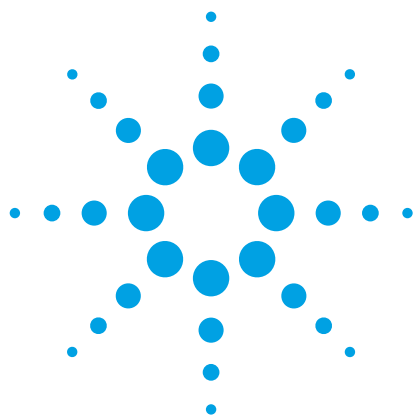




硅胶填料的孔径和粒径大小对一种小分子蛋白质——胰岛素分离的影响

应用报告

生物制药

作者

Rongjie Fu
安捷伦科技有限公司（上海）
英伦路 412 号
上海 200131
中国

Maureen Joseph
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

摘要

本文采用不同孔径和粒径的硅胶填料色谱柱对胰岛素这种小分子蛋白质进行分离。对不同孔径（包括 80 Å、95 Å、120 Å、170 Å、300 Å）和粒径（包括 1.8 μm、2.7 μm、3.5 μm、5 μm）填料色谱柱的柱效和分辨率进行了对比。

对比结果显示，胰岛素分析采用较大孔径填料的色谱柱可获得更高的柱效。填料孔径大于 100 Å 的色谱柱即可以使胰岛素达到高效分离，而采用 300 Å 的大孔径色谱柱对于该中等分子量分子的分析就没有必要。采用小粒径填料色谱柱分析胰岛素也可获得较高柱效。这一点通过改变粒径大小（5 μm→3.5 μm→1.8 μm）进行分析得到证实。

Agilent Poroshell 120 色谱柱使用了 120 Å 孔径，2.7 μm 粒径的表面多孔颗粒填料，使它成为胰岛素分析的最佳选择。



Agilent Technologies

前言

硅胶填料的粒径和孔径是反相 HPLC 分析中色谱柱选择的重要参数。3 μm 以下（包括亚 2 μm）的小粒径填料色谱柱因其可实现高柱效和快速分离而得到广泛应用。另外，硅胶颗粒的孔径在选择色谱柱时也应充分考虑。对于分子量小于 5000 Da 的分子通常选择小孔径（60-120 Å）填料的色谱柱，分析低分子量蛋白质（5-50 KDa）时通常选择 200-300 Å 孔径填料的色谱柱，而高分子量蛋白质和疫苗则需要采用更大孔径（1000-4000 Å）填料的色谱柱。

虽然分析小分子蛋白质，如分子量约为 5800 Da 的胰岛素，可采用小孔径填料的色谱柱，但也需要对较大孔径填料色谱柱的分析效果进行评价，选择合适填料孔径的色谱柱可获得最高的柱效。过小的孔径会限制分子在孔内外的扩散，采用适当填料孔径的色谱柱可获得较高的柱效。为了得到最高的柱效，应选用较小粒径和最佳孔径的填料。

最佳孔径和粒径的研究采用 USP 规定的以等度流动相洗脱测定胰岛素的方法进行。通过考察不同孔径（包括 80 Å、95 Å、120 Å、170 Å、300 Å）和不同粒径（包括 1.8 μm、2.7 μm、3.5 μm、5 μm）填料色谱柱的柱效和分辨率，对比其色谱性能。同时考察了不同的颗粒类型，包括表面多孔颗粒和全多孔颗粒。本应用报告的最终结果得到了实现最高的柱效和分辨率，同时满足中国药典 [1] 和美国药典 [2] 规定方法要求的推荐色谱柱。

材料与方法

HPLC 条件

色谱柱	所有色谱柱均为 C18 色谱柱，满足药典规定的十八烷基（C18）化学键合多孔硅胶键合相的要求
流速	1.0 mL/min
进样量	20 μL
柱温	40 °C
检测波长	214 nm
流动相	74% A: 26% B, A: 0.2 mol/L 硫酸盐缓冲液（将 28.4 g 无水硫酸钠溶于 1000 mL 水中，加入 2.7 mL 磷酸，并用乙醇胺调节 pH 至 2.3，混匀） B: 乙腈

材料

样品

猪胰岛素（由中国食品药品检定研究院提供）

色谱柱

Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 × 150 mm, 5 μm (部件号 883975-902)
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 150 mm, 5 μm (部件号 959993-902)
Agilent ZORBAX 300SB-C18, 4.6 × 150 mm, 5 μm (部件号 883995-902)
Agilent TC-C18(2), 4.6 × 150 mm, 5 μm (部件号 588935-902)
Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 × 100 mm, 3.5 μm (部件号 861953-902)
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 100 mm, 3.5 μm (部件号 959961-902)
Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 × 100 mm, 1.8 μm (部件号 828975-902)
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 100 mm, 1.8 μm (部件号 959964-902)
Agilent Poroshell 120 SB-C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 685975-902)
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695975-902)

