

使用ACQUITY Premier BEH C₁₈寡核苷酸分析专用柱改善寡核苷酸的色谱分析性能

Martin Gilar, Zhimin Li, Jason MacLean

Waters Corporation

摘要

本应用纪要介绍因色谱柱金属硬件（筛板）上发生样品吸附导致寡核苷酸损失的原因，并提供改善寡核苷酸分析的解决方案、色谱柱和最佳实践。

优势

- 使用MaxPeak HPS技术无需进行色谱柱活化
 - 大幅减少金属表面的样品吸附
 - 提高分析重现性
 - 充分发挥开箱即用的色谱柱性能
-

简介

核酸药物是一类具有治疗作用的新型化合物，其中包括反义寡核苷酸(ASO)¹、沉默RNA双链体(siRNA)²、小分子R(miRNA)³和大分子生物聚合物，例如信使RNA(mRNA)或可用作疫苗的质粒⁴。本应用纪要将重点介绍寡核苷酸类药物。

通常使用化学合成法制备15-35 mer的寡核苷酸类药物。使用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、毛细管凝胶电泳(CGE)或阴离子交换色谱(AEC)进行质量控制和表征分析⁵。近年来,离子对反相液相色谱(IP RP LC)已成为寡核苷酸LC和LC-MS分析的理想选择^{1,6}。IP RP LC-MS适用于对ASO和siRNA类化合物药物进行高灵敏度分析。

寡核苷酸的IP RP LC分析需要使用由疏水性胺和酸组成的离子对流动相⁷⁻⁹。例如,其中一个可用的离子对流动相是用乙酸(乙酸己基铵; HAA)将pH调节至7-9的25 mM己胺。用乙腈或甲醇梯度从反相柱上洗脱寡核苷酸。柱温通常设置为60 °C,以消除寡核苷酸二级结构及其对LC分离的影响¹⁰。分析时使用的碱性pH和高温对硅胶基质色谱柱的使用寿命均有不利影响。因此,对于寡核苷酸的IP RP LC分离,推荐使用有机/无机杂化固定相,例如亚乙基桥杂化(BEH)色谱柱中所用的固定相¹¹。使用碱性流动相时,BEH色谱柱明显比传统硅胶色谱柱更稳定¹²。

超高效UPLC色谱柱可以从短链合成杂质和寡核苷酸代谢物中有效分离出目标寡核苷酸。对于21/20 mer寡核苷酸,分离度通常可以达到N/N-1¹³。核酸越长,越难分离^{14,15}。填充亚2 μm颗粒的色谱柱可使用缓梯度分离高达60 mer的寡核苷酸¹⁶。该分离能力足以达到大多数ASO和siRNA应用的要求。

AEC和IP RP LC寡核苷酸分析的原理已为人们所熟知。但是,核酸分析领域的专家发现,非特异性吸附会对寡核苷酸的定量分析造成不利影响¹⁷。据了解,带负电荷的核酸会与不锈钢或钛等金属表面发生相互作用(螯合),更准确地说,是与金属表面上存在的氧化层发生相互作用^{18,19}。金属表面的吸附可能导致峰拖尾、回收率下降和样品残留²⁰。当使用先前未暴露于寡核苷酸样品的新色谱柱时,该行为最为明显,随着色谱柱暴露于样品中的进样次数增加,该行为逐渐减少。

一些实验室已经开发出用于液相色谱系统和色谱柱活化的方案以减轻上述影响。使用稀磷酸清洗仪器来执行液相色谱系统活化。在分析目标寡核苷酸之前,通常以重复进样方式消耗寡核苷酸样品进行色谱柱活化。当分析亚pmol级样品时,痕量分析中最明显的问题是金属表面吸附而导致的样品损失。

Waters MaxPeak高性能表面(HPS)专为色谱柱硬件开发,旨在尽可能减少金属表面与某些分析物之间的非特异性相互作用,例如寡核苷酸、磷酸肽、小分子有机磷酸酯,以及其他已被证明对金属表面有很强亲和力的分析物。采用MaxPeak HPS技术的MaxPeak Premier色谱柱硬件可以在流路的金属表面与样品之间形成屏障,大幅减少分析物与色谱柱硬件之间的相互作用。本应用纪要介绍了使用ACQUITY Premier BEH C₁₈寡核苷酸分析专用柱对寡核苷酸分析的改进。液相色谱系统优化的考虑因素将在单独的应用纪要中予以讨论。

