

## 高性能生物大分子分离用反相色谱柱 TSKgel<sup>®</sup> Protein C<sub>4</sub>-300

### —— 目 录 ——

|                            |    |
|----------------------------|----|
| 1.前言                       | 1  |
| 2.特点                       | 1  |
| 3.基本物性                     | 4  |
| 3-1 基本特性                   | 4  |
| 3-2 标准测定条件                 | 4  |
| 3-3 蛋白质的分离                 | 5  |
| 3-4 多肽的分离                  | 6  |
| 3-5 梯度时间的影响                | 7  |
| 3-6 流速的影响                  | 8  |
| 3-7 检测条件对选择性的影响            | 10 |
| 3-8 离子对试剂的影响               | 12 |
| 3-9 温度的影响                  | 13 |
| 3-10 进样量的影响                | 15 |
| 3-11 定量性                   | 15 |
| 3-12 与其他 TSKgel RPC 色谱柱的比较 | 17 |
| 3-13 与市售的蛋白分析用 RPC 色谱柱的比较  | 19 |
| 4.分离实例                     | 20 |
| 4-1 高通量分析                  | 20 |
| 4-2 肽图                     | 21 |
| 4-3 PEG 化蛋白质               | 22 |
| 4-4 单克隆抗体 (IgG)            | 23 |
| 5.总结                       | 24 |

## 1. 前言

近年来，蛋白质、多肽类等生物大分子药物的开发日渐流行，针对这些生物大分子特性的分析技术的需求也日益高涨。蛋白质与多肽的液相色谱分离纯化方法除了尺寸排阻色谱法（SEC）、离子交换色谱法（IEC）、疏水色谱法（HIC）等方法外，也有很多人使用反相色谱法（RPC）。

RPC 色谱柱 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 的开发是为了实现蛋白质的高速和高分离度分析，在本报告中，将对其基本性质和测定条件对分离效果的影响、与其它 RPC 色谱柱的对比、以及分离示例展开介绍。

## 2. 特点

### 1) 适用于蛋白质分离的 30nm 细孔径

适合分离的孔径尺寸因测定对象的不同而异。如孔径比需要测定的分子尺寸小，分子无法在小孔内扩散。由于无法扩散，也就无法达到充分的分离效果。相反，如果孔径过大，填料比表面积减小，即分离所需的有效固定相体积缩小，分离效果也会降低。由此，为了实现良好的分离效果，必须根据分子的大小来选择适合的孔径。

我们在硅胶中导入丁基，制成各种不同孔径的试制填料，并比较孔径大小对蛋白质分离效果的影响，结果如图 1 所示。在 30nm 孔径的填料中，分子量范围在 12,000~66,000 的蛋白质均呈现了良好的峰形；当孔径减小后，峰宽将会增大，尤其是分子量 66,000 的牛血清白蛋白（bovine serum albumin; BSA），出现了明显的倾斜峰。根据这一结果，可明确 30nm 的孔径非常适合分离蛋白质。

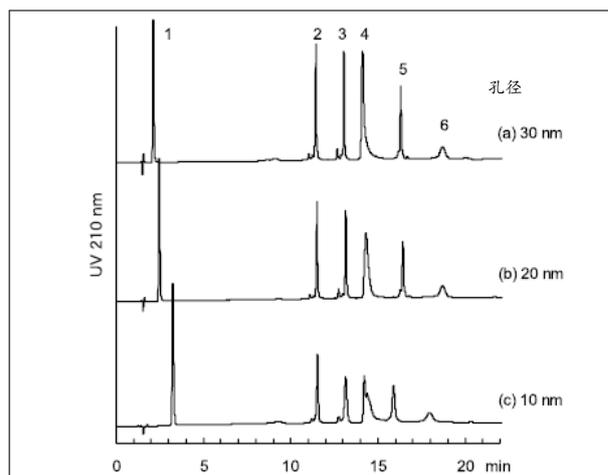


图1 孔径大小对蛋白质分离效果的影响

色谱柱： 试制 RPC 色谱柱（4.6mm I.D.×10cm）

粒子径： 3 $\mu$ m

孔径： (a) 30nm, (b) 20nm, (c) 10nm

官能团： 丁基

洗脱液： A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.05 (v / v / v)

B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.05 (v / v / v)

A→B 线性梯度（30min）

流速： 1.0mL/min

检测： UV 210nm

温度： 40°C

进样量： 10 $\mu$ L

样品： 1. 苯丙氨酸（MW 165）  
2. 细胞色素 c（马）（MW 12,400）  
3. 溶菌酶（MW 14,300）  
4. 牛血清白蛋白（MW 66,000）  
5.  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶原 A（MW 25,700）  
6. 卵白蛋白（MW 44,300）（各 2 $\mu$ g）

### 2) 适用于蛋白质分离的 C<sub>4</sub> 固定相

RPC 广泛采用以十八烷基（C<sub>18</sub>）为固定相的 ODS 色谱柱，但在测定疏水性较强的样品时，采用与样品相互作用较弱的辛基（C<sub>8</sub>）、丁基（C<sub>4</sub>）等烷基链较短的固定相时，可获得良好的分离效果。

我们在 30nm 孔径的硅胶中导入 C<sub>18</sub>、C<sub>8</sub>、C<sub>4</sub> 制成试制填料，并比较固定相的烷基链长度对蛋白质分离效果的影响，结果如图 2 所示。导入 C<sub>4</sub> 制成的填料对所有的蛋白质均可获得良好的峰形，但导入 C<sub>8</sub> 与 C<sub>18</sub> 而制成的填料可观察到峰面积的减小与峰宽的增大。根据这一结果，可明确 C<sub>4</sub> 具有较低的蛋白吸附性与较高的回收率，是适用于蛋白质测定的固定相。

对硅胶中的丁基导入量对蛋白质分离效果的影响进行比较, 其结果如图 3 所示。丁基导入并实施末端封闭后, 试制填料的碳含量为 3.8% 以上的 (c) 及 (d), BSA (3 号峰) 的拖尾增大, 峰面积减小。另外, 使用碳含量为 2.3% 的试制填料 (a) 时, BSA

的峰形良好, 但在酸性洗脱液中, 耐用性不佳。根据上述研究结果, 调节 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 的丁基导入量, 使其碳含量达到 3% 后, 可令色谱柱兼具良好的分离效果、回收率与耐用性。

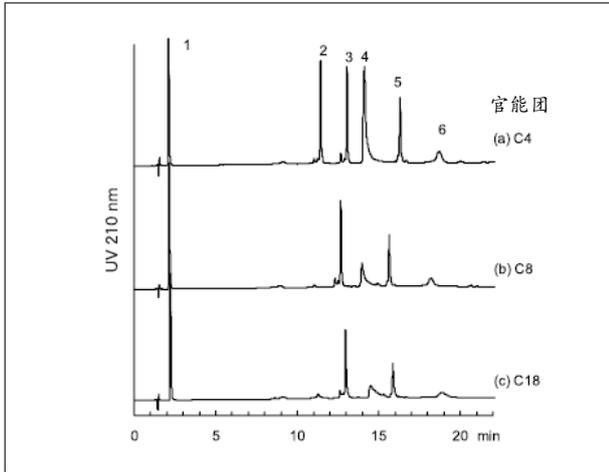


图2 固定相的烷基链长度对蛋白质分离效果的影响

色谱柱: 试制 RPC 色谱柱 (4.6mm I.D.×10cm)  
 粒子径: 3 $\mu$ m  
 孔径: 30nm  
 官能团: (a) C4, (b) C8, (c) C18  
 洗脱液: A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.05 (v / v / v)  
 B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.05 (v / v / v)  
 A→B 线性梯度 (30min)  
 流速: 1.0mL/min  
 检测: UV 210nm  
 温度: 40°C  
 进样量: 10 $\mu$ L  
 样品: 1. 苯丙氨酸 (MW 165)  
 2. 细胞色素 c (马) (MW 12,400)  
 3. 溶菌酶 (MW 14,300)  
 4. 牛血清白蛋白 (MW 66,000)  
 5.  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶原 A (MW 25,700)  
 6. 卵白蛋白 (MW 44,300)  
 (各 2 $\mu$ g)

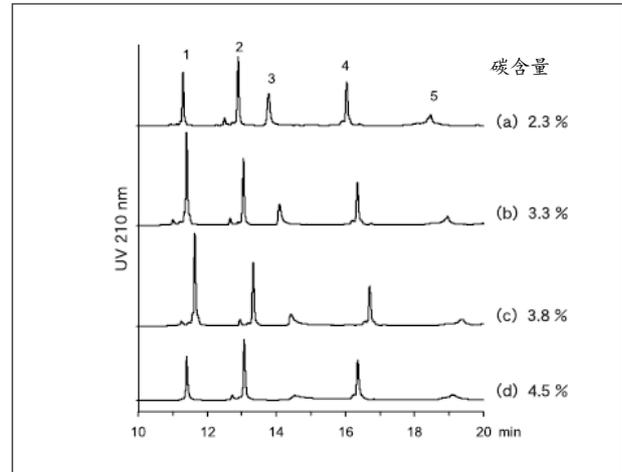


图3 丁基导入量对蛋白质分离效果的影响

色谱柱: 试制 RPC 色谱柱 (4.6mm I.D.×10cm)  
 粒子径: 3 $\mu$ m  
 孔径: 30nm  
 官能团: C4  
 碳含量:  
 (a) 2.3%, (b) 3.3%, (c) 3.8%, (d) 4.5%  
 洗脱液: A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.05 (v / v / v)  
 B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.05 (v / v / v)  
 A→B 线性梯度 (30min)  
 流速: 1.0mL/min  
 检测: UV 210nm  
 温度: 40°C  
 进样量: 10 $\mu$ L  
 样品: 1. 细胞色素 c (马) (MW 12,400)  
 2. 溶菌酶 (MW 14,300)  
 3. 牛血清白蛋白 (MW 66,000)  
 4.  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶原 A (MW 25,700)  
 5. 卵白蛋白 (MW 44,300)  
 (各 2 $\mu$ g)

### 3) 含 TFA 的酸性洗脱液中的高耐用性

TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 在难以水解的聚合形态中导入丁基后, 通过对于残留的硅烷醇基实施高效的封端, 实现了色谱柱的高耐用性。

通过 RPC 法分析蛋白质时常用的含三氟乙酸 (TFA) 的酸性洗脱液, 对色谱柱耐用性进行比较。用含有高于常规浓度 (0.2%) 的 TFA 的洗脱液以 1.0mL/min 的流速冲洗 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.×15cm) 1000 个小时后, 茶的保留时

间、以及苯酚的理论塔板数的摸索结果如图 4 及图 5 所示。茶的保留时间随冲洗时间而逐渐下降, 但冲洗 1000 小时后, 保留时间仍保持在冲洗前的 90% 以上。另外, 苯酚的理论塔板数在冲洗前后未见明显变化。由此, TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 可同时确保固定相的化学稳定性、以及填料层的物理稳定性, 即使经过长时间使用, 测定时仍可实现高度的重复性。