色谱系统

Agilent 1200 SL LC 系统，配备二元泵、柱温箱（TCC）、高效自动进样器和二极管阵列检测器（DAD）。

结果与讨论

硅胶孔径对柱效和分辨率的影响

为了探讨硅胶孔径在胰岛素分离过程中对柱效、分辨率和拖尾因子的影响，我们使用 4 种不同孔径，填料粒径为 $5\ \mu\text{m}$ 的传统色谱柱（如图 1 所示），采用相同的方法对胰岛素进行分析。采用最小孔径为 $80\ \text{\AA}$ 和 $95\ \text{\AA}$ 的 SB-C18， $5\ \mu\text{m}$ 色谱柱和 Eclipse Plus C18， $5\ \mu\text{m}$ 色谱柱对胰岛素进行分析时，得到的柱效最低。孔径从 $80\ \text{\AA}$ 到 $95\ \text{\AA}$ 的微量增加极小地提高了胰岛素分析的柱效。

Agilent TC-C18 (2) 和 Agilent ZORBAX 300SB-C18 色谱柱均使用较大孔径的填料，分析胰岛素获得了更高的柱效。 $300\ \text{\AA}$ 孔径填料的色谱柱通常用于分子量大于 $5000\ \text{Da}$ 分子的分析。如图 1 所示，从填料孔径小于 $100\ \text{\AA}$ 的色谱柱到填料孔径为 $300\ \text{\AA}$ 的色谱柱，胰岛素分析的对比结果显示后者的柱效比前者高出两倍多。最小孔径的色谱柱（Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱）和最大孔径的色谱柱（300SB-C18 色谱柱）对比发现后者的峰形也有显著改善。这两根色谱柱仅填料孔径不同，色谱柱填料的键合相类型和粒径均相同。这种对比最为确切，并且清楚地指出为实现胰岛素有效的分离，必须采用填料孔径大于 $80\ \text{\AA}$ 的色谱柱进行分析。

我们比较中采用的第四根色谱柱为 Agilent TC-C18 (2) 色谱柱，其孔径为 $170\ \text{\AA}$ ，介于 $80\ \text{\AA}$ 、 $95\ \text{\AA}$ 和 $300\ \text{\AA}$ 之间。该色谱柱的柱效也比小孔径色谱柱的柱效高出两倍多，此结果表明对于分析分子量为 $5800\ \text{Da}$ 的胰岛素，没有必要采用 $300\ \text{\AA}$ 孔径填料的色谱柱，但是为了使该 $5800\ \text{Da}$ 分子量的胰岛素分子完全进入孔内实现高效分离，必须采用孔径大于 $100\ \text{\AA}$ 填料的色谱柱。

当我们更详细地比较四根 $5\ \mu\text{m}$ 色谱柱的测试结果时，我们发现它们的保留能力有些不同。这四根色谱柱有不同的比表面积和键合相类型。其中，300SB-C18 色谱柱填料的比表面积最小，大约为 $45\ \text{m}^2/\text{g}$ ，其次是 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱，其填料的比表面积为 $160\ \text{m}^2/\text{g}$ ，接下来是 SB-C18 色谱柱，为 $180\ \text{m}^2/\text{g}$ ，最后是 TC-C18 (2) 色谱柱，为 $290\ \text{m}^2/\text{g}$ 。最小孔径的 Eclipse Plus C18 和 SB-C18 色谱柱的保留能力最为相似，当然它们的比表面积并不是最小。胰岛素分子如果不能完全进入孔内，并与键合相充分作用，填料的保留能力将受到削弱。Eclipse Plus C18 和 SB-C18 色谱柱填料上的 C18 键合极为不同。SB-C18 色谱柱填料的碳载量低，未封端。而 Eclipse Plus C18 色谱柱填料的碳载量高、键合密度大，并且封端彻底。虽然键合类型的改变有助于改善峰形，但是并没有改变其保留能力，因为胰岛素并没有与孔内的键合相充分作用。