实验

MISER (一次实验多次进样) 的实验条件

样品前处理：

将25 mer硫代磷酸酯(PS)寡核苷酸CTC TCG CAC CCA TCT CTC TCC TTC T（分子量7776 Da，GEM 91）以2 pmol/ μ L的浓度溶于流动相水性缓冲液中。将1 μ L (2 pmol)样品重复进样分析20-90次。

仪器： ACQUITY UPLC H-Class Bio，
用500 pmol的39 mer寡聚脱氧
胸苷活化

数据管理： Empower 3.0软件，MISER实验
由FTN样品管理器固件1.65.356
(MISER_HT_V13)提供支持。在
FTN仪器方法注释窗口中指定进
样次数、进样频率和间隔时间等
特定的MISER命令。

方法条件

色谱柱： MISER实验不使用色谱柱，而是
在进样器前、检测器后的流路支
架中放置2.1 mm UPLC色谱柱
筛板。在对照实验中，将带有筛
板的支架替换为PEEK两通接头
(不含金属的流路)。

流动相1： 10 mM乙酸己基铵(HAA)缓冲水
溶液，pH 7

流动相2： 10 mM乙酸铵(AmAc)缓冲水溶
液，pH 4.5

流动相3： 10 mM乙酸铵(AmAc)缓冲水溶
液，pH 5

| | |
|---------|---------------------------|
| 流动相4: | 10 mM乙酸铵(AmAc)缓冲水溶液, pH 6 |
| 流动相5: | 10 mM乙酸铵(AmAc)缓冲水溶液, pH 7 |
| 流动相6: | 10 mM乙酸铵(AmAc)缓冲水溶液, pH 8 |
| 等度条件: | 0.2 mL/min, 指定流动相 |
| 实验温度: | 25 °C |
| 检测(UV): | 260 nm PDA, 5 μL钛检测池 |
| 进样体积: | 1 μL |

离子对反相液相色谱实验条件

样品前处理:

MassPREP寡核苷酸标准品 (部件号: [186004135](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186004135) <
<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186004135>>) 包含1 nmol的15、20、25、30和35 mer寡聚脱氧胸苷。将样品瓶内容物溶于200 μL去离子水中, 最终浓度为5 pmol/μL。将2 μL该样品进样至色谱柱(10 pmol)。

仪器: ACQUITY UPLC H-Class Bio, 用500 pmol的39 mer寡聚脱氧胸苷活化

数据管理: Empower v3.0软件

方法条件

| | |
|-----------|---|
| 色谱柱: | ACQUITY Premier C18, 130 Å, 1.7 μm, 2.1 × 50 mm寡核苷酸分析专用柱 (部件号: 186009484) |
| 流动相A: | 25 mM HAA水溶液, 用乙酸将pH调节至6、7或8.5 |
| 流动相B: | 50%流动相A和50%乙腈(v:v) |
| 柱温: | 60 °C |
| 检测条件(UV): | 260 nm PDA, 5 μL钛检测池 |
| 进样体积: | 2 μL |

梯度

| 时间 | 流速 | %A | %B | 曲线 |
|-------|-----|----|----|----|
| 初始 | 0.4 | 50 | 50 | 初始 |
| 12.00 | 0.4 | 14 | 86 | 6 |
| 12.5 | 0.4 | 50 | 50 | 6 |
| 20 | 0.4 | 50 | 50 | 6 |

数据处理和分析:

在MISER实验中, 根据观察到的寡核苷酸峰面积估算相对回收率。使用PEEK两通接头时, 或用过量寡核苷酸样品活化ACQUITY Premier BEH C₁₈寡核苷酸分析专用柱后, 可获得代表100%回收率的峰面积。

对于OST MassPREP标准品, 100%的回收率被视为色谱柱经过活化后获得的单次或多次500 nmol 39 mer寡核苷酸进样的峰信号。

结果与讨论

不锈钢筛板上的寡核苷酸吸附

在初步实验中，使用经过活化的ACQUITY UPLC H-Class Bio系统评估25 mer硫代磷酸酯(PS)寡核苷酸的吸附损失。该实验的目的是估计单个2.1 mm不锈钢筛板（UPLC色谱柱硬件中使用的同一款筛板）造成的分析物损失。使用内径为75 μm 、长40 cm的PEEK管将筛板外壳的出口连接至PDA检测池。该实验不使用色谱柱。

