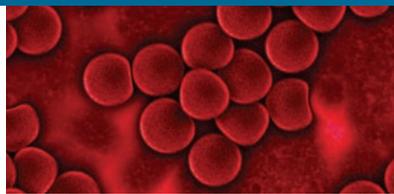


安捷伦生物分析 样品前处理及液相分析解决方案



Agilent Technologies

安捷伦

为复杂的生物分析提供全面的消耗品支持

安捷伦是全球分析测量行业的领导者，致力于帮助各种机构提升基础研究能力，解开疑难疾病的根本原因，加速新药的发现和研制，提供全面的针对生物分析的样品前处理、液相色谱柱以及液相和质谱仪器系统。安捷伦先进的前处理和色谱柱技术帮助生物分析工作者最大化地减少分析中的困难，更快、更高效地完成分析任务。



生物分析的基质：

- 血浆、血清、全血、
- 尿液、唾液等

生物分析的特点：

- 样品基质复杂
- 药物浓度低
- 样品量少
- 个体差异大

生物分析的目标化合物：

- 以小分子药物为主

生物分析对方法的要求：

- 灵敏度高
- 专一性佳
- 高通量
- 方法快捷可靠

药物研发

药物研发过程中的生物分析检测（如药代动力学 DMPK、毒理学、药理学研究，临床 I,II,III 期研究）

医学研究

生物标志物的研究、代谢组学等

滥用药物

违禁品检测
毒物筛查
兴奋剂检测

生物样品分析的工作流程



样品前处理



分离

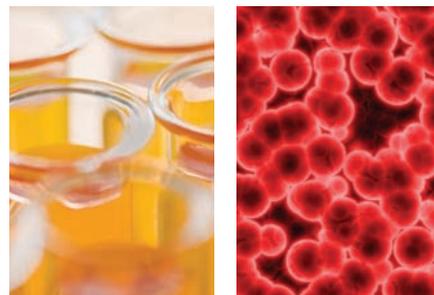


检测、分析和报告

当我们选择样品前处理时, 我们必须考虑什么?

样品基质

- 实验基质越复杂, 就需要越强净化能力的前处理技术去除掉干扰基质
- 如果干扰基质去除能力差, 会带来严重的残留效应、磷脂堆积、离子抑制以及较差的信号相应
- 如果前处理效果差, 会增加样品分析和仪器维护的成本, 影响实验的重现性以及色谱柱的柱寿命



目标化合物的特点

- 目标化合物独特的化学特点 (如: 极性、pKa、溶解性等)
- 目标化合物是否有稳定性的局限

检测限的要求

- 根据所用的检测器灵敏度, 考虑是否需要在前处理中对样品进行浓缩

生物样品前处理技术比较

		高	← 对仪器和检测方法的要求					←	低
		差	→ 样品前处理的专一性					→	佳
样品前处理技术	去除的干扰物	稀释进样	过滤	常规液液萃取	固相支持液液萃取 (SLE)	蛋白质沉淀	QuEChERS	脂类去除过滤	固相萃取
	脂类	否	否	否	一些	否	是	是	是
	低聚物	否	否	否	否	否	否	是	是
	表面活性剂	否	否	否	否	否	否	是	是
	颗粒	否	是	否	一些	是	是	是	是
	色素	否	否	否	一些	否	是	否	是
	极性有机酸	否	否	是	是	否	是	否	
	蛋白质	否	否	是	是	是	是	是	是
	盐	否	否	是	是	否	否	否	是
安捷伦推荐产品		进样瓶/ 96 孔收集盘	Captiva 针筒过滤头		Chem Elut	Captiva ND	Bond Elut QuEChERS	Captiva ND LIPIDS	Bond Elut Silica 和 Polymeric SPE

Agilent Captiva 过滤产品推荐应用于所有的 LC 和 LC/MS 分析

简化生物分析样品前处理流程 — 更快更方便!

自动化蛋白质沉淀样品制备实现高通量分析

Agilent Captiva ND 无滴落过滤板

Agilent Captiva ND Lipids 无滴落过滤板

对于生物基质中药物的液质分析, 样品前处理的蛋白质去除步骤是必不可少的。蛋白质沉淀及离心是最常见的蛋白质去除技术之一, 然而, 由于涉及多个手工操作步骤, 它不适合高通量分析。基于 96 孔板的全自动蛋白质沉淀系统 Captiva ND, 适用于用有机溶剂沉淀蛋白, 能够显著减少高通量分析实验室进行样品制备所需的时间、成本和人力资源。



左图: Captiva ND Lipids 套件包括

- CaptiVac 真空夹
- Captiva NDLipids 过滤板
- 96 孔深孔收集盘
- 可扎透的收集板硅胶盖

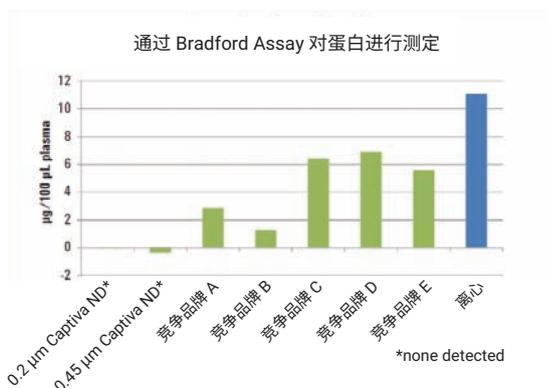


右图: 单独显示 CaptiVac 真空夹

产品优势:

