

Agilent BioHPLC-Säulen

Ihre wichtigste Ressource für die Biomolekülanalytik





Wer wir sind. Was wir tun.

Im gesamten Labor, auf der ganzen Welt und bei jedem Schritt auf dem Weg zum Erfolg.

CrossLab ist ein Angebot von Agilent, das Services, Verbrauchsmaterialien und laborweites Ressourcenmanagement umfasst und Laboren unter anderem dabei hilft, ihre Effizienz zu steigern, Betriebsabläufe zu optimieren, Betriebszeiten von Geräten zu verlängern und Fertigkeiten von Nutzern zu entwickeln.

Agilent CrossLab ist für Geräte von Agilent sowie anderen Anbietern verfügbar und umfasst beratende Unterstützung für die Umsetzung von Arbeitsabläufen, Laboranalytik, Compliance, Inventarverwaltung und das Anlagenmanagement, einschließlich Umzugsservices.

Erfahren Sie mehr über Agilent CrossLab und sehen Sie sich an, wie Erkenntnisse zu optimalen Ergebnissen führen:

www.agilent.com/crosslab

Sehen Sie sich die CrossLab-Geschichten aus dem Labor an, um herauszufinden, wie wir Sie unterstützen können.



Anwendungsberichte aus dem Labor

Agilent CrossLab Servicetechniker haben es sich zur Aufgabe gemacht, Ihnen bei jedem Kontakt mit detaillierten Erkenntnissen zur Seite zu stehen, Ihnen dabei zu helfen, Ihre Effizienz zu steigern, Ressourcen zu optimieren, Ihre Betriebszeiten zu verlängern und Benutzerqualifikationen zu entwickeln. Erfahren Sie, wie Kunden auf der ganzen Welt von den durch Agilent CrossLab gewonnenen Erkenntnissen und dem Mehrwert profitiert haben.

www.agilent.com/chem/crosslabstories

Inhaltsverzeichnis

Anleitungen für die Auswahl von Biosäulen	1	AdvanceBio RP-mAb	39
Was ist ein Biomolekül?	2	ZORBAX 300 Å StableBond	44
Was ist eine Biosäule?	3	ZORBAX 300 Å Extend-C18	53
Flussdiagramm für die Säulenauswahl	5	Poroshell 300	57
		AdvanceBio Peptide Mapping	62
Trennung von Biomolekülen	6	Agilent Peptid-Qualitätskontrollstandard	66
Proteintrennungen	6	PLRP-S-Säulen	67
Glykantrennungen	12	AdvanceBio Entsalzungs-RP	73
Peptidtrennungen	14	AdvanceBio Oligonucleotide	74
AdvanceBio-Säulen: für schnellere, konsistentere biopharmazeutische Analysen	16	AdvanceBio Oligonukleotid-Standards	76
Trennung von DNA- und RNA-Oligonukleotiden	17		
Aminosäureanalytik	19	Analyse intakter Formen mittels hydrophober Interaktionschromatographie	78
Aminosäuren	20	AdvanceBio HIC	78
Anleitungen für die Methodenentwicklung	21	Analyse der Ladungsvarianten	80
Primärstruktur-Analysemethoden	21	Aufreinigung von Proteinen und anderen geladenen Molekülen	80
Umkehrphasen-LC/MS-Methoden	23	Anwendung der Ionenaustauschchromatographie auf die Analyse der Ladungsvarianten	80
Methoden zur Analyse der Ladungsvarianten	24	Bio MAb HPLC-Säulen	83
Methoden zur Analyse der Ladungsvarianten mit der Software		Bio IEX HPLC-Säulen	88
Agilent Buffer Advisor	26	Ionenaustausch-Säulen mit dem starken	
Methoden zur Aggregations- und Fragmentanalyse	27	Anionenaustauscher PL-SAX	95
Analyse von Glykanen, hydrophilen Peptiden und Glykopeptiden	29	Ionenaustausch-Säulen mit dem starken	
Methoden zur Titerbestimmung und Optimierung von Zellkulturen	30	Kationenaustauscher PL-SCX	99
Methoden mit hochempfindlichen Kapillarsäulen	31	Bio-Monolith-Ionenaustausch-HPLC-Säulen	102
Agilent Geräte zur Proteinidentifizierung und Charakterisierung von Verunreinigungen	32	Aggregations- und Fragmentanalyse	106
1260 Infinity II bioinertes LC-System	32	Genaue Bestimmung der Aggregation, Fragmentation und chemischen Ligation/Modifikation von Biomolekülen	106
1290 Infinity II LC mit Hochgeschwindigkeitspumpe	33	Anwendung der SEC in Aggregationsstudien	106
1260 Infinity II LC mit binärer Pumpe	34	Anwendung der SEC zur Quantifizierung und Molekulargewichtsbestimmung	107
1260 Infinity II Prime LC	35	Welche SEC-Säule eignet sich für Ihre Applikation?	109
		AdvanceBio SEC	110
Primärstrukturanalyse	36	Standards für AdvanceBio SEC	116
Genaue Bestimmung der Aminosäuresequenz und posttranslationaler Modifikationen und Analyse der Verunreinigungen von Peptiden und Oligonukleotiden	36	Bio SEC-3	117
		Bio SEC-5	123
		ProSEC 300S	127
		ZORBAX GF-250- und GF-450-Gelfiltrationssäulen	128

(Fortsetzung)

Inhaltsverzeichnis (Fortsetzung)

Charakterisierung der Glykosylierung	130	Microbore-Säulen (1,0 mm ID)	169
AdvanceBio Glycan Mapping-Säulen	132	2D-LC	172
N-Glykan-Standards	136	Offline-Säulenregenerierung	172
Analyse von hydrophilen Peptiden und Glykopeptiden	138	Umfassende 2D-LC	174
		Präparative HPLC für die Aufreinigung	176
Titerbestimmung	140	mRP-C18 High Recovery Protein-Säulen	178
Bio-Monolith HPLC-Säulen	140	ZORBAX PrepHT	180
		PLRP-S für den präparativen Maßstab bis zum Prozessmaßstab	182
Zellkultur- und Aminosäureanalytik	145	Bio MAb und Bio IEX	188
Lösungen von Agilent zur Analyse von gebrauchten Zellkulturmedien	146	PL-SAX und PL-SCX vom präparativen Maßstab bis zum Prozessmaßstab	190
AdvanceBio Aminosäureanalytik (AAA)	147	Peptidaufreinigung	194
AdvanceBio Amino Acid Analysis -Standards und -Kit	149	VariTide RPC-Säulen für synthetische Peptide	194
AdvanceBio MS Spent Media	150	VariPure IPE	195
ZORBAX Eclipse Amino Acid Analysis (AAA)	152	Präparative Load & Lock-HPLC-Säulen	196
		Bio SEC	198
Proteinentfernung	155	Agilent-Lösungen	200
Proteinfraktionierungssystem und Proteomikreagenzien von Agilent	155	Agilent CrossLab Services	202
Multiple Affinity Removal-System	156		
Starterkits für Multiple Affinity Removal-Systeme	159		
Spezialabmessungen	160		
Kapillar- und Nanosäulen	160		
ZORBAX Bio-SCX Serie II	166		

Tipps und Werkzeuge

Applikationsbeispiele für das gesamte Portfolio der Biosäulen finden Sie im Applikationskompendium zu kritischen Qualitätsmerkmalen:
www.agilent.com/chem/cqa-applications

Anleitungen für die Auswahl von Biosäulen

Biotherapeutika verfügen über ein großes Potential zur Verbesserung der menschlichen Gesundheit. Die Anzahl an zugelassenen Protein- und Antikörpertherapeutika steigt auf der ganzen Welt immer weiter an, da sich diese wichtige therapeutische Klasse mit medizinischen Bedürfnissen befasst, die bisher nicht erfüllt wurden. Die Entdeckung und Entwicklung von Biopharmazeutika ist jedoch schwierig. Wissenschaftler müssen viele Herausforderungen meistern: Sie müssen nicht nur mit den Fortschritten in der Wissenschaft und den Verbesserungen der Technologie Schritt halten, sondern sich auch im Labyrinth der sich ändernden Richtlinien zurechtfinden. Schnell gute Entscheidungen zu treffen ist wichtig. In jedem Stadium der Entwicklung, von der Erforschung der Krankheit über QA/QC bis hin zur Herstellung – Agilent unterstützt Sie dabei, die richtige Wahl zu treffen, wenn es darum geht, Arzneimittel erfolgreich auf den Markt zu bringen. Wir stellen nicht nur zuverlässige Geräte und Verbrauchsmaterialien her, die genaue, reproduzierbare Ergebnisse liefern, wir kennen auch die Arbeitsabläufe im Bereich Biopharmazie und bieten Produktfamilien an, die, als treibende Kräfte für Forschung, Entdeckung und Entwicklung, nahtlos zusammenarbeiten, um potentielle biopharmazeutische Wirkstoffe in ihrer Entwicklung voranzutreiben.

Da die Protein-Biopharmazeutika eine sehr heterogene Gruppe darstellen, sind eine Reihe von chromatographischen Methoden erforderlich, um den pharmazeutischen Wirkstoff genau zu charakterisieren. Zu den Methoden gehören u. a. die Größenausschlusschromatographie zur Quantifizierung von Dimeren und Aggregaten und die Ionenaustauschchromatographie zur Analyse der Ladungsvarianten. Abgesehen von der vollständigen Charakterisierung müssen die primäre Aminosäuresequenz und jegliche posttranslationalen Modifikationen der Sequenz, die während der Aufreinigung oder Formulierung entstanden sein könnten, beachtet werden. Um eine vollständige, reproduzierbare und qualitativ hochwertige Analyse für wichtige Arbeitsabläufe bei der Charakterisierung zu ermöglichen, bietet Agilent eine breite Palette an Säulen und Zubehör an.

Diese umfassende Anleitung hilft Ihnen, die richtige Säule für Ihren Arbeitsablauf in der Charakterisierung zu finden. Sie enthält auch Ratschläge und Tipps zur Methodenentwicklung, Lösemittelauswahl, Modifikation der mobilen Phase, Optimierung und viele Beispieltrennungen, die Sie bei der Säulenauswahl und der Methodenentwicklung unterstützen sollen.

Agilent hat für Ihre Anforderungen umfassende Lösungen. Dazu gehört das Agilent 1260 Infinity II bioinerte LC-System mit einem metallfreien Probenweg und das Agilent 1290 Infinity II LC-System, das für schnellste Geschwindigkeit, höchste Auflösung und größte Empfindlichkeit für UHPLC-Applikationen entwickelt wurde. Biomoleküle mögen in ihrem Aufbau komplex sein, die Analyse von Biomolekülen wird jedoch mit der Verwendung von HPLC-Säulen, -Systemen und -Zubehör von Agilent vereinfacht.

Was ist ein Biomolekül?

Biomoleküle sind Verbindungen, die von lebenden Organismen gebildet werden. Ihre Größe reicht von Aminosäuren und kleinen Lipiden bis zu großen Polynukleotiden wie DNA oder RNA.

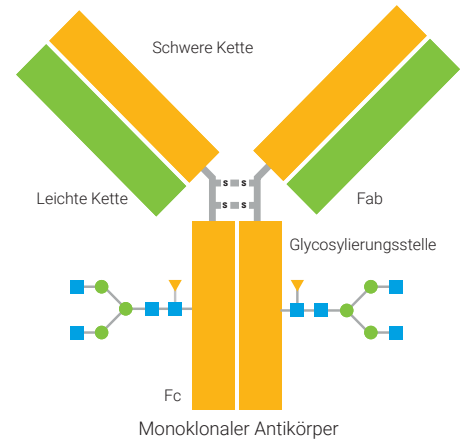
In diesem Abschnitt behandeln wir die Trennung folgender Verbindungen:

Proteine – die Trennung beruht bei der Größenausschlusschromatographie auf der Größe, bei der Ionenaustauschchromatographie auf der Ladung und bei der Umkehrphasenchromatographie oder der hydrophoben Interaktionschromatographie auf der Hydrophobie.

Peptide – Biosäulen für die Analyse und Aufreinigung der gesamten Bandbreite der Peptide, die hydrophobe, hydrophile, basische und saure Peptide umfasst, im gesamten Größenbereich. Wir behandeln auch Säulen für das Peptid-Mapping mittels HPLC oder UHPLC.

DNA/RNA-Oligonukleotide – Umkehrphasen- und Ionenaustauschsäulen für DNA- und RNA-Oligonukleotide sowie mit Partikeln unterschiedlicher Porengröße, um den gesamten Größenbereich der Oligonukleotide, von kleinen synthetischen Oligonukleotiden bis zu großen Plasmiden abzudecken.

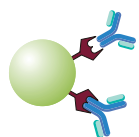
Aminosäuren – die AdvanceBio Amino Acid Analysis Säulen bieten eine hocheffiziente Lösung für die Analyse von 24 Aminosäuren. Die typische Analysendauer reicht von 14 Minuten bei einer 75-mm-Säule bis zu 24 Minuten bei einer 150-mm-Säule.



Was ist eine Biosäule?

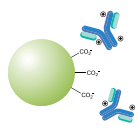
Biochromatographie-Säulen, oder kurz Biosäulen, sind Flüssigkeitschromatographie-Säulen, die für die Trennung von biologischen Verbindungen wie Peptiden und Proteinen, Oligonukleotiden und Polynukleotiden sowie anderer Biomoleküle und Komplexe verwendet werden. Biosäulen sind speziell für die Analyse von Biomolekülen mit größeren Porengrößen konzipiert, um der größeren Molekülgröße Rechnung zu tragen. Die Medien sind so entwickelt, dass für eine bessere Wiederfindung möglichst wenig unspezifische Bindungen der Analyten auftreten. Die Trennmechanismen sind so ausgewählt, dass entweder die biologische Funktion erhalten bleibt, damit die Bioaktivität während der Analyse nicht verloren geht, oder dass die Biomoleküle gezielt denaturiert werden, um die Primärstruktur zu charakterisieren.

Das Angebot an Biosäulen von Agilent bietet Lösungen für alle wichtigen Charakterisierungstechniken in der Biomolekülanalytik. Es umfasst:



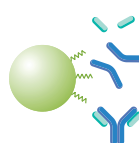
Titerbestimmung

Verwendung einzigartiger Säulentechnologie, wie beispielsweise AdvanceBio Bio-Monolith Protein A, zur Titerbestimmung und Zelllinienoptimierung.



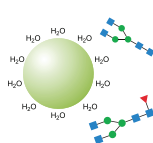
Analyse der Ladungsvarianten

Ionenaustausch-Säulen von Agilent umfassen optimierte Phasentypen für die Analyse monoklonaler Antikörper, wie beispielsweise Bio MAb und Bio IEX für die genaue Analyse der Isoformen.



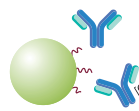
Analyse intakter Formen und Reinheitsanalyse von Untereinheiten mithilfe von Umkehrphasen

Verwendung entscheidend wichtiger Säulentechnologien wie AdvanceBio RP-mAb, ZORBAX RRHD 300 Å und PLRP-S für zuverlässige Ergebnisse von der Primärstrukturcharakterisierung bis zur Analyse intakter oder fragmentierter Proteine.



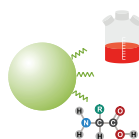
Glykananalytik

Säulen für die hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC) von Agilent liefern genaue und reproduzierbare Glykan- und Glykopeptidanalysen.



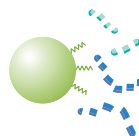
Analyse intakter Formen auf Basis hydrophober Wechselwirkungen

Agilent AdvanceBio HIC-Säulen trennen unterschiedliche Proteinvarianten (PTM) einschließlich der Oxidationsprodukte monoklonaler Antikörper und Wirkstoff-Antikörper-Spezies in Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten.



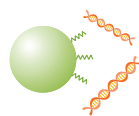
Aminosäuren- und Zellkulturanalytik

Analyse entscheidender Komponenten von Zellkulturmedien entweder mittels LC/UV mit AdvanceBio AAA oder mittels LC/MS mit AdvanceBio MS Spent Media.



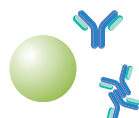
Peptid-Mapping

Detektion und Identifizierung wichtiger posttranslatiionaler Modifikationen in Proben mit verdauten Proteinen mit AdvanceBio Peptide Mapping.



Oligonukleotidanalytik

Robuste, hocheffiziente Lösungen für die DNA/RNA-Analytik.



Aggregat- und Fragmentanalytik

AdvanceBio SEC misst Aggregate (wie Dimere, Trimere, Tetramere und so weiter) genau und trennt niedermolekulare Hilfsstoffe und Verunreinigungen von Proteinen mit höherem Molekulargewicht.

Anleitungen für die Auswahl von Biosäulen

Agilent AdvanceBio-Säulen kommen zur Verbesserung der Genauigkeit und Geschwindigkeit bei der Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern und anderen intakten Proteinen sowie der Analyse der Aggregation mit SEC, der Ladungsvarianten mit IEX, der intakten Masse, der Primärstruktur und der posttranslationalen Modifikationen (PTM) mithilfe von Umkehrphasen und der Analyse abgespaltener Glykane mittels hydrophiler Interaktionschromatographie zum Einsatz.

Diese Anleitung enthält weitere Einzelheiten zum gesamten Agilent Biosäulen-Portfolio sowie Informationen zur Auswahl innerhalb der AdvanceBio Produktfamilie für die genaue Charakterisierung von Biotherapeutika.



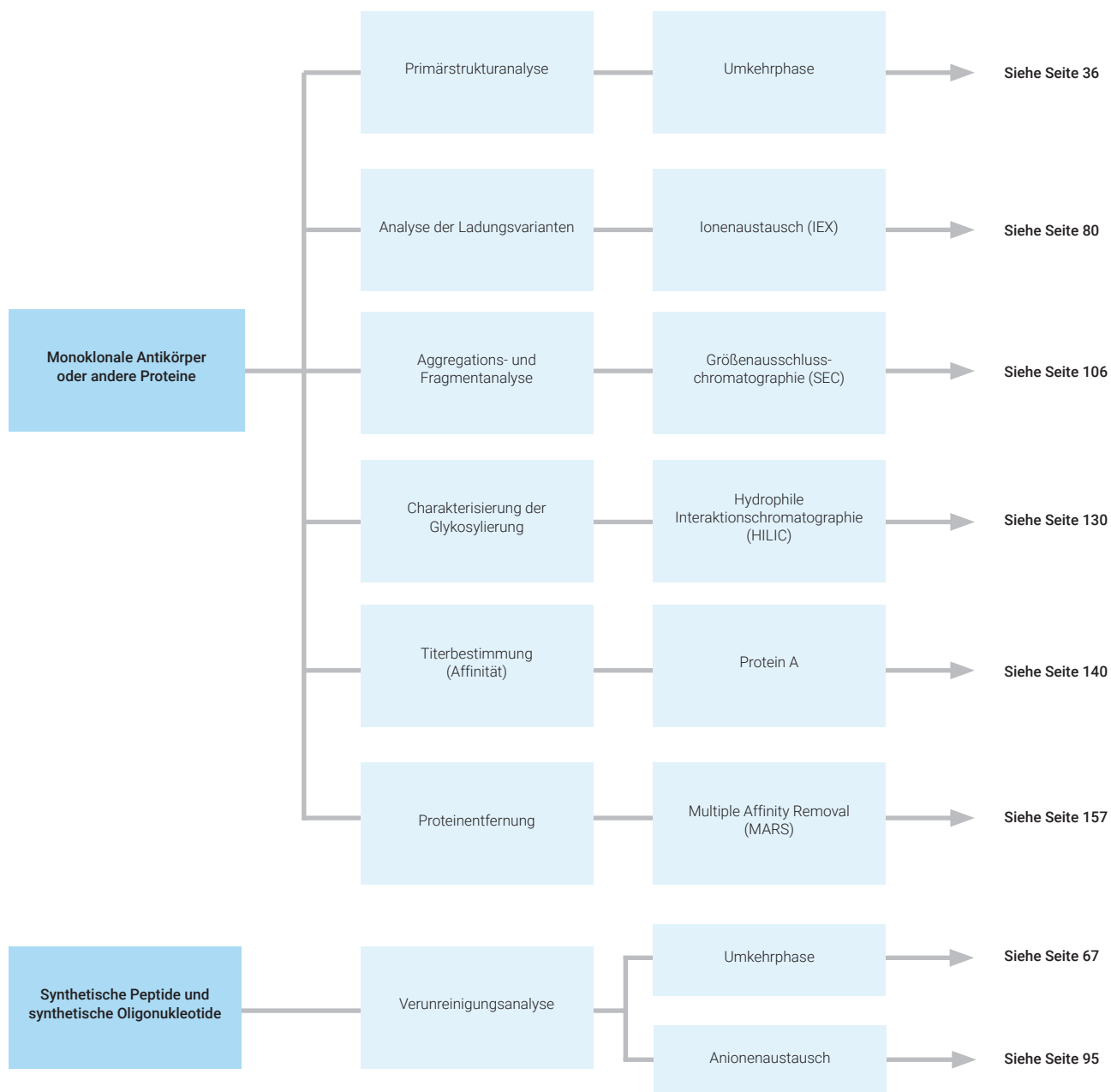
Tipps und Werkzeuge

Weitere Informationen über die AdvanceBio Produktfamilie und verschiedene Werkzeuge zur Verbesserung Ihrer Charakterisierungen finden Sie unter: www.agilent.com/chem/advancebio

Flussdiagramm für die Säulenauswahl

Im folgenden Flussdiagramm sehen Sie, auf welchen Seiten Sie in den jeweiligen Kapiteln die Auswahlanleitungen finden, mit denen Sie die beste Säule für Ihre Biomolekül-Applikation auswählen können.

Für die Hilfe bei der Auswahl der optimalen Säule für Biomolekül-Trennungen gibt es unterschiedliche Faktoren. Der Ausgangspunkt ist die Molekülgröße, da sie die Porengröße der HPLC-Methode für die Trennung bestimmt. Im zweiten Schritt wird die Löslichkeit der Moleküle berücksichtigt. Drittens werden Trennmechanismus, Größe, Hydrophobie und Ladung betrachtet.



Trennung von Biomolekülen

Proteintrennungen

Proteine sind komplexe Moleküle, zu deren vollständiger Charakterisierung mehrere Techniken angewandt werden müssen. Die Proteine liegen in dreidimensionalen Strukturen vor, die ihre biologische Aktivität ausmachen.

Die Sequenz der Aminosäurekette definiert die Primärstruktur des Proteins.

Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Aminosäuren der Primärstruktur führen zu einer Sekundärstruktur, in der Regel in der Form einer α -Helix oder eines β -Faltblatts. Weitere Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, ionische und hydrophobe Wechselwirkungen sowie Disulfidbrücken zwischen Regionen der Sekundärstruktur sind dann für die Tertiärstruktur des Proteins, die dreidimensionale Konformation, verantwortlich. Setzt sich ein Protein aus mehreren Aminosäureketten zusammen, ergeben die Wechselwirkungen dieser Ketten die Quartärstruktur.

Bei der Betrachtung von Abbildung 1 wird klar, dass bei der Proteincharakterisierung Techniken erforderlich sind, die das Protein in seinem nativen Zustand charakterisieren, ohne die Tertiär- und Quartärstruktur aufzubrechen. Ebenso sind Techniken erforderlich, die die Aminosäuresequenz in vollständig denaturiertem Zustand, also ohne die dreidimensionale Struktur, analysieren.

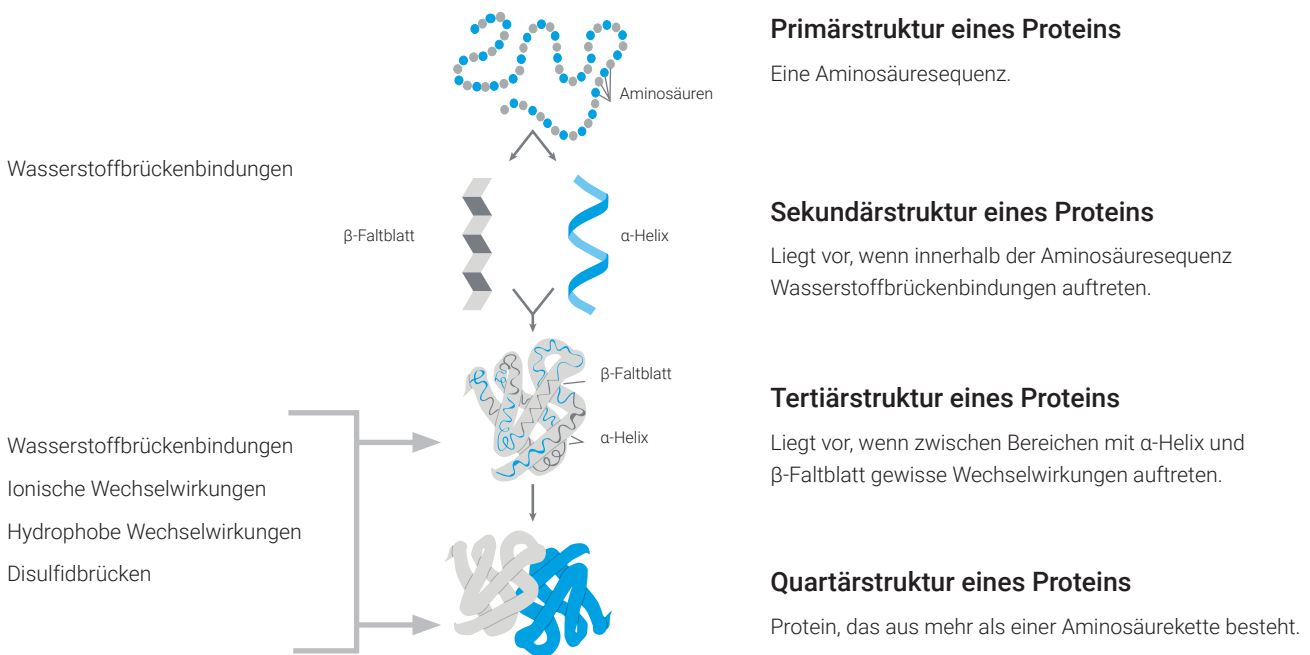


Abbildung 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Proteinstrukturebenen.

Die Umgebung eines Proteins kann seine Struktur beeinflussen, d. h. sie stabilisieren oder aufbrechen. Dabei zu berücksichtigende Faktoren sind pH-Wert, Temperatur, Salzkonzentration, der Anteil an wässrigem oder organischem Lösemittel sowie, für einige Proteine, die Anwesenheit stabilisierender kleiner Moleküle oder Metallionen. Die Proteinstruktur kann auch durch den Einsatz von Sulfhydryl-reduzierenden Reagenzien zum Bruch der -S-S-Bindungen oder chaotroper Reagenzien wie Harnstoff oder Guanidin-Hydrochlorid aufgebrochen werden. Aufgrund der Komplexität der Proteine und der intramolekularen Wechselwirkungen, die ihre dreidimensionale Struktur bestimmen, kann man davon ausgehen, dass es auch intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Proteinmolekülen und anderen Moleküleinheiten sowie mit Oberflächen gibt, mit denen die Proteine in Kontakt kommen. Dies kann zur Bildung von Proteinkomplexen, zu Aggregation (möglicherweise mit Proteinpräzipitation) und zur Ablagerung an Oberflächen, auch jenen der HPLC-Säule und des -Systems, führen. Daher müssen die Handhabung und die Umgebung, in der das Protein vorliegt, in die Betrachtung einbezogen werden.

Selektionshilfe für Protein-Säulen

Applikation	Technik	Agilent Säulen	Hinweise
Primärstruktur-analyse	UHPLC/HPLC-Umkehrphasentrennungen	AdvanceBio RP-mAb PLRP-S ZORBAX RRHD 300 Å Poroshell 300 Å ZORBAX 300 Å AdvanceBio Peptide Mapping	Umkehrphasentrennungen erfordern (oder verursachen) die Denaturierung des Proteins, um genaue Informationen über Aminosäuresequenz und Aminosäureveränderungen (einschl. posttranslati onaler Modifikationen) zu erhalten.
Analyse der Ladungsvarianten	Ionenaustausch-Trennungen	Agilent Bio IEX Agilent Bio MAb PL-SAX PL-SCX	Das Verhältnis der einzelnen Aminosäuren bestimmt die Nettoladung eines Proteinmoleküls. Der pH-Wert, bei dem die Nettoladung gleich Null ist, wird als isoelektrischer Punkt (pI) bezeichnet. Ist der pH-Wert der Lösung kleiner als der isoelektrische Punkt, ist das Protein positiv geladen (sauer), ist der pH-Wert der Lösung größer als der isoelektrische Punkt, ist das Protein negativ geladen (basisch). Für die Ionenaustauschanalyse empfehlen wir, dass der pH-Wert des Eluenten sich mindestens um eine pH-Einheit vom isoelektrischen Punkt unterscheidet. Für Proteinanalysen mit Ionenaustauschsäulen sind gepufferte mobile Phasen sowie Salz- oder pH-Gradienten für die Elution erforderlich.
Aggregations- und Fragmentanalyse	Größenausschluss-trennungen	AdvanceBio SEC Bio SEC-3 Bio SEC-5	Aggregate in Protein-Biopharmazeutika stellen ein großes Problem dar, da sie eine Immunantwort hervorrufen und die Zusammensetzung der endgültigen Formulierung beeinflussen können.
Charakterisierung der Glykosylierung	Hydrophile Interaktions-chromatographie	AdvanceBio Glycan Mapping ZORBAX RRHD 300 HILIC	Kenntnisse über Glykosylierung und Glykanstrukturen von Proteinen und monoklonalen Antikörpern sind aufgrund des Immunogenitätseffekts und der Sicherheit der Biotherapeutika von wachsender Bedeutung. Die HILIC-Chromatographie liefert zu den Umkehrphasensäulen komplementäre Informationen, da bei ihr der hydrophile Teil der Probe retardiert wird.
Titerbestimmung	Trennung aufgrund der Affinität	Bio-Monolith Protein A Bio-Monolith Protein G	Bevor Sie teure und große Mengen an Protein A im präparativen Maßstab einsetzen, wenden Sie zur Überwachung des Titors monoklonaler Antikörper und der Ausbeute aus Zellkulturüberständen ein Verfahren in kleinem (analytischem) Maßstab an. Anhand dieses Verfahrens wird der Titer des monoklonalen Antikörpers bestimmt und ermittelt, wann der optimale Zeitpunkt für die Ernte des Produkts, also des monoklonalen Antikörpers, ist.
Proteinentfernung	Aufreinigung aufgrund der Affinität	MARS Human-14 MARS Human-7 MARS Human-6 MARS Human-6 High Capacity MARS Human-2 MARS Human-1 MARS Mouse-3	Entfernung hoch abundanter Proteine aus biologischen Proben. Die Entfernung dieser abundanten Proteine verbessert die nachfolgende LC/MS- und die elektrophoretische Analyse der Probe dank der wirksamen Erweiterung des dynamischen Bereichs.

Schnelle, hochaufgelöste Trennung einer Trastuzumab-IgG1-Variante

Säule: AdvanceBio RP-mAb C4
795775-904
2,1 x 100 mm, 3,5 µm

Mobile Phase: A: 0,1 % TFA in Wasser:IPA (98:2)
B: IPA:ACN:mobile Phase A (70:20:10)

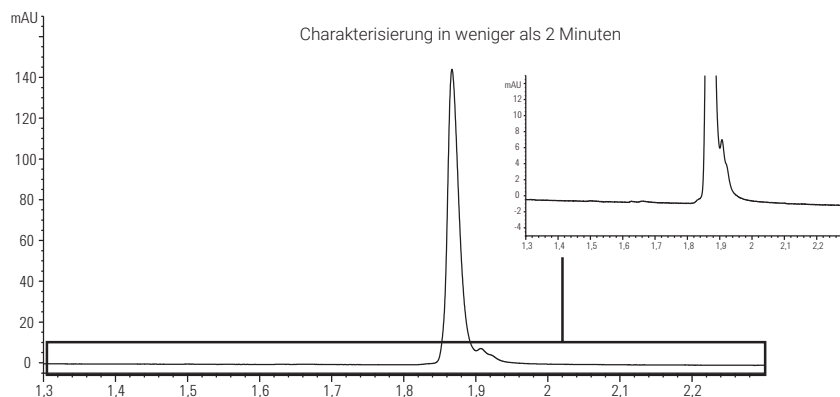
Flussrate: 1,0 ml/min

Gradient: 10-58 % B in 4 min, Spülung 1 min bei 95 % B, erneute Äquilibration 1 min bei 10 % B

Temperatur: 80 °C

Detektor: UV, 254 nm

Probe: 5 µl Injektion der intakten humanisierten rekombinanten Trastuzumab-IgG1-Variante von Creative Biolabs (1 mg/ml)



AdvanceBio RP-mAb C4 liefert in weniger als 2 Minuten einen scharfen Peak und eine hohe Detailauflösung.

Höhere Auflösung von Oxidationsprodukten

Säule: ZORBAX RRHD 300SB-C18
857750-902
2,1 x 50 mm, 1,8 µm

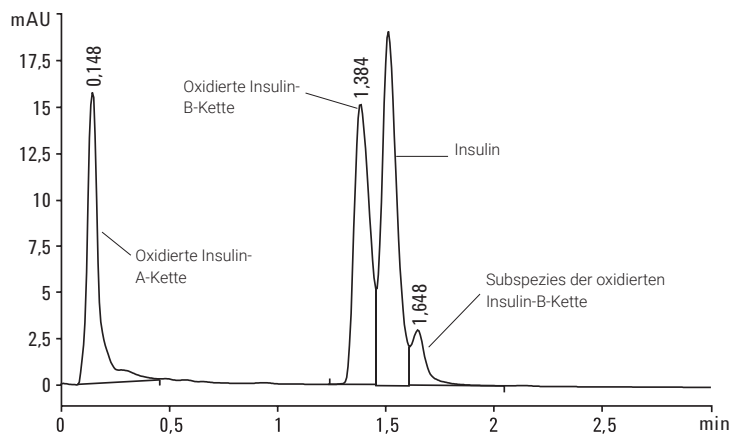
Mobile Phase: A: 0,1 % TFA
B: 0,01 % TFA + 80 % ACN

Flussrate: 1,0 ml/min

Gradient: 33-50 % B, 0-4 min

Detektor: 1290 Infinity LC mit Diodenarray-Detektor bei 280 nm

Probe: Insulin, Insulin-A-Kette und -B-Kette, oxidiert (BSA, Sigma-Aldrich, Corp., 1 mg/ml)



Oxidierte Insulinketten werden von Insulin in weniger als zwei Minuten mit einer ZORBAX RRHD 300SB-C18, 2,1 x 50 mm, 1,8 µm Säule getrennt.

Trennung intakter mAb-Monomere und -Dimere

Säule: Bio SEC-3, 300 Å
5190-2511
7,8 x 300 mm, 3 µm

Flussrate: 1,0 ml/min

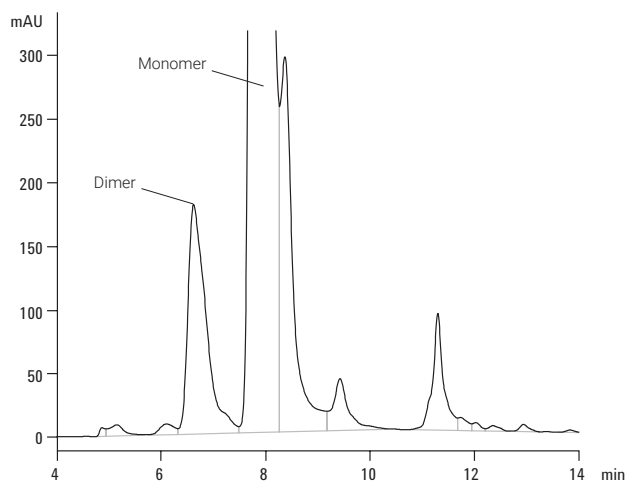
Injektion: 5 µl

Temperatur: Umgebungstemperatur

Detektor: UV, 220 nm

Puffer: 150 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0

Isokratisch: 0-100 % Puffer von 0-30 min



Tipps und Werkzeuge

Agilent kennt Ihre außergewöhnlich komplizierten und arbeitsintensiven Arbeiten. Wir unterstützen Sie dabei. Weitere Information finden Sie in *BioPharma Workflow Solutions: How Agilent Helps Resolve Complex Analytical Challenges* (Publikation 5991-5235EN).
www.agilent.com/search

Trennung der Ladungsvarianten von Human-IgG1 mit einem Salzgradienten

Säule: Bio MAb, PEEK
5190-2407
4,6 x 250 mm, 5 µm

Detektor: UV, 225 nm

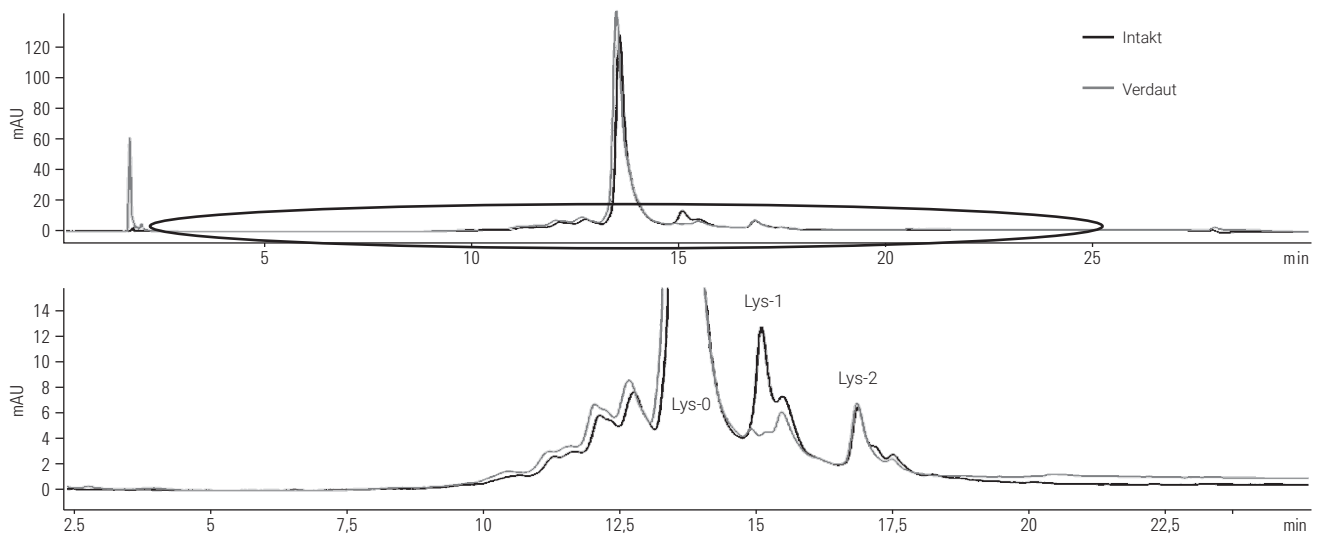
Gerät: 1260 Infinity bioinerte quaternäre LC oder
LC der Serie 1100

Mobile Phase: A: 10 mM Na₂HPO₄, pH 5,5
B: A + 0,5 M NaCl

Probe: 5 µL einer 1 mg/mL-Lösung von intaktem oder C-terminal
verdautem IgG1

Flussrate: 0,85 ml/min

Gradient: 10 bis 35 % B von 0 bis 25 min



Trennung von intaktem und C-terminal verdautem IgG1 mit einer Agilent Bio MAb 5 µm Säule.

IgG1-Titerbestimmung im Überstand einer CHO-Zellkultur

Säule: Bio-monolith Protein A
5069-3639
5,2 x 4,95 mm

Mobile Phase: A: 50 mM Phosphat, pH 7,4
B: 100 mM Zitronensäure, pH 2,8

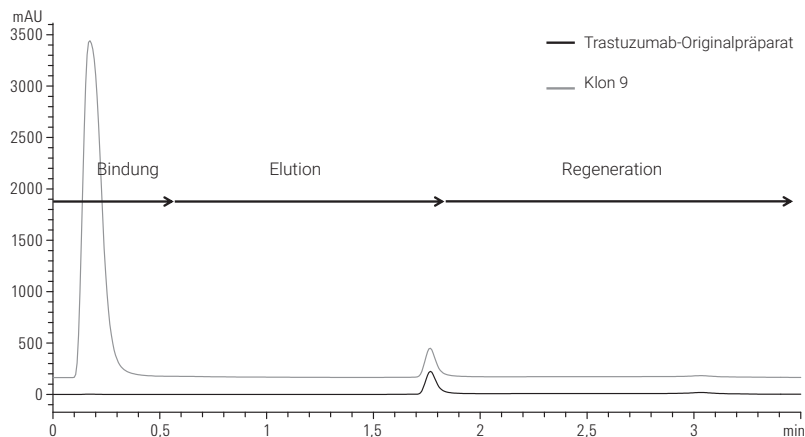
Flussrate: 1 ml/min

Gradient: **Zeit (min) % B**
0 bis 0,5 0 % B (Bindung)
0,6 bis 1,7 100 % B (Elution)
1,8 bis 3,5 0 % B (Regeneration)

Injektionsvolumen: 50 µl

Detektor: UV, 280 nm

Fraktionssammlung: Zeitbasiert



Chromatogramm des Kulturüberstands eines Trastuzumab-produzierenden CHO-Klons, des Klons 9 und eines Trastuzumab-Originalpräparats, jeweils verdünnt in 50 mM Natriumphosphat bei pH 7,4 auf 0,2 mg/ml, auf einer AdvanceBio Bio-Monolith Protein A-Säule. Hinweis: Der Überstand wurde 1:1 in Phosphatpuffer verdünnt.

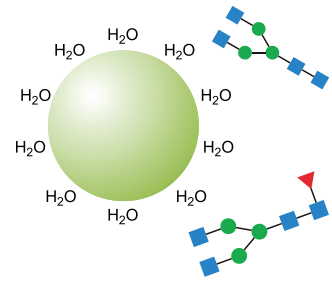
Glykantrennungen

Glykan-Charakterisierung

Da das Glykosylierungsmuster die Sicherheit und Wirksamkeit des Endprodukts beeinträchtigen kann, ist eine Glykananalyse für die Charakterisierung von Biotherapeutika erforderlich.

Dabei wird das intakte Glykoprotein mit einem Enzym wie beispielsweise PNGase F behandelt, um die Glykane vom Protein abzuspalten. Die Glykane werden dann mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, da sie selbst im UV- oder Fluoreszenzbereich nicht sichtbar sind. Nach der Markierung wird ein Aufreinigungsschritt durchgeführt, um überschüssiges Reagens und deglykosyliertes Protein aus der Probenmischung zu entfernen. Die gereinigte Probe, die die freigesetzten Glykane enthält, wird dann in der Regel mittels hydrophiler Interaktionschromatographie (HILIC) mit Fluoreszenz- oder massenspektrometrischer Detektion analysiert.

Das chromatographische Profil ist charakteristisch für die analysierte Glykoproteinprobe und in ihrer Komplexität äußerst variabel. Die AdvanceBio Glycan Mapping-Säulen sind gut dafür geeignet, in kurzer Zeit eine hochaufgelöste Trennung zu erzielen.



Tipps und Werkzeuge

Bioinerte Verbrauchsmaterialien von Agilent sorgen für einen metallfreien Probenflussweg, der die Wechselwirkungen Ihrer Biomoleküle minimiert.

Besuchen Sie: www.agilent.com/chem/bio-inert-uhplc

Sehr schnelle Glykananalyse: mit 1,8 µm Partikeln in weniger als zehn Minuten

Säule: Agilent AdvanceBio Glycan Mapping
859700-913
2,1 x 150 mm, 1,8 µm

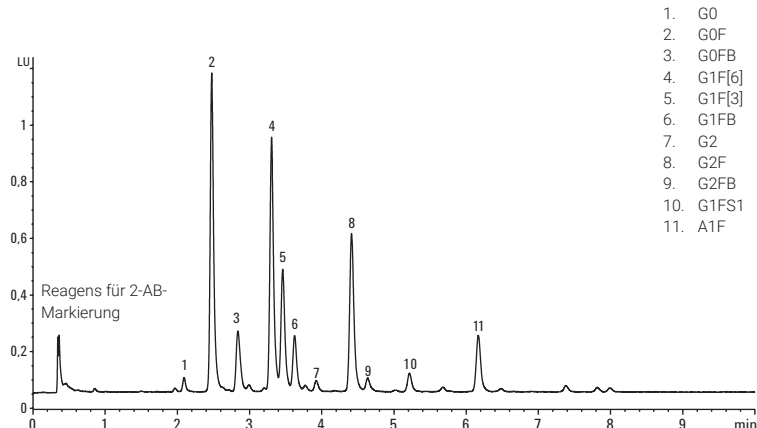
Mobile Phase: A: 100 mM Ammoniumformiat, pH 4,5
B: ACN

Injektionsvolumen: 2 µl in ACN:100 mM Ammoniumformiat (70:30)

Fluoreszenz detektion: Anregung: 260 nm
Emission: 430 nm

Gerät: Agilent 1290 Infinity LC mit
Agilent 1260 Infinity Fluoreszenzdetektor

Probe: Bibliothek aus 2-AB-markierten N-verknüpften
Glykanen, Human-IgG (Best.-Nr. 5190-6996)



1. G0
2. G0F
3. G0FB
4. G1F[6]
5. G1F[3]
6. G1FB
7. G2
8. G2F
9. G2FB
10. G1FS1
11. A1F

Schnelles, hoch aufgelöstes Glykan-Mapping (1,8 µm Säule). Dieser Standard wird zur Prüfung aller AdvanceBio Glycan Mapping-Säulen verwendet.

Zeit	%A	%B	Flussrate (ml/min)
0	25	75	1,0
12	40	60	1,0
12,15	60	40	0,5
12,5	60	40	0,5
12,9	25	75	0,5
13,05	25	75	1,0
15	25	75	1,0

Peak	Glykan	Struktur	Peak	Glykan	Struktur
1	G0		9	G2F	
2	G0F		10	G2FB	
3	G0FB		11	G1FS1	
4	G1F		12	A1	
5	G1F'		13	A1F	
6	G1FB		14	A1FB	
7	G1FB Man6		15	A2	
8	G2		16	A2F	
			17	A2FB	

- Fucose
- Galaktose
- Mannose
- N-Acetylglucosamin
- N-Acetylneuraminsäure

Peptidtrennungen

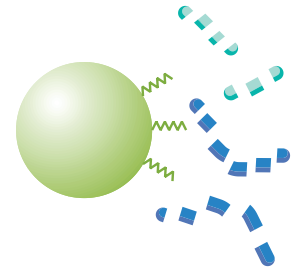
Peptid-Mapping

Für die Charakterisierung von Proteinen ist ein Peptid-Mapping erforderlich. Dabei wird die Identität eines Proteins bestätigt und posttranslationale Modifikationen werden identifiziert und quantifiziert.

Das gereinigte Protein wird zuerst mithilfe eines Enzyms wie etwa Trypsin verdaut, wodurch viele einzelne Peptidfragmente entstehen. Die Spezifität der Spaltung durch das Enzym liefert eine Mischung von Peptiden, die charakteristisch für das Protein ist, den sogenannten Fingerprint. Die Identifizierung der Peptidfragmente bestätigt die Identität des Proteins. Veränderungen im Profil des Peptidverdaus können dazu genutzt werden, posttranslationale Modifikationen des Ausgangsproteins, die im Herstellungs- oder Reinigungsprozess aufgetreten sein könnten, zu identifizieren.

Die Umkehrphasen-UHPLC/HPLC entweder mit MS- oder UV-Detektion ist die bevorzugte Technik zur Analyse eines Peptid-Verdaus. Die LC/MS-Analyse wird zur Identifizierung von Peptidfragmenten und zur Bestimmung der Sequenzabdeckung verwendet, während die LC/UV-Analyse meist für Peptid-Map-Vergleiche im Bereich Überwachung/Qualitätskontrolle eingesetzt wird.

Ein Peptid-Verdau ist eine komplexe Mischung und um diese vollständig zu trennen, d. h. um die einzelnen Peptide aufzulösen, sind hocheffiziente hoch auflösende Säulen erforderlich. AdvanceBio Peptide Mapping-Säulen sind so konzipiert, dass sie Peptid-Maps mit hoher Auflösung zur Proteinidentifizierung und zur Bestimmung posttranslationaler Modifikationen liefern. Mit diesen Säulen können Sie schnell Aminosäuresubstitutionen bzw. -modifikationen in einer Proteinprimärsequenz auflösen und identifizieren.



Tests zur Qualitätssicherung mit der Peptidmischung von Agilent

Säule: AdvanceBio Peptide Mapping

653750-902

2,1 x 150 mm, 2,7 µm

Flussrate: 0,5 ml/min

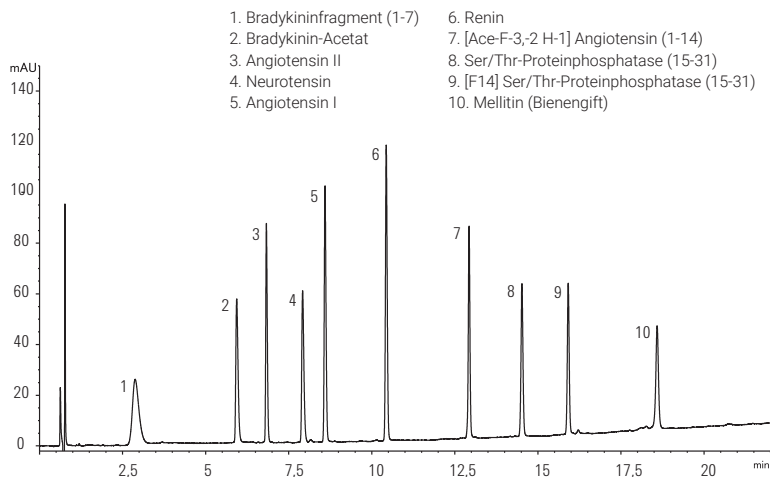
Injektion: 3 µl

Gradient: A, Wasser (0,1 % TFA), B, ACN (0,1 % TFA), 0-25 min, 15-65 % B; 25-26 min, 65-95 % B

Temperatur: 55 °C

Detektor: 220 nm

Probe: Peptid-Mapping Standard-Mischung
(0,5-1,0 µg/µl pro Peptid) Best.-Nr. 5190-0583



Testmischung, die für alle Chargen der AdvanceBio Peptide Mapping-Medien verwendet wird. Die Mischung enthält 10 Peptide mit entweder hydrophilem, hydrophobem oder basischem Charakter und Molekulargewichten von 757 bis 2845 Da. Die Säulen werden außerdem mit einer Probe kleiner Moleküle getestet, um ihre Effizienz zu überprüfen.

Tipps und Werkzeuge

Agilent InfinityLab Wellplates und Dichtungsmatten sind die optimalen Probenbehälter für LC/MS-Applikationen mit hohem Probendurchsatz.

Besuchen Sie: www.agilent.com/chem/well-plates

AdvanceBio-Säulen: für schnellere, konsistentere biopharmazeutische Analysen

AdvanceBio Peptide Mapping-Säulen gehören zur immer größer werdenden Produktfamilie der modernsten Biosäulen von Agilent. Sie bieten eine konsistent hervorragende Leistung bei der Trennung und Charakterisierung von Peptiden und Proteinen, Antikörpern, Konjugaten, neuen biologischen Komponenten und Biopharmazeutika. Die Forschung hinter AdvanceBio-Säulen hilft, die Genauigkeit und Produktivität als Grundlage für schnellere Analysen und mehr Effizienz im Labor zu verbessern.

Informationen zur Bestellung von Agilent Peptid-Mapping-Lösungen finden Sie auf **Seite 62**.



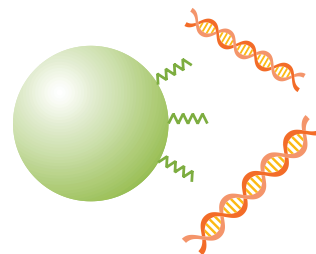
Tipps und Werkzeuge

Weitere Informationen über die Agilent Biosäulen finden Sie unter: www.agilent.com/chem/bioHPLC

Trennung von DNA- und RNA-Oligonukleotiden

Es besteht erneut großes Interesse an Oligonukleotiden (Oligos), da sie in immer mehr Applikationen sowie auch als potentielle Therapeutika relevant sind. Ihre Synthese ähnelt der weiter verbreiteten Peptidsynthese: Ein aktiviertes Festphasen-Syntheseharz wird zur sequenziellen Addition der jeweiligen Nukleotide verwendet, um die gewünschte Sequenz aufzubauen.

Die Nukleotideinheiten sind am 5'-Hydroxylterminus mit einer Dimethoxytrityl(DMT)-Gruppe geschützt und das Zieloligonukleotid enthält diese Schutzgruppe noch nach der Abspaltung. Da die DMT-Gruppe hydrophob ist, ist sie ein guter Ansatzpunkt für den ersten Schritt. Zur Steigerung der Stabilität des Oligonukleotids, insbesondere gegenüber Abbau durch Enzyme, kann es chemisch modifiziert werden, beispielsweise indem Sauerstoff durch Schwefel ersetzt wird und Phosphorthioate entstehen. Bei der chemischen Synthese von Biomolekülen ist die Ausbeute der Kopplungsreaktion in jedem weiteren Zyklus niemals 100 %. Die Probe enthält nach der Abspaltung vom Festphasen-Syntheseträger Fehlsequenzen, also Oligonukleotide, bei denen ein oder zwei Nukleotide fehlen, und einen gewissen Anteil an größeren Oligonukleotiden, die durch doppelte Kopplung oder Verzweigung entstanden sind. Die Probenmischung ist komplex und für ihre Analyse sind hocheffiziente Techniken erforderlich.



Bei der Trennung von Oligonukleotiden werden routinemäßig drei UHPLC-/HPLC-Techniken angewandt:

Trityl-on: Dieses Verfahren ist relativ einfach durchzuführen und trennt das Zieloligonukleotid in voller Länge, das noch mit der DMT-Gruppe verbunden ist, von den entschützten Fehlsequenzen. Die dadurch erhaltenen analytischen Informationen sind begrenzt. Daher wird dieses Verfahren als Aufreinigungsmethode betrachtet.

Ionenaustausch-Trennung der entschützten Trityl-off-Oligonukleotide: Bei dieser Methode wird die negative Ladung des Oligonukleotidgerüsts zur Trennung genutzt. Die Auflösung ist für die kürzeren Oligonukleotide gut, nimmt aber bei zunehmender Kettenlänge ab. Es werden wässrige Eluenten eingesetzt. Da Oligonukleotide aber stark geladen sind, sind hohe Salzkonzentrationen notwendig, um die Elution aus der Säule zu erzielen.

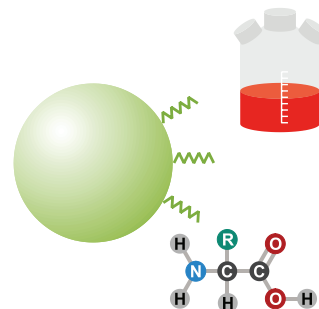
Ionenpaar-Reversed-Phase-Trennung der entschützten Trityl-Off-Oligonukleotide: Diese Technik verwendet organische Lösemittel und flüchtige Ionenpaarreagenzien und ist für die LC/MS-Analyse geeignet. Die Technik wird am besten mit hocheffizienten Partikeln durchgeführt. Es sind bestimmte Bedingungen erforderlich, bei denen die Oligonukleotide vollständig denaturieren und die eine Assoziation mit komplementären Sequenzen verhindern. Daher wird die Trennung am besten bei erhöhten Temperaturen durchgeführt.

Säulenauswahl für DNA- und RNA-Oligonukleotide

Applikation	Technik	Agilent Säulen	Hinweise
Trityl-on-/Trityl-off-Oligonukleotide	Trityl-on	PLRP-S 50 µm Medien	Trennung nach unterschiedlicher Hydrophobie. Ideal geeignet für die Trennung von Trityl-on-Oligonukleotiden von Trityl-off-Oligonukleotiden, wird auch für Ionenpaar-Reversed-Phase-Trennungen von entschützten Oligonukleotiden verwendet.
Entschützte Oligonukleotide	Ionenpaar-Reversed-Phase-Trennung der entschützten Trityl-off-Oligonukleotide	PLRP-S 3 µm bis 50 µm AdvanceBio Oligonucleotide-Säule	
Aggregations- und Fragmentanalyse	Ionenaustausch-Trennungen der entschützten Trityl-off-Oligonukleotide	PL-SAX 1000 Å	Trennung der entschützten Oligonukleotide unter denaturierenden Bedingungen bei hohen pH-Werten. Die quaternären Ammoniumgruppen auf den polymeren Partikeln ermöglichen Ionenaustausch-Trennungen bei hohen pH-Werten und verbessern so die Chromatographie für selbst-komplementäre Sequenzen.

Aminosäureanalytik

Die hocheffiziente AdvanceBio AAA-Säule trennt Aminosäuren nach einem aktualisierten und verbesserten Protokoll. Während der Produktion des Proteins wird das Zellkulturmedium überwacht, um sicherzustellen, dass die für die Expression des Produktproteins richtigen Nährstoffkonzentrationen eingehalten werden. Aminosäuren sind wichtige Bestandteile der zugeführten Lösungen und müssen daher während des Produktionsprozesses überwacht und nachgeregelt werden. Die Umkehrphasen-Chromatographie ist für die Aminosäureanalytik die beste Technik. Die Gesamtanalysendauer von einer Injektion bis zur nächsten beträgt 14 Minuten (9 Minuten reine Analysendauer) auf kürzeren Säulen mit 75 mm Länge und 24 Minuten (18 Minuten reine Analysendauer) auf Säulen mit 150 mm Länge. Die erforderliche Empfindlichkeit (5 bis 50 pmol mit einem Diodenarray- oder Fluoreszenzdetektor) und Zuverlässigkeit wird mit OPA- oder FMOC-Derivatisierungen in einem vollautomatisierten Verfahren mit einem beliebigen Agilent LC-System erzielt.



AdvanceBio Amino Acid Analysis

Säule: AdvanceBio Amino Acid Analysis
655950-802
4,6 x 100 mm, 2,7 µm

Mobile Phase: A = 10 mM Na₂HPO₄ und 10 mM Na₂B₄O₇, pH 8,2
B = Acetonitril:Methanol:Wasser (45:45:10, v:v:v)

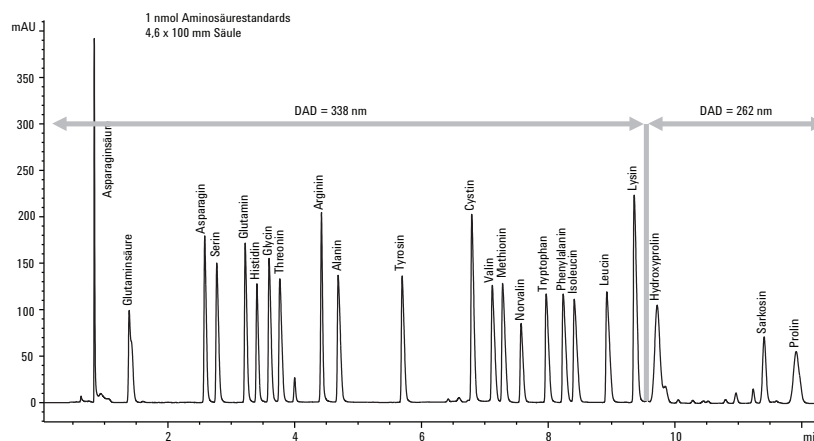
Flussrate: 1,5 ml/min

Injektion: 3 µl

Gradient:	Zeit	% B
	0	2
	0,35	2
	13,4	57
	13,5	100
	15,7	100
	15,8	2
	18	Stop

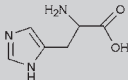
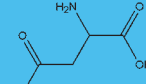
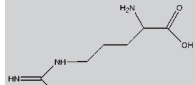
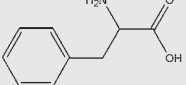
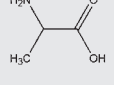
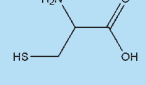
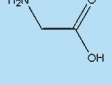
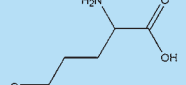
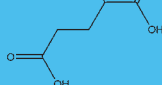
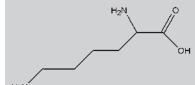
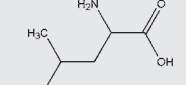
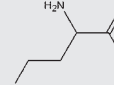
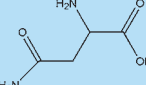
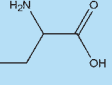
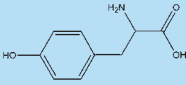
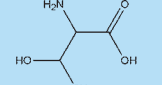
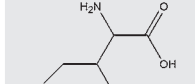
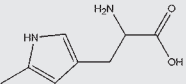
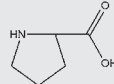
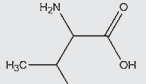
Säulen-temperatur: 40 °C

Detektor: UV, 338 und 262 nm



Trennung von Standards mit 1 nmol Aminosäure mit der AdvanceBio Amino Acid Analysis-Säule

Aminosäuren

H 155,16 137,14 C₆H₉N₃O₂  Histidin				D 133,10 115,09 C₄H₇NO₄  Asparaginsäure		
R 174,20 156,19 C₆H₁₄N₄O₂  Arginin	F 165,19 147,18 C₉H₁₁NO₂  Phenylalanin	A 89,09 71,08 C₃H₇NO₂  Alanin	C 121,16 103,14 C₃H₇NO₂S  Cystein	G 75,07 57,05 C₂H₅NO₂  Glycin	Q 146,15 128,13 C₅H₁₀N₂O₃  Glutamin	E 147,13 129,11 C₅H₉NO₄  Glutaminsäure
K 146,19 128,17 C₆H₁₄N₂O₂  Lysin	L 131,17 113,16 C₆H₁₃NO₂  Leucin	M 149,21 131,20 C₅H₁₁NO₂S  Methionin	N 132,12 114,10 C₄H₈N₂O₃  Asparagin	S 105,09 87,08 C₃H₇NO₃  Serin	J 181,19 163,17 C₉H₁₁NO₃  Tyrosin	T 119,12 101,10 C₄H₉NO₃  Threonin
I 131,18 113,16 C₆H₁₃NO₂  Ile	W 204,23 186,21 C₁₁H₁₂N₂O₂  Trp	P 115,13 97,12 C₅H₉NO₂  Pro	V 117,15 99,13 C₆H₁₁NO₂  Val			

■ Basisch

■ Unpolar (hydrophob)

■ Polar, ungeladen

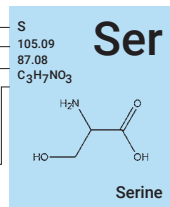
■ Sauer

Aminosäurecode mit 1 Buchstaben

Molekulargewicht

Molekulargewicht
(Aminosäure - H_2O)

Summenformel



Aminosäurecode mit 3 Buchstaben

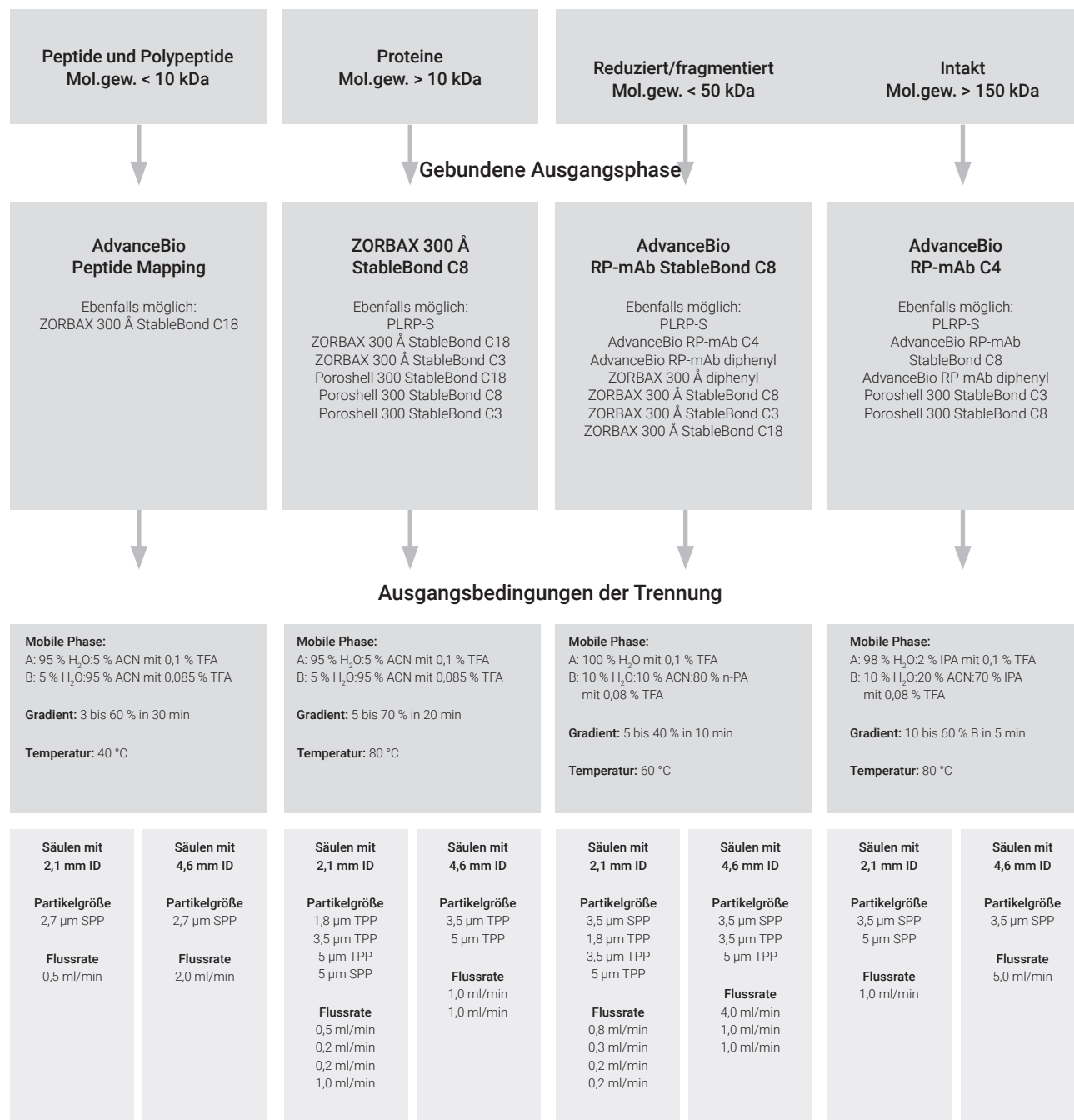
Chemische Struktur

Chemische Bezeichnung

Anleitungen für die Methodenentwicklung

Primärstruktur-Analysemethoden

Dieser Abschnitt über die Säulenauswahlstrategie für die Analyse der Primärstruktur enthält entscheidende Einzelheiten über die Methodenentwicklung für monoklonale Antikörper, Proteine und Peptide.