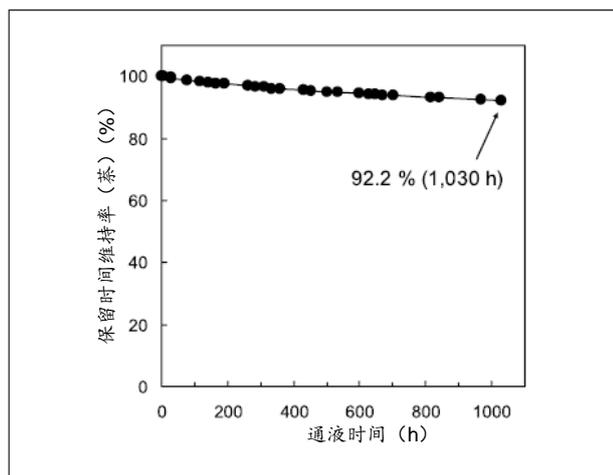


图4 酸性条件下茶保留时间的变化

色谱柱: TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.×15cm)

洗脱液: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=70 / 30 / 0.2 (v / v / v)

流速: 1.0mL/min

检测: UV 254nm

温度: 40°C

进样量: 10μL

样品: 茶

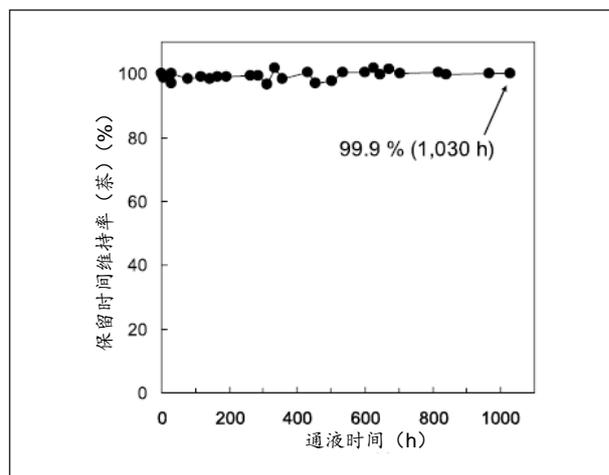


图5 酸性条件下苯酚理论塔板数的变化

色谱柱: TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.×15cm)

洗脱液: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=70 / 30 / 0.2 (v / v / v)

流速: 1.0mL/min

检测: UV 254nm

温度: 40°C

进样量: 10μL

样品: 苯酚

### 3. 基本性质

#### 3-1 基本特性一览

TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 的规格如表 1 及表 2 所示。4.6 mm I.D. 色谱柱适用于常规分析, 2.0 mm I.D. 色谱柱适用于微量分析及 LC/MS ( / MS)。为了避免受到强吸附性杂质对分析色谱柱的影响, 4.6mm I.D. 色谱柱、2.0mm I.D. 色谱柱均可使用插入式保护卡套色谱柱 TSKgel guardgel Protein C<sub>4</sub>。

表1 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 填料的规格

|       |                           |
|-------|---------------------------|
| 基质    | 硅胶                        |
| 平均颗粒径 | 3 $\mu$ m                 |
| 孔径    | 30nm (硅胶)                 |
| 比表面积  | 100m <sup>2</sup> /g (硅胶) |
| 表面官能团 | 丁基 (Polymeric)            |
| 末端    | 三甲氧基硅基                    |
| 碳含量   | 3%                        |

表2 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 色谱柱的规格

| 产品名称                                      | 编号      | 色谱柱尺寸<br>(mm I.D.x cm) |
|---|---------|------------------------|
| TSKgel Protein C <sub>4</sub> -300        | 0022827 | 4.6× 5                 |
|   | 0022828 | 4.6×10                 |
|   | 0022829 | 4.6×15                 |
|   | 0022830 | 2.0× 5                 |
|   | 0022831 | 2.0×10                 |
|   | 0022832 | 2.0×15                 |
| TSKgel guardgel<br>Protein C <sub>4</sub> | 0022833 | 3.2×1.5 (3 支装) ※1      |
|   | 0022834 | 2.0× 1 (3 支装) ※2       |

色谱柱材质: 不锈钢 出厂溶剂: 乙腈

※1 需要搭配的保护柱套 (货号: 0019018)

※2 需要搭配的保护柱套 (货号: 0019308)

#### 3-2 标准测定条件

使用 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 测定蛋白质与多肽时的标准测定条件如表 3 所示。确立分析方法时, 建议按标准测定条件确认试样溶解后, 以 3-3~3-11 中记载的内容为参考, 对测定条件开展研究。

表3 标准测定条件

|        |  |
|--------|--|
| 洗脱液    | A: H <sub>2</sub> O / CH <sub>3</sub> CN / TFA=90 / 10 / 0.05 (v / v / v)<br>B: H <sub>2</sub> O / CH <sub>3</sub> CN / TFA=20 / 80 / 0.05 (v / v / v)<br>A→B 线性梯度 |
| 梯度保留时间 | 45min (15cm 色谱柱)<br>30min (10cm 色谱柱)<br>15min (5cm 色谱柱)  |
| 平衡时间   | 15min (15cm 色谱柱)<br>10min (10cm 色谱柱)<br>5min (5cm 色谱柱)   |
| 流速     | 1.0mL/min (4.6 mm I.D.)<br>0.2mL/min (2.0 mm I.D.)   |
| 温度     | 40°C   |
| 样品负载量  | 配制成 0.1-1.0 $\mu$ g 左右   |

### 3-3 蛋白质的分离

测定标准蛋白质的色谱图如图6所示。总体来说,可观察到样品的分子量越大、保留时间越长这一趋势,但是,例如乳铁蛋白这种分子量约为90000的大分子,比分子量较小的 $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶原A与碳酸酐酶更早地被洗脱出来。推测可能是由于氨基酸组成、翻译后修饰、高级结构等因素,乳铁蛋白与其他蛋白质相比,对C4固定相的疏水性相互作用较弱。

一般情况下,反相色谱法(RPC)相比其他不同机制的分离模式(尺寸排阻色谱法(SEC)、离子交换色谱法(IEC)、疏水色谱法(HIC)等),在蛋白质的分离方面,具有分离效果更高的特征。但是,RPC的洗脱液所采用的有机溶剂与离子对试剂,很容易导致蛋白质的变性,因此,不适用于蛋白质分离后的结构与功能分析。

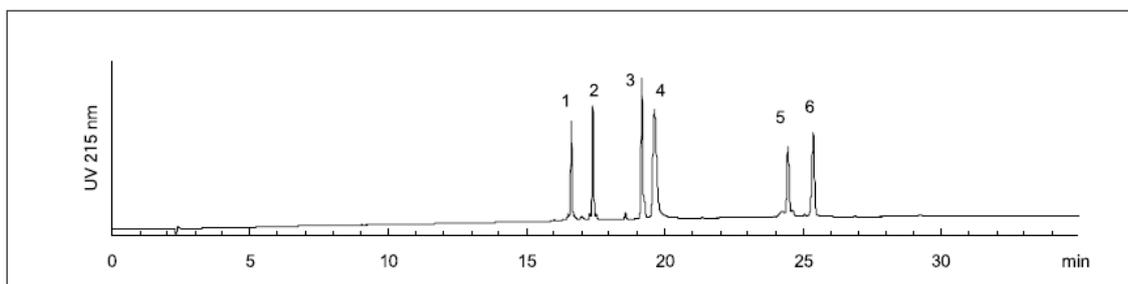


图6 蛋白质标准样品的色谱图

色谱柱: TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.x15cm)

洗脱液: A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.05 (v / v / v)

B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.05 (v / v / v)

A→B 线性梯度 (45min)

流速: 1.0mL/min

检测: UV 215nm

温度: 40°C

进样量: 10 $\mu$ L

样品: 1. 细胞色素 c (马) (MW 12,400)  
2. 细胞色素 c (牛) (MW 12,300)  
3. 溶菌酶 (MW 14,300)  
4. 乳铁蛋白 (人) (MW 90,000)  
5.  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶原 A (MW 25,700)  
6. 碳酸酐酶 (MW 29,000)  
(各 1 $\mu$ g)

### 3-4 多肽的分离

测定标准多肽的色谱如图7所示。与蛋白质相同,也存在分子量较大但保留时间较短的多肽、或是分子量较小却保留时间较长的多肽,显示了氨基酸组成会导致疏水性的相互作用。

在采用RPC法分离多肽时,一直以来都是尝试根据氨基酸序列来计算疏水性,通过ODS色谱柱进行预测性的分离作业。根据Sasagawa等人研究得出的疏水性保留系数<sup>1)</sup>计算得出的39种多肽

样品的疏水性,与通过TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.x5cm)测定的保留时间之间的关系如图8所示。预测的多肽疏水性与TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300上的保留时间之间可确认具有相关性,多肽的疏水性越高,保留时间越长。考虑到TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300与ODS色谱柱上二级保留结构(与残留硅烷醇基之间的相互作用等)不同,因此,通过推测TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300对氨基酸保留系数及近似式进行优化,达到更好的分离效果。

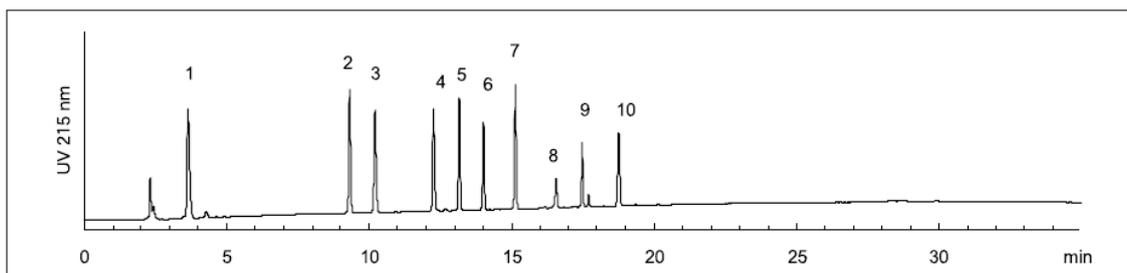


图7 多肽标准样品的色谱图

色谱柱: TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.x15cm)  
洗脱液: A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.05 (v/v/v)  
B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.05 (v/v/v)  
A→B 线性梯度 (45min)  
流速: 1.0mL/min  
检测: UV 215nm  
温度: 40°C  
进样量: 10μL

样品: 1. δ-睡眠诱导肽 (MW 849)  
2. 蛋氨酸脑啡肽 (MW 574)  
3. 缓激肽 (MW 1,060)  
4. 章鱼唾腺精相关多肽 (MW 707)  
5. 血管紧张素 I (MW 1,297)  
6. P 物质 (MW 1,348)  
7. 生长抑素 (MW 1,638)  
8. β-内啡肽 (MW 3,465)  
9. 胰岛素 (MW 5,808)  
10. 胃泌素 I (MW 2,098)  
(各 0.25μg)

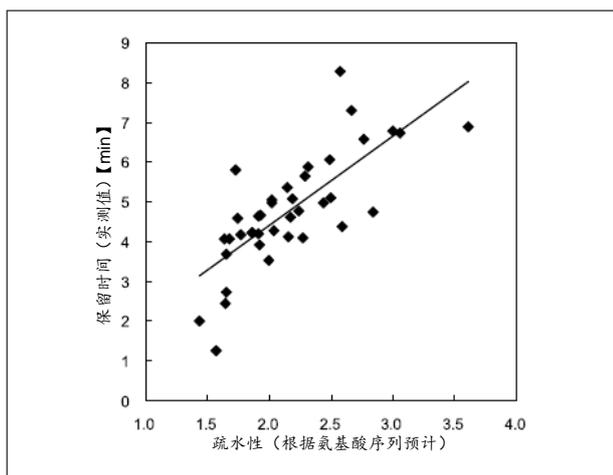


图8 根据氨基酸序列预测的多肽疏水性与保留时间的关系

色谱柱: TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.x5cm)  
洗脱液: A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.05 (v/v/v)  
B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.05 (v/v/v)  
0% B→75% B 线性梯度 (11.25min)  
流速: 1.0mL/min  
检测: UV 215nm  
温度: 40°C  
进样量: 10μL

