

Практическое руководство Agilent

# ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА БИМОЛЕКУЛ

The Measure of Confidence



**Agilent Technologies**

# РУКОВОДСТВО ПО ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКСКЛЮЗИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

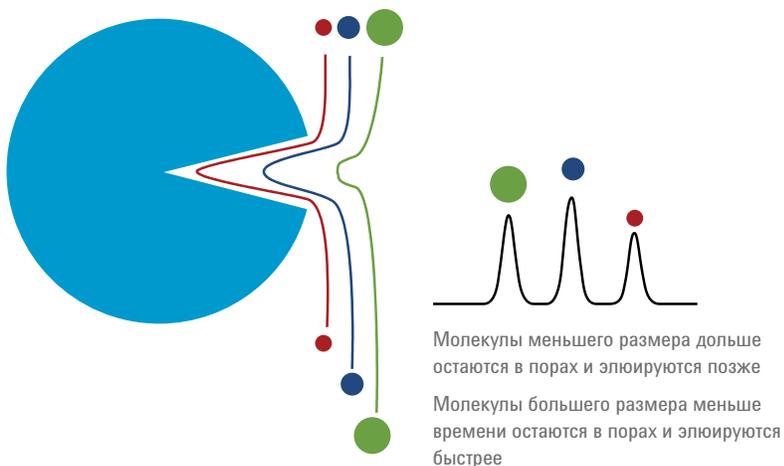
Эксклюзионная хроматография (SEC) — это метод хроматографического разделения биомолекул в растворе в зависимости от их размера. В отличие от других видов хроматографии, в эксклюзионной хроматографии отсутствует взаимодействие анализируемого вещества с материалом неподвижной фазы колонки. Благодаря этому обеспечивается идеальное разделение и исследование интактных белков, которые содержат агрегаты, вспомогательные вещества, клеточный детрит и другие загрязнения, образующиеся при деградации белков. По этой причине эксклюзионная хроматография широко используется для характеристики биотерапевтических молекул в процессе их разработки и производства.

В данном руководстве рассматриваются разделение по методу эксклюзионной хроматографии, влияние размера молекул растворенного вещества и его молекулярной массы, выбор колонок для ЭХ, важные моменты об используемых подвижных фазах, общие правила проведения эксклюзионной хроматографии и многое другое.



## ПРОСТОЕ ДОСТИЖЕНИЕ ВЫСОКОГО УРОВНЯ РАЗДЕЛЕНИЯ

В ходе эксклюзионной хроматографии молекулы разделяются на большие и малые в зависимости от своего размера в растворе. Очень крупные молекулы не проникают в поры сорбента и элюируются первыми в пустом объеме. Менее крупные молекулы, в зависимости от размера, смогут проникать в поры на разную глубину (рис. 1), а самые мелкие молекулы будут проникать в поры глубже остальных и элюироваться последними.



**Рис. 1.** В зависимости от своего размера молекулы проникают в поры неподвижной фазы в разной степени

Узнать подробнее о биоколонках для эксклюзионной хроматографии  
[www.agilent.com/chem/bioHPLC](http://www.agilent.com/chem/bioHPLC)

Поскольку эксклюзионная хроматография подходит для разделения и количественного определения белковых смесей, она является ценной методикой контроля качества при производстве рекомбинантных белков. Контроль качества включает измерение агрегатов (димеров, тримеров, тетрамеров и т. д.) или отделение эксципиентов и загрязнений с низкой молекулярной массой от более крупных белков (рис. 2).

Поскольку агрегация терапевтических белков влияет на их эффективность и стойкость и даже может вызвать серьезный потенциальный иммуногенный эффект, необходимо понимать и контролировать ее. Согласно требованиям Международной конференции по гармонизации ICH (Q6B), агрегаты должны быть отделены от требуемого продукта и количественно охарактеризованы.

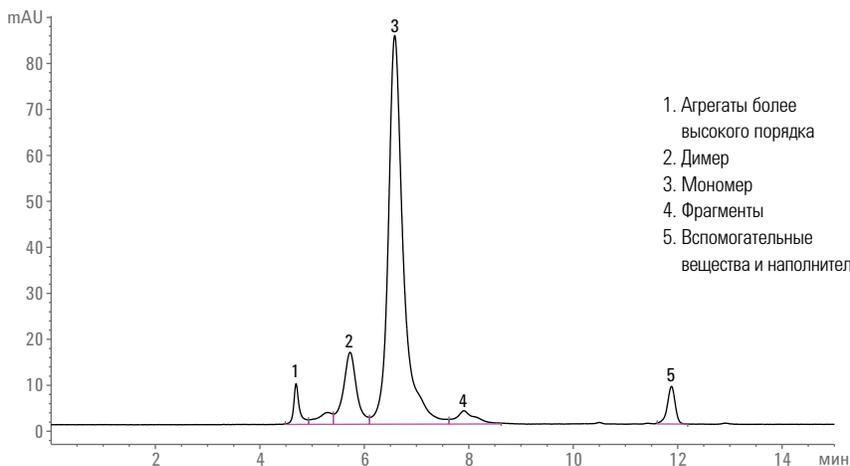


Рис. 2. Разделение агрегатов и вспомогательных веществ IgG

### Разделение мономеров и димеров интактных IgG

**Колонка:** Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7,8 × 300 мм, 2,7 мкм (кат. № PL1180-5301)

**Прибор:** система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-inert с четырехканальным насосом

**Скорость потока:** 1,0 мл/мин

**Температура:** комнатная

**Детектор:** УФ, 220 нм

**Вводимый объем:** 5 мкл

**Проба:** поликлональный IgG

**Подвижная фаза:** 150-мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,0

### МИН

Порядок элюирования обычно связан с молекулярной массой. Первыми элюируются молекулы с самой высокой молекулярной массой. Однако в действительности механизм эксклюзионной хроматографии основан на различии размеров молекул в растворе. Большинство белков имеют компактную форму молекул, но некоторые из них имеют цилиндрическую форму и вследствие этого больший гидродинамический радиус в растворе и поэтому элюируются раньше, чем ожидается (рис. 3). Более того, различные подвижные фазы могут способствовать изменению формы молекул в растворе (гидродинамического радиуса или радиуса инерции), что приводит к изменению порядка элюирования.

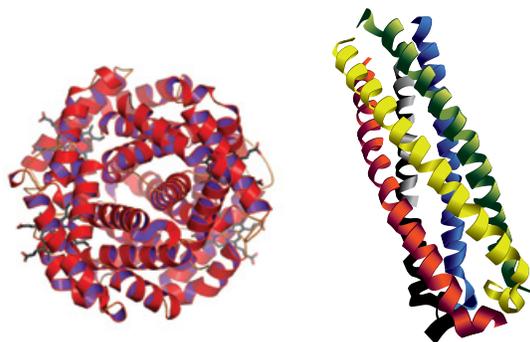


Рис. 3. Сравнение компактной и цилиндрической формы глобулярного белка

# Руководство по разработке методов ЭХ с УФ-детектором или детектором на диодной матрице

Выберите начальные условия и колонки для разделения по методу ЭХ биомолекул, агрегатов, пептидов, полипептидов и белков

Пептиды, полипептиды, белки, моноклональные антитела  
Молек. масса > 0,1–1 250 кДа

Пептиды, полипептиды, белки, моноклональные антитела  
Молек. масса > 0,1–10 000 кДа

Выберите колонку в зависимости от молекулярного веса и размера пор

## AdvanceBio SEC (2,7 мкм)

Размер пор	Диапазон молек. масс (кДа)
130Å	0,1–100
300Å	5–1 250

## Agilent Bio SEC-5 (5 мкм)

Размер пор	Диапазон молек. масс (кДа)
100Å	0,1–100
150Å	0,5–150
300Å	5–1 250
500Å	15–5 000
1 000Å	50–7 500
2 000Å	>10 000

## Рекомендованные начальные условия разделения

**Колонка:** AdvanceBio SEC или Agilent Bio SEC-5  
**Подвижная фаза:** 150-мМ фосфатный буфер, рН 7,0\*  
**Градиент:** изократический режим в диапазоне 10–30 мин  
**Температура:** рекомендовано: 10–30 °С, Максимально: 80 °С

**Скорость потока:** 0,1–0,4 мл/мин для колонок с внутренним диаметром 4,6 мм  
0,1–1,25 мл/мин для колонок с внутренним диаметром 7,8 мм

**Размер пробы:** ≤ 5% от общего объема колонки

\* Возможно использование других водных буферных растворов с высоким и низким содержанием солей.

