

高性能 SEC 色谱柱 TSKgel® UP-SW Aggregate

— 目 录 —

	页码
1. 前言	1
2. TSKgel UP-SW Aggregate 的基本特性	1
2 - 1. 填料的特性	1
2 - 2. 标准曲线与分离性能	1
2 - 3. 洗脱液中盐浓度的影响	3
2 - 4. 测定时流速的影响	4
2 - 5. 色谱柱的耐用性	5
3. 分析示例	6
3 - 1. 抗体经热处理后产生的多聚体分析	6
3 - 2. IgM 的分析	7
3 - 3. 核酸的分析	8
4. 总结	8

1. 前言

抗体药物中使用的单克隆抗体会在生产、储存和运输过程中产生聚集体并引发副作用，所以在进行质量控制时，会使用尺寸排阻色谱法（SEC）进行分析。由于二聚体以上的多聚体可能会引发免疫反应，所以在抗体药物的质量控制中，规定要对高分子杂质的含量进行定量评估。

另外，通过定量分析四聚体、六聚体等多聚体，明确聚集体的形成机理也变得越来越重要。

现在，以分离聚集体为主要目的的 SEC 色谱柱 TSKgel UP-SW Aggregate 已实现了商品化。本报告主要介绍 TSKgel UP-SW Aggregate 的基本特性和分离示例。

2. TSKgel UP-SW Aggregate 的基本特性

2-1. 填料的特性

表 1 的内容是 TSKgel UP-SW Aggregate 的填料特性、色谱柱的产品规格，以及与常用于抗体分离的现有色谱柱 UP-SW 系列的对比。TSKgel UP-SW Aggregate 色谱柱中填充了在 30 nm 孔径改性硅胶表面导入二醇基后形成的 3 μm 粒径的填料。与现有的 UP-SW 系列色谱柱相比，孔径更大，适用于分离抗体聚集体。

表 1 填料、色谱柱的特性

产品名称	TSKgel UP-SW Aggregate	TSKgel UP-SW3000	TSKgel UP-SW2000
色谱柱尺寸	4.6 mm I.D. × 30 cm, 15 cm	4.6 mm I.D. × 30 cm, 15 cm	4.6 mm I.D. × 30 cm, 15 cm
基质	改性硅胶	改性硅胶	改性硅胶
官能团	二醇	二醇	二醇
粒径	3 μm	2 μm	2 μm
孔径	30 nm	25 nm	12.5 nm
分子量测定范围	10 ~ 2,000 kDa	10 ~ 500 kDa	5 ~ 100 kDa
用途	抗体（聚集体）的高分离度分析	抗体（二聚体 / 单体 / 片段）的高分离度分析	抗体（片段）、肽、寡核苷酸的高分离度分析

2-2. 标准曲线和分离度

图 1 的内容是使用 TSKgel UP-SW Aggregate、TSKgel UP-SW3000 和 TSKgel UP-SW2000 测定蛋白标准品的色谱图。另外，各洗脱峰的分度度（R）如表 2 所示。可以看出，TSKgel UP-SW Aggregate 与其他色谱柱相比，甲状腺球蛋白二聚体（洗脱峰 1'）与单体（洗脱峰 1），以及甲状腺球蛋白单体（洗脱峰 1）与 γ-球蛋白二聚体（洗脱峰 2'）的分度度更高，适用于大分子蛋白的分离。图 2 是使用相同色谱柱在相同条件下测定甲状腺球蛋白样品的色谱图。

使用 TSKgel UP-SW3000 及 TSKgel UP-SW 2000 时，甲状腺球蛋白的二聚体以上的聚集体因无法进入细孔内而被排阻，洗脱至 V_0 中。而使用孔径较大的 TSKgel UP-SW Aggregate 时，二聚体会进入细孔内，与三聚体以上的多聚体分离开来。

图 3 是使用蛋白标准品时的标准曲线对比图。可以看出，在分子量大于 300,000 以上的范围内，TSKgel UP-SW Aggregate 与其他色谱柱相比，其标准曲线的斜率更加平缓，可以得到更好的分离结果。

