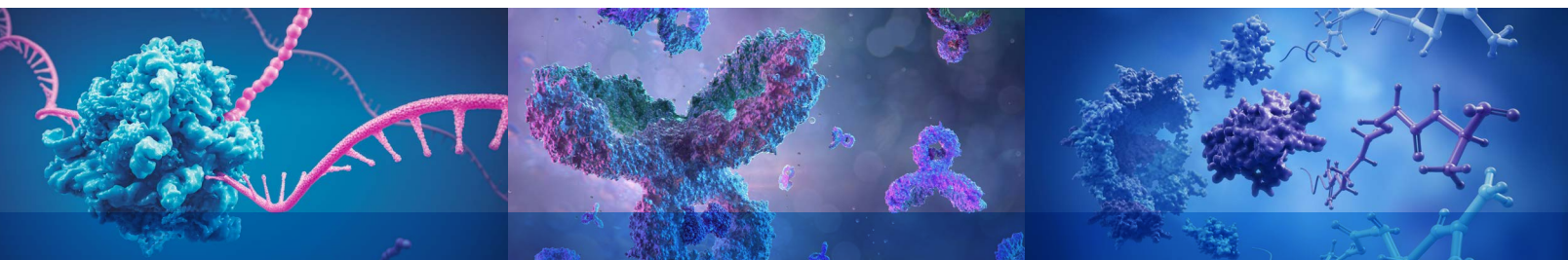


Agilent BioHPLC 色谱柱和消耗品

生物分子分析必备资源





Agilent
CrossLab
From Insight to Outcome

安捷伦定位， 安捷伦目标。

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

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

目录

前言

1 生物色谱柱选择指南

什么是生物分子？	5
什么是生物色谱柱？	6
色谱柱选择流程图	7
	8

2 生物分子分离

蛋白质分离	11
多聚糖分离	11
多肽分离	13
氨基酸和培养消耗分析	13
氨基酸	14
腺相关病毒 (AAVs)	14
DNA 和 RNA 寡核苷酸分离	15
	16

3 用于生物治疗药物分析的仪器

1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统	17
1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统	17
1290 Infinity II 生物液相色谱系统	18
1290 Infinity II 生物二维液相色谱系统	18
1260 Infinity II Bio-SEC 系统	19
1260 Infinity II 多检测器 GPC/SEC 系统	19
1290 Infinity II 分析型生物液相色谱纯化系统	20
1260 Infinity II Prime 分析型生物液相色谱纯化系统	20
Load & Lock 制备型 HPLC 色谱柱	21
6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统	22
6230B 飞行时间 (TOF) LC/MS	22
MassHunter BioConfirm 软件	23
OpenLab 软件套装	24
InfinityLab 液相色谱备件	25

单克隆抗体和蛋白质关键质量属性

4 完整蛋白质分析

反相	26
反相分离的色谱柱选择	26
AdvanceBio RP-mAb	27
PLRP-S	29
AdvanceBio 脱盐反相柱	33
ZORBAX 300 Å StableBond	37
ZORBAX 300 Å Extend-C18	38
Poroshell 300	45
ZORBAX 300 Å HILIC	47
AdvanceBio HIC	50
产品订购信息	55

5 肽谱分析

AdvanceBio 肽谱分析色谱柱	60
安捷伦肽质量控制标准品	61
AdvanceBio Peptide Plus	65
产品订购信息	65

6 电荷异构体分析

纯化蛋白质和其他带电荷分子	72
将 IEX 应用于电荷异构体的分析	72
Bio MAb HPLC 色谱柱	74
Bio IEX HPLC 色谱柱	79
PL-SAX 强阴离子交换色谱柱	84
PL-SCX 强阳离子交换色谱柱	87
Bio-Monolith 离子交换 HPLC 色谱柱	88
产品订购信息	90

7 聚集体及片段分析

准确测定生物分子聚集和碎裂	95
哪一种体积排阻色谱柱适合您的应用？	95
AdvanceBio SEC	97
Bio SEC	104
PROTEOMA 色谱柱	108
MAB	109
用于 SEC 分析的蛋白质标准品	110
AdvanceBio SEC 标准品	110
蛋白质标准品试剂盒	112
产品订购信息	114

8 糖基化表征

N-糖样品前处理	117
AdvanceBio 唾液酸分析与定量	118
糖生物学标准品和文库	120
糖生物学酶	121
AdvanceBio 糖谱分析色谱柱	122
亲水性和糖肽分析	123
产品订购信息	127

9 滴度测定

Bio-Monolith HPLC 色谱柱	134
稳定、可靠的抗体滴度测定	134
产品订购信息	141

(续)

目录 (续)

10 细胞培养基和氨基酸分析

安捷伦培养基消耗分析解决方案	143
AdvanceBio 氨基酸分析 (AAA)	144
AdvanceBio 氨基酸分析标准品和试剂盒	145
AdvanceBio MS Spent Media	146
产品订购信息	149

11 蛋白质去除

安捷伦蛋白质分级分离系统和蛋白质组学试剂	151
多重亲和去除系统	152
多重亲和去除系统启动工具包	153
产品订购信息	154

新型生物药物形式关键质量属性

12 寡核苷酸

DNA 和 RNA 寡核苷酸色谱柱的选择	157
离子对反相色谱分离	158
AdvanceBio 寡核苷酸	158
AdvanceBio 寡核苷酸标准品	160
PLRP-S	162
强阴离子交换	164
Agilent Bio-IEX	164
PL-SAX	165
产品订购信息	166

13 载体类治疗药物分析

142

从完整载体到单个氨基酸修饰的表征	171
衣壳蛋白定性确认	172
腺相关病毒的空衣壳 / 完整衣壳分析	175
载体类治疗药物的聚集体分析	177

入门指南

151

14 方法开发指南

一级结构分析方法	181
反相 LC/MS 方法	183
电荷异构体分析方法	184
利用安捷伦缓冲液顾问软件的电荷异构体分析方法	186
聚集体及片段分析方法	187
寡核苷酸分析	189
腺相关病毒 (AAV) 分析	191
多聚糖和亲水性 / 糖肽分析	193
滴度测定和细胞培养基优化方法	194
高灵敏度毛细管柱方法	195

支持

15 安捷伦解决方案

196

16 安捷伦生命科学解决方案

198

生物色谱柱选择指南

生物治疗药物表征面临着不断变化的挑战

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。为了在关键表征工作流程中实现完整、可重现的高质量分析，安捷伦提供了各种色谱柱和备件。

安捷伦解决方案简化生物制剂表征

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，并列出了许多分离实例，所有这些将为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 应用提供超高分析速度、分离度和灵敏度的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统。生物分子的结构可能非常复杂，但是使用安捷伦 HPLC 色谱柱、系统和备件可简化其分析过程。

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

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。

多肽

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。

氨基酸

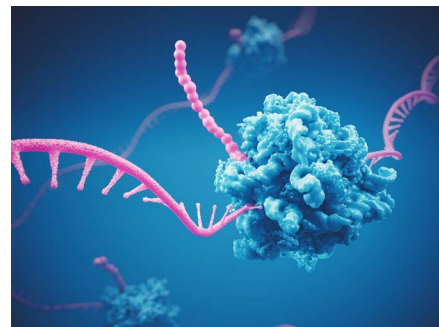
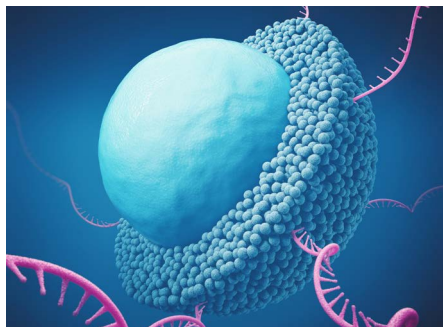
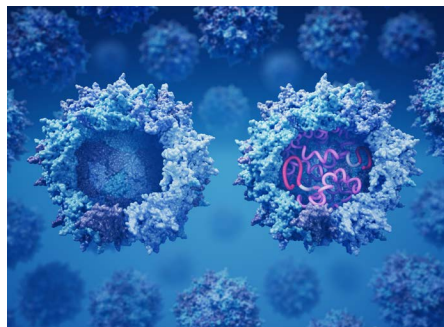
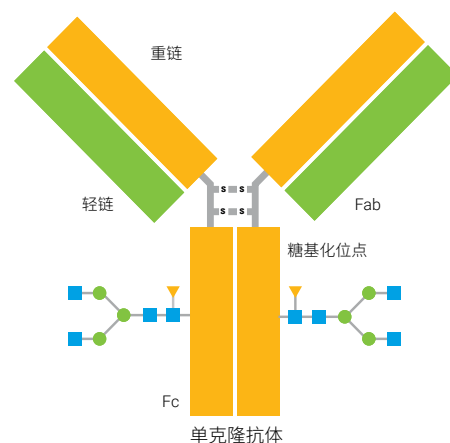
AdvanceBio 氨基酸分析色谱柱为 24 种氨基酸的分析提供了高效解决方案。一般情况下，分析时间从 14 分钟（使用 75 mm 色谱柱）到 24 分钟（使用 150 mm 色谱柱）。

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。

腺相关病毒 (AAVs)

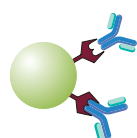
AAVs 是由包裹单链 DNA 基因组的二十面体蛋白质外壳组成的大分子复合物。蛋白质衣壳和包裹的 DNA 都需要专门的分析技术以确保整个产品的质量和安全性。



什么是生物色谱柱？

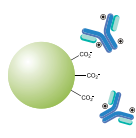
生物色谱柱或生物柱是用于分离生物化合物（如肽和蛋白质、寡核苷酸和多聚核苷酸）及其他生物分子和复合物的液相色谱柱。生物色谱柱专门设计用于生物分子分析，具有适合大分子分析的大孔径。在填料设计上，尽量减少填料与分析物之间的非特异性结合，以提高回收率。分离机制的选择或为保留分析物的生物学功能（在分析过程中不失去生物活性），或故意使分析物变性以便对一级结构进行表征。

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：



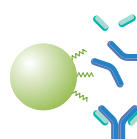
滴度测定

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



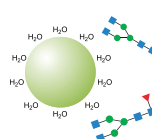
电荷异构体分析

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。



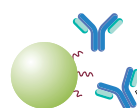
使用反相色谱分析完整蛋白质和亚基纯度

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。



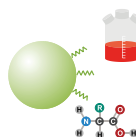
多聚糖分析

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。



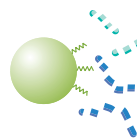
使用疏水相互作用分析完整蛋白质

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



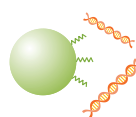
氨基酸和细胞培养基分析

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。



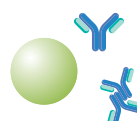
肽谱分析

使用 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱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。



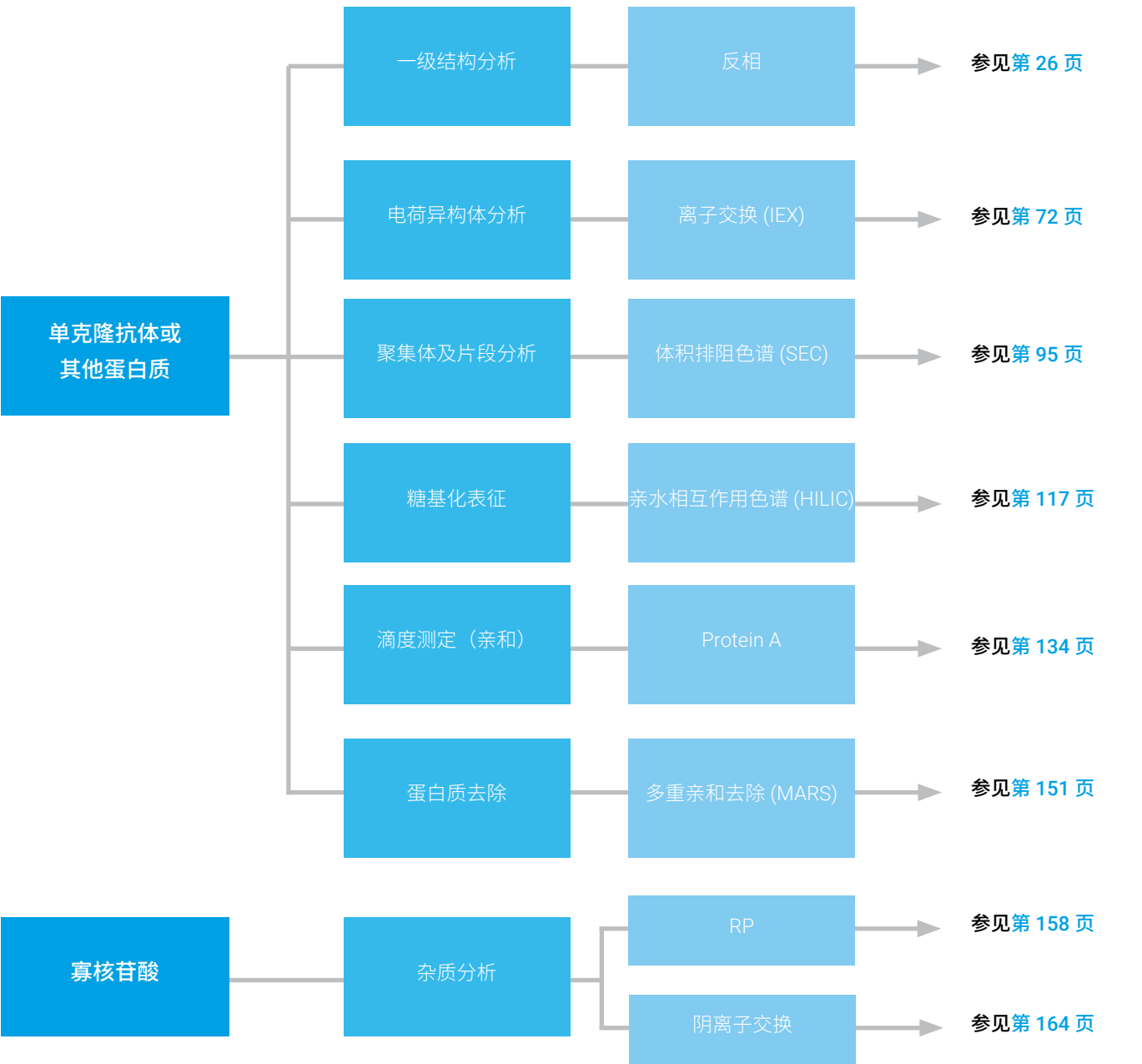
腺相关病毒 (AAVs)

针对完整衣壳蛋白和翻译后修饰 (PTMs) 的优化的反相解决方案。完整衣壳和空衣壳的强阴离子交换分析，以及用于聚集体及片段分析的 SEC。

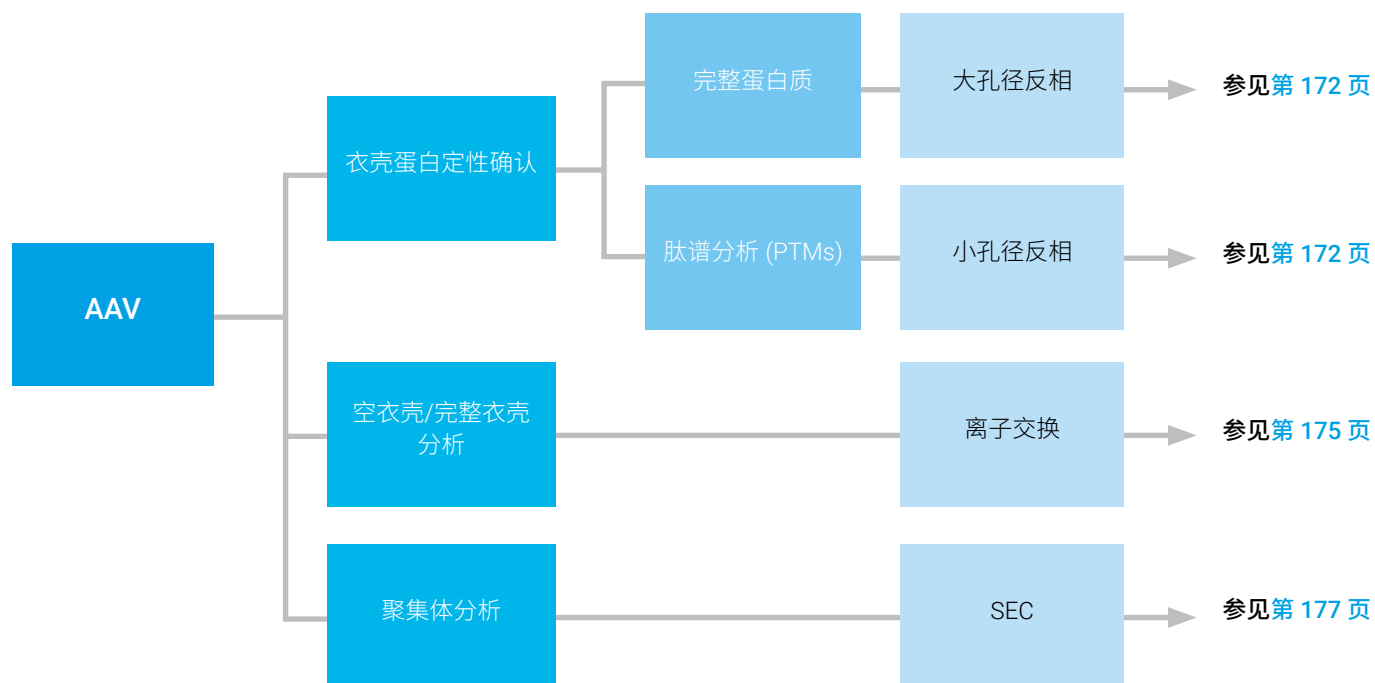
色谱柱选择流程图

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合适的生物分子分离色谱柱。首先，需要考虑分子的大小，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。



腺相关病毒 (AAV) 分析



技巧和工具

安捷伦社区是宝贵的在线资源，您可以在这里提出问题，并获得来自安捷伦专家和其他用户的实用建议。在社区搜索“AdvanceBio Blog” (AdvanceBio 博客)，查找生物分子分离的最佳实践和故障排除技巧。

Agilent AdvanceBio 色谱柱

Agilent AdvanceBio 色谱柱专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 (PTMs)，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信息，以及如何在 AdvanceBio 系列产品中选择合适的产品，以准确表征生物治疗药物。



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

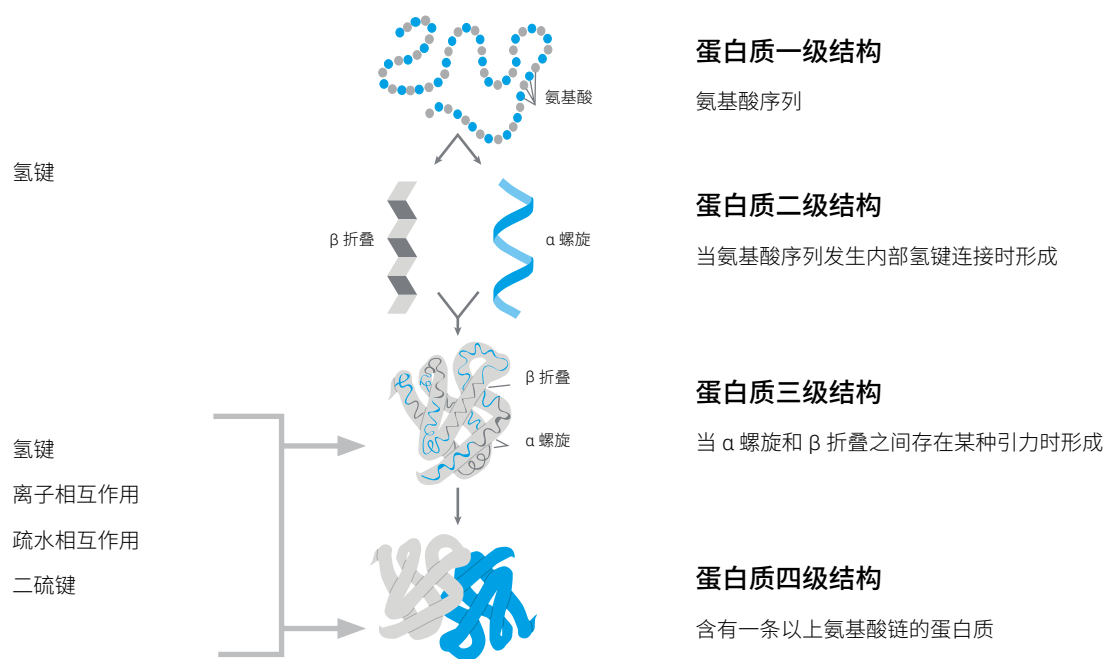
生物分子分离

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 α 螺旋和 β 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。



蛋白质多级结构示意图

蛋白质分离注意事项

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尿素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	说明
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 肽谱分析色谱柱	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。
聚集体及片段分析	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。

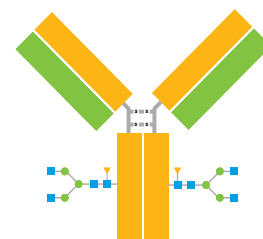
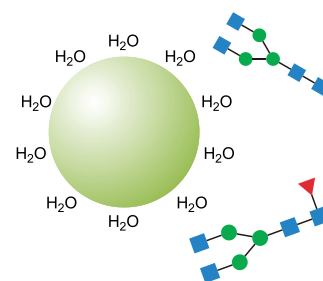
多聚糖分离

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。



多肽分离

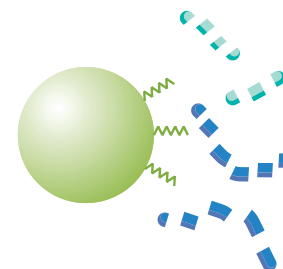
肽谱分析

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。

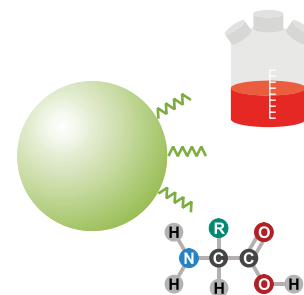
反相 UHPLC/HPLC 结合 MS 或 UV 检测，是分析肽裂解物的首选技术。LC/MS 用于肽片段的鉴定，以及测定序列覆盖率，而 LC/UV 更常用于监测/质控部门进行肽谱比较。

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。



氨基酸和培养基消耗分析

在生物治疗性蛋白质生产过程中，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。氨基酸作为蛋白质的结构单元，是原料的关键组分，必须在生产过程中进行监测和调整。氨基酸是一组种类繁多的极性化合物，它们有类似的结构骨架，带有氨基和羧酸官能团。它们的侧链结构不同，其侧链可能呈碱性、非极性（疏水性）、极性不带电和酸性。氨基酸的不同理化性质为色谱分析带来了挑战，但安捷伦提供了 AdvanceBio 解决方案，以不同的方式应对这些挑战。AdvanceBio 氨基酸分析色谱柱和衍生化试剂盒提供了高度可靠且可重现的反相色谱解决方案，而 AdvanceBio MS Spent Media 色谱柱利用 HILIC 分离结合质谱检测来分析未衍生化的氨基酸。



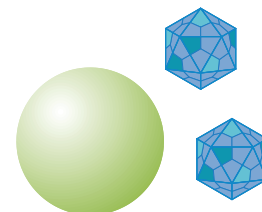
氨基酸

H 155.16 137.14 $C_6H_9N_3O_2$ 组氨酸						D 133.10 115.09 $C_4H_7NO_4$ 天冬氨酸
R 174.20 156.19 $C_8H_{12}N_2O_2$ 精氨酸	F 165.19 147.18 $C_9H_9NO_2$ 苯丙氨酸	A 89.09 71.08 $C_3H_7NO_2$ 丙氨酸	C 121.16 103.14 $C_3H_7NO_2S$ 半胱氨酸	G 75.07 57.05 $C_2H_5NO_2$ 甘氨酸	Q 146.15 128.13 $C_5H_9N_2O_3$ 谷氨酰胺	E 147.13 129.11 $C_5H_9NO_4$ 谷氨酸
K 146.19 128.17 $C_6H_{12}N_2O_2$ 赖氨酸	L 131.17 113.16 $C_6H_{11}NO_2$ 亮氨酸	M 149.21 131.20 $C_5H_{11}NO_2S$ 蛋氨酸	N 132.12 114.10 $C_4H_8N_2O_3$ 天冬酰胺	S 105.09 87.08 $C_3H_7NO_3$ 丝氨酸	Y 181.19 163.17 $C_9H_9NO_3$ 酪氨酸	T 119.12 101.10 $C_4H_9NO_3$ 苏氨酸
I 131.18 113.16 $C_6H_{13}NO_2$ 异亮氨酸	W 204.23 186.21 $C_{11}H_{12}N_2O_2$ 色氨酸	P 115.13 97.12 $C_5H_9NO_2$ 脯氨酸	V 117.15 99.13 $C_5H_{11}NO_2$ 缬氨酸			

■ 碱性
 ■ 非极性（疏水性）
 ■ 极性，不带电荷
 ■ 酸性

腺相关病毒 (AAVs)

腺相关病毒 (AAVs) 是一种新型药物递送平台，也是基因疗法中应用最广泛的载体，已成功应用于治疗遗传性视网膜疾病和脊髓型肌肉萎缩症。AAVs 由二十面体蛋白质外壳组成，内含约 4.7 kb 的线性单链 DNA 基因组。完整 AAVs 可作为保护和递送寡核苷酸治疗药物的载体。随着对 AAVs 作为药物递送平台的探索不断深入，监测治疗产品的所有关键质量属性至关重要。蛋白质衣壳和包裹的 DNA 都需要专门的分析技术以确保整个产品的质量和安全性。



AAVs 色谱柱选择

应用	技术	安捷伦色谱柱	说明
衣壳蛋白定性确认： 完整蛋白质	大孔径 反相	ZORBAX RRHD 大孔径 色谱柱	用于完整衣壳蛋白的高效反相分离和表征的 1.8 μm 300 Å ZORBAX RRHD Stablebond C18 和 Diphenyl 色谱柱。
衣壳蛋白鉴定： 肽谱分析 (PTMs)	小孔径 反相	AdvanceBio 肽谱分析 色谱柱	2.7 μm Poroshell 颗粒填料，可提供出色的柱效和分离度。
空衣壳/完整衣壳 分析	强阴离子交换	Agilent Bio SAX	Agilent Bio SAX 强阴离子交换色谱柱是分离完整 AAV 衣壳和空 AAV 衣壳的理想色谱柱。
聚集体分析	体积排阻色谱	Agilent Bio SEC-5	孔径为 1000 Å 的 Agilent Bio SEC-5 非常适合用于 AAV 聚集体及片段分析和纯化。

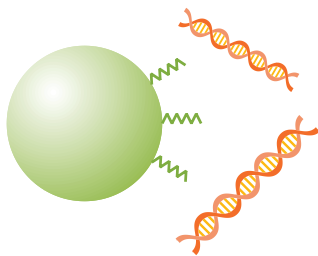
技巧和工具

安捷伦生物惰性备件提供了无金属样品流路，可大幅减小与生物分子的相互作用。

请访问：www.agilent.com/chem/bio-inert-uhplc

DNA 和 RNA 寡核苷酸分离

随着研究表明寡核苷酸 (oligos) 有望成为有前景的治疗药物，寡核苷酸在生物制药市场上受到越来越多的关注。这些寡核苷酸的大小、序列复杂度和整体修饰存在差异。较小的寡核苷酸可通过合成制备，大小从几个核苷酸到 40 或 50 个碱基不等，并包含不同的 DNA 或 RNA 修饰。在化学合成过程，由于发生丢失、插入或化学修饰，将产生各种序列非常相似的杂质。较大的寡核苷酸（包括向导 RNA 或 NGS 引物和探针）包含 50–200 个碱基，并根据其具体应用添加了不同的修饰和标签。RNA 治疗药物的序列可能包含数千个碱基，在纯化时需要考虑独特的纯化要求。由于这种多样性，通过液相色谱分析和纯化寡核苷酸的过程比较复杂，并且需要利用各种技术、色谱柱化学键合相和颗粒担体。



有多种 UHPLC/HPLC 技术可用于分离寡核苷酸。

三苯甲基保护 — 此步骤从脱保护失败序列中分离仍带有二甲氧基三苯甲基 (DMT) 基团的全长目标寡核苷酸。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 — 此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，但寡核苷酸带电荷较多，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 — 此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。此技术最好通过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	说明
脱三苯甲基寡核苷酸表征/纯化	离子对反相色谱分离	AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱	2.7 μm 和 4 μm 表面多孔颗粒填料，适用于寡核苷酸及其杂质的高分离度分析和纯化。
		PLRP-S	大孔聚合物颗粒填料具有各种粒径和孔径，可提供更出色的 pH 和温度稳定性。
脱三苯甲基聚集体及片段分析	离子交换分离	Agilent Bio IEX	具有亲水性涂层的无孔聚合物颗粒填料消除了传质问题，提供了出色的性能。提供各种填料粒径，适用于分析级和实验室规模的制备应用。
		PL-SAX	具有强阴离子交换官能团的全多孔聚合物颗粒填料可用于从分析级到制备级规模的应用，包括散装填料。

用于生物治疗药物分析的仪器

安捷伦提供了完整的工作流程解决方案

虽然液相色谱柱是许多纯化或分析表征工作流程的关键要素，但终究只是其中一个组件。安捷伦为许多生物分子工作流程提供端到端解决方案和专家支持，包括样品前处理、样品瓶和其他备件、仪器以及数据分析和管理工作。

1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统

用于全（生物）惰性应用

1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统具有全生物惰性，可消除金属相互作用并有助于分析极具挑战性的化合物。耐腐蚀的钛制溶剂输送系统和不含金属的样品流路可以在常规生物应用中确保生物分子的完整性。该系统也可作为 ICP-MS 分析的理想前端。

- 耐压高达 600 bar 的无金属样品流路可实现对生物样品的可靠分析，这意味着您的珍贵样品不会接触金属表面，能够尽量减少不必要的表面相互作用，同时延长色谱柱寿命
- 用于 UV 和荧光检测的惰性流通池、惰性溶剂以及用于多方法/多属性分析的色谱柱选择阀可提供仪器多样性，从而实现出色的适应性
- 高耐盐性 (2 mol/L) 和宽 pH 耐受范围 (1–13，短时间分析可以耐受 14) 结合主动密封垫清洗和四元溶剂混合功能，提高了灵活性
- 新型生物惰性毛细管和连接设计以及 InfinityLab Quick Connect 快速连接接头/Quick Turn 色谱柱接头提供了简便易用性



1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统

为日常分析提供高灵活性

生物兼容性 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统是一款用于生物分离的通用型 HPLC，为生物分析型 HPLC 和入门级四元生物 UHPLC 提供了出色的功能和操作便捷性。

- 生物兼容性溶剂和样品流路可确保生物分子的完整性，尽可能减少不必要的表面相互作用
- 高耐盐性和宽 pH 范围可增强灵活性与耐用性，延长仪器正常运行时间
- 功能强大，高达 800 bar 的压力和高达 5 mL/min 的分析流速，可实现出色的 UHPLC 性能
- 浅微孔板抽屉最多可容纳 6144 个样品，具有出众的样品容量



1290 Infinity II 生物液相色谱系统

为复杂分析提供超高性能

1290 Infinity II 生物液相色谱系统可配备 1290 Infinity II 生物高速泵或全能泵。该系统专为要求极高的应用而设计，可提供非常平缓的梯度，实现出色的性能、准确度和可靠性。系统的生物兼容性可确保分析可靠性和生物分子完整性。

- 适合所有应用的出色灵活性 — 更宽的性能范围和温度范围、可自动扩展的进样范围以及梯度选项（二元和四元溶剂混合）
- 整个系统延迟体积极小，可实现超高速谱分离度和极低的扩散
- 各种生物附件，包括一系列生物热交换器、生物毛细管工具包、生物定量环和分析头，可实现仪器的多功能性和高效率，从而满足各种应用需求
- 功能强大，高达 1300 bar 的超高压力和高达 5 mL/min 的高分析流速，可实现出色的 UHPLC 性能
- 卓越性能和可持续性：1260/1290 Infinity II 液相色谱系统系列经过独立审计，确认其在整个产品生命周期对环境的影响后，获得了 My Green Lab ACT（归责性、一致性、透明度）标签



1290 Infinity II 生物二维液相色谱系统

生物兼容性二维液相色谱系统实现超高分离能力

1290 Infinity II 生物二维液相色谱系统结合了二维液相色谱系统的高分离能力和峰容量以及生物液相色谱系统的生物兼容性。

- 无论是样品需要更出色的分离度以分离共洗脱化合物，还是样品包含大量无法通过常规 (U)HPLC 有效分离的化合物，二维液相色谱都是首选方法
- Agilent InfinityLab 二维液相色谱解决方案基于专用的 1290 Infinity II 硬件和专用软件，可提供出色的性能、质量和易用性
- 生物制药以及其他行业的应用在样品、溶剂和试剂方面会采用苛刻的条件。生物兼容性二维液相色谱系统为此类应用提供了优异的分​​离性能和稳定性。MP35N 与陶瓷、PEEK 或金等其他贵重材料一起用于生物二维液相色谱流路。这些材料减少了与生物分子的表面结合和相互作用，并且兼容各种严苛的条件，如宽 pH 范围或高盐浓度的溶剂、样品和试剂
- 所有生物兼容性和生物惰性液相色谱模块和部件均可与 1290 Infinity II 生物二维液相色谱系统一起使用



1260 Infinity II Bio-SEC 系统

使用无金属流路和可选的先进检测器对生物聚合物进行可靠分析

1260 Infinity II Bio-SEC 系统是一种体积排阻色谱 (SEC) 系统，旨在应对分析生物聚合物所面临的挑战。该系统具有先进的检测功能，是蛋白质摩尔质量、纯度和聚集体分析的理想解决方案。

- 无金属样品流路可对生物聚合物进行可靠表征
- 高耐盐性和宽 pH 耐受范围结合主动密封垫清洗和四元流动相混合功能，提高了灵活性
- 专用的 SEC 柱温箱具有高容量和冷却功能
- 灵活添加多角度光散射 (MALS) 检测，可以表征生物聚合物的聚集体、尺寸和形状
- WinGPC 软件符合软件法规要求，提供了专用的 SEC 软件平台



1260 Infinity II 多检测器 GPC/SEC 系统

使用光散射检测器准确且可重现地表征蛋白质和生物分子

可任意选择示差折光检测、光散射检测和粘度测定进行组合。该系统可提供准确的绝对分子量和大小，并且可用于分析各种聚合物，适用于各种分子量范围或溶剂。

- **准确的分子量** — 光散射检测器无需色谱柱校准，并且与 PLgel 色谱柱结合使用时，可提供有关真实聚合物分子量、大小、形状和长支链的准确结果
- **准确的尺寸大小和结构** — 可使用粘度测定法在宽分子量范围内测量 R_g (样品半径) 和样品结构
- **低分子量样品分析** — 由于二氧化硅和压力传感器技术的最新进展，粘度计可测量分子量低至数百的样品
- **三重检测提供了出色的聚合物分析结果** — 利用光散射检测器测定绝对分子量，并且利用光散射检测器和粘度计测定分子大小和溶液行为



1290 Infinity II 分析型生物液相色谱纯化系统

超高性能生物兼容性分析型液相色谱纯化系统可保护您的生物分子

1290 Infinity II 分析型生物液相色谱纯化系统是由生物兼容性材料组成的二元或四元 UHPLC，适用于生物制药。它是一款非常灵活、通用的解决方案，可在高盐和极端 pH 条件下实现化合物分离。

- 生物兼容性溶剂和样品流路可确保生物分子的完整性，尽可能减少不必要的表面相互作用
- 高耐盐性和宽 pH 范围可增强灵活性与耐用性，延长仪器正常运行时间
- 可在微孔板中最多收集 4 × 96 种馏分，或利用具有 4 种管外径的收集器，在玻璃管中最多收集 216 种馏分
- 集成的自动化馏分延迟传感器技术可提高所收集的馏分的纯度和回收率
- 可根据您的需求升级馏分容量：通过正交分析信息（仅可从分离的化合物中获得）提高实验室效率



1260 Infinity II Prime 分析型生物液相色谱纯化系统

生物兼容性分析型液相色谱纯化系统，压力范围高达 800 bar

1260 Infinity II Prime 分析型生物液相色谱纯化系统是一款用于生物分离的通用型 HPLC。它能在压力高达 800 bar、流速高达 5 mL/min 的条件下，为生物分析型 HPLC 和入门级四元生物 UHPLC 提供出色的功能和操作便捷性。

- 生物兼容性溶剂和样品流路可确保生物分子的完整性，尽可能减少不必要的表面相互作用
- 功能强大，高达 800 bar 的压力和高达 5 mL/min 的分析流速，可实现出色的 UHPLC 性能
- 各种流通池可实现广泛、灵敏的光学检测能力，可用于 VWD、DAD、FLD 或 LC/MS 检测，从而实现出色的适应性
- 集成的自动化馏分延迟传感器技术可提高所收集的馏分的纯度和回收率
- 可根据您的需求升级馏分容量：通过正交分析信息（仅可从分离的化合物中获得）提高实验室效率



Load & Lock 制备型 HPLC 色谱柱

超高的柱床稳定性和优化的液流分布，可实现大量物质的常规纯化

安捷伦提供了完整的实验室级 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合适解决方案。我们 Load & Lock 色谱柱采用独特的流体/样品分配系统，可大幅提高分析效率。其能够在整个柱床表面上更高效地扩散样品，从而提高色谱柱性能。

- 超高性能：利用独特的液流分配系统获得卓越的结果
- 超高灵活性：所有 1 英寸、2 英寸和 3 英寸的 Load & Lock 色谱柱均能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
- 出色的移动性：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，能够以更高的速度、灵活性和易操作性提供高质量的纯化。

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

描述	水套	内径 × 柱长 (mm)	货号
Load & Lock 色谱柱	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



技巧和工具

参阅安捷伦选择指南 **5991-9153ZHCN**，比较 InfinityLab 液相色谱纯化系统、模块、色谱柱和填料的特性、物理规格和性能特征。

www.agilent.com/chem/lc-purification-selection-guide

6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统

专为生物大分子分析而设计

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统经过专门设计，可以处理生物制药表征中的多项工作流程。无论是需要在完整蛋白质水平获得更多信息，还是需要多肽水平自动确认蛋白质序列，以及可靠分析 PTMs，安捷伦提供的 UHPLC Q-TOF 均可轻松实现。

利用飞行时间技术准确分析主要和次要蛋白质形式，提供了全新水平的灵敏度和更清晰的完整蛋白质质谱。采用迭代 MS /MS 操作模式轻松深入分析多肽酶解物。6545XT AdvanceBio Q-TOF 是为生物制药设计的全套工具的重要组成部分。

- 超高 TOF 真空 ($10E-8$) 提供出色的蛋白质谱图清晰度
- 使用 SWARM 群集自动调谐一键优化大分子分析
- 能够分析非常大的分子，质量数范围高达 $30k\text{ m/z}$
- 改进的光束光学元件，可提供 $50k$ 分辨率
- 无需放空即可取出毛细管，维护便捷



6230B 飞行时间 (TOF) LC/MS

用于生物分子分析的精确质量 TOF LC/MS

Agilent 6230B 飞行时间 LC/MS (TOF LC/MS) 系统是一种高分辨率精确质量系统，具有增强的分析能力。同时测定范围高达 20000 的全谱质荷比，可提高分析速度和灵敏度。TOF LC/MS 的全质谱图扫描功能可确保捕获所有必要的信息，从而实现生物分子表征。6230B TOF LC/MS 与安捷伦生物惰性 HPLC 系统兼容，可实现优化的完整蛋白质表征以及肽、多聚糖和寡核苷酸分析。高分辨率和精确质量支持可萃取物与可浸出物以及其他杂质的检测和鉴定。直观的软件工具使任何用户都能够在日常分析中获得可靠的结果。6230B TOF LC/MS MassHunter 软件套装符合法规要求。

- 实现单克隆抗体 (mAb) 的高质量准确度分析，并具有出色的糖型和截短分离能力
- 利用高达 20000 m/z 的宽质量数范围表征大分子生物化合物
- 使用直观的 MassHunter WalkUp 软件减少管理任务，降低风险，且无需具备 LC/MS 专业知识
- 不局限于 UHPLC 分离，支持毛细管电泳、SFC 和 2D-LC
- 在极低浓度下检测杂质，使用安捷伦喷射流技术可实现柱上皮克级的灵敏度



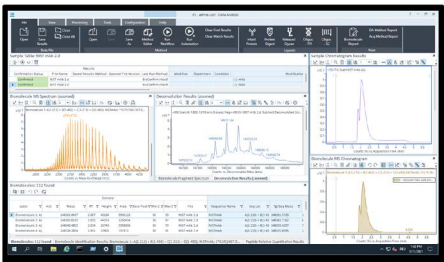
MassHunter BioConfirm 软件

BioConfirm 助力实现高效的生物分子表征

Agilent MassHunter BioConfirm 软件能够通过简便易用的工作流程对生物分子进行常规表征，适用于寡核苷酸分析、完整蛋白质分析、肽谱分析和常规多聚糖分析。这款用于 LC/Q-TOF 的生物制药软件是生物制药产品（如单克隆抗体和寡核苷酸）质谱分析全面解决方案的重要组成部分。从自动化样品前处理到分离和检测再到数据分析和报告，安捷伦生物制药工作流程可提供先进的分析。药物/抗体比率 (DAR) 计算器、灵活的报告模板等工具以及与 MassHunter WalkUp 的集成操作，使非专家也能利用专业的 LC/MS 功能。

完整的工作流程，用于：

- 完整蛋白质（包括 DAR）
- 肽谱分析
- 游离多聚糖
- 寡核苷酸



满足数据可靠性标准，提供技术控制确保遵循 FDA 21 CFR Part 11、欧盟附录 11、GAMP 5、ISO/IEC 17025 和 EPA 40 CFR Part 160 法规合规性指南的实验室安全地采集、处理、报告和存储数据

技巧和工具

使用安捷伦液相色谱备件实现出众性能和效率

Agilent InfinityLab 备件能够与 InfinityLab 液相色谱系列仪器无缝匹配，实现超高的性能、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，或访问以下网址以了解 InfinityLab 液相色谱备件目录：www.agilent.com/chem/catalog

OpenLab 软件套装

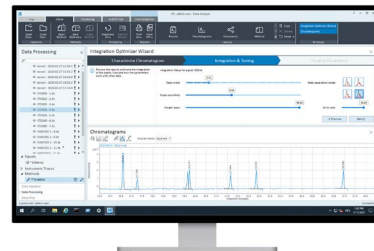
Agilent OpenLab 软件产品组合是完善的产品套装，其中包括样品管理、数据采集、数据分析、数据管理、实验室工作流程管理。

OpenLab CDS — 简化大分子分析工作流程

OpenLab CDS 是一款结合了高效率、易用性和数据可靠性的色谱数据系统。使用自定义计算器和 Integration Optimizer 积分优化器等软件工具，可自动计算寡核苷酸纯度或确定 DAR，无需将峰数据手动输入电子表格中。它能够快速解析数据，获得准确、一致的结果。

支持生物制药工作流程的特定应用工具

- 用于 OpenLab 的 MatchCompare 能够根据用户定义的限制条件客观对比未知样品和已知标样
- 二维液相色谱软件可用于进行二维测量和分析多维数据
- WalkUp 软件是一款直观样品提交和方法选择软件，使用户可以开放访问 LC 和 LC/MS



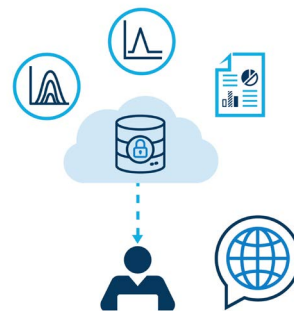
OpenLab ECM XT — 实现所有分析数据的单点访问

OpenLab ECM XT 是一款科学的数据管理系统 (SDMS) 软件，提供对数据的集中云存储和本地存储。将 MassHunter 与 OpenLab Server/ECM XT 配合使用进行安全存储，您的实验室将获益于广泛的技术控制手段，从而更好地应对监管审计：

- 活动记录的安全本地存储或云存储，包括数据文件、方法、工作列表、报告模板和结果
- 审计追踪清楚地显示了文件历史记录，包括执行操作的人员、操作内容、时间及原因的详细信息
- 基于用户职能及其可访问的数据分配访问权限

利用网络化系统打破数据孤岛

无论是 mRNA 治疗性药物还是双特异性单克隆抗体，支持大分子模式的分析数据至关重要。然而，单机工作站使得仪器数据难以访问和管理。采用网络化配置可以改善您的整体实验室运营。



InfinityLab 液相色谱备件

非常适合您的生物分子分析

Agilent InfinityLab 备件是创新的消耗品，旨在与安捷伦液相色谱仪器和色谱柱无缝配合，为您的生物 HPLC 分析提供更高的分析效率和性能。

保护色谱柱免受颗粒污染

颗粒可能会导致色谱柱堵塞、色谱结果不佳和停机时间延长。为了防止这些问题，采用有效的过滤技术至关重要。液相色谱过滤组件可用于过滤流动相（尤其是当使用水性缓冲溶液时），以去除未溶解的盐晶体和微生物的残留物。

可安装在线过滤器，以捕集流路中来自溶剂、样品或磨损的系统部件的任何颗粒。InfinityLab Quick Change 在线过滤器无需工具即可更换滤盘，通过“咔哒声”即可判断是否安装到位，非常方便。

为生物应用提供出色的连接

在 InfinityLab 系列中，安捷伦提供多种材质的 HPLC 毛细管，可满足您的各种需求。由 MP35N、PEEK 内衬不锈钢和钛制成的毛细管具有惰性和耐腐蚀性，特别适用于生物应用。与 InfinityLab Quick Connect 快速连接接头相结合，可实现出色的手紧式连接，耐压高达 1300 bar。获得出色的分析性能。

减少实验室中的化学物质挥发

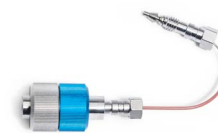
在日常实验中，您可能会接触到许多有毒化合物，乙腈和甲醇只是其中的两种。InfinityLab Stay Safe 溶剂瓶安全盖可防止溶剂释放到空气中。与创新的 InfinityLab Stay Safe 吹扫瓶相结合，用多达 4 条溶剂管线更安全地冲洗 HPLC。

样品分析过程从样品瓶开始 — 选择合适的样品瓶至关重要！

安捷伦提供品种齐全样品瓶、瓶盖和内插管；无论是标准硼硅酸盐玻璃样品瓶、表面去活玻璃样品瓶还是聚丙烯样品瓶，我们提供的储存解决方案可以满足您的任何需求。除了各种样品瓶材质以外，我们还提供各种设计的样品瓶，以满足不同样品性质和可用样品量的要求：从针对样品量有限情况的 3–5 μL 样品瓶，到样品量充足的 1.75 mL 样品瓶。

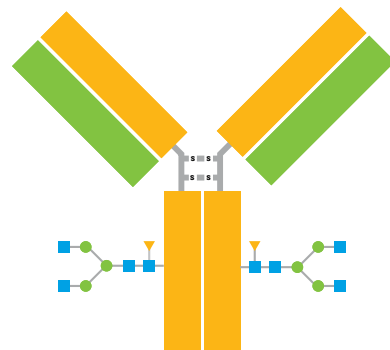
技巧和工具

下载安捷伦样品瓶产品目录 (5994-4803ZHCN)，通过我们的**样品瓶选择工具**选择合适的样品瓶。



使用反相和疏水相互作用色谱进行完整蛋白质分析

获得在完整蛋白质或亚基水平分离杂质所需的选择性和分离度



通常使用 LC/MS 在完整蛋白质或亚基水平分析蛋白质，以监测杂质或准确测量分子量。完整蛋白质测量所需的样品前处理通常比多肽水平的分析要少得多，同时能够相对更快速地进行产品质量和纯度评估。

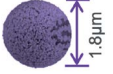
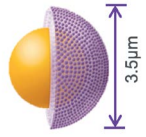
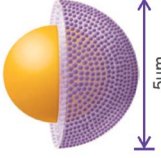
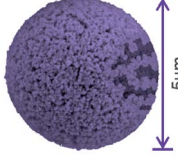
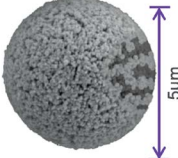
安捷伦具有种类齐全的优化大孔径 300 Å、450 Å 及更大的反相 BioHPLC 色谱柱，并由遍布全球的技术支持专家和应用化学家提供支持。该系列产品包括耐压范围为 400–1200 bar 的 1.8、3.5 和 5 µm 多孔颗粒填料，在较低压力下进行 UHPLC 分离的三种不同的表面多孔颗粒，以及用于在多种条件下进行分析的聚合物色谱柱，包括用于 MS 分析的甲酸流动相。