Дополнительную информацию см. в рекомендациях по применению: *Определение оптимальных условий для эффективного разделения белков методом эксклюзионной хроматографии* (№ публикации 5990-8895EN) [www.agilent.com/chem/library](http://www.agilent.com/chem/library)

После получения первоначальных хроматограмм могут понадобиться дополнительные изменения параметров для улучшения разделения, поддержания растворимости белка или снижения взаимодействия пробы с хроматографическим наполнителем. Для достижения оптимального разделения ионная сила подвижной фазы может быть усилена или ослаблена. Также возможна корректировка рН в пределах ±0,2. Для дальнейшей оптимизации необходимо расширить эти пределы. Также возможно изменение температуры или добавление органического растворителя.

## В случае работы по протоколам, требующим использование дополнительного солевого содержания, обычно применяют следующие буферные растворы:

100–150 мМ хлорида натрия в 50 мМ натрий-фосфатного раствора, рН 7,0;  
100–150 мМ сульфата натрия в 50 мМ натрий-фосфатного раствора, рН 7,0;  
50–100 мМ мочевины в 50 мМ натрий-фосфатного раствора, рН 7,0.  
Также возможно использовать другие похожие соли (например, KCl) и гидрохлорид гуанидина.

**Диапазон рН:** 2,0–8,5

**Дополнительно возможно использовать органические растворители:**  
5–10%-й этанол (или другие похожие растворители, такие как метанол или ацетонитрил) в 50 мМ натрий-фосфатного раствора, рН 7,0; 5%-й диметилсульфоксид в 50 мМ натрий-фосфатного

раствора, рН 7,0. Обратите внимание, что при использовании более вязких подвижных фаз для поддержания давления ниже максимального может потребоваться снижение скорости потока.

## Температура:

Обычно разделение происходит при 10–30 °С. Для улучшения разрешения и степени извлечения белков и гидрофобных пептидов может потребоваться более высокая температура. Для поддержания максимальной биологической активности белков, чувствительных к изменению температуры, анализы по методу эксклюзионной хроматографии можно проводить в прохладном помещении.

Максимальная рабочая температура колонки Agilent Bio SEC 80 °С. Обратите внимание, что при более высокой температуре возможна денатурация белков.

# РАССМОТРЕНИЕ ПРИБОРОВ ДЛЯ ЭКСКЛЮЗИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

При проведении анализа по методу эксклюзионной хроматографии чрезвычайно важным показателем является объем элюции (или время удерживания). Для этого требуются высокоэффективные приборы, которые обеспечивают точность и воспроизводимость данных. Возможно использовать изократический насос или градиентный насос в изократическом режиме, а также рефрактометры и более распространенные УФ-детекторы или детекторы на диодной матрице. Для обеспечения стабильности базовой линии, особенно при использовании рефрактометра, настоятельно рекомендуется постоянная дегазация подвижной фазы и использование термостата колонок. Повышение рабочей температуры увеличивает коэффициент диффузии, что, в свою очередь, улучшает разрешение и воспроизводимость, а также снижает воздействие на колонку. По этой причине для высокой эффективности системы необходим термостат колонок.

## Устойчивость и надежность работы независимо от используемого растворителя

Для анализа биомолекул часто используются буферные растворы с высоким содержанием солей, такие как 2-М р-р NaCl или 8-М р-р мочевины и pH в широком диапазоне от 1 до 13, что значительно осложняет использование приборов ВЭЖХ. Благодаря специальной конструкции система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-inert с четырехканальным насосом легко подстраивается для работы с различными растворителями. Чрезвычайная надежность прибора достигается благодаря системе подачи растворителя из коррозионно-стойкого титана с капиллярами, по которым проходит анализ из неметаллических материалов, что позволяет защищать не только пробу, но и ваши инвестиции. Детектор также разработан специально для разделения биомолекул. Его работа не влияет на анализ белков, форму пика и степень извлечения определяемого вещества.

## Защита белков во время анализа

Поскольку нагрев может вызвать денатурацию белков, важно поддерживать постоянную температуру во всей системе ВЭЖХ. Биоинертный автосамплер Agilent с петлей для пробы из инертного материала и керамической иглой может быть охлажден с помощью дополнительного термостата. Биоинертные теплообменники термостата поддерживают постоянную температуру. Для обеспечения надежности анализа белков в разных условиях Agilent предлагает набор биоинертных проточных кювет. Узнать подробнее о вариантах проточных кювет [www.agilent.com/chem/bioflowcells](http://www.agilent.com/chem/bioflowcells).



Система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-inert с четырехканальным насосом



Биоинертная проточная кювета с маркером RFID, 10 мм, 13 мкл (кат. № G5615-60022)

## Расширение возможностей благодаря набору программных решений

Программное обеспечение для эксклюзионной хроматографии:

- **ПО для ВЭЖХ:** ПО Agilent OpenLAB CDS ChemStation для сбора, просмотра и изложения хроматографических данных, а также проведения количественного анализа;
- **ПО для ГПХ:** доступно в виде части ГПХ системы Agilent, содержит дополнительную информацию на основе данных молекулярной массы;
- **ПО Agilent Buffer Advisor:** при помощи быстрого и удобного построения градиента pH и солевого содержания позволяет устранить лишние и ошибочные действия во время разработки методики по приготовлению буферного раствора, смешиванию буферов и подбору pH.



## Комплексная характеристика молекул

Метод эксклюзионной хроматографии возможно использовать для определения средней молекулярной массы полимерных аналитов, включая природные вещества (полисахариды, крахмалы и др.) и синтетические полимеры (полиэтиленгликоль или оксид полиэтилена) (рис. 4).

Для исследования белков или более сложных проб, включая вакцины, часто требуется специальное ПО, позволяющее получать специализированные данные анализа. В сочетании с соответствующими детекторами можно получить ценную информацию о структуре веществ в пробе. Информацию о выборе детектора см. на стр. 17.

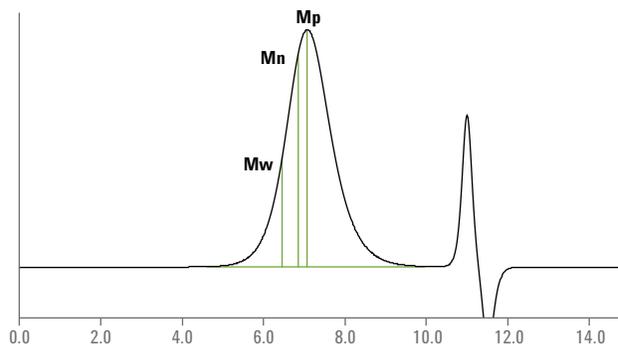
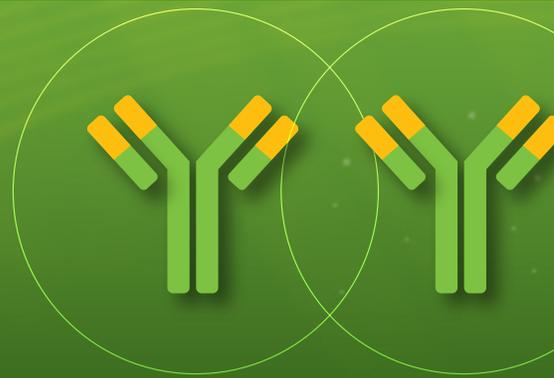


Рис. 4. Эксклюзионная хроматография полисахарида с получением значений Mw, Mn и Mp

# КОМПОНЕНТЫ ХАРАКТЕРИЗАЦИИ ПО МЕТОДУ ЭКСКЛЮЗИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ



## Пробоподготовка

Пробоподготовка для эксклюзионной хроматографии такая же, как для ВЭЖХ белков. Наиболее важным аспектом является растворимость пробы в элюенте и в подвижной фазе. По сравнению с другими видами ВЭЖХ вследствие больших размеров колонки и низкой линейной скорости из-за относительно низких скоростей потока (см. ниже Размер колонки) может понадобиться увеличение концентрации проб и объемов вводов. Для защиты колонки от разрушения рекомендуется фильтровать или центрифугировать пробы перед анализом, чтобы удалить из них микрочастицы. Однако для проб с низкой растворимостью фильтрация не подходит. Для таких проб необходимо подобрать другой растворитель.