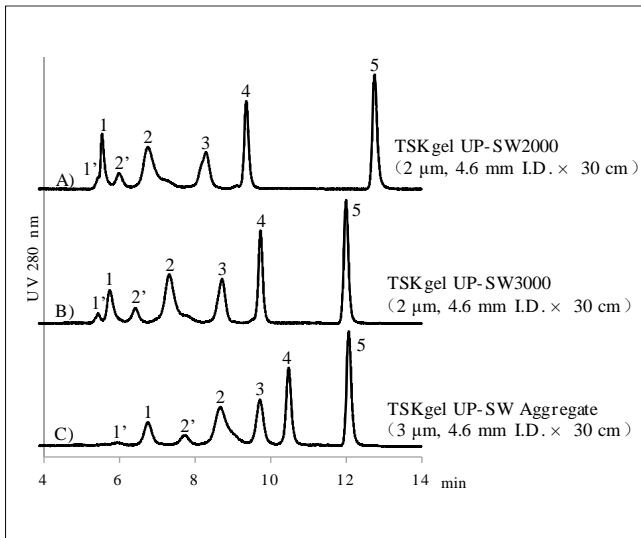


图1 蛋白标准品的分离谱图

〈测定条件〉

色谱柱: A) TSKgel UP-SW2000
(2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)
B) TSKgel UP-SW3000
(2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)
C) TSKgel UP-SW Aggregate
(3 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)
洗脱液: 100 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液 (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 °C
进样量: 10 μL
样品: 1. 甲状腺球蛋白, 640,000 Da
(1'. 甲状腺球蛋白二聚体)
2. γ-球蛋白, 155,000 Da
(2'. γ-球蛋白二聚体)
3. 卵白蛋白, 47,000 Da
4. 核糖核酸酶 A, 13,700 Da
5. *p*- 氨苯甲酸, 137 Da

表2 蛋白标准品洗脱峰的分离度 (R) 对比

色谱柱	R (洗脱峰 1'/1)	R (洗脱峰 1/2')	R (洗脱峰 2'/2)	R (洗脱峰 2/3)	R (洗脱峰 3/4)	R (洗脱峰 4/5)
TSKgel UP-SW Aggregate	1.58	2.23	1.73	2.17	2.48	6.48
TSKgel UP-SW3000	1.08	2.11	2.21	3.33	3.48	10.34
TSKgel UP-SW2000	—	1.68	1.71	3.08	3.15	15.13

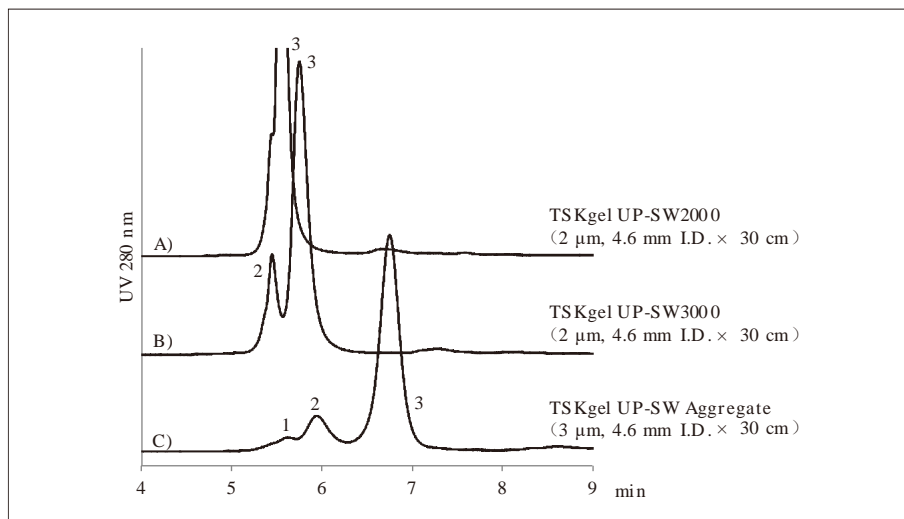


图2 甲状腺球蛋白的色谱图

〈测定条件〉

色谱柱: A) TSKgel UP-SW2000 (2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)
B) TSKgel UP-SW3000 (2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)
C) TSKgel UP-SW Aggregate (3 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)
洗脱液: 100 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液 (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 °C
进样量: 10 μL
样品: 甲状腺球蛋白
洗脱峰 1. 聚集体, 2. 二聚体, 3. 单体

