

## 使用精心设计的GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 3 µm色谱柱优化大分子生物分析的体积排阻色谱

---

Abraham S. Finny, Lavelay Kizekai, Kristine Camacho, Oksana T'choul, Justin McLaughlin, Steven Byrd, MingCheng Xu, Balasubrahmanyam Addepalli, Matthew A. Lauber

Waters Corporation

### 摘要

本应用纪要讨论了在生物分子表征过程中使用GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å色谱柱进行体积排阻色谱分析的优势。稳健的SEC方法必须展示出分析物的高重现性、尽可能少的吸附和低次级相互作用，而这些性能可归功于色谱柱硬件和（色谱）填料。本应用纪要介绍了采用MaxPeak™高性能表面(HPS)的GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å色谱柱，采用平均孔径为1000 Å的新型亚乙基桥聚环氧乙烷(HO-PEO)键合3 µm颗粒（色谱）填料。这种孔径和粒径专为大分子分析而设计。使用标准流动相时，这些色谱柱在批次间和色谱柱间均表现出优异的惰性、高分离度、回收率和重现性，与市售5 µm颗粒1000 Å孔径色谱柱相比，实现了性能和可靠性的飞跃。这些色谱柱所提供的分离度将有助于我们更快速地测量细胞和基因治疗产品中存在的工艺和产品相关杂质，从而推动制药行业快速开发出更有效、更安全和更全球化的药物。

### 优势

- 新型亚乙基桥HO-PEO键合3 µm颗粒，具有更高的化学惰性和高柱效
- 为生物分子（包括高分子量蛋白质复合物和核酸）提供出色的分离度
- 通过质量控制批次测试确认重现性，测试包括两种分子类型（蛋白质和核酸样品）

- 改进色谱性能，表现为更高的信号、更清晰的峰形和更多的理论塔板数
- 尽可能降低吸附作用，与色谱柱基质的次级相互作用显著减少，在使用更多流动相组分时有助于获得更稳健的结果

---

## 简介

体积排阻色谱(SEC)，也称为凝胶渗透、凝胶过滤、空间排阻或简单称为凝胶色谱，是一种根据大分子的相对大小或流体动力学体积以及填料的平均孔径来分离分析物的色谱技术<sup>1</sup>。多年来，它已成为一种得到广泛认可的成熟分离技术，在表征原料药的关键质量属性方面发挥了重要作用<sup>2</sup>。然而，细胞和基因治疗产品（如蛋白质复合物、mRNA和脂质纳米颗粒等）的分析需要高孔容、惰性更高的颗粒表面化学填料，并需要总体上减少次级相互作用。此外，细胞和基因治疗药物产品的分析测试需要更高的通量，因此使用更高效、更小粒径的填料开发SEC色谱柱将具有重要价值。

众所周知，大分子生物分子由于存在集中的静电斑块和暴露出来的疏水残基，容易与传统填料和色谱柱硬件表面发生不理想的次级相互作用。这些次级相互作用可能导致洗脱时间漂移、回收率低、峰形不佳和峰拖尾<sup>3</sup>。尽管可以通过增加离子强度尽量减少静电相互作用，但较高的盐浓度可能会对后续的检测技术（如质谱等）产生影响，或者在某些情况下对保持分子复合物的完整性产生影响。同样，可以向SEC流动相中添加有机溶剂以减少疏水相互作用，但这可能会导致精细折叠的生物分子变性，尤其是在需要浓度高于5%的有机溶剂的情况下。

本应用纪要重点介绍了采用GTxResolve Premier SEC 1000 Å 3 µm色谱柱所获得的色谱性能改进。性能改进包括：与目前孔径相似的5 µm硅胶颗粒色谱柱相比，新款色谱柱可获得更高的分离度和柱效，信号、批次间和色谱柱间的重现性更好，几乎不发生吸附，次级相互作用非常小或没有。

---

## 实验

### 样品前处理

2倍强度的PBS缓冲液（20 mM磷酸盐、276 mM NaCl、5.4 mM KCl，pH 7.4）：将2包Sigma磷酸盐缓冲液（Sigma P/N：P-3813）溶于1 L 18.2 MΩ水中，然后通过0.2 µm滤膜过滤。