- 自动化的简便操作 — 可在 96 孔板内进行有机溶剂蛋白质沉淀, 不抽真空时不滴落
- 独特的过滤性能 — 双层双孔径过滤, 防止堵塞及样品丢失
- 高效快速的蛋白沉淀和磷脂去除 — 在几分钟内就可以得到不含颗粒、不含蛋白质的样品, 比传统的离心方法快 5 倍
- 优异的脂类去除能力 — Captiva ND Lipids 可去除样品中 99% 以上的脂类和蛋白, 确保痕量分析的精确度和重复性, 特别适用于对样品洁净程度及回收率要求高的样品分析
- 延长柱寿命 / 缩短仪器停机时间 — 最大程度减小色谱柱污染和系统压力问题, 节省仪器维护时间和成本
- 全面的产品形式满足您的需求 — 96 孔板帮您实现高通量和自动化, 3mL 针筒式助力较大体积样品需求

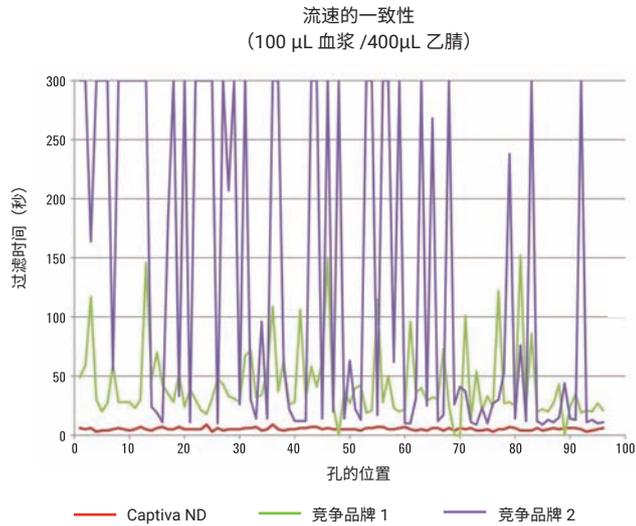
Captiva ND — 优异的蛋白质去除能力
(基于 Captiva ND 96 孔板的研究数据):
采用图中蛋白质沉淀产品或技术处理
100uL 人血浆样品 (n=24) 后的蛋白质
含量测定。



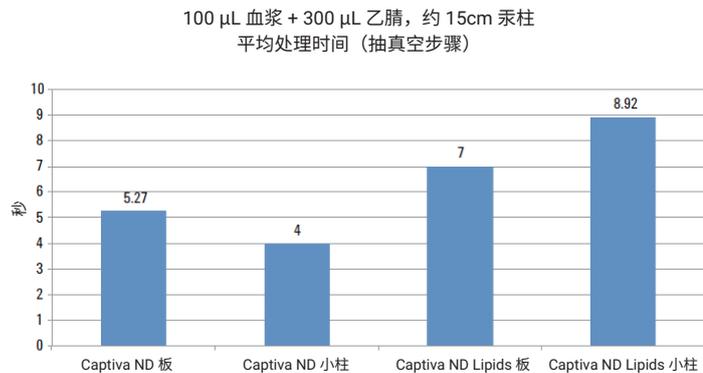
Captiva ND & Captiva ND Lipids

为生物分析提供持久稳定的性能

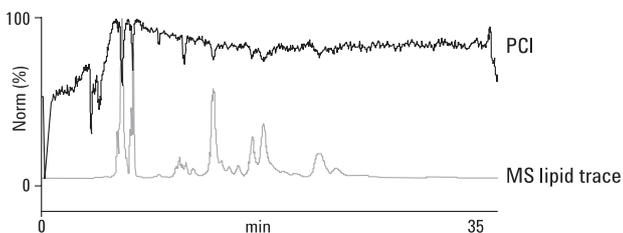
Captiva ND 96 孔板均匀的孔间重现性即便采用真空泵形式，也可得到快速一致的样品处理结果，无需正压系统。



