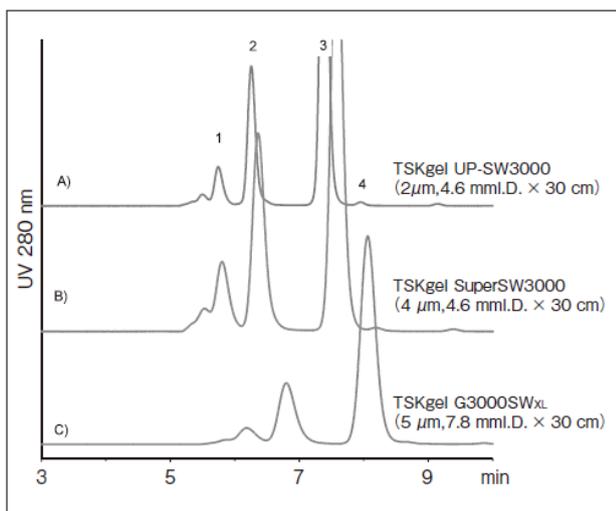


图3 单克隆抗体的色谱图对比

〈检测条件〉
 色谱柱: A) TSKgel UP-SW3000 (2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)
 B) TSKgel SuperSW3000 (4 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)
 C) TSKgel G3000SW_{XL} (5 μm, 7.8 mm I.D. × 30 cm)
 洗脱液: 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7) + 100 mmol/L 硫酸钠 + 0.05 % 叠氮化钠
 流速: A, B) 0.35 mL/min, C) 1.0 mL/min
 温度: 25 °C
 检测波长: UV 280 nm
 A, B) 微型比色皿, C) 标准比色皿
 进样量: 10 μL
 样品: IgG 人鼠嵌合单克隆抗体
 1. 三聚体, 2. 二聚体, 3. 单体
 4. 片段

表3 单克隆抗体峰的分高度 (R) 对比

色谱柱	粒径	R (峰 1/2)	R (峰 2/3)	R (峰 3/4)
A) TSKgel UP-SW3000	2 μm	5.02	3.50	2.70
B) TSKgel SuperSW3000	4 μm	2.16	1.53	1.19
C) TSKgel G3000SW _{XL}	5 μm	2.56	1.73	-

2-3. 洗脱液盐浓度对蛋白质出峰结果的影响

采用合理的 SEC 进行测定时, 必须抑制填料与测定物质之间的相互作用 (静电相互作用、疏水相互作用等)。以硅胶为基质的 TSKgel UP-SW3000 色谱柱, 填料表面残留的硅烷醇基和蛋白质之间发生静电相互作用 (离子排斥、离子吸附), 因此采用合适盐浓度的洗脱液抑制该作用非常重要。图 4 所示为通过改变磷酸缓冲液 (pH 6.7) 的浓度后, 标准蛋白质的洗脱效果。等电点 (pI) 低于洗脱液 pH 的甲状腺蛋白 (pI 4.5)、γ-球蛋白 (pI 5.1) 及卵黄蛋白 (pI 4.6), 由于在洗脱液中会带有负电荷, 因此在较低的盐浓度中, 会由于与残留的硅烷醇基之间的离子排斥而快速洗脱。一般情况下, 盐浓度越高粒子排斥效果越受到抑制, 随着磷酸缓冲液浓度的升高, 洗脱时间减缓, 当洗脱液中盐浓度高于 100 mmol/L 时, 洗脱时间即可保持稳定。DNP-L-丙氨酸等具有疏水部的化合物, 随着磷酸缓冲液浓度的升高, 疏水吸附作用导致洗脱时间减缓。另外, 等电点 (pI) 高于洗脱液 pH 的细胞色素 C (pI 10.1) 和溶菌酶 (pI 11.2) 在洗脱液中带

有正电荷, 由于与残留硅烷醇基产生静电相互作用, 会吸附于填料。图 5 所示为磷酸缓冲液浓度与碱性蛋白质峰面积的相关性。碱性蛋白质细胞色素 C 和溶菌酶, 在盐浓度较低的情况下会吸附于填料, 因此峰面积下降。随着磷酸缓冲液浓度的升高, 峰面积增大, 当磷酸缓冲液浓度高于 150 mmol/L 时, 峰面积几乎可以保持稳定。磷酸缓冲液的浓度越高, 越抑制静电吸附作用, 因此可以改善吸收峰拖尾现象, 显示良好的吸收峰形。故在检测碱性蛋白质时, 必须使用恒定离子强度的洗脱液。图 6 所示为, 通过采用磷酸缓冲液和在磷酸缓冲液中添加硫酸钠的洗脱液, 按照上述内容调节洗脱液的盐浓度使溶液的离子强度维持恒定, 从而抑制静电吸附相互作用, 可以得到恒定的峰面积。200 mmol/L 磷酸缓冲液即可得到恒定的峰面积, 在磷酸缓冲液中添加硫酸钠的洗脱液, 由于磷酸缓冲液浓度不一致, 一般添加 100 mmol/L ~ 150 mmol/L 的硫酸钠后可得到恒定的峰面积。磷酸缓冲液浓度越高, 越能在低浓度硫酸钠的洗脱条件下, 获得恒定的峰面积。

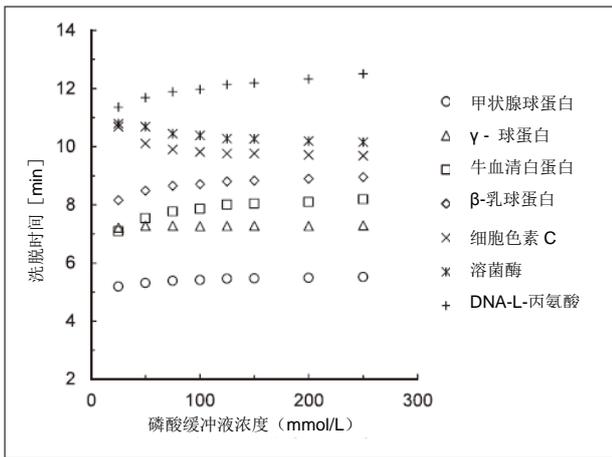


图 4 磷酸缓冲液浓度对洗脱时间的影响

〈检测条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW3000
(4.6 mm I.D. × 30 cm)
洗脱液: X mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7)
+ 0.05 % 叠氮化钠
流速: 0.35 mL/min
检测: UV 280 nm (微型比色皿)
温度: 25 °C
进样量: 10 μL (Rheodyne 公司 8125 型)
样品: 按表中记录

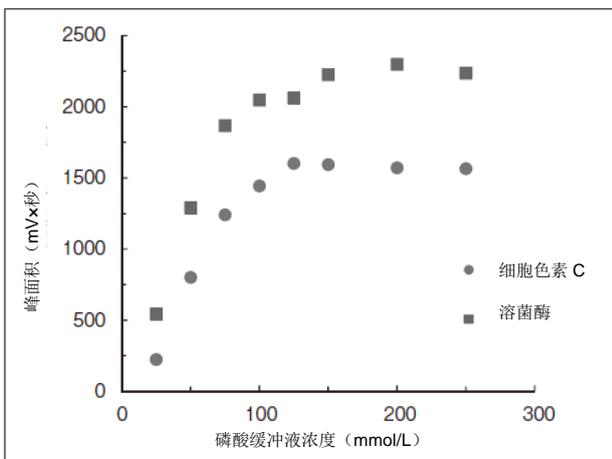


图 5 磷酸缓冲液浓度对峰面积的影响

〈检测条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW3000
(4.6 mm I.D. × 30 cm)
洗脱液: X mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7)
+ 0.05 % 叠氮化钠
流速: 0.35 mL/min
检测波长: UV 280 nm (微型比色皿)
温度: 25 °C
进样量: 10 μL (Rheodyne 公司 8125 型)
样品: 按表中记录