Качественная пробоподготовка предполагает проверку того, что при растворении пробы по выбранной методике не изменяются ее свойства. В условиях различного воздействия некоторые белки могут агрегировать (образовывать димеры или мультимеры с более высокой молекулярной массой) или распадаться (образовывать элементы с более низкой молекулярной массой). Такие воздействия могут включать замораживание и оттаивание, экстремальные температуры, ультразвук или даже изменение концентрации. Подробнее о разработке методов см. руководство на стр. 5.

## Cartiva-фильтры с низким связыванием белка

Независимо от способа выбранной пробоподготовки хорошей практикой является фильтрование пробы с помощью фильтра с низким связыванием белка.

Фильтры из ПЭС Agilent обеспечивают превосходную фильтрацию растворов, содержащих белок, при этом связывание белка остается неизменно низким. Для большинства анализов ВЭЖХ фильтрующие мембраны из ПЭС предпочтительнее, чем мембраны из ПВДФ. Фильтры из ПЭС Agilent совместимы с фильтрами из ПВДФ, которые используются с общепринятыми растворителями ВЭЖХ, и дают превосходные результаты по связыванию белка и уровню чистоты. Узнать подробнее [www.agilent.com/chem/filtration](http://www.agilent.com/chem/filtration)



## Фильтры из ПЭС Cartiva

Диаметр (мм)	Размер пор (мкм)	Сертификация	Корпус	Кат. номер
4	0,45	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5095
4	0,2	ЖХ-МС	Полипропилен	5190-5094
15	0,2	ЖХ-МС	Полипропилен	5190-5096
15	0,45	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5097
25	0,2	ЖХ-МС	Полипропилен	5190-5098
25	0,45	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5099

## Выбор колонки

### Размер колонки

Колонки для эксклюзионной хроматографии, как правило, имеют больший размер, чем колонки для других видов хроматографии, и используются при сравнительно низких скоростях потока или низких линейных скоростях. Стандартные размеры колонок для эксклюзионной хроматографии 7,8 x 300 мм, скорость потока 1,0 мл/мин, размеры обращенно-фазных колонок 2,1 x 150 мм или 4,6 x 150 мм, а линейные скорости в 2–3 раза выше, чем у колонок для ЭХ. Разница параметров колонок вызвана особенностями протекания процесса эксклюзионной хроматографии.

В эксклюзионной хроматографии концентрация в пробах не увеличивается, в отличие от других методов хроматографии, в которых возможна абсорбция или взаимодействия с неподвижной фазой. По этой причине объем проб, исследуемых по методу эксклюзионной хроматографии, гораздо больше (5–20 мкл), а концентрация часто высокая (1–4 мг/мл). Время анализа обычно составляет 10–12 мин на колонку (для обычной колонки 7,8 x 300 мм со скоростью потока 1,0 мл/мин) и пики обычно широкие, поэтому нет необходимости в высокой скорости сбора данных. Для сравнения или количественного определения агрегации белков используется ПО для ВЭЖХ. Для получения информации о распределении молекулярной массы полидисперсных полимеров используется специальное ПО для эксклюзионной хроматографии.

Регулярно проводя калибровку выбранной колонки, очень важно знать ее свойства. Используя достаточно крупные молекулы, которые не могут проникнуть ни в какие поры материала, можно определить эксклюзионный предел колонки. Таким же образом, используя молекулы малого размера, которые способны заполнить все поры материала, возможно определить общий предел проникания колонки. Затем следует удостовериться, что необходимый уровень разделения находится в этих пределах. Если после получения хроматограммы пробы полученные данные не входят в ранее определенные пределы, это говорит о том, что для данного анализа, возможно, необходимо использовать колонку с другим размером пор.



### Увеличение скорости анализа

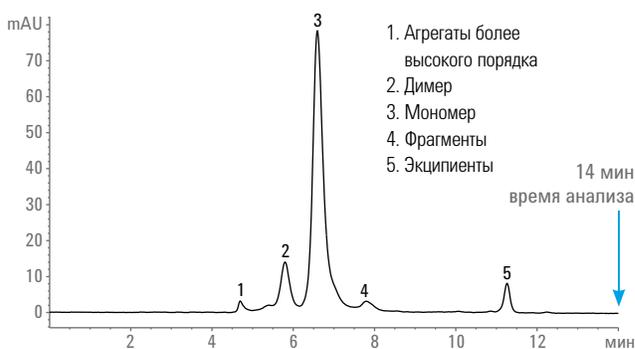
#### с использованием более коротких колонок

Обычно для получения необходимого уровня разрешения используются колонки длиной 300 мм. Однако, для ускорения разделения следует рассмотреть применение более коротких колонок. При использовании колонки длиной 150 мм разделение может быть выполнено в два раза быстрее, но при этом понизится разрешение. Если необходима высокая производительность, время анализа можно сократить за счет применения коротких колонок, используемых при более высоких скоростях потока, без риска достижения пределов обратного давления. См. рис. 5.

Колонка: **AdvanceBio SEC, 7,8 x 300 мм**

Скорость потока: 1,0 мл/мин

Проба: поликлональный IgG



Колонка: **AdvanceBio SEC, 7,8 x 150 мм**

Скорость потока: 2,0 мл/мин

Проба: поликлональный IgG

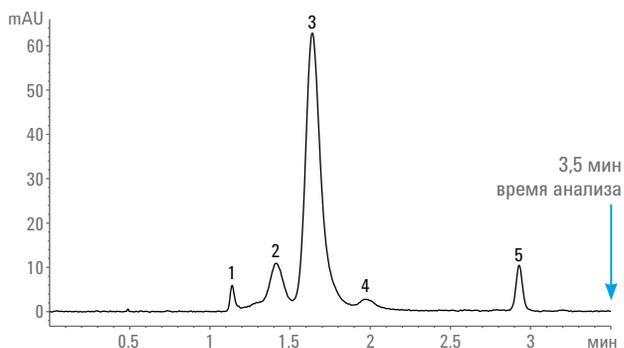


Рис. 5. Сравнение хроматограмм, полученных при использовании колонок длиной 150 и 300 мм, демонстрирующее сокращение времени анализа

## Выбор колонки

Выбор колонки зависит от типа и размеров молекул пробы, а также ее растворимости в используемых подвижных фазах — воде, буферных растворах или органических растворителях. Колонки с сорбентом на полимерной основе часто используются для анализа полимерных молекул с широким распределением молекулярной массы, таких как гепарин, крахмал или целлюлоза. Для белков и молекул с дискретным строением наиболее подходящими являются неподвижные фазы на основе силикагеля (табл. 1).

Важно помнить, что белки содержат большое количество аминокислот, имеющих различные функциональные группы: кислотные, основные, гидрофобные и нейтральные/гидрофильные. Для исключения взаимодействия пробы с материалом колонки на основе силикагеля подвижная фаза должна содержать буферный раствор.

У всех колонок Agilent есть рекомендованный диапазон молекулярных масс. В идеале, определяемые молекулярные массы должны находиться в середине рабочего диапазона выбранной колонки.