安捷伦 Captiva ND 及 Captiva ND Lipids 处理血浆样品的速度适中，无明显堵塞。

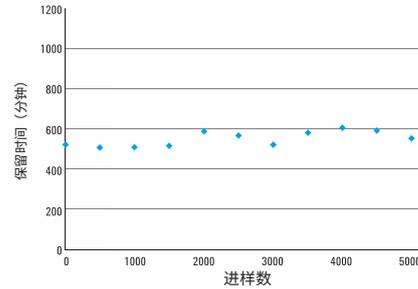


Captiva ND Lipids 处理后的血浆样品，明显减少了脂类造成的离子抑制：

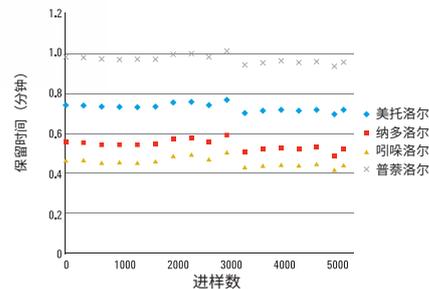


无 Captiva ND Lipids 处理的血浆，柱后注射沙丁胺醇的液质响应 (上图) 及脂类的液质响应 (下图)。

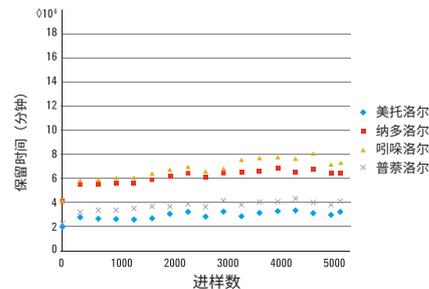
Captiva ND 样品前处理的长期稳定性实验中的系统背压数据：



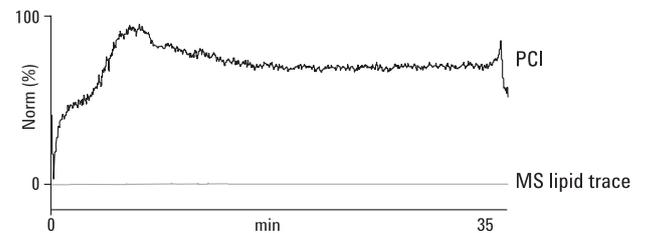
样品经 Captiva ND 净化之后，5000 次连续进样的保留时间数据：



含 β 阻断剂的人血浆样品经 Captiva ND 净化之后的峰面积稳定性数据：



Captiva ND Lipids 处理后的血浆，柱后注射沙丁胺醇的液质响应 (上图) 及脂类的液质响应 (下图)。



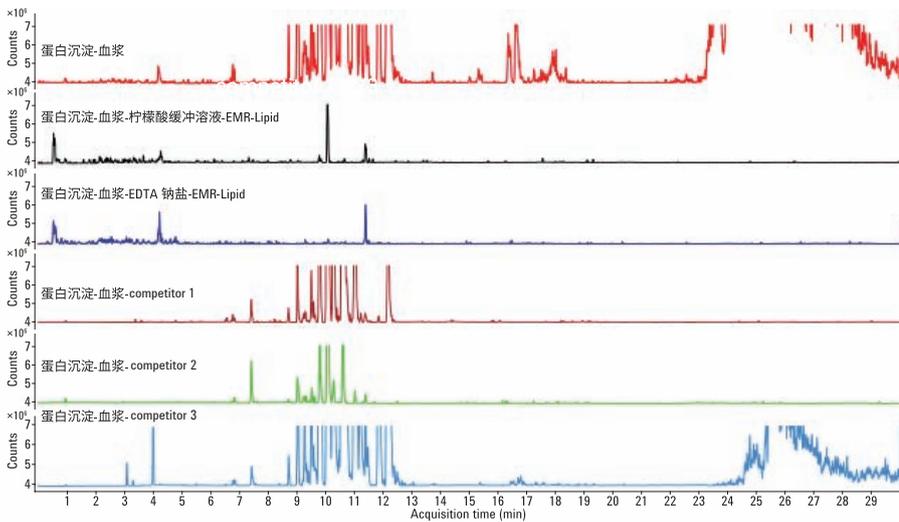
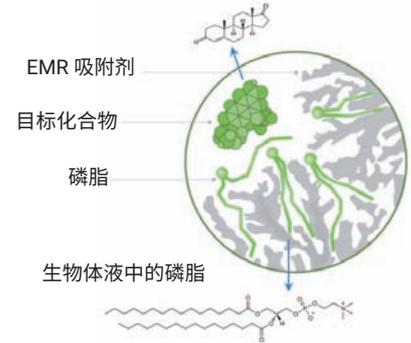
Captiva EMR-Lipid

专门用作生物体液分析

增强型脂质去除产品 Captiva EMR-Lipid 与其它样品前处理方法不同,它是一种能够选择性去除复杂基质中脂质并挑战血浆等高脂肪含量样品的独特吸附剂,因此您可以在不损失分析物的前提下去除脂质。

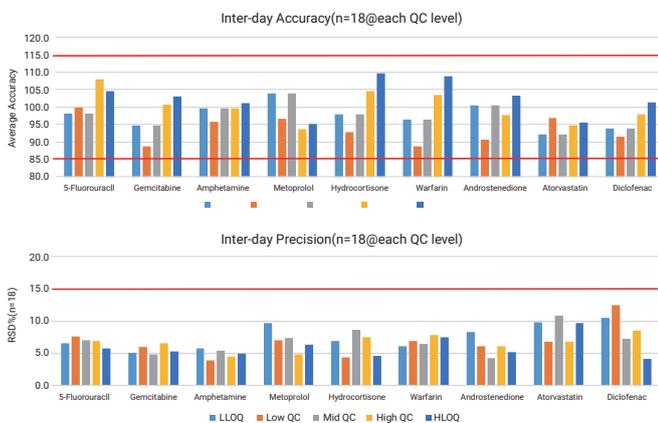
- 氧化硅支持基质上的 EMR 吸附剂提供高效基质脂质去除
- 1 mL 填充小柱和 96 孔板
- 样品通过式的基质清除,与 PPT 样品处理流程的完美结合
- 防渗透设计与深层过滤确保柱内 PPT 及沉积物过滤的高效可行性