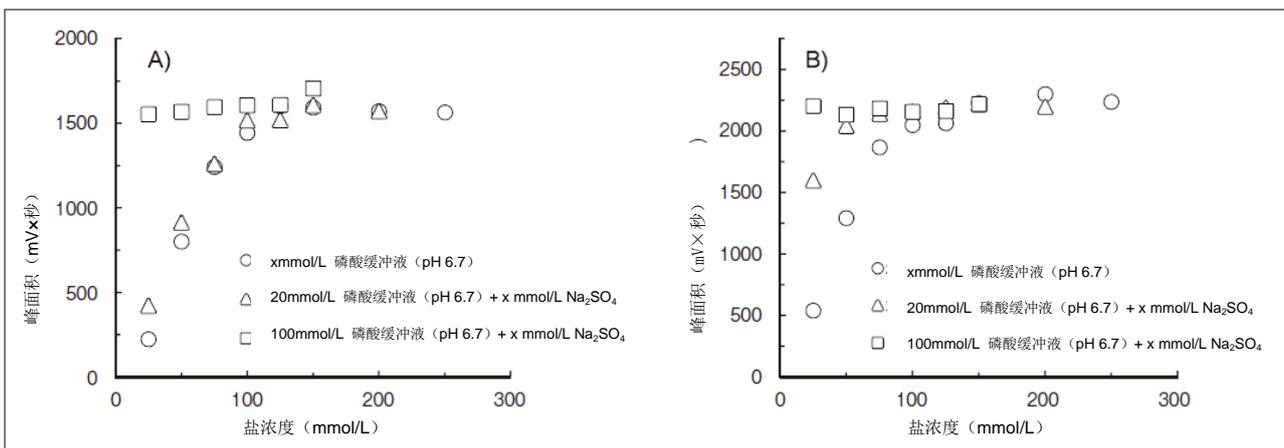


图 6 洗脱液盐浓度对峰面积的影响

〈检测条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW3000
(4.6 mm I.D. × 30 cm)
洗脱液: X mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7)
+ X mmol/L Na₂SO₄

流速: 0.35 mL/min
检测: UV 280 nm (微型比色皿)
温度: 25 °C
进样量: 10 μL (Rheodyne 公司 8125 型)
样品: A) 细胞色素 C、B) 溶菌酶

2-4. 测定流速的影响

通过采用不同分子量的两种蛋白质（牛血清白蛋白；BSA: Mw 66,500、核糖核酸酶 A: Mw 13,700）及低分子化合物对氨基苯甲酸（Mw 137），确认了测定时流速对理论塔板数的影响（图 7）。对氨基苯甲酸测定时流速越高，理论塔板数也越高。对氨基苯甲酸扩散系数较高，测定时流速减缓后因扩散导致理论塔板数减小。但是，分子量较大的蛋白质则随着流速减缓而呈现理论塔板数增大的趋势，分子量越大，越可以通过较低流速取得较高的理论塔板数。因此，在分离蛋白质时，通过减缓测定时流速，可以提高色谱柱的柱效，得到更好的分离效果。图 8 所示为流速减缓后 γ -球蛋白二聚体和单体的分离效果也得以提升。图 9 所示为 TSKgel UP-SW3000（粒径 2 μm ）和 TSKgel SuperSW mAb（粒径 4 μm ）的流速与 HETP（Height equivalent to a

theoretical plate: 理论塔板高度）的相关性。对氨基苯甲酸的任何粒径均随测定时流速加快，而呈现 HETP 减小，色谱柱的柱效也随之提高。相反，蛋白质随着测定流速加快而呈现 HETP 增大的趋势，分子量越大（分子尺寸较大）的蛋白质，色谱柱的柱效降低越明显。在填充了小粒径填料的 TSKgel UP-SW3000 色谱柱中，测定时流速对 HETP 的影响较小，提升测定时流速后可以抑制柱效降低，与填充大粒径的填料相比，可以说填充了小粒径填料 TSKgel UP-SW3000 色谱柱对高速分析非常有利。图 10 所示为提高流速后测定标准蛋白质的色谱图。通过将测定时流速调整为 0.50 mL/min，可在 5min 的分析时间内获得良好的分离效果。而且，图 11 还揭示了流速与压力之间的相关性。TSKgel UP-SW3000（30 cm 色谱柱）可在标准流速（0.35 mL/min）、35 MPa 以下的较低操作压强下使用。

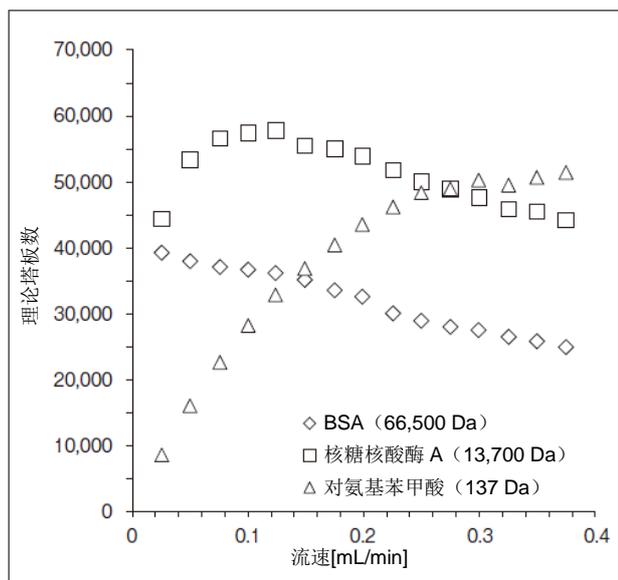


图 7 流速对理论塔板数的影响

〈检测条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW3000
(4.6 mm I.D. x 30 cm)
洗脱液: 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7)
+ 100 mmol/L 硫酸钠
+ 0.05 % 叠氮化钠
流速: 0.02~0.38 mL/min
检测: UV 280 nm (微型比色皿)
温度: 25 $^{\circ}\text{C}$
进样量: 10 μL (Rheodyne 公司 8125 型)
样品: BSA, 66,500 Da
核糖核酸酶 A, 13,700 Da
对氨基苯甲酸, 137 Da

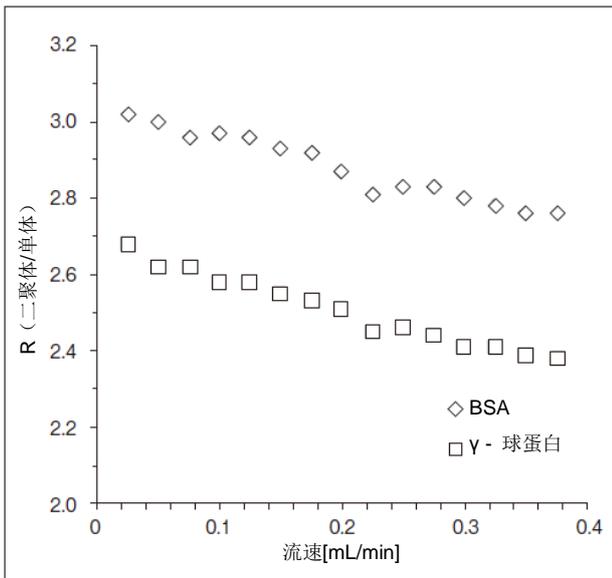


图 8 流速与分离度 R (二聚体/单体) 的相关性

〈检测条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW3000
(2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)
洗脱液: 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7)
+ 100 mmol/L 硫酸钠 + 0.05% 叠氮化钠
流速: 0.02~0.38 mL/min
检测: UV 280 nm (微型比色皿)
温度: 25 °C
进样量: 10 μL (Rheodyne 公司 8125 型)
样品: BSA,
人 γ-球蛋白 (多克隆)