SPP = oberflächenporöse Partikel, TPP = vollständig poröse Partikel

Bei niedrigem pH-Wert mit einfachem wässrig/organischen Gradienten starten

In der Regel wird ein Wasser-Acetonitril-Gradient mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) verwendet, um alle relevanten Komponenten zu eluieren. Ein typischer Gradient für hohe Auflösung auf einer Säule mit Partikeln mit einer Porengröße von 300 Å benötigt 30 bis 50 min. Für eine AdvanceBio RP-mAb-Säule ist die Flussrate höher und die Analysendauer kürzer; sie liefert dennoch eine hervorragende Auflösung. Zur Verbesserung der Auflösung erhöhen Sie die Gradientendauer und verringern die Säulenlänge oder erhöhen die Flussrate. Bei LC/MS-Methoden kann die Verwendung von TFA die Empfindlichkeit des Detektors herabsetzen; sie wird häufig durch Ammoniumformiat/ Ameisensäure ersetzt.

Löslichkeit der Probe optimieren

Um bei einem beliebigen pH-Wert die beste Peakform und Wiederfindung zu erzielen, ist es wichtig, die Probe vollständig aufzulösen. Stark saure oder neutrale Lösemittel können für die Säulen AdvanceBio RP-mAb, ZORBAX 300 Å StableBond, Poroshell 300 StableBond und AdvanceBio Peptide Mapping verwendet werden, neutrale Lösemittel und verdünnte Basen für die Säulen ZORBAX 300Extend-C18 und Poroshell 300Extend-C18.

Lösemittelauswahl zur Auflösung der Proteine und Peptide

Wasser/Phosphat-Puffer

Verdünnte Säure (TFA, Essigsäure oder HCl)

Neutraler pH-Wert, 6-8 M Guanidin-HCl oder Isothiocyanat

Essigsäure (5 %)/6 M Harnstoff

Verdünnte Säure + wässrig/organisches Lösemittel (ACN, MeOH, THF)

Verdünnte Base (Ammoniumhydroxid)

DMSO oder 0,1 % -1 % in DMSO

Formamid

Schwach

Stark

Temperatur erhöhen

Trennungen von Proteinen und Peptiden werden durch die Temperatur beeinflusst und eine höhere Säulentemperatur kann sowohl die Auflösung als auch die Wiederfindung von Proteinen sowie von hydrophoben und aggregierenden Peptiden erheblich verbessern.

AdvanceBio RP-mAb: Bis zu 90 °C
ZORBAX 300 StableBond, Poroshell 300 StableBond: Bis zu 80 °C
AdvanceBio Peptide Mapping: Bis zu 60 °C

pH-Wert der mobilen Phase optimieren

Falls ein niedriger pH-Wert nicht zum Erfolg führt, verwenden Sie einen mittleren oder höheren pH-Wert.

Falls eine für einen niedrigen pH-Wert optimierte Methode keine ideale Trennung liefert, können auch mobile Phasen mit einem mittleren oder hohen pH-Wert verwendet werden. Die Selektivität unterscheidet sich bei hohen pH-Werten häufig stark, da saure Aminosäuren negativ geladen werden und einige basische Aminosäuren ihre Ladung verlieren können. ZORBAX 300Extend-C18 ist für Trennungen bei einem mittleren bis hohen pH-Wert eine exzellente Wahl.

Säule: **ZORBAX 300Extend-C18**
4,6 x 150 mm, 5 µm
773995-902

Mobile Phase: A: 20 mM NH₄OH in H₂O
B: 20 mM NH₄OH in 80 % ACN

Gradient: 5-60 % B in 30 min

Temperatur: 25-30 °C (< 60 °C)

Flussrate: 1 ml/min

Umkehrphasen-LC/MS-Methoden

LC/MS-Analysen von Proteinen und Peptiden werden dazu genutzt, Informationen für die Charakterisierung von Proteinen zu erhalten, posttranslationale Modifikationen von Proteinen genau zu identifizieren und das Molekulargewicht von synthetischen und natürlichen Peptiden zu bestimmen. Die LC/MS wird weiterhin dazu genutzt, Proteine in 2D-Trennungen für Proteomikapplikationen zu identifizieren. Daher ist die LC/MS von Proteinen und Peptiden eine entscheidende Trennmethode, für die es einige Spezialsäulen und Empfehlungen für die mobile Phase gibt. Für die LC/MS werden häufig kleinere Säulengrößen verwendet und in der Regel wird TFA wegen der Reduzierung der Empfindlichkeit im MS nicht als Additiv für die mobile Phase eingesetzt.

Analytische LC/MS-Applikationen

Säulen mit 2,1 mm ID bieten eine gute Empfindlichkeit, wenn die Probenmenge nicht begrenzt ist. Bei Poroshell-Säulen können kleinere Säulen mit 1 mm ID verwendet werden.



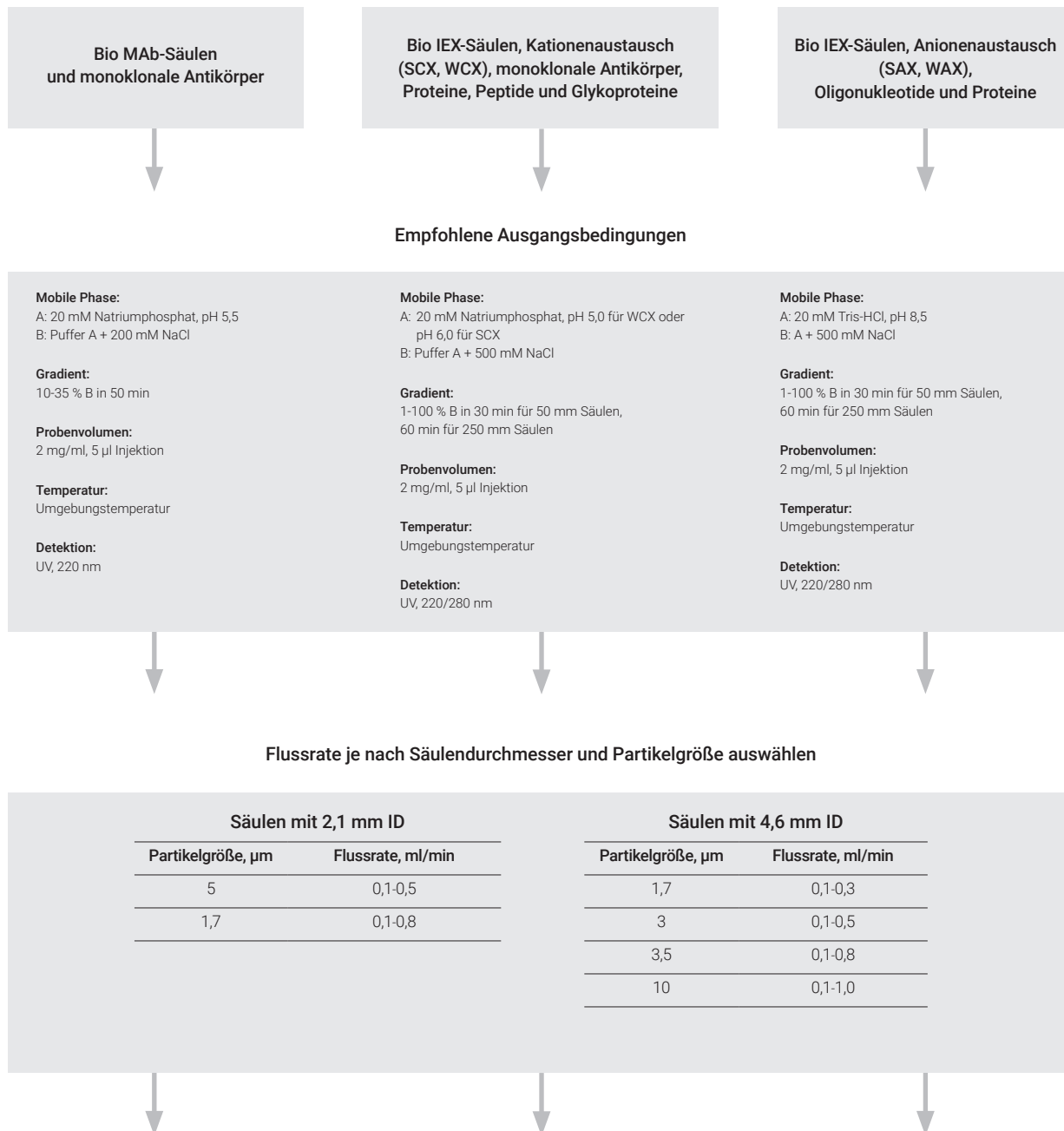
Applikationen mit hoher Empfindlichkeit/Proteomik-Applikationen

Kapillarsäulen werden für Protein- und Peptid-Applikationen verwendet, die eine hohe Empfindlichkeit erfordern. Die Säulen mit 0,5 mm ID werden für Trennungen von Proteinen und Proteinverdauen verwendet, während die Säulen mit 0,3 mm ID meist für Proteinverdau verwendet werden. Diese können bei hohem pH-Wert mit einer mobilen Phase mit Ammoniumhydroxid analysiert werden. Nanosäulen (0,1 und 0,075 mm ID) werden häufig in 2D-LC/MS-Systemen für die Proteomik eingesetzt und als Ausgangspunkt wird eine gebundene C18-Phase ausgewählt.



Methoden zur Analyse der Ladungsvarianten

Dieser Abschnitt über die Säulenauswahlstrategie für die Analyse der Ladungsvarianten enthält entscheidende Einzelheiten über die Methodenentwicklung für monoklonale Antikörper, Proteine und Peptide.



Bedingungen optimieren

Einige Trennungen erfordern unter Umständen besondere Puffer oder spezielle Werte für Ionenstärke, pH-Wert und Temperatur.

Ionenstärke

Es ist eine gewisse Ionenstärke zur Aufrechterhaltung der Funktion der Säule erforderlich. In der Regel wird eine minimale Konzentration von 10 bis 20 mM Salz benötigt.

Eine höhere Ionenstärke als 20 mM kann jedoch die Adsorption von Biomolekülen auf der Säule verhindern. Üblicherweise verwendete Salze sind Natrium- und Kaliumchlorid und -acetat. Typische Salzkonzentrationen für die Elution sind 400 bis 500 mM.

Hinweis: Verwenden Sie niemals nur Wasser zum Spülen der Säulen, da dies einen erheblichen Anstieg des Rückdrucks verursacht.

Puffer und pH-Wert auswählen

Puffer spielen bei der Optimierung von Trennungen eine wichtige Rolle. Für Antikörper und viele Biomoleküle werden in der Regel Phosphatpuffer verwendet. Es werden aber auch folgende Puffer empfohlen: MES-, TRIS- und ACES-Puffer. Verwenden Sie Puffer mit pH 5,0 bis 6,5. Der pH-Wert kann in der Regel auf +/- 0,2 Einheiten eingestellt werden.

Für einige spezielle Proteine sind unter Umständen Puffer mit einem höheren pH-Wert (> pH 6,5) erforderlich. Zur Einstellung des pH-Werts können Phosphorsäure, Essigsäure, HCl und NaOH verwendet werden.

Für die Elution können auch pH-Gradienten eingesetzt werden.

Puffer und pH-Wert auswählen

Für den Anionenaustausch werden Acetat- und Phosphatpuffer mit pH 8,0 bis 9,0 empfohlen. Der pH-Wert kann in der Regel auf +/- 0,2 Einheiten eingestellt werden. Für einige spezielle Proteine sind unter Umständen Puffer mit einem höheren oder niedrigeren pH-Wert erforderlich.

Zur Einstellung des pH-Werts können Phosphorsäure, Essigsäure, HCl und NaOH verwendet werden.

Für die Elution können auch pH-Gradienten eingesetzt werden.

Additive

Organische Lösemittel

Acetonitril, Ethanol, Methanol und andere ähnliche Lösemittel können bis zu einem Anteil von 50 % verwendet werden.

Detergenzien

Nicht ionische, anionische und zwitterionische Detergenzien können eingesetzt werden. Kationische Detergenzien werden nicht empfohlen.

Additive

Organische Lösemittel

Acetonitril, Ethanol, Methanol und andere ähnliche Lösemittel können bis zu einem Anteil von 50 % verwendet werden.

Detergenzien

Nicht ionische, kationische und zwitterionische Detergenzien können eingesetzt werden. Anionische Detergenzien werden nicht empfohlen.

Temperatur

Agilent Bio MAb- und IEX-Säulen sind bis 80 °C stabil. Aber viele Proteine und Biomoleküle sind nicht hitzebeständig. Prüfen Sie zunächst die Temperaturstabilität Ihrer Probe, bevor Sie routinemäßig höhere Temperaturen für die Trennung verwenden.

Methoden zur Analyse der Ladungsvarianten mit der Software Agilent Buffer Advisor

Agilent Buffer Advisor ist eine Software, die besser reproduzierbare und genauere Ionenaustausch-Methoden ermöglicht. Die Software kann beispielsweise Methoden mit quaternärer Mischung für einen Salzgradienten mit konstantem pH-Wert oder für einen pH-Gradienten mit Salzgradient zur Aufreinigung erstellen. Die Methoden können direkt in die Agilent LC-Datenerfassungssoftware importiert werden.

Empfohlene Ausgangsbedingungen

Salzgradient (siehe Application Note: 5991-0656DEE)		pH-Gradient (siehe Application Note: 5990-9629EN)	
Säulen:	Bio WCX, 4,6 x 250 mm, 10 µm Bio WCX, 4,6 x 250 mm, 5 µm	Säule:	Bio MAb, 4,6 x 250 mm, 5 µm
Mobile Phase:	A: Wasser B: 1,6 M NaCl C: 40,0 mM NaH ₂ PO ₄ D: 40,0 mM Na ₂ HPO ₄ Durch Mischen der vorberechneten Anteile von C und D werden Pufferlösungen von 20 mM im vorgesehenen pH-Bereich erstellt.	Mobile Phase:	A: Wasser B: 1,6 M NaCl C: 40,0 mM NaH ₂ PO ₄ D: 40,0 mM Na ₂ HPO ₄ Durch Mischen der vorberechneten Anteile von C und D werden Pufferlösungen im vorgesehenen pH-Bereich und mit ausgewählten Pufferstärken hergestellt.
Gradient:	0 bis 50 % B, 0 bis 20 min (konstanter pH, zum Beispiel pH 6,0) 50 % B, 20 bis 25 min 0 % B, 25 bis 35 min	Gradient:	pH 6,0 bis 8,0, 0 bis 20 min 0 bis 800 mM NaCl, 20 bis 25 min 800 mM NaCl, 25 bis 30 min
Temperatur:	Umgebungstemperatur	Temperatur:	Umgebungstemperatur
Injektionsvolumen:	10 µl	Injektionsvolumen:	10 µl
Detektion:	UV, 220 nm	Detektion:	UV, 220 nm
Gerät:	1260 Infinity bioinertes LC-System	Gerät:	1260 Infinity II bioinertes LC-System
Probe:	Ovalbumin, Ribonuklease A, Cytochrom C, Lysozym	Probe:	Monoklonaler IgG-Antikörper
Probenkonz.:	2 mg/ml (in 20 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 6,0)	Probenkonz.:	2 mg/ml (in 20 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 6,0)

Hinweis: Auf gleiche Weise können die oben beschriebenen Ansätze mit Veränderungen für Agilent WAX- und SCX-Säulen verwendet werden. Zugang zum Applikationskompendium zu kritischen Qualitätsmerkmalen finden Sie unter: www.agilent.com/chem/cqa-applications

Flussrate je nach Säulendurchmesser und Partikelgröße auswählen

Säulen mit 2,1 mm ID		Säulen mit 4,6 mm ID	
Partikelgröße, µm	Flussrate, ml/min	Partikelgröße, µm	Flussrate, ml/min
1,7	0,1-0,3	1,7	0,1-0,3
3	0,1-0,5	3	0,1-0,5
5	0,1-0,8	5	0,1-0,8
10	0,1-1,0	10	0,1-1,0

Hinweis: Beginnen Sie immer mit einer geringen Flussrate und steigern Sie diese bis zur empfohlenen Betriebsgrenze der Säule.

Methoden zur Aggregations- und Fragmentanalyse

Dieser Abschnitt über die Säulenauswahlstrategie für Aggregationsanalysen enthält entscheidende Informationen für die Methodenentwicklung für monoklonale Antikörper, Proteine und Peptide.

Anfängliche Säulenauswahl und Bedingungen für die größenabhängige Trennung von Biomolekülen, die Aggregationsanalyse sowie für Peptide, Polypeptide und Proteine

Peptide, Polypeptide, Proteine
Mol.gew. > 0,1-1250 kDa

Peptide, Polypeptide, Proteine
Mol.gew. > 0,1-10 000 kDa

Auswahl der Säule nach Molekulargewichtsbereich und Porengröße

AdvanceBio SEC (2,7 µm)

Porengröße	Mol.gew.-bereich, kDa
130 Å	0,1-120
300 Å	5-1250

Bio SEC-3 (3 µm)

Porengröße	Mol.gew.-bereich, kDa
100 Å	0,1-100
150 Å	0,5-150
300 Å	5-1250

Bio SEC-5 (5 µm)

Partikelgröße, µm	Flussrate, ml/min
100 Å	0,1-100
150 Å	0,5-150
300 Å	5-1250
500 Å	15-5000
1000 Å	50-7500
2000 Å	> 10 000

Empfohlene Ausgangsbedingungen der Trennung

Säulen: AdvanceBio SEC
Bio SEC (3 µm und 5 µm)

Mobile Phase: 150 mM Phosphatpuffer, pH 7,0*

Gradient: Isokratisch im Bereich von 15 bis 60 min

Temperatur: Empfohlen: 10 bis 30 °C, maximal 80 °C

* Andere wässrige Puffer mit hohem oder niedrigem Salzgehalt können ebenfalls verwendet werden

Flussrate: 0,1 bis 0,4 ml/min für Säulen mit 4,6 mm ID
0,1 bis 1,25 ml/min für Säulen mit 7,8 mm ID
1,0 bis 10,0 ml/min für Säulen mit 21,2 mm ID

Probenvolumen: ≤ 5 % des gesamten Säulenvolumens

Zusätzliche Informationen finden Sie unter:
Schnelle und zuverlässige Auftrennung aggregierter und abgebauter Proteine (Publikation 5991-2898DEE)
www.agilent.com/search

Nach dem ersten Chromatogramm sind möglicherweise Änderungen erforderlich, um die Trennung zu verbessern, die Löslichkeit der Proteine aufrechtzuerhalten oder Wechselwirkungen der Probe mit dem Chromatographiemedium zu verringern. Die Ionenstärke der mobilen Phase kann nach oben oder nach unten korrigiert werden, um eine optimale Trennung zu erhalten. Auch der pH-Wert kann in der Regel um +/- 0,2 Einheiten angepasst werden. Sind weitere Optimierungsschritte erforderlich, sollte der Bereich nach unten oder nach oben erweitert werden. Eine Änderung der Temperatur oder der Zusatz eines organischen Lösemittels ist ebenfalls möglich.

Typische Puffer für Protokolle, die höhere Salzkonzentrationen erfordern:

100 bis 150 mM Natriumchlorid in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0

100 bis 150 mM Natriumsulfat in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0

50 bis 100 mM Harnstoff in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0

Andere ähnliche Salze (z. B. KCl) und Guanidinhydrochlorid können ebenfalls verwendet werden.

pH-Bereich:

2,0 bis 8,5

Folgende organische Lösemittel können zugesetzt werden:

5 bis 10 % Ethanol (oder andere ähnliche Lösemittel) in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0

5 % DMSO in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0

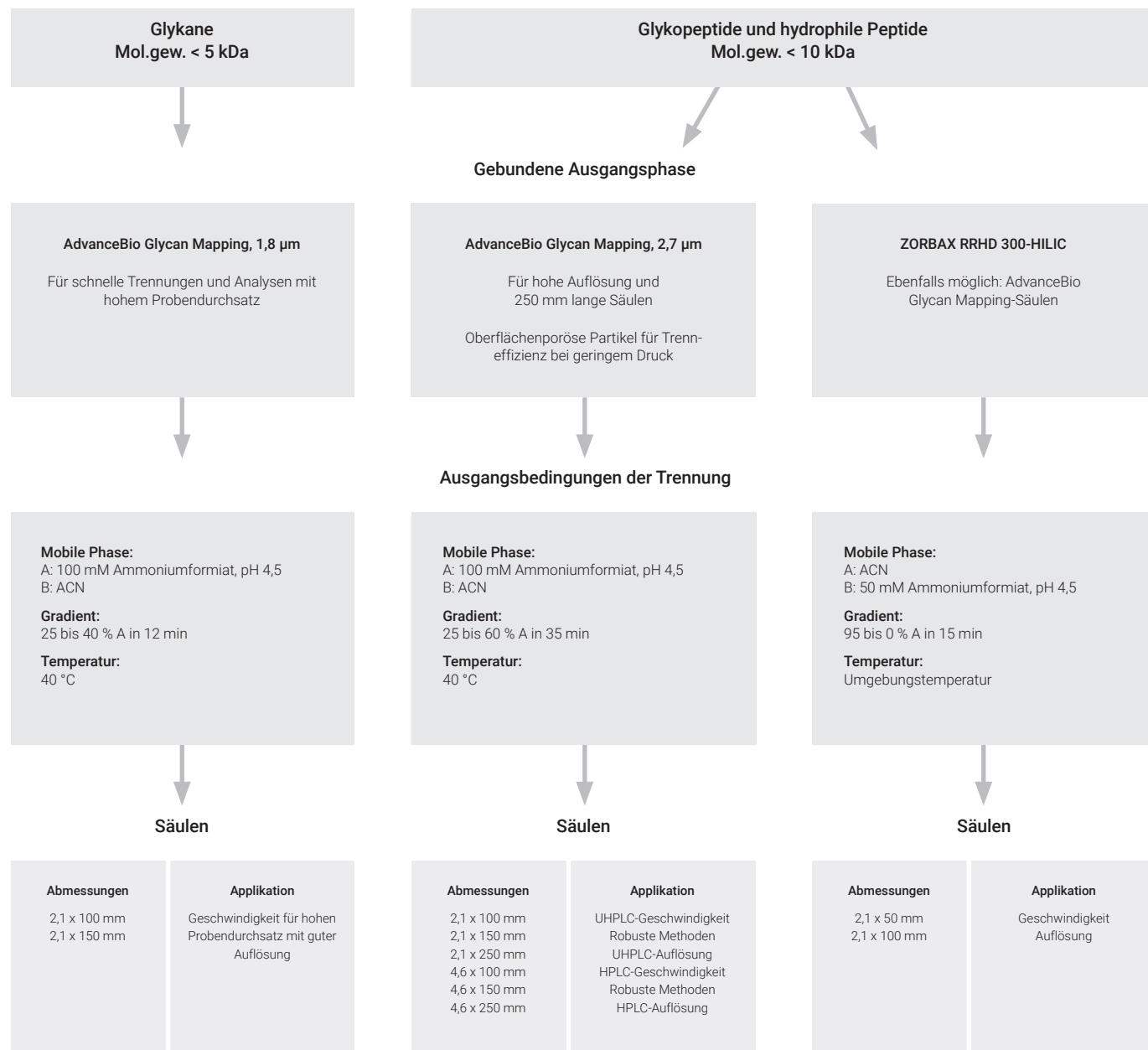
Es muss immer darauf geachtet werden, dass starke Druckänderungen, die aufgrund der hohen Viskosität einiger wässrig/organischer Lösemittelmischungen entstehen, vermieden werden. Reduzierte Flussraten oder erhöhte Temperaturen können dazu beitragen, die potentiellen Probleme zu entschärfen.

Temperatur:

In der Regel erfolgen SEC-Trennungen bei 20 bis 30 °C. Die Trennung von Proteinen und Peptiden kann höhere Temperaturen erfordern, um sowohl die Auflösung und als auch die Wiederfindung von Proteinen und hydrophoben Peptiden zu verbessern.

Die maximal zulässige Temperatur für Bio SEC-Säulen beträgt 80 °C.

Analyse von Glykanen, hydrophilen Peptiden und Glykopeptiden



Methoden zur Titerbestimmung und Optimierung von Zellkulturen

Agilent Bio-Monolith Protein A und empfohlene Bedingungen

Säulen:	Bio-Monolith Protein A (Best.-Nr. 5069-3639)			
Mobile Phase:	A: 50 mM Phosphat, pH 7,4			
	B: 100 mM Zitronensäure, pH 2,8, oder 500 mM Essigsäure, pH 2,6			
Gradient:	Zeit (min)	% A	% B	
	0 bis 0,5	100	0	Bindung
	0,6 bis 1,7	0	100	Elution
	1,8 bis 3,5	100	0	erneute Äquilibration
Temperatur:	Umgebungstemperatur			
Flussrate:	1 ml/min			
Injektionsvolumen:	Variabel (50 µl, optimiert für CHO-Zellkulturüberstand, der IgG1 enthält)			
Detektion:	UV, 280 nm			
Probe:	IgG1 (1 bis 20 mg/ml) und CHO-Zellkulturüberstand, der IgG1 (bis zu 20 mg/ml Gesamtprotein) enthält			
Hinweis: Es können zusätzlich Salze wie Natriumchlorid zur mobilen Phase zugegeben werden: bis zu 150 mM. Höhere Salzkonzentrationen sollten experimentell getestet werden.				

Tipps und Werkzeuge

Agilent ist sich der Tatsache bewusst, dass es viele verschiedene Faktoren gibt, die die Qualität der Trennungen von monoklonalen Antikörpern und Proteinen beeinflussen. Daher hat Agilent eine Reihe von „How to“-Anleitungen entwickelt, damit Sie beste Ergebnisse erhalten. Weitere Informationen finden Sie unter:

Schlüsselstrategien zur optimalen Charakterisierung von Peptiden: Ein praktischer Leitfaden für Peptid-Mapping (Publikation 5991-2348DEE)

Ion-exchange Chromatography for Biomolecule Analysis: A "How to" Guide (Publikation 5991-3775EN)

Agilent praktischer Leitfaden für Größenausschlusschromatographie für die Analyse von Biomolekülen (Publikation 5991-3651DEE)

Weitere Informationen zu den oben genannten und anderen Anleitungen, die Sie bei der Charakterisierung unterstützen, finden Sie unter:

www.agilent.com/chem/getbioguides

Methoden mit hochempfindlichen Kapillarsäulen

Überlegungen in Bezug auf die mobile Phase für Methoden mit Umkehrphasen

Bei LC/MS-Methoden, bei denen die mobile Phase direkt von der Säule in den massenselektiven Detektor geführt wird, darf die mobile Phase nur flüchtige Salze und Additive enthalten. Um die maximale Empfindlichkeit zu erzielen, darf keine Ionensuppression oder Adduktbildung auftreten.

Niedriger pH-Wert



TFA wird in der Regel nicht für LC/MS-Trennungen von Proteinen und Peptiden verwendet, da sie die Ionisation unterdrückt und die Nachweisgrenze erhöht. Der erste Schritt besteht meist darin, die TFA durch 0,1 bis 1 % Ameisensäure zu ersetzen. Alternativ kann bis zu 1 % Essigsäure in der mobilen Phase verwendet werden. Bei einem niedrigen pH-Wert erzielt man die beste Trennung unter Umständen dennoch mit TFA in der mobilen Phase, allerdings bei herabgesetzter Empfindlichkeit. In einigen Fällen kann die Trifluoressigsäure nach der Säule durch eine andere Säure, beispielsweise Propionsäure, mit einer einfachen Online-Entscheidung (Gegenionenaustausch) ersetzt werden.

Mittlerer oder hoher pH-Wert



Hohe pH-Werte werden weniger häufig für die Proteincharakterisierung verwendet, aber die LC/MS-Analyse kann auch bei einem hohen pH-Wert mit 10 bis 20 mM NH_4OH als Zusatz zur mobilen Phase durchgeführt werden.

Agilent Geräte zur Proteinidentifizierung und Charakterisierung von Verunreinigungen

1260 Infinity II bioinertes LC-System

Wirklich bioinert für effiziente Analysen von Biomolekülen

Das einzige UHPLC-System mit metallfreiem Probenflussweg. Weitere Vorteile:

100 % bioinert

- Kein Edelstahl: für höchste Probenintegrität
- pH 1 bis pH 13 (kurzzeitig pH 14) für höchste Betriebsbereitschaft des Geräts
- Geeignet für 2 M Salzlösungen und 8 M Harnstofflösung
- Bedienerfreundliche Kapillartechnologie

UHPLC-fähig

- 600 bar

Robust und bedienerfreundlich

- Geringe Oberflächenaktivität, Korrosionsfestigkeit, aktive Kolbenhinterspülung und Mischung quaternärer Puffer

Optimal geeignet für die Proteinidentifizierung

Beste Ergebnisse in Verbindung mit AdvanceBio Peptide Mapping-, Bio MAb- und AdvanceBio SEC-Säulen.



1260 Infinity II bioinertes
LC-System

1290 Infinity II LC mit Hochgeschwindigkeitspumpe

Ausgezeichnete Leistung für Ergebnisse von höchster Zuverlässigkeit

Das führende Instrument hinsichtlich Auflösung pro Zeit, Dispersion, Empfindlichkeit, Genauigkeit und Präzision bei LC/UV- und LC/MS-Applikationen. Vereint innovative Funktionen wie aktive Dämpfung, Mikrofluidmischung sowie Optofluidic-Wellenleiter-Detektion und erreicht damit:

- UHPLC-Leistungsbereich von bis zu 1300 bar und 5 ml/min
- Schnellster und einfachster Methodentransfer mit ISET, der einzigartigen Intelligent System Emulation Technology von Agilent
- Produktivität der UHPLC auf dem Betriebskostenniveau der HPLC

Geeignet zur Charakterisierung von Verunreinigungen, Peptid-Mapping und ultraschnelle Gradienten

Beste Ergebnisse in Verbindung mit ZORBAX RRHD 300 Å, 1,8 µm Säulen.



1290 Infinity II LC mit Hochgeschwindigkeitspumpe

Optimale Leistung und Effizienz mit LC-Zubehör von Agilent

Agilent InfinityLab Zubehör funktioniert nahtlos mit Geräten der Serie InfinityLab LC, um höchste Leistung, Betriebseffizienz und Laborsicherheit zu erreichen. Für mehr Zuverlässigkeit Ihrer Analysen verfolgen intelligente Sensoren den Gebrauch der Verschleißteile nach.

Besuchen Sie www.agilent.com/chem/infinitylab oder entdecken Sie den Katalog für InfinityLab LC-Zubehör unter www.agilent.com/chem/catalog

1260 Infinity II LC mit binärer Pumpe

Verbesserung des Standards in der analytischen HPLC mit 600 bar

100 % HPLC-Kompatibilität und UHPLC-Fähigkeit

- UHPLC-Leistung zu den Betriebskosten der HPLC
- Unterstützt LC- und LC/MS-Applikationen mit allen analytischen Narrow-Bore- und Standard-Säulen (Innendurchmesser 2,1 bis 4,6 mm)
- Hervorragende Gradientengenauigkeit durch Hochdruckmischung

Geeignet für alle Standard-UHPLC-Applikationen



1260 Infinity II LC mit binärer Pumpe

1260 Infinity II Prime LC

Höchste Zuverlässigkeit und Genauigkeit in der Routineanalytik

Höchste quaternäre UHPLC-Leistung vereinfacht nahtlosen Methodentransfer und automatisierte Puffermischung

- UHPLC-Leistungsbereich von bis zu 800 bar und 5 ml/min
- BlendAssist, das einfachste Tool zum genauen Mischen von Puffern und Additiven
- Produktivität der UHPLC auf dem Betriebskostenniveau der HPLC

Für die Methodenentwicklung oder Walk-Up-Systeme mit genauer Puffermischfunktion



1260 Infinity II Prime LC

Tipps und Werkzeuge

Für weitere Einzelheiten zu diesen modernen Systemen besuchen Sie unsere Website unter:
www.agilent.com/chem/BioHPLC

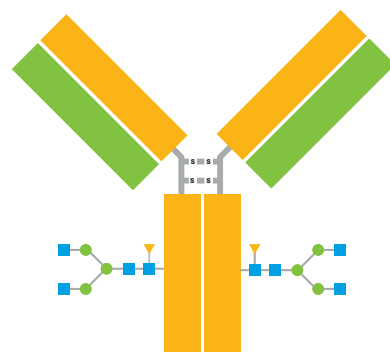
Primärstrukturanalyse

Genau Bestimmung der Aminosäuresequenz und posttranslationaler Modifikationen und Analyse der Verunreinigungen von Peptiden und Oligonukleotiden

Für die vollständige Charakterisierung eines Proteins, wie beispielsweise eines monoklonalen Antikörpers, müssen die primäre Aminosäuresequenz und alle posttranslationalen Modifikationen der Sequenz betrachtet werden, die während der Aufreinigungs- und Formulierungsschritte in der Herstellung aufgetreten sein könnten. Für diese Art der Analyse sind denaturierende Bedingungen erforderlich, die Umkehrphasen-Chromatographie ist also die richtige Wahl.

Agilent bietet die umfassendste Auswahl an weitporigen Reversed Phase BioHPLC-Säulen mit Porengrößen von 300 Å, 450 Å und größer, mit weltweiter Unterstützung durch hochqualifizierte technische Kundenbetreuer und Applikationschemiker. Die Produktfamilie schließt Säulen mit 1,8, 3,5 und 5 µm Partikeln, die für Drücke von 400 bis 1200 bar geeignet sind, Säulen mit drei unterschiedlichen oberflächenporösen Partikeln für die UHPLC-Trennung bei niedrigeren Drücken und Polymer-Säulen für Analysen unter unterschiedlichsten Bedingungen, wie mobile Phasen mit Ameisensäure für MS-Analysen, ein.

Für die Analyse von Verunreinigungen von Peptiden oder Oligonukleotiden bietet Agilent sowohl Silica- als auch Polymer-Säulen mit hoher pH-Toleranz an. Polymer-Säulen haben den zusätzlichen Vorteil, dass sie von Trennungen im analytischen Maßstab auf den präparativen Maßstab skalierbar sind.



- **AdvanceBio RP-mAb-Säulen** sind die einzigen Umkehrphasensäulen, die speziell für die Charakterisierung monoklonaler Antikörper entwickelt wurden. Die Poroshell-Technologie mit einer Porengröße von 450 Å und der richtigen Selektivität der gebundenen Phase ermöglicht eine schnelle, hoch aufgelöste Charakterisierung von intakten monoklonalen Antikörpern und mAb-Fragmenten.
- **PLRP-S-Säulen** enthalten makroporöse Polymerpartikel, die HPLC-Trennungen in einem sehr weiten pH-Bereich erlauben. Mit acht Partikelgrößen und drei weiten Porengrößen bieten die PLRP-S-Säulen optimale Lösungen für die analytisch-präparative Trennung von Peptiden, Proteinen und Proteinkomplexen.
- **ZORBAX RRHD 300 Å 1,8 µm Säulen** bieten UHPLC-Leistung für die Umkehrphasen-Trennung von intakten Proteinen, Proteinfragmenten und Proteinverdauen mit einer Stabilität bis 1200 bar.
- **ZORBAX 300 Å 3,5- und 5-µm-Säulen** enthalten voll poröse Materialien für die HPLC- und präparative Trennung; viele der gebundenen Phasen bieten Skalierbarkeit ausgehend von 1,8 µm Partikeln.
- **Poroshell 300-Säulen** sind die ersten Säulen der Branche mit kleinen, oberflächenporösen Partikeln zur schnellen Trennung von Polypeptiden und Proteinen.
- **AdvanceBio Peptide Mapping-Säulen** bieten eine schnelle Auflösung zur Identifizierung von Aminosäureveränderungen in der Primärstruktur. Mit ihren 2,7-µm-Partikeln und der C18-Funktion bieten AdvanceBio Peptide Mapping-Säulen hervorragende Retention, Auflösung und Peakform bei der Trennung basischer hydrophober Peptide.
- **Agilent AdvanceBio Oligonucleotide-Säulen** enthalten hocheffiziente, oberflächenporöse 2,7-µm-Partikel für Analysen mit hoher Auflösung von Oligonukleotiden und deren Verunreinigungen. Durch die Anwendung einer einzigartigen Technologie sind die Partikel chemisch modifiziert. Dies macht sie resistent gegenüber mobilen Phasen mit hohen pH-Werten, die für die Trennung von Oligonukleotiden erforderlich sind.



Auswahl von Umkehrphasensäulen

Applikation	Agilent Säulen	Hinweise
Monoklonale Antikörper und mAb-Fragmente	AdvanceBio RP-mAb	Auf der Grundlage der Poroshell-Technologie verfügen die Säulen über oberflächenporöse Partikel, die die Diffusionswege verkürzen und die Verwendung höherer Flussraten sowie steilerer Gradienten ermöglichen. Dies reduziert die Analysendauer, auch bei Systemen mit 600 bar. Durch die Porengröße von 450 Å bietet die gebundene Phase vollen Zugang für große Moleküle. Dies ermöglicht die bestmögliche chromatographische Trennung. Robuste gebundene Phasen, die eigens für die Trennung von monoklonalen Antikörpern entwickelt wurden, bieten eine Reihe verschiedener Selektivitäten, die die Optimierung der Auflösung erlauben.
	C4 SB-C8 Diphenyl	
	PLRP-S 1000 Å	Das makroporöse Polymer PLRP-S liefert exzellente mAb-Trennungen, insbesondere mit mobilen Phasen mit Ameisensäure für die MS-Detektion.
Intakte Proteine, monoklonale Antikörper, mAb-Fragmente und Polypeptide	ZORBAX 300 Å, 1,8 µm	Optimierte Packungsverfahren für Stabilität bis 1200 bar für den Einsatz zusammen mit 1290 Infinity II LC. RRHD 1,8 µm Säulen sind in den Längen 50 und 100 mm erhältlich und ermöglichen schnelle oder hochauflösende Trennungen komplexester Proben. StableBond C18 ist ideal für Trennungen von komplexen Proteinen und Proteinverdauen.
	RRHD 300SB-C18 RRHD 300SB-C8 RRHD 300SB-C3 RRHD 300-Diphenyl	
	ZORBAX 300 Å, 3,5 und 5 µm	Ideal zur Verwendung mit HPLC-Systemen. StableBond C3 und CN sind für größere, hydrophobere Verbindungen geeignet.
	300SB-C18 300SB-C8 300SB-C3 300SB-CN	
	PLRP-S	Das polymere PLRP-S bietet eine zu den Silica-Säulen alternative Selektivität sowie exzellente Peakformen mit mobilen Phasen mit Ameisensäure.
	100 Å 300 Å 1000 Å 4000 Å	
	Poroshell 300	5-µm-Poroshell-Partikel mit 300-Å-Poren ermöglichen schnelle HPLC-Trennungen intakter Proteine.
	300SB-C18 300SB-C8 300SB-C3 300Extend-C18	
Proteine in Proteinverdauen	AdvanceBio Peptide Mapping	Durch die ideale Porengröße von 120 Å zur Identifizierung von Peptiden in einem weiten Molekulargewichtsbereich geeignet. Durch Tests mit einem komplexen Peptid-Gemisch nachgewiesene Leistungsfähigkeit. Die einzigartige Agilent Poroshell-Technologie ermöglicht kürzere Analysendauern und eine bessere Auflösung der vollständigen Peptidsequenz.
Analyse der Verunreinigungen synthetischer Peptide	PLRP-S 100 Å, 300 Å	Skalierbar von analytischen auf präparative Trennungen. Hervorragende pH-Stabilität ermöglicht die Verwendung bei extremen pH-Werten, auch zur Desinfektion.
Oligonukleotidanalyse	PLRP-S 100 Å, 300 Å, 1000 Å, 4000 Å PL-SAX 1000 Å, 4000 Å	Unterschiedliche Porengrößen für verschieden lange Oligonukleotide. Hohe Temperaturbeständigkeit. Skalierbar von analytischen auf präparative Trennungen. Weitere Informationen über PL-SAX finden Sie auf Seite 95 .
	AdvanceBio Oligonucleotide-Säule	Ideal für Trennungen im analytischen Maßstab mit hoher Auflösung.

AB

AB

AB

AB

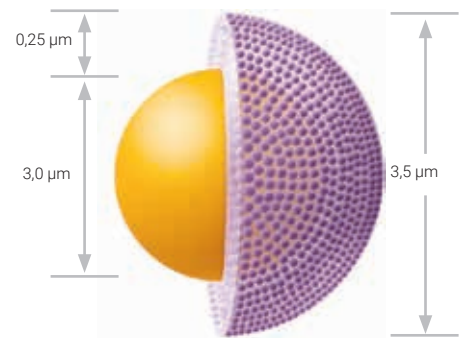
AB

AB

Teil der AdvanceBio-Produktfamilie

AdvanceBio RP-mAb

- **Verbesserte Genauigkeit:** Oberflächenporöse Partikel (3,5 µm) mit weiten Poren (450 Å) erhöhen die Auflösung für mAb, während die Kompatibilität mit allen LC-Geräten bestehen bleibt.
- **Geschwindigkeit:** kürzere Analysendauer als bei Säulen, die mit vollständig porösen Partikeln gepackt sind.
- **Flexible Methodenentwicklung:** verschiedene Phasentypen – SB-C8, C4 und Diphenyl.
- **Geringere Kosten:** Robustes gepacktes Poroshell-Säulenbett und die 2 µm Einlassfritte verlängern die Lebensdauer der Säule, indem Verstopfungen am Einlass verhindert werden.



Für die einzigartigen Herausforderungen der Charakterisierung monoklonaler Antikörper entwickelte Umkehrphasensäulen

Die Analyse von intakten und reduzierten monoklonalen Antikörpern ist ein entscheidendes Kriterium für die Charakterisierung therapeutischer Proteine und das Verständnis ihrer Wirksamkeit und Stabilität. Schlechte chromatographische Trennungen können zu Wiederholungsanalysen führen und sogar die Genauigkeit der Charakterisierung beeinträchtigen.

Lange Analysendauern beeinflussen den Durchsatz eines Labors negativ und führen zu Verzögerungen bei Entscheidungen, die auf den Charakterisierungsergebnissen beruhen. Um diese Probleme zu vermeiden, hat Agilent eine neue Umkehrphasensäule zur Optimierung der Leistung bei der Analyse intakter und reduzierter monoklonaler Antikörper entwickelt. Die AdvanceBio RP-mAb-Säule beruht auf der Poroshell-Technologie mit einem einzigartigen Design für Porengröße und gebundene Phase.

Tipps und Werkzeuge

Weitere Informationen über die Charakterisierung der Primärstruktur monoklonaler Antikörper finden Sie in: *Better Characterization of Biomolecules using Agilent AdvanceBio Reversed-Phase Columns* (Publikation **5991-2032EN**)

www.agilent.com/search



Große Biomoleküle wie monoklonale Antikörper werden in der Regel langsam getrennt, um die bei diesen langsam diffundierenden Analyten mögliche Peakverbreiterung zu reduzieren. Bei AdvanceBio RP-mAb-Säulen, für die die Poroshell-Technologie verwendet wurde, liegen oberflächenporöse Partikel vor, die aus einer 0,25 µm dicken Schicht aus porösem Silica um einen 3,0 µm großen Kern aus festem Silica bestehen. Diese Morphologie verringert den Diffusionsweg und die Verwendung höherer Flussraten sowie steilerer Gradienten wird ermöglicht, auch bei Systemen mit 600 bar. Der weite Durchmesser der Poren von 450 Å in der dünnen Schicht ermöglicht den großen Antikörpermolekülen vollen Zugang zur gebundenen Phase und sorgt damit für eine optimale chromatographische Trennung. Eine Auswahl robuster gebundener Phasen, die eigens für die Trennung von monoklonalen Antikörpern entwickelt wurden, d. h. C4, SB-C8 sowie eine spezielle Diphenyl-Phase, bietet eine Reihe verschiedener Selektivitäten, die die Optimierung der Auflösung erlauben.

AdvanceBio RP-mAb-Säulen bieten eine höhere Auflösung sowie kürzere Analysendauer für schnelle, genaue und reproduzierbare Ergebnisse bei der Analyse monoklonaler Antikörper zur Erforschung und Entwicklung von Biopharmazeutika und in QA/QC-Applikationen.

Säulenspezifikationen

Gebundene Phase	Porengröße	Temperaturgrenzen*	pH-Bereich*	mit Endcapping
AdvanceBio RP-mAb C4	450 Å	90 °C	1,0-8,0	Ja
AdvanceBio RP-mAb SB-C8	450 Å	90 °C	1,0-8,0	Nein
AdvanceBio RP-mAb Diphenyl	450 Å	90 °C	1,0-8,0	Ja

Die Angaben beziehen sich nur auf typische Werte.

* Die Säulen sind für eine optimale Verwendung bei niedrigen pH-Werten konzipiert. Bei pH 6-8 sind sämtliche Säulen auf Silica-Basis bei Betriebstemperaturen < 40 °C und niedrigen Pufferkonzentrationen im Bereich von 0,01-0,02 M am stabilsten.

Schnelle, hochaufgelöste Trennung einer Trastuzumab-IgG1-Variante

Säule: AdvanceBio RP-mAb C4
795775-904
2,1 x 100 mm, 3,5 µm

Temperatur: 80 °C

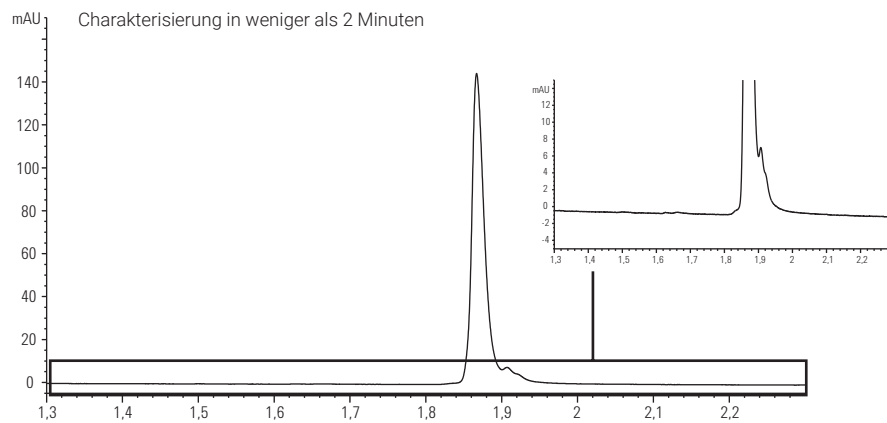
Detektor: UV, 254 nm

Mobile Phase: A: 0,1 % TFA in Wasser:IPA (98:2)
B: IPA:ACN:mobile Phase A (70:20:10)

Probe: 5 µl Injektion der intakten humanisierten rekombinanten
Trastuzumab-IgG1-Variante von
Creative Biolabs (1 mg/ml)

Flussrate: 1,0 ml/min

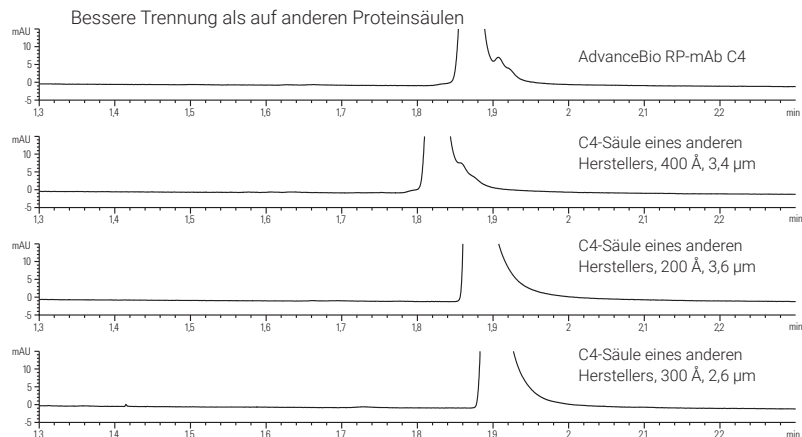
Gradient: 10-58 % B in 4 min, Spülung 1 min bei 95 % B,
erneute Äquilibration 1 min bei 10 % B



AdvanceBio RP-mAb C4 liefert einen scharfen Peak und löst feine Einzelheiten in weniger als 2 Minuten auf.

Trennung des intakten humanisierten rekombinanten Trastuzumab-IgG1

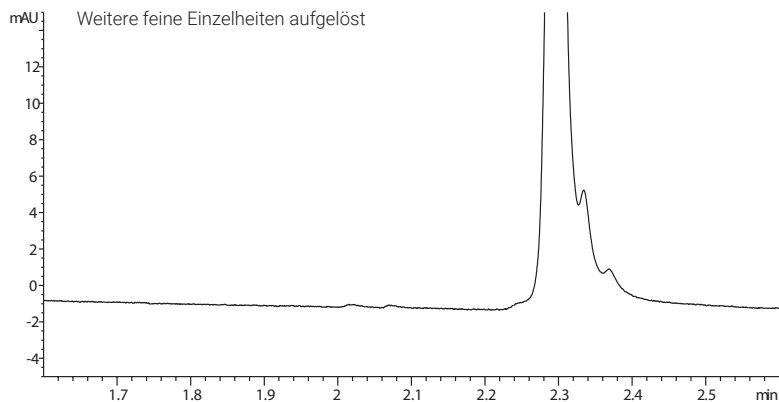
Säule:	AdvanceBio RP-mAb C4 795775-904 2,1 x 100 mm, 3,5 µm
Mobile Phase:	A: 0,1 % TFA in Wasser:IPA (98:2) B: IPA:ACN:mobile Phase A (70:20:10)
Flussrate:	1,0 ml/min
Gradient:	10-58 % B in 4 min, Spülung 1 min bei 95 % B, erneute Äquilibration 1 min bei 10 % B
Temperatur:	80 °C
Detektor:	UV, 254 nm
Probe:	5 µl Injektion der intakten humanisierten rekombinanten Trastuzumab-IgG1-Variante von Creative Biolabs (1 mg/ml)



Die AdvanceBio RP-mAb-Säulen sind speziell für mAb-Trennungen entwickelt und liefern eine bessere Peakform und Auflösung im Vergleich zu anderen Säulen, die bei Trennungen von intakten Proteinen zum Einsatz kommen.

Selektive Diphenyl-Phase

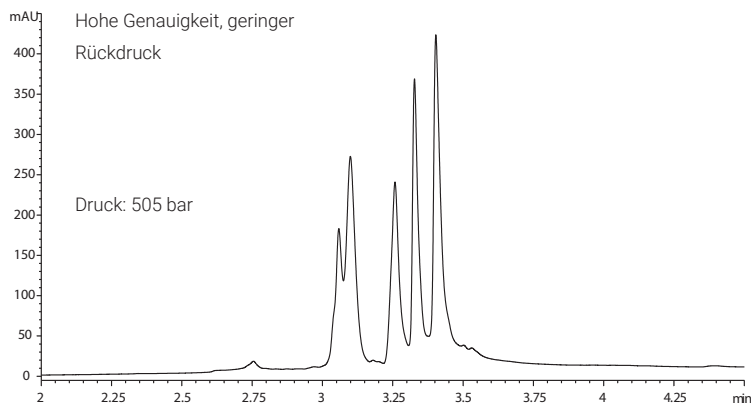
Säule:	AdvanceBio RP-mAb Diphenyl 795775-944 2,1 x 100 mm, 3,5 µm
Mobile Phase:	A: 0,1 % TFA in Wasser: IPA (98:2) B: IPA:ACN:mobile Phase A (70:20:10)
Flussrate:	1,0 ml/min
Gradient:	10-58 % B in 4 min, Spülung 1 min bei 95 % B, erneute Äquilibration 1 min bei 10 % B
Temperatur:	80 °C
Detektor:	UV, 254 nm
Probe:	5 µl Injektion der intakten humanisierten rekombinanten Trastuzumab-IgG1-Variante von Creative Biolabs (1 mg/ml)



Die einzigartige Selektivität der AdvanceBio RP-mAb Diphenyl-Säule ermöglicht eine noch feinere Auflösung.

Der Vorteil von Poroshell

Säule:	AdvanceBio RP-mAb SB-C8 785775-906 2,1 x 100 mm, 3,5 µm
Mobile Phase:	A: 0,1 % TFA in Wasser B: n-Propanol:ACN:mobile Phase A (80:10:10)
Flussrate:	0,8 ml/min
Gradient:	5-40 % B in 5 min, Spülung 1 min bei 95 % B, erneute Äquilibrierung 1 min bei 10 % B
Temperatur:	60 °C
Detektor:	UV, 220 nm
Probe:	1 µl Injektion von Fc/Fab, Papain-verdaute humanisierte rekombinante Trastuzumab-IgG1 Variante von Creative Biolabs (2 mg/ml)



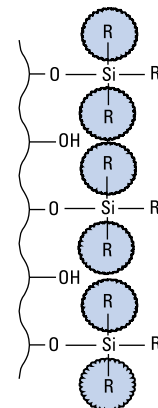
Die Poroshell-Technologie der AdvanceBio RP-mAb-Säulen mit weitporigem Material bietet hohe Effizienz, eine kurze Analysendauer und geringen Druck bei Temperaturen unter 80 °C – die typische Temperatur von vielen Umkehrphasen-Methoden.

AdvanceBio RP-mAb

Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	AdvanceBio RP-mAb C4 USP L26	AdvanceBio RP-mAb SB-C8 USP L7	AdvanceBio RP-mAb Diphenyl USP L11
4,6 x 150	3,5	793975-904	783975-906	793975-944
4,6 x 100	3,5	795975-904	785975-906	795975-944
4,6 x 50	3,5	799975-904	799975-906	799975-944
2,1 x 150	3,5	793775-904	783775-906	793775-944
2,1 x 100	3,5	795775-904	785775-906	795775-944
2,1 x 75	3,5	797775-904	787775-906	797775-944
2,1 x 50	3,5	799775-904	789775-906	799775-944

ZORBAX 300 Å StableBond

Agilent ZORBAX 300 Å StableBond-Säulen sind aus zwei wichtigen Gründen die ideale Wahl für reproduzierbare Trennungen von Proteinen und Peptiden. Erstens sind weitporige Säulen mit 300 Å für eine effiziente Trennung von Proteinen und Peptiden oder anderer großer Moleküle erforderlich, damit diese Analyten einen vollständigen Zugang zur gebundenen Phase erhalten. Zweitens ist die Stabilität der 300StableBond-Säulen bei niedrigen pH-Werten wie bei mobilen Phasen, die TFA enthalten und typischerweise für die Trennung von Proteinen und Peptiden verwendet werden, außerordentlich hoch. 300StableBond-Säulen können darüber hinaus für LC/MS-Trennungen bei niedrigen pH-Werten mit Ameisensäure oder Essigsäure als Modifier der mobilen Phase eingesetzt werden. Diese Säulen sind mit fünf verschiedenen gebundenen Phasen (C18, C8, C3, CN und Diphenyl(DP)) zur Optimierung der Selektivität und Wiederfindung von Proteinen und Polypeptiden erhältlich. Zur weiteren Steigerung der Probenwiederfindung und zur Verbesserung der Trennleistung für schwierige Proteine können 300StableBond-Säulen bei bis zu 80 °C verwendet werden. StableBond 300SB-C18- und 300SB-C8-Säulen sind die ideale Wahl für die Trennung komplexer Proteine und Proteinverdau. Diese Phasen sind für Umkehrphasen-LC/MS-Trennungen von Proteinverdauen auch als Kapillarsäulen (0,3 und 0,5 mm ID) und als Nanosäulen (0,075 und 0,10 mm ID) erhältlich. Kapillar- und Nanosäulen können für 1D- oder 2D-Proteomiktrennungen eingesetzt werden.



Sterisch geschützte gebundene Phase von 300StableBond

Spezifikationen der UHPLC-Säulen

Gebundene Phase	Porengröße	Temp.- grenzen*	pH-Bereich*	mit Endcapping
ZORBAX RRHD 300SB-C18	300 Å	90 °C	1,0-8,0	Nein
ZORBAX RRHD 300SB-C8	300 Å	80 °C	1,0-8,0	Nein
ZORBAX RRHD 300SB-C3	300 Å	80 °C	1,0-8,0	Nein
ZORBAX RRHD 300-Diphenyl	300 Å	80 °C	1,0-8,0	Ja
ZORBAX 300SB-C18	300 Å	80 °C	1,0-8,0	Nein
ZORBAX 300SB-C8	300 Å	80 °C	1,0-8,0	Nein
ZORBAX 300SB-C3	300 Å	80 °C	1,0-8,0	Nein
ZORBAX 300SB-CN	300 Å	80 °C	1,0-8,0	Nein

Die Angaben beziehen sich nur auf typische Werte.

* 300StableBond-Säulen sind für eine optimale Verwendung bei niedrigen pH-Werten konzipiert. Bei pH 6-8 sind sämtliche Säulen auf Silica-Basis bei Betriebstemperaturen < 40 °C und niedrigen Pufferkonzentrationen im Bereich von 0,01-0,02 M am stabilsten.

Bei mittleren oder hohen pH-Werten wird 300Extend-C18 empfohlen.

Bessere Auflösung intakter monoklonaler Antikörper

Säule: ZORBAX RRHD 300SB-C8
857750-906
2,1 x 50 mm, 1,8 µm

Mobile Phase: A: H₂O:IPA (98:2) + 0,1 % TFA (v/v)
B: IPA:ACN:H₂O (70:20:10) + 0,1 % TFA (v/v)

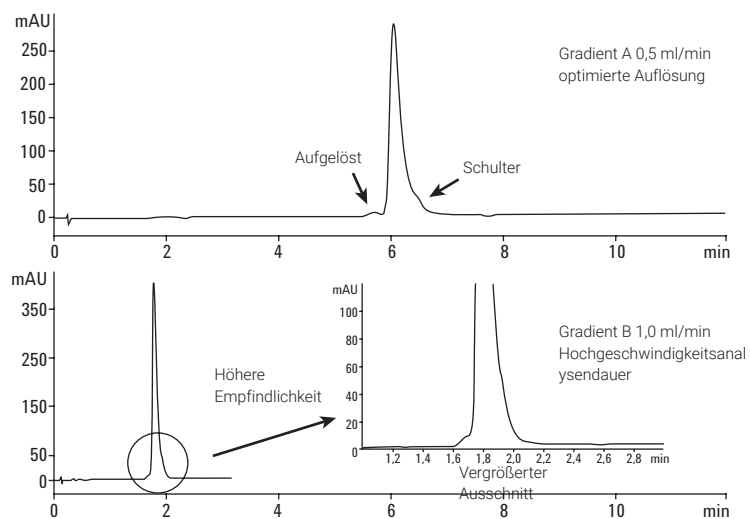
Flussrate: Zwischen 0,5 ml/min und 1,0 ml/min

Gradient: Abschnittsweise und lineare Elution

Temperatur: 80 °C

LC-System: UV, 225 nm

Detektor: Intakter mAb



Tipps und Werkzeuge

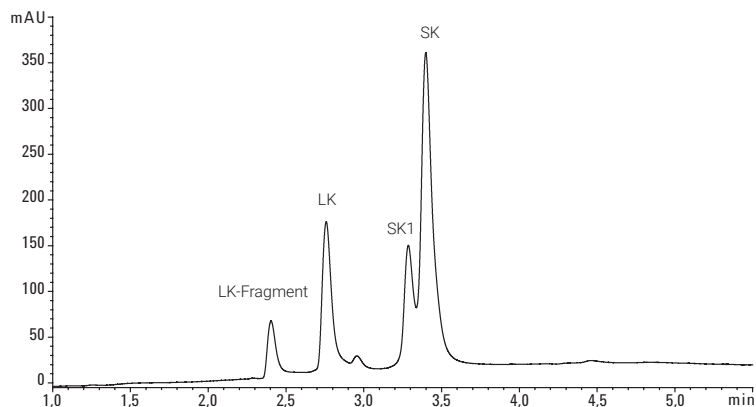
Weitere Informationen über die bessere Charakterisierung von Biomolekülen mit AdvanceBio Umkehrphasensäulen finden Sie im Whitepaper zu diesem Thema (Publikation **5991-2032EN**).

www.agilent.com/search



Reduzierte und alkylierte mAb: Trennung von Varianten der leichten Kette und der schweren Kette

Säule:	ZORBAX RRHD 300SB-C8 858750-906 2,1 x 150 mm, 1,8 µm
Mobile Phase:	A: H ₂ O + 0,1 % TFA (v/v) B: n-Propanol:ACN:H ₂ O (80:10:10) + 0,1 % TFA (v/v)
Flussrate:	0,5 ml/min
Injektion:	3 µl (aus einer Probe mit 2,5 mg/ml)
	% Lösemittel B Zeit (min)
	20 0
	35 3
	40 4
	40 5
	90 5,1
	90 5,5
	25 6
Gradient:	Abschnittsweise
Temperatur:	75 °C
Detektor:	UV, 225 nm
LC-System:	1290 Infinity LC mit automatischem Probengeber, binärer Pumpe, thermostatisiertem Säulenofen und Diodenarray-Detektor (DAD)



Für aufeinander folgende chromatographische Trennungen wurde eine Nachlaufzeit von 2 min zur erneuten Äquilibration der Säule eingefügt.

Tipps und Werkzeuge

Typische mobile Phasen für die Trennung von Proteinen und Peptiden enthalten TFA (oder andere Säuren) und haben einen sehr niedrigen pH-Wert zum Lösen der Proteine. Unter diesen Bedingungen weisen StableBond-Säulen eine extrem lange Lebensdauer auf. Sie haben eine Porengröße von 300 Å und sind für Proteine mit bis zu 100-500 kDa geeignet.