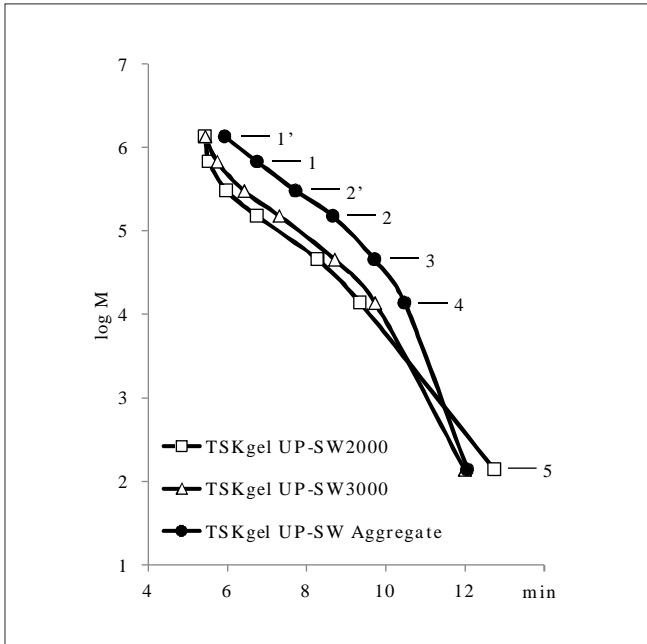


图3 对蛋白标准品的标准曲线

2-3. 洗脱液中盐浓度影响

使用 SEC 法精确测定时，需要抑制填料与测定物质之间产生的非特异性相互作用（静电相互作用、疏水性相互作用等）。在使用以改性硅胶为基质的 TSKgel UP-SW Aggregate 分析时，对洗脱液的盐浓度进行优化以抑制填料表面残留的硅烷醇基与蛋白质之间发生的静电相互作用（排阻离子、吸附离子）是非常重要的。

图4 是使用 20 mmol/L 的磷酸钠缓冲溶液 (pH 6.7)，通过改变硫酸钠的盐浓度后，蛋白标准品的洗脱情况。等电点 (pI) 低于洗脱液 pH 的甲状腺球蛋白 (pI 4.5)、 γ -球蛋白 (pI 5.1)、牛血清白蛋白 (pI 4.9) 以及 β -乳球蛋白 (pI 5.2) 由于在洗脱液中带负电，所以在较低盐浓度下，

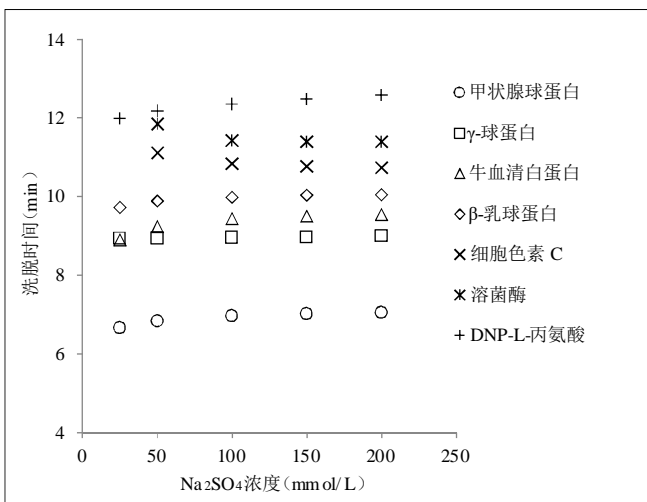


图4 硫酸钠浓度对蛋白质洗脱时间的影响

〈测定条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW2000 (4.6 mm I.D. × 30 cm)
 TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. × 30 cm)
 TSKgel UP-SW Aggregate
 (4.6 mm I.D. × 30 cm)

洗脱液: 100 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液 (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 °C

进样量: 10 μ L

样品: 1. 甲状腺球蛋白, 640,000 Da
 (1'. 甲状腺球蛋白二聚体)
 2. γ -球蛋白, 155,000 Da
 (2'. γ -球蛋白二聚体)
 3. 卵白蛋白, 47,000 Da
 4. 核糖核酸酶 A, 13,700 Da
 5. *p*- 氨基甲酸, 137 Da

与残留的硅烷醇基之间的离子排斥作用，能更快洗脱。一般来说，盐浓度越高越可以抑制静电相互作用，所以随着洗脱液中硫酸钠浓度的升高，洗脱速度会变慢。在浓度达到 100 mmol/L 以上时，所需的洗脱时间基本保持恒定。

