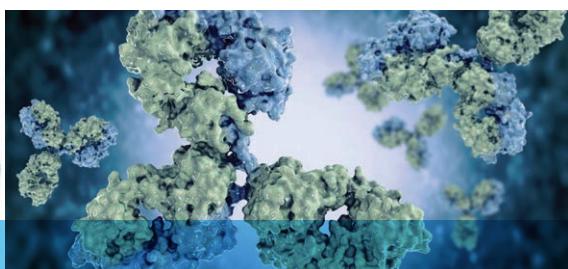


# Agilent BioHPLC 色谱柱

生物分子分析必备资源





Agilent  
**CrossLab**

洞察敏锐，成就超群

# 我们的定位 我们的使命

服务遍及全球，涵盖整个实验室，并贯穿流程中的每一步。

CrossLab 代表了安捷伦集服务、消耗品和实验室资源管理于一体的独特解决方案，能帮助实验室提高效率、优化操作、延长仪器正常运行时间，并提升用户技能等。

Agilent CrossLab 为安捷伦和特定的非安捷伦仪器提供支持，并为实验室提供工作流程搭建、实验室业务咨询和合规性、库存管理和资产管理（包括移机服务）等咨询服务。

如需了解关于 Agilent CrossLab 的更多信息，以及洞察敏锐、成就超群的示例，请访问 [www.agilent.com/crosslab](http://www.agilent.com/crosslab)

欢迎阅读实验室的 CrossLab 案例，了解我们能从哪些方面给予您帮助。



## 实验室真实案例

Agilent CrossLab 服务工程师努力在每一次互动中提供见解，以帮助客户提高效率、优化资源、延长仪器正常运行时间并提升用户技能。了解 Agilent CrossLab 如何为全球客户提供见解与价值。

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

# 目录

<b>生物色谱柱选择指南</b>	<b>1</b>	ZORBAX 300 Å StableBond	44
什么是生物分子?	2	ZORBAX 300 Å Extend-C18	53
什么是生物色谱柱?	3	Poroshell 300	57
色谱柱选择流程图	5	AdvanceBio 肽谱分析色谱柱	62
		安捷伦肽质量控制标准品	66
		PLRP-S	67
		AdvanceBio 脱盐反相小柱	73
		AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱	74
		AdvanceBio 寡核苷酸标准品	76
<b>生物分子分离</b>	<b>6</b>		
蛋白质分离	6		
多聚糖分离	12		
肽分离	14		
信赖 AdvanceBio 色谱柱带来更快速、更一致的生物药物分析	16		
DNA 和 RNA 寡核苷酸的分离	17	<b>使用疏水相互作用色谱分析完整蛋白质</b>	<b>78</b>
氨基酸分析	19	AdvanceBio HIC	78
氨基酸	20		
<b>方法开发指南</b>	<b>21</b>		
一级结构分析方法	21	电荷异构体分析	80
反相 LC/MS 方法	23	纯化蛋白质和其他带电荷分子	80
电荷异构体分析方法	24	将 IEX 应用于电荷异构体的分析	80
利用安捷伦缓冲液顾问软件的电荷异构体分析方法	26	Bio MAb HPLC 色谱柱	83
聚集体与片段分析方法	27	Bio IEX HPLC 色谱柱	88
多聚糖和亲水性/糖肽分析	29	PL-SAX 强阴离子交换色谱柱	95
滴度测定和细胞培养基优化方法	30	PL-SCX 强阳离子交换色谱柱	99
高灵敏度毛细管柱方法	31	Bio-Monolith 离子交换 HPLC 色谱柱	102
<b>用于蛋白质鉴定和杂质分析的安捷伦仪器</b>	<b>32</b>		
1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统	32	<b>聚集体与片段分析</b>	<b>106</b>
配备高速泵的 1290 Infinity II 液相色谱系统	33	准确测定生物分子聚集、碎裂和化学配基/修饰	106
配备二元泵的 1260 Infinity II 液相色谱系统	34	应用 SEC 进行聚集体分析	106
1260 Infinity II Prime 液相色谱系统	35	应用 SEC 进行定量分析和分子量测定	107
<b>一级结构分析</b>	<b>36</b>	哪一种体积排阻色谱柱适合您的应用?	109
准确测定氨基酸序列和翻译后修饰，并分析肽和寡核苷酸的杂质	36	AdvanceBio SEC	110
AdvanceBio RP-mAb	39	AdvanceBio SEC 标准品	116
		Bio SEC-3	117
		Bio SEC-5	123
		ProSEC 300S	127
		ZORBAX GF-250 和 GF-450 凝胶过滤柱	128

(续)

# 目录 (续)

<b>糖基化表征</b>	<b>130</b>	微径 (内径 1.0 mm) 色谱柱	169
AdvanceBio 糖谱分析色谱柱	132	2D-LC	172
N-糖标准品	136	离线色谱柱再生	172
亲水性和糖肽分析	138	全二维液相色谱	174
		纯化 — 制备型 HPLC	176
<b>滴度测定</b>	<b>140</b>	mRP-C18 高回收率蛋白质分析柱	178
Bio-Monolith HPLC 色谱柱	140	ZORBAX PrepHT	180
		用于 Prep to Process 的 PLRP-S 柱	182
<b>细胞培养物和氨基酸分析</b>	<b>145</b>	Bio MAb 和 Bio IEX	188
Agilent Spent Media 分析解决方案	146	用于 Prep to Process 的 PL-SAX 和 PL-SCX	190
AdvanceBio 氨基酸分析 (AAA)	147	肽纯化	194
AdvanceBio 氨基酸分析标准品和试剂盒	149	用于合成肽的 VariTide RPC 色谱柱	194
AdvanceBio MS Spent Media	150	VariPure IPE	195
ZORBAX Eclipse 氨基酸分析 (AAA)	152	Load & Lock 制备型 HPLC 色谱柱	196
		Bio SEC	198
<b>蛋白质去除</b>	<b>155</b>		
安捷伦蛋白质分馏系统和蛋白质组学试剂	155	<b>安捷伦解决方案</b>	200
多重亲和去除系统	156		
多重亲和去除系统启始工具包	159	<b>Agilent CrossLab 服务</b>	202
<b>专用尺寸</b>	<b>160</b>		
毛细管柱和纳流柱	160		
ZORBAX Bio-SCX 系列 II	166		

## 技巧和工具

有关涵盖生物色谱柱产品系列的应用实例，请参见关键质量属性应用文集：[www.agilent.com/chem/cqa-applications](http://www.agilent.com/chem/cqa-applications)

# 生物色谱柱选择指南

生物治疗药物对改善人类健康具有巨大潜力。在全球范围内，获得批准的蛋白质和抗体治疗药物的数量不断增长，因为这一重要的治疗药物类别能够应对尚未满足的医疗需求。但生物药物的发现和开发十分困难。科学家们面临着许多挑战，不仅要随时掌握知识进步和技术改进，而且还必须满足不断变化的政府法规的要求。快速做出正确决策至关重要。从疾病研究到 QA/QC 再到生产的每个阶段，安捷伦都能帮助您做出正确选择，将治疗药物成功推向市场。这不仅仅是因为我们制造的可靠仪器和消耗品能够提供准确、可重现的结果。更是因为我们了解生物制药工作流程，并提供无缝协同的产品系列（作为研究、发现和开发的引擎），以推动候选生物药物的开发。

鉴于蛋白质生物药物非常不均一，需要采用许多色谱方法以准确表征活性药物成分 (API)。分析方法包括用于定量分析二聚体和聚集体的体积排阻色谱以及用于电荷异构体分析的离子交换色谱。作为全面表征的组成部分，还有必要了解一级氨基酸序列以及在纯化或配制步骤中对该序列可能进行的任何翻译后修饰。为了对关键表征工作流程进行完整、可重现的高质量分析，安捷伦提供了各种色谱柱和备件。

本综合指南将帮助您选择适合您的表征工作流程的色谱柱。我们还对方法开发、溶剂选择、流动相改性、优化给出了一些建议和提示，并列举了许多分离实例，所有这些将对您选择色谱柱和开发方法提供帮助。

安捷伦针对您的需求提供了完备的解决方案。其中包括配备无金属样品管路的 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统，以及设计用于为 UHPLC 应用提供最高分析速度、分离度和超高灵敏度的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统。生物分子可能在结构上非常复杂，但是使用安捷伦 HPLC 色谱柱、系统和备件可简化其分析过程。

## 什么是生物分子？

生物分子是由生物体产生的化合物。其分子量范围可以从氨基酸和小分子脂类到大分子多聚核苷酸，如 DNA 或 RNA。

在本节中，我们将探讨以下化合物的分离：

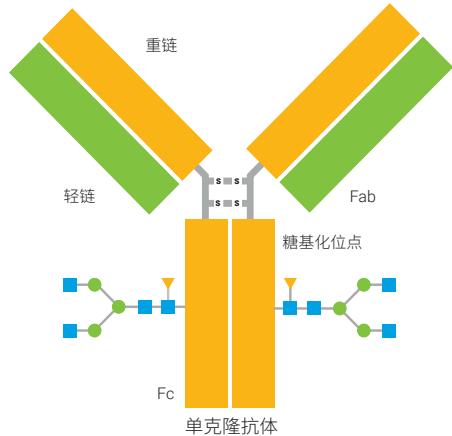
**蛋白质** — 用体积排阻色谱基于尺寸进行分离，用离子交换色谱基于电荷进行分离，用反相或疏水相互作用色谱基于疏水性进行分离。

**肽** — 用于各种肽（包括所有尺寸的疏水、亲水、碱性和酸性肽）分析和纯化的生物色谱柱。另外，还有适用于 HPLC 和 UHPLC 肽谱分析的色谱柱。

**DNA/RNA 寡核苷酸** — 反相和离子交换柱适合分离 DNA 和 RNA 寡核苷酸，填料孔径满足所有尺寸寡核苷酸的分离需求，从合成的小分子寡核苷酸到大分子质粒。

**氨基酸** — AdvanceBio 氨基酸分析色谱柱为 24 种氨基酸的分析提供了高效解决方案。

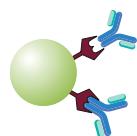
一般情况下，分析时间从 14 分钟（使用 75 mm 色谱柱）到 24 分钟（使用 150 mm 色谱柱）。



## 什么是生物色谱柱？

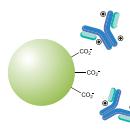
生物色谱柱或生物柱是用于分离生物化合物（如肽和蛋白质、寡核苷酸和多聚核苷酸）及其他生物分子和复合物的液相色谱柱。生物柱色谱柱专门设计用于生物分子分析，具有适合大分子分析的大孔径。在填料设计上，尽量减少填料与分析物之间的非特异性结合，以提高回收率。分离机制的选择或为保留分析物的生物学功能（在分析过程中不失去生物活性），或故意使分析物变性以便对一级结构进行表征。

安捷伦生物色谱柱产品为生物分子分析所需的所有主要表征技术提供各种解决方案。其中包括：



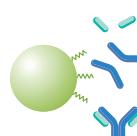
### 滴度测定

使用 AdvanceBio Bio-Monolith Protein A 色谱柱等独有的技术进行滴度测定和细胞系优化。



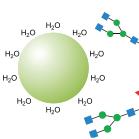
### 电荷异构体分析

安捷伦离子交换色谱柱包括针对单克隆抗体分析进行优化的固定相，例如 Bio MAb 和 Bio IEX，以实现准确的异构体分析。



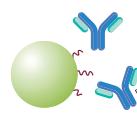
### 使用反相谱分析完整蛋白质和亚基纯度

使用 AdvanceBio RP-mAb、ZORBAX RRHD 300 Å 和 PLRP-S 等关键技术，在一级结构表征到完整或碎片蛋白质分析等各种应用中获得更加可靠的分析结果。



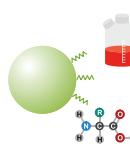
### 多聚糖分析

安捷伦亲水相互作用色谱 (HILIC) 柱可为多聚糖和糖肽分析提供准确且可重现的结果。



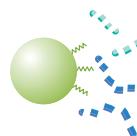
### 使用疏水相互作用分析完整蛋白质

Agilent AdvanceBio HIC 色谱柱将分离各种蛋白质异构体 (PTM)，包括 mAb 中的氧化以及在 ADC 中观察到的药物抗体种类。



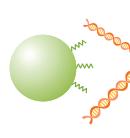
### 氨基酸和细胞培养基分析

采用 AdvanceBio AAA 的 LC/UV 型工作流程或采用 AdvanceBio MS Spent Media 的 LC/MS 型工作流程，分析关键的细胞培养基成分。



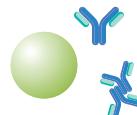
### 肽谱分析

使用 AdvanceBio 肽谱分析检测并鉴定酶解的蛋白质样品中的关键翻译后修饰。



### 寡核苷酸分析

稳定、高效的 DNA/RNA 分析解决方案。



### 聚集体及片段分析

AdvanceBio SEC 可准确测量聚集体（例如二聚体、三聚体和四聚体等）并从较大分子量的蛋白质中分离低分子量的赋形剂和杂质。

# 生物色谱柱选择指南

Agilent AdvanceBio 色谱柱旨在为提升准确度和速度而设计，适用于通过反相色谱表征单克隆抗体和其他完整蛋白质、聚集体 SEC、电荷异构体 IEX、完整质量数、一级结构和翻译后修饰(PTM)，以及使用亲水相互作用色谱进行裂解多聚糖分析。

本指南提供了有关完整的安捷伦生物色谱柱产品系列的更多详细信息，以及 AdvanceBio 系列产品中可准确表征生物治疗药物的选择信息。



## 技巧和工具

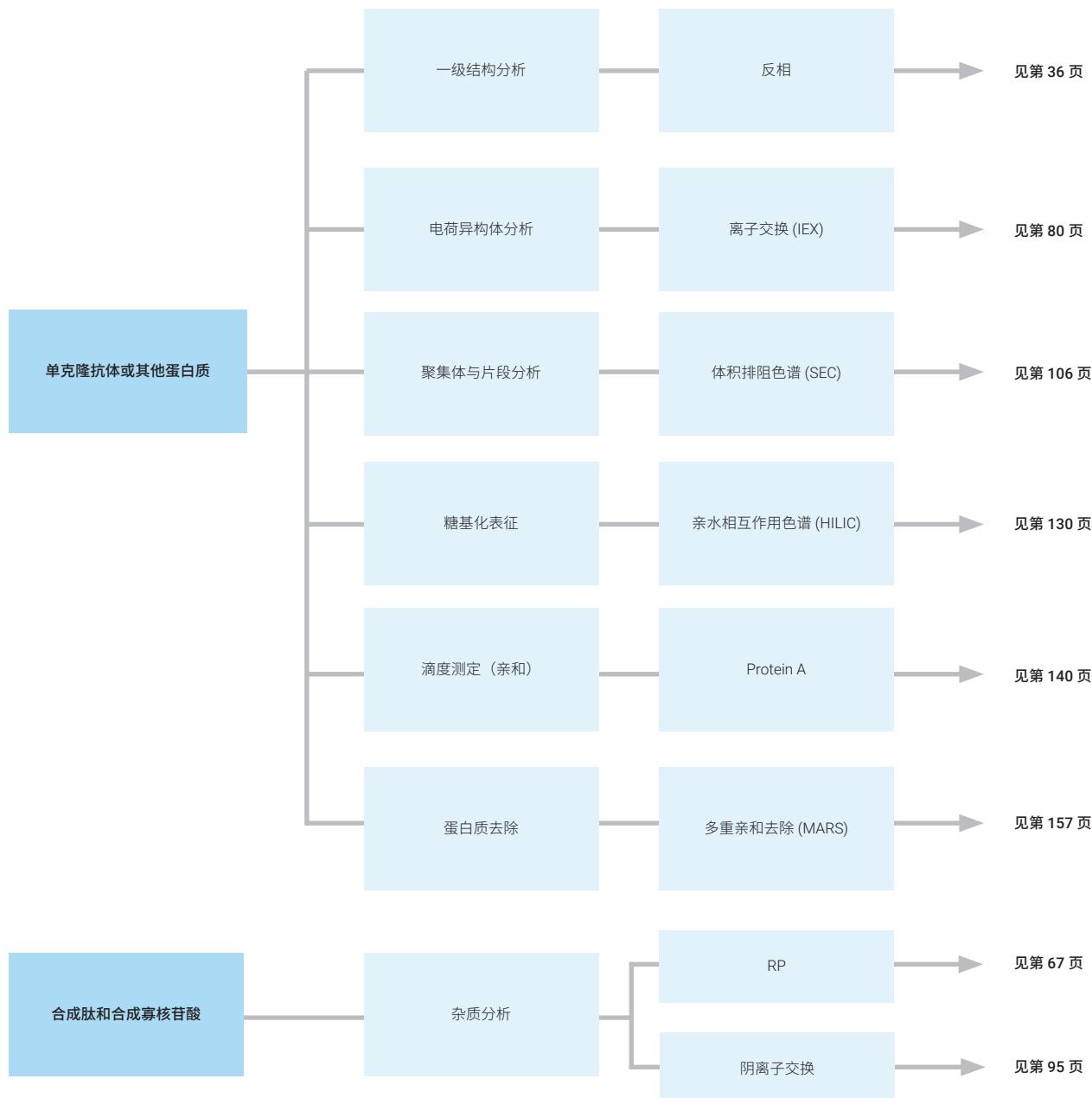
如需了解有关我们的 AdvanceBio 色谱柱系列产品以及有助于推动您的表征需求的各种工具的更多信息，请访问：

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

## 色谱柱选择流程图

以下流程图提供了各章选择指南的页码，帮助您选择最适合您的生物分子应用的色谱柱。

可遵循各种指南以帮助您选择最佳的生物分子分离色谱柱。首先，需要考虑分子的尺寸，这将决定分离所用的 HPLC 方法的孔径。其次，需要考虑分子的溶解度。第三，需要考虑分离机制、尺寸、疏水性和电荷。



## 生物分子分离

### 蛋白质分离

蛋白质是复杂的分子，对其进行全面表征需要采用多种技术。蛋白质以三维结构存在，并且这些结构决定了其生物活性。

氨基酸链的序列决定了蛋白质的一级结构。一级结构氨基酸之间形成的氢键使蛋白质形成了二级结构，一般为 $\alpha$ 螺旋和 $\beta$ 折叠。二级结构区域之间进一步发生一系列氢键、离子、疏水和二硫键相互作用，即形成三级蛋白质结构或三维构象。如果蛋白质由许多氨基酸链组成，那么这些链之间的相互作用形成四级结构。

因此，从图 1 可以清楚地看出，要表征天然状态的蛋白质，需要不破坏其三级结构和四级结构。而测定一级氨基酸序列时，需要破坏其三维结构，在蛋白质完全变性状态下进行分析。

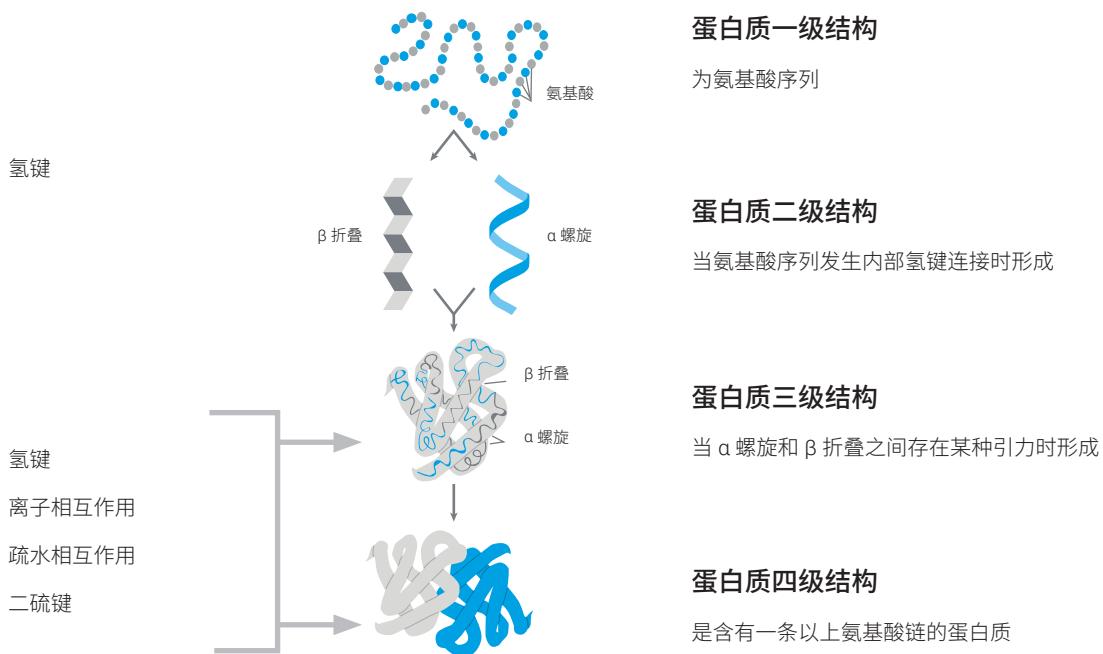


图 1. 蛋白质多级结构示意图

蛋白质的环境可能影响、稳定或破坏其结构。需要考虑的因素包括 pH、温度、盐浓度、水或有机溶剂的含量。对某些蛋白质来说，还存在起稳定作用的小分子或金属离子。蛋白质结构还可能因使用破坏二硫键的巯基还原剂或者或尿素或盐酸胍等变性剂而被破坏。除内在的复杂性以及决定其三维结构的分子内相互作用以外，蛋白质分子与其他分子以及它们所接触的表面之间还存在分子间缔合。这些相互作用可能导致蛋白质络合、聚集（可能发生沉淀）以及在表面（包括 HPLC 色谱柱和系统的表面）上沉积。因此，应考虑蛋白质的处理和保存环境。

### 蛋白质分析色谱柱选择指南

应用	技术	安捷伦色谱柱	备注
一级结构分析	UHPLC/HPLC 反相分离	AdvanceBio RP-mAb PLRP-S ZORBAX RRHD 300 Å Poroshell 300 Å ZORBAX 300 Å AdvanceBio 肽谱分析专用柱	反相分离需要（或引起）蛋白质变性，以获得关于氨基酸序列和氨基酸修饰（包括翻译后修饰）的详细信息。
电荷异构体分析	离子交换分离	Agilent Bio IEX Agilent Bio MAb PL-SAX PL-SCX	各氨基酸的比例决定了蛋白质分子的静电荷。静电荷为零的 pH 值称为等电点 (pI)。当溶液 pH 低于 pI 时，蛋白质带正电荷（酸性）；当溶液 pH 高于 pI 时，蛋白质带负电荷（碱性）。对于离子交换分析，我们建议洗脱剂 pH 至少高于或低于其 pI 一个 pH 单位。使用离子交换柱分析蛋白质，需要使用缓冲流动相，以及进行盐梯度洗脱或者 pH 梯度洗脱。
聚集体与片段分析	体积排阻分离	AdvanceBio SEC Bio SEC-3 Bio SEC-5	蛋白质生物药物的聚集体形成是一个重要问题，因为其可能引发免疫原性反应，并影响最终制剂的组成。
糖基化表征	亲水相互作用色谱	AdvanceBio 糖谱分析柱 ZORBAX RRHD 300 HILIC	由于免疫原性和生物治疗药物的安全性的影响，了解蛋白质和 mAb 的糖基化和多聚糖结构越来越重要。HILIC 色谱可保留样品的亲水性部分，从而为反相色谱柱提供正交信息。
滴度测定	亲和分离	Bio-Monolith Protein A Bio-Monolith Protein G	在投入高成本进行前处理以及使用大量 Protein A 色谱柱之前；若想要对细胞培养上清液的单克隆抗体滴度和产量进行监测，就需要通过小型（分析型）的处理工序来确定单克隆抗体的滴度，以便确定单克隆抗体产品的最佳采集时间。
蛋白质去除	亲和纯化	MARS Human-14 MARS Human-7 MARS Human-6 MARS Human-6 高容量柱 MARS Human-2 MARS Human-1 MARS Mouse-3	去除生物样品中存在的高丰度蛋白质。去除这些高丰度蛋白质后，可改善样品的后续 LC/MS 分析和电泳分析，有效扩展动态范围。



## 曲妥珠单抗 IgG1 变异体的快速高分离度分离

色谱柱： AdvanceBio RP-mAb C4

795775-904

2.1 × 100 mm, 3.5 μm

流动相： A: 含 0.1% TFA 的水:异丙醇 (98:2)

B: IPA:ACN:流动相 A (70:20:10)

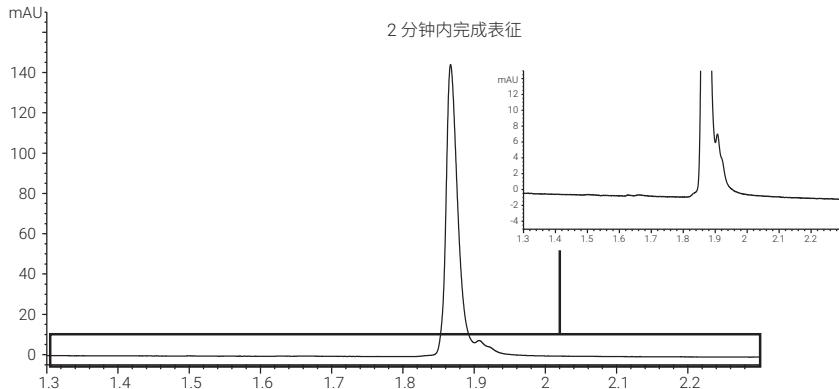
流速： 1.0 mL/min

梯度： 4 min 内 B 由 10% 升至 58%，以 95% B 淋洗  
1 min，并以 10% B 再平衡 1 min

柱温： 80 °C

检测器： UV, 254 nm

样品： 5 μL 完整人源化重组曲妥珠单抗变异性 IgG1  
(1 mg/mL)，购自 Creative Biolabs



AdvanceBio RP-mAb C4 柱提供尖锐的峰形，可在 2 分钟内使分析物实现完美分离。

## 更高分离度的氧化

色谱柱： ZORBAX RRHD 300SB-C18

857750-902

2.1 × 50 mm, 1.8 μm

流动相： A: 0.1% TFA

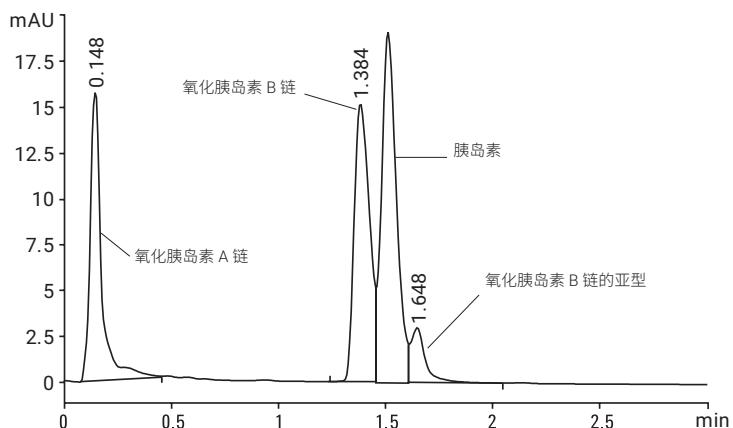
B: 0.01% TFA + 80% ACN

流速： 1.0 mL/min

梯度： 0 至 4 min, B 由 33% 升至 50%

检测器： 1290 Infinity 液相色谱系统，配备二极管阵列检测器，检测  
波长 280 nm

样品： 胰岛素、胰岛素 A 链和 B 链、氧化型 (BSA, Sigma-Aldrich,  
Corp., 1 mg/mL)



使用 ZORBAX RRHD 300SB-C18 (2.1 × 50 mm, 1.8 μm) 色谱柱，可在两分钟内  
从胰岛素中分离出氧化胰岛素链。

## 完整 mAb 单体和二聚体的分离

色谱柱: Bio SEC-3, 300 Å  
5190-2511  
7.8 × 300 mm, 3 µm

流速: 1.0 mL/min

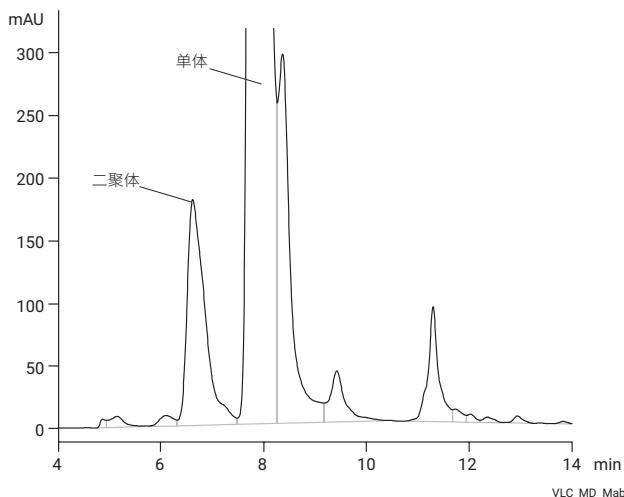
进样量: 5 µL

柱温: 室温

检测器: UV, 220 nm

缓冲液: 磷酸钠缓冲液, 150 mmol/L, pH 7.0

等度: 0 至 30 min, 缓冲液由 0 升至 100%



## 技巧和工具

安捷伦完全了解您所做的极其复杂且费力的工作。我们可以为您提供帮助。更多信息可参见生物制药工作流程解决方案：安捷伦如何有效解决复杂的分析挑战（出版号 5991-5235CHCN）。

[www.agilent.com/search](http://www.agilent.com/search)



## 用盐梯度分离人 IgG1 电荷异构体

色谱柱: Bio MAb, PEEK  
5190-2407  
4.6 × 250 mm, 5 μm

流动相: A: 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 5.5  
B: A + 0.5 mol/L NaCl

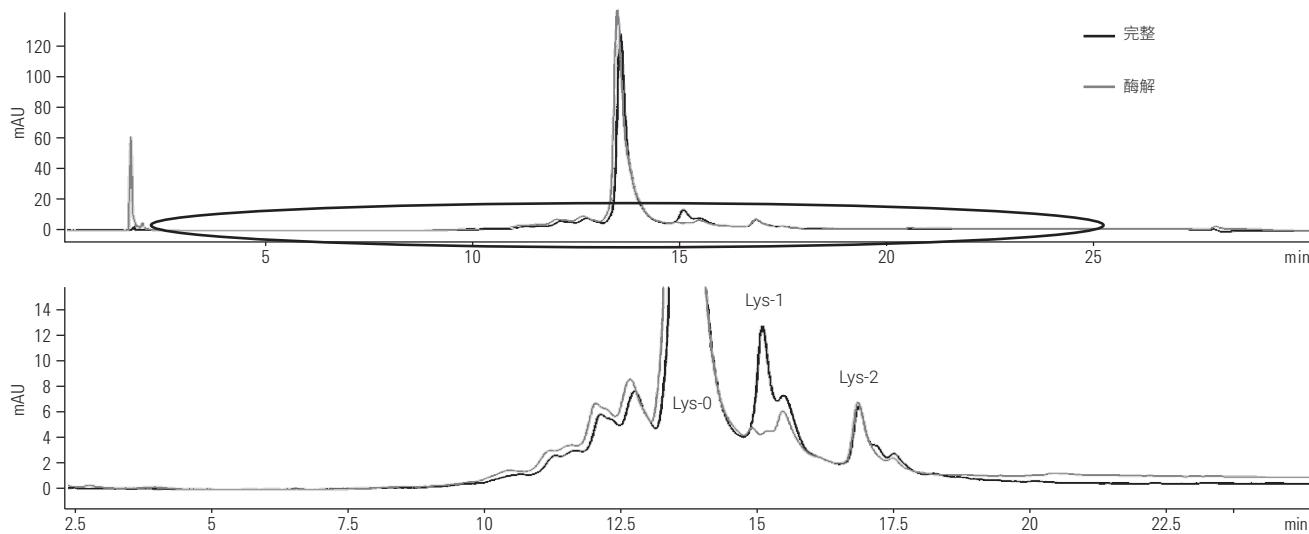
流速: 0.85 mL/min

梯度: 0 至 25 min, B 由 10% 升至 35%

检测器: UV, 225 nm

仪器: 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱或 1100 系列液相色谱系统

样品: 5 μL 1 mg/mL 完整或 C 端酶解的 IgG1



使用 Agilent Bio MAb 5 μm 色谱柱分离完整和 C 端酶解的 IgG1。



### 对 CHO 细胞上清液中的 IgG1 进行滴度测定

色谱柱: Bio-monolith Protein A

5069-3639

5.2 × 4.95 mm

流动相: A: 50 mmol/L 磷酸盐, pH 7.4

B: 100 mmol/L 柠檬酸, pH 2.8

流速: 1 mL/min

梯度: 时间 (min) % B

0-0.5 0 (结合)

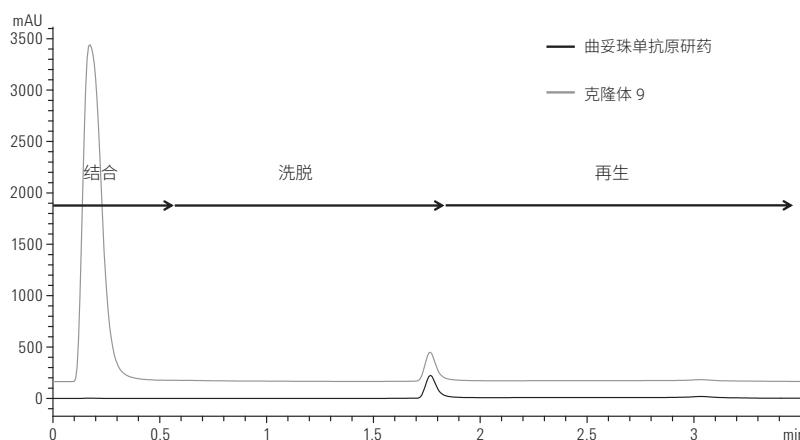
0.6-1.7 100 (洗脱)

1.8-3.5 0 (再生)

进样量: 50 μL

检测器: UV, 280 nm

馏分收集: 基于时间



采用 AdvanceBio Bio-Monolith Protein A 得到的由曲妥珠单抗产生的 CHO 克隆体 (克隆体 9) 以及用 50 mmol/L 磷酸钠 (pH 7.4) 稀释至 0.2 mg/mL 的曲妥珠单抗原研药的色谱图。请注意，用磷酸盐缓冲液按 1:1 的比例对上清液进行稀释。

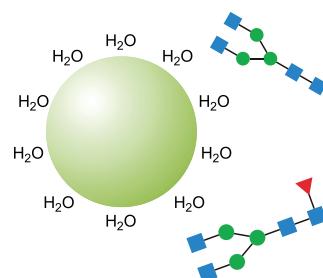
## 多聚糖分离

### 多聚糖分析

生物治疗药物的表征需要多聚糖分析，因为糖基化方式会影响最终产品的安全性和有效性。

完整糖蛋白经 PNGase F 等酶处理，使多聚糖从蛋白质上裂解下来。然后用荧光染料标记多聚糖，因为它们本身在紫外线或荧光下不可见。标记后，执行净化步骤，从样品混合物中除去过量试剂和去糖基化蛋白质。然后，经纯化的游离多聚糖样品通常用配备荧光或质谱检测的亲水相互作用色谱 (HILIC) 进行分析。

该色谱图是起始糖蛋白样品的特性，并且复杂程度可能千差万别。AdvanceBio 糖谱分析色谱柱非常适合在短时间内实现高分离度分离。



### 技巧和工具

安捷伦生物惰性备件提供了无金属样品流路，可最大程度减小与生物分子的相互作用。

请访问：[www.agilent.com/chem/bio-inert-uhplc](http://www.agilent.com/chem/bio-inert-uhplc)



### 超快速多聚糖分析：利用 1.8 μm 填料颗粒在 10 分钟内即可完成

色谱柱：**Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱**

**859700-913**

**2.1 × 150 mm, 1.8 μm**

流动相：  
A: 100 mmol/L 甲酸铵, pH 4.5

B: ACN

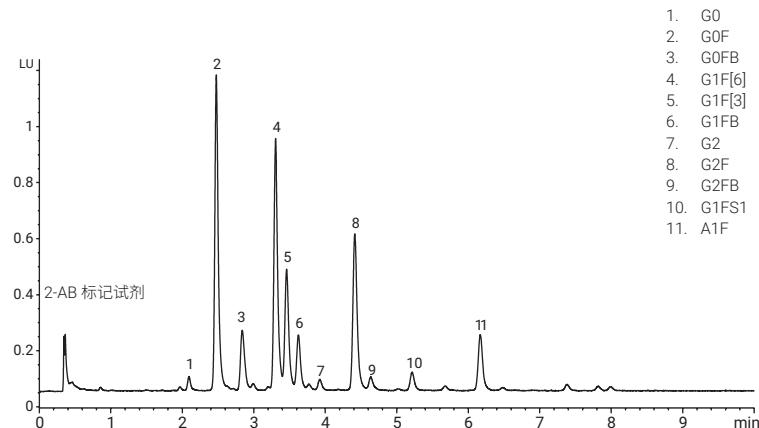
进样量：  
2 μL, 70:30 ACN:100 mmol/L 甲酸铵溶液

荧光检测：  
激发波长 = 260

发射波长 = 430

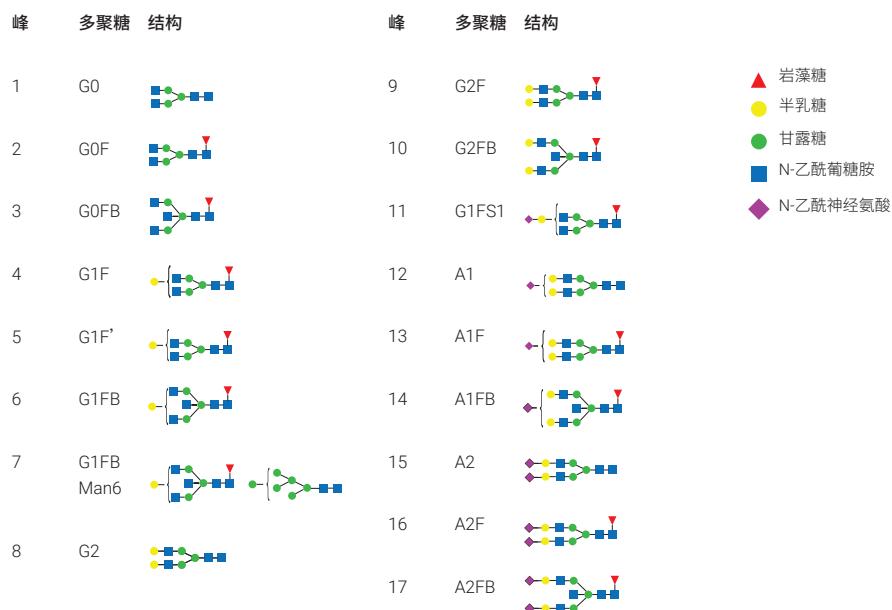
仪器：  
Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统, 配备 Agilent 1260  
Infinity FLD

样品：  
2-AB 标记的人 IgG N-糖文库 (部件号 5190-6996)



快速、高分离度糖谱分析 (1.8 μm 色谱柱)。此标准品用于对所有 AdvanceBio 糖谱分析色谱柱进行测试。

时间	%A	%B	流速 (mL/min)
0	25	75	1.0
12	40	60	1.0
12.15	60	40	0.5
12.5	60	40	0.5
12.9	25	75	0.5
13.05	25	75	1.0
15	25	75	1.0





## 肽分离

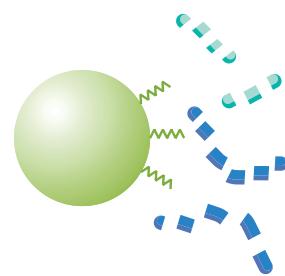
### 肽谱分析

表征蛋白质需要进行肽谱分析。用于确认蛋白质的种类，并鉴定和定量翻译后修饰。

首先，用酶（如胰蛋白酶）裂解纯化的蛋白质，得到一系列肽片段。酶的特异性裂解能够产生蛋白质的特征性肽指纹图谱。对肽片段的鉴定可以进一步确认蛋白质的类型，肽裂解谱的变化可以用来鉴定蛋白质生产或纯化过程中可能发生的翻译后修饰。

反相 UHPLC/HPLC 结合 MS 或 UV 检测，是分析肽裂解物的首选技术。LC/MS 用于肽片段的鉴定，以及测定序列覆盖率，而 LC/UV 更常用于监测/质控部门进行肽谱比较。

肽裂解物为复杂的混合物，要达到完全覆盖（即分离所有肽），需要采用高效/高分离度色谱柱。AdvanceBio 肽谱分析色谱柱旨在为蛋白质鉴定和翻译后修饰鉴定提供高分离度肽谱分析。这些色谱柱使您能够快速分离和鉴定蛋白质一级结构中的氨基酸取代/修饰。



## 使用安捷伦肽混标进行质量保证测试

色谱柱： AdvanceBio 肽谱分析色谱柱

653750-902

2.1 × 150 mm, 2.7 µm

流速： 0.5 mL/min

进样量： 3 µL

梯度： A: 水 (0.1% TFA), B: 乙腈 (0.1% TFA), 0 至 25 min,  
B 由 15% 升至 65%; 25 至 26 min, B 由 65% 升至 95%

柱温： 55 °C

检测器： 220 nm

样品： 肽谱分析混标（每个肽，0.5–1.0 µg/µL），部件号  
5190-0583

1. 缓激肽片段 (1–7)

2. 醋酸缓激肽

3. 血管紧张素 II

4. 神经降压素

5. 血管紧张素 I

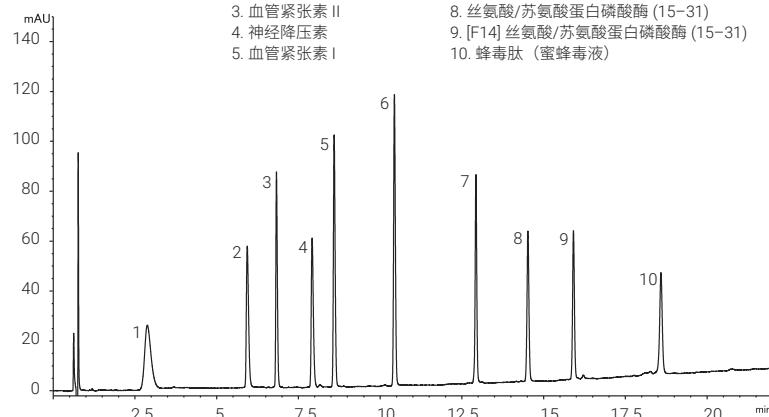
6. 肾素

7. [Ace-F-3-2 H-1] 血管紧张素 (1–14)

8. 丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 (15–31)

9. [F14] 丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 (15–31)

10. 蜂毒肽 (蜜蜂毒液)



用于测试每批 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱的混标的谱图。该混标包含 10 种分子量在 757–2845 Da 的亲水、疏水和碱性肽。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。

## 技巧和工具

Agilent InfinityLab 孔板和密封垫是高通量 LC/MS 应用的理想样品容器。

请访问：[www.agilent.com/chem/well-plates](http://www.agilent.com/chem/well-plates)

### 信赖 AdvanceBio 色谱柱带来更快速、更一致的 生物药物分析

AdvanceBio 肽谱分析色谱柱是安捷伦日益增多的先进生物色谱柱系列的组成部分。它们旨在为肽和蛋白质、抗体、偶合物、新生物实体和生物药物的分离和表征提供一致、卓越的性能。AdvanceBio 色谱柱中蕴含的科技有助于提高准确度和分析效率，从而为实验室的快速高效分析提供支持。

有关安捷伦肽谱分析解决方案的订购信息，请参考第 62 页。



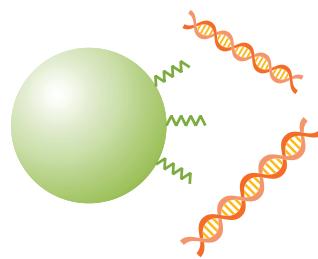
### 技巧和工具

如需了解有关安捷伦生物色谱柱的更多信息，请访问：[www.agilent.com/chem/bioHPLC](http://www.agilent.com/chem/bioHPLC)

## DNA 和 RNA 寡核苷酸的分离

寡核苷酸又重新引起关注，因为其应用越来越多，包括潜在的治疗作用。其合成流程与较成熟的肽合成流程相似，即采用活性固相合成树脂，通过不断添加特定核苷酸，来构建所需要的序列。

在 5' 羟基端用二甲氧基三苯甲烷 (DMT) 基团进行保护，断裂的目标核苷酸仍连着这些保护基团。由于 DMT 具有疏水性，在第一阶段进行该处理非常有用。为提高寡核苷酸的稳定性，特别是对酶降解的稳定性，可以对其进行化学改性，如用硫置换氧，形成硫代磷酸酯。使用化学合成生产生物分子时，每个添加循环的偶联效率都不是 100%。从固相合成支持相上裂解下来的样品含有缺失序列（丢失了一个或几个残基的寡核苷酸），以及某些由于双偶联或支链连接产生的更大的寡核苷酸。样品混合物非常复杂，需要高效的技术进行分析。



寡核苷酸的分离通常使用三种 UHPLC/HPLC 技术：

**三苯甲基保护** — 此步骤为从脱保护失败序列中分离仍带有 DMT 基团的全长目标寡核苷酸，相对比较简单。此步骤得到的分析信息有限，并且被视为纯化方法。

**脱三苯甲基保护寡核苷酸的离子交换分离** — 该方法利用寡核苷酸骨架上的负电荷进行分离。较短寡核苷酸的分离度良好，但分离度随链长增加而降低。使用水相洗脱液，但寡核苷酸高度带电荷，需要用高浓度盐从色谱柱上洗脱下来。

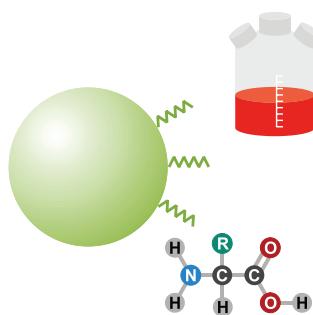
**脱三苯甲基保护寡核苷酸的离子对反相色谱分离** — 该技术使用有机溶剂和挥发性离子配对试剂，并且适用于 LC/MS。该技术最好用高效颗粒填料来实施。需要能使寡核苷酸完全变性，并防止其与互补序列发生结合的条件。因此，该分离最好在高温下进行。

## DNA 和 RNA 寡核苷酸色谱柱的选择

应用	技术	安捷伦色谱柱	备注
三苯甲基保护/ 脱三苯甲基保护 寡核苷酸	三苯甲基保护	PLRP-S 50 $\mu\text{m}$ 填料	基于疏水性差异进行分离。特别适合从脱三苯甲基保护寡核苷酸中分离三苯甲基保护寡核苷酸，也可以用于反相离子对色谱分离脱保护的寡核苷酸。
脱保护的寡核苷酸	脱三苯甲基保护寡核苷酸的 离子对反相色谱分离	PLRP-S 3 $\mu\text{m}$ 至 50 $\mu\text{m}$ AdvanceBio 寡核苷酸色 谱柱	
聚集体与片段分析	脱三苯甲基保护寡核苷酸的 离子交换分离	PL-SAX 1000 $\text{\AA}$	在变性高 pH 条件下分离脱保护寡核苷酸。聚合型填料上的季胺官能团实现了高 pH 下的离子交换分离，改善了自补序列的色谱分离。

## 氨基酸分析

按照一套升级和改进方案，AdvanceBio AAA 高效色谱柱可以分离各种氨基酸。在蛋白质生产过程中，对细胞培养基进行监测，确保维持正确的营养物质平衡和水平以表达产物蛋白质。氨基酸是原料的关键成分，因此必须在生产过程中进行监测和调整。反相色谱是用于氨基酸分析的主要技术。在较短的 75 mm 色谱柱上，进样之间的总分析时间为 14 分钟（分析时间 9 分钟）；在 150 mm 色谱柱上，进样之间的总分析时间为 24 分钟（分析时间 18 分钟）。使用任何安捷伦液相色谱系统，采用 OPA 和 GMOC 衍生化填料执行全自动化分析程序，均可获得良好的灵敏度（用二级管阵列或荧光检测器可达 5–50 pmol）和可靠性。



AdvanceBio 氨基酸分析色谱柱

色谱柱: AdvanceBio 氨基酸分析色谱柱  
655950-802  
 $4.6 \times 100 \text{ mm}, 2.7 \mu\text{m}$

流动相： A = 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 10 mmol/L Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, pH 8.2  
B = 乙腈:甲醇:水 (45:45:10, v/v:v)

流速： 1.5 mL/min

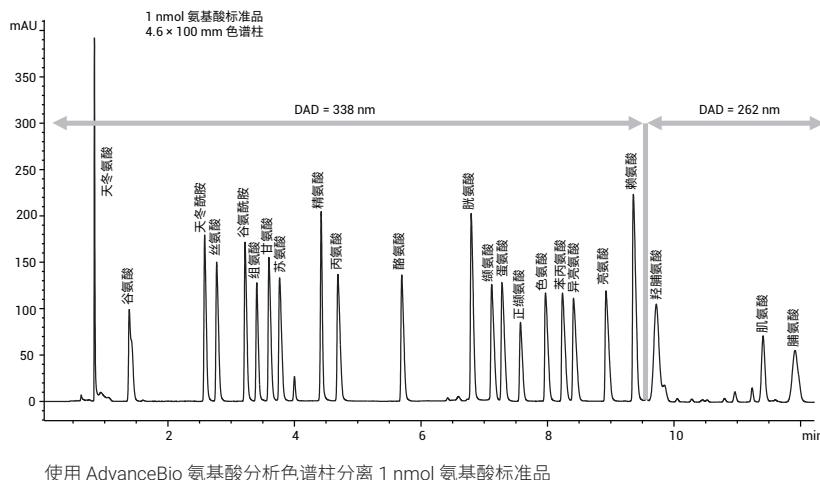
进样量: 3 μl

梯度·时间 %B

0	2
0.35	2
13.4	57
13.5	100
15.7	100
15.8	2
18	停止

柱温: 40 °C

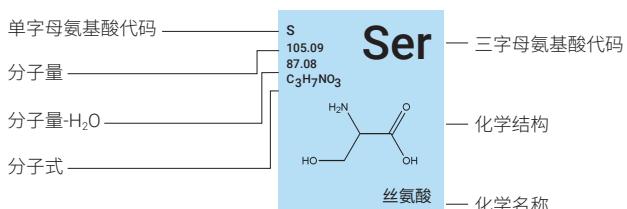
检测器： UV, 338 和 262 nm



## 氨基酸

<p>H 155.16 137.14 <math>C_6H_9N_3O_2</math></p> <p><b>His</b></p> <p>组氨酸</p>	<p>D 133.10 115.09 <math>C_4H_7NO_4</math></p> <p><b>Asp</b></p> <p>天冬氨酸</p>
<p>R 174.20 156.19 <math>C_8H_{11}N_3O_2</math></p> <p><b>Arg</b></p> <p>精氨酸</p>	<p>F 165.19 147.18 <math>C_9H_{11}NO_2</math></p> <p><b>Phe</b></p> <p>苯丙氨酸</p>
<p>A 89.09 71.08 <math>C_3H_7NO_2</math></p> <p><b>Ala</b></p> <p>丙氨酸</p>	<p>C 121.16 103.14 <math>C_3H_7NO_2S</math></p> <p><b>Cys</b></p> <p>半胱氨酸</p>
<p>G 75.07 57.05 <math>C_2H_5NO_2</math></p> <p><b>Gly</b></p> <p>甘氨酸</p>	<p>Q 146.15 128.13 <math>C_5H_9N_3O_3</math></p> <p><b>Gln</b></p> <p>谷氨酰胺</p>
<p>E 147.13 129.11 <math>C_5H_9NO_4</math></p> <p><b>Glu</b></p> <p>谷氨酸</p>	<p>K 146.19 128.17 <math>C_6H_{11}N_2O_2</math></p> <p><b>Lys</b></p> <p>赖氨酸</p>
<p>L 131.17 113.16 <math>C_6H_{11}NO_2</math></p> <p><b>Leu</b></p> <p>亮氨酸</p>	<p>M 149.21 131.20 <math>C_6H_{11}NO_2S</math></p> <p><b>Met</b></p> <p>蛋氨酸</p>
<p>N 132.12 114.10 <math>C_4H_8N_2O_3</math></p> <p><b>Asn</b></p> <p>天冬酰胺</p>	<p>S 105.09 87.08 <math>C_3H_7NO_3</math></p> <p><b>Ser</b></p> <p>丝氨酸</p>
<p>Y 181.19 163.17 <math>C_9H_{11}NO_3</math></p> <p><b>Tyr</b></p> <p>酪氨酸</p>	<p>T 119.12 101.10 <math>C_4H_9NO_3</math></p> <p><b>Thr</b></p> <p>苏氨酸</p>
<p>I 131.18 113.16 <math>C_6H_9N_2O_2</math></p> <p><b>Ile</b></p>	<p>W 204.23 186.21 <math>C_{11}H_{12}N_2O_2</math></p> <p><b>Trp</b></p>
<p>P 115.13 97.12 <math>C_5H_9NO_2</math></p> <p><b>Pro</b></p>	<p>V 117.15 99.13 <math>C_5H_9NO_2</math></p> <p><b>Val</b></p>