## Эксклюзионная хроматография (SEC)

Область применения	Колонки Agilent	Примечания
<b>Белки</b>		
Эксклюзионная хроматография моноклональных антител, белков и пептидов с УФ-детектором/детектором на диодной матрице или светорассеивающем детекторе	Agilent AdvanceBio SEC	В новейшей инновационной технологии благодаря высокому разрешению исключаются повторные анализы проб, высокая скорость позволяет снизить время анализа, а в результате повышается производительность лаборатории
ЭХ-МС-анализ моноклональных антител, белков и пептидов	Agilent Bio SEC-3	Обеспечивает стабильность базовой линии при МС-детектировании
Крупные биомолекулы и пробы, содержащие компоненты с разной молекулярной массой	Agilent Bio SEC-5	Большой выбор материалов-наполнителей (размер пор 100Å, 150Å, 300Å, 500Å, 1 000Å и 2 000Å) для анализа широкого диапазона аналитов
Глобулярные белки, антитела	ProSEC 300S	Единственная колонка для анализа белков в высокосолевых условиях
Белки, глобулярные белки	ZORBAX GF-250/450	Традиционные продукты, которые необходимо использовать, если в протоколах требуется применять указание L35 Фарм США
<b>Водорастворимые аналиты</b>		
Полимеры с низкой молекулярной массой и олигомеры, олигосахариды, полиэтиленгликоли, лигносульфонаты	2 или 3 PL aquagel-OH ✓ PL aquagel-OH 8 мкм ✓ PL aquagel-OH 20 5 мкм ✓ PL aquagel-OH MIXED-M 8 мкм	Аналитическая серия PL aquagel-OH характеризуется диапазоном pH 2–10, совместимостью с органическим растворителем (до 50% метанола), механической стабильностью при давлении до 140 бар (2 030 psi) и низким рабочим давлением в колонке
Полидисперсные биополимеры, полисахариды, производные целлюлозы	2 или 3 PL aquagel-OH ✓ PL aquagel-OH MIXED-H 8 мкм ✓ PL aquagel-OH 60/50/40 8 мкм	
Полимеры с очень большой молекулярной массой, гиалуроновые кислоты, крахмалы, смолы	PL aquagel-OH 60/50/40 15 мкм последовательно	

Таблица 1. Выбор колонки в зависимости от применения и размера молекул пробы



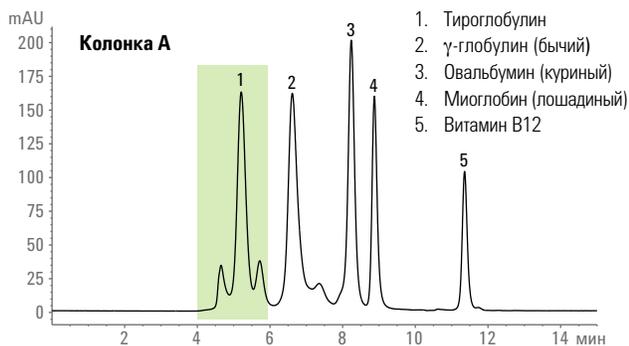
Колонки Agilent Bio SEC для разделения биомолекул (включая агрегацию белков) и колонки Agilent ГПХ для анализа природных полимеров (включая определение молекулярной массы полисахарида)

## Размер пор

Поскольку молекулы белков по сравнению с другими биомолекулами меньше и компактнее, для начала можно выбрать колонку с размером пор 300Å. Для сравнения на рис. 6 представлены хроматограммы эталонной стандартной смеси пяти белков и пробы поликлонального IgG, полученные при

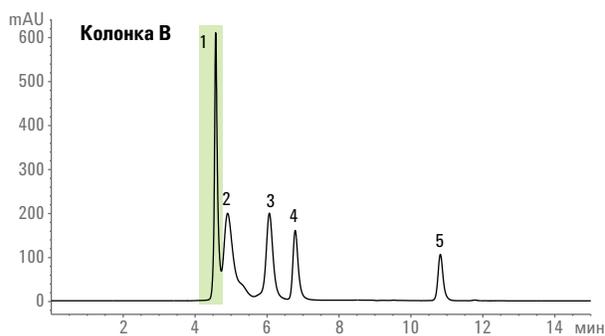
использовании колонок с разным размером пор наполнителя. На хроматограммах отчетливо видно, что размер пор влияет на разрешение. При размере пор 300Å самый крупный белок тироглобулин и димер IgG разделяются, но если размер пор меньше, самые крупные белки в них не проникают и разделения не происходит.

### Стандартная смесь для гель-фильтрации BioRad



**Колонка А:** AdvanceBio SEC 300Å  
4,6 x 300 мм, 2,7 мкм (кат. № PL1580-5301)

**Колонка В:** AdvanceBio SEC 130Å  
4,6 x 300 мм, 2,7 мкм (кат. № PL1580-5350)



Прибор: система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-inert с четырехканальным насосом

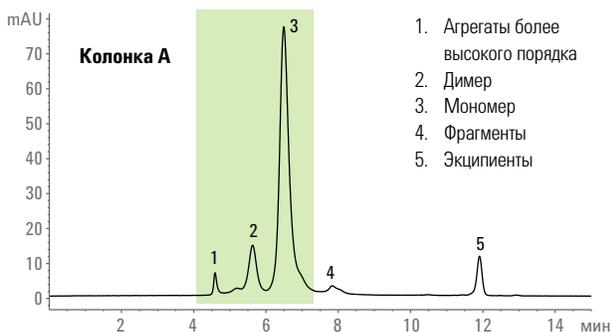
Подвижная фаза: 150-мМ фосфатный буфер, рН 7,0

Скорость потока: 0,35 мл/мин

Детектор: УФ, 220 нм

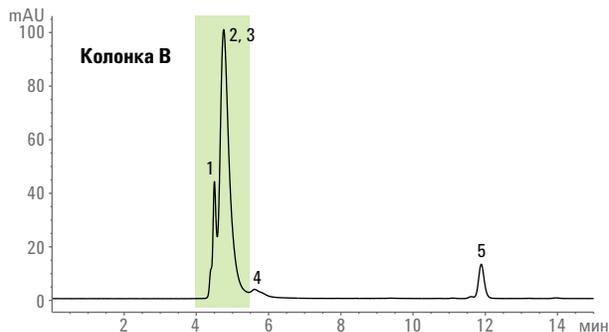
Проба: Стандартная смесь для гель-фильтрации BioRad

### Разделение поликлональных IgG



**Колонка А:** AdvanceBio SEC 300Å  
4,6 x 300 мм, 2,7 мкм (кат. № PL1580-5301)

**Колонка В:** AdvanceBio SEC 130Å  
4,6 x 300 мм, 2,7 мкм (кат. № PL1580-5350)



Прибор: система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-inert с четырехканальным насосом

Подвижная фаза: 150-мМ фосфатный буфер, рН 7,0

Скорость потока: 0,35 мл/мин

Детектор: УФ, 220 нм

Проба: поликлональный IgG

**Рис. 6.** Влияние размера пор на разрешение. Хроматограммы стандарта для гель-фильтрации BioRad и поликлонального IgG. Характер участков хроматограммы, выделенных зеленым цветом, свидетельствует о разном разрешении при использовании материала с разным размером пор. Для анализа более крупных белков необходимо использовать материал с более крупными порами

## Определение области проникания ЭХ

Важно понимать, что в процессе эксклюзионно-хроматографического разделения белков растворенные вещества разделяются в зависимости от их размера, а не от их молекулярной массы. Это ясно видно при сравнении трех калибровочных кривых: белки/пептиды, пуллулан/полисахарид и полиэтиленгликоль/полиэтиленоксид, показанных на рис. 7. Калибровочные кривые пуллулана/полисахарида и полиэтиленгликоля/полиэтиленоксида похожи, а кривая белков/пептидов смещена и имеет другую форму.

