

SEPARATION REPORT

高性能SEC色谱柱 TSKgel® UP-SW3000-LS

—目 录—

	页码
1. 前言	1
2. TSKgel UP-SW3000-LS的基本特性	1
2 - 1. 填料、色谱柱的规格	1
2 - 2. 色谱柱的分离性能	2
2 - 3. 色谱柱中蛋白质的吸附特性	3
2 - 4. 使用光散射检测器分析	4
2 - 5. 测定流速的影响	5
2 - 6. 色谱柱的耐用性	6
2 - 7. 填料的批间差异	8
3. 分离实例	8
4. 与光散射检测器联用的注意点	9
5. 总结	9

1. 前言

以抗体药物为首的生物药物主要有蛋白质、核酸、多糖等，与通常的药物相比，生物药的分子尺寸更大，因此也被称为大分子药物。由于分子大，所以具有容易变性和分解的特性，在生产工艺和存储、运输时会产生多聚体、片段等分子大小变异体。这些也被指出可能引起免疫原性。因此，分子大小变异体的含量被列为关键质量属性（CQA: Critical Quality Attributes，确保药物质量的必要性或性质）之一，在分析时常会使用尺寸排阻色谱（SEC）。近年来，除了紫外可见吸收检测器（UV检测器）之外，还推荐使用可直接评价绝对分子量和分子尺寸的光散射检测器。

现在，我们向市场推出了蛋白质初期吸附较低，并且可应用于光散射检测器的高性能SEC色谱柱TSKgel UP-SW3000-LS。本报告主要介绍了TSKgel UP-SW3000-LS色谱柱的基本特性及其分离示例。

2. TSKgel UP-SW3000-LS的基本特性

2-1. 填料、色谱柱的规格

表1的内容是TSKgel UP-SW3000-LS的填料特性、色谱柱的产品规格以及与现有TSKgel UP-SW3000的对比。TSKgel UP-SW3000-LS色谱柱是由25 nm孔径硅胶表面导入二醇基后制成的2 μm颗粒充填。具有与现有TSKgel UP-SW3000相同的高分离性能，适用于抗体二聚体和单体的分离，同时，由于降低了蛋白质样品的初期吸附，并且色谱柱脱落（shedding）较少，所以可应用于光散射检测器。

色谱柱规格上分为4.6 mm I.D.×30 cm的高分辨率分析色谱柱，以及4.6 mm I.D.×15 cm的快速分析色谱柱。

表1 填料、色谱柱的规格

	新色谱柱		现有色谱柱	
品名	TSKgel UP-SW3000-LS		TSKgel UP-SW3000	
色谱柱尺寸	4.6 mm I.D. × 30 cm	4.6 mm I.D. × 15 cm	4.6 mm I.D. × 30 cm	4.6 mm I.D. × 15 cm
基质	硅胶		硅胶	
官能团	二醇基		二醇基	
粒径	2 μm		2 μm	
孔径	25 nm		25 nm	
分子量排阻限 (蛋白质)	800 kDa		800 kDa	
分子量测定范围 (蛋白质)	10~500 kDa		10~500 kDa	
保存溶剂	20%乙醇溶液		0.1 mol/L磷酸盐缓冲液+0.1 mol/L硫酸钠+0.05%叠氮化钠 (pH 6.7) 或含0.05%叠氮化钠的缓冲液	
用途	抗体（二聚体 / 单体 / 片段）的高分辨率分析	抗体（二聚体 / 单体）的快速分析	抗体（二聚体 / 单体 / 片段）的高分辨率分析	抗体（二聚体 / 单体）的快速分析
	与光散射检测器联用分析			

2-2. 色谱柱的分离性能

图1是使用TSKgel UP-SW3000-LS和TSKgel UP-SW3000测定标准蛋白质时的色谱比较图，图2是使用标准蛋白质时的校正曲线比较图。可以看出，TSKgel UP-SW3000-LS与现有的TSKgel UP-SW3000相比，具有相同的分离选择性以及相同的校正曲线。

另外，图1中各洗脱峰的分度度 (R) 如表2所示，色谱柱的理论塔板数如表3所示。可以看出，TSKgel UP-SW3000-LS与现有的TSKgel UP-SW3000相比，蛋白质的分离度相同，理论塔板数相同或更高。