采用在一次实验中多次进样(MISER)的数据采集方法²¹。在单次运行中，执行至多90次25 mer寡核苷酸进样。进样间隔为30秒，每10次进样后插入30秒间隔以优化结果视图（图1）。在初步测试中，使用pH 7的10 mM乙酸己基铵(HAA)流动相。图1A中的红色色谱图表示在PEEK两通接头上进样20次寡核苷酸样品得到的结果。观察到峰高一致。图1A中的峰面积代表100%寡核苷酸回收率。然后，将PEEK两通接头替换为包含2.1 mm内径不锈钢筛板的支架，并且将同一样品进样分析50次。图1B中的色谱图表示因筛板表面发生吸附而造成的寡核苷酸样品损失。初始峰较低，但在随后的进样中增加。这是因为过量样品逐渐使金属筛板上的活性吸附位点达到饱和。这种作用称为液相色谱系统/色谱柱活化。利用图1A所示实验的平均峰面积定量图1B中不锈钢筛板上的分析物损失。第50次寡核苷酸进样得到的回收率为71%。50次进样后峰信号达到平稳状态；在随后的进样中仅观察到峰面积略微增加（数据未展示）。

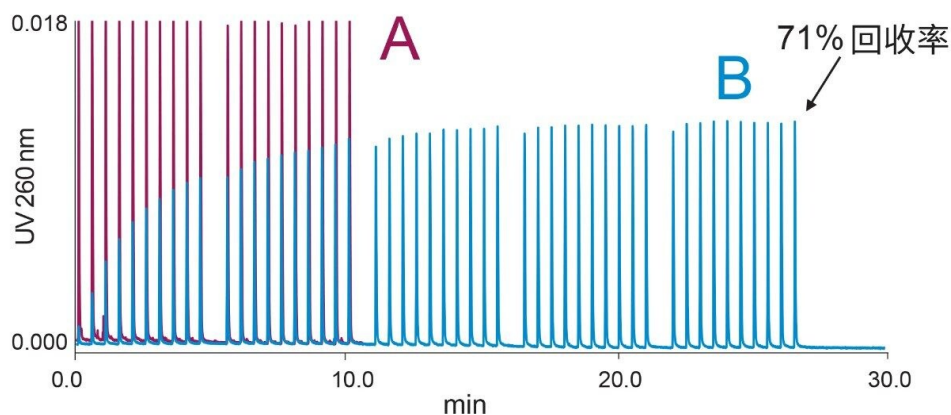


图1.MISER实验的结果，包括2 pmol的25 mer PS寡核苷酸在PEEK两通接头上的20次连续进样结果（红色色谱图）。随后将两通接头替换为支架中的2.1 mm不锈钢筛板，并且将相同的样品进样分析50次（蓝色色谱图B）。实验条件：10 mM HAA，pH 7（流动相1）。

流动相pH对金属表面寡核苷酸吸附的影响

第二项研究考察了寡核苷酸吸附与流动相pH的关系。流动相为10 mM乙酸铵水溶液，用乙酸或氢氧化铵调节至不同的pH值。同样利用2.1 mm内径的不锈钢筛板进行观察，各pH研究实验均使用新的筛板。图2所示结果表明，酸性pH下的寡核苷酸损失更明显。在pH 7-8的条件下（寡核苷酸分离的常用条件），样品损失不太明显，但在任何给定的实验条件下，最初的10-20次进样仍然面临挑战。利用由图2获得的数据估算每次pH实验中前50次进样的累积寡核苷酸损失。根据不锈钢筛板上每次进样的峰面积($A_{\text{筛板}}$)以及在对照实验中使用PEEK两通接头获得的峰面积(A_{PEEK})计算损失。

$$\text{累积损失} = 2 \text{ pmol} \times \sum_i^{50} \frac{A_{\text{筛板 } i}}{A_{\text{PEEK } i}}$$

