



TOSOH

No.109

SEPARATION REPORT

高性能离子交换色谱柱 TSKgel STAT 系列色谱柱

— 目录 —

	页码
1. 前言	1
2. 色谱柱的基本特点	1
2-1. 填料特点	1
2-2. 柱压	2
2-3. 标准蛋白质的分离	2
2-4. 核酸的分离	4
2-5. 样品载量	5
3. 阴离子交换色谱柱的应用实例	6
4. 阳离子交换色谱柱的应用实例	10
5. 总结	14

1. 前言

离子交换色谱法是一项广泛应用于生物制药、生物化学和食品工业等领域的分析技术，其可以轻松地对生物大分子样品（例如蛋白质和核酸）进行分离和定量分析。离子交换色谱包括阴离子交换色谱和阳离子交换色谱，前者使用带季胺或叔胺基团的填料，后者使用带磺酸或羧酸基团的填料。可以根据目标蛋白质的化学性质、空间立体构造、等电点，或者根据与杂质组分间的不同分离选择性，选择最适填料装填的离子色谱柱。核酸一般采用阴离子交换色谱柱进行分离分析。东曹离子交换色谱柱包括TSKgel 5PW系列和TSKgel NPR系列产品，前者使用一种多孔性填料，可用于实验室规模的分离和纯化工作，后者使用非多孔性填料（粒径：2.5 μm ），适用于高速、高分辨率和微量分析。

无论是不同粒径的TSKgel PW系列高速分析、中高压制备填料，亦或是工业生产制备用TOYOPEARL系列的中低压层析填料，其填料基质的化学组成和骨架构造都是一致的，因此实验室规模下使用TSKgel 5PW系列色谱柱优化获得的分离条件可以很容易地规模放大到生产级别。

TSKgel NPR系列色谱柱使用非多孔性填料（粒径：2.5 μm ），因此尤其适用于高分辨率和高通量的分析。此外，该类色谱柱对低浓度的肽和蛋白质样品分离、分析时，亦可获得良好的回收率。

最近推出的TSKgel STAT系列色谱柱，使用非多孔性填料，能够实现在较低柱压下获得与TSKgel NPR系列色谱柱相同或更好的保留及分辨率。本报告将详细介绍TSKgel STAT系列色谱柱的基本特点和部分应用实例。

2. 色谱柱的基本特点

2-1. 填料特点

TSKgel STAT系列色谱柱包括导入了季胺基团、非多孔、亲水性聚合物基质填料装填的TSKgel Q-STAT阴离子交换色谱柱和TSKgel DNA-STAT阴离子交换色谱柱，可以提供10、7和5 μm 多种粒径选择；包括导入了磺酸基团、非多孔、亲水性聚合物基质填料装填的TSKgel SP-STAT强阳离子交换色谱柱，可以提供10和7 μm 的两种粒径选择；还包括导入了羧酸基团、非多孔、亲水性聚合物基质填料装填的TSKgel CM-STAT弱阳离子交换色谱柱。这些色谱柱的规格和特点详见表1。

TSKgel STAT系列色谱柱包括尺寸为3.0 mm I.D.× 3.5 cm的、设计用于进行1至2分钟内完成分析的高通量色谱柱（粒径10 μm ：高通量色谱分析柱）；包括尺寸为4.6 mm I.D.× 10 cm的、设计用于进行高分辨率分析的色谱柱（粒径7 μm ：高分辨率色谱柱）。由于该类色谱柱使用的填料基质的机械强度高，填料几乎不会因溶剂改变而发生收缩或膨胀，所以也可以使用添加了有机溶剂的洗脱条件。在洗脱液中适当添加有机溶剂，可以有效抑制高疏水性样品的吸附，从而加快洗脱速度。此外，也可以通过在洗脱液中适当添加有机溶剂，有效清洗和去除实际样品分析中吸附在色谱柱填料上的污染物质。

表1 . TSKgel STAT系列色谱柱填料特点

产品名称	TSKgel Q-STAT		TSKgel DNA-STAT	TSKgel SP-STAT		TSKgel CM-STAT	
产品编号	0021960	0021961	0021962	0021963	0021964	0021965	0021966
色谱柱尺寸* (mm I.D.× cm)	3.0 × 3.5	4.6 × 10	4.6 × 10	3.0 × 3.5	4.6 × 10	3.0 × 3.5	4.6 × 10
填料基质	非多孔、亲水性聚合物						
粒径 (μm)	10	7	5	10	7	10	7
官能基团	季胺基团			磺酸基团		羧酸基团	
离子交换容量 ($\mu\text{eq/g-drygel}$)	约250			约20		约100	
对离子	氯离子			钠离子			
出货溶剂	水						

*: 色谱柱材质：不锈钢（滤头：PEEK 材料）

2-2. 柱压

图 1 显示了不同填料装填的几种高分辨率色谱柱在不同柱温下的柱压变化情况。数据表明，在标准流速下（1.0mL/分），即使在低柱温范围内，各种色谱柱的柱压也不过在 10MPa 左右。这在耐压较低 HPLC 系统下使用这些色谱柱提供了可能。

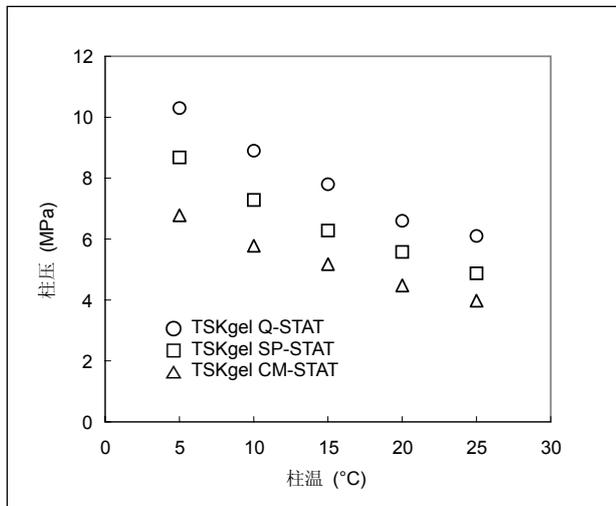


图 1. 柱温与柱压的关系

色谱柱: TSKgel Q-STAT (4.6 mm I.D.× 10 cm)
 TSKgel SP-STAT (4.6 mm I.D.× 10 cm)
 TSKgel CM-STAT (4.6 mm I.D.× 10 cm)
 洗脱液: 10 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 5.0)
 (TSKgel SP-STAT, TSKgel CM-STAT)
 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)
 (TSKgel Q-STAT)
 流速: 1.0 mL/min