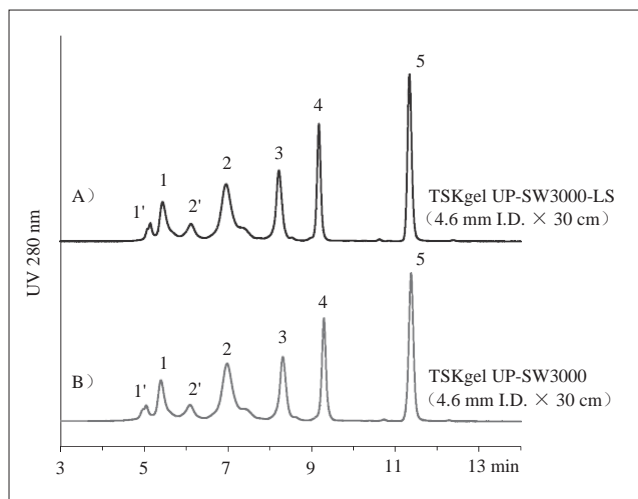


图1 标准蛋白质的色谱图

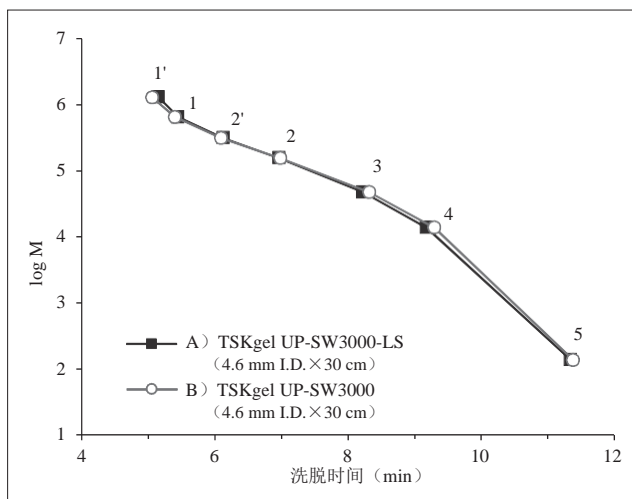


图2 标准蛋白质的校正曲线

〈测定条件〉

色谱柱：A) TSKgel UP-SW3000-LS

B) TSKgel UP-SW3000

色谱柱尺寸：4.6 mm I.D. × 30 cm

洗脱液：100 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (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 °C

进样量：10 μL

样品：1. 甲状腺球蛋白 (MW 640,000) (1'. 甲状腺球蛋白二聚体)

2. γ -球蛋白 (MW 155,000) (2'. γ -球蛋白二聚体)

3. 卵白蛋白 (MW 47,000)

4. 核糖核酸酶A (MW 13,700)

5. *p*-氨基苯甲酸 (MW 137)

表2 色谱柱性能对比 (分离度 R)

色谱柱	分离度 R			
	洗脱峰1/2	洗脱峰2/3	洗脱峰3/4	洗脱峰4/5
A) TSKgel UP-SW3000-LS	4.05	3.70	4.43	12.60
B) TSKgel UP-SW3000	4.01	3.46	4.07	10.29

表3 色谱柱性能对比（理论塔板数）

色谱柱	理论塔板数	
	核糖核酸酶A（洗脱峰4）	p-氨基甲酸（洗脱峰5）
A) TSKgel UP-SW3000-LS	51,595	58,233
B) TSKgel UP-SW3000	43,340	48,455

2-3. 色谱柱中蛋白质的吸附特性

TSKgel UP-SW3000-LS的保存溶剂与现有的TSKgel SW色谱柱不同，建议使用20%乙醇水溶液（表1）。使用20%乙醇水溶液保存的益处较多，例如可提高色谱柱保存稳定性，防止色谱柱内流动相盐结晶的蓄积（防止色谱柱脱落？增加），不使用叠氮化钠等。但是，由于使用20%乙醇水溶液保存时，可能会发生样品的初期吸附，所以对低浓度蛋白质（甲状腺球蛋白：Mw 640,000、 γ -球蛋