Белки состоят из набора полипептидных цепей, которые образуют трехмерную структуру. Параметры окружающей среды, такие как pH и ионная сила раствора, влияют на эти структуры. Под воздействием цепи принимают «удобную» для них форму, поэтому их размер и структура могут отличаться.

Чтобы убедиться, что время элюирования в большей степени зависит от размера, а не от молекулярного веса, определите времена удерживания калибровочных стандартов с молекулярной массой примерно 50 000, которые значительно различаются (рис. 8). Полиэтиленгликоль элюируется сразу после 7 минут, полисахарид элюируется сразу после 7,5 минуты, а белок элюируется примерно на 9,5 минуты.

Этот пример наглядно демонстрирует то, что разделение по методу ЭХ основано не на значении молекулярной массы, а на действительном размере разделяемых молекул. По этой причине при использовании калибровочных кривых важно определить, по каким калибровочным стандартам они построены. Например, есть основание полагать, что интересующая проба имеет молекулярную массу 50 000, эквивалентную пуллулану/полисахариду. На стр. 16 описаны высокоточные детекторы, использование которых позволяет снизить влияние описанного выше эффекта.

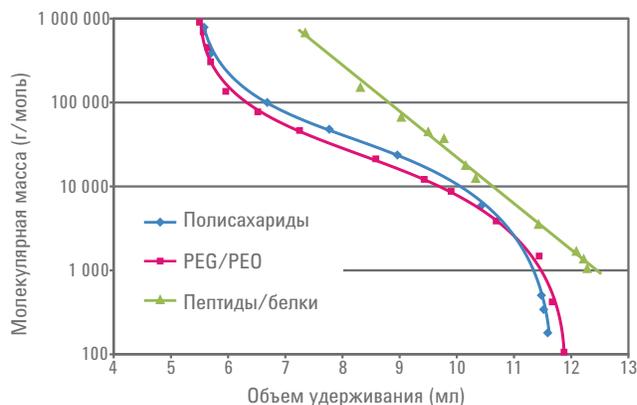


Рис. 7. Сравнение калибровочных кривых, построенных по трем калибровочным стандартам

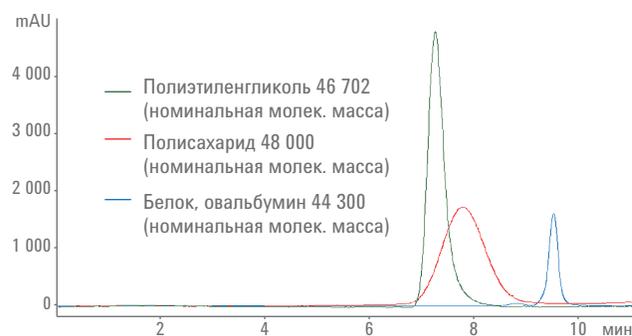


Рис. 8. Наложение хроматограмм, полученных для калибровочных стандартов с близкой молекулярной массой



### Калибровочный стандарт AdvanceBio SEC 130Å (кат. № 5190-9416 130Å AdvanceBio SEC калибровочный стандарт, флакон 2 мл)

Данная смесь, состоящая из пяти тщательно отобранных белков (овальбумин, миоглобин, апротинин, нейротензин, ангиотензин II), разработана для калибровки колонок для эксклюзионной хроматографии Agilent AdvanceBio 130Å. Данный калибровочный стандарт подходит для регулярной калибровки колонки и обеспечивает превосходную производительность для различных вариантов применения, включая очистку белков и выполнение анализов.

### Калибровочный стандарт AdvanceBio SEC 300Å (кат. № 5190-9417 300Å AdvanceBio SEC калибровочный стандарт, флакон 2 мл)

Данная смесь, состоящая из пяти тщательно отобранных белков (тиреоглобулин,  $\gamma$ -глобулин, овальбумин, миоглобин, ангиотензин II), разработана для калибровки колонок для эксклюзионной хроматографии Agilent AdvanceBio 300Å. Данный калибровочный стандарт подходит для регулярной калибровки колонки и обеспечивает превосходную производительность для различных вариантов применения, включая очистку белков и выполнение анализов.

## Размер частиц

При выборе колонки также важно обратить внимание на размер пор. Использование материала с меньшим размером пор обеспечивает более эффективное разделение, но есть риск деградации белка (распада на фрагменты или деформации). На рис. 9 представлено сравнение хроматограмм при использовании колонок Agilent Bio SEC-3 3 мкм и Agilent Bio

SEC-5 5 мкм. Без тщательной подготовки пробы и растворителей возникает большой риск увеличения обратного давления и блокирования колонки. Для удаления нерастворимых веществ и загрязнений рекомендуется фильтровать растворы. Также для продления срока службы колонки можно использовать предколонку или поточный фильтр.

## Сравнение Agilent Bio SEC-3 и Agilent Bio SEC-5

### Анализ моноклональных антител (mAb)

Колонка: **Bio SEC-3, 300Å**  
**7,8 x 300 мм, 3 мкм**  
(кат. № 5190-2511)

Колонка: **Bio SEC-5, 300Å**  
**7,8 x 300 мм, 5 мкм**  
(кат. № 5190-2526)

Прибор: система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity  
Bio-inert с четырехканальным насосом

Подвижная фаза: 150 - mM натрий-фосфатный буфер,  
pH 7

Скорость потока: 1 мл/мин

Детектор: УФ, 220 нм

Проба: гуманизированные моноклональные  
антитела

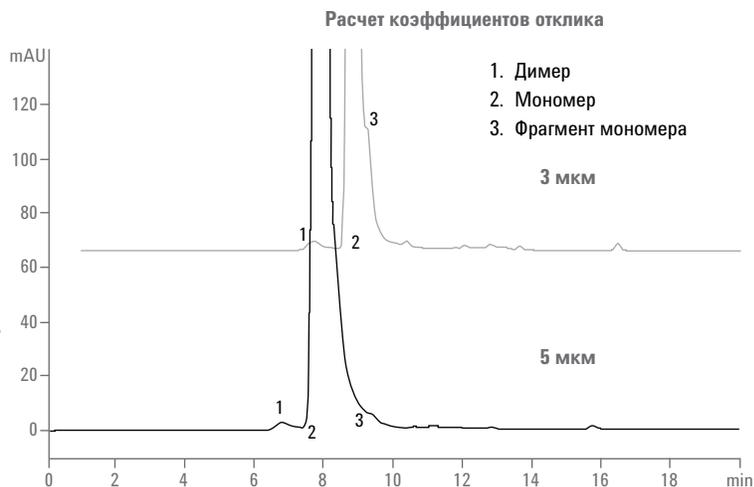


Рис. 9. Сравнение колонок Agilent Bio SEC-3 и Agilent Bio SEC-5. Колонка с размером пор 3 мкм обеспечивает лучшее разделение

## Диаметр колонки

В зависимости от количества пробы диаметр колонки может иметь большое значение. Если в распоряжении имеется ограниченное количество материала, лучше использовать колонки с внутренним диаметром 4,6 мм (скорость потока 0,35 мл/мин). Но при использовании колонки меньшего диаметра важно сократить рабочие объемы системы до минимума, чтобы предотвратить избыточную дисперсию и снижение разрешения.

Поскольку ЭХ с водными растворителями считается неразрушающим методом, она идеально подходит для разделения на фракции сложных проб или для выделения компонентов проб для дальнейшего анализа. В случае использования колонок большего диаметра (например, колонки длиной 21,2 мм в линейке продуктов Agilent SEC-3 и SEC-5) пробоподготовка можно проводить с помощью лабораторных систем ВЭЖХ.



