

安捷伦使用指南

# 生物分子分析体积排阻色谱

The Measure of Confidence



**Agilent Technologies**

# SEC 成功分析指南

利用生物分子在溶液中的体积而进行色谱分离的方法即为体积排阻色谱 (SEC)。与其他色谱模式不同，SEC 的分离不依靠分析物和色谱柱固定相之间的任何化学作用。这是从多种干扰物（包括聚集体、赋形剂、细胞碎片及其他降解产生的杂质）中分离和分析完整蛋白质的最佳解决方案。因此，SEC 广泛应用于开发和生产过程中的生物治疗性分子表征。

在本指南中，我们将讨论 SEC 分离、溶质大小和分子量的影响、色谱柱选择、流动相重要注意事项，以及 SEC 的使用规则等内容。



## 分离方法简单直接

利用 SEC，分子可按其在溶液中的尺寸从大到小依次分离。非常大的分子将被排出柱床，在死体积内最先洗脱。大小适中的分子依据其体积的不同可以不同程度地渗透进微孔中（图 1），而最小的分子在微孔结构中扩散最深，从而最后洗脱。

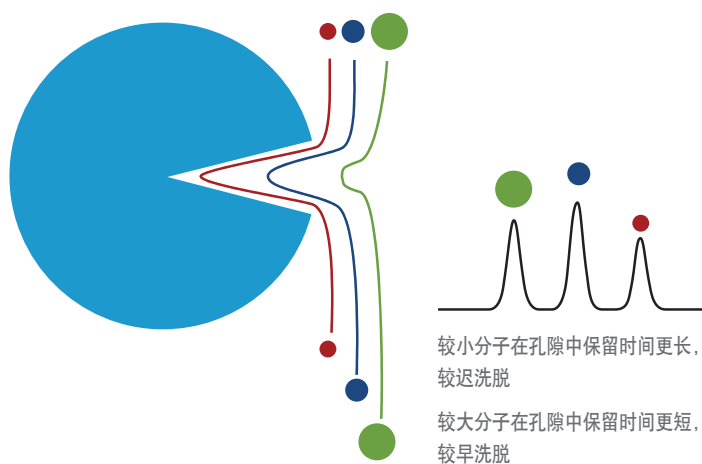


图 1. 不同体积的分子以不同程度渗入固定相孔隙内

如需了解关于安捷伦 SEC 生物色谱柱的更多信息，请访问  
[www.agilent.com/chem/bioHPLC](http://www.agilent.com/chem/bioHPLC)

体积排阻色谱法适用于分离和定量蛋白质混合物，因此是重组蛋白生产过程中的一种重要质控手段。包括测定聚集体（二聚体、三聚体、四聚体等）以及从较大分子量的蛋白质中分离低分子量的赋形剂和杂质（图 2）。了解并控制治疗性蛋白中的聚

集体十分必要，因为这会影响其有效性、保质期甚至会导致潜在的严重免疫反应。ICH(Q6B) 等法规明确指出必须分离并定量目标产品中的聚集体。

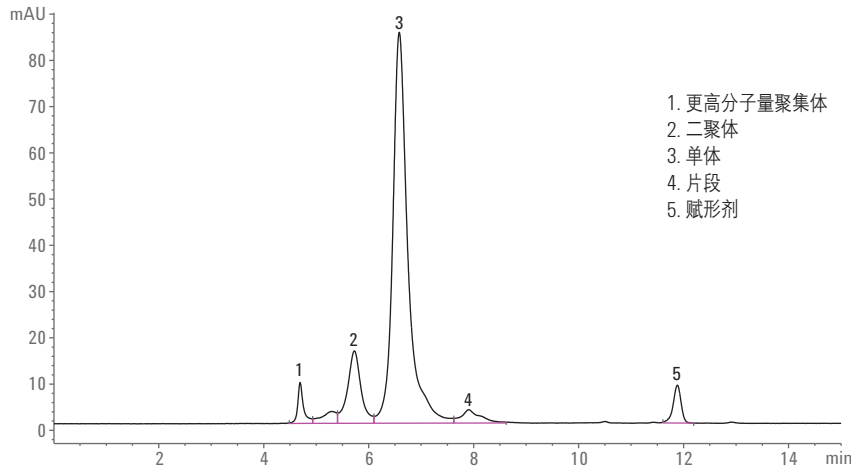


图 2. IgG 聚集体和赋形剂的分离

### 完整 IgG 单体和二聚体的分离

**色谱柱:** Agilent AdvanceBio SEC, 300Å  
7.8 x 300 mm, 2.7 μm  
(部件号 PL1180-5301)

**仪器:** Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统

**流速:** 1.0 mL/min

**柱温:** 室温

**检测器:** UV, 220 nm

**进样量:** 5 μL

**样品:** 多克隆 IgG

**样品浓度:** 150 mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.0

洗脱顺序通常由分子量大小决定，分子量最大的分子最先被洗脱，但 SEC 真正的分离机制是基于分子在溶液中的体积。大多数蛋白是致密的球形结构，但一些蛋白分子是圆柱形，因此可能会比预期更先被洗脱，这是由于它们在溶液中有着更大的流体动力学半径（图 3）。此外，不同的流动相也会影响洗脱顺序，因为溶液中分子体积会改变（流体动力学半径或回转半径）。

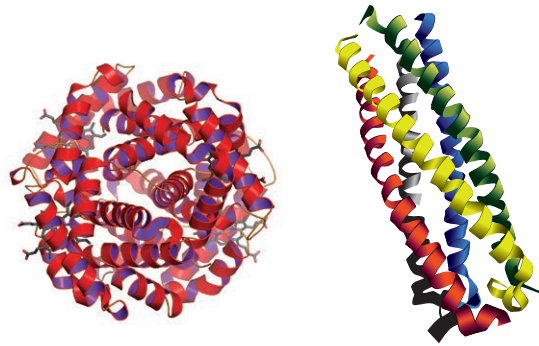


图 3. 致密型球状蛋白与圆柱形蛋白的对比

# SEC-UV/DAD 方法开发指南

选择初始色谱柱和条件：针对肽、多肽、蛋白质、生物分子和聚集体基于体积的分离

肽、多肽、蛋白质和 mAb  
分子量 > 0.1 - 1250 kDa

肽、多肽、蛋白质和 mAb  
分子量 > 0.1 - 10000 kDa

根据分子量范围和孔径选择色谱柱

AdvanceBio SEC (2.7 $\mu\text{m}$ )	
孔径	分子量范围 (kDa)
130Å	0.1 - 100
300Å	5 - 1250

Agilent Bio SEC-5 (5 $\mu\text{m}$ )	
孔径	分子量范围 (kDa)
100Å	0.1 - 100
150Å	0.5 - 150
300Å	5 - 1250
500Å	15 - 5000
1000Å	50 - 7500
2000Å	> 10000

