

Agilent BioHPLC 色谱柱

## 使用反相 HPLC/UHPLC 进行蛋白质鉴定和杂质分析

The Measure of Confidence



Agilent Technologies

# 反相 HPLC/UHPLC: 安捷伦助您显著提高 准确性和工作效率

反相技术被用于蛋白质鉴定确认、杂质谱图分析以及翻译后修饰定量。该技术是基于各物质疏水性的差异并运用变性条件来实现样品分离的。它提供了分子一级结构的氨基酸序列信息以及序列的变异和修饰信息。

安捷伦提供了业内最全面的大孔径（300Å 以及更宽孔径）反相 BioHPLC 色谱柱，并由遍布全球的技术支持专家和应用化学家提供支持。色谱柱系列包括压力范围 400 至 1200 bar 的 1.8、3.5 和 5 µm 多孔填料柱、用于 UHPLC 在低压条件下分离的表面多孔填料柱，以及适用于最极端条件下分析的聚合物柱。

**Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱：**快速分离和鉴定一级结构中的氨基酸修饰。AdvanceBio 肽谱分析色谱柱采用 2.7 µm 的填料和 C18 官能团，为碱性疏水性多肽分析提供极佳的保留时间、分离度和峰形。

**Agilent Poroshell 300 色谱柱：**业内首款用于多肽和蛋白质快速分离的表面多孔小粒径填料柱。

**Agilent ZORBAX RRHD 300Å 1.8 µm 色谱柱：**为完整蛋白质、蛋白质片段以及蛋白质酶解物的反相分离提供 UHPLC 分析性能，在 1200 bar 下性能稳定。

**Agilent ZORBAX 300Å 3.5 和 5 µm 色谱柱：**全多孔填料，可用于 HPLC 分离和制备级分离；许多键合相的粒径可从 1.8 µm 扩展到更大粒径。

**Agilent PLRP-S 色谱柱：**大孔聚合物填料可以在最宽的 pH 范围内进行 HPLC 分离。PLRP-S 柱具有 3 种宽径尺寸和 8 种填料粒径，可以为多肽、蛋白质以及蛋白质复合体的分析前处理分离提供最佳解决方案。

## 目录：用于蛋白质鉴定的完整反相色谱柱产品系列

AdvanceBio 色谱柱 用于快速肽谱分析	4
Poroshell 300 色谱柱 用于完整蛋白质分离	7
ZORBAX RRHD 色谱柱 用于完整蛋白质和 多肽裂解物分析	12
ZORBAX 300 StableBond 色谱柱 用于低 pH 分离	14
PLRP-S 色谱柱极端条件下 可获得稳定结果	15
色谱柱选择指南/订购信息	17

## 哪种快速液相柱最能满足您的反相分离需求？

安捷伦提供最为齐全的快速 HPLC/UHPLC 大孔径柱。无论您所用的仪器是耐压 400、600 还是 1200 bar，您都可以灵活地创建方法以获得最大分离度。为了有效分离蛋白质和多肽，需要使用大孔径 300Å 色谱柱，因为这类色谱柱能够使这些分析物完全通过键合相。

### 反相柱的选择

系统	安捷伦色谱柱	备注
UHPLC	<b>ZORBAX 300Å, 1.8 µm</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• RRHD 300SB-C18</li><li>• RRHD 300SB-C8</li><li>• RRHD 300SB-C3</li><li>• RRHD 300-Diphenyl</li></ul>	优化的填充工艺使其耐压可高达 1200 bar，可与 Agilent 1290 Infinity 液相色谱一起使用。超高压快速高分离度 1.8 µm 色谱柱有 50 和 100 mm 两种长度。 C18、C8 和 C3 柱采用 StableBond 技术，低 pH 条件下可以稳定地实现方法转换和扩展。 安捷伦独有的联苯固定相提供了更多的选择性。
HPLC	<b>ZORBAX 300Å 3.5 和 5 µm</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• 300SB-C18</li><li>• 300SB-C8</li><li>• 300SB-C3</li><li>• 300SB-CN</li></ul> <b>ZORBAX 300 Extend-C18</b>	ZORBAX 色谱柱由全多孔填料填充，该填料机械强度高、耐压、纯度高 (99.995%)，且金属含量极低，并且严格确保 300Å 孔径和填料粒径。这样就提高了柱子的稳定性和色谱性能。 C18、C8 和 C3 柱采用 StableBond 技术，低 pH 条件下可以实现稳定地方法转换和扩展。 通过使用 C18 固定相，在高 pH (高达 11.5) 条件下可获得更高的稳定性，还能延长色谱柱寿命。
	<b>Poroshell 300</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• 300SB-C18</li><li>• 300SB-C8</li><li>• 300SB-C3</li></ul> <b>Poroshell 300Extend-C18</b>	Poroshell 表面多孔填料是由 300Å 多孔硅胶外层包裹实心硅胶内核制备而成。可以在 HPLC 压力范围内实现快速分离且丝毫无损分离度或分析准确性。 C18、C8 和 C3 柱采用 StableBond 技术，低 pH 条件下可以稳定地实现方法转换和扩展。 通过使用 C18 固定相，在高 pH (高达 11.5) 条件下获得更高的稳定性，延长色谱柱寿命。
	<b>PLRP-S</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• PLRP-S 100Å</li><li>• PLRP-S 300Å</li><li>• PLRP-S 1000Å</li><li>• PLRP-S 4000Å</li></ul>	聚合物填料拥有出色的化学稳定性和热稳定性，即使在最苛刻的条件下也能获得最长的色谱柱寿命。
	<b>AdvanceBio</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• AdvanceBio 肽谱分析色谱柱</li></ul>	该色谱柱在分离和表征多肽和蛋白质、抗体、抗体偶联物、新生物体和生物制药方面具有一致、卓越的性能。  色谱柱孔径为 120Å，填充 2.7 µm 的多孔颗粒填料。  使用复杂的多肽混标进行测试，确保色谱柱性能。

如需了解有关使用安捷伦反相色谱柱进行高分离度蛋白质分离的更多信息，

请访问 [www.agilent.com/chem/AdvanceBio](http://www.agilent.com/chem/AdvanceBio)

# Agilent AdvanceBio 肽谱分析 BioHPLC 色谱柱 缩短肽谱分析时间但不降低 分离度

使用全多孔 HPLC 色谱柱进行常规肽谱分析需耗费 60 min 甚至更久。而 Agilent AdvanceBio 肽谱色谱柱能帮助您快速分离和鉴定一级结构中的氨基酸修饰。

这些先进的生物色谱柱孔径为 120 Å, 填充 2.7 μm 的表面多孔颗粒填料, 能够提供:

► **可靠性更高的分析结果:** 每批 AdvanceBio 肽谱分析柱均采用多肽混合物标样进行严格测试, 确保适用性和高重现性, 使其能鉴定复杂多肽图谱中的重要多肽。(图 1)

► **大幅节省分析时间:** 高分离度分离速度比全多孔 HPLC 色谱柱快 2-3 倍

► **提高每台仪器的性能:** 内径 4.6、3.0 和 2.1 mm 的色谱柱能在 0-600 bar 范围内稳定工作, 最大限度地发挥 UHPLC 仪器的利用率。同时, 这些色谱柱在用于 400 bar 的旧型号仪器时也有卓越表现

► **更大的灵活性:** 任何以甲酸为流动相的 HPLC 分析均可提高质谱灵敏度

图 2 显示了使用 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱可轻松进行蛋白质鉴定以及翻译后修饰鉴定。

## 使用安捷伦多肽混标进行测试以保证质量

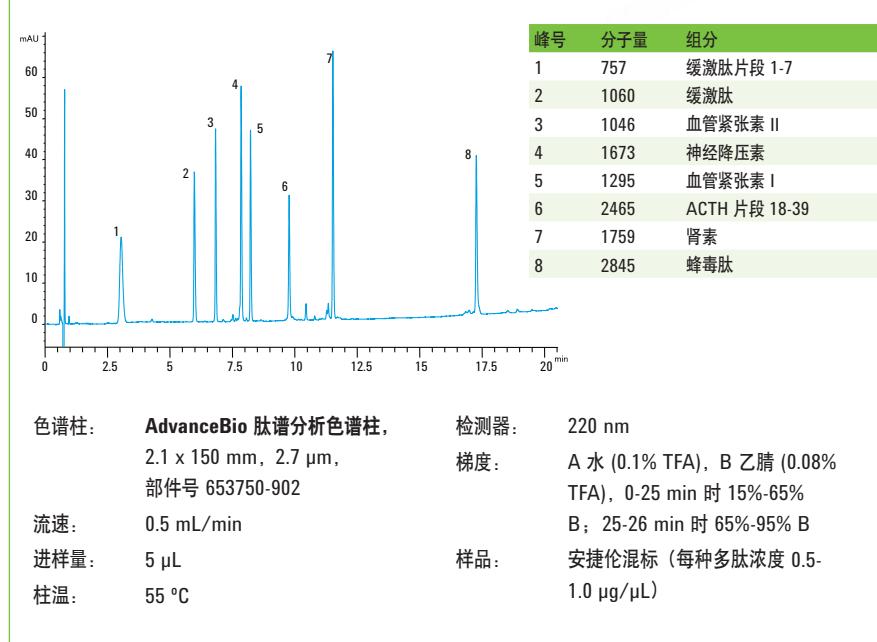


图 1. 用于测试每批 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱的混标的谱图。该混标含 8 种分子量在 757-3845 Da 的亲水、疏水和碱性多肽。另外还使用小分子探针对每个色谱柱进行测试以确保效率