公式1

pH 5、pH 6、pH 7和pH 8实验中的累积寡核苷酸损失分别为39.9、24.1、13.8和7.4 pmol。此估算值为液相色谱系统/色谱柱活化提供了重要指导。在寡核苷酸分析实践领域经验丰富的分析人员通常会先执行一系列进样消耗寡核苷酸，然后再分析目标样品。根据累积回收率结果得出以下结论：应使用10 pmol以上（约100 pmol以上更好）的样品进行UPLC系统和色谱柱活化，以便使用pH值为7-8的流动相实现高效活化。使用10 mM HAA缓冲液或10 mM乙酸三乙铵(TEAA)缓冲液进行的实验表现出类似的寡核苷酸吸附量（数据未展示）。

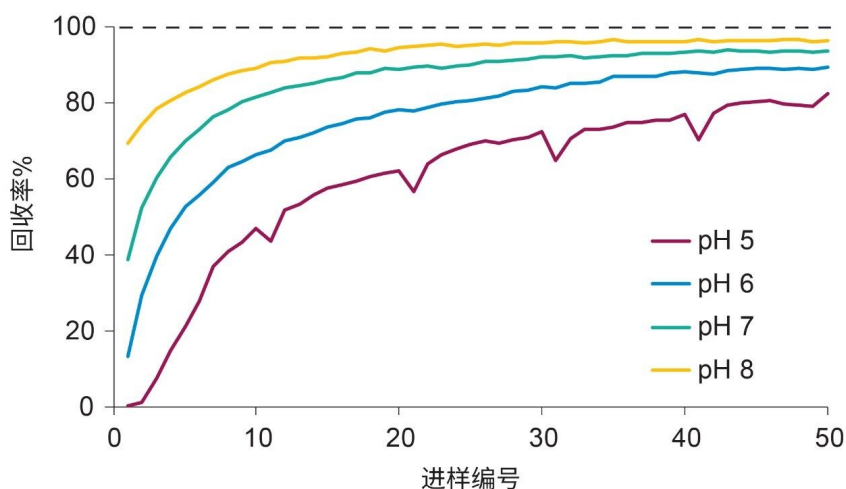


图2. *MISER*实验结果，包括在2.1 mm不锈钢筛板上对2 pmol的25 mer寡核苷酸样品进行50次连续进样的结果。实验使用10 mM乙酸铵缓冲液将pH调节至5、6、7和8（流动相2-6）

用寡核苷酸样品对金属表面进行短暂活化

图1和图2的结果说明了在处理液相色谱仪和色谱柱样品活化时应考虑的重要因素。首先，尽管多次重复进样，分析物信号仍未达到完全100%的回收率。其次，pH 5检测序列中的回收率“下降”（图2）突出说明：活化并非永久策略，只能起到短暂作用。回收率下降发生在每10次进样后插入的时间间隔之后。在长时间清洗期间，使用过量流动相可以洗脱筛板表面吸附的部分分析物。图2中的所有实验均出现了“性能降低”现象，只不过在pH 5实验中最明显。图3是使用pH值4.5的10 mM乙酸铵流动相获得的结果，其中更详细地展示了性能降低现象。图3显示，延长清洗时间会导致筛板的性能进一步降低。分析物从金属筛板表面逐渐洗脱的现象也很明显，如峰拖尾一样。