此外，安捷伦还提供疏水相互作用色谱 (HIC) 和亲水相互作用色谱 (HILIC) 柱，用作完整蛋白质或亚基分离的替代和互补方法。

反相

- **AdvanceBio RP-mAb 色谱柱**是专为 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**包括可以在更宽的 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 种大孔径尺寸和 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理想解决方案
- **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**是安捷伦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

反相分离的色谱柱选择

	ZORBAX RRHD SB 300	AdvanceBio RP-mAb	Poroshell 300	ZORBAX 300SB	PLRP-S
					
固定相选择	SB-C3、SB-C8、Diphenyl	C4、SB-C8、Diphenyl	SB-C3、SB-C8	SB-C3、SB-C8、Diphenyl	聚合物
孔径	300 Å	450 Å	300 Å	300 Å	1000 Å
HPLC		●	●	●	●
UHPLC	●				
优势	- 超高分离度 - 独特的二苯基化学键合相	- 专为 mAbs 而设计 - 独特的二苯基化学键合相	- 更小的球蛋白 - 更高通量，更新为 ZORBAX 300SB 方法	- 可靠的主力色谱柱 - 独特的二苯基化学键合相	- 推荐用于 MS — 使用 FA 和 TFA 均可获得出色的峰形 - 带 PEEK 内衬的不锈钢卡套

疏水相互作用色谱

- **AdvanceBio HIC 色谱柱**采用独特的 450 Å 孔径、全多孔 ZORBAX 颗粒填料，可用于天然模式分析，是反相分离的替代方案。天然折叠的完整蛋白质按疏水性从低到高的顺序洗脱

亲水相互作用色谱

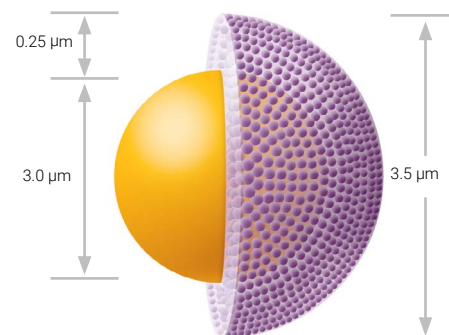
- **ZORBAX RRHD 300 Å HILIC 色谱柱**由全多孔 1.8 μm 颗粒填料制成，与反相色谱具有互补的选择性，尤其适用于亲水性样品（例如糖肽和糖蛋白）

反相色谱柱选择		
应用	安捷伦色谱柱	说明
单克隆抗体和 mAb 片段	AdvanceBio RP-mAb	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，从而确保出色的色谱分离。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。
	C4	
	SB-C8	
	Diphenyl	
	PLRP-S 1000 Å	
完整蛋白质、单克隆抗体、mAb 片段和多肽	ZORBAX 300 Å, 1.8 µm	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，用于对极为复杂的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。
	RRHD 300SB-C18	
	RRHD 300SB-C8	
	RRHD 300SB-C3	
	RRHD 300-Diphenyl	
	ZORBAX 300 Å, 3.5 和 5 µm	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。
	300SB-C18	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。
	300SB-C8	
	300SB-C3	
	300SB-CN	
	PLRP-S	
	100 Å	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。
	300 Å	
	1000 Å	
	4000 Å	
	Poroshell 300	
寡核苷酸分析	300SB-C18	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 84 页。
	300SB-C8	
	300SB-C3	
	300Extend-C18	
	PLRP-S 100 Å, 300 Å, 1000 Å, 4000 Å	
	PL-SAX 1000 Å, 4000 Å	
	AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱	非常适合用于高分离度分析型和制备型分离。 2.7 µm 和 4 µm 表面多孔颗粒填料，适用于寡核苷酸及其杂质的高分离度分析和纯化。

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 diphenyl 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

完整和还原态的单克隆抗体的分析是表征治疗性蛋白和了解其有效性与稳定性的关键。色谱分离性能不佳可能导致重复工作，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。

专门设计用于快速和高分离度 mAb 分离的稳定的颗粒填料

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，确保获得出色的色谱性能。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 diphenyl 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。

4 完整蛋白质分析

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 Diphenyl	450 Å	90 °C	1.0–8.0	是

性能指标只代表典型值。

* 色谱柱尤其适合在低 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）条件下可获得更高的柱稳定性。

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：反相 LC 一级结构表征工作流程（出版物 **5991-6321CHCN**）。

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

温度: 80 °C

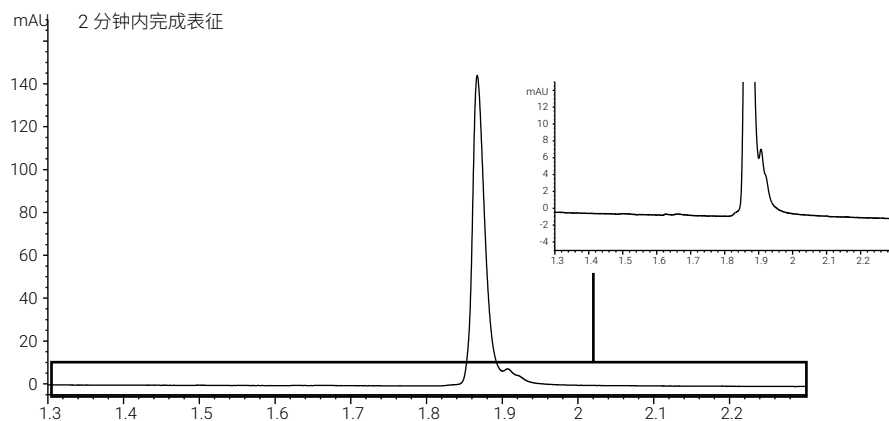
检测器: UV, 254 nm

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

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

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理想分离。

选择性 Diphenyl 固定相

色谱柱: AdvanceBio RP-mAb Diphenyl

795775-944

2.1 × 100 mm, 3.5 μm

流动相: A: 含 0.1% TFA 的水: IPA (98:2)

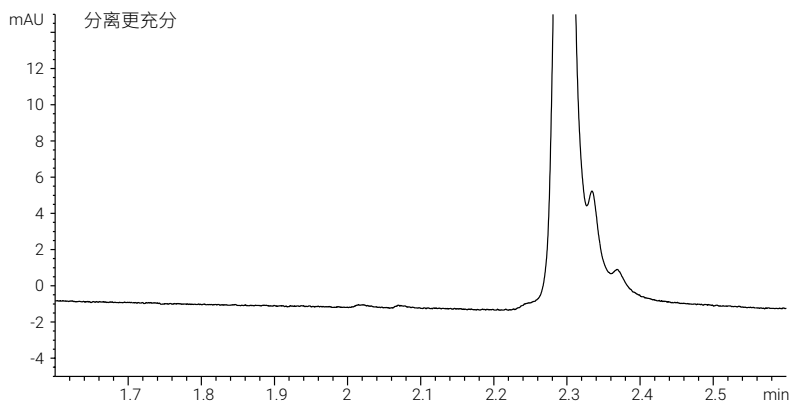
B: IPA:ACN:流动相 A (70:20:10)

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

温度: 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 Diphenyl 柱可提供更为充分的分离。

4 完整蛋白质分析

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)

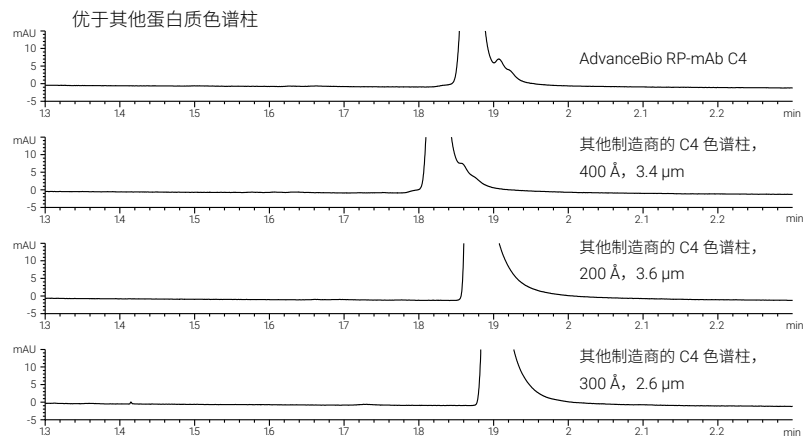
流速: 1.0 mL/min

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

温度: 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。

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)

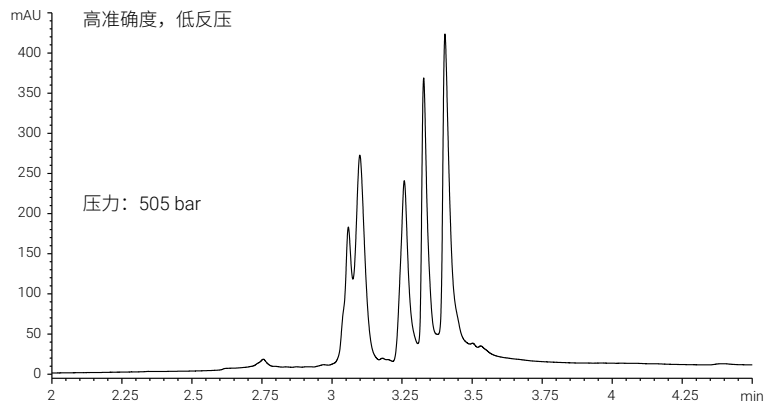
流速: 0.8 mL/min

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

温度: 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异体 IgG1 (2 mg/mL) 得到



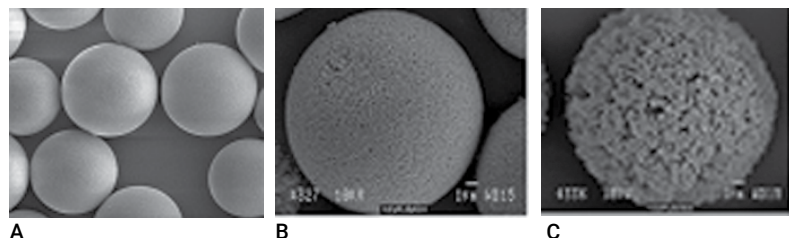
采用大孔径 Poroshell 技术的 AdvanceBio RP-mAb 色谱柱不仅柱效高、分析时间短、压力低, 而且温度也低于多数反向方法的一般温度 (80 °C)。

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
- 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。

对于完整蛋白质，孔径通常大于 300 Å，建议从 PLRP-S 1000 Å 开始。较小的 100 Å 孔径常用于肽或非生物小分子的反相分离。所有孔径均可用于寡核苷酸分离。如需了解有关用于寡核苷酸分离的 PLRP-S 的更多信息，请参见第 162 页。



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

4 完整蛋白质分析

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、合成和肽
300 Å	重组肽/蛋白质
1000 Å	大分子蛋白质和单克隆抗体
4000 Å	大分子寡核苷酸或高速分离

利用化学稳定性 — TFA 浓度

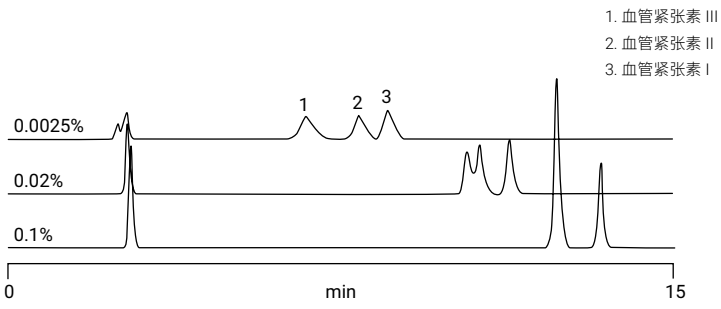
色谱柱: **PLRP-S 100 Å**
PL1512-5500
4.6 × 250 mm, 5 µm

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_4OH 浓度

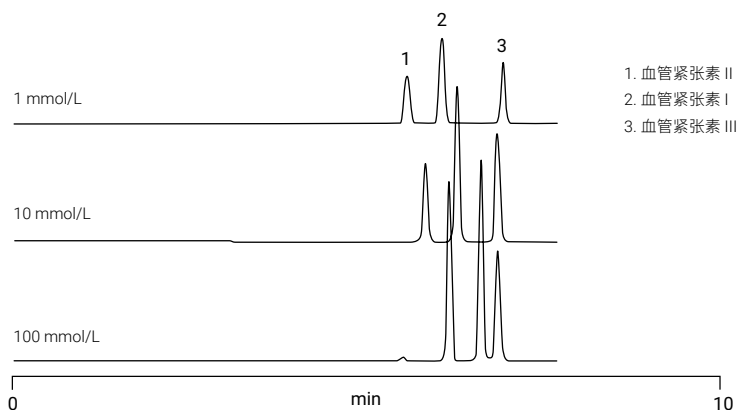
色谱柱: PLRP-S 100 Å
PL1512-5500
4.6 × 250 mm, 5 μm

流动相: A: NH_4OH (各种浓度) 水溶液
B: NH_4OH (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)



Alberta Peptide Institute 测试混标

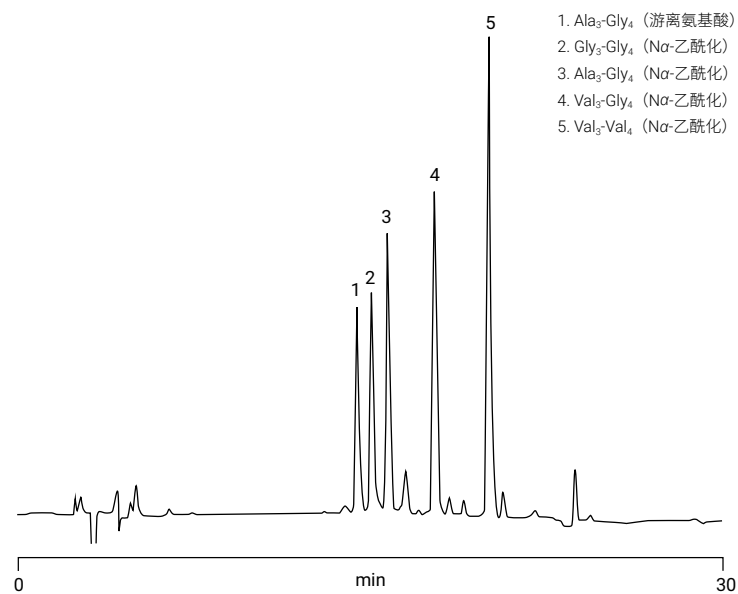
色谱柱: PLRP-S 100 Å
PL1512-5500
4.6 × 250 mm, 5 μm

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: 在 30 min 内 B 由 0 升至 100%

检测器: UV, 220 nm



4 完整蛋白质分析

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

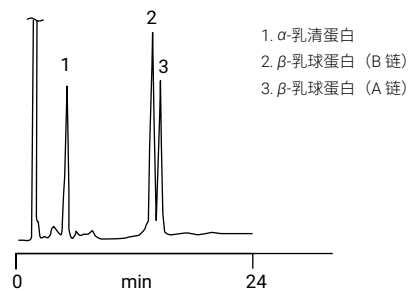
流动相: A: 含 0.1% TFA 的 99% 水: 1% ACN
B: 含 0.1% TFA 的 1% 水: 99% ACN

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



大分子纤维蛋白

色谱柱: PLRP-S 300 Å

PL1512-3801

4.6 × 150 mm, 8 μm

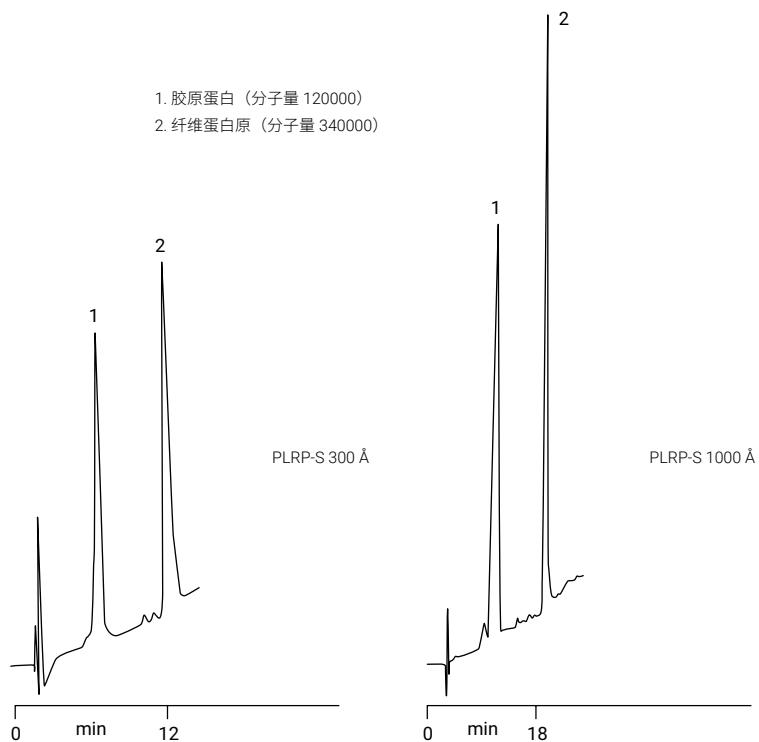
流动相: A: 0.25% TFA 水溶液
B: 含 0.25% TFA 的 5% 水: 95% ACN

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



AdvanceBio 脱盐反相柱

在 MS 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（例如单克隆抗体）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，因为它们会导致信号抑制，并可能因盐沉积而污染 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。



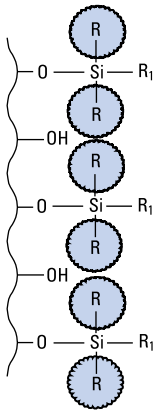
AdvanceBio 脱盐反相柱（货号 PL1612-1102）
和柱芯支架（货号 820999-901）

技巧和工具

有关在 2D-LC/MS 中有效使用 AdvanceBio 脱盐反相柱的示例，请参见应用简报 **5991-7066CHCN**。

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。首先，对于有效分离蛋白质和多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，大孔径 300 Å 色谱柱是必需的。其次，300StableBond 色谱柱在低 pH 条件下具有出色的耐受性，例如采用通常用于分离蛋白质和多肽的含有 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、CN 和 Diphenyl (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柱（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。毛细管柱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

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 色谱柱尤其适合在低 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，可获得更高的色谱柱稳定性。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: H₂O:IPA (98:2) + 0.1% TFA (v/v)

B: IPA:ACN:H₂O (70:20:10) + 0.1% TFA (v/v)

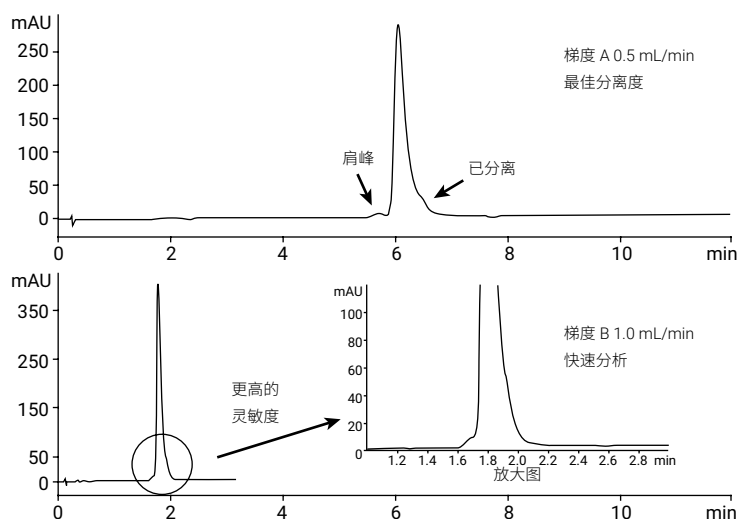
流速: 在 0.5 mL/min 和 1.0 mL/min 之间

梯度: 多段线性洗脱

温度: 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

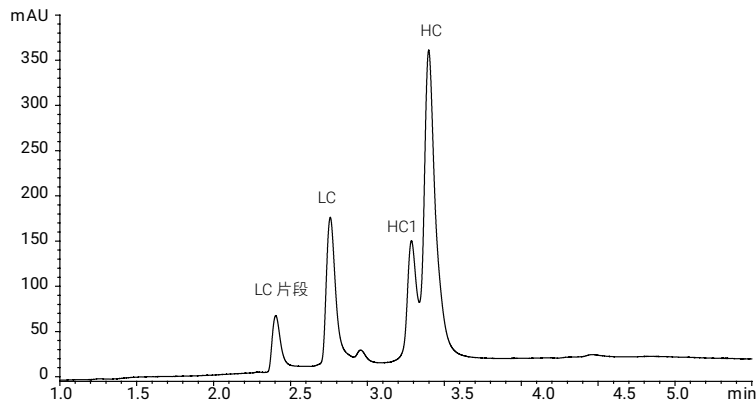
如需了解关于单克隆抗体一级结构表征的更多信息, 请参见: 使用 *Agilent AdvanceBio* 反相色谱柱优化生物分子的鉴定 (出版号 5991-2032CHCN)



4 完整蛋白质分析

还原和烷基化 mAb — 轻链和重链变异体的分离

色谱柱:	ZORBAX RRHD 300SB-C8																
	866750-906																
	2.1 × 150 mm, 1.8 μm																
流动相:	A: H ₂ O + 0.1% TFA (v/v)																
	B: 正丙醇:ACN:H ₂ 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)																
梯度:	<table><tr><th>时间 (min)</th><th>溶剂 B (%)</th></tr><tr><td>0</td><td>20</td></tr><tr><td>3</td><td>35</td></tr><tr><td>4</td><td>40</td></tr><tr><td>5</td><td>40</td></tr><tr><td>5.1</td><td>90</td></tr><tr><td>5.5</td><td>90</td></tr><tr><td>6</td><td>25</td></tr></table>	时间 (min)	溶剂 B (%)	0	20	3	35	4	40	5	40	5.1	90	5.5	90	6	25
时间 (min)	溶剂 B (%)																
0	20																
3	35																
4	40																
5	40																
5.1	90																
5.5	90																
6	25																
温度:	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、柱温箱和二极阵列检测器 (DAD)																



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。

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: H₂O:IPA (98:2) + 0.1% TFA (v/v)
B: IPA:ACN:H₂O (70:20:10) + 0.1% TFA

流速: 1.0 mL/min

温度: 80 °C

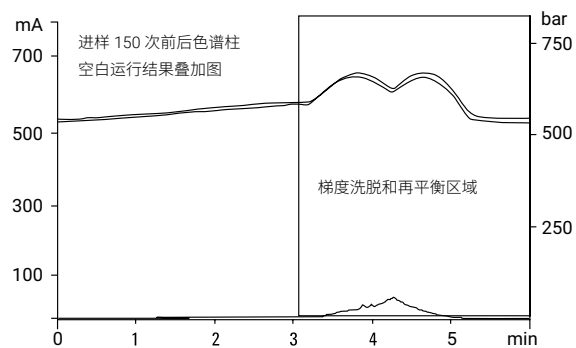
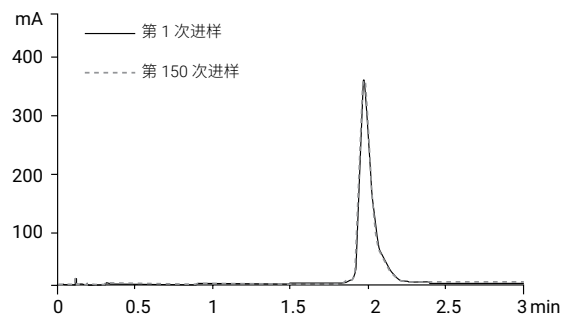
检测器: 1290 Infinity 液相色谱系统, 配备二极管阵列检测器,
检测波长 225 nm

样品: mAb

梯度

时间, min	%B
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。



4 完整蛋白质分析

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: H₂O (0.1% TFA) (v/v)

B: 80% 正丙醇:10% ACN:10% H₂O (0.08% TFA) (v/v)

进样量: 3 μL (来自 2.5 mg/mL 样品)

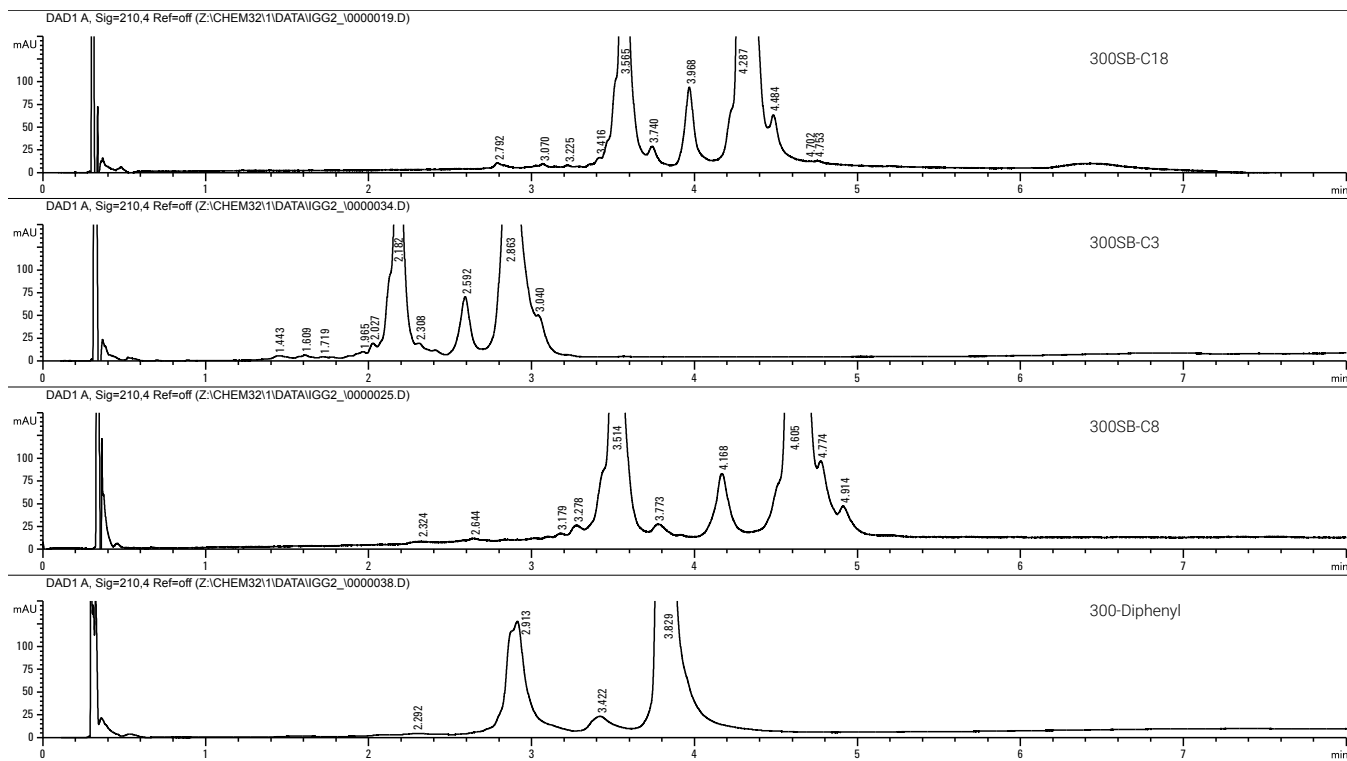
流速: 1.0 mL/min (3.5 μm*), 1.0 mL/min (1.8 μm)

梯度: 25%–35% B, 90% 清洗

温度: 80 °C

检测器: UV, 215 nm

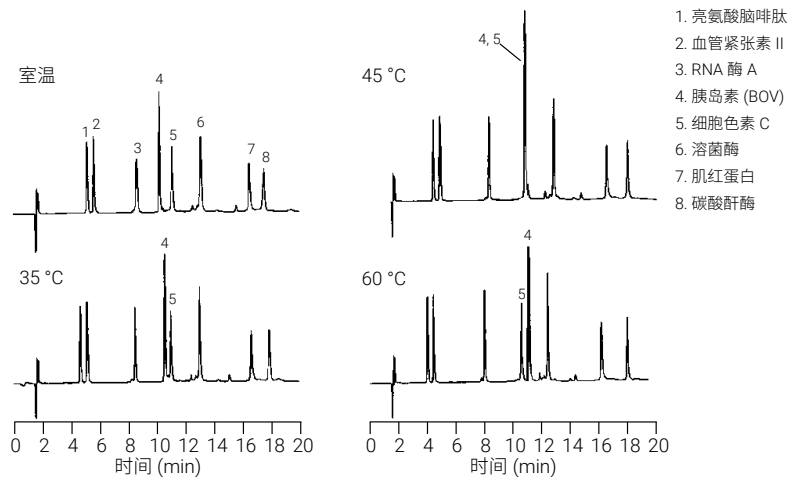
*在低流速下峰展宽



肽/蛋白质：高温的影响

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

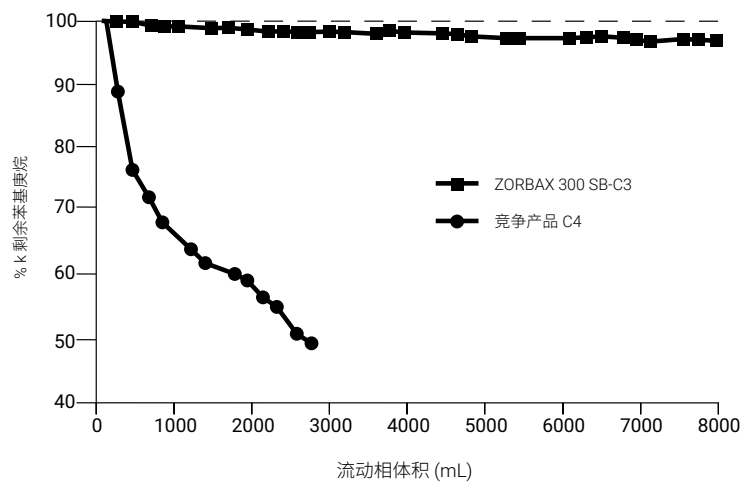
流动相: A: 5:95 ACN:水, 含 0.10% TFA (v/v%)
B: 95:5 ACN:水, 含 0.085% TFA (v/v%)
流速: 1.0 mL/min
梯度: 20 min 内由 15% 升至 53%, 后运行时间 12 min
温度: 环境温度-60 °C
检测器: UV, 215 nm
样品: 多肽



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
温度: 60 °C



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 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

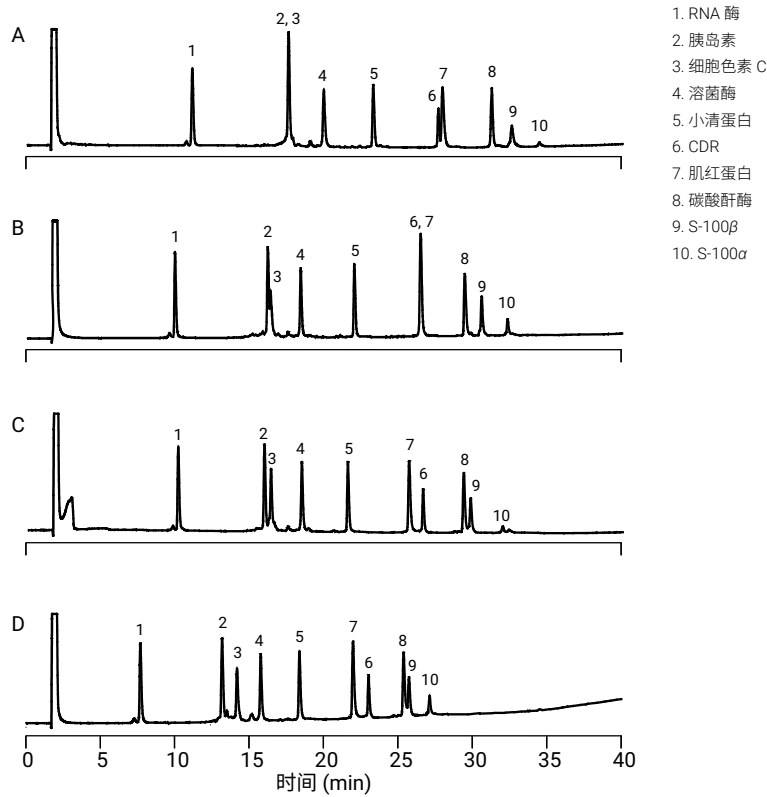
色谱柱 D: ZORBAX 300SB-CN
858750-905
4.6 × 150 mm, 5 μm

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

温度: 60 °C

样品: 蛋白质各 3 μg

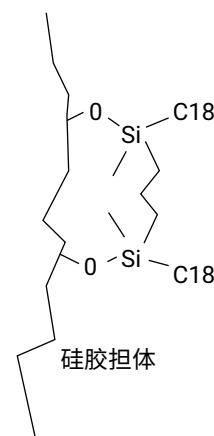


300SB-C18、C8、C3 和 CN 键合相为该组多肽提供不同的分离。这为快速优化蛋白质分离增加了一个重要参数。300SB-CN 色谱柱对亲水性更高的多肽具有独特的选择性。

ZORBAX 300 Å Extend-C18

- 在高和低 pH (pH 2–11.5) 条件下, 实现多肽和肽的稳定分离
- 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	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: www.agilent.com/chem/lamps 了解更多信息。



在高 pH 下具有长寿命

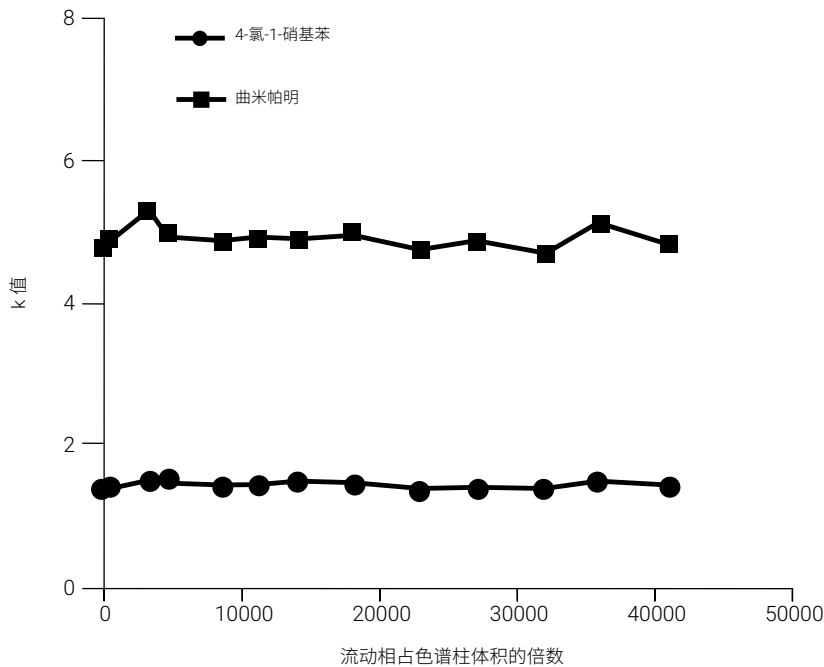
色谱柱: ZORBAX Extend-C18
773450-902
4.6 × 150 mm, 5 μm

流动相: 20% 20 mmol/L NH₄OH, pH 10.5
80% 甲醇

流速: 1.5 mL/min

温度: 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。



利用 ZORBAX Extend-C18 在高 pH 条件下实现不同的选择性

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: 含 0.085% TFA 的 80% ACN 溶液
A: 20 mmol/L NH₄OH 水溶液
B: 含 20 mmol/L NH₄OH 的 80% ACN 溶液

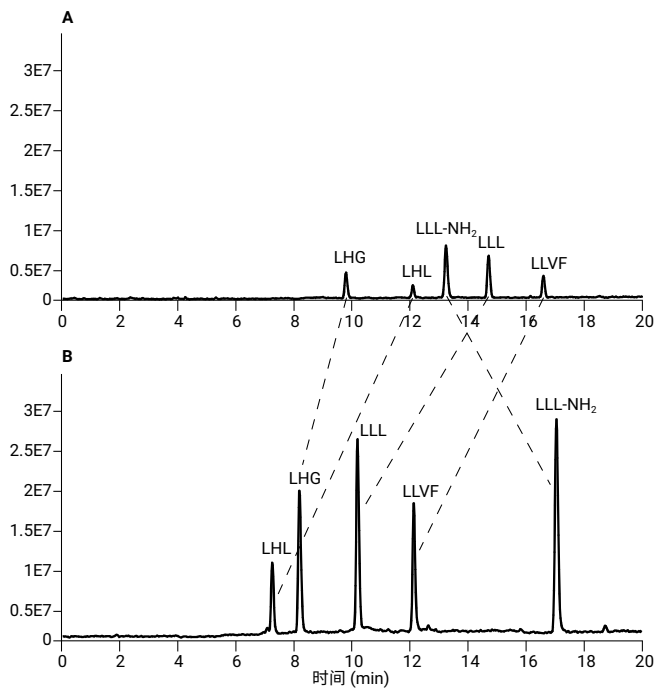
流速: 0.25 mL/min

梯度: 20 min 内 B 由 5% 升至 60%

温度: 25 °C

质谱条件: 正离子 ESI; Vf 70 V, Vcap 4.5 kV,
N₂, 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。

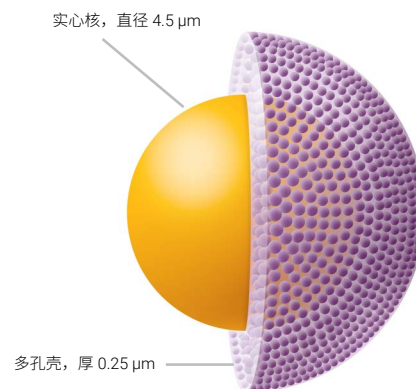


Poroshell 300 AB

- 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
- 在低 pH 条件下使用 Poroshell 300SB，高 pH 条件下使用 300Extend-C18，可以获得长柱寿命
- 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多肽的理想选择，其 5 μm 直径的表面多孔颗粒填料支持采用更高流速，同时保持高效分离和尖锐的峰。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。

多肽和蛋白质的分离一般较慢，以减少这些慢扩散分析物的潜在峰展宽。然而，Poroshell 色谱柱采用表面多孔颗粒填料，这种填料通过在硅胶实心核上覆盖一层 0.25 μm 多孔硅胶薄层制成，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 的多肽和蛋白质进行快速 HPLC 分离。



HPLC 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 以下 60 °C	2.0–11.0	是

性能指标只代表典型值

* 300StableBond 色谱柱尤其适合在低 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，可获得更高的色谱柱稳定性。在中等或高 pH 条件下，建议使用 300Extend-C18 色谱柱



Poroshell 300 色谱柱

AB AdvanceBio 系列产品的一部分

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: 含 0.07% TFA 的 ACN 溶液

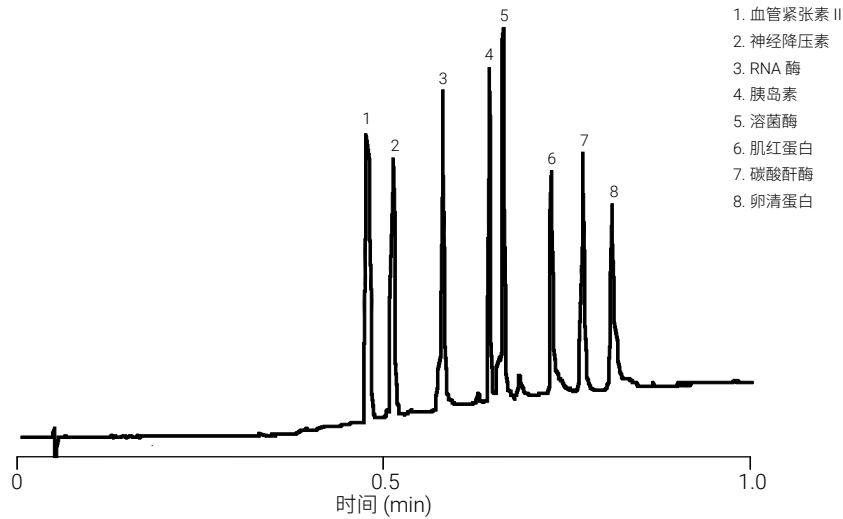
流速: 0.3 mL/min

梯度: 1.0 min 内 B 由 5% 升至 100%

温度: 70 °C, 260 bar

检测器: UV, 215 nm

样品: 蛋白质和多肽



八种肽和蛋白质的分离在不到 60 秒内即可完成。每个色谱峰均得到高效分离且峰形尖锐。

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**）

Poroshell 300 微径柱为 LC/MS 分析提供了更高的灵敏度

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%

温度: 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

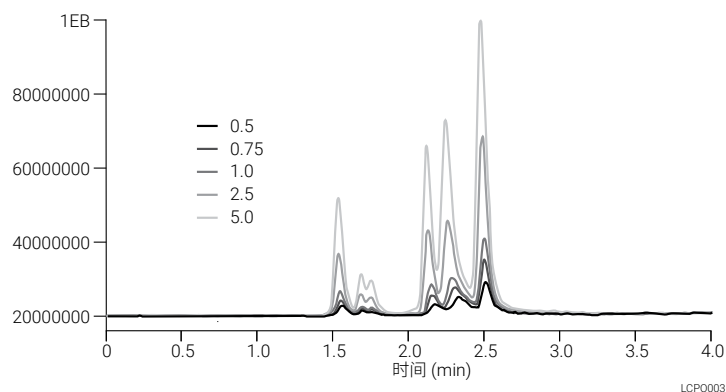
碎裂电压: 140 V

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 5994-4803ZHCN。

www.agilent.com/chem/vials-productivity

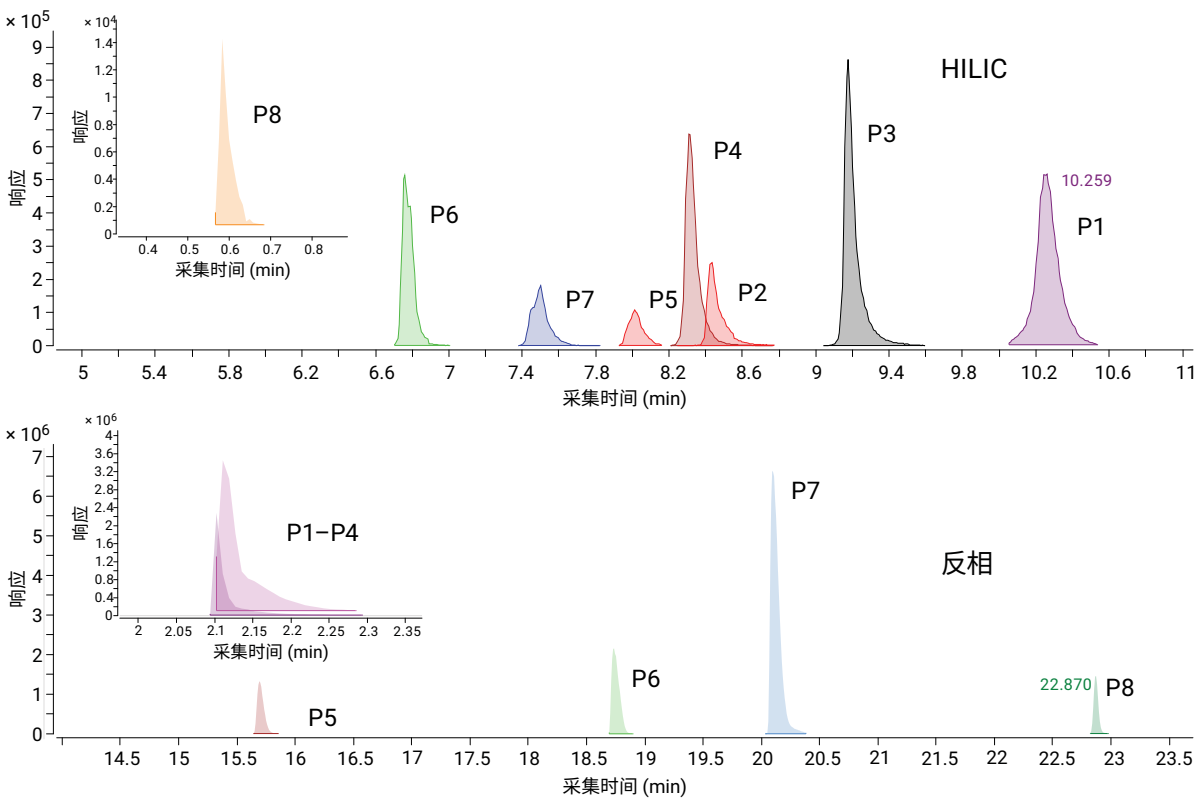


ZORBAX 300 Å HILIC

Agilent ZORBAX 300 Å HILIC 色谱柱基于与反相 ZORBAX RRHD 色谱柱相同的全多孔 1.8 µm 颗粒填料，在用于 UHPLC 分离的低 pH 和高压下具有出色的稳定性。HILIC 选择性与反相分离高度互补，疏水性最强的分析物首先洗脱而非最后洗脱。HILIC 还能够保留在反相分析中通常无法保留的分析物，例如亲水性非常强的多肽或蛋白质（如糖基化肽或蛋白质）。300 Å 孔径使这些 HILIC 色谱柱可用于完整蛋白质，同时仍然适用于较小的多肽。

色谱柱性能指标				
键合相	粒径	孔径	pH 范围	最大压力
HILIC	1.8 µm	300 Å	1–8	1200 bar

用于多肽和蛋白质分离的不同选择性



比较通过两种色谱柱获得的 8 种多肽的保留时间和分离度

HILIC 条件

色谱柱: Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度 300-HILIC 色谱柱,
2.1 × 100 mm, 1.8 μm (货号 858750-901)

洗脱液: A: 95% ACN + 5% 水;
B: 50 mmol/L 甲酸铵, pH 4.0

流速: 0.4 mL/min

梯度: 时间 (min) % B
0 0
15 100
15.1 0
20 0

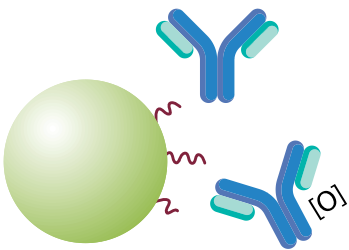
温度: 55 °C

肽	序列	疏水性	RP 保留时间 (min)	HILIC 保留时间 (min)
P1	APPR	1.83	2.103	10.259
P2	GKLG	3.84	2.118	8.437
P3	ALGAQK	4.57	2.119	9.181
P4	AVSGLR	9.15	2.13	8.316
P5	YLLEAK	19.64	15.698	8.014
P6	VYSNFLRGK	23.14	18.742	6.583
P7	SLTTLLR	24.79	20.109	7.492
P8	VNFYAWKR	27.64	22.87	0.587

在两种色谱柱上分析的肽。

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独特的键合技术进行制造，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 (mAbs)、抗体药物偶联物 (ADCs) 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卓越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：无需对多种色谱柱进行筛选以用于不同的 CQAs
- 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	粒径	温度上限	pH 范围	压力限值	流速*
450 Å	3.5 µm	60 °C (pH 7)	2.0-8.0 (35 °C)	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

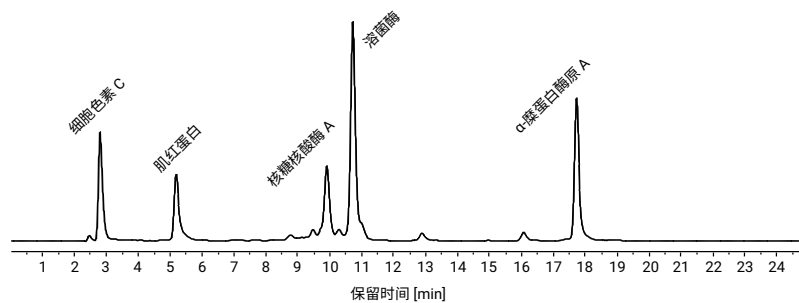
梯度:	时间 (min)	%A	%B
	0	100	0
	20	0	100
	25	0	100
	30	100	0
	40	100	0

