

高性能 SEC 色谱柱 TSKgel[®] UP-SW2000

— 目 录 —

	页码
1. 前言	1
2. TSKgel UP-SW2000 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. 测定流速的影响	6
2 - 4. 样品进样量的影响	8
2 - 5. 色谱柱外（管路中）体积的影响	9
2 - 6. 色谱柱的耐用性	11
2 - 7. 填料的批间差异	12
2 - 8. 与市售 UHPLC 用 SEC 色谱柱的对比	12
3. 分离示例	14
3 - 1. 生物药物的分离	14
3 - 2. 寡核苷酸的分离	15
4. 总结	15

1. 前言

尺寸排阻色谱（SEC）是根据样品的分子大小来进行分离的一种色谱方法，从很久以前开始便用于蛋白质的分离、纯化。

虽然东曹公司现有的色谱柱产品 TSKgel G2000SW_{XL}（粒径 5 μm）和 TSKgel SuperSW2000（粒径 4 μm）适用于分离分析分子量在 5,000~100,000 范围内的蛋白质和肽，但用户仍需要能够更快速且高分离度分析的 SEC 色谱柱。

现在，可同时在 UHPLC 和 HPLC 中使用的粒径 2 μm 的高性能 SEC 色谱柱 TSKgel UP-SW2000 已经实现了商品化。

本报告主要介绍了 TSKgel UP-SW2000 色谱柱的基本特性及其分离示例。

2. TSKgel UP-SW2000 的基本特性

2-1. 填料、色谱柱的规格

表 1 的内容是 TSKgel UP-SW2000 的填料、色谱柱的产品规格以及与现有色谱柱在相同用途中使用时的对比。

TSKgel UP-SW2000 色谱柱中填充了 12.5 nm 孔径硅胶表面导入二醇基后形成的粒径为 2 μm 的填料。与现有色谱柱相比，具有较高的分离性能，适用于分离分析低分子量的蛋白质和肽。

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: 色谱柱和填料的规格

产品名称	本色谱柱		现有色谱柱	
	TSKgel UP-SW2000		TSKgel SuperSW2000	TSKgel G2000SW _{XL}
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	7.8 mm I.D. × 30 cm
基质	硅胶		硅胶	硅胶
官能团	二醇基		二醇基	二醇基
粒径	2 μm		4 μm	5 μm
分子量排阻界限	500 kDa		500 kDa	500 kDa
分子量测定范围	5~100 kDa		5~100 kDa	5~100 kDa

2-2. 色谱柱的分离性能

2-2-1. 蛋白质的分离

图1是使用TSKgel UP-SW2000、TSKgel SuperSW2000（粒径4 μm）和TSKgel G2000SW_{XL}（粒径5 μm），测定标准蛋白质时的色谱图对比，图2是使用标准蛋白质时的校正曲线对比图。

可以看出，TSKgel UP-SW2000与在有色谱柱相比，具有相同的分离选择性。另外还可以看出，与现有色谱柱相比，校正曲线的斜率相同。

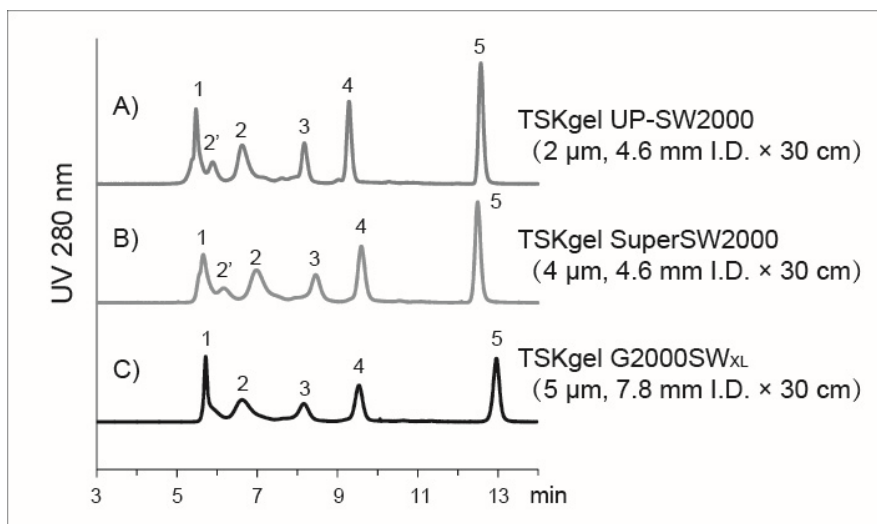


图1 标准蛋白质的色谱图对比

〈测定条件〉

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

B) TSKgel SuperSW2000（4 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm）

C) TSKgel G2000SW_{XL}（5 μm, 7.8 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：A) 和 B) 0.35 mL/min, C) 1.0 mL/min

检测：UV 280 nm, 微型比色皿 温度：25 °C 进样量：10 μL

样品：1. 甲状腺球蛋白，640,000 Da（0.5 g/L） 2. γ-球蛋白，155,000 Da（1.0 g/L）（2' γ-球蛋白二聚体）
3. 卵白蛋白，47,000 Da（1.0 g/L） 4. 核糖核酸酶 A，13,700 Da（1.0 g/L）
5. p-氨基苯甲酸，137 Da（0.01 g/L）

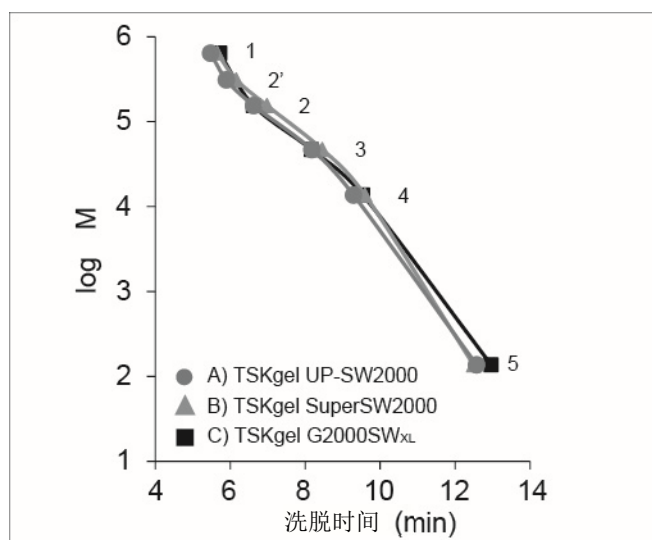


图2 标准蛋白质的校正曲线

〈测定条件〉

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

B) TSKgel SuperSW2000
（4 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm）

C) TSKgel G2000SW_{XL}
（5 μm, 7.8 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：A) 和 B) 0.35 mL/min, C) 1.0 mL/min

检测：UV 280 nm, 微型比色皿

温度：25 °C 进样量：10 μL

样品：1. 甲状腺球蛋白，640,000 Da（0.5 g/L）
2. γ-球蛋白，155,000 Da（1.0 g/L）
（2' γ-球蛋白二聚体）
3. 卵白蛋白，47,000 Da（1.0 g/L）
4. 核糖核酸酶 A，13,700 Da（1.0 g/L）
5. p-氨基苯甲酸，137 Da（0.01 g/L）

表 2: 色谱柱性能对比 (标准蛋白质的分离度 (R))

色谱柱	粒径	R (洗脱峰 1/2)	R (洗脱峰 2/3)	R (洗脱峰 3/4)	R (洗脱峰 4/5)
A) TSKgel UP-SW2000	2 μm	3.3	4.0	4.5	14.5
B) TSKgel SuperSW2000	4 μm	2.0	2.7	3.7	11.2
C) TSKgel G2000SW _{XL}	5 μm	1.9	2.4	3.2	10.4

表 2 的内容是图 1 中各洗脱峰的分离度。粒径较小的 TSKgel UP-SW2000 在所有洗脱峰之间都表现出最高的分离度。

表 3 的内容是各色谱柱的理论塔板数。可以看出, 粒径较小的 TSKgel UP-SW2000 与现有色谱柱相比, 理论塔板数更高。

表 3: 色谱柱性能对比 (理论塔板数)