白：Mw 155,000、卵白蛋白：Mw 47,000）样品的初期吸附进行了验证。使用20%乙醇水溶液，对4 CV（色谱柱规格）通液后的色谱柱替换洗脱液后，连续进样10次，对比第10次进样（平顶曲线）和第1次进样的峰面积值，确认到在色谱柱中的吸附率。使用了TSKgel UP-SW3000-LS、TSKgel UP-SW3000以及市售的UHPLC用SEC色谱柱，验证结果如图3所示。可以看出，TSKgel UP-SW3000-LS与TSKgel UP-SW3000以及市售的UHPLC用SEC色谱柱相比，蛋白质的初期吸附已降低。

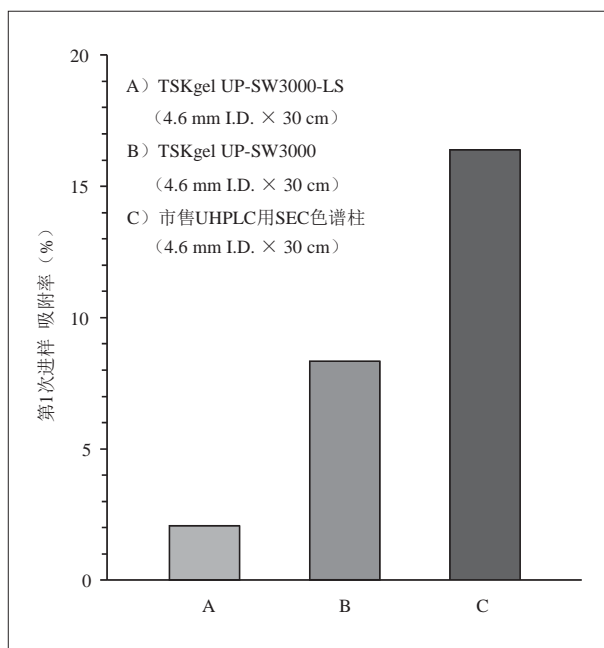


图3 色谱柱中蛋白质的吸附率

〈测定条件〉

色谱柱：A) TSKgel UP-SW3000-LS

B) TSKgel UP-SW3000

C) 市售UHPLC用SEC色谱柱

色谱柱尺寸：4.6 mm I.D. × 30 cm

洗脱液：100 mmol/L 磷酸钠缓冲液（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 °C

进样量：10 μ L

样品：1. 甲状腺球蛋白（MW 640,000）、0.05 g/L

2. γ -球蛋白（MW 155,000）、0.1 g/L

3. 卵白蛋白（MW 47,000）、0.1 g/L

2-4. 使用光散射检测器分析

使用TSKgel UP-SW3000-LS和市售UHPLC用SEC色谱柱，测定牛血清白蛋白的色谱图对比如图4所示。TSKgel UP-SW3000-LS与市售UHPLC用SEC色谱柱相比，其基线干扰更少，并且由于未观察到进样峰，所以也适用于光散射检测器的测定。

另外，使用填充了不同批次填料的TSKgel UP-SW3000-LS，测定牛血清白蛋白的色谱图对比如图5所示。可以看出，每个色谱柱的基线干扰都很少，批间的差异很小。