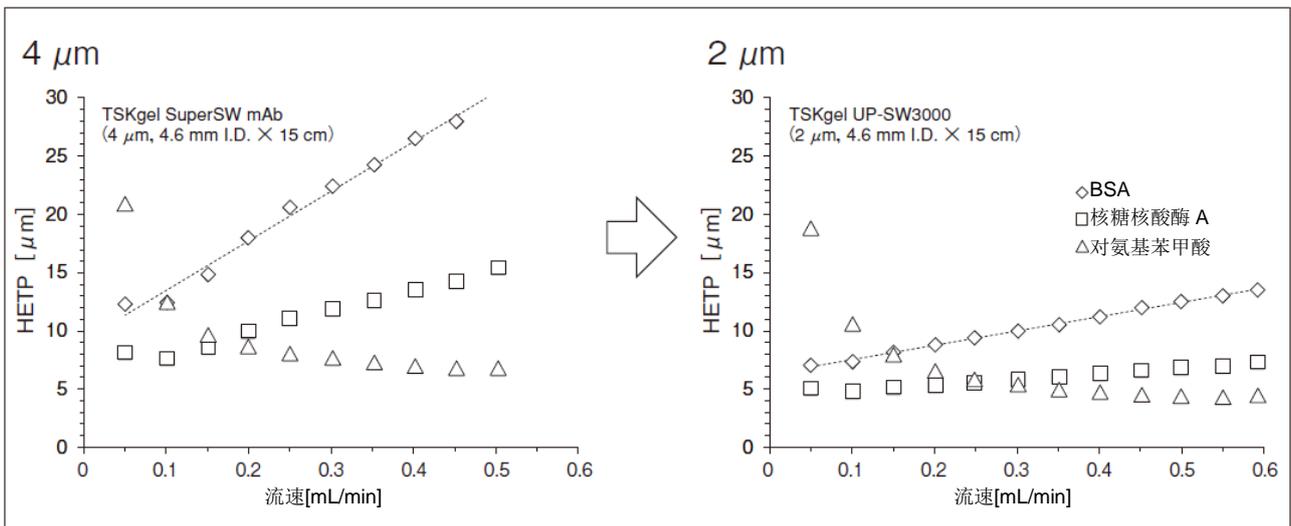


图 9 不同粒径的 SEC 色谱柱流速与 HETP 的相关性

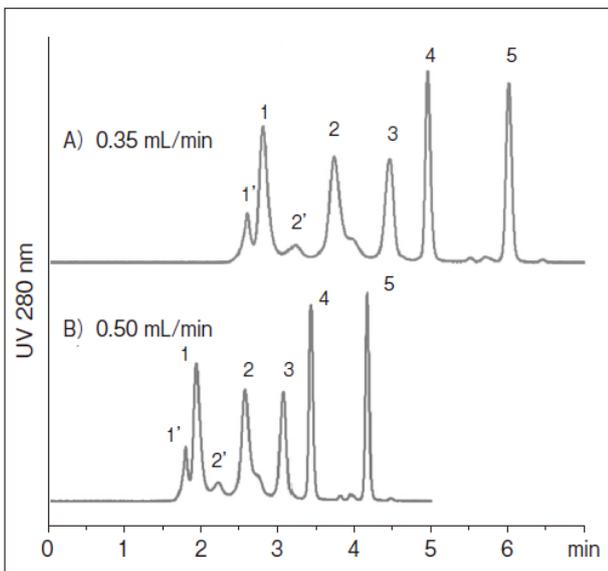


图 10 高流速条件下标准蛋白质的分离

〈检测条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. × 15 cm)
洗脱液: 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7)
+ 100 mmol/L 硫酸钠
+ 0.05 % 叠氮化钠
流速: A) 0.35 mL/min, B) 0.50 mL/min
检测: UV 280 nm (微型比色皿)
温度: 25 °C
进样量: 5 μL (Rheodyne 公司 8125 型)
样品: 1. 甲状腺球蛋白, 640,000 Da
(1'甲状腺球蛋白的二聚体)
2. γ-球蛋白, 155,000 Da
(2'γ-球蛋白的二聚体)
3. 卵白蛋白, 47,000 Da
4. 核糖核酸酶 A, 13,700 Da
5. 对氨基苯甲酸, 137 Da

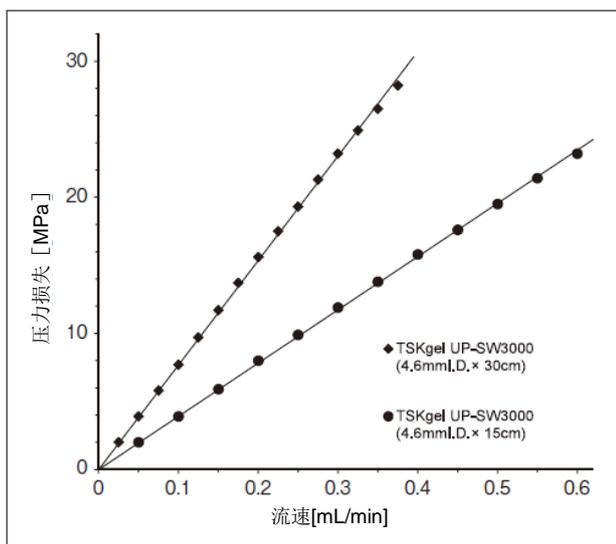


图 11 流速与压力的相关性

2-5. 样品载量及样品进样量的影响

采用牛血清白蛋白 (BSA), 核糖核酸酶 A 和对氨基苯甲酸, 确认了 4.6 mm I.D. × 15 cm 色谱柱及 4.6 mm I.D. × 30 cm 色谱柱的样品载量。测定 15 cm 色谱柱的样品进样量为 5 μ L, 30 cm 色谱柱的样品进样量为 10 μ L, 图 12 所示为各色谱柱的样品载量与理论塔板数的相关性。如为 15 cm 色谱柱, BSA 载量为 50 μ g 以上, 核糖核酸酶 A 载量为 37.5 μ g 以上时, 观察到理论塔板数下降。如为 30 cm 色谱柱, BSA 载量为 100 μ g 以上, 核糖核酸酶 A 载量为 70 μ g 以上时, 观察到理论塔板数严重下降。据此认为, 标准蛋白质的载量为色谱柱每 15cm 负载 35~50 μ g, (30 cm 色谱柱则负载 70~100 μ g)。

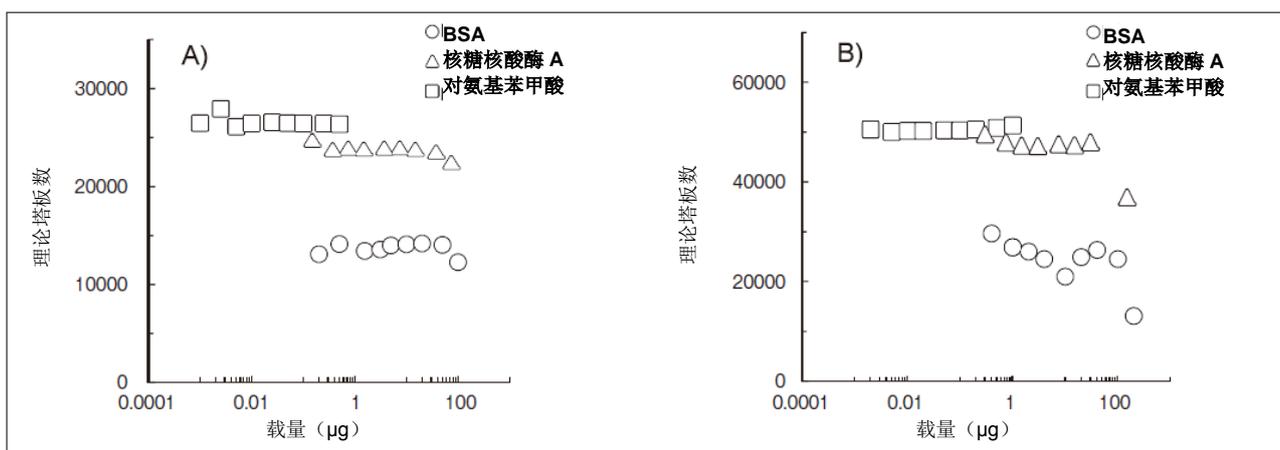


图 12 样品载量与理论塔板数的相关性

〈检测条件〉

色谱柱: A) TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. × 15 cm) B) TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. × 30 cm)
 洗脱液: 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7) + 100 mmol/L 硫酸钠 + 0.05 % 叠氮化钠
 流速: 0.35 mL/min 检测: UV 280 nm (微型比色皿) 温度: 25 $^{\circ}$ C
 进样量: A) 5 μ L, B) 10 μ L (Rheodyne 公司 8125 型)

〈检测条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW3000
 (4.6 mm I.D. × 30 cm, 4.6 mm I.D. × 15 cm)
 洗脱液: 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7)
 + 100 mmol/L 硫酸钠 + 0.05 % 叠氮化钠
 流速: 0.025 ~ 0.59 mL/min
 温度: 25 $^{\circ}$ C

分别制备 BSA、核糖核酸酶 A 及对氨基苯甲酸样品, 使其上样量分别达到 2 μ g、1.5 μ g 及 0.01 μ g, 并确认进样量对理论塔板数的影响。图 13 所示为各色谱柱的进样量与理论塔板数的相关性。15cm 色谱柱、30cm 色谱柱在 2 μ L 进样量内未见理论塔板数下降, 但在 2 μ L 以上进样量时, 随着进样量增加理论塔板数不断下降。而且, 15cm 色谱柱在 5 μ L 进样量, 30cm 色谱柱在 10 μ L 进样量下, 理论塔板数下降 10~15 % 左右。建议 TSKgel UP-SW3000 的 15cm 色谱柱采用 5 μ L 以下的进样量, 30cm 色谱柱采用 10 μ L 以下的进样量。