Verbesserte Reproduzierbarkeit der Analyse monoklonaler Antikörper

Säule: ZORBAX RRHD 300SB-C8
857750-906
2,1 x 50 mm, 1,8 µm

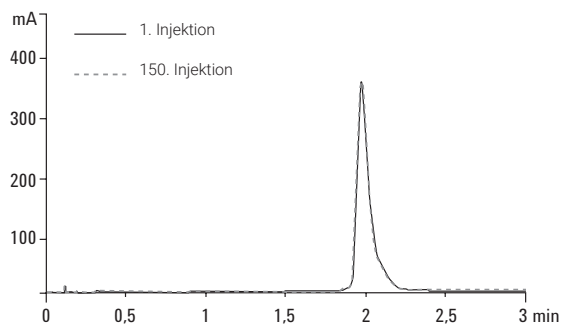
Mobile Phase: A: H₂O:IPA (98:2) + 0,1 % TFA (v/v)
B: IPA:ACN:H₂O (70:20:10) + 0,1 % TFA

Flussrate: 1,0 ml/min

Temperatur: 80 °C

Detektor: 1290 Infinity LC mit Diodenarray-Detektor bei 225 nm

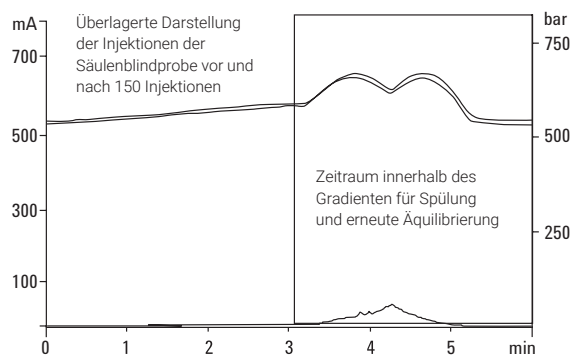
Probe: mAb



Gradient

Partikelgröße, µm	Flussrate, ml/min
0,00	25
3,00	35
4,00	90
5,00	25

Exzellente Reproduzierbarkeit und
Protein-Wiederfindung mit der ZORBAX
300SB-C8-Säule.



Einzigartige Selektivitätsauswahl für mAb-Charakterisierungen

Säulen: ZORBAX RRHD 300SB-C18
858750-902
2,1 x 100 mm, 1,8 µm

ZORBAX RRHD 300SB-C3
858750-909
2,1 x 100 mm, 1,8 µm

ZORBAX RRHD 300SB-C8
858750-906
2,1 x 100 mm, 1,8 µm

ZORBAX RRHD 300-Diphenyl
858750-944
2,1 x 100 mm, 1,8 µm

Mobile Phase: A: H₂O (0,1 % TFA) (v/v)
B: 80 % nPA:10 % ACN:10 % H₂O (0,08 % TFA) (v/v)

Injektionsvolumen: 3 µl (aus einer Probe mit 2,5 mg/ml)

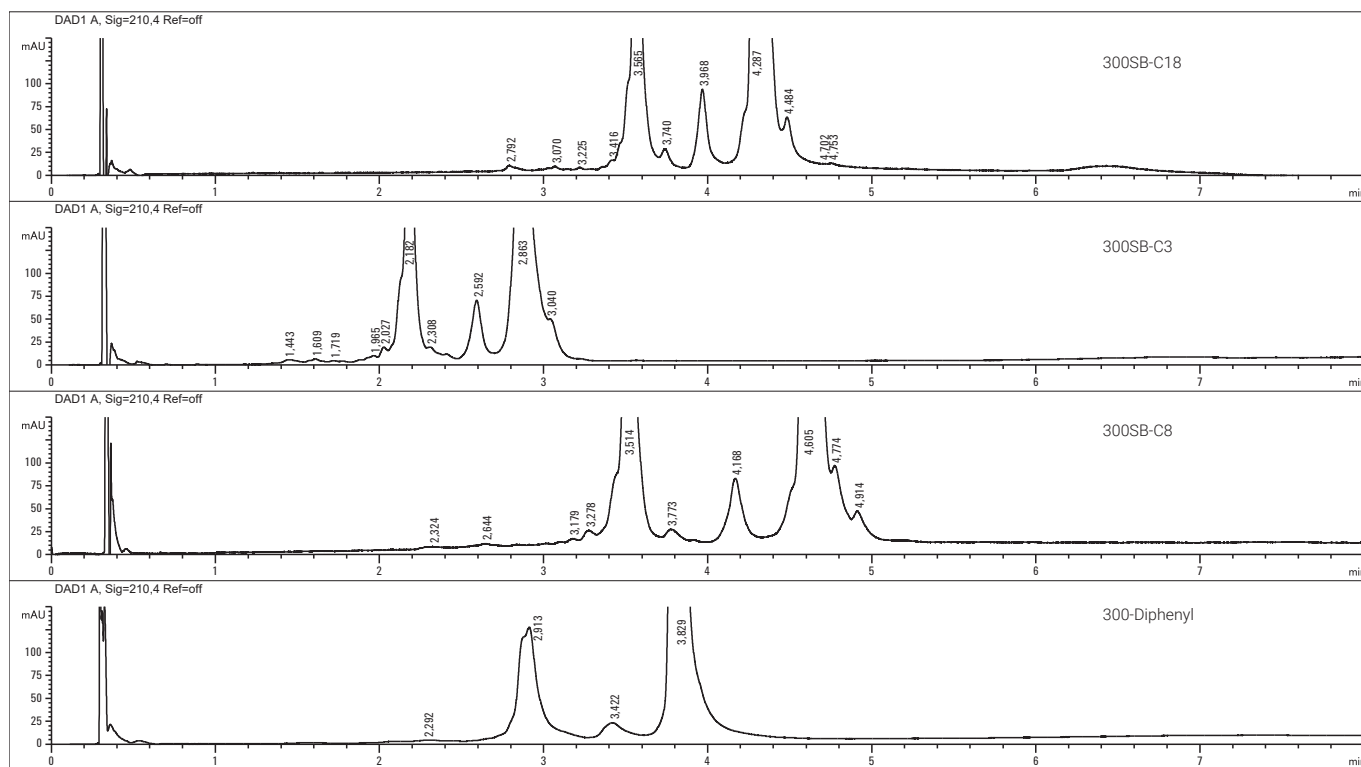
Flussrate: 1,0 ml/min (3,5 µm*), 1,0 ml/min (1,8 µm)

Gradient: 25-35 % B, Spülung bei 90 %

Temperatur: 80 °C

Detektor: UV, 215 nm

* Peakverbreiterung bei niedrigeren Flussraten



Peptide/Proteine: Effekt erhöhter Temperatur

Säule: ZORBAX RRHD 300SB-C3
883995-909
4,6 x 150 mm, 5 µm

Mobile Phase: A: 5:95 ACN:Wasser mit 0,10 % TFA (v/v)
B: 95:5 ACN:Wasser mit 0,085 % TFA (v/v)

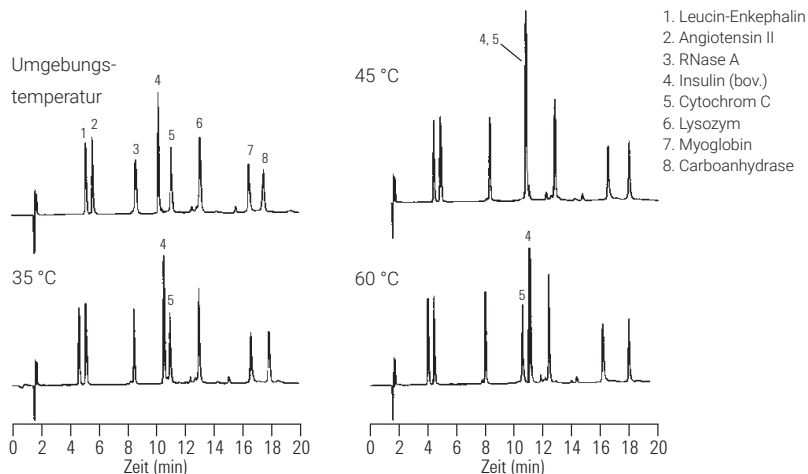
Flussrate: 1,0 ml/min

Gradient: 15-53 % in 20 min, Nachlaufzeit 12 min

Temperatur: Raumtemperatur bis 60 °C

Detektor: UV, 215 nm

Probe: Polypeptide



Kurzkettige ZORBAX 300SB-C3-Phase ist stabil bei niedrigem pH und hoher Temperatur

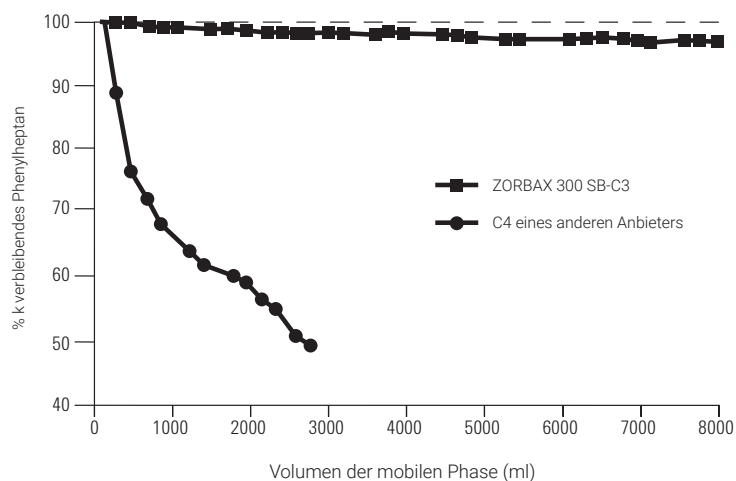
Säule: ZORBAX 300SB-C3
883995-909
4,6 x 150 mm, 5 µm

Mobile Phase: Gradient 0-100 % B in 80 min
A: 0,5 % TFA in Wasser
B: 0,5 % TFA in Acetonitril
Testbedingungen für isokratische

Retention: 1-Phenylheptan 50 % A, 50 % B

Flussrate: 1,0 ml/min

Temperatur: 60 °C



Vier verschiedene gebundene 300SB-Phasen zur Optimierung der Trennung großer Polypeptide

Säule A: ZORBAX RRHD 300SB-C18
883995-902
4,6 x 150 mm, 5 µm

Säule B: ZORBAX 300SB-C8
883995-906
4,6 x 150 mm, 5 µm

Säule C: ZORBAX 300SB-C3
858750-909
4,6 x 150 mm, 5 µm

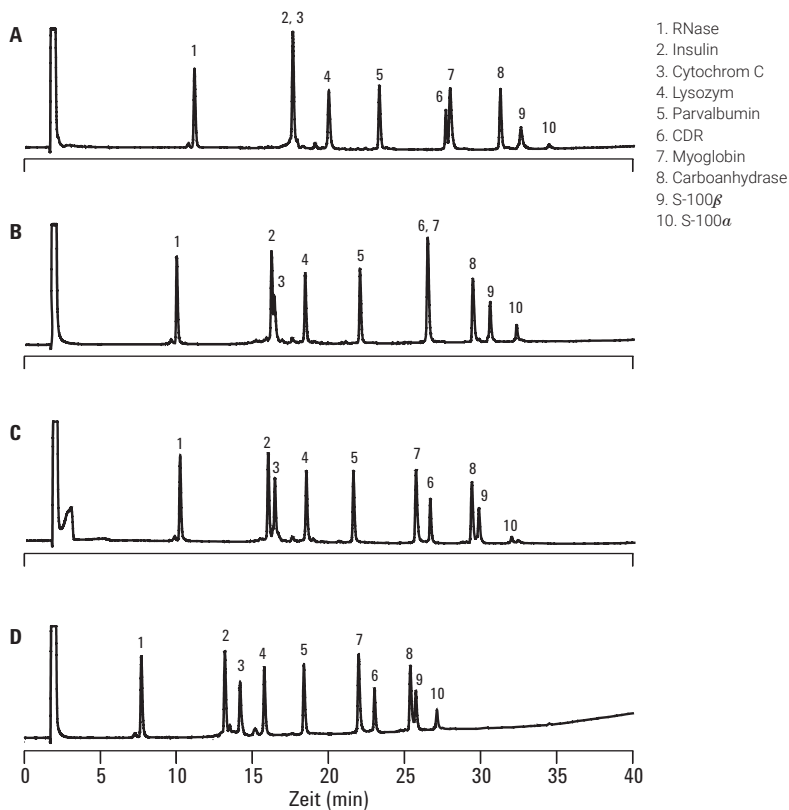
Säule D: ZORBAX 300SB-CN
858750-905
4,6 x 150 mm, 5 µm

Mobile Phase: Linearer Gradient, 25-70 % B in 40 min
A: 0,1 % TFA in Wasser
B: 0,09 % TFA in 80 % Acetonitril:20 % Wasser

Flussrate: 1,0 ml/min

Temperatur: 60 °C

Probe: 3 µg pro Protein



Die gebundenen 300SB-C18, C8, C3 und CN-Phasen bieten jeweils eine unterschiedliche Trennung dieser Polypeptidgruppe. Dies liefert einen wichtigen zusätzlichen Parameter zur schnellen Optimierung von Proteintrennungen. Die 300SB-CN-Säule bietet eine einzigartige Selektivität für hydrophilere Polypeptide.

ZORBAX 300 Å StableBond

Beschreibung	Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7	300SB-CN USP L10	300SB-C3 USP L56	300-Diphenyl USP L11
Standardsäulen (keine besondere Hardware erforderlich)							
Semipräparativ	9,4 x 250	5	880995-202	880995-206	880995-205	880995-209	
Analytisch	4,6 x 250	5	880995-902	880995-906	880995-905	880995-909	
Analytisch	4,6 x 150	5	883995-902	883995-906	883995-905	883995-909	
Analytisch	4,6 x 50	5	860950-902	860950-906	860950-905	860950-909	
Rapid Resolution	4,6 x 150	3,5	863973-902	863973-906	863973-905	863973-909	
Rapid Resolution	4,6 x 100	3,5	861973-902	861973-906			
Rapid Resolution	4,6 x 50	3,5	865973-902	865973-906	865973-905	865973-909	
Solvent Saver Plus	3,0 x 150	3,5	863974-302	863974-306		863974-309	
Solvent Saver Plus	3,0 x 100	3,5		861973-306			
Narrow Bore	2,1 x 250	5	881750-902				
Narrow Bore	2,1 x 150	5	883750-902	883750-906	883750-905	883750-909	
Narrow Bore RR	2,1 x 150	3,5		863750-906			
Narrow Bore RR	2,1 x 100	3,5	861775-902	861775-906			
Narrow Bore RR	2,1 x 50	3,5	865750-902	865750-906			
Narrow Bore RRHD	2,1 x 150	1,8	863750-902	866750-906		863750-914	863750-944
Narrow Bore RRHD	2,1 x 100	1,8	858750-902	858750-906		858750-909	858750-944
Narrow Bore RRHD	2,1 x 50	1,8	857750-902	857750-906		857750-909	857750-944
MicroBore	1,0 x 250	5	861630-902				
MicroBore RR	1,0 x 150	3,5	863630-902	863630-906			
MicroBore RR	1,0 x 50	3,5	865630-902	865630-906			
MicroBore-Vorsäule, 3 St.	1,0 x 17	5	5185-5920	5185-5920			
Vorsäulenkartusche, 2 St.	9,4 x 15	7	820675-124	820675-124	820675-124	820675-124	

(Fortsetzung)

AB

AB

Teil der AdvanceBio-Produktfamilie

Tipps und Werkzeuge

Mehr Informationen dazu, wie Sie Ihre Agilent Geräte optimal nutzen, finden Sie unter: www.agilent.com/chem/getbioguides

ZORBAX 300 Å StableBond

Beschreibung	Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7	300SB-CN USP L10	300SB-C3 USP L56	300-Diphenyl USP L11
Vorsäulenkartusche, 4 St.	4,6 x 12,5	5	820950-921	820950-918	820950-923	820950-924	
Vorsäulenkartusche, 4 St.	2,1 x 12,5	5	821125-918	821125-918	821125-924	821125-924	
Vorsäulen-Hardware-Kit			840140-901	840140-901	840140-901	840140-901	
Vorsäulen-Hardware-Kit			820999-901	820999-901	820999-901	820999-901	

PrepHT Kartuschensäulen (erfordern Endfittingskit 820400-901)

PrepHT Kartusche	21,2 x 250	7		897250-102	897250-106	897250-105	897250-109
PrepHT Kartusche	21,2 x 150	7		897150-102	897150-106		897150-109
PrepHT Kartusche	21,2 x 150	5		895150-902	895150-906		895150-909
PrepHT Kartusche	21,2 x 100	5		895100-902	895100-906		895100-909
PrepHT Kartusche	21,2 x 50	5		895050-902	895050-906		895050-909
PrepHT Endfittings, 2 St.				820400-901	820400-901	820400-901	820400-901
PrepHT Vorsäule	17,0 x 7,5	5		820212-921	820212-918	820212-924	820212-924
Vorsäulenkartuschen-Hardware				820444-901	820444-901	820444-901	820444-901

Glasbeschichtete Kapillarsäulen

Kapillare	0,5 x 250	5	5064-8266	
Kapillare	0,5 x 150	5	5064-8264	
Kapillare	0,5 x 35	5	5064-8294	
Kapillare RR	0,5 x 150	3,5	5064-8268	
Kapillare RR	0,5 x 35	3,5	5065-4459	
Kapillare	0,3 x 250	5	5064-8265	
Kapillare	0,3 x 150	5	5064-8263	
Kapillare	0,3 x 35	5	5064-8295	
Kapillare RR	0,3 x 150	3,5	5064-8267	5065-4460
Kapillare RR	0,3 x 100	3,5	5064-8259	5065-4461
Kapillare RR	0,3 x 35	3,5	5064-8270	5065-4462
Kapillare RR	0,3 x 50	3,5	5064-8300	5065-4463

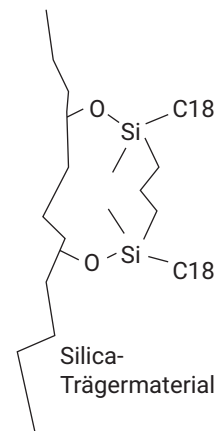
Nanosäulen (PEEK Fused-Silica)

Nano RR	0,1 x 150	3,5	5065-9910	
Nano RR	0,075 x 150	3,5	5065-9911	
Nano RR	0,075 x 50	3,5	5065-9924	5065-9923
Falle/Vorsäule, 5 St.	0,3 x 5	5	5065-9913	5065-9914
Falle/Vorsäulen-Hardware-Kit			5065-9915	5065-9915

ZORBAX 300 Å Extend-C18

- Stabile Trennungen von Polypeptiden und Peptiden von pH 2-11,5
- Unterschiedliche Selektivität bei hohen und niedrigen pH-Werten möglich
- Hohe Effizienz und gute Wiederfindung hydrophober Peptide bei hohen pH-Werten
- Ideal für LC/MS mit Ammoniumhydroxid modifizierter mobiler Phase

Die ZORBAX 300 Å Extend-C18-Säule ist eine HPLC-Säule mit weitporigem Material für hocheffiziente Trennungen von Peptiden von pH 2-11,5. Die einzigartige, zweizählig gebundene Phase bietet eine exzellente Lebensdauer und Reproduzierbarkeit bei hohen und niedrigen pH-Werten. Bei einem hohen pH-Wert kann aufgrund der Veränderung der Molekülladungen eine erheblich veränderte Retention und Selektivität der Peptide und Polypeptide vorliegen. Für hydrophobe Polypeptide wurden bei Raumtemperatur und hohem pH-Wert exzellente Wiederfindungsraten erzielt. Die LC/MS-Empfindlichkeit von Peptiden und Polypeptiden kann bei hohen pH-Werten durch die Verwendung einer einfachen Ammoniumhydroxid enthaltenden mobilen Phase verbessert werden.



Neuartige zweizählige C18-C18-Bindung der gebundenen Extend-C18-Phase

Spezifikationen der UHPLC-Säulen

Gebundene Phase	Porengröße	Temp.- grenzen*	pH-Bereich*	mit Endcapping
ZORBAX 300 Å Extend-C18 60 °C	300 Å	60 °C	2,0-11,5	Doppelt

Die Spezifikationen stellen nur typische Werte dar

* Temperaturgrenzen: 60 °C bis pH 8, 40 °C von pH 8 bis 11,5.

Tipps und Werkzeuge

Die Auswahl der richtigen Säule ist nur ein Teil der gesamten Lösung. Denken Sie an wichtiges Zubehör wie unsere breite Palette an LC-Lampen. Besuchen Sie:

www.agilent.com/chem/lamps.



LC/MS-Analyse von Angiotensin

Säule: ZORBAX Extend-C18
773700-902
2,1 x 150 mm, 5 µm

Mobile Phase: Saure Bedingungen:
A: 0,1 % TFA in Wasser
B: 0,085 % TFA in 80 % Acetonitril (ACN)
Basische Bedingungen:
A: 10 mM NH₄OH in Wasser
B: 10 mM NH₄OH in 80 % ACN

Flussrate: 0,2 ml/min

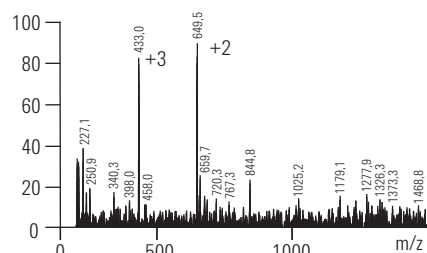
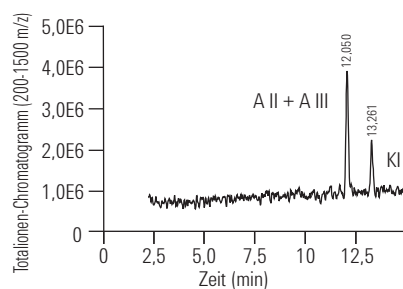
Gradient: 15-50 % B in 15 min

Temperatur: 35 °C

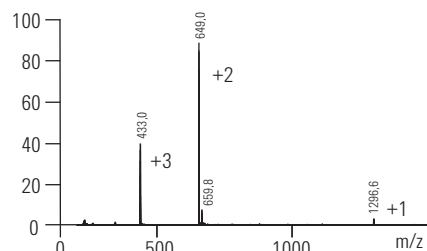
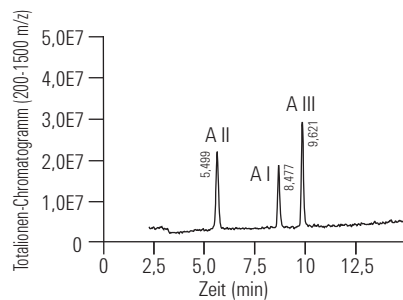
MS-Bedingungen: Pos. Ionen-ESI; Vf 70 V, Vcap 4,5 kV, N₂,
35 psi, 12 l/min, 325 °C

Probe: Angiotensin I, II, III, 2,5 µl Probe (jeweils 50 pmol)

A
Angiotensin I
Max.: 10 889
Niedriger pH-Wert



B
Angiotensin I
Max.: 367 225
Hoher pH-Wert



Sowohl kleine als auch große Peptide zeigen beim Wechsel zwischen hohem und niedrigem pH-Wert eine veränderte Selektivität. Bei einem hohen pH-Wert können aufgrund der veränderten Ladung alle drei Angiotensine aufgelöst werden. Außerdem ist bei hohem pH-Wert mit einer mobilen Phase mit Ammoniumhydroxid die spektrale Reinheit von Angiotensin I erheblich verbessert. Die Extend C18-Säule kann auch zur Analyse von kleinen Peptiden bei hohen pH-Werten verwendet werden.

Literatur: B.E. Boyes. Separation and Analysis of Peptides at High pH Using RP-HPLC/ESI-MS, 4th WCBP, San Francisco, CA, Jan. 2000.

Lange Lebensdauer bei hohem pH-Wert

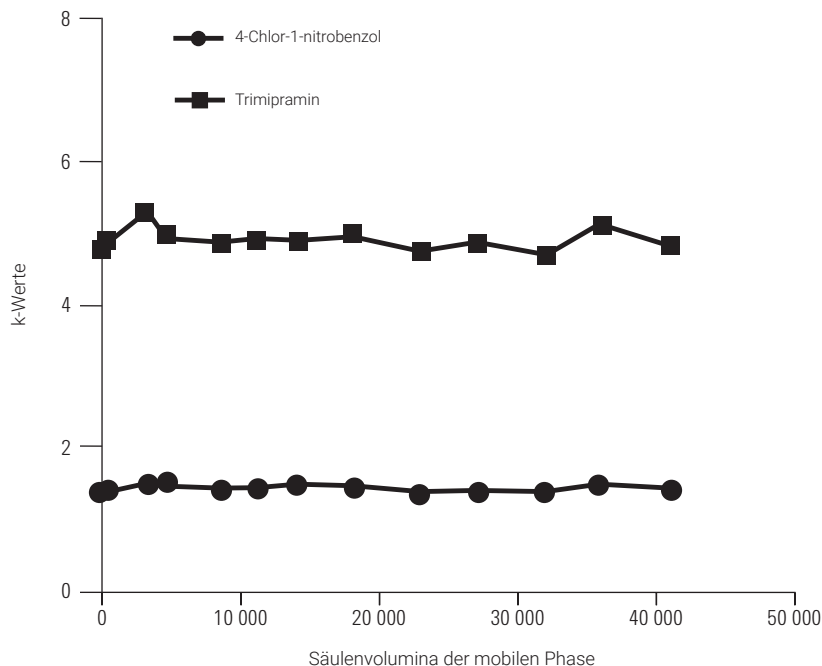
Säule: ZORBAX Extend-C18
773450-902
4,6 x 150 mm, 5 µm

Mobile Phase: 20 % 20 mM NH_4OH , pH 10,5
80 % Methanol

Flussrate: 1,5 ml/min

Temperatur: Alterung: 24 °C
Tests: 40 °C

Jeweils 10 000 Säulenvolumina entsprechen
ungefähr einem Arbeitsmonat.



Verwendung von ZORBAX Extend-C18 für alternative Selektivität bei hohem pH-Wert

Säule: ZORBAX Extend-C18
773700-902
2,1 x 150 mm, 5 µm

Mobile Phase: A: 0,1 % TFA in Wasser
B: 0,085 % TFA in 80 % ACN
A: 20 mM NH_4OH in Wasser
B: 20 mM NH_4OH in 80 % ACN

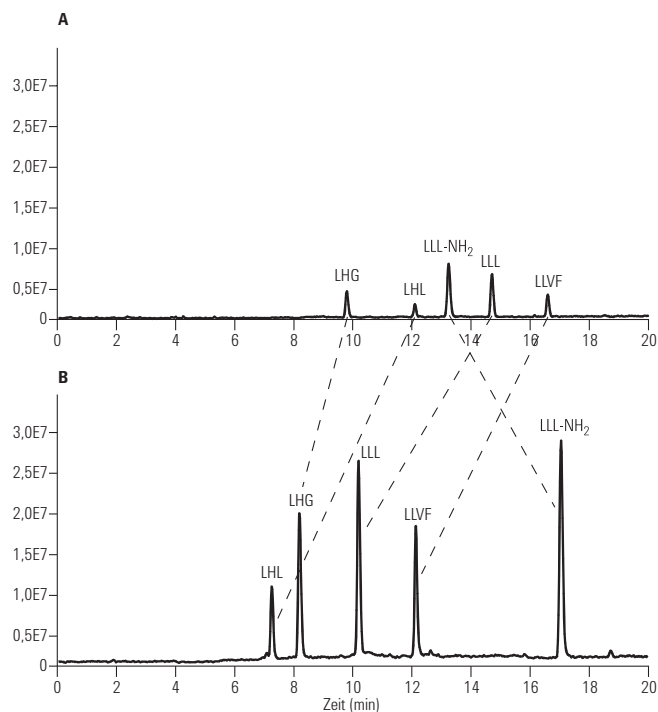
Flussrate: 0,25 ml/min

Gradient: 5-60 % B in 20 min

Temperatur: 25 °C

MS-Bedingungen: Pos. Ionen-ESI; Vf 70 V, Vcap 4,5 kV,
 N_2 , 35 psi, 12 l/min, 300 °C,
Probe: 4 µl (50 ng pro Peptid)

Die Extend-Säule kann für die Trennung von Peptiden bei hohen pH-Werten verwendet werden. Bei hohen und niedrigen pH-Werten können jeweils sehr unterschiedliche Selektivitäten auftreten. Nur durch die Änderung des pH-Werts kann eine komplementäre Methode entwickelt werden und damit sichergestellt werden, dass alle Peaks aufgelöst sind. Die Extend-Säule kann bei hohen und niedrigen pH-Werten verwendet werden; eine komplementäre Trennung kann also auf derselben Säule durchgeführt werden. Für diese Probe wird bei einem hohen pH-Wert auch eine bessere MS-Empfindlichkeit erzielt.



ZORBAX 300 Å Extend-C18

Beschreibung	Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	Best.-Nr.
Analytisch	4,6 x 250	5	770995-902
Analytisch	4,6 x 150	5	773995-902
Rapid Resolution	4,6 x 150	3,5	763973-902
Rapid Resolution	4,6 x 100	3,5	761973-902
Rapid Resolution	4,6 x 50	3,5	765973-902
Narrow Bore RR	2,1 x 150	3,5	763750-902
Narrow Bore RR	2,1 x 100	3,5	761775-902
Narrow Bore RR	2,1 x 50	3,5	765750-902
Vorsäulenkartusche, 4 St.	4,6 x 12,5	5	820950-932
Vorsäulenkartusche, 4 St.	2,1 x 12,5	5	821125-932
Vorsäulen-Hardware-Kit			820999-901
Glasbeschichtete Kapillarsäulen			
Kapillare RR	0,3 x 150	3,5	5065-4464
Kapillare RR	0,3 x 100	3,5	5065-4465
Kapillare RR	0,3 x 75	3,5	5065-4466
Kapillare RR	0,3 x 50	3,5	5065-4467

Tipps und Werkzeuge

Vorsäulen und Filter schützen Ihre Säulen und Geräte vor Partikeln, die Blockagen verursachen können, die wiederum den Systemdruck erhöhen und die Leistung negativ beeinflussen und so Ihren täglichen Arbeitsablauf unterbrechen. Die neuen Fast Guards für UHPLC- und Bio LC-Säulen von Agilent schützen die Säule, ermöglichen eine längere Lebensdauer der Säule und minimieren Unterbrechungen Ihres Arbeitsablaufs. Weitere Informationen finden Sie unter:

www.agilent.com/chem/fastguards

Poroshell 300 AB

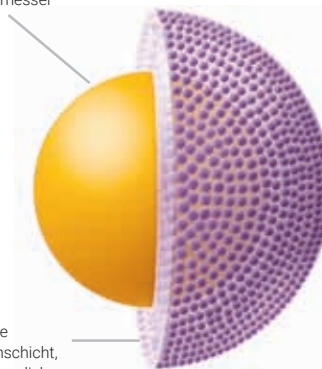
- Schnelle Trennung von Biomolekülen mit oberflächenporösen Partikeln
- Hohe Effizienz und Wiederfindung für Proteine (bis zu 1000 kDa) durch 300 Å Poren
- Lange Lebensdauer bei niedrigen pH-Werten mit Poroshell 300SB und bei hohen pH-Werten mit 300Extend-C18
- Optimale Wiederfindung und Selektivität mit vier verschiedenen gebundenen Phasen: 300SB-C18, 300SB-C8, 300SB-C3 und 300Extend-C18

Poroshell 300-Säulen sind ideal für schnelle Trennungen von Proteinen und Peptiden geeignet, da die oberflächenporösen Partikel mit 5 µm Durchmesser schnelle Flussraten ermöglichen, wobei scharfe, effiziente Peaks erhalten bleiben. Poroshell-Säulen mit gebundenen StableBond-Phasen bieten eine exzellente Stabilität und Selektivitätsauswahl für mobile Phasen mit TFA oder Ameisensäure. Die Poroshell 300Extend-C18-Säule kann für hervorragende Trennungen von pH 2-11 verwendet werden. Diese Säulen können ebenfalls für analytische Proteintrennungen und LC/MS-Trennungen eingesetzt werden.

Peptide und Proteine werden typischerweise langsam getrennt, um die bei diesen langsam diffundierenden Analyten mögliche Peakverbreiterung zu reduzieren. Poroshell-Säulen verwenden jedoch oberflächenporöse Partikel, die aus einer dünnen Schicht aus porösem Silica (0,25 µm dick) auf einem festen Silica-Kern bestehen. Dieser Aufbau reduziert den Diffusionsweg der Proteine und ermöglicht schnelle HPLC-Trennungen von Peptiden und Proteinen bis zu 500-1000 kDa mit 400/600 bar HPLC-Systemen wie beispielsweise dem 1260 Infinity II bioinerten LC-System.

Fester Kern, 4,5 µm Durchmesser

Poröse Außenschicht, 0,25 µm dick



Spezifikationen der UHPLC-Säulen

Gebundene Phase	Porengröße	Temp.-grenzen*	pH-Bereich*	mit Endcapping
Poroshell 300SB-C18, C8, C3	300 Å	90 °C	1,0-8,0	Nein
Poroshell 300Extend-C18	300 Å	40 °C über pH 8 60 °C über pH 8	2,0-11,0	Ja

Die Spezifikationen stellen nur typische Werte dar

* 300StableBond-Säulen sind für eine optimale Verwendung bei niedrigen pH-Werten konzipiert. Bei pH 6-8 sind sämtliche Säulen auf Silica-Basis bei Betriebstemperaturen < 40 °C und niedrigen Pufferkonzentrationen im Bereich von 0,01-0,02 M am stabilsten. Bei mittleren oder hohen pH-Werten wird 300Extend-C18 empfohlen.



Poroshell 300-Säulen

AB

Teil der AdvanceBio-Produktfamilie

Poroshell 300-Säulen trennen Proteine und Peptide in Sekunden

Säule: Poroshell 300SB-C18
660750-902
2,1 x 75 mm, 5 µm

Mobile Phase: A: 0,1 % TFA in H₂O
B: 0,07 % TFA in ACN

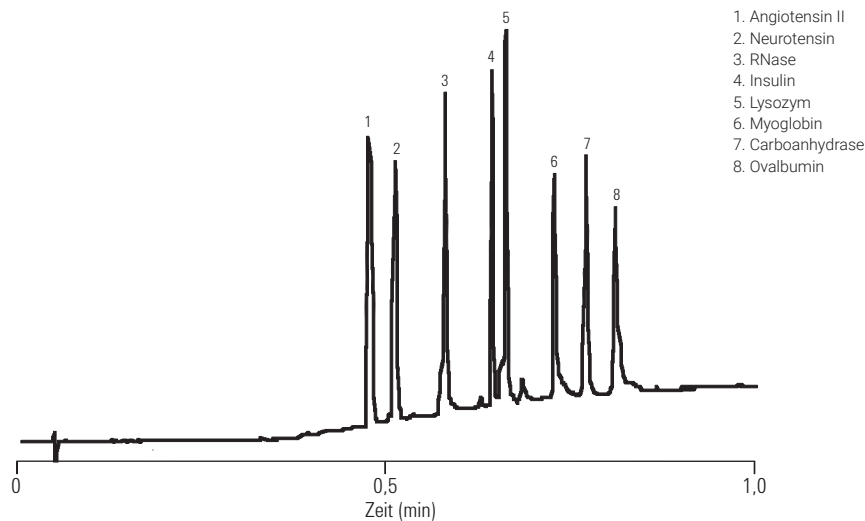
Flussrate: 0,3 ml/min

Gradient: 5-100 % B in 1,0 min

Temperatur: 70 °C, 260 bar

Detektor: UV, 215 nm

Probe: Proteine und Peptide



Diese Trennung von acht Polypeptiden und Proteinen ist in weniger als 60 Sekunden abgeschlossen. Jeder Peak ist scharf und effizient.

Tipps und Werkzeuge

Weitere Informationen finden Sie im Dokument:

Characterization of Glycosylation in the Fc Region of Therapeutic Recombinant Monoclonal Antibody (Publikation **5991-2323EN**)

Using the High-pH Stability of ZORBAX Poroshell 300Extend-C18 to Increase Signal-to-Noise in LC/MS (Publikation **5989-0683EN**)

www.agilent.com/search

Schnelle hochaufgelöste Analyse von fragmentiertem IgG

Säule: Poroshell 300SB-C3
660750-909
2,1 x 75 mm, 5 µm

Mobile Phase: A: Wasser (5 % Essigsäure, 1,0 % Ameisensäure, 0,05 % TFA)
B: 70:20:10 = IPA:ACN:Wasser (5 % Essigsäure, 1,0 % Ameisensäure, 0,05 % TFA)

Flussrate: 1,0 ml/min

Injektionsvolumen: 2 µl

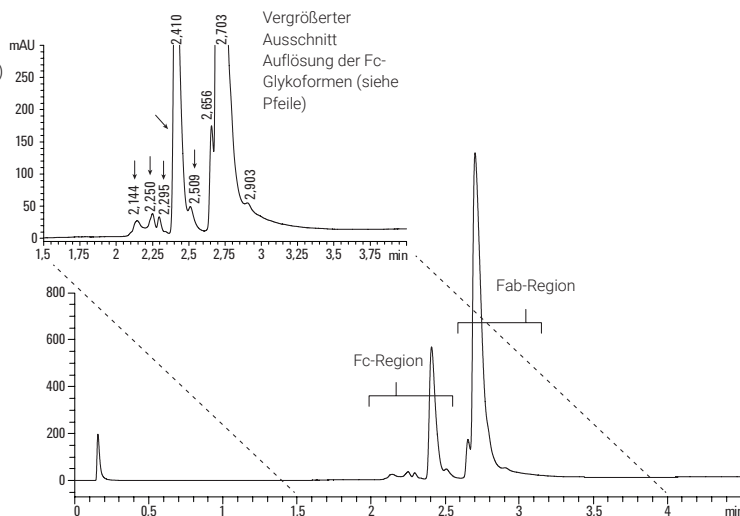
Gradient: Abschnittsweise

Zeit (min)	% B
0	20
4	45
8	45
9	90
10	20

Temperatur: 80 °C

Detektor: UV, 280 nm

Gerät: 1200 Infinity Serie mit automatischem Hochleistungs-Probengeber,
binärer Pumpe, thermostatisiertem Säulenofen (TCC) und Diodenarray-Detektor (DAD) gekoppelt mit einem 6224 Accurate Mass TOF LC/MS



Umkehrphasen-Trennung von IgG1 nach Papain-Verdau zeigt zwei Hauptpeaks der Fc- und Fab-Fragmente. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt teilweise aufgelöste Peaks, die von Varianten der Fc- und Fab-Fragmente stammen (siehe Pfeile).

MicroBore Poroshell 300-Säulen bieten maximale Empfindlichkeit für die LC/MS

Säule: Poroshell 300SB-C18
661750-902
1,0 x 75 mm, 5 µm

Mobile Phase: A: Wasser + 0,1 % Ameisensäure
B: ACN + 0,1 % Ameisensäure

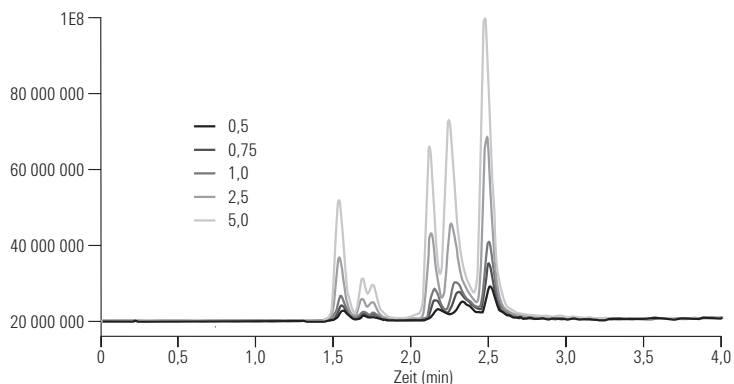
Flussrate: 600 µl/min

Gradient: 20-100 % B in 5,5 min

Temperatur: 80 °C

MS-Bedingungen: LC/MS: Pos. Ionen-ESI; Vcap 6000 V
Trocknungsgasfluss: 12 l/min
Trocknungsgastemperatur: 350 °C
Zerstäuber: 45 psi
Fragmentorspannung: 140 V
Scan: 600-2500
Schrittgröße: 0,15 amu
Peakbreite: 0,06 min

Probe: 1 µl



Mit den Narrow-Bore-Durchmessern von 2,1 mm, 1,0 mm und 0,5 mm sind Poroshell-Säulen ideale LC/MS-Partner. Ist die Probenmenge sehr begrenzt, sind die Poroshell-Säulen mit 1,0 mm oder 0,5 mm ID eine exzellente Wahl für LC/MS-Analysen mit hoher Empfindlichkeit. Auf Poroshell-Säulen sind empfindliche massenspektrometrische Molekulargewichtsbestimmungen bis zu 0,5 bis 5 pmol Protein möglich. Die Säulen wurden ebenfalls für schnelle massenspektrometrische Identifizierungen intakter Proteine, auch in Anwesenheit von Stabilisatoren und Gewebekulturmedien verwendet.

Tipps und Werkzeuge

Agilent bietet eine große Auswahl an Probenflaschen und Probenbehältern an: beispielsweise aus Polypropylen und deaktiviertem und silikonisiertem Glas. Das vollständige Angebot finden Sie in der Publikation **5990-9022DEE**.

www.agilent.com/chem/vials-productivity



Elutionsmuster von Proteinen

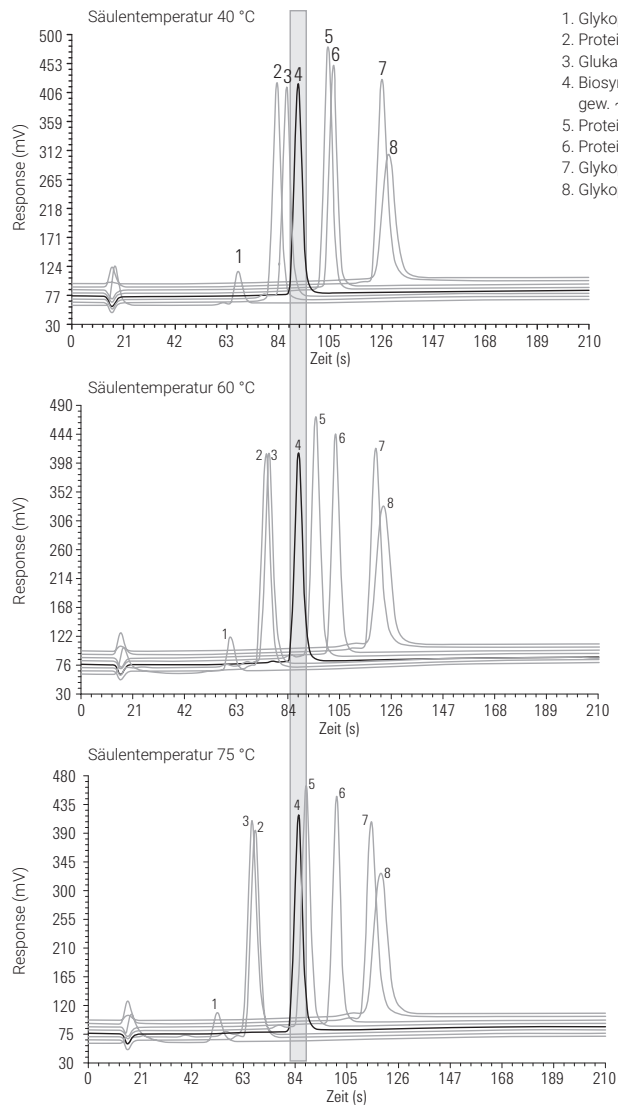
Säule: Poroshell 300SB-C8
660750-906
2,1 x 75 mm, 5 µm

Mobile Phase: A: 0,1 % TFA in H₂O
B: 0,1 % TFA in ACN

Flussrate: 1,0 µl/min

Gradient: 20 bis 70 % B in 3 min

Detektor: UV, 214 nm



Poroshell 300

Beschreibung	Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	Poroshell 300SB-C18	Poroshell 300SB-C8	Poroshell 300SB-C3	Poroshell 300Extend-C18
Narrow Bore	2,1 x 75	5	660750-902	660750-906	660750-909	670750-902
MicroBore	1,0 x 75	5	661750-902	661750-906	661750-909	671750-902
Kapillare	0,5 x 75	5		5065-4468		
Vorsäulenkartusche, 4 St.	2,1 x 12,5	5	821075-920	821075-918	821075-924	
Vorsäulen-Hardware-Kit			820999-901	820999-901	820999-901	
MicroBore-Vorsäule, 3 St.	1,0 x 17	5	5185-5968	5185-5968	5185-5968	5185-5968

AdvanceBio Peptide Mapping

- **Größere analytische Zuverlässigkeit:** Jede Charge des AdvanceBio Peptid-Mapping-Mediums wird mit einer komplexen Peptidmischung getestet, um Eignung und Reproduzierbarkeit zu gewährleisten und die Identifizierung wichtiger Peptide in komplexen Peptid-Maps zu ermöglichen.
- **Zeiteinsparung:** zwei- bis dreimal schneller als vollständig poröse HPLC-Säulen.
- **Jedes Gerät leistet mehr:** Säulen mit 4,6, 3,0 und 2,1 mm ID sind bis 600 bar stabil, sodass Sie Ihre UHPLC-Geräte optimal nutzen können. Darüber hinaus bieten sie hervorragende Leistung bei Ihren älteren Geräten von 400 bar.
- **Höhere Flexibilität:** Höhere MS-Empfindlichkeit bei Verwendung mobiler Phasen mit Ameisensäure bei jeder beliebigen HPLC-Trennung erreichen.



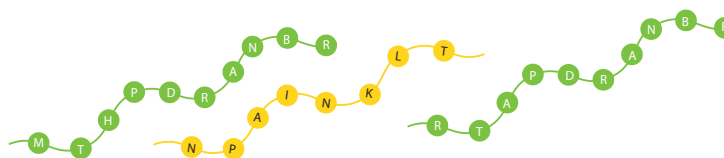
Diese leistungsstarken Biosäulen sind mit oberflächenporösen 2,7 µm Partikeln der Porengröße 120 Å gepackt. Sie werden mit einem komplexen Peptid-Gemisch speziell getestet, um eine zuverlässige Leistung beim Peptid-Mapping zu gewährleisten. Darüber hinaus liefern AdvanceBio Peptide Mapping-Säulen eine herausragende Auflösung und Geschwindigkeit für die UHPLC und exzellente Ergebnisse für die herkömmliche HPLC.

Säulenspezifikationen

Gebundene Phase	Porengröße	Temp.-Grenzen	pH-Bereich	mit Endcapping
EC-C18	120 Å	60 °C	2,0-8,0	Doppelt

Die Spezifikationen stellen nur typische Werte dar

Tipps und Werkzeuge



Interessieren Sie sich dafür, wie andere Wissenschaftler AdvanceBio Peptide Mapping-Säulen verwenden? Siehe:

Amano, M. *et al.* Detection of Histidine Oxidation in a Monoclonal Immunoglobulin gamma (IgG) 1 Antibody. *Analytical Chemistry*, 2014, 86 (15): 7536 -7543

Leah G. Luna and Katherine Coady, Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J. Anal Bioanal Tech*, 2014, 5:3

Peptid-Map eines Erythropoietin-Verdaus mit hoher Auflösung

Säule: AdvanceBio Peptide Mapping
651750-902
2,1 x 250 mm, 2,7 µm

Mobile Phase: A: H₂O + 0,1 % Ameisensäure (v/v)
B: Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure (v/v)

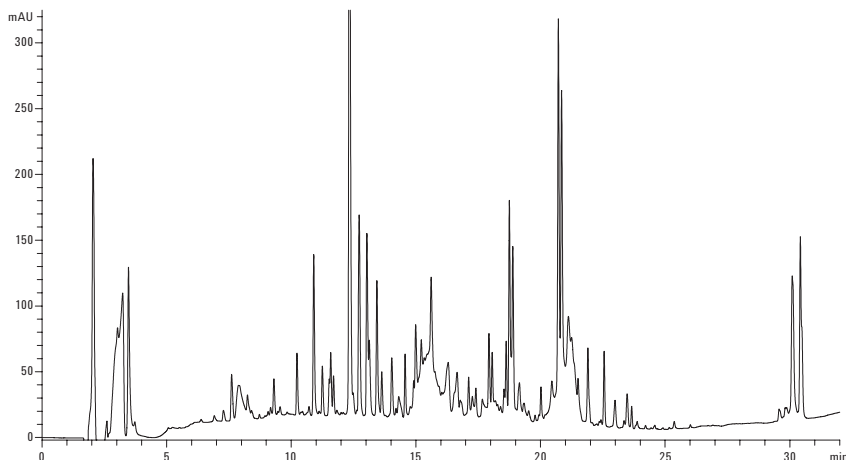
Flussrate: 0,4 ml/min

Gradient:

Zeit (min)	% B
0	3
28	45
33	60
34	95

Temperatur: 55 °C

Probe: 5 µl (2 µg/µl)



Schnelles und effizientes Peptid-Mapping von IgG

Säule: AdvanceBio Peptide Mapping
655750-902
2,1 x 100 mm, 2,7 µm
AdvanceBio Peptide Mapping
653750-902
2,1 x 150 mm, 2,7 µm

Mobile Phase: A: H₂O + 0,1 % Ameisensäure (v/v)
B: 90 % ACN + 0,1 % Ameisensäure (v/v)

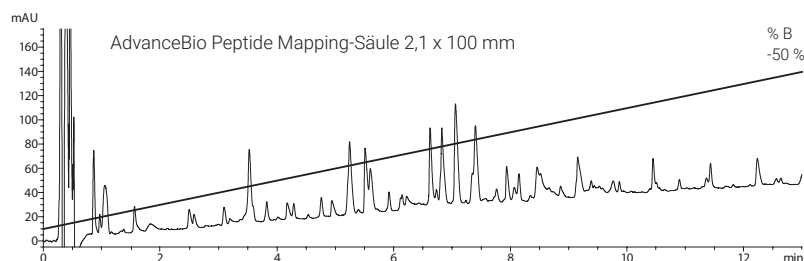
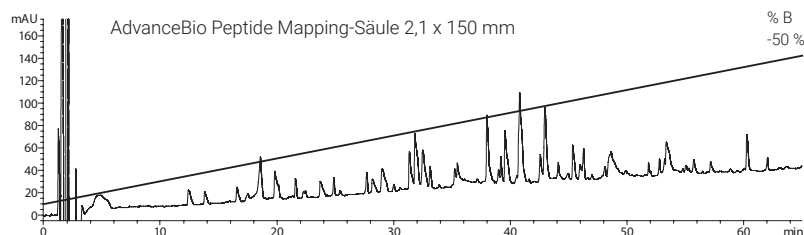
Flussrate: Unterschiedlich

Injektionsvolumen: 15 µl

Temperatur: 40 °C

Detektor: UV, 215/220 nm

Gerät: 1290 Infinity LC-System und
6530 Accurate-Mass Quadrupol-
Time-of-Flight LC/MS



AdvanceBio Peptide Mapping-Säulenoptimierung, um schnellere Peptid-Mapping-Analysen zu erzielen. Gradient 10-40 % B, DAD: 215 nm, 40 °C. Oberes Chromatogramm: Trennung in 75 min auf einer 2,1 x 150 mm Säule zeigte 59 Peptidpeaks (Flussrate 0,2 ml/min, 211 bar). Unteres Chromatogramm: optimierte Trennung in 14 min auf einer 2,1 x 100 mm Säule zeigte 57 Peptidpeaks (Flussrate 0,6 ml/min, 433 bar).

Tests zur Qualitätssicherung mit der Peptidmischung von Agilent

Säule: AdvanceBio Peptide Mapping
653750-902
2,1 x 150 mm, 2,7 µm

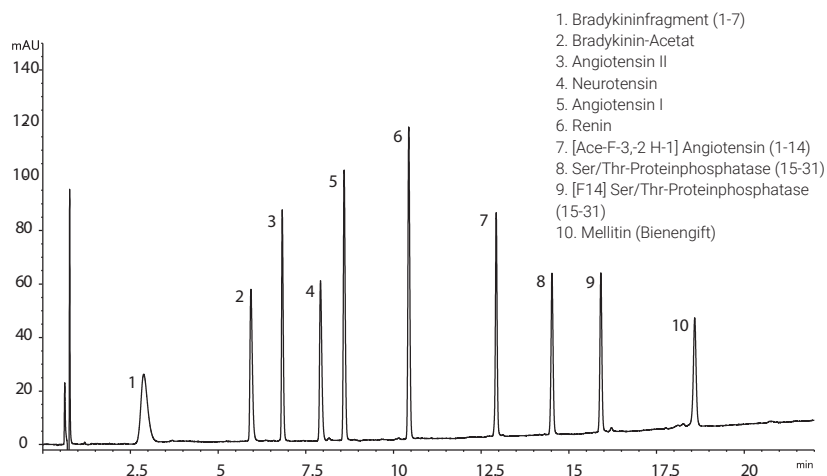
Flussrate: 3 µl

Gradient: A, H₂O (0,1 % TFA), B, ACN (0,1 % TFA), 0-25 min,
15-65 % B; 25-26 min, 65-95 % B

Temperatur: 55 °C

Detektor: 220 nm

Probe: Peptid-Mapping Standard-Mischung
(0,5-1,0 µg/µl pro Peptid) Best.-Nr. 5190-0583



Testmischung, die für alle Chargen der AdvanceBio Peptide Mapping-Medien verwendet wird. Die Mischung enthält 10 Peptide mit entweder hydrophilem, hydrophobem oder basischem Charakter und Molekulargewichten von 757 bis 2845 Da. Die Säulen werden außerdem mit einer Probe kleiner Moleküle getestet, um ihre Effizienz zu überprüfen.



Anwendungsberichte aus dem Labor

Bio-Lichtblick

Erfahren Sie, wie Labormanager die Ausfallzeit drastisch reduzieren und die Bediensicherheit verbessern können.

www.agilent.com/chem/story25

Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge nach 200 Injektionen

Säule: AdvanceBio Peptide Mapping
651750-902
2,1 x 250 mm, 2,7 µm

Flussrate: 0,5 ml/min

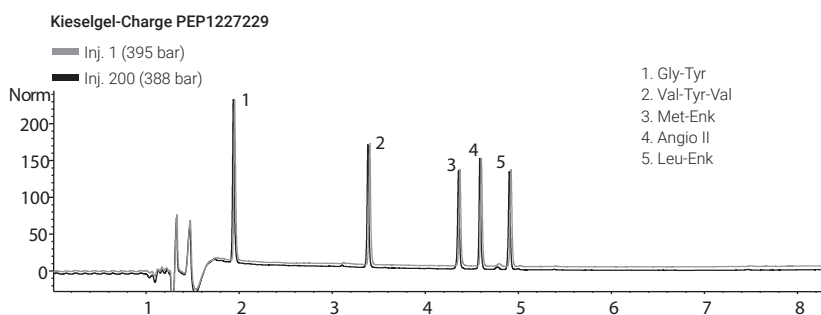
Injektion: 1 µl

Gradient: A, H₂O (0,1 % TFA), B, ACN (0,08 % TFA), 0-8 min,
10-60 % B; 8,1-9 min, konstant 95 % B

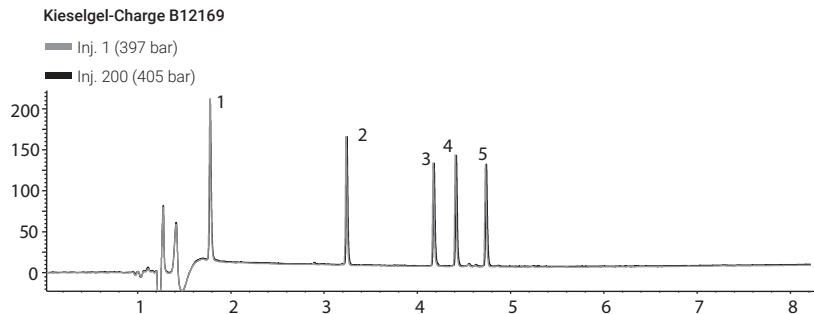
Temperatur: 55 °C

Detektor: 220 nm

Probe: Sigma HPLC Peptid-Standards



Injektion	RT2 (min)	RT3 (min)	RT4 (min)	RT5 (min)
1	3,39	4,36	4,59	4,90
200	3,52	4,48	4,70	5,02
Injektion	PW2	PW3	PW4	PW5
1	0,020	0,021	0,020	0,022
200	0,020	0,021	0,019	0,021



Injektion	RT2 (min)	RT3 (min)	RT4 (min)	RT5 (min)
1	3,36	4,29	4,52	4,85
200	3,24	4,18	4,41	4,74
Injektion	PW2	PW3	PW4	PW5
1	0,019	0,020	0,019	0,020
200	0,019	0,020	0,019	0,020

Bessere Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge und zwischen den Läufen. Um maximale Auflösung zu erreichen, wurde eine 2,1 x 250 mm AdvanceBio Peptide Mapping-Säule verwendet.

AdvanceBio Peptide Mapping

Beschreibung	Best.-Nr.
4,6 x 150 mm, 2,7 µm	653950-902
3,0 x 150 mm, 2,7 µm	653950-302
2,1 x 250 mm, 2,7 µm	651750-902
2,1 x 150 mm, 2,7 µm	653750-902
2,1 x 100 mm, 2,7 µm	655750-902
4,6 x 5 mm, Fast Guard*	850750-911
3,0 x 5 mm, Fast Guard*	853750-911
2,1 x 5 mm, Fast Guard*	851725-911

* Fast Guards verlängern die Lebensdauer der Analysesäulen, ohne die Trennung zu verlangsamen oder die Auflösung zu beeinträchtigen.

Agilent Peptid-Qualitätskontrollstandard

Verwenden Sie den Standard zur Qualitätskontrolle von Agilent mit zehn Peptiden – denselben Standard, den Agilent für die Qualitätskontrolle der eigenen Säulen verwendet –, um die Leistung Ihrer Säulen während der Nutzungsdauer zu prüfen. Der Standard kann für HPLC oder LC/MS eingesetzt werden. Etwa 20 Injektionen pro Flasche.

Agilent Peptid-Qualitätskontrollstandard

Beschreibung	Best.-Nr.
Standard zur Qualitätskontrolle von Peptiden, 71 µg in einem 2 ml Probenfläschchen	5190-0583



Tipps und Werkzeuge

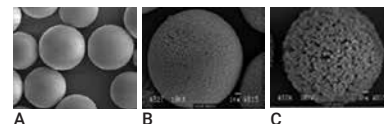
Das Peptid-Mapping ist eine leistungsstarke Technik und der am häufigsten verwendete Identitätsnachweis für Proteine, insbesondere für Proteine, die mit rekombinanten Methoden hergestellt werden. Um reproduzierbare und genaue Peptid-Maps zu erhalten, müssen außer der Säulenauswahl weitere Aspekte bedacht werden: Proteinverdau, Probenvorbereitung, Methodenoptimierung und so weiter. Weitere Informationen zu grundlegenden Techniken, die beim Peptid-Mapping verwendet werden, und weitere Aspekte zur Optimierung der Trennungen beim Peptid-Mapping finden Sie in *Keys for Enabling Optimum Peptide Characterizations: A Peptid-Mapping "How to" Guide* (Publikation **5991-2348EN**).

www.agilent.com/search

PLRP-S-Säulen

- Langlebige, widerstandsfähige Polymerpartikel ergeben über einen längeren Zeitraum reproduzierbare Ergebnisse
- Temperaturbeständig und chemisch stabil
- Entspricht der USP-Säulenspezifikation L21
- Wird in den Bio- und Materialwissenschaften sowie in den Bereichen Chemie, klinische Forschung, Energie, Umweltanalytik, Lebensmittel, Landwirtschaft und in der pharmazeutischen Industrie verwendet
- Porengrößen (100 Å bis 4000 Å) für Trennungen von niedermolekularen Verbindungen bis zu großen Komplexen und Polynukleotiden

Die Produktfamilie der PLRP-S-Säulen bietet eine Reihe von Poren- und Partikelgrößen, die identische Phasen und Adsorptionseigenschaften besitzen. Die Partikel sind von sich aus hydrophob. Es ist daher keine gebundene Phase und kein Alkyl-Ligand für Umkehrphasen-Trennungen erforderlich. Dies gewährleistet ein Material, das hohe Reproduzierbarkeit bietet und frei von Silanolen und Schwermetallionen ist. Die Säulen dieser umfassenden Produktgruppe eignen sich für Mikrotrennungen, einschließlich Bottom-up- und Top-down-Proteomik, analytische Trennungen und präparative Aufreinigungen. Außerdem können Prozesssäulen mit Bulk-Ware gepackt werden.



Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen von PLRP-S 10 µm Partikeln.

Die unterschiedlichen Porengrößen sind deutlich erkennbar.