## 推荐的初始分离条件

色谱柱： AdvanceBio SEC 或 Agilent Bio SEC-5

流动相： 150 mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.0\*

梯度： 10 - 30 min 等度洗脱

柱温： 推荐： 10 - 30 °C, 最高： 80 °C

流速： 4.6 mm 内径色谱柱： 0.1 - 0.4 mL/min

7.8 mm 内径色谱柱： 0.1 - 1.25 mL/min

样品大小：  $\leq$  总柱体积的 5%

\* 可以使用高盐和低盐的其他水相缓冲液

如需了解其他信息，请参见应用简报： *Defining the Optimum Parameters for Efficient Size Separations of Proteins (蛋白质高效体积分离的最佳参数优化)* (出版号 5990-8895EN) [www.agilent.com/chem/library](http://www.agilent.com/chem/library)

初始色谱分析后，可能需要进行某些改变来改善分离度、保持蛋白质溶解性，或减少样品与色谱填料之间的相互作用。可以上下调整流动相的离子强度，以便获得最佳分离。通常，pH 值也可以调节  $\pm 0.2$  个单位。如果还需要进一步优化，上下调整的范围则应相应扩大。还可以改变温度或添加有机溶剂。

对于需要加盐的方案，以下为常用缓冲液：

100 - 150 mM 氯化钠溶于 50 mM 磷酸钠, pH 7.0

100 - 150 mM 硫酸钠溶于 50 mM 磷酸钠, pH 7.0

50 - 100 mM 尿素溶于 50 mM 磷酸钠, pH 7.0。也可以用其他类似的盐 (如 KCl) 和盐酸胍。

pH 范围： 2.0 - 8.5

可添加的有机溶剂包括：

5% - 10% 乙醇 (或其他类似溶剂，如甲醇或乙腈) 溶于 50 mM 磷酸

钠, pH 7.0; 5% DMSO 溶于 50 mM 磷酸钠, pH 7.0。请注意：使用高粘度流动相时，应当降低流速以保持压力不超过最高运行压力。

柱温：

SEC 分离通常在 10 - 30 °C 下进行。蛋白质和多肽的分离需要较高温度，以改善蛋白质和疏水性多肽的分离度和回收率。为尽可能保持温度敏感型蛋白质的最大生物活性，可在冷藏室中运行 SEC。

Agilent Bio SEC 色谱柱的最高运行温度为 80 °C。注意高温会使蛋白质变性。



## SEC 的仪器注意事项

SEC 的分离原理意味着洗脱体积或保留时间对分析结果至关重要。只有高性能的仪器才能确保高精度和重现性。最好用等度泵或梯度泵运行等度模式，同时可采用示差折光 (RI) 检测器以及更为常规的 UV 或 DAD 检测器。为确保基线稳定，特别是当使用 RI 检测器时，强烈建议对流动相进行在线脱气并使用柱温箱。高温下运行可以增加扩散系数，从而提高分离度、重现性并降低柱压。因此对于高性能系统而言，柱温箱必不可少。

### 即使复杂溶剂条件也能确保稳定可靠运行

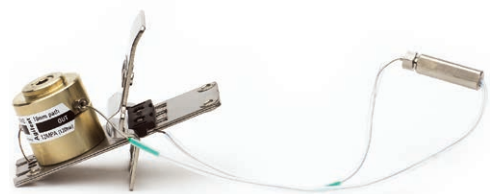
分析生物分子时通常使用 2 M NaCl 或 8 M 尿素等高盐浓度的缓冲液且使用 1 - 13 的极端 pH 值给液相色谱仪带来了严峻的挑战。1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱采用的特殊设计可轻易应对这些严苛的溶剂条件。溶剂运送系统使用耐腐蚀的钛材质，样品流路采用非金属材料，由此建立了极为稳定的仪器，不仅可以保护您的样品，还能保护您的仪器投资。此外，检测器专为生物分子分离而设计，不会影响蛋白质分析、峰形和回收率。

### 分析过程中确保蛋白质稳定

加热会使蛋白质变性，所以样品在整个液相流路中保持恒定的温度非常重要。使用附加的控温器可有效冷却配有惰性样品定量环和陶瓷进样针的安捷伦生物惰性自动进样器。柱温箱中的生物惰性热交换器可保持温度恒定。安捷伦提供了多种生物惰性流通池，可确保在不同条件下进行可靠的蛋白质分析。如需了解更多关于流通池选项的信息，请访问 [www.agilent.com/chem/bioflowcells](http://www.agilent.com/chem/bioflowcells)。



Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统



配有 RFID 标签的生物惰性流通池，10 mm，13  $\mu$ L  
(部件号 G5615-60022)

## 软件解决方案提供全新见解

使用体积排阻色谱时，有多种可选软件为您提供支持：

- **HPLC 软件：**Agilent OpenLAB CDS Chemstation 软件有助于获取、查看和组织色谱数据，并执行定量分析
- **GPC/SEC 软件：**可作为安捷伦 GPC/SEC 系统的配置部件，提供基于分子量的更多信息
- **缓冲液顾问软件：**快速简单地创建盐梯度和 pH 梯度，免除繁琐且易于出错的方法开发步骤，如缓冲液前处理、缓冲液混合及 pH 测定



## 全面的分子表征

SEC 可用于测定聚合物的平均分子量，包括天然存在的分子（多糖、淀粉等）以及合成聚合物（聚乙二醇或聚环氧乙烷）（图 4）。对于蛋白质或疫苗等更复杂的样品，通常需要使用专业软件进行更为精细的数据分析。联用合适的检测器便可获取有关样品构型的重要信息。检测器选择的更多信息详见第 17 页。

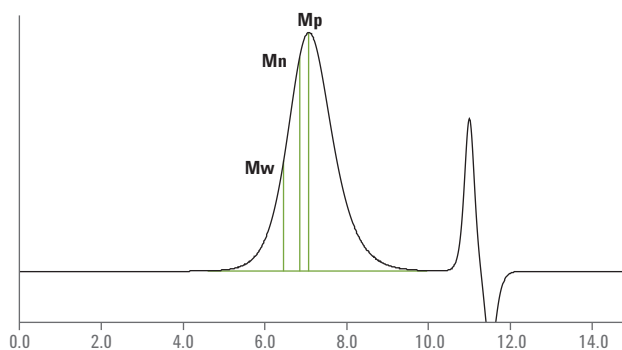
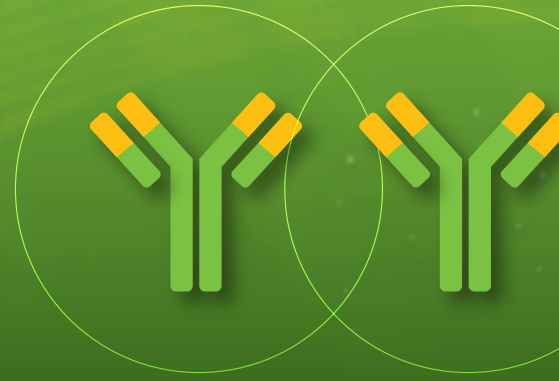


