

## 合成肽：用于分离、定量和表征的色谱方法

优化分析和纯化流程

脱酰胺肽段分离

合成肽分析

治疗性多肽定量

本定制电子书由安捷伦赞助，  
并与 LCGC 的 CHROMacademy 合作推出。



# 前言

**多**肽作为一类多功能分子，在生物技术、医学和科研领域具有广泛的应用。它们不仅可以用作药物、诊断试剂和生物标志物，还可作为研究细胞过程的重要工具。然而，多肽的复杂性、多样性和敏感性也为其分析和纯化带来了独特的挑战。在本电子书中，您将全面了解多肽分析和纯化的基本原理及方法，涵盖多肽合成、表征、分离、鉴定和定量等主题。此外，您还可以学习如何使用先进的仪器和色谱柱，在您的多肽研究项目中获得理想的结果。本电子书中的四篇文章将向您展示如何：

- 使用不同孔径的 Agilent PLRP-S 色谱柱优化合成肽的分析和纯化
- 使用 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱在不同 pH 条件下分离脱酰胺肽段
- 使用与质谱兼容的流动相和 AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱分析合成肽及其杂质
- 使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱和 Agilent 6495 三重四极杆液质联用系统对大鼠血浆中的治疗性多肽艾塞那肽进行定量分析

无论您是初涉多肽色谱分析领域的新手，还是经验丰富的专家，本电子书都将为您提供宝贵的见解和实用技巧，助您优化多肽分析与纯化工作流程。



# 使用 PLRP-S 色谱柱优化合成肽的分析和纯化

可靠的色谱柱和填料，具有出色的可扩展性和多种孔径，可成功纯化合成肽

## 作者

Andrea Angelo P. Tripodi  
Andrew Coffey

安捷伦科技有限公司

## 摘要

反相离子对色谱在使用含三氟乙酸（TFA，作为离子对试剂）的流动相来分析和纯化合成肽方面正得到越来越多的应用。从分析型高效液相色谱（HPLC）放大至制备型 HPLC 可能既昂贵又耗时，并且由于化学键合相、pH 条件、粒径和柱长的差异，通常难以实现。本应用简报介绍了合成肽的分析以及如何使用 Agilent PLRP-S 分析型 HPLC 色谱柱来放大方法。将梯度和上样信息直接应用于填充有相同填料的更大尺寸的制备柱。

## 前言

由于生物技术和生物工程（包括癌症诊断和治疗、抗生素药物开发和新疫苗）的发展，多肽治疗药物越来越受欢迎。大多数多肽药物通过固相多肽合成法 (SPPS) 进行生产。这些药物在聚合物载体或树脂上进行合成，而聚合物载体或树脂可以轻松地从反应中滤出。合成途径包括多个去保护、活化和偶联步骤。使用含有清除剂及其他组分的切割混合液从树脂上分离出最终肽序列，得到可直接纯化的最终粗产物。利用 HPLC 和反相色谱柱分析通过固相多肽合成法合成的粗制肽，使用乙腈水溶液（通常含有作为离子对试剂的 0.1% 三氟乙酸 (TFA)）进行梯度洗脱。基于液/质联用系统 (LC/MS) 的多肽分析通常用于确认目标分子的结构。然而，由于 TFA 会引起离子抑制，导致 MS 信号较弱，因此它并非 LC/MS 分析的理想选择。LC/MS 方法的首选离子对试剂是甲酸 (FA)，

一种比 TFA 更弱的酸。本研究使用了人胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 7-36 酰胺，这是一种含有 30 个氨基酸的多肽单链，分子量为 3297.7 道尔顿 (Da) (图 1)。本应用简报介绍了从分析型 PLRP-S 4.6 × 250 mm, 8 μm 色谱柱直接放大至更大规模的制备型 PLRP-S 21.2 × 250 mm, 8 μm 色谱柱的能力，考察了适用于分离多肽的两种孔径，即 100 Å 和 300 Å。Agilent PLRP-S 是一种刚性大孔径苯乙烯/二乙烯基苯 (PS-DVB) HPLC 固定相，具有出色的化学和物理稳定性。PLRP-S HPLC 填料本身具有疏水性，无需键合 C8 或 C18 等烷基链来赋予其疏水性。使用配备正交的 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱 (2.1 × 100 mm, 2.7 μm) 的 Agilent 6545XT AdvanceBio 液相色谱/四极杆飞行时间质谱 (LC/Q-TOF) 确认了最终产品的表征结果。

图 1. 合成的 GLP-1 (7-36) 酰胺的氨基酸序列

H-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-NH<sub>2</sub>

## 样品前处理

胰高血糖素样肽 GLP-17-36 酰胺由 CS Bio (Menlo Park, CA 94025, USA) 合成。用于合成的固相载体由安捷伦科技公司提供。使用标准侧链保护策略和偶联条件（苄基甲氧基羰基 (Fmoc) 化学基团）进行合成。

## 分析仪器

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统由以下模块组成：

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler，配备样品恒温箱 (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7117C)，配备 10 mm InfinityLab 最大光强卡套式流通池 (G7117-60020)

## 制备仪器

Agilent 1290 Infinity II 制备型液相色谱系统由以下模块组成：

- Agilent 1290 Infinity II 制备型二元泵 (G7161B)
- Agilent 1260 Infinity II 馏分收集器 (G7157A)
- Agilent 1290 Infinity II 制备柱阀智能管理单元 (G7163B)
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7165A)

## LC/MS 仪器

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱与 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 联用系统 (G6549AA)

## 软件和数据处理

- Agilent OpenLab 软件套装，2.6 版
- OpenLab ChemStation CDS，C01.09 版
- Agilent MassHunter 工作站数据采集软件，B10.00 版
- Agilent MassHunter BioConfirm 软件，10.00 版

## 色谱柱

- **分析柱：**Agilent PLRP-S 100 Å, 4.6 × 250 mm, 8 μm (部件号 PL1512-5800) ; Agilent PLRP-S 300 Å, 4.6 × 250 mm, 8 μm (部件号 PL1512-5801)
- **制备柱：**Agilent PLRP-S 100 Å, 21.2 × 250 mm, 8 μm ; Agilent PLRP-S 300 Å, 21.2 × 250 mm, 8 μm (定制规格)
- **LC/MS 色谱柱：**AdvanceBio 肽谱分析色谱柱 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 655750-902)

## 固相载体

- AmphiSpheres 40 RAM 0.4 mmol/g 75–150 μm (部件号 PL3867-4764)
- PL-Rink 树脂 (1% DVB) 0.3 mmol/g 75–150 μm

## 试剂与化学品

所有试剂均为 HPLC 级或更高等级

## 方法条件

表 1. 液相色谱参数

Agilent 1290 Infinity II 分析型液相色谱系统			
参数	设定值		
色谱柱	Agilent PLRP-S, 4.6 × 250 mm, 8 μm		
柱温箱	4 °C		
溶剂 A	0.1% TFA 水溶液		
溶剂 B	0.1% TFA 乙腈溶液		
梯度	梯度 1:		
	时间 (min)	%B	
	0-2	35	
	2-22	35-50	
	22-24	50-90	
	24-28	90	
	28-30	90-35	
	30-36	35	
	梯度 2:		
	时间 (min)	%B	
	0-2	35	
	2-22	35-65	
	22-24	65-90	
	24-28	90	
28-30	90-35		
30-36	35		
柱温	25 °C		
流速	1.0 mL/min		
进样量	5.0 μL		
Agilent 1290 Infinity II 制备型液相色谱系统			
色谱柱	Agilent PLRP-S, 21.2 × 250 mm, 8 μm		
柱温箱	4 °C		
溶剂 A	0.1% TFA 水溶液		
溶剂 B	0.1% TFA 乙腈溶液		
梯度	梯度 1:		
	时间 (min)	%B	
	0-2	35	
	2-22	35-50	
	22-24	50-90	
	24-28	90	
	28-30	90-35	
	30-45	35	
	柱温	室温	
	流速	21.2 mL/min	
进样量	100 μL		
馏分收集	2.5 mL 馏分; 基于时间		

表 2. LC/MS 数据采集参数

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF			
参数	设定值		
离子源	双 AJS		
极性	正		
气体温度	325 °C		
气流量	13 L/min		
雾化器	35 psi		
鞘气温度	275 °C		
鞘气流量	12 L/min		
毛细管电压	4000 V		
喷嘴电压	500 V		
碎裂电压	175 V		
锥孔电压	65 V		
采集模式	2.5 Hz		
质量数范围	100-2100 m/z		
采集速率	5 幅谱图/秒		
Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统			
色谱柱	AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm		
柱温箱	4 °C		
溶剂 A	0.1% 甲酸水溶液		
溶剂 B	0.1% 甲酸乙腈溶液		
梯度	时间 (min)	%B	
	0-2	3	
	2-23	3-47	
	23-25	47-50	
	25-26	50-97	
	26-27	97-3	
	27-30	3*	
	* 等度 (后运行)		
	柱温	55 °C	
	流速	0.3 mL/min	
进样量	20 μL		

## 结果与讨论

使用两种树脂合成目标 GLP-1 7-36 酰胺肽。第一种是 AmphiSpheres 40 RAM 0.4 mmol/g 75–150  $\mu\text{m}$ ，其含有聚乙二醇链，可改善树脂对难合成多肽的合成性能。第二种是 PL-Rink 树脂 (1% DVB) 0.3 mmol/g 75–150  $\mu\text{m}$ ，其载量更低，适用于合成更长的肽链。在相同的条件下进行合成，并得到两种粗制肽：多肽 1A (来自 AmphiSpheres 树脂) 和多肽 1B (来自 PL-Rink 树脂)。多肽的纯化通常要求

孔径为 100  $\text{\AA}$  或 300  $\text{\AA}$ 。该孔径下可大幅提高载量，同时尽可能减少大分子的进入受限或排阻现象，并保持所需的传质以实现理想的分离。粗制肽的分析型色谱分析是用于确认目标分子是否存在以及了解洗脱特性的不错的方法，因此非常有必要。最初，不了解两种样品的洗脱曲线，因此对不同的梯度方法进行了筛选 (图 2A、2B、3A 和 3B)，然后选择理想的梯度 (B 由 35% 升至 50%) 用于后续的制备型运行。实际方法条件见表 1。

图 2. (A) Agilent PLRP-S 100  $\text{\AA}$  色谱柱上针对多肽 1A 的梯度优化。  
(B) Agilent PLRP-S 100  $\text{\AA}$  色谱柱上针对多肽 1B 的梯度优化

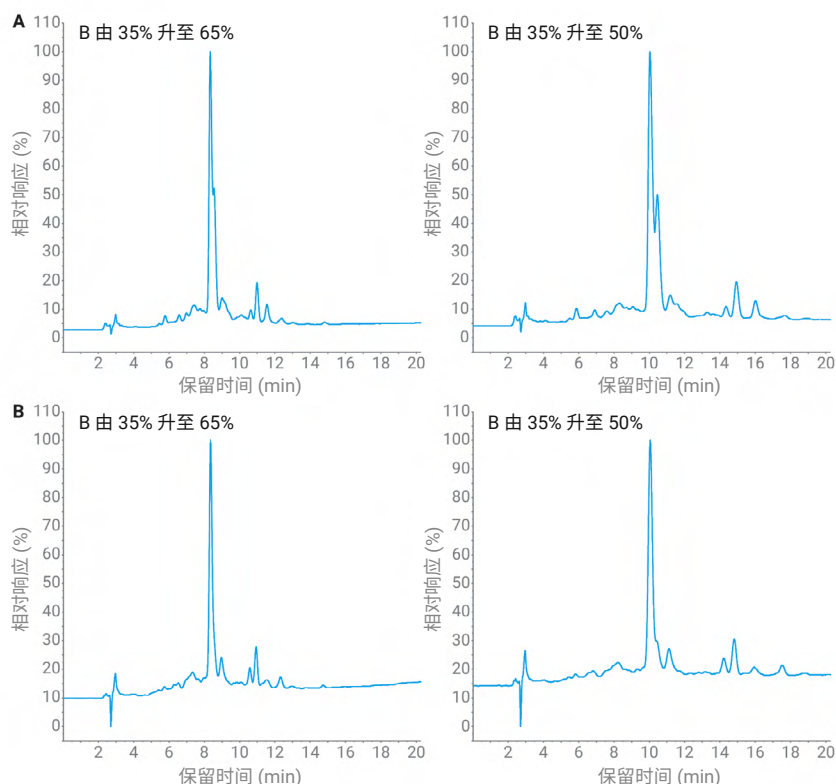


图 3. (A) Agilent PLRP-S 300 Å 色谱柱上针对多肽 1A 的梯度优化。  
(B) Agilent PLRP-S 300 Å 色谱柱上针对多肽 1B 的梯度优化

