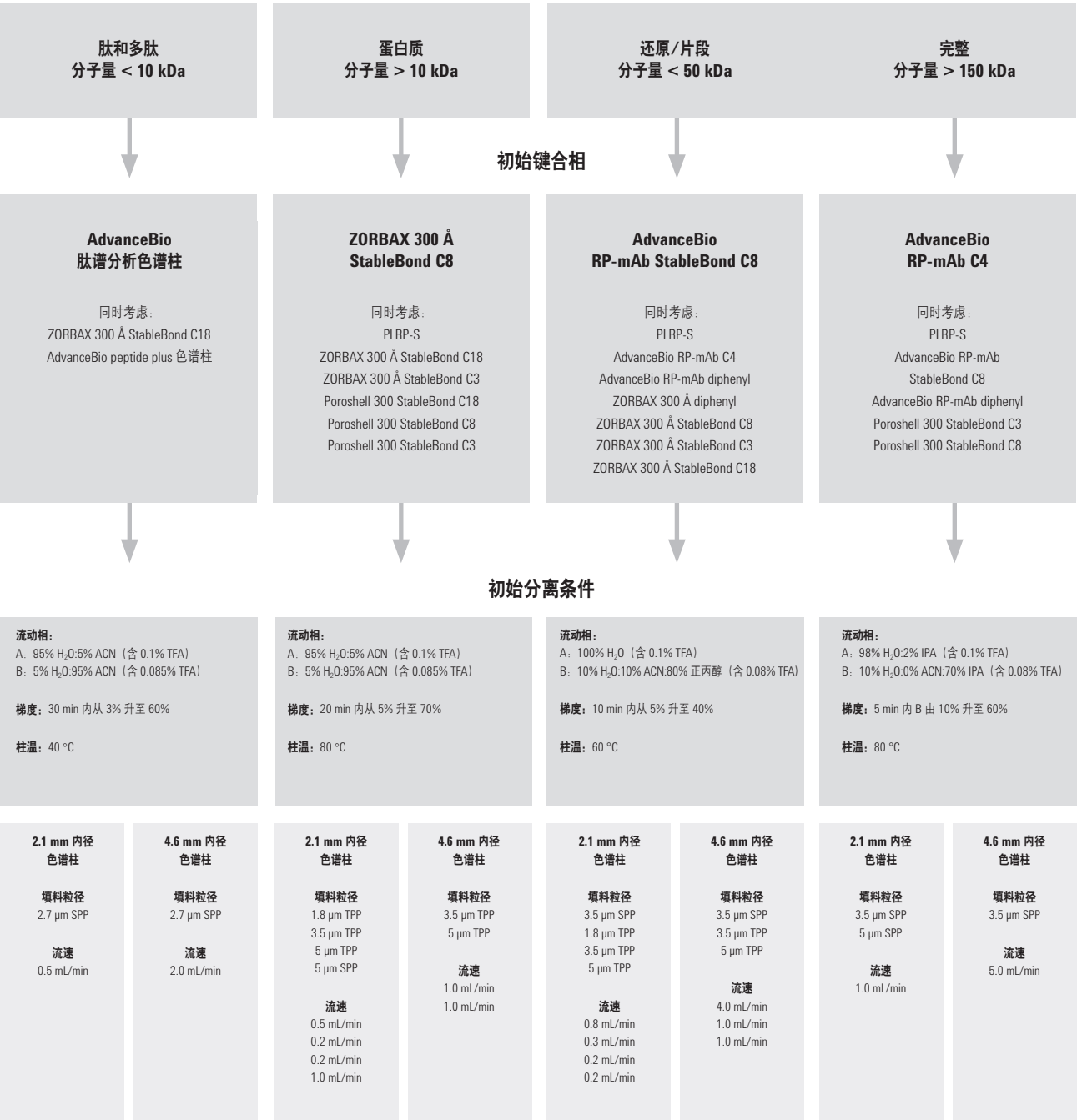


方法开发指南

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感兴趣的组分。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 下要得到最佳峰形和回收率，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 盐酸胍或异硫氰酸胍

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 分离的最佳选择。

色谱柱: ZORBAX 300Extend-C18
4.6 × 150 mm, 5 µm
773995-902

流动相: A: 20 mmol/L NH₄OH 水溶液
B: 20 mmol/L NH₄OH 的 80% ACN 溶液

梯度: 30 min 内 B 由 5% 升至 60%
柱温: 25–30 °C (< 60 °C)
流速: 1 mL/min