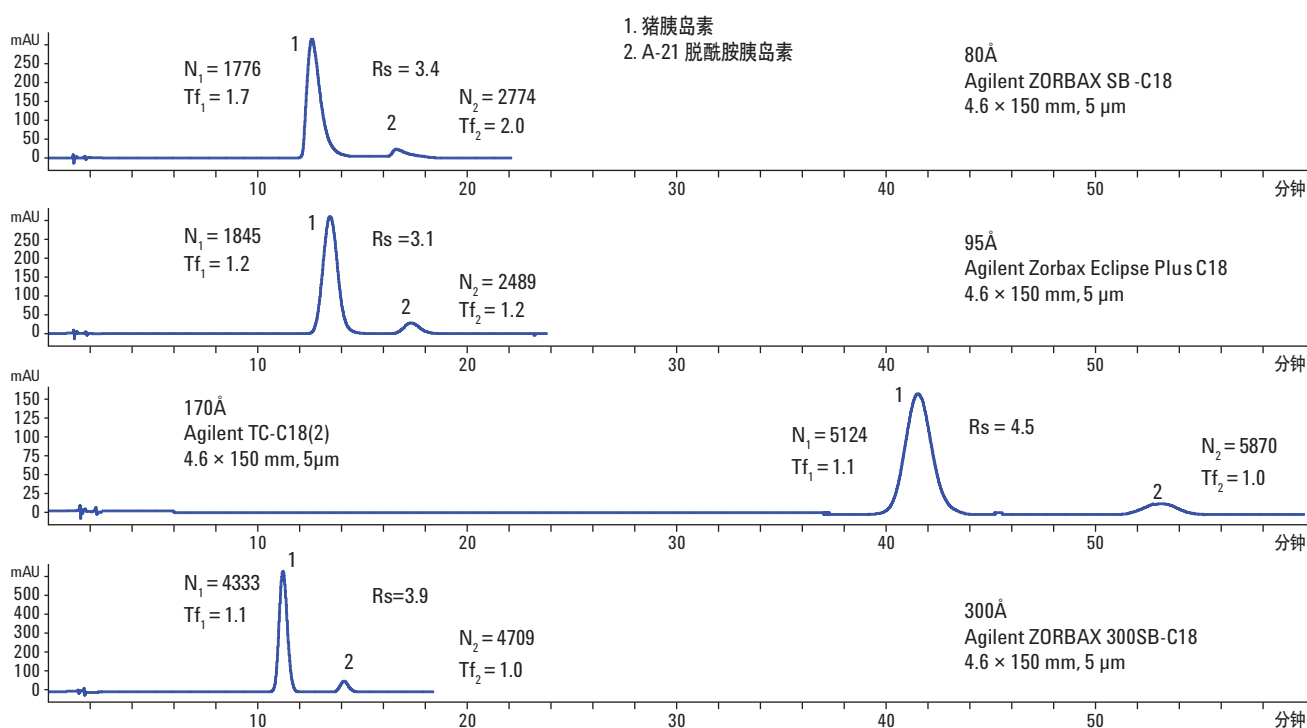


图 1. 采用不同孔径填料的 $4.6 \times 150\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$ 色谱柱分析得到的色谱图

Agilent ZORBAX 300SB-C18 色谱柱填料的比表面积最小，但是其保留能力仅比小孔径填料色谱柱的略低。一旦胰岛素可以进入填料孔中，与孔内所有的键合相相互作用，它就会得到更好的保留。即使采用无封端的键合相分析，这种更高效的孔内保留也有效改善了色谱峰的峰形。Agilent TC-C18 (2) 色谱柱填料的比表面积最大，保留能力最强，这很可能是由于分子可以进入填料所有孔中，使得样品保留随硅胶颗粒比表面积 (290 m²/g) 增加而增大。

Agilent TC-C18 (2) 色谱柱的保留时间非常长，超过了 40 分钟，不太理想。因此使用 TC-C18 (2) 色谱柱时，可通过增大流动相中有机相的比例，来大幅度地缩短保留时间，同时仍保持良好的峰型和柱效 (如图 2 所示)。流动相中有机相仅增加 1.5% 时，保留时间即从 44 分钟缩短至 15 分钟。当流动相中有机相比比例改变时，大分子 (如蛋白质) 样品保留时间的变化比小分子样

品保留时间的变化更大，因此可容易地大幅度调整保留时间。同时分辨率会略微降低，但如果保留时间和其它 5 μm 填料色谱柱一致，其分辨率也会相似。

对比这四根 5 μm 填料色谱柱的分析结果可以得出，170 $\text{\AA}$ 的颗粒孔径是足够大的，可使胰岛素分子进入颗粒孔内以实现高效分离。颗粒孔径仅大于 100 $\text{\AA}$ 时太小，而对于中等分子量化合物的分析，选用孔径 300 $\text{\AA}$ 的填料也没有必要。