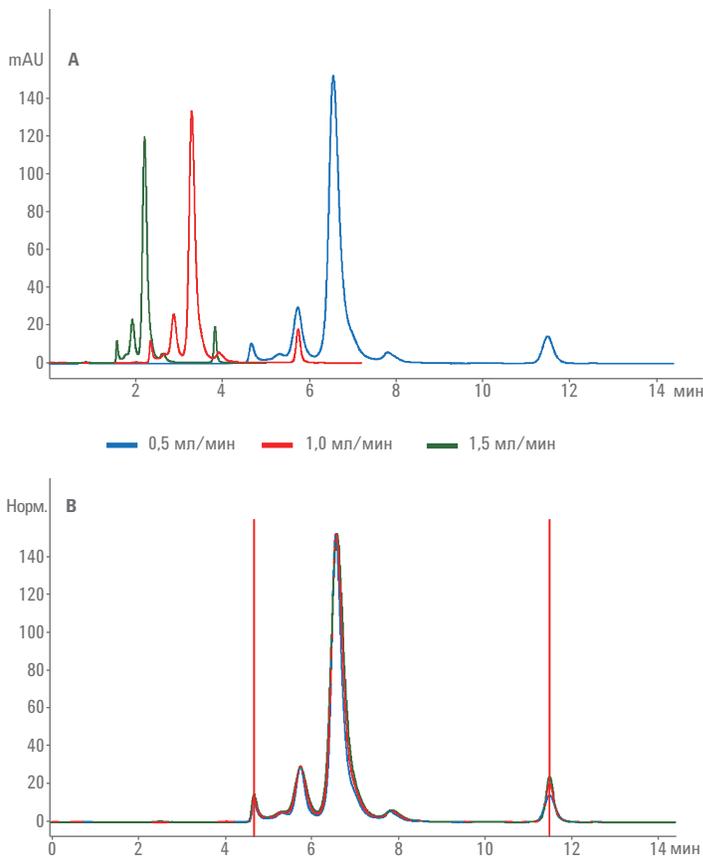
Колонки Agilent AdvanceBio SEC 7,8 x 300 мм и 4,6 x 300 мм

## Параметры метода

### Скорость потока

Скорость анализа очень важна для некоторых вариантов применения. Более короткие колонки длиной 150 мм (длина традиционных колонок—300 мм) могут быть использованы для снижения времени анализа или увеличения скорости потока, или и того, и другого одновременно. Однако это может снизить разрешение, так как ЭХ основана на проникновении молекул в поры и выход из пор, в результате чего оптические пути через колонку имеют различные длины. Данные рис. 10 демонстрируют, что, несмотря на это, при использовании колонки длиной 150 мм и скорости потока 2 мл/мин за 4 мин возможно получить достаточный уровень разрешения для количественного определения мономеров и димеров IgG.

<b>Колонка:</b>	<b>AdvanceBio SEC 300Å 7,8 x 150 мм, 2,7 мкм (кат. № PL1180-3301)</b>
Растворитель:	150-мМ фосфатный буфер, рН 7,0
Скорость потока:	0,5; 1,0; 1,5 мл/мин (52, 102, 152 бар)
Детектор:	УФ, 220 нм
Вводимый объем:	5 мкл
Проба:	IgG (2 мг/мл)



**Рис. 10.** Сокращение времени анализа с 12 до 4 минут за счет увеличения скорости потока (А). При нормализации и совмещении времен удерживания отчетливо видно, что времена удерживания совместимы, а снижение разрешения минимальное

## Возможные проблемы при использовании метода ЭХ

Проблема	Источник	Решение
Степень извлечения ниже ожидаемой или наблюдается уширение пика	Гидрофобные аналиты	Добавьте в подвижную фазу небольшое количество (10–20%) органического модификатора (ацетонитрила или метанола)
Появление лишних пиков (в зависимости от молекулярной массы) и хвостов у пиков	Взаимодействие между ионами или основными белками	Увеличьте ионную силу раствора за счет увеличения солесодержания в интервале от 50 до 100 мМ; добавьте фосфатный буфер
Слабые пики	Нехарактерная адсорбция	Увеличьте солесодержание или попробуйте использовать систему ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-inert с четырехканальным насосом
Слабое удерживание/разрешение аналитов	Размер пор не подходит для данного размера молекул	Проверьте размер пор выбранной колонки, подробнее см. стр. 11

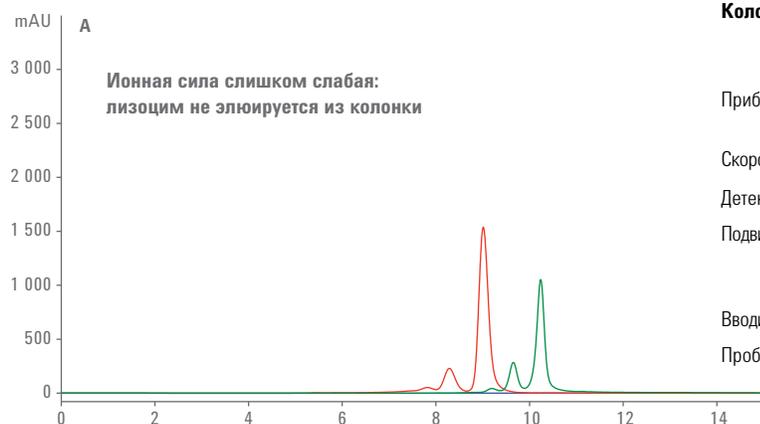
## Выбор подвижной фазы

### Сложности, вызванные вторичными взаимодействиями

Для исключения нежелательных вторичных взаимодействий может понадобиться оптимизация метода. Такие взаимодействия могут стать причиной более позднего элюирования аналита и образования элементов с более низкой молекулярной массой.

Для исключения этих взаимодействий необходимо незначительное изменение состава подвижной фазы: корректировка pH,

изменение ионной силы раствора или добавление органических модификаторов (рис. 11). Для достижения желаемого уровня разделения необходимо пересмотреть выбор размера пор, объединить колонки в серии, снизить скорость потока или изменить рабочую температуру анализа.



**Колонка:** Agilent Bio SEC-3, 300Å  
4,6 мм x 300 мм, 3 мкм  
(кат. № 5190-2513)

**Прибор:** система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-inert с четырехканальным насосом

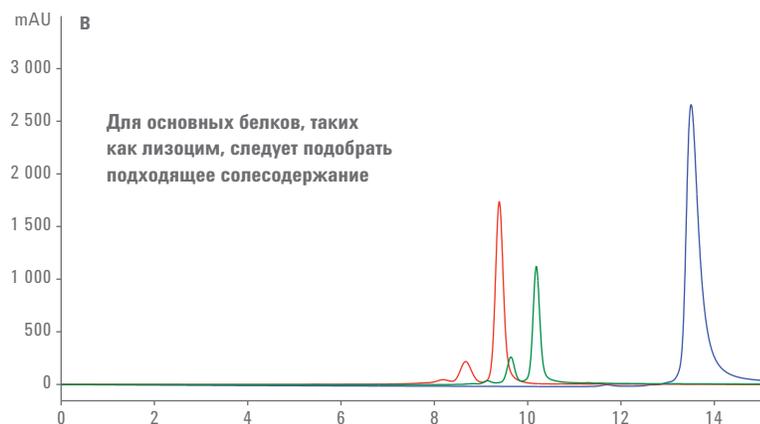
**Скорость потока:** 0,35 мл/мин

**Детектор:** УФ, 220 нм

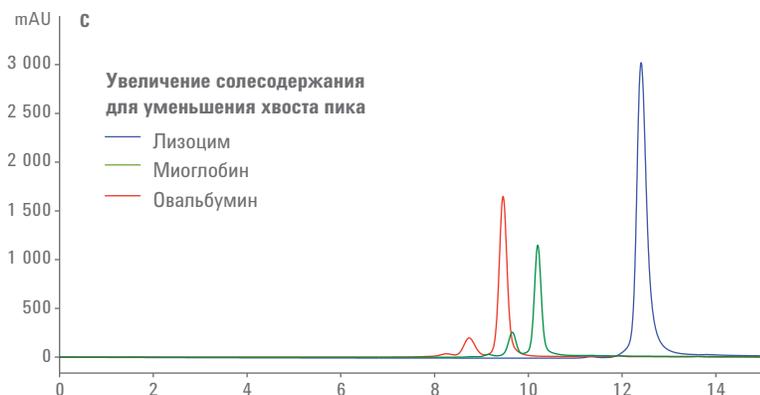
**Подвижная фаза:** А: Растворитель 20-мМ фосфатный буфер, pH 7 + 50 мМ NaCl  
В: Растворитель 20-мМ фосфатный буфер, pH 7 + 100 мМ NaCl  
С: Растворитель 20-мМ фосфатный буфер, pH 7 + 400 мМ NaCl