## 生物仿制药 EPO 的肽谱

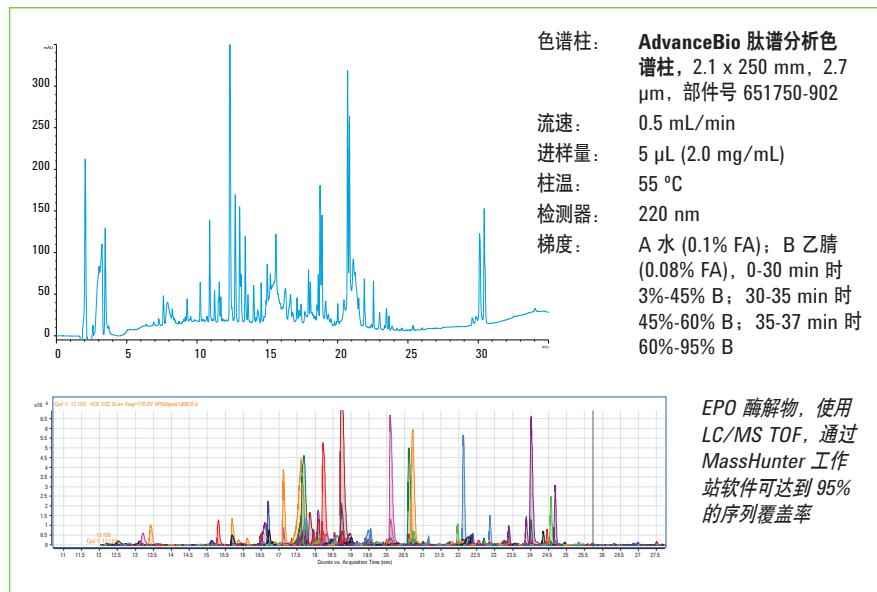


图 2. 使用 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱可轻松进行蛋白质鉴定以及翻译后修饰鉴定

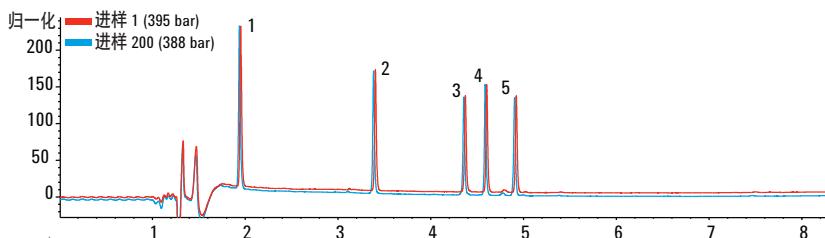
## 卓越的重现性

AdvanceBio 色谱柱的科学设计能够提高结果的准确性和分析效率，实现快速高效的生物制药分析。此外，为了确保重现性，安捷伦对 AdvanceBio 色谱柱进行了严格测试，让您对结果更加充满信心。

图 3 表明，使用 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱可以获得优异的批次间以及每次运行间重现性。

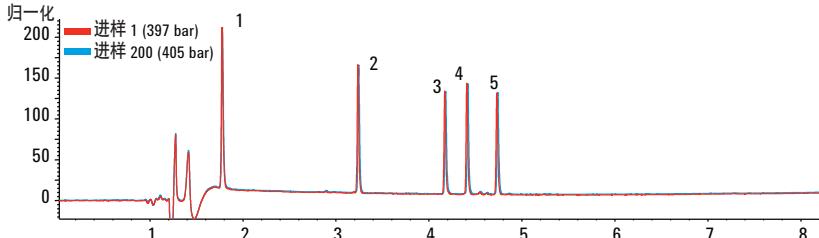
### 200 次进样的批次间重现性

#### 硅胶柱，批次 PEP1227229



进样	保留时间 2 (min)	保留时间 2 (min)	保留时间 4 (min)	保留时间 5 (min)
1	3.39	4.36	4.59	4.90
200	3.52	4.48	4.70	5.02
进样	PW2	PW3	PW4	PW5
1	0.020	0.021	0.020	0.022
200	0.020	0.021	0.019	0.021

#### 硅胶柱，批次 B12169



进样	保留时间 2 (min)	保留时间 2 (min)	保留时间 4 (min)	保留时间 5 (min)
1	3.36	4.29	4.52	4.85
200	3.24	4.18	4.41	4.74
进样	PW2	PW3	PW4	PW5
1	0.019	0.020	0.019	0.020
200	0.019	0.020	0.019	0.020

色谱柱: AdvanceBio 肽谱分析色谱柱，  
2.1 x 250 mm, 2.7  $\mu$ m,  
部件号 651750-902  
进样量: 0.50 mL/min  
柱温: 1  $\mu$ L  
柱温: 55 °C  
梯度: 220 nm  
梯度: A 水 (0.1% TFA), B 乙腈 (0.08% TFA),  
0-8 min 时 10%-60% B; 8.1-9 min 保持  
95% B  
样品: Sigma HPLC 多肽标样:  
1-Gly-Tyr, 2-Val-Tyr-Val, 3-Met Enk,  
4-Angio II, 5-Leu Enk

图 3. 使用 2.1 x 250 mm AdvanceBio 肽谱分析色谱柱实现最大分离度

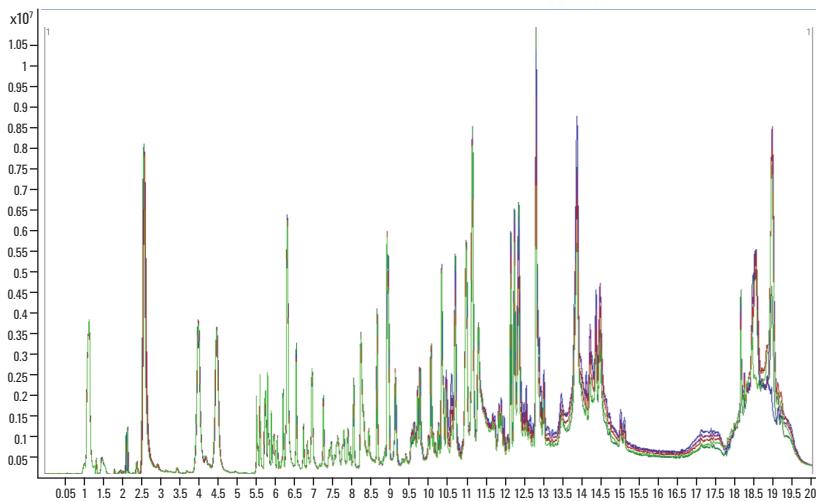
如需了解有关使用安捷伦反相色谱柱  
进行高分离度蛋白质分离的更多信息，  
请访问 [agilent.com/chem/AdvanceBio](http://agilent.com/chem/AdvanceBio)

## 快速或高分离度多肽分离的理想选择

Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱采用 2.7  $\mu\text{m}$  超高纯 ( $>99.995\%$  SiO<sub>2</sub>) 表面多孔硅胶，致密填装到 C18 柱中，能够提供多肽分离所需要的高选择性。与小粒径全多孔填料相比，这种填料在低压下柱效高。

由图 4 中可以看出，AdvanceBio 肽谱分析色谱柱能够确保峰高和保留时间的重现性，从而更准确地鉴定目标多肽。

### LC/MS 重现性



色谱柱:	<b>AdvanceBio 肽谱分析色谱柱,</b> 3.0 x 150 mm, 2.7 $\mu\text{m}$ , 部件号 653950-302	进样量:	1 $\mu\text{L}$
		柱温:	40 °C
LC/MS (Agilent 6520 Q-TOF) 参数:			梯度: A 水 (0.1% FA), B 乙腈 (0.10% FA), 0-3 min 时 2% B; 3-13 min 时 2%-45% B; 13-15 min 时 45%-65% B; 15.1-17 min 保持 90% B
干燥气体:	10 L/min, Vcap: 4000 V,		
碎裂电压:	150 V		
流速:	0.3 mL/min	样品:	Stratagene mAb, 胰蛋白酶解

图 4. 20 min 内即完成了 IgG1 胰蛋白酶的整个肽谱分析 (n=5)