色谱柱	粒径	理论塔板数	
		核糖核酸酶 A (洗脱峰 4)	p-氨苯甲酸 (洗脱峰 5)
A) TSKgel UP-SW2000	2 μm	28,767	53,818
B) TSKgel SuperSW2000	4 μm	13,308	35,929
C) TSKgel G2000SW _{XL}	5 μm	10,115	29,371

使用不同尺寸的 TSKgel UP-SW2000 色谱柱, 测定标准蛋白质时的色谱图如图 3 所示。可以看出, 15 cm 长的色谱柱 (色谱图 A)) 与 30 cm 长的

色谱柱 (色谱图 B)) 相比, 只需约一半的时间便可获得同样分离度的色谱图, 所以可实现快速分析。

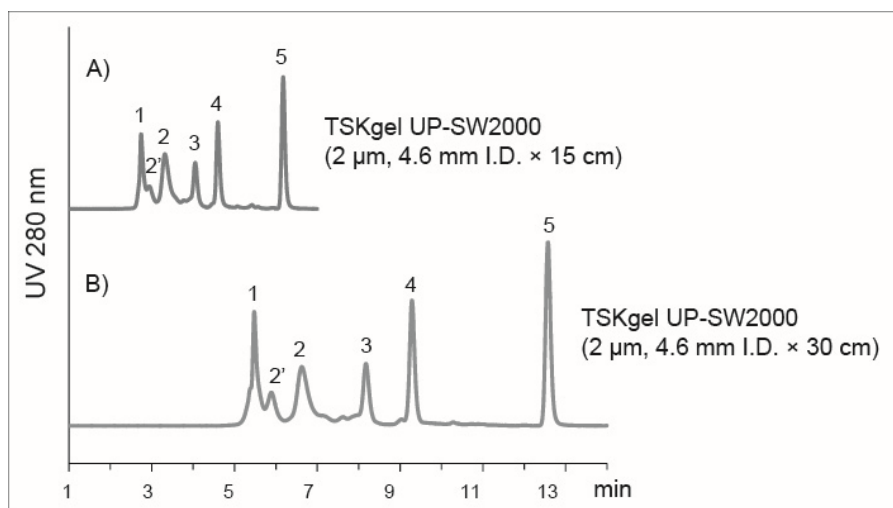


图 3 标准蛋白质的色谱图 (色谱柱尺寸对比)

〈测定条件〉

色谱柱: A) TSKgel UP-SW2000 (2 μm, 4.6 mm I.D. × 15 cm)

B) TSKgel UP-SW2000 (2 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, 微型比色皿 温度: 25 °C 进样量: A) 5 μL, B) 10 μL

样品: 1. 甲状腺球蛋白, 640,000 Da (0.5 g/L) 2. γ-球蛋白, 155,000 Da (1.0 g/L) (2' γ-球蛋白二聚体)

3. 卵白蛋白, 47,000 Da (1.0 g/L)

4. 核糖核酸酶 A, 13,700 Da (1.0 g/L)

5. p-氨苯甲酸, 137 Da (0.01 g/L)

表 4: 色谱柱性能对比 (理论塔板数)

色谱柱	色谱柱尺寸	理论塔板数	
		核糖核酸酶 A (洗脱峰 4)	p-氨苯甲酸 (洗脱峰 5)
A) TSKgel UP-SW2000	4.6 mm I.D. × 30 cm	28,767	53,818
B) TSKgel UP-SW2000	4.6 mm I.D. × 15 cm	17,535	29,545

图4是使用TSKgel UP-SW2000、TSKgel UP-SW3000测定标准蛋白质时的色谱比较图，图5是使用标准蛋白质时的校正曲线比较图。可以看出，

TSKgel UP-SW2000与TSKgel UP-SW3000相比，在相对较低的分子量区域（约5万以下）中，校正曲线的斜率更为平缓。

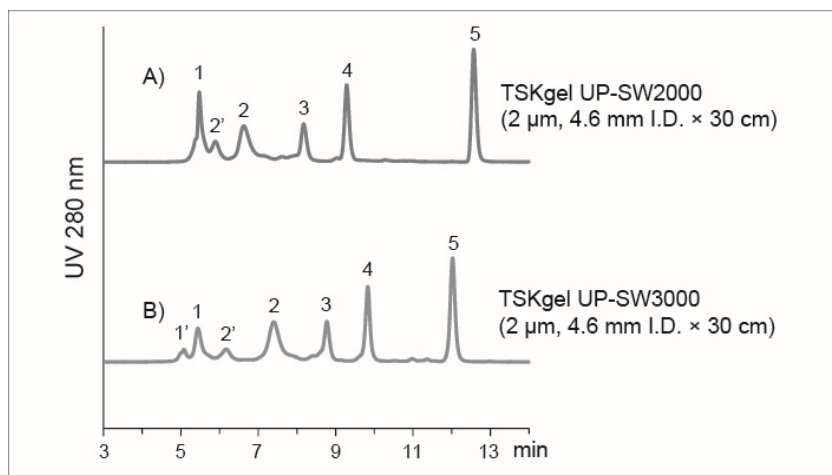


图4 标准蛋白质的色谱图

〈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)

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：A) 和 B) 0.35 mL/min, C) 1.0 mL/min 检测：UV 280 nm, 微型比色皿

温度：25 °C 进样量：10 μL

样品：1. 甲状腺球蛋白, 640,000 Da (0.5 g/L) (1'甲状腺球蛋白二聚体)
2. γ-球蛋白, 155,000 Da (1.0 g/L) (2'γ-球蛋白二聚体) 3. 卵白蛋白, 47,000 Da (1.0 g/L)
4. 核糖核酸酶 A, 13,700 Da (1.0 g/L) 5. p-氨基甲酸, 137 Da (0.01 g/L)

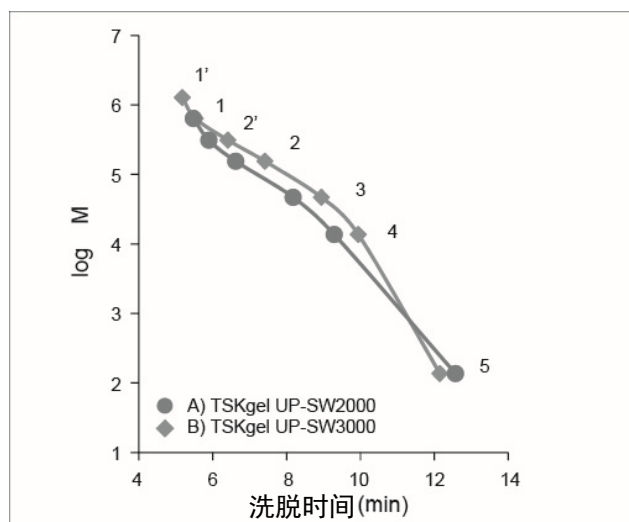


图5 标准蛋白质的校正曲线

〈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)

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：A) 和 B) 0.35 mL/min, C) 1.0 mL/min

检测：UV 280 nm, 微型比色皿

温度：25 °C 进样量：10 μL

样品：1. 甲状腺球蛋白, 640,000 Da (0.5 g/L)
(1'甲状腺球蛋白二聚体)
2. γ-球蛋白, 155,000 Da (1.0 g/L)
(2'γ-球蛋白二聚体)
3. 卵白蛋白, 47,000 Da (1.0 g/L)
4. 核糖核酸酶 A, 13,700 Da (1.0 g/L)
5. p-氨基甲酸, 137 Da (0.01 g/L)

表5: 色谱柱和填料的规格

	TSKgel UP-SW2000	TSKgel UP-SW3000
色谱柱尺寸	4.6 mm I.D. × 30 cm, 15 cm	4.6 mm I.D. × 30 cm, 15 cm
基质	硅胶	硅胶
官能团	二醇基	二醇基
粒径	2 μm	2 μm
分子量排阻上限*	500 kDa	800 kDa
分子量划分范围*	5~100 kDa	10~500 kDa
色谱柱用途	低分子量蛋白质、肽的分离分析	抗体(二聚体/单体/片段)的分离分析