图 4. 显示 Mw、Mn 和 Mp 的多糖 SEC 分离结果

# 体积排阻表征步骤



## 样品前处理

体积排阻色谱的样品前处理方法与 HPLC 蛋白质分析的样品前处理方法类似。最重要的一点是样品必须能够溶于洗脱液，且自身可在流动相条件下实现良好分离。由于 SEC 分离与 HPLC 的其他形式相比具有更大的色谱柱尺寸与更小的线速度从而具有相对较低的流速（见下文的“色谱柱尺寸”部分），因此样品浓度和进样量需要大于常规量。为避免损害色谱柱，建议在使用前进行样品过滤或离心以除去颗粒物。然而过滤无法解决样品溶解度低的问题，此时需要更换洗脱液。

为进行有效的样品前处理，确保溶解样品的方法不会改变样品本身的性质也很重要。某些蛋白质可能会在压力条件下发生聚集（形成二聚体或更大分子量的多聚体）或解离（形成更低分子量的亚基）。这些条件包括反复冻融、极端温度、超声甚至浓缩。请参见第 5 页的方法开发指南了解详细信息。

## Captiva 低蛋白质结合过滤器

无论您使用何种样品前处理方法，采用一种低蛋白结合过滤器对样品进行过滤都是一个不错的选择。

安捷伦 PES 过滤器可在蛋白质相关的过滤中提供出色而一致的低蛋白质结合力。在大多数液相色谱分析中，PES 滤膜相对 PVDF 滤膜而言是一种更好的选择。对于常见的液相色谱溶剂，安捷伦 PES 具有与 PVDF 过滤器相似的兼容性，而在蛋白质结合力和清洁度方面比 PVDF 更胜一筹。如需了解更多信息，请访问

[www.agilent.com/chem/filtration](http://www.agilent.com/chem/filtration)



## Captiva PES 过滤器

直径 (mm)	孔径 (µm)	认证	外壳	部件号
4	0.45	LC	聚丙烯	5190-5095
4	0.2	LC/MS	聚丙烯	5190-5094
15	0.2	LC/MS	聚丙烯	5190-5096
15	0.45	LC	聚丙烯	5190-5097
25	0.2	LC/MS	聚丙烯	5190-5098
25	0.45	LC	聚丙烯	5190-5099



## 色谱柱选择

### 色谱柱尺寸

SEC 色谱柱尺寸通常大于其他色谱所用的色谱柱尺寸，而流速及线速度却相对较小。SEC 标准色谱柱尺寸为 7.8 x 300 mm，流速 1.0 mL/min，而反相色谱柱常为 2.1 x 150 mm 或 4.6 x 150 mm，线速度为 SEC 的 2 - 3 倍。这不是色谱柱尺寸决定的，而是 SEC 分离原理所致。

进行 SEC 分离时，样品浓度不会增加，而这一现象在其他色谱技术中较为常见，原因是分析物会被固定相吸附或是发生相互作用。因此，SEC 的进样量要大得多 (5 - 20  $\mu$ L)，且浓度通常较高 (1 - 4 mg/mL)。每根色谱柱的分析时间通常为 10 - 12 分钟 (假定常规 7.8 x 300 mm 色谱柱流速为 1.0 mL/min)，色谱峰通常很宽，因此无需较高的数据采集速率。蛋白质聚集体的对比或定量要用到 HPLC 软件。获得多分散聚合物的分子量分布信息需要使用特定的 SEC 软件。

最为重要的是要通过定期校准来了解所选色谱柱的性质。使用足够大的、无法渗入任何孔隙的分子，便可测定色谱柱的排阻极限。同样地，使用非常小的、可渗入任何孔隙的分子，便可测定色谱柱的总渗透极限。然后，您需要确保所进行的分离处于这两个极限值之间。如果样品的色谱图中存在排阻物质或在总渗透点处洗脱的物质，这表明需要选用其他孔径的色谱柱进行分析。

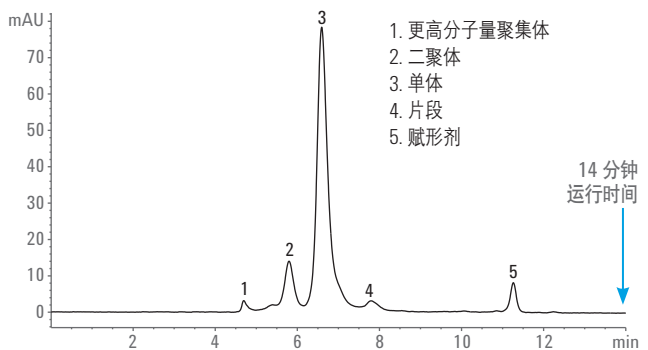
### 较短的色谱柱可提高分析速度

通常需要使用 300 mm 长的色谱柱以获得所需的分离度。不过为了提高分离速度，可以考虑使用更短的色谱柱。使用 150 mm 柱长的色谱柱可使分离时间缩短一半，但分离度会降低。如果需要实现高通量，通常可在不超过反压限值的前提下采用更短的色谱柱和更高的流速，从而可进一步缩短分析时间。见图 5。

色谱柱: **AdvanceBio SEC, 7.8 x 300 mm**

流速: 1.0 mL/min

样品: 多克隆 IgG



色谱柱: **AdvanceBio SEC, 7.8 x 150 mm**

流速: 2.0 mL/min

样品: 多克隆 IgG

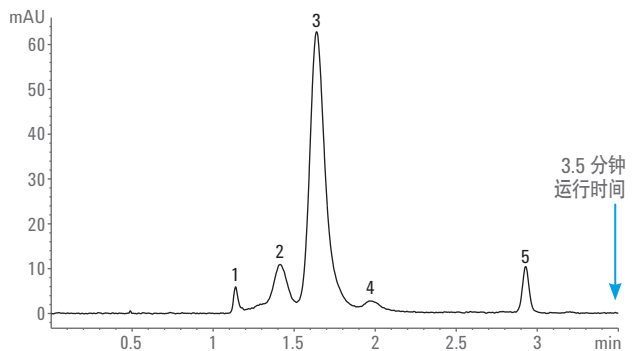


图 5. 300 mm 与 150 mm 色谱柱的分析结果对比，显示节省的时间



## 色谱柱填料选择

测定样品溶解性以及确定分离流动相（水、缓冲液或有机溶剂）后，根据分子的类型和尺寸选择合适的体积排阻色谱柱。对于分子量分布范围较宽的聚合物分子，如肝素、淀粉或纤维素，常使用装填聚合物吸附剂的色谱柱。硅胶基固定相最适于分析蛋白质和分子量不均一的分子（表 1）。

需要牢记的是，蛋白质所含的众多氨基酸带有各不相同的侧链基团，如酸性、碱性、疏水性、中性/亲水性基团。为了防止它们与硅胶色谱柱的固定相相互作用，需要在流动相中加入缓冲液。