Material **A** mit kleinen Poren: 100 Å

Material **B** mit größeren Poren: 300 Å

Material **C** mit Gigaporen: 4000 Å

Säulenspezifikationen

pH-Bereich	1-14
Puffergehalt	Unbegrenzt
Organischer Modifizier	1-100 %
Temperaturgrenzen	200 °C
Maximaldruck	3 µm: 275 bar/4000 psi
	5 µm, 8 µm und 10 µm: 207 bar/3000 psi
	10-15 µm, 15-20 µm und 30 µm: 103 bar/1500 psi

PLRP-S-Applikationen

Porengröße	Applikation
100 Å	Kleine Moleküle/Synthese
300 Å	Rekombinante Peptide/Proteine
1000 Å	Große Proteine
4000 Å	DNA/hohe Geschwindigkeit

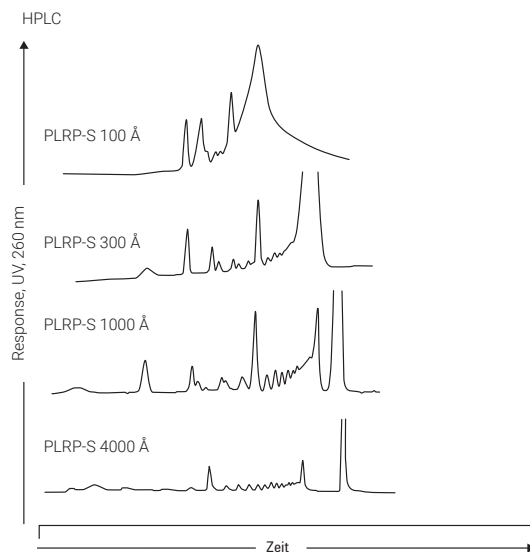
HPLC einer 25 bp DNA-Leiter

Säule: PLRP-S, 2,1 x 150 mm

Mobile Phase: A: 100 mM TEAA
B: 100 mM TEAA in 50 % Wasser:50 % ACN

Flussrate: 200 µl/min

Gradient: 12,5-50 % B in 150 min



Polyethylenglykole

Säule: PLRP-S 100 Å
PL1111-3500
4,6 x 150 mm, 5 µm

Mobile Phase: A: H₂O
B: ACN

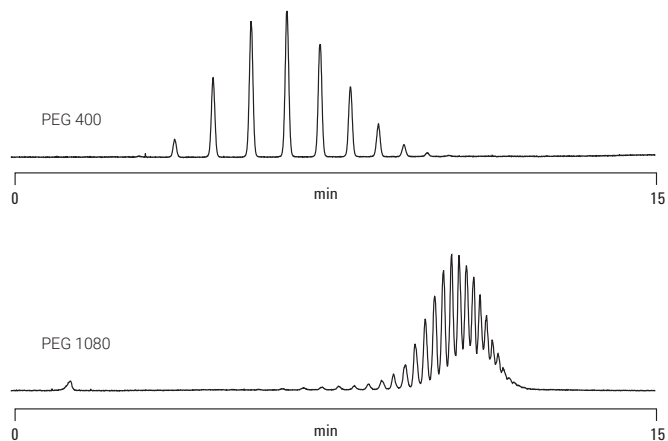
Flussrate: 1 mL/min

Injektionsvolumen: 10 µl

Gradient: 10–30 % B in 12 min, konstant bei 30 % B für 3 Minuten

Detektor: ELS (Zerstäubung = 50 °C, Verdampfung = 70 °C,
Gas = 1,6 SLM)

Probenkonz.: 1 mg/ml



Ausnutzung der chemischen Beständigkeit – TFA-Konzentration

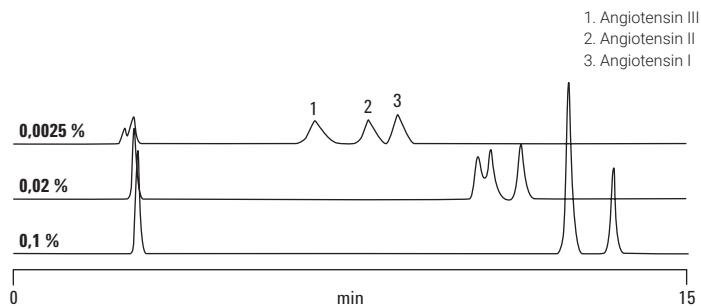
Säule: PLRP-S 100 Å
PL1512-5500
4,6 x 250 mm, 5 µm

Mobile Phase: A: TFA (unterschiedliche Prozentsätze) in Wasser
B: TFA (unterschiedliche Prozentsätze) in ACN

Flussrate: 1,0 ml/min

Gradient: Linear 12-40 % B in 15 min

Detektor: ELS (Zerstäubung = 75 °C, Verdampfung = 85 °C, Gas = 1,0 SLM)



Ausnutzung der chemischen Beständigkeit – NH₄OH-Konzentration

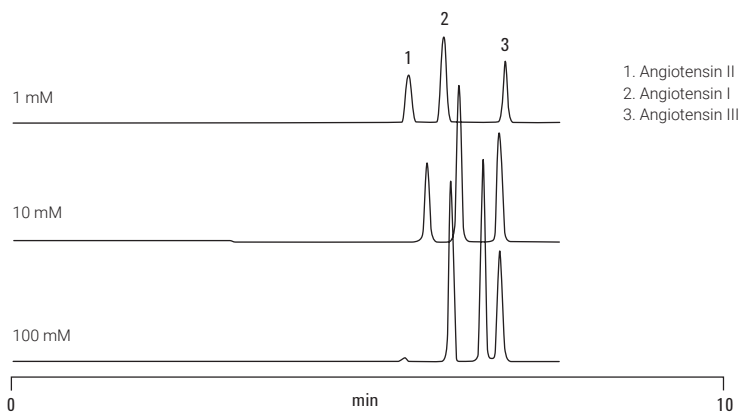
Säule: PLRP-S 100 Å
PL1512-5500
4,6 x 250 mm, 5 µm

Mobile Phase: A: NH₄OH (unterschiedlich mM) in Wasser
B: NH₄OH (unterschiedlich mM) in ACN

Flussrate: 1,0 ml/min

Gradient: Linear 10-100 % B in 15 min

Detektor: ELS (Zerstäubung = 80 °C, Verdampfung = 85 °C, Gas = 1,0 SLM)



Testmischung des Alberta Peptide Institute

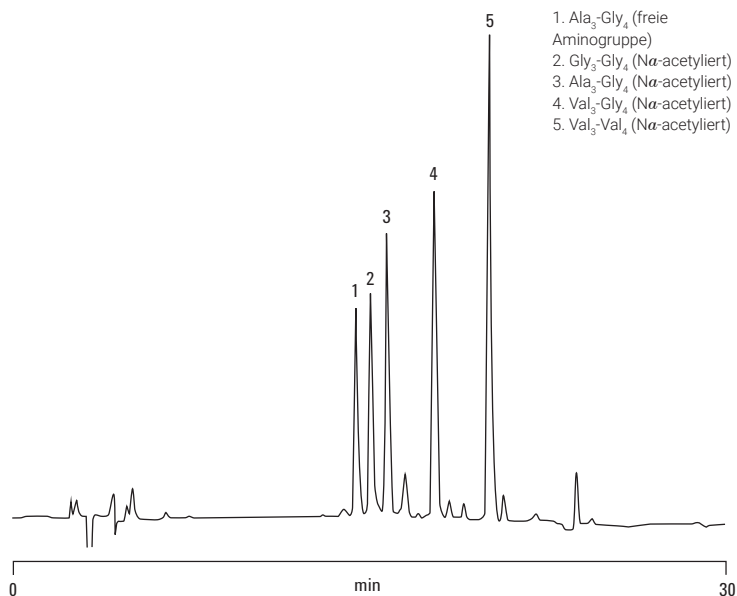
Säule: PLRP-S 100 Å
PL1512-5500
4,6 x 250 mm, 5 µm

Mobile Phase: A: 0,1 % TFA in 99 % Wasser:1 % ACN
B: 0,1 % TFA in 70 % Wasser:30 % ACN

Flussrate: 1 mL/min

Gradient: 0-100 % B in 30 min

Detektor: UV, 220 nm



Molkeproteine in Molkereiprodukten – Milch

Säule: PLRP-S 300 Å
PL1512-3801
4,6 x 150 mm, 8 µm

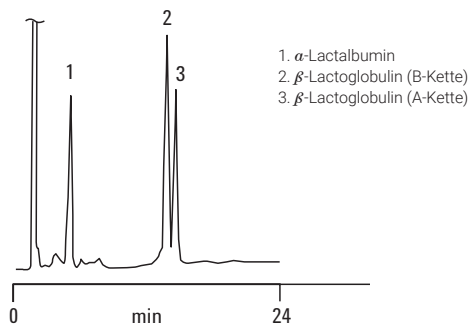
Mobile Phase: A: 0,1 % TFA in 99 % Wasser: 1 % ACN
B: 0,1 % TFA in 1 % Wasser: 99 % ACN

Flussrate: 1,0 ml/min

Injektionsvolumen: 10 µl

Gradient: 36-48 % B, 0-24 min, 48-100 % B, 24-30 min
100 % B, 30-35 min, 100-36 % B, 35-40 min

Detektor: UV, 220 nm



Temperatur als Werkzeug für verbesserten Stoffaustausch und verbesserte Auflösung von Oligonukleotiden mit Ionenpaar-Reversed Phase-HPLC

Säule: PLRP-S 100 Å
PL1512-1300
4,6 x 50 mm, 3 µm

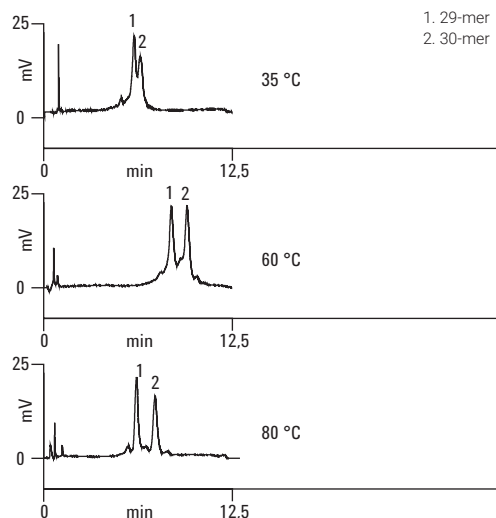
Mobile Phase: A: 100 mM TEAA
B: 100 mM TEAA in 25 % ACN

Flussrate: 1,0 ml/min

Gradient: 5 % Änderung von Puffer B in 5 min

Temperatur: 35 °C, 60 °C oder 80 °C

Detektor: UV, 254 nm



Große Faserproteine

Säule: PLRP-S 300 Å
PL1512-3801
4,6 x 150 mm, 8 µm

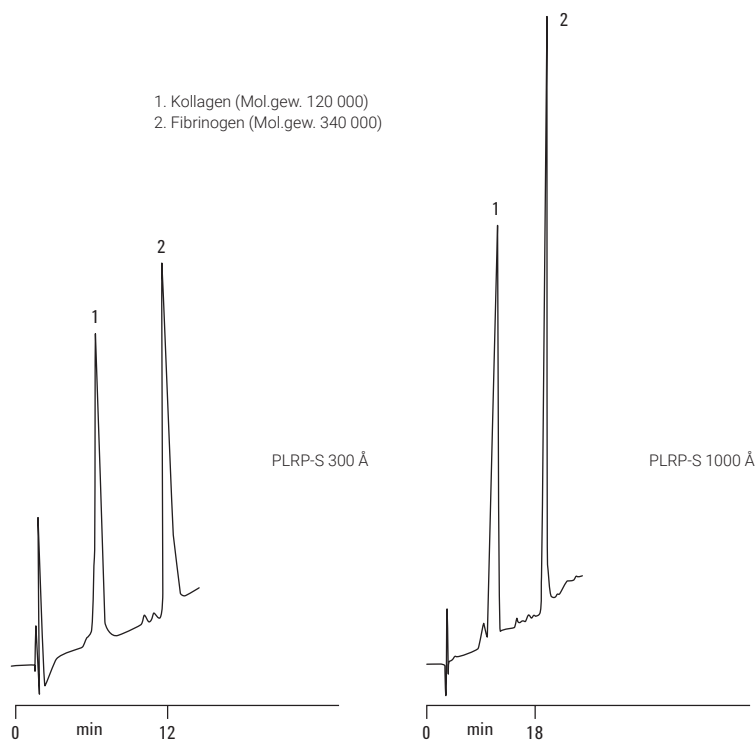
Mobile Phase: A: 0,25 % TFA in Wasser
B: 0,25 % TFA in 5 % Wasser:95 % ACN

Flussrate: 1,0 ml/min

Injektionsvolumen: 10 µl

Gradient: 20-60 % B in 15 min

Detektor: UV, 220 nm



PLRP-S HPLC-Säulen

Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	PLRP-S 100 Å USP L21	PLRP-S 300 Å USP L21	PLRP-S 1000 Å USP L21	PLRP-S 4000 Å USP L21
4,6 x 250	8	PL1512-5800	PL1512-5801	PL1512-5802	
4,6 x 150	8	PL1512-3800	PL1512-3801	PL1512-3802	PL1512-3803
4,6 x 50	8		PL1512-1801	PL1512-1802	PL1512-1803
4,6 x 250	5	PL1512-5500	PL1512-5501		
4,6 x 150	5	PL1111-3500	PL1512-3501		
4,6 x 50	5	PL1512-1500	PL1512-1501	PL1512-1502	PL1512-1503
4,6 x 150	3	PL1512-3300	PL1512-3301		
4,6 x 50	3	PL1512-1300	PL1512-1301		
2,1 x 250	8		PL1912-5801		
2,1 x 150	8		PL1912-3801	PL1912-3802	PL1912-3803
2,1 x 50	8		PL1912-1801	PL1912-1802	PL1912-1803
2,1 x 250	5	PL1912-5500	PL1912-5501		
2,1 x 150	5	PL1912-3500	PL1912-3501		
2,1 x 50	5	PL1912-1500	PL1912-1501	PL1912-1502	PL1912-1503
2,1 x 150	3	PL1912-3300	PL1912-3301		
2,1 x 50	3	PL1912-1300	PL1912-1301		
1,0 x 50	8			PL1312-1802	
1,0 x 50	5	PL1312-1500		PL1312-1502	
1,0 x 10	5			PL1C12-2502	
1,0 x 150	3	PL1312-3300			
1,0 x 50	3	PL1312-1300			
PLRP-S Vorsäulenkartuschen für 3,0 x 5,0 mm, 2 St.		PL1612-1801	PL1612-1801	PL1612-1801	PL1612-1801
Vorsäulenkartuschenhalter für 3,0 x 5,0 mm Kartuschen		PL1310-0016	PL1310-0016	PL1310-0016	PL1310-0016

Tipps und Werkzeuge

Bestellinformationen für Microbore-Säulen finden Sie auf **Seite 169**.

Bestellinformationen für PLRP-S-Säulen vom präparativen bis zum Prozessmaßstab und PLRP-S-Medien finden Sie auf **Seite 182**.

AdvanceBio Entsalzungs-RP

Umkehrphasen-Entsalzung zur Online-Entfernung von Salzionen vor der MS-Detektion

Affinitäts-, Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie sind häufig für die Analyse von Proteinen wie beispielsweise monoklonalen Antikörpern verwendete Techniken. Diese Techniken erfordern jedoch wässrige mobile Phasen, die nichtflüchtige Salze enthalten. Die nichtflüchtigen Salze stellen bei der MS-Detektion ein Problem dar, da sie Signalunterdrückung verursachen und den massenselektiven Detektor mit Salzablagerungen kontaminieren können, die zu erhöhtem Wartungsaufwand und längeren Ausfallzeiten des Geräts führen können. AdvanceBio Entsalzungs-RP-Kartuschen lösen dieses Problem, indem sie eine schnelle und effiziente Online-Entfernung der Salzionen vor der MS-Detektion ermöglichen. Sie können diese Kartuschen-Säulen für sich alleine mit jedem LC-System verwenden, um gesammelte Fraktionen zu entsalzen. Oder Sie können sie im 1290 Infinity II 2D-LC-System als zweite Dimension zur Entsalzung nach der Trennung in der ersten Dimension verwenden.



AdvanceBio Entsalzungs-RP,
Best.-Nr. PL1612-1102 und Kartuschenhalter,
Best.-Nr. 820999-901

AdvanceBio Entsalzungs-RP

Beschreibung	Best.-Nr.
AdvanceBio Entsalzungs-RP, 2,1 mm x 12,5 mm, 2 St.	PL1612-1102
Kartuschenhalter	820999-901

AdvanceBio Oligonucleotide

Zur erfolgreichen Trennung von entschützten Trityl-Off-Oligonukleotiden benötigen Sie Säulen mit hoher Trennleistung, die auch robust und bei schwierigen Bedingungen beständig sind.

Agilent AdvanceBio Oligonucleotide-Säulen sind mit hocheffizienten 2,7 µm Poroshell-Partikeln mit poröser Partikeloberfläche gepackt. Durch exklusive Technologie modifizieren wir bei Agilent die Partikel chemisch, um sie gegenüber mobilen Phasen mit hohem pH-Wert noch resistenter zu machen. Wir versehen sie auch mit einer C18-Phase mit Endcapping, die eine ausgezeichnete Selektivität für Oligonukleotide bietet. Darüber hinaus testen wir jede Charge der AdvanceBio Oligonucleotide-Medien mit einem Standard zur Prüfung der Auflösung, um eine konsistente Leistung zu gewährleisten.

Die AdvanceBio-Produktfamilie ist auf einheitliche, herausragende Leistung bei der lückenlosen Charakterisierung von Proteinen, Antikörpern, Konjugaten, neuen biologischen Komponenten und Biopharmazeutika abgestimmt.



Säulenspezifikationen

Gebundene Phase	Partikelgröße	Porengröße	Temp.-Grenze	pH-Bereich	mit Endcapping	Drucklimit
C18	2,7 µm	100 Å	65 °C	3,0-11,0	Doppelt	600 bar

**Säule: AdvanceBio Oligonucleotide-Säule
2,1 x 50 mm
(Best.-Nr. 659750-702)**

Mobile Phase: A: HFIP:TEA (400 mM:15 mM) in Wasser
B: MeOH:mobile Phase A (50:50)

Flussrate: 0,4 ml/min

Gradient: 30-40 % B in 0,5 min; 40-70 % B in 5 min

Probe: 25-mer DNA

Temperatur: 65 °C

Detektion: UV, 260 nm

Detektion: MS

Min. Bereich: 400 m/z

Max. Bereich: 1700 m/z

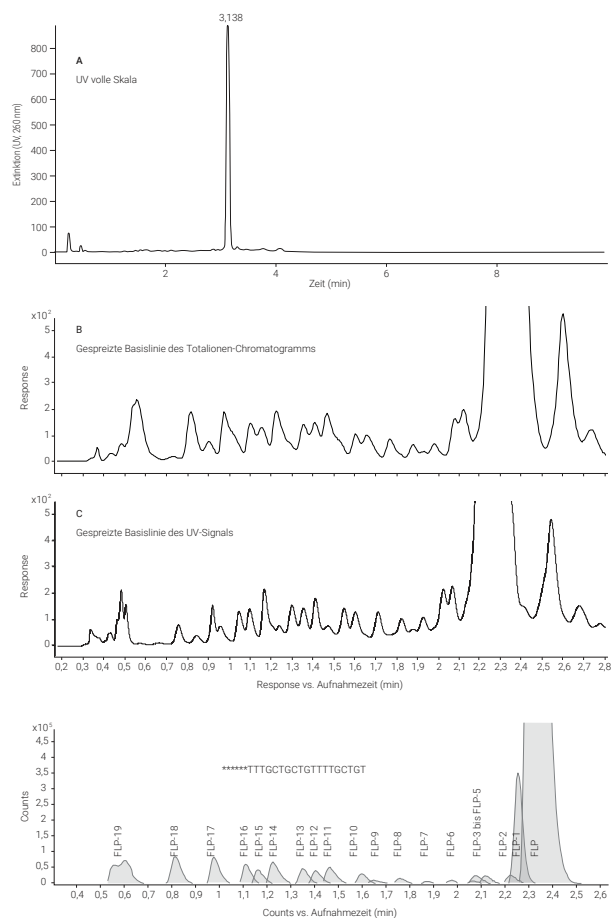
Scanrate: 3,00 Spektren/s

Ionenpolarität: negativ

VCap: 3500

Nozzle Voltage: 1000 V

Fragmentor: 200



Dekonvolvierte Daten des Totalionen-Chromatogramms einer Trennung eines DNA-Oligonukleotids mit 25 Einheiten mit einer AdvanceBio Oligonucleotide-Säule

AdvanceBio Oligonucleotide-Säulen

Beschreibung	ID (mm)	Länge (mm)	Partikelgröße (µm)	Best.-Nr.
Herkömmlich	2,1	150	2,7	653750-702
Herkömmlich	2,1	100	2,7	655750-702
Herkömmlich	2,1	50	2,7	659750-702
UG-Vorsäule, 600 bar	2,1	5	2,7	821725-921
Herkömmlich	4,6	150	2,7	653950-702
Herkömmlich	4,6	100	2,7	655950-702
Herkömmlich	4,6	50	2,7	659950-702
UG-Vorsäule, 600 bar	4,6	5	2,7	820750-921

AdvanceBio Oligonukleotid-Standards

Um die Leistungsfähigkeit für Ihre Trennungen sicherzustellen, wird jede Charge des AdvanceBio Oligonucleotide-Materials mit dem Oligonukleotid Resolution Standard von Agilent getestet. Der Oligonukleotid Resolution Standard, der synthetische Oligonukleotide aus 14, 17, 20 und 21 Nukleotideinheiten enthält, zeigt die Auflösung der Peaks für N und N-1.

Säule: AdvanceBio Oligonucleotide-Säule
2,1 x 50 mm
(Best.-Nr. 659750-702)

Flussrate: 0,6 ml/min

Probe: Agilent Oligonukleotide Resolution Standard
(Best.-Nr. 5190-9028)

Mobile Phase: A: 100 mM TEAA in Wasser
B: 100 mM TEAA in Acetonitril

Temperatur: 65 °C

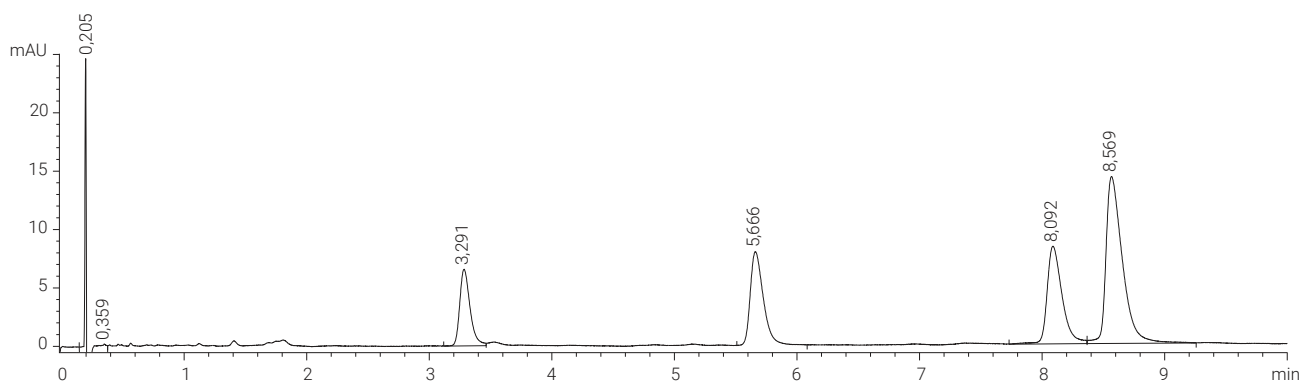
Gradient: 6 bis 8 % B in 12 min

Injektion: 0,5 µl

Stoppzeit: 13 min

Detektion: UV, 260 nm

Nachlaufzeit: 5 min



Agilent bietet außerdem einen Oligonukleotid-Ladder-Standard an, der synthetische Oligodesoxythymidine mit 15, 20, 25, 30, 35 und 40 Einheiten enthält. Dies ist ein ausgezeichneter Standard, mit dem die Selektivität und Reproduzierbarkeit von Säulen gezeigt werden kann.

Säule: AdvanceBio Oligonucleotide-Säule
2,1 x 50 mm
(Best.-Nr. 659750-702)

Flussrate: 0,6 ml/min

Säulen-
temperatur: 65 °C

Mobile Phase: A: 100 mM TEAA in Wasser
B: 100 mM TEAA in Acetonitril

Probe: Agilent Oligonukleotid-Ladder-Standard
(Best.-Nr. 5190-9029)

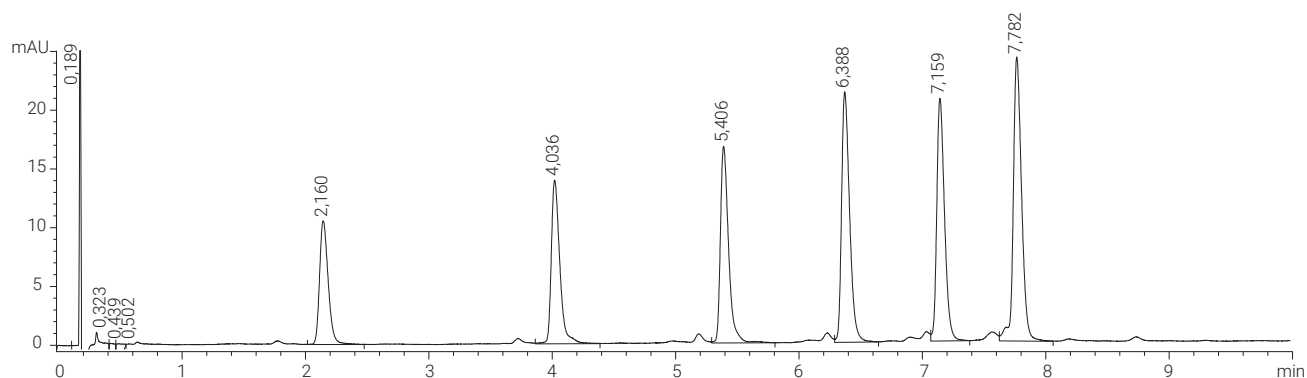
Gradient: 10 bis 14 % B in 10 min

Injektion: 10 µl

Stoppzeit: 11 min

Detektion: UV, 260 nm

Nachlaufzeit: 5 min

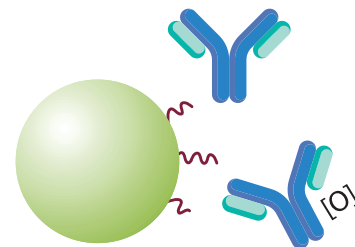


AdvanceBio Oligonukleotid-Standards

Beschreibung	Best.-Nr.
Oligonukleotid Resolution Standard	5190-9028
Oligonukleotid-Ladder-Standard	5190-9029

Analyse intakter Formen mittels hydrophober Interaktionschromatographie

AdvanceBio HIC



AdvanceBio HIC-Säulen bieten robuste und reproduzierbare Trennungen nativer Proteine im intakten Zustand mit hoher Auflösung.

Auf der Grundlage der Eigenschaften der voll porösen ZORBAX-Partikel und einer proprietären Bindungstechnologie bieten diese Säulen ein neues Maß an Hydrophobie und einen vielseitigen Phasentyp für die Trennung besonders schwieriger Moleküle wie beispielsweise monoklonaler Antikörper (mAb), Antikörper-Arzneimittel-Konjugate (ADC) und anderer rekombinanter Proteine.

Zusammen mit dem 1260 Infinity II bioinerten LC-System bieten die AdvanceBio HIC-Säulen eine kompromisslose Leistung und Datenkonsistenz für Charakterisierung und Validierung.

- Optimierte Selektivität: ideal für mAb-Oxidationsvarianten und DAR-Verhältnisse von ADC.
- Ein Phasentyp: verringert die Notwendigkeit für verschiedene kritische Qualitätsmerkmale mehrere Säulen zu testen.
- Verbesserte Robustheit: längere Lebensdauer der Säule für Daten von höchster Zuverlässigkeit.
- Bewährte Leistung: jede Mediencharge wird mit dem NIST-mAb getestet.
- Hohe Qualität: jede Säule wird individuell getestet, um die effiziente Packung zu gewährleisten.
- Größere Produktivität: kürzere Säulen reduzieren die Analysendauer bei gleicher Trennleistung.

Säulenspezifikationen

Porengröße	Partikelgröße	Temperaturgrenze	pH-Bereich	Drucklimit	Flussrate*
450 Å	3,5 µm	60 °C (bei pH 7)	2,0-8,0 (bei 35 °C)	400 bar (typischer Betriebsdruck < 200 bar)	0,5-1,0 ml/min (ID: 4,6 mm)

*In einigen Fällen kann die Reduzierung der Flussrate auf 0,3 ml/min und die Verlängerung der Gradientendauer die Auflösung noch weiter verbessern.

Säule: **AdvanceBio HIC**
4,6 x 100 mm, 3,5 µm

Lösemittel A: 2 M Ammoniumsulfat,
50 mM Natriumphosphat, pH 7,0

Lösemittel B: 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0

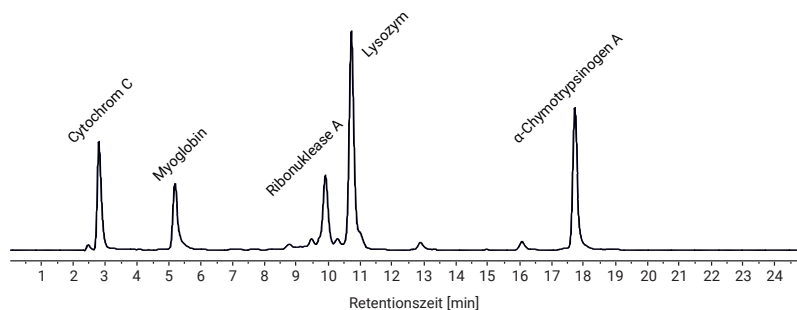
Gradient:	Zeit (min)	% A	% B
	0	100	0
	20	0	100
	25	0	100
	30	100	0
	40	100	0

Flussrate: 0,5 ml/min

Temperatur: 30 °C

Injektionsvolumen: 5 µl

Detektion: UV, 220 nm



Säule: **AdvanceBio HIC**
4,6 x 100 mm, 3,5 µm

Lösemittel A: 2 M Ammoniumsulfat,
50 mM Natriumphosphat, pH 7,0

Lösemittel B: 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0

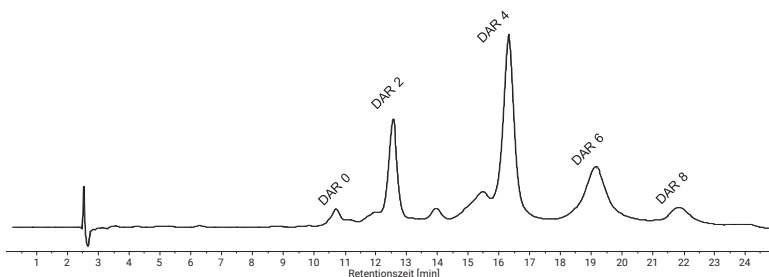
Gradient:	Zeit (min)	% A	% B	% C
	0	50	45	5
	20	0	75	25
	25	0	75	25
	30	50	45	5
	40	50	45	5

Flussrate: 0,5 ml/min

Temperatur: 30 °C

Injektionsvolumen: 5 µl

Detektion: UV, 220 nm



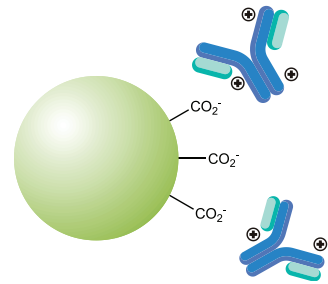
Agilent AdvanceBio HIC-Säulen

Beschreibung	Best.-Nr.
AdvanceBio HIC, 4,6 x 100 mm, 450 Å, 3,5 µm	685975-908
AdvanceBio HIC, 4,6 x 30 mm, 450 Å, 3,5 µm	681975-908

Analyse der Ladungsvarianten

Aufreinigung von Proteinen und anderen geladenen Molekülen

Die Ionenaustauschchromatographie (IEX) ist eine hoch empfindliche Technik, die eine Trennung von Ionen und polaren Molekülen nach ihrer Ladung ermöglicht. Wie die Größenausschlusschromatographie kann die Ionenaustauschchromatographie dazu verwendet werden, Proteine in ihrem nativen Zustand zu trennen.



Anwendung der Ionenaustauschchromatographie auf die Analyse der Ladungsvarianten

Während der Produktion und Aufreinigung können Antikörper als Folge von Aminosäuresubstitutionen, Glykosylierung, Phosphorylierung und anderen posttranslationalen oder chemischen Modifikationen Veränderungen der Ladungsheterogenität aufweisen. Diese Veränderungen können die Stabilität und die Aktivität beeinflussen oder immunologische Nebenwirkungen verursachen. Daher ist die Analyse der Ladungsheterogenität in monoklonalen Antikörperpräparaten für die Herstellung von Biopharmazeutika ein wichtiger Analyseschritt.

Bei der Proteinanalyse weisen Ladungsvarianten bei einem gegebenen pH-Wert auf Veränderungen der Primärstruktur hin, die zusätzliche Formen des fraglichen Proteins ergeben. Diese werden als Isoformen (oder Ladungsvarianten) bezeichnet und können mithilfe der IEX-Chromatographie getrennt werden. Die Ionenaustauschchromatographie ist auch als präparative Technik sehr nützlich.

Diese Veränderungen können die Stabilität und die Aktivität beeinflussen oder immunologische Nebenwirkungen verursachen. Daher ist die Charakterisierung von Ladungsvarianten für Biopharmazeutika ein wichtiger Analyseschritt.

Als führender Anbieter für die biopharmazeutische Industrie ist sich Agilent bewusst, dass Qualität und Konsistenz entscheidende Voraussetzungen für die Herstellung sicherer und hochwirksamer Arzneimittel sind. Agilent BioHPLC Ionenaustausch-Säulen bieten die Trenngeschwindigkeit, Auflösung und Reproduzierbarkeit, die erforderlich sind, um schnell und kostengünstig Produkte auf den Markt zu bringen, die das Leben vieler Menschen zum Positiven verändern können.

Die folgenden Seiten beschreiben die Produktfamilien der schwachen und starken, anionischen und kationischen Ionenaustauscher von Agilent.

- Für Trennungen mit hoher Auflösung, Effizienz und Wiederfindung wurden nicht poröse Bio IEX-Säulen entwickelt.
- Bio MAb-Säulen sind für die Trennung von Isoformen monoklonaler Antikörper optimiert.
- Poröse IEX-Säulen (PL-SAX und PL-SCX) sind chemisch beständig und in zwei Porengrößen erhältlich. Sie ermöglichen die Trennung von Peptiden, Oligonukleotiden und sehr großen Proteinen.
- Bio-Monolith IEX-Säulen sind hervorragend geeignet für die Trennung von Antikörpern, Viren und DNA.
- Die Software Buffer Advisor ist die ideale Lösung für automatisierte Proteintrennungen durch Ionenstärke-Gradienten.

Tipps und Werkzeuge



Weitere Informationen über die Software Agilent Buffer Advisor finden Sie in der Publikation **5991-1408EN**

www.agilent.com/search

Ionenaustausch-Säulenauswahl		
Applikation	Agilent Säulen	Hinweise
Monoklonale Antikörper	Bio MAb	Genaue Charakterisierung monoklonaler Antikörper einschließlich Identifizierung und Überwachung saurer und basischer Isoformen. Bio MAb HPLC-Säulen sind mit einem Harz gepackt, das speziell für Trennungen mit hoher Auflösung von monoklonalen Antikörpern aufgrund ihrer Ladung entwickelt wurde.
Peptide und Proteine	Bio IEX	Bio IEX-Säulen sind mit nicht porösen Ionenaustausch-Polymerpartikeln gepackt. Die Bio IEX-Säulen wurden für Trennungen mit hoher Auflösung, Wiederfindung und Effizienz entwickelt.
Proteine, Peptide und entschlützte synthetische Oligonukleotide	PL-SAX	Die starke Anionenaustauscher-Funktion, kovalent an ein voll poröses, chemisch beständiges Polymer gebunden, erweitert den pH-Arbeitsbereich. Außerdem ist die Anionenaustauschkapazität vom pH-Wert unabhängig. Alle Säulen sind für die Trennung synthetischer Oligonukleotide unter denaturierenden Bedingungen von Temperatur, organischem Lösemittel und hohem pH-Wert geeignet. Die 5-µm-Partikel liefern Trennungen mit hoher Auflösung, während die 30-µm-Partikel für Flüssigkeitschromatographie bei mittleren Drücken verwendet werden.
	• 1000 Å • 4000 Å	
Globuläre Proteine und Peptide	PL-SAX 1000 Å	
Sehr große Biomoleküle/hohe Geschwindigkeit	PL-SAX 4000 Å	
Kleine Peptide bis große Proteine und sehr große Biomoleküle	PL-SCX	PL-SCX ist eine makroporöse PS/DVB-Matrix mit einer stark hydrophilen Beschichtung und einer starken Kationenaustauscher-Funktion. Der Herstellungsprozess wird so gesteuert, dass Partikel mit optimaler Dichte an starken Kationenaustauscher-Gruppen für die Analyse, Trennung und Aufreinigung einer großen Bandbreite an Biomolekülen entstehen. Die 5-µm-Partikel liefern Trennungen mit höherer Auflösung, während die 30-µm-Partikel für Flüssigkeitschromatographie bei mittleren Drücken verwendet werden.
	• 1000 Å • 4000 Å	
Antikörper (IgG, IgM), Plasmid-DNA, Viren, Phagen und andere Makro-Biomoleküle	Bio-Monolith	Starke Kationenaustausch-Phasen, starke und schwache Anionenaustausch-Phasen. Bio-Monolith HPLC-Säulen sind mit den InfinityLab LC-Serien kompatibel.
	• Bio-Monolith QA • Bio-Monolith DEAE • Bio-Monolith SO ₃	
Viren, DNA, große Proteine	Bio-Monolith QA	
Plasmid-DNA, Bakteriophagen	Bio-Monolith DEAE	
Proteine Antikörper	Bio-Monolith SO ₃	

Bio MAb HPLC-Säulen

- Packungsmaterial aus starren, sphärischen, stark vernetzten und nicht porösen Polystyrol-Divinylbenzol (PS-DVB)-Beads
- Partikel, auf die eine hydrophile Polymerschicht aufgepfropft wurde, wodurch nahezu alle unspezifischen Bindungen von Antikörper-Proteinen verhindert werden
- Für die Beschichtung der Partikel mit der schwachen Kationenaustauscher-Phase wird ein anderer Prozess verwendet, was eine höhere Dichte als bei den Bio WCX-Säulenpartikeln ermöglicht
- Speziell entwickelt für die Trennung von Isoformen (Ladungsvarianten) monoklonaler Antikörper

Genaue Charakterisierung monoklonaler Antikörper einschließlich Identifizierung und Überwachung saurer und basischer Isoformen. Bio MAb HPLC-Säulen sind mit einem Harz gepackt, das speziell für Trennungen mit hoher Auflösung von monoklonalen Antikörpern aufgrund ihrer Ladung entwickelt wurde. Diese Säulen sind mit wässrigen Pufferlösungen, Acetonitril/Aceton/Methanol- und Wasser-Mischungen kompatibel. Häufig verwendete Puffer sind Phosphat, TRIS, MES und Acetat.

Bio MAb-Säulen sind mit Partikeln der Größen 1,7, 3, 5 und 10 µm erhältlich, wobei kleinere Partikel eine höhere Auflösung liefern.

Säulenspezifikationen

Gebundene Phase	ID	Partikelgröße	pH-Stabilität	Betriebstemperaturgrenze	Flussrate
Schwacher Kationenaustauscher (Carboxylat)	2,1 und 4,6 mm	1,7, 3, 5 und 10 µm	2-12	80 °C	0,1-1,0 ml/min

Tipps und Werkzeuge

Wollen Sie Ihren Durchsatz bei der Analyse der Ladungsvarianten monoklonaler Antikörper erhöhen? Dann sehen Sie sich folgende Publikation an:

Reducing Cycle Time for Charge Variant Analysis of Monoclonal Antibodies
(Publikation **5991-4722EN**)

www.agilent.com/search



Konsistente Ionenaustausch-Trennungen monoklonaler Antikörper

Säule: Bio MAb, PEEK
5190-2407
4,6 x 250 mm, 5 µm

Mobile Phase: A: 10 mM Natriumphosphat, pH 5,5
B: A + 0,5 M Natriumchlorid

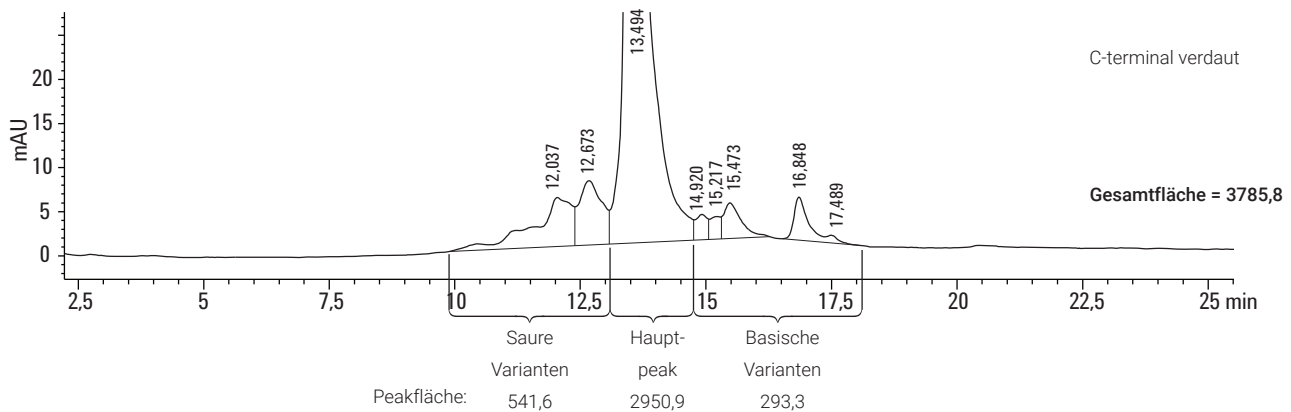
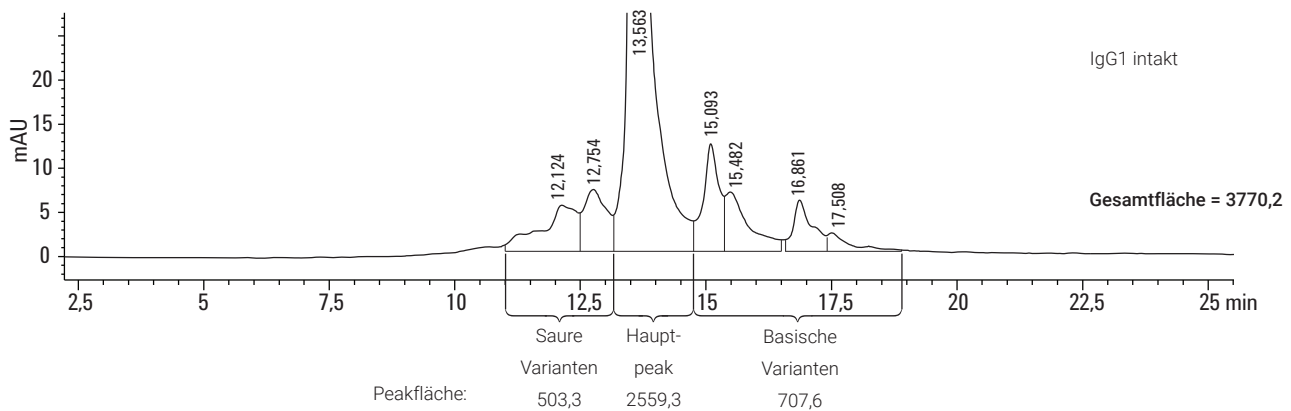
Flussrate: 0,85 ml/min

Gradient: 10 bis 35 % B von 0 bis 25 min
(wenn nicht anders angegeben)

Detektor: UV, 225 nm

Probe: 5 µg einer 1 mg/ml-Lösung von intaktem oder
C-terminal verdautem IgG1

Gerät: 1260 Infinity bioinerte quaternäre LC oder
LC der Serie 1100



Analyse eines C-terminal verdauten IgG1-Antikörpers mithilfe einer Bio MAb 5 µm Säule auf dem 1260 Infinity bioinerten quaternären LC-System.

Reproduzierbarkeit und Genauigkeit – Bio MAb-Säulen erlauben präzise Quantifizierung mithilfe robuster Methoden

Säule: Bio MAb, PEEK
5190-2407
4,6 x 50 mm, 5 µm

Mobile Phase: A: 10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 6,0
B: 10 mM Natriumhydrogencarbonatpuffer, pH 9,5

Flussrate: 1,0 ml/min

Injektionsvolumen: 10 µl (Nadelspülung, Spülanschluss 7 s lang aktiv)

Gradient:

Zeit (min)	% B
0	0
25	100
27	100
30	0

Datenakquisition: 214 und 280 nm

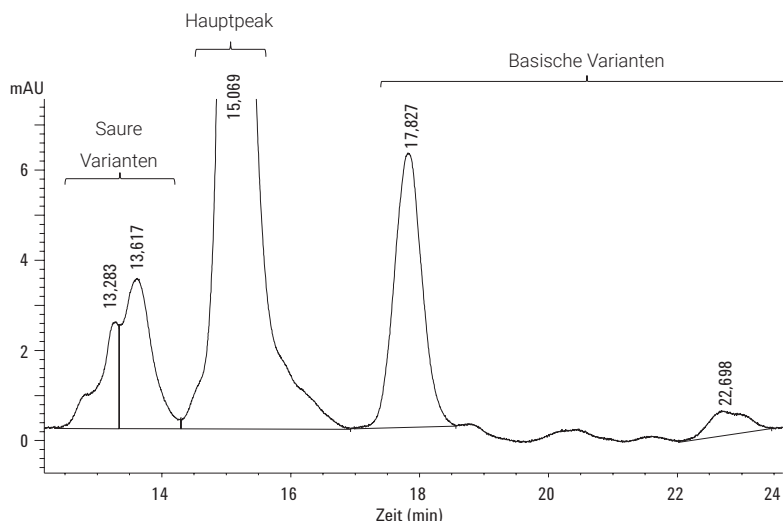
Akquisitionsrate: 20 Hz

Durchflusszelle: 60 mm Schichtdicke

Säulentemperatur: 30 °C

Probenthermostat: 50 °C

Nachlaufzeit: 5 min



WCX-Trennung von Fab- und Fc-Fragmenten von Trastuzumab

Säule: Bio MAb, PEEK
5190-2411
2,1 x 250 mm, 5 µm

Mobile Phase: A: 20 mM MES, pH 5,6
B: 20 mM MES, pH 5,6 + 300 mM NaCl

Flussrate: 170 µl/min

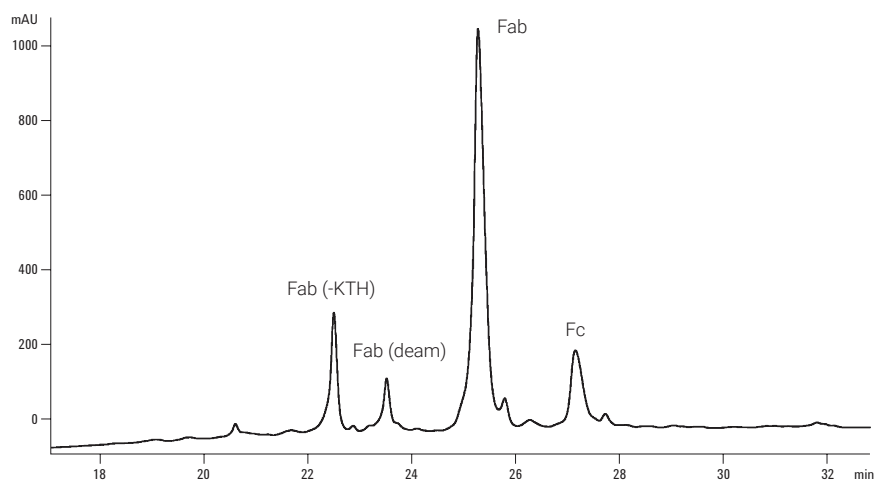
Injektionsvolumen: 16 µl

Gradient:

Zeit (min)	% B
0	0
39,5	80
40	100
50	100
50,5	2
60	2

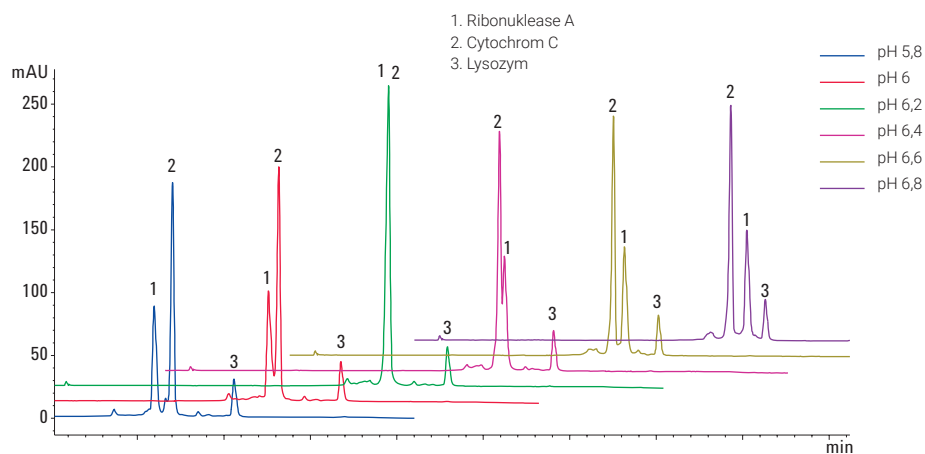
Temperatur: 30 °C

Gerät: Serie 1100



Methodenentwicklung mit der Software Buffer Advisor – Bestimmung des optimalen pH-Werts

Säule:	Bio MAb, PEEK 5190-2407 4,6 x 250 mm, 5 µm		
Gerät:	1260 Infinity bioinerte quaternäre LC	Gradient:	0 min – 20 mM NaCl 5 min – 20 mM NaCl 30 min – 500 mM NaCl 35 min – 1000 mM NaCl 36 min – 20 mM NaCl
Puffer:	A: H ₂ O B: 3 M NaCl C: 60 mM MES (2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure-Monohydrat) D: 35 mM MES-Na (2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure-Natriumsalz)	Injektionsvolumen:	10 µl
Probe:	Mischung aus drei Proteinen, aufgelöst in PBS (phosphatgepufferte Salzlösung), pH 7,4 Ribonuklease A: 13 700 Da, pI 9,6 Cytochrom C: 12 384 Da, pI 10-10,5 Lysozym: 14 307 Da, pI 11,35	Thermostat:	4 °C
Flussrate:	1 ml/min	TCC-Temperatur:	25 °C
		DAD:	280 nm/4 nm
		Referenz:	AUS
		Peakbreite:	> 0,05 min (1,0 s Response-Zeit)(5 Hz)



Bestimmung des optimalen pH-Werts für die Trennung einer Proteinmischung mit drei Proteinen mithilfe dynamisch gemischter quaternärer Gradienten

Nahezu keine Abweichungen bei Retentionszeiten

Säule: Bio MAb, Edelstahl
5190-2413
4,6 x 250 mm, 10 µm

Mobile Phase: A: 10 mM Natriumphosphat, pH 6,0
 B: A + 1,0 M Natriumchlorid

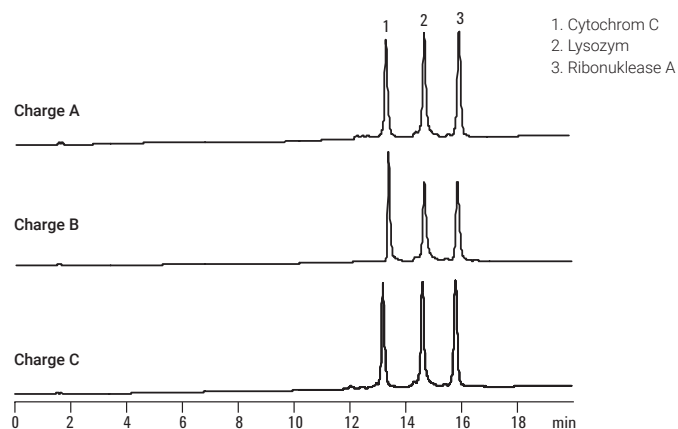
Flussrate: 1,0 ml/min

Gradient: 0-100 % B in 42 min

Temperatur: 25 °C

Detektor: UV, 214 nm

Die Kombination der gut gesteuerten Harzherstellung mit der Oberflächenbehandlung des Säulenmaterials und der Packung der Säule schaltet Abweichungen bei Retentionszeiten von Säule zu Säule und von Charge zu Charge nahezu aus.



Agilent Bio MAb HPLC-Säulen

Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	Bio MAb PEEK	Drucklimit	Bio MAb Edelstahl	Drucklimit
21,2 x 250	5			5190-6885	275 bar, 4000 psi
10 x 250	5			5190-6884	275 bar, 4000 psi
4,6 x 250	10	5190-2415	275 bar, 4000 psi	5190-2413	275 bar, 4000 psi
4,6 x 50	10	5190-2416	275 bar, 4000 psi		
4,6 x 250	5	5190-2407	400 bar, 5800 psi	5190-2405	400 bar, 5800 psi
4,6 x 50	5	5190-2408	400 bar, 5800 psi		
4,6 x 50	3			5190-2403	551 bar, 8000 psi
4,6 x 50	1,7			5190-2401	600 bar, 8700 psi
4,0 X 10, Vorsäule	10			5190-2414	275 bar, 4000 psi
4,0 X 10, Vorsäule	5			5190-2406	413 bar, 6000 psi
4,0 X 10, Vorsäule	3			5190-2404	551 bar, 8000 psi
4,0 X 10, Vorsäule	1,7			5190-2402	600 bar, 8700 psi
2,1 x 250	10	5190-2419	275 bar, 4000 psi		
2,1 x 50	10	5190-2420	275 bar, 4000 psi		
2,1 x 250	5	5190-2411	400 bar, 5800 psi		
2,1 x 50	5	5190-2412	400 bar, 5800 psi		

Bio IEX HPLC-Säulen

- Auf stark vernetzte und starre, nicht poröse Poly-(Styrol-Divinylbenzol)(PS-DVB)-Partikel ist eine hydrophile Polymerschicht aufgepfropft, wodurch unspezifische Bindungen unmöglich werden
- An die hydrophile Schicht sind die funktionellen Gruppen der Ionenaustausch-Funktion einheitlich und dicht chemisch gebunden (mehrere Ionenaustauscher-Gruppen pro Anker), um die Säulenkapazität zu erhöhen
- Partikel, Beschichtung und Bindung sind resistent gegenüber hohen Drücken und ermöglichen eine höhere Auflösung und eine schnellere Trennung
- Mehrere Ionenaustauscher-Gruppen sind an einen Anker gebunden, um die Kapazität zu erhöhen



Bio IEX HPLC-Säulen sind mit nicht porösen Ionenaustausch-Partikeln auf Polymerbasis gepackt und für Trennungen von Peptiden, Oligonukleotiden und Proteinen mit hoher Auflösung, Wiederfindung und Effizienz entwickelt.

Die Bio IEX-Produktfamilie umfasst starke Kationenaustauscher (SCX), schwache Kationenaustauscher (WCX), starke Anionenaustauscher (SAX) und schwache Anionenaustauscher (WAX). Alle Phasen sind als nicht poröse Partikel in den Größen 1,7, 3, 5 und 10 µm erhältlich.

Säulenspezifikationen

Gebundene Phase	ID	Partikelgröße	pH-Stabilität	Betriebstemperaturgrenze	Flussrate
SCX (starker Kationenaustauscher) –SO ₃ H	2,1 und 4,6 mm	1,7, 3, 5 und 10 µm	2-12	80 °C	0,1-1,0 ml/min
WCX (schwacher Kationenaustauscher) –COOH					
SAX (starker Anionenaustauscher) –N ⁺ (CH ₃) ₃					
WAX (schwacher Anionenaustauscher) – N(C ₂ H ₅) ₂					

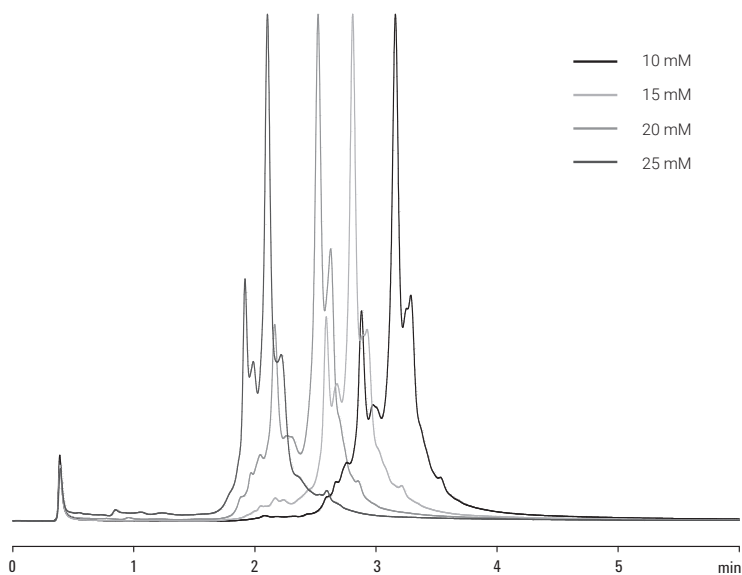
Tipps und Werkzeuge

Weitere Informationen zur Optimierung der Analyse von Ladungsvarianten finden Sie in: *Ion-exchange chromatography for biomolecule analysis: a "how-to" guide* (Publikation **5991-3775EN**) und in *Agilent BioHPLC Ionenaustausch-Säulen, Schnelle und zuverlässige Charakterisierung der Ladungsvarianten von Proteinen* (Publikation **5991-2449DEE**)

www.agilent.com/search

Verkürzter und vereinfachter Arbeitsablauf für Ladungsvarianten

Säule:	Bio WCX, Edelstahl 5190-2443 4,6 x 50 mm, 3 µm	Injektionsvolumen:	10 µl
	Bio SCX, Edelstahl 5190-2423 4,6 x 50 mm, 3 µm	Gradient:	Bedingungen für die gezeigten Chromatogramme: pH 5,0 bis 7,0, 10 bis 25 mM Pufferstärke Natriumchlorid (NaCl) 0 bis 500 mM, 0 bis 15 min Natriumchlorid (NaCl) 500 mM, 15 bis 20 min DOE-Experimente pH 5,0 bis 7,0 0 bis 200 mM, 0 bis 250 mM und 0 bis 300 mM NaCl
Mobile Phase:	A: Wasser	Temperatur:	Umgebungstemperatur
	B: 1,5 M Natriumchlorid	Detektor:	UV, 220 nm
	C: 40 mM Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Probe:	Monoklonaler IgG-Antikörper
	D: 40 mM Dinatriumhydrogenphosphat	Probenkonz.:	2 mg/ml (in 20 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 6,0)
	Durch Mischen der von der Software Buffer Advisor errechneten Anteile an C und D wurden Pufferlösungen mit dem gewünschten pH-Bereich und der vorgesehenen Stärke hergestellt.	Gerät:	1260 Infinity bioinerte quaternäre LC
Flussrate:	1,0 ml/min		



Automatisierte Methodenentwicklung für die optimierte Trennung von Ladungsvarianten.
Optimierung der Pufferstärke bei pH 6,5 anhand der Screening-Chromatogramme der
Trennung eines monoklonalen Antikörpers.

Kürzere Analysendauer durch kleinere Partikel und kürzere Säulen – beschleunigen Sie Ihre Trennung um 30 %

Säule: Bio WCX, Edelstahl
5190-2445
4,6 x 250 mm, 5 µm

Bio WCX, Edelstahl
5190-2443
4,6 x 50 mm, 3 µm

Mobile Phase: A: 20 mM Natriumphosphat, pH 6,5
B: A + 1,6 M Natriumchlorid

Flussrate: 1,0 ml/min

Injektionsvolumen: 10 µl

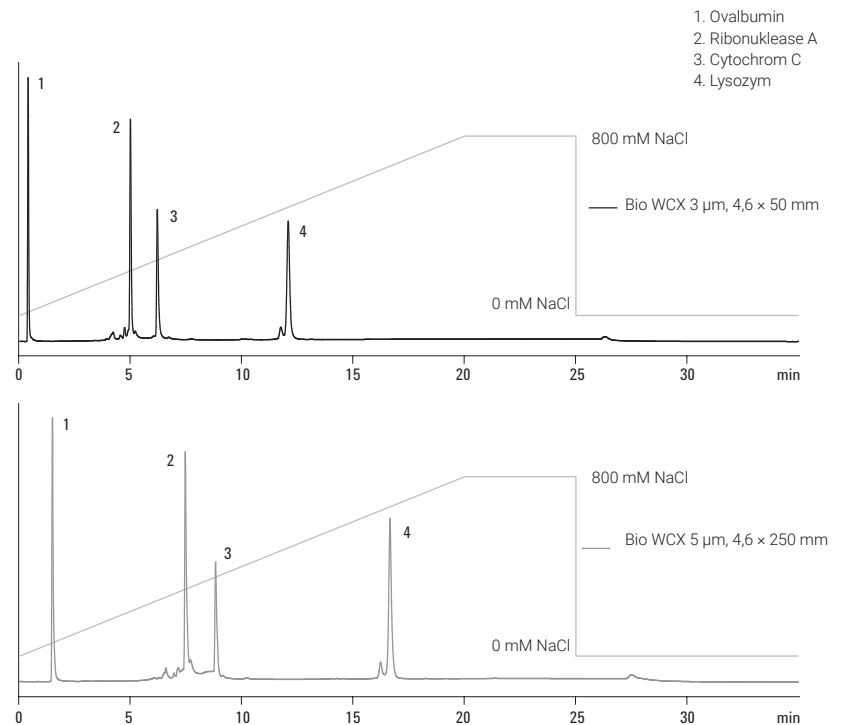
Gradient: 0 bis 50 % B

Temperatur: Umgebungstemperatur

Detektor: UV, 220 nm

Probenkonz.: 0,5 mg/ml

Gerät: 1260 Infinity bioinerte quaternäre LC



Proteintrennung auf einer Bio WCX 4,6 x 50 mm 3 µm Säule im Vergleich zu einer Bio WCX 4,6 x 250 mm 5 µm Säule (Flussrate 1,0 ml/min). Durch eine geringere Partikelgröße und eine kürzere Säule wurde eine kürzere Analysendauer erreicht. Die Proben eluierten von der längeren Säule in 17 min, von der kürzeren Säule dagegen in nur 12 min.

Geringere Partikelgrößen ergeben eine bessere Auflösung

Säule: Bio WCX, Edelstahl
5190-2443
4,6 x 50 mm, 3 µm
Bio WCX, Edelstahl
5190-2441
4,6 x 50 mm, 1,7 µm

Mobile Phase: A: 20 mM Natriumphosphat, pH 6,5
B: A + 1,6 M Natriumchlorid

Injektionsvolumen: 10 µl

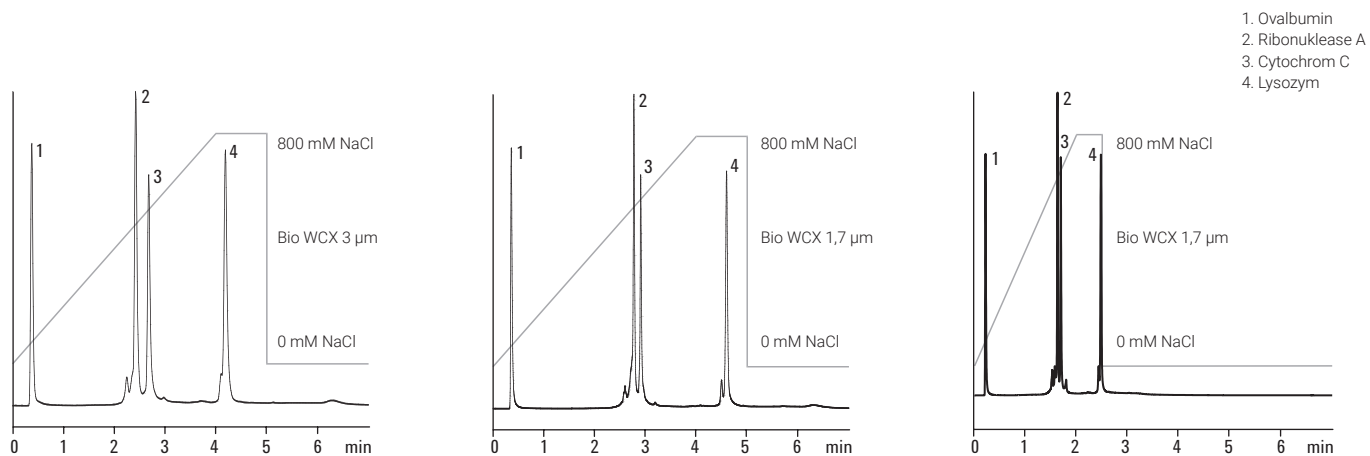
Gradient: 0 bis 50 % B

Temperatur: Umgebungstemperatur

Detektor: UV, 220 nm

Probenkonz.: 0,5 mg/ml

Gerät: 1260 Infinity bioinerte quaternäre LC



Links und Mitte: Proteintrennung auf einer Bio WCX 3 µm Säule im Vergleich zu einer Bio WCX 1,7 µm Säule (Flussrate 1,0 ml/min).

Rechts: Durch Erhöhung der Flussrate auf 1,7 ml/min reduzierte sich die Trennzeit auf weniger als 3 Minuten. (Es wurde eine Bio WCX-Säule verwendet.)

Verkürzung der Analysendauer – ohne Einbußen bei der Peakform und der Auflösung – durch Erhöhung der Flussrate.

Proteinanalyse auf Anionenaustauschsäulen mit dem Agilent 1260 Infinity bioinerten quaternären LC-System

Säule:	Bio WAX, PEEK 5190-2487 4,6 x 250 mm, 5 µm
Puffer:	A: 20 mM TRIS, pH-Wert 7,6 B: 20 mM TRIS, pH 7,6 + 2 M NaCl, 1 M KCl, 1 M CH ₃ COONa, 1 M [(CH ₃) ₄ N]Cl
Gradient 1 M:	5 min-100 % A 20 min-70 % B 25 min-100 % B
Gradient 2 M:	5 min-100 % A 20 min-35 % B 25 min-50 % B 25,01 min-100 % B
Stoppzeit:	30 min
Nachlaufzeit:	20 min
Temperatur:	25 °C
Flussrate:	0,5 ml/min
Injektionsvolumen:	5 µl
DAD:	280 nm
Peakbreite:	0,025 min (0,5 s Response-Zeit) (10 Hz)

Weitere Informationen finden Sie in der
Application Note
5990-9614EN (www.agilent.com/search)

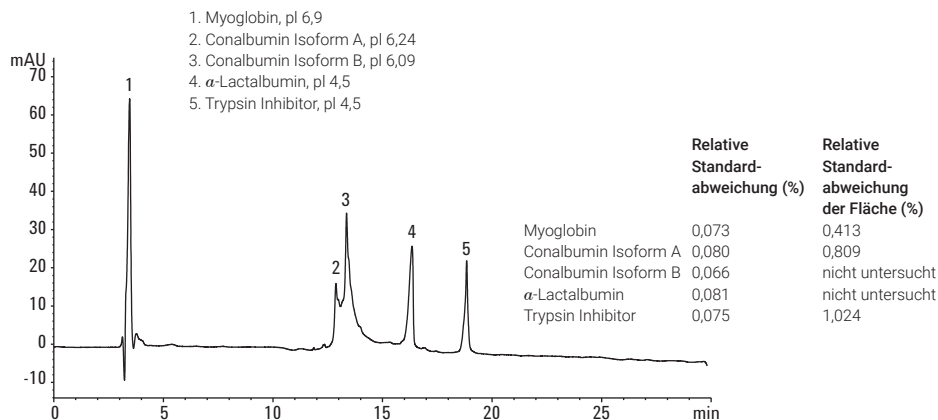


Abbildung 1: Proteintrennung durch AEX durch einen linearen Gradienten unter Verwendung von 2 M NaCl als Elutionssalz.