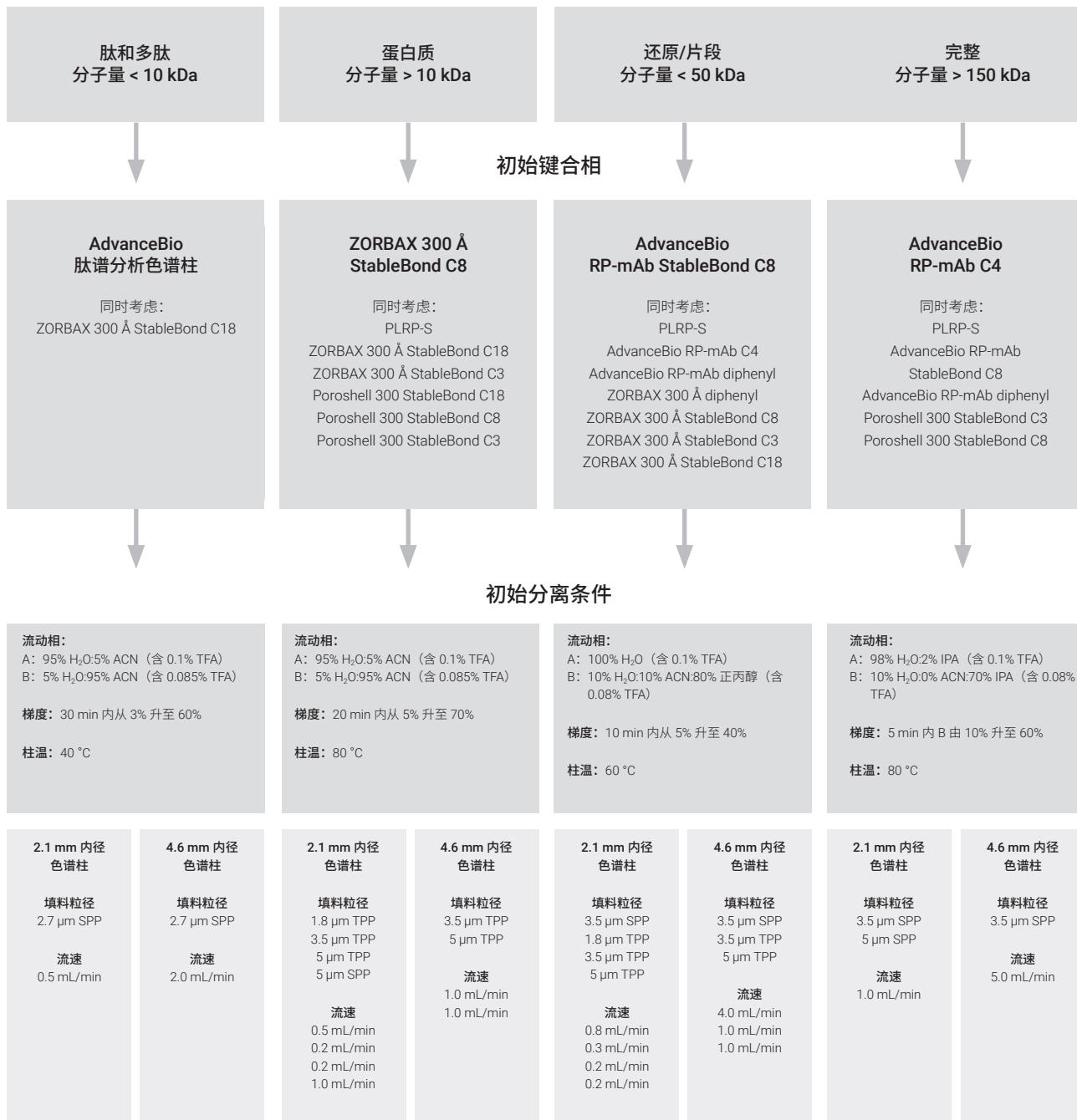
- 碱性
- 非极性 (疏水性)
- 极性, 不带电荷
- 酸性

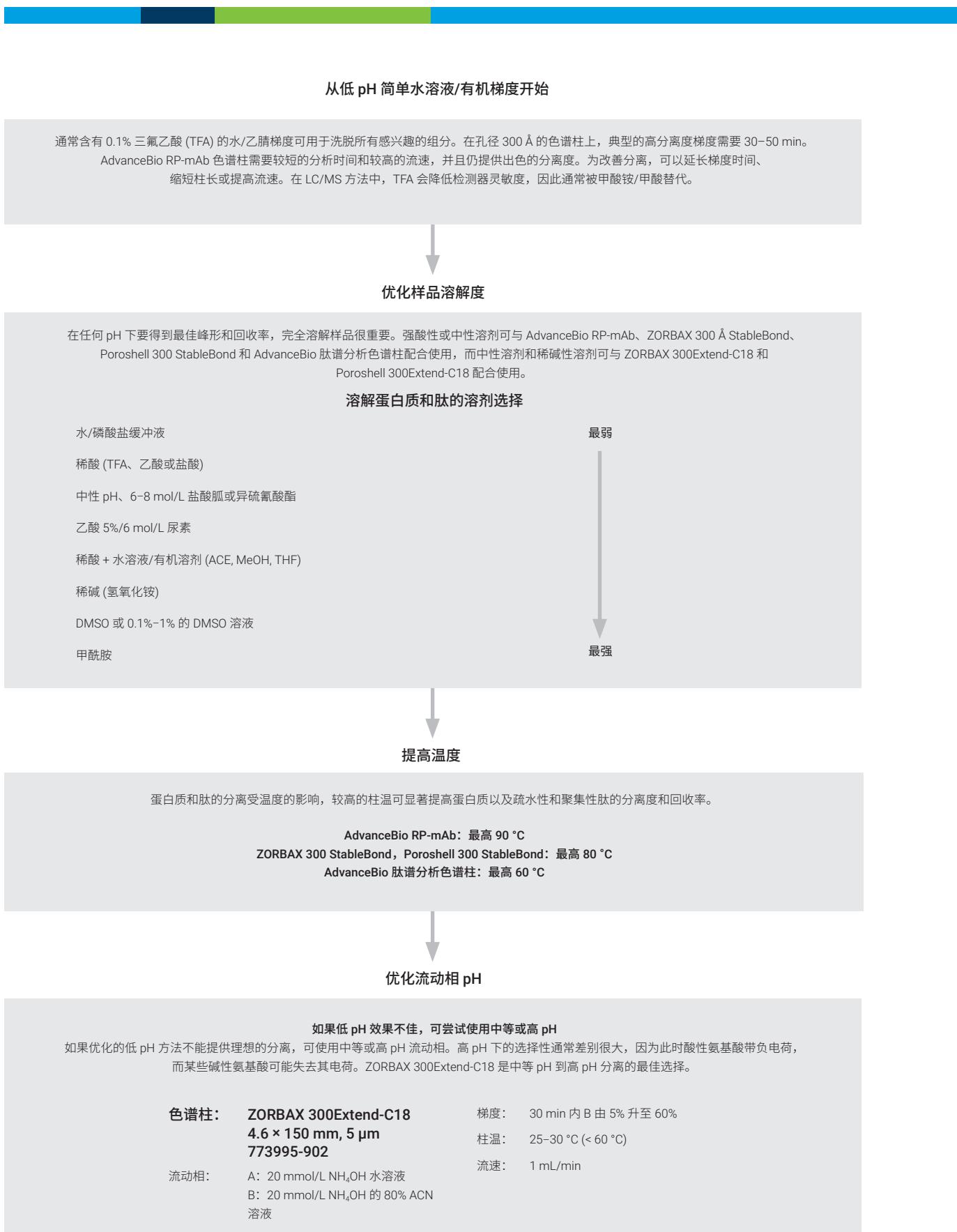


# 方法开发指南

## 一级结构分析方法

本节涉及一级结构分析的色谱柱选择策略，提供了有关 mAb、蛋白质和肽的方法开发的一些关键细节。





## 反相 LC/MS 方法

蛋白质和肽的 LC/MS 分析用于提供蛋白质表征信息，准确鉴定蛋白质的翻译后修饰并测定合成和天然肽的分子量。LC/MS 还用于蛋白质组学应用中在 2D 分离中对蛋白质进行鉴定。因此，蛋白质和肽的 LC/MS 分析是一个关键的分离领域，需要一些特殊的色谱柱和流动相建议。LC/MS 一般使用较小尺寸的色谱柱，并且流动相中通常不使用 TFA，因为它作为流动相添加剂会降低质谱的灵敏度。

### 分析型 LC/MS 应用

当样品量不受限制时，2.1 mm 内径色谱柱将提供良好的灵敏度。借助 Poroshell 色谱柱，可使用内径较小的 1 mm 色谱柱。



### 高灵敏度/蛋白质组学应用

毛细管柱适用于高灵敏度蛋白质和肽分析应用中。内径为 0.5 mm 的色谱柱适用于蛋白质和蛋白质酶解物的分离，而内径为 0.3 mm 的色谱柱最常用于蛋白质酶解物分析。可在高 pH 下用氢氧化铵流动相进行分析。纳流柱（内径为 0.1 和 0.075 mm）常用于蛋白质组学的 2D LC/MS 系统中，且初始选择为 C18 键合相。



## 电荷异构体分析方法

本节涉及电荷异构体分析的色谱柱选择策略，提供了有关 mAb、蛋白质和肽的方法开发的一些关键细节。



## 优化条件

某些分离可能需要使用特殊的缓冲液、离子强度、pH 和/或温度。

### 离子强度

需要特定的离子强度以保持色谱柱功能。通常，所需的最低盐浓度为 10–20 mmol/L。  
但是，离子强度大于 20 mmol/L 可能阻止生物分子吸附到色谱柱上。常用的盐是钠和钾的氯化物和乙酸盐。  
洗脱所用的典型盐浓度为 400–500 mmol/L。

**注：**不得单独用水清洗色谱柱，因为它会导致反压明显升高。

### 缓冲液和 pH 的选择

缓冲液在分离优化中起到重要作用。在抗体和许多生物分子分析中，  
通常使用磷酸盐缓冲液。还推荐使用以下缓冲液：MES、Tris 和 ACES 缓冲液。  
使用 pH 5.0–6.5 的缓冲液。pH 通常可以调节 +/- 0.2 个单位。  
某些特殊蛋白质可能需要更高的 pH (> pH 6.5)。  
可以用磷酸、乙酸、HCl 和 NaOH 来调节 pH。

洗脱时也可以采用 pH 梯度。

### 缓冲液和 pH 的选择

对于阴离子交换，建议使用 pH 8.0–9.0 的乙酸盐和  
磷酸盐缓冲液，pH 通常可以调节 +/- 0.2 个单位。  
某些特殊蛋白可能需要具有更高或更低 pH 的缓冲液。  
可以用磷酸、乙酸、HCl 和 NaOH 来调节 pH。

洗脱时也可以采用 pH 梯度。

### 添加剂

#### 有机溶剂

可使用最多 50% 的乙腈、乙醇、甲醇及其他类似溶剂。

#### 洗涤剂

可使用非离子型、阴离子型和两性离子型表面活性剂。  
不建议使用阳离子表面活性剂。

### 添加剂

#### 有机溶剂

可使用最多 50% 的乙腈、乙醇、甲醇及其他类似溶剂。

#### 洗涤剂

可使用非离子型、阳离子型和两性离子型表面活性剂。  
不建议使用阴离子表面活性剂。

### 温度

Agilent Bio MAb 和 IEX 色谱柱能够在高达 80 °C 下保持稳定。但是，许多蛋白质和生物大分子对热不稳定。  
在常规分离中使用高温之前，务必确定样品的温度稳定性。

## 利用安捷伦缓冲液顾问软件的电荷异构体分析方法

安捷伦缓冲液顾问软件是一种软件工具，有助于实现重现性和精密度更高的离子交换方法。例如，该软件可使用四元混合方法生成盐梯度和恒定 pH 或 pH 梯度和盐梯度以实施净化。这些方法可直接导入安捷伦液相色谱采集软件中。

### 推荐的初始条件

盐梯度 (参见应用简报: 5991-0656ZHCN)		pH 梯度 (参见应用简报: 5990-9629CHCN)	
色谱柱:	Bio WCX, 4.6 × 250 mm, 10 µm Bio WCX, 4.6 × 250 mm, 5 µm	色谱柱:	Bio MAb, 4.6 × 250 mm, 5 µm
流动相:	A: 水 B: 1.6 mol/L NaCl C. 40.0 mmol/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> D. 40.0 mmol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	流动相:	A: 水 B: 1.6 mol/L NaCl C. 40.0 mmol/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> D. 40.0 mmol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
梯度:	将预先确定的 C 和 D 组分混合，在所要求的 pH 范围内配制 20 mmol/L 缓冲溶液。 0–20 min B 由 0% 升至 50% (pH 恒定，例如 pH 6.0)， 20–25 min B 保持为 50%，25–35 min B 由 50% 降至 0%	梯度:	将预先确定的 C 和 D 组分混合，在所要求的 pH 范围内配制选定缓冲强度的缓冲溶液。 0–20 min, pH 6.0–8.0 20–25 min, 0–800 mmol/L NaCl 25–30 min, 800 mmol/L NaCl
柱温:	室温	柱温:	室温
进样量:	10 µL	进样量:	10 µL
检测:	UV, 220 nm	检测:	UV, 220 nm
仪器:	1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统	仪器:	1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统
样品:	卵清蛋白、核糖核酸酶 A、细胞色素 C、溶菌酶	样品:	IgG 单克隆抗体
样品浓度:	2 mg/mL (溶于 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 6.0)	样品浓度:	2 mg/mL (溶于 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 6.0)

注: 同样, 上述方法也可以应用于经过改进的 Agilent WAX 和 SCX 色谱柱。  
如需获取关键质量属性应用文集, 请访问: [www.agilent.com/chem/cqa-applications](http://www.agilent.com/chem/cqa-applications)

### 基于色谱柱内径和填料粒径选择流速

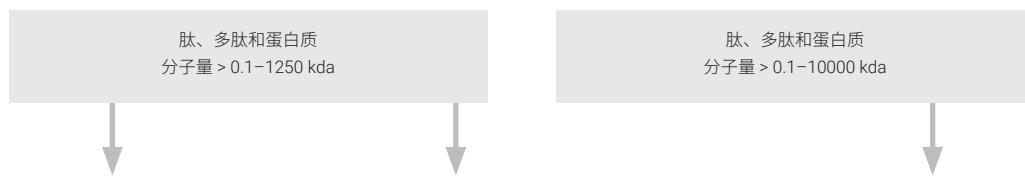
2.1 mm 内径色谱柱		4.6 mm 内径色谱柱	
填料粒径, µm	流速, mL/min	填料粒径, µm	流速, mL/min
1.7	0.1–0.3	1.7	0.1–0.3
3	0.1–0.5	3	0.1–0.5
5	0.1–0.8	5	0.1–0.8
10	0.1–1.0	10	0.1–1.0

注: 始终从低流速开始, 并默认采用建议的色谱柱操作限值。

## 聚集体与片段分析方法

本节涉及聚集体分析的色谱柱选择策略，提供了有关 mAb、蛋白质和肽的方法开发的一些关键细节。

### 针对生物分子、聚集体分析（肽、多肽和蛋白质）的基于体积的分离选择初始色谱柱和条件



**AdvanceBio SEC (2.7 μm)**

孔径	分子量范围, kDa
130 Å	0.1-120
300 Å	5-1250

**Bio SEC-3 (3 μm)**

孔径	分子量范围, kDa
100 Å	0.1-100
150 Å	0.5-150
300 Å	5-1250

**Bio SEC-5 (5 μm)**

填料粒径, μm	流速, mL/min
100 Å	0.1-100
150 Å	0.5-150
300 Å	5-1250
500 Å	15-5000
1000 Å	50-7500
2000 Å	> 10000

### 推荐的初始分离条件

色谱柱： AdvanceBio SEC Bio SEC (3 μm 和 5 μm)

流动相： 磷酸盐冲液 150 mmol/L, pH 7.0\*

梯度： 15–60 min 范围内等度洗脱

柱温： 推荐使用 10–30 °C, 最高温度 80 °C

流速： 对于 4.6 mm 内径色谱柱, 采用 0.1–0.4 mL/min

对于 7.8 mm 内径色谱柱, 采用 0.1–1.25 mL/min

对于 21.2 mm 内径色谱柱, 采用 1.0–10.0 mL/min

样品量： ≤ 总色谱柱体积的 5%

\* 可使用高盐含量和低盐含量的其他水相缓冲液

如需了解更多信息，请参见：

快速可靠地分离蛋白质聚集体和降解产物 (出版号 5991-2898CHCN)

[www.agilent.com/search](http://www.agilent.com/search)



得到初始色谱图后，可能需要进行某些改变以改善分离度、保持蛋白质溶解性，或降低样品与色谱填料之间的相互作用。可以上下调整流动相的离子强度，以便获得最佳分离。通常，pH 值也可以调节 +/- 0.2 个单位。如果还需要进一步优化，上下调整的范围则应相应扩大。还可以改变温度或添加有机溶剂。



## 对于需要加盐的方案，以下为常用缓冲液：

100–150 mmol/L 氯化钠（溶于 50 mmol/L 磷酸钠中），pH 7.0

100–150 mmol/L 硫酸钠（溶于 50 mmol/L 磷酸钠中），pH 7.0

50–100 mmol/L 尿素（溶于 50 mmol/L 磷酸钠中），pH 7.0

也可以用其他类似的盐（如 KCl）和盐酸胍。

## pH 范围：

2.0–8.5

## 可添加的有机溶剂包括：

5%–10% 乙醇或其他类似溶剂（溶于 50 mmol/L 磷酸钠中），pH 7.0

5% DMSO（溶于 50 mmol/L 磷酸钠中），pH 7.0

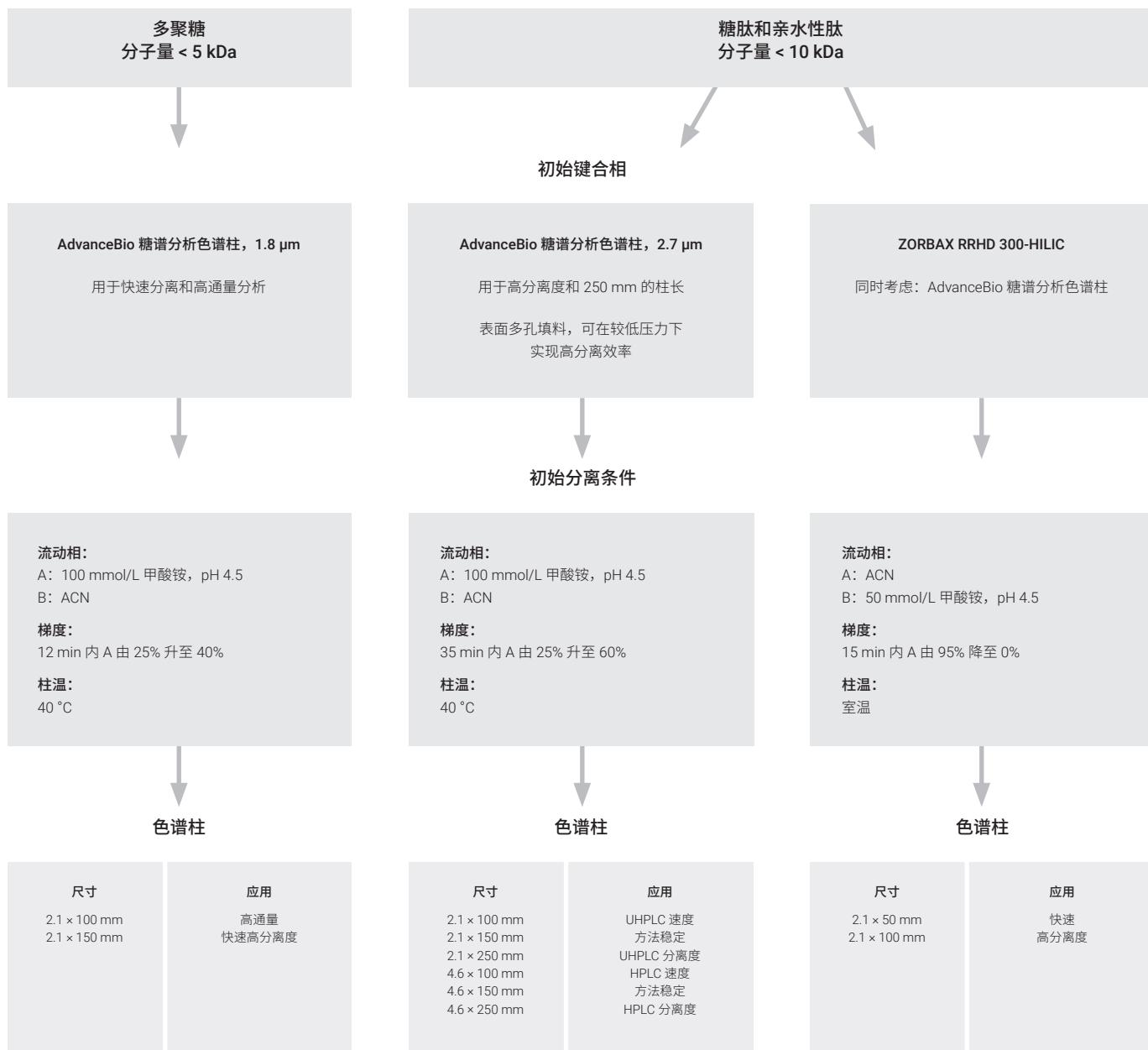
必须特别注意，以免由于某些水/有机溶剂混合物的高粘度而导致压力变化过大。使用较小的流速或更高的温度有助于缓解潜在的问题。

## 柱温：

SEC 分离通常在 20–30 °C 下进行。蛋白质和肽的分离需要较高温度，以改善蛋白质和疏水性肽的分离度和回收率。

Bio SEC 色谱柱的最高耐受温度是 80 °C。

## 多聚糖和亲水性/糖肽分析





## 滴度测定和细胞培养基优化方法

### Agilent Bio-Monolith Protein A 推荐条件

**色谱柱:** Bio-Monolith Protein A (部件号 5069-3639)

**流动相:** A: 50 mmol/L 磷酸盐, pH 7.4;  
B: 100 mmol/L 柠檬酸, pH 2.8, 或 500 mmol/L  
乙酸, pH 2.6

梯度:	时间 (min)	%A	%B	
	0–0.5	100	0	结合
	0.6–1.7	0	100	洗脱
	1.8–3.5	100	0	再平衡

**柱温:** 室温

**流速:** 1 mL/min

**进样量:** 可变 (50 µL, 针对包含 IgG1 的 CHO 细胞培养上清液进行优化)

**检测:** UV, 280 nm

**样品:** IgG1 (1–20 mg/mL) 和 CHO 细胞上清液包含 IgG1 (最多 20 mg/mL 总蛋白质)

**注:** 可以向流动相中加入其他盐, 例如氯化钠, 且最高添加浓度为 150 mmol/L。更高的盐浓度应通过实验测定。

## 技巧和工具

安捷伦意识到影响 mAb 和蛋白质分离质量的因素很多。为了使您获得最佳结果, 我们开发出一系列“操作指南”。如需了解更多信息, 请参见:

**最优化肽段表征的要点:** 肽谱分析指南 (出版号 5991-2348CHCN)

*Ion-exchange Chromatography for Biomolecule Analysis: A "How to" Guide* (生物分子分析离子交换色谱: 使用指南) (出版号 5991-3775EN)

**生物分子分析体积排阻色谱: 使用指南** (出版号 5991-3651CHCN)

有关上述内容的更多信息以及有助于表征的其他指南, 请访问: [www.agilent.com/chem/getbioguides](http://www.agilent.com/chem/getbioguides)

# 高灵敏度毛细管柱方法

## 反相方法的流动相注意事项

对于色谱柱洗脱液直接从色谱柱流向质谱检测器的 LC/MS 方法，流动相必须仅包含挥发性盐和添加剂。并且为获得最高的灵敏度，必须不存在离子抑制或加合物形成。

### 低 pH



TFA 通常不用于蛋白质和肽的 LC/MS 分离，因为它会抑制电离并提高检测限。第一步通常用 0.1%-1% 甲酸替代 TFA。最高浓度 1% 的乙酸也可以作为另一种流动相改性剂。在低 pH 下，在流动相中使用 TFA 仍可获得最佳分离，但是灵敏度有所降低。在某些情况下，可使用简单的在线脱盐/反离子交换，在柱后用另一种酸（例如，丙酸）置换 TFA。

### 中等 pH 和高 pH



高 pH 较少用于蛋白质表征，但是也可以在高 pH 条件下以 10–20 mmol/L NH<sub>4</sub>OH 作为流动相添加剂进行 LC/MS 分析。

# 用于蛋白质鉴定和杂质分析的安捷伦仪器

## 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统

### 真正的生物惰性实现高效生物分子分析

唯一能提供无金属样品流路的 UHPLC。其他优势还包括：

#### 100% 生物惰性

- 不含不锈钢：确保极高的样品完整性
- pH 1 至 pH 13（短时间可耐受 pH 14），实现最长的仪器正常运行时间
- 可在 2 mol/L 盐和 8 mol/L 尿素条件下操作
- 简便易用的毛细管技术

#### 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

#### 对蛋白质鉴定尤为适用

为获得最佳结果，请使用 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱、Bio MAb 色谱柱和 AdvanceBio SEC 色谱柱



1260 Infinity II 生物惰性  
液相色谱系统

## 配备高速泵的 1290 Infinity II 液相色谱系统

### 无与伦比的性能，让您对结果充满信心

在 LC/UV 和 LC/MS 中具有一流的单位时间分离度、扩散、灵敏度、准确度和精密度。结合了创新的主动阻尼、微流控混合和光流波导检测技术，可实现：

- 高达 1300 bar 和 5 mL/min 的 UHPLC 性能范围
- 最快速、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 HPLC 的使用维护成本，获得 UHPLC 的分析效率

### 适用于杂质分析、肽谱分析或超快速梯度

为获得最佳结果，请使用 ZORBAX RRHD 300 Å, 1.8 µm 色谱柱。



配备高速泵的 1290 Infinity II 液相色谱系统

## 使用安捷伦液相色谱备件实现最佳性能和效率

Agilent InfinityLab 备件能够与 InfinityLab 液相色谱系列仪器完美匹配，实现最高的性能、运行效率和实验室安全性。智能消耗品可跟踪使用情况，使您的分析具有更高的可信度。

请访问：[www.agilent.com/chem/infinitylab](http://www.agilent.com/chem/infinitylab) 或访问以下网址以了解 InfinityLab 液相色谱备件目录 [www.agilent.com/chem/catalog](http://www.agilent.com/chem/catalog)



## 配备二元泵的 1260 Infinity II 液相色谱系统

### 借助 600 bar 的耐压水平，提升分析型 HPLC 的标准

100% 兼容 HPLC，同时拥有 UHPLC 的功能

- 以 HPLC 的使用维护成本，获得 UHPLC 的性能
- 支持液相色谱和液质联用色谱系统应用，可使用任何窄径和标准内径分析柱（内径 2.1–4.6 mm）
- 高压混合获得卓越的梯度准确度

适用于所有标准 UHPLC 应用



配备二元泵的 1260 Infinity II 液相色谱系统

## 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统

### 在日常分析中获得最出色的可信度和准确度

最高的四元 UHPLC 性能便于方法转移和自动化缓冲液混合

- 高达 800 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 HPLC 的使用维护成本，获得 UHPLC 的分析效率

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



1260 Infinity II Prime  
液相色谱系统

## 技巧和工具

如需了解这些先进系统的详细信息，请访问：[www.agilent.com/chem/BioHPLC](http://www.agilent.com/chem/BioHPLC)

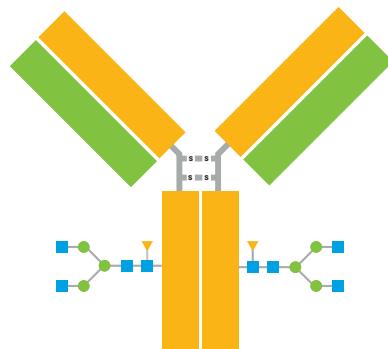
# 一级结构分析

准确测定氨基酸序列和翻译后修饰，并分析肽和寡核苷酸的杂质

为全面表征蛋白质（例如单克隆抗体），有必要了解一级氨基酸序列以及在制造的纯化或配制步骤中对该序列可能进行的任何翻译后修饰。在执行此类分析时，需要采用变性条件，因此反相液相色谱通常为首选技术。

安捷伦具有种类最为齐全的优化大孔径 300 Å、450 Å 及更大的反相 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。该系列产品包括耐压范围为 400–1200 bar 的 1.8、3.5 和 5 µm 多孔颗粒填料，在较低压力下进行 UHPLC 分离的三种不同的表面多孔颗粒，以及用于在多种条件下进行分析的聚合物色谱柱，包括用于 MS 分析的甲酸流动相。

对于肽或寡核苷酸的杂质分析，安捷伦提供具有高 pH 耐受性的硅胶色谱柱和聚合物色谱柱。聚合物色谱柱选件的另一项优势是可以从分析型分离扩展为制备型分离。





- **AdvanceBio RP-mAb 色谱柱**是唯一专为 mAb 表征而设计的反相色谱柱。450 Å 孔径 Poroshell 技术和正确的键合相选择性为完整 mAb 和 mAb 片段提供了快速、高分离度表征
- **PLRP-S 色谱柱**包括可以在最宽的 pH 范围内进行 HPLC 分离的大孔聚合物填料。PLRP-S 色谱柱具有 3 种宽径尺寸和 8 种填料粒径，可以为肽、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
- **ZORBAX RRHD 300 Å 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
- **ZORBAX 300 Å 3.5 和 5 µm 色谱柱**由全多孔材料制成，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
- **Poroshell 300 色谱柱**是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
- **AdvanceBio 肽谱分析色谱柱**快速分离并鉴定一级结构中的氨基酸修饰。AdvanceBio 肽谱分析色谱柱的 C18 功能和 2.7 µm 填料，为碱性疏水性肽提供了卓越的保留、分离度和峰形
- **AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱**采用高效 2.7 µm 表面多孔颗粒填料，能够对寡核苷酸及其杂质进行高分离度分析。使用专有技术对颗粒填料进行了化学修饰，使其对寡核苷酸分离所需的高 pH 流动相条件具有耐受性

# 一级结构分析

## 反相色谱柱选择

应用	安捷伦色谱柱	备注
单克隆抗体和 mAb 片段	AdvanceBio RP-mAb C4 SB-C8 联苯 PLRP-S 1000 Å	基于采用表面多孔颗粒填料的 Poroshell 技术，其能够减小扩散距离，并允许使用更高的流速和更陡的梯度，从而缩短运行时间，即使在 600 bar 系统上运行也是如此。 450 Å 孔径能够使大分子完全进入键合相，从而确保最佳的色谱分离。专为单克隆抗体分离设计的稳定键合相提供了多种选择性，能够对分离度进行优化。 大孔聚合物 PLRP-S 具有优异的 mAb 分离效果，对于用于 MS 检测的甲酸流动相尤其如此。
完整蛋白质、单克隆抗体、mAb 片段和多肽	ZORBAX 300 Å, 1.8 µm RRHD 300SB-C18 RRHD 300SB-C8 RRHD 300SB-C3 RRHD 300-Diphenyl ZORBAX 300 Å, 3.5 和 5 µm 300SB-C18 300SB-C8 300SB-C3 300SB-CN PLRP-S 100 Å 300 Å 1000 Å 4000 Å Poroshell 300 300SB-C18 300SB-C8 300SB-C3 300Extend-C18	优化的填充工艺使其耐压可高达 1200 bar，可与 1290 Infinity II 液相色谱系统一起使用。RRHD 1.8 µm 色谱柱有 50 和 100 mm 柱长可选，用于对最复杂样品进行快速或高分离度分离。 StableBond C18 尤为适用于复杂蛋白质和蛋白质酶解物的分离。 非常适合用于 HPLC 系统。 StableBond C3 和 CN 可用于较大的疏水性更强的化合物。 聚合物 PLRP-S 提供了与硅胶基色谱柱不同的选择性，并且在甲酸流动相中具有优异的峰形。 具有 300 Å 孔径的 5 µm Poroshell 颗粒填料能够实现完整蛋白质的快速 HPLC 分离。
蛋白质酶解物中的蛋白质	AdvanceBio 肽谱分析色谱柱	理想的 120 Å 孔径适用于鉴定各种分子量的肽。经过复杂的肽混合物测试，确保其性能。独特的 Agilent Poroshell 技术能够缩短运行时间，并更好地分离完整的肽序列。
合成肽杂质分析	PLRP-S 100 Å, 300 Å	可从分析型分离扩展至制备型分离。 优异的 pH 稳定性使极端 pH 的使用成为可能，包括用于消毒。
寡核苷酸分析	PLRP-S 100 Å, 300 Å, 1000 Å, 4000 Å PL-SAX 1000 Å, 4000 Å	多种孔径选择，具体取决于寡核苷酸长度。 高温稳定性。 可从分析型分离扩展至制备型分离。 如需了解有关 PL-SAX 的更多信息，请参见第 95 页。
	AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱	非常适合用于高分离度分析型分离。

AB

AB

AB

AB

AB

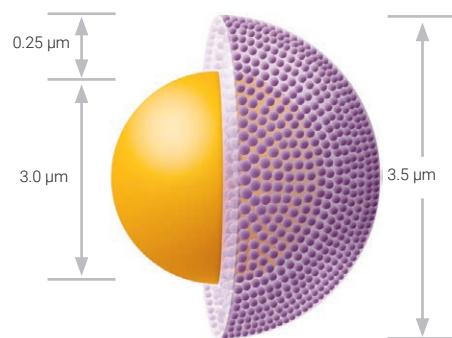
AB

AdvanceBio 系列产品的一部分

## AdvanceBio RP-mAb

- **准确度更高:** 大孔径 (450 Å) 的表面多孔颗粒填料 (3.5 μm) 兼容所有液相色谱仪，可提高 mAb 分离度
- **分析速度快:** 与填充全多孔颗粒填料的色谱柱相比，分析时间更短
- **方法开发灵活:** 提供各种化学键合相 — SB-C8、C4 和联苯基键合相
- **成本更低:** 稳定的 Poroshell 填充床和 2 μm 入口筛板可防止入口堵塞，从而延长柱使用寿命

### 专为应对单克隆抗体表征的特有挑战而开发的反相色谱柱



完整和还原态单克隆抗体的分析是表征治疗性蛋白以及了解其有效性与稳定性的重要测量手段。不良的色谱分离性能可能导致重复工作，甚至影响表征的准确性。

较长的分析时间可对实验室通量造成不良影响，并且导致基于表征结果的决策制定受到延误。为了解决这些问题，安捷伦开发出一种新型反相色谱柱来优化完整和还原态 mAb 分析的性能。AdvanceBio RP-mAb 色谱柱基于 Poroshell 技术，具有独特的孔径与键合相工艺设计。

## 技巧和工具

如需了解关于单克隆抗体一级结构表征的更多信息，请参见：

使用 Agilent AdvanceBio 反相色谱柱优化生物分子的鉴定（出版号 5991-2032CHCN）

[www.agilent.com/search](http://www.agilent.com/search)



## 一级结构分析



分析中通常需要降低单克隆抗体等生物大分子的分离速度以降低这些缓慢扩散分析物的潜在谱峰展宽。但是，AdvanceBio RP-mAb 色谱柱使用的 Poroshell 技术采用覆盖在 3.0 μm 硅胶实心核上的一层 0.25 μm 厚多孔硅胶薄层制成的表面多孔填料颗粒。这种形态缩短了扩散距离，支持使用更快的流速和更陡的梯度，即使在 600 bar 系统上运行也是如此。薄层色谱柱的 450 Å 较宽孔径能够使单克隆抗体大分子完全通过键合固定相，确保获得最佳的色谱性能。专为单克隆抗体分离设计的稳定键合相选择（C4、SB-C8 和独特的联苯键合相）提供了多种选择性，能够对分离度进行优化。

AdvanceBio RP-mAb 色谱柱可实现更高的分离度与更短的运行时间，从而为生物制药发现、开发和 QA/QC 应用提供快速、准确且可重现的单克隆抗体分析结果。

### 色谱柱性能指标

键合相	孔径	温度上限*	pH 范围	封端
AdvanceBio RP-mAb C4	450 Å	90 °C	1.0–8.0	是
AdvanceBio RP-mAb SB-C8	450 Å	90 °C	1.0–8.0	否
AdvanceBio RP-mAb 联苯柱	450 Å	90 °C	1.0–8.0	是

性能指标只代表典型值

\* 色谱柱最适合在低 pH 条件下使用。pH 为 6–8 时，所有硅胶基色谱柱在 < 40 °C 和低浓度缓冲液（范围 0.01–0.02 mol/L）条件下可获得最高的柱稳定性

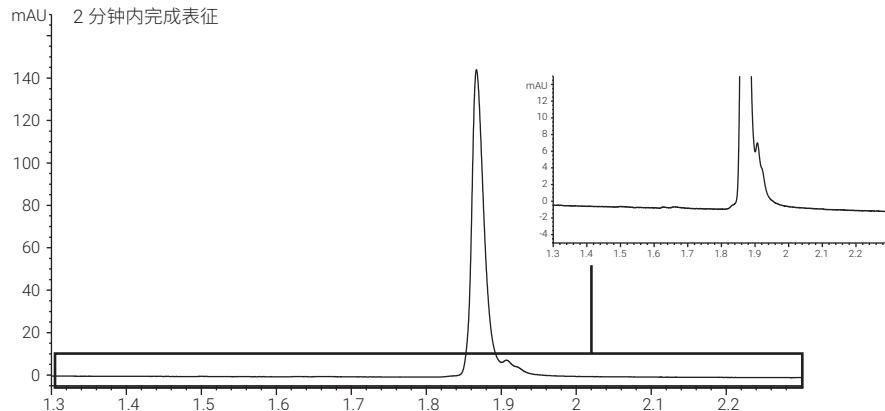


### 曲妥珠单抗 IgG1 变异体的快速高分离度分离

色谱柱： AdvanceBio RP-mAb C4  
795775-904  
**2.1 × 100 mm, 3.5 μm**

流动相：  
A: 含 0.1% TFA 的水:异丙醇 (98:2)  
B: IPA:ACN:流动相 A (70:20:10)  
流速： 1.0 mL/min  
梯度： 4 min 内 B 由 10% 升至 58%，以 95% B 淋洗 1 min，  
并以 10% B 再平衡 1 min

柱温： 80 °C  
检测器： UV, 254 nm  
样品： 5 μL 完整人源化重组曲妥珠单抗变异体 IgG1 (1 mg/mL)，  
购自 Creative Biolabs



AdvanceBio RP-mAb C4 色谱柱提供尖锐的峰形，可在 2 分钟内使分析物实现完美分离。

## 一级结构分析



### 完整人源化重组曲妥珠单抗 IgG1 的分离

色谱柱: AdvanceBio RP-mAb C4

795775-904

2.1 × 100 mm, 3.5 μm

流动相: A: 含 0.1% TFA 的水:IPA (98:2)

B: IPA:ACN:流动相 A (70:20:10)

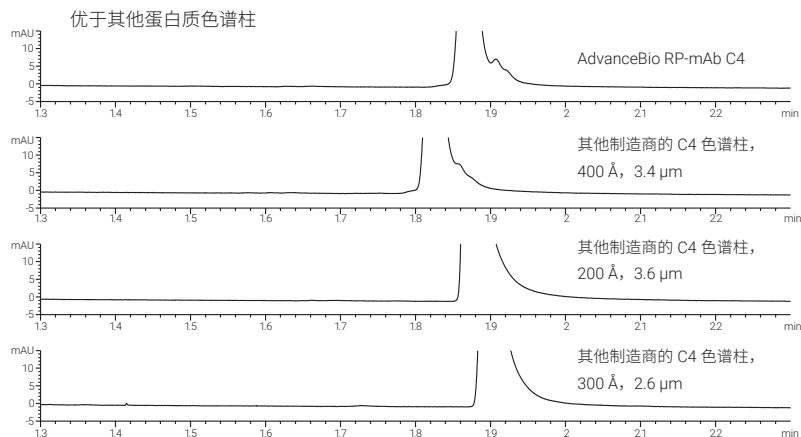
流速: 1.0 mL/min

梯度: 4 min 内 B 由 10% 升至 58%，以 95% B 淋洗 1 min，  
并以 10% B 再平衡 1 min

柱温: 80 °C

检测器: UV, 254 nm

样品: 5 μL 完整人源化重组曲妥珠单抗变异体 IgG1  
(1 mg/mL)，购自 Creative Biolabs



AdvanceBio RP-mAb 专为分离 mAb 而设计，在分离完整蛋白质时所获得的峰形和分离度均  
优于其他色谱柱。

### 选择性联苯固定相

色谱柱: AdvanceBio RP-mAb 联苯柱

795775-944

2.1 × 100 mm, 3.5 μm

流动相: A: 含 0.1% TFA 的水: IPA (98:2)

B: IPA:ACN:流动相 A (70:20:10)

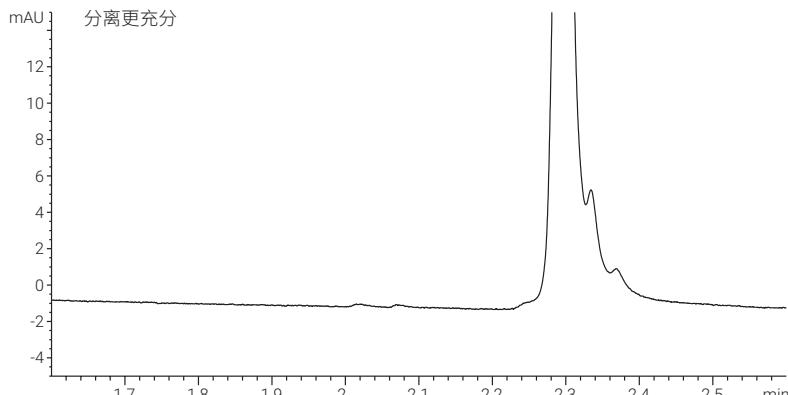
流速: 1.0 mL/min

梯度: 4 min 内 B 由 10% 升至 58%，以 95% B 淋洗 1 min，  
并以 10% B 再平衡 1 min

柱温: 80 °C

检测器: UV, 254 nm

样品: 5 μL 完整人源化重组曲妥珠单抗变异体 IgG1  
(1 mg/mL)，购自 Creative Biolabs



具有卓越选择性的 AdvanceBio RP-mAb 联苯柱可提供更为完整的分离。



## Poroshell 的优势

色谱柱: AdvanceBio RP-mAb SB-C8

**785775-906**

**2.1 × 100 mm, 3.5 μm**

流动相: A: 0.1% TFA 水溶液

B: 正丙醇:ACN:流动相 A (80:10:10)

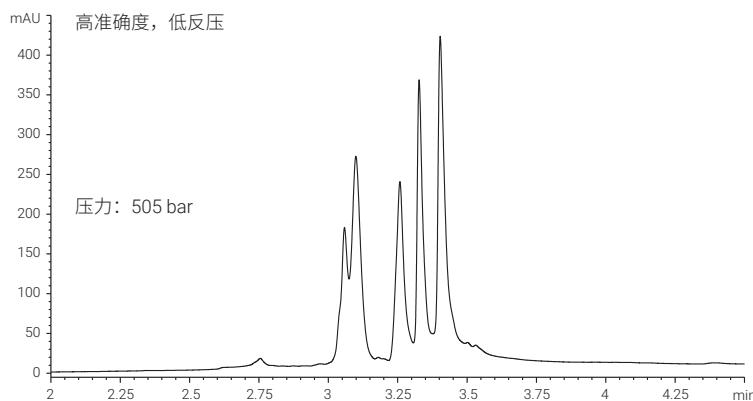
流速: 0.8 mL/min

梯度: 5 min 内 B 由 5% 升至 40%, 以 95% B 淋洗 1 min,  
并以 10% B 再平衡 1 min

柱温: 60 °C

检测器: UV, 220 nm

样品: 1 μL 的 Fc/Fab, 由木瓜蛋白酶水解 Creative Biolabs 的  
人源性重组曲妥珠单抗变体 IgG1 (2 mg/mL) 得到



采用大孔径 Poroshell 技术的 AdvanceBio RP-mAb 色谱柱不仅柱效高、分析时间短、  
压力低，而且温度也低于多数反向方法的一般温度 (80 °C)。

## AdvanceBio RP-mAb

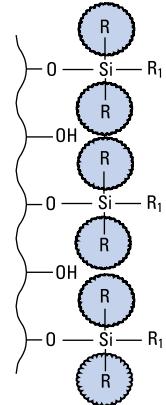
规格 (mm)	填料粒径 (μm)	AdvanceBio RP-mAb C4 USP L26	AdvanceBio RP-mAb SB-C8 USP L7	AdvanceBio RP-mAb Diphenyl USP L11
4.6 × 150	3.5	793975-904	783975-906	793975-944
4.6 × 100	3.5	795975-904	785975-906	795975-944
4.6 × 50	3.5	793975-904	783975-906	793975-944
2.1 × 150	3.5	793975-904	783975-906	793975-944
2.1 × 100	3.5	795975-904	785975-906	795975-944
2.1 × 75	3.5	793975-904	783975-906	793975-944
2.1 × 50	3.5	793975-904	783975-906	793975-944

## 一级结构分析



### ZORBAX 300 Å StableBond

Agilent ZORBAX 300 Å StableBond 色谱柱是实现蛋白质和肽的可重现性分离的理想选择，有以下两个原因。对于有效分离蛋白质和肽或其他大分子而言，要使这些分析物完全进入键合固定相，第一种大孔径 300 Å 色谱柱是必需的。第二，300StableBond 色谱柱在低 pH 条件下具有无可比拟的耐受性，如采用通常用于分离蛋白质和肽的含有 TFA 的流动相时。在低 pH 下进行 LC/MS 分离时，300StableBond 色谱柱还可以使用甲酸和乙酸作为流动相改性剂。这些色谱柱有五种不同键合相可供选择（C18、C8、C3、氰基和联苯（DP）），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善难分离蛋白质的分离效率，300StableBond 色谱柱可以在高达 80 °C 的温度下使用。StableBond 300SB-C18 和 300SB-C8 色谱柱是分离复杂蛋白质及蛋白质酶解物的理想选择。这些色谱柱有毛细管（内径 0.3 和 0.5 mm）和纳流柱（内径 0.075 和 0.10 mm）规格，用于蛋白裂解产物的反相 LC/MS 分离。毛细管和纳流色谱柱可用于一维或二维蛋白质组学分离。



立体保护 300StableBond 键合相

#### UHPLC 色谱柱性能指标

键合相	孔径	温度上限*	pH 范围	封端
ZORBAX RRHD 300SB-C18	300 Å	90 °C	1.0–8.0	否
ZORBAX RRHD 300SB-C8	300 Å	80 °C	1.0–8.0	否
ZORBAX RRHD 300SB-C3	300 Å	80 °C	1.0–8.0	否
ZORBAX RRHD 300-Diphenyl	300 Å	80 °C	1.0–8.0	是
ZORBAX 300SB-C18	300 Å	80 °C	1.0–8.0	否
ZORBAX 300SB-C8	300 Å	80 °C	1.0–8.0	否
ZORBAX 300SB-C3	300 Å	80 °C	1.0–8.0	否
ZORBAX 300SB-CN	300 Å	80 °C	1.0–8.0	否

性能指标只代表典型值

\* 300StableBond 色谱柱最适合在低 pH 条件下使用。所有硅胶基色谱柱在 pH 6–8 条件下，采用小于 40 °C 的柱温和较低的缓冲液浓度 (0.01–0.02 mol/L) 操作，可获得最高的色谱柱稳定性。在中等或高 pH 条件下，建议使用 300Extend-C18 色谱柱

## 完整单克隆抗体的更高分离度

色谱柱： ZORBAX RRHD 300SB-C8

857750-906

2.1 × 50 mm, 1.8 μm

流动相： A: H<sub>2</sub>O:IPA (98:2) + 0.1% TFA (v/v)

B: IPA:ACN:H<sub>2</sub>O (70:20:10) + 0.1% TFA (v/v)

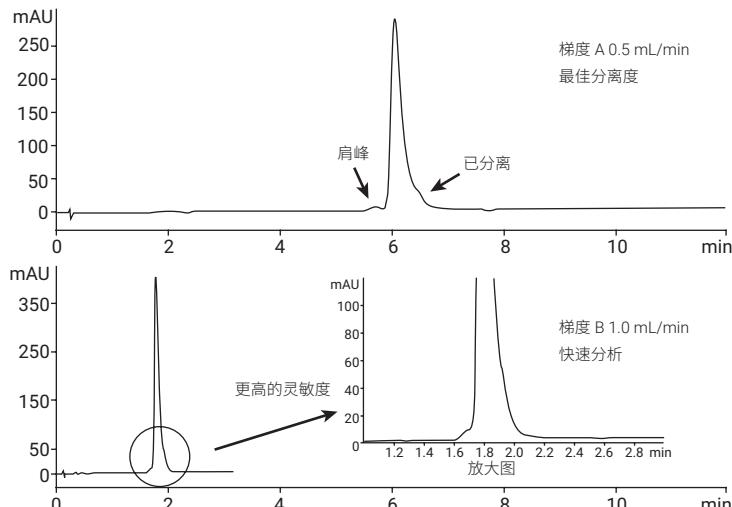
流速： 在 0.5 mL/min 和 1.0 mL/min 之间

梯度： 多段线性洗脱

柱温： 80 °C

检测器： 1290 Infinity 液相色谱系统，配备自动进样器、二元泵和柱温箱以及二极管阵列检测器 (DAD)

样品： UV, 225 nm



## 技巧和工具

有关使用 AdvanceBio 反相色谱柱更好地表征生物分子的更多信息，请参见有关此主题的白皮书（出版物 5991-2032CHCN）。

[www.agilent.com/search](http://www.agilent.com/search)



## 一级结构分析

### 还原和烷基化 mAb — 轻链和重链变体的分离

色谱柱： ZORBAX RRHD 300SB-C8  
858750-906  
2.1 × 150 mm, 1.8 μm

流动相： A: H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA (v/v)

B: 正丙醇:ACN:H<sub>2</sub>O (80:10:10) + 0.1% TFA (v/v)

流速： 0.5 mL/min

进样量： 3 μL (来自 2.5 mg/mL 样品)

% 溶剂 B      时间 (min)

20            0

35            3

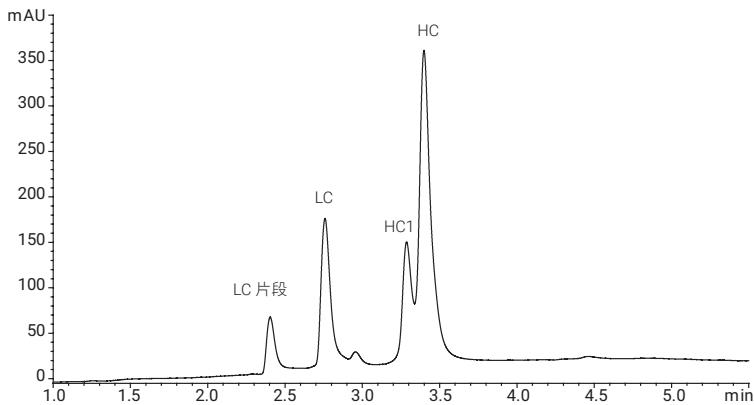
40            4

40            5

90            5.1

90            5.5

25            6



为了连续进行色谱分析，增加了 2 min 后运行程序对色谱柱进行再平衡。

梯度： 多段

柱温： 75 °C

检测器： UV, 225 nm

仪器： 1290 Infinity 液相色谱系统，配备自动进样器、二元泵、柱温箱和二极管阵列检测器 (DAD)

## 技巧和工具

通常添加 TFA (或其他酸) 使流动相 (常用于蛋白质和肽分离) 形成极低 pH 值以溶解蛋白质。StableBond 色谱柱在这些条件下具有极长的色谱柱寿命。可提供 300 Å 孔径柱，适用于高达 100-500 kDa 的蛋白质分离。



## 更高的单克隆抗体分析重现性

色谱柱： ZORBAX RRHD 300SB-C8

857750-906

2.1 × 50 mm, 1.8 μm

流动相： A: H<sub>2</sub>O:IPA (98:2) + 0.1% TFA (v/v)

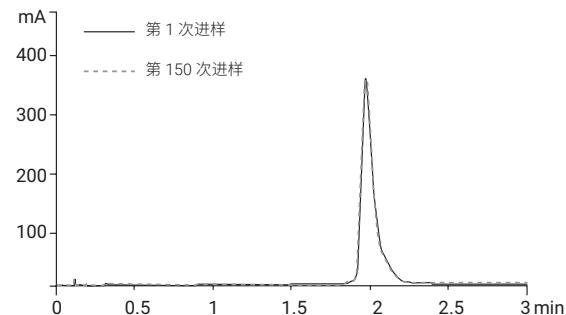
B: IPA:ACN:H<sub>2</sub>O (70:20:10) + 0.1% TFA

流速： 1.0 mL/min

柱温： 80 °C

检测器： 1290 Infinity 液相色谱系统，配备二极管阵列检测器，  
检测波长 225 nm

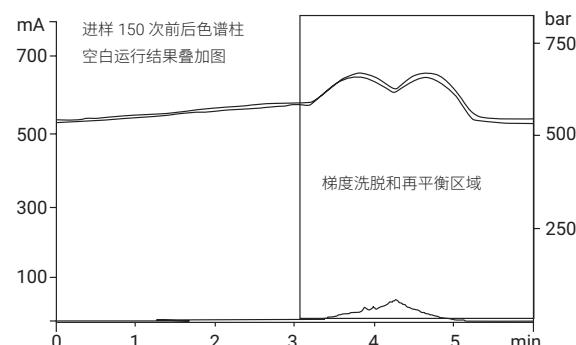
样品： mAb



## 梯度

填料粒径, μm	流速, mL/min
0.00	25
3.00	35
4.00	90
5.00	25

ZORBAX 300SB-C8 色谱柱的优异重现性和  
蛋白质回收率。



# 一级结构分析



## 为 mAb 表征提供独特的选择性

色谱柱： ZORBAX RRHD 300SB-C18  
858750-902  
2.1 × 100 mm, 1.8 μm

ZORBAX RRHD 300SB-C3  
858750-909  
2.1 × 100 mm, 1.8 μm

ZORBAX RRHD 300SB-C8  
858750-906  
2.1 × 100 mm, 1.8 μm

ZORBAX RRHD 300-Diphenyl  
858750-944  
2.1 × 100 mm, 1.8 μm

流动相： A: H<sub>2</sub>O (0.1% TFA) (v/v)  
B: 80% 正丙醇:10% ACN:10% H<sub>2</sub>O (0.08% TFA) (v/v)

进样量： 3 μL (来自 2.5 mg/mL 样品)

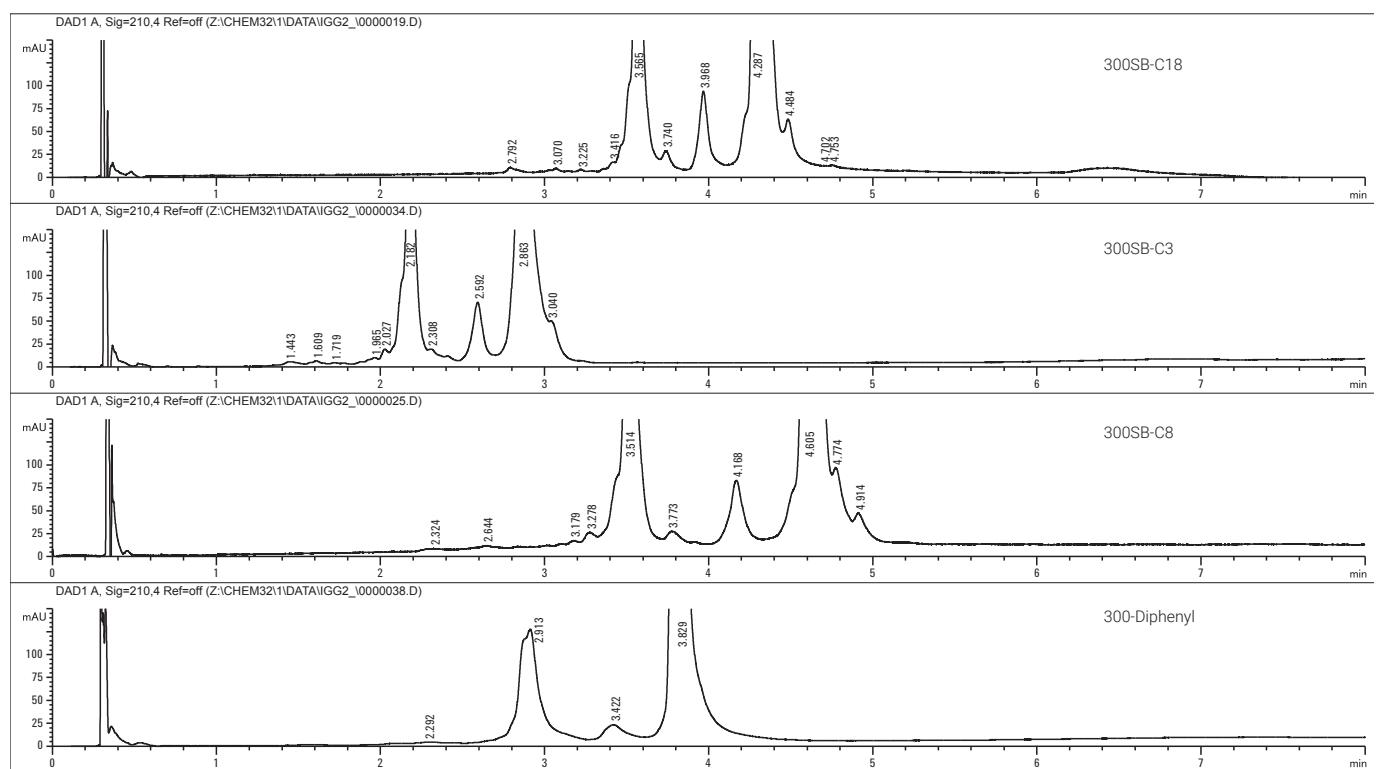
流速： 1.0 mL/min (3.5 μm\*), 1.0 mL/min (1.8 μm)