安捷伦会针对色谱柱给出适合的分子量范围，理想情况下您所选用的色谱柱应该处于该操作范围的中间区间。

## 体积排阻色谱 (SEC)

应用	安捷伦色谱柱	备注
<b>蛋白质</b>		
mAb、蛋白质和多肽的 SEC-UV/DAD 或 LS 分析	Agilent AdvanceBio SEC	是一种创新技术，能够提供避免重复样品分析的高分离度以及缩短分析时间从而提高实验室分析效率
mAb、蛋白质和多肽的 SEC-MS 分析	Agilent Bio SEC-3	利用质谱检测器提供稳定的基线
大生物分子及含有多种分子量组成的样品	Agilent Bio SEC-5	有更多孔径可供选择（100Å、150Å、300Å、500Å、1000Å 及 2000Å），能够覆盖更宽的分析物范围
球蛋白，抗体	ProSEC 300S	高盐浓度下蛋白质分析的单色谱柱选项
蛋白质，球蛋白	ZORBAX GF-250/450	在方案仍要求使用 USP 指定产品 L35 时应采用的老式产品
<b>水溶性分析物</b>		
低分子量聚合物和低聚物、低聚糖、PEG、木质素磺酸盐	2 或 3 PL aquagel-OH ✓ PL aquagel-OH 8 μm ✓ PL aquagel-OH 20 5 μm ✓ PL aquagel-OH MIXED-M 8 μm	PL aquagel-OH 分析型色谱柱的 pH 范围为 2 - 10，与有机溶剂（最高 50% 甲醇）兼容，机械稳定性高达 140 bar (2030 psi)，并具有较低色谱柱运行压力
多分散生物聚合物、多糖、纤维素衍生物	2 或 3 PL aquagel-OH ✓ PL aquagel-OH MIXED-H 8 μm ✓ PL aquagel-OH 60/50/40 8 μm	
极高分子量的聚合物、透明质酸、淀粉、树脂	PL aquagel-OH 60/50/40 15 μm 串联	

表 1. 根据应用和样品尺寸选择色谱柱



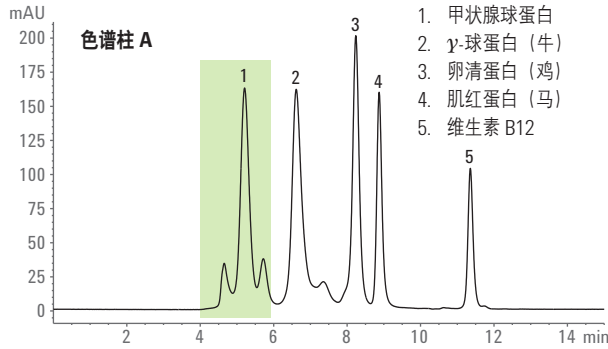
Agilent Bio SEC 色谱柱用于分离包括蛋白聚集体在内的生物分子，而安捷伦 GPC 色谱柱用于包括多糖分子量测定在内的天然聚合物分析。

## 孔径

相对于其他生物聚合物而言，蛋白质的体积相对较小且致密，所以 300Å 孔径是进行初始色谱柱选择的一个不错选择。图 6 对比了使用不同孔径的色谱柱分离含 5 种蛋白质混合物的参比标样和多克隆 IgG 样品，结果清楚表明孔径对分离度的影响。

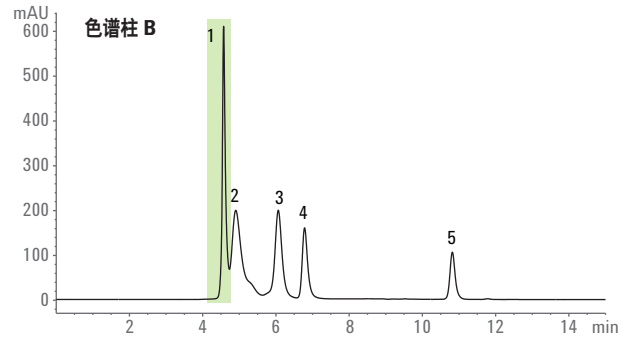
使用 300Å 孔径的色谱柱时，最大体积的蛋白质甲状腺球蛋白和 IgG 二聚体可实现分离，但随着孔径的减小，最大的蛋白质均被排出色谱柱，因此无法进行有效分离。

### BioRad 凝胶过滤混标



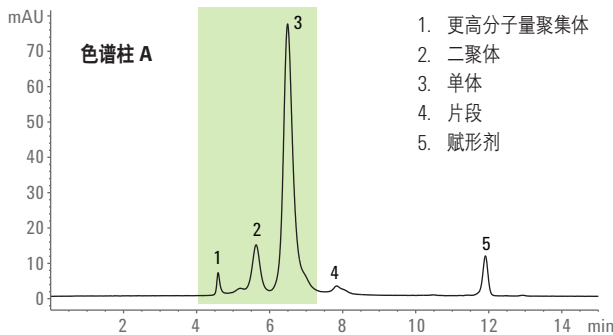
色谱柱 A: AdvanceBio SEC 300Å  
4.6 x 300 mm, 2.7  $\mu$ m (部件号 PL1580-5301)

色谱柱 B: AdvanceBio SEC 130Å  
4.6 x 300 mm, 2.7  $\mu$ m (部件号 PL1580-5350)



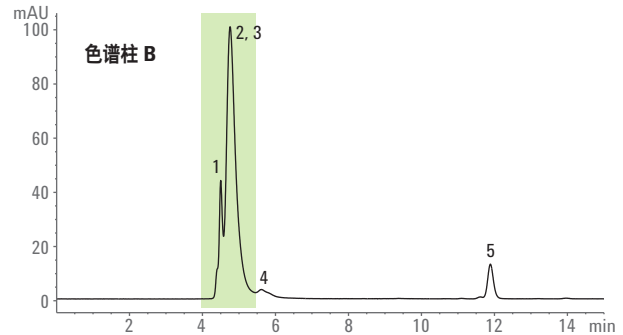
仪器: Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统  
流动相: 150 mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.0  
流速: 0.35 mL/min  
检测器: UV, 220 nm  
样品: BioRad 凝胶过滤混标

### 多克隆 IgG 分离



色谱柱 A: AdvanceBio SEC 300Å  
4.6 x 300 mm, 2.7  $\mu$ m (部件号 PL1580-5301)

色谱柱 B: AdvanceBio SEC 130Å  
4.6 x 300 mm, 2.7  $\mu$ m (部件号 PL1580-5350)



仪器: Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统  
流动相: 150 mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.0  
流速: 0.35 mL/min  
检测器: UV, 220 nm  
样品: 多克隆 IgG

图 6. 孔径对 BioRad 凝胶过滤标样和多克隆 IgG 的分离度影响对比。绿色区域突出显示了两种孔径下的不同分离度。分析较大蛋白质时需使用较大的孔径。

## 评价 SEC 的渗透范围

对于蛋白质分离，必须了解，SEC 的分离机制是依据溶质在溶液中的体积而非它们的分子量。对比蛋白质/多肽与支链淀粉/多糖及 PEG/PEO 的校准曲线时这一点尤为明显，如图 7 所示。支链淀粉/多糖与 PEG/PEO 的校准曲线非常类似，而蛋白质/多肽的曲线发生了偏移且形状不同。