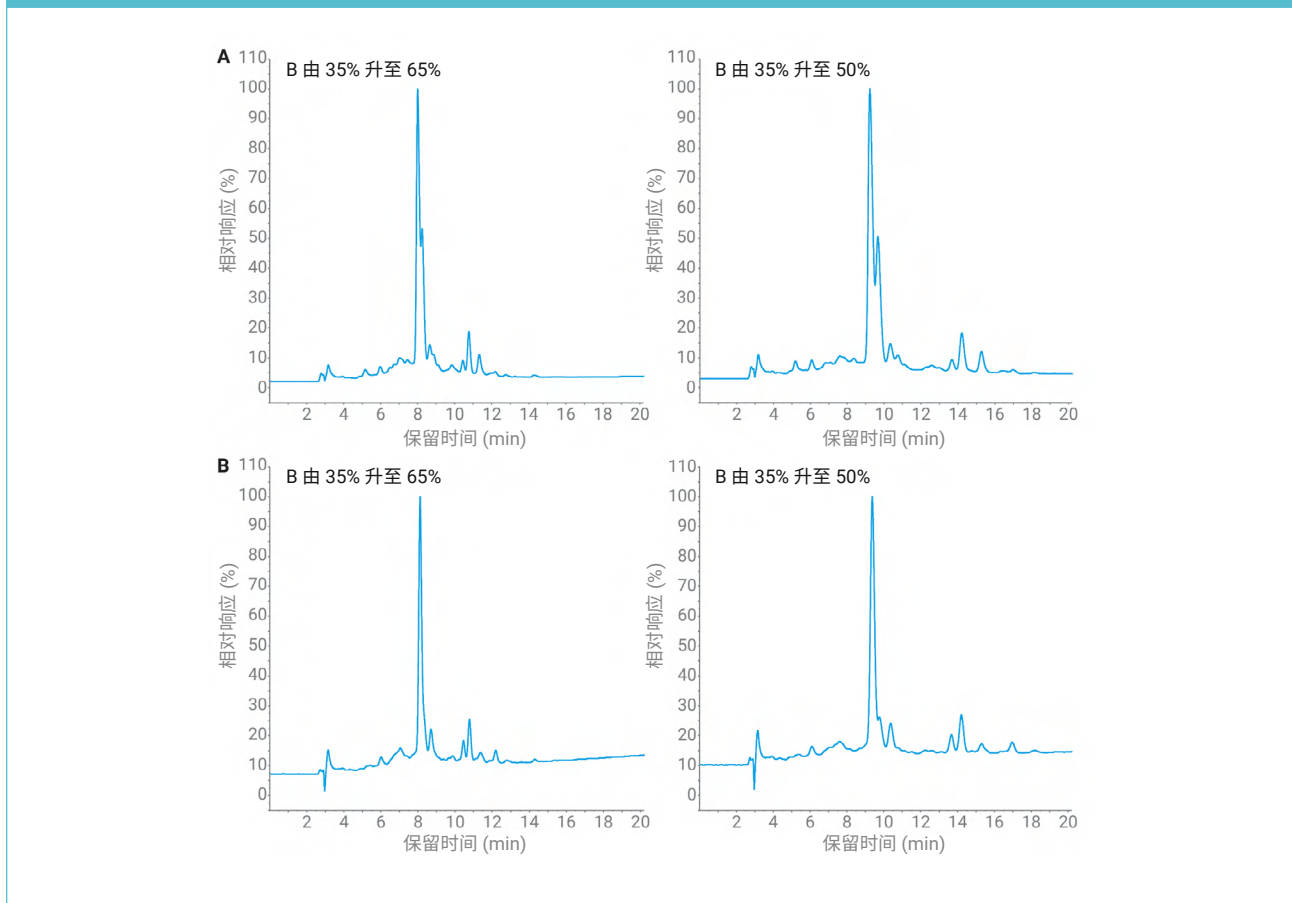
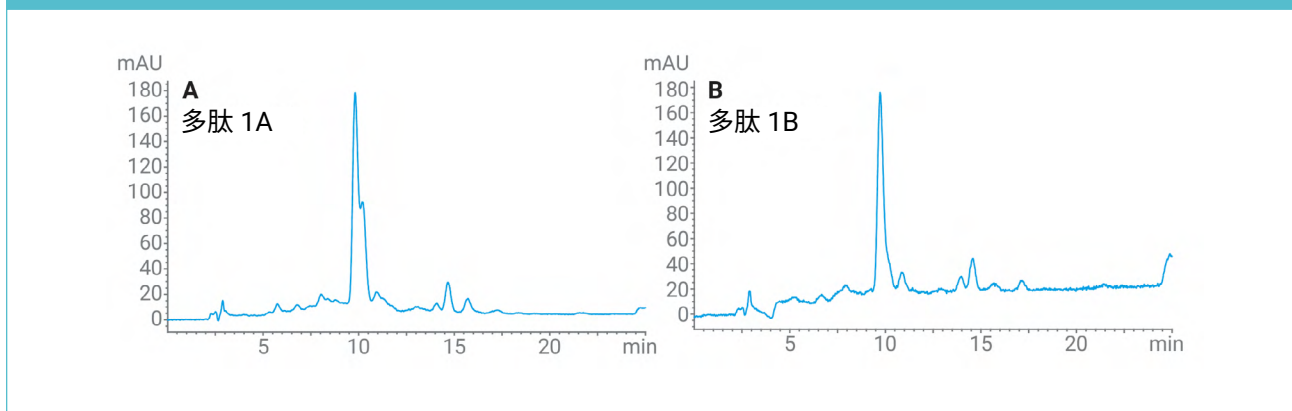


图 4. Agilent PLRP-S 100 Å 色谱柱上获得的多肽 1A (A) 和多肽 1B (B) 的制备色谱图



很明显，在本例中，多肽 1B（使用 PL-Rink 树脂 0.3 mmol/g 制得）的粗纯度高于 AmphiSpheres 40 RAM（表 3）。

表 3. 粗制肽纯度

	多肽 1A	多肽 1B
PLRP-S 100 Å	33.15%	43.19%
PLRP-S 300 Å	41.23%	46.53%

通过进样 100 μL 溶于流动相 A（0.1% TFA 水溶液）中的浓度为 1 mg/mL 的粗制肽进行制备级分离。在 PLRP-S 100 Å 和 PLRP-S 300 Å 色谱柱（内径为 21.2 mm）上纯化的总量为 1 mg，色谱柱规格从内径 4.6 mm 放大至 21.2 mm（图 4 和图 6）。将馏分收集器设置为在主峰洗脱的时间段内使用固定体积的 2.5 mL 馏分收集全长产物 (FLP)。通过在分析柱上重新分析相应的馏分，可轻松鉴定产物和任何邻近洗脱的杂质（图 5 和图 7）。

总体纯度水平根据各馏分的峰面积百分比进行计算（表 4）。

图 5. (A) Agilent PLRP-S 100 Å 上的多肽 1A 分析，显示了馏分重新分析的结果（右图）。(B) Agilent PLRP-S 100 Å 上的多肽 1B 分析，显示了馏分重新分析的结果（右图）

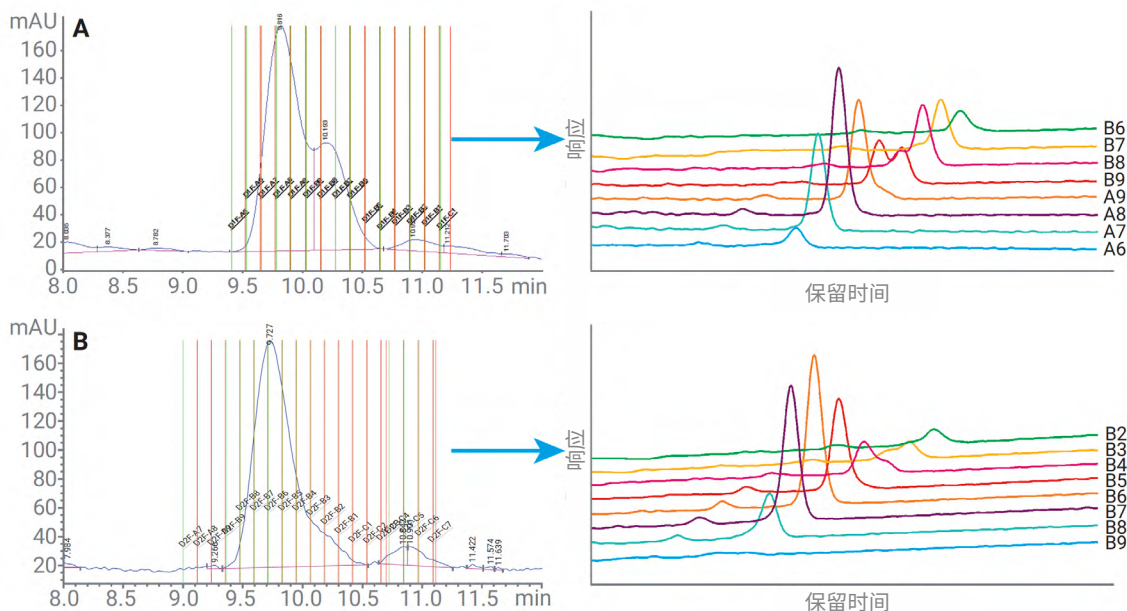


图 6. Agilent PLRP-S 300 Å 色谱柱上获得的多肽 1A (A) 和多肽 1B (B) 的制备色谱图

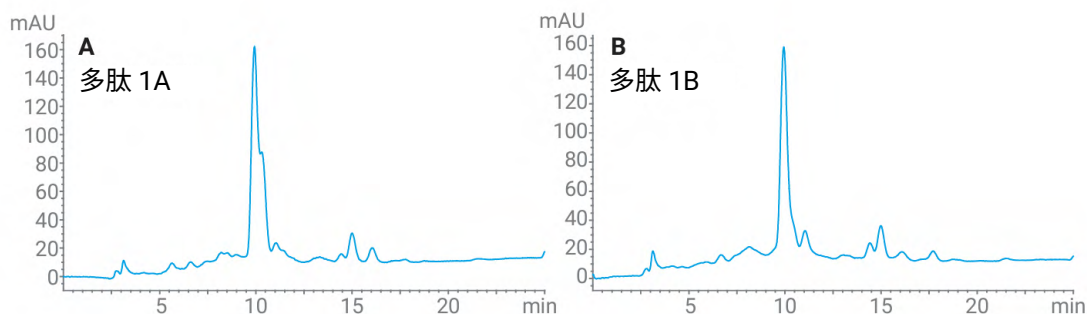
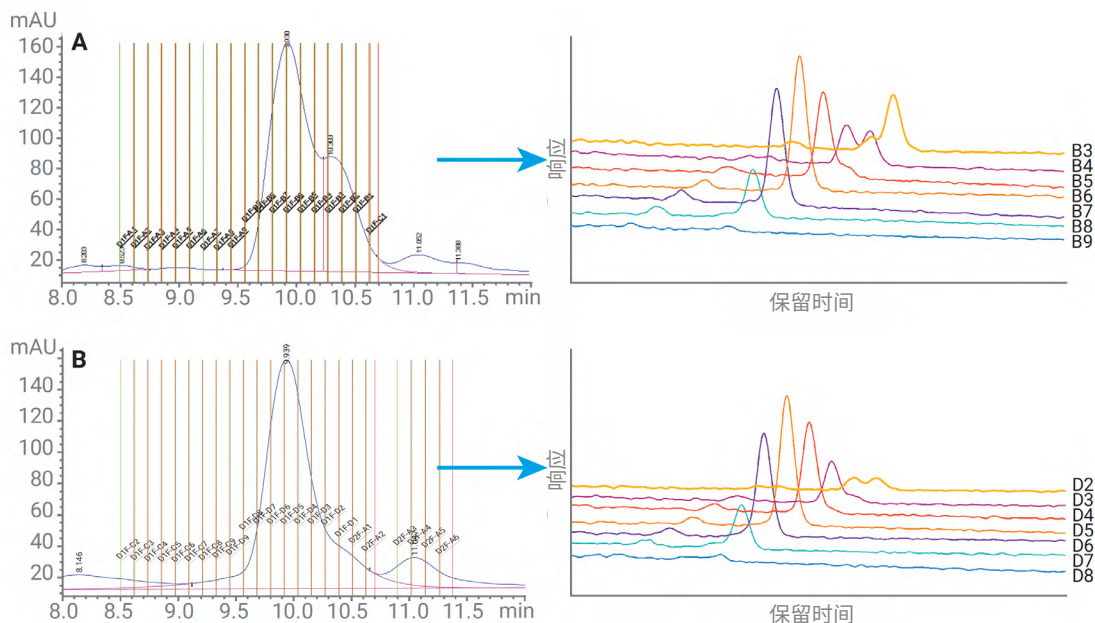