流速: 0.5 mL/min

温度: 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

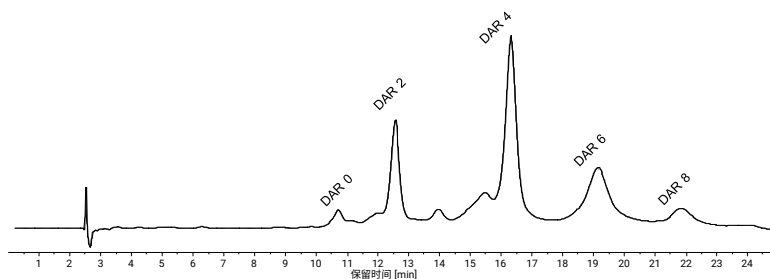
梯度:	时间 (min)	%A	%B	%C
	0	50	45	5
	20	0	75	25
	25	0	75	25
	30	50	45	5
	40	50	45	5

流速: 0.5 mL/min

温度: 30 °C

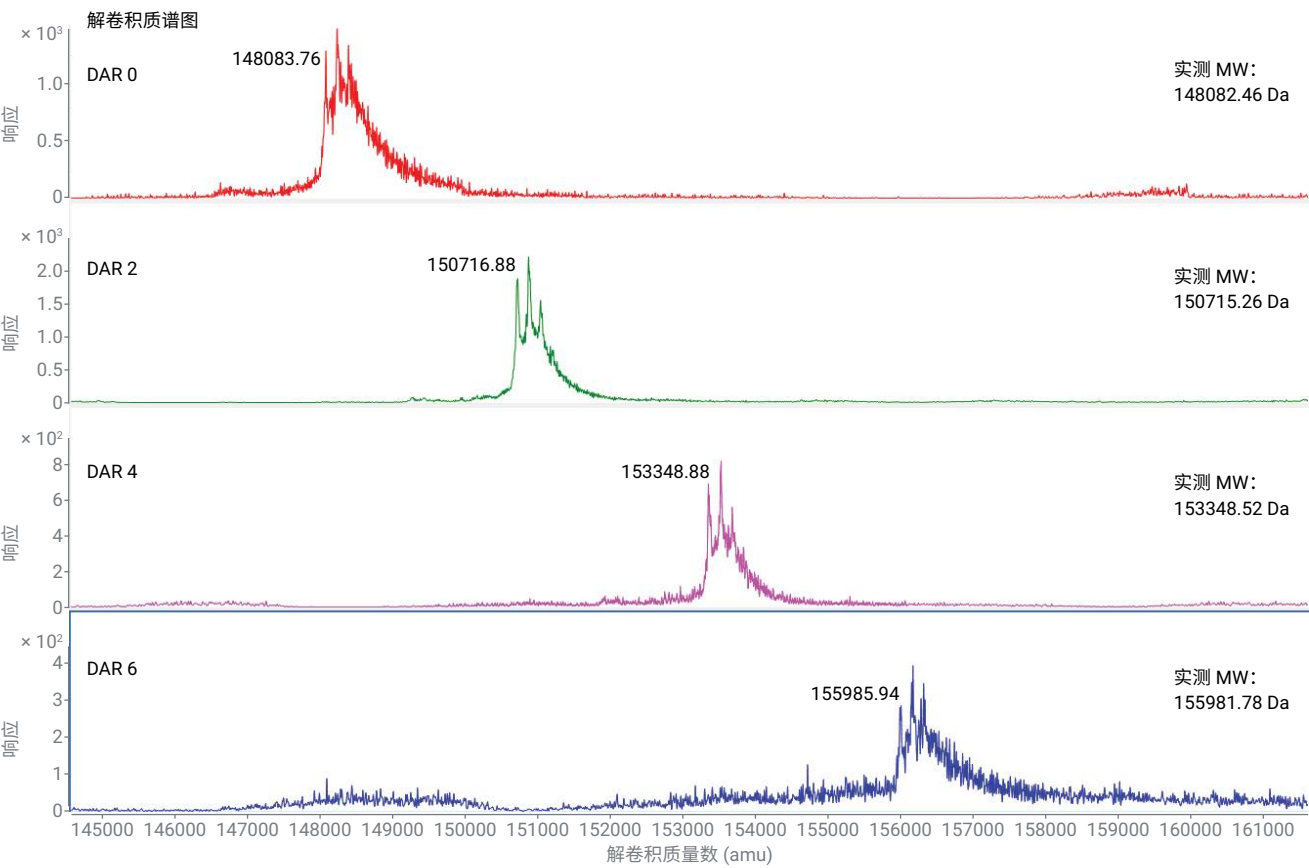
进样量: 5 μL

检测: UV, 220 nm



通过 MS 分析准确确认 AdvanceBio HIC DAR 值

LC-非变性 MS 方法还可以测定半胱氨酸连接的 ADC DAR。安捷伦开发了一种 2D-LC/MS 方法，用于在非变性 LC/MS 条件下表征完整的半胱氨酸连接的 DARs。该工作流程在第一维中使用 Agilent AdvanceBio HIC 色谱柱、在第二维中使用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱作为脱盐柱，以及高度灵敏的 MS 方法，以准确测定具有不同 DARs 的所有 ADCs 的完整质量。



各种维布妥昔单抗 DARs (DAR 0–DAR 6) 的非变性 SEC LC/MS 分析的解卷积质谱图。

产品订购信息

AdvanceBio RP-mAb 色谱柱

规格 (mm)	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	799975-904	789975-906	799975-944
2.1 × 150	3.5	793775-904	783775-906	793775-944
2.1 × 100	3.5	795775-904	785775-906	795775-944
2.1 × 75	3.5	797775-904	787775-906	797775-944
2.1 × 50	3.5	799775-904	789775-906	799775-944

PLRP-S HPLC 色谱柱

规格 (mm)	粒径 (μm)	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		

(续)

技巧和工具

访问安捷伦在线商城，直接购买安捷伦色谱柱和消耗品：www.agilent.com/chem/store

4 完整蛋白质分析

PLRP-S HPLC 色谱柱

规格 (mm)	粒径 (µm)	PLRP-S 100 Å USP L21	PLRP-S 300 Å USP L21	PLRP-S 1000 Å USP L21	PLRP-S 4000 Å USP L21
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	PL1312-1803
1.0 × 50	5	PL1312-1500	PL1312-1501	PL1312-1502	PL1312-1503
1.0 × 10	5			PL1C12-2502	
1.0 × 150	3	PL1312-3300			
1.0 × 50	3	PL1312-1300	PL1312-1301		
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

ZORBAX 300 Å StableBond 色谱柱

描述	规格 (mm)	粒径 (µm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7	300SB-CN L10	300SB-C3 USP L56	300-Diphenyl USP L11
4.6 mm 内径分析柱和保护柱							
分析柱	4.6 × 250	5	880995-902	880995-906	880995-905	880995-909	
分析柱	4.6 × 150	5	883995-902	883995-906	883995-905	883995-909	
分析柱	4.6 × 50	5	860950-902	860950-906	860950-905	860950-909	
保护柱柱芯，4/包*	4.6 × 12.5	5	820950-921	820950-918	820950-923	820950-924	
快速分离柱	4.6 × 150	3.5	863973-902	863973-906	863973-905	863973-909	
快速分离柱	4.6 × 100	3.5	861973-902	861973-906			
快速分离柱	4.6 × 50	3.5	865973-902	865973-906	865973-905	865973-909	
3.0 mm 内径分析柱和保护柱							
Solvent Saver Plus	3.0 × 150	3.5	863974-302	863974-306		863974-309	
Solvent Saver Plus	3.0 × 100	3.5		861973-306			
2.1 mm 内径分析柱和保护柱							
窄径柱	2.1 × 250	5	881750-902				
窄径柱	2.1 × 150	5	883750-902	883750-906	883750-905	883750-909	
推荐的保护柱柱芯，4/包*	2.1 × 12.5	5	821125-918	821125-918	821125-924	821125-924	

*需要保护柱卡套，货号 820999-901

(续)

ZORBAX 300 Å StableBond 色谱柱

描述	规格 (mm)	粒径 (µm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7	300SB-CN L10	300SB-C3 USP L56	300-Diphenyl USP L11
窄径 RR 柱	2.1 × 150	3.5		863750-906			
窄径 RR 柱	2.1 × 100	3.5	861775-902	861775-906			
窄径 RR 柱	2.1 × 50	3.5	865750-902	865750-906			
窄径 RRHD 柱	2.1 × 150	1.8	863750-902	866750-906		863750-914	863750-944
窄径 RRHD 柱	2.1 × 100	1.8	858750-902	858750-906		858750-909	858750-944
窄径 RRHD 柱	2.1 × 50	1.8	857750-902	857750-906		857750-909	857750-944
1.0 mm 内径分析柱和保护柱							
微径柱	1.0 × 250	5	861630-902				
微径 RR 柱	1.0 × 150	3.5	863630-902	863630-906			
微径 RR 柱	1.0 × 50	3.5	865630-902	865630-906			
MicroBore RRHD	1.0 × 50	1.8					965600-944
半制备柱和保护柱							
半制备柱	9.4 × 250	5	880995-202	880995-206	880995-205	880995-209	
推荐的保护柱柱芯, 2/包*	9.4 × 15	7	820675-124	820675-124	820675-124	820675-124	
PrepHT 卡套柱 (需要柱端接头套件 820400-901) 和保护柱							
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 保护柱, 2/包*	17.0 × 7.5	5	820212-921	820212-918		820212-924	
玻璃内衬毛细管柱							
毛细管柱	0.5 × 150	5	5064-8264				
毛细管柱	0.5 × 35	5	5064-8294				
毛细管 RR 柱	0.5 × 150	3.5	5064-8268				

*需要保护柱卡套, 货号 820999-901

(续)

技巧和工具

为了更有效地利用安捷伦仪器, 请访问: www.agilent.com/chem/biolc-columns-user-guides

4 完整蛋白质分析

ZORBAX 300 Å StableBond 色谱柱

描述	规格 (mm)	粒径 (µm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7	300SB-CN L10	300SB-C3 USP L56	300-Diphenyl USP L11
毛细管 RR 柱	0.5 × 35	3.5	5065-4459				
毛细管柱	0.3 × 150	5	5064-8263				
毛细管柱	0.3 × 35	5	5064-8295				
捕集阱/保护柱, 5/包**	0.3 × 5	5	5065-9913	5065-9914			
毛细管 RR 柱	0.3 × 150	3.5	5064-8267	5065-4460			
毛细管 RR 柱	0.3 × 100	3.5	5064-8259	5065-4461			
毛细管 RR 柱	0.3 × 50	3.5	5064-8300	5065-4463			
纳流柱 (PEEK 熔融石英)							
纳流 RR 柱	0.1 × 150	3.5	5065-9910				
纳流 RR 柱	0.075 × 150	3.5	5065-9911				
纳流 RR 柱	0.075 × 50	3.5	5065-9924	5065-9923			

*需要保护柱卡套, 货号 820999-901

**需要保护柱卡套, 货号 5065-9915

ZORBAX 300 Å Extend-C18 色谱柱

描述	规格 (mm)	粒径 (µm)	货号
分析柱	4.6 × 250	5	770995-902
分析柱	4.6 × 150	5	773995-902
快速分离柱	4.6 × 150	3.5	763973-902
快速分离柱	4.6 × 100	3.5	761973-902
快速分离柱	4.6 × 50	3.5	765973-902
窄径 RR 柱	2.1 × 150	3.5	763750-902
窄径 RR 柱	2.1 × 100	3.5	761775-902
窄径 RR 柱	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
保护柱卡套			820999-901

Poroshell 300 色谱柱

描述	规格 (mm)	粒径 (µm)	Poroshell 300SB-C18	Poroshell 300SB-C8	Poroshell 300SB-C3	Poroshell 300Extend-C18
窄径柱	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
毛细管柱	0.5 × 75	5		5065-4468		
保护柱柱芯, 4/包*	2.1 × 12.5	5	821075-920	821075-918	821075-924	

*需要保护柱卡套, 货号 820999-901

ZORBAX 300 Å HILIC 色谱柱

描述	货号
ZORBAX 300 Å HILIC, 2.1 × 100 mm, 300 Å, 1.8 µm	858750-901
ZORBAX 300 Å HILIC, 2.1 × 50 mm, 300 Å, 1.8 µm	857750-901

Agilent AdvanceBio HIC 色谱柱

描述	货号
AdvanceBio HIC, 4.6 × 100 mm, 450 Å, 3.5 µm	685975-908
AdvanceBio HIC, 4.6 × 100 mm, 3.5 µm, 方法验证工具包	685975-908K
AdvanceBio HIC, 4.6 × 30 mm, 450 Å, 3.5 µm	681975-908
AdvanceBio HIC, 4.6 × 30 mm, 3.5 µm, 方法验证工具包	681975-908K

AdvanceBio 脱盐反相柱

描述	货号
AdvanceBio 脱盐反相柱, 2.1 × 12.5 mm, 2/包	PL1612-1102
柱芯支架	820999-901

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, 这些颗粒可能造成堵塞, 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, 尽可能减少工作流程的中断。

有关快速保护柱的示例, 请单击[此处](#)和[此处](#)。

肽谱分析

准确测定氨基酸序列、翻译后修饰和合成杂质

为了全面表征蛋白质（例如单克隆抗体），有必要了解一级氨基酸序列以及在生产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 (PTMs)。反相分离通常是首选技术，因为其能够基于疏水性分离多肽内的单个氨基酸修饰，并且与用于质量数确认的 MS 检测兼容。

安捷伦提供多种肽谱分析色谱柱产品，可满足每位用户的分离需求，无论是全面的肽谱分析、脱酰胺 PTMs 的详细研究、UV 或 MS 检测，还是高或低 pH 流动相条件，均可找到合适的产品。



反相色谱柱选择		
应用	安捷伦色谱柱	说明
蛋白质酶解物中的多肽	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。经过复杂的多肽混标测试，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 宿主细胞蛋白质分析	AdvanceBio Peptide Plus	表面带电荷的 C18 化学键合相与 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱具有不同的选择性。这款色谱柱在脱酰胺形体肽段的分离中以及甲酸流动相和高载样量条件下表现优异。
合成肽纯化或杂质分析	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。

技巧和工具

对于多肽的 HILIC 分离，请考虑 ZORBAX RRHD 300 Å HILIC。如需了解更多信息，请参见第 59 页。

如需了解有关 PLRP-S 的更多信息，请参见第 55 页“完整蛋白分析”一节的 PLRP-S 部分。

关于货号 and 订购信息，请参见第 71 页的表格。

AdvanceBio 肽谱分析色谱柱

- **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：**分析速度是全多孔 HPLC 色谱柱的 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，尽可能发挥 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



5 肽谱分析

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

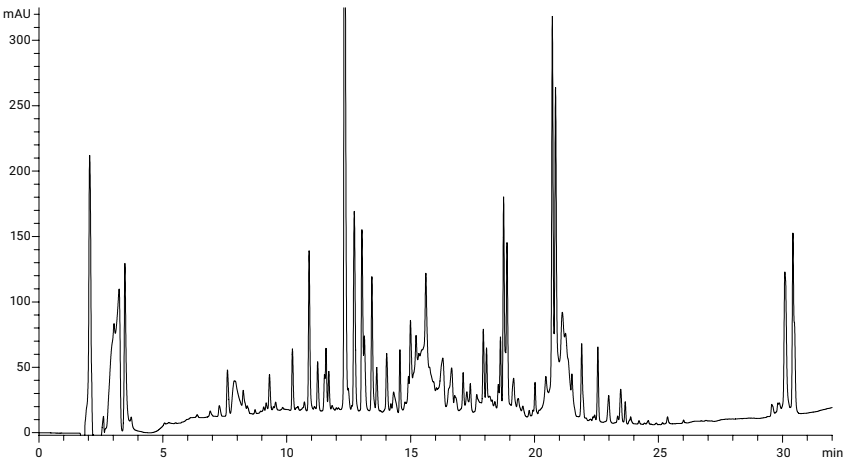
流动相: A: H₂O + 0.1% 甲酸 (v/v)
B: 乙腈 + 0.1% 甲酸 (v/v)

流速: 0.4 mL/min

梯度: 时间 (min) % B
0 3
28 45
33 60
34 95

温度: 55 °C

样品: 5 μL (2 μg/μL)



IgG 的快速高效肽谱分析

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: H₂O + 0.1% FA (v/v)
B: 90% ACN + 0.1% FA (v/v)

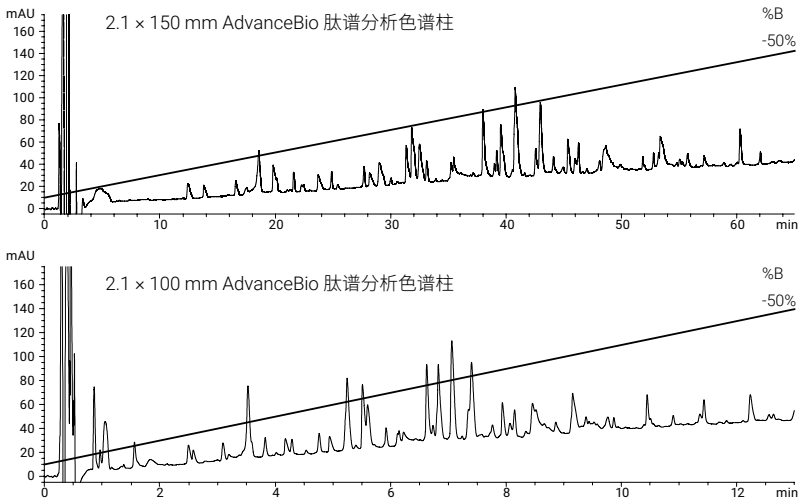
流速: 不定

进样量: 15 μL

温度: 40 °C

检测器: UV, 215/220 nm

样品: 1290 Infinity 液相色谱和 6530 精确质量四级杆
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)。

使用安捷伦多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

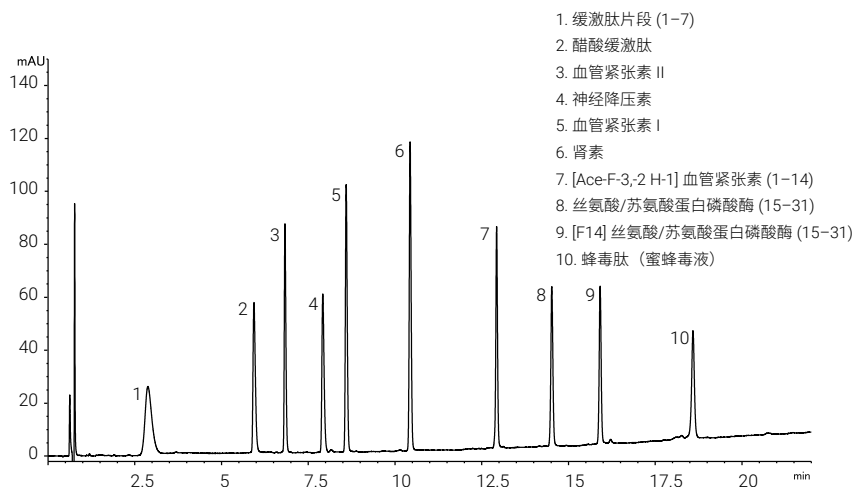
流速: 3 μL

梯度: A: H₂O (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%

温度: 55 °C

检测器: 220 nm

样品: 肽谱分析混标 (每种肽 0.5–1.0 μg/μL),
货号 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

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

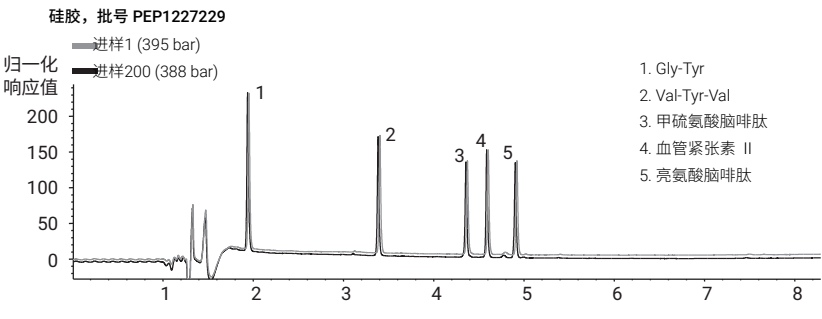
进样量： 1 μL

梯度： A: H₂O (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 95%

温度： 55 °C

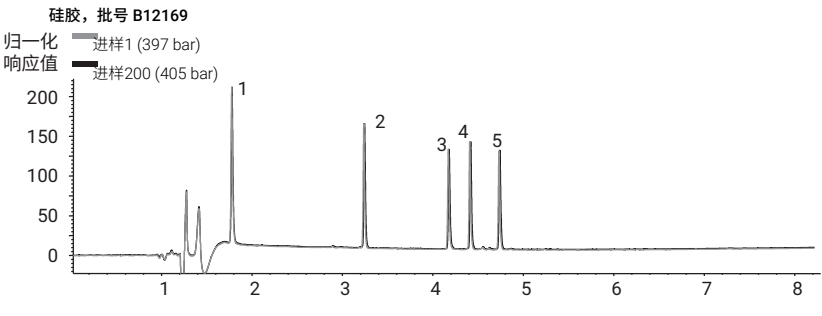
检测器： 220 nm

样品： Sigma HPLC 肽标准品



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



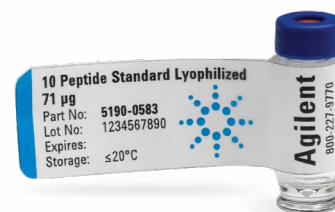
进样	RT2 (min)	RT3 (min)	RT4 (min)	RT5 (min)
1	3.36	4.29	4.52	4.85
200	3.24	4.18	4.41	4.74

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更高的分离度。

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）在色谱柱的整个寿命期间评估其性能。此标准品可用于 HPLC 或 LC/MS。每瓶可进行约 20 次进样。



AdvanceBio Peptide Plus

AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱为反相、表面多孔颗粒填料 HPLC 色谱柱，经过优化适用于分离目标肽和杂质，以及进行翻译后修饰分析。这类色谱柱采用基于 100 Å 孔径、2.7 µm 填料颗粒的混合封端 C18 固定相，经改性后表面带电。与传统的 C18 色谱柱相比，**表面带电荷的 C18 色谱柱显著提高了脱酰胺肽与其未修饰异构体的分离度**，增强了对肽脱酰胺异构体相对于其未修饰形式的选择性。

脱酰胺涉及将天冬酰胺转化为天冬氨酸或异天冬氨酸。脱酰胺肽通常具有 1 道尔顿的质量偏移，因此通常使用 LC/MS 技术来检测这种质量数的微小变化。脱酰胺肽有时会与其未修饰形式共洗脱，因为在低 pH 下天冬酰胺转化为相应的羧酸不会导致疏水性发生较大变化。这可能会影响脱酰胺基化的定量，在某些情况下，甚至可能导致无法检测脱酰胺基化异构体。请记住，质谱本身无法分离脱酰胺肽，因此色谱分离至关重要。

为了实现可靠、分离度良好的肽谱分离，其中最重要的因素是选择合适的色谱柱。对于多肽分离，首选孔径为 100 Å 至 120 Å 的色谱柱，理想的固定相通常为 C18。表面多孔填料色谱柱越来越多地用于生物分离（尤其是在生物制药行业），因为它们解决了蛋白质和多肽质量扩散的限制。这些色谱柱的扩散路径更短，可在较高的线性速度下分离较大的分子，不会由于粒径的减少而出现系统反压增加的问题。反相多肽分离常在低 pH (pH < 3)、高温 (> 40 °C) 下进行。

PTMs 或杂质

脱酰胺异构体的分离 — 表面带正电荷的 C18 可增强对脱酰胺异构体的选择性

数据准确度

峰形和 MS 灵敏度 — 带电荷的表面使得使用甲酸时可获得出色的峰形

在高载样量下表现优异

鉴定低丰度肽 — 表面带电荷的 C18 固定相对高载样量耐受性更好

数据质量

严格的 QC 流程，可满足高要求的科学家的需求

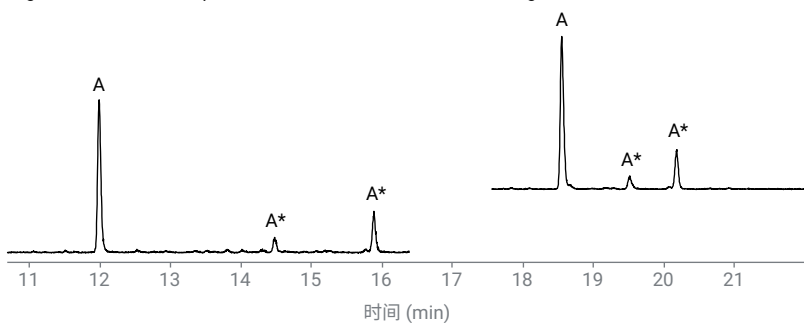
对脱酰胺异构体具有更高的选择性

参数	Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统	
色谱柱	Agilent AdvanceBio Peptide Plus, 2.1 × 150 mm (货号 695775-949) Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm (货号 653750-902)	
柱温	60 °C	
流动相	A) 0.1% 甲酸水溶液 B) 0.1% 甲酸乙腈溶液	
流速	0.4 mL/min	
梯度	时间 (min)	% B
	0	3
	2	3
	40	40
	50.5	100
	53	3
后运行时间	7 分钟	

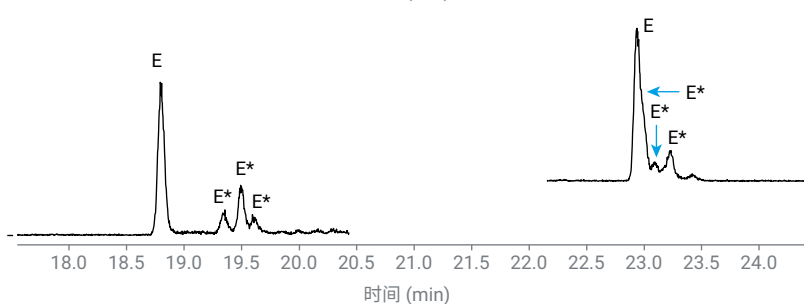
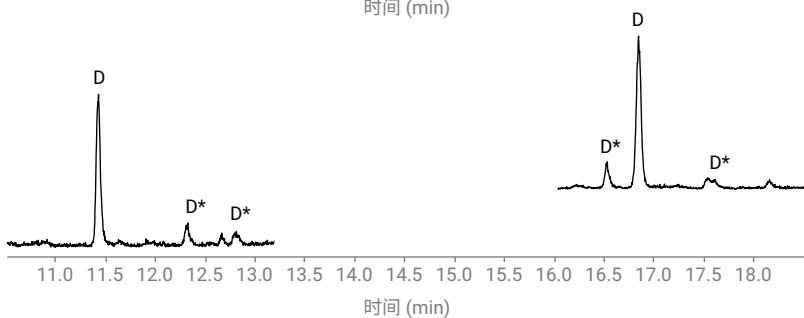
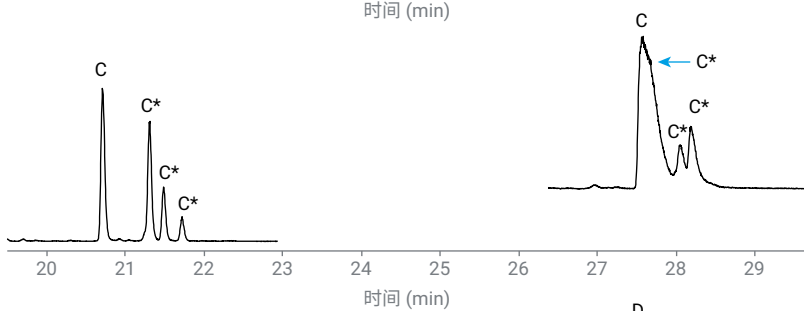
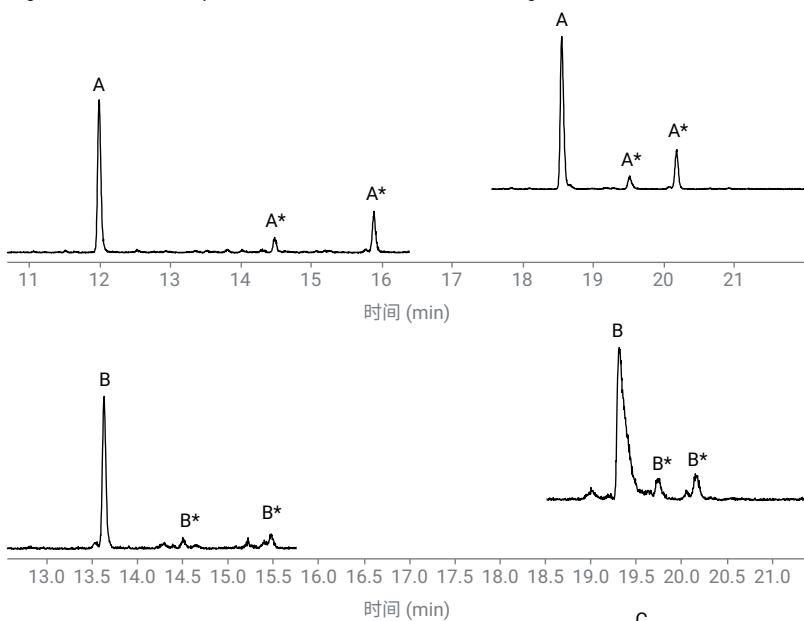
参数	Agilent 6546 Q-TOF
离子源	安捷伦喷射流
气体温度	323 °C
干燥气流速	13 L/min
雾化器气体	35 psi
鞘气温度	275 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	4000 V
喷嘴电压	0 V
碎裂电压	125 V
锥孔电压	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
质量数范围	m/z 300–1700
MS 扫描速率 (质谱图/秒)	5
采集模式	正离子模式, 扩展动态范围 (2 GHz) 棒状数据格式

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

Agilent AdvanceBio Peptide Plus



Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱



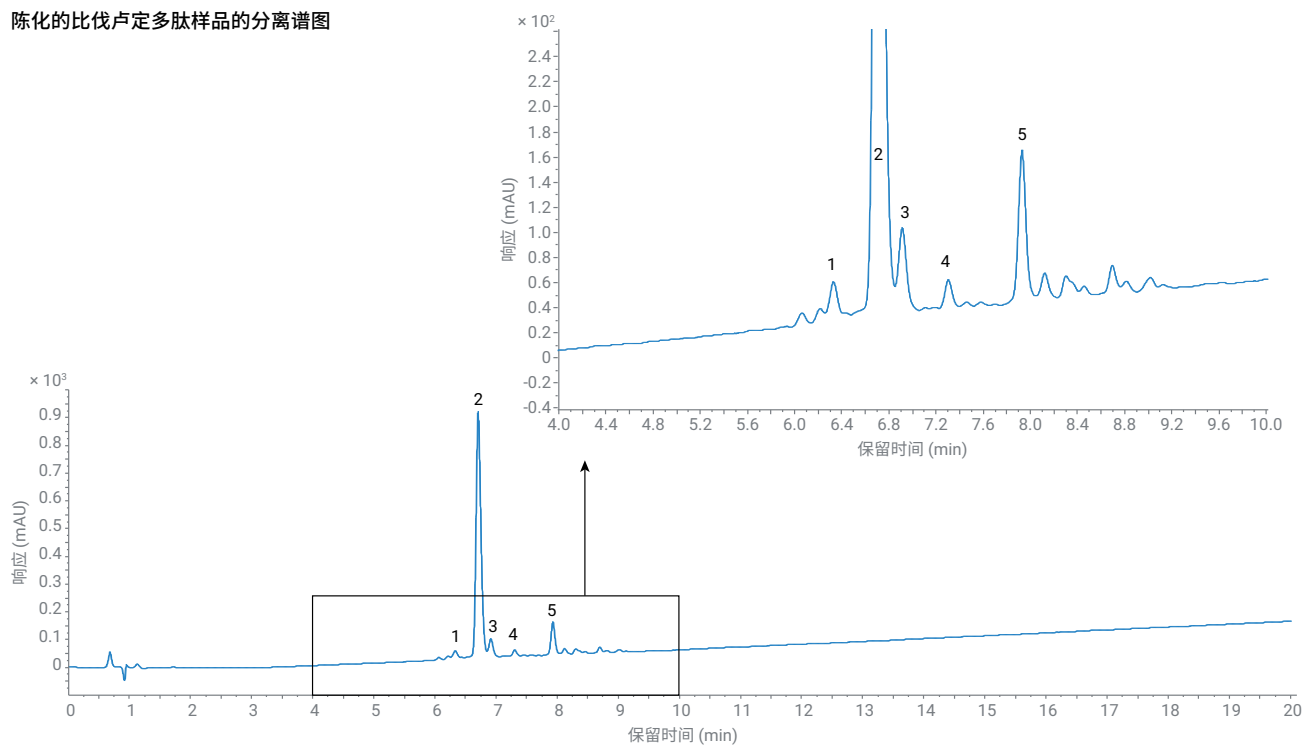
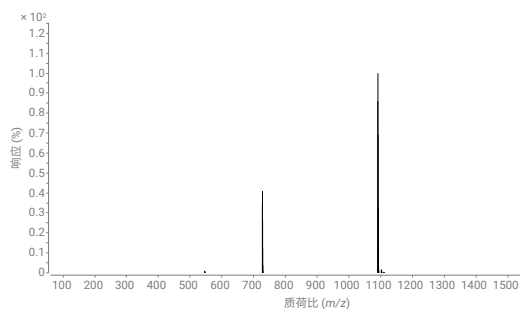
在相同的条件下，使用 0.1% 甲酸流动相改性剂，在 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱（升高，较晚洗脱）和 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱（较早洗脱）上分离肽段及其脱酰胺基化异构体（用 * 表示）

HPLC 条件

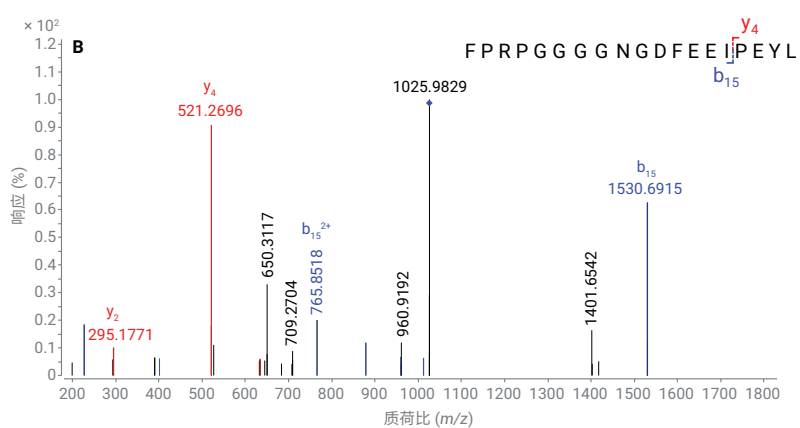
色谱柱	Agilent AdvanceBio Peptide Plus, 2.1 × 150 mm (货号 695775-949)
流动相	A) 0.1 % 甲酸水溶液 B) 0.1 % 甲酸乙腈溶液
梯度	0 min: 17% B 2 min: 17% B 22 min: 37% B 24 min: 95% B 26 min: 95% B 26.1 min: 17% B
后运行时间	5 min
流速	0.4 mL/min
柱温	60 °C
进样量	5 µL (UV); 1 µL (MS)

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

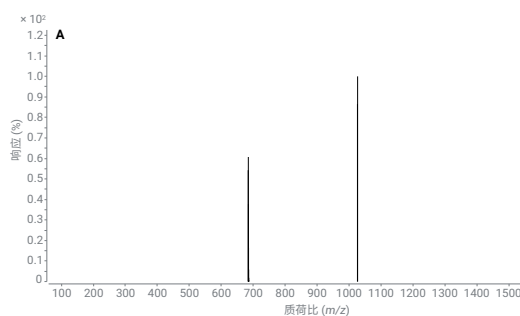
陈化的比伐卢定多肽样品的分离谱图

主成分（峰 2）的 MS 谱图，
FPRPGGGNGDFEEIPEEYL

杂质（峰 1）的 MS/MS 谱图，揭示了缺失谷氨酸残基的位置

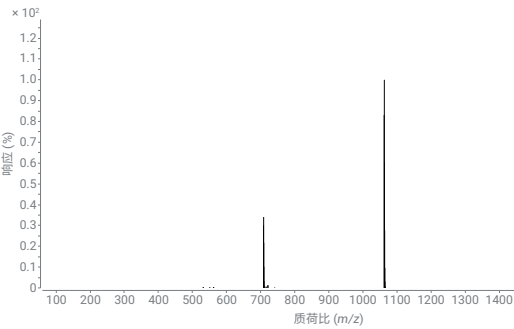


杂质（峰 1）的 MS 谱图

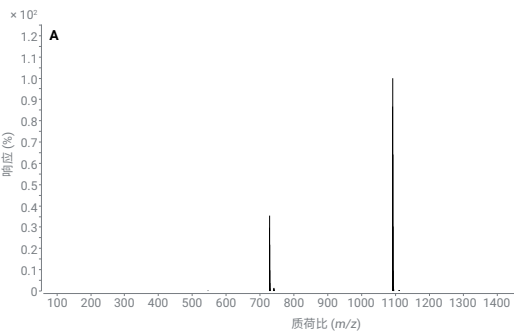


5 肽谱分析

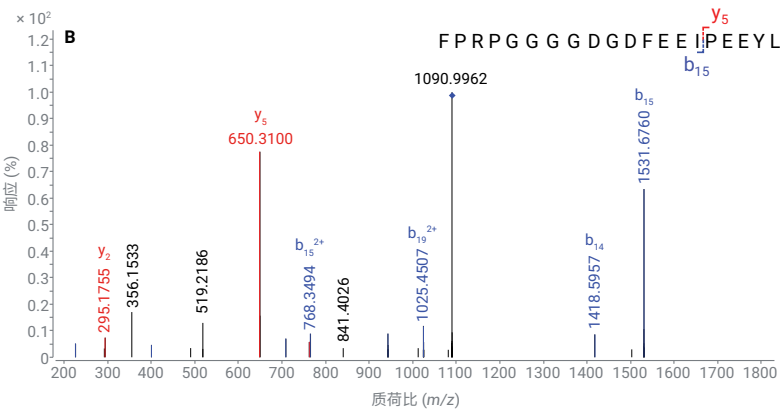
主成分（峰 2）的 MS 谱图，
FPRPGGGNGDFEEIPEEYL



杂质（峰 5）的 MS 谱图



杂质（峰1）的 MS/MS 谱图，揭示了 Asn 脱酰胺的位置



峰	质量 (Da)	峰归属	目标质量 (Da)	质量偏差 (ppm)
1	2049.95	Glu 缺失	2049.94	1.71
2	2178.99	产物	2178.99	1.65
5	2179.97	脱酰胺基化	2179.97	2.02

峰 5 指示脱酰胺作用 — 位置 9 处的 Asn 已转化为 Asp

技巧和工具

肽谱分析技术功能强大，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（出版物 5991-2348CHCN）。

产品订购信息

AdvanceBio 肽谱分析色谱柱

描述	货号
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
1 × 150 mm, 2.7 µm	863600-911
0.075 × 150 mm, 2.7 µm	5065-9925
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
0.3 × 50 mm, 快速保护柱*	5065-9946

*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

描述	货号
肽质量控制标准品, 71 µg, 装在 2 mL 样品瓶中	5190-0583

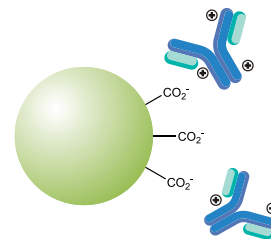
AdvanceBio Peptide Plus

描述	货号
AdvanceBio Peptide Plus, 2.1 × 150 mm, 2.7 µm	695775-949
AdvanceBio Peptide Plus, 2.1 × 250 mm, 2.7 µm	693775-949
AdvanceBio Peptide Plus, 2.1 × 50 mm, 2.7 µm	699775-949
AdvanceBio Peptide Plus, 3.0 × 150 mm, 2.7 µm	693975-349
AdvanceBio Peptide Plus, 4.6 × 150 mm, 2.7 µm	693975-949
AdvanceBio Peptide Plus, 2.1 × 150 mm, 2.7 µm, 方法验证工具包	695775-949K
UHPLC 保护柱, AdvanceBio Peptide Plus, 2.1 mm, 2.7 µm, 3/包	821725-954
UHPLC 保护柱, AdvanceBio Peptide Plus, 3.0 mm, 2.7 µm, 3/包	823750-952
UHPLC 保护柱, AdvanceBio Peptide Plus, 4.6 mm, 2.7 µm, 3/包	820750-940

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，可以根据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。

在蛋白质分析中，在给定 pH 下蛋白质发生电荷变化，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。这些被称为异构体（或电荷异构体）。

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。

作为生物制药业的前沿供应商，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 色谱柱针对单克隆抗体电荷异构体的分离进行了优化
- 多孔 IEX 色谱柱 (PL-SAX 和 PL-SCX) 化学性质稳定，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**

离子交换色谱柱选择

应用	安捷伦色谱柱	说明
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。
多肽和蛋白质	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、多肽和脱保护合成寡核苷酸	PL-SAX • 1000 Å • 4000 Å	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。
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 1000 Å	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，具有理想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。
抗体 (IgG, IgM)、质粒 DNA、病毒、噬菌体和其他生物大分子	Bio-Monolith • Bio-Monolith QA • Bio-Monolith DEAE • Bio-Monolith SO ₃	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 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) 非多孔微球组成
- 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 μm 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	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 μm	2–12	80 °C	0.1–1.0 mL/min
	10 mm	5 μm	2–12	80 °C	2.3–4.7 mL/min
	21.2 mm	5 μm	2–12	80 °C	10.6–21.2 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）



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

B: A + 氯化钠 0.5 mol/L

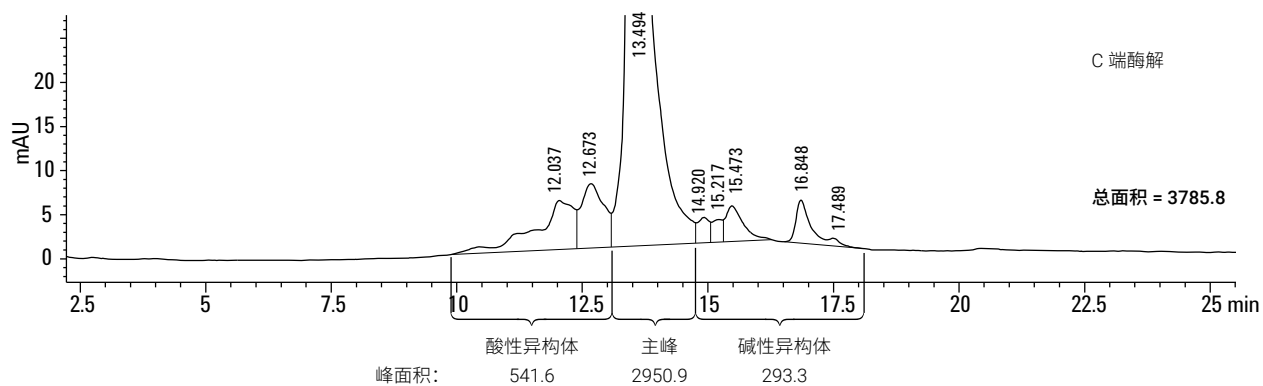
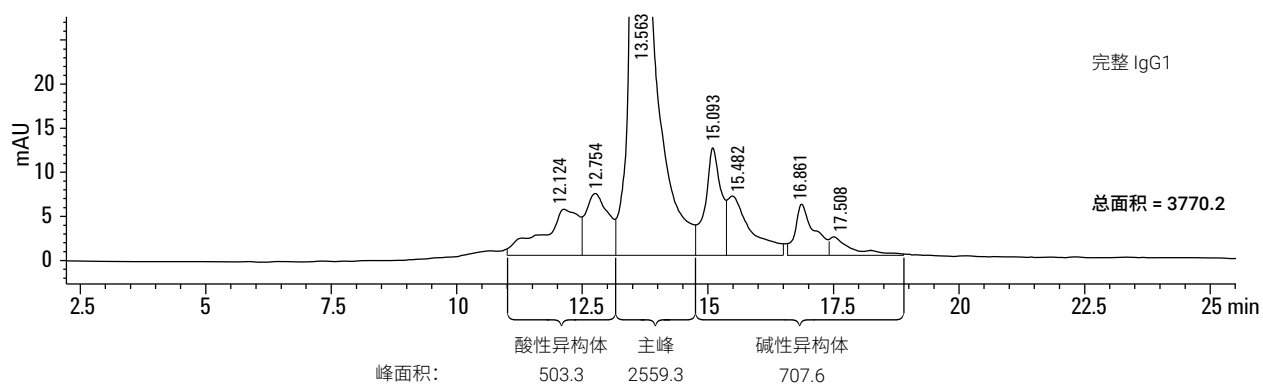
流速: 0.85 mL/min

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

检测器: UV, 225 nm

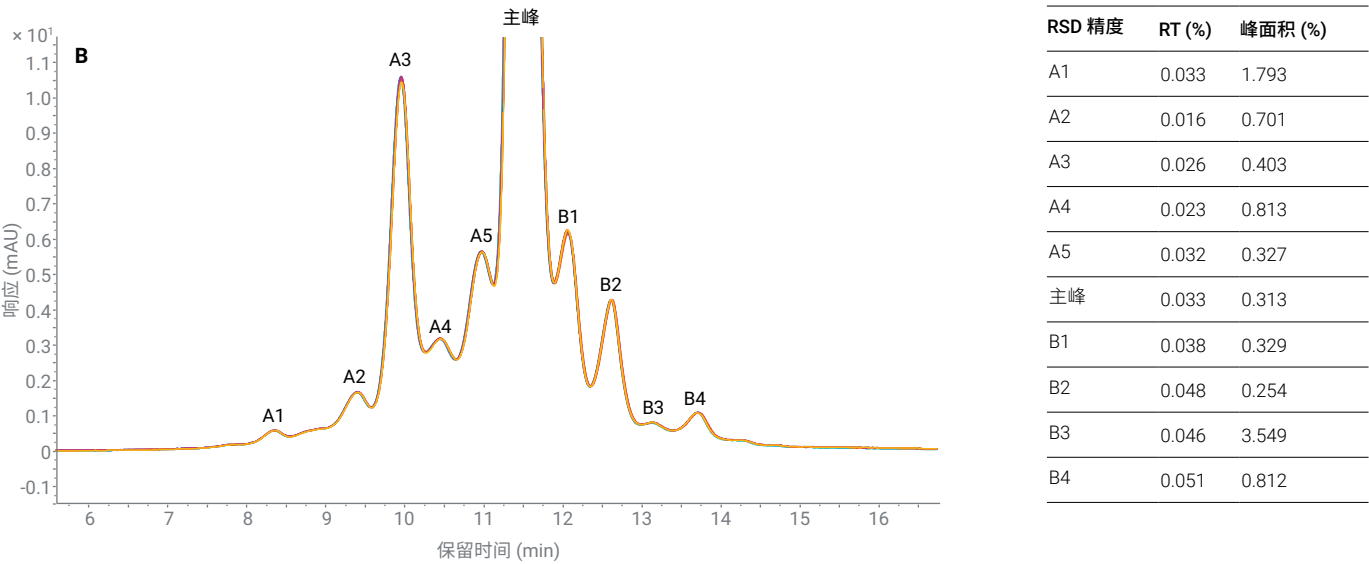
样品: 5 μg 1 mg/mL 完整或 C 端酶解的 IgG1

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



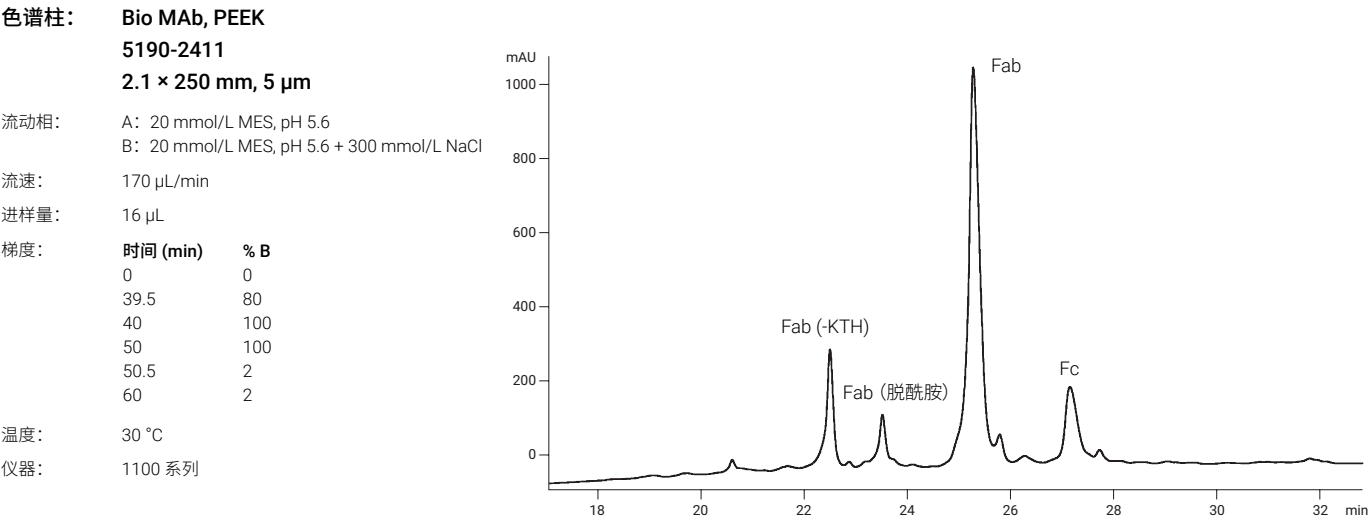
在 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统上使用 Bio MAb 5 μm 色谱柱分析 C 端酶解的 IgG1 的计算数据。