表 1. 不同孔径 5 μm 填料色谱柱每米的理论塔板数

N/m	80 $\text{\AA}$	95 $\text{\AA}$	170 $\text{\AA}$	300 $\text{\AA}$
峰 1	11840	12300	34160	28887
峰 2	18493	16593	39133	31393

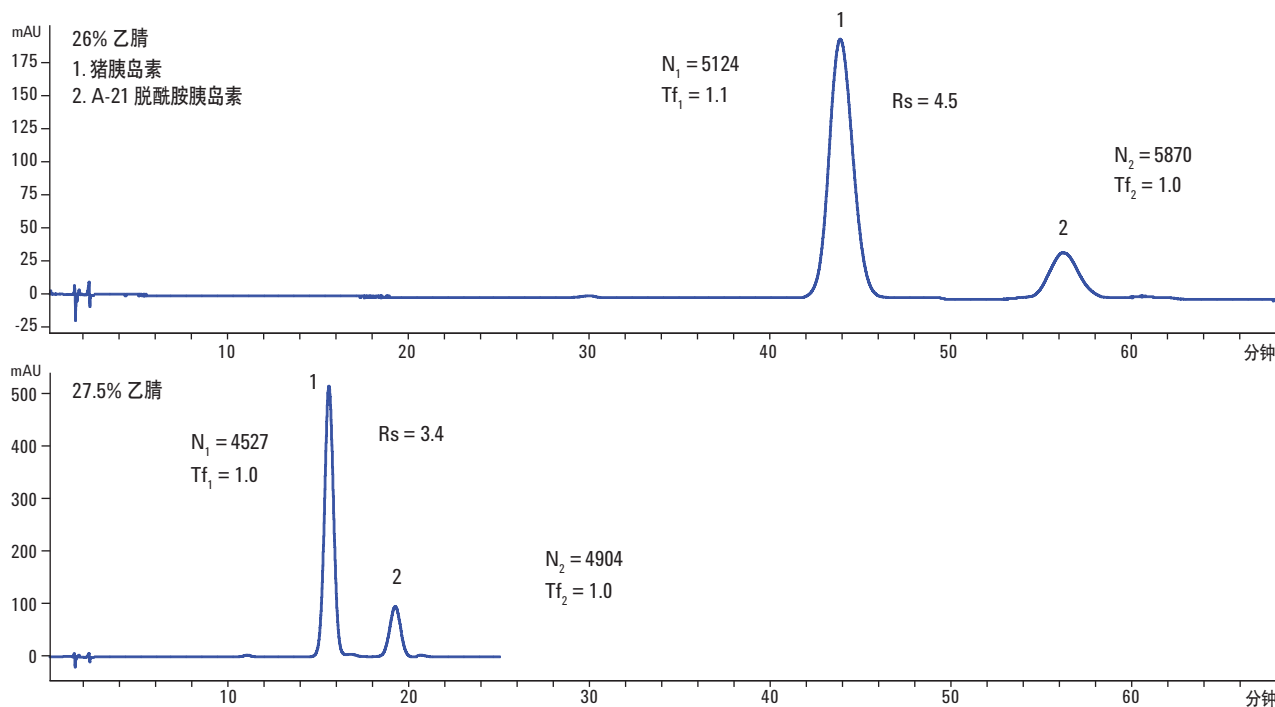


图 2. 使用 Agilent TC-C18 (2), 4.6 x 150 mm, 5 μm 色谱柱, 改变流动相中有机相比比例后分析的色谱图

硅胶粒径的影响

在方法开发中，直到 20 世纪 90 年代中期，HPLC 色谱柱通常采用的标准填料粒径为 5 μm ，那时填料粒径为 3.5 μm 的色谱柱刚刚出现并逐渐普及。最近，由于对高速和高分辨率分析的需求，色谱工作者通常选用粒径小于 3 μm 或 2 μm 填料色谱柱，如 1.8 μm 填料的色谱柱。

本文中分别在 5 μm 、3.5 μm 和 1.8 μm 填料的 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱和 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱上进行胰岛素的分析。为了确保不同长度色谱柱的数据可以相互比较，按色谱柱长度，以每米柱长的理论塔板数 (N/m) 表示柱效。表 2、3 中的数据表明，使用较小的 1.8 μm 颗粒色谱柱可获得更高柱效。虽然这些色谱柱填料并不是最理想的孔径条件，但使用更小粒径填料的色谱柱仍会获得柱效的改善，正如本实验中对胰岛素的分析。

表 2. 不同粒径填料的 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱每米的理论塔板数

N/m	SB-C18 5 μm	SB-C18 3.5 μm	SB-C18 1.8 μm
峰 1	11840	18060	52150
峰 2	18493	21720	66910