梯度： 25%–35% B, 90% 清洗

柱温： 80 °C

检测器： UV, 215 nm

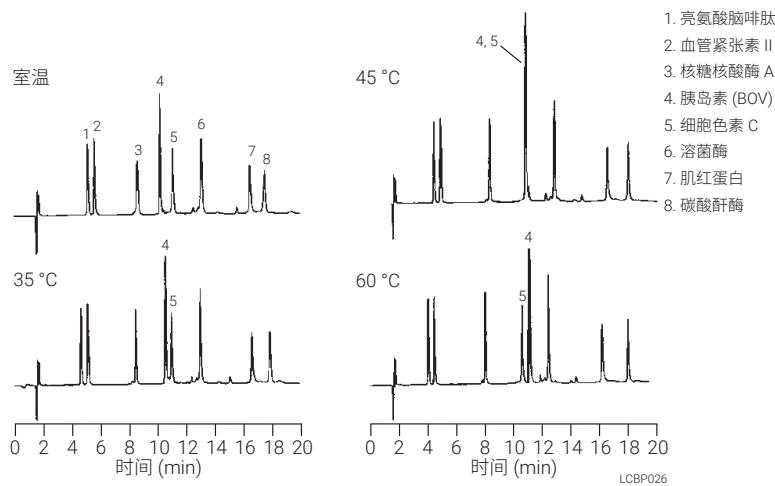
\* 在低流速下峰展宽



### 肽/蛋白质：升高温度的影响

色谱柱: ZORBAX RRHD 300SB-C3  
883995-909  
4.6 × 150 mm, 5 μm

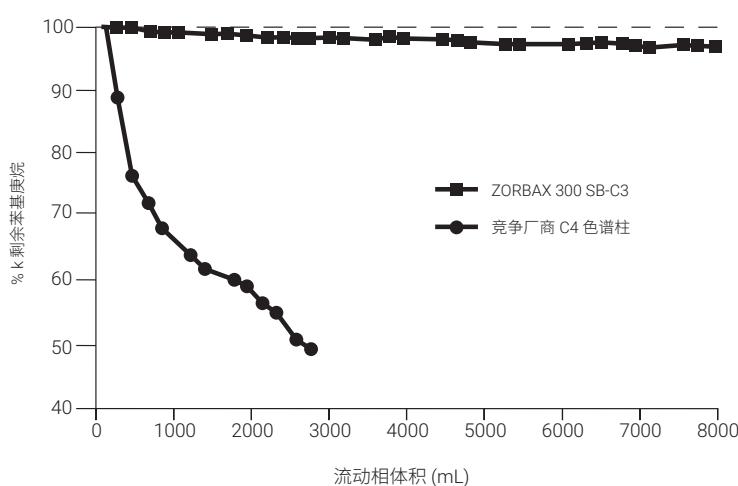
流动相: A: 5:95 ACN:水, 含 0.10% TFA (v/v%)  
B: 95:5 ACN:水, 含 0.085% TFA (v/v%)  
流速: 1.0 mL/min  
梯度: 20 min 内由 15% 升至 53%, 后运行时间 12 min  
柱温: 环境温度-60 °C  
检测器: UV, 215 nm  
样品: 多肽



### 短链 ZORBAX 300SB-C3 填料在低 pH 和高温下稳定

色谱柱: ZORBAX 300SB-C3  
883995-909  
4.6 × 150 mm, 5 μm

流动相: 梯度 80 min 内 B 由 0% 升至 100%  
A: 0.5% TFA 水溶液  
B: 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



## 一级结构分析



### 四种不同的 300SB 键合固定相优化了大分子多肽的分离

色谱柱 A: ZORBAX RRHD 300SB-C18

883995-902

4.6 × 150 mm, 5 μm

色谱柱 B: ZORBAX 300SB-C8

883995-906

4.6 × 150 mm, 5 μm

色谱柱 C: ZORBAX 300SB-C3

858750-909

4.6 × 150 mm, 5 μm

色谱柱 D: ZORBAX 300SB-CN

858750-905

4.6 × 150 mm, 5 μm

流动相: 线性梯度, 40 min 内 B 由 25% 升至 70%

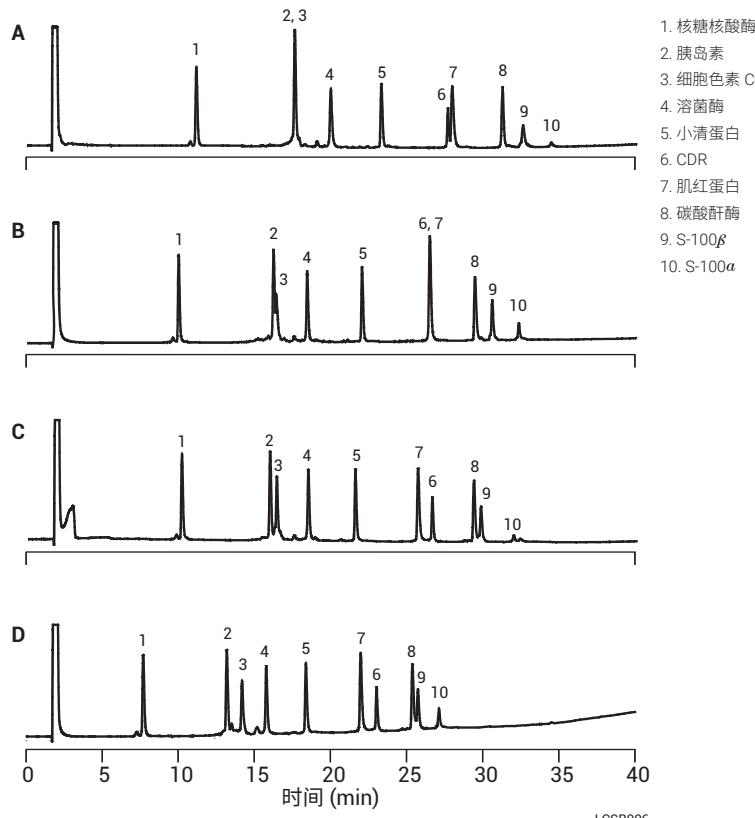
A: 0.1% TFA 水溶液

B: 含 0.09% TFA 的 80% 乙腈:20% 水

流速: 1.0 mL/min

柱温: 60 °C

样品: 各 3 μg 蛋白质



LCSB006  
300SB-C18、C8、C3 和 CN 键合相为该组多肽提供不同的分离。这为快速优化蛋白质分离增加了一个重要参数。300SB-CN 色谱柱对亲水性更高的多肽具有独特的选择性。

**ZORBAX 300 Å StableBond**

说明	规格 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7	300SB-CN USP L10	300SB-C3 USP L56	300-Diphenyl USP L11
<b>标准色谱柱 (无需特殊硬件)</b>							
半制备型	9.4 × 250	5	880995-202	880995-206	880995-205	880995-209	
分析型	4.6 × 250	5	880995-902	880995-906	880995-905	880995-909	
分析型	4.6 × 150	5	883995-902	883995-906	883995-905	883995-909	
分析型	4.6 × 50	5	860950-902	860950-906	860950-905	860950-909	
快速分离	4.6 × 150	3.5	863973-902	863973-906	863973-905	863973-909	
快速分离	4.6 × 100	3.5	861973-902	861973-906			
快速分离	4.6 × 50	3.5	865973-902	865973-906	865973-905	865973-909	
Solvent Saver Plus	3.0 × 150	3.5	863974-302	863974-306		863974-309	
Solvent Saver Plus	3.0 × 100	3.5		861973-306			
窄径	2.1 × 250	5	881750-902				
窄径	2.1 × 150	5	883750-902	883750-906	883750-905	883750-909	
窄径 RR	2.1 × 150	3.5		863750-906			
窄径 RR	2.1 × 100	3.5	861775-902	861775-906			
窄径 RR	2.1 × 50	3.5	865750-902	865750-906			
窄径 RRHD	2.1 × 100	1.8	858750-902	858750-906		858750-909	858750-944
窄径 RRHD	2.1 × 50	1.8	857750-902	857750-906		857750-909	857750-944
微径柱	1.0 × 250	5	861630-902				
微径 RR	1.0 × 150	3.5	863630-902	863630-906			
微径 RR	1.0 × 50	3.5	865630-902	865630-906			
微径保护柱, 3/包	1.0 × 17	5	5185-5920	5185-5920			
保护柱柱芯, 2/包	9.4 × 15	7	820675-124	820675-124	820675-124	820675-124	
保护柱柱芯, 4/包	4.6 × 12.5	5	820950-921	820950-918	820950-923	820950-924	

(续)

AB

AB

AdvanceBio 系列产品的一部分

**技巧和工具**为了最有效地利用安捷伦仪器, 请访问: [www.agilent.com/chem/getbioguides](http://www.agilent.com/chem/getbioguides)

## 一级结构分析

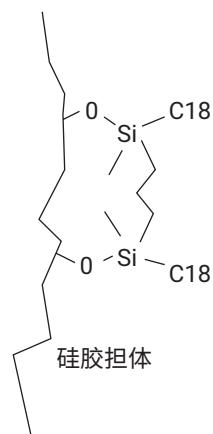
### ZORBAX 300 Å StableBond

说明	规格 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7	300SB-CN USP L10	300SB-C3 USP L56	300-Diphenyl USP L11
保护柱柱芯, 4/包	2.1 × 12.5	5	821125-918	821125-918	821125-924	821125-924	
保护柱硬件工具包			840140-901	840140-901	840140-901	840140-901	
保护柱硬件工具包			820999-901	820999-901	820999-901	820999-901	
<b>PrepHT 卡套柱 (需要柱端接头套件 820400-901)</b>							
PrepHT 卡套柱	21.2 × 250	7		897250-102	897250-106	897250-105	897250-109
PrepHT 卡套柱	21.2 × 150	7		897150-102	897150-106		897150-109
PrepHT 卡套柱	21.2 × 150	5		895150-902	895150-906		895150-909
PrepHT 卡套柱	21.2 × 100	5		895100-902	895100-906		895100-909
PrepHT 卡套柱	21.2 × 50	5		895050-902	895050-906		895050-909
PrepHT 柱端接头, 2/包				820400-901	820400-901	820400-901	820400-901
PrepHT 保护柱	17.0 × 7.5	5		820212-921	820212-918	820212-924	820212-924
保护柱柱芯硬件				820444-901	820444-901	820444-901	820444-901
<b>玻璃内衬毛细管柱</b>							
毛细管	0.5 × 250	5	5064-8266				
毛细管	0.5 × 150	5	5064-8264				
毛细管	0.5 × 35	5	5064-8294				
毛细管 RR	0.5 × 150	3.5	5064-8268				
毛细管 RR	0.5 × 35	3.5	5065-4459				
毛细管	0.3 × 250	5	5064-8265				
毛细管	0.3 × 150	5	5064-8263				
毛细管	0.3 × 35	5	5064-8295				
毛细管 RR	0.3 × 150	3.5	5064-8267	5065-4460			
毛细管 RR	0.3 × 100	3.5	5064-8259	5065-4461			
毛细管 RR	0.3 × 35	3.5	5064-8270	5065-4462			
毛细管 RR	0.3 × 50	3.5	5064-8300	5065-4463			
<b>纳流柱 (PEEK 熔融石英)</b>							
Nano RR	0.1 × 150	3.5	5065-9910				
Nano RR	0.075 × 150	3.5	5065-9911				
Nano RR	0.075 × 50	3.5	5065-9924	5065-9923			
捕集阱/保护柱, 5/包	0.3 × 5	5	5065-9913	5065-9914			
捕集阱/保护柱硬件工具包			5065-9915	5065-9915			

## ZORBAX 300 Å Extend-C18

- 在 pH 2-11.5 条件下，多肽和肽在高和低 pH 下实现稳定的分离
- 在高和低 pH 条件下具有不同的选择性
- 在高 pH 下对疏水性肽的分离效果好、回收率高
- 非常适合使用氢氧化铵流动相的 LC/MS

ZORBAX 300 Å Extend-C18 是一种大孔径 HPLC 色谱柱，可以在 pH 2-11.5 范围内高效分离肽。独特的双齿键合相在高和低 pH 值下均具有优异的使用寿命和重现性。在高 pH 条件下，由于分子电荷的变化，导致肽和多肽的保留和选择性发生显著变化。在室温和高 pH 条件下分离疏水性强的多肽，可以实现优异的回收率。在使用简单的含氢氧化铵的流动相的高 pH 条件下，还可以提高 LC/MS 对肽和多肽分析的灵敏度。



用于 Extend-C18 键合相的新型双齿  
C18-C18 键合

### UHPLC 色谱柱性能指标

键合相	孔径	温度上限*	pH 范围	封端
ZORBAX 300 Å Extend-C18 60 °C	300 Å	60 °C	2.0-11.5	双封端

性能指标只代表典型值

\* 温度上限在 pH 8 以下时为 60 °C，在 pH 8-11.5 时为 40 °C

### 技巧和工具

选择合适的色谱柱仅仅是总体解决方案中的一部分。不要忘记那些重要备件，例如各种液相色谱光源。请访问：访问 [www.agilent.com/chem/lamps](http://www.agilent.com/chem/lamps) 以了解更多信息。



# 一级结构分析

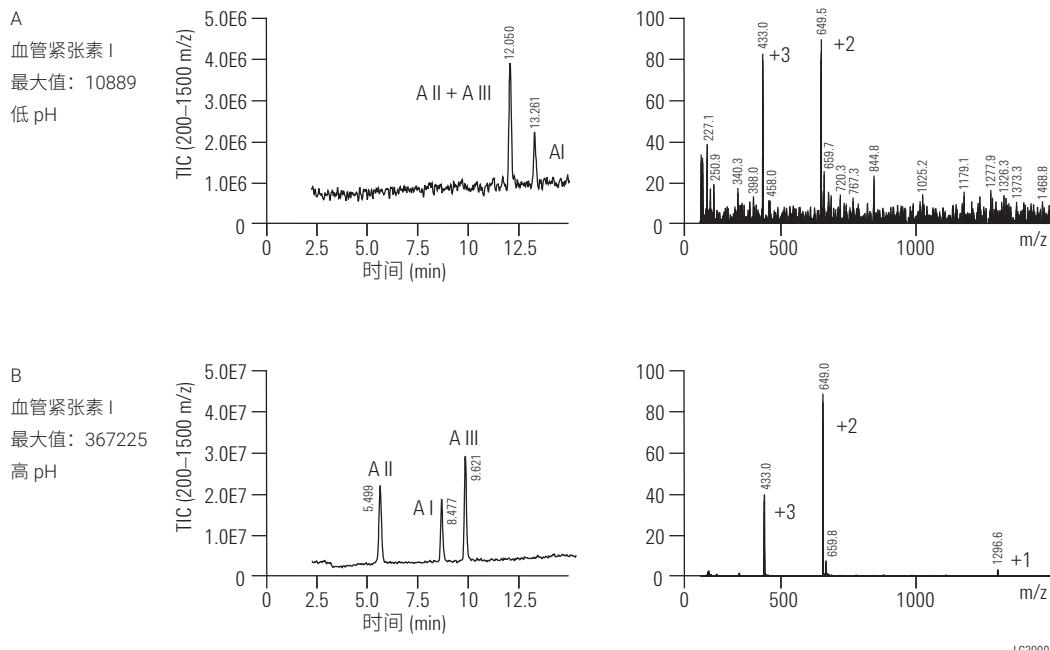


## 血管紧张素的 LC/MS 分析

色谱柱： ZORBAX Extend-C18  
773700-902  
2.1 × 150 mm, 5 μm

流动相： 酸性条件：  
A: 0.1% TFA 水溶液  
B: 0.085% TFA 的 80% 乙腈 (ACN) 溶液  
碱性条件：  
A: 10 mmol/L NH<sub>4</sub>OH 水溶液  
B: 10 mmol/L NH<sub>4</sub>OH 的 80% ACN 溶液  
梯度： 15 min 内 B 由 15% 升至 50%  
柱温： 35 °C  
质谱条件： 正离子 ESI; V<sub>f</sub> 70 V, V<sub>cap</sub> 4.5 kV, N<sub>2</sub>, 35 psi, 12 L/min,  
325 °C  
样品： 血管紧张素 I, II, III, 2.5 μL 样品 (各 50 pmol)

流速： 0.2 mL/min



小分子和大分子肽在高和低 pH 下均表现出选择性变化。在高 pH 下，由于电荷的变化，所有三种血管紧张素均可得到分离。此外，在高 pH 下使用氢氧化铵流动相可以显著提高血管紧张素 I 的谱图清晰度。Extend-C18 色谱柱也可用于在高 pH 下分析小分子肽。

参考文献：B.E.Boyse. Separation and Analysis of Peptides at High pH Using RP-HPLC/ESI-MS, 4th WCBP, San Francisco, CA, Jan. 2000.



## 在高 pH 下具有长寿命

色谱柱: ZORBAX Extend-C18

773450-902

4.6 × 150 mm, 5 μm

流动相: 20% 20 mmol/L NH<sub>4</sub>OH, pH 10.5

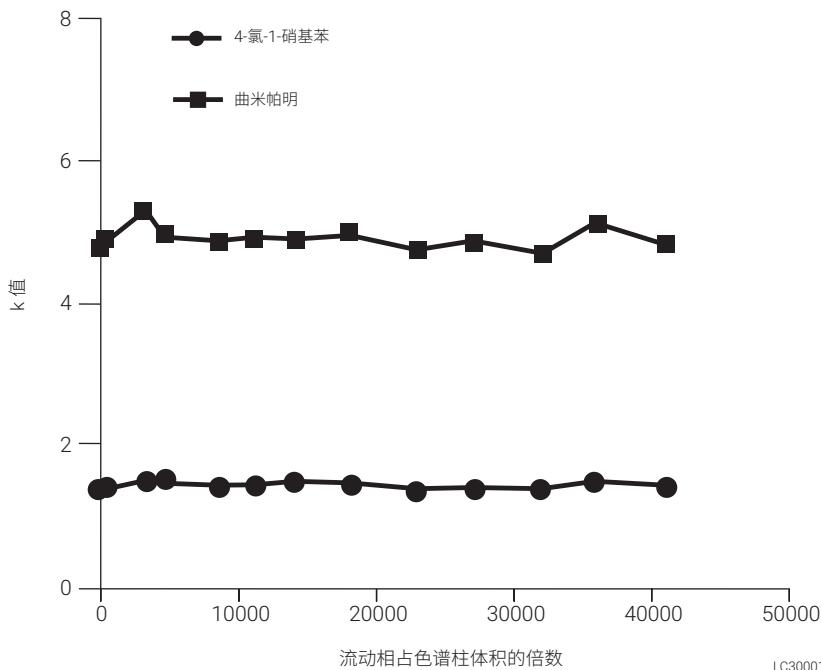
80% 甲醇

流速: 1.5 mL/min

柱温: 老化 24 °C

测试 40 °C

每 10000 倍色谱柱体积大约需要一个工作月。



LC30001

## 利用 ZORBAX Extend-C18 在高 pH 条件下更改选择性

色谱柱: ZORBAX Extend-C18

773700-902

2.1 × 150 mm, 5 μm

流动相: A: 0.1% TFA 水溶液

B: 0.085% TFA 的 80% ACN 溶液

A: 20 mmol/L NH<sub>4</sub>OH 水溶液

B: 20 mmol/L NH<sub>4</sub>OH 的 80% ACN 溶液

流速: 0.25 mL/min

梯度: 20 min 内 B 由 5% 升至 60%

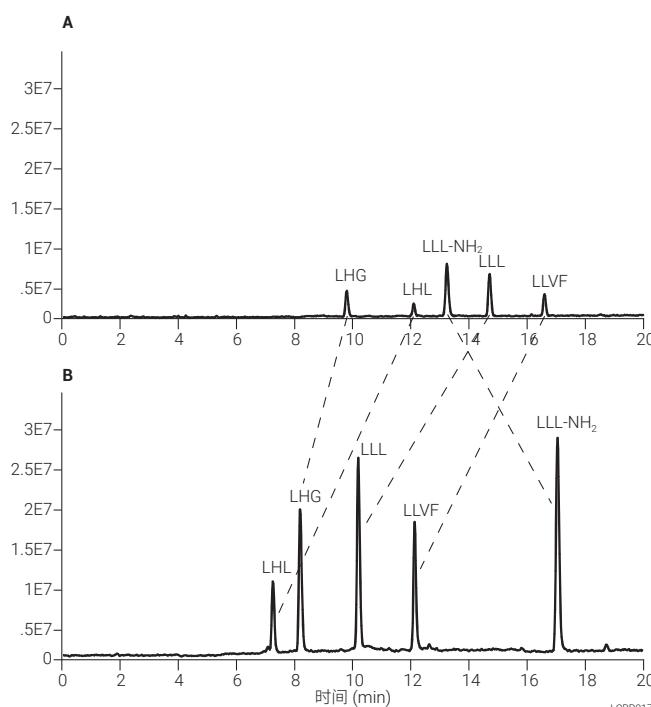
柱温: 25 °C

质谱条件: 正离子 ESI; Vf 70 V, Vcap 4.5 kV,

N<sub>2</sub>, 35 psi, 12 L/min, 300 °C

4 μL (肽各 50 ng)

Extend 色谱柱可用于高 pH 条件下肽的分离。在高 pH 和低 pH 条件下, 选择性差异很大。仅改变 pH, 即可作为方法开发的补充, 可以判断所有峰是否都得到了分离。Extend 色谱柱可以在高 pH 和低 pH 条件下使用, 因此, 使用一根色谱柱即可进行互补分离研究。该样品在高 pH 下同样可获得更出色的质谱灵敏度。



LCBP017

## 一级结构分析

### ZORBAX 300 Å Extend-C18

说明	规格 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	部件号
分析型	4.6 × 250	5	770995-902
分析型	4.6 × 150	5	773995-902
快速分离	4.6 × 150	3.5	763973-902
快速分离	4.6 × 100	3.5	761973-902
快速分离	4.6 × 50	3.5	765973-902
窄径 RR	2.1 × 150	3.5	763750-902
窄径 RR	2.1 × 100	3.5	761775-902
窄径 RR	2.1 × 50	3.5	765750-902
保护柱柱芯, 4/包	4.6 × 12.5	5	820950-932
保护柱柱芯, 4/包	2.1 × 12.5	5	821125-932
保护柱硬件工具包			820999-901
<b>玻璃内衬毛细管柱</b>			
毛细管 RR	0.3 × 150	3.5	5065-4464
毛细管 RR	0.3 × 100	3.5	5065-4465
毛细管 RR	0.3 × 75	3.5	5065-4466
毛细管 RR	0.3 × 50	3.5	5065-4467

## 技巧和工具

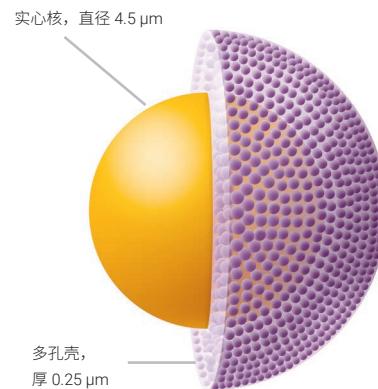
保护柱和过滤器有助于保护色谱柱和仪器不受颗粒的影响，后者可能造成堵塞，使系统压力增高并影响系统性能 — 中断您的日常工作流程。安捷伦用于 UHPLC 和生物液相色谱柱的新型快速保护柱有助于保护色谱柱，从而延长色谱柱寿命，最大程度减少工作流程的中断。如需了解更多信息，请访问：[www.agilent.com/chem/fastguards](http://www.agilent.com/chem/fastguards)

## Poroshell 300 AB

- 通过表面多孔颗粒填料快速分离生物分子
- 300 Å 孔径柱为蛋白质（分子量高达 1000 kDa）分析提供了高柱效和回收率
- 使用 Poroshell 300SB 和 300Extend-C18 分别在低 pH 和高 pH 条件下获得更长的使用寿命
- 通过四种不同的键合相（300SB-C18、300SB-C8、300SB-C3 和 300Extend-C18）优化回收率和选择性

Poroshell 300 色谱柱是快速分离蛋白质和肽的理想色谱柱，其 5 μm 直径的表面多孔颗粒填料允许采用较快的流速，同时保持尖锐且高效的峰。Poroshell 色谱柱采用 StableBond 键合相，在使用三氟乙酸和甲酸流动相时具有出色的稳定性和选择性。Poroshell 300Extend-C18 色谱柱可在 pH 2–11 条件下使用，实现独特的分离。这类色谱柱还可用于分析型蛋白质分离和液质联用分离。

肽和蛋白质的分离一般较慢，以降低这些慢扩散分析物的潜在峰展宽。然而，Poroshell 色谱柱采用覆盖在硅胶实心核上的一层 0.25 μm 厚多孔硅胶薄层制成的表面多孔填料颗粒，从而减小了蛋白质的扩散距离，实现了使用 400/600 bar HPLC 系统（包括 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统）对分子量高达 500–1000 kDa 的肽和蛋白质进行的快速 HPLC 分离。



### UHPLC 色谱柱性能指标

键合相	孔径	温度上限*	pH 范围	封端
Poroshell 300SB-C18, C8, C3	300 Å	90 °C	1.0–8.0	否
Poroshell 300Extend-C18	300 Å	pH 8 以上 40 °C pH 8 以上 60 °C	2.0–11.0	是

性能指标只代表典型值

\* 300StableBond 色谱柱最适合在低 pH 条件下使用。所有硅胶基色谱柱在 pH 6–8 条件下，采用小于 40 °C 的柱温和较低的缓冲液浓度 (0.01–0.02 mol/L) 操作，可获得最高的柱稳定性。在中等或高 pH 条件下，建议使用 300Extend-C18 色谱柱



Poroshell 300 色谱柱

AB

AdvanceBio 系列产品的一部分

## 一级结构分析



### Poroshell 300 色谱柱分离蛋白质和肽仅需几秒钟

色谱柱： Poroshell 300SB-C18  
660750-902  
2.1 × 75 mm, 5 μm

流动相： A: 0.1% TFA 水溶液

B: 0.07% TFA 的 ACN 溶液

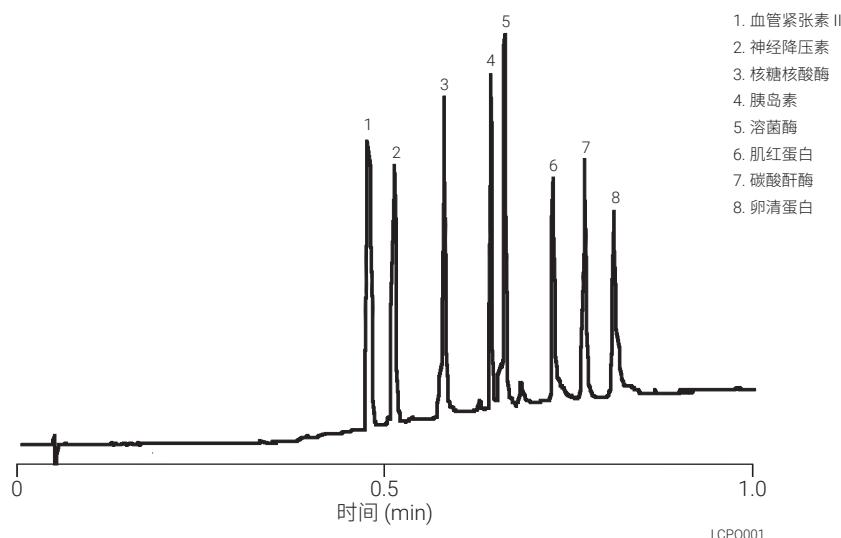
流速： 0.3 mL/min

梯度： 1.0 min 内 B 由 5% 升至 100%

柱温： 70 °C, 260 bar

检测器： UV, 215 nm

样品： 蛋白质和肽



八种肽和蛋白质的分离在不到 60 秒内即可完成。每个色谱峰均尖锐且高效。

## 技巧和工具

有关详细信息，可参见：

Characterization of Glycosylation in the Fc Region of Therapeutic Recombinant Monoclonal Antibody (对治疗性重组单克隆抗体 Fc 区中的糖基化进行表征) (出版号 5991-2323EN)

Using the High-pH Stability of ZORBAX Poroshell 300Extend-C18 to Increase Signal-to-Noise in LC/MS (利用 ZORBAX Poroshell 300Extend-C18 色谱柱的高 pH 稳定性提高液质联用分析时的信噪比) (出版号 5989-0683EN)

[www.agilent.com/search](http://www.agilent.com/search)



## 碎片 IgG 的快速高分离度分析

色谱柱： Poroshell 300SB-C3

660750-909

2.1 × 75 mm, 5 μm

流动相： A: 水 (5% AcOH, 1.0% FA, 0.05% TFA)

B: 70/20/10 IPA:ACN:水 (5% AcOH, 1.0% FA, 0.05% TFA)

流速： 1.0 mL/min

进样量： 2 μL

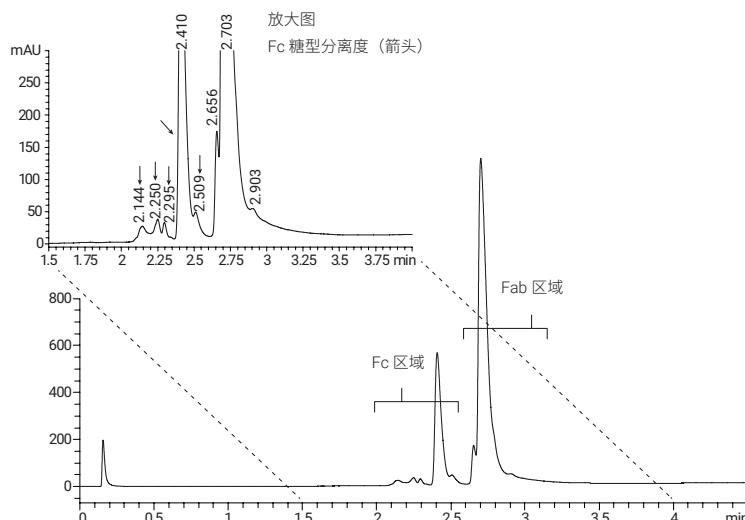
梯度： 分段

时间 (min)	% B
0	20
4	45
8	45
9	90
10	20

柱温： 80 °C

检测器： UV, 280 nm

仪器： 1200 Infinity 系列产品，配备高性能自动进样器、二元泵、柱温箱 (TCC) 和二极管阵列检测器 (DAD)，与 6224 精确质量 TOF LC/MS 联用



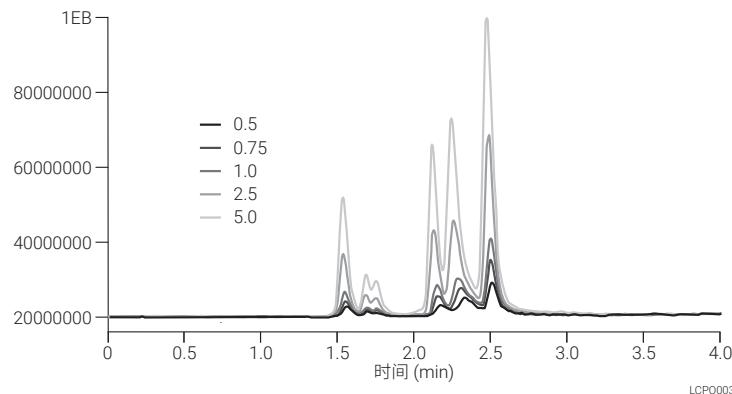
木瓜蛋白酶酶解后 IgG1 的反相分离表现出 Fc 和 Fab 片段的两个主峰。插图详细显示了代表 Fc 和 Fab 片段的变异体的部分分离的峰（箭头）。

## 一级结构分析

Poroshell 300 微径柱为 LC/MS 分析提供了最高的灵敏度

色谱柱： Poroshell 300SB-C18  
661750-902  
1.0 × 75 mm, 5 μm

流动相： A: 水 + 0.1% 甲酸  
B: ACN + 0.1% 甲酸  
流速： 600 μL/min  
梯度： 5.5 min 内 B 由 20% 升至 100%  
柱温： 80 °C  
质谱条件： LC/MS 正离子 ESI; Vcap 6000 V  
干燥气流速： 12 L/min  
干燥气温度： 350 °C  
雾化器： 45 psi  
碎裂电压： 140 V  
扫描： 600–2500  
步长： 0.15 amu  
峰宽： 0.06 min  
样品： 1 μL



Poroshell 色谱柱具有 2.1 mm、1.0 mm 和 0.5 mm 的窄径，非常适合用于 LC/MS。当样品量非常有限时，内径 1.0 mm 或 0.5 mm 的 Poroshell 色谱柱是高灵敏度 LC/MS 分析的理想选择。在 Poroshell 色谱柱上，能够对低至 0.5–5 pmol 的蛋白质进行灵敏的 MS 分子量测定。这些色谱柱还已经被用于完整蛋白质的快速 MS 鉴定，即使在存在稳定剂和组织培养基的情况下也是如此。

## 技巧和工具

安捷伦有各种样品瓶和样品容器解决方案可供选择，包括聚丙烯样品瓶和去活化及硅烷化玻璃样品瓶。如需了解完整信息，请参见出版物 5990-9022CHCN。

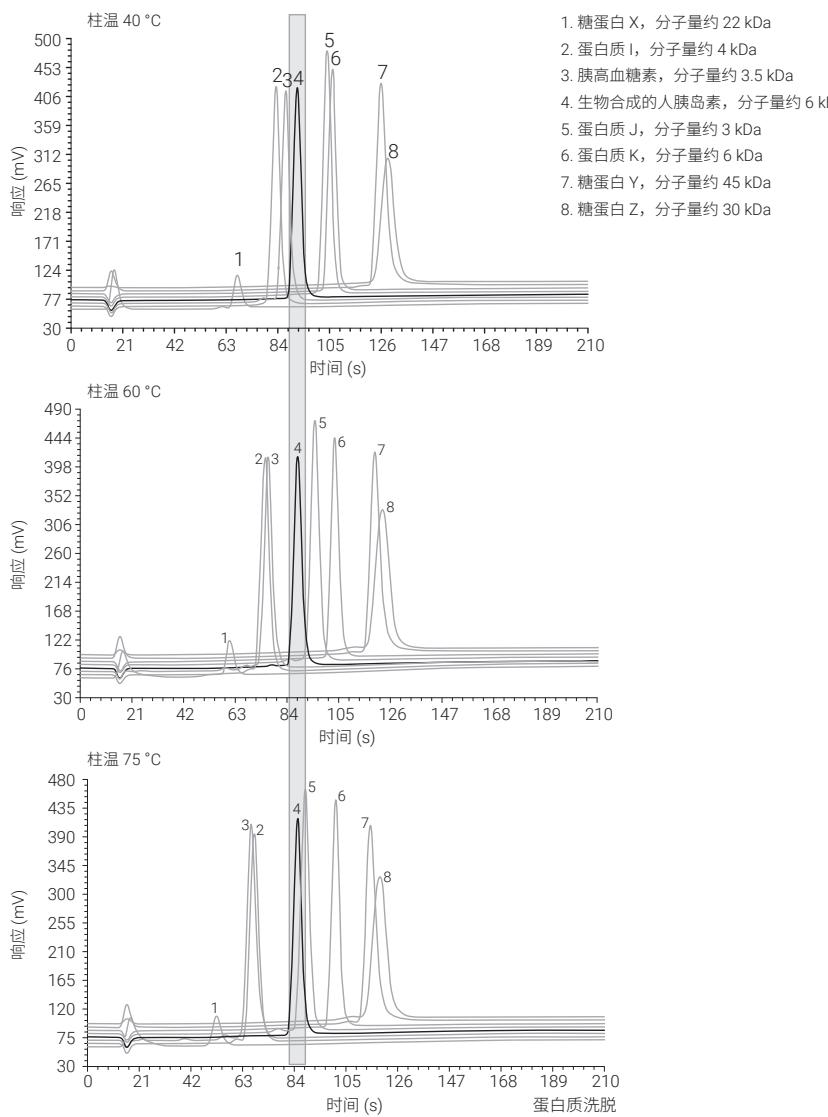
[www.agilent.com/chem/vials-productivity](http://www.agilent.com/chem/vials-productivity)



## 蛋白质洗脱模式

色谱柱: **Poroshell 300SB-C8  
660750-906  
2.1 × 75 mm, 5 μm**

流动相: A: 0.1% TFA 水溶液  
B: 0.1% TFA 的 ACN 溶液  
流速: 1.0 μL/min  
梯度: 3 min 内 B 由 20% 升至 70%  
检测器: UV, 214 nm



## Poroshell 300

说明	规格 (mm)	粒径 (μm)	Poroshell 300SB-C18	Poroshell 300SB-C8	Poroshell 300SB-C3	Poroshell 300Extend-C18
窄径	2.1 × 75	5	660750-902	660750-906	660750-909	670750-902
微径柱	1.0 × 75	5	661750-902	661750-906	661750-909	671750-902
毛细管	0.5 × 75	5		5065-4468		
保护柱柱芯, 4/包	2.1 × 12.5	5	821075-920	821075-918	821075-924	
保护柱硬件工具包			820999-901	820999-901	820999-901	
微径保护柱, 3/包	1.0 × 17	5	5185-5968	5185-5968	5185-5968	5185-5968

- 更高的分析可靠性：**每批 AdvanceBio 肽谱分析填料均采用肽混标进行了严格测试，以确保适用性和高重现性，使其能鉴定复杂肽图谱中的重要肽
- 节省时间：**分析速度较全多孔 HPLC 色谱柱提高了 2–3 倍
- 提高每台仪器的性能：**内径 4.6、3.0 和 2.1mm 的色谱柱能在 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
- 更高的灵活性：**任何以甲酸为流动相的 HPLC 分析均可提高质谱灵敏度

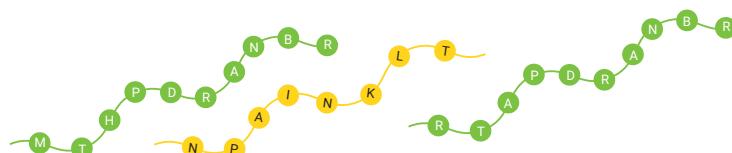


这类先进生物柱的表面多孔 2.7 μm 填料颗粒具有 120 Å 的孔径。安捷伦使用复杂的肽混标对这些色谱柱进行特殊测试，确保可靠的肽谱分析性能。此外，AdvanceBio 肽谱分析色谱柱为 UHPLC 提供了出色的分离度和速度，并为常规 HPLC 提供了优异的结果。

### 色谱柱性能指标

键合相	孔径	温度上限*	pH 范围	封端
EC-C18	120 Å	60 °C	2.0–8.0	双封端

性能指标只代表典型值



### 技巧和工具

有关 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱的科学应用实例，请参见：

Amano, M. et al. Detection of Histidine Oxidation in a Monoclonal Immunoglobulin gamma (IgG) 1 Antibody. *Analytical Chemistry*, 2014, 86 (15): 7536 -7543

Leah G. Luna and Katherine Coady, Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J. Anal Bioanal Tech*, 2014, 5:3



### 促红细胞生成素酶解物的高分离度肽谱

色谱柱： AdvanceBio 肽谱分析色谱柱

651750-902

2.1 × 250 mm, 2.7 μm

流动相： A: H<sub>2</sub>O + 0.1% 甲酸 (v/v)

B: 乙腈 + 0.1% 甲酸 (v/v)

流速： 0.4 mL/min

梯度： 时间 (min) % B

0 3

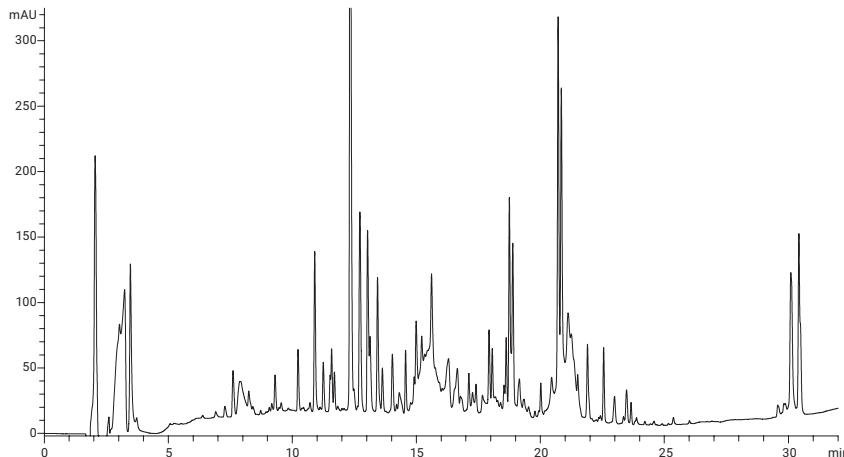
28 45

33 60

34 95

柱温： 55 °C

样品： 5 μL (2 μg/μL)



### IgG 的快速高效的肽谱分析

色谱柱： AdvanceBio 肽谱分析色谱柱

655750-902

2.1 × 100 mm, 2.7 μm

AdvanceBio 肽谱分析色谱柱

653750-902

2.1 × 150 mm, 2.7 μm

流动相： A: H<sub>2</sub>O + 0.1% FA (v/v)

B: 90% ACN + 0.1% FA (v/v)

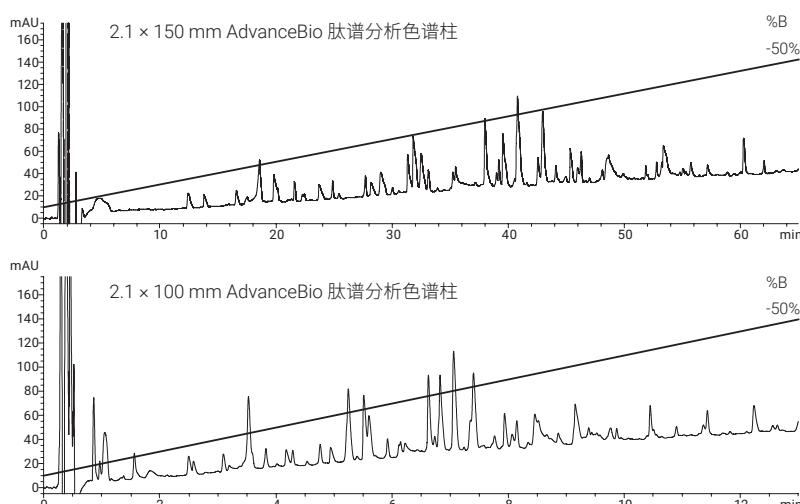
流速： 不定

进样量： 15 μL

柱温： 40 °C

检测器： UV, 215/220 nm

样品： 1290 Infinity 液相色谱和 6530 精确质量四极杆  
飞行时间 LC/MS



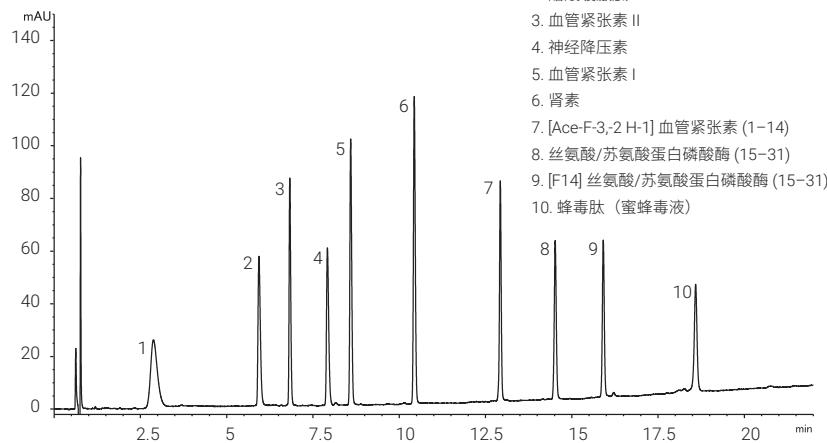
AdvanceBio 肽谱分析色谱柱经优化可实现更快的肽谱分析。梯度 10%–40% B, DAD: 215 nm, 40 °C。上图为 75 min 分离，采用 2.1 × 150 mm 色谱柱获得 59 个肽峰（流速 0.2 mL/min, 211 bar）。下图，在 2.1 × 100 mm 色谱柱上采用优化的 14 min 分离得到的 57 个肽峰（流速 0.6 mL/min, 433 bar）。

## 一级结构分析

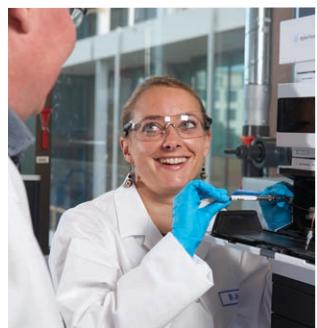


### 使用安捷伦肽混标进行质量保证测试

色谱柱： AdvanceBio 肽谱分析色谱柱  
653750-902  
2.1 × 150 mm, 2.7 µm  
流速： 3 µL  
梯度： A: H<sub>2</sub>O (0.1% TFA), B: 乙腈 (0.1% TFA), 0–25 min,  
B 由 15% 升至 65%, 25–26 min, B 由 65% 升至 95%  
柱温： 55 °C  
检测器： 220 nm  
样品： 肽谱分析混标 (每个肽, 0.5–1.0 µg/µL), 部件号  
5190-0583



用于测试每批 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱的混标的谱图。该混标包含 10 种分子量在 757–2845 Da 的亲水、疏水和碱性肽。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。



### 实验室真实案例

#### 生物分析亮点

立即了解该实验室管理人员如何能够显著缩短停机时间并改善用户信心。

[www.agilent.com/chem/story25](http://www.agilent.com/chem/story25)

## 200 次进样的批次间重现性

色谱柱： AdvanceBio 肽谱分析色谱柱

651750-902

2.1 × 250 mm, 2.7 μm

流速： 0.5 mL/min

进样量： 1 μL

梯度： A: H<sub>2</sub>O (0.1% TFA), B: 乙腈 (0.08% TFA), 0–8 min,  
B 由 10% 升至 60%; 8.1–9 min, B 保持为 95%

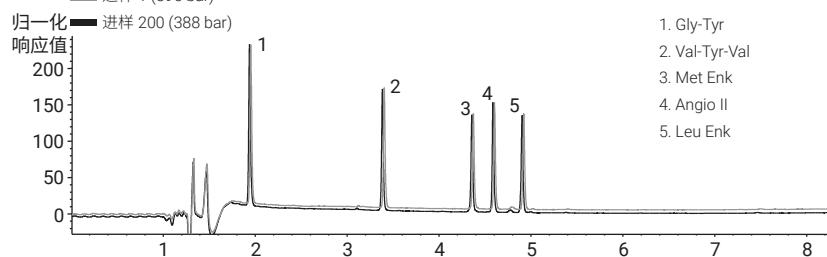
柱温： 55 °C

检测器： 220 nm

样品： Sigma HPLC 肽标准品

硅胶柱，批号 PEP1227229

进样 1 (395 bar)

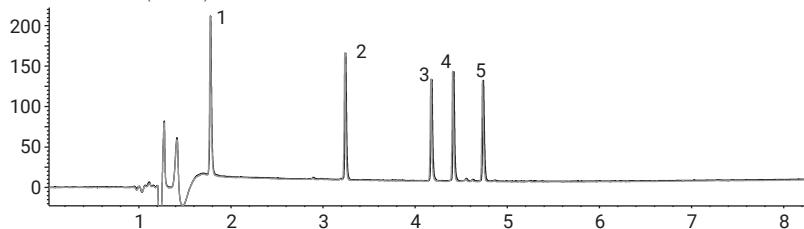


进样	RT2 (min)	RT3 (min)	RT4 (min)	RT5 (min)
1	3.39	4.36	4.59	4.90
200	3.52	4.48	4.70	5.02
进样	PW2	PW3	PW4	PW5
1	0.020	0.021	0.020	0.022
200	0.020	0.021	0.019	0.021

硅胶柱，批号 B12169

进样 1 (397 bar)

进样 200 (405 bar)



进样	RT2 (min)	RT3 (min)	RT4 (min)	RT5 (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

优异的批次间和运行间重现性。使用 2.1 × 250 mm AdvanceBio 肽谱分析色谱柱实现最大分离度

## 一级结构分析



### AdvanceBio 肽谱分析色谱柱

说明	部件号
4.6 × 150 mm, 2.7 µm	653950-902
3.0 × 150 mm, 2.7 µm	653950-302
2.1 × 250 mm, 2.7 µm	651750-902
2.1 × 150 mm, 2.7 µm	653750-902
2.1 × 100 mm, 2.7 µm	655750-902
4.6 × 5 mm, 快速保护柱*	850750-911
3.0 × 5 mm, 快速保护柱*	853750-911
2.1 × 5 mm, 快速保护柱*	851725-911

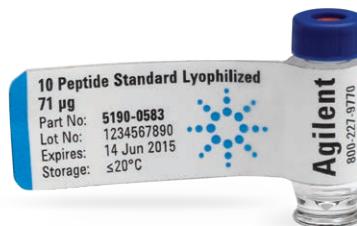
\* 快速保护柱可在不降低分离速度或不影响分离度的条件下延长色谱柱寿命

## 安捷伦肽质量控制标准品

使用安捷伦的十肽质量控制标准品（与安捷伦用于色谱柱质量控制的标准品相同）在色谱柱的寿命期内评估其性能。它可用于 HPLC 或 LC/MS。每瓶可进行约 20 次进样。

### 安捷伦肽质量控制标准品

说明	部件号
肽质量控制标准品, 71 µg, 装在 2 mL 样品瓶中	5190-0583



## 技巧和工具

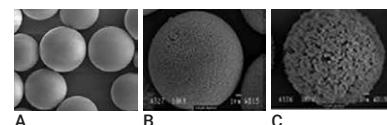
肽谱分析技术功能强大，最广泛应用于蛋白质鉴定测试，尤其适用于重组蛋白质的分析。除了色谱柱选择之外，包括蛋白质消解、样品前处理和方法优化等在内的其他因素也对实现准确且可重现的肽谱分析十分重要。有关肽谱分析程序中使用的基础技术以及优化肽谱分析分离时的注意事项，请参见最优化肽段表征的要点：肽谱分析指南（出版号 5991-2348CHCN）。

[www.agilent.com/search](http://www.agilent.com/search)

## PLRP-S

- 具有耐用的弹性聚合物颗粒填料，能在更长的使用寿命内提供高重现性结果
- 热稳定和化学稳定
- 遵循 USP L21 标准
- 用于生命科学、化学、临床研究、能源、环境、食品与农业、材料科学和制药行业
- 各种孔径 (100 Å–4000 Å) 适用于从小分子到大分子复合物和多聚核苷酸的分离

PLRP-S 系列色谱柱由多种孔径和粒径的颗粒填料组成，所有填料都具有相同的化学性质和基本吸附特性。颗粒填料本身具有疏水性。因此，反相分离无需键合相或烷基配体。因此，我们能得到无硅醇基和重金属离子的高重现性填料。该色谱柱拥有多种产品系列，适用于纳流/微量分离，包括自下而上和自上而下的蛋白质组学、分析型分离以及前处理纯化。此外，生产型色谱柱可以使用散装填料进行装填。



PLRP-S 10 μm 填料的扫描电镜图 (SEM)

可清楚地看出孔径差别。

**A** 为小孔径 100 Å

**B** 为大孔径 300 Å

**C** 为超大孔径 4000 Å

### 色谱柱性能指标

pH 范围	1–14
缓冲液含量	无限制
有机改性剂	1%–100%
温度上限	200 °C
最大压力	3 μm: 275 bar/4000 psi 5 μm、8 μm 和 10 μm: 207 bar/3000 psi 10–15 μm、15–20 μm 和 30 μm: 103 bar/1500 psi

### PLRP-S 应用

孔径	应用
100 Å	小分子/合成
300 Å	重组肽/蛋白质
1000 Å	大分子蛋白质
4000 Å	DNA/高速分离

## 一级结构分析

### 25 bp DNA 分子量标准品的 HPLC 分离

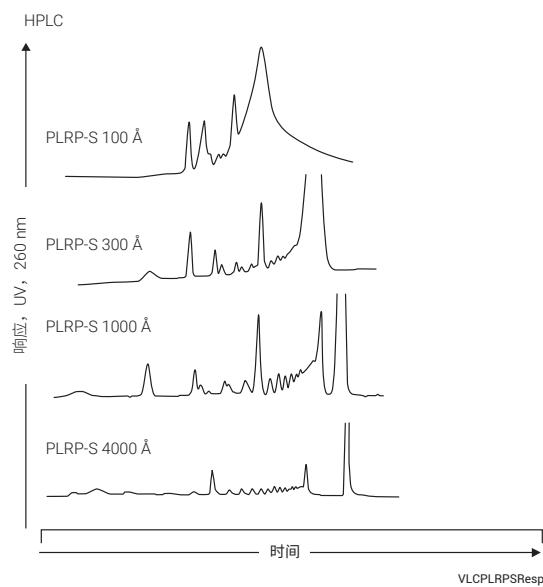
色谱柱: PLRP-S, 2.1 × 150 mm

流动相: A: 100 mmol/L TEAA

B: 含 100 mmol/L TEAA 的 50% 水:50% ACN

流速: 200 μL/min

梯度: 150 min 内 B 由 12.5% 升至 50%



### 聚乙二醇

色谱柱: PLRP-S 100 Å

PL1111-3500

4.6 × 150 mm, 5 μm

流动相: A: H<sub>2</sub>O

B: ACN

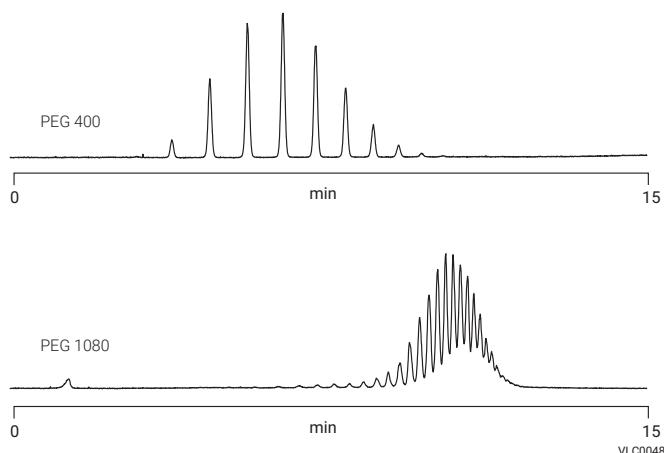
流速: 1 μL/min

进样量: 10 μL

梯度: 12 min 内 B 由 10% 升至 30%，并在 30% B 下保持 3 min

检测器: ELS (雾化温度 = 50 °C, 蒸发温度 = 70 °C, 气体流速 = 1.6 SLM)

样品浓度: 1 mg/mL



## 利用化学稳定性 — TFA 浓度

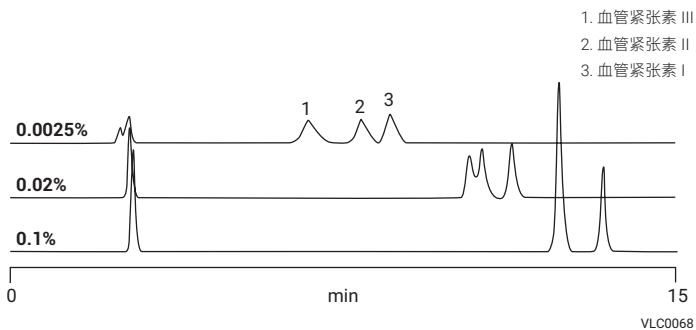
色谱柱： PLRP-S 100 Å  
PL1512-5500  
4.6 × 250 mm, 5 µm

流动相： A: TFA (各种百分比) 水溶液  
B: TFA (各种百分比) 的乙腈溶液

流速： 1.0 mL/min

梯度： 15 min 内 B 由 12% 线性升至 40%

检测器： ELS (雾化温度 = 75 °C, 蒸发温度 = 85 °C, 气体流速 = 1.0 SLM)