## Agilent Poroshell 300 色谱柱 快速可靠地分离完整蛋白质 与蛋白质片段

Agilent Poroshell 色谱柱是您分离和表征包括完整蛋白质和蛋白质片段等复杂生物分子的理想选择，可耐受最高 400 bar。

我们推荐使用 Agilent Poroshell 300 色谱柱来快速分析完整蛋白质。Poroshell 300 表面多孔填料是一种革命性的色谱填料，能够实现蛋白质和其他大分子的快速、高分离度 RP-HPLC 分离。

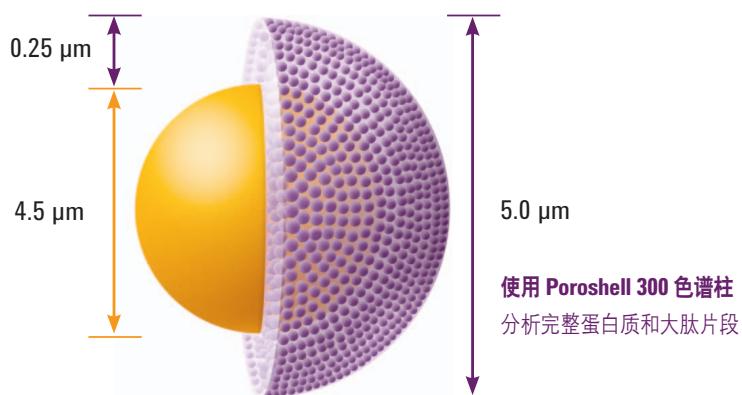
Poroshell 色谱柱能够实现在 300 Å 多孔薄层内外进行快速的质量转移，从而快速分离大分子，因而峰形更尖锐、分离度更高，定量翻译后修饰以及杂质的指纹图谱的结果也就更准确。

特性	优点
在实心填料内核外涂覆一层 0.25 μm, 300 Å 多孔层	<ul style="list-style-type: none"><li>减少了扩散距离，缩短了分析时间</li></ul>
5 μm 填料	<ul style="list-style-type: none"><li>更低的操作压力</li><li>由于需要捕集的样品减少，因此延长了色谱柱的寿命</li><li>在低压下获得 UHPLC 的分离度和效率，实现更快分离</li></ul>
StableBond 柱化学	<ul style="list-style-type: none"><li>低 pH 下性能稳定</li><li>使用 TFA 和甲酸流动相时，依旧保持长色谱柱寿命</li></ul>



更短分析时间、更高分离度、更低柱背压

### Poroshell 300 色谱柱



如需了解有关使用安捷伦反相色谱柱  
进行高分离度蛋白质分离的更多信息，  
请访问 [agilent.com/chem/AdvanceBio](http://agilent.com/chem/AdvanceBio)

## 2.1 mm 内径色谱柱实现高流速

Poroshell 300 色谱柱具有更大的 300Å 孔径以及薄外层，是您快速分离完整蛋白质的可靠选择。图 5 所示的分离用时不到 1.5 min。

由于表面多孔填料能够实现快速质量转移，所以 Poroshell 300 色谱柱是您在高流速下进行高效、超快速蛋白质分离的最佳选择。

### 多肽和蛋白质的分离

色谱柱: **Poroshell 300SB-C18**, 2.1 x 75 mm, 5 µm

流动相: A: 0.1% TFA

B: 含 0.07% TFA 的乙腈溶液

流速: 3.0 mL/min

柱温:

70 °C

检测器: UV 215 nm

梯度: 1.0 min 内 B 从 5% 到 100%

柱压: 250 bar

样品:

1. 血管紧张素 II

2. 神经降压素

3. 核糖核酸酶

4. 胰岛素

5. 溶菌酶

6. 肌红蛋白

7. 碳酸酐酶

8. 卵清蛋白

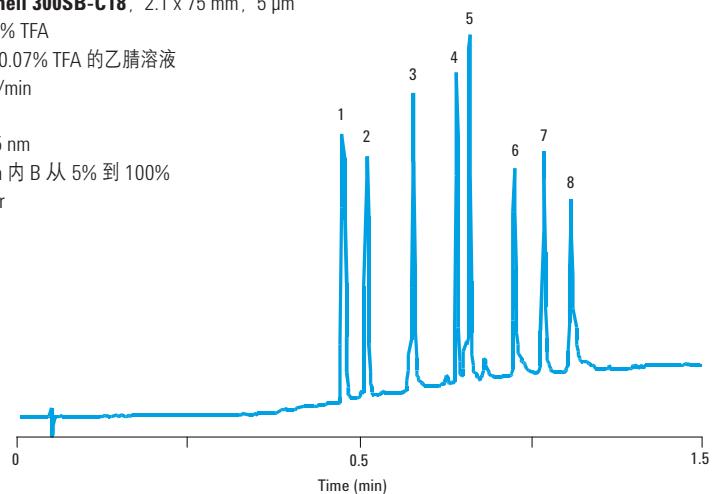


图 5. 在 1.5 min 内分离 8 种多肽和蛋白质，复杂样品的快速分离得到了良好的峰容量

### 分离单克隆抗体重链和轻链

色谱柱:

**Poroshell 300SB-C8**, 2.1 x 75 mm, 5 µm

流动相: A: 水 - 乙腈 (90:10)

B: 水 - 乙腈 (10:90)

A 和 B 含 0.1% 的 TFA 和 3 mL/L 的 PEG 300

流速: 1.0 mL/min

柱温:

70 °C

检测器:

UV 210 nm

梯度:

时间 (min)	% 溶剂 B
0.00	25
10.00	40
10.10	25
12.00	25

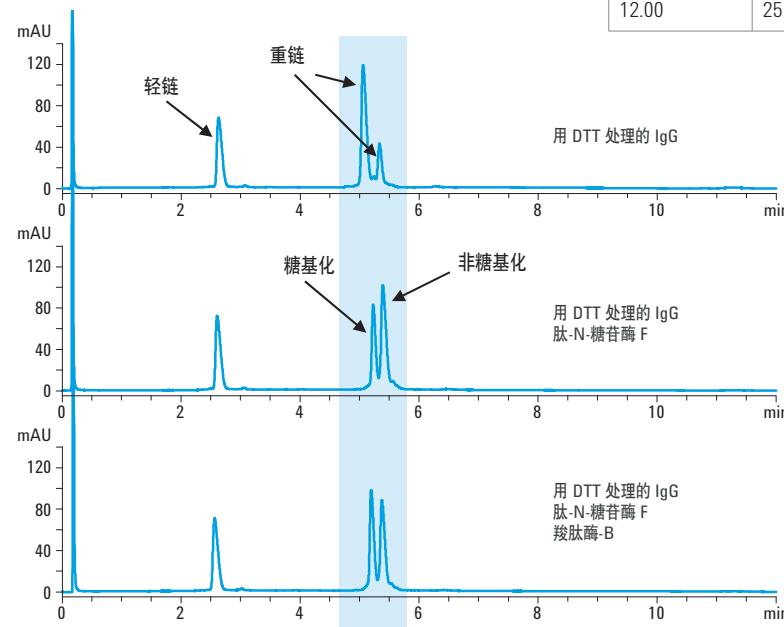


图 6. 经还原和酶裂解的抗体 IgG 的色谱图对比

## 超快速分离优势

与竞争厂商的表面多孔 3.7  $\mu\text{m}$ , 150 mm (低流速) 色谱柱相比, 5  $\mu\text{m}$  Poroshell 300 色谱柱具有显著的快速分离优势。

从图 7 可以看出, Poroshell 300 色谱柱在超高速梯度下实现超快速分离且仍然保持了良好的分离度, 而且 HPLC 的压降还维持在 400 bar 以内。Agilent Poroshell 300 色谱柱对 8 种蛋白质的分离速度比其他厂商的表面多孔色谱柱快 12 倍。

### Poroshell 300 与竞争厂商色谱柱 – 安捷伦色谱快 12 倍

色谱柱:

竞争厂商色谱柱: C18, 2.1 x 150 mm

样品:

蛋白质混标 (13 kDa - 660 kDa)

流动相:

A: 水 (0.1% TFA)

B: 乙腈 (0.08% TFA)

柱温:

40 °C

DAD:

UV 215 nm

梯度:

5%-90% B, 60 min, 0.3 mL/min

样品:

1. 核糖核酸酶 A 5. 转铁蛋白

2. 溶菌酶

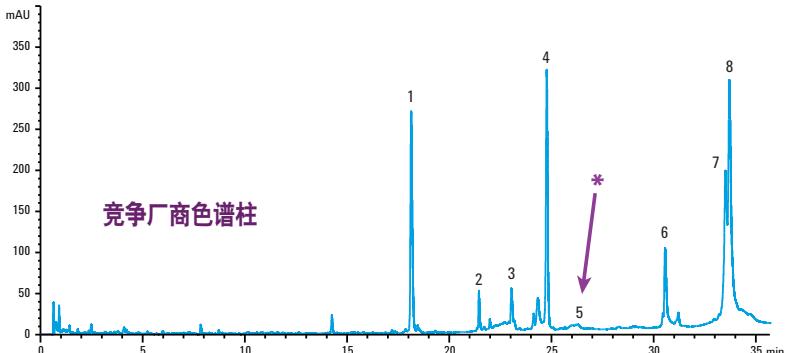
6. 肌红蛋白

3. 细胞色素 c

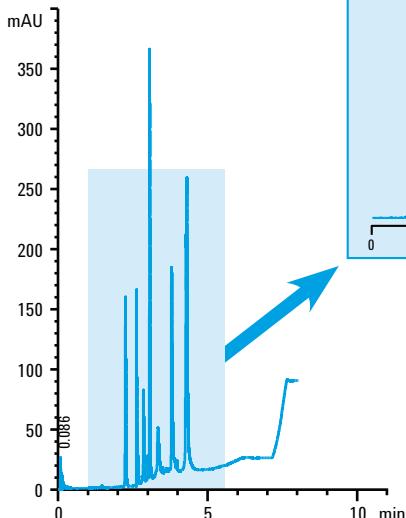
7.  $\beta$ -淀粉酶

4. 胰岛素

8. 甲状腺球蛋白



### 安捷伦色谱柱 12 倍速



色谱柱: Poroshell 300SB-C18 柱, 2.1 x 75 mm

流动相: A: 水 (0.1% TFA)

B: 乙腈 (0.08% TFA)

柱温: 40 °C

DAD: UV 215 nm

梯度: 5%-90% B, 5 min, 2.5 mL/min

\* 使用 Agilent Poroshell 300 色谱柱分析得到的第 5 个峰 (转铁蛋白) 峰形更尖锐、准确性更高。

图 7. 与竞争厂商色谱柱相比, Poroshell 300 SB-C18 色谱柱具有超快速分离的优势

如需了解有关使用安捷伦反相色谱柱  
进行高分离度蛋白质分离的更多信息,  
请访问 [agilent.com/chem/AdvanceBio](http://agilent.com/chem/AdvanceBio)

## 多种键合相为您提供更强的分离能力和更高的回收率

Poroshell 300 HPLC 有四种键合相（选择性）供您选择：300SB-C18、300SB-C8、300SB-C3 和 300Extend-C18。

300SB-C8 和 300SB-C3 键合相的链较短，因而疏水性较弱。例如，在图 8 描述的条件下，胰岛素和细胞色素 c 在 Poroshell 300SB-C3 色谱柱上可以实现基线分离，但是在 Poroshell 300SB-C18 中却会共流出。

对于某些复杂样品来说，蛋白质的回收率是一个问题。使用疏水性较弱的 Poroshell 300SB-C8 和 C3 色谱柱可以显著提高回收率。

图 9 显示在 Poroshell 300SB-C3 色谱柱上进 100 μL 发酵液后马上进 100 μL 水空白样所得到的谱图。由于提高了样品回收率以及关键化合物对的峰分离度，蛋白质分析的准确度也得到了提高。

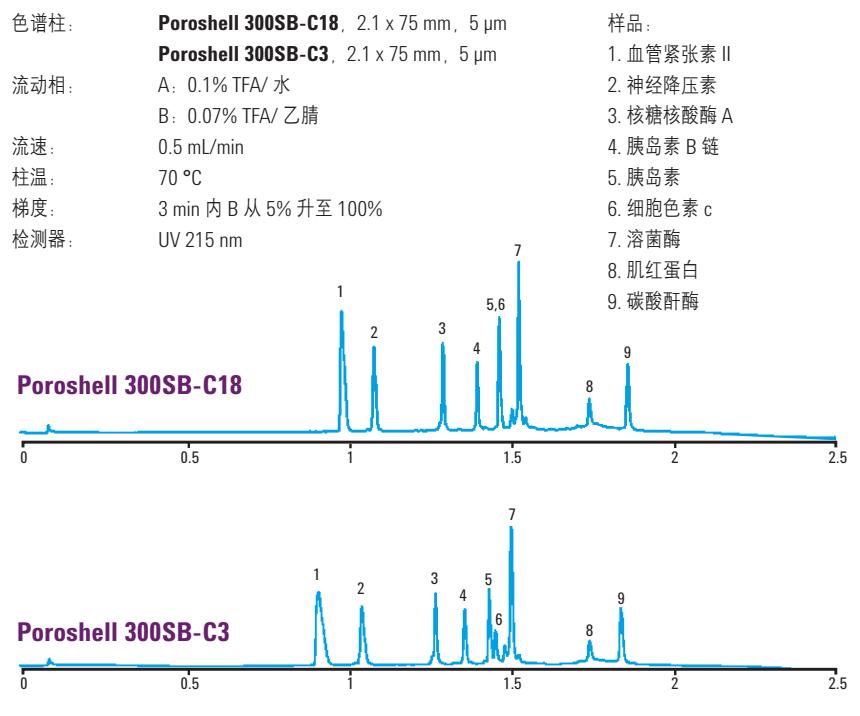


图 8. Poroshell 300SB-C3 分离了峰 5 (胰岛素) 和峰 6 (细胞色素 c)，如果使用疏水性更强的 C18 固定相，这两种物质会共流出

色谱柱: **Poroshell 300SB-C3**, 2.1 x 75 mm, 5 μm  
流动相: A: 0.1% TFA/ 水  
B: 0.07% TFA/ 乙腈  
流速: 1.0 mL/min  
柱温: 50 °C  
梯度: 在 10.5 min 内 B 由 10 % 升至 60%，然后在 1 min 内升至 100%。  
在进 100 μL 澄清发酵液后马上进水 (空白)  
检测器: UV 215 nm

提高分析的准确度  
和精度

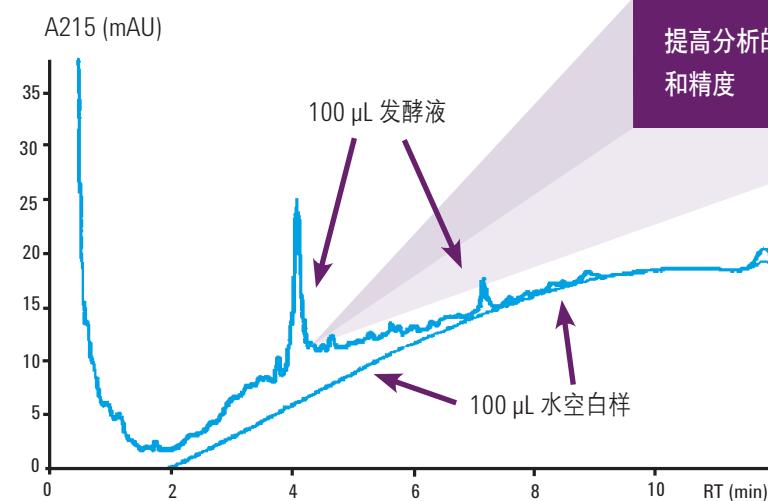


图 9. 使用 Agilent Poroshell 300SB-C3 色谱柱没有残留污染

## 在 pH 2-11.5 范围内具有独特选择性

图 10 表明，选择性差异与 Poroshell 300

色谱柱的高分离能力能够极大提高分离性能。

Poroshell 300Extend-C18 色谱柱将双配位硅烷与双封端处理技术相结合，能够有效保护硅胶颗粒，避免它们在高 pH 条件下发生溶解，从而延长了色谱柱在高 pH 条件下的寿命，并且提高了基线稳定性。

图 11 表明疏水性最强的 C18 固定相能够在不到一分钟的时间里快速分离小蛋白质和多肽。

色谱柱: **Poroshell 300**, 2.1 x 75 mm, 5  $\mu$ m  
样品: 降解胰岛素  
流动相: A: 水 (0.1% TFA)  
B: 乙腈 (0.08% TFA)  
流速: 1.75 mL/min  
柱温: 45 °C  
梯度: 5% B 保持 0.3 min, 然后在 2.7 min 内从 5% 升至 65%