小分子目标物,如生物流体中的激素类

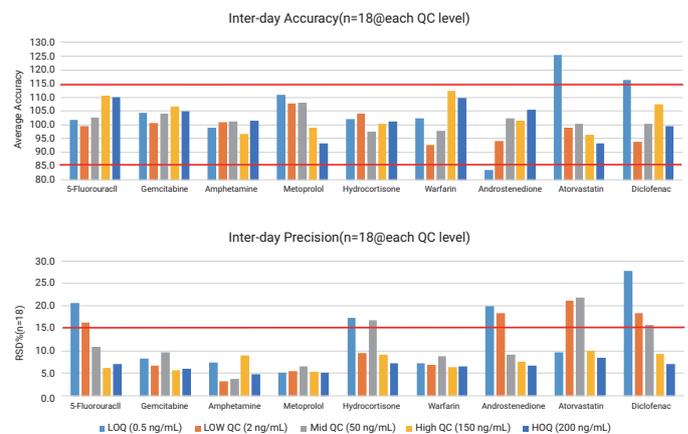


采用普通蛋白质沉淀、安捷伦 EMR-lipid 产品、以及其它竞争产品处理血浆样品后,采用 LC/MS/MS 对 m/z 184 (主要的脂类结构碎片)的母离子进行扫描所获得的谱图。由图可见,EMR-Lipid 对脂肪的去除能力要远远优于竞争产品。

使用蛋白沉淀及 EMR-Lipid 对血清样品前处理的方法验证数据



仅使用蛋白沉淀对血清样品前处理的方法验证数据



血浆中常规药物不同前处理方法验证数据,及定量的准确度和精密度对比。

(QC 添加浓度: LLOQ = 0.5 ng/mL; Low QC = 2 ng/mL, Mid QC = 50 ng/mL, High QC = 150 ng/mL, HLOQ = 200 ng/mL)

固相支持液液萃取 Chem Elut

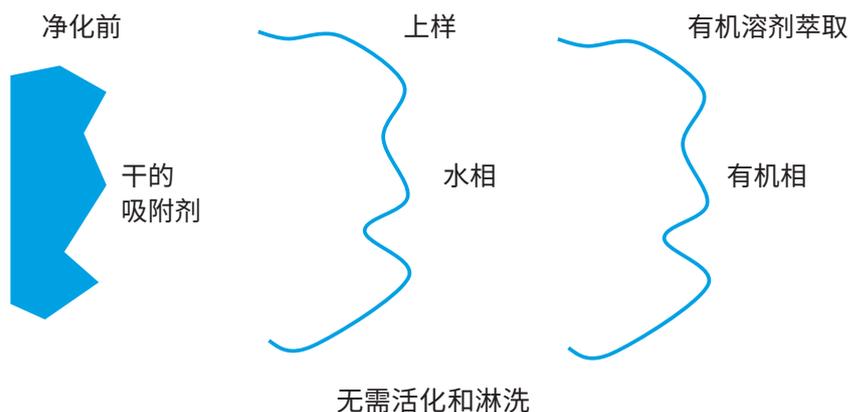
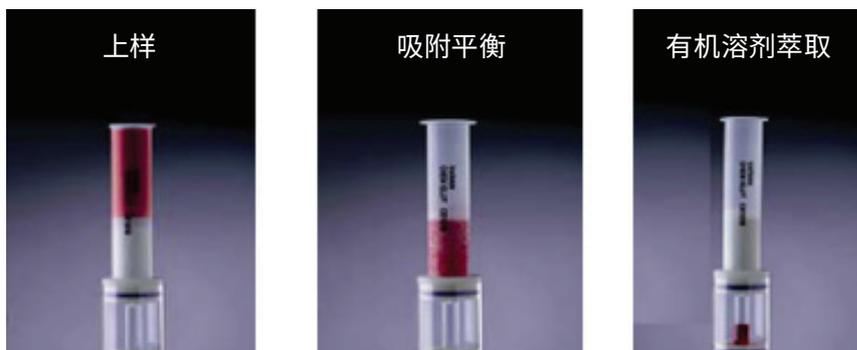
简单高效自动化

Chem Elut 是一种经济型、用途广泛的吸附剂, 可以用于诸如血浆、血清、全血和尿等生物样品的快速样品前处理。具有如下特点:

- 高纯度惰性硅藻土吸附剂 Hydromatrix
- 强极性表面
- 高比表面积吸水模式
- 适于生物体液中的小分子药物的萃取
- 超净的聚丙烯管

优势:

- 快速处理
- 简易操作
- 与自动化操作兼容
- 可批量处理样品
- 提高分析结果重复性
- 避免发生乳化现象



Agilent Chem Elut™ - pre-assembled cartridges



Agilent Combitut™ - 96-well plate

Bond Elut 固相萃取系列

安捷伦拥有包括最常用的 C18、C8 在内的将近 50 种不同吸附功能的填料、不同形式的柱形和不同规格的 96 孔板, 为生物分析中多样化的药物种类提供最优的选择性。