* 标准蛋白质

2-2-2. 肽的分离

使用 TSKgel UP-SW2000 (粒径 2 μm) 和 TSKgel SuperSW2000 (粒径 4 μm)，洗脱液使用 40% 乙腈水溶液 + 0.05% 三氟乙酸，在变性条件下测定肽混合物时的色谱图对比如图 6 和图 7 所示，

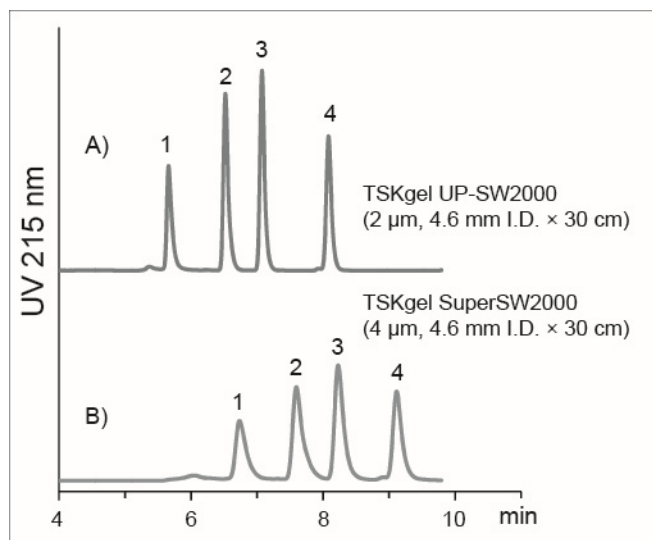


图 6 肽混合物的色谱图 (1)

各洗脱峰的分度度 (R) 的比较结果如表 6 和表 7 所示。

可以看出，与 TSKgel SuperSW2000 相比，使用粒径较小的 TSKgel UP-SW2000 分析时，肽的峰宽都更窄，分离度都较高。

〈测定条件〉

色谱柱: A) TSKgel UP-SW2000
(2 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)
B) TSKgel SuperSW2000
(4 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)
洗脱液: 40% 乙腈 + 0.05% 三氟乙酸
流速: 0.35 mL/min
检测: UV 215 nm, 微型比色皿
温度: 25 $^{\circ}\text{C}$
进样量: 10 μL
样品浓度: 各 0.05 g/L
样品: 1. 抑肽酶, 6,512 Da
2. 大胃泌素, 3,849 Da
3. 蛙皮素, 1,620 Da
4. 催产素, 1,007 Da

表 6: 色谱柱性能对比 (分离度 (R))

色谱柱	粒径	R (洗脱峰 1/2)	R (洗脱峰 2/3)	R (洗脱峰 3/4)
A) TSKgel UP-SW2000	2 μm	6.6	4.4	7.6
B) TSKgel SuperSW2000	4 μm	3.1	2.5	3.7

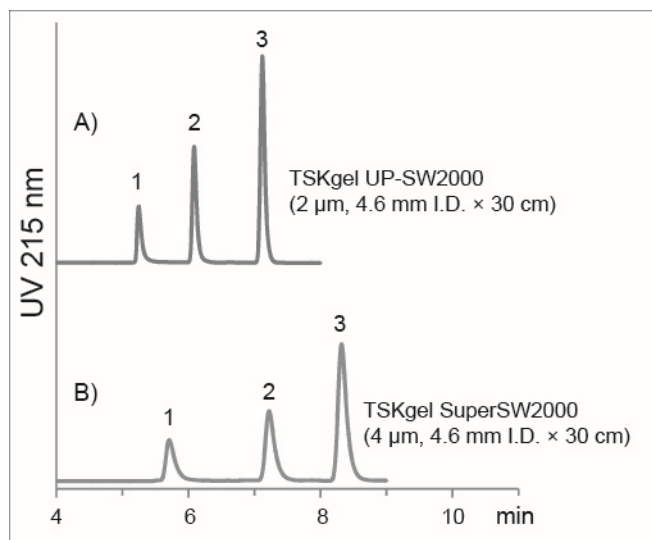


图 7 肽混合物的色谱图 (2)

〈测定条件〉

色谱柱: A) TSKgel UP-SW2000
(2 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)
B) TSKgel SuperSW2000
(4 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)
洗脱液: 40% 乙腈 + 0.05% 三氟乙酸
流速: 0.35 mL/min
检测: UV 215 nm, 微型比色皿
温度: 25 $^{\circ}\text{C}$
进样量: 10 μL
样品浓度: 各 0.05 g/L
样品: 1. 肌球蛋白, 17,800 Da
2. 胰高血糖素, 3,483 Da
3. LH-RH, 1,182 Da

表 7: 色谱柱性能对比 (分离度 (R))

色谱柱	粒径	R (洗脱峰 1/2)	R (洗脱峰 2/3)
A) TSKgel UP-SW2000	2 μm	7.3	8.8
B) TSKgel SuperSW2000	4 μm	6.2	4.6

2-3. 测定流速的影响

2-3-1. 与理论塔板数的关系

图8是2种不同分子量的蛋白质（卵白蛋白：Mw 47,000、核糖核酸酶 A：Mw 13,700）以及 p-氨基苯甲酸（Mw 137）的测定流速与理论塔板数的关系。

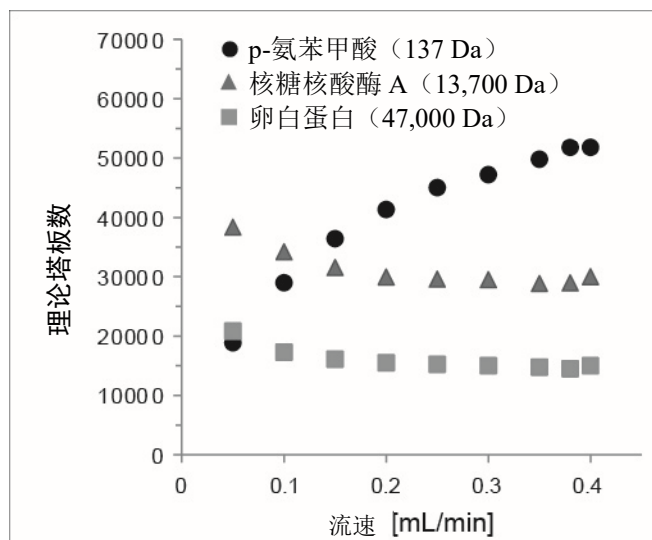


图8 测定流速与理论塔板数的关系

2-3-2. 与理论塔板高度 (HETP) 的关系

TSKgel UP-SW2000（粒径 2 μm）和 TSKgel Super SW2000（粒径 4 μm）的测定流速与理论塔板高度（HETP）的相关性如图9所示。

可以看出，使用填料粒径较小的 TSKgel UP-SW2000 时，无论测定样品的分子量如何，测定流速对 HETP 的影响都较小，提升测定流速后可以

抑制色谱柱柱效降低。而在使用 TSKgel SuperSW2000 时，HETP 会根据测定流速发生较大变化。特别是分析蛋白质时在明显提升流速时，HETP 会随之变大，色谱柱柱效会随之降低。因此，TSKgel UP-SW2000 更适用于蛋白质的快速分析。