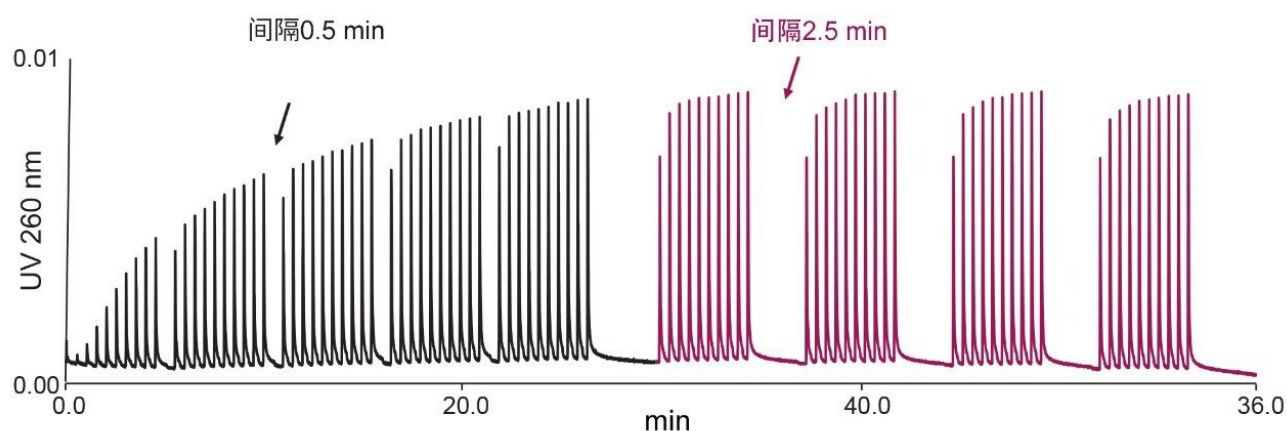


图3. *MISER*实验结果，包括在2.1 mm不锈钢筛板上对2 pmol的25 mer寡核苷酸进行50次进样分析（黑色线条），然后延长时间间隔（每10次进样后间隔2.5 min，代替初始的0.5 min）对相同的样品进行40次进样的结果。流动相为10 mM乙酸铵，pH 4.5（流动相2）。

由于分析物从金属表面流出，因此即使进行50次进样后，也难以完全活化不锈钢硬件并实现100%的回收率（参见图1B）。实验过程中，筛板上吸附的分析物不断被洗脱。样品流失可能导致寡核苷酸分析中出现难以预料的高水平样品残留。色谱柱活化解释了安装新色谱柱或彻底清洗液相色谱系统后样品信号可能突然下降的原因。建议在发生此类事件后重复实施活化方案，获得与先前绘制的标准曲线一致的结果。

图1-3中显示的数据证实，由于液相色谱仪器的金属组件上发生非特异性样品吸附，可能导致寡核苷酸液相色谱分析难度变大。这种现象会干扰定量分析，尤其是在灵敏的LC-MS分析中。我们观察到，非特异性吸附并不仅限于不锈钢表面；在钛和有色金属合金上同样观察到不同程度的样品损失（数据未展示）。为解决这些样品损失问题，沃特世开发出MaxPeak高性能表面技术，可用于MaxPeak Premier色谱柱。该技术将杂化硅胶的高度交联成分以共价方式固定在金属表面，从而在硬件上形成一层屏障[Lauber等人，沃特世白皮书，720006930EN <<https://www.waters.com/waters/library.htm?lid=135074404>>，2020]。HPS技术用于永久性钝化包括筛板在内的色谱柱硬件。MaxPeak Premier色谱柱为许多实验室中实施的色谱柱短暂活化提供了优异的解决方案。

MaxPeak Premier色谱柱技术在寡核苷酸分析中的应用

选择ACQUITY UPLC BEH C₁₈寡核苷酸分析专用柱进行高分离度寡核苷酸分析。该色谱柱填充有1.7 μm杂化硅胶颗粒，非常适合在中性至中等碱性pH条件和高温下进行分离。ACQUITY BEH C₁₈寡核苷酸分析专用柱使用不锈钢硬件，因此金属表面的吸附可能导致部分样品损失。相比之下，ACQUITY Premier BEH C₁₈寡核苷酸分析专用柱填充相同的颗粒，但是采用MaxPeak HPS色谱柱硬件。以下研究对这两种色谱柱进行了比较。

图4展示了常规ACQUITY UPLC不锈钢硬件与MaxPeak Premier硬件色谱柱（两者填充相同的色谱颗粒）的性能比较。如预期一样，对不锈钢色谱柱进行短暂活化之前，在若干初始进样中观察到少量样品损失。利用MaxPeak Premier色谱柱未观察到明显的样品损失；首次进样即观察到寡核苷酸几乎完全回收。