2-3. 标准蛋白质的分离

图 2 和图 3 显示了使用 TSKgel NPR 系列色谱柱（粒径：2.5 μ m）与高分辨率 STAT 色谱柱分离蛋白质的对比。由于填料表面修饰技术的改进，TSKgel STAT 系列色谱柱可以获得比传统 TSKgel NPR 系列色谱柱更强的保留能力，而且无论填料粒径大小差异，两种色谱柱均可以获得峰形尖锐的高分辨率分离分析效果。显然，由于使用了不同的离子交换基团，TSKgel SP-STAT 和 TSKgel CM-STAT 色谱柱在分离选择性方面亦有所不同。

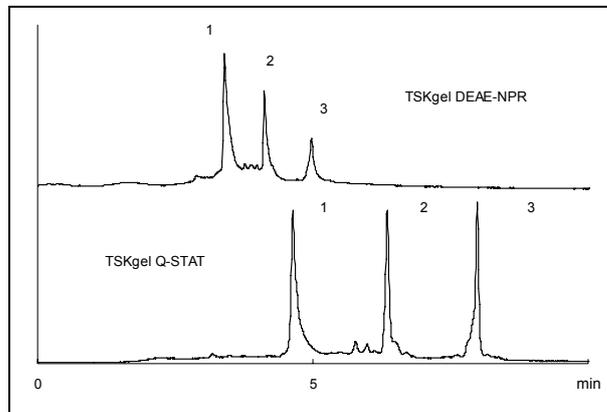


图 2. 阴离子交换色谱柱在标准蛋白质中的分离结果比较

色谱柱: TSKgel DEAE-NPR
 (4.6 mm I.D.× 3.5 cm) (上)
 TSKgel Q-STAT (4.6 mm I.D.× 10 cm) (下)
 洗脱液: A: 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)
 B: 0.5 mol/L NaCl + 20 mmol/L
 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)
 线性梯度: B 0% → 100%, 10 分钟
 流速: 1.0 mL/min
 检测: UV (280nm)
 温度: 25°C
 进样量: 各 0.6 μ g
 样品: 1. 伴清蛋白 2. 卵清蛋
 3. 胰蛋白酶抑制剂

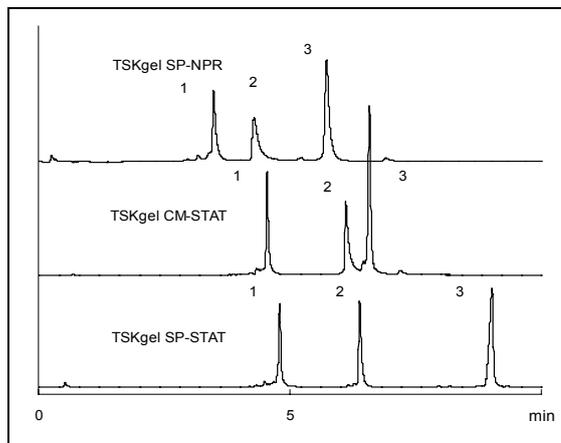


图 3. 阳离子交换色谱柱在标准蛋白质中的分离结果比较

色谱柱: TSKgel SP-NPR (4.6 mm I.D.× 3.5 cm) (上)
 TSKgel CM-STAT (4.6 mm I.D.× 10 cm) (中)
 TSKgel SP-STAT (4.6 mm I.D.× 10 cm) (下)
 洗脱液: A: 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.2)
 B: 0.5 mol/L NaCl + 10 mmol/L
 磷酸钠缓冲液 (pH 6.2)
 线性梯度: B 0% → 100%, 10 分钟
 流速: 1.0 mL/min
 检测: UV (280nm)
 温度: 25°C
 进样量: 各 10 μ g
 样品: 1. α -胰凝乳蛋白酶原 A
 2. 细胞色素 C
 3. 溶菌酶

图 4、5 和 6 显示了使用 10 μ m 粒径填料装填的高通量色谱柱的高速分析比较结果。图 4 是 TSKgel Q-STAT 高通量色谱柱与整体型 (Monolith) 阴离子交换整体柱的分离比较结果。相对于整体柱, TSKgel Q-STAT 高通量色谱柱可以在 1 分钟内完成 3 种标准蛋白质的分离, 并且具有更佳的色谱峰形。

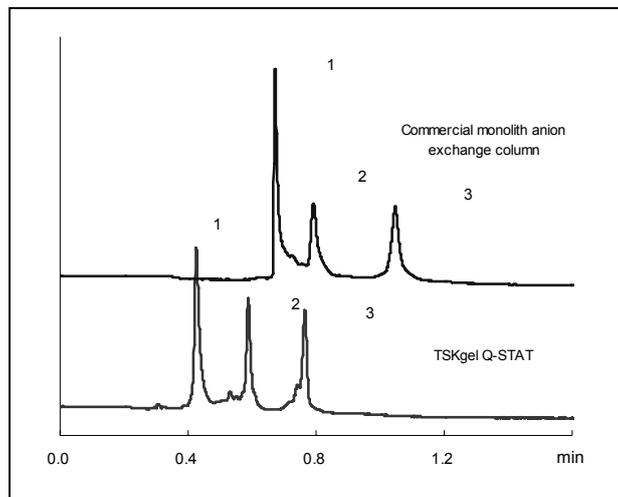


图 4. 标准蛋白质的阴离子交换色谱柱的高通量分析

色谱柱: 市售阴离子交换整体柱 (5.0 mm I.D.× 5 cm) (上)
TSKgel Q-STAT (3.0 mm I.D.× 3.5 cm) (下)

洗脱液: A: 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)

B: 0.5 mol/L NaCl + 20 mmol/L

Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)

线性梯度: B 0% → 100%, 1 分钟

流速: 2.0 mL/min (整体柱)

1.0 mL/min (TSKgel Q-STAT)

检测: UV (280 nm)

温度: 25 $^{\circ}$ C

进样量: 各 3 μ g

样品: 1. 伴白蛋白
2. 卵清蛋白
3. 胰蛋白酶抑制剂

* 使用了微混合器

图 5 是 TSKgel SP-STAT 高通量色谱柱与阳离子交换整体柱的分离比较结果。相对于整体柱, TSKgel SP-STAT 高通量色谱柱可以在 1 分钟内完成 3 种标准蛋白质的分离, 并且具有更佳的色谱峰形。