200 mM磷酸钠缓冲液，pH 6.8：将28.39 g无水磷酸氢二钠溶于1 L 18.2 MΩ水中，用浓盐酸将pH调节至6.8。

蛋白质混标：使用Waters™ BEH™ 450 SEC蛋白质混标（P/N：186006842 <  
<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186006842-beh450-sec-protein-standard-mix.html>>）作为蛋白质标准品。该标准品是一种五组分蛋白质混合物，由0.1 mg/mL甲状腺球蛋白二聚体、3 mg/mL甲状腺球蛋白单体、2 mg/mL IgG、5 mg/mL BSA、2 mg/mL肌红蛋白和0.1 mg/mL尿嘧啶组成。在使用之前，用1 mL 200 mM磷酸钠pH 6.8缓冲液将冻干标准品复溶。

dsDNA 50~1350 Ladder：沃特世dsDNA 50~1350 Ladder（P/N：186010778 <  
<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186010778-dsdna-50-to-1350-ladder.html>>），这是一种包含17种大小为50 bp~1,350 bp双链DNA的冻干混合物，用作DNA标准品。此冻干标准品使用100 μL 2× PBS缓冲液复溶。

曲妥珠单抗-美坦新偶联物（Kadcyla™ (ado-trastuzumab emtansine)，抗体偶联药物）：5 mg/mL，使用18.2 MΩ的水稀释20 mg/mL储备液制得。

NIST单克隆抗体参比物质(NISTmAb)：2 mg/mL，使用组氨酸缓冲液（含12.5 mM组氨酸-盐酸的12.5 mM组氨酸）稀释10 mg/mL储备液制得。

## 重现性研究的液相色谱条件

|         |   |
|---------|---|
| 液相色谱系统： | ACQUITY™ UPLC™ H-Class Bio系统（相当于配备四元溶剂管理器和高pH试剂盒的ACQUITY Premier系统）   |
| 检测：     | ACQUITY TUV检测器  |
| 波长：     | 260/280 nm  |
| 样品瓶：    | 聚丙烯材质12 × 32 mm螺纹颈口样品瓶，带聚乙烯无隔垫瓶盖，300 μL 体积（P/N：186004112）   |
| 色谱柱：    | GTxResolve Premier SEC 1000 Å, 3 μm, 4.6 × 150 mm色谱柱（P/N：186010735）；GTxResolve Premier SEC 1000 Å 3 μm 4.6 × 300 mm色谱柱（ |

|       |   |
|-------|---|
|       | P/N: 186010736)                                       |
| 柱温:   | 35 °C   |
| 样品温度: | 6 °C  |
| 进样体积: | 3.5 μL或20 μL (蛋白质混合物) , 5 μL (dsDNA 50~1350 Ladder)   |
| 流速:   | 0.1 mL/min (适用于150 mm色谱柱) , 0.2 mL/min (适用于300 mm色谱柱) |
| 流动相A: | 2X PBS缓冲液 (20 mM磷酸盐、276 mM NaCl、5.4 mM KCl, pH 7.4)   |
| 流动相B: | 18.2 MΩ·cm水   |
| 流动相C: | 色谱柱储存溶液 (含10%乙腈的25 mM磷酸钠+100 mM KCl溶液)                |
| 流动相D: | 18.2 MΩ·cm水   |
| 梯度:   | 请参考下表。  |

## 测试次级相互作用的液相色谱条件

|         |  |
|---------|--|
| 液相色谱系统: | ACQUITY™ UPLC™ H-Class Bio系统 (相当于配备四元溶剂管理器和高pH试剂盒的ACQUITY Premier系统) |
| 检测:     | ACQUITY TUV检测器   |

|       |  |
|-------|--|
| 波长:   | 260/280 nm   |
| 样品瓶:  | 聚丙烯材质12 × 32 mm螺纹颈口样品瓶 (P/N: 186002639) , 带聚乙烯无隔垫瓶盖, 300 μL (P/N: 186004112) |
| 色谱柱:  | GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 3 μm 4.6 × 150 mm色谱柱 (P/N: 186010735)         |
| 柱温:   | 35 °C  |
| 样品温度: | 6 °C   |
| 进样体积: | 2 μL (蛋白质混合物) , 1 μL (NISTmAb, Kadcyla)                                      |
| 流速:   | 0.25 mL/min  |
| 流动相A: | 200 mM磷酸钠, pH 6.8  |
| 流动相B: | 1 M NaCl   |
| 流动相C: | 50:50乙腈:18.2 MΩ水[v/v]  |
| 流动相D: | 18.2 MΩ·cm水  |
| 梯度:   | 等度运行。请参阅下表了解各种测试条件下的流动相组成。   |