蛋白质由形成三维结构的复杂多肽链组成。而这些结构会受到它们所暴露环境的影响，如 pH 值或离子强度。氨基酸链会形成最适宜的形状，导致蛋白质的结构和体积发生变化。

为了证实洗脱时间取决于体积而非分子量，查看分子量约 50000 左右的校准物的保留时间，可发现其中存在显著差异（图 8）。PEG 在 7 分钟左右时洗脱，多糖在 7.5 分钟左右时洗脱，而蛋白质的洗脱时间则约为 9.5 分钟。

这清楚地表明 SEC 的分离机制是基于分子的实际体积而非分子量。因此，当使用校准曲线时需要说明所使用的校准物。例如，可说明目标样品相当于分子量 50000 的支链淀粉/多糖。第 16 页中的先进检测器就不存在这种相对性。

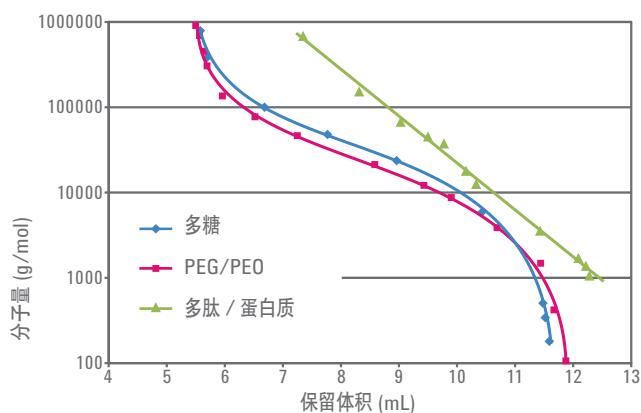


图 7. 三种类型的校准物所得的校准曲线对比

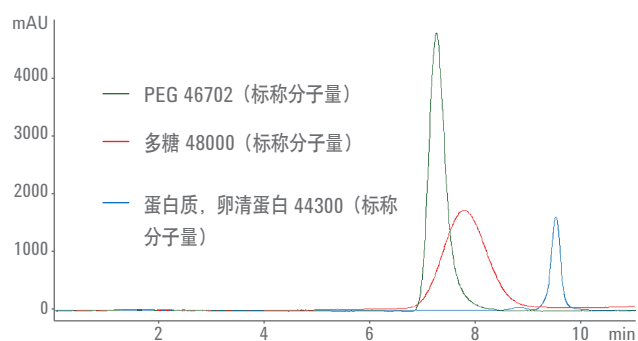


图 8. 分子量相似的校准物的叠加色谱图



### 130Å AdvanceBio SEC 校准标样（部件号 5190-9416，130Å AdvanceBio SEC 校准标样，2 mL/ 瓶）

含 5 种精选蛋白质（卵清蛋白、肌红蛋白、抑肽酶、神经降压素、血管紧张素 II）的蛋白质混合物，适用于校准 Agilent 130Å AdvanceBio 体积排阻色谱柱。该标样可用于常规色谱柱校准，以确保涉及蛋白质纯化与分析的多种应用可在理想的系统性能下进行。

### 300Å AdvanceBio SEC 校准标样（部件号 5190-9417，300Å AdvanceBio SEC 校准标样，2 mL/ 瓶）

含 5 种精选蛋白质（甲状腺球蛋白、 $\gamma$ -球蛋白、卵清蛋白、肌红蛋白、血管紧张素 II）的蛋白质混合物，适用于校准 Agilent 300Å AdvanceBio 体积排阻色谱柱。该标样可用于常规色谱柱校准，以确保涉及蛋白质纯化与分析的多种应用可在理想的系统性能下进行。



## 粒径

选择色谱柱时，粒径也是一个重要考虑因素。较小的粒径可提供更有效的分离，但是存在蛋白质降解（剪切/变形）的风险。图 9 显示了 Agilent 3  $\mu\text{m}$  Bio SEC-3 色谱柱与 5  $\mu\text{m}$  Bio SEC-5 色谱柱的对比结果。如果样品前处理和洗脱液前处理过程中不够

仔细，会造成色谱柱反压升高、色谱柱堵塞的风险。推荐采用过滤器去除不溶物质和碎片。使用保护柱或在线过滤器还可延长色谱柱使用寿命。

## Agilent Bio SEC-3 柱和 Agilent Bio SEC-5 柱的对比

### 单克隆抗体分析

色谱柱: **Bio SEC-3, 300Å**  
**7.8 x 300 mm, 3  $\mu\text{m}$**   
(部件号 5190-2511)

色谱柱: **Bio SEC-5, 300Å**  
**7.8 x 300 mm, 5  $\mu\text{m}$**   
(部件号 5190-2526)

仪器: Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相系统

流动相: 150 mM 磷酸钠, pH 7

流速: 1 mL/min

检测器: UV, 220 nm

样品: 人源化单克隆抗体

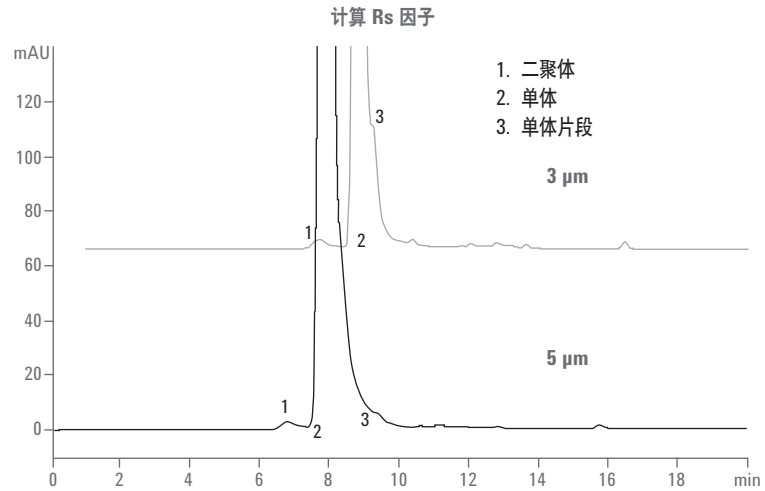


图 9. Agilent Bio SEC-3 和 Agilent Bio SEC-5 色谱柱的对比。3  $\mu\text{m}$  柱具有更出色的分离效果

## 色谱柱内径

根据样品量选择色谱柱内径也十分重要。如果待分析物质的量很少，采用 4.6 mm 内径色谱柱（流速 0.35 mL/min）即可。但使用更小内径的色谱柱时，使系统体积最小化非常重要，可以避免过度扩散和分离度降低。

当使用水相洗脱液时，SEC 被认为是一种非变性技术，极为适用于分离复杂样品或样品成分，以便进一步分析。Agilent SEC-3 和 SEC-5 产品系列的 21.2 mm 色谱柱等大内径色谱柱可用于通过分析型 HPLC 系统进行实验室制备型分离。



Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱 7.8 x 300 mm 和 4.6 x 300 mm