图 7. (A) Agilent PLRP-S 300 Å 上的多肽 1A 分析，显示了馏分重新分析的结果（右图）。(B) Agilent PLRP-S 300 Å 上的多肽 1B 分析，显示了馏分重新分析的结果（右图）



在 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱上对纯化的主要组分进行 LC/MS 分析，以确认鉴定结果。合成多肽样品通常含有大量不同分子量的杂

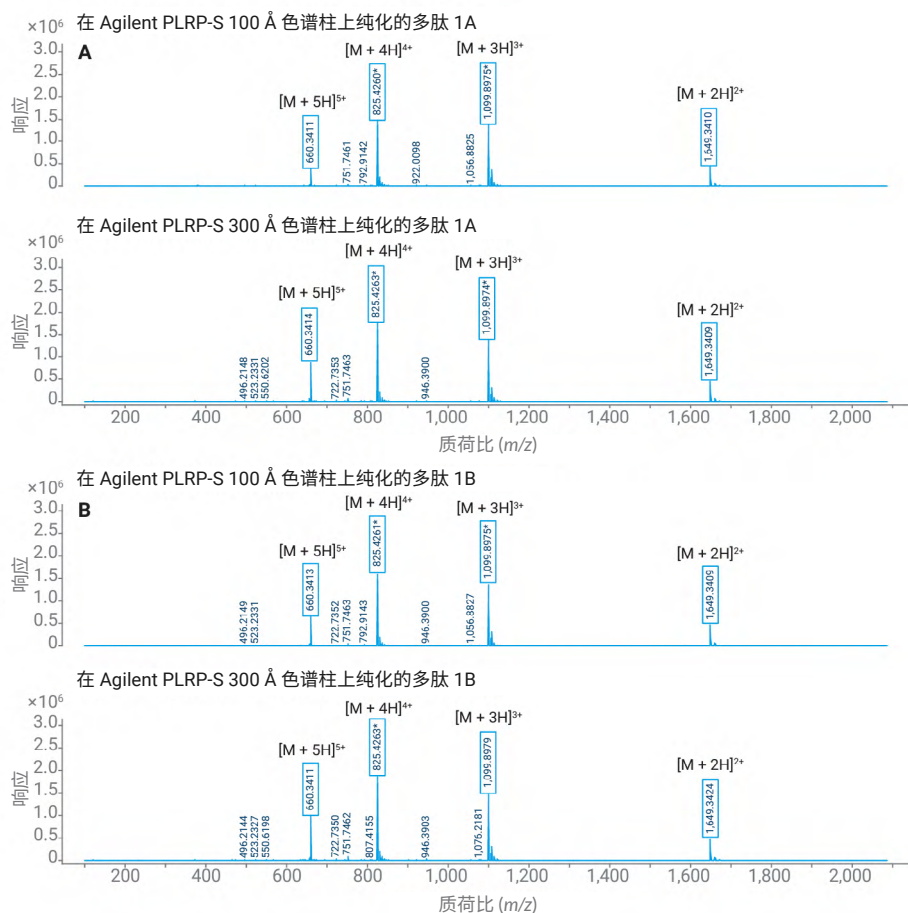
质、缺失氨基酸的序列、失水产物，有时因从固相载体上切割失败导致合成过程中的保护基团仍然可能连接在目标分子上。因此，

表 4. 由馏分组合得到的纯度和收率汇总

多肽 1A	峰面积% (纯度)	总体收率 (%)
PLRP-S 100 Å (馏分 A6-B9)	89.29	85.59
PLRP-S 300 Å (馏分 B8-B5)	90.29	73.02
多肽 1B	峰面积% (纯度)	总体收率 (%)
PLRP-S 100 Å (馏分 B8-B4)	97.81	92.69
PLRP-S 300 Å (馏分 D7-D3)	90.55	90.93

用于合成肽的分析方法必须涵盖各种可能的杂质。来自纯度最高的馏分的主要组分获得了预期的 660.34 处的  $[M + 2H]^{2+}$ 、825.42 处的  $[M + 3H]^{3+}$ 、1099.89 处的  $[M + 4H]^{4+}$  和 1649.34 处的  $[M + 5H]^{5+}$ 。结果对应于分子量为 3297.7 Da 的 (GLP-1) 7-36 酰胺的全长氨基酸序列 (图 8)。方法条件和仪器参数见表 2。

图 8. 利用 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱通过 LC/MS 分析纯化的多肽得到的质谱结果 (方法条件见表 2)



## 结论

本应用简报表明，粗制肽纯度可能取决于合成条件（包括所选择的固相树脂）。然而，Agilent PLRP-S 色谱柱是合成肽的离子对反相纯化的理想选择。孔径较小的 100 Å 颗粒填料具有更高的可用表面积，可提供更高的纯化能力。对于更大的物质，更宽的孔径可提供更出色的传质和更尖锐的峰。Agilent PLRP-S 制备型 HPLC 色谱柱搭配 Agilent 1290 Infinity II 制备型液相色谱系统可实现高效分离。最后，对于 LC/MS 方法，使用



赞助内容

生产规模的多肽合成

Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱并以甲酸作为流动相改性剂，成功确认了分子的鉴定结果。



# 使用 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱分离脱酰胺形体肽段

## 作者

Oscar Potter  
Veronica Qin

安捷伦科技有限公司

## 摘要

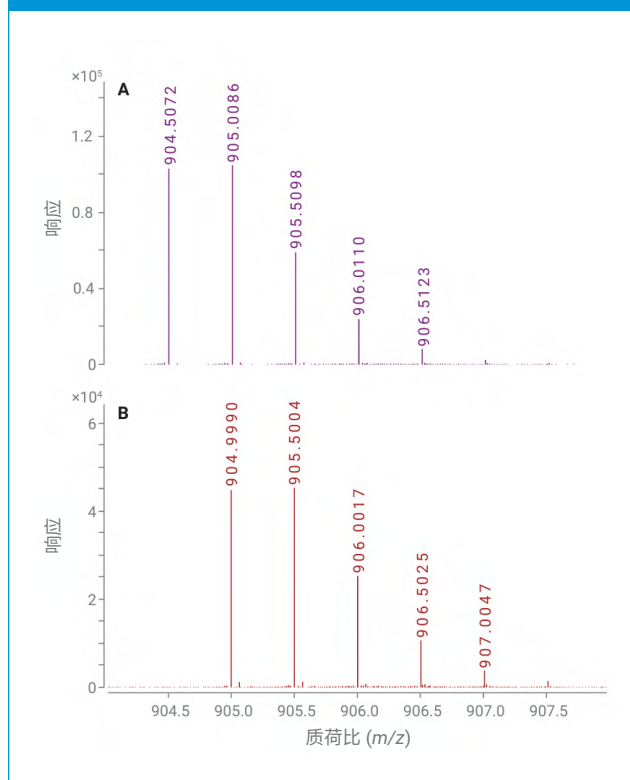
谷氨酰胺和天冬酰胺的脱酰胺基化是影响蛋白质的最常见降解途径之一。然而，由于与未修饰形式相比质量偏移较小（小于 1 Da），因此通过质谱分析脱酰胺基化存在一定的挑战性。通常通过蛋白酶酶解和 LC/MS 分析来确定位点特异性脱酰胺基化，但是当未修饰形式和脱酰胺基化形式无法实现色谱分离时，即使这一方法也会失败。幸运的是，表面带电荷的 C18 色谱柱极大地提高了脱酰胺肽段与其未修饰异构体的分离度。此外，流动相优化可以进一步控制这些分析物的分离度。

## 前言

蛋白质脱酰胺基化分析对生物药物开发和生产的多个阶段具有重要意义。从分析的角度来看，脱酰胺基化去除了一个酰胺基团并引入了一个新的羧酸基团，能够通过基于电荷的方法（例如 IEX 和等电聚焦）进行分析<sup>[1]</sup>。然而，这些技术并不总是能够分离脱酰胺基化产物，也无法确认蛋白质中具体位点的脱酰胺基化。因此，许多分析人员对样品进行蛋白酶酶解，并通过反相 LC/MS 分析得到的肽段。与未修饰形式的肽相比，天冬酰胺或谷氨酰胺脱酰胺基化后质量会增加 0.9840 Da，通过这一点可以确定是否发生脱酰胺基化。在某些情况下，含有这些降解位点的肽段能够实现完全分离，并且可以根据不同形式的相对信号强度进行相对定量<sup>[2]</sup>。然而，由于在低 pH 下天冬酰胺/谷氨酰胺转化为相应的羧酸不会导致疏水性发生较大变化，因此脱酰胺肽段有时会与其未脱酰胺形式共洗脱<sup>[3]</sup>。这种共洗脱导致脱酰胺肽段的信号与未修饰形式的高丰度 <sup>13</sup>C 同位素信号重叠，如图 1 所示。这可能会影响脱酰胺肽段的定量，在某些情况下，甚至可能导致无法检测脱酰胺异构体。本应用简报表明，与传统的 C18 色谱柱相比，相对于未修饰形式，表面带电荷的 C18 色谱柱极大地提高了对脱酰胺肽段异构体的选择性。这提高了多肽水平脱酰胺基化的检测和定量结果的可信度。Agilent AdvanceBio

Peptide Plus 色谱柱基于安捷伦表面多孔 Poroshell 技术，采用混合封端 C18 固定相，这种固定相的 120 Å 孔径、2.7 μm 颗粒填料经改性后表面带正电荷。与传统的 C18 色谱柱相比，提供了不同的选择性。

图 1. VVSVLTVLHQDWLNGK (A) 以及该肽段脱酰胺基化异构体 (B) 的质谱图，显示了质谱图之间的重叠



## 实验部分

### 材料

mAb 样品由中国仓鼠卵巢细胞表达并经纯化得到。样品经胰蛋白酶酶解，使用试剂级氢氧化铵 (Sigma-Aldrich) 调节 pH 至 11 左右，并置于 60 °C 下温育 4 小时加速脱酰胺基化。LC/MS 级甲酸 (部件号 533002) 和乙腈 (部件号 900667) 同样购自 Sigma-Aldrich。

### 仪器

#### 液相色谱系统

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统，采用如下配置：

- Agilent 1290 Infinity II 二元泵 (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity II 自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity II 柱温箱 (G1316C)

#### 质谱系统

Agilent 6546 LC/Q-TOF

#### 数据处理

LC/MS 数据由 Agilent MassHunter BioConfirm 软件 (10.0 SP1 版) 和 MassHunter 定性分析软件 (10.0 版) 进行处理。

## LC/MS 条件

参数	Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统												
色谱柱	Agilent AdvanceBio Peptide Plus, 2.1 × 150 mm (部件号 695775-949) Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm (部件号 653750-902)												
柱温	60 °C												
流动相	A) 0.1% 甲酸水溶液 B) 0.1% 甲酸的乙腈溶液												
流速	0.4 mL/min												
梯度	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>50.5</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>53</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>	时间 (min)	%B	0	3	2	3	40	40	50.5	100	53	3
时间 (min)	%B												
0	3												
2	3												
40	40												
50.5	100												
53	3												
后运行时间	7 分钟												
进样量	3 µL												

参数	Agilent 6546 LC/Q-TOF
离子源	安捷伦喷射流
气体温度	323 °C
干燥气流量	13 L/min
雾化气压力	35 psi
鞘气温度	275 °C
毛细管电压	4000 V
喷嘴电压	0 V
碎裂电压	125 V
锥孔电压	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
质量数范围	<i>m/z</i> 300–1700
MS 扫描速率 (谱图/秒)	5
采集模式	正离子, 扩展动态范围 (2 GHz) 棒状数据格式

## 结果与讨论

在 mAb 酶解产物中鉴定出 5 种显示部分脱酰胺基化的肽段，如表 1 所示。使用这些肽段考察了不同的色谱柱和流动相如何影响未修饰肽与其脱酰胺基化异构体的分离。

表 1. 在 mAb 酶解产物中鉴定出 5 种显示部分脱酰胺基化的肽段

肽段	序列 (非脱酰胺基化形式)	[M+2H] <sup>2+</sup> 的 m/z
A	NQVSLTCLVK	581.8103
B	FNWYVDGVEVHNAK	839.4047
C	VVSVLTVLHQDWLNGK	904.5071
D	NTAYLQMNSLR	655.8300
E	GLEWVGVIDPSNGETTYNQK	1136.0323