## 利用化学稳定性 — NH<sub>4</sub>OH 浓度

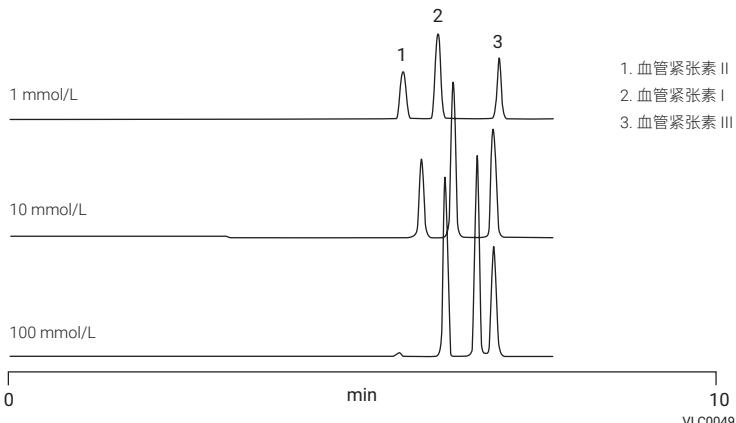
色谱柱： PLRP-S 100 Å  
PL1512-5500  
4.6 × 250 mm, 5 µm

流动相： A: NH<sub>4</sub>OH (各种浓度) 水溶液  
B: NH<sub>4</sub>OH (各种浓度) 的乙腈溶液

流速： 1.0 mL/min

梯度： 15 min 内 B 由 10% 线性升至 100%

检测器： ELS (雾化温度 = 80 °C, 蒸发温度 = 85 °C,  
气体流速 = 1.0 SLM)

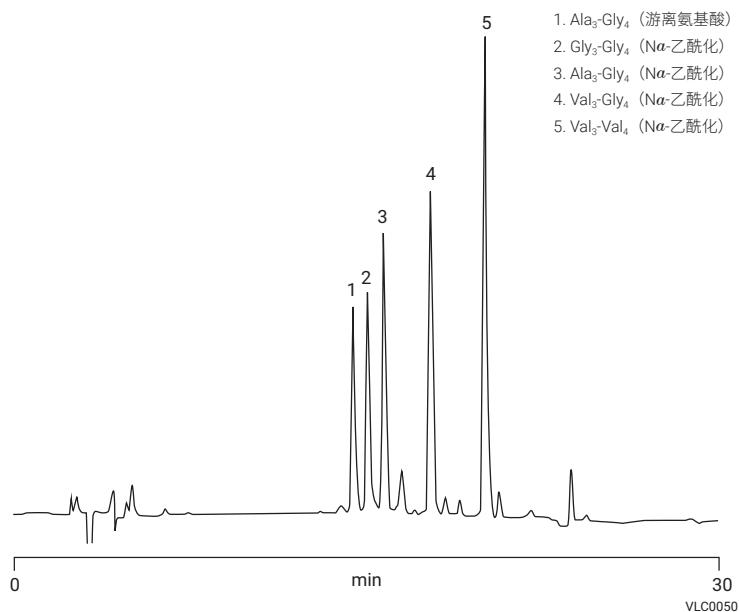


## 一级结构分析



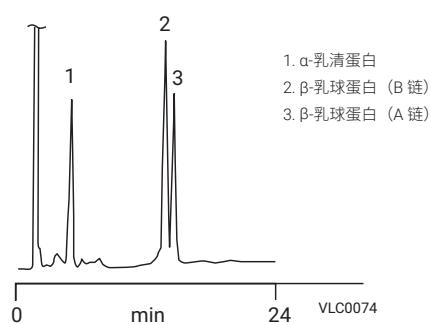
### Alberta Peptide Institute 测试混标

色谱柱: PLRP-S 100 Å  
PL1512-5500  
4.6 × 250 mm, 5 µm  
流动相: A: 含 0.1% TFA 的 99% 水:1% ACN  
B: 含 0.1% TFA 的 70% 水:30% ACN  
流速: 1 µL/min  
梯度: 30 min 内 B 由 0% 升至 100%  
检测器: UV, 220 nm



### 乳制品样品 — 牛奶中的乳清蛋白

色谱柱: PLRP-S 300 Å  
PL1512-3801  
4.6 × 150 mm, 8 µm  
流动相: A: 0.1% TFA 的 99% 水: 1% ACN  
B: 0.1% TFA 的 1% 水: 99% ACN  
流速: 1.0 mL/min  
进样量: 10 µL  
梯度: 0–24 min, B 由 36% 升至 48%; 24–30 min, B 由 48% 升至 100%; 30–35 min, B 保持 100%; 35–40 min, B 由 100% 降至 36%  
检测器: UV, 220 nm





在离子对反相 HPLC 中，温度可以作为一项加快传质和改善寡核苷酸分离度的工具

色谱柱： PLRP-S 100 Å  
PL1512-1300  
4.6 × 50 mm, 3 μm

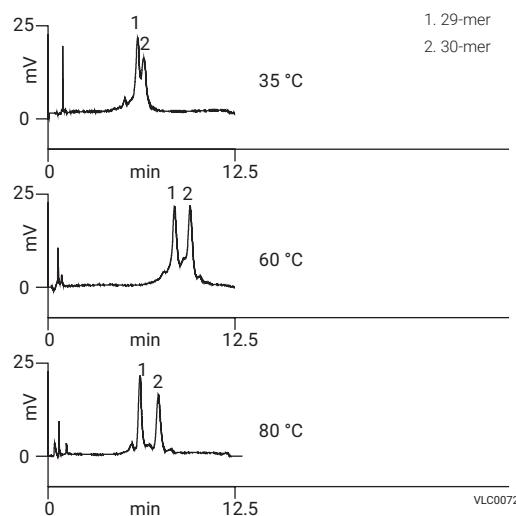
流动相： A: 100 mmol/L TEAA  
B: 100 mmol/L TEAA 的 25% ACN 溶液

流速： 1.0 mL/min

梯度： 缓冲液 B 在 5 min 内改变 5%

柱温： 35 °C、60 °C 或 80 °C

检测器： UV, 254 nm



## 大分子纤维蛋白

色谱柱： PLRP-S 300 Å  
PL1512-3801  
4.6 × 150 mm, 8 μm

流动相： A: 0.25% TFA 水溶液  
B: 含 0.25% TFA 的 5% 水:95% ACN

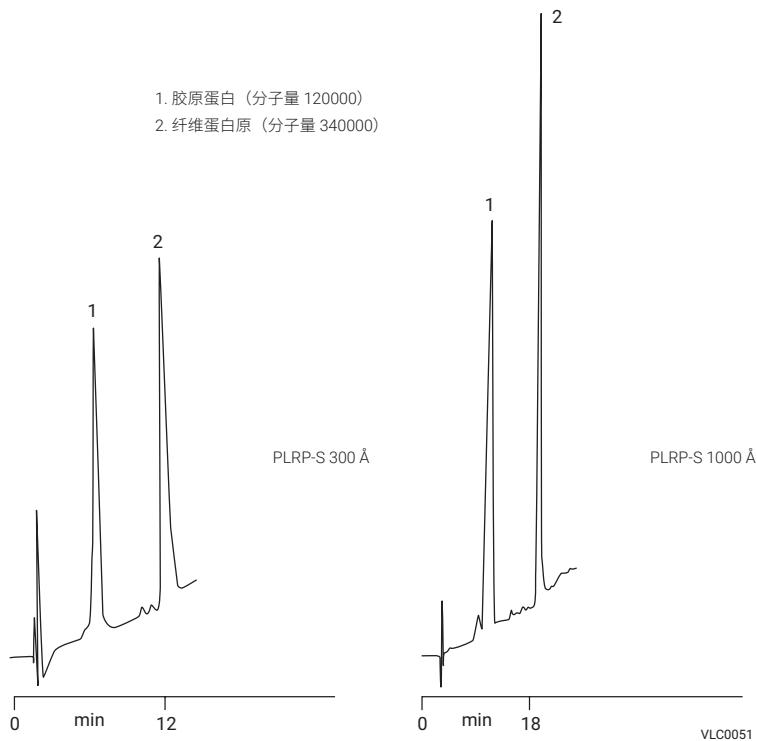
流速： 1.0 mL/min

进样量： 10 μL

梯度： 15 min 内 B 由 20% 升至 60%

检测器： UV, 220 nm

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



## 一级结构分析

### PLRP-S HPLC 色谱柱

规格 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	PLRP-S 100 Å USP L21	PLRP-S 300 Å USP L21	PLRP-S 1000 Å USP L21	PLRP-S 4000 Å USP L21
4.6 × 250	8	PL1512-5800	PL1512-5801	PL1512-5802	
4.6 × 150	8	PL1512-3800	PL1512-3801	PL1512-3802	PL1512-3803
4.6 × 50	8		PL1512-1801	PL1512-1802	PL1512-1803
4.6 × 250	5	PL1512-5500	PL1512-5501		
4.6 × 150	5	PL1111-3500	PL1512-3501		
4.6 × 50	5	PL1512-1500	PL1512-1501	PL1512-1502	PL1512-1503
4.6 × 150	3	PL1512-3300	PL1512-3301		
4.6 × 50	3	PL1512-1300	PL1512-1301		
2.1 × 250	8		PL1912-5801		
2.1 × 150	8		PL1912-3801	PL1912-3802	PL1912-3803
2.1 × 50	8		PL1912-1801	PL1912-1802	PL1912-1803
2.1 × 250	5	PL1912-5500	PL1912-5501		
2.1 × 150	5	PL1912-3500	PL1912-3501		
2.1 × 50	5	PL1912-1500	PL1912-1501	PL1912-1502	PL1912-1503
2.1 × 150	3	PL1912-3300	PL1912-3301		
2.1 × 50	3	PL1912-1300	PL1912-1301		
1.0 × 50	8			PL1312-1802	
1.0 × 50	5	PL1312-1500			PL1312-1502
1.0 × 10	5				PL1C12-2502
1.0 × 150	3	PL1312-3300			
1.0 × 50	3	PL1312-1300			
PLRP-S 保护柱柱芯, 用于 3.0 × 5.0 mm 色谱柱, 2/包		PL1612-1801	PL1612-1801	PL1612-1801	PL1612-1801
保护柱柱芯支架, 用于 3.0 × 5.0 mm 色谱柱芯		PL1310-0016	PL1310-0016	PL1310-0016	PL1310-0016

## 技巧和工具

有关微径色谱柱的订购信息, 请参见第 169 页。

有关 PLRP-S 制备到生产的色谱柱和填料订购信息, 请参见第 182 页。

## AdvanceBio 脱盐反相小柱

### 在质谱检测前通过反相脱盐在线去除盐离子

亲和、离子交换和体积排阻色谱是分析蛋白质（例如抗体）的常用技术。但是，这些技术需要包含非挥发性盐的水性流动相。这些非挥发性盐在使用 MS 检测时会出现问题，因为它们导致信号抑制，并可能通过盐沉积而污染 MS 检测器，导致维护和仪器停机时间延长。AdvanceBio 脱盐反相小柱解决了这一问题，能够在 MS 检测之前快速、高效地在线去除盐离子。这些小柱型色谱柱可在任何液相色谱系统上单独使用，用于对收集的馏分进行脱盐。或在 1290 Infinity II 二维液相色谱系统上进行一维分离后作为第二维以脱盐。



AdvanceBio 脱盐反相小柱（部件号 PL1612-1102）

和小柱支架（部件号 820999-901）

### AdvanceBio 脱盐反相小柱

说明	部件号
AdvanceBio 脱盐反相小柱, 2.1 × 12.5 mm, 2/包	PL1612-1102
小柱支架	820999-901



### AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱

想要成功分离脱三苯甲基、去保护的寡核苷酸，您需要具有高分离能力并且可以耐受严苛条件的色谱柱。

Agilent AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱拥有高效的 2.7  $\mu\text{m}$  表面多孔 Poroshell 颗粒填料。采用安捷伦独有的技术对颗粒填料进行化学修饰，使其可耐受高 pH 的流动相。我们还将这些填料与封端 C18 固定相键合，从而为寡核苷酸的分析提供出色的选择性。此外，我们还采用分离度标准品对每一批 AdvanceBio 寡核苷酸填料进行了测试，确保其具有一致的性能。

AdvanceBio 系列产品旨在为蛋白质、抗体、偶联物、新生物实体和生物药物的完整表征提供一致、卓越的性能。



#### 色谱柱性能指标

键合相	填料粒径	孔径	温度上限	pH 范围	封端	压力限值
C18	2.7 $\mu\text{m}$	100 $\text{\AA}$	65 $^{\circ}\text{C}$	3.0–11.0	双封端	600 bar

色谱柱: AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱

2.1 × 50 mm

(部件号 659750-702)

流动相: A: HFIP:TEA (400 mmol/L:15 mmol/L) 水溶液

B: MeOH:流动相 A (50:50)

流速: 0.4 mL/min

梯度: 0.5 min 内 B 由 30% 升至 40%; 5 min 内 B 由 40% 升至 70%

样品: 25 mer DNA

柱温: 65 °C

检测: UV 260 nm

检测: MS

最小范围: 400 m/z

最大范围: 1700 m/z

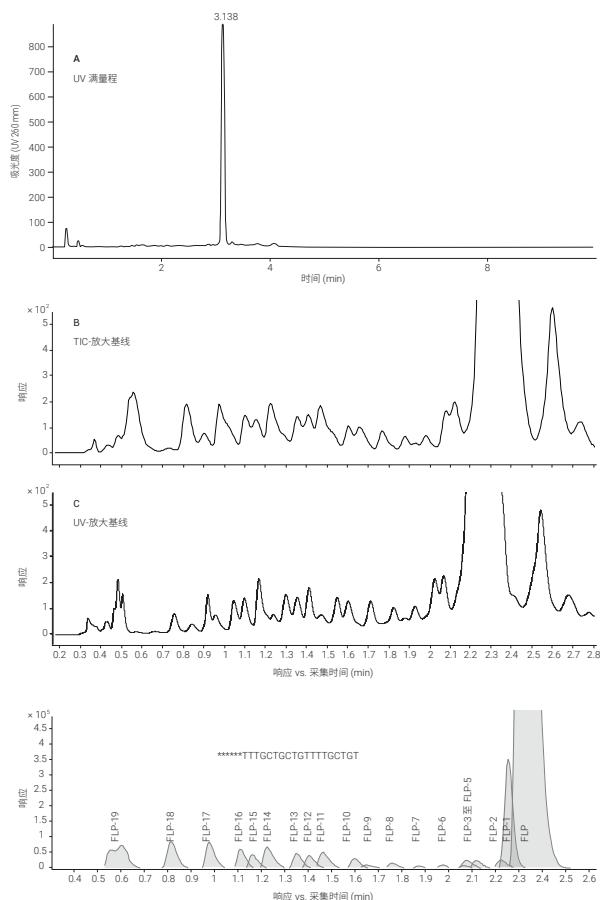
扫描速率: 3.00 幅谱图/秒

离子极性: -ve

毛细管电压: 3500

喷嘴电压: 1000 V

碎裂电压: 200



由 AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱分离的 25-mer DNA 寡核苷酸的 TIC  
解卷积数据

### AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱

说明	内径 (mm)	长度 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	部件号
传统	2.1	150	2.7	653750-702
传统	2.1	100	2.7	655750-702
传统	2.1	50	2.7	659750-702
UG 保护柱, 600 bar	2.1	5	2.7	821725-921
传统	4.6	150	2.7	653950-702
传统	4.6	100	2.7	655950-702
传统	4.6	50	2.7	659950-702
UG 保护柱, 600 bar	4.6	5	2.7	820750-921

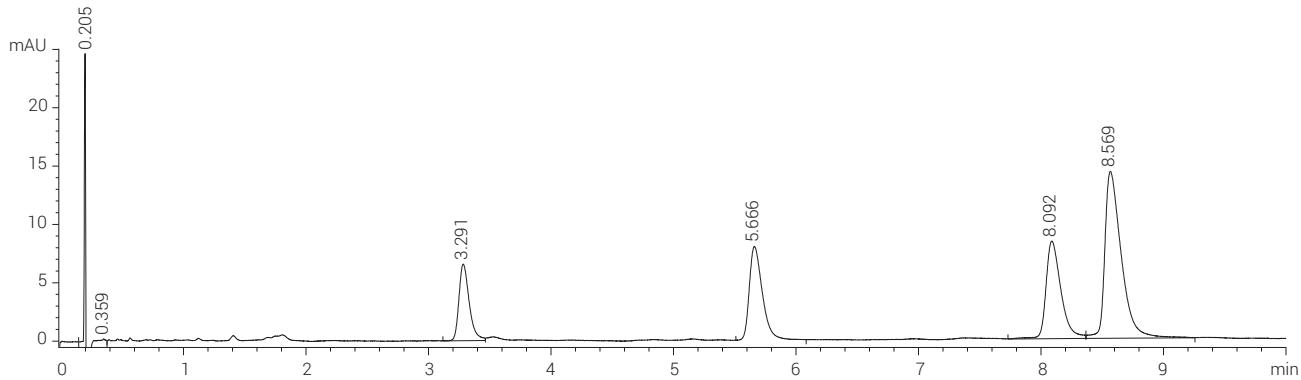
## 一级结构分析



## AdvanceBio 寡核苷酸标准品

为确保分离性能，每一批次的 AdvanceBio 寡核苷酸介质均采用安捷伦寡核苷酸分离度标准品进行了测试。寡核苷酸分离度标准品含有 14、17、20 和 21 mer 的合成型寡核苷酸，专为展示 N/N-1 的分离度而设计。

色谱柱： AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱  
2.1 × 50 mm  
(部件号 659750-702) 流速： 0.6 mL/min  
样品： 安捷伦寡核苷酸分离度标准品 (部件号 5190-9028)  
流动相： A: 100 mmol/L TEAA 水溶液 柱温： 65 °C  
B: 100 mmol/L TEAA 的乙腈溶液 进样量： 0.5 μL  
梯度： 12 min 内 B 由 6% 升至 8% 检测： UV 260 nm  
停止时间： 13 min  
后运行： 5 min





安捷伦还提供含有 15、20、25、30、35 和 40 mer 合成型寡核苷酸的寡核苷酸分子量标准品，是展示色谱柱选择性和重现性的理想工具。

**色谱柱：** AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱  
**2.1 × 50 mm**  
**(部件号 659750-702)**

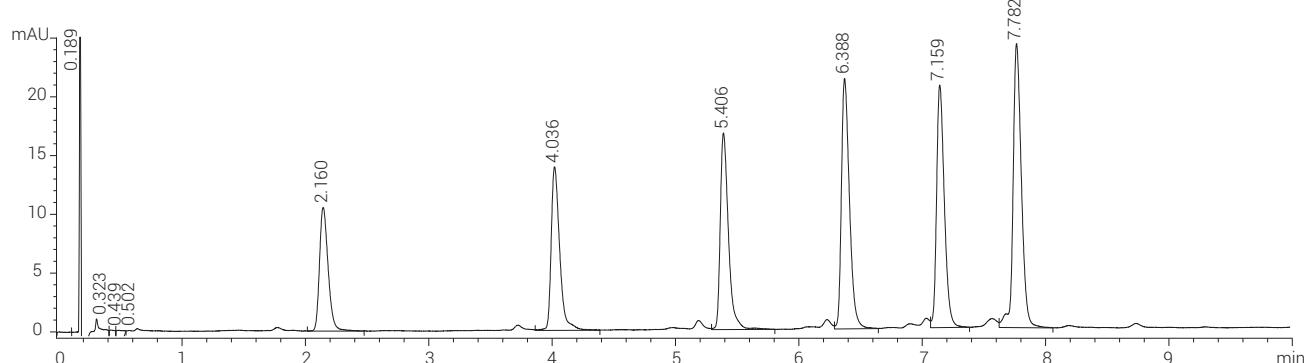
**流动相：** A: 100 mmol/L TEAA 水溶液  
 B: 100 mmol/L TEAA 的乙腈溶液

**梯度：** 10 min 内 B 由 10% 升至 14%

**停止时间：** 11 min

**后运行：** 5 min

**流速：** 0.6 mL/min  
**柱温：** 65 °C  
**样品：** 安捷伦寡核苷酸分子量标准品 (部件号 5190-9029)  
**进样量：** 10 µL  
**检测：** UV 260 nm



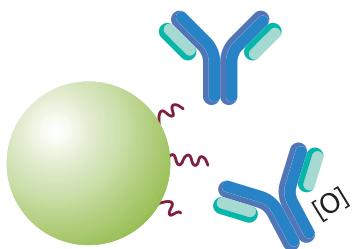
### AdvanceBio 寡核苷酸标准品

说明	部件号
寡核苷酸分离度标准品	5190-9028
寡核苷酸分子量标准品	5190-9029



# 使用疏水相互作用色谱分析完整蛋白质

## AdvanceBio HIC



AdvanceBio HIC 色谱柱可在完整蛋白质水平实现对天然蛋白质的高分离度、稳定、可重现的分离。

这些色谱柱结合了 ZORBAX 全多孔颗粒填料的性能和专利键合技术进行制造，将疏水性和通用的单一化学键合相提升到了全新水平，可处理单克隆抗体 (mAb)、抗体药物偶联物 (ADC) 及其他重组蛋白质等特别难分离的分子。

与 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统配合使用时，AdvanceBio HIC 还可在表征和验证过程中提供无与伦比的性能和数据一致性。

- 更高的选择性：非常适合用于测定 mAb 氧化和 ADC DAR 比率
- 单一化学键合相：减少了不同 CQA 对多色谱柱筛选的需求
- 更高的稳定性：延长了色谱柱使用寿命，让您对数据充满信心
- 经验证的性能：每一批填料都经 NIST mAb 测试
- 高质量：每根色谱柱均单独进行测试以确保填充效率
- 更高的分析效率：色谱柱更短，保持分离性能的同时可减少分析时间

### 色谱柱性能指标

孔径	填料粒径	温度上限	pH 范围	压力限值	流速*
450 Å	3.5 µm	60 °C (在 pH 7 下)	2.0–8.0 (在 35 °C 下)	400 bar (典型操作压力 < 200 bar)	0.5–1.0 mL/min (内径 4.6 mm)

\* 在一些情况下，流速降至 0.3 mL/min 并延长梯度时间可进一步提高分离度

**色谱柱:** AdvanceBio HIC  
4.6 × 100 mm, 3.5 μm

洗脱液 A: 2 mol/L 硫酸铵, 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0

洗脱液 B: 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0

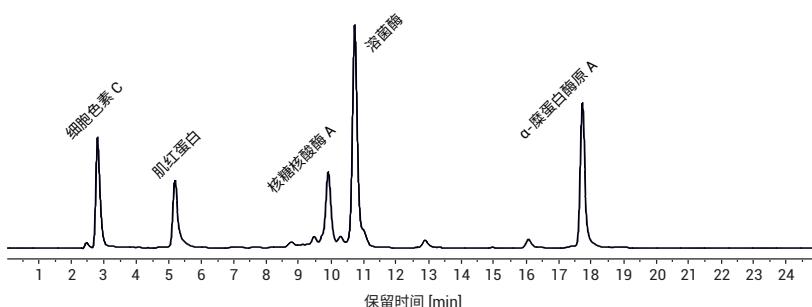
梯度: 时间 (min) %A %B  
0 100 0  
20 0 100  
25 0 100  
30 100 0  
40 100 0

流速: 0.5 mL/min

柱温: 30 °C

进样量: 5 μL

检测: UV, 220 nm



**色谱柱:** AdvanceBio HIC  
4.6 × 100 mm, 3.5 μm

洗脱液 A: 2 mol/L 硫酸铵,  
50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0

洗脱液 B: 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0

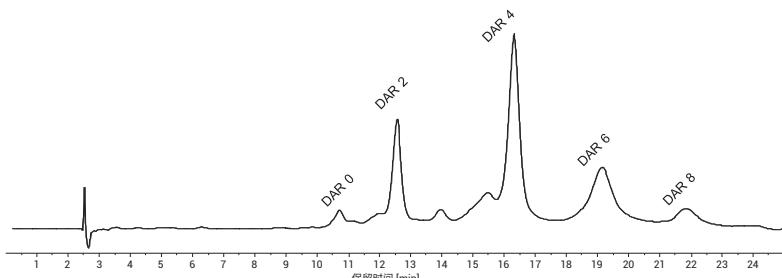
梯度: 时间 (min) %A %B %C  
0 50 45 5  
20 0 75 25  
25 0 75 25  
30 50 45 5  
40 50 45 5

流速: 0.5 mL/min

柱温: 30 °C

进样量: 5 μL

检测: UV, 220 nm



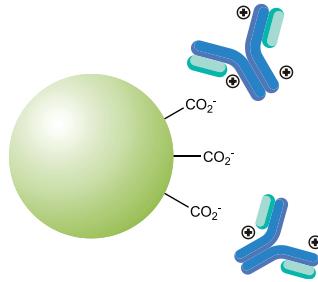
### Agilent AdvanceBio HIC 色谱柱

说明	部件号
AdvanceBio HIC, 4.6 × 100 mm, 450 Å, 3.5 μm	685975-908
AdvanceBio HIC, 4.6 × 30 mm, 450 Å, 3.5 μm	681975-908

# 电荷异构体分析

## 纯化蛋白质和其他带电荷分子

离子交换色谱 (IEX) 是一种高灵敏度的技术，可以基于电荷的差异分离离子和极性分子。与 SEC 一样，用 IEX 也可以分离天然状态的蛋白质。



## 将 IEX 应用于电荷异构体的分析

抗体在生产和纯化过程中，由于发生了氨基酸取代、糖基化、磷酸化和其他翻译后修饰或化学修饰，其电荷异质性可能发生改变。由于这类变化可能影响稳定性和活性 — 或引发免疫副反应 — 因此，单克隆抗体 (mAb) 前处理过程中电荷异质性的分析对生物药物生产非常重要。

蛋白质分析中，在给定 pH 下蛋白质发生电荷变异，说明其分子一级结构发生了改变，从而导致额外的蛋白构象产生。这些称为异构体（或电荷异构体），可以用 IEX 色谱进行分离。IEX 也可以用作前处理技术。

由于这类变化可能影响稳定性和活性（或引发免疫副反应），因此，电荷异构体的分析对生物药物非常重要。

作为生物制药业领先的供应商，安捷伦深知产品的高质量和一致性是实现安全、高效治疗的关键。安捷伦离子交换 BioHPLC 色谱柱可提供用户所需的高速、高分离度和优异的重现性，使得用户能够以较低成本、快速推出能够改善目标群体生活质量的产品。

这几页将介绍安捷伦弱和强离子交换剂（阴离子和阳离子）产品系列。

- 非多孔 Bio IEX 色谱柱专为实现高分离度、高效率和高回收率分离而设计
- Bio MAb 色谱柱针对分离单克隆抗体电荷异构体进行了优化
- 多孔 IEX 色谱柱（PL-SAX 和 PL-SCX）化学稳定，有两种孔径可供选择，可用于分离肽、寡核苷酸和分子量非常大的蛋白质
- Bio-Monolith IEX 色谱柱非常适合分离抗体、病毒和 DNA
- 缓冲液顾问软件是通过离子强度梯度自动化分离蛋白质的理想解决方案

## 技巧和工具

如需了解有关安捷伦缓冲液顾问软件的更多信息，请参见出版物 **5991-1408EN**

[www.agilent.com/search](http://www.agilent.com/search)

# 电荷异构体分析

## 离子交换色谱柱选择

应用	安捷伦色谱柱	备注
单克隆抗体	Bio MAb	重组抗体的全面表征，包括酸性和碱性亚型的鉴定和监测。Bio MAb HPLC 色谱柱填充了专为单克隆抗体基于带电量的高分离度分离而设计的特殊树脂颗粒。
肽和蛋白质	Bio IEX	Bio IEX 色谱柱填充有聚合物型非多孔离子交换填料。Bio IEX 色谱柱专为实现高分离度、高回收率和高分离效率而设计。
蛋白质、肽和去保护 合成寡核苷酸	PL-SAX	强阴离子交换官能团共价连接到化学稳定的全多孔聚合物表面，拓展了操作的 pH 范围。此外，阴离子交换能力与 pH 值无关。对于合成寡核苷酸，可以使用高温、有机溶剂和高 pH 等变性条件进行分离。5 μm 填料可提供高分离度分离，而 30 μm 填料可用于中等压力液相色谱
	• 1000 Å • 4000 Å	
球蛋白和肽	PL-SAX 1000 Å	
非常大的生物分子/高速	PL-SAX 4000 Å	
小分子肽到大分子蛋白质和非常大的生物分子	PL-SCX	PL-SCX 是一种具有强亲水性涂层和强阳离子交换官能团的大孔径 PS/DVB 填料。生产工艺受到严格控制，具有最佳的强阳离子交换官能团密度，适用于分析、分离和纯化各种生物分子。5 μm 填料可提供高分离度分离，而 30 μm 填料可用于中等压力液相色谱。
	• 1000 Å • 4000 Å	
抗体 (IgG, IgM)、质粒 DNA、病毒、噬菌体和其他生物大分子	Bio-Monolith	强阳离子交换相、强阴离子交换相和弱阴离子交换相。Bio-Monolith HPLC 色谱柱与 InfinityLab 液相色谱系列兼容。
	• Bio-Monolith QA • Bio-Monolith DEAE • Bio-Monolith SO <sub>3</sub>	
病毒、DNA、大分子蛋白	Bio-Monolith QA	
质粒 DNA、噬菌体	Bio-Monolith DEAE	
蛋白质、抗体	Bio-Monolith SO <sub>3</sub>	

## Bio MAb HPLC 色谱柱

- 填料载体由硬质球形、高度交联的聚苯乙烯二乙烯基苯 (PS/DVB) 无孔微球组成
- 填料表面结合了亲水聚合物层，避免抗体蛋白的非特异性结合
- 填料的弱阳离子交换固定相层采用了不同工艺，使其比 Bio WCX 色谱柱填料的密度更高
- 专为单克隆抗体的电荷异构体分离而设计

单克隆抗体的全面表征，包括酸性和碱性亚型的鉴别和监测。Bio MAb HPLC 色谱柱填充了专为单克隆抗体基于带电量的高分离度分离而设计的特殊树脂颗粒。这类色谱柱可与水性缓冲盐溶液、乙腈/丙酮/甲醇和水混合物兼容。常用缓冲盐有磷酸盐、Tris、MES 和醋酸盐。

Bio MAb 色谱柱有 1.7、3、5 和 10  $\mu\text{m}$  粒径可供选择，较小的粒径能够提供较高的分离度。

### 色谱柱性能指标

键合相	内径	填料粒径	pH 稳定性	操作温度上限	流速
弱阳离子交换 (羧酸型)	2.1 和 4.6 mm	1.7、3、5 和 10 $\mu\text{m}$	2–12	80 °C	0.1–1.0 mL/min

## 技巧和工具

您是否希望提高单克隆抗体的电荷异构体分析的通量？如果是，请参见：

*Reducing Cycle Time for Charge Variant Analysis of Monoclonal Antibodies* (缩短单克隆抗体电荷异构体的分析周期) (出版号 5991-4722EN)

[www.agilent.com/search](http://www.agilent.com/search)



## 电荷异构体分析



### 一致的离子交换 mAb 分离

色谱柱: Bio MAb, PEEK

5190-2407

4.6 × 250 mm, 5 μm

流动相: A: 磷酸钠 10 mmol/L, pH 5.5

检测器: UV, 225 nm

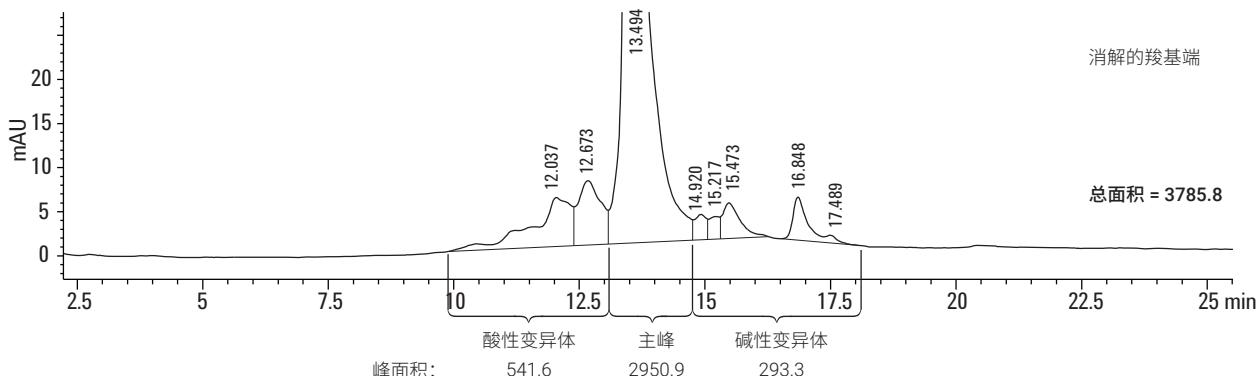
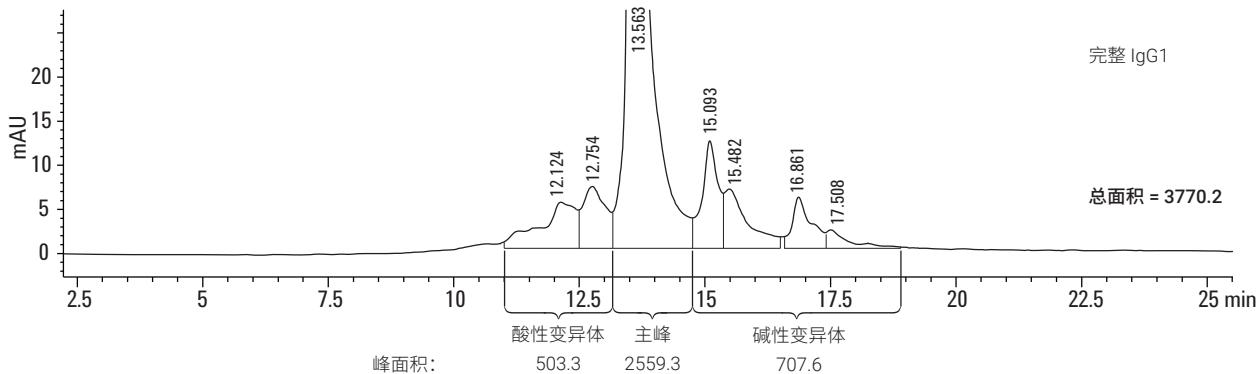
B: A + 氯化钠 0.5 mmol/L

样品: 5 μg 1 mg/mL 完整或 C 端酶解的 IgG1

流速: 0.85 mL/min

仪器: 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱或 1100 系列液相色谱系统

梯度: 0 至 25 min, B 由 10% 升至 35% (除非另有说明)



在 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统上使用 Bio MAb 5 μm 色谱柱分析羧基端消解的 IgG1 的计算数据。



## 重现性和精密度 — 使用 Bio MAb 色谱柱获得精确定量的可靠方法

色谱柱： Bio MAb, PEEK

5190-2407

4.6 × 50 mm, 5 μm

流动相： A: 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 6.0  
B: 10 mmol/L 碳酸氢钠缓冲液, pH 9.5

流速： 1.0 mL/min

进样量： 10 μL (洗针进样, 冲洗进样口 7 s)

梯度： 时间 (min) % B

0	0
25	100
27	100
30	0

数据采集： 214 和 280 nm

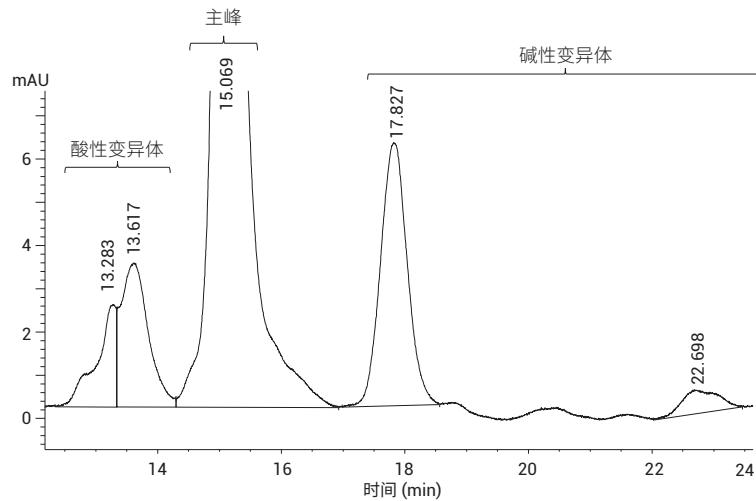
采集速率： 20 Hz

流通池： 60 mm 光程

柱温： 30 °C

样品恒温箱： 50 °C

后运行时间： 5 min



## 曲妥珠单抗的 Fab 和 Fc 片段的 WCX 分离

色谱柱： Bio MAb, PEEK

5190-2411

2.1 × 250 mm, 5 μm

流动相： A: 20 mmol/L MES, pH 5.6  
B: 20 mmol/L MES, pH 5.6 + 300 mmol/L NaCl

流速： 170 μL/min

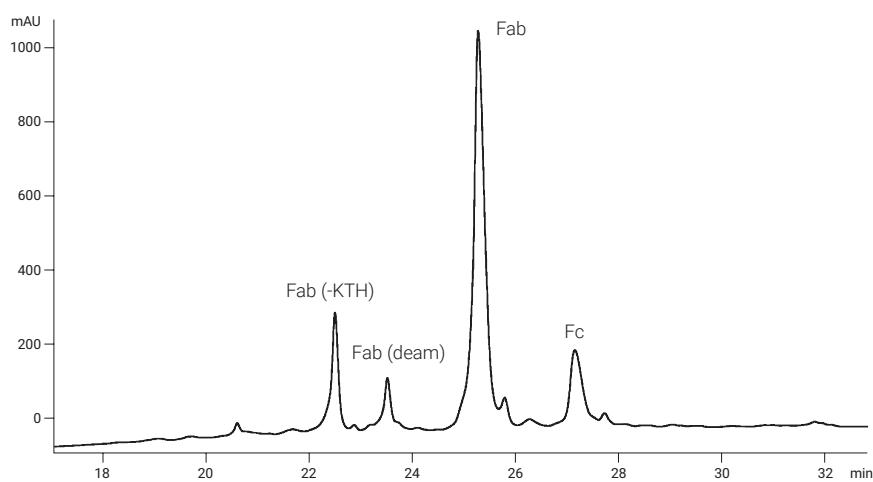
进样量： 16 μL

梯度： 时间 (min) % B

0	0
39.5	80
40	100
50	100
50.5	2
60	2

柱温： 30 °C

仪器： 1100 系列



# 电荷异构体分析

## 使用缓冲液顾问软件进行方法开发 — 最佳 pH 的确定

色谱柱： Bio MAbs, PEEK

5190-2407

4.6 × 250 mm, 5 µm

仪器： 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统

缓冲液： A: H<sub>2</sub>O

B: NaCl 3 mol/L

C: MES (2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物) 60 mmol/L

D: MES-Na (2-(N-吗啉)乙磺酸钠盐) 35 mmol/L

样品： 三种蛋白质混合物，溶于 PBS (磷酸盐缓冲盐水) 中，pH 7.4

核糖核酸酶 A: 13700 Da, pI 9.6

细胞色素 C: 12384 Da, pI 10-10.5

溶菌酶： 14307 Da, pI 11.35

流速： 1 mL/min

梯度： 0 min–20 mmol/L NaCl

5 min–20 mmol/L NaCl

30 min–500 mmol/L NaCl

35 min–1000 mmol/L NaCl

36 min–20 mmol/L NaCl

进样量： 10 µL

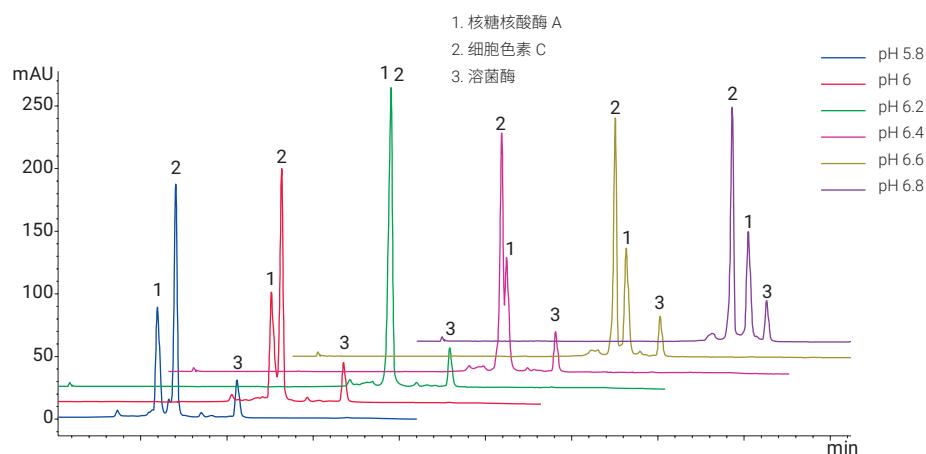
柱温箱： 4 °C

TCC 温度： 25 °C

DAD： 280 nm/4 nm

参比： 关闭

峰宽： > 0.05 min (1.0 s 响应时间) (5 Hz)



**几乎没有保留时间变化**

色谱柱：**Bio MAb, 不锈钢  
5190-2413  
4.6 × 250 mm, 10 μm**

流动相：A: 10 mmol/L 磷酸钠, pH 6.0

B: A + 1.0 mol/L 氯化钠

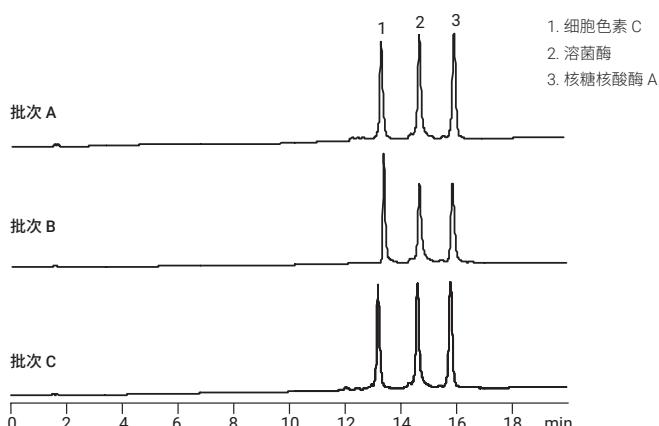
流速：1.0 mL/min

梯度：42 min 内 B 由 0% 升至 100%

柱温：25 °C

检测器：UV, 214 nm

良好控制的树脂生产以及优质的色谱柱表面固定相和色谱柱填料的完美结合，几乎消除了色谱柱之间以及批次间的保留时间变化。

**Agilent Bio MAb HPLC 色谱柱**

规格 (mm)	填料粒径 (μm)	Bio MAb PEEK	压力限值	Bio MAb 不锈钢	压力限值
21.2 × 250	5			5190-6885	275 bar, 4000 psi
10 × 250	5			5190-6884	275 bar, 4000 psi
4.6 × 250	10	5190-2415	275 bar, 4000 psi	5190-2413	275 bar, 4000 psi
4.6 × 50	10	5190-2416	275 bar, 4000 psi		
4.6 × 250	5	5190-2407	400 bar, 5800 psi	5190-2405	400 bar, 5800 psi
4.6 × 50	5	5190-2408	400 bar, 5800 psi		
4.6 × 50	3			5190-2403	551 bar, 8000 psi
4.6 × 50	1.7			5190-2401	600 bar, 8700 psi
4.0 × 10, 保护柱	10			5190-2414	275 bar, 4000 psi
4.0 × 10, 保护柱	5			5190-2406	413 bar, 6000 psi
4.0 × 10, 保护柱	3			5190-2404	551 bar, 8000 psi
4.0 × 10, 保护柱	1.7			5190-2402	600 bar, 8700 psi
2.1 × 250	10	5190-2419	275 bar, 4000 psi		
2.1 × 50	10	5190-2420	275 bar, 4000 psi		
2.1 × 250	5	5190-2411	400 bar, 5800 psi		
2.1 × 50	5	5190-2412	400 bar, 5800 psi		



## Bio IEX HPLC 色谱柱

- 高度交联的非多孔聚苯乙烯二乙烯基苯 (PS/DVB) 硬质填料表面结合亲水聚合物层，避免了非特异性键合
- 均匀、致密填装的离子交换官能团化学键合到亲水层上（每个位点连接多个离子交换基团），提高了色谱柱容量
- 填料、涂层和键合能够耐高压，有助于实现更高的分离度和更快速的分离
- 多个离子交换基团固定连接在一个结合位点上，以增加柱容量



Bio IEX HPLC 色谱柱填充有聚合型非多孔离子交换填料，专门用于肽、寡核苷酸和蛋白质的高分离度、高回收率和高效分离。

Bio IEX 系列包括强阳离子交换 (SCX)、弱阳离子交换 (WCX)、强阴离子交换 (SAX) 和弱阴离子交换 (WAX) 填料。所有填料均有 1.7、3、5 和 10  $\mu\text{m}$  非多孔填料规格可供选择。

### 色谱柱性能指标

键合相	内径	填料粒径	pH 稳定性	操作温度上限	流速
SCX (强阳离子交换) $-\text{SO}_3\text{H}$	2.1 和 4.6 mm	1.7、3、5 和 10 $\mu\text{m}$	2–12	80 °C	0.1–1.0 mL/min
WCX (弱阳离子交换) $-\text{COOH}$					
SAX (强阴离子交换) $-\text{N}(\text{CH}_3)_3$					
WAX (弱阴离子交换) $-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$					

### 技巧和工具

有关优化电荷异构体分析的更多信息，请参阅：*Ion-exchange chromatography for biomolecule analysis: a "how-to" guide*（用于生物分子分析的离子交换色谱：使用指南）(出版号 5991-3775EN) 和安捷伦离子交换 BioHPLC 色谱柱 — 满怀信心地快速表征蛋白质的电荷异构体 (出版号 5991-2449CHCN)

[www.agilent.com/search](http://www.agilent.com/search)

## 缩短和简化电荷异构体工作流程

色谱柱： Bio WCX，不锈钢  
5190-2443

4.6 × 50 mm, 3 μm

Bio SCX，不锈钢  
5190-2423

4.6 × 50 mm, 3 μm

流动相：

A: 水  
B: 氯化钠 1.5 mol/L  
C: 磷酸二氢钠 40 mmol/L  
D: 磷酸氢二钠 40 mmol/L

按照由缓冲液顾问软件预先确定的比例混合 C 和 D，得到具有所需 pH 范围和强度的缓冲液。

流速： 1.0 mL/min

进样量： 10 μL

梯度：

色谱图采集条件：

pH 5.0–7.0, 缓冲液强度 10–25 mmol/L  
0–15 min, 氯化钠 (NaCl) 由 0 升至 500 mmol/L,

15–20 min, 氯化钠 (NaCl) 保持 500 mmol/L,

DOE 实验

pH 5.0–7.0

0–200 mmol/L、0–250 mmol/L 和 0–300 mmol/L NaCl

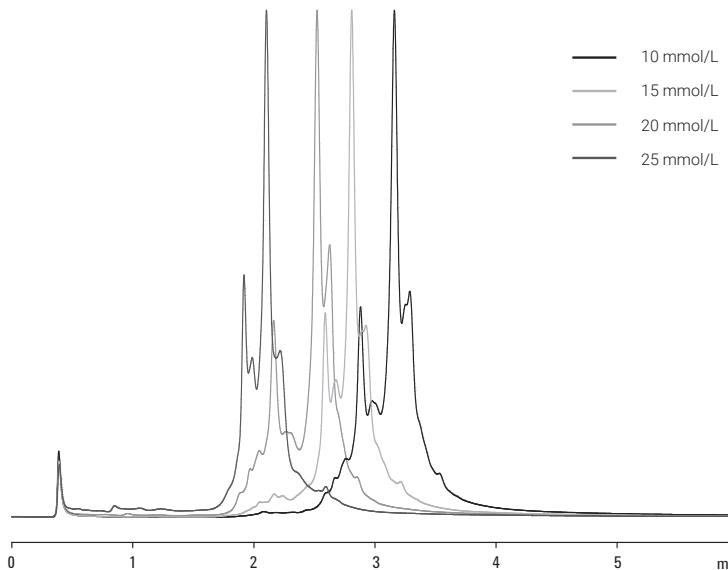
柱温： 室温

检测器： UV, 220 nm

样品： IgG 单克隆抗体

样品浓度： 2 mg/mL (溶于 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液中, pH 6.0)

仪器： 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统



优化电荷异构体分离的自动化方法开发。从单克隆 IgG 分离的筛选色谱图中，在 pH 6.5 条件下优化缓冲液强度。

## 电荷异构体分析

利用更小粒径的填料和更短的色谱柱实现更快分析 — 分离速度提高 30%

色谱柱： Bio WCX，不锈钢

5190-2445

4.6 × 250 mm, 5 μm

Bio WCX，不锈钢

5190-2443

4.6 × 50 mm, 3 μm

流动相： A: 磷酸钠 20 mmol/L, pH 6.5

B: A + 氯化钠 1.6 mmol/L

流速： 1.0 mL/min

进样量： 10 μL

梯度： 0%–50% B

柱温： 室温

检测器： UV, 220 nm

样品浓度： 0.5 mg/mL

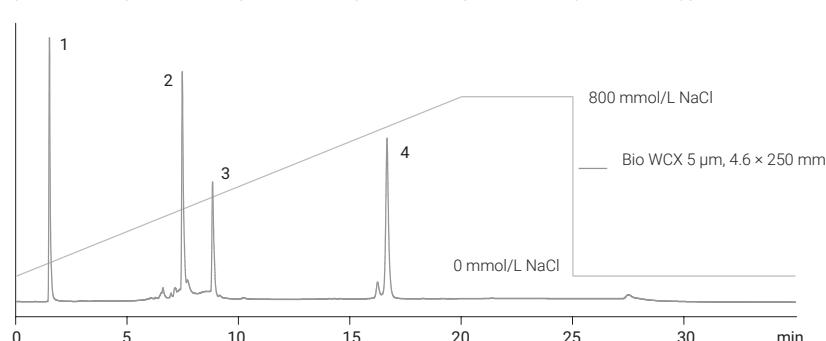
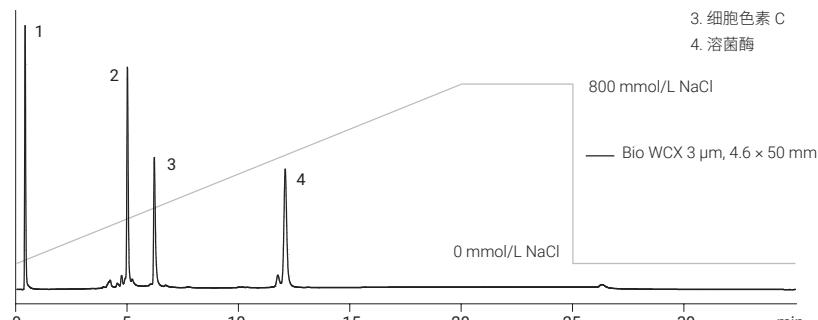
仪器： 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统

1. 卵清蛋白

2. 核糖核酸酶 A

3. 细胞色素 C

4. 溶菌酶



使用 Bio WCX 4.6 × 50 mm (3 μm) 色谱柱和 Bio WCX 4.6 × 250 mm (5 μm) 色谱柱分离蛋白质的色谱图对比 (流速 1.0 mL/min)。通过更小填料粒径和更短色谱柱实现了更快的分析 — 样品从较长色谱柱中 17 min 流出，而在较短色谱柱流出仅需 12 min。

## 较小粒径填料显著提高分离度

色谱柱： Bio WCX， 不锈钢

5190-2443

4.6 × 50 mm, 3 μm

Bio WCX， 不锈钢

5190-2441

4.6 × 50 mm, 1.7 μm

流动相： A: 磷酸钠 20 mmol/L, pH 6.5

B: A + 氯化钠 1.6 mmol/L

进样量： 10 μL

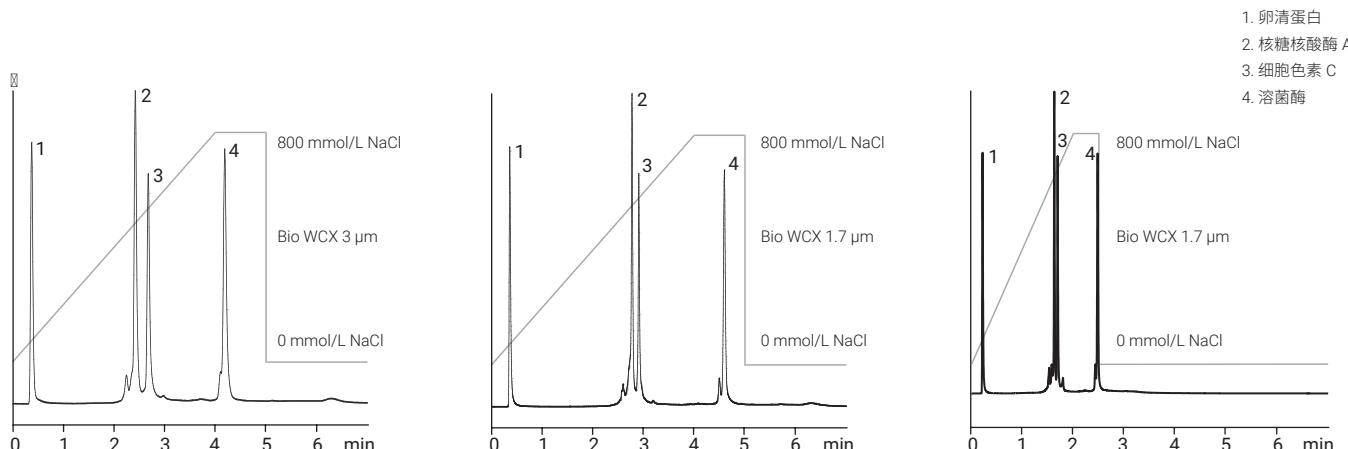
梯度： 0%–50% B

柱温： 室温

检测器： UV, 220 nm

样品浓度： 0.5 mg/mL

仪器： 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统



**左图和中间图：**蛋白质在 Bio WCX 3 μm 色谱柱与 Bio WCX 1.7 μm 色谱柱（流速 1.0 mL/min）上的分离。

**右图：**流速提升至 1.7 mL/min 后，分离时间缩短至 3 分钟以内。（使用 Bio WCX 色谱柱）

通过提高流速缩短分析时间（峰形和分离度不受影响）。

# 电荷异构体分析

## 使用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统通过阴离子交换柱分析蛋白质

色谱柱： Bio WAX, PEEK

5190-2487

4.6 × 250 mm, 5 μm

缓冲液：

A: 20 mmol/L Tris, pH 7.6

B: 20 mmol/L Tris, pH 7.6 + 2 mol/L NaCl,  
1 mol/L KCl, 1 mol/L CH<sub>3</sub>COONa,  
1 mol/L [(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>N]Cl

梯度 1 mol/L：

5 min–100% A

20 min–70% B

25 min–100% B

梯度 2 mol/L：

5 min–100% A

20 min–35% B

25 min–50% B

25.01 min–100% B

停止时间：

30 min

后运行时间：

20 min

柱温：

25 °C

流速：

0.5 mL/min

进样量：

5 μL

DAD：

280 nm

峰宽：

0.025 min

(响应时间 0.5 s)

(10 Hz)

如需了解更多信息，请参见应用简报

5990-9614CHCN ([www.agilent.com/search](http://www.agilent.com/search))