## 方法参数

### 流速

对某些应用而言，分析速度十分关键。采用短色谱柱（如采用 150 mm 替代常规 300 mm）和/或提高流速均可缩短分析时间。但这两种方法同时也会降低分离度，这是因为 SEC 依靠分子不断扩散进入和排出色谱柱的孔隙中而形成不同的路径长度，从而实现分离。尽管如此，如图 10 所示，使用 150 mm 长色谱柱在 2 mL/min 流速下分析 IgG 二聚体和单体时，仍可在 4 分钟内获得定量分析所需的足够分离度。

**色谱柱:** AdvanceBio SEC 300Å,  
7.8 x 150 mm, 2.7 μm  
(部件号 PL1180-3301)

**洗脱液:** 150 mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.0

**流速:** 0.5、1.0、1.5 mL/min (52、102、152 bar)

**检测器:** UV, 220 nm

**进样量:** 5 μL

**样品:** IgG (2 mg/mL)

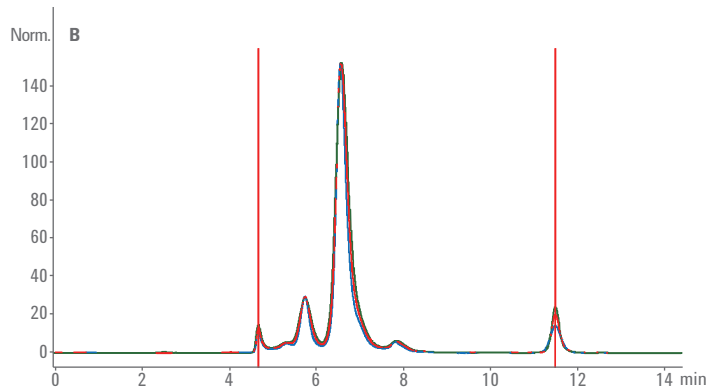
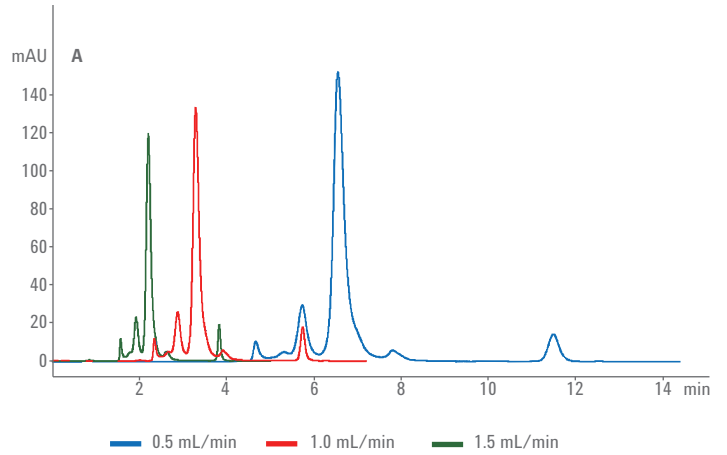


图 10. 提高流速可将分析时间从 12 min 缩短至 4 min (A)。将保留时间进行归一化处理后再叠加以 (B)，可明显发现 3 张谱图的保留时间是一致的，且几乎没有损失分离度

## SEC 方法的故障排除

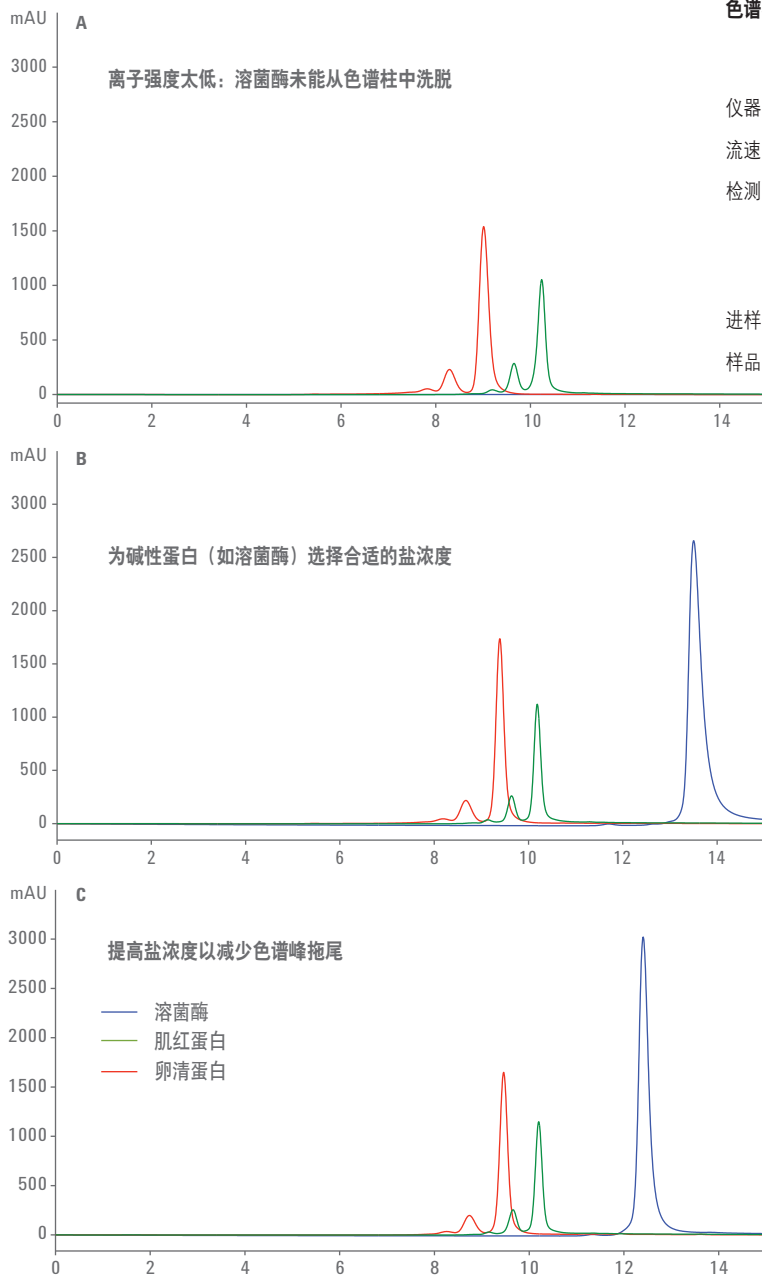
问题	原因	解决方案
回收率低于预期，或峰形过宽	疏水性分析物	在流动相内加入少量 (10% - 20%) 有机改性剂 (乙腈或甲醇)
色谱峰出现在不应出现的地方 (根据分子量判断)，或色谱峰拖尾	离子相互作用或碱性蛋白	增加离子强度，使盐浓度达到 50 - 100 mM 之间；加入磷酸盐缓冲液
峰形差	非特异性吸附	增加盐浓度或试用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统
分析物保留/分离度差	孔径小于分子体积	检查色谱柱孔径；详见第 11 页

## 流动相选择

### 次级相互作用会导致分离不佳

可以通过进行方法优化,来防止次级相互作用的发生。这样的相互作用可能会导致迟于预期的分析物洗脱, 出现分子量较低

的假象。略微调整 pH 值、离子强度或有机改性剂等流动相组成有利于解决类似问题 (图 11)。还可能



色谱柱: **Agilent Bio SEC-3 300Å**  
**4.6 mm x 300 mm, 3 μm**  
(部件号 5190-2513)