### 色谱柱类型

图 2 显示了使用典型的 LC/MS 分析方法，在甲酸改性的水/乙腈梯度下，两种不同的 C18 色谱柱对肽段及其脱酰胺基化异构体的分离结果。

AdvanceBio 肽谱分析色谱柱采用 120 Å 孔径、2.7 μm 表面多孔的封端 C18 硅胶填料颗粒。在该色谱柱上，脱酰胺基化异构体的洗脱时间通常稍晚于未修饰形式。在每种情

况下，至少检测到两种脱酰胺基化异构体，表明天冬酰胺可能转化为天冬氨酸和异天冬氨酸。然而，就肽段 D 而言，一种脱酰胺基化异构体在未修饰形式之前洗脱，而对于肽段 C 和 E，一种脱酰胺基化异构体与未修饰形式共洗脱。这些结果表明，在极少数情况下，标准 C18 色谱柱无法从未修饰形式中分离脱酰胺基化异构体。

而 AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱在类似 C18 官能化和封端的相同类型颗粒填料上具有带正电的表面。在该色谱柱上，所有脱酰胺基化异构体都能与未修饰形式完全分离。此外，5 种肽段的所有脱酰胺基化异构体都比其未修饰形式晚洗脱。

由结果可知，造成两种色谱柱之间这一差异的原因可能是，与标准 C18 固定相相比，带正电荷的 C18 固定相对肽段的保留能力较弱。保留时间缩短可能是由于与肽段的离子相互作用，因为存在 0.1% 甲酸时它们通常带正电荷<sup>[4]</sup>。这种保留时间缩短对于强碱性肽段的影响更大，而对于酸性氨基酸较多的肽段则没有明显的影响。由于脱酰胺基化引入了一个额外的酸性基团，因此脱酰胺肽段异构体的碱性弱于其未修饰形式，从而在带电荷色谱柱上表现出更强的保留性。

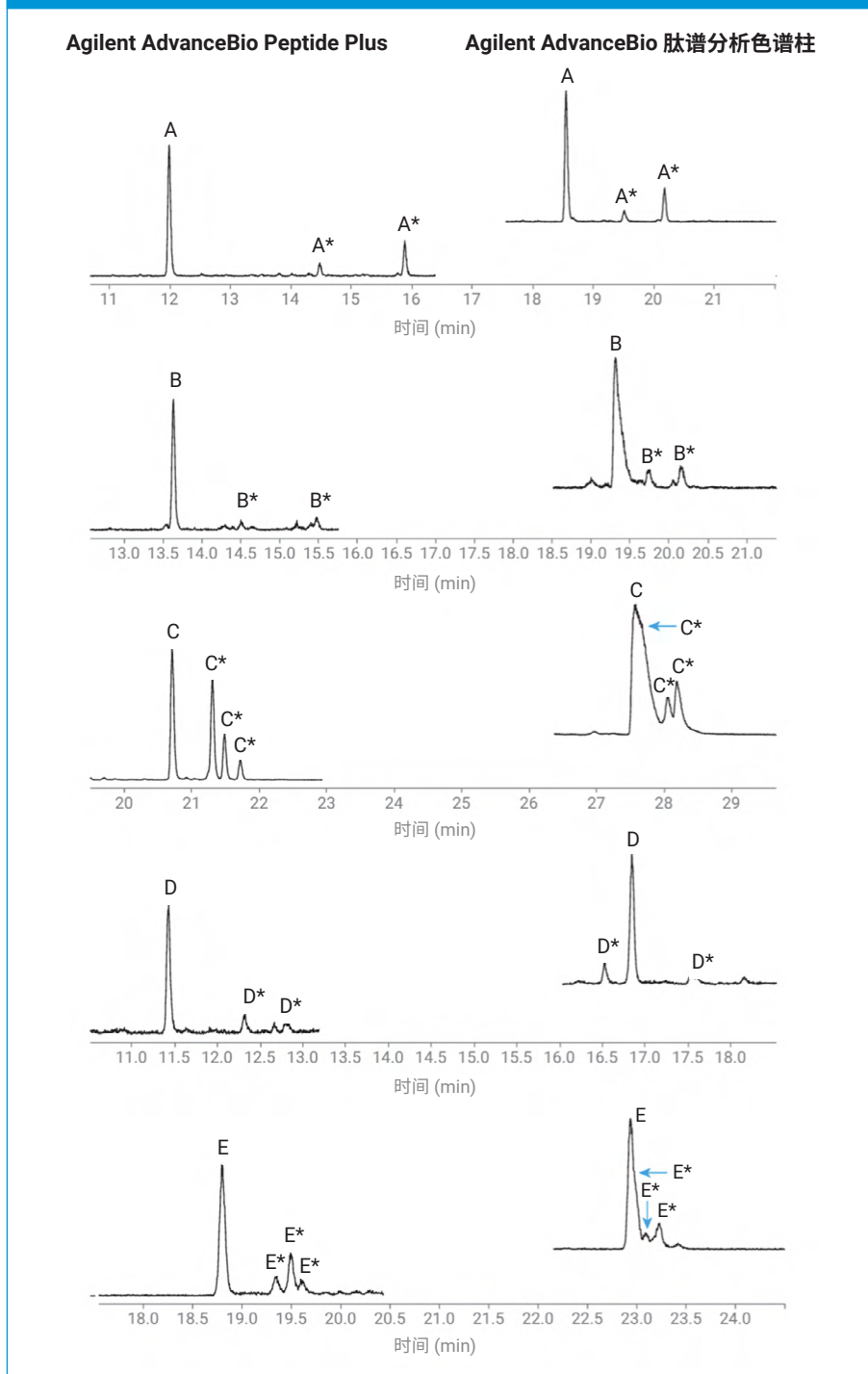
相对于未修饰形式，带电荷色谱柱对脱酰胺基化异构体的选择性增强，大大降低了这些分析物共洗脱的几率，从而避免了质谱图重叠带来的任何挑战。

### 流动相

在 0.1% 甲酸条件下，5 种肽段均在 AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱上与其脱酰胺基化异构体实现完全分离，这在很大程度上也受到了流动相选择的影响。

图 3 展示了使用 0.05%、0.1% 或 0.3% 甲酸对水相流动相和有机流动相进行改性后，肽段 C 与其异构体的分离情况。甲酸浓度降至 0.05% 时，选择性和分离度均增加，而浓度为 0.3% 时，分离度有所下降。在肽段 E 中也观察到类似的情况。

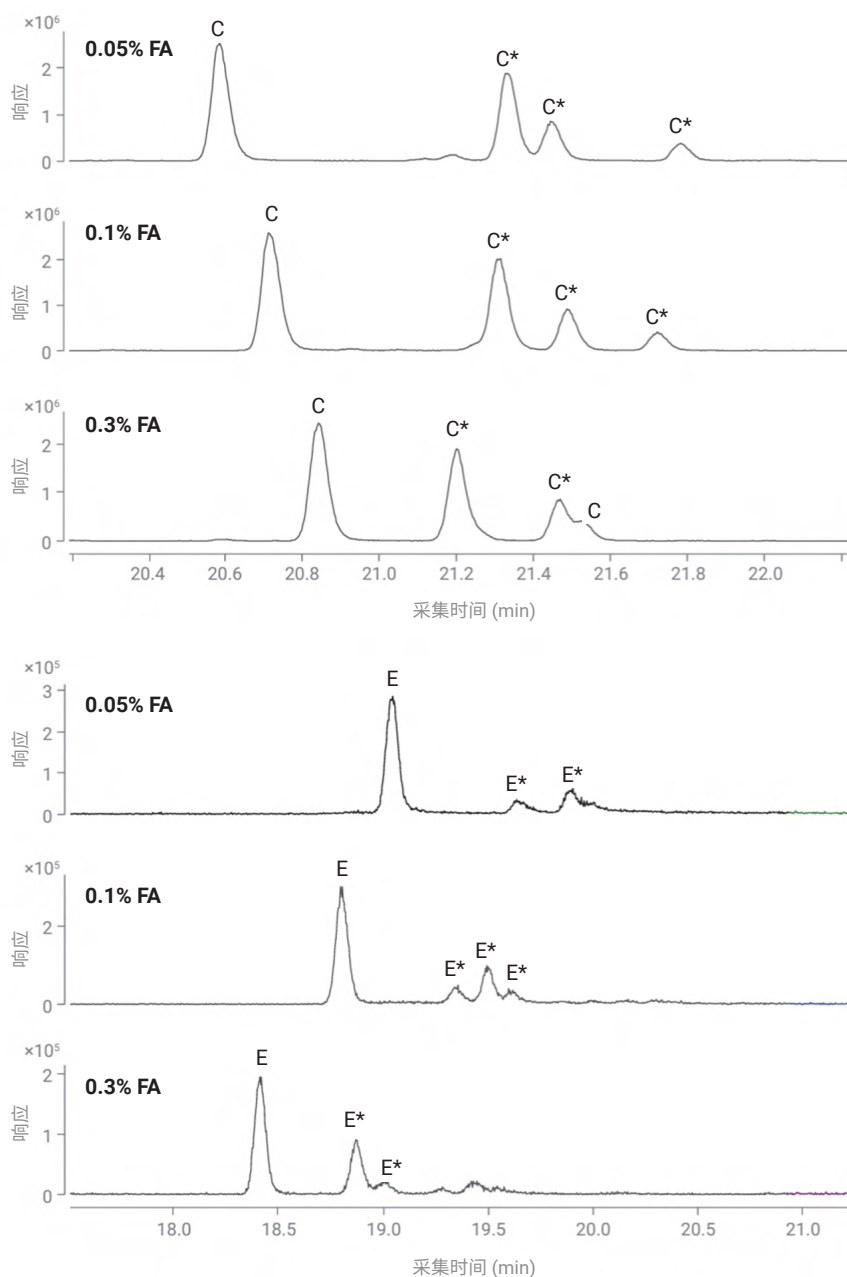
图 2. 在相同的条件下，使用 0.1% 甲酸流动相改性剂，在 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱（升高，较晚洗脱）和 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱（较早洗脱）上分离肽段及其脱酰胺基化异构体（用 \* 表示）



虽然甲酸通常是 LC/MS 肽段分离的首选流动相改性剂，但有时会使用三氟乙酸 (TFA) 改善峰形，即使它会影响 ESI-MS 的灵敏度<sup>[5]</sup>。与甲酸相比，TFA 能更大程度地降低流动相的 pH，从而抑制脱酰胺基化生成的羧酸的电离。此外，据报道，TFA 作为一种比甲酸更强的离子对试剂，能够减少离子相互作用的影响。这可能会影响 AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱从未修饰肽中分离脱酰胺基化异构体的能力。

图 4 显示了用 0.1% TFA 代替 0.1% 甲酸的效果。在此条件下，相对于未修饰形式，脱酰胺基化异构体的选择性大大降低。对于肽段 A，这使未修饰形式与异构体之间的基线减少，分离变差。而对于肽段 C，其中一种脱酰胺基化异构体在未修饰形式之前洗脱。与此同时，肽段 E 的未修饰形式与其中一种脱酰胺基化异构体未实现分离。

图 3. 逐渐增加甲酸流动相改性剂的浓度，在 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 上分离肽段。在低浓度下，相对于天然形式，可大大提高对脱酰胺肽段异构体的选择性