曲妥珠单抗电荷异构体分离的重现性



曲妥珠单抗电荷异构体分离 7 次连续运行的重现性研究，梯度斜率为 0.66% B/min (3.3 mmol/L/min)。

曲妥珠单抗的 Fab 和 Fc 片段的 WCX 分离



使用缓冲液顾问软件进行方法开发 — 确定最佳 pH

色谱柱: Bio MAb, 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: H₂O

B: NaCl 3 mol/L

C: MES (2-(N-吗啉)乙磺酸—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

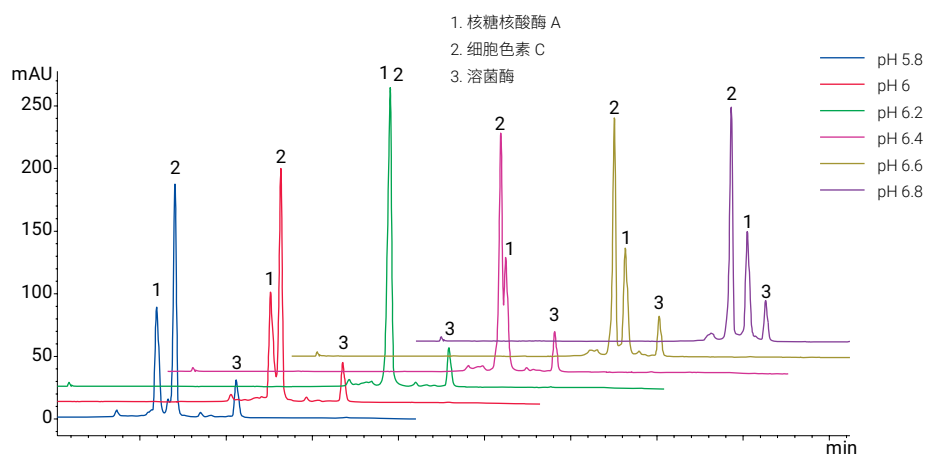
恒温箱: 4 °C

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)



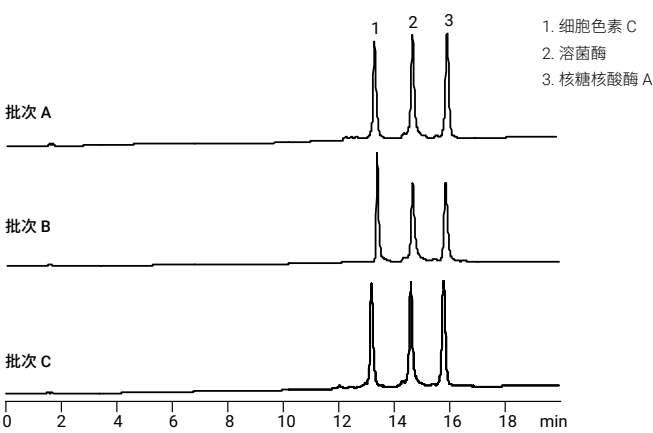
利用动态混合四元梯度进行三种蛋白质混合物分离的 pH 筛选

保留时间几乎不发生变化

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

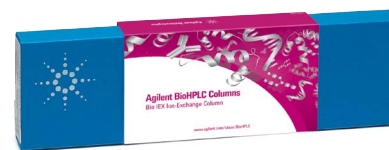
流动相: A: 10 mmol/L 磷酸钠, pH 6.0
B: A + 1.0 mol/L 氯化钠
流速: 1.0 mL/min
梯度: 在 42 min 内 B 由 0 升至 100%
温度: 25 °C
检测器: UV, 214 nm

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。



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 μm 非多孔填料规格可供选择。

色谱柱性能指标

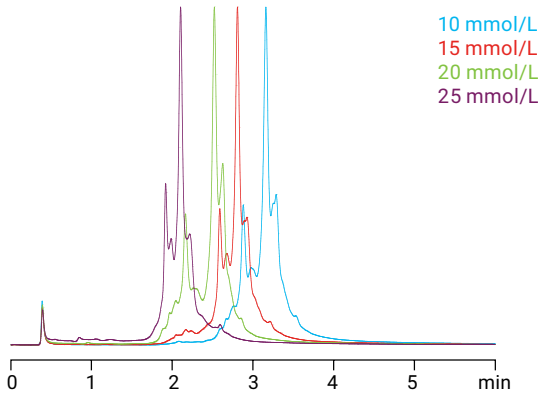
键合相	内径	粒径	pH 稳定性	操作温度上限	流速
SCX (强阳离子交换) $-\text{SO}_3\text{H}$					
WCX (弱阳离子交换) $-\text{COOH}$	2.1 和 4.6 mm	1.7、3、5 和 10 μm	2–12	80 °C	0.1–1.0 mL/min
	10 mm	5 μm	2–12	80 °C	2.3–4.7 mL/min
SAX (强阴离子交换) $-\text{N}(\text{CH}_3)_3$	21.2 mm	5 μm	2–12	80 °C	10.6–21.2 mL/min
WAX (弱阴离子交换) $-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$					

技巧和工具

有关优化电荷异构体分析的更多信息，请参阅《安捷伦生物色谱柱应用文集 — 电荷异构体分析》，包括文集第 5 页的操作指南（出版物 5994-0034ZHCN）。

缩短和简化电荷异构体分析工作流程

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	进样量:	10 μL
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。	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
流速:	1.0 mL/min	温度:	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



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

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

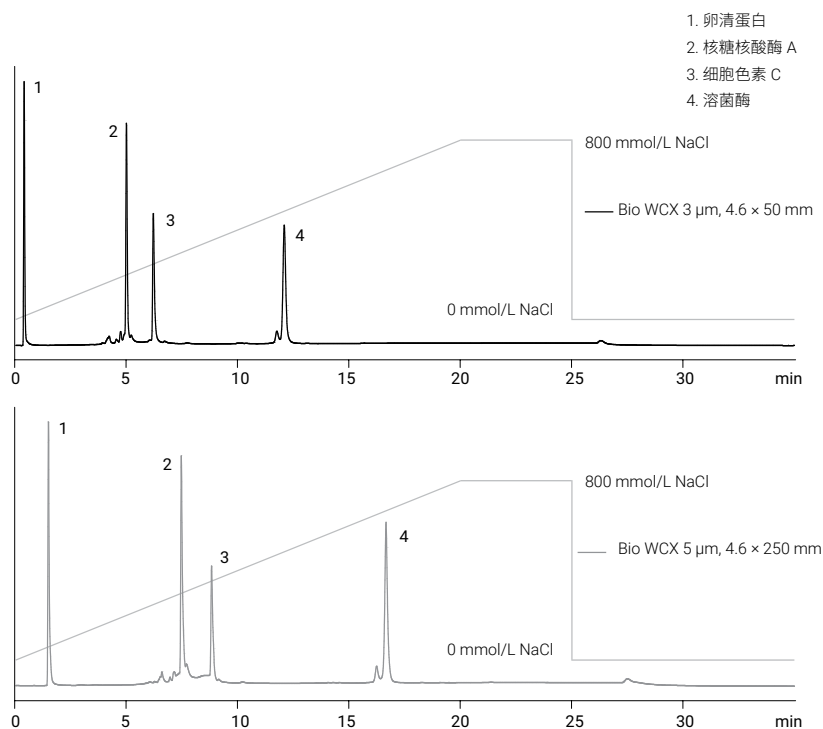
梯度: 0%–50% B

温度: 室温

检测器: UV, 220 nm

样品浓度: 0.5 g/mL

仪器: 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统



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。

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 (使用安捷伦弱阳离子交换柱进行更快速分离) (出版物 5990-9931EN)

pH 梯度洗脱用于改善单克隆抗体异构体的分离 (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)

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

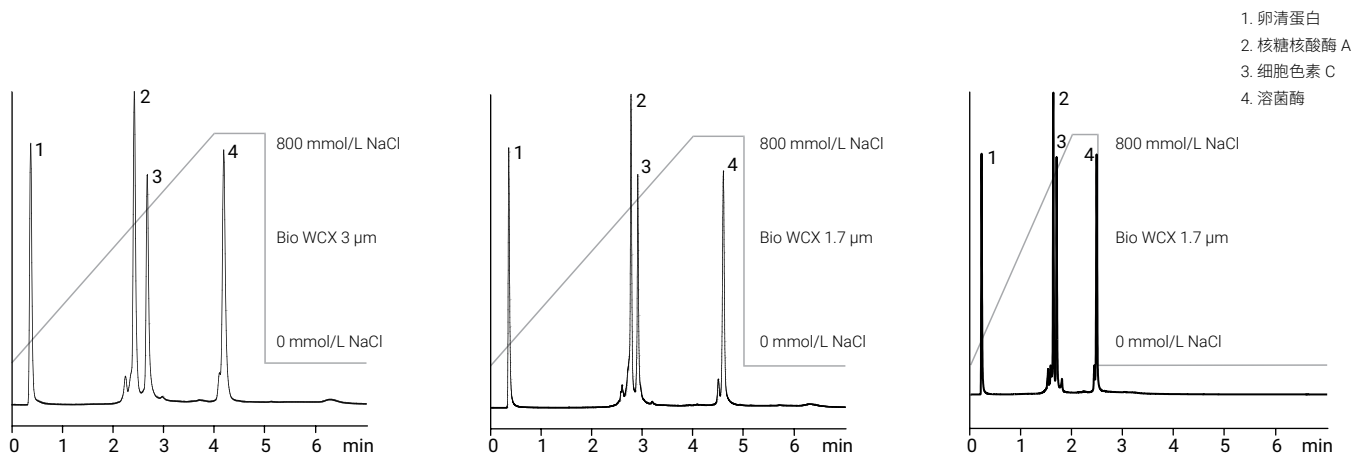
梯度: 0%–50% B

温度: 室温

检测器: UV, 220 nm

样品浓度: 0.5 g/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)。

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

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 CH₃COONa,
 1 mol/L [(CH₃)₄N]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

温度: 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

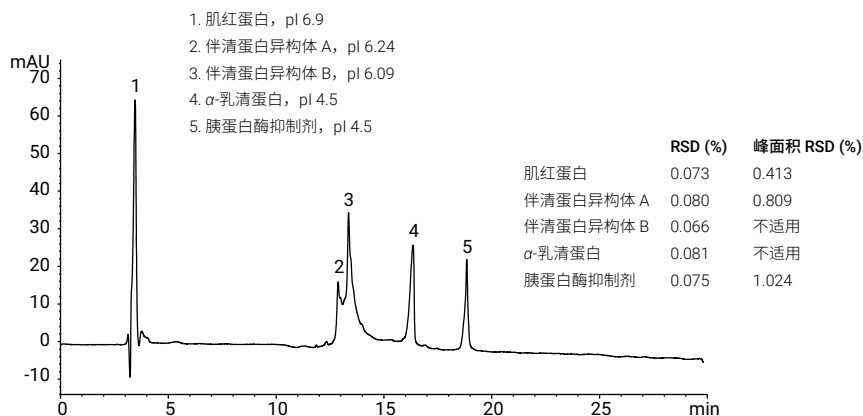


图 1. 线性梯度下蛋白质的 AEX 分离色谱图, 采用 2 mol/L NaCl 作为洗脱盐

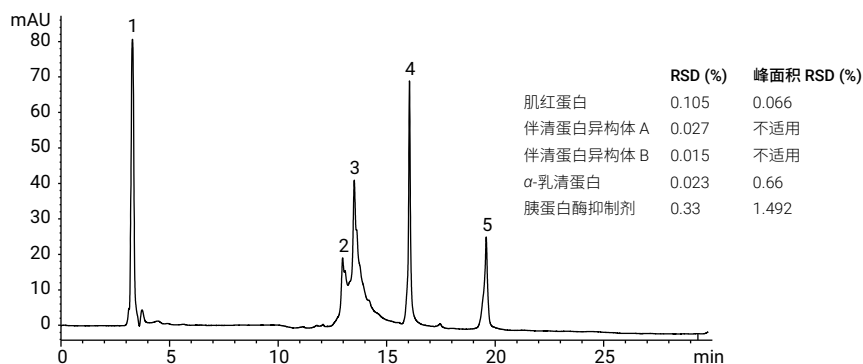
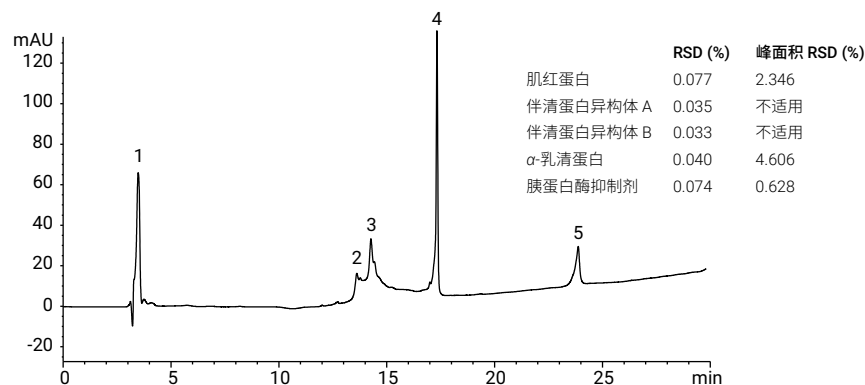


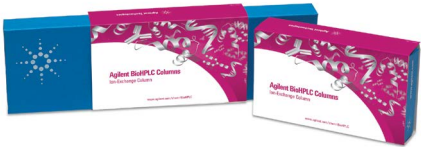
图 2. 线性梯度下蛋白质的 AEX 分离色谱图, 采用 1 mol/L KCl 作为洗脱盐

图 3. 线性梯度下蛋白质的 AEX 分离色谱图, 采用 1 mol/L [(CH₃)₄N]Cl 作为洗脱盐

PL-SAX 强阴离子交换色谱柱

- 小粒径填料提供出色的色谱性能
- 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(CH₃)₃⁺ 是使用阴离子交换 HPLC 分离技术在变性条件下对蛋白质、肽和脱保护的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 (mm)	粒径 (μm)	孔径 (Å)	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

技巧和工具

如需了解有关寡核苷酸分离的更多信息，请参阅本目录的第 12 章。
如需了解有关制备级 PL-SAX 的更多详细信息，请参见5994-4723EN。

标准离子交换蛋白质分离

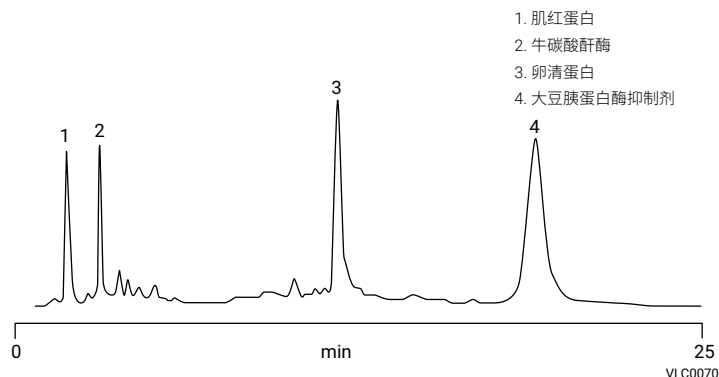
色谱柱: PL-SAX 1000 Å
PL1551-1502
4.6 × 50 mm, 5 μm

流动相: A: 10 mmol/L Tris HCl, pH 8
B: A + 350 mmol/L 氯化钠, pH 8

梯度: 在 20 min 内 B 由 0 升至 100%

流速: 1.0 mL/min

检测器: UV, 220 nm



卵清蛋白和大豆胰蛋白酶抑制剂的分离

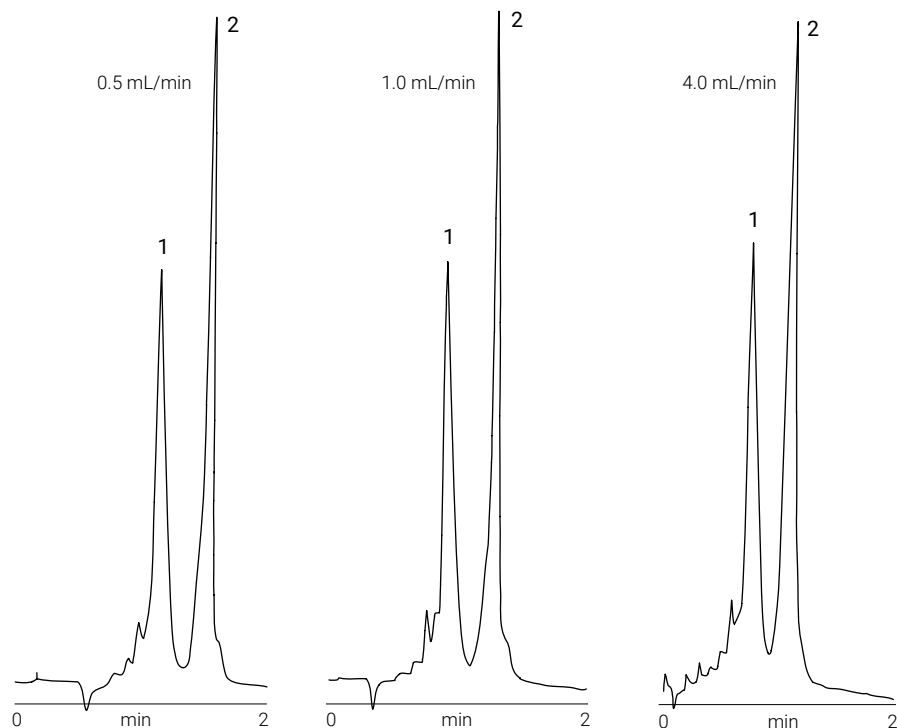
色谱柱: PL-SAX 1000 Å 8 μm

缓冲液: 0.01 mol/L Tris, pH 8, 洗脱盐 NaCl

流速: 1.0 mL/min

1. 卵清蛋白
2. 大豆胰蛋白酶抑制剂

流速 (mL/min)	R _s
0.5	3.79
1.0	4.27
1.5	4.46
2.0	3.68
3.0	3.37
4.0	3.09



6 电荷异构体分析

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

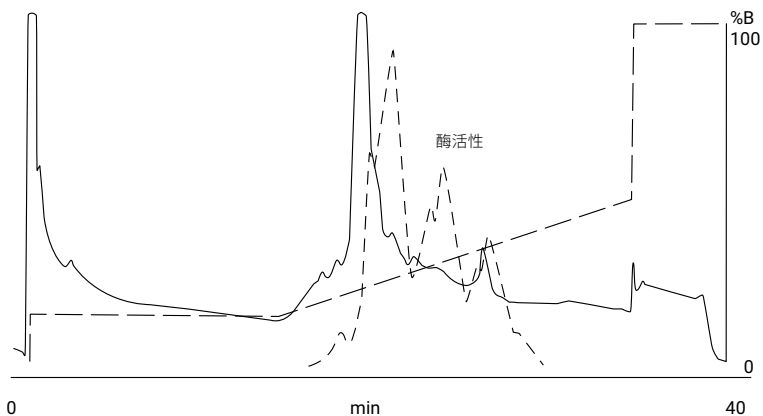
2.0 mmol/L β-巯基乙醇

0.2 mmol/L 苄磺酰氟

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

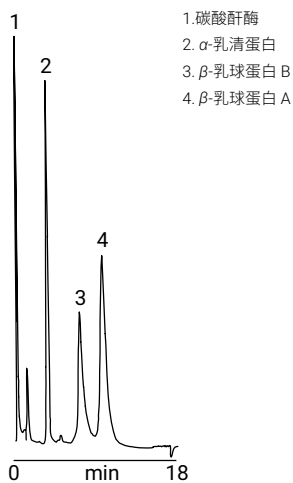
4.6 × 50 mm, 8 μm

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

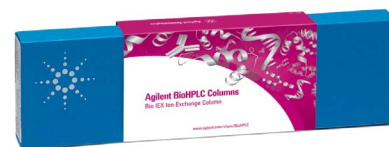
梯度: 10 min 内 B 由 0% 线性升至 50%

检测器: UV, 280 nm



PL-SCX 强阳离子交换色谱柱

- 理想的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-SO₃ 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，具有优化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。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)	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	1–14	80 °C

标准蛋白质分离

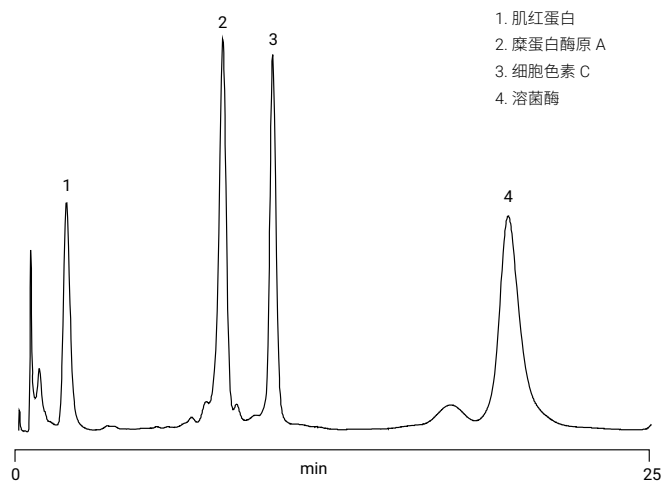
色谱柱: PL-SCX 1000 Å
PL1545-1502
4.6 × 50 mm, 5 μm

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: 在 20 min 内 B 由 0 升至 100%

流速: 1.0 mL/min

检测器: UV, 280 nm



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。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	描述	主要应用
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。	- 腺病毒工艺监控和质量控制 - IgM 纯化监测和质量控制 - 监测 DNA 杂质去除 - 监测内毒素去除 - HSA 纯度
Bio-Monolith DEAE	二乙氨基键合相（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。	- 细菌噬菌体生产和纯化的监测和质量控制 - 质粒 DNA 纯化的监测和质量控制
Bio-Monolith SO ₃	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。	- 大分子（如蛋白质和抗体）的快速、高分离度分析分离 - 血红素 A1c 的快速分析

色谱柱性能指标

规格	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 储存温度：2–8 °C
推荐 pH	运行范围：2–13 原位清洗：1–14
结构材料	卡套：不锈钢 填充：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 ₃ ：红色
保质期/有效期	SO ₃ , QA, DEAE：24–36 个月

5 型腺病毒颗粒的分析

色谱柱: Agilent Bio-Monolith QA 柱,
5.2 mm 内径 × 4.95 mm
(货号 5069-3635)

流动相: A/B: 参见图例

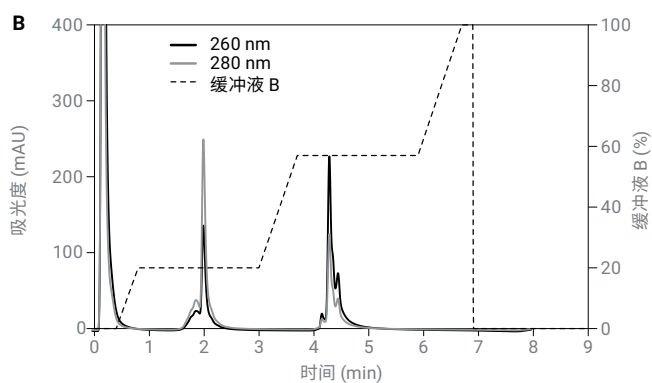
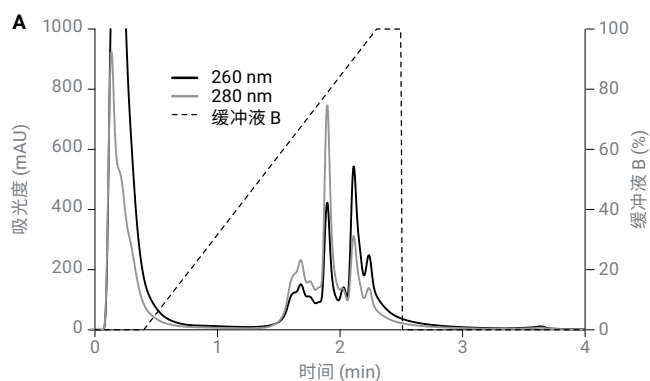
流速: 1 mL/min

梯度: 参见图例

检测器: UV, 260 和 280 nm

仪器: 配备二极管阵列检测器 (DAD) 的 Agilent 1100 系列
HPLC 系统

使用 Agilent Bio-Monolith QA 柱分析 Ad5 细胞裂解物。黑色实线为 260 nm 处的吸光度, 灰线为 280 nm 处的吸光度。条件: (A) 缓冲液 A: 20 mmol/L Tris, pH 7.5; 缓冲液 B: 20 mmol/L Tris, 1.5 mol/L NaCl (pH 7.5)。采用 19 倍色谱柱体积 (CV), 缓冲液 B 通过线性梯度从 0% 升至 100%, 然后在 100% B 下保持两个 CV。 (B) 缓冲液 A: 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 + 0.1 mol/L NaCl, pH 7.5; 缓冲液 B: 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 + 2 mol/L NaCl, pH 7.5。阶梯梯度: 在 20% 缓冲液 B 下保持 22 个 CV, 在 57% 缓冲液 B 下保持 22 个 CV。流速: 1 mL/min。样品: Ad5 细胞裂解物。进样量: 25 μ L。



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

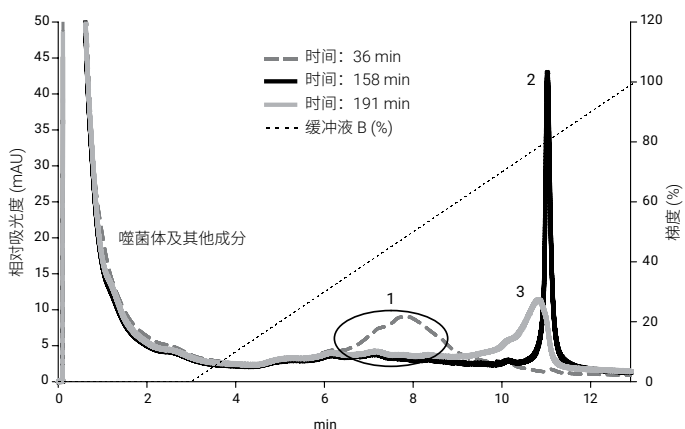
流动相: A: 125 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.0
B: 125 mmol/L 磷酸钠缓冲液 + 1 mol/L 氯化钠,
pH 7.0

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 开始降解为片段。这些 gDNA 片段不易被纯化介质去除, 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 片段

产品订购信息

Bio MAb HPLC 色谱柱

规格 (mm)	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, PEEK

规格 (mm)	粒径 (µm)	压力限值	Bio SCX 货号	Bio WCX 货号	Bio SAX 货号	Bio WAX 货号
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

Bio IEX HPLC 色谱柱，不锈钢

规格 (mm)	粒径 (μm)	压力限值	Bio SCX 货号	Bio WCX 货号	Bio SAX 货号	Bio WAX 货号
21.2 × 250	5	413 bar, 6000 psi	5190-6879	5190-6881	5190-6883	5190-6877
10 × 250	5	413 bar, 6000 psi	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	551 bar, 8000 psi				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

Bio-Monolith HPLC 色谱柱选择指南

色谱柱	货号
Bio-Monolith QA	5069-3635
Bio-Monolith DEAE	5069-3636
Bio-Monolith SO ₃	5069-3637



PL-SAX 强阴离子交换色谱柱

规格 (mm)	粒径 (μm)	压力限值	PL-SAX 1000 Å	PL-SAX 4000 Å
100 × 300	30	207 bar, 3000 psi	PL1851-3102	PL1851-3103
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
7.5 × 150	8	207 bar, 3000 psi	PL1151-3802	PL1151-3803
7.5 × 150	8	207 bar, 3000 psi	PL1151-1802	PL1151-1803
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

技巧和工具

访问安捷伦在线商城，直接购买安捷伦色谱柱和消耗品：www.agilent.com/chem/store

PL-SAX 强阴离子交换柱散装填料

含量	粒径 (μm)	压力限值	PL-SAX 1000 Å	PL-SAX 4000 Å
10 g	30	207 bar, 3000 psi	PL1451-2702	PL1451-2703
10 g	10	207 bar, 3000 psi	PL1451-2102	PL1451-2103
100 g	30	207 bar, 3000 psi	PL1451-4702	PL1451-4703
100 g	10	207 bar, 3000 psi	PL1451-4102	PL1451-4103
1 kg	30	207 bar, 3000 psi	PL1451-6702	PL1451-6703
1 kg	10	207 bar, 3000 psi	PL1451-6102	PL1451-6102

PL-SCX 强阳离子交换色谱柱

规格 (mm)	粒径 (μm)	压力限值	PL-SCX 1000 Å
100 × 300	30	207 bar, 3000 psi	PL1845-3102
100 × 300	10	207 bar, 3000 psi	PL1845-2102
50 × 150	30	207 bar, 3000 psi	PL1745-3703
50 × 150	10	207 bar, 3000 psi	PL1745-3102
25 × 150	30	207 bar, 3000 psi	PL1245-3702
25 × 150	10	207 bar, 3000 psi	PL1245-3102
25 × 50	10	207 bar, 3000 psi	PL1245-1102
7.5 × 50	8	207 bar, 3000 psi	PL1145-1802
4.6 × 250	30	207 bar, 3000 psi	PL1545-5703
4.6 × 150	30	207 bar, 3000 psi	PL1545-3702
4.6 × 250	10	207 bar, 3000 psi	PL1545-5102
4.6 × 150	10	207 bar, 3000 psi	PL1545-3102
4.6 × 150	8	207 bar, 3000 psi	PL1545-3802
4.6 × 50	8	207 bar, 3000 psi	PL1545-1802
4.6 × 50	5	207 bar, 3000 psi	PL1545-1502
2.1 × 150	8	207 bar, 3000 psi	PL1945-3802
2.1 × 50	8	207 bar, 3000 psi	PL1945-1802
2.1 × 50	5	207 bar, 3000 psi	PL1945-1502

PL-SCX 强阳离子交换散装填料

含量	粒径 (µm)	压力限值	PL-SCX 1000 Å
100 g	30	207 bar, 3000 psi	PL1455-4702
100 g	10	207 bar, 3000 psi	PL1455-4102
1 kg	30	207 bar, 3000 psi	PL1455-6702
1 kg	10	207 bar, 3000 psi	PL1455-6102

技巧和工具

安捷伦工作流程订购指南为您提供了针对特定应用的窍门与技巧、起始条件以及色谱柱和附件的货号。

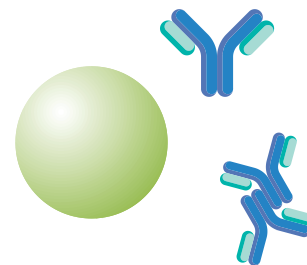
当前的离子交换工作流程订购指南包括有关使用 PL-SAX 色谱柱进行寡核苷酸纯化和使用 Bio MAb 色谱柱进行 mAbs 电荷异构体分析的出版物 **5994-4636ZHCN** 和出版物 **5994-6053ZHCN**。

聚集体及片段分析

准确测定生物分子聚集和碎裂

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。它是定量分析蛋白质生物治疗药物中存在的聚集体的重要工具。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。

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一个问题。聚集体可通过二硫键共价形成，或通过非共价作用形成。二聚体及更高程度的聚集体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产品聚集程度非常低且控制在安全水平。



哪一种体积排阻色谱柱适合您的应用？

安捷伦作为有 30 多年 SEC 色谱柱和仪器生产经验的先锋企业，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：

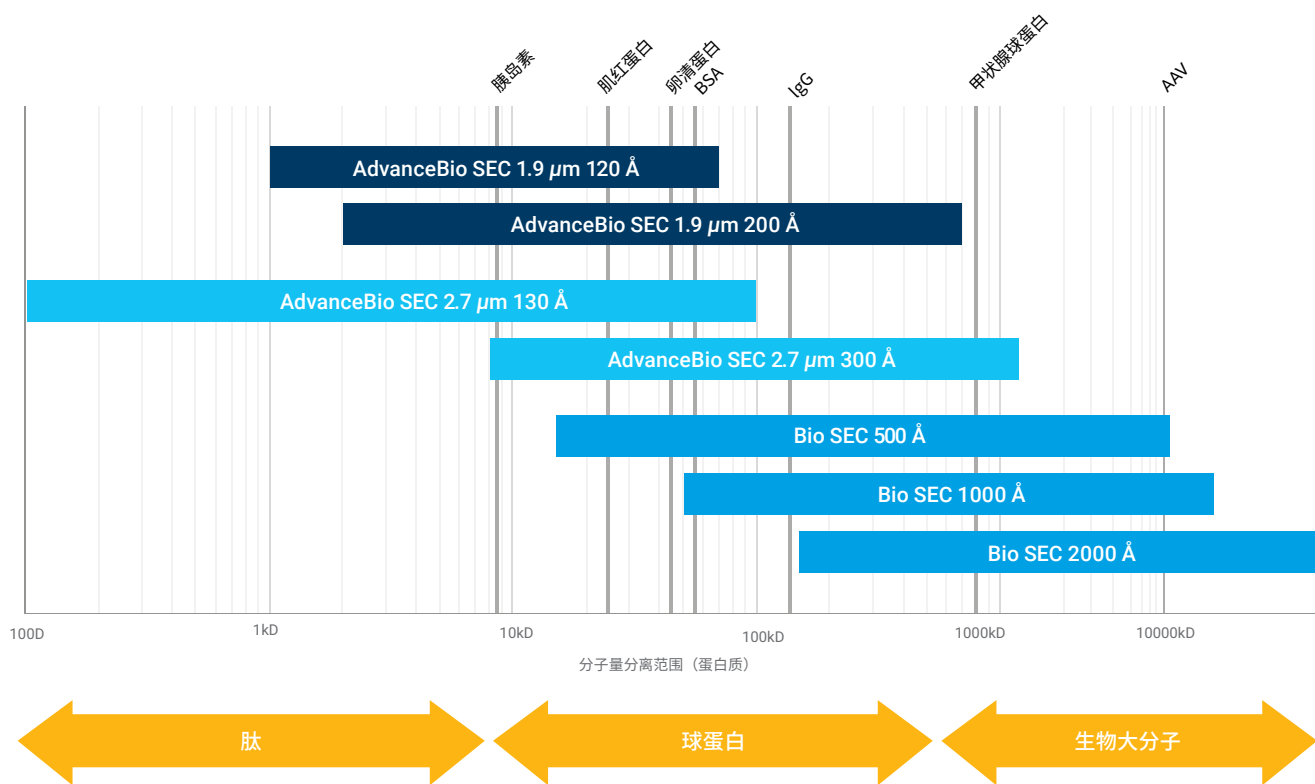
- AdvanceBio SEC 有两种填料粒径可供选择，适用于蛋白质和肽的聚集体及片段分析。建议常规 SEC-UV 或 SEC-LS 测量采用 2.7 μm 颗粒填料色谱柱。1.9 μm 颗粒填料能够在高达 600 bar 下保持稳定，可用于高分离度和高通量 SEC-UV 或 SEC-MS 分析。两种颗粒均具有亲水性聚合物涂层，可大大减小次级相互作用
- Bio SEC-3 和 Bio SEC-5 色谱柱有各种孔径可供选择，直径可达 21.2 mm，非常适合用 UV 或 MS 检测进行蛋白质分析。请注意，3 μm Bio SEC-3 色谱柱与 5 μm Bio SEC-5 色谱柱相比，能提供更高的分离度
- Bio SEC-5 色谱柱有 500 Å 至 2000 Å 的孔径可供选择，适用于 AAVs、病毒样颗粒和大分子寡核苷酸等大分子结构的 SEC 分析
- PROTEEMA 和 MAB 色谱柱为二醇 SEC 色谱柱，建议用于需要 L20 USP 色谱柱的情况。孔径范围为 100–1000 Å，并且提供生物惰性色谱柱卡套

7 聚集体及片段分析

体积排阻色谱 (SEC)			
应用	安捷伦色谱柱	说明	USP 标准
肽、蛋白质、聚集体分析	AdvanceBio SEC 2.7 μm	稳定的亲水性涂层可大大减小次级相互作用。有两种孔径可供选择：130 Å 和 300 Å。	L59
	AdvanceBio SEC 1.9 μm	同样稳定的亲水性涂层，但填料颗粒粒径更小，能够提供更高的分离度和通量。1.9 μm 颗粒填料能够在高达 620 bar 下保持稳定，并有 120 Å 和 200 Å 两种孔径可供选择。	L59
	Bio SEC-3	采用 3 μm 颗粒填料，有 100 Å、150 Å 和 300 Å 孔径可供选择，能够提供更高的分离度和更快速的分离。可扩展至 21.2 mm 内径。	L59
	PROTEEMA	二醇 SEC 固定相采用 3 μm 颗粒填料，孔径为 100 Å、300 Å 或 1000 Å。	L20
	MAB	采用 3 μm 颗粒填料的混合柱床二醇 SEC 固定相。	L20
生物大分子（例如 AAVs 和 VLPs）或含有多种分子量组成的样品	Bio SEC-5	多种孔径可供选择（100 Å、150 Å、300 Å、500 Å、1000 Å 和 2000 Å），能够覆盖各种分析物。可扩展至 21.2 mm 内径。	L59

孔径选择

您可以基于您的分析物和方法参数，从安捷伦种类齐全的体积排阻色谱柱中选择适合您的色谱柱，实现出色分离。本图为您提供了实现常见分子的理想分离的孔径范围概览。我们建议首先使用 AdvanceBio SEC 色谱柱进行方法开发。



AdvanceBio SEC

AdvanceBio SEC 色谱柱能够为 mAbs、其他蛋白质和多肽的聚集体及片段分析提供准确、精密的定量。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。

AdvanceBio SEC 2.7 μm 色谱柱稳定、可靠，能够满足常规 SEC 需求，其采用独特的亲水性涂层，可大大减小样品与固定相之间的次级相互作用，而无需向流动相中添加额外的盐或有机溶剂。即使对于粘性样品（例如 ADCs），这款色谱柱也能够大幅减小次级相互作用，从而提供准确的结果。有两种孔径可供选择：130 Å 和 300 Å，它们是对蛋白质和多肽进行灵敏的高重现性聚集体分析的理想选择。

AdvanceBio SEC 1.9 μm 色谱柱将您的 SEC 分离提升到一个新的水平。更小的颗粒填料以及亲水性化学键合相，可实现高效、高分离度分离。在高达 620 bar 下保持稳定，可实现更快的流速，以满足高通量需求。针对 200 Å 孔径进行了专门优化，可同时分离二聚体、单体和片段，实现全面的 mAb 表征。

对于 SEC-MS 和极具挑战性的 SEC 应用，AdvanceBio SEC 1.9 μm 色谱柱还提供内径为 2.1 mm 的带 PEEK 内衬的不锈钢卡套。这种生物惰性、不含金属的流路是对金属敏感的样品或天然模式 SEC-MS 分析的理想选择。

- 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，可提供出色的校准和性能验证
- 2.7 μm 和 1.9 μm 填料粒径，各自提供两种孔径选择
- 适用于生物惰性流路的带 PEEK 内衬的不锈钢卡套



色谱柱性能指标

粒径	孔径	分子量范围	pH 范围	最大压力	流速
2.7 μm	130 Å	100–120000 Da	2–8.5	400 bar (典型操作压力 < 200 bar)	0.1–2.0 mL/min (内径 7.8 mm)
2.7 μm	300 Å	5000–1250000 Da	2–8.5	400 bar (典型操作压力 < 200 bar)	0.1–0.7 mL/min (内径 4.6 mm)
1.9 μm	120 Å	1000–80000 Da	2–8.5	620 bar	0.1–0.5 mL/min (4.6 × 300 mm)
1.9 μm	200 Å	2000–700000 Da	2–8.5	620 bar	0.1–0.7 mL/min (4.6 × 150 mm) 0.05–0.1 mL/min (内径 2.1 mm)



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

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

有关推荐的仪器配置以及初始流动相条件和相应的色谱图，请参见 AdvanceBio SEC 2.7 μm 和 1.9 μm 色谱柱快速入门指南（出版物 5994-4620EN 和 5994-4621EN）。

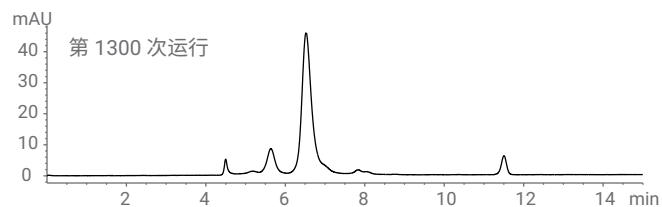
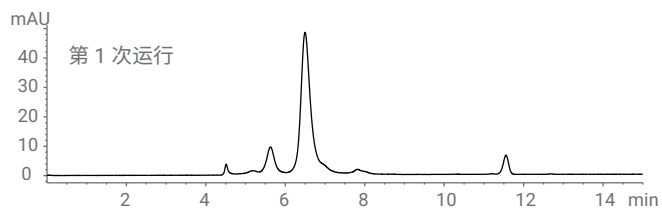
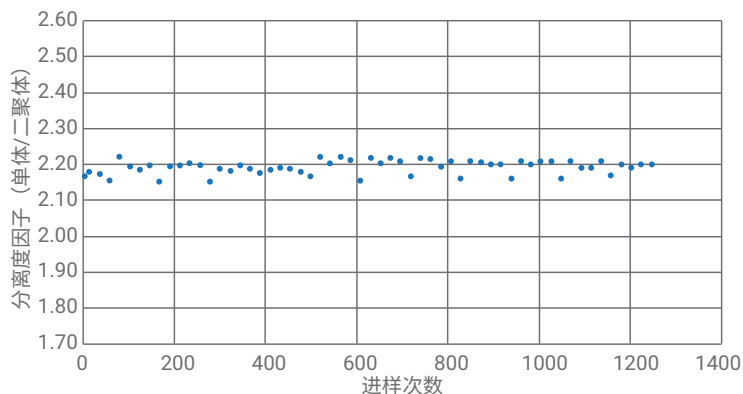
AdvanceBio SEC 色谱柱稳定、可靠，使用寿命长

色谱柱: AdvanceBio SEC 2.7 μm
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期间,在工作范围内, IgG 单体与二聚体的分离度因子和定量结果也保持不变。

亲水性 SEC 填料是抗体:药物偶联物 (ADC) 分析的理想选择

色谱柱: AdvanceBio SEC 2.7 μm
300 Å, 7.8 × 300 mm

仪器: Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统

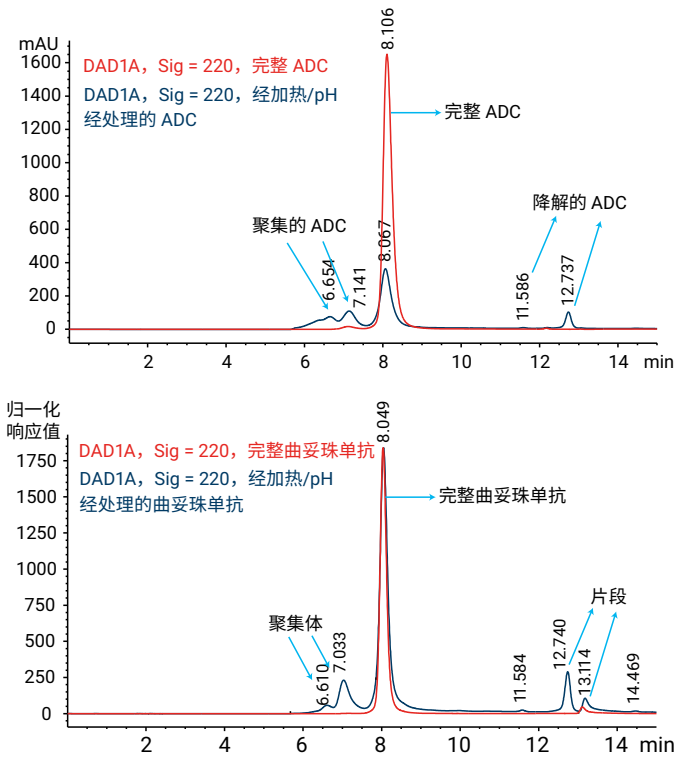
流动相: PBS, 含 150 mmol/L 氯化钠的 50 mmol/L 磷酸钠,
pH 7.4

TCC 温度: 室温

进样量: 10 μL

流速: 0.8 mL/min

检测器: UV, 220 nm



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
进样量	1–5 μL (推荐) 最大 1% 色谱柱体积
操作温度	20–30 °C (推荐温度) 80 °C (最高温度)
典型操作压力	< 200 bar (2900 psi) (单柱)
最大压力	400 bar (5800 psi)
工作流程	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。

AdvanceBio SEC 1.9 μm 操作参数

参数	值
保护剂/长期储存溶液	含 0.02% NaN_3 的 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 6.7
工作流速	对于 4.6 $\times$ 150 mm 色谱柱, 0.1–0.7 mL/min 对于 4.6 $\times$ 300 mm 色谱柱, 0.1–0.5 mL/min 对于 2.1 mm 内径色谱柱, 0.05–0.10 mL/min
进样量	1–5 μL (推荐) 最大 1% 色谱柱体积
最大压力	620 bar (9000 psi)
pH 稳定性	2–8.5
盐浓度	≤ 0.5 mol/L
流动相兼容性	与所有用于 UV 检测的 SEC 流动相兼容。具有不同盐浓度的磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 以及变性和天然模式 SEC-MS 流动相。
操作温度	20–40 $^{\circ}\text{C}$ (推荐), 80 $^{\circ}\text{C}$ (最高温度)

注：在极端操作参数下运行色谱柱可能会缩短使用寿命。

高分离度、高通量 mAb 分离

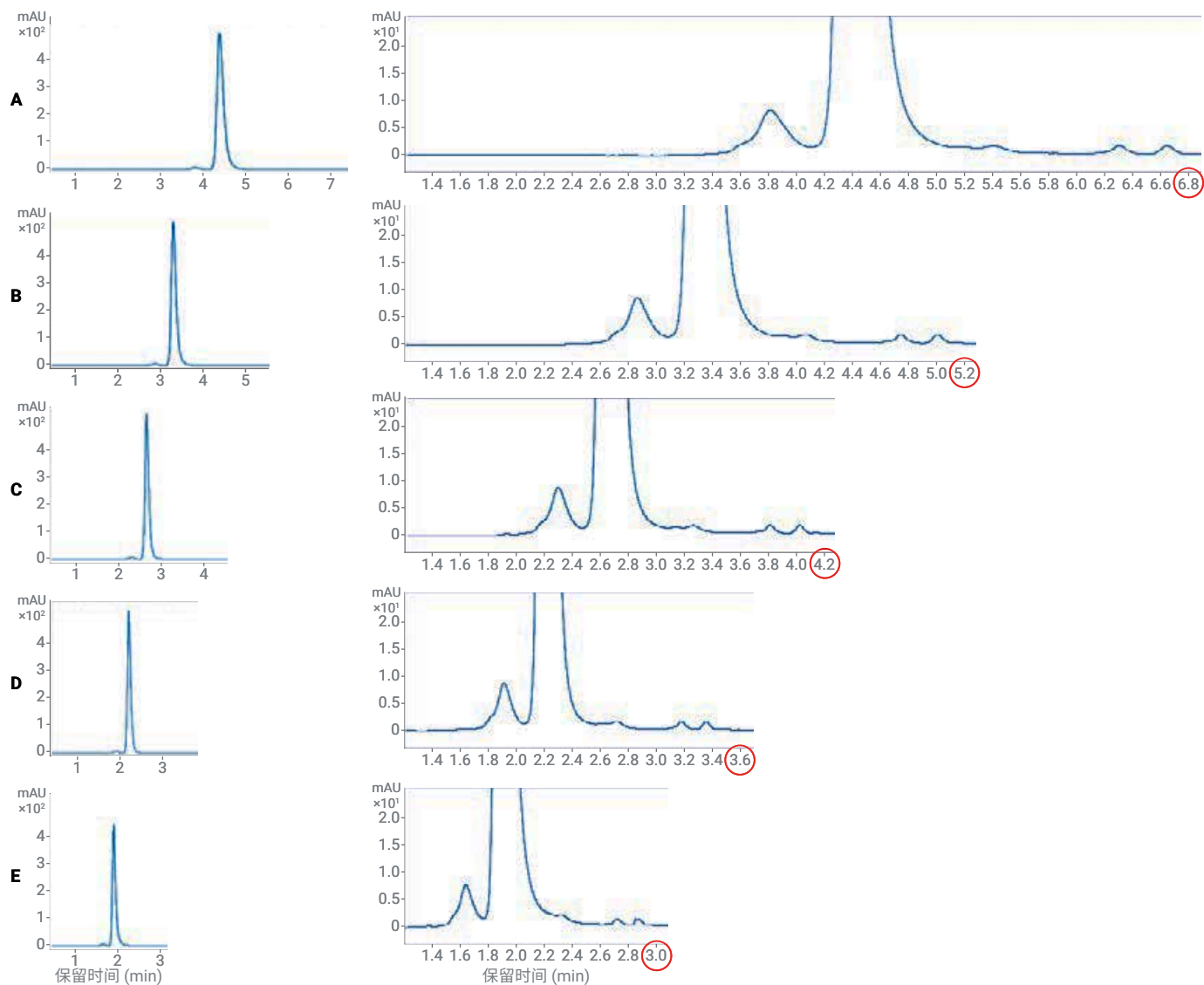
色谱柱： AdvanceBio SEC 1.9 μm
200 $\text{\AA}$, 4.6 $\times$ 150 mm