仪器: Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统

流速: 0.35 mL/min

检测器: UV, 220 nm

A: 洗脱液 20 mM 磷酸盐缓冲液, pH 7 + 50 mM NaCl

B: 洗脱液 20 mM 磷酸盐缓冲液, pH 7 + 100 mM NaCl

C: 洗脱液 20 mM 磷酸盐缓冲液, pH 7 + 400 mM NaCl

进样量: 5 μL

样品: 蛋白质 (1 mg/mL 20 mM 磷酸盐缓冲液, pH 7)

50 mM NaCl 溶于 20 mM 缓冲液



400 mM NaCl 溶于 20 mM 缓冲液

图 11. 离子强度过高或过低对所需分离度的影响

## 校准

选择了色谱柱后，需要使用已知分子量的标样进行校准。每次更改色谱柱或流动相后，都需要再次校准。将保留时间对分子量作图即可得到校准曲线（图 12）。根据目标分子选择合适的

标样极其重要。对蛋白质分离而言，需采用蛋白质分子量标样。对多糖分离而言，需采用支链淀粉分子量标样。

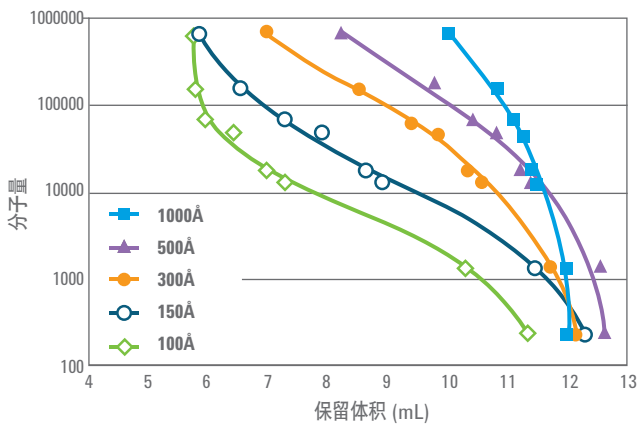
**色谱柱:** Agilent Bio SEC-5  
7.8 x 300 mm, 5  $\mu$ m  
(部件号 5190-2521)

**仪器:** Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统

**流动相:** 150 mM 磷酸钠, pH 7.0

**流速:** 1.0 mL/min

**检测器:** UV



蛋白质	分子量	保留体积				
		1000Å	500Å	300Å	150Å	100Å
甲状腺球蛋白	670000	10.07	8.23	7.03	5.82	5.77
$\gamma$ -球蛋白	158000	10.88	9.80	8.57	6.55	5.79
BSA	67000	11.13	10.44	9.44	7.29	6.00
卵清蛋白	45000	11.28	10.83	9.89	7.90	6.40
肌红蛋白	17000	11.44	11.28	10.42	8.66	7.05
核糖核酸酶 A	12700	11.52	11.41	10.58	8.93	7.32
维生素 B12	1350	12.00	12.59	11.78	11.49	10.30
腺嘌呤	112	12.08	12.68	12.21	12.13	11.41

图 12. 将保留时间对分子量作图得到的校准曲线

理想情况下，标样应溶解于流动相，且需确保样品完全溶于流动相。如果溶液浑浊，则需要进一步处理。进样前应采用离心

或过滤以除去不溶物。而物理方法可能会改变分子量组成，因此有必要通过改变流动相条件以提高样品溶解度。



## 先进的检测技术

SEC 中需要进一步考虑的因素还包括检测器的选择。UV 或二极管阵列 (DAD) 检测器常用于蛋白质分离。多肽和蛋白质通常可在 220 nm 下获得最佳结果 (最高灵敏度)。一些缓冲液或有机改性剂可能在低波长处背景吸收过高, 这时有必要选择 254 nm 或 280 nm。UV 检测的一个缺点是有些分子不具有发色团, 而由于分析物为等度洗脱, 则可改用 RI 检测器。高级光散射检测

器的加入可显著提高 SEC 的性能。静态光散射检测可准确测定摩尔质量, 无需色谱柱校准, 还可避免不良的相互作用。联用动态光散射检测还可用于分子体积大小研究。光散射检测大大提高了灵敏度, 可用于发现含量极低的聚集体 (图 13)。选择死体积较低的检测器非常重要, 可确保获取额外信息且丝毫不损色谱性能。

**色谱柱:** Agilent AdvanceBio 300Å,  
7.8 x 300 mm, 2.7 μm

**仪器:** Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液  
相色谱系统联用 Agilent 1260 Infinity  
多检测器 GPC/SEC 系统

**流动相:** 150 mM 磷酸钠, pH 7.0

**流速:** 0.8 mL/min

**柱温:** 30 °C

**检测器:** UV, 280 nm + RI + LS 90°

**进样量:** 5 μL

**样品:** 降解单克隆抗体

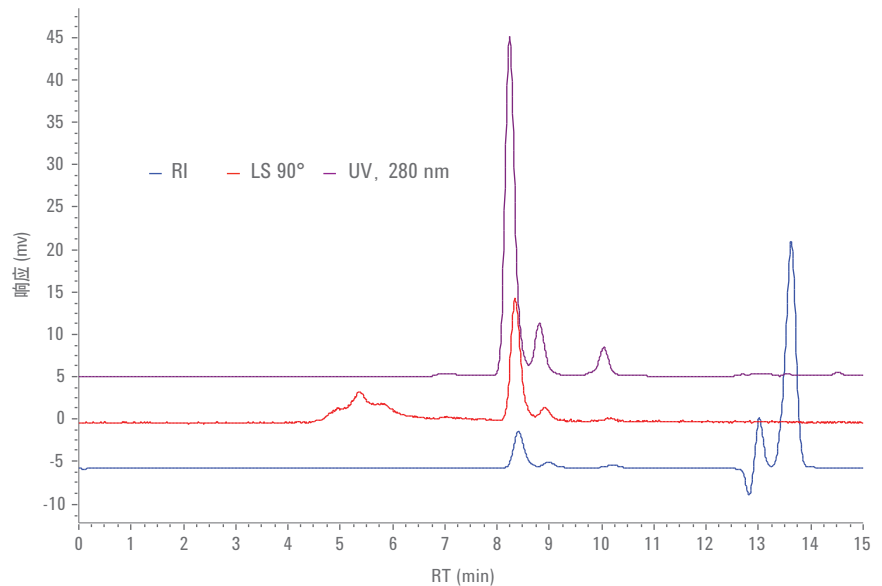


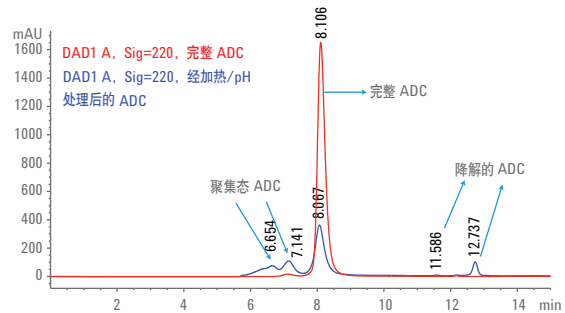
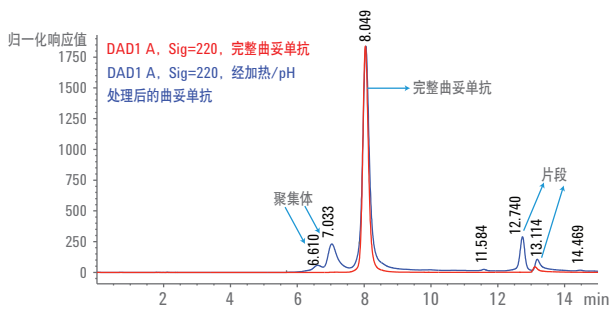
图 13. 使用不同检测器对蛋白质分离的检测结果