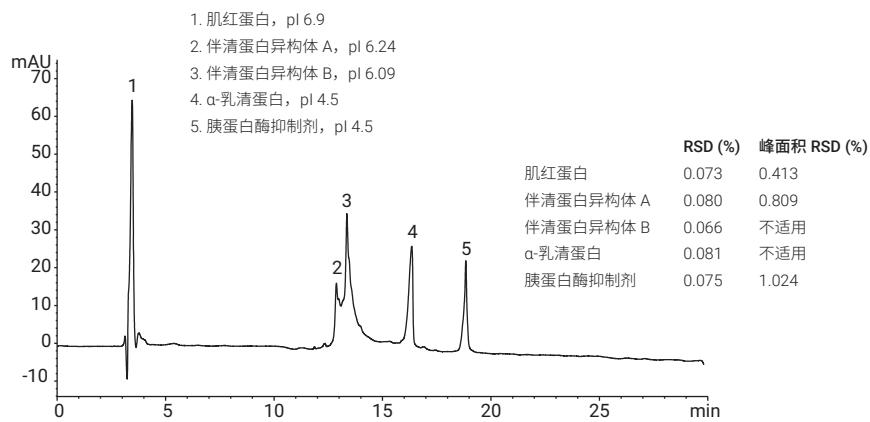


图 1. 线性梯度下蛋白质的 AEX 分离色谱图，采用 2 mol/L NaCl 作为洗脱盐

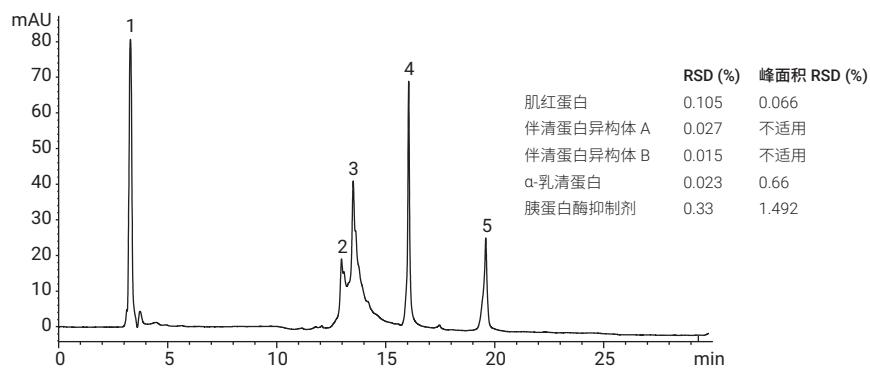


图 2. 线性梯度下蛋白质的 AEX 分离色谱图，采用 1 mol/L KCl 作为洗脱盐

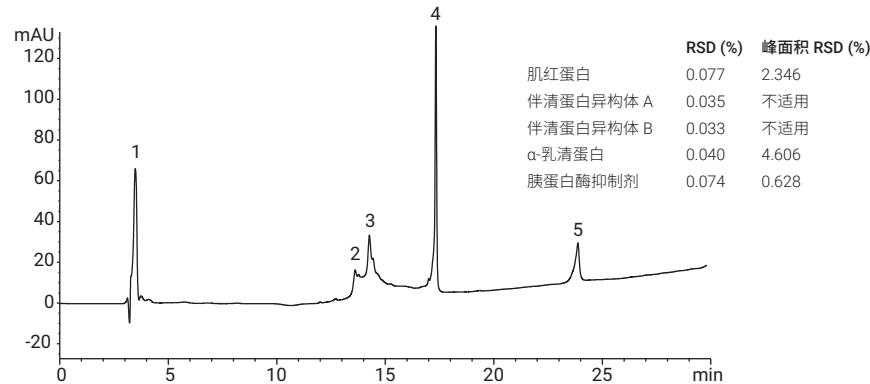


图 3. 线性梯度下蛋白质的 AEX 分离色谱图，采用 1 mol/L [(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>N]Cl 作为洗脱盐

**Bio IEX HPLC 色谱柱, PEEK**

规格 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	压力限值	Bio SCX 部件号	Bio WCX 部件号	Bio SAX 部件号	Bio WAX 部件号
4.6 × 250	10	275 bar, 4000 psi	5190-2435	5190-2455	5190-2475	5190-2495
4.6 × 50	10	275 bar, 4000 psi	5190-2436	5190-2456	5190-2476	5190-2496
4.6 × 250	5	400 bar, 5800 psi	5190-2427	5190-2447	5190-2467	5190-2487
4.6 × 50	5	400 bar, 5800 psi	5190-2428	5190-2448	5190-2468	5190-2488
2.1 × 250	10	275 bar, 4000 psi	5190-2439	5190-2459	5190-2479	5190-2499
2.1 × 50	10	275 bar, 4000 psi	5190-2440	5190-2460	5190-2480	5190-2500
2.1 × 250	5	400 bar, 5800 psi	5190-2431	5190-2451	5190-2471	5190-2491
2.1 × 50	5	400 bar, 5800 psi	5190-2432	5190-2442	5190-2462	5190-2492

**技巧和工具**

使用安捷伦溶剂过滤器除去自行制备的缓冲液和流动相中的颗粒。

请访问: [www.agilent.com/chem/solvent-filters-degassers](http://www.agilent.com/chem/solvent-filters-degassers)

## 电荷异构体分析

### Bio IEX HPLC 色谱柱，不锈钢

规格 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	压力限值	Bio SCX 部件号	Bio WCX 部件号	Bio SAX 部件号	Bio WAX 部件号
21.2 × 250	5		5190-6879	5190-6881	5190-6883	5190-6877
10 × 250	5		5190-6878	5190-6880	5190-6882	5190-6876
4.6 × 250	10	275 bar, 4000 psi	5190-2433	5190-2453	5190-2473	5190-2493
4.6 × 250	5	413 bar, 6000 psi	5190-2425	5190-2445	5190-2465	5190-2485
4.6 × 150	3					5190-6875
4.6 × 50	3	551 bar, 8000 psi	5190-2423	5190-2443	5190-2463	5190-2483
4.6 × 50	1.7	600 bar, 8700 psi	5190-2421	5190-2441	5190-2461	5190-2481
4.0 × 10, 保护柱	10	275 bar, 4000 psi	5190-2434	5190-2454	5190-2474	5190-2494
4.0 × 10, 保护柱	5	413 bar, 6000 psi	5190-2426	5190-2446	5190-2466	5190-2486
4.0 × 10, 保护柱	3	551 bar, 8000 psi	5190-2424	5190-2444	5190-2464	5190-2484
4.0 × 10, 保护柱	1.7	600 bar, 8700 psi	5190-2422	5190-2442	5190-2462	5190-2482

## 技巧和工具

如需了解更多信息，请参见：

利用安捷伦弱阳离子交换色谱柱优化蛋白质的分离（出版物 **5990-9628CHCN**）

Faster separations using Agilent weak cation-exchange columns（采用安捷伦弱阳离子交换柱进行快速分离）（出版物 **5990-9931EN**）

pH 梯度洗脱用于改善单克隆抗体带电变体的分离（出版物 **5990-9629CHCN**）

使用安捷伦缓冲液顾问软件优化阳离子交换色谱法的蛋白质分离（出版物 **5991-0565CHCN**）

[www.agilent.com/search](http://www.agilent.com/search)



## PL-SAX 强阴离子交换色谱柱

- 小粒径填料提供卓越的色谱性能
- 多种粒径大小和两种孔径可供选择，提高分析灵活性并可放大至纯化级别
- 出色的稳定性显著延长色谱柱寿命

PL-SAX -N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup> 是使用阴离子交换 HPLC 分离技术在变性条件下对蛋白质、肽和去保护合成寡核苷酸进行分析的理想选择。强阴离子交换官能团共价交联到化学稳定的全多孔聚合物表面，拓展了运行的 pH 范围。此外，阴离子交换能力与 pH 值无关。对于合成寡核苷酸，可以使用高温、有机溶剂和高 pH 等变性条件进行分离。PL-SAX 为可能形成聚集体或发夹结构的自补序列或富含 g 的序列提供更高的色谱性能。5 μm 填料能够高效分离相差一个结构单元的序列。多种粒径和色谱柱尺寸可供选择，确保分析灵活性并可放大至纯化级别。强阴离子官能团确保该填料具有出色的化学稳定性和热稳定性，即使使用氢氧化钠洗脱液也可保证较长的色谱柱寿命。

### 色谱柱性能指标

键合相	内径	填料粒径 (mm)	孔径 (μm)	pH 稳定性	操作温度上限
强阴离子交换	2.1、4.6、7.5、 25、50 和 100	5、8、10 和 30	1000 Å 和 4000 Å	1–14	80 °C

## 电荷异构体分析



### 标准离子交换蛋白质分离

色谱柱: PL-SAX 1000 Å

PL1551-1502

4.6 × 50 mm, 5 μm

流动相: A: 10 mmol/L Tris HCl, pH 8

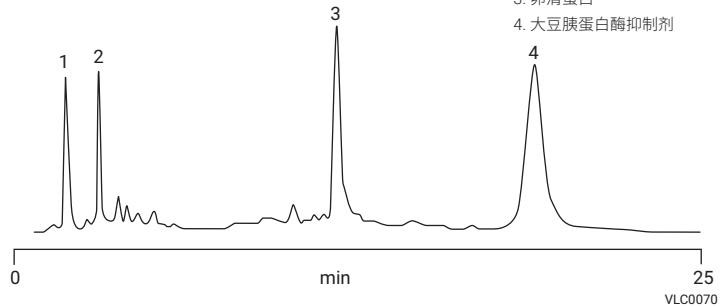
B: A + 350 mmol/L 氯化钠, pH 8

梯度: 20 min 内 B 由 0% 升至 100%

流速: 1.0 mL/min

检测器: UV, 220 nm

1. 肌红蛋白
2. 牛碳酸酐酶
3. 卵清蛋白
4. 大豆胰蛋白酶抑制剂



### 胆碱激酶分析

色谱柱: PL-SAX 4000 Å

PL1551-1803

4.6 × 50 mm, 8 μm

流动相: A: 20 mmol/L tris 5% 乙二醇, pH 7.5

(需要以下试剂以保持酶活性)

1.0 mmol/L 乙二醇四乙酸

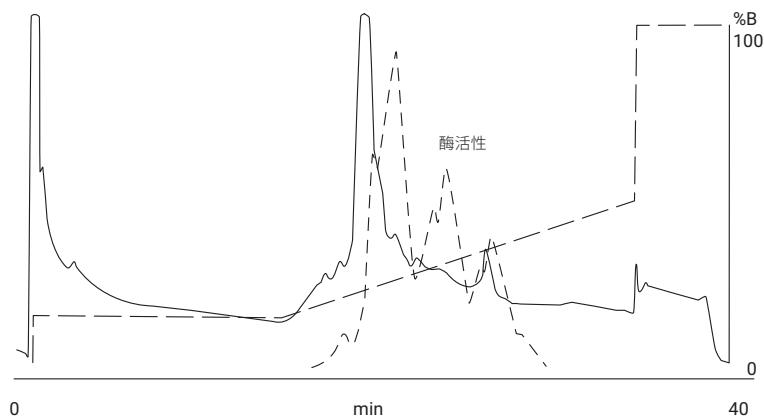
2.0 mmol/L β-巯基乙醇

0.2 mmol/L 苄碘酰氟

B: A + 1 mol/L 氯化钾

流速: 3.0 mL/min

检测器: UV, 280 nm



感谢美国普渡大学 T Porter 提供分离

## 典型乳清蛋白的分析

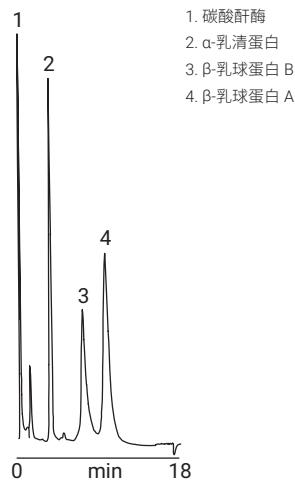
色谱柱： PL-SAX 1000 Å  
 PL1551-1802  
 4.6 × 50 mm, 8 μm

流动相： A: 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7  
 B: A + 500 mmol/L 乙酸钠, pH 7

流速： 1.0 mL/min

梯度： 10 min 内 B 由 0% 线性升至 50%

检测器： UV, 280 nm



## 合成寡核苷酸的可靠分离 — 多聚-T 寡核苷酸标准品的高分离度分离，添加标准片段大小 10 mer、15 mer、30 mer 和 50 mer (主峰)

色谱柱： PL-SAX 1000 Å  
 PL1551-1802  
 4.6 × 50 mm, 8 μm

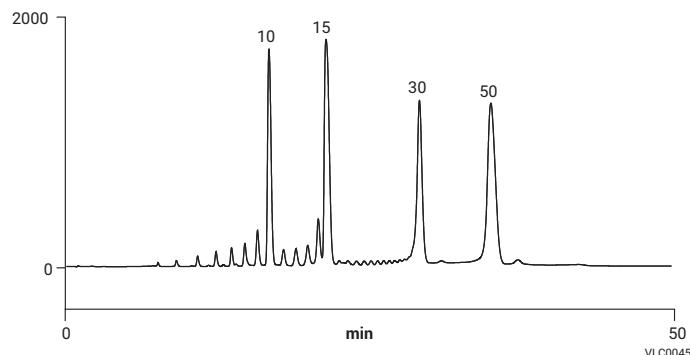
流动相： A: 7:93 v/v ACN: 100 mmol/L TEAA, pH 8.5  
 B: 7:93 v/v ACN: 100 mmol/L TEAA, 1 mol/L 氯化钠, pH 8.5

梯度： 在 10 min 内 B 由 0 升至 40%，再在 14 min 内由 40% 升至 70%，最后在 25 min 内由 70% 升至 100%

流速： 1.0 mL/min

柱温： 60 °C

检测器： UV, 220 nm



聚-T 寡核苷酸的高分离度分离。采用该梯度很容易从 n 中获得高至 15 mer 的 n-1 的基线分离。

## 电荷异构体分析

### PL-SAX 强阴离子交换色谱柱

规格 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	压力限值	PL-SAX 1000 Å	PL-SAX 4000 Å
100 × 300	10	207 bar, 3000 psi	PL1851-2102	PL1851-2103
50 × 150	30	207 bar, 3000 psi	PL1751-3702	PL1751-3703
50 × 150	10	207 bar, 3000 psi	PL1751-3102	PL1751-3103
25 × 150	30	207 bar, 3000 psi	PL1251-3702	PL1251-3703
25 × 150	10	275 bar, 4000 psi	PL1251-3102	PL1251-3103
25 × 50	10	207 bar, 3000 psi	PL1251-1102	PL1251-3103
4.6 × 250	30	207 bar, 3000 psi	PL1551-5702	PL1551-5703
4.6 × 150	30	207 bar, 3000 psi	PL1551-3702	PL1551-3703
4.6 × 250	10	207 bar, 3000 psi	PL1551-5102	PL1551-5103
4.6 × 150	10	207 bar, 3000 psi	PL1551-3102	PL1551-3103
4.6 × 150	8	207 bar, 3000 psi	PL1551-3802	PL1551-3803
4.6 × 50	8	207 bar, 3000 psi	PL1551-1802	PL1551-1803
4.6 × 50	5	207 bar, 3000 psi	PL1551-1502	PL1551-1503
2.1 × 150	8	207 bar, 3000 psi	PL1951-3802	PL1951-3803
2.1 × 50	8	207 bar, 3000 psi	PL1951-1802	PL1951-1803
2.1 × 50	5	207 bar, 3000 psi	PL1951-1502	PL1951-1503
1.0 × 50	5	207 bar, 3000 psi	PL1351-1502	PL1351-1503

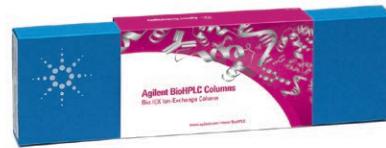
### PL-SAX 强阴离子交换柱散装填料

规格 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	压力限值	PL-SAX 1000 Å	PL-SAX 4000 Å
100 g	30	207 bar, 3000 psi	PL1451-4702	PL1451-4703
100 g	10	207 bar, 3000 psi	PL1451-4102	PL1451-4103

## PL-SCX 强阳离子交换色谱柱

- 最佳设计实现生物分子的高效分离
- 孔径适用于不同大小的生物分子
- 出色的稳定性显著延长色谱柱寿命

PL-SCX-SO<sub>3</sub> 是一种具有强亲水性涂层和强阳离子交换官能团的大孔径 PS/DVB 填料。生产工艺受到严格控制，具有最佳的强阳离子交换官能团密度，适合于分析、分离和纯化从小分子肽到大分子蛋白质的各种生物分子。有 1000 Å 和 4000 Å 两种孔径可供选择，为不同大小的生物分子提供良好的传质性能。5 μm 填料能够提供比中等压力液相色谱中使用的 30 μm 填料更高的分离度。



### 色谱柱性能指标

键合相	内径 (mm)	填料粒径 (μm)	孔径	pH 稳定性	操作温度上限
强阳离子交换	2.1、4.6、7.5、 25、50 和 100	5、8、10 和 30	1000 Å 和 4000 Å	1–14	80 °C

# 电荷异构体分析



## 标准蛋白质分离

色谱柱: PL-SCX 1000 Å

PL1545-1502

4.6 × 50 mm, 5 μm

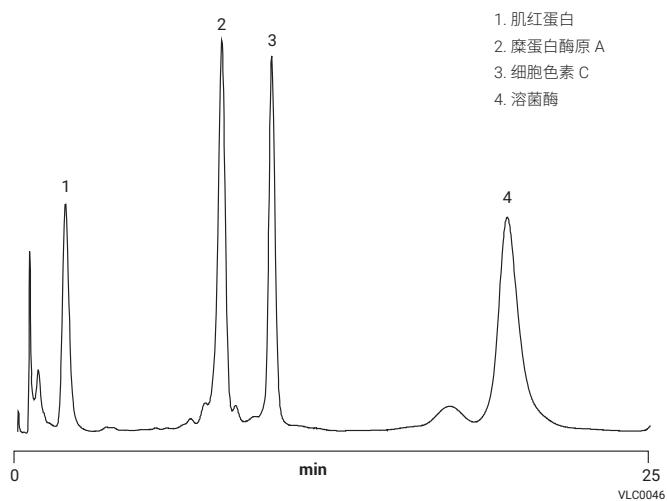
流动相: A: 20 mmol/L 磷酸二氢钾, pH 6.0

B: A + 1 mol/L 氯化钠

梯度: 20 min 内 B 由 0% 升至 100%

流速: 1.0 mL/min

检测器: UV, 280 nm



**PL-SCX 强阳离子交换色谱柱**

规格 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	压力限值	PL-SCX 1000 Å	PL-SCX 4000 Å
100 × 300	10	207 bar, 3000 psi	PL1845-2102	PL1845-2103
50 × 150	30	207 bar, 3000 psi	PL1745-3703	PL1745-3703
50 × 150	10	207 bar, 3000 psi	PL1745-3102	PL1745-3103
25 × 150	30	207 bar, 3000 psi	PL1245-3702	PL1245-3703
25 × 150	10	207 bar, 3000 psi	PL1245-3102	PL1245-3103
25 × 50	10	207 bar, 3000 psi	PL1245-1102	PL1245-1103
4.6 × 250	30	207 bar, 3000 psi	PL1545-5703	PL1545-5703
4.6 × 150	30	207 bar, 3000 psi	PL1545-3702	PL1545-3703
4.6 × 250	10	207 bar, 3000 psi	PL1545-5102	PL1545-5103
4.6 × 150	10	207 bar, 3000 psi	PL1545-3102	PL1545-3103
4.6 × 150	8	207 bar, 3000 psi	PL1545-3802	PL1545-3803
4.6 × 50	8	207 bar, 3000 psi	PL1545-1802	PL1545-1803
4.6 × 50	5	207 bar, 3000 psi	PL1545-1502	PL1545-1503
2.1 × 150	8	207 bar, 3000 psi	PL1945-3802	PL1945-3803
2.1 × 50	8	207 bar, 3000 psi	PL1945-1802	PL1945-1803
2.1 × 50	5	207 bar, 3000 psi	PL1945-1502	PL1945-1503
1.0 × 50	5	207 bar, 3000 psi	PL1345-1502	PL1345-1503

**PL-SCX 强阳离子交换散装填料**

规格 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	PL-SCX 1000 Å	PL-SCX 4000 Å
100 g	30	PL1445-4702	PL1445-4703
100 g	10	PL1445-4102	PL1445-4102

**技巧和工具**

用于从前处理到工艺开发的 PL-SAX 和 PL-SCX 色谱柱和散装填料。

参见第 190–195 页。



## Bio-Monolith 离子交换 HPLC 色谱柱

- 基于聚合物的 Monolith HPLC 色谱柱专为分离生物大分子而设计
- 分离不受流速影响；无扩散、无微孔、无死体积，使流动相和固定相之间的传质非常迅速
- Monolith 盘为 5.2 mm × 4.95 mm (100 μL 柱容量)，带有连续的通道，可消除传质扩散
- 极快的分离速度可加快方法开发，降低成本；锁定方法参数显著缩短了时间，节省了缓冲液

Bio-Monolith 离子交换 HPLC 色谱柱可为抗体 (IgG 和 IgM)、质粒 DNA、病毒、噬菌体和其他生物大分子提供高分离度的快速分离。该产品系列提供强阳离子交换、强和弱阴离子交换，以及 Protein A 固定相。Bio-Monolith HPLC 色谱柱与 InfinityLab 液相色谱系列兼容。



Bio-Monolith 离子交换 HPLC  
色谱柱

### Bio-Monolith HPLC 色谱柱选择指南

色谱柱	说明	主要应用	部件号
Bio-Monolith QA	季铵键合相（强阴离子交换）在 pH 2–13 操作范围内全部带电荷，结合带负电荷的生物大分子。	<ul style="list-style-type: none"><li>- 腺病毒工艺监控和质量控制</li><li>- IgM 纯化监测和质量控制</li><li>- 监测 DNA 杂质去除</li><li>- 监测内毒素去除</li><li>- HSA 纯度</li></ul>	5069-3635
Bio-Monolith DEAE	二乙氨基乙基键合相（弱阴离子交换）在 pH 3–9 操作范围带负电荷，提高了生物大分子的选择性。	<ul style="list-style-type: none"><li>- 细菌噬菌体生产和纯化的监测和质量控制</li><li>- 质粒 DNA 纯化的监测和质量控制</li></ul>	5069-3636
Bio-Monolith SO <sub>3</sub>	磺酰基键合相（强阳离子交换）在 pH 2–13 操作范围内全部带电荷，结合带正电荷的生物大分子。	<ul style="list-style-type: none"><li>- 大分子（如蛋白质和抗体）的快速、高分离度分析分离</li><li>- 血红素 A1c 的快速分析</li></ul>	5069-3637

**色谱柱性能指标**

尺寸	5.2 mm × 4.95 mm
色谱柱体积	100 μL
最大压力	150 bar (15 MPa, 2200 psi)
最低温度/最高温度	操作温度: 2–40 °C 储存: 2–8 °C
推荐 pH	操作范围: 2–13 原位清洗: 1–14
结构材料	硬件: 不锈钢 包装: 聚(环氧丙基甲基丙烯酸酯-co-乙二醇二甲基丙烯酸酯) 高孔隙率整体柱
彩带标识:	Bio-Monolith QA: 蓝色 Bio-Monolith DEAE: 绿色 Bio-Monolith SO <sub>3</sub> : 红色
保质期/有效期	SO <sub>3</sub> , QA, DEAE: 24–36 个月

# 电荷异构体分析

## 蛋白质标准品分离的基线延长

色谱柱： Bio-Monolith CM15, 5.5 × 15 mm

流动相： A: 10 mmol/L 磷酸氢二钠, pH 6.0

B: A + 500 mmol/L 氯化钠或仅 500 mmol/L 磷酸氢二钠, pH 6.0

流速： 2 mL/min

梯度： 流动相 A 保持 0.5 min, 然后在 15 min 内 B 以线性梯度升至 45% (运行时间 15.5 min), 然后在 15.6 min 至 20 min 内 B 升至 60%。在针对下次运行再平衡之前, 用 100% B 冲洗色谱柱 15 min。

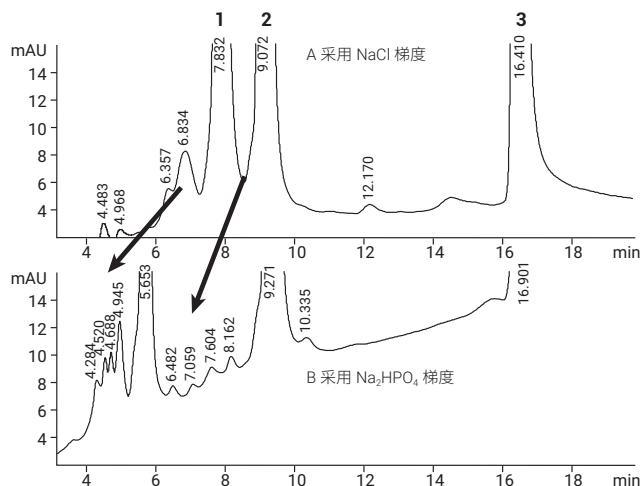
pH 梯度： A: 5 mmol/L 磷酸氢二钠, 缓冲液, pH 5.5 和 B: 40 mmol/L 磷酸氢二钠 (不经缓冲, pH 8.9)。以 1 mL/min 流速用 2% B/min 洗脱 15 min, 然后用 90% B 冲洗色谱柱 5 min。

检测器： UV, 220 nm

样品： 各 1 mg/mL, 用流动相 A 溶解

1. 从牛胰腺提取的核糖核酸酶 (pI 9.6)
2. 从牛心提取的细胞色素 C (pI 10.37–10.8)
3. 从鸡蛋中提取的溶菌酶 (pI 11.35) (0.5 mg)

仪器： 配备二极管阵列检测器的 1200 Infinity 系列



B 显示对蛋白污染物具有更好的分离度

## 监测发酵过程中噬菌体的产生

色谱柱： Bio-Monolith DEAE

5069-3636

5.2 × 4.95 mm

流动相： A: 125 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.0

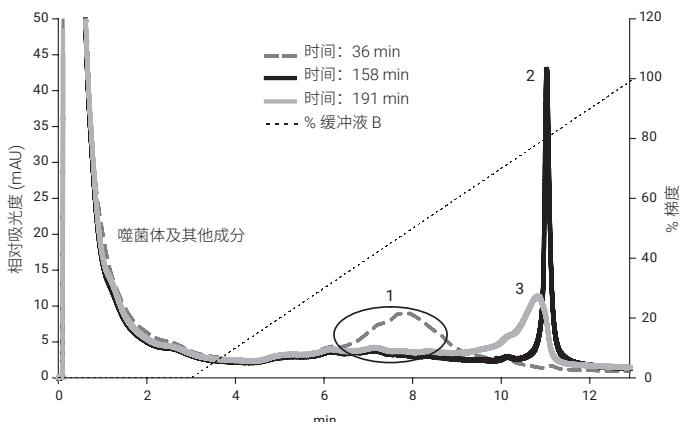
B: 125 mmol/L 磷酸钠缓冲液 + 1 mol/L 氯化钠,  
pH 7.0

流速： 1 mL/min

梯度： 100% 缓冲液 A (2.5 min)  
0–100% 缓冲液 B (10 min)  
100% 缓冲液 A (2 min)

检测器： UV, 280 nm

仪器： 高压梯度 HPLC 系统, Agilent 1200 Infinity 系列



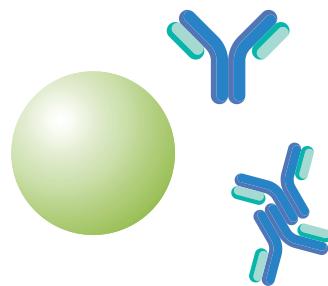
在噬菌体增殖期间，基因组 DNA (gDNA) 的浓度在宿主细胞溶解时上升。在发酵后期，gDNA 开始降解为碎片。这些 gDNA 片段被纯化介质去除，因此在 gDNA 降解之前中止发酵至关重要。上面的色谱图代表了分别在 36、158 和 191 min 时从生物反应器中取出的三个样品。峰 1 代表噬菌体、介质和宿主细胞，峰 2 代表完整 gDNA，峰 3 代表 gDNA 碎片。



# 聚集体与片段分析

## 准确测定生物分子聚集、碎裂和化学配基/修饰

体积排阻色谱 (SEC) 是一种使用水相洗脱液基于尺寸分离蛋白质、寡核苷酸和其他复杂生物聚合物的技术。具体地，它是定量分析蛋白质生物治疗药物中存在的聚集物的重要工具。生物药物（例如单克隆抗体）的生产是一个复杂的过程，而蛋白质聚集是细胞培养、分离、纯化和配制过程中可能出现的问题。二聚体及更高程度聚集体的存在会影响最终产品的有效性和安全性；必须在工艺开发过程中对聚集体含量进行定量分析以确定产品的关键质量属性 (CQA)，以及在最终产品表征过程中确保使聚集程度最小化并控制在安全水平。



## 应用 SEC 进行聚集体分析

蛋白质类生物药物中聚集体的尺寸、类型和含量会对药效和配方产生影响，有时甚至会引起免疫反应等严重后果。聚集体的形成有多种机制，包括形成二硫键和发生非共价相互作用。

由于蛋白质聚集体（包括二聚体）的尺寸与蛋白质单体有很大区别，因此可以使用 SEC 分离这些不同形式的蛋白质。事实上，SEC 结合 UV 或光散射检测是定量检测蛋白质聚集体和测定分子量的标准技术。

## 应用 SEC 进行定量分析和分子量测定

对于蛋白质和其他离散分子量的分子，用 SEC 可以对单体、二聚体、聚合体和片段进行检测和定量。SEC 还可以分离寡核苷酸混合物。

对于含有不同碳链长度的生物聚合物，例如淀粉及其他多糖，SEC 可提供有关分子量分布和分支的数据（使用适当的检测器）。

安捷伦作为有 30 多年 SEC 色谱柱和仪器生产经验的领先企业，不断开发能够提供更高分离度和更快分离速度的新型 SEC 产品。本节将着重介绍用于蛋白质生物聚合物分析的各种安捷伦 SEC 系列色谱柱：

- AdvanceBio SEC 有两种填料粒径可供选择，适用于 SEC-UV 或 SEC-LS 测量。2.7  $\mu\text{m}$  颗粒有 130  $\text{\AA}$  或 300  $\text{\AA}$  孔径可供选择，可覆盖各种样品量。1.9  $\mu\text{m}$  颗粒具有 200  $\text{\AA}$  的孔径，并提供最高的分离度。两种颗粒均具有亲水性聚合物涂层，最大程度减小次级相互作用。这使它们对 ADC 等挑战性样品以及常规分析而言非常稳定
- Bio SEC-3 和 Bio SEC-5 色谱柱有多种孔径可供选择，非常适合于利用 UV 或 MS 检测进行蛋白质分析，尤其是治疗性生物分子中二聚体和聚集体的测定。请注意，3  $\mu\text{m}$  Bio SEC-3 色谱柱与行业标准的 5  $\mu\text{m}$  Bio SEC-5 色谱柱相比，能提供更高的分离度
- ProSEC 300S 色谱柱在高盐条件下能很好地分离球蛋白
- ZORBAX GF-250 和 GF-450 色谱柱是在方案仍要求使用 USP 指定产品 L35 时应采用的老式产品。或者，我们建议使用 Bio SEC 色谱柱以提高性能
- PL aquagel-OH 色谱柱可用于分析宽分子量范围的生物聚合物，例如 PEG、寡糖和多糖、淀粉和树脂。请参见“水相和极性 GPC/SEC 色谱柱产品指南”（出版物 5990-7995CHCN）

## 体积排阻色谱 (SEC)

应用	安捷伦色谱柱	备注	USP 指定产品
肽、蛋白质、聚集体分析	AdvanceBio SEC	稳定的亲水性聚合物涂层产生最小的次级相互作用；2.7 μm 颗粒具有 130 Å 或 300 Å 孔径，或 1.9 μm 颗粒具有 200 Å 的孔径以实现最高分离度。	L59
	Bio SEC-3	采用 3 μm 填料，100 Å、150 Å 和 300 Å 孔径可选，能够提供更高的分离度和更快速的分离。	L59
大生物分子及含有多种分子量组成的样品	Bio SEC-5	有更多孔径可供选择（100 Å、150 Å、300 Å、500 Å、1000 Å 及 2000 Å），能够覆盖更宽的分析物范围。	L59
球蛋白，抗体	ProSEC 300S	高盐浓度下蛋白质分析的单色谱柱选项。	L33
蛋白质，球蛋白	ZORBAX GF-250/450	在方案仍要求使用 USP 指定产品 L35 时应采用的老式产品。	L35

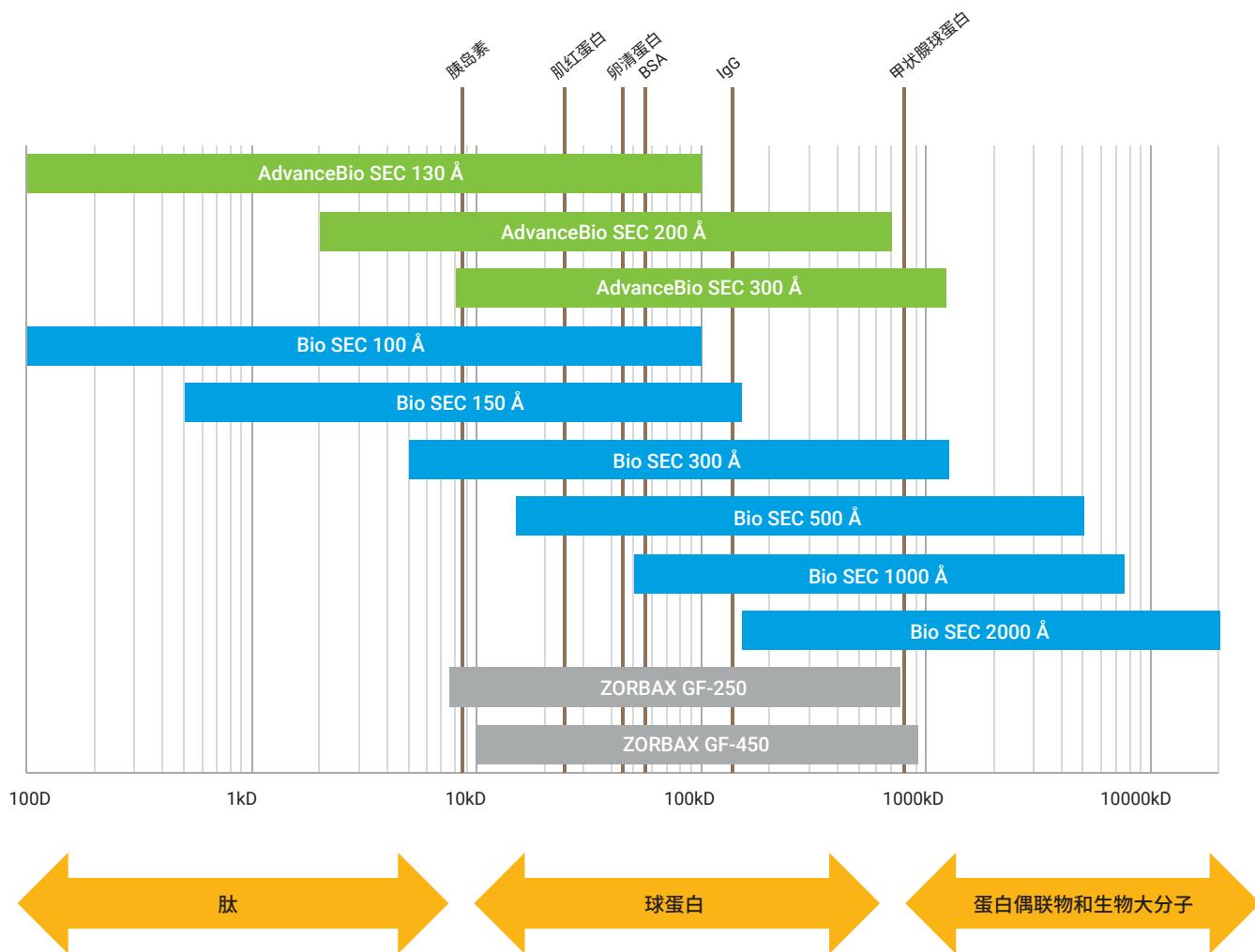
## 技巧和工具

使用安捷伦溶剂过滤器除去自行制备的缓冲液和流动相中的颗粒。

请访问：[www.agilent.com/chem/solvent-filters-degassers](http://www.agilent.com/chem/solvent-filters-degassers)

## 哪一种体积排阻色谱柱适合您的应用？

您可以基于您的分析物和方法参数，从安捷伦范围广泛的尺寸排阻色谱柱中，选择适合您的色谱柱，实现完美分离。本图为您提供实现常见分子类型最佳分离结果的孔径范围概览。我们建议使用 AdvanceBio SEC 色谱柱进行初次方法开发。





## AdvanceBio SEC

AdvanceBio SEC 色谱柱能够实现 mAb 聚集体的准确定量与蛋白质分析。这些创新的体积排阻色谱柱由安捷伦设计和制造，可提供避免样品重复分析的稳定、可靠的方法，从而提高实验室分析效率。不同色谱柱、不同批次以及不同实验室均可获得一致结果，确保方法可以跨部门和地区转移，有助于消除不确定性。

- 更快的分析速度助您按时交付结果
- 更高的分离度实现更准确的定量
- 更高的灵敏度可实现低浓度聚集体的定量分析
- 更高的重现性可避免重复工作
- 专门设计用于 AdvanceBio SEC 色谱柱的标准品，可提供最佳的校准和性能验证

### 色谱柱性能指标

孔径	填料粒径	分子量范围	pH 范围	最大压力	流速
130 Å	2.7 µm	100–120000	2–8.5	400 bar (典型操作压力 < 200 bar)	0.1–2.0 mL/min (内径 7.8 mm)
					0.1–0.7 mL/min (内径 4.6 mm)
300 Å	2.7 µm	5000–1250000	2–8.5	400 bar (典型操作压力 < 200 bar)	0.1–2.0 mL/min (内径 7.8 mm)
					0.1–0.7 mL/min (内径 4.6 mm)
200 Å	1.9 µm	2000–700000	2–8	620 bar	0.1–0.7 mL/min (4.6 × 150 mm)
					0.1–0.5 mL/min (4.6 × 300 mm)



**AdvanceBio SEC, 2.7 µm**

说明	130 Å	300 Å
<b>分析柱</b>		
4.6 × 300 mm, 2.7 µm	PL1580-5350	PL1580-5301
4.6 × 150 mm, 2.7 µm	PL1580-3350	PL1580-3301
7.8 × 300 mm, 2.7 µm	PL1180-5350	PL1180-5301
7.8 × 150 mm, 2.7 µm	PL1180-3350	PL1180-3301
<b>分析型保护柱</b>		
4.6 × 50 mm, 2.7 µm	PL1580-1350	PL1580-1301
7.8 × 50 mm, 2.7 µm	PL1180-1350	PL1180-1301

**AdvanceBio SEC, 1.9 µm**

说明	200 Å
<b>分析柱</b>	
4.6 × 300 mm, 1.9 µm	PL1580-5201
4.6 × 150 mm, 1.9 µm	PL1580-3201
<b>保护柱</b>	
4.6 × 30 mm, 1.9 µm	PL1580-1201

**实验室真实案例****降低复杂性，提高实验室效益**

了解 CrossLab 团队如何帮助大型制药实验室管理来自不同制造商的不同类型的仪器。

[www.agilent.com/chem/story92](http://www.agilent.com/chem/story92)

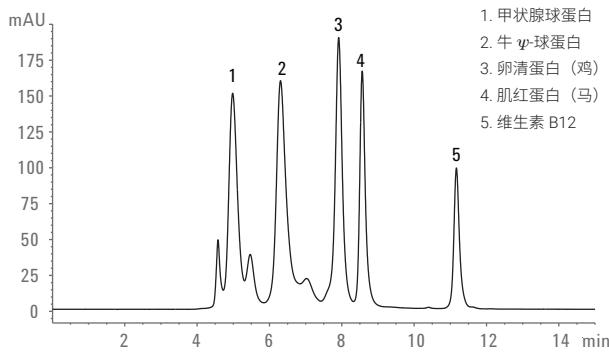
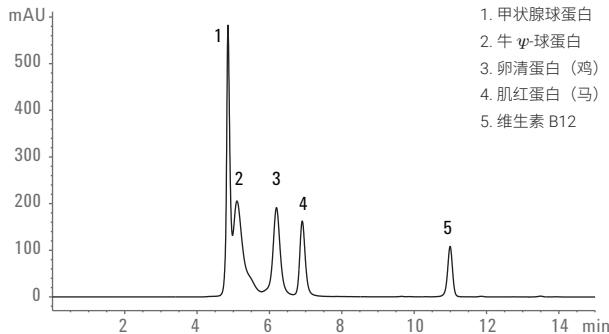


## SEC 分子量标准品分离

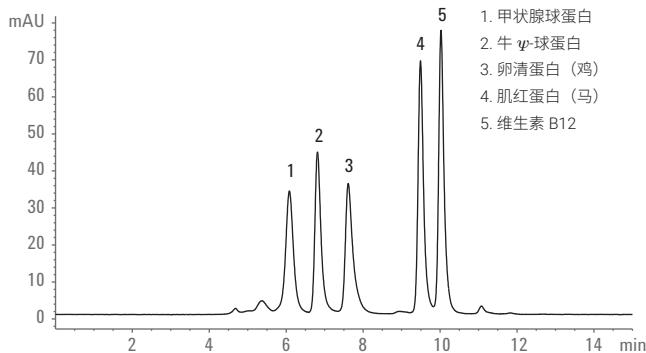
色谱柱： AdvanceBio SEC  
7.8 × 300 mm

样品： BioRad Gel 凝胶过滤标准品 #1511901

流动相： A: 150 mmol/L 磷酸钠， pH 7.0



AdvanceBio SEC 300 Å 和 130 Å 色谱柱对 BioRad 凝胶过滤混标的分离结果。300 Å 色谱柱可提高分离度



AdvanceBio SEC 130 Å 色谱柱对蛋白质和多肽混合物的分离结果，显示其对小分子多肽和蛋白质的分离度

## AdvanceBio SEC 推荐的初始条件

**色谱柱:** AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 µm  
**7.8 × 300 mm**  
**(部件号 PL1180-5301)**

**流速:** 1 mL/min

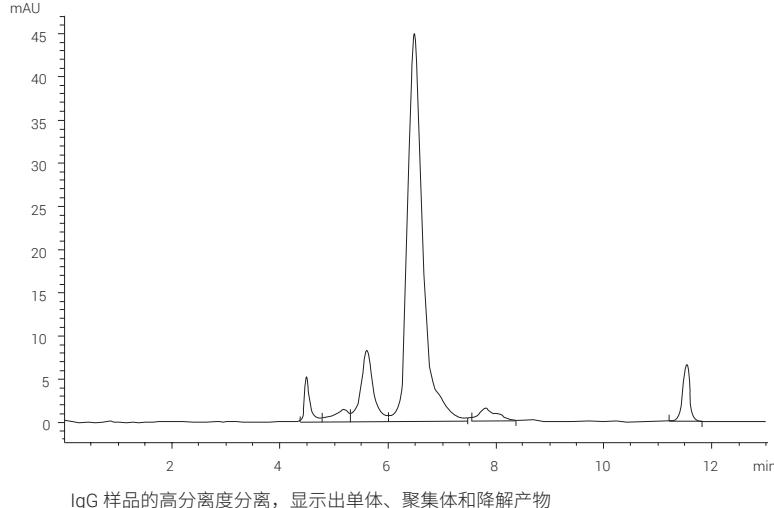
**流动相:** 150 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0

**波长:** 220 nm

**温度:** 室温

**进样量:** 5 µL

**样品:** IgG



## AdvanceBio SEC 2.7 µm 操作参数

**流动相兼容性** 150 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0 (推荐的初始条件)

可使用高盐含量和低盐含量的其他水相缓冲液

可使用水与乙腈的混合物

(检查缓冲液成分的溶解度和系统压力)

**pH 稳定性**

2–8.5

**操作温度**

20–30 °C (推荐温度)

80 °C (最高温度)

**常规操作压力**

< 200 bar (2900 psi) (单柱)

**最大压力**

400 bar (5800 psi)

**工作流速**

对于内径 7.8 mm 的色谱柱, 采用 0.1–2.0 mL/min (推荐)

对于内径 4.6 mm 的色谱柱, 采用 0.1–0.7 mL/min (推荐)

对于串联的两根色谱柱, 可能需要降低压力, 以确保最大压力不超过 400 bar (5800 psi)

**注:** 在极端操作参数下运行色谱柱可能会缩短色谱柱寿命

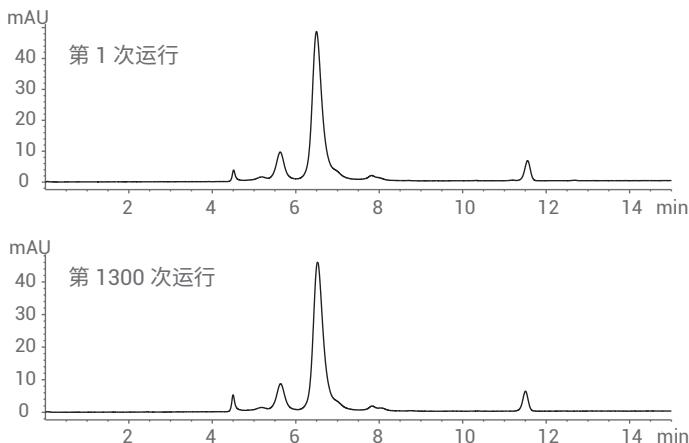
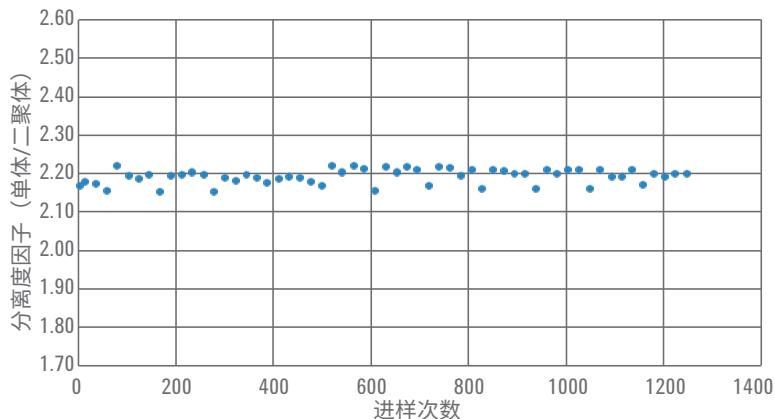
## 聚集体与片段分析

色谱柱： AdvanceBio SEC  
300 Å 7.8 × 300 mm

流动相： 150 mmol/L 磷酸钠，pH 7.0

样品： IgG

1300 次进样序列中 IgG 单体和二聚体的分离度图。



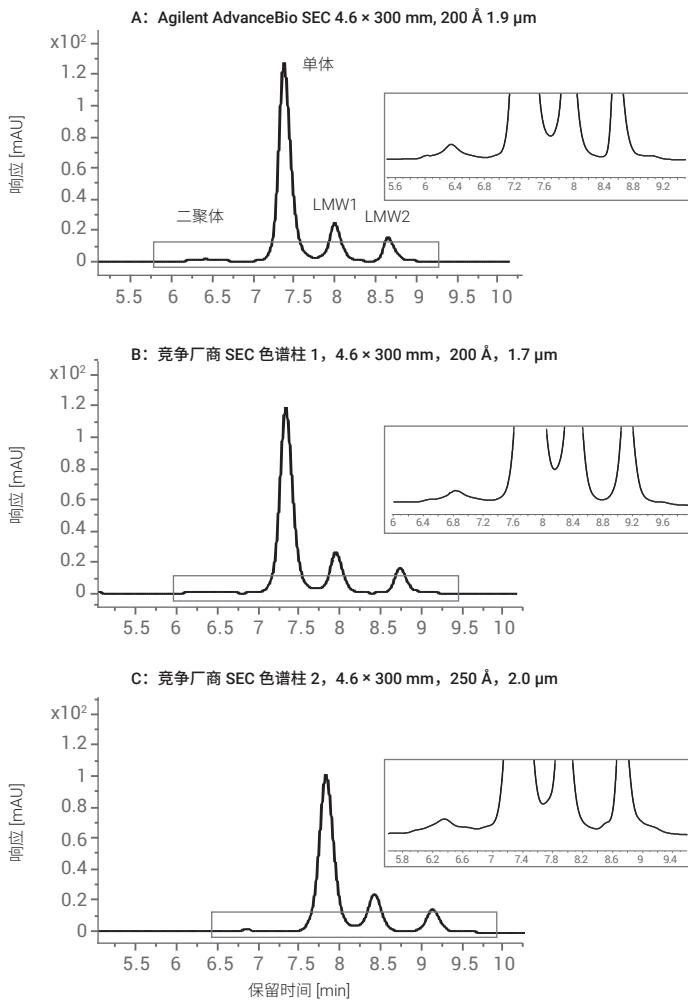
IgG 样品的分析结果即使在 1300 次进样后仍未发生改变。在整个色谱柱使用寿命的工作范围内，IgG 单体与二聚体的分离度因子和定量结果也保持不变

**AdvanceBio SEC, 1.9  $\mu\text{m}$** 

仪器：	1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统
软件：	Agilent OpenLab CDS
流速：	0.35 mL/min
洗脱液：	50 mmol/L 磷酸钠, 200 mmol/L NaCl, pH 7.0
柱温：	25 °C
进样量：	1 $\mu\text{L}$
检测：	UV, 220 nm

经过安捷伦独有的亲水键合化学技术修饰的 1.9  $\mu\text{m}$  硅胶颗粒填料可确保高分离度和高效分离。此外，它们能最大程度减少与 mAb、ADC 及其他蛋白质的次级相互作用。

与竞争厂商的色谱柱相比，AdvanceBio SEC 色谱柱具有更好的分离度和更高的分离效率。



SigmaMAb（与 LMW1 和 LMW2 片段混合）的体积排阻色谱图

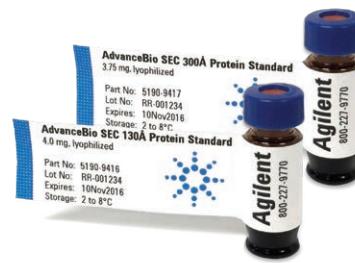
	半峰宽			分离度		反压 (bar)
	单体	LMW1	LMW2	二聚体/单体	单体/LMW1	
Agilent Advance Bio SEC 1.9 $\mu\text{m}$	0.159	0.154	0.148	2.79	2.28	340
竞争厂商 SEC 色谱柱 1	0.172	0.166	0.160	2.46	2.09	354
竞争厂商 SEC 色谱柱 2	0.194	0.182	0.169	2.49	1.83	260



## AdvanceBio SEC 标准品

### 130 Å AdvanceBio SEC 蛋白质标准品

含 5 种精选蛋白质（卵清蛋白、肌红蛋白、抑肽酶、神经降压素、血管紧张素 II）的蛋白质混合物，适用于校准 Agilent 130 Å AdvanceBio 体积排阻色谱柱。该标准品可用于常规色谱柱校准，以确保涉及蛋白质纯化与分析的多种应用可在理想的系统性能下进行。



AdvanceBio SEC 蛋白质标准品，  
部件号 5190-9416 和部件号 5190-9417

### 300 Å AdvanceBio SEC 蛋白质标准品

含 5 种精选蛋白质（甲状腺球蛋白、γ-球蛋白、卵清蛋白、肌红蛋白、血管紧张素 II）的蛋白质混合物，适用于校准 Agilent 300 Å AdvanceBio 体积排阻色谱柱。该标准品可用于常规色谱柱校准，以确保涉及蛋白质纯化与分析的多种应用可在理想的系统性能下进行。

### AdvanceBio SEC 标准品

说明	规格	部件号
130 Å	1.5 mL 样品瓶	5190-9416
300 Å	1.5 mL 样品瓶	5190-9417

## Bio SEC-3

在更快速的肽和蛋白质分离中实现更高的分离度

Bio SEC-3 色谱柱因其填料尺寸小且高效，所以在速度和分离度方面比其他体积排阻色谱柱更有优势。

- 比大粒径 SEC 柱的分离速度更快
- 高分离度：更尖锐的色谱峰及更出色的蛋白质回收率
- 优异的上样容量和回收率：得益于其专利亲水层
- 灵活的方法开发：与大多数水相缓冲液兼容
- 在高盐和低盐条件下均具有出色的稳定性
- 性能可靠、一致：填料分散窄；专利亲水层最大限度地减少了次级相互作用
- 高稳定性填料：与包括蒸发光散射在内的多种检测器兼容
- 与 MS 兼容



Bio SEC-3 色谱柱帮助您获得一致性更高的 SEC 分离。每根色谱柱都填充了球形、粒径分散窄的 3 μm 硅胶颗粒，表面涂覆专利亲水聚合物层，以确保高回收率，并最大限度地减少次级相互作用、提供一致性更好的分离。这层很薄的聚合物层在控制条件下化学键合到机械稳定的纯硅胶表面，以确保得到高效的体积排阻填料。

## 技巧和工具

去活/硅烷化样品瓶拥有不与金属、生物分子或蛋白质发生相互作用，也不会引起 pH 值偏移的惰性表面。

生物分子或光敏化合物禁止使用标准的聚丙烯样品瓶。

## 聚集体与片段分析



### 色谱柱性能指标

孔径	填料粒径	分子量范围	pH 范围	最大压力	流速
100 Å	3 µm	100–100000	2–8.5	137 bar, 2000 psi	1.0–10.0 mL/min (内径 21.2 mm)
					0.2–1.2 mL/min (内径 7.8 mm)
					0.1–0.4 mL/min (内径 4.6 mm)
150 Å	3 µm	500–150000	2–8.5	137 bar, 2000 psi	1.0–10.0 mL/min (内径 21.2 mm)
					0.2–1.2 mL/min (内径 7.8 mm)
					0.1–0.4 mL/min (内径 4.6 mm)
300 Å	3 µm	5000–1250000	2–8.5	137 bar, 2000 psi	1.0–10.0 mL/min (内径 21.2 mm)
					0.2–1.2 mL/min (内径 7.8 mm)
					0.1–0.4 mL/min (内径 4.6 mm)



### 校准曲线 — Bio SEC-3

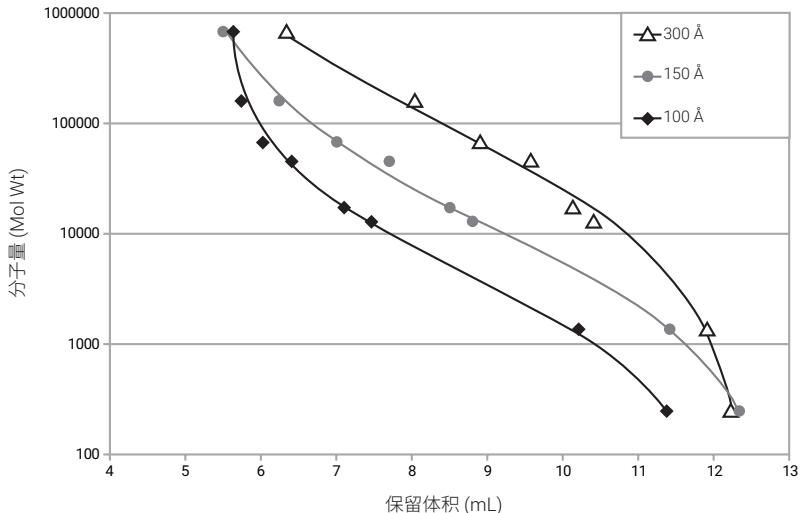
色谱柱: Bio SEC-3  
7.8 × 300 mm, 3 μm

流动相: 磷酸钠 150 mmol/L, pH 7.0

流速: 1.0 mL/min

检测器: UV

蛋白质	分子量	孔径		
		300 Å	150 Å	100 Å
甲状腺球蛋白	670000	6.34	5.50	5.63
γ-球蛋白	150000	8.03	6.24	5.74
BSA	67000	8.90	7.00	6.03
卵清蛋白	45000	9.57	7.70	6.41
肌红蛋白	17000	10.12	8.50	7.10
核糖核酸酶 A	12700	10.40	8.80	7.46
维生素 B12	1350	11.90	11.40	10.20



填料孔径的选择将影响 SEC 的分离度。由于分离基于溶液中分子大小的差异，因此样品必须能够进入到填料的多孔结构中。如果孔径太小，样品组分都被排阻在孔隙之外，将在死体积内被洗脱，而如果孔径太大，各组分都能完全渗透到填料孔隙中，将很难实现分离。