仪器： Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统
流动相： 50 mmol/L 磷酸钠, 200 mmol/L NaCl,
pH 7.0
柱温： 25 $^{\circ}\text{C}$
进样量： 1 μL
流速： 0.3–0.7 mL/min
检测器： UV, 220 nm

流速对分离度、单体峰面积百分比和样品通量的影响

流速 (mL/min)	运行时间 (min)	反压 (bar)	分离度 (二聚体/单体)	二聚体峰面积 (%)	每小时可处理的 样品数	每天处理的样品数 (24 小时)
0.3	6.8	164	1.81	2.33	8–9	211
0.4	5.2	218	1.79	2.35	11–12	276
0.5	4.2	272	1.78	2.35	14	342
0.6	3.6	324	1.77	2.39	16–17	400
0.7	3.0	380	1.58	2.30	20	480

7 聚集体及片段分析



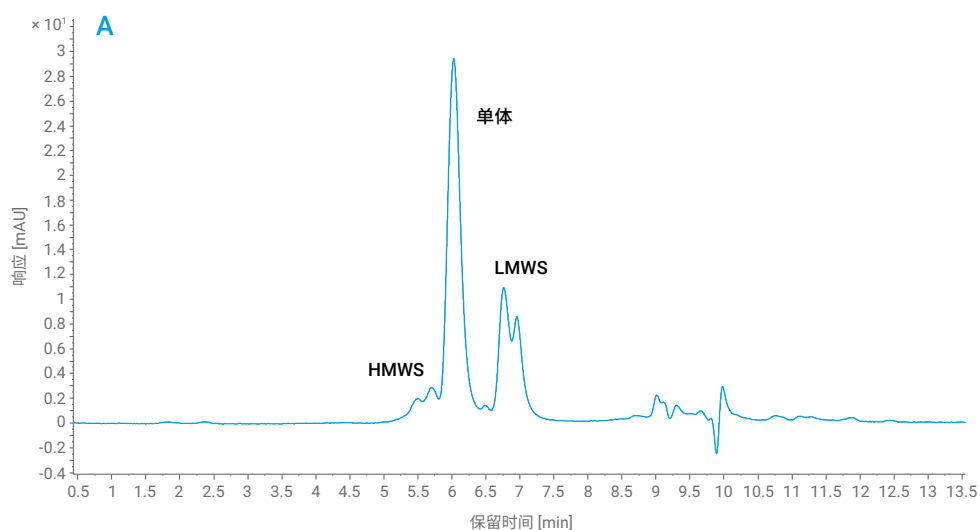
SigmaMAB 的体积排阻色谱图，采用 4.6×150 mm SEC 色谱柱，流动相为 50 mmol/L 磷酸钠，200 mmol/L NaCl，pH 7.0，流速为 A) 0.3 mL/min；B) 0.4 mL/min；C) 0.5 mL/min；D) 0.6 mL/min；E) 0.7 mL/min。

人生长激素的体积排阻分离

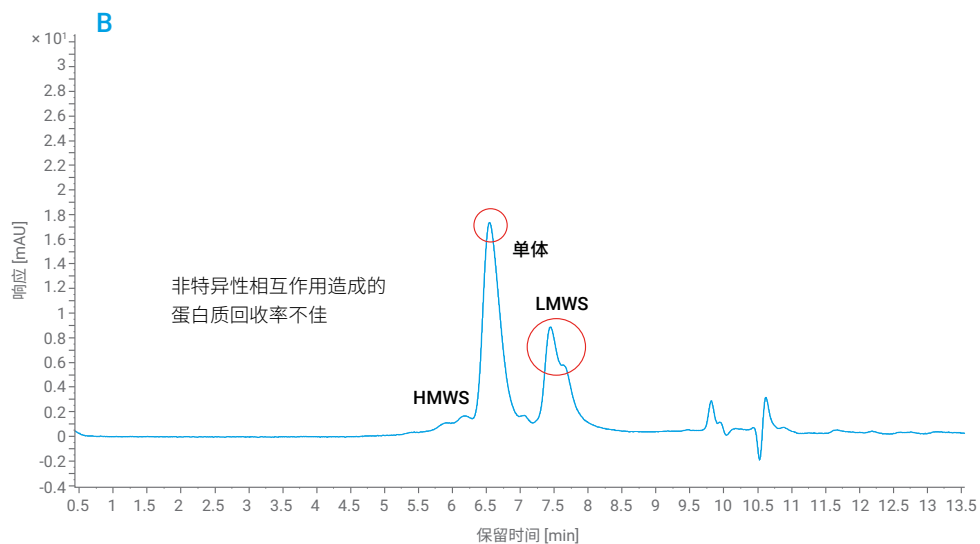
仪器: Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统
 软件: Agilent OpenLab CDS
 流速: 0.35 mL/min
 洗脱液: 150 mmol/L 磷酸盐, pH 7
 样品: 浓度 1 mg/mL
 温度: 25 °C
 进样量: 2 μ L
 检测: UV, 220 nm

色谱柱	单体 RT (min)	总峰面积 (平均 n = 2)	单体峰拖尾	单体峰宽
Agilent AdvanceBio SEC	6.02	691.81	1.22	0.21
竞争厂商 SEC 色谱柱 1.7 μ m	6.54	581.10	1.33	0.28

A: Agilent AdvanceBio SEC, 4.6 $\times$ 300 mm, 120 $\text{\AA}$ 1.9 μ m



B: 竞争厂商 SEC 色谱柱, 4.6 $\times$ 300 mm, 125 $\text{\AA}$ 1.7 μ m



Bio SEC

Agilent Bio SEC 提供孔径为 100 Å 至 2000 Å 且内径最高达 21.2 mm 的通用产品组合，支持各种蛋白质大小和进样量要求。

Agilent Bio SEC 采用专为增加孔容量而特别设计的填料，提高了峰容量和分离度，可为更大的生物分子提供优异的分度。

Bio SEC 特点

- 高分离度：更尖锐的色谱峰及更出色的蛋白质回收率
- 优异的载样量和回收率：得益于其专利亲水层
- 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：与大多数水性缓冲液兼容
- 应用广泛：孔径为 100 Å 至最高 2000 Å，适用于小分子蛋白质、疫苗和高分子量生物分子
- 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 色谱柱填充有球形、粒径分布窄的 3 μm 硅胶颗粒，表面涂覆独特亲水聚合物层，以确保高回收率以及尽可能小的次级相互作用，从而提供更稳定可靠的分离。这层很薄的聚合物层在严格控制的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颗粒填料。

如需分离生物大分子和含多种分子量的样品，Bio SEC-5 色谱柱是理想的选择。它们填充了 5 μm 硅胶填料，涂覆有确保高柱效和稳定性的独特中性亲水聚合物层，有 6 种不同孔径，以便在宽分子量范围内实现优异的分度。



色谱柱性能指标				
孔径	粒径	分子量范围	pH 范围	最大压力
100 Å	3 μm	100–100000	2–8.5	137 bar, 2000 psi
150 Å	3 μm	500–150000	2–8.5	137 bar, 2000 psi
300 Å	3 μm	5000–1250000	2–8.5	137 bar, 2000 psi
100 Å	5 μm	100–100000	2–8.5	137 bar, 2000 psi
150 Å	5 μm	500–150000	2–8.5	137 bar, 2000 psi
300 Å	5 μm	5000–1250000	2–8.5	137 bar, 2000 psi
500 Å	5 μm	15000–5000000	2–8.5	137 bar, 2000 psi
1000 Å	5 μm	50000–7500000	2–8.5	137 bar, 2000 psi
2000 Å	5 μm	> 10000000	2–8.5	137 bar, 2000 psi

流速	
色谱柱内径	建议流速
4.6 mm	0.1–0.4 mL/min
7.8 mm	0.2–1.2 mL/min
21.2 mm	1.0–10.0 mL/min

孔径选择

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，因此样品必须要能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中，很难实现分离。

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

色谱柱 B: Bio SEC-3, 150 Å
5190-2508
4.6 × 300 mm, 3 μm

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

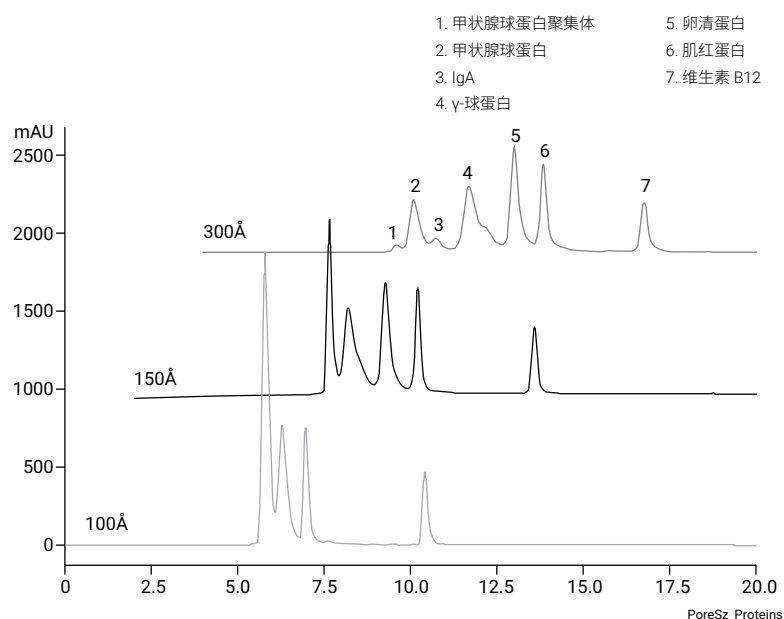
流动相: 磷酸钠 100 mmol/L, 氯化钠 150 mmol/L, pH 6.8

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



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。

访问安捷伦**样品瓶和密封件**商店，提高您实验室的工作效率。

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

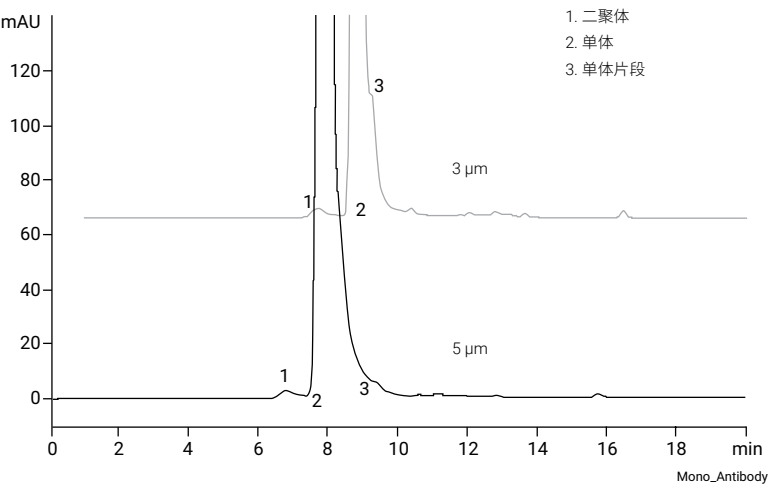
色谱柱: Bio SEC-5, 300 Å
5190-2526
7.8 × 300 mm, 5 μm

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片分离曲线。

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（出版物 5991-3651CHCN）

校准曲线 — Bio SEC-5

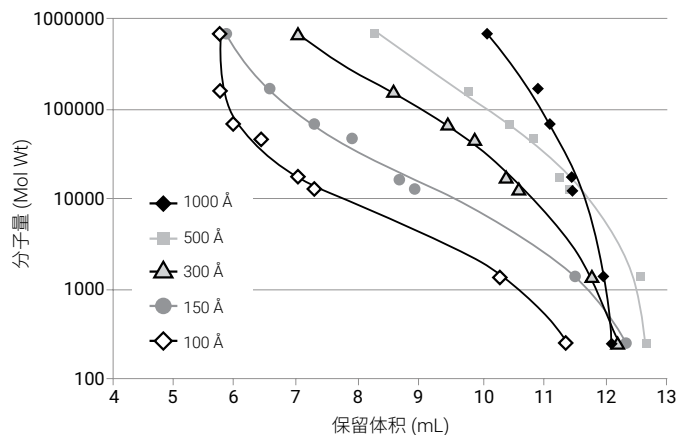
色谱柱: **Bio SEC-5**
7.8 × 300 mm, 5 μm

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



病毒样颗粒聚集体分析

色谱柱: **Agilent Bio SEC-5, 7.8 × 300 mm, 5 μm, 2000 Å**
(货号 5190-2541)

Agilent Bio SEC-5, 7.8 × 300 mm, 5 μm, 1000 Å
(货号 5190-2536)

流动相: 含 400 mmol/L 氯化钠的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4)

流速: 0.6 mL/min

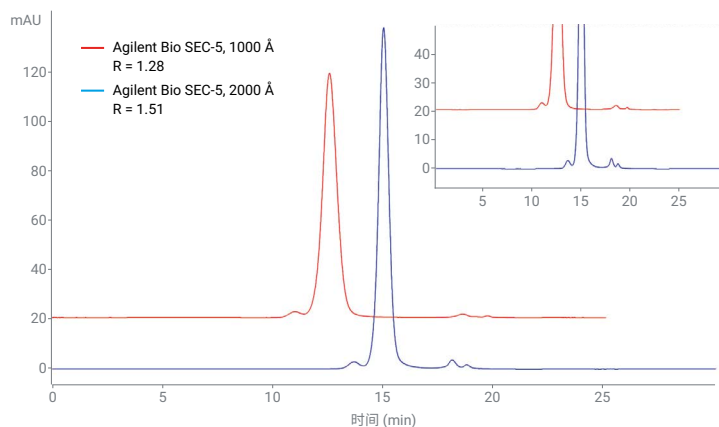
柱温: 室温

样品量: 5 μL

检测波长: 220 nm

运行时间: 30 min

HPLC 系统: 配备四元泵的 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统



使用 Agilent Bio SEC-5 2000 Å 色谱柱和 Bio SEC-5 1000 Å 色谱柱分析相同的病毒样颗粒。

PROTEEMA 色谱柱

PROTEEMA 色谱柱非常适合用于分子量范围为 100–7500000 Da 的天然和合成蛋白质、肽、酶和明胶/胶原蛋白的水相 GPC/SEC 分析。提供多种色谱柱配置，可满足您的特定应用需求，包括两种填料粒径（3 μm 和 5 μm）、三种孔径（100 Å、300 Å 和 1000 Å）以及不锈钢和生物惰性卡套选件。这款二醇 SEC 固定相适用于需要 USP L20 色谱柱的分离。

色谱柱性能指标						
粒径	孔径	分子量范围*	pH 范围	最大压力	最高温度	最大流速
3 或 5 μm	100 Å	100–150000 Da	2–8	200 bar (3 μm)	70 °C	3 mL/min
	300 Å	1000–1200000 Da		150 bar (5 μm)		
	1000 Å	1000–7500000 Da				

*基于蛋白质

校准曲线 — 普鲁兰多糖（缓冲液）

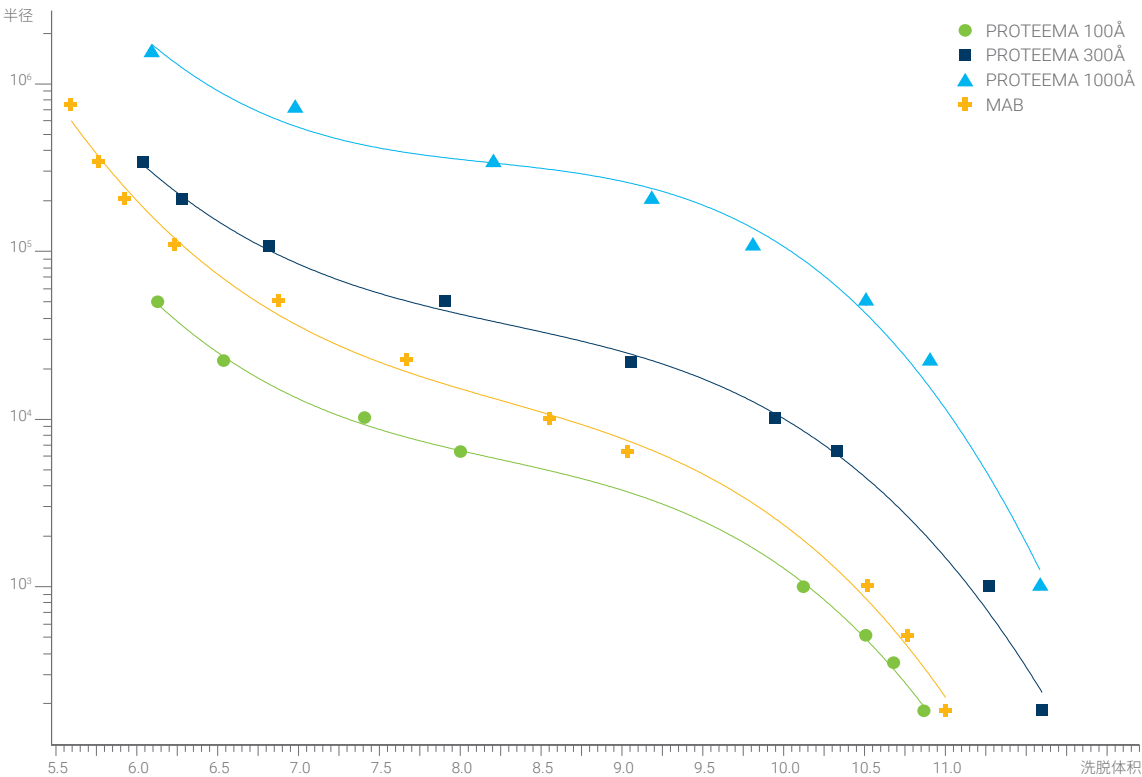
色谱柱： PROTEEMA 100 Å, 300 Å, 1000 Å
MAB, 均为 8 × 300 mm, 3 μm

流动相： 磷酸盐缓冲液 pH 6.6 (34 mmol) + 0.5 mol/L NaCl

流速： 1 mL/min

温度： 23 °C

检测器： RI



MAB

MAB 色谱柱可用于分子量范围为 100–1000000 Da 的单克隆抗体、IgG 和蛋白质的水相 GPC/SEC 分析。混合柱床设计用于分离单克隆抗体聚集体和片段，并且经过优化和预平衡，可快速用于光散射检测。这些硅胶基二醇 SEC 色谱柱被归类为 USP L20。MAB 色谱柱提供有 3 μm 填料粒径，非常适合蛋白质分析。

色谱柱性能指标

粒径	孔径	分子量范围	pH 范围	最大压力	最高温度	最大流速
3 μm	混合	100–1000000 Da	2–8	150 bar	70 °C	3 mL/min

免疫球蛋白 G 的聚集体分析

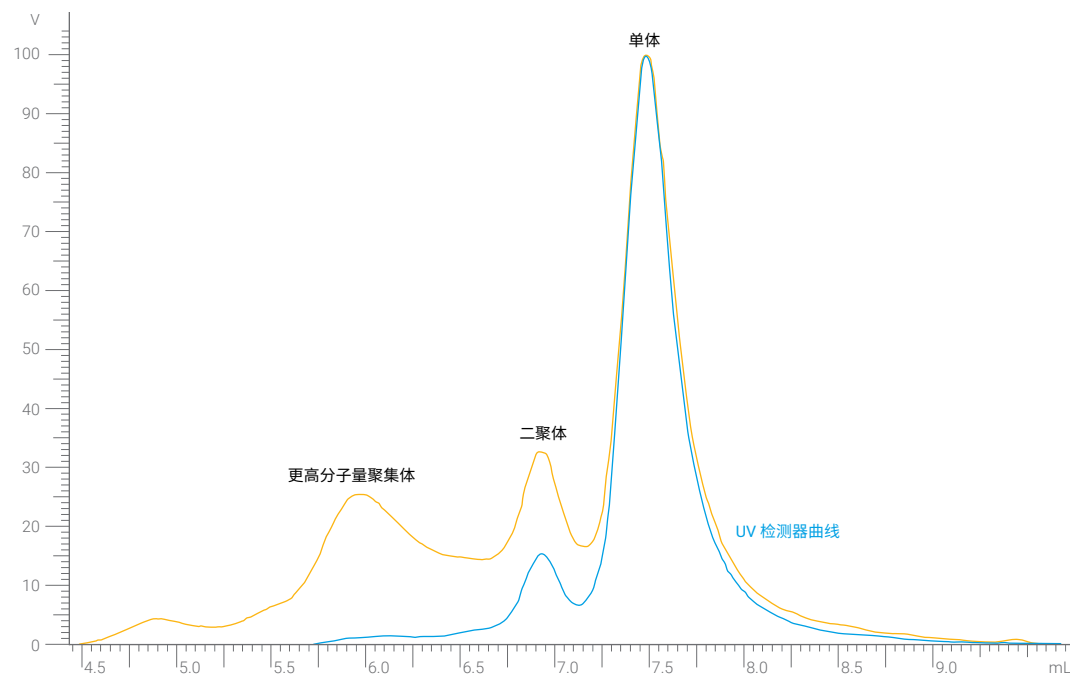
色谱柱: MAB, 8 × 300 mm, 3 μm

流速: 1 mL/min

样品浓度: 2.5 g/L

进样量: 20 μL

检测: UV, 280 nm
MALLS (90°)



低浓度的高阶聚集体，使用 MALLS 进行检测（黄色信号）

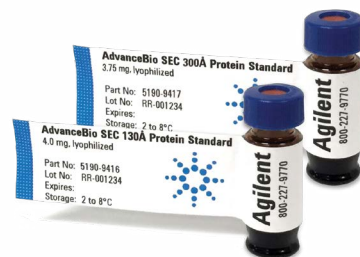
用于 SEC 分析的蛋白质标准品

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。

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 或 200 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，
货号 5190-9416 和货号 5190-9417

技巧和工具

定期使用经过准确测量的性能标准品检查 HPLC 系统，可提高结果的可信度，并有助于快速发现问题。虽然许多科学家使用蛋白质混合物（如 AdvanceBio SEC 标准品），但也有部分人使用单克隆抗体标准品。为了方便使用，**Agilent-NISTmAb** 以小份量提供。

有关样品方法和色谱图，请参见 Agilent NISTmAb 应用文集（出版物 **5994-1501EN**）的聚集体分析章节（出版物 **5994-2069EN**）。

SEC 分子量标准品分离

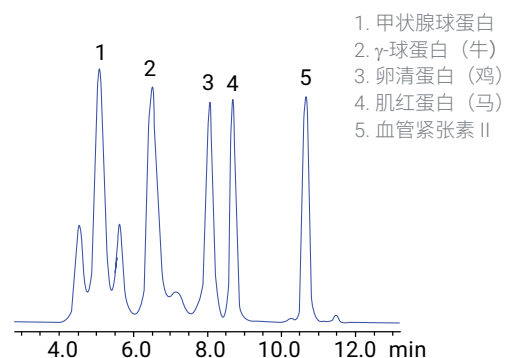
色谱柱: AdvanceBio SEC 2.7 μm
7.8 $\times$ 300 mm

样品: AdvanceBio SEC 蛋白质标准品

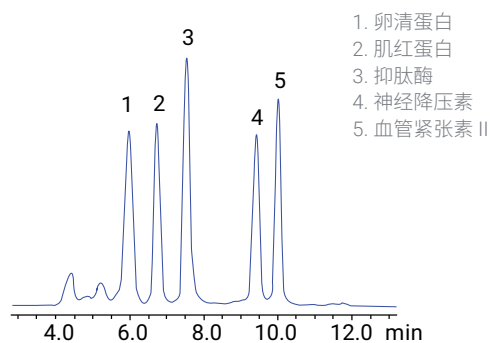
流动相: 150 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0

流速: 1.0 mL/min

Agilent AdvanceBio SEC 蛋白质标准品



AdvanceBio SEC 300 Å 蛋白质标准品在 AdvanceBio SEC 300 Å 色谱柱上的分离



AdvanceBio SEC 130 Å 蛋白质标准品在 AdvanceBio SEC 130 Å 色谱柱上的分离

技巧和工具

色谱柱用户指南是非常实用的资源, 其中包含色谱柱使用和维护说明以及建议的启用方法:

www.agilent.com/chem/biolc-columns-user-guides

蛋白质标准品试剂盒

蛋白质标准品试剂盒使用户能够针对给定的分析或故障排除情况选择合适的蛋白标准品。PSS-PROKIT 包含 10 种单独瓶装的冻干标准品，分子量范围为 243 Da 至 670 kDa。PSS-PROKITR1 包含 3 种不同的小瓶各 5 个，其中含 3–4 种已混合的冻干标准品。这些试剂盒使用户能够灵活地设计自己的混合物，用不同的蛋白质进行故障排除，或使用完全分离的标准品的现成混合物。

PSS-PROKIT 组分

组分名称	分子量	流体动力学半径 (nm)	数量
胞苷	243 Da		1 × 0.1 g
维生素 B12	1.4 kDa		1 × 0.1 g
抑肽酶	6.5 kDa		1 × 0.1 g
细胞色素 C	12 kDa	1.5	1 × 0.1 g
肌红蛋白	17.5 kDa	1.8	1 × 0.1 g
β-乳球蛋白	35 kDa	2.8	1 × 0.1 g
白蛋白 (鸡)	44 kDa	3.5	1 × 0.1 g
白蛋白 (牛)	67 kDa	4.4	1 × 0.1 g
丙种球蛋白	158 kDa	5.8	1 × 0.1 g
甲状腺球蛋白	670 kDa	9.1	1 × 0.1 g

技巧和工具

安捷伦[应用方法订购指南](#)使您能够轻松找到适合您的分析需求的具体消耗品，而无需花时间浏览多个产品目录。

查看 [mAb 二聚体及片段分析订购指南](#)，或 [SEC-MS 订购指南](#)，查找您需要的所有工具，以及实用资源（例如选择标准、应用简报和最佳实践技巧）。

ReadyCal 试剂盒组分

样品瓶	组分
绿盖	甲状腺球蛋白、白蛋白、细胞色素 C、胞苷
红盖	丙种球蛋白、 β -乳球蛋白、抑肽酶
白盖	白蛋白（牛）、肌红蛋白、维生素 B12

ReadyCal 试剂盒蛋白质标准品的叠加图

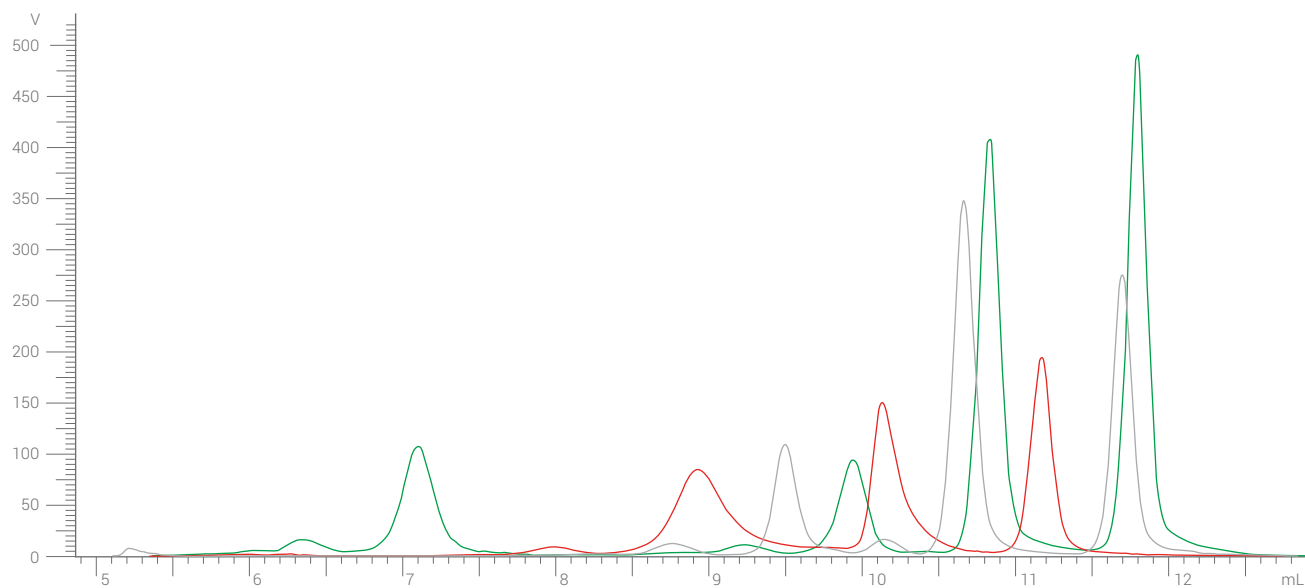
色谱柱: PROTEEMA 300 A,
8 × 300 mm, 3 μ m

流动相: 磷酸盐缓冲液 pH 6.6 (34 mmol), 0.5 mol/L NaCl

流速: 1 mL/min

温度: 23 °C

检测: UV, 280 nm



产品订购信息

AdvanceBio SEC 色谱柱, 2.7 µm

规格 (mm)	粒径 (µm)	130 Å	300 Å
4.6 × 300	2.7	PL1580-5350	PL1580-5301
4.6 × 150	2.7	PL1580-3350	PL1580-3301
4.6 × 50, 保护柱	2.7	PL1580-1350	PL1580-1301
7.8 × 300	2.7	PL1180-5350	PL1180-5301
7.8 × 150	2.7	PL1180-3350	PL1180-3350
7.8 × 50, 保护柱	2.7	PL1180-1350	PL1180-1301

AdvanceBio SEC 色谱柱, 1.9 µm

规格 (mm)	粒径 (µm)	120 Å	200 Å
4.6 × 300	1.9	PL1580-5250	PL1580-5201
4.6 × 150	1.9	PL1580-3250	PL1580-3201
4.6 × 30, 保护柱	1.9	PL1580-1250	PL1580-1201
2.1 × 150, 带 PEEK 内衬的不锈钢卡套	1.9	PL1980-3250PK	PL1980-3250PK
2.1 × 50, 带 PEEK 内衬的不锈钢卡套, 保护柱	1.9	PL1980-1250PK	PL1980-1201PK

Bio SEC-3 色谱柱

规格 (mm)	粒径 (µm)	Bio SEC-3 100 Å	Bio SEC-3 150 Å	Bio SEC-3 300 Å
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

Bio SEC-5 色谱柱

规格 (mm)	粒径 (μm)	Bio SEC-5 100 Å	Bio SEC-5 150 Å	Bio SEC-5 300 Å	Bio SEC-5 500 Å	Bio SEC-5 1000 Å	Bio SEC-5 2000 Å
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

PROTEEMA 色谱柱

规格 (mm)	粒径 (μm)	孔径 (Å)	不锈钢	生物惰性	PROTEEMA Lux 可直接用于光散射检测
4.6 × 30	3	保护柱	PRM050303	PRM050303BI	
4.6 × 250	3	100	PRM0525031E2	PRM0525031E2BI	
4.6 × 250	3	300	PRM0525033E2	PRM0525033E2BI	
4.6 × 250	5	300	PRM0525053E2	PRM0525053E2BI	
8 × 50	5	保护柱	PRA080505	PRA080505BI	PRA080505LS
8 × 300	5	100	PRA0830051E2	PRA0830051E2BI	PRA0830051E2LS
8 × 150	5	300	PRA0815053E2	PRA0815053E2BI	
8 × 300	5	300	PRA0830053E2	PRA0830053E2BI	PRA0830053E2LS
8 × 300	5	1000	PRA0830051E3	PRA0830051E3BI	PRA0830051E3LS

MAB 色谱柱

规格 (mm)	粒径 (μm)	不锈钢	生物惰性
4.6 × 30, 保护柱	3	MAM050303	MAM050303BI
4.6 × 250	3	MAM052503MC	MAM052503MCBI
8 × 50, 保护柱	3	MAA080503	MAA080503BI
8 × 300	3	MAA083003MC	MAA083003MCBI

7 聚集体及片段分析

AdvanceBio SEC 标准品

描述	形式	货号
AdvanceBio SEC 130 Å 蛋白质标准品	冻干固体	5190-9416
AdvanceBio SEC 300 Å 蛋白质标准品	冻干固体	5190-9417

PSS 蛋白质标准品

描述	形式	货号
GPC/SEC 校准试剂盒，10 种单标	冻干固体	PSS-PROKIT
ReadyCal 蛋白质试剂盒，5 种混合物，各含 3–4 种蛋白质	冻干固体	PSS-PROKITR1

ZORBAX GF-250 和 GF-450 凝胶过滤柱

描述	规格 (mm)	粒径 (µm)	货号
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
保护柱（需要卡套）			
GF-450 二醇，保护柱柱芯，2/包	9.4 × 15	6	820675-111
GF-250 二醇，保护柱柱芯，4/包	4.6 × 12.5	6	820950-911
GF-450 二醇，保护柱柱芯，2/包	9.4 × 15	6	820675-111
制备型保护柱卡套			840140-901
保护柱卡套			820999-901
PrepHT 色谱柱			
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
保护柱柱芯卡套			820444-901

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。

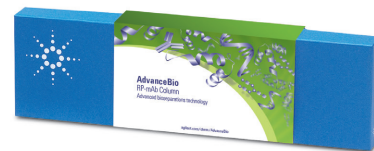
更多信息，请参见第 97 页。

糖基化表征

N-糖表征是生物治疗药物开发过程的重要环节，因为 N-糖的结构会影响糖基化生物治疗药物的功能，因此，糖基化通常是一种关键质量属性 (CQA)。

N-糖分析通常涉及用标签标记游离多聚糖，以便进行荧光 (FLD) 检测，并增强质谱 (MS) 的电离，及后续的 N-糖分离、检测和相对定量。

可采用多种分析方法获得蛋白糖基化的结构和形态信息。

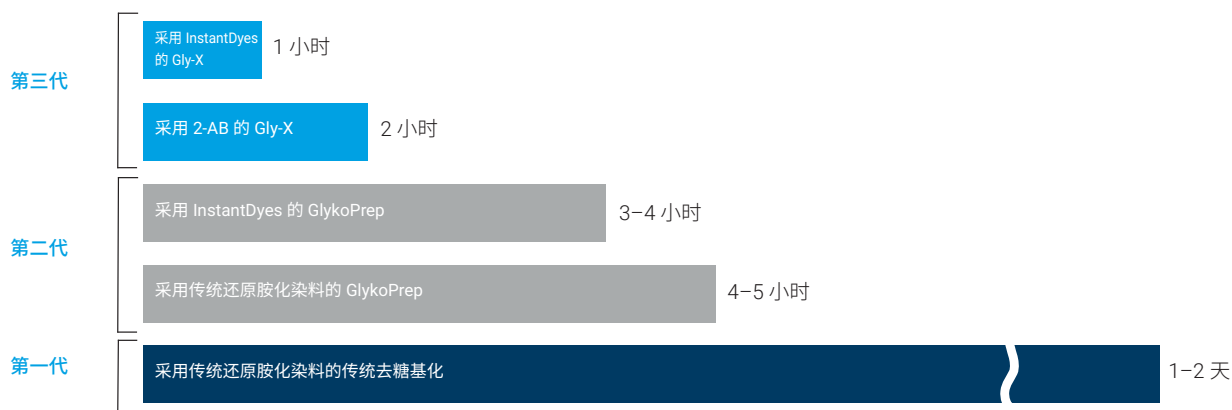


糖基化表征方法

- 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)
- 在游离 N-糖分析中，用荧光标记对多聚糖进行衍生化，以便进行荧光检测并通过 HILIC 分离
- 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。安捷伦还提供用于制备荧光标记的游离唾液酸的解决方案，以实现 LC/FLD 或比色分析

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。要进行此类分析，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化，以便使用 FLD 检测器进行表征和定量。

除色谱柱、软件和仪器以外，安捷伦还提供全系列 N-糖和唾液酸样品前处理试剂盒以及有助于 N-糖鉴定的工具（例如酶、标准品和文库）。



N-糖样品前处理技术的演化（右侧显示时间）

亲和相互作用色谱柱选择

应用	安捷伦色谱柱	说明
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	氨基键合相可缩短平衡时间并提高多聚糖选择性。
	1.8 μm	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。
	2.7 μm	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。这可在较低的压力下实现高分离度分离，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	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。
	AdvanceBio 糖谱分析色谱柱	氨基键合相为亲水性小分子肽和糖肽提供了不同的 HILIC 官能团。

AB

AB

AB AdvanceBio 系列产品的一部分

N-糖样品前处理

AdvanceBio Gly-X 技术

Agilent AdvanceBio Gly-X (原 ProZyme) 是新一代 N-糖前处理平台，可提供简化的溶液内工作流程。与 InstantPC 染料结合，通过高效的真空板净化步骤去除多余的标记和变性剂，样品仅需 60 分钟或更短的时间便可用于 UHPLC 或 LC/MS 分析。

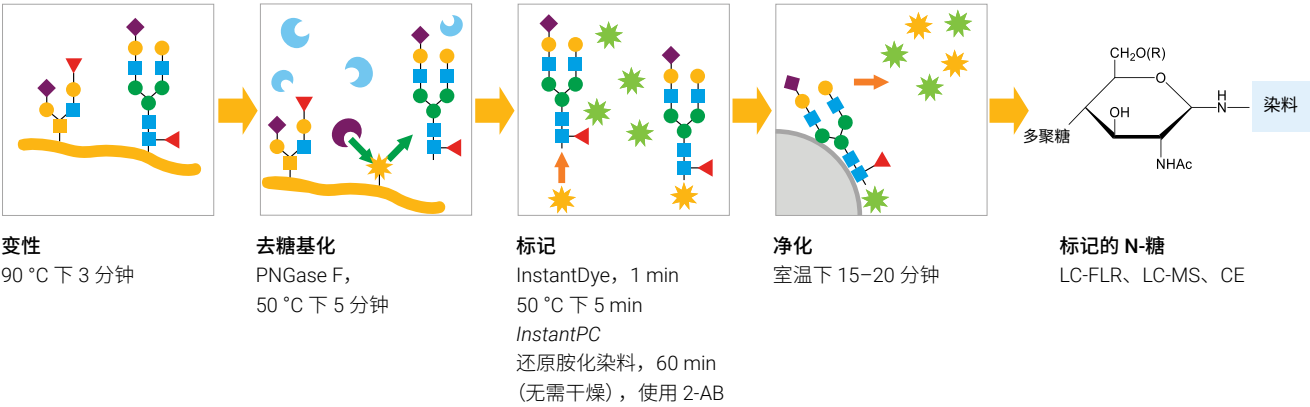


技巧和工具

了解有关 N-糖样品前处理的更多信息

- 工作流程订购指南 — 生物治疗性糖蛋白的 N-糖分析 (出版物 5994-3926)
- 工作流程订购指南 — 使用 AdvanceBio Gly-X 2-AB 对生物治疗性糖蛋白进行 N-糖分析 (出版物 5994-4158)
- 应用简报 — Gly-X InstantPC 与 Waters RapiFluor-MS 的比较 (出版物 5994-5653)
- 应用简报 — 使用 LC/FLD/MS 简化生物治疗药物的 N-糖分析工作流程 (出版物 5994-1348)

Gly-X N-糖样品前处理工作流程

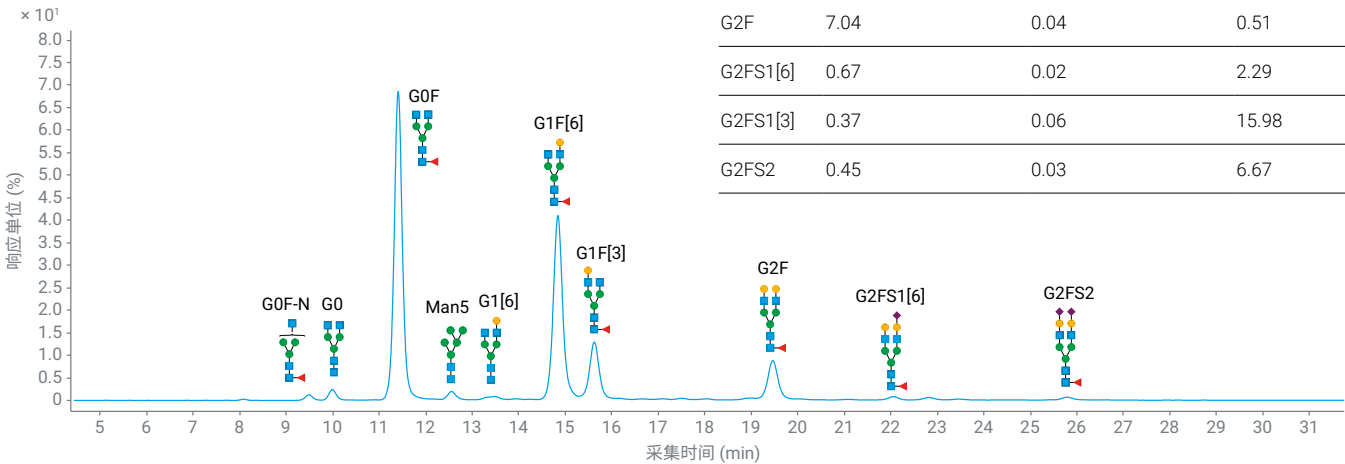


Gly-X N-糖样品前处理工作流程。推荐的初始样品量为 1–40 µg，最大样品量高于类似工作流程。可能还可使用更多蛋白质，具体取决于分子。如需了解更多的样品考虑因素，请参阅具体的 Gly-X 产品手册。

利妥昔单抗 N-糖，Gly-X InstantPC

用 InstantPC 标记的利妥昔单抗 N-糖的相对峰面积百分比、SD 和 %CV, n = 4

	平均相对峰面积 (%)	标准偏差	%CV
G0F-N	0.75	0.01	1.55
G0	1.47	0.02	1.18
G0F	46.82	0.07	0.15
Man5	1.21	0.01	0.83
G1[6]	0.75	0.02	2.67
G1F[6]	31.21	0.11	0.35
G1F[3]	9.27	0.05	0.54
G2F	7.04	0.04	0.51
G2FS1[6]	0.67	0.02	2.29
G2FS1[3]	0.37	0.06	15.98
G2FS2	0.45	0.03	6.67



GlykoPrep 和 GlykoPrep-plus N-糖样品前处理

ProZyme GlykoPrep 固相小柱于 2012 年推出，是安捷伦首个使用“即时”多聚糖标记的平台。这款小柱实现了离心和自动化 (AssayMAP Bravo) 形式的 N-糖样品前处理流程的简化和标准化。使用 LC 和 CE 的两项实验室研究证明了小柱的重现性。

GlykoPrep-plus 试剂盒可与 Agilent AssayMAP Bravo 配套使用，实现开箱即用的自动化流程，并获得更高的精度以及更长的无人值守时间。尽管 GlykoPrep 已被 Gly-X 代替，但我们将继续为现有的 GlykoPrep 客户提供支持。

传统 N-糖样品前处理方法

较早的 N-糖样品前处理工作流程包括使用 PNGase F 进行天然或变性剂驱动的酶解、游离多聚糖纯化、荧光团标记以及纯化标记的多聚糖。此类工作流程需要 1–2 天，不适用于高通量应用或自动化。

随着 Gly-X 的推出，安捷伦可以帮助您从 2-AB 工作流程换用更高通量的快速样品前处理技术。而我们仍将提供多种多聚糖标记和净化工具，来支持传统的工作流程。

AdvanceBio 唾液酸分析与定量

简化唾液酸分析 — 安捷伦提供用于唾液酸分析与定量的产品，能够满足您的各种唾液酸分析需求。

技巧和工具

了解有关 Agilent AdvanceBio 唾液酸分析与定量的更多信息

使用 AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒和 LC/FLD/MS 分析生物治疗性糖蛋白的唾液酸（出版物 **5994-4201ZHCHN**）

生物治疗性糖蛋白的总唾液酸定量分析（出版物 **5994-4383ZHCHN**）

Agilent AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒 — NANA 和 NGNA 类唾液酸的快速定量（出版物 **5994-2788ZHCHN**）

Agilent AdvanceBio 唾液酸定量分析试剂盒 — 简化样品处理（出版物 **5994-2789ZHCHN**）

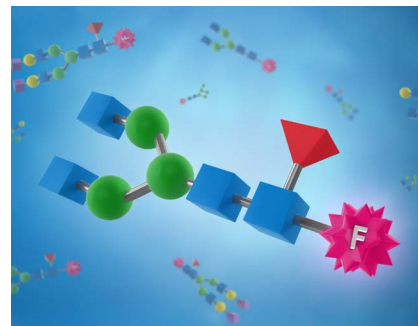
用于生物治疗药物中唾液酸分析与定量的改进工作流程（出版物 **5994-2352ZHCHN**）

糖生物学标准品和文库

多聚糖标准品帮助您获得可靠的答案 — 提供未标记或用 InstantPC、2-AB、InstantAB、APTS 和 2-AA 预标记的 N-糖标准品和文库。

涵盖了生物治疗药物中多种常见多聚糖类型，包括复杂二天线中性型与唾液酸化型、高甘露糖型以及 α -Gal 型。还可选择以下糖蛋白的多聚糖文库：

- 人 IgG
- 牛 RNA 酶 B
- 牛胎球蛋白
- 人 α 1-酸糖蛋白 (AGP)
- 中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞产生的重组单克隆 IgG (mAb)
- 三天线和四天线唾液酸化 N-糖文库

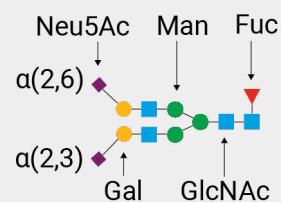


此外，安捷伦还提供含 α (2,3)-或 α (2,6)-连接的唾液酸的标准品：

- 在 CHO 细胞产生的糖蛋白上发现了 α (2,3) 唾液酸结合位点。带有 α (2,3) 唾液酸键的多聚糖比具有 α (2,6) 唾液酸键的异构 N-糖在 HILIC 上的保留时间更短
- 在静脉注射用人免疫球蛋白 (IVIG) 等糖蛋白上发现了 α (2,6) 唾液酸结合位点

参见多聚糖标准品选择指南 **5994-2202ZHCN**

多聚糖结构图示



2-AB 标记的葡聚糖分子量标准品的分离

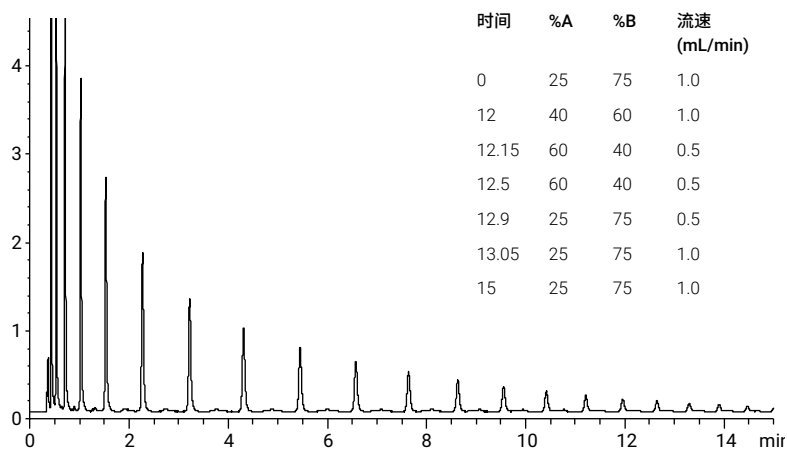
色谱柱：**AdvanceBio 糖谱分析色谱柱，
859700-913
2.1 × 150 mm, 1.8 μ m**