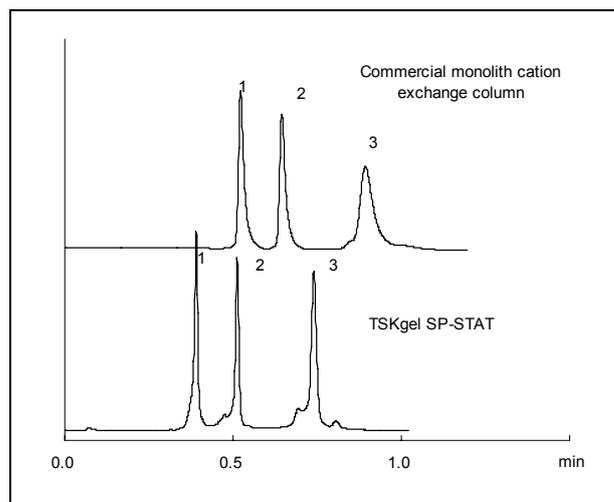


图 5. 标准蛋白质的阳离子交换色谱柱的高通量分析

色谱柱: 市售阳离子交换整体柱 (5.0 mm I.D.× 5 cm) (上)
TSKgel SP-STAT (3.0 mm I.D.× 3.5 cm) (下)

洗脱液: A: 20 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 5.0)

B: 1.0 mol/L NaCl + 20 mmol/L

醋酸钠缓冲液 (pH 5.0) (TSKgel SP-STAT),

1.5 mol/L NaCl + 20 mmol/L

醋酸钠缓冲液 (pH 5.0) (整体柱)

线性梯度: B 0% → 100%, 1 分钟

流速: 4.73 mL/min (整体柱)

2.0 mL/min (TSKgel SP-STAT)

检测: UV (280 nm)

温度: 25 $^{\circ}$ C

进样量: 5 μ L

样品: 1. α -胰凝乳蛋白酶原 A 1 g/L

2. 细胞色素 C 1 g/L

3. 溶菌酶 1 g/L

* 使用了微混合器

2-4. 核酸的分离

图 6 为使用 TSKgel Q-STAT 高通量色谱柱在 1 分钟内分离 6 种核苷酸的色谱图。

使用不同的梯度时间对二磷酸胞苷 (CDP) 和三磷酸胞苷 (CTP) 两种核苷酸进行了分离。图 7 为以这两种核苷酸间的分辨率 (分离度) 为纵坐标, CTP 的洗脱时间为横坐标绘制而成的分析图。从图中可以看出, 即使使用高分辨率色谱柱, 其分辨率也会随梯度时间缩短而下降, 但很显然, 即使 CTP 的梯度洗脱时间很短时 (本例为 2.5 分钟), 使用该种高通量色谱柱仍然可以获得优异的分辨率和分离效果。

图 8 为使用高分辨率色谱柱对 15 种核苷酸进行同时分离的色谱图。

综合以上结果可以看出, 对于核酸的分析, 可以根据所要求的分析时间或者分辨率做出对 TSKgel STAT 色谱柱的最适选择。

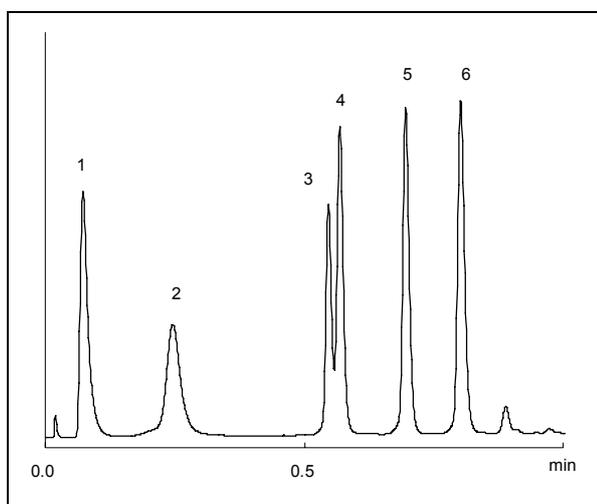


图 6. 阴离子交换色谱柱核苷酸的高通量分析

色谱柱: TSKgel Q-STAT (3.0 mm I.D. × 3.5 cm)
 洗脱液: A: 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)
 B: 0.5 mol/L NaCl + 20 mmol/L Tris-HCl
 线性梯度: B 0% → 100%, 1 分钟
 流速: 2.0 mL/min
 检测: UV (260 nm)
 温度: 25°C
 进样量: 5 μL
 样品: 1. 胞嘧啶核苷 0.05 g/L
 2. 3',5'-Cyclic CMP 0.1 g/L
 3. 2d-CMP 0.1 g/L
 4. CMP 0.15 g/L
 5. CDP 0.2 g/L
 6. CTP 0.25 g/L

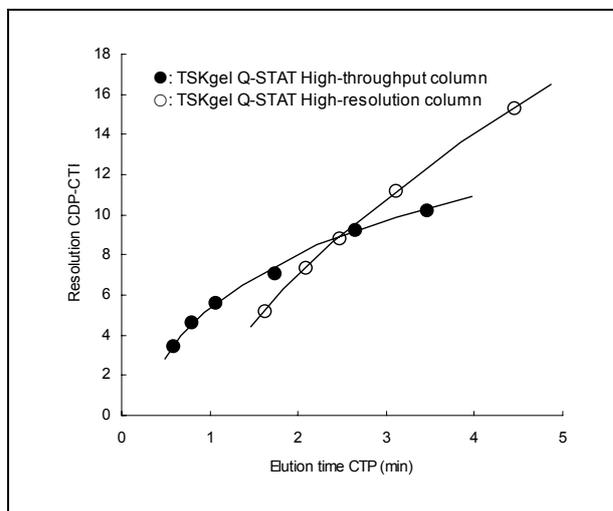


图 7. 高通量和高分辨率色谱柱的洗脱时间与分辨率变化关系

色谱柱: TSKgel Q-STAT (3.0 mm I.D. × 3.5 cm)
 TSKgel Q-STAT (4.6 mm I.D. × 10 cm)
 洗脱液: A: 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)
 B: 0.5 mol/L NaCl + 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)
 (改变梯度洗脱时间)
 流速: 2.0 mL/min (3.0 mm I.D.)
 1.5 mL/min (4.6 mm I.D.)
 检测: UV (260 nm)
 温度: 25°C
 样品: CTP, CDP