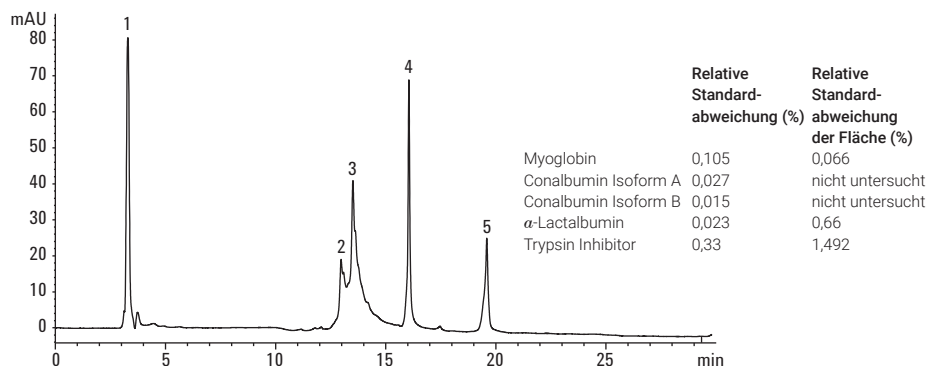


Abbildung 2: Proteintrennung durch AEX durch einen linearen Gradienten unter Verwendung von 1 M KCl als Elutionssalz.

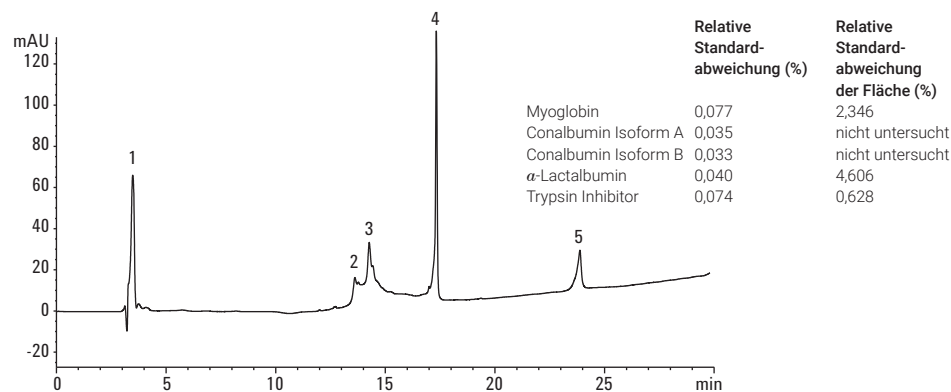


Abbildung 3: Proteintrennung durch AEX durch einen linearen Gradienten unter Verwendung von 1 M [(CH₃)₄N]Cl als Elutionssalz.

Bio IEX HPLC-Säulen, PEEK

Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	Drucklimit	Bio SCX Best.-Nr.	Bio WCX Best.-Nr.	Bio SAX Best.-Nr.	Bio WAX Best.-Nr.
4,6 x 250	10	275 bar, 4000 psi	5190-2435	5190-2455	5190-2475	5190-2495
4,6 x 50	10	275 bar, 4000 psi	5190-2436	5190-2456	5190-2476	5190-2496
4,6 x 250	5	400 bar, 5800 psi	5190-2427	5190-2447	5190-2467	5190-2487
4,6 x 50	5	400 bar, 5800 psi	5190-2428	5190-2448	5190-2468	5190-2488
2,1 x 250	10	275 bar, 4000 psi	5190-2439	5190-2459	5190-2479	5190-2499
2,1 x 50	10	275 bar, 4000 psi	5190-2440	5190-2460	5190-2480	5190-2500
2,1 x 250	5	400 bar, 5800 psi	5190-2431	5190-2451	5190-2471	5190-2491
2,1 x 50	5	400 bar, 5800 psi	5190-2432	5190-2442	5190-2462	5190-2492

Tipps und Werkzeuge

Verwenden Sie Lösemittelfilter von Agilent, um Partikel aus selbst hergestellten Puffern und mobilen Phasen zu entfernen.

Besuchen Sie: www.agilent.com/chem/solvent-filters-degassers

Bio IEX HPLC-Säulen, Edelstahl

Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	Drucklimit	Bio SCX Best.-Nr.	Bio WCX Best.-Nr.	Bio SAX Best.-Nr.	Bio WAX Best.-Nr.
21,2 x 250	5		5190-6879	5190-6881	5190-6883	5190-6877
10 x 250	5		5190-6878	5190-6880	5190-6882	5190-6876
4,6 x 250	10	275 bar, 4000 psi	5190-2433	5190-2453	5190-2473	5190-2493
4,6 x 250	5	413 bar, 6000 psi	5190-2425	5190-2445	5190-2465	5190-2485
4,6 x 150	3					5190-6875
4,6 x 50	3	551 bar, 8000 psi	5190-2423	5190-2443	5190-2463	5190-2483
4,6 x 50	1,7	600 bar, 8700 psi	5190-2421	5190-2441	5190-2461	5190-2481
4,0 x 10, Vorsäule	10	275 bar, 4000 psi	5190-2434	5190-2454	5190-2474	5190-2494
4,0 x 10, Vorsäule	5	413 bar, 6000 psi	5190-2426	5190-2446	5190-2466	5190-2486
4,0 x 10, Vorsäule	3	551 bar, 8000 psi	5190-2424	5190-2444	5190-2464	5190-2484
4,0 x 10, Vorsäule	1,7	600 bar, 8700 psi	5190-2422	5190-2442	5190-2462	5190-2482

Tipps und Werkzeuge

Weitere Informationen finden Sie unter:

Optimizing protein separations with Agilent weak cation-exchange columns (Publikation **5990-9628EN**)

Faster separations using Agilent weak cation-exchange columns (Publikation **5990-9931EN**)

pH Gradient elution for improved separation of monoclonal antibody variants (Publikation **5990-9629EN**)

Optimizing protein separations with cation-exchange chromatography using Agilent Buffer Advisor (Publikation **5991-0565EN**)

www.agilent.com/search

Ionenaustausch-Säulen mit dem starken Anionenaustauscher PL-SAX

- Kleine Partikel liefern exzellente chromatographische Leistung
- Große Bandbreite an Partikelgrößen und zwei Porengrößen für flexible Analysen und Aufskalierung für Aufreinigungen
- Außergewöhnliche Beständigkeit garantiert eine lange Lebensdauer der Säulen



PL-SAX- $\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ ist ideal für Anionenaustausch-HPLC-Trennungen von Proteinen, Peptiden und entschützten synthetischen Oligonukleotiden unter denaturierenden Bedingungen geeignet. Die starke Anionenaustauscher-Funktion, kovalent an ein chemisch beständiges, voll poröses Polymer gebunden, erweitert den pH-Arbeitsbereich. Außerdem ist die Anionenaustauschkapazität vom pH-Wert unabhängig. Alle Säulen sind für die Trennung synthetischer Oligonukleotide unter denaturierenden Bedingungen von Temperatur, organischem Lösemittel und hohem pH-Wert geeignet. PL-SAX bietet eine bessere chromatographische Trennung selbst-komplementärer oder G-reicher Sequenzen, die zur Bildung von Aggregaten oder Haarnadelstrukturen neigen. Das 5- μm -Material bietet Trennungen mit hoher Effizienz von Sequenzen mit n und n-1 Einheiten. Große Bandbreite an Partikelgrößen und Säulenabmessungen ermöglicht Aufskalierung der Analyse bis zur Aufreinigung. Die starke Anionenaustauscher-Funktion bietet ein Material mit außergewöhnlicher thermischer und chemischer Stabilität, sogar gegenüber Natriumhydroxid-haltigen Eluenten, und führt damit zu einer längeren Lebensdauer der Säule.

Säulenspezifikationen

Gebundene Phase	ID (mm)	Partikelgröße (μm)	Porengröße	pH-Stabilität	Betriebstemperaturgrenze
Starker Anionenaustauscher	2,1, 4,6, 7,5, 25, 50 und 100	5, 8, 10 und 30	1000 Å und 4000 Å	1-14	80 °C

Standard-Proteintrennung durch Ionenaustausch

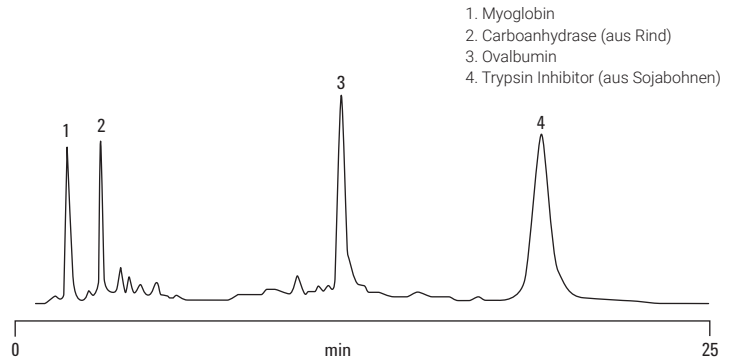
Säule: PL-SAX 1000 Å
PL1551-1502
4,6 x 50 mm, 5 µm

Mobile Phase: A: 10 mM TRIS-HCl, pH 8
B: A + 350 mM Natriumchlorid, pH 8

Gradient: 0-100 % B in 20 min

Flussrate: 1,0 ml/min

Detektor: UV, 220 nm



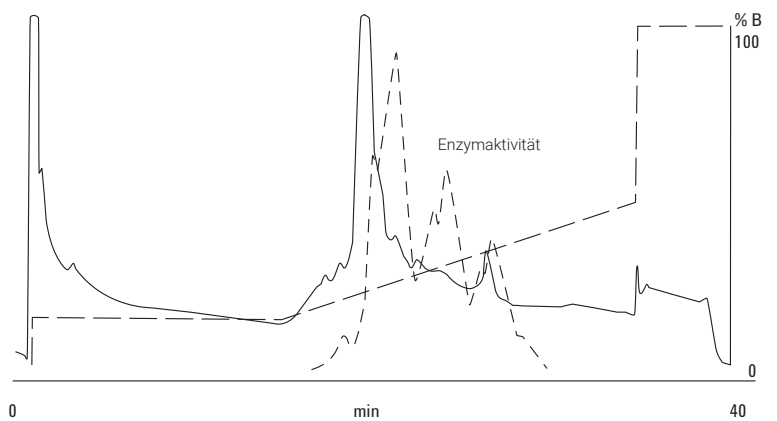
Analyse von Cholin kinase

Säule: PL-SAX 4000 Å
PL1551-1803
4,6 x 50 mm, 8 µm

Mobile Phase: A: 20 mM TRIS 5 % Ethylenglykol, pH 7.5
(Die folgenden Bestandteile sind erforderlich, um die Enzymaktivität zu erhalten)
1,0 mM Ethylenglykoltetraessigsäure
2,0 mM β-Mercaptoethanol
0,2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid
B: A + 1 M Kaliumchlorid

Flussrate: 3,0 ml/min

Detektor: UV, 280 nm



Trennung mit freundlicher Genehmigung von T. Porter,
Purdue University, USA

Analyse repräsentativer Molkeproteine

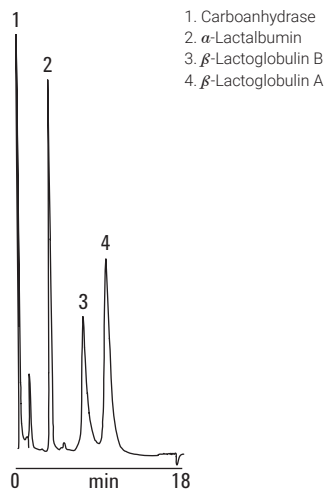
Säule: PL-SAX 1000 Å
PL1551-1802
4,6 x 50 mm, 8 µm

Mobile Phase: A: 20 mM TRIS-HCl, pH 7
B: A + 500 mM Natriumacetat, pH 7

Flussrate: 1,0 ml/min

Gradient: Linear 0-50 % B in 10 min

Detektor: UV, 280 nm



**Zuverlässige Trennungen synthetischer Oligonukleotide –
Hochaufgelöste Trennung eines Poly-T-Oligonukleotid-
Größenstandards, versetzt mit 10-mer,
15-mer, 30-mer und 50-mer (Hauptpeaks)**

Säule: PL-SAX 1000 Å
PL1551-1802
4,6 x 50 mm, 8 µm

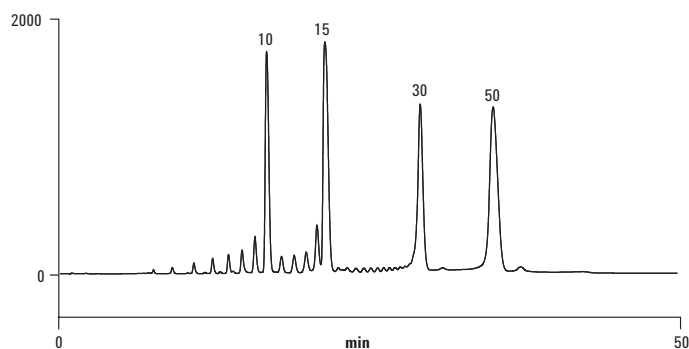
Mobile Phase: A: 7:93 v/v ACN: 100 mM TEAA, pH 8,5
B: 7:93 v/v ACN: 100 mM TEAA, 1 M Ammoniumchlorid, pH 8,5

Gradient: 0-40 % B in 10 min, gefolgt von 40-70 % B
in 14 min und 70-100 % B in 25 min

Flussrate: 1,0 ml/min

Temperatur: 60 °C

Detektor: UV, 220 nm



Hochauflösende Trennung eines Poly-T-Oligonukleotids. Mit dem hier verwendeten Gradienten war es möglich, eine Basislinientrennung der Moleküle mit einer Länge von bis zu 15-mer und einem Längenunterschied von einem Nukleotid zu erreichen.

Ionenaustausch-Säulen mit dem starken Anionenaustauscher PL-SAX

Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	Drucklimit	PL-SAX 1000 Å	PL-SAX 4000 Å
100 x 300	10	207 bar, 3000 psi	PL1851-2102	PL1851-2103
50 x 150	30	207 bar, 3000 psi	PL1751-3702	PL1751-3703
50 x 150	10	207 bar, 3000 psi	PL1751-3102	PL1751-3103
25 x 150	30	207 bar, 3000 psi	PL1251-3702	PL1251-3703
25 x 150	10	275 bar, 4000 psi	PL1251-3102	PL1251-3103
25 x 50	10	207 bar, 3000 psi	PL1251-1102	PL1251-3103
4,6 x 250	30	207 bar, 3000 psi	PL1551-5702	PL1551-5703
4,6 x 150	30	207 bar, 3000 psi	PL1551-3702	PL1551-3703
4,6 x 250	10	207 bar, 3000 psi	PL1551-5102	PL1551-5103
4,6 x 150	10	207 bar, 3000 psi	PL1551-3102	PL1551-3103
4,6 x 150	8	207 bar, 3000 psi	PL1551-3802	PL1551-3803
4,6 x 50	8	207 bar, 3000 psi	PL1551-1802	PL1551-1803
4,6 x 50	5	207 bar, 3000 psi	PL1551-1502	PL1551-1503
2,1 x 150	8	207 bar, 3000 psi	PL1951-3802	PL1951-3803
2,1 x 50	8	207 bar, 3000 psi	PL1951-1802	PL1951-1803
2,1 x 50	5	207 bar, 3000 psi	PL1951-1502	PL1951-1503
1,0 x 50	5	207 bar, 3000 psi	PL1351-1502	PL1351-1503

Starker Anionenaustauscher PL-SAX, Bulk-Ware

Packungseinheit	Partikelgröße (µm)	Drucklimit	PL-SAX 1000 Å	PL-SAX 4000 Å
100 g	30	207 bar, 3000 psi	PL1451-4702	PL1451-4703
100 g	10	207 bar, 3000 psi	PL1451-4102	PL1451-4103

Ionenaustausch-Säulen mit dem starken Kationenaustauscher PL-SCX

- Optimaler Aufbau für effektive Trennung von Biomolekülen
- Porengrößen ermöglichen gelöste Stoffe unterschiedlicher Größe
- Außergewöhnliche Beständigkeit garantiert eine lange Lebensdauer der Säulen



PL-SCX-SO₃ ist eine makroporöse PS/DVB-Matrix mit einer stark hydrophilen Beschichtung und einer starken Kationenaustauscher-Funktion. Der Fertigungsprozess wird so gesteuert, dass sich eine optimale Dichte von starken Anionenaustauscher-Resten ergibt, die die Analyse, Trennung und Aufreinigung eines breiten Spektrums von Biomolekülen erlaubt, von kleinen Peptiden bis hin zu großen Proteinen. Zwei Porengrößen, 1000 und 4000 Å, sind erhältlich, um gute Eigenschaften für den Stoffaustausch für gelöste Substanzen unterschiedlicher Größe zu ermöglichen. Die 5-µm-Partikel liefern Trennungen mit höherer Auflösung, während die 30-µm-Partikel für Flüssigkeitschromatographie bei mittleren Drücken verwendet werden..

Säulenspezifikationen

Gebundene Phase	ID (mm)	Partikelgröße (µm)	Porengröße	pH-Stabilität	Betriebstemperaturgrenze
Starker Kationenaustauscher	2,1, 4,6, 7,5, 25, 50 und 100	5, 8, 10 und 30	1000 Å und 4000 Å	1-14	80 °C

Standard-Proteintrennung

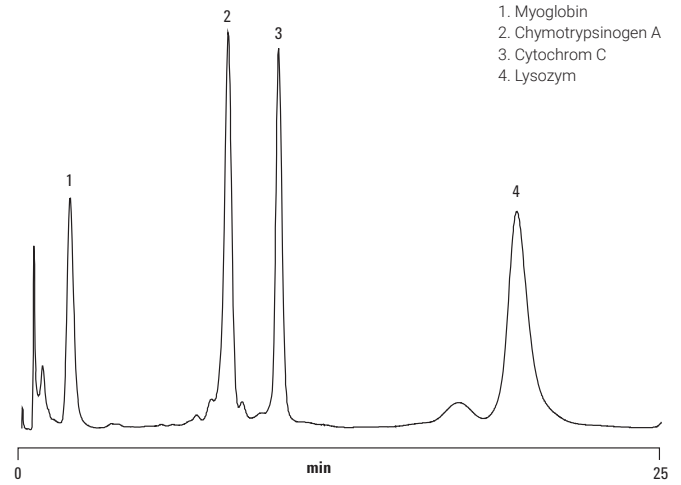
Säule: PL-SCX 1000 Å
PL1545-1502
4,6 x 50 mm, 5 µm

Mobile Phase: A: 20 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 6,0
B: A + 1 M Natriumchlorid

Gradient: 0-100 % B in 20 min

Flussrate: 1,0 ml/min

Detektor: UV, 280 nm



Ionenaustausch-Säulen mit dem starken Kationenaustauscher PL-SCX

Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	Drucklimit	PL-SCX 1000 Å	PL-SCX 4000 Å
100 x 300	10	207 bar, 3000 psi	PL1845-2102	PL1845-2103
50 x 150	30	207 bar, 3000 psi	PL1745-3703	PL1745-3703
50 x 150	10	207 bar, 3000 psi	PL1745-3102	PL1745-3103
25 x 150	30	207 bar, 3000 psi	PL1245-3702	PL1245-3703
25 x 150	10	207 bar, 3000 psi	PL1245-3102	PL1245-3103
25 x 50	10	207 bar, 3000 psi	PL1245-1102	PL1245-1103
4,6 x 250	30	207 bar, 3000 psi	PL1545-5703	PL1545-5703
4,6 x 150	30	207 bar, 3000 psi	PL1545-3702	PL1545-3703
4,6 x 250	10	207 bar, 3000 psi	PL1545-5102	PL1545-5103
4,6 x 150	10	207 bar, 3000 psi	PL1545-3102	PL1545-3103
4,6 x 150	8	207 bar, 3000 psi	PL1545-3802	PL1545-3803
4,6 x 50	8	207 bar, 3000 psi	PL1545-1802	PL1545-1803
4,6 x 50	5	207 bar, 3000 psi	PL1545-1502	PL1545-1503
2,1 x 150	8	207 bar, 3000 psi	PL1945-3802	PL1945-3803
2,1 x 50	8	207 bar, 3000 psi	PL1945-1802	PL1945-1803
2,1 x 50	5	207 bar, 3000 psi	PL1945-1502	PL1945-1503
1,0 x 50	5	207 bar, 3000 psi	PL1345-1502	PL1345-1503

Starker Kationenaustauscher PL-SCX, Bulk-Ware

Packungseinheit	Partikelgröße (µm)	PL-SCX 1000 Å	PL-SCX 4000 Å
100 g	30	PL1445-4702	PL1445-4703
100 g	10	PL1445-4102	PL1445-4102

Tipps und Werkzeuge

PL-SAX und PL-SCX-Säulen und Bulk-Ware sind auch erhältlich für den präparativen Maßstab bis zum Prozessmaßstab.

Weitere Informationen auf den **Seiten 190–195**.

Bio-Monolith-Ionenaustausch-HPLC-Säulen

- Für die Trennung von Makro-Biomolekülen entwickelte polymerbasierte Bio-Monolith-HPLC-Säulen
- Von der Flussrate unabhängige Trennungen, keine Diffusion, keine Poren und kein Totvolumen machen den Austausch zwischen mobiler und stationärer Phase sehr schnell
- Abmessungen der Monolith-Scheibe: 5,2 x 4,95 mm (100 µl Säulenvolumen) mit durchgehenden Kanälen, zur Ausschaltung des Stoffaustauschs durch Diffusion
- Extrem schnelle Trennungen beschleunigen die Methodenentwicklung und senken Kosten: Die Festlegung der Methodenparameter benötigt deutlich weniger Zeit und Puffer

Bio-Monolith-Ionenaustausch-HPLC-Säulen ermöglichen die hochaufgelöste und schnelle Trennungen von Antikörpern (IgG, IgM), Plasmid-DNA, Viren, Phagen und anderen Makro-Biomolekülen. Die Produktfamilie umfasst starke Kationenaustauscher, starke und schwache Anionenaustauscher und Protein A-Phasen. Bio-Monolith-HPLC-Säulen sind mit den InfinityLab LC-Serien kompatibel.



Bio-Monolith-Ionenaustausch-HPLC-Säule

Selektionshilfe für Bio-Monolith-HPLC-Säulen

Säule	Beschreibung	Wichtige Applikationen	Best.-Nr.
Bio-Monolith QA	Die gebundene Phase, ein quaternäres Amin (starker Anionenaustauscher), ist innerhalb eines Arbeitsbereichs von pH 2-13 vollständig geladen und bindet negativ geladene Biomoleküle.	– Prozessüberwachung und Qualitätskontrolle bei der Produktion von Adenoviren – Überwachung der Aufreinigung und Qualitätskontrolle bei der Herstellung von IgM – Kontrolle der Entfernung von DNA-Verunreinigungen – Kontrolle der Entfernung von Endotoxinen – HSA-Reinheit	5069-3635
Bio-Monolith DEAE	Die gebundene Diethylaminoethyl-Phase (schwacher Anionenaustauscher) bietet höhere Selektivität für Biomoleküle mit negativer Ladung über einen Arbeitsbereich von pH 3-9.	– Prozessüberwachung und Qualitätskontrolle bei der Herstellung und Aufreinigung von Bakteriophagen – Prozessüberwachung und Qualitätskontrolle bei der Aufreinigung von Plasmid-DNA	5069-3636
Bio-Monolith SO ₃	Die gebundene Sulfonyl-Phase (starker Kationenaustauscher) ist innerhalb eines Arbeitsbereichs von pH 2-13 komplett geladen und bindet positiv geladene Biomoleküle.	– Rasche und hochaufgelöste Trennung von großen Molekülen wie Proteinen und Antikörpern – Schnelle Analyse von Hämoglobin A1c	5069-3637

Säulenspezifikationen

Abmessungen	5,2 mm x 4,95 mm
Säulenvolumen	100 µl
Maximaldruck	150 bar (15 MPa, 2200 psi)
Mindest- und Höchsttemperaturen	Im Betrieb: 2-40 °C
	Zur Lagerung: 2-8 °C
Empfohlener pH-Wert	Im Betrieb: 2-13
	Zur Reinigung: 1-14
Verwendete Materialien	Hardware: Edelstahl
	Packung: stark poröser Monolith aus Poly(glycidyl-methacrylat)-Ethylendimethacrylat-Copolymer
Kennzeichnung durch farbigen Ring	Bio-Monolith QA: blau
	Bio-Monolith DEAE: grün
	Bio-Monolith SO ₃ ⁻ : rot
Haltbarkeit/Ablaufdatum	SO ₃ ⁻ , QA, DEAE: 24-36 Monate

Entwicklung der Basislinie für eine Trennung von Proteinstandards

Säule: Bio-Monolith CM15, 5,5 x 15 mm

Mobile Phase: A: 10 mM Natriumhydrogenphosphat, pH 6,0
B: A + 500 mM Natriumchlorid oder nur 500 mM Natriumhydrogenphosphat, pH 6,0

Flussrate: 2 ml/min

Gradient: 0,5 min konstant mit mobiler Phase A, danach linearer Gradient bis 45 % B in 15 min (verstrichene Zeit: 15,5 min), dann 60 % B bei 15,6 min bis 20 min. 15 min lang Spülung der Säule mit 100 % B vor der erneuten Äquilibration vor der nächsten Analyse.

pH-Gradient: A: 5 mM

Natriumhydrogenphosphat, Puffer, pH 5,5 und B: 40 mM

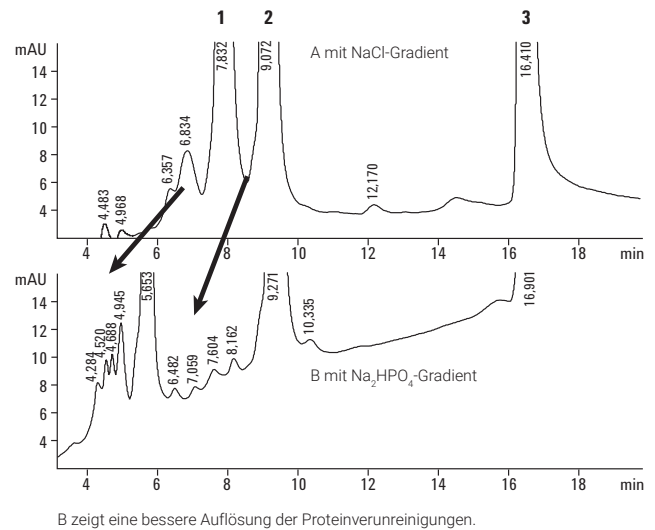
Natriumhydrogenphosphat (nicht gepuffert, pH 8,9). 2 % B/min bei 1,0 ml/min für 15 min, danach 5 min lang Säulenspülung mit 90 % B.

Detektor: UV, 220 nm

Probe: Jeweils 1 mg/ml in mobiler Phase A

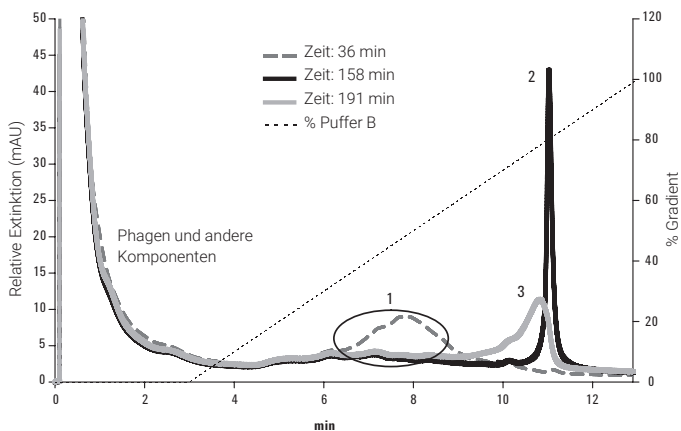
1. Ribonuklease aus Rinderpankreas (pI 9,6)
2. Cytochrom C aus Rinderherz (pI 10,37-10,8)
3. Lysozym aus Hühnerei (pI 11,35) (0,5 mg)

Gerät: 1200 Infinity Serie mit Diodenarray-Detektor



Überwachung der Phagenproduktion bei der Fermentation

Säule:	Bio-Monolith DEAE 5069-3636 5,2 x 4,95 mm
Mobile Phase:	A: 125 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0 B: 125 mM Natriumphosphat + 1 M Natriumchlorid, pH 7,0
Flussrate:	1 ml/min
Gradient:	100 % Puffer A (2,5 min) 0-100 % Puffer B (10 min) 100 % Puffer A (2 min)
Detektor:	UV, 280 nm
Gerät:	Hochdruckgradienten-HPLC-System, Agilent 1200 Infinity Serie

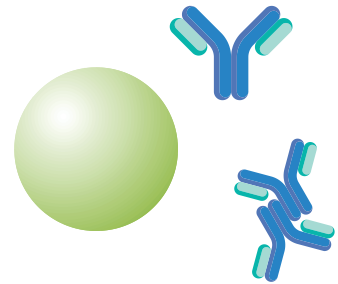


Mit dem Fortschritt der Phagenproliferation steigt die Konzentration der genomischen DNA (gDNA) an, da die Wirtszellen lysiert werden. In den späteren Stadien der Fermentation wird die gDNA allmählich zu Fragmenten abgebaut. Diese gDNA-Fragmente können durch Aufreinigungsmedien nur schwer entfernt werden. Daher ist es entscheidend, den Fermentationszyklus vor dem Abbau der gDNA zu beenden. Das obige Chromatogramm repräsentiert drei Proben, die nach 36, 158 und 191 Minuten aus dem Bioreaktor entnommen wurden. Peak 1 repräsentiert Phagen, Medium und Wirtszellen, Peak 2 die intakte gDNA und Peak 3 die fragmentierte gDNA.



Aggregations- und Fragmentanalyse

Genaue Bestimmung der Aggregation, Fragmentation und chemischen Ligation/Modifikation von Biomolekülen



Die Größenausschlusschromatographie (SEC) ist eine Technik zur Trennung von Proteinen, Oligonukleotiden und anderen komplexen Biopolymeren nach ihrer Größe unter Verwendung wässriger Eluenten. Sie ist insbesondere für die Quantifizierung von Aggregaten in Protein-Biotherapeutika ein wichtiges Werkzeug. Die Herstellung eines Biopharmazeutikums wie beispielsweise eines monoklonalen Antikörpers ist ein komplexer Prozess und die Aggregation ist dabei ein Problem, das während der Zellkultur und bei der Isolierung, Aufreinigung und Formulierung auftreten kann. Das Vorhandensein von Dimeren und höheren Aggregaten kann die Wirksamkeit und Sicherheit des Endprodukts beeinträchtigen; die Quantifizierung des Aggregatgehalts muss während der Prozessentwicklung durchgeführt werden, um die kritischen Qualitätsmerkmale (CQA) des Produkts festzulegen, und sie muss bei der endgültigen Charakterisierung des Produkts durchgeführt werden, um zu gewährleisten, dass der Aggregatgehalt minimal und kontrolliert in einem sicheren Ausmaß vorliegt.

Anwendung der SEC in Aggregationsstudien

Die Größe, Art und Konzentration von Aggregaten in therapeutischen Protein-Biopharmazeutika können sich sowohl auf die Wirksamkeit als auch die Formulierung auswirken – oder im schlimmsten Fall sogar zu einer Immunogenität führen. Die Bildung von Aggregaten erfolgt über verschiedene Mechanismen wie beispielsweise durch die Bildung von Disulfidbrücken oder durch nicht kovalente Wechselwirkungen.

Da sich die Größen der Proteinaggregate, auch die der Dimere, deutlich genug von der Größe des Proteinmonomers unterscheiden, kann man die verschiedenen Formen mittels SEC trennen. Die SEC mit UV- oder Lichtstreuungsdetektion ist eine Standardtechnik zur Quantifizierung der Proteinaggregation.

Anwendung der SEC zur Quantifizierung und Molekulargewichtsbestimmung

Für Proteine und andere Moleküle mit diskreten Molekulargewichten kann die SEC eingesetzt werden, um Monomere, Dimere, Aggregate und Fragmente zu quantifizieren. Die SEC kann auch Oligonukleotid-Mischungen trennen.

Bei Biopolymeren mit unterschiedlichen Kettenlängen wie beispielsweise Stärken und anderen Polysacchariden kann die SEC Daten zur Molekulargewichtsverteilung und zu Verzweigungen (mit geeigneten Detektoren) liefern.

Mit mehr als 30-jähriger Erfahrung als einer der führenden Hersteller von Säulen und Analysegeräten für die Größenausschlusschromatographie bietet Agilent fortlaufend neue SEC-Produkte, die eine bessere Auflösung und eine höhere Trenngeschwindigkeit liefern. Dieser Abschnitt behandelt die große Produktfamilie an SEC-Säulen von Agilent für die Protein- und Biopolymeranalyse:

- AdvanceBio SEC ist in zwei Partikelgrößen für SEC-UV- oder SEC-LS(Lichtstreu)-Messungen erhältlich. Die 2,7- μm -Partikel sind mit Porengrößen von 130 Å oder 300 Å erhältlich, um die große Bandbreite an Probengrößen abzudecken. Die 1,9- μm -Partikel haben eine Porengröße von 200 Å und bieten die höchste Auflösung. Beide Partikel haben eine hydrophile Polymerbeschichtung, die sekundäre Wechselwirkungen auf ein Minimum begrenzt. Sie sind sehr robust und können daher für schwierige Proben wie Antikörper-Arzneimittel-Konjugate aber auch für Routineanalysen eingesetzt werden.
- Bio SEC-3- und Bio SEC-5-Säulen sind mit verschiedenen Porengrößen erhältlich und eignen sich gut für die Proteinanalyse mit UV- oder MS-Detektion, insbesondere beim Nachweis von Dimeren und Aggregaten in therapeutischen Biologika. Die Bio SEC-3-Säulen mit 3 μm Partikeln bieten eine höhere Auflösung als die Standard-Bio SEC-5-Säulen mit 5 μm Partikeln.
- ProSEC 300S-Säulen sind gut für globuläre Proteine unter Bedingungen mit hohem Salzgehalt geeignet.
- ZORBAX GF-250- und GF-450-Säulen sind ältere Produkte, die verwendet werden sollten, wenn Protokolle die Verwendung von Säulen mit der USP-Säulenspezifikation L35 vorsehen. Alternativ empfehlen wir die Verwendung von Bio SEC-Säulen für bessere Leistung.
- PL aquagel-OH-Säulen können zur Analyse von Biopolymeren mit breitem Molekulargewichtsbereich wie Polyethylenglykole, Oligo- und Polysaccharide, Stärken und Gummi eingesetzt werden. Weitere Informationen zu wässrigen und polaren GPC/SEC-Säulen finden Sie im Produktleitfaden (Publikation 5990-7995DEE).

Größenausschlusschromatographie (SEC)

Applikation	Agilent Säulen	Hinweise	USP-Säulen-spezifikation
Peptide, Proteine, Aggregatanalyse	AdvanceBio SEC	Die robuste hydrophile Polymerbeschichtung sorgt für minimale sekundäre Wechselwirkungen; 2,7-µm-Partikel mit Poren von 130 Å oder 300 Å oder 1,9-µm-Partikel mit einer Porengröße von 200 Å für höchste Auflösung.	L59
	Bio SEC-3	Höhere Auflösung und schnellere Trennung durch 3-µm-Partikel mit Porengrößen von 100 Å, 150 Å und 300 Å.	L59
Große Biomoleküle und Proben mit mehreren Komponenten mit unterschiedlichen Molekulargewichten	Bio SEC-5	Mehr unterschiedliche Porengrößen (100 Å, 150 Å, 300 Å, 500 Å, 1000 Å und 2000 Å) zur Abdeckung einer größeren Bandbreite an Analyten.	L59
Globuläre Proteine, Antikörper	ProSEC 300S	Einzelsäulenooption für die Proteinanalyse bei hohem Salzgehalt.	L33
Proteine, globuläre Proteine	ZORBAX GF-250/450	Ältere Produkte, die verwendet werden sollten, wenn Protokolle die Verwendung von Säulen mit der USP-Säulenspezifikation L35 vorsehen.	L35

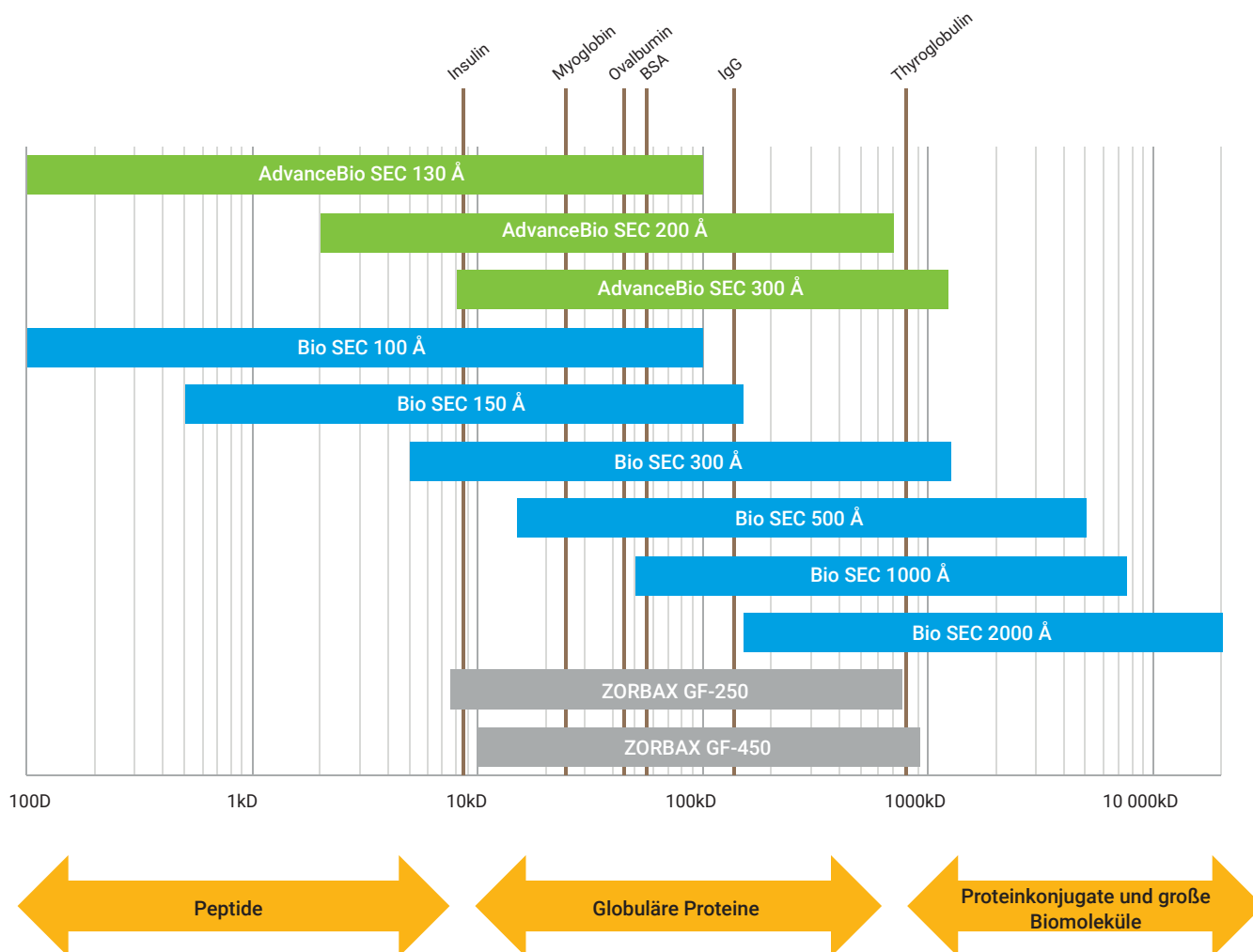
Tipps und Werkzeuge

Verwenden Sie Lösemittelfilter von Agilent, um Partikel aus selbst hergestellten Puffern und mobilen Phasen zu entfernen.

Besuchen Sie: www.agilent.com/chem/solvent-filters-degassers

Welche SEC-Säule eignet sich für Ihre Applikation?

Agilent hat ein großes Angebot an SEC-Säulen, um ausgehend von Ihren Analyten und Methodenparametern die bestmöglichen Trennungen zu erzielen. Die nachfolgende Tabelle bietet Ihnen einen Überblick über die verfügbaren Porengrößen für sehr gute Ergebnisse bei den häufigsten Molekülarten. Zu Beginn der Methodenentwicklung empfehlen wir die Verwendung der AdvanceBio SEC-Säulen.



AdvanceBio SEC

Die AdvanceBio SEC-Säulen liefern genaue, präzise Quantifizierungen der Aggregation monoklonaler Antikörper sowie von Proteinen. Diese innovativen Größenausschlusschromatographie-Säulen wurden von Agilent entwickelt und hergestellt, um die Laborproduktivität durch robuste, zuverlässige Methoden, die Wiederholungsanalysen von Proben überflüssig machen, zu verbessern. Es werden damit konsistente Ergebnisse von Säule zu Säule, von Charge zu Charge und von Labor zu Labor erzielt. Zudem lassen sich Methoden zwischen unterschiedlichen Abteilungen oder Standorten problemlos übertragen.

- Schnellere Analysen für leichtere Einhaltung wichtiger Fristen
- Bessere Auflösung für eine genauere Quantifizierung
- Höhere Empfindlichkeit für die Quantifizierung von Aggregaten selbst bei niedriger Konzentration
- Bessere Reproduzierbarkeit, die Wiederholungsanalysen überflüssig macht
- Einzigartig zusammengestellte Standards für AdvanceBio SEC-Säulen, die optimale Kalibrierung und Leistungsüberprüfung bieten

Säulenspezifikationen

Porengröße	Partikelgröße	Mol.gew.-Bereich	pH-Bereich	Max. Druck	Flussrate
130 Å	2,7 µm	100-120 000	2-8,5	400 bar (typischer Betriebsdruck < 200 bar)	0,1-2,0 ml/min (ID: 7,8 mm) 0,1-0,7 ml/min (ID: 4,6 mm)
300 Å	2,7 µm	5000-1 250 000	2-8,5	400 bar (typischer Betriebsdruck < 200 bar)	0,1-2,0 ml/min (ID: 7,8 mm) 0,1-0,7 ml/min (ID: 4,6 mm)
200 Å	1,9 µm	2000-700 000	2-8	620 bar	0,1-0,7 ml/min (4,6 x 150 mm) 0,1-0,5 ml/min (4,6 x 300 mm)



AdvanceBio SEC, 2,7 µm

Beschreibung	130 Å	300 Å
Analytische Säulen		
4,6 x 300 mm, 2,7 µm	PL1580-5350	PL1580-5301
4,6 x 150 mm, 2,7 µm	PL1580-3350	PL1580-3301
7,8 x 300 mm, 2,7 µm	PL1180-5350	PL1180-5301
7,8 x 150 mm, 2,7 µm	PL1180-3350	PL1180-3350
Vorsäulen (analytisch)		
4,6 x 50 mm, 2,7 µm	PL1580-1350	PL1580-1301
7,8 x 50 mm, 2,7 µm	PL1180-1350	PL1180-1301

AdvanceBio SEC, 1,9 µm

Beschreibung	200 Å
Analytische Säulen	
4,6 x 300 mm, 1,9 µm	PL1580-5201
4,6 x 150 mm, 1,9 µm	PL1580-3201
Vorsäulen	
4,6 x 30 mm, 1,9 µm	PL1580-1201



Anwendungsberichte aus dem Labor

Geringere Komplexität fördert die Wirtschaftlichkeit eines Labors

Erfahren Sie, wie das Team von Agilent CrossLab ein großes pharmazeutisches Labor beim Management unterschiedlicher Geräte von unterschiedlichen Herstellern unterstützt hat.

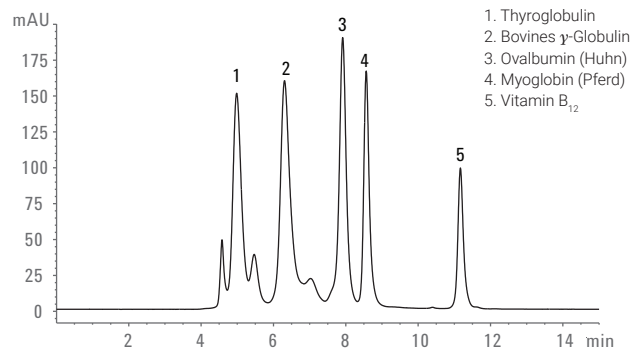
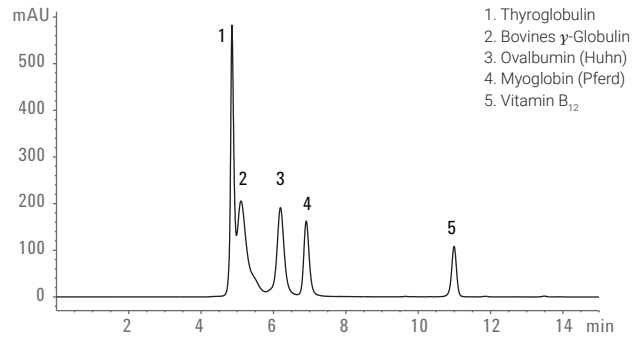
www.agilent.com/chem/story92

SEC-Trennungen von Molekulargewichtsstandards

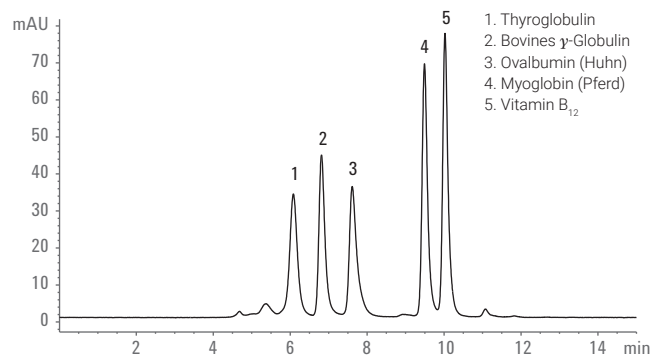
Säule: AdvanceBio SEC
7,8 x 300 mm

Probe: BioRad Standardgemisch Nr. 1511901 für die Gelfiltration

Mobile Phase: A: 150 mM Natriumphosphat, pH 7,0



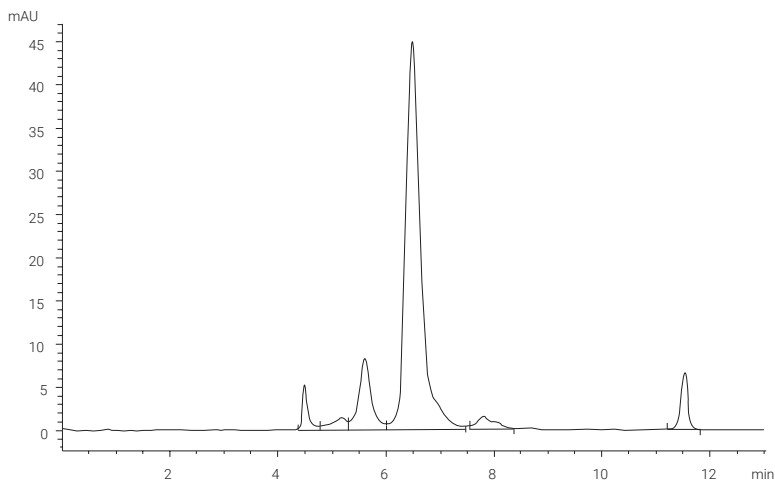
Trennung des BioRad-Gemischs für die Gelfiltration an AdvanceBio SEC 300 Å und 130 Å Die 300 Å Säule bietet eine höhere Auflösung.



Die Trennung eines Protein- und Peptidgemischs an der AdvanceBio SEC 130 Å zeigt die Auflösung für kleine Peptide und Proteine.

Für AdvanceBio SEC-Säulen empfohlene Anfangsbedingungen

Säule:	AdvanceBio SEC 300 Å, 2,7 µm 7,8 x 300 mm (Best.-Nr. PL1180-5301)
Flussrate:	1 ml/min
Mobile Phase:	150 mM Phosphatpuffer, pH 7,0
Wellenlänge:	220 nm
Temperatur:	Umgebungstemperatur
Injektionsvolumen:	5 µl
Probe:	IgG



Hochaufgelöste Trennung einer IgG-Probe, die das Monomer sowie Aggregate und Abbauprodukte zeigt.

Betriebsparameter für AdvanceBio SEC 2,7 µm

Kompatibilität der mobilen Phase	150 mM Phosphatpuffer, pH 7,0 (empfohlene Anfangsbedingungen) Andere wässrige Puffer mit hohem oder niedrigem Salzgehalt können ebenfalls verwendet werden. Mischungen aus Wasser und Acetonitril können eingesetzt werden. (Löslichkeit von Pufferkomponenten und Systemdruck prüfen.)
pH-Stabilität	2 bis 8,5
Betriebstemperatur	20-30 °C (empfohlen) 80 °C(maximal)
Typischer Betriebsdruck	< 200 bar (2900 psi) (eine Säule)
Maximaldruck	400 bar (5800 psi)
Arbeitsflussrate	0,1 bis 2,0 ml/min für Säulen mit 7,8 mm ID (empfohlen) 0,1 bis 0,7 ml/min für Säulen mit 4,6 mm ID (empfohlen) Für zwei Säulen in Serie sind unter Umständen geringere Flussraten erforderlich, um zu gewährleisten, dass der maximale Druck den Wert von 400 bar (5800 psi) nicht überschreitet.

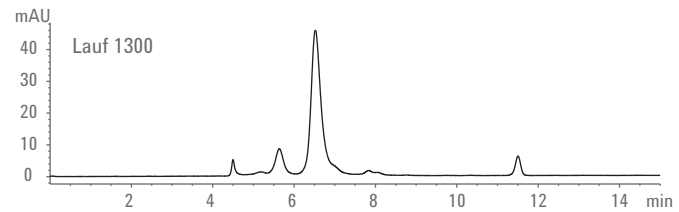
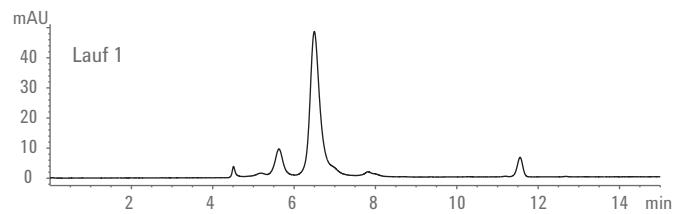
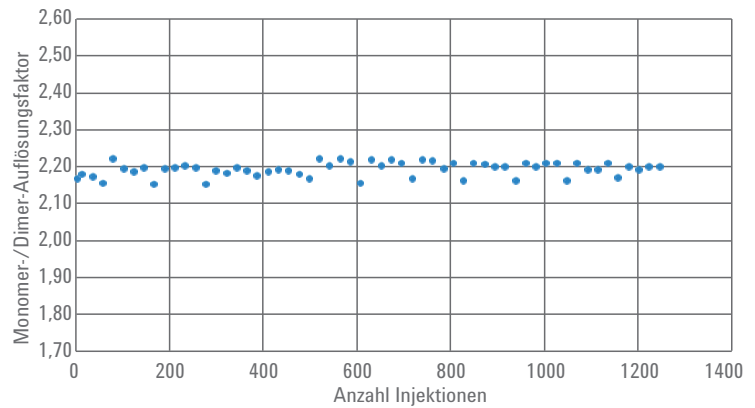
Hinweis: Das Arbeiten an den Grenzen der Betriebsparameter verkürzt wahrscheinlich die Lebensdauer der Säule.

Säule: AdvanceBio SEC
300 Å, 7,8 x 300 mm

Mobile Phase: 150 mM Natriumphosphat, pH 7,0

Probe: IgG

Das Diagramm zeigt die Auflösung zwischen dem IgG-Monomer und -Dimer über eine Abfolge von 1300 Injektionen hinweg.



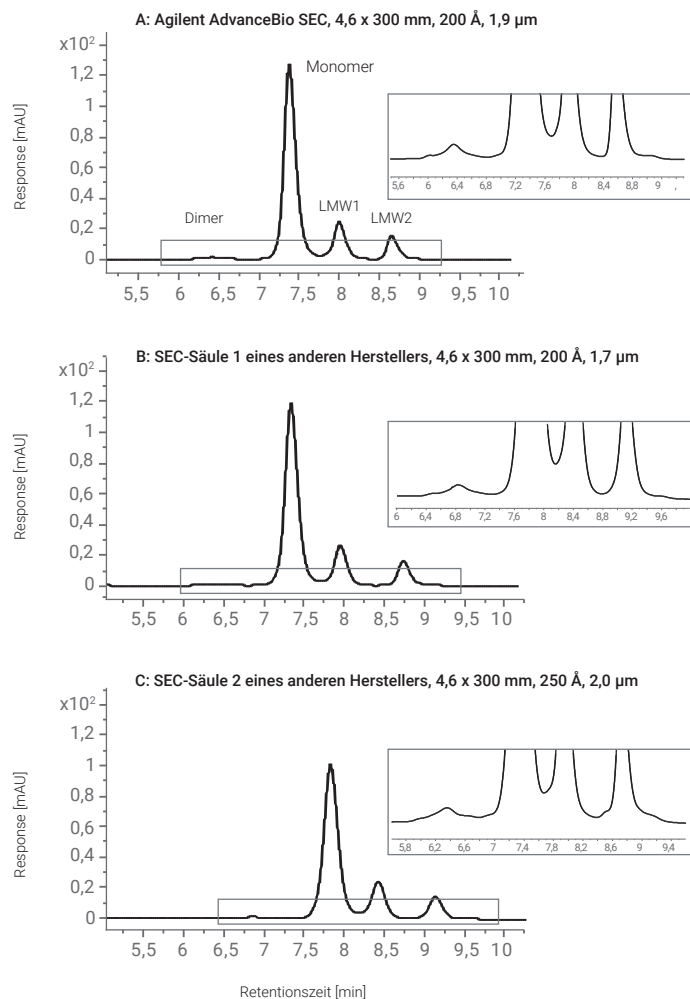
Das Profil der IgG-Probe änderte sich auch nach 1300 Injektionen nicht. Auflösungsfaktoren und die Quantifizierung des IgG-Monomers und -Dimers blieben während der gesamten Lebensdauer der Säule im Arbeitsbereich.

AdvanceBio SEC, 1,9 µm

Gerät:	1260 Infinity II bioinertes LC-System
Software:	Agilent OpenLab CDS
Flussrate:	0,35 ml/min
Mobile Phase:	50 mM Natriumphosphat, 200 mM NaCl, pH 7,0
Temperatur:	25 °C
Injektionsvolumen:	1 µl
Detektion:	UV, 220 nm

Die mit der speziellen hydrophilen Agilent Bindungschemie behandelten 1,9 µm Kieselgelpartikel gewährleisten eine hohe Auflösung und Trenneffizienz. Darüber hinaus minimieren sie sekundäre Wechselwirkungen mit mAbs, ADCs und anderen Proteinen.

AdvanceBio SEC-Säulen zeichnen sich im Vergleich zu den Säulen anderer Hersteller durch eine bessere Auflösung und Trenneffizienz aus.



Größenausschlusschromatographie von SigmaMAb gemischt mit LMW1- und LMW2-Fragmenten

	Peakbreite 50 %			Auflösung		Rückdruck (bar)
	Monomer	LMW1	LMW2	Dimer/Monomer	Monomer/LMW1	
Agilent AdvanceBio SEC 1,9 µm	0,159	0,154	0,148	2,79	2,28	340
SEC-Säule 1 eines anderen Herstellers	0,172	0,166	0,160	2,46	2,09	354
SEC-Säule 2 eines anderen Herstellers	0,194	0,182	0,169	2,49	1,83	260

Standards für AdvanceBio SEC

Proteinstandards für AdvanceBio SEC 130 Å

Eine Proteinmischung aus 5 sorgfältig ausgewählten Proteinen (Ovalbumin, Myoglobin, Aprotinin, Neurotensin, Angiotensin II) für die Kalibrierung der AdvanceBio SEC 130 Å-Säulen von Agilent. Dieser Standard kann zur regelmäßigen Kalibrierung der Säule eingesetzt werden, um optimale Systemleistung bei verschiedensten Applikationen mit Aufreinigung und Analyse von Proteinen sicherzustellen.

Proteinstandards für AdvanceBio SEC 300 Å

Eine Proteinmischung aus 5 sorgfältig ausgewählten Proteinen (Thyreoglobulin, γ -Globulin, Ovalbumin, Myoglobin, Angiotensin II) für die Kalibrierung der AdvanceBio SEC 300 Å-Säulen von Agilent. Dieser Standard kann zur regelmäßigen Kalibrierung der Säule eingesetzt werden, um optimale Systemleistung bei verschiedensten Applikationen mit Aufreinigung und Analyse von Proteinen sicherzustellen.



Proteinstandards für AdvanceBio SEC,
Best.-Nr. 5190-9416 und
Best.-Nr. 5190-9417

Standards für AdvanceBio SEC

Beschreibung	Größe	Best.-Nr.
130 Å	1,5 ml Probenflasche	5190-9416
300 Å	1,5 ml Probenflasche	5190-9417

Bio SEC-3

Optimierte Auflösung für die schnellere Trennung von Peptiden und Proteinen
Agilent Bio SEC-3-Säulen liefern aufgrund ihrer kleinen, leistungsfähigen Partikel spürbare Vorteile hinsichtlich Laufzeit und Auflösung im Vergleich zu anderen SEC-Säulen.



- Schnellere Trennungen als bei SEC-Säulen mit großen Partikeln
- Hochauflösung: schärfere Peaks und bessere Protein-Wiederfindung
- Dank der proprietären hydrophilen Schicht außergewöhnliche Beladungskapazität und Wiederfindung
- Flexible Methodenentwicklung: kompatibel mit den meisten wässrigen Puffern
- Hervorragende Stabilität bei hohen als auch niedrigen Salzkonzentrationen
- Zuverlässige, konsistente Leistung: Partikel mit enger Größenverteilung und proprietäre hydrophile Schicht sorgen für minimale sekundäre Wechselwirkungen
- Robuste Partikel für die sichere Verwendung mit Multidetektoren einschließlich Lichtstreuendetektoren
- MS-kompatibel

Bio SEC-3-Säulen unterstützen Sie, SEC-Trennungen mit hoher Konsistenz zu erreichen. Jede Säule ist mit sphärischen Kieselgelpartikeln mit einer Größe von 3 µm und einer engen Größenverteilung gepackt. Die Partikel sind mit einer proprietären hydrophilen Beschichtung versehen, die eine hohe Wiederfindung und minimale sekundäre Wechselwirkungen sicherstellt – für konsistentere Trennungen. Diese dünne Polymerschicht wird unter kontrollierten Bedingungen chemisch an reines, mechanisch stabiles Silica gebunden, wodurch äußerst effiziente und stabile Partikel für die größenbasierte Auftrennung entstehen.

Tipps und Werkzeuge

Deaktivierte/silanisierte Probenflaschen haben eine inerte Oberfläche, die keine Wechselwirkungen mit Metallen, Biologika oder Proteinen eingeht und keine Verschiebung des pH-Werts verursacht. Vermeiden Sie Standard-Probenflaschen aus Polypropylen für Biologika oder lichtempfindliche Verbindungen.



Säulenspezifikationen					
Porengröße	Partikelgröße	Mol.gew.-Bereich	pH-Bereich	Max. Druck	Flussrate
100 Å	3 µm	100-100 000	2-8,5	137 bar, 2000 psi	1,0-10,0 ml/min (ID: 21,2 mm)
					0,2-1,2 ml/min (ID: 7,8 mm)
					0,1-0,4 ml/min (ID: 4,6 mm)
150 Å	3 µm	500-150 000	2-8,5	137 bar, 2000 psi	1,0-10,0 ml/min (ID: 21,2 mm)
					0,2-1,2 ml/min (ID: 7,8 mm)
					0,1-0,4 ml/min (ID: 4,6 mm)
300 Å	3 µm	5000-1 250 000	2-8,5	137 bar, 2000 psi	1,0-10,0 ml/min (ID: 21,2 mm)
					0,2-1,2 ml/min (ID: 7,8 mm)
					0,1-0,4 ml/min (ID: 4,6 mm)

Kalibrierungskurven für Bio SEC-3

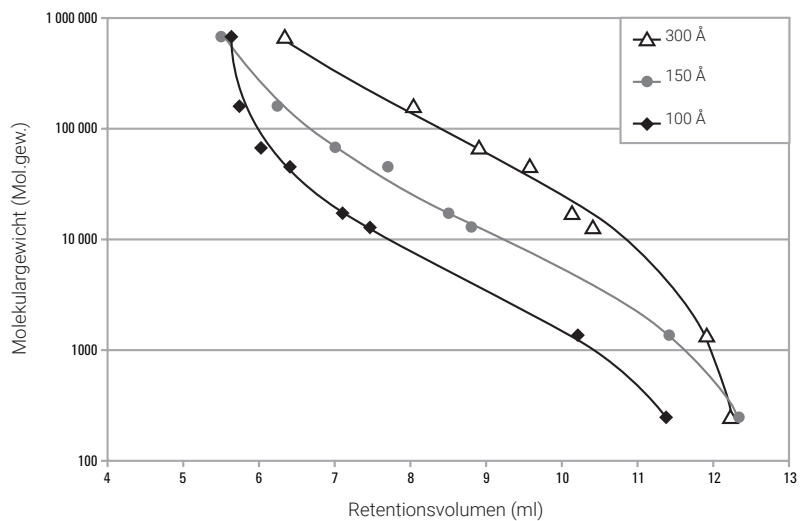
Säule: Bio SEC-3
7,8 x 300 mm, 3 µm

Mobile Phase: 150 mM Natriumphosphat, pH 7,0

Flussrate: 1,0 ml/min

Detektor: UV

Proteine	Mol. gew.	Porengröße		
		300 Å	150 Å	100 Å
Thyroglobulin	670 000	6,34	5,50	5,63
γ-Globulin	150 000	8,03	6,24	5,74
BSA	67 000	8,90	7,00	6,03
Ovalbumin	45 000	9,57	7,70	6,41
Myoglobin	17 000	10,12	8,50	7,10
Ribonuklease A	12 700	10,40	8,80	7,46
Vitamin B ₁₂	1350	11,90	11,40	10,20



Auswahl der Porengröße

Die Auswahl der Porengröße des Mediums beeinflusst die Auflösung in der SEC. Da die Trennung aufgrund von unterschiedlichen Molekülgrößen der gelösten Stoffe erfolgt, muss die Probe in die Porenstruktur der Partikel eindringen können. Ist die Porengröße zu klein, wird die Probe aus den Poren ausgeschlossen und eluiert mit dem Totvolumen der Säule, ist sie dagegen zu groß, können alle gelösten Stoffe vollständig in die Partikel eindringen und es erfolgt nur eine geringfügige Trennung.