## 梯度表

|             | 流动相A (%) | 流动相B (%) | 流动相C (%) | 流动相D (%) |
|-------------|----------|----------|----------|----------|
| 0 mM NaCl   | 50       | 0        | 0        | 50       |
| 50 mM NaCl  | 50       | 5        | 0        | 45       |
| 100 mM NaCl | 50       | 10       | 0        | 40       |
| 200 mM NaCl | 50       | 20       | 0        | 30       |
| 0% ACN      | 50       | 20       | 0        | 30       |
| 5% ACN      | 50       | 20       | 10       | 20       |
| 10% ACN     | 50       | 20       | 20       | 10       |
| 15% ACN     | 50       | 20       | 30       | 0        |

---

## 结果与讨论

### GTxResolve Premier SEC 1000 Å 3 μm颗粒和色谱柱结构

图1展示了GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å色谱柱硬件表面与填料键合的设计特点。在色谱分析过程中，生物分子可能与常规金属色谱柱硬件中带正电荷的金属氧化物薄层相互作用，导致样品损失和定量不准确。为防止这种情况，研究中采用MaxPeak™ HPS高性能表面来保护分析物，避免发生吸附相互作用。这种新型硬件由亲水改性的有机/无机杂化层构成，类似于亚乙基桥杂化颗粒成分。减少非特异性吸附对于任何杂质分析或合规分析都至关重要，因为这有助于确保可重现和准确的回收率。

这款全新GTxResolve™ Premier SEC色谱柱在设计和性能方面的另一项突破是率先采用了3 μm高强度1000 Å硅胶颗粒。这种颗粒的填料经过创新的聚环氧乙烷键合和亚乙基桥杂化交联的改进。这种颗粒技术展现出全新水平的惰性，同时还具有特有的亲水性和低离子特性。