表 3. 三种不同粒径填料的 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱每米的理论塔板数

N/m	Plus 5 μm	Plus 3.5 μm	Plus 1.8 μm
峰 1	12300	21570	78540
峰 2	14580	26040	94340

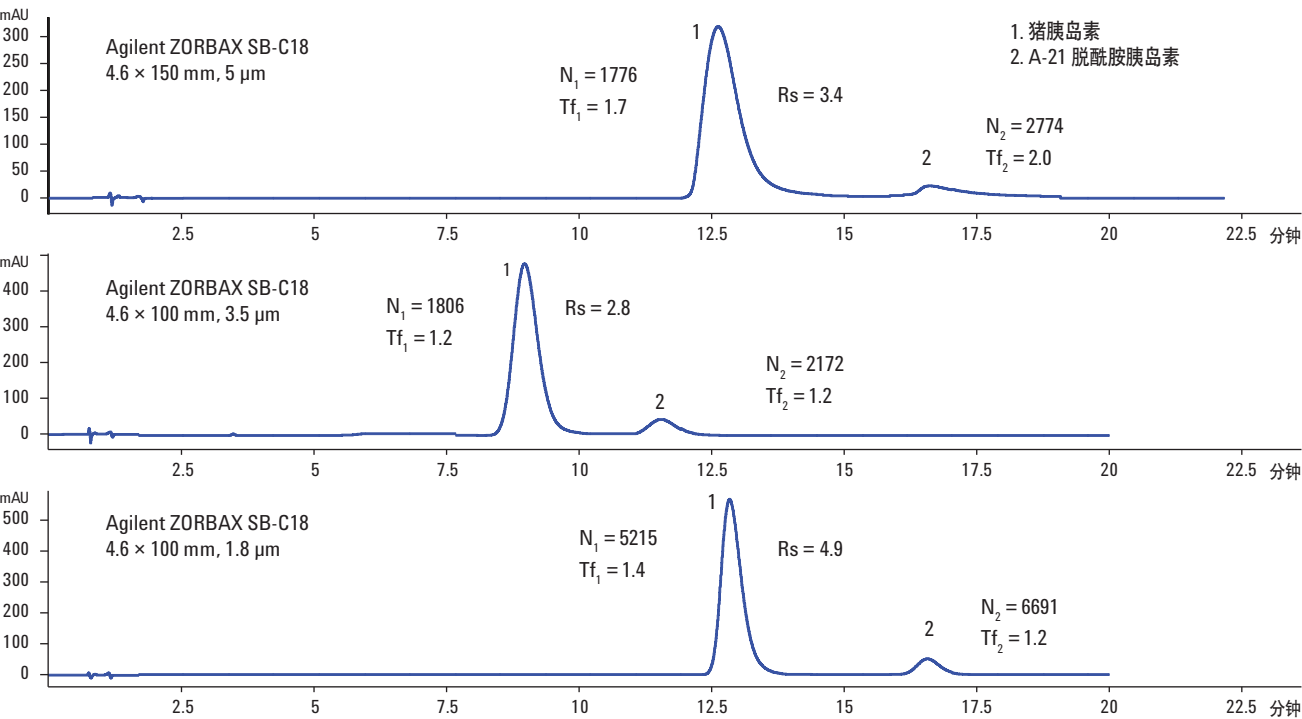


图 3. 采用不同粒径填料的 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱分析的色谱图

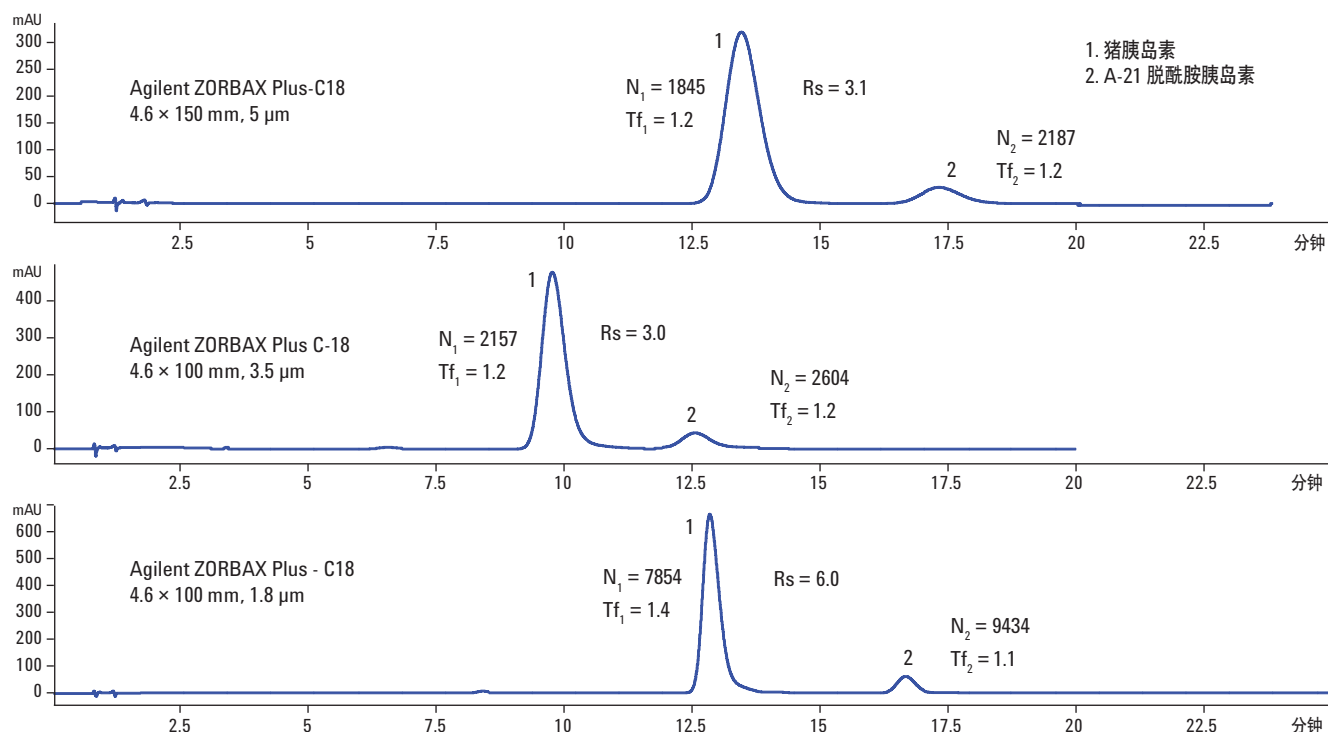


图 4. 采用三种不同粒径填料的 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱分析的色谱图

2.7 µm 表面多孔 Agilent Poroshell 120 色谱柱与全多孔亚 2 µm 色谱柱的比较

迄今为止，所有对比的色谱柱都是全多孔填料色谱柱，其具有广泛的孔径和粒径类型可供选择。Agilent Poroshell 120，2.7 µm 色谱柱的表面多孔填料颗粒具有 120 Å 孔径和亚 3 µm 粒径。120 Å 孔径大于 100 Å，但小于之前比较的 170 Å 孔径。此外，众所周知在分离小分子（小于 2000Da）样品时，2.7 µm 颗粒与亚 2 µm 颗粒色谱柱的性能相似。对于分子量约 5000Da 的分子，如胰岛素，则需要进一步的考察比较。