〈测定条件〉

色谱柱：TSKgel UP-SW2000

（2 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：0.05~0.40 mL/min

检测：UV 280 nm，微型比色皿

温度：25 °C

进样量：10 μL

样品：卵白蛋白，47,000 Da（1.0 g/L）

核糖核酸酶 A，13,700 Da（1.0 g/L）

p-氨基苯甲酸，137 Da（0.01 g/L）

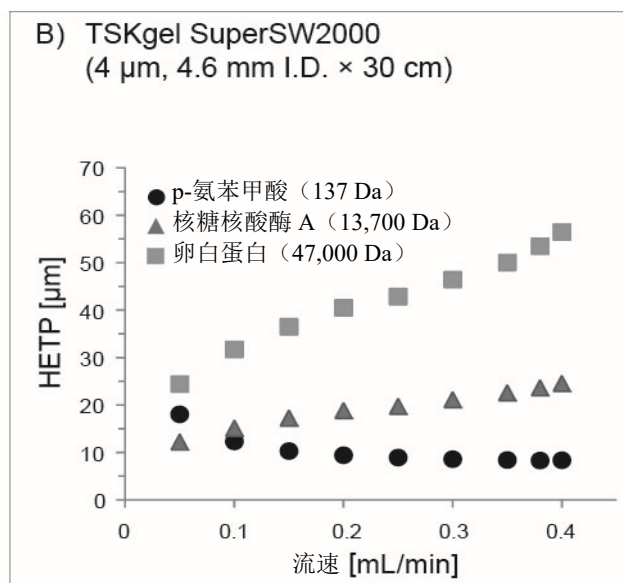
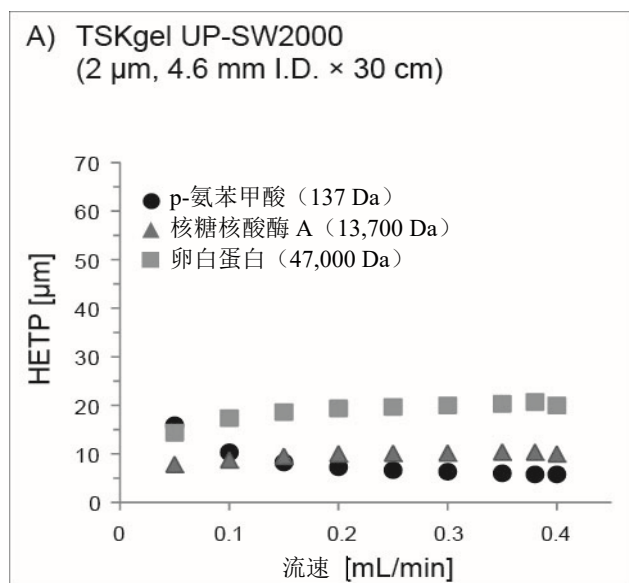


图9 测定流速与理论塔板高度（HETP）的关系

2-3-3. 与色谱柱压力的关系

测定流速与色谱柱压力的关系如图 10 所示。

使用 4.6 mm I.D.×30 cm 尺寸的色谱柱时，测定流速在 0.05~0.35 mL/min 的范围内，流速与压力的关系呈现为直线关系。

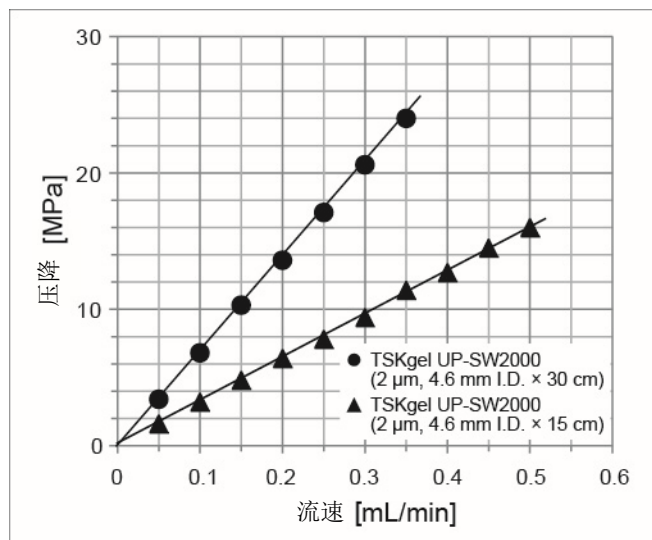


图 10 测定流速与色谱柱压力的关系

另外，使用 4.6 mm I.D.×15 cm 尺寸的色谱柱时，测定流速在 0.05~0.50 mL/min 的范围内，流速与压力的关系也呈现为直线关系，并且如图 11 所示，在测定流速为 0.50 mL/min 下测定标准蛋白质，可在 5 min 的分析时间内获得良好的分离效果。

〈测定条件〉

色谱柱：TSKgel UP-SW2000

色谱柱尺寸：4.6 mm I.D. × 15 cm, 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：0.05~0.50 mL/min

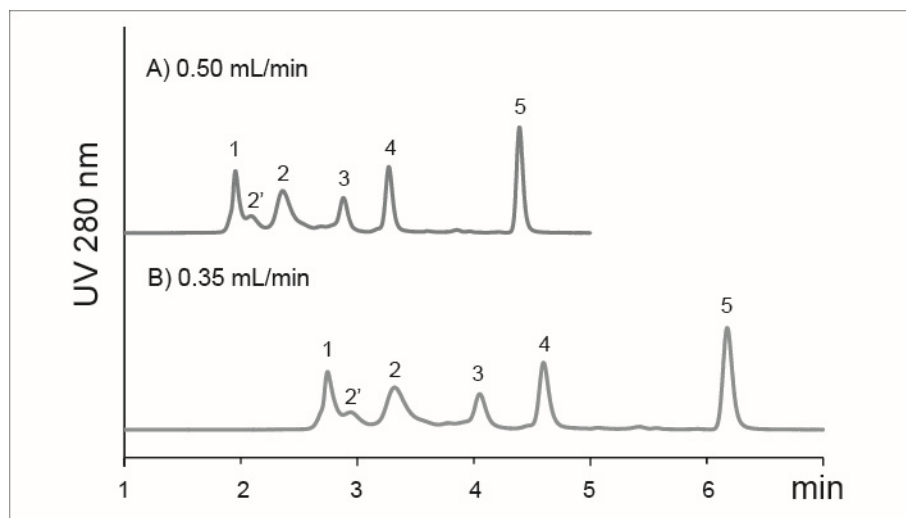


图 11 标准蛋白质的色谱图 (测定流速的影响)

〈测定条件〉

色谱柱：TSKgel UP-SW2000 (2 μm, 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：A) 0.50 mL/min, B) 0.35 mL/min

检 测：UV 280 nm, 微型比色皿

温 度：25 °C

进样量：5 μL

样 品：1. 甲状腺球蛋白, 640,000 Da (0.5 g/L)
2. γ-球蛋白, 155,000 Da (2' γ-球蛋白二聚体) (1.0 g/L)
3. 卵白蛋白, 47,000 Da (1.0 g/L)
4. 核糖核酸酶 A, 13,700 Da (1.0 g/L)
5. p-氨苯甲酸, 137 Da (0.01 g/L)

2-4. 样品进样量的影响

我们使用卵白蛋白、核糖核酸酶 A 和 p-氨基苯甲酸，研究了样品载量（样品进样量）与理论塔板数的关系。在一定的样品浓度下，进样量在 1~30 μL 之间进行测定时的理论塔板数如图 12 和图 13 所示。图 12 是使用 4.6 mm I.D.×30 cm 色谱柱时的结果，图 13 是使用 4.6 mm I.D.×15 cm 色谱柱时的结果。

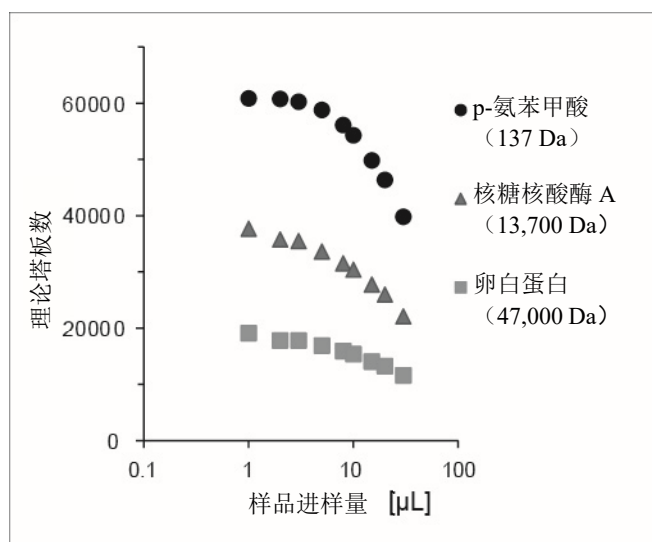


图 12 样品进样量与理论塔板数的关系 (4.6 mm I.D.×30 cm)