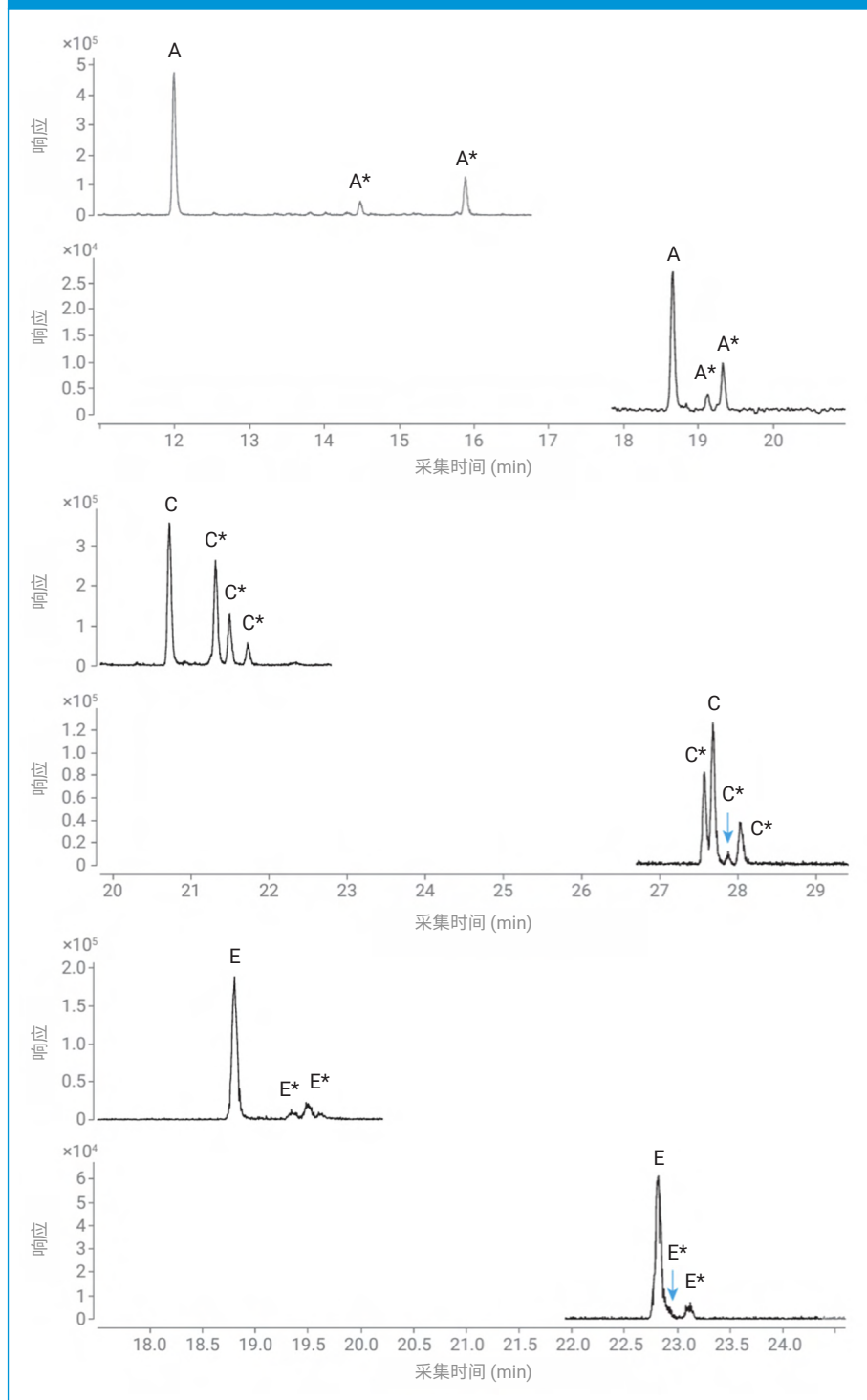


总体而言，在 0.1% TFA 的条件下，AdvanceBio Peptide Plus 保留了脱酰胺肽段在未修饰异构体之后洗脱的一般模式。但是，分析人员应该清楚，使用 TFA 时发生共洗脱的几率比使用甲酸时要高得多。

## 结论

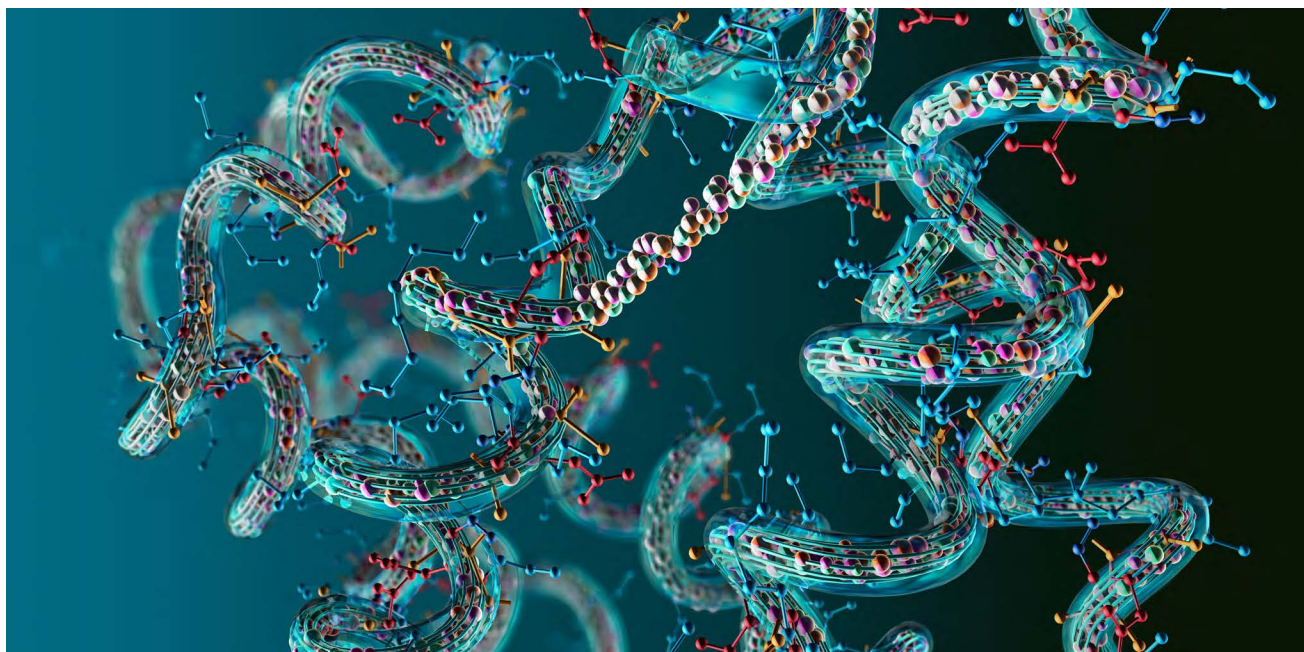
与传统的 C18 色谱柱相比，AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱对脱酰胺肽段异构体的选择性高于其未修饰形式。通过避免质谱图重叠问题，极大地提高了手动或通过自动分析软件检测和定量脱酰胺基化形式肽段的结果可信度。增加或降低甲酸流动相改性剂的浓度可以改变选择性。这些发现对任何使用 LC/MS 分析蛋白质脱酰胺基化的人可能都非常有用，如应用简报《单克隆抗体化学诱导脱酰胺化和氧化的定量分析》<sup>[2]</sup> 中所述。

图 4. 使用 0.1% 甲酸流动相改性剂和 0.1% TFA 在 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 上分离肽段及其脱酰胺基化异构体的结果比较



## 参考文献

1. Gervais, D. Protein Deamidation in Biopharmaceutical Manufacture: Understanding, Control and Impact. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2015, 91, 569–575
2. Linfeng, Wu. Quantitation of Chemical Induced Deamidation and Oxidation on Monoclonal Antibodies (单克隆抗体化学诱导脱酰胺化和氧化的定量分析), 安捷伦科技公司, 2018
3. Wang, W. et al. Quantification and Characterization of Antibody Deamidation by Peptide Mapping with Mass Spectrometry *International Journal of Mass Spectrometry* 2011, 312, 107–113
4. Nogueira, R.; Lämmerhofer, M.; Lindner, W. Alternative High-Performance Liquid Chromatographic Peptide Separation and Purification Concept Using a New Mixed-Mode Reversed Phase/Weak Anion-Exchange Type Stationary Phase. *Journal of Chromatography A* 2005, 1089, 158–169
5. Apffel, A. et al. Enhanced Sensitivity for Peptide Mapping with Electrospray Liquid Chromatography Mass Spectrometry in the Presence of Signal Suppression Due to Trifluoroacetic Acid Containing Mobile Phase. *Journal of Chromatography A* 1995, 712, 177–1190



# 合成肽及其杂质的分析

将质谱兼容的流动相与 *Agilent AdvanceBio Peptide Plus* 色谱柱配合使用

## 作者

Andrew Coffey  
Veronica Qin

安捷伦科技有限公司

## 摘要

传统上使用 C18 反相 HPLC 色谱柱和三氟乙酸 (TFA) 作为离子对试剂的流动相，对多肽进行色谱分离，并使用 UV 进行检测。虽然 TFA 提供了更高的分离度，但是它可能会抑制质谱 (MS) 信号。甲酸 (FA) 是用于 MS 检测的首选流动相离子对试剂，但它会导致许多传统 C18 柱无法达到最佳分离效果。本应用简报介绍了使用 *Agilent AdvanceBio Peptide Plus* 色谱柱和 MS 兼容的 FA (作为流动相改性剂) 分离合成多肽杂质。

## 前言

大多数多肽药物通过固相多肽合成法进行生产。合成多肽相关杂质可能来自原料、生产过程，或者在生产或储存过程中因降解而产生<sup>[1]</sup>。传统上，使用反相色谱柱实现多肽分离，并以三氟乙酸 (TFA) 作为流动相改性剂，UV 作为检测器。然而，TFA 会抑制质谱 (MS) 信号，因此它并不是 MS 的理想选择。

通过 LC/MS 方法鉴定杂质峰时，甲酸 (FA) 是首选的流动相改性剂，但它会导致传统 C18 柱无法达到最佳分离效果。TFA (pKa = 0.23) 可以降低 pH 值，使固定相表面残留的 (未完全烷基化或封端) 硅醇基位点质子化，从而没有负电荷与带正电荷的多肽相互作用，有利于形成良好的峰形。此外，TFA 阴离子与带正电荷的多肽形成离子对，增强了疏水性并延长了保留时间。与此相反，FA (pKa = 3.77) 的酸性比 TFA 弱，无法将 pH 降低到使所有硅醇基位点质子化的程度，因此硅醇基与多肽之间的相互作用不会被完全掩盖。与使用 TFA 作为流动相改性剂相比，FA 会导致峰展宽、拖尾增加、整体分离度以及

峰容量降低。与传统的 C18 柱相比，Agilent AdvanceBio Peptide Plus 固定相具有杂化且带正电荷的表面，使用 FA 作为改性剂时也可以提供更好的峰形和分离效果。本简报介绍了一种使用 FA 作为流动相改性剂来分离合成肽杂质的液相色谱方法，此方法可以使用 UV 或 MS 检测器，因此更容易在 LC/UV 和 LC/MS 之间进行方法转移。LC/MS 和 LC/MS/MS 均可用于鉴定样品 (合成比伐卢定，图 1) 中的某些杂质。比伐卢定是一种含有 20 个氨基酸的合成肽，能够可逆性地抑制凝血酶。合成肽的质量控制要求对杂质进行检测和鉴定。比伐卢定氨基酸序列 (FPRPGGGGNGDFEIIPEEYL) 的单一同位素质量为 2178.9858 Da。

因此，使用 LC/MS 可以准确测定多肽的分子量，但是使用 MS/MS 分析还可以通过预测的碎裂模式来确定序列，如表 1 所示。实验部分 试剂与化学品 所有试剂均为 HPLC 级或更高等级。样品前处理 陈化的合成多肽三氟醋酸比伐卢定水合物购自 Selleckchem，与 0.1 % 甲酸水溶液复溶至 1 mg/mL。

图 1. 合成比伐卢定的氨基酸序列

H-D-Phe-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-OH

表 1. 预测的比伐卢定 MS/MS 碎裂模式

序列	编号	b	y	编号 (+1)
F	1	148.076	2179.993	20
P	2	245.129	2032.925	19
R	3	401.230	1935.872	18
P	4	498.282	1779.771	17
G	5	555.304	1682.718	16
G	6	612.325	1625.697	15
G	7	669.347	1568.675	14
G	8	726.368	1511.654	13
N	9	840.411	1454.632	12
G	10	897.433	1340.589	11
D	11	1012.460	1283.568	10
F	12	1159.528	1168.541	9
E	13	1288.571	1021.472	8
E	14	1417.613	892.430	7
I	15	1530.697	763.387	6
P	16	1627.750	650.303	5
E	17	1756.793	553.250	4
E	18	1885.835	424.208	3
Y	19	2048.899	295.165	2
L	20	2161.983	132.102	1

对于 LC/MS 实验，将相同的 1290 Infinity LC 配置与 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 检测器配合使用。

## 数据处理

使用 Agilent OpenLab 2.2 CDS 处理 LC/UV 数据。使用 Agilent MassHunter BioConfirm B.08.00 软件处理 LC/MS 数据。MS/MS 谱图用于确认合成肽及其杂质的身份。

## 方法条件

HPLC 条件	
色谱柱	Agilent AdvanceBio Peptide Plus, 2.1 × 150 mm (部件号 695775-949)
流动相	A) 0.1% 甲酸水溶液 B) 0.1% 甲酸的乙腈溶液
梯度	0 min: 17% B 2 min: 17% B 22 min: 37% B 24 min: 95% B 26 min: 95% B 26.1 min: 17% B
后运行时间	5 min
流速	0.4 mL/min
柱温	60 °C
进样量	5 µL (UV); 1 µL (MS)