**Вводимый объем:** 5 мкл

**Проба:** белок (1 мг/мл 20-мМ фосфатный буфер, pH 7)



**50 мМ NaCl в 20 мМ буферного раствора**



**400 мМ NaCl в 20 мМ буферного раствора**

Рис. 11. Влияние слишком сильной и слишком слабой ионных си раствора на достижение необходимого разделения

## Калибровка

После выбора колонки необходимо провести ее калибровку по калибровочным стандартам с известной молекулярной массой. Каждый раз при смене колонки или замене подвижной фазы необходимо калибровать колонку. Калибровочная кривая — это график зависимости времени удерживания от молекулярной массы (рис. 12). Очень важно выбрать стандарты,

подходящие для исследуемых молекул. Для разделения белка используйте стандарты с молекулярной массой, соответствующей белку. Для разделения полисахаридов необходимо использовать стандарты с молекулярной массой, соответствующей пуллулану.

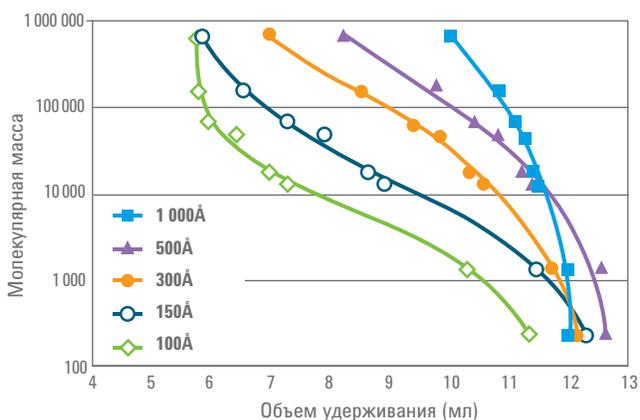
**Колонка:** Agilent Bio SEC-5  
7,8 x 300 мм, 5 мкм  
(кат. № 5190-2521)

**Прибор:** система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-inert с четырехканальным насосом

**Подвижная фаза:** 150 - мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,0

**Скорость потока:** 1,0 мл/мин

**Детектор:** УФ



Белки	MW	Объем удерживания				
		1 000Å	500Å	300Å	150Å	100Å
Тироглобулин	670 000	10,07	8,23	7,03	5,82	5,77
γ-глобулин	158 000	10,88	9,80	8,57	6,55	5,79
Площадь поверхности тела	67 000	11,13	10,44	9,44	7,29	6,00
Овальбумин	45 000	11,28	10,83	9,89	7,90	6,40
Миоглобин	17 000	11,44	11,28	10,42	8,66	7,05
Рибонуклеаза А	12 700	11,52	11,41	10,58	8,93	7,32
Витамин В12	1 350	12,00	12,59	11,78	11,49	10,30
Урацил	112	12,08	12,68	12,21	12,13	11,41

**Рис. 12.** Калибровочные кривые, изображающие зависимость времени удерживания от молекулярной массы

Теоретически стандарты должны растворяться в подвижной фазе; кроме этого, необходимо удостовериться, что проба полностью растворена. Если раствор непрозрачный, необходима его дополнительная обработка. Перед вводом пробы для удаления из нее нерастворимых веществ необходимо провести

фильтрацию или центрифугирование раствора. Однако такое физическое воздействие на молекулы пробы может изменить их молекулярную массу, поэтому для увеличения растворимости пробы может понадобиться изменение параметров подвижной фазы.



## Методики высокоточного детектирования

Теперь рассмотрим выбор детектора для ЭХ. Для разделения белков обычно используется УФ-детектор или детектор на диодной матрице (DAD).

Лучшие результаты (например, самая высокая чувствительность) при анализе пептидов и белков обычно получают при длине волны 220 нм. Если буферные растворы или органические модификаторы имеют слишком сильный фоновый шум при низких длинах волн, необходимо использовать длину волны 254 или 280 нм. Если молекулы не обладают хромофором, УФ-детектирование не подходит. Вместо УФ-детектора можно использовать рефрактометр, тогда анализы элюируются в изократическом режиме.

Использование специализированного детектора по светорассеянию повышает эффективность ЭХ. Благодаря статическому рассеянию света можно точно измерить молекулярную массу (независимо от калибровки колонок и нежелательных взаимодействий), а дополнительное динамическое рассеяние света позволяет определить молекулярный размер. Использование рассеяния света существенно увеличило чувствительность и позволило определять агрегацию при гораздо меньшем содержании агрегатов (рис. 13). Чтобы гарантировано получать эти данные без ущерба для эффективности хроматографического разделения, важно выбирать детектор с малым значением мертвого объема.

<b>Колонка:</b>	<b>Agilent AdvanceBio 300 Å, 7,8 x 300 мм, 2,7 мкм</b>
Прибор:	система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-inert с четырехканальным насосом и мультidetекторным блоком ГПХ Agilent 1260 Infinity MDS
Подвижная фаза:	150-мМ натрий-фосфатный буфер, рН 7,0
Скорость потока:	0,8 мл/мин
Температура:	30 °С
Детектор:	УФ, 280 нм + рефрактометр + светорассеивающий 90°
Вводимый объем:	5 мкл
Проба:	разложившиеся моноклональные антитела

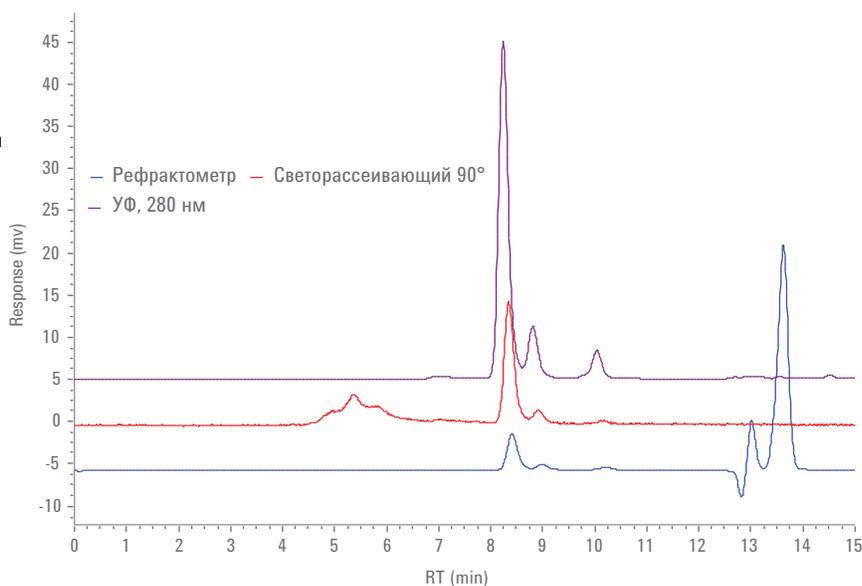
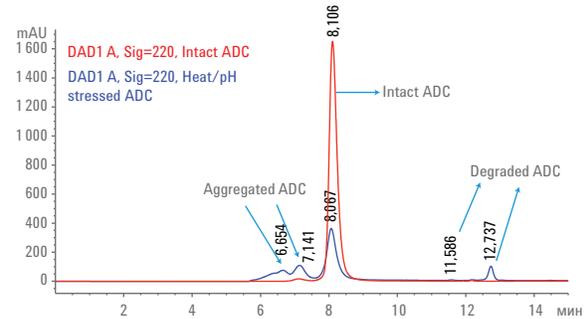
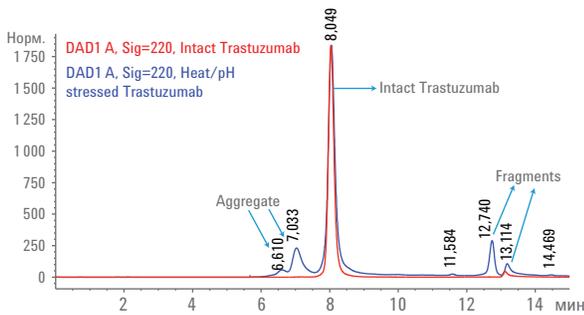


