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。

Bio MAb 色谱柱和单克隆抗体

Bio IEX 色谱柱、阳离子交换 (SCX, WCX)、单克隆抗体、蛋白质、肽和糖蛋白

Bio IEX 色谱柱、阴离子交换 (SAX, WAX)、寡核苷酸和蛋白质

推荐的初始条件

流动相：
A：20 mmol/L 磷酸钠，pH 5.5
B：缓冲液 A + 200 mmol/L NaCl

梯度：
50 min 内 B 由 10% 升至 35%

样品量：
2 mg/mL，进样量 5 µL

柱温：
室温

检测：
UV，220 nm

流动相：
A：20 mmol/L 磷酸钠，pH 5.0 (WCX) 或 pH 6.0 (SCX)
B：缓冲液 A + 500 mmol/L NaCl

梯度：
对于 50 mm 色谱柱，30 min 内 B 由 1% 升至 100%；对于 250 mm 色谱柱，60 min 内 B 由 1% 升至 100%

样品量：
2 mg/mL，进样量 5 µL

柱温：
室温

检测：
UV，220/280 nm

流动相：
A：20 mmol/L Tris-HCl，pH 8.5
B：A + 500 mmol/L NaCl

梯度：
对于 50 mm 色谱柱，30 min 内 B 由 1% 升至 100%；对于 250 mm 色谱柱，60 min 内 B 由 1% 升至 100%

样品量：
2 mg/mL，进样量 5 µL

柱温：
室温

检测：
UV，220/280 nm

基于色谱柱内径和填料粒径选择流速

2.1 mm 内径色谱柱

填料粒径，µm	流速，mL/min
5	0.1–0.5
1.7	0.1–0.8

4.6 mm 内径色谱柱

填料粒径，µm	流速，mL/min
1.7	0.1–0.3
3	0.1–0.5
3.5	0.1–0.8
10	0.1–1.0

优化条件

某些分离可能需要使用特殊的缓冲液、离子强度、pH 和/或温度。

离子强度

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

注：不得单独用水清洗色谱柱，因为它会导致反压明显升高。

缓冲液和 pH 的选择

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

洗脱时也可以采用 pH 梯度。

缓冲液和 pH 的选择

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

洗脱时也可以采用 pH 梯度。

添加剂

有机溶剂
可使用最多 50% 的乙腈、乙醇、甲醇及其他类似溶剂。

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

添加剂

有机溶剂
可使用最多 50% 的乙腈、乙醇、甲醇及其他类似溶剂。

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

温度

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