而 pI 高于洗脱液 pH 的细胞色素 C (pI 10.1) 以及溶菌酶 (pI 11.2) 在洗脱液中带正电，与残留的硅烷醇基之间的静电相互作用，会产生附着填料的现象。随着洗脱液中硫酸钠浓度的升高，洗脱速度变快，当浓度高于 150 mmol/L 时，所需的洗脱时间基本相同。

另外，二硝基氟苯(dinitrophenyl, DNP)-L-丙氨酸之类带有疏水性的化合物，随着洗脱液中盐浓度的升高，会由于疏水性吸附而导致洗脱速度变慢。

〈测定条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW Aggregate
 (4.6 mm I.D. × 30 cm)

洗脱液: 20 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 6.7)
 + X 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 °C

进样量: 10 μ L

2-4. 测定流速的影响

测定流速对理论塔板数的影响与填料的粒径、测定物质的分子尺寸等因素相关。使用了2种分子量不同的蛋白质(牛血清白蛋白: Mw 66,500、核糖核酸酶 A: Mw 13,700)以及小分子化合物 *p*-氨基甲酸 (Mw 137), 对测定流速的影响进行了研究(图5)。

测定流速越快, *p*-氨基甲酸的理論塔板数越大。如果加大 *p*-氨基甲酸的扩散系数, 降低测定流速, 则会由于扩散而导致理论塔板数减小。但是, 对于分子量较大的蛋白质, 呈现了测定流速越慢理论塔板数越大的倾向, 分子量越大,

越可在更慢的流速下获得更大的理论塔板数。这样, 在分离蛋白质时, 降低测定流速可以提高色谱柱柱效, 从而得到更高的分离度。

图6呈现的是使用 TSKgel UP-SW Aggregate 时, 流速对单克隆抗体二聚体和单体的分离度的影响。降低测定流速, 可以提高色谱柱柱效, 并提高单克隆抗体二聚体和单体的分离度。

另外, 图7呈现的是测定流速与压降的关系。TSKgel UP-SW Aggregate (30 cm 色谱柱) 在标准流速 (0.35 mL/min) 下, 可在 10 MPa 以下的较低压强下使用。

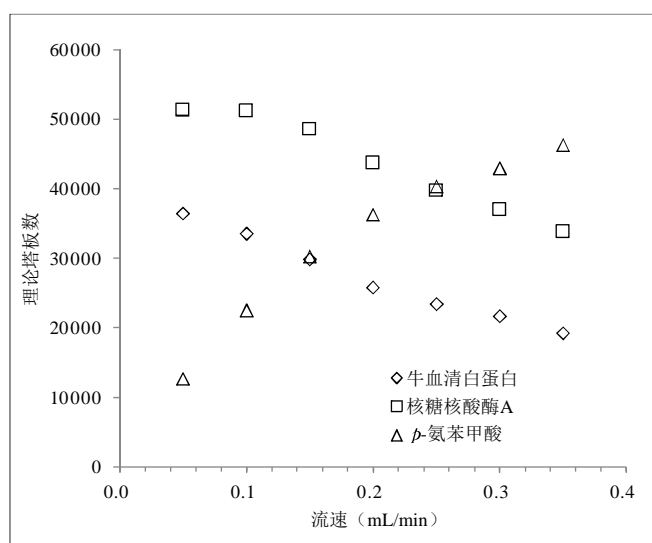


图5 流速对理论塔板数的影响

〈测定条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW Aggregate
(4.6 mm I.D. × 30 cm)
洗脱液: 100 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 6.7)
+ 100 mmol/L 硫酸钠
+ 0.05 % 叠氮化钠
流速: 0.05 ~ 0.35 mL/min
检测: UV 280 nm
温度: 25 °C
进样量: 10 μL
样品: 牛血清白蛋白, 66,500 Da
核糖核酸酶 A, 13,700 Da
p-氨基甲酸, 137 Da

