

应用纪要

在UPLC、UHPLC和HPLC色谱系统上使用 BioResolve SEC mAb色谱柱对mAb聚集体、 单体和碎片进行高分离度体积排阻色谱分 离

Pamela C. Iraneta, Stephan M. Koza

Waters Corporation



仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

Waters BioResolve SEC mAb, 200 Å, 2.5 µm 色谱柱经过专门优化和质量测试，能够对单克隆抗体(mAb)聚集体、单体和碎片进行高分离度分离。利用mAb大小异构体标准品进行色谱柱性能认证，并指导研究人员选择合适的系统和色谱柱，使mAb大小异构体定量分析在实际应用中发挥稳定可靠的分离性能。在开发和检测mAb时，也可以考虑将该色谱柱用于蛋白质大小异构体（分子量范围大约在450 kDa至17 kDa之间）的SEC分离。

在UPLC、UHPLC和HPLC平台上，7.8 mm内径色谱柱可以大幅提升mAb单体（约150 kDa）与片段（约100 kDa）的分离效率。4.6 mm内径色谱柱虽然价格比7.8 mm内径色谱柱低，但两者在低扩散性UPLC系统上的分离性能相当，能够实现准确定量，对于要求较低的mAb聚集体与单体分离，在具有较高系统扩散性的UHPLC或HPLC色谱平台上也能表现相当的性能。

生产的每批BioResolve SEC mAb色谱柱均使用Waters NIST mAb大小异构体标准品（添加有IdeS酶解NIST mAb碎片）进行性能测试。所有色谱柱性能确认测试都在ACQUITY UPLC H-Class Bio系统上完成。本应用纪要将介绍在选择不同SEC色谱柱内径和柱长的条件下，液相色谱系统扩散体积对mAb分离的影响。

优势

- BioResolve SEC mAb色谱柱使用沃特世mAb大小异构体标准品进行单独的性能测试，有助于确保在mAb分析中的开箱即用性能
- 选择具有合适内径和柱长的色谱柱在UPLC、UHPLC和HPLC系统上实现高分离度分离
- 使用沃特世mAb大小异构体标准品进行单独的SEC色谱柱性能测试，让研究人员对获得高分离度以实现可靠的mAb大小异构体定量分析更有信心

简介

过去，使用水性流动相的体积排阻色谱法(SEC)在蛋白质聚集体及自缔合形态（高分子量物质，HMWS）的相对定量分析中已经占据重要地位，该方法有助于保障重组蛋白类生物治疗药物的安全性和有效性¹。近期，使用非变性SEC方法定量分析单克隆抗体(mAb)碎片（低分子量物质，LMWS）得到了越来越多的关注。碎裂原因似乎并非为酶解或宿主细胞蛋白质驱动，而是上部重链铰链区中动力学金属离子诱导的水解切割导致产生Fab片段（约50 kDa）、具有单个Fab结构域的Fc（Fab/c，约100 kDa）以及两个Fab结构域均水解时的低含量Fc片段²。

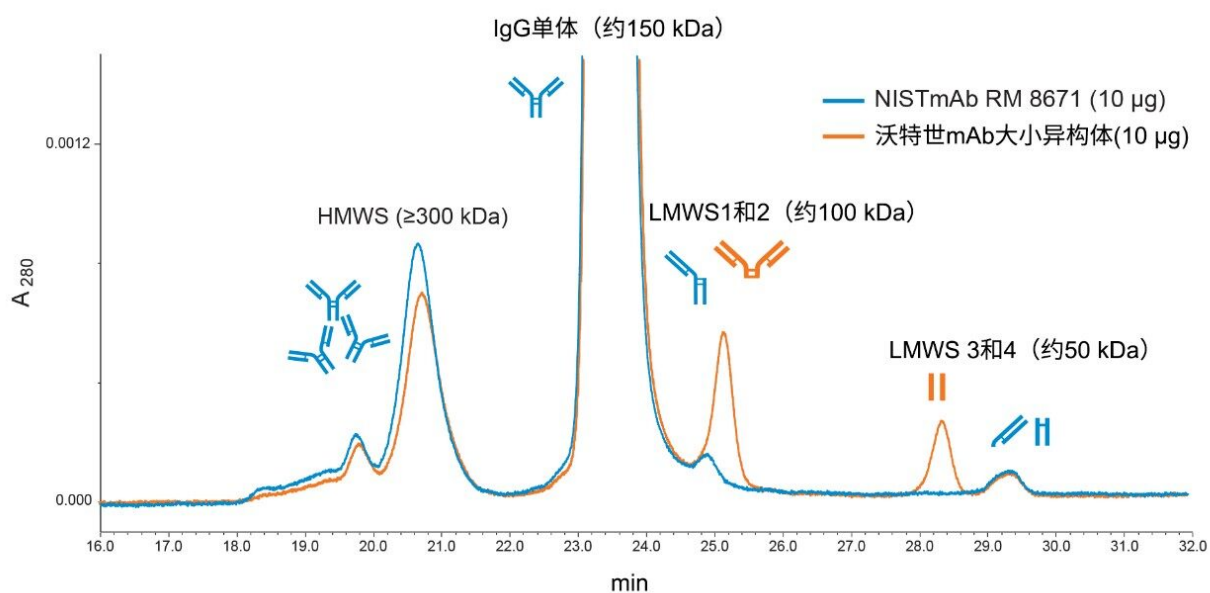


图1.使用BioResolve SEC mAb, 200 Å, 2.5 µm, 7.8 × 300 mm色谱柱时, NISTmAb RM 8671和沃特世mAb大小异构体标准品的mAb聚集体、单体和碎片的分离结果。LMWS: F(ab')₂和(Fc/2)₂ IdeS片段 (橙色); Fab/c、Fab、Fc水解片段 (蓝色)。条件: 室温, 流速0.3 mL/min

与Fab/c片段的分离相比, HMWS (≥300 kDa)与主要mAb单体 (约150 kDa) 的分离难度通常较低, 因为Fab/c片段的大小与单体更接近, 并且在单体的尾部流出, 通常以低丰度存在 (图1)。不过, 随着液相色谱系统不断改进、SEC色谱柱柱效不断提高, 以及对液相色谱系统扩散如何影响组分分离度的理解更加深入, 可靠分离这些不同形态的mAb的能力也有所提高³。