可以看出，随着样品进样量的增加，理论塔板数呈现降低的趋势。使用 4.6 mm I.D.×30 cm 色谱柱时，样品进样量超过 10 μL ，理论塔板数的下降率会变大，所以建议进样量不要超过 10 μL 。

另外，使用 4.6 mm I.D.×15 cm 色谱柱时，建议样品进样量不要超过 5 μL 。

〈测定条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW2000
(2 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, 微型比色皿
温 度: 25 $^{\circ}\text{C}$
进样量: 1~30 μL
样 品: 卵白蛋白, 47,000 Da (1.0 g/L)
核糖核酸酶 A, 13,700 Da (1.0 g/L)
p-氨基苯甲酸, 137 Da (0.01 g/L)

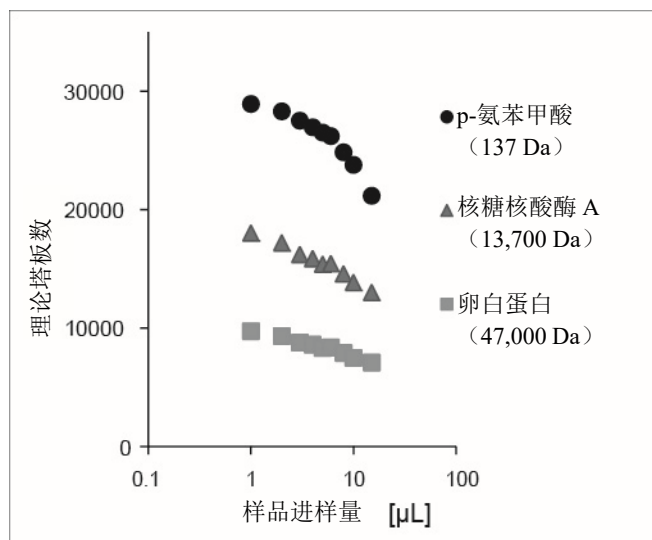


图 13 样品进样量与理论塔板数的关系 (4.6 mm I.D.×15 cm)

〈测定条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW2000
(2 μm , 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: 0.35 mL/min
检 测: UV 280 nm, 微型比色皿
温 度: 25 $^{\circ}\text{C}$
进样量: 1 ~ 15 μL
样 品: 卵白蛋白, 47,000 Da (1.0 g/L)
核糖核酸酶 A, 13,700 Da (1.0 g/L)
p-氨基苯甲酸, 137 Da (0.01 g/L)

2-5. 色谱柱外（管路中）体积的影响

由于 TSKgel UP-SW2000 的粒径较小，所以在色谱柱外的管路中出现样品扩散可能会导致色谱柱原来的性能无法充分发挥。为了完全确保色谱柱性能，检测器的比色皿需使用容量小的微型比色皿。另外，色谱柱前后的管路也需尽量使用容量小的管路。

为了确认进样阀—色谱柱入口之间以及色谱柱出口—检测器（UV 比色皿）之间的管路直径、管路长度与样品成分的理论塔板数的关系，我们分别使用了管路内径为 0.10 mm、0.13 mm、0.20 mm 的，长度在 5 cm~30 cm 范围内的管路，测定了蛋白质、低分子化合物的理论塔板数。

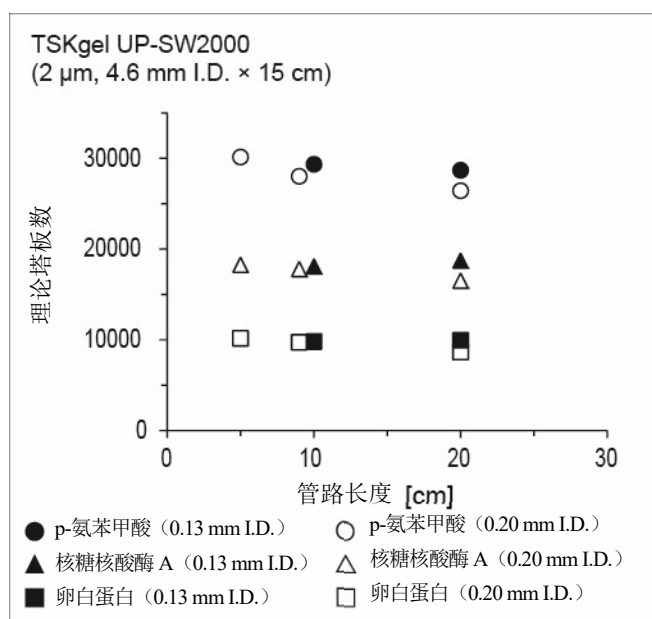


图 14 色谱柱入口侧管路与理论塔板数的关系

2-5-1. 进样阀—色谱柱入口之间的管路的影响

使用 4.6 mm I.D.×15 cm 色谱柱时，进样阀—色谱柱入口之间的管路直径、管路长度与理论塔板数的关系如图 14 所示。

可以看出，使用直径 0.20 mm 的管路时（图 14 的○、△、□），随着管路长度的增加，理论塔板数会缓缓下降，在管路长度达到 20 cm（管路容量：约 6.28 μL）时，理论塔板数的下降率（与管路长度 5 cm 相比）超过了 10%。

建议进样阀—色谱柱入口之间的管路直径不超过 0.13 mm，管路长度不超过 20 cm。

（测定条件）

色谱柱：TSKgel UP-SW2000

（2 μm, 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：0.35 mL/min

检测：UV 280 nm，微型比色皿

温度：25 °C

进样量：5 μL

样品：卵白蛋白，47,000 Da（1.0 g/L）

核糖核酸酶 A，13,700 Da（1.0 g/L）

p-氨基甲酸，137 Da（0.01 g/L）

※ 色谱柱出口侧管路：0.10 mm I.D.×20 cm

2-5-2. 色谱柱出口—检测器 (UV 比色

皿) 之间管路的影响

使用 4.6 mm I.D.×15 cm 色谱柱时, 色谱柱出口—检测器 (UV 比色皿) 之间的管路直径、管路长度与理论塔板数的关系如图 15 所示。另外、管路容量与理论塔板数的关系如图 16 所示。