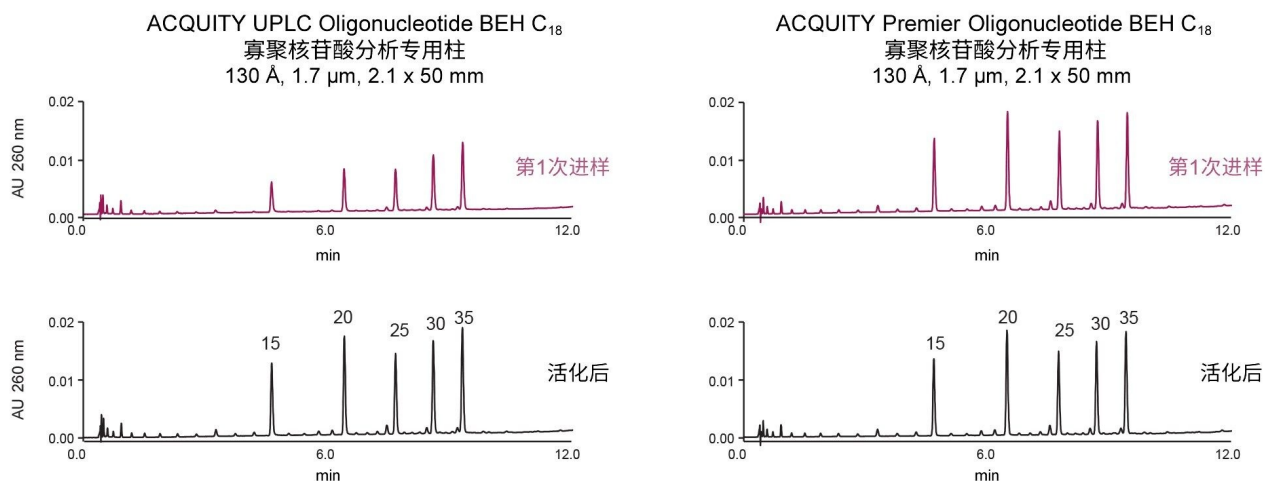


图4.使用常规色谱柱硬件与ACQUITY Premier色谱柱硬件进行寡核苷酸分析的结果比较。将10 pmol的15、20、25、30和35 mer寡核苷酸（OST MassPREP样品）进样至新色谱柱（第1次进样）。在不锈钢色谱柱上观察到寡核苷酸回收不完全，而使用ACQUITY Premier色谱柱则几乎完全回收。随后进样1 nmol的39 mer寡核苷酸对色谱柱进行活化，并重复分析（色谱图标记为“活化后”）。所有实验均使用25 mM HAA (pH 7)作为离子对流动相。

如上所述，pH的选择是实验中重要的考虑因素。即使使用常规色谱柱硬件，提高pH值也能够改善寡核苷酸的回收率。但是，pH的选择受到两个因素的限制。首先，碱性pH会使色谱柱稳定性下降，且pH较高可能会缩短色谱柱使用寿命。其次，离子对保留机制依赖于胺流动相添加剂被质子化以有效形成离子对。寡核苷酸必须与质子化胺形成离子对，才能保留在反相色谱柱上。由于大多数适合用作离子对试剂的胺的 pK_a 值为约10.5，因此在pH值高于9.5的流动相中携带的电荷逐渐减少，导致寡核苷酸保留减少，分离度下降。不建议使用pH高于8.5的流动相进行寡核苷酸的离子对反相分离。

在六根先前未用过的色谱柱上，使用三个不同的pH值对30 mer寡聚脱氧胸苷进行回收率测定。将25 mM HAA缓冲液体系的pH值调节至6、7和8.5，用于比较常规不锈钢色谱柱与ACQUITY Premier色谱柱。务必考虑到液相色谱系统也会因硬件组件上的非特异性吸附而导致分析物损失。图5所示的实验使用经过活化的液相色谱系统进行，旨在尽量减少混杂效应。在该实验中观察到的回收率如图5所示。正如预期所料，提高pH值有助于减少分析物损失。但是，即使在pH 8.5的条件下，不锈钢色谱柱仍未实现完全回收。相比之下，在研究的pH 6–8.5范围内，