每根BioResolve SEC mAb色谱柱均在低扩散液相色谱系统上使用mAb大小异构体标准品进行性能测试, 以展示其分离能力。观察到色谱分离效率会受色谱系统中各种组件的影响, 比如进样器、管路、色谱柱和检测器。本应用纪要提供了各种液相色谱系统的一系列色谱图, 旨在利用实际观察到的色谱分离效率说明色谱柱尺寸 (内径和柱长) 与系统扩散之间的关系。无论液相色谱系统扩散程度如何, 7.8 mm内径、300 mm柱长的色谱柱都能够对聚集体、单体和碎片实现高分离度分离及准确定量。

实验

使用由50/50乙腈/水稀释得到的0.16 mg/mL咖啡因 (UPLC吸光度测试溶液套件, 部件号: [700002642](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=700002642) < <https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=700002642>>, 溶液7) 测量系统扩散。

流动相为50/50乙腈/水(v/v)，流速为0.5 mL/min。使用零死体积两通接头（部件号：[700002636](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=720002636) <
<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=720002636>>）代替色谱柱。平衡10 min后，进样3次空白流动相溶液，然后连续进样5次0.5 μL咖啡因，运行时间1-2 min。计算4.4%峰高处咖啡因峰宽（5σ峰宽）的平均值。将平均值乘以500 μL/min，即获得5σ柱外扩散(5σ_{ec})体积报告值。所用三套系统（四种配置）的扩散数据见表1。

液相色谱系统	系统体积(μL)	4.4%处5σ峰宽(μL)	USP 拖尾因子
1) 配有CH-A的ACQUITY UPLC H-Class Bio	16.8	10	1.25
2) 配有CH-30A的ACQUITY UPLC H-Class Bio	22.6	13	1.33
3) 配有30cm CH的ACQUITY Arc Bio	43.4	30	1.37
4) 配有CH的Alliance HPLC	61.6	49	1.66

表1.液相色谱系统的系统扩散性

样品描述：

沃特世mAb大小异构体标准品（部件号：[186009284](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009284) <
<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009284>>）包含160 μg稳定、冻干的NISTmAb RM8671，并添加有2 μg非还原IdeS酶解NISTmAb碎片（F(ab')₂和(Fc/2)₂）。使用70 μL MilliQ水将每个样品瓶中的冻干内容物溶解。

方法条件

LC条件

系统：	ACQUITY UPLC H-Class Bio, 5σ系统扩散 = 10 μL, 13 μL ACQUITY Arc Bio, 5σ系统扩散 = 30 μL Alliance HPLC, 5σ系统扩散 = 49 μL
检测器：	ACQUITY UPLC H-Class Bio系统使用配备5 mm 钛流通池的可变波长紫外(TUV)检测器； ACQUITY Arc Bio和Alliance系统使用配备10 mm生物惰性流通池的2489紫外/可见光 (UV/Vis)

检测器

检测条件:	280 nm, 10 Hz, 快速滤光器
样品瓶:	最大回收样品瓶 (部件号: 186000327C)
色谱柱:	BioResolve SEC mAb, 200 Å, 2.5 µm, 4.6 × 150 mm (部件号: 176004592*) 4.6 × 300 mm (部件号: 176004593*) 7.8 × 150 mm (部件号: 176004594*) 7.8 × 300 mm (部件号: 176004595*) *包含色谱柱和赠送的一瓶mAb大小异构体标准品
柱温:	35 °C主动预加热器CH-A (ACQUITY UPLC H-Class)、CH-30A (ACQUITY UPLC H-Class)、对流加热器30 cm CH (ACQUITY Arc)、CH (Alliance)
样品温度:	8 °C
样品:	2.28 mg/mL沃特世mAb大小异构体标准品
进样体积:	不同色谱柱配置 (内径和柱长) 的进样体积不同 : 1.8、3.5、5或10 µL
流速:	0.200 mL/min (适用于4.6 mm内径色谱柱)) /0.575 mL/min (适用于7.8 mm内径色谱柱)
密封清洗液:	10% HPLC级甲醇/90% 18.2 MΩ水v/v (密封件清洗间隔设置为0.5 min)

样品管理器清洗液:	18.2 MΩ水
流动相A:	50 mM磷酸钠 (pH 7.0) , 200 mM氯化钾
流动相B和C:	18.2 MΩ水
流动相D:	10%乙腈/90% 25 mM磷酸钠 (pH 7.0) + 100 mM氯化钾
注射器吸取速度:	30 μL/min
进样针位置:	1.0 mm
气隙:	无
数据通道:	ACQUITY TUV ChA 280 nm; 系统压力, 室温
流动相A:	向每升水中加入2.66 g无水磷酸氢二钠、4.36 g磷酸二氢钾一水合物和14.91 g氯化钾混合, 然后使用无菌0.2 μm尼龙过滤器进行过滤, 制得该流动相 (过滤后的流动相pH为6.9)
色谱软件:	Empower 3 FR 3.0

结果与讨论

SEC是一种独特的具有挑战性的色谱方法。在理想条件下 (需要进行方法开发), 蛋白质通过色谱柱迁移, 几乎不与固定相发生相互作用。分析物不在色谱柱中保留, 仅通过填料多孔结构中特殊设计的孔径所提供的尺寸障碍实现由扩散驱动分离。因此, 当分析物从进样器迁移至检测器时, 产生的谱带展宽将对SEC分离度产生重大影响。之前发表的应用纪要中详细评估了系统扩散对SEC法分析mAb聚集体(HMWS)和碎片(LMWS)的影响以及柱外扩散对分离的影响^{4,5}。

测定系统扩散

开展谱带展宽实验以评估系统扩散时，如果预期使用SEC分析，则必须测量4.4%处峰高的峰宽。计划分离和定量分析的许多杂质的峰高远低于主峰峰高的4.4%（图2）。液相色谱系统扩散会影响mAb主峰的5 σ 峰宽和USP拖尾因子，进而明显影响100 kDa左右碎片的分离度。在方法开发期间记录这些参数非常有用，因为这些数据是色谱柱故障或系统扩散问题的潜在指标。因此，可以将该分析得到的数据并入标准程序中，用于确保色谱柱和系统适用于重要样品的分析。