Auswahl der Porengröße für Proteine

Säule A: Bio SEC-3, 100 Å
5190-2503
4,6 x 300 mm, 3 µm

Säule B: Bio SEC-3, 150 Å
5190-2508
4,6 x 300 mm, 3 µm

Säule C: Bio SEC-3, 300 Å
5190-2513
4,6 x 300 mm, 3 µm

Mobile Phase: 100 mM Natriumphosphat
+ 150 mM Natriumchlorid, pH 6,8

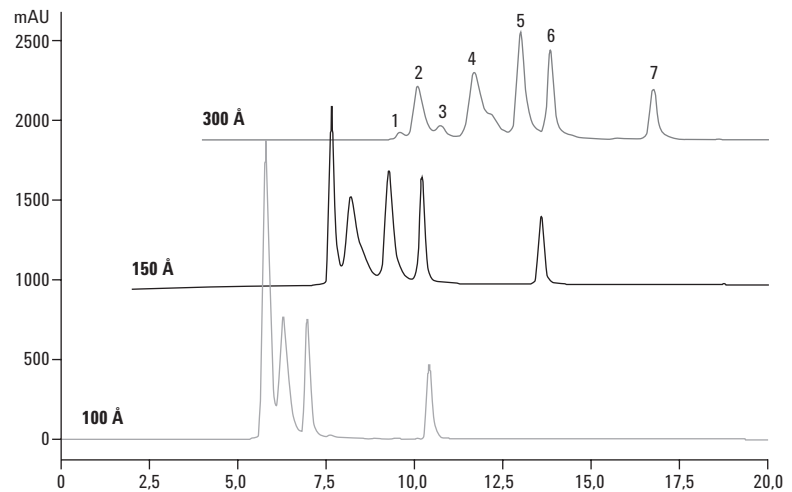
Flussrate: 0,35 ml/min

Gradient: 10-58 % B in 4 min, Spülung 1 min bei 95 % B,
erneute Äquilibration 1 min bei 10 % B

Detektor: UV, 220 nm

Probe: BioRad-Standardgemisch für die Gelfiltration

- | | |
|----------------------------|----------------------------|
| 1. Thyroglobulin-Aggregate | 5. Ovalbumin |
| 2. Thyroglobulin | 6. Myoglobin |
| 3. IgA | 7. Vitamin B ₁₂ |
| 4. γ-Globulin | |



Auswahl der Porengröße für Maus-IgG

Säule A: Bio SEC-3, 100 Å
5190-2503
4,6 x 300 mm, 3 µm

Säule B: Bio SEC-3, 150 Å
5190-2508
4,6 x 300 mm, 3 µm

Säule C: Bio SEC-3, 300 Å
5190-2513
4,6 x 300 mm, 3 µm

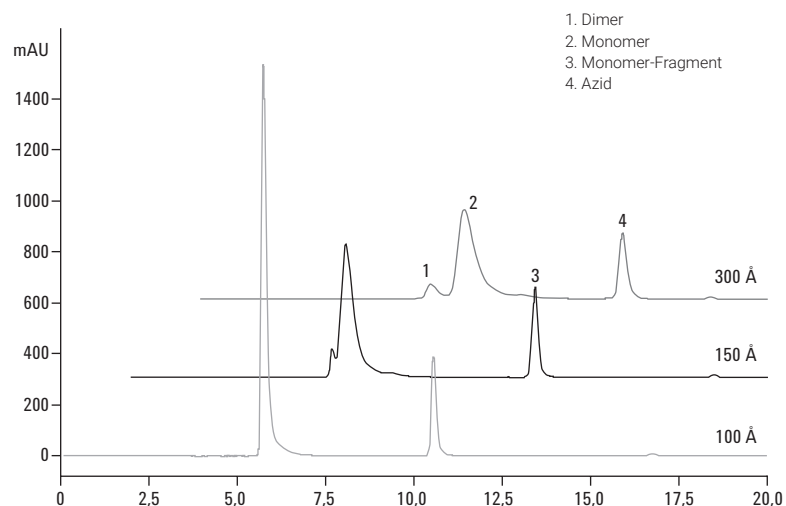
Mobile Phase: 100 mM Natriumphosphat
+ 150 mM Natriumchlorid, pH 6,8

Flussrate: 0,35 ml/min

Gradient: 10-58% B in 4 min, Spülung 1 min bei 95 % B,
erneute Äquilibration 1 min bei 10 % B

Detektor: UV, 220 nm

Probe: Maus-IgG



Bio SEC-3

Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	Bio SEC-3 100 Å USP L59	Bio SEC-3 150 Å USP L59	Bio SEC-3 300 Å USP L59
21,2 x 300	3	5190-6850	5190-6851	5190-6852
21,2 x 50, Vorsäule	3	5190-6854	5190-6855	5190-6856
7,8 x 300	3	5190-2501	5190-2506	5190-2511
7,8 x 150	3	5190-2502	5190-2507	5190-2512
7,8 x 50, Vorsäule	3	5190-2505	5190-2510	5190-2515
4,6 x 300	3	5190-2503	5190-2508	5190-2513
4,6 x 150	3	5190-2504	5190-2509	5190-2514
4,6 x 50, Vorsäule	3	5190-6846	5190-6847	5190-6848

Tipps und Werkzeuge

Weitere Informationen zur Molekulargewichtsbestimmung und Aggregationsanalyse mit dem 1260 Infinity Bio-SEC-Multidetektorsystem mit Bio SEC-3-Säulen finden Sie in:

Detailed Aggregation Characterization of Monoclonal Antibodies Using the Agilent 1260 Infinity Multi-Detector Bio-SEC Solution with Advanced Light Scattering Detection (Publikation 5991-3954EN) und *Determination of Protein Molecular Weight and Size Using the Agilent 1260 Infinity Multi-Detector Bio-SEC Solution with Advanced Light Scattering Detection* (**Publikation 5991-3955EN**)

www.agilent.com/search

Bio SEC-5

- Außerordentlich gute Auflösung für große Moleküle
- Hohe Stabilität und Effizienz dank proprietärer neutraler, hydrophiler Beschichtung
- Verbesserte Peakkapazität und Auflösung durch das vergrößerte Porenvolumen der speziellen Packung
- Stabile Leistung: Ausgezeichnete Reproduzierbarkeit und Lebensdauer der Säule
- Exzellente Stabilität, auch bei hohem pH-Wert und hoher oder niedriger Salzkonzentration
- Flexible Methodenentwicklung: kompatibel mit den meisten wässrigen Puffern
- Breite Anwendbarkeit: Porengrößen von bis zu 2000 Å für Vakzine und Biomoleküle mit hohem Molekulargewicht
- MS-kompatibel

Die Bio SEC-5-Säulen sind eine ideale Wahl bei großen Biomolekülen oder Proben, die Komponenten mit unterschiedlichen Molekulargewichten enthalten. Sie sind mit 5 µm Kieselgelpartikeln gepackt, die für maximale Effizienz und Stabilität mit einer proprietären neutralen, hydrophilen Beschichtung versehen sind. Sechs verschiedene Porengrößen bieten bestmögliche Auflösung über den gesamten Molekulargewichtsbereich.



Säulenspezifikationen

Porengröße	Partikelgröße	Mol.gew.-Bereich	pH-Bereich	Max. Druck	Flussrate
100 Å	5 µm	100-100 000	2-8,5	137 bar, 2000 psi	1,0-10,0 ml/min (ID: 21,2 mm)
					0,2-1,2 ml/min (ID: 7,8 mm)
					0,1-0,4 ml/min (ID: 4,6 mm)
150 Å	5 µm	500-150 000	2-8,5	137 bar, 2000 psi	1,0-10,0 ml/min (ID: 21,2 mm)
					0,2-1,2 ml/min (ID: 7,8 mm)
					0,1-0,4 ml/min (ID: 4,6 mm)
300 Å	5 µm	5000-1 250 000	2-8,5	137 bar, 2000 psi	1,0-10,0 ml/min (ID: 21,2 mm)
					0,2-1,2 ml/min (ID: 7,8 mm)
					0,1-0,4 ml/min (ID: 4,6 mm)
500 Å	5 µm	15 000-5 000 000	2-8,5	137 bar, 2000 psi	1,0-10,0 ml/min (ID: 21,2 mm)
					0,2-1,2 ml/min (ID: 7,8 mm)
					0,1-0,4 ml/min (ID: 4,6 mm)
1000 Å	5 µm	50 000-7 500 000	2-8,5	137 bar, 2000 psi	1,0-10,0 ml/min (ID: 21,2 mm)
					0,2-1,2 ml/min (ID: 7,8 mm)
					0,1-0,4 ml/min (ID: 4,6 mm)
2000 Å	5 µm	> 10 000 000	2-8,5	137 bar, 2000 psi	1,0-10,0 ml/min (ID: 21,2 mm)
					0,2-1,2 ml/min (ID: 7,8 mm)
					0,1-0,4 ml/min (ID: 4,6 mm)

Vergleich von Bio SEC-3 und Bio SEC-5

Analyse eines monoklonalen Antikörpers

Säule: Bio SEC-3, 300 Å
5190-2511
7,8 x 300 mm, 3 µm

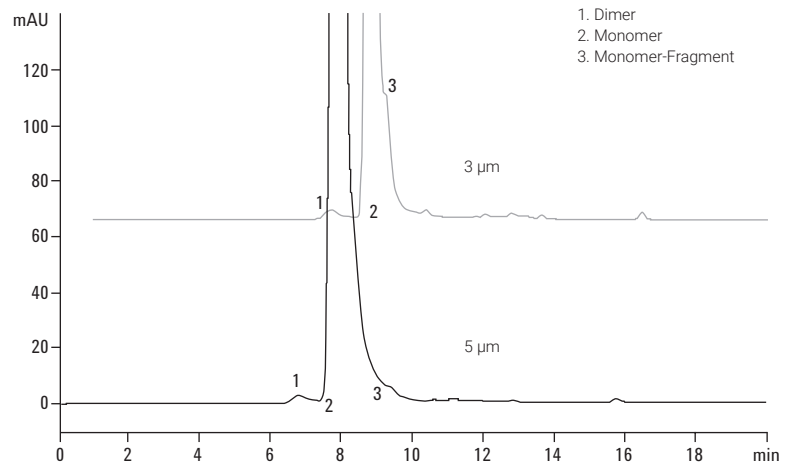
Säule: Bio SEC-5, 300 Å
5190-2526
7,8 x 300 mm, 5 µm

Mobile Phase: 150 mM Natriumphosphat, pH 7,0

Flussrate: 1 ml/min

Detektor: UV, 220 nm

Probe: Humanisierter monoklonaler Antikörper



Die Säule mit dem 3-µm-Material erzielt eine bessere Auflösung der Fragmentierung.

Tipps und Werkzeuge

Bei der Entwicklung von Aggregationsanalysen für Proteine müssen viele Faktoren berücksichtigt werden: der Einfluss der Größe und des Molekulargewichts der gelösten Stoffe, Möglichkeiten der Säulenauswahl, wichtige Überlegungen zur mobilen Phase und vieles mehr. Eine Anleitung zu den Auswahlmöglichkeiten finden Sie in:

Size Exclusion Chromatography for Biomolecule Analysis: A "How to" guide (Publikation 5991-3651EN)

www.agilent.com/search

Kalibrierungskurven für Bio SEC-5

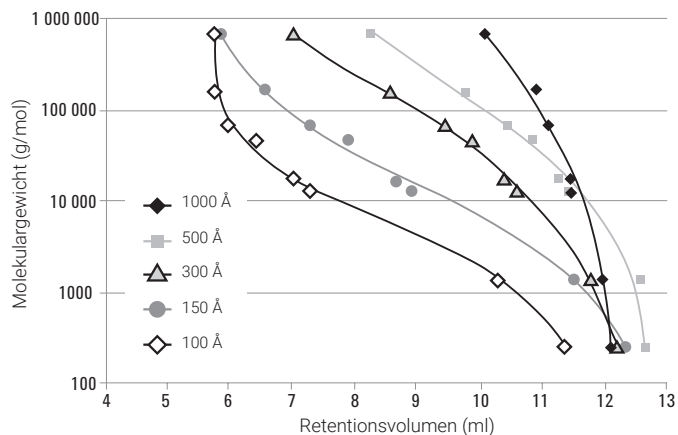
Säule: Bio SEC-5
7,8 x 300 mm, 5 µm

Mobile Phase: 150 mM Natriumphosphat, pH 7,0

Flussrate: 1,0 ml/min

Detektor: UV, 214 nm

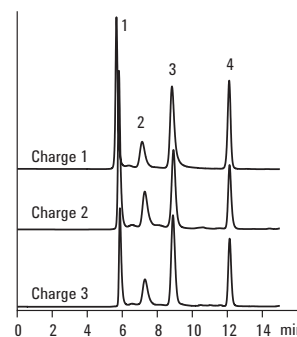
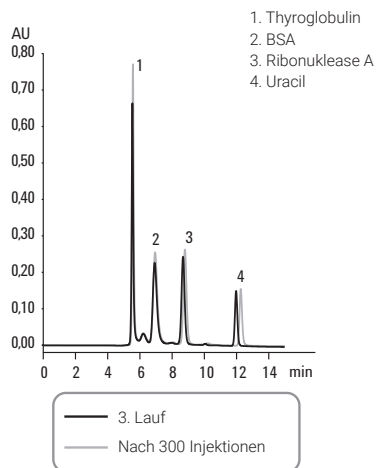
Proteine	Mol. gew.	Retentionsvolumen				
		1000 Å	500 Å	300 Å	150 Å	100 Å
Thyroglobulin	670 000	10,07	8,23	7,03	5,82	5,77
γ-Globulin	150 000	10,88	9,80	8,57	6,55	5,79
BSA	67 000	11,13	10,44	9,44	7,29	6,00
Ovalbumin	45 000	11,28	10,83	9,89	7,90	6,40
Myoglobin	17 000	11,44	11,28	10,42	8,66	7,05
Ribonuklease A	12 700	11,52	11,41	10,58	8,93	7,32
Vitamin B ₁₂	1350	12,00	12,59	11,78	11,49	10,30
Uracil (Marker für vollständige Permeation)	112	12,08	12,68	12,21	12,13	11,41



Herausragende Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge

Säule: Bio SEC-5, 150 Å
5190-2521
7,8 x 300 mm, 5 µm

Mobile Phase: 150 mM Natriumphosphat, pH 7,0



Die Mischung der vier Proteine zeigt eine exzellente Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten über 300 Injektionen hinweg und auf drei Säulen aus unterschiedlichen Herstellungsladungen.

Bio SEC-5

Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	Bio SEC-5 100 Å USP L59	Bio SEC-5 150 Å USP L59	Bio SEC-5 300 Å USP L59	Bio SEC-5 500 Å USP L59	Bio SEC-5 1000 Å USP L59	Bio SEC-5 2000 Å USP L59
21,2 x 300	5	5190-6863	5190-6864	5190-6865	5190-6866	5190-6867	5190-6868
21,2 x 50, Vorsäule	5	5190-6869	5190-6870	5190-6871	5190-6872	5190-6873	5190-6874
7,8 x 300	5	5190-2516	5190-2521	5190-2526	5190-2531	5190-2536	5190-2541
7,8 x 150	5	5190-2517	5190-2522	5190-2527	5190-2532	5190-2537	5190-2542
7,8 x 50, Vorsäule	5	5190-2520	5190-2525	5190-2530	5190-2535	5190-2540	5190-2545
4,6 x 300	5	5190-2518	5190-2523	5190-2528	5190-2533	5190-2538	5190-2543
4,6 x 150	5	5190-2519	5190-2524	5190-2529	5190-2534	5190-2539	5190-2544
4,6 x 50, Vorsäule	5	5190-6857	5190-6858	5190-6859	5190-6860	5190-6861	5190-6862

Tipps und Werkzeuge

Aktualisieren Sie Ihre SEC-Methode auf AdvanceBio SEC 300 Å und erzielen Sie eine höhere Auflösung bei weniger sekundären Wechselwirkungen.

Weitere Informationen finden Sie auf **Seite 110**.

ProSEC 300S

- Stabile Leistung: mechanisch robuste Kieselgelpartikel, die beim Gebrauch nicht ausbluten
- Einfache Methodenentwicklung: mit dem erweiterten linearen Auflösungsbereich entfällt der Auswahlschritt für die Porengröße – eine einzige Säule ermöglicht die Analyse der meisten globulären Proteine
- Auswahlmöglichkeiten zur Perfektionierung Ihrer Trennung: zwei Innendurchmesser der Säule passend zur SEC mit Mehrfachdetektion
- Größere Empfindlichkeit bei der Verwendung von Lichtstreuendetektoren zur Identifikation von Dimeren, Trimeren und Aggregaten



Die ProSEC 300S-Säule ist eine Einsäulen-Lösung, die speziell für die Analyse globulärer Proteine entwickelt wurde. Die Auswahl und Optimierung der Porengröße ermöglicht einen erweiterten linearen Auflösungsbereich. Daher kann diese Säule für die Analyse des gesamten Bereichs der globulären Proteine eingesetzt werden.

Die Partikel sind äußerst robust und fragmentieren beim Gebrauch nicht, sodass auch keine Feststoffpartikel ausgespült werden. Dies ermöglicht eine außergewöhnlich stabile Basislinie, sodass diese Säule die ideale Wahl für den Gebrauch mit Lichtstreuendetektoren ist.

Die zwei Säulenabmessungen, 7,5 mm und 4,6 mm ID, passend zur Multidetektor-Größenausschlusschromatographie, bieten eine Möglichkeit für die Analyse von kleinen Massen.

Säulenspezifikationen ProSEC 300S

Gebundene Phase	Porengröße	Partikelgröße	Mol.gew.-Bereich der Proteine	pH-Bereich	Flussrate	Max. Druck
ProSEC 300S	300 Å	5 µm	1500-80000	2-7,5	< 1,5 ml/min (7,5 mm ID) < 0,5 ml/min (4,6 mm ID)	250 bar, 3700 psi

ProSEC 300S

Abmessungen	Partikelgröße (µm)	Best.-Nr.
7,5 x 600	5	PL1147-8501
7,5 x 300	5	PL1147-6501
4,6 x 250	5	PL1547-5501
Vorsäulen		
7,5 x 50	5	PL1147-1501
4,6 x 50	5	PL1547-1501

ZORBAX GF-250- und GF-450-Gelfiltrationssäulen

- Ältere Produkte zur Verwendung, wenn Protokolle den Gebrauch von Säulen mit der USP-Säulenspezifikation L35 vorsehen
- Semipräparative und präparative Säulenabmessungen
- Kompatibel mit organischen Modifiern und Denaturierungsmitteln
- Großer nutzbarer pH-Bereich (pH 3 bis 8)



GF-250-Gelfiltrationssäulen

ZORBAX GF-250- und GF-450-Größenausschluss-(Gelfiltrations-)Säulen sind ideal für die Trennung von Proteinen und anderen Biomolekülen nach ihrer Größe geeignet. Proteine können bei der Verwendung einer GF-250- und einer GF-450-Säule in Serie in einem Molekulargewichtsbereich von 4000 bis 900 000 getrennt werden. Die GF-250/GF-450-Größenausschlussssäulen haben eine hydrophile, gebundene Diol-Phase für hohe Wiederfindung von Proteinen (in der Regel > 90 %) und eine einzigartige Zirkonoxidmodifizierung des Silica, mit der eine Verwendung im Bereich von pH 3 bis 8 ermöglicht wird. Die GF-250- und GF-450-Säulen sind mit porösen Kieselgel-Mikropartikeln mit exakter Größe und enger Porengrößen- sowie Partikelgrößenverteilung gepackt. Das Ergebnis sind effiziente, stabile und reproduzierbare Größenausschlussssäulen, die sowohl für analytische als auch für präparative Trennungen von Proteinen mit Flussraten von bis zu 3 ml/min verwendet werden können. Die Säulen sind mit organischen Modifiern (< 25 %) und Denaturierungsmitteln in der mobilen Phase zur Reduzierung der Proteinaggregation kompatibel. Einige der häufigsten Anwendungen sind die Trennung von Proteinmonomeren, -dimeren und -aggregaten, die Entsalzung, die Abschätzung des Molekulargewichts von Proteinen und die Trennung von modifizierten Proteinen.

Spezifikationen der UHPLC-Säulen

Gebundene Phase	Porengröße	Partikelgröße	Mol.gew.-Bereich	Oberfläche	pH-Bereich	Flussrate	Max. Druck
ZORBAX GF-250	150 Å	4 µm	4000-400 000	140 m ² /g	3,0-8,0	< 3,0 ml/min	350 bar
ZORBAX GF-450	300 Å	6 µm	10 000-900 000	50 m ² /g	3,0-8,0	< 3,0 ml/min	350 bar

Die Spezifikationen stellen nur typische Werte dar

ZORBAX GF-250 (USP L35) und GF-450 (USP L35) Gelfiltrationssäulen

Beschreibung	Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	Best.-Nr.
GF-250, 150 Å	9,4 x 250	4	884973-901
GF-250, 150 Å	4,6 x 250	4	884973-701
GF-450, 300 Å	9,4 x 250	6	884973-902
Vorsäulen (Hardware erforderlich)			
GF-450 Diol, Vorsäulenkartusche, 2 St.	9,4 x 15	6	820675-111
GF-250 Diol, Vorsäulenkartusche, 4 St.	4,6 x 12,5	6	820950-911
GF-450 Diol, Vorsäulenkartusche, 2 St.	9,4 x 15	6	820675-111
Vorsäulen-Hardware-Kit für präparative Säulen			840140-901
Vorsäulen-Hardware-Kit			820999-901
PrepHT-Säulen			
PrepHT GF-250, 150 Å	21,2 x 250	6	877974-901
PrepHT GF-450, 300 Å	21,2 x 250	6	877974-910
PrepHT Endfittings, 2 St.			820400-901
PrepHT Vorsäulenkartusche, 2 St.	17,0 x 7,5	5	820212-911
Vorsäulenkartuschen-Hardware			820444-901

Tipps und Werkzeuge

Benutzerinformationen zu Säulen sind hervorragende Informationsquellen mit Anleitungen zum Gebrauch und zur Säulenpflege sowie Empfehlungen für Anfangsmethoden:

www.agilent.com/chem/biolc-columns-user-guides

Charakterisierung der Glykosylierung

Posttranslationale Modifikationen der primären Aminosäuresequenz, einschließlich Glykosylierung, haben Konsequenzen für die Funktionalität und können die Wirksamkeit und Immunogenität eines Biopharmazeutikums beeinträchtigen. Die Struktur des Glykans trägt auch zur Halbwertszeit des Proteins im Plasma und zur Fähigkeit des monoklonalen Antikörpers bei, die Immunantwort auszulösen, die für die Wirksamkeit erforderlich ist. Regulierungsbehörden betrachten die Glykosylierung als eines der kritischen Qualitätsmerkmale. Daher muss sie charakterisiert und quantifiziert werden. Des Weiteren muss als Teil des Entwicklungsprozesses der zulässige Bereich für ein Original-, Biosimilar- oder Biobetter-Glykoproteinpharmazeutikum bestimmt werden.

Es gibt eine ganze Reihe von analytischen Methoden, die dazu verwendet werden, Informationen über die Struktur und die Form der Proteinglykosylierung zu erhalten.

- Zur Strukturidentifizierung, einschließlich der Identifizierung der Glykosylierungsstellen, wird die massenspektrometrische Detektion für die Umkehrphasen- und hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC) eingesetzt.
- Da Sialinsäure enthaltende Glykane mehr Ladungen in ein Protein einbringen, können diese mittels Ionenaustauschchromatographie charakterisiert werden.

Nach der Charakterisierung der Glykoprotein- und Glykopeptidfragmente müssen die einzelnen Glykane identifiziert und quantifiziert werden, um Informationen über die Anzahl und Position der Glykosylierungsstellen zu erhalten. Hierzu müssen die Glykane vom Protein abgespalten und mit HILIC-Säulen analysiert werden. Da die Glykane kein Chromophor besitzen, wird eine Derivatisierung mit einem Fluorophor durchgeführt, um die Detektion mit einem Fluoreszenzdetektor zu ermöglichen und die Glykane zuzuordnen und zu quantifizieren.



Säulenauswahl für die hydrophile Interaktionschromatographie

Applikation	Agilent Säulen	Hinweise
Glykane nach Abspaltung vom Glykoprotein einschließlich monoklonaler Antikörper	AdvanceBio Glycan Mapping	Gebundene Amid-Phase für schnelle Äquilibration und bessere Selektivität für Glykane.
	1,8 µm	Auf der Basis vollständig poröser Partikel für Hochgeschwindigkeitstrennungen und Applikationen mit hohem Probendurchsatz. Stabilität bis 1200 bar für den Einsatz mit 1290 Infinity II LC.
	2,7 µm	Auf der Basis der Poroshell-Technologie zur Herstellung oberflächenporöser Partikel mit verkürzten Diffusionswegen. Dies ermöglicht hochaufgelöste Trennungen mit geringen Drücken und ermöglicht die Verwendung längerer Säulen für eine bessere Trenneffizienz.
Hydrophile Peptide und Glykopeptide	ZORBAX RRHD 300 Å, 1,8 µm	Silica-Partikel mit einer Porengröße von 300 Å bieten eine orthogonale Trennung im Vergleich zu den ZORBAX RRHD 300 Å, 1,8-µm-Umkehrphasensäulen.
	AdvanceBio Glycan Mapping	Die gebundene Amid-Phase bietet eine alternative HILIC-Funktionalität für kleine hydrophile Peptide und Glykopeptide.

AB

AB

AB

Teil der AdvanceBio-Produktfamilie

Nutzen Sie die vielfältigen Produkte für N-Glykan-Analysen von Agilent

Agilent bietet alle Geräte und Verbrauchsmaterialien aus einer Hand – von der Probe bis zu zuverlässigen Ergebnissen.

Mit Produkten und Services von ProZyme deckt unser Know-how jetzt auch den gesamten Arbeitsablauf für die N-Glykan-Analyse ab. Das Portfolio von Agilent umfasst nun auch die Gly-X N-Glykan-Probenvorbereitungstechnologie mit InstantPC und bietet erstklassigen Durchsatz und analytische Empfindlichkeit. Darüber hinaus sind einzelne Reagenzien für die Glykobiologieforschung wie Glykanstandards und Glykoenzyme und eine Reihe von analytischen Services erhältlich.

Weitere Informationen erhalten Sie unter: www.agilent.com/chem/better-together

AdvanceBio Glycan Mapping-Säulen

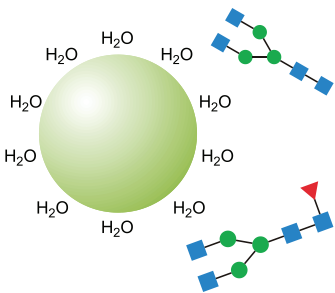
AdvanceBio Glycan Mapping-Säulen, Standards und Produkte zur Probenvorbereitung für eine selektive Entfernung der N-Glykane aus einem Glykoprotein, einschließlich monoklonaler Antikörper.

Analysegeschwindigkeit: 1,8 µm Partikel bieten hohen Probendurchsatz in der N-Glykan-Analytik, bei der die Geschwindigkeit entweder aufgrund der hohen Anzahl an Proben oder dem unmittelbar erforderlichen Vorhandensein der Daten die höchste Priorität hat.

Auflösung: hochaufgelöste Trennungen werden von 250 mm Säulen, die mit 2,7 µm Partikeln gepackt sind, erzielt. Diese höhere Auflösung ermöglicht die genaue Quantifizierung der Zielglykane und der Veränderungen am Glykosylierungsmuster des Proteins, die während der Expression aufgetreten sein können.

Umfassende Methoden: für Probenvorbereitung, chromatographische Analyse und Datenauswertung zur Gewährleistung von Reproduzierbarkeit und Genauigkeit von Identifizierung und Quantifizierung

Einfacher Bestellvorgang: eine einzige Bestellnummer für die Bestellung aller Produkte für die Probenvorbereitung von der Auflösung der Proteine bis zur Aufreinigung der 2-AB-markierten Glykane sowie Kits für jeden Teilschritt der Probenvorbereitung für individuelle Anpassungen.



Säulenspezifikationen						
Gebundene Phase	ID (mm)	Partikel	mit Endcapping	pH-Stabilität	Betriebstemperatur	Drucklimit
Amid HILIC	2,1 und 4,6	1,8 µm, vollständig porös	Nein	2-7	40 °C	1200 bar
Amid HILIC	2,1 und 4,6	2,7 µm, oberflächenporös	Nein	2-7	40 °C	600 bar

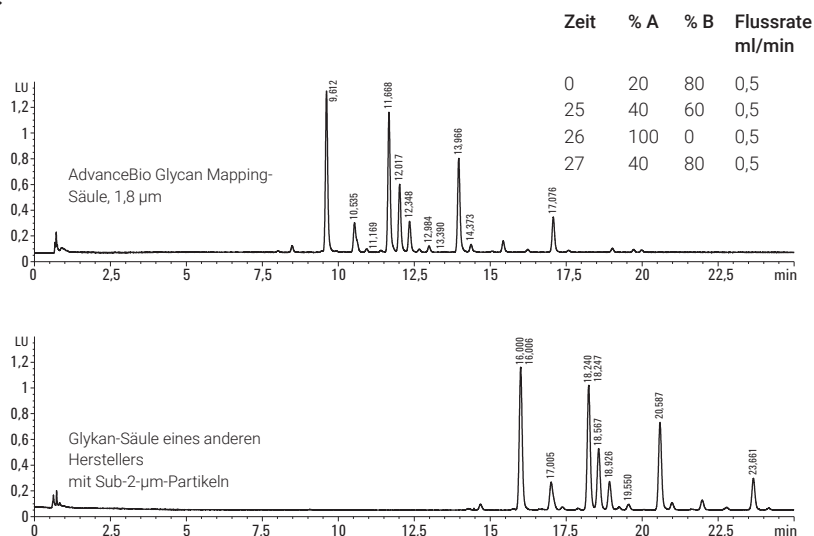
Das Mapping der N-verknüpften Glykane eines Glykoproteins, einschließlich monoklonaler Antikörper, erfordert die enzymatische Abspaltung der N-Glykane mit PNGase F vom Aminosäuregerüst des Proteins. Die abgespaltenen N-Glykane können dann mittels hydrophiler Interaktionschromatographie mit MS-Detektion oder nach der Derivatisierung mit einem Fluorophor, 2-Aminobenzamid (2-AB), mittels HPLC/UHPLC entweder mit Fluoreszenzdetektion oder massenspektrometrischer Detektion analysiert werden. Die AdvanceBio Glycan-Säulen bieten sowohl Analysegeschwindigkeit, mit 1,8 µm Partikeln, als auch Auflösung, mit 2,7 µm Partikeln, bei der Identifizierung und Quantifizierung der abgespaltenen Glykane.

Analysegeschwindigkeit

Die AdvanceBio Glycan Mapping-Säulen mit 1,8 µm Partikeln werden für Analysen mit hohem Probendurchsatz empfohlen, bei denen kurze Laufzeiten erforderlich sind.

Überragende Ergebnisse – 40 % schneller als die Produkte anderer Hersteller

Säule:	AdvanceBio Glycan Mapping 859700-913 2,1 x 150 mm, 1,8 µm
Säule B:	Glykan-Säule eines anderen Herstellers mit Sub-2-µm-Partikeln
Mobile Phase:	A: 100 mM Ammoniumformiat, pH 4,5 B: ACN
Injektionsvolumen:	2 µl in 70:30 ACN: 100 mM Ammoniumformiat
Probenthermostat:	10 °C
FLD:	Anregung = 260 nm Emission = 430 nm
Flussrate:	0,35 ml/min
Gerät:	1290 Infinity LC mit 1260 Infinity Fluoreszenzdetektor (FLD)
Probe:	Bibliothek aus 2-AB-markierten N-verknüpften Glykanen, Human-IgG (Best.-Nr. 5190-6996)



Die AdvanceBio Glycan Mapping-Säule bietet bessere Auflösung, schmalere Banden und höhere Peakkapazität als die Säule eines anderen Herstellers mit Sub-2-µm-Partikeln in der Konfiguration 2,1 x 150 mm.

Auflösung

AdvanceBio Glycan Mapping-Säulen mit 2,7 µm Partikeln in längeren Säulen werden für Trennungen empfohlen, die eine hohe Auflösung erfordern.

Überragende Ergebnisse – 40 % schneller als die Produkte anderer Hersteller

Säule: AdvanceBio Glycan Mapping
859700-913
2,1 x 150 mm, 1,8 µm

Gerät: 1290 Infinity binäre LC

Puffer: A: 100 mM Ammoniumformiat in Wasser, pH 4,5

B: Acetonitril

MS-Bedingungen: Gastemperatur: 250 °C

Sheathgas-

Temperatur: 250 °C

Gasfluss: 8 l/min

Sheathgas-Fluss: 8 l/min

Zerstäuber: 25 psi

Vcap: 3500 V

Düse: 1000 V

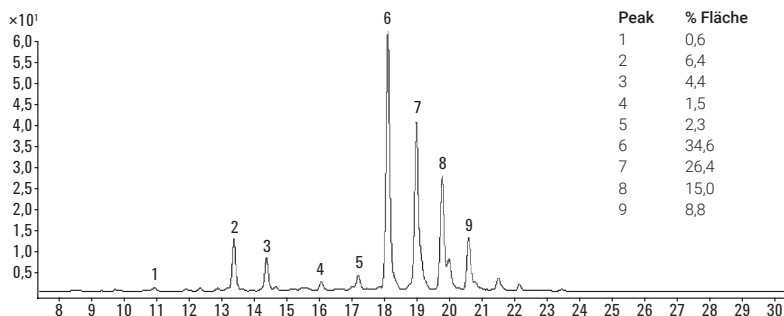
Fragmentor: 200 V

Skimmer: 45 V

Okt 1 RF Vpp: 550

Kollisionsenergien: 15 und 30 V

Modus: MS und gezielte MS/MS



Die mit PNGase F von Fetuin abgespaltenen N-Glykane wurden nach Derivatisierung mit 2-AB mittels UHPLC und Fluoreszenzdetektion analysiert. Die Peakzuordnung durch die MS-Analyse zeigt, dass die N-Glykane, die von Fetuin abgespalten werden, komplexe Glykane mit zwei oder drei Antennen sind, die N-Acetylneuraminsäure (NeuAc), aber keine Fucose enthalten. Die von Fetuin abgespaltenen 2-AB-N-Glykane wurden mittels HILIC-UHPLC analysiert und die Peakzuordnung erfolgte durch MS-Analyse.

Gerätebedingungen

	Standardgradient für Antikörper	Gradient für Fetuin	Gradient für Ovalbumin
Anfangsflussrate	0,5 ml/min	0,5 ml/min	0,5 ml/min
Gradient	0 min 85 % B	0 min 75 % B	0-6 min 85 % B
	5 min 75 % B	45 min 50 % B	10 min 80 % B
	35 min 64 % B	47 min 40 % B, Fluss 0,5 ml/min	60 min 70 % B
	40 min 50 % B	47,01 min, Fluss 0,25 ml/min	65 min 50 % B, Fluss 0,5 ml/min
	42 min, Fluss 0,5 ml/min 42,01 min, Fluss 0,25 ml/min	49 min 0 % B	65,01 min Fluss 0,25 ml/min
	43 min, 0 % B	51 min 0 % B	68 min 0 % B
	48 min 0 % B	51,01 min 75 % B, Fluss 0,25 ml/min	73 min 0 % B
	50 min 85 % B 50,01 min, Fluss 0,25 ml/min	52,00 min, Fluss 0,5 ml/min	74 min 85 % B, Fluss 0,25 ml/min
	51 min, Fluss 0,5 ml/min		75,00 min, Fluss 0,5 ml/min
Stoppzeit	51 min	52 min	75 min
Nachlaufzeit	20 min	20 min	20 min
Injektionsvolumen	5 µl	1 µl	1 µl
Thermostat des automatischen Probengebers	5 °C		
FLD	Anregung = 260 nm Emission = 430 nm		
Peakbreite	> 0,013 min (0,25 s Response-Zeit) (37,04 Hz)		

Detaillierte Informationen zu Fetuin N-Glykanen

Peak	Oxford	Struktur
1	A2G2S1	
2, 3	A2G2S2	
4	A3GGS2	
5	A3G3S3, A3G3S2 (Spur)	
6	A3G3S3, A3G3S2 (Spur)	
7	A3G3S3, A3G3S4 (Spur)	
8	A3G3S4, A3G3S3	
9	A3G3S4	

- Fucose
- Galaktose
- Mannose
- N-Acetylglucosamin
- N-Acetylneuraminsäure

N-Glykan-Standards

Agilent bietet in seinem Produktsortiment Referenzmaterialien, N-verknüpfte Glykanstandards (IgG) und Dextran-Ladder-Standards an, die im Arbeitsablauf benötigt werden, um die optimale Leistung sowohl der Probenvorbereitung als auch des LC-Systems zu gewährleisten. Die beiden Standards sind mit 2-AB-Markierung und ohne 2-AB-Markierung als Referenzmaterialien für die Probenvorbereitung erhältlich.

Der N-verknüpfte Glykanstandard (IgG) wird für jede Charge des AdvanceBio Glycan Mapping Mapping-Säulenmaterials in einem Qualitätssicherungstest eingesetzt, um sicherzustellen, dass jede Säule die strengen Anforderungen an die Reproduzierbarkeit für diese schwierigen Analysen erfüllt.

Der Dextran-Ladder-Standard wird für die Kalibrierung des Systems aufgrund der Elutionszeiten der Glucoseeinheiten (GU) in der homologen Reihe der Dextrane und für die relativen Retentionsdaten der Glucoseeinheiten verwendet.



Trennung einer 2-AB-markierten Dextran-Ladder

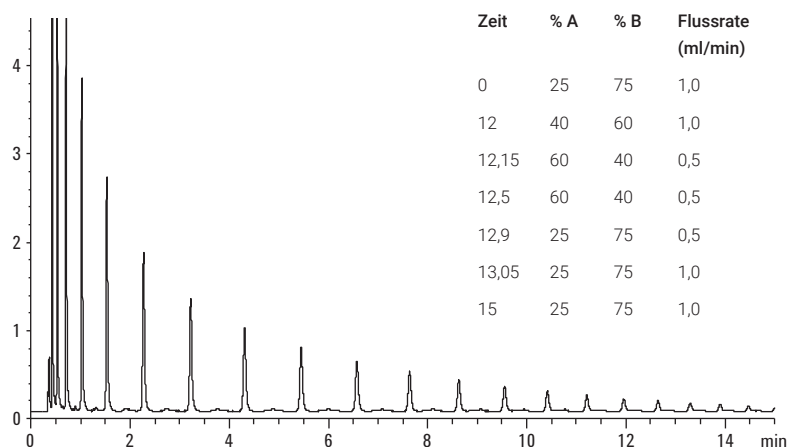
Säule: AdvanceBio Glycan Mapping
859700-913
2,1 x 150 mm, 1,8 µm

Mobile Phase: A: 100 mM Ammoniumformiat, pH 4,5
B: ACN

FLD: Anregung = 260 nm
Emission = 430 nm

Injektionsvolumen: 2 µl (10 pmol Gesamtglykan/1 µl,
75:25 ACN:Wasser)

Probe: 2-AB (Best.-Nr. 5190-6998)
markierte Dextran-Ladder



Diese Analyse verwendet den Agilent Dextran-Ladder-Standard zusammen mit einer AdvanceBio Glycan Mapping-Säule zur Korrelation der Retentionszeiten unbekannter Glykane.

AdvanceBio Glycan Mapping, 1,8 µm, bis 1200 bar stabil

Größe (mm)	Best.-Nr.
2,1 x 150	859700-913
2,1 x 100	858700-913
2,1, 1,8 µm, Fast Guard	821725-905

AdvanceBio Glycan Mapping, 2,7 µm, oberflächenporös, Bis 1200 bar stabil

Größe (mm)	Best.-Nr.
4,6 x 250	680975-913
4,6 x 150	683975-913
4,6 x 100	685975-913
2,1 x 250	651750-913
2,1 x 150	683775-913
2,1 x 100	685775-913
2,1, 2,7 µm, Fast Guard	821725-906

N-Glykan-Standards

Beschreibung	Best.-Nr.
Dextran-Ladder-Standard, 10 µg, 0,5 ml Probenflasche	5190-6997
2-AB-markierter Dextran-Ladder-Standard, 200 pmol	5190-6998
Bibliothek aus N-verknüpften Glykanen, IgG, 20 µg, 0,5 ml	5190-6995
Bibliothek aus 2-AB-markierten N-verknüpften Glykanen, IgG, 200 pmol	5190-6996

Analyse von hydrophilen Peptiden und Glykopeptiden

Die Peptidanalyse erfordert eine hohe Selektivität und Reproduzierbarkeit von Lauf zu Lauf, wie sie von der Umkehrphasen-Chromatographie ermöglicht wird.

Umkehrphasensäulen haben jedoch eine eingeschränkte Retention und Selektivität für hydrophile Peptide wie beispielsweise Glykopeptide. Die ZORBAX RRHD 300-HILIC-Säulen mit 1,8 µm Partikeln bieten eine stärkere Retention der hydrophilen Peptide und Glykopeptide im Vergleich zu Umkehrphasensäulen, bei denen wertvolle Informationen bei Peptid-Mapping-Experimenten verloren gehen können.

Die beiden Techniken sind orthogonal und bieten komplementäre Informationen bei der Primärstrukturanalyse eines Proteins.

- Ein ZORBAX 300 Å Partikel für die Analyse der gesamten Bandbreite von Peptiden unterschiedlicher Größen
- 1,8 µm Partikel liefern UHPLC-Leistung mit einer Stabilität von bis zu 1200 bar
- Bietet in der UHPLC zu ZORBAX RRHD 300 Å-Umkehrphasensäulen komplementäre Informationen

Säulenspezifikationen

Gebundene Phase	ID (mm)	Partikelgröße	mit Endcapping	pH-Stabilität	Betriebstemperatur	Drucklimit
Silica	2,1	1,8, vollständig porös	Nein	1-8	40 °C	1200 bar

Peptid-Mapping wird zur Charakterisierung der Protein-Biotherapeutika selbst und deren Verunreinigungen eingesetzt. Die Umkehrphasen-UHPLC/HPLC wird routinemäßig verwendet, aber wenn der Verdau hydrophile Peptide wie beispielsweise Glykopeptide enthält, können wertvolle Informationen verloren gehen. Die ZORBAX RRHD 300-HILIC-Säule retardierte die hydrophilen Glykopeptide und ermöglicht bei Kopplung mit Massenspektrometrie die Identifizierung dieser wichtigen Gruppe von Proteinfragmenten.

Identifizierung von Glykopeptiden in einem tryptischen Verdau eines Proteins

Säule: ZORBAX RRHD 300-HILIC
858750-901
2,1 x 100 mm, 1,8 µm

Mobile Phase: A: 100 % ACN
B: 50 mM Ammoniumformiat, pH 4,5

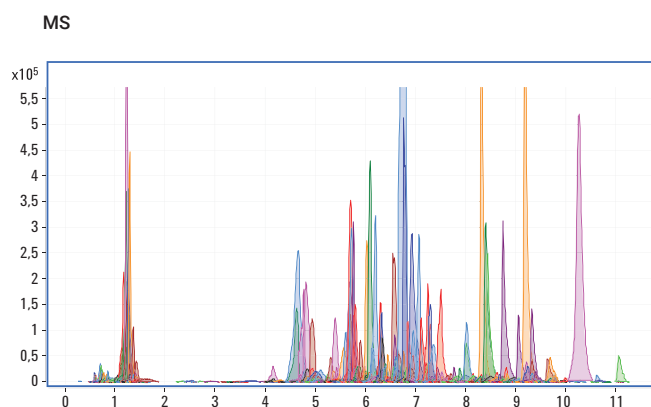
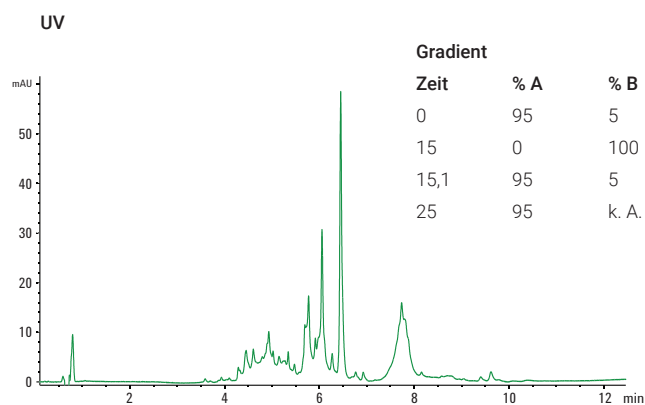
Flussrate: 0,4 ml/min

Injektion: 5 µg

Detektor: UV, 280 nm

Gerät: 1290 Infinity LC, 6224 Accurate-Mass Time-of-Flight,
duale ESI-Quelle im positiven Ionenmodus

Probe: Glykoproteine aus verdautem EPO-Protein (1 mg/ml)



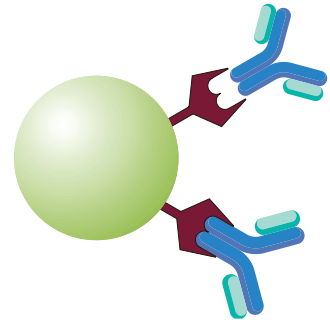
Das UV-Signal in der Abbildung zeigt die Trennung eines Erythropoietin(EPO)-Peptid-Mappings auf einer ZORBAX RRHD 300-HILIC-Säule (2,1 x 100 mm) und das MS-Signal zeigt die Extracted-Compound-Chromatogramme der entsprechenden EPO-Probe. Aus den HILIC/MS-Daten wurden sieben Peptide identifiziert, die durch RP-LC/MS nicht identifiziert wurden. Die hydrophile Interaktionschromatographie ist eine zur Umkehrphasenchromatographie orthogonale Technik und bietet die zusätzliche Auflösung hydrophiler Glykoproteine, z. B. aus einem Enzymverdau von Proteinen.

ZORBAX RRHD 300-HILIC 1,8 µm Säulen

Größe (mm)	ID (mm)	Partikelgröße (µm)	Best.-Nr.
ZORBAX RRHD 300-HILIC	2,1 x 100	1,8	858750-901
ZORBAX RRHD 300-HILIC	2,1 x 50	1,8	857750-901

Titerbestimmung

Die Affinitätschromatographie nutzt die hoch spezifischen molekularen Wechselwirkungen, die häufig zwischen bestimmten Proteinen (beispielsweise Antigen und Antikörper) auftreten, und ist daher eine leistungsstarke Technik. Agilent bietet verschiedene spezielle Affinitätsprodukte an: monolithische Protein A- und monolithische Protein G-Säulen für die Isolierung und Quantifizierung von IgG und eine Reihe von Multiple Affinity Removal Systemen für die Eliminierung von hoch abundanten Proteinen in biologischen Proben.



Bio-Monolith HPLC-Säulen

- Für die analytische Trennung aller Immunglobuline G (Human- und Maus-IgG) entwickelt
- Von der Flussrate unabhängige Trennungen, keine Diffusion, keine Poren und kein Totvolumen machen den Austausch zwischen mobiler und stationärer Phase sehr schnell
- Extrem schnelle Trennungen verringern den Zeitaufwand bei der Methodenentwicklung und senken Kosten
- Festlegung von Methodenparametern benötigt deutlich weniger Zeit und Puffer

Bio-Monolith Protein A- und Protein G-HPLC-Säulen sind Teil der Produktfamilie der Bio-Monolith-Säulen. Protein A- und Protein G-Bio-Monolith-Säulen sind mit HPLC- und präparativen LC-Systemen kompatibel, beispielsweise mit den LC-Systemen der Serien 1100 und 1200 und dem 1260 bioinerten quaternären LC.



Bio-Monolith Protein A-Säule,
5069-3639

Tipps und Werkzeuge

Weitere Informationen über die Salztoleranz für die Bindung monoklonaler Antikörper und über die Kompatibilität saurer Puffer für die Elution monoklonaler Antikörper von Bio-Monolith Protein A-Säulen finden Sie in der Publikation **5991-2990EN**.

www.agilent.com/search

Säulenspezifikationen

Abmessungen	5,2 mm x 4,95 mm
Säulenvolumen	100 µl
Maximaldruck	150 bar (15 MPa, 2200 psi)
Mindest- und Höchsttemperaturen	Im Betrieb: 2-40 °C
	Zur Lagerung: 2-8 °C
Empfohlener pH-Wert	Im Betrieb: 2-13
	Zur Reinigung: 1-14
Verwendete Materialien	Hardware: Edelstahl
	Packung: stark poröser Monolith aus Poly(glycidyl-methacrylat)-Ethylendimethacrylat-Copolymer
Kennzeichnung durch farbigen Ring	Bio-Monolith Protein A: weiß Bio-Monolith Protein G: orange
Haltbarkeit/Ablaufdatum	12 Monate

Bio-Monolith Protein A und Protein G

Beschreibung	Best.-Nr.
Bio-Monolith Protein A-Säule, 4,95 x 5,2 mm	5069-3639
Bio-Monolith Protein G-Säule, 4,95 x 5,2 mm	5190-6900

Tipps und Werkzeuge

Weitere Informationen finden Sie in folgenden Publikationen:

mAb Titer Analysis with the Agilent Bio-Monolith Protein A Column (**Publikation 5991-5135EN**)

Agilent Bio-Monolith Protein A Monitors Monoclonal Antibody Titer from Cell Cultures (Publikation **5991-2990EN**)

Cell Clone Selection Using the Agilent Bio-Monolith Protein A Column and LC/MS (Publikation **5991-5124EN**)

Cell Culture Optimization Using an Agilent Bio-Monolith Protein A Column and LC/MS (Publikation **5991-5125EN**)

www.agilent.com/search

Bindungsaffinität von Bio-Monolith Protein A und G für verschiedene IgG-Subklassen

Antikörper-	Protein A	Protein G
Human		
Humanes IgG1	++++	++++
Humanes IgG2	++++	++++
Humanes IgG3	–	++++
Humanes IgG4	++++	++++
Humanes IgA	++	–
Humanes IgD	++	–
Humanes IgE	++	–
Humanes IgM	++	–
Maus		
Maus-IgG1	+	++
Maus-IgG2a	++++	++++
Maus-IgG2b	++++	+++
Maus-IgG3	+	+++
Maus-IgM	+/-	–
Antikörperfragmente		
Humanes Fab	+	+
Humanes F(ab') ₂	+	+
Humanes scFv	+	+
Humanes Fc	+	+
Humanes κ	+	+
Humanes λ	+	+

++++ = Starke Affinität
 +++ = Mäßige Affinität
 ++ = Schwache Affinität
 + = Sehr schwache Affinität
 – = Keine Affinität



Schnelle Quantifizierung humanisierter monoklonaler Antikörper

Säule: Bio-Monolith Protein A
5069-3639
5,2 x 4,95 mm

Mobile Phase: A: 50 mM Phosphat, pH 7,4
B: 100 mM Zitronensäure, pH 2,8

Flussrate: 1 ml/min

Injektionsvolumen: Variabel (50 µl, optimiert für CHO-Zellkultur-
überstand, der IgG1 enthält)

Gradient:

Zeit (min)	% A	% B	
0 bis 0,5	100	0	Bindung
0,6 bis 1,7	0	100	Elution
1,8 bis 3,5	100	0	erneute Äquilibration

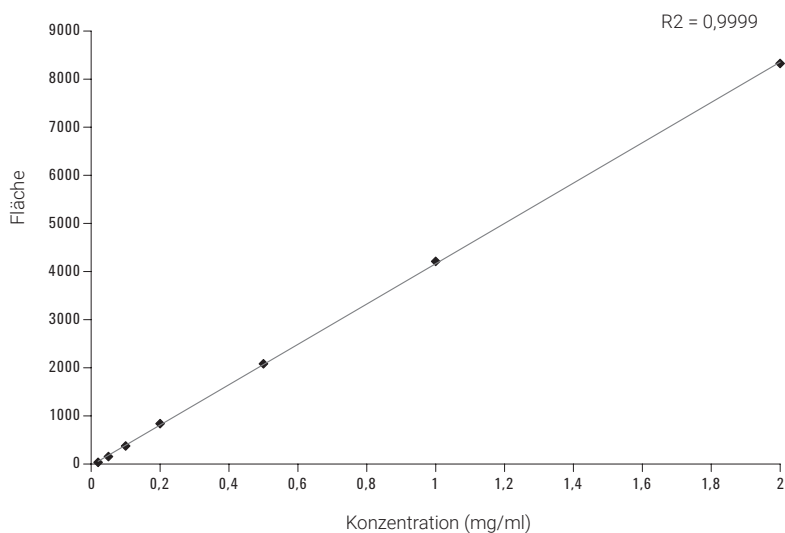
Temperatur: Umgebungstemperatur

Detektor: UV, 280 nm

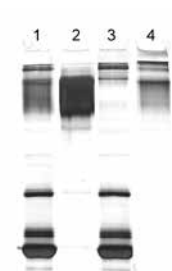
Fraktionssammlung: Zeitbasiert

Probe: IgG1 (1-20 mg/ml) und CHO-Zellkulturüberstand,
der IgG1 (bis zu 20 mg/ml Gesamtprotein) enthält

	RT (min)	Peakfläche
1	383	1,666
2	372	1,666
3	365	1,665
4	389	1,667
5	383	1,666
6	378	1,666
7	379	1,668
8	377	1,666
9	376	1,667
10	377	1,667
Mittel	378	1,667
S	6,52	0,001
% RSD	1,73	0,060

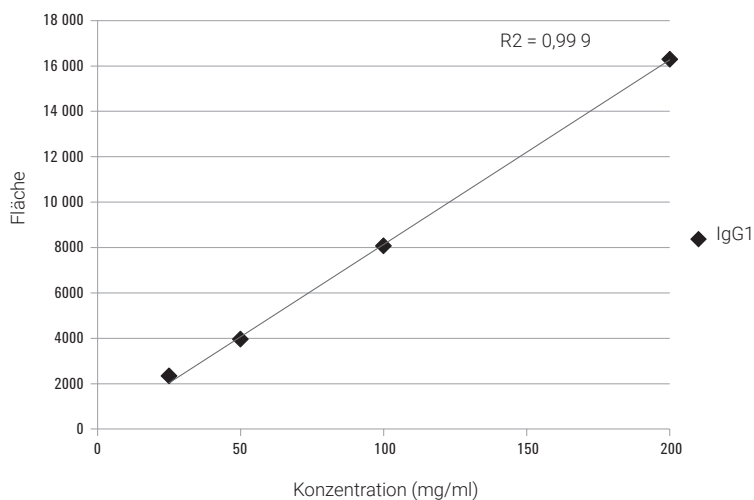


Kalibrierungskurven für modifiziertes humanisiertes
Trastuzumab (Panel A: 0-2 mg/ml und B: 25-200 mg/ml)

**Legende:**

Spur 1: Vollserum vor der Trennung
Spur 2: IgG-Standard
Spur 3: Peak 1 (Durchflussfraktion)
Spur 4: Peak 2 (an Protein A gebundene
Fraktion, beispielsweise IgG1)

SDS PAGE von Fraktionen der Trennung



Kein Einfluss auf die Bindungseffizienz durch hohe Flussrate

Säule: Bio-Monolith Protein A
5069-3639
5,2 x 4,95 mm

Mobile Phase: A: 20 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,4
B: 0,1 M Zitronensäure, pH 2,8

Flussrate: 1,0, 1,5 und 2,0 ml/min

Injektion: 4 µl (aus 2,5 mg/ml IgG1 versetzt mit 20 mg/ml E.coli-Überstand)

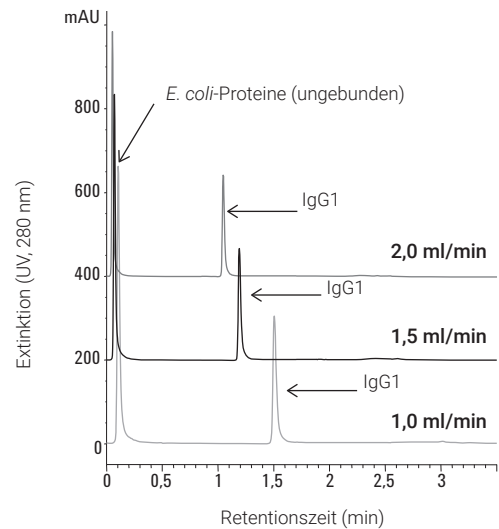
Detektor: UV, 280 nm

Gradient: 0 % B für 0,5 min, 100 % B von 0,6-1,7 min,
0 % B von 1,8-3 min

Temperatur: 25 °C

Probe: Humanisiertes IgG1 und E.coli-Lysat

Gerät: 1260 Infinity bioinertes LC-System



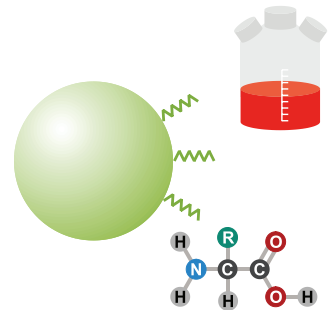
Bindung von IgG1 auf der Bio-Monolith Protein A-Säule bei unterschiedlichen Flussraten. Für diese Studie wurde mehr Probe aufgegeben, um Veränderungen des Chromatogramms und der Signalintegration besser beobachten zu können.

Relative Peakflächen des ungebundenen Proteins und von IgG1 in Abhängigkeit von der Flussrate

Flussrate (ml/min)	Fläche des ungebundenen Proteins (mAu/S)	Fläche des IgG1 (mAu/S)	Relative Fläche des ungebundenen Proteins (%)	Relative Fläche des IgG1 (%)	Druck (bar)
1,0	1230	738	63	37	32
1,5	840	492	63	37	47
2,0	636	363	64	36	68

Zellkultur- und Aminosäureanalytik

AdvanceBio Säulen von Agilent vereinfachen die Analyse von Aminosäuren und anderen kleinen Metaboliten in verbrauchten Zellkulturmedien im biotechnischen Labor – mit oder ohne Probenderivatisierung. Zur Gewährleistung von Qualität und Leistung werden die Säulen für beide Lösungsstrategien mit Aminosäuren getestet. Wählen Sie einfach den Arbeitsablauf, der am besten für Ihre Anforderungen geeignet ist.



Wählen Sie das Agilent AdvanceBio Aminosäureanalytik-Kit für die LC/UV-Analyse gemäß Industriestandard

- Automatische Derivatisierung von Aminosäuren online mit Trennung durch Umkehrphasen-LC und UV-Detektion.
- Dafür sind alle LC-Systeme von Agilent geeignet.
- Minimieren Sie die Investition in Geräte und Schulungen.

Wählen Sie Agilent AdvanceBio MS Spent Media Säulen für schnelle LC/MS-Analysen ohne Derivatisierung

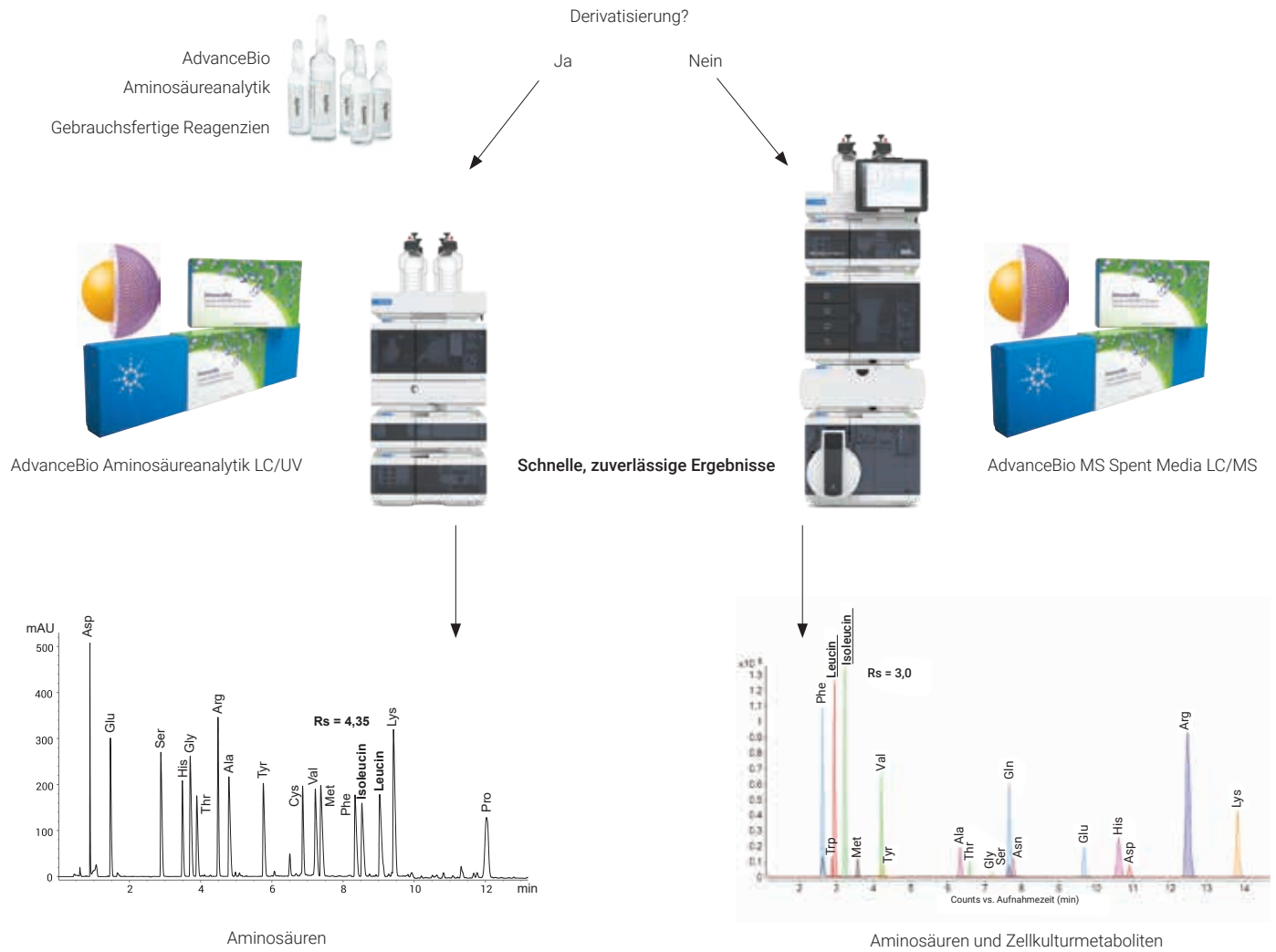
- Analysieren Sie Aminosäuren und andere Zellkulturmetabolite mit nur einer Methode: Trennung durch HILIC-LC mit MS-Detektion.
- Eine Derivatisierung Ihrer Proben ist nicht länger notwendig.
- Alle LC/MS-Systeme sind geeignet.
- Kein Bedarf einer chromatographischen Auflösung bis auf die Basislinie dank MS-Detektion.

Tipps und Werkzeuge

Agilent InfinityLab Wellplates und Dichtungsmatten sind die optimalen Probenbehälter für LC/MS-Applikationen mit hohem Probendurchsatz.

Besuchen Sie: www.agilent.com/chem/well-plates

Lösungen von Agilent zur Analyse von gebrauchten Zellkulturmedien



AdvanceBio Aminosäureanalytik (AAA)

AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA)-Säulen von Agilent liefern schnelle, empfindliche und reproduzierbare Trennungen von Aminosäuren in Proteinhydrolysaten und Zellkulturmedien.

Die Produktfamilie der AdvanceBio AAA-Produkte umfasst bewährte Reagenzien zur Aminosäurederivatisierung, Kits mit gebrauchsfertigen Aminosäurestandards, auf der innovativen Poroshell-Technologie von Agilent basierende Säulen sowie Support von Experten von Agilent. Zusammen mit den Geräten der Agilent InfinityLab LC Serie bieten die AdvanceBio AAA-Produkte eine Komplettlösung für die Aminosäureanalytik.

Die Säulen sind Teil der Agilent AdvanceBio-Produktfamilie, die als innovative Lösungen für die Charakterisierung von Biomolekülen entwickelt wurde.

- Zuverlässige Ergebnisse: hochaufgelöste Trennungen durch effiziente Poroshell-Partikelmorphologie.
- Geringere Kosten: lange Lebensdauer der Säule durch robustes, bei hohen pH-Werten stabiles, chemisch modifiziertes Silica.
- Größere Flexibilität: kompatibel mit HPLC- und UHPLC-Systemen dank Partikeln mit einem Durchmesser von 2,7 µm.
- Qualitätskontrolle: Chargenweise Tests der AdvanceBio AAA-Säulen mit Aminosäurestandards stellen die Qualität sicher.
- Einfache Bestellung: Standards und Reagenzien sind als Kits erhältlich.
- Automatisierte Online-Derivatisierung: mit Injektionssystemen für den analytischen Maßstab von Agilent.

