



使用 AGILENT ADVANCEBIO 反相色谱柱优化生物分子的鉴定

The Measure of Confidence

白皮书

为何选择反相色谱？

蛋白质生物药物非常不均匀，因此可能需要采用多种色谱技术以全面表征活性药物成分 (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鉴定电荷异构体的离子交换色谱。这两种技术均采用水相洗脱液和非变性条件。然而，作为蛋白质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制造的纯化或配制步骤中对该序列可能进行的任何翻译后修饰。在执行此类分析时，需要采用变性条件，因此反相 HPLC 通常为首选技术。

反相 (RP) 是用于生物色谱的三种关键技术之一，并且因其兼容 LC/MS 检测技术而尤为有用。对 Agilent ZORBAX RRHD 300Å, 1.8 μm 色谱柱等小颗粒填料的改进使 RP 成为许多生物制药应用的理想选择。对于完整单克隆抗体和大片段分离，AdvanceBio RP-mAb 中采用的 Agilent Poroshell 技术具有独特优势，因为它缩短了扩散距离，可提供显著的速度和分离度优势。通过引入最新的固定相化学组成，RP 分离能够提供更多选择性，其中某些分离对蛋白质具有更高的灵敏度。例如，AdvanceBio RP-mAb 和 ZORBAX RRHD 300Å 1.8 μm 色谱柱采用的独特联苯固定相可实现完美分离，该分离效果难以通过其他化学键合相实现。

反相色谱的优势之一在于它在分析不同阶段的蛋白质时具有通用性。图 1 示出从完整 mAb 到多肽 mAb 片段的步骤，它是全面表征 mAb 流程的组成部分。该表征从完整蛋白质开始，然后进行还原、烷基化和消解。大孔反相色谱柱适用于前两个步骤，而孔径较小的色谱柱最适合分析消解的蛋白质。利用不同的键合相、色谱柱尺寸和色谱条件可获得不同的选择性。

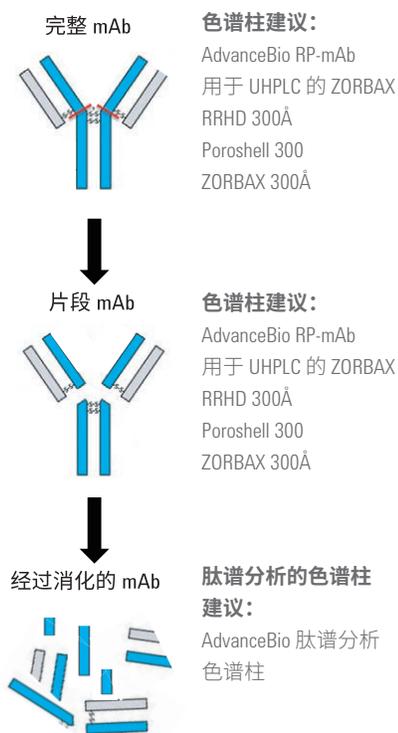


图 1. 从完整蛋白质到消解蛋白质的过程



Agilent Technologies

孔径较大的色谱柱可用于分离重链和轻链或 Fab 和 Fc 区等结构。我们建议采用 AdvanceBio RP-mAb 分析非常大 (150 kDa) 的分子。对于 UHPLC 或需要极高分离度的应用, 可首选 ZORBAX RRHD 300Å, 1.8 μm 色谱柱。蛋白质消解的最后一步是酶解, 该步骤将产生小肽片段。然后利用孔径 120Å 的色谱柱完成肽谱分析, 正如 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱所做的工作。

对蛋白质表征过程的这一简要概述是一个开始, 但作为所有蛋白质分析起始点的样品前处理又该如何?

通过样品前处理实现更出色的生物色谱分析

样品前处理对于利用生物色谱获得准确、可重现且有意义的结果是一个重要步骤。从生物细胞或有机体中分离所得的蛋白质含有各种污染物, 例如天然存在的角蛋白、白蛋白、血清蛋白、核酸、脂质、碳水化合物和多糖。此外, 为了保持酶活性或生物活性, 可能还需要添加各种无机盐、缓冲液、还原剂、表面活性剂、去污剂和防腐剂。这些物质会影响液相色谱技术的性能 (例如质谱的检测和/或定量分析性能), 必须除去这些物质才可获得准确的分析结果。

不存在可分离混合物中所有蛋白质的通用的样品前处理步骤, 因为蛋白质以多种形式存在, 并位于细胞的不同位置 (如细胞膜或细胞质), 而且还具有不同的溶解度。

常用的蛋白质样品前处理方法包括脱盐、富集、离心、亲和、透析、过滤和超滤、沉淀以及冷冻干燥。可根据蛋白质的不同特性 (例如等电点、分子量、形状、溶解度和疏水性) 进行纯化流程设计。因为蛋白质是易损物质, 所以样品前处理过程中必须谨慎操作, 以避免引入改变蛋白构象和生物活性的负面修饰。

生物色谱样品前处理方法由样品类型和所需的分离类别决定, 其取决于检测器、仪器及其他因素。表 1 示出了选择样品前处理方法时的主要选项。这些选项并不相互冲突, 因此针头预过滤器可用于除去脏样品中的颗粒物, 然后利用 Captiva ND Lipids 过滤板或管除去磷脂并防止离子抑制。

表 1. 用于生物色谱的样品前处理选项

样品	样品前处理装置	备注	参考文献
高丰度蛋白质	安捷伦多重亲和去除系统	利用安捷伦多重亲和去除系统 (MARS) 可以对血清、血浆和其他体液中高价值的低丰度蛋白质和生物标记物进行鉴定和表征。MARS 能够可重现且特异性地除去人生物体液中的 14 种高丰度蛋白质并除去小鼠生物体液中的三种高丰度蛋白质，提供各种液相色谱柱尺寸和离心小柱形式。MARS 与安捷伦优化的缓冲液、便捷的离心过滤膜和浓缩器相结合，形成了自动化的集成式蛋白质去除解决方案，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。利用 MARS 净化的样品适用于二维凝胶电泳、LC/MS 及其他分析技术等下游分析。	Agilent BioHPLC 色谱柱选择指南
脱盐	mRP-C18	在使用 MARS 除去高丰度蛋白质后，Agilent mRP-C18 色谱柱实现人血清的最佳脱盐和浓缩。这一组合的工作流程能够使生物标记物研究的进一步下游处理获得高回收率。另外，采用分子量截留 (MWCO) 后可省略离心浓缩步骤，从而安全回收通常小于 5 kDa MWCO 的肽和多肽。该技术通过联用可以实现正交分离，且不干扰 mRP-C18 色谱柱能够去除的盐分或其他添加剂。	应用简报 5989-2506EN
颗粒含量高的样品	Captiva 优质针头过滤器玻璃纤维/尼龙	玻璃纤维用作在颗粒物堵塞膜之前将其捕获的预过滤器，使 PTFE 能够高效滤除样品中的颗粒物	应用简报 5991-1308EN
蛋白质分析、生物分子、缓冲溶液	Captiva 优级针头过滤器 PES	建议采用 PES，因为它具有极低的蛋白质结合特性。它是一种疏水性膜，且可萃取物含量超低。PES 可兼容水溶液和一些有机溶液	应用简报 5991-1308EN
微量 SPE	OMIX	OMIX 移液枪头能够在 MALDI-TOF 或 LC/MS/MS 分析前可靠地纯化和富集飞摩尔及皮摩尔级的多肽和蛋白质。OMIX 所用的独特整体吸附剂技术可始终提供均匀液流与较强的分析物-表面相互作用。OMIX 的高结合容量可提供高分析效率。10 µL 枪头最多可以结合 8 µg 多肽。OMIX 优异的流通性和超高容量确保了多肽具有可靠的回收率，最大程度减少了多等份、多枪头和蒸发过程中多肽的损失。	应用简报 5990-8885EN
裂解液过滤	Captiva ND 滤板或滤管	简单易用的过滤装置专为高通量、自动化的孔内蛋白沉淀而设计。由于使用了一种独特的无滴落式 (ND) 膜，Captiva ND 过滤板允许首先使用甲醇或乙醇进行蛋白质沉淀处理。Captiva 独特的双层过滤设计提供了快速均匀流量，同时避免了样品损失和过滤器堵塞。	应用简报 5990-8388CHCN
裂解液过滤以及脂质去除	Captiva ND Lipids 滤板或滤管	Captiva ND Lipids 专为血浆的 LC/MS 生物分析而设计，其结合了 Captiva ND 的易用性和卓越的流通性，并带有独特的化学过滤器。这款滤板能有效去除沉淀血浆样品中可产生离子抑制作用的磷脂、蛋白质和表面活性剂的干扰。	应用简报 5991-0445EN

药物研发

研发应用需要极高的灵敏度和分离度，因此质谱 (MS) 得到广泛应用并且非常适合反相分离。MS 的高灵敏度有助于 mAb 及其他重组蛋白的表征，并鉴定复杂的多肽消解物。MS 可提供有关多肽特性和翻译后修饰的信息。