Рис. 13. Хроматограммы, полученные при разделении белка с использованием различных детекторов

## Конъюгированные белки

Терапевтические белки подвергаются агрегации и деградации на всех стадиях разработки: при биосинтезе, рефолдинге, производстве и выделении целевого продукта, приготовлении лекарственных форм, стерилизации и хранении. Хотя агрегаты и продукты деградации присутствуют в чрезвычайно низких концентрациях, они могут сильно повлиять на качество биологических процессов, вызывая снижение активности, уменьшение растворимости и усиление иммуногенных эффектов. Эксклюзионная хроматография — стандартный метод характеристики агрегации белков и подтверждения их соответствия нормативным требованиям.

Для облегчения транспортировки, увеличения времени полужизни и эффективности белки, содержащие моноклональные антитела, могут быть соединены. Водорастворимые полимеры, такие как полиэтиленгликоль, для усиления фармакологической активности, увеличения их времени полужизни в кровотоке и снижения иммуногенных эффектов объединяют с белками. В последнее время появился интерес к конъюгатам антител и лекарственных средств (ADC), в которых моноклональные антитела объединены с цитотоксическим средством, что придает медикаменту целевое действие и повышает эффективность лечения. После объединения требуются такие же исследования агрегатов, потому что изменение параметров пробы может значительно затруднить разделение по методу ЭХ. Для анализа антител и конъюгатов антител необходимо использовать колонки с очень низким уровнем неспецифического связывания, такие как AdvanceBio SEC, и водные подвижные фазы. См. рис. 14.



**Колонка:** AdvanceBio SEC 300Å  
7,8 x 300 мм, 2,7 мкм

**Прибор:** система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-inert с четырехканальным насосом

**Подвижная фаза:** фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), 50 мМ натрий-фосфатного раствора содержит 150 мМ хлорида натрия, pH 7,4

**Температура термостата колоночного отделения:** комнатная

**Объем вводимой пробы:** 10 мкл

**Скорость потока:** 0,8 мл/мин

**Детектор:** УФ, 220 нм

Рис. 14. Для анализа mAb и более гидрофобного конъюгата ADC была использована одна и та же подвижная фаза

### Узнайте, как получать лучшие результаты

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

С помощью системы выбора колонок и проведения пробоподготовки для ВЭЖХ Agilent NAVIGATOR вы сможете правильно выбрать колонку для конкретных задач из обширного перечня колонок для анализа биомолекул и колонок для анализа малых молекул.

В системе NAVIGATOR предусмотрен поиск по четырем параметрам:

- Поиск по каталожному номеру со ссылками на колонки для ВЭЖХ и продукты для пробоподготовки позволяет найти лучшие варианты от Agilent



- Поиск по названию соединения из раскрывающегося списка
- Поиск по методике ФармСША
- Поиск по наименованию колонки с получением рекомендаций в зависимости от выбранной методики

## Пробоподготовка

- Теоретически пробы должны растворяться в подвижной фазе.
- Если проба мутная, возможно, необходимо изменить параметры подвижной фазы.
- Для осветления проб можно использовать фильтрацию или центрифугирование, но такая обработка может повлиять на молекулярный вес молекул пробы.
- Для растворения пробы иногда используется небольшой нагрев, перемешивание или обработка ультразвуком, но такие операции следует использовать с осторожностью, т. к. они могут повлиять на молекулярный вес молекул пробы.
- Также необходима тщательная проверка того, что в процессе хранения пробы ее параметры не изменились.
- Для анализа необходимо использовать свежеприготовленные пробы, а сам анализ начинать как можно быстрее.
- В буферных растворах возможен быстрый рост бактерий.
- Концентрация в высококонцентрированных пробах со временем может изменяться; кроме того, возможно образование агрегатов и осадка.



## Выбор колонки

- Для обеспечения сохранения качества проб ЭХ проводится при низких скоростях потока с использованием длинных колонок.
- Обычно длина колонки составляет 250 или 300 мм.
- В случае использования колонки с внутренним диаметром 7,5 или 7,8 мм скорость потока обычно составляет 1,0 мл/мин, а в случае использования колонки с внутренним диаметром 4,6 мм — 0,35 мл/мин.
- Для увеличения разрешения при анализе биополимеров часто используют серии колонок.
- Для увеличения разрешения при анализе белков используют частицы меньшего размера.
- Время анализа возможно сократить при использовании колонок длиной 150 мм с частицами меньшего размера.

## Выбор наполнителя колонки

- Не должно быть неспецифического взаимодействия аналита с наполнителем колонки.
- Для анализа пептидов и белков используются сорбенты на основе силикагеля.
- Для анализа биополимеров используются сорбенты на основе полимеров.

## Параметры колонки

- **Размер пор:** выбирается в зависимости от диапазона молекулярных масс составляющих пробы. Правильный выбор размера пор позволяет избежать вытеснения компонентов пробы из пор и позволяет получить максимальное разделение в требуемой области.
- **Размер частиц:** для достижения более высокого разрешения используйте частицы меньшего размера (при этом обратное давление увеличится).
- **Длина колонки:** влияет на разрешение и скорость анализа; следует выбрать компромиссный вариант.
- **Внутренний диаметр колонки:** для сокращения расхода растворителя и объема ввода используйте колонки меньшего размера.



## Подвижная фаза

- Для подавления ионных реакций подвижная фаза должна содержать буфер или соль, однако их избыток может вызвать гидрофобные взаимодействия.
- Для предотвращения агрегации или образования продуктов деградации и т. п. не изменяйте аналит.
- Готовьте свежие подвижные фазы перед использованием, так как в разбавленных буферных растворах при комнатной температуре возможен быстрый рост бактерий.
- Срок хранения буферного раствора без охлаждения составляет менее семи дней.
- Для удаления микрочастиц из водных растворов (менее вероятно) и из солевых растворов (более вероятно) перед использованием проводите фильтрование.
- Использование фосфатных буферных растворов с высоким значением pH (особенно при повышенных температурах) может значительно снизить срок службы колонок с материалами на основе силикагеля.

Узнать подробнее о биоколонках для эксклюзионной хроматографии

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

## Совместная работа, приносящая превосходные результаты

Новые трудности требуют лучших решений. Наши решения позволяют ученым в области биофармацевтики совершать все новые открытия в исследовании заболеваний, ускорять процесс разработки новых лекарственных препаратов и иметь полную уверенность в процессе разработки и производства.

Узнайте о решениях Agilent для биофармакологии

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

Узнать подробнее

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

Поиск региональных центров по работе с клиентами компании Agilent в вашей стране

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

США и Канада

**1-800-227-9770**

**agilent\_inquiries@agilent.com**

Европа

**info\_agilent@agilent.com**

Азиатско-Тихоокеанский регион

**inquiry\_lsca@agilent.com**

Только для ознакомительных целей. Информация, описания и спецификации в настоящем документе могут быть изменены без предупреждения. Компания Agilent Technologies не несет ответственности за возможные ошибки в настоящем документе, а также за убытки, связанные или являющиеся следствием получения настоящего документа, ознакомления с ним и его использования.

© Agilent Technologies, Inc. 2015  
Напечатано в США 1 ноября 2015  
5991-3651RU