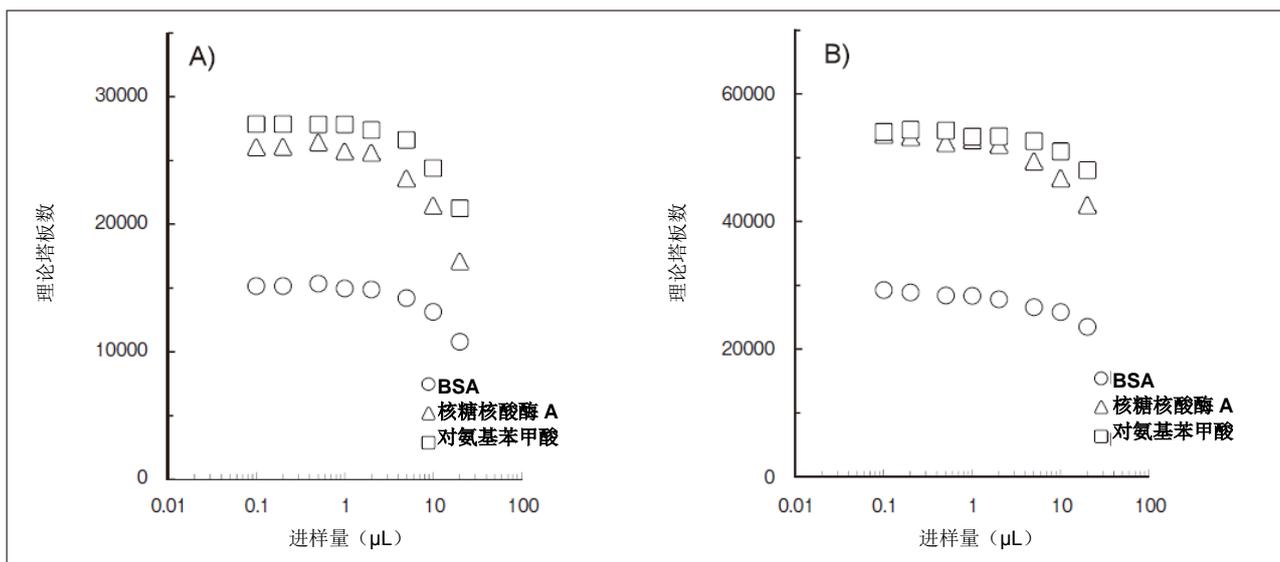


图 13 样品上样量的影响

〈检测条件〉

色谱柱: A) TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. x 15 cm)

B) TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. x 30 cm)

洗脱液: 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7) + 100 mmol/L 硫酸钠 + 0.05 % 叠氮化钠

流速: 0.35 mL/min

检测波长: UV 280 nm (微型比色皿)

温度: 25 °C

2-6. 色谱柱外（管路）扩散的影响

TSKgel UP-SW3000 色谱柱由于填料粒径变小，管路等色谱柱外扩散作用可能导致色谱柱原来的性能无法充分发挥。我们确认了进样阀—色谱柱之间以及色谱柱—UV 比色皿之间的管路中样品扩散对理论塔板数的影响。将进样阀—色谱柱之间或色谱柱—UV 比色皿之间的管路，分别改为内径 0.13mm 及内径 0.25mm 的 PEEK 管路长度，测定了蛋白质、低分子化合物的理论塔板数。图 14 所示为进样阀—色谱柱之间的管路长度对理论塔板数的影响。图 15 所示为色谱柱—UV 比色皿之间的管路长度对理论塔板数的影响。进样阀—色谱柱之间采用内径 0.13mm 的管路时（图 14、15 的●，▲，■），随着管路的长度增加，理论塔板数逐渐下降，使用 25cm 长度（约 3.32 μL）的管路时，理

论塔板数下降约 10%。更改色谱柱—UV 比色皿之间的管路长度时，随着管路的长度增加，理论塔板数逐渐下降，使用 40 cm 长度（约 5.31 μL）的管路时，理论塔板数下降约 10%。另一方面，使用内径 0.25 mm 的管路时（图 14、15 的○，△，□），随着管路的长度增加，与内径 0.13 mm 管路均显示出理论塔板数下降的趋势。与使用内径 0.13 mm 管路相比，进样阀—色谱柱之间的管路直径不同导致理论塔板数下降约 5~10%，色谱柱—UV 比色皿之间的管路直径不同导致理论塔板数下降约 15~20%。为获得 TSKgel UP-SW3000 色谱柱的良好性能，建议仪器的管路直径低于 0.13 mm，进样阀—色谱柱之间的管路长度小于 20 cm，色谱柱—UV 比色皿之间的管路长度小于 30 cm。

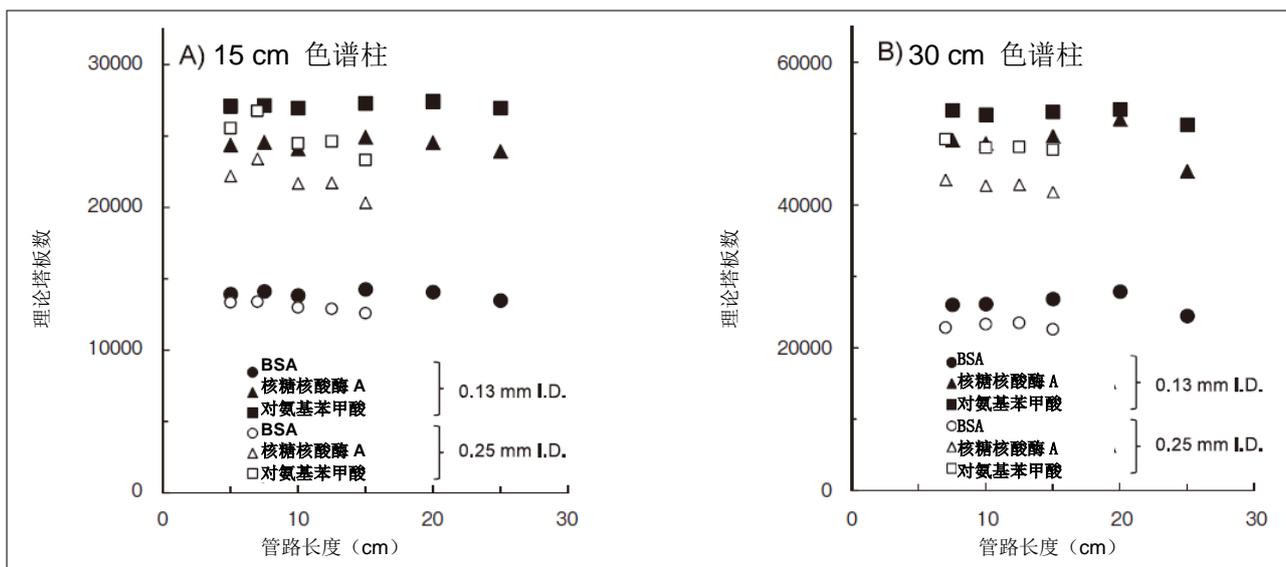


图 14 色谱柱外死体积的影响（色谱柱入口侧管路）

〈检测条件〉

色谱柱： A) TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. × 15 cm)、B) TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. × 30 cm)

洗脱液： 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7) + 100 mmol/L 硫酸钠 + 0.05 % 叠氮化钠

流速： 0.35 mL/min

检测： UV 280 nm (微型比色皿)

温度： 25 °C

进样量： A) 5 μL、B) 10 μL

*色谱柱出口侧管路： 0.13 mm I.D. × 30 cm

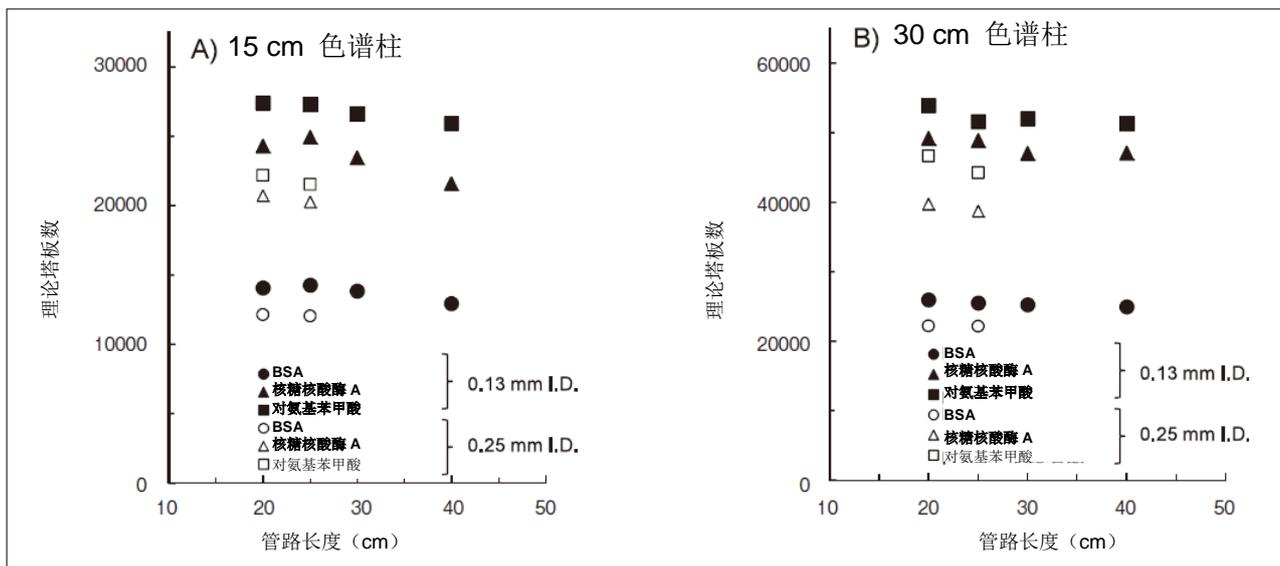


图 15 色谱柱外死体积的影响（色谱柱出口侧管路）

〈检测条件〉

色谱柱： A) TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. × 15 cm)、B) TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. × 30 cm)