参数	设定值
仪器	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
离子源	双安捷伦喷射流
气体温度	350 °C
干燥气流量	10 L/min
雾化气压力	30 psi
鞘气温度	275 °C
鞘气流量	12 L/min
毛细管电压	4000 V
喷嘴电压	0 V
碎裂电压	125 V
锥孔电压	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
质量数范围	$m/z$ 100–1700 (MS); $m/z$ 50–1700 (MS/MS)
MS 扫描速率	8 幅谱图/秒
MS/MS 扫描速率	3 幅谱图/秒
采集模式	正离子, 扩展动态范围 (2 GHz)
碰撞能量	$3.6 \times (m/z)/100-4.8$

## 仪器

对于 HPLC 实验，使用 Agilent 1290 Infinity LC，其中包括：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 (DAD) (G7115A)

## 结果与讨论

图 2 为陈化的比伐卢定多肽样品的分离谱图，其中使用 FA 作为流动相改性剂，并通过 UV 进行检测。如表 2 所示，LC/MS/MS 用于鉴定谱图中的几个主要杂质峰时，具有非常低的质量偏差。常见的杂质包括缺失序列（缺少单个氨基酸）、存在未完全去除的保护基团或在去除保护基团期间发生对多肽的修饰、失水以及在此特定多肽序列中 Asn 易发生脱酰胺化（可能发生在生产或储存过程中）。总

共选择了 5 个峰来说明联合使用 LC/MS 和 LC/MS/MS 的鉴定技术。

表 2. 陈化的比伐卢定多肽和主要杂质的峰鉴定

峰	质量 (Da)	峰归属	目标质量 (Da)	质量偏差 (ppm)
1	2,049.9467	Glu 缺失	2,049.9432	1.71
2	2,178.9894	产物	2,178.9858	1.65
3	2,121.9663	Gly 缺失	2,121.9644	0.90
4	2,160.9764	失水	2,160.9705	2.73
5	2,179.9742	脱酰胺基化	2,179.9698	2.02

图 2. 合成比伐卢定的 LC/UV 谱图。放大了合成比伐卢定的基线区域

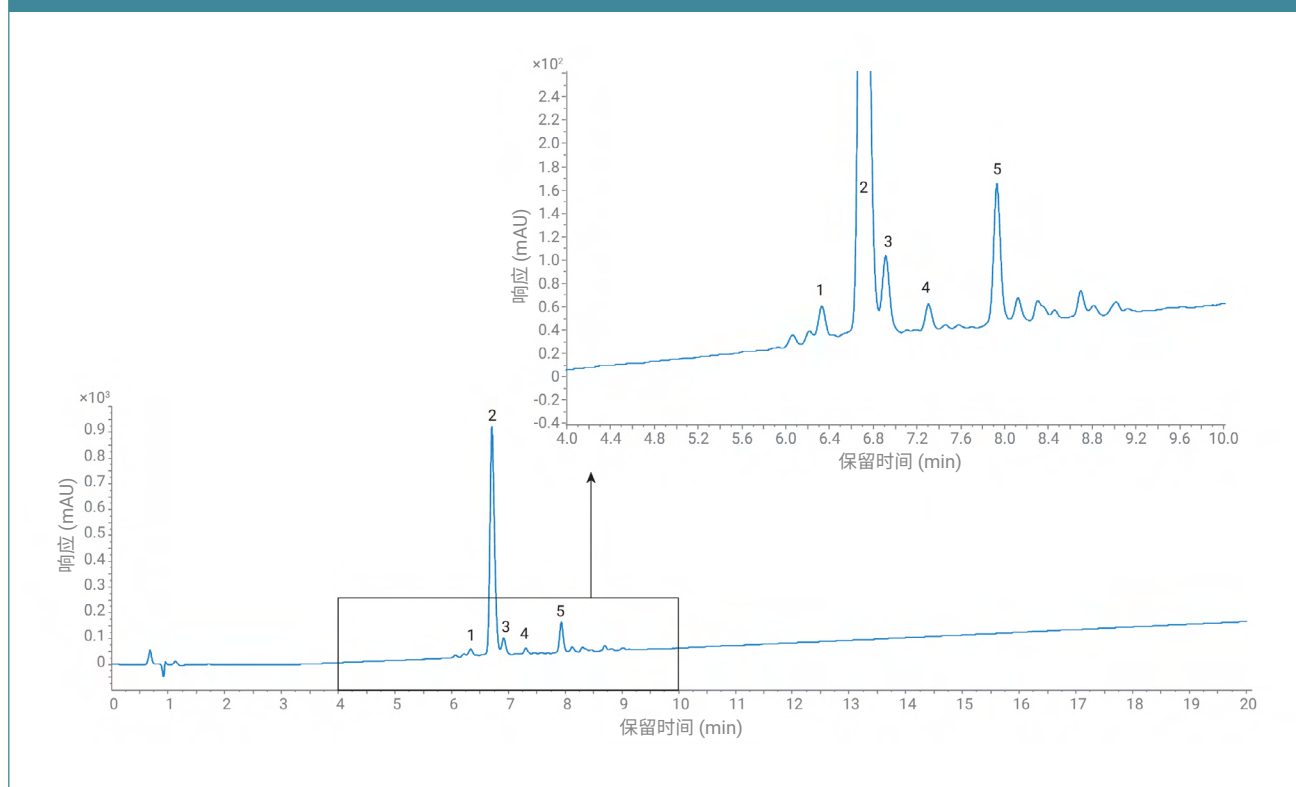
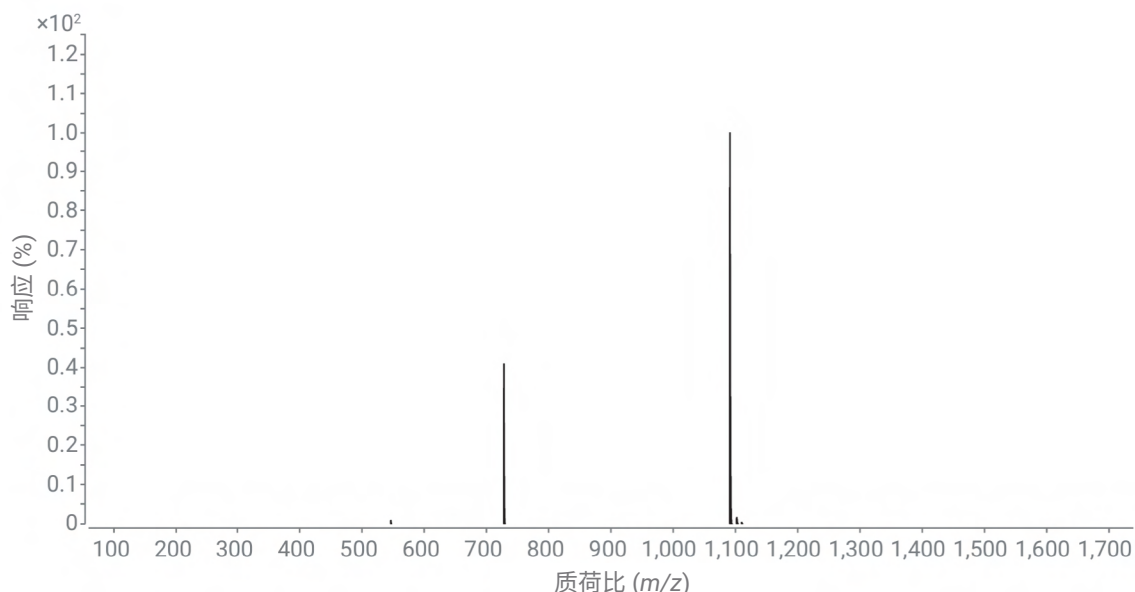


图 3. 主成分（峰 2）的 MS 谱图



LC/UV 色谱图的主要成分（峰 2）的 MS 谱图如图 3 所示。该质谱图对应  $m/z$   $[M + 2H]^{2+}$  和  $[M + 3H]^{3+}$ ，解卷积后质量为 2178.9894，对应比伐卢定的完整多肽序列 FPRPGGGGNGDFEEIPEEYL。使用类似的方法来鉴定较早洗脱的杂质峰 1，得到了相似的质谱图（图 4A），但是解卷积之后，杂质的质量为 2049.9467。质量差为 -129 Da，表明该杂质只比比伐卢定少了一个谷氨酸。仔细查看 LC/MS/MS 谱图，可以确定丢失的 Glu 残基的位置（图 4B）。BioConfirm 软件鉴定出 FPRPGGGGNGDFEEIPEYL（一个 19 个氨基

酸的序列）的 b15 和 y4 片段，表明该序列在 17 或 18 号位丢失一个谷氨酸。

分析杂质峰 3 得出的质量差为 -57 Da，表明该杂质丢失一个甘氨酸（图 5）。同时，杂质峰 4 的质量差为 18，表明由于脱水丢失了一个  $H_2O$  分子（MS 谱图未显示）。最后，分析杂质峰 5 得出的质量差为 +1 Da，表明发生了脱酰胺反应（图 6A）。仔细查看该杂质的 MS/MS 数据后发现，该软件已确定位置 9 的 Asn (N) 已通过脱酰胺作用转化为 Asp (D)。