流动相：A: 100 mmol/L NH₄Fc, pH 4.5
B: 乙腈

FLD: 激发波长 = 260 nm
发射波长 = 430 nm

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

样品：2-AB (货号 GKS-B-503)
标记的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。

糖生物学酶

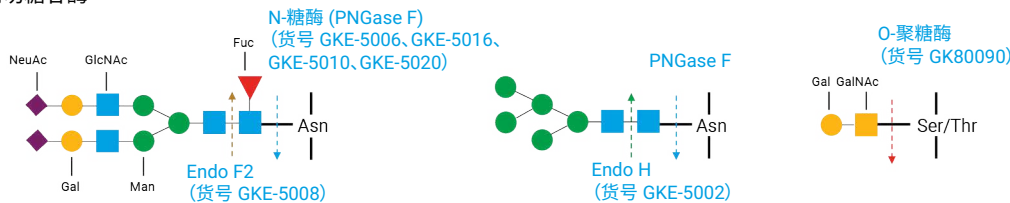
安捷伦现提供多种糖酶来支持您的游离多聚糖和其他分析工作流程。部分可选糖酶如图 8 所示。请访问安捷伦网站了解所有产品。

- 内切糖苷酶可在多聚糖结构内进行裂解。N-聚糖酶（PNGase F，实际上为天冬酰胺酰胺酶）因具备释放大多数完整 N-糖的功能而广泛用于研究游离多聚糖及生成去 N-糖基蛋白质
- 外切糖苷酶可从多聚糖上裂解暴露或“末端”的单糖残基。常用的糖苷外切酶包括用于去半乳糖基化的半乳糖苷酶，以及用于游离多聚糖、糖蛋白或细胞去唾液酸化的唾液酸酶（神经氨酸酶）

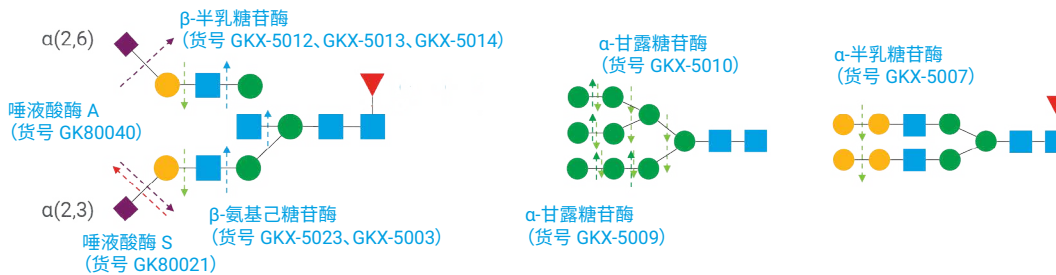
参见酶选择指南，出版号 5994-2202ZHCN

选定内切糖苷酶 (A) 和外切糖苷酶 (B) 的特异性

A. 内切糖苷酶



B. 外切糖苷酶



AdvanceBio 糖谱分析色谱柱

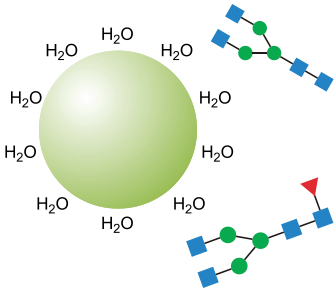
用于从糖蛋白（包括单克隆抗体）中选择性地去除 N-糖的 AdvanceBio 糖谱分析色谱柱、标准品和样品前处理产品。

分析速度 — 1.8 μm 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 μm 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 — 使用一个货号就可订购用于蛋白质溶解到 2-AB 标记的多聚糖纯化的整个样品前处理工作流程的产品，以及针对样品前处理工作流程中每个阶段的试剂盒，通用性更强。



色谱柱性能指标

键合相	内径 (mm)	颗粒	封端	pH 稳定性	操作温度	压力限值
酰胺 HILIC	2.1 和 4.6	1.8 μm , 全多孔	否	2-7	40 °C	1200 bar
酰胺 HILIC	2.1 和 4.6	2.7 μm , 表面多孔	否	2-7	40 °C	600 bar

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 $\times$ 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

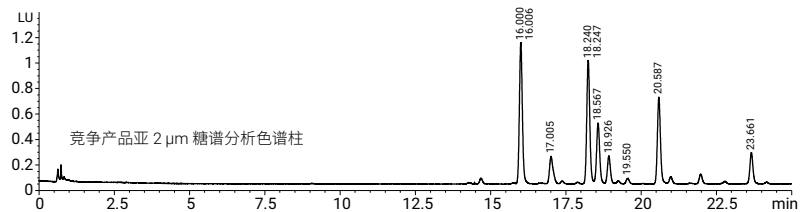
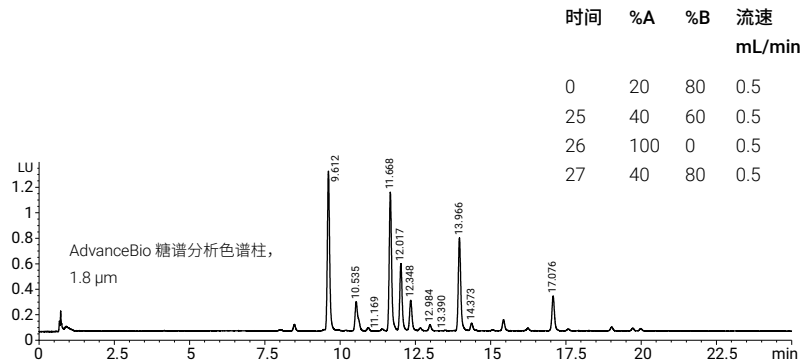
样品恒温箱: 10 $^{\circ}\text{C}$

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 (货号 GKS0-005)



与 2.1 $\times$ 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 μm 填料色谱柱。

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 $\times$ 150 mm, 1.8 μm

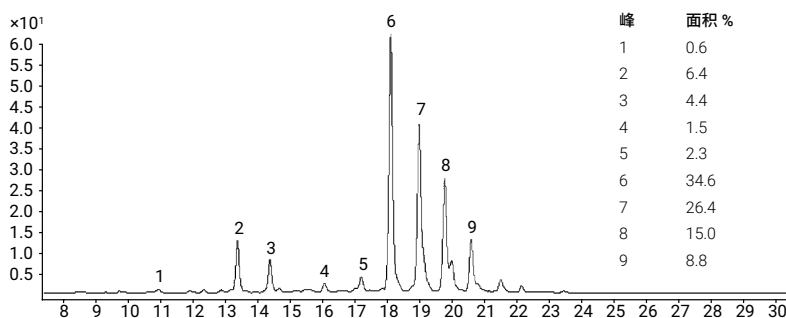
仪器: 1290 Infinity 二元液相色谱系统

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 和靶向 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) 但无岩藻糖的复杂二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

胎球蛋白梯度	
初始流速	0.5 mL/min
梯度	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
	51 min 0% B
	51.01 min 75% B, 流速 0.25 mL/min
52.00 min, 流速 0.5 mL/min 流速	
停止时间	52 min
后运行时间	20 min
进样量	1 µL
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)

胎球蛋白 N-糖结构的详细信息

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

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 μm 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 Å 颗粒，可用于分析各种大小的肽
- 1.8 μm 颗粒提供 UHPLC 性能以及在 1200 bar 下的稳定性
- 与 ZORBAX RRHD 300 Å 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)	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

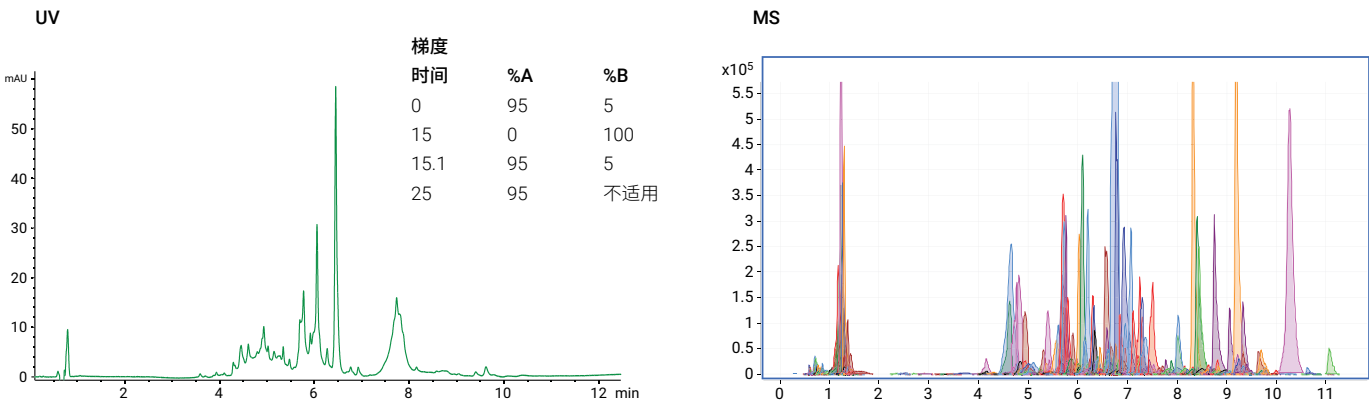
流速: 0.4 mL/min

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 显示了使用 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 显示了匹配的 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。

产品订购信息

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

规格 (mm)	货号
2.1 $\times$ 150	859700-913
2.1 $\times$ 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)	货号
4.6 $\times$ 250	680975-913
4.6 $\times$ 150	683975-913
4.6 $\times$ 100	685975-913
2.1 $\times$ 250	651750-913
2.1 $\times$ 150	683775-913
2.1 $\times$ 100	685775-913
2.1, 2.7 μm , 快速保护柱	821725-906

GlykoPrep

描述	货号
使用 InstantPC 的 GlykoPrep 快速 N-糖前处理，24 ct	GP24NG-PC
使用 2-AB 的 GlykoPrep 快速 N-糖前处理，24 ct	GP24NG-AB
使用 InstantPC 的 GlykoPrep 快速 N-糖前处理，96 ct	GP96NG-PC
使用 2-AB 的 GlykoPrep 快速 N-糖前处理，96 ct	GP96NG-AB
使用 InstantPC 的 GlykoPrep 快速 N-糖前处理，96 ct，AssayMAP Bravo 自动化	GPPNG-PC
使用 2-AB 的 GlykoPrep 快速 N-糖前处理，96 ct，AssayMAP Bravo 自动化	GPPNG-AB
GlykoPrep 启动实验器皿套装	AM200
GlykoPrep 微量管适配器套装	AM400

Gly-X

使用 InstantPC 的 AdvanceBio Gly-X N-糖前处理，24 ct	GX24-IPC
使用 2-AB Express 的 AdvanceBio Gly-X N-糖前处理，24 ct	GX24-2AB
使用 InstantPC 的 AdvanceBio Gly-X N-糖前处理，96 ct	GX96-IPC
使用 2-AB Express 的 AdvanceBio Gly-X N-糖前处理，96 ct	GX96-2AB
AdvanceBio Gly-X 多管真空装置垫片	GX100

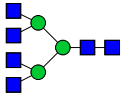
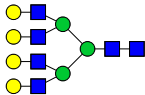
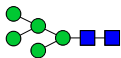
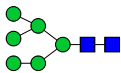
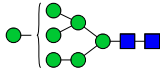
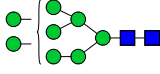
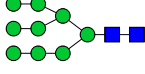
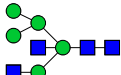
唾液酸分析

AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒，24 ct	GS24-SAP
AdvanceBio 总唾液酸定量分析试剂盒，48 ct	GS48-SAQ
AdvanceBio 总唾液酸定量分析试剂盒，96 ct	GS96-SAQ

多聚糖	ProZyme 名称	Oxford 名称 ¹	CFG 结构	未标记 ²	InstantPC	InstantAB	2-AB	2-AA	APTS
复合型天然 N-糖									
G0-N	NGA2-N	A1			GKPC-401		GKSB-401		GKSP-401
G0	NGA2	A2		GKC-004300	GKPC-301	GKIB-301	GKSB-301	GKSA-301	GKSP-301
G0F-N	NGA2F-N	F(6)A1			GKPC-402		GKSB-402		GKSP-402
G0F	NGA2F	F(6)A2		GKC-004301	GKPC-302	GKIB-302	GKSB-302	GKSA-302	GKSP-302
G0FB	NGA2FB	F(6)A2B		GKC-004311			GKSB-303		
G1	NA2G1	A2G1		GKC-014300	GKPC-317	GKIB-317	GKSB-317		GKSP-317
G1F	NA2G1F	F(6)A2G1		GKC-014301	GKPC-316	GKIB-316	GKSB-316	GKSA-316	GKSP-316
G2	NA2	A2G(4)2		GKC-024300	GKPC-304	GKIB-304	GKSB-304	GKSA-304	GKSP-304
G2F	NA2F	F(6)A2G(4)2		GKC-024301	GKPC-305	GKIB-305	GKSB-305	GKSA-305	GKSP-305
G2FB	NA2FB	F(6)A2BG(4)2		GKC-024311			GKSB-306		
G1S1 α(2,3)		A2G(4)1S(3)1			GKPC-329				

多聚糖	ProZyme 名称	Oxford 名称 ¹	CFG 结构	未标记 ²	InstantPC	InstantAB	2-AB	2-AA	APTS
G1S1 α(2,6)		A2G(4)1S(6)1			GKPC-319				
G1FS1 α(2,3)		FA2G(4)1S(3)1			GKPC-330				
G1FS1 α(2,6)		FA2G(4)1S(6)1			GKPC-320				
G2S1 α(2,3)	A1(α2,3)	A2G(4)2S(3)1			GKPC-321				
G2S1 α(2,6)	A1(α2,6)	A2G(4)2S(6)1		GKC-124300	GKPC-311	GKIB-311	GKSB-311	GKSA-311	GKSP-311
G2FS1 α(2,3)	A1F(α2,3)	F(6) A2G(4)2S(3)1			GKPC-325				
G2FS1 α(2,6)	A1F(α2,6)	F(6) A2G(4)2S(6)1		GKC-124301	GKPC-315	GKIB-315	GKSB-315	GKSA-315	GKSP-315
G2S2 α(2,3)	A2(α2,3)	A2G(4)2S(3)2			GKPC-322				
G2S2 α(2,6)	A2(α2,6)	A2G(4)2S(6)2		GKC-224300	GKPC-312	GKIB-312	GKSB-312	GKSA-312	GKSP-312
G2FS2 α(2,3)	A2F(α2,3)	F(6) A2G(4)2S(3)2			GKPC-323				
G2FS2 α(2,6)	A2F(α2,6)	F(6) A2G(4)2S(6)2		GKC-224301	GKPC-313	GKIB-313	GKSB-313	GKSA-313	GKSP-313
G2F w/2 α-gal	NA2Ga2F	F(6) A2G(4)2Ga(3)2			GKPC-318		GKSB-318		GKSP-318
G1F w/1 α-gal	NA2G 1FGa1	F(6) A2G(4)1Ga(3)1			GKPC-403				
G2F w/1 α-gal	NA2FGa1	F(6) A2G(4)2Ga(3)1			GKPC-404				
A3	NGA3	A3		GKC-005300		GKIB-307	GKSB-307	GKSA-307	
G3	NA3	A3G(4)3		GKC-035300			GKSB-308	GKSA-308	
G3S3 α(2,6)	A3(α2,6)	A3G(4)3S(6)3		GKC-335300			GKSB-314		

8 糖基化表征

多聚糖	ProZyme 名称	Oxford 名称 ¹	CFG 结构	未标记 ²	InstantPC	InstantAB	2-AB	2-AA	APTS
A4	NGA4	A4		GKC-006300			GKSB-309	GKSA-309	
G4	NA4	A4G(4)4		GKC-046300			GKSB-310		
高甘露糖型天然 N-糖									
Man5	MAN-5	M5		GKM-002500	GKPC-103	GKIB-103	GKSB-103	GKSA-103	GKSP-103
Man6	MAN-6	M6		GKM-002600	GKPC-104	GKIB-104	GKSB-104	GKSA-104	GKSP-104
Man7	MAN-7	M7		GKM-002700	GKPC-105	GKIB-105	GKSB-105	GKSA-105	GKSP-105
Man8	MAN-8	M8		GKM-002800	GKPC-106	GKIB-106	GKSB-106	GKSA-106	GKSP-106
Man9	MAN-9	M9		GKM-002900	GKPC-107	GKIB-107	GKSB-107	GKSA-107	GKSP-107
杂合型天然 N-糖									
杂合型	HYBR	M5A1B					GKSB-111		
天然 N-糖核心									
NF	NF			GKR-001001					
NN	NN			GKR-002000			GKSB-100		
NNF	NNF			GKR-002001					
Man1	MNN	M1		GKR-002100					
Man1F	MNNF	F(6)M1		GKR-002101					
Man3				GKR-002300			GKSB-101		
Man3F				GKR-002301			GKSB-102		

多聚糖	未标记	InstantPC	InstantAB	2-AB	2-AA	APTS
N-糖文库						
人 IgG N-糖文库	GKLB-005	GKPC-005	GKIB-005	GKSB-005	GKSA-005	GKSP-005
CHO mAb N-糖文库		GKPC-020				
CHO mAb N-糖文库 + CHO mAb 糖蛋白		GKPC-020-P				
人 α 1-酸糖蛋白 N-糖文库	GKLB-001		GKIB-001	GKSB-001	GKSA-001	
牛胎球蛋白 N-糖文库	GKLB-002		GKIB-002	GKSB-002	GKSA-002	
RNA 酶 B N-糖文库 (高甘露糖)			GKIB-009			
二天线型与高甘露糖分区文库			GKIB-520	GKSB-520		GKSP-520
唾液酸化二天线型 N-糖文库			GKIB-232	GKSB-232		GKSP-232
α (2,6) 唾液酸化二天线型 N-糖文库				GKSB-262		GKSP-262
α (2,3) 唾液酸化三天线型 N-糖文库		GKPC-233	GKIB-233	GKSB-233		GKSP-233
α (2,6) 唾液酸化三天线型 N-糖文库		GKPC-263		GKSB-263		GKSP-263
α (2,3) 唾液酸化四天线型 N-糖文库		GKPC-234	GKIB-234	GKSB-234		GKSP-234
α (2,6) 唾液酸化四天线型 N-糖文库		GKPC-264		GKSB-264		GKSP-264
比对标准品						
葡萄糖单元 (GU) 分子量标准品		GKPC-503	GKIB-503	GKSB-503	GKSA-503	GKSP-503
用于毛细管电泳 (CE) 的迁移内标						GKSP-500

ZORBAX RRHD 300-HILIC 1.8 μ m 色谱柱

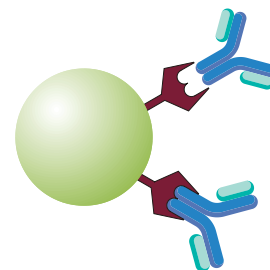
规格 (mm)	内径 (mm)	粒径 (μ m)	货号
ZORBAX RRHD 300-HILIC	2.1 $\times$ 100	1.8	858750-901
ZORBAX RRHD 300-HILIC	2.1 $\times$ 50	1.8	857750-901

技巧和工具

访问安捷伦在线商城，直接购买安捷伦色谱柱和消耗品：www.agilent.com/chem/store

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液兼容性的更多信息，请参见：**5991-2990CHCN**。

色谱柱性能指标

规格	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
	储存温度: 2–8 °C
推荐 pH	运行范围: 2–13
	原位清洗: 1–14
结构材料	卡套: 不锈钢
	填充: 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 重组 Protein A 和天然 Protein A: 白色
	Bio-Monolith Protein G: 橙色
保质期/有效期	12 个月

技巧和工具

有关详细信息, 可参见:

稳定可靠的重组 Protein A Monolith 色谱柱, 用于抗体滴度测定 (出版物 **5994-3088ZHCHN**)

使用 Agilent Bio-Monolith rProtein A 色谱柱可在 60 秒内测定 mAb 滴度 (出版物 **5994-3969ZHCHN**)

mAb Titer Analysis with the Agilent Bio-Monolith Protein A Column (使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱进行 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 (出版物 **5991-2990CHCHN**)

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**)

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



重组 Protein A 与天然 Protein A 色谱柱之间的桥接研究

色谱柱: Bio-Monolith 重组 Protein A 5190-6903 4.95 × 5.2 mm
Bio-Monolith Protein A 5069-3639 4.95 × 5.2 mm

流动相: A: 磷酸钠缓冲液, 50 mmol/L, pH 7.4
B: 柠檬酸, 0.1 mol/L, pH 2.6

流速: 1.5 mL/min

进样量: 5–50 µL (上样量 25 µg)

检测器: UV, 280 nm

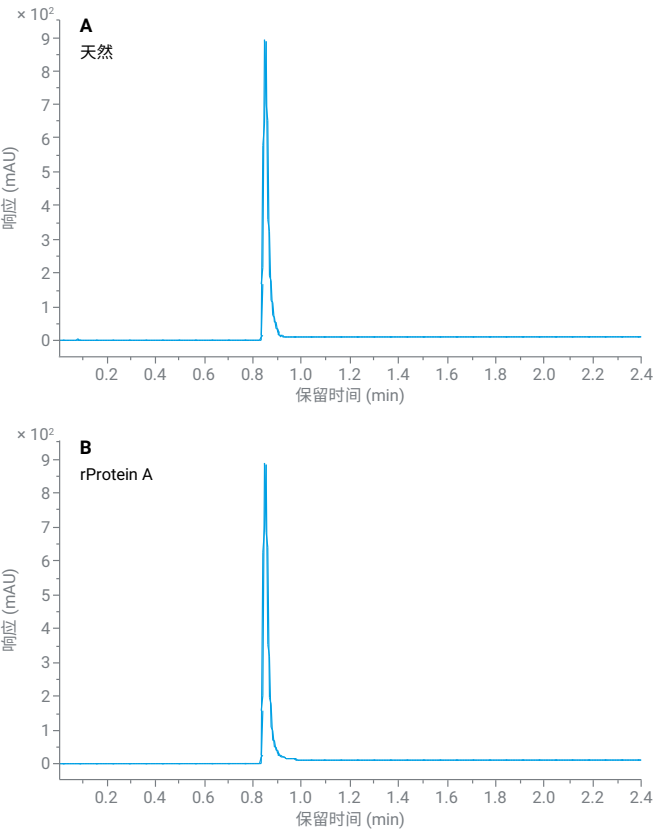
梯度: 0.5 min 内 0% B, 0.6–2.6 min 时 100% B, 2.7–4 min 时 0% B

温度: 25 °C

样品: 中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞培养上清液中的重组 IgG

仪器: 1290 Infinity II 生物液相色谱系统

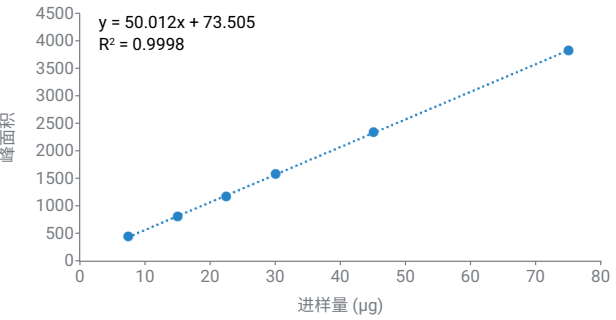
保留时间



	天然	rProtein A
保留时间 (min)	0.850 ± 0.001	0.850 ± 0.001
峰高	880.9 ± 8.1	881.8 ± 5.3

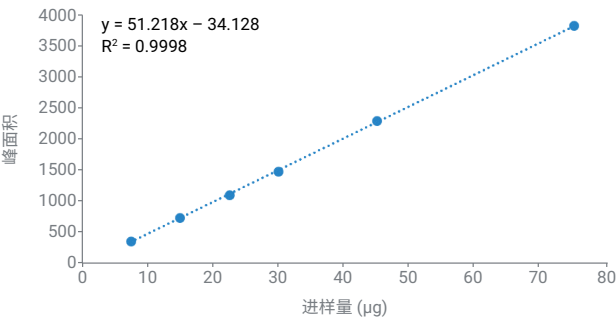
天然 Protein A 色谱柱和 rProtein A 色谱柱的色谱图和 mAb 峰结果比较。

线性响应



加标样品	实测值	偏差 (%)
25 µg (经纯化)	25.25 µg	0.99%
25 µg (上清液中)	26.09 µg	4.35%

rProtein A 色谱柱: 线性响应



加标样品	实测值	偏差 (%)
25 µg (经纯化)	24.94 µg	-0.23%
25 µg (上清液中)	25.78 µg	3.12%

天然 Protein A 色谱柱: 线性响应

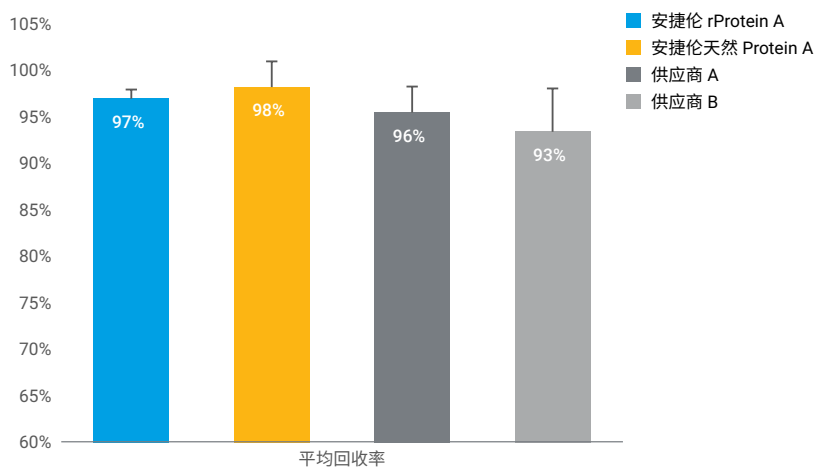
回收率分析

除了比较天然 Protein A 和 rProtein A 色谱柱的回收率外，本研究还比较了两种非安捷伦的 rProtein A 色谱柱。流速调整为 2 mL/min，以适应非安捷伦色谱柱的运行流速。其他 mAb 样品包括：

- Agilent-NISTmAb（货号：5191-5744）
- Sigma-Aldrich 的 Sigma SiLu mAb（SiLu Lite，货号：MSQC4）

不使用色谱柱（使用两通接头），通过进样纯化的 mAb 样品获得 mAb 峰的基线曲线下面积 (AUC)，纯化的 mAb 样品用流动相 B 稀释。使用色谱柱，获得洗脱的 mAb 的 AUC。mAb 样品量与测定基线 AUC 时的用量相同。

回收率 (%) = (洗脱的 mAb 的 AUC/基线 AUC) × 100



mAb 回收率结果比较

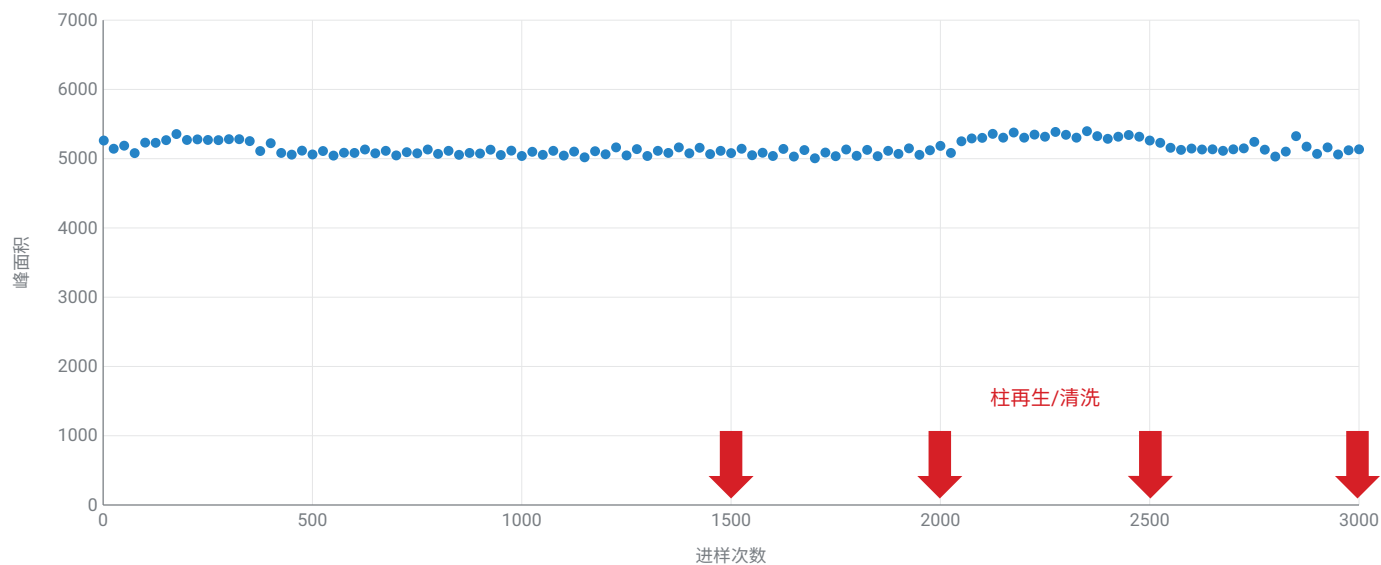
rProtein A 色谱柱的平均回收率比天然 Protein A 色谱柱低 1%，但仍优于两种非安捷伦色谱柱。虽然天然 Protein A 色谱柱的回收率略占优势，但在 3 个 mAb 样品中，rProtein A 色谱柱的回收率最稳定。

稳定、可靠的抗体滴度测定

方法条件

HPLC 条件

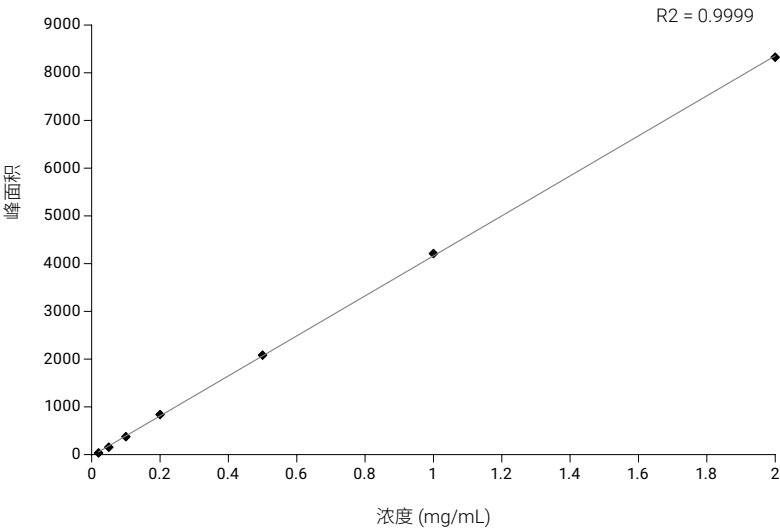
色谱柱	Bio-Monolith Protein A, 4.95 × 5.2 mm (货号 5190-6903)	
结合缓冲液 (洗脱液 A)	50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.4	
洗脱缓冲液 (洗脱液 B)	100 mmol/L 柠檬酸, pH 2.6	
清洗缓冲液	含 1 mol/L NaCl 的 100 mmol/L 磷酸钠, pH 7.4 含 20% 异丙醇的 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.4	
梯度曲线	时间	%B
	0.0–0.5	0 (结合)
	0.6–1.8	100 (洗脱)
	1.9–4.0	0 (再平衡)
流速	1 mL/min	
柱温	24 °C	
检测	UV, 280 nm	
进样量	根据需要 (1–20 µL)	



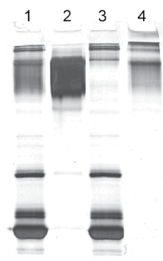
快速人源化单克隆抗体定量分析

色谱柱：	Bio-Monolith Protein A 5069-3639 5.2 × 4.95 mm			温度：	室温
流动相：	A: 50 mmol/L 磷酸盐, pH 7.4 B: 100 mmol/L 柠檬酸, pH 2.8			检测器：	UV, 280 nm
流速：	1 mL/min			馏分收集：	基于时间
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)			样品：	IgG1 (1~20 mg/mL) 和包含 IgG1 的 CHO 细胞上清液 (最多 20 mg/mL 总蛋白质)
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	

	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

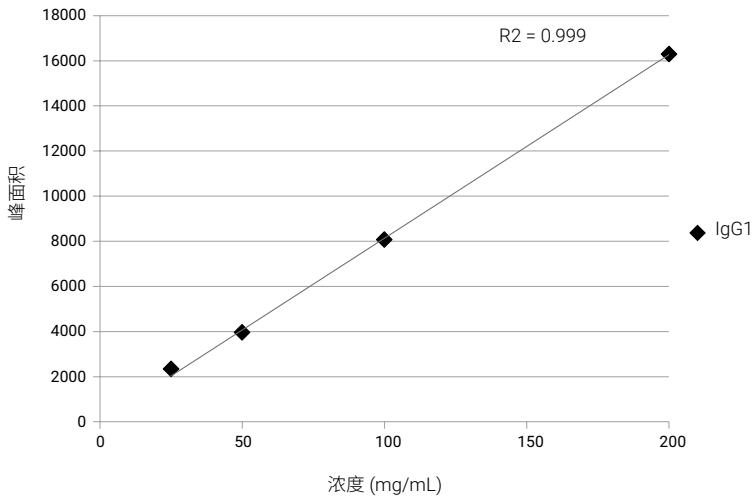


经修饰的人源化曲妥珠单抗的校准曲线
(图 A: 0~2 mg/mL, B: 25~200 mg/mL)



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

分离组分的 SDS PAGE 分析



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 mol/L, pH 2.8

流速: 1.0、1.5 和 2.0 mL/min

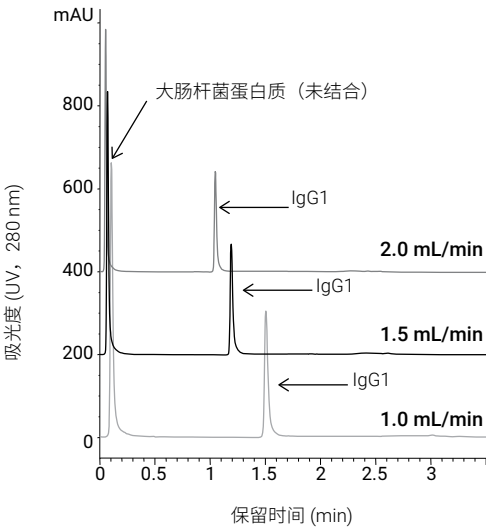
进样量: 4 µL (含 2.5 mg/mL IgG1 的 20 mg/mL 大肠杆菌上清液)
检测器: UV, 280 nm

梯度: 0.5 min 内 0% B, 0.6–1.7 min 时 100% B, 1.8–3 min 时 0% B

温度: 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



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

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。

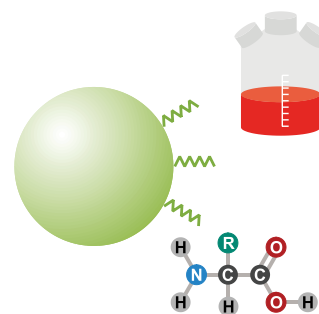
产品订购信息

Bio-Monolith Protein A 和 Protein G

描述	货号
Bio-Monolith 重组 Protein A, 4.95 × 5.2 mm	5190-6903
Bio-Monolith Protein G, 4.95 × 5.2 mm	5190-6900
Bio-Monolith Protein A, 4.95 × 5.2 mm	5069-3639

细胞培养基和氨基酸分析

安捷伦的 AdvanceBio 色谱柱能够让您的生物技术实验室更轻松的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
- 大幅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

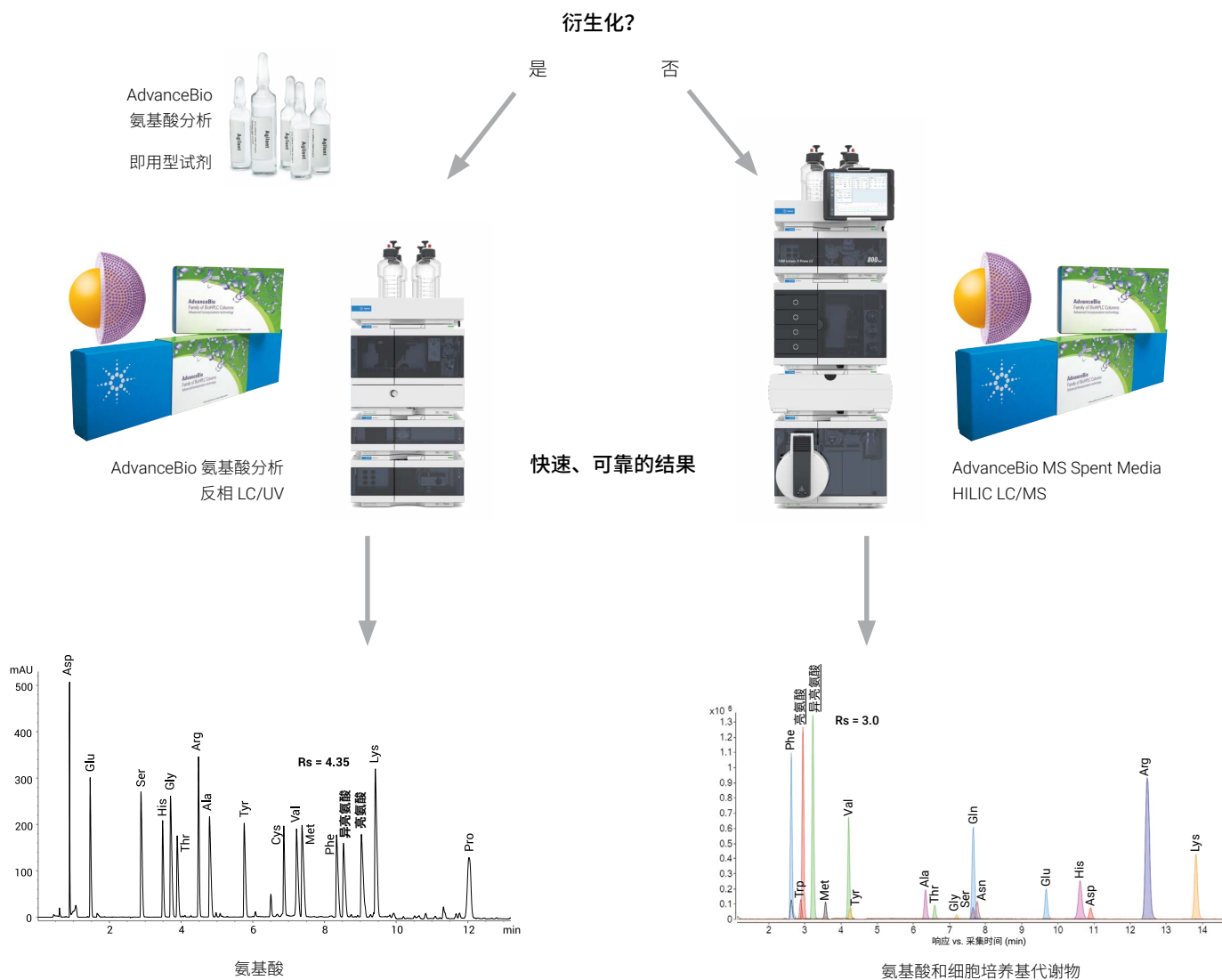
- 用一种方法分析氨基酸和其他细胞培养基代谢物：HILIC 液相色谱分离结合质谱检测
- 无需对样品进行衍生化处理
- 使用任意 LC/MS 系统
- 采用质谱检测，无需达到基线色谱分离

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

安捷伦培养基消耗分析解决方案



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	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

如需分步指导并了解安捷伦端到端解决方案，请访问：

www.agilent.com/chem/aaa-how-to-guide

LC/UV

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

柱温: 30 °C

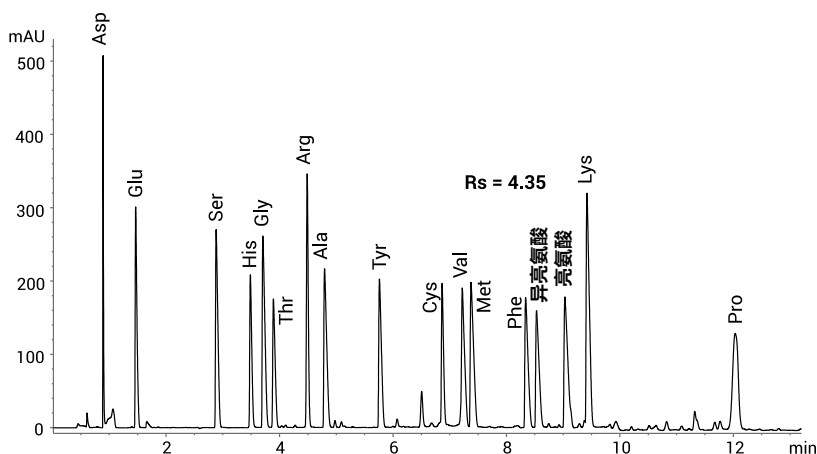
流动相: 低 pH, 正离子模式质谱检测:
A = 10 mmol/L Na₂HPO₄, 10 mmol/L Na₂B₄O₇,
pH 8.2 B = 乙腈:甲醇:水, 45:45:10 (v:v:v)

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货号中。各种组分可根据需要重新订购。

每种氨基酸标准品中包含以下氨基酸:

- | | | |
|----------|----------|----------|
| - 甘氨酸 | - L-丝氨酸 | - L-精氨酸 |
| - L-半胱氨酸 | - L-丙氨酸 | - L-苏氨酸 |
| - L-组氨酸 | - L-苯丙氨酸 | - L-缬氨酸 |
| - L-酪氨酸 | - L-谷氨酸 | - L-赖氨酸 |
| - L-亮氨酸 | - L-脯氨酸 | - L-天冬氨酸 |
| - L-甲硫氨酸 | - L-异亮氨酸 | |



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 为培养基消耗分析提供了一套完整的解决方案。

AdvanceBio MS Spent Media 培养基分析是 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卡套组成惰性流路，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 µm 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	粒径	温度上限	pH 范围	压力限值
HILIC-Z	100 Å	2.7 µm	80 °C (pH 7)	3.0-11.0 (35 °C)	600 bar

技巧和工具

有关 HILIC 最佳实践，请参见：亲水相互作用色谱方法开发和故障排除 (出版物 5991-9271ZH-CN)。

LC/MS

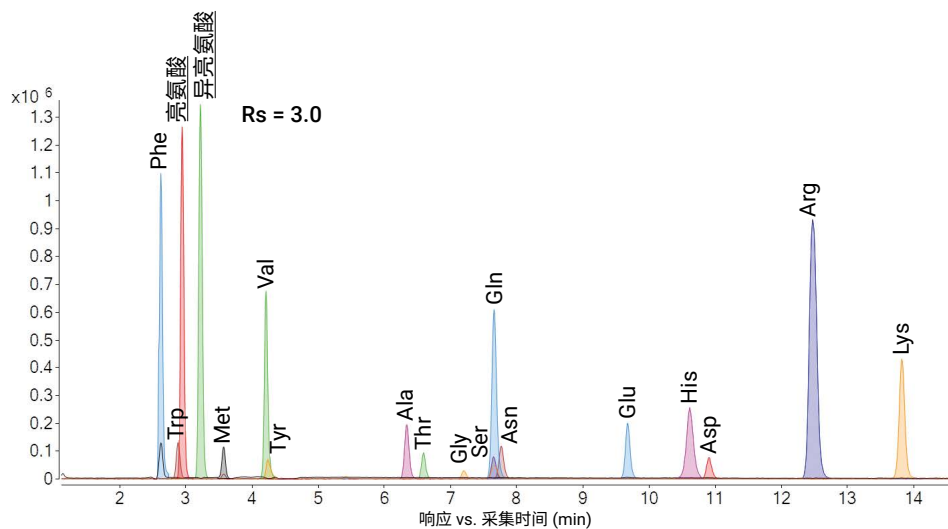
色谱柱: Agilent AdvanceBio
MS Spent Media
2.1 × 100 mm
货号 675775-901

柱温: 30 °C

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。

流速: 0.5 mL/min
梯度: 时间 (min) %B (低 pH, 正离子模式) %B (高 pH, 负离子模式)
0 1.00 100
15 80 80
15.5 100 100
20 100 100

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



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 Na₂HPO₄, pH 7.8

B: ACN:MeOH:水, 45:45:10 v/v

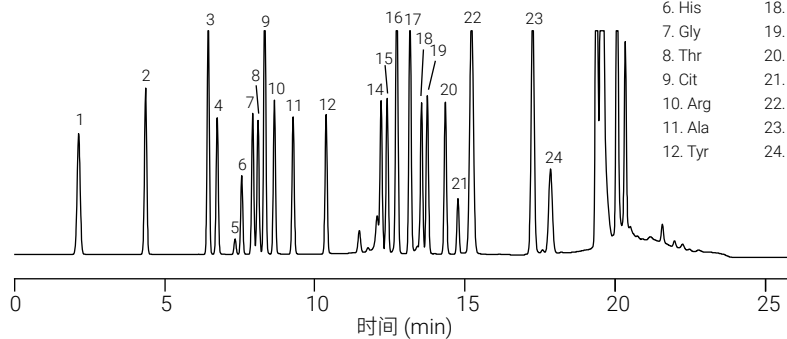
流速: 2 mL/min

温度: 40 °C

检测器: 荧光

样品: 24 种氨基酸

- | | |
|---------|---------|
| 1. Asp | 13. Cys |
| 2. Glu | 14. Val |
| 3. Asn | 15. Met |
| 4. Ser | 16. Nva |
| 5. Gln | 17. Trp |
| 6. His | 18. Phe |
| 7. Gly | 19. Ile |
| 8. Thr | 20. Leu |
| 9. Cit | 21. Lys |
| 10. Arg | 22. Hyp |
| 11. Ala | 23. Sar |
| 12. Tyr | 24. Pro |



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

快速参考指南列出了使您的 Agilent InfinityLab 液相色谱系列产品保持理想状态必备的常用备件。

请访问 www.agilent.com/chem/getguides 下载免费文档

产品订购信息

AdvanceBio 氨基酸分析 (AAA) 柱

描述	货号
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

AdvanceBio 氨基酸分析 (AAA) 标准品和试剂

描述	货号
标准品和试剂盒	5190-9426
试剂盒内容 (可单独订购)	
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



AdvanceBio MS Spent Media

描述	货号
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

ZORBAX 色谱柱

描述	货号
ZORBAX Eclipse 氨基酸分析色谱柱, 80 Å, 4.6 × 150 mm, 5 µm	993400-902
ZORBAX Eclipse 氨基酸分析色谱柱, 80 Å, 4.6 × 150 mm, 3.5 µm	963400-902
ZORBAX Eclipse 氨基酸分析色谱柱, 80 Å, 4.6 × 75 mm, 3.5 µm	966400-902
ZORBAX Eclipse 氨基酸分析色谱柱, 80 Å, 3.0 × 150 mm, 5 µm	961400-302
ZORBAX Eclipse 氨基酸分析色谱柱, 80 Å, 4.6 × 12.5 mm, 5 µm (保护柱 4/包)	820950-931
保护柱卡套	820999-901
ZORBAX Eclipse Plus RRHD, 95 Å, 2.1 × 50, 1.8 µm, 1200 bar	959757-902
ZORBAX Eclipse Plus RRHT, 95 Å, 2.1 × 50, 1.8 µm, 600 bar	959741-902



硼酸盐缓冲液,
100 mL, 5061-3339



氨基酸补充装, 每份 1 g,
5062-2478

蛋白质去除

为了更轻松分离和鉴定血清、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。



安捷伦蛋白质分级分离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、浓缩和分级分离

针对样品的分级分离和脱盐，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、浓缩和分级分离，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，安捷伦还提供用于生物标志物研究中样品制备和其他蛋白质组学应用的经验证试剂，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。