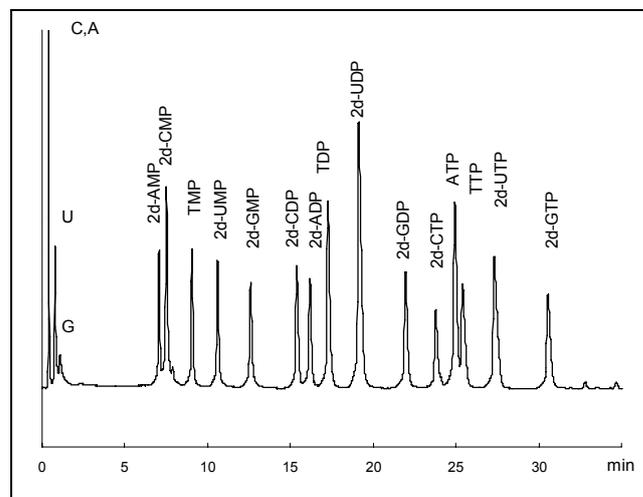


图 8. 阴离子交换色谱柱对 15 种核苷酸的同时分析

色谱柱: TSKgel Q-STAT (4.6 mm I.D. × 10 cm)
 洗脱液: A: 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)
 B: 0.5 mol/L NaCl + 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)
 线性梯度: B 0% → 50%, 60 分钟
 流速: 1.5 mL/min
 检测: UV (260 nm)
 温度: 25°C
 进样量: 5 μL
 样品: 核酸碱基 各 0.05 g/L
 单磷酸型 各 0.1 g/L
 二磷酸型 各 0.15 g/L
 三磷酸型 各 0.2 g/L

2-5. 样品载量

TSKgel STAT 系列色谱柱由于使用了非多孔性填料，其填料比表面积要比多孔性填料小，因此与多孔性填料装填的色谱柱相比，在进样量较低时，色谱柱分辨率受进样量大小的影响程度更为显著。

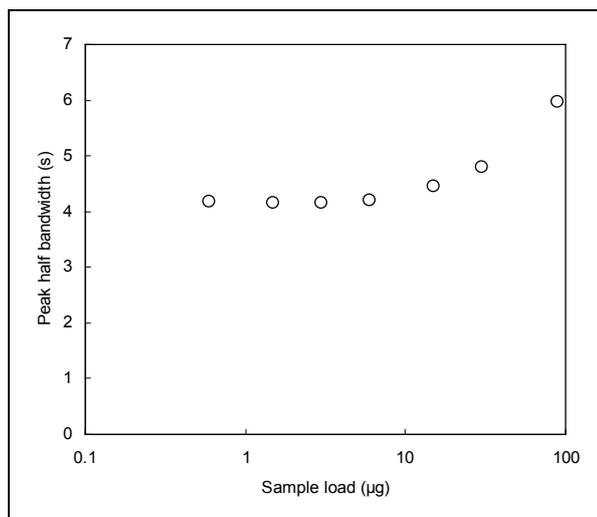


图 9. 进样量与半峰宽的关系

色谱柱: TSKgel Q-STAT (4.6 mm I.D. × 10 cm)
洗脱液: A: 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)
B: 0.5 mol/L NaCl + 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)
线性梯度: B 0% → 100%, 10 分钟
流速: 1.0 mL/min
检测: UV (280 nm)
温度: 25°C
进样量: 5 µL
样品: 卵清蛋白

图 9 和图 10 阐明了进样量与色谱柱分辨率之间的关系。结果表明，约 10 µg 以下的进样量对 TSKgel STAT 系列的阴离子交换色谱柱和阳离子交换色谱柱是比较合适的。

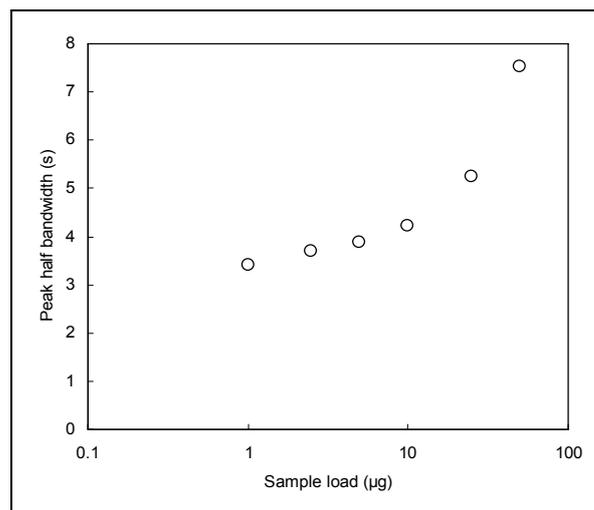


图 10. 进样量与半峰宽的关系

洗脱液: A: 20 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 5.0)
B: 0.5 mol/L NaCl + 20 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 5.0)
线性梯度: B 0% → 100%, 10 分钟
流速: 1.0 mL/min
检测: UV (280 nm).
温度: 25°C
样品: 细胞色素 C

3. 阴离子交换色谱柱的应用实例

图 11 是对市售脂肪酶粗品的分离实例。显然，与 TSKgel DEAE-NPR 相比，TSKgel Q-STAT 色谱柱可以获得更强的保留和更佳的分辨率，其色谱峰形更为尖锐。

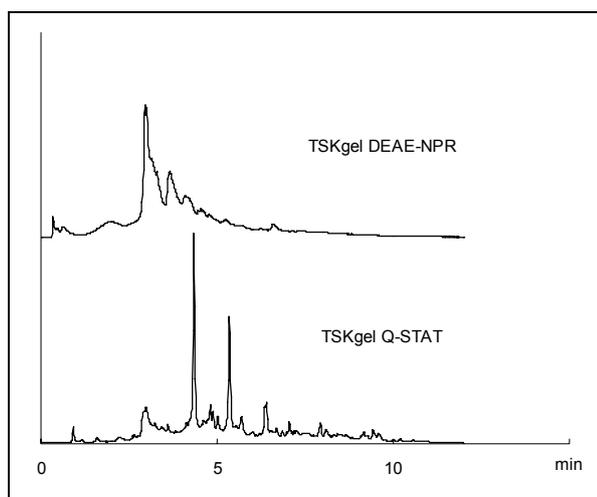


图 11. 市售脂肪酶粗品的分离结果比较

色谱柱: TSKgel DEAE-NPR (4.6 mm I.D.× 3.5 cm) (上)
TSKgel Q-STAT (4.6 mm I.D.× 10 cm) (下)
洗脱液: A: 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)
B: 0.5 mol/L NaCl + 20 mmol/L
Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)
线性梯度: B 0% → 100%, 10 分钟
流速: 1.0 mL/min
检测: UV (280 nm)
温度: 25°C
进样量: 10 μL
样品: 市售脂肪酶粗品

图 12 是对市售牛血清白蛋白 (BSA) 酶解标准品的分离实例。显然，与 TSKgel DEAE-NPR 和另一款商品化的 WAX 色谱柱相比，TSKgel Q-STAT 可以获得更多的分离色谱峰信息，流穿的组分更少 (图中椭圆标记区域)。