优化药物研发的技巧

为您的分离选择合适的孔径

硅胶孔径是生物色谱反相色谱柱的一个非常重要的参数。对于分子量小于 5000 Da 的分子，通常选择小孔径（如 90 至 150Å）色谱柱（在生物应用中不使用 60Å 色谱柱）。对于低分子量蛋白质（5 至 150 kDa），

通常采用 200 至 300Å 的孔径。单克隆抗体的分子量约为 150 kDa，因此 300Å、450Å 和更大孔径（如 1000 至 4000Å）色谱柱适用于反相分离。二氧化硅的最大孔径为 450Å。

聚合物 PLRP-S 提供 1000 和 4000Å 孔径，其适合分子量非常高的蛋白质和疫苗。小蛋白质（如分子量约为 5800 Da 的胰岛素）可利用小孔径色谱柱进行分析，但同时应对更大孔径的色谱柱进行评估。选择合适的孔径可最大程度提高效率。孔径过小，则分子进出孔道的扩散受限。采用适当的孔径有助于获得更高的效率。为最大限度提高效率，应选择具有最佳孔径的小粒径。

通常认为具有较小孔径（例如 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱的 120Å）的色谱柱最适合多肽分析。对于多肽、蛋白质片段和完整蛋白质，首选 300Å 孔径或更大孔径的色谱柱。图 4 显示孔径 < 100Å 的色谱柱与孔径 300Å 的色谱柱相比，后者对胰岛素的分离效率提高了一倍以上。孔径最小的色谱柱 (ZORBAX SB-C18) 和孔径最大的色谱柱 (ZORBAX 300SB-C18) 相比，后者得到的峰形也具有显著改善。这两种色谱柱仅有孔径不同；色谱柱的键合类型和粒径均相同。由此提供了更准确的比较，结果表明实现最高效的胰岛素分离需要采用大于 80Å 的孔径。

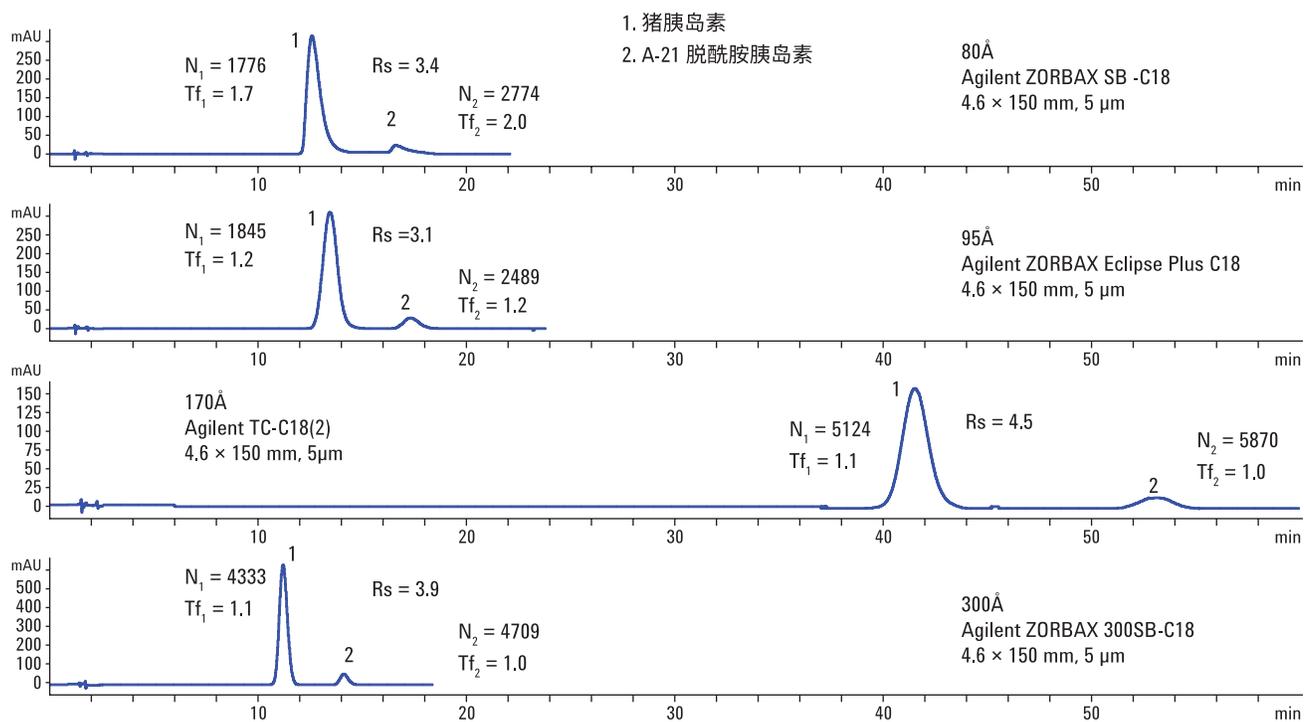


图 4. 胰岛素在 Agilent ZORBAX 4.6 × 150 mm, 5 μm 液相色谱柱上分离得到的色谱图，显示了孔径对分离效率的影响

选择填料粒径较小的色谱柱以提高分离度

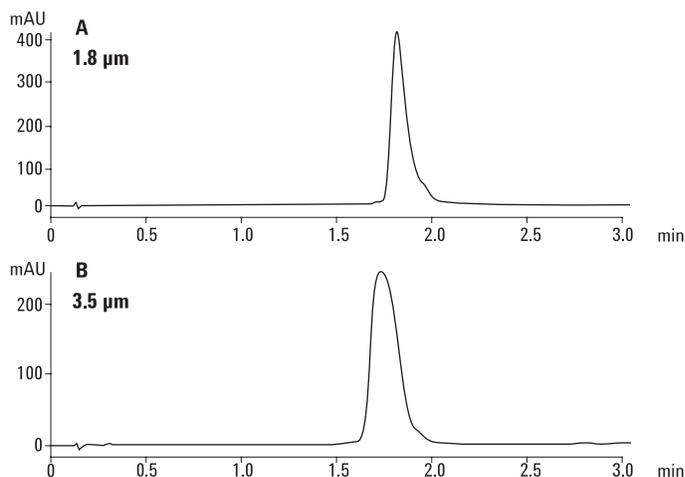
较小的颗粒能够实现更尖锐的峰形和更优异的分度。在图 5 中，我们采用大斜率梯度以较快的流速分析一种完整 mAb，1.8 μm ZORBAX 300SB-C8 色谱柱提供了更高的分离度、更出色的峰形和几乎翻倍的灵敏度。

选择窄内径色谱柱以获得更高的选择性

内径较窄的色谱柱能够洗脱得到更尖锐的谱带，当您选择控制柱外效应时，可获得更高的灵敏度以及对 MS 的兼容性。使用 MS、UHPLC 或二者结合的分析人员希望通过内径 2.1 mm 的色谱柱获得最佳结果。

调节离子对试剂以改善分离

蛋白质和多肽 RPLC 分析的流动相中含有用作离子对试剂的添加剂。这种成分可与分子的带电基团形成离子对，增加分子的疏水性。因此，分子可能与疏水性固定相发生相互作用，从而改善其分离。三氟乙酸 (TFA)、甲酸 (FA) 和乙酸 (AcOH) 等常用添加剂可产生非常低的 pH，并促进蛋白质去折叠和变性。因此，分子可洗脱得到更尖锐、更对称的色谱峰。蛋白质和多肽分离中应用最广泛的离子对试剂为 TFA，但在使用 ESI LC/MS 时，TFA 会降低信号和方法的痕量灵敏度。这会限制这种方法的使用，使鉴定小峰变得更加困难。或者，可采用 FA 和 AcOH 代替 TFA 进行 ESI LC/MS 分析，在有机相中使用较少的 TFA 也有助于增强信号。