技巧和工具

如需详细了解安捷伦的完整服务，请访问 www.agilent.com/chem/services

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。

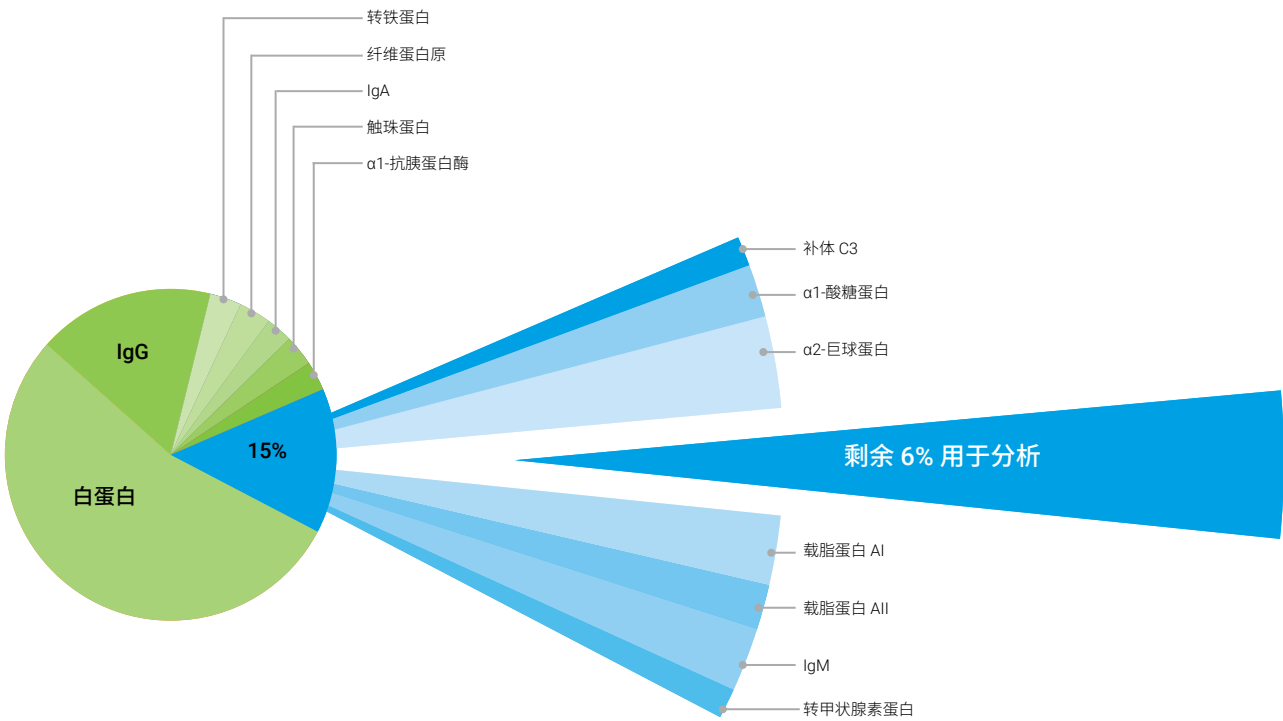
多重亲和去除系统可以使用各种液相柱规格和离心小柱。多重亲和去除系统与安捷伦优化的缓冲液、方便的离心过滤膜和浓缩器结合在一起，形成了一个自动化的一体式蛋白去除解决方案，可以与大多数液相色谱仪（色谱柱）和台式离心机（离心小柱）兼容。

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

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



多重亲和去除系统起始工具包

液相色谱柱和离心小柱试剂起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理想条件。

- 该工具包提供足够的缓冲液 A 和缓冲液 B，用于使用 4.6 × 50 mm 液相色谱柱实现约 200 个样品的去除，使用 4.6 × 100 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）大幅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



液相色谱柱试剂起始工具包，5185-5986

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）

产品订购信息

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	规格	载样量	货号
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, α2-巨球蛋白, α1-酸糖蛋白, IgM, 载脂蛋白 AI, 载脂蛋白 AII, 补体 C3, 甲状腺素运载蛋白	94%	离心小柱	8–10 μL	5188-6560
			4.6 × 50 mm	20 μL	5188-6557
			4.6 × 100 mm	40 μL	5188-6558
			10.0 × 100 mm	250 μL	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 μL	5188-6408
			4.6 × 50 mm	30–35 μL	5188-6409
			4.6 × 100 mm	60–70 μL	5188-6410
			10.0 × 100 mm	250–300 μL	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 μL	5188-5230
			4.6 × 50 mm	15–20 μL	5185-5984
			4.6 × 100 mm	30–40 μL	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 μL	5188-5341
			4.6 × 50 mm	30–40 μL	5188-5332
			4.6 × 100 mm	60–80 μL	5188-5333
			10.0 × 100 mm	高达 340 μL	5188-5336
MARS Human-2	白蛋白, IgG	69%	离心小柱	50 μL	5188-8825
			4.6 × 50 mm	100 μL	5188-8826
MARS Human-1	白蛋白	50%–55%	离心小柱	65 μL	5188-5334
			4.6 × 50 mm	130 μL	5188-6562
MARS Mouse-3	白蛋白, IgG, 转铁蛋白	80%	离心小柱	25–30 μL	5190-2534
			4.6 × 50 mm	37–50 μL	5188-5217
			4.6 × 100 mm	75–100 μL	5188-5218

技巧和工具

访问安捷伦在线商城，直接购买安捷伦色谱柱和消耗品：www.agilent.com/chem/store

多重亲和去除系统起始工具包

描述	货号
高浓度样品稀释缓冲液, 50 mL	5188-8283
液相色谱柱试剂起始工具包, 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 µm 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 µm 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
柱帽和堵头, 6/包	5188-5252
PTFE 针头, Luer-Lok, 10/包	5188-5253



Luer-Lok 注射器, 5188-5250



Luer-Lok 转接头, 5188-5249



Luer-Lok 针头, 5188-5253

寡核苷酸

前言

近年来，人们对寡核苷酸的关注越来越多，包括各种大小（从 10–20 个核苷酸到成百上千个核苷酸）的 DNA 和 RNA。较小的分子可通过合成制得，并且可能含有多种杂质，包括因缺失和插入而形成的各种非常相似的序列和包含不同化学修饰（无论是有意还是副反应造成的意外化学修饰）的序列。mRNA 等较大的序列通过酶促反应产生，可能含有不同的杂质。

因此，利用液相色谱分析和纯化寡核苷酸面临着独特的挑战。磷酸骨架意味着分子的亲水性非常强，导致反相色谱分析并不会像预期的那样简单。另外，这些分子会与互补序列形成强氢键（形成熟悉的经典双螺旋结构所必需），可能需要在更高的温度下进行色谱分析以解离这些二级结构。



纯化注意事项

寡核苷酸应用广泛，所需的纯度可能决定了纯化所需的方法。在一些情况下，例如 PCR（聚合酶链反应）引物，寡核苷酸的大小相对较小（约 20–30 个核苷酸），可以使用被称为“trityl on”（三苯甲基保护）纯化的固相萃取方法完成纯化。对于其他应用，或者对于杂质与产品非常相似的较大的寡核苷酸，首选 HPLC 方法。

有关 HILIC 色谱柱的选择，我们建议使用第 123 页介绍的 AdvanceBio 糖谱分析色谱柱（酰胺基 HILIC 固定相）或第 146 页介绍的 AdvanceBio MS Spent Media 色谱柱（两性离子 HILIC 固定相）。

寡核苷酸分析和纯化最常用的色谱技术有：

- 离子对反相色谱 — 将阳离子碱（例如醋酸三乙胺 (TEAA)）与带负电荷的磷酸骨架进行离子配对，形成足以保留在传统反相色谱柱上的疏水性复合物。然后，所得复合物很容易保留在传统反相色谱柱上。非常平缓的有机改性剂增加梯度将使寡核苷酸以非常出色的分离度洗脱
- 离子交换色谱 — 强阴离子交换剂将与寡核苷酸带负电荷的磷酸骨架相互作用。盐浓度增加梯度将确保各种寡核苷酸依次洗脱并充分分离

DNA 和 RNA 寡核苷酸色谱柱的选择

DNA 和 RNA 寡核苷酸色谱柱的选择

技术	安捷伦色谱柱	说明
离子对反相色谱	AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱	高效 2.7 μm 和 4 μm 表面多孔颗粒填料，适用于寡核苷酸及其杂质的高分离度分析。
	PLRP-S	大孔聚合物颗粒填料具有各种粒径和孔径，可提供更出色的 pH 和温度稳定性。
阴离子交换	Agilent Bio IEX	具有亲水性涂层的无孔聚合物颗粒填料消除了传质问题，提供了出色的性能。提供各种填料粒径，适用于分析级和实验室规模的制备应用。
	PL-SAX	具有强阴离子交换官能团的全多孔聚合物颗粒填料可用于从分析级到制备级规模的应用，包括散装填料。

在选择适用的技术时，应考虑多项因素。在确定是否需要使用某项技术进行制备级纯化时，意味着要选择既能提供更高容量又能达到所需纯度的色谱柱，同时还要求色谱柱或固定相能够放大到必要的尺寸。如果要使用 MS 检测，则有必要使用流动相兼容的方法。

由于各种寡核苷酸的大小不尽相同，因此选择孔径足以允许所有分子扩散的色谱柱固定相至关重要。如果孔径过大，则会将因为表面积减小而损失一部分分离能力。如果孔径太小，大分子将无法渗透进颗粒填料中。但是，当使用非多孔颗粒填料进行分析时，是一个例外情况。

技巧和工具

如需了解有关安捷伦用于寡核苷酸分离的液相色谱柱产品组合的更多信息（包括工作流程订购指南和培训材料），请参见 [explore.agilent.com/oligonucleotide-chromatography-solutions-cn](https://www.agilent.com/oligonucleotide-chromatography-solutions-cn)。

离子对反相色谱分离

AdvanceBio 寡核苷酸

想要成功分离脱保护的合成寡核苷酸，您需要使用具有高分离能力并且可以耐受严苛条件的色谱柱。

Agilent AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱采用高效的 2.7 µm 和 4 µm 表面多孔 Poroshell 填料，提供从 2.1 mm 内径的分析柱到 21.2 mm 内径的制备柱。采用安捷伦独特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。

这些填料所提供的独特的孔径分布和较短的扩散距离，可用于 LC-UV (LC-DAD) 和 LC-MS 应用，或用作 2D-LC 实验的第二维以实现分离，且能够高分离度分离多达约 100–150 个核苷酸的寡核苷酸。

尽管 AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱的孔径不足以分析 mRNA 等非常大的寡核苷酸（需要使用大孔径 PLRP-S 填料），但可用于分析 mRNA 加帽，这是 mRNA 类生物治疗性疫苗的一种关键质量属性。

色谱柱性能指标

键合相	粒径	孔径	温度上限	pH 范围	封端	压力限值
C18	2.7 µm	100 Å	65 °C	3.0–11.0	双封端	600 bar
C18	4 µm	100 Å	65 °C	3.0–11.0	双封端	600 bar

技巧和工具

如需详细了解不同的离子对试剂对寡核苷酸分离的影响，请参见应用简报 **5994-2957ZHCN**。

色谱柱: AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱**2.1 × 50 mm****(货号 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

温度: 65 °C

检测: UV 260 nm

检测: MS

最小范围: 400 m/z

最大范围: 1700 m/z

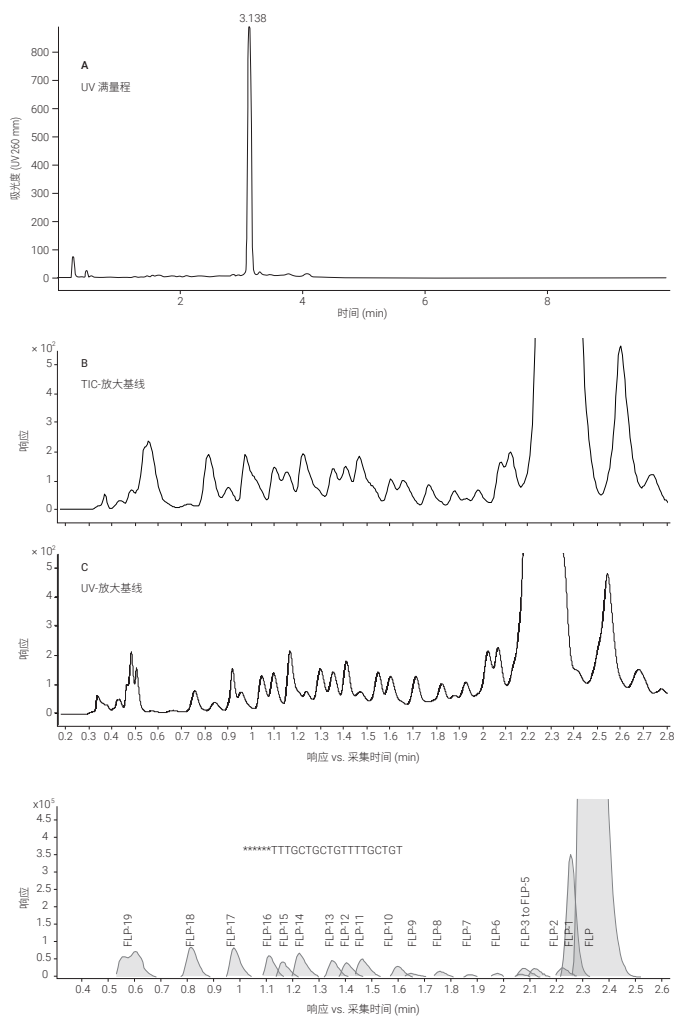
扫描速率: 3.00 幅谱图/秒

离子极性: 负

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

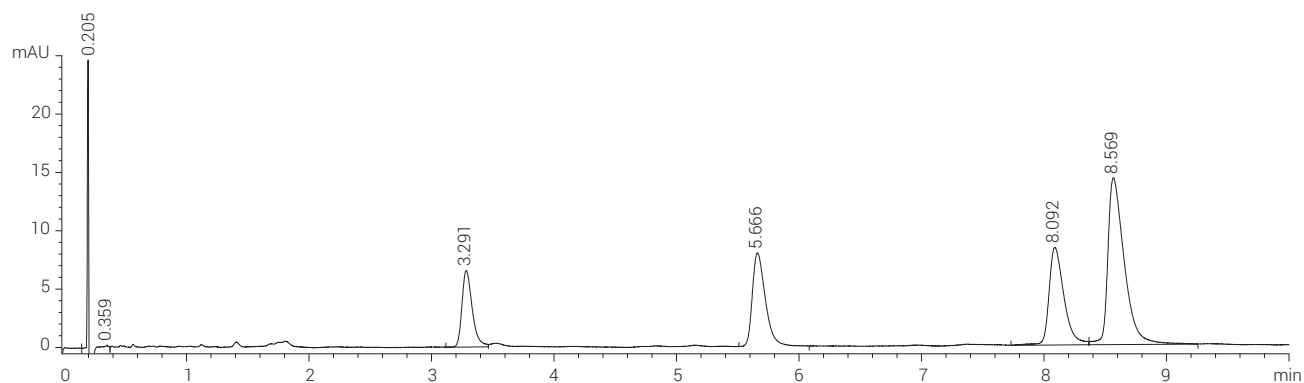
AdvanceBio 寡核苷酸标准品

为确保分离性能，每一批次的 AdvanceBio 寡核苷酸填料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
(货号 659750-702)

样品： 安捷伦寡核苷酸分离度标准品（货号 5190-9028）
温度： 65 °C
进样量： 0.5 µL
检测： UV 260 nm

流动相： A: 100 mmol/L TEAA 水溶液
B: 100 mmol/L TEAA 的乙腈溶液
梯度： 12 min 内 B 由 6% 升至 8%
停止时间： 13 min
后运行： 5 min
流速： 0.6 mL/min

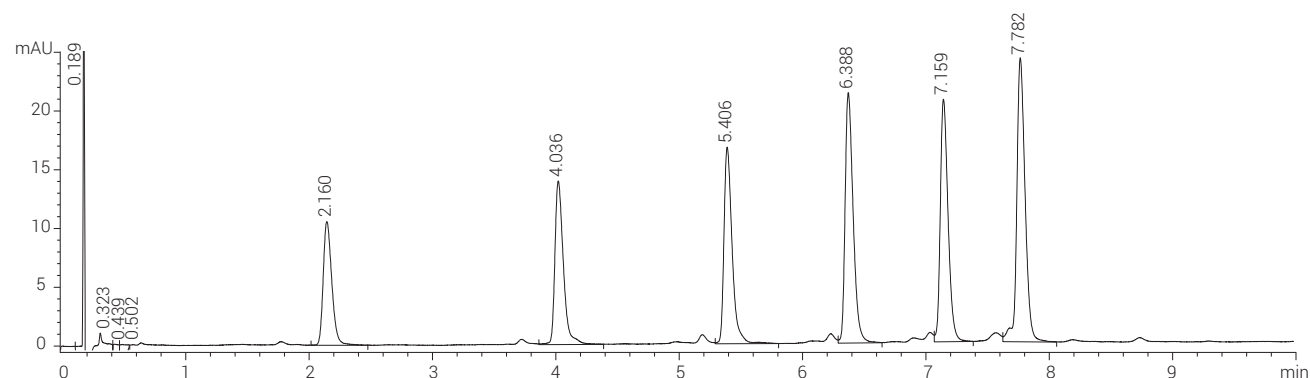


安捷伦还提供含有 15、20、25、30、35 和 40 mer 合成型寡核苷酸的寡核苷酸分子量标准品，是展示色谱柱选择性和重现性的理想工具。

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

样品： 安捷伦寡核苷酸分子量标准品 (货号 5190-9029)
进样量： 10 µL
检测： UV 260 nm

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



技巧和工具

体积排阻色谱 — 适用于脱盐或分离不同类别的寡核苷酸，SEC 无法分离大小相近的分子。这是一种非相互作用技术，且操作非常简单，无需进行梯度洗脱。对于 SEC 色谱柱的选择，我们建议使用第 97 页介绍的 AdvanceBio SEC 色谱柱，对于用于更长寡核苷酸的孔径更大的色谱柱，建议使用第 104 页介绍的 Agilent Bio SEC-5 色谱柱。

HILIC (亲水相互作用液相色谱) — 非常适合分离亲水性极强的分子，例如寡核苷酸。它被视为一种“难以掌控”的技术，因为分离发生在固定相表面所吸附的水层中。这项技术的关键在于确保该吸附层持续形成并保持，因此必须特别注意色谱柱活化。

PLRP-S

- 采用耐用的弹性聚合物颗粒填料，即使在生产级分离的苛刻冲洗条件下，也能实现更长的使用寿命并提供高重现性结果
- 热稳定和化学稳定
- 各种孔径 (100 Å–4000 Å)，适用于从小分子寡核苷酸到大分子多聚核苷酸的分离
- 可从分析型发现阶段全面扩展至几千克级 cGMP 生产

PLRP-S 色谱柱和填料提供多种孔径和粒径，所有填料都具有相同的化学性质和基本吸附特性。固有的疏水化学性质意味着无需反相分离所需要的键合相、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。在我们大量的产品中，还有适用于分析级分离和制备纯化的聚合物反相色谱柱。另外，还可以使用散装填料填充生产型色谱柱。

PLRP-S 聚合物填料具有高 pH 和温度兼容性，对于寡核苷酸纯化和分析至关重要。

容量和分离度是大幅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，能够实现理想流程提供更多选择。填料粒径范围从 3 μm 到 50 μm，适用于从研发阶段的 μg/mg 水平放大到 cGMP 生产的几千克级水平。优异的化学稳定性，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。

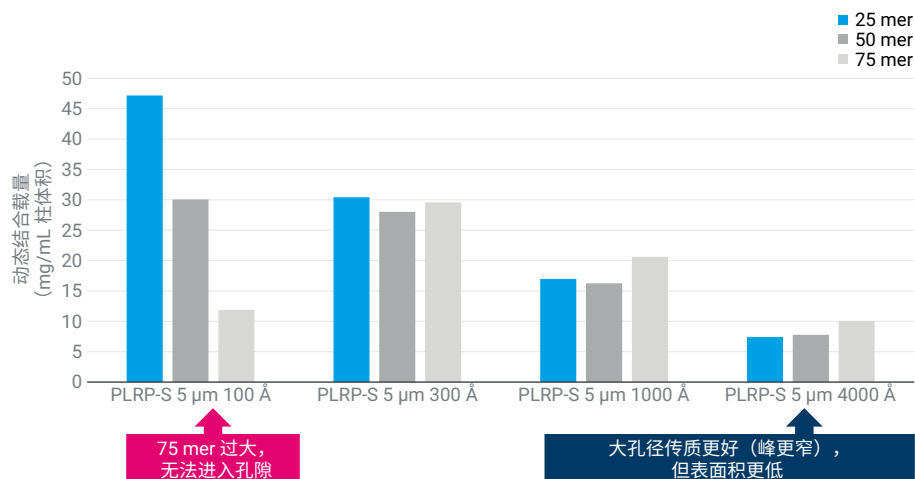


UHPLC 色谱柱性能指标	
pH 范围	1–14
缓冲液含量	无限制
有机改性剂	1%–100%
温度上限	200 °C
最大压力	3 μm: 275 bar/4000 psi
	5 μm、8 μm 和 10 μm: 207 bar/3000 psi
	10–15 μm、15–20 μm 和 30 μm: 103 bar/1500 psi

PLRP-S 应用

孔径	应用
100 Å、300 Å	从小分子寡核苷酸到 CRISPR 向导 RNA
1000 Å	大分子寡核苷酸
4000 Å	非常大的寡核苷酸/mRNA/高速

应根据分子大小选择合适的孔径：大分子需要更大的孔径，以便于分子进入孔中并改善传质。对于全多孔颗粒填料（例如 PLRP-S），孔径越大意味着内表面积越小。小孔径所对应的表面积更大，可提供更高的容量，这是纯化的重要考虑因素。



不同大小寡核苷酸的结合载量对比

技巧和工具

如需了解有关安捷伦寡核苷酸纯化解决方案的更多信息，请参见产品样本 5994-4286ZHCN。

强阴离子交换

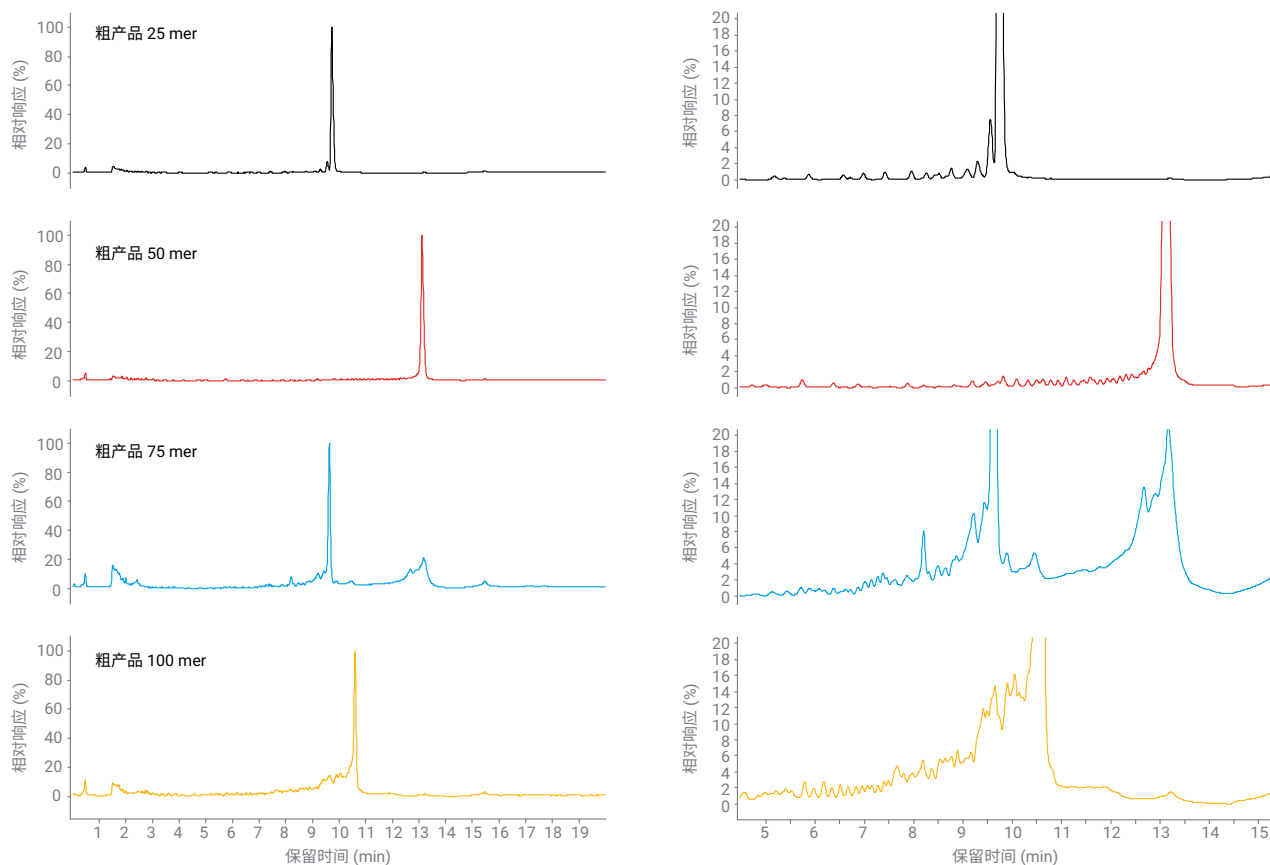
Agilent Bio-IEX

- 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

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、高回收率和高效率分离。

Bio IEX 系列包括用于蛋白质分析的阳离子交换色谱柱, 然而寡核苷酸的磷酸骨架带负电荷, 意味着强阴离子交换 (SAX) 是首选。所有填料均有 1.7、3、5 和 10 μm 非多孔填料规格可供选择。

无孔结构意味着可及性和传质问题被消除, 从而改善了分析分离的分离度; 然而, 整体容量大大降低。



使用 Agilent Bio SAX 5 μm 色谱柱对 25、50、75 和 100 mer 粗产品进行分析分离的色谱图 (左) 以及放大图 (右)。

PL-SAX

- 小粒径全多孔填料提供出色的色谱性能
- 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 是变性条件下脱保护的合成寡核苷酸以及其他酸性肽和蛋白质的阴离子交换 HPLC 分离的理想选择。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 (mm)	粒径 (μm)	孔径 ($\text{\AA}$)	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 $\text{\AA}$ 和 4000 $\text{\AA}$	1–14	80 °C

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，添加了标准片段 10 mer、15 mer、30 mer 和 50 mer (主峰)

色谱柱: PL-SAX 1000 $\text{\AA}$
PL1551-1802

4.6 $\times$ 50 mm, 8 μm

流动相: A: 7:93 v/v ACN:100 mmol/L TEAA, pH 8.5

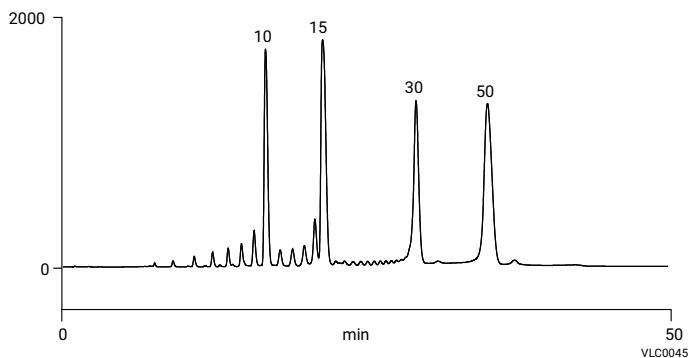
B: 7:93 v/v ACN:100 mmol/L TEAA, 1 mol/L 氯化钠, pH 8.5

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

温度: 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。

产品订购信息

AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱

规格 (mm)	粒径 (μm)	货号
2.1 × 150	2.7	653750-702
2.1 × 100	2.7	655750-702
2.1 × 50	2.7	659750-702
2.1 × 5, 保护柱	2.7	821725-921
4.6 × 150	2.7	653950-702
4.6 × 100	2.7	655950-702
4.6 × 50	2.7	659950-702
4.6 × 5, 保护柱	2.7	820750-921

AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱

规格 (mm)	粒径 (μm)	货号
21.2 × 50	4	671050-702
21.2 × 150	4	671150-702
4.6 × 150	4	693971-702
4.6 × 100	4	695971-702
4.6 × 50	4	699971-702
4.6, 保护柱	4	820750-941

AdvanceBio 寡核苷酸标准品

描述	货号
寡核苷酸分离度标准品	5190-9028
寡核苷酸分子量标准品	5190-9029

PLRP-S HPLC 色谱柱

规格 (mm)	粒径 (μm)	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

(续)

PLRP-S HPLC 色谱柱

规格 (mm)	粒径 (µm)	PLRP-S 100 Å USP L21	PLRP-S 300 Å USP L21	PLRP-S 1000 Å USP L21	PLRP-S 4000 Å USP L21
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	PL1312-1803
1.0 × 50	5	PL1312-1500	PL1312-1501	PL1312-1502	PL1312-1503
1.0 × 10	5			PL1C12-2502	
1.0 × 150	3	PL1312-3300			
1.0 × 50	3	PL1312-1300	PL1312-1301		
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

Prep to Process PLRP-S

规格 (mm)	粒径 (µm)	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		

(续)

Prep to Process PLRP-S

规格 (mm)	粒径 (µm)	PLRP-S 100 Å	PLRP-S 300 Å	PLRP-S 1000 Å	PLRP-S 4000 Å
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

粒径 (µm)	单位	PLRP-S 100 Å	PLRP-S 300 Å	PLRP-S 1000 Å	PLRP-S 4000 Å
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。

Bio SAX HPLC 色谱柱, PEEK

规格 (mm)	粒径 (μm)	压力限值	货号
4.6 × 250	10	275 bar, 4000 psi	5190-2475
4.6 × 50	10	275 bar, 4000 psi	5190-2476
4.6 × 250	5	400 bar, 5800 psi	5190-2467
4.6 × 50	5	400 bar, 5800 psi	5190-2468
2.1 × 250	10	275 bar, 4000 psi	5190-2479
2.1 × 50	10	275 bar, 4000 psi	5190-2480
2.1 × 250	5	400 bar, 5800 psi	5190-2471
2.1 × 50	5	400 bar, 5800 psi	5190-2462

Bio SAX HPLC 色谱柱, 不锈钢

规格 (mm)	粒径 (μm)	压力限值	货号
21.2 × 250	5		5190-6883
10 × 250	5		5190-6882
4.6 × 250	10	275 bar, 4000 psi	5190-2473
4.6 × 250	5	413 bar, 6000 psi	5190-2465
4.6 × 150	3		
4.6 × 50	3	551 bar, 8000 psi	5190-2463
4.6 × 50	1.7	600 bar, 8700 psi	5190-2461
4.0 × 10, 保护柱	10	275 bar, 4000 psi	5190-2474
4.0 × 10, 保护柱	5	413 bar, 6000 psi	5190-2466
4.0 × 10, 保护柱	3	551 bar, 8000 psi	5190-2464
4.0 × 10, 保护柱	1.7	600 bar, 8700 psi	5190-2462

技巧和工具

访问安捷伦在线商城, 直接购买安捷伦色谱柱和消耗品: www.agilent.com/chem/store

PL-SAX 强阴离子交换色谱柱

规格 (mm)	粒径 (μm)	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)	粒径 (μm)	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

技巧和工具

色谱柱用户指南是非常实用的资源，其中包含色谱柱使用和维护说明以及建议的启用方法：

www.agilent.com/chem/biolc-columns-user-guides

载体类治疗药物分析

从完整载体到单个氨基酸修饰的表征

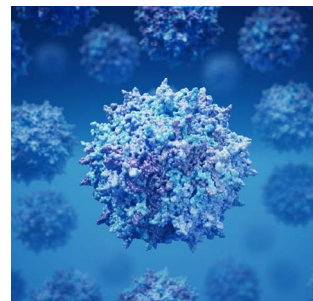
在生物制药研究领域，众多生物治疗药物递送平台已成为令人兴奋且颇具前景的新模式。这包括从用于细胞和基因疗法的递送寡核苷酸的基于蛋白质的衣壳，到用于疫苗的基于蛋白质的病毒样颗粒，以及用于疫苗的递送 mRNA 的基于脂质的纳米颗粒。

腺相关病毒 (AAVs) 是细胞和基因疗法研究中最常见的病毒载体类型，已成功应用于治疗遗传性视网膜疾病和脊髓型肌肉萎缩症。随着研究将 AAVs 用作药物递送平台，确保监测治疗产品的所有关键质量属性 (CQAs) 至关重要。

AAVs 既具有熟悉的 CQAs，也具有独特的 CQAs

AAVs 有几种不同的形式，称为血清型，每种血清型具有相似的高阶结构，但氨基酸序列的差异足以靶向不同类型的组织。这种天然的选择性使它们成为靶向生物治疗药物开发的有用载体，但也使平台分析方法的实施面临挑战。

由于 AAV 的许多 CQAs 与其他单一蛋白质生物治疗药物所监测的 CQAs 相似，如通过 LC/MS 或肽谱分析确认蛋白质序列，因此这些 CQAs 已为人们所熟悉。而其他 CQAs，例如填充（正确填充）的衣壳与空衣壳的比值，是一种独特的 CQA。由于 AAV 中封装了转基因，其中一些分析变得更加复杂。

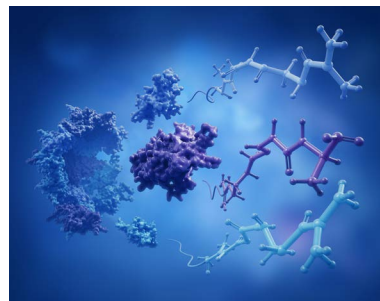


技巧和工具

如需了解有关安捷伦用于 AAVs CQA 分析的液相色谱柱产品组合的更多信息，请访问 explore.agilent.com/advancebio-aav-cn。

衣壳蛋白定性确认

AAV 衣壳由 VP1、VP2 和 VP3 三种蛋白组成，约含 60 个蛋白质拷贝，其化学计量比约为 1:1:10。由于这三种蛋白质都是从相同基因剪接而来，具有高度序列同源性，因此对他们进行色谱分离具有挑战性。历来使用 SDS-PAGE 凝胶银染法或抗体检测类方法（如 ELISA 和免疫印迹法）评估三种衣壳蛋白的比例。然而，这些方法繁琐且容易出错，并可能需要产生针对每种 AAV 的新抗体。考虑到 AAV 血清型之间的高度同源性，产生具有区分所需特异性的抗体可能较为困难。液质联用系统 (LC/MS) 具备更快速度、更高特异性和准确性，可以克服这些难题。安捷伦提供用于完整蛋白质和肽谱分析的工作流程解决方案，可实现翻译后修饰 (PTMs) 的鉴定和定位。



AAVs 的反相分离

对于 AAV 衣壳的完整蛋白质分离，推荐使用 ZORBAX RRHD 大孔径色谱柱。这些 1.8 μm 颗粒填料 UHPLC 色谱柱有 4 种不同的化学键合相可供选择。AAV 血清型之间的序列差异使得单一平台方法具有挑战性，但通过利用这些不同的固定相填料，可以使用非常相似的方法。根据血清型不同，目前推荐使用 ZORBAX RRHD 300SB-C18 和 300-Diphenyl 色谱柱。

肽谱分析是确定蛋白质序列和鉴定 PTMs 的重要方法，其细致程度高于单纯的完整质量测量。在开发和表征阶段通常采用 MS 检测，在放行产品的 QC 中常采用 UV 或 MS 检测。

建议使用 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱对 AAV 衣壳蛋白进行序列和 PTM 鉴定。2.7 μm 表面多孔 C18 固定相能够在相对较低的反压下实现高分离度，并且对于多肽尺寸和疏水性差异较大的肽谱分析，具有更强的整体性能。

技巧和工具

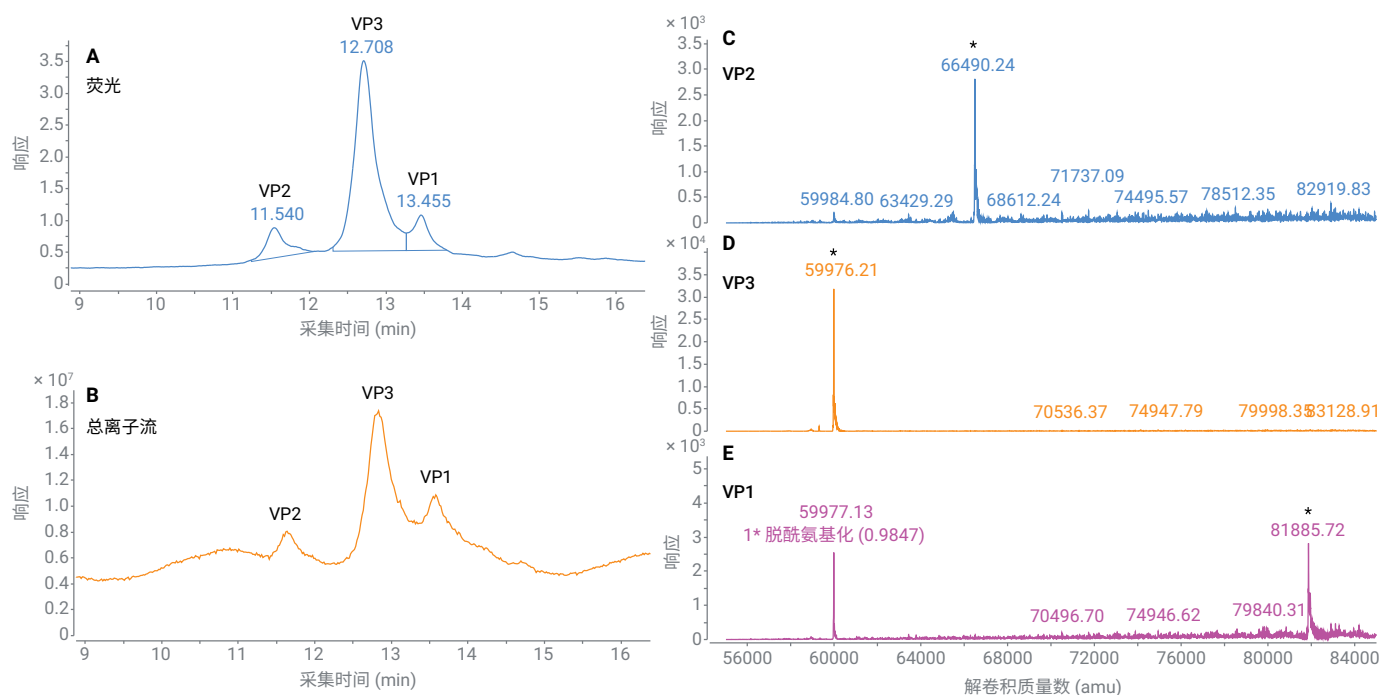
如需进一步了解色谱柱的选择和方法详细信息以及其他消耗品建议，请参见订购指南 **5994-4829ZHCN**。

ZORBAX RRHD 大孔径色谱柱性能指标

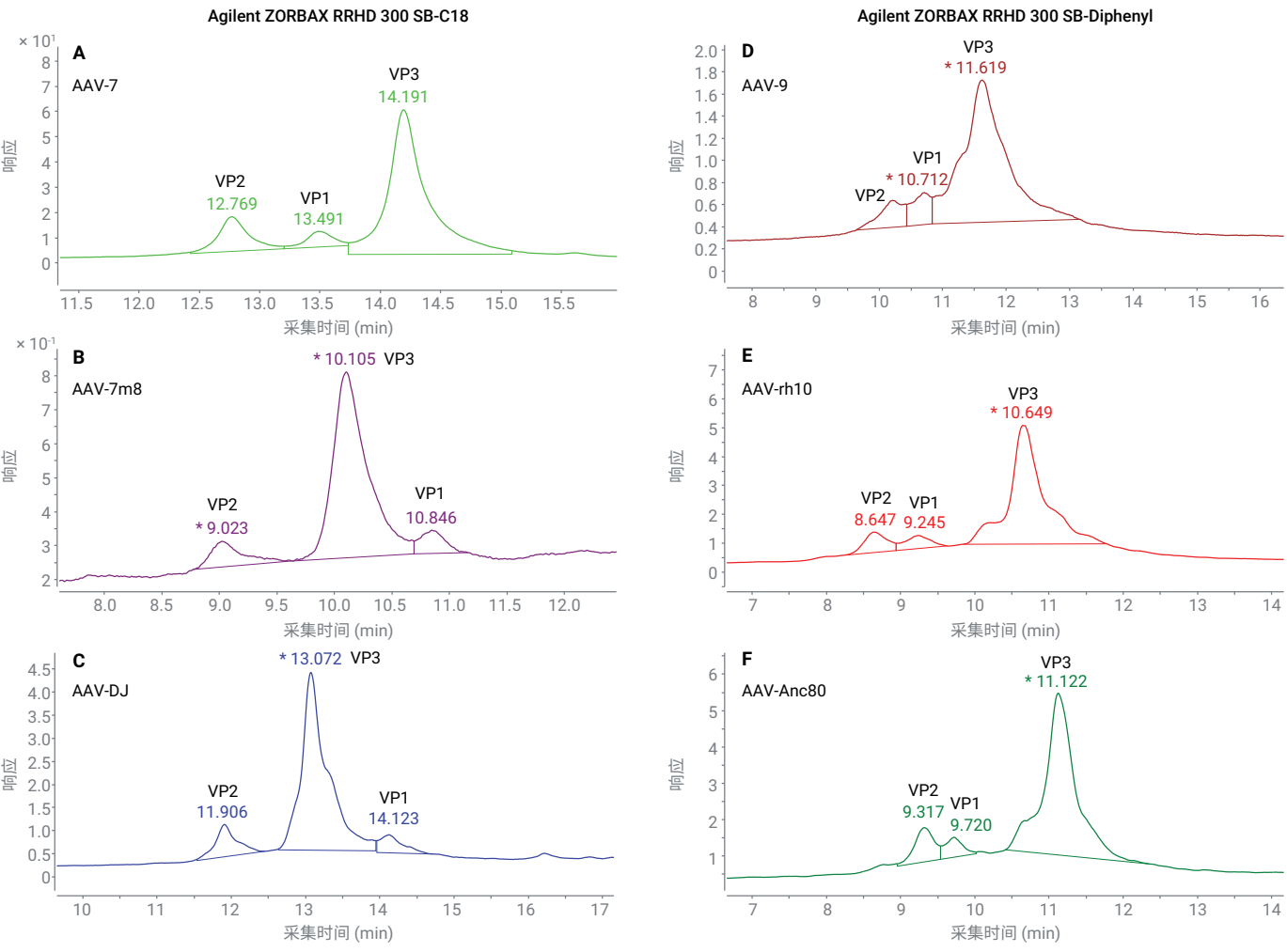
键合相	粒径	孔径	温度上限	pH 范围	封端
300SB-C18	1.8 μm	300 $\text{\AA}$	80 $^{\circ}\text{C}$	1.0–8.0	否
300-Diphenyl	1.8 μm	300 $\text{\AA}$	80 $^{\circ}\text{C}$	1.0–8.0	是

AdvanceBio 肽谱分析色谱柱性能指标

键合相	粒径	孔径	温度上限	pH 范围	封端
EC-C18	2.7 μm	120 $\text{\AA}$	60 $^{\circ}\text{C}$	2.0–8.0	双封端



使用 Agilent ZORBAX RRHD 300 $\text{\AA}$ SB-C18 色谱柱, 采用优化的方法对变性 AAV-2 衣壳蛋白进行的 LC/MS 分析。(A) 三种衣壳蛋白的荧光色谱图。(B) 总离子流。(C-E) 三种衣壳蛋白的解卷积质谱图, 相关质量峰用星号标出。

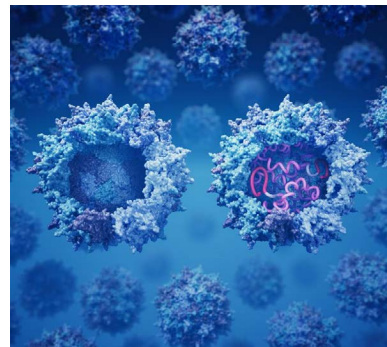


使用 (A-C) Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18 和 (D-F) Agilent SB-Diphenyl 色谱柱对六种不同血清型变体 AAV 衣壳蛋白进行的 LC/MS 分析。

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统		
色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD 300 Å StableBond C18	Agilent ZORBAX RRHD 300 Å Diphenyl
	2.1 × 100 mm, 1.8 μm	2.1 × 100 mm, 1.8 μm
	货号 858750-902	货号 858750-944
梯度	0–5 min, 28% B	0–5 min, 33% B
	23 min, 32.5% B	21 min, 37% B
	23.5 min, 80% B	21.5 min, 80% B
	26 min, 80% B	23 min, 80% B
溶剂 A	含 0.1% 甲酸、0.1% TFA 的去离子水溶液	
溶剂 B	90% 异丙醇、9.8% 去离子水、0.1% 甲酸、0.1% TFA	
柱温	80 °C	
流速	0.4 mL/min	
样品量	每次进样 1.5 × 10 ¹¹ 个病毒基因组	

腺相关病毒的空衣壳/完整衣壳分析

有效载荷分析（包括填充衣壳与空衣壳的比值以及有效载荷特性）是基于衣壳的生物治疗药物（例如 AAVs）特有的关键质量属性。区分填充衣壳与空衣壳具有挑战性，当考虑到这些样品通常浓度较低时，这些测量变得更具挑战性。通常使用电子显微镜和分析型超速离心来评估空衣壳与完整衣壳的比值，但这些方法速度慢、难度大、成本高，促使用户继续寻找其他方法。空衣壳与完整衣壳难以通过色谱区分，但色谱技术潜在的速度优势和相对简单的操作使其仍然成为一种受欢迎的方法。采用光散射检测的体积排阻色谱法与采用荧光检测的阴离子交换色谱是两种颇具前景的方法。然而，由于缺乏通用的解决方案（即能够直接应用于所有血清型和有效载荷的解决方案），因此目前尚未就理想的技术达成共识。



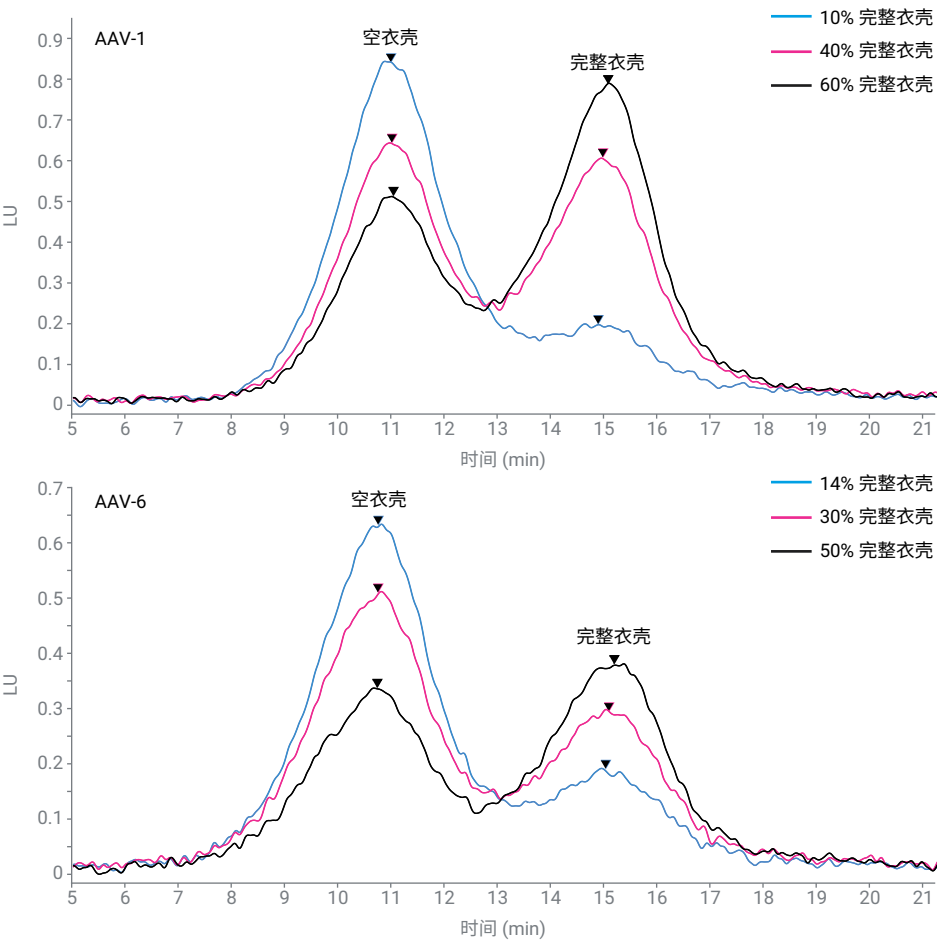
AAV 的阴离子交换分离

虽然阴离子交换方法必须针对差异巨大的血清型进行优化，但其线性和重现性十分出色。Agilent Bio SAX 色谱柱已被证明能够实现所需的可重现分离，推荐用于定量分析空 AAV 衣壳与完整 AAV 衣壳。