图 4. (A) 杂质峰 1 的 MS 谱图。(B) 杂质峰 1 的 MS/MS 谱图

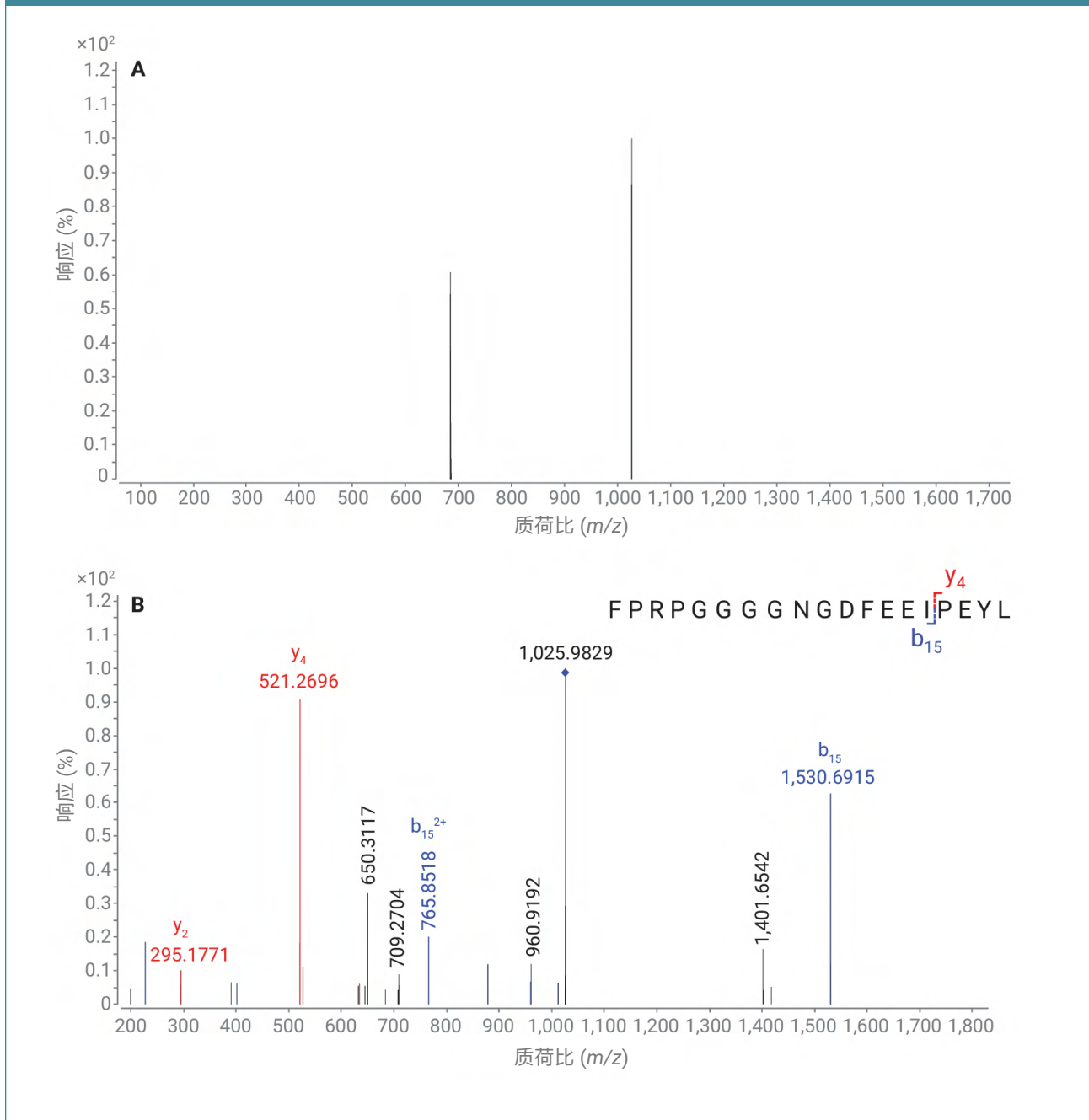


图 5. 杂质峰 3 的 MS 谱图

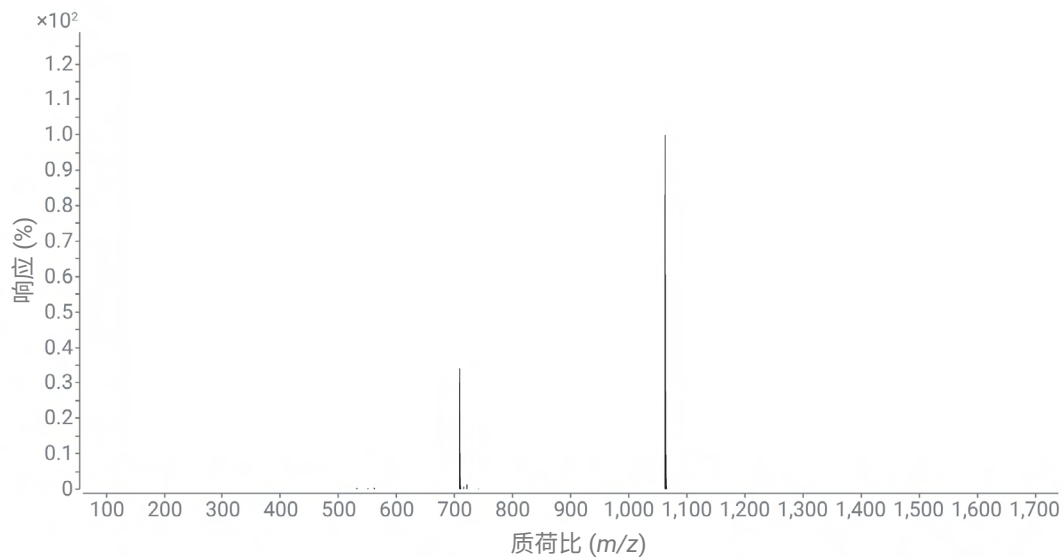
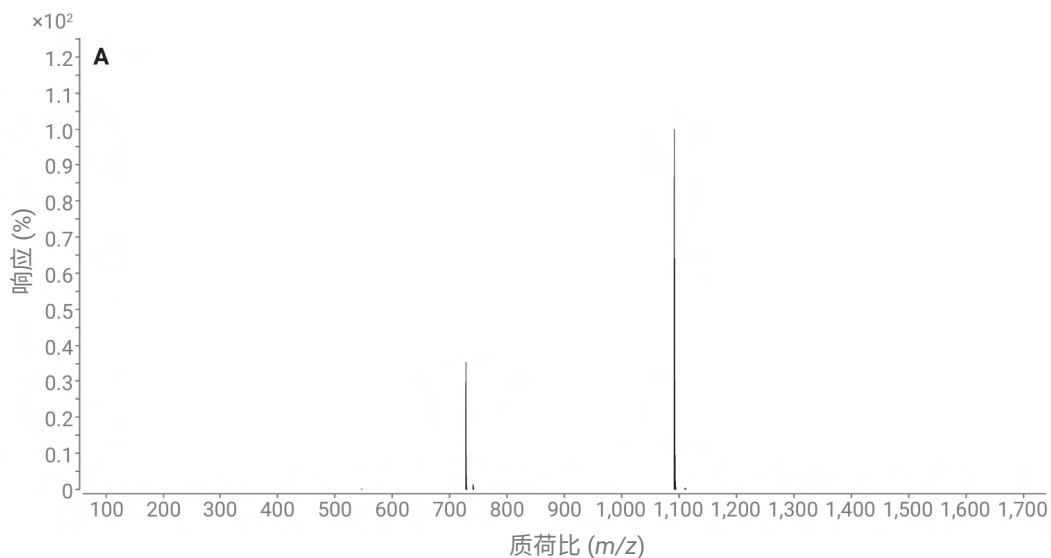
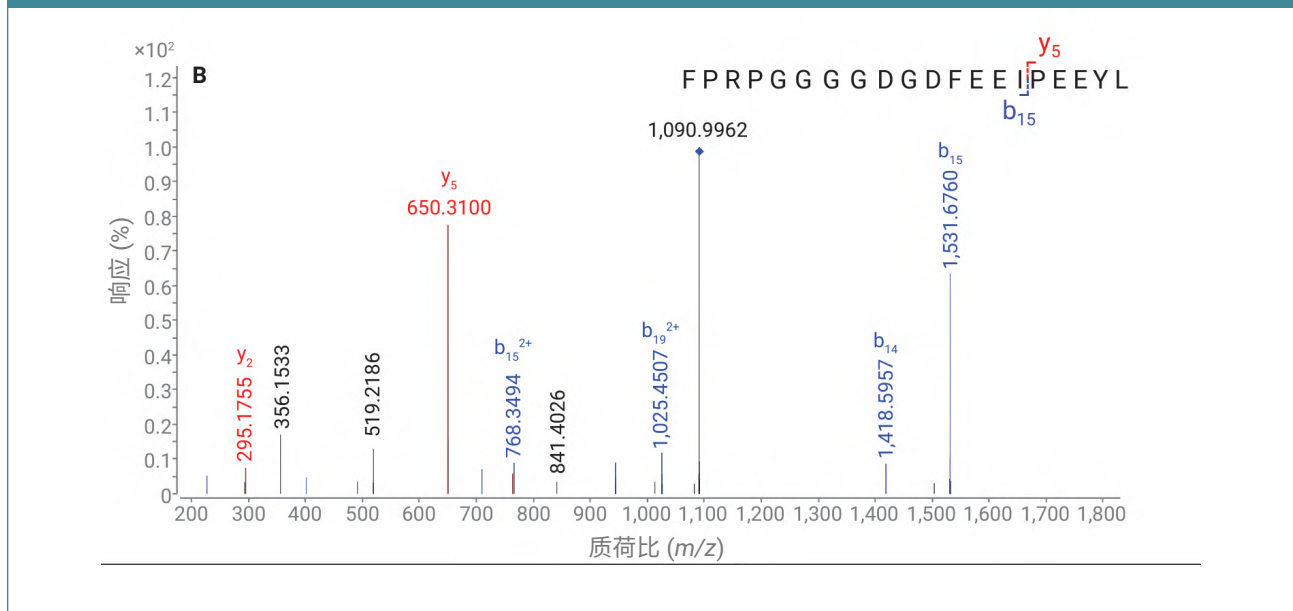


图 6. (A) 杂质峰 5 的 MS 谱图



(图 6(B) 接下页)

图 6. (B) 杂质峰 5 的 MS/MS 谱图



## 结论

在本研究中，使用 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱并以甲酸作为流动相改性剂分析了合成肽及其杂质。采用的方法可以在 LC/UV 和 LC/MS 之间轻松转移。

## 参考文献

1. Eggen, I. et al. Control Strategies for Synthetic Therapeutic Peptide APIs Part III: Manufacturing Process Considerations. *Pharm. Technol.* 2014, 38(5)



# 大鼠血浆中治疗性多肽艾塞那肽的定量分析

使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱和 Agilent 6495 三重四极杆液质联用系统

作者

Xi Qiu

安捷伦科技有限公司

## 前言

近年来，药物研发的重点已从小分子药物转向生物治疗领域，例如大分子多肽药物、抗体偶联药物、重组融合蛋白、单克隆抗体 (mAb) 和寡核苷酸药物等。对于这些大分子药物，传统的分析方法为配体结合试验 (LBA)，因为该方法具有高灵敏度、高通量、低成本以及易于自动化操作等特点。然而，在过去二十年中，液质联用技术 (LC/MS) 因其高特异性、高灵敏度、宽动态范围及快速方法开发等优势，已成为分析这些大分子的替代方法<sup>[1]</sup>。此外，与传统 LBA 相比，LC/MS 可以避免交叉反应，并且所需的试剂更常用且容易获取。

艾塞那肽是一种大分子多肽治疗药物，已获批用于治疗 2 型糖尿病<sup>[2]</sup>。它是 Exendin-4 的人工合成品，Exendin-4 是一种在希拉毒蜥唾液中发现的激素，由 39 个氨基酸组成，分子量为 4186.6 Da<sup>[3]</sup>。过去，艾塞那肽的血浆浓度是通过配体结合试验测定的，但这种方法不仅需要时间来开发抗体，并且缺乏选择性和特异性。本应用简报介绍了使用 Agilent Infinity II 生物液相色谱和 Agilent 6495 三重四极杆 LC/MS 系统对大鼠血浆中的艾塞那肽进行定量分析的 LC/MS 方法（图 1）。结果表明，该 LC/MS 分析方法简便、快捷，可用于艾塞那肽的定量分析，并具有优异的灵敏度和重现性。

图 1. Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱和 Agilent 6495 三重四极杆液质联用系统



## 实验部分

### 材料与amp;方法

艾塞那肽购自 MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ)。甲酸 (FA) 购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。LC/MS 级乙腈来自安捷伦科技公司，96 孔蛋白质 LoBind 板购自 Eppendorf USA (Hauppauge, NY)。

### 仪器

- Agilent 1290 Infinity II 生物 UHPLC 系统包括：
  - Agilent 1290 Infinity II 生物高速泵 (G7132A)
  - Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A)
  - Agilent 1290 Infinity II 柱温箱 (G7116A)，配备一个标准流速 Quick Connect 快速连接生物热交换器 (G7116-60071)
- Agilent 6495 三重四极杆液质联用系统

### 样品前处理

将乙腈 (600  $\mu$ L，含 1% 甲酸) 加入 200  $\mu$ L 含不同浓度艾塞那肽的大鼠血浆中。将混合物涡旋混合 5 分钟，然后在 16000 g 下离心 10 分钟。将上清液转移至 96 孔蛋白质 LoBind 板中，然后在氮气下加热吹干。吹干后，加入 100  $\mu$ L 20% 乙腈 (0.1% FA) 进行复溶，并取 20  $\mu$ L 进样至 LC/MS 进行分析。

## LC/MS 分析

使用 Agilent 1290 Infinity II 生物 UHPLC 与配备安捷伦喷射流离子源的 Agilent 6495 三重四极杆 LC/MS 的联用系统进行数据采集。使用安捷伦肽谱分析色谱柱 (2.1 × 150 mm, 120 Å, 2.7 μm) 进行分离。表 1 和表 2 列出了此工作流程所用的 LC 和 MS 参数。

艾塞那肽通过正离子电喷雾电离，形成了 [M+5H]<sup>5+</sup> 离子，其 m/z 为 838.3，也是强度最高的离子。然后对 MRM 离子对进行优化，选择了 838.3 → 948.8 作为定量离子，838.3 → 396.3 作为定性离子，并在最佳碰撞能量下进行检测。

表 1. 液相色谱参数

LC 条件															
色谱柱	AdvanceBio 肽谱分析柱, 120 Å, 2 × 150 mm, 2.7 μm (部件号 653750-902)														
柱温	60 °C														
进样量	20 μL														
自动进样器温度	4 °C														
流动相	A) 水 + 0.1% 甲酸 B) 乙腈 + 0.1% 甲酸														
流速	0.5 mL/min														
梯度程序	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>65</td> </tr> <tr> <td>8.2</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>9.2</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>9.3</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>12</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	时间 (min)	%B	0	10	8	65	8.2	95	9.2	95	9.3	10	12	10
时间 (min)	%B														
0	10														
8	65														
8.2	95														
9.2	95														
9.3	10														
12	10														
停止时间	12 min														

表 2. 质谱采集参数

质谱条件	
气体温度	290 °C
干燥气流量	18 L/min
雾化器气体	35 psi
鞘气温度	250 °C
鞘气流量	12 L/min
毛细管电压	4500 V
喷嘴电压	1000 V
高压 RF	150 V
低压 RF	80 V