在下表中, 我们列出了适合于生物流体中药物分析的 Agilent Bond Elut 固相萃取 (SPE) 系列产品选择指南。

方法	Bond Elut 填充吸附剂	分析物	活化溶剂	洗脱溶剂	应用举例
反相非极性萃取	C18、C8、C2、CH-环己基、PH-苯基、CN-封端	疏水基团: 芳香环、脂肪烃	甲醇、水或缓冲液	甲醇、乙腈、酸性甲醇、非极性溶剂 (乙酸乙酯、氯仿、正己烷)	弱极性或非极性药物
阳离子交换	SCX- (强)、PRS-丙磺酸 (强)、CBA-羧酸 (弱)	阳离子: 氨基、嘧啶	低于分析物 pKa 值 1-2 个 pH 单位的缓冲液	碱性缓冲液 (高于分析物 pKa 值 1-2 个 pH 单位) 或者高离子强度缓冲液	儿茶酚胺、碱性药物
阴离子交换	SAX-季胺 (强)、PSA-伯胺/仲胺 (弱)、NH ₂ -胺丙基 (弱)、DEA-二乙基胺丙基 (弱)	阴离子: 羧酸、磺酸、磷酸	高于分析物 pKa 值 1-2 个 pH 单位的缓冲液	酸性缓冲液 (低于分析物 pKa 值 1-2 个 pH 单位的缓冲液)	有机酸、维生素、脂肪酸、磷酸
共价萃取	PBA-苯硼酸	带有顺式邻二醇官能团的化合物	甲醇、水或缓冲液	酸性缓冲液、酸性甲醇	核苷酸、糖类、儿茶酚胺
专业固定相	Certify - (C8 + SCX)	阳离子药物	甲醇、水或缓冲液	强酸、强碱、含有酸或碱的有机混合物	碱性药物、中性药物
	Certify II - (C8 + SAX)	阴离子药物	甲醇、水或缓冲液	强酸、强碱、含有酸或碱的有机混合物	酸性药物
	AccuCAT - (SCX + SAX)	阳离子 阴离子	缓冲液	酸性或碱性缓冲液、高离子强度的缓冲液	有机酸、儿茶酚胺、碱性药物
	TCA-三环抗抑郁药	疏水基团 (芳香环、脂肪烃)	甲醇和水	甲醇、碱性甲醇	三环抗抑郁药苯 (并) 二氮
高级聚合物	Plexa	疏水基团	甲醇和水	甲醇	酸性、碱性和中性药物
	Plexa PCX	疏水基团、阳离子化合物	甲醇和水	甲醇、乙腈、酸性和碱性的甲醇/乙腈混合溶剂	碱性化合物
	Plexa PAX	疏水基团、阴离子化合物	甲醇和水	甲醇、乙腈、酸性和碱性的甲醇/乙腈混合溶剂	酸性化合物

Bond Elut Plexa 系列

为您提供不同凡响的易用和重现的操作流程

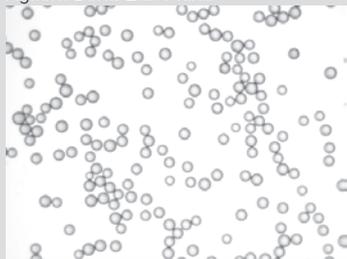
优异的填料颗粒完整性, 节省您的分析时间, 减轻您的工作负荷

Agilent Bond Elut Plexa 产品显示出优异的填料颗粒完整性, 不存在粒径过大、填料颗粒破损或细小的颗粒, 这些特点可有效避免筛板堵塞及样品损失。

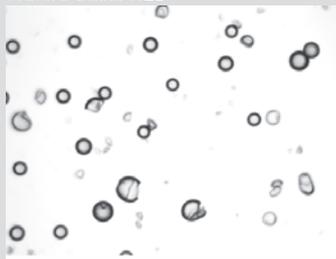
填料粒径分布窄, 能够提高流畅性, 减少堵塞的发生

Agilent Bond Elut Plexa 与 Waters Oasis 填料粒径分布和流速比较如图 2 和 3 所示, 两种产品粒径均值相近, 然而, Bond Elut Plexa 填料的粒径分布符合高斯分布, 显示了更好的流畅性和更佳的重复性。而 Waters 聚合物填料粒径分布范围宽, 并含有破损及粒径低于 10 μm 的细小填料颗粒。宽粒径分布的填料会降低流速, 提高柱堵塞风险, 降低分析精密度 (降低柱间及孔间的重现性)。