Agilent Bio SAX 色谱柱性能指标

键合相	粒径	温度上限	pH 范围	流速
SAX (强阴离子交换) — N(CH ₃) ₃	5 µm	80 °C	2.0–12.0	0.1–1.0 mL/min *建议采用 0.1 mL/min， 以获得理想的 AAVs 结果

测量空 AAV 衣壳与完整 AAV 衣壳的混合物



使用安捷伦二元高速泵分离具有不同完整衣壳/空衣壳比的 AAV-1 和 AAV-6 样品。

Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统			
色谱柱	Agilent Bio SAX, 2.1 × 50 mm, 5 μm PEEK 卡套		
溶剂 A	70 mmol/L bis-tris 丙烷, pH 9.0 2 mmol/L MgCl ₂		
溶剂 B	70 mmol/L bis-tris 丙烷 + 1 mol/L 四甲基氯化铵, pH 9.0 2 mmol/L MgCl ₂		
梯度	时间	%B	流速
	0 min	15%	0.1 mL/min
	25 min	27.5%	0.1 mL/min
	25.1 min	100%	0.3 mL/min
	28 min	100%	0.3 mL/min
荧光检测	λ _{ex} = 280 nm, λ _{em} = 340 nm		

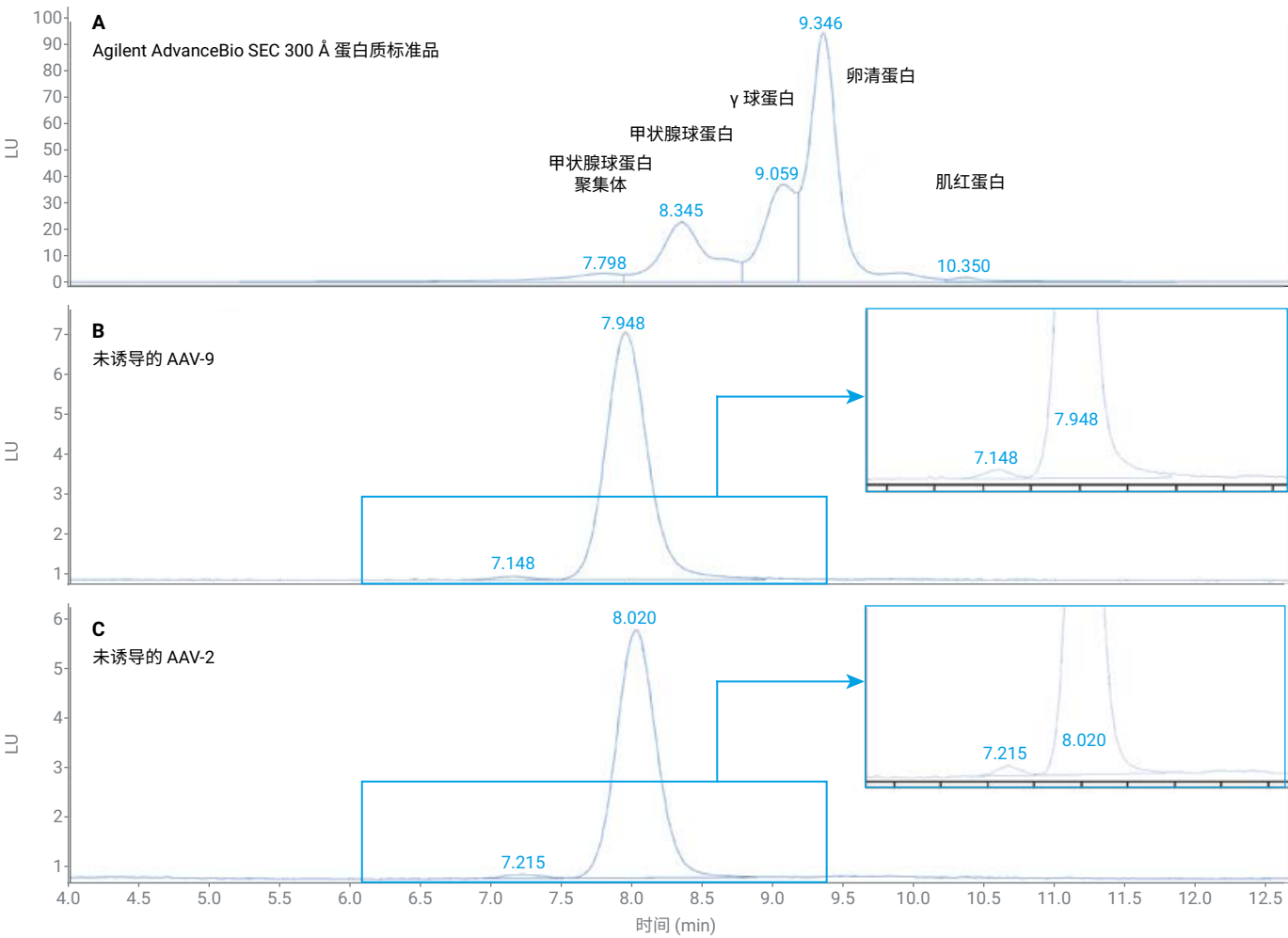
载体类治疗药物的聚集体分析

与任何其他蛋白质类生物治疗药物一样，聚集体分析也是 AAVs 经常监测的一种 CQA。主要差异在于准确评估样品聚集所需的孔径。AAV 衣壳直径约为 250 Å (25 nm)，因此其聚集体过大，无法进入常用的体积排阻色谱柱的孔隙中（这些色谱柱的孔径通常不超过 300 Å）。传统观点认为，SEC 孔径至少应为目标分子的 3 倍，即孔径应 ≥ 750 Å。虽然许多用户采用孔径约为 500 Å 的色谱柱分析 AAV，但我们发现使用 1000 Å 孔径能够改善单体-二聚体分离度。

安捷伦的 Bio SEC-5 色谱柱产品线提供适用于各种大分子生物治疗药物的孔径，包括 500 Å、1000 Å，甚至 2000 Å。

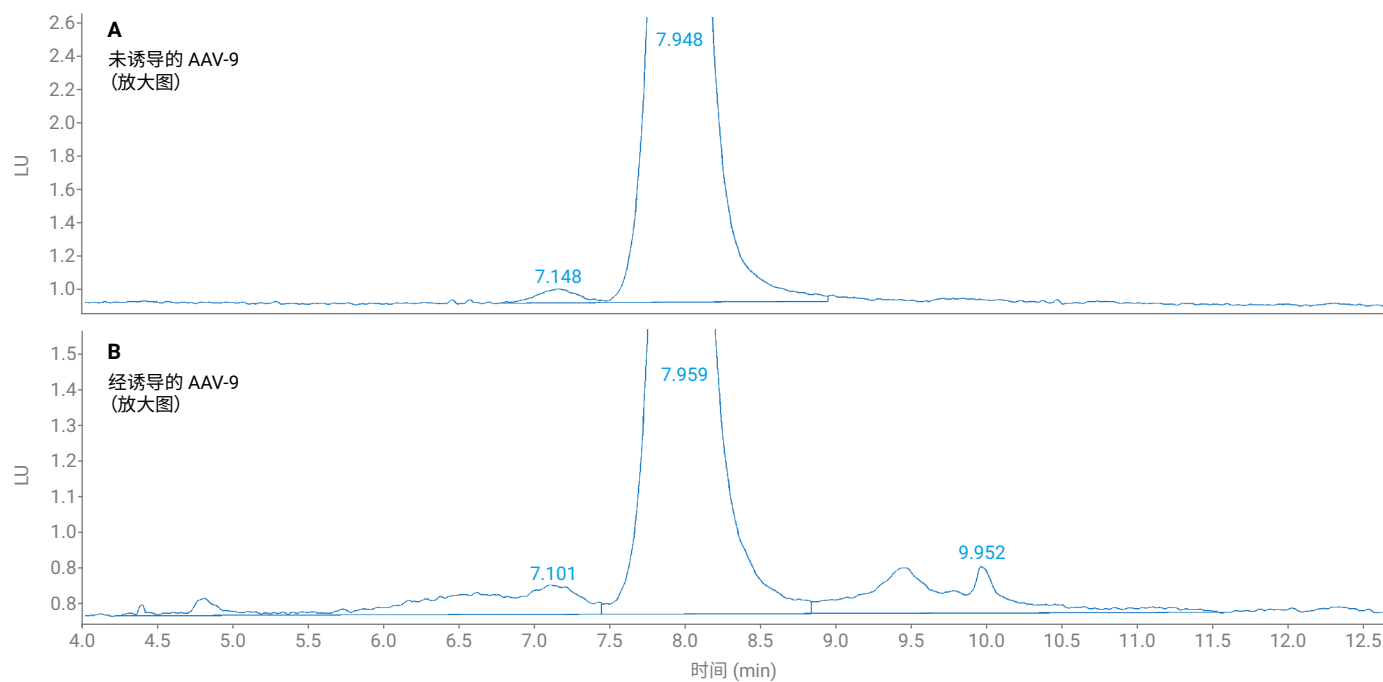
Agilent Bio SEC-5 色谱柱性能指标					
孔径	粒径	分子量范围	pH 范围	最大压力	流速
500 Å	5 µm	15000–5000000	2–8.5	137 bar, 2000 psi	1.0–10.0 mL/min (内径 21.2 mm)
					0.2–1.2 mL/min (内径 7.8 mm)
					0.1–0.4 mL/min (内径 4.6 mm)
1000 Å	5 µm	50000–7500000	2–8.5	137 bar, 2000 psi	1.0–10.0 mL/min (内径 21.2 mm)
					0.2–1.2 mL/min (内径 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)

AAV-9 和 AAV-2 的体积排阻色谱图



Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 蛋白质标准品和未诱导的 AAV-9 和 AAV-2 的荧光色谱图。请注意，蛋白质标准品中还包含血管紧张素 II，图中未示出，因为它不含色氨酸，因此在所选激发和发射条件下没有荧光。

未诱导和诱导的 AAV-9 聚集情况



未诱导和诱导的 AAV-9 的荧光色谱图。

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统

色谱柱	Agilent Bio SEC-5 5 μm , 1000 Å, 4.6 $\times$ 300 mm 货号 5190-2538
流动相	50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 + 400 mmol/L NaCl, pH 7.4
柱温	80 °C
流速	0.4 mL/min
检测	荧光, λ_{ex} = 280 nm, λ_{em} = 340 nm
进样量	20 μL

产品订购信息

用于完整蛋白质分析的 ZORBAX RRHD 大孔径色谱柱

描述	货号
Agilent ZORBAX RRHD Diphenyl, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm, 300 Å	863750-944
Agilent ZORBAX RRHD Diphenyl, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm, 300 Å	858750-944
Agilent ZORBAX RRHD StableBond C18, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm, 300 Å	863750-902
Agilent ZORBAX RRHD StableBond C18, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm, 300 Å	858750-902

用于多肽水平分析的 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱

描述	货号
AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm, 2.7 μm	653750-902
AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 × 250 mm, 2.7 μm	651750-902
AdvanceBio 肽谱分析保护柱, 2.1 × 150 mm, 2.7 μm, 3/包	851725-911

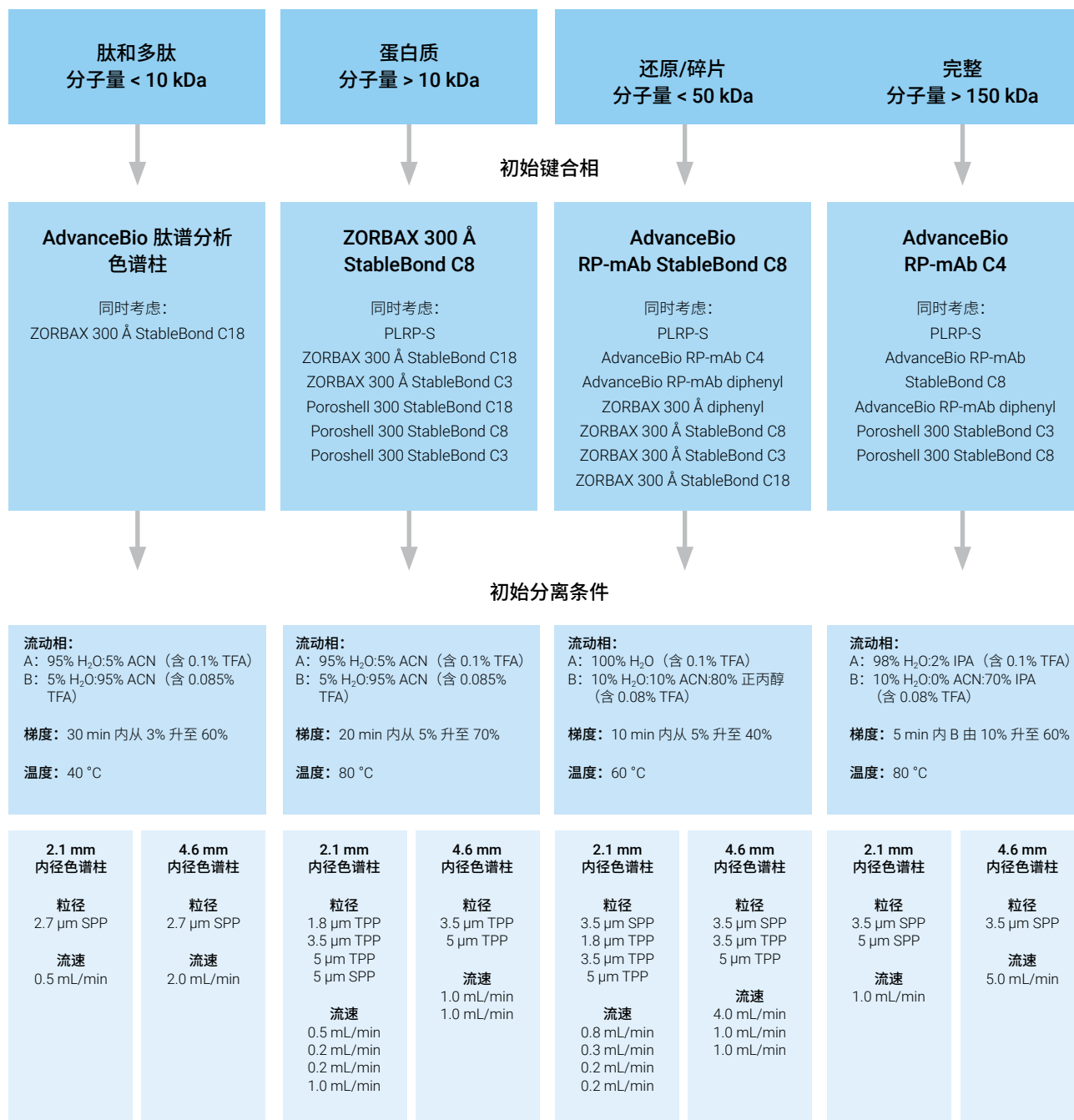
用于聚集体和尺寸分布分析的 Bio SEC-5 色谱柱

规格 (mm)	粒径 (μm)	Bio SEC-5 500 Å USP L59	Bio SEC-5 1000 Å USP L59	Bio SEC-5 2000 Å USP L59
21.2 × 300	5	5190-6866	5190-6867	5190-6868
21.2 × 50, 保护柱	5	5190-6872	5190-6873	5190-6874
7.8 × 300	5	5190-2531	5190-2536	5190-2541
7.8 × 150	5	5190-2532	5190-2537	5190-2542
7.8 × 50, 保护柱	5	5190-2535	5190-2540	5190-2545
4.6 × 300	5	5190-2533	5190-2538	5190-2543
4.6 × 150	5	5190-2534	5190-2539	5190-2544
4.6 × 50, 保护柱	5	5190-6860	5190-6861	5190-6862

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。



SPP = 表面多孔颗粒填料, TPP = 全多孔颗粒填料

从低 pH 简单水溶液/有机梯度开始

通常含有 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 的水/乙腈梯度可用于洗脱所有目标组分。在孔径 300 Å 的色谱柱上，典型的高分离度梯度需要 30–50 min。AdvanceBio RP-mAb 色谱柱需要较短的分析时间和较高的流速，并且仍提供出色的分离度。为改善分离，可以延长梯度时间、缩短柱长或提高流速。

在 LC/MS 方法中，TFA 会降低检测器灵敏度，因此通常被甲酸铵/甲酸替代。

优化样品溶解度

在任何 pH 下要得到理想峰形和回收率，完全溶解样品很重要。强酸性或中性溶剂可与 AdvanceBio RP-mAb、ZORBAX 300 Å StableBond、Poroshell 300 StableBond 和 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱配合使用，而中性溶剂和稀碱性溶剂可与 ZORBAX 300Extend-C18 和 Poroshell 300Extend-C18 配合使用。

溶解蛋白质和肽的溶剂选择

- 水/磷酸盐缓冲液
- 稀酸 (TFA、乙酸或盐酸)
- 中性 pH、6–8 mol/L 盐酸胍或异硫氰酸酯
- 乙酸 5%/6 mol/L 尿素
- 稀酸 + 水溶液/有机溶剂 (ACE, MeOH, THF)
- 稀碱 (氢氧化铵)
- DMSO 或 0.1%–1% 的 DMSO 溶液
- 甲酰胺
- 最弱
- 最强

提高温度

蛋白质和肽的分离受温度的影响，较高的柱温可显著提高蛋白质以及疏水性和聚集性肽的分离度和回收率。

AdvanceBio RP-mAb: 最高 90 °C
ZORBAX 300 StableBond, Poroshell 300 StableBond: 最高 80 °C
AdvanceBio 肽谱分析色谱柱: 最高 60 °C

优化流动相 pH

如果低 pH 效果不佳，可尝试使用中等或高 pH

如果优化的低 pH 方法不能提供理想的分离，可使用中等或高 pH 流动相。高 pH 下的选择性通常差别很大，因为此时酸性氨基酸带负电荷，而某些碱性氨基酸可能失去其电荷。ZORBAX 300Extend-C18 是中等 pH 到高 pH 分离的理想选择。

色谱柱:	ZORBAX 300 Extend-C18 4.6 × 150 mm, 5 µm 773995-902	梯度:	30 min 内 B 由 5% 升至 60%
		温度:	25–30 °C (< 60 °C)
		流速:	1 mL/min
流动相:	A: 20 mmol/L NH ₄ OH 水溶液 B: 含 20 mmol/L NH ₄ OH 的 80% ACN 溶液		

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。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：不得单独用清水清洗色谱柱，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 ($> \text{pH } 6.5$)。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。

去垢剂

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。

去垢剂

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 或者 pH 梯度和盐梯度以实施纯化。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 ₂ PO ₄ D: 40.0 mmol/L Na ₂ HPO ₄ 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。	流动相：	A: 水 B: 1.6 mol/L NaCl C: 40.0 mmol/L NaH ₂ PO ₄ D: 40.0 mmol/L Na ₂ HPO ₄ 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。
梯度：	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：	0–20 min, pH 6.0–8.0 20–25 min, 0–800 mmol/L NaCl 25–30 min, 800 mmol/L NaCl
温度：	室温	温度：	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			

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	
粒径, μm	流速, mL/min	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。			

聚集体及片段分析方法

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



得到初始色谱图后，可能需要进行某些更改以改善分离、保持蛋白质溶解性，或减少样品与色谱填料的相互作用。可以上下调整流动相的离子强度，以便获得理想分离。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

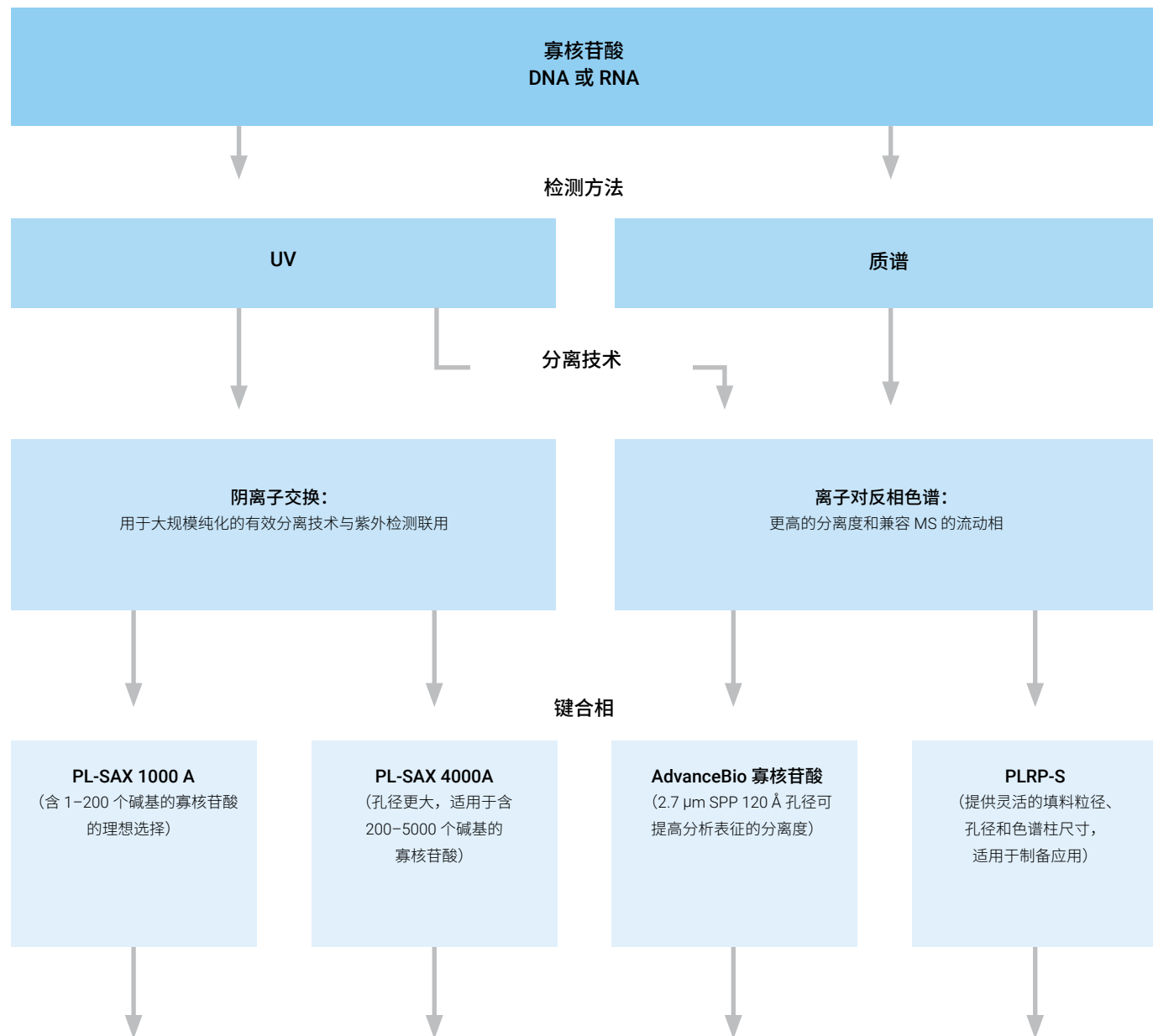
必须特别注意，以免由于某些水/有机溶剂混合物的高粘度而导致压力变化过大。使用较小的流速或更高的温度有助于缓解潜在的问题。

温度：

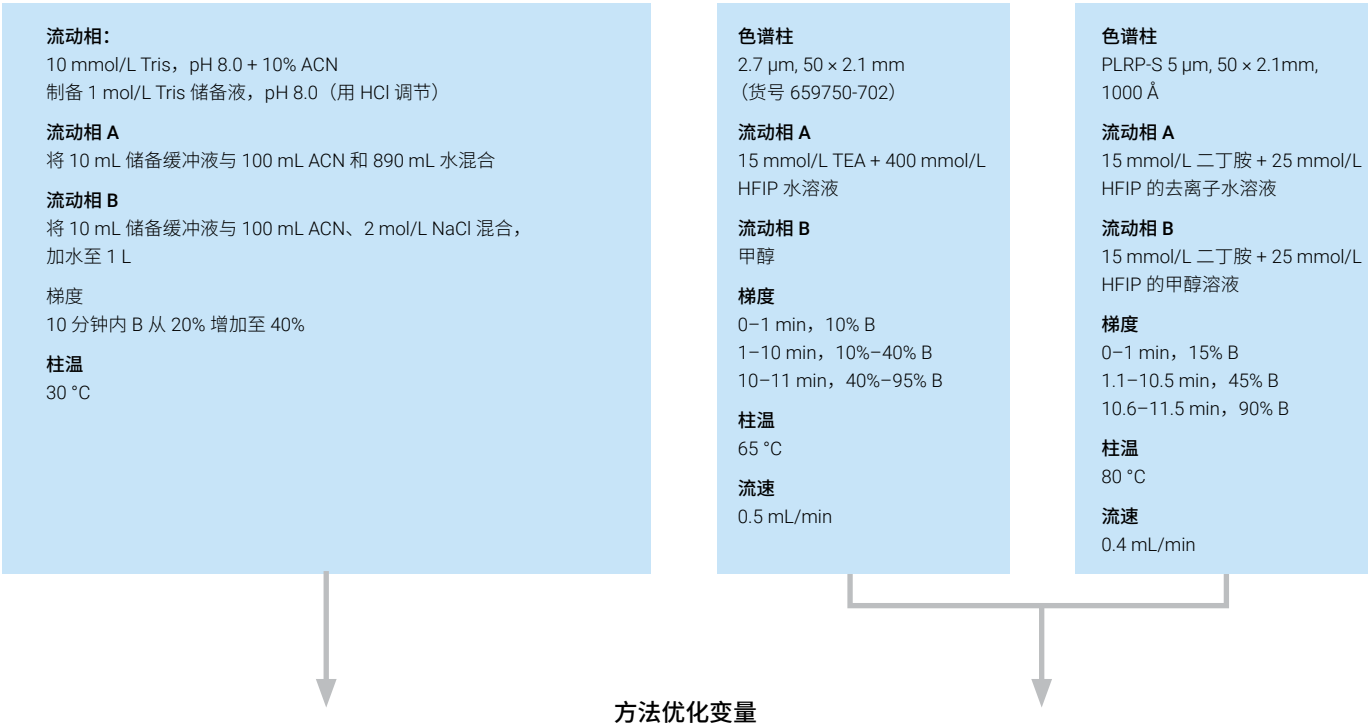
SEC 分离通常在 20–30 °C 下进行。蛋白质和肽的分离需要较高温度，以改善蛋白质和疏水性肽的分离度和回收率。

Bio SEC 色谱柱的最高耐受温度是 80 °C。

寡核苷酸分析



初始分离条件



可以调整以优化色谱分析的变量:

pH: 加入 NaOH 使 pH 增加至 11 或 12, 有助于限制次级相互作用并使峰形更尖锐。更高的 pH 结合增加的盐浓度, 有助于洗脱较长的寡核苷酸。

温度: 增加流动相和柱温箱温度, 可降低流动相粘度, 减少次级相互作用, 从而改善峰形。

有机流动相改性剂: 已证明, 添加乙腈流动相改性剂 (10%–15%) 能够改善色谱分析。

* pH 和温度升高可能导致样品发生不必要的降解。应逐步改变 pH 和温度并监测意外杂质

可以调整以优化色谱分析的变量:

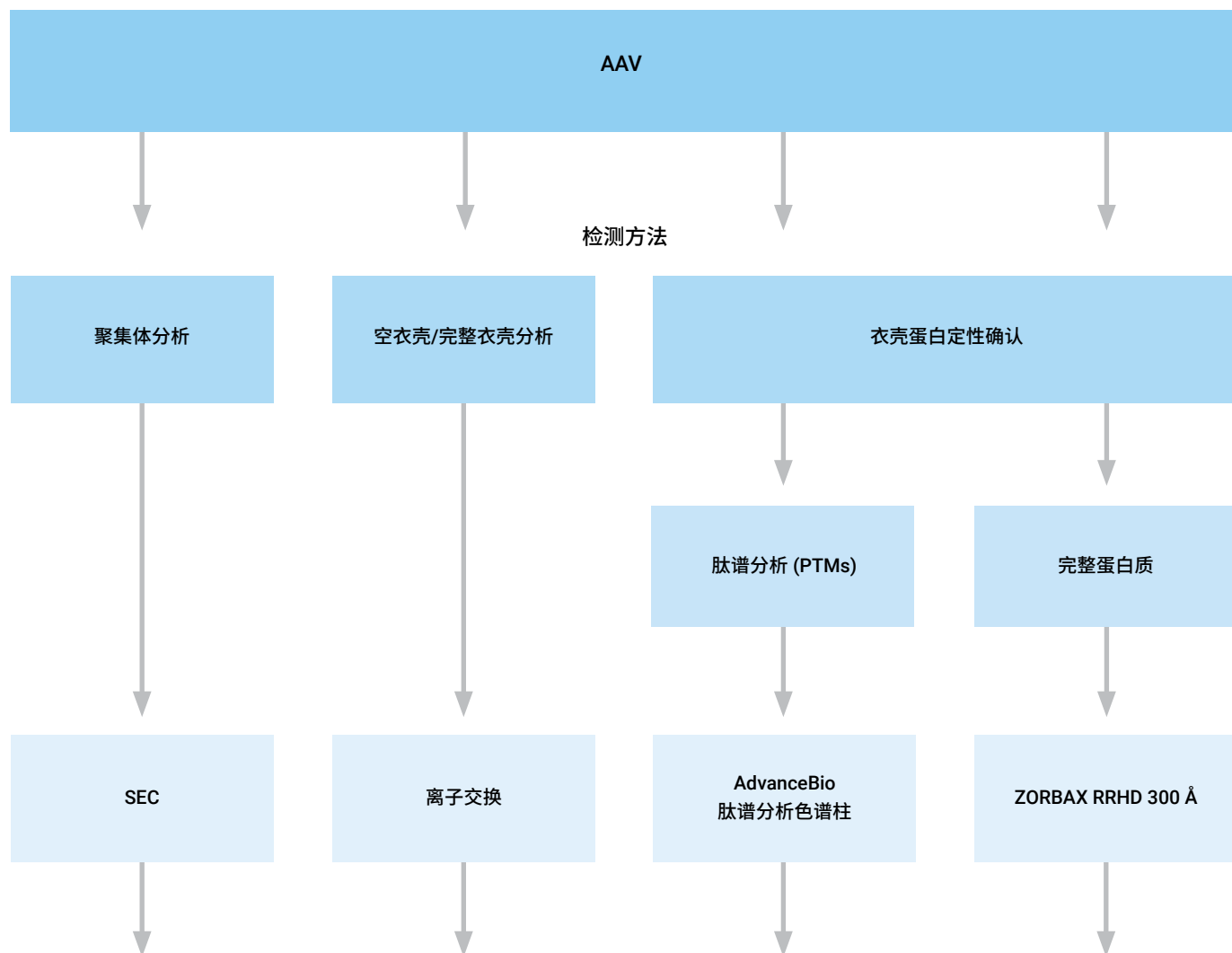
温度: 增加流动相和柱温箱温度, 可降低流动相粘度, 减少次级相互作用, 从而改善峰形。

离子对试剂: IP-RP 利用离子对试剂, 通常是具有不同疏水性烷基链的胺。胺与阴离子寡核苷酸相互作用形成一对, 然后可通过与 RP 固定相的疏水相互作用而得以保留。可以调整所选择的离子对以改善分离和保留

有机流动相改性剂: 根据所选择的离子对试剂, 可通过流动相中有机物浓度的变化来优化分析物的保留特性 (增强或减弱)。

* pH 和温度升高可能导致样品发生不必要的降解。应逐步改变 pH 和温度并监测意外杂质

腺相关病毒 (AAV) 分析



初始分离条件

色谱柱 Agilent Bio SEC-5, 300 × 4.6 mm, 5 μm, 1000 Å 流动相 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 400 mmol/L NaCl, pH 7.4 柱温 80 °C 流速 0.4 mL/min FLD λ_{ex} = 280 nm, λ_{em} = 340 nm	色谱柱 Agilent Bio SAX, 50 × 2.1 mm 5 μm 流动相 A 70 mmol/L bis-tris 丙烷, pH 9.0 2 mmol/L MgCl₂ 流动相 B 70 mmol/L bis-tris 丙烷 + 1 mol/L 四甲基氯化铵, pH 9.0 2 mmol/L MgCl₂ 梯度 0 min 15% B 流速: 0.1 mL/min 25 min 27.5% B 流速: 0.1 mL/min 25.1 min, 100% B 流速: 0.3 mL/min 28 min 100% B 流速: 0.3 mL/min FLD λ_{ex} = 280 nm, λ_{em} = 340 nm	色谱柱 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 150 × 2.1 mm, 2.7 μm 流动相 A 含 0.1% 甲酸的去离子水溶液 流动相 B 含 0.1% FA 的乙腈溶液 梯度 0–3 min, 3% B 50 min, 35% B 60 min, 97% B 62 min, 97% B 65 min, 3% B 柱温 60 °C 流速 0.4 mL/min	色谱柱 Zorbax RRHD 300A SB C18, 100 × 2.1 mm, 1.8 μm 流动相 A 0.1% 甲酸 + 0.1% TFA 的去离子水溶液 流动相 B 90% IPA + 9.8% 去离子水 + 0.1% 甲酸 + 0.1% TFA 梯度 0–5 min, 28% B 23 min, 32.5% B 23.5 min, 80% B 26 min, 80% B 柱温 80 °C 流速 0.4 mL/min
---	---	--	--

可以调整以优化 RP 色谱分析的变量：

- 温度**

增加流动相和柱温箱温度，可降低流动相粘度，减少次级相互作用，从而改善峰形。
- 有机流动相改性剂：**

对于反相分离，有机溶剂为强溶剂。调整流动相中有机改性剂的百分比会影响洗脱强度。流动相中有机溶剂百分比较高将降低疏水性分析物在反相色谱柱上的保留性。
- 色谱柱化学键合相**

固定相的选择性是一种变量，可以改变选择性以优化目标分析物的分离。对于完整衣壳蛋白的分析，Zorbax RRHD 300-Diphenyl 与 C18 具有不同的选择性，为不同血清型提供了优势。

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（货号 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
温度:	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) 和包含 IgG1 的 CHO 细胞上清液（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确定。			

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有很多。 为了使您获得理想结果, 我们发布了一系列“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 (出版物 5991-2348CHCN) Ion-exchange Chromatography for Biomolecule Analysis A “How to” guide (生物分子离子交换色谱分析: 使用指南) (出版物 5991-3775EN) 生物分子分析体积排阻色谱: 使用指南 (出版物 5991-3651CHCN)
--

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。并且为了获得更高的灵敏度，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出限。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 仍可获得理想分离，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_4OH 作为流动相添加剂进行 LC/MS 分析。

您的分析结果凝聚了安捷伦四十余年的不断创新

通过不断提升支持您常规分析的技术标准，安捷伦努力进行研发，实现了如下技术突破：

- **新型气相色谱柱**帮助您实现更高水平的柱惰性和柱间重现性
- **丰富的液相色谱柱可供选择**，为您极为严格的应用提供所需的灵敏度和可靠性
- **前沿的样品前处理产品**可快速、可靠地进行萃取和浓缩
- **新颖的原子光谱和分子光谱理念**用于鉴别和确认目标化合物和未知化合物

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安捷伦如何通过不断创新为您提供便利，并为您带来更多优势。

化学分析解决方案

食品

从食品中多种农药的筛查，到病原体的快速鉴定，安捷伦清楚地了解食品生产商、出口商和管理者的不同分析需求。使用我们简便易用的分析仪和最新筛查库，客户可迅速开发出稳定、可靠的分析方法。我们前沿的气相色谱和质谱系统是公认的适合各种不同分析的高水平的食品检测技术。



环境

安捷伦在环境检测和合规性方面拥有 40 多年的专业经验。我们为政府和私有实验室提供全方位的实验方法——从土壤中重金属的常规检测，到地下水中浓度为 ppt 级的药物检测。



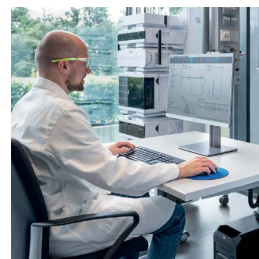
法医学

无论是法医调查中的毒品检测、运动员兴奋剂筛查、消遣用药物样品分析，还是犯罪现场的爆炸物检测，都依赖于仪器的准确度。安捷伦全面的工作流程解决方案能够对成千上万的物质进行鉴定、确证和定量，在行业中处于先锋地位。



实验室信息学

实验室采集、分析和共享数据的方式，在很大程度上会影响其分析效率。安捷伦以客户为导向，推出了种类丰富的集成软件产品，创造了 Agilent OpenLab 软件套装。OpenLab 具有卓越的性能，可在多个系统之间建立联系，实现开放式系统集成和投资保护。我们承诺为贯穿科学数据生命周期的每一步提供价值——从收集和分析到解析和管理。



能源与化工

安捷伦与石油化工行业用户密切合作，提供能够满足他们在分离、检测、通量和支撑方面需求的分析系统。我们甚至还预配置定制或标准分析仪，使其到货即可投入使用。从原油、天然气和精炼，到专用化学品和可替代燃料，安捷伦提供了前沿的技术和解决方案，提高能源与化工实验室的质量、安全性和盈利能力，同时满足行业严格的质量要求。安捷伦在与 ASTM 的合作方面处于先锋地位，并将持续投身于行业标准的开发。



材料科学

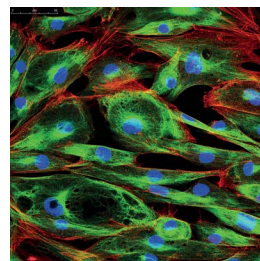
安捷伦提供新的仪器扩展产品阵容，用于从精密光学镜片到纸浆和纸张等高级材料的研究、生产和检测。原子光谱、分子光谱、色谱和 X 射线衍射等工具，为材料科学的不断进步提供相应硬件支持。



生命科学解决方案

生物制药

生物治疗药物对改善人类健康有着巨大潜力，越来越多的蛋白质和抗体疗法可应对尚未满足的医疗需求。从疾病研究到 QA/QC 再到生产的每个开发阶段，安捷伦都能帮助您做出正确选择，将治疗产品推向市场。我们全面了解生物制药工作流程，因此我们的产品系列可无缝匹配，从而促进研究、发现和开发。安捷伦可利用反相色谱、体积排阻、离子交换和亲和色谱法完整表征生物分子。我们的生物惰性备件可确保您工作流程的每一步都发挥您所需的性能，以优化您的生物分离。



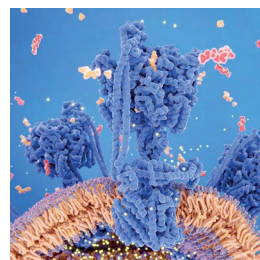
制药

您需要更高效的工艺来评估候选药物、确定疗效，并在开发生产过程中确保安全与合规性。安捷伦与多家制药公司合作多年，帮助他们确保实验室间和全球范围内的可靠性和可重现性，从而确保合规。我们的制药解决方案通过自动化样品前处理、前沿的 HPLC 和 UHPLC 系统、丰富的快速液相色谱柱系列、开放式 LC/MS、光谱和自动溶出度仪，在产品生命周期的每个阶段提供高通量分析性能。完整的液相色谱备件和灯系列有助于优化每次分析，进一步提高实验室的日常分析效率。



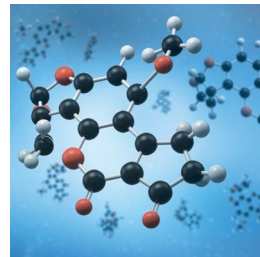
蛋白质组学

研究众多蛋白质如何影响生物体的健康需要一系列分析工具。安捷伦为蛋白质鉴定和蛋白质生物标记物开发推出了一系列强大的产品，包括液相色谱/质谱仪、生物信息学系统、多重亲和蛋白去除柱和 OFFGEL 电泳备件系列产品。精确质量质谱和微流控 HPLC-Chip/MS 是安捷伦的两项创新技术，提高了全球蛋白质组学研究人员的工作效率。



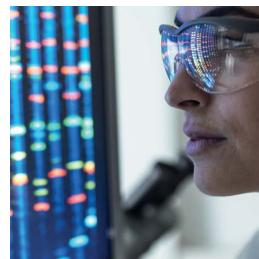
代谢组学

小分子组合越来越多地被视为生物标记物的丰富来源，但代谢组学研究仍面临诸多挑战。由于代谢组中的分子在不断地进入、离开或变化，因此，在研究瞬间代谢组化学特性时，需要卓越的分析速度、准确性和强大的解析能力。安捷伦 GC、LC 和 MS 系列产品，以及我们卓越的生物信息学软件、用户可定制的 LC/MS METLIN 代谢物数据库和我们的首款商品化 GC/MS 保留时间锁定代谢物数据库，完全满足代谢组学研究人员的需求。



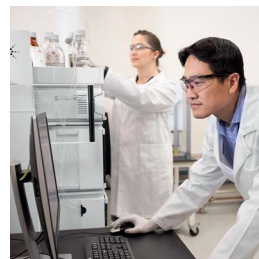
基因组学

安捷伦是各种基因组学疾病研究实验中所使用的微阵列芯片、扫描仪和 NGS 试剂领域的全球先锋。我们的 SureSelect 和 HaloPlex 靶向序列捕获系统广为畅销，使二代测序研究得以顺利开展。安捷伦提供各种型号 CGH、基因表达微阵列芯片以及高度开发功能，使用我们的免费在线设计工具 SureDesign 可生成定制阵列。安捷伦的所有微阵列芯片都配备了灵敏、高选择性的 60 mer 探针，在一个板上可印制多达 8 个微阵列，显著降低了每个样品的成本。



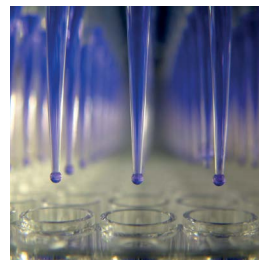
生命科学信息学

与广泛的仪器产品系列相呼应的是，安捷伦提供了非常广泛的生物信息软件产品系列，帮助用户从复杂的基因组学、蛋白质组学、代谢组学和其他生物数据中发掘信息。SureCall 和 CytoGenomics 软件可分析 NGS 和 aCGH 数据，GeneSpring 软件包具有多组学分析和可视化功能，有助于对比复杂的数据组，并从多种角度探索生物学问题。GeneSpring 软件包包括 GX 模块（用于基于微阵列芯片的基因表达和基因分型数据）、PA 模块（用于通路分析和多组学分析）以及 MPP 软件（分析蛋白质组学和代谢组学实验产生的质谱数据）。



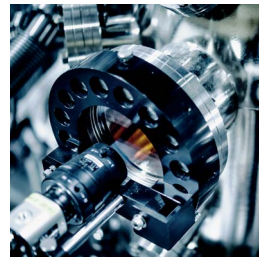
实验室自动化

为了满足对更高通量和自动化日益增长的要求，安捷伦已经大大扩展了实验室自动化产品。安捷伦液体处理和微孔板处理产品线专为简化高通量生命科学工作流程而设计。安捷伦还继续升级其用于 LC、GC、LC/MS 和 GC/MS 的先进自动进样器，使其具备更多功能并提高速度，以实现先进仪器的性能。



真空技术

安捷伦为客户解决从高能物理实验到纳米技术系统的挑战性真空问题。安捷伦生产可在其质谱仪上和其他厂商的仪器上使用的真空系统。我们的真空技术已通过非常强大的物理实验得到了证明，即欧洲核子研究中心 (CERN) 曾用于研究希格斯玻色子的大型强子对撞机。



服务与支持

专注于您擅长的工作

安捷伦不断寻找优化您实验室性能的途径。因此，您可以完全信赖安捷伦，我们会为您提供所需的工具，并通过全方位的服务来保护您的投资，这些服务由经验丰富的安捷伦认证专业服务人员全球网络作为后盾，致力于提升您的实验室效率。

Agilent CrossLab 服务计划

为您的安捷伦仪器提供优质服务

Agilent CrossLab 服务为实验室提供全面的维护保障，可满足特定需求和预算。我们提供多种服务计划，因此您可以根据需要进行选择。

- **Agilent CrossLab 金牌服务** — 用于关键任务系统的优质服务
- **Agilent CrossLab 银牌服务** — 大幅提高效率，减少工作流程干扰
- **Agilent CrossLab 铜牌服务** — 及时维修，控制预算

Agilent CrossLab 虚拟技术支持让您可以通过最新的视频通信工具获取实时的远程技术支持。我们的虚拟助手应用程序使用安全的视频连接，可以保护客户和安捷伦的隐私。它支持数字注释，使用户和安捷伦服务工程师能够标示出对象，为远程解决问题提供清晰的说明。这样可以确保进行深入的故障排除和故障诊断，提高远程支持的成功率，缩短仪器停机时间。

Agilent CrossLab 合规服务

帮助您的实验室保持合规性

安捷伦提供一整套实验室合规服务，包括基于 USP <1058> 分析仪器确认 (AIQ) 的仪器和软件确认 (IQOQ、OQ 和 RQ)，以及定制验证服务，如计算机系统验证、审计/评估、定制化规程编写等。为了帮助您确保合规，使用安捷伦自动化合规解决方案为您的整个分析仪器确认 (AIQ) 过程提供支持。自动化法规认证引擎 (ACE) 是一种随时可供审计的电子化确认解决方案，能够通过以下方式满足数据可靠性和预期用途要求：

- 通过统一各个平台的方案，大幅降低审计风险并提高确认效率
- 采用适用于您所有仪器并确保符合方案要求的稳定测试设计实现整个合规操作的标准化
- 根据您的 SOP 配置测试并选择规格
- 通过可确保数据可靠性、便于存储、搜索和检索的电子确认计划和报告节约审核/批准时间和成本



安捷伦服务承诺

如果我们不能修好 Agilent CrossLab 服务计划涵盖的仪器（不限生产商），我们将通过上报流程来解决该问题，包括为您免费更换仪器*。

* 须符合条件。



Agilent CrossLab 助您充分发挥实验室潜力

[agilent.com/chem/crosslab](https://www.agilent.com/chem/crosslab)



考虑选择灵活支付计划？请访问：
[agilent.com/chem/financing](https://www.agilent.com/chem/financing)

安捷伦仪器培训和方法服务

获得理想的科学成果与经济效益

与 Agilent CrossLab 携手合作，提升工作实操技能，改善实验室运营。利用先进方法学习新技术要点或掌握实际应用。

- 提供方法与应用服务，改进从方法开发到方法维护的工作流程
- 将培训和方法支持与仪器捆绑或单独提供，以转移至新技术和优化现有技术的结果
- 我们提供多种培训方式，包括在线培训、课堂培训和现场培训，以适应您的需求和预算
- 客户可以使用我们的在线云实验室解决方案来学习如何使用软件

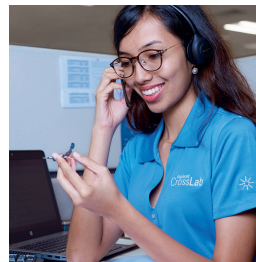


安捷伦保值承诺 — 10 年保值

除了不断的产品升级，我们还提供行业特有的服务 — 安捷伦 10 年保值承诺。安捷伦保值承诺保证仪器从购买之日起至少有 10 年的使用寿命，您也可以将仪器的剩余价值抵扣到更换的新型号仪器中。我们为每一台系统提供全方位技术支持，因此我们的保值承诺可以让您安心购买，从而实现更高的投资回报。如需了解更详细的信息，请访问 agilent.com/chem/services，或者联系您当地的安捷伦服务和支持部门。

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。有关本目录中备件的问题，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 agilent.com/en/support。



需要了解更多信息？

访问 agilent.com/chem/contactus，您可以：

- 查找离您最近的安捷伦分公司或经销商以获得专业的技术支持
- 通过电话快速获得销售和产品帮助。只需利用下拉菜单即可选择您所在的国家/地区
- 使用便捷的在线表格，通过接收电子邮件获得帮助

查找当地的安捷伦客户服务中心：
www.agilent.com/chem/contactus-cn

与安捷伦互动：
www.agilent.com/chem/social

了解完整的产品目录：
www.agilent.com/chem/catalog

免费专线：
800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：
LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：
www.agilent.com/chem/erfq-cn

RA45107.4572916667

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

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，2019–2023
2023 年 10 月 1 日，中国出版
5994-6123ZHCN