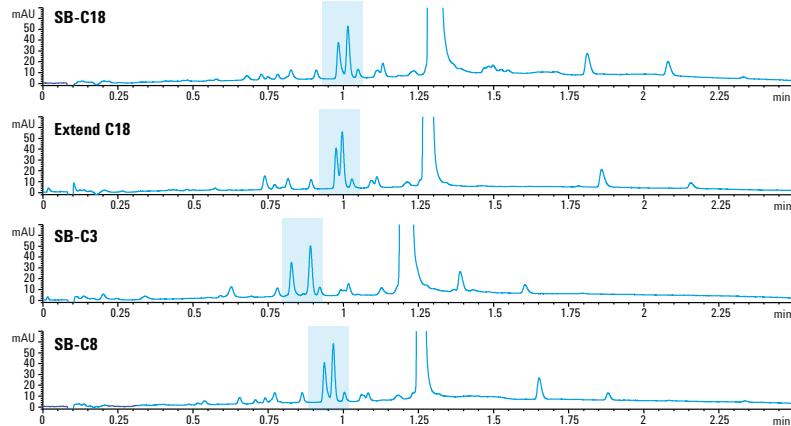


图 10. 改变键合相能够提高难分离化合物对的峰分离度，进而提高分析准确性

色谱柱: **Poroshell 300SB-C18**, 2.1 x 75 mm, 5  $\mu$ m  
样品: 多肽 / 蛋白, 0.5  $\mu$ L  
用部件号 G1312-67301 旁路混合器;  
用旁路定量环程序  
流动相: A: 0.1% TFA 水溶液  
B: 0.07% TFA 乙腈溶液  
流速: 3 mL/min.  
梯度: 1.33 min 内 B 由 0% 升至 100%  
柱温: 70 °C  
Detector: DAD 215/16 nm, 参比波长 = 310/10 nm

样品:  
1. gly-tyr 0.125 mg/mL  
2. Val-tyr-val 0.5 mg/mL  
3. 甲硫氨酸 - 脑啡肽 0.5 mg/mL  
4. 亮氨酸 - 脑啡肽 0.5 mg/mL  
5. 血管紧张素 II 0.5 mg/mL  
6. 核糖核酸酶 A 1 mg/mL  
7. 细胞色素 c 1 mg/mL  
8. 全合酶转铁蛋白 1 mg/mL  
9. 脱辅基肌红蛋白 1 mg/mL

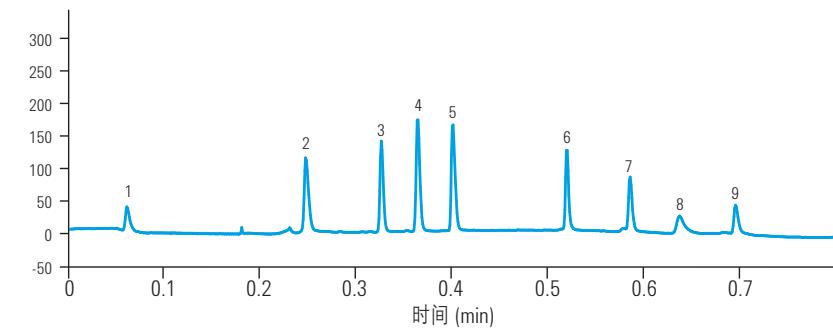


图 11. 1 min 内即可快速分离小蛋白和多肽

如需了解有关使用安捷伦反相色谱柱  
进行高分离度蛋白质分离的更多信息，  
请访问 [agilent.com/chem/AdvanceBio](http://agilent.com/chem/AdvanceBio)



## Agilent ZORBAX RRHD 色谱柱 300Å 1.8 MM 填料确保在 1200 BAR 下保持稳定

大孔径 ZORBAX RRHD 300SB-C18、C8、C3 和 300-Diphenyl 1.8 μm 色谱柱可为完整蛋白质和多肽裂解物的反相分离提供 UHPLC 性能。用于 UHPLC 仪器（比如 Agilent 1290 Infinity 液相色谱）时，这些用途广泛的色谱柱能够在更短的分析时间里完成更准确的鉴定。

此外，ZORBAX StableBond 技术（C18、C8 和 C3）还具有如下优点：

- ▶ **低 pH 条件下非常稳定**，可以使用三氟乙酸（TFA）和甲酸作为洗脱液，在低至 pH 1 的条件下信心十足地进行蛋白质和多肽的分离
- ▶ **热稳定性**，可在高达 80 °C 的温度下保持稳定，可在高温下进行分离而无需担心色谱柱寿命受到影响。因此您能够提高效率并降低流动相黏度

联苯固定相可提供独特的选择性。



具有四种不同的配体类型：C18、C8、和 C3 烷基链；除芳香氨基酸的 pi-pi 相互作用外，联苯还提供了额外选择性。安捷伦拥有最为齐全的反相色谱柱供您在多肽和蛋白质 UHPLC 分离时进行选择。

### 单克隆抗体的重现性和回收率

在分析包括单克隆抗体在内的大分子蛋白质时使用了较短的、疏水性更弱的 C8 柱。提高了分离度，获得高回收率。

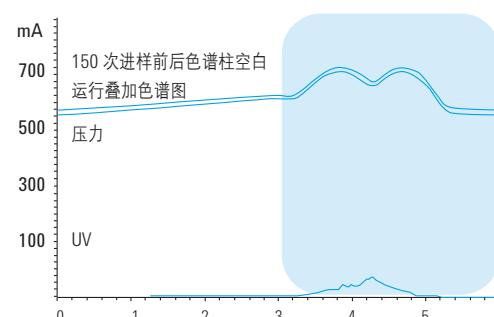
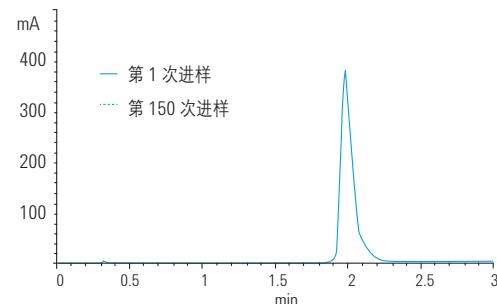


图 12. 本例子证明 Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C8 色谱柱在进样 150 次后重现性和柱寿命均良好，保留时间没有漂移，峰形也没有异常。下方的色谱图给出了进样 150 针前后空白运行和梯度压力曲线，证明进样 150 次后没有出现鬼峰，压力也没有上升——也就是说，无柱失效、无样品损失定量的准确性提高

## 速度更快、分离度更高

以往，独特的联苯固定相只能用于小孔径的100Å Pursuit XRs 和 200Å Pursuit 色谱柱。而现在，通过应用于 ZORBAX 300Å 1.8 µm 色谱柱的成熟键合技术，使得联苯独特的选择性也能用于大分子蛋白质的分离了。

与 3.7 µm 色谱柱（低流速模式）相比，1.8 µm RRHD 色谱柱具有快速分离的优势，后者分析速度更快，且分离度可与前者相媲美。从图 14 可以看出，采用超快速梯度的超快速分离速度下，1.8 µm 色谱柱保持（甚至超越）了良好的分离度，展现出卓越的 UHPLC 优势。

### 还原态单克隆抗体的快速分离

色谱柱：ZORBAX RRHD 300SB-C3 和 300-Diphenyl 柱，2.1 x 100 mm, 1.8 µm  
样品：还原态单克隆抗体 (IgG1) (1.0 mg/mL)  
进样量：2 µL  
流动相：  
A: 0.1% TFA 水溶液  
B: 80% 正丙醇、10% 乙腈、9.9% 水和 0.1% TFA  
梯度：0 min -1% B, 2 min -20% B, 5 min -50% B  
流速：0.5 mL/min  
柱温：74 °C  
检测器：UV 280

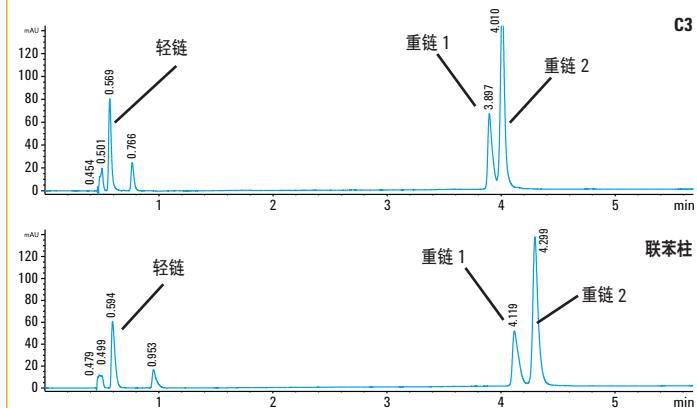


图 13. 使用 Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3 和 300-Diphenyl, 2.1 x 100 mm, 1.8 µm 色谱柱进行还原态单克隆抗体快速分离的谱图对比，两条重链在联苯柱上的分离度更好