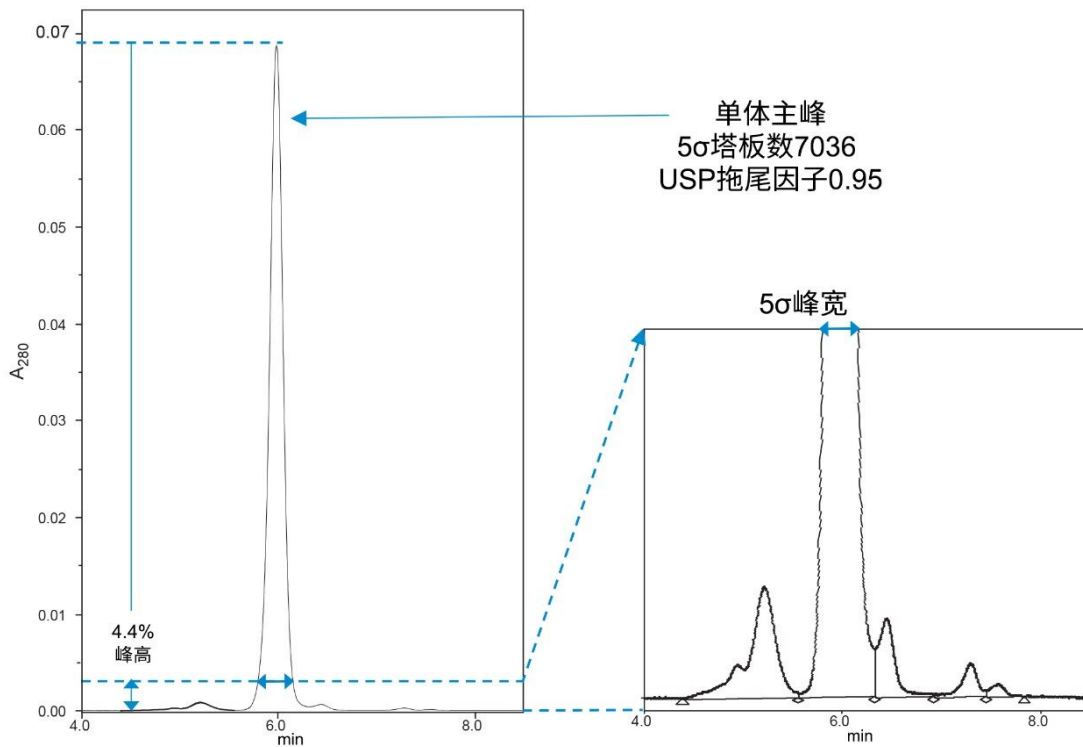


图2.使用ACQUITY UPLC H-Class Bio系统和BioResolve SEC mAb, 4.6 × 150 mm色谱柱时，沃特世mAb大小异构体标准品的分离结果。分离条件见实验部分

利用沃特世mAb大小异构体标准品系统性考察不同系统扩散对下列四种色谱柱各自分离性能的影响。在每个系统上评估相同的色谱柱。在进行所有评估前、后分别对色谱柱进行检查，以维持其性能。BioResolve SEC mAb色谱柱包装箱中随附的各质量报告色谱图与ACQUITY UPLC H-Class Bio系统上生成的色谱图基本相同，示例如下。

以下实验在三套相对现代的液相色谱系统上使用四种BioResolve SEC mAb色谱柱（4.6 × 150 mm、4.6 × 300 mm、7.8 × 150 mm和7.8 × 300 mm）进行：

- 扩散性最低的(UPLC)系统为ACQUITY UPLC H-Class Bio，使用150 mm色谱柱的柱温箱(CH-A)时，5 σ_{ec}

扩散为10 μL ，使用300 mm色谱柱的柱温箱(CH-30A)时， $5\sigma_{ec}$ 扩散为13 μL ：两者均采用主动预加热。

- 扩散性中等的(UHPLC)系统为ACQUITY Arc Bio，其 $5\sigma_{ec}$ 扩散为30 μL 。所有色谱柱均使用强制空气对流30 cm柱温箱(30cm CH)。
- 扩散性最高的(HPLC)系统为Alliance，其 $5\sigma_{ec}$ 扩散为49 μL 。所有色谱柱均使用强制空气对流柱温箱。