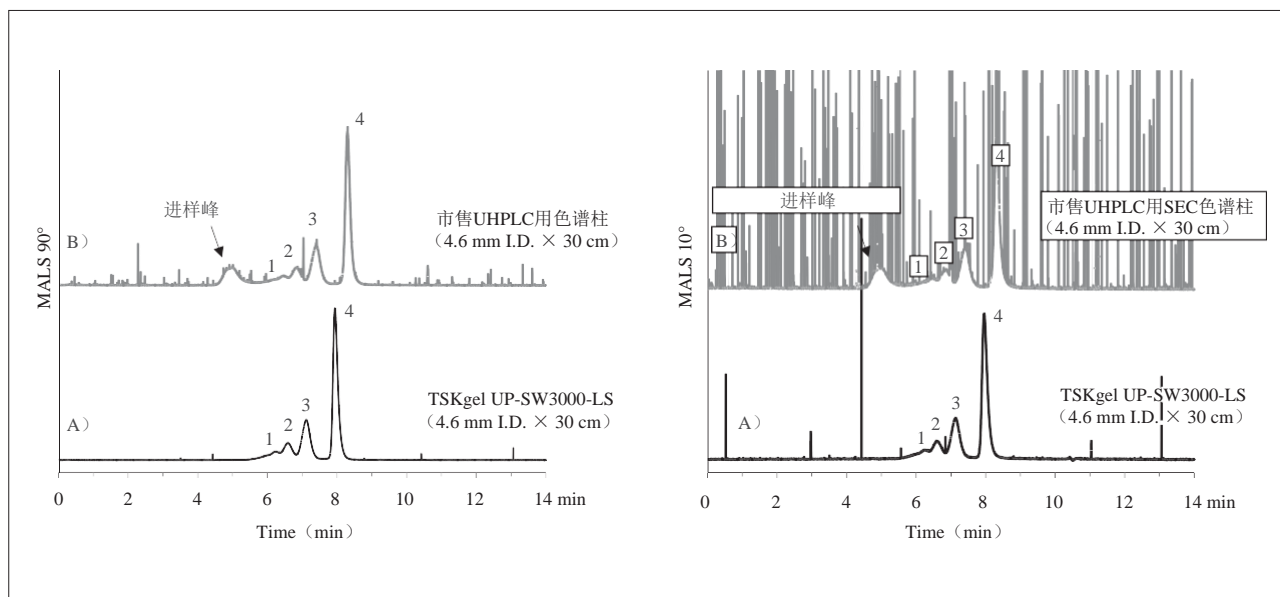


图4 牛血清白蛋白的色谱图（光散射分析，产品对比）

〈测定条件〉

色谱柱：A) TSKgel UP-SW3000-LS

B) 市售UHPLC用SEC色谱柱

色谱柱尺寸：4.6 mm I.D. × 30 cm

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

流速：0.35 mL/min

检测：MALS 10°、90°

温度：25 °C

进样量：10 μL

样品：牛血清白蛋白（MW 66,500）

1. 多聚体、2. 三聚体、3. 二聚体、4. 单体

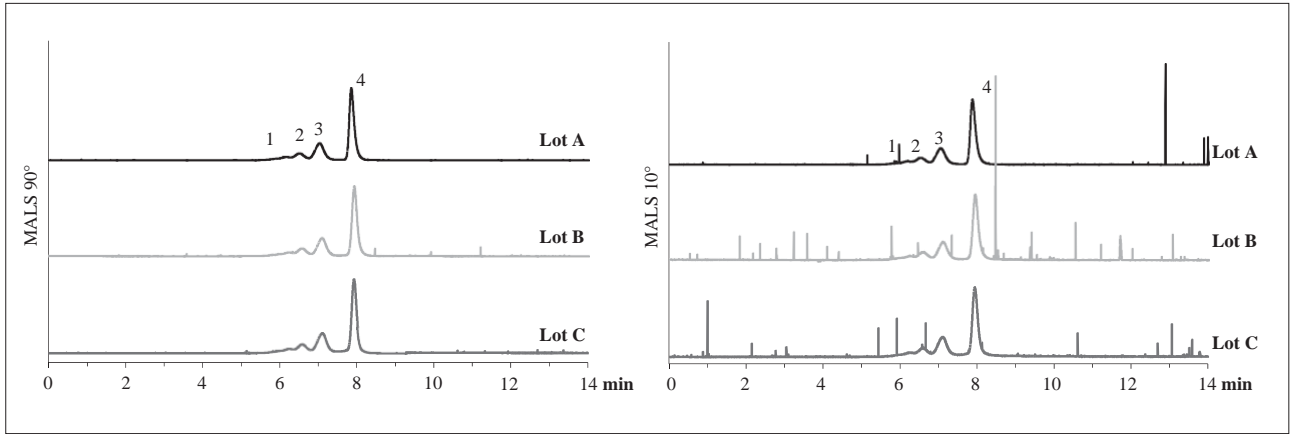


图5 牛血清白蛋白的色谱图（光散射分析，填料批间差异）

〈测定条件〉

色谱柱：TSKgel UP-SW3000-LS

色谱柱尺寸：4.6 mm I.D. × 30 cm

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

流速：0.35 mL/min

检测：MALS 10°、90°

温度：25 °C

进样量：10 μL

样品：牛血清白蛋白（MW 66,500）

1. 多聚体、2. 三聚体、3. 二聚体、4. 单体

2-5. 测定流速的影响

图6是2种不同分子量的蛋白质（牛血清白蛋白：Mw 66,500、核糖核酸酶A：Mw 13,700）以及低分子化合物（*p*-氨基苯甲酸：Mw 137）的测定流速与理论塔板数的关系。可以看出，扩散系数较大的低分子

p-氨基苯甲酸的测定流速越快，理论塔板数越高。另一方面，分子量较大的蛋白质

的测定流速越慢，色谱柱效率越高，理论塔板数越高。

图7呈现的是测定流速与压降的关系。TSKgel UP-SW3000-LS（4.6 mm I.D. × 30 cm）在标准流速（0.35 mL/min）下，可在35 MPa以下的较低压强下使用。