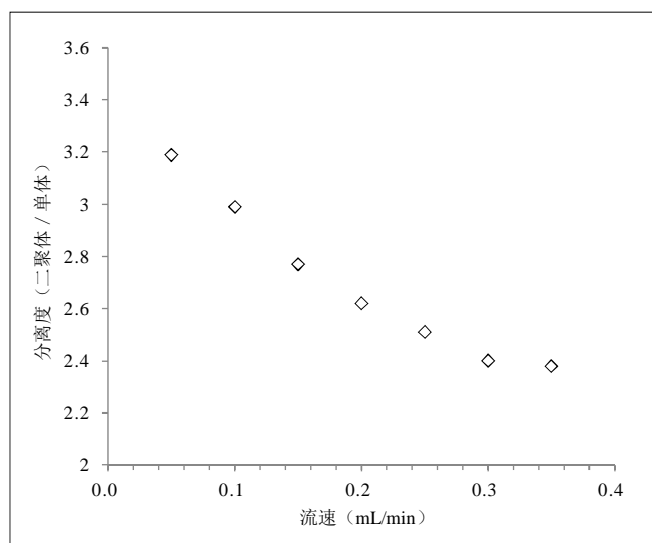


图6 流速对分离度的影响

〈测定条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW Aggregate
(4.6 mm I.D. × 30 cm)
洗脱液: 100 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 6.7)
+ 100 mmol/L 硫酸钠
+ 0.05 % 叠氮化钠
流速: 0.05 ~ 0.35 mL/min
检测: UV 280 nm
温度: 25 °C
进样量: 10 μL
样品: 单克隆抗体 (人)

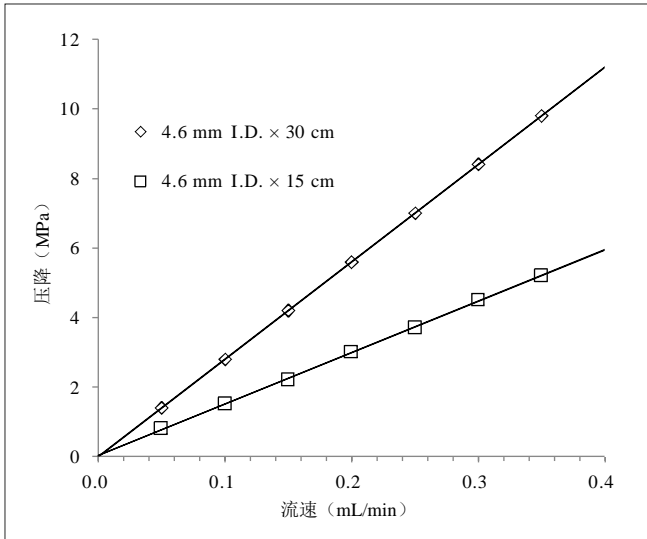


图7 流速与压降的关系

〈测定条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW Aggregate

(4.6 mm I.D. × 30 cm, 15 cm)

洗脱液: 100 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 6.7)

+ 100 mmol/L 硫酸钠

+ 0.05 % 叠氮化钠

流 速: 0.05 ~ 0.35 mL/min

温 度: 25 °C

2-5. 色谱柱的耐用性

通过观察小分子化合物 *p*-氨基苯甲酸的洗脱情况, 可以确认 TSKgel UP-SW Aggregate (4.6 mm I.D. × 30 cm、4.6 mm I.D. × 15 cm) 在最大流速下 (30 cm 色谱柱的流速是 0.35 mL/min、15 cm 色谱柱的流速是 0.50 mL/min), 连

续进样时的色谱柱耐用性。图 8 和图 9 所示为在不同尺寸的色谱柱上对 3 个批次填料的确认结果。两种色谱柱都进样 500 次后, 色谱柱性能未见明显变化, 表明了色谱柱具有良好的使用寿命。