Säulenspezifikationen

Gebundene Phase	Partikelgröße	Porengröße	Temp.-Grenze	pH-Bereich	mit Endcapping	Drucklimit
C18	2,7 µm	100 Å	60 °C	3,0-11,0	Doppelt	600 bar

Tipps und Werkzeuge

Weitere Informationen über die Komplettlösungen für die Aminosäureanalytik von Agilent finden Sie unter:
www.agilent.com/chem/aaa-how-to-guide

AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA)-Säulen

Beschreibung	Best.-Nr.
AdvanceBio Amino Acid Analysis 100 Å, 3,0 x 100 mm, 2,7 µm	695975-322
AdvanceBio Amino Acid Analysis 100 Å, 4,6 x 100 mm, 2,7 µm	655950-802
AdvanceBio Amino Acid Analysis 100 Å, 3,0 x 5 mm, 2,7 µm (Vorsäulen, 3 Stück)	823750-946
AdvanceBio Amino Acid Analysis 100 Å, 4,6 x 5 mm, 2,7 µm (Vorsäulen, 3 Stück)	820750-931

LC/UV

Säule: Agilent AdvanceBio
Amino Acid Analysis
4,6 x 100 mm
Best-Nr. 655950-802

Säulen-temperatur: 30 °C
Mobile Phase: Niedriger pH, MS-Detektion im positiven
Ionenmodus:

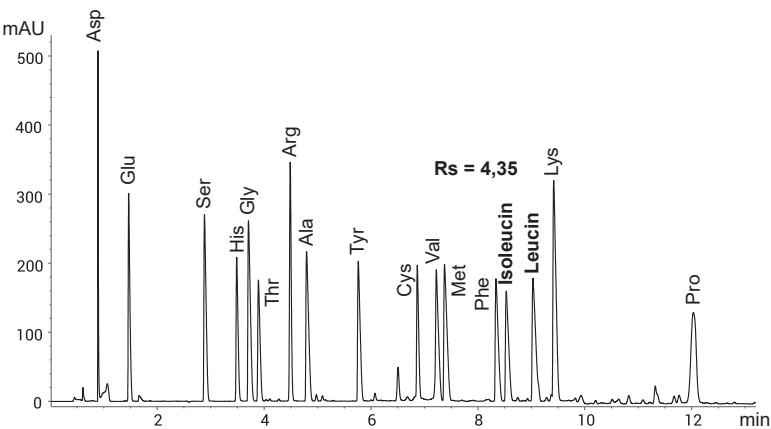
A = 10 mM Na₂HPO₄, 10 mM Na₂B₄O₇,
pH 8,2
B = Acetonitril:Methanol:Wasser,
45:45:10 (v:v:v)

Flussrate: 1,5 ml/min

Gradient:	Zeit (min)	% B
0	2	
0,35	2	
13,4	57	
13,5	100	
15,7	100	
15,7	2	
18	Ende	

Probe: Proteinhydrolysat

Detektion: Agilent 1260 Infinity II DAD WR



Ultraviolettchromatogramm von Aminosäuren eines Proteinhydrolysats. Die Auflösung von Leucin und Isoleucin beträgt 4,35. Dies übertrifft die Anforderungen des europäischen Arzneibuchs, das eine minimale Auflösung von 1,5 vorschreibt. [Europäisches Arzneibuch 9.0 (2.2.56) Aminosäurenanalyse.]

AdvanceBio Amino Acid Analysis -Standards und -Kit

Alle erforderlichen Derivatisierungsreagenzien und Aminosäurestandards für die Quantifizierung sind mit einer einzigen Bestellnummer erhältlich. Einzelne Komponenten können je nach Bedarf nachbestellt werden.

AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA)-Standards und -Reagenzien

Beschreibung	Best.-Nr.
Kit mit Standards und Reagenzien	5190-9426
Inhalt des Kits (kann auch separat bestellt werden)	
Boratpuffer, 100 ml	5061-3339
FMOC-Reagens für AAA, 10 Ampullen, je 1 ml	5061-3337
OPA-Reagens, 10 mg/ml, 6 Ampullen, je 1 ml	5061-3335
Dithiodipropionsäure (DTDPA), 5 g	5062-2479
AS-Standard, 1 nmol, 10 St.	5061-3330
AS-Standard, 250 pmol, 10 St.	5061-3331
AS-Standard, 100 pmol, 10 St.	5061-3332
AS-Standard, 25 pmol, 10 St.	5061-3333
AS-Standard, 10 pmol, 10 St.	5061-3334
AS-Ergänzung, je 1 g	5062-2478



Boratpuffer, 100 ml,
5061-3339



AS-Ergänzung, je 1 g, 5062-2478

Jeder Aminosäure-Standard enthält die folgenden Aminosäuren:

- Glycin
- L-Cystein
- L-Histidin
- L-Tyrosin
- L-Leucin
- L-Methionin
- L-Serin
- L-Alanin
- L-Phenylalanin
- L-Glutaminsäure
- L-Prolin
- L-Isoleucin
- L-Arginin
- L-Threonin
- L-Valin
- L-Lysin
- L-Asparaginsäure



AdvanceBio MS Spent Media

Agilent AdvanceBio MS Spent Media-Säulen sind HILIC-Säulen, die schnelle, empfindliche und reproduzierbare Trennungen nicht derivatisierter Aminosäuren und anderer polarer Metaboliten in Bioprozess-Zellkulturmedien für die massenspektrometrische Detektion liefern.

In Kombination mit Agilent InfinityLab Geräten der LC-Serie und Agilent MS-Geräten bieten die AdvanceBio MS Spent Media-Säulen eine Komplettlösung für die Analyse verbrauchter Medien.

Die AdvanceBio MS Spent Media-Säule ist ein neues Mitglied der Agilent AdvanceBio-Produktfamilie, die als innovative Lösung für die Produktion und Charakterisierung von Biomolekülen entwickelt wurde.

- Schneller, MS-basierter Arbeitsablauf
- Keine Derivatisierung der Proben erforderlich: das spart Zeit und Ressourcen
- Edelstahlsäulen mit PEEK-Beschichtung für einen inerten Flussweg, um exzellente Peakformen und Wiederfindungsraten schwieriger ionischer Metabolite zu erzielen
- Chromatographische Basislinientrennung der Isomere Leucin und Isoleucin
- Zur Gewährleistung von Qualität und Leistung werden die Säulen mit Aminosäuren getestet
- Exzellente analytische Empfindlichkeit mit MS-geeigneten mobilen Phasen
- Kompatibilität mit HPLC- und UHPLC-Systemen dank Poroshell Partikeln mit einem Durchmesser von 2,7 µm

Säulenspezifikationen

Gebundene Phase	Porengröße	Partikelgröße	Temperaturgrenze	pH-Bereich	Drucklimit
HILIC-Z	100 Å	2,7 µm	80 °C (bei pH 7)	3,0-11,0 (bei 35 °C)	600 bar

AdvanceBio MS Spent Media

Beschreibung	Best.-Nr.
AdvanceBio MS Spent Media 100 Å, 2,1 x 50 mm, 2,7 µm	679775-901
AdvanceBio MS Spent Media 100 Å, 2,1 x 100 mm, 2,7 µm	675775-901
AdvanceBio MS Spent Media 100 Å, 2,1 x 150 mm, 2,7 µm	673775-901

LC/MS

Säule: Agilent AdvanceBio
MS Spent Media
2,1 x 100 mm
Best-Nr. 675775-901

Säulentemperatur: 30 °C

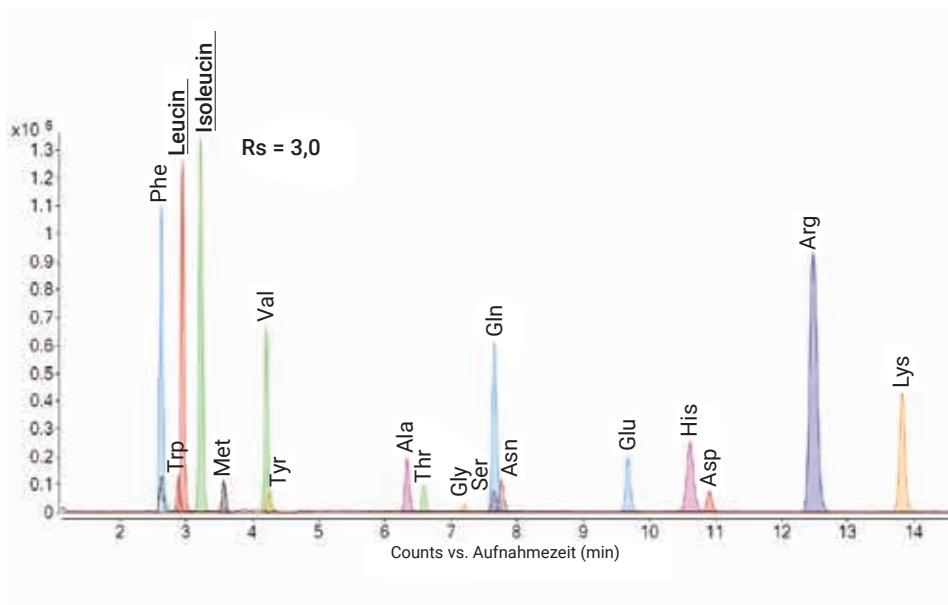
Mobile Phase: Niedriger pH, MS-Detektion im positiven Ionenmodus:
A = 10 % 200 mM Ammoniumformiat in Wasser
pH 3, 90 % Wasser
B = 10 % 200 mM Ammoniumformiat in Wasser
pH 3, 90 % Acetonitril
Endsalzkonzentration ist 20 mM.
Wir empfehlen zur Herstellung robuster, konsistenter mobiler
Phasen einen Puffer aus konzentrierter Stammlösung zu
verwenden.

Flussrate: 0,5 ml/min

Gradient:	Zeit (min)	% B (Niedriger pH, positiver Ionenmodus)	% B (Hoher pH, negativer Ionenmodus)
	0	1,00	100
	15	80	80
	15,5	100	100
	20	100	100

Probe: Zellkulturmedien, fünffach verdünnt
mit mobiler Phase B

Detektion: Agilent 6230 Time-of-Flight LC/MS

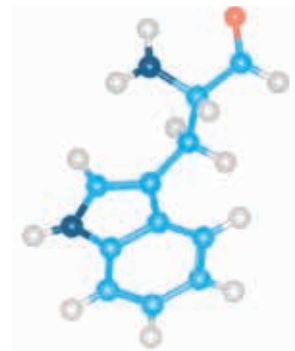
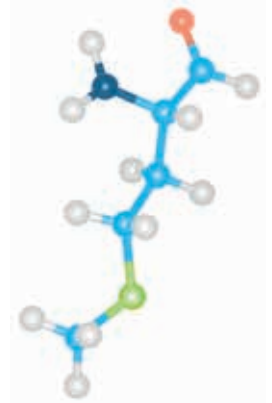


ZORBAX Eclipse Amino Acid Analysis (AAA)

- Für die Aminosäureanalytik getestet
- Verwendet bekannte Derivatisierungsreaktionen mithilfe der OPA- und FMOC-Vorsäulen
- Einfache Automatisierung unter Verwendung eines detaillierten Protokolls für die Online-Derivatisierung, erhältlich für die InfinityLab LC-Serie

Die ZORBAX Eclipse AAA-Säule trennt Aminosäuren nach einem aktualisierten und verbesserten Protokoll. Die Gesamtanalysendauer von einer Injektion bis zur nächsten beträgt 14 Minuten (9 min reine Analysendauer) auf kürzeren Säulen mit 75 mm Länge und 24 Minuten (18 min reine Analysendauer) auf Säulen mit 150 mm Länge. Die erforderliche Empfindlichkeit (5-50 pmol mit einem Diodenarray- oder Fluoreszenzdetektor) und Zuverlässigkeit wird mit OPA- und FMOC-Derivatisierungen in einem vollautomatisierten Verfahren mit einem InfinityLab LC-System erzielt.

ZORBAX Eclipse Plus-C18-Säulen mit 1,8 µm Partikeln erzielen bei Hochgeschwindigkeitsanalysen von Aminosäuren auf UHPLC-Systemen exzellente Ergebnisse.



ZORBAX Eclipse Amino Acid Analysis(AAA)-Säulen

Beschreibung	Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	Best.-Nr.
Empfindlichkeit in der Routineanalytik	4,6 x 150	5	993400-902
Empfindlichkeit in der Routineanalytik, hohe Auflösung mit Fluoreszenzdetektion	4,6 x 150	3,5	963400-902
Empfindlichkeit in der Routineanalytik, hoher Probendurchsatz	4,6 x 75	3,5	966400-902
Hohe Empfindlichkeit mit der Solvent Saver-Säule, hohe Auflösung	3,0 x 150	5	961400-302
Vorsäulenkartuschen, 4 St.	4,6 x 12,5	5	820950-931
Vorsäulen-Hardware-Kit			820999-901

**ZORBAX Eclipse Plus**

Beschreibung	Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	Eclipse Plus C18 USP L1
Narrow-Bore RRHD, 1200 bar	2,1 x 50	1,8	959757-902
Narrow-Bore RRHT, 600 bar	2,1 x 50	1,8	959741-902

Tipps und Werkzeuge

Weitere Informationen finden Sie im Dokument: *Automatic Precolumn Derivatization of Amino Acids and Analysis by Fast LC using the Agilent 1290 Infinity LC System* (Publikation 5990-5599EN)

www.agilent.com/search

Hohe Auflösung für 24 Aminosäuren

Säule: ZORBAX Eclipse AAA
963400-902
4,6 x 150 mm, 3,5 µm

Mobile Phase: A: 40 mM Na₂HPO₄, pH 7,8
B: ACN:MeOH:Wasser, 45:45:10 v/v/v

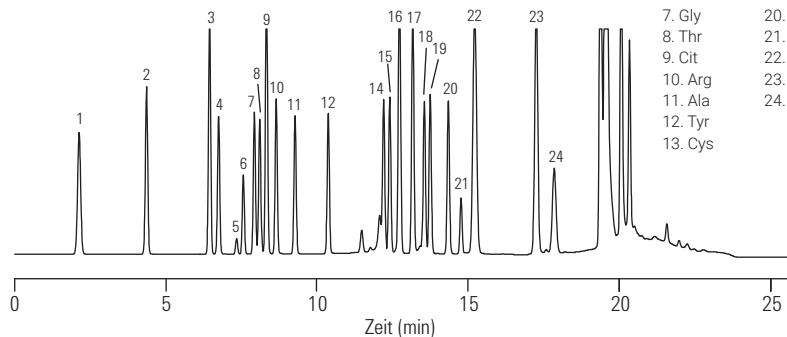
Flussrate: 2 ml/min

Temperatur: 40 °C

Detektor: Fluoreszenz

Probe: 24 Aminosäuren

- | | |
|---------|---------|
| 1. Asp | 14. Val |
| 2. Glu | 15. Met |
| 3. Asn | 16. Nva |
| 4. Ser | 17. Trp |
| 5. Gln | 18. Phe |
| 6. His | 19. Ile |
| 7. Gly | 20. Leu |
| 8. Thr | 21. Lys |
| 9. Cit | 22. Hyp |
| 10. Arg | 23. Sar |
| 11. Ala | 24. Pro |
| 12. Tyr | |
| 13. Cys | |



Diese hochaufgelöste Trennung von 24 Aminosäuren wird in 18 Minuten erzielt. Wird die Rapid Resolution Eclipse AAA-Säule, 4,6 x 75 mm, ausgewählt, werden diese Aminosäuren in 9 Minuten aufgelöst.

Tipps und Werkzeuge

In den Kurzanleitungen werden die allgemeinen Verbrauchsmaterialien aufgeführt, die Sie zur Hand haben sollten, damit die Geräte der Agilent InfinityLab LC-Serie immer die optimale Leistung liefern. Laden Sie Ihr kostenloses Exemplar herunter: www.agilent.com/chem/getguides

Proteinentfernung

Zur einfacheren Isolierung und Identifizierung von Proteinen in biologischen Proben wie Serum, Plasma und Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) wurde das Multiple Affinity Removal System entwickelt, um störende, hoch abundante Proteine aus biologischen Proben chromatographisch zu entfernen. Die Entfernung dieser abundanten Proteine verbessert die nachfolgende LC/MS- und die elektrophoretische Analyse der Probe dank der wirksamen Erweiterung des dynamischen Bereichs.



Proteinfractionierungssystem und Proteomikreagenzien von Agilent

- LC/MS-Analyse biologischer Proben
- Vorbereitung für elektrophoretische Analysen
- Probenvorbereitung für die Identifizierung von Biomarkern
- Validierung von Geräten und Arbeitsabläufen
- Kostengünstige Immundepletion
- Entsalzung, Aufkonzentrierung und Fraktionierung von Proben

Die Agilent mRP-C18 High Recovery Protein-Säule wurde entwickelt, um Proben zeitgleich in einem Schritt zu entsalzen, aufzukonzentrieren und zu fraktionieren, wobei extrem hohe Wiederfindungsraten im Vergleich zu herkömmlichen Umkehrphasen-HPLC-Säulen, die mit LC/MS-Analysen vollständig kompatibel sind, erzielt werden.

Darüber hinaus sind validierte Reagenzien zur Probenvorbereitung bei der Identifizierung von Biomarkern und anderen Proteomik-Applikationen erhältlich, wie beispielsweise ein komplexer Standard und für die Proteomik geeignetes Trypsin. Die Reagenzien sind vollständig mit Agilent LC/MS-Methoden kompatibel und erfordern keine zusätzliche Vorbehandlung der Proben.

Große und kundenspezifische Säulenabmessungen können mit unseren Kundenkonfigurationen erstellt werden.

Multiple Affinity Removal-System

Das Multiple Affinity Removal-System ermöglicht die Identifizierung und Charakterisierung wertvoller und in kleinen Mengen vorliegender Proteine und Biomarker in Serum, Plasma und anderen biologischen Flüssigkeiten.

Die Reproduzierbarkeit und Spezifität des Multiple Affinity Removal-Systems entfernt bis zu vierzehn hoch abundante Proteine aus biologischen Flüssigkeiten des Menschen und drei hoch abundante Proteine aus biologischen Flüssigkeiten der Maus.

Das Multiple Affinity Removal System ist in einer Reihe von LC-Säulenabmessungen und im Spin-Kartuschenformat erhältlich. In Kombination mit optimierten Puffern von Agilent, praktischen Spin-Filtern und Konzentratoren stellt das Multiple Affinity Removal-System eine automatisierte, integrierte Proteinentfernungslösung dar, die mit den meisten LC-Geräten (LC-Säulen) und Tischzentrifugen (Spin-Kartuschen) kompatibel ist.

Proben, für die mit dem Multiple Affinity Removal-System eine Proteinentfernung durchgeführt wurde, sind einsatzbereit für Downstreamanalysen wie 2D-Gelelektrophorese, LC/MS und andere analytische Methoden.



Multiple Affinity Removal-System

Tipps und Werkzeuge

Weitere Informationen zur Reduzierung der Zykluszeit in der Affinitätschromatographie finden Sie unter:

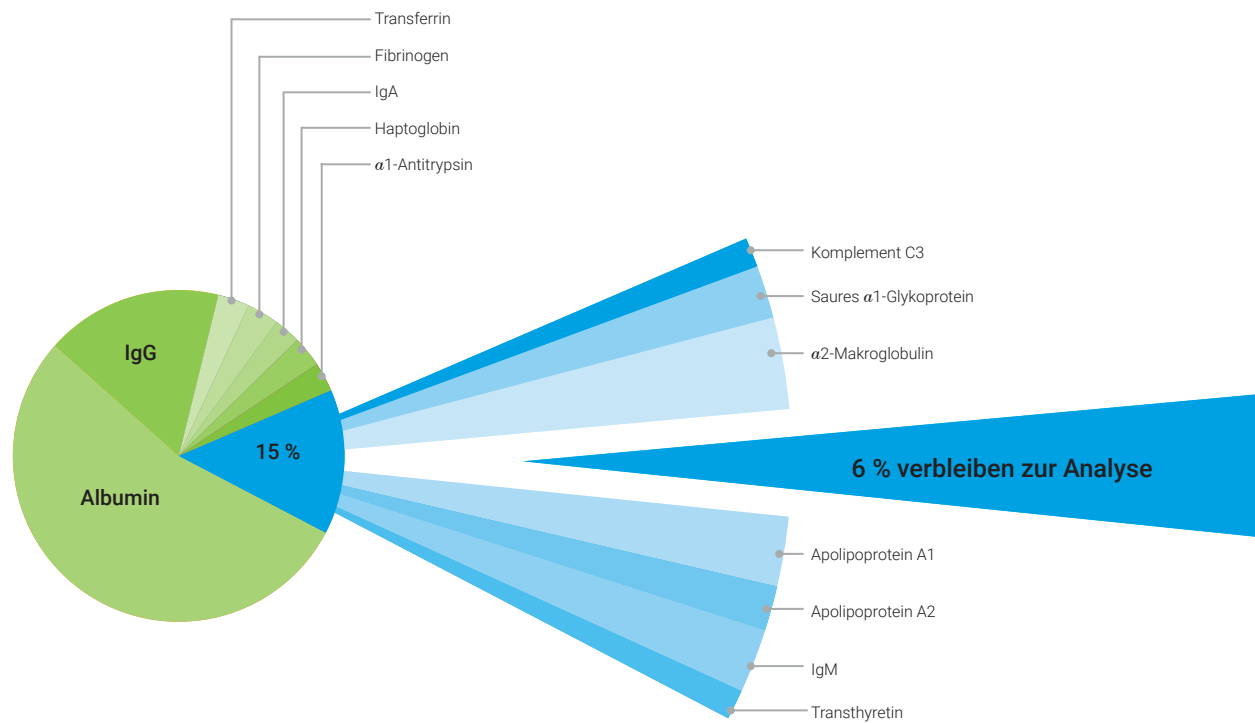
Reducing Cycle Time for Affinity Removal of High-Abundant Proteins in Human Plasma. Alternating Column Regeneration Using an Agilent 1200 Infinity Series Quick-Change Bio-inert 2-position/10-port Valve and an Agilent 1290 Infinity Flexible Cube (Publikation 5991-4721EN)

www.agilent.com/search

Anleitungen für die Auswahl von Multiple Affinity Removal-Systemen

Produkt	Entfernte Proteine	Insgesamt entfernte Proteine	Abmessungen	Beladungs-kapazität	Best.-Nr.
MARS Human-14	Albumin, IgG, Antitrypsin, IgA, Transferrin, Haptoglobin, Fibrinogen, Alpha-2-Makroglobulin, saures Alpha-1-Glykoprotein, IgM, Apolipoprotein A1, Apolipoprotein A2, Komplement C3, Transthyretin	94 %	Spin-Kartusche	8-10 µl	5188-6560
			4,6 x 50 mm	20 µl	5188-6557
			4,6 x 100 mm	40 µl	5188-6558
			10,0 x 100 mm	250 µl	5188-6559
MARS Human-7	Albumin, IgG, IgA, Transferrin, Haptoglobin, Antitrypsin, Fibrinogen	88-92 %	Spin-Kartusche	12-14 µl	5188-6408
			4,6 x 50 mm	30-35 µl	5188-6409
			4,6 x 100 mm	60-70 µl	5188-6410
			10,0 x 100 mm	250-300 µl	5188-6411
MARS Human-6	Albumin, IgG, IgA, Transferrin, Haptoglobin, Antitrypsin	85-90 %	Spin-Kartusche	7-10 µl	5188-5230
			4,6 x 50 mm	15-20 µl	5185-5984
			4,6 x 100 mm	30-40 µl	5185-5985
MARS Human-High Capacity	Albumin, IgG, IgA, Transferrin, Haptoglobin, Antitrypsin	85-90 %	Spin-Kartusche	14-16 µl	5188-5341
			4,6 x 50 mm	30-40 µl	5188-5332
			4,6 x 100 mm	60-80 µl	5188-5333
			10,0 x 100 mm	bis zu 340 µl	5188-5336
MARS Human-2	Albumin, IgG	69 %	Spin-Kartusche	50 µl	5188-8825
			4,6 x 50 mm	100 µl	5188-8826
MARS Human-1	Albumin	50-55 %	Spin-Kartusche	65 µl	5188-5334
			4,6 x 50 mm	130 µl	5188-6562
MARS Mouse-3	Albumin, IgG, Transferrin	80 %	Spin-Kartusche	25-30 µl	5190-2534
			4,6 x 50 mm	37-50 µl	5188-5217
			4,6 x 100 mm	75-100 µl	5188-5218

Von Multiple Affinity Removal-Säulen und -Spin-Kartuschen entfernte hoch abundante Proteine



Tipps und Werkzeuge

Erfahren Sie mehr über das gesamte Serviceangebot von Agilent unter www.agilent.com/chem/services

Starterkits für Multiple Affinity Removal-Systeme

Starterkits mit Reagenzien für LC-Säulen und Spin-Kartuschen enthalten alle erforderlichen Verbrauchsmaterialien für den Gebrauch mit dem Multiple Affinity Removal-System. Die Puffer bieten optimale Bedingungen für eine lange Lebensdauer der Säulen und für die Reproduzierbarkeit der Probenanalysen.

- Die Kits enthalten Puffer A und Puffer B in ausreichender Menge für die Depletion von ungefähr 200 Proben mit einer 4,6 x 50 mm LC-Säule, für die Depletion von ungefähr 100 Proben mit einer 4,6 x 100 mm LC-Säule oder für 200 Einsätze der Spin-Kartuschen.
- Der Ladepuffer A minimiert die Protein-Protein-Wechselwirkungen und ermöglicht es den gering abundanten Proteinen, die häufig an hoch abundante Proteine gebunden sind, die Säule zu verlassen, während die hoch abundanten Zielproteine an ihre jeweiligen Antikörper binden.
- Der Elutionspuffer B bricht die Antikörper-Protein-Wechselwirkungen anschließend auf und eluiert die hoch abundanten Proteine von der Säule.

Starterkits für Multiple Affinity Removal-Systeme

Beschreibung	Best.-Nr.
Verdünnungspuffer für hoch konzentrierte Proben, 50 ml	5188-8283
Starterkit mit Reagenzien für LC-Säulen enthält:	5185-5986
Puffer A, zum Beladen, Waschen und Äquilibrieren, 1 l	5185-5987
Puffer B, zur Elution, 1 l	5185-5988
Spin-Filter, 0,22 µm Celluloseacetat, 25 St.	5185-5990
Spin-Konzentratoren, 5K MWCO, 4 ml, 25 St.	5185-5991
Das Kit mit Reagenzien für Multiple Affinity Removal Spin-Kartuschen enthält:	5188-5254
Puffer A, zum Beladen, Waschen und Äquilibrieren, 1 l	5185-5987
Puffer B, zur Elution, 1 l	5185-5988
2 x Spin-Filter, 0,22 µm Celluloseacetat, 25 St.	5185-5990
Spin-Konzentratoren, 5K MWCO, 4 ml, 25 St.	5185-5991
Luer-Lok-Adapter, 2 St.	5188-5249
Kunststoffspritze, 5 ml, Luer-Lok, 2 St.	5188-5332
6 x Mikroröhrchen, 1,5 ml, Schraubverschluss, 100 St.	5188-5251
Verschlüsse und Stopfen, 6 St.	5188-5252
PTFE-Nadeln, Luer-Lok, 10 St.	5188-5253



Starterkit mit Reagenzien für LC-Säulen, 5185-5986



Luer-Lok-Spritze, 5188-5250



Luer-Lok-Adapter, 5188-5249



Luer-Lok-Nadeln, 5188-5253

Spezialabmessungen

Kapillar- und Nanosäulen

- Höchste Empfindlichkeit für kleinste Probenmengen
- Mit allen LC/MS-Interfaces kompatibel
- Innendurchmesser von 0,5, 0,3, 0,1 und 0,075 mm
- Porengröße von 300 Å für die Analyse von Biomolekülen
- Ideal für 1D- und 2D(Proteomik)-Applikationen

ZORBAX Kapillarsäulen (0,5 und 0,3 mm ID) und Nanosäulen (0,1 und 0,075 mm ID) gibt es mit einer Vielzahl verschiedener Phasen und Abmessungen. Die Säulen sind ideal für Applikationen mit sehr geringen Probenmengen geeignet, da sie durch die Reduzierung der Probenverdünnung auf der Säule eine verbesserte Empfindlichkeit bieten.



Nanosäulen

Tipps und Werkzeuge

Agilent bietet verschiedene Online-Seminare und Vor-Ort-Schulungen an, um Ihre Kenntnisse darüber zu vertiefen, wie Sie die Chromatographie noch wirksamer einsetzen können.

Weitere Information erhalten Sie unter: www.agilent.com/chem/education

Hoch empfindliche LC/MS-Analyse eines Proteinverdaus

Säule: ZORBAX 300SB-C18
5065-9911
0,075 x 150 mm, 3,5 µm

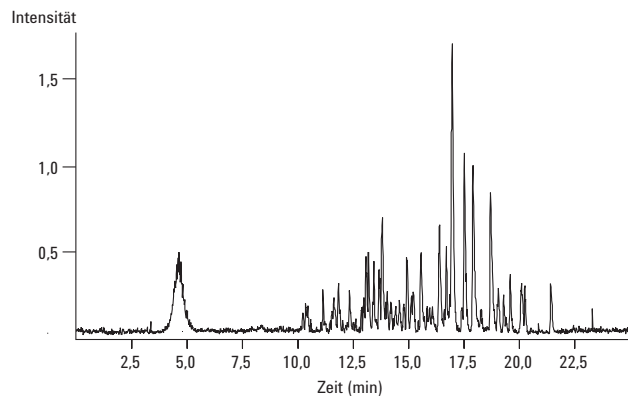
Mobile Phase: A: Wasser + 0,1 % Ameisensäure
B: ACN + 0,1 % Ameisensäure

Flussrate: 600 nL/min

Gradient: 2 % B bis 52 % B in 25 min

Detektor: Positive Nano-Ionen-Elektrospray-MS

Probe: Verdauprodukt von acht Proteinen, 100 fmol (1 µL)



Eine ZORBAX Nano-HPLC-Säule, 0,075 mm ID, wird für die hoch empfindliche LC/MS-Analyse einer Proteinverdauprobe verwendet.

Hohe Empfindlichkeit mit Kapillarsäulen

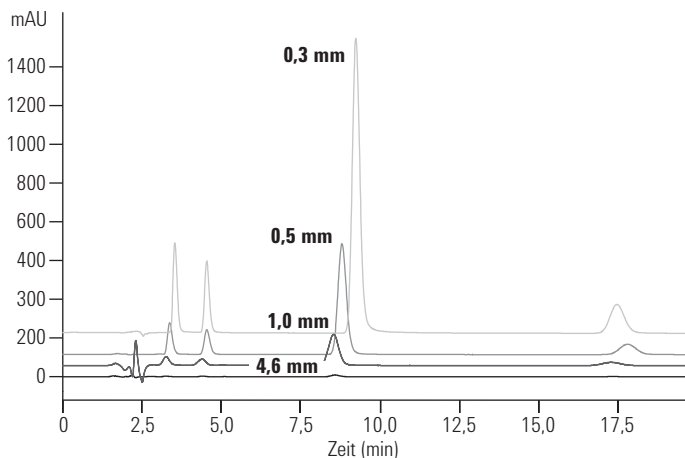
Säule: ZORBAX SB-C18
5064-8255
0,3 x 150 mm, 5 µm

Säule: ZORBAX SB-C18
5064-8256
0,5 x 150 mm, 5 µm

Säule: ZORBAX SB-C18
863600-902
1,0 x 150 mm, 3,5 µm

Säule: ZORBAX SB-C18
883975-902
4,6 x 150 mm, 5 µm

Probe: Biphenyl 200 ng



Applikationen mit sehr geringen Probenmengen erfordern Kapillarsäulen, um die Probenverdünnung auf der Säule zu minimieren und die Empfindlichkeit zu verbessern. Die 0,3 mm Kapillare in diesem Beispiel bietet eine 100-fach größere Empfindlichkeit als die Standardsäule mit 4,6 mm Innendurchmesser. Nanobore-Säulen von Agilent (0,1 mm bis 0,075 mm ID) können eine bis zu 2000-fach höhere Empfindlichkeit für die meisten Applikationen mit sehr geringen Probenmengen bieten.

Humanserum: Isolierung und Identifizierung eines gering abundanten Proteins aus einer 1D-Gelbande mittels LC/MS

Säule: ZORBAX 300SB-C18
Falle: 0,3 x 5 mm, 5 µm, 5065-9913
Analytische Säule: 0,3 x 150 mm, 5 µm,

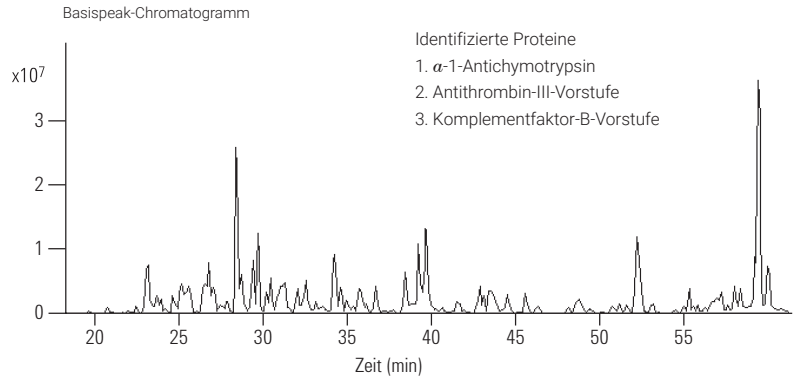
5064 -8263

Mobile Phase: A: Wasser + 0,1 % Ameisensäure
B: Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure

Flussrate: 6 µl/min

Gradient: 0 min 3 % B
5 min 3 % B (Beladung)
50 min 45 % B
52 min 80 % B
57 min 80 % B
60 min 3 % B

Probe: Bande aus 1D-Gelverdau



Probenvorbereitung des Humanserums: Die abundanten Serumproteine wurde unter Verwendung einer Multiple Affinity Removal-Säule, 4,6 x 100 mm (Best-Nr. 5185-5985), entfernt.

Danach wurde ein 1D-Gelverdau durchgeführt.

Peptidphosphorylierungsstellen, LC und LC/MS mit Kapillar-LC-Säulen

Säule: ZORBAX 300SB-C18
5064-8268
0,5 x 150 mm, 3,5 µm

Mobile Phase: A: Wasser + 0,1 % Ameisensäure
B: Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure

Flussrate: 5,5 µl/min

Gradient: 5-55 % B in 50 min, bis 85 % B von 55-57 min

Detektor: UV, 206 nm

MS-Bedingungen: LC/MS: Pos. Ionen-ESI mit
LC/MSD-Falle

Vcap: 4000 V

Trocknungsgas-
fluss: 7 l/min

Trocknungsgas-
temperatur: 250 °C

Zerstäuber: 15 psi

Spannung am
Kapillaraustritt: 50 V

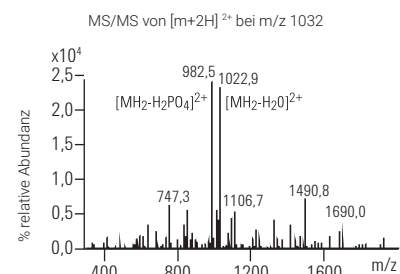
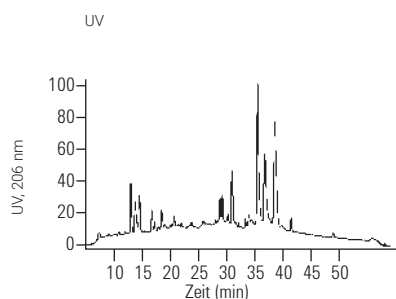
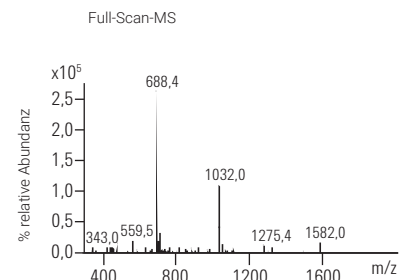
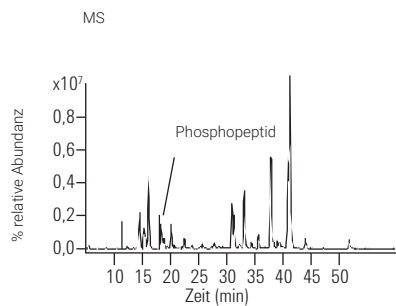
Max. Akkum.zeit: 300 ms

Gesamtdurch-
schnitt: 3

Isolationsbreite: 3 m/z

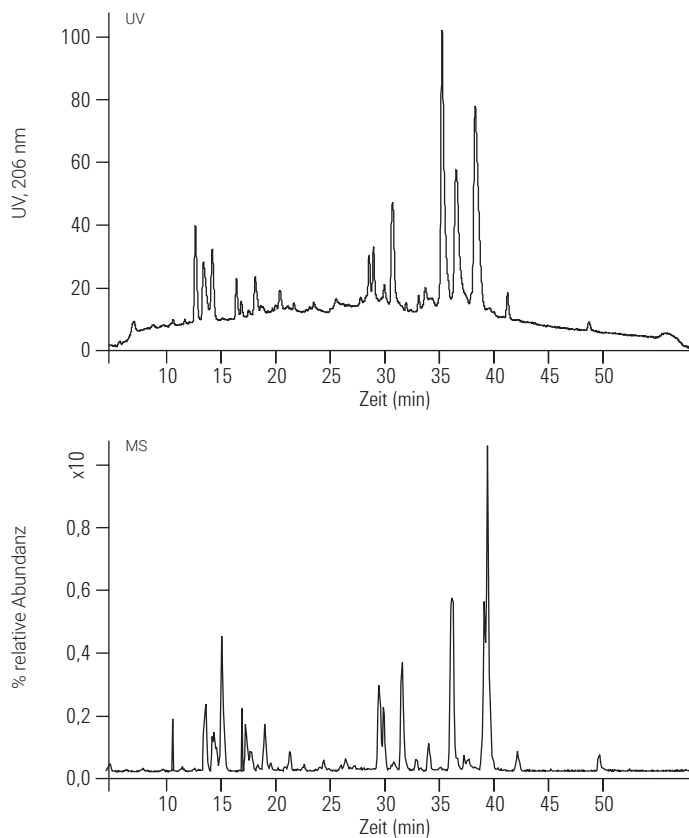
Frag.amplitude: 1,0 V

Probe: Beta-Casein-Verdau, 100 nl (4 pmol)



Kapillarsäulen für HPLC-Analysen mit UV- und MS-Detektion

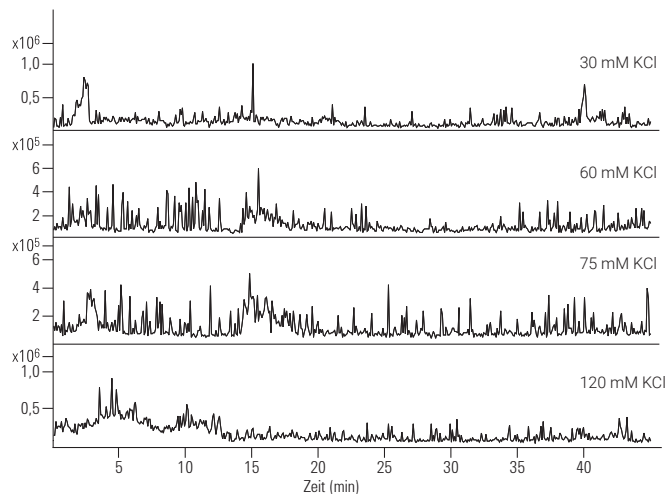
Säule:	ZORBAX 300SB-C18 5064-8263 0,3 x 150 mm, 5 µm
Mobile Phase:	5-55 % B in 50 min, bis 85 % B von 55-57 min A: Wasser + 0,1 % Ameisensäure B: Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure
Flussrate:	5,5 µl/min
Detektor:	UV, 206 nm
MS-Bedingungen:	LC/MS: Pos. Ionen-ESI mit LC/MSD-Falle, Vcap 4000 V Trocknungsgas- fluss: 7 l/min Trocknungsgas- temperatur: 250 °C Zerstäuber: 15 psi Spannung am Kapillaraustritt: 50 V Max. Akkum.zeit: 300 ms Gesamtdurch- schnitte: 3 Isolationsbreite: 3 m/z Frag.amplitude: 1,0 V
Probe:	Beta-Casein-Verdau, 100 nl (4 pmol)



Für die Trennung des Proteinverdaus wird eine ZORBAX 300SB-C18-Kapillarsäule (0,3 mm ID) verwendet. Die Detektion erfolgt sowohl mit UV als auch mit Elektrospray-MS. Die MS-Detektion kann zur Identifizierung der Peptidfragmente eingesetzt werden.

Proteine in einer komplexen Probe: 2D-HPLC-Analyse mit Nano-HPLC-Säulen

Säule:	ZORBAX 300SB-C18 5065-9913 0,3 x 5 mm, 5 µm
Säule:	ZORBAX 300SB-C18 5065-9911 0,075 x 150 mm, 3,5 µm
Mobile Phase:	Quaternäre Pumpe: 3 % Acetonitril; 0,1 % Ameisensäure Nanopumpe: A; Wasser, 0,1 % Ameisensäure, B; ACN, 0,1 % Ameisensäure
Flussrate:	Quaternäre Pumpe: 30 µl/min Nanopumpe: 300 nl/min
Gradient:	Quaternäre Pumpe: isokratisch Nanopumpe: 6 min = 3 % B, 120 min = 60 % B, 125 min = 80 % B, 130 min = 80 % B, 131 min = 3 % B, 140 min = 3 % B
MS-Bedingungen:	Quelle: Nano-ESI, Trocknungsgasfluss: 5 l/min, Trocknungsgastemperatur: 225 °C Ionenfalle: Skim: 1: 35 V, Offset am Kap.austritt: 115 V, Oktopol 1: 12 V, Oktopol 2: 3,5 V, Trap drive: 80 V. ICC: ein, Durchschnitt: 4, max. Akkum.zeit: 150 ms; Ziel 60,000, positiver Ionenmodus, MS/MS-Modus
Probe:	Tryptischer Verdau von bovinem Serumalbumin Volumen: 1 bis 8 µl Elution mit hohem Salzgehalt: 8 ml 10 mM bis 100 mM KCl (10 mM Inkremente), 125 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM, 500 mM, 1 M



Tryptischer Verdau von bovinem Serumalbumin (BSA). Die Basispeak-Chromatogramme zeigen eine Auswahl der Fraktionen der 2D-HPLC-Trennung. Die einzelnen Chromatogramme bilden die Peptide des BSA ab, die bei der angegebenen Salzkonzentration eluieren, dann angereichert und einer Umkehrphasen-Chromatographie unterzogen werden.

ZORBAX Bio-SCX Serie II

ZORBAX Bio-SCX-Säulen der Serie II wurden für eine optimierte 2D-Trennung von Peptiden und Proteinen mittels LC/MS entwickelt. Das Packungsmaterial basiert auf ultrareinen ZORBAX Silicapartikeln mit einer Größe von 3,5 µm, an die ein für Biomoleküle geeignetes und mit Sulfonsäuregruppen funktionalisiertes Polymer gebunden ist. Mit diesen Eigenschaften werden im Ionenaustauschschritt der 2D-Analyse von Peptiden und Proteinen eine starke Retention und gute Peakformen erzielt.



Nanosäulen

Spezifikationen der HPLC-Säulen

Gebundene Phase	Porengröße	Oberfläche	pH-Bereich	Funktionalität	Max. Druck
ZORBAX Bio-SCX Serie II	300 Å	90 m ² /g	2,5-8,5	Sulfonsäure	350 bar

Stärkere Retention kleiner Peptide

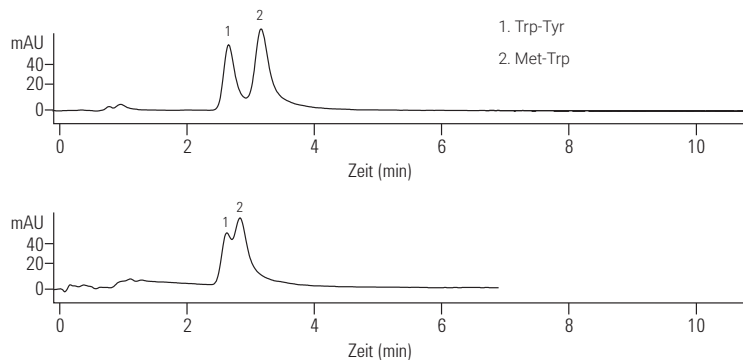
Säule: ZORBAX Bio-SCX Serie II
5065-9912
0,3 x 35 mm, 3,5 µm

Mobile Phase: 95 % 40 mM NaCl: 5 % ACN, 0,3 % Ameisensäure

Flussrate: 5 µl/min

Detektor: UV, 230 nm

Probe: Synthetisches Dipeptid



Die ZORBAX Bio-SCX-Säulen der Serie II retardieren kleinere Peptide stärker als einige andere SCX-Säulen. Daher wird eine bessere Auflösung der hydrophileren Peptidfragmente und eine genauere Identifizierung erzielt, wenn diese Säulen in 2D-HPLC-Analysen eingesetzt werden.

Tipps und Werkzeuge

Bioinerte Verbrauchsmaterialien von Agilent sorgen für einen metallfreien Probenflussweg, der die Wechselwirkungen Ihrer Biomoleküle minimiert.

Besuchen Sie: www.agilent.com/chem/bio-inert-uhplc

ZORBAX HPLC-Kapillarsäulen (glasbeschichteter Edelstahl)

Beschreibung	Größe (mm)	Partikelgröße (mm)	300SB-C18	300SB-C8	300Extend-C18
Kapillare	0,5 x 250	5	5064-8266		
Kapillare	0,5 x 150	5	5064-8264		
Kapillare RR	0,5 x 150	3,5	5064-8268		
Kapillare	0,5 x 35	5	5064-8294		
Kapillare RR	0,5 x 35	3,5	5065-4459		
Kapillare	0,3 x 250	5	5064-8265		
Kapillare	0,3 x 150	5	5064-8263		
Kapillare	0,3 x 35	5	5064-8295		
Kapillare RR	0,3 x 150	3,5	5064-8267	5065-4460	5065-4464
Kapillare RR	0,3 x 100	3,5	5064-8259	5065-4461	5065-4465
Kapillare RR	0,3 x 75	3,5	5064-8270	5065-4462	5065-4466
Kapillare RR	0,3 x 50	3,5	5064-8300	5065-4463	5065-4467
Ersatzsiebe, 10 St.			5065-4427	5065-4427	5065-4427

ZORBAX Nano-HPLC-Säulen (PEEK)

Beschreibung	Größe (mm)	Partikelgröße (mm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7
Nano RR	0,1 x 150	3,5	5065-9910	
Nano RR	0,075 x 150	3,5	5065-9911	
Nano RR	0,075 x 50	3,5	5065-9924	5065-9923
Falle/Vorsäule, 5 St.	0,3 x 5	5	5065-9913	5065-9914
Falle/Vorsäulen-Hardware-Kit			5065-9915	5065-9915



Microbore-Säulen (1,0 mm ID)

- Hohe Empfindlichkeit für kleine Probenmengen
- Mit LC/MS-Interfaces kompatibel
- Große Bandbreite gebundener Phasen
- Silica- und Polymerpartikel

Microbore-Säulen (1,0 mm ID) sind eine gute Wahl, wenn die Probenmenge begrenzt ist. Sie können die Nachweisgrenze bei gleicher Probenmenge um das Fünffache im Vergleich zu Säulen mit 2,1 mm ID verbessern. Diese Steigerung der Empfindlichkeit kann entscheidend sein. Microbore-Säulen verwenden geringe Flussraten (typischerweise ~ 50 µl/min). Daher sind diese Säulen ideal für Detektoren, die geringe Flussraten erfordern (wie Massenspektrometer) und für Kapillar-LC-Systeme geeignet.

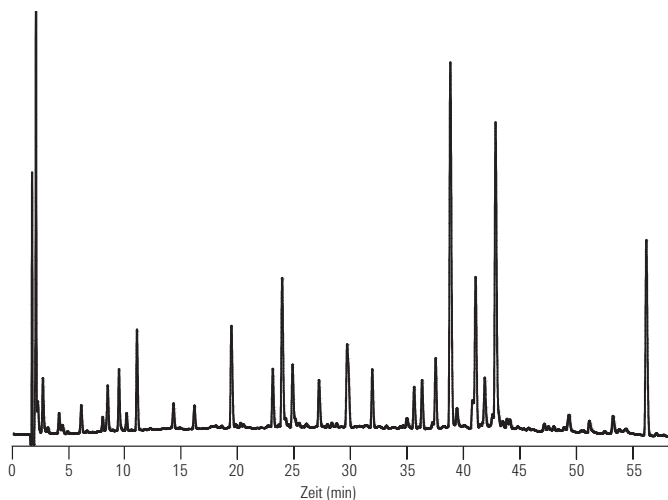
Die optimale Leistung wird erzielt, wenn Microbore-Säulen in UHPLC-/HPLC-Microbore-Systemen eingesetzt werden. Eine große Bandbreite gebundener Phasen ist für den Einsatz bei bis zu 400 bar erhältlich: StableBond, 300SB-C18, 300SB-C8 und Poroshell-Säulen. Für Applikationen, die außergewöhnlich stabile Partikel mit weiten Poren erfordern, sind auch Umkehrphasen auf Polymerbasis, PLRP-S, und die Ionenaustauscher PL-SAX und PL-SCX erhältlich. Vorsäulen sind jetzt auch mit einem einstellbaren Anschlag für die Einführtiefe der Kapillare erhältlich, um immer eine perfekte Verbindung ohne Totvolumen zu liefern.



Sterisch geschützte gebundene Phase von 300StableBond

Trennung eines tryptischen Verdaus

Säule:	ZORBAX 300SB-C18 863630-902 1,0 x 150 mm, 3,5 µm
Mobile Phase:	Gradient: 2-60 % B in 60min A: 0,1 % TFA B: 0,075 % TFA:80 % ACN
Flussrate:	50 µl/min
Temperatur:	50 °C
Detektor:	UV, 215 nm
Probe:	Tryptischer Verdau von rhGH, 2 µl



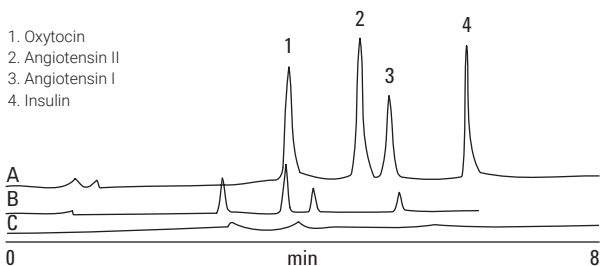
Dieses Beispiel einer Trennung eines tryptischen Verdaus auf einer Microbore-Säule zeigt die hohe Empfindlichkeit und Auflösung, die auf Säulen mit 1,0 mm ID möglich ist.

Microbore-HPLC für empfindliche Peptidanalyse

Säule:	PLRP-S 100 Å, 5 µm 150 mm x verschiedene ID
Mobile Phase:	A: 0,01 M TRIS-HCl, pH 8 B: A + 0,35 M NaCl, pH 8
Flussrate:	1 ml/min
Gradient:	linear 20 % ACN, 0,1 % TFA bis 50 % ACN, 0,1 % TFA für 15 min
Injektionsvolumen:	0,5 µl
Probenkonz.:	0,25 mg/ml
Detektor:	UV, 220 nm

Peakidentifikation

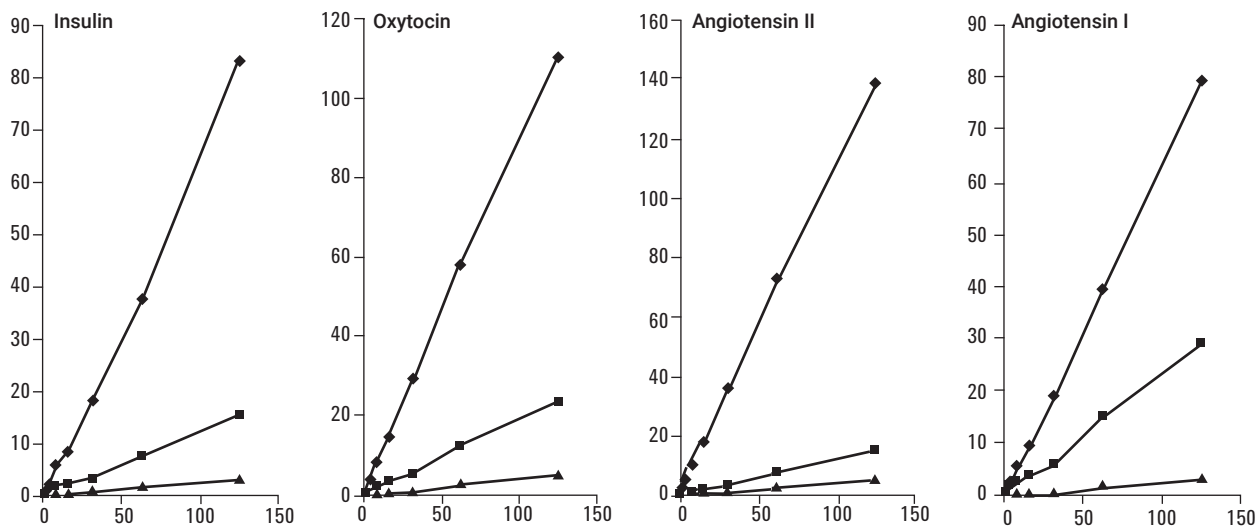
- A.** 1,0 mm ID (Flussrate 47 µl/min)
B. 2,1 mm ID (Flussrate 200 µl/min)
C. 4,6 mm ID (Flussrate 1 ml/min)



Peptidtrennung auf PLRP-S 100 Å-Säulen mit 5 µm Partikeln

Peakidentifikation

- ◆ 1,0 mm
 ■ 2,1 mm
 ▲ 4,6 mm



Graphische Darstellungen der Datenpunkte der Standardkurve auf PLRP-S-Säulen. Die Reduzierung des Innendurchmessers der Säule senkt die Nachweisgrenze und ermöglicht eine Quantifizierung mit einer geringeren Probenmenge.

Microbore (1,0 mm ID)

Beschreibung	Größe (mm)	Partikelgröße (mm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7		
Microbore	1,0 x 250	5	861630-902			
Microbore RR	1,0 x 150	3,5	863630-902	863630-906		
Microbore RR	1,0 x 50	3,5	865630-902	865630-906		
Microbore-Vorsäule, 3 St.	1,0 x 17	5	5185-5920	5185-5920		
Beschreibung	Größe (mm)	Partikelgröße (mm)	Poroshell 300SB-C18	Poroshell 300SB-C8	Poroshell 300SB-C3	Poroshell 300Extend-C18
Microbore	1,0 x 75	5	661750-902	661750-906	661750-909	671750-902
Microbore-Vorsäule, 3 St.	1,0 x 17	5	5185-5968	5185-5968	5185-5968	
Beschreibung	Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	PLRP-S 100 Å USP L21	PLRP-S 300 Å USP L21	PLRP-S 1000 Å USP L21	PLRP-S 4000 Å USP L21
Microbore	1,0 x 150	3	PL1312-3300			
Microbore	1,0 x 50	8			PL1312-1802	PL1312-1803
Microbore	1,0 x 50	5	PL1312-1500	PL1312-1501	PL1312-1502	PL1312-1503
Microbore	1,0 x 50	3	PL1312-1300	PL1312-1301		
Beschreibung	Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	PL-SAX 1000 Å	PL-SAX 4000 Å	PL-SCX 1000 Å	PL-SCX 4000 Å
Microbore	1,0 x 50	5	PL1351-1502	PL1351-1503	PL1345-1502	PL1345-1503

2D-LC

- Kombination zweier orthogonaler LC-Techniken in einer einzigen Analyse
- Bietet selbst im Vergleich mit UHPLC-Methoden eine größere Peakkapazität
- Verbindet Größenausschluss- und Ionenaustausch-Methoden mit der Massenspektrometrie

Die Heterogenität und Komplexität von Biomolekülen erfordert die Verwendung mehrerer LC-Techniken zur Identifizierung und Charakterisierung von Zielbiopharmazeutika. Durch die Kombination zweier orthogonaler Techniken in einer einzigen Analyse, beispielsweise der hydrophilen Interaktionschromatographie und der Umkehrphasen-Chromatographie oder der Kationenaustausch-Chromatographie und der Umkehrphasen-Chromatographie, kann eine ausgezeichnete Trennleistung zur Identifizierung und Analyse von kritischen Qualitätsmerkmalen erzielt werden.

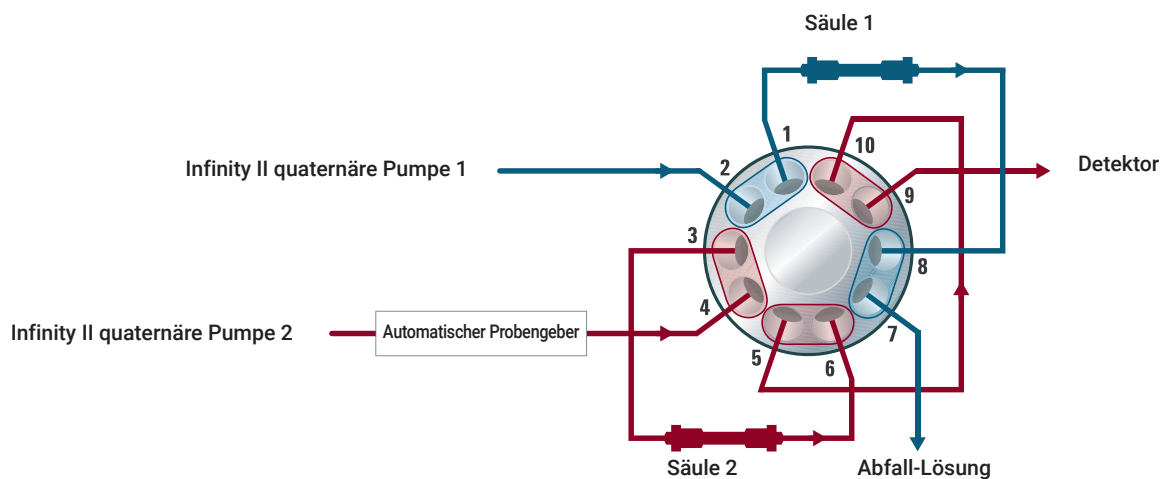
Die Einsatzgebiete der 2D-LC reichen von der einfachen Entsalzung einer Fraktion eines auf einer Protein A-Säule gereinigten monoklonalen Antikörpers bis zur Verbindung der hydrophilen Interaktionschromatographie mit dem Peptid-Mapping mit Umkehrphasenmethoden zur Charakterisierung des gesamten Spektrums der Peptidfragmente: hydrophobe sowie hydrophile Peptidfragmente und Fragmente von Glykopeptiden.

Erzielen Sie eine gesteigerte Produktivität, indem Sie die 2D-LC nutzen, um die Analysendauer zu verkürzen und die Generierung von Daten und deren Interpretation zu maximieren:

- Erprobung von Methoden und Umschaltung zwischen Applikationen
- Offline-Säulenregenerierung
- Online-Verunreinigungsanalyse
- Heart-Cutting-2D-LC
- Umfassende 2D-LC

Offline-Säulenregenerierung

Für eine korrekte Analyse der Ladungsvarianten mit der Ionenaustausch-LC ist eine sorgfältige Reinigung der Säule und deren erneute Äquilibrierung erforderlich. Dies verlängert die Gesamtanalysendauer und daher sind Strategien erforderlich, mit denen diese Zeit verkürzt werden kann, um den Probendurchsatz zu erhöhen. Dies wird durch die Offline-Säulenregenerierung erreicht. Die Zykluszeit kann damit um bis zu 40 % reduziert werden.



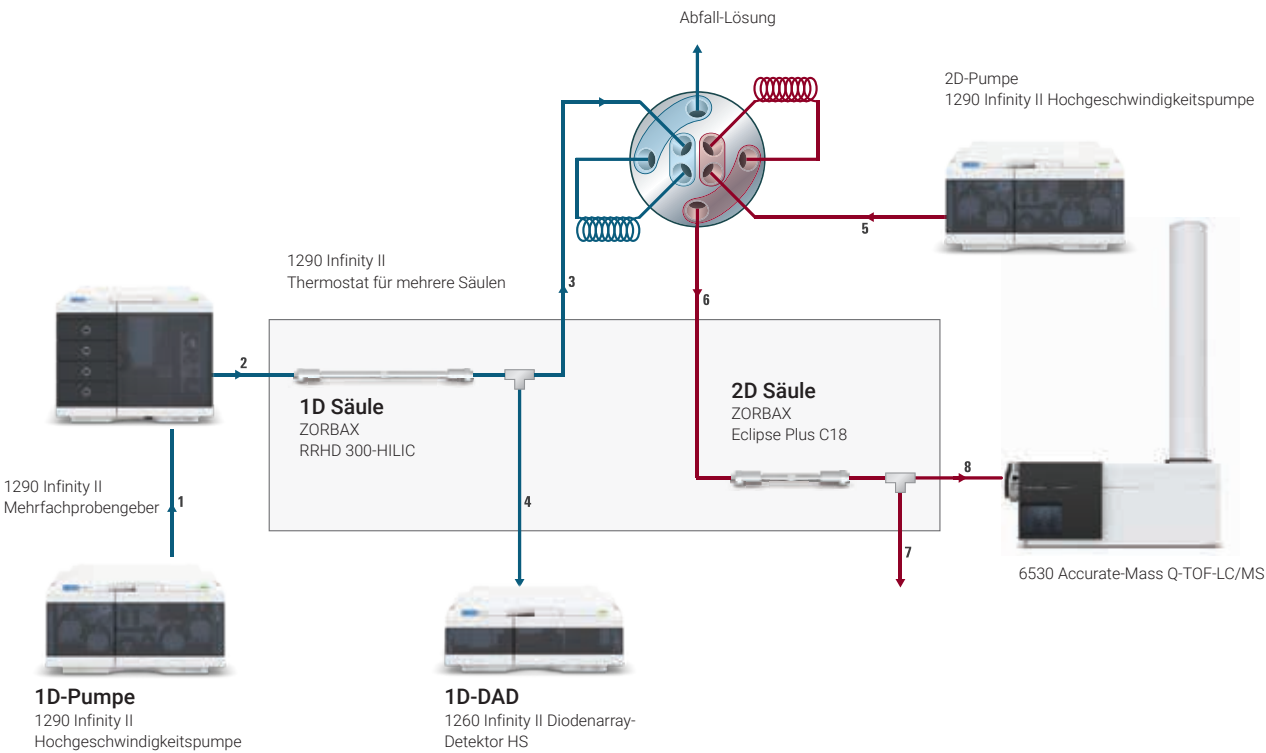
Schematische Darstellung des erforderlichen Ventilaufbaus für eine Offline-Säulenregenerierung, wie er für die Analyse der Ladungsvarianten monoklonaler Antikörper mit einem 1260 Infinity II bioinerten LC-System und zwei Bio MAb PEEK-Säulen, 2,1 x 250 mm, 5 µm Partikel, verwendet wird.

Intra- (n = 6) und Inter- (n = 12) Säulenpräzision der Retentionszeit und Fläche

	Intra-Säulen % RSD RT	Intra-Säulen % RSD Fläche	Inter-Säulen % RSD RT	Inter-Säulen % RSD Fläche
CV1	0,205	2,50	0,247	3,39
CV2	0,183	1,91	0,218	1,63
CV3	0,247	1,13	0,277	2,56
CV4	0,302	6,73	0,286	6,67
CV5	0,301	1,63	0,255	1,41
CV6	0,252	2,78	0,213	2,93

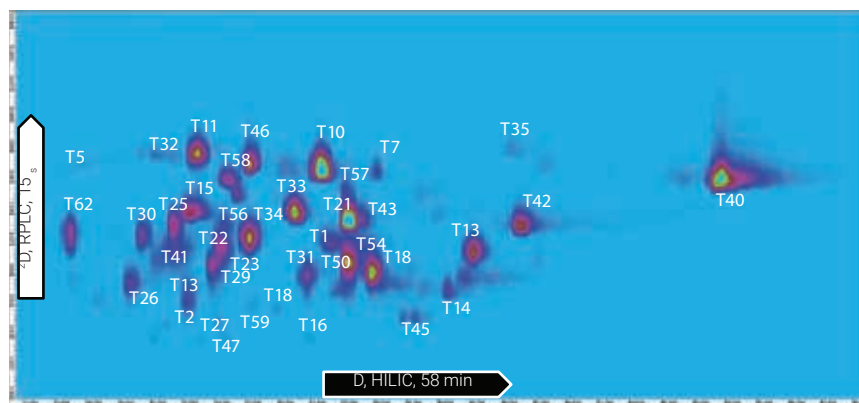
Es wird eine gute Inter- und Intra-Säulenpräzision in Bezug auf Retentionszeit und Fläche für die Offline-Säulenregenerierung der Bio MAb PEEK-Säule erzielt. Intra-Säulen-Vergleich (n = 6) und Inter-Säulenvergleich (n = 12).