在这些实验中，采用7.8 mm内径色谱柱得到的色谱分离结果见图3，采用4.6 mm内径色谱柱得到的色谱分离结果见图4。

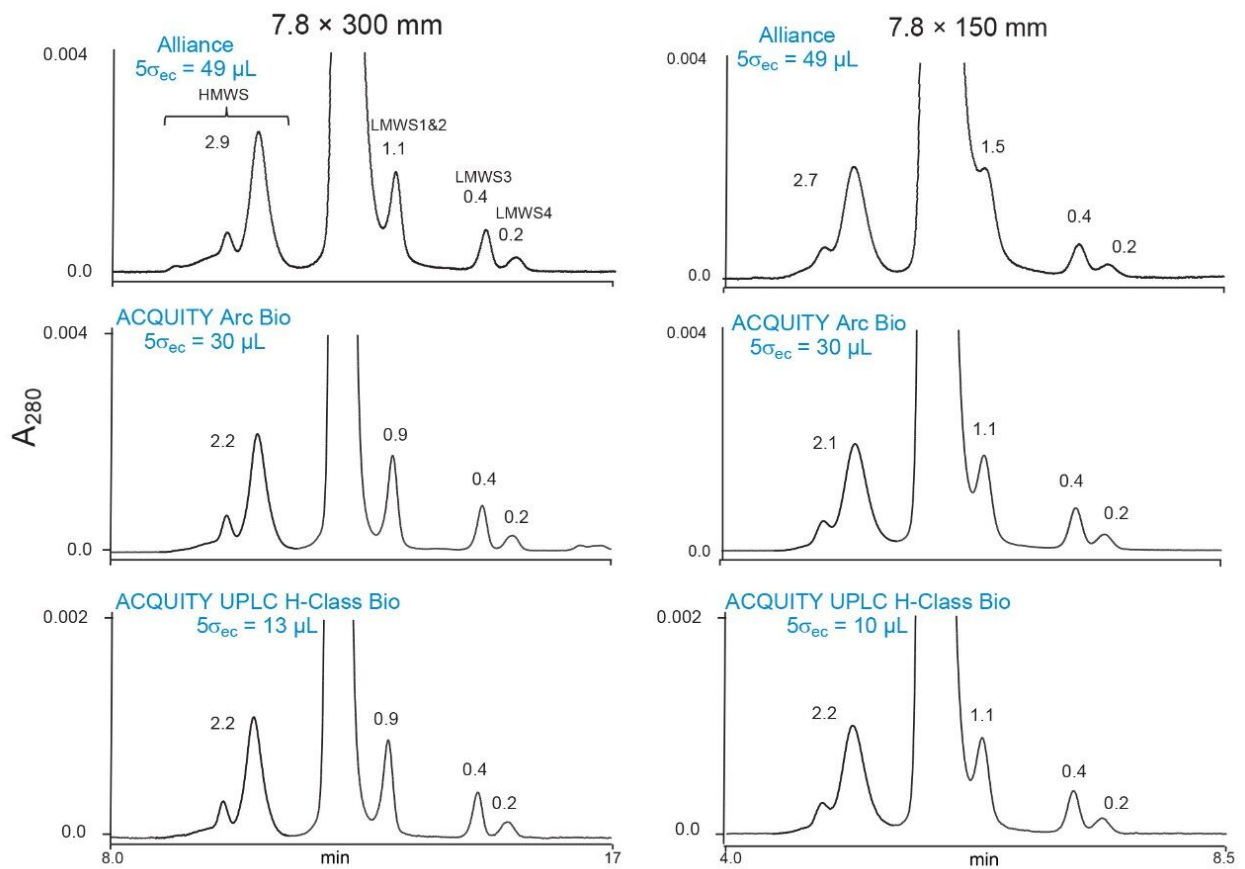


图3.在系统扩散分别为49 μL (Alliance)、30 μL (ACQUITY Arc)以及10 μL 或13 μL (ACQUITY UPLC H-Class)的液相色谱系统上使用BioResolve SEC mAb, 7.8 x 300 mm和7.8 x 150 mm色谱柱得到的沃特世mAb大小异构体标准品的分离结果。每张色谱图均报告了峰面积百分比。分离条件见实验部分

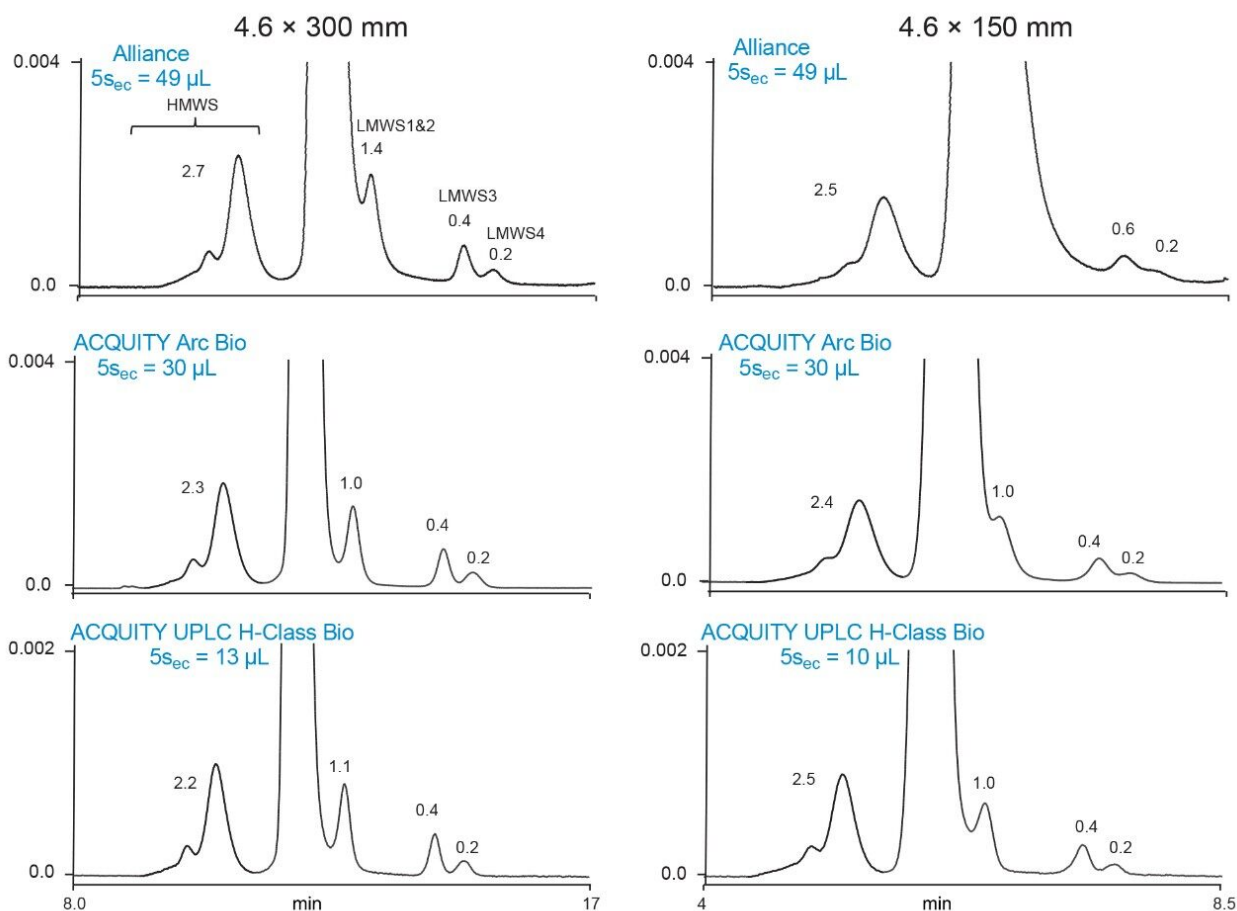


图4.在系统扩散分别为49 µL (*Alliance*)、30 µL (*ACQUITY Arc*)以及10 µL或13 µL (*ACQUITY UPLC H-Class*)的液相色谱系统上使用*BioResolve SEC mAb*, 4.6 × 300 mm和4.6 × 150 mm色谱柱得到的沃特世mAb大小异构体标准品的分离结果。每张色谱图均报告了峰面积百分比。分离条件见实验部分

查看色谱分离结果之前，务必先标明沃特世mAb大小异构体标准品中的各种组分。市售mAb药品中低分子量物质的组分比例通常非常低，并且不同产品批次之间的变化很大，用作标准品时结果不理想。为解决这一不足，沃特世推出了mAb大小异构体标准品。每瓶标准品均包含160 µg美国国家标准技术研究所(NIST) mAb参比物质(RM) 8671，并添加有2 µg IdeS (*FabRICATOR*[®])酶解NISTmAb。图5展示了mAb大小异构体标准品中各种组分的来源。从色谱图(图5b)中可以看出，100 kDa左右NISTmAb内源性Fab/c片段的流出时间略早于IdeS生成的100 kDa左右F(ab')₂片段。由于洗脱顺序被视作流体动力学体积的差异，因此Fab/c比F(ab')₂更难与单体分离。为使NISTmAb RM 8671中的Fab/c达到报告所示的分离度，在较低流速(0.3 mL/min)下使用*BioResolve SEC mAb* 7.8 × 300 mm色谱柱进行分离。更多详细信息请参见mAb大小异构体标准品维护和使用手册(部件号: [720006811EN](#) <