Agilent Bond Elut Plexa



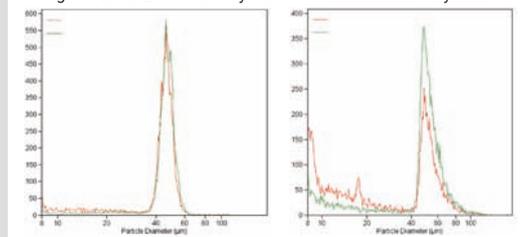
Waters Oasis HLB



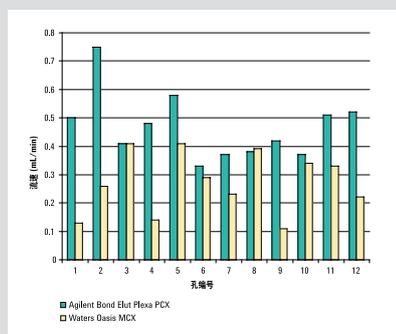
SPE 聚合物填料粒径的放大分析比较图

Agilent Bond Elut Plexa Polymers

Waters Oasis Polymers



SPE 聚合物填料的粒径分布比较图



96 孔板上 12 个孔的分析结果



Bond Elut Plexa 重要优势：

没有细的粉末意味着：

- 减少堵塞
- 流畅性更好, 重复性更佳

近似单分散微粒可以提供：

- 优异重复的填充效果
- 更佳流速重复性

Bond Elut Plexa 系列

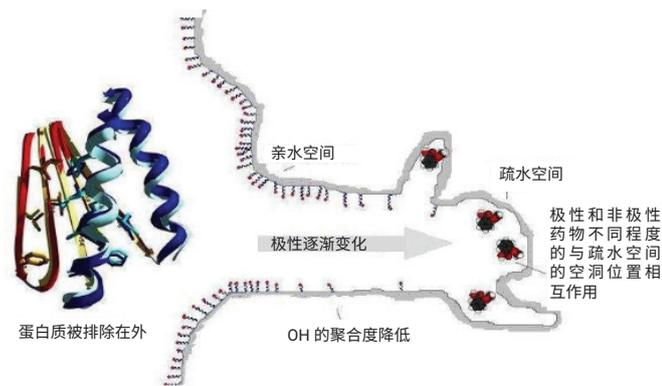
生物基质药物分析的理想之选

Agilent Bond Elut Plexa SPE 产品具有独特的羟基化表层、疏水性内层和优良的聚合物结构, 为复杂的生物分析提供稳定可靠的分析结果。



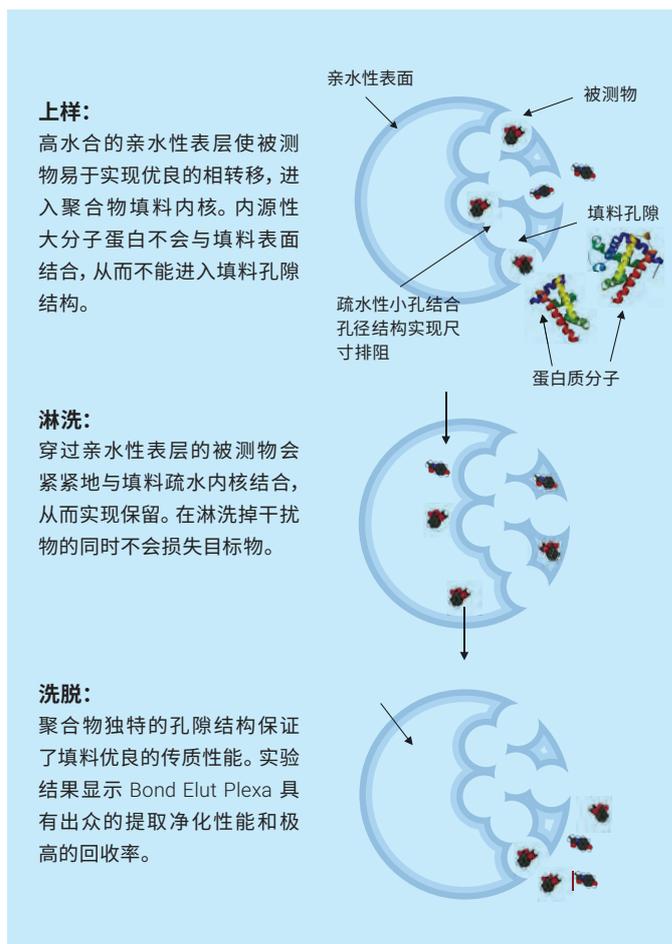
- 更佳的流畅性: 填料粒径均匀、分布窄, 确保在固相萃取操作过程中保持更佳的流畅性
- 优异的柱间重现性: Plexa 吸附剂填料利用专利聚合技术生产, 粒径分布极窄, 并且可以消除细小填料颗粒的产生
- 更少的时间和样品消耗: 无细小颗粒, 有效减少了 SPE 及筛板堵塞的风险, 并减少样品损失
- 更加可靠的数据: 专利的自动化筛板安装和实时生产流程质量监控, 使填充吸附剂柱床中的沟槽 (或死体积) 最小化, 有效防止分析物穿漏及回收率波动

羟基化表面 (而非氨基官能团表面) 排除了蛋白质结合, 可最大限度减小离子抑制, 有效阻止基质干扰。



两种聚合物填料选择可涵盖广泛种类和性质的被测物:

- Agilent Bond Elut Plexa (非极性聚合物) 是从不同基质中广泛萃取酸性、中性和碱性被测物的理想选择。
- Agilent Bond Elut Plexa PCX 是一种强阳离子交换剂, 具有复合吸附特性, 它适合萃取和纯化生物体液中的碱性和非极性被测物。Bond Elut Plexa PCX 具有和 Bond Elut Plexa 同样优异的粒径分布和出众的填料颗粒完整性。



Bond Elut Plexa 系列

无障碍固相萃取应用的通用方法

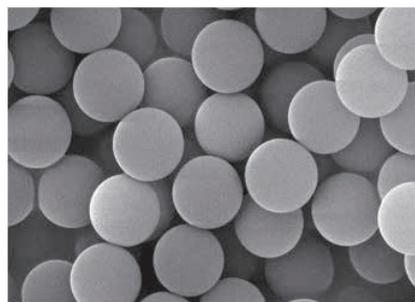
根据目标化合物的性质，我们推荐用以下流程做为起始方法，再根据实际情况对方法进行优化和调整。

	酸性药物	中性药物		碱性药物
目标化合物	Log P > 1.0 pKa < 5	Log P > 1.5 pKa 3-6	Log P > 1.5 pKa 6-10	Log P > 0.8 pKa 6-10
	Plexa PAX	Plexa 弱酸性药物	Plexa 弱碱性药物	Plexa PCX
样品处理	2% NH ₄ OH	1% HCO ₂ H	2% NH ₄ OH	2% H ₃ PO ₄
目标化合物	100% 甲醇	100% 甲醇		100% 甲醇
平衡	100% 水	100% 水		100% 水
上样	使用预处理好的生物样品			
淋洗	100% 水	5% MeOH 的水溶液		2% 甲酸水溶液
洗脱 1	100% 甲醇 中性	100% 甲醇 中性		1:1 甲醇/乙酸酸性 中性
洗脱 2	5% 甲酸甲醇溶液酸性			5% NH ₃ 的1:1 甲醇/乙腈溶液碱性
分析	吹干复溶或稀释进样 LC/MS			