MaxPeak Premier色谱柱几乎实现完全回收。使用MaxPeak Premier色谱柱观察到少量分析物损失可能是因为液相色谱系统硬件未完全活化。

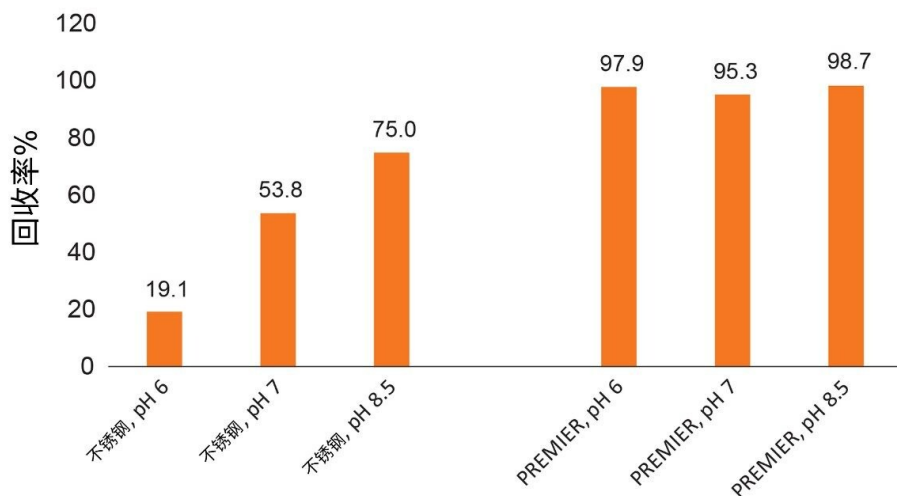


图5.使用新色谱柱进行的前几次进样中，30 mer寡聚脱氧胸苷的回收率。在pH 6.0-8.5的范围内，使用常规不锈钢色谱柱观察到回收不完全。使用由MaxPeak HPS色谱柱硬件制成的MaxPeak Premier色谱柱获得较高回收率。

结论

本应用纪要提出了实现高灵敏度寡核苷酸分析的最佳实践，并证明不锈钢色谱柱硬件更容易发生非特异性寡核苷酸吸附。重复进样可以逐步对色谱柱和液相色谱仪中的金属表面进行活化。但是，我们观察到这种活化只是短暂的；随着流动相不断冲洗，样品逐渐从液相色谱系统（和色谱柱）的金属表面洗脱，导致部分硬件的性能降低。

流动相pH是重要的实验参数。提高pH可改善寡核苷酸样品的回收率；但是，该解决方案并不如期望的那样有效。

近期推出的MaxPeak HPS技术是一种非常有潜力的方法，有望大幅减少寡核苷酸与金属表面的不良相互作用。如今，采用这项新技术的ACQUITY Premier色谱柱已上市，可用于改善寡核苷酸的分析性能。采用这项新技术，分

析人员可以提高寡核苷酸分析的质量和重现性，其适用于常规LC-UV应用，尤其是高灵敏度LC-MS分析。

参考资料

1. Gilar, M.; Fountain, K. J.; Budman, Y.; Holyoke, J. L.; Davoudi, H.; Gebler, J. C. Characterization of Therapeutic Oligonucleotides Using Liquid Chromatography with On-line Mass Spectrometry Detection. *Oligonucleotides* 2003, 13(4), 229–243.
2. McCarthy, S. M.; Gilar, M.; Gebler, J. Reversed-Phase Ion-pair Liquid Chromatography Analysis and Purification of Small Interfering RNA. *Anal.Biochem.* 2009, 390(2), 181–188.
3. Basiri, B.; Sutton, J. M.; Hooshfar, S.; Byrnes, C. C.; Murphy, M. M.; Bartlett, M. G. Direct Identification of Microribonucleic Acid miR-451 from Plasma Using Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *J. Chromatogr.A* 2019, 1584, 97–105.
4. Pardi, N.; Hogan, M. J.; Porter, F. W.; Weissman, D. mRNA Vaccines - A New Era in Vaccinology. *Nat.Rev. Drug Discov.* 2018, 17(4), 261–279.
5. Gilar, M.; Bouvier, E.S.P. Purification of Crude DNA Oligonucleotides by Solid-Phase Extraction and Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.A* 2000, 890(1), 167–177.
6. Gilar, M. Analysis and Purification of Synthetic Oligonucleotides by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array and Mass Spectrometry Detection. *Anal.Biochem.* 2001, 298(2), 196–206.
7. Gilar, M.; Fountain, K. J.; Budman, Y.; Neue, U. D.; Yardley, K. R.; Rainville, P. D.; Russell II, R. J.; Gebler, J. C. Ion-pair Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Oligonucleotides: Retention Prediction. *J. Chromatogr.A* 2002, 958(1-2), 167–182.
8. Li, N.; El Zahar, N. M.; Saad, J. G.; van der Hage, E. R. E.; Bartlett, M.G. Alkylamine Ion-Pairing Reagents and The Chromatographic Separation of Oligonucleotides. *J. Chromatogr.A* 2018, 1580, 110–119.
9. Gong, L.; McCullagh, J. S. Comparing Ion-Pairing Reagents and Sample Dissolution Solvents for Ion-Pairing Reversed-Phase Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry Analysis