<https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=135068415&type=USRM>>)。有关NISTmAb RM

8671的更多信息请访问nist.gov⁶。

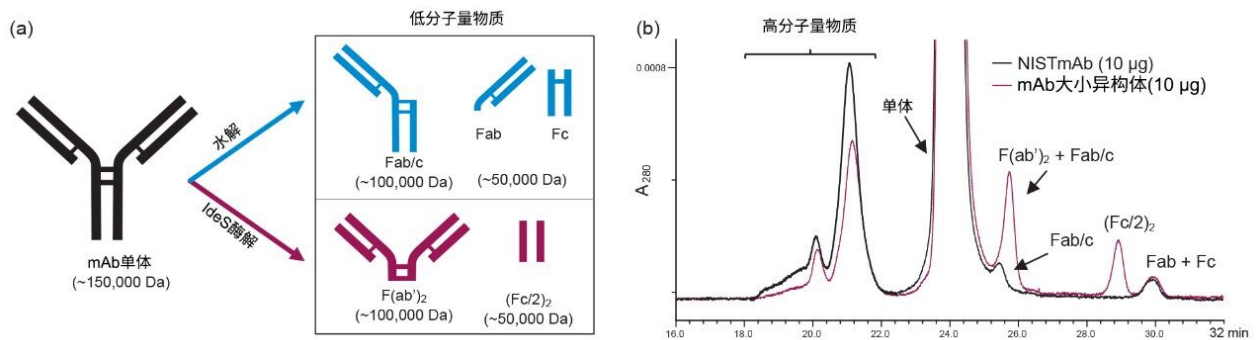


图5.(a)和(b): mAb研究图, 展示了NISTmAb和mAb大小异构体标准品中完整单体与碎片之间的差异。截取NISTmAb (黑色迹线) 和经修饰的mAb大小异构体标准品 (红色迹线) 的代表性 A_{280} SEC色谱图以显示高分子量物质、低分子量物质以及单体。由于流体动力学体积相似, $F(ab')_2$ 和Fab/c无法分离。使用BioResolve SEC mAb, 200 Å, 2.5 µm, 7.8 × 300 mm色谱柱采集数据, 在室温下以0.3 mL/min流速测量280 nm下的吸光度。

图3显示了mAb大小异构体标准品在7.8 mm内径色谱柱上的分离结果, 从色谱图可以看出, 在HPLC、UHPLC和UPLC系统中运行7.8 × 300 mm色谱柱时, HMWS、主峰和碎片峰表现出非常相似的分离性能。正如预期所料, 7.8 × 150 mm短色谱柱的分离度更低, 而且分离LMWS1&2时在HPLC系统上表现出明显的性能损失。在三套液相色谱系统上, HMWS在两种7.8 mm内径色谱柱上均得到充分分离。

虽然图3表明7.8 × 150 mm色谱柱在UPLC系统上为LMWS1&2提供了足够高的分离度, 但是必须了解, 大部分LMWS1&2峰面积均属于添加的IdeS酶解片段 $F(ab')_2$ 。如前文所述, 该片段看起来略小于自然产生的Fab/c片段 (因此分离度略高) (图5)。

图4显示了系统扩散对4.6 mm内径色谱柱的影响, 与上文所述对7.8 mm内径色谱柱的影响有所不同。在所有三套系统上, 4.6 × 300 mm色谱柱均使LMWS1&2分离, 随着系统扩散增加, 分离度明显下降。这种趋势在柱长为150 mm的色谱柱中更加明显。在不同的液相色谱系统上, 采用4.6 × 300 mm色谱柱未观察到HMWS分离度显著变化, 但随着系统扩散增加, 采用150 mm柱长时观察到HMWS分离度轻微损失。

聚集体的分离度

使用Empower系统适用性参数, 对图3和图4所示色谱图中观察到的趋势进行定量分析。对于聚集体分离度, 使用半峰高(HH)处的USP分离度来评估在三套系统中使用这些色谱柱获得的单体主峰和二聚体峰分离质量。通常所称的基线分离度1.5与大多数实际色谱分离无关。实际样品可接受的分离度标准为1.75~2.0⁷。改用较高的值是因为考虑到峰不对称性以及SEC分离中遇到的差异区域的影响⁷。观察图6可以发现, 除4.6 × 150 mm色谱柱以外, 二聚体与主峰的分离度在三套液相色谱系统上基本相同。在三套液相色谱系统中, 4.6 ×