### 3-5 梯度时间的影响

在流速恒定的条件下，梯度时间发生变化后对分离度的影响如图9所示。梯度时间越长，保留时间相近的蛋白质（细胞色素c（牛）与细胞色素c（马）、以及α-胰凝乳蛋白酶原A与碳酸酐酶）之间的分离度越高，但分离效果的改善却逐渐减小。对长度不同的色谱柱（4.6mm I.D.x15cm、4.6mm I.D.x5cm）所受梯度时间的影响进行比较后，可见梯度时间较长时，使用4.6mm I.D.x15cm 色谱柱进

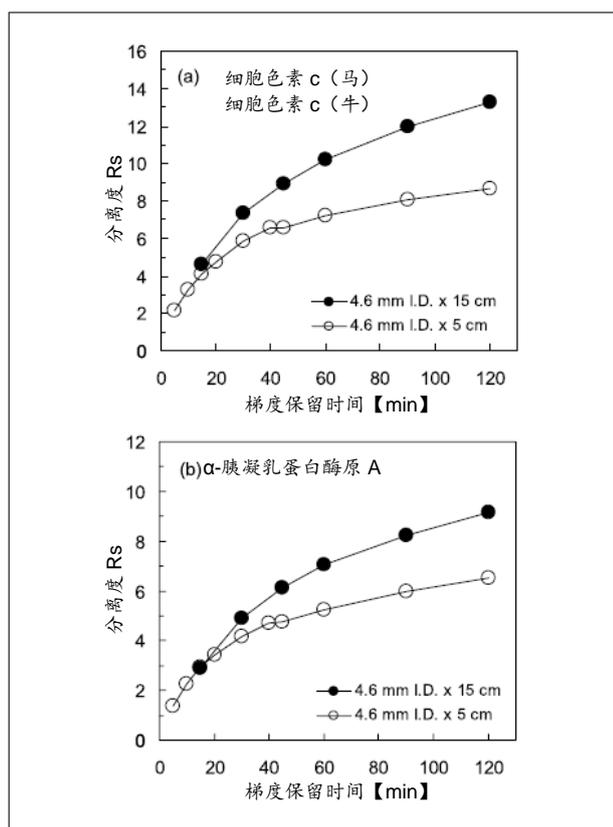


图9 梯度时间对蛋白质分离效果的影响

色谱柱: TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.x15cm),  
TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.x5cm)

洗脱液: A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.05 (v/v/v)

B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.05 (v/v/v)

A→B 线性梯度 (5~120min)

流速: 1.0mL/min

检测: UV 215nm

温度: 40°C

进样量: 10μL

样品: (a) 细胞色素c (马), 细胞色素c (牛)

(b) α-胰凝乳蛋白酶原A, 碳酸酐酶 (各1μg)

行测定可获得更好的分离度，但如果梯度时间较短，则色谱柱长度所造成的分离度差异就会减小。根据这一结果，为了实现更好的分离效果，建议采用较长的色谱柱以及延长梯度时间；而需要进行高通量分析时，则建议采用较短的色谱柱，并缩短梯度时间。

采用多肽样品计算得出的峰容量 (P<sub>c</sub>; 分离度 Rs=1 时可实现分离的最大吸收峰数<sup>2)</sup>), 获得的结果也与蛋白质相同 (图10)。

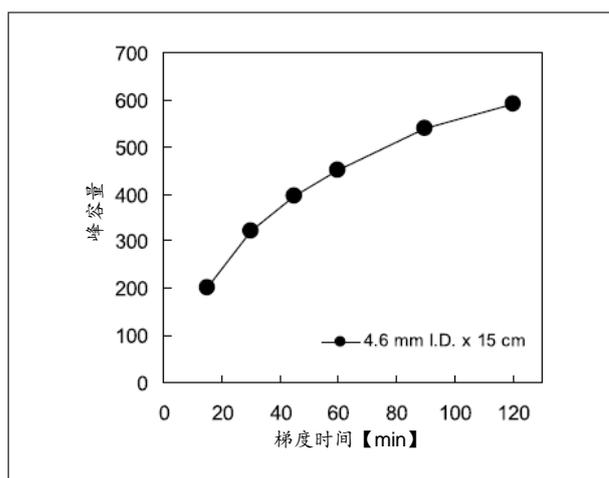


图10 梯度时间对多肽分离效果的影响

色谱柱: TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.x15cm)

洗脱液: A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.05 (v/v/v)

B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.05 (v/v/v)

A→B 线性梯度 (15~120min)

流速: 1.0mL/min

检测: UV 215nm

温度: 40°C

进样量: 10μL

样品: δ-睡眠诱导多肽,  
蛋氨酸脑啡肽, 缓激肽,  
章鱼唾腺精相关肽, 血管紧张素 I,  
P 物质, 生长抑素,  
β-内啡肽,  
胰岛素, 胃泌素 I (各 0.25μg)

峰容量 (P<sub>c</sub>) 的计算公式

$$P_c = 1 + \frac{t_G}{1.7 \cdot W_{0.5}}$$

t<sub>G</sub> : 梯度保留时间

W<sub>0.5</sub> : 实施测定的 10 种多肽试样的半峰宽平均值

### 3-6 流速的影响

在梯度时间恒定的条件下，流速发生变化后，对分离度的影响如图 11 所示。虽然保留时间相近的蛋白质（细

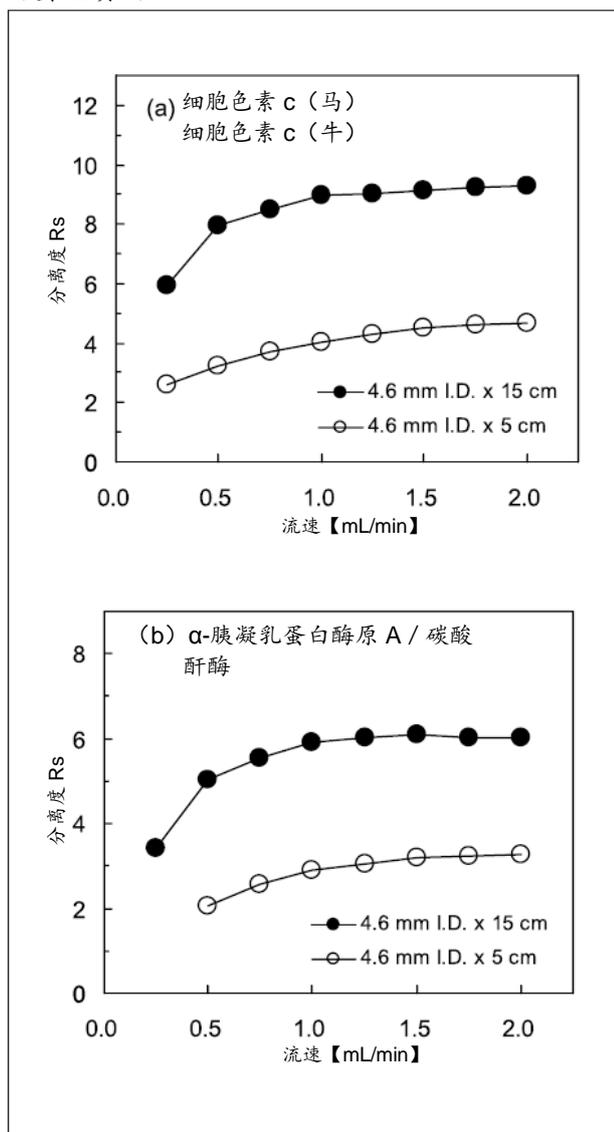


图11 流速对蛋白质分离效果的影响

色谱柱: TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.x15cm),

TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300(4.6mm I.D.x5cm)

洗脱液: A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.05 (v / v / v)

B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.05 (v / v / v)

A→B 线性梯度

45min (4.6mm I.D.x15cm), 15min (4.6mm I.D.x5cm)

流速: 0.25~2.0mL/min

检测: UV 215nm

温度: 40°C

进样量: 10μL

样品: (a) 细胞色素 c (马), 细胞色素 c (牛)

(b) α-胰凝乳蛋白酶原 A, 碳酸酐酶

(各 1μg)

胞色素 c (牛) 与细胞色素 c (马)、以及 α-胰凝乳蛋白酶原 A 与碳酸酐酶) 之间的分离度会随着流速增大而提高, 但达到 1.0 mL/min 以上 (线速度 6 cm/min 以上) 后, 流速的影响即会减小, 显示分离度基本保持恒定。另外, 根据多肽样品计算得出的峰容量, 获得的结果也与蛋白质相同 (图 12)。根据这一结果, 在使用 4.6 mm I.D. 色谱柱时, 考虑 1.0 mL/min 的流速比较合适; 在使用 2.0 mm I.D. 色谱柱时, 宜采取 0.2 mL/min 左右的流速。

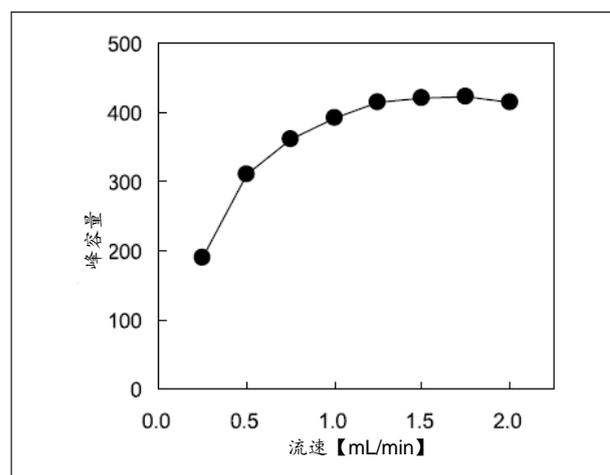


图12 流速对多肽分离效果的影响

色谱柱: TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.x15cm)

洗脱液: A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.05 (v / v / v)

B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.05 (v / v / v)

A→B 线性梯度 (45min)

流速: 0.25~2.0mL/min

检测: UV 215nm

温度: 40°C

进样量: 10μL

样品: δ-睡眠诱导多肽,

蛋氨酸脑啡肽, 缓激肽,

章鱼唾腺精氨酸多肽, 血管紧张素 I,

P 物质, 生长抑素, β-内啡肽,

胰岛素, 胃泌素 I

(各 0.25μg)

峰容量的计算公式与图 10 所示相同

在较低的流速下测定梯度时，根据所使用的系统，可能会出现色谱柱外的流路（进样器、管路、检测器）中扩散与梯度精度不均匀等因素导致的分离性能不佳及重复性下降。在这种情况下，可通过确保测定中的色谱柱压力在不超过最大使用压力的范围内使流速增大，从而改善分离效果。