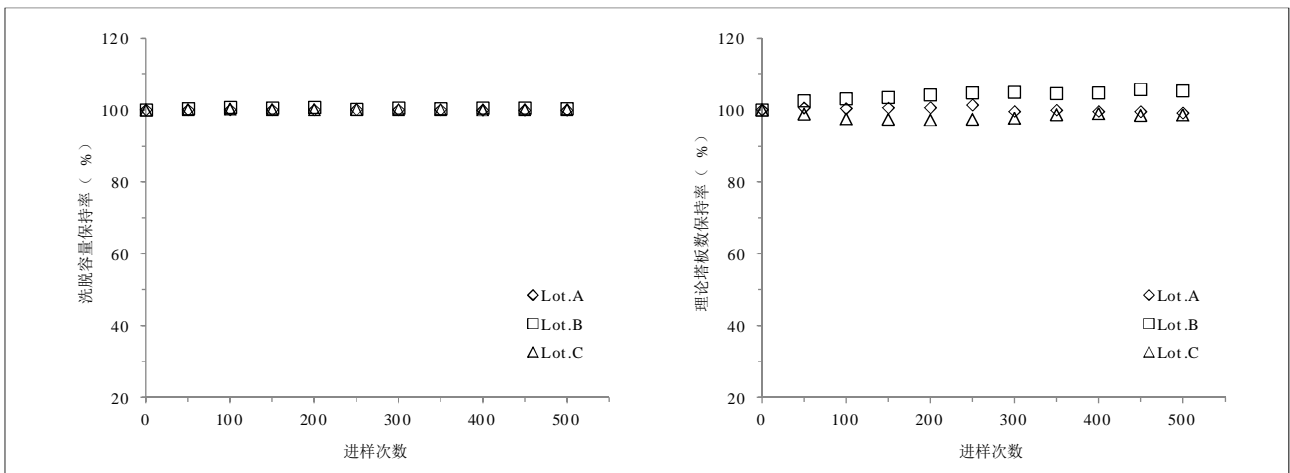


图8 色谱柱的稳定性 (连续进样: 30 cm 色谱柱)

〈测定条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW Aggregate (4.6 mm I.D. × 30 cm)

洗脱液: 100 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液 (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 °C

进样量: 10 μL

样 品: 甲状腺球蛋白、 γ -球蛋白、卵白蛋白、核糖核酸酶 A、*p*-氨基苯甲酸

* 使用了 *p*-氨基苯甲酸确认色谱柱性能。

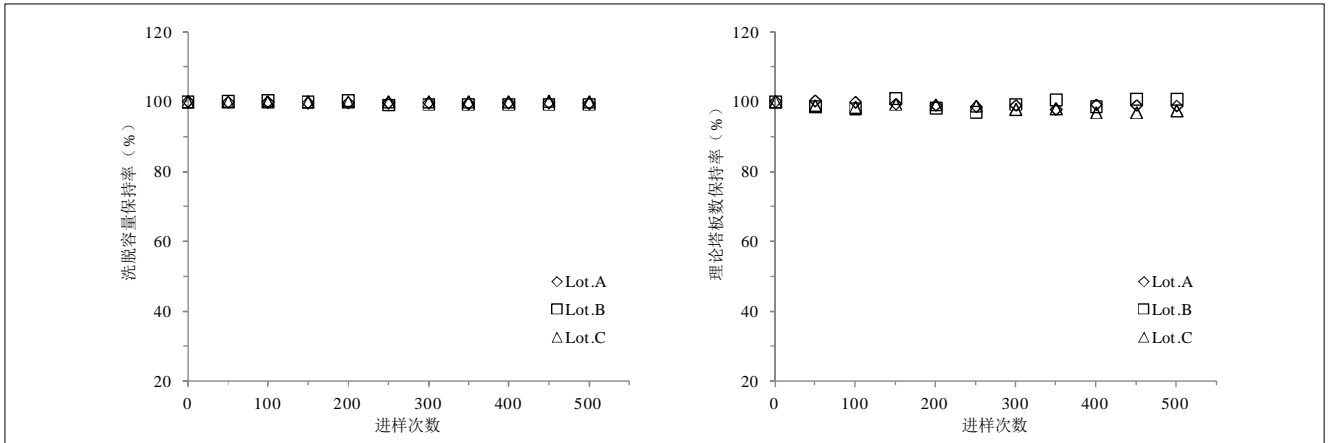


图9 色谱柱的稳定性（连续进样：15 cm色谱柱）

〈测定条件〉

色谱柱：TSKgel UP-SW Aggregate (4.6 mm I.D. × 15 cm)

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

流速：0.50 mL/min

检测：UV 280 nm

温度：25 °C

进样量：5 μL

样品：甲状腺球蛋白、γ-球蛋白、卵白蛋白、核糖核酸酶 A、*p*-氨基甲酸

* 使用了 *p*-氨基甲酸检测色谱柱性能。

3. 分析示例

3-1. 抗体经热处理后产生的聚集体分析

使用 TSKgel UP-SW Aggregate 和 TSKgel UP-SW 3000, 对单克隆抗体在热变性后产生的聚集体进行了分析测定。色谱图如图 10 所示。使用 TSKgel UP-SW3000 时, 由于热变性作用产生的聚集体不会进入到细孔内, 而是洗脱至 V0 中,