150 mm色谱柱的分离度损失26%，但仍高于许多聚集体分析的可接受水平。

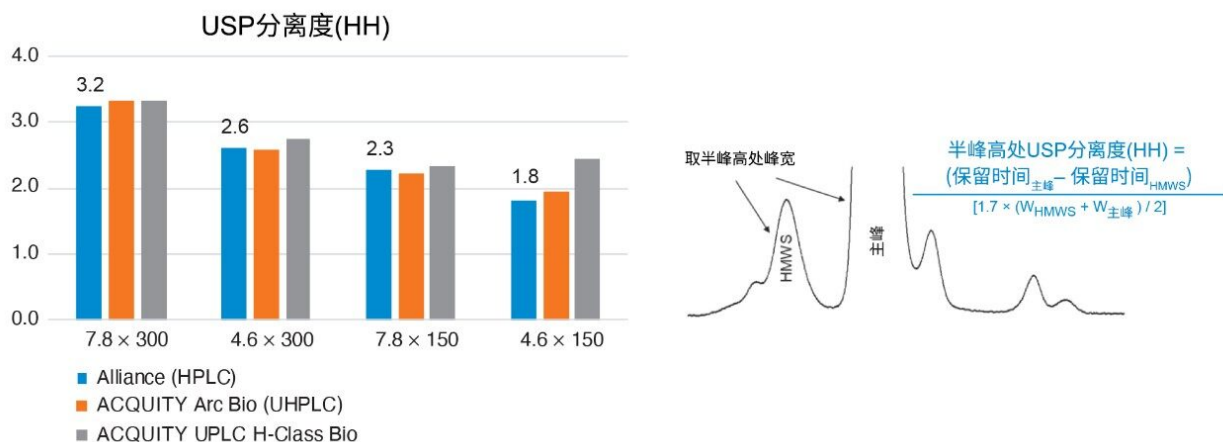


图6.在三套液相色谱系统中使用四种色谱柱获得的二聚体-主峰USP分离度(HH)数据。图中显示了分离度计算公式。分离条件见实验部分

碎片的分离度

为定量测量和比较LMWS1&2的分离度，需要采用另一种分离度指标，即峰谷比(p/v)。如图7所示，p/v参数通常用于量化具有不同峰面积且洗脱时间过于接近（部分共流出）的峰的分离质量，通过传统使用的分离度公式无法获得这些峰的分离度值。p/v值可用于定量评估非常棘手的分离，例如碎片分析中遇到的分离。例如，使用 $p/v \geq 2.0$ 的标准定量评估SEC分析中的邻近洗脱峰，详情可参见《美国药典 - 胰岛素专论》⁸。USP胰岛素专论规定，定量分析胰岛素样品中高分子量蛋白质(HMWP)的相对含量时，最终 $p/v \geq 2.0$ ⁸。在本研究中，由于并非所有色谱柱配置/系统组合的USP分离度(HH)值都可用，因此使用起始p/v参数进行比较。

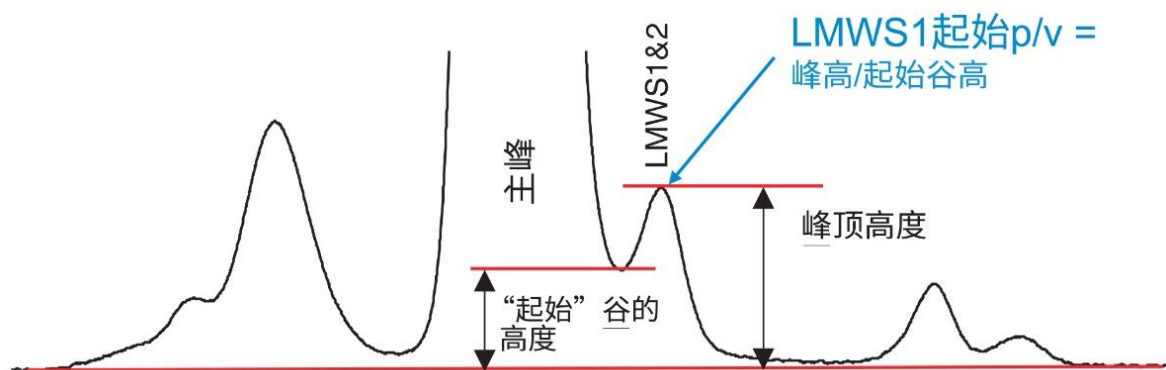


图7.介绍LMWS1&2起始p/v计算的示例色谱图

在图8中，所有色谱柱配置在UPLC和UHPLC系统上的p/v分离度值保持一致。通常，当p/v比增加至3以上时，重现性较差（数据未显示）。正如预期所料，采用300 mm柱长的色谱柱获得的分离度高于150 mm柱长的色谱柱。图中未显示4.6 × 150 mm色谱柱的结果，因为该色谱柱在Alliance上无法分离LMWS1&2，且在其他系统上获得的p/v为1.6甚至更低。当p/v分离度增加至1以上时，LMWS1&2的峰面积百分比逐渐减小，直至接近p/v > 2时开始趋于稳定。Alliance系统上的所有色谱柱均存在这一趋势。

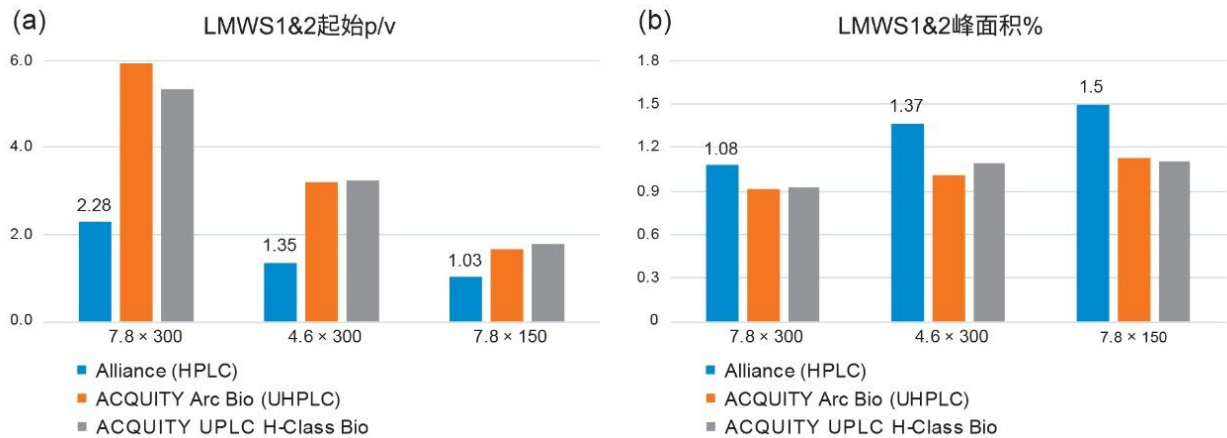


图8.在三套系统中使用三种色谱柱得到的(a) LMWS1&2起始p/v和(b) LMWS1&2峰面积%。分离条件见实验部分

主峰

主峰显示在所有SEC mAb色谱图的中心。从图3和图4的色谱图可以明显看出，主峰的分选效率因系统扩散而下降。随着分选效率下降，分析物峰高下降。由于峰高的下降直接影响杂质（计划通过分选进行定量分析）的信噪比，因此通常不会讨论系统扩散对分析灵敏度的影响。

如图9a所示，随着色谱柱体积减小，系统扩散体积与5 σ 塔板数之间的相关系数平方(R²)值表现出越来越高的相关性。R²值代表塔板数变化的百分比，可以用系统扩散体积的差异来解释；意味着主峰5 σ 塔板数减少84-100%的原因可能是系统扩散体积增加。与7.8 mm内径色谱柱相比，采用4.6 mm内径色谱柱获得的线性相关曲线的斜率更陡峭，表明扩散体积对4.6 mm内径色谱柱的影响更大。还注意到，即使使用4.6 × 300 mm色谱柱，其分选效率也不及使用7.8 × 300 mm色谱柱获得的分选效率，表明即使在UPLC系统上，系统扩散也会限制色谱柱性能。