图 5 展示了两种不同键合相的 Poroshell 120 色谱柱分别与它们最相近的 1.8 µm 粒径填料的 Agilent ZORBAX SB-C18 及 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱直接比较的色谱图。这些色谱图表明，Poroshell 120 SB-C18 120 Å 色谱柱能提供两倍于 SB-C18 80 Å 色谱柱的柱效。这是由于 120 Å 孔径较大，组分能更为迅速地于孔中扩散。对比 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱和 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱的色谱图时，我们发现颗粒孔径为 120 Å 的色谱柱同样比颗粒孔径为 95 Å 的色谱柱的柱效更高。另外，两根 Poroshell 120 色谱柱均使胰岛素色谱峰峰型得到改善，这是由于胰岛素更容易进入其颗

粒孔内（如图 5 所示）。表 4 列出了采用颗粒粒径为 2.7 µm 和 1.8 µm 的四种色谱柱每米柱长的理论板数（N/m），表明当采用 Poroshell 120 色谱柱时能获得较高的柱效。

采用 1.8 µm 填料色谱柱时，柱压大约为 250 bar，而采用 Poroshell 120 色谱柱时，柱压则低于 200 bar。两类色谱柱都可用于标准 HPLC 仪，但 Poroshell 120 色谱柱更为适用，这是因为它与填料粒径为 1.8 µm 的色谱柱相比，能降低大约 30% 的柱压。

图 6 展示了 Agilent Poroshell 120 SB-C18 色谱柱与 5 µm Agilent TC-C18（2）色谱柱相比，能提供更高的柱效。色谱图显示，采用 TC-C18（2）色谱柱时使用含 27.5% 有机相的流动相，能使保留时间更为相近。对比两根色谱柱，柱效的提高得益于前者填料小粒径、大孔径的特点。