洗脱液： 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7) + 100 mmol/L 硫酸钠 + 0.05 % 叠氮化钠

流速： 0.35 mL/min

检测： UV 280 nm (微型比色皿)

温度： 25 °C

进样量： A) 5 μL、B) 10 μL

*色谱柱入口侧管路： 0.13 mm I.D. × 15 cm

2-7. 色谱柱的耐用性

我们实施了一项在 TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. × 15 cm, 4.6 mm I.D. × 30 cm) 上连续进样时的色谱柱耐用性试验。

经过标准蛋白质混合样品连续 100 次进样后, 中止进样, 每次中止 6 小时以上, 反复实验 5 次, 使用对氨基苯甲酸确认了色谱柱性能(洗脱时间、理论塔板数)。采用各色谱柱的最大使用流速(15 cm 色谱柱为 0.50 mL/min, 30 cm 色谱柱为 0.35 mL/min) 实施本试验。结果如图 16、17

所示。通过各色谱柱尺寸确认了 3 批次的填料, 结果显示, 在任一情况下, 经过 500 次进样后均未见色谱柱性能有显著变化。

TSKgel UP-SW3000 比原有色谱柱填料的粒径小, 因此洗脱液中含有的不溶性物质以及样品中的夹杂物易在色谱柱入口蓄积, 可能导致色谱柱性能下降。通过在分析柱的入口侧安装保护柱, 适时进行更换, 可以防止分析柱老化, 长时间稳定地进行测定。

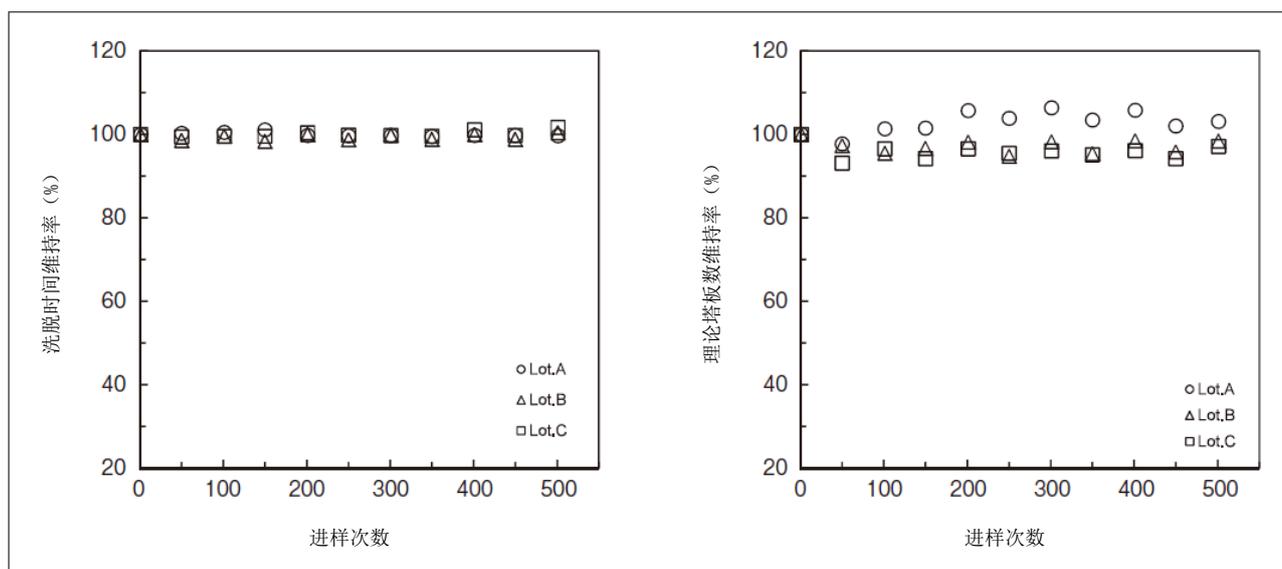


图 16 色谱柱的连续进样试验 (15cm 色谱柱)

〈检测条件〉

- 色谱柱: TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. × 15 cm)
洗脱液: 200 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7) + 0.05 % 叠氮化钠
流速: 0.50 mL/min
检测: UV 280 nm (微型比色皿)
温度: 25°C
进样量: 5 μL
进样间隔时间: 10 min (样品 ①→②→③→④) (100 次进样后, 中止进样 6 小时以上)
进样次数: 500 次 (100 次连续进样, 共进样 5 次)
样品: ①甲状腺球蛋白 (1.5 g/L), γ-球蛋白 (1.5 g/L), 卵清蛋白 (1.5 g/L), 核糖核酸酶 A (1.5 g/L), 对氨基苯甲酸 (10 mg/L)
②甲状腺球蛋白 (1.5 g/L), β-乳球蛋白 (1.5 g/L), DNP-L-丙氨酸 (20 mg/L)
③γ-球蛋白 (1.5 g/L), 细胞色素 C (1.5 g/L), DNP-L-丙氨酸 (20 mg/L)
④牛血清白蛋白 (1.5 g/L), 溶菌酶 (1.5 g/L), DNP-L-丙氨酸 (20 mg/L)

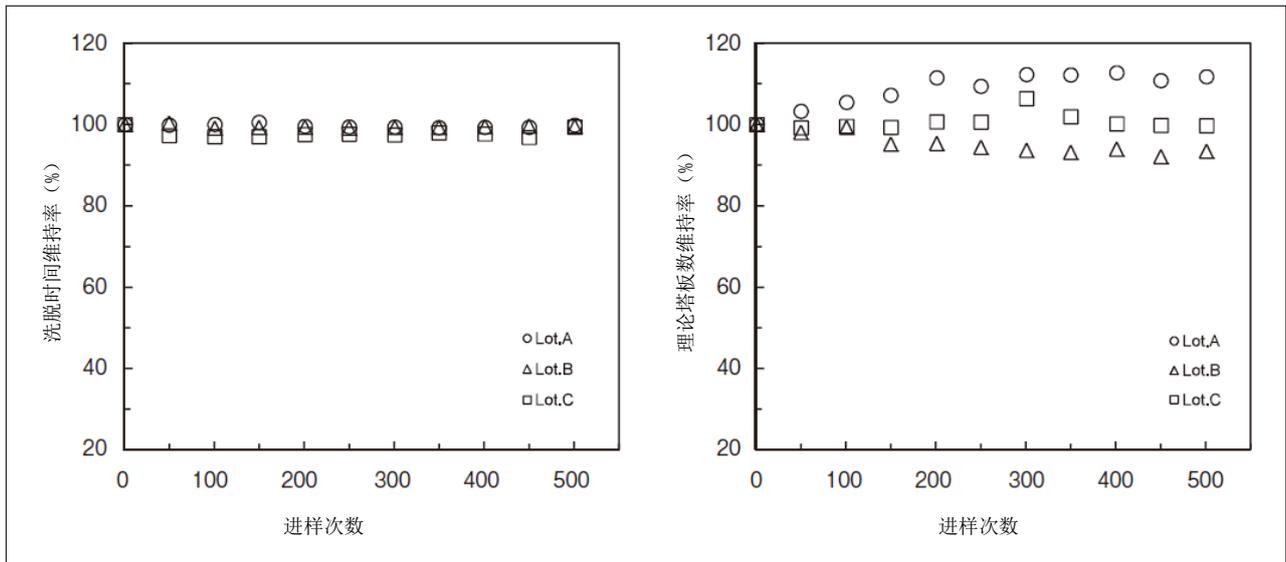


图 17 色谱柱的连续进样试验 (30cm 色谱柱)