### 孔径选择：蛋白质

色谱柱 A: Bio SEC-3, 100 Å  
5190-2503

4.6 × 300 mm, 3 µm

色谱柱 B: Bio SEC-3, 100 Å  
5190-2508

4.6 × 300 mm, 3 µm

色谱柱 C: Bio SEC-3, 100 Å  
5190-2513

4.6 × 300 mm, 3 µm

流动相: 磷酸钠 100 mmol/L + 氯化钠 150 mmol/L, pH 6.8

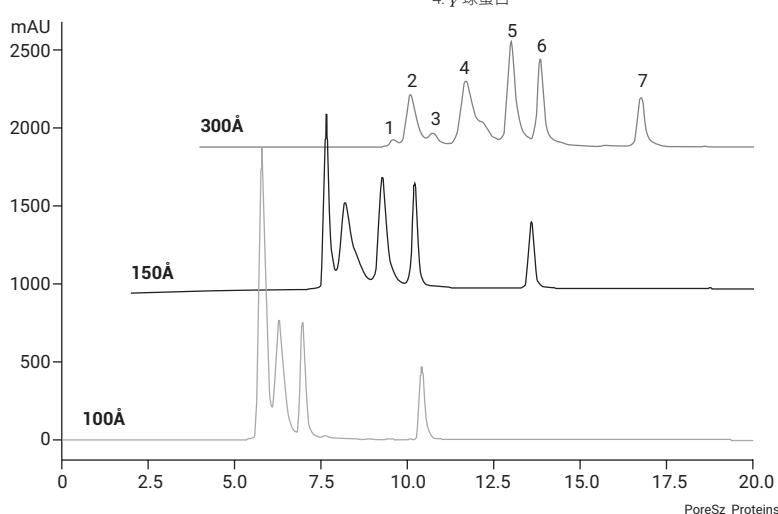
流速: 0.35 mL/min

梯度: 4 min 内 B 由 10% 升至 58%，以 95% B 淋洗 1 min，并以 10% B 再平衡 1 min

检测器: UV, 220 nm

样品: Bio-Rad 凝胶过滤混标

- 1. 甲状腺球蛋白聚集体
- 5. 卵清蛋白
- 2. 甲状腺球蛋白
- 6. 肌红蛋白
- 3. IgA
- 7. 维生素 B12
- 4. γ-球蛋白



**孔径选择：小鼠 IgG**

色谱柱 A: Bio SEC-3, 100 Å  
5190-2503  
4.6 × 300 mm, 3 µm

色谱柱 B: Bio SEC-3, 100 Å  
5190-2508  
4.6 × 300 mm, 3 µm

色谱柱 C: Bio SEC-3, 100 Å  
5190-2513  
4.6 × 300 mm, 3 µm

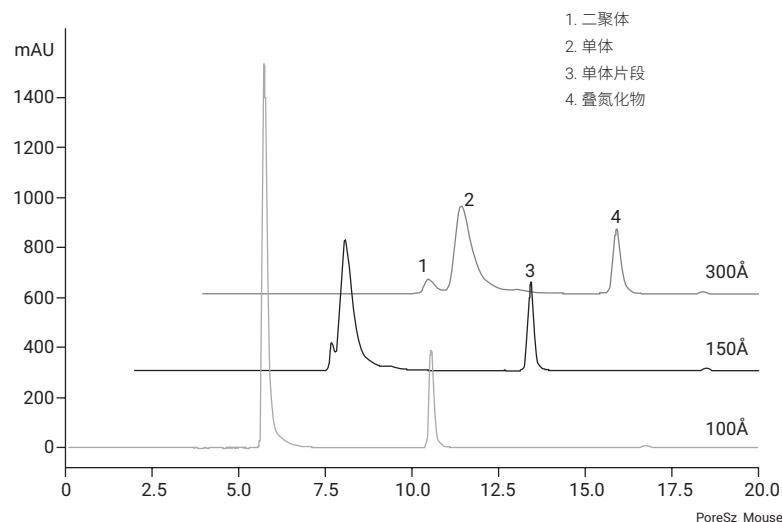
流动相: 磷酸钠 100 mmol/L + 氯化钠 150 mmol/L, pH 6.8

流速: 0.35 mL/min

梯度: 4 min 内 B 由 10% 升至 58%, 以 95% B 淋洗 1 min,  
并以 10% B 再平衡 1 min

检测器: UV, 220 nm

样品: 小鼠 IgG



## Bio SEC-3

规格 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	Bio SEC-3	Bio SEC-3	Bio SEC-3
		100 Å USP L59	150 Å USP L59	300 Å USP L59
21.2 × 300	3	5190-6850	5190-6851	5190-6852
21.2 × 50, 保护柱	3	5190-6854	5190-6855	5190-6856
7.8 × 300	3	5190-2501	5190-2506	5190-2511
7.8 × 150	3	5190-2502	5190-2507	5190-2512
7.8 × 50, 保护柱	3	5190-2505	5190-2510	5190-2515
4.6 × 300	3	5190-2503	5190-2508	5190-2513
4.6 × 150	3	5190-2504	5190-2509	5190-2514
4.6 × 50, 保护柱	3	5190-6846	5190-6847	5190-6848

## 技巧和工具

如需了解使用 1260 Infinity 多检测器 Bio-SEC 解决方案与 BioSEC-3 色谱柱进行分子量测定和聚集体分析的更多信息，请参见：

*Detailed Aggregation Characterization of Monoclonal Antibodies Using the Agilent 1260 Infinity Multi-Detector Bio-SEC Solution with Advanced Light Scattering Detection* (利用 Agilent 1260 Infinity 多检测器 Bio-SEC 解决方案的先进的光散射检测功能对单克隆抗体进行详细的聚集体表征) (出版号 5991-3954EN)，以及 *Determination of Protein Molecular Weight and Size Using the Agilent 1260 Infinity Multi-Detector Bio-SEC Solution with Advanced Light Scattering Detection* (利用 Agilent 1260 Infinity 多检测器 Bio-SEC 解决方案和先进的光散射检测功能测定蛋白质分子量和分子大小) (出版号 5991-3955EN)

[www.agilent.com/search](http://www.agilent.com/search)

## Bio SEC-5

- 具有适用于大分子的出色分离度
- 专利的中性亲水聚合物层可实现高稳定性和效率
- 为增加孔容量特别设计的填料改善了峰容量和分离度
- 性能稳定：卓越的重现性和色谱柱寿命
- 即使在高 pH、高盐和低盐条件下也具有优异的稳定性
- 灵活的方法开发：与大多数水相缓冲液兼容
- 用途广泛：孔径高达 2000 Å，适用于疫苗和高分子量生物分子的分离
- 与 MS 兼容



对于分离含多个分子量的生物大分子和样品来说，Bio SEC-5 色谱柱是理想的选择。

它们填充以 5 μm 硅胶填料，涂覆有确保最高柱效和稳定性的专利中性亲水聚合物层，有 6 种不同孔径，以便在不同分子量范围时优化分离度。

### 色谱柱性能指标

孔径	填料粒径	分子量范围	pH 范围	最大压力	流速
100 Å	5 μm	100–100000	2–8.5	137 bar, 2000 psi	1.0–10.0 mL/min (内径 21.2 mm)
					0.2–1.2 mL/min (内径 7.8 mm)
					0.1–0.4 mL/min (内径 4.6 mm)
150 Å	5 μm	500–150000	2–8.5	137 bar, 2000 psi	1.0–10.0 mL/min (内径 21.2 mm)
					0.2–1.2 mL/min (内径 7.8 mm)
					0.1–0.4 mL/min (内径 4.6 mm)
300 Å	5 μm	5000–1250000	2–8.5	137 bar, 2000 psi	1.0–10.0 mL/min (内径 21.2 mm)
					0.2–1.2 mL/min (内径 7.8 mm)
					0.1–0.4 mL/min (内径 4.6 mm)
500 Å	5 μm	15000–5000000	2–8.5	137 bar, 2000 psi	1.0–10.0 mL/min (内径 21.2 mm)
					0.2–1.2 mL/min (内径 7.8 mm)
					0.1–0.4 mL/min (内径 4.6 mm)
1000 Å	5 μm	50000–7500000	2–8.5	137 bar, 2000 psi	1.0–10.0 mL/min (内径 21.2 mm)
					0.2–1.2 mL/min (内径 7.8 mm)
					0.1–0.4 mL/min (内径 4.6 mm)
2000 Å	5 μm	> 10000000	2–8.5	137 bar, 2000 psi	1.0–10.0 mL/min (内径 21.2 mm)
					0.2–1.2 mL/min (内径 7.8 mm)
					0.1–0.4 mL/min (内径 4.6 mm)

## 比较 Bio SEC-3 和 Bio SEC-5

### 单克隆抗体分析

色谱柱: Bio SEC-3, 300 Å  
5190-2511  
7.8 × 300 mm, 3 µm

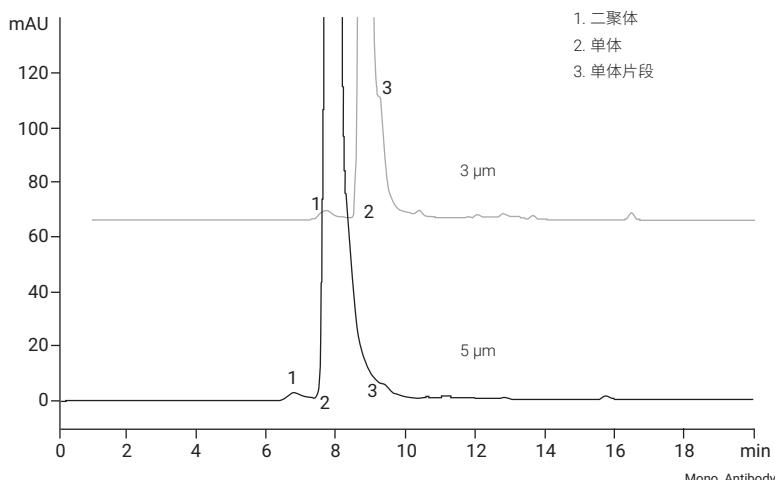
色谱柱: Bio SEC-5, 300 Å  
5190-2526  
7.8 × 300 mm, 5 µm

流动相: 磷酸钠 150 mmol/L, pH 7.0

流速: 1 mL/min

检测器: UV, 220 nm

样品: 人源化单克隆抗体



3 µm 色谱柱能够提供更高分离度的碎裂模式

## 技巧和工具

在开发蛋白质的聚集体分析时，需要考虑许多因素：溶质大小和分子量的影响、色谱柱选择、重要流动相注意事项等。有关上述全部内容的指南，请参见：

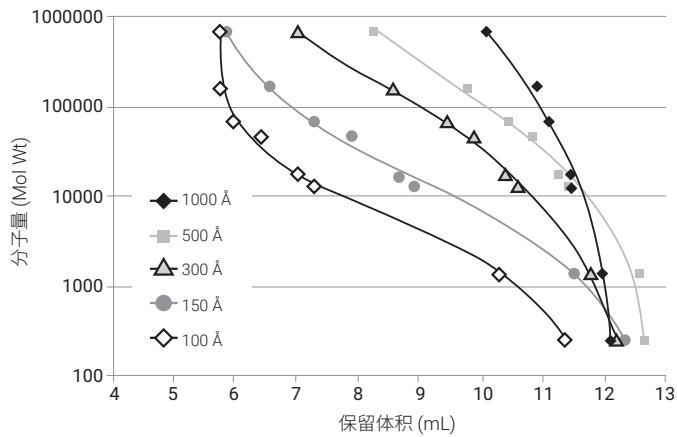
生物分子分析体积排阻色谱：使用指南（出版号 5991-3651CHCN）

[www.agilent.com/search](http://www.agilent.com/search)

## 校准曲线 — Bio SEC-5

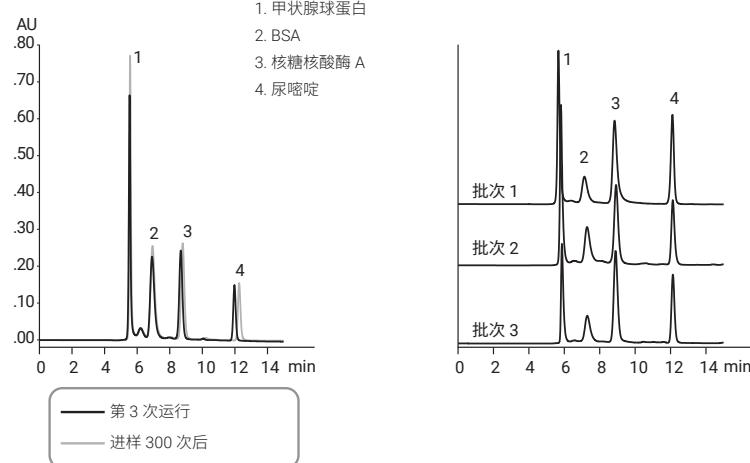
色谱柱: Bio SEC-5  
7.8 × 300 mm, 5 μm  
流动相: 磷酸钠 150 mmol/L, pH 7.0  
流速: 1.0 mL/min  
检测器: UV, 214 nm

蛋白质	分子量	保留体积				
		1000 Å	500 Å	300 Å	150 Å	100 Å
甲状腺球蛋白	670000	10.07	8.23	7.03	5.82	5.77
γ-球蛋白	150000	10.88	9.80	8.57	6.55	5.79
BSA	67000	11.13	10.44	9.44	7.29	6.00
卵清蛋白	45000	11.28	10.83	9.89	7.90	6.40
肌红蛋白	17000	11.44	11.28	10.42	8.66	7.05
核糖核酸酶 A	12700	11.52	11.41	10.58	8.93	7.32
维生素 B12	1350	12.00	12.59	11.78	11.49	10.30
尿嘧啶 (总渗透标准品)	112	12.08	12.68	12.21	12.13	11.41



## 无与伦比的批次间重现性

色谱柱: Bio SEC-5, 150 Å  
5190-2521  
7.8 × 300 mm, 5 μm  
流动相: 磷酸钠 150 mmol/L, pH 7.0



含 4 种蛋白质的混合物在色谱柱上进样 300 多次后的色谱结果以及在不同生产批号的 3 种色谱柱上分析的色谱结果均显示出优异的保留时间重现性

## 聚集体与片段分析



### Bio SEC-5

规格 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	Bio SEC-5	Bio SEC-5				
		100 Å USP L59	150 Å USP L59	300 Å USP L59	500 Å USP L59	1000 Å USP L59	2000 Å USP L59
21.2 × 300	5	5190-6863	5190-6864	5190-6865	5190-6866	5190-6867	5190-6868
21.2 × 50, 保护柱	5	5190-6869	5190-6870	5190-6871	5190-6872	5190-6873	5190-6874
7.8 × 300	5	5190-2516	5190-2521	5190-2526	5190-2531	5190-2536	5190-2541
7.8 × 150	5	5190-2517	5190-2522	5190-2527	5190-2532	5190-2537	5190-2542
7.8 × 50, 保护柱	5	5190-2520	5190-2525	5190-2530	5190-2535	5190-2540	5190-2545
4.6 × 300	5	5190-2518	5190-2523	5190-2528	5190-2533	5190-2538	5190-2543
4.6 × 150	5	5190-2519	5190-2524	5190-2529	5190-2534	5190-2539	5190-2544
4.6 × 50, 保护柱	5	5190-6857	5190-6858	5190-6859	5190-6860	5190-6861	5190-6862

### 技巧和工具

将 SEC 技术更新为 AdvanceBio SEC 300 Å，可获得更高的分离度和更少的次级相互作用。

有关更多信息，请参见第 110 页。

## ProSEC 300S

- 性能稳定：机械性能稳定的硅胶填料，在使用过程中不会流失
- 轻松实现方法开发：扩展了线性分离范围，无需进行孔径选择 — 可使用单柱分析大多数球蛋白
- 帮助完善您的分离的选择：两种色谱柱内径适用于多检测器 SEC
- 提高灵敏度：与光散射检测器一起使用，可鉴定二聚体、三聚体和聚集体



ProSEC 300S 色谱柱是专为球蛋白质分析而设计的单柱解决方案。孔径的选择和优化扩展了线性分离范围，从而可以用这一根色谱柱分离全部的球蛋白。

填料极为稳定耐用，不会在使用过程中碎裂而渗漏出颗粒。这确保了极其稳定的基线，使这种色谱柱成为使用光散射检测器时的首选。

7.5 mm 内径和 4.6 mm 内径两种规格，适用于多检测器尺寸排阻色谱，为小质量分子的分析提供了一种选择。

### ProSEC 300S 色谱柱性能指标

键合相	孔径	填料粒径	蛋白质分子量范围	pH 范围	流速	最大压力
ProSEC 300S	300 Å	5 µm	1500–800000	2–7.5	< 1.5 mL/min (内径 7.5 mm)	250 bar, 3700 psi
					< 0.5 mL/min (内径 4.6 mm)	

### ProSEC 300S

尺寸	填料粒径 (µm)	部件号
7.5 × 600	5	PL1147-8501
7.5 × 300	5	PL1147-6501
4.6 × 250	5	PL1547-5501
<b>保护柱</b>		
7.5 × 50	5	PL1147-1501
4.6 × 50	5	PL1547-1501

## ZORBAX GF-250 和 GF-450 凝胶过滤柱

- 在方案仍要求使用 USP 指定产品 L35 时采用的老式产品
- 半制备柱和制备柱规格
- 与有机改性剂和变性剂兼容
- 适用 pH 范围宽 (3-8)



GF-250 凝胶过滤柱

ZORBAX GF-250 和 GF-450 体积排阻（凝胶过滤）色谱柱是蛋白质和其他生物分子的体积排阻分离的理想选择。将 GF-250 和 GF-450 色谱柱串联使用时，球状蛋白质的分离范围为 4000–900000。GF-250/GF-450 体积排阻色谱柱具有亲水性二醇键合固定相，可使蛋白质获得高回收率（通常 > 90%），还具有独特的经过氧化锆改性的硅胶，可实现 3–8 的 pH 操作范围。GF-250 和 GF-450 色谱柱填充有体积精确的多孔硅胶微球，孔径和粒径分布窄。这使得高效、耐用且可重现的体积排阻色谱柱能够在流速高达 3 mL/min 的条件下用于实现蛋白质的分析型和制备型分离。这些色谱柱与流动相中的有机改性剂 (< 25%) 和变性剂兼容，可减少蛋白质聚集。一些常见的应用包括蛋白质单体、二聚体和聚集体的分离、脱盐、蛋白质分子量估算以及修饰蛋白质的分离等。

### UHPLC 色谱柱性能指标

键合相	孔径	填料粒径	分子量范围	比表面积	pH 范围	流速	最大压力
ZORBAX GF-250	150 Å	4 µm	4000–400000	140 m <sup>2</sup> /g	3.0–8.0	< 3.0 mL/min	350 bar
ZORBAX GF-450	300 Å	6 µm	10000–900000	50 m <sup>2</sup> /g	3.0–8.0	< 3.0 mL/min	350 bar

性能指标只代表典型值

**ZORBAX GF-250 (USP L35) 和 GF-450 (USP L35) 凝胶过滤柱**

说明	规格 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	部件号
GF-250, 150 Å	9.4 × 250	4	884973-901
GF-250, 150 Å	4.6 × 250	4	884973-701
GF-450, 300 Å	9.4 × 250	6	884973-902
<b>保护柱 (需要硬件)</b>			
GF-450 Diol, 保护柱柱芯, 2/包	9.4 × 15	6	820675-111
GF-250 Diol, 保护柱柱芯, 4/包	4.6 × 12.5	6	820950-911
GF-450 Diol, 保护柱柱芯, 2/包	9.4 × 15	6	820675-111
制备型保护柱硬件工具包			840140-901
保护柱硬件工具包			820999-901
<b>PrepHT 色谱柱</b>			
PrepHT GF-250, 150 Å	21.2 × 250	6	877974-901
PrepHT GF-450, 300 Å	21.2 × 250	6	877974-910
PrepHT 柱端接头, 2/包			820400-901
PrepHT 保护柱柱芯, 2/包	17.0 × 7.5	5	820212-911
保护柱柱芯硬件			820444-901

**技巧和工具**

色谱柱用户指南是非常实用的资源，其中包含使用和色谱柱维护说明以及建议的启动方法：

[www.agilent.com/chem/biolc-columns-user-guides](http://www.agilent.com/chem/biolc-columns-user-guides)

# 糖基化表征

一级氨基酸序列的翻译后修饰（包括糖基化）将会造成功能上的变化，并且可能影响生物药物的疗效和免疫源性。多聚糖结构还会影响蛋白质在血浆中的半衰期以及单克隆抗体触发具有治疗意义的免疫应答的能力。监管机构将糖基化归为关键质量属性，因此在糖蛋白原研药、生物仿制药或改良型生物相似药的开发阶段，研究人员必须对糖基化进行表征并且在可接受的范围内获得定量结果。

可采用多种分析方法获得蛋白糖基化的结构和形态信息。

- 对于结构鉴定，包括糖基化位点的鉴定，可使用质谱检测联用反相和亲和相互作用色谱 (HILIC)
- 含有唾液酸的多聚糖也会向蛋白质传递更多电荷，并且可使用离子交换色谱进行表征



当对糖蛋白和糖肽进行表征并获得糖基化位点的数量和位置信息后，就需要对单个多聚糖进行鉴定和定量。要进行这类分析，必须先将多聚糖从蛋白质上切下，再用 HILIC 色谱柱进行分析。由于多聚糖不含发色团，所以使用具有荧光发色团的试剂对其进行衍生，以便用 FLD 检测器进行分析和定量。

## 亲和相互作用色谱柱选择

应用	安捷伦色谱柱	备注
从糖蛋白上裂解下来的多聚糖 包括单克隆抗体	AdvanceBio 糖谱分析色谱柱 1.8 µm 2.7 µm	氨基键合相可缩短平衡时间并提高多聚糖选择性。 该色谱柱基于全多孔颗粒填料，适合高速分离和高通量应用。耐压高达 1200 bar，可与 1290 Infinity II 液相色谱仪一起使用。 基于 Poroshell 技术，可制得具有更小的扩散距离的表面多孔颗粒填料。这在较低的压力下实现了高分离度分离，并能够使用更长的柱长来提高分离效率。
亲水性多肽和糖肽	ZORBAX RRHD 300 Å, 1.8 µm AdvanceBio 糖谱分析色谱柱	300 Å 硅胶颗粒可与 ZORBAX RRHD 300 Å, 1.8 µm 反相色谱柱进行正交分离。 氨基键合相为亲水性小分子肽和糖肽提供可选的 HILIC 官能团。

AB

AdvanceBio 系列产品的一部分

AB

AB

## 技巧和工具

可以将 Agilent BioHPLC 色谱柱与 InfinityLab Quick Connect 快速连接接头和无金属的生物惰性毛细管连接。

了解更多信息：[www.agilent.com/chem/5991-7469EN](http://www.agilent.com/chem/5991-7469EN)

## AdvanceBio 糖谱分析色谱柱

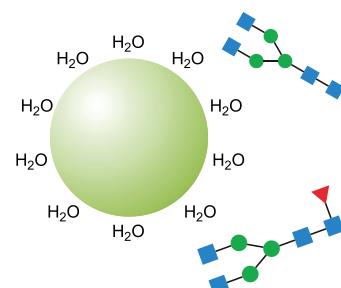
用于从糖蛋白（包括单克隆抗体）中选择性地去除 N-糖的 AdvanceBio 糖谱分析色谱柱、标准品和样品前处理产品。

**分析速度** — 1.8  $\mu\text{m}$  色谱柱可实现高通量的 N-糖分析，适合由于样品数量庞大或需要快速得到数据而需要将速度作为主要考虑因素的应用

**分离度** — 使用 2.7  $\mu\text{m}$  颗粒和 250 mm 柱长的色谱柱实现高分离度分离。这种更高的分离度可对目标多聚糖以及表达过程中可能出现的蛋白糖基化谱图变化进行准确的定量分析

**综合性方法** — 覆盖样品前处理、色谱分析和数据解析，确保鉴定和定量的可重现性以及准确度

**订购简便** — 使用一个部件号就可订购用于蛋白质溶解到 2-AB 标记的多聚糖纯化的全部样品前处理工作流程，以及针对样品前处理工作流程中每个阶段的试剂盒，具有更多功能



### 色谱柱性能指标

键合相	内径 (mm)	填料	封端	pH 稳定性	操作温度	压力限值
酰胺 HILIC	2.1 和 4.6	1.8 $\mu\text{m}$ , 全多孔	否	2–7	40 °C	1200 bar
酰胺 HILIC	2.1 和 4.6	2.7 $\mu\text{m}$ , 表面多孔	否	2–7	40 °C	600 bar

对糖蛋白（包括单克隆抗体）的 N-糖组分谱进行分析时，需要使用 PNGase F 将 N-糖从蛋白质氨基酸主链上酶切下来。切下的 N-糖可使用亲和相互作用色谱联用质谱检测进行分析，或使用具有荧光发色团的试剂 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 衍生化后通过 HPLC/UHPLC 联用 FLD 或 MS 进行分析。AdvanceBio 糖谱分析色谱柱用于鉴定和定量裂解的多聚糖时可提供 1.8  $\mu\text{m}$  填料的分析速度和 2.7  $\mu\text{m}$  填料的分离度。



## 分析速度

对于需要短运行时间的高通量分析，建议使用 AdvanceBio 糖谱分析 1.8 μm 色谱柱。

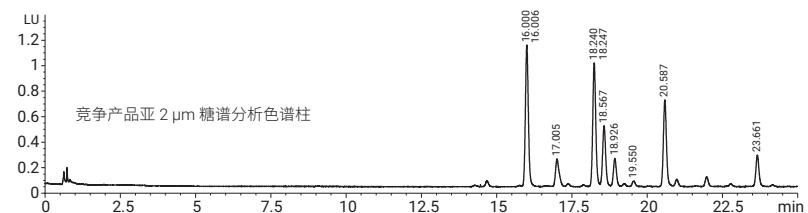
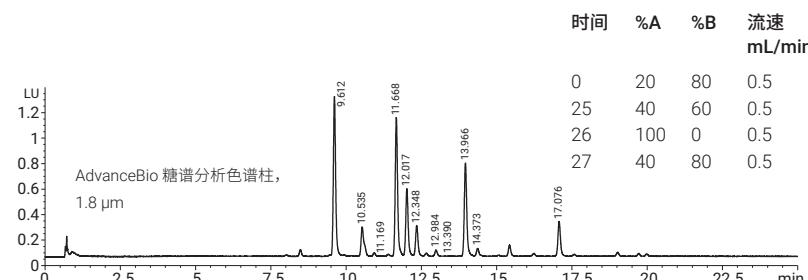
### 出色的结果 — 比竞争对手节约 40% 的时间

色谱柱： AdvanceBio 糖谱分析色谱柱，  
859700-913  
2.1 × 150 mm, 1.8 μm

色谱柱 B： 竞争产品亚 2 μm 糖谱分析色谱柱  
流动相： 100 mmol/L 甲酸铵, pH 4.5  
B: ACN  
进样量： 2 μL, 溶液为 70:30 乙腈: 100 mmol/L 甲酸铵  
样品恒温箱： 10 °C

FLD： 激发波长 = 260  
发射波长 = 430

流速： 0.35 mL/min  
仪器： 配备 1260 Infinity 荧光检测器 (FLD) 的 1290 Infinity  
液相色谱系统  
样品： 2-AB 标记的人 IgG N-糖文库 (部件号 5190-6996)



与 2.1 × 150 mm 规格的非安捷伦亚 2 μm 糖分析色谱柱相比，AdvanceBio 糖谱分析色谱柱可提供更高的分离度、更窄的色谱峰以及更高的峰容量



## 分离度

对于高分离度分离，建议使用柱长更长的 AdvanceBio 糖谱分析 2.7  $\mu\text{m}$  填料。

### 出色的结果 — 比竞争对手节约 40% 的时间

色谱柱： AdvanceBio 糖谱分析色谱柱，  
859700-913  
2.1 × 150 mm, 1.8  $\mu\text{m}$

仪器： 1290 Infinity 二元液相色谱系统

缓冲液： A: 100 mmol/L 甲酸铵水溶液, pH 4.5

B: 乙腈

质谱条件： 载气温度： 250 °C

鞘气温度： 250 °C

载气流速： 8 L/min

鞘气流速： 8 L/min

雾化器压力： 25 psi

毛细管电压： 3500 V

喷嘴电压： 1000 V

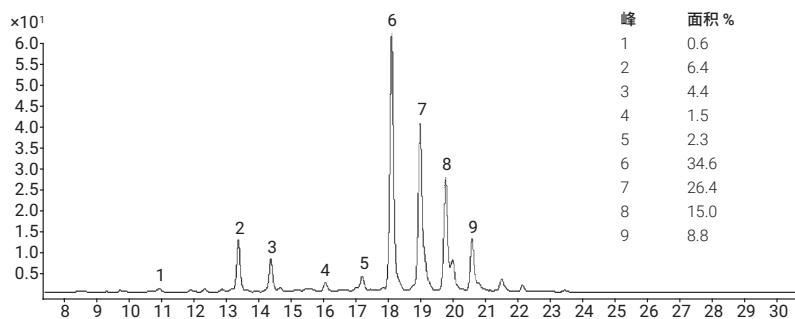
碎裂电压： 200 V

截取电压： 45 V

Oct 1 RF Vpp: 550

碰撞能量： 15 和 30 V

模式： MS 和目标 MS/MS



经过 2-AB 衍生化后，使用 UHPLC-FLD 对用 PNGase F 从胎球蛋白裂解下来的 N-糖进行分析。MS 的峰归属结果表明，从胎球蛋白裂解下来的 N-糖是包含 N-乙酰神经氨酸 (NeuAc) 但无岩藻糖的复杂双天线或三天线多聚糖。用 HILIC-UHPLC 分析胎球蛋白 2-AB N-糖，并利用质谱确定峰归属。

## 仪器条件

	抗体标准梯度	胎球蛋白梯度	卵清蛋白梯度
初始流速	0.5 mL/min	0.5 mL/min	0.5 mL/min
梯度	0 min 85% B 5 min 75% B 35 min 64% B 40 min 50% B 42 min, 流速 0.5 mL/min 42.01 min, 流速 0.25 mL/min 43 min 0% B 48 min 0% B 50 min 85% B 50.01 min, 流速 0.25 mL/min 51 min, 流速 0.5 mL/min	0 min 75% B 45 min 50% B 47 min 40% B, 流速 0.5 mL/min 47.01 min, 流速 0.25 mL/min 49 min 0% B 73 min 0% B 51.01 min 75% B, 流速 0.25 mL/min 52.00 min, 流速 0.5 mL/min 74 min 85% B, 流速 0.25 mL/min 75.00 min, 流速 0.5 mL/min	0–6 min 85% B 10 min 80% B 60 min 70% B 65 min 50% B, 流速 0.5 mL/min 65.01 min, 流速 0.25 mL/min 68 min 0% B 73 min 0% B 74 min 85% B, 流速 0.25 mL/min 75 min 85% B, 流速 0.25 mL/min
停止时间	51 min	52 min	75 min
后运行时间	20 min	20 min	20 min
进样量	5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
温控自动进样器	5 °C		
FLD	激发波长 = 260 nm 发射波长 = 430 nm		
峰宽	> 0.013 min (响应时间 0.25 s) (37.04 Hz)		

## 卵清蛋白 N-糖的详细信息

峰	Oxford	结构
1	A2G2S1	
2、3	A2G2S2	
4	A3GGS2	
5	A3G3S3, A3G3S2 (痕量)	
6	A3G3S3, A3G3S2 (痕量)	
7	A3G3S3, A3G3S4 (痕量)	
8	A3G3S4, A3G3S3	
9	A3G3S4	

- ▲ 岩藻糖
- 半乳糖
- 甘露糖
- N-乙酰葡萄糖胺
- ◆ N-乙酰神经氨酸



## N-糖标准品

安捷伦提供需要作为工作流程的一部分以确保样品前处理和液相色谱系统的最佳性能的标准物质：IgG N-糖标准品和葡聚糖分子量标准品。这两种标准品可提供带 2-AB 标记和不带 2-AB 标记的版本，用作样品前处理的标准物质。

IgG N-糖标准品用于每批 AdvanceBio 糖谱分析填料的 QA 测试，以确保每根色谱柱均满足此苛刻分析的严格的重现性要求。

葡聚糖分子量标准品用于基于葡聚糖同系物中的葡萄糖单位 (GU) 的洗脱时间校准系统，并报告 GU 相对保留数据。



## 2-AB 标记葡聚糖分子量标准品的分离

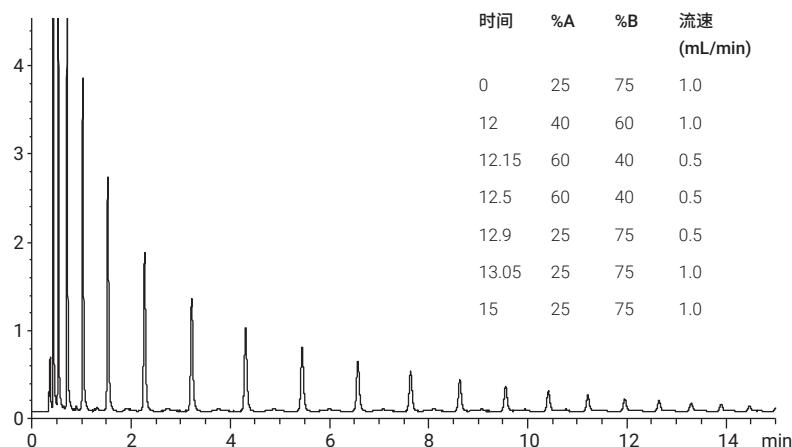
色谱柱：**AdvanceBio 糖谱分析色谱柱，  
859700-913  
2.1 × 150 mm, 1.8 μm**

流动相：**A: 100 mmol/L NH<sub>4</sub>Fc, pH 4.5  
B: ACN**

FLD：**激发波长 = 260 nm  
发射波长 = 430 nm**

进样量：**2 μL (10 pmol 总多聚糖/1 μL, 75:25 乙腈:水)**

样品：**2-AB (部件号 5190-6998) 标记葡聚糖分子量标准品**



本次分析使用安捷伦葡聚糖分子量标准品与 AdvanceBio 糖谱分析色谱柱，以便关联未知多聚糖的保留时间

**AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 1.8 μm, 耐压高达 1200 bar**

规格 (mm)	部件号
2.1 × 150	859700-913
2.1 × 100	858700-913
2.1, 1.8 μm, 快速保护柱	821725-905

**AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.7 μm, 表面多孔, 耐压高达 1200 bar**

规格 (mm)	部件号
4.6 × 250	680975-913
4.6 × 150	683975-913
4.6 × 100	685975-913
2.1 × 250	651750-913
2.1 × 150	683775-913
2.1 × 100	685775-913
2.1, 2.7 μm, 快速保护柱	821725-906

**N-糖标准品**

规格 (mm)	部件号
葡聚糖分子量标准品, 10 μg, 0.5 mL 样品瓶	5190-6997
2-AB 标记葡聚糖分子量标准品, 200 pmol	5190-6998
IgG N-糖文库, 20 μg, 0.5 mL	5190-6995
2-AB 标记 IgG N-糖文库, 200 pmol	5190-6996



## 亲水性和糖肽分析

肽分析需要反相色谱所提供的高选择性和分析间重现性。但是，反相色谱柱对亲水性肽（包括糖肽）的保留和选择性有限。ZORBAX RRHD 300-HILIC 1.8  $\mu\text{m}$  色谱柱与反相色谱柱相比，具有更高的亲水性和糖肽保留能力，因此在实施肽谱分析实验时不会丢失有价值的信息。

两种技术是正交的，能够为蛋白质一级结构分析提供互补的信息。

- ZORBAX 300  $\text{\AA}$  颗粒，可用于分析各种大小的肽
- 1.8  $\mu\text{m}$  颗粒提供 UHPLC 性能以及在 1200 bar 下的稳定性
- 与 ZORBAX RRHD 300  $\text{\AA}$  反相色谱柱配合使用时，可提供 UHPLC 正交性

### 色谱柱性能指标

键合相	内径 (mm)	填料粒径	封端	pH 稳定性	操作温度	压力限值
硅胶	2.1	1.8, 全多孔	否	1–8	40 °C	1200 bar

肽谱分析用于蛋白质生物治疗药物的表征和杂质分析。通常使用反相 UHPLC/HPLC，但是当酶解物中包含亲水性肽（如糖肽）时，可能会丢失有价值的信息。ZORBAX RRHD 300-HILIC 色谱柱保留了亲水性糖肽，并且与质谱联用时，可鉴定这一重要的蛋白质片段组。

## 蛋白质胰蛋白酶酶解产物中的糖肽鉴定

色谱柱： ZORBAX RRHD 300-HILIC

858750-901

2.1 × 100 mm, 1.8 μm

流动相： A: 100% ACN

B: 50 mmol/L 甲酸铵, pH 4.5

流速： 0.4 mL/min

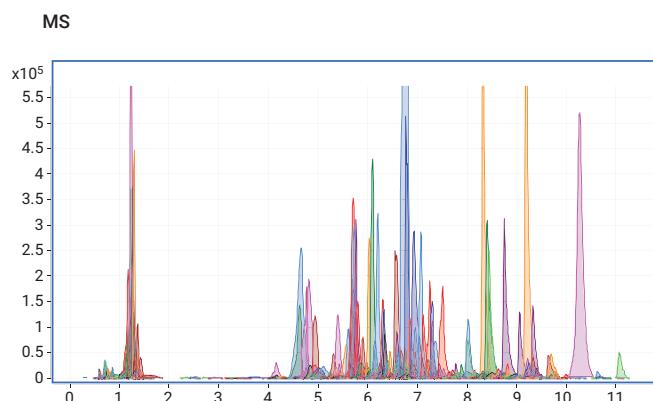
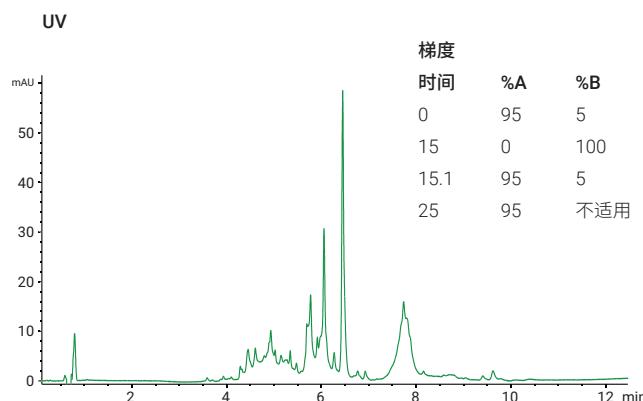
进样量： 5 μg

检测器： UV, 280 nm

仪器： 1290 Infinity 液相色谱系统, 6224 精确质量飞行时间系统,

双 ESI 离子源, 在正离子模式下操作

样品： 来自酶解的 EPO 蛋白质的糖肽 (1 mg/mL)



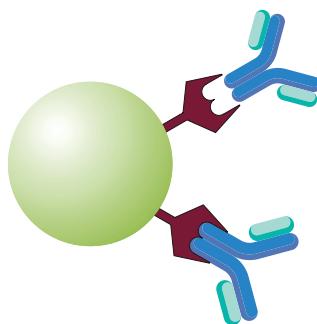
UV 图示出使用 ZORBAX RRHD 300-HILIC 2.1 × 100 mm 色谱柱分离的促红细胞生成素 (EPO) 肽谱, MS 图示出匹配的 EPO 的提取化合物色谱图。从 HILIC-MS 数据中鉴定出 7 种肽, 而这些肽通过 RP-MS 无法鉴定。HILIC 与 RP 正交, 为蛋白质酶解物的亲水性糖肽提供更高的分离度

## ZORBAX RRHD 300-HILIC 1.8 μm 色谱柱

规格 (mm)	内径 (mm)	填料粒径 (μm)	部件号
ZORBAX RRHD 300-HILIC	2.1 × 100	1.8	858750-901
ZORBAX RRHD 300-HILIC	2.1 × 50	1.8	857750-901

# 滴度测定

亲和色谱是一种利用特定蛋白之间（例如，抗原/抗体）高度特异性分子间相互作用的强大分离技术。安捷伦提供多种专门的亲和产品，适用于对 IgG 进行分离和定量的 Monolithic Protein A 和 Monolithic Protein G 色谱柱，以及用于去除生物样品中高丰度蛋白的一系列多重亲和去除系统产品。



## Bio-Monolith HPLC 色谱柱

- 针对所有 IgG（人和鼠）的分析型分离而设计
- 分离不受流速影响；无扩散、无微孔、无死体积，使流动相和固定相之间的传质非常迅速
- 极快的分离速度可加快方法开发，降低成本
- 锁定方法参数显著缩短了时间，节省了缓冲液

Bio-Monolith Protein A 和 Protein G HPLC 色谱柱是 Bio-Monolith 色谱柱系列产品的组成部分。Protein A 和 Protein G Bio-Monolith 色谱柱与 HPLC 和制备型液相色谱系统兼容，包括 1100、1200 和 1260 生物惰性四元液相色谱系统。



Bio-Monolith Protein A 色谱柱，  
5069-3639

## 技巧和工具

有关 Bio-Monolith Protein A 色谱柱在 mAb 结合方面的耐盐性和在 mAb 洗脱方面的酸性缓冲盐兼容性的更多信息，请参见：  
**5991-2990CHCN**。

[www.agilent.com/search](http://www.agilent.com/search)

## 色谱柱性能指标

尺寸	5.2 mm × 4.95 mm
色谱柱体积	100 µL
最大压力	150 bar (15 MPa, 2200 psi)
最低温度/最高温度	操作温度: 2–40 °C 储存: 2–8 °C
推荐 pH	操作范围: 2–13 原位清洗: 1–14
结构材料	硬件: 不锈钢 包装: 聚(环氧丙基甲基丙烯酸酯-co-乙二醇二甲基丙烯酸酯) 高孔隙率整体柱
彩带标识:	Bio-Monolith Protein A: 白色 Bio-Monolith Protein G: 橙色
保质期/有效期	12 个月

## Bio-Monolith Protein A 和 Protein G

说明	部件号
Bio-Monolith Protein A, 4.95 × 5.2 mm	5069-3639
Bio-Monolith Protein G, 4.95 × 5.2 mm	5190-6900

## 技巧和工具

有关详细信息，可参见：

*mAb Titer Analysis with the Agilent Bio-Monolith Protein A Column* (使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱进行的 mAb 滴度分析) (出版号 **5991-5135EN**)

采用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱监测细胞培养液中的单克隆抗体滴度 (出版号 **5991-2990CHCN**)

*Cell Clone Selection Using the Agilent Bio-Monolith Protein A Column and LC/MS* (采用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱和 LC/MS 进行细胞克隆选择) (出版号 **5991-5124EN**)

*Cell Culture Optimization Using an Agilent Bio-Monolith Protein A Column and LC/MS* (采用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱和 LC/MS 进行细胞培养基优化) (出版号 **5991-5125EN**)

[www.agilent.com/search](http://www.agilent.com/search)

## 滴度测定

### Bio-Monolith Protein A 和 G 对不同 IgG 亚类的结合亲和性

抗体	Protein A	Protein G
人		
人 IgG1	++++	++++
人 IgG2	++++	++++
人 IgG3	-	++++
人 IgG4	++++	++++
人 IgA	++	-
人 IgD	++	-
人 IgE	++	-
人 IgM	++	-
小鼠		
小鼠 IgG1	+	++
小鼠 IgG2a	++++	++++
小鼠 IgG2b	++++	+++
小鼠 IgG3	+	+++
小鼠 IgM	+/-	-
抗体片段		
人 Fab	+	+
人 F(ab')2	+	+
人 scFv	+	+
人 Fc	+	+
人 κ	+	+
人 λ	+	+

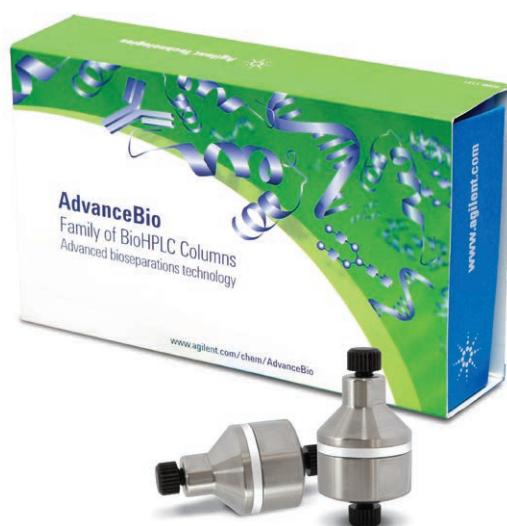
++++ = 强亲和性

+++ = 中等亲和性

++ = 弱亲和性

+ = 微弱亲和性

- = 无亲和性





## 快速人源化单克隆抗体定量分析

色谱柱: Bio-Monolith Protein A

5069-3639

5.2 × 4.95 mm

流动相: A: 50 mmol/L 磷酸盐, pH 7.4  
B: 100 mmol/L 柠檬酸, pH 2.8

流速: 1 mL/min

进样量: 可变 (50 μL, 针对包含 IgG1 的 CHO 细胞培养上清液进行优化)

梯度:	时间 (min)	%A	%B	
	0-0.5	100	0	结合
	0.6-1.7	0	100	洗脱
	1.8-3.5	100	0	再平衡

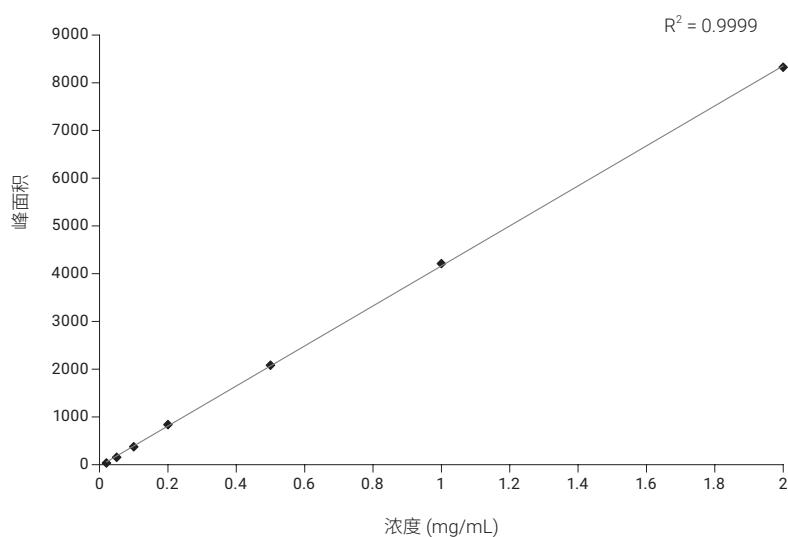
柱温: 室温

检测器: UV, 280 nm

馏分收集: 基于时间

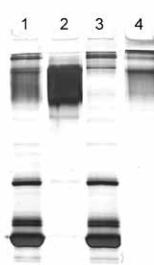
样品: IgG1 (1–20 mg/mL) 和 CHO 细胞上清液包含 IgG1 (最多 20 mg/mL 总蛋白质)

	RT (min)	峰面积
1	383	1.666
2	372	1.666
3	365	1.665
4	389	1.667
5	383	1.666
6	378	1.666
7	379	1.668
8	377	1.666
9	376	1.667
10	377	1.667
平均值	378	1.667
S	6.52	0.001
%RSD	1.73	0.060



经修饰的人源化曲妥珠单抗的校准曲线

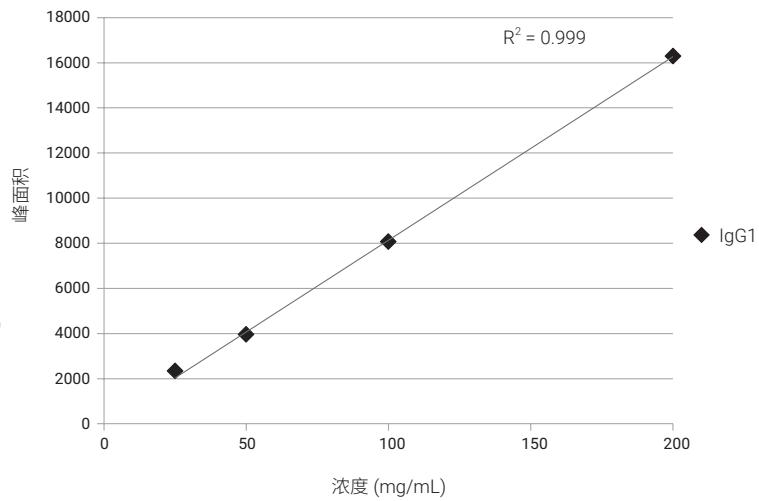
(图 A: 0–2 mg/mL, B: 25–200 mg/mL)



### 图示说明:

- 第 1 道: 分离之前的全血浆
- 第 2 道: IgG 标准品
- 第 3 道: 峰 1 (流通组分)
- 第 4 道: 峰 2 (蛋白 A 结合组分; 例如 IgG1)

分离组分的 SDS PAGE 分析

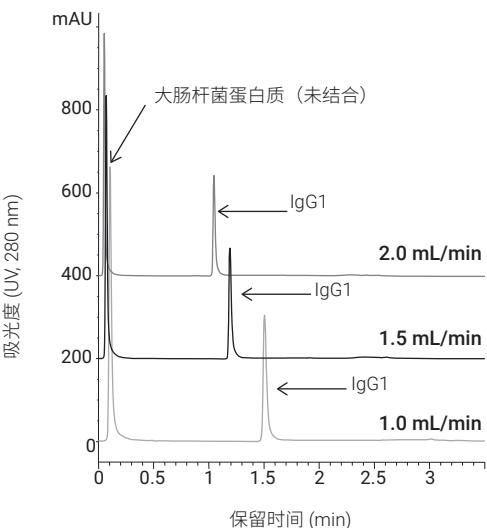


# 滴度测定

## 高流速不影响结合效率

色谱柱: Bio-Monolith Protein A  
5069-3639  
5.2 × 4.95 mm

流动相: A: 磷酸钠缓冲液, 20 mmol/L, pH 7.4  
B: 柠檬酸, 0.1 mmol/L, pH 2.8  
流速: 1.0、1.5 和 2.0 mL/min  
进样量: 4 μL (含 2.5 mg/mL IgG1 的 20 mg/mL 大肠杆菌上清液)  
检测器: UV, 280 nm  
梯度: 0.5 min 内 0% B, 0.6–1.7 min 时 100% B, 1.8–3 min 时 0% B  
柱温: 25 °C  
样品: 人源化 IgG1 和大肠杆菌裂解液  
仪器: 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统



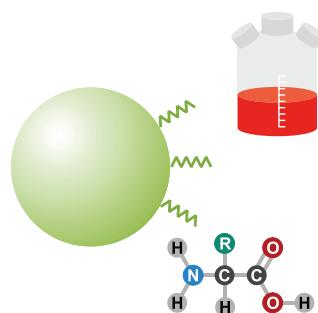
在多种流速下对 IgG1 在 Bio-Monolith Protein A 色谱柱上结合性能的评估。为实施这项研究，需要加载更多样品，以轻松观察色谱图和信号积分的变化。

## 流速与未结合蛋白和 IgG1 相对峰面积的关系

流速 (mL/min)	未结合蛋白的峰面积 (mAu/S)	IgG1 峰面积 (mAu/S)	未结合蛋白的相对 峰面积 (%)	IgG1 相对峰面积 (%)	压力 (bar)
1.0	1230	738	63	37	32
1.5	840	492	63	37	47
2.0	636	363	64	36	68

# 细胞培养物和氨基酸分析

安捷伦的 AdvanceBio 色谱柱能够让您的生物技术实验室更轻松地分析用过的细胞培养基中的氨基酸和其他小分子代谢物，无论样品是否经过衍生化处理。用氨基酸对用于这两种解决方案的色谱柱进行测试，以确保其质量和性能。您只需选择满足您需求的工作流程。



## 选择用于行业标准 LC/UV 分析的 Agilent AdvanceBio 氨基酸分析试剂盒

- 使用反相液相色谱分离和紫外检测实现氨基酸的自动化在线衍生化
- 使用任意安捷伦液相色谱系统
- 最大限度减少您对仪器和专业技能的投资

## 选择用于快速、未衍生化 LC/MS 分析的 Agilent AdvanceBio MS Spent Media 色谱柱

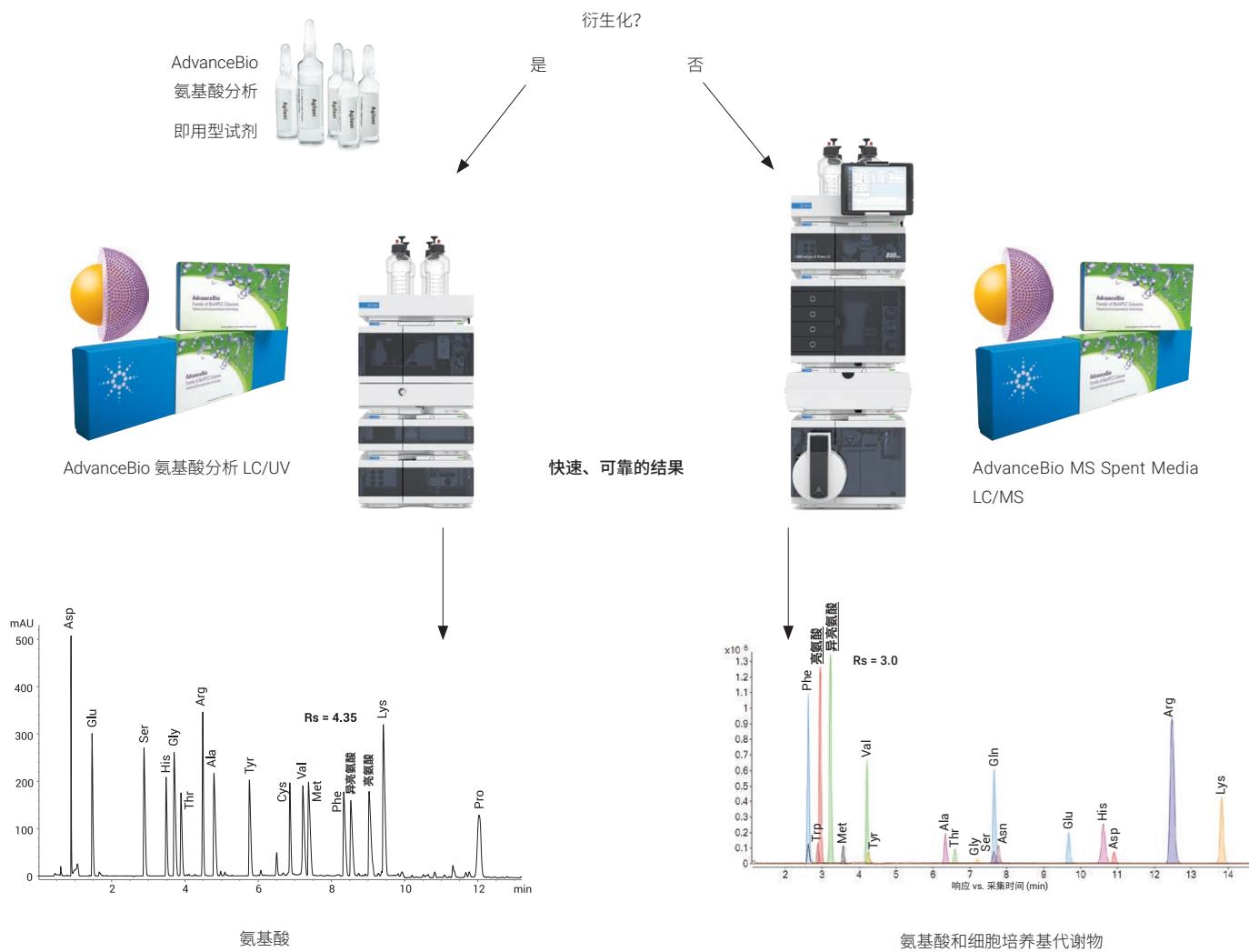
- 用一种方法分析氨基酸和其他细胞培养基代谢物：HILIC 液相色谱分离结合质谱检测
- 无需对样品进行衍生化处理
- 使用任意 LC/MS 系统
- 采用质谱检测，无需达到基线色谱分离