表 4. 采用 Agilent Poroshell 120 和亚 2 µm 色谱柱获得的每米理论塔板数

N/m	SB-C18, 1.8 µm	Poroshell 120, SB-C18, 2.7 µm	Plus C18, 1.8 µm	Poroshell 120, EC-C18, 2.7 µm
峰 1	52150	108600	78540	97680
峰 2	66910	123770	94340	107100

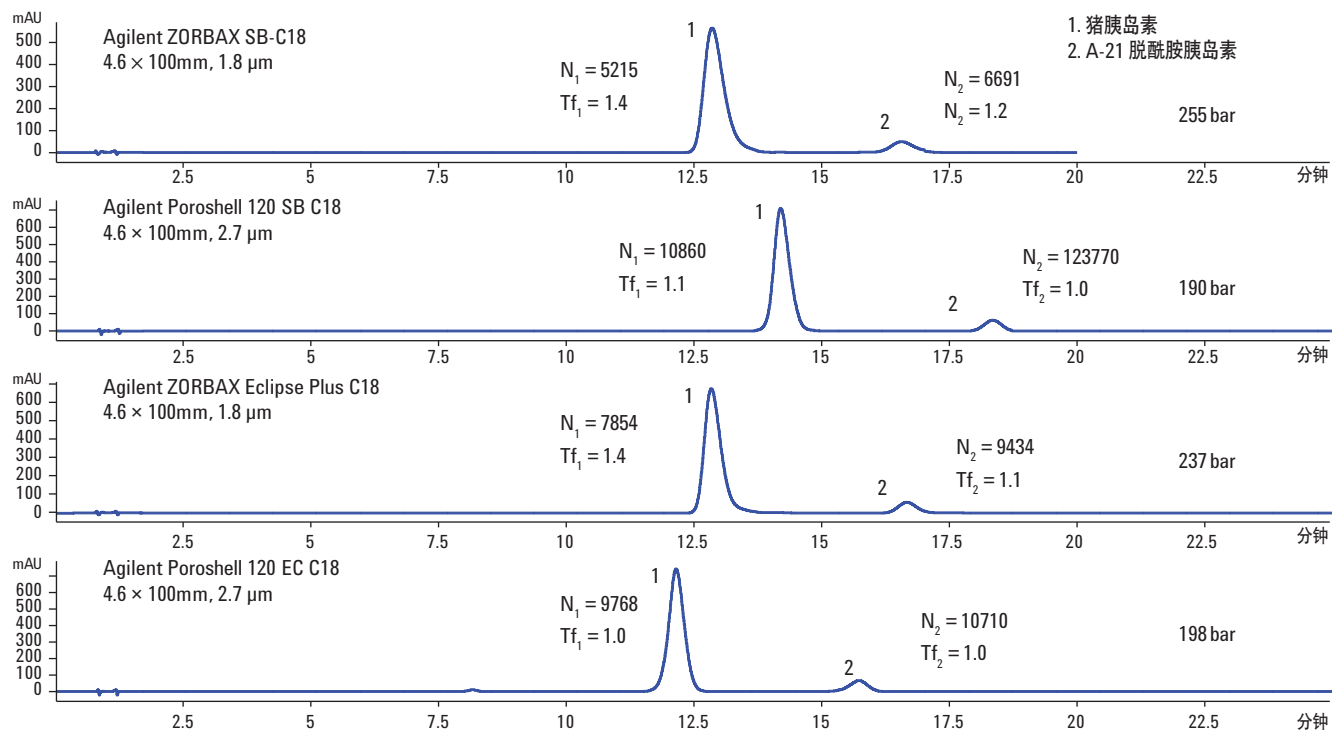


图 5. 采用 Agilent Poroshell 120 和亚 2 μ m 色谱柱获得的对照色谱图

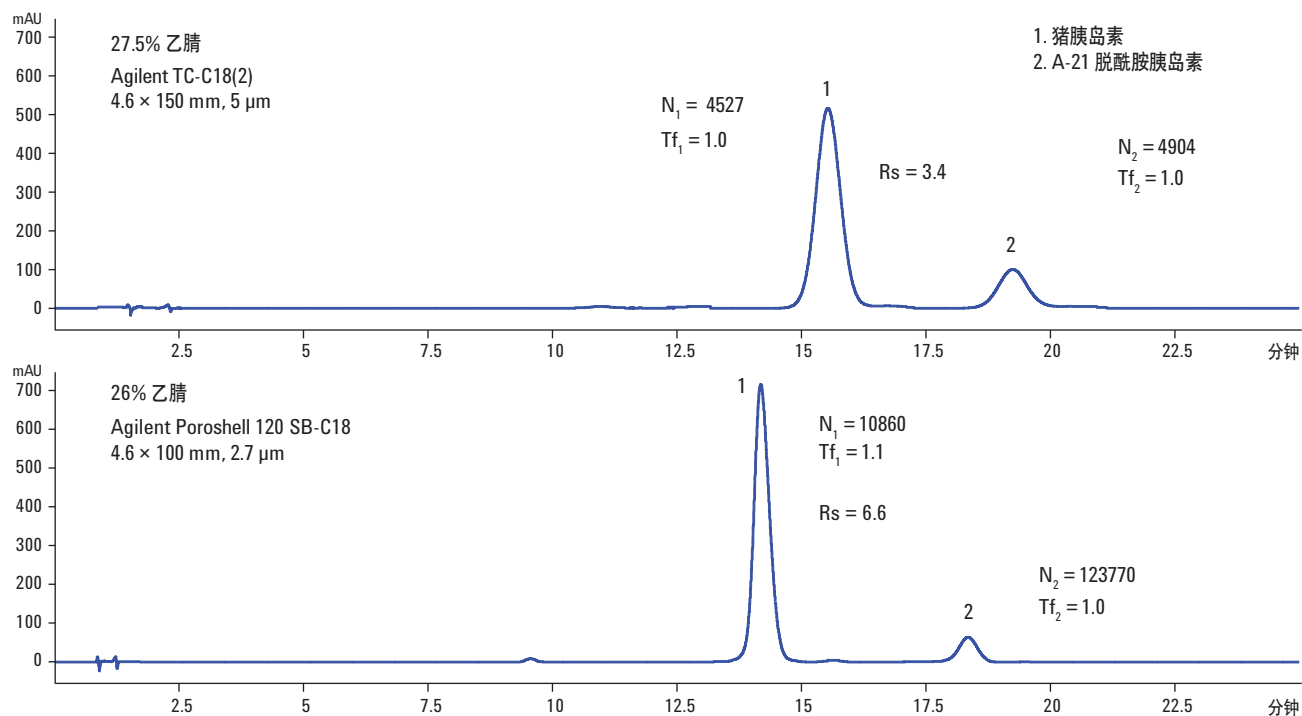


图 6. 采用 Agilent Poroshell 120 SB-C18 色谱柱和 Agilent TC-C18 (2) 色谱柱获得的对照色谱图

最后我们还应该比较 2 μm 粒径、300 Å 孔径的 300SB-C18 色谱柱和 80 Å 孔径的 SB-C18 色谱柱的分离性能。将来还需要对胰岛素分析中采用的合适流动相进行考察。但在不同条件下，300SB-C18 色谱柱对胰岛素的分离已获得良好的效果 [3]。

结论

本文按照药典方法规定对比研究了能有效用于胰岛素分析的 C18 色谱柱的规格和类型。过小孔径填料的色谱柱 (<100 Å) 无法提供最佳的分析结果。这些色谱柱的柱效低且拖尾因子较大，这是由于其填料孔径小，限制了分子进入填料孔内与键合相的作用。采用大孔径填料的色谱柱 (>100 Å)，如 Agilent Poroshell 120、Agilent TC-C18 (2) 和 Agilent ZORBAX 300SB-C18 色谱柱，能获得很高的柱效和较小的拖尾因子。填料孔径 300 Å 的色谱柱用于高效分离胰岛素并没有必要。中等大小孔径填料的色谱柱，如 Poroshell 120 和 TC-C18 (2) 色谱柱，是分离胰岛素及其它小分子蛋白或多肽的最佳选择。

通过比较柱效和分辨率实现了对填料粒径的评价。小粒径填料能提供高柱效。采用 Agilent Poroshell 120 色谱柱时获得了最佳的柱效。这些具有 2.7 μm 粒径、120 Å 孔径填料的色谱柱适用于胰岛素的高效分析。

参考文献

1. 中国药典 (2010 版)，胰岛素，845–846。
2. 美国药典 USP 31 (卷 2) 胰岛素，2403–2404。
3. Phu T Duong, Analysis of Oxidized Insulin chains using Reversed Phase Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18, 安捷伦应用简报, 5990-7988EN。

更多详细信息

这些数据代表了典型的结果。有关我们产品和服务的更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦科技公司对本资料中所包含的错误，以及由于使用本资料引起的相关损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和性能指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2012
2011 年 9 月 28 日, 中国印刷
5990-9028CHCN



Agilent Technologies