### 3-7 检测条件对选择性的影响

一般情况下, 已知在反相色谱法的等度洗脱条件下, 洗脱液中有机溶剂的浓度  $\Phi$  与样品的保留因子  $\log k'$  ( $k'$ : 保留系数) 基本保持线性关系, 其斜率  $S$  (等度系统的性能参数) 值因样品而各异。为此,  $S$  值不同的样品在等度洗脱条件下测定时, 洗脱液中有机溶剂的浓度发生改变后, 分离系数  $\alpha = k'_2/k'_1$  即会发生变化。同样, 在梯度检测过程中, 对有机溶剂浓度的梯度会产生影响的因素 (梯度时间、流速、色谱柱的长度) 发生变化后, 分离选择性也会发生改变, 并导致吸收峰的形状发生变化。图 13 所示为改变梯度时间 (a)、以及流速 (b) 后检测标准多肽时色谱图发生的变化。

为方便起见, 为了使缓激肽 (吸收峰 2)、生长抑素 (吸收峰 6)、胃泌素 I (吸收峰 9) 的出峰位置一致, 对横轴的标尺进行了调整, 但梯度时间以及流速发生改变时, 可观察到不同特异性的吸收

峰。在此我们注意到了胰岛素 (吸收峰 8) 的变化并标上箭头标记。

在保持特异性并对测定条件进行变更时, 为了保持  $t_G F / V_0 \Delta \Phi$  ( $t_G$ : 梯度时间、 $F$ : 流速、 $V_0$ : 色谱柱空隙容量、 $\Delta \Phi$ : 梯度起点至终点的有机溶剂浓度变化量) 的值恒定, 必须对检测条件进行设定。具体示例如图 14 所示。与图 13 相同, 为了使生长抑素 (吸收峰 2)、胃泌素 I (吸收峰 5) 的出峰位置基本一致, 对横轴的标尺进行了调整。在  $t_G F / V_0 \Delta \Phi$  的值保持恒定 ((a)、(b) 均为上部与下部的色谱) 的情况下, 可见其他吸收峰的特异性也未发生变化。在此我们注意到了胰岛素 (吸收峰 4) 的变化并标上箭头标记。详情请参考 (L.R.Snyder, J.L.Glajch, J.J.Kirkland、(翻译) 高桥昭、荒木峻、【高效液相色谱的实际应用】、p.154、东京化学同人 (1992))。

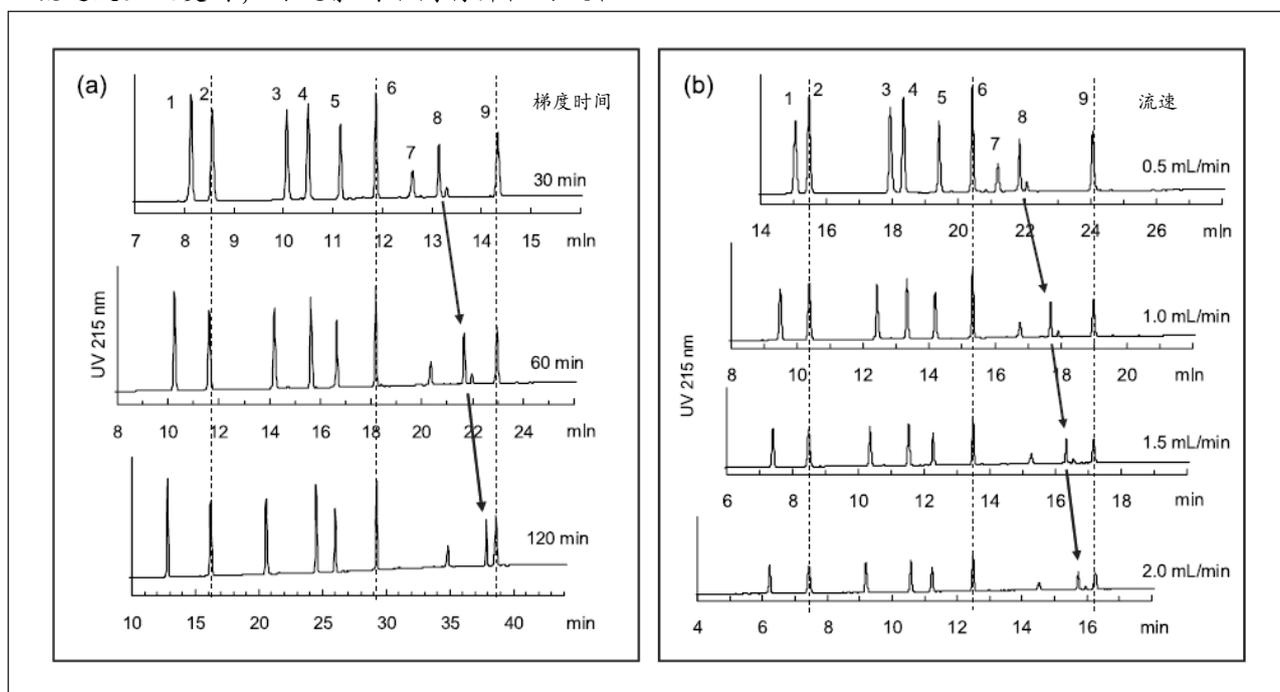


图 13 检测条件对多肽标准品分离选择性的影响

色谱柱: TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.x15cm)

洗脱液: A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.05 (v/v/v)

B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.05 (v/v/v)

A→B 线性梯度, (a) 30~120min, (b) 45min

流速: (a) 1.0mL/min, (b) 0.5~2.0mL/min

检测: UV 215nm

温度: 40°C

进样量: 10μL

样品: 1. 蛋氨酸脑啡肽

2. 缓激肽

3. 章鱼唾腺精氨酸多肽

4. 血管紧张素 I

5. P 物质

6. 生长抑素

7. β-内啡肽

8. 胰岛素

9. 胃泌素 I

(各 0.25μg)

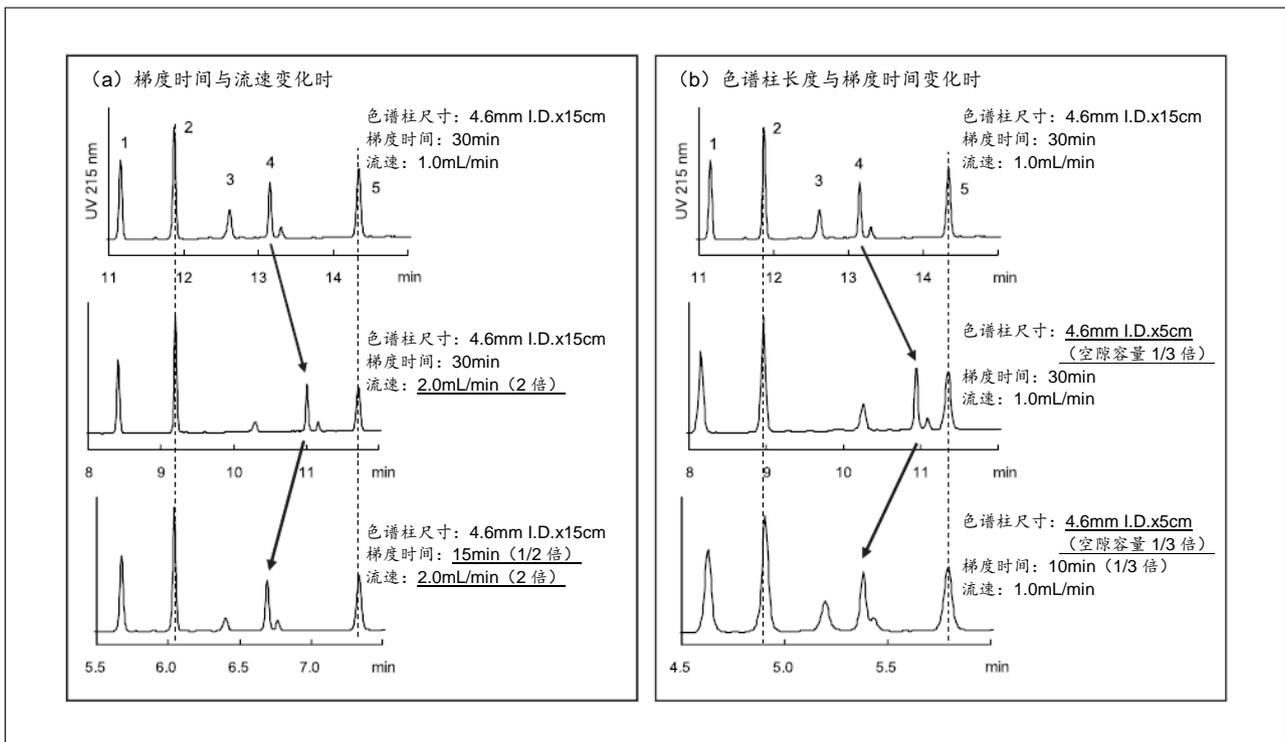


图14 分离选择性的合理控制

色谱柱: TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300  
 洗脱液: A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.05  
           (v / v / v)  
           B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.05  
           (v / v / v)  
           A→B 线性梯度  
 检测: UV 215nm  
 温度: 40°C  
 进样量: 10μL

样品: 1. P 物质  
       2. 生长抑素  
       3. β-内啡肽  
       4. 胰岛素  
       5. 胃泌素 I  
       (各 0.25μg)

※色谱柱尺寸、梯度时间、流速如图中所示

### 3-8 离子对试剂的影响

RPC 法分离蛋白质时,使用的洗脱液中一般都会添加三氟乙酸 (TFA) 作为离子对试剂。

洗脱液中 TFA 浓度对分离效果的影响如图 15 及图 16 所示。TFA 浓度在 0.02~0.1% 的范围内时,蛋白质、多肽均可获得良好的分离效果。检测多肽样品时,可观察到 TFA 浓度不同所致的特异性变化。TFA 浓度低于 0.01% 时,部分蛋白质的吸收峰

会出现明显的前延或拖尾。对多肽进行测定时,虽然未见吸收峰的前延或拖尾,但峰宽会出现一定程度的增大,峰容量 ( $P_c$ ) 降低。另外, TFA 浓度高于 0.1% 时,可能会成为 LC/MS 灵敏度下降与色谱柱损坏的原因,因此不建议采用。根据这些结果,可得知在对蛋白质、多肽进行检测时, TFA 浓度在 0.02~0.1% 的范围内较为适宜。

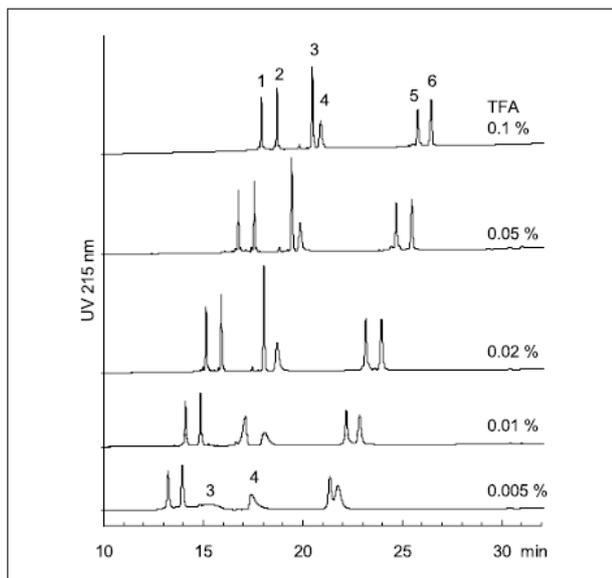


图15 TFA 浓度对蛋白质分离效果的影响

色谱柱: TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.x15cm)

洗脱液: A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.005~0.1 (v/v/v)

B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.005~0.1 (v/v/v)

A→B 线性梯度 (45min)