扩散体积及其拖尾因子并非独立变量。但是，扩散峰体积（图9a）和拖尾因子（图9b）与主峰塔板数之间的R²值比较结果表明，系统扩散拖尾因子对7.8 mm内径色谱柱中主峰塔板数变化的影响高于对4.6 mm内径色谱柱的影响。目前尚不清楚这些观察结果是否适用于所有系统，但确实表明，减小扩散峰的拖尾可能使7.8 mm内径色谱柱配置获得更出色的性能。

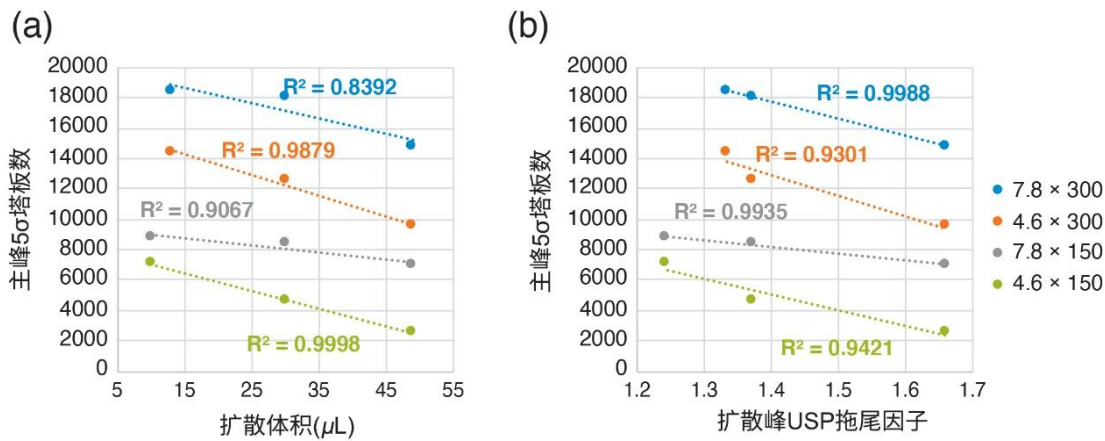


图9.系统扩散对主峰5σ塔板数的影响：(a)扩散体积的影响；(b)扩散峰USP拖尾因子的影响。分离条件见实验部分

研究300 mm柱长的色谱柱时，观察到LMWS1&2 p/v受主峰和扩散峰拖尾因子的影响最大。同样发现p/v值受主峰塔板数（4.6 mm内径色谱柱的R²值为0.88，7.8 mm内径色谱柱的R²值为0.95）和系统扩散体积（4.6 mm内径色谱柱的R²值为0.80，7.8 mm内径色谱柱的R²值为0.64）的影响，但影响程度不及图10中所述。由于主峰的拖尾因子也与扩散峰的拖尾因子密切相关（图9b），因此应研究尽量减少扩散峰拖尾的方法，以提高碎片分析的分度。

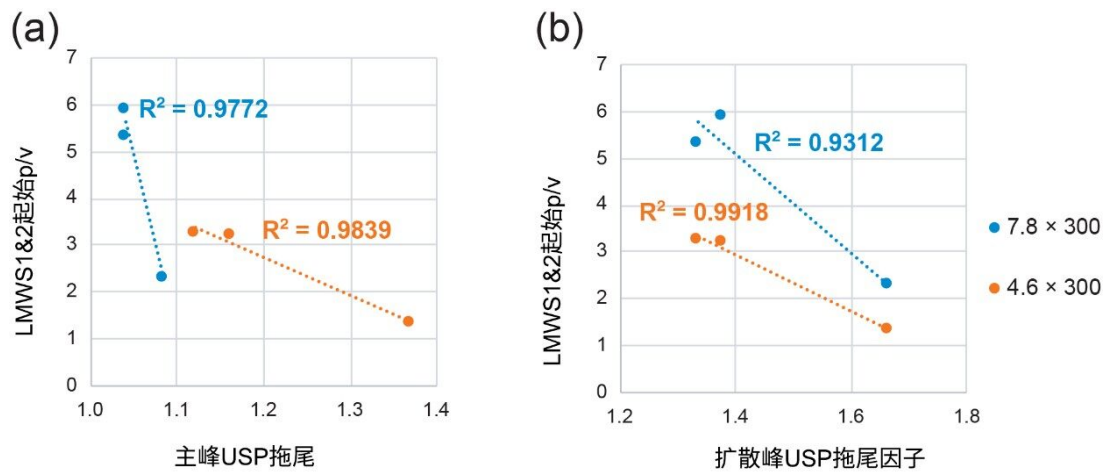


图10.在三套液相色谱系统中研究300 mm柱长的色谱柱，影响LMWS1&2 p/v的因素：(a)主峰USP拖尾因子；(b)扩散峰USP拖尾因子。分离条件见实验部分

结论

Waters BioResolve SEC mAb色谱柱可提供高分离度、高重现性的mAb HMWS、单体和LMWS分离。在HPLC、UHPLC和UPLC系统上，7.8 mm内径色谱柱的色谱性能优于4.6 mm内径色谱柱，因此极力推荐该配置用于高分离度分离，尤其是需要分析部分分离的LMWS1 (Fab/c)的应用。4.6 mm内径色谱柱在UPLC系统上的分离效率与7.8 mm内径色谱柱近乎一致，该色谱柱适用于在UHPLC上（在一些情况下也适用于在HPLC上）分析HMWS。4.6 mm内径色谱柱具有减少样品用量和流动相消耗量的优势，且价格更低。

在上述实验中，未对所用液相色谱系统的常用组件进行修改以进一步降低扩散。例如，众所周知，缩短连接路的长度和内径可进一步降低扩散⁹。沃特世在低扩散性液相色谱系统上使用沃特世mAb大小异构体标准品对每批BioResolve SEC mAb色谱柱的“开箱即用”性能进行了测试，色谱图应与图3和图4所示ACQUITY UPLC H-Class系统上的结果相似。图11展示了四批不同BioResolve SEC mAb色谱柱的代表性质量测试结果，这些结果具有高度重现性。