所以无法获得聚集体的分子尺寸相关信息。但是, 使用孔径较大的 TSKgel UP-SW Aggregate 时, 聚集体会进入细孔内并洗脱出来。从色谱图中可以看出, 使用 TSKgel UP-SW Aggregate 时, 随着热处理时间变长, 分子尺寸较大的聚集体会随之增加。

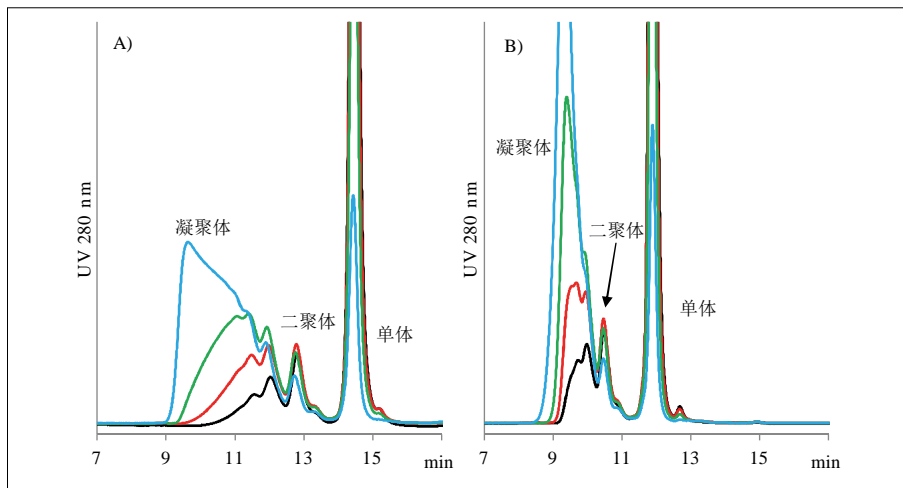


图10 抗体凝聚体的经时变化

〈测定条件〉

色谱柱：A) TSKgel UP-SW Aggregate (3 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

B) TSKgel UP-SW3000 (2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

洗脱液：40 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 6.7) + 400 mmol/L 高氯酸钠 + 0.05 % 叠氮化钠

流速：0.20 mL/min

检测：UV 280 nm

温度：25 °C

进样量：10 μL

样 品：单克隆抗体

*反应条件：70 °C（2小时），73 °C（2小时），77 °C（2小时），80 °C（2小时）

3-2. IgM 的分析

图 11 是使用 TSKgel UP-SW Aggregate、TSKgel UP-SW3000 和 TSKgel UP-SW2000，测定 IgM（分子量 900 kDa 的五聚体免疫球蛋白）的色谱图对比。使用 TSKgel UP-SW3000 和 TSKgel UP-SW2000 时，IgM 的聚集体在单体

洗脱峰的前端，没有很好地分开。而使用 TSKgel UP-SW Aggregate 时，IgM 聚集体与单体的分离效果得到了提升。所以，根据测定对象的分子尺寸来选择合适孔径的色谱柱，便可以进行分析。

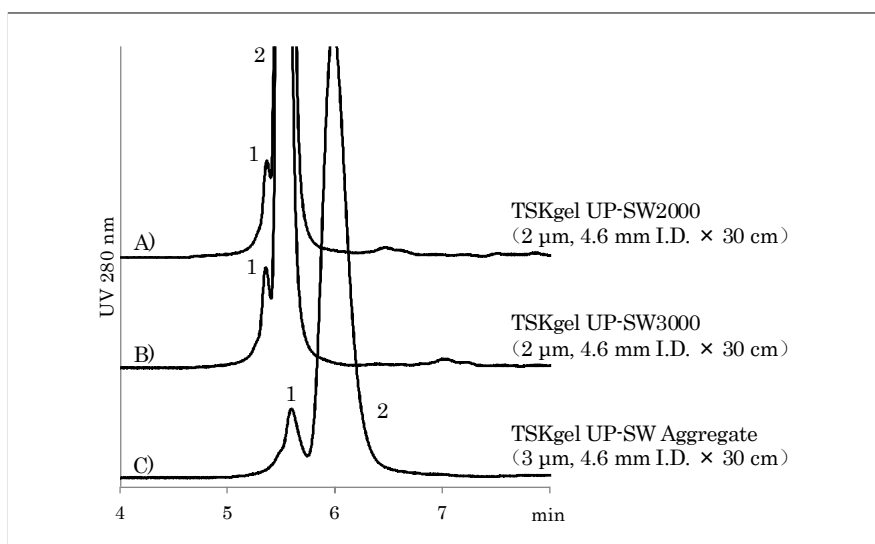


图11 IgM的色谱图

〈测定条件〉

色谱柱：A) TSKgel UP-SW2000 (2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

B) TSKgel UP-SW3000 (2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

C) TSKgel UP-SW Aggregate (3 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