流速: 1.0mL/min

检测: UV 215nm

温度: 40°C

进样量: 10μL

样品: 1. 细胞色素 c (马)  
2. 细胞色素 c (牛)  
3. 溶菌酶  
4. 乳铁蛋白 (人)  
5. α-胰凝乳蛋白酶原 A  
6. 碳酸酐酶  
(各 1μg)

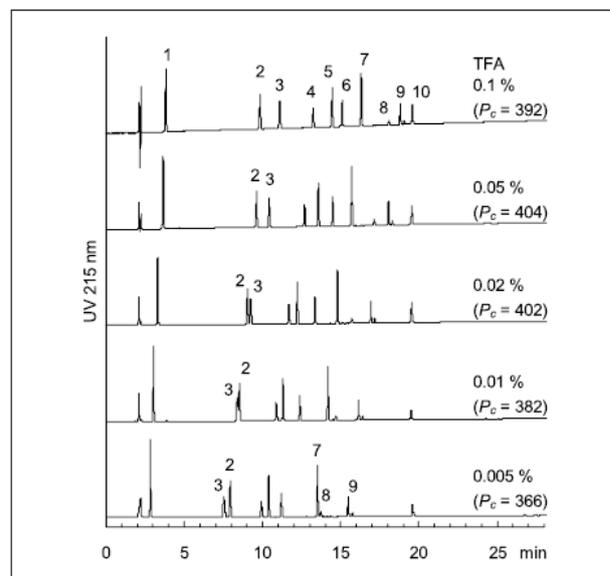


图16 TFA 浓度对多肽分离效果的影响

色谱柱: TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.x15cm)

洗脱液: A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.005~0.1 (v/v/v)

B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.005~0.1 (v/v/v)

A→B 线性梯度 (45min)

流速: 1.0mL/min

检测: UV 215nm

温度: 40°C

进样量: 10μL

样品: 1. δ-睡眠诱导多肽  
2. 蛋氨酸脑啡肽  
3. 缓激肽  
4. 章鱼唾腺精氨酸多肽  
5. 血管紧张素 I  
6. P 物质  
7. 生长抑素  
8. β-内啡肽  
9. 胰岛素  
10. 胃泌素 I  
(各 0.25μg)

峰容量 ( $P_c$ ) 的计算公式与图 10 所示相同

作为 TFA 的替代物,也可使用高氯酸与磷酸作为离子对试剂。测定示例如图 17 所示。由于高氯酸与磷酸在短波长下的吸光度较低,因此在使用 UV 检测器检测时,可减少基线的变动与假峰的出现。另一方面,由于这些试剂不具有挥发性,因此不适用于通过 LC/MS 与蒸发光散射检测器(ELSD)等的检测。

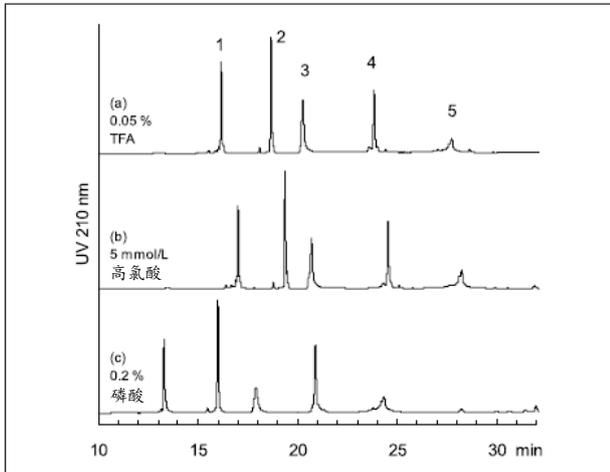


图17 采用高氯酸及磷酸作为离子对试剂时蛋白质样品的色谱图

色谱柱: TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.x15cm)

洗脱液: (a) A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.05 (v/v/v)

B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.05 (v/v/v)

(b) A: 5mmol / L HClO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN=90 / 10 (v/v)

B: 5mmol / L HClO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN=20 / 80 (v/v)

(c) A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>=90 / 10 / 0.2 (v/v/v)

B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>=20 / 80 / 0.2 (v/v/v)

(a) ~ (c) 均显示 A→B 线性梯度 (45min)

流速: 1.0mL/min

检测: UV 210nm

温度: 40°C

进样量: 10μL

样品: 1. 细胞色素 c (马)

2. 溶菌酶

3. 牛血清白蛋白

4. α-胰凝乳蛋白酶原 A

5. 卵白蛋白

(各 2μg)

### 3-9 温度的影响

使用 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.x15cm) 进行检测时,色谱柱温度对分离效果的影响如图 18 及图 19 所示。在 27~50°C 的范围内,色谱柱温度越高,蛋白质的吸收峰越尖;在细胞色素 c 与 α-胰凝乳蛋白酶原 A 的主峰附近,杂质峰的分 离效果也得以改善。这一现象可推测是由于温度越高样品的扩散系数越大、进出小孔的速度加快所致。根据这一结果,可判断在检测蛋白质时,色谱柱温度一般在 40~50°C 左右比较适宜。但是,必须注意在高温下的长时间使用可能会导致色谱柱的损坏。

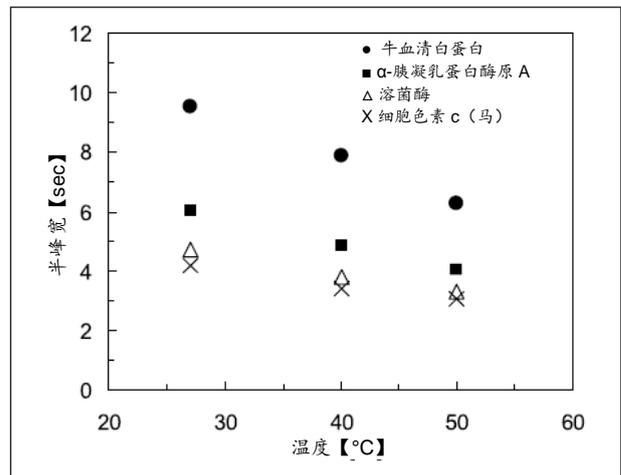


图18 色谱柱温度对蛋白质半峰宽的影响

色谱柱: TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.x15cm)

洗脱液: A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.05 (v/v/v)

B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.05 (v/v/v)

A→B 线性梯度 (45min)

流速: 1.0mL/min

检测: UV 215nm

温度: 27, 40, 50°C

进样量: 10μL

样品: 细胞色素 c (马), 溶菌酶, 牛血清白蛋白, α-胰凝乳蛋白酶原 A (各 2μg)

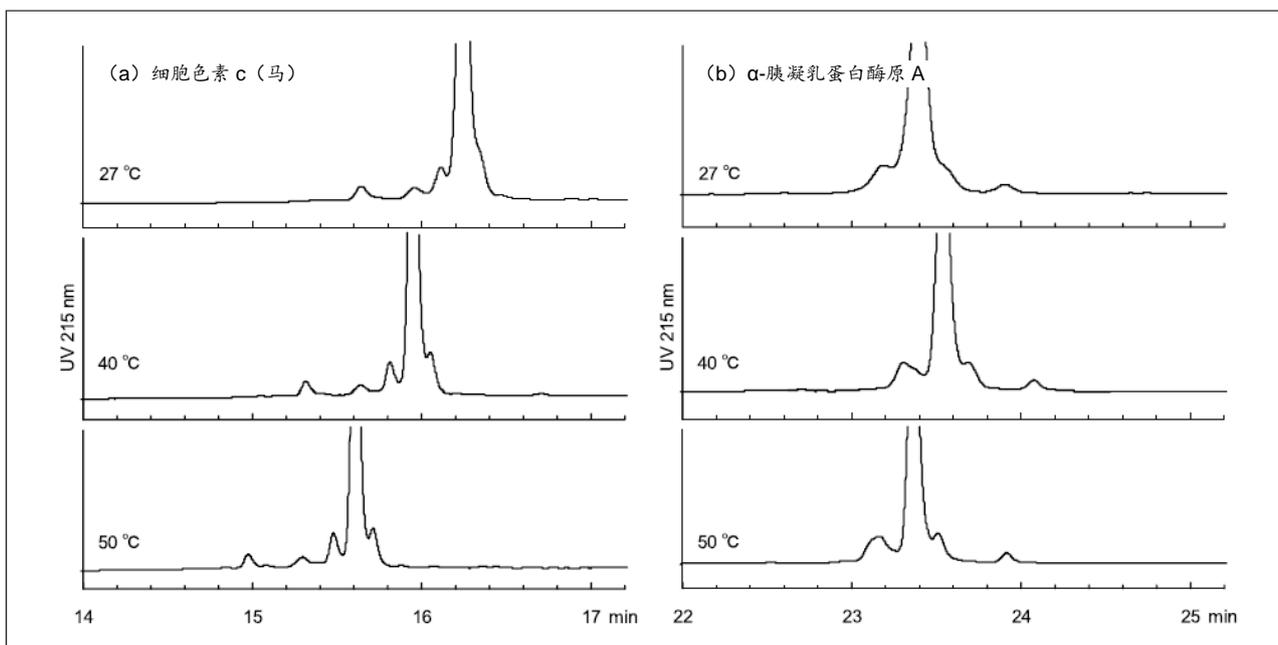


图19 色谱柱温度对杂质峰分离效果的影响

色谱柱: TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.×15cm)

洗脱液: A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.05 (v / v / v)

B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.05 (v / v / v)

A→B 线性梯度 (45min)

流速: 1.0mL/min

检测: UV 215nm

温度: 27, 40, 50°C

进样量: 10μL

样品: 细胞色素 c (马), α-胰凝乳蛋白酶原 A  
(各 2μg)

### 3-10 进样量的影响

使用 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.x15cm) 检测时, 进样量与峰宽的相关性如图 20 所示。测定蛋白质样品时, 如进样量低于 3 $\mu$ g 时, 峰宽基本保持恒定, 但大于 3 $\mu$ g 时, 可见进样量过大所致的峰宽增大。另外, 测定多肽样品时, 即使进样量低于蛋白质, 也可见峰宽增大。可见在分离疏水性小、保留较弱的样品时, 进样量的大小会很容易对其造成影响。

### 3-11 定量效果

在 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.x15cm) 检测时, 进样量与峰面积的相关性如图 21 所示。如样品是多肽、或者分子量较小的蛋

白质时, 其标准曲线在 10~1000ng 范围内呈现通过原点的直线, 定量效果良好。另一方面, 分子量较大的 BSA 与乳铁蛋白的标准曲线通过原点的下方, 在进样量低于 30ng 时, 无法进行定量。作为对 BSA 与乳铁蛋白之类可吸附固定相的样品采用微量分析的方法, 可考虑 (1) 改变分离条件 (色谱柱温度、离子对试剂的浓度、种类等) 以抑制吸附 (2) 改用内径小、长度短的色谱柱 (3) 采用孔径大于 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 的 RPC 色谱柱 (TSKgel Phenyl-5PW RP 等)、或采用填料表面积较小的无孔型 RPC 色谱柱 (TSKgel Octadecyl-NPR 等)。