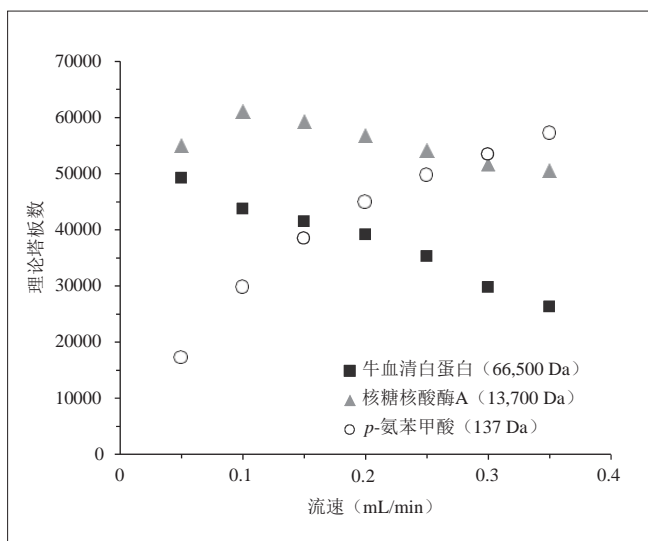


图6 测定流速与理论塔板数的关系

〈测定条件〉

色谱柱：TSKgel UP-SW3000-LS

色谱柱尺寸：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. 牛血清白蛋白（MW 66,500）

2. 核糖核酸酶A（MW 13,700）

3. *p*-氨基苯甲酸（MW 137）

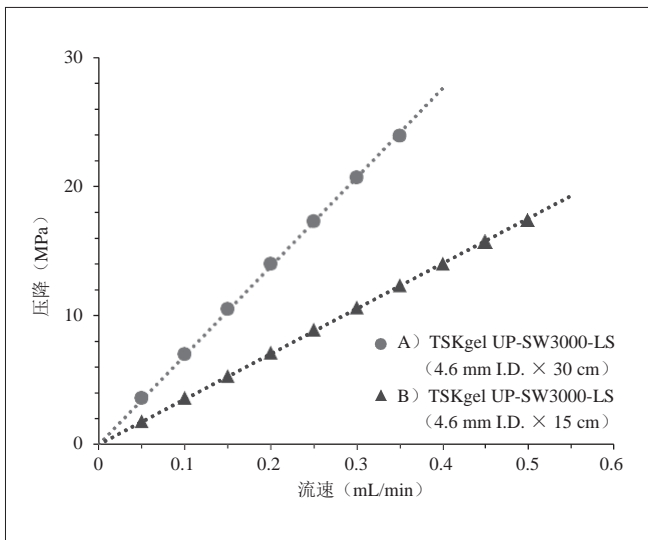


图7 测定流速与压降的关系

〈测定条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW3000-LS

色谱柱尺寸: A) 4.6 mm I.D. × 30 cm

B) 4.6 mm I.D. × 15 cm

洗脱液: 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.7)

+ 100 mmol/L 硫酸钠

+ 0.05% 叠氮化钠

流速: 0.05 ~ 0.50 mL/min

温度: 25 °C

2-6. 色谱柱的耐用性

使用规格为4.6 mm I.D. × 30 cm 和 4.6 mm I.D. × 15 cm 的色谱柱, 在最大流速 (30 cm 色谱柱: 0.35 mL/min、15 cm 色谱柱: 0.50 mL/min) 下, 连续测定 *p*-氨基苯甲酸时的样品测定次数与理论塔板数的关系如图8和图9所示。