- of Oligonucleotides. *Rapid Commun.Mass Spectrom.* 2014, 28(4), 339-350.
10. Sturm, M.; Quinten, S.; Huber, C. G.; Kohlbacher, O. A Statistical Learning Approach to the Modeling of Chromatographic Retention of Oligonucleotides Incorporating Sequence and Secondary Structure Data. *Nucleic Acids Res.* 2007, 35(12), 4195-4202.
 11. Gilar, M.; Yang, H.; Bouvier, E. S.; Warren, B. HPLC and UPLC Columns for the Analysis of Oligonucleotides. Waters Application Note, [720002376EN](#) <
<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=1521847>> , 2007.
 12. Wyndham, K. D.; O'Gara, J. E.; Walter, T. H.; Glose, K. H.; Lawrence, N. L.; Alden, B. A.; Izzo, G. S.; Hudalla, C. J.; Iraneta, P. C. Characterization and Evaluation of C18 HPLC Stationary Phases based on Ethyl-Bridged Hybrid Organic/Inorganic Particles. *Anal.Chem.* 2003, 75(24), 6781-6788.
 13. Ivleva, V. B., UPLC-MS Analysis of Interfering RNA Oligonucleotides. Waters Application Note, [720002412EN](#) <<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=10014836>> , 2008.
 14. Huber, C. G.; Oefner, P. J.; Bonn, G. K. High-Resolution Liquid Chromatography of Oligonucleotides on Nonporous Alkylated Styrene-Divinylbenzene Copolymers. *Anal.Biochem.* 1993, 212(2), 351-358.
 15. Huber, C. G.; Oefner, P. J.; Preuss, E.; Bonn, G. K. High-Resolution Liquid Chromatography of DNA Fragments on Non-Porous Poly(Styrene-Divinylbenzene) Particles. *Nucleic Acids Res.* 1993, 21(5), 1061-1066.
 16. McCarthy, S. M.; Gilar, M. Hexylammonium Acetate as an Ion-Pairing Agent for IP-RP LC Analysis of Oligonucleotides. Waters Application Note, [720003361EN](#) <
<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=10152270>> , 2010.
 17. Shlyankevich, A. Validation of Analytical Methods for Oligonucleotides: Unique Challenges and Solutions. *TIDES* 2010.
 18. Tuytten, R.; Lemiere, F.; Witters, E.; Van Dongen, W.; Slegers, H.; Newton, R. P.; Van Onckelen, H.; Esmans, E. L. Stainless-Steel Electrospray Probe: A Dead End for Phosphorylated Organic Compounds? *J. Chromatogr.A* 2006, 1104(1-2), 209-221.
 19. Walter, T. H.; Alden, B. A.; Blaze, M.; Boissel, C.; DeLano, M.; Field, J.; Lawrence, N.; Osterman, D.; Patel, A. Characterization of New MS-Compatible Mixed-Mode Reversed-Phase/Anion-Exchange HPLC
-

columns. *J. Chromatogr A* 2020, Submitted for publication.

20. Chen, S.; Zhang, J.; Liao, D.; Qian, M. G. A Novel Dynamic Flush Method to Reduce Column-Related Carryover. *J. Chromatogr.Sci.* 2014, 52(8), 950-953.

21. Welch, C. J.; Gong, X.; Schafer, W.; Pratt, E. C.; Brkovic, T.; Pirzada, Z.; Cuff, J. F.; Kosjek, B. MISER Chromatography (Multiple Injections in A Single Experimental Run): The Chromatogram is the Graph. *Tetrahedron: Asymmetry* 2010, 21(13-14), 1674–1681.

特色产品

[ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <https://www.waters.com/10166246>](https://www.waters.com/10166246)

[ACQUITY UPLC PDA检测器 <https://www.waters.com/514225>](https://www.waters.com/514225)

[Empower 3色谱数据软件 <https://www.waters.com/10190669>](https://www.waters.com/10190669)

720007012ZH, 2020年9月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号