### ZORBAX RRHD 与竞争厂商色谱柱

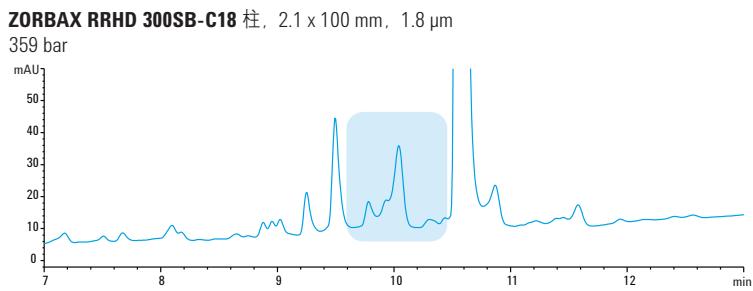
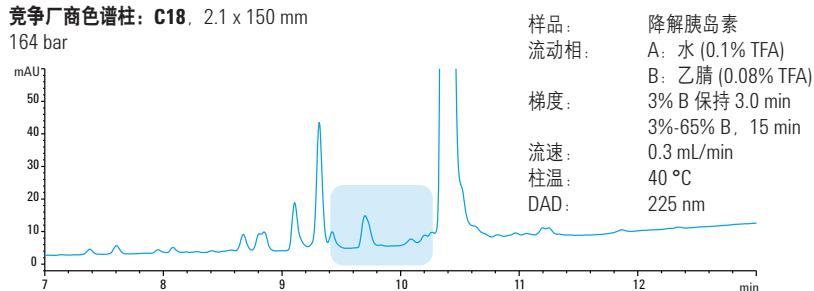


图 14. 分离降解胰岛素。可以看出，安捷伦快速高分离度 300Å 1.8 µm 色谱柱的带宽和峰形都比竞争厂商色谱柱的更好（降解胰岛素的分离度更高）

如需了解有关使用安捷伦反相色谱柱  
进行高分离度蛋白质分离的更多信息，  
请访问 [agilent.com/chem/AdvanceBio](http://agilent.com/chem/AdvanceBio)

Agilent ZORBAX 300Å 3.5 和  
5 μm 色谱柱  
**在 pH 1-6 范围内具有优异  
的化学稳定性和热稳定性**

Agilent ZORBAX 300StableBond 色谱柱是蛋白和多肽进行重现分离的理想选择，主要有以下两个原因：

- ▶ 大孔径 300Å 色谱柱能够使蛋白质、多肽和其他大分子完全通过键合相
- ▶ ZORBAX 300StableBond 色谱柱在低 pH 流动相条件（常用于分离蛋白质和多肽的含三氟乙酸）下具有无可比拟的稳定性

在低 pH 下进行 LC/MS 分离时，ZORBAX 300StableBond 色谱柱还可以使用甲酸和乙酸作为流动相改性剂。

这类色谱柱有四种不同键合相可供选择（**StableBondC18、C8、C3 和 Extend-C18**），用于优化蛋白质和多肽的选择性与回收率。为了进一步提高样品回收率并改进复杂蛋白质的分析效率，300StableBond 柱可以在高达 80-90 °C 的温度下使用。

**短链 ZORBAX 300SB-C3 填料在低 pH 和高温下很稳定，能够实现高重现性分离并延长色谱柱寿命**

色谱柱：**ZORBAX 300SB-C3**, 4.6 x 150 mm, 5 μm  
流动相：  
梯度 80 min 内 B 从 0% 升至 100%  
A: 含 0.5% TFA 的水溶液  
B: 含 0.5% TFA 的乙腈溶液  
等度保留测试条件：  
1-苯基庚烷 50% A, 50% B  
流速：1.0 mL/min  
柱温：60 °C

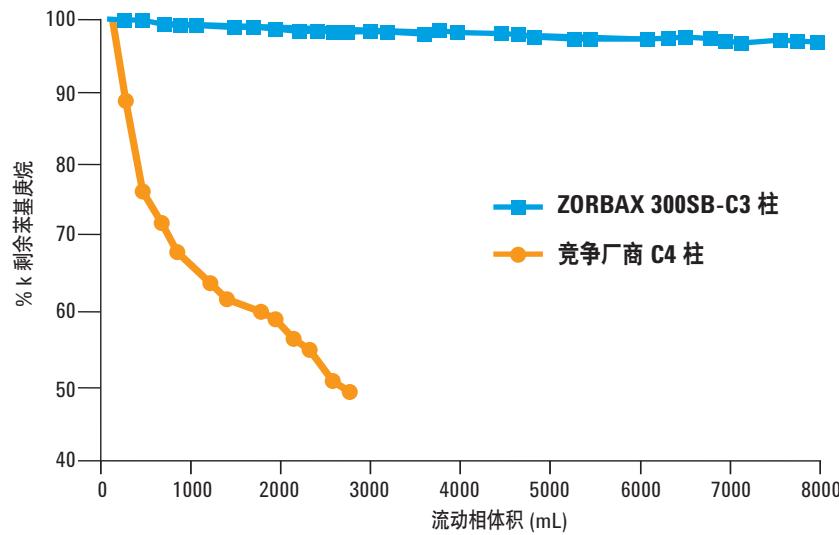
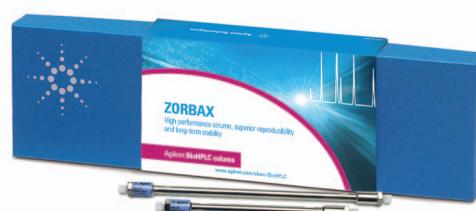


图 15. 通常添加 TFA (或其他酸) 使流动相 (常用于蛋白质和多肽分离) 形成极低 pH 值并在高温下变性和溶解蛋白质。Agilent StableBond 柱在这种条件下具有极长的柱寿命



## Agilent PLRP-S HPLC 色谱柱 在极端条件下也能实现重现性良好的分离

Agilent PLRP-S 色谱柱系列包括各种孔径和填料大小，所有填料都具有相同的化学特性和基本的色谱特性。它们具有如下特点：

- ▶ 耐用的弹性聚合物填料提供重现性结果，色谱柱寿命更长
- ▶ 热稳定和化学稳定性高，能够用于极端 pH 和高温条件下的分离
- ▶ 100-4000 Å 的孔径可用于分离各种大小的蛋白质和多肽

PLRP-S 填料本质上是疏水的，因此没有键合相，烷基配体需要进行反相分离。从而确保了这种高重现性材料不含硅烷醇与重金属离子。

此外，PLRP-S 可以用于分析型分离和制备纯化，也可以用大量散装填料进行装填。

纯化蛋白质时，可能需要用 PLRP-S 填料净化柱子。如图 17 所示，可以使用包括 1 M NaOH 在内的腐蚀性极强的清洗剂按顺序进行清洗。可以用一系列的溶解剂如氢氧化钠在填充柱 (CIP) 中清洗填料，也可以在散装的形式下清洗填料，以确保能够获得无可比拟的色谱柱和填料寿命。

### 大分子纤维蛋白

1. 胶原蛋白 (120000 MW)  
2. 纤维蛋白原 (340000 MW)

色谱柱: **PLRP-S 300 Å**  
4.6 x 150 mm, 8 µm  
色谱柱: **PLRP-S 1000 Å**  
4.6 x 150 mm, 8 µm  
流动相: A: 含 0.25% TFA 的水溶液  
B: 含 0.25% TFA 的 5% 水 : 95% 乙腈溶液  
流速: 1.0 mL/min  
梯度: 15 min 内 B 由 20% 升至 60%  
检测器: UV 220 nm

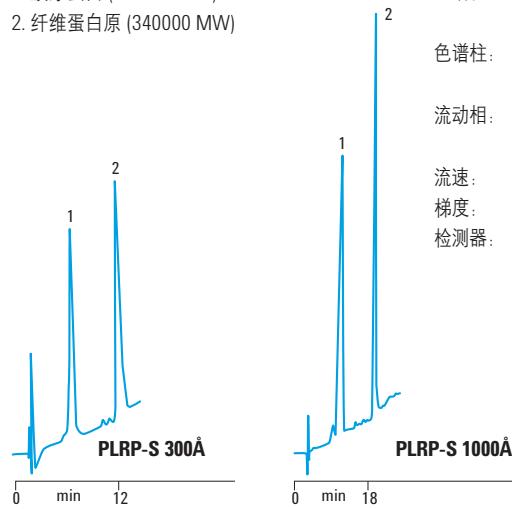


图 16. 如图所示，Agilent PLRP-S 300 Å 和 PLRP-S 1000 Å 填料能够分离大分子纤维蛋白质。但是，孔径更大的 PLRP-S 1000 Å 色谱柱得到的峰形更好，峰高更高

### 利用化学稳定性 — NaOH 浓度

1. 催产素  
2. 血管紧张素 II  
3. 血管紧张素 I  
4. 胰岛素

色谱柱: **PLRP-S 300 Å**  
4.6 x 250 mm, 10-15 µm  
流动相: A: 含 0.1% TFA 的水溶液  
B: 含 0.1% TFA 的乙腈溶液  
梯度: 15 min 内 B 由 20% 升至 50%  
流速: 1.0 mL/min  
检测器: UV 220 nm