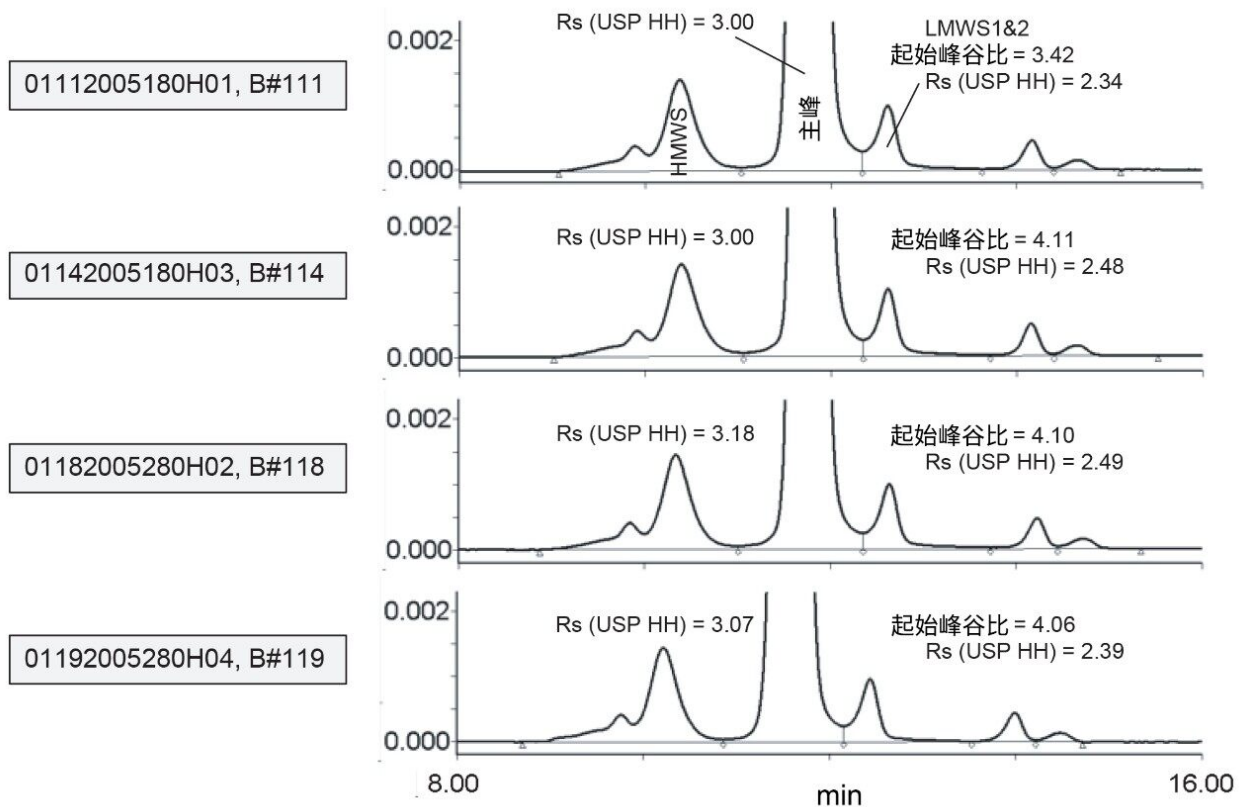


图11.在同一套ACQUITY UPLC H-Class Bio系统上使用四批不同的BioResolve SEC mAb 7.8 × 300 mm色谱柱分析沃特世mAb大小异构体标准品获得的分离度比较。分离条件见实验部分

在mAb生物治疗药物的研究、开发和生产中，SEC能否成功应用的关键在于，认识并选择一款与所用液相色谱系统的扩散程度兼容的色谱柱，这样有助于确保生成可靠的数据（尤其是使用经过验证的方法时）。开发一组合适的分离条件，使分析物能够实现可靠分离，同时能够大幅减少与色谱柱和液相色谱系统流路发生二次相互作用，对于任何SEC方法的成功都至关重要。最后，在分析所需的mAb之前，需要考虑确定并使用可靠的mAb参比样品，以帮助确保色谱柱、液相色谱系统、流动相和方法的适用性。

参考文献

1. Hong, P.; Koza, S.; Bouvier, E. S. Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2012, 35, 2923–2950.
2. Cordoba, A. J.; Shyong, B. J.; Breen, D.; Harris, R. J. Non-Enzymatic Hinge Region Fragmentation of Antibodies in Solution. *J. Chromatogr., B.* 2005, 818, 115-12.
3. Koza, S. M.; Chen, W. High Resolution and High Throughput Size-Exclusion Chromatography Separations of IgG Antibody Aggregates and Fragments on UHPLC and HPLC Systems with 2.5 μm BEH Particles. Waters Application Note, [720006522EN](#) <
<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135016169>> , April 2019.
4. Koza, S. M.; Reed, C. E.; Chen, W. Impact of LC System Dispersion on the Size-Exclusion Chromatography Analysis of Monoclonal IgG Antibody Aggregates and Fragments: Selecting the Optimal Column for Your Method. Waters Application Note, [720006336EN](#) <
<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134996417>> , June 2019.
5. Koza, S. M.; Reed, C. E.; Chen, W. Evaluating the Impact of LC System Dispersion on the Size-Exclusion Chromatography Analysis of Proteins. Waters Application Note, [720006337EN](#) <
<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134996381>> , June 2019.
6. NISTmAb, Humanized IgG1 κ Monoclonal Antibody, Reference Material 8671: <https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/8671.pdf> <<https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/8671.pdf>>
7. Dolan, J. W. LC Troubleshooting: Peak Tailing and Resolution. *LC · GC Europe* June 2002: 1-4.
8. USP43-NF39, Official Monographs/Insulin. May 1, 2016; 4314-17.
9. Fekete, S.; Guillarme, D. Influence of Connection Tubing in Modern Size Exclusion

Chromatography and Its Impact on the Characterization of mAbs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018, 149, 22–32.

致谢

本文作者诚挚感谢Steve Shiner、Steven Byrd和Justin McLaughlin对BioResolve SEC mAb色谱柱开发所作的贡献，并感谢Bill Warren为支持本项目所提供的指导和付出的精力。

NIST是美国国家标准技术研究所的注册商标。

FabRICATOR是Genovis AB的注册商标。

特色产品

ACQUITY Arc Bio系统 <<https://www.waters.com/134966135>>

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

Alliance HPLC系统 <<https://www.waters.com/534293>>

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

Empower 3色谱数据软件 <<https://www.waters.com/10190669>>

720006956ZH, 2020年8月