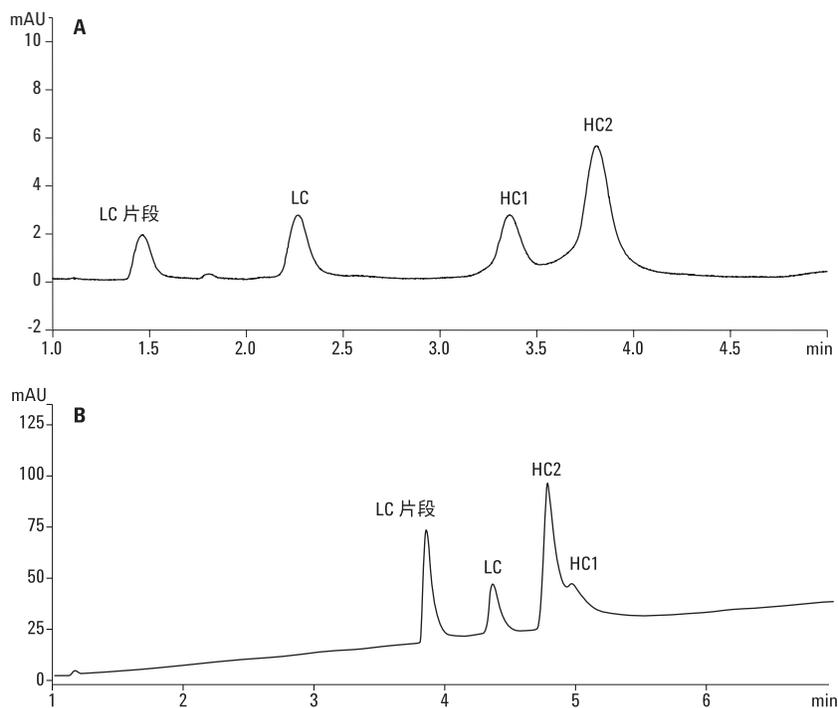
条件

色谱柱:	Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C8, 2.1 × 50 mm, 1.8 μm (部件号 857750-906) Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C8, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm (部件号 865750-906)
洗脱液:	A: H ₂ O:IPA (98:2) + 0.1% TFA (v/v) B: IPA:ACN:H ₂ O (70:20:10) + 0.1% TFA (v/v)
进样量:	1 μL (2 mg/mL)
流速:	1 mL/min
梯度:	多段线性洗脱 时间 (min) %B 0 25 3 25 4 90 5 25
柱温:	80 °C
检测器:	UV, 225 nm
系统:	Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统, 配备自动进样器、二元泵、柱温箱和二极管阵列检测器

图 5. 用 1.8 μm (A) 和 3.5 μm (B) Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C8, 2.1 × 50 mm 液相色谱柱分离完整 mAb 的结果比较。1.8 μm 色谱图表现出更出色的峰形 (A)、分离度和灵敏度

我们评估了有机流动相 B 与多种离子对添加剂的各种组合在 LC/MS 分析中作为仅含 ACN/TFA 的常规系统的替代选择，以提供更高的信号强度。离子对试剂的浓度在 0.5% 和 5% 之间进行调节，而 B 流动相则包括 ACN、1-丙醇和异丙醇或它们的组合。

图 6 显示本研究得到的最佳分离结果。在确定的梯度条件下，轻链和两个重链异构体的分离针对快速分析进行了全面优化，每次分离在 5 分钟内即可完成。上图的分离使用 0.05% TFA 进行了优化，其中加入了 0.5% AcOH。下图显示采用更常规的水/ACN 梯度进行分离的结果，其中加入了 0.05% TFA 和 0.05% FA。在该分离中，两个重链异构体表现出与上图不同的选择性，其中 HC1 和 HC2 的保留位置互换。我们发现使用与图 6 相同的梯度斜率和流动相组成但是不采用 FA 时，无法在 HC1 和 HC2 之间提供足够高的分离度。使用少量 TFA 和 FA 或 AcOH 时，每次分离的条件非常适合超快速分析 mAb，并可成为 LC/MS 分析的替代分析方案。



条件, 图 6A

洗脱液: A: H₂O + 0.5% AcOH:0.05% TFA (v/v)
 B: 正丙醇:ACN:H₂O (80:10:10) + 0.5% AcOH:0.05% TFA (v/v)

梯度:

时间 (min)	%B
0	25
10	35
12	35
14	90
18	25

条件, 图 6B

洗脱液: A: H₂O + 0.05% FA:0.05% TFA (v/v)
 B: 正丙醇:ACN:H₂O (80:10:10) + 0.05% FA:0.05% TFA (v/v)

梯度:

时间 (min)	%B
0	25
7	50
8	90
9	25

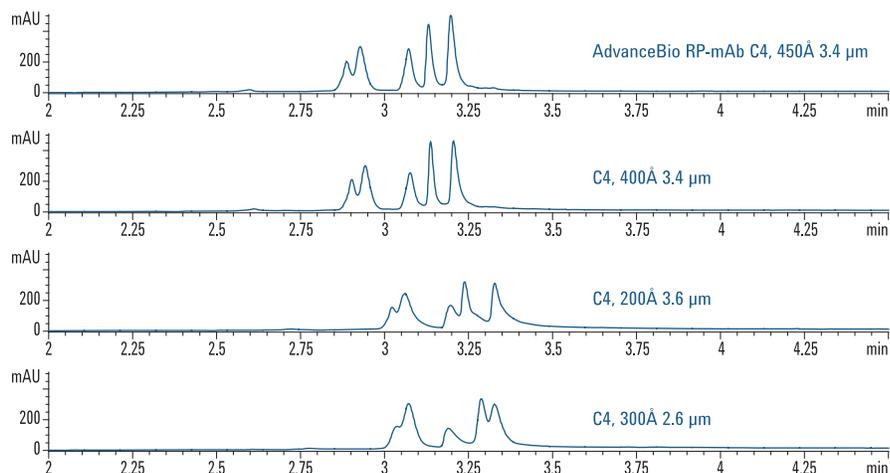
图 6. 使用 Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C8, 2.1 × 100 mm 色谱柱对还原态和烷基化抗体进行超快速 LC/MS 表征的 MS 友好型流动相组分。在上图 (A) 所示的分离中，在洗脱液中加入乙酸以提高 MS 信号强度。在下图 (B) 中，采用更常用的水:乙腈流动相进行分析，但是减少了 TFA 的量并加入甲酸以减少离子抑制

使用基于大孔径表面多孔颗粒填料的色谱柱

由于大分子的扩散速度远远低于小分子，因此蛋白质分离的典型流速较低，以便使蛋白质能够充分进入和离开孔。因此，蛋白质迁移的扩散路径较短的色谱柱更为合适。Agilent AdvanceBio RP-mAb 色谱柱具有这种较短的扩散距离，因为它采用表面多孔颗粒填料结构，并能在更高的流速和更陡峭的梯度下运行，而不存在额外的谱带效应。图 7 是一个很好的示例，说明了如何使用 Poroshell 技术快速实现高分离度 mAb 片段分析，以及填料的孔隙率对分离质量的影响。

另外，柱长更短的亚 2 μm 颗粒色谱柱是在更短运行时间内获得更高灵敏度和更小谱带展宽的理想选择，同时仍具有优异的分度。

安捷伦超高压快速高分离度 (RRHD) 亚 2 μm 色谱柱经过优化，能够在非常短的运行时间内快速分离蛋白质。使用完整单克隆抗体在多种色谱柱流速下对系统梯度进行优化，以评估分离速度及后续分离度对 mAb 分离的影响。



方法参数

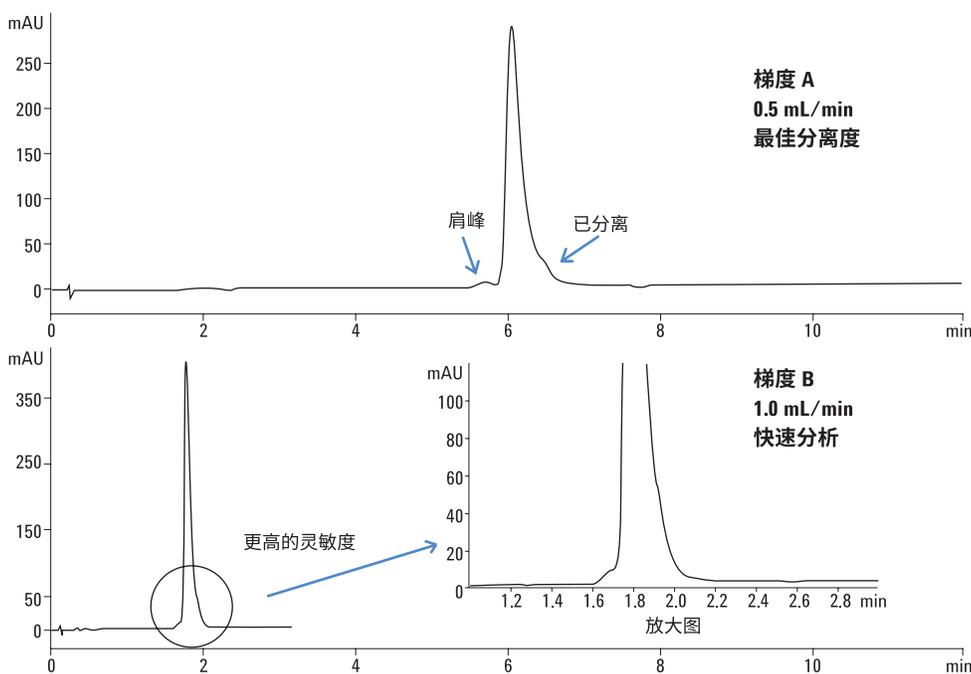
色谱柱尺寸:	2.1 × 100 mm
流动相 A:	0.1% TFA 水溶液
流动相 B:	正丙醇:ACN:流动相 A (80:10:10)
流速:	0.8 mL/min
梯度:	5 min 内 B 由 5% 升至 40%，以 95% B 淋洗 1 min，并以 10% B 重新平衡 1 min
样品:	1 μL 的 Fc/Fab，由木瓜蛋白酶水解的人源重组赫赛汀 IgG1 (2 mg/mL)，购自 Creative Biolabs
柱温:	60 °C
检测器:	UV 220 nm