而使用30 cm 色谱柱连续进样 γ -球蛋白时, 每100次的色谱图如图10所示。可以看出, 500次测定后的色谱图无明显变化, 色谱柱具备良好的耐用性。

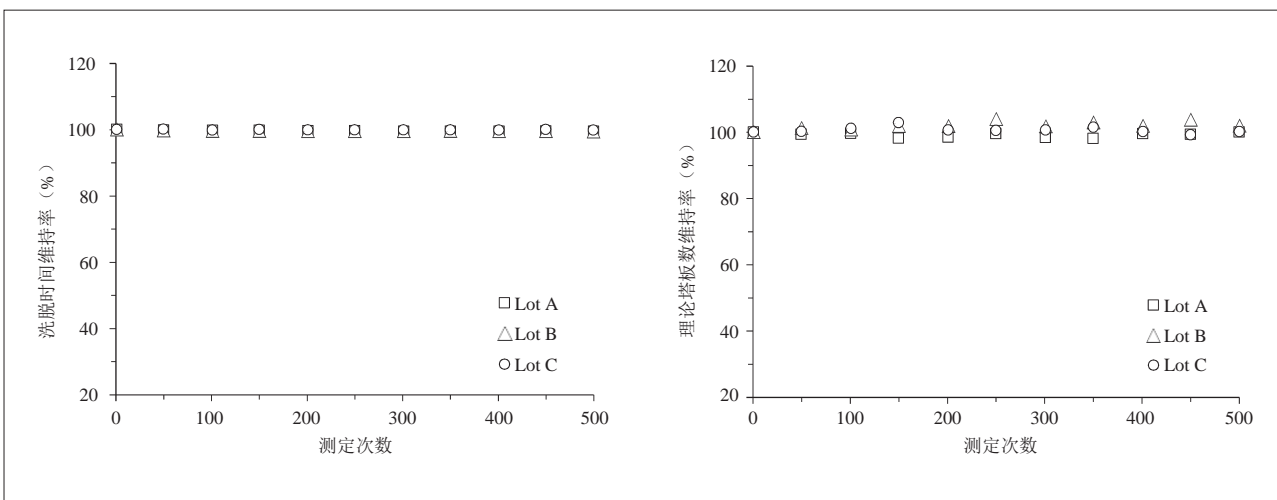


图8 测定次数与维持率的关系 (4.6 mm I.D. × 30 cm)

〈测定条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW3000-LS

色谱柱尺寸: 4.6 mm I.D. × 30 cm

洗脱液: 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (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 °C

进样量: 10 μ L

样品: *p*-氨基苯甲酸 (MW 137)

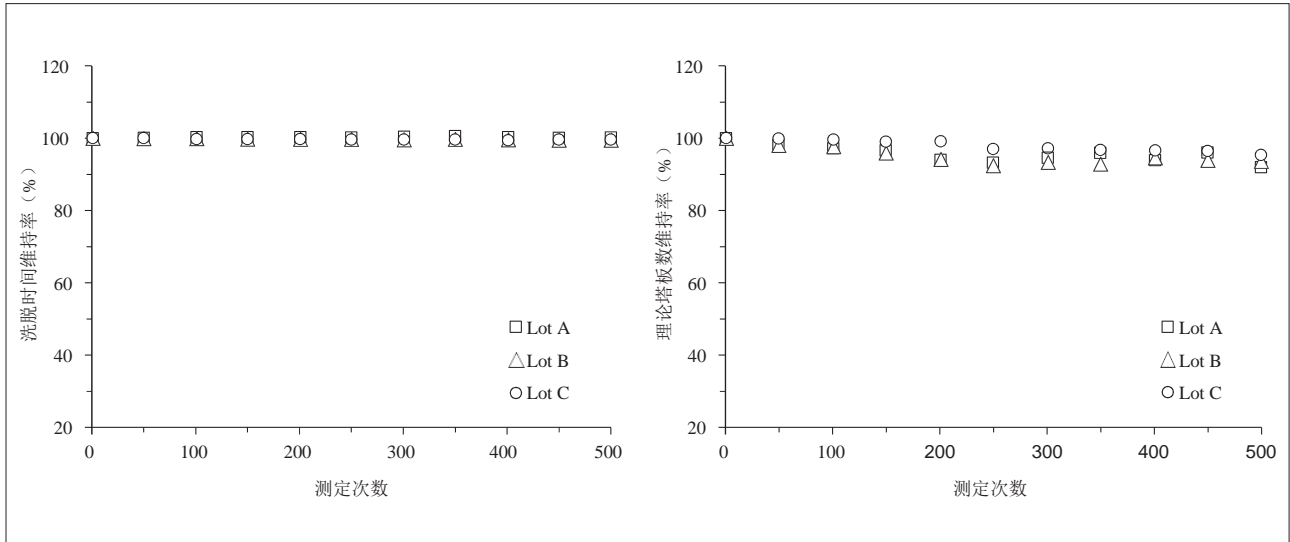


图9 测定次数与维持率的关系 (4.6 mm I.D. × 15 cm)