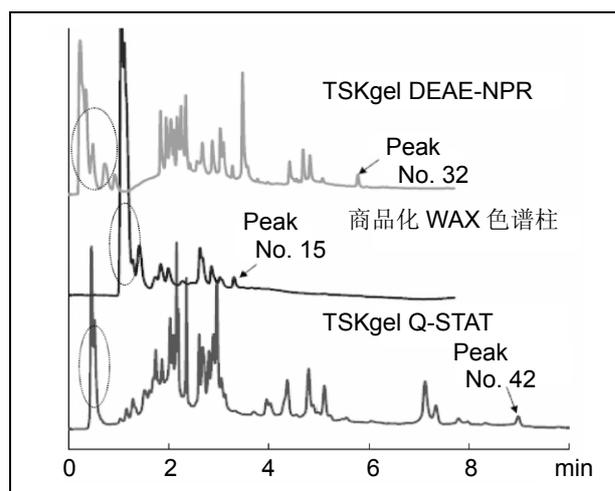


图 12. 市售 BSA 酶解标准品的分离结果比较

色谱柱: TSKgel DEAE-NPR (4.6 mm I.D.× 3.5 cm) (上)
商品化 WAX 色谱柱 (4.0 mm I.D.× 25 cm) (中)
TSKgel Q-STAT (4.6 mm I.D.× 10 cm) (下)
洗脱液: A: 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)
B: 0.5 mol/L NaCl + 20 mmol/L
Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)
线性梯度: B 0% → 100%, 10 分钟
流速: 1.5 mL/min
检测: UV (220 nm)
温度: 25°C
进样量: 10 μL
样品: 市售 BSA 酶解标准品 (Waters, Co.) 10 μL

图 13 是对含有单克隆抗体 (MAB) 的小鼠腹水样品进行分离的结果。上方为使用 TSKgel Q-STAT 色谱柱对小鼠腹水分离的色谱图, 很明显, 抗体和白蛋白组分很好地得到了分离。下方为使用 TSKgel Q-STAT 色谱柱对小鼠腹水纯化而来的单抗样品的分离色谱图, 很显然, 纯化后的单抗样品中存在多个色谱峰。

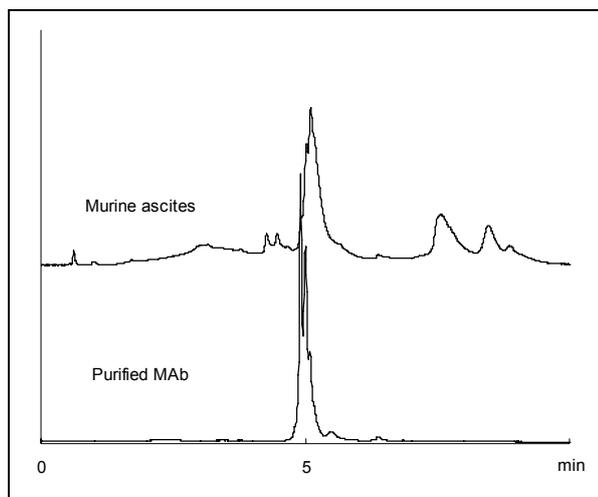


图 13. 含有单抗的小鼠腹水和纯化后的单抗样品的分离

色谱柱: TSKgel Q-STAT (4.6 mm I.D.× 10 cm)
 洗脱液: A: 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)
 B: 0.5 mol/L NaCl + 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)
 线性梯度: B 0% → 100%, 10 分钟
 流速: 1.0 mL/min
 检测: UV (280 nm)
 温度: 25℃
 进样量: 10 μL
 样品: 稀释 10 倍的含有单抗的小鼠腹水 (上)
 纯化后的小鼠单抗 (下)
 样品使用洗脱液 A 稀释 10 倍后, 进样 10 μL。

图 14 为使用更加平缓的线性梯度分离图 13 中纯化后的单抗样品的色谱图。结果表明, 纯化后的单抗样品中仍然存在离子相互作用不同的多种电荷异构体。可以通过缓慢的、精细的线性梯度洗脱, 实现这些电荷异构体组分间的良好分离。

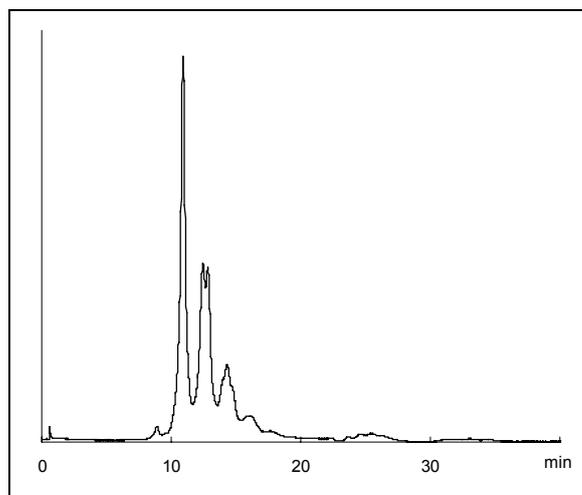


图 14. 纯化后的单抗电荷异构体的分离

色谱柱: TSKgel Q-STAT (4.6 mm I.D.× 10 cm)
 洗脱液: A: 0.05 mol/L NaCl + 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)
 B: 0.15 mol/L NaCl + 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)
 线性梯度: B 25% → 100%, 30 分钟
 流速: 1.0 mL/min
 检测: UV (280 nm)
 温度: 25℃
 样品: 纯化后的小鼠单抗

图 15 和图 16 为 1kb DNA 分子量标准物的核酸分离实例。样品中含有碱基对从 75bp 到 12,216bp 的 23 种不同长度的 DNA 片段。结果表明，使用 TSKgel DNA-NPR 色谱柱时，

这种分离条件对于分析第 20 个及以上的 DNA 片段(碱基对>9,126 bp)并不合适。但使用 TSKgel DNA-STAT 色谱柱进行同样的分析时，样品中的所有 DNA 片段都得到了良好分离，并且分辨率均大于 1.5。

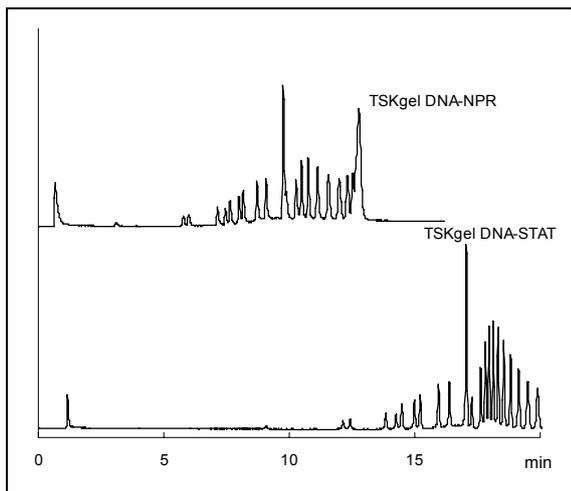


图 15. 1kb 间隔的 DNA 分子量标准物的分离结果比较

色谱柱: TSKgel DNA-NPR (4.6 mm I.D.× 7.5 cm) (上)
TSKgel DNA-STAT (4.6 mm I.D.× 10 cm) (下)