Umfassende 2D-LC



1	Von der 1D-Pumpe zum automatischen Probengeber	Kalibrierungskapillare (G1312-67500)
2	Vom automatischen Probengeber zur 1D-Säule (1,6 µl Wärmetauscher)	Edelstahl, 0,17 mm
3	Von T-Stück 1 zum 2D-LC-Ventil	Edelstahl, 0,12 x 200 mm
4	Von T-Stück 1 zum 1D-DAD	Edelstahl, 0,12 x 140 mm
5	Von der 2D-Pumpe zum 2D-LC-Ventil	Edelstahl, 0,17 mm
6	Vom 2D-LC-Ventil zur 2D-Säule (1,6 µl Wärmetauscher)	Edelstahl, 0,12 x 270 mm
7	Von T-Stück 2 zur Abfall-Lösung	Edelstahl, 0,12 x 340 mm
8	Von T-Stück 2 zum Detektor (AJS-Quelle oder DAD 2D)	Edelstahl, 0,075 x 340 mm (5067-4783)

InfinityLab 2D-LC-Systemkonfiguration für umfassende 2D-Analyse des Verdaus eines monoklonalen Antikörpers und Peptid-Mapping mittels HILIC und RPLC-MS.



LCxLC-Konturplot für die Analyse des tryptischen Verdaus von Trastuzumab, der mit den Totalionendaten der MS-Messung erstellt wurde. Die zwei Dimensionen, zuerst die hydrophile Interaktionschromatographie und dann die Umkehrphasen-Chromatographie, wiesen eine gute Orthogonalität für diese Analyse auf.

Bei Agilent sind eine Reihe von Phasen in den erforderlichen Säulengrößen erhältlich. Sollten Sie die Kombination von Porengröße, Partikelgröße, Phase und Säulengröße, die Sie benötigen, nicht finden, wenden Sie sich an unser Team für kundenspezifische Säulen. Es verfügt über eine Fülle an Know-how bei der Herstellung von Säulen, die bestimmte Leistungskriterien erfüllen sollen.

Tipps und Werkzeuge

Weitere Informationen über die Grundlagen der 2D-LC finden Sie in der 2D-LC-Broschüre: *Principles, Practical Implementation and Applications of Two-Dimensional Liquid Chromatography* (Publikation **5991-2359EN**)

www.agilent.com/chem/2DLC-Primer



Präparative HPLC für die Aufreinigung

Agilent verfügt über eine umfassende Bandbreite an Silica- und Polymer-HPLC-Säulen und -Medien, die für die Aufreinigung von Biomolekülen entwickelt wurden. Es gibt hocheffiziente präparative Säulen mit kleinen Partikeln, die für die Aufreinigung von Wirkstoffmengen eines potentiellen Biopharmazeutikums von µg bis mg entwickelt wurden. Auf der anderen Seite ist auch vollständig poröse Bulk-Ware zum Packen von Entwicklungs- und Prozesssäulen zur Aufreinigung von Wirkstoffmengen im Bereich von g, kg oder mehreren kg erhältlich.

Einige Säulen sind speziell auf die Anforderungen einer hocheffizienten Aufreinigung zugeschnitten, während andere Produkte ein einfaches Aufskalieren von analytischen Säulen mit kleinen Partikeln auf die Aufreinigung des pharmazeutischen Wirkstoffs im Produktionsmaßstab ermöglichen. Die folgende Tabelle führt die Optionen der präparativen Säulen/Medien und die Produktmenge auf, die damit aufgereinigt werden kann.



Präparative HPLC-Säulen auf Polymerbasis

Lebenszyklus von Biopharmazeutika		Entdeckung µg zu mg hohe Effizienz	Entwicklung g	Produktion kg zu mehrere kg hoher Probendurchsatz
Umkehrphase	mRP-C18	→		
	ZORBAX Prep HT 300 Å StableBond	→	→	
	VariTide RPC	→	→	→
	PLRP-S 100 Å, 300 Å, 1000 Å, 4000 Å	→	→	→
Ionenaustausch	Bio MAb	→	→	
	Bio IEX	→	→	
	PL-SAX	→	→	→
	PL-SCX	→	→	→
Größenausschluss	Bio SEC-3	→	→	
	Bio SEC-5	→	→	

Säulen und Medien von Agilent für die Aufreinigung von Biomolekülen: Chromatographie-Technik, Produktfamilie und Aufreinigungsmaßstab.

Auswahl der Aufreinigungssäule

Applikation	Technik	Hinweise	Agilent Säulen
Proteomik	Umkehrphase	Eine spezielle Säule mit hoher Wiederfindung für Proteomik-Applikationen. Sie wurde für den µg-Maßstab für eine Aufreinigung mit maximaler Wiederfindung entwickelt.	mRP-C18
Alle Biomoleküle	Umkehrphase	Hoch effiziente 300 Å Partikel auf Silicabasis.	ZORBAX PrepHT 300SB
Synthetische Peptide	Umkehrphase	Polymermaterial, das für die Aufreinigung synthetischer Peptide entwickelt wurde. Dies ist eine Einsäulen-Lösung mit hoher Effizienz für eine Vielzahl synthetischer Peptide mit sauren, basischen, hydrophoben und hydrophilen Eigenschaften und deckt den gesamten Größenbereich der in Lösung und bei der Festphasen-Synthese hergestellten Peptide ab.	VariTide RPC
Alle Biomoleküle	Umkehrphase	Die Premium-Produktfamilie der Umkehrphasen auf Polymerbasis mit einer Reihe von Porengrößen und Partikelgrößen: präparative Säulen mit kleinen Partikeln für Aufreinigungen mit hoher Effizienz im Labormaßstab, Aufskalierung möglich für Aufreinigungen mit hoher Ausbeute im Prozessmaßstab mit größeren Partikeln. Verwenden Sie PLRP-S, wenn die Aufreinigung für die Herstellung von pharmazeutischen Wirkstoffen aufskaliert wird und eine Dokumentation für die Aufsichtsbehörde erforderlich ist. 3 µm und 5 µm für hohe Effizienz 8 µm, 10 µm, 10-15 µm, 15-20 µm, 30 µm und 50 µm Partikel für Aufreinigungen in größerem Maßstab und bei geringem Druck	PLRP-S
Monoklonale Antikörper	Ionenaustausch	Ein nicht poröser schwacher Kationenaustauscher	Bio MAB
Alle Biomoleküle	Ionenaustausch	Nicht poröse Ionenaustauscher Die funktionellen Gruppen der SAX-, WAX-, SCX- und WCX-Phasen bieten Möglichkeiten zur Aufreinigung saurer und basischer Moleküle Nicht poröse 5 µm Partikel für höchste Effizienz für Aufreinigungen im Labormaßstab	Bio IEX
Alle Biomoleküle	Ionenaustausch	Ein vollständig poröser starker Anionenaustauscher - Partikelgröße von 5 µm für hocheffiziente Trennungen 8 µm, 10 µm und 30 µm Partikel für Aufreinigungen in größerem Maßstab und bei geringem bis mittlerem Druck	PL-SAX
		Ein vollständig poröser starker Kationenaustauscher - Partikelgröße von 5 µm für hocheffiziente Trennungen 8 µm, 10 µm und 30 µm Partikel für Aufreinigungen in größerem Maßstab und bei geringem bis mittlerem Druck	PL-SCX
Alle Biomoleküle	Größenausschluss	SEC-Material auf Silicabasis mit einer Reihe unterschiedlicher Porengrößen - Partikelgrößen von 3 µm und 5 µm für hohe Effizienz - Porengrößen von 100 Å bis 2000 Å decken einen weiten Bereich bei der Molekülgröße von Proben ab	Bio SEC-3 und Bio SEC-5

Tipps und Werkzeuge

Weitere Informationen finden Sie im Dokument:

Biomolecule Purification (Publikation **5990-8335EN**)

www.agilent.com/search

mRP-C18 High Recovery Protein-Säulen

Die mRP (makroporöse Reversed Phase) C18 High Recovery Protein-Säule ist speziell entwickelt für hohe Wiederfindung, hochaufgelöste Trennung, Fraktionierung und gleichzeitige Entsalzung komplexer Proteinproben wie abgereichertes Serum- oder Plasmaproteine.

- Bei abgereichertem Serum und der Verwendung einer Multiple Affinity Removal-System-LC-Säule wurde eine Protein-Wiederfindung von mehr als 95 bis 99 % beobachtet.
- Beladung mit bis zu 380 µg Gesamtprotein ist ohne Verlust der chromatographischen Auflösung der Proteine möglich
- Mit makroporösen ultrareinen 5 µm Silicapartikeln mit gebundener C18-Phase gepackte Säule zur Reduzierung oder Eliminierung starker Adsorption von Proteinen
- Maximaler Betriebsdruck von 250 bar (4000 psi)
- Mit Wasser und allen häufig verwendeten organischen Lösemitteln kompatibel



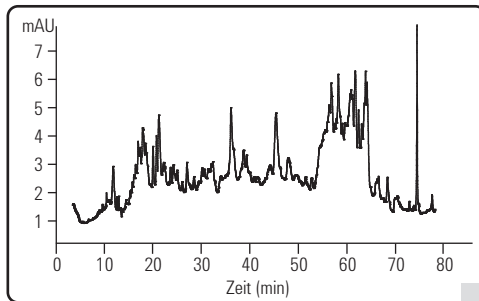
mRP-C18 High Recovery Protein-Säule,
4,6 x 50 mm, 5188-5231

mRP-C18 High Recovery Protein-Säulen

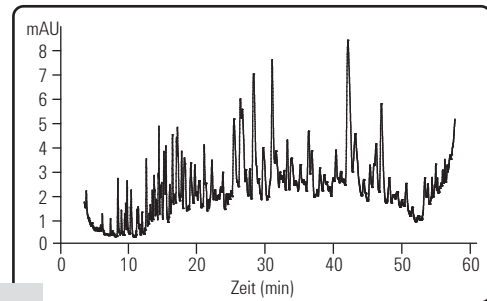
Beschreibung	Proteinbeladbarkeit	Best.-Nr.
mRP-C18, 0,5 x 100 mm	10 ng-5 µg	5188-6510
mRP-C18, 2,1 x 75 mm	8-85 µg	5188-6511
mRP-C18, 4,6 x 50 mm	40-380 µg	5188-5231

Proteinfraktionierung komplexer Proben auf der mRP-Säule

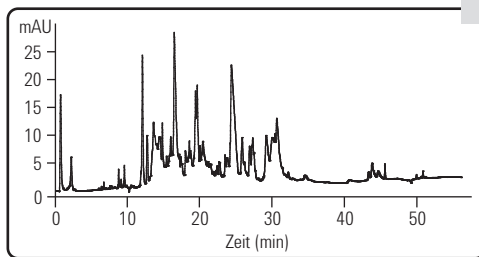
mRP-C18, 4,6 x 50 mm



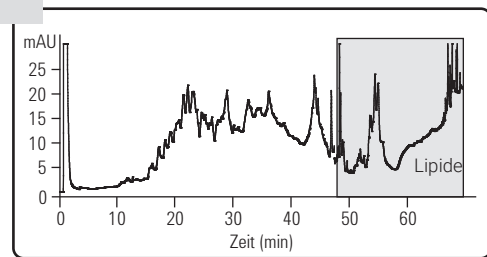
Vorbereitete HeLa-Membranprobe



HeLa-Zelllysat (352 µg)



„Top 6“-angereichertes Humanserum



Vorbereitete Human-Hirnmembranlipidprobe (500 µg)

Höchste Wiederfindung

ZORBAX PrepHT

- Einfache Aufskalierung vom analytischen zum präparativen Maßstab mit ZORBAX-Phasen
- Schnelle präparative Trennungen, bis zu 2000 mg
- 5 bis 7 µm Partikel für hohe Effizienz und hohe Ausbeute
- Einfach zu installierende fingerfeste Verbindungen, dicht bis zu 5000 psi (350 bar)
- Verwendung zur Aufrechterhaltung der Selektivität von der analytischen Phase bis zu präparativen Trennungen

Mit ZORBAX PrepHT-Säulen können hohe Reinheit, hohe Wiederfindung und hoher Probendurchsatz einfach erreicht werden. Sie sind mit einer Reihe an gebundenen Phasen (StableBond 300 Å, C18, C8, C3 und CN) für optimale Auflösung und Beladbarkeit unter beliebigen Bedingungen erhältlich.

ZORBAX PrepHT-Säulen werden mit Partikeln mit Größen von 5 und 7 µm für sehr hohe Auflösung gepackt. Die hohe Auflösung ermöglicht eine hohe Beladbarkeit, hohe Ausbeute und hohe Reinheit der Verbindungen. Die Säulen mit größerem Durchmesser und die mechanisch stabileren ZORBAX-Partikel ermöglichen Flussraten von bis zu 100 ml/min und erhöhen so den Durchsatz.

ZORBAX PrepHT-Säulen wurden für eine schnelle Aufskalierung vom analytischen zum präparativen Maßstab ohne Verlust bei der Auflösung entwickelt. Für komplexe Trennungen auf größeren Säulen (21,2 mm ID, Länge von 150 mm und länger) hat Agilent mit Bedacht die Partikelgröße von 7 µm ausgewählt, um eine Balance zwischen hoher Effizienz und hoher Beladbarkeit zu erreichen.



ZORBAX 300 Å StableBond
PrepHT Kartuschensäulen

ZORBAX 300 Å StableBond

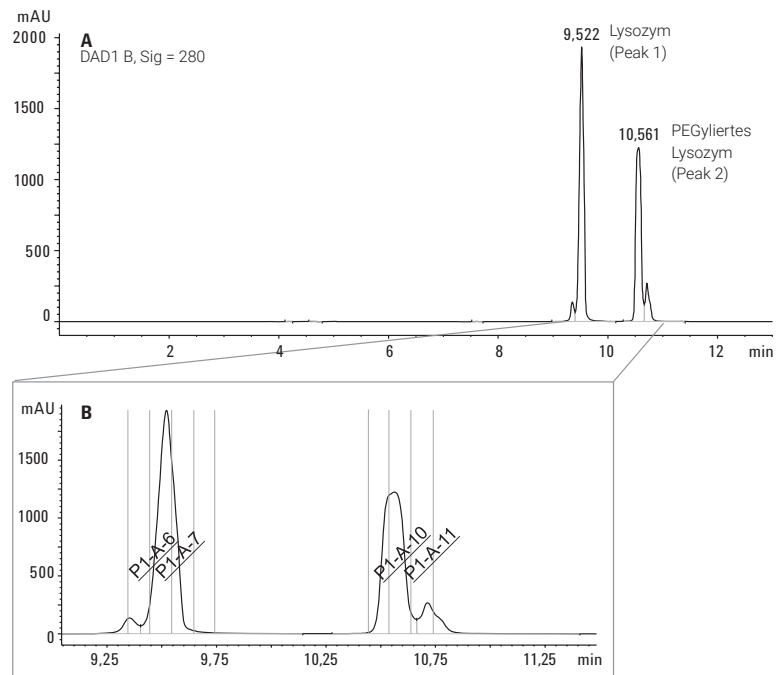
Beschreibung	Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7	300SB-CN USP L10	300SB-C3 USP L56
PrepHT Kartuschensäulen (erfordern Endfittingskit 820400-901)						
PrepHT Kartusche	21,2 x 250	7	897250-102	897250-106	897250-105	897250-109
PrepHT Kartusche	21,2 x 150	7	897150-102	897150-106		897150-109
PrepHT Kartusche	21,2 x 150	5	895150-902	895150-906		895150-909
PrepHT Kartusche	21,2 x 100	5	895100-902	895100-906		895100-909
PrepHT Kartusche	21,2 x 50	5	895050-902	895050-906		895050-909
PrepHT Endfittings, 2 St.			820400-901	820400-901	820400-901	820400-901
PrepHT Vorsäulenkartusche, 2 St.	17,0 x 7,5	5	820212-921	820212-918	820212-924	820212-924
Vorsäulenkartuschen-Hardware			820444-901	820444-901	820444-901	820444-901

Semipräparative RP-HPLC einer PEG-Lysozym-Reaktionsmischung

Säule: ZORBAX SB-C18
880975-202
9,4 x 250 mm, 5 µm

A: Semipräparative RP-HPLC einer PEG-Lysozym-Reaktionsmischung auf einer semipräparativen ZORBAX 300 SB-C18-Säule

B: Vergrößerte Darstellung zeigt Fraktionssammlung



PLRP-S für den präparativen Maßstab bis zum Prozessmaßstab

- Einsatz von der Erforschung bis zur CGMP-Produktion mehrerer kg Substanz reduziert den Zeitaufwand bei der Methodenentwicklung
- Chemische Stabilität für Trennungen, Optimierung, Desinfektion und Regenerierung erhöht die Selektivität und die Lebensdauer der Säule
- Das Packen mehrerer Säulen mit Material einer Charge reduziert Systemausfallzeiten und Validierungskosten

Das PLRP-S-Material, feste Poly(Styrol/Divinylbenzol)-Partikel, sind in einer Reihe von Porengrößen für die Aufreinigung niedermolekularer Verbindungen, synthetischer Biomoleküle und von Makromolekülen erhältlich. Durch ihre thermische und chemische Stabilität sind die Partikel ideal für Aufreinigungen geeignet, die extreme Bedingungen für die Probenvorbereitung, die Elution der Verbindung oder die Säulenregenerierung erfordern.

Kapazität und Auflösung sind zwei wichtige Parameter für die Maximierung des Durchsatzes einer Aufreinigung. Mit einer großen Auswahl an unterschiedlichen Porengrößen und dem erweiterten Bereich der Betriebsbedingungen bietet PLRP-S mehr Möglichkeiten, den optimalen Prozess zu erzielen. Die Partikelgrößen reichen von 3 µm bis zu 50 µm für eine Aufskalierung vom Forschungsmaßstab mit Mengen im µg/mg-Bereich bis zur CGMP-Produktion mit mehreren kg. Exzellente chemische Stabilität, bis zu 1 M NaOH, ermöglicht Desinfektion und Regenerierung und verlängert dadurch die Lebensdauer der Säule. Chargengrößen des PLRP-S-Materials von bis zu 600 l sind erhältlich und ermöglichen das Packen mehrerer Säulen mit dem Material einer Charge.

Als Teil unseres Engagements für Qualität und Lieferkontinuität werden alle Fertigungsschritte in einem vollständig dokumentierten Prozess vorgenommen und Audits des Produktionsstandorts werden routinemäßig durchgeführt.



Applikationsanleitung für PLRP-S für den präparativen Maßstab bis zum Prozessmaßstab

Applikation	Porengröße des PLRP-S Mediums			
	100 Å	300 Å	1000 Å	4000 Å
Synthetische Biomoleküle, Peptide, Oligonukleotide	✓	✓		
Rekombinante Biomoleküle, Peptide, Proteine	✓	✓		
Große Biomoleküle, Antikörper, DNA-Fragmente			✓	✓
Kleine Moleküle, instabile Verbindungen einschließlich metallempfindlichen	✓			

Spezifikationen der UHPLC-Säulen

pH-Bereich	1-14
Puffergehalt	Unbegrenzt
Organischer Modifizier	1-100 %
Temperaturgrenzen	200 °C
Maximaldruck	5-8 µm: 3000 psi (210 bar)
	3 µm: 4000 psi (300 bar)

Aufreinigung eines Trityl-Off-Oligonukleotids (25-mer) und analytische Quantifizierung der Fraktion mittels PLRP-S 100 Å, 4,6 x 50 mm

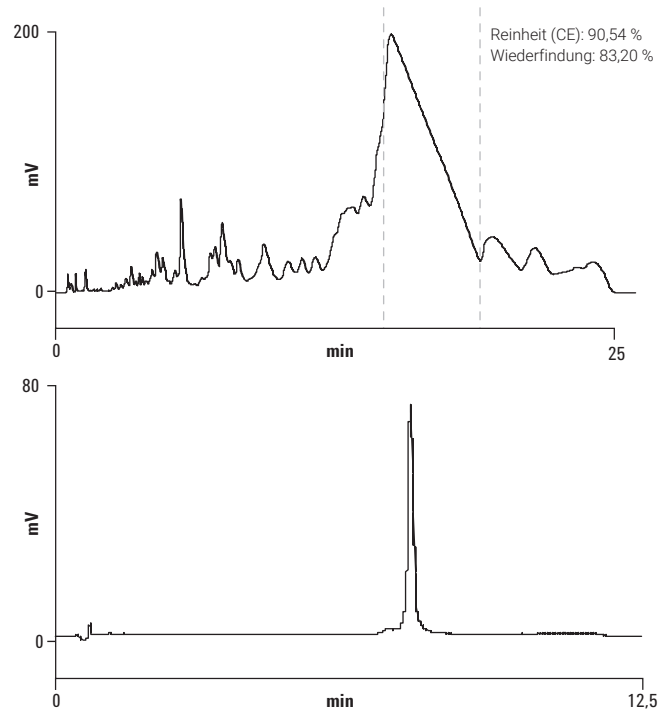
Säule: PLRP-S 100 Å
PL1512-1300
4,6 x 50 mm, 3 µm

Mobile Phase: A: 100 mM Triethylammoniumacetat (TEAA)
B: 100 mM TEAA in 25:75 Acetonitril:Wasser

Flussrate: 1 ml/min

Gradient: 25 % B 0 min, 35 % B 2 min,
45 % B 22,5 min, 45 % B 23 min,
25 % B 23,05 min, 25 % B 26 min

Temperatur: 80 °C



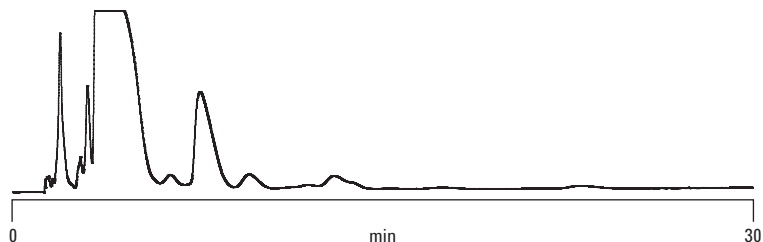
Präparative Beladung mit Bradykinin-Rohprodukt

Säule: PLRP-S 100 Å
PL1512-5100
4,6 x 250 mm, 10 µm

Mobile Phase: 0,1 % TFA in 21 % ACN:79 % Wasser

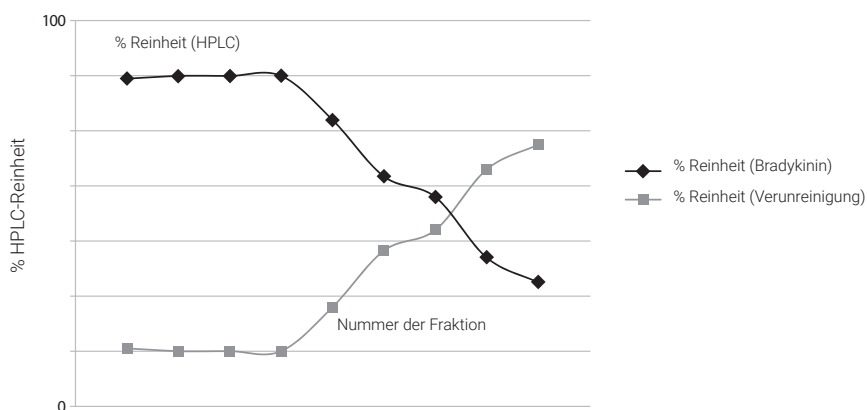
Flussrate: 1 ml/min (360 cm/h)

Probe: 30 µl, die 1,5 mg des Rohpeptids enthalten



Fraktionsanalyse – die Aufreinigung durch Konzentrationsüberladung

Die HPLC-Analyse der innerhalb des Peaks gesammelten Fraktionen zeigte, dass die Fraktionen 1 bis 4 nur das relevante Peptid enthielten und der Anteil an kritischer Verunreinigung mit der Anzahl der Fraktion anstieg. Mit der hocheffizienten PLRP-S-Säule war es möglich, aus dem Rohpeptid mit einer Reinheit von 91,7 % nach der Aufreinigung mit einer Wiederfindung von 97 % ein Produkt mit einer Reinheit von 100 % zu erhalten. Weitere Informationen finden Sie in der Application Note 5990-7736EN.



PLRP-S für den präparativen Maßstab bis zum Prozessmaßstab

Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	PLRP-S 100 Å	PLRP-S 300 Å	PLRP-S 1000 Å	PLRP-S 4000 Å
100 x 300	30			PL1812-3102	PL1812-3103
100 x 300	15-20	PL1812-6200	PL1812-6201		
100 x 300	10-15	PL1812-6400	PL1812-6401		
100 x 300	10	PL1812-6100	PL1812-6101		
100 x 300	8	PL1812-6800	PL1812-6801		
50 x 300	8	PL1712-6800	PL1712-6801		
50 x 150	30			PL1712-3702	PL1712-3703
50 x 150	15-20	PL1712-3200	PL1712-3201		
50 x 150	10-15	PL1712-3400	PL1712-3401		
50 x 150	10	PL1712-3100	PL1712-3101	PL1712-3102	PL1712-3103
50 x 150	8	PL1712-3800	PL1712-3801		
25 x 300	15-20	PL1212-6200	PL1212-6201		
25 x 300	10-15	PL1212-6400	PL1212-6401		
25 x 300	10	PL1212-6100	PL1212-6101		
25 x 300	8	PL1212-6800	PL1212-6801		
25 x 150	30			PL1212-3702	PL1212-3703
25 x 150	10	PL1212-3100	PL1212-3101	PL1712-3102	PL1712-3103
25 x 150	8	PL1212-3800	PL1212-3801		
25 x 50	10			PL1212-1102	PL1212-1103
PLRP-S Methodenentwicklungssäulen					
4,6 x 250	30			PL1512-5702	PL1512-5703
4,6 x 250	15-20	PL1512-5200	PL1512-5201		
4,6 x 250	10-15	PL1512-5400	PL1512-5401		
4,6 x 250	10	PL1512-5100	PL1512-5101	PL1512-5102	PL1512-5103
4,6 x 250	8	PL1512-5800	PL1512-5801		
4,6 x 150	30			PL1512-3702	PL1512-3703
4,6 x 150	15-20	PL1512-3200	PL1512-3201		
4,6 x 150	10-15		PL1512-3401		
4,6 x 150	10	PL1512-3100	PL1512-3101	PL1512-3102	PL1512-3103
4,6 x 150	8	PL1512-3800	PL1512-3801		

PLRP-S Bulk-Ware

Partikelgröße (µm)	Verpackungseinheit	PLRP-S 100 Å	PLRP-S 300 Å	PLRP-S 1000 Å	PLRP-S 4000 Å
50	1 kg	PL1412-6K00	PL1412-6K01	PL1412-6K02	
	100 g	PL1412-4K00	PL1412-4K01	PL1412-4K02	
30	100 g			PL1412-4702	PL1412-4703
15-20	1 kg	PL1412-6200	PL1412-6201		
	100 g	PL1412-4200	PL1412-4201		
10-15	1 kg	PL1412-6400	PL1412-6401		
	100 g	PL1412-4400	PL1412-4401		
10	1 kg	PL1412-6100	PL1412-6101		
	100 g	PL1412-4100	PL1412-4101	PL1412-4102	PL1412-4103
8	1 kg	PL1412-6800	PL1412-6801		

Bestellung kundenspezifischer Säulen und Bulk-Ware.

Sollten Sie die Kombination von Porengröße, Partikelgröße und Säulenabmessung oder die Menge an Bulk-Ware, die Sie benötigen, in diesen Tabellen nicht finden, wenden Sie sich bitte für die Bestellung kundenspezifischer Produkte an die lokale Vertriebsniederlassung.

Tipps und Werkzeuge

Benutzerinformationen zu Säulen sind hervorragende Informationsquellen mit Anleitungen zum Gebrauch und zur Säulenpflege sowie Empfehlungen für Anfangsmethoden:

www.agilent.com/chem/biolc-columns-user-guides

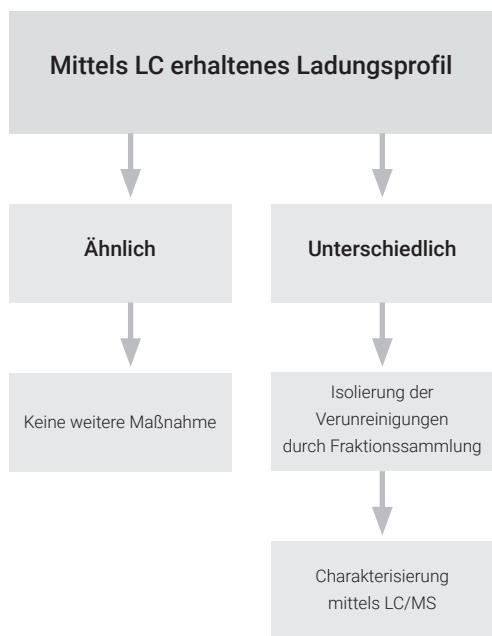
Bio MAb und Bio IEX

Analytischer bis hocheffizienter präparativer Maßstab

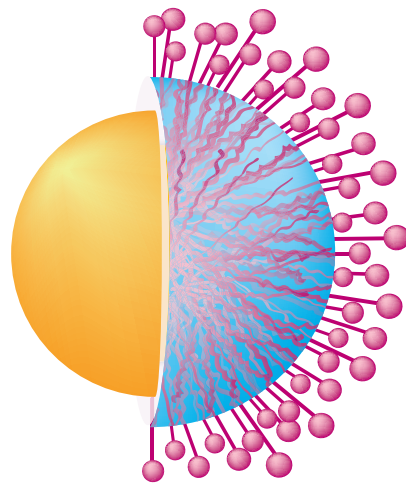
- Nicht poröse Partikel eliminieren den Stoffaustausch und bieten höchste Effizienz zur Aufreinigung von Verunreinigungen mit geringen Unterschieden
- Fünf Funktionalitäten: SAX, WAX, SCX, WCX und CX, eine Phase, die speziell für monoklonale Antikörper optimiert ist, um bei erhöhter Beladung mit Probe eine maximale Auflösung zu liefern
- Aufskalierung vom analytischen über den semipräparativen bis zum präparativen Maßstab mit den gleichen 5 µm Partikeln

Die äußere hydrophile Schicht der Partikel reduziert unspezifische Wechselwirkungen und sorgt für eine hohe Wiederfindung der Probe.

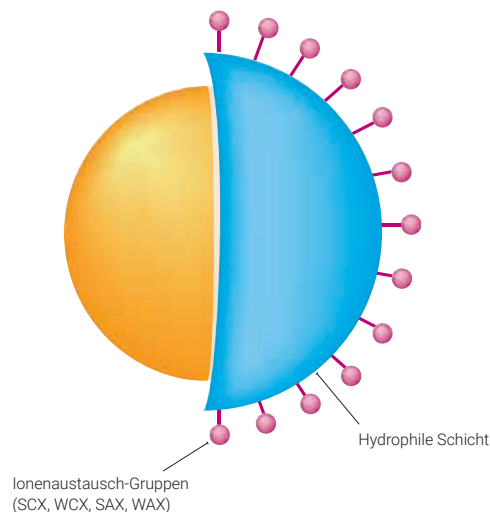
Wenn analytische, semipräparative und präparative Säulen mit den gleichen 5 µm Partikeln gepackt sind, können bei der Prozessentwicklung unerwartet aufgetretene Ladungsvarianten eines Biopharmazeutikums schnell zur weiteren Charakterisierung und Identifizierung aufgereinigt werden.



Bio MAb-Partikel



Bio IEX-Partikel



Bio MAb HPLC-Säulen

Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	Best.-Nr.
21,2 x 250	5	5190-6885
10 x 250	5	5190-6884

Bio IEX HPLC-Säulen, Edelstahl

Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	Bio SCX Best.-Nr.	Bio WCX Best.-Nr.	Bio SAX Best.-Nr.	Bio WAX Best.-Nr.
21,2 x 250	5	5190-6879	5190-6881	5190-6883	5190-6877
10 x 250	5	5190-6878	5190-6880	5190-6882	5190-6878

Tipps und Werkzeuge

Sie können Ihre Agilent BioHPLC-Säulen mit InfinityLab Quick Connect Fittings und metallfreien bioinerten Kapillaren anschließen.

Weitere Informationen finden Sie unter: www.agilent.com/chem/5991-7469EN

PL-SAX und PL-SCX vom präparativen Maßstab bis zum Prozessmaßstab

- Aufreinigung durch Ionenaustausch in einem größeren pH-Bereich für erweiterte Anwendungsmöglichkeiten
- HPLC-Flussraten und schnelle Äquilibration verkürzen die Zykluszeiten der Aufreinigung
- Große Porengrößen für verbesserten Stoffaustausch ermöglichen schnelle Aufreinigungen mit hoher Auflösung

Diese festen, widerstandsfähigen Ionenaustauschmaterialien sind äußerst hydrophil und speziell für die Aufreinigung von Biomolekülen entwickelt worden. Die PL-SAX- und PL-SCX-Materialien sind vollständig polymer und im gesamten Bereich der HPLC-Bedingungen chemisch stabil und temperaturbeständig. Die funktionellen Gruppen der starken Ionenaustauscher, die kovalent an ein chemisch stabiles Polymer gebunden sind, erleichtern in einem großen pH-Bereich die Aufreinigung durch Ionenaustausch. Diese Stabilität kann für die Desinfektion und Reinigung ausgenutzt werden. Die thermische Stabilität ermöglicht die Anwendung denaturierender Bedingungen und stabilisierender/solubilisierender Substanzen für die Aufreinigung von Zielverbindungen wie es bei der Aufreinigung von synthetischen Oligonukleotiden mit selbst-komplementären Sequenzen der Fall ist.

Sowohl das Material mit 1000 Å Poren als auch das weitporige Material mit 4000 Å ist mechanisch stabil und robust und kann in einem großen Bereich linearer Geschwindigkeiten für die schnelle Beladung mit verdünnten Lösungen und kurze Spülzyklen eingesetzt werden. HPLC-Flussraten und schnelle Äquilibration verkürzen die Zykluszeiten der Aufreinigung.

Das Packen von Säulen mit dynamischer axialer Kompression (DAC) ist einfach und es können hocheffiziente Säulen mit exzellenter Reproduzierbarkeit und Lebensdauer hergestellt werden. Das Material mit der Porengröße von 1000 Å ist für Aufreinigungen mit hoher Kapazität vorgesehen, die superporösen Partikel mit 4000 Å mit verbessertem Stoffaustausch wurden für große Biomoleküle und hochaufgelöste Aufreinigungen mit hoher Geschwindigkeit entwickelt.



Spezifikationen der UHPLC-Säulen

	PL-SAX	PL-SCX
Matrix	Vollständig polymer	Vollständig polymer
Porengrößen	1000 Å, 4000 Å	1000 Å, 4000 Å
Partikelgrößen	10 µm, 30 µm	10 µm, 30 µm
Form der Beads	Starr sphärisch	Starr sphärisch
Funktionalität	Quaternäres Amin	Sulfonsäure
Druckstabilität	3000 psi	3000 psi
Temperaturstabilität	80 °C	80 °C
pH-Bereich	1-14	1-14
Kompatibilität mit Lösemitteln	Alle Anionenaustauschpuffer	Alle Kationenaustauschpuffer
Dichte des gepackten Säulenbetts	0,39 g/ml	0,39 g/ml

Aufreinigung eines großen Oligonukleotids

Säule: PL-SAX 1000 Å, 8 µm

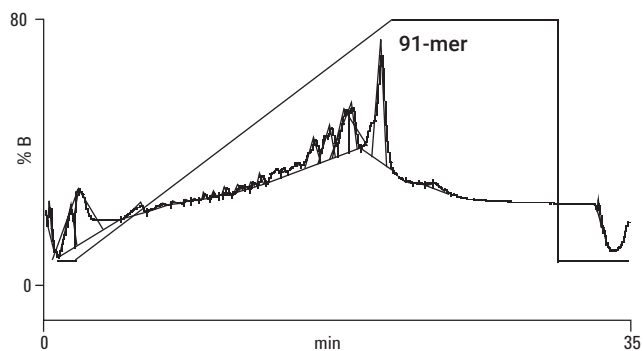
Mobile Phase: A: 93 % 100 mM TEAA, pH 7:7 % ACN
B: 93 % 100 mM TEAA, 3,24 M Ammoniumacetat, pH 7: 7 % ACN

Flussrate: 1,5 ml/min

Gradient: 0-100 % B in 20 min

Temperatur: 60 °C

Detektor: UV, 290 nm



Präparative Fraktionierung eines Kulturfiltrats, das Amyloglucosidasen enthält

Säule: PL-SAX 4000 Å
PL1551-1803
4,6 x 50 mm, 8 µm

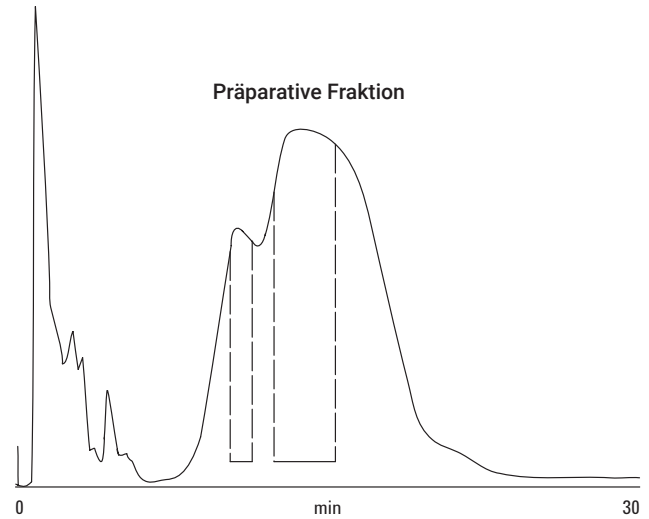
Mobile Phase: A: 10 mM TRIS-HCl, pH 8
B: A + 500 mM NaCl, pH 8

Flussrate: 4,0 ml/min

Gradient: Linear 0-100 % B in 2 min

Temperatur: 60 °C

Detektor: UV, 280 nm



PL-SAX und PL-SCX vom präparativen Maßstab bis zum Prozessmaßstab

Abmessungen	Partikelgröße (µm)	PL-SAX 1000 Å	PL-SAX 4000 Å	PL-SCX 1000 Å	PL-SCX 4000 Å
50 x 150	30	PL1751-3702	PL1751-3703	PL1745-3702	PL1745-3703
50 x 150	10	PL1751-3102	PL1751-3103	PL1745-3102	PL1745-3103
25 x 150	30	PL1251-3702	PL1251-3703	PL1245-3702	PL1245-3703
25 x 150	10	PL1251-3102	PL1251-3103	PL1245-3102	PL1245-3103
25 x 50	10	PL1251-1102	PL1251-1103	PL1245-1102	PL1245-1103
7,5 x 150	8	PL1151-3802	PL1151-3803		
7,5 x 50	8	PL1151-1802	PL1151-1803	PL1145-1802	PL1145-1803

PL-SAX- und PL-SCX-Säulen für die Methodenentwicklung

4,6 x 250	30	PL1551-5702	PL1551-5703	PL1545-5702	PL1545-5703
4,6 x 250	10	PL1551-5102	PL1551-5103	PL1545-5102	PL1545-5103
4,6 x 150	30	PL1551-3702	PL1551-3703	PL1545-3702	PL1545-3703
4,6 x 150	10	PL1551-3102	PL1551-3103	PL1545-3102	PL1545-3103



PL-SAX- und PL-SCX-Säulen
vom präparativen Maßstab bis zum
Prozessmaßstab und Bulk-Ware

PL-SAX- und PL-SCX-Bulk-Ware

Partikelgröße (µm)	Verpackungs- einheit	PL-SAX 1000 Å	PL-SAX 4000 Å	PL-SCX 1000 Å	PL-SCX 4000 Å
30	100 g	PL1451-4702	PL1451-4703	PL1445-4702	PL1445-4703
10	100 g	PL1451-4102	PL1451-4103	PL1445-4102	PL1445-4103

Bestellung kundenspezifischer Säulen und Bulk-Ware.

Sollten Sie die Kombination von Porengröße, Partikelgröße und Säulenabmessung oder die Menge an Bulk-Ware, die Sie benötigen, in diesen Tabellen nicht finden, wenden Sie sich bitte für die Bestellung kundenspezifischer Produkte an die lokale Vertriebsniederlassung.

Peptidaufreinigung

VariTide ist eine kostengünstige Lösung für die Produktion synthetischer Peptide. Mit diesen Säulen haben Sie die Kosten und die Effizienz von Aufreinigungen großer Mengen synthetischer Peptide, vom µg- bis zum g-Maßstab, im Griff. VariTide ist eine Lösung für Peptid-Unternehmen, die kleine Mengen von Hunderten oder Tausenden von Peptiden herstellen und bei denen die Herstellungsdauer die wirtschaftlich treibende Kraft ist.



VariTide RPC-Säulen für synthetische Peptide

- Eine einzige Säule für die gesamte Bandbreite synthetischer Peptide
- Kleine Partikelgröße für maximale Effizienz, auch bei präparativen Säulen mit 1 oder 2 Zoll Durchmesser
- Bulk-Ware zum Packen von präparativen Säulen mit 1 oder 2 Zoll Durchmesser für die Aufreinigung von Mengen im Bereich von mg bis g

VariTide RPC-Säulen und -Medien sind Teil der VariPep-Peptidlösung. Dies ist die empfohlene Option für eine kostengünstige Trennung und Aufreinigung synthetischer Peptide mit allgemeinen Methoden.

VariTide RPC-Säulen für synthetische Peptide

Größe (mm)	Best.-Nr.
21,2 x 250	PL1E12-5A05
10,0 x 250	PL1012-5A05
4,6 x 250	PL1512-5A05

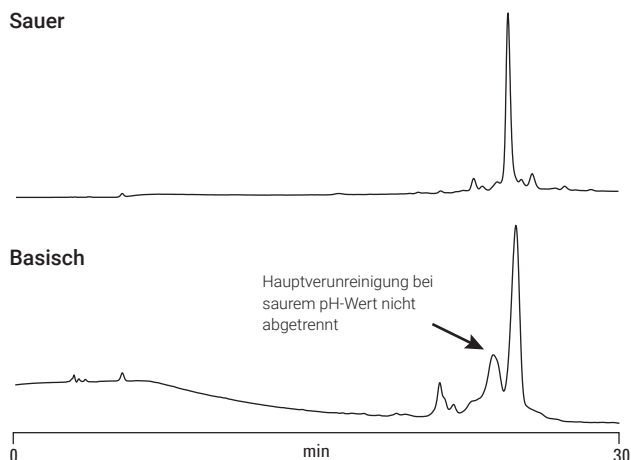
VariTide RPC Bulk-Ware

Beschreibung	Best.-Nr.
100 g	PL1412-4A05
1 kg	PL1412-6A05

Rohpeptid-Screening

Säule:	VariTide RPC PL1512-5A05 4,6 x 250 mm
Mobile Phase:	Sauer A: 0,1 % TFA in 95 % Wasser: 5% ACN B: 0,1 % TFA in 50 % Wasser: 50 % ACN Basisch A: 5 % ACN, 95 % 20 mM Ammoniumcarbonat, pH 9,5 B: 50 % ACN, 50 % 20 mM Ammoniumcarbonat, pH 9,5
Flussrate:	1 ml/min (360 cm/h)
Gradient:	0-100 % B in 30 min
Detektor:	UV, 220 nm

Sauer



VariPure IPE

- Vorgepackt für einfache Anwendung
- Entfernt Ionenpaarreagenzien zur Verbesserung der Produktivität
- Bietet hohe Leistung und ist kostengünstig für herausragende Effizienz

VariPure IPE ist ein quaternäres Amin auf einem polymeren Träger mit Hydrogencarbonat als Gegenion und wurde für die Entfernung saurer Ionenpaarreagenzien wie Trifluoressigsäure (TFA), Ameisensäure oder Essigsäure entwickelt. VariPure IPE ist ein leistungsfähiges und kostengünstiges Material zur Entfernung von Säure, das im praktischen vorgepackten SPE-Format angeboten wird. Partikelgröße, Kapazität und Gefäßgeometrie sind so gewählt, dass eine ausreichende Verweilzeit erreicht und unter Schwerkraft-Durchfluss eine effektive Extraktion der Ionen der Ionenpaarreagenzien erzielt wird. Bei säurelabilen Peptiden verhindert die Entfernung des Ionenpaarreagenzies den Abbau des Peptids im sauren Milieu während der Arbeitsschritte nach der HPLC-Trennung und erhöht die Ausbeute an gereinigtem Produkt.

VariPure IPE

Beladung	Kapazität zur Entfernung von Gegenionen	Verpackungseinheit	Best.-Nr.
100 mg pro 3 ml Röhrchen	~ 5 ml 0,1 % TFA	50 St.	PI3540-d603VP
500 mg pro 6 ml Röhrchen	~ 25 ml 0,1 % TFA	50 St.	PI3540-C603VP
1 g pro 20 ml Röhrchen	~ 50 ml 0,1 % TFA	25 St.	PI3540-P603VP
25 g			PI3549-3603VP

Präparative Load & Lock-HPLC-Säulen

Agilent bietet ein komplettes Sortiment an Load & Lock-Säulen im Labormaßstab und die mobile Packstation an. Die Ausrüstung ist so konzipiert, dass Sie einfach und schnell Ihre eigenen hocheffizienten Säulen für den präparativen Maßstab packen können. Damit ist sie die richtige Lösung für Applikationen in der Entwicklung pharmazeutischer Verbindungen, von Peptiden und natürlichen Produkten. Unsere Load & Lock-Säulen haben ein einzigartiges Flüssigkeits-/Proben-Verteilungssystem zur Maximierung der Produktivität. Die Säulenleistung wird verbessert, indem die Probe effizienter auf der gesamten Säulenbettoberfläche verteilt wird.

- Höchste Leistung: bessere Ergebnisse mit einem einzigartigen Flussverteilungssystem
- Maximale Flexibilität: Alle 1-Zoll-, 2-Zoll- und 3-Zoll-Load & Lock-Säulen werden mit der gleichen mobilen Packstation gepackt und können entweder im Modus mit dynamischer (DAC) oder mit statischer axialer Kompression (SAC) verwendet werden
- Mehr Komfort: Packen und Entpacken der Säulen in wenigen Minuten
- Maximale Mobilität: Säule und Packstation sind zusammen auf einem praktischen fahrbaren Gestell montiert und können einfach am gewünschten Ort eingesetzt werden

Die beiden Packmethoden mit dynamischer oder statischer axialer Kompression ermöglichen eine einfache Anwendung und liefern konsistente, leistungsfähige Ergebnisse.

Agilent Load & Lock-Säulen im Labormaßstab vereinen eine exzellente Stabilität des gepackten Säulenbetts mit einer besseren Flussverteilung und liefern mit maximaler Geschwindigkeit, Flexibilität und Nutzerfreundlichkeit Aufreinigungen mit höchstmöglicher Qualität.

Für die Load & Lock-Packstation, die nur Druckluft verwendet, ist keine Stromversorgung erforderlich. Ihr Gebrauch in Zusammenhang mit beliebigen Lösemitteln ist daher sicher. Damit ist sie die bevorzugte Lösung in gesundheitsgefährdenden Umgebungen. Die mit einer Schraube befestigte Klammer kann schnell geöffnet und geschlossen werden und ermöglicht ein einfaches Packen und Entpacken innerhalb von Minuten.



Präparative Load & Lock-HPLC-Säulen

Beschreibung	Wasserummantelung	Größe (mm)	Best.-Nr.
Load & Lock-Säule	Nein	27,0 x 500	PCG93LL500X25
	Ja	27,0 x 500	PCG93LL500X25WJ
	Ersatzteilkit		PCG931AAKIT
Mobile Packstation (mit Druckluft betriebene Hydraulik)			PCG93LLSTAND123

Bio SEC

Aufreinigung nach Größe

- Sechs Porengrößen ermöglichen Trennung nach Größe für die gesamte Bandbreite der Biopharmazeutika
- Aufskalierung von analytischen Säulen mit 3 µm und 5 µm Partikeln bis zum präparativen Labormaßstab mit den gleichen Partikeln
- Die dünne hydrophile Polymerschicht minimiert unspezifische Wechselwirkungen und ermöglicht gute Peakformen und erhöhte Probenkapazität

Die SEC-Materialien auf Silicabasis haben optimale Porengrößen und Porenvolumina, um hochaufgelöste Trennungen unter HPLC-Bedingungen für Druck und Flussrate zu liefern. Die 3 µm Partikel mit Porengrößen von 100 Å, 150 Å und 300 Å bieten höchste Effizienz für den präparativen Labormaßstab, während die 5 µm Partikel mit einer Reihe von Porengrößen für die Fraktionierung großer Biomoleküle und Konjugate erhältlich sind.

Tipps und Werkzeuge



Benutzerinformationen zu Säulen sind hervorragende Informationsquellen mit Anleitungen zum Gebrauch und zur Säulenpflege sowie Empfehlungen für Anfangsmethoden:

www.agilent.com/chem/biolc-columns-user-guides

Bio SEC-3-HPLC-Säulen für schnellere Peptid- und Proteintrennungen

Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	Bio SEC-5 100 Å USP L33	Bio SEC-5 150 Å USP L33	Bio SEC-5 300 Å USP L33
21,2 x 300	3	5190-6850	5190-6851	5190-6852
Vorsäulen (präparativ)				
21,2 x 50	3	5190-6854	5190-6855	5190-6856

Bio SEC-5-HPLC-Säulen für größenbasierte Biomolekültrennungen

Größe (mm)	Partikelgröße (µm)	Bio SEC-5 100 Å USP L33	Bio SEC-5 150 Å USP L33	Bio SEC-5 300 Å USP L33	Bio SEC-5 500 Å USP L33	Bio SEC-5 1000 Å USP L33	Bio SEC-5 2000 Å USP L33
21,2 x 300	5	5190-6863	5190-6864	5190-6865	5190-6866	5190-6867	5190-6868
Vorsäulen (präparativ)							
21,2 x 50	5	5190-6869	5190-6870	5190-6871	5190-6872	5190-6874	5190-6875



Agilent-Lösungen

Profitieren Sie von den 40 Jahren Erfahrung in der kontinuierlichen Innovation für optimale Ergebnisse

Agilent bietet ein umfassendes Portfolio innovativer Lösungen an: von der Verbesserung der Laborproduktivität für chemische Analysen über Vakuumsysteme bis zu Arbeitsabläuflösungen, die entwickelt wurden, um einfacher die Komplexität lebender Systeme erforschen zu können. Wir helfen Ihnen, bei neuen Applikationen und zugelassenen Methoden auf dem Laufenden zu bleiben, und unsere integrierten Arbeitsabläuflösungen liefern genaue, umfassende Daten, damit Sie gute Geschäftsentscheidungen treffen können, um den Erhalt von Ergebnissen zu beschleunigen.

Langjährige Kunden von Agilent kennen unser Engagement bereits aus eigener Erfahrung. Nun freuen wir uns zeigen zu können, wie Sie unseren Ansatz der kontinuierlichen Innovation auch zu Ihrem Vorteil nutzen können.



Hochschulbereich

Mit unserem Engagement für Erfolg über internationale Grenzen und wissenschaftliche Disziplinen hinweg wollen wir Forscher dabei unterstützen, Impulse für ihre Forschung und größere Anerkennung für ihre bedeutenden Beiträge in ihrem jeweiligen Bereich zu erhalten.



Geochemie, Bergbau und Metalle

Unabhängig davon, ob es um die Bestimmung von Haupt- oder Spurenanalyten, die Bestimmung der Gold-, Silber- oder Platinelemente, die Analyse von galvanischen Bädern oder die Durchführung geochemischer Kartierungen geht: Agilent bietet bedienerfreundliche und zuverlässige analytische Geräte, die für die komplexesten und schwierigsten Proben erforderlich sind.



Biologika und Biosimilars

Biotherapeutika verfügen über ein großes Potential zur Verbesserung der menschlichen Gesundheit. Die Anzahl an zugelassenen Protein- und Antikörpertherapeutika steigt auf der ganzen Welt immer weiter an, da sich diese wichtige therapeutische Klasse mit medizinischen Bedürfnissen befasst, die bisher nicht erfüllt wurden.



Sicherheit

Beschäftigen Sie sich mit dem Nachweis chemischer oder biologischer Kampfstoffe, giftiger Industriechemikalien oder mit der Überwachung von Lebensmitteln, Luft, Boden oder Wasser? Agilent hat schnelle, flexible und zuverlässige Lösungen, die Ihren Anforderungen entsprechen.



Zellmetabolismus

Kenntnisse über den Zellmetabolismus sind entscheidend für das Verstehen vieler zellulärer Prozesse. Mit Agilent können Sie den Metabolismus in lebenden Zellen in Echtzeit analysieren und physiologisch äußerst relevante Daten generieren.



Materialprüfung und -forschung

Mit Agilent haben Sie die Möglichkeit, die Art und die Quelle unerwünschter Gerüche in Fertigprodukten zu identifizieren, mikrokristalline Unregelmäßigkeiten in Kompositen zu charakterisieren und Spurenverunreinigungen in Metalllegierungen zu quantifizieren.



Klinische Forschung

Mit unserem umfassenden Portfolio an branchenführenden LC/MS-, GC/MS- und ICP-MS-Geräten sowie mit Angeboten zur Automation wie RapidFire und für die Probenvorbereitung unterstützt Sie Agilent, damit Sie von der wachsenden Welt der MS-Analytik in der klinischen Forschung profitieren.



Energie und Chemie

Bei Agilent erhalten Sie kundenspezifische Methoden und Lösungen für Ihre speziellen Anforderungen, damit Sie höchste Produktivität und Profitabilität mit Ihrem Labor erzielen und trotzdem die strengen Vorschriften der Branche einhalten können.



Umwelt

Agilent bietet zuverlässige und effiziente Umweltanalytik und Fachkompetenz in Bezug auf regulatorische Vorschriften. Die Themen umfassen Verunreinigungen in Abwässern, Reinheit des Trinkwassers, Messung der Luftqualität in Innenräumen, die Reaktion auf Naturkatastrophen oder vom Menschen verursachte Katastrophen oder die Identifizierung neuer Schadstoffe.



Lebensmittelprüfung und Agrarwirtschaft

Die Nahrungsmittel- und Agrarbranche erlebt eine immer größere Nachfrage nach empfindlicheren und leistungsfähigeren analytischen Lösungen. Unsere Geräte, Systeme und Verbrauchsmaterialien werden im Verlauf der gesamten Lebensmittelherstellungskette eingesetzt. Agilent entwickelt Systeme und Applikationen, die die neuesten Anforderungen erfüllen.



Forensik

Ob beim Nachweis von Giften, bei Drogentests, bei der Analyse von Freizeitdrogen oder bei der Untersuchung eines Tatorts auf Rückstände von Explosivstoffen – der Branchenführer Agilent Technologies bietet robuste Geräte, mit denen sich Tausende von Substanzen bestätigen und quantifizieren lassen.



Genomik

Unabhängig davon, ob Sie Genexpression, Klonierung und quantitative PCR oder vergleichende genomische Hybridisierung einsetzen, um Kopienzahlvariationen (CNV) nachzuweisen, oder das Humanexom auswählen, um relevante Regionen zu sequenzieren, Agilent bietet die Innovation und Zuverlässigkeit, die Sie für Ihre Forschung benötigen.



Metabolomik

Die Metabolomik-Lösungen von Agilent werden für die Erforschung von Krankheiten sowie in der analytischen Toxikologie, der Umweltanalytik, der Landwirtschaft, der Biokraftstoffentwicklung und im Bereich der Ernährung eingesetzt. Die Ergebnisse der Metabolomik liefern zusammen mit Studien zur Genexpression und/oder Proteomik ein umfassendes Verständnis biologischer Vorgänge.



Proteomik

Die Proteomik untersucht die Struktur und Funktion von Proteinen sowie deren Wechselwirkungen in einem komplexen biologischen System. Da die Proteinanalyse dabei eine große Herausforderung darstellt, sollten Sie Ihre Forschungsziele in der Proteomik mit kompletten, optimierten und erhältlichen Arbeitsabläufen verfolgen, um schnelle, genaue und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.



Halbleiteranalytik

Analytische Geräte von Agilent bieten höchste Leistung für die Analytik von Spurenelementen über das gesamte Spektrum an Proben in der Halbleiterindustrie wie beispielsweise die Analyse von Siliziumwafern mit Oberflächenmetallextraktion (SME), von Silizium für Solarzellen für die Photovoltaik, von hochreinen Prozesschemikalien, von Reinstwasser, von organischen Lösemitteln und von Fotolacken.



Niedermolekulare Arzneistoffe

In einer Zeit, in der sich der sowohl der wirtschaftliche als auch der wissenschaftliche und der regulatorische Druck erhöht und Interessen kollidieren, steht die pharmazeutische Industrie vor ständigen Herausforderungen. Von der personalisierten Medizin bis hin zu Auftragsforschungseinrichtungen hat sich der Prozess, ein Arzneimittel auf den Markt zu bringen, in den vergangenen zehn Jahren bis heute grundlegend verändert.



Spezialchemikalien

Mit unserem umfassenden Portfolio an Geräten, Zubehör, Support und Verbrauchsmaterialien und unserem großen, vielfältigen Netzwerk an Partnern unterstützt Agilent Sie dabei, nahezu jedes Messproblem zu lösen.



Vakuumlösungen

Kenntnisse über die Anforderungen an Vakuumsysteme sind entscheidend für die Entwicklung von Lösungen, die zuverlässig sind und Ihre Produktivität steigern. Mit Agilent Technologies an Ihrer Seite haben Sie Zugang zu wissenschaftlichem Fachwissen und profitieren von unserer Kreativität, die wir bei der Entwicklung maßgeschneiderter Lösungen für Ihre Anforderungen einfließen lassen.

Tipps und Werkzeuge

Weitere Informationen erhalten Sie unter: www.agilent.com/en/solutions

Agilent CrossLab Services

Maximale Betriebszeit mit umfassendem Support

Vertrauen Sie den Agilent CrossLab-Serviceexperten: Sie halten wertvolle Informationen bereit und sorgen dafür, dass Ihre Geräte optimal funktionieren. Unsere branchenführenden Services lassen sich genau auf Ihre Anforderungen zuschneiden und beinhalten: Technology Refresh, Applikationsberatung, Reparaturen, vorbeugende Wartung, Compliance-Prüfung und Schulung. Fragen Sie uns, wie wir Ihr Labor heute unterstützen können.

Agilent CrossLab Serviceverträge

Schützen Sie sich vor kostspieligen Reparaturen und Ausfallzeiten

Moderne Labore stehen komplexen Herausforderungen gegenüber, die die Unterstützung durch einen kompetenten Servicepartner erforderlich machen. Agilent CrossLab Serviceverträge gewährleisten maximale Produktivität und einen reibungslosen Betrieb Ihres Labors – Tag für Tag. Unabhängig von der Konfiguration Ihres Labors bieten wir Ihnen Support, der für Ihre Anforderungen und Ihr Budget maßgeschneidert ist.

Agilent Compliance Services

Gerätequalifizierung, die auch strengsten Anforderungen gerecht wird

Enterprise Edition Compliance wurde speziell entwickelt, um die Qualifizierung im Hinblick auf Compliance im gesamten Labor zu vereinfachen und zu vereinheitlichen. Weltweit in regulierten Laboren eingesetzt, darunter Normungsorganisationen und Aufsichtsbehörden, bietet Ihnen Enterprise Edition:

- Verbesserte Effizienz der Qualifizierung durch Harmonisierung plattformübergreifender Protokolle - zur Steigerung der Effizienz und zur Minimierung regulatorischer Risiken.
- Standardisierung Ihres Compliance-Verfahrens durch robust konzipierte Tests, die sich für alle Geräte im Labor eignen.
- Hinzufügen, Entfernen oder Rekonfigurieren von Tests gemäß kundenspezifischen Anforderungen.
- Verkürzung der für die Bewertung durch Mitarbeiter erforderlichen Zeit mithilfe einheitlich formatierter, computergenerierter und manipulationssicherer Berichte.



Profitieren Sie von der Agilent Service-Garantie.

Sollte Ihr Agilent Gerät während der Laufzeit eines Servicevertrags einen Service benötigen, garantiert Agilent eine Reparatur oder die kostenfreie Bereitstellung eines Ersatzgeräts.

Kein anderes Unternehmen setzt sich so konsequent dafür ein, dass Ihr Labor dauerhaft mit höchster Effizienz betrieben werden kann.

Agilent University

Holen Sie sich das Wissen, das Sie für Ihren Erfolg und den Ihres Teams benötigen

Einen hohen Stand der Kenntnisse und Fertigkeiten aufrecht zu erhalten, ist eine Herausforderung, zumal er direkt die Betriebsbereitschaft von Geräten, die Produktivität im Labor und die Genauigkeit von Analysen beeinflusst. Agilent University bietet ein umfassendes Schulungsangebot – von Kursen für Anfänger bis hin zu Kursen für Fortgeschrittene – für jeden Mitarbeiter in Ihrem Team mit definierten Lerninhalten.



Das Agilent Wertversprechen – 10 Jahre Garantie

Erweiterte Services

Das Agilent Wertversprechen garantiert eine Lebensdauer des Geräts von mindestens 10 Jahren, mit 7 Jahren garantiertem Support. CrossLab Erweiterter Service bietet Kunden mit älteren Geräten konsistente Diagnostik, Reparatur und Wartung sowie Qualität des Services für Schulungen. Der CrossLab Erweiterte Service wird von Agilent Ingenieuren mit den neuesten Tools, Verfahren und Originalersatzteilen von Agilent ausgeführt.

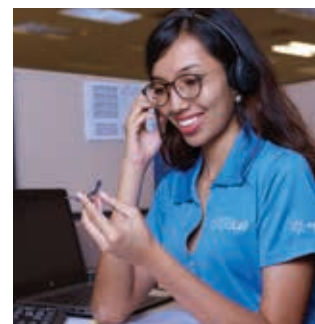
Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an Ihren lokalen Vertreter von Agilent Services und Support oder besuchen Sie: www.agilent.com/chem/extended-services

Technischer Support zu Ihren Diensten

Haben Sie eine Frage zu Hardware, Software, Applikationen, Geräte Reparaturen oder zur Fehlersuche? Die technischen Experten von Agilent stehen bereit, um Ihre Fragen zu beantworten. Durch ihre jahrelange Labortätigkeit verfügen die Fachleute unseres technischen Supports über detailliertes Wissen und umfangreiche Erfahrung.

Bei Fragen zu den in diesem Katalog genannten Verbrauchsmaterialien wenden Sie sich an die lokale Agilent Vertriebsniederlassung oder Ihren autorisierten Agilent Vertriebspartner oder besuchen Sie:

www.agilent.com/chem/techsupport



Agilent Community

In Verbindung stehen, zusammenarbeiten und Ansichten teilen

Die Agilent Community ist der beste Ort für die Zusammenarbeit mit Kollegen in Bezug auf Applikationen, für Diskussionen über Produkte von Agilent und zur Suche nach vertiefenden Inhalten, die für Ihre Analyse relevant sind. Besuchen Sie: community.agilent.com

Kontakt:

www.agilent.com/chem/contactus

Online einkaufen:

www.agilent.com/chem/store

Treten Sie in Kontakt mit Agilent:

www.agilent.com/chem/social

Unser vollständiges Katalogsortiment
finden Sie auf:

www.agilent.com/chem/catalog

Ausschließlich zu Forschungszwecken.
Nicht für Diagnoseverfahren geeignet.

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Veröffentlicht in den USA, 11. Juni 2019
5994-0974DEE