## 技巧和工具

Agilent InfinityLab 孔板和密封垫是高通量 LC/MS 应用的理想样品容器。

请访问：[www.agilent.com/chem/well-plates](http://www.agilent.com/chem/well-plates)

## Agilent Spent Media 分析解决方案



## AdvanceBio 氨基酸分析 (AAA)

Agilent AdvanceBio 氨基酸分析 (AAA) 色谱柱可对蛋白质水解产物以及细胞培养基中的氨基酸实现快速、灵敏且可重现的分离。

AdvanceBio AAA 包括用于氨基酸衍生化的经验证的试剂、即开即用型氨基酸标准品试剂盒、采用安捷伦创新的 Poroshell 技术的色谱柱，以及安捷伦专家支持。配合 Agilent InfinityLab 液相色谱系列仪器，AdvanceBio AAA 为您提供了一套完整的氨基酸分析解决方案。

这些色谱柱是 Agilent AdvanceBio 系列产品的组成部分，是专用于生物分子表征的创新型解决方案。

- 结果可靠：由高效 Poroshell 颗粒形态实现高分离度分离
- 降低成本：稳定、耐高 pH 的化学改性硅胶可确保色谱柱的长使用寿命
- 提高灵活性：直径 2.7 μm 的填料与 HPLC 和 UHPLC 系统均兼容
- 质量控制：使用氨基酸标准品对 AdvanceBio AAA 色谱柱进行了批次测试，确保质量可靠
- 订购方便：标准品和试剂以试剂盒形式提供
- 自动化在线衍生：利用安捷伦分析型进样系统

### 色谱柱性能指标

键合相	填料粒径	孔径	温度上限	pH 范围	封端	压力限值
C18	2.7 μm	100 Å	60 °C	3.0–11.0	双封端	600 bar

### 技巧和工具

如需了解安捷伦有关氨基酸分析的全程解决方案，请访问：[www.agilent.com/chem/aaa-how-to-guide](http://www.agilent.com/chem/aaa-how-to-guide)

# 细胞培养物和氨基酸分析



## AdvanceBio 氨基酸分析 (AAA) 柱

说明	部件号
AdvanceBio 氨基酸分析柱, 100 Å, 3.0 × 100 mm, 2.7 µm	695975-322
AdvanceBio 氨基酸分析柱, 100 Å, 4.6 × 100 mm, 2.7 µm	655950-802
AdvanceBio 氨基酸分析柱, 100 Å, 3.0 × 5 mm, 2.7 µm (保护柱 3/包)	823750-946
AdvanceBio 氨基酸分析柱, 100 Å, 4.6 × 5 mm, 2.7 µm (保护柱 3/包)	820750-931

## LC/UV

色谱柱: Agilent AdvanceBio  
氨基酸分析柱,  
4.6 × 100 mm,  
部件号 655950-802

柱温: 30 °C

流动相: 低 pH, 正离子模式质谱检测:  
A = 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mmol/L Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>,  
pH 8.2 B = 乙腈:甲醇:水, 45:45:10 (v:v:v)

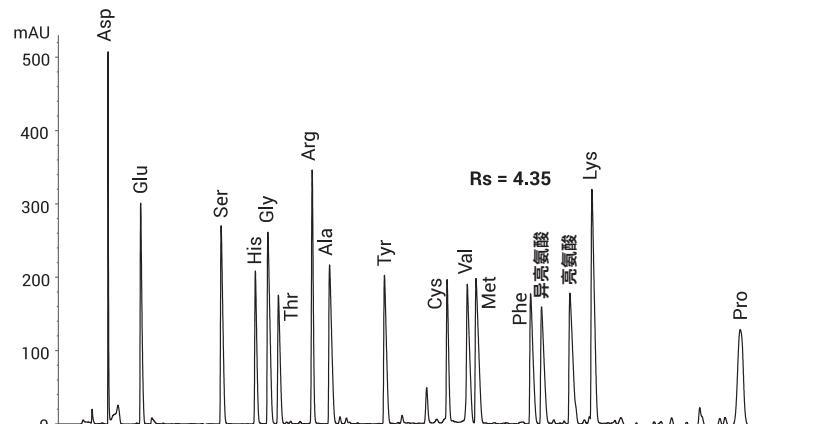
流速: 1.5 mL/min

梯度:

时间 (min)	%B
0	2
0.35	2
13.4	57
13.5	100
15.7	100
15.7	2
18	结束

样品: 蛋白质水解产物

检测: Agilent 1260 Infinity II DAD WR



蛋白质水解产物中氨基酸的紫外色谱图。亮氨酸与异亮氨酸之间的分离度为 4.35, 轻松满足了欧洲药典中分离度大于 1.5 的要求 (欧洲药典 9.0 (2.2.56) 氨基酸分析)

## AdvanceBio 氨基酸分析标准品和试剂盒

所有必需的衍生化试剂和用于定量的氨基酸标准品都包含在单一部件号中。各种组分可根据需要重新排序。

### AdvanceBio 氨基酸分析 (AAA) 标准品和试剂

说明	部件号
标准品和试剂盒	5190-9426
<b>试剂盒内容 (可单独订购)</b>	
硼酸盐缓冲液, 100 mL	5061-3339
FMOC 试剂, 10 个 1 mL 的安瓿瓶, 适用于 AAA	5061-3337
OPA 试剂, 10 mg/mL, 6 个 1 mL 的安瓿瓶	5061-3335
二硫代二丙酸 (DTDPA), 5 g	5062-2479
氨基酸标准品, 1 nmol, 10/包	5061-3330
氨基酸标准品, 250 pmol, 10/包	5061-3331
氨基酸标准品, 100 pmol, 10/包	5061-3332
氨基酸标准品, 25 pmol, 10/包	5061-3333
氨基酸标准品, 10 pmol, 10/包	5061-3334
氨基酸补充装, 每份 1 g	5062-2478



硼酸盐缓冲液, 100 mL,  
5061-3339



氨基酸补充装, 每份 1 g,  
5062-2478



### AdvanceBio MS Spent Media

Agilent AdvanceBio MS Spent Media 色谱柱是 HILIC 色谱柱，能够为生物处理器细胞培养基中的未衍生化氨基酸及其他极性代谢物提供快速、灵敏且可重现的分离，以备质谱检测。

配合 Agilent InfinityLab 系列液相色谱仪和安捷伦质谱仪，AdvanceBio MS Spent Media 为 Spent Media 培养基分析提供了一套完整的解决方案。

AdvanceBio MS Spent Media 分析是 Agilent AdvanceBio 系列产品的最新成员，是一款专为生物分子生产和表征而设计的创新解决方案。

- 基于质谱的快速工作流程
- 无需样品衍生化，可节省时间和资源
- 具有 PEEK 内衬的不锈钢色谱柱硬件组成惰性流路，能够使具有挑战性的离子型代谢物获得优异的峰形和回收率
- 使亮氨酸与异亮氨酸同分异构体实现基线色谱分离
- 色谱柱经氨基酸测试，可确保质量和性能
- 对适用于质谱的流动相具有优异的分析灵敏度
- 提供 2.7  $\mu\text{m}$  Poroshell 颗粒，可同时兼容 HPLC 和 UHPLC 系统

#### 色谱柱性能指标

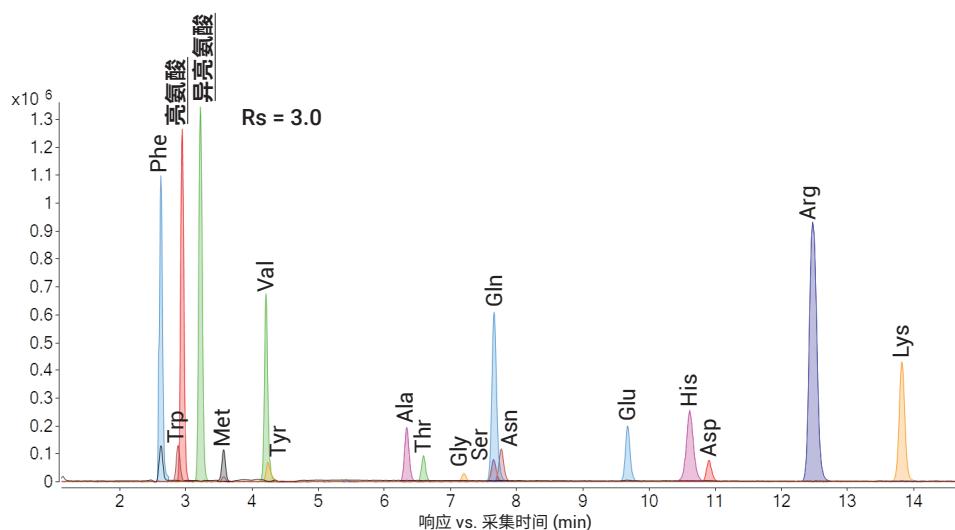
键合相	孔径	填料粒径	温度上限	pH 范围	压力限值
HILIC-Z	100 $\text{\AA}$	2.7 $\mu\text{m}$	80 $^{\circ}\text{C}$ (在 pH 7 下)	3.0-11.0 (在 35 $^{\circ}\text{C}$ 下)	600 bar

**AdvanceBio MS Spent Media**

说明	部件号
AdvanceBio MS Spent Media 100 Å, 2.1 × 50 mm, 2.7 µm	679775-901
AdvanceBio MS Spent Media 100 Å, 2.1 × 100 mm, 2.7 µm	675775-901
AdvanceBio MS Spent Media 100 Å, 2.1 × 150 mm, 2.7 µm	673775-901

**LC/MS**

色谱柱:	<b>Agilent AdvanceBio MS Spent Media 2.1 × 100 mm 部件号 675775-901</b>	流速:	0.5 mL/min
柱温:	30 °C	梯度:	时间 (min) %B (低 pH, 正离子模式) % B (高 pH, 负离子模式)
流动相:	低 pH, 正离子模式质谱检测: A = 10% 200 mmol/L 甲酸铵水溶液 pH 3, 90% 水 B = 10% 200 mmol/L 甲酸铵水溶液 pH 3, 90% 乙腈 最终盐浓度为 20 mmol/L 建议用浓缩缓冲液储备溶液配制流动相, 以确保流动相稳定一致	样品:	细胞培养基, 用流动相 B 稀释五倍
		检测:	Agilent 6230 飞行时间 LC/MS



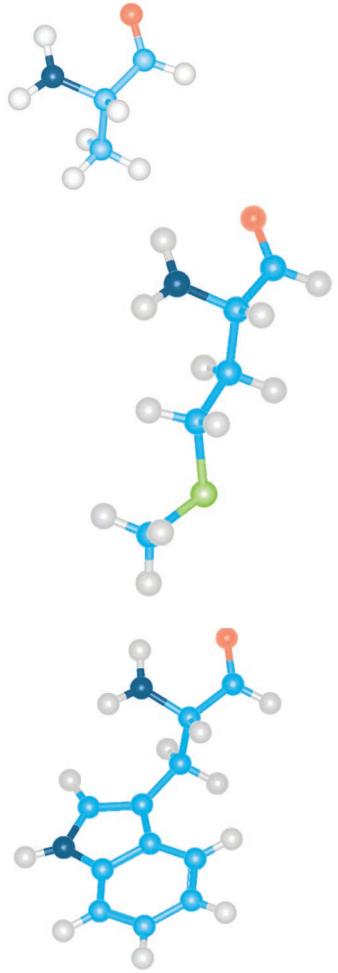


### ZORBAX Eclipse 氨基酸分析 (AAA)

- 经过氨基酸分析的测试
- 利用众所周知的 OPA 和 FMOC 柱前衍生化化学键合相
- 使用 InfinityLab 液相色谱系列产品，按照在线衍生化方案，轻松实现自动化

按照一套升级和改进方案，ZORBAX Eclipse AAA 色谱柱可以分离各种氨基酸。在较短的 75 mm 长的色谱柱上一次进样的总分析时间可以缩短为 14 min（分析时间 9 min），在 150 mm 长的色谱柱上为 24 min（分析时间 18 min）。使用 InfinityLab 液相色谱系列，采用 OPA 和 GMOC 衍生化填料执行全自动化分析程序，均可获得良好的灵敏度（用 DAD 和 FLD 可达 5–50 pmol）和可靠性。

对于 UHPLC 系统上的高速氨基酸分析，ZORBAX Eclipse Plus C18 1.8  $\mu\text{m}$  色谱柱可提供优异的结果。



**ZORBAX Eclipse 氨基酸分析 (AAA) 柱**

说明	规格 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	部件号
常规分析灵敏度	4.6 × 150	5	993400-902
常规分析灵敏度, 使用 FLD 实现高分离度	4.6 × 150	3.5	963400-902
常规分析灵敏度, 高通量	4.6 × 75	3.5	966400-902
溶剂节省、高灵敏度、高分离度	3.0 × 150	5	961400-302
保护柱柱芯, 4/包	4.6 × 12.5	5	820950-931
保护柱硬件工具包			820999-901

**ZORBAX Eclipse Plus**

说明	规格 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	Eclipse Plus C18 USP L1
窄径 RRHD, 1200 bar	2.1 × 50	1.8	959757-902
窄径 RRHT, 600 bar	2.1 × 50	1.8	959741-902

**技巧和工具**

有关详细信息, 可参见: *Automatic Precolumn Derivatization of Amino Acids and Analysis by Fast LC using the Agilent 1290 Infinity LC System* (使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统自动完成氨基酸的柱前衍生化并通过快速 LC 进行分析) (出版物 5990-5599EN)

[www.agilent.com/search](http://www.agilent.com/search)



## 24 种氨基酸的高分离度分离

色谱柱： ZORBAX Eclipse AAA

963400-902

4.6 × 150 mm, 3.5 μm

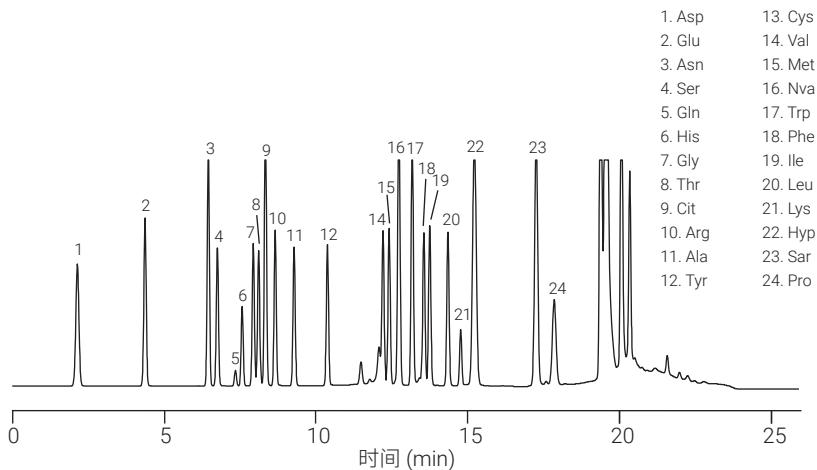
流动相： A: 40 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.8  
B: ACN:MeOH:水, 45:45:10 v/v

流速： 2 mL/min

柱温： 40 °C

检测器： 荧光

样品： 24 种氨基酸



在 18 分钟内即可实现 24 种氨基酸的高分离度分离。如果选择快速分离 4.6 × 75 mm Eclipse AAA 色谱柱，这些氨基酸将在 9 分钟内得到分离。

## 技巧和工具

快速参考指南列出使您的 Agilent InfinityLab 液相色谱系列产品保持最佳状态必备的常用备件。请访问 [www.agilent.com/chem/getguides](http://www.agilent.com/chem/getguides)  
下载免费拷贝



## 蛋白质去除

为了更轻松地分离和鉴定血清、血浆和脑脊液 (CSF) 等生物样品中的蛋白质，设计了多重亲和去除系统，以通过色谱法从生物样品中消除干扰性高丰度蛋白质。去除这些高丰度蛋白质后，可改善样品的后续 LC/MS 分析和电泳分析，有效扩展动态范围。

### 安捷伦蛋白质分馏系统和蛋白质组学试剂

- 生物样品的 LC/MS 分析
- 电泳分析的准备
- 生物标志物发现的样品前处理
- 仪器和工作流程验证
- 经济有效的免疫去除
- 样品脱盐、浓缩和分馏

针对样品的馏分和脱盐，安捷伦设计了 mRP-C18 高回收率蛋白质分析柱，可以用一个简单的步骤同时完成脱盐、浓缩和分馏，极高的样品回收率可以与常规 RP HPLC 柱媲美，后者与 LC/MS 分析完全兼容。

另外，安捷伦还提供生物标志物研究中样品制备和其他蛋白质组学应用的验证试剂，包括复杂标准品和蛋白质组学级胰蛋白酶。为便于使用，这些试剂均与安捷伦 LC/MS 方法完全兼容，无需任何额外的样品预处理。

我们的定制配置还可以满足您的大体积进样要求和定制其他色谱柱规格。



### 多重亲和去除系统

多重亲和去除系统可以对血清、血浆和其他生物体液中高价值的低丰度蛋白质和生物标志物进行鉴定和表征。

多重亲和去除系统能够可重现地、特异地去除人的生理体液中多达 14 种高丰度蛋白以及小鼠生理体液中 3 种高丰度蛋白。

多重亲和去除系统可以使用各种液相柱规格和离心小柱。多重亲和去除系统与安捷伦优化的缓冲液、方便的离心过滤膜和浓缩器结合在一起，形成了一个自动化的一体式蛋白去除解决方案，可以与大多数液相色谱仪（色谱柱）和台式离心机（离心小柱）兼容。

用多重亲和去除系统净化的样品适用于下游的各种分析，如二维凝胶电泳、LC/MS 和其他分析技术。



多重亲和去除系统

### 技巧和工具

如需了解有关如何缩短亲和色谱的分析周期的更多信息，请参见：

*Reducing Cycle Time for Affinity Removal of High-Abundant Proteins in Human Plasma. Alternating Column Regeneration Using an Agilent 1200 Infinity Series Quick-Change Bio-inert 2-position/10-port Valve and an Agilent 1290 Infinity Flexible Cube* (缩短人血浆中高丰度蛋白的亲和去除循环时间 — 使用 Agilent 1200 Infinity 系列生物惰性 2 位/10 通快速更换阀和 Agilent 1290 Infinity Flexible Cube 交替进行色谱柱再生) (出版物 5991-4721EN)

[www.agilent.com/search](http://www.agilent.com/search)

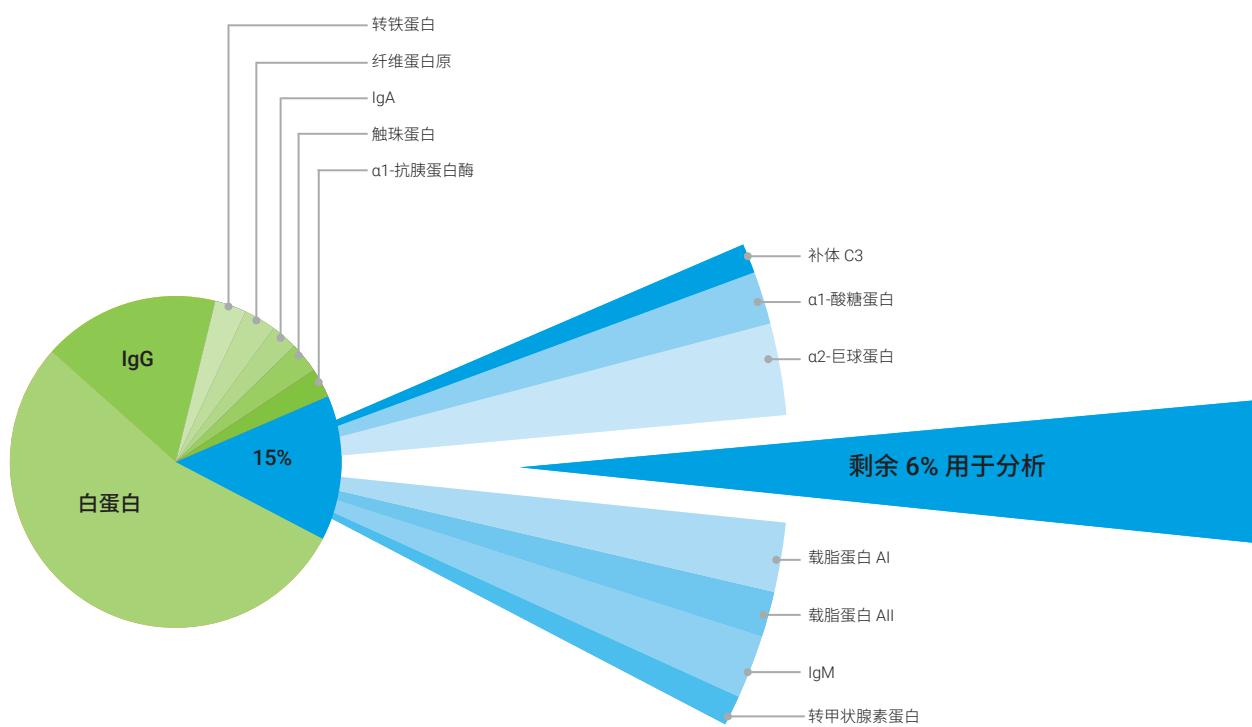
## 多重亲和去除系统选择指南

产品	去除的蛋白质	去除的总蛋白质	尺寸	载样量	部件号
MARS Human-14	白蛋白, IgG, 抗胰蛋白酶, IgA, 转铁蛋白, 触珠蛋白, 纤维蛋白原, $\alpha_2$ -巨球蛋白, $\alpha_1$ -酸糖蛋白, IgM, 载脂蛋白 AI, 载脂蛋白。全部, 补体 C3, 甲状腺素运载蛋白	94%	离心小柱	8–10 $\mu$ L	5188-6560
			4.6 $\times$ 50 mm	20 $\mu$ L	5188-6557
			4.6 $\times$ 100 mm	40 $\mu$ L	5188-6558
			10.0 $\times$ 100 mm	250 $\mu$ L	5188-6559
MARS Human-7	白蛋白, IgG, IgA, 转铁蛋白, 触珠蛋白, 抗胰蛋白酶, 纤维蛋白原	88%–92%	离心小柱	12–14 $\mu$ L	5188-6408
			4.6 $\times$ 50 mm	30–35 $\mu$ L	5188-6409
			4.6 $\times$ 100 mm	60–70 $\mu$ L	5188-6410
			10.0 $\times$ 100 mm	250–300 $\mu$ L	5188-6411
MARS Human-6	白蛋白, IgG, IgA, 转铁蛋白, 触珠蛋白, 抗胰蛋白酶	85%–90%	离心小柱	7–10 $\mu$ L	5188-5230
			4.6 $\times$ 50 mm	15–20 $\mu$ L	5185-5984
			4.6 $\times$ 100 mm	30–40 $\mu$ L	5185-5985
MARS Human- 大容量	白蛋白, IgG, IgA, 转铁蛋白, 触珠蛋白, 抗胰蛋白酶	85%–90%	离心小柱	14–16 $\mu$ L	5188-5341
			4.6 $\times$ 50 mm	30–40 $\mu$ L	5188-5332
			4.6 $\times$ 100 mm	60–80 $\mu$ L	5188-5333
			10.0 $\times$ 100 mm	高达 340 $\mu$ L	5188-5336
MARS Human-2	白蛋白, IgG	69%	离心小柱	50 $\mu$ L	5188-8825
			4.6 $\times$ 50 mm	100 $\mu$ L	5188-8826
MARS Human-1	白蛋白	50%–55%	离心小柱	65 $\mu$ L	5188-5334
			4.6 $\times$ 50 mm	130 $\mu$ L	5188-6562
MARS Mouse-3	白蛋白, IgG, 转铁蛋白	80%	离心小柱	25–30 $\mu$ L	5190-2534
			4.6 $\times$ 50 mm	37–50 $\mu$ L	5188-5217
			4.6 $\times$ 100 mm	75–100 $\mu$ L	5188-5218

## 蛋白质去除



### 用安捷伦多重亲和去除色谱柱和离心小柱去除高丰度蛋白质



## 技巧和工具

如需了解安捷伦完整的服务系列产品的更多信息，请访问 [www.agilent.com/chem/services](http://www.agilent.com/chem/services)

## 多重亲和去除系统启始工具包

液相色谱柱和离心小柱试剂启始工具包包括与多重亲和去除系统配合使用的所有必需的备件。这些缓冲液为色谱柱使用寿命和样品重现性提供了最佳条件。

- 该工具包提供足够的缓冲液 A 和缓冲液 B，用于使用  $4.6 \times 50\text{ mm}$  液相色谱柱实现约 200 个样品的去除，使用  $4.6 \times 100\text{ mm}$  液相色谱柱实现约 100 个样品的去除，并且使用离心小柱 200 次
- 缓冲液 A（上样缓冲液）最大程度地减少蛋白质与蛋白质之间的相互作用，使通常与高丰度蛋白质结合的低丰度蛋白质通过色谱柱，而目标高丰度蛋白质则与其相关的抗体结合
- 然后，缓冲液 B（洗脱缓冲液）破坏抗体与蛋白质之间的相互作用，将高丰度蛋白质从色谱柱上洗脱下来

## 多重亲和去除系统启始工具包

说明	部件号
高浓度样品稀释缓冲液，50 mL	5188-8283
液相色谱柱试剂启始工具包，包括：	5185-5986
缓冲液 A，用于上样、清洗和平衡，1 L	5185-5987
缓冲液 B，用于洗脱，1 L	5185-5988
0.22 $\mu\text{m}$ 乙酸纤维素，25/包，1 L	5185-5990
离心浓缩器，5K MWCO，4 mL，25/包	5185-5991
多重亲和去除离心小柱试剂盒包括：	5188-5254
缓冲液 A，用于上样、清洗和平衡，1 L	5185-5987
缓冲液 B，用于洗脱，1 L	5185-5988
2 个离心过滤器，0.22 $\mu\text{m}$ 乙酸纤维素，25/包	5185-5990
离心浓缩器，5K MWCO，4 mL，25/包	5185-5991
Luer-Lok 转接头，2/包	5188-5249
塑料注射器，5 mL，Luer-Lok，2/包	5188-5332
6 个微量管，1.5 mL，螺口，100/包	5188-5251
盖和内插管，6/包	5188-5252
PTFE 针头，Luer-Lok，10/包	5188-5253



液相色谱柱试剂启始工具包，5185-5986



Luer-Lok 注射器，5188-5250



Luer-Lok 转接头，5188-5249



Luer-Lok 针头，5188-5253



## 专用尺寸

### 毛细管柱和纳流柱

- 对于样品量极少的分析具有最高灵敏度
- 与所有 LC/MS 接口兼容
- 内径 0.5、0.3、0.1 和 0.075 mm
- 300 Å 孔径，用于生物分子分析
- 一维和二维（蛋白质组学）应用的理想选择



提供各种固定相和规格的 ZORBAX 毛细管（内径 0.5 和 0.3 mm）和纳流柱（内径 0.1 和 0.075 mm）。这些色谱柱可通过减少柱上样品稀释而提高灵敏度，因此非常适合于样品量有限的应用。

## 技巧和工具

安捷伦提供各种在线研讨会和现场培训，帮助您学习如何成为更高效的色谱工作者。

如需了解更多信息，请访问：[www.agilent.com/chem/education](http://www.agilent.com/chem/education)

## 利用 LC/MS 进行高灵敏度蛋白质酶解物分析

色谱柱: ZORBAX 300SB-C18  
**5065-9911**  
**0.075 × 150 mm, 3.5 μm**

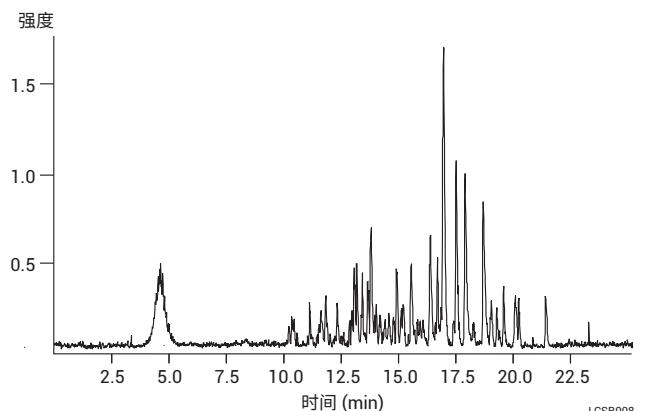
流动相: A: 水 + 0.1% 甲酸  
 B: ACN + 0.1% 甲酸

流速: 600 nL/min

梯度: 25 min 内 B 由 2% 升至 52%

检测器: 正离子纳流电喷雾 MS

样品: 八种蛋白质的酶解物, 100 fm (1 μL)



ZORBAX nano HPLC 色谱柱 (内径 0.075 mm) 用于对蛋白质酶解物样品进行高灵敏度 LC/MS 分析

## 利用毛细管柱实现高灵敏度

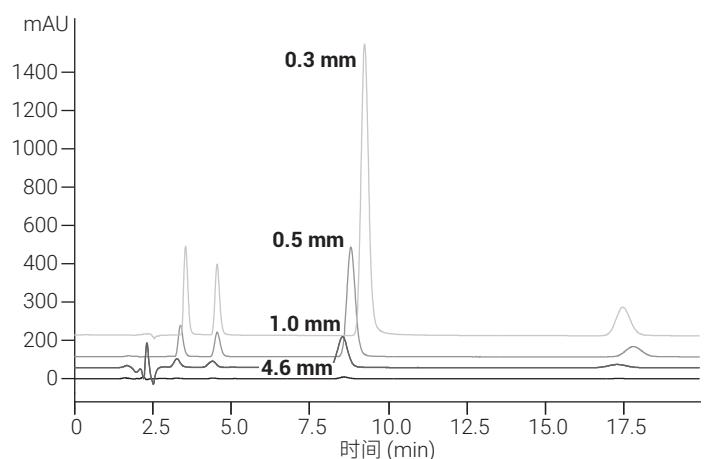
色谱柱: ZORBAX SB-C18  
**5064-8255**  
**0.3 × 150 mm, 5 μm**

色谱柱: ZORBAX SB-C18  
**5064-8256**  
**0.5 × 150 mm, 5 μm**

色谱柱: ZORBAX SB-C18  
**863600-902**  
**1.0 × 150 mm, 3.5 μm**

色谱柱: ZORBAX SB-C18  
**883975-902**  
**4.6 × 150 mm, 5 μm**

样品: 联苯 200 ng



样品量有限的应用要求毛细管柱尺寸最大程度减小样品稀释并提高灵敏度。在本示例中, 0.3 mm 毛细管柱的灵敏度是标准 4.6 mm 色谱柱的 100 倍。对于样品量非常有限的应用, 使用安捷伦纳径柱 (内径 0.1 mm 至 0.075 mm) 可使灵敏度提高达 2000 倍



## 人血清：利用 LC/MS 实现一维凝胶条带上的低丰度蛋白质的分离和鉴定

色谱柱： ZORBAX 300SB-C18

捕集阱： 0.3 × 5 mm, 5 μm, 5065-9913

分析柱： 0.3 × 150 mm, 5 μm, 5064-8263

流动相： A: 水 + 0.1% 甲酸

B: 乙腈 + 0.1% 甲酸

流速： 6 μL/min

梯度： 0 min 3% B

5 min 3% B (上样)

50 min 45% B

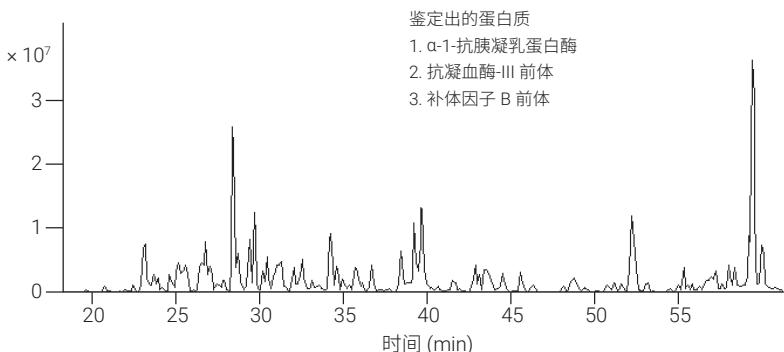
52 min 80% B

57 min 80% B

60 min 3% B

样品： 一维胶上酶解物的条带

基峰色谱图



人血清的样品前处理：使用多重亲和去除色谱柱 4.6 × 100 mm (部件号 5185-5985)

去除主要血清蛋白

然后进行 1D 凝胶酶解

## 利用毛细管液相色谱柱通过 LC 和 LC/MS 分析多肽磷酸化位点

色谱柱: ZORBAX 300SB-C18

5064-8268

0.5 × 150 mm, 3.5 μm

流动相: A: 水 + 0.1% 甲酸

B: 乙腈 + 0.1% 甲酸

流速: 5.5 μL/min

梯度: 50 min 内 B 由 5% 升至 55%, 55–57 min 保持 85% B

检测器: UV, 206 nm

质谱条件: LC/MS 正离子化模式 ESI 和 LC/MSD 离子阱

Vcap: 4000 V

干燥气流速: 7 L/min

干燥气温度: 250 °C

雾化器: 15 psi

毛细管出口电压: 50 V

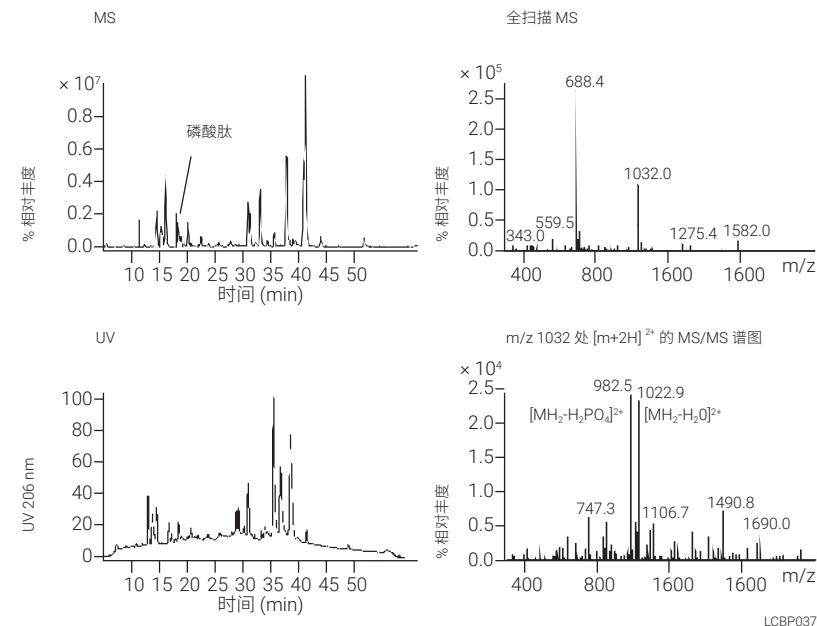
最大累积时间: 300 ms

总平均值: 3

分离峰宽: 3 m/z

碎裂电压: 1.0 V

样品: 酶解物中的 β-连环蛋白 100 nL (4 pmol)



## 用于 HPLC 分析与 UV 和 MS 检测的毛细管柱

色谱柱: ZORBAX 300SB-C18

5064-8263

0.3 × 150 mm, 5 µm

流动相: 50 min 内 B 由 5% 升至 55%，55–57 min 保持 85% B

A: 水 + 0.1% 甲酸

B: 乙腈 + 0.1% 甲酸

流速: 5.5 µL/min

检测器: UV, 206 nm

质谱条件: LC/MS 正离子化模式 ESI 和 LC/MSD 离子阱

Vcap: 4000 V

干燥气流速: 7 L/min

干燥气温度: 250 °C

雾化器: 15 psi

毛细管出口电压: 50 V

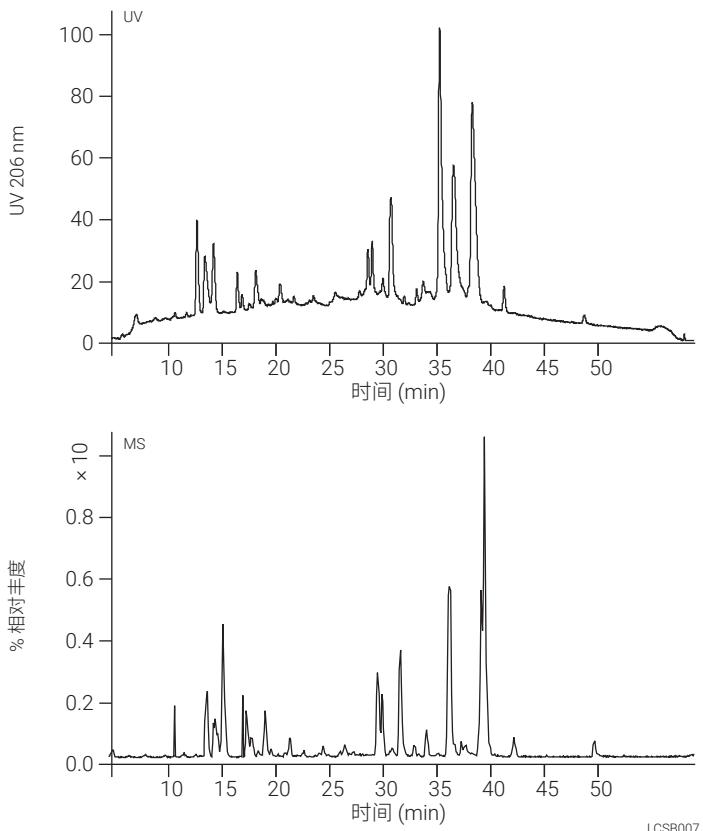
最大累积时间: 300 ms

总平均值: 3

分离峰宽: 3 m/z

碎裂电压: 1.0 V

样品: 酶解物中的 β-连环蛋白 100 nL (4 pmol)



ZORBAX 300SB-C18 毛细管（内径 0.3 mm）用于分离蛋白质酶解物同时采用 UV 和电喷雾 MS 进行检测。MS 检测可用于鉴定肽片段。

## 用纳流 HPLC 色谱柱和二维 HPLC 系统分离复杂样品中的蛋白质

色谱柱: ZORBAX 300SB-C18

5065-9913

0.3 × 5 mm, 5 µm

色谱柱: ZORBAX 300SB-C18

5065-9911

0.075 × 150 mm, 3.5 µm

流动相: 四元泵: 3% 乙腈:0.1% 甲酸

纳流泵: A; 水, 0.1% 甲酸, B; ACN, 0.1% 甲酸

流速: 四元泵: 30 µL/min

纳流泵: 300 nL/min

梯度: 四元泵: 等度

纳流泵: 6 min = 3% B,

120 min = 60% B, 125 min = 80% B, 130 min = 80% B,

131 min = 3% B, 140 min = 3% B

质谱条件: 离子源: 纳流 ESI, 干燥气流速: 5 L/min, 干燥气温度: 225 °C

离子阱: 截取电压: 1:35 V, 毛细管出口补偿: 115 V, 八极杆 1:

12 V, 八极杆 2: 3.5 V, 捕集阱驱动: 80 V。ICC: 开启, 平均值:

4, 最大累积时间: 150 ms; 目标值 60.000, 离子模式正, MS/MS

模式

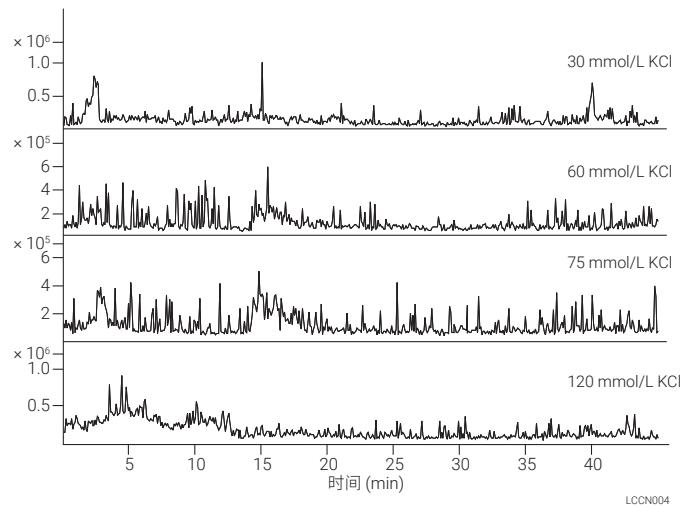
样品: 牛血清白蛋白的胰蛋白酶酶解物

体积: 1–8 µL

盐逐步洗脱: 8 mL 10 mmol/L–100 mmol/L KCl

(增量 10 mmol/L), 125 mmol/L, 150 mmol/L, 200 mmol/L,

300 mmol/L, 500 mmol/L, 1 mol/L



LCCN004

牛血清白蛋白 (BSA) 的胰蛋白酶酶解物。基峰色谱图显示了二维 HPLC 分离的一系列组分。单一色谱图代表在给定的盐浓度下洗脱, 然后进行富集并用反相色谱分析所得到的 BSA 肽



## ZORBAX Bio-SCX 系列 II

ZORBAX Bio-SCX 系列 II 色谱柱专为使用 LC/MS 优化肽和蛋白质的二维分离而设计。该填料基于超纯 3.5 μm ZORBAX 硅胶颗粒，并结合了用磺酸基团官能化的生物友好型聚合物。这在对肽和蛋白质进行二维分析的离子交换步骤中具有强大的保留能力和良好的峰形。



纳流柱

### HPLC 色谱柱性能指标

键合相	孔径	比表面积	pH 范围	功能	最大压力
ZORBAX Bio-SCX 系列 II	300 Å	90 m <sup>2</sup> /g	2.5–8.5	磺酸	350 bar

## 延长小分子肽的保留时间

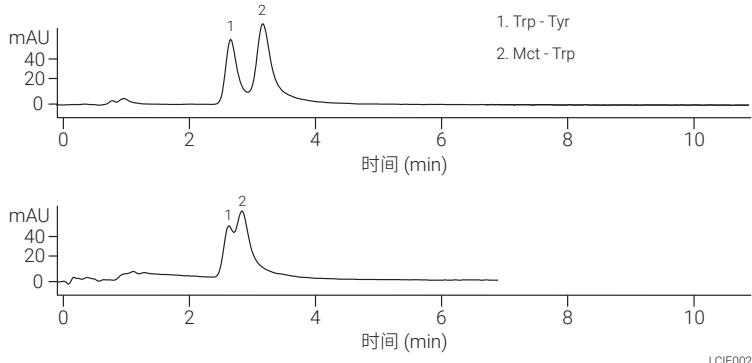
色谱柱： ZORBAX Bio-SCX 系列 II  
**5065-9912**  
**0.3 × 35 mm, 3.5 μm**

流动相： 95% 40 mmol/L NaCl: 5% ACN, 0.3% 甲酸

流速： 5 μL/min

检测器： UV, 230 nm

样品： 合成二肽



ZORBAX Bio-SCX 系列 II 色谱柱比其他 SCX 色谱柱更强地保留小分子肽。因此当这些色谱柱用于二维 HPLC 分析时，可提供亲水性肽片段的分离度并实现了更准确的鉴定。

## 技巧和工具

安捷伦生物惰性备件提供了无金属样品流路，可最大程度减小与生物分子的相互作用。

请访问：[www.agilent.com/chem/bio-inert-uhtlc](http://www.agilent.com/chem/bio-inert-uhtlc)

## 专用尺寸

### ZORBAX HPLC 毛细管柱（玻璃内衬不锈钢）

说明	规格 (mm)	填料粒径 (mm)	300SB-C18	300SB-C8	300Extend-C18
毛细管	0.5 × 250	5	5064-8266		
毛细管	0.5 × 150	5	5064-8264		
毛细管 RR	0.5 × 150	3.5	5064-8268		
毛细管	0.5 × 35	5	5064-8294		
毛细管 RR	0.5 × 35	3.5	5065-4459		
毛细管	0.3 × 250	5	5064-8265		
毛细管	0.3 × 150	5	5064-8263		
毛细管	0.3 × 35	5	5064-8295		
毛细管 RR	0.3 × 150	3.5	5064-8267	5065-4460	5065-4464
毛细管 RR	0.3 × 100	3.5	5064-8259	5065-4461	5065-4465
毛细管 RR	0.3 × 75	3.5	5064-8270	5065-4462	5065-4466
毛细管 RR	0.3 × 50	3.5	5064-8300	5065-4463	5065-4467
更换筛网, 10/包			5065-4427	5065-4427	5065-4427

### ZORBAX Nano HPLC 色谱柱 (PEEK)

说明	规格 (mm)	填料粒径 (mm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7
Nano RR	0.1 × 150	3.5	5065-9910	
Nano RR	0.075 × 150	3.5	5065-9911	
Nano RR	0.075 × 50	3.5	5065-9924	5065-9923
捕集阱/保护柱, 5/包	0.3 × 5	5	5065-9913	5065-9914
捕集阱/保护柱硬件工具包			5065-9915	5065-9915



ZORBAX 300SB-C18 捕集阱/保护柱, 5065-9913

## 微径（内径 1.0 mm）色谱柱

- 对于样品量很少的分析具有高灵敏度
- 与 LC/MS 接口兼容
- 包括各种键合相
- 硅胶核聚合物填料

当样品量有限时，微径（内径 1.0 mm）色谱柱是一种很好的选择。当使用相同的样品质量时，与内径 2.1 mm 的色谱柱相比，它们可以使检测限改善五倍。这一灵敏度的提高可能至关重要。微径柱使用低流速（通常为约 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ ）。因此，这些色谱柱非常适合用于要求低浓度的检测器（例如某些质谱仪）和毛细管液相色谱系统。

将微径柱与 UHPLC/HPLC 微径系统配合使用时，可获得最佳性能。各种键合相的最高耐受压力为 400 bar，包括 StableBond 300SB-C18、300SB-C8 和 Poroshell 色谱柱。还提供适用于需要非常稳定的宽径颗粒的应用的聚合物反相、PLRP-S 和离子交换 PL-SAX 和 PL-SCX。现在还提供保护柱，这些保护柱具有可调节的管深度限位器，确保始终提供完美的零死体积连接。



立体保护 300StableBond 键合相

### 胰蛋白酶裂解物的分离

**色谱柱:** ZORBAX 300SB-C18  
863630-902  
1.0 × 150 mm, 3.5  $\mu\text{m}$

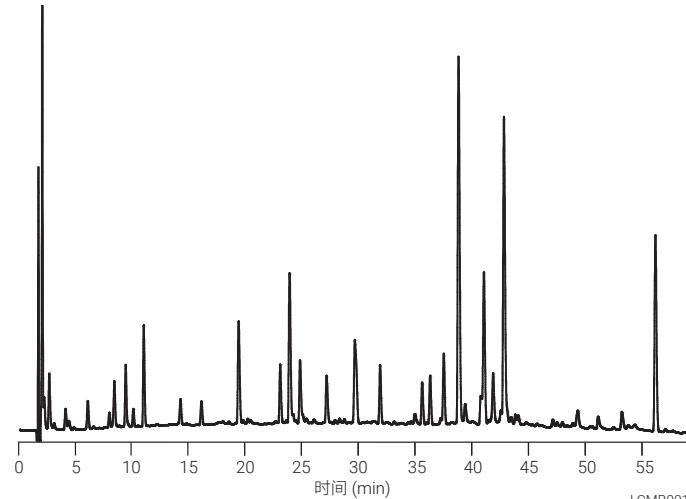
**流动相:** 梯度: 60 min 内 B 由 2% 升至 60%  
A: 0.1% TFA  
B: 0.075% TFA:80% ACN

**流速:** 50  $\mu\text{L}/\text{min}$

**柱温:** 50 °C

**检测器:** UV, 215 nm

**样品:** rhGH 胰蛋白酶酶解物 2  $\mu\text{L}$



在微径柱上分离的胰蛋白酶酶解物的这一示例展示了内径 1.0 mm 的色谱柱可能实现的高灵敏度和分离度。



## 用于高灵敏度肽分析的微径 HPLC

色谱柱： PLRP-S 100 Å 5 µm  
150 mm × 各种内径

流动相： A: 0.01 mol/L tris HCl, pH 8  
B: A + 0.35 mol/L NaCl, pH 8

流速： 1 mL/min

梯度： 15 min 内，20% ACN (含 0.1% TFA) 增加至 50%  
ACN (含 0.1% TFA)

进样量： 0.5 µL

样品浓度： 0.25 mg/mL

检测器： UV, 220 nm

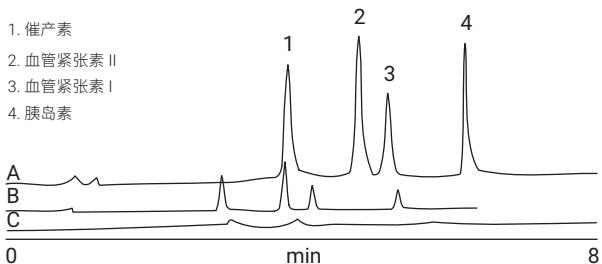
### 峰归属

A. 1.0 mm 内径 (流速 47 µL/min)

B. 2.1 mm 内径 (流速 200 µL/min)

C. 4.6 mm 内径 (流速 1 mL/min)

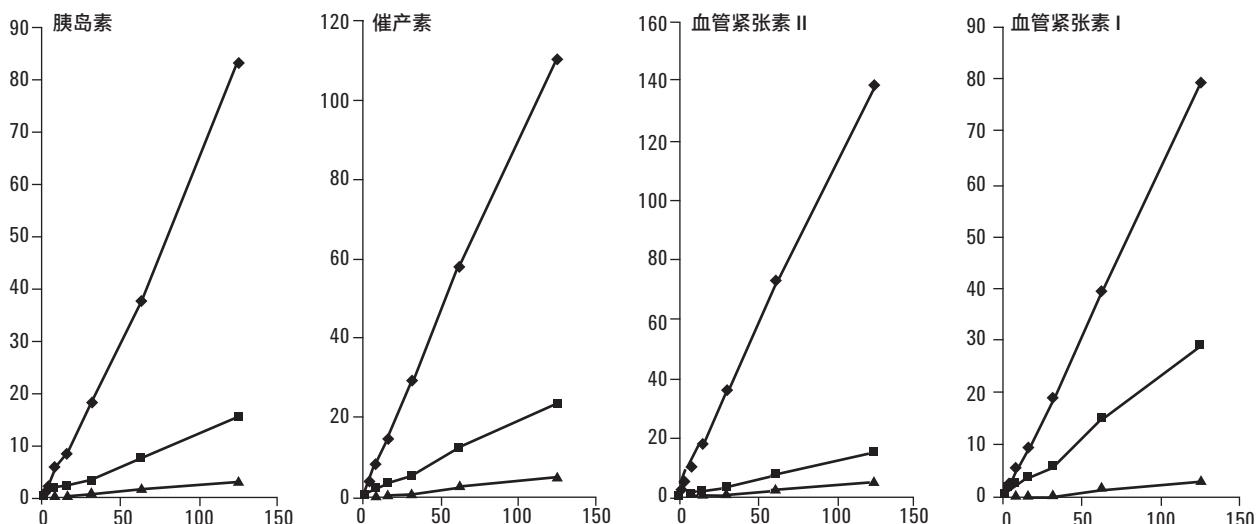
- 1. 催产素
- 2. 血管紧张素 II
- 3. 血管紧张素 I
- 4. 胰岛素



用 PLRP-S 100 Å 5 µm 色谱柱进行肽分离

### 峰归属

- ◆ 1.0 mm
- 2.1 mm
- ▲ 4.6 mm



采用 PLRP-S 色谱柱得到的标准曲线数据点图。减小色谱柱内径可降低检测限，并能够定量分析少量样品

## 微径柱 (内径 1.0 mm)

说明	规格 (mm)	填料粒径 (mm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7		
微径柱	1.0 × 250	5	861630-902			
微径 RR	1.0 × 150	3.5	863630-902	863630-906		
微径 RR	1.0 × 50	3.5	865630-902	865630-906		
微径保护柱, 3/包	1.0 × 17	5	5185-5920	5185-5920		
说明	规格 (mm)	填料粒径 (mm)	Poroshell 300SB-C18	Poroshell 300SB-C8	Poroshell 300SB-C3	Poroshell 300Extend-C18
微径柱	1.0 × 75	5	661750-902	661750-906	661750-909	671750-902
微径保护柱, 3/包	1.0 × 17	5	5185-5968	5185-5968	5185-5968	
说明	规格 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	PLRP-S 100 Å USP L21	PLRP-S 300 Å USP L21	PLRP-S 1000 Å USP L21	PLRP-S 4000 Å USP L21
微径柱	1.0 × 150	3	PL1312-3300			
微径柱	1.0 × 50	8			PL1312-1802	PL1312-1803
微径柱	1.0 × 50	5	PL1312-1500	PL1312-1501	PL1312-1502	PL1312-1503
微径柱	1.0 × 50	3	PL1312-1300	PL1312-1301		
说明	规格 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	PL-SAX 1000 Å	PL-SAX 4000 Å	PL-SCX 1000 Å	PL-SCX 4000 Å
微径柱	1.0 × 50	5	PL1351-1502	PL1351-1503	PL1345-1502	PL1345-1503

### 2D-LC

- 将两种正交液相色谱技术结合到一次分析中
- 与 UHPLC 方法相比，提供更大的峰容量
- 将体积排阻和离子交换方法与 MS 相结合

由于生物分子的异质性和复杂性，必须使用多种液相色谱技术来鉴定和表征目标生物药物。通过将两种正交技术结合到一次分析中，例如亲水相互作用色谱和反相色谱，或阳离子交换色谱和反相色谱，可实现无与伦比的分离能力，从而能够鉴定和分析关键质量属性。

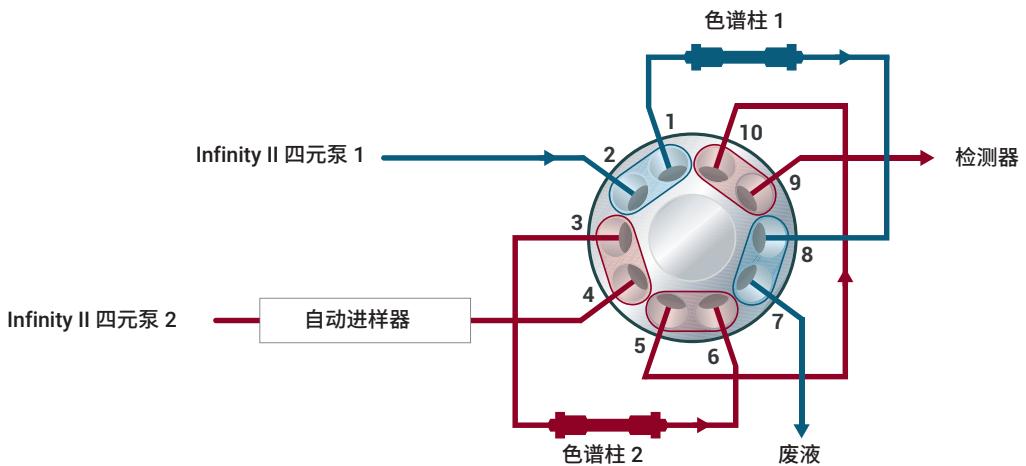
二维液相色谱的应用范围很广，包括从单克隆抗体的 Protein A 捕获物中获得的馏分进行简单的在线脱盐，将亲水性相互作用色谱和反相肽谱分析方法连接以表征肽片段的全谱图（亲水性肽、糖肽和疏水性肽片段）。

使用 2D-LC 缩短分析时间并最大程度增加数据生成/解析，从而实现更高的分析效率：

- 方法筛查和应用切换
- 离线色谱柱再生
- 在线杂质分析
- 中心切割二维液相色谱
- 全二维液相色谱

### 离线色谱柱再生

为使用离子交换液相色谱实现稳定的电荷异构体分析，需要进行稳定的色谱柱净化和平衡。这样会延长总分析时间，因此需要缩短这一时间以提高样品通量的方法。一种方法是使用离线色谱柱再生，该方法已被证明能够使分析周期缩短多达 40%。