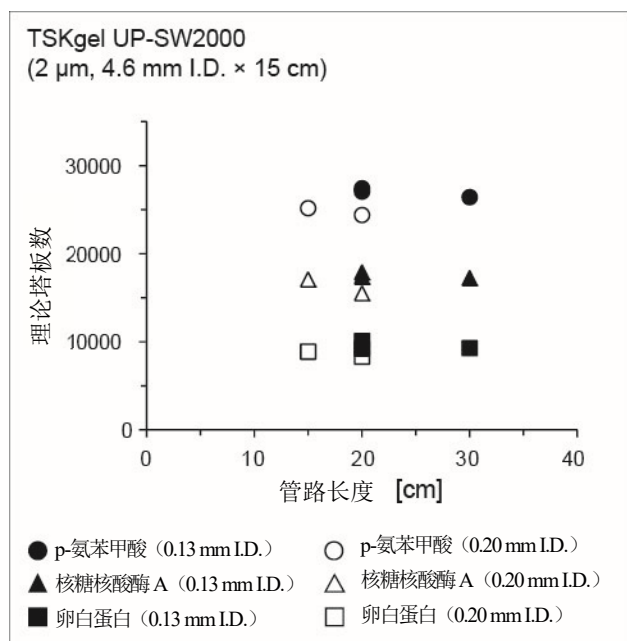


图 15 色谱柱出口侧管路与理论塔板数的关系

与 2-5-1 相同, 使用直径 0.20 mm 的管路 (图 15 的○、△、□), 在管路长度达到 20 cm 时, 确认到理论塔板数的下降。

建议色谱柱出口—检测器 (UV 比色皿) 之间的管路直径不超过 0.13 mm, 管路长度不超过 30 cm。

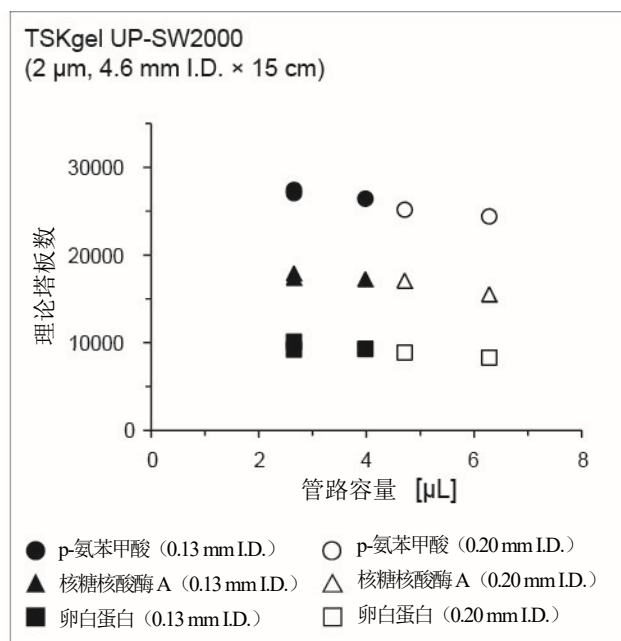


图 16 色谱柱出口侧管路容量与理论塔板数的关系

〈测定条件〉

色谱柱: TSKgel UP-SW2000 (2 μm, 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: 0.35 mL/min

检测: UV 280 nm, 微型比色皿

温度: 25 °C

进样量: 5 μL

样品: 卵白蛋白, 47,000 Da (1.0 g/L)

核糖核酸酶 A, 13,700 Da (1.0 g/L)

p-氨基甲酸, 137 Da (0.01 g/L)

※ 色谱柱入口侧管路: 0.10 mm I.D.×20 cm

使用 4.6 mm I.D.×30 cm 的色谱柱时, 管路长度的影响较小, 所以可在 4.6 mm I.D.×15 cm 色谱柱的推荐条件下使用。

另外, 使用相同粒径的现有色谱柱 TSKgel UP-SW3000 (色谱柱尺寸 4.6 mm I.D.×30 cm、4.6 mm

I.D.×15 cm) 时, 建议仪器的管路直径不超过 0.13 mm, 进样阀—色谱柱入口之间的管路长度不超过 20 cm, 色谱柱出口—检测器 (UV 比色皿) 之间的管路长度不超过 30 cm。

2-6. 色谱柱的耐用性

使用 4.6 mm I.D.×30 cm 和 4.6 mm I.D.×15 cm 的色谱柱，连续进样 p-氨基苯甲酸时的样品进样次数与理论塔板数的关系，如图 17 所示。

使用 4.6 mm I.D.×30 cm 的色谱柱，在 0.35 mL/min 的流速下，连续进样 100 次后停止洗脱液供液 6 小时以上。重复该操作 5 次并确认了理论塔

板数的变化。由于进样 500 次后理论塔板数的变化较小，图 18 所示的标准蛋白质的色谱图也无变化，说明该色谱柱的耐用性很好。

另外，使用 4.6 mm I.D.×15 cm 的色谱柱，在 0.50 mL/min 的流速下进行相同操作，同样也显示出该色谱柱良好的耐用性。

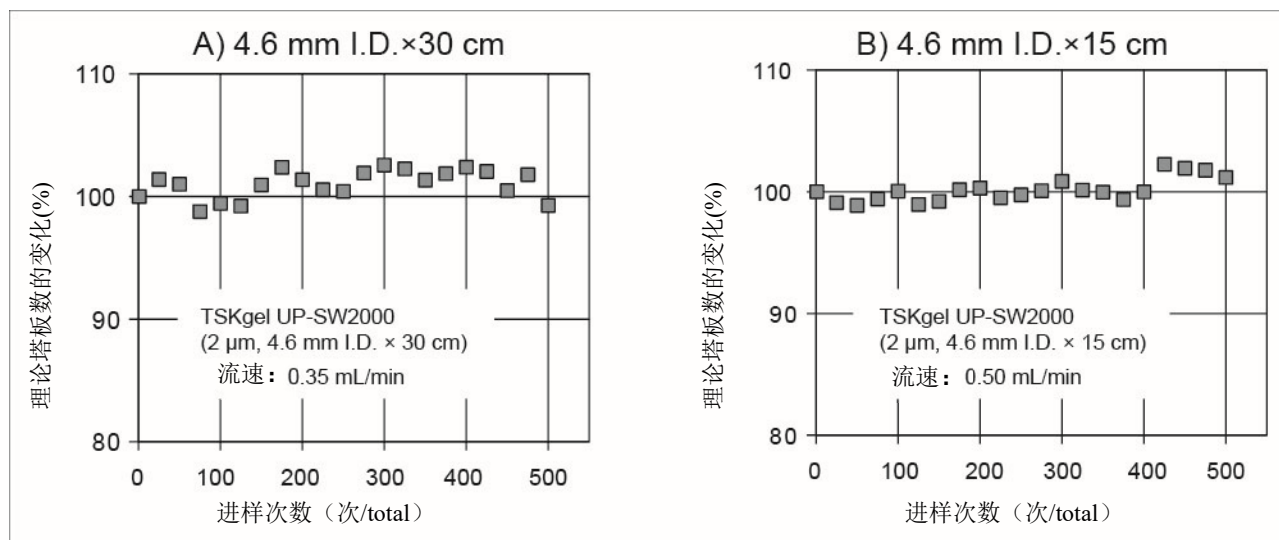


图 17 样品进样次数与理论塔板数的关系

〈测定条件〉

色谱柱：TSKgel UP-SW2000 (2 μm, A) 4.6 mm I.D. × 30 cm, B) 4.6 mm I.D. × 15 cm)
 洗脱液：100 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 6.7) + 100 mmol/L 硫酸钠 + 0.05% 叠氮化钠
 流速：A) 0.35 mL/min, B) 0.50 mL/min
 检测：UV 280 nm, 微型比色皿
 温度：25 °C
 进样量：A) 10 μL, B) 5 μL
 进样间隔：A) 15 分钟间隔 (进样 100 次后，停止洗脱液供液 6 小时以上)
 : B) 5 分钟间隔 (进样 100 次后，停止洗脱液供液 6 小时以上)
 样品：p-氨基苯甲酸，137 Da (0.01 g/L)

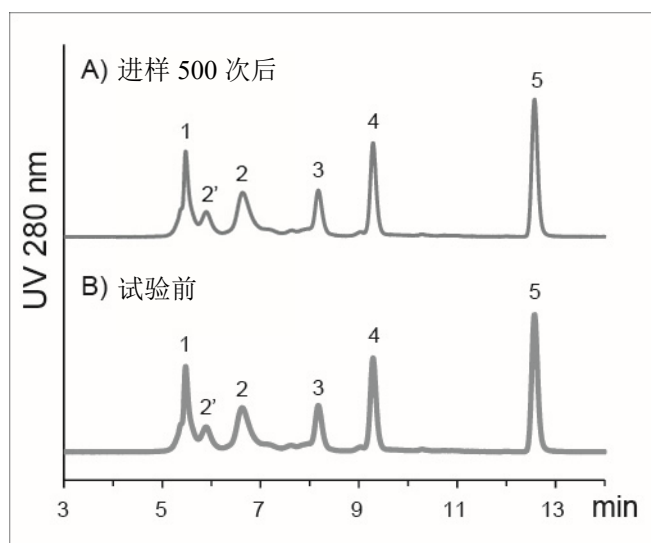


图 18 标准蛋白质的色谱图 (耐用性试验前后)

〈测定条件〉

色谱柱：TSKgel UP-SW2000
 (2 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, 微型比色皿
 温度：25 °C
 进样量：10 μL
 样品：1. 甲状腺球蛋白，640,000 Da (0.5 g/L)
 2. γ-球蛋白，155,000 Da (1.0 g/L)
 (2' γ-球蛋白二聚体)
 3. 卵白蛋白，47,000 Da (1.0 g/L)
 4. 核糖核酸酶 A，13,700 Da (1.0 g/L)
 5. p-氨基苯甲酸，137 Da (0.01 g/L)