## 蛋白质偶联物

治疗性蛋白质容易在开发过程的表达、再折叠、下游处理、制剂、灭菌和储存等所有阶段发生聚集和降解。尽管聚集体/降解产物的含量极低，但它们仍可对生物药物产生严重影响，如导致活性丧失、降低溶解度以及增加免疫原性。体积排阻色谱是表征蛋白质聚集体的标准方法，法规文件申报和审批中也明确要求使用体积排阻色谱。

为改善给药方式并提高半衰期与效价，可将包括单克隆抗体在内的蛋白质进行偶联。将水溶性聚合物（如聚乙二醇）与蛋白

质偶联可提高药物活性、延长药物在血液中的半衰期并降低免疫原性。最近，抗体药物偶联物 ADC 越来越受到关注，期间研究人员将单克隆抗体与细胞毒素剂偶联以进行靶向给药并增强治疗效果。偶联后同样需要进行聚集体研究，因为样品特性的改变将为 SEC 分离带来更大挑战。需使用具有低非特异性结合的色谱柱（如 AdvanceBio SEC）分析抗体和 ADC，流动相可使用水性流动相。见图 14。



**色谱柱:** AdvanceBio SEC 300Å  
7.8 x 300 mm, 2.7 μm  
**仪器:** Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统  
**流动相:** PBS, 50 mM 磷酸钠 + 150 mM 氯化钠, pH 7.4  
**TCC 温度:** 室温

**进样量:** 10 μL  
**流速:** 0.8 mL/min  
**检测器:** UV, 220 nm

图 14. mAb 和疏水性较强的 ADC 均使用同一种水性流动相

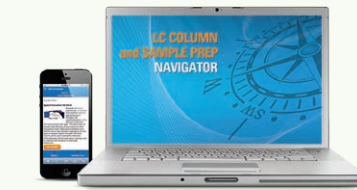
### 为您的成功之路指引方向

[www.agilent.com/chem/navigator](http://www.agilent.com/chem/navigator)

安捷伦液相色谱和样品前处理在线选择工具中包括品种丰富的生物色谱柱和小分子色谱柱系列产品，帮助您针对应用选择合适的色谱柱。

在线选择工具为您提供四种简单的搜索选项：

- 按部件号搜索，液相色谱柱和样品前处理产品交叉引用信息将帮助您寻找最佳的安捷伦替换部件



- 按化合物搜索，使用下拉列表
- 按 USP 方法搜索
- 按色谱柱搜索，根据所用的色谱柱方法提供建议



## 样品前处理

- 理想情况下，样品应溶解于流动相
- 如果样品浑浊，可能需要改变流动相条件
- 过滤或离心可使样品澄清，但这些方法会改变样品的分子量组成
- 为溶解样品，可通过略微加热、漩涡振荡，或有时使用超声，但需要小心使用，因为这会改变分子量组成
- 小心仔细，确保样品不会在储存中发生变化
- 样品需新鲜制备并尽快用于分析
- 细菌会在缓冲液中快速生长
- 高浓度样品可能会逐渐发生变化，导致聚集甚至沉淀



## 色谱柱选择

- 为确保样品完整性，需使用长柱以较低流速进行 SEC 分离
- 色谱柱长度通常为 250 或 300 mm
- 7.5 或 7.8 mm 内径的色谱柱常规流速为 1.0 mL/min，4.6 mm 内径的色谱柱常规流速为 0.35 mL/min
- 通常采用串联色谱柱以提高生物聚合物应用的分度
- 使用较小填料粒径可提高蛋白质应用中的分离度
- 采用较小填料粒径的 150 mm 色谱柱可缩短分析时间

### 色谱柱填料选择

- 分析物不得与色谱柱填料发生非特异性相互作用
- 硅胶基质吸附剂可用于分析多肽和蛋白
- 聚合物基质吸附剂可用于分析生物聚合物

### 色谱柱参数

- **孔径** — 取决于样品的分子量范围，避免排阻出样品成分，将所需分离区域的体积最大化
- **粒径** — 填料粒径越小分离度越高（但反压更高）
- **色谱柱长度** — 平衡好分离度及分析时间
- **色谱柱内径** — 使用较小内径的色谱柱可减少溶剂损耗和进样量



## 流动相

- 流动相应包括缓冲液/盐以克服离子相互作用，但盐度太高会导致疏水作用
- 请勿改变分析物，以避免蛋白质降解/聚集等现象的发生
- 新鲜配制流动相并迅速使用，室温下存储的稀缓冲液非常利于细菌生长
- 缓冲液的保存期不得超过 7 天，除非冷藏保存
- 使用前应过滤水（可能性小）或缓冲盐（可能性大）中的颗粒物
- 当使用硅胶色谱柱时，高 pH 磷酸盐缓冲液（尤其是高温条件下）会显著缩短色谱柱寿命

如需了解关于安捷伦 SEC 生物色谱柱的更多信息，请访问

[www.agilent.com/chem/bioHPLC](http://www.agilent.com/chem/bioHPLC)

## 与您携手合作，共获理想结果

不断出现的挑战需要更优异的解决方案。我们的解决方案将帮助生物制药科学家在疾病研究领域实现开拓创新、加速药物发现，且在整个产品开发和生产阶段更具信心。

如需了解有关安捷伦生物制药解决方案的更多信息，请访问

[www.agilent.com/chem/togetherbiopharma](http://www.agilent.com/chem/togetherbiopharma)

如需了解更多信息，请访问

[www.agilent.com/chem/BioHPLC](http://www.agilent.com/chem/BioHPLC)

查找当地的安捷伦客户服务中心，请访问

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

**800-820-3278**

**400-820-3278 (手机用户)**

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

安捷伦科技大学：

<http://www.lscs-china.com.cn/agilent>

浏览和订阅 Access Agilent 电子期刊：

[www.agilent.com/chem/accessagilent-cn](http://www.agilent.com/chem/accessagilent-cn)

仅限研究使用。本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。安捷伦科技公司对本资料可能存在的错误，或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2015

2015年11月1日，中国出版

5991-3651CHCN



**Agilent Technologies**