图 7. Agilent AdvanceBio RP-mAb 色谱柱提供了更短的扩散距离和更陡峭的梯度，且不存在额外的谱带效应

然后选择两种梯度以突出显示快速 mAb 分析的分离效率。特别是，图 8 中的梯度（上方色谱图）经过优化以突出显示对完整 mAb 的超高分离度及其在 7 分钟快速运行过程中出现的肩峰，而图 8 下方色谱图中的梯度被选择用于突出显示 2.0 分钟内的超快速分离，其中灵敏度更高，而分离度略有下降。两次分离均提供了优异的结果，并突出显示了生物治疗药物分析适用的 mAb 分离的不同方面。

表 2. 针对分离度和分析速度优化的梯度

实现最佳分离度的梯度 A		实现高速分析的梯度 B	
时间 (min)	%B	时间 (min)	%B
0	25	0	25
10	35	3	35
12	35	4	90
14	90	5	25
18	25		



条件

色谱柱: Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C8, 1.8 μ m, 2.1 \times 50 mm (部件号 857750-906)
 洗脱液: A: H₂O:IPA (98:2) + 0.1% TFA (v/v)
 B: IPA:ACN:H₂O (70:20:10) + 0.1% TFA (v/v)
 进样量: 1 μ L (2 mg/mL)
 流速: 0.5 或 1 mL/min
 梯度: 多段线性洗脱
 柱温: 80 $^{\circ}$ C
 检测器: UV, 225 nm
 系统: Agilent 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

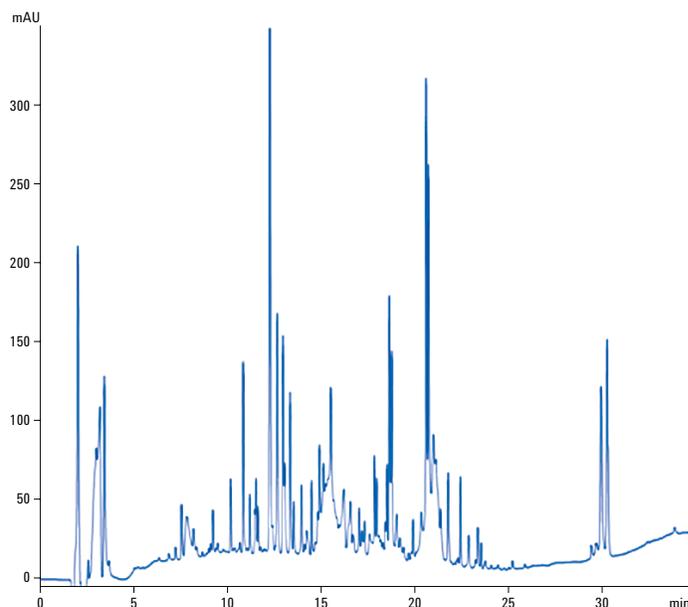
图 8. 两张色谱图比较结果表明，完整 mAb 在 Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度 300SB-C8, 1.8 μ m 色谱柱上实现了最佳梯度分离。上方色谱图显示了在较长运行时间和较低流速下获得的超高分离度，而下方色谱图及放大图则显示在极快分析速度（见表 2）下获得了更高的灵敏度和足够高的分离度，适用于 mAb 筛选

确保色谱柱和方法条件能够实现完全的序列覆盖

为实现肽谱的完全分离，色谱柱需要具备一些重要特性：

- 用于多肽分子量范围的最佳孔径 — 120Å 为理想选择
- 固定相对分离肽谱片段具有良好的选择性，因此可通过 MS 鉴定这些片段；封端的致密 C18 键合相将为亲水、疏水和碱性多肽提供优异的保留性和选择性
- 能够实现快速高分离度分离的色谱柱

Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱专为改善肽谱分析的分离而设计，可提供实现高效肽谱分析（例如促红细胞生成素（rhEPO）分析和增强的糖肽挖掘）所需的更高分离度、更高灵敏度和更高选择性。此外，2.7 μm 表面多孔颗粒填料支持使用 2.1 × 250 mm 这样更长的色谱柱，并以更高流速提供更出色的 rhEPO 分析性能，其反压仅为亚 2 μm 色谱柱的一部分。图 9 为经优化的 EPO 肽谱的一个示例。该分离在整个梯度曲线中表现出优异的分​​离度、选择性和峰形，使其非常适合 ESI-MS 分析，并获得 100% 的序列覆盖率（图 10）。



条件

色谱柱：	AdvanceBio 肽谱分析柱, 2.1 × 250 mm, 2.7 μm (部件号 651750-902)
样品：	重组人源消解 EPO
样品浓度：	2.0 mg/mL
洗脱液：	A: 水 (0.1% FA) B: ACN (0.08% FA), 0-28 min 3%-45% B, 28-33 min 45%-60% B, 33-34 min 60%-95% B
进样量：	5 μL
流速：	0.4 mL/min
柱温：	55 °C
检测器：	UV, 220 nm

图 9. 使用 2.1 × 250 mm 的 Agilent 2.7 μm AdvanceBio 肽谱分析色谱柱得到的反相 rhEPO 肽谱

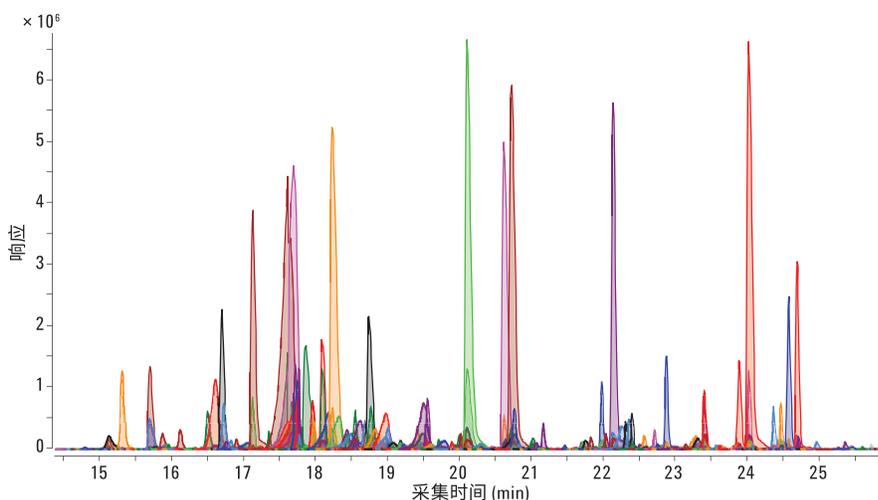


图 10. 使用 2.1 × 250 mm AdvanceBio 肽谱分析色谱柱和 ESI-MS 实现了 100% rhEPO 序列覆盖率。使用 Agilent Masshunter 定性 MS 分析软件中的分子特征提取器生成的数据

药物开发

蛋白质的纯化和表征对于药物开发至关重要，通常需要使用各种分析技术。除增加源自表征的信息以外，重现性和色谱柱寿命在开发阶段变得更加重要。

由于 mAb 疏水性结构的异质性，反相分离逐渐成为制造、配制和储存过程中监控纯度和稳定性的一种选择。Agilent ZORBAX RRHD 色谱柱具有较小的 1.8 μm 颗粒、可重现的性能和选择性，它具有稳定的分离性能，使用反相色谱对 mAb 杂质进行表征时具有较快的分析速度。LC/UV 是 mAb 和肽谱分析的最佳选择。

使药物开发更出色的技巧

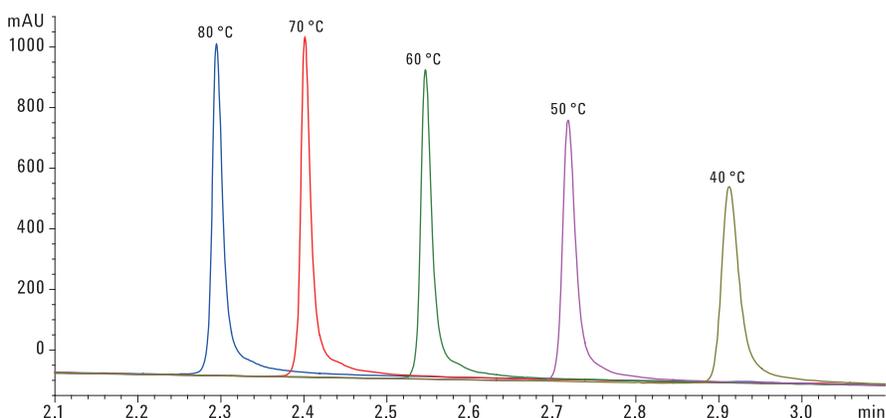
升高柱温可改善峰形性能、减少保留并提高灵敏度

溶剂粘度、蛋白质扩散性和流动相极性与温度密切相关。柱温的控制是疏水性多肽和蛋白质分离过程中的一个重要变量。如图 11 所示的单克隆抗体 (mAb) 分离很好地说明升高温度对峰形和保留特性造成的影响。在较低的温度下，mAb 和 mAb