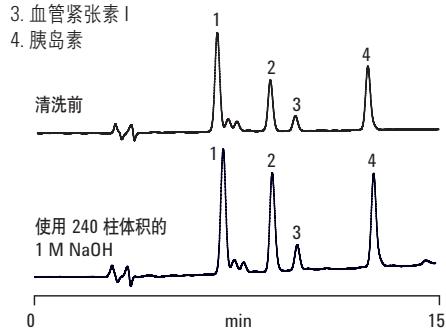


图 17. Agilent PLRP-S 填料的化学稳定性强，能够耐受腐蚀性极强的净化 / 清洗剂的清洗，从而确保获得无可比拟的色谱柱和填料寿命



# 用于蛋白质鉴定和杂质分析的安捷伦仪器



用于蛋白质鉴定 —  
使用 Poroshell 300 柱  
可获得最佳结果

## Agilent 1260 Infinity 生物惰性 四元液相色谱系统：蛋白质分离 的最佳选择

唯一能提供无金属样品流路的 UHPLC。其它优势还包括：

### ► 100% 生物惰性

- 不含不锈钢：样品不会接触到金属表面
- pH 1 至 pH 13（短时间可耐受 pH 14）
- 可在 2 M 盐和 8 M 尿素条件下操作
- 最新的毛细管技术

### ► UHPLC 级分析性能：600 bar

- 稳定易用：表面活性低，耐腐蚀，主动密封垫冲洗和四元缓冲液混合功能



## Agilent 1290 Infinity 二元液相 色谱系统：适应性最强、应用范 围最广的 UHPLC 系统

在 LC/UV 和 LC/MS 的单位时间分离度、分散值、灵敏度、准确度和精度等方面具有一流的性能 — 再加上创新性的主动阻尼、微流混合和光学波导检测技术：

- 高达 1200 bar 和 5 mL/min 的 UHPLC 性能范围
- 最快和最简便的方法转移（使用 ISET，安捷伦独特的智能系统模拟技术）
- 以近似于 HPLC 的成本获得 UHPLC 的效率

用于杂质分析、肽谱  
分析或超快速梯度 —  
使用 ZORBAX RRHD  
300<sup>Å</sup> 1.8 μm 可得  
最佳结果



## Agilent 1260 Infinity 二元液相色 谱系统：将分析型 HPLC 的标准 提升至 600 bar、80 Hz 高速检测 器和最高 10 倍的灵敏度

100% HPLC 兼容性，拥有 UHPLC 的功能：

- 以近似于 HPLC 的成本获得 UHPLC 的效率
- 支持 LC 和 LC/MS 应用 — 可使用窄径和标准径分析柱（2.1 - 4.6 mm 内径）
- 高压混合获得卓越的梯度准确度

适用于所有标准  
UHPLC 应用



## Agilent 1290 Infinity 四元液相 色谱系统：高性能与灵活性的完 美结合

唯一具有二元泵准确性和精度的二元 UHPLC 系统。其它优势还包括：

- 高达 1200 bar 和 5 mL/min 的 UHPLC 性能范围
- BlendAssist（混合助手），实现缓冲液和添加剂准确混合的最简便工具
- 以近似于 HPLC 的成本获得 UHPLC 的效率

适用于方法开发或  
含准确缓冲液混合功能  
的无人值守  
(walk-up) 系统

## 订购信息和性能指标

### 用于蛋白质分析的 Poroshell 300 色谱柱

键合相	孔径	最高使用温度	pH 范围	封端	
300SB-C18, C8, C3	300Å	90 °C	1.0 至 8.0	否	
300Extend-C18	300Å	pH > 8 时, 40 °C, pH < 8 时, 60 °C	2.0 至 11.0	是	
说明	规格 (mm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7	300SB-C3 USP L3	300Extend-C18 USP L1
毛细管柱	0.5 x 75		5065-4468		
毛细管柱	0.5 x 75		5065-4468		
微径柱	1.0 x 75	661750-902	661750-906	661750-909	971750-902
窄径柱	2.1 x 75	660750-902	660750-906	660750-909	970750-902
保护柱芯, 4/ 包	2.1 x 12.5	821075-920	821075-918	821075-924	
保护柱卡套		820888-901	820888-901	820888-901	
微径保护柱, 3/ 包	1.0 x 17	5185-5968	5185-5968	5185-5968	5185-5968



### 用于 HPLC 和 UHPLC 蛋白质分离的 ZORBAX 300Å 色谱柱

键合相	孔径	比表面积	最高使用温度	pH 范围	封端	碳载量
300SB-C18	300Å	45 m <sup>2</sup> /g	90 °C	1.0 至 8.0	否	2.8%
300SB-C8	300Å	45 m <sup>2</sup> /g	80 °C	1.0 至 8.0	否	1.5%
300SB-C3	300Å	45 m <sup>2</sup> /g	80 °C	1.0 至 8.0	否	1.1%
300SB-CN	300Å	45 m <sup>2</sup> /g	80 °C	1.0 至 8.0	否	1.2%
300Extend-C18	300Å	45 m <sup>2</sup> /g	60 °C	2.0 至 11.5	Double	4%
300-Diphenyl	300Å	45 m <sup>2</sup> /g	80 °C	1.0 至 8.0	是	1.9%



说明	规格 (mm)	粒径 (μm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7	300SB-CN USP L10	300SB-C3 USP L56	300Extend-C18 USP L1	300-Diphenyl USP L11
微径柱	1.0 x 250	5	861630-902					
快速分离微径柱	1.0 x 150	3.5	863630-902	863630-906				
快速分离微径柱	1.0 x 50	3.5	865630-902	865630-906				
窄径柱	2.1 x 250	5	881750-902					
窄径柱	2.1 x 150	5	883750-902	883750-906	883750-905	883750-909		
窄径柱	2.1 x 100	1.8	858750-902	858750-906		858750-909	858750-944	
窄径柱	2.1 x 50	1.8	857750-902	857750-906		857750-909	857750-944	
快速分离窄径柱	2.1 x 150	3.5		863750-906			763750-902	
快速分离窄径柱	2.1 x 100	3.5	861775-902	861775-906			761775-902	
快速分离窄径柱	2.1 x 50	3.5	865750-902	865750-906			765750-902	
溶剂节省 Plus 柱	3.0 x 150	3.5	863974-302	863974-306		863974-309		
溶剂节省 Plus 柱	3.0 x 100	3.5		861973-306				
分析柱	4.6 x 250	5	880995-902	880995-906	880995-905	880995-909	770995-902	
分析柱	4.6 x 150	5	883995-902	883995-906	883995-905	883995-909	773995-902	
分析柱	4.6 x 50	5	860950-902	860950-906	860950-905	860950-909		
快速分离柱	4.6 x 150	3.5	863973-902	863973-906	863973-905	863973-909	763973-902	
快速分离柱	4.6 x 100	3.5	861973-902	861973-906			761973-902	
快速分离柱	4.6 x 50	3.5	865973-902	865973-906	865973-905	865973-909	765973-902	
半制备柱	9.4 x 250	5	880995-202	880995-206	880995-205	880995-209		
微径保护柱, 3/ 包	1.0 x 17	5	5185-5920	5185-5920				
保护柱芯, 4/ 包	4.6 x 12.5	5	820950-921	820950-918	820950-923	820950-924	820950-932	
保护柱芯, 4/ 包	2.1 x 12.5	5	821125-918	821125-918	821125-924	821125-924	821125-932	
PrepHT 卡套柱	21.2 x 250	7	897250-102	897250-106	897250-105	897250-109		
PrepHT 卡套柱	21.2 x 150	7	897150-102	897150-106		897150-109		
PrepHT 卡套柱	21.2 x 150	5	895150-902	895150-906		895150-909		
PrepHT 卡套柱	21.2 x 100	5	895100-902	895100-906		895100-909		
PrepHT 卡套柱	21.2 x 50	5	895050-902	895050-906		895050-909		
PrepHT 柱接头, 2/ 包			820400-901	820400-901	820400-901	820400-901		
PrepHT 保护柱芯, 2/ 包	17 x 7.5	5	820212-921	820212-918	820212-924	820212-924		
保护柱卡套			820444-901	820444-901	820444-901	820444-901		