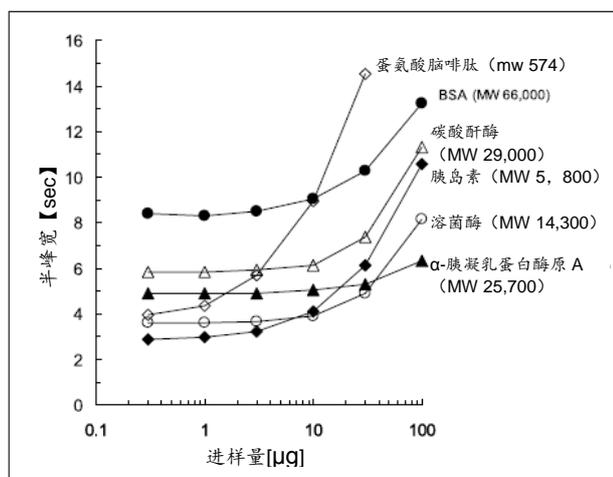


图 20 进样量对峰宽的影响

色谱柱: TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6 mm I.D.x15 cm)

洗脱液: A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.05 (v / v / v)

B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.05 (v / v / v)

A→B 线性梯度 (45 min)

流速: 1.0mL/min

检测: UV 245nm

温度: 40°C

进样量: 100 $\mu$ L

样品: 蛋氨酸脑啡肽 (MW 574)

胰岛素 (MW 5,800)

溶菌酶 (MW 14,300)

α-胰凝乳蛋白酶原 A (MW 25,700)

碳酸酐酶 (MW 29,000)

牛血清白蛋白 (MW 66,000)

(各 0.3~100  $\mu$ g)

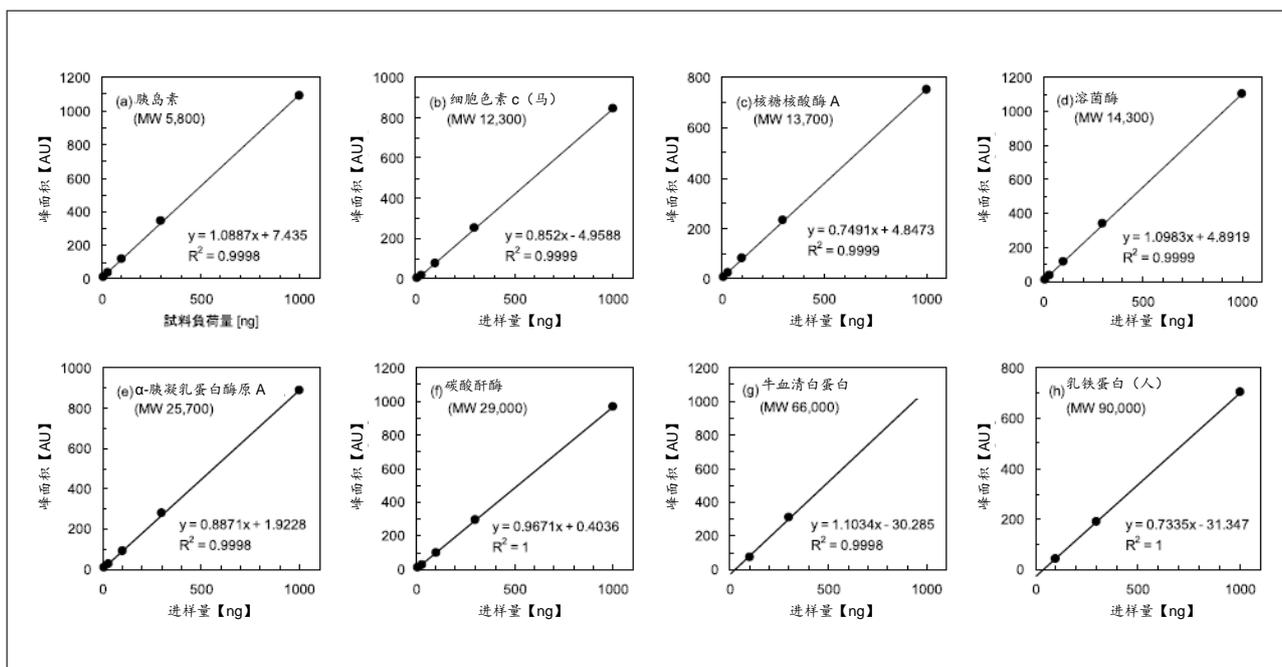


图21 进样量与峰面积的关系

色谱柱: TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.×15cm)

洗脱液: A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.05 (v / v / v)

B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.05 (v / v / v)

A→B 线性梯度 (45min)

流速: 1.0 mL/min

检测: UV 215nm

温度: 40°C

进样量: 100μL

样品: (a) 胰岛素 (MW 5,800)

(b) 细胞色素 c (马) (MW 12,300)

(c) 核糖核酸酶 A (MW 13,700)

(d) 溶菌酶 (MW 14,300)

(e) α-胰凝乳蛋白酶原 A (MW 25,700)

(f) 碳酸酐酶 (MW 29,000)

(g) 牛血清白蛋白 (BSA) (MW 66,000)

(h) 乳铁蛋白 (人) (MW 90,000)

(各 10~1000ng)

### 3-12 与其他 TSKgel RPC 色谱柱的比较

将 6 种具有不同官能团、颗粒直径、孔径、以及基质 TSKgel RPC 色谱柱 (表 4)，对标准蛋白质及标准多肽的分离进行了比较。

在相同条件下对 6 种标准蛋白质测定的结果如图 22 所示。采用 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 时的分离效果最好。另外,不同的色谱柱导致部分蛋白质(特别是乳铁蛋白)的峰面积存在较大差异,但在 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 未观察到峰面积的减小,对蛋白的回收率高于其他 TSKgel RPC 色谱柱。TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 与 TSKgel ODS-100V 3 $\mu$ m 虽然都是颗粒直径为 3 $\mu$ m 的硅胶基质的 RPC 色谱柱,但 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 的吸收峰更尖,可得知官能团及孔径的不同对蛋白质分离效果的影响较大。

表4 对比的 TSKgel RPC 色谱柱

| 色谱柱                                | 色谱柱尺寸<br>(mm I.D.xcm) | 粒径<br>( $\mu$ m) | 孔径<br>(nm) | 基质  |
|------------------------------------|-----------------------|------------------|------------|-----|
| TSKgel Protein C <sub>4</sub> -300 | 4.6 x 15              | 3                | 30         | 硅胶  |
| TSKgel ODS-100V 3 $\mu$ m          | 4.6 x 15              | 3                | 10         | 硅胶  |
| TSKgel ODS-120T                    | 4.6 x 15              | 5                | 12         | 硅胶  |
| TSKgel Octadecyl-4PW               | 4.6 x 15              | 7                | 50         | 聚合物 |
| TSKgel Octadecyl-NPR               | 4.6 x 3.5             | 2.5              | 无孔         | 聚合物 |
| TSKgel Phenyl-5PW RP               | 4.6 x 7.5             | 10               | 100        | 聚合物 |

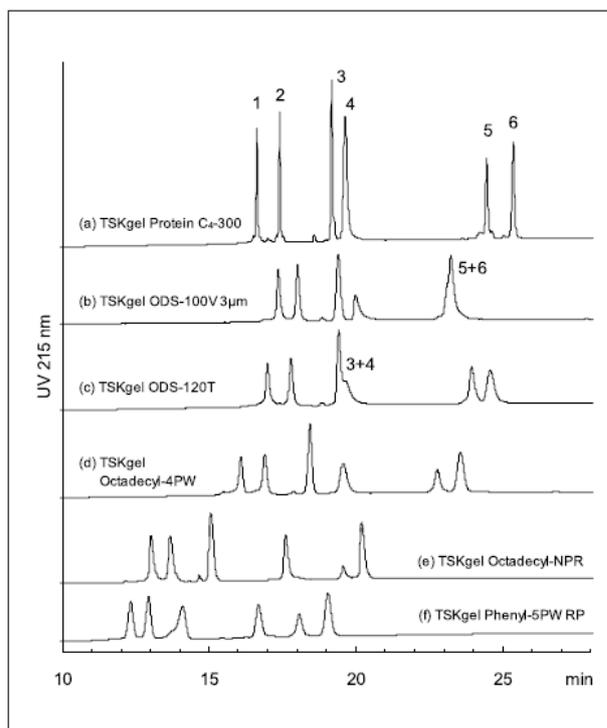


图22 与其他 TSKgel RPC 色谱柱的比较 (蛋标样)

色谱柱: (a) TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.x15cm)  
 (b) TSKgel ODS-100V 3 $\mu$ m (4.6mm I.D.x15cm)  
 (c) TSKgel ODS-120T (4.6mm I.D.x15cm)  
 (d) TSKgel Octadecyl-4PW (4.6mm I.D.x15cm)  
 (e) TSKgel Octadecyl-NPR (4.6mm I.D.x3.5cm)  
 (f) TSKgel Phenyl-5PW RP (4.6mm I.D.x7.5cm)

洗脱液: A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.05 (v / v / v)

B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.05 (v / v / v)

A→B线性梯度 (45min)

流速: 1.0mL/min

检测: UV 215nm

温度: 40°C

进样量: 10 $\mu$ L

样品: 1. 细胞色素 c (马)  
 2. 细胞色素c (牛)  
 3. 溶菌酶  
 4. 乳铁蛋白 (人)  
 5.  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶原A  
 6. 碳酸酐酶  
 (各1 $\mu$ g)

在相同条件下对 10 种多肽标准品进行测定的结果如图 23 所示。在采用 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 及 TSKgel ODS-100V 3 $\mu$ m 时可获得最尖的吸收峰, 相反, 采用 3 种聚合物基质的色谱柱时, 吸收峰即会变宽。另外, 部分多肽的出峰顺序有相反, 可得知不同的色谱柱对多肽的分离选择性也不同。将 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 与 TSKgel ODS-100V 3 $\mu$ m 的分离结果进行对比, 由于 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 上  $\delta$ -睡眠诱导多肽(吸收峰 1) 的保留作用较弱, 因此在测定分子量较小、疏水性较低的低聚糖多肽时, 采用 TSKgel ODS-100V 3 $\mu$ m 可获得更好分离效果。另一方面, 由于在 TSKgel ODS-100V 3 $\mu$ m 上胃泌素 I (吸收峰 10) 的峰面积较小, 因此在分离分子量较大、疏水性较高的多肽时, 使用 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 可获得较高的回收率。

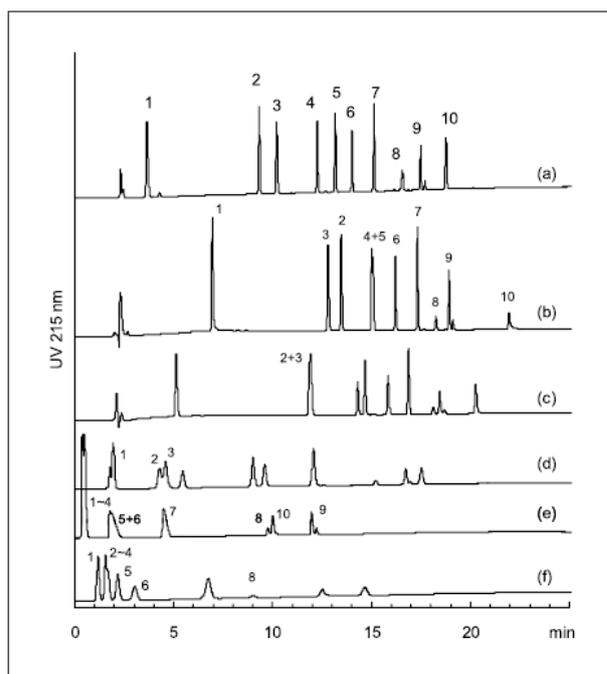


图23 与其他 TSKgel RPC 色谱柱的比较 (多肽标准品)