洗脱液：40 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 6.7) + 400 mmol/L 高氯酸钠 + 0.05 % 叠氮化钠

流 速：0.35 mL/min

检 测：UV 280 nm

温 度：25 °C

进样量：10 μL

样 品：IgM

1. 二聚体, 2. 单体

3-3. 核酸的分析

图 12 是使用了 TSKgel UP-SW Aggregate、TSKgel UP-SW3000 和 TSKgel UP-SW2000，测定 DNA 标记的色谱图

对比。在分子尺寸大于 100 个碱基对的区域内，TSKgel UP-SW Aggregate 与其他 UP-SW 色谱柱相比，其洗脱峰的间隔更大，显示出了良好的分离性能。

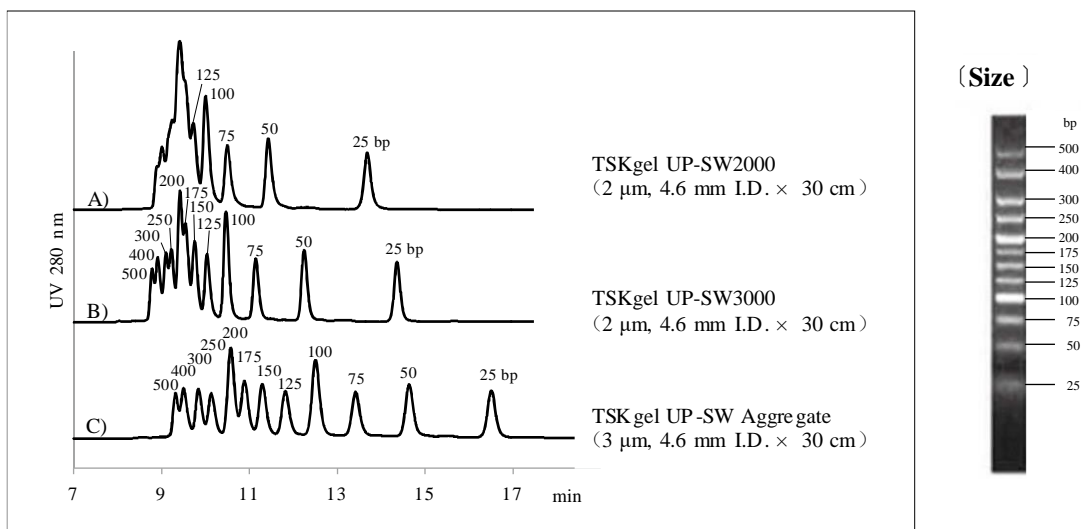


图12 DNA标记的色谱图

〈测定条件〉

色谱柱：A) TSKgel UP-SW2000 (2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

B) TSKgel UP-SW3000 (2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

C) TSKgel UP-SW Aggregate (3 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

洗脱液：20 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 6.7) + 300 mmol/L 氯化钠 + 0.05 % 叠氮化钠

流速：0.2 mL/min

检测：UV 260 nm

温度：25 °C

进样量：10 μL

样品：DNA Ladder

4. 总结

综上所述，对 TSKgel UP-SW Aggregate 进行了简要的说明。使用本色谱柱，不仅可以确认抗体聚集体的分布，

还可以对 IgM、长链核酸等分子尺寸较大的物质进行精确分析。

※ “TSKgel” 是东曹株式会社在日本的注册商标。



TOSOH

TOSOH BIOSCIENCE

东曹（上海）生物科技有限公司

地址：上海市徐汇区虹梅路1801号A区凯科国际大厦1001室

电话：+86-21-34610856 传真：+86-21-34610858

邮箱：info.tbs@tosoh.com.cn

网址：www.separations.asia.tosohbioscience.com