〈检测条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. × 30 cm)
 洗脱液: 200 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7) + 0.05% 叠氮化钠
 流速: 0.35 mL/min 检测波长: UV 280 nm (微型比色皿)
 温度: 25 °C 进样量: 10 μL
 进样间隔时间: 15 min (样品 ①→②→③→④) (100 次进样后, 中止进样 6 小时以上)
 进样次数: 500 次 (100 次连续进样, 共进样 5 次)
 样品: ①甲状腺球蛋白 (1.5 g/L), γ-球蛋白 (1.5 g/L), 蛋清蛋白 (1.5 g/L), 核糖核酸酶 A (1.5 g/L), 对氨基苯甲酸 (10 mg/L)
 ②甲状腺球蛋白 (1.5 g/L), β-乳球蛋白 (1.5 g/L), DNP-L-丙氨酸 (20 mg/L)
 ③γ-球蛋白 (1.5 g/L), 细胞色素 C (1.5 g/L), DNP-L-丙氨酸 (20 mg/L)
 ④牛血清白蛋白 (1.5 g/L), 溶菌酶 (1.5 g/L), DNP-L-丙氨酸 (20 mg/L)

2-8. 填料的批间差异

图示 18 所示为采用不同批次的填料测定标准蛋白质混合样

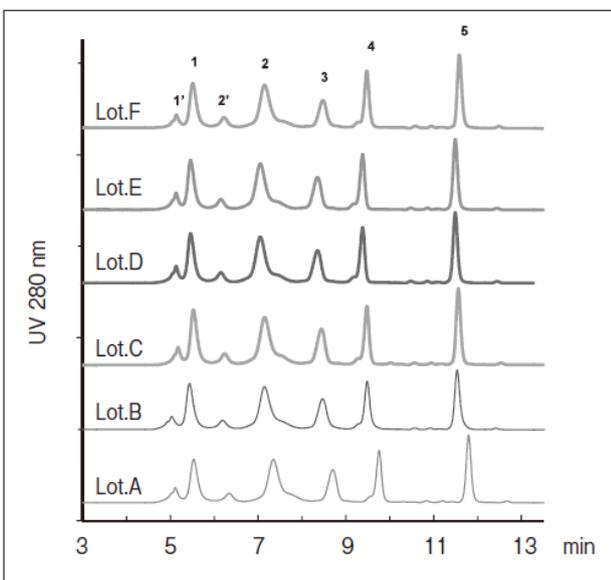


图 18 标准蛋白质的色谱图 (填料的批间差异)

品的色谱图。可见不同批次的样品之间未见峰形状、洗脱位置有大的差异, 批间差异较小, 生产的填料稳定性很高。

〈检测条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. × 30 cm)
 洗脱液: 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7) + 100 mmol/L 硫酸钠 + 0.05% 叠氮化钠
 流速: 0.35 mL/min
 检测: UV 280 nm (微型比色皿)
 温度: 25 °C
 进样量: 10 μL
 样品: 1. 甲状腺球蛋白, 640,000 Da (1'甲状腺球蛋白的二聚体)
 2. γ-球蛋白, 155,000 Da (2'γ-球蛋白的二聚体)
 3. 蛋清蛋白, 47,000 Da
 4. 核糖核酸酶 A, 13,700 Da
 5. 对氨基苯甲酸, 137 Da

2-9. 与 TSKgel G3000SW_{XL} 的对比

在抗体药物的 SEC 法测定中，要求色谱柱不仅对抗体二聚体和单体的分离，对单体和片段的分离也有更高的分离度。采用 2 根串联的 TSKgel G3000SW_{XL} 的色谱柱以及 TSKgel UP-SW3000 (30 cm 色谱柱、1 根)，对比了二者对丙种球蛋白制剂及单克隆抗体的分离性能。图 19 所示为丙种球蛋白制剂的色谱图。与 TSKgel G3000SW_{XL} 相比，TSKgel UP-SW3000 可在其 1/2 的测定时间即可获得同等

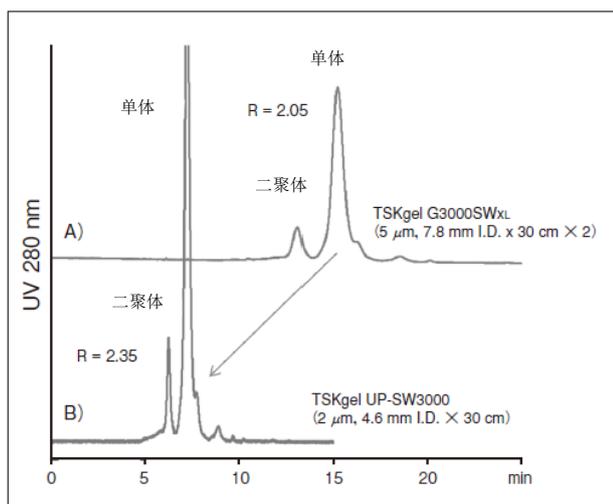


图 19 丙种球蛋白制剂的分离对比

〈检测条件〉

色谱柱: A) TSKgel G3000SW_{XL}
(5 μm, 7.8 mm I.D. x 30 cm x 2)
B) TSKgel UP-SW3000
(2 μm, 4.6 mm I.D. x 30 cm)
洗脱液: 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7)
+ 100 mmol/L 硫酸钠
+ 0.05 % 叠氮化钠
流速: A) 1.0 mL/min, B) 0.35 mL/min
检测: UV 280 nm
温度: 25 °C
进样量: 10 μL
样品: 人 γ-球蛋白、多克隆

表 4 单克隆抗体峰的分度 (R)

色谱柱	色谱柱尺寸 (mm I.D. x cm)	R (峰 1/2)	R (峰 2/3)	R (峰 3/4)
A) TSKgel G3000SW _{XL} x 2	7.8 x 30 + 7.8 x 30	1.60	3.63	1.77
B) TSKgel UP-SW3000	4.6 x 30	2.16	5.02	2.56

以上的分离度 (R)。图 20 所示为单克隆抗体的色谱图，不仅可使二聚体和单体得到良好的分离，还显示单体及片段也得到良好的分离。表 4 所示为各峰的分度。TSKgel UP-SW3000 只要现有 (TSKgel G3000SW_{XL}) 色谱柱 1/2 的测定时间即可获得蛋白质的高分离分析效果。(为获得 TSKgel UP-SW3000 色谱柱的良好性能，必须减小样品在管路或进样阀中的扩散。)

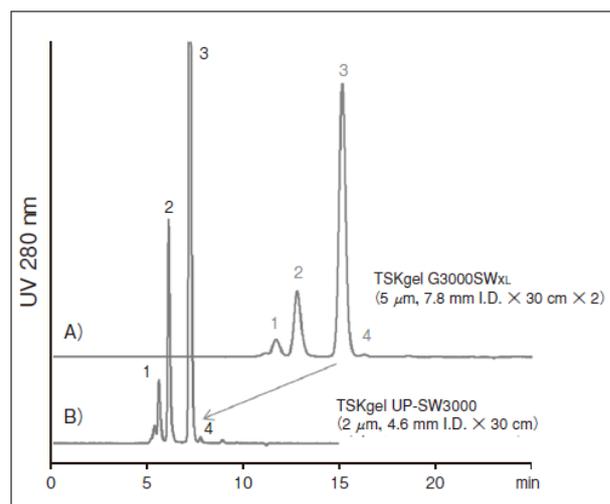


表 20 单克隆抗体的分离效果对比

〈检测条件〉

色谱柱: A) TSKgel G3000SW_{XL}
(5 μm, 7.8 mm I.D. x 30 cm x 2)
B) TSKgel UP-SW3000
(2 μm, 4.6 mm I.D. x 30 cm)
洗脱液: 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7)
+ 100 mmol/L 硫酸钠
+ 0.05 % 叠氮化钠
流速: A) 1.0 mL/min, B) 0.35 mL/min
检测: UV 280 nm
温度: 25 °C
进样量: 10 μL
样品: IgG 人鼠嵌合单克隆抗体
峰: 1.三聚体, 2. 二聚体, 3. 单体, 4.片段

2-10. 与市售 UHPLC 用 SEC 色谱柱的对比

为获得 SEC 色谱柱的高分离性能，使用的填料必须满足以下两个条件。图 21 所示为 1.填料的粒径、2.填料的细孔特性。减小填料粒径，可以增加理论塔板数、提高分离度，但由于色谱柱柱压升高，必须采用高耐压系统进行测定。另一方面，通过扩大填料的细孔容积，使校正曲线的斜率更平缓，可以扩大不同分子量物质的洗脱时间差异，提高分离度。但在一般情况下，填料的细孔容积越大，填料的强度越低，操作压强随之上升。TSKgel UP-SW3000 通过优化填料的粒径和细孔容积，实现了色谱柱性能的提升和色谱柱操作压强的降低。图 22 为采用 TSKgel UP-SW3000 和市售 UHPLC 用 SEC 色谱柱制成的标准蛋白质的校正曲线。在