2-7. 填料的批间差异

对于 4.6 mm I.D.×30 cm 的色谱柱，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 19 所示。

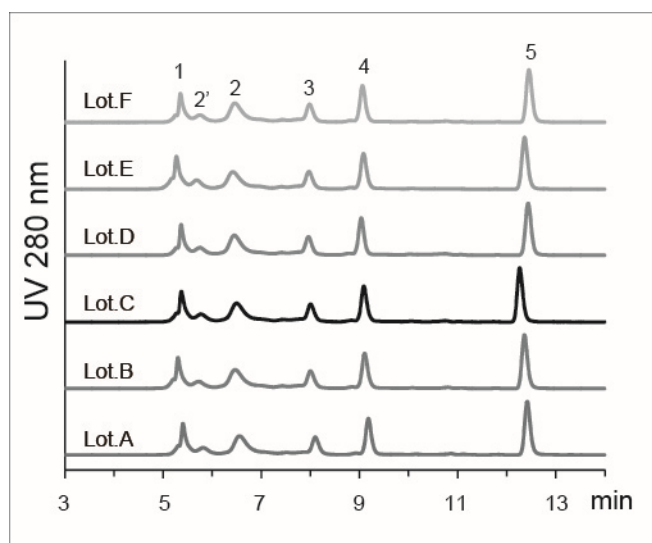


图 19 标准蛋白质的色谱图（填料批间差异）

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，生产稳定性很高。

〈测定条件〉

色谱柱：TSKgel UP-SW2000
(2 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, 微型比色皿
温度：25 °C
进样量：10 μL
样品：1. 甲状腺球蛋白, 640,000 Da (0.5 g/L)
2. γ-球蛋白, 155,000 Da
(2'γ-球蛋白二聚体) (1.0 g/L)
3. 卵白蛋白, 47,000 Da (1.0 g/L)
4. 核糖核酸酶 A, 13,700 Da (1.0 g/L)
5. p-氨苯甲酸, 137 Da (0.01 g/L)

2-8. 与市售 UHPLC 用 SEC 色谱柱的对比

2-8-1. 蛋白质的分离

分别使用 TSKgel UP-SW2000 (粒径 2 μm) 和市售 UHPLC 用 SEC 色谱柱 (粒径 1.7 μm)，测定标准蛋白质的色谱图对比如图 20 所示。

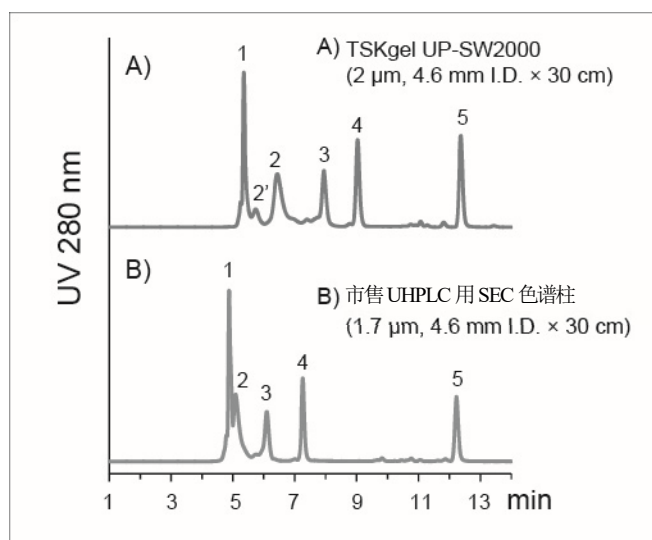


图 20 标准蛋白质的色谱图（产品对比）

〈测定条件〉

色谱柱：A) TSKgel UP-SW2000
(2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)
B) 市售 UHPLC 用 SEC 色谱柱
(1.7 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, 微型比色皿
温度：25 °C
进样量：10 μL
样品：1. 甲状腺球蛋白, 640,000 Da (0.5 g/L)
2. γ-球蛋白, 155,000 Da
(2' γ-球蛋白二聚体) (1.0 g/L)
3. 卵白蛋白, 47,000 Da (1.0 g/L)
4. 核糖核酸酶 A, 13,700 Da (1.0 g/L)
5. p-氨苯甲酸, 137 Da (0.01 g/L)

2-8-2. 肽的分离

对于 TSKgel UP-SW2000 (粒径 2 μm)、TSKgel Super SW2000 (粒径 4 μm) 以及市售 UHPLC 用 SEC 色谱柱 (粒径 1.7 μm)，使用 40%

乙腈水溶液+0.10%三氟乙酸的洗脱液，测定肽样品的校正曲线对比图如图 21 所示，测定肽混合物的色谱对比图如图 22 所示。

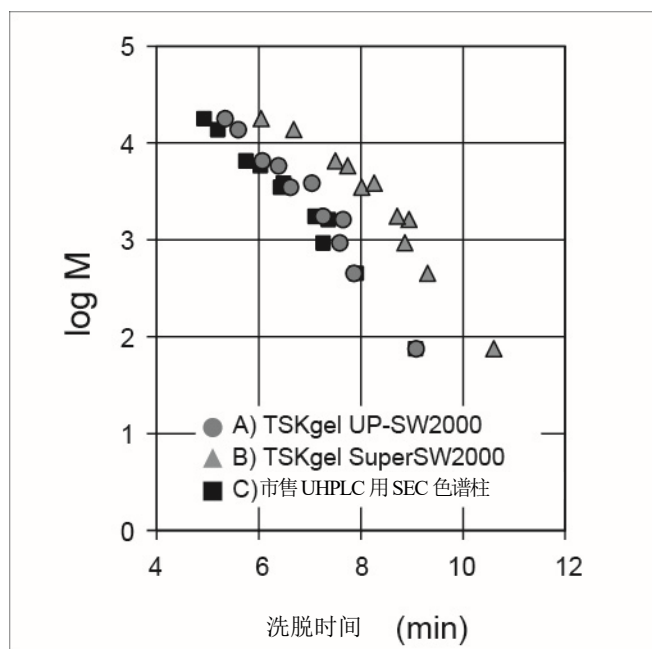


图 21 肽样品的校正曲线

〈测定条件〉

色谱柱: A) TSKgel UP-SW2000
(2 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)
B) TSKgel SuperSW2000
(4 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)
C) 市售 UHPLC 用 SEC 色谱柱
(1.7 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)

洗脱液: 40%乙腈+0.10%三氟乙酸

流速: 0.35 mL/min

检测: UV 215 nm, 微型比色皿

温度: 25 $^{\circ}\text{C}$

进样量: 10 μL

样品浓度: 0.05 g/L

样品: 1. 肌球蛋白, 17,800 Da
2. 核糖核酸酶 A, 13,700 Da
3. 抑肽酶, 6,512 Da
4. 胰岛素, 5,808 Da
5. 胰高血糖素, 3,483 Da
6. 大胃泌素, 3,849 Da
7. α -内啡肽, 1,746 Da
8. 蛙皮素, 1,620 Da
9. 血管紧张素III, 931 Da
10. Gly-Gly-Tyr-Ag, 451 Da
11. 甘氨酸, 75 Da