## 数据处理

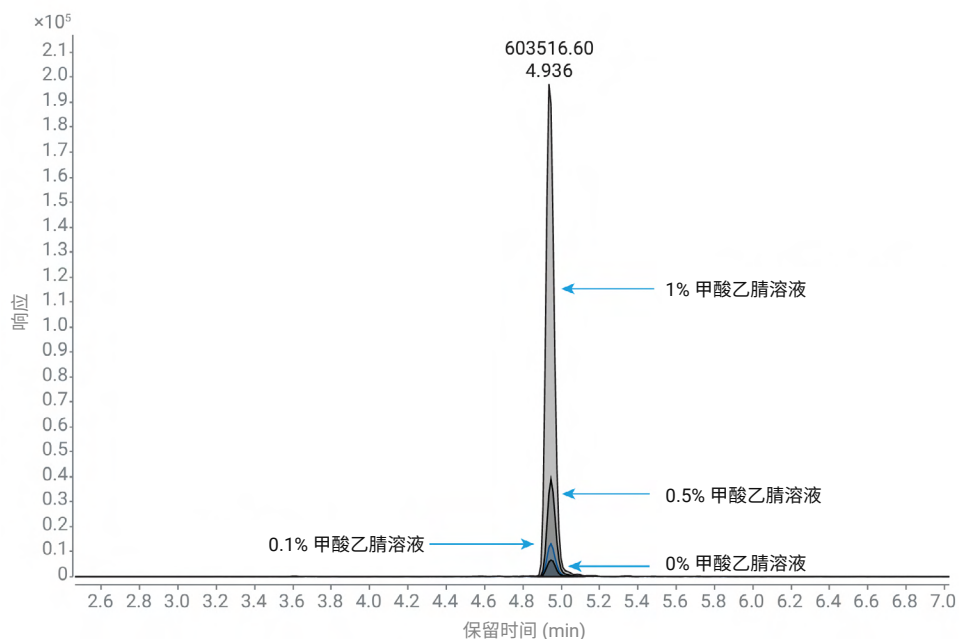
所有质谱数据均使用 Agilent MassHunter 定量分析软件进行处理。

## 结果与讨论

### 艾塞那肽定量分析方法优化

为提高大鼠血浆中艾塞那肽定量分析的灵敏度和重现性，对样品前处理、液相色谱条件和质谱条件进行了优化，以获得更出色的灵敏度和重现性。实验中评估了含 0%、0.1%、0.5% 和 1% 甲酸的乙腈溶液对大鼠血浆中蛋白质的沉淀效果。数据如图 2 所示。由于 MRM 离子对的提取离子色谱图 (EIC) 显示含 1% 甲酸的乙腈溶液产生的分析物响应最佳，因此后续所有样品前处理均采用含 1% 甲酸的乙腈溶液进行蛋白质沉淀。

图 2. 乙腈中不同浓度的甲酸对样品前处理的影响



使用肽谱分析色谱柱优化了 UHPLC 方法，温度设定为 60 °C，流速为 0.5 mL/min，以实现理想重现性。在此条件下，所设置的柱温显著降低了泵压，同时大幅提升了质谱的检测灵敏度。

### 大鼠血浆中艾塞那肽的定量分析

采用 Agilent MassHunter 定量分析软件对校准曲线样品和质量控制样品进行定量分析。使用空白大鼠血浆，艾塞那肽的定量下限为 0.02 ng/mL (如图 3A 和图 3B 所示)，校准曲线的浓度范围为 0.02–20 ng/mL，并采用二次拟合和  $1/x^2$  加权 (如图 4 和表 3 所示)。

通过连续三天独立处理样品，获得了日和日间的分析精度和准确度。大鼠血浆中艾塞那肽的精度和准确度结果如表 4 所示。各个浓度下的质量控制样品 (n = 6) 的检测结果均符合美国食品药品监督管理局建议的 20% 的可接受标准 (LLOQ 为 25%)。结果表明，使用 Infinity II 生物液相色谱和 6495 三重四极杆 LC/MS 系统对大分子多肽进行定量分析，可获得出色的检测性能。

图 3. (A) 空白大鼠血浆的 EIC。(B) 艾塞那肽最低校准浓度下的 EIC

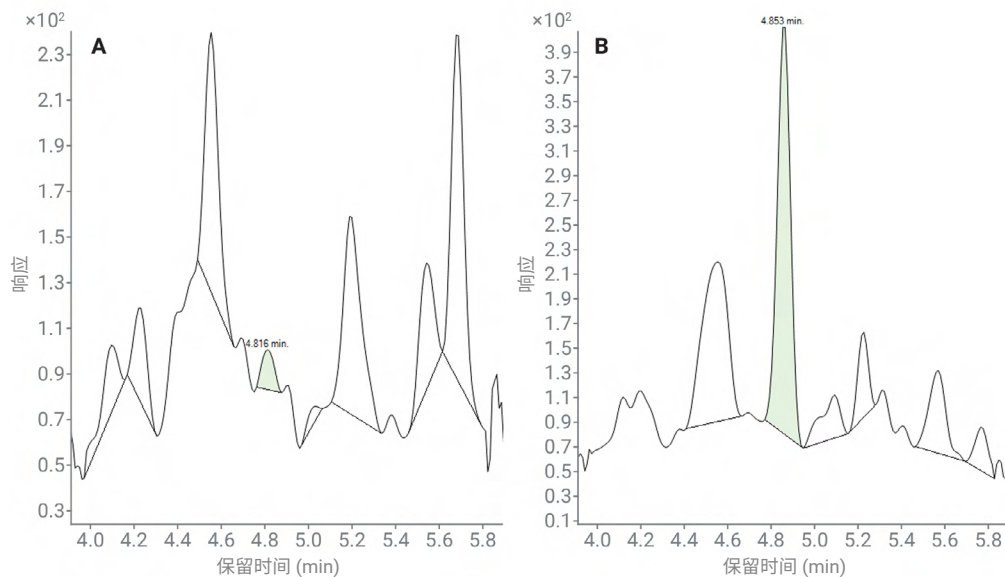


图 4. 大鼠血浆中艾塞那肽的校准曲线，浓度范围为 0.02–20 ng/mL

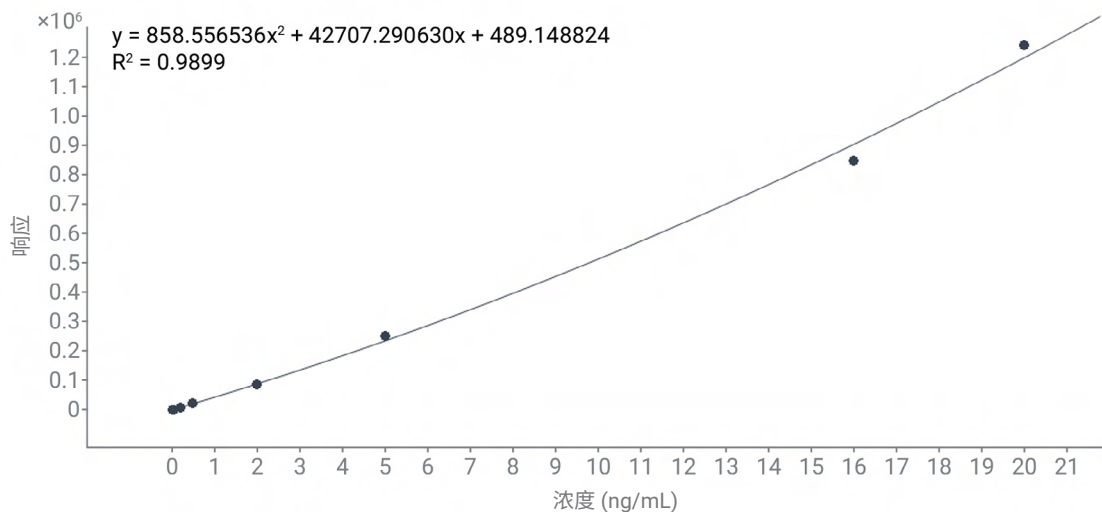


表 3. 三次运行获得的艾塞那肽校准曲线性能

校准 (ng/mL)	0.020	0.040	0.200	0.500	2.000	5.000	16.000	20.000
平均值	0.021	0.044	0.201	0.538	1.978	5.315	15.922	19.855
偏差 (%)	5.25	9.00	0.30	7.62	-1.11	6.31	-0.49	-0.72
%CV	3.70	15.57	12.48	5.55	1.37	0.12	6.63	4.90

表 4. 大鼠血浆质量控制样品的分析精度和准确度 (n = 6)

	QC 浓度 (ng/mL)	0.02 (LLOQ)	0.06 (低)	1.00 (中)	15.0 (高)
第 1 次 运行	平均值	0.0181	0.0649	1.19	15.3
	偏差 (%)	-9.5	8.2	19.0	2.1
	%CV	12.8	12.0	6.7	3.5
第 2 次 运行	平均值	0.0225	0.0593	1.04	15.2
	偏差 (%)	12.3	-1.1	3.7	1.6
	%CV	17.0	15.2	4.5	9.8
第 3 次 运行	平均值	0.0218	0.0623	1.10	14.8
	偏差 (%)	9.0	3.8	10.0	-1.3
	%CV	14.6	13.7	8.3	8.6
日间	平均值	0.021	0.0622	1.11	15.1
	偏差 (%)	3.9	3.6	10.9	0.8
	%CV	11.8	4.7	7.7	1.8

## 结论

Agilent Infinity II 生物液相色谱和 Agilent 6495 三重四极杆 LC/MS 系统非常适合大分子多肽的定量分析，可实现出色的分析重现性。本应用简报介绍了一种用于大鼠血浆中艾塞那肽定量分析的高灵敏度 LC/MS 方法。该方法简单、快速，使用 200  $\mu$ L 大鼠血浆获得的定量下限为 0.02 ng/mL，该样品用量与其他固相萃取样品前处理方法相当。在三次定性运行中，QC 样品日内和日间精度及准确

度均符合法规规定的可接受标准，证明该方法具有优异的分析性能和重现性。

## 参考文献

- Jenkins, R. et al. Recommendations for Validation of LC-MS/MS Bioanalytical Methods for Protein Biotherapeutics. AAPS J. 2015, 17(1), 1-16
- Drugs.com AHFS Monographs. <https://www.drugs.com/monograph/exenatide.html#> (2019 年 3 月 22 日访问)
- Raufman, J. P. Bioactive Peptides from Lizard Venoms. Regul. Pept. 1996, 61(1), 1-18

## 工作流程订购指南 | 利用液相色谱分析和纯化合成肽

获取有关如何实现更出色的色谱分离和检测的技巧，以及轻松选择和订购信息。

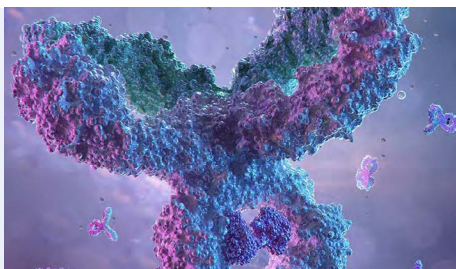
[了解更多信息](#)



## 多肽分离 | 安捷伦反相 HPLC 色谱柱

搜索表面多孔和亚 2  $\mu\text{m}$  全多孔 C18 反相生物色谱柱，实现高分离度肽谱分析实验。这些色谱柱可用于 HPLC 和 UHPLC 仪器系统。

[了解更多信息](#)



## 用于生物分子的 PLRP-S | 安捷伦聚合物反相 HPLC 色谱柱

安捷伦的 PLRP-S 填料提供一系列孔径和粒径。所有规格均具有一致的化学性质和保留特性，使其成为小分子、合成生物分子和大分子纯化的理想选择。

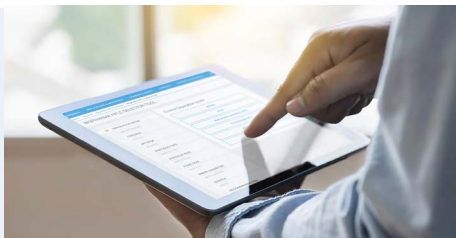
[了解更多信息](#)



## 生物制药液相色谱柱选择工具

这一系列简单易用的工具可帮助您找到适合您应用的色谱柱。您可以根据制造商部件号对照表、所需的固定相填料或应用进行搜索。

[试用选择工具](#)



## 安捷伦的 AdvanceBio 网络研讨会系列

- [合成肽的纯化和分析：方法开发的挑战](#)
- [HPLC 多肽分析简介](#)

[观看更多网络研讨会](#)



## 仍有疑问？咨询安捷伦社区

您可以从众多技术领域中挑选一个您感兴趣的领域，然后找到相关的讨论和文档。您还可以通过安捷伦知识门户网站查找适用的维护指南、最佳实践和故障排除文章。

[community.agilent.com](http://community.agilent.com)