色谱柱: (a) TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.x15cm)  
 (b) TSKgel ODS-100V 3 $\mu$ m (4.6mm I.D.x15cm)  
 (c) TSKgel ODS-120T (4.6mm I.D.x15cm)  
 (d) TSKgel Octadecyl-4PW (4.6mm I.D.x15cm)  
 (e) TSKgel Octadecyl-NPR (4.6mm I.D.x3.5cm)  
 (f) TSKgel Phenyl-5PW RP (4.6mm I.D.x7.5cm)

洗脱液: A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA = 90 / 10 / 0.05 (v / v / v)

B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA = 20 / 80 / 0.05 (v / v / v)

A→B线性梯度 (45min)

流速: 1.0mL/min

检测: UV 215nm

温度: 40°C

进样量: 10 $\mu$ L

样品: 1.  $\delta$ -睡眠诱导多肽  
 2. 蛋氨酸脑啡肽  
 3. 缓激肽  
 4. 章鱼唾液腺精氨酸多肽  
 5. 血管紧张素I  
 6. P物质  
 7. 生长抑素  
 8.  $\beta$ -内啡肽  
 9. 胰岛素  
 10. 胃泌素I  
 (各0.25 $\mu$ g)

### 3-13 与市售的蛋白分析专用 RPC 色谱柱的比较

关于标准蛋白质的分离效果，将 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 与 6 种市面销售的蛋白分析专用 RPC 色谱柱进行了比较，结果如图 24 所示。TSKgel

Protein C<sub>4</sub>-300 可获得比市售的色谱柱更高的分离效果。另外，图 25 所示可见，TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 的峰面积与其他色谱柱基本相同，回收率良好。

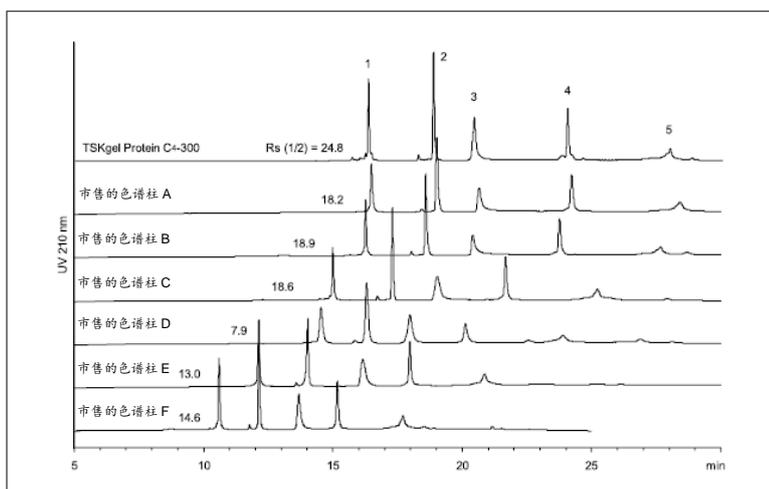


图 24 与市售的蛋白分析专用 RPC 色谱柱的比较

色谱柱：TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (3 $\mu$ m, 4.6mm I.D.x15cm)  
 市售的 RPC (C4) 色谱柱 A (5 $\mu$ m, 4.6mm I.D.x15cm)  
 市售的 RPC (C4) 色谱柱 B (5 $\mu$ m, 4.6mm I.D.x15cm)  
 市售的 RPC (C4) 色谱柱 C (3.5 $\mu$ m, 4.6mm I.D.x15cm)  
 市售的 RPC (C4) 色谱柱 D (5 $\mu$ m, 4.6mm I.D.x15cm)  
 市售的 RPC 色谱柱 E (3 $\mu$ m, 4.6mm I.D.x15cm)  
 市售的 RPC (C4) 色谱柱 F (3 $\mu$ m, 4.6mm I.D.x10cm)

洗脱液：A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA = 90 / 10 / 0.05 (v / v / v)  
 B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA = 20 / 80 / 0.05 (v / v / v)  
 A→B 线性梯度 (45min, 仅色谱柱为 F 30min)  
 流速：1.0mL/min  
 检测：UV 210nm  
 温度：40°C  
 进样量：10 $\mu$ L  
 样品：1. 细胞色素 c (马)  
 2. 溶菌酶  
 3. 牛血清白蛋白  
 4.  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶原 A  
 5. 卵白蛋白  
 (各 2 $\mu$ g)

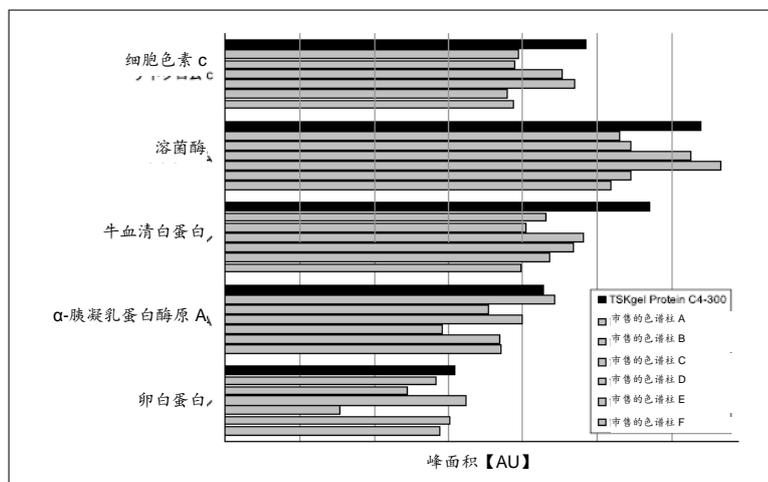


图 25 标准蛋白质的峰面积比较

## 4. 分离实例

### 4-1 高通量分析

在要求缩短测定时间的高通量分析中，有效的方法是采用较短的色谱柱（5cm），在不超过最大耐受压力的范围内尽量设定较大的流速，调整梯度条件以达到所需的分离效果。

采用 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300（2.0mm I.D.x5cm）对6种标准蛋白质在2min以内的分离结果如图26所示。与市售的较大孔径RPC色谱柱（填料：5 $\mu$ m表面多孔（核壳）粒子、色谱柱尺寸：2.1mm I.D.x7.5cm）相比，TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300上的吸收峰延迟较小、峰形尖锐，在高通量分析过程中可获得较理想的分离效果。

另外，由于在高通量分析中峰宽非常小，为了获得最好的结果，还必须注意减少色谱柱外的扩散、检测器的灵敏度、以及数据的读入间隔等。

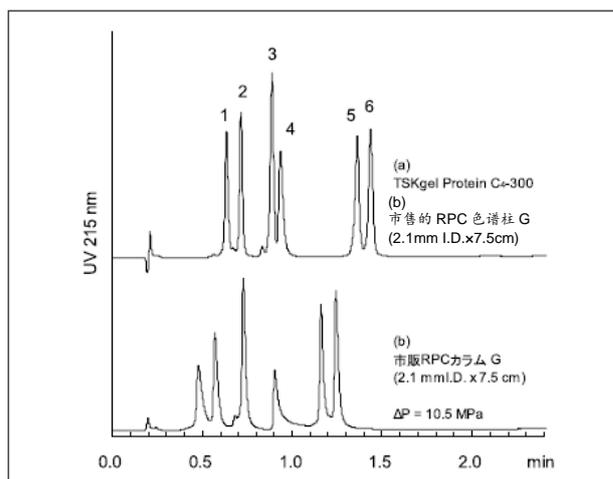


图26 标准蛋白质的高通量分析

色谱柱： (a) TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300（3 $\mu$ m，2.0mm I.D.x5cm）  
(b) 市售的RPC色谱柱G（5 $\mu$ m核壳粒子，2.1mm I.D.x7.5cm）

洗脱液： A：H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA = 90 / 10 / 0.05 (v / v / v)  
B：H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA = 20 / 80 / 0.05 (v / v / v)  
25% B→75% B线性梯度（2min）

流速： 0.8mL/min

检测： UV 215nm

温度： 40°C

进样量： 10 $\mu$ L

样品： 1. 细胞色素c（马）  
2. 细胞色素c（牛）  
3. 溶菌酶  
4. 乳铁蛋白（人）  
5.  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶原A  
6. 碳酸酐酶  
（各1 $\mu$ g）

#### 4-2 肽图

通过胰蛋白酶消化等方法分解蛋白质,用RPC对获得的多肽断片进行分离后,分析氨基酸序列的手法称为“肽图”。肽图分析需要具备可分离数十~数百种多肽断片的高度的分离性能,有效的方法是采用较长的色谱柱(15cm),并以缓慢的梯度分布进行测定。

采用 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm

I.D.x15cm)对BSA的胰蛋白酶消化物进行分离的结果如图27所示。通过对2种不同消化时间的样品的分离结果重叠观察,可得知随着消化过程的进行,各吸收峰高度会发生变化。

梯度时间所致的峰容量变化如图28所示。在对复杂的多肽混合物进行分析时,通过延长梯度时间,可对更多的吸收峰进行分离。

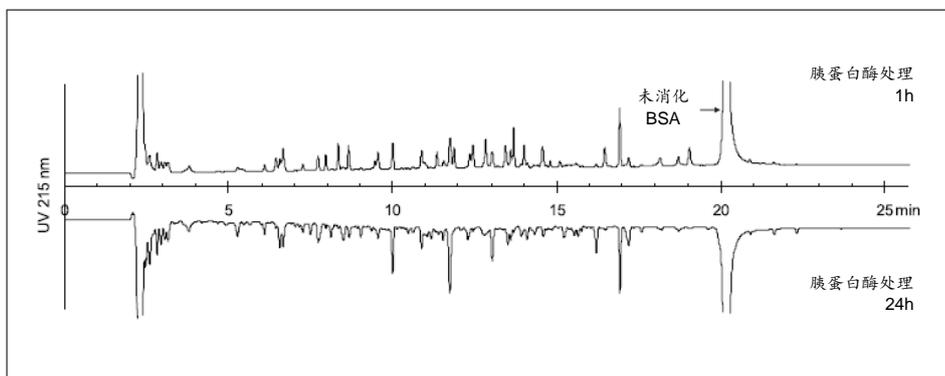


图27 BSA胰蛋白酶消化物的分离

色谱柱: TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.x15cm)

洗脱液: A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.05 (v / v / v)

B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.05 (v / v / v)

A→B线性梯度(45min)

流速: 1.0mL/min

检测: UV 215nm

温度: 40°C

进样量: 10μL

样品: BSA的胰蛋白酶消化物  
(处理时间: A.1h, B.24h)  
(各20μg)

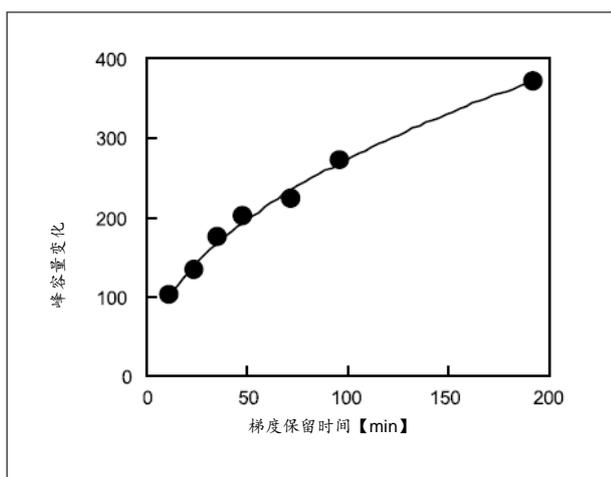


图28 梯度时间所致的峰容量变化

峰容量 ( $P_c$ ) 的计算公式

$$P_c = 1 + \frac{t_R - t_0}{1.7 \cdot w_{0.5}}$$

$t_R$ : 未消化BSA的洗脱时间

$t_0$ : 死时间

(洗脱液通过色谱柱的时间)