示意图示出离线色谱柱再生所需的阀布置，该阀布置用于使用 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统和两根 Bio MAb PEEK (2.1 × 250 mm, 5 µm) 色谱柱进行 mAb 电荷异构体分析。

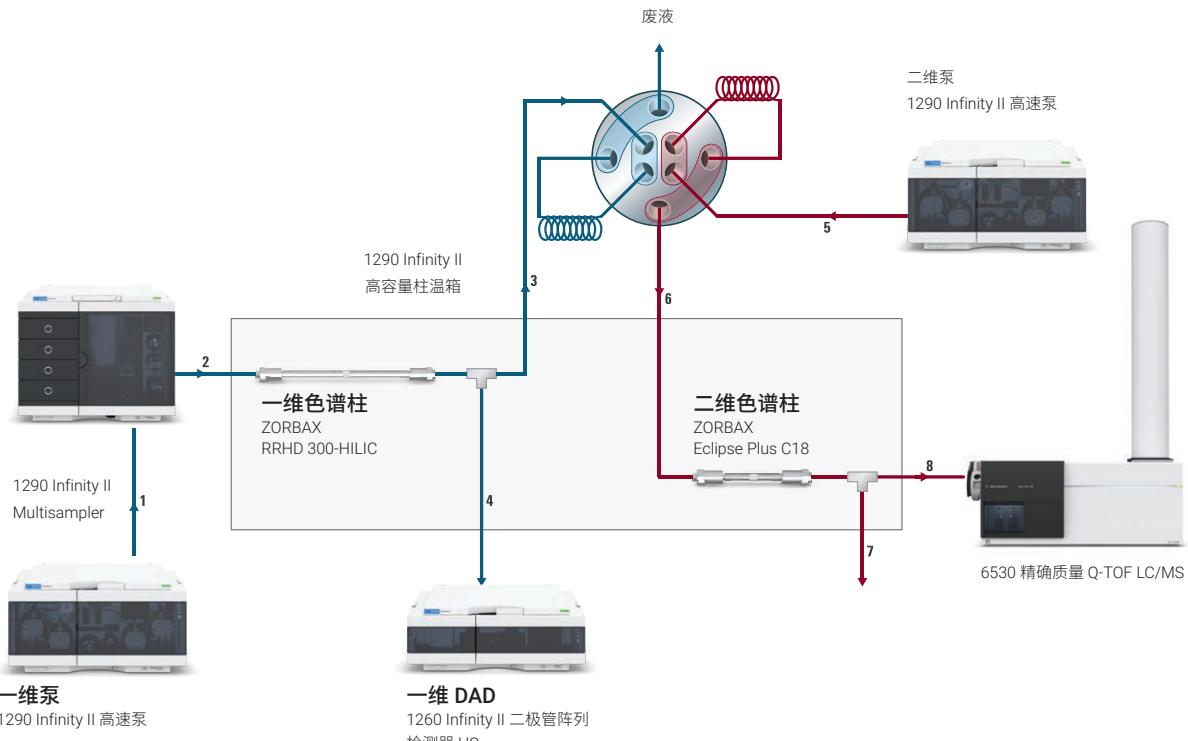
#### 保留时间和峰面积的柱内 ( $n = 6$ ) 和柱间 ( $n = 12$ ) 精密度

	RT 的柱内 % RSD	峰面积的柱内 % RSD	RT 的柱间 % RSD	峰面积的柱间 % RSD
CV1	0.205	2.50	0.247	3.39
CV2	0.183	1.91	0.218	1.63
CV3	0.247	1.13	0.277	2.56
CV4	0.302	6.73	0.286	6.67
CV5	0.301	1.63	0.255	1.41
CV6	0.252	2.78	0.213	2.93

利用 Bio MAb PEEK 色谱柱的离线再生实现良好的保留时间和峰面积的柱间和柱内精密度。

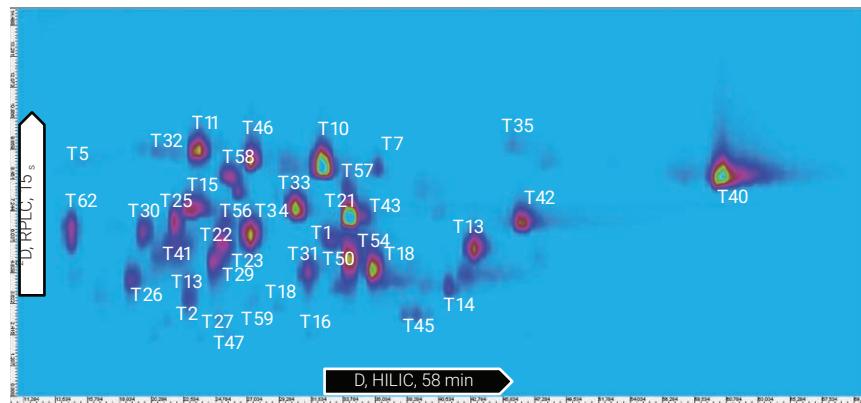
柱内 ( $n = 6$ ) 和柱间 ( $n = 12$ )。

## 全二维液相色谱



1	一维泵至自动进样器	校准毛细管 (G1312-67500)
2	自动进样器至一维色谱柱 (1.6 μL 热交换器)	不锈钢, 0.17 mm
3	三通 1 至 2D-LC 阀	不锈钢, 0.12 × 200 mm
4	三通 1 至 1D DAD	不锈钢, 0.12 × 140 mm
5	2D 泵至 2D-LC 阀	不锈钢, 0.17 mm
6	2D-LC 阀至二维色谱柱 (1.6 μL 热交换器)	不锈钢, 0.12 × 270 mm
7	三通 2 至废液	不锈钢, 0.12 × 340 mm
8	三通 2 至检测器 (AJS 离子源或 DAD 2D)	不锈钢, 0.075 × 340 mm (5067-4783)

InfinityLab 二维液相色谱系统配置，使用 HILIC 和 RPLC-MS 实现单克隆抗体酶解物的全二维分析和肽谱分析。



利用 MS 总离子计数数据生成的曲妥珠单抗的胰蛋白酶酶解物分析的 LCxLC 等高线图。该分析的两个维度（第一维为 HILIC 和第二维为 RP）具有良好的正交性。

安捷伦提供具有所需色谱柱尺寸的多种固定相。如果您找不到所需的孔径、填料粒径、固定相和色谱柱尺寸，请联系我们的定制色谱柱团队，他们在生产满足特定的性能标准的色谱柱方面拥有丰富的专业知识。

## 技巧和工具

如需了解有关 2D-LC 基本原理的更多信息，请参见我们的 2D-LC 基础导论：*Principles, Practical Implementation and Applications of Two-Dimensional Liquid Chromatography* (二维液相色谱的原理、实际实施和应用) (出版物 5991-2359EN)

[www.agilent.com/chem/2DLC-Primer](http://www.agilent.com/chem/2DLC-Primer)





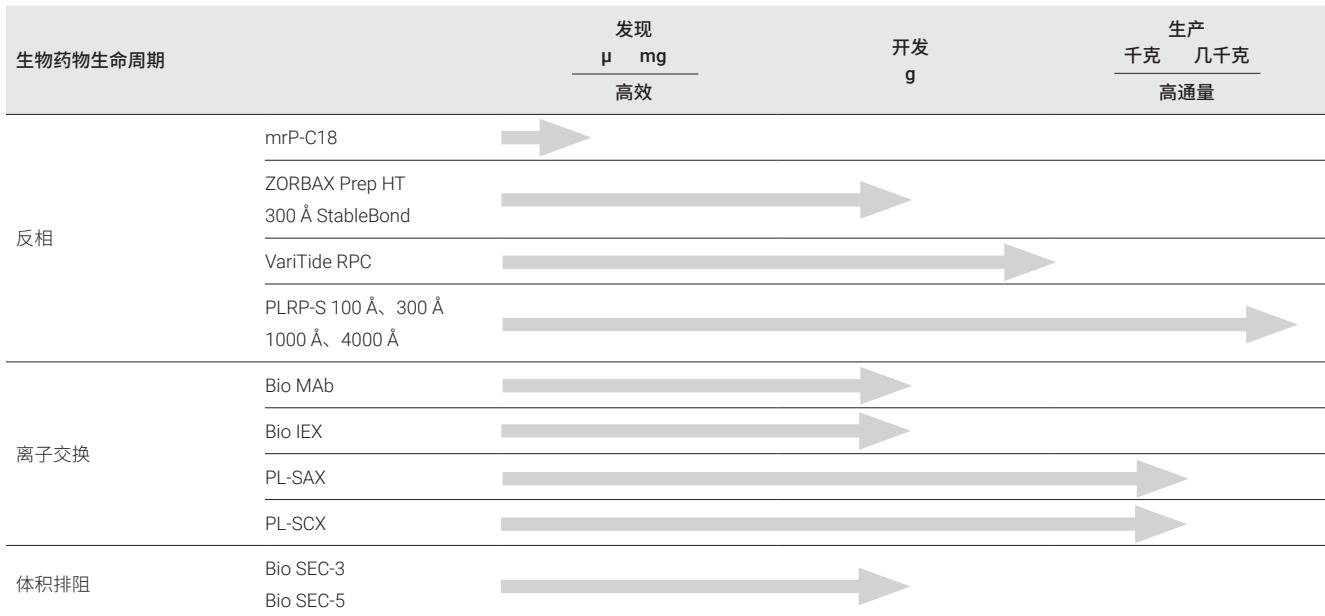
## 纯化 — 制备型 HPLC

安捷伦提供专为生物分子纯化而设计的一系列硅胶和聚合物型 HPLC 色谱柱与填料。其中包括为纯化微克和毫克级生物制药候选药物而优化的高效小粒度前处理柱，以及填充能纯化克级、千克级和几千克 API 的开发和生产色谱柱的全多孔散装填料。

某些色谱柱专门设计用于满足高效纯化的需求，而其他产品能够从小颗粒分析柱轻松放大至大规模 API 生产。表 1 显示了制备柱/填料的选择，以及可以纯化的产品量。



聚合物制备型 HPLC 色谱柱



用于生物分子纯化的安捷伦色谱柱和填料 — 色谱类型、产品系列和纯化规模。

## 纯化柱选择

应用	技术	备注	安捷伦色谱柱
蛋白质组学	反相	适用于蛋白质组学研究的专用高回收率色谱柱。其设计用于具有最大回收率的 µg 级纯化。	mRP-C18
所有生物分子	反相	高效 300 Å 硅胶型填料。	ZORBAX PrepHT 300SB
合成肽	反相	设计用于合成肽的纯化的聚合物材料。这是一款高效的单色谱柱解决方案，适用于合成肽，酸性、碱性、疏水性和亲水性多肽，涵盖液相和固相合成生产的全尺寸范围多肽。	VariTide RPC
所有生物分子	反相	提供各种孔径和粒度的优级聚合物型反相系列色谱柱，其中小粒度制备柱可进行高效的实验室级纯化，大粒度生产级色谱柱可用于放大到大量生产型纯化。如果纯化将被放大到生产 API，并需要进行合规文件记录时，使用 PLRP-S。	PLRP-S
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 适用于高效纯化的 3 µm 和 5 µm 填料</li> <li>- 适用于较大规模和低压纯化的 8 µm、10 µm、10–15 µm、15–20 µm、30 µm 和 50 µm 填料</li> </ul>	
单克隆抗体	离子交换	非多孔弱阳离子交换剂	Bio MAb
所有生物分子	离子交换	非多孔离子交换剂  SAX、WAX、SCX 和 WCX 官能团能够为酸性和碱性分子的纯化提供选择 非多孔 5 µm 颗粒，可实现最高效率的实验室制备	Bio IEX
所有生物分子	离子交换	全多孔强阴离子交换剂  <ul style="list-style-type: none"> <li>- 用于高效分离的 5 µm 填料粒径</li> <li>- 用于更大规模的中压和低压纯化的 8 µm、10 µm 和 30 µm 填料</li> </ul>	PL-SAX
		全多孔强阳离子交换剂  <ul style="list-style-type: none"> <li>- 用于高效分离的 5 µm 填料粒径</li> <li>- 用于更大规模的中压和低压纯化的 8 µm、10 µm 和 30 µm 填料</li> </ul>	PL-SCX
所有生物分子	体积排阻	具有各种孔径的硅胶基 SEC 材料  <ul style="list-style-type: none"> <li>- 用于实现高效分离的 3 µm 和 5 µm 填料粒径</li> <li>- 100 Å 至 2000 Å 的孔径可覆盖各种样品分子大小</li> </ul>	Bio SEC-3 和 5

## 技巧和工具

有关详细信息，可参见：

生物分子纯化（出版物 5990-8335ZHCN）

[www.agilent.com/search](http://www.agilent.com/search)



## mRP-C18 高回收率蛋白质分析柱

mRP（大孔反相）C18 高回收率蛋白质分析柱适用于复杂蛋白质样品（如免疫去除后的血清或血浆蛋白）的高回收率、高分离度分离、分级以及同步脱盐。

- 采用多重亲和去除系统（液相色谱柱）对血清进行免疫去除，可以获得 95%–99% 以上的蛋白样品回收率
- 可以负载高达 380 µg 的总蛋白质量，而不会影响蛋白质的色谱分离度
- 色谱柱填充大孔径 C18 键合的超纯 5 µm 硅胶颗粒，专为降低或消除蛋白质的强吸附而设计
- 最大操作压力为 250 bar (4000 psi)
- 与水和所有常用有机溶剂兼容



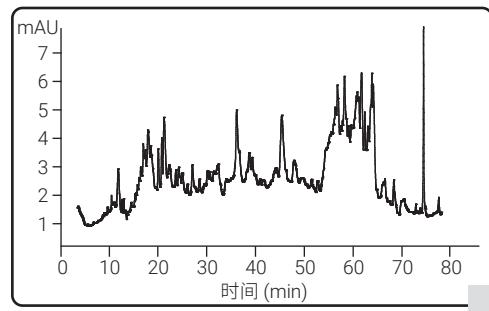
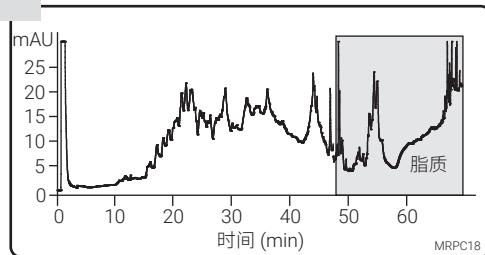
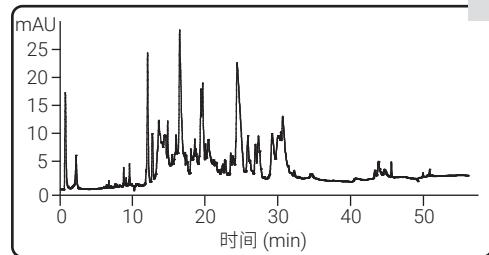
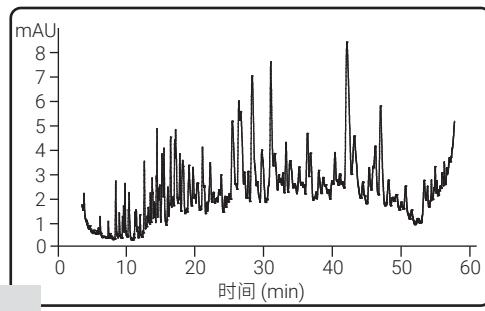
mRP-C18 高回收率蛋白质分析柱，  
4.6 × 50 mm, 5188-5231

### mRP-C18 高回收率蛋白质分析柱

说明	蛋白质载样量	部件号
mRP-C18, 0.5 × 100 mm	10 ng–5 µg	5188-6510
mRP-C18, 2.1 × 75 mm	8–85 µg	5188-6511
mRP-C18, 4.6 × 50 mm	40–380 µg	5188-5231

**mRP 色谱柱上复杂样品的蛋白质分馏**

mRP-C18, 4.6 × 50 mm

**最高的回收率**



## ZORBAX PrepHT

- 利用 ZORBAX 固定相从分析级轻松放大至制备级
- 快速制备分离，最高达 2000 mg
- 5–7  $\mu\text{m}$  颗粒，可实现高效率和高产量
- 易于安装的手紧式连接，密封度高达 5000 psi/350 bar
- 用于在制备分离中维持分析固定相的选择性

利用 ZORBAX PrepHT 色谱柱轻松实现高纯度、高回收率和高通量。提供多种键合相 — StableBond 300  $\text{\AA}$ 、C18、C8、C3 和 CN — 用于各种条件下优化分离度和载样量。

ZORBAX PrepHT 色谱柱填充有粒径为 5 和 7  $\mu\text{m}$  的填料，具有非常高的分离度。高分离度支持化合物采用高载样量，可获得高产率和高纯度。直径较大的色谱柱和机械强度更高的 ZORBAX 颗粒可允许流速高达 100 mL/min，从而提高通量。

ZORBAX PrepHT 色谱柱专门设计用于从分析级快速放大至制备级而不降低分离度。对于在较大的色谱柱（内径为 21.2 mm，长度为 150 mm 及更长）上的复杂分离，安捷伦精心选择了 7  $\mu\text{m}$  粒径填料以实现高柱效和高上样量之间的平衡。



ZORBAX 300  $\text{\AA}$  StableBond  
Prep HT 卡套柱

### ZORBAX 300 $\text{\AA}$ StableBond

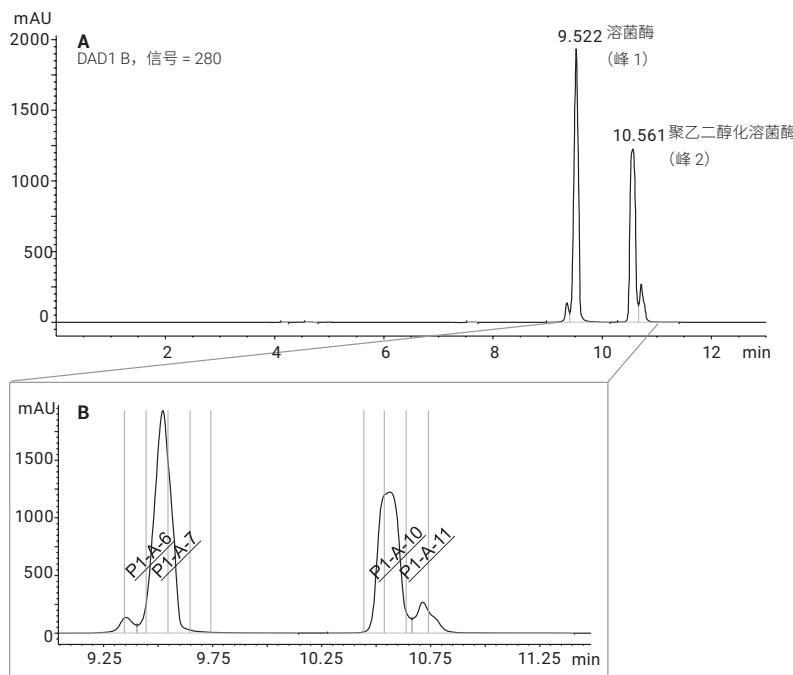
说明	规格 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7	300SB-CN USP L10	300SB-C3 USP L56
<b>PrepHT 卡套柱 (需要柱端接头套件 820400-901)</b>						
PrepHT 卡套柱	21.2 × 250	7	897250-102	897250-106	897250-105	897250-109
PrepHT 卡套柱	21.2 × 150	7	897150-102	897150-106		897150-109
PrepHT 卡套柱	21.2 × 150	5	895150-902	895150-906		895150-909
PrepHT 卡套柱	21.2 × 100	5	895100-902	895100-906		895100-909
PrepHT 卡套柱	21.2 × 50	5	895050-902	895050-906		895050-909
PrepHT 柱端接头, 2/包			820400-901	820400-901	820400-901	820400-901
PrepHT 保护柱柱芯, 2/包	17.0 × 7.5	5	820212-921	820212-918	820212-924	820212-924
保护柱柱芯硬件			820444-901	820444-901	820444-901	820444-901

## PEG 溶菌酶反应混合物的半制备型 RP-HPLC 分析

色谱柱： ZORBAX SB-C18  
880975-202  
9.4 × 250 mm, 3.5 μm

A: PEG 溶菌酶反应混合物在 ZORBAX 半制备级 300 SB-C18 色谱柱上的半制备型 RP-HPLC 分析

B: 示出馏分收集的放大图



### 用于 Prep to Process 的 PLRP-S 柱

- 适用于从研发阶段放大到几千克级 cGMP 生产，缩短了方法开发时间
- 分离、优化、清洗和再生的优良化学稳定性，提高了选择性和柱寿命
- 多根色谱柱采用同一批次填料装填，缩短了系统停机时间并减少了验证成本

PLRP-S 填料为刚性聚(苯乙烯/二乙烯基苯) 颗粒，可提供各种孔径，适用于小分子、合成生物分子和大分子的纯化。其具有出色的热稳定性和化学稳定性，尤为适合需要在极端条件下进行样品前处理、化合物洗脱和色谱柱再生的纯化应用。

容量和分离度是最大程度提高纯化通量的两个关键参数。PLRP-S 具有多种填料孔径可供选择，且操作条件范围更宽，能够为实现最佳流程提供更多选择。填料粒径范围从 3  $\mu\text{m}$  到 50  $\mu\text{m}$ ，适用于从研发阶段的  $\mu\text{g}/\text{mg}$  水平放大到 cGMP 生产的几千克级水平。卓越的化学稳定性， $\text{NaOH}$  浓度可高达 1 mol/L，可通过冲洗和再生延长色谱柱寿命。PLRP-S 填料批量规模可高达 600 L，多根色谱柱可采用同一批次填料进行装填。

作为我们对质量和持续供应承诺的一部分，所有生产均在记录完备的过程中进行，并定期实施设施审计。



## PLRP-S Prep to Process 应用指南

应用	PLRP-S 填料孔径			
	100 Å	300 Å	1000 Å	4000 Å
合成生物分子, 肽, 寡核苷酸	✓	✓		
重组生物分子, 肽, 蛋白质	✓	✓		
大生物分子, 抗体, DNA 片段			✓	✓
小分子, 不稳定化合物 (包括金属灵敏度)	✓			

## UHPLC 色谱柱性能指标

pH 范围	1–14
缓冲液含量	无限制
有机改性剂	1%–100%
温度上限	200 °C
最大压力	5–8 µm: 3000 psi (210 bar) 3 µm: 4000 psi (300 bar)

## 专用尺寸

使用 PLRP-S 100 Å, 4.6 × 50 mm 纯化 25 mer 脱三苯甲基保护的寡核苷酸，并对馏分进行定量分析

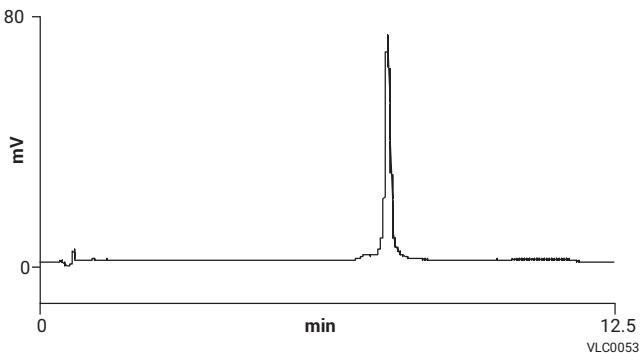
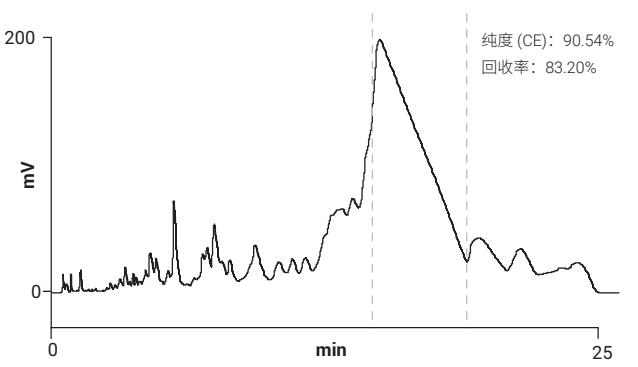
色谱柱: PLRP-S 100 Å  
PL1512-1300  
4.6 × 50 mm, 3 μm

流动相: A: 100 mmol/L 醋酸三乙胺 (TEAA)  
B: 含 100 mmol/L TEAA 的 25:75 乙腈:水

流速: 1 mL/min

梯度: 25% B 0 min, 35% B 2 min,  
45% B 22.5 min, 45% B 23 min,  
25% B 23.05 min, 25% B 26 min

柱温: 80 °C





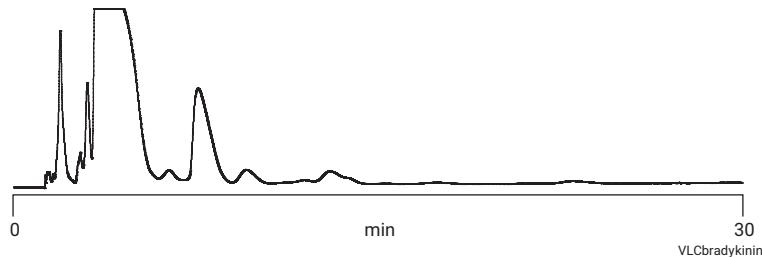
### 粗制缓激肽制备载样量

色谱柱: PLRP-S 100 Å  
PL1512-5100  
4.6 × 250 mm, 10 µm

流动相: 含 0.1% TFA 的 21% ACN:79% 水

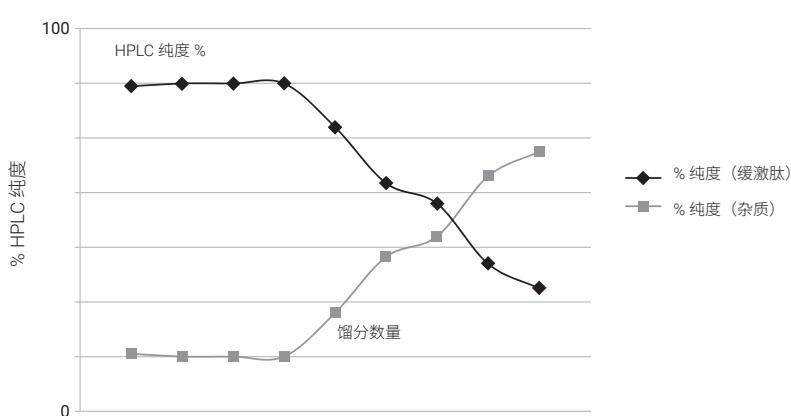
流速: 1 mL/min (360 cm/h)

样品: 30 µL, 含 1.5 mg 粗制肽



### 馏分分析 — 浓度过载纯化

在整个峰中收集的馏分的 HPLC 分析表明, 馏分 1 至 4 仅包含目标肽, 并且主要杂质的含量随馏分数量的增多而增加。使用高效 PLRP-S 色谱柱, 可能将纯度为 91.7% 的粗品提纯至纯度 100% (回收率 97%)。如需了解更多信息, 请参见应用简报 5990-7736EN。



## 专用尺寸

### Prep to Process PLRP-S

规格 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	PLRP-S 100 Å	PLRP-S 300 Å	PLRP-S 1000 Å	PLRP-S 4000 Å
100 × 300	30			PL1812-3102	PL1812-3103
100 × 300	15–20	PL1812-6200	PL1812-6201		
100 × 300	10–15	PL1812-6400	PL1812-6401		
100 × 300	10	PL1812-6100	PL1812-6101		
100 × 300	8	PL1812-6800	PL1812-6801		
50 × 300	8	PL1712-6800	PL1712-6801		
50 × 150	30			PL1712-3702	PL1712-3703
50 × 150	15–20	PL1712-3200	PL1712-3201		
50 × 150	10–15	PL1712-3400	PL1712-3401		
50 × 150	10	PL1712-3100	PL1712-3101	PL1712-3102	PL1712-3103
50 × 150	8	PL1712-3800	PL1712-3801		
25 × 300	15–20	PL1212-6200	PL1212-6201		
25 × 300	10–15	PL1212-6400	PL1212-6401		
25 × 300	10	PL1212-6100	PL1212-6101		
25 × 300	8	PL1212-6800	PL1212-6801		
25 × 150	30			PL1212-3702	PL1212-3703
25 × 150	10	PL1212-3100	PL1212-3101	PL1712-3102	PL1712-3103
25 × 150	8	PL1212-3800	PL1212-3801		
25 × 50	10			PL1212-1102	PL1212-1103

### PLRP-S 方法开发色谱柱

4.6 × 250	30			PL1512-5702	PL1512-5703
4.6 × 250	15–20	PL1512-5200	PL1512-5201		
4.6 × 250	10–15	PL1512-5400	PL1512-5401		
4.6 × 250	10	PL1512-5100	PL1512-5101	PL1512-5102	PL1512-5103
4.6 × 250	8	PL1512-5800	PL1512-5801		
4.6 × 150	30			PL1512-3702	PL1512-3703
4.6 × 150	15–20	PL1512-3200	PL1512-3201		
4.6 × 150	10–15		PL1512-3401		
4.6 × 150	10	PL1512-3100	PL1512-3101	PL1512-3102	PL1512-3103
4.6 × 150	8	PL1512-3800	PL1512-3801		

**PLRP-S 散装填料**

填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	单位	PLRP-S 100 $\text{\AA}$	PLRP-S 300 $\text{\AA}$	PLRP-S 1000 $\text{\AA}$	PLRP-S 4000 $\text{\AA}$
50	1 kg	PL1412-6K00	PL1412-6K01	PL1412-6K02	
	100 g	PL1412-4K00	PL1412-4K01	PL1412-4K02	
30	100 g			PL1412-4702	PL1412-4703
15-20	1 kg	PL1412-6200	PL1412-6201		
	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		
	100 g	PL1412-4100	PL1412-4101	PL1412-4102	PL1412-4103
8	1 kg	PL1412-6800	PL1412-6801		

定制色谱柱和散装填料的订购。

如果您在这些表中没有找到所需的孔径/粒径和色谱柱规格的组合，或没有您需要的散装填料数量，请联系当地的销售办事处，他们将帮助您进行定制订购。

**技巧和工具**

色谱柱用户指南是非常实用的资源，其中包含使用和色谱柱维护说明以及建议的启动方法：

[www.agilent.com/chem/biolc-columns-user-guides](http://www.agilent.com/chem/biolc-columns-user-guides)



## Bio MAb 和 Bio IEX

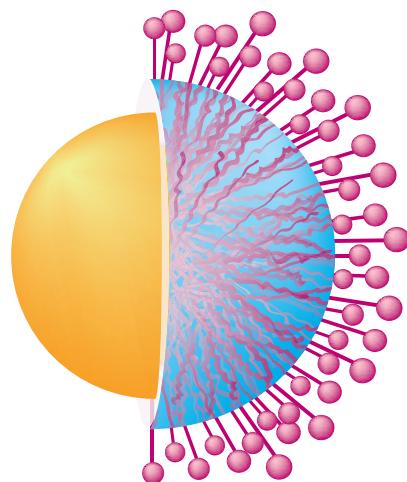
### 分析到高效制备

- 非多孔颗粒可消除杂质，并提供最高效率以纯化即使密切相关的杂质
- 五种官能团：SAX、WAX、SCX、WCX 和 CX，专门针对 mAb 进行了优化，可提供最大的分离度以增加样品载量
- 使用相同的 5 μm 颗粒从分析级放大至半制备级和制备级

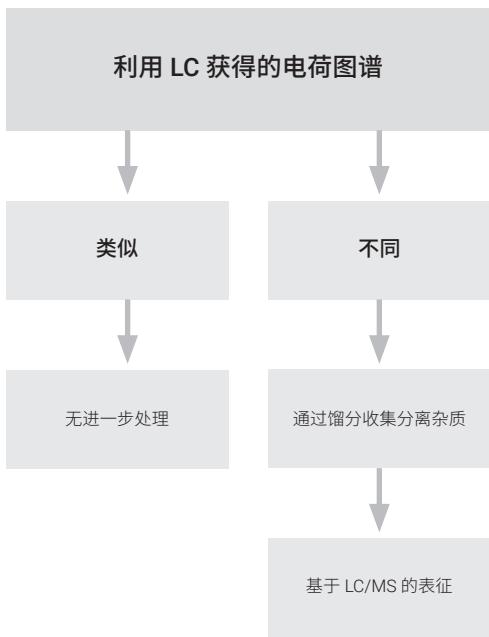
这些颗粒上的外部亲水层减少了非特异性相互作用，并实现了较高的样品回收率。

使用填充有相同 5 μm 颗粒的分析柱、半制备柱和制备柱，可快速纯化生物制药工艺开发过程中发现的任何意外的电荷异构体，以进行进一步的表征和鉴定。

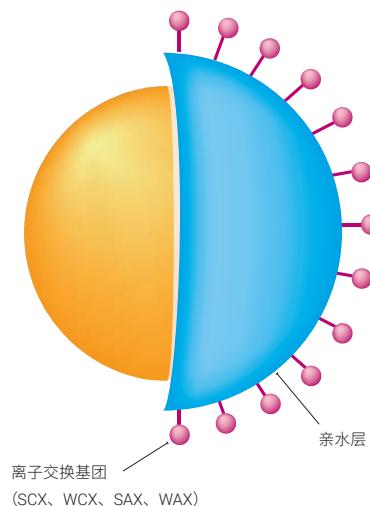
Bio MAb 填料



利用 LC 获得的电荷图谱



Bio IEX 填料



**Bio MAb HPLC 色谱柱**

规格 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	部件号
21.2 × 250	5	5190-6885
10 × 250	5	5190-6884

**Bio IEX HPLC 色谱柱，不锈钢**

规格 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	Bio SCX 部件号	Bio WCX 部件号	Bio SAX 部件号	Bio WAX 部件号
21.2 × 250	5	5190-6879	5190-6881	5190-6883	5190-6877
10 × 250	5	5190-6878	5190-6880	5190-6882	5190-6878

**技巧和工具**

可以将 Agilent BioHPLC 色谱柱与 InfinityLab Quick Connect 快速连接接头和无金属的生物惰性毛细管连接。

了解更多信息：[www.agilent.com/chem/5991-7469EN](http://www.agilent.com/chem/5991-7469EN)

### 用于 Prep to Process 的 PL-SAX 和 PL-SCX

- 更宽 pH 范围内的阳离子交换纯化扩展了应用范围
- HPLC 流速和快速平衡缩短了纯化周期时间
- 大孔径改善了传质性能，可提供快速、高分离度纯化

这些强离子交换填料具有非常高的亲水性，专为纯化生物分子而设计。PL-SAX 和 PL-SCX 填料采用全聚合物材料制成，在任何 HPLC 条件下都具有化学稳定性和热稳定性。强离子交换官能团与化学稳定的聚合物共价连接，有利于在更宽的 pH 范围内进行离子交换纯化。这种稳定性可用于色谱柱清洗和净化。热稳定性还能在目标化合物纯化时实现变性条件和稳定剂/增溶剂的使用，例如带自我互补序列的合成寡核苷酸的纯化。

1000 Å 和 4000 Å 的大孔径填料均具有机械稳定性和稳定性，能够在各种线速度下运行，并且能够快速加入稀溶液中并进行清洗。HPLC 流速和快速平衡缩短了纯化周期。

动态轴向压缩 (DAC) 色谱柱硬件中的填料简单直接，并且高效色谱柱可实现优异的重现性和寿命。1000 Å 孔径用于大容量纯化，而 4000 Å 超大孔径填料改善了传质性能，适用于生物大分子和快速高分离度纯化。



## UHPLC 色谱柱性能指标

	PL-SAX	PL-SCX
基质	全聚合	全聚合
孔径	1000 Å、4000 Å	1000 Å、4000 Å
填料粒径	10 µm, 30 µm	10 µm, 30 µm
微球形式	硬质球形	硬质球形
官能团	季胺	磺酸
压力稳定性	3000 psi	3000 psi
温度稳定性	80 °C	80 °C
pH 范围	1–14	1–14
洗脱液兼容性	所有阴离子交换缓冲液	所有阳离子交换缓冲液
填充柱床密度	0.39 g/mL	0.39 g/mL

## 大分子寡核苷酸的纯化

色谱柱： PL-SAX 1000 Å, 8 µm

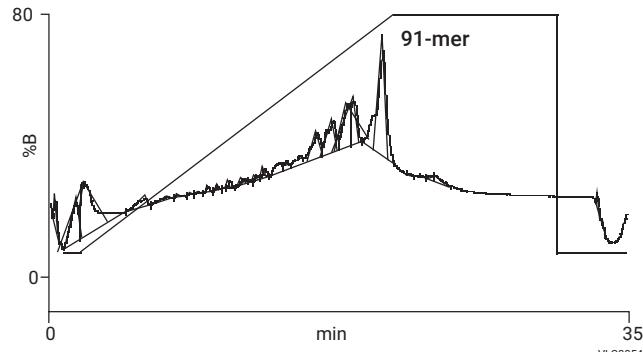
流动相：  
A: 93% 100 mmol/L TEAA (pH 7):7% ACN  
B: 93% 100 mmol/L TEAA 和 3.24 mol/L  
乙酸铵 (pH 7):7% ACN

流速： 1.5 mL/min

梯度： 20 min 内 B 由 0% 升至 100%

柱温： 60 °C

检测器： UV, 290 nm



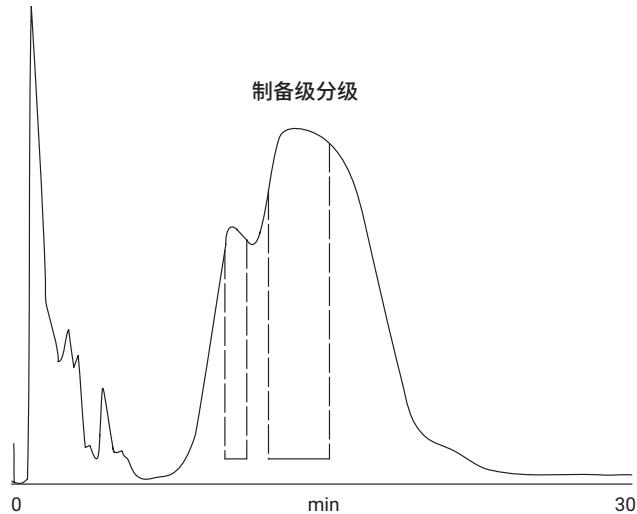
VLC0054



含淀粉葡萄糖苷酶的培养液滤液的制备级分级

色谱柱: PL-SAX 4000 Å  
PL1551-1803  
**4.6 × 50 mm, 8 µm**

流动相: A: 10 mmol/L Tris HCl, pH 8  
B: A + 500 mmol/L NaCl, pH 8  
流速: 4.0 mL/min  
梯度: 2 min 内 B 由 0% 线性升至 100%  
柱温: 60 °C  
检测器: UV, 280 nm



**Prep to Process PL-SAX 和 PL-SCX**

尺寸	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	PL-SAX 1000 Å	PL-SAX 4000 Å	PL-SCX 1000 Å	PL-SCX 4000 Å
50 × 150	30	PL1751-3702	PL1751-3703	PL1745-3702	PL1745-3703
50 × 150	10	PL1751-3102	PL1751-3103	PL1745-3102	PL1745-3103
25 × 150	30	PL1251-3702	PL1251-3703	PL1245-3702	PL1245-3703
25 × 150	10	PL1251-3102	PL1251-3103	PL1245-3102	PL1245-3103
25 × 50	10	PL1251-1102	PL1251-1103	PL1245-1102	PL1245-1103
7.5 × 150	8	PL1151-3802	PL1151-3803		
7.5 × 50	8	PL1151-1802	PL1151-1803	PL1145-1802	PL1145-1803

**PL-SAX 和 PL-SCX 方法开发色谱柱**

4.6 × 250	30	PL1551-5702	PL1551-5703	PL1545-5702	PL1545-5703
4.6 × 250	10	PL1551-5102	PL1551-5103	PL1545-5102	PL1545-5103
4.6 × 150	30	PL1551-3702	PL1551-3703	PL1545-3702	PL1545-3703
4.6 × 150	10	PL1551-3102	PL1551-3103	PL1545-3102	PL1545-3103

**PL-SAX 和 PL-SCX 散装填料**

填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	单位	PL-SAX 1000 Å	PL-SAX 4000 Å	PL-SCX 1000 Å	PL-SCX 4000 Å
30	100 g	PL1451-4702	PL1451-4703	PL1445-4702	PL1445-4703
10	100 g	PL1451-4102	PL1451-4103	PL1445-4102	PL1445-4103

定制色谱柱和散装填料的订购。

如果您在这些表中没有找到所需的孔径/粒径和色谱柱规格的组合，或没有您需要的散装填料数量，请联系当地的销售办事处，他们将帮助您进行定制订购。



Prep to Process PL-SAX 和  
PL-SCX 柱和散装填料



## 肽纯化

VariTide 是针对合成多肽生产的高性价比分离解决方案。用该色谱柱可以经济而有效地纯化大量合成多肽产品，规模从  $\mu\text{g}$  级到  $\text{g}$  级。VariTide 为以生产时间为经济驱动力，生产成百上千种小量多肽的生产商提供解决方案。



VariTide RPC 色谱柱

### 用于合成肽的 VariTide RPC 色谱柱

- 只需一根色谱柱即可涵盖整个合成多肽分子量范围
- 小粒径填料可实现最高的柱效，甚至使用 1 英寸和 2 英寸制备柱也可获得高效率
- 散装填料填充的 1 英寸和 2 英寸制备柱，可以纯化毫克到克级的分析物

VariTide RPC 色谱柱和填料均为 VariPep 肽分析解决方案的一部分。这是使用通用方法进行合成多肽的高性价比分离和纯化的推荐选择。

### 用于合成肽的 VariTide RPC 色谱柱

规格 (mm)	部件号
21.2 × 250	PL1E12-5A05
10.0 × 250	PL1012-5A05
4.6 × 250	PL1512-5A05

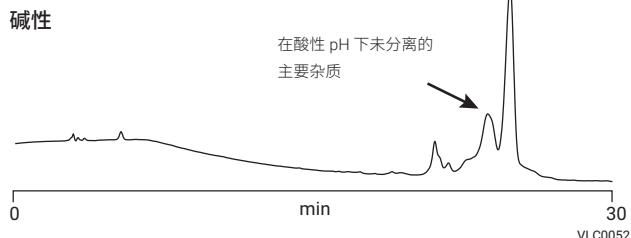
### VariTide RPC 散装填料

说明	部件号
100 g	PL1412-4A05
1 kg	PL1412-6A05

**粗制肽筛选**

色谱柱： VariTide RPC  
PL1512-5A05  
4.6 × 250 mm

流动相：  
酸性  
A: 0.1% TFA 的 95% 水: 5% ACN  
B: 0.1% TFA 的 50% 水: 50% ACN  
碱性  
A: 5% ACN, 95% 20 mmol/L 碳酸铵, pH 9.5  
B: 50% ACN, 50% 20 mmol/L 碳酸铵, pH 9.5  
流速： 1.0 mL/min (360 cm/h)  
梯度： 30 min 内 B 由 0% 升至 100%  
检测器： UV, 220 nm

**酸性****碱性**

VLC0052

**VariPure IPE**

- 已预装填，方便使用
- 去除离子对试剂以提高分析效率
- 性能出色且经济，具有优异的效率

VariPure IPE 为具有碳酸氢根反离子的聚合物负载的季胺树脂，旨在去除酸性离子对试剂，例如三氟乙酸 (TFA)、甲酸或乙酸。VariPure IPE 是一种高性能且经济的酸去除材料，可作为预包装的 SPE 型装置方便地提供。填料粒径、容量和装置几何形状相匹配，以提供足够长的停留时间，从而在重力流下实现有效的离子-空气提取。对于酸不稳定的肽，去除离子对试剂可防止肽在 HPLC 无人值守运行后发生酸降解，并提高纯化产物的产率。

**VariPure IPE**

载样	反离子去除容量	单位	部件号
每 3 mL 试管 100 mg	约 5 mL 0.1% TFA	50/包	PI3540-d603VP
每 6 mL 试管 500 mg	约 25 mL 0.1% TFA	50/包	PI3540-C603VP
每 20 mL 试管 1 g	约 50 mL 0.1% TFA	25/包	PI3540-P603VP
25 g			PI3549-3603VP

### Load & Lock 制备型 HPLC 色谱柱

安捷伦提供了完整的实验室规模的 Load & Lock 色谱柱和移动式装填工作站。专为轻松快速地自行装填制备型高效色谱柱而设计，是针对药物化合物、肽和天然产物开发应用的正确解决方案。我们 Load & Lock 色谱柱采用独特的流体/样品分配系统，可最大程度提分析效率。其能够整个柱床表面上更高效地扩散样品，从而提高色谱柱性能。

- 最高的性能：利用独特的液流分配系统获得卓越的结果
- 最高的灵活性：所有 1 英寸、2 英寸和 3 英寸的 Load & Lock 色谱柱均方便地使用相同的移动式装填工作站并执行动态轴向压缩 (DAC) 或静态轴向压缩 (SAC)
- 更高的便利性：几分钟即可装填或拆卸色谱柱
- 最大的移动性：将色谱柱和装填工作站组合在一个易于移动的滑轨中，移到任何所需的地方

双模式（使用 DAC 或 SAC 模式）装填形式可确保轻松操作并提供一致的高性能结果。

安捷伦实验室级 Load & Lock 色谱柱结合了优异的填充床稳定性与增强的液流分配，能够以最大的速度、灵活性和易操作性提供最高质量的纯化。

Load & Lock 装填工作站仅需要压缩空气，无需电源，因此可以安全地与任何类型的溶剂一起使用，是危险环境中的首选解决方案。快速释放单螺栓夹具可在数分钟内快速轻松地装填和拆卸。



**Load & Lock 制备型 HPLC 色谱柱**

说明	水套	规格 (mm)	部件号
Load & Lock 色谱柱	否	27.0 × 500	PCG93LL500X25
	是	27.0 × 500	PCG93LL500X25WJ
备件工具包		PCG931AAKIT	
移动式装填工作站 (空气驱动液压)			PCG93LLSTAND123

## 专用尺寸



## Bio SEC

### 基于尺寸的纯化

- 六种孔径能够在整个生物药物范围内提供体积排阻分离
- 从 3 μm 和 5 μm 分析柱放大为采用相同填料的实验室制备柱
- 亲水性聚合物薄层可最大程度减小非特异性相互作用，提供良好的峰形并提高样品容量

这些硅胶型 SEC 填料具有优化的孔径和孔容，能够在 HPLC 压力和流速条件下提供高分离度分离。具有 100 Å、150 Å 和 300 Å 孔径的 3 μm 颗粒能够为实验室制备柱提供最高的柱效，而 5 μm 颗粒可提供宽孔径范围，用于生物大分子和偶联物的分级。

## 技巧和工具



色谱柱用户指南是非常实用的资源，其中包含使用和色谱柱维护说明以及建议的启动方法：

[www.agilent.com/chem/biolc-columns-user-guides](http://www.agilent.com/chem/biolc-columns-user-guides)

**Bio SEC-3 HPLC 色谱柱，可实现更快速的肽和蛋白质分离**

规格 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	Bio SEC-5 100 Å USP L33	Bio SEC-5 150 Å USP L33	Bio SEC-5 300 Å USP L33
21.2 × 300	3	5190-6850	5190-6851	5190-6852
<b>制备型保护柱</b>				
21.2 × 50	3	5190-6854	5190-6855	5190-6856

**用于基于尺寸的生物分子的 Bio SEC-5 HPLC 色谱柱**

规格 (mm)	填料粒径 ( $\mu\text{m}$ )	Bio SEC-5 100 Å USP L33	Bio SEC-5 150 Å USP L33	Bio SEC-5 300 Å USP L33	Bio SEC-5 500 Å USP L33	Bio SEC-5 1000 Å USP L33	Bio SEC-5 2000 Å USP L33
21.2 × 300	5	5190-6863	5190-6864	5190-6865	5190-6866	5190-6867	5190-6868
<b>制备型保护柱</b>							
21.2 × 50	5	5190-6869	5190-6870	5190-6871	5190-6872	5190-6874	5190-6875



## 安捷伦解决方案

### 您每一次的分析结果都凝聚了安捷伦四十余年的不断创新

安捷伦提供最全面的创新解决方案系列 — 从提高实验室的化学分析效率到真空系统，再到为简化生物系统复杂性而开发的工作流程解决方案。我们帮助您随时掌握新型应用和批准的方法，同时我们集成的工作流程解决方案提供准确、全面的数据，可帮助您做出明智的决定，从而加快获得结果。

一直以来，安捷伦始终恪守对客户的承诺。现在，我们同样期待着向您展示不断创新如何为您提供便利并转化为您的优势。



#### 学术

通过我们对跨国际边界和科学学科的成就的承诺，我们致力于帮助研究人员在其研究中保持发展势头，并获得其领域内有意义的贡献者的更大认可。



#### 生物制剂与生物仿制药

生物治疗药物对改善人类健康具有巨大潜力。在全球范围内，获得批准的蛋白质和抗体治疗药物的数量不断增长，因为这一重要的治疗药物类别能够应对尚未满足的医疗需求。



#### 细胞代谢

了解细胞代谢对于理解许多细胞过程至关重要。借助安捷伦，您可以实时分析活细胞中的代谢，并生成生理学相关性最强的数据。



#### 地球化学、采矿与金属

无论是测定常量或痕量分析物，测定金、银和铂元素，分析电镀液，还是进行地球化学填图，安捷伦都能为最精细且最困难的样品提供简便易用且可靠的分析仪器。



#### 国土安全

如果您从事化学战剂 (CWA)、生物战剂 (BWA)、有毒工业化学品 (TIC) 的检测，或食品、空气、土壤和水的监测，安捷伦都将提供快速、灵活、可靠的解决方案以满足您的需求。



#### 材料检测与研究

安捷伦使您能够鉴定成品中不良气味的性质和来源，表征复合材料中的微晶不规则性，并定量分析金属合金中的痕量杂质。



## 临床研究

借助我们行业领先的 LC/MS、GC/MS 和 ICP-MS 仪器以及 RapidFire 和样品前处理自动化全套产品系列，安捷伦可帮助您在临床研究中充分利用不断发展的质谱分析技术。



## 能源与化工

安捷伦针对您的特定需求提供定制的方法和解决方案，帮助您的实验室获得最高的分析效率和盈利能力，同时满足业界最严格的法规要求。



## 环境

安捷伦提供可靠而高效的环境分析和法规专业知识。它可能是废水中的污染物，饮用水的纯净度，测量室内空气质量，应对自然或人为灾难，或鉴定新型污染物。



## 食品检测与农业

食品和农业行业亟需更灵敏、更高效的分析解决方案。我们的仪器、系统和备件的应用贯穿于整个食品生产链。安捷伦开发满足最新要求的系统和应用。



## 法医学

无论是毒品检测、毒品筛查、分析消遣用药物，还是犯罪现场的爆炸残留物检测，安捷伦科技公司的可靠仪器能够用于数千种物质的确认和定量分析，在行业中处于领先地位。



## 基因组学

无论您使用基因表达、克隆和定量 PCR、比较基因组杂交来检测拷贝数变异，还是选择人外显子组对目标区域进行测序，安捷伦均能够提供您的研究所需的创新性和可靠性。



## 代谢组学

安捷伦代谢组学解决方案用于疾病研究、分析毒理学、环境分析、农业、生物燃料开发和营养。代谢组学结果与基因表达和/或蛋白质组学的研究相结合，可全面了解生物学。



## 蛋白质组学

蛋白质组学研究蛋白质的结构和功能，以及它们在复杂生物系统中的相互作用。蛋白质分析带来许多挑战，用于快速获取准确可重现的结果的完整、优化且方便使用的工作流程必须满足您的蛋白质组学研究目标。



## 半导体分析

安捷伦分析仪器为半导体行业中的各种样品（包括表面金属提取(SME) 的硅晶片、太阳能 PV 硅、高纯度工艺化学品、超纯水、有机溶剂和光刻胶）中的痕量元素分析提供了最高性能。



## 小分子药物

随着商业、科学和法规压力的发展和冲突，制药行业不断面临新的挑战。从个体化医疗到 CRO，如今将药物推向市场的过程与十年前截然不同。



## 专用化学品

安捷伦的仪器、附件、技术支持和备件产品系列，以及我们庞大而多样的渠道合作伙伴网络，意味着我们可以帮助您解决几乎所有可能遇到的测量问题。



## 真空解决方案

了解您的真空需求对于提供可靠且有助于提高分析效率的解决方案至关重要。有了安捷伦科技公司的陪伴，您将发现我们在为您量身定制解决方案时所拥有的扎实的科学专业知识和创造力。

## 技巧和工具

如需了解更多信息，请访问：[www.agilent.com/en/solutions](http://www.agilent.com/en/solutions)



## Agilent CrossLab 服务

### 全程技术支持助您最大限度延长正常运行时间

Agilent CrossLab 服务专家为您提供有价值的见解，确保您的仪器以最佳性能运行。我们为您的需求量身定制的行业领先服务包括：技术更新、应用咨询、维修、预防性维护、法规认证和培训。立即咨询了解我们如何为您的实验室提供支持。



### 获得安捷伦服务承诺

在安捷伦服务协议范围之内，如果您购买的仪器需要服务，我们将保证维修，如无法修复可免费更换。

其他任何公司都没有做出这样的承诺，我们的承诺能使您的实验室以最佳效率运行。

## Agilent CrossLab 服务计划

### 避免昂贵的维修和停机

如今的实验室面临着复杂的挑战，需要一个真正的服务合作伙伴提供支持。Agilent CrossLab 服务计划能够最大限度提高实验室的分析效率，日复一日使您的操作顺利运行。无论您的实验室配置如何，我们都能提供最符合您的需求和预算的支持级别。

## 安捷伦法规认证服务

### 满足最严格要求的设备认证

企业版法规认证服务的开发是为了保证您整个实验室顺利地进行法规认证，适用于全球法规实验室，包含标准机构和法规机构，企业版可使您：

- 提高认证效率，通过跨平台的自动认证协议保证更高的效率和最小的法规风险
- 采用适用于您所有仪器的稳定测试设计实现法规认证操作的标准化
- 根据用户的特殊需求，添加、删除或重新配置测试
- 减少员工处理数据的时间，获得格式一致、计算机生成、符合标准的报告

## 安捷伦大学

### 获取所需知识，大步迈向成功

保持高技术水平是一项挑战，技术水平会直接影响仪器正常运行时间、实验室分析效率和分析准确度。

安捷伦大学通过确定的学习方式为您团队的每位成员提供从基础级课程到高级课程的全面学习机会。



## 安捷伦保值承诺 — 10 年保值

### 延期服务

安捷伦保值承诺提供 7 年支持，保证仪器至少具有 10 年的使用寿命。CrossLab 延期服务为拥有老旧仪器的客户提供一致的诊断、维修、维护和培训服务。CrossLab 延期服务由安捷伦工程师使用最新的工具、规程和安捷伦原厂部件提供。

如需了解更详细的信息，请联系当地的安捷伦客户服务中心或访问：

[www.agilent.com/chem/extended-services](http://www.agilent.com/chem/extended-services)

## 为您提供技术支持

您是否遇到了硬件、软件、应用、仪器维修或故障排除方面的问题？安捷伦技术专家将随时为您解答问题。我们的技术支持专家拥有多年的实验室工作经验，可以提供丰富的专业知识和经验。

有关本目录中的备件问题，请联系当地的安捷伦分公司或安捷伦授权经销商，也可访问：

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



## 安捷伦社区

### 连接，合作，分享观点

安捷伦社区是与同行进行应用合作、探讨安捷伦产品以及查找与分析相关的深度内容的绝佳平台。请访问：[community.agilent.com](http://community.agilent.com)

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)

与安捷伦互动：  
[www.agilent.com/chem/social](http://www.agilent.com/chem/social)

了解完整的产品目录：  
[www.agilent.com/chem/catalog](http://www.agilent.com/chem/catalog)

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2019  
2019年6月11日，中国出版  
5994-0974ZHCN