Poroshell 120 液相色谱柱

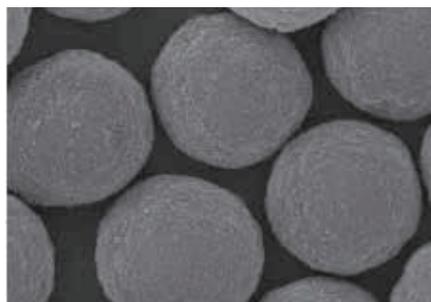
持久、快速的液相色谱，您的信心之选

Agilent Poroshell 120 色谱柱专利的填料生产技术：



第一步 制造实心内核

Poroshell 120 填料内核具有非常光滑的表面和均一的粒径，整体粒径分布集中。因此可以获得填充更紧实的柱床以及比全多孔填料更高的效率。



第二步 包覆多孔外壳

安捷伦采用单步法（即采用与制造传统 ZORBAX 色谱柱相似的凝聚技术）制造多孔外壳。这种独特的单步法工艺提高了产量，使柱间重现性优于其他供应商的产品。



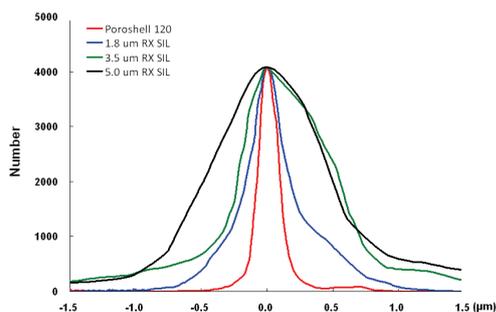
第三步 键和固定相

Poroshell 120 固定相系列已扩展至能够匹配 ZORBAX 系列固定相，在方法开发方面具备更强的灵活性和可扩展性。

专利制作技术，造就均匀的填料粒径

全多孔填料和 Poroshell 120 填料的粒径分布对比：

这幅图表明 Poroshell 120 色谱柱最终填料粒径的分布最集中，这是内核填料粒径集中分布的直观结果。

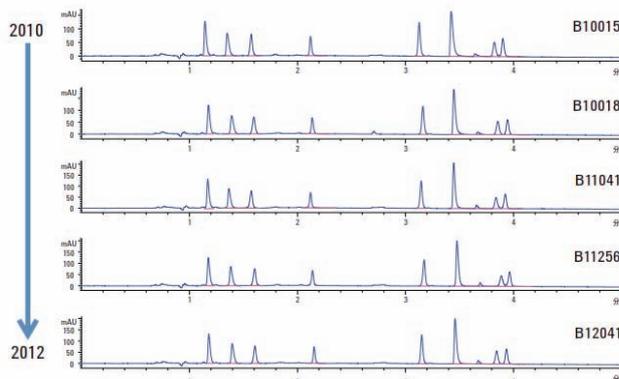


分布集中的最终填料粒径是内核粒径集中分布的结果。这有助于实现最小扩散，使表面多孔层色谱柱具有高柱效。

单步法的简单工艺，造就出色的批次重现性

制造工艺越简单，色谱柱一致性越出色：

从五个批次之间的对比结果可以得出，单步孔层工艺创造出了高重现性的色谱柱。Poroshell 120 颗粒采用安捷伦发明的专利性多孔颗粒制作工艺制成。不同于传统的多层制造工艺，Poroshell 120 色谱柱采用单步式凝聚工艺制造，保证最终获得的颗粒更加均匀、色谱结果更加可靠。



Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 100 mm, 2.7 µm
(部件号 695975-902)，来自 5 个不同批次

Poroshell 120 液相色谱柱

适用于生物分析的色谱柱理想之选

样品检测任务重？

Poroshell 120 多孔外层和实心内核限制了扩散距离并提高了分析速度，而窄粒径分布同时提高了柱效，更好地分离邻近洗脱峰，提高 LC/MS 准确度与鉴定性能。分析速度和分离度可媲美亚 2 μm ，而背压可降低约 40%。



简单样品前处理后，样品仍然比较脏？

Poroshell 120 2.7 μm 粒径色谱柱配有 2 μm 筛板，因此不易发生堵塞，保证较长的色谱柱寿命，这在生物分析应用中分析脏的生物样品时尤其重要。适用于 UHPLC 的快速保护柱也可进一步延长色谱柱寿命，同时不会降低 UHPLC 的性能。

样品浓度低，需要提高灵敏度？

Poroshell 120 由于其特殊的核壳设计提高了柱效，减小了峰宽，使得色谱峰的响应灵敏度比常规 5 μm 色谱柱提高了 2 到 5 倍。高柱效同时可改善色谱分离，帮助减小复杂生物样品的基质效应。