〈测定条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW3000-LS

色谱柱尺寸: 4.6 mm I.D. × 15 cm

洗脱液: 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (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: *p*-氨基苯甲酸 (MW 137)

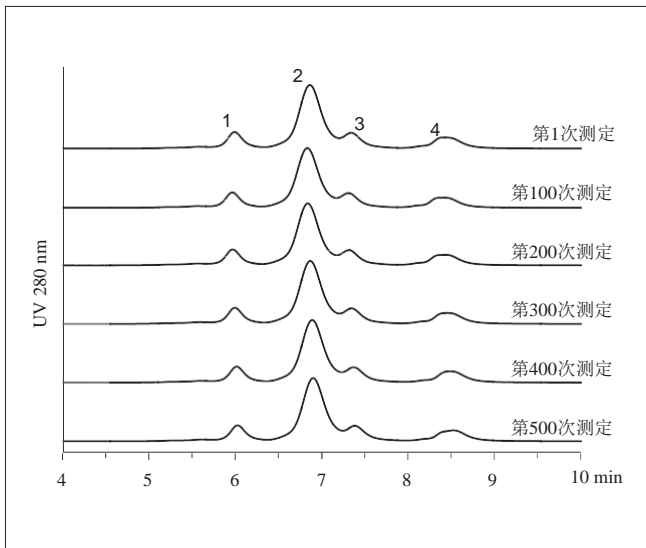


图10 连续测定时的色谱图 (4.6 mm I.D. × 30 cm)

〈测定条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW3000-LS

色谱柱尺寸: 4.6 mm I.D. × 30 cm

洗脱液: 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (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 °C

进样量: 10 μL

样品: γ -球蛋白

1. 二聚体、2. 单体、3. 片段

2-7. 填料的批间差异

使用填充有不同批次填料的色谱柱测定标准蛋白质时，其色谱图对比如图11所示。可以看到洗脱峰形状、洗脱位

置之间的差异较小，所以填料批间的差异较小，生产的填料稳定性很高。

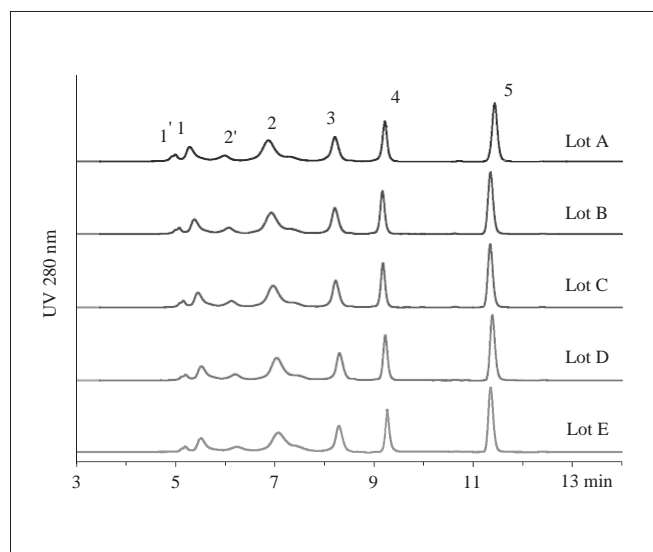


图 11 标准蛋白质的色谱图（填料批间差异）

〈测定条件〉

色谱柱：TSKgel UP-SW3000-LS

色谱柱尺寸：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（MW 640,000）
（1' 甲状腺球蛋白二聚体）
2. γ -球蛋白（MW 155,000）
（2' γ -球蛋白二聚体）
3. 卵白蛋白（MW 47,000）
4. 核糖核酸酶A（MW 13,700）
5. *p*-氨基苯甲酸（MW 137）