洗脱液: A: 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 9.0)

B: 2.0 mol/L NaCl + 20 mmol/L

Tris-HCl 缓冲液 (pH 9.0)

线性梯度: B 37.5% → 50%, 20 分钟

(TSKgel DNA-STAT)

B 25% → 37.5%, 20 分钟

(TSKgel DNA-NPR)

流速: 0.75 mL/min

检测: UV (260 nm)

温度: 25°C

进样量: 2 μL

样品: 1kb 间隔的 DNA 分子量标准物

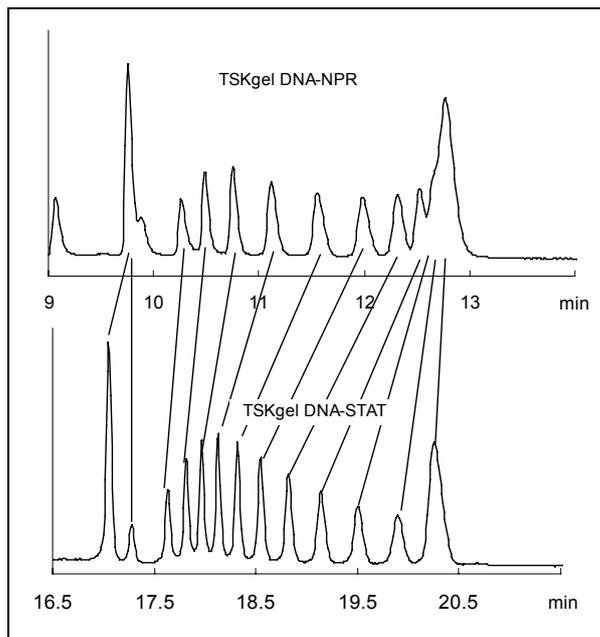


图 16. 图 15 的放大

另一方面，如图 17 所示，由于 TSKgel DNA-NPR 色谱柱对分析长度相同、碱基序列不同的短链 DNA 片断（含 26 个碱基的 PCR 引物）具有极佳的分离选择性，因此应根据样品情况及分析目的选择 TSKgel NPR 系列色谱柱或者 TSKgel STAT 系列色谱柱。

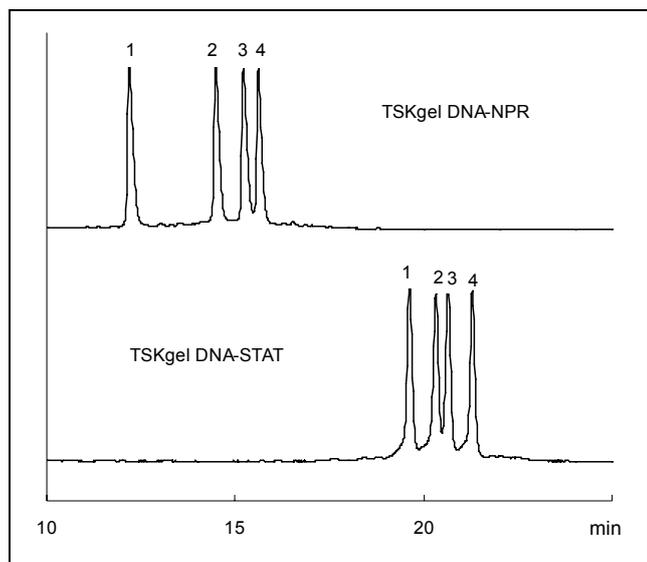


图 17. PCR 引物的分离结果比较

色谱柱： TSKgel DNA-NPR (4.6 mm I.D.× 7.5 cm) (上)

TSKgel DNA-STAT (4.6 mm I.D.× 10 cm) (下)

洗脱液： A: 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)

B: 0.75 mol/L NaCl + 20 mmol/L

Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)

线性梯度： B 50% → 75%, 25 分钟

流速： 0.8 mL/ min

检测： UV (260 nm)

温度： 25℃

进样量： 10 μL

样品浓度： 各 10 μmol/L

样品： 含 26 个碱基的 PCR 引物

1. 5'-TAATTAAGGACTCCGTTCTTCTATAT-3'-NH₂

2. 5'-TCTTTACTTTAGTCACAAAGCGATAA-3'-NH₂

3. 5'-GACTCCGTTCTTCTATATTTTCGAGG-3'-NH₂

4. 5'-GGACGTGCTGGGTGTCTTCTCCGTGCG-3'-NH₂

4. 阳离子交换色谱柱的应用实例

图 18 为使用阳离子交换色谱柱对单抗电荷异构体的分离实例。结果表明, 该类色谱柱对电荷略有差异的异构体可以获得极佳的分离效果。比较而言, TSKgel CM-STAT 色谱柱可以获得更为尖锐的色谱分离峰、分辨率更高。

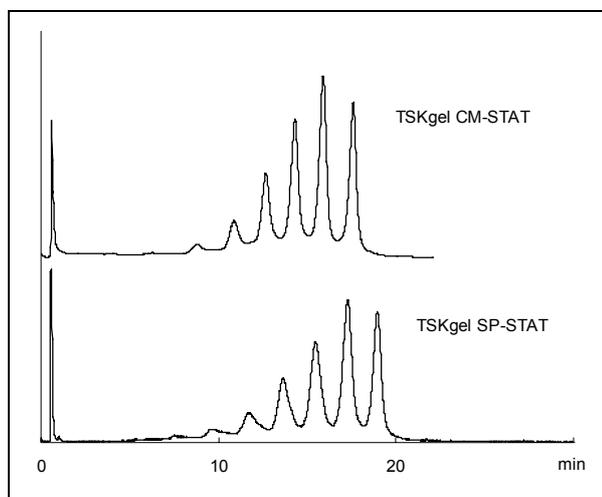


图 18. 纯化后的单抗电荷异构体的分离 (盐浓度梯度洗脱)

色谱柱: TSKgel CM-STAT (4.6 mm I.D. × 10 cm) (上)
TSKgel SP-STAT (4.6 mm I.D. × 10 cm) (下)

洗脱液: A: 20 mmol/L MES 缓冲液 (pH 6.0)

B: 0.1 mol/L NaCl + 20 mmol/L
MES 缓冲液 (pH 6.0)

线性梯度: B 25% → 55%, 30 分钟
(TSKgel SP-STAT)

B 20% → 50%, 30 分钟
(TSKgel CM-STAT)