片段表现出较差的峰形，因此采用极高比例的有机流动相洗脱可提供准确的曲线。采用温度更高的相同

色谱条件，该分离在较短洗脱时间内具有优异的峰形，并具有更高的灵敏度和分离度。

- A) 0.1% TFA 水溶液:IPA (98:2)
- B) IPA:ACN:流动相 A (70:20:10), 1.0 mL/min, 5 min 内 B 由 10% 升至 70%, 进样量 5 μL , 由木瓜蛋白酶水解的人源重组赫赛汀 IgG1 (1 mg/mL), 购自 Creative Biolabs 254.8 nm; 参比 = 关闭, RP-mAb Diphenyl, 2.1 \times 100 mm, 3.5 μm



- A) 0.1% TFA 水溶液
- B) 正丙醇:ACN:流动相 A (80:10:10), 1.0 mL/min, 5 min 内 B 由 5% 升至 50%, 1 μL 的 Fc/Fab, 由木瓜蛋白酶水解的人源重组赫赛汀 IgG1 (2 mg/mL), 购自 Creative Biolabs, 60 $^{\circ}\text{C}$, 220.8 nm; 参比 = 关闭, RP-mAb Diphenyl, 2.1 \times 100 mm, 3.5 μm

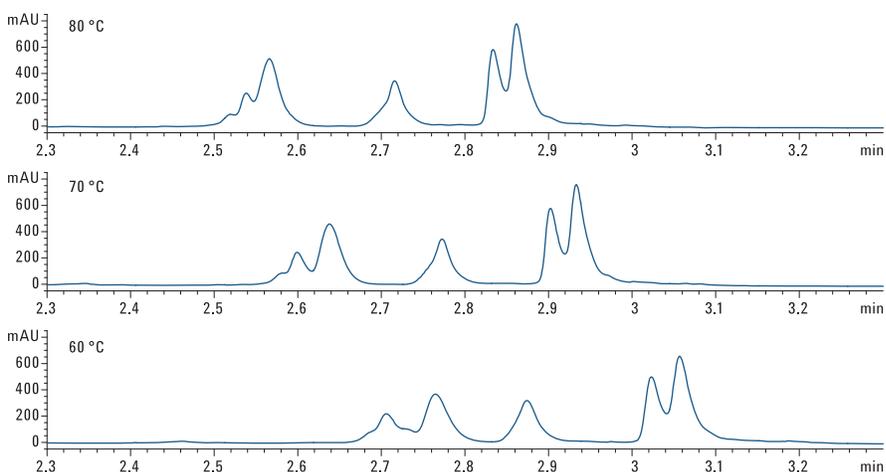
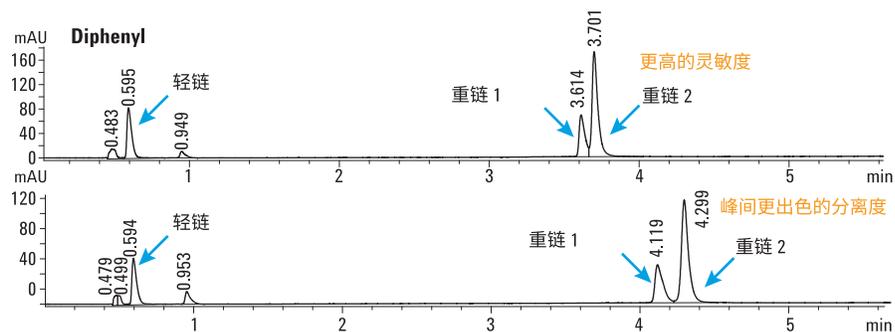


图 11. 完整单克隆抗体分离对 Agilent AdvanceBio RP-mAb 色谱柱的温度依赖性。(上图) 提高柱温可改善峰形并缩短保留时间。(下图) 采用更高的柱温可改善 mAb 分析, 片段峰得到了更好的分离

调整梯度以实现最佳分析

如图 12 所示的色谱比较显示了对还原态和烷基化单克隆抗体的两次优化高速分离。ZORBAX RRHD 300-Diphenyl, 2.1 × 100 mm 色谱柱和色谱条件能够很好地分离还原态 mAb 轻链和两个重链异构体。上方色谱图详细展示了重链的分离结果，其具有窄带和高分离度。相比之下，下图所示的分离经过优化后获得了更出色的重链分离度，但峰宽略有增加。在该分离中，两个重链几乎表现出基线分离。两次分离结果相比，联苯固定相能够通过改善分离控制分离两个重链峰，其对梯度斜率的改变极小。



条件

色谱柱:	Agilent ZORBAX RRHD 300-Diphenyl, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm (部件号 858750-944)
样品:	还原态克隆抗体 (IgG1) BioCreative IgG1
样品浓度:	1.0 mg/mL
洗脱液:	A: 0.1% TFA 水溶液 B: 80% 正丙醇、10% ACN、9.9% 水和 0.1% TFA
进样量:	2 μL
流速:	0.5 mL/min
梯度:	第一条件: 0 min 1% B, 2 min 20% B, 5 min 70% B 第二条件: 0 min 1% B, 2 min 20% B, 5 min 50% B
柱温:	74 °C
检测器:	UV, 280 nm

图 12. 在不同的最佳梯度条件下，还原态单克隆抗体在 Agilent ZORBAX RRHD 300-Diphenyl, 2.1 × 100 mm 液相色谱柱上两次超快速分离的比较。上图分离实现了窄峰宽和更短的保留时间。下图分离显示两个重链峰之间获得了更高的分离度，但效率较低

在对称梯度方法下，我们鉴定了每个 mAb 的梯度以实现高速分离和最佳分离度。图 13 上图所示的分离针对由 CDH 介质表达的安捷伦标准抗体进行了优化，使用的是表 3 所示的梯度 A 梯度条件。该分离在 4 分钟内完成，完整峰表现出优异的分度并具有非常窄的带宽。相比之下，下方色谱图针对由 CHO 细胞系表达的人源 mAb 进行了优化，使用的是表 3B 所示的梯度 B 梯度条件。在该分离中，该梯度采用更平缓的梯度进行了优化，这种梯度能够分离前肩峰与 mAb 基峰。图 13 中的两个分离有助于以高效率进行 mAb 表征的高通量持续运行。每次分离以快速的 90% 异丙醇清洗和快速重新平衡为终点，可获得重复的进样序列。

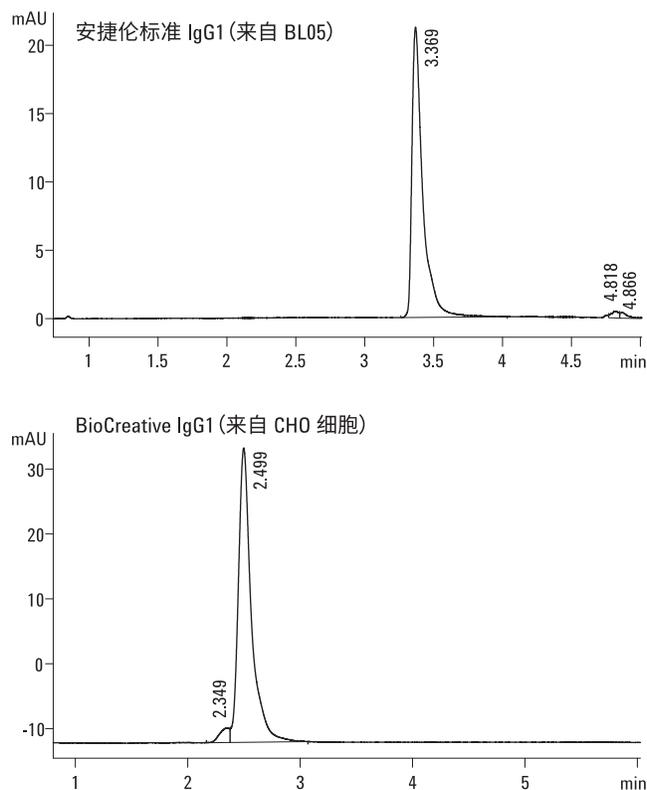


表 3. 可实现最佳选择性的最优梯度

用于安捷伦标准 IgG1 的梯度 A		用于 BioCreative IgG1 的梯度 B	
时间 (min)	%B	时间 (min)	%B
0	10	0	5
2.5	25	5	25
4.5	35	7	25
4.56	90	8	90
5	90	9	5
6	10		