## pH 范围最宽的 PLRP-S HPLC 色谱柱

说明	规格 (mm)	粒径 ( $\mu\text{m}$ )	PLRP-S 100Å USP L21	PLRP-S 300Å USP L21	PLRP-S 1000Å USP L21	PLRP-S 4000Å USP L21
微径柱	1.0 x 50	3	PL1312-1300	PL1312-1301		
微径柱	1.0 x 50	5	PL1312-1500		PL1312-1502	
微径柱	1.0 x 150	3	PL1312-3300			
分析柱	4.6 x 50	8		PL1512-1801	PL1512-1802	PL1512-1803
分析柱	4.6 x 250	5	PL1512-5500	PL1512-5501		
分析柱	4.6 x 150	5	PL1111-3500	PL1512-3501		
分析柱	4.6 x 50	5	PL1512-1500	PL1512-1501	PL1512-1502	PL1512-1503
分析柱	4.6 x 150	3	PL1512-3300	PL1512-3301		
分析柱	4.6 x 50	3	PL1512-1300	PL1512-1301		
分析柱	2.1 x 250	8		PL1912-5801		
分析柱	2.1 x 150	8		PL1912-3801	PL1912-3802	PL1912-3803
分析柱	2.1 x 50	8		PL1912-1801	PL1912-1802	PL1912-1803
分析柱	2.1 x 250	5	PL1912-5500	PL1912-5501		
分析柱	2.1 x 150	5	PL1912-3500	PL1912-3501		
分析柱	2.1 x 50	5	PL1912-1500	PL1912-1501	PL1912-1502	PL1912-1503
分析柱	2.1 x 150	3	PL1912-3300	PL1912-3301		
分析柱	2.1 x 50	3	PL1912-1300	PL1912-1301		
方法开发	4.6 x 250	30		PL1512-5702	PL1512-5703	821125-918
方法开发	4.6 x 250	15-20	PL1512-5200	PL1512-5201		
方法开发	4.6 x 250	10-15	PL1512-5400	PL1512-5401		
方法开发	4.6 x 250	10	PL1512-5100	PL1512-5101	PL1512-5102	PL1512-5103
方法开发	4.6 x 250	8	PL1512-5800	PL1512-5801	PL1512-5802	
方法开发	4.6 x 150	30			PL1512-3702	PL1512-3703
方法开发	4.6 x 150	15-20	PL1512-3200	PL1512-3201		
方法开发	4.6 x 150	10-15		PL1512-3401		
方法开发	4.6 x 150	10	PL1512-3100	PL1512-3101	PL1512-3102	PL1512-3103
方法开发	4.6 x 150	8	PL1512-3800	PL1512-3801	PL1512-3802	PL1512-3803
前处理步骤	100 x 300	30			PL1812-3102	PL1812-3103
前处理步骤	100 x 300	15-20	PL1812-6200	PL1812-6201	880995-902	880995-906
前处理步骤	100 x 300	10-15	PL1812-6400	PL1812-6401	883995-902	883995-906
前处理步骤	100 x 300	10	PL1812-6100	PL1812-6101	860950-902	860950-906
前处理步骤	100 x 300	8	PL1812-6800	PL1812-6801	863973-902	863973-906
前处理步骤	50 x 300	8	PL1712-6800	PL1712-6801	861973-902	861973-906
前处理步骤	50 x 150	30			PL1712-3702	PL1712-3703
前处理步骤	50 x 150	15-20	PL1712-3200	PL1712-3201	863974-302	863974-306
前处理步骤	50 x 150	10-15	PL1712-3400	PL1712-3401		861973-306
前处理步骤	50 x 150	10	PL1712-3100	PL1712-3101	PL1712-3102	PL1712-3103
前处理步骤	50 x 150	8	PL1712-3800	PL1712-3801	883750-902	883750-906
前处理步骤	25 x 300	15-20	PL1212-6200	PL1212-6201		863750-906
前处理步骤	25 x 300	10-15	PL1212-6400	PL1212-6401	861775-902	861775-906
前处理步骤	25 x 300	10	PL1212-6100	PL1212-6101	865750-902	865750-906
前处理步骤	25 x 300	8	PL1212-6800	PL1212-6801	861630-902	
前处理步骤	25 x 150	30			PL1212-3702	PL1212-3703
前处理步骤	25 x 150	10	PL1212-3100	PL1212-3101	PL1712-3102	PL1712-3103
前处理步骤	25 x 150	8	PL1212-3800	PL1212-3801	5185-5920	5185-5920
前处理步骤	25 x 50	10			PL1212-1102	PL1212-1103
PLRP-S 保护柱芯	用于 5 x 3 mm 柱, 2/包		PL1612-1801	PL1612-1801	PL1612-1801	PL1612-1801
保护卡套柱卡套	用于 3.0 x 5.0 mm 柱芯		PL1310-0016	PL1310-0016	PL1310-0016	PL1310-0016

## PLRP-S HPLC 散装填料

粒径 ( $\mu\text{m}$ )	单位	PLRP-S 100Å USP L21	PLRP-S 300Å USP L21	PLRP-S 1000Å USP L21	PLRP-S 4000Å USP L21
50	1 kg	PL1412-6K00	PL1412-6K01	PL1412-6K02	
	100 g	PL1412-4K00	PL1412-4K01	PL1412-4K02	
30	1 kg			PL1412-6702	PL1412-6703
	100 g			PL1412-4702	PL1412-4703
15-20	1 kg	PL1412-6200	PL1412-6201	861973-906	
	100 g	PL1412-4200	PL1412-4201		
10-15	1 kg	PL1412-6400	PL1412-6401		
	100 g	PL1412-4400	PL1412-4401		
10	1 kg	PL1412-6100	PL1412-6101	PL1412-6102	PL1412-6103
	100 g	PL1412-4100	PL1412-4101	PL1412-4102	PL1412-4103
8	1 kg	PL1412-6800	PL1412-6801		

如果需要更大量, 请联系安捷伦客户服务中心

## Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱

说明	部件号
4.6 x 150 mm, 2.7 $\mu\text{m}$	653950-902
3.0 x 150 mm, 2.7 $\mu\text{m}$	653950-302
2.1 x 250 mm, 2.7 $\mu\text{m}$	651750-902
2.1 x 150 mm, 2.7 $\mu\text{m}$	653750-902
2.1 x 100 mm, 2.7 $\mu\text{m}$	655750-902
4.6 mm 快速保护柱*	850750-911
3.0 mm 快速保护柱*	853750-911
2.1 mm 快速保护柱*	851725-911



\*快速保护柱可以在不降低分离速度或不影响分离度的条件下延长色谱柱寿命

### 最大运行压力

400 bar      600 bar      1200 bar

ZORBAX RRHD 300Å 1.8  $\mu\text{m}$  色谱柱

Poroshell 300 色谱柱

ZORBAX 300Å 3.5 和 5  $\mu\text{m}$  色谱柱

PLRP-S 3 和 5  $\mu\text{m}$  色谱柱

AdvanceBio 2.7  $\mu\text{m}$  色谱柱

## Agilent AdvanceBio 色谱柱:

### 更快、一致性更好的生物制药分析

Agilent AdvanceBio 系列是最先进的生物色谱柱，可为多肽和蛋白质的分离鉴定提供一致、卓越的性能。

AdvanceBio 色谱柱的科学设计能够提高准确度和效率，同时消除那些妨碍分析的干扰。AdvanceBio 色谱柱经过了安捷伦的严格测试，确保您获得最好结果。它们均享有安捷伦 60 天全满意度质量保证。



# 安捷伦生物色谱柱： 选择快速、准确的反相 BioHPLC 获得值得信赖 的结果

- 产品齐全选择灵活，可用于反相生物分子分析
- 最前沿的快速液相色谱技术，可以在任何 HPLC 或 UHPLC 仪上应用，实现了快速和高分辨分析的表面多孔层 Poroshell 120 色谱柱技术
- 采用 ZORBAX RRHD 1.8  $\mu\text{m}$  色谱柱（1200 bar 压力下保持稳定），完善了 UHPLC 方法
- 优异的性能、重现性和超高价值 — 已通过数百万次进样分析加以证明
- 快速、一致的生物制药分析：Agilent AdvanceBio 肽谱分析 BioHPLC 色谱柱让您能快速分离并鉴定一级结构中的氨基酸修饰
- 卓越的峰形，通过创新的硅胶键合技术为蛋白质鉴定确证和杂质分析提供准确结果
- 广泛的选择性，为多肽和蛋白质分析提供高分离度和回收率

您也可以参考安捷伦众多的应用报告集成的数据协助您的方法开发，另外我们还有世界范围内的技术支持、快速问题解决方案，以及遍布全球的分支机构和配送网络。

## 用于纯化的 Load & Lock 色谱柱硬件

安捷伦提供 Load & Lock 前处理与工艺开发色谱柱硬件以及装柱机，可以纯化从几克到几千克的产品。还有更大包装的 PLRP-S 填料供您填充这些柱子。



## 需要样品前处理以进行蛋白 质分析？

安捷伦低蛋白质结合率过滤器是蛋白质和多肽等样品过滤的最佳选择，过滤中所产生的蛋白质结合程度始终最低。



## 如需了解更多信息

如需了解有关安捷伦反相色谱柱的更多信息，请访问 [www.agilent.com/chem/AdvanceBio](http://www.agilent.com/chem/AdvanceBio)

查找当地的安捷伦客户服务中心：  
[www.agilent.com/chem/contactus](http://www.agilent.com/chem/contactus)

安捷伦客户服务中心：  
**免费专线：800-820-3278**  
**400-820-3278 (手机用户)**

联系我们：

[customer-cn@agilent.com](mailto:customer-cn@agilent.com)

在线询价：

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

本文中的信息如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）公司，2013  
中国印制，2013年11月27日  
5991-0625CHCN



**Agilent Technologies**