流速: 1.0 mL/min

检测: UV (280 nm)

温度: 25°C

进样量: 10 μL

样品浓度: 1 g/L

样品: 纯化后的单抗

此外, 如图 19 所示, 利用 pH 梯度洗脱, TSKgel CM-STAT 色谱柱同样可以进行单抗电荷异构体的分离分析。

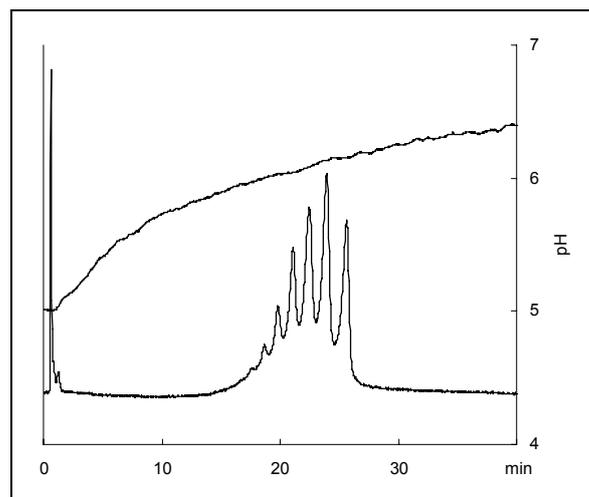


图 19. 纯化后的单抗电荷异构体的分离 (pH 梯度洗脱; 色谱聚焦)

色谱柱: TSKgel CM-STAT (4.6 mm I.D. × 10 cm)

洗脱液: A: 50 mmol/L 酸钠缓冲液 (pH 5.0)

B: 30 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (未调整 pH 值)

使用 A 液对色谱柱进行平衡, 进样后, 逐步过渡至 100% 的 B 液进行洗脱。

流速: 1.0 mL/min

检测: UV (280 nm)

温度: 25°C

进样量: 10 μL

样品浓度: 1 g/L

样品: 纯化后的单抗

研究人员正在研究使用聚乙二醇对蛋白质进行修饰 (PEG 化) 以延长蛋白药物的体内半衰期。图 20 和图 21 为使用 TSKgel SP-STAT 高通量色谱柱对聚乙二醇修饰溶菌酶的反应过程跟踪分析。图 20 是 PEG 化反应开始后, 一定时间取样分析后的叠加色谱图。图 21 是以各色谱图峰面积的百分比为纵坐标, 反应时间为横坐标所获得的反应过程变化跟踪结果。

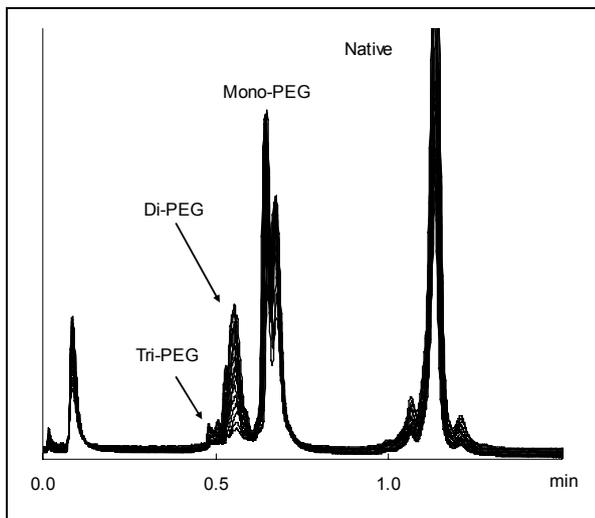


图 20. 溶菌酶 PEG 化反应的跟踪色谱图

色谱柱: TSKgel SP-STAT (3.0 mm I.D.× 3.5 cm)

洗脱液: A: 20 mmol/L 酸钠缓冲液 (pH 5.0)

B: 0.5 mol/L NaCl + 20 mmol/L

醋酸钠缓冲液 (pH 5.0)

线性梯度: B 0% → 100%, 1.5 分钟

流速: 2.0 mL/min

检测: UV (280 nm)

温度: 25°C

样品: 将 5g/L 的溶菌酶溶解于磷酸盐缓冲液中, 并添加 3 倍摩尔当量的聚乙二醇修饰试剂 (ME-200CS; 日本油脂公司产品)。每 4 分钟取样进行分析。

由于高通量色谱柱的分析时间大为缩短, 因而保证了该类色谱柱可以及时跟踪如 PEG 化修饰这样的快速反应中的变化情况。

此外, 如图 22 所示, 还可以使用 TSKgel SP-STAT 这样的高分辨率色谱柱进行单、双和三聚乙二醇修饰后的蛋白质多种异构体的精密分离分析。

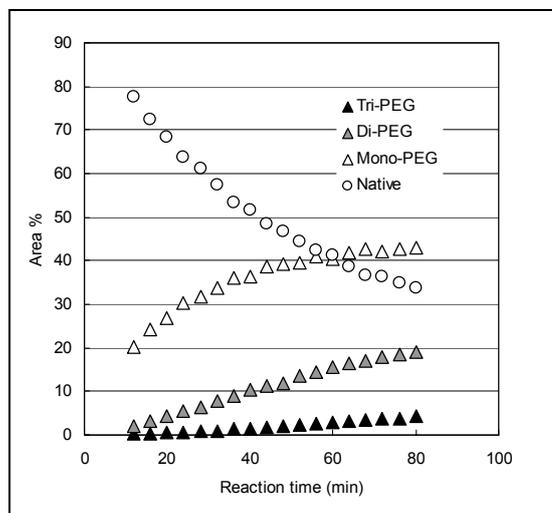


图 21. 溶菌酶 PEG 化过程中各洗脱峰面积百分比变化跟踪图

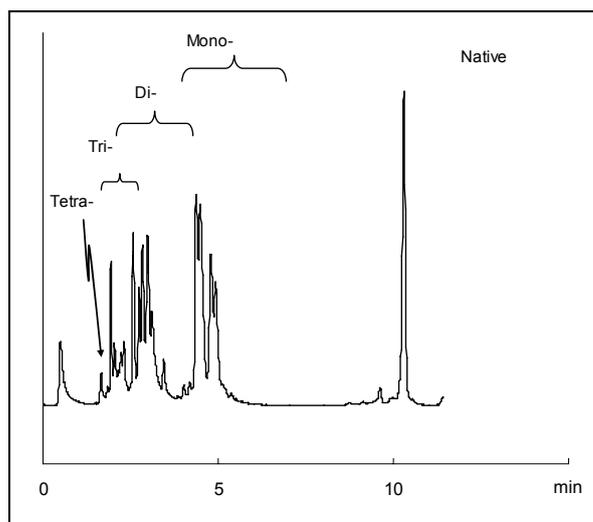


图 22. 溶菌酶 PEG 化反应物的色谱分析图

色谱柱: TSKgel SP-STAT (4.6 mm I.D.× 10 cm)