$W_{0.5}$ : 前5条吸收峰高度的多肽断片半峰宽平均值

#### 4-3 PEG 化蛋白质

已知通过将聚乙二醇 (PEG) 与蛋白质结合, 可降低蛋白质的免疫原性、以及抑制蛋白水解酶的分解作用。为了减轻药物毒性与改善蛋白药物的药代动力学, 蛋白质的 PEG 化修饰已在生物医药领域中被广泛使用。

对平均分子量为 5000 以及 30000 的 PEG 修饰后的溶菌酶采用 SEC 法按分子大小进行分离(图 29), 对获得的各分组用 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300

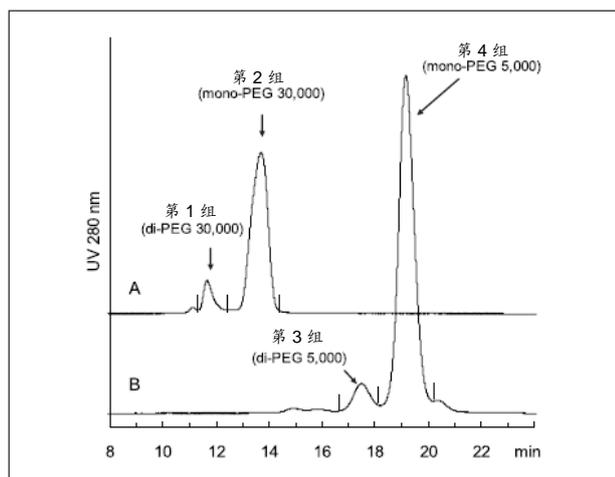


图29 SEC 法 (TSKgel SuperSW3000) 分离 PEG 修饰后的溶菌酶

色谱柱: TSKgel SuperSW3000 (4.6mm I.D.x30cmx2根)

洗脱液: 0.2mol/L 磷酸缓冲液+0.05% NaN<sub>3</sub> (pH 6.7)

流速: 0.35mL/min

检测: UV 280nm

温度: 25°C

进样量: 50 $\mu$ L

样品: A. PEG 修饰后溶菌酶 (PEG 分子量: 5000) (5g/L)

B. PEG 修饰后溶菌酶 (PEG 分子量: 30000) (5g/L)

进行分析(图 30)。PEG 修饰后的溶菌酶与未修饰的溶菌酶相比, 在色谱柱上的保留更强, 可得知在 1 个溶菌酶分子上结合的 PEG 数量或者 PEG 的分子量不同, 保留时间也各不相同。与未修饰的溶菌酶相比, PEG 修饰后的溶菌酶其峰宽会增大, 推测其原因是溶菌酶结合的 PEG 会影响整体的分子量。

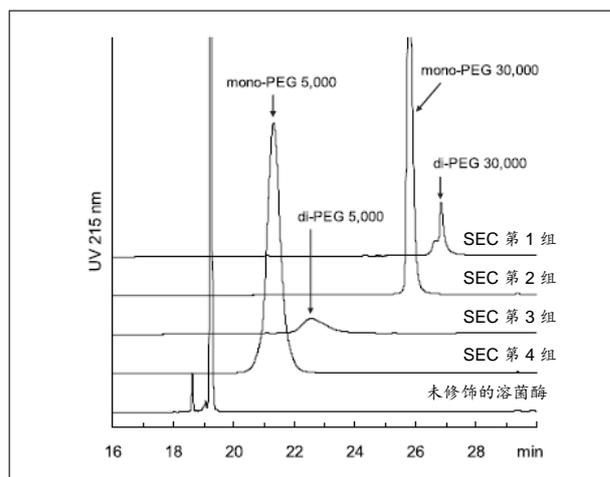


图30 RPC 法 (TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300) 分离 PEG 修饰后的溶菌酶

色谱柱: TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.x15cm)

洗脱液: A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.05 (v / v / v)

B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.05 (v / v / v)

A→B 线性梯度 (45min)

流速: 1.0mL/min

检测: UV 215nm

温度: 40°C

进样量: 100 $\mu$ L

样品: 未修饰的溶菌酶 (0.1g/L), SEC 法分离后获得组分 1~4

#### 4-4 单克隆抗体 (IgG)

抗体药物中使用到的单克隆抗体 (IgG) 在生产工艺与保存过程中可能会发生氨基酸序列、糖链结构、二硫键等不均一的变化。发生不均一变化的分子可能会使药物的药效、安全性方面受到影响, 因此, 对不均一化的检测在生物医药的开发领域及质量管理方面极为重要。在此将例举几个采用 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 色谱柱分析 IgG 不均一性的分析实例。

通过二硫苏糖醇对 IgG 进行还原处理后, 获得其 H 链、L 链, 然后用 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 进行分析, 结果如图 31 所示。可观察到 1 根 L 链的吸收峰与 2 根 H 链的吸收峰。可推测该 IgG 的 H 链的氨基酸序列发生了某些变化, 或 H 链上结合的糖链结构已发生改变。

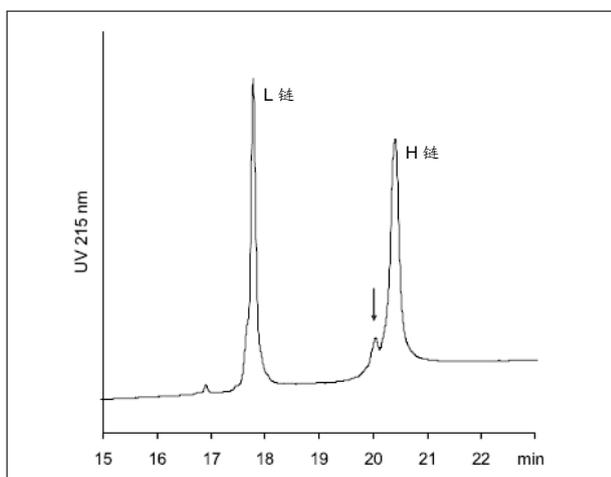


图31 二硫苏糖醇还原处理后的 IgG 的分离

色谱柱: TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D.x15cm)

洗脱液: A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.05 (v / v / v)

B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.05 (v / v / v)

A→B 线性梯度 (45min)

流速: 1.0mL/min

检测: UV 215nm

温度: 50°C

进样量: 100μL

样品: 还原型单克隆抗体 IgG (小鼠)

对于上述不同来源的 IgG, 通过木瓜蛋白酶消化分离其 Fab 片段与 Fc 片段, 用 SEC 色谱柱将分子量 50000 左右及分子量 100000 左右的组分进行分离 (图 32), 对获得的组分再分别使用 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 进行分析 (图 33)。分子量 50000 的组分中, 推测含有 Fab 片段与 Fc 片段, 再次使用 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 进行 RPC 法分析时, 分离出了 5 个吸收峰。推测该 IgG 的氨基酸序列或糖链结构存在不均一性。

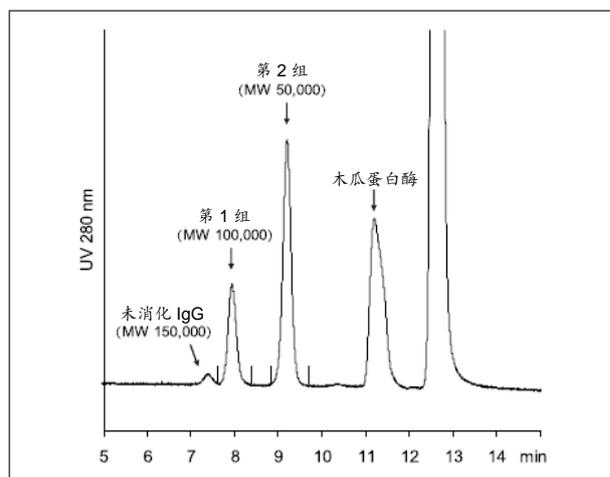


图32 SEC 法分离 IgG 的木瓜蛋白酶消化物

色谱柱: TSKgel SuperSW3000 (4.6mm I.D.x30cm)

洗脱液: 0.2mol/L 磷酸缓冲液+0.05% NaN<sub>3</sub>(pH 6.7)

流速: 0.35mL/min

检测: UV 280nm

温度: 25°C

进样量: 100μL

样品: 单克隆抗体 IgG (小鼠) 的木瓜蛋白酶消化物

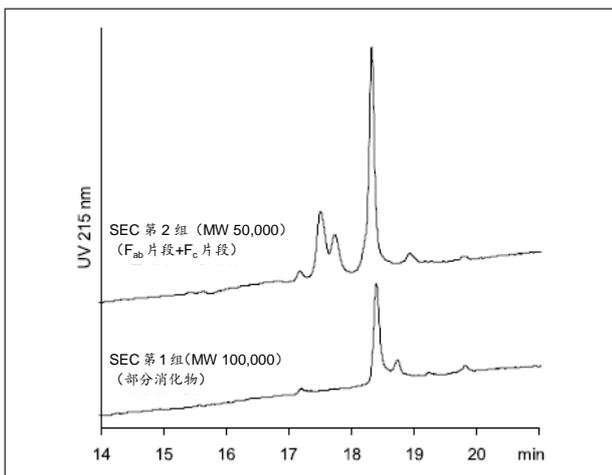


图33 RPC 法分析 IgG 的木瓜蛋白酶消化物

色谱柱: TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 ( 4.6mm I.D.x15cm)

洗脱液: A: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=90 / 10 / 0.05 (v / v / v)

B: H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / TFA=20 / 80 / 0.05 (v / v / v)

A→B线性梯度 (45min)

流速: 1.0mL/min

检测: UV 215nm

温度: 50°C

进样量: 100μL

样品: SEC 法分离出的组分 1, 2

## 5. 总结

本报告介绍了 RPC 色谱柱 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 在蛋白质高速和高效分离分析中的特性及应用实例。在颗粒直径 3μm、孔径 30nm 的多孔性硅胶表面导入丁基后制成的 TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300, 可使原先用一般 RPC 色谱柱难以分离的高分子量、高疏水性蛋白质得到良好的分离效果和高回收率。随着今后生物医药领域的不断扩大, 药物的研发与质量控制方面, 纯度和不均一性检测是不可或缺的, TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 色谱柱将会是一种有效的分析手段。

### (参考文献)

- 1) Sasagawa, T. et al., J. Chromatogr., 240, 329-340 (1982)
- 2) Neue, U., D., J. Chromatogr. A, 1184, 107-130 (2008)



TOSOH

---

**TOSOH BIOSCIENCE**

**东曹（上海）生物科技有限公司**

地址：上海市徐汇区宜山路 1289 号 B 座 3F, 301 室  
电话：+86-21-34610856 传真：+86-21-34610858  
电子邮件：[info@tosoh.com.cn](mailto:info@tosoh.com.cn)  
网址：[www.separations.asia.tosohbioscience.com](http://www.separations.asia.tosohbioscience.com)