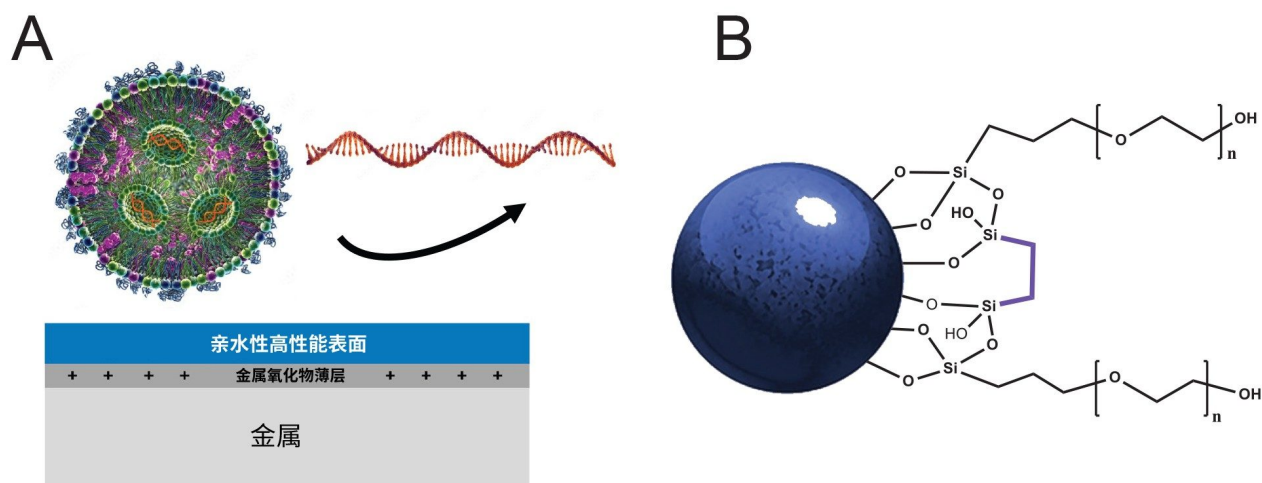


图1. GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 3 μm 色谱柱结构。(A) 亲水性MaxPeak™高性能表面(HPS)，可大幅减少生物分子与SEC色谱柱硬件之间的次级相互作用。(B) GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 3 μm 颗粒杂化交联HO-PEO键合示意图。

## 高重现性分离与高分离度

无论分析人员是在分析开发、工艺开发、制剂、CMC还是产品放行检测实验室中工作，高分离度和可重现的分离性能对他们所有人而言都至关重要。这样可以大幅减少方法开发和验证过程中的意外情况，并提高所采集数据的整体可靠性。考虑到这一点，我们评估了GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 3 μm 色谱柱的批次间和色谱柱间重现性。重要的是，这些测试使用了高分子量蛋白质和一系列逐渐增大的核酸分析物。

### (1) 蛋白质分析

首先使用蛋白质混合物测试色谱柱的SEC性能，这些蛋白质按从小到大顺序依次为肌红蛋白、牛血清白蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白单体和甲状腺球蛋白二聚体（表1）。图2展示了采用三批次的三根尺寸为4.6 × 150 mm和4.6 × 300 mm的色谱柱的表现。该图还展示了色谱柱与市售5 μm 1000 Å 硅胶颗粒色谱柱的性能对比。总体而言，使用GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 色谱柱获得的信号(0.12 AU)高于5 μm 色谱柱(0.09 AU)。此外，使用GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 色谱柱大幅提高了IgG与BSA峰之间的分离度。GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 色谱柱的优异性能还表现在更高的理论塔板数上。150 mm GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 色谱柱的理论塔板数为19 K（所有峰的平均值），而5 μm 硅胶对比色谱柱则为9 K。当300 mm 色谱柱的流速加倍（达到0.2 mL/min）后，GTxResolve Premier SEC 1000 Å 色谱柱不仅能够保持较高的理论塔板数，甚至由于较小的粒径(3

μm) 进一步增加。3 μm GTxResolve Premier SEC 1000 Å 色谱柱与5 μm 硅胶颗粒色谱柱的分离性能比较请参见表2。

| BEH450 SEC测试混合物 (P/N: 186006842) |          |
|----------------------------------|----------|
| 蛋白质                              | MW (KDa) |
| 甲状腺球蛋白 (二聚体)                     | 1400     |
| 甲状腺球蛋白 (单体)                      | 660      |
| IgG                              | 150      |
| BSA                              | 66.4     |
| 肌红蛋白                             | 17       |