条件

色谱柱: Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm (部件号 858750-909)
样品: 来自 CDH 介质的标准品 IgG1 (安捷伦), 来自 CHO 的 IgG1 (BioCreative)
样品浓度: 1.0 mg/mL
洗脱液: A: 0.1% TFA 水溶液
 B: 70% 异丙醇、20% 乙腈、10% 水和 0.1% TFA
进样量: 2 μL
流速: 1.0 mL/min
梯度: 见表 3
柱温: 75 °C
检测器: UV, 280 nm

图 13. Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3 2.1 × 50 mm 液相色谱柱上针对两种单克隆抗体进行优化的 UHPLC 分离。该分离在 1.0 mL/min 和 75 °C 下进行。上图针对由 CDH 介质表达的 mAb 进行优化，而下方色谱图针对 CHO 细胞系表达的人源 mAb 进行了优化。每次分离后均采用 2 分钟快速平衡的后运行时间

比较不同的选择性以实现最佳蛋白质分离

不同的选择性为改善 mAb 的蛋白质分离提供了额外工具，在促进生物治疗药物分析方面表现出极大潜力。

图 14 表明选择性差异与 Poroshell 300 色谱柱的高分离能力相结合能够极大地提高分离性能。

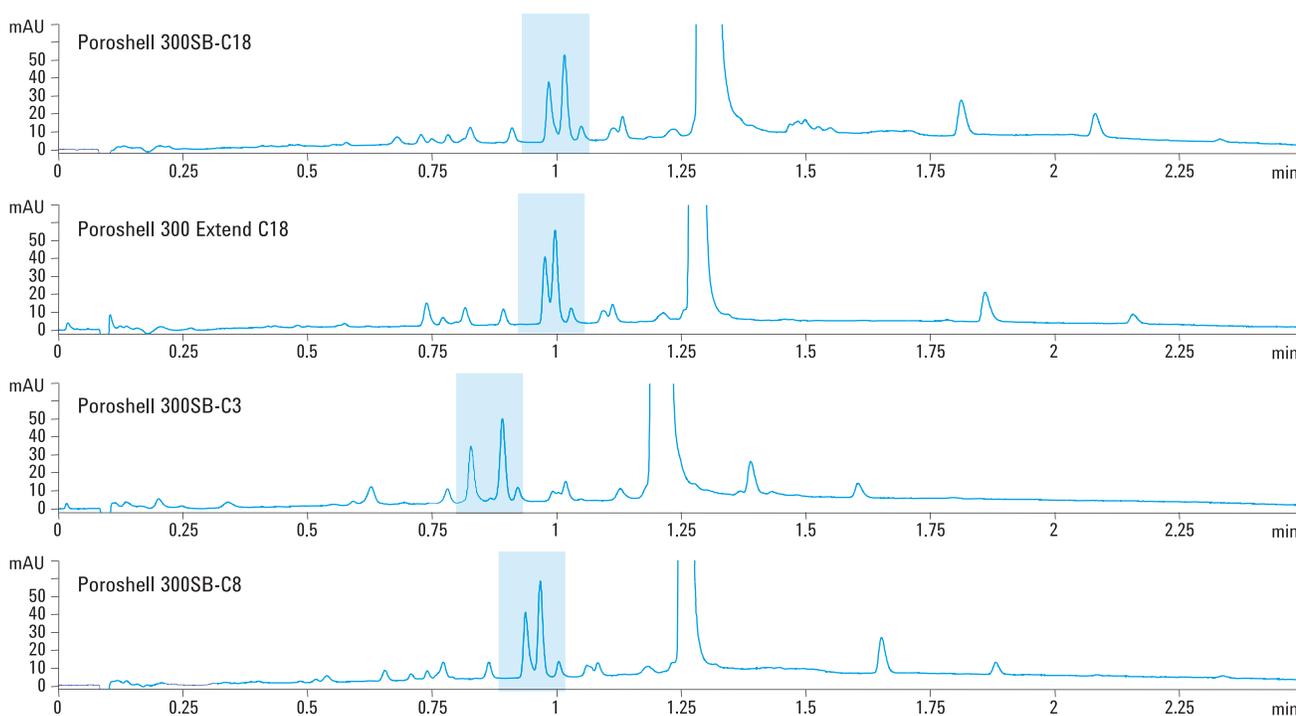
选择持久耐用的色谱柱固定相

通常用于反相分析的流动相呈酸性，其中含有三氟乙酸或甲酸。这些流动相使大多数 HPLC 色谱柱获得了极长的寿命。色谱柱选择不仅要考虑实现最佳峰形的相关性能，而且要根据所用的条件考虑寿命性能。

在典型的肽谱分析应用中，可使用 0.1% TFA 和甲酸。由致密键合相制

得的 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱将提供出色的峰形，并在这些条件下有良好表现。

使用高浓度 TFA 或其他改性剂时，可考虑采用 StableBond 技术，该技术能够在低 pH 环境下保持稳定。需要注意的一点是：有时采用乙酸替代三氟乙酸或甲酸。在较高温度下，乙酸将会大大限制色谱柱寿命。



条件

色谱柱： Agilent Poroshell 300 柱，2.1 × 75 mm，5 μm（部件号 660750-902）
样品： 降解胰岛素
洗脱液： A：水 + 0.1% TFA
 B：ACN + 0.08% TFA
流速： 1.75 mL/min
梯度： 5% B 下保持 0.3 min，2.7 min 内 B 由 5% 升至 65%
柱温： 45 °C

图 14. 改变 Agilent Poroshell 300 的键合相可改善关键峰对的分离度，从而提高分析准确度

我们对重复进样序列中的 ZORBAX RRHD 300SB-C3 色谱柱在低 pH 条件下的寿命进行了评估。在重复 mAb 分析过程中，色谱柱填充床的稳定性、固定相的稳定和入口筛板性能对于高温和高压下的连续运行均至关重要。为评估这一性能，对核糖核酸酶、细胞色素 C 和溶菌酶进行 1000 次重复进样。此次分离的色谱图如图 15 所示。图 16 显示了寿命曲线图。

条件

色谱柱: Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3, 2.1 × 50 mm (部件号 857750-909)
 洗脱液: 流动相 A: H₂O + 0.1% TFA (v/v)
 流动相 B: ACN + 0.1% TFA (v/v)
 进样量: 2 μL
 流速: 1.25 mL/min
 梯度: %溶剂 B 时间 (min)
 10 0
 70 2.5
 90 2.6
 90 3.0
 10 5.0
 柱温: 75 °C
 柱压: 900 bar
 系统: Agilent 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

使用 Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3, 2.1 × 50 mm, 1.8 μm 色谱柱快速分离标准蛋白质及其降解产物。

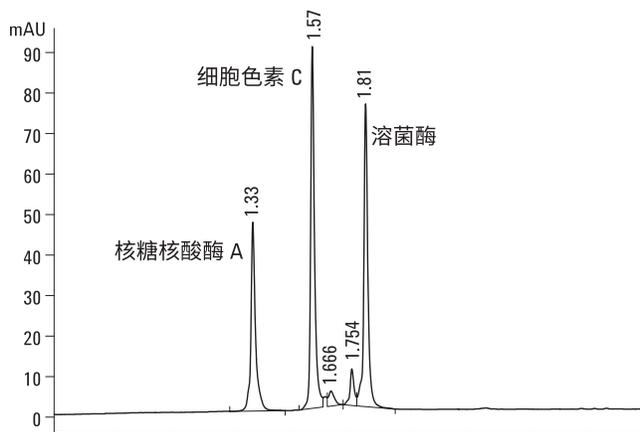


图 15. 高速分离核糖核酸酶 A、细胞色素 C 和溶菌酶以监测 Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3, 2.1 × 50 mm 液相色谱柱的寿命稳定性

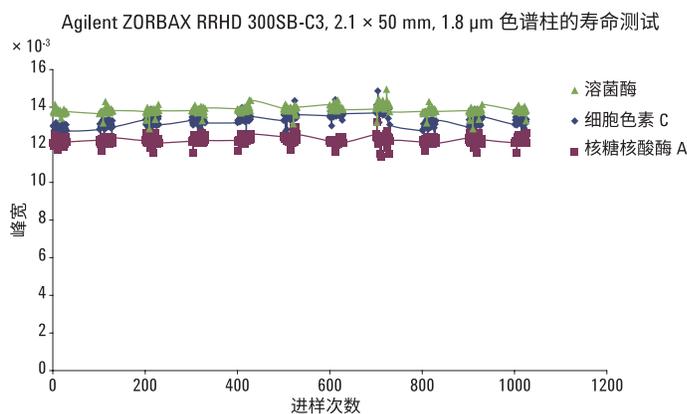


图 16. Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3, 2.1 × 50 mm 液相色谱柱的寿命曲线图。该图显示了在 1000 次进样过程中每隔 100 次运行所绘制的核糖核酸酶 A、细胞色素 C 和溶菌酶连续系列蛋白质峰宽记录