3. 分离实例

使用TSKgel UP-SW3000-LS，通过紫外吸收检测器（UV）、多角度光散射检测器（MALS）测定人源化单克隆抗体时的色谱图如图12所示。可以看出，由于不同检测器下的多聚体、二聚体和单体的各洗脱峰发生分离，

并且干扰等级较低，所以可应用于光散射分析。另外，分子量更高的多聚体可在光散射检测器的高强度模式下观察，分析也比较容易。

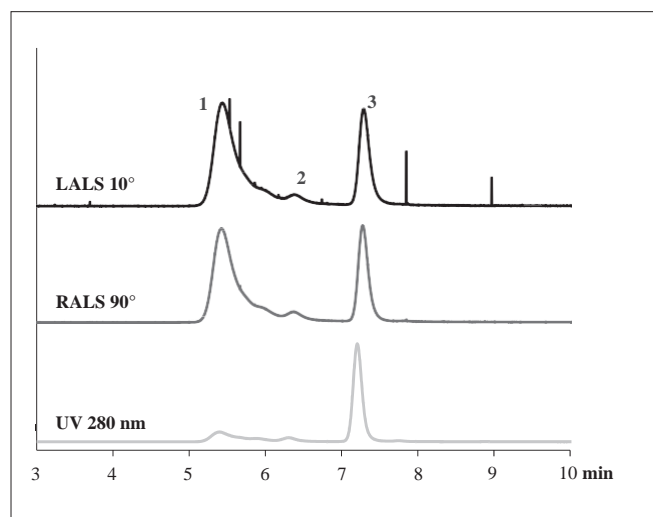


图 12 人源化单克隆抗体的色谱图

〈测定条件〉

色谱柱：TSKgel UP-SW3000-LS

色谱柱尺寸：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, MALS 10°, 90°

温 度：25 °C

进样量：10 μL

样 品：人源化单克隆抗体（MW 150,000）
1. 多聚体、2. 二聚体、3. 单体

4. 与光散射检测器联用的注意点

表4是与光散射检测器联用时的注意点。

表 4 与光散射检测器联用时的注意点

系 统	<p>1. 使用前的仪器清洗（在连接色谱柱之前进行） 建议在使用之前，将清洗仪器的溶液用0.2 μm以下孔径的过滤器过滤。</p> <p>1) 已充分进行了内部清洗的系统 用纯水供液至少30分钟进行内部清洗。</p> <p>2) 旧系统或内部清洗不充分的系统</p> <p>① 纯水供液至少30分钟</p> <p>② 10% 甲醇水溶液至少供液一夜</p> <p>③ 纯水供液至少30分钟</p> <p>对1) 和2) 进行了上述清洗后，请替换为洗脱液。 然后，请连接色谱柱，平衡处理，开始测定。</p> <p>2. 在线过滤器 建议在泵和进样器之间安装0.2 μm以下孔径的在线过滤器。</p>
洗 脱 液	使用含盐的缓冲液作为洗脱液时，由于洗脱液中容易产生微生物，所以建议在使用时进行配制。另外，建议在配制后，将溶液用0.2 μm以下孔径的过滤器过滤。
样 品 溶 液	建议在使用之前，将样品溶液用0.2 μm以下孔径的过滤器过滤。
色 谱 柱 清 洗	在连接光散射检测器之前，请将洗脱液按不超过0.17 mL/min的流速，供液色谱柱体积的至少4倍。
色 谱 柱 保 存	如果在供液停止后超过5天以上不使用色谱柱，请将色谱柱内的溶液替换为水，然后再替换为20%乙醇水溶液（出厂溶剂）保存。如果色谱柱内流动相盐结晶或细菌杂质蓄积，可能会在光散射测定时导致噪声增多等问题。

5. 总结

以上是对TSKgel UP-SW3000-LS的概述。使用本色谱柱，可以在短时间内对抗体的二聚体、单体和片段进行高分辨率分析，适用于光散射检测器的测定。

* “TSKgel”是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：上海市徐汇区虹梅路1801号A区凯科国际大厦1001室

电话：+86-21-3461 0856 传真：+86-21-3461 0858

电子邮箱：info.tbs@tosoh.com.cn

网址：www.separations.asia.tosohbioscience.com