表1. BEH 450 SEC蛋白质混标中的组分。



## GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 3 μm 4.6 × 150 mm色谱柱

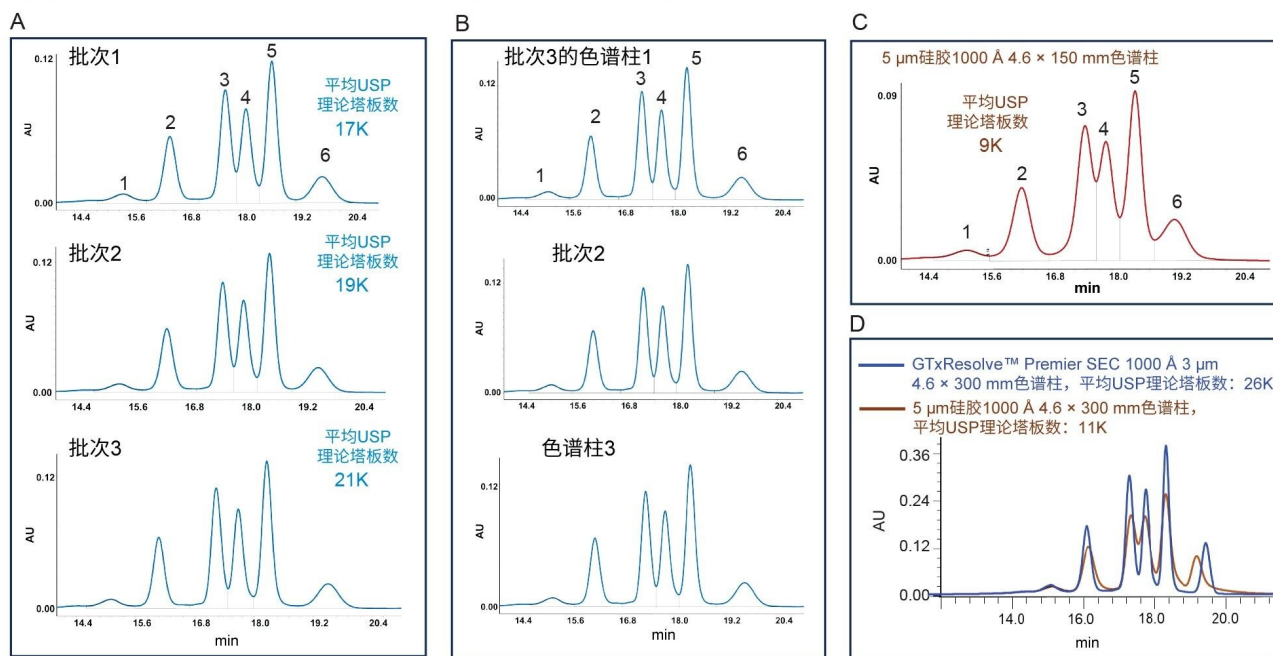


图2.使用1000 Å SEC色谱柱获得的BEH450 SEC测试蛋白质混合物色谱图。图中所示为使用GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 3 μm 4.6 × 150 mm色谱柱观察到的(A) 批次间重现性和(B) 色谱柱间重现性 (同一批次色谱柱)。(C) 使用5 μm 1000 Å硅胶色谱柱获得的示例SEC色谱图。(D) 图中还展示了相同内径(4.6 × 300 mm)较长色谱柱的分离性能比较。峰1-6分别对应甲状腺球蛋白二聚体、单体、IgG、BSA、肌红蛋白、尿嘧啶。每个批次中所有峰的平均USP理论塔板数也已标示。

| 色谱柱              | 甲状腺球蛋白<br>单体/二聚体 |        | 甲状腺球蛋白<br>单体/IgG |        | IgG/BSA |        | BSA/肌红蛋白 |        | 肌红蛋白/尿嘧啶 |        |
|------------------|------------------|--------|------------------|--------|---------|--------|----------|--------|----------|--------|
|                  | 150 mm           | 300 mm | 150 mm           | 300 mm | 150 mm  | 300 mm | 150 mm   | 300 mm | 150 mm   | 300 mm |
| 批次1*             | 1.42             | 1.428  | 2.49             | 2.675  | 0.97    | 1.127  | 1.24     | 1.527  | 1.69     | 2.787  |
| 批次2*             | 1.45             | 1.412  | 2.57             | 2.670  | 1.03    | 1.141  | 1.31     | 1.531  | 1.65     | 2.688  |
| 批次3*             | 1.54             | 1.476  | 2.82             | 2.846  | 1.10    | 1.207  | 1.46     | 1.654  | 2.00     | 3.158  |
| 5 μm 1000 Å硅胶色谱柱 | 1.14             | N/D    | N/D              | 1.153  | N/D     | N/D    | N/D      | N/D    | N/D      | 1.580  |