需要多种键合相、多种规格便于方法开发及不同仪器的需求？

- 目前 12 种键和相供您灵活选择，帮您实现完美的分离
- 三种粒径选择 (4 μm / 2.7 μm / 1.9 μm)，使您实验室的液相仪器物尽其用

要求稳定的质量和优异的批次间重现性？

Poroshell 120 色谱柱由专利性单步多孔壳层工艺制造而成，这极大地减少了色谱柱之间和批次之间的细微差异。

通用型	低 pH 流动相 耐受最佳	低 pH 流动相 耐受最佳	不同的选择性	强极性化合物 分析适用
Poroshell 120 EC-C18 1.9 μm , 2.7 μm , 4 μm	Poroshell 120 SB-C18 2.7 μm	Poroshell HPH-C18 1.9 μm , 2.7 μm , 4 μm	Poroshell 120 Bonus-RP 2.7 μm	Poroshell 120 SB-Aq 2.7 μm
Poroshell 120 EC-C8 1.9 μm , 2.7 μm , 4 μm	Poroshell 120 SB-C8 2.7 μm	Poroshell HPH-C8 2.7 μm , 4 μm	Poroshell 120 PFP 1.9 μm , 2.7 μm , 4 μm	Poroshell 120 EC-CN 2.7 μm
Poroshell 120 Phenyl-Hexyl 1.9 μm , 2.7 μm , 4 μm				Poroshell 120 HILIC 1.9 μm , 2.7 μm , 4 μm

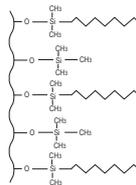
Poroshell 120 液相色谱柱

多种固定相更适用于生物分析中的方法应用

方法开发首选柱

Poroshell 120 EC-C18 和 C8:

- 小分子药物开发和筛选的通用色谱柱
- 双重封端优异峰型
- 专利技术造就更长的色谱柱寿命和稳定性



高 pH 应用

Poroshell 120 HPH-C18 和 C8

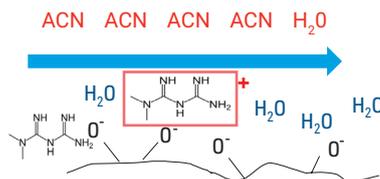
- 方法开发和筛选的合适选择
- 为碱性药物提供更强保留及完美峰形
- 较宽的 pH 耐受范围, 尤其高 pH 条件下具有极佳的稳定耐用性 (pH 2~11)



亲水模式应用

Poroshell 120 HILIC

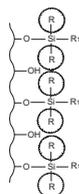
- 高纯硅胶基质的亲水作用色谱固定相
- 适合强极性药物的 HILIC 模式分析



低 pH 应用

Poroshell 120 SB-C18 和 C8

- 低 pH 条件应用的绝佳选择
- 为酸性液质分析条件提供稳定的柱寿命



Poroshell 120 SB-Aq

专利固定相是极性化合物和高水性条件分析的理想选择。

Poroshell 120 Bonus-RP

极性嵌入式的 Bonus-RP 改善了峰形, 尤其适合于低和中等 pH 条件下极性化合物及碱性化合物的分离。

Poroshell 120 Phenyl-Hexyl

该固定相可替代苯基官能团的选择性, 为苯基结构化合物提供良好的选择。

Poroshell 120 PFP

为卤代化合物、苯环上的位置异构体及极性分析物的分离提供了另一种选择性。

Poroshell 120 EC-CN

与 ZORBAX Eclipse XDB-CN 类似, 为极性化合物提供另一种选择性。



生物分析样品

- 血液
- 血浆
- 血清
- 尿液
- 组织
- 生物液体



样品制备

- Captiva ND 系列蛋白质沉淀板
- Chem Elut 固相支持液液萃取板
- Bond Elut Plexa 系列固相萃取小柱和 96 孔板



样品分析

- Poroshell 120 EC 系列双重封端良好峰型
- Poroshell 120 HPH 系列高 pH 流动相稳定耐用
- Poroshell 120 SB 系列低 pH 流动相稳定耐用
- Poroshell 120 HILIC 高纯硅胶亲水应用

安捷伦生物分析推荐方法包

Captiva 自动化蛋白质沉淀板

Captiva ND 96 孔板, 5/包	A5960002
Captiva ND Lipids 96 孔板, 5/包	A59640002V
Captiva EMR-Lipid 96孔板, 5/包	5190-1001

Agilent Chem Elut

Combilute 96 孔板	65401507
-----------------	----------

Bond Elut Plexa 聚合物 SPE

规格	Plexa	Plexa PCX	Plexa PAX
30mg, 2mL, 96 孔板, 1/包	A3969030	A3968030	A3967030

Poroshell 120 2.7µm 液相色谱柱

规格 (mm)	Poroshell 120 EC-C18	Poroshell 120 SB-C18	Poroshell 120 HPH-C18	Poroshell 120 Bonus-RP	Poroshell 120 SB-Aq	Poroshell 120 PFP	Poroshell 120 HILIC
2.1 x 50	699775-902	689775-902	689775-906	699768-901	689775-914	699775-408	699775-901
2.1x 100	695775-902	685775-902	695775-702	695768-901	685775-914	695775-408	695775-901
3.0 x 50	699975-302	689975-302	699975-502	699968-301	689975-314	699975-308	699975-301
3.0x 100	695975-302	685975-302	695975-502	695968-301	685975-314	695975-308	695975-301

特别说明：

此手册只包含了安捷伦适用于生物分析的主要前处理和色谱柱产品,并未包含所有适用的产品。更多产品信息,请联系安捷伦消耗品销售或安捷伦客户服务中心。

了解更多信息

www.agilent.com

查找当地的安捷伦客户中心

www.agilent.com/chem/contactus-cn

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

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, 2017

2017年9月12日, 中国出版

5991-7928CHCN



Agilent Technologies