甲状腺球蛋白 (Mw 640,000) 至卵清蛋白 (Mw 47,000) 的分子量范围内，TSKgel UP-SW3000 色谱柱的校正曲线斜率更为平缓。已知在标准蛋白质的色谱图中，如图 23 所示， γ -球蛋白 (峰 2) 附近的峰间隔扩大，TSKgel UP-SW3000 更适合抗体的分离。采用 TSKgel UP-SW3000 和市售 UHPLC 用 SEC 色谱柱，分离单克隆抗体的色谱图如图 24 所示，洗脱峰的分离性能如表 5 所示。与市售 UHPLC 用 SEC 色谱柱相比，TSKgel UP-SW3000 色谱柱对单克隆抗体三聚体/二聚体/单体的分离性能更高。对单体及片段也有良好的分离效果。

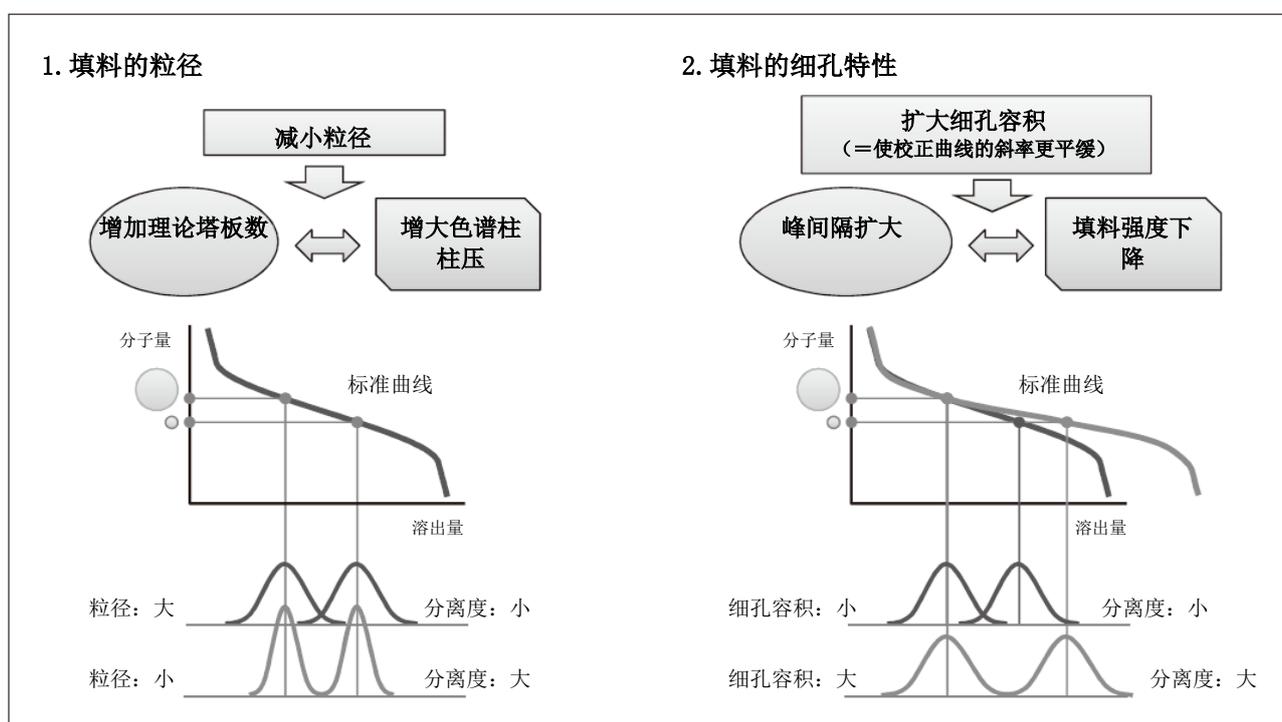


图 21 SEC 色谱柱分离性能的两个决定性因素

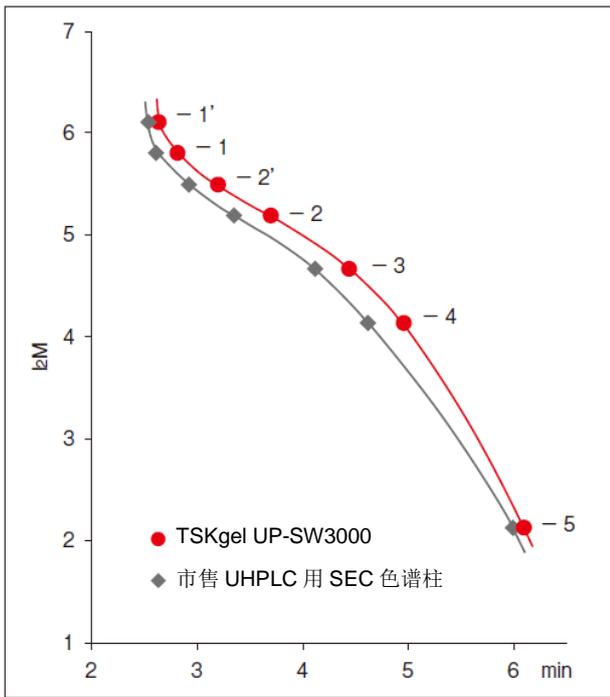


图 22 采用标准蛋白质制成的校正曲线的对比

〈检测条件〉
 色谱柱: TSKgel UP-SW3000
 (2 μm , 4.6 mm I.D. \times 15 cm)
 市售 UHPLC 用 SEC 色谱柱
 (1.7 μm , 4.6 mm I.D. \times 15 cm)
 洗脱液: 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7)
 + 100 mmol/L 硫酸钠
 + 0.05 % 叠氮化钠
 流 速: 0.35 mL/min
 检 测: UV 280 nm
 温 度: 25 $^{\circ}\text{C}$
 进样量: 5 μL
 样 品: 1. 甲状腺球蛋白, 640,000 Da
 (1' 甲状腺球蛋白的二聚体)
 2. γ -球蛋白, 155,000 Da
 (2' γ -球蛋白的二聚体)
 3. 蛋清蛋白, 47,000 Da
 4. 核糖核酸酶 A, 13,700 Da
 5. 对氨基苯甲酸, 137 Da

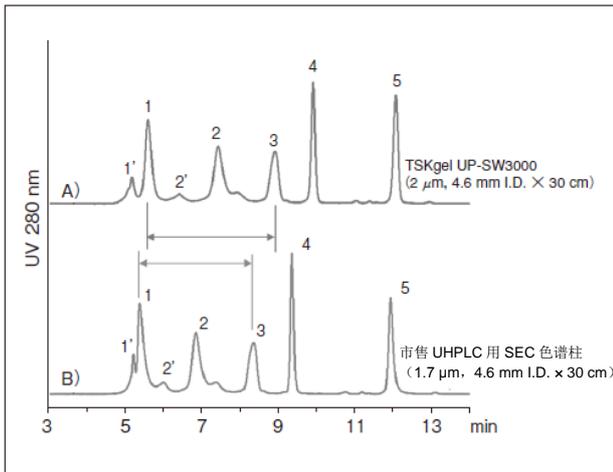


图 23 标准蛋白质的色谱图对比

〈检测条件〉
 色谱柱: A) TSKgel UP-SW3000
 (2 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)
 B) 市售 UHPLC 用 SEC 色谱柱
 (1.7 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)
 洗脱液: 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7)
 + 100 mmol/L 硫酸钠
 + 0.05 % 叠氮化钠
 流 速: 0.35 mL/min
 检 测: UV 280 nm (微型比色皿)
 温 度: 25 $^{\circ}\text{C}$
 进样量: 10 μL (Rheodyne 公司 8125 型)
 样 品: 1. 甲状腺球蛋白, 640,000 Da
 (1' 甲状腺球蛋白的二聚体)
 2. γ -球蛋白, 155,000 Da
 (2' γ -球蛋白的二聚体)
 3. 蛋清蛋白, 47,000 Da
 4. 核糖核酸酶 A, 13,700 Da
 5. 对氨基苯甲酸, 137 Da