表2: 蛋白质混合物组分的分离度比较。

\*GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å色谱柱批次, N/D - 未检测到分离度。

## (2) 核酸分析物

与蛋白质相比，带负电荷的核酸更容易与色谱柱表面发生非特异性吸附。它们对填料的净电荷也非常敏感。不幸的是，过去色谱工作者经常遇到不同批次的填料在静电特性和离子强度依赖性方面存在差异，这种差异意味着与核酸分析物之间的静电排斥和/或吸引力有所不同。因此，使用dsDNA（例如50~1350 ladder）测试 GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 色谱柱至关重要。与蛋白质分离一样，本研究考察了批次间和色谱柱间重现性。和之前一样，再次对比了5 μm 1000 Å 硅胶颗粒色谱柱的色谱性能。如图3所示，GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 3 μm 色谱柱在所有批次和所有色谱柱上均获得了一致的色谱特征。精细结构表明有8种组分在766 bp至400 bp的洗脱窗口内部分分离。同时，所有其他组分（例如1350、916、350、300、100和50 bp的组分）均实现了近基线分离。这种分离能力在5 μm 硅胶颗粒对比色谱柱上是无法实现的。分离效率也通过分离峰的USP理论塔板平均值表示。GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 色谱柱的这一数值为20 K，5 μm 硅胶色谱柱为11K。新色谱柱的分离度提高可归功于GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 色谱柱优化的孔径分布和独特的填料，能够根据分子大小差异实现更有效的分离。简而言之，3 μm 填料应达到的预测动力学效率在本研究中得到了验证。

### GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 3 µm 4.6 × 150 mm色谱柱

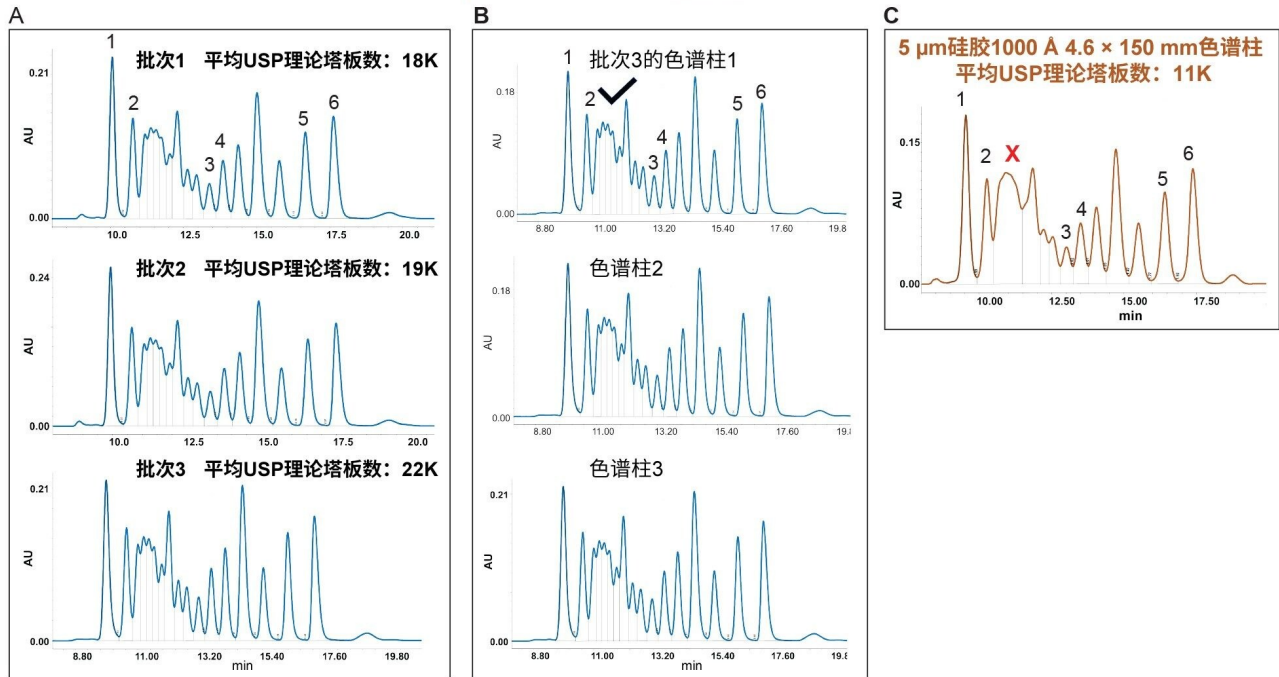


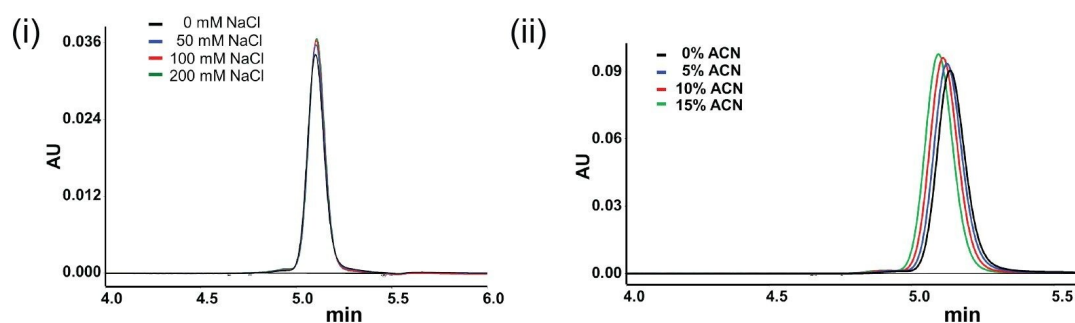
图3. 使用1000 Å SEC色谱柱获得的dsDNA 50~1350 Ladder的色谱图。使用GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 3 µm 4.6 × 150 mm色谱柱获得的SEC色谱图：(A) 批次间重现性和(B) 色谱柱间重现性（同一批次色谱柱）。(C) 使用对比5 µm硅胶色谱柱分析DNA ladder获得的SEC色谱图示例。dsDNA 50~1350 DNA Ladder (P/N: 186010778) 包括1350、916、766、700、650、600、550、500、450、400、350、300、250、200、150、100和50 bp的组分。峰1至峰6分别对应于1350、916、350、300、100和50 bp，这些峰已用于计算 USP理论塔板数。

### 尽可能少的吸附和低次级相互作用

虽然GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å色谱柱并非专门为分析单克隆抗体（例如NISTmAb）和抗体偶联药物（例如Kadcyla（曲妥珠单抗-美坦新偶联物））而设计，但这些分析物非常容易发生次级相互作用。2017年，Goyon、Fekete及其同事提出了使用这类探针分子进行测试的想法<sup>4</sup>。色谱柱和这些分析物对流动相添加剂滴定的依赖性一直是指导SEC色谱柱开发的有力工具<sup>3</sup>。本研究仍然采用了该方法，只不过采用了大孔径SEC色谱柱填料。GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 3 µm色谱柱在静电和疏水型吸附事件中显示出非常小的次级相互作用。这是基于GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 3 µm色谱柱USP拖尾变化的平均百分比（静电和疏水相互作用分别为6%和11%）得出的结论。相比之下，5 µm硅胶色谱柱在这类次级相互作用中的USP拖尾变化分别为21%和

31% (表3)。无论添加剂水平如何,均获得了高斯峰,且观察到低盐浓度(0 mM)与高盐浓度(200 mM)之间的峰拖尾变化程度很小(6%)。使用GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å色谱柱时,在流动相中添加乙腈略微改变了Kadcyla (曲妥珠单抗-美坦新偶联物)的峰位置,整体形状保持良好。相比之下,5 μm 1000 Å硅胶颗粒对比色谱柱在分析Kadcyla (曲妥珠单抗-美坦新偶联物) ADC时的疏水相互作用时表现出较高的峰拖尾和较宽的峰宽(1.5 min)。而同一分析物在GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 3 μm色谱柱上的峰宽小于0.4 min。添加流动相添加剂后,对比色谱柱的拖尾因子变化更大,在Kadcyla (曲妥珠单抗-美坦新偶联物) 的分离中添加乙腈时尤为明显。