洗脱液: A: 20 mmol/L 酸钠缓冲液 (pH 5.0)

B: 0.5 mol/L NaCl + 20 mmol/L

醋酸钠缓冲液 (pH 5.0)

线性梯度: B 0% → 100%, 10 分钟

流速: 1.4 mL/min

检测: UV (280 nm)

温度: 25°C

进样量: 5 μL

样品: 图 20 中最后一次的反应物

图 23 是一种市售 PEG 化蛋白药物的分析色谱图。同时，收集各组分峰进一步进行了 SDS-PAGE 电泳分析，结果如图 24 所示。

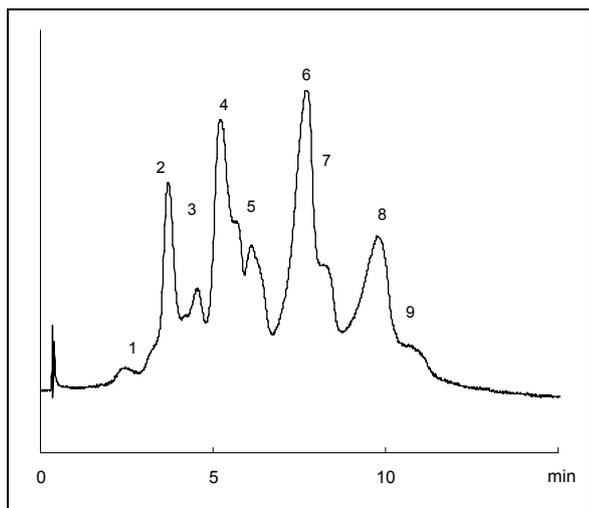


图 23. 市售 PEG 化蛋白药物的分析

色谱柱: TSKgel SP-STAT (4.6 mm I.D.× 10 cm)
 洗脱液: A: 20 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 4.2)
 B: 0.2 mol/L NaCl + 20 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 4.2)
 线性梯度: B 0% → 100%, 20 分钟
 流速: 1.5 mL/min
 检测: UV (280 nm)
 温度: 25°C
 样品: 市售 PEG 化蛋白药物

SDS-PAGE 电泳分析结果也表明，PEG 化蛋白药物中确实含有未分离的多个组分。TSKgel SP-STAT 色谱柱可以用于 PEG 药物生产中的过程控制及产品质量控制。

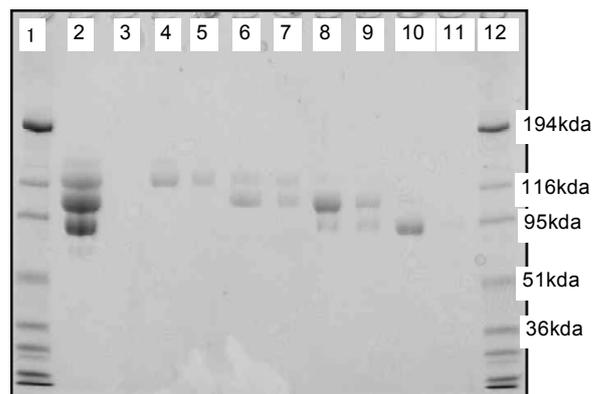


图 24. 市售 PEG 化蛋白药物洗脱组分的 SDS-PAGE 电泳分析结果

* 非还原 SDS-PAGE 电泳
 泳道 1、12: 分子量标记物
 泳道 2: 市售 PEG 化蛋白药物
 泳道 3 至 11: 图 22 所示峰组分

图 25 为使用 TSKgel CM-STAT 高分辨率色谱柱对一些市售抗体药物分离的色谱图。各抗体药物异构体在短时间内便得到了很好的分离。结果清楚地表明，TSKgel CM-STAT 色谱柱完全适用于抗体药物的研发及品质管理。

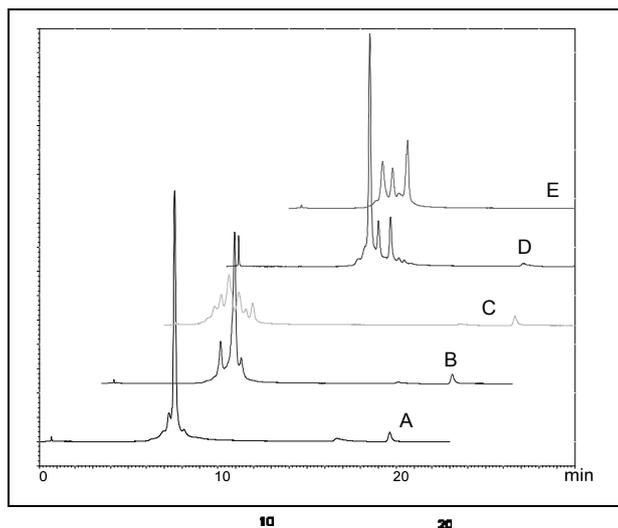


图 25. 抗体药物异构体的分析

色谱柱: TSKgel CM-STAT (4.6 mm I.D. × 10 cm)

洗脱液: A: 20 mmol/L MES 缓冲液 (pH 6.0)

B: 0.5 mol/L NaCl + 20 mmol/L
MES 缓冲液 (pH 6.0)

线性梯度: B 10% → 30%, 15 分钟

流速: 1.0 mL/min

检测: UV (280 nm)

温度: 25°C

进样量: 20 μL

样品浓度: 0.5 g/L

样品: A: 人源化抗体, IgG₁

B: 人源化抗体, IgG₁

C: 嵌合抗体, IgG₁

D: 嵌合抗体, IgG₁

E: 嵌合抗体, IgG₁

* 本数据为日本相模中央化学研究所 Hitoshi Kakidani 教授惠赠。

5. 总结

迄今为止，非多孔性填料装填而成的 TSKgel NPR 系列离子交换色谱柱已被广泛应用于蛋白质和核酸等的高分辨率分离分析。然而，在一些情况下，该系列色谱柱存在柱压过高、对低分子量组分的分析峰形较差的不足之处。TSKgel STAT 系列离子交换色谱柱，由于其填料基质的特点及表面修饰技术的改良，对低分子量组分的分析峰形得到改善。加之对填料粒径的优化处理，该系列色谱柱更可以在较低的柱压下实现高分辨率的分离分析。此外，该系列色谱柱的上市，更加充实了东曹公司高分辨率、高通量离子色谱柱的产品链，因此应用范围必将更为广泛。

*本报告中使用的以下名称是东曹公司的商标：TSKgel、TSKgel STAT