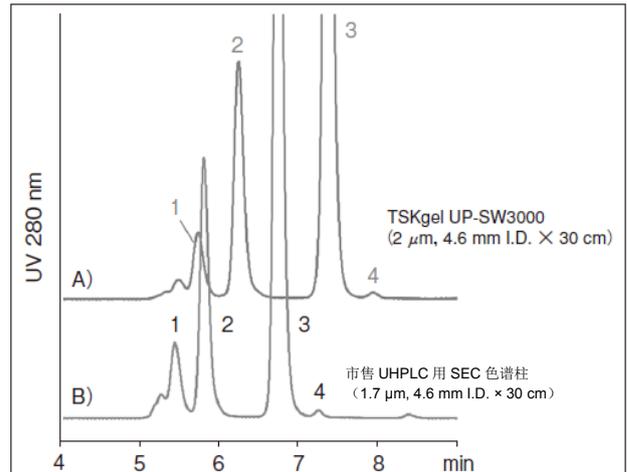


表 24 单克隆抗体的分离效果对比

〈检测条件〉
 色谱柱: A) TSKgel UP-SW3000
 (2 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)
 B) 市售 UHPLC 用 SEC 色谱柱
 (1.7 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)
 洗脱液: 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7)
 + 100 mmol/L 硫酸钠
 + 0.05 % 叠氮化钠
 流 速: 0.35 mL/min
 检 测: UV 280 nm (微型比色皿)
 温 度: 25 $^{\circ}\text{C}$
 进样量: 10 μL (Rheodyne 公司 8125 型)
 样 品: IgG 人鼠嵌合单克隆抗体
 峰: 1. 三聚体, 2. 二聚体, 3. 单体, 4. 片段

表 5 单克隆抗体峰的分离度 (R) 对比

色谱柱	R (峰 1/2)	R (峰 2/3)	R (峰 3/4)
A) TSKgel UP-SW3000	2.16	5.02	2.56
B) 市售 UHPLC 用 SEC 色谱柱	1.64	4.66	2.57

3. 分离实例

3-1. 抗体类药物的精密分析

图 25 所示为使用长 30 cm 色谱柱, 减缓测定时流速, 对单克隆抗体进行的精密分析实例。测定时流速为 0.35 mL/min

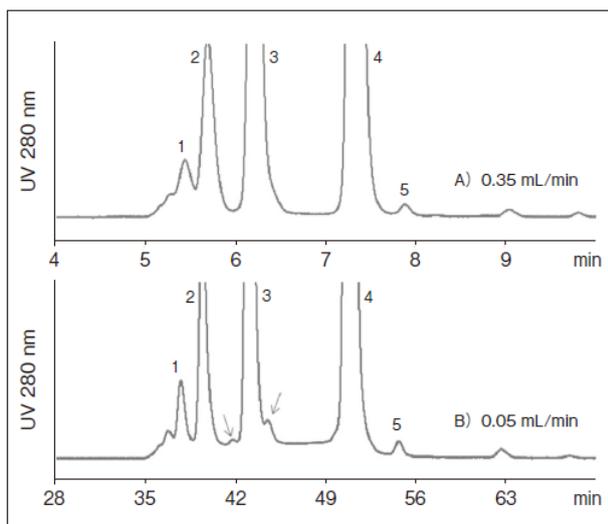


图 25 低流速条件下的高分离分析

时, 仅观察到 1 个二聚体的吸收峰, 通过将测定时流速减缓至 0.05 mL/min, 可以分离出二聚体的吸收峰前后洗脱的杂质峰。表 6 所示为抗体四聚体至单体以及片段的各峰的分离度。已知低流速测定可提高分离度, 对抗体进行精密分析。

〈检测条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW3000
(4.6 mm I.D. × 30 cm)
洗脱液: 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7)
+ 100 mmol/L 硫酸钠 + 0.05 % 叠氮化钠
流速: A) 0.35 mL/min, B) 0.05 mL/min
检测: UV 280 nm (微型比色皿)
温度: 25 °C
进样量: 10 μL (Rheodyne 公司 8125 型)
样品: IgG 型人鼠嵌合单克隆抗体
峰: 1.四聚体, 2.三聚体, 3.二聚体
4.单体, 5.片段

表 6 单克隆抗体峰的分离度

流速	R (峰 1/2)	R (峰 2/3)	R (峰 3/4)	R (峰 4/5)
A) 0.35 mL/min	0.88	2.20	5.07	2.52
B) 0.05 mL/min	1.49	3.51	7.00	3.34

3-2. 抗体木瓜蛋白酶消化物的分离实例

使用 TSKgel UP-SW3000 与市售 UHPLC 用 SEC 色谱柱对 IgG 抗体（小鼠）木瓜蛋白酶消化物进行了测定，获得的色谱图对比如图 26 所示。TSKgel UP-SW3000 可以分

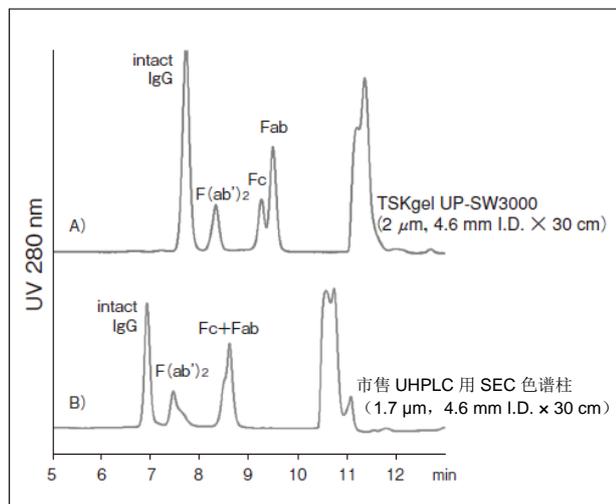


图 26 抗体木瓜蛋白酶消化物的分离对比

〈检测条件〉

色谱柱: A) TSKgel UP-SW3000
(2 μm, 4.6 mm I.D. x 30 cm)
B) 市售 UHPLC 用 SEC 色谱柱
(1.7 μm, 4.6 mm I.D. x 30 cm)
洗脱液: 200 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.5)
流速: 0.35 mL/min
检测: UV 280 nm (微型比色皿)
温度: 25 °C
进样量: 5 μL (Rheodyne 公司 8125 型)
样品: 木瓜蛋白酶消化小鼠 IgG 类单克隆抗体得到的样品 (消化时间 30 分钟)

4. 总结

综上所述，对 2 μm 粒径的高性能 SEC 色谱柱 TSKgel UP-SW3000 进行了简要说明。使用中要注意检测系统中的柱外死体积的影响，与现有色谱柱相比，通过使用 TSKgel

离分子量接近的 Fc 和 Fab 片段。使用 TSKgel UP-SW3000 的色谱图分析了木瓜蛋白酶消化过程，如图 27 所示。IgG 抗体单体的吸收峰随消化时间推移而逐渐变小，F(ab')₂、Fc 及 Fab 片段的吸收峰随消化时间推移而逐渐变大。

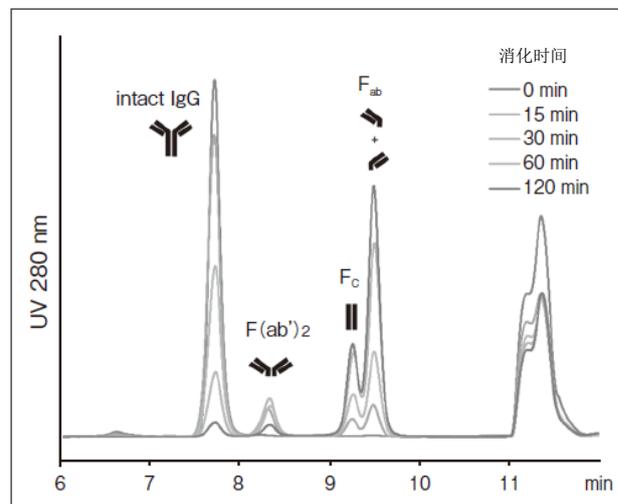


图 27 木瓜蛋白酶对 IgG 抗体消化过程的色谱图

〈检测条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. x 30 cm)
样品: 木瓜蛋白酶消化小鼠 IgG 类单克隆抗体得到的样品 (消化时间 0~120 分钟)
*其他测定条件与图 23 相同

UP-SW3000，可在短时间内实现抗体二聚体/单体/片段的高速分离。而且减小粒径加快测定时流速后，理论塔板数下降幅度较小，加快测定时流速后可进行高通量分析。

※ “TSKgel” 系东曹株式会社的注册商标。



TOSOH BIOSCIENCE

东曹（上海）生物科技有限公司

地址：上海市徐汇区宜山路1289号B座3F, 301室

电话：+86-21-34610856 传真：+86-21-34610858

电子邮箱：info@tosoh.com.cn

网址：www.separations.asia.tosohbioscience.com