#### A. GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 3 μm 4.6 × 150 mm 色谱柱 – 次级相互作用滴定



#### B. 5 μm 硅胶1000 Å 4.6 × 150 mm 色谱柱 - 次级相互作用滴定

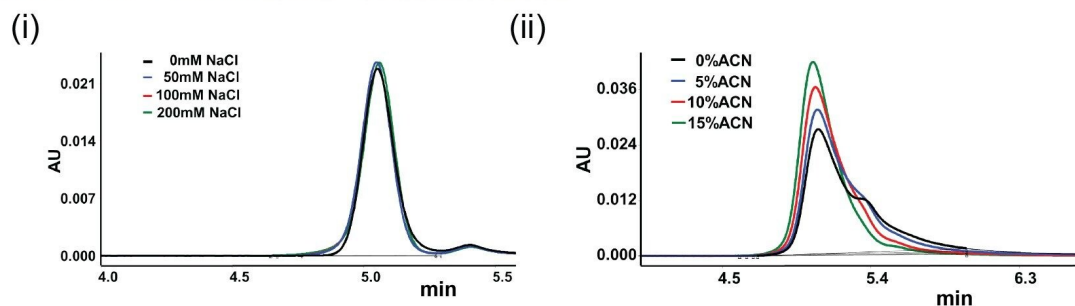


图4.次级相互作用评估。(A) 使用GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 3 μm 色谱柱通过逐渐向流动相滴定增加盐(0-200 mM NaCl) (i)和乙腈(ii)来举例说明静电相互作用。(B) 采用5 μm 1000 Å 硅胶色谱柱和不锈钢硬件在相同条件下获得的静电(i)和疏水相互作用(ii)结果。

| 批次*                                     | NIST mAb<br>(添加0 mM vs. 200 mM NaCl) | Kadcyla (曲妥珠单抗-美坦新偶联物)<br>(0 vs. 15% ACN) |
|---|--------------------------------------|---|
| # 1                                     | 7                                    | 7   |
| # 2                                     | 5                                    | 15  |
| <b>5 <math>\mu</math>m 1000 Å 硅胶色谱柱</b> | <b>21</b>                            | <b>31</b>                                 |

表3. 次级相互作用滴定引起的峰拖尾变化百分比。

\*GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 色谱柱批次

## 结论

本应用纪要重点介绍了GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 3  $\mu$ m 色谱柱的优势，及其在生物大分子（包括蛋白质和核酸）分离中的出色表现（提供更高的分离度和更高的信号）。其新型颗粒结合MaxPeak™ HPS硬件，可大幅减少样品吸附损失，同时提高分离效率并获得可重现的色谱图。这些特点使其成为当前市场上5  $\mu$ m 硅胶1000 Å SEC 色谱柱的优质替代品。这类改进对于改善新药（例如mRNA、病毒载体和脂质纳米颗粒）的表征至关重要。GTxResolve™ Premier SEC 1000 Å 色谱柱可提升SEC性能，在准备IND申报以及最终确定疗效和安全性指示放行检测的过程中，能够记录杂质表征并解析重要的关键质量属性。

GTxResolve、MaxPeak、ACQUITY和UPLC是沃特世科技公司的商标。Kadcyla是Genentech, Inc.的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

## 参考资料

1. H. G. Barth and B. E. Boyes, “Size Exclusion Chromatography,” *Anal Chem*, vol.62, no.12, pp.268–303, Jun. 1990, doi: 10.1021/ac00211a020.
2. P. Hong, S. Koza, and E. S. P. Bouvier, “A review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates,” *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, vol.35, no.20. Taylor & Francis Group, pp.2923–2950, Jan. 01, 2012.doi:

10.1080/10826076.2012.743724.

3. S. Fekete, L. Kizekai, Y. T. Sarisozen, N. Lawrence, S. Shiner, and M. Lauber, “Investigating the secondary interactions of packing materials for size-exclusion chromatography of therapeutic proteins,” *J Chromatogr A*, vol.1676, p. 463262, Aug. 2022, doi: 10.1016/J.CHROMA.2022.463262.
4. A. Goyon, A. Beck, O. Colas, K. Sandra, D. Guillarme, and S. Fekete, “Evaluation of size exclusion chromatography columns packed with sub-3 $\mu$ m particles for the analysis of biopharmaceutical proteins.” *J Chromatogr A*, vol.1498, pp.80-89, May.2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.11.056> <<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.11.056>> .

---

## 特色产品

[ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <https://www.waters.com/10166246>](https://www.waters.com/10166246)

[ACQUITY Premier系统 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739)

[ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <https://www.waters.com/514228>](https://www.waters.com/514228)

720008289ZH, 2024年4月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私策略](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie](#)  
[设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)