质量控制

QC 方法需要关注可靠性和稳定性。此外，分析速度变得更加重要。

使 QC 更出色的技巧

评估色谱柱重现性

ZORBAX RRHD 300Å 色谱柱的卓越批次间重现性源于生产过程中始终坚持的 QC 控制，可确保获得始终如一的性能。图 17 和表 4 显示了 200 次连续进样后获得的结果，以考察 ZORBAX RRHD 300SB-C18 色谱柱的重现性。峰形完整性、不对称性、保留时间和效率在多次进样后保持不变，无需清洗色谱柱。

表 4. 两百次的胰岛素进样证明了 Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C18 1.8 μm 液相色谱柱的重现性

进样次数	重链峰 1			重链峰 2		
	RT (min)	峰宽	对称性	RT (min)	峰宽	对称性
1	6.845	0.043	1.74	6.912	0.048	0.611
50	6.871	0.043	1.75	6.935	0.049	0.609
150	6.864	0.040	1.70	6.924	0.049	0.617
200	6.867	0.041	1.76	3.928	0.051	0.592

条件		梯度:	0 min - 1% B, 2 min - 20% B, 5 min - 50% B, 7 min - 50% B, 8.0 min - 90% B, 8.3 min - 1% B, 保持 2 min
色谱柱:	Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm		
样品:	还原态单克隆抗体 (IgG1) (1.0 mg/mL) - Agilent BL05 IgG1		
进样量:	2 μL	柱温:	75 °C
流动相 A:	0.1% TFA 水溶液	流速:	0.4 mL/min
流动相 B:	80% 正丙醇、10% ACN、 9.9% 水和 0.1% TFA	检测器:	UV 280

色谱柱重现性 — 还原态单克隆抗体在 Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm 色谱柱上的 200 次重复进样

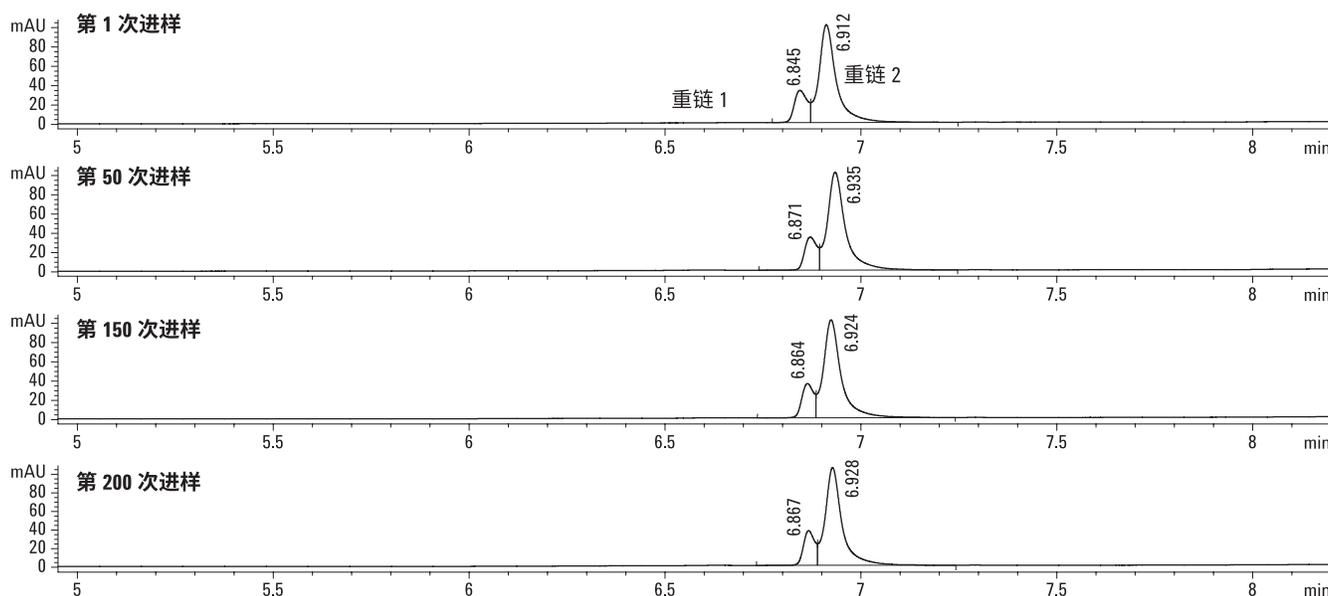


图 17. 两百次进样揭示了 Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C18 1.8 μm 液相色谱柱的重现性

利用更快的流速和更短的色谱柱提高分析速度

除上述方法外，还可通过控制流速，利用更短的柱长提供快速分离。除峰不对称性和效率保持不变外，亚 2 μm 颗粒的特点是帮助实现快速分离。图 18 和表 5 说明了流速对重组人促红细胞生成素分析的影响，图 19 和表 6 显示了胰岛素的分离结果。

表 5. rEPO 蛋白质分离中流速对保留时间、不对称性和峰宽的影响

流速 (mL)	压力 (bar)	保留时间 (min)	不对称性	峰宽
0.5	350	1.64	0.60	0.047
1.0	680	1.41	0.85	0.030
1.5	890	1.26	0.84	0.030

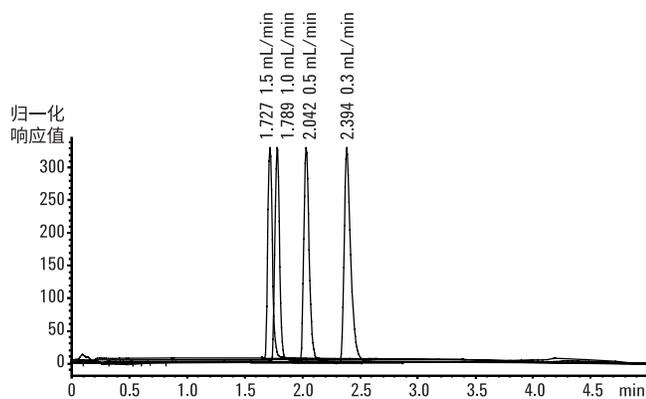
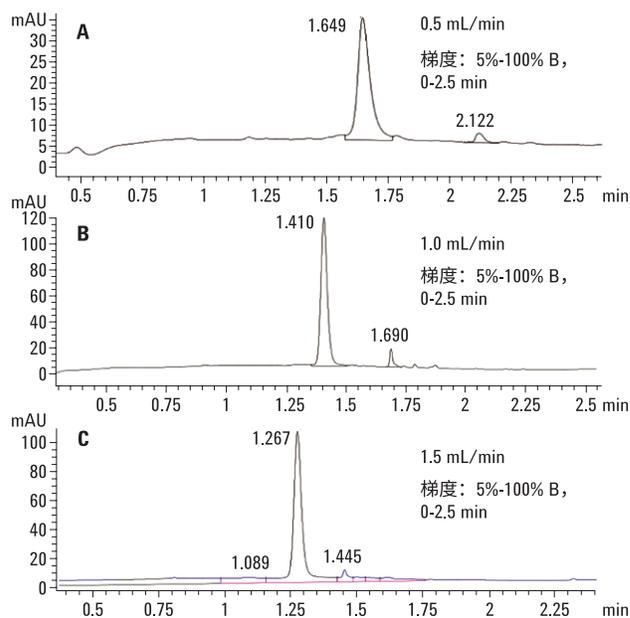


图 18. 可在 Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C18, 2.1 \times 50 mm, 1.8 μm 液相色谱柱上选择不同流速分离胰岛素蛋白质

表 6. 胰岛素分离中流速对保留时间、不对称性和峰宽的影响

流速 (mL)	压力 (bar)	保留时间 (min)	不对称性	塔板数
0.3	230-150	2.39	0.80	8815
0.5	350-250	2.04	0.82	8390
1.0	680-520	1.78	0.88	8034
1.5	890-670	1.72	0.88	8060



条件

- 色谱柱: Agilent ZORBAX 300SB-C18, 2.1 \times 50 mm, 1.8 μm , (部件号 857750-902)
- 样品: 牛胰腺的胰岛素、氧化胰岛素 A 链和 B 链 (Sigma-Aldrich 公司)
- 样品浓度: 1 mg/mL
- 洗脱液: A: 0.1% TFA 的去离子水溶液
B: 80% ACN + 0.01% TFA 的蒸馏水溶液
- 进样量: 3 μL
- 流速: 见表 6
- 梯度: 5%-100% B, 0-4 min
- 柱压: 约 650 bar
- 检测器: UV, 280 nm
- 系统: Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统

图 19. 可在 Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C18, 2.1 \times 50 mm, 1.8 μm 液相色谱柱上选择不同流速分离 rEPO 蛋白质