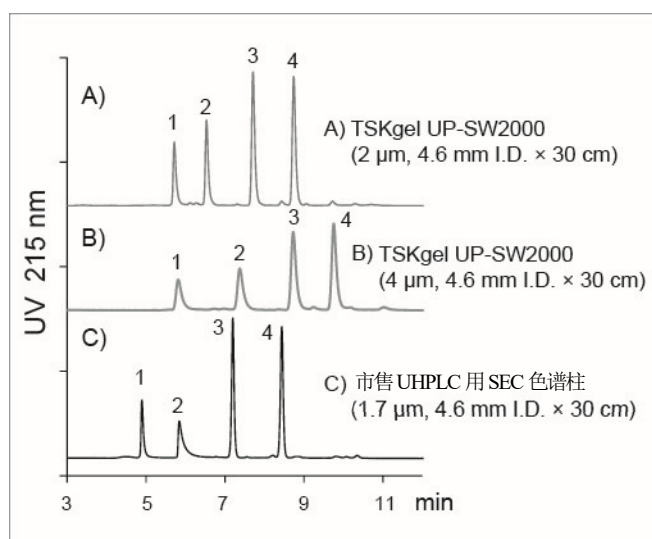


图 22 肽混合物的色谱图

〈测定条件〉

色谱柱: A) TSKgel UP-SW2000
(2 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)
B) TSKgel SuperSW2000
(4 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)
C) 市售 UHPLC 用 SEC 色谱柱
(1.7 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)

洗脱液: 40%乙腈+0.10%三氟乙酸

流速: 0.35 mL/min

检测: UV 215 nm, 微型比色皿

温度: 25 $^{\circ}\text{C}$

进样量: 10 μL

样品浓度: 0.05 g/L

样品: 1. 肌球蛋白, 17,800 Da
2. 胰岛素, 5,808 Da
3. LH-RH, 1,182 Da
4. TRH, 362 Da

3. 分离示例

3-1. 生物药物的分离

图 23 和图 24 是使用 TSKgel UP-SW2000 分析生物药物的色谱图。分析条件都符合“第 17 次修订版日本药典”的规定。另外，由于色谱柱内径与药典中的记述不同，所以根据线速度更改了流速。

阿法依泊汀（Epoetin Alfa）是分子量约为 28,000 的糖蛋白药物。使用 TSKgel UP-SW2000

进行分析，可以将阿法依泊汀和多聚体完全分离开（图 23）。

人胰岛素是将分子量约为 5,800 的肽利用基因重组技术生产出来的药物。由于肽的疏水性较强，所以分析时在洗脱液中添加 20% 的乙腈。使用 TSKgel UP-SW2000 进行分析，人胰岛素和高分子聚集体被很好的分离开来（图 24）。

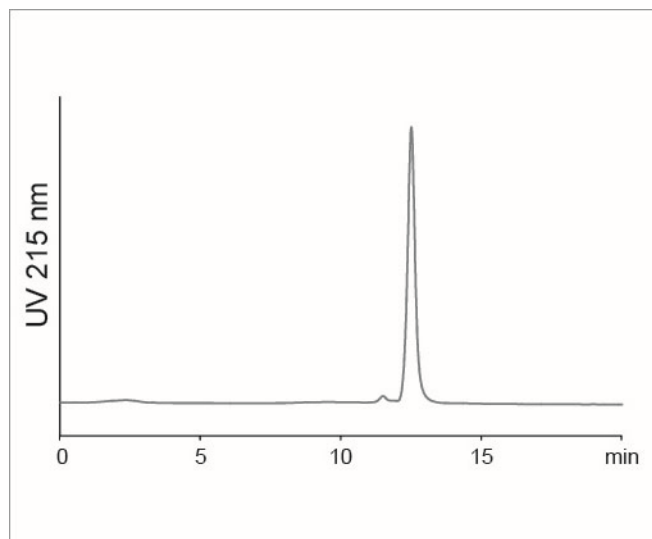


图 23 阿法依泊汀的分离

〈测定条件〉

色谱柱：TSKgel UP-SW2000
(4.6 mm I.D. × 30 cm)
洗脱液：0.25 mmol/L 磷酸氢二钠
+ 1.7 mmol/L 磷酸氢二钠
+ 0.15 mol/L 氯化钠
流 速：0.3 mL/min
检 测：UV 215 nm
进样量：10 μL
样 品：阿法依泊汀制剂

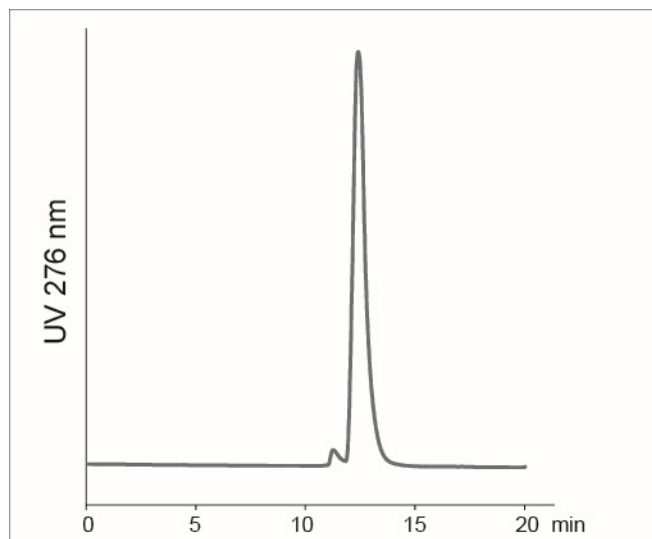


图 24 基因重组人胰岛素的分离

〈测定条件〉

色谱柱：TSKgel UP-SW2000
(4.6 mm I.D. × 30 cm)
洗脱液：0.1% L-精氨酸/乙腈/醋酸 = 13 / 4 / 3
流 速：0.2 mL/min
检 测：UV 276 nm
进样量：10 μL
样 品：基因重组人胰岛素

3-2. 寡核苷酸的分离

近年来，利用合成寡核苷酸的核酸药物的研发越来越热，获批上市的产品数量也日益增加。在合成寡核苷酸时，会生成链长不同的成分，所以必须对其进行分离分析。通常会使用离子交换色谱或反相色谱进行分析。但如果使用尺寸排阻色谱，则可

更为简便地完成分离分析。核酸药物中使用的寡核苷酸通常为修饰型核苷酸，但在下述示例中，使用 TSKgel UP-SW2000 分离了未修饰的、不同链长的寡核苷酸（图 25）。每个样品中主峰和不同链长的成分都分离开来了。并且，可以分离约 100 单体以下的寡核苷酸。

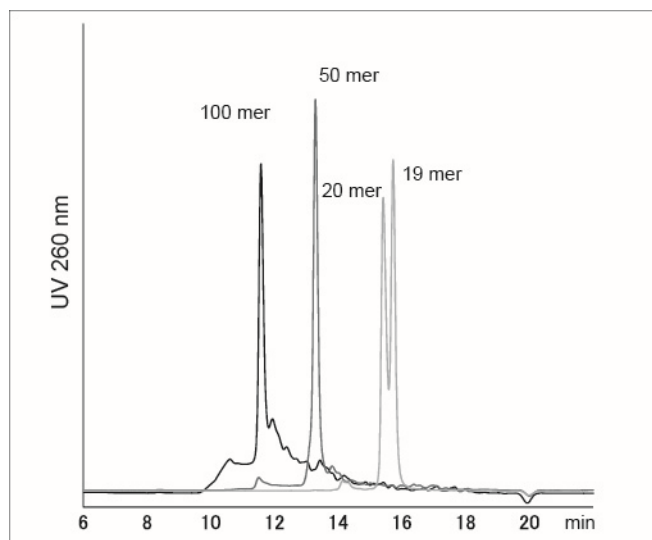


图 25 粗合成寡核苷酸的分离

〈测定条件〉

色谱柱：TSKgel UP-SW2000

(4.6 mm I.D. × 30 cm)

洗脱液：50 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 6.7)

0.3 mol/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：2 μL

样品：粗合成寡核苷酸

(100mer、50mer、20mer 和 19mer 的混合物)

4. 总结

以上是对粒径 2 μm 的高性能 SEC 色谱柱 TSKgel UP-SW2000 的概述。在 UHPLC 或者系统死体积较小的 HPLC 系统上，UP-SW2000 比普通 SEC 色谱柱更能实现高分辨率和快速分离。与现有色谱柱 TSKgel UP-SW3000 相比，其分子量范围

更低，因此适用于分离低分子量蛋白质、肽和寡核苷酸。

TSKgel UP-SW2000 不仅适用于分析现有的生物药物，也可用于今后市场有望不断扩大的中分子药物的研发与质控。



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