AdvanceBio RP-mAb

专注于应对单克隆抗体表征特有挑战的唯一反相色谱柱

每根 AdvanceBio RP-mAb 色谱柱均采用安捷伦独有的 Poroshell 技术，具有以下优势：

- **更高的准确性：**大孔径 (450Å) 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
- **快速：**与填充相同尺寸全多孔颗粒填料的色谱柱相比，分析时间更短

- **更低的成本：**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
- **灵活的方法开发：**固定相范围：SB-C8、C4 和联苯

Agilent AdvanceBio RP-mAb 色谱柱

键合相	孔径	温度限	pH 范围	封端
C4	450Å	90 °C	1.0-8.0	是
SB-C8	450Å	90 °C	1.0-8.0	否
联苯	450Å	90 °C	1.0-8.0	是



ZORBAX 超高压快速高分离度 (RRHD) 柱，300Å，1.8 μm

1.8 μm 颗粒具有 UHPLC 性能，与常规 300Å 3.5 μm 色谱柱相比表现出更高的灵敏度、改善的峰形以及更出色的分离度。性能重现性极高，这是 ZORBAX 制造中质量控制的标志。这

些色谱柱专为在 1200 bar 优级 UHPLC 中保持稳定性的设计，因此用户可以放心地提高流速。

ZORBAX RRHD 300Å, 1.8 μm 色谱柱提供多种固定相，包括独有的联苯基固定相，其具有精确的选择性和性

能。因此，StableBond 涂层具有优异的低 pH 稳定性和热灵活性，300SB-C18 色谱柱能够在 90 °C 下保持稳定，可灵活升温以改善分离；专用键合相（例如 ZORBAX StableBond C8）能够以更快的运行速度实现高分离度 mAb 分离。

Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度 (RRHD) 300Å 色谱柱

键合相	粒径	孔径	温度限	pH 范围	封端	压力限 (bar)
300SC-C18	1.8 μm	300Å	90 °C	1.0-8.0	否	1200 (18000 psi)
300SB-C8	1.8 μm	300Å	80 °C	1.0-8.0	否	1200 (18000 psi)
300SB-C3	1.8 μm	300Å	80 °C	1.0-8.0	否	1200 (18000 psi)
300 Diphenyl	1.8 μm	300Å	80 °C	1.0-8.0	是	1200 (18000 psi)



Poroshell 300

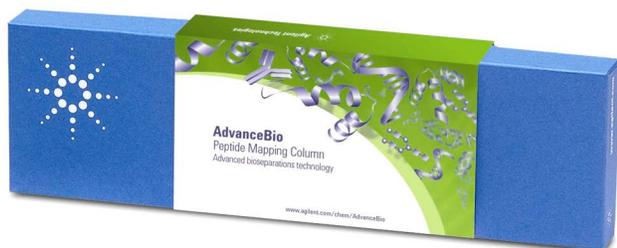
这款色谱柱独特的颗粒技术改善了对大分子完整蛋白质的反相分析。虽然 Poroshell 300 具有 300Å 的孔径，但其行为类似于孔径更大的色谱柱，且更适合分析较大的（50 kDa，

对于 mAb 为 150 kDa）生物分子。与装填小颗粒的色谱柱相比，Poroshell 300 筛板不易堵塞。Poroshell 300 上的表面多孔颗粒填料能够采用更高的流速和更快的分析速度，且反压增加较少，同时仍可获得优异的分

度。Poroshell 300 以其表面多孔颗粒填料为大分子完整蛋白质提供了独特的优势，其行为类似于孔径更大的色谱柱，具有显著的速度优势。

Agilent Poroshell 300 色谱柱规格

键合相	粒径	孔径	温度限	pH 范围	封端	压力限
300SB、C18、C8、C3	5 μm	300Å	90 °C	1.0-8.0	否	400 bar (6000 psi)
300Extend C18	5 μm	300Å	高于 pH 8 时为 40 °C； 低于 pH 8 时为 50 °C	2.0-11.0	是	400 (6000 psi)



AdvanceBio 肽谱分析色谱柱

AdvanceBio 肽谱分析色谱柱具有理想的 120Å 孔径，非常适合鉴定分子量范围很宽的多肽片段。它们采用复杂的多肽混标进行了测试，确保

用于肽谱分析的性能和重现性。安捷伦独特的表面多孔填料技术支持更高的流速，能够使整个多肽序列获得更出色的分离度。

Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱

键合相	粒径	孔径	温度限	pH 范围	封端	压力限
EC-C18	2.7 μm 表面多孔	120Å	60 °C	2.0-8.0	双封端	600 bar (9000 psi)

订购信息

Agilent AdvanceBio RP-mAb 色谱柱, 3.5 μm					
描述	规格 (mm)	部件号	描述	规格 (mm)	部件号
C4	2.1 \times 50	799775-904	SB-C8	4.6 \times 50	789975-906
C4	2.1 \times 75	797775-904	SB-C8	4.6 \times 100	785975-906
C4	2.1 \times 100	795775-904	SB-C8	4.6 \times 150	783975-906
C4	2.1 \times 150	793775-904	联苯	2.1 \times 50	799775-944
C4	4.6 \times 50	799975-904	联苯	2.1 \times 75	797775-944
C4	4.6 \times 100	795975-904	联苯	2.1 \times 100	795775-944
C4	4.6 \times 150	793975-904	联苯	2.1 \times 150	793775-944
SB-C8	2.1 \times 50	789775-906	联苯	4.6 \times 50	799975-944
SB-C8	2.1 \times 75	787775-906	联苯	4.6 \times 100	795975-944
SB-C8	2.1 \times 100	785775-906	联苯	4.6 \times 150	793975-944
SB-C8	2.1 \times 150	783775-906			

Agilent Poroshell 300 柱, 5 μm					
描述	规格 (mm)	300SB-C18	300SB-C8	300SB-C3	300Extend-C18
		USP L1	USP L7		USP L1
毛细管	0.5 \times 75		5065-4468		
微径柱	1.0 \times 75	661750-902	661750-906	661750-909	671750-902
窄径柱	2.1 \times 75	660750-902	660750-906	660750-909	670750-902
保护卡套柱, 4/包	2.1 \times 12.5	821075-920	821075-918	820975-924	
保护柱卡套		820888-901	820888-901	820888-901	
微径保护柱, 3/包	1.0 \times 17	5185-5968	5185-5968	5185-5968	5185-5968

Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度 (RRHD) 300 \AA 色谱柱, 1.8 μm						
描述	规格 (mm)	300SB-C18	300SB-C8	300SB-C3	300-Diphenyl	300-HILIC
		USP L1	USP L7		USP L11	
窄径柱	2.1 \times 100	858750-902	858750-906	858750-909	858750-914	959758-901
窄径柱	2.1 \times 50	857750-902	857750-906	857750-909	857750-914	959757-901

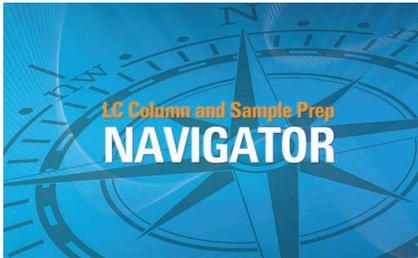
Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.7 μm	
描述	部件号
4.6 \times 150 mm	653950-902
3.0 \times 150 mm	653950-302
2.1 \times 250 mm	651750-902
2.1 \times 150 mm	653750-902
2.1 \times 100 mm	655750-902
4.6 mm 快速保护柱	850750-911
3.0 mm 快速保护柱	853750-911
2.1 mm 快速保护柱	851725-911



Agilent AdvanceBio 色谱柱

安捷伦推出的 AdvanceBio 系列生物色谱柱致力于提高生物色谱分析的准确度和效率。AdvanceBio 色谱柱采用独特的先进技术改善 UHPLC 性

能和生物色谱检测能力，以确保获得可重现的结果。AdvanceBio 色谱柱旨在帮助生物制药科学家从每次表征中获取更多信息。



为您的成功之路指引方向

www.agilent.com/chem/navigator

除众多的生物色谱柱和小分子色谱柱外，安捷伦还推出了液相色谱柱和样品前处理在线选择工具，帮助您针对应用选择合适的色谱柱。

在线选择工具为您提供四种简单的搜索选项：

- 按部件号搜索 — 液相色谱柱和样品前处理产品交叉引用信息，便于您寻找最佳的安捷伦替换部件
- 按色谱柱搜索 — 根据方法提供建议
- 按化合物搜索 — 下拉式列表
- 按 USP 方法搜索。此外，该工具还可提供用于优化色谱分析的色谱柱支持、样品前处理产品建议，以及对技术支持资源和其他工具的快速访问

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

安捷伦科技大学：

<http://www.lscs-china.com.cn/agilent>

浏览和订阅 Access Agilent 电子期刊：

www.agilent.com/chem/accessagilent-cn

如需了解更多信息或购买色谱柱，请访问

www.agilent.com/chem/advancebio

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，2014
2014 年 11 月 13 日，中国出版
5